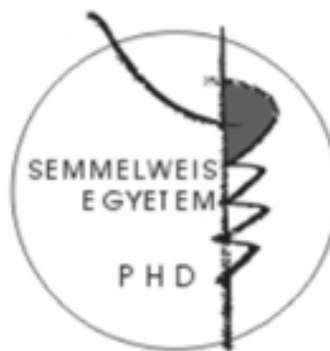


A Caskin1 állványfehérje vizsgálata

Doktori tézisek

Balázs Annamária

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezeto: Dr. Buday László egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Enyedi Péter egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nyitrai László egyetemi docens
Dr. Mócsai Attila egyetemi docens

Budapest
2009

Bevezetés

A szignál transzdukcióban résztvevő legtöbb fehérje moduláris szerkezetű, fehérje-fehérje kapcsolatok kialakítására képes, illetve katalitikus aktivitással rendelkező elemekből, úgynevezett doménekből áll. Dolgozatomban a fehérjék közti interakciók létrehozásáért felelős doménekkal is foglalkozom. Miért is olyan fontosak a fehérje-fehérje kölcsönhatások a jelátviteli folyamatokban? Két fehérje interakciójának számos következménye lehet, például a szignálfehérje más fehérjékhez kapcsolódva aktiválódásának helyére lokalizálódhat. A fehérjék közti kölcsönhatások következménye konformáció változás is lehet, amelynek hatására egyéb kötő-, illetve katalitikus helyek szabadulhatnak fel. Természetesen a két folyamat nem zárja ki egymást, a fehérje lokalizációjának változása együtt járhat konformációjának átalakulásával. Két fehérje kapcsolatának patológiás következménye is lehet. Néhány fehérjemutáció hatása rendellenes interakciók létrejöttében nyilvánul meg, amely átprogramozhatja a sejt működését.

Az általam vizsgált Caskin1 fehérje protein-protein kölcsönhatások kialakítására alkalmas doménekből áll. N-terminálisán hatszoros ankirin ismétlődés található, e szekvenciák fehérje-fehérje interakciók létrejöttében betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. A fehérjén ezt követően SH3 domén helyezkedik el, amihez prolinban-gazdag szekvenciák kapcsolódhatnak. A fehérje középső szakaszán fellelhető SAM domének homó- és hetero-oligomerek létrehozásában vesznek részt. A Caskin1 C-terminálisán hosszú prolinban-gazdag szekvencia található, amihez SH3 doménnel rendelkező fehérjék kötődhetnek.

A fehérjét 2002-ben írták le először. Cask-kötő fehérjeként azonosították affinitástisztítási rendszerben, ahol csaliként a Cask N-terminális CaM kináz doménjét használták. Neve innen ered, Caskin: *Cask-interacting protein*.

A Caskin fehérjének két isoformája létezik, Caskin1 és Caskin2. Ellentétben a gerinctelenekben is expresszálandó Caskkal, az evolúció során a gerincesekben jelennek meg, konzervált szerkezetűek a különböző fajokban. Érdekes, hogy a Cask fehérje összes egyéb ismert interakciós partnere kifejeződik gerinctelenekben is.

In situ vizsgálatok kimutatták, hogy a Caskin1 csak az agyban expresszálandó, immunitokémiai festéssel pedig azt igazolták, hogy csupán a neuronokban fejeződik ki, leginkább a poszt-szinaptikus denzitásban (PSD).

Mint említettem, a fehérje neve Caskkal való kapcsolatára utal. Azt találták, hogy a Caskin1 a Cask fehérje CaM kináz doménjéhez kötődik, a Mint1-el versengve és a Velis

fehérjével együtt hármass komplexet formálnak. Kimutatták, hogy a Cask-Caskin1-Velis és a Cask-Mint1-Velis komplex egyaránt elfordul az agyban, sejtfelszíni molekulához, neurexinekhez, szindekánokhoz kapcsolódva. Mivel a Caskin1, ellentétben az ubikviter Mint1-el, csak az agyban expresszálódik, esetleges funkciója lehet a Cask-Mint1 komplex kialakulásának agyi szabályozásában.

Újabb kísérletekből úgy tűnik, hogy a fehérjének a kemoszensoros plaszticitás kialakításában, fenntartásában is szerepe lehet.

Munkánk során a Caskin1 szerepét szeretnénk volna vizsgálni. Szerkezetéből feltételeztük, hogy állványfehérjeként viselkedhet, számos fehérjével kapcsolódhat, és részt vehet a poszt-szinaptikus denzitás hatalmas fehérjeállományának szervezésében. Élesztő két-hibrid rendszerben tesztelve a fehérjét jónéhány interakciós partnert azonosítottunk. A lehetséges kötődő fehérjék közül mi az Abl-interactor 2-vel való kapcsolatát vizsgáltuk.

Az Abi2 fehérjét élesztő két-hibrid rendszerben azonosították, ahol csaliként az Abl regulátor szakaszát használták. Úgy tűnik, az Abi2 fontos lehet az Abl regulációjában. Az Abi2 fehérje szerepét leírták egy, az aktin citoskeleton szabályozó komplexben is, melyben az Abi2, a Nap1/Nap125, PIR121, és a HSPC300 fehérje vesz részt, WAVE gátló hatása van. 2002-ben Grove és munkatársai elkészítették az Abi2 géntünetes egeret. Legsúlyosabb eltéréseket az agyban és a szemben találtak, abban a két szervben, amely legnagyobb mennyiségben expresszálja a fehérjét. A géntünetes egerek vakok és jelentősen romlik rövid- és hosszútávú memóriájuk is. Abi2 hiányában továbbá rendellenes aktin polimerizáció és sejt-sejt kapcsolatok figyelhetők meg, amely azt mutatja, hogy a fehérjének szerepe lehet a cadherin aktiváció és az aktin citoskeleton átrendezés összekapcsolásában.

Célkituzések

A Caskin1 a neuronok posztszinaptikus denzitásában expresszálódik, s ismert tény, hogy az a szervezet fehérjékben legdúsabb területe. A PSD fehérjehálózatának szerveződése a neurobiológia intenzíven kutatott területe, s mivel a Caskin1 vélhetően egy állványfehérje, szerepe lehet annak organizálásában. Munkacsoportunk ezért arra vállalkozott, hogy a fehérjéhez kötődő egyéb proteinek keres, majd interakciós partnereinek keresztül felderíti annak szerepét.

A Caskin1 C-terminálisának szerkezetéről nem szerepel adat az irodalomban. Ez a szakasz számos prolint tartalmaz, prolinban-gazdag szekvenciákba rendeződve. Ismert, hogy prolin megtöri a fehérjeláncot és a másodlagos fehérjeszerkezeti elemekben viszonylag ritkán fordul elő, viszont a rendezetlen fehérjékben gyakran megjelenő aminosav. Célul tuztük ki ezért, hogy szerkezeti vizsgálatokkal felderítsük e fehérjeszakasz esetleges rendezetlenségét.

Módszerek

Ellenanyagok készítése:

A kereskedelmi forgalomban nem kapható Caskin1 ellenanyag, ezért nekünk kellett készítenünk. Nyúlban állítottunk elő poliklonális ellenanyagokat.

A humán monoklonális ellenanyagot az AbDSerotec céggel együttműködve két hónap alatt, immunizálás nélkül, rekombináns technikával állítottuk elő.

A GenScript céggel együttműködve poliklonális, foszforilált Caskin1-et felismerő ellenanyagokat állítottunk elő.

Élesztő két-hibrid teszt:

A Caskin1-hez kötődő fehérjét élesztő két-hibrid tesztben azonosítottuk. A kísérletet alapvetően a *Hybrigenics S.A.* cég végezte. Csaliként a Caskin1 SH3 doménjét, SAM doménjeit, illetve a prolinban-gazdag régiójának egy szakaszát (280-970 aminosav) tartalmazó konstrukciót használták, amelyet az általuk küldött pB27 vektorba klónoztunk, majd juttattunk el a céghez. A vektor tartalmazta a LexA transzkripció faktor DNS-kötő doménjét. A Caskin1-et humán embrionális agy cDNS könyvtárral szemben tesztelték.

Precipitáció, immunprecipitáció és Western blot:

A fehérjék közti kölcsönhatást GST-precipitációs kísérletek és immunprecipitáció segítségével bizonyítottuk. A GST címkével jelölt fehérjét *E. coli* baktériumokban állítottuk elő, majd affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Transzfektált COS7 sejtekből, illetve patkány agyból kivonatot készítettünk és abból precipitáltuk a fehérjét GST fúziós fehérjékkel, illetve antitestekkel. A precipitált fehérjét SDS-gélelektroforézis segítségével elválasztottuk, majd az eredményt Western blot segítségével vizsgáltam.

A Caskin1 C-terminális szerkezetének vizsgálata:

A Caskin1 C-terminálisának szerkezetét első lépésben az IUPred predikciós programmal vizsgáltuk. Kísérleti úton limitált proteolízises vizsgálatokkal, CD spektroszkópiával, NMR spektroszkópiával és géliszűrési technikával igazoltuk a fehérje szakasz rendezetlenségét.

A Caskin1 foszforilációjának vizsgálata:

A Caskin1 foszforilációját *in vitro* és *in vivo* is vizsgáltuk. Az *in vitro* kináz mérés elvégzéséhez a COS7 sejtekbe transzfektált V5 címkével jelzett Caskin1-et immunprecipitálva végeztük a protein kináz A és protein kináz C általi foszforilációt. A gyantához kötődő fehérjéket ezt követően SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével elválasztottuk, majd anti-foszfo-Caskin ellenanyaggal történő Western blottal tettük láthatóvá az eredményt. Az *in vivo* méréshez V5 címkével jelzett Caskin1-el transzfektált COS7 sejteket TPA-val, illetve dbcAMP-val kezeltem. A Caskin1-et immunprecipitáltam, majd a fehérjéket SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottam szét. A Caskin1 foszforilációját a foszforilált Caskin1 ellen termeltetett ellenanyagokkal detektáltam. A Caskin1 *in vitro* foszforilációját ATP jelenlétében PKA és PKC hozzáadásával vizsgáltam. A foszforilációt szintén az anti-foszfo-Caskin1 ellenanyagokkal tettem láthatóvá.

Eredmények

Doktoranduszi munkám eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

A kereskedelmi forgalomban nem kapható Caskin1 ellenanyag, ezért nekünk kellett előállítanunk specifikus antitesteket. Nyulak immunizálásával két poliklonális ellenanyagot készítettünk. Az egyik a fehérje SAM doménjeit ismeri fel, a másik a Caskin1 16 aminosavas C-terminális peptidjére specifikus. Mindkét ellenanyag immunprecipitálja a fehérjét és alkalmas Western blot módszerrel való detektálásra.

Az AbDSerotec céggel közösen gyártott monoklonális antitest szintén a fehérje SAM doménjeire specifikus és alkalmas immuncitokémiai vizsgálatok elvégzésére.

A GenScript céggel együttműködve két foszfospecifikus ellenanyagot állítottunk elő. Az egyik ellenanyag a 1065. foszfo-treonint, míg a másik antitest a 1067. foszfo-szerint ismeri fel.

A továbbiakban Caskin1-hez kötődő fehérjéket próbáltunk azonosítani. Ennek magyarázata, hogy a Caskin1 szerkezetéből ítélve vélhetően állványfehérje, számos protein-protein interakció kialakítására képes domént tartalmaz. Kötopartnereinek azonosítása azért lehet fontos, mert a fehérje az idegsejtek posztzinaptikus denzitálásában expresszálódik, ami a szervezet fehérjékben legsűrűbb területe. A hatalmas fehérjehálózat szerveződése a neurobiológia intenzíven kutatott területe, melyben fontos szerep jut a fehérjék közti kapcsolatok kialakítására képes állványfehérjéknek. A számos módszer közül az élesztő két-hibrid vizsgálatot választottuk a Caskin1 interakciós partnereinek azonosítására, melyet a Hybrigenics céggel közösen végeztünk el. Jónéhány kötopartnerrel találtunk, melyek közül a fehérje Abi2-vel való kapcsolatát vizsgáltuk részletesen. A két fehérje kötődését *in vitro* GST-precipitációs kísérletekkel, illetve *in vivo* immunprecipitációval is meggyőzően igazoltuk.

Szintén GST-precipitációs kísérletekkel és immunprecipitációval mutattuk ki, hogy az Abi2 SH3 doménjén keresztül kapcsolódik a Caskin1 prolinban-gazdag régiójához. A Caskin1 prolinban-gazdag szekvenciáján belül GST-precipitációs módszerrel meghatároztuk a valószínű kötohelyet is.

Munkánk során felmerült, hogy a Caskin1 fehérje C-terminális, prolinban-gazdag szakasza rendezetlen szerkezetű. Ez annyit jelent, hogy egyáltalán nem, vagy csak rövid szakaszokra kiterjedően rendelkezik a fehérjeszakasz másodlagos szerkezettel és egyáltalán nincs harmadlagos szerkezete. Tompa Péter munkacsoportjával együttműködve kimutattuk, hogy az említett fehérjerész valóban rendezetlen szerkezetű. Eredményeinket számos, *in silico*

és kísérletes módszerrel is igazoltunk. Adódott a kérdés, hogy vajon a rendezetlenség általánosan jellemző-e az állványfehérjékre? Számos dokkoló-, adapter- és állványfehérjét vizsgálva *in silico* úgy találtuk, hogy ezek a fehérjecsaldók kiemelkedően magas arányban tartalmaznak rendezetlen szakaszokat.

A Caskin1 poszttranszlációs módosulását, esetleges szabályozását is vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy mind a protein kináz-A, mind pedig a protein kináz-C képes a Caskin1 prolinban-gazdag régióját az 1065-ös treoninon foszforilálni. Azt, hogy ez a foszforiláció mi módon szabályozza a fehérjét, jelenleg kutatja munkacsoportunk.

Következtetések

A Caskin1 fehérje funkciója még jórészt ismeretlen, kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy az állványfehérjék családjába tartozhat. A Caskin1 állványfehérje voltát több adat is alátámasztja: a, szerkezetében több fehérje-fehérje kapcsolat kialakítására képes domén, illetve prolinban-gazdag régió is megtalálható; b, nincs katalitikus aktivitása; c, éleszto két-hibrid rendszerben számos, jelátvitelben szerepet játszó interakciós partnerét azonosítottuk, köztük az Abi2-t; d, foképp az idegsejtek posztszinaptikus denzitásába lokalizálódik, ahol részt vehet az ott kifejezodo hatalmas fehérjeállomány organizálásában.

Kísérleti eredményeink szerint a Caskin1 prolinban-gazdag régiójához kötődik az Abi2 fehérje *in vitro* és *in vivo* is. Ez jelentheti, hogy a Caskin1 tagja az Abl tirozin kinázok jelátviteli útvonalának, illetve fontos lehet az aktin citoszkeleton átrendeződésében, másrészt arra utal, hogy a prolinban-gazdag, rendezetlen régióknak szerepe van fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a Caskin1/Abi2 interakciónak a dendritikus tüskék formálódásában és átalakulásában lehet szabályozó szerepe, sejtfelszíni molekuláktól továbbítja a jelet az aktin citoszkeleton felé.

A Caskin1 szerkezetében több ismert funkciójú fehérjekötő domén, és egy hosszú, eddig szerkezetileg nem jellemzett prolinban-gazdag szakasz (PRD) található. Munkánk során a PRD struktúráját is vizsgáltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy ebben a régióban nem lelhetők fel másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemek, azonban ez a rendezetlen szakasz funkcionális része a fehérjének.

74 állványfehérjét vizsgálva, bioinformatikai módszereket alkalmazva megállapítottuk, hogy a globuláris doméneket összekötő kapocs régiók nagy százalékban rendezetlenek. A rendezetlenség számos elonnyel jár. A kitekeredett rendezetlen szakaszok például megnövekedett interakciós lehetőséget biztosítanak a fehérjéknek, ezt mutatja, hogy a hub fehérjékre jellemző rendezetlenség, és a rendezetlenség mértéke no a fehérjék által létrehozott komplexek növekedésével. A rendezetlenség az elonyök mellett veszélyt is hordozhat magában, ugyanis megjelenhetnek például onkogén fúziós fehérjék és a neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezető amiloid aggregátumok is.

A Caskin1 esetleges szabályozását vizsgálva arra az eredményre jutottunk, hogy a fehérje prolinban-gazdag régióját mind a PKA, mind pedig a PKC is képes foszforilálni. Ennek a foszforilációnak fontos szerepe lehet a fehérje lokalizálásában, illetve partnereivel való kapcsolatának regulálásában.

Saját közlemények jegyzéke

A doktori értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények:

1, Balázs A, Csizmok V, Buday L, Rakacs M, Kiss R, Bokor M, Udupa R, Tompa K,
Tompai P.

High levels of structural disorder in scaffold protein as exemplified by a novel neuronal
protein, Caskin1.

FEBS J. In press

2, Illés A, Enyedi B, Tamás P, Balázs A, Bogel G, Lukács M, Buday L.

Cortactin is required for integrin-mediated cell spreading.

Immunol Lett. 2006 Apr 15;104(1-2):124-30. Epub 2005 Dec 7.

A doktori értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemény:

1, Illés A, Enyedi B, Tamás P, Balázs A, Bogel G, Buday L.

Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin
polymerisation.

Cell Signal 2006 Jun;18(6):830-40. Epub 2005 Aug 16.