

A Tks4 állványfémje szerepe az EGF jelpályában

Doktori tézisek

Bógel Gábor

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buday László egyetemi tanár, az MTA
doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Lontay Beáta, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Csanády László, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Tretter László, egyetemi tanár, az MTA doktora.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sármay Gabriella, egyetemi tanár, az MTA doktora.

Dr. Czirják Gábor, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest

2013

1. Bevezetés

1.1. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete

A Tks5 állványfehérjét 1998-ban azonosították, mint az Src nem-receptor tirozin kináz egy új szubsztrátját. A fehérje rendelkezik egy N-terminális PX (phox-homology) doménnel, mely membránlipidek kötésére képes, valamint öt SH3 doménnel, melyek jól ismert fehérje-fehérje interakciós modulok. Az SH3 doméneket összekötő szakaszok számos prolin-gazdag régiót tartalmaznak, melyek további fehérjék megkötését teszik lehetővé. A szerkezete alapján valószínűsíthető tehát, hogy a Tks5 állványfehérjeként vesz részt bizonyos jelátviteli utakban.

A Tks4-et nemrég azonosították, mint a Tks5 némileg szélesebb expressziós mintázatú homológját. A fehérje szerkezete igen hasonló a Tks5-höz, de csak négy SH3 doménnel rendelkezik.

1.1.1. A PX domén

A PX domént először a p40^{phox} és p47^{phox} fehérjékben azonosították, mint lipidek kötésére képes konzervált szerkezetet. Jelenleg emlősökben legalább 49 PX domént tartalmazó fehérje ismert. A legtöbb ilyen protein az endocitotikus vezikulák szállításában játszik szerepet.

A rendelkezésre álló szerkezeti és funkcionális adatok tükrében a PX domének legfontosabb kötőpartnerének a foszfatidil-inozitol-3-foszfát tűnik, mely a PI 3-kinázok egyik terméke. A PX domének számos konzervált bázikus aminosavat – főként arginint – tartalmaznak,

melyek ezt a kapcsolatot lehetővé teszik. Mindazonáltal néhány PX domén esetén ismert, hogy más foszforilált inozitol-lipideket is képesek kötni, sőt egyes esetekben fehérje-fehérje interakcióban való részvételt is kimutattak.

1.1.2. Az SH3 domén

Az SH3 domének a jelátviteli fehérjék elterjedt fehérje-fehérje interakciós moduljai. Bár legtöbbször prolin-gazdag régiót tartalmazó fehérjéket kötnek meg, néhány esetben kimutatták kapcsolatukat olyan fehérjékkel is, melyek nem tartalmaznak ilyen szakaszt. Érdekes szabályozási lehetőséget vet fel a kötőpartnerek vagy az SH3 domének foszforilációja, mely általában a kötés erősségének csökkenéséhez vezet.

Biokémiai vizsgálatok eredménye szerint elképzelhető, hogy a Tks4 és Tks5 fehérjék első két SH3 doménje úgynevezett “szuper-SH3” doménként működik, azaz közös felszínen kötik meg ligandjukat.

1.2. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepe élettani és kóros folyamatokban

1.2.1. Podoszómák és invadopódiumok

A Tks5 és Tks4 fehérjék biológiai funkciói közül a legjobban a podoszómák és invadopódiumok létrejöttében és működésében betöltött szerepük bizonyított. Ezeket az extracelluláris mátrix kötésére és bontására képes struktúrákat először Src-vel transzformált sejtekben írták le. Mostanra azonban világossá vált, hogy ilyen sejtnyúlványok élettani körülmények között is előfordulnak néhány specializált

sejttípusban, például makrofágokban és oszteoklasztokban. Bár újabban transzformált és tumoros sejtek esetén az “invadopodium”, normál sejtek esetén pedig a “podoszóma” elnevezés használatát javasolják, jelenleg az irodalomban gyakran nem tesznek különbséget a két fogalom között.

Mind a Tks4, mind pedig a Tks5 jelenlétét kimutatták invadopodiumokban. Továbbá, a jelenleg hozzáférhető irodalmi adatok szerint mindkét fehérje szükséges ezen invazív sejtsztruktúrák kialakításához. A két állványfehérje számos invadopódiális fehérjét képes kötni, mint például az ADAM családba tartozó proteázokat, a disztroglikán nevű sejtadhéziós molekulát és az aktin citoskeletont szabályozó N-WASP-ot.

Meg kell jegyezni, hogy bár az invadopodiumoknak feltételezhetően szerepük van a tumor sejtek terjedésében, kísérleti eredmények szerint a Tks5 csendesítése nem csökkenti az Src-vel transzformált sejtek által képzett metasztázisok számát. Mindazonáltal a keletkező áttétek mérete jelentősen csökkent, amit a kutatók a daganatok rosszabb vérellátására vezetnek vissza.

1.2.2. A NADPH oxidázok szabályozása

Tekintve, hogy a Tks4 és Tks5 fehérjék legközelebbi rokonai – a p47^{phox} és NOXO1 fehérjék – a NADPH oxidázok szabályozásában vesznek részt, megvizsgálták, hogy ezek az állványfehérjék is képesek-e ezen enzimek működését befolyásolni. Bár jelenleg több irodalmi adat is alátámasztja ezt a lehetőséget, még mindig nem világos, hogy a két fehérjének van-e szerepe a reaktív

oxigénszármazékok termelésének szabályozásában élettani vagy patológiás körülmények között.

1.2.3. Egyedfejlődés

A Tks4 és Tks5 fehérjék gerincesek egyedfejlődésében betöltött szerepére génhiányos állatmodelleken végzett kísérletek és egy ritka, örökletes emberi szindróma vizsgálata világított rá.

A Tks4 hiányos egerek jellegzetes fenotípussal rendelkeznek, melynek vezető tünetei a csökkent testméret, a koponya és a csontváz többi részének deformitása, mineralizációs hiányosságok, glaukóma és terméketlenség.

Nagyon hasonló tüneteket figyeltek meg egy ritka genetikai betegségben, az ún. Frank - ter Haar szindrómában szenvedő betegek esetén. 13 érintett család genetikai vizsgálata során 7 esetben mutációt mutattak ki a Tks4 génjében. A legtöbb mutáció gyakorlatilag a Tks4 fehérje teljes hiányához vezetett, egy családban azonban csak egy aminosav cserét okozó eltérést találtak ebben a génben. Ez a pontmutáció a Tks4 PX doménjének egyik konzervált argininjét triptofánra változtatja (R43W mutáció).

Bár egyelőre nem ismert, hogy milyen mechanizmussal jön létre ez a betegség, feltételezhető, hogy a podoszóma-függő vagy attól független sejtmigráció zavara jelentős szerepet játszik a tünetek kialakulásában. Érdekes kísérleti eredmény, hogy a Tks4 csendesítése gátolja a zsírsejtek *in vitro* differenciációját, ami szintén hozzájárulhat az egereken és embereken is megfigyelt fenotípus létrejöttéhez.

2. Célkitűzések

A Tks4 állványfehérjét Geiszt Miklós és munkacsoportja az elsők között klónozták. Az új fehérje vizsgálata során megfigyelték, hogy az EGF-kezelés hatására membránfodrokba transzlokálódik és azok kialakulásában is szerepet játszhat. Mivel laboratóriumunkban hosszabb ideje foglalkozunk az EGF jelpálya és az aktin citoszkeleton szabályozásának vizsgálatával, a Tks4 karakterizálását együtt folytattuk. Munkacsoportunk elsősorban az alábbi kérdések megválaszolását tűzte ki célul:

1. Foszforilálódik-e a Tks4 EGF-kezelés hatására?
2. Ha foszforilálódik, mely kinázok katalizálhatják a reakciót és mely oldalláncok módosulnak ennek során?
3. Milyen szerepe lehet a fehérje N-terminális PX doménjének?
4. Milyen fiziológiás vagy patológias folyamatokban lehet jelentősége a vizsgált fehérjének, különös tekintettel az aktin-citoszkeleton szabályozására?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Plazmidok és konstrukciók

A V5-Tks4-et kódoló vektort Geiszt Miklós munkacsoportjától kaptuk. A cortactin N- és C-terminális részét GST fúziós fehérjeként kódoló pGEX plazmidokat PCR alapú klónozással állítottuk elő. A pontmutációkat az Agilent Technologies által forgalmazott QuickChange mutagenézis készlet segítségével hoztuk létre.

3.2. Sejtvonalak és tranziens transzfekciójuk

Valamennyi felhasznált sejtvonalat 10% magzati borjúsérumot és antibiotikumot tartalmazó DMEM tápoldatban tartottuk fenn, amit a sejtek EGF-kezelése előtti éjszakára sérummentes médiumra cseréltünk.

A sejteket az Invitrogen által forgalmazott Lipofectamine reagens segítségével transzfektáltuk.

3.3. RNS interferencia

A Tks4-re specifikus kis inhibitoros RNS-t 40 nM-os koncentrációban Lipofectamine RNAiMAX reagens segítségével jutattuk be a sejtekbe. A kontroll RNS a hatásos RNS szekvenciájához képest négy pontmutációt hordozott. A Tks4 csendesítését 48 órával a transzfekció után western blot-tal ellenőriztük.

A Tks4 siRNS rezisztens formája öt, aminosav cserét nem okozó pontmutációt hordozott a csendesítésre használt RNS által felismert szekvenciában.

3.4. Ellenanyagok

A legtöbb antitestet kereskedelmi forrásból szereztük be. A Tks4-re specifikus szérumot nyulak immunizálásával állították elő laboratóriumunk számára. Antigénként a Tks4 egy GST fúziós fehérjeként előállított darabja szolgált.

3.5. Immunprecipitáció és western blot

A sejteket Triton X-100-at és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben tártuk fel. Az immunprecipitációkat anti-V5 Sepharose gyöngyökkel vagy Protein A Sepharose-hoz kapcsolt antitestekkel végeztük.

A sejtlizátumok és immunprecipitátumok fehérjéit SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk őket. A western blot-okat torma peroxidázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyagokkal hívtuk elő.

3.6. Immunfluoreszcens festés

A sejteket kis sűrűségben, üveg fedőlemezen növesztettük. Transzfekció és megfelelő kezelések után paraformaldehiddel fixáltuk, majd jelöletlen elsődleges és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel festettük őket. A sejtmagok festéséhez DAPI-t használtunk.

Az értekezésben bemutatott képek Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készültek.

3.7. GST fúziós fehérjék

A GST fúziós fehérjéket *E.coli* baktériumokban termeltettük, majd glutation-agaróz gyöngyök

segítségével tisztítottuk. A fúziós fehérjéhez kötődő proteinek azonosításához

ezeket a gyöngyöket sejtkivonattal inkubáltuk.

A GST-PX domén *in vitro* lipid-kötés vizsgálatához a fehérjét redukált glutationt tartalmazó pufferrel eluáltuk az agaróz gyöngyökről.

A fehérjék expresszióját és tisztítását SDS gélelektroforézist követő Coomassie festéssel ellenőriztük.

3.8. *In vitro* lipid-kötés vizsgálata

A tisztított GST-PX domének membrán lipidekhez való kötődését az Invitrogen által forgalmazott LipidStrip membránok segítségével vizsgáltuk. A membránokat zsírsavmentes BSA-val blokkoltuk, majd a megfelelő GST fúziós fehérjével inkubáltuk. A kötődő fehérjéket anti-GST ellenanyaggal detektáltuk.

3.9. Sejtmigráció vizsgálata Boyden-kamrás módszerrel

Kísérleteinkhez a Millipore által “QCM 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay” néven forgalmazott készletet használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Kemoattraktánsként 10%-os magzati borjúsérumot vagy 200 ng/ml koncentrációjú EGF-et alkalmaztunk. Az átvándorolt sejteket megfestettük, majd a kioldott festékanyag fotometráálásával kvantifikáltuk eredményeinket.

4. Eredmények

4.1. A Tks4 EGF-kezelés hatására foszforilálódik és asszociálódik az EGF-receptorral

Azért, hogy megvizsgálhassuk, hogy a Tks4 foszforilálódik-e EGF-kezelés hatására először V5-Tks4 fehérjét fejeztünk ki COS7 sejtekben, a sejteket egy éjszakán át szérumentes körülmények között tartottuk, majd 10 percig EGF-fel kezeltük. Ezután a V5-Tks4-et immunprecipitáltuk és anti-foszfotirozin western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációját.

Érdekes módon a foszforilálódó Tks4 mellett egy kb. 170 kDa-os tirozin-foszforilált fehérje is megjelent a membránon, melyet később, specifikus ellenanyag segítségével EGF receptorként azonosítottunk.

Ezt a kísérletet endogén Tks4-gyel is megismételve hasonló eredményre jutottunk.

4.2. A Tks4-et EGF-stimulus hatására az Src nem-receptor tirozin-kináz foszforilálja

A Tks4 az Src tirozin-kináz jól ismert szubsztrátja. Tekintve, hogy irodalmi adatok szerint az EGF jelpálya működése során az Src aktiválódik, úgy gondoltuk, hogy nagy valószínűséggel az általunk vizsgált rendszerben is ez a tirozin kináz foszforilálja a Tks4-et. Ezen feltételezés ellenőrzése végett a sejteket EGF-kezelés előtt az Src specifikus gátlószerével, PP1-gyel egy órán át inkubáltuk.

Ezzel a kísérlettel sikerült igazolnunk, hogy a PP1 előkezelés szinte teljesen megakadályozza a Tks4 EGF hatására bekövetkező foszforilációját.

Eredményünk további ellenőrzése végett előállítottuk a V5-Tks4-nek egy olyan mutánsát, melyben az Src három ismert foszforilációs helyén tirozin helyett fenilalanin szerepel. Eredményeink szerint ezen mutáns fehérje foszforilációja szinte teljesen elmarad EGF-fel kezelt sejtekben, ami tovább erősíti azon elképzelésünket, miszerint a Tks4 az EGF jelpályában az Src egyik szubsztrátja.

4.3. Az Src EGF-kezelés hatására összekapcsolódik a Tks4-gyel

Az Src szubsztrátjaival sok esetben hosszabb időre is összekapcsolódik. Annak ellenőrzésére, hogy ez a Tks4 esetében is így van-e, V5-Tks4-et immunprecipitáltunk EGF-fel kezelt sejtekből és anti-Src western blot-tal vizsgáltuk a kináz jelenlétét a mintákban.

Ezen kísérlet alapján megállapítottuk, hogy a Tks4 EGF-fel kezelt sejtekben koimmunprecipitálódik az Src tirozin-kinázzal, míg kezeletlen sejtekben nem jön létre ilyen kapcsolat.

4.4. A Tks4 PX doménjének lipid-kötése szükséges a fehérje membránhoz való transzlokációjához és foszforilációjához

Irodalmi adatok szerint a PX domének fő kötőpartnerei a PI 3-kináz lipid-termékei. Geiszt Miklós laboratóriumában végzett korábbi kísérletekből ismert volt, hogy a Tks4 EGF-kezelés hatására az ún. membránfodrokba lokalizálódik. A Tks4 membrán

transzlokációja mellett szól az az eredmény is, mely szerint az állványfehérje EGF-fel stimulált sejtekben összekapcsolódik az EGF receptorral. Tekintve, hogy irodalmi adatok szerint a PI 3-kináz aktiválódik az EGF jelpálya működése során, megvizsgáltuk, hogy ezen enzim működése szükséges-e a Tks4 membránba történő áthelyeződéséhez.

Kísérleteinkben azt figyeltük meg, hogy ha a sejteket a PI 3-kinázok specifikus gátlószerével (LY294002-vel) előkezeljük, a Tks4 membrán-transzlokációja elmarad.

Mivel a Tks4 foszforilációja korábbi kísérleteink szerint minden bizonnyal a membrán közelében történik, megvizsgáltuk azt is, hogy a PI 3-kináz gátlása vajon megakadályozza-e ezt a kovalens módosítást. Megfigyeltük, hogy a sejtek LY294002-vel való előkezelése gátolja a Tks4 EGF hatására bekövetkező foszforilációját.

Hasonlóan csökkent foszforilációt figyeltünk meg a Tks4 egy olyan mutánsának vizsgálatán, melyben a PX domén két konzervált argininjét leucinra cseréltük le (R71,94L mutáns).

4.5. A Tks4 R43W mutánsa nem képes membránlipidek kötésére

A Tks4 PX doménjét érintő R43W mutációt egy Frank - ter Haar szindrómát hordozó család esetén írták le. Tekintve, hogy a pontmutációt hordozó beteg tünetei hasonlóak voltak azon betegekéhez, akiknél a Tks4 fehérje teljesen hiányzott, kíváncsiak voltunk, hogy ez az aminosav csere milyen hatással van a fehérje működésére.

A mutáns Tks4 lipiddkötő képességének megítéléséhez GST-fúziós fehérjeként fejeztük ki a PX domén vad típusú és R43W mutációt hordozó formáját. A fehérjéket glutation tartalmú puffer segítségével eluáltuk, majd PIPStip membránok segítségével meghatároztuk, hogy mely membránlipideket képesek kötni.

Eredményeink szerint míg a vad típusú forma számos foszforilált inozitol-származékhoz kapcsolódott, az R43W mutáns nem mutatott specifikus kötődést a vizsgált lipidekkel. Ebből arra következtethetünk, hogy a konzervált 43. arginin mutációja a Tks4 lipiddkötő képességének elvesztéséhez vezet.

4.6. Az R43W mutáns a sejtekben aggregálódik

Annak vizsgálatára, hogy a Tks4 R43W mutánsa képes-e a membránhoz transzlokálódni és ott foszforilálódni, a mutáns fehérjét COS7 sejtekben fejeztük ki. EGF kezelés utáni immunprecipitációval és western blot-tal kimutattuk, hogy a vad típusúval szemben a mutáns fehérje nem foszforilálódik. Ezen kísérleteink során érdekes módon azt figyeltük meg, hogy a mutáns forma valamennyi esetben jóval alacsonyabb expressziót mutatott, mint a vad típusú fehérje.

Az expresszált fehérje immunfluoreszcens festésével kimutattuk, hogy az R43W mutáns a legtöbb sejtben aggregálódik és ún. aggreszómákba lokalizálódik. Valószínűleg ez az aggregáció a magyarázata a western blot-okon megfigyelt alacsonyabb expressziós szinteknek.

4.7. A cortactin SH3 doménje képes a Tks4 kötésére

Mivel Geiszt Miklós és munkatársai kísérleteikben kimutatták, hogy a Tks4 az EGF-fel kezelt sejtek szélén létrejövő membránfodrokban kolokalizálódik az aktin citoszkeletont szabályozó cortactin fehérjével, kíváncsiak voltunk, hogy a két fehérje között kialakulhat-e közvetlen kapcsolat. Ezért a cortactin N- és C-terminális darabját GST-fúziós fehérjeként állítottuk elő, és megvizsgáltuk, hogy képesek-e a használt sejt-kivonatban jelen lévő Tks4 kötésére.

Ezen módszer segítségével kimutattuk, hogy a cortactin C-terminális, SH3 domént is hordozó darabja képes megkötni a Tks4-et. Ez a kapcsolat nem volt kimutatható, ha a cortactin SH3 doménjének egy konzervált triptofánját lizinre cseréltük (W525K mutáció).

4.8. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa sejtek szétterülését

Ha szuszpenzióban tartott sejteket fibronectinnel bevont felületre rétegezzük, azok integrinjeik segítségével letapadnak és a meginduló sejtszéli aktin-polimerizáció következtében szétterülnek.

Kollaborációs partnereinkkel közösen ezzel a módszerrel vizsgáltuk a Tks4 esetleges szerepét az aktin citoszkeleton szabályozásában. A Tks4-et csendesítő vagy hatástalan shRNS-t kifejező HeLa sejtklónokat 30 percig hagytunk szétterülni, majd fixáltuk őket és TRITC-falloidin segítségével festettük az aktin citoszkeletonjukat.

A sejtek átlagos méretét számítógéppel meghatározva kimutattuk, hogy a Tks4 csendesítése gátolja a sejtek szétterülését.

4.9. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa-sejtek vándorlását

A Tks4 aktin citoszekeleton szabályozásában betöltött szerepének további vizsgálatához Boyden-kamrás kísérleteket állítottunk össze és megvizsgáltuk, hogy a Tks4 csendesítése milyen hatással van a sejtek vándorlási képességére. Kimutattuk, hogy a Tks4 mennyiségének csökkentése mind a szérum-, mind pedig az EGF-grádiens irányába történő sejt vándorlást jelentősen gátolja.

Annak ellenőrzésére, hogy valóban a Tks4 mennyiségének csökkenése és nem a használt siRNS nem specifikus hatása okozta-e a megfigyelt különbséget a kísérletet elvégeztük olyan sejtekkel is, melyekben a Tks4 egy, a használt siRNS-re rezisztens formáját fejeztük ki. Eredményeink szerint ezen sejtek vándorlási képessége szinte teljes egészében helyreállt.

5. Következtetések

A fent bemutatott eredmények tézisszerűen a következőképpen foglalhatóak össze:

1. Kimutattuk, hogy COS7 sejtek EGF kezelésének hatására a Tks4 fehérje tirozin oldalláncokon foszforilálódik és indirekt módon asszociálódik az EGF receptorral.
2. Vizsgálataink szerint az EGF-függő Tks4 foszforilációért az Src tirozin-kináz felelős.
3. *In vitro* és *in vivo* módszerekkel igazoltuk, hogy a Tks4 PX doménje EGF-fel kezelt sejtekben főként a PI3-kináz lipidtermékeihez kötődik, s így szerepet játszik a fehérje membrántranszlokációjában.
4. Megállapítottuk továbbá, hogy a Tks4 PX doménjét érintő, Frank-ter Haar szindrómában is előforduló R43W mutáció a fehérje hibás feltekeredését, aggregációját és lipid-kötő képességének elvesztését eredményezi.
5. RNS interferencián alapuló kísérletekkel kimutattuk, hogy a Tks4 szerepet játszik a HeLa sejtek szétterülésében és EGF- valamint szérumgrádiens irányában való vándorlásában.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Lanyi A, Barath M, Peterfi Z, Bogel G, Orient A, Simon T, Petrovszki E, Kis-Toth K, Sirokmany G, Rajnavolgyi E, Terhorst C, Buday L, Geiszt M (2011) The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading. PLoS One 6: e23653.
2. Bogel G, Gujdar A, Geiszt M, Lanyi A, Fekete A, Sipkei S, Downward J, Buday L (2012) Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration. J Biol Chem 287: 31321-31329.

6.2. Egyéb közlemények

1. Illes A, Enyedi B, Tamas P, Balazs A, Bogel G, Buday L (2006) Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation. Cell Signal 18: 830-840.
2. Illes A, Enyedi B, Tamas P, Balazs A, Bogel G, Melinda, Lukacs, Buday L (2006) Cortactin is required for integrin-mediated cell spreading. Immunol Lett 104: 124-130.

3. Pesti S, Balazs A, Udupa R, Szabo B, Fekete A, Bogel G, Buday L (2012) Complex formation of EphB1/Nck/Caskin1 leads to tyrosine phosphorylation and structural changes of the Caskin1 SH3 domain. *Cell Commun Signal* 10: 36.