

# A Tks4 állványfehérje szerepe az EGF jelpályában

Doktori értekezés

**Bőgel Gábor**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományi 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. Sármy Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora  
Dr. Czirják Gábor egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest  
2013

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
1. Rövidítések jegyzéke .....	4
2. Bevezetés .....	6
2.1. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete .....	6
2.1.1. A PX domén .....	8
2.1.2. Az SH3 domén .....	11
2.2. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepe élettani és kóros folyamatokban .....	16
2.2.1. Podoszómák és invadopódiumok .....	16
2.2.2. NADPH oxidázok szabályozása .....	24
2.2.3. Egyedfejlődés .....	27
3. Célkitűzések .....	32
4. Anyagok és módszerek .....	33
4.1. Plazmidok és konstrukciók .....	33
4.2. Sejtvonalak és tranziens transzfekciójuk .....	33
4.3. RNS interferencia .....	34
4.4. Ellenanyagok .....	34
4.5. Immunprecipitáció és western blot .....	35
4.6. Immunfluoreszcens festés .....	36
4.7. GST fúziós fehérjék .....	36
4.8. In vitro lipid-kötés vizsgálata .....	37
4.9. Sejtmigráció vizsgálata Boyden-kamrás módszerrel .....	37
5. Eredmények .....	38
5.1. A Tks4 EGF-kezelés hatására foszforilálódik és asszociálódik az EGF-receptorral .....	38
5.2. A Tks4-et EGF-stimulus hatására az Src nem-receptor tirozin-kináz foszforilálja .....	42
5.3. Az Src EGF-kezelés hatására összekapcsolódik a Tks4-gyel .....	44
5.4. A Tks4 PX doménjének lipid-kötése szükséges a fehérje membránhoz való transzlokációjához és foszforilációjához .....	45
5.5. A Tks4 R43W mutánsa nem képes membránlipidek kötésére .....	49
5.6. Az R43W mutáns a sejtekben aggregálódik .....	51
5.7. A cortactin SH3 doménje képes a Tks4 kötésére .....	55
5.8. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa sejtek szétterülését .....	57
5.9. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa-sejtek vándorlását .....	61
6. Megbeszélés .....	66
6.1. A Tks4 Src általi foszforilációja .....	66
6.2. A Tks4 és az EGF-receptor asszociációja .....	69
6.3. A PX domén szerepe .....	70
6.4. A Tks4 R43W mutánsának jellemzése .....	72
6.5. A Tks4 és az aktin-citoszkeleton kapcsolata .....	74
7. Következtetések .....	78
8. Összefoglalás .....	79
9. Summary .....	80
10. Irodalomjegyzék .....	81
11. Saját publikációk jegyzéke .....	99

11.1.	Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények.....	99
11.2.	Egyéb közlemények.....	99
12.	Köszönetnyilvánítás .....	100

## 1. Rövidítések jegyzéke

Abi1	Abl interactor 1
Abl	Abelson tyrosine-protein kinase
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
Arp	Actin-related protein
BAR	Bin–Amphiphysin–Rvs
Bcr	Breakpoint cluster region protein
Cas	CRK-associated substrate
Cdc42	Cell division control protein 42
Crk	CT10 (virus) regulator of kinase
DUOX	Dual oxidase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
Eps8	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8
Fc	Fragment crystallizable
Fyb	FYN-binding protein
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathione S-transferase
HDAC6	Histone deacetylase 6
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IUPred	Intrinsically unstructured protein prediction
MMP	Matrix metalloproteinases
MT1MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase-1
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
nee	Nose, eye, ear
NOX	NADPH oxidase
NOXA1	NADPH oxidase activator 1
NOXO1	NADPH oxidase organizer 1
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein

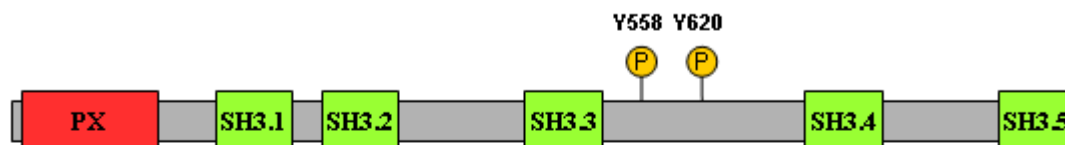
PBS	Phosphate buffered saline
Pex	Peroxisome
phox	Phagocyte oxidase
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTP	Protein tyrosine phosphatase
PX	Phox homology
Pyk	Proline-rich tyrosine kinase
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor $\kappa$ B Ligand
Rho	Ras homolog
ROS	Reactive oxygen species
shRNA	Small hairpin RNA
SNX	Sorting nexin
SOS	Son of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAPP1	Tandem PH domain-containing protein 1
TIRF	Total internal reflection fluorescence
Tks4	Tyrosine kinase substrate with four SH3 domains
Tks5	Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains
UPAR	Urokinase plasminogen activator surface receptor
VCA	Verprolin cofilin acidic
v-Src	Viral Src
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WIP	Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein

## 2. Bevezetés

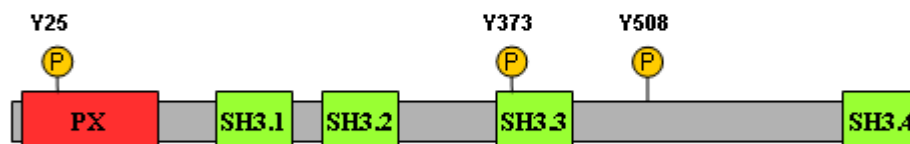
### 2.1. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete

A két egymáshoz szerkezetében és részben funkciójában nagyon hasonló fehérje közül a Tks5-öt fedezték föl először 1998-ban Sara Courtneidge és munkatársai [1]. A munkacsoport egy újfajta fág bemutatáson alapuló módszert használt Src szubsztrátok azonosítására, és így talált rá az addig ismeretlen fehérjére. Az aminosav sorrend alapján várható doménszerkezetet az 1. ábra mutatja. A fehérje N-terminális részén egy PX (phox-homology) domén található, melyet öt SH3 domén követ. (Ezeknek a doméneknek a szerkezetét később részletesen tárgyalom.) A doméneket összekötő szakaszokon több olyan prolin-gazdag régió található, ami SH3 domének kötőhelye lehet.

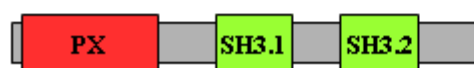
#### Tks5



#### Tks4



#### p47phox



1. ábra. A Tks5, Tks4 és a p47phox fehérjék doménszerkezete. Az ábrán a Tks állványfehérjék ismert Src foszforilációs helyei is fel vannak tüntetve az emberi fehérjék aminosav-számozása szerint.

A Tks5-nek két splice variánsa ismert. A hosszabb változat egy 28 aminosavas inzerciót tartalmaz az első és a második SH3 domén között [2]. A fehérje szekvenciájában három olyan tirozin van (Y553, Y558, Y620), melynek környezete hasonlít az Src szubsztrátok konszenzus szekvenciájához (EEEIYG/EEFD [3]), ezek közül az 558-as és a 620-as foszforilációját mutatták ki kísérletesen is [4]. Ezek a tirozinok foszforilált állapotban SH2 doménnel rendelkező proteinek kötésére is képesek lehetnek.

A fehérje szerkezete alapján valószínűsíthető, hogy nincsen katalitikus aktivitása, ugyanakkor számos fehérje-fehérje interakcióra képes doménnel rendelkezik, amiből arra következtethetünk, hogy jelátviteli utakban állványfehérjeként működhet. Bár mind a Tks5, mind a Tks4 gyakran kapcsoló (adapter) fehérjeként szerepelnek a közleményekben, szerkezetük alapján inkább állványfehérjéknek felelnek meg. A kapcsoló fehérjék ugyanis általában csak két fehérjét kötnek össze – mint például a jól ismert Grb2 az EGF-receptort és az SOS kicserélődési faktort – míg az állványfehérjék egy jelátviteli út több komponensét hozzák egymás közelébe [5,6].

A Tks5 mRNS-ét számos szövetben (például szív, agy, tüdő, máj, izom, vese) kimutatták, egyes szövetekből (here, lép) és sejtvonalakból (például a jelen értekezés alapját képező kísérletek többségében használt COS7 és HeLa vonalakból) azonban hiányzik [1].

A Tks5-tel rokon, kb. 130 kDa-os Tks4 fehérjét három, egymástól független munkacsoport írta le [7-9]. Doménszerkezete igen hasonló a Tks5-höz: az N-terminális PX domént itt négy SH3 domén követi (lásd 1. ábra). A doméneket hosszabb-rövidebb kapcsoló szakaszok kötik össze, melyekben számos potenciálisan SH3 domént kötő prolin-gazdag szekvencia található. A harmadik és negyedik SH3 domén közötti hosszabb szakasz a Tompa Péter és munkacsoportja által fejlesztett IUPred algoritmus [10,11] szerint rendezetlen szerkezetű, ami valószínűleg nagy mozgási szabadságot ad az utolsó fehérjekötő doménnek. Bár a Tks5 és a Tks4 közötti homológia nagy (43%-os azonosság az egymáshoz rendezett aminosav sorrendben), ennek főként a konzervált domének az okai. Az ezeket összekapcsoló fehérjeszakaszok ugyanis csak alacsony (12%-os) identitást mutatnak. A Tks5-höz hasonlóan a Tks4 is szubsztrátja az Src-nek mind *in vivo* mind *in vitro*. Foszforilációs helyekként a 25-ös, 373-as és 508-as tirozint azonosították [9]. Szöveti expressziója a Tks5-nél is szélesebb körű, de T- és B-

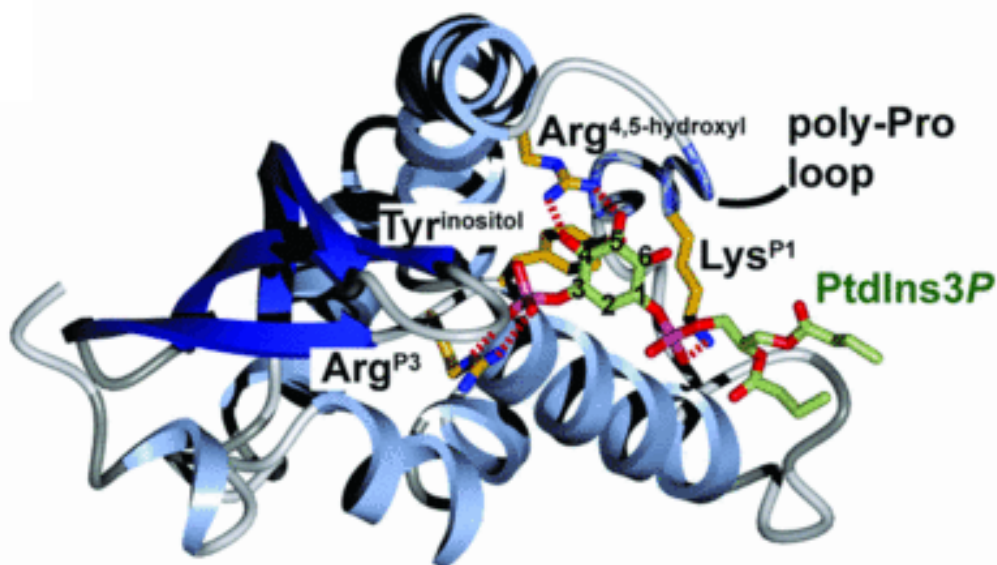
limfocitákban, valamint differenciálatlan monocitákban nem fejeződik ki. Jelen van a legtöbb vizsgált sejtvonalban – így például COS7 és HeLa sejtekben – is, hiányzik azonban például a T-sejt eredetű Jurkat sejtekből [9]. Érdekes, hogy nagyobb mennyiségben van jelen embrionális szövetmintákban, mint felnőtt állatokból származókban [8].

### 2.1.1. A PX domén

A PX domén egy olyan, elsősorban membránlipidek kötésére alkalmas konzervált szerkezeti elem, melyet először a p40<sup>phox</sup> és p47<sup>phox</sup> fehérjékben írtak le [12]. Legalább 49 emlős fehérje rendelkezik ezzel a doménnel, melyeket a doménösszetételük és fiziológiás funkciójuk alapján csoportosítanak [13]. A legtöbb ilyen protein az endoszómális rendszer szabályozásában vesz részt [14]. A Tks5 és Tks4 fehérjékkel egy csoportban csak az egyes NADPH oxidázok szabályozásában szerepet játszó p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> és NOXO1 fehérjék szerepelnek.

Egy PX domén kb. 110-130 aminosavból áll, melyek N-terminálisan három láncból álló  $\beta$ -redőt alkotnak, amit három  $\alpha$ -hélix követ. Több PX domén szerkezetét fő kötőpartnerével, a foszfatidil-inozitol-3-foszfáttal (PI3P-vel) komplexben is földerítették. A 2. ábra a p40<sup>phox</sup> PX doménjének ilyen modelljét mutatja. A PI3P kötéséhez szükséges egy konzervált arginin (az ábrán Arg<sup>P3</sup>, a Tks4 szekvenciájában R44), ami elektrosztatikus kapcsolatot alakít ki az inozitol-gyűrű 3-as helyén lévő foszfáttal. Maga a gyűrű az ezt az arginint közvetlenül követő tirozinnal (Tyr<sup>inositol</sup>, Y45) kerül hidrofób kölcsönhatásba. A 4-es és 5-ös hidroxilcsoportok egy másik konzervált argininhez kötődnek (Arg<sup>4,5-hydroxyl</sup>, R94). Ez az arginin – elméletileg – megakadályozza a 4-es és 5-ös helyen foszforilált inozitol-gyűrűk bekötődését. Végül az 1-es helyen lévő foszfátot is köti egy konzervált lizin oldallánc (Lys<sup>P1</sup>, K78). [13,15]





**2. ábra. A p40<sup>phox</sup> PX doménjének kristályszerkezete PI3P-vel komplexben.** Az Arg<sup>P3</sup> jelű arginin az inozitol gyűrű 3. szénatomjához kötődő foszfáttal alakít ki elektrosztatikus kapcsolatot. A Tyr<sup>inositol</sup> jelölésű tirozin oldallánc magával az inozitol gyűrűvel lép kölcsönhatásba. Arg<sup>4,5-hydroxyl</sup> felíratú arginin az inozitol gyűrű szabad 4-es és 5-ös hidroxil csoportjához kötődik, a Lys<sup>P1</sup> lizin pedig a gyűrű 1-es pozíciójában lévő kétszeresen észterezett foszfáthoz kapcsolódik. A poli-prolin hurok képes lehet SH3 domének kötésére is. Forrás: [13,15] PDB: 1H6H

A fent leírt struktúra ismeretében azt gondolhatnánk, hogy a PX domének kizárólag a foszfatidil-inozitol-3-foszfátot kötik, hiszen ez a molekula úgy illik a doménbe, mint kulcs a zárba. Az irodalmi adatok alapján valóban úgy tűnik, hogy ez sok esetben tényleg így van. Yu és munkatársai például szisztematikusan vizsgálták az élesztő genomban kódolt 15 darab PX domén lipid-kötését, és azt találták hogy ezek szinte kizárólag a PI3P-t képesek kötni [16]. Ismerünk azonban ennek ellentmondó eredményeket is. A p47<sup>phox</sup> PX doménje például a PI(3,4)P<sub>2</sub>-höz kötődik, ami szintén a PI3-kináz terméke lehet [17]. Még érdekesebb eredmény, hogy a CPK nevű PI3-kináz PX doménje a hármashelyen egyáltalán nem foszforilált PI(4,5)P<sub>2</sub>-t kötheti meg [18]. Ugyanezt a lipidet köti az SNX5 PX doménje is, aminek szerkezete azonban egy nagyobb inzerció miatt kissé eltér a „szokványostól” [19]. Ez a kölcsönhatás viszont igen kis affinitású, és valószínűleg önállóan nem is alkalmas a fehérje membránhoz kötésére élettani körülmények között. Kimutatták ugyanis, hogy az SNX5 csak egy másik fehérjével, a PX és – szintén savas foszfolipideket kötő – BAR doméneket hordozó SNX1-gyel heterodimert alkotva képes a PIP(4,5)P<sub>2</sub> tartalmú endoszómák felületéhez kapcsolódni [20].

Bár a PX domént ma is elsősorban lipid-kötő doménként tartják számon [21], számos adat utal arra, hogy molekulán belüli és molekulák közötti fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is részt vehet. Ennek egyik oka, hogy az első és második alfa-hélix között egy hosszú prolin-gazdag régió található (A 2. ábra ezt „poly-Pro loop” felirattal jelzi), ami SH3 domének kötőhelyéül szolgálhat. A p47<sup>phox</sup> C-terminális SH3 doménje például ennek segítségével képes kapcsolódni a fehérje saját PX doménjéhez, ami hozzájárulhat a protein inaktív konformációjának kialakításához [22]. Hasonló, de intermolekuláris kölcsönhatás léphet föl a PLC $\gamma$ 1 SH3 doménje és a PLD2 PX doménje között, aminek potencírozó szerepet tulajdonítanak az IP<sub>3</sub> és Ca<sup>2+</sup> sejten belüli felszabadulásában [23]. Egyes kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a PX domének nem kizárólag SH3 doménekkal képesek összekapcsolódni. Kimutatták például, hogy a PLD a dinamin GTPáz doménjével alakíthat ki kapcsolatot, ami ezen domén enzimaktivitását is képes növelni [24].

Mind a Tks5, mind pedig a Tks4 PX doménjének lipid-kötésére találunk adatot az irodalomban. Ezek szerint az egymással 77%-os szekvencia azonosságot mutató domének egyaránt képesek a PI3P kötésére [7-9,25,26]. Az irodalom és saját eredményeink alapján lehetséges azonban, hogy ezek a fehérjeszerkezetek – legalábbis *in vitro* – más inozitol lipidekhez is kötődhetnek, de hogy pontosan melyekhez, arról ellentmondásosak az adatok. (lásd még az Eredmények (17. ábra) és Megbeszélés című fejezeteket).

A Tks fehérjék PX doménjének fehérje kötésére is találunk adatokat, ezek azonban egyelőre inkább előzetes jellegűek. Abram és munkatársai cikkük diszkussziójában utalást tesznek arra, hogy nem publikált eredményeik szerint a Tks5 harmadik SH3 doménje képes a fehérje saját PX doménjének kötésére, amely kapcsolat az Src általi foszforiláció hatására megszűnik [25]. Hishida és munkatársai pedig azt bizonyították, hogy a Tks4 PX doménje *in vitro* képes a fehérje saját harmadik SH3 doménjével kapcsolódni [7]. Mindez fölveti annak lehetőségét, hogy a Tks állványfehérjékben a – p47<sup>phox</sup>-hoz hasonlóan – foszforilálatlan állapotban egy inaktív, zárt konformáció jöjjön létre, amelynek kinyílása után válik csak kötőképessé a PX domén. Ennek tisztázására azonban még további kísérletek szükségesek.

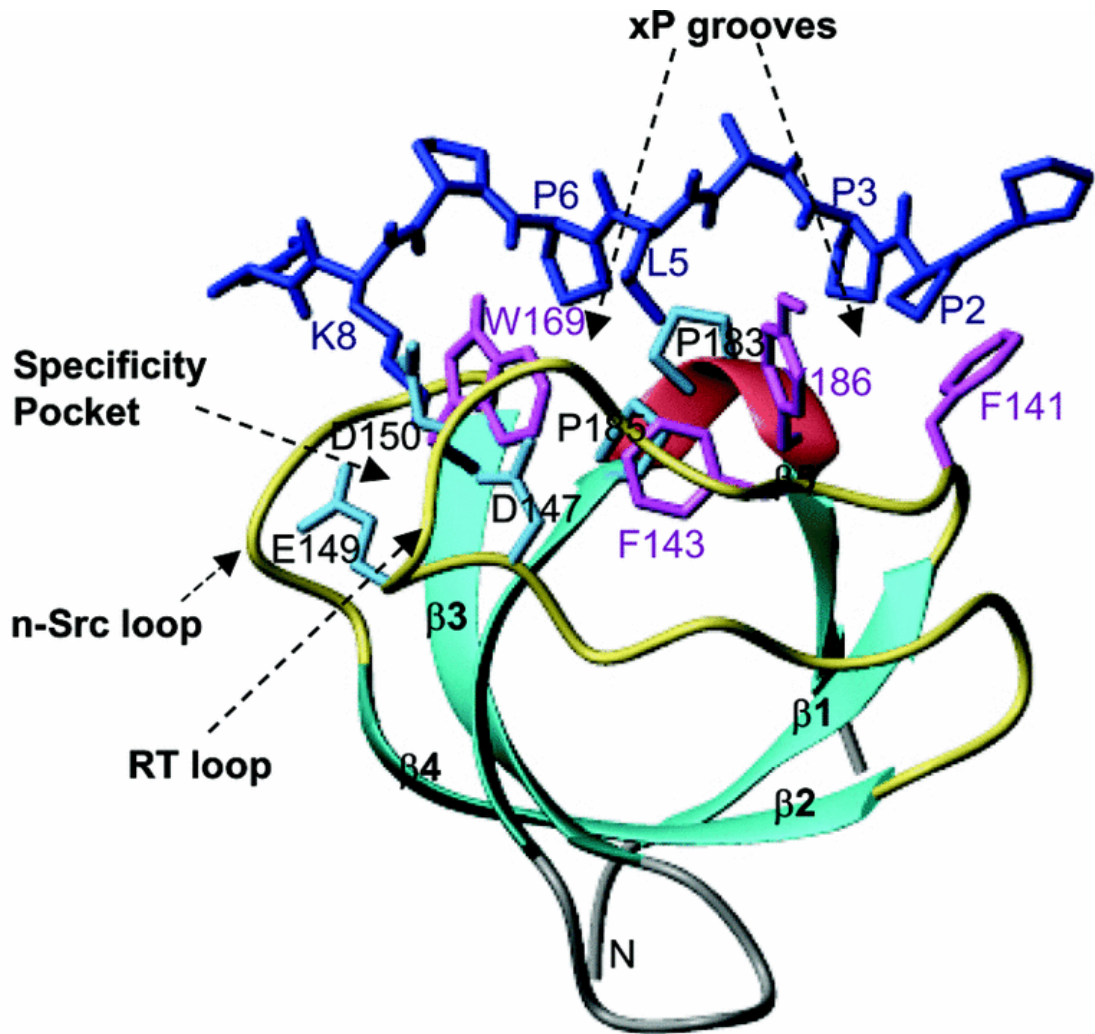
### 2.1.2. Az SH3 domén

Az SH3 (Src-homology 3) domén más fehérjék prolin-gazdag szakaszait felismerni és kötni képes konzervált szerkezeti egység, melyet 1988-ban írtak le [27-29]. A domén rendkívül elterjedt a jelátviteli fehérjék körében: a konzervált doménszerkezeteket katalogizáló SMART adatbázis [30] jelen értekezés írásának idején 536 olyan emberi fehérjét tartalmazott, melyek a szekvencia homológia alapján ilyen modullal rendelkezhetnek.

A domén kb. 60 aminosav hosszúságú, központi részét egy öt lemezből álló, antiparallel szerkezetű  $\beta$ -redő alkotja (3. ábra). A lemezeket összekötő szakaszok közül a leghosszabb az úgynevezett RT-hurok, mely a benne található fontos arginin (R) és treonin (T) oldalláncokról kapta nevét.

Az SH3 domének legjobban ismert kötőpartnerei a prolin-gazdag, PxxP motívumot hordozó peptid szakaszok. Ezeknek két klasszikus osztálya van. Az első osztályba tartozó peptidekre az (R/K)xxPxxP szekvencia jellemző, tehát a kötőpartner magját alkotó PxxP motívumot egy pozitív töltésű aminosav (arginin vagy lizin) előzi meg. A második osztályba tartozó célpeptidek PxxPx(R/K) szekvenciát hordoznak, a pozitív töltésű oldalláncok tehát ebben az esetben a PxxP résztől C-terminálisan helyezkednek el [31]. A prolin merev szerkezete miatt az ebben az aminosavban gazdag szekvenciák legkedvezőbb másodlagos szerkezete a kollagénhez hasonló, balmenetes, úgynevezett poliprolin II hélix, melyben három aminosav alkot egy fordulatot.

Az 3. ábra a Crk N-terminális SH3 doménjét mutatja egy második osztályba tartozó ligandjával komplexben [32]. A kötőfelszínen négy aromás aminosav (az ábrán lila színűek) két barázdát alakít ki (az ábrán „xP grooves”), melyekbe a poliprolin hélix egy-egy csavarulata illeszkedik be, amely magában foglalja a PxxP magot. Ettől a magtól C-terminálisan (az ábrán balra) található a pozitív töltésű aminosav (ebben az esetben egy lizin: K8), ami illeszkedik az RT-hurok három negatív töltésű aminosava alkotta zsebbe (Az ábrán a D147, E149 és D150 aminosavak határolta „Specificity Pocket”). Az első osztályba tartozó ligandoknak hasonló kötőhelyük van, de ők ellentétes orientációban kapcsolódnak az SH3 doménekhez, így a negatív töltésű kötőhelyhez itt a PxxP szerkezettől N-terminálisan lévő bázisos aminosav illeszkedik.



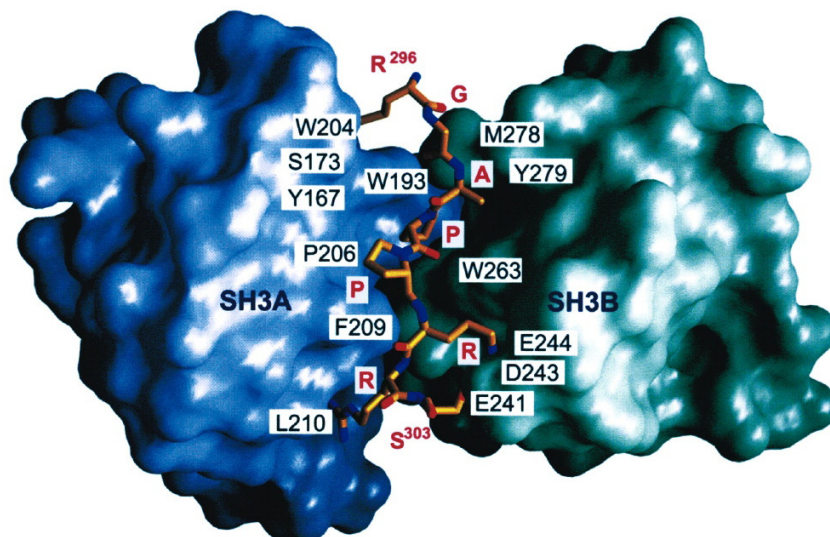
**3. ábra.** Az egér Crk N-terminális SH3 doménjének kristályszerkezete ligandjával komplexben. Az SOS fehérjéből származó prolin-gazdag ligandot kék színű pálcikamodellként ábrázolták. Az SH3 domén színezése a másodlagos szerkezeti elemeket jelöli. Lila színnel emelték ki a hidrofób kötőzsebeket (xP grooves) alkotó aromás aminosav-oldalláncokat. A specifikus zseb (specificity pocket) negatív töltésű aminosavaihoz a ligand egy lizinje (K8) illeszkedik. Az n-Src- és RT-hurkok (n-Src loop illetve RT loop) konzervált elemek az SH3 doménekben. Forrás: [31,32] PDB: 1CKB

Nem minden SH3 ligand tartalmaz azonban PxxP motívumot. Az Eps8 tirozin-kináz szubsztrát és a hozzá hasonló fehérjék SH3 doménje például PxxDY motívumot ismer föl [33]. Találtak olyan SH3 doméneket is, amelyek prolint nem tartalmazó szekvenciákat is képesek kötni. Ilyen található például a Fyb adapter fehérjében, ami egy RKxxYxxY konszenzus szekvenciát ismer föl [34]. Még érdekesebb az élesztő Pex13p fehérjéjének SH3 doménje, melynek két oldala két különböző fehérje – akár egyidejű – kötésére is képes. Az egyik oldala a Pex14p-ben egy hagyományos poliprolin hélixet ismer föl, másik oldala pedig a Pex5p fehérje egy  $\alpha$ -hélixéhez

kapcsolódik [35,36]. Az SH3 domének úgynevezett terciér kapcsolatok létrehozására is képesek lehetnek. Ez azt jelenti, hogy nem egy folytonos szakaszt ismernek fel egy fehérjében, hanem annak harmadlagos szerkezetében egymás mellé kerülő aminosavak alkotta foltokat. A Grb2 SH3 doménje például így képez heterodimert a Vav Rac kicserélődési faktor SH3 doménjével [37].

Az SH3 domének által létrehozott fehérje-fehérje kapcsolatok szabályozhatóak is lehetnek. Bár az ismert szabályozási módok működése igen eltérő, nagyrészüknél valamilyen szerepet kap a foszforiláció. A legjobban felderített talán a p47<sup>phox</sup> fehérje szabályozásának mechanizmusa. A NADPH oxidáz ezen citoplazmatikus faktora N-terminális PX doménjét követően két SH3 domént tartalmaz (1. ábra). Ezután egy polibázikus összekötő szakasz, végül pedig egy prolinban gazdag régió következik. Ehhez a prolin-gazdag régióhoz kapcsolódik a p67<sup>phox</sup> SH3 doménje, az ilyen jellegű kapcsolatoknál szokatlanul erős kötéssel. (Az erős kötés szerkezeti magyarázata, hogy nem csak egy poliprolin hélix kötődik az SH3 doménhez, hanem az azt követő „helix-turn-helix” struktúra is [38,39].) Mivel a p67<sup>phox</sup> még a p40<sup>phox</sup>-hoz is kapcsolódik, egy háromtagú fehérjekomplex jön létre [40]. A NADPH oxidáz aktiválásához az szükséges, hogy ez az alapállapotban citoplazmatikus hármas komplex a membránhoz helyeződjön át és a p47<sup>phox</sup> SH3 doménje(i) megkösse(k) az enzim egyik membránban lévő komponensének, a p22<sup>phox</sup>-nak a prolin-gazdag régióját. Ez azonban csak akkor történik meg, ha a p47<sup>phox</sup> polibázikus régiójában lévő bizonyos szerin oldalláncok foszforilálódnak. Addig ugyanis a p47<sup>phox</sup> SH3 doménjei a fehérje saját polibázikus régióját kötik, és így egy inaktív, „összehajtott” konformációt tartanak fenn [41]. Az inaktív fehérje röntgenkristallográfiás vizsgálatával kimutatták, hogy a két SH3 domén „hagyományos” kötőfelszínei egymás felé fordulnak és így egy közös árkot hoznak létre, amelybe a polibázikus szakasz N-terminális, prolinban gazdag része illeszkedik (4. ábra) [42]. Az így együttműködő SH3 doméneket „szuper-SH3”-nak is nevezik. A prolinmentes, pozitív töltésű aminosavakban gazdag C-terminális rész is kötődik ehhez a „szuper-SH3” doménhez, de a poliprolin-kötő árkon kívül. A polibázikus szakasz foszforilációja csökkenti annak pozitív töltését, aminek következtében az SH3 domének elengedik azt és így képessé válnak a p22<sup>phox</sup> prolin-gazdag régiójának kötésére. Nem tisztázott, hogy a két SH3 domén ebben az új kapcsolatban is „szuper-SH3”-ként

működik-e, mint ahogy az sem, hogy inaktív állapotban a p47<sup>phox</sup> PX doménje kötődik-e ehhez a domén kettőshöz. (vö. a PX doménnél írottakkal)



**4. ábra. Egy "szuper SH3" domén szerkezete.** A p47<sup>phox</sup> két SH3 doménje közös felszínén köti meg a fehérje saját, pálcsika-modellként ábrázolt prolin-gazdag szakaszát. Forrás: [42] PDB: 1NG2

Érdekes másik példát találunk a foszforiláció általi szabályozásra a Crk adapter fehérje esetében. Ez a molekula egy N-terminális SH2 doménből és azt követő két SH3 doménből áll. Az SH3 domének között található 221-es tirozint az Abl nem-receptor tirozin-kináz képes foszforilálni. Ha a Crk saját SH2 doménje az így létrejött foszfortirozinhoz kötődik, az olyan konformáció-változást eredményez benne, ami lehetővé teszi, hogy az SH2 domén egy prolin-gazdag hurka kapcsolódni tudjon az Abl SH3 doménjéhez [43]. A két fehérjét így egy SH2 – SH3 kapcsolat tartja össze, hasonlóan, mint az SAP és FynT fehérjéket, bár ott a kapcsolat foszforilációtól független [44].

Számos példa van az irodalomban arra, hogy maga az SH3 domén foszforilálódik. Tatárová és munkatársai a PhosphoSite Plus adatbázisban 188 ismert foszforilációs helyet találtak SH3 doméneken belül, melyek között 106 tirozin volt [45]. Ezeknek csak egy kis töredéke esetén bizonyított, hogy valóban szabályozó szerepük van. A legtöbb ismert esetben ez a szabályozás negatív, azaz a foszforiláció gyengíti az SH3 domén ligantkötési képességét. Kimutatták például, hogy a Grb2 C-terminális SH3 doménjének Bcr-Abl általi foszforilációja csökkenti annak kötődését az SOS fehérjéhez [46].

Hasonlóan a CAS fehérje SH3 doménjének tirozin-foszforilációja gátolja annak kapcsolódását a fokális adhéziós kinázhoz [47], mint ahogy az Abl SH3 doménje is gyengébben kötődik foszforilált állapotban az Abl kinázhoz [48]. Laboratóriumunkban mutatták ki, hogy a Caskin1 állványfehérje SH3 doménjének tirozin-foszforilációja annak harmadlagos szerkezetét megváltoztatja [49]. Bár ennek ligandkötésre gyakorolt hatása még nem ismert, valószínű, hogy a foszforiláció más SH3 doménekben is jelentős konformáció változást okoz és emiatt gyengül a ligandkötő-képességük.

Bár a Tks5 és Tks4 fehérjék szinte teljes egészében fehérje-fehérje interakcióra képes egységekből állnak, egyelőre viszonylag kevés kötőpartnerük ismeretes. Ilyenek az ADAM családba tartozó peptidázok, melyek közül az ADAM15 kötését mindkét állványfehérje esetén kimutatták. A Tks5 [25] esetén az ötödik, a Tks4 [50] esetében pedig az arra legjobban hasonlító negyedik SH3 domén vesz részt a kapcsolatban. A Tks5 ötödik SH3 doménjének kötődését az ADAM19 és ADAM12 fehérjék esetén is kimutatták [25]. (A Tks4-ről nem áll rendelkezésre erre vonatkozó adat.) Érdekes, hogy az ADAM12-vel való kapcsolatnak a  $\beta$ -amiolid-fehérje neurotoxicitásában is szerepet tulajdonítanak. Nikolay és munkatársai ugyanis arra az eredményre jutottak, hogy ha a Tks5 egy C-terminális – PX és első két SH3 doménjétől megfosztott – részét neuronsejt-tenyészetben expresszálják, az fokozza a sejtpusztulást. Ennek oka a szerzők szerint feltehetően az ADAM12 extracelluláris proteolitikus doménjének fokozott „sheddase” aktivitása\* [52]. Megjegyzendő, hogy a teljes hosszúságú fehérje fokozott expressziójának alig volt ilyen hatása, amit a protein esetleges zárt, inaktív konformációjának tulajdonítanak a vizsgálatot végző kutatók.

Ismert még a Tks5 harmadik SH3 doménjének kapcsolata a laminin-kötő disztroglikán  $\beta$  alegységével, melynek az ADAM családdhoz hasonlóan a podoszómák kialakulásában is szerepe lehet [53]. (lásd a következő fejezetben)

A Tks állványfehérjék biokémiai szempontból jelenleg legjobban jellemzett interakciója a Tks5 és az SOS fehérjék között lép föl. Rufer és munkatársai kimutatták, hogy az első és második SH3 domének együttműködve kötik meg ezt a kicserélődési

---

\* A sheddase aktivitás azt jelenti, hogy az ADAM12 különböző membránfehérjék extracelluláris részét képes proteolitikus hasítással felszabadítani. Hogy itt konkrétan milyen hasított fehérje(k) játszhatnak szerepet a patomechanizmusban, az nem derül ki a közleményből. Kísérleti adatok szerint az ADAM12-nek nincs amyloid  $\beta$ -t felszabadító ( $\alpha$ -szekretáz) aktivitása. 51. Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM (2008) Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1685-1702..

faktort, valószínűleg úgy, hogy a p47<sup>phox</sup> SH3 doménjeihez hasonlóan úgynevezett „szuper-SH3”-ként működnek (vö. 4. ábra) [2]. A két domén külön-külön ugyanis csak gyengén képes kötni az SOS prolin-gazdag részét, sőt már akkor is jelentősen gyengül a kapcsolat, ha a Tks5 hosszabb splice variánsában meglévő 28 aminosavas inzerció a két SH3 domén közé ékelődik. Ehhez hasonló a Tks5 és a dynamin-1 közötti kapcsolat is, de ez az inzerció jelenléte esetén nem csak gyengül, hanem teljesen meg is szűnik [2]. Meg kell jegyezni, hogy ezen jól jellemzett fehérje-fehérje kölcsönhatások élettani jelentősége egyelőre nem ismert.

További kapcsolatokat mutattak ki a Tks fehérjék és a NADPH oxidáz rendszer egyes elemei között. Így a Tks5 képes első két SH3 doménjével a p22<sup>phox</sup>-hoz kapcsolódni [54] és mindkét állványfehérje kapcsolatát kimutatták a NoxA1-gyel [55-57]. Ennek esetleges biológiai jelentőségéről egy későbbi fejezetben még szólnunk.

## ***2.2. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepe élettani és kóros folyamatokban***

### **2.2.1. Podoszómák és invadopódiumok**

A Tks5 és Tks4 fehérjék biológiai funkciói közül a legjobban a podoszómák és invadopódiumok létrejöttében és működésében betöltött szerepük bizonyított.

A podoszómák és invadopódiumok aktinban gazdag sejtfelszíni adhéziós struktúrák, melyek a sejtek rögzítésében, mozgásában és az extracelluláris mátrixon való áthatolásukban játszanak szerepet. Először 1980-ban David-Pfeuty és Singer figyelték meg, hogy v-Src-t hordozó vírussal fertőzött fibroblasztokban az aktin-citoszkeleton szabályozásában szerepet játszó  $\alpha$ -aktinin és vinculin fehérjék a fokális adhéziókból kör alakú csoportokba helyeződtek át, melyeket a szerzők rozettáknak neveztek el [58]. A podoszóma elnevezés későbből származik, amikor Tarone és munkatársai hasonló, aktinban és tirozinon foszforilált fehérjékben gazdag, a fertőzött sejt ventrális oldaláról kinyúló adhéziós struktúrákat írtak le ilyen néven [59]. Hamar megfigyelték azt is, hogy ezek a nyúlványok a sejt körüli anyagot bontani képesek [60,61], és ezért az invadopódium megnevezést javasolták rájuk. Ezekhez hasonló képleteket nem csak transzformált sejtekben, hanem például makrofágokban, dendritikus sejtekben, érfali simaizomsejtekben is találtak, ahol fiziológias funkciót tulajdonítanak nekik. Jelenleg az irodalomban a podoszóma elnevezést inkább ép sejtek esetén, az invadopódium nevet

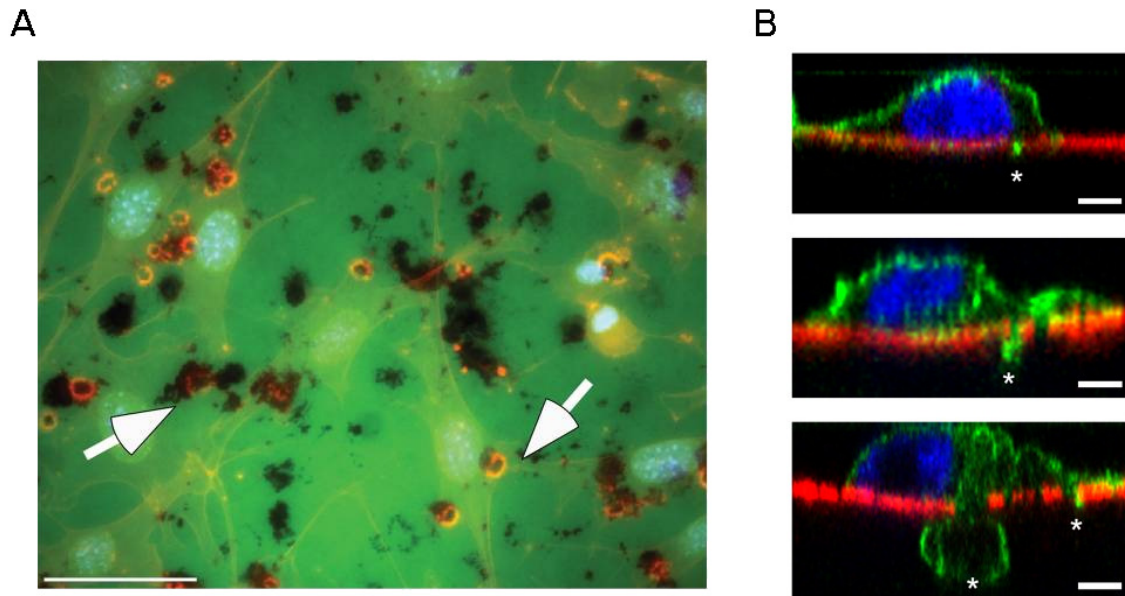


pedig tumoros sejtekkel kapcsolatban használják [62], de sok cikkben nem tesznek különbséget köztük.

Mindmáig vitatott, hogy a podoszómák és az invadopódiumok azonos struktúráknak tekinthetők e. Mindenesetre sok közös tulajdonságuk van, például a szerkezetükre jellemző fehérjék tekintetében. Kimutatták bennük számos, az aktin-citoszkeletont szabályozó molekula jelenlétét. Ilyenek például az új aktin-szálak nukleációjára képes forminok, valamint az elágazódó aktin-hálózatok létrejöttéhez szükséges Arp2/3 komplex, az őt aktiválni képes WASP, N-WASP és cortactin fehérjékkel együtt. Számos jelátviteli komponens lokalizálódik ezekbe a képletekbe, például a Rho és Cdc42 kis GTPázok, az Src, Abl és Pyk2 tirozin-kinázok. Az invazív funkcióért proteázok felelősek, mint például az MMP2, MMP9 és MT1MMP mátrix metalloproteázok, az ADAM család tagjai, a cisztein proteáz cathepsinek és a szerin proteázok közé tartozó seprase és UPAR enzimek. Az adhéziós képességet főként különböző integrinek biztosítják, de osteoclastokban kimutatták a hialuronsavat kötő CD44 molekulák szerepét is [62-65].

Néhány morfológiai különbséget is megfigyeltek a podoszómák és invadopódiumok között. Az előbbieket például inkább a sejt szélénél találhatók, az utóbbiak pedig a sejtmag környékén. Az invadopódiumok hossza általában nagyobb fiziológiás társaiknál, és élettartamuk is hosszabb (percek helyett órák) [62]. Általános érvényű megállapításokat tenni azonban a sokféle sejttípus és vizsgálati körülmény miatt nem lehet.

A podoszómák és invadopódiumok vizsgálatára általában immunfluoreszcens mikroszkópiát használnak. Jól láthatóvá tehető bennük például az aktin, valamint a cortactin és más aktin-kötő fehérjék. Ennél nagyobb bizonyosságot ad a TIRF és konfokális mikroszkópia, melyek képesek ezen struktúrák ventrális elhelyezkedésének kimutatására is. Még jobb, ha a sejteket fluoreszcensen jelölt zselatinra vagy fibronektinre ültetik, így ugyanis a proteolitikus aktivitás hatása is közvetlenül megfigyelhetővé válik [66]. Ilyen módszerrel készült felvételt mutat az 5. ábra „A” része.



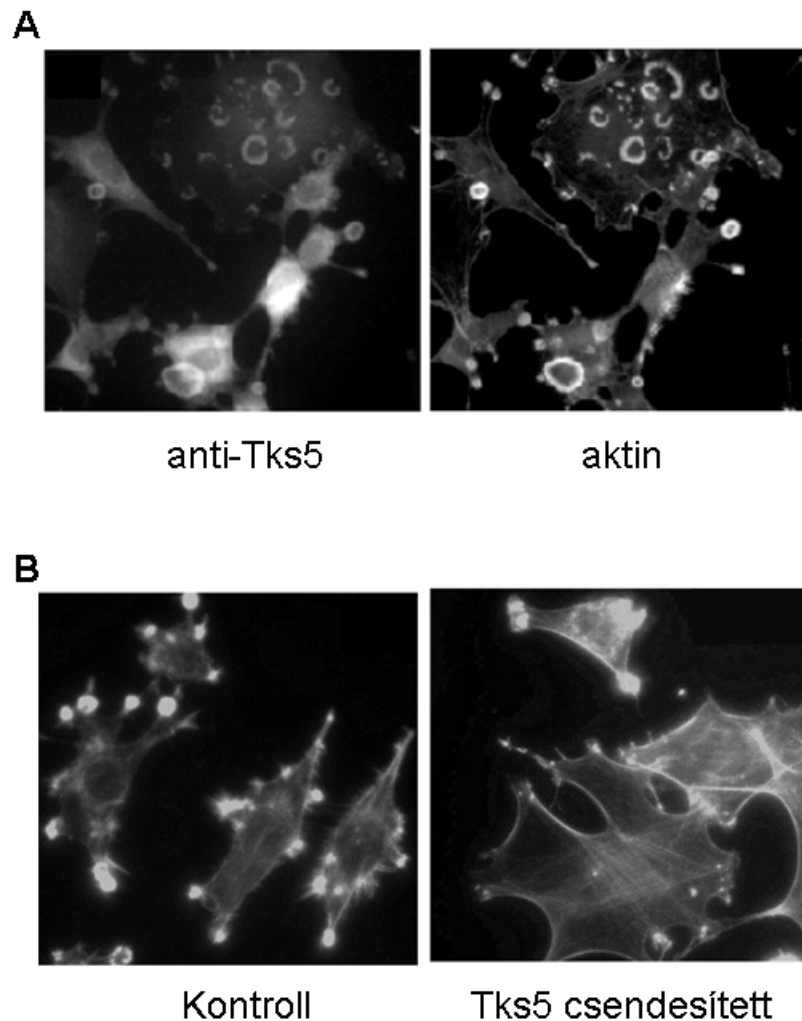
**5. ábra. A podoszómák a sejten kívüli mátrix degradációjára képesek.** (A) Src-3T3 sejteket zöld fluoreszcens festékkel jelölt zselatinrétegre ültettek. Fixálás után pirossal az aktin-citoszkeletont, késsel pedig a sejtmagokat jelölték. A nyilak olyan helyekre mutatnak, ahol a podoszómákba lokalizálódó proteázok lebontották a zselatint. A fehér vonal 50 $\mu$ m-nek felel meg. Forrás: [8] (B) A basális membránon való áttörés lépései. HCT116 human colorectalis carcinoma sejteket patkány hashártya preparátumra ültettek, majd fixálás és fluoreszcens jelölés után konfokális mikroszkóppal vizsgálták őket. Piros színben a laminin látható, zöldben az aktin, késsel pedig a sejtmagokat festették meg. Az első stádiumban (fönt) invadopódiumok jelennek meg (csillaggal jelölve), melyek elkezdi bontani a membránt. A második stádiumban (középen), melyet a sejtek általában 3-5 nap alatt érnek el, már nagyobbak az invazív sejtnyúlványok. A harmadik stádiumban (alul) a sejt jelentős része átkerült a basális membrán túloldalára. A fehér szakaszok itt 5 $\mu$ m-nek felelnek meg. Forrás: [67]

Vannak próbálkozások a podoszómák és invadopódiumok az élettanihoz közelebb álló rendszerekben való vizsgálatára is. Schoumacher és munkatársai például patkány mezentériumból nyert bazális membránra ültettek sejteket, és igen látványos képeket készítettek az invadopódium érésének és a membránon való áttörésének lépéseiről [67]. (5. ábra / „B”) Több munkacsoport háromdimenziós mátrixban is vizsgálta a podoszómák tulajdonságait például makrofágok esetén [68]. Ennek ellenére alig van közvetlen bizonyíték a podoszómák és invadopódiumok *in vivo* létezésére, bár Quintaville és munkatársai immunelektronmikroszkópos módszerrel megfigyeltek nagyon hasonló cortactin és Tks5 tartalmú képleteket egér aortában [69].

Mivel Sara Courtneidge munkacsoportja a Tks5-öt az Src tirozin-kináz szubsztrátjaként azonosította [1], hamar vizsgálni kezdték azt is, hogy az Src általi foszforiláció hatással van-e a fehérje sejten belüli lokalizációjára. Azt találták, hogy nyugvó fibroblasztokban a Tks5 elszórt citoplazmatikus elhelyezkedést mutat, Src-vel

transzformált sejtekben azonban a podoszómákba lokalizálódik [25]. (Lásd a 6. ábra „A” részét.)

Ehhez a lokalizációhoz a fehérjének szüksége van a PX doménjére, ami arra enged következtetni, hogy a hármask helyen foszforilált inozitol lipidek fontos szerepet játszanak a fehérje lokalizációjában. Valószínű azonban, hogy a lipid-kötés egyedül nem elegendő a Tks5 podoszómákba irányításához, mivel az önmagában expresszált PX domén endoszóma szerű struktúrákba lokalizálódik, nem pedig podoszómákba [25]. Nem teljesen világos az sem, hogy pontosan melyik lipid kötéséről van szó, hiszen a PI3P leginkább endoszómákban fordul elő. A legvalószínűbb, hogy a PI(3,4)P<sub>2</sub> a kötődő partner, mivel a Tapp1 fehérje ezt specifikusan fölismerni képes PH doménje podoszómákba lokalizálódik és overexpressziója valamelyest gátolja is azok kialakulását [71].



**6. ábra. A Tks5 szerepe podoszómákban.** (A) A Tks5 Src-vel transzformált sejtekben podoszómákba lokalizálódik. A Tks5-öt specifikus ellenanyaggal, az aktin-citoszkeletont pedig falloidinnel festették. Forrás: [25]. (B) Tks5 csendesített sejtvonalon nem jelennek meg érett podoszómák Src-vel való transzformálás hatására. Mindkét ábrán a sejtek aktin-citoszkeletonja látható, falloidin festéssel. Forrás: [70]

Tks5 csendesített Src-3T3 sejtvonalon mutatták ki először, hogy a Tks5 nem csak jelen van a podoszómákban, hanem szükséges is azok kialakulásához [70]. (Lásd a 6. ábra „B” részét.) Hogy vizsgálhassák a Tks5 hiányának hatását a sejtmozgásra és a sejtek extracelluláris mátrixon keresztüli inváziójára, a kutatók kétféle Boyden-kamrás kísérletet állítottak össze. (Ehhez hasonló kísérletek leírása részletesen megtalálható az Anyagok és módszerek valamint az Eredmények című fejezetekben. Lásd még 25. ábra) A motilitás vizsgálatára szolgáló kísérleteknél a sejteknek egy lyukacsos membránon kellett átjutniuk szérum-grádiens irányába. Ezzel a módszerrel nem figyeltek meg jelentős különbséget a Tks5 csendesített és a kontroll sejtek mozgása között. Más volt a

helyzet, ha a Boyden-kamra lyukacsos membránja fölé egy extracelluláris mátrix elemekből álló gélt (ún. Matrigel<sup>TM</sup>-t) rétegezték. Az ezen való átjutás, amihez a mátrixot bontó proteázokra is szükség van, már jelentősen lassabb volt a Tks5-hiányos sejtek esetén. Hasonló eredményeket adott egy emlőrák és egy melanóma sejtvonal vizsgálata is [70]. Úgy tűnik tehát, hogy a Tks5 jelenléte nem magához a sejtmozgáshoz szükséges, hanem csak a mátrix lebontásához.

Mivel számos emberi daganatos sejtvonalban megfigyeltek podoszómákat, illetve jelenlétük és a sejtek *in vitro* invazivitása között összefüggést találtak [70,72-74], azt gondolhatnánk, hogy a Tks5-hiányos sejtek vad típusú társaiknál kevésbé képesek *in vivo* áttéteket képezni. Az immunhiányos, ún. meztelen egereken végzett kísérletek azonban nem várt eredményt hoztak. A farokvénába fecskendezett Tks5 csendesített és kontroll Src-3T3 sejtek által létrehozott mikrometasztázisok száma között ugyanis nem volt jelentős különbség, ami arra utal, hogy ezeknek a sejteknek nincs szükségük podoszómákra a vérerek elhagyásához és a szöveti invázióhoz [75]. A Tks5-hiányos sejtekkel beoltott egereknél képződött tumorok mérete azonban jóval kisebb volt, mint kontroll sejtek által létrehozott daganatoké. Tekintve, hogy a Tks5 csendesítése a kutatócsoport eredményei szerint a sejtosztódás ütemét sem *in vitro* sem *in vivo* nem befolyásolta, a tumorok erezettsége azonban gyengébb volt a Tks5 csendesített sejtekkel oltott csoportban, a szerzők a rosszabb vérellátást tartják a korlátozott daganatnövekedés valószínű okának. Ennek mechanizmusa azonban egyelőre nem tisztázott, és az sem kizárható hogy az – ismeretlen okból – kisebb Tks5-hiányos tumorok sejtjei diffúzióval még elegendő oxigénhez jutnak és emiatt nem váltanak ki nagyobb mértékű érújdonképződést. Mindazonáltal a pontos háttér ismerete nélkül is hasznos és igen fontos eredmény, hogy a Tks5 csendesítése csökkent tumor-növekedést és javuló túlélést okozhat. A Tks5 humán tumorokban betöltött szerepére utalhat az is, hogy malignus gliómák esetén a Tks5 expressziója és a halálozás között pozitív összefüggést találtak [76].

Az irodalmi adatok alapján tehát igen valószínű, hogy a Tks5 fontos szerepet játszik a podoszómák és invadopódiumok kialakulásában és működésében. Azonban az, hogy pontosan hogyan tölti be ezt a szerepet, egyelőre nem tisztázott. Állványfehérjéről lévén szó, talán a legfontosabb a kötőpartnerek azonosítása. Elsőként az ADAM család egyes tagjaival (ADAM12, ADAM15, ADAM19) mutattak ki kapcsolatot, melyet

valószínűleg a Tks5 ötödik SH3 doménje közvetít [25]. Ezek a fehérjék a metalloproteázok közé tartozó transzmembrán multidomén fehérjék. Szerepük van számos élettani és kóros folyamatban, mint például a megtermékenyítés, a szív fejlődése, a sejtadhézió vagy a mioblasztok fúziója. Egyes tagjaik úgynevezett „sheddate”-ként működnek, azaz transzmembrán fehérjék extracelluláris részeit képesek felszabadítani, amik azután például receptorok ligandjaiként funkcionálhatnak [77-81]. A Tks5-tel kapcsolatba hozott családtagok azonban a kevésbé ismert ADAM-ok közé tartoznak, melyek podoszómák működésében betöltött funkciója egyelőre nem ismert. Elképzelhető, hogy extracelluláris doménjeik részt vesznek egyes mátrixfehérjék bontásában vagy a sejtadhézióban, de lehetséges az is, hogy intracelluláris részük maga is állványfehérjeként működik. Ez a szakaszuk ugyanis prolinban gazdag és több, a podoszómák létrejöttében fontosnak tartott jelátviteli fehérje kötésére képes, mint például a PI3-kináz [82], az Src vagy a Grb2 [83]. Érdekes összefüggés továbbá, hogy ADAM15 génkiütött egereknél csökkent kóros érújdonképződést és daganatnövekedést figyeltek meg [84], ami felveti annak lehetőségét, hogy az ADAM15 és a Tks5 együttműködnek ebben a folyamatban. Nem világos azonban, hogy ennek van-e közvetlen köze a podoszómákhoz.

További kötőpartnerként azonosították a Grb2 adapter fehérjét [85-87], melynek N-terminális SH3 doménje kapcsolódik a Tks5 valamely prolin-gazdag részletéhez [71]. Elképzelhető, hogy ennek a proteinnak szerepe van a podoszómák kialakulásában, mivel Src-vel transzformált sejtekben csendesítése gátolja ezen képletek kialakulását, valamint a mátrix bontását. Érdekes módon koimmunprecipitációval a Grb2 és a Tks5 kapcsolata csak Src-vel transzformált sejteken volt kimutatható. Ennek egyik lehetséges oka lehet a foszforilálatlan Tks5 esetleges zárt konformációja, de ennek tisztázására még további vizsgálatok szükségesek. Élő sejteken végzett kísérletek szerint a podoszómák előalakjaiban először a Grb2 jelenik meg és csak azután a Tks5. Ezt a sorrendet az is alátámasztja, hogy Grb2 csökkent Tks5 tartalmú sejtek esetén is ezekre az adhéziós helyekre lokalizálódott [71]. Bár lehetségesnek tűnik, hogy a Grb2 szerepet játszik a Tks5 lokalizációjában, a közvetlen kísérletes bizonyítékok egyelőre hiányoznak, mint ahogyan a Grb2 podoszómák kialakulásában betöltött pontos molekuláris funkciója is tisztázásra szorul.

Könnyebben elképzelhető egy másik kötőpartner az N-WASP szerepe. Ez a fehérje a kizárólag hematopoetikus sejtekben található Wiskott-Aldrich szindróma protein (WASP) általánosan előforduló rokona. N-terminális VCA-régiójával az Arp2/3 komplexet aktiválja, ami elágazódó aktin-hálózat kialakulását váltja ki. Ezen felül képes más aktin-szabályozó fehérjék, mint a WIP és a cortactin kötésére is [88-90]. Az N-WASP-nak nem csak a filopódiumoknak nevezett vékony, aktin-gazdag sejtnyúlványok kialakításában van szerepe, hanem a podoszómák és invadopódiumok mikrofilamentum-rendszerének szervezésében is. Ezt igazolja, hogy a fehérje domináns negatív formáinak kifejezése [91] és génjének csendesítése [92] egyaránt gátolja a podoszómák kialakulását. A Tks5 és az N-WASP közötti kapcsolat Src-től független, és – legalábbis a GST fúziós fehérjékkel végzett kísérletek eredménye szerint – az állványfehérje SH3 doménjeinek bármelyike közvetítheti [71].

Szintén könnyen magyarázható a disztroglikán fehérje esetében megfigyelt kapcsolat jelentősége. A disztroglikán tulajdonképpen egy sejtadhéziós molekula, amely többek között a laminin kötésére képes [93-96]. Két alegységből áll, egy erősen glikozilált, extracelluláris alfa- és egy transzmembrán béta-láncból, melyek egy közös prekursor proteolitikus hasítása által jönnek létre. A lamininnal való kapcsolatért az alfa alegység a felelős, míg a béta lánc sejten belüli része további fehérjék közvetítésével az aktin-sejtvázhoz kapcsolódik. Ehhez kötődik mioblasztok podoszómáiban a Tks5 is harmadik SH3 doménjének segítségével [53]. Érdekes, hogy ehhez a kötéshez a disztroglikán 890-es tirozinjának Src általi foszforilációja szükséges. Mivel ez az adhéziós molekula a fokális adhéziók kialakításában is szerepet játszik [97], feltételezhető, hogy podoszómákban is elsősorban az extracelluláris mátrix és az aktin-citoszkeleton egymáshoz rögzítésében játszik szerepet, de a hosszú, több fehérjével kapcsolódni képes béta lánc állványszerű vagy egyéb jelátviteli funkciója is elképzelhető.

Szintén az Src aktivitása szükséges a Tks5 és az Nck adapter fehérje kapcsolatához, mivel ezt az Nck SH2 doménje közvetíti [98]. Tyr → Phe mutáns fehérjék vizsgálata alapján a Tks5 részéről az 558-as tirozin vesz részt a kölcsönhatásban. Immunfluoreszcens mikroszkópiával végzett vizsgálatok szerint az Nck csak akkor lokalizálódik a podoszómákba, ha a Tks5 a megfelelő helyen foszforilálva van. Tekintve, hogy az Nck csendesítése csökkenti, fokozott expressziója pedig növeli a mátrix podoszómák általi degradációját, a fehérje feltehetően szerepet játszik ezen

sejtszervecskék működésében is [98]. Bár ennek mechanizmusa egyelőre ismeretlen, az Nck aktin-citoszkeleton szabályozásában betöltött szerepe jól ismert [99,100]. Így feltehetően a podoszómák sűrű mikrofilamentum-hálózatának kialakításában lehet valamilyen szerepe ennek az adapter fehérjének.

A Tks5-höz képest jóval kevesebb adat áll rendelkezésre a Tks4 podoszómákban betöltött szerepével kapcsolatban. Mindazonáltal igen valószínű, hogy ez a fehérje is részt vesz ezen sejtalkotók kialakításában, hiszen állandóan aktív Src-t kifejező sejtekben a Tks5-höz hasonlóan maga is ezekbe a struktúrákba lokalizálódik [9,50]. Sara Courtneidge laboratóriumában végzett kísérletek kimutatták továbbá, hogy Tks4-hiányos („gécscsapdázott”) egérből származó Src-vel transzformált embrionális fibroblasztokban nem alakulnak ki működőképes podoszómák, annak ellenére sem, hogy ezek a sejtek tartalmaznak Tks5-öt [8]. A megjelenő kezdeményekben ugyan kimutathatóak a podoszómákra jellemző Tks5, cortactin és egyéb tirozinon foszforilált fehérjék, de a képletek alacsony akintartalmúak és nem képesek a sejten kívüli anyag bontására. Érdekes, hogy a Tks5 fokozott expressziója ezekben a sejtekben a podoszóma-kezdemények aktintartalmát helyreállította, zselatinbontó képességüket azonban nem. Ezzel összhangban áll a munkacsoport azon megfigyelése is, hogy a kezdeményekből az MT1 mátrix metalloproteáz is hiányzott [8]. A Tks4 proteázok szervezésében betöltött esetleges szerepére utal az is, hogy *in vitro* kimutatták az állványfehérje negyedik SH3 doménjének ADAM15-tel való kapcsolatát [50].

### 2.2.2. NADPH oxidázok szabályozása

Tekintve, hogy doménszerkezetük és aminosav szekvenciájuk alapján a Tks5 és Tks4 fehérjék leginkább a NADPH oxidázok szabályozásában szerepet játszó p47<sup>phox</sup> molekulákhoz hasonlítanak, felmerül annak lehetősége, hogy maguk is képesek szabályozni ezen enzimes család egyes tagjainak aktivitását.

A NADPH oxidáz (röviden NOX) családba tartozó enzimek NADPH-tól származó elektronokkal molekuláris oxigént redukálnak általában szuperoxiddá. Az első ilyen enzimet – melyet ma NOX2-nek neveznek – Segal és munkatársai 1978-ban azonosították granulocitákban [101,102]. Később klónozták az enzim két transzmembrán komponensét, az enzimaktivással rendelkező gp91<sup>phox</sup> glikoproteint [103,104] és az annak stabilizálásában és szabályozásban résztvevő p22<sup>phox</sup> [105-107]



fehérjét. A NOX2 szabályozásának vizsgálata során az enzim működéséhez szükséges citoplazmatikus faktorokat is azonosítottak, így a p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> [108,109] és p40<sup>phox</sup> [110] fehérjéket. Kiderült továbbá, hogy Rac1 és Rac2 kis GTPázok is szerepet játszanak az enzim szabályozásában [111,112]. (A NOX2 p47<sup>phox</sup> általi szabályozásának rövid összefoglalása megtalálható az SH3 doménről szóló fejezetben.) A főként a fagocitákban, a kórokozók elpusztításában szerepet játszó NOX2 mellett más NADPH oxidázokat is fölfedeztek. Az elsődleges szerkezet és a szabályozás szempontjából leginkább a NOX1 enzim hasonlít a NOX2-re. Citoplazmatikus faktoraiként, a NOXO1 és NOXA1 [113-116] fehérjéket azonosították, melyek a p47<sup>phox</sup> illetve a p67<sup>phox</sup> homológjai. Mindazonáltal overexpressziós rendszerben a korábban felfedezett faktorok is képesek aktiválni az enzimet [113]. A főként a belső fülben kifejeződő NOX3 esetén is felmerült ezen fehérjék szabályozó szerepe, de az eredmények nem egyértelműek [117]. A távolabbi rokon NOX4 és a NOX5 fehérjék nem igényelnek citoplazmatikus faktorokat. Az előbbi konstitutívan aktív [118-120] az utóbbi pedig az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció szabályozása alatt áll [121,122], hasonlóan az eltérő szerkezetű DUOX1 és DUOX2 enzimekhez [123].

Több jel utal arra, hogy a Tks4 és Tks5 fehérjék képesek lehetnek bizonyos NADPH oxidázok szabályozására. Mindkét fehérje kapcsolatát kimutatták ezen enzimrendszer egyes elemeivel. Így például a Tks4 és a Tks5 egyaránt összekapcsolódhat a NOXA1 fehérjével [55-57]. A kölcsönhatás közvetlen, közvetítője a NOX aktivátor 1 első prolin-gazdag régiója [57], mely feltehetően a Tks5 több SH3 doménjéhez is képes kötődni, mivel az egyes domének mutációja nem befolyásolta a kötést, az összes egyidejű inaktivációja viszont megszüntette azt [55]. Kimutatták – Tks4 esetén – hogy a kapcsolat akkor a legerősebb, ha az Src a NOXA1 110-es és a Tks4 508-as tirozinját foszforilálta [56]. A Tks fehérjék és a NADPH oxidáz rendszer egy további kapcsolódási pontjára utalhatnak azok a koimmunprecipitációval nyert eredmények, melyek szerint a Tks5 a p22<sup>phox</sup>-szal is egy komplexben lehet jelen [54], bár direkt kötődésre egyelőre nincs bizonyíték.

A Tks4/5 állványfehérjék és a NADPH oxidázok között nem csak fizikai, hanem funkcionális kapcsolat is van. Különböző sejtes rendszerekben kimutatták ugyanis, hogy a Tks5 illetve a Tks4 csendesítése csökkenti, overexpressziójuk pedig növeli a reaktív oxigénszármazékok termelését [54-56]. A ROS képződés serkentésének nemcsak a

NOXA1-gyel való kapcsolat, hanem a Tks5 PX doménje is szükséges volt [55]. Bár a rendelkezésre álló irodalmi adatokból nem derül ki egyértelműen, hogy mely NOX izoformákat aktiválhatnak a Tks fehérjék, overexpressziós kísérletek [54,55] eredményei szerint és az egyes enzimek szabályozásának ismeretében a NOX1 és NOX3 a legvalószínűbb jelöltek.

Felmerül annak a lehetősége, hogy a Tks4/5 által kiváltott ROS képződés és a fehérjék podoszómák kialakulásában játszott szerepe nem teljesen független egymástól. Kimutatták ugyanis, hogy a podoszómák környezetében jelentős mennyiségű reaktív oxigénszármazék termelődik és a NOX enzimek gátlása a podoszómák létrejöttét és mátrixbontó képességét is akadályozza [54]. Nem világos azonban hogy ezért melyik enzim felelős, illetve azt milyen citoplazmatikus faktorok szabályozhatják. Diaz és munkatársai kimutatták a NOX4 jelenlétét podoszómákban, és igazolták azt is, hogy ezen izoenzim csendesítése – a vizsgált sejttípusban szintén jelenlévő jelenlévő NOX1 és NOX3 megtartottsága ellenére – gátolja a podoszómák képződését és csökkenti a sejtek mátrix degradációs képességét is [54]. Ennek az izoformának a Tks fehérjékkel való együttműködése azonban nem valószínű, mivel a NOX4-et konstitutívan aktív enzimnek tartják és kísérletes adat is van arra, hogy a Tks4/5 enzimek nem képesek ezt az izoformát aktiválni [55]. Nehezen összeegyeztethető ezekkel az eredményekkel az a megfigyelés, hogy a NOX1 csendesítése szintén gátolja a podoszómák létrejöttét [55]. Mindezek alapján egyelőre nem jelenthető ki, hogy a Tks4/5 fehérjék részt vennének a podoszómális ROS képződés szabályozásában. A lokálisan képződött oxigénszármazékok azonban – bármely szabályozás alatt is álljon termelésük – hatással lehetnek a Tks fehérjék működésére. Ismert jelenség például az, hogy ezen oxidálószerkezetek foszfatázok inaktiválására képesek [124]. Ennek a mechanizmusnak az esetleges szerepére utalnak azok az eredmények, melyek szerint a NOX enzimek gátlása a PTP-PEST tirozin foszfatáz csendesítéséhez hasonlóan fokozza a Tks4 és Tks5 foszforiláltságát [54].

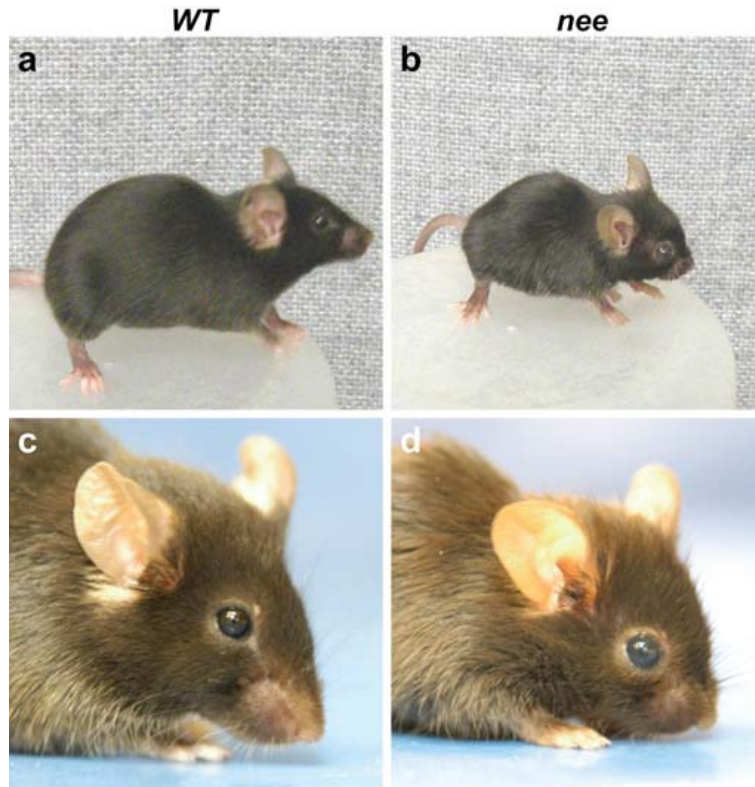
Meg kell jegyezni, hogy a fent bemutatott irodalmi adatokkal ellentétben Geiszt Miklós és munkatársainak eredménye szerint a Tks4 nem képes a NADPH oxidázok szabályozására. [Geiszt Miklós és munkatársainak nem közölt eredménye]

### 2.2.3. Egyedfejlődés

A Tks4, illetve a Tks5 fehérjék egyedfejlődésben betöltött szerepére gén-hiányos állatmodellek és egy ritka humán genetikai betegség vizsgálata világított rá.

Mao és munkatársai úgynevezett nee (nose, eye, ear) mutáns egerek vizsgálata során a Tks4 génjének utolsó exonjában találtak egy egy bázispáros deléciót, ami kereteltolódást, és ennek következtében korai STOP kodont okoz [50]. Bár elvileg ennek csak a harmadik SH3 domén egy része és az attól C-terminálisan lévő szakaszok esnek áldozatul, Lányi Árpád laboratóriumának tapasztalatai szerint a fehérje teljesen hiányzik ezen egerek sejtjeiből. Az állatokat makroszkóposan vizsgálva elsősorban azok kis mérete, az agy- és arckoponya rendellenes alakja, és a szemek abnormális megjelenése tűnik fel (7. ábra). A részletesebb vizsgálat során kiderült, hogy mind a hím mind a nőstény állatok terméketlenek, csontjaik deformáltak és csökkent sűrűségűek [50]. Hallásuk sérült, feltehetően a koponyadeformitások okozta idült középfülgyulladás miatt [50,125]. 3-4 hónapos korukban glaukóma fejlődik ki náluk, melyet valószínűleg a csarnokvíz elvezetésének zavara okoz [126,127].

Úgynevezett géncsapda módszerrel [128] (gene-trap) célzottan is létrehoztak olyan egereket, melyeknek szövetei nem tartalmaznak immunoblottal kimutatható Tks4 fehérjét [129]. Ezek az állatok morfológiailag nagyon hasonlóak a nee egerekhez. A szerzők részletes szövettani vizsgálatnak vetették alá nyolc ilyen rágcsáló szívét, melynek során többek között a kamrák dizmorfiáját és elvékonyodott mitrális billentyűket találtak.



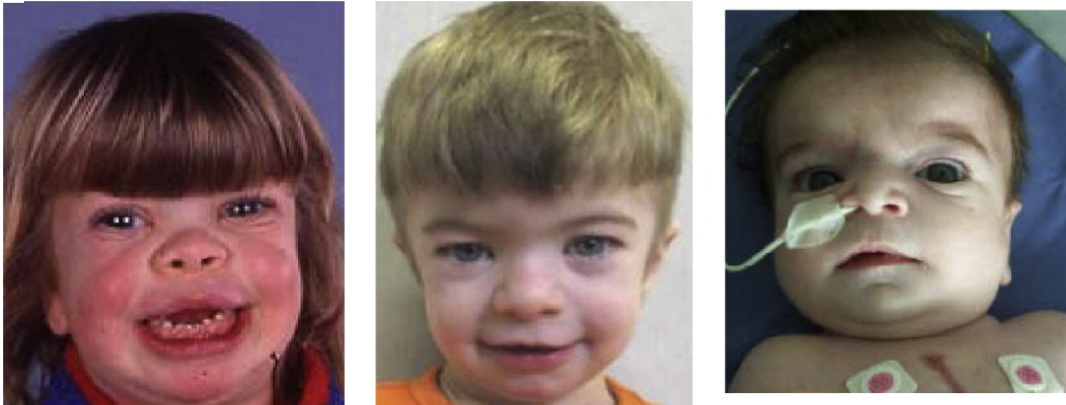
**7. ábra. Vad típusú és nee egér.** A vad típusú (a és c) egérrel összehasonlítva a Tks4-hiányos nee egerek (b, d) kis testmérete, és jellegzetes koponyadeformitása tűnik fel leginkább. Forrás: [50]

A Tks4-hiányos egerekhez nagyon hasonló tünetek figyelhetők meg Frank – ter Haar szindrómás betegeken. Ezt az igen ritka, autoszómális recesszív öröklődésű betegséget Yitzchak Frank és Ben ter Haar írták le először [130,131]. A tünetegyüttes fő jellemzői a brachycephalia, a tág kutacsok, előugró homlok és szemek, hypertelorismus, macrocornea, gyakran glaucoma. A koponya deformitásai mellé a hosszú csontok hajlottsága és számos egyéb, főként a csontvázat érintő elváltozás valamint szívzörejek társulnak [132]. (8. ábra) A betegségben szenvedő gyermekek általában csecsemő-, vagy fiatal gyermekkorban meghalnak.

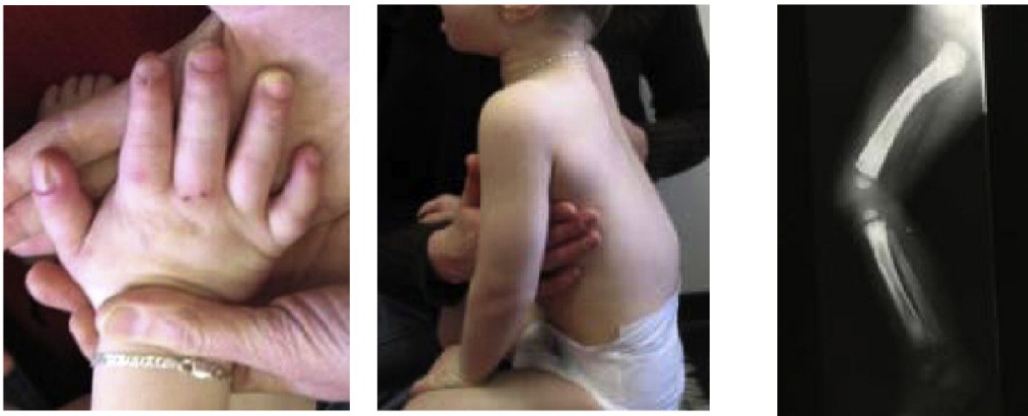
Iqbal és munkatársai 13 Frank – ter Haar szindrómát hordozó család vizsgálatán során 7 olyan családot találtak, melyben a Tks4 génje mutációt szenvedett [129]. A legtöbb esetben ez a fehérje szinte teljes hiányához vezetett, korai STOP kodon, kereteltolódás, a splicing zavara vagy a gént tartalmazó nagyobb szakasz deléciója miatt. Egy család esetén viszont csak egy, a PX domén konzervált 43. argininjét triptofánra cserélő pontmutációt találtak. Meg kell jegyezni, hogy a vizsgált családok majdnem felében nem találtak eltérést a Tks4 génjében, tüneteik viszont nem voltak

megkülönböztethetők a mutációt hordozó családokban előforduló szimptomáktól [129]. Frank – ter Haar szindrómát tehát valószínűleg nem csak a Tks4 génjének mutációja okozhat. A gén-hiányos állatokkal szerzett tapasztalatok viszont arra utalnak, hogy a Tks4 hiánya feltétel nélkül a tünetegyüttes megjelenéséhez vezet.

**A**



**B**



**8. ábra. Frank - ter Haar szindrómás betegek. (A)** Jellemző arcdeformitások. Leginkább a brachycephalia, hypertelorismus, micrognathia és a nagy szemek (megalocornea) szembeötlőek. **(B)** A csontváz egyéb deformitásai. A kézen (balra) feltűnő az ujjak rövidsége, az utolsó ujjperc rövid és széles. A gerinc fokozott thoracolumbalis kyphosisa (középen) és a hosszú csontok hajlottsága (jobbra) figyelhető meg. Forrás: [129]

Már a Tks4 fehérjével kapcsolatos első vizsgálatok rámutattak arra, hogy a fehérje génje legnagyobb mértékben embrionális szövetekben expresszálódik [8]. Egér embriókon az *in situ* hibridizáció módszerével kimutatták azt is, hogy a Frank – ter Haar szindrómában érintett szövetekben és szervekben, például csontokban és a szívben

magas expressziót mutat ez a gén a fejlődés kritikus szakaszaiban [129]. Mindazonáltal a Tks4 pontos szerepe az egyedfejlődésben egyelőre nem ismert.

A Tks4 podoszómák létrejöttében és működésében betöltött funkciójának ismeretében feltételezhető azonban, hogy a sejtmozgás vagy a sejtadhézió zavara fontos tényező a kóros fenotípus kialakulásában. Ezt támasztják alá a Murphy és munkatársai által zebrahal modellen végzett kísérletek is. A szerzők ún. morpholino módszerrel [133,134] Tks5-hiányos zebrahal embriókat hoztak létre és a dúcléc eredetű sejtek csökkent vándorlási képességét figyelték meg bennük [135]. Érdekes, hogy a Tks5 egy olyan mutánsának újraexpresszálása, melyet az Src nem képes foszforilálni nem állította vissza ezeknek a sejteknek a migrációs képességét, míg a vad típusú fehérje alkalmas volt erre. Nem derül ki azonban a kísérletekből, hogy a csökkent sejt migráció a podoszómális működés zavara miatt következik-e be vagy valamely más mechanizmusú sejt vándorlás sérüléséről van szó. Arról sem áll rendelkezésre információ, hogy – a zebraadanió esetén az adatbázisokban egyelőre csak prediktált fehérjeként szereplő – Tks4 kifejeződik-e a vizsgált sejtekben. Mindenesetre érdekes, hogy néhány más, podoszómákban is megtalálható fehérjét érintő mutáció a Frank – ter Haar szindrómához hasonló craniofaciális rendellenességek létrejöttéhez vezet [136], ami ezek részben közös – esetleg podoszómális – patomechanizmusára utalhat.

Mind a nee egerek, mind pedig a géncsapda módszerrel előállított Tks4-hiányos egerek testtömege jóval alacsonyabb társaiknál, ami részben a zsigeri és bőr alatti zsírszövet csökkent mennyiségére vezethető vissza [50,129]. Ez összhangban állhat azzal a korábbi kísérleti eredménnyel, mely szerint a Tks4 szükséges a 3T3-L1 fibroblaszt sejtek adipocita irányú differenciációjához [7]. A fehérje valószínűleg az átalakulás kezdeti lépéseiben játszhat szerepet, mivel expressziója a differenciációt indukáló kezelés (inzulin, dexamethason és IBMX hozzáadása) után három órával a legmagasabb, és 24 óra alatt visszatér az eredeti, alacsony szintre. A cikk szerzői kimutatták, hogy ha a Tks4 expresszióját kis hajtűformájú RNS (shRNA) segítségével megakadályozzák, az gátolja a triglicerid cseppek megjelenését, a sejtek klonális expresszióját és számos adipocita marker-gén indukcióját [7]. Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét is, hogy a Tks4 kifejeződése esetleg más sejtekben is hormonális szabályozás alatt áll, illetve önmaga is részt vehet más gének expressziójának irányításában. Ezekre a kérdésekre azonban egyelőre nem találunk

választ az irodalomban. Különösen érdekessé teszi az eredményt viszont az, hogy a zsírsejt-differenciáció minden bizonnyal podoszómáktól független folyamat, ami a Tks4 funkcióinak sokrétűségére utalhat.

A Tks5-nek a többmagvú oszteoklasztok kialakulásában is szerepet tulajdonítanak. Oikawa és munkatársai ugyanis kimutatták, hogy a fehérje csendesítése gátolja a RANK-liganddal kezelt makrofág prekursorok fúzióját és így a multinukleáris sejtek kialakulását [4]. A szerzők véleménye szerint ez a folyamat nem független a podoszómáktól, mivel a fúzió helyén gyakran megfigyelhetőek PI(3,4)P<sub>2</sub>-, Tks5- és aktin-gazdag struktúrák. A sejtek egyesüléséhez szükséges a PI3-kináz aktivitása, a Tks5 PX doménjének megléte és valószínűleg ezen állványfehérje Src általi foszforilációja is. A közlemény alapvetően a Tks5 és a podoszómák szerepével foglalkozik, a Tks4-ről kevés szó esik. A kevés közölt adat viszont arra utal, hogy a Tks4 ebben a rendszerben legközelebbi rokonától eltérően viselkedhet. A Tks5-tel szemben ugyanis ennek a fehérjének az expressziója nem nő meg RANKL kezelés hatására makrofágokban [4]. Mivel azonban az oszteoklasztok funkciójában is fontos szerepet játszó podoszómák kialakulását és működését a Tks4 hiánya is gátolja [8], könnyen elképzelhető hogy a Frank - ter Haar szindróma csonttüneteinek kialakulásában ezen sejtek diszfunkciója is szerepet játszik.

### 3. 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 citoskeleton 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 fiziológias vagy patológias folyamatokban lehet jelentősége a vizsgált fehérjének, különös tekintettel az aktin-citoskeleton szabályozására?



## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Plazmidok és konstrukciók

A PCDNA3.1 vektorban klónozott humán V5-Tks4 konstrukciót Geiszt Miklós laboratóriumából kaptuk. Ebből QuickChange mutagenézis kit (Agilent Technologies) segítségével állítottuk elő az Src által foszforilált tirozinok (25, 373, 508) helyett fenilalanint tartalmazó, és az R43W mutánsokat. Szintén ennek a PCR alapú módszernek a felhasználásával készítettük el „siRNS rezisztens” V5-Tks4-et kódoló vektorunkat. Ehhez az „si2” kis interferáló RNS által felismert szekvenciát (GCCTGATACCAATTGATGAATACTG) öt helyen változtattuk meg úgy, hogy a kódolt aminosavak ne változzanak (GCCTGATCCCCATCGATGAGTATTG). A konstrukciók bázissorendjét szekvenálással, expressziójukat COS7 sejtekben immunoblottal ellenőriztük. Az „siRNS rezisztens” V5-Tks4 konstrukció rezisztenciáját előzetesen si2-vel transzfektált COS7 sejteken próbáltuk ki. (27. ábra)

A cortactin N- (aa 1..334) és C-terminális (aa 336..542) darabját GST fúziós fehérjeként kódoló pGEX plazmidokat PCR alapú klónozással hoztuk létre egy teljes hosszúságú eger cortactint hordozó plazmid templátkénti felhasználásával. A C-terminális darabban az W525K mutációt QuickChange módszerrel készítettük.

A vad típusú Tks4 PX doménjét GST fúziós fehérjeként kódoló pGEX vektort Geiszt Miklós laboratóriumából szereztük be, majd QuickChange módszerrel hoztuk benne létre az R43W mutációt.

### 4.2. Sejtvonalak és tranziens transzfekciójuk

Az értekezésben bemutatott legtöbb kísérletet COS7 sejteken végeztük. Ezeket 10% magzati borjúsérumot és antibiotikumot (100 egység/ml penicillin, 50µ/ml sztreptomycin) tartalmazó DMEM-ben tartottuk fönt. EGF-stimuláció előtt egy éjszakával ezt sérummentes DMEM-re cseréltük. Ugyanígy elkészített tápoldatot használtunk a sejtmigrációs kísérletben alkalmazott HeLa sejtek tenyésztéséhez is.

A 293T sejteket Geiszt Miklós laboratóriumában tartották fenn, a fönt leírtakhoz hasonló körülmények között.

A különböző plazmidokkal való tranziens transzfekciót Lipofectamine reagens (Invitrogen) segítségével végeztük. Ehhez az első napon a legtöbb bemutatott kísérlet esetén 10cm-es petricsészébe kb.  $10^6$  sejtet tettünk ki. Másnap a következő transzfekciós elegyet állítottuk össze: 50 $\mu$ l Lipofectamine, 7 $\mu$ g DNS, 1ml Optimem. A sejteken Optimem-re cseréltük a médiumot, majd 45 perc eltelté után hozzájuk tettük a fent leírt szuszpenziót. Kb. négy és fél óra múlva szérumos DMEM-re cseréltük a tápoldatot. Ha a másnapi EGF-kezelés miatt ez szükséges volt, akkor újabb négy és fél óra eltelté után cseréltük szérumosra a tenyésztőközeget. Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz hatlyukú tenyésztőedényeket használtunk, 50 000 és 100 000 közötti sejtszámmal, és felületarányosan (1:3) kevesebb reagenst használtunk, mint a 10cm átmérőjű tenyésztőedények esetén.

### **4.3. RNS interferencia**

A Tks4 HeLa sejtekben való csendesítéséhez GCCUGAUACCAAUUGAUGAAUACUG szekvenciájú kis interferáló RNS-t használtunk, melyre az értekezésben „si2” néven hivatkozom. Kontrollként olyan RNS-t használtunk, amelynek szekvenciája négy „pontmutációt” tartalmaz az si2-höz képest. (GCCGGAUACCAAUUGAUUAACAUUG) Ennek nem volt hatása a Tks4 expressziójára (27. ábra) és – elméletileg, a szekvencia komplementaritása alapján – más gének expressziójára sem.

Az RNS-ek transzfekciójához Lipofectamine RNAiMAX reagenst használtunk. 10cm-es petricsészében növekvő HeLa sejteken 7,5ml Optimem-re cseréltük a médiumot, és a következő összetételű transzfekciós elegyet adtuk hozzájuk: 1,5ml Optimem, 360pmol RNS, 15 $\mu$ l transzfekciós reagens. Az RNS végkoncentrációja a sejteken így 40nM volt. Négy és fél óra eltelté után szérumos DMEM-re cseréltük a médiumot. Tapasztalataink szerint a Tks4 fehérje 48 órával a transzfekció után már csak nagyon kis mennyiségben található meg a sejtekben. (lásd 27. ábra)

### **4.4. Ellenanyagok**

A monoklonális anti-V5 ellenanyag oldott és agaróz gyöngyökhöz kötött formáját egyaránt az Invitrogen-től szereztük be. A foszotirozin elleni monoklonális ellenanyagok (4G10) és az EGF-receptor ellenes antitestek a Millipore-tól származtak. Az álatulnuk

használt, Fc-részükben nyúl-típusú monoklonális Src ellenanyagok a Cell Signaling Technology termékei. Az egyes immunoblotok „loading”-kontrolljához használt aktin ellenanyagokat (Sigma-Aldrich termék) Geiszt Miklós laboratóriumából kaptuk. A PX domén lipid-kötésének vizsgálatához használt PIPStrip-ek előhívásához használt poliklonális anti-GST ellenanyagok a Santa Cruz Biotechnology cégtől származtak. Másodlagos ellenanyagként immunoblothoz toma peroxidázzal konjugált anti-egér, illetve anti-nyúl antitesteket (GE Healthcare), az immunfluoreszcens festésekhez pedig Alexa Fluor 488-cal jelölt anti-egér immunglobulint használtunk.

A poliklonális Tks4 antiszérumot laboratóriumunk számára egyedileg készítette a Thermo Fisher Scientific Inc. A Tks4 egy darabját (aa 23-430) GST-fúziós fehérjeként állítottuk elő és elküldtük a cég részére. A kiküldött fehérjével két nyulat oltottak be, majd az oltás előtti és utáni szérumokat visszaküldték. A kapott ellenanyagot ellenőriztük és mind immunoblotra, mind pedig immunprecipitációra alkalmasnak találtuk. A bemutatott kísérletekhez a G1679 jelű állatból származó, immunizáció előtti és utáni szérumot használtuk.

#### ***4.5. Immunprecipitáció és western blot***

A 10cm-es csészéken növekvő sejteket jéghideg PBS-sel való mosás után 1ml ún. harvest-pufferben tártuk föl. Ennek összetétele: 50mM Tris-HCl pH=7,4, 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 20mM NaF, 1mM EGTA, 1mM p-nitrofenil-foszfát, 10mM benzamidin, 25µg/ml leupeptin, 25µg/ml szója tripszin inhibitor, 1mM PMSF. Ezt a legtöbb esetben a foszfatázok gátlása végett 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-tal egészítettük ki. Föltárás után 14.000 fordulat/perc-en 10 percig 4°C-on centrifugáltuk a sejtízátumot, a törmelékek eltávolítása céljából.

Az anti-V5 immunprecipitációkhoz 50µl egyszer PBS-sel mosott anti-V5 agarózhoz adtunk 1ml sejtízátumot. Az anti-Tks4 immunprecipitációk 25µl protein A sepharose gyönggyel és 10µl anti-Tks4 szérummal (vagy kontrollként ugyan ennyi oltás előtti szérummal) készültek. Minden esetben 1 órán át forgattuk 4°C-on a mintákat. Utána négyszer 0,5% Triton-X-et tartalmazó, hűtött PBS-sel mostuk a gyöngyöket, majd SDS-mintapufferrel főztük őket.

A mintákat SDS tartalmú poliakrilamid-gélen választottuk el, amit azután nitrocellulóz membránra blottoltunk át. Az előhívás az előző pontban ismertetett

elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal történt. A detektálást ECL-reagenssel és fényérzékeny filmmel végeztük.

#### **4.6. Immunfluoreszcens festés**

A Tks4 és mutánsainak sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatához a COS7 sejteket alkohollal zsírtalanított és leégetett mikroszkóp fedőlemezekre ültettük ki. A sejtszám 50 000 és 100 000 között volt, mivel tapasztalataink szerint így a sejtek nagy része nem érintkezik más sejtekkel, ami lehetővé teszi a sejtsejeli membrán megfigyelését. A sejteket a megfelelő transzfekciók és kezelések után PBS-sel mostuk, 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk és 0,2% Triton-X tartalmú PBS-sel feltártuk. A blokkolás 10mg/ml BSA-val történt, amit az elsődleges (a bemutatott kísérletekben anti-V5), majd – mosás után – másodlagos (Alexa Fluor 488 anti-egér) ellenanyagok követtek. Ezután négyszer mostuk a sejteket PBS-sel, úgy hogy egyes kísérleteknél az utolsó előtti mosófolyadék a sejtmagokat festő DAPI-t is tartalmazta. A fedőlemezeket ezután Mowiol-lal tárgylemezekre rögzítettük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A bemutatott képeket Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük.

#### **4.7. GST fúziós fehérjék**

A GST fúziós fehérjéket *E. coli* baktériumokban termeltettük. A baktériumokat a tisztítást megelőző napon 50 ml ampicillin tartalmú tápoldatba (LB) oltottuk le és éjszakán át hagytuk őket 37°C-on növekedni. Másnap a tenyészetet 500ml ampicillin tartalmú tápoldatba oltottuk át és egy órai inkubáció után IPTG-vel indukáltuk a fúziós fehérjék expresszióját. Három óra eltelte után a baktériumokat lecentrifugáltuk (4500 fordulat/perc, 15 perc), majd 5ml jéghideg ún. Y-pufferben (1mM EDTA, 14,5mM benzamidin, 1% Triton-X, 10mM PMSF PBS-ben oldava) szonikálással tártuk fel a sejteket. A törmeléket centrifugálással (13000 fordulat/perc, 10 perc) távolítottuk el. A felülúszót 700µl glutation-agaróz gyöngy szuszpenzióhoz adtuk és 1 órán át 4°C-on kevertettük. A gyöngyöket ezután egyszer Y-pufferral majd kétszer PBS-sel mostuk, majd végül azonos térfogatú PBS-sel szuszpendáltuk.

A GST-PX domének gyöngyökről való eluálása céljából 1ml szuszpenziót 1ml redukált glutation tartalmú eluáló pufferrel (50mM pH=8,0 TRIS, 151,4mM NaCl,

5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol, 6mg/ml redukált glutation) egy órán át 4°C-on kevertettük. Ezután a felülúszót éjszakán át 1l PBS-ben 4°C-on dializáltuk. A fehérje termeltetés és eluáció sikerességét SDS poliakrilamid gélelektroforézis utáni Coomassie-festéssel ellenőriztük. A fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg.

#### ***4.8. In vitro lipid-kötés vizsgálata***

A vad típusú és R43W mutáns PX domének lipid-kötésének vizsgálatához az Invitrogen-től beszerzett PIP Strips™ membránokat használtuk, amelyekre a gyártó adott sorrendben pontonként 100pmol membránlipidet vitt föl (lásd 17. ábra). A membránokat 3% zsírsavmentes BSA-t tartalmazó TBS-T oldattal (10mM TRIS-HCl pH=8,0, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) blokkoltuk, majd ugyanilyen oldathoz tettük az eluált GST fúziós fehérje megfelelő mennyiségét és ezzel éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a lapokat. Másnap a membránt 3% zsírsavmentes BSA-val blokkoltuk, majd anti-GST elsődleges és tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyagokkal hívtuk elő. A detektáláshoz ECL-t (GE Healthcare) és fényérzékeny filmet használtunk.

#### ***4.9. Sejtmigráció vizsgálata Boyden-kamrás módszerrel***

A sejtmigráció vizsgálatához a Millipore által „QCM™ 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay” néven forgalmazott készletet használtuk. Ennek fő komponensei azok a betétek, amelyekbe a 8µm-es lyukakat hordozó membránok vannak beépítve. A készlet tartalmaz továbbá 24 lyukú sejtenyészítő lemezeket, sejtfestő oldatot és az annak kioldásához szükséges detergens oldatot. A felhasználás nagyrészt a gyártó utasításai szerint történt. A kísérlet részletes leírása megtalálható az Eredmények című fejezet megfelelő részében.

## 5. Eredmények

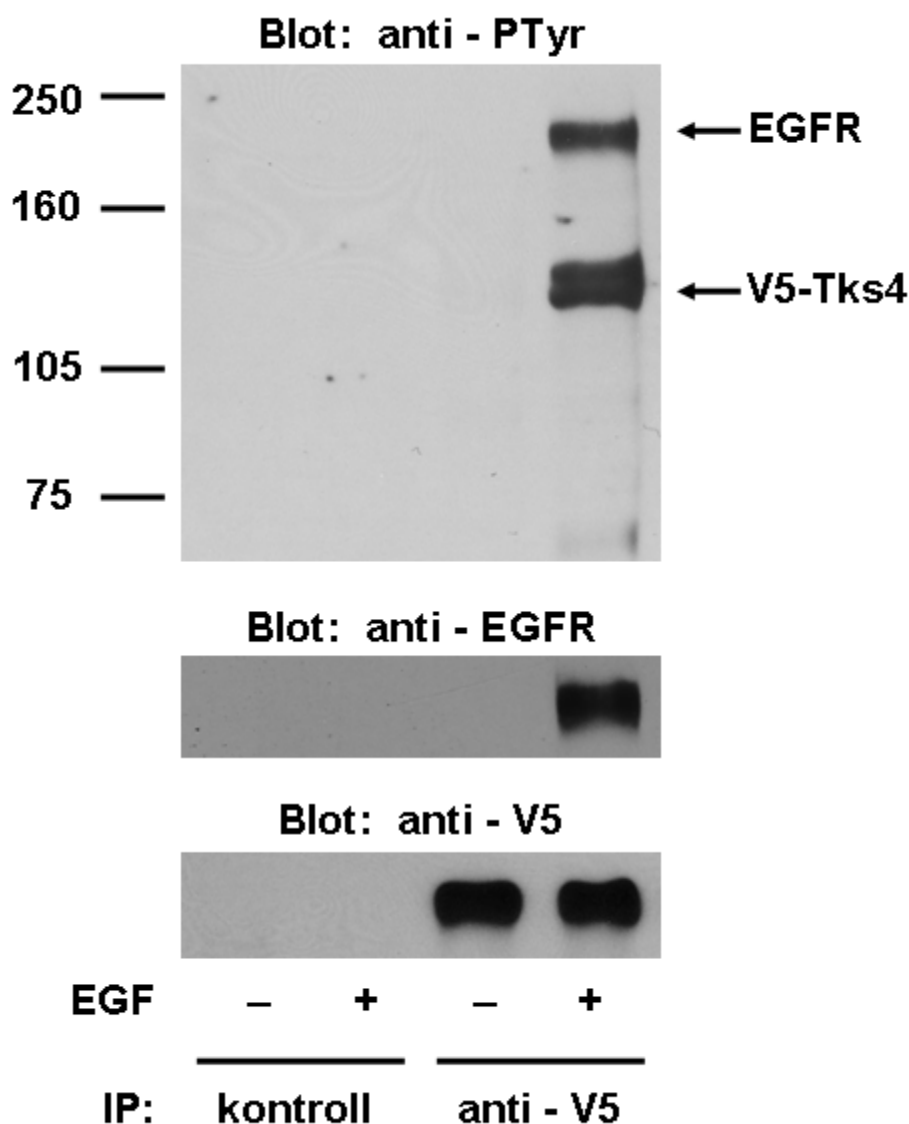
### 5.1. A Tks4 EGF-kezelés hatására foszforilálódik és asszociálódik az EGF-receptorral

Geiszt Miklós munkacsoportjának azon megfigyelése, miszerint a Tks4 EGF-kezelés hatására a membránhoz transzlokálódik és csendesítése gátolja a növekedési faktor által kiváltott membrán-fodrozódást (ún. „ruffling”-ot) [9], felvetette annak a lehetőségét, hogy ez az állványfehérje valamilyen módon szerepelhet az EGF-receptor jelátviteli mechanizmusában.

Ismert tirozin-kináz szubsztrátról lévén szó, az ezirányú vizsgálódás első logikus lépése annak ellenőrzése volt, hogy EGF-kezelés hatására vajon foszforilálódik-e tirozinon a Tks4 fehérje.

Vizsgálati rendszerül a laboratóriumunkban rutinszerűen tenyésztett, EGF-re jól reagáló COS7 sejt vonalat választottuk, melyeket V5-Tks4 plazmid-konstrukcióval transzfektáltunk. A transzfekció utáni éjszakán át szérumentes tápoldatban tartottuk a sejteket, hogy az EGF-kezelést ne zavarják meg a szérumban található egyéb növekedési faktorok. Másnap az EGF-kezelést 10 percig végeztük, mivel tapasztalataink szerint az aktivált EGF-receptor által kiváltott foszforilációs események nagy része ennyi idő alatt lezajlik. A kezelési idő lejártá után a sejteket azonnal jégen lehűtöttük és gyors, jéghideg PBS-sel történő mosás után föltártuk. A sejtörmelék lecentrifugálása után a felülúszóból anti-V5 agaróz szuszpenzió segítségével immunprecipitációt végeztünk. Egy óra eltelté után a gyöngyöket megmostuk, majd SDS-mintapufferrel főzve eluáltuk róluk a megkötött fehérjéket. A mintákat 10%-os poliakrilamid gélen választottuk el, amit azután nitrocellulóz lapra blottoltunk. A membránt anti-foszfotirozin ellenanyaggal hívtuk elő. A V5-Tks4 konstrukció kifejeződésének ellenőrzése végett a membránt az ellenanyagok lemosása után újra előhívtuk anti-V5 ellenanyaggal (9. ábra).

Amint az ábrán látható, az alkalmazott EGF-kezelés hatására a Tks4 fehérje foszforilálódott.



**9. ábra.** A V5-Tks4 EGF-kezelés hatására foszforilálódik és összekapcsolódik az EGF-receptorral. COS7 sejtekben V5-Tks4-et overexpresszáltunk, majd az éjszakán át szérummentes környezetben tartott sejteket az ábrán jelölt pontok esetén 10 percig EGF-fel kezeltük. A V5-Tks4-et immunprecipitáltuk és anti-foszfotirozin western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációs állapotát (felső panel). A membránt anti-EGF-receptor ellenanyaggal is előhívtuk, bizonyítandó, hogy az anti-foszfotirozin bloton kb. 170kDa-nál megfigyelhető jel az EGF-receptornak felel meg. (középső panel) A V5-Tks4 expresszióját anti-V5 ellenanyaggal mutattuk ki. (alsó panel) Kontrollként ellenanyagmentes gélyöngyökkel is elvégeztük a kísérletet.

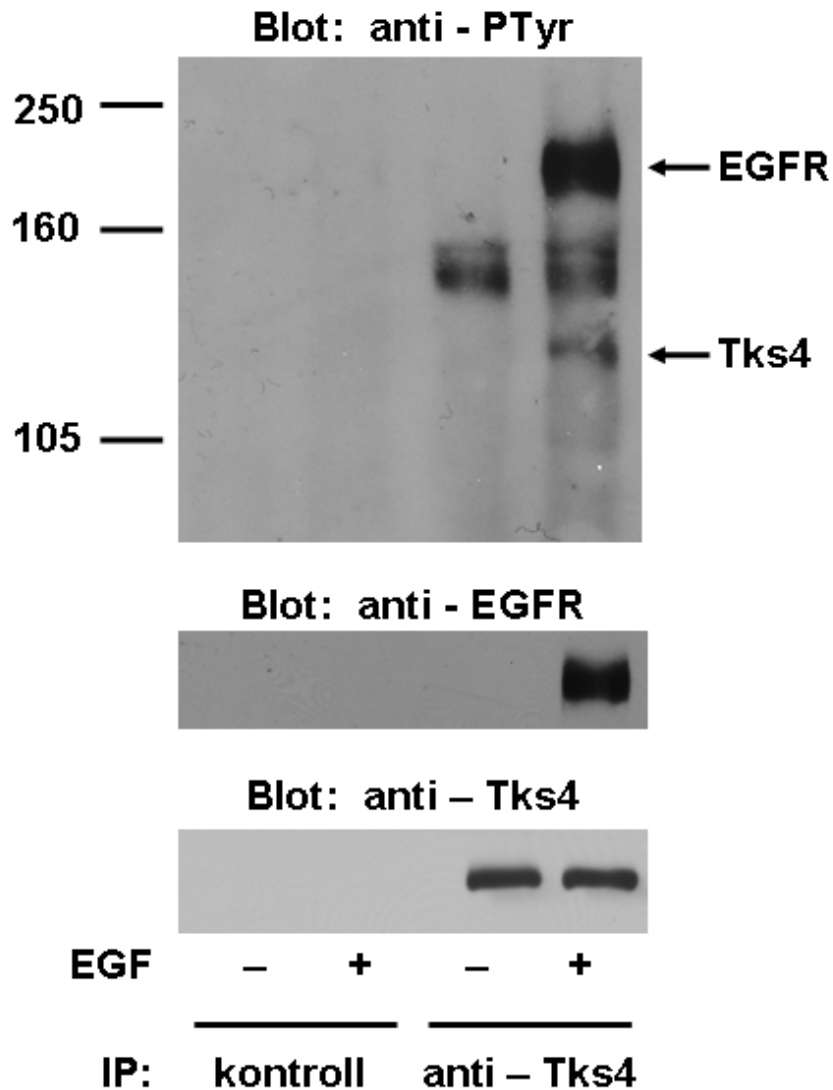
Érdekes módon a V5-Tks4 120 kDa-os csíkjá fölött, kb. 170 kDa-nál is látható volt egy foszfoproteinnek megfelelő jel, ami a későbbi kísérletek során is gyakran reprodukálódott. Mivel ez a molekulatömeg megfelel az EGF-receptor molekulatömegének, és tapasztalatból tudjuk hogy EGF-kezelt COS7 sejtekben az EGF-receptor az egyik legerősebb foszfotirozin jelet adó fehérje, feltételezhető volt,

hogy ez a csík az auto-foszforilálódott receptornak felel meg. Ezt sikerült bizonyítanunk a nitrocellulóz membrán anti-EGF-receptor ellenanyaggal való előhívásával.

Később, amikor már rendelkezésünkre állt a laboratóriumunk számára készített specifikus Tks4 antiszérum, megismételtük a fenti kísérletet a fehérje overexpressziója nélkül is. A kísérlet körülményei – a transzfekciós lépés kihagyásától eltekintve – a fent leírtakkal megegyeztek. Az immunprecipitációhoz protein A sepharose gyöngyöket és Tks4 szérumot használtunk, az immunprecipitációs kontrollok pedig azonos mennyiségű, immunizálás előtti szérum felhasználásával készültek. A kísérlet eredménye gyakorlatilag az overexpresszált V5-Tks4-nél tapasztaltakkal megegyező volt (10. ábra). (A Tks4-immunprecipitátumokban EGF-kezeléstől függetlenül megjelenő kb. 150kDa-os foszfoproteint egyelőre nem sikerült azonosítani.) A Tks4 overexpressziója tehát nem befolyásolta jelentősen az állványfehérje viselkedését a vizsgált rendszerben.

A Tks4 tehát EGF-kezelés hatására rövid idő alatt foszforilálódik és asszociálódik az EGF-receptorral. Ennek alapján valószínű, hogy annak közvetlen közelében, a jelátviteli út kezdetén tölthet be valamilyen funkciót. Már itt meg kell azonban jegyezni, hogy későbbi kísérleti eredményeink szerint a Tks4 és az EGF-receptor közötti kapcsolat nagy valószínűség szerint nem közvetlen.





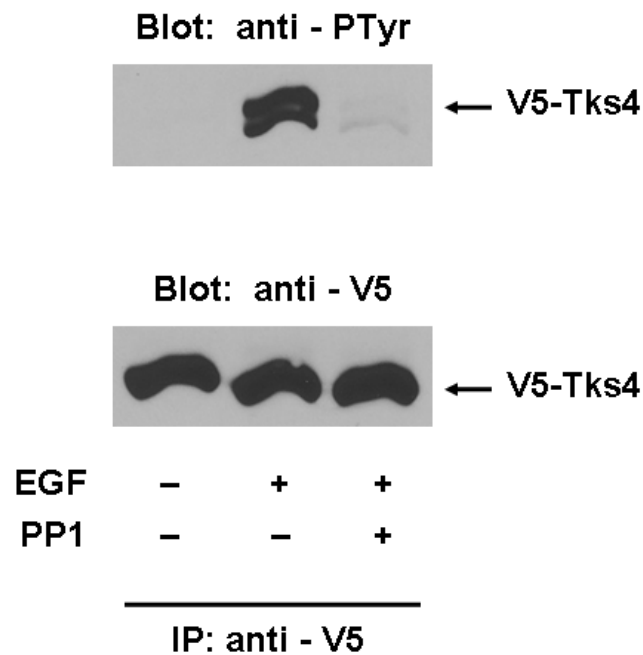
**10. ábra.** Az endogén Tks4 az overexpresszállhoz hasonlóan viselkedik EGF-fel kezelt COS7 sejtekben. COS7 sejteket éjszakán át szérummentes körülmények között tartottunk, majd a jelölt pontoknál 10 perces EGF-kezelést alkalmaztunk. A sejtek feltárása után a lizátumból Tks4 antiszérum, illetve – kontrollként – preimmun szérum segítségével immunprecipitációt végeztünk. Poliakrilamid SDS-gélelektroforézis után western blot-ot készítettünk először anti-foszfotirozin, majd – az előző ellenanyag eltávolítása után – EGF-receptor ellenanyaggal, végül pedig az immunprecipitációhoz is használt Tks4 antiszérummal.

## ***5.2. A Tks4-et EGF-stimulus hatására az Src nem-receptor tirozin-kináz foszforilálja***

Irodalmi adatokból tudható, hogy a Tks4 az Src nem-receptor tirozin-kináz szubsztrátja [8], mint ahogy az is hogy ez a kináz az EGF jelpálya során aktíválódhat [137]. A legvalószínűbb tehát, hogy a Tks4 megfigyelt foszforilációjáért ez a kináz – vagy inkább kináz család – a felelős. Kísérleti adatok hiányában azonban nem zárható ki, hogy maga az EGF-receptor vagy valamely más EGF-hatásra aktíválódó enzim katalizálja a reakciót.

Annak vizsgálatára, hogy valóban az Src foszforilálja-e a Tks4-et EGF-kezelés után, első körben a kináz szelektív gátlószerét, a PP1-et [138] használtuk. Az előző fejezetben leírt alapkísérlethez hasonlóan itt is V5-Tks4 konstrukcióval transzfektált COS7 sejteken végeztük a kísérletet. Az éjszakán át szérummentes közegben tartott sejtek közül egy csészényit 20 $\mu$ M koncentrációjú PP1-gyel 1 órán át előinkubáltuk, majd ezt és még egy sejtcsoportot 10 percig 100ng/ml EGF-fel kezeltünk. A Tks4 foszforilációját immunprecipitációval és anti-foszfotirozin immunoblottal vizsgáltuk.

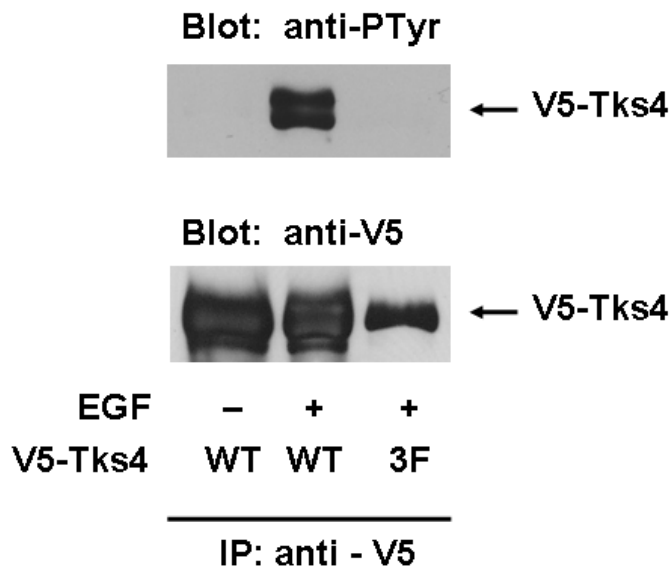
Amint a 11. ábra mutatja, a PP1 előkezelés szinte teljesen megakadályozta a Tks4 EGF-kezelés hatására bekövetkező foszforilációját.



**11. ábra. A PP1 Src inhibitor gátolja a Tks4 EGF-kezelés hatására történő foszforilációját.** V5-Tks4-gyel transzfektált COS7 sejteket szérummentes médiumban tartottunk éjszakán át. Az egyik kísérleti pont esetében 1 órási PP1 előkezelést alkalmaztunk a 10 percig tartó EGF-stimuláció előtt. A sejtek feltárása után anti-V5 immunprecipitációt, majd anti-foszfotirozin és anti-V5 western blot-ot végeztünk.

Az irodalomból ismert, hogy az Src három helyen, mégpedig a 25-ös, 373-as és 508-as tirozinokon foszforilálja a Tks4-et [8]. Az Src általi foszforiláció további bizonyítása céljából ezért ezt a három aminosavat fenilalaninra cseréltük a V5-Tks4 konstrukciónkban, és ezzel is elvégeztük a kísérletet. Anti-foszfotirozin immunoblottal kapott eredményeink szerint a három tirozinon mutációt hordozó fehérje nem foszforilálódik kimutatható módon EGF-kezelés hatására, ami szintén megerősíti azt a feltételezésünket, hogy az Src a Tks4 foszforilációjáért felelős kináz az általunk használt kísérletes rendszerben.

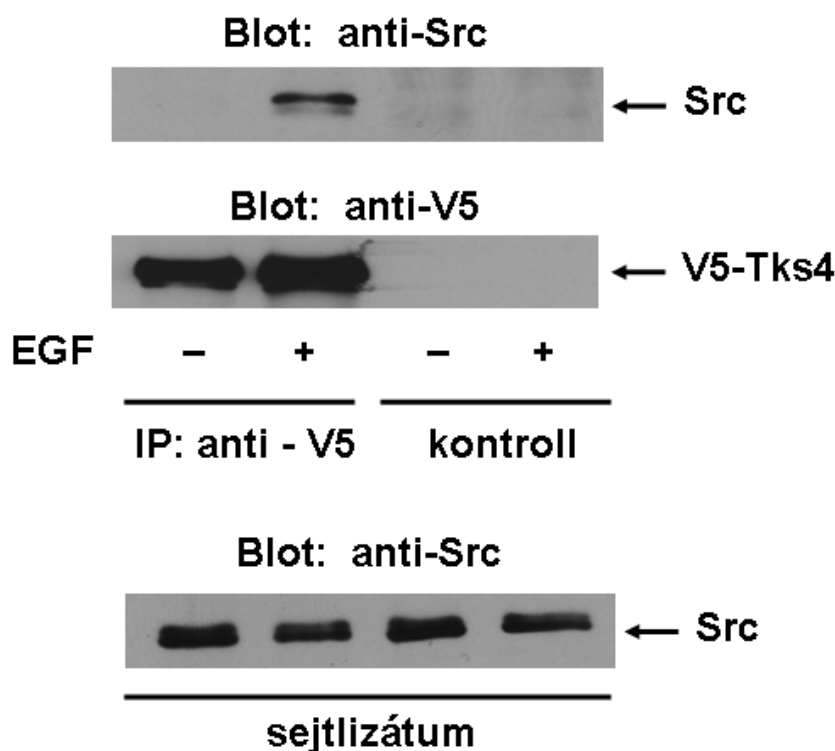
Meg kell jegyezni, hogy a foszforilációs mutáns (3F) Tks4 expressziója – ismeretlen okból – minden kísérletben alacsonyabb volt, mint a vad típusú fehérjéé. A kifejeződő fehérje mennyiségét azonban elegendőnek találtuk ahhoz, hogy esetleges foszforilációját detektálhassuk.



**12. ábra.** A Tks4 az Src ismert foszforilációs helyein foszforilálódik EGF-kezelés után. COS7 sejteket vad típusú (WT), illetve olyan V5-Tks4 konstrukcióval transzfektáltunk, melyben az Src által foszforilált három tirozin (25, 373, 508) kodonja helyett fenilalanint kódolóak vannak („3F”). A sejteket éjszakán át szérumentes médiumban tartottuk, majd 10 percig EGF-fel kezeltük. Feltárás és anti-V5 immunprecipitáció után SDS gélelektroforézist és anti-foszfotirozin western blot-ot végeztünk. A nitrocellulóz membránt az ellenanyagok eltávolítása után anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk.

### 5.3. Az Src EGF-kezelés hatására összekapcsolódik a Tks4-gyel

Mivel az Src tirozin-kináz SH3- vagy SH2 doménjével gyakran erősebben és tartósabban összekapcsolódik a szubsztrátjával mint azt a katalizált reakció feltétlenül megkívánná, kíváncsiak voltunk, hogy a Tks4 esetén is kialakul e ilyen jellegű kapcsolat. Ennek vizsgálatához V5-Tks4 konstrukciókkal COS7 sejteket transzfektáltunk, majd éjszakán át szérumentes környezetben hagytuk őket. Másnap a sejtek egy részét a szokásos koncentrációban 10 percig EGF-fel kezeltük. A kezelt és a kezeletlen sejtek kivonatából anti-V5 immunprecipitációt és anti-Src immunoblottot végeztünk. Feltételezésünknek megfelelően megjelent az Src tirozin-kináz az EGF-fel kezelt mintákban (13. ábra). Ezt a membránt később anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk, hogy a V5-Tks4 egyenlő kifejeződését ellenőrizzük. Ezen kívül az immunprecipitációhoz használt sejtlizátumok Src tartalmát is vizsgáltuk megfelelő ellenanyaggal, hogy a kináz mennyiségének azonos voltáról meggyőződhesünk.



**13. ábra. A Tks4 és az Src EGF-kezelés hatására összekapcsolódik.** V5-Tks4-et overexpresszáltunk COS7 sejtekben, majd szérumentesen tartottuk őket éjszakán át. Másnap a jelölt pontoknál 10 perces EGF-kezelést alkalmaztunk, majd immunprecipitációt végeztünk V5-ellenanyaggal. A mintákat poliakrilamid gélen elválasztottuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk és anti-Src ellenanyaggal hívtuk elő. Az antitestek eltávolítása után a membránt anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk. Az alsó panel azt demonstrálja, hogy a sejtkivonatokban az Src kináz egyenlő koncentrációban volt jelen.

Bár a fenti kísérlet nem nyújt felvilágosítást arról, hogy az Src és a Tks4 kapcsolatát a fehérjék mely doménjei vagy más szerkezeti elemei közvetítik, a fehérjék szerkezetének ismeretében a legvalószínűbb, hogy az Src SH3 doménje kapcsolódik a Tks4 valamely prolin-gazdag régiójához. Mivel az irodalomból ismert, hogy az Src SH2 doménje a foszforilált EGF-receptorhoz képes kötödni [139], elképzelhető, hogy ez a nem-receptor tirozin-kináz részt vesz a Tks4 és az EGF-receptor között megfigyelt kapcsolat kialakításában is.

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

Jól ismert, hogy EGF-stimulust követően a PI3-kináz aktiválódik és a membránban kialakítja 3-as helyen foszforilált inozitol-lipid termékeit [140]. Tekintve, hogy a Tks4

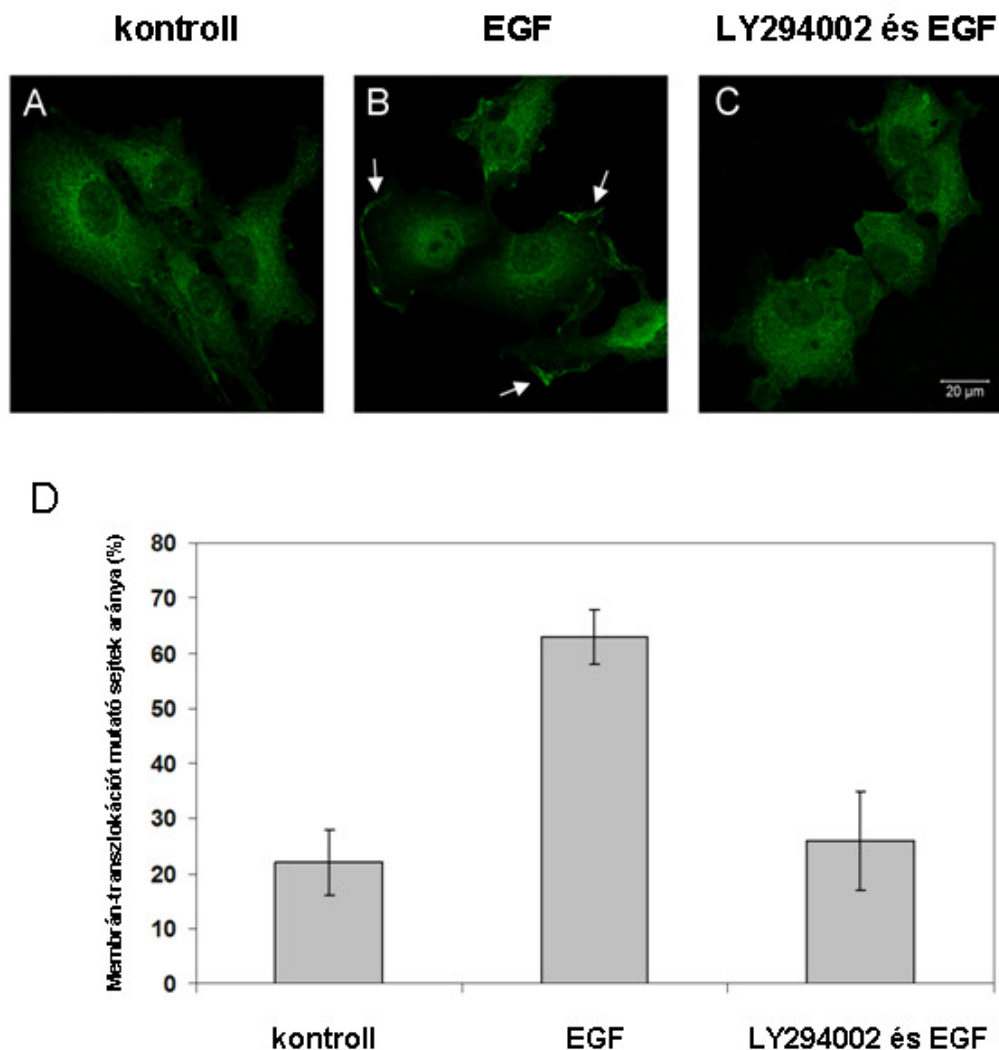
PX doménje valószínűleg éppen ilyen membránlipidek kötésére alkalmas (lásd a Bevezetés című fejezetet), megvizsgáltuk, hogy a PI3-kináz aktivitása szükséges-e az állványfehérje EGF-kezelést követő membrán-transzlokációjához. Ehhez V5-Tks4 plazmiddal transzfektált COS7 sejteket használtunk, melyek közül egy sejtcsoportot az EGF-kezelést megelőzően a PI3-kináz specifikus gátlószerével, LY294002-vel előkezeltünk. A sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően anti-V5 ellenanyaggal immuncitokémiai festést végeztünk. Fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálva a sejteket megfigyeltük, hogy míg nyugvó sejtekben a Tks4 főként diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutat, az EGF-kezelt sejtekben jelentősen feldúsul a sejtmembrán alatti régióban is. Konfokális mikroszkóppal jól kimutatható volt, hogy a Tks4 sok helyen a növekedési faktor kezelés hatására kialakuló, aktinban gazdag sejtshéli fodrozódásokba lokalizálódik. Az LY294002-vel előkezelt sejtek esetén azonban a membrán-transzlokáció nagyrészt elmaradt (14. ábra).

Az eredmények számszerűsítése végett a kísérletet többször megismételtük és minden egyes kísérleti pontnál 100-100 sejt mikroszkópos vizsgálatával meghatároztuk a Tks4 membrán-transzlokációt mutató sejtek arányát. Ennek eredménye alátámasztotta első megfigyelésünket, miszerint a PI3-kináz gátlása gátolja a Tks4 membrán-kötését (14. ábra / D).

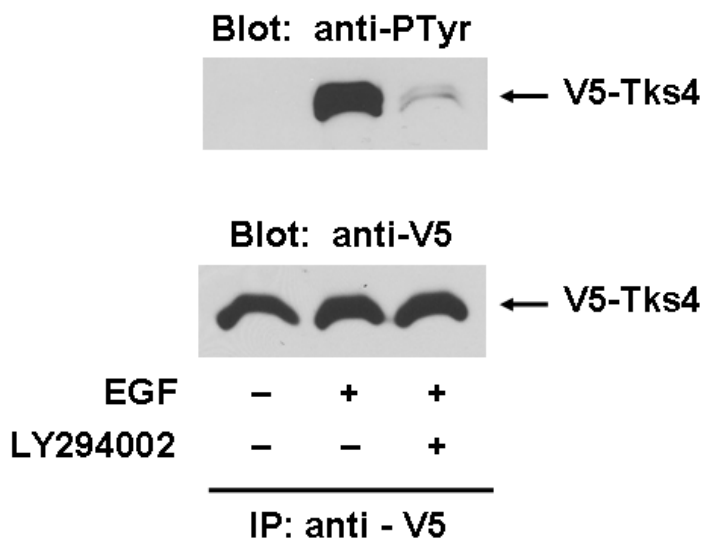
Mivel eddigi kísérleteink szerint az Tks4 foszforilációjának helye a sejtmembrán, megvizsgáltuk azt is, hogy a membrán-transzlokáció LY294002-vel való gátlása vajon megakadályozza-e ezt az eseményt. Ennek céljából COS7 sejteket a fenti kísérlethez hasonlóan kezeltünk és immunprecipitációt követő anti-foszfotirozin immunoblottal vizsgáltuk a fehérjék foszforilációját. Amint azt a 15. ábra mutatja, a PI3-kináz gátlószerrel előkezelt sejtekben a Tks4 csak igen kis mértékben foszforilálódott, ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy az állványfehérje foszforilációja a membrán közelében, tehát minden bizonnyal a transzlokáció után történik meg.

A PX domén szerepének további vizsgálatához a Geisz Miklós munkacsoportjától kapott R71,94L mutáns V5-Tks4 konstrukciót használtuk. Az ezen plazmid alapján termelődő Tks4 PX doménjében két, az irodalmi adatok alapján [17,141,142] a lipid-kötéshez nélkülözhetetlen pozitív töltésű arginin helyett töltés nélküli leucin található.

(A 94-es arginint a 2. ábra „Arg<sup>4,5-hydroxyl</sup>”-ként mutatja, a 71-esnek nincs megfelelője az ott bemutatott p40<sup>phox</sup>-ban.)



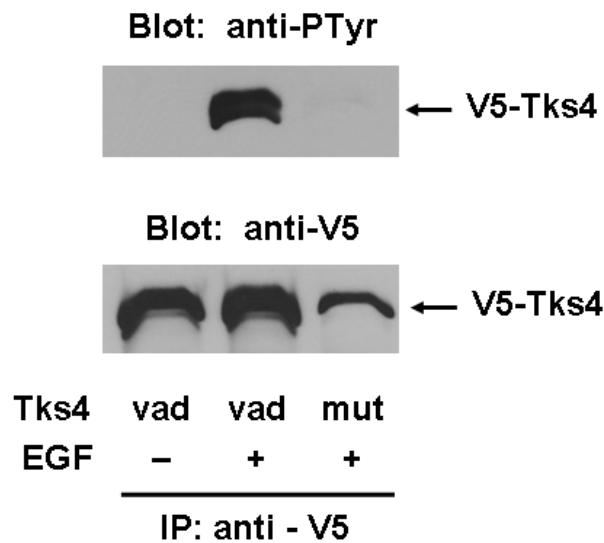
**14. ábra.** Az PI3-kináz gátlása megakadályozza a Tks4 EGF-hatásra bekövetkező membrán-transzlokációját. COS7 sejteket fedőlemezekre ültettünk és V5-Tks4-gyel transzfektáltunk. Éjszakán át szérumentesen tartottuk őket, majd egy pontot csak EGF-fel egy másikat pedig először LY294002-vel, majd EGF-fel kezeltünk. Minden esetben monoklonális anti-V5 és Alexa-488-cal konjugált anti-egér ellenanyagokkal végeztünk immuncitokémiai festést. (A) A Tks4 nyugvó sejtekben citoplazmatikus elhelyezkedést mutat. (B) EGF-kezelés hatására a Tks4 membránfodrokba transzlokálódik (fehér nyilak). (C) A PI3-kinázt gátló LY294002 megakadályozza a Tks4 transzlokációját. (D) A membrán-transzlokációt mutató sejtek aránya az összes sejt százalékában. A kísérletet összesen háromszor végeztük el, és minden kísérlet minden pontja esetén kb. 100 darab sejtet osztályoztunk. A hibaszávok a három kísérletből származó átlagok átlagának standard deviációját mutatják.



**15. ábra. A PI3-kináz gátlása gátolja a Tks4 EGF-hatásra bekövetkező foszforilációját.** COS7 sejteket V5-Tks4-gyel transzfektáltunk, majd szérumban tartottunk egy éjszakán át. Egy sejtcsoportot LY294002 előkezelés után, a másikat ennek kihagyásával EGF-fel kezeltünk 10 percig, majd a sejteket feltártuk és az így nyert kivonatból anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk. A mintákat SDS-gélelektroforézis után nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit először anti-foszfortirozin, majd anti-V5 ellenanyagokkal hívtunk elő.

A kísérlethez három sejtcsoportot használtunk, melyből kettőt vad típusú, egyet pedig a fent említett mutáns V5-Tks4-et kódoló plazmiddal transzfektáltunk. A sejteket ezután a szokásos módon szérumban tartottuk, majd – a kontroll kivételével – 10 perces EGF-kezelésnek vetettük alá őket. Anti-V5 immunprecipitáció után gélelektroforézist és anti-foszfortirozin immunoblottot végeztünk. Ennek eredménye szerint a lipid-kötésre képtelen R71,94L mutáns Tks4 foszforilációja szinte teljesen elmaradt (16. ábra). A membránt az ellenanyagok eltávolítása után anti-V5 antitesttel előhívva feltűnt, hogy a mutáns fehérje kisebb expressziót mutat, ami a kísérlet ismétléseinek során is reprodukálódott. Ennek oka feltehetően a fehérje hajtogatódásának („foldingjának”) zavara, ami annak gyorsabb lebomlásához vagy tritonnal nem oldható aggregátumba kerüléséhez vezet. (Lásd még 5.6) Mindazonáltal denzitometriás méréseink szerint a mutáns fehérje a vad típusú kb. 30%-ának megfelelő mennyiségben jelen van az immunprecipitátumban, így egyedül ezzel nem magyarázható a foszforilációs jel szinte teljes hiánya. Valószínű tehát, hogy ez a mutáns nem tud a membránhoz horgonyozni, és ezért tirozin-foszforilációja is elmarad.





**16. ábra. A PX domén mutációja megakadályozza a Tks4 foszforilációját.** Két csészényi COS7 sejtet vad típusú, egyet pedig a PX domén lipid-kötését elrontó R71,94L mutációt hordozó V5-Tks4 konstrukcióval transzfektáltunk. A sejteket éjszakán át szérumentes körülmények között tartottuk, majd a jelölt pontoknál 10 perces EGF-kezelést alkalmaztunk. A sejteket feltártuk és anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk a lizátumokból. A mintákat poliakrilamid gélen elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blottoltunk, amit azután anti-foszfotirozin, majd anti-V5 ellenanyaggal hívtunk elő.

### 5.5. A *Tks4 R43W* mutánsa nem képes membránlipidek kötésére

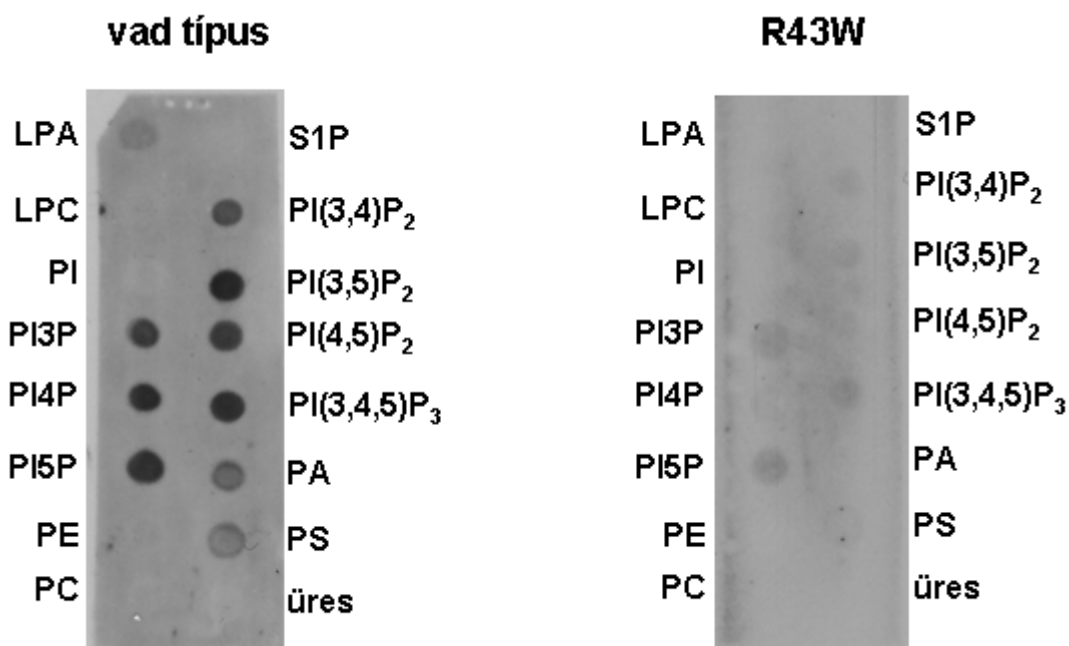
Frank – ter Haar szindrómában szenvedő betegek vizsgálata során Iqbal és munkatársai kimutatták, hogy a 13 általuk vizsgált családból 7-nél a *Tks4* génje mutációt szenvedett [129]. 6 család esetén a mutáció gyakorlatilag a *Tks4* fehérje teljes hiányához vezetett, egy esetben azonban egy pontmutációt találtak, ami a PX doménben található 43-as arginin triptofánra való cseréjét okozta (R43W mutáció). Mivel az előző fejezetben bemutatott kísérleteinkben azt figyeltük meg, hogy a *Tks4* membránkötésének megakadályozása – a PX domén mutációja vagy a PI3-kináz gátlása által – a fehérje foszforilációjának elmaradásához vezet, felmerült, hogy az R43W mutáció esetén is a lipid-kötés hiánya okozza a fehérje funkciójának kiesését.

A mutáns PX domén lipid-kötésének vizsgálatához egy, korábban már több munkacsoport által sikeresen alkalmazott [7-9,25] *in vitro* módszert választottunk. Ennek lényege, hogy a GST-fúziós fehérjeként előállított domént nitrocellulóz lapon gyárilag immobilizált lipidekkel inkubálják, majd a megkötött fehérjét GST-ellenes antitestekkel mutatják ki. Mivel a PX domén elsősorban foszforilált inozitol lipideket

ismer föl, a kísérlethez mi az Invitrogen által forgalmazott PIP Strip™ membránokat használtuk.

A kísérlethez először a mutáns PX domént kellett előállítanunk GST-fúziós fehérjeként. Ehhez a Geiszt Miklós munkacsoportja által rendelkezésünkre bocsátott GST-PX konstrukciót használtuk kiindulásul, melyben PCR-alapú módszerrel hoztuk létre az R43W mutációt. Ezután az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtaknak megfelelően *E. coli* baktériumokban termeltetett vad típusú és mutáns GST-PX doméneket glutation-agaróz gyöngyökhöz kötve tisztítottuk. A kísérlethez oldott fehérjére van szükség, ezért a GST-fúziós proteineket redukált glutation tartalmú pufferrel leoldottuk a gyöngyökről, majd PBS-ben éjszakán át dializáltuk. (A részleteket lásd az Anyagok és Módszerek című fejezetben.)

A GST-fehérje termelésének, tisztításának, valamint a dialízis sikerességének ellenőrzése végett a mintákat másnap poliakrilamid gélen elválasztottuk és Commassie-val láthatóvá tettük a fehérjéket. A dializált fehérjeoldatok koncentrációját Bradford-módszerrel megmértük, hogy azonos koncentrációban adhassuk őket a foszfolipideket hordozó membránhoz. A PIP Strip™ membránokat először 3% zsírsavmentes BSA-oldattal blokkoltuk, majd ehhez hozzátettük a vad típusú vagy mutáns PX domén oldatának megfelelő mennyiségét és éjszakán át 4°C-on ezzel inkubáltuk a lapokat. A következő napon a membránokat western blot-hoz hasonló, de blokkolóanyagként zsírsavmentes BSA-t használó eljárással, anti-GST ellenanyaggal hívtuk elő (17. ábra).



**17. ábra. A Tks4 PX doménjének R43W mutánsa nem köt lipideket.** A Tks4 PX doménjének vad típusú és R43W mutáns GST-fúziós formáját *E.coli* baktériumokban termeltettük, tisztítottuk, majd PipStrip™ membránokkal inkubáltuk. A megkötött fehérjéket anti-GST ellenanyaggal végzett, western blothoz hasonló eljárással hívtuk elő. LPA: lizo-foszfatisav, LPC: lizo-foszfatidil-kolin, PI: foszfatidil-inozitol és foszforilált származékai, PE: foszfatidil-etanolamin, S1P: szfingozin-1-foszfát, PA: foszfatidsav, PS: foszfatidil-szerin

A vad típusú PX domén lipid-kötése nagyrészt megfelelt a korábban Geiszt Miklós munkacsoportja által kapott profilhoz [9]. Eszerint a Tks4 PX doménje *in vitro* valamennyi, a membránon szereplő foszforilált foszfatidil-inozitol származékot képes megkötni. Kis mértékű kötés kimutatható volt a foszfatidsav és – az egyes kísérleteknél változó erősségben – a foszfatidil-szerin esetén is. Ezzel szemben az R43W mutációt hordozó mutánsnál nem volt megfigyelhető specifikus kötődés.

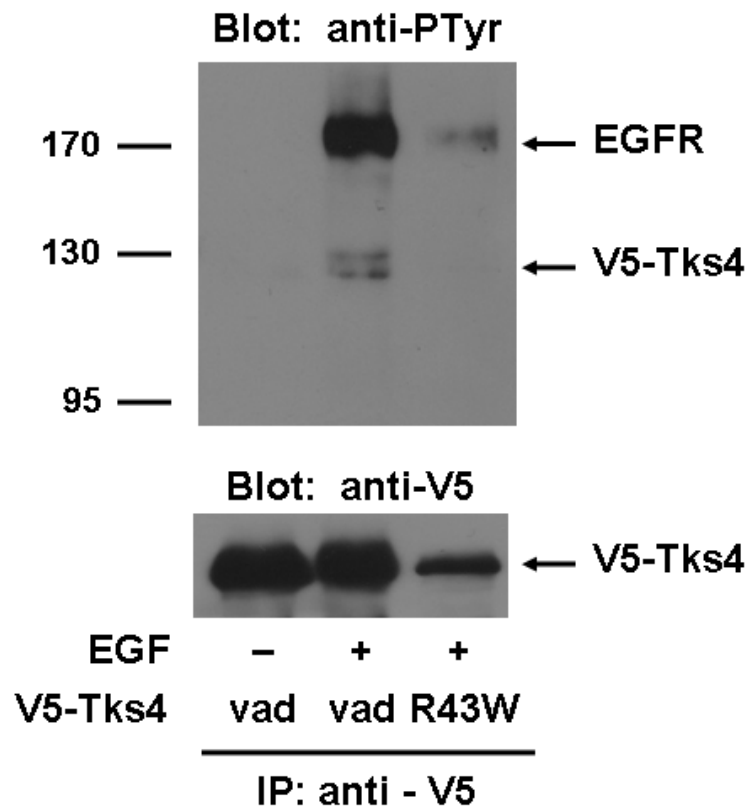
### 5.6. Az R43W mutáns a sejtekben aggregálódik

Az előző pontban bemutatott *in vitro* kísérletek szerint a Tks4 R43W mutánsa nem képes inozitol-lipidek kötésére. Kíváncsiak voltunk, hogy a PI3K gátlásához hasonlóan ez a mutáció is befolyásolja-e a Tks4 fehérje EGF-hatásra bekövetkező foszforilációját és membrán-lokalizációját.

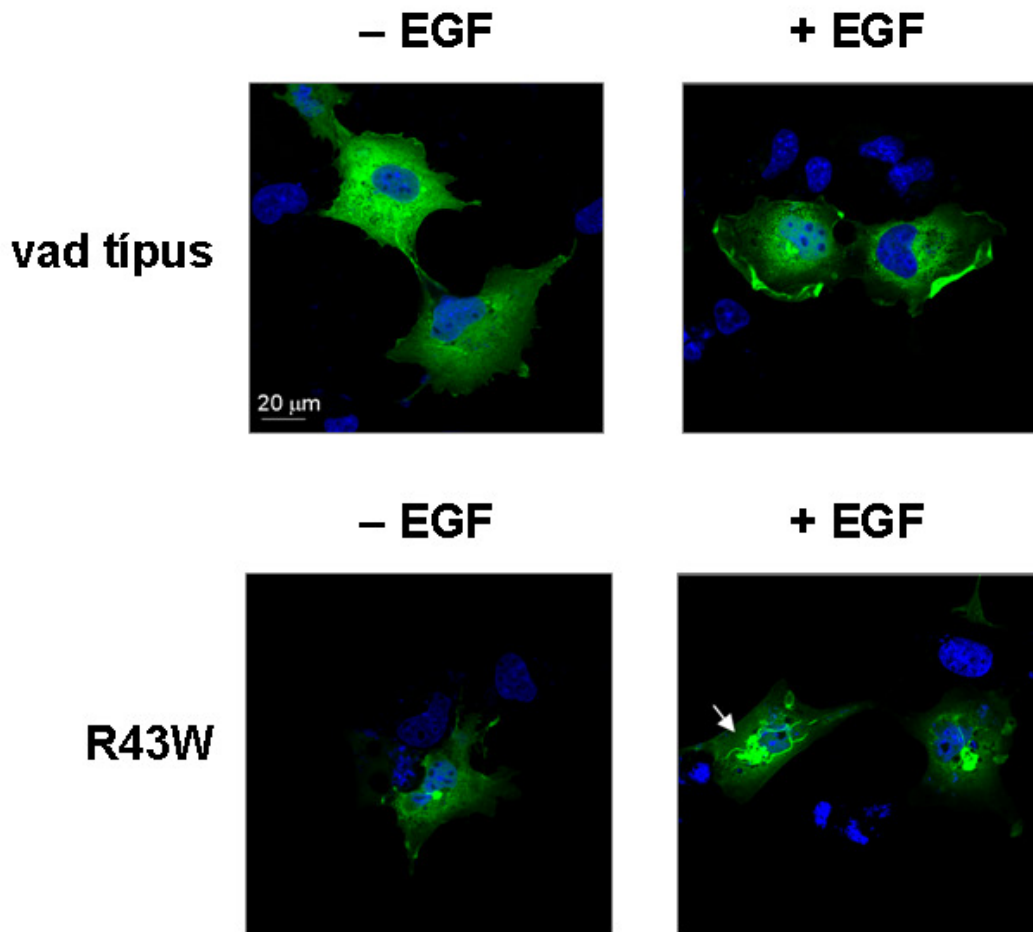
A foszforiláció érintettségének vizsgálatához 10cm-es petricsészére kiültetett COS7 sejteket transzfektáltunk vad típusú vagy R43W mutációt hordozó V5-Tks4

konstrukcióval. A sejteket a szokásos módon, éjszakán át szérumentes körülmények között tartottuk, majd – a kontroll sejtek kivételével – 10 percig EGF-fel kezeltük. A sejtek feltárása és a törmelék centrifugálása után anti-V5 agarózzal immunprecipitációt végeztünk. A mintákat poliakrilamid gélen való elválasztás után nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit azután először anti-foszfotirozin, majd anti-V5 ellenanyagokkal hívtunk elő (18. ábra). Az anti-V5-tel készült immunobloton feltűnt, hogy a mutáns fehérje mennyisége jóval kisebbnek látszik, mint a vad típusú fehérjéé. A különbség a kísérlet többszöri ismétlése során is fennmaradt. Denzitometriás mérések szerint az R43W mutáns expressziója átlagosan kb. 20%-a volt a vad típusú V5-Tks4-nek. Az anti-foszfotirozin immunobloton a Tks4 EGF hatására bekövetkező foszforilációja a mutáns fehérje esetén egyáltalán nem volt látható és az EGF-receptorral való asszociáció is jelentősen gyengült a vad típusúhoz képest. Mindazonáltal a fehérje expressziójának jelentős csökkenése miatt nem dönthető el egyértelműen, hogy ezt valóban a lipid-kötés hiánya okozza e.

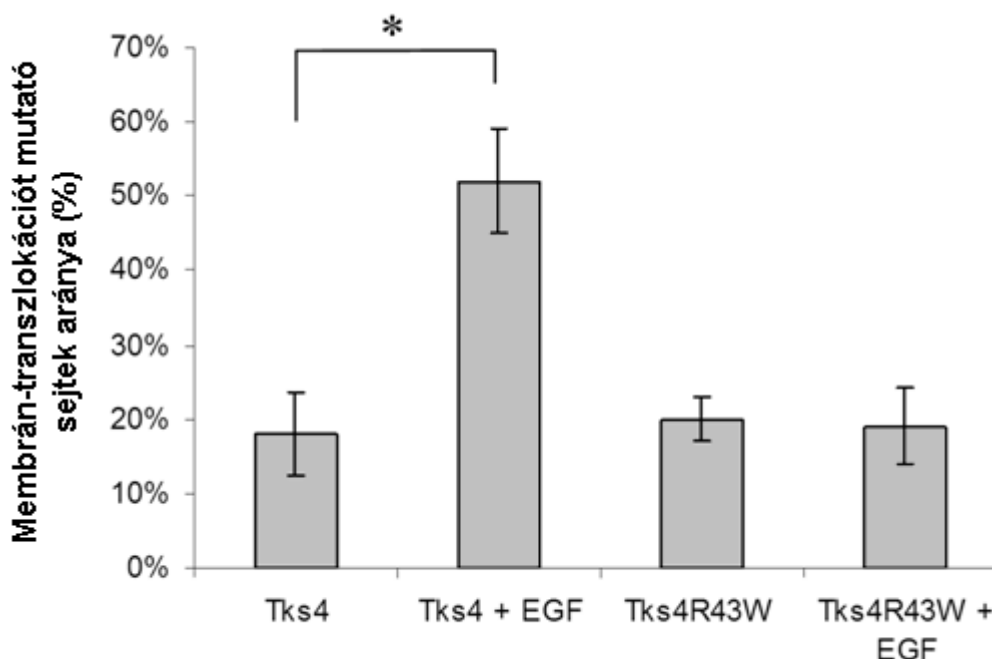
A Tks4<sup>R43W</sup> intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához mikroszkóp fedőlemezekre ültetett COS7 sejtekben expresszáltuk a vad típusú és a mutáns fehérjét. A sejteket szérumentes médiumban tartottuk éjszakán át, majd EGF-fel kezeltük őket. Mosás és fixálás után anti-V5 elsődleges, és Alexa 488 fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos ellenanyagokkal festettük a mintákat. A sejtmagok festéséhez DAPI-t használtunk. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken (19. ábra) látható, hogy a vad típusú fehérje a korábban megfigyeltnek megfelelően a sejt széléhez transzlokálódik EGF-kezelés hatására és nagy mennyiségben van jelen a kialakult membrán fodrokban. Ezzel szemben az R43W mutáns fehérje a legtöbb sejtben – EGF-kezeléstől függetlenül – furcsa, szálak szerkezetű képletekké csapzódott össze. Ezek a – laboratóriumunk által azóta aggreszómaként azonosított – képletek minden bizonnyal a mutáns fehérje hajtogatózavarai miatt alakulnak ki. (Részletesen lásd a Megbeszélés című fejezetben.) Mindazonáltal a mikroszkópos képek és a western blotos kísérletek (lásd 18. ábra) alapján úgy ítéltük, hogy elegendő oldott mutáns fehérje marad a sejtekben ahhoz, hogy a membrántranszlokációt értékelhessük. Ezért a kísérletet még kétszer megismételtük, és pontonként mindig legalább 100 sejtet értékelve meghatároztuk a membrán-transzlokációt mutató sejtek arányát. Amint azt a 20. ábra mutatja, a Tks4 R43W mutánsa nem transzlokálódott a membránhoz EGF-kezelés hatására.



**18. ábra. A Tks4 R43W mutánsának expressziója, foszforilációja és EGF-receptor asszociációja gyengébb.** COS7 sejtekben vad típusú illetve R43W mutáns V5-Tks4-et fejeztünk ki, majd a megfelelő pontokat 10 perces EGF-kezelésnek vetettük alá. A sejtek feltárása után anti-V5 immunprecipitációt végeztünk. A poliakrilamid gélen elválsztott mintákat nitrocellulóz lapra blottoltuk át, amit azután először anti-foszfortirozin, majd – az ellenanyagok lemosása után – anti-V5 ellenanyaggal hívtunk elő.



**19. ábra. A Tks4 R43W a sejtekben aggregálódik.** COS7 sejtekben a V5-Tks4 vad típusú vagy mutáns formáját fejeztük ki. Az éjszakán át szérumentesen tartott sejtek egy részét EGF-fel kezeltük, majd valamennyi mintát fixáltuk és anti-V5 ellenanyaggal festettük (zöld). A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá (kék). A jobb alsó ábrán látható fehér nyíl összecsapzódott V5-Tks4<sup>R43W</sup> fehérjékből álló aggregátumot mutat. A képek konfokális mikroszkóppal készültek.



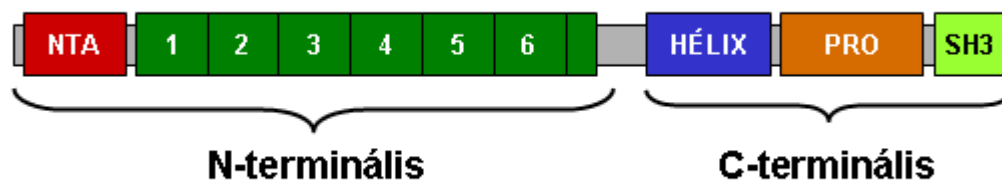
**20. ábra.** Az R43W mutáció megakadályozza a Tks4 EGF-hatásra bekövetkező membrán-transzlokációját. A V5-Tks4 vad típusú és R43W mutáns formáját fejeztük ki COS7 sejtekben. A sejteket éjszakán át szérumban tartottuk, majd – a kontroll pontok kivételével – 10 percig EGF-fel kezeltük. A sejteket anti-V5 ellenanyaggal fluoreszcensen festettük. Mikroszkóp alatt minden pont esetén legalább 100 sejt vizsgálatával meghatároztuk azon sejtek arányát, melyekben a Tks4 fehérje a membrán alatt dúsulást mutat. A kísérletet háromszor ismételtük meg. Ezen három kísérlet átlagának standard deviációját mutatják a hibásávok. A csillag (\*) szignifikáns különbséget jelöl ( $p < 0,005$ ).

### 5.7. A cortactin SH3 doménje képes a Tks4 kötésére

Geiszt Miklós és munkatársai megfigyelték, hogy EGF-fel kezelt HeLa sejtekben a Tks4 fehérje – a COS7 sejtekhez hasonlóan (lásd 14. ábra / B) – a membránfodrokba transzlokálódik és ott kolokalizációt mutat a cortactin fehérjével [9].

A cortactin az aktin-citoszkeleton fontos szabályozója, doménszerkezetét a 21. ábra mutatja. N-terminális részén egy rövid, negatív töltésű aminosavakból álló szakasz található, amely képes az Arp2/3 komplex aktiválására, és így elágazódó aktin-hálózat kialakulásának elősegítésére [143,144]. Ezt a domént egy hat és fél ismétlődésből álló F-aktin kötő szakasz követi, aminek szintén szerepe lehet a létrejövő aktin-hálózat stabilizálásában [144]. Ezután egy helikális szakasz, majd egy prolin-gazdag régió következik, melyet egy C-terminális SH3 domén követ. Az utóbbi két fehérjerész számos más fehérje kötésére képes, így valószínű hogy a cortactinnak adapter- vagy

állványfehérje szerepe is van. Ezen kívül a fehérje számos protein kináz – köztük az Src – szubsztrátja is, ami működésének szabályozásában lehet fontos [145,146].



**21. ábra. A cortactin doménszerkezete és felosztása N- és C-terminális darabokra.** A cortactin N-terminális részén lévő savas oldalláncú aminosavakban gazdag részét „NTA” felirat jelöli. (NTA: N-terminal acidic) Ez képes az Arp2/3 komplex kötésére és aktiválására, ami elágazódó aktin-hálózat kialakulását indukálja. A számok az F-aktin kötő régió ismétlődéseit jelölik. (Összesen hat és fél ilyen van a fehérjében.) Ezeket egy – predikciók szerint – helikális szakasz, majd egy prolin-gazdag régió és egy SH3 domén követi. A Tks4-gyel való kapcsolat vizsgálatához a fehérje jelölt N- és C-terminális részeit fejeztettük ki baktériumokban GST fúziós fehérjeként.

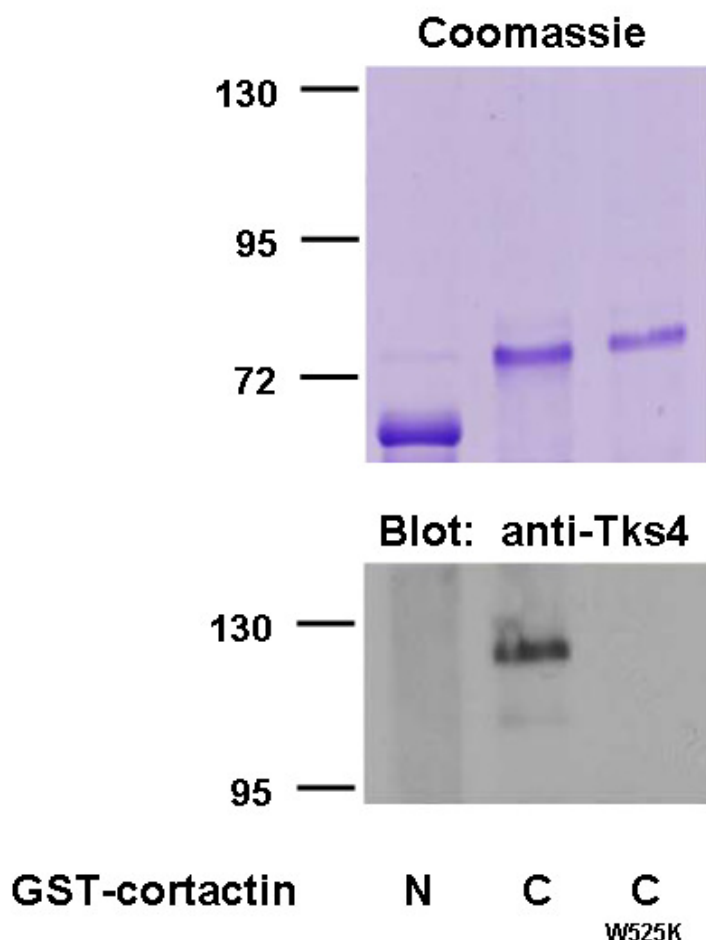
Geiszt Miklós laboratóriumának eredményei szerint a 293T sejtekben overexpresszált V5-Tks4 – EGF-kezelés nélkül, illetve az Src overexpressziójától függetlenül – koimmunprecipitálódik a cortactin-nal [9], kíváncsiak voltunk ezért, hogy kialakulhat-e közvetlen kapcsolat a két fehérje között.

Ennek bizonyítására a cortactin N- és C-terminális részét (lásd 21. ábra) GST fúziós fehérjeként expresszáltuk *E.coli* baktériumokban. A C-terminális résznek egy olyan mutánsát is elkészítettük, ahol az SH3 domén egy konzervált triptofánja helyett lizin szerepel (W525K), ami a domén ligand-kötését gátolja. (Ez az aminosav a 3. ábra 169-es triptofánjának felel meg, ami a poliprolin hélix egyik csavarulatát kötő hidrofób árok kialakításában vesz részt. A poláris, pozitív töltésű lizin ezt a kapcsolatot minden bizonnyal akadályozza.) A glutation-agaróz gyöngyökhöz kötött GST fúziós fehérjéket egy órán át 4°C-on 293T sejtek kivonatával inkubáltuk, majd a gyöngyöket Triton-X tartalmú jéghideg PBS-sel mostuk és SDS-mintapufferrel főztük. A Tks4 jelenlétét az egyes mintákban anti-Tks4 immunoblottal vizsgáltuk. A géltre fölvittünk valamennyi GST fúziós fehérjéből is mintát, hogy expressziójukat ellenőrizhessük. A gélnek ezen részét nem blottoltuk, hanem Coomassie festéssel tettük láthatóvá benne a fehérjéket.

Amint a 22. ábra mutatja, a cortactin – SH3 domént is hordozó – C-terminális része képes volt megkötni a Tks4-et, míg az N-terminális és az SH3 domént inaktíváló mutációt hordozó C-terminális darabok erre nem voltak képesek. Valószínű tehát, hogy



a cortactin és a Tks4 között közvetlen kapcsolat alakulhat ki a cortactin SH3 doménjének közvetítésével.

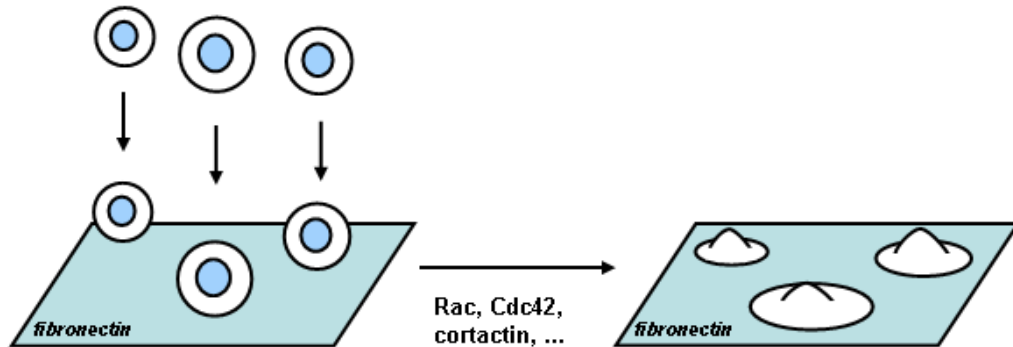


**22. ábra. A cortactin SH3 doménje köti a Tks4-et.** A cortactin N- és C-terminális részét, valamint az utóbbinak az SH3 domén ligandkötését gátló mutációt (W525K) hordozó változatát GST fúziós fehérjeként baktériumokban termeltettük. A fehérje expresszióját gélelektroforézist követő Coomassie festéssel ellenőriztük. (felső panel) Az egyes fehérjedarabokat hordozó gyöngyöket 293T sejtek kivonatával inkubáltuk, majd anti-Tks4 western blottot végeztünk (alsó panel).

### 5.8. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa sejtek szétterülését

Ha szuszpenzióban lévő sejteket fibronectinnel bevont fedőlemezre ültetünk, azok letapadnak, majd az integrinektől kiinduló jelátviteli folyamatok – elsősorban a Rac és a Cdc42 aktivitása – következtében sejtszéli aktin-polimerizáció indul meg és a sejtek szétterülnek [147] (23. ábra). Mivel ez a folyamat sok szempontból hasonló az EGF-kezelés hatására létrejövő membrán-fodrozódáshoz – amihez a Geiszt-munkacsoport eredményei szerint szükséges a Tks4 jelenléte – a laboratóriumaink közötti

együttműködés keretében megvizsgáltuk, hogy a Tks4 hiánya vajon befolyásolja-e a sejtek szétterülési képességét.



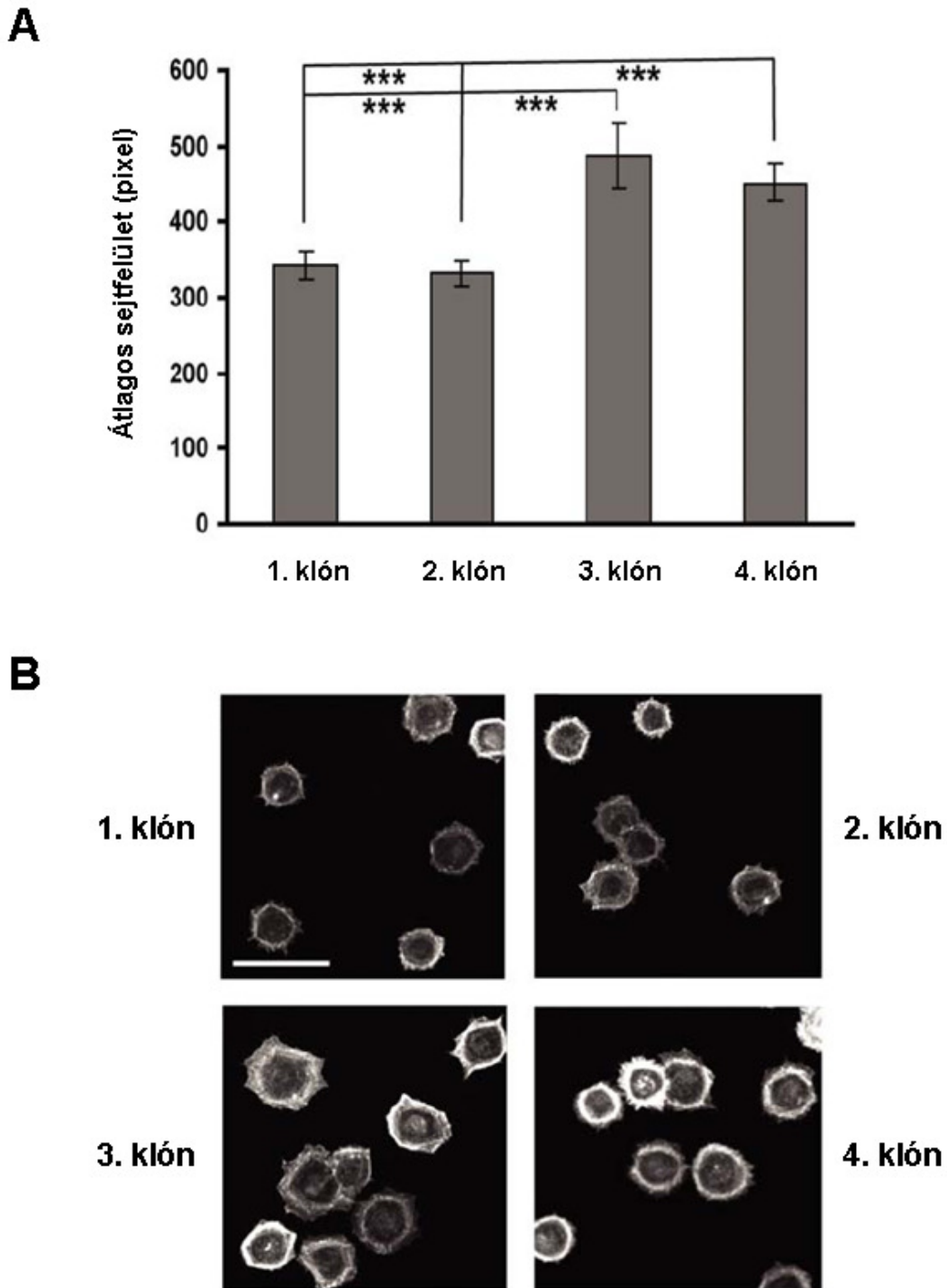
**23. ábra. A sejszétterülés vizsgálata.** A tripszinnel és EDTA-val szilárd alapjukról eltávolított sejteket fibronectinnel bevont mikroszkóp fedőlemezekre rétegezzük. A sejtek integrinjeik segítségével kitapadnak, majd – mivel a beinduló jelátviteli útvonal (többek között a Rac, Cdc42 és cortactin fehérjék közreműködésével) az aktin-polimerizáció aktiválásához vezet – a sejtek szétterülnek. A folyamatot a sejtek fixálása állítja le. (Ez a bemutatott kísérlet esetén 30 perc után történt.) Az aktin-citoszkeletont TRITC-falloidinnel festve láthatóvá tehetőek a sejtek és szétterültségük mértéke (technikailag a fényképen elfoglalt területük) számítógép segítségével meghatározható.

A kísérlethez Geiszt Miklós munkatársai által létrehozott és fenntartott HeLa sejtklónokat használtuk. Ezek közül kettő (az 1-es és 2-es számmal jelöltek) a Tks4-et csendesítő kis hajtűalakú RNS-t fejez ki egy stabilan transzfektált plazmidról. A másik két felhasznált sejtvonalon (3-as és 4-es számú klónok) az RNS-nek egy olyan módosított változatát expresszálja, ami már nem komplementer a Tks4 mRNS-ének szekvenciájával. Ezeket a sejteket a sejttenyésztések passzálásakor is használt tripszin-EDTA oldattal eltávolították szilárd alapjukról és egy órán át 37°C-on tripszin inhibitor tartalmú oldatban inkubálták őket, hogy esetlegesen sérült membránfehérjék regenerálódhassanak. Ezután a sejteket hatlyukú tenyésztőedény mélyedéseiben elhelyezett, fibronectinnel bevont fedőlemezekre rétegezték. Az edényeket 37°C-os sejttenyésztő termosztátban 30 percen át mozdulatlanul hagyták, majd paraformaldehiddel fixálva állították le a szétterülési folyamatot. A sejteket az aktin-citoszkeleton TRITC-falloidinnel való festésével tették láthatóvá.

A kísérlet kiértékelése a mi laboratóriumunkban történt. Fluoreszcens mikroszkóppal véletlenszerűen kiválasztott látótereket fényképeztünk le, úgy hogy minden kísérleti pont esetén legalább 200 sejtről nyerjünk képet. A kapott képeken az egyes sejtek

méretét az NIH (USA) által fejlesztett ImageJ nevű program segítségével határoztuk meg.

Amint a 24. ábra mutatja, a Tks4 csendesített sejtvonalak szétterülési képessége jelentősen kisebb volt a kontroll esetén mérténél.

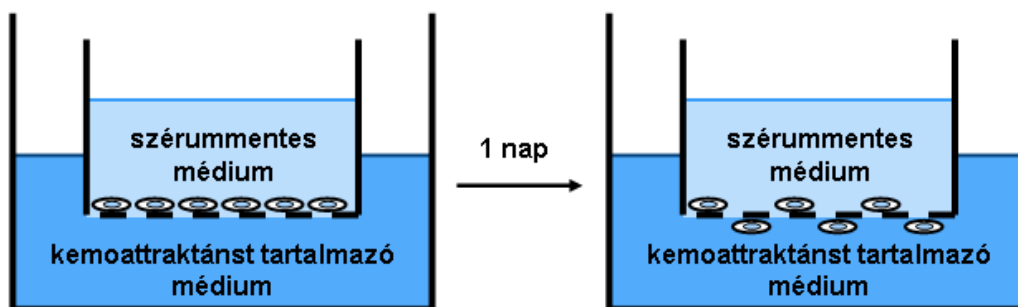


**24. ábra. A Tks4 csendesítése gátolja a sejtek szétterülését.** Tks4 csendesített (1. és 2. második klón) és kontroll (3. és 4. klón) HeLa sejtvonalakat fibronectinnel borított lemezen 30 percig hagyták szétterülni. (A) A fixált és TRITC-falloidinnel festett sejtek felületét számítógép segítségével határoztuk meg, pontonként legalább 200 sejt alapján. Az ábra hat kísérlet átlagát mutatja a standard hibákkal. A három csillag (\*\*\*) jelölés szignifikanciát jelöl:  $p < 0.001$  (B) Reprezentatív fénykép az egyes sejtklónok szétterültségéről. TRITC-falloidin festés. A fehér sáv  $20\mu\text{m}$ -nek felel meg.

### 5.9. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa-sejtek vándorlását

Mivel Geiszt Miklós munkacsoportjának – részben laboratóriumunkkal együttműködésben végzett – kísérleteinek eredményei arra utaltak, hogy a Tks4-nek szerepe lehet az aktin-citoszkeleton átrendeződésben, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a fehérjének van-e közvetlen szerepe a sejtek aktin-függő vándorlásában.

Ehhez Boyden-kamrás módszert választottunk, melynek lényege, hogy a sejteknek egy lyukacsos membránon át, kemotaktikus anyag grádiensének irányában vándorolnak. A vizsgálati idő (esetünkben 1 nap) eltelte után az átvándorolt sejtek mennyisége kvantifikálható. (25. ábra)



**25. ábra. Boyden-kamra felépítése és működése.** Az általunk használt Boyden-kamra egy 24 lyukú sejtenyésző lemezből (ún. „plate”) és az abba helyezhető, kivehető betétekből állt. A sejtenyésző lemez egyes mélyedéseibe kerül a kemoattraktáns (esetünkben EGF vagy szérum) tartalmú médium, az ebbe helyezett betétekbe pedig a szérummentes médiumban szuszpendált sejtek. Kb. egy nap alatt a sejtek letapadnak és egy részük átvándorol a lyukacsos membránon.

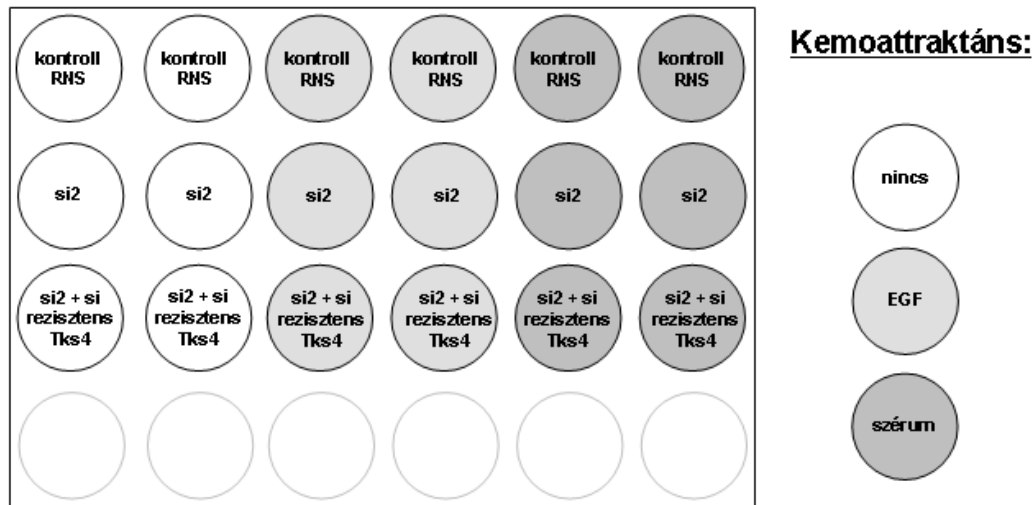
A Tks4 sejtmigrációban betöltött szerepének vizsgálatához a fehérje expresszióját kis inhibitoros RNS-sel csendesítettük [148]. Ennek a módszernek a használata során azonban előfordulhat, hogy nem kizárólag a célgén kifejeződése csökken [149-151]. Annak bizonyítására, hogy az általunk kimutatott hatást valóban a Tks4 koncentrációjának csökkenése okozza, szükségünk volt egy olyan Tks4 konstrukcióra is, amire nincs hatással az általunk használt csendesítő RNS. Ehhez a V5-Tks4 konstrukciónkban összesen öt olyan pontmutációt hoztunk létre, melyek a genetikai kód degeneráltsága miatt nem okoznak aminosav cserét a képződő fehérjében. Erre a konstrukcióra, melynek pontos leírása megtalálható az Anyagok és Módszerek fejezetben a továbbiakban „si-rezisztens V5-Tks4”-ként fogok hivatkozni.

A kísérlethez a HeLa sejtvonalat választottuk, mivel előzetes kísérleteink szerint ezek a sejtek képesek EGF-grádiens irányába vándorolni, így ezek segítségével specifikusabban vizsgálható a Tks4 EGF-függő sejtmozgásában betöltött szerepe. Meg kell azonban jegyezni, hogy a legtöbb általunk vizsgált sejtípus – például a legtöbb bemutatott kísérlethez használt COS7 sejtvonal – esetén nem figyeltünk meg jelentős EGF-irányú sejt vándorlást.

Kísérletünkhöz 4db 10cm-es petricsészébe kb.  $10^6$  db HeLa sejtet tettünk ki. Másnap egy sejtcsoportot kontroll, kettőt pedig hatásos Tks4 elleni kis interferáló RNS-sel („si2”, lásd Anyagok és Módszerek) transzfektáltunk. A következő napon az egyik si2-vel kezelt pontot si-rezisztens V5-Tks4 konstrukcióval is transzfektáltuk.

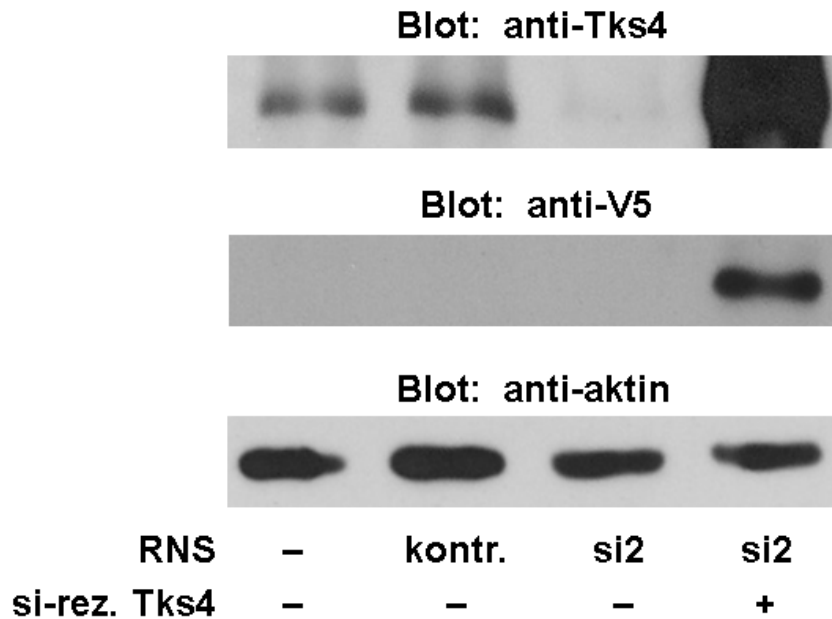
Magát a sejt vándorlást a harmadik napon indítottuk el. Ehhez a sejteket a tenyészetek passzálásakor is használt tripszin és EDTA tartalmú oldattal eltávolítottuk szilárd alapjukról, majd 10% FCS tartalmú DMEM-ben szuszpendáltuk őket. A szuszpenziót centrifugáltuk, majd a sejteket pontonként 2ml szérummentes DMEM-ben vettük föl, és erős keveréssel („vortex”) igyekeztünk elválasztani őket egymástól. Ezután Bürker-kamra segítségével meghatároztuk az egyes pontok sejtszámát, és a szuszpenziókat a kísérlethez használandó kb. 500 000 sejt/ml-es koncentrációra hígítottuk szérummentes DMEM-mel.

A Boyden-kamrák membránját a jobb sejttapadás érdekében először kollagénnel vontuk be. Ehhez 50 $\mu$ g/ml kollagén tartalmú PBS-t pipettáztunk a membránokra és egy órán át 37°C-on inkubáltuk, majd PBS-es mosás után megszáritottuk őket. A külső térként szolgáló 24 lyukú lemez egyes mélyedéseibe a 26. ábra sémája szerint 500 $\mu$ l kemoattraktáns tartalmozó médiumot töltöttünk. Ezután elhelyeztük a membránt tartalmazó betéteket a lyukakba és az ábrán jelölt sejtsuszpenziók 300 $\mu$ l-ét töltöttük beléjük, majd a lemezt 37°C-os sejtenyészítő termosztátban helyeztük el.



**26. ábra. A sejt vándorlási kísérlet elrendezése 24 lyukú lemezen.** Az egyes körök satírozása az adott pontnál használt kemoattraktánsra utal. A szérum 10% főtális borjúsérumot jelent, az EGF pedig 200ng/ml koncentrációjú volt. „si2”-vel a Tks4-et csendesítő kis interferáló RNS-t jelöltük. Az alsó hat lyukat nem használtuk.

A sejtek Tks4 tartalmának ellenőrzése végett a fel nem használt mintákat lecentrifugáltuk, jég hideg PBS-sel mostuk, majd harvest-pufferben feltártuk. A sejtkivonatok fehérjekoncentrációját Bradford-módszerrel megmértük, majd azonos fehérjemennyiséget tartalmazó mintákat vittünk fel belőlük egy 10%-os poliakrilamid géltre. Az elektroforézis után a gélt nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit azután anti-Tks4 antiszérummal, majd anti-V5 antitesttel hívtunk elő. A membrán alacsonyabb molekulatömegeknek megfelelő részét anti-aktin ellenanyaggal hívtuk elő, ellenőrizendő hogy valóban azonos mennyiségű mintákat vittünk föl a géltre. Ezen előhívások eredményét a 27. ábra mutatja. Látható, hogy az si-rezisztens V5-Tks4 transzfekciója a Tks4 jelentős túltermelődéséhez vezetett, de mivel előzetes kísérleteink eredménye szerint a Tks4 overexpressziója nem befolyásolja érdemben a sejtek vándorlását az általunk használt rendszerben, valószínűleg ez itt sem jelent zavaró tényezőt.

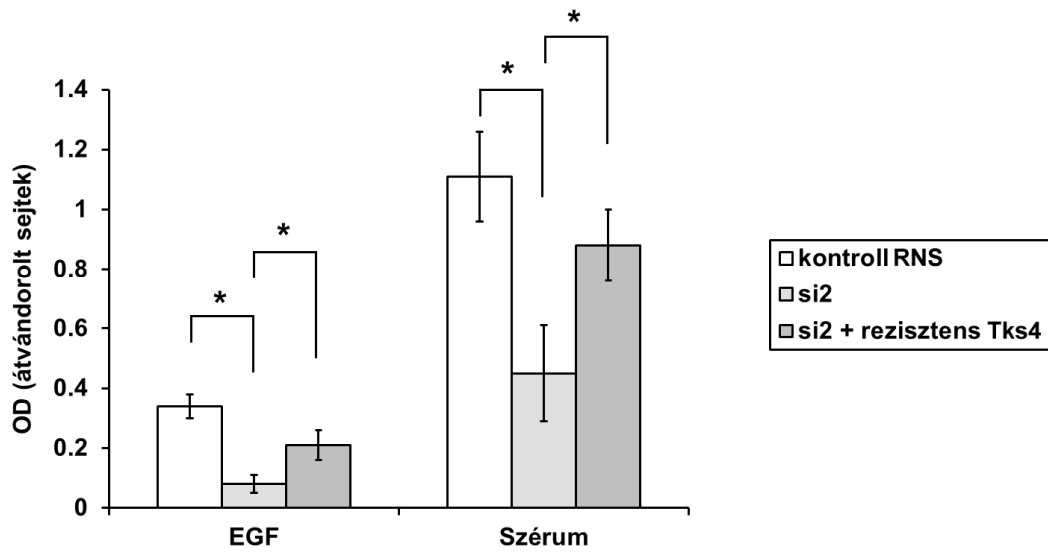


**27. ábra. A Boyden-kamrás kísérlethez használt sejtek Tks4 tartalma.** A sejmigrációs kísérlethez föl nem használt sejtek lizátumából western-blot-ot készítettünk anti-Tks4, anti-V5 és anti-aktin ellenanyagokkal. Az „si2”jelölés a Tks4-et csendesítő kis interferáló RNS-re utal.

Másnap a belső terekből eltávolítottuk a médiumot és a betéteket olyan 24 lyukú lemezbe helyeztük, melynek mélyedéseit előzetesen 400µl kék festékoldattal töltöttük fel. A húsz percig tartó festődés után a betéteket desztillált vízbe mártogatva megmostuk, majd a membrán felső oldalán lévő – át nem vándorolt – sejteket fülpszikálóval és felcsavart papírvattával óvatosan eltávolítottuk. Szárítás után a készlethez kapott extrakciós puffer 200µl-ével kivontuk a sejtek által megkötött festéket, amit azután 560nm-en fotometráltunk. Vakként a kemoattraktáns nélküli pontokból származó extraktumokat használtuk. (A megfestett membránokat mikroszkóppal vizsgálva itt gyakorlatilag egyáltalán nem volt látható átvándorolt sejt.)

A kísérlet eredménye szerint a Tks4 csendesítése mind a szérum grádiens mind pedig a – kevésbé hatékony – EGF koncentrációkülönbség irányába történő vándorlást gátolja. (28. ábra)





**28. ábra. A Tks4 csendesítése gátolja a HeLa sejtek vándorlását.** HeLa sejtekben kis interferáló RNS-sel (si2) csökkentettük a Tks4 mennyiségét, majd az egyik pont esetén olyan Tks4-et expresszáltattunk, melynek kifejeződését nem akadályozza a gátló RNS jelenléte. Ezután a sejtek EGF illetve szérum grádiens irányába történő vándorlási képességét vizsgáltuk Boyden-kamrás módszerrel. Az átvándorolt sejteket megfestettük, majd a festéket kioldva 560nm-en fotometráltuk. A kísérleteteket háromszor végeztük el, a hibásávok ezen három kísérlet standard deviációját mutatják. A csillagok (\*) szignifikáns különbséget jelölnek ( $p < 0,005$ ).

## 6. Megbeszélés

### 6.1. A *Tks4 Src* általi foszforilációja

Az EGF-receptor (ErbB-1) a receptor tirozin-kinázok közé tartozó transzmembrán receptor, melynek jelátvitelében igen fontos szerepet játszik a reverzibilis fehérje-foszforiláció. Ligand-kötés hatására a receptor dimerizálódik és citoplazmatikus protein-kináz doménje aktíválódik. Ennek hatására maga a receptor több tirozin oldalláncon foszforilálódik számos egyéb jelátviteli fehérjével együtt [152,153]. Az EGF-stimulust követő foszforilációs eseményekért azonban nem kizárólag az EGF-receptor kináz aktivitása felelős. A jelpálya működése során ugyanis citoplazmatikus tirozin-kinázok is aktíválódnak, például az Src család tagjai [154].

Az Src EGF jelpályában betöltött szerepe mind a jelátvitel mechanizmusa szempontjából, mind pedig funkcionálisan jól ismert. Az aktíválódó Src több helyen (Y891, Y920 [155], Y845, Y1101 [156]) képes az EGF-receptor foszforilációjára. Az így kialakuló foszfortirozin oldalláncok különböző jelátviteli utak kiindulópontjaként szolgálhatnak. Kimutatták például, hogy a 920-as tirozin-foszforilációja szükséges a PI3-kináz p85, szabályozó alegységének receptorhoz kötődéséhez [155], a 845-ös foszfortirozin pedig a STAT5b transzkripció faktor aktiválásában játszhat szerepet [157]. Ezen kívül számos egyéb olyan szubsztrátja ismert az Src tirozin-kinázoknak, melyek hozzájárulhatnak az EGF-hatásra bekövetkező sejtválasz kialakításához. Jelen értekezés szempontjából kiemelendők az aktin-citoszkeleton szabályozásában résztvevő fehérjék, mint például a cortactin [158], a p190RhoGAP [159], a p130Cas [160] és Eps8[161] állványfehérjék és a fokális adhéziós kináz [162].

Az irodalom alapján úgy tűnik, hogy az EGF-receptor és az Src szinergizmusának a fiziológias működés mellett patológias jelentősége is van. Számos tumorfajtára ugyanis jellemző, hogy bennük mind a két tirozin-kináz fokozottan expresszálódik [163-165]. A két tirozin-kináz onkogenezisben való együttműködését *in vitro* nyert adatok is megerősítik. Parsons és munkatársai már 1988-ban leírták, hogy az Src overexpressziója erősíti az EGF fibroblasztokra gyakorolt sejtosztódást serkentő hatását [166]. Szintén Sarah J. Parsons vezette munkacsoport mutatta ki, hogy az Src és az EGF-receptor egyidejű overexpressziója a sejtek tumorképző képességét jelentősen növeli [167].

A Tks4 [8] és a Tks5 [1] fehérjék egyaránt jó szubsztrátjai az Src-nek (már az elnevezésük is innen eredeztethető), így nem meglepő, hogy kísérleteinkben EGF-kezelés hatására a Tks4 tirozin-foszforilációját tapasztaltuk. Ennek ellenére alig található olyan adat az irodalomban, amely a Tks állványfehérjék receptor tirozin-kinázok jelpályájában betöltött szerepével foglalkozik. Az eddig megjelent egyetlen konkrét adat Sara Courtneidge munkatársaitól származik, akik a Tks5 PDGF kezelés hatására bekövetkező tirozin-foszforilációját figyelték meg Rat1 fibroblaszt sejtekben [1]. Érdekes módon ezen kísérletekben a foszforiláció csak a kezelés után 1-2 órával következett be, míg a mi kísérleteinkben 10 perces stimuláció után már jelentős foszforilációt tudtunk kimutatni. Az eltérés oka valószínűleg nem a két állványfehérje közötti különbségekben keresendő. Munkacsoportunkban ugyanis kimutatták, hogy a COS7-sejtekben expresszált Tks5 – mely fiziológiásan hiányzik ebből a sejtvonalból – a Tks4-hez hasonló kinetikával foszforilálódik EGF-kezelés hatására. [Fekete Anna nem publikált eredménye] A magyarázat tehát valószínűleg az eltérő sejt típusban és a PDGF- és EGF jelpályák közötti eltérésekből adódhat. Mivel az idézett közleményben [1] nem szerepel a foszforilációt katalizáló kináz mibenlétére vonatkozó adat, elképzelhető az is, hogy itt nem az Src felelős a foszforilációért, bár ez a jelenleg hozzáférhető irodalmi adatok alapján valószínűtlennek tűnik.

Kísérleteinkben a Tks4-et foszforiláló kinázként az Src-t (pontosabban az Src családot) azonosítottuk. Ennek alapja, hogy a PP1 Src-gátlószer jelenléte (11. ábra) vagy az ismert Src-foszforilációs helyek fenilalaninra való mutációja (12. ábra) ezt a foszforilációt megakadályozta. Munkacsoportunk további – az értekezésben be nem mutatott – eredményei is megerősítik ezt az állítást. A Tks4 EGF-kezelés hatására bekövetkező tirozin-foszforilációja ugyanis nem volt kimutatható olyan egér embrionális fibroblaszokban, amikből az Src család valamennyi általános expressziójú tagja (Src, Yes, Fyn) hiányzik (ún. SYF-sejtek [168]). A c-Src-vel stabilan transzformált SYF-sejtekben viszont, – a gyenge EGF-reszponzivitás ellenére – kis mértékben ugyan, de kimutatható volt az állványfehérje foszforilációja. Munkacsoportunk bizonyította azt is, hogy az Src *in vitro* körülmények között is képes a tisztított Tks4 foszforilálására, míg maga az EGF-receptor erre nem volt képes. [Gujdár Annamária nem közölt eredményei]

Számos – az irodalmi adatokkal egybehangzó – kísérleti eredmény utal tehát arra, hogy a Tks4-et az EGF jelpályában is az Src nem receptor tirozin-kináz foszforilálja.

Egyelőre azonban semmilyen adat nem áll rendelkezésünkre arra vonatkozólag, hogy ez a foszforiláció az általunk vizsgált rendszerekben milyen jelentőséggel bírhat. Bár ezzel kapcsolatban az irodalomban is csak kevés adat áll rendelkezésre, valószínű hogy a foszforiláció nem csak egy véletlen, mellékes jelenség, hanem valamilyen funkcionális következménnyel is bír. Erre utalnak például Sara Courtneidge és munkatársainak azon eredményei, melyek szerint a Tks4-hiányos fibroblasztokban overexpresszált, mindhárom tirozin-foszforilációs helyen fenilalanint tartalmazó (Y25,373,508F) Tks4 mutáns csak részlegesen képes visszaállítani a podoszómák zselatinbontó képességét [8]. Ugyanez a munkacsoport írta le azt is, hogy a Tks5 Y557,619F foszforilációs mutánsa nem volt képes helyreállítani az általuk vizsgált Tks5-hiányos zebraadánió sejtek migrációját [135]. Ezen megfigyelések biokémiai hátteréhez tartozhatnak azok az adatok, melyek szerint a Tks5 Y557F mutánsa – a vad típusú proteinnel ellentétben – sem az aktin-polimerizációt elősegítő N-WASP-pal, sem pedig az Nck adapter fehérjével nem képes koimmunprecipitálódni [98]. Ezek alapján könnyen elképzelhető, hogy a Tks állványfehérjék foszforilációja fontos eleme az aktin-citoszkeleton változásaihoz vezető jelpályáknak, és így az általunk vizsgált jelenségeknek is. Mindenképp érdemes lenne tehát további kísérletekkel tisztázni, hogy például a Tks4 foszforilációs mutánsának újraexpressziója képes-e visszaállítani a vizsgált sejtek szétterüleri és migrációs képességét (lásd 24. és 28. ábra).

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a Tks4 nem csak szubsztrátja, hanem interakciós partnere is az Src nem-receptor tirozin-kináznak. A két fehérje szerkezetének ismeretében ez egyáltalán nem meglepő, hiszen mindkét fehérje több olyan szakasszal és doménnel rendelkezik, amely más fehérjék megkötésére lehet képes. Egyelőre nyitott kérdés azonban, hogy a fehérjék mely protein-protein interakcióra képes részei vesznek részt a kapcsolatban.

Az egyik lehetőség az lenne, hogy az Src SH3 doménje kötődik a Tks4 valamely prolin-gazdag régiójához. Mivel a két fehérje közötti kapcsolat csak EGF-kezelés hatására jött létre, ez az eshetőség fölveti annak kérdését, hogy vajon mi szabályozza ezt a kapcsolatot. Ennek több lehetséges módja is elképzelhető. Az egyik, hogy a Tks4 foszforilálatlan állapotban egy inaktív konformációt vesz föl, ami a prolin-gazdag régiókat valamilyen módon hozzáférhetetlenné teszi, így az Src csak akkor kapcsolódhat a Tks4-hez, hogy ha előtte már foszforilálta azt. Amint az Irodalmi

áttekintés című fejezetben olvashattuk, több kutatóban is felmerült egy ilyen zárt állapot lehetősége, de a kísérleti bizonyítékok egyelőre nem állnak rendelkezésre. A másik lehetőség, hogy az Src van olyan inaktív konformációban a kezeletlen sejtekben, ami megakadályozza a kapcsolatot. Az Src ilyen konformációját szerkezetvizsgálati módszerekkel több munkacsoport is kimutatta [169-171]. Ezekben a szerkezetekben az SH3 domén az SH2 és kináz doméneket összekötő fehérjeszakaszhoz kapcsolódik. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy ez a kapcsolat gyenge, (többek között azért, mert a megkötött szakasz nem tartalmaz PxxP motívumot) és így nem feltétlenül zárja ki annak lehetőségét, hogy az SH3 domén „átkötődjön” egy másik fehérjéhez. (Sőt, ez az Src aktivációjának egyik lehetséges mechanizmusa lehet. Lásd [172])

A másik lehetőség az lenne, hogy az Src SH2 doménje kötődik a foszforilált Tks4-hez. Ez rögtön magyarázatot is adna arra, hogy miért csak EGF-kezelés után mutatható ki kapcsolat a két fehérje között. Bár a Tks4-ben két olyan foszforilálódó tirozin is található (Y373 és Y508), amelynek környezete megfelel az Src konszenzus kötőszekvenciájának (YEEL), Sara Coutneidge és munkatársainak közleménye [8] szerint ezek mégsem képesek a kináz kötésére. Sokkal valószínűbb ezért, hogy az Src SH2 doménje inkább az EGF-receptorhoz és nem a Tks4-hez kötődik az általunk vizsgált rendszerben.

## **6.2. A Tks4 és az EGF-receptor asszociációja**

A Tks4 foszforilációjának vizsgálata során kapott eredményeink szerint a Tks4 a sejtek EGF-fel való kezelése után koimmunprecipitálódik az EGF-receptorral (9. és 10. ábra). A két fehérje kapcsolatának lehetőségét az a mikroszkóppal történt megfigyelés is megerősíti, hogy a kezelt sejtekben a Tks4 a membránhoz lokalizálódik (lásd 19. ábra), ahol a receptorok nagy része is található.

Mindazonáltal a fehérjék szerkezete és néhány kísérleti eredményünk arra utal, hogy a két fehérje kapcsolata nem közvetlen. Az autofoszforilálódott EGF-receptorhoz ugyanis elsősorban SH2 doménnel rendelkező proteinek kapcsolódnak, ilyen doménnel pedig a Tks4 nem rendelkezik, mint ahogy az EGF-receptor sem rendelkezik olyan prolin-gazdag régióval, ami a Tks4 SH3 doménjeinek kötőhelyéül szolgálhatna. A laboratóriumunkban korábban végzett kísérletek eredményei is a közvetlen kapcsolat ellen szólnak. A tisztított Tks4 ugyanis az *in vitro* foszforilációs kísérletekben nem

mutatott kapcsolatot a reakcióelegyben enzimként használt EGF-receptorral. [Gujdár Annamária nem publikált eredménye]

Ha az EGF-receptor és a Tks4 közötti kapcsolat nem közvetlen, felmerül a kérdés, hogy vajon mi kapcsolja össze a két fehérjét. Az irodalmi adatok és néhány kísérleti eredményünk szerint a legvalószínűbb jelölt maga az Src. Ez a nem-receptor tirozinkináz ugyanis egyaránt képes kötődni az EGF-receptorhoz [173-178] és a Tks4-hez (13. ábra). Feltételezésünk szerint a komplex úgy jön létre, hogy az Src SH2 doménje a foszforilált EGF-receptorhoz, SH3 doménje pedig a Tks4-hez kötődik. Ezt a lehetőséget támasztja alá azon kísérleti eredményünk is, miszerint az Src SH2- és SH3-hiányos mutánsainak overexpressziója egyaránt domináns negatív módon gátolja a Tks4-EGF-receptor kapcsolatot.

### **6.3. A PX domén szerepe**

A PX domén – melynek rövid leírása megtalálható az Irodalmi áttekintés című fejezetben – elsősorban membránlipidek, közülük is leginkább a foszforilált inozitol lipidek kötésére alkalmas szerkezet. Kísérleti eredményeink és az irodalmi adatok alapján a Tks4 PX doménje fontos szerepet játszik a fehérje sejten belüli lokalizációjában.

*In vitro*, tisztított GST-fúziós PX doménnel nyert eredményeink szerint (17. ábra) a Tks4 valamennyi vizsgált foszforilált inozitol gyűrűt tartalmazó lipiddel képes kölcsönhatást kialakítani. Ez az eredmény azonban az irodalomban található, hasonló módszerrel nyert adatokkal csak részben egyezik meg. Egy japán munkacsoport vizsgálatai szerint ugyanis a Tks4 PX doménje nem, vagy csak nagyon gyengén köti a PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> és PI(3,4,5)P<sub>3</sub> lipideket [7], melyek a mi kísérleteinkben a többi inozitol-származékkal összehasonlítható erősségű kötést mutattak. Sara Courtneidge munkacsoportjának hasonló kísérleteiben a vizsgált domén még szűkebb specificitást mutatott, hiszen csak a PI(3)P és PI(3,4)P<sub>2</sub> lipidekkel mutatott jelentős kölcsönhatást [8]. A különbségek oka valószínűleg az egyes kísérletek részleteiben (például eltérő lipid és fehérje koncentrációk) keresendő. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy a használt módszer jellegéből adódóan aligha alkalmas kvantitatív, *in vivo* körülményekre fenntartás nélkül alkalmazható lipidszámításos profil meghatározására.

Az értekezésben bemutatott kísérleteink szerint az általunk vizsgált, EGF-fel kezelt COS7 sejtekben a Tks4 PX doménjének fő kötőpartnerei a sejtmembránban a PI3-kináz termékei lehetnek. Ennek az enzimnek a specifikus gátlása ugyanis meggátolta a Tks4 membránhoz való transzlokációját (14. ábra) és foszforilációját (15. ábra). Az irodalomból jól ismert, hogy az EGF-receptor aktíválódása után PI3-kinázok Ia osztályába tartozó enzimek aktíválódnak. Ennek mechanizmusa valószínűleg kettős. Egyrészt az enzim SH2 doménnel rendelkező szabályozó alegysége kötődhet a foszforilált receptorhoz (vagy az azzal heterodimert alkotó ErbB3 fehérjéhez [179,180]), másrészt az EGF jelpálya működése során aktíválódó Ras GTPáz aktíválhatja a PI3-kináz katalitikus (p110) alegységét [152]. Bár *in vitro* az enzim egyaránt képes a foszfatidil-inozitol (PI), a PI4P és PI(4,5)P<sub>2</sub> 3-as helyen való foszforilációjára az enzim fő terméke a sejtekben valószínűleg a PI(4,5)P<sub>2</sub>-ből kialakuló PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [140,181]. Mivel a Tks4 PX doménje – legalábbis az általunk végzett kísérletek eredménye szerint – valóban képes ennek a lipidnek a kötésére, feltehetően ez a kölcsönhatás is hozzájárul a Tks4 EGF-kezelés utáni membránhoz horgonyzódásához.

Az előző pontban írottakkal összevetve ez azt jelenti, hogy a Tks4 legalább két módon rögzülhet a membrán közelében: (1) az EGR-receptorral való asszociáció által, amit feltételezhetően az Src közvetít és (2) a PX domén lipid-kötése által. Felmerül a kérdés, hogy melyik kötés a fontosabb, illetve hogy azok milyen sorrendben jöhetnek létre. Mivel a PI3-kináz gátlása és a PX domént inaktiváló mutációk mind a Tks4 transzlokációját, mind pedig az Src általi foszforilációját gátolták, úgy gondolhatjuk, hogy a PX domén membránhoz kötődése az elsődleges jelentőségű. Ez azonban ellentmond Geiszt Miklós munkacsoportjának azon eredményének, miszerint a Tks4 lipidkötésre nem képes R43Q mutánsa EGF-kezelés hatására a membránhoz lokalizálódik [9]. Meg kell azonban jegyezni, hogy saját laboratóriumunkban megismételve ezt a kísérletet nem figyeltünk meg jelentős membrántranszlokációt sem az R43Q, sem pedig az ahhoz nagyon hasonló R43W mutáns esetén (19. és 20. ábra). Bár egyelőre nem találtunk magyarázatot arra, hogy a – legjobb tudomásunk szerint – azonos kísérleti körülmények ellenére miért kaptunk különböző eredményeket, de mivel mindkét mutáns fehérje aggregációra hajlamos (lásd következő pont) elképzelhető hogy ez az oka a vizsgált proteinek „kiszámíthatatlan” viselkedésének.

A Tks4 pontos transzlokációs mechanizmusának tisztázására mindazonáltal további kísérletek szükségesek. Érdekes kérdés lenne például, hogy a Tks4 és az EGF-receptor kapcsolatát megakadályozó domináns negatív Src konstrukciók vajon megakadályozzák-e az állványfehérje membrántranszlokációját, illetve hogy az önállóan kifejezett PX domén a membránhoz kötődik-e EGF-kezelés hatására. (Az utóbbi kérdést Geiszt Miklós munkacsoportja GFP-fúziós fehérjeként kifejezett PX domén segítségével próbálta megválaszolni. Ez a konstrukció azonban – ismeretlen okból – sejtmagi lokalizációt mutatott [9].)

#### **6.4. A Tks4 R43W mutánsának jellemzése**

Iqbal és munkatársai Frank – Ter Haar szindrómás családok vizsgálata során fedezte fel, hogy a Tks4 PX doménjében R43W aminosav cserét okozó pontmutáció – mely egyetlen családban volt megtalálható – a fehérje teljes hiánya által okozottakkal azonos tüneteket okoz [129]. Ezen jelenség biokémiai hátterének vizsgálata céljából elkészítettük a mutáns fehérjét kódoló emlős expressziós vektort és a PX domén GST-fúziós formáját.

A mutációt hordozó PX doménről kimutattuk, hogy – a vad típusú fehérjedarabbal ellentétben – gyakorlatilag nem képes foszforilált inozitol-lipidek kötésére (17. ábra). Ez összhangban áll Geiszt Miklós munkacsoportjának azon eredményeivel, melyek szerint ugyanezen aminosav glutaminra való cseréje (R43Q) a lipid-kötő képesség teljes elvesztésével jár [9].

Western blottal vizsgálva az emlős sejtekben expresszált mutáns fehérjét megfigyeltük, hogy az vad típusú társánál mindig alacsonyabb jelet adott (18. ábra). Laboratóriumunk újabb eredményei szerint ennek magyarázata, hogy az R43W mutáns Tks4 a sejt kivonatokban Tritonnal oldhatatlan csapadék formájában van jelen. [Ádám Csaba publikálatlan eredménye] Ezt erősítik meg a fluoreszcens mikroszkópos megfigyeléseink is, melyek szerint a fehérje nagy része szálas szerkezetű kötegekben vagy egy pontba gyűlve van jelen a legtöbb sejtben (19. ábra).

Jól ismert, hogy ha emlős sejtekben nagy – a proteaszómák bontókapacitását meghaladó – mennyiségű hibásan hajtogatott fehérje van jelen, az gyakran aggregátóknak nevezett zárványokban különül el [182]. Ezen képletek kialakulásának első lépése általában az aggregálódott fehérje poliubikvitinációja, melyet például a



parkin nevű ubikvitin ligáz végezhet el [183]. Az így megjelölt molekulákat a HDAC6 nevű protein fölismeri és a mikrotubulusokkal asszociált dineinekhez köti [184]. Ezen motorfehérjék aktivitásának következtében a hibás fehérje a sejt mikrotubulus organizáló centruma felé mozog, és annak környékén lerakódik [185]. Az így összegyűlt aggregátumot később intemedier filamentumok – leginkább vimentin – veszik körül, és határolják el a sejtplazma többi részétől.

A laboratóriumunkban Ádám Csaba által végzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a Tks4 R43W mutánsa valóban aggreszómákban különül el a sejtekben. Sikerült kimutatni, hogy ez a mutáns COS7 sejtekben expresszáva ubikvitinálódik. Immunfluoreszcens módszerrel igazolódott az is, hogy a 19. ábra jobb alsó paneljén is látható szálas szerkezet mikrotubulusokat tartalmaz, tehát feltehetően a mikrotubulus organizáló centrum felé haladó fehérje-aggregátumoknak felel meg. Az egy pontban összegyűlt mutáns fehérje (lásd a 19. ábra bal alsó paneljét) pedig az MTOC-re jellemző  $\gamma$ -tubulinnal mutat kolokalizációt. Kimutatható volt továbbá az is, hogy ezeket az aggregátumokat az irodalomból ismert „vimentin ketrec” veszi körül. [Ádám Csaba nem közölt eredményei]

Igen valószínű tehát, hogy az overexpresszált R43W mutáns Tks4 hajtogatódása súlyos zavart szenved, ami a fehérje aggregációjához és aggreszómákba való intracelluláris izolációjához vezet. Valószínűleg a hibás tekeredés az oka annak is, hogy a lipid-kötés vizsgálatához használt *E. coli* baktériumban expresszált GST-fúziós PX domén R43W mutáns formája minden kísérletben alacsonyabb fehérjekoncentrációt eredményezett, mint a vad típus. Bár a lipideket hordozó membránra arányosan több fehérjeoldatot tettünk, nem kizárható, hogy lipid-kötés elvesztésének oka a fehérje foldingjának globális zavara. Nem vonható tehát le az a következtetés, hogy a 43. arginin részt venne az inozitol lipidek kötésében. A mutáció hatásának nem specifikus voltát támasztja alá az is, hogy a vizsgált mutáns a vad típusú domén egyetlen vizsgált kötőpartnerével sem tudott kapcsolatot kialakítani, nem pedig csak egyes lipidekkel szemben csökkent az affinitása (17. ábra).

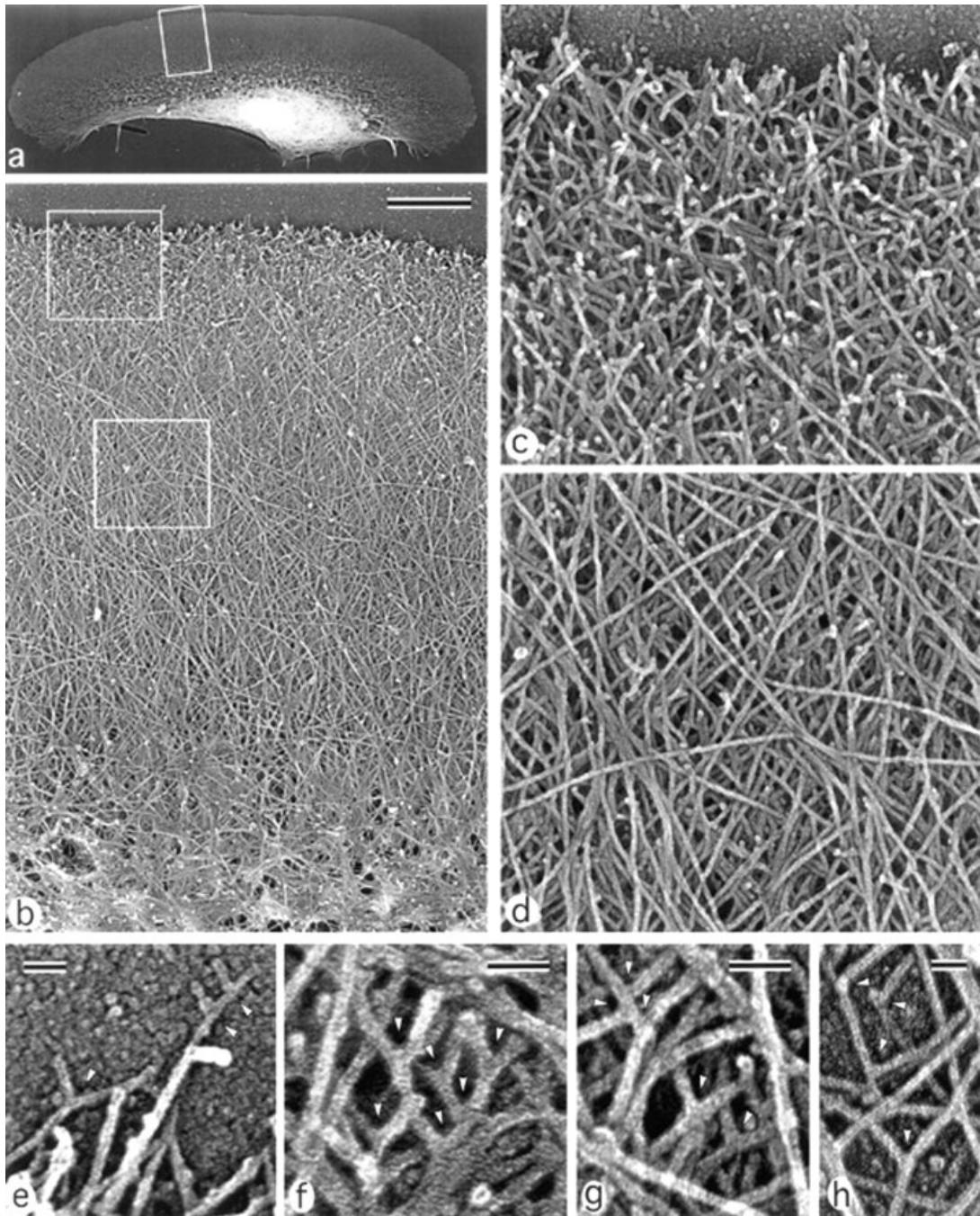
Nyitott marad az a kérdés is, hogy az R43W mutációt hordozó Frank – ter Haar szindrómás betegek esetén a lipid-kötés elvesztése vagy az – esetleg a normál expressziós szinten is – aggreszómákba kerülő Tks4 citoplazmatikus hiánya a tünetek okozója. Mivel azonban ezen beteg fenotípusa nem volt elkülöníthető azokétól, akikben

a fehérje gyakorlatilag teljesen hiányzott [129], az utóbb említett mechanizmus a valószínűbb.

### **6.5. A Tks4 és az aktin-citoszkeleton kapcsolata**

A Tks4 és Tks5 állványfehérjékkel kapcsolatban a legtöbb irodalmi adat az aktinban gazdag podoszómák és invadopádiumok kialakulásában játszott szerepükre vonatkozik (Lásd a Bevezetés című fejezetet). A Geiszt Miklós és saját munkacsoportunk által végzett kísérleti eredmények azonban azt valószínűsítik, hogy a Tks4-nek a sejt szélén bekövetkező aktin-polimerizáció szabályozásában is szerepe lehet.

Erre utal az a megfigyelés, hogy olyan sejtekben, melyekben a Tks4 expresszióját kis hajtűalakú RNS segítségével csendesítették, EGF hatására kevésbé alakulnak ki membrán fodrok [9]. Ezek a membrán fodrok (angolul ruffles) felépítésükben igen hasonlóak a lamellipódiumoknak nevezett legyezőszerű sejtszéli kitüremkedésekhez, melyek jellegzetes, elágazódó aktin-hálózatot tartalmaznak (29. ábra). Ezen hálózat kialakításában kulcsszerepe van a hét fehérjéből álló Arp2/3 komplexnek. Ez a fehérjekomplex képes egy meglévő aktin-szállhoz kapcsolódni, és ott egy új – az eredetitől kb. 70°-ban eltérő irányú – szálat megkezdeni (nukleálni), úgy hogy a komplex két aktinhoz hasonló proteinje (actin related protein 2 és 3) képezi az új F-aktin két láncának első elemeit [186]. A lamellipódiumot ez a folyamatosan növekvő (és a túloldalán állandóan bomló) aktin-hálózat türemíti ki [187]. A sejtnyúlvány ezek után adhéziós molekulák segítségével letapad és lehetővé teszi, hogy a sejt miozin segítségével „előrehúzza magát”. Úgy gondoljuk, hogy az EGF-kezelés hatására bekövetkező membrán-fodrozódás (ruffling) olyan irányultság nélküli – gyakran körkörös – lamellipódium-képződésnek felel meg, ahol a képződő nyúlványok – megfelelő szubsztrátum vagy idő hiányában – nem tapadnak le, hanem felpöndörödnek. (lásd például 14/B ábrán, valamint a 19. ábra jobb felső paneljén)



**29. ábra. A lamellipódiumok szerkezete.** Az ábrák hal keratocita lamellipódiumának felépítését mutatják különböző elektronmikroszkópos nagyításokkal. Az (A) ábrán a sejt átnézeti képe látható, melyen jól megfigyelhető ez a nagy, legyezőalakú sejtnyúlvány. (Az általunk használt sejtekre inkább a több kisebb, de hasonló alakú és felépítésű lamellipódium jellemző.) A (B) ábrán látható nagyításon felismerhető az elágazódó aktin-hálózat. A fekete sáv itt 1 $\mu$ m-t jelöl. A (C) és (D) paneleken további nagyításban láthatóak a B ábrán jelölt részek. Az ennél is nagyobb nagyítással (fekete sáv: 50nm) készült (E-H) ábrákon az Arp2/3 komplex által létrehozott elágazódások is jól megfigyelhetők (fehér nyilak). Forrás: [188]

A lamellipódiumok és membránfodrok létrejöttében kulcsszerepet játszó Arp2/3 komplex működése szabályozott. Fő aktivátorai az N-WASP és WAVE fehérjék –

melyek többek között a Cdc42 és Rac kis GTPázok szabályozása alatt állnak [189] – valamint a cortactin [144].

Arra a kérdésre, hogy a Tks4 pontosan milyen szerepet játszik ebben a folyamatban, egyelőre nem tudunk választ adni. Több jel is utal azonban arra, hogy a Tks4 cortacinnal való kapcsolata fontos eleme lehet ennek a szabályozásnak. Mivel EGF-kezelés hatására mind a cortactin, mind pedig a Tks4 a membránhoz lokalizálódik (lásd [9] valamint 14. és 20. ábra), felmerül a kérdés, hogy az egyik fehérje transzlokációja okozója-e a másikénak. Ennek megválaszolásához egyelőre egyetlen kísérlet eredménye áll rendelkezésünkre. Geiszt Miklós és munkatársai, ugyanis Tks4 csendesített sejtekben a kontrollnál némileg kisebb mértékű cortactin transzlokációt figyeltek meg [9], ami arra utalhat, hogy a Tks4 „vinné magával” a cortactint a sejtmembránhoz. Bár más rendszerre vonatkozik, de ezzel ellentmondó Sara Courtneidge munkacsoportjának azon megfigyelése, mely szerint a Tks4-hiányos sejtekben kialakuló podoszóma kezdeményekben jelen van a cortactin. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a cortactin maga is F-aktin-kötő fehérje, így lehet, hogy a Tks4 hiányában – valamely egyéb okból – csökkent aktin-polimerizáció miatt található kevesebb cortactin a membrán alatt ezekben a sejtekben. Mindezek ellenére vonzó elképzelésről van szó, hiszen az értekezésben bemutatott kísérletek szerint a Tks4 EGF-hatásra bekövetkező transzlokációja cortactintól független folyamat, és arra is utalnak kísérleti eredmények, hogy a cortactin egy állandó komplexet képezhet a sejtekben a Tks4-gyel (lásd [9] és 22. ábra).

Geiszt Miklós, Lányi Árpád és saját munkacsoportunk együttműködésében végzett kísérletek szerint a Tks4 sejtben belüli koncentrációjának csökkentése nem csak a membránfodrok kialakulását, hanem a – szintén aktin-polimerizáció- és cortactin-függő [190] – sejtészterületet is gátolja (24. ábra). Ez a folyamat mechanizmusában nagyon hasonló a membrán-fodrozódáshoz, de nem az EGF-receptor, hanem a fibronectinnel kapcsolatba kerülő integrinek aktiválódása váltja ki. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a Tks4 nem csak az EGF hanem az integrin jelpályának is részét képezi. Ez nem is lenne annyira meglepő, hiszen a két jelátviteli útnak számos közös eleme van (például az Src), sőt kimutatták, hogy az integrinek aktiválódása után az EGF-receptor is foszforilálódik és részt vesz a további szignál transzdukcióban [191].

Szintén a Tks4 aktin-citoszkeleton szabályozásában játszott esetleges szerepére utalhat az az eredmény is, ami szerint az állványfehérje csendesítése gátolja a HeLa sejtek EGF- és szérum-grádiens irányába történő vándorlását (28. ábra). Bár a sejt migráció ezen fajtájának mechanizmusa valószínűleg némileg eltér a mesterséges, kétdimenziós környezetben létrejövő lamellipódiális sejt vándorlástól, az aktin-polimerizáció minden bizonnyal itt is kulcsszerpet játszik. Ezt erősíti meg az a kísérleti eredmény is miszerint az elágazódó aktin-hálózat létrejöttét elősegítő cortactin csendesítése ebben a rendszerben is a sejt migráció gátlásához vezet [192]. A fent írottakkal egybevetve ez felveti annak a lehetőségét, hogy éppen a Tks4 csendesítése következtében csökkent cortactin transzlokáció a migrációs képesség csökkenésének egyik okozója. Ennek igazolásához azonban még további kísérletek elvégzése szükséges.

További kérdés, hogy a Tks4-hiányos HeLa sejteken megfigyelt sejtmozgás-zavar mennyire általános, illetve mennyire járul hozzá a Tks4-hiányos egerek fenotípusának kialakulásához. Mivel ezek az állatok, ha kórosan is, de kifejlődnek és életképesek, nem valószínű, hogy ennek az állványfehérjének a hiánya a sejtmozgás teljes és globális zavarához vezetne. Ezt erősítik meg azon előzetes eredményeink is, miszerint Tks4 knock out egerek embrióiból nyert primer fibroblasztok vándorlási képessége megtartott. Valószínű tehát, hogy a sejtmozgás általunk megfigyelt zavara csak egyes sejt típusokban kifejezett. Mindezek mellett nem zárható ki az sem, hogy a Tks4 hosszú időn keresztül fennálló hiánya valamilyen kompenzáló mechanizmust – például Tks5 overexpressziót – vált ki ezekben a sejtekben.

Meg kell jegyezni azt is, hogy a Tks4 fehérjének sejtmozgáson kívül számos egyéb ismert – és valószínűleg még több ismeretlen – olyan funkciója van, ami szerepet játszhat az egyedfejlődésben (lásd Bevezetés című fejezet megfelelő szakaszát). Így a fenotípus kialakulása minden bizonnyal több tényezős, komplex folyamat, melynek további vizsgálata reményeink szerint a Tks4 állványfehérje működésének jobb megértéséhez vezet majd.

## 7. 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, 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 szérum-grádiens irányában való vándorlásában.

## 8. Összefoglalás

A Tks4 egy nemrég fölfedezett állványfehérje, mely egy PX és négy SH3 doménnel rendelkezik. Bár jelenleg keveset tudunk a Tks4 fehérje élettani és kóros folyamatokban betöltött szerepéről, a rendelkezésre álló irodalom alapján valószínű, hogy szerepe van az invadopódiumoknak nevezett invazív sejtnyúlványok kialakulásában. Érdekes, hogy a Tks4 hiánya mind egerekben mind pedig emberekben súlyos fejlődési rendellenességek megjelenéséhez vezet.

A jelen értekezésben bemutatott kutatásaink fő célja a Tks4 EGF jelpályában betöltött szerepének vizsgálata volt. Az immunprecipitáció és western blot módszerével kimutattuk, hogy a Tks4 EGF-kezelés hatására tirozinon foszforilálódik és összekapcsolódik az EGF-receptorral. A foszforilációért felelős kinázként az Src-t azonosítottuk, mely a kezelt sejtekben a Tks4-gyel össze is kapcsolódik, így elképzelhető, hogy szerepet játszik az állványfehérje és a receptor közvetett fizikai interakciójában is.

Konfokális mikroszkópia segítségével bizonyítottuk, hogy a Tks4 az EGF-kezelés hatására kialakuló aktinban-gazdag sejtszéli fodrokba lokalizálódik. Ez a transzlokáció – legalábbis részben – PX domén-függő folyamat, hiszen a PI3-kináz gátlása és a domént inaktíváló mutációk egyaránt a membrán lokalizáció elmaradásához vezetnek. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a PX doménben lévő 43-as arginin triptofánra való mutációja a fehérje hibás tekeredéséhez és ún. aggreszómákba való izolációjához vezet. Ez magyarázatot adhat arra a jelenségre, hogy ez a mutáció a fehérje teljes hiánya esetén megfigyelttel azonos tünetek (Frank – ter Haar szindróma) kialakulásához vezet emberben.

Mivel eredményeink szerint a Tks4 membránfodrokba lokalizálódik és képes összekapcsolódni az aktin-kötő cortactin fehérjével, vizsgáltuk az állványfehérje aktin-citoszkeleton szabályozásában betöltött esetleges szerepét is. Geiszt Miklós laboratóriumával együttműködve kimutattuk, hogy a Tks4 csendesítése gátolja a sejtek fibronektin felületen való szétterülését. Boyden-kamrás kísérletekkel bizonyítottuk továbbá azt is, hogy a Tks4 hiánya HeLa sejtek csökkent EGF- és szérum-grádienssel szembeni vándorlásához vezet.

Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a Tks4-nek szerepe lehet az aktin-citoszkeleton EGF-függő átrendeződésében.

## 9. Summary

Tks4 is a recently identified scaffolding protein with one PX and four SH3 domains. Currently little is known about the physiological or pathological functions of this protein. Most of the previous studies focused on its role in actin rich invasive protrusions called invadopodia. Interestingly it has been recently reported that the loss of Tks4 leads to severe developmental defects in both mice and humans.

The major goal of the research presented in this dissertation was to investigate the role of Tks4 in EGF signaling. Using immunoprecipitation and western blotting we have shown first that the protein becomes tyrosine phosphorylated and associates with the EGF receptor upon a brief stimulation of COS7 cells with epidermal growth factor. We identified Src as the kinase responsible for this phosphorylation. Since this non-receptor tyrosine kinase readily coimmunoprecipitates with Tks4 in EGF treated cells, it is possible that Src also serves as an adaptor between the EGF receptor and Tks4.

We have also demonstrated by confocal microscopy that Tks4 translocates to actin rich lamellipodia-like membrane ruffles in EGF stimulated cells. This translocation is – at least in part – mediated by the PX domain of the scaffolding protein, as inhibition of the PI3-kinase or mutation of conserved amino acids in the domain prevented the membrane localisation of Tks4. Interestingly we also found that mutating the conserved amino acid residue Arg43 to tryptophan in the PX domain leads to the production of misfolded Tks4 which is transported to aggresomes within cells. This may help to explain why this mutation leads to the same symptoms in humans as the complete loss of the protein (Frank – ter Haar syndrome).

As we found that Tks4 is localised to membrane ruffles and associates with the actin regulatory protein cortactin we also investigated the possible role of Tks4 in the regulation of the actin cytoskeleton. Together with the laboratory of Dr. Miklós Geiszt we demonstrated that Tks4 is required for integrin-mediated cell spreading. We have also shown using a Boyden chamber based assay that the lack of Tks4 inhibits the EGF and serum dependent migration of HeLa cells.

Taken together our results suggest a role of Tks4 in the EGF dependent reorganization of the actin cytoskeleton.



## 10. Irodalomjegyzék

1. Lock P, Abram CL, Gibson T, Courtneidge SA (1998) A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *EMBO J* 17: 4346-4357.
2. Rufer AC, Rumpf J, von Holleben M, Beer S, Rittinger K, Groemping Y (2009) Isoform-selective interaction of the adaptor protein Tks5/FISH with Sos1 and dynamins. *J Mol Biol* 390: 939-950.
3. Songyang Z (1999) Recognition and regulation of primary-sequence motifs by signaling modular domains. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 359-372.
4. Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K (2012) Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J Cell Biol* 197: 553-568.
5. Buday L, Tompa P (2010) Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J* 277: 4348-4355.
6. Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332: 680-686.
7. Hishida T, Eguchi T, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M (2008) A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion. *FEBS J* 275: 5576-5588.
8. Buschman MD, Bromann PA, Cejudo-Martin P, Wen F, Pass I, Courtneidge SA (2009) The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Mol Biol Cell* 20: 1302-1311.
9. 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.
10. Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 347: 827-839.

11. Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21: 3433-3434.
12. Ellson CD, Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT (2002) The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* 115: 1099-1105.
13. Teasdale RD, Collins BM (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J* 441: 39-59.
14. Seet LF, Hong W (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1761: 878-896.
15. Bravo J, Karathanassis D, Pacold CM, Pacold ME, Ellson CD, Anderson KE, Butler PJ, Lavenir I, Perisic O, Hawkins PT, Stephens L, Williams RL (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol Cell* 8: 829-839.
16. Yu JW, Lemmon MA (2001) All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *J Biol Chem* 276: 44179-44184.
17. Kanai F, Liu H, Field SJ, Akbary H, Matsuo T, Brown GE, Cantley LC, Yaffe MB (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3: 675-678.
18. Song X, Xu W, Zhang A, Huang G, Liang X, Virbasius JV, Czech MP, Zhou GW (2001) Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry* 40: 8940-8944.
19. Koharudin LM, Furey W, Liu H, Liu YJ, Gronenborn AM (2009) The phox domain of sorting nexin 5 lacks phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) specificity and preferentially binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>). *J Biol Chem* 284: 23697-23707.
20. Kerr MC, Lindsay MR, Luetterforst R, Hamilton N, Simpson F, Parton RG, Gleeson PA, Teasdale RD (2006) Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J Cell Sci* 119: 3967-3980.
21. Lemmon MA (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 99-111.

22. Hiroaki H, Ago T, Ito T, Sumimoto H, Kohda D (2001) Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nat Struct Biol* 8: 526-530.
23. Jang IH, Lee S, Park JB, Kim JH, Lee CS, Hur EM, Kim IS, Kim KT, Yagisawa H, Suh PG, Ryu SH (2003) The direct interaction of phospholipase C-gamma 1 with phospholipase D2 is important for epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 278: 18184-18190.
24. Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh PG, Ryu SH (2006) The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8: 477-484.
25. Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM, Courtneidge SA (2003) The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* 278: 16844-16851.
26. Bogel G, Gujdar A, Geiszt M, Lanyi A, Fekete A, Sipeki S, Downward J, Buday L (2012) Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates EGF-dependent cell migration. *J Biol Chem*.
27. Stahl ML, Ferenz CR, Kelleher KL, Kriz RW, Knopf JL (1988) Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature* 332: 269-272.
28. Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332: 272-275.
29. Lehto VP, Wasenius VM, Salven P, Saraste M (1988) Transforming and membrane proteins. *Nature* 334: 388.
30. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5857-5864.
31. Li SS (2005) Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390: 641-653.
32. Wu X, Knudsen B, Feller SM, Zheng J, Sali A, Cowburn D, Hanafusa H, Kuriyan J (1995) Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk. *Structure* 3: 215-226.

33. Mongiovi AM, Romano PR, Panni S, Mendoza M, Wong WT, Musacchio A, Cesareni G, Di Fiore PP (1999) A novel peptide-SH3 interaction. *EMBO J* 18: 5300-5309.
34. Kang H, Freund C, Duke-Cohan JS, Musacchio A, Wagner G, Rudd CE (2000) SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J* 19: 2889-2899.
35. Barnett P, Bottger G, Klein AT, Tabak HF, Distel B (2000) The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction. *EMBO J* 19: 6382-6391.
36. Douangamath A, Filipp FV, Klein AT, Barnett P, Zou P, Voorn-Brouwer T, Vega MC, Mayans OM, Sattler M, Distel B, Wilmanns M (2002) Topography for independent binding of alpha-helical and PPII-helical ligands to a peroxisomal SH3 domain. *Mol Cell* 10: 1007-1017.
37. Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, Horiuchi M, Ogura K, Mandiyan V, Schlessinger J, Inagaki F (2001) Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO J* 20: 2995-3007.
38. Dutta K, Shi H, Cruz-Chu ER, Kami K, Ghose R (2004) Dynamic influences on a high-affinity, high-specificity interaction involving the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Biochemistry* 43: 8094-8106.
39. Kami K, Takeya R, Sumimoto H, Kohda D (2002) Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J* 21: 4268-4276.
40. Groemping Y, Rittinger K (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386: 401-416.
41. Takeya R, Sumimoto H (2003) Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 16: 271-277.
42. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113: 343-355.
43. Donaldson LW, Gish G, Pawson T, Kay LE, Forman-Kay JD (2002) Structure of a regulatory complex involving the Abl SH3 domain, the Crk SH2 domain, and a Crk-derived phosphopeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14053-14058.

44. Latour S, Roncagalli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, Schwartzberg PL, Davidson D, Veillette A (2003) Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 5: 149-154.
45. Tatarova Z, Brabek J, Rosel D, Novotny M (2012) SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution. *PLoS One* 7: e36310.
46. Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA (2001) Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling. *EMBO J* 20: 6793-6804.
47. Janostiak R, Tolde O, Bruhova Z, Novotny M, Hanks SK, Rosel D, Brabek J (2011) Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Mol Biol Cell* 22: 4256-4267.
48. Sato M, Maruoka M, Yokota N, Kuwano M, Matsui A, Inada M, Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Takeya T (2011) Identification and functional analysis of a new phosphorylation site (Y398) in the SH3 domain of Abi-1. *FEBS Lett* 585: 834-840.
49. Pesti S, Balazs A, Udupa R, Szabo B, Fekete A, G BG, 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.
50. Mao M, Thedens DR, Chang B, Harris BS, Zheng QY, Johnson KR, Donahue LR, Anderson MG (2009) The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development. *Mamm Genome* 20: 462-475.
51. Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM (2008) Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1685-1702.
52. Malinin NL, Wright S, Seubert P, Schenk D, Griswold-Prenner I (2005) Amyloid-beta neurotoxicity is mediated by FISH adapter protein and ADAM12 metalloprotease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3058-3063.
53. Thompson O, Kleino I, Crimaldi L, Gimona M, Saksela K, Winder SJ (2008) Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts. *PLoS One* 3: e3638.

54. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, Quintavalle M, Courtneidge SA (2009) Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal* 2: ra53.
55. Gianni D, Diaz B, Taulet N, Fowler B, Courtneidge SA, Bokoch GM (2009) Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity. *Sci Signal* 2: ra54.
56. Gianni D, Taulet N, DerMardirossian C, Bokoch GM (2010) c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Mol Biol Cell* 21: 4287-4298.
57. Gianni D, DerMardirossian C, Bokoch GM (2011) Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol* 90: 164-171.
58. David-Pfeuty T, Singer SJ (1980) Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 6687-6691.
59. Tarone G, Cirillo D, Giancotti FG, Comoglio PM, Marchisio PC (1985) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 159: 141-157.
60. Chen WT, Chen JM, Parsons SJ, Parsons JT (1985) Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature* 316: 156-158.
61. Chen WT (1989) Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool* 251: 167-185.
62. Murphy DA, Courtneidge SA (2011) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413-426.
63. Gimona M, Buccione R, Courtneidge SA, Linder S (2008) Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol* 20: 235-241.
64. Buccione R, Orth JD, McNiven MA (2004) Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 647-657.

65. Linder S (2007) The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol* 17: 107-117.
66. Bowden ET, Coopman PJ, Mueller SC (2001) Invadopodia: unique methods for measurement of extracellular matrix degradation in vitro. *Methods Cell Biol* 63: 613-627.
67. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM (2010) Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol* 189: 541-556.
68. Van Goethem E, Guiet R, Balor S, Charriere GM, Poincloux R, Labrousse A, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V (2011) Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol* 90: 224-236.
69. Quintavalle M, Elia L, Condorelli G, Courtneidge SA (2010) MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 189: 13-22.
70. Seals DF, Azucena EF, Jr., Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M, Resau JH, Courtneidge SA (2005) The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell* 7: 155-165.
71. Oikawa T, Itoh T, Takenawa T (2008) Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *J Cell Biol* 182: 157-169.
72. Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, Chen WT (1994) A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Res* 54: 5702-5710.
73. Kelly T, Yan Y, Osborne RL, Athota AB, Rozypal TL, Colclasure JC, Chu WS (1998) Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 16: 501-512.
74. Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, Mueller SC (1999) An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC $\mu$  associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18: 4440-4449.

75. Blouw B, Seals DF, Pass I, Diaz B, Courtneidge SA (2008) A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol* 87: 555-567.
76. Stylli SS, I ST, Kaye AH, Lock P (2012) Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas. *J Clin Neurosci* 19: 436-442.
77. Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 32-43.
78. Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17: 7-30.
79. White JM (2003) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* 15: 598-606.
80. Wolfsberg TG, White JM (1996) ADAMs in fertilization and development. *Dev Biol* 180: 389-401.
81. Huovila AP, Almeida EA, White JM (1996) ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol* 8: 692-699.
82. Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A (2001) Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85alpha activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. *J Biol Chem* 276: 24466-24472.
83. Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, Izumi T, Takenawa T, Sabe H, Endo T (2000) Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene* 19: 5842-5850.
84. Horiuchi K, Weskamp G, Lum L, Hammes HP, Cai H, Brodie TA, Ludwig T, Chiusaroli R, Baron R, Preissner KT, Manova K, Blobel CP (2003) Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol* 23: 5614-5624.
85. Downward J (1994) The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett* 338: 113-117.
86. Chardin P, Cussac D, Maignan S, Ducruix A (1995) The Grb2 adaptor. *FEBS Lett* 369: 47-51.
87. Giubellino A, Burke TR, Jr., Bottaro DP (2008) Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1021-1033.
88. Takenawa T, Suetsugu S (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 37-48.



89. Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G (2004) Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 14: 303-311.
90. Snapper SB, Rosen FS (1999) The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol* 17: 905-929.
91. Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H, Takenawa T (2002) Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res* 62: 669-674.
92. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J (2005) Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* 168: 441-452.
93. Henry MD, Campbell KP (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11: 602-607.
94. Henry MD, Campbell KP (1996) Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8: 625-631.
95. Durbeej M, Henry MD, Campbell KP (1998) Dystroglycan in development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 10: 594-601.
96. Moore CJ, Winder SJ (2010) Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal* 8: 3.
97. Thompson O, Moore CJ, Hussain SA, Kleino I, Peckham M, Hohenester E, Ayscough KR, Saksela K, Winder SJ (2010) Modulation of cell spreading and cell-substrate adhesion dynamics by dystroglycan. *J Cell Sci* 123: 118-127.
98. Stylli SS, Stacey TT, Verhagen AM, Xu SS, Pass I, Courtneidge SA, Lock P (2009) Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *J Cell Sci* 122: 2727-2740.
99. Buday L, Wunderlich L, Tamas P (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14: 723-731.
100. Li W, Fan J, Woodley DT (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 20: 6403-6417.

101. Segal AW, Jones OT (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 276: 515-517.
102. Segal AW, Jones OT, Webster D, Allison AC (1978) Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 2: 446-449.
103. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322: 32-38.
104. Teahan C, Rowe P, Parker P, Totty N, Segal AW (1987) The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 327: 720-721.
105. Dinanuer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 327: 717-720.
106. Parkos CA, Dinanuer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3319-3323.
107. Segal AW (1987) Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature* 326: 88-91.
108. Nuno H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 242: 1298-1301.
109. Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242: 1295-1297.
110. Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW (1993) p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 ( Pt 3): 557-561.
111. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353: 668-670.

112. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254: 1512-1515.
113. Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 278: 3510-3513.
114. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD (2004) Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 279: 34250-34255.
115. Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 20006-20012.
116. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234-25246.
117. Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
118. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8010-8014.
119. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18: 69-82.
120. Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276: 1417-1423.
121. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276: 37594-37601.
122. Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA (2004) Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279: 18583-18591.

123. Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C (2005) Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *J Biol Chem* 280: 30046-30054.
124. Meng TC, Fukada T, Tonks NK (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9: 387-399.
125. Yang B, Tian C, Zhang ZG, Han FC, Azem R, Yu H, Zheng Y, Jin G, Arnold JE, Zheng QY (2011) Sh3pxd2b mice are a model for craniofacial dysmorphology and otitis media. *PLoS One* 6: e22622.
126. Mao M, Hedberg-Buenz A, Koehn D, John SW, Anderson MG (2011) Anterior Segment Dysgenesis and Early-Onset Glaucoma in nee Mice with Mutation of Sh3pxd2b. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 2679-2688.
127. Mao M, Solivan-Timpe F, Roos BR, Mullins RF, Oetting TA, Kwon YH, Brzeskiewicz PM, Stone EM, Alward WL, Anderson MG, Fingert JH (2012) Localization of SH3PXD2B in human eyes and detection of rare variants in patients with anterior segment diseases and glaucoma. *Mol Vis* 18: 705-713.
128. Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2: 756-768.
129. Iqbal Z, Cejudo-Martin P, de Brouwer A, van der Zwaag B, Ruiz-Lozano P, Scimia MC, Lindsey JD, Weinreb R, Albrecht B, Megarbane A, Alanay Y, Ben-Neriah Z, Amenduni M, Artuso R, Veltman JA, van Beusekom E, Oudakker A, Millan JL, Hennekam R, Hamel B, Courtneidge SA, van Bokhoven H (2010) Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *Am J Hum Genet* 86: 254-261.
130. Frank Y, Ziprkowski M, Romano A, Stein R, Katznelson MB, Cohen B, Goodman RM (1973) Megalocornea associated with multiple skeletal anomalies: a new genetic syndrome? *J Genet Hum* 21: 67-72.
131. ter Haar B, Hamel B, Hendriks J, de Jager J (1982) Melnick-Needles syndrome: indication for an autosomal recessive form. *Am J Med Genet* 13: 469-477.
132. Maas SM, Kayserili H, Lam J, Apak MY, Hennekam RC (2004) Further delineation of Frank-ter Haar syndrome. *Am J Med Genet A* 131: 127-133.

133. Heasman J (2002) Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev Biol* 243: 209-214.
134. Summerton J, Weller D (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7: 187-195.
135. Murphy DA, Diaz B, Bromann PA, Tsai JH, Kawakami Y, Maurer J, Stewart RA, Izpisua-Belmonte JC, Courtneidge SA (2011) A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. *PLoS One* 6: e22499.
136. Cejudo-Martin P, Courtneidge SA (2011) Podosomal proteins as causes of human syndromes: a role in craniofacial development? *Genesis* 49: 209-221.
137. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA (2004) The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23: 7957-7968.
138. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271: 695-701.
139. Lombardo CR, Consler TG, Kassel DB (1995) In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by c-src: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites. *Biochemistry* 34: 16456-16466.
140. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.
141. Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W (2001) SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* 3: 658-666.
142. Cheever ML, Sato TK, de Beer T, Kutateladze TG, Emr SD, Overduin M (2001) Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes. *Nat Cell Biol* 3: 613-618.
143. Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Y, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 3: 259-266.

144. Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11: 370-374.
145. Ammer AG, Weed SA (2008) Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 687-707.
146. Kirkbride KC, Sung BH, Sinha S, Weaver AM (2011) Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr* 5: 187-198.
147. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 9: 1863-1871.
148. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9742-9747.
149. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635-637.
150. Dahlgren C, Zhang HY, Du Q, Grahn M, Norstedt G, Wahlestedt C, Liang Z (2008) Analysis of siRNA specificity on targets with double-nucleotide mismatches. *Nucleic Acids Res* 36: e53.
151. Jackson AL, Linsley PS (2010) Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9: 57-67.
152. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284: 31-53.
153. Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 505-516.
154. Weernink PA, Rijksen G (1995) Activation and translocation of c-Src to the cytoskeleton by both platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 270: 2264-2267.
155. Stover DR, Becker M, Liebetanz J, Lydon NB (1995) Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem* 270: 15591-15597.

156. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274: 8335-8343.
157. Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM (2003) STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem* 278: 1671-1679.
158. Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273: 25770-25776.
159. Roof RW, Haskell MD, Dukes BD, Sherman N, Kinter M, Parsons SJ (1998) Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol Cell Biol* 18: 7052-7063.
160. Nojima Y, Mimura T, Morino N, Hamasaki K, Furuya H, Sakai R, Nakamoto T, Yazaki Y, Hirai H (1996) Tyrosine phosphorylation of p130Cas in cell adhesion and transformation. *Hum Cell* 9: 169-174.
161. Provenzano C, Gallo R, Carbone R, Di Fiore PP, Falcone G, Castellani L, Alema S (1998) Eps8, a tyrosine kinase substrate, is recruited to the cell cortex and dynamic F-actin upon cytoskeleton remodeling. *Exp Cell Res* 242: 186-200.
162. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71: 435-478.
163. Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, van Beurden EA, Hennipman A, Michels AA, Staal GE (1992) Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer Res* 52: 4773-4778.
164. Khazaie K, Schirrmacher V, Lichtner RB (1993) EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12: 255-274.
165. Banker N, Evers BM, Hellmich MR, Townsend CM, Jr. (1996) The role of Src family kinases in the normal and neoplastic gastrointestinal tract. *Surg Oncol* 5: 201-210.

166. Luttrell DK, Luttrell LM, Parsons SJ (1988) Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src. *Mol Cell Biol* 8: 497-501.
167. Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ (1995) Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6981-6985.
168. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P (1999) Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* 18: 2459-2471.
169. Williams JC, Weijland A, Gonfloni S, Thompson A, Courtneidge SA, Superti-Furga G, Wierenga RK (1997) The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol* 274: 757-775.
170. Xu W, Harrison SC, Eck MJ (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-602.
171. Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* 3: 629-638.
172. Boggon TJ, Eck MJ (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23: 7918-7927.
173. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE (1999) ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274: 17209-17218.
174. Keely SJ, Calandrella SO, Barrett KE (2000) Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular  $Ca^{2+}$ , PYK-2, and p60(src). *J Biol Chem* 275: 12619-12625.
175. Sato K, Kimoto M, Kakumoto M, Horiuchi D, Iwasaki T, Tokmakov AA, Fukami Y (2000) Adaptor protein Shc undergoes translocation and mediates up-regulation of the tyrosine kinase c-Src in EGF-stimulated A431 cells. *Genes Cells* 5: 749-764.



176. Lee CW, Lin CC, Lin WN, Liang KC, Luo SF, Wu CB, Wang SW, Yang CM (2007) TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L799-812.
177. Jaganathan S, Yue P, Paladino DC, Bogdanovic J, Huo Q, Turkson J (2011) A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 6: e19605.
178. Lee IT, Lin CC, Wu YC, Yang CM (2010) TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/TRAF2/PKCalpha-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol* 224: 454-464.
179. Kim HH, Sierke SL, Koland JG (1994) Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J Biol Chem* 269: 24747-24755.
180. Ram TG, Ethier SP (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase recruitment by p185erbB-2 and erbB-3 is potently induced by neu differentiation factor/herregulin during mitogenesis and is constitutively elevated in growth factor-independent breast carcinoma cells with c-erbB-2 gene amplification. *Cell Growth Differ* 7: 551-561.
181. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
182. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 777-788.
183. Olzmann JA, Chin LS (2008) Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination: a signal for targeting misfolded proteins to the aggresome-autophagy pathway. *Autophagy* 4: 85-87.
184. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115: 727-738.

185. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146: 1239-1254.
186. Goley ED, Welch MD (2006) The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 713-726.
187. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465.
188. Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM, Borisy GG (1997) Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* 139: 397-415.
189. Stradal TE, Scita G (2006) Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18: 4-10.
190. 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.
191. Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Boeri Erba E, Smeriglio M, Turco E, Retta SF, Giuffrida MG, Venturino M, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Schaefer E, Beguinot L, Tacchetti C, Gaggini P, Silengo L, Tarone G, Defilippi P (2002) Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem* 277: 9405-9414.
192. van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuuring E (2006) Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp Cell Res* 312: 1658-1670.

## **11.Saját publikációk jegyzéke**

### ***11.1.Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények***

- 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.
- Bogel G, Gujdar A, Geiszt M, Lanyi A, Fekete A, Sipeki 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.

### ***11.2.Egyéb közlemények***

- 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.
- 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.
- 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.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Buday Lászlónak, hogy laboratóriumában végezhettem PhD-munkámat, valamint az Orvosi Vegytani Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak Prof. Mandl Józsefnek és Prof. Bánhegyi Gábornak, amiért helyet biztosítottak számomra az Intézetben.

Köszönet illeti Tamás Pétert és Illés András, akiktől TDK-munkám során a dolgozatban bemutatott kísérleti technikák java részét tanultam.

Köszönöm munkacsoportunk jelenlegi és volt munkatársainak munkáját és segítségét, különösen Gujdár Annamáriáét, aki a Tks4-gyel kapcsolatos első kísérleteket végezte laboratóriumunkban. Köszönettel tartozom asszisztensünknek, Solti Zitának, aki a plazmid és GST-fehérje tisztítás mellett számos egyéb műveletben is segítséget nyújtott. Köszönöm Dr. Pesti Szabolcs laboratóriumi munkámhoz nyújtott segítségét, valamint az MTA TTK Enzimológiai Intézetében dolgozó munkatársaimnak, Fekete Annának és Ádám Csabának, hogy rendelkezésemre bocsátották még nem publikált eredményeiket. Köszönet illeti Sipeki Szabolcsot és Bander Erzsébetet, akik laboratóriumunkban beállították a dolgozatban bemutatott Boyden-kamrás módszert.

Szeretnék köszönetet mondani Geiszt Miklósnak és Lányi Árpádnak, valamint munkacsoportjainak – különösen Péterfi Zalánnak és Baráth Mónikának –, akik együttműködő partnerként jelentősen hozzájárultak az itt bemutatott kutatómunka sikeréhez.

Köszönettel tartozom Prof. Buday Lászlónak, Pesti Szabolcsnak és Fekete Annának akik a dolgozat szövegét lelkiismeretesen átnézték és számos hibáját javították.

Köszönöm továbbá a doktori szigorlati bizottság elnökének (Prof. Tretter László) és tagjainak (Prof. Sármay Gabriella és Dr. Czirják Gábor), hogy elvállalták a vizsgáztatás feladatát valamint a dolgozat munkahelyi bírálójának, Dr. Kardon Tamásnak, hogy számos kérdésével és megjegyzésével hozzájárult a dolgozat színvonalának emeléséhez.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet valamennyi dolgozójának segítségükért és támogatásukért.

Végül köszönöm családomnak, hogy PhD-munkámban támogattak.