

# Állványfehérjék szerepe a tirozin kinázokkal működő jelpályákban

Doktori értekezés

**dr. Pesti Szabolcs**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buday László egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Csontos Csilla egyetemi docens, CSc.  
Dr. Németh Tamás egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pál Gábor egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Balla András tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
1. Rövidítések jegyzéke .....	3
2. Bevezetés .....	5
3. Irodalmi áttekintés .....	6
3.1 Tirozin kinázok .....	6
3.1.1 Nem receptor tirozin kinázok .....	7
3.1.2 Receptor tirozin kinázok .....	8
3.2 Eph tirozin kináz receptorcsalád .....	12
3.3 Állvány- és kapcsoló fehérjék .....	15
3.3.1 Állványfehérjék .....	16
3.3.2 Kapcsoló fehérjék .....	24
3.4 SH3 domén tirozin foszforilációja .....	28
3.4.1 Az SH3 domén .....	28
3.4.2 Az SH3 domén által létrehozott interakciók szabályozása .....	31
3.4.3 Az SH3 domén tirozin foszforilációja .....	33
4. Célkitűzések .....	35
5. Anyagok és módszerek .....	36
5.1 Plazmidok és DNS konstrukciók .....	36
5.2 Ellenanyagok .....	37
5.3 Sejtvonalak, tranziens transzfekció és stimuláció .....	38
5.4 Immunprecipitáció és Western Blot .....	38
5.5 Caskin SH3 doménjének tisztítása .....	39
5.6 In vitro foszforiláció .....	40
5.7 CD spektroszkópia .....	40
5.8 Caskin1 SH3 doménjének 3D modellezése .....	41
5.9 Natív gélelektroforézis .....	41
5.10 Immunfluoreszcens festés .....	41
6. Eredmények .....	43
6.1 A Caskin1 az Nck SH3 doménjeihez kapcsolódik .....	43
6.2 A Caskin1 az Nck-n keresztül az EphB1 tirozin kinázhoz kötődik .....	48

6.3	EphB1 hatására foszforilálódik a Caskin1 296-os és 336-os tirozinja .....	53
6.4	A tirozin foszforiláció az SH3 domén szerkezetváltozásához vezet .....	60
6.5	A Tks4 állványfehérje Frank-ter Haar szindrómában kimutatott néhány mutánsának expressziós és lokalizációs vizsgálata .....	66
7.	Megbeszélés és következtetések.....	69
8.	Összefoglalás.....	75
9.	Summary.....	76
10.	Irodalomjegyzék .....	77
11.	Saját publikációk jegyzéke .....	97
11.1	Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények.....	97
11.2	Az értekezés témájától független közlemény .....	97
12.	Köszönetnyilvánítás .....	98

## 1. Rövidítések jegyzéke

ADAM	Disintegrin és metalloproteináz
ATP	adenozin trifoszfát
CASK	Calcium/calmodulin-dependens szerin protein kináz
Caskin	CASK-interacting protein
CD	cirkuláris dikroitizmus
CID	CASK-interacting domén
Crk	CT10 (virus) kináz regulátor
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Ditiotreitol
EGF	Epidermális növekedési faktor
Eph	Erythropoetin-termelő hepatocelluláris karcinóma
FAK	Fokális adhézions kináz
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GFP	Zöld fluoreszcens protein
GPI	Glikozil-foszfatidil-inozitol
Grb2	Növekedési-faktor receptor-kötő protein 2
GST	Glutation S-transzferáz
IGF1	Inzulinszerű növekedési faktor
MAGUK	Membrán-asszociált guanilát kináz
MAPK	Mitogén aktivált protein kináz
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NGF	Idegi eredetű növekedési faktor
NIK	Nck-interacting kináz
nRTK	Nem receptor tirozin kináz
PBS	Foszfát-pufferes sóoldat
PDGF	Trombocita eredetű növekedési faktor
PDZ	Posztzinaptikus denzitás, disc large, zo-1
PH	Pleksztrin homológ
PMSF	Fenil-metil-szulfonil fluorid

PSD	Posztszinaptikus denzitás
PTB	Foszfotirozin kötő
PTK	Protein tirozin kináz
PX	Phox homológ
ROS	Reaktív oxigén származék
RTK	Receptor tirozin kináz
SAM	Steril alfa motívum
SDS-PAGE	SDS poliakrilamid gélelektroforézis
SH2	Src homológ 2
SH3	Src homológ 3
SKAP	Src kináz asszociált protein
SOS	Son of sevenless
TKD	Tirozin kináz domén
Tks4	Tirozin kináz szubsztrát 4 SH3 doménnel
Tks5	Tirozin kináz szubsztrát 5 SH3 doménnel
VEGF	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
WASP	Wiscott-Aldrich szindróma protein

## 2. Bevezetés

Magasabb szintű életformák létrejöttének előfeltétele volt az egyedülálló sejtek közötti kommunikáció. Ez a kommunikáció teszi lehetővé a sejtek funkcióinak összehangolását, a különálló sejtek együttműködését. A folyamatot magát, amely során egy sejt a külső és belső környezeti hatásokra válaszol jelátvitelnek, más szóval szignál transzdukciónak nevezzük.

A sejtek közötti kommunikációs hálózat tehát jelátviteli folyamatok összetett rendszerére épül. Ez a rendszer felelős a sejt alapműködéséért, összehangolja a különböző tényezőkre adott reakciókat. A jelátvitel alapját, a jel továbbítását különböző fehérjék közötti interakció biztosítja. A folyamat során a sejten kívülről érkező információ továbbítása, modulálása történik. Bizonyos fehérjéknek effektor funkciójuk van, ilyenek például a kinázok, melyek a célfehérje foszforilációjával idéznek elő változást. Az effektor fehérjék megfelelő működését az úgynevezett állvány- (scaffold) és kapcsoló (adaptor) fehérjék teszik lehetővé.

Az állványfehérjék kulcsfontosságú szabályozói sok jelátviteli útvonalnak. Noha a funkciójuk nincs szigorúan definiálva, az állványfehérjék úgy ismertek, mint nagy molekulatömegű fehérjék, melyek a jelátviteli út tagjait megkötik, és komplexekbe szervezik. Hasonló funkciója van a kapcsoló fehérjéknek is, melyek azonban 2 vagy 3 fehérjét kötnek össze.

A jelátvitelben szerepet játszó állványfehérjék első példáinak a receptor tirozin kinázokat, mint az epidermális növekedési faktor receptort és a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptort tartották [1]. Ebben az esetben a receptor ligandaktiváció hatására foszforilálódott citoplazmatikus doménjét tekintették az állványzatnak, melyhez különböző fehérjék kapcsolódhattak Src homológ 2 (SH2) doménjeikkel. A jelenlegi definíció szerint állványfehérjének nevezünk minden olyan proteint, mely jelátviteli fehérjéket hoz egymás fizikai közelségébe.

Az azonban már az előző bekezdésből is látszik, hogy az állványfehérjéknek kulcsszerepük van a tirozin kinázokkal működő jelpályákban. Értekezésemben ezt a kapcsolatot fogom részletezni.

### 3. Irodalmi áttekintés

A foszforiláció egyike a legalapvetőbb szabályozó mechanizmusoknak [2]. A reverzibilis tirozin foszforiláció fontosságát a sejtműködések szabályozásában még jobban alátámasztja a tény, hogy a tirozin kinázok képezik az onkogének legnagyobb csoportját [3].

A tirozin foszforiláció viszonylag újabb keletű evolúciós innováció, hiszen körülbelül 600 millió éve jelent meg az első többsejtű élőlényekkel [4]. A teljes foszforilációs jelátviteli rendszer, amely egy „író” (kináz), egy „törlő” (foszfatáz), és egy „olvasó” (SH2 domén) egységből áll, a choanoflagellata *Monosiga brevicollis*-ban jelent meg [5,6]. Egyes elemei azonban már más egysejtűekben, például *Acanthamoeba*, is megjelentek [7].

#### 3.1 Tirozin kinázok

A protein tirozin kinázok (PTK) olyan enzimek, melyek az ATP gamma foszfát csoportját helyezik át különböző fehérjék tirozin oldalláncára foszfát észter kötés kialakulása mellett.

A PTK-ok egy nagy és diverz géncsalád, mely a metazoákra jellemző. Alapfunkciójuk közé tartozik a többsejtű szervezetek működésének a szabályozása, beleértve a növekedést, differenciálódást, a sejtadhézió kialakulását, a motilitást és a sejthalált [8]. Emberek esetében kimutatták, hogy a tirozin kinázok jelentős szerepet játszanak számos betegség, köztük a cukorbetegség, illetve malignus daganatok különböző típusainak kialakulásában [8]. Nemrég derült fény arra, hogy számos egysejtű élőlény is rendelkezik a metazoákhoz hasonló receptor és nem receptor tirozin kinázokkal. Pontos élettani funkciójuk azonban még nem ismert. Valószínűleg az extracelluláris jelekre - mint tápanyagok, ionok vagy kemikáliák - adott válaszban vesznek részt [9].

A tirozin kinázok testesítik meg az emberi daganatokban szerepet játszó onkogének prototípusát. Emellett kongenitális szindrómák széles spektrumához, mint a törpenövés, vénás fejlődési rendellenesség, vagy a koponya elcsontosodása (*craniosynostosis*) is hibás tirozin kináz gének köthetők [10]. Az elmúlt 30 év intenzív kutatása betekintést engedett ezen gének és termékeik szerkezetébe, szabályozásába és funkciójába.

A tirozin kinázok, hasonlóan a szerin/treonin és a treonint és tirozint egyaránt foszforilálni képes úgynevezett vegyes kinázokhoz, konzervált katalitikus doméneket tartalmaznak, jellegzetes aldomén motívumokkal, melyek egyértelműen meghatározzák a tirozin kinázok egyes tagjait [11]. A tirozin kináz motívumok magas fokú konzerváltsága lehetővé tette a tirozin kináz gének azonosítását a legtöbb metazoa törzsből. Tirozin kináz géneket írtak le a szivacsok, csalánozók, fonalféreg, gyűrűsféreg, ízeltlábúak, tüskésbőrűek és a gerincesek esetében [12-17].

A protein tirozin kinázokat két fő csoportba lehet osztani attól függően, hogy rendelkeznek-e receptor-szerű tulajdonságokkal és transzmembrán doménekkel.

Ez a két csoport a

- nem receptor tirozin kinázok (nRTK)
- receptor tirozin kinázok (RTK)

Mind a két típus megtalálható minden metazoában.

### **3.1.1 Nem receptor tirozin kinázok**

A nem receptor tirozin kinázok citoplazmatikus enzimek. Humán sejtekben eddig 32 különböző kinázot találtak, melyek 10 alcsoportba sorolhatóak a kináz domén szekvenciája alapján [8]. A fehérjecsaldok fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménekkel rendelkeznek (pl. SH2 és SH3 domének), melyekkel információt képesek közvetíteni [18].

A nem receptor tirozin kinázok is gyakran vesznek részt receptor-mediált transzmembrán jelátviteli útvonalakban. Ilyen esetben a PTK aktivitásától megfosztott receptorok sejten belüli jelátviteli alegységeiként funkcionálnak [19]. Például a trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF) receptorának aktiválódása az Src nem receptor tirozin kináz család kihelyeződéséhez és aktivációjához vezet, ami többek között DNS szintézist és aktin polimerizációt von maga után [20]. Az a megfigyelés, hogy számos nem receptor tirozin kináz fontos része valamilyen receptor mediált jelátvitelnek felveti a kérdést, hogy miért használ néhány receptor nRTK-t, míg más receptorok saját tirozin kináz doménnel rendelkeznek? A legvalószínűbb magyarázat, hogy a nRTK-ok, mint alegységek, sejt-specifikus jelátvitelt tesznek lehetővé, ami egyes PTK-ok sejt-specifikus expressziós mintázatán alapul. Továbbá, többféle válaszreakció jöhet létre, mely elősegíti a különböző receptorok közötti kommunikációt.

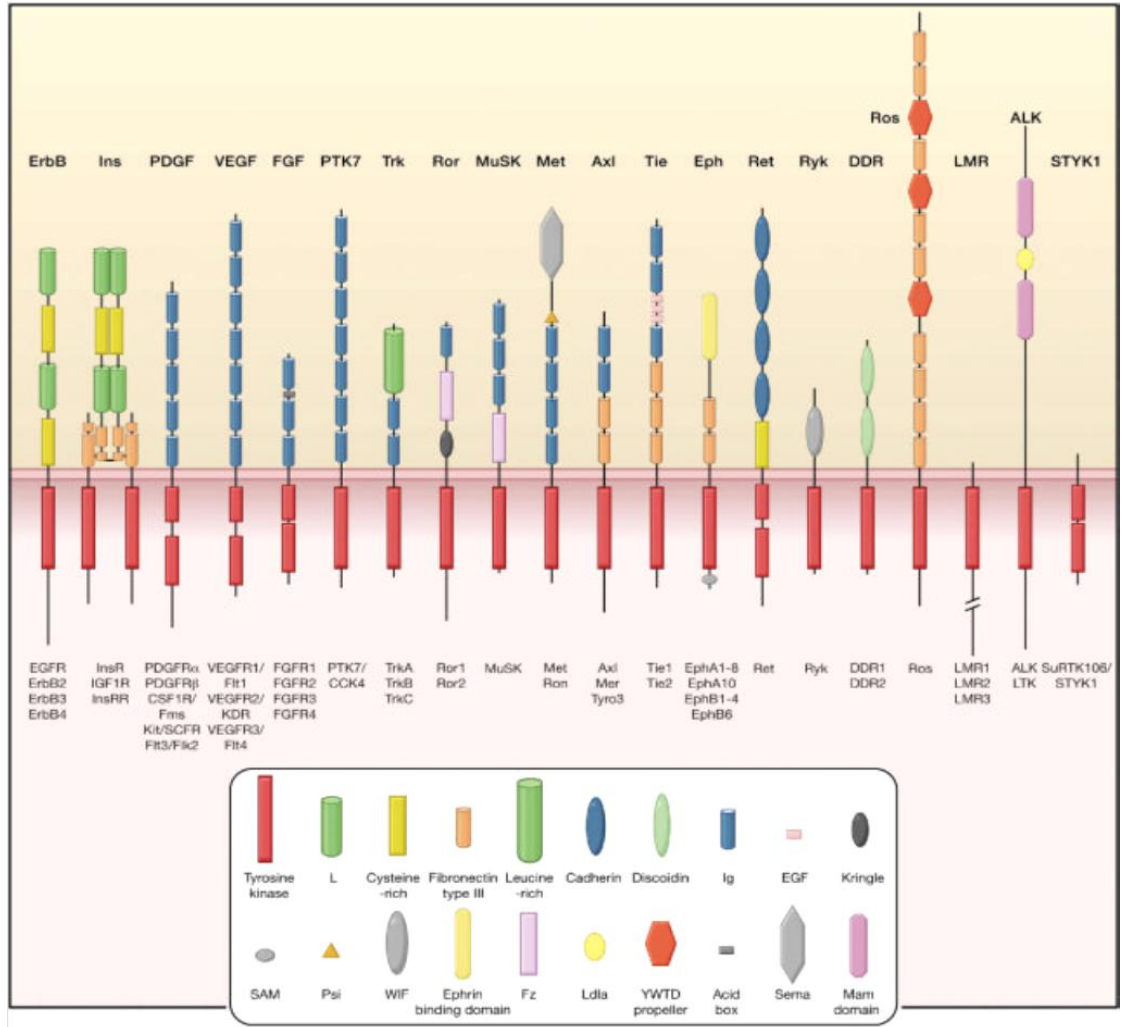


Mivel a PTK-ok közül munkám során főleg a receptor tirozin kinázokkal foglalkoztam, ezért a következőkben erről a csoportról részletesebben írok.

### **3.1.2 Receptor tirozin kinázok**

Az első tirozin kináz receptor felfedezése óta (több, mint negyed százada) a sejtfelszíni receptorcsalád sok tagjáról derült ki, hogy kulcs szabályozói olyan fontos sejtműködéseknek, mint a sejtproliferáció, differenciáció, túlélési jelpálya, metabolizmus, sejtváándorlás és a sejtciklus [21].

Az ember esetében 58 különböző RTK ismert, melyeket 20 alcsaládra oszthatunk (3-1. ábra). Minden RTK-nak hasonló a molekuláris felépítése. A receptorok N terminálisán egy ligandkötő domén található, melyet egy transzmembrán hélix követ. A citoplazmatikus régió tartalmazza a tirozin kináz domént, illetve a különböző C terminális és juxtamembrán szabályozó régiókat. Az evolúcióban a *Caenorhabditis elegans*tól az emberig a RTK-ok átfogó topológiája, az aktiváció mehanizmusa, a beindított intracelluláris jelátviteli utak fő szereplői rendkívül konzerváltak. Ez összhangban van az általuk végzett szabályozó szerepkörrel.



**3-1. ábra: Receptor tirozin kináz családok.** Az ábrán a humán RTK-ok 20 alcsaládjá látható sematikusan. Minden receptor alatt az adott család tagjai olvashatóak, illetve az extracelluláris régió doménszerkezete is megfigyelhető. [21]

Ahogy már említettem számos betegség okozója olyan genetikai változás vagy abnormalitás, mely a RTK-ok aktivitását, mennyiségét, vagy szabályozását érinti. Receptor tirozin kinázok mutációját, illetve az intracelluláris jelátviteli útjaik aberráns aktivációját ok-okozati összefüggésbe hozták karcinómák, diabétesz, gyulladások, csont rendellenességek, érlelmeszesedés és érújdonképződés kialakulásával. Ezek a kapcsolatok számos újgenerációs hatóanyag kifejlesztéséhez vezettek, melyek gátolják vagy csökkentik a RTK-ok aktivitását [21].

Ha általánosságban megnézzük, azt mondhatjuk, hogy a növekedési faktor kötődése aktiválja a RTK-okat, azáltal, hogy előidéz a receptor dimerizációját [22]. Fontos megjegyezni, hogy egyes RTK-ok az aktiváló ligand hiányában is oligomereket

képeznek. Például az inzulin receptor és az IGF1-receptor diszulfid híddal összekötött dimer ( $\alpha\beta$ ) formájában expresszálódik a sejtfelszínen [23]. Az inzulin kötődése szerkezeti változást okoz a receptor dimerben, ami stimulálja a tirozin kináz aktivitást és a jelátvitelt. Néhány tanulmány szerint az epidermális növekedési faktor (EGF) már létező receptoroligomerhez kötődik [24,25], de az oligomerek pontos természete és mérete még nem ismert. Továbbá azt is kimutatták, hogy bizonyos RTK-ok, mint a Tie2 (egy angiopoetin receptor) és az Eph receptorok aktiválása nagyobb oligomerek kialakulását igénylik [26,27]. Függetlenül attól, hogy az inaktív állapot monomer vagy oligomer, a receptorok aktivációjához a legtöbb esetben szükséges a ligand kötődése. Ennek következtében stabilizálódik a kapcsolat az aktív dimerben vagy oligomerben a receptormolekulák között.

RTK-okról és citokin receptorokról készült korai tanulmányok egy egyértelmű ligand indukálta dimerizációt írtak le: a kétértékű ligand egyidejűleg lép kapcsolatba a két receptor molekulával, és egy dimerbe kapcsolja össze őket. Ezt a ligand-közvetített receptor dimerizációt később kristályszerkezeti elemzésekkel is bizonyították, több RTK ligandkötő doménfragmentumának és a kötődő ligandok kapcsolódásának vizsgálatával. Erre példa az őssejt faktor receptor KIT [28], az Flt1 vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor [29], a nerve growth factor (NGF)/neutrophin receptor TrkA [30], az Ax1 [31], Tie2 [26] és az Eph receptorok [27].

A ligandaktiváció hatására a receptorok a katalitikus doménon kívül eső tirozin oldalláncokon autofoszforilálódnak, aminek következtében SH2 vagy foszfortirozin kötő (PTB) domén kötődésére alkalmas hely jön létre. A foszfortirozinok tehát dokkolóhelyként funkcionálnak az SH2 vagy PTB doménnel rendelkező enzimeknek (pl. a nRTK Src és a Ras-GAP), vagy kapcsoló fehérjéknek (pl. Grb2, Shc és Crk). Ezen fehérjék pedig további molekulákat vagy jelátviteli kaszkádokat aktiválhatnak (pl. a Ras/MAPK kaszkád) [18].

A tirozin kináz doménon (TKD) belüli aktivációs hurok foszforilációjának döntő szabályozó szerepe van a legtöbb kináz esetében. A foszforiláció szükséges mind az aktív konformáció stabilizálásához [32], mind az esetleges öngátló interakciók destabilizálásához. Ezen szabályozó mehanizmushoz tartozik, hogy több RTK esetében egy TKD-en kívül eső fehérjerészlet gátolja cisz-autoinhibícióval az aktivációs helyet. A legismertebb példa a juxtamembrán gátlás pl. a MuSK [33], az Flt3 [34] és a KIT

[35] fehérjéknél, valamint az Eph RTK-oknál [36]. Minden esetben a juxtamembrán régió egyes szekvenciái kiterjedt kapcsolatot létesítenek a TKD néhány elemével, beleértve az aktivációs hurkot, és stabilizálják a gátolt konformációt. Ezek a gátló kölcsönhatások egyes részleteiben különböznek a TKD-ek között, de mindig a juxtamembrán régió néhány kulcs tirozinja játsza a főszerepet a működésükben. A receptor dimerizáció transz-foszforilálja ezeket a tirozinokat, aminek következtében megszűnik az öngátlás és a receptor aktiválódhat [37]. Olyan mutációk, melyek megzavarják ezt az autoinhibíciót a KIT/PDGF receptor családnál folyamatos RTK aktivációhoz vezetnek, és gyakran kimutathatóak daganatokban [38].

Összegezve azt mondhatjuk, hogy az első és legfontosabb foszforilációs szubsztrátjai a RTK-oknak saját maguk. Ahogy már említettem a kináz doménon belüli autofoszforilációs helyek is fontos szabályozó szerepet töltenek be a legtöbb RTK esetében (kivéve az EGF és a Ret). Például az aktivációs hurok autofoszforilációja hatására az inzulin receptor TKD-jának katalitikus hatékonysága 50-200-szorosára fokozódik [39]. De nem csak a kináz domén, hanem a receptor citoplazmai régiójának más részei is autofoszforilálódhatnak. Ezek a foszfortirozinok pedig a korábban már említett SH2 és PTB doménnal rendelkező leszálló jeltátvivő molekulák dokkoló helyei lehetnek.

Mivel kísérleteim során a RTK-ok közül az Eph receptorokkal foglalkoztam, ezért a következő fejezetben erről receptorcsaládról adok egy kis áttekintést.

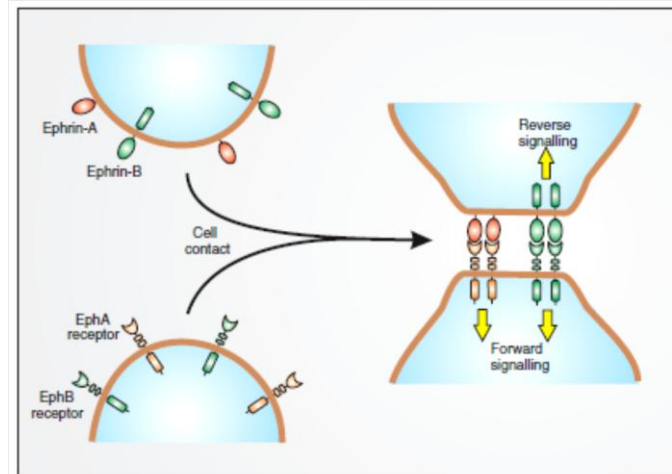
### 3.2 *Eph tirozin kináz receptorcsalád*

Az Eph receptorok, melyeket elsőként egy speciális daganatsejtben fedeztek fel (eritropoetin termelő hepatocelluláris karcinóma, Eph), a receptor tirozin kinázok (RTK) legnagyobb családját alkotják, és egyedülálló tulajdonságaikkal fokozzák a jelátvitel kapacitását [40,41]. 16 különböző tagját mutatták ki eddig gerincesekben, melyek közül 14 az emlősökben is megjelenik [42].

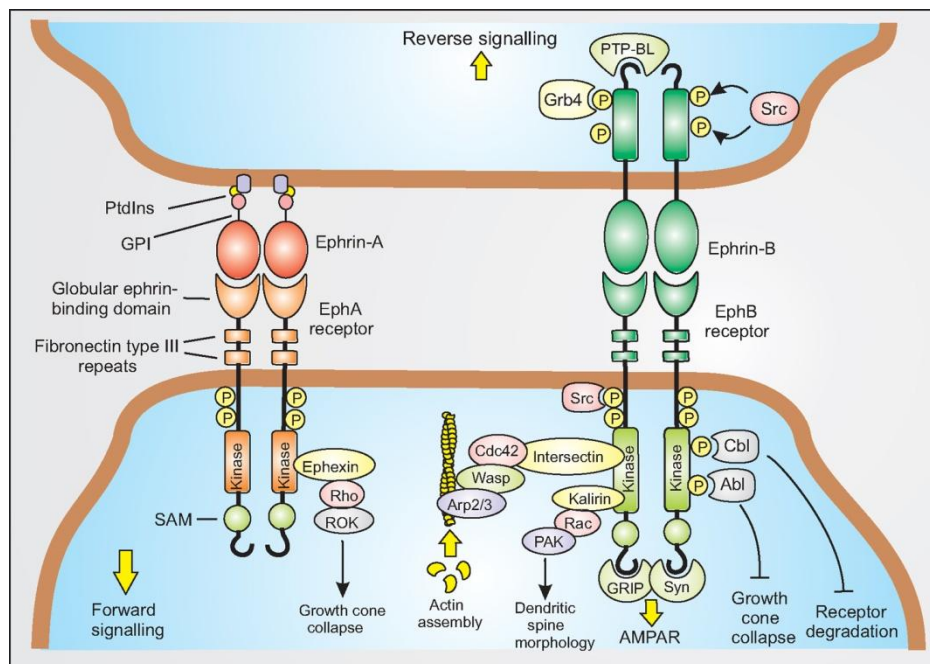
Az Eph receptorokat általában saját ligandjaik, az Ephrinek (Eph receptor interacting fehérjék) aktiválják, melyek legtöbbször a sejt felszínén kötve találhatóak. Az aktiváció leggyakrabban a szomszédos sejtről kiindulva transz módon történik. Az utóbbi időben azonban cisz interakciót is leírtak azonos sejten lévő Ephrinek és Eph receptorok között [43,44].

Az Eph receptorokat és az Ephrineket két alcsoportra lehet osztani a szerkezeti hasonlóság és affinitás alapján. Az Ephrinek A csoportja glikozilfoszfatidil-inozitol (GPI) motívummal horgonyzódik a sejt felszínéhez, és elsősorban EphA receptorokkal lép interakcióba, míg az Ephrin B ligandok egy transzmembrán doménnel rendelkező proteinek, és az EphB receptorok iránt mutatnak nagy affinitást [42,45]. Ahogy már említettem emlősökben 14 Eph receptort (EphA1-A8, EphA10, EphB1-B4, EphB6) és 9 Ephrin ligandot (Ephrin-A1-A6, Ephrin-B1-3) azonosítottak [45].

Az Eph-Ephrin interakciók meglehetősen kuszák mind az A és B csoporton belül, mind azok között. Például az EphA4 meg tudja kötni az Ephrin-B2-t és Ephrin-B3-at, az EphB2 pedig kapcsolódhat az Ephrin-A5-höz [46]. Az Eph receptorok és Ephrinek másik tulajdonsága a kétirányú jelátvitelre való képességük. Az Ephrin hatására aktiválódott EphB receptor aktivációját előremutató, forward jelpályának hívjuk a receptort kifejező sejtben. Ezzel szemben reverse útnak nevezzük az Ephrint expresszáló sejtben aktiválódó jelet (3-2. ábra). Az evolúció során az Eph receptorok néhány ősi génből váltak az RTK-ok legnagyobb alcsaládjává. Mindez mutatja az Eph jelátvitel jelentőségét gerincesekben [47,48]. Az Eph receptorok és Ephrin ligandok funkcióinak sora egyre hosszabb és hosszabb. Szerepük van a sejtosztódásban, sejtváándorlásban, axon irányításban (axon guidance), szinaptogenezisben, a szinaptikus plaszticitás kialakulásában, és eddig csak a központi idegrendszerben betöltött funkcióiról volt röviden szó. Emellett az éréjdonképzésben, csontképződésben és egyes daganatok kialakulásában is kimutatták jelentőségüket [49] (3-3. ábra).



**3-2. ábra: Eph receptor/Ephrin kétirányú jelátvitel.** Az Ephrinek sejtfelszíni ligandok, melyek szomszédos sejtek Eph receptoraival lépnek kölcsönhatásba, és kétirányú (forward és reverse) jelátvitelt hoznak létre. [50]



**3-3. ábra: Az Ephrin/Eph receptor rendszer jelátviteli sémája.** Ephrin ligandok bekötődésének hatására az Eph receptorok aktiválódnak. Míg az Ephrin-A ligandok glikozilfoszfatidilinozitol (GPI) horgonnyal kapcsolódnak a membrán foszfatidilinozitoljaihoz, addig az Ephrin-B ligandok transzmembrán fehérjék, melyek reverse jelátvitelre képes citoplazmai doménnel rendelkeznek. Eph receptorok forward jelátvitel során a kináz domén meghatározott tirozin oldalláncai foszforilálódnak, és ezáltal kötőhelyet biztosítanak különböző jelátviteli molekuláknak. Ezek közül számos az aktin átrendezés irányításában játszik szerepet, melyre jó példa a dendritikus tüskék kialakulásának szabályozása. [50]

Amíg az elmúlt években a receptorok és ligandjaik szerepét az embrionális korban bekövetkező retinotektális projekcióban intenzíven tanulmányozták [51,52], addig a központi idegrendszerben, az őssejtek proliferációjának és differenciációjának a szabályozása csak az elmúlt időszakban adódott a listához [53,54]. Az Eph receptorok és az Ephrinek gyakran mint kemorepellensek tevékenykednek, komplex multidimenzionális expressziós grádienszt létrehozva irányítják nagyon pontosan a sejteket vagy axonokat a végső helyükre [55]. Továbbá szabályozzák a glutamát receptorok irányítását és funkcióját is [56,57].

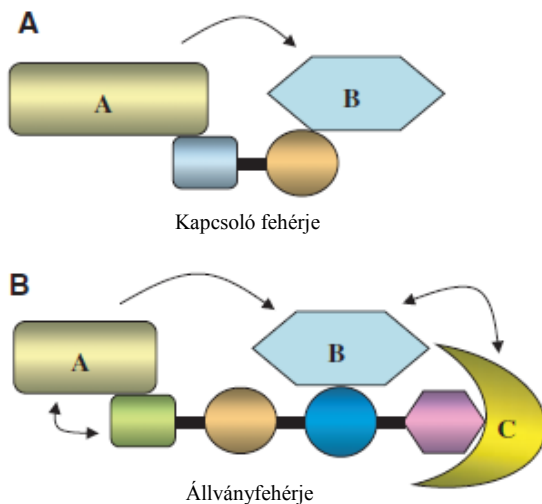
Az elmúlt évek kutatásai alapján valószínűleg az Eph receptorok szabályozhatnak olyan adhezív folyamatokat is, melyek az excitátoros szinaptikus kapcsolatok kialakulásáért felelősek [58]. Az excitátoros szinapszisok nagy többsége a felnőtt emlős agyban a dendritikus tüskék területére lokalizálódik. A tüskék olyan mikrométeres kitüremkedések a dendritek felszínén, melyek egy excitátoros szinapszis posztszinaptikus részét képezik, és fontos szerepet játszanak a posztszinaptikus válaszban. Az Eph receptorok ezen kívül részt vesznek az aktin citoskeleton szabályozásában, ezáltal a tüskék és szinapszisok kialakulásában, a szinaptikus plaszticitásban [59].

További bizonyítékot szolgáltat az EphB receptorok szerepére a dendritikus tüskék létrejöttében a Henkemeyer és munkatársai által végzett tanulmány, melyben EphB1/B2/B3 receptor génhányos egereket vizsgáltak. A kísérletekben szimpla, dupla vagy tripla receptorhiány hatását elemezték a tüskék kialakulásában [60]. Kimutatták, hogy a tripla EphB1/B2/B3 receptor hiányos egerek hippocampális neuronjaiban nem tudtak érett tüskék kifejlődni. Az *in vitro* eredményeket *in vivo* megfigyelések is alátámasztották, miszerint csökkent a tüskék száma, és azok is éretlen morfológiát mutattak [60]. Ezzel szemben az endogén EphB receptorok Ephrin-B1 és Ephrin-B2 liganddal történő stimulálása a hippocampális sejt kultúrákban az érett tüskék gyors növekedését indította be, mely folyamat kináz aktivitásától megfosztott EphB2-vel gátolható volt [60,61].

### 3.3 Állvány- és kapcsoló fehérjék

Az állványfehérjék (scaffold protein) fontos szerepet játszanak különböző jelátviteli utak sejten belüli szabályozásában. Ezek a fehérjék multiprotein komplexek kialakításában vesznek részt, mellyel különböző proteinek hoznak egymás fizikai közelségébe [62]. Noha az állványfehérjék a legtöbb sejtípusban megtalálhatóak, legnagyobb mennyiségben az idegrendszerben fejeződnek ki. Az előző fejezetben részletezett receptor tirozin kinázokat, mint az EGF és a PDGF receptor, tartották az állványfehérjék első típuspéldáinak [1].

Hasonló funkciójuk van az úgynevezett kapcsoló fehérjéknek is. Az irodalomban kapcsolónak vagy adaptornak nevezzük azokat a kisebb molekulatömegű fehérjéket, melyek kettő vagy három fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménnel rendelkeznek [63]. A molekulaméret mellett további különbség az állvány- és a kapcsoló fehérjék között (noha az irodalomban gyakran egymás szinonimájaként használják őket), hogy míg az állványfehérjék általában a sejten belül meghatározott lokalizációban vannak jelen (pl. posztszinaptikus denzitás, sejtmag, Golgi, endoszómák), addig a kapcsoló fehérjék szabadabban mozoghatnak a citoszólban (3-4. ábra). A következőkben nézzük meg részleteiben a két fehérjetípus funkcióját.



**3-4. ábra: A kapcsoló és az állványfehérjék működése.** Mindkét típusú fehérje a jelátvitel szabályozásában vesz részt azáltal, hogy megköti, irányítja, komplexbe szervezi az útvonal egyes komponenseit.

(A) A kapcsoló fehérjék leggyakrabban kicsi, két kötő régióval rendelkező proteinek, melyek két legtöbbször enzimaktivással rendelkező fehérje megkötésére képesek.

(B) Az állványfehérjék nagy multidomén proteinek és ezáltal a jelátviteli út számos tagjának megkötésére képesek. A fehérjékben lévő aminosavak átlagosan 43,3%-a rendezetlen szakaszon belül található. A, B és C általános fehérjéket jelölnek.

[63]



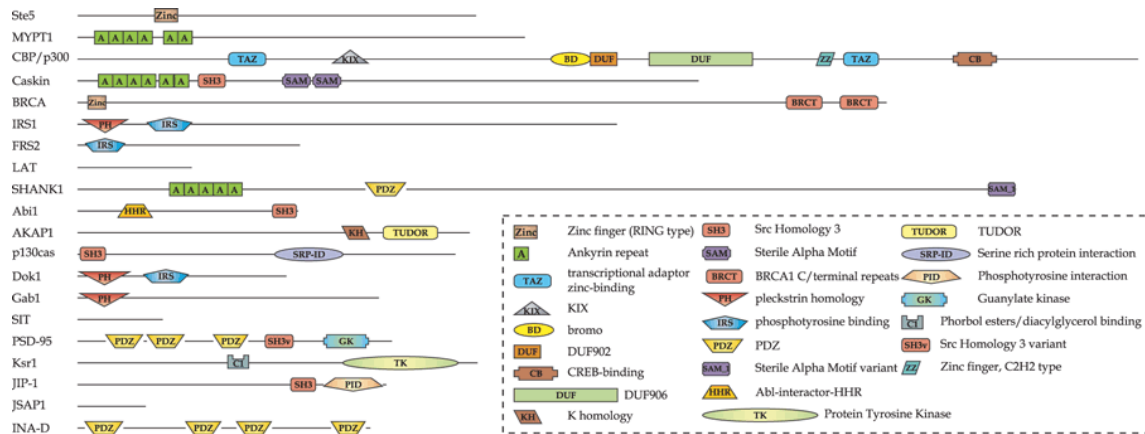
### 3.3.1 Állványfehérjék

Definíció szerint az állványfehérjék jelátviteli komplexeket hoznak létre több fehérje, illetve enzim egyidejű megkötésével, melyek ezáltal megfelelő fizikai közelségbe kerülnek, lokális koncentrációjuk megnő, és kommunikálhatnak egymással. A klasszikus megfogalmazás szerint az állványfehérjék passzív platformként funkcionálnak a kialakuló "szignaloszómban". Újabban azonban kiderült, hogy aktív szabályozóként is részt vehetnek a jelátvitelben. Működésüket négy alap mechanizmusra lehet felosztani:

- a) platformként működnek, melyen a jelátviteli molekulák összekapcsolódnak
- b) a fehérjéket a sejt egy meghatározott részére lokalizálják
- c) módosítják a jelátviteli utat a pozitív és negatív feedback szignálok összehangolásával
- d) megvédik az aktivált jelátviteli molekulákat az inaktíválódástól

Az állványfehérjék fentebb felsorolt funkciói még sokrétűbbé teszik a jelátviteli kaszkádok működését, hiszen jelátviteli küszöbök alakíthatnak ki, és összetett jelátviteli működéseket szabályozhatnak [62]. Mindezekre típuspélda az egyik legjobban jellemzett állványfehérje, a Ste5. A Ste5 központi szereplője az élesztő párosodás jelátviteli útjának, hiszen mind az extracelluláris jelre reagáló receptort, mind a MAP kináz kaszkád tagjait képes megkötni [64]. Funkciói közé tartozik a fehérjekomplexek létrehozása, az intracelluláris lokalizáció biztosítása, allosztérikus feed-back és feed-forward szabályozás és a degradáció elleni védelem [62].

Az állványfehérjék egyrészt létező jelátviteli pályák kontextus függő finomhangolását, másrészt a jelátviteli molekulák új kombinációjával, új utak létrejöttét teszik lehetővé. A fehérjék rendkívül heterogének mind szerkezetileg, mind funkció szempontjából. A 3-5. ábrán látható, hogy gyakran rendelkeznek elkülönülő, fehérje-fehérje interakcióra képes kötő doménnel, illetve emellett rendezetlen szerkezetet is mutatnak [65]. Ez a felépítés biztosítja a dinamikus átrendeződéshez szükséges kötő régiókat és flexibilitást (3-5. ábra). Ezen törvényszerűségek egyaránt megjelennek a neuronokban és immunsejtekben található állványfehérjékben is.



**3-5. ábra: Néhány kiválasztott állványfehérje doménszerkezete.** Az ábra 20 állványfehérje család egy-egy tagjának a doménszerkezetét mutatja. Látható, hogy a legtöbb fehérje számos fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménnel rendelkezik. A funkcionális doméneket összekötő szürke szakaszok olyan régiók, melyek nem mutatnak felismerhető hasonlóságot eddig ismert fehérjékkel. [65]

Idegsejtekben és immunsejtekben az állványfehérjék részt vesznek a kémia szinapszis komplex szerkezetének a kialakításában. A szinapszisok tengernyi receptort, ioncsatornát, a preszinaptikus membrántól érkező jelek érzékeléséhez és feldolgozásához szükséges jelátviteli fehérjéket tartalmaznak, melyek szervezetten, a citoszkeletonhoz kapcsolódva hatalmas komplexeket hoznak létre [66,67]. Tipikus példája az előbb említett komplexnek a posztszinaptikus denzitás (PSD). A PSD legismertebb állványfehérjéi a membrán-asszociált guanilát kinázok, a MAGUK fehérjék [68]. Felépítésükre jellemző, hogy különböző számú posztszinaptikus denzitás, disc large, zo-1 (PDZ) domént, SH3 domént, L27 domént és egy C-terminális guanilát kináz domént tartalmaznak [69]. A legjobban tanulmányozott MAGUK fehérje T sejtekben a DLG1, míg idegsejtekben a hasonló funkciókkal rendelkező PSD95. A PSD95 a posztszinaptikus denzitás legnagyobb mennyiségben előforduló állványfehérjéje, mely három PDZ domént tartalmaz és számos receptort (NMDA) [70], csatornát ( $K^+$ ) [71], citoszkeletonális és jelátvivő fehérjéket (ADAM22 [72], synGAP[73]) köt meg. Pontosan a kötőpartnerek sokszínűsége miatt a PSD95 funkciói közé tartozik a receptorok klaszterezése, a receptorról kiinduló jel Rho és Ras G-fehérjék felé való irányítása, a receptorok átalakulásának szabályozása. Hasonló logika ismerhető fel a DLG1-nél (más néven SAP-97), mely az immunológiai szinapszisoknál szabályozza a bekötődő T-sejt receptor hatására bekövetkező citoszkeleton átrendeződést [74].

A fenti két fehérje, csak két kiragadott példa a rengeteg állványfehérje közül, melyek mind számos fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménnel és motívummal rendelkeznek, melyek előtt/között/után hosszú rendezetlen régió található. Többek között ilyen fehérje a ProSAP/Shank1 (proline-rich synapse-associated protein/SH3 and ankyrin repeat containing protein) és az általunk vizsgált Caskin1 (Cask-interacting protein) az idegsejtek posztzinaptikus denzitásában, illetve a laborunkban kutatott további állványfehérje a Tks4 és a Tks5 is.

## CASKIN1

Az általunk vizsgált állványfehérjét, a Caskin1-et 2002-ben azonosították CASK-kötő fehérjeként [75]. Azóta több mint 10 éve telt el, de még mindig vajmi keveset tudunk a funkciójáról, noha számos bizonyíték azt mutatja, hogy egy fontos idegrendszeri állványfehérjéről van szó.

A CASK szerkezetét tekintve egy állványfehérje, mely a MAGUK családba tartozik. Több tekintetben is különlegesnek tekinthető ugyanakkor, mivel nem csak a szinaptikus fehérjék irányításában, hanem az idegfejlődésben és génexpresszió szabályozásban is szerepet játszik [76]. Kimutatták a kapcsolatát többek között a Parkinson kór kialakulásában szerepet játszó parkinnal, számos sejtfelszíni molekulával, mint a neurexin, a szindekán, a glikoforin,  $Ca^{2+}$  csatorna fehérjékkel, Mint1, Veli, SAP97, CIP98 állványfehérjékkel, transzkripció faktor Tbr1-gyel [77-86], illetve a Caskin1-gyel.

Azon túl, hogy a Caskin1 kötődik a CASK fehérjéhez, kimutatták az interakcióját a LAR receptor protein tirozin foszfatázzal, a Dock, a neurexin2, a synaptotagmin és a septin4 proteinekkal [65,87,88].

A Caskin1 az agyban mutat magas expressziós szintet. Az agyon belül először a neuronok preszinaptikus régiójában [75], majd a PSD-ban mutatták ki előfordulását, mind mRNS [89], mind protein [90] szinten génchip és tömegspektrometria alkalmazásával is.

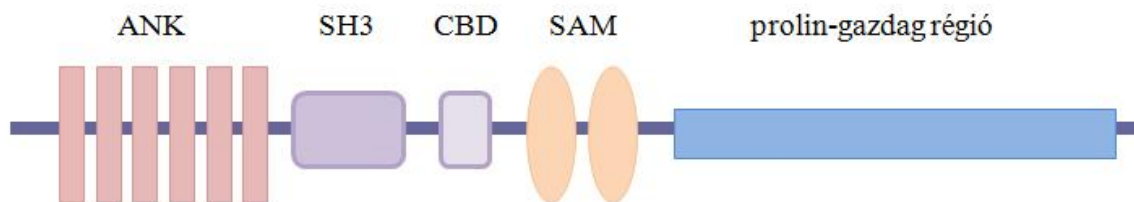
A Caskin1-ről eredetileg úgy gondolták, hogy csak gerincesekben található meg. 2011-ben azonban Drosophilában felfedeztek egy Caskin1 homológot, melyről kimutatták, hogy részt vesz a LAR receptor tirozin foszfatáz mediálta motoros axon irányításban [87].

Egy másik munkacsoport a Caskin1 mRNS szintjének csökkenését figyelte meg embrionális korban etanol diétának kitett patkányokban. Ez alapján összefüggés mutatkozik a Caskin1 expresszió és az anyai alkoholfogyasztás között. Valószínűsítették, hogy a Caskin1 szintjének csökkenése fontos szerepet játszik a szinaptikus ingerületátvitel megváltozásában. Ezt egészíti ki, hogy azok a további gének, melyeknek leginkább csökkent az expressziója az idegsejtek nyúlványainak kinövésében és a dendritikus tüskék formálódásában van szerepük (Tropomiozin 3 gamma, béta spektrin) [91].

2008-ban Ala és munkatársai egy érdekes tanulmányban konzervált koexpressziót vizsgálva igyekeztek kapcsolatot találni különböző betegségeket okozó gének között. Azt találták, hogy a Caskin1 szerepet játszhat a csecsemőkori mioklonusos epilepsziában [92].

Eddig csak a Caskin1-ről írtam, de a Caskin1-nek létezik egy izoformája a Caskin2. A felépítésük nagyon hasonló, azonban kisebb szerkezetbeli eltérések megfigyelhetők a két fehérje között. Fontos különbség, hogy a Caskin2 nem kötődik a CASK-hoz [75].

A Caskin fehérjék N terminálisán hat ankirin ismétlődésből álló régió található, melyet egy SH3 domén, majd CBD (CASK-kötő domén) és két középső steril-alfa motívum (SAM) domén követ. A fehérjék C terminálisán egy hosszú körülbelül 800 aminosavból álló rendezetlen prolin-gazdag régió helyezkedik el [65,75]. (3-6. ábra)



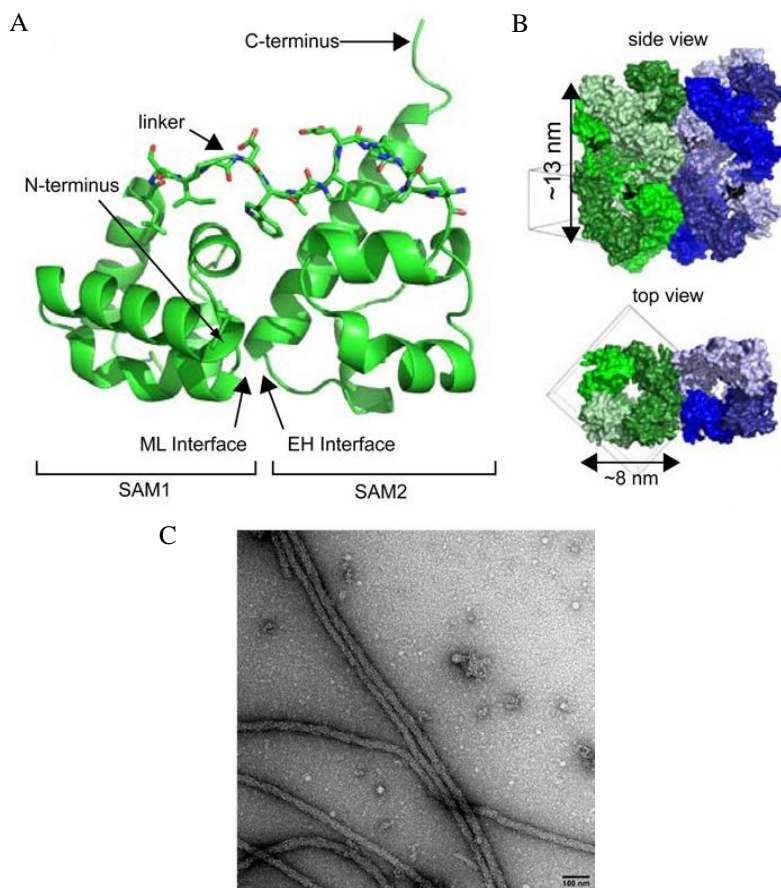
**3-6. ábra: A Caskin1 szerkezete.** A fehérje amino-terminálisán először ankirin ismétlődések (ANK), majd egy SH3 domén, a CASK-kötő domén (CBD), két homo- és heterodimerizációra képes SAM domén, végezetül egy hosszú prolin-gazdag régió található. Az állványfehérje nagy része, főleg a C-terminális fele rendezetlen szerkezetet mutat. Megfigyelhető továbbá, hogy a Caskin1 nem rendelkezik enzimaktivitásért felelős doménnel.

Ahogy már említettem, a Caskin1-et CASK kötő fehérjeként azonosították. Neve is innen ered *Cask interacting protein*. Most már ismerve a Caskin1 doménszerkezetét, elmondhatjuk, hogy a CASK CaM kináz doménje kötődik a Caskin1 SH3 és SAM domének közötti szakaszához, a CASK-kötő doménhez (CBD). Ez a szakasz a Caskin két izoformájában eltérő. Ezzel magyarázható, hogy a Caskin2 nem kötődik a CASK-hoz [75].

Megvizsgálva a Caskin1 szerkezetét, látható, hogy leginkább a Shank állványfehérjével mutat hasonlóságot, mely szintén tartalmaz ankirin ismétlődést, egy SH3 domént, egy prolin-gazdag régiót és a C terminálisán egy SAM domént [93]. A Caskin és a Shank

proteinek doménszerkezetében megjelenő egyezések a konvergens evolúció során hasonló funkcióra kialakuló fehérjék szép példáját mutatják [94,95].

2011-es adatok azt mutatják, hogy a Caskin1 tandem SAM doménjei egy polimert alakítanak ki (négy Caskin1 tandem SAM moduljából). Az így létrejött hélix 8 SAM domént tartalmaz fordulatonként és szokatlanul hosszú a menetemelkedése (3-7. ábra). Ez az újonnan felfedezett tulajdonság is fontosnak tűnik a Caskin1 szinaptikus funkciók szervezésében betöltött szerepében. A kísérletek alapján valószínű, hogy a Caskin SAM doménjei segítenek létrehozni a preszinaptikus sejtmatrixot az aktív zónában. A munkacsoport egy olyan hipotetikus jelpályát ír le, melyben a neurexin-hez kötődő CASK kihorgonyozza a Caskin1-et a preszinaptikus membránhoz. Caskin1 pedig a szinaptotagminnal interakcióba lépve elősegíti a szinaptikus vezikulák dokkolódását [96].



**3-7. ábra: Caskin1 SAM polimerek.** (A) A Caskin1 két SAM doménje intramolekuláris dimert alakít ki az első domén ML és a második domén EH felszíne között. (B) A kristályszerkezeti ábrán látható, hogy a helikális polimerek egymás mellett helyezkednek el. (C) Caskin1 SAM doménjei által létrehozott rostok negatív festést követő elektronmikroszkópos képe. [96]

**TKS4 ÉS TKS5 FEHÉRJÉK**

A két egymáshoz szerkezetében és részben funkciójában nagyon hasonló fehérje közül a Tks5-öt fedezték föl először 1998-ban Sara Courtneidge és munkatársai [97]. A munkacsoport egy újfajta fág bemutatáson alapuló módszert használt Src szubsztrátok azonosítására, és így talált rá az addig ismeretlen fehérjére. A fehérje N-terminális részén egy PX (phox-homology) domén található, melyet öt SH3 domén követ (3-8. ábra). A Tks5-ről kimutatták, hogy az Src-transzformált sejtek podoszómáiban helyezkedik el és az ADAM metalloproteáz család néhány tagjához kapcsolódik [98]. Később megállapították, hogy a Tks5 az invazív tumorsejtek podoszómáiban is kifejeződik. Emellett a Tks5 szükséges a proteáz-alapú matrigel invázióhoz emberi daganatsejtekben [99]. Úgy tűnik ebben a folyamatban az Nck kapcsoló fehérjék kapcsolják a Tks5-t az invadopodia aktin szabályozásához és az extracelluláris mátrix degradációjához. Immunfluoreszcens mikroszkópiával végzett vizsgálatok szerint az Nck csak akkor lokalizálódik a podoszómákba, ha a Tks5 a megfelelő helyen tirozinon foszforilálódik [100]. Nemrégiben kimutatták, hogy a Tks5-nek szerepe van a dúcléc sejteinek vándorlásában a zebradánió embriók fejlődése során [101].

A Tks5-tel rokon Tks4 fehérjét három, egymástól független munkacsoport írta le [102-104]. Doménszerkezete igen hasonló a Tks5-höz: az N-terminális PX domént itt négy SH3 domén követi (3-8. ábra). A Tks4 az Src és az EGF receptoron keresztüli aktin citoskeleton szabályozás egy fontos állványfehérjéjévé emelkedett az elmúlt időszakban [104-106]. Kimutatták továbbá, hogy a Tks4 fontos szerepet játszik a funkcionális podoszómák kialakulásában [103], reaktív oxigén származékok (ROS) termelésében daganatsejtekben [107-109], és a fehér zsírszövet differenciálódásában [102].

A Tks4, illetve a Tks5 fehérjék egyedfejlődésben betöltött szerepére gén-hiányos állatmodellek és egy ritka humán genetikai betegség vizsgálata világított rá. 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 [110,111]. 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 [112]. Iqbal és munkatársai 13 Frank-ter Haar szindrómát hordozó család vizsgálata során 7 olyan családot találtak, melyben a Tks4 génje mutációt szenvedett. 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 (R43W) találtak [113]. Munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy az R43W mutáció súlyosan károsítja a Tks4 sejten belüli kifejeződését és funkcióját [105].

Tks5



Tks4



**3-8. ábra: Tks5 és Tks4 fehérjék doménszerkezete.** A fehérje amino-terminálisán egy PX domén található, melyet a Tks5 esetén öt, a Tks4 esetében négy SH3 domén követ. A doméneket összekötő szakaszokon több olyan prolin-gazdag régió található, ami SH3 domének kötőhelye lehet.



### 3.3.2 Kapcsoló fehérjék

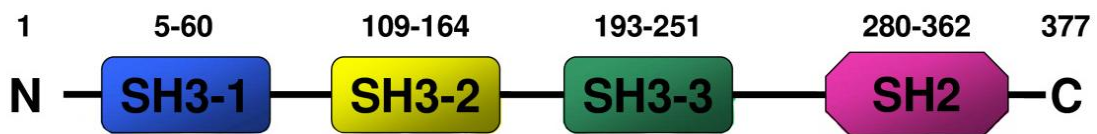
A kapcsoló fehérje kifejezést általában azokra az alacsony molekulatömegű fehérjékre értjük, melyek egy jelátviteli út két tagját kötik össze.

A kapcsoló fehérjék először azonosított csoportja az SH2/SH3 domént tartalmazó fehérjecsalád volt. Ilyen protein a Grb2, a Crk, a CrkL és az Nck1 [114]. Az SH2 domén, ahogy már a RTK-oknál említettem, az aktivált receptorok vagy a szubsztrátjaik megfelelő foszfortirozin oldalláncát köti meg [115], míg az SH3 domének a célfehérjék interakcióra alkalmas prolin-gazdag motívumaihoz asszociálódnak [116]. Érdekes módon a kapcsoló fehérjék ezen családja csak egy SH2, míg gyakran két vagy több SH3 domént tartalmaz. Elméletileg az SH3 domének nagyobb száma lehetővé tenné, hogy a fehérje külön-külön több ligandot tudjon megkötni. A gyakorlatban azonban úgy tűnik, hogy a domének között bizonyos kooperáció van a ligand megkötése során. Az Nck esetében erről még részletesebben írok.

Az SH2/SH3 domént tartalmazó kapcsoló fehérjék funkciója közé tartozik, hogy összekösse a célmolekulákat a membránhoz kötött receptorral. Néhány esetben a kapcsoló fehérje lipid-kötő doménjén keresztül közvetlenül a plazmamembránhoz viszi a kötő partnereket. Hematopoetikus sejtekben a pleksztrin homológ (PH) doménnel rendelkező kapcsoló molekulák biztosítják az összeköttetést az aktiválódó foszfoinozitol-3 kináz és a limfocita-funkciókért felelős fehérjék között. Példának okáért aktivált limfocitákban a SKAP (Src kináz asszociált foszfoprotein) és a Bam32 (32 kDa-os B-limfocita adaptor molekula) más néven DAPP (dual-adaptor for phosphotyrosine and 3-phosphoinositides) kikötődése a plazmamembránhoz a foszfoinozitol-3 kináz lipidtermékein keresztül valósul meg [117]. Míg a SKAP egy PH domént tartalmaz az N terminális végen és egy SH3 domént a C terminális végen, addig a Bam32/DAPP1 egy SH2 és egy PH doménnel rendelkezik. Ennél fogva, noha mindkét kapcsoló fehérje képes a membrán foszfoinozitoljaihoz asszociálódni, a SKAP prolin-gazdag molekulákat, míg a Bam32/DAPP1 foszfortirozint tartalmazó fehérjéket köthet ki a plazmamembránhoz.

## Nck

Az Nck család az SH2/SH3 domént tartalmazó kapcsoló fehérjék közé tartozik. Két tagját azonosították: az Nck1/ $\alpha$ -t és az Nck2/ $\beta$ -t [118,119]. Az Nck fehérjék szerkezetére jellemző egy C terminális SH2 domén, mely a pY-D-X-V motívumhoz kötődik előszeretettel, és három N terminális SH3 domén, mellyel az aktin citoskeleton átalakulásban szerepet játszó fehérjékhez kapcsolódhat, például az N-WASP-hoz, vagy a Pak szerin-treonin kinázhoz [119]. (3-9. ábra)



**3-9. ábra: Az Nck1 fehérje szerkezete.** A fehérje N-terminálisán három SH3 domén követi egymást, mellyel prolin-gazdag régiókhoz kapcsolódhat. A C-terminálison pedig foszfo tirozinok kötésére képes SH2 domén helyezkedik el. A domének között hosszabb, rövidebb rendezetlen szakaszok találhatóak. <http://www.biosignaling.com/content/7/1/1/figure/F1?highres=y>

Szerepüket kimutatták többek között az embriogenezis során a mezoderma fejlődésnél [120], patogén ágens-gazdasejt interakció során kialakuló citoskeleton átrendeződésnél [121-124], T-sejt receptor aktivációnál [125], invadopódiumok kialakulásánál [100,126], sejt adhézió és motilitás esetében [127-132], illetve vese podocitákban a sejtek közötti kapcsoló struktúrák szerveződésében [133,134].

A két izoformának 68%-ban azonos az aminosav szekvenciája [135], és mindkét forma azonos affinitással tudja megkötni a foszfopeptideket SH2 doménjével [136]. Noha úgy tartjuk, hogy az Nck1-nek és Nck2-nek a funkciói többnyire átfedik egymást [120], néhány esetben ki lehet mutatni, hogy egyes sejteknél és jelátviteli utaknál a két forma nem felcserélhető [130,137,138].

Összességében azt mondhatjuk, hogy az Nck kapcsoló fehérjék kiváló célpontjai azoknak a sejtfelszíni receptoroknak, melyek aktivációja aktin citoskeleton átrendeződéshez vezet. Erre példa a funkciók között eddig még nem említett axon guidance-ben betöltött szerepe. Számos axon vezetésben szerepet játszó receptorhoz asszociálódhat az Nck. Többek között a B típusú Eph receptorokhoz [139,140], az ő

transzmembrán Ephrin ligandjaikhoz [141], a Robo (*Drosophila Roundabout*) [142], és a netrin-1 receptor DCC-hez [143]. Továbbá több citoplazmai dokkoló fehérjéhez is kapcsolódhat, mint a Dok1 [139], disabled-1 [144], és a p130<sup>cas</sup> [145]. Ezen kívül az Nck *Drosophilában* jelenlévő ortológja, a Dock (dreadlocks) is fontos szerepet játszik a Pak-kal összekapcsolódva [146] a fotoreceptor sejtek (R sejtek) axon irányításában [147].

Egy 2009-es tanulmányban mutatták ki, hogy a nem receptor tirozin kináz Src által foszforilált, munkacsoportunk által is vizsgált Tks5 állványfehérje megköti az Nck-t. Ez pedig az invadopódiumok aktin összeszerelődésének szabályozásához, ezáltal az extracelluláris mátrix degradációjához vezet [100].

Az előbb már említettem, hogy az Nck fehérjék kötődhetnek az EphB receptorokhoz is. Számos tanulmány bizonyítja, hogy nem csak a B, hanem a különböző A típusú receptorokkal is interakcióba léphet a fehérje. Kimutatták kapcsolatát EphB1, EphB2, EphA2, EphA3 és EphA4 receptorral is [88,138,140,148-150].

Stein és munkatársai írták le először, hogy az aktiválódott EphB1 receptor képes megkötni az Nck-t. A kapcsolat a receptor juxtamembrán régiójában lévő 594. foszfortirozint tartalmazó pYIDP motívuma és a kapcsoló fehérje SH2 doménje között jön létre [140]. A két fehérje közötti kapcsolatot tovább vizsgálva kimutatták, hogy az EphB1 receptor szabályozza az integrin-függő sejtadhéziót a c-Jun kináz Ste20 NIK (Nck-interacting kináz) által történő aktivációjával. A jelátvitel során kialakuló komplexben a receptor és a NIK mellett részt vesznek még értelemszerűen az Nck, továbbá a p62<sup>dok</sup>, és a RasGAP fehérjék is [149]. Az EphB1 receptor és az Nck jelátvitelét boncolgatva jutottak arra a felfedezésre is, hogy a receptor hatására aktiválódó c-Src foszforilálja a paxillin 31. és 118. tirozinját. A jelátviteli út során az aktivált EphB1 594-es foszfortirozinjával megköti az Nck-t, mely komplexet képez a paxillinnel és a fokális adhéziós kinázzal (FAK). Közben a c-Src az EphB1 600-as foszfortirozinjához kapcsolódik, és foszforilálja a kikötött paxillint. Ezen események végső soron EphB1 hatására bekövetkező sejt migráció létrejöttében játszanak fontos szerepet [148].

Már többször említettem, hogy az Nck SH3 doménjeivel az RTK jelpályában prolin-gazdag régióval rendelkező partnereket tud megkötni. Kísérleti adatok ezen túlmenően azt is mutatják, hogy különböző Nck konstrukciók, melyek mind a három SH3 domént

tartalmazzák, sokkal nagyobb affinitással tudnak a partner fehérjékhez kötődni, mint egy-egy különálló SH3 domén [119,151]. Ennél fogva nagyon valószínű, hogy azok a kapcsoló fehérjék, melyek két vagy három egymást követő SH3 domént tartalmaznak valójában csak két tagját kapcsolják össze a jelátviteli útnak.

### 3.4 SH3 domén tirozin foszforilációja

#### 3.4.1 Az SH3 domén

Az SH3 (Src-homology) domén más fehérjék prolin-gazdag szakaszait felismerni és kötni képes konzervált szerkezeti egység, melyet 1988-ban írtak le [152-154]. A domén egyike a legjobban jellemzett interakcióra alkalmas fehérje moduloknak. Az SH3 domén által közvetített jelátvitel szerepet játszik az összes alapvető sejtfolyamatban, valamint számos patológiás állapotban, beleértve a malignus transzformációt is [155]. Elterjedtségét mutatja, hogy a konzervált doménszerkezeteket katalogizáló SMART adatbázis [156] jelen értekezés írásakor 536 olyan emberi fehérjét tartalmazott, melyek a szekvencia homológia alapján ilyen doménnal rendelkezhet.



RT- hurok

**3-10. ábra: A humán Tks5 fehérje első SH3 doménjének szerkezete.** Sárgával a doménre jellemző öt  $\beta$ -redő, lilával pedig egy rövid  $\alpha$ -hélix került jelölésre. A domén alsó részén látható az RT-hurok.

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2EGA&bionumber=1>

oldalláncokat. Például az Src SH3 doménjének esetében a ligandkötéshez alapvető oldalláncok a Y90, a N135 és a Y136 az első zsebben, a Y92, a W118 és a P133 a második zsebben, és a D99 és Y131 a harmadik zsebben (aminosavszámozás a csirke c-Src alapján) [159,160].

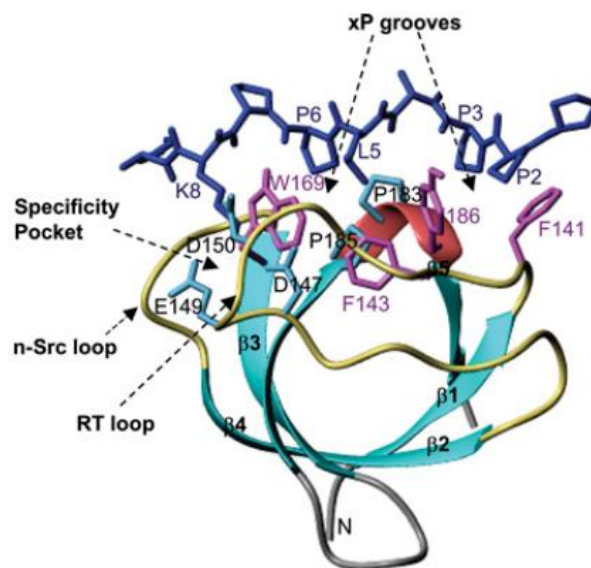
A domén körülbelül 60 aminosav hosszúságú, központi részét egy öt lemezből álló, antiparallel szerkezetű  $\beta$ -redő, és egy  $3_{10}$  hélix alkotja. A lemezeket összekötő szakaszok közül a leghosszabb az úgynevezett RT-hurok, melyet a benne található fontos arginin (R) és treonin (T) oldalláncokról neveztek el (3-10. ábra).

Az SH3 közvetített jelátviteli folyamatok leggyakrabban a domén szerkezete által felismert poliprolin-II hélixeken keresztül valósulnak meg [157]. Az SH3 domén ligandkötő felszíne

kulcsszerepet játszik az intra- és intermolekuláris interakciókban [158]. Ez a felszín három hidrofób zsebet tartalmaz, melyek mindegyike konzervált aminosav oldalláncokkal rendelkeznek. Mutációs vizsgálattal kimutatták a liganddal való összekapcsolódáshoz szükséges legfontosabb

Az SH3 domének legjobban ismert kötőpartnerei a prolin-gazdag, PxxP motívumot hordozó peptid szakaszok. Ezeknek két klasszikus osztálya ismert. Az első osztályba tartozó peptidekre az (R/K)xxPxxP szekvencia jellemző. Azaz a kötőpartner közepét alkotó PxxP motívum előtt egy arginin vagy lizin található. A második osztályba tartozó célpeptidek PxxPx(R/K) szekvenciával rendelkeznek. A pozitív töltésű oldalláncok így ebben az esetben a PxxP résztől C-terminálisan foglalnak helyet [161]. A prolin, mint szekunder amin merev szerkezete miatt, az ebben az aminosavban gazdag szekvenciák legkedvezőbb másodlagos szerkezete a kollagénhez hasonló, balmenetes, korábban már említett poliprolin-II hélix. A hélixben három aminosav alkot egy fordulatot.

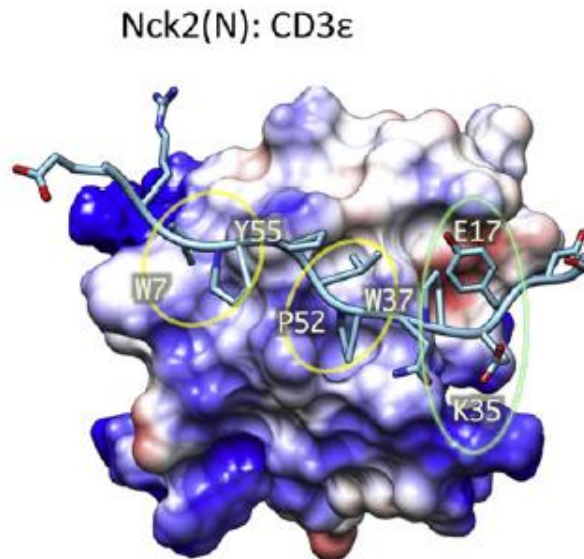
A 3-11. ábrán a Crk N-terminális SH3 doménje látható egy második osztályba tartozó ligandjával komplexben [162]. A kötőfelületen négy aromás aminosav (lila színűek az ábrán) két árkot alakít ki (xP grooves), melyekbe a poliprolin hélix egy-egy csavarulata fekszik bele, mely magában foglalja a PxxP szekvenciát. Ettől C-terminálisan (az ábrán balra) található a pozitív töltésű aminosav (ebben az esetben egy lizin: K8), ami szorosan illeszkedik az RT-hurok három negatív töltésű aminosava által alkotott zsebbe



**3-11. ábra: A Crk fehérje N-terminális SH3 doménjének és megkötött ligandjának kristályszerkezete.** Az SH3 domén másodlagos fehérjeszerkezeti elemei különböző színű szalagokként jelölődnek. A kapcsolódó fehérje (PPPALPPKRR) sötétkék színnel került ábrázolásra. Az SH3 domén kötőfelületén az aromás oldalláncok lilával, a nem aromás oldalláncok világoskékkel láthatóak. Amíg az aromás aminosavak a hidrofób kötőzsebeket (xP grooves), addig az RT hurok negatív töltésű aminosavai a specifikus zsebet hozzák létre. [161]

(Az ábrán a D147, E149 és D150 aminosavak határolta zseb, "Specificity Pocket"). Ezek a bázikus aminosavak nemcsak a kötési energiát növelik azáltal, hogy elektrosztatikus kölcsönhatásokat alakítanak ki a specifikus zsebben lévő aminosavakkal, de irányítják is a ligandot a kötőhely felé. Az első osztályba tartozó ligandok hasonló kötőhellyel rendelkeznek, de ők ellentétes irányban kötődnek az SH3 doménekhez, így a negatív töltésű kötőhelyhez itt a PxxP szerkezettől aminoterminálisan elhelyezkedő bázikus aminosav illeszkedik.

Nem minden SH3 ligand tartalmaz azonban PxxP motívumot. Az Nck, az Eps8 tirozin-kináz szubsztrát és a hozzá hasonló fehérjék SH3 doménje például PxxDY motívumot ismernek fel [163]. (3-12. ábra)



**3-12. ábra:** Az Nck N-terminális SH3 doménjének és ligandjának (CD3ε citoplazmatikus farka) **komplexe**. Az ábrán sárgával bekarikázva az xP árkok, zölddel a specificitás zseb látható. A ligand és az SH3 domén interakciója során a kapcsolat a ligand PxxDY aszpartát oldallánca és az n-Src hurok 35-ös pozíciójában lévő bázikus aminosava, illetve a motívumban lévő tirozin és a specificitás zseb 17-es glutamátja között jön létre. Meg kell említeni, hogy míg az Nck esetében a CD3ε peptid proliprolin-II szerkezetű, addig az Eps8 esetében egy nyújtottabb konformációt vesz fel. Ennek magyarázata, hogy az Eps8 esetében izoleucin található egy tirozin helyett a konzervált 55-ös pozícióban. Ez pedig megváltoztatja az első hidrofób kötőhely alakját. [164]

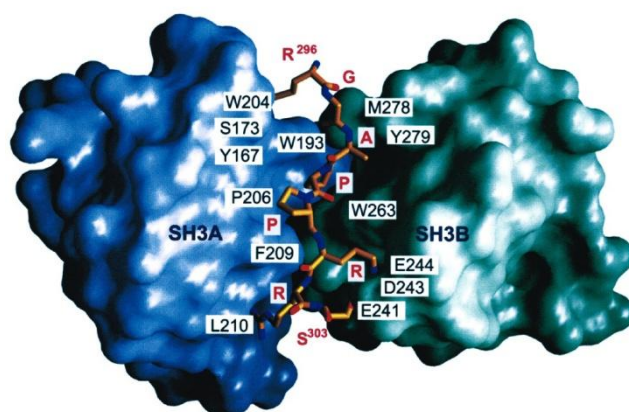
Azonosítottak olyan SH3 doméneket is, amelyek képesek megkötni prolint nem tartalmazó szekvenciákat is. Például a Fyb kapcsoló fehérje, a Grb2 és/vagy Gad fehérjék SH3 doménjei egy RKxxYxxY konszenzus szekvenciát ismernek fel a Gab1 és a Gab2, a BLNK (B-cell linker protein) és az SLP-76 fehérjékben [165-167]. Ennél is érdekesebb a Pex13p fehérje SH3 doménje élesztőben, mely két oldalával két különböző fehérje – akár egyidejű – kötésére is alkalmas. Az egyik oldala a Pex14p-ben egy hagyományos poliprolin hélixet ismer fel, míg másik oldala a Pex5p fehérje egyik  $\alpha$ -hélixéhez kapcsolódik [168,169]. Az SH3 domének képesek lehetnek terciér kapcsolatok létrehozására. Azaz nem egy folytonos szakaszt ismernek fel egy fehérjében, hanem annak harmadlagos szerkezetében egy egymás mellé kerülő aminosavak által kialakított kötőhelyet. A Grb2 SH3 doménje például így hoz létre heterodimert a Vav Rac kicserélődési faktor SH3 doménjével [170].

### 3.4.2 Az SH3 domén által létrehozott interakciók szabályozása

Az SH3 domének által létrehozott fehérje-fehérje interakciók szabályozhatóak. 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 (Phox homológ) doménjét követően két SH3 domént tartalmaz. Ezután egy polibázikus összekötő szakasz, végül C-terminálisan egy prolin-gazdag régió következik. Ehhez a prolin-gazdag régióhoz kapcsolódik szokatlanul erős kötéssel a p67<sup>phox</sup> SH3 doménje. Ennek oka, hogy nem csak egy poliprolin hélix kötődik az SH3 doménhez, hanem az azt követő „helix-turn-helix” struktúra is [171,172]. Mivel a p67<sup>phox</sup> még a p40<sup>phox</sup>-hoz is kapcsolódik, egy három tagból álló komplex jön létre [173]. Ahhoz, hogy a NADPH oxidáz aktiválódjon szükséges, hogy ez az alapállapotban citoplazmatikus hármas komplex a membránhoz helyeződjön 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 csak akkor történhet meg, ha bizonyos szerin oldalláncok foszforilálódnak a p47<sup>phox</sup> polibázikus régiójában. Foszforiláció nélkül ugyanis a p47<sup>phox</sup> SH3 doménjei a fehérje saját polibázikus régióját kötik, és így egy inaktív, „összehajtott” konformációt tartanak fenn [174]. Az inaktív fehérje röntgenkristallográfiás vizsgálatával egy érdekes jelenségre derült fény.



Kimutatták, hogy a két SH3 domén „hagyományos” kötőfelszínei egymás felé fordulnak egy közös árkot létrehozva, amelybe a polibázikus szakasz aminoterminális, prolinban gazdag része beleilleszkedik [175]. Az így együttműködő SH3 doméneket „szuper-SH3”-nak is nevezik (3-13. ábra). A prolin nélküli, pozitív töltésű aminosavakban gazdag C-terminális rész is kapcsolódik ehhez a „szuper-SH3” doménhez, de kívül a poliprolin-kötő árkon. A polibázikus szakasz foszforilációja következtében csökken annak pozitív töltése, ennélfogva az SH3 domének elengedik azt, és így meg tudják kötni a p22<sup>phox</sup> prolin-gazdag régióját.



**3-13. ábra:** A P47<sup>phox</sup> két SH3 doménje által kialakított "szuper SH3" szerkezet. Az ábrán a két SH3 domén és a polibázikus szakasz (R<sub>296</sub>GAPRRSS<sub>304</sub>) komplexe látható. Az SH3A és SH3B domének molekuláris felszínei sötétkékkel és szürkés-kékkel láthatók. A peptidszakasz pálcika-modellként ábrázolódik. [173]

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, amely lehetővé teszi, hogy az SH2 domén egy prolin-gazdag hurka kapcsolódni tudjon az Abl SH3 doménjéhez [176]. A két fehérjét így egy SH2 – SH3 kapcsolat tartja össze, hasonlóan, mint az SAP és FynT fehérjéket. Itt a kapcsolat azonban foszforilációtól független [177].

### 3.4.3 Az SH3 domén tirozin foszforilációja

Az elmúlt két évtizedben számos olyan jelátviteli fehérjét azonosítottak, melyekben az SH3 domén tirozinon foszforilálódik [178-180]. Tatárová és munkatársai a PhosphoSite Plus adatbázisban 188 ismert foszforilációs helyet találtak SH3 doméneken belül, melyek között 106 tirozin volt [181]. Egyes esetekben mutációs analízist végeztek, hogy meghatározzák az egyes foszforilált tirozinok funkcióban betöltött jelentőségét. Ezen vizsgálatok eredményei bebizonyították, hogy az SH3 domén hidrofób zsebében lévő konzervált tirozinok foszforilációja fontos szerepet játszhat a domén ligandkötő képességének szabályozásában, és ezáltal fontos része a jelátviteli fehérjék intermolekuláris kontrolljának. A következőkben részletezek néhányat az eddig ismert utak közül.

A legtöbb ismert esetben ez a szabályozás negatív, azaz a foszforiláció gyengíti az SH3 domén ligandkötő képességét. Kimutatták például, hogy a Grb2 C-terminális SH3 doménjének Bcr-Abl általi foszforilációja csökkenti annak kötődését az SOS fehérjéhez [182]. Hasonlóan a CAS fehérje SH3 doménjének tirozin-foszforilációja gátolja annak kapcsolódását a fokális adhézíós kinázhoz [180], mint ahogy az Abl SH3 doménje is gyengébben kötődik foszforilált állapotban az Abl kinázhoz [183]. A fenti példákban a hidrofób ligandkötő zseb egy konzervált tirozinja foszforilálódik, és ennek köszönhető, hogy csökken az SH3 domén ligand iránti affinitása. Ettől eltérő mechanizmus figyelhető meg a Crk esetében. A fehérjében a korábban bemutatott SH3 domének közötti (Y221) foszforiláción túl maga az SH3 domén is foszforilálódhat tirozin oldalláncon. Kimutatták, hogy az Abl tirozin kináz a Crk C-terminális SH3 doménjének (SH3C) RT-hurkában található 251. tirozint is foszforilálja. Az így kialakuló foszfortirozin az Abl SH2 doménjéhez kötődik és fokozza az aktivitását [184]. A foszforilált SH3 doménhez pedig további SH2/PTB doménnel rendelkező fehérjék kapcsolódhatnak. Ez a szabályozás egy bináris kapcsoló mechanizmust valószínűsít. A jelátviteli út során a Crk az SH2 doménjével az aktivált RTK-hoz kapcsolódik, majd N-terminális SH3 doménjével (SH3N) további proliprolin-II motívummal rendelkező effektorokat, mint DOCK180, C3G, vagy az Abl kináz köt ki a membránhoz. Amennyiben az Abl foszforilálja a 221. és a 251. tirozint, a jelátvitel az SH2-SH3N tengely helyett átkapcsolódhat egy SH3C domén által közvetített útvonalra, és a

foszforilált tirozin kötőhelyként szolgálhat SH2/PTB domént tartalmazó fehérjék számára [185].

Az 1. táblázatban látható az irodalomban eddig ismert SH3 doménben történő tirozin foszforiláció, illetve ennek hatása a különböző fehérjékre.

**1. táblázat: Az SH3 domének tirozin oldalláncainak foszforilációja, illetve mutációja által okozott hatások.**

Fehérje	Nem foszforilálható mutáns	Foszforilációt utánzó mutáns	Foszfortirozin	Mutáció/foszforiláció hatása	Ref.
Abi-1			Y398p	csökkenti az Abl-hez való kötődését	[183]
Abl	Y89F			csökkenti a TF-1 mieloid sejtek Bcr-Abl által közvetített transzformációját	[179]
			Y89p	csökkenti az SH3 domén kapcsolódását az interakciós partnerekhez	[186]
Btk	Y223F			blokkolja a Btk autofoszforilációt és fibroblasztokban fokozza a Btk transzformáló aktivitását	[178]
			Y223p	gátolja a WASP-al történő interakcióját	[187]
Crk			Y215p	indukálja az Abl kináz transzaktivációt	[184]
Grb2			Y209p	csökkenti az SOS-hez való kötődését	[182]
Itk	Y180F			pozitív szerep az Itk jelátvitelben	[188]
p130CAS	Y12F			csökkenti az Src-transzformált sejtek invazivitását	[180]
		Y12E		csökkenti az SH3 domén interakcióját a FAK és a PTP-PEST fehérjékkel	[180]
			Y12p	csökkenti az SH3 domén és a FAK fehérje kötődését	[180]
PST-PIP		Y367E		csökkenti a WASP-al való interakciót	[189]
Endophilin		Y315E		gátolja az SH3 domén és a Dinamin kapcsolódását	[190]
ADAP			Y559p	elősegíti az interakciót az Nck fehérjével	[191]
CAP	Y623F			a CAP fehérje részleges nukleáris lokalizálódását okozza	[192]
Src	Y90A, Y92A			gátolja az interakciót a Sam68 és a PI3K-p85 $\alpha$ fehérjékkel	[159]
	Y133F, Y138F			gátolja a PDGF és EGF jelátvitelt	[193]
Txk			Y91p	közreműködik az INF-g gén transzkripciójának felülszabályozásában	[194]
Vav1	Y826F			gátolja a CSK fehérjével való kapcsolatot	[195]

## 4. Célkitűzések

Munkacsoportunk az elmúlt években intenzíven kutatta a Caskin1 állványfehérjét. Élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálva sikerült több Caskin1 kötő fehérjét azonosítani. Korábban Balázs Annamária ezen lehetséges kapcsolatok közül az Abi2 Caskin1 interakciót bizonyította és térképezte fel mind *in vitro*, mind *in vivo* módszerekkel. Szerettük volna azonban a többi interakcióra képes proteinnel való kapcsolatot is megvizsgálni.

- Első lépésként a Caskin1 és az Nck adapter fehérje kapcsolatát kívántuk bizonyítani.
- További célkitűzések közé tartozott az interakció pontos feltérképezése, annak kimutatása, hogy a fehérjék mely doménjei asszociálódnak egymással.
- Terveink között szerepelt a jelátviteli út felderítése is. Olyan fehérje, fehérjék keresése, mely vagy melyek a Caskin1-hez az Nck fehérjén keresztül kötődhetnek. Ehhez kiindulásként szolgáltak korábbi eredményeink. Élesztő két-hibrid rendszerben interakciós partnerként azonosított EphA2 receptor és Caskin1 kapcsolatot ugyanis nem sikerült bizonyítanunk. Az elvégzett kísérletek azonban ráirányították a figyelmünket az irodalmi áttekintésben is említett EphB1-Nck interakcióra.
- Végző célunk így az esetleges Caskin1-Nck-EphB1 komplex létrejöttének és funkciójának az azonosítása volt.

A Caskin1 mellett a laborban kutatott másik állványfehérje családba tartozó Tks4 esetben pedig meg kívántuk vizsgálni a Frank-ter Haar szindromában Iqbal és munkatársai által leírt mutánsok [113] expresszióját és intracelluláris lokalizációját.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Plazmidok és DNS konstrukciók

A teljes hosszúságú Caskin1 cDNS-t Thomas Sűdhof-tól (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA), a teljes hosszúságú HA-címkével ellátott EphB1-et Uyen Hynh-Do-tól (University of Bern Medical School, Bern, Svájc) kaptuk. A Caskin1 cDNS-ét nagy hűségű DNS polimerázzal sokszorosítottuk, majd pcDNA3.1/V5-His TOPO vektorba (Life Technologies) klónoztuk. A Caskin1 cDNS-ének különböző szakaszait, az ankirin ismétlődéseket és az SH3 domént együtt (1-346 aminosav), a SAM doméneket (347-610), a prolin-gazdag régió első részét (603-804), a prolin-gazdag régió második szakaszát (804-1199), a prolin-gazdag régió harmadik részét (1200-1430), illetve a teljes prolin-gazdag szakaszt (603-1430) PCR reakcióval amplifikáltuk, majd EcoRI/SalI restrikciós enzimek segítségével pGEX-4T1 expressziós vektorba (GE Healthcare) klónoztuk (további részletek Balázs Annamária értekezésében). A teljes hosszúságú Nck-t tartalmazó pGEX-2T vektort M. Waterfield-től (Ludwig Institute for Cancer Research, London, UK) kaptuk. Az Nck különböző doménjeit, az első (N-terminális) SH3 domént (1-102 aminosav), a második SH3 domént (91-182), a harmadik SH3 domént (182-260), illetve mind a három SH3 domént tartalmazó GST fúziós fehérjét állítottunk elő pGEX-2TK vektorba történő szubklónozással. Az előállított konstrukciókat minden esetben DNS-szekvenálással ellenőriztük (további részletek Wunderlich Líviusz disszertációjában). A GST-fúziós fehérjét Glutation-agaróz (Sigma-Aldrich) gyantához kötöttük és affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk. Az így nyert fúziós fehérjét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztva, majd a géleket Coomassie-blue festékkel festve a legtöbb esetben egyetlen határozott csíkot láttunk a fehérje GST-vel megnövelt molekulatömegének megfelelő mérettartományban. A patkány Caskin1 SH3 doménjét tartalmazó DNS szakaszt Pfu Turbo HotStart DNS polimerázzal (Agilent Technologies) amplifikáltuk, majd a pET22b vektor (New England Biolabs) NdeI/XhoI helyére klónoztuk. EphB1-pY594 (PQMKI<sub>pTyr</sub>}IDPFTK), PDGFR-pY751 (DESVD<sub>pTyr</sub>}VPMLDK), és PDGFR-Y100 (TSSVL<sub>pTyr</sub>}TAVQPK) biotinilált foszfopeptideket és a hozzájuk tartozó foszfospecifikus ellenanyagokat a Life Technologies céggel csináltattuk. V5-Caskin1Y296F, V5-Caskin1Y336F és V5-

Caskin1Y296/336F mutációkat QuickChange módszerrel (Agilent Technologies) hoztuk létre az alábbi primer szekvenciák alapján:

	Forward primer	Reverse primer
Y296F	5' GAT TAC TGT AAC AAT <b>TTC</b> GAT CTG ACC AGT CTC 3'	5' GAG ACT GGT CAG ATC <b>GAA</b> ATT GTT ACA GTA ATC 3'
Y336F	5' C AAT GAC AGG GTG GGC <b>TTC</b> TTC CCA TCC TCG CTG 3'	5' CAG CGA GGA TGG GAA <b>GAA</b> GCC CAC CCT GTC ATT G 3'

Az Ephrin B1-Fc törzsoldatot a gyártó (R&D Systems) útmutatása alapján készítettük el. Streptavidin-agaróz és az aktív rekombináns EphB1 tirozin kináz a Sigma-Aldrich-tól származik.

A V5 címkével ellátott Tks4<sup>R43W</sup> mutáns konstrukció elkészítésének részletei Dr. Bögel Gábor értekezésében találhatóak. A V5-Tks4<sup>1-48</sup> és V5-Tks4<sup>1-341</sup> csonkolt fehérjék előállításához a rövidebb kódoló szekvenciákat PCR reakcióval amplifikáltuk, majd BamHI/XbaI restrikciós enzimek segítségével pcDNA3.1/TOPO-V5-His expressziós vektorba (Life Technologies) klónoztuk. A deléció okozó egy guanin cserét a Tks4<sup>1-341</sup> mutánsnál szintén QuickChange módszerrel (Agilent Technologies) hoztuk létre. Az előállított konstrukciókat DNS-szekvenálással ellenőriztük.

## 5.2 *Ellenanyagok*

A monoklonális anti-GFP ellenanyag a Cancer Research UK Hybridoma Development Unit (London) ajándéka. A poliklonális anti-Caskin1 ellenanyagot a Caskin1 SAM doménjei ellen termeltettük nyúlban. A monoklonális anti-Caskin1 ellenanyagot az AbDSerotec céggel készítettük. A monoklonális anti-Nck ellenanyagot a BD Transduction Laboratories-tól vásároltuk. A poliklonális Nck és a foszfortirozin elleni monoklonális ellenanyagot (4G10) a Millipore-tól szereztük be. A monoklonális anti-V5 ellenanyag oldott és agaróz gyöngyökhöz kötött formája egyaránt a Life Technologies-tól származik. Az anti-HA monoklonális ellenanyagot a Cell Signaling Technologies-tól, az anti-EphB1 poliklonális ellenanyagot a Santa Cruz Biotechnology, Inc.-től vásároltuk. Az anti-pTyr296 (DYCNNpTyr}DLTSLN) és az anti-pTyr336 (GNDRVGpTyr}FPSSLGC) foszfospecifikus poliklonális ellenanyagokat a GenScript céggel szintetizáltattuk. Az anti- $\alpha$ -tubulin (DM1A) monoklonális ellenanyagot a Sigma-Aldrich-től vásároltuk. Másodlagos ellenanyagként immunoblothoz torma peroxidázzal konjugált anti-egér, illetve anti-nyúl antitesteket (GE Healthcare) az immunfluoreszcens

festésekhez pedig Alexa Fluor 488-cal és 546-al jelölt anti-egér és anti-nyúl immunglobulint (Invitrogen) használtunk.

### **5.3 Sejtvonalak, tranziens transzfekció és stimuláció**

Az értekezésben bemutatott legtöbb kísérletet COS7 sejteken végeztük. Ezeket 10% magzati borjúsérumot és antibiotikumot (100 egység/ml penicillin, 50 $\mu$ /ml sztreptomycin) tartalmazó DMEM-ben (Life Technologies) tartottuk fent.

A különböző plazmidokkal való tranziens transzfekciót Lipofectamine reagens (Life Technologies) segítségével végeztük. Ehhez az első napon a legtöbb kísérlet esetén 10 cm-es petricsészébe körülbelül 10<sup>6</sup> sejtet tettünk ki. Másnap a következő transzfekciós elegyet állítottuk össze: 50 $\mu$ l Lipofectamine, 7 $\mu$ g DNS, 1ml Opti-MEM (Life Technologies). A sejteken Opti-MEM-re cseréltük a médiumot, majd 45 perc eltelté után hozzájuk tettük a fent leírt szuszpenziót. Körülbelül négy és fél óra múlva sérumot tartalmazó DMEM-re cseréltük a tápoldatot. Ha a másnapi Ephrin-B1 kezelés miatt ez szükséges volt, akkor újabb négy és fél óra eltelté után sérummentesre cseréltük a tenyésztőközeget. Stimulációhoz a sejteket 20 percig kezeltük a liganddal 500 ng/ml-es végkoncentrációban. Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz hatlyukú tenyésztőedényeket használtunk, 50 000 és 100 000 közötti sejtszámmal, és felületarányosan (1:3) kevesebb reagenst alkalmaztunk, mint a 10cm átmérőjű tenyésztőedények esetén.

### **5.4 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, 25 $\mu$ g/ml leupeptin, 25 $\mu$ g/ml szója trpszin inhibitor, 1mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF). Ezt a legtöbb esetben a tirozin foszfatázok gátlása végett 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-tal egészítettük ki. Feltárás után 14.000 fordulat/perc-en 10 percig 4°C-on centrifugáltuk a sejtlyázátumot, a törmelékek eltávolítása céljából. A patkány agyakat 5 ml harvest-pufferben levágott végű pipetta segítségével tártuk fel néhányszor fel-le pipettázva, majd a sejt kivonathoz hasonlóan centrifugáltuk.

Az anti-V5 immunprecipitációkhoz 50 µl egyszer PBS-sel mosott anti-V5 agarózhoz adtunk 900 µl sejtlizátumot. Az anti-HA immunprecipitációknál 50 µl anti-HA agarózt használtunk. Caskin1 immunprecipitációnál 5 µl monoklonális Caskin1 ellenanyagot tettünk 25 µl Protein G Sepharose gyöngyhöz, Nck esetében pedig 5 µl poliklonális Nck ellenanyaghoz 25 µl Protein A gyöngyöt adtunk. Agykivonatból történt immunprecipitációnál 900 µl lizátumot alkalmaztunk. Az immunprecipitáció kontrollja során olyan ellenanyagokat használtunk, melyek típusa és származása (pl. nyúl IgG) megegyezett a specifikus ellenanyaggal, de más, nem releváns fehérje ellen termeltették. GST pull-down kísérleteknél 5 µg GST fúziós fehérjét immobilizáltunk glutation-agaróz gyantán. Ezután minden alkalommal 4°C-on 1 órán át forgattuk a mintákat. Majd négyszer 0,5% Triton-X-et tartalmazó, hűtött PBS-sel mostuk a gyöngyöket, végül SDS-mintapufferben inkubáltuk őket 3 percig 95 °C-on.

A mintákat SDS tartalmú poliakrilamid-gélen választottuk el SDS-t is tartalmazó Tris-glicin oldatban, 45 mA és 500V maximális értékeket beállítva, amit azután nitrocellulóz membránra blottoltunk át Tris-glicin oldatban, 25V-on egész éjszakán keresztül. Az előhívást 1 órás 5%-os tejpor PBS-ben történt blokkolás után az előző pontban ismertetett elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal végeztük az alábbi táblázatban részletezett térfogatokat felhasználva. Ellenanyagok esetében 10 ml 1%-os tejpor, 0.5%-os Tween 20 PBS-el inkubáltuk a membránokat, elsődleges antitestnél 1 órán, másodlagos antitestnél 30 percen keresztül.

#### **Elsődleges**

<i>antitest</i>	anti-Caskin1	anti-GFP	anti-HA	anti-His	anti-Nck	anti-pTyr
<i>térfogat</i>	10 µl	10 µl	10 µl	1.6 µl	6 µl	2 µl
<i>antitest</i>	anti-pTyr296	anti-pTyr336	anti-V5			
<i>térfogat</i>	15 µl (10 µg)	15 µl (10 µg)	5 µl			

#### **Másodlagos**

<i>antitest</i>	anti-egér	anti-nyúl
<i>térfogat</i>	10 µl	4 µl

A detektálást ECL-reagenssel (GE Healthcare) és fényérzékeny filmmel végeztük.

### **5.5 Caskin SH3 doménjének tisztítása**

A szerkezeti vizsgálathoz a 6-szoros His-címkével ellátott SH3 fehérjét *E. coli* BL21 Star törzsben expresszáltuk. A sejteket 500 ml NZYM médiumban növesztettük 37 °C-on, 250-es fordulatszámon, 0.5-0.6-os OD600-as értékig. Az expressziót 0.5 mM



izopropil tio- $\beta$ -D-galaktoziddal indukáltuk 20 °C-on 5 órán keresztül. Ezután 20 percig fugáltuk a sejteket 4 °C-on 4000 fordulat/percen, majd 10 ml pufferben lizáltuk őket (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, 500 mM NaCl és 20 mM imidazol). 10-szer 10 másodperces szonikálás után a sejtízátumokat 1 %-os TritonX 100-al kezeltük 30 percig jég között. Majd 40 perces 4 °C-on és 50.000-es fordulatszámra történő fugálás után a felülúszót 0.20  $\mu$ m-es szűrőn tisztítottuk. A fehérjét ezt követően ÄKTAexplorer protein tisztító rendszerrel (GE Healthcare) tisztítottuk 1 ml-es HisTrap HP oszlopon (GE Healthcare). A tisztított lizátumok felvitele után az oszlopot 10-szer mostuk a pufferrel. A célfehérjét a protokoll alapján 1 M imidazol is tartalmazó pufferrel eluáltuk. A 6x His-címkevel ellátott Caskin1 SH3 domént tartalmazó frakciókból AKTA HiPrep 26/10 Desalting oszloppal távolítottuk el az imidazol, illetve cseréltük át a megfelelő puffert. A fehérjék tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.

## 5.6 *In vitro foszforiláció*

A kináz reakcióhoz előállított reakcióelegy (310  $\mu$ l) 200  $\mu$ l tisztított (3.8 mg/ml) Caskin1 SH3 doménből, 100  $\mu$ l 3-szoros kináz pufferből (200 mM Tris puffer, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) és 10  $\mu$ l rekombináns, GST tag-gel ellátott EphB1 receptorból (Sigma-Aldrich) állt. A foszforilációt 7.5  $\mu$ l 10 mM-os jéghideg ATP hozzáadásával indítottuk. A kontroll elegy nem tartalmazott receptort. Az inkubációt asztali rázón végeztük 1 órán keresztül 30 °C-on. Natív gélelektroforézis céljára a foszforiláció hasonlóan történt, azzal a kivétellel, hogy az inkubáció 15 °C-on zajlott a megjelölt időpontokig.

## 5.7 *CD spektroszkópia*

A távoli UV cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumot Jasco J-720 spektropolariméterrel vettük fel, folyamatos módban, 1 mm útvonalhosszú kvarcküvetével, 1 nm-es sáv szélességgel, 8 másodperces válaszidővel és 20 nm/perces szkennelési sebességgel. Minden mérést 25 °C-on végeztünk el, és minden spektrum 4 szkennelés átlagát mutatja. A spektrumot 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-ot, 50 mM NaCl-ot (pH 7.2) és 50  $\mu$ M fehérje koncentrációt tartalmazó oldatban mértük. A protein nélküli háttér spektrumot kivontuk a fehérjék jelenlétében felvett spektrumból. A közeli UV spektrum felvétele hasonló körülmények között történt, azzal a kivétellel, hogy 1 cm-es úthosszú és 110  $\mu$ M-os protein koncentrációt alkalmaztunk.

## 5.8 Caskin1 SH3 doménjének 3D modellezése

A patkány Caskin1 SH3 doménjének 3D struktúráját a szabadon elérhető I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) szerkezet-jósló szervertel modelleztük. A modellezéshez az alábbi mintastruktúrákat használtuk: a Caskin2 SH3 doménjének oldatfázisú NMR szerkezete, 2ke9; aktin-kötő fehérje SH3 doménje *S. cerevisiae*-ből, 2k3b; humán Grb2-like 3 protein SH3 doménje, 2ew3. A szekvenciák a következők voltak:

LQVRATKDYCNNDLTSLNVKAGDIITVLEQHPDGRWKGCIHDNRTGNDRVGYFPSSLGEAIV	Q8VHK2(284-346)SH3
LKVRALKDFWNLHDPTALNVRAGDVITVLEQHPDGRWKGHIHESQRTDRIGYFPPGIVEVVS	2ke9A
PWATAEYDYDAA-EDNELTFVENDKIINIEFVDDDDWWLGELE----KDGSKGLFPSNYVSLGN	2k3bA
PCCRGLYDFE-PENQGELGFKEGDIITLTNQIDENWYEGMIHG-----ESGFFPINYVEVIV	2ew3A

## 5.9 Natív gélelektroforézis

Natív gélelektroforézist végeztünk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az *in vitro* foszforiláció nem okoz dimerizációt, vagy aggregációt az SH3 domének között. A mintákat az alábbi összetételű mintapufferben vittük fel: 4.6 ml 87 %-os glicerin, 1.2 ml 1 M Tris pH 6.8, 2.4 mg brómfenolkék, desztillált vízzel kiegészítve 10 ml-re. Majd SDS-t nem tartalmazó 12.5%-os nem-denaturáló gélen, Tris-glicin pufferben, 50 V-on, 2 órán keresztül, 4 °C-on futtattuk őket. Az alsó gél összetétele: 2 ml desztillált víz, 1.5 ml 1.5 M Tris puffer pH 8.8, 2.5 ml akrilamid, 6 µl TEMED, 45 µl 10 %-os ammónium perszulfát. A felső gél összetétele: 2.5 ml desztillált víz, 1 ml 0.5 M Tris puffer pH 6.8, 0.54 ml akrilamid, 3 µl TEMED, 20 µl 10 %-os ammónium perszulfát.

A Caskin1 SH3 doménjének az ExPASy bioinformatikai portál ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) alapján becsült izoelektromos pontja 6.67. Így a natív fehérje a pH 8.8-as Tris pufferben negatív töltésű, ezért a pozitív pólus felé vándorol.

## 5.10 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 sejtszéli membrán

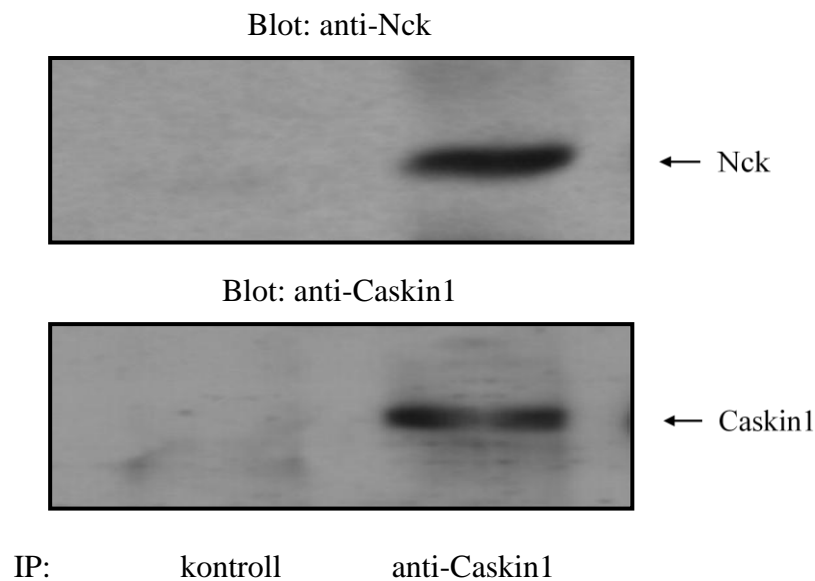
megfigyelését. A sejteket a megfelelő transzfekciók és kezelések után PBS-sel mostuk, 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk és 0,2% Triton-X tartalmú PBS-sel feltártuk. A blokkolás 10mg/ml BSA-val történt, amit az elsődleges (a bemutatott kísérletben 30 percig 1:1000-hez hígítással monoklonális anti- $\alpha$ -tubulin és poliklonális anti-V5) majd mosás után másodlagos (1:1000-hez hígítással Alexa Fluor 488 anti-egér és Alexa Fluor 546 anti-nyúl) ellenanyagok követtek 30 percig. 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 inverz konfokális mikroszkóppal és 63X objektívvel készítettük.

## 6. Eredmények

### 6.1 A Caskin1 az Nck SH3 doménjeihez kapcsolódik

Ahogy azt már az irodalmi áttekintésben részletesen kifejtettem az Nck egy kapcsoló fehérje, melynek N-terminálisán 3 SH3 domén található, amit egy SH2 domén követ. Doménszerkezetéből adódóan számos foszfortirozin alapú jelátviteli út résztvevőjeként azonosították. Vizsgálni kívántuk tehát, hogy az Nck SH3 doménjeivel kapcsolódik-e a Caskin1-hez.

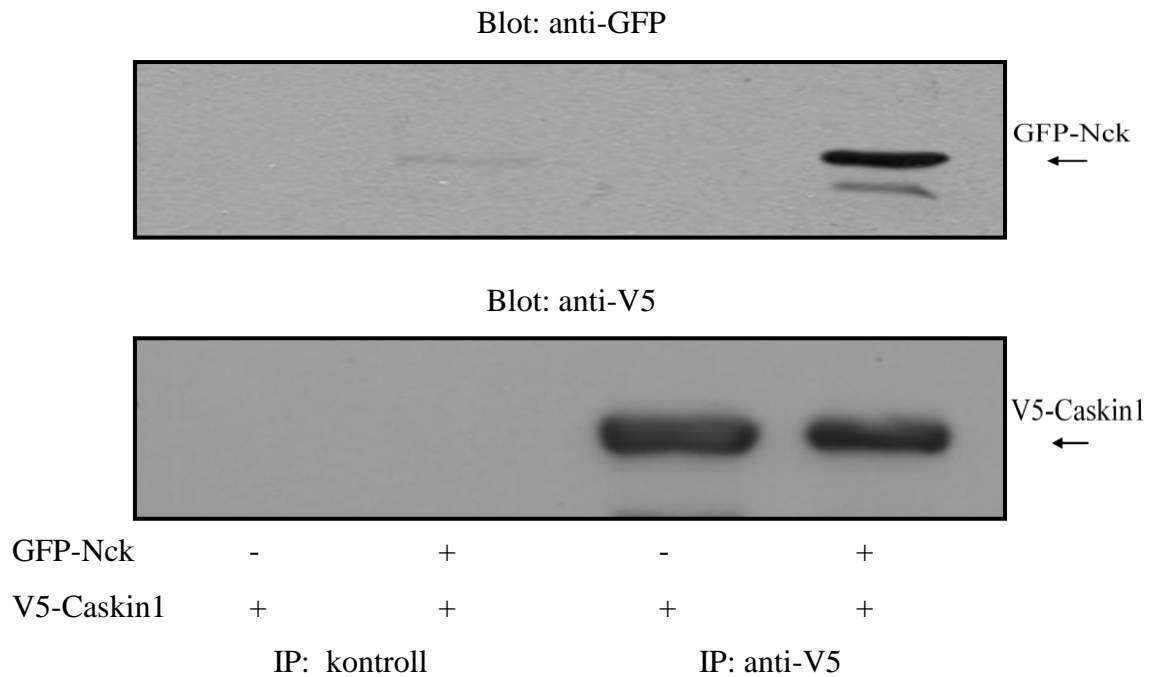
Első lépésként endogén Caskin1-et immunprecipitáltunk monoklonális anti-Caskin1 ellenanyaggal patkány agykivonatból. SDS gélelektroforézis, majd nitrocellulózra történő blottolás után a membránt anti-Nck ellenanyaggal hívtuk elő. Kontrollként anti-Caskin1 ellenanyaggal is előhívtuk, hogy ellenőrizzük az immunprecipitáció sikerességét. A 6-1. ábrán látszik, hogy az Nck stabilan kapcsolódik a Caskin1-hez.



**6-1. ábra: A Caskin1 patkány agykivonatban kötődik az Nck-hoz.** Patkány agykivonatból endogén Caskin1-et immunprecipitáltunk (IP) monoklonális anti-Caskin1 ellenanyaggal. Többszöri mosás, SDS poliakrilamid gélelektroforézis és nitrocellulózra történő blottolás után a mintákat anti-Nck és anti-Caskin1 ellenanyagokkal vizsgáltuk. Látható, hogy a Caskin1 megköti az Nck-t.

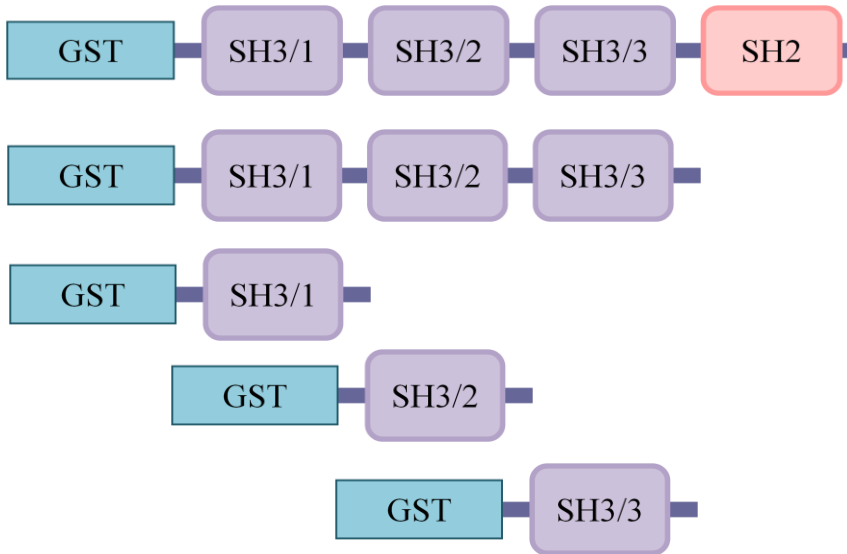
Más rendszerben is megvizsgáltuk a két fehérje interakcióját. V5 címkével jelzett Caskin1-et és GFP jelölt Nck-t expresszáltunk különböző kombinációkban COS7 sejtekben. Kontroll, illetve anti-V5 monoklonális ellenanyaggal immunprecipitáltuk a

Caskin1-et a sejtkivonatból, majd a fehérjét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el. Nitrocellulózra történő blottolás után anti-GFP antitesttel detektáltuk az Nck fehérjét. A 6-2. ábrán megfigyelhető, hogy a mindkét fehérjét koexpresszáló sejtekben a Caskin1 képes megkötni az Nck-t. Kontrollként a membránt anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk.

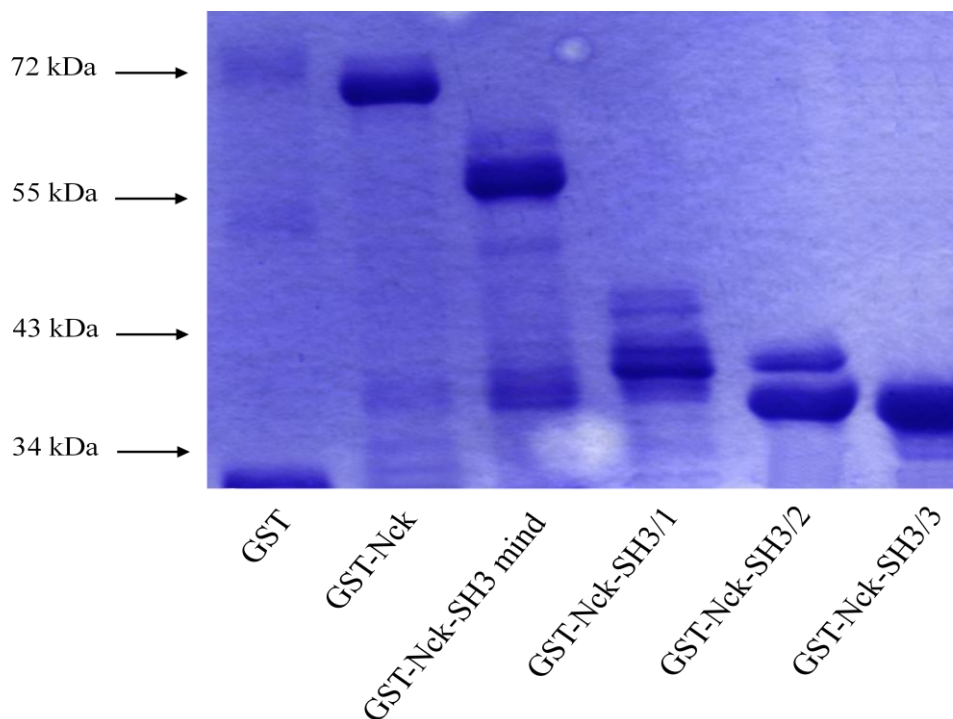


**6-2. ábra: Nck-Caskin1 interakció COS7 sejten.** V5-Caskin1-et és GFP-Nck-t expresszáló COS7 sejtkivonatból kontroll, illetve anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitáltuk a Caskin1-et. SDS-PAGE és nitrocellulózra történő transzferálás után a kötődést anti-GFP ellenanyaggal vizsgáltuk. Az utolsó panelen látható, hogy koexpresszió esetén a Caskin1 képes megkötni az Nck-t.

Következő lépésként pontosítani szeretnénk volna a két fehérje interakcióját, megvizsgálni, hogy mely domének kapcsolódnak. Noha az irodalomban már korábban kimutatták, hogy a Caskin1 Nck kötődés az Nck SH3 doménjein keresztül jön létre [88], az azonban nem volt ismert, hogy melyik SH3 domén szükséges ehhez. A válasz kiderítésére GST pull-down mérést végeztünk. Ehhez a már korábban előállított GST-Nck konstrukciókat használtuk. (6-3., 6-4. ábra)



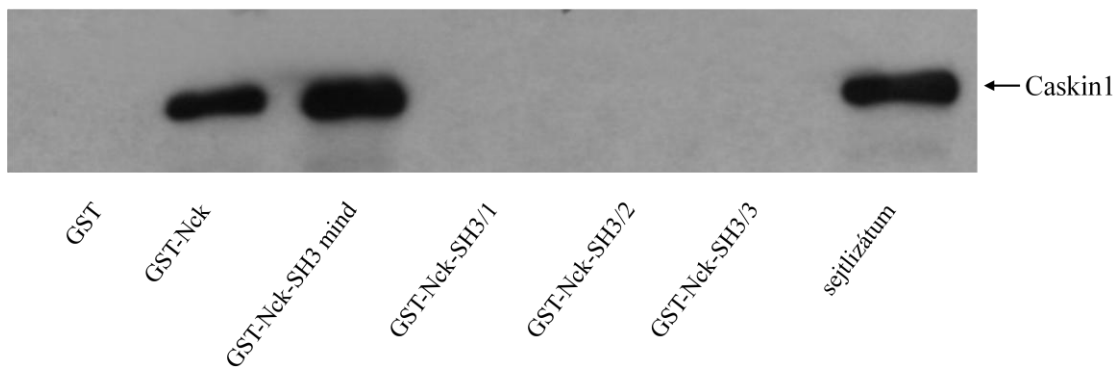
**6-3. ábra:** Az Nck egyes doménjei GST fúziós fehérjeként kifejezve. Rendelkezésünkre állt a teljes hosszúságú Nck, egy mind a három SH3 domént tartalmazó, illetve külön-külön az SH3 doméneket (SH3/1, SH3/2 és SH3/3) tartalmazó konstrukciók. A fenti fúziós fehérjékkel végeztük el a GST pull-down kísérletet.



**6-4. ábra:** Az Nck fehérje különböző doménjeinek expressziója Coomassie blue festéssel ellenőrizve. Az Nck különböző szakaszait *E.coli* baktériumokban expresszáztuk, majd a fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét. Ezt követően a fúziós fehérjéket Coomassie blue festékkel azonosítottuk. A különböző Nck fragmentumok a GST tömegével megnövelt mérettartományban láthatóak.

A GST precipitációs mérés során a fentebb bemutatott fúziós fehérjéket (a teljes hosszúságú Nck-t, a mind a három SH3 domént, illetve külön-külön az SH3 doméneket tartalmazó konstrukciókat) glutation agaróz gyantához kötöttük, majd V5-Caskin1-gyet overexpresszáló COS7 sejtek kivonatával inkubáltuk. Gélelektroforézis, majd nitrocellulózra történő blottolás után a Caskin1 fehérjét anti-V5 monoklonális ellenanyaggal tettük láthatóvá. Az ábrán megfigyelhető, hogy külön-külön az SH3 domének nem voltak képesek a Caskin1 megkötésére. Azonban azokban a konstrukciókban, ahol mind a három SH3 domén megtalálható volt (GST-Nck és a GST-Nck SH3 mind) a Caskin1 képes volt az Nck-hoz kapcsolódni (6-5. ábra). Ez az eredmény azt mutatja, hogy hasonlóan több Nck-val interakcióra képes fehérjéhez, a Caskin1-nél is szükséges az Nck mind a három SH3 doménje a kötődés kialakításához. Ahogy, azt már az irodalmi áttekintésben is írtam, ez valószínűleg a két fehérje közötti kapcsolat nagyobb stabilitását szolgálja.

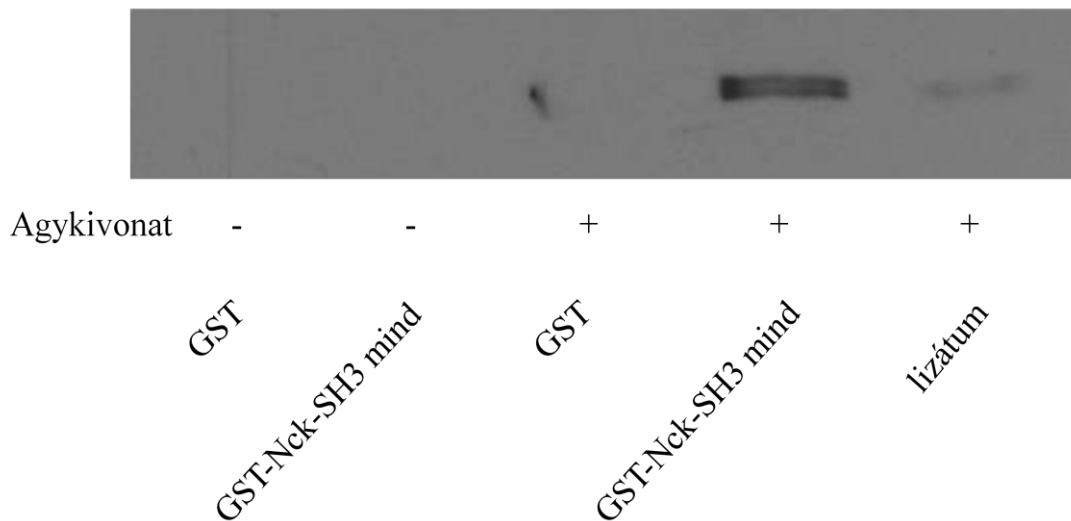
Blot: anti-V5



**6-5. ábra: *In vitro* a Caskin1 az Nck SH3 doménjeihez kapcsolódik.** Teljes hosszúságú Nck-t (GST-Nck), a három SH3 domént egyben (GST-Nck-SH3 mind), és a különálló SH3 doméneket (GST-Nck-SH3/1, SH3/2, SH3/3) tartalmazó GST konstrukciókat glutation gyantához kötöttük, majd V5-Caskin1-et overexpresszáló COS7 sejtek kivonatával inkubáltuk. A precipitált fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulóz membránra történt transzferálás után a Caskin1 kötődését anti-V5 ellenanyaggal detektáltuk. Caskin1 csak a mind a három SH3 domént tartalmazó konstrukciókhoz kötődik.

További lépésként szeretnénk volna kimutatni, hogy az előbb bemutatott GST precipitációs kísérlet nem csak overexpresszált rendszerben, hanem endogén Caskin1-gyel is működik. Ezért a GST fehérje formájában *E. coli* baktériumokban kifejezett és glutation agaróz gyantához kötött mind a három SH3 domént tartalmazó konstrukciót patkány agykivonattal inkubáltuk, majd SDS-PAGE és nitrocellulózra történő blottolás után a kötődést monoklonális anti-Caskin1 ellenanyaggal vizsgáltuk. Látható, hogy a mindhárom SH3 domént tartalmazó GST fúziós fehérje patkány agykivonatból megköti az endogén Caskin1-et (6-6. ábra).

Blot: anti-Caskin1 mab.



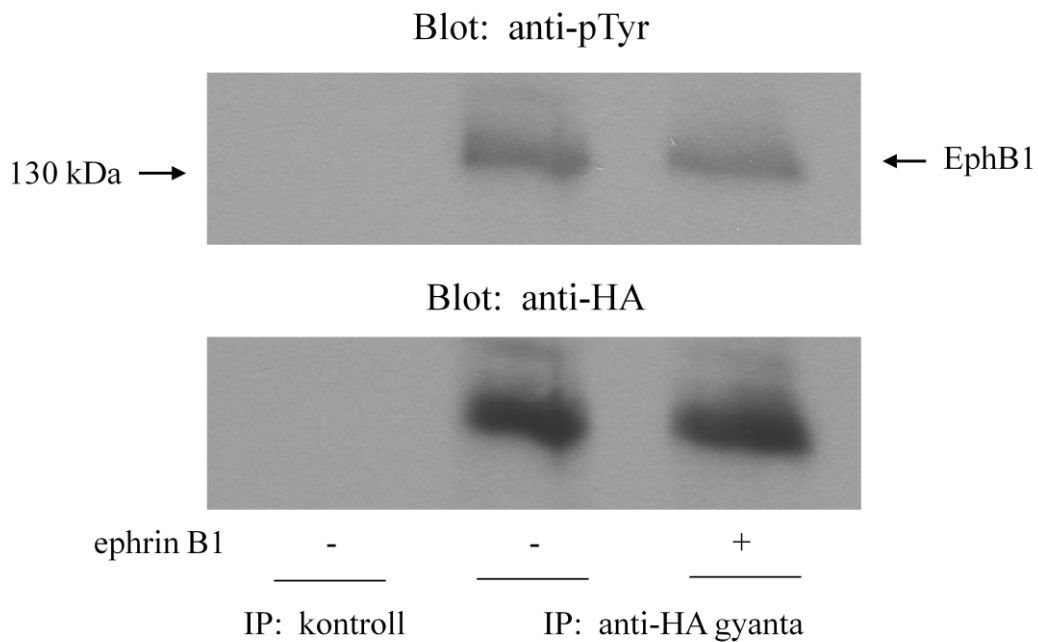
**6-6. ábra: Nck SH3 doménjei patkány agykivonatból precipitálják a Caskin1-et.** A GST fúziós fehérje formájában mindhárom SH3 domént tartalmazó, majd glutation agaróz gyantához kötött konstrukciót patkány agykivonattal inkubáltuk. A kötődő fehérjéket többszöri mosás után SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd nitrocellulózra blottolás után a Caskin1 kapcsolódását monoklonális anti-Caskin1 ellenanyaggal detektáltuk. Látható, hogy a GST-Nck-SH3 mind konstrukció patkány agykivonatból megköttette az endogén Caskin1-et. Az ábrán megfigyelhető, hogy az agykivonatból GST-Nck fehérjével kihúzott Caskin1 szignifikánsan erősebb jelet ad, mint a teljes agykivonat preparátum. Ennek oka, hogy míg immunprecipitáció során 900  $\mu$ l-t, addig önállóan a lizátumból csak 30  $\mu$ l-t alkalmaztunk.



## **6.2 A *Caskin1* az *Nck-n* keresztül az *EphB1* tirozin kinázhoz kötődik**

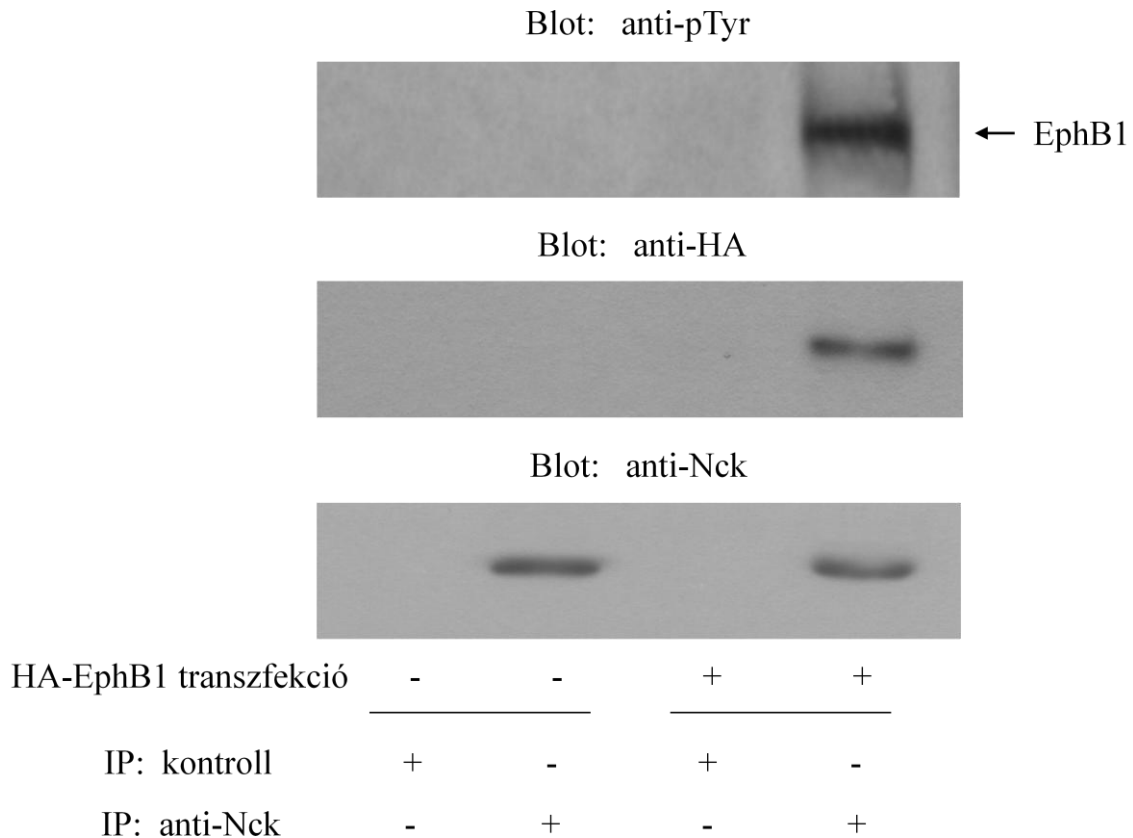
Az irodalomban jól dokumentált, hogy számos tirozin kináz, illetve szubsztrátjaik képesek megkötni az Nck adapter fehérje SH2 doménjét [119]. Az egyik ilyen tirozin kináz receptor az idegrendszerben is előforduló EphB1, melyről kimutatták, hogy az 594-es foszfortirozinjához kapcsolódhat az Nck [140]. Ezen eredményeket ismerve feltételeztük, hogy az Nck kötő partnerként szolgálhat mindkét fehérje számára és ezáltal egymás fizikai közelségébe, interakcióra alkalmas helyzetbe hozza őket.

A feltevés megválaszolására először HA címkével jelzett EphB1-et tranziensen expresszáló COS7 sejteket stimuláltunk a receptort aktiváló Ephrin-B1 liganddal. Azt kívántuk vizsgálni, hogy egy 20 perces ligandaktiváció (500 ng/ml-es végkoncentráció) hatására mennyire kapunk erős foszforilációs jelet. Meglepve tapasztaltuk, hogy EphB1 expresszió hatására már önmagában is aktiválódik, tirozin foszforilálódik a receptor (6-7. ábra). Érdekes módon ligand hozzáadása nem fokozta a foszforiláció mértékét. Irodalomi adatok szerint, hasonló jelenséget figyeltek meg már korábban is mind az EphB1, mind az EphA3 receptor esetében [138], [196]. Valószínűleg overexpresszált rendszerben az Eph receptorok a nagy számuk miatt képesek ligand nélkül is autoaktiválódni. Ezen ismeret fényében a további kísérleteket külön ligand hozzáadása nélkül végeztük el.



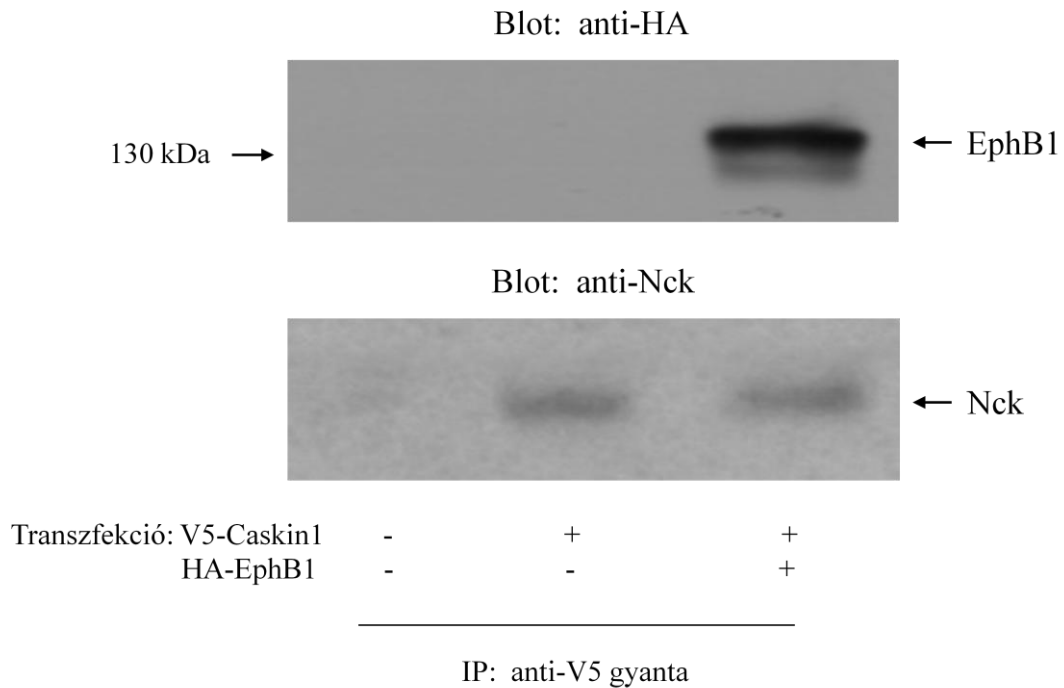
**6-7. ábra: Az EphB1 receptor ligand nélkül is aktiválódik.** COS7 sejteket HA címkével ellátott EphB1-gyel transzfektáltuk, majd éjszakán át szérummentes médiumban tartottuk. Ezután a sejteket 20 percig stimuláltuk Ephrin-B1 liganddal, illetve hagytuk kezeletlenül. Kontroll és Sepharose gyantához kovalensen kapcsolt HA címke elleni ellenanyaggal immunprecipitáltuk az EphB1-et. SDS-PAGE és nitrocellulózra történt blottolás után a membránt anti-foszfotirozin és anti-HA ellenanyaggal hívtuk elő. Látható, hogy már ligandaktiváció nélkül is foszforilálódik a receptor, és ennek mértéke nem fokozódik ligand adása után. Az alsó panelen látható, hogy nincs különbség a percipitált EphB1 mennyiségében.

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a COS7 sejtekben expresszált, HA címkével ellátott EphB1 is képes-e az Nck megkötésére. HA címkével jelzett EphB1-et nem tartalmazó, illetve overexpresszáltó sejlizátumokat kontroll, illetve anti-Nck ellenanyaggal immunprecipitáltuk, majd a fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézis és nitrocellulózra történt blottolás után anti-foszfotirozin, anti-HA és anti-Nck ellenanyaggal hívtuk elő. Azt találtuk, hogy az endogén Nck megkötésére képes poliklonális anti-Nck ellenanyag koimmunprecipitálja az EphB1 tirozin kinázt (6-8. ábra).



**6-8. ábra: EphB1-Nck interakció ellenőrzése COS7 sejtben.** HA címkével ellátott EphB1-et expresszálok COS7 sejt kivonatokból kontroll és poliklonális anti-Nck ellenanyaggal immunprecipitáltunk. SDS poliakrilamid gélelektroforézis és nitrocellulózra történt blottolás után az Nck-hoz kötődő EphB1-et először anti-foszfotirozin, majd anti-HA ellenanyaggal is kimutattuk. A legalsó panelen kontrollként látható, hogy az Nck immunprecipitáció sikeres volt.

Végül a három fehérje (EphB1/Nck/Caskin) által alkotott komplex létezését kívántuk bizonyítani. A kísérletben V5-Caskinnal, illetve V5-Caskinnal és HA-EphB1-gyel kotranszfektált COS7 sejt kivonatot használtunk. A lizátumból a Caskin1-et Sepharose gyantához kovelensen kapcsolt anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitáltuk. Majd SDS-PAGE és nitrocellulózra történt blottolás után a membránt anti-EphB1 és anti-Nck ellenanyaggal is előhívtuk. Ahogy a 6-9. ábrán látható, a Caskin1 lehozza magával mind az Nck, mind az EphB1 fehérjét azokban a sejtekben, ahol mindkét fehérjét expresszáltuk. Így a 6-1., 6-2., 6-8., és 6-9. ábrát figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a Caskin1 az Nck-n keresztül az EphB1 receptorhoz kötődik.

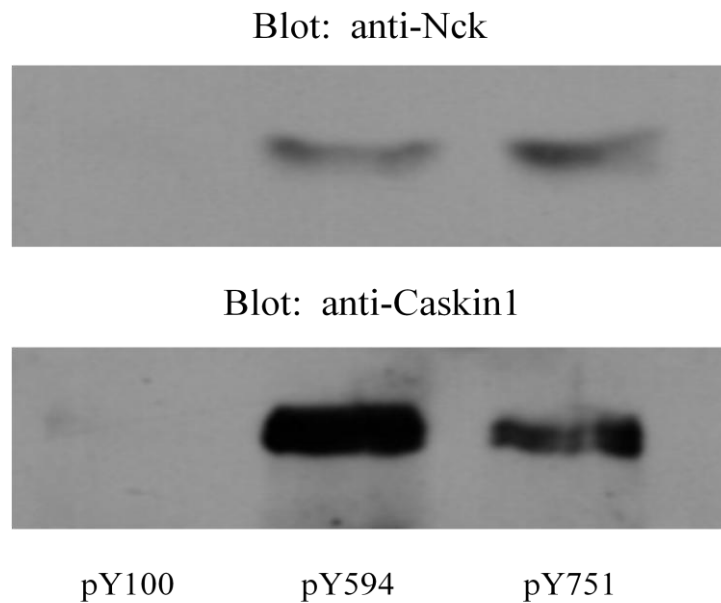


**6-9. ábra: *In vivo* a Caskin1 az Nck-n keresztül az EphB1-hez asszociálódik.** V5-Caskin1-gyel, illetve HA-EphB1-gyel és V5-Caskin1-gyel tranziensen transzfektált COS7 sejtek kivonatából anti-V5 gyantával immunprecipitáltunk. A fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulóz membránra történt blottolás után a Wester blottot anti-HA, majd anti-Nck ellenanyaggal hívtuk elő. A harmadik pontban látható, hogy a Caskin1 az Nck-n keresztül precipitálja az EphB1-et.

Szerettük volna az EphB1 meghatározott foszfortirozin oldalláncához kötődő Nck/Caskin1 komplex kialakulását más, "élettanibb" körülmények között is bizonyítani. Ehhez a laborunkban már korábban is alkalmazott eljárást [197,198], a Streptavidin gyantához immobilizált biotinilált foszfopeptidekkel történő precipitációt használtuk.

Az irodalomban ismert, hogy az Nck SH2 doménje nem csak az EphB1 594-es, hanem pl. a PDGF receptor 751-es foszfortirozinjával is interakcióba lép [140,199]. Szintetizáltunk ezért két olyan foszfopeptidet (lásd 5.1 fejezet), melyek az előbb említett foszforilációs helyeket tartalmazzák (pY594, pY751), illetve kontrollként egy az Nck kötésére képtelen, a PDGF-receptor 100-as foszfortirozinjával rendelkező foszfopeptidet is (pY100). A kísérletben a Streptavidin gyantához kötött biotinilált foszfopeptidekkel patkány agykivonatból próbáltuk precipitálni az Nck/Caskin1 komplexet. A 6-10. ábrán megfigyelhető, hogy mindkét Nck specifikus Streptavidin

gyantához kötött, biotinizált foszfopeptid (mind a pY594, mind a pY751) képes volt az Nck és Caskin1 által alkotott komplexet kihalszíni a patkány agykivonatból, míg a kontroll pY100-as foszfopeptid nem tudta megkötni a fehérjéket. A fenti eredmények alapján valószínűsíthetjük, hogy az aktivált, autofoszforilált EphB1 tirozin kináz receptor idegsejtekben is képes lehet az Nck kapcsoló fehérjén keresztül a Caskin1 állványfehérjével interakcióba lépni.

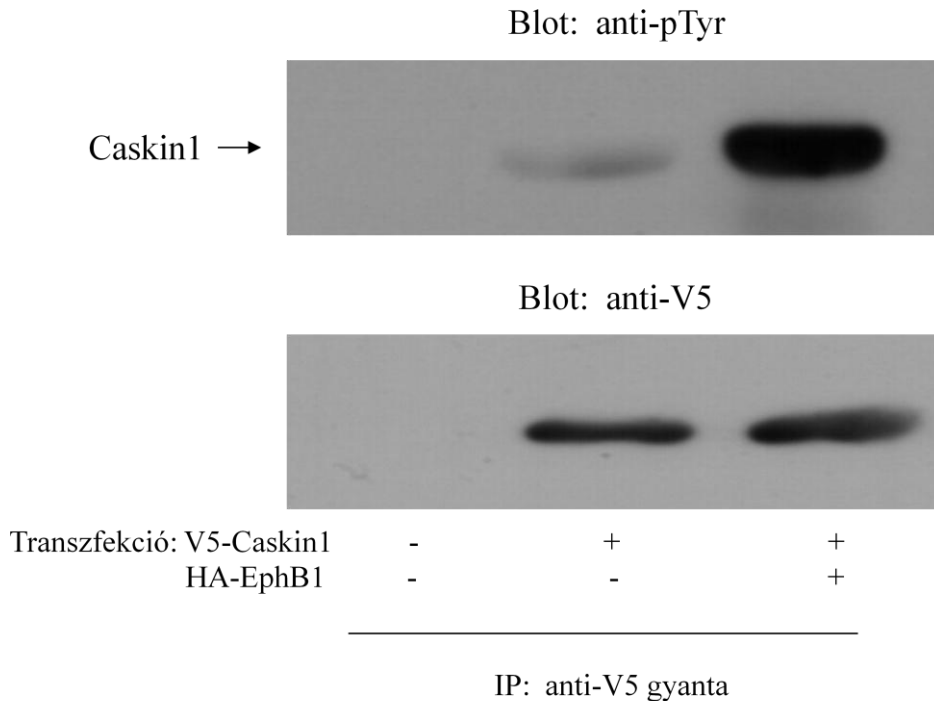


**6-10. ábra: Biotinizált foszfopeptidek patkányagyban Nck-n keresztül megkötik a Caskin1-et.** Az EphB1 receptor 594-es, a PDGF receptor 751-es és kontrollként a 100-as foszforilált tirozinját tartalmazó biotinizált tirozin foszfopeptideket szintetizáltattunk, majd Streptavidin gyantához kötöttük őket. A fenti foszfopeptidekkel patkány agykivonatból próbáltuk precipitálni az Nck-Caskin1 komplexet. A foszfopeptidekhez kötődő fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulózra történő transzferálás után a membránt anti-Nck és anti-Caskin1 ellenanyaggal hívtuk elő. Látható, hogy mindkét Nck kötésére képes foszfopeptid megköti az Nck-t és vele együtt a Caskin1 fehérjét.

### 6.3 EphB1 hatására foszforilálódik a Caskin1 296-os és 336-os tirozinja

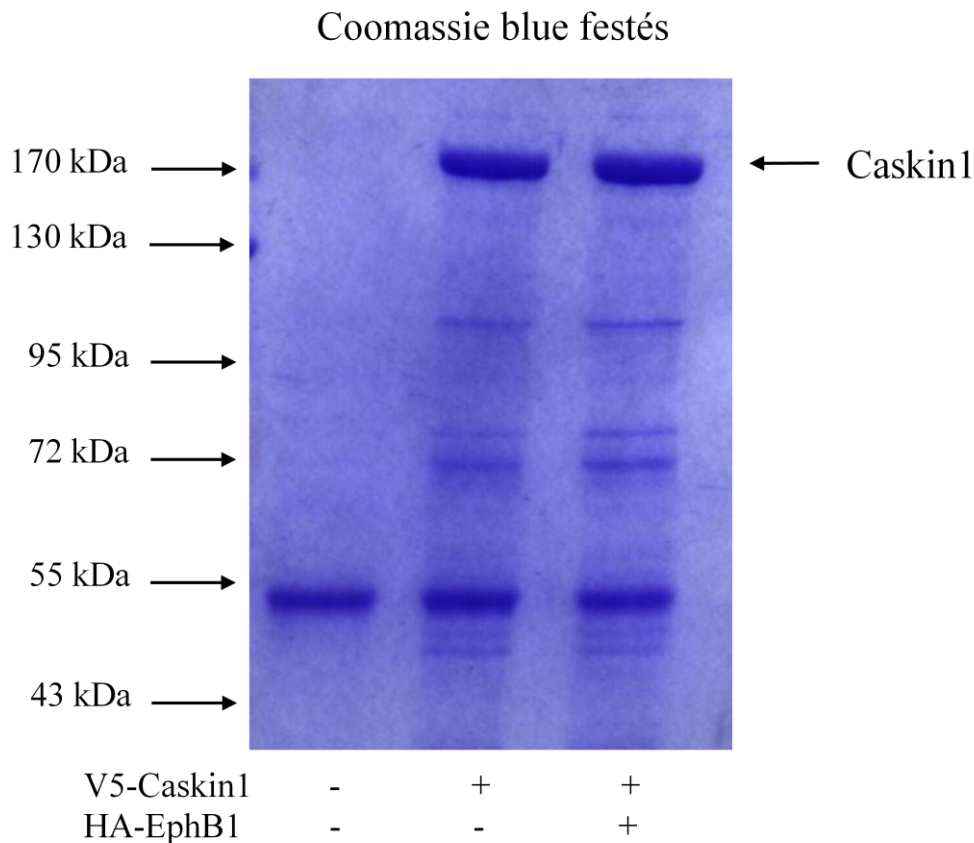
Irodalmi adatok alapján jól ismert, hogy a tirozin kináz receptorok jelátviteli fehérjéket kötnek meg, és gyakran foszforilálják is őket [200]. Mi is feltételeztük ezért, hogy az aktivált EphB1 receptorhoz Nck-n keresztül kötődő Caskin1 esetleg tirozinon foszforilálódhat.

A kérdés megválaszolására V5 címkével ellátott Caskin1-gyel, és V5-Caskin1-gyel és HA címkével jelzett EphB1-gyel kotranszfektált COS7 sejtek kivonatából anti-V5 gyantával immunprecipitáltuk a Caskin1-et. SDS-PAGE és nitrocellulózra történő transzfer után a foszforilációt anti-foszfotirozin monoklonális antitesttel vizsgáltuk. A 6-11. ábrán látható, hogy EphB1 jelenlétében a Caskin1 állványfehérje jelentősen foszforilálódik.



**6-11. ábra: EphB1 receptor hatására a Caskin1 tirozinon foszforilálódik.** COS7 sejteket transzfekektáltunk csak V5-Caskin1-gyel, V5-Caskin1 és HA-EphB1-gyel, illetve hagyunk transzfekeció nélkül. Feltárás után a fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét, majd nitrocellulózra történő blottolás után anti-foszfotirozin ellenanyaggal vizsgáltuk. A felső panelen látható, hogy az EphB1 receptor a kötődés hatására erőteljesen foszforilálja a Caskin1-et. A membránt újra előhívtuk anti-V5 ellenanyaggal, bizonyítandó, hogy az eltérést nem a Caskin1 fehérjeszintjének a különbsége okozza.

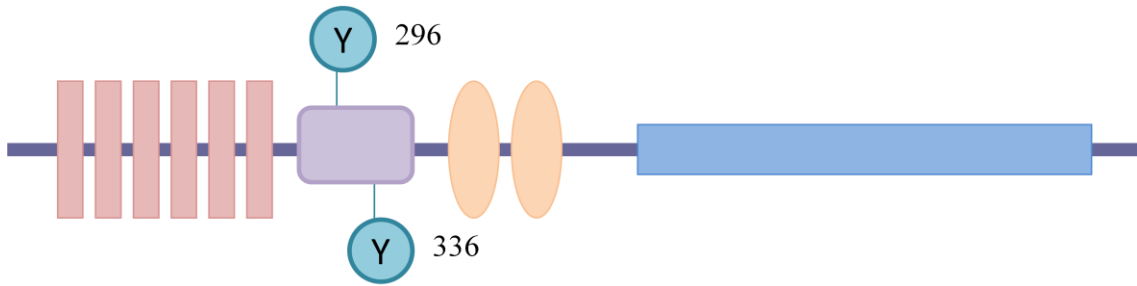
Szerettük volna meghatározni a pontos foszforilációs hely(ek)et. Első körben erre tömegspektrometriás analízist tartottunk a legmegfelelőbbnek. Felvettük a kapcsolatot Douglas Lamont-tal, aki a Dundee Egyetem Természettudományi Karán működő Proteomikai labornak a vezetője. Az ő instrukciója alapján az alábbi mintákat küldtük ki Skóciába. COS7 sejteket V5-Caskin1-gyel, illetve V5-Caskin1-gyel és HA-EphB1-gyel kotranszfectáltunk. A sejtlyúzátumokból ezután anti-V5 gyantával immunprecipitáltuk a Caskin1-et. SDS poliakrilamid gélelektroforézis után a fehérjéket Coomassie blue festéssel festettük meg. A 6-12. ábrán látható, hogy mind a két Caskin1-gyel transzfectált esetben az állványfehérje jól festődő csíkot ad. Ezt a kettőt, a foszforilálatlan és az EphB1-gyel foszforilált Caskin1 fehérjecsíkot vágtuk ki a gélből és küldtük el -80°C-on tömegspektrometriára.



IP: anti-V5 gyanta

**6-12. ábra: Az immunprecipitált Caskin1 láthatóságának ellenőrzése.** Transzfectió nélküli, V5-Caskin1-gyel, illetve V5-Caskin1-gyel és HA-EphB1-gyel kotranszfectált COS7 sejtek kivonatából anti-V5 gyantával immunprecipitáltuk a Caskin1-et. SDS-PAGE után a gélt Coomassie blue-val festettük meg. Látható, hogy a két Caskinnal transzfectált pontban a fehérje egy erőteljes csíkot ad, melyet kivágtunk és elküldtünk tömegspektrometriás analízisre.

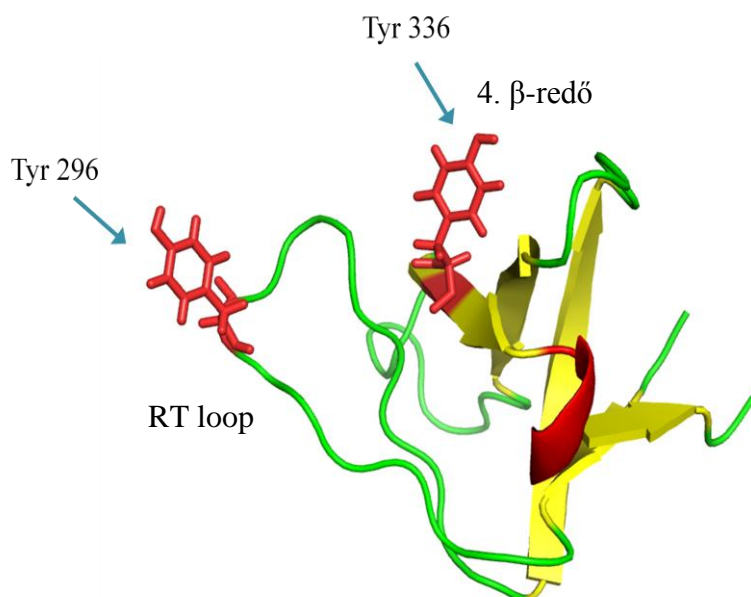
A tömegspektrometria során úgy találták, hogy noha számos szerin/treonin már alap esetben foszforilálva volt (valószínűleg a szérumban lévő növekedési faktorok miatt), a két minta között csak két új tirozin foszforilációs hely jelent meg: a Caskin1 296. és 336. tirozinja. Meglepve tapasztaltuk, hogy mindkét tirozin az állványfehérje SH3 doménjében helyezkedik el (6-13. ábra).



SH3 domén

**6-13. ábra:** Az EphB1 hatására megjelenő két tirozin foszforilációs hely a Caskin1 SH3 doménjében található.

Először modellezni kívántuk a foszforilált tirozinok helyzetét a Caskin SH3 doménjének 3D szerkezetében. Ehhez a módszerekben már leírt I-TASSER szerkezet-jósló szervert használtuk Magyar Csaba (MTA TTK Enzimológiai Intézet) segítségével. Ahogy a 6-14. ábrán látszik a 296. tirozin az első két béta-redőt összekötő flexibilis RT loopban, a 336. tirozin a jóval kompaktabb negyedik béta-redőben foglal helyet.

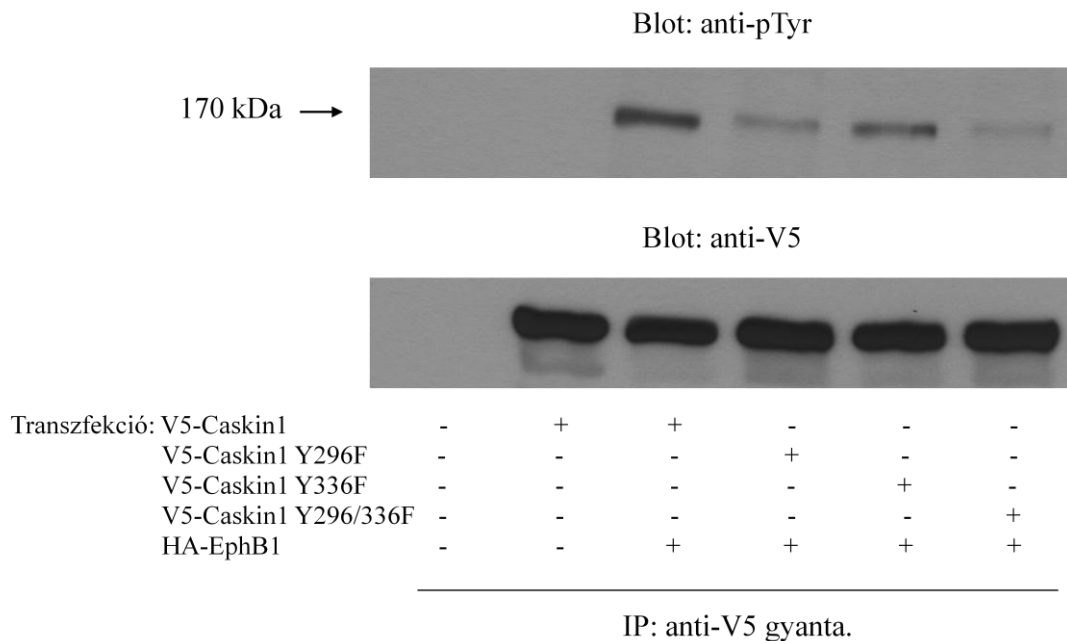


**6-14. ábra:** A foszfortirozinok helyzetének modellezése. A Caskin SH3 doménjének 3D szerkezetét a publikus I-TASSER szerkezet-jósló szerverrel modelleztük. Az EphB1 hatására foszforilálódó 296. tirozin egy RT loopban, a 336. tirozin pedig a negyedik béta-redőben található.



Bizonyítandó a tömegspektrometria eredményét, hogy valóban a 296. és 336. tirozin foszforilálódik, QuickChange módszerrel különböző konstrukciókat hoztunk létre, melyekben fenilalaninra mutáltuk a 296-os és a 336-os tirozint. Az elsőben csak a Caskin 296-os tirozinját (Y296F), a másodikban csak a 336-os tirozint (Y336F), a harmadikban pedig mind a két tirozint (Y296/336F) fenilalaninra cseréltük. A előbbi konstrukciókkal újra elvégeztük a foszforilációs vizsgálatot.

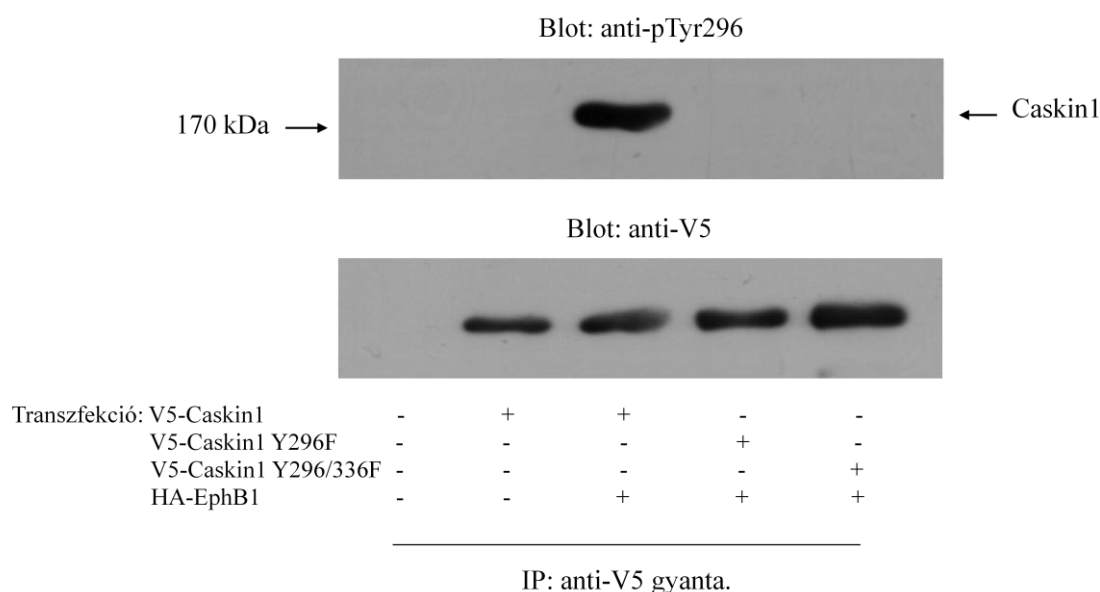
V5-Caskin1-et, illetve HA-EphB1-et és V5-Caskin1-et, illetve a V5-Caskin1 mutánsokat koexpresszáló COS7 sejtek lizátumát anti-V5 gyantával immunprecipitáltuk. Majd SDS poliakrilamid gélelektroforézis és nitrocellulózra történő transzfer után anti-foszfotirozin ellenanyaggal hívtuk elő a membránt. A 6-15. ábrán látszik, hogy a 6-11. ábrához hasonlóan a vad típusú Caskin1 EphB1 jelenlétében tirozinon foszforilálódik. A Caskin mutánsok esetében már a Caskin1 Y296F és Y336F konstrukciók esetében is jelentős csökkenést látunk a foszforiláció szintjében. A legalacsonyabb foszforilációs szintet a mindkét tirozin helyett fenilalanint tartalmazó mutáns esetében láttuk. A jel itt szinte a foszforiláció nélküli állapotot mutatja. Az alsó panelen megfigyelhető, hogy azonos mennyiségű V5-Caskin1 fehérje immunprecipitálódott.



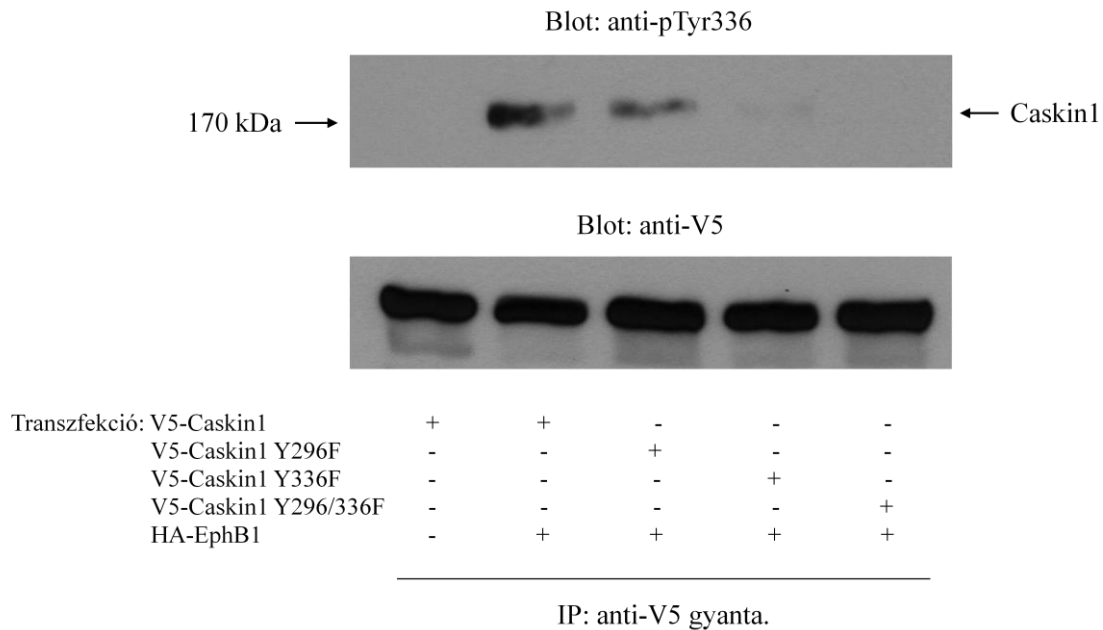
**6-15. ábra: A Caskin1 mutánsok foszforilációjának vizsgálata COS7 sejtekben.** HA-EphB1-et és a különböző V5-Caskin1 konstrukciókat koexpresszáltuk COS7 sejtekben. A sejtizátumokból anti-V5 gyantával immunprecipitáltunk. A kötődő fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulózra blottoltuk, végül a membránt anti-foszfortirozinnal, majd anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk. Megfigyelhető, hogy az EphB1 hatására megjelenő tirozin foszforiláció szintje már az Y296F és Y336F konstrukció esetében is jelentősen visszaesik. Az Y296/336F mutánsnál a foszforilációs jel erőssége pedig szinte az alap szintre csökken.

Szerettük volna másik oldalról is megközelíteni a foszforilációs helyek vizsgálatát, ezért a GenScript-től foszfortirozin elleni antitestet rendeltünk mind a 296-os, mind a 336-os foszfortirozin ellen (anti-pTyr296 és anti-pTyr336). A poliklonális ellenanyagokat a cég nyúlban termeltette a Módszerek fejezetben leírt antigénekkal szemben.

A fenti ellenanyagokkal is elvégeztük a korábbi kísérletet. V5-Caskin1 és V5-Caskin1 mutáns konstrukciókkal (Y296F, Y336F és Y296/336F) kotranszfektáltunk HA-EphB1-gyel expresszázó COS7 sejteket. V5 gyantával történt immunprecipitáció, majd SDS-PAGE után az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Végül anti-pTyr296 és anti-pTyr336 poliklonális ellenanyagokkal detektáltunk. A 6-16. ábrán megfigyelhető, hogy a 296. tirozin ellen termeltetett ellenanyaggal a Caskin1 foszforilációját egyértelműen ki lehet mutatni. Látható továbbá, hogy a jel teljesen eltűnik az Y296F és Y296/336F mutáns konstrukciók esetében. Az anti-pTyr336-os foszfospecifikus ellenanyag is tisztán kimutatja a vad típusú Caskin1 esetén a foszforilációt. Itt is detektálható, hogy mind az Y336F, mind a dupla mutáns (Y296/336F) esetében jelentősen, az alap szintig csökken a foszforilációs jel (6-17. ábra). Kontrollként mindkét kísérletnél a nitrocellulóz membránokat újra előhívtuk anti-V5 ellenanyaggal, bizonyítandó, hogy nem a V5-Caskin mennyiségének eltérése okozza a különbségeket.



**6-16. ábra: A Caskin1 mutánsok foszforilációjának vizsgálata anti-pTyr296 foszfospecifikus ellenanyaggal COS7 sejtben.** HA-EphB1-gyel és különböző V5-Caskin1 konstrukciókat koexpresszáztunk COS7 sejtekben. A sejtizátumokat anti-V5 gyantával immunprecipitáltuk, majd SDS-PAGE és nitrocellulózra történő transzferálás után a membránt a 296. foszfortirozin ellen termeltetett, majd anti-V5 ellenanyaggal hívtuk elő. Az ábra felső paneljén látható, hogy a foszfospecifikus ellenanyag egyértelműen kimutatja, hogy EphB1 hatására foszforilálódik a 296. tirozin. Az alsó panelen pedig megfigyelhető, hogy nincs különbség a fehérjeszintekben.



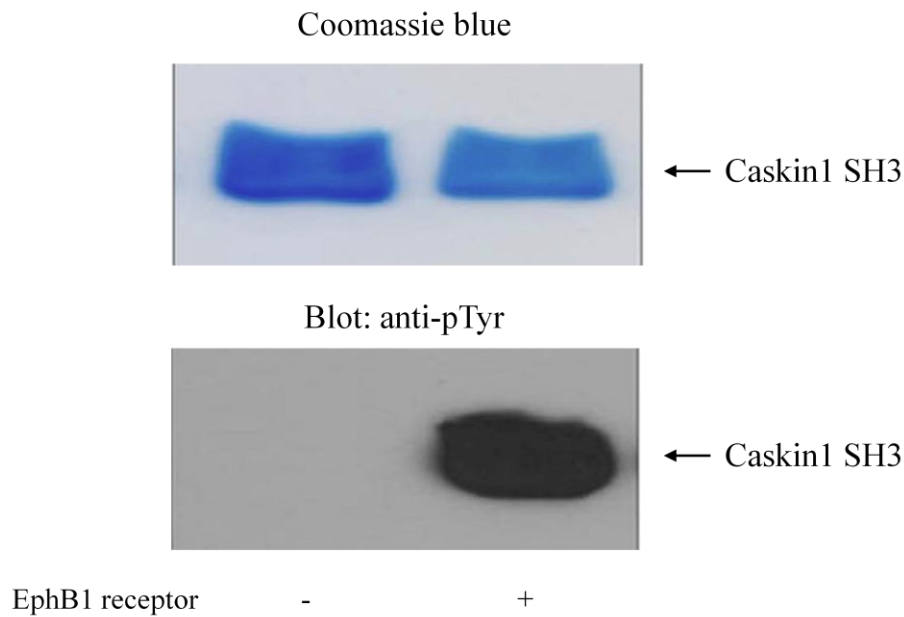
**6-17. ábra: A Caskin1 mutánsok foszforilációjának vizsgálata anti-pTy336 foszfospecifikus ellenanyaggal COS7 sejtben.** COS7 sejteket HA-EphB1-gyel és különböző V5-Caskin1 konstrukciókkal kotranszfektáltunk, majd agaróz gyantához kovalensen kapcsolt anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitáltunk. Ezt követően a kötődő fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk, nitrocellulózra blottoltuk és anti-pTyr336 poliklonális ellenanyaggal hívtuk elő. Megfigyelhető az ábrán, hogy EphB1 hatására a Caskin1 foszforilálódik a 336-os tirozinon. Látható továbbá, hogy a Y336F és Y296/336F pontmutáns konstrukciók esetében a foszforilációs jel csökken, az alap szintre esik vissza. Az alsó panelen látszik, hogy nincs eltérés a Caskin1 fehérjeszintjében.

Összefoglalva az előbbi kísérleteket kijelenthetjük, hogy a Caskin1, amikor az Nck kapcsoló fehérjén keresztül az EphB1 receptorhoz kötődik, foszforilálódik a 296. és a 336. tirozinon.

#### **6.4 A tirozin foszforiláció az SH3 domén szerkezetváltozásához vezet**

Az utóbbi időben sikerült kimutatni, hogy SH3 domének tirozin foszforilációja negatívan befolyásolhat fehérje-fehérje interakciókat [182,183]. Valószínűsítik, hogy maga a tirozinhoz kapcsolódó foszfát csoport, illetve annak töltése akadályozza meg, hogy a kapcsolódni próbáló fehérjék poliprolin hélicei interakciót alakítsanak ki az SH3 doménnel [181]. Mindeztáig azonban a foszforiláció hatására létrejövő szerkezeti változásokat nem térképezték fel.

Ennek megválaszolására az Enzimológiai Intézetrel együttműködve megvizsgáltuk milyen szerkezeti átalakulást okoz a 296. és 336. tirozin foszforilációja. Első lépésként a Caskin1 SH3 doménjét BL21star baktérium törzsben expresszáltuk, majd a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően tisztítottuk. Ezt követően a tisztított SH3 domént rekombináns aktív EphB1 receptorral megfoszforiláltuk, illetve kontrollként kezeletlenül hagytuk (a pufferbe nem tettünk szolubilis receptort), majd SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Ezt követően egyik esetben a gélt Coomassie blue festékkel megfestettük, a másik esetben a fehérjét nitrocellulózra blottoltuk és anti-foszfortirozin ellenanyaggal hívtuk elő. A 6-18. ábra felső paneljén látható, hogy Coomassie festés után a Caskin1 SH3 doménje a His címkével megnövelt mérettartományban egy erőteljes csíkot ad. Az alsó panelen pedig megfigyelhető, hogy EphB1 receptor hatására az SH3 domén tirozinon foszforilálódik.

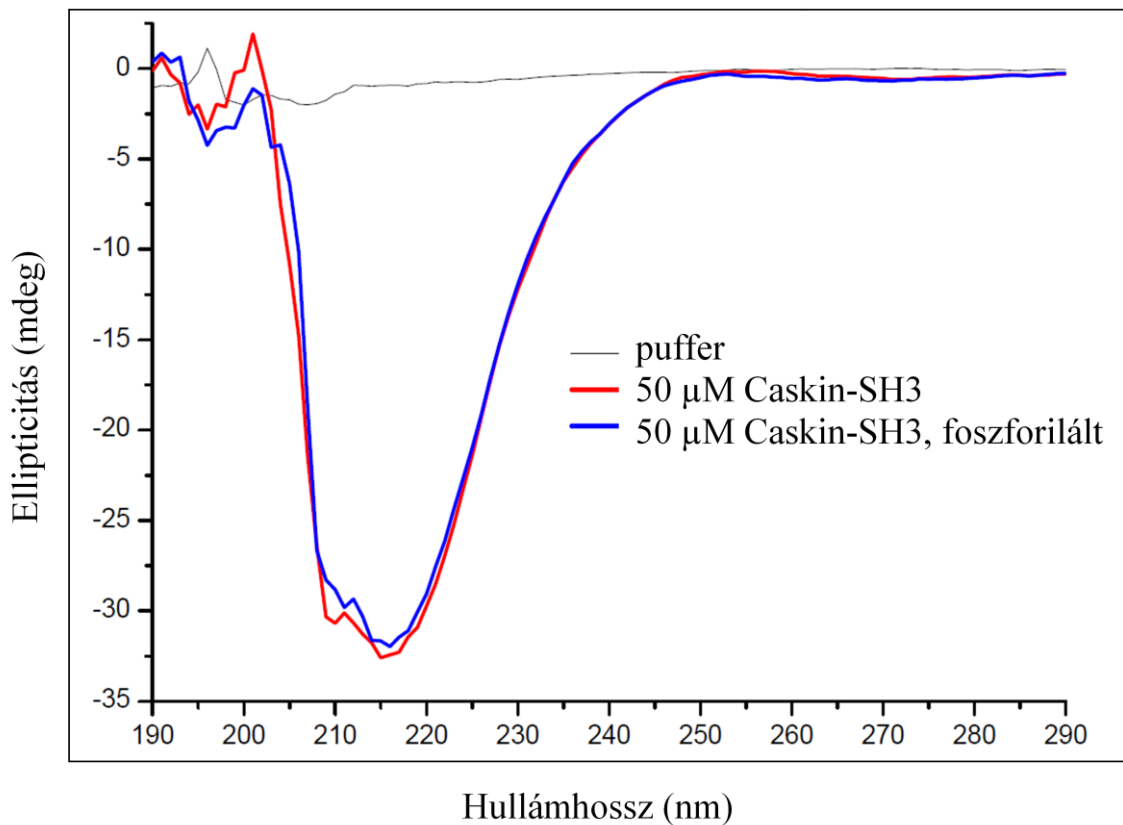


**6-18. ábra: A tisztított SH3 domén foszforilációjának vizsgálata.** A Caskin1 SH3 doménjét baktériumban expresszáltattuk, tisztítottuk, majd rekombináns aktív EphB1 receptorral *in vitro* tirozinon foszforiláltuk. A felső panelen megfigyelhető, hogy tisztítás, majd SDS-PAGE után a fehérjénk Coomassie blue festést követően a megfelelő mérettartományban van, és egy határozott csíkot ad. Az alsó panelen az látható, hogy EphB1 receptor hatására az SH3 domén masszívan foszforilálódik.

A dolgozat korábban bemutatott kísérletei bizonyították, hogy a Caskin1 és az EphB1 egyazon fehérje komplexben találhatóak. Továbbá a 6.3. alfejezetben igazoltuk, hogy a Caskin1 tirozin foszforilációja korrelál az EphB1 receptor tirozin kináz koexpressziójával. Mindezek valóban nagyon valószínűvé teszik a Caskin1 EphB1 általi foszforilációját, azonban teljesen nem zárható ki, hogy az EphB1 megjelenésének hatására más, olyan további fehérje tirozin kinázok aktiválódnak, melyek végső soron felelősek lesznek a Caskin1 foszforilálásáért. Utóbbi feltételezést cáfolja az előbbi 6-18. ábra. Ez az eredmény megerősítette számunkra, hogy az EphB1 receptor közvetlenül, nem más tirozin kinázokon keresztül felelős a Caskin1 állványfehérje foszforilációjáért.

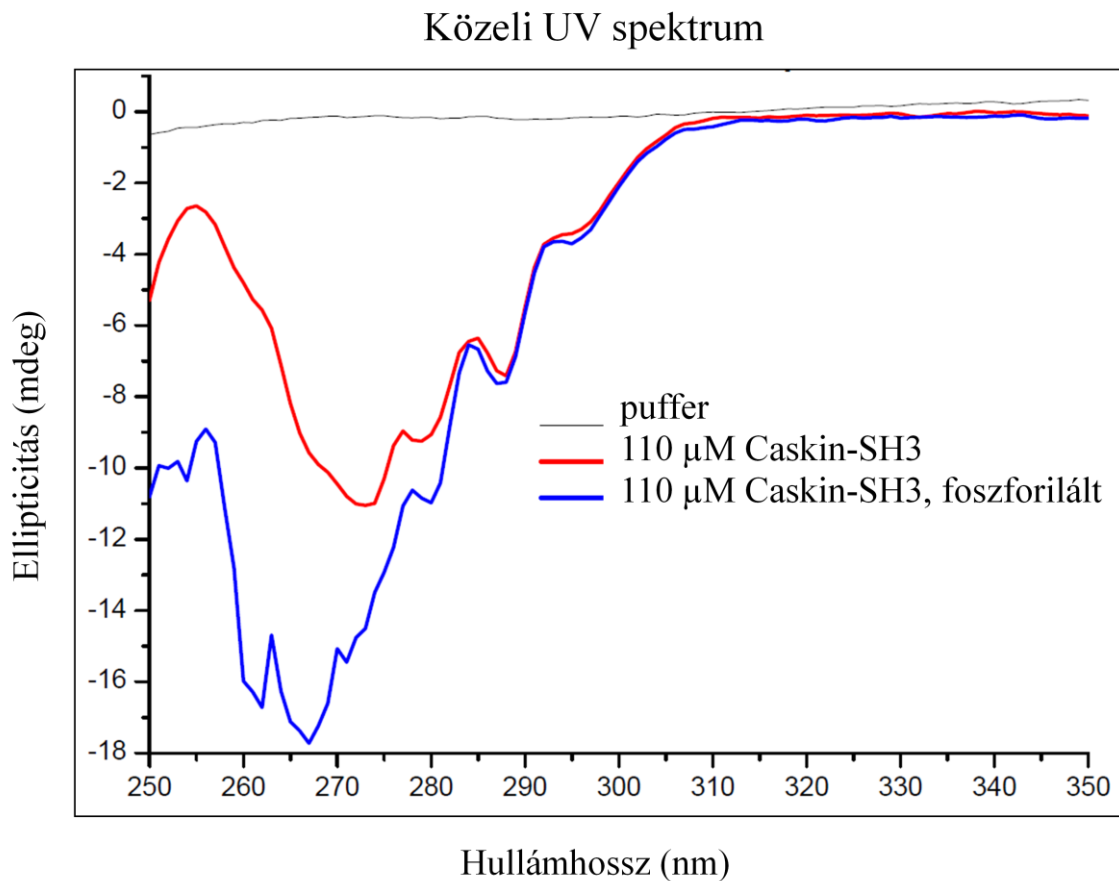
Korábban több módszer mellett, CD spektroszkópiával a munkacsoportunk már bizonyította, hogy a Caskin1 prolin-gazdag doménje rendezetlen szerkezetű [65]. A következő lépésben újra ehhez a módszerhez folyamodtunk, és távoli UV tartományban vizsgáltuk meg a tisztított Caskin1 foszforilált és foszforilálatlan SH3 doménjét. Irodalomból ismert, hogy a távoli UV tartományban felvett CD spektrummal a fehérjék másodlagos szerkezetének megváltozását lehet kimutatni. A 6-19. ábrán látható, hogy 50  $\mu\text{M}$ -os fehérje koncentrációnál nincs különbség a foszforilált és foszforilálatlan SH3 domének ellipticitásában. Mindez arra utal, hogy a másodlagos térszerkezet nem változik meg a foszforiláció hatására.

### Távoli UV spektrum



**6-19. ábra: A Caskin1 SH3 doménjének másodlagos szerkezete nem változik meg foszforiláció hatására.** Az SH3 domén távoli UV tartományban felvett CD spektruma alapján nincs különbség a foszforilált és foszforilálatlan minta között. Ez arra utal, hogy az EphB1 receptor hatására létrejövő tirozin foszforiláció nem változtatja meg a domén másodlagos szerkezetét. Az ábrán szürkével önállóan a pufferek is látható a CD spektruma.

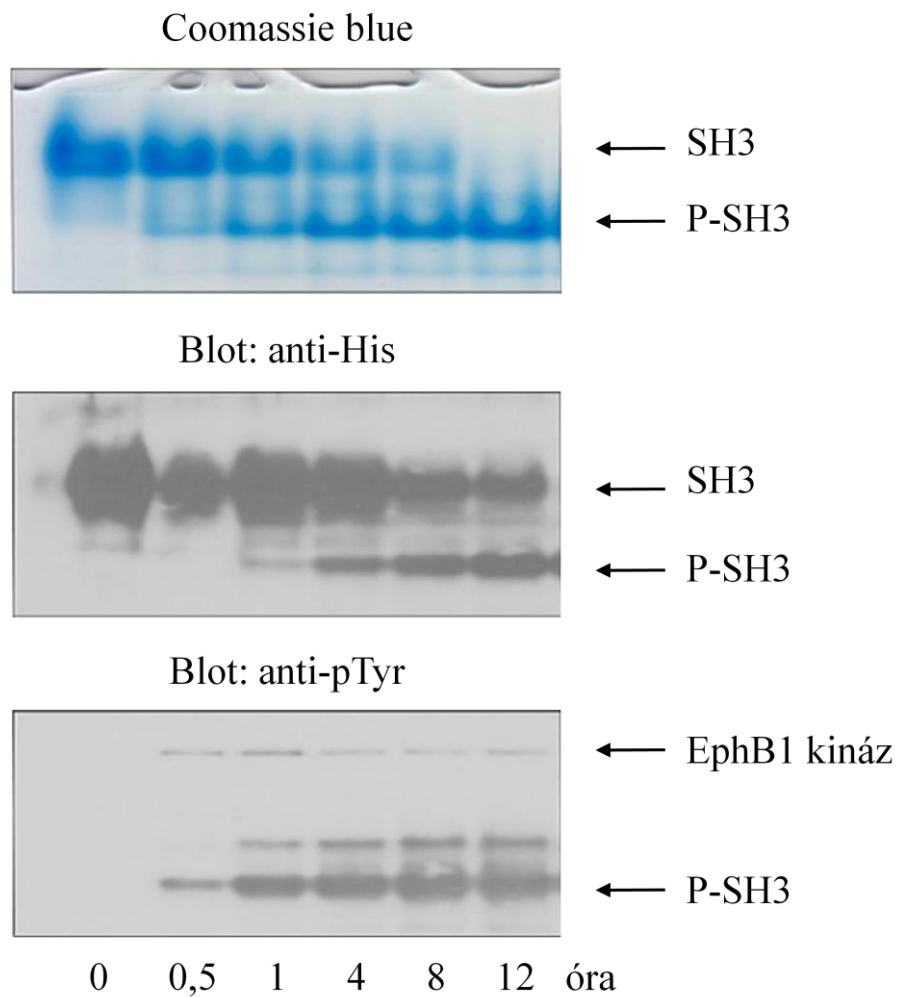
Közeli UV tartományban is megvizsgáltuk a fehérjénket, mellyel a fehérjék harmadlagos, negyedleges szerkezetében bekövetkező változásokat lehet kimutatni. Ebben az esetben jelentős különbség mutatkozott foszforiláció hatására a minták között. Úgy tűnik, hogy a tirozinok körüli kémiai környezet érzékeny a foszforilációra, következésképpen az SH3 domén harmadlagos szerkezete megváltozik a foszforilált tirozinok körül (6-20.ábra).



**6-20. ábra: A Caskin1 SH3 doménjének harmadlagos szerkezete megváltozik foszforiláció hatására.** Az SH3 domén közeli UV tartományban felvett CD spektrumában jelentős különbség látható a foszforilált és nem foszforilált minta között. Az ábrán megfigyelhető, hogy foszforiláció hatására csökken az ellipticitás, mely mutatja, hogy megváltozik a tirozin oldalláncok környezete, ezáltal a harmadlagos szerkezet a kapcsolódó foszfátcsoportok miatt. Szürkével magának a puffernek is felvettük a CD spektrumát.



Felmerül azonban, hogy a létrehozott SH3 konstrukció dimerizálódik, és az így kialakuló negyedleges szerkezetet tudjuk a közeli UV tartományban végzett CD spektroszkópiával kimutatni. Hogy kizárjuk ennek a lehetőségét idő-kinetikát is alkalmazva megfoszforiláltuk a mintáinkat 15°C-on, majd natív gélelektroforézist végeztünk. Natív gélelektroforézis esetében a gél és a pufferek nem tartalmaztak sem SDS-t, sem redukálószer (például merkaptotanol), ezért a fehérjék foldingja, így a natív konformációjuk megmarad. Ennek következtében a molekulaméret mellett a töltés is befolyásolja a vándorlás sebességét. A 6-21. ábrán megfigyelhető, hogy a gél egyik esetben csak Coomassie blue-val festettük meg, másik esetekben nitrocellulózra történő transzferálás után a fehérjéket anti-His, illetve anti-foszfotirozin ellenanyaggal hívtuk elő. Az ábrán látható, hogy a tirozinon foszforilált Caskin SH3 domén gyorsabban vándorol, mint a nem foszforilált fehérje. A gyorsabb vándorlást a foszfátcsoportok miatt megjelenő negatív töltéstöbbletnek tulajdoníthatjuk. Több ok miatt is kizárhatjuk annak a lehetőségét, hogy a lassabban mozgó fehérje nem egy dimer, ami a foszforiláció hatására disszociálódik. Egyrészt az SH3 domén az általunk várt molekulaméretnél helyezkedett el (a His címkével ellátott Caskin SH3 domén becsült mérete 8.82 kDa). Másrészt ellenőrzésképpen megfuttattuk natív gélen a nem-foszforilált fehérjét redukálószer mellett is (eredmény nincs feltüntetve), hogy megnézzük valóban dimer formában van-e. A kísérlet során azt találtuk, hogy a foszforilálatlan SH3 domén redukálószer jelenlétében nem hasadt szét kisebb darabokra. Harmadrészt, ha a domén esetleg nagyobb aggregátumot alkotna, akkor a foszforiláció hatására bekövetkező bomlás miatt nem egyértelműen két csíkot kapnánk a gélen, hanem többet. Mindezeket figyelembe véve kijelenthetjük, hogy valóban a harmadlagos szerkezet változik meg foszforiláció hatására.

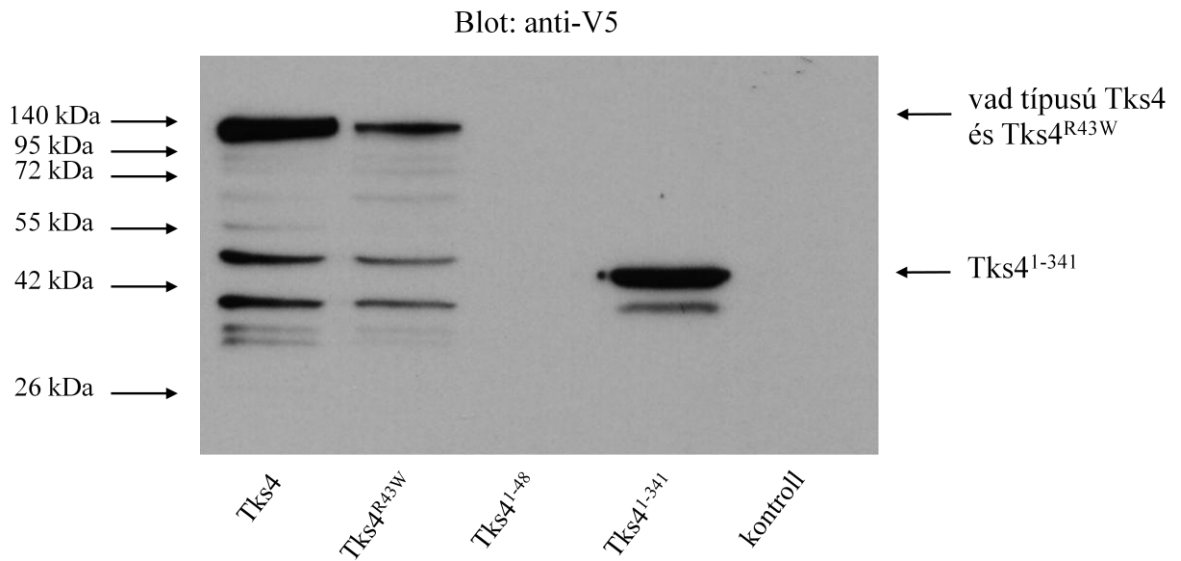


**6-21. ábra: A foszforilált Caskin1 SH3 domén gyorsabban vándorol.** Az expresszált, tisztított SH3 domént rekombináns aktív EphB1 receptorral foszforiláltuk 15 °C-on különböző időn keresztül. Ezt követően natív gélen futtattuk meg a fehérjét. Első esetben csak gélfestést alkalmaztunk (Coomassie blue), másodsorra nitrocellulózra történő blottolás után anti-His, illetve anti-foszfortirozin ellenanyaggal hívtuk elő a membránt. Látható, hogy a foszforiláció hatására az SH3 domén gyorsabban vándorol. Ennek oka a foszfátcsoport miatt megjelenő negatív töltéstöbblet. Megfigyelhető továbbá, hogy nincs jele dimerizációnak, illetve aggregációnak, bizonyítva ezzel, hogy nem alakul ki negyedleges szerkezet az SH3 domének összekapcsolódásával.

## **6.5 A Tks4 állványfehérje Frank-ter Haar szindrómában kimutatott néhány mutánsának expressziós és lokalizációs vizsgálata**

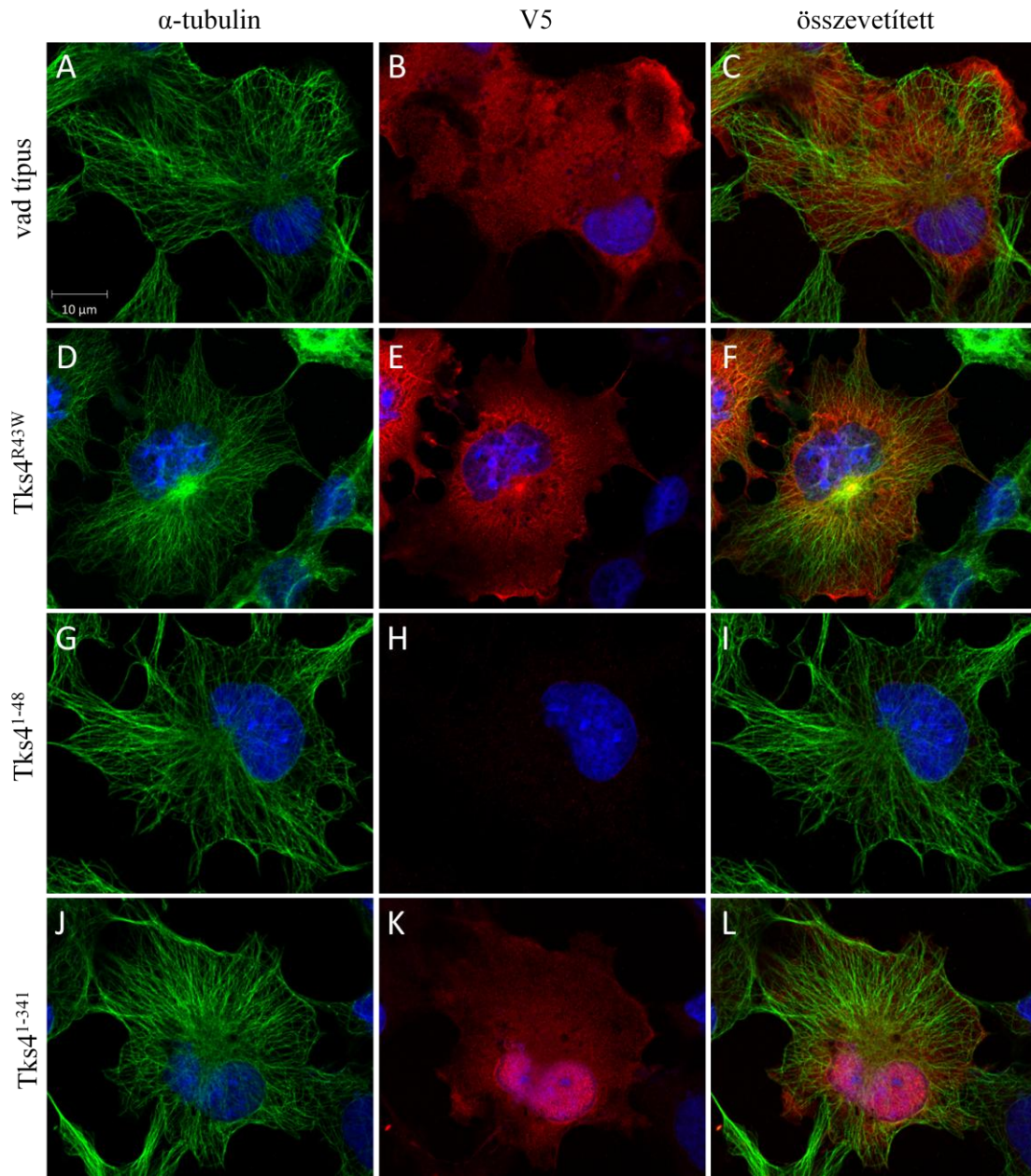
Munkacsoportunk egy korábbi cikkben kimutatta, hogy a Tks4 Frank-ter Haar szindrómában Iqbal és munkatársai által leírt R43W mutációja súlyosan károsítja az állványfehérje sejten belüli kifejeződését és funkcióját [105]. Iqbal közleményében az R43W mutáció mellett további két változat is felkeltette az érdeklődésünket. Az egyik esetben egy homozigóta inzerció következtében egy korai STOP kodon jelenik meg, ami egy 48 aminosav hosszúságú csonkolt fehérjét (Tks4<sup>1-48</sup>) eredményez, ami csak a PX domént tartalmazza. Másik betegekben egy 1 bázispáros deléción hatására létrejövő kereteltolódás okoz szintén egy korai STOP kodont, és ezáltal egy 341 aminosavból álló megrövidült fehérje fejeződik ki. Ebben az esetben a csonkolódás a második SH3 domén után következik be [113].

Szerettük volna megvizsgálni mindhárom általunk kiválasztott mutáns expresszióját és sejten belüli elhelyezkedését. Az Anyagok és módszerek fejezetben részletezett V5-Tks4<sup>R43W</sup>, V5-Tks4<sup>1-48</sup> és V5-Tks4<sup>1-341</sup> mutáns konstrukciókat hoztunk létre, melyekkel COS7 sejteket transzfektáltunk. A sejtizátumokat SDS-PAGE-nek vetettük alá, majd az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk. Végül anti-V5 monoklonális ellenanyaggal detektáltunk. A 6-22. ábrán látható, hogy a vad típusú Tks4 és a Tks4<sup>R43W</sup> mutáns a várt 140 kDa-os molekulaméretnél helyezkedik el. Érdekes megjegyezni, hogy a fehérjék túltermelődése miatt a degradáció jelei is megfigyelhetők az alacsonyabb molekulaméreteknél. Érdekes módon a rövidebb, Tks4<sup>1-48</sup> mutáns egyáltalán nem fejeződik ki. Végül a Tks4<sup>1-341</sup> mutáns körülbelül 45 kDa-nál jelenik meg. Az ábrán feltűnik, hogy a Tks4<sup>R43W</sup> mutáns fehérje mennyisége jóval kisebbnek látszik, mint a vad típusú fehérjéé. Ennek okát Dr. Bögel Gábor részletesebben körbejárja doktori értekezésében.



**6-22. ábra: A Tks4 mutáns fehérjék expressziós mintázata:** COS7 sejteket transzfektáltunk V5-Tks4, V5-Tks4<sup>R43W</sup>, V5-Tks4<sup>1-48</sup> és V5-Tks4<sup>1-341</sup> konstrukciókkal. 18 óra után feltártuk a sejteket, majd centrifugálás után a felülészóban található fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el. Ezt követően nitrocellulózra blottoltunk, végül anti-V5 ellenanyaggal hívtunk elő a membránt. A panelen látható, hogy a V5-Tks4<sup>R43W</sup> mutáns a vad típusú Tks4-el azonos molekulatömegű, míg a Tks4<sup>1-341</sup> kisebb méretű a megjelenő STOP kodon miatt. A harmadik pontban megfigyelhető, hogy a Tks4<sup>1-48</sup> mutáns nem expresszálódik a sejtben.

A mutáns konstrukciók (Tks4<sup>R43W</sup>, Tks4<sup>1-48</sup>, Tks4<sup>1-341</sup>) intracelluláris lokalizációjának vizsgálatához mikroszkóp fedőlemezekre ültetett COS7 sejtekben expresszáltuk a vad típusú és a mutáns fehérjéket. Mosás és fixálás után megfestésre kerültek a Tks4 fehérjék anti-V5 (piros), és az  $\alpha$ -tubulin anti- $\alpha$ -tubulin (zöld) elsődleges ellenanyagokkal. A sejtmagok festéséhez DAPI-t használtunk. Ahogy a 6-23. ábrán látható a Tks4<sup>R43W</sup> mutáns fehérje egy része a sejtmag melletti területre, pontosabban az aggresszómába lokalizálódik. Ennek további bizonyításáról szóló kísérletek részletei a társszerzős közleményemben olvashatóak. A Tks4<sup>1-48</sup> mutáns, ahogy az előző kísérlet alapján várható volt, nem fejeződik ki a sejtben. Ezzel szemben a Tks4<sup>1-341</sup> csonkolt fehérje elhelyezkedése egy érdekes képet mutat. A harmadik mutáns protein meglepetésünkre a sejtmagban halmozódik fel. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy amíg a Tks4<sup>1-48</sup> nem expresszálódik a sejtekben, addig a másik két mutáns fehérje, a Tks4<sup>R43W</sup> és a Tks4<sup>1-341</sup> abnormális sejtben belüli lokalizációt mutat.



**6-23. ábra: A Tks4 mutáns fehérjék sejten belüli lokalizációja.** COS7 sejteket fedőlemezekre ültettünk és különböző Tks4 konstrukciókkal (V5-Tks4, V5-Tks4<sup>R43W</sup>, V5-Tks4<sup>1-48</sup> és V5-Tks4<sup>1-341</sup>) transzfektáltuk. 18 óra elteltével mosás és fixálás után minden esetben poliklonális anti-V5 és monoklonális anti- $\alpha$ -tubulin elsődleges, majd Alexa-546-al és Alexa-488-cal konjugált anti-nyúl és anti-egér ellenanyagokkal végeztünk immuncitokémiai festést. A sejtmagok DAPI-val lettek jelölve. Megfigyelhető, hogy a Tks4<sup>R43W</sup> fehérje egy része a juxtanukleáris régióba, valószínűleg az aggresszómába lokalizálódik. A Tks4<sup>1-48</sup> mutáns nem fejeződik ki a sejtben. Végül a Tks4<sup>1-341</sup> egy eddig ismeretlen módon a sejtmagba kerül. Összefoglalva elmondható, hogy a Tks4<sup>R43W</sup> és a Tks4<sup>1-341</sup> mutáns rendellenes sejten belüli elhelyezkedést mutat.

## 7. Megbeszélés és következtetések

Az irodalomban nagyon jól ismert, hogy a tirozin kinázok hatására megjelenő foszforiláció fontos szerepet játszik különböző jelátviteli folyamatokban. Az is alaposan tanulmányozott, hogy a foszforilált tirozinok milyen doménekhez, és hogyan tudnak kapcsolódni. Az azonban sokkal kevésbé vizsgált, hogy egyes domének tirozin foszforilációja milyen szabályozó szerepet tölt be.

Nézzük meg például a kutatási témámhoz tartozó másik állványfehérje, a már korábban is említett Tks5 egy új általunk kimutatott szabályozását. A Tks5 részt vesz az EGF jelpályában. EGF hatására az állványfehérje tirozinon foszforilálódik, melyért az Src nem receptor tirozin kináz a felelős. Kimutattuk továbbá azt is, hogy az állványfehérje EGF kezelés hatására a membránhoz transzlokálódik, amiért részben a PI 3-kináz lipidtermékei, és a Tks5 PX doménje közötti kölcsönhatás felelős [106]. Esetünkben, ahogy a tirozin foszforilációval kapcsolatos kutatási eredmények legnagyobb részében is, a kinázok által foszforilált motívumok, illetve az ezekhez kapcsolódó fehérjék interakcióját vizsgálják. Arról kevesebb adat áll rendelkezésre, hogy egy adott doménon belüli tirozin foszforiláció milyen szerepet játszik különböző fehérjék esetében. Értekezésemben ezért másik oldalról közelítettem meg a tirozin foszforiláció vizsgálatát. Egy érdekes, kevésbé vizsgált regulációs mechanizmust jártam körül, melyben a kapcsoló és állványfehérjék SH3 doménjének tirozin foszforilációja játssza a főszerepet.

Az elmúlt években az Ephrinek és receptoraik által közvetített intracelluláris jelátviteli utakat intenzíven vizsgálták. Noha számos EphB receptorhoz kötődő fehérjét azonosítottak, ezen kapcsolatok funkciója, főleg az axon vezetésben, még mindig hiányos. Az értekezésemben egy új jelátviteli utat vázoltam fel, melyben az idegsejt specifikus állványfehérje, a Caskin1 komplexet képez az EphB1 receptorral az Nck kapcsoló fehérjén keresztül. Ezen túlmenően a komplex kialakulása során az állványfehérje SH3 doménje tirozinon foszforilálódik.

Az irodalomban már ismert volt, hogy a Caskin1 számos fehérjéhez kötődhet, mint a Cask-hoz, az Nck/Dock fehérjékhez, a LAR receptor tirozin foszfatázhoz, a synaptotagminhoz, az Abi2-höz és a neurexinhez [65,75,87]. Azonban még mindig

homály fedí, hogy milyen receptorok, transzmembrán fehérjék felelősek a Caskin1 működésének szabályozásáért.

Az EphB1 és az Nck/Dock interakcióját intenzíven kutatták [65,87,88,140]. Kimutatták, hogy az EphB1 juxtamembrán régiójában elhelyezkedő 594. tirozinhoz kötődik az Nck SH2 doménjével [140], SH3 doménjeivel pedig további fehérjékhez tud kapcsolódni. Ilyen fehérjék az aktin citoszkeleton szabályozásában részt vevő paxillin, Nck-interacting kináz (NIK) és WASP [140,148,149,201]. Kísérleteinkben mi is reprodukáltuk az EphB1 receptor és az Nck kapcsoló fehérje interakcióját, illetve egy érdekes jelenséget is megfigyeltünk a receptorok aktivációjával kapcsolatban. Kimutattuk, hogy overexpresszált rendszerben a receptorok ligand nélkül is képesek aktiválódni. Valószínűleg pusztán a receptorok nagy száma miatt ligand hiányában is oligomerizálódnak, és ezáltal aktiválódnak. Az irodalomban több munkacsoport is szembesült ezzel a jelenséggel [138,196].

Az EphB1/Nck/Caskin1 komplex kialakulása jelentheti a negyedik lehetőséget, mely során a jel a receptortól az aktin citoszkeleton irányába továbbítható (7-1. ábra). Kísérleteinkben sikerült kimutatnunk a három fehérje komplexét mind overexpresszált rendszerben, mind patkány agykivonatban.

Noha az Nck kapcsoló fehérje és az EphB1 kapcsolatát alaposan feltérképezték, sokkal kevesebbet tudni az Nck SH3 doménjeinek partnereiről a jelátvitel későbbi szakaszában. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az Nck melyik SH3 doménje szükséges a Caskin1-gyel történő interakcióhoz. Kísérleti eredményeink alapján úgy tűnik, hogy külön-külön az SH3 domének nem képesek a Caskin1-hez kötődni. A kapcsolat létrejöttéhez az Nck mindhárom SH3 doménje szükséges. Nem értek meglepetésként minket ezek az eredmények, hiszen az irodalomban ismert, hogy az Nck számos kötőpartnere igényli két vagy három SH3 domén jelenlétét a nagyobb affinitású kötődés kialakulása miatt [119,151]. Ez abból a tényből ered, hogy az SH3 domének ligand iránti affinitása jellemzően az alacsony mikromoláris és a közepes-nanomoláris tartományban mozog [155,161,202]. Következésképpen az SH3 doménnel rendelkező fehérjék eltérő stratégiát alkalmaznak, hogy erősítsék az interakciót. Az egyik módszer, hogy több SH3 domént tartalmaznak, mint a Grb2, Nck vagy a Tks családba tartozó állványfehérjék; vagy további ligandkötő felszínekkal rendelkeznek a PPII hélixen kívül, például a nagy változatosságot mutató RT és n-Src hurkokban [155,161].

Vizsgálva a Caskin1 EphB1-gyel alkotott komplex kialakulásakor fellépő esetleges foszforilációját arra az eredményre jutottunk, hogy a receptor foszforilálja a 296. és a 336. tirozint (7-1. ábra). A foszforilációs helyek azonosítása után kisebb meglepetésként ért bennünket, hogy mind a két tirozin az állványfehérje SH3 doménjében található. A patkány Caskin1 SH3 doménjének 3D szerkezetét modellezve azt találtuk, hogy a 296. tirozin az első két béta redőt összekötő flexibilis RT hurokban, míg a 336. tirozin a sokkal tömörebb negyedik béta redőben helyezkedik el.

A legújabb eredmények azt mutatják, hogy számos SH3 domén konzervált tirozin oldallánca foszforilálódhat [181]. Többek között a Grb2 C-terminális SH3 doménjében lévő 209. tirozin is foszforilálódhat az EGF-receptor, vagy a Bcr/Abl fúziós fehérje által. Ennek következtében csökken a prolin-gazdag régióval rendelkező fehérjék kötődése az SH3 doménhez. A fenti példánál maradván a foszforiláció hatására az Sos kicserélő fehérje kevésbé tud a Grb2-hez kapcsolódni [182]. Az Abi1 kapcsoló fehérje foszforilációja az Abl által szintén gátolja az Abi1 Abl kinázhoz való kötődését [183]. Sajnos az irodalomban eddig nem ismert egyetlen olyan fehérje sem, mely a Caskin1 SH3 doménjével lép interakcióba. Így nem tudtuk megvizsgálni, hogy az általunk kimutatott tirozin foszforiláció befolyásolja-e az SH3 domén és a ligand kapcsolatát. Megnéztük azonban, hogy a foszforiláció hogyan befolyásolja a fehérjedomén szerkezetét. Közeli UV tartományban elvégzett CD spektroszkópia során azt találtuk, hogy foszforiláció hatására megváltozik az SH3 domén szerkezete. Úgy tűnik, hogy ezen oldallánccok kémiai környezete egyértelműen érzékeny a foszforilációra, következésképpen a domén harmadlagos fehérjeszerkezete megváltozik a foszforilált tirozinok körül. Mindazonáltal lehetőségként merül fel az is, hogy a 296. és a 336. foszfortirozin kötőhelyként szolgálhat SH2 doménnel rendelkező jelátviteli molekulák számára, és ezáltal a foszforiláció pozitívan szabályozza a Caskin1 további fehérjékhez történő kapcsolódását.

Egér posztszinaptikus denzitás és szinaptoszóma frakciók tandem tömegspektrometriás analízise kimutatta, hogy számos szerin/treonin foszforilációs hely található a Caskin1 prolin-gazdag régiójában [203,204]. Munkacsoportunk is kimutatta, hogy mind a PKA, mind a PKC képes az állványfehérjét foszforilálni [65]. Tirozin foszforilációs hely azonban nem volt ismert egészen egy 2008-as tanulmányig, mely során kvantitatív foszfo proteomikai vizsgálatot végeztek kináz-szelektív dúsítással. A kísérletben



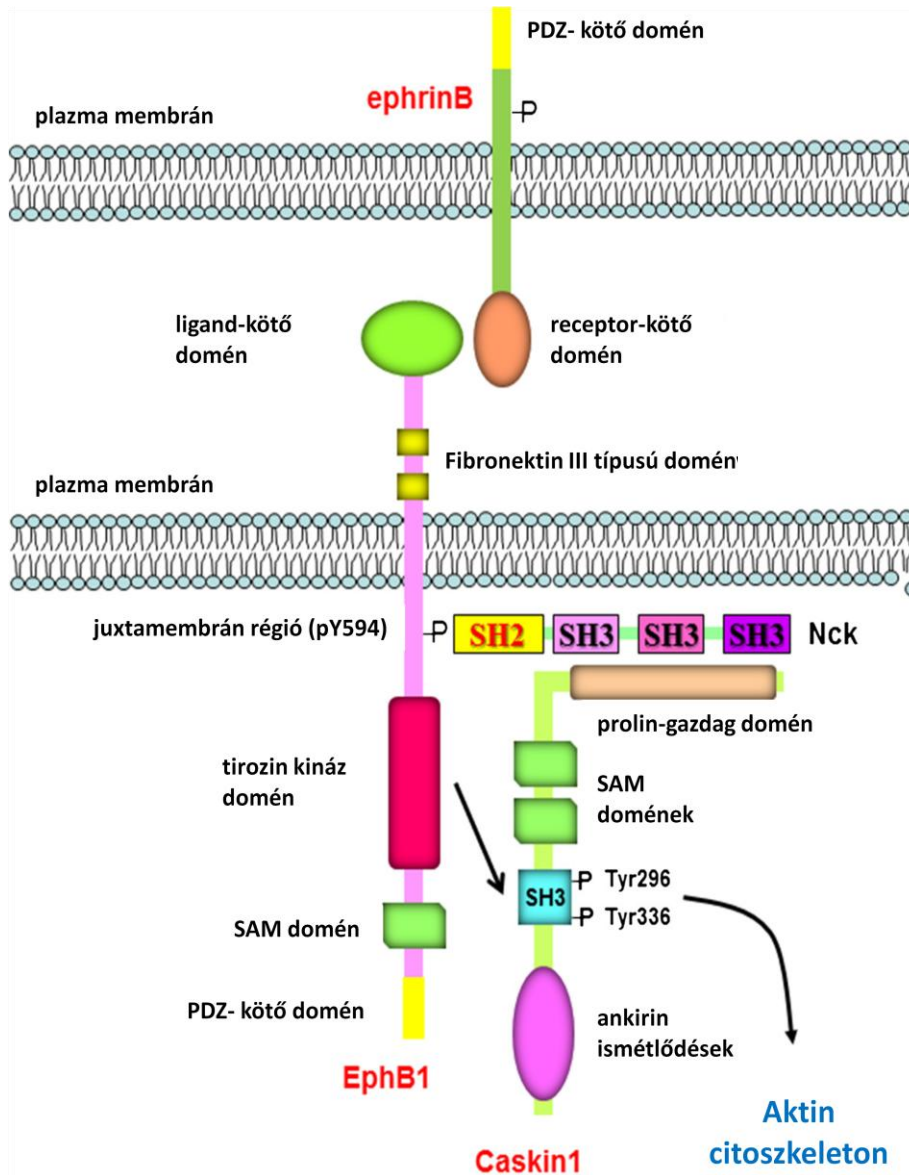
azonosították a Caskin1 336. tirozinját, mint *in vivo* foszforilációs helyet [205]. Ez a független munka alátámasztja az eredményeinket, és mutatja, hogy a 336. tirozin fiziológiásan is foszforilálódik, és valószínűleg szerepet játszik a Caskin1 jelátvitelének szabályozásában.

Korábbi adatok azt mutatják, hogy a sejtfelszíni EphB receptorok részt vesznek többek között a dendritikus tüskék alakjának kifejlődésében [60,206]. Az EphB receptorok szerepe a tüskék kialakulásában összhangban van azokkal a korábbi eredményekkel, melyekben kapcsolatot mutattak ki az EphB receptorok és a dendritek poszt-szinaptikus denzitálásában elhelyezkedő PDZ doméneket tartalmazó fehérjék között [207,208]. Emellett egy másik csoport kimutatta, hogy az EphB receptor tirozin kinázok működnek közre az aktin citoszkeleton dinamikus átrendeződésében, amely olyan, a tüskék alakjában történő változáshoz vezet, mint a filopódia zsugorodása, vagy a stabil, érett, gomba-alakú tüskék kialakulása [61]. Összevetve az irodalmi és a saját adatainkat valószínűsíthetjük, hogy az aktiválódott EphB1 receptorhoz kötődő Nck és Caskin1 közreműködhet a citoszkeleton átrendeződésben, és ezáltal a dendritikus tüskék morfogenezisének szabályozásában. Feltételezzük ezért, hogy ebben a jelátviteli útban megjelenő SH3 doméneken belüli tirozin foszforiláció nem gátló hatást fejt ki, hanem a megjelenő foszfortirozinok kötőhelyként szolgálhatnak más SH2 vagy PTB doménekekkel rendelkező fehérjék [63] számára (7-1.ábra).

A munkacsoportunk által vizsgált másik állványfehérje családba tartozó Tks4-nél a Frank-ter Haar szindrómában Iqbal és munkatársai által azonosított néhány mutáns lokalizációját vizsgáltuk. Sikerült kimutatni, hogy a PX-domén konzervált 43. argininjét triptofánra cserélő pontmutáció (R43W) következtében a mutáns fehérje az aggresszómában halmozódik fel. A másik 48 aminosav hosszúságú csonkolt fehérje nem fejeződik a sejtben, míg a harmadik 341 aminosavból álló lerövidült Tks4 változat a sejmagba került. A folyamatban feltehetőleg az SH3 domének játszanak szerepet. Ennek bizonyításához azonban további kísérletek szükségesek.

Korábban FTTHS betegek primer bőr eredetű fibroblasztjait vizsgálva nem találtak Tks4 fehérjét a sejtekben. A mi kísérleteink megerősítették ezt a korábbi eredményt. Iqbal közleményében a rövidebb trunkált fehérjét okozó mutációban szenvedő betegek esetében normális RNS mennyiséget mutattak ki, amely kizárja a korai STOP kodon hatására bekövetkező RNS lebomlást. Véleményük szerint a csonkolódás egy instabil

fehérjét eredményez. Összességében elmondhatjuk, hogy a Tks4<sup>1-48</sup> expressziójának a hiánya, vagy a Tks4<sup>R43W</sup> és Tks4<sup>1-341</sup> abnormalis intracelluláris elhelyezkedése egy rendellenes, funkcióját ellátni képtelen fehérjét eredményez, amely végül a Frank-ter Haar szindróma kifejlődéséhez vezet.



**7-1. ábra: Az EphB1-Caskin1 jelátviteli út modellje.** Az ephrinB ligand által aktivált EphB1 receptor 594. foszfortirozinjához kötődik az Nck kapcsoló fehérje. Az Nck emellett komplexet képez a Caskin1 állványfehérjével az SH3 doménjein keresztül. A Caskin1 kihorgonyozódása az aktivált EphB1 közelébe az állványfehérje foszforilációját eredményezi az SH3 doménben található 296. és 336. tirozinon. A tirozinon foszforilált Caskin1 valószínűleg az aktin citoszkeleton átrendeződésében, és ezáltal a dendritikus tüskék kialakulásában vesz részt.

A korábban bemutatott eredményekből az alábbi fő következtetéseket vonhatjuk le:

1. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a Caskin1 kötődik az Nck kapcsoló fehérjéhez.
2. Kimutattuk továbbá, hogy a Caskin1 az Nck SH3 doménjeihez kapcsolódik.
3. Sikerült kimutatnunk az EphB1-Nck-Caskin1 komplexet.
4. A Caskin1 és az EphB1 receptor molekuláris közelségét az is bizonyítja, hogy a tirozin kináz foszforilálja *in vivo* az állványfehérjét.
5. A két potenciális foszforilációs hely a Caskin1 SH3 doménjében található 296-os és 336-os tirozin.
6. Foszforiláció hatására a fehérje harmadlagos szerkezete átalakul a foszfortirozinok körül.
7. Kimutattuk továbbá, hogy a Tks4 állványfehérje Tks4<sup>R43W</sup> és Tks<sup>1-341</sup> mutánsai rendellenes sejten belüli elhelyezkedést mutatnak.

## 8. Összefoglalás

Az állványfehérjék és kapcsoló fehérjék fontos szerepet játszanak extracelluláris jelek továbbterjedésének szabályozásában. Multiprotein komplexek kialakításában vesznek részt, melyben különböző fehérjéket hoznak egymás fizikai közelségébe. A jelátviteli folyamat során az állványfehérjék receptor és nem-receptor tirozin kinázok szubsztrátjaiként is szolgálhatnak.

A Caskin1 fehérje tipikus képviselője az állványfehérjéknek. Neuronokban, azon belül a pre- és posztzinaptikusan területeken található. A fehérjét már több jelátviteli útban kimutatták, szerepe azonban nem pontosan ismert.

Munkám során sikerült kimutatni, hogy az EphB1 receptor tirozin kináz megköti a Caskin1 állványfehérjét az Nck kapcsoló fehérjén keresztül. A receptor aktivációjakor az Nck SH2 doménjével az EphB1 egy tirozin oldalláncához kapcsolódik, míg SH3 doménjeivel a Caskin1 prolin-gazdag régiójával lép interakcióba. A receptor, kapcsoló- és állványfehérje komplexének kialakulása során az EphB1 tirozinon foszforilálja a Caskin1-et. A foszforilációs helyek az állványfehérje SH3 doménjében található 296. és 336. tirozin, melyet tömegspektrometriával, foszforilációs mutánsokkal és foszfospecifikus ellenanyagokkal is kimutattunk. Megvizsgáltuk, hogy a foszforiláció milyen változásokat okoz a Caskin1 szerkezetében. Ennek kimutatására CD spektroszkópiát végeztünk. Eredményeink alapján a tirozin foszforiláció megváltoztatja a Caskin1 SH3 doménjének harmadlagos szerkezetét.

Az EphB1 receptorok Nck fehérjén keresztüli jelátvitelle fontos szerepet játszik a dendritikus tüskék alakjának szabályozásában. Valószínűsítjük ezért, hogy az általunk felvázolt jelátviteli út, mely során az aktiválódott EphB1 receptor megköti az Nck és Caskin1 fehérjét közreműködhet az aktin citoszkeleton átrendeződésben, és ezáltal a dendritikus tüskék morfogenezisében.

Az irodalomban számos kapcsoló és állványfehérje ismert, melynek SH3 doménje tirozinon foszforilálódhat. A foszforiláció szerepe kettős. Egyrészt megakadályozhatja két fehérje kapcsolódását, másrészt a megjelenő foszforilációs helyek kötőhelyként szolgálhatnak SH2 és PTB doménnel rendelkező fehérjék számára. A Caskin1 esetében, az aktin citoszkeleton átrendeződésben betöltött feltételezhető szerepe miatt a második lehetőség tűnik valószínűbbnek.

## 9. Summary

Scaffold and adaptor proteins have an important role in the regulation of signal propagation. They are defined as proteins organizing signaling complexes by binding at least two signaling enzymes together and promoting their communication by proximity. In a signal transduction pathways scaffold proteins can be substrates of receptor and non-receptor tyrosine kinases.

Caskin1 is a representative example of scaffold proteins, typically present in neuronal cells, particularly, in the pre- and postsynaptic density. However, the signaling mechanisms by which Caskin1 protein is regulated are largely unknown.

Here, we demonstrated that EphB1 receptor tyrosine kinase can recruit Caskin1 through the adaptor protein Nck. Upon activation of the receptor kinase, Nck SH2 domain binds to one of the tyrosine residues of EphB1, while Nck SH3 domains interact with the proline-rich domain of Caskin1. Complex formation of the receptor kinase with adaptor and scaffold proteins results in the tyrosine phosphorylation of Caskin1 on its SH3 domain. The phosphorylation sites were identified by mass-spectrometry as tyrosines 296 and 336. To reveal the structural consequence of this phosphorylation, CD spectroscopy was performed. This measurement suggests that upon tyrosine phosphorylation the tertiary structure of the Caskin1 SH3 domain changes significantly. Cell surface EphB receptors through Nck are participating in the regulation of dendritic spike morphogenesis. We suggest that EphB receptors recruit the complex of Nck and Caskin1 to the plasma membrane and may also contribute to the actin cytoskeletal organization of dendritic spines.

In the literature many SH3 domains of adaptor and scaffold proteins are known to be tyrosine phosphorylated. Phosphorylation has a dual role. On the one hand it can decrease interaction of two proteins, on the other hand the phosphotyrosine residues may bind scaffold or adaptor proteins containing SH2 or PTB domains. Because of the hypothetical role of Caskin1 in the regulation of actin cytoskeleton we suggest that the second strategy is more likely.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31: 263-273.
2. Hunter T (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* 21: 140-146.
3. Rodrigues GA, Park M (1994) Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* 4: 15-24.
4. King N, Hittinger CT, Carroll SB (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301: 361-363.
5. Lim WA, Pawson T (2010) Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell* 142: 661-667.
6. Manning G, Young SL, Miller WT, Zhai Y (2008) The protist, *Monosiga brevicollis*, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9674-9679.
7. Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, Spencer DF, Majoros WH, Gray MW, Loftus BJ (2005) Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist* 156: 203-214.
8. Robinson DR, Wu YM, Lin SF (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548-5557.
9. Schultheiss KP, Craddock BP, Tong M, Seeliger M, Miller WT (2013) Metazoan-like signaling in a unicellular receptor tyrosine kinase. *BMC Biochem* 14: 4.
10. Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ (2000) RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet* 16: 265-271.
11. Hanks SK, Quinn AM (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200: 38-62.
12. Suga H, Koyanagi M, Hoshiyama D, Ono K, Iwabe N, Kuma K, Miyata T (1999) Extensive gene duplication in the early evolution of animals before the

- parazoan-eumetazoan split demonstrated by G proteins and protein tyrosine kinases from sponge and hydra. *J Mol Evol* 48: 646-653.
13. Muller WE, Kruse M, Blumbach B, Skorokhod A, Muller IM (1999) Gene structure and function of tyrosine kinases in the marine sponge *Geodia cydonium*: autapomorphic characters in Metazoa. *Gene* 238: 179-193.
  14. Miller MA, Malik IA, Shenk MA, Steele RE (2000) The Src/Csk regulatory circuit arose early in metazoan evolution. *Oncogene* 19: 3925-3930.
  15. Rikke BA, Murakami S, Johnson TE (2000) Paralogy and orthology of tyrosine kinases that can extend the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Evol* 17: 671-683.
  16. Lucini C, Castaldo L, Lamanna C, Maruccio L, Vega JA, Gargiulo G (1999) Neuronal and non-neuronal Trk neurotrophin receptor-like proteins in *Eisenia foetida* (Annelida Oligochaeta). *Neurosci Lett* 261: 163-166.
  17. Sakuma M, Onodera H, Suyemitsu T, Yamasu K (1997) The protein tyrosine kinases of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Zoolog Sci* 14: 941-946.
  18. Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC (2006) G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* 17: 48-54.
  19. Neet K, Hunter T (1996) Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells* 1: 147-169.
  20. Veracini L, Franco M, Boureux A, Simon V, Roche S, Benistant C (2005) Two functionally distinct pools of Src kinases for PDGF receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 33: 1313-1315.
  21. Lemmon MA, Schlessinger J (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117-1134.
  22. Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.
  23. Hsu CY, Mohammadi M, Nathan M, Honegger A, Ullrich A, Schlessinger J, Hurwitz DR (1990) Generation of recombinant cytoplasmic domain of epidermal growth factor receptor with intrinsic protein tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ* 1: 191-200.

24. Clayton AH, Walker F, Orchard SG, Henderson C, Fuchs D, Rothacker J, Nice EC, Burgess AW (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280: 30392-30399.
25. Gadella TW, Jr., Jovin TM (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol* 129: 1543-1558.
26. Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, Kolev MV, Rajashankar KR, Himanen JP, Nikolov DB (2006) Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat Struct Mol Biol* 13: 524-532.
27. Himanen JP, Nikolov DB (2003) Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 26: 46-51.
28. Liu H, Chen X, Focia PJ, He X (2007) Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 26: 891-901.
29. Leppanen VM, Prota AE, Jeltsch M, Anisimov A, Kalkkinen N, Strandin T, Lankinen H, Goldman A, Ballmer-Hofer K, Alitalo K (2010) Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2425-2430.
30. Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 401: 184-188.
31. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E (2006) Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J* 25: 80-87.
32. Nolen B, Taylor S, Ghosh G (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell* 15: 661-675.
33. Till JH, Becerra M, Watty A, Lu Y, Ma Y, Neubert TA, Burden SJ, Hubbard SR (2002) Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. *Structure* 10: 1187-1196.



34. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13: 169-178.
35. Mol CD, Dougan DR, Schneider TR, Skene RJ, Kraus ML, Scheibe DN, Snell GP, Zou H, Sang BC, Wilson KP (2004) Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* 279: 31655-31663.
36. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, Tong J, Pawson T, Sicheri F (2001) Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 106: 745-757.
37. Hubbard SR (2004) Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 464-471.
38. Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD (2004) Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer* 4: 718-727.
39. Cobb MH, Sang BC, Gonzalez R, Goldsmith E, Ellis L (1989) Autophosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction. *J Biol Chem* 264: 18701-18706.
40. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F (1987) A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science* 238: 1717-1720.
41. Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, Boyle WJ, Parker VP, Lindberg RA, Lu HS, Colombero AM, Elliott RL, Guthrie BA, et al. (1994) B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 368: 558-560.
42. No authors listed (1997) Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90: 403-404.
43. Carvalho RF, Beutler M, Marler KJ, Knoll B, Becker-Barroso E, Heintzmann R, Ng T, Drescher U (2006) Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci* 9: 322-330.
44. Antion MD, Christie LA, Bond AM, Dalva MB, Contractor A (2010) Ephrin-B3 regulates glutamate receptor signaling at hippocampal synapses. *Mol Cell Neurosci* 45: 378-388.
45. Murai KK, Pasquale EB (2003) 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116: 2823-2832.

46. Pasquale EB (2004) Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat Neurosci* 7: 417-418.
47. Drescher U (2002) Eph family functions from an evolutionary perspective. *Curr Opin Genet Dev* 12: 397-402.
48. Mellott DO, Burke RD (2008) The molecular phylogeny of eph receptors and ephrin ligands. *BMC Cell Biol* 9: 27.
49. Pasquale EB (2005) Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 462-475.
50. Berridge MJ (2012) *Cell Signalling Biology*.
51. Scicolone G, Ortalli AL, Carri NG (2009) Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation. *Brain Res Bull* 79: 227-247.
52. Rebsam A, Petros TJ, Mason CA (2009) Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *J Neurosci* 29: 14855-14863.
53. Nomura T, Goritz C, Catchpole T, Henkemeyer M, Frisen J (2010) EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells. *Cell Stem Cell* 7: 730-743.
54. Khodosevich K, Watanabe Y, Monyer H (2011) EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J Cell Sci* 124: 1268-1279.
55. Lackmann M, Boyd AW (2008) Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity? *Sci Signal* 1: re2.
56. Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, Greenberg ME (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103: 945-956.
57. Takasu MA, Dalva MB, Zigmond RE, Greenberg ME (2002) Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 295: 491-495.
58. Garner CC, Waites CL, Ziv NE (2006) Synapse development: still looking for the forest, still lost in the trees. *Cell Tissue Res* 326: 249-262.
59. Ethell IM, Pasquale EB (2005) Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75: 161-205.

60. Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163: 1313-1326.
61. Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37: 263-274.
62. Shaw AS, Filbert EL (2009) Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol* 9: 47-56.
63. Buday L, Tompa P (2010) Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J* 277: 4348-4355.
64. Good M, Tang G, Singleton J, Remenyi A, Lim WA (2009) The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell* 136: 1085-1097.
65. Balazs A, Csizmok V, Buday L, Rakacs M, Kiss R, Bokor M, Udupa R, Tompa K, Tompa P (2009) High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactive protein1. *FEBS J* 276: 3744-3756.
66. Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7058-7061.
67. Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001) Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron* 29: 131-143.
68. Woods DF, Bryant PJ (1991) The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66: 451-464.
69. Funke L, Dakoji S, Brecht DS (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74: 219-245.
70. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-1740.

71. Joseph BK, Thakali KM, Pathan AR, Kang E, Rusch NJ, Rhee SW (2011) Postsynaptic density-95 scaffolding of Shaker-type K(+) channels in smooth muscle cells regulates the diameter of cerebral arteries. *J Physiol* 589: 5143-5152.
72. Ogawa Y, Osés-Prieto J, Kim MY, Horresh I, Peles E, Burlingame AL, Trimmer JS, Meijer D, Rasband MN (2010) ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. *J Neurosci* 30: 1038-1048.
73. Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir RL (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20: 683-691.
74. Lasserre R, Charrin S, Cuche C, Danckaert A, Thoulouze MI, de Chaumont F, Duong T, Perrault N, Varin-Blank N, Olivo-Marin JC, Etienne-Manneville S, Arpin M, Di Bartolo V, Alcover A (2010) Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J* 29: 2301-2314.
75. Tabuchi K, Biederer T, Butz S, Sudhof TC (2002) CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with caskin 1, a novel CASK-binding protein. *J Neurosci* 22: 4264-4273.
76. Hsueh YP (2006) The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem* 13: 1915-1927.
77. Fallon L, Moreau F, Croft BG, Labib N, Gu WJ, Fon EA (2002) Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem* 277: 486-491.
78. Hata Y, Butz S, Sudhof TC (1996) CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *J Neurosci* 16: 2488-2494.
79. Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 142: 129-138.
80. Hsueh YP, Yang FC, Kharazia V, Naisbitt S, Cohen AR, Weinberg RJ, Sheng M (1998) Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate

- proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol* 142: 139-151.
81. Martinez-Estrada OM, Villa A, Breviario F, Orsenigo F, Dejana E, Bazzoni G (2001) Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial caco-2 cells. *J Biol Chem* 276: 9291-9296.
  82. Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. *J Biol Chem* 274: 24453-24456.
  83. Biederer T, Sudhof TC (2001) CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neuroligins. *J Biol Chem* 276: 47869-47876.
  84. Yap CC, Liang F, Yamazaki Y, Muto Y, Kishida H, Hayashida T, Hashikawa T, Yano R (2003) CIP98, a novel PDZ domain protein, is expressed in the central nervous system and interacts with calmodulin-dependent serine kinase. *J Neurochem* 85: 123-134.
  85. Hsueh YP, Wang TF, Yang FC, Sheng M (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature* 404: 298-302.
  86. Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA (2004) A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem* 279: 19051-19063.
  87. Weng YL, Liu N, DiAntonio A, Broihier HT (2011) The cytoplasmic adaptor protein Caskin mediates Lar signal transduction during *Drosophila* motor axon guidance. *J Neurosci* 31: 4421-4433.
  88. Fawcett JP, Georgiou J, Ruston J, Bladt F, Sherman A, Warner N, Saab BJ, Scott R, Roder JC, Pawson T (2007) Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20973-20978.
  89. Suzuki T, Tian QB, Kuromitsu J, Kawai T, Endo S (2007) Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res* 57: 61-85.

90. Peng J, Kim MJ, Cheng D, Duong DM, Gygi SP, Sheng M (2004) Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279: 21003-21011.
91. Middleton FA, Carrierfenster K, Mooney SM, Youngentob SL (2009) Gestational ethanol exposure alters the behavioral response to ethanol odor and the expression of neurotransmission genes in the olfactory bulb of adolescent rats. *Brain Res* 1252: 105-116.
92. Ala U, Piro RM, Grassi E, Damasco C, Silengo L, Oti M, Provero P, Di Cunto F (2008) Prediction of human disease genes by human-mouse conserved coexpression analysis. *PLoS Comput Biol* 4: e1000043.
93. Sheng M, Kim E (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 1851-1856.
94. Gundelfinger ED, Boeckers TM, Baron MK, Bowie JU (2006) A role for zinc in postsynaptic density asSAMBly and plasticity? *Trends Biochem Sci* 31: 366-373.
95. Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Gundelfinger ED, Bowie JU (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science* 311: 531-535.
96. Stafford RL, Hinde E, Knight MJ, Pennella MA, Ear J, Digman MA, Gratton E, Bowie JU (2011) Tandem SAM domain structure of human Caskin1: a presynaptic, self-assembling scaffold for CASK. *Structure* 19: 1826-1836.
97. 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.
98. 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.
99. 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.

100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Fekete A, G BG, Pesti S, Peterfi Z, Geiszt M, Buday L (2013) EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5. *J Mol Signal* 8: 8.
107. 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.
108. 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.

109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. 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.
114. Buday L (1999) Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422: 187-204.
115. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al. (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767-778.
116. Knudsen BS, Zheng J, Feller SM, Mayer JP, Burrell SK, Cowburn D, Hanafusa H (1995) Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the Crk proteins. *EMBO J* 14: 2191-2198.
117. Zhang TT, Li H, Cheung SM, Costantini JL, Hou S, Al-Alwan M, Marshall AJ (2009) Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. *Immunol Rev* 232: 255-272.
118. Li W, Fan J, Woodley DT (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* 20: 6403-6417.
119. Buday L, Wunderlich L, Tamas P (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14: 723-731.



120. Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, Strasser GA, Nash P, Tafuri A, Gertler FB, Pawson T (2003) The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 23: 4586-4597.
121. Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G, Stewart D, Way M (2000) A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol* 2: 441-448.
122. Scaplehorn N, Holmstrom A, Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Way M (2002) Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* 12: 740-745.
123. Campellone KG, Rankin S, Pawson T, Kirschner MW, Tipper DJ, Leong JM (2004) Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J Cell Biol* 164: 407-416.
124. Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, Pawson T, Finlay BB (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3: 856-859.
125. Lettau M, Pieper J, Janssen O (2009) Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal* 7: 1.
126. Oser M, Mader CC, Gil-Henn H, Magalhaes M, Bravo-Cordero JJ, Koleske AJ, Condeelis J (2010) Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J Cell Sci* 123: 3662-3673.
127. Lapetina S, Mader CC, Machida K, Mayer BJ, Koleske AJ (2009) Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion. *J Cell Biol* 185: 503-519.
128. Antoku S, Saksela K, Rivera GM, Mayer BJ (2008) A crucial role in cell spreading for the interaction of Abl PxxP motifs with Crk and Nck adaptors. *J Cell Sci* 121: 3071-3082.
129. Rivera GM, Antoku S, Gelkop S, Shin NY, Hanks SK, Pawson T, Mayer BJ (2006) Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9536-9541.

130. Guan S, Fan J, Han A, Chen M, Woodley DT, Li W (2009) Non-compensating roles between Nckalpha and Nckbeta in PDGF-BB signaling to promote human dermal fibroblast migration. *J Invest Dermatol* 129: 1909-1920.
131. Ruusala A, Pawson T, Heldin CH, Aspenstrom P (2008) Nck adapters are involved in the formation of dorsal ruffles, cell migration, and Rho signaling downstream of the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Biol Chem* 283: 30034-30044.
132. Abella JV, Vaillancourt R, Frigault MM, Ponzio MG, Zuo D, Sangwan V, Larose L, Park M (2010) The Gab1 scaffold regulates RTK-dependent dorsal ruffle formation through the adaptor Nck. *J Cell Sci* 123: 1306-1319.
133. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, Huang H, Larose L, Li SS, Takano T, Quaggin SE, Pawson T (2006) Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440: 818-823.
134. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB (2006) Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116: 1346-1359.
135. Chen M, She H, Davis EM, Spicer CM, Kim L, Ren R, Le Beau MM, Li W (1998) Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J Biol Chem* 273: 25171-25178.
136. Frese S, Schubert WD, Findeis AC, Marquardt T, Roske YS, Stradal TE, Heinz DW (2006) The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 Src homology 2 domains. *J Biol Chem* 281: 18236-18245.
137. Guan S, Chen M, Woodley D, Li W (2007) Nckbeta adapter controls neuritogenesis by maintaining the cellular paxillin level. *Mol Cell Biol* 27: 6001-6011.
138. Hu T, Shi G, Larose L, Rivera GM, Mayer BJ, Zhou R (2009) Regulation of process retraction and cell migration by EphA3 is mediated by the adaptor protein Nck1. *Biochemistry* 48: 6369-6378.
139. Holland SJ, Gale NW, Gish GD, Roth RA, Songyang Z, Cantley LC, Henkemeyer M, Yancopoulos GD, Pawson T (1997) Juxtamembrane tyrosine

- residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells. *EMBO J* 16: 3877-3888.
140. Stein E, Huynh-Do U, Lane AA, Cerretti DP, Daniel TO (1998) Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase. *J Biol Chem* 273: 1303-1308.
  141. Cowan CA, Henkemeyer M (2001) The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413: 174-179.
  142. Fan X, Labrador JP, Hing H, Bashaw GJ (2003) Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40: 113-127.
  143. Li X, Meriane M, Triki I, Shekarabi M, Kennedy TE, Larose L, Lamarche-Vane N (2002) The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. *J Biol Chem* 277: 37788-37797.
  144. Pramatarova A, Ochalski PG, Chen K, Gropman A, Myers S, Min KT, Howell BW (2003) Nck beta interacts with tyrosine-phosphorylated disabled 1 and redistributes in Reelin-stimulated neurons. *Mol Cell Biol* 23: 7210-7221.
  145. Morimoto C, Tachibana K (1996) Beta 1 integrin-mediated signaling in human T cells. *Hum Cell* 9: 163-168.
  146. Hing H, Xiao J, Harden N, Lim L, Zipursky SL (1999) Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell* 97: 853-863.
  147. Garrity PA, Rao Y, Salecker I, McGlade J, Pawson T, Zipursky SL (1996) *Drosophila* photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein. *Cell* 85: 639-650.
  148. Vindis C, Teli T, Cerretti DP, Turner CE, Huynh-Do U (2004) EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *J Biol Chem* 279: 27965-27970.
  149. Becker E, Huynh-Do U, Holland S, Pawson T, Daniel TO, Skolnik EY (2000) Nck-interacting Ste20 kinase couples Eph receptors to c-Jun N-terminal kinase and integrin activation. *Mol Cell Biol* 20: 1537-1545.

150. Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H (2009) EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 20: 1949-1959.
151. Wunderlich L, Goher A, Farago A, Downward J, Buday L (1999) Requirement of multiple SH3 domains of Nck for ligand binding. *Cell Signal* 11: 253-262.
152. 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.
153. Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332: 272-275.
154. Lehto VP, Wasenius VM, Salven P, Saraste M (1988) Transforming and membrane proteins. *Nature* 334: 388.
155. Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114: 1253-1263.
156. 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.
157. Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76: 933-945.
158. Kaneko T, Li L, Li SS (2008) The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci* 13: 4938-4952.
159. Erpel T, Superti-Furga G, Courtneidge SA (1995) Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J* 14: 963-975.
160. Xu W, Harrison SC, Eck MJ (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595-602.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
  164. Saksela K, Permi P (2012) SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett* 586: 2609-2614.
  165. 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.
  166. Lewitzky M, Harkiolaki M, Domart MC, Jones EY, Feller SM (2004) Mona/Gads SH3C binding to hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) combines an atypical SH3 binding motif, R/KXXXK, with a classical PXXP motif embedded in a polyproline type II (PPII) helix. *J Biol Chem* 279: 28724-28732.
  167. Berry DM, Nash P, Liu SK, Pawson T, McGlade CJ (2002) A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Curr Biol* 12: 1336-1341.
  168. 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.
  169. 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.
  170. 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.
  171. 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.

172. 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.
173. Groemping Y, Rittinger K (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386: 401-416.
174. Takeya R, Sumimoto H (2003) Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 16: 271-277.
175. Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113: 343-355.
176. 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.
177. 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.
178. Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, Scharenberg AM, Kinet JP, Witte ON (1996) Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4: 515-525.
179. Meyn MA, 3rd, Wilson MB, Abdi FA, Fahey N, Schiavone AP, Wu J, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE (2006) Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J Biol Chem* 281: 30907-30916.
180. 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.
181. Tatarova Z, Brabek J, Rosel D, Novotny M (2012) SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution. *PLoS One* 7: e36310.
182. 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.
183. 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.
184. Sriram G, Reichman C, Tunceroglu A, Kaushal N, Saleh T, Machida K, Mayer B, Ge Q, Li J, Hornbeck P, Kalodimos CG, Birge RB (2011) Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation. *Oncogene* 30: 4645-4655.
185. Sriram G, Birge RB (2012) Commentary: The carboxyl-terminal Crk SH3 domain: Regulatory strategies and new perspectives. *FEBS Lett* 586: 2615-2618.
186. Chen S, O'Reilly LP, Smithgall TE, Engen JR (2008) Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core. *J Mol Biol* 383: 414-423.
187. Morrogh LM, Hinshelwood S, Costello P, Cory GO, Kinnon C (1999) The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase displays altered ligand binding properties when auto-phosphorylated in vitro. *Eur J Immunol* 29: 2269-2279.
188. Wilcox HM, Berg LJ (2003) Itk phosphorylation sites are required for functional activity in primary T cells. *J Biol Chem* 278: 37112-37121.
189. Wu Y, Spencer SD, Lasky LA (1998) Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein. *J Biol Chem* 273: 5765-5770.
190. Wu X, Gan B, Yoo Y, Guan JL (2005) FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev Cell* 9: 185-196.
191. Sylvester M, Kliche S, Lange S, Geithner S, Klemm C, Schlosser A, Grossmann A, Stelzl U, Schraven B, Krause E, Freund C (2010) Adhesion and degranulation promoting adapter protein (ADAP) is a central hub for phosphotyrosine-mediated interactions in T cells. *PLoS One* 5: e11708.

192. Fernow I, Tomasovic A, Siehoff-Icking A, Tikkanen R (2009) Cbl-associated protein is tyrosine phosphorylated by c-Abl and c-Src kinases. *BMC Cell Biol* 10: 80.
193. Broome MA, Hunter T (1996) Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *J Biol Chem* 271: 16798-16806.
194. Kashiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyoshima S (2002) Evidence of autophosphorylation in Txk: Y91 is an autophosphorylation site. *Biol Pharm Bull* 25: 718-721.
195. Lazer G, Pe'er L, Farago M, Machida K, Mayer BJ, Katzav S (2010) Tyrosine residues at the carboxyl terminus of Vav1 play an important role in regulation of its biological activity. *J Biol Chem* 285: 23075-23085.
196. Han DC, Shen TL, Miao H, Wang B, Guan JL (2002) EphB1 associates with Grb7 and regulates cell migration. *J Biol Chem* 277: 45655-45661.
197. Buday L, Egan SE, Rodriguez Viciano P, Cantrell DA, Downward J (1994) A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem* 269: 9019-9023.
198. Buday L, Warne PH, Downward J (1995) Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos. *Oncogene* 11: 1327-1331.
199. Nishimura R, Li W, Kashishian A, Mondino A, Zhou M, Cooper J, Schlessinger J (1993) Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 13: 6889-6896.
200. Carpenter G (2000) The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 22: 697-707.
201. Mohamed AM, Boudreau JR, Yu FP, Liu J, Chin-Sang ID (2012) The *Caenorhabditis elegans* Eph receptor activates NCK and N-WASP, and inhibits Ena/VASP to regulate growth cone dynamics during axon guidance. *PLoS Genet* 8: e1002513.
202. Kay BK (2012) SH3 domains come of age. *FEBS Lett* 586: 2606-2608.



203. Trinidad JC, Specht CG, Thalhammer A, Schoepfer R, Burlingame AL (2006) Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations. *Mol Cell Proteomics* 5: 914-922.
204. Munton RP, Tweedie-Cullen R, Livingstone-Zatchej M, Weinandy F, Waidelich M, Longo D, Gehrig P, Potthast F, Rutishauser D, Gerrits B, Panse C, Schlapbach R, Mansuy IM (2007) Qualitative and quantitative analyses of protein phosphorylation in naive and stimulated mouse synaptosomal preparations. *Mol Cell Proteomics* 6: 283-293.
205. Daub H, Olsen JV, Bairlein M, Gnad F, Oppermann FS, Korner R, Greff Z, Keri G, Stemmann O, Mann M (2008) Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell* 31: 438-448.
206. Ethell IM, Irie F, Kalo MS, Couchman JR, Pasquale EB, Yamaguchi Y (2001) EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 31: 1001-1013.
207. Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Haganir RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21: 1453-1463.
208. Buchert M, Schneider S, Meskenaite V, Adams MT, Canaani E, Baechli T, Moelling K, Hovens CM (1999) The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *J Cell Biol* 144: 361-371.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### *11.1 Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények*

- Pesti S, Balázs A, Udupa R, Szabó B, Fekete A, Bögel 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(1):36.1-13.
- Ádám C, Fekete A, Bögel G, Németh Z, Tőkési N, Ovádi J, Liliom K, Pesti S, Geiszt M, Buday L. (2015) Accumulation of the PX domain mutant Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 in aggresomes. *Cell Commun Signal.* 13:33 doi: 10.1186/s12964-015-0108-8

### *11.2 Az értekezés témájától független közlemény*

- Fekete A, Bögel G, Pesti S, Péterfi Z, Geiszt M, Buday L. (2013) EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5. *J Mol Signal.* 8(1):8.1-8.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik nélkül ez az értekezés nem születhetett volna meg.

Először is köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Buday László professzornak, aki TDK-s koromtól kezdve irányította a pályámat. Bevezetett a tudományos módszerek és gondolkodás világába, és mindenben támogatott a dolgozat elkészüléséig vezető hosszú úton.

Köszönöm a labor összes dolgozójának a segítségét. Külön szeretném megemlíteni Dr. Balázs Annamáriát és Roopesh Udupát, akik szintén a Caskin fehérjével foglalkoztak. Továbbá köszönöm Dr. Bögel Gábornak és Haidarné Solti Zitának, hogy bármilyen felmerülő probléma esetén nyugodtan fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Szabó Beátának és Fekete Annának, az MTA TTK Enzimológiai Intézetből a rengeteg segítséget a CD spektroszkópiában és az SH3 domének tisztításában és foszforilációjában.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Mandl Józsefnek és Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak, intézetünk korábbi és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették munkámat az Intézetben. Továbbá köszönet illeti az Intézet valamennyi dolgozóját segítségükért.

Külön köszönöm Prof. Dr. Mandl Józsefnek, a Patobiokémia PhD program vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy a Doktori Iskola hallgatója legyek.

Végezetül hálával tartozom feleségemnek, édesanyámnak, az egész családomnak, hogy biztos háttérrel nyújtottak számomra, és támogattak a legnehezebb pillanatokban is. Utolsóként köszönöm édesapámnak, hogy megtanított a kitartásra. Ezt a dolgozatot az ő emlékének ajánlom.