

ZÁRÓJELENTÉS

A Tks állványfehérjék szerepének vizsgálata az EGF jelpályában (OTKA K83867)

Pályázatunk munkatervében azt írtuk, hogy tanulmányozzuk a Tks4 fehérjecsalád szerepét az EGF jelpályájában. Ezen belül vállaltuk, hogy vizsgáljuk az EGFR/Tks4 interakció természetét, illetve azonosítjuk a Tks4-t foszforiláló kinázt. Terveztük továbbá, hogy siRNS technikával csendesítjük a fehérje génjét, hogy funkcionális vizsgálatokat is tudjunk végezni, illetve további interakciós partnereket is kívántuk azonosítani. Végezetül két további vállalkásunk is volt: a Tks4 génhiányos egér létrehozása, illetve a Tks5 rokon-fehérje tanulmányozása az EGF jelátvitelben. Örömmel jelenthetjük, hogy terveink döntő többségét sikeresen megvalósítottuk. A Tks4 génhiányos egér létrehozása ugyanakkor olyan új lehetőségeket teremtett, melynek előzetes eredményiről a zárójelentésben be kívánunk számolni, azonban az ezekkel kapcsolatos publikációk csak a későbbiekben fognak megjelenni.

A Tks4 fehérje elhelyezkedése az EGF jelpályában

HeLa sejteket vizsgálva kimutattuk, hogy a Tks4 fehérje EGF kezelés hatására transzlokálódik a sejtmembránba és kolokalizációt mutat mind az actinnal, mind a cortactinnak nevezett fehérjével. Megállapítottuk továbbá, hogy siRNS-sel csendesítette sejtekben, Tks4 hiányában, jelentősen elmarad a sejtekben a membrán fodrozódása, illetve lamellipodiumok kialakulása, illetve sérül a sejtek kiterülése (spreading) is. Bizonyítottuk továbbá, hogy a Tks4 kolokalizálódik a cortactinnal, illetve az Src tirozin kinázzal a sejtek podoszómáiban (Lányi A, et al, PLoS ONE 2011, 6, e23653).

Tovább vizsgálva a Tks4 szerepét az EGF jelpályába megállapítottuk, hogy EGF kezelésre az EGF receptor asszociálódik a Tks4-gyel, illetve megtörténik a Tks4 tirozin oldalláncokon történő foszforilációja. Egy kísérletsorozattal bizonyítottuk, hogy a Tks4 nem közvetlenül asszociálódik az EGF receptorral, hanem közvetve, az Src tirozin kinázon keresztül, mely foszforilálja is az állvány fehérjét. Kimutattuk továbbá, hogy a Tks4 N-terminális részén található PX domén (PH doménre hasonlít) fontos szerepet játszik a fehérje működésében, ugyanis konzervatív aminosavak mutációja (R71-94L) a lipid-kötés elvesztésével jár, ami a PI 3-kináz szerepére utalhat. Ráadásul a mutáns Tks4 fehérje tirozin oldalláncokon történő foszforilációja is sérül. A foszforiláció szintén gátlódik, ha a PI 3-kináz jól ismert gátlószerével, a LY294002-vel előinkubáljuk a sejteket. Kimutattuk továbbá, hogy ha HeLa sejtekben siRNS technikával csendesítjük a Tks4 fehérjét, akkor egy módosított Boyden-kamrában vizsgálva a sejtek mozgását, mind EGF, mind szérum hatására a sejtek mozgása drámaian csökken. Ez arra utal, hogy a növekedési faktorok jelpályáiban a Tks4-nek kulcsszerepe lehet a sejtmozgás szabályozásában (Bogel G, et al, J Biol Chem, 2012, 287(37):31321-9).

Tks4 fehérje kötőpartnereinek azonosítása

Ahogy az OTKA pályázat munkatervében ígértük, felvettük a kapcsolatot a svájci Dualsystem Biotech céggel, aki azt vállalja szabadalmaztatott, ún. CaptiVate szolgáltatásában, hogy tetszőleges fehérjét tandem-affinitás címkével (TAP) ellátva expresszálja emlős sejtekben az endogén fehérjével összemérhető mennyiségben, majd kétszeres affinitástisztítás után tömegspektrometriával azonosítja a csalifehérjével asszociálódott fehérjéket. A Tks4 fehérjére mi is elvégeztettük a szolgáltatást, s közel harminc, eddig nem azonosított fehérjét találtunk, mely kapcsolódik a Tks4-hez. Érdekes módon ezen fehérjék között számos foszfatáz, illetve a sejtciklus szabályozásban résztvevő enzim is szerepel (lásd. alább). Vizsgálni kezdtük azon fehérjék kapcsolódását a Tks4-hez, melyek ellen ellenanyagot lehetett vásárolni. Eddig sikerült kimutatnunk, hogy a PP2A foszfatáz targettáló elegysége koimmunoprecipitálódik a Tks4/HOFI-fehérjével. Munkahipotézisünk szerint az állványfehérje számos szerinen és treoninon képes foszforilálódni (a tirozinok mellett), s ezen szabályozó foszforilációkban lehet kulcsszerepe a PP2A foszfatáznak. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy az állványfehérje komplexének van-e mérhető foszfatáz aktivitása. A sejtciklus szabályozásban szerepet játszó fehérjék közül sikerült a Cdc5L (Cell division cycle 5-like protein) interakcióját kimutatni a Tks4 fehérjével. A Cdc5L fehérje a G2/M restrikciós pont szabályozásában játszik kulcsszerepet. A sejtciklus szabályozásban résztvevő fehérjék, illetve a Tks4 interakcióját azért tartjuk nagyon érdekesnek, mert korábban kimutatták, hogy egerekben a zsírszövet differenciációja Tks4/HOFI nélkül nem lehetséges (a későbbiekben visszatérek erre a problémára, BL). A fent említett kísérletek jelenleg intenzíven folynak.

Protein Names	Protein Descriptions	Peptides	Sequence Coverage [%]	Mol. Weight [kDa]
SPD2B	SH3 and PX domain-containing protein 2B	86	80,1	101,58
PGRC2	Membrane-associated progesterone receptor component 2	2	10,3	23,818
CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	1	1,1	92,25
RM45	39S ribosomal protein L45, mitochondrial	1	6,5	35,351
MRE11	Isoform 2 of Double-strand break repair protein MRE11A	1	3,1	80,592
UTS2	Urotensin-2	1	5,8	16,029
MMP15	Matrix metalloproteinase-15	2	4,9	75,806
CND2	Condensin complex subunit 2	1	2,2	82,562
RMS0	39S ribosomal protein L50, mitochondrial	1	7	18,325
FA45A	Protein FAM45A	1	5,6	40,513
APC7	Isoform 2 of Anaphase-promoting complex subunit 7	1	2,5	66,855
GRB2	Isoform GRB3-3 of Growth factor receptor-bound protein 2	13	56,7	25,206
PERQ2	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	2	1,2	152,53
E2AK4	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4	1	0,5	186,91
CCD84	Coiled-coil domain-containing protein 84	1	3,3	37,974
UFL1	Isoform 2 of E3 UFM1-protein ligase 1	1	2,9	89,594
SKP1	Isoform 2 of S-phase kinase-associated protein 1	1	11,7	18,658
TTC24	Tetratricopeptide repeat protein 24	1	1,7	63,396
TADBP	TAR DNA-binding protein 43	1	2,9	44,991
SPTB2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, brain 1	37	18	274,61
DDX20	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	2	4,2	92,239
CPNS1	Calpain small subunit 1	1	3,4	28,315
RFA1	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	1	3,1	68,137
PP2AA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	11	49,8	35,594
RCC2	Protein RCC2	1	3,3	56,084
TRPC5	Short transient receptor potential channel 5	1	0,8	111,41
2ABA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	10	27,5	51,691
TAF2	Transcription initiation factor TFIID subunit 2	1	0,9	136,97
EIF3H	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	5	18,5	39,93
RFA2	Replication protein A 32 kDa subunit O	1	6,4	38,809

1. ábra: Tks4 azonosított interakciós partner fehérjéi

Tks5/FISH az EGF jelpályában

A Tks5/FISH fehérjét a 90-es évek végén írták le először. Irodalmi adatok szerint a sejtek mozgásában játszik szerepet, ugyanis a sejtekbe kialakuló podoszómákat/invadopódiumok működését szabályozza. Ezek a sejtorganellumok szükségesek ahhoz, hogy a sejtek a háromdimenziós extracelluláris térben mozogni tudjanak. Tekintve, hogy a Tks5/FISH fehérje nagyon hasonlít a Tks4 fehérjére, vizsgálni kezdtük, hogy a Tks5 is rész vesz-e az EGF jelpályában. Sikerült kimutattuk, hogy EGF hatására a fehérje tirozin oldalláncokon foszforilálódik, a foszforilációért felelős enzim az Src tirozin kináz. Bizonyítottuk továbbá, hogy a fehérje EGF hatására a sejtmembránhoz transzlokálódik. Ennek a kötődésnek az a mechanizmusa, hogy az EGF hatására aktiválódó PI 3-kináz olyan lipid-termékeket hoz létre, melyek megkötik a Tks5 PX doménjét. Akár a PI 3-kináz gátlása, akár a PX domén pontmutációja, mely a lipid-kötés eliminálja, gátolja az EGF-függő Tks5 transzlokációt (Anna Fekete, et al, J Molecular Signaling, 2013 Aug 7;8(1):8).

A Frank-ter Haar szindróma és a Tks4 mutációja

2010 tavaszán felfedezték, hogy a Tks4 génjének kiesése egy ritka, de drámai megjelenésű emberi génhiányos állapotot, a Frank-Ter Haar szindrómát okozza. Ezek a betegek alacsony növésűek, csont- és koponya rendellenességekkel rendelkeznek, látás- és halláskárosodást mutatnak, nincsen zsírszövetük, stb. Érdekes módon, a Tks4 gén teljes vagy részleges hiánya mellett egyetlen pontmutációt találtak, mely a génhiánnyal azonos tüneteket mutat: a PX doménben a R43W aminosavcserét. Sikerült kimutatnunk, hogy a PX domén mutáns fehérje szerkezete instabillá válik és sejten belül az ún. agresszómákban akkumulálódik. Vélhetően ez az oka, hogy a pontmutáns fehérje ugyanolyan klinikai képet mutat, mint ha a fehérje nem is lenne jelen a sejtekben. Eredményeinket beküldtük a Cell Communication and Signalling folyóiratnak, ahol jelenleg revízió alatt van (Csaba Ádám, Gábor Bögel, Anna Fekete, Zsuzsanna Németh, Natália Tőkési, Judit Ovádi, Károly Liliom, Szabolcs Pesti, Miklós Geiszt and László Buday, Accumulation of PX domain mutant Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 in aggresomes, Cell Communication and Signalling, revízió alatt).

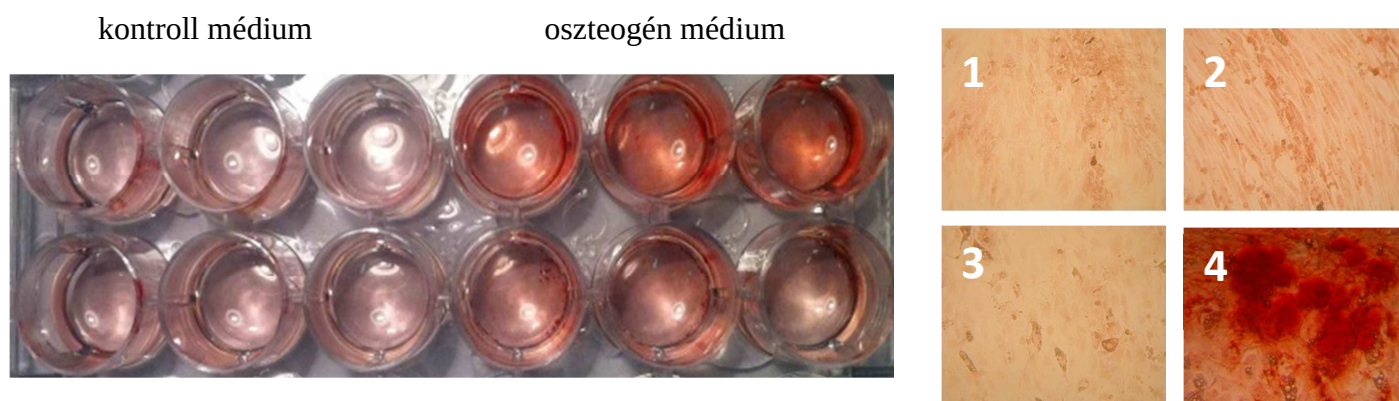
Tks4 génhiányos egér előállítása és vizsgálata

A Tks4 génhiányos egér elkészítésével az amerikai TaconicArtemisPharma céget bíztuk meg. A kondicionálisan génhiányos egerek 2008-ben készültek el. Természetesen ahhoz, hogy valódi génkiütött egereink legyenek, a Tks4 egereket Cre rekombinázt expresszáló hím egerekkel kellett keresztezni. Utóbbi egerek ivarsejtjei tartalmazzák a Cre enzimet, melynek specifikus hasítási helye a kondicionális KO egerekben elhelyezett loxP. Ezt a keresztezést az MTA KOKI állatházában végezték el, s a végleges génhiányos egér 2012-ben készült el. Az egér drámai morfológiai jeleket mutat: a kis mérete mellett hiányzik a zsírszövete, csont- és koponya deformitásokat mutat, szív- és idegrendszeri problémák is mutatkoznak (2. ábra).



2. ábra. Tks4/HOFI génhiányos egér (jobb oldal) és alomtársa 25 napos korukban

A KO egér eltérései - ha szabad összehasonlítani – nagyon hasonlóak a Frank-ter Haar szindrómása beteg gyerekek defektusaihoz, ahol szintén a Tks4 fehérje hiánya áll a háttérben. Először primer fibroblasztokat izoláltunk vad és génhiányos egerek farkából, majd a sejtenyészeten vizsgáltuk a sejtmozgást EGF hatására. Sajnos a normális fibroblasztok sem mozogtak EGF hatására, illetve a szérummal kiváltott sejtmozgásban nem láttunk különbséget a vad és a génhiányos sejtek között. Szabó Gábor (KOKI) munkacsoportja segítségével embrionális fibroblasztokat is izoláltunk vad és génhiányos egerekből. Ezek a fibroblasztok már mozogtak EGF hatására (megegyezően az irodalmi adatokkal), de itt sem láttunk különbséget a vad és a génhiányos sejtek között. 2013-ban Uher Ferenc (OVSZ) segítségével új irányban indultunk el. Uher doktor a Tks4 KO egerekből mesenchymális őssejteket izolált, melyeket zsírszövet és csontszövet irányban próbáltunk differenciáltatni. Nagy meglepetésünkre a génhiányos egerekben jelentősen sérül a mesenchymális őssejtek differenciációs képessége, mely magyarázatát adhatja annak, hogy miért látunk drámai morfológiai képet a génhiányos egerek esetében (3. ábra, csontszöveti differenciáció sérülése).



3. ábra. Tks4 szükséges a megfelelő csontszöveti differenciációhoz mesenchymális őssejtek esetében. A felső hat lyukban a vad egerekből izolált, míg az alsó hat lyukban a KO egerekből izolált mesenchymális őssejtek láthatóak. A bal oldali 3-3 lyukban kontroll médium, míg a jobb oldali 3-3 lyukban oszteogén médium található. A kalcium-gazdag precipitátumokat, melyeket a sejtek termelnek Alizarin red-del festettük meg. Mikroszkópos képek: 1, Sejtek KO egérből, kontrol médiumban 2, Sejtek KO egérből, oszteogén médiumban, 3, Sejtek vad egérből, kontrol médiumban, 4, Sejtek vad egérből, oszteogén médiumban