

ZÁRÓJELENTÉS

A Caskin fehérje szerepének vizsgálata (K61555)

Pályázatunk munkatervében az írtuk, hogy tanulmányozzuk a Caskin fehérjecsalád szerepét az idegsejtek működésében. Vállaltuk továbbá, hogy elkészítjük a Caskin1 és Caskin2 génkiütött egereket. Terveink nagy részét sikeresen megvalósítottuk, bár több eredmény esetén a publikáció az OTKA pályázat lezárása utánra nyúlik ki. Ennek alapvetően az az oka, hogy – irodalmi adatok alapján - a Caskin fehérjék vizsgálatán jelenleg kizárólag munkacsoportunk dolgozik a világon, így a fehérjék működésének felderítésében úttörő szerepet vállaltunk. A másik ok az, hogy a TaconicArtemisPharma céggel együttműködésben készítettük el a feltételeken gényhiányos Caskin egereket, s ezek közül a Caskin2 egér estében csak többedik kísérletre sikerült chiméra egereket előállítani.

A kísérleti terveknek megfelelően a Tomas Südhof (Denver, USA) laboratóriumától elkért Caskin1 fehérjét emlős expressziós vektorba klónoztuk, illetve a fehérje egyes doménjeiből GST fúziós fehérjéket állítottunk elő. Azért, hogy az endogén fehérjét is tanulmányozni tudjuk, ellenanyagokat is termeltettük a Caskin1 fehérje ellen: két poliklonális ellenanyagot, illetve újfajta technikával, az ABSerotec céggel együttműködésben egy rekombináns, humán monoklonális ellenanyagot. Mind a 3 ellenanyag kiválóan immunprecipitálja a fehérjét, illetve alkalmas immunblot kísérletre. A monoklonális ellenanyag ezen kívül jól alkalmazható immunhisztokémiára is.

A Caskin1 fehérje szerkezete, illetve az idegsejtek poszt-szinaptikus denzitálásában (PSD) való bedúsulása alapján valószínűsíthető, hogy a protein ún. állványfehérjeként működik [1]. Ez azt jelenti, hogy számos fehérjével alkothat komplexet. Ennek vizsgálatára molekuláris biológiai eszközökkel „feldaraboltuk” a fehérjét, és egyes doménjeit GST fúziós fehérjeként expresszáltuk *E. coli*-ban. A tisztított fehérjéket glutation-Agarose gyantán hagytuk, majd ezzel a gyantával fehérjéket próbáltunk izolálni patkány agy kivonatából. Sajnos többszöri kísérletünkre sem kaptunk tömegspektrometriával azonosításra alkalmas fehérjecsíkot az SDS gélelektroforézist követően. Ugyancsak nem bizonyult sikeresnek az a megközelítés sem, hogy meglévő ellenanyagainkkal immunprecipitáltuk patkány agyból a Caskin1 fehérjét, s az immunkomplexben próbáltunk azonosításra alkalmas fehérjéket találni. Ezt követően más technikához fordultunk. A francia Hybrigenics céggel együttműködésben élesztő két-hibrid eljárással kerestünk asszociálódó fehérjepartnereket. A cég javaslatára nem a teljes fehérjét használtuk csalinak, hanem a 280. aminosavtól a 963. aminosavig terjedő szakaszt, mely az SH3 és SAM doméneket tartalmazta, illetve a prolinban-gazdag domén egy részét. Az élesztő két-hibrid módszerrel számos fehérje interakcióját tudtuk kimutatni [2].

Nagyon sok energiát és időráfordítást igényelt, hogy a két-hibrid rendszer alapján azonosított és valószínűnek tűnő interakciókat bizonyítsuk. Ehhez a fehérjéket egyesével meg kellett klónozni és cDNS-üket bakteriális, illetve emlős expressziós vektorokba helyezni. Ahol elérhető volt, elkértük vagy megvettük a specifikus ellenanyagot, melyek közül igen sok sajnos alkalmatlannak bizonyult. Ahol nem volt elérhető ellenanyag, ott a fehérjét affinitás címkével láttuk el. Így vizsgáltuk a Caskin1 interakcióját a Septin4, a Siah1, az EphA2, a neurexin2, az Abi2 és az Nck fehérjékkel. A Cask fehérjével a kapcsolódása már korábban ismert volt, hiszen így találták meg a Caskin1-t [1].

Sajnálatos módon, a számos vizsgált fehérje közül csak néhány esetében tudtuk a két-hibrid rendszer eredményét validálni. Így *in vitro*, illetve *in vivo* precipitációs kísérletekkel sikerült

megerősítettük az Abi2/Caskin1 interakciót. Bizonyítottuk, hogy SH3 domén/prolinban-gazdag domén kölcsönhatásról van szó, ahol pontosan behatároltuk a Caskin1 fehérjében található Abi1 kötőhelyet [2]. A Caskin1 szerkezetét Tompa Péter munkacsoportjával együttműködésben vizsgálva kimutattuk, hogy a Caskin1 teljes C-terminális fele rendezetlen fehérje-szerkezetű. Ennek fontos szerepe lehet az állványfehérje működésében. A Caskin1 fehérje szerkezete alapján tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a humán állványfehérjék nagy része tartalmaz rendezetlen fehérjeszakaszokat [2].

Az állványfehérjék jelentős részénél megfigyelhető, hogy működésüket poszt-transzlációs módosítások, mint a szerin/treonin foszforiláció szabályozhatják. Vizsgálni kezdtük ezért, a Caskin1-en található lehetséges foszforilációs helyeket. Kimutattuk, hogy a prolinban-gazdag, rendezetlen szerkezetű régióban mind a treonin 1065-ös, illetve a szerin 1067-es mind *in vitro*, mind *in vivo* foszforilálódik. Érdekes módon a T1065-t mind a protein kináz C (PKC), mind a protein kináz A (PKA) képes foszforilálni. Azért, hogy az *in vivo* foszforilációt bizonyítsuk, a két foszforilációs hely alapján foszfospecifikus ellenanyagokat szintetizáltunk (itt eltértünk az eredeti tervhez képest, ahol még izotópos jelölést ígértünk). Bizonyítottuk, hogy mind farmakológias aktivátorok (forbol észter (TPA) és dibutiril-cAMP), mind fiziológias stimulusok (izoproterenol, béta-adrenerg receptor agonista, illetve EGF, PKC aktivátor) hatására a Caskin1 foszforilálódik. Sajnos eddig nem tudtuk kimutatni, hogy a szépen detektálható Caskin1 foszforilációnak mi lehet a szerepe. Vizsgáltuk, a foszforiláció szerepét a Caskin1 sejten belüli lokalizációjára, fehérje-stabilitására, a kötődő partnerfehérjékkel való interakcióra. Ugyanakkor Schlett Katalinnal (ELTE) történő kollaboráció eredményeként kimutattuk, hogy egér hipokampuszból izolált primér neuronsejtekben a PSD-ben lokalizálódó Caskin1 fehérje a foszforilációt előidéző stimulusok hatására feldúsul a PSD-ben (a kézirat megírás alatt).

A élesztő két-hibrid kísérlet alapján felmerül, hogy a Caskin1 az Nck kapcsoló fehérjén keresztül kötheti az állványfehérjét az Eph receptor tirozin kinázokhoz, ezzel szabályozva a receptor körüli fehérjék koncentrációját. Irodalmi adatok alapján ugyanis ismert volt, hogy az Nck SH2 doménje révén kötődhet az EphB1 receptor tirozin kináz 494-es foszforilált tirozinjához. Laboratóriumunkban megerősítettük ezt az eredményt és sikerült *in vivo* kimutatni az Nck/EphB1 asszociációt. Ugyanakkor bizonyítottuk az Nck kapcsolódását a Caskin1-hez is. Itt megállapítottunk, hogy az Nck egyik SH3 doménje sem tudja önmagában megkötni a Caskin1, csak az olyan Nck konstrukció, mely mind a három SH3 domént tartalmazza. Ilyen megfigyelést az Nck és Bcr-Abl fehérjék interakciója esetében munkacsoportunk már korábban leírt [3]. Ugyanakkor minden erőfeszítésünk ellenére sem voltunk képesek arra, hogy immunprecipitáció segítségével kimutassuk az EphB1/Nck/Caskin1 hármas komplexét. A következő technikához folyamodtunk ezért: az EphB1 receptor Nck-t kötni képes foszforilációs helye alapján elkészítettünk egy foszfopeptidet, melyet kovalensen Affi Gel 10-es gyantához kötöttünk. Ugyancsak készítettünk olyan affinitás gyantákat is, melyek a nem foszforilált peptidet, illetve olyan foszforilált peptideket tartalmaztak, melyekhez az Nck SH2 doménje nem kötődik. A specifikus foszfopeptidet tartalmazó gyantát patkány agykivonattal inkubáltuk és kimutattuk, hogy az Nck/Caskin1 komplex kötődött a foszfopeptidhez. Ez pedig azt jelenti, hogy az Nck/Caskin1 képes foszfortirozint tartalmazó fehérjével komplexet képezni. Kimutattuk továbbá, hogy EphB1-et expresszáló sejtekben EphrinB ligand hatására a Caskin1 tirozin oldalláncokon foszforilálódik, ami megerősíti, hogy a kináz és szubsztrátja sejten belül közel kerül egymáshoz (kézirat megírás alatt).

4 évvel ezelőtt a kísérleti tervek megírásánál vállaltuk, hogy sejtekben is vizsgálni fogjuk a Caskin1 fehérje működését. Be is szereztünk számos idegsejtből származtatott sejtvonalat, ilyen volt a PC12 sejtvonala, vagy a Madarász Emiliától (KOKI) kapott NE-4C sejtvonala. Sajnos az NE-4C sejtvonala leszámítva semelyik sejtvonalba sem tudtuk detektálni a fehérje jelenlétét, bár az összes rendelkezésre álló anti-Caskin1 ellenanyaggal próbálkoztunk. Geiszt Miklóssal (SE, Élettani Intézet) együttműködésben RT-PCR technikával kimutattuk, hogy PC12 sejtekben a Caskin1 mRNS-e jelen van, sőt NGF kezelés hatására 2-2,5-szeresére növekszik mennyisége. A biztató adatok ellenére a fehérjét egyik ellenanyagunk sem detektálta. Az NE-4C sejtek esetében, bár a fehérje expresszálódik a sejtek reténsavval történő differenciáció hatására, a reténsavas kezelés a sejtek száma és minősége esetében nem bizonyult annyira reprodukálhatónak, hogy az eredmények érdemben használhatóak lettek volna.

Tompa Péter laborjával együttműködésbe kerültünk a Caskin1 projekt kapcsán, ahol kimutattuk a Caskin1 fehérje C-terminálisának rendezetlenségét. Bár az OTKA pályázat terveiben nem szerepelt, megnéztük, hogy főleg vérképzőrendszeri daganatokban expresszálódó fúziós fehérjékbe, mint milyent a Bcr-Abl tirozin kináz, található-e rendezetlenség. Kimutattuk, hogy a fúziós onkogén fehérjék esetében szinte mindig rendezetlen az a szakasz, ahol a két gén által kódolt fehérje fuzionált [4].

Az OTKA pályázati periódusban felkérést kaptam Julian Downward-dal arra, hogy két összefoglaló cikket írjak a Cortactin fehérjéről (ezzel kölcsönhatásban izoláltuk a Caskin1 fehérjét), illetve a Ras fehérjék aktivációs mechanizmusairól [5, 6].

Referenciák

1. Tabuchi K, Biederer T, Butz S, Sudhof TC: **CASK participates in alternative tripartite complexes in which Mint 1 competes for binding with caskin 1, a novel CASK-binding protein.** *J Neurosci* 2002, **22**(11):4264-4273.
2. Balazs A, Csizmok V, Buday L, Rakacs M, Kiss R, Bokor M, Udupa R, Tompa K, Tompa P: **High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactive protein1.** *Febs J* 2009.
3. Wunderlich L, Goher A, Farago A, Downward J, Buday L: **Requirement of multiple SH3 domains of Nck for ligand binding.** *Cell Signal* 1999, **11**(4):253-262.
4. Hegyi H, Buday L, Tompa P: **Intrinsic structural disorder confers cellular viability on oncogenic fusion proteins.** *PLoS Comput Biol* 2009, **5**(10):e1000552.
5. Buday L, Downward J: **Roles of cortactin in tumor pathogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**(2):263-273.
6. Buday L, Downward J: **Many faces of Ras activation.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1786**(2):178-187.