

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Strukturní a regulační aspekty aktivace kinázy Src
Structural and regulatory aspects of Src kinase activation

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Lenka Koudelková

školitel: doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

konzultant: doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 6. 2020

.....
Mgr. Lenka Koudelková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. a doc. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. za vedení, podporu, odborné i méně odborné diskuse a shovívavost (jež musela být asi občas potřeba). Můj velký dík patří i ostatním členům naší laboratoře (současným i těm minulým) za jejich pomoc, přátelství a milou společnost. Jmenovat je ošemetné, tudíž nebudu, jen s výjimkou Marušky Charvátové za to, že se o nás stará jako o vlastní. V neposlední řadě moc děkuji své rodině a kamarádům za jejich podporu během studia a tak nějak za všechno.

Práce vznikla za podpory grantů Grantové agentury České republiky (GA15-07321S, GA19-03932S) a Grantové agentury University Karlovy (GAUK 674612).

ABSTRAKT

Kináza Src má stěžejní roli v množství fundamentálních buněčných procesů. Mimo jiné je součástí signálních drah řídících proliferaci, motilitu či diferenciaci a často bývá deregulována v různých typech nádorů. Aktivita Src proto podléhá přísné a komplexní regulaci, která je zprostředkována SH3 a SH2 doménami a fosforylačním stavem tyrosinů 416 a 527. V kompaktním inaktivním stavu kinázu udržují intramolekulárními inhibiční interakce. Jejich narušením dochází k otevření struktury Src a přechodu do aktivního stavu. Identifikovali jsme nový mechanismus, skrze který může být Src regulována. Jedná se o fosforylaci konzervovaného tyrosinu 90 vazebného povrchu SH3 domény, která vede ke snížení afinity SH3 domény k ligandům včetně CD linkeru a aktivaci kinázy. Fosfomimikující mutace tyrosinu 90 indukovala transformaci buněk a zvýšený invazivní potenciál. Jelikož je katalytická aktivita Src reflektována jeho strukturou, lze prostřednictvím stanovení tvaru kinázy usuzovat na její aktivitu. Na základě této korelace jsme sestrojili FRET senzor konformace Src umožňující sledovat s prostorovým a časovým rozlišením dynamiku aktivace kinázy v buňkách. Dokumentovali jsme, že aktivační mutace v SH3, SH2 i kinázové doméně nebo některé typy inhibitorů jsou schopny vyvolat otevření struktury Src. Analýza aktivace Src ve fokálních adhezích ukázala, že během vzniku adheze dochází k výraznému lokálnímu nárůstu jeho katalytické aktivity, která zůstává stabilní během maturované fáze a klesá s rozpadem adheze.

KLÍČOVÁ SLOVA

Src, SH3 doména, FRET senzor, struktura, fokální adheze, invazivita, transformace

ABSTRACT

Src kinase plays a crucial role in a multitude of fundamental cellular processes. Src is an essential component of signalling pathways controlling cellular proliferation, motility or differentiation, and is often found deregulated in tumours. Src activity is therefore maintained under stringent and complex regulation mediated by SH3 and SH2 domains and the phosphorylation state of tyrosines 416 and 527. Active Src adopts an open conformation whereas inactive state of the kinase is characterised by a compact structure stabilised by inhibitory intramolecular interactions. We identified phosphorylation of tyrosine 90 within binding surface of SH3 domain as a new regulatory switch controlling Src kinase activation. Using substitutions mimicking phosphorylation state of the residue we demonstrated that tyrosine 90 phosphorylation controls Src catalytic activity, conformation and interactions mediated by the SH3 domain, representing a positive regulatory mechanism leading to elevated activation of mitogenic pathways and increased invasive potential of cells. Based on correlation between compactness of Src structure and its catalytic activity, we constructed a FRET-based sensor of Src conformation enabling to measure the dynamics of Src activation in cells with spatio-temporal resolution. We found that activating mutations within either SH3, SH2 or kinase domains and some groups of inhibitors induce opening of Src structure. Analysing Src activity dynamics in focal adhesions we demonstrated that Src is activated during adhesion assembly, its activity remains steady and high throughout mature phase and decreases concurrently with adhesion disassembly.

KEYWORDS

Src, SH3 domain, FRET sensor, structure, focal adhesions, invasiveness, transformation

OBSAH

1. Úvod.....	8
2. Literární přehled.....	9
2.1. Struktura a regulace kinázy Src	9
2.1.1. Struktura kinázy Src	9
2.1.2. Strukturní aspekty regulace aktivity kinázy Src	13
2.2. Tyrosin 90 a regulace vazebných vlastností SH3 domény	22
2.3. Senzory aktivity a konformace kináz rodiny Src	26
2.3.1. Försterův rezonanční přenos energie (FRET)	27
2.3.2. Substrátové senzory aktivity kinázy Src.....	28
2.3.3. Konformační senzory kináz rodiny Src	32
3. Publikace	38
4. Diskuse.....	112
5. Shrnutí.....	122
6. Publikace a podíl na jejich přípravě	124
7. Seznam použité literatury	125

Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BCR	receptor B buněk (B cell receptor)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
EGFP	Emerald zelený fluorescenční protein (Emerald green fluorescent protein)
EYFP	žlutý fluorescenční protein (enhanced yellow fluorescent protein)
FAT	doména lokalizující do adhezí (focal adhesion targeting domain)
FLIM	fluorescence lifetime imaging
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer)
KD	kinázová doména
MD	molekulární dynamika (molecular dynamics)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDGFR	receptor růstového faktoru krevních destiček (platelet-derived growth factor receptor)
PH	doména homologní s pleckstrinem (pleckstrin homology domain)
PPII	polyprolinový helix typu II
PTB	fosfotyrosin vazebná doména (phosphotyrosine-binding domain)
SAXS	nízkoúhlový rozptyl rentgenového záření (small-angle X-ray scattering)
SFK	kinázy Src rodiny (Src family kinases)
SH	homolog domény kinázy Src (Src homology domain)
tECFP	zkrácený modrý fluorescenční protein (truncated enhanced cyan fluorescent protein)
UD	unikátní doména (unique domain)
ULBR	oblast unikátní domény vázající lipidy (unique lipid binding region)

1. ÚVOD

Src je první identifikovaná tyrosinová kináza a rovněž první objevený onkoprotein. Je esenciální pro udržování homeostáze vnitřního prostředí buňky a významnou měrou se uplatňuje v množství fundamentálních buněčných procesů. Funguje jako nezbytná komponenta signálních drah, které řídí proliferaci, motilitu nebo diferenciaci buněk. Podílí se na regulaci buněčného cytoskeletu, polarizace a tvaru buněk nebo udržování kontaktů s extracelulární matrix a okolními buňkami.

Src patří do skupiny nereceptorových proteintyrosinkináz. Působí jako přenašeč signálů mezi extracelulárními receptory a intracelulárními dráhami. Lze jej označit za zásadní signální uzel, který je schopen integrovat mnoho různých stimulů a na jejich základě pak zprostředkovávat rozličné buněčné odpovědi. Zásadní je jeho úloha zejména v signalizaci zprostředkované integriny, receptorovými tyrosinkinázami nebo receptory spřaženými s G-proteiny.

Vzhledem ke své stěžejní roli v širokém spektru významných buněčných procesů, podléhá Src přísné a velmi komplexní regulaci. Inaktivní konformace je udržována intramolekulárními inhibičními interakcemi zprostředkovanými SH3 a SH2 doménou. Rozrušení těchto vazeb, v důsledku změny fosforylačního stavu klíčových tyrosinů či vyvázání regulačních domén, vede k přechodu do aktivního stavu.

Aberantní aktivace Src obvykle způsobuje nádorovou transformaci buněk. Dochází ke zvýšení buněčné proliferace, ztrátě kontaktní inhibice a závislosti na ukotvení k povrchu. Lze pozorovat výraznou reorganizaci aktinového cytoskeletu doprovázenou oslabením mezibuněčných kontaktů a snížením adheze k extracelulární matrix. Výsledkem je pak neoplastický růst a vznik metastáz. Zvýšená kinázová aktivita a exprese Src byla pozorována u řady typů nádorů.

Předkládaná práce se věnuje strukturním aspektům aktivace kinázy Src a regulaci její katalytické aktivity. První část pojednává o přípravě, testování a použití senzoru konformace a aktivity Src. Zaměřuje se na studium vlivu aktivačních mutant Src nebo inhibitorů jeho aktivity na strukturu kinázy. Na příkladu fokálních adhezí demonstruje využití senzoru pro sledování dynamiky aktivace Src v živých buňkách. Druhá část je dedikována objasnění významu fosforylace tyrosinu 90 (Tyr90) vazebného povrchu SH3 domény Src. Ukazuje, že se jedná o nový mechanismus, jakým může být regulována katalytická aktivita a interakční schopnosti kinázy Src.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Struktura a regulace kinázy Src

Soustava mechanismů založená na přenosech fosfátových skupin je jedním z nejvíce rozvinutých signálních systémů. Je esenciální součástí signálních sítí regulujících veškeré buněčné procesy. Hlavními komponentami jsou proteinkinázy, což je nadrodina proteinů, které vznikly divergentní evolucí. Jedná se o jednu z největších proteinových rodin, jež tvoří 2 – 4 % všech eukaryotických genů. Většina kinázových rodin je zastoupena u všech metazoií (Manning et al., 2002).

Src patří do skupiny nереceptorových proteintyrosinkináz čítající rodin: Src, Csk, FAK, Abl, Jak, Fps, Syk, Tec, Frk a Ack (Tsygankov, 2003). Společným rysem těchto kináz je modulární povaha jejich struktury. Kromě katalytické domény jsou totiž tvořeny řadou dalších domén a strukturních prvků regulační povahy, které zprostředkovávají jak intermolekulární interakce se signálními partnery, tak intramolekulární vazby umožňující modulaci kinázové aktivity proteinu.

Rodina Src kináz (SFK) je u člověka tvořena 11 členy: Src, Yes, Fyn, Blk, Brk, Frk, Fgr, Hck, Lck, Lyn a Srm. Kinázy Src, Yes a Fyn jsou exprimovány ve všech buněčných typech. Ostatní proteiny této rodiny jsou produkovány více specificky, zejména však v hematopoetických buňkách (Thomas and Brugge, 1997). SFK mají molekulovou hmotnost v rozmezí 52 – 62 kDa a jsou tvořeny šesti konzervovanými strukturními celky. N-konec je tvořen SH4 doménou, jež je opatřena myristoylovou a v některých případech i palmytoylovou kotvou sloužící k lokalizaci kináz do cytoplasmatické membrány. Za touto oblastí dále následuje unikátní doména specifická pro jednotlivé SFK, SH3 doména, SH2 doména, kinázová (SH1) doména a C-koncová regulační oblast (Boggon and Eck, 2004; Roskoski, 2004; Tatosyan and Mizenina, 2000).

2.1.1. Struktura kinázy Src

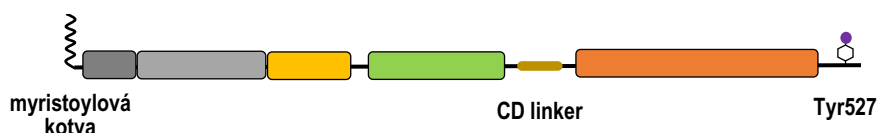
Kináza Src je 60 kDa velký protein, jež je tvořen N-koncovou SH4 doménou s myristoylovou kotvou, unikátní doménou, SH3 doménou, SH2 doménou, CD linkerem, kinázovou SH1 doménou a C-koncovou regulační oblastí nesoucí tyrosin 527 (číslování bude uváděno podle kuřecího Src) (Obr. 1). Inaktivní Src zaujímá kompaktní konformaci stabilizovanou intramolekulárními interakcemi. Jedná se zejména o vazbu SH2 domény na C-terminální segment s fosforylovaným Tyr527 a asociaci SH3 domény s CD linkerem. SH2 a SH3 domény dále interagují s laloky kinázové domény na straně protilehlé katalytickému místu. Aktivace kinázy je spojena s rozrušením některých nebo všech intramolekulárních

vazeb, což umožní přechod do více otevřené katalyticky aktivní konformace (Bernadó et al., 2008; Cowan-Jacob et al., 2005; Xu et al., 1997, 1999).

2.1.1.1. SH4 doména

SH4 doména je tvořena 15 aminokyselinovými zbytky. Prvních 7 aminokyselin slouží

Obr. 1: Schematické znázornění doménové struktury kinázy Src. Src je od N-konce tvořen SH4 doménou nesoucí myristoylační místo, unikátní doménou (UD), SH3 doménou, SH2 doménou a kinázovou doménou (KD, SH1). Dalšími významnými regulačními prvky jsou CD linker lokalizovaný mezi SH2 a kinázovou doménou a Tyr527 C-koncového segmentu.



jako myristoylační signál (Kaplan et al., 1988; Pellman et al., 1985), po jehož rozpoznání je pak během proteosyntézy Src odštěpen N-koncový Met1 a Gly2 je acylován myristoylovou skupinou, která zajišťuje kotvení kinázy v membráně (Buss and Sefton, 1985; Garber et al., 1985). U většiny SFK, vyjma Src a Blk, je SH4 doména dále modifikována palmitoylem. Ukotvení Src v membráně je proto stabilizováno několika oblastmi bohatými na bazické aminokyseliny, jež díky svému kladnému náboji mohou tvořit elektrostatické interakce se záporně nabitými polárními skupinami membránových fosfolipidů (Resh, 1994).

2.1.1.2. Unikátní doména

Unikátní doména (UD) kinázy Src je 66 aminokyselin dlouhá nestrukturovaná oblast spojující SH4 a SH3 doménu. Sekvence unikátních domén jednotlivých SFK se výrazně liší, nicméně UD dané kinázy je konzervovaná mezi různými organismy (Amata et al., 2014). Funkce a význam této oblasti byly zatím objasněny jen částečně. Prohození unikátních domén kináz Src a Yes ukázalo, že UD se podílí na determinování interakční a funkční specificity jednotlivých kináz (Hoey et al., 2000; Summy et al., 2003). Unikátní doména Src asociuje s lipidy, čímž se podílí na stabilizaci kinázy v membráně. Interaguje s SH3 doménou či calmodulinem (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). Obsahuje množství fosforylačních míst, jež se ukazují být významnými v regulaci Src signalizace i jeho aktivity (Amata et al., 2014; Dandoulaki et al., 2018).

2.1.1.3. SH3 doména

SH3 doména (aminokyselinové zbytky 81 – 142) je kompaktní globulární struktura, jejíž hydrofobní jádro je složeno z 5 β -řetězců (β A – β E) uspořádaných do dvou navzájem kolmých antiparalelních β -listů. Ligand-vazebný povrch je hydrofobní oblast ohraničená RT a nSrc smyčkou, což jsou flexibilní úseky spojující řetězce β A s β B a β B s β C. Je tvořen 2 vazebnými kapsami a jednou specifitní. Na základě strukturních a mutačních analýz byly identifikovány aminokyselinové zbytky klíčové pro vazbu ligandů: Tyr90, Asn135 a Tyr136

první vazebné kapsy, Tyr92, Trp118 a Pro133 druhé vazebné kapsy a Asp99 s Tyr131 specifitní kapsy (Erpel et al., 1995; Xu et al., 1997; Yu et al., 1992).

SH3 doména váže prolin-bohaté sekvence nesoucí PxxP motiv, které po interakci s vazebným místem zaujímají konformaci levotočivého polyprolinového helixu typu II (PPII) (Yu et al., 1994). Afinita a specifita vazby je navíc zesílena tzv. kotvící aminokyselinou, jež se nachází v okolí PxxP motivu. Tento zbytek (nejčastěji se jedná o arginin) se váže do specifitní kapsy a v závislosti na tom, zda je lokalizován na N- či C- konci PxxP, určuje orientaci ligandu na povrchu SH3 domény. Vazebné motivy lze proto kategorizovat jako ligandy I. (RxxPxxP) a II. (PxxPxR) třídy (Feng et al., 1994, 1995). Při interakci vzniká ne příliš velké množství vodíkových vazeb a odehrává se na malém povrchu (přibližně 400 Å). Jedná se proto o slabší vazbu (s disociační konstantou 1 – 10 μM), která je navíc v porovnání s interakcemi jiných signálních domén poměrně málo specifická (Kuriyan and Cowburn, 1997).

2.1.1.4. SH2 doména

Krátkým 6aminokyselinovým linkerem je SH3 doména napojena na SH2 doménu (aminokyseliny 148 – 245). Je to globulární struktura, jejíž centrální část tvoří 2 antiparalelní β-listy, které z obou stran obklopuje jeden α-helix. SH2 domény rozpoznávají sekvence obsahující fosforylovaný tyrosin. Takovéto ligandy asociují s jejich vazebným povrchem v podobě volných natažených řetězců. Ligand-vazebné místo je tvořeno dvěma kapsami. První vazebná kapsa obsahuje vysoce konzervovaný arginin (u Src Arg175), který elektrostaticky interaguje s fosfotyrosinem. Druhá kapsa se nachází na opačné straně centrálního β-listu a váže hydrofobní aminokyselinu v pozici +3 C-terminálně od fosforylovaného tyrosinu (Eck et al., 1993; Waksman et al., 1992, 1993). SH2 doména Src přednostně váže sekvenci pYEEI. Isoleucin je vnořen do hydrofobní kapsy a kyselé glutamátové zbytky vytváří elektrostatické interakce s bazickými aminokyselinami vazebného povrchu (Songyang et al., 1993). Sekvence v okolí fosforylovaného tyrosinu výrazně zvyšují afinitu vůči SH2 (až 10tisíckrát) (Koch et al., 1991), přičemž výsledná vazba je přibližně o řád silnější než interakce SH3 domény s PPII helixem (Kuriyan and Cowburn, 1997).

2.1.1.5. CD linker

CD linker (aminokyseliny 246 – 266) je krátký 14aminokyselinový peptid, který propojuje SH2 a kinázovou doménu. Aminokyselinové zbytky 249 – 253 tvoří levotočivý polyprolinový helix typu II, který v inaktivní konformaci Src interaguje s SH3 doménou. SH3-vazebný motiv CD linkeru je kategorizován jako ligand II. třídy. Nejedná se však o klasický PxxPxR konsensus, jelikož obsahuje pouze jeden prolin (Pro250), jenž se při vazbě na SH3 doménu zanořuje do první hydrofobní kapsy mezi Tyr90, Asn135 a Tyr 136. V druhé hydrofobní kapse, kam se v případě ideální sekvence vkládá druhý prolin, je umístěn

Gln253. Dlouhý polární řetězec glutaminu mu neumožňuje zaujmout patřičnou polohu, což vede k výrazně slabší interakci oproti optimálním ligandům (Xu et al., 1997, 1999).

2.1.1.6. Kinázová (SH1) doména (KD)

Katalytická doména Src má charakteristický dvoulaločný tvar a vykazuje vysokou strukturní i sekvenční homologii s doménami ostatních proteinkináz (Knighton et al., 1991). Menší N-terminální lalok (aminokyseliny 267-337) je tvořen 5 antiparalelními β -řetězci složenými do β -listu a jedním α -helixem (α C) lokalizovaným mezi řetězci β 3 a β 4. Větší C-koncový lalok (aminokyseliny 341 – 520) je převážně helikální a zahrnuje 7 α -helixů a 2 β -řetězce (Xu et al., 1997).

Katalytické místo se nachází ve štěrbině mezi oběma laloky. Na vazbě adenosintrifosfátu se podílí převážně N-koncový lalok, který spolu s ohybem spojujícím oba laloky orientuje ATP do katalyticky permisivní polohy. C-lalok zajišťuje zejména asociaci s cílovým peptidem. N-terminální lalok obsahuje množství konzervovaných zbytků nezbytných pro katalytickou funkci domény: glycin bohatou smyčku (G-smyčku; Gly274, 276, 279), Lys295 a Gly310. Lys295 a Gly310 interagují s α - a β -fosfáty ATP, zatímco γ -fosfát je koordinován G-smyčkou. V C-terminálním laloku se nachází vysoce konzervovaná katalytická smyčka a aktivační smyčka. Asp386 katalytické smyčky je zodpovědný za správnou orientaci substrátového tyrosinu do polohy umožňující katalýzu. Funguje rovněž jako obecná báze, jež odnímá proton z hydroxylové skupiny tyrosinu, čímž usnadňuje nukleofilní atak γ -fosfátu ATP. Asp404 aktivační smyčky váže dvoumocné kationty hořčíku, které se podílí na koordinování β - a γ -fosfátové skupiny ATP (Breitenlechner et al., 2005; Cowan-Jacob, 2006; Roskoski, 2004; Xu et al., 1997).

Laloky kinázové domény se vzájemně pohybují, což mění strukturu katalytického místa a vede k jeho zavírání a otevírání. Otevřená konformace je esenciální pro uvolnění ADP a navázání ATP. Uzavření katalytické štěrbiny umožňuje substrátům zaujmout pozici vhodnou pro katalytickou reakci. Blokování těchto konformačních přechodů nebo modulování vzájemné orientace laloků má vliv na aktivitu kinázové domény (Roskoski, 2004).

2.1.1.7. C-koncový segment

C-konec Src tvoří krátká sekvence (aminokyseliny 521 – 533) s regulačním tyrosinem 527. Po fosforylaci Tyr527 vytváří C-konec autoinhibiční interakci s SH2 doménou, čímž uzamyká kinázu v inaktivní konformaci (Young et al., 2001). Jelikož SH2-vazebná sekvence C-terminálního segmentu nemá podobu optimálního ligandu s hydrofobní aminokyselinou na pozici pTyr + 3, která by zapadla do vazebné kapsy (nese sekvenci YQPG), probíhá asociace s SH2 doménou pouze přes fosfotyrosin a je tudíž poměrně slabá (Xu et al., 1997).

2.1.2. Strukturální aspekty regulace aktivity kinázy Src

Kináza Src je stěžejní komponenta velkého množství signálních drah a buněčných procesů včetně metabolismu, proliferace, motility či diferenciace. Deregulace její aktivity vedou k aberantní signalizaci a následným patologickým projevům, které mohou vyústit v tumorigenezi a zvýšený metastatický potenciál nádorových buněk (Frame, 2002; Irby and Yeatman, 2000). Katalytická aktivita Src musí být tudíž pod přísnou kontrolou.

Existuje několik mechanismů, jež v odpověď na příslušné podněty Src aktivují nebo inaktivují. Jedná se zejména o intramolekulární a intermolekulární interakce, fosforylace, defosforylace, ubiquitinaci, SUMOylaci či S-nitrosylaci. Ze strukturálních studií a simulací molekulární dynamiky (MD) lze usuzovat, že tyto regulační elementy determinují katalytickou aktivitu skrze působení jen na několik klíčových efektorových struktur kinázové domény, které spoluvytváří katalytické centrum a obsahují aminokyselinové zbytky esenciální pro vazbu substrátů nebo vlastní katalytickou reakci. Změny polohy a konformace těchto komponent v důsledku interakcí regulačních domén či posttranslačních modifikací kontrolují kinázovou aktivitu (Hubbard, 1998; Johnson et al., 1996; Meng et al., 2017).

2.1.2.1. Kinázová doména

Katalytická aktivita Src je dána konformačním stavem kinázové domény. Hlavními strukturálními komponentami řídícími tranzici mezi inaktivní a aktivní formou jsou především glycin-bohatá smyčka a helix α C N-laloku a katalytická a aktivační smyčka (aktivační segment) C-koncového laloku. Jsou-li ve vhodné orientaci a konformaci, vytváří klíčové elementy aktivního místa, jež jsou nezbytné pro vazbu substrátů a vlastní přenos fosfátové skupiny.

Významnou součástí katalytického centra je α C helix N-laloku. Nese vysoce konzervovaný Glu310, který svým postranním řetězcem tvoří iontovou vazbu s Lys295. Tento lysin potom v součinnosti s Asp404 vázajícím dvojmocný kation hořčíku koordinuje fosfátové skupiny ATP do polohy umožňující katalýzu (Cowan-Jacob et al., 2005).

Při přechodu Src do inaktivního stavu je α C helix vychýlen z této katalyticky permissivní pozice (tranzice z α C-in do α C-out konformace), následkem čehož je Glu310 vytlačen mimo aktivní místo a stabilizován v této orientaci vodíkovým můstkem s Arg409. Nemůže tudíž interagovat s Lys295, který z toho důvodu vytváří solný můstek s Asp404. Asp404 důsledkem toho nemůže vázat Mg^{2+} iont. Výsledkem je rozrušení vazebného místa pro ATP. Inaktivní konformace α C helixu je dále stabilizována aminokyselinami na jeho vnitřní straně (Phe278, Leu297, Met302, Phe307, Met314, Ile336), jež tvoří hydrofobní interakce s N-terminální částí aktivační smyčky (Leu407, Leu410, Ile411). Orientaci α C helixu navíc ovlivňuje pozice C-koncového úseku CD linkeru. V inaktivním stavu Trp260 CD linkeru směřuje k C-konci α C helixu a pomáhá jej udržovat v katalyticky nekompetentní poloze (Cowan-Jacob et al., 2005; Gonfloni et al., 1997; Xu et al., 1997, 1999).

Aktivační smyčka je zásadní regulační prvek lokalizovaný v C-laloku. Její N-konec tvoří tzv. DFG motiv (Asp404-Phe-Gly) a C-terminální část tzv. APE motiv. DFG segment může nabývat dvou konformačních stavů: inaktivní DFG-Asp-out a aktivní DFG-Asp-in, který umožňuje Asp404 vázat Mg^{2+} iont a koordinovat fosfáty ATP (Roskoski, 2016).

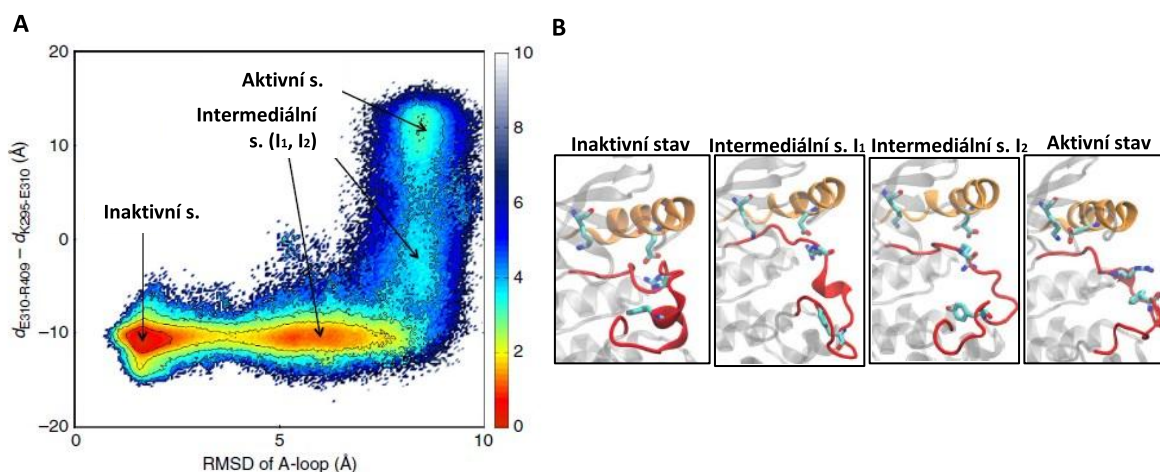
Aktivační smyčka obsahuje tyrosin 416, který je jedním z hlavních fosforylačních míst ovlivňujících kinázovou aktivitu. V aktivní konformaci Src je aktivační smyčka fosforylovaná na Tyr416, díky čemuž se manifestuje jako rozvolněný řetězec bez sekundárních struktur exponovaný vně struktury kinázové domény. Z krystalografické analýzy aktivované katalytické domény kinázy Lck vyplývá, že fosforylovaný Tyr416 interaguje s aminokyselinami Arg385, Arg409 a Ala418, což stabilizuje aktivační smyčku v poloze umožňující optimálně vázat substráty a katalyzovat přenos fosfátu (Cowan-Jacob et al., 2005; Yamaguchi and Hendrickson, 1996). K fosforylaci Tyr416 dochází trans-autofosforylačním mechanismem (Barker et al., 1995; Porter et al., 2000). Na základě simulací molekulární dynamiky (MD) se usuzuje, že izolované nefosforylované kinázové domény mohou konformačně oscilovat, přičemž nezůstávají jen v neaktivní konformaci, ale transientně přechází i do aktivního stavu. Fosforylace Tyr416 stabilizuje struktury důležité pro kinázovou aktivitu a uzamkne doménu v katalyticky kompetentní konformaci (Meng and Roux, 2014).

V inaktivní konformaci tvoří N-terminální úsek aktivační smyčky (aminokyseliny 413 – 418) krátký α -helix (A-loop helix), jenž je vklíněn mezi laloky kinázové domény. Tyrosin 416 je skryt uvnitř vzniklé struktury a není tudíž přístupný fosforylaci. A-loop helix zamezuje rozpoznání a přístupu substrátů do oblasti aktivního centra a stabilizuje nekatalytickou orientaci α C helixu (Xu et al., 1999).

Analýzy porovnávající konformační motivy identifikovaly 2 konzervované hydrofobní struktury, které se vyskytují v aktivní konformaci katalytických domén všech proteinkináz, ale nejsou přítomny v inaktivním stavu. Jedná se o tzv. regulační osu (regularory spine) a katalyckou osu (catalytic spine). Jsou to podlouhlé motivy tvořené několika hydrofobními aminokyselinami (katalytická osa je navíc doplněna adeninovým kruhem ATP) lokalizované paralelně vedle sebe v N-C orientaci propojující oba laloky. Obsahují rezidua z klíčových struktur jako je α C helix, aktivační smyčka či katalytická smyčka, které, pokud jsou v katalyticky permissivní konformaci, vytváří obě osy. Vychýlení z této orientace vede k rozrušení os a inaktivaci kinázy (Kornev et al., 2006; Taylor and Kornev, 2011).

Způsob, jakým dochází k přechodu kinázové domény z inaktivní do aktivní konformace umožnily alespoň částečně objasnit MD simulace. Tranzice se realizuje skrze hustou síť intermediálních mikrostavů, které jsou distribuovány podél poměrně široké reakční cesty propojující inaktivní a aktivní strukturu kinázové domény. Tento přechod je dvoukrokovým procesem, kdy nejdříve dochází k rozbalení a zpřístupnění aktivační smyčky a až následně k rotaci α C helixu směrem dovnitř do aktivního místa (Gan et al., 2009; Meng

et al., 2016). Konformační krajina obsahuje kromě inaktivní a aktivní konformace ještě dva výrazněji stabilnější intermediální stavy: I_1 , ve kterém je aktivační smyčka již v otevřené konformaci, ale síť elektrostatických interakcí zahrnující Lys295, Glu310 a Arg409 je stále v inaktivní konfiguraci. Ve druhém intermediálním stavu I_2 je již rozrušen vodíkový můstek mezi Glu310 a Arg409, nicméně zatím nedošlo k rotaci α C helixu dovnitř N-laloku, tak aby mohl být vytvořen vodíkový můstek spojující Arg295 s Glu310 (Shukla et al., 2014) (Obr. 2).

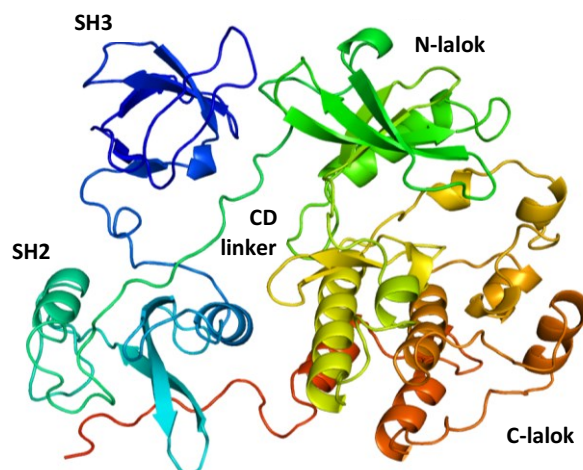


Obr. 2: Strukturální změny během aktivace Src v oblasti katalytického místa. A) Konformační krajina znázorňující síť mikrostavů podél reakční cesty mezi aktivní a inaktivní strukturou katalytického centra Src. B) Strukturální modely aktivního místa během přechodu z inaktivní do aktivní konformace zobrazující α C-helix a aktivační smyčku. V inaktivním stavu je aktivační smyčka sbalená uvnitř štěrbin mezi N- a C-lalokem a α C-helix je vytočen vně katalytického místa. Při aktivaci nejdříve dojde k rozbalení a zpřístupnění aktivační smyčky (intermediální stav I_1), následně je rozrušen vodíkový můstek mezi Glu10 a Arg409 (intermediální stav I_2) a až poté nastane rotace α C-helixu dovnitř aktivního centra (aktivní stav). Převzato a upraveno z (Shukla et al., 2014).

2.1.2.2. Regulační domény SH2 a SH3

Katalytická doména Src je opatřena komplexním systémem regulačních domén, které v závislosti na okolních podnětech a signalizaci modulují její aktivitu a cílí ji do specifických buněčných struktur a signálních komplexů. Hlavními mechanismy regulujícími kinázovou aktivitu Src jsou interakce SH2 a SH3 domény a fosforylační stav tyrosinů 416 a 527.

Inaktivní konformace Src je kompaktní „zavřená“ struktura, ve které SH3 doména asociuje s CD linkerem a SH2 doména váže C-terminální segment fosforylovaný na Tyr527. Obě regulační domény navíc nasedají na povrch kinázové domény ze strany protilehlé katalytickému centru (Obr. 3). Rozrušení intramolekulárních inhibičních interakcí vede k otevření struktury Src a aktivaci její kinázové aktivity (Pawson, 1997; Xu et al., 1997).



Obr. 3: Stužkový model struktury kinázy Src v inaktivní konformaci. SH3 doména váže polyprolinový helix CD linkeru, zatímco SH2 doména asociuje s C-koncovým segmentem fosforylovaným na Tyr527. Obě regulační domény navíc interagují s laloky katalytické domény. PDB 2SRC (Xu et al., 1997). Převzato a upraveno z (Gerndtová, 2008).

SH3 doména interaguje s CD linkerem v oblasti, jejíž centrální část tvoří prolinový motiv zaujímající strukturu PPII helixu. Konzervovaný prolin 250 se vkládá do první hydrofobní kapsy (Tyr90, Asn135, Tyr136) vazebného povrchu SH3 domény. Druhá hydrofobní kapsa je místo prolinu obsazena glutaminem 253. SH3 doména navíc prostřednictvím RT a nSrc smyček vytváří extenzivní kontakty s N-lalokem kinázové domény. RT smyčka (Arg95, Thr96) interaguje s $\beta 2$ a $\beta 3$ řetězcí N-laloku (Thr252, Trp286). Současně vzniká solný můstek mezi Asp117 nSrc smyčky a Arg318 N-laloku. Interakce zprostředkovaná RT smyčkou je rozsáhlejší a zahrnuje jak vodíkové vazby, tak van der Waalovy a hydrofobní interakce (Pawson, 1997; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997).

V důsledku vzájemné orientace SH3 a kinázové domény je CD linker mezi těmito doménami vmezeřen (Xu et al., 1997). Správná pozice CD linkeru je nezbytná pro inaktivaci katalytické aktivity Src. Mutace vlastního CD linkeru či záměny v místech jeho kontaktu s SH3 nebo kinázovou doménou deregulují Src (Gonfloni et al., 1997). Skrze CD linker je totiž informace o pozici SH3-SH2 tandemu alostericky předávána na katalytickou doménu (Banavali and Roux, 2005; Fajer et al., 2017). Velmi výraznou interakci zabezpečuje konzervovaný Leu255 CD linkeru, jež je vnořen v hluboké hydrofobní kapse N-laloku, čímž se podílí na spřažení všech tří struktur (Gonfloni et al., 1999). V inaktivním stavu Src je vysoce konzervovaný tryptofan 260 (lokalizovaný na rozhraní CD linkeru a kinázové domény) vmezeřen do hydrofobní kapsy N-laloku v těsné blízkosti αC helixu. Aminokyseliny CD linkeru Ala256 – Ala259 zároveň tvoří β -otočku typu II, která je v aktivní konformaci nahrazena β -otočkou typu I mezi zbytky Asp258 – Glu261, což má za následek rotaci Trp260 ven z kapsy, její zánik a pohyb αC helixu směrem k aktivnímu místu do katalyticky permisivní orientace (Fajer et al., 2017; Gonfloni et al., 1997). Výpočetní analýzy nasvědčují tomu, že SH2 a SH3 doména jsou esenciální pro stabilizaci CD linkeru

v inhibiční konformaci, nicméně je to právě samotný linker, který drží kinázovou doménu v inaktivním stavu (Banavali and Roux, 2005; Fajer et al., 2017).

SH2 doména váže C-koncový segment fosforylovaný na Tyr527. Fosfotyrosin se váže do kapsy tvořené α A helixem a jednou stranou β D řetězce centrálního β -listu. Na jeho druhé straně se nachází hydrofobní kapsa, kam se u vysoce afinních ligandů váže velký nepolární zbytek na pozici pTyr+3. V případě C-terminu Src je toto místo obsazeno glycinem, díky čemuž je tak vazba k SH2 doméně relativně slabá. SH2 doména dále tvoří prostřednictvím α A helixu iontové vazby s antiparalelními helixy α E a α I C-koncového laloku. Ačkoli tyto struktury nejsou spojeny nikterak těsně, jejich povrchy jsou elektrostaticky komplementární a navzájem interagují několika polárními a nabitými aminokyselinovými řetězci (Xu et al., 1997).

Fosforylaci C-terminálního tyrosinu 527 zajišťují kinázy Csk a Chk (Cooper et al., 1986; Okada and Nakagawa, 1989). Pro Csk je charakteristická její úzká specifita k Tyr527 kinázy Src. Je zajištěna skrze schopnost C-laloků katalytických domén obou kináz asociovat. Katalytické místo Csk se tak dostane přesně do pozice, ve které kontaktuje C-koncový segment Src nesoucí Tyr527, jenž je následně fosforylován (Levinson et al., 2008). Chk je více tkáňově specifická kináza z rodiny Csk. Kinázu Src je schopna inhibovat kromě fosforylace Tyr527 rovněž prostřednictvím tvorby komplexů s jejími katalyticky aktivními formami (Chong et al., 2006). Bylo dokumentováno, že C-koncový tyrosin 527 navíc podléhá intermolekulární autofosforylaci. Probíhá však jen s velmi nízkou kinetikou, protože se na regulaci aktivity Src podílí jen zanedbatelně (Osusky et al., 1995). Defosforylaci Tyr527 zabezpečuje fosfatáz, zejména: PTP1B, PTP α , Shp1, Shp2 nebo CD45 hematopoetických buněk (Frame, 2002; Thomas and Brugge, 1997).

SH3 a SH2 doména váží své intramolekulární vazebné partnery s poměrně nízkou afinitou. Důvodem je, že ani jedna z těchto struktur nemá sterické ani elektrostatické vlastnosti optimálního ligandu pro daný vazebný povrch. Ačkoli CD linker vytváří polyprolinový helix, na rozdíl od konsenzus sekvence PxxP obsahuje místo druhého prolinu glutamin. C-koncový segment s regulačním tyrosinem 527 má na pozici pTyr+3 glycin oproti preferovanému isoleucinu (Xu et al., 1997). Přestože jsou intramolekulární vazebné motivy jen velmi slabými ligandy, jejich lokalizace na jednom peptidovém řetězci spolu s SH3 a SH2 jim poskytuje entropickou výhodu a zabezpečuje tak, že budou s vysokou pravděpodobností asociovat s regulačními doménami. Interakční partneři Src nesoucí více afinní ligandy kompetují s intramolekulárními vazebnými motivy, které mohou vytěsnit a tím vyvázat regulační domény z jejich intramolekulárních inhibičních interakcí, což vyústí v přechod kinázy do katalyticky aktivní konformace.

SH3 a SH2 doména jsou propojeny krátkým 8aminokyselinovým linkerem. V inaktivní konformaci Src zaujímá strukturu β -otočky následovanou 3_{10} helixem, která je stabilizována několika vodíkovými můstky. Substituce 3 aminokyselinových zbytků (Ser142, Ala145, Glu146) za glyciny vedla k výraznému nárůstu flexibility linkeru a konstitutivní aktivaci Src (Young et al., 2001).

Na základě MD simulací lze usuzovat, že pokud obě regulační domény asociují se svými intramolekulárními ligandy, tvoří linker mezi nimi rigidní strukturu. Důsledkem toho jsou pohyby obou domén dynamicky spřaženy a SH3-SH2 tandem tudíž funguje jako jakási svorka, jež uzamyká kinázovou doménu v inaktivním stavu. Vysokou míru korelace rovněž vykazují vzájemné pohyby SH3 domény a C-laloku. Uvolnění SH2 domény z její vazby na C-terminální segment zvýší flexibilitu SH3-SH2 linkeru, což má za následek desynchronizaci pohybů regulačních domén, uvolnění svorkového mechanismu a aktivaci kinázy. Z výpočetních analýz vyplývá, že zvýšená mobilita SH2 domény disociované z C-konce je přes linker přenesena na SH3 doménu, což způsobí nárůst její pohyblivosti vzhledem k N-laloku a oslabení interakcí mezi nimi (Ulmer et al., 2002; Young et al., 2001).

Rigidní spojení SH3 a SH2 domény je nezbytné pro udržení inaktivní konformace Src. MD simulace ukazují, že regulační domény zaujímající inhibiční konfiguraci, při níž nasedají na katalytickou doménu, stabilizují inaktivní formu kinázové domény. Přechod KD do aktivní konformace je v této situaci termodynamicky natolik nevýhodný, že je v podstatě znemožněn (Fajer et al., 2017; Young et al., 2001).

Události, které interferují s koordinovanými oscilacemi regulačních domén a způsobují rozpřažení svorkového mechanismu stabilizujícího laloky kinázové domény v katalyticky nepermissivní orientaci, povedou k aktivaci Src. Může se jednat jak o defosforylaci Tyr527 C-terminálního segmentu, přímou vazbu proteinu na katalytickou doménu, tak o vyvázání regulačních domén interakčním partnerem Src (Cowan-Jacob et al., 2005; Ma et al., 2000; Xu et al., 1999; Young et al., 2001).

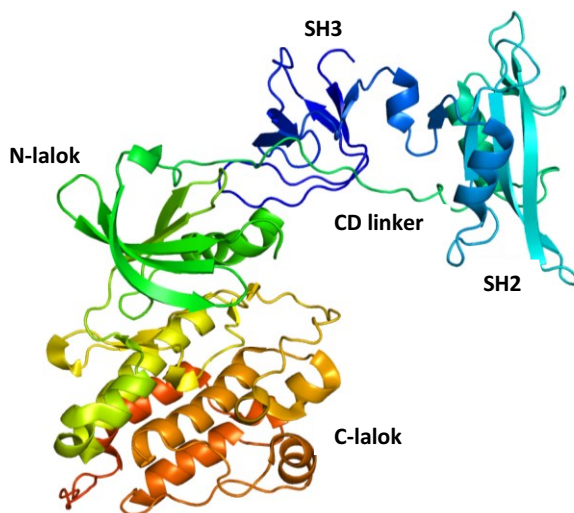
2.1.2.3. Struktura aktivní kinázy Src

Podoba kinázy Src v inaktivním stavu je již do značné míry objasněna. Byla vyřešena její krystalická struktura, jež obsahuje majoritní část proteinu počínaje SH3 doménou (aminokyseliny 83 – 533) (Xu et al., 1997, 1999). Celý Src se nepodařilo krystalizovat, jelikož SH4 a unikátní doména jsou vnitřně neuspořádané oblasti. Jak vypadá aktivní Src a jakých konformací může nabývat, však nebylo ještě uspokojivě vyjasněno.

Rozrušení intramolekulárních inhibičních interakcí, jak defosforylací C-koncového tyrosinu, tak asociací s dalšími proteiny, vede k přechodu do aktivního stavu. Přítomnost dvou dominantních negativních regulačních interakcí v rámci jedné molekuly může znamenat, kromě potřeby co nejpřísněji kontrolovat aktivitu kinázy, rovněž několik úrovní aktivace. Existují 3 teorie: podle první je přerušování jedné intramolekulární inhibiční vazby dostatečné pro indukci katalytické aktivity, přičemž druhá regulační interakce může zůstat

zachována. Znamenalo by to, že aktivní Src se může vyskytovat ve více konformacích. Podle druhé hypotézy by vyvázání jedné inhibiční vazby vedlo k destabilizaci i druhé regulační interakce a tím i celého regulačního mechanismu, což by pokaždé vyústilo v zaujetí jedné unifikované aktivní konfigurace. Tato teorie je podporována MD simulacemi Younga a kolektivu (Young et al., 2001). Třetí model se opírá o práci Alexandropoulos a Baltimore (Alexandropoulos and Baltimore, 1996) a předkládá, že stabilní aktivace Src je dosaženo až zrušením obou intramolekulárních vazeb. V případě kinázy Src se většina studií přiklání k první hypotéze (Bernadó et al., 2008; Brábek et al., 2002; Cowan-Jacob et al., 2005; Lerner et al., 2005).

Základní představu o podobě aktivní konformace Src přinesla rentgenová difrakční analýza nefosforylované strukturované části kinázy (aminokyseliny 82 – 533) krystalizované v komplexu s inhibítor (des-metyl analog imatinibu) (Cowan-Jacob et al., 2005). Vyřešená struktura zaujímá otevřenou konformaci, ve které jsou regulační domény rotovány o 130° oproti inaktivnímu stavu a svírají s katalytickou doménou přibližně pravý úhel (Obr. 4). Absence fosfátu na Tyr527 nedovoluje SH2 doméně asociovat s C-koncovým segmentem, což vede ke zrušení interakce s C-lalokem a rozpadu kompaktní konformace inaktivního Src. SH3 doména stejně jako v neaktivní formě váže CD linker a udržuje kontakty s N-lalokem. Nefosforylovaný C-terminální segment se stáčí zpátky a prostřednictvím Leu533, jež interkaluje do kapsy tvořené helixy α D, α E, α F, α H, asociuje s C-lalokem. Hydroxylová skupina benzenového jádra tyrosinu 527 vytváří vodíkové vazby s dusíky uhlíkaté kostry C-konce, jež jsou navíc stabilizovány interakcí Tyr527 s konzervovaným Pro529 a je tak chráněna před fosforylací (Cowan-Jacob et al., 2005).



Obr. 4: Stuhkový model struktury kinázy Src v aktivní konformaci. Nedochází k interakci SH2 domény s C-koncovým segmentem, ale vazba SH3 domény k CD linkeru a její interakce s N-lalokem kinázové domény zůstává zachována. PDB 1Y57 (Cowan-Jacob et al., 2005). Převzato a upraveno z (Gerndtová, 2008).

Výzkum kinázy Hck (náležící do rodiny Src) ukázal, že SH3 a SH2 domény mohou regulovat katalytickou aktivitu nezávisle na sobě.

Expresí Hck v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (organismus, který nemá endogenní tyrosinkinázy) způsobuje snížení proliferace buněčné kultury. Obdobné experimenty s *S. cerevisiae* heterologně exprimujícími Src ukázaly, že doba zdvojení pozitivně koreluje s katalytickou aktivitou produkované kinázy (Murphy et al., 1993). Vzhledem k absenci regulační proteintyrosinkinázy Csk vykazuje Hck výraznou kinázovou aktivitu, jež může být ale dále modulována. Protein viru HIV-1 Nef váže SH3 doménu Hck s nejvyšší dokumentovanou afinitou (Lee et al., 1995) a je tak schopen ji vyvézt z inhibiční interakce s CD linkerem. Koexpresí Hck s Nef v *S. cerevisiae* vede k nárůstu katalytické aktivity kinázy. Minimálně u části populace Hck musí být tudíž zachována inhibiční vazba SH3 domény na CD linker i v situaci, kdy SH2 doména neasociuje s C-terminálním segmentem (Lerner et al., 2005).

Aminokyselinové záměny měnící CD linker Hck ve vysoko-afinní ligand neschopný disociace od SH3 domény nebrání aktivaci kinázy prostřednictvím SH2 domény (Lerner et al., 2005). Komplementární experimenty potvrdily, že modifikace C-koncového segmentu ve vysoko-afinní vazebný motiv, jež není schopen uvolnit se z interakce s SH2 doménou, neinterferuje s aktivací Hck přes SH3 doménu. Vazba proteinu Nef na SH3 a následná aktivace Hck nemá vliv na fosforylační státní C-koncového tyrosinu (Lerner and Smithgall, 2002).

Důkazy podporující model vícestupňové aktivace poskytl rovněž výzkum kinázy Src. Lze mezi ně řadit jak krystalovou strukturu nefosforylovaného Src v aktivní konformaci (Cowan-Jacob et al., 2005), tak mutační experimenty s v-Src a c-Src.

SH3 doména interaguje s N-lalokem kinázové domény skrze RT a nSrc smyčky. Mutace aminokyselin Arg95 a Thr96 RT smyčky (Arg95Trp, Thr96Ile), jež zprostředkovávají tento kontakt, vedou k částečně transformovanému fenotypu buněk (Kato et al., 1986; Miyazaki et al., 1999). Obdobně záměna Asp117 nSrc smyčky (Asp117Asn) pravděpodobně ruší její interakci s N-lalokem (Xu et al., 1997) a pokud je spolu s Arg95Trp a Leu124Val alteracemi vnesena do c-Src, dojde k nárůstu jeho katalytické aktivity (Miyazaki et al., 1999). Zavedení všech těchto 4 mutací (Arg95Trp, Thr96Ile, Asp117Asn, Leu124Val) do konstitutivně aktivního Src527F, jež má místo Tyr527 nefosforylovatelný fenylalanin, způsobí 2,5násobný nárůst jeho aktivity. Disociace C-koncového segmentu z SH2 domény tudíž nevede ke zrušení všech intramolekulárních inhibičních interakcí a plné aktivitě Src. Toho je docíleno až dodatečně, přerušením kontaktů zprostředkovaných SH3 doménou (Brábek et al., 2002).

Kromě klasické rentgenové krystalografie byl ke stanovení struktury aktivního Src použit rovněž nízkohlový rozptyl rentgenového záření (SAXS). SAXS umožňuje měřit testované molekuly přímo v roztoku a obejít tak obtíže spojené s krystalizací, nicméně

s daleko nižším rozlišením než krystalografická analýza. Studie využívající nízkohledový rozptyl (Bernadó et al., 2008) dokumentovala, že nativní c-Src je v roztoku zastoupen téměř výhradně v jednu majoritní konformaci, jež odpovídá struktuře inaktivního Src. Konstitutivně aktivní Src527F se vyskytuje minimálně ve dvou konformačních stavech. 85 % molekul zaujímá kompaktní formu nerozlišitelnou od inaktivního Src, kde však nemůže docházet k vazbě SH2 domény na C-terminální segment. Lze usuzovat, že se jedná o mezistupeň mezi aktivní a inaktivní formou, který v závislosti na regulačních signálech může přejít do jednoho či druhého stavu. Zbytek populace tvoří minimálně jedna rozvolněná konformace, jež majoritně vykazuje tvar podobný struktuře nefosforylovaného aktivního Src (Cowan-Jacob et al., 2005).

Pokud by tedy platil model víceúrovňové aktivace Src, tak by různé aktivační či inaktivační stimuly zprostředkované různými dráhami a efektorovými proteiny mohly vést k několika odlišným aktivním konformacím Src lišícími se dostupností SH3 a SH2 domény. Rozdílné interakční schopnosti kinázy pak mohou vyústit v asociaci s jinými vazebnými partnery, změněnou lokalizaci a možnost fosforylovat jiné spektrum substrátů. Může to být mechanismus, jak v závislosti na počátečním podnětu vést signál rozdílnými dráhami či s odlišnou kinetikou.

2.1.2.4. Vliv SH4 a unikátní domény na regulaci Src

Mechanismus regulace Src byl z velké části objasňován na základě krystalografických studií, jež nezahrnovaly SH4 a unikátní doménu (UD). Ukazuje se, že tato strukturně vnitřně neuspořádaná oblast na N-konci Src funguje jako významný signalizační uzel kontrolovaný řadou faktorů, který je schopen ovlivňovat aktivitu i lokalizaci kinázy.

Src je na úplném N-konci opatřen myristylovou kotvou, která je nezbytná pro jeho lokalizaci do cytoplasmatické membrány (Cross et al., 1984; Kamps et al., 1985). Energie vložení této jedné mastné kyseliny do lipidové vrstvy však není dostatečná pro membránové ukotvení celého proteinu (Buser et al., 1994; Peitzsch and McLaughlin, 1993). Jako významné se ukázaly být elektrostatické interakce lipidů s bazickými aminokyselinami SH4 domény (Buser et al., 1994). Později byla v rámci unikátní domény objevena částečně strukturovaná oblast ULBR (Unique Lipid Binding Region) zahrnující aminokyseliny 51, 53, 55, 60 – 67 (číslováno dle lidského c-Src), jež je schopna interagovat s acidickými lipidy. Dalším identifikovaným regionem asociujícím s membránou jsou RT a nSrc smyčky SH3 domény (Pérez et al., 2009, 2013). NMR studie ukázaly, že SH3 doména vytváří strukturní podporu vnitřně neuspořádaným N-koncovým oblastem kinázy. Kromě asociace s lipidy nSrc smyčka váže SH4 doménu a RT smyčka ULBR oblast unikátní domény. K těmto interakcím dochází na opačné straně SH3 domény než se nachází ligand-vazebné rozhraní. Vazba ligandu SH3 doménou a jí indukované strukturní změny jsou schopny propagace skrz celou SH3 doménu a způsobí disociaci RT smyčky od membrány a zrušení interakce s ULBR. Dojde k oddálení kinázy od membrány, což by mohlo mít za následek přístup

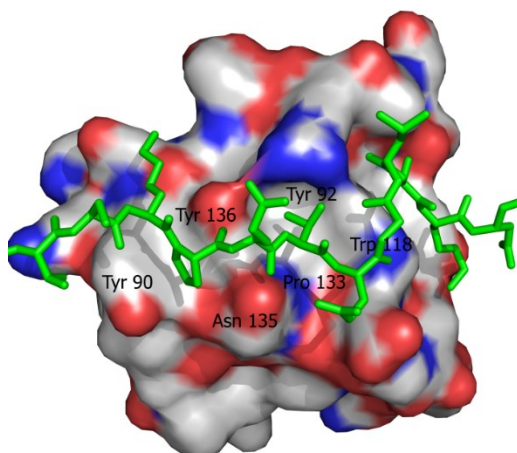
k odlišným interakčním partnerům a substrátům (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). SH3 doména tak funguje jako strukturně-signalizační uzel, který komunikuje konformační změny, jež se udály ve strukturované části Src, s vnitřně neuspořádanou oblastí a naopak.

Na N-koncové nestrukturované části Src se nachází řada fosforylačních míst, které ovlivňují vazbu této oblasti k membráně. Záporný náboj fosfátové skupiny zřejmě interferuje s elektrostatickými interakcemi mezi bazickými aminokyselinami a acidickými lipidy, čímž snižuje schopnost Src interagovat s membránou (Pérez et al., 2013). Fosforylace Ser17 kinázou PKA ruší asociaci SH4 domény s membránou (Pérez et al., 2013), pravděpodobně způsobuje translokaci Src z plasmatické membrány do cytosolu a inhibuje buněčný růst (Obara et al., 2004; Walker et al., 1993). Naopak fosforylace Thr34 a Ser72 kinázou Cdk5 inhibuje interakci ULBR s membránou (Pérez et al., 2013). V mitóze jsou Thr34 a Ser72 fosforylovány Cdk1, což vede k aktivaci Src (Shenoy et al., 1992; Stover et al., 1994). Ser72 může být rovněž fosforylován Cdk5. Takto označený Src je ubiquitinován a směřován k proteasomální degradaci (Pan et al., 2011). Fosforylace Ser51 (číslování dle lidského Src) kinázou Chk1 rovněž aktivuje Src. Během cytokineze takto aktivovaný Src indukuje polymeraci aktinu na bázi chromatinových můstků, stabilizuje je a zabraňuje tak poškození chromatinu během dělení buněk (Dandoulaki et al., 2018).

Nestrukturovaná N-koncová část Src je rovněž zodpovědná za dimerizaci Src molekul. Měření vazby myristoylovaného konstruktu SH4-UD-SH3 na imobilizované liposomy pomocí povrchové plasmonové rezonance naznačilo, že Src je schopen dimerizovat přes SH4 doménu (Le Roux et al., 2016). Nedávná studie ukázala, že dimerizace Src je zprostředkována spíše vazbou myristoylovaného N-konce do hydrofobní kapsy ve struktuře C-laloku kinázové domény. Dimerizace vyžaduje fosforylovaný Tyr416 a následně způsobuje nárůst fosforylace tohoto tyrosinu i substrátů kinázy Src. Zároveň dokumentovali, že delece nestrukturované oblasti Src inhibuje katalytickou aktivitu Src (Spasov et al., 2018).

2.2. Tyrosin 90 a regulace vazebných vlastností SH3 domény

SH3 doména je tvořena hydrofobním jádrem, které sestává z 5 β -řetězců složených do dvou vůči sobě kolmých antiparalelních β -listů. Vazebné místo je hydrofobní relativně plochá oblast na jinak globulární struktuře. Je tvořeno 3 vazebnými kapsami, jež jsou formovány množstvím konzervovaných aminokyselin náležících povětšinou do RT nebo nSrc smyčky. Strukturní a mutační analýzy ukázaly, že u kinázy Src jsou to především Tyr90, Asn135, Tyr136 první vazebné kapsy, Tyr92, Trp118, Pro133 druhé vazebné kapsy a Asp99, Tyr131 specifitní kapsy (Erpel et al., 1995; Xu et al., 1997; Yu et al., 1992) (Obr. 5).



Obr. 5: Struktura SH3 domény vázající CD linker. Znárodné aminokyseliny jsou významné pro interakci s ligandy. Barvy prvků SH3 domény: C, H, N, O; CD linker – zelená (PDB 2SRC (Xu et al., 1997)). Převzato a upraveno z (Gerndtová, 2008).

Ligandy SH3 domény nesou konsenzus sekvenci PxxP. Zaujímají konformaci levotočivého polyprolinového helixu typu II, což je úzká struktura s třemi aminokyselinami na otáčku. Příčný průřez má tudíž přibližně tvar trojúhelníku, jehož základna asociuje s povrchem SH3 domény. Pokud se jedná o optimální ligand, jsou obě vazebné kapsy obsazeny dipeptidem ϕ P, kde ϕ je hydrofobní aminokyselinový zbytek. Do specifitní kapsy se obvykle váže bazická aminokyselina, která se vyskytuje na jednom či druhém okraji ϕ Px ϕ P sekvence a určuje tak orientaci peptidu vzhledem k SH3 doméně (Kay et al., 2000; Mayer, 2001).

Ačkoli je tyrosinová fosforylace chápána především jako mechanismus zprostředkovávající protein-proteinové interakce mezi motivy nesoucími tyrosin a SH2 nebo PTB doménami, ukazuje se, že může být rovněž významným regulačním prvkem modulujícím vazebné vlastnosti SH3 domén. Fosforylované tyrosinové zbytky byly detekovány v SH3 doménách desítek různých proteinů. Analýza jejich sekvencí odhalila, že většina fosfotyrosinů se nachází na pozicích 7 a 66, jež v případě kuřecího Src odpovídají Tyr90 a Tyr131 (Tatárová et al., 2012). Oba identifikované tyrosiny jsou strukturními komponentami první respektive třetí hydrofobní kapsy vazebného povrchu (Erpel et al., 1995) a tudíž se velkou měrou podílejí na interakci s ligandem.

Porovnání sekvencí sousedících s fosforylovanými tyrosiny ukázalo výraznou konzervovanost aminokyselin přilehlých Tyr90. Na pozici -2 vzhledem k Tyr90 se obvykle vyskytuje alanin následovaný leucinem, dále aspartát na pozici +1 a pozice +2 je většinou obsazena aminokyselinou s benzenovým jádrem. Motiv ALYD(Y/F) RT smyčky je tudíž nejvíce preferovaná sekvence ve struktuře SH3 domény, která podléhá tyrosinové fosforylaci. Jedná se o poměrně konzervovaný motiv, jelikož byl nalezen u 12 – 15 % SH3 domén lidských proteinů. Na základě predikčních programů lze usuzovat, že Tyr90 (Tyr7)

ALYS(Y/F) motivu je pravděpodobně fosforylován kinázami rodiny Src, případně kinázami FAK, Abl, Btk nebo PDGFR (Tatárová et al., 2012).

Jedna z prvních prací dokumentující fosforylaci SH3 domény Src studovala mitogenní signalizaci zprostředkovanou stimulací PDGF receptoru. Src se váže na aktivovaný PDGFR pomocí SH2 domény. Aktivace PDGFR vedla k fosforylaci Tyr136 SH3 domény Src, což je konzervovaný aminokyselinový zbytek specifitní kapsy vazebného povrchu. Fosforylace Tyr136 neměla vliv na PDGFR mediovanou aktivaci Src, ale snižovala schopnost SH3 domény asociovat s peptidovými ligandy (Broome and Hunter, 1997).

Pilotní práce ukazující regulační vliv fosforylace Tyr7 na vazebné vlastnosti SH3 domény byla publikována o kináze Btk, která náleží do rodiny noreceptorových proteintyrosin kináz Tec. Její struktura je tvořena katalytickou, SH3 a SH2 doménou. Na N-konci navíc nese PH doménu a prolin-bohaté sekvence. V maturovaných B lymfocytech se podílí na přenosu signálu z BCR (receptor B buněk). Stimulace BCR aktivuje kinázy rodiny Src, jež následně fosforylují Btk na Tyr551 katalytické domény, což vede k přechodu kinázy do aktivního stavu (Rawlings et al., 1996; de Weers et al., 1994). Na vazebném povrchu SH3 domény Btk dochází k autofosforylaci Tyr223 (odpovídá Tyr90 kuřecího Src). Mutace tohoto tyrosinu za nefosforylovatelný fenylalanin u konstitutivně aktivní Btk zvyšuje její transformační potenciál. Nedochází však k žádnému výraznému nárůstu kinázové aktivity, lze tudíž soudit, že fosforylační status Tyr223 ovlivňuje afinitu SH3 domény k interakčním partnerům (Park et al., 1996).

Vazebné studie s GST-fúzními SH3 doménami kinázy Btk potvrdily, že fosfotyrosin na pozici 223 má odlišný vliv na asociaci s různými ligandy. Fosforylace Tyr223 SH3 domény Btk nemá efekt na vazbu c-Cbl, ale inhibuje její interakci s proteinem WASP a naopak zvyšuje afinitu pro kinázu Syk (Morrogh et al., 1999).

Obdobný mechanismus se uplatňuje i v regulaci interakce PSTPIP s WASP, což jsou proteiny účastníci se řízení dynamiky aktinového cytoskeletu. Jsou nezbytné pro modulaci kortikálního aktinu nebo cytokinezi (Li, 1997). Kinázy rodiny Src fosforylují PSTPIP na Tyr367 SH3 domény (odpovídá Tyr90), jehož záměna za fosfomimikující glutamát inhibuje vazbu WASP a má za následek narušení jejich kolokalizace uvnitř buněk. SH3 doména PSTPIP, kde Tyr367 není fosforylován nebo je nahrazen nefosforylovatelným fenylalaninem, s proteinem WASP asociuje. Fosforylace Tyr367 SH3 domény PSTPIP je proto mechanismem, který umožňuje kontrolovat lokalizaci obou proteinů v rámci buňky a pravděpodobně tak ovlivňovat i formování a přestavby aktinového cytoskeletu (Wu et al., 1998).

Fosforylace SH3 domény se rovněž uplatňuje v regulaci katalytické aktivity a vazebných schopností kinázy Abl a jejího fúzního proteinu Bcr-Abl. Abl je nerekceptorová proteintyrosinkináza, jejíž strukturu tvoří N-koncová myristoylová kotva, SH3, SH2, katalytická doména a pro Abl specifická C-terminální doména. Abl je v inaktivním stavu udržována vazbou SH3 domény na linker spojující SH2 a kinázovou doménu a asociací myristoylovaného N-konce s C-terminálním lalokem. Tyto intramolekulární inhibiční interakce umožňují, podobně jako u kináz Src či Hck, navázání regulačních domén na laloky kinázové domény, čímž ji udržují v katalyticky nepermissivním stavu (Hantschel and Superti-Furga, 2004; Nagar et al., 2003, 2006).

Reciprokou translokací mezi *c-abl* protoonkogenem mapovaným na chromosom 9 a *bcr* lokusem na chromosomu 22 vznikne vyjma pozměněného chromosomu 9 rovněž tzv. Filadelfský chromosom, což je cytogenetický ukazatel chronické myeloidní leukemie. V důsledku této přestavby dochází k expresi fúzního onkogenního proteinu Bcr-Abl, jež disponuje konstitutivní kinázovou aktivitou a způsobuje transformaci hematopoetických buněk a buněk kostní dřeně. Bcr-Abl není na rozdíl od Abl regulován skrze vazbu myristátu N-terminálního segmentu do C-laloku, ale zůstává u něj částečně zachována inhibiční interakce mezi SH3 doménou a SH2-KD linkerem (Hantschel and Superti-Furga, 2004; Wong and Witte, 2004).

Bcr-Abl je fosforylována kinázami Hck, Lyn a Fyn Src rodiny na 7 tyrosinech lokalizovaných v oblasti regulačních domén, z nichž 2 se nachází v SH3 doméně, 4 v SH2 doméně a jeden v linkeru mezi nimi. Nejvýznamnějším se ukazuje být Tyr89 SH3 domény (homolog Tyr90), jehož výrazně zvýšená fosforylace byla detekována v leukemických buněčných liniích K-562 a Meg-01. Záměna Tyr89 za nefosforylovatelný fenylalanin snižovala schopnost Bcr-Abl transformovat buňky. Nejvyšší transformační potenciál však vykazoval Bcr-Abl protein, který měl všech 7 tyrosinů fosforylovaných. Majorita těchto aminokyselinových zbytků se vyskytuje na interakčním rozhraní SH3-SH2 tandemu s kinázovou doménou. Negativní náboj fosfotyrosinů destabilizuje inhibiční spřažení regulačních domén a katalytické domény, čímž dojde k aktivaci kinázy (Meyn et al., 2006).

Fosforylace Tyr89 kinázy Abl ruší asociaci SH3 domény jak s proteinem Abi-1, tak s SH2-KD linkerem (Chen et al., 2008). Bylo zjištěno, že jeden z důvodů, proč u pacientů s chronickou myeloidní leukemií vzniká rezistence vůči inhibitoru Bcr-Abl imatinibu, je mutace Tyr89. Imatinib se preferenčně váže do katalytického místa kinázové domény Abl zaujímající inaktivní konformaci. Mutace Tyr89 má za následek rozrušení inhibiční vazby mezi SH3 doménou a linkerem, která zůstává do určité míry zachována i u Bcr-Abl, což vede k přechodu do plně aktivního stavu a znemožnění vazby inhibitoru (Azam et al., 2003; Chen et al., 2008).

Fosforylace vazebného povrchu SH3 domény byla dokumentována i u adaptorového proteinu p130Cas, což je jeden ze stěžejních substrátů kinázy Src podílející se na integrinové

signalizaci. p130Cas je tvořen N-koncovou SH3 doménou, C-koncovou CCH doménou, mezi kterými se nachází serin-bohatá doména, Src-vazebná doména a substrátová doména obsahující 15 motivů YXXP. V buněčných adhezích jsou tyto tyrosiny fosforylovány kinázami rodiny Src v odpověď na mechanické stimuly, což vede k aktivaci signálních drah regulujících motilitu a viabilitu buněk (Defilippi et al., 2006; Janoštiak et al., 2014).

SH3 doména p130Cas může být fosforylována na Tyr12 (homolog Tyr90 kuřecího Src) (Luo et al., 2008). Záměna Tyr12 za kyselinu glutamovou mimikující fosforylovaný tyrosin vede k výraznému snížení nebo ztrátě schopnosti SH3 domény vázat své proteinové ligandy (Gemperle et al., 2017; Janoštiak et al., 2011). Způsobuje rovněž uvolnění p130Cas z jeho původní lokalizace ve fokálních adhezích, což má za následek jejich zvýšenou dynamiku a tím i vyšší motilitu buněk. Buňky exprimující p130Cas s mutovaným Tyr12 za nefosforylovatelný fenylalanin vykazují defekty v migraci způsobené pravděpodobně abnormálně zvětšenými a stabilními fokálními adhezemi. Fosforylace Tyr12 v SH3 doméně p130Cas tudíž ovlivňuje nejen jeho schopnost interagovat s vazebnými partnery a tím i lokalizaci, ale skrze tyto fenomény se podílí na regulaci dynamiky adhezních struktur, migraci a invazivitě (Janoštiak et al., 2011).

První důkaz o signifikanci tyrosinu 90 (a přilehlých aminokyselin) SH3 domény kinázy Src přinesla práce testující transformační potenciál mutantních variant c-Src. Expresí kinázy s delecí aminokyselinové sekvence mezi zbytky 90 – 95 (včetně) došlo ke změně buněčné morfologie, nárůstu fosforylace proteinových substrátů a indukci neadhezivního růstu buněk (Potts et al., 1988). Význam Tyr90 coby jednoho z důležitých zbytků podílejících se na vazbě ligandu ukázala studie mapující konzervované hydrofobní aminokyseliny na vazebném povrchu SH3 domény. Mutace Tyr90 za alanin vedla k částečné deregulaci Src a v kontextu samotné SH3 domény ke ztrátě její schopnosti vázat protein Sam68 a regulační podjednotku kinázy PI3K (p85 α) (Erpel et al., 1995).

2.3. Senzory aktivity a konformace kináz rodiny Src

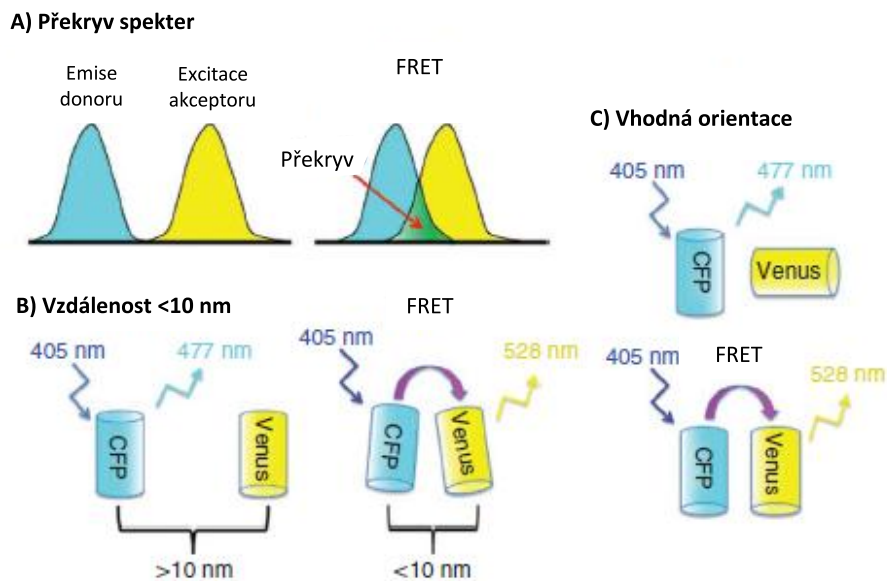
Abychom byli schopni zkoumat procesy regulované kinázou Src a pochopit jejich roli v buněčné fyziologii, je potřeba nejen znát celkovou míru aktivace Src, ale zejména umět stanovit kde v buňce dochází k jeho aktivaci, kdy, za jakých podmínek a s jakou dynamikou se tato aktivace mění v čase a prostoru. Za tímto účelem byly různými výzkumnými skupinami sestrojeny buněčné senzory detekujících aktivitu nebo konformaci Src. Jsou založeny na měření fluorescence a Försterova rezonančního přenosu energie mezi fluorofory. Přehled publikovaných senzorů kináz rodiny Src předkládají následující podkapitoly.

2.3.1. Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

FRET je kvantově-mechanický jev, při kterém dochází k přenosu energie mezi dvěma fluorofory, kdy excitační spektrum jednoho (donor) se překrývá s emisním spektrem druhého (akceptor). Přenos energie je neradiační (dipólové spřažení) a dochází k němu, pokud jsou fluorofory v těsné blízkosti (1 – 10 nm) a ve vhodné orientaci. Účinnost FRET E lze vyjádřit jako: $E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$, kde r je vzdálenost mezi fluorofory a R_0 je Försterův poloměr. R_0 je vzdálenost, při které je účinnost FRET mezi daným párem fluoroforů 50%. Hodnota R_0 je závislá na spektrálním překryvu použité dvojice fluoroforů, jejich vzájemné orientaci (tj. orientaci jejich dipólových momentů) a kvantovém výtěžku donoru (Zadran et al., 2012) (Obr. 6).

Vložíme-li FRET pár fluoroforů do jedné molekuly či každý fluorofor zvlášť na dva spolu interagující proteiny, je měření účinnosti FRET unikátním nástrojem pro stanovování intra a intermolekulárních vzdáleností. K FRET dochází v intervalu 1 – 10 nm, což je rozsah délek přesně odpovídající vzdálenostem v rámci biomolekul, jejich konformačním změnám nebo intermolekulárním interakcím. Vzhledem k tomu, že účinnost FRET klesá s šestou mocninou vzdálenosti fluoroforů (Edelhoch et al., 1967), je tato metoda rovněž vysoce citlivá, s prostorovým rozlišením daleko přesahujícím difrakční limit konvenční optické mikroskopie.

Existuje mnoho způsobů jak měřit FRET a počítat jeho účinnost. Nejběžnější postupy jsou založeny na detekci intenzity fluorescence donoru a akceptoru při excitaci donoru, kdy účinnost FRET je úměrná poměru těchto dvou hodnot (metoda sensitized emission). Další možností může být měření intenzity fluorescence donoru před a po vysvícení akceptorové molekuly. Komplexnější postupy spočívají ve stanovování kinetiky dohasínání fluorescence donoru, jež je různá v závislosti na přítomnosti akceptoru (fluorescence lifetime imaging (FLIM)). Lze měřit míru vysvícení donoru, změnu doby dohasínání jeho fluorescence či analyzovat jednotlivé komponenty křivky dohasínání fluorescence donoru i akceptoru, což může reflektovat populace molekul lišící se různou účinností FRET (Broussard et al., 2013; Jares-Erijman and Jovin, 2003).



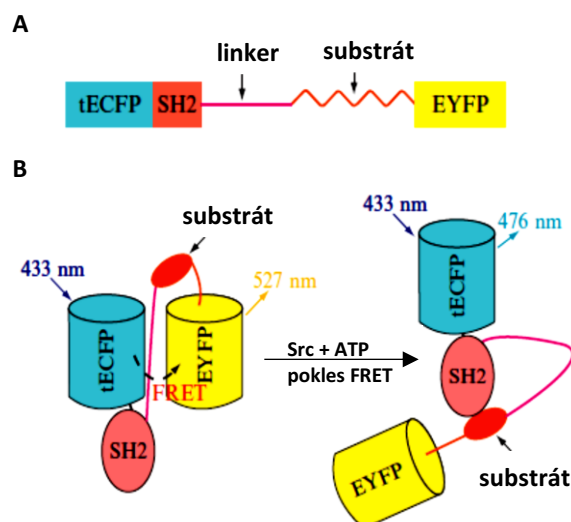
Obr. 6: Schématické diagramy 3 podmínek FRET: A) Emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru. B) Aby mohlo docházet k přenosu energie z donoru na akceptor, musí být fluorofory v dostatečně blízkosti. C) Fluorofory musí být vhodně orientovány. Jsou-li jejich dipólové momenty vzájemně rovnoběžné, dosahuje FRET nejvyšší účinnosti. Pokud dipólové momenty fluoroforů svírají pravý úhel, FRET nenastává. Převzato a upraveno z (Broussard et al., 2013).

2.3.2. Substrátové senzory aktivity kinázy Src

Substrátové senzory kinázové aktivity, jež jsou založeny na principu FRET, jsou obvykle tvořeny párem fluoroforů mezi nimiž se nachází fosfo-vazebná doména spojená krátkým linkerem se specifickým substrátem pro sledovanou kinázu. Po fosforylaci kinázou začne substrát interagovat s fosfo-vazebnou doménou, přičemž se tato konformační přestavba projeví jako změna v detekované účinnosti FRET.

2.3.2.1. Ting et al., 2001

První senzor kinázové aktivity Src byl vyvinut v laboratoři Rogera Tsiena (Ting et al., 2001). Je tvořen, směrem od N-konce, C-terminálně zkráceným modrým fluorescenčním proteinem tECFP (Miyawaki et al., 1997), SH2 doménou odvozenou od Src, flexibilním linkerem (GSTSGSGKPGSGEGS), substrátovou sekvencí (EIYGEF), která byla vybrána na základě screeningu peptidové knihovny na optimální sekvenci specificky fosforylovatelnou Src (Songyang et al., 1995) a C-koncovým žlutým fluorescenčním proteinem (citrin, EYFP). V klidovém stavu bez přítomnosti aktivního Src jsou oba fluorofory senzoru v těsné blízkosti, důsledkem čehož lze měřit vysoké hodnoty FRET. Po aktivaci Src a fosforylaci substrátu dojde k jeho navázání na SH2 doménu, což způsobí oddálení fluoroforů od sebe a pokles FRET (Obr. 7).



Obr. 7: Model substrátového senzoru (Ting et al., 2001). A) Schematické znázornění doménové struktury a B) aktivačního mechanismu reporteru. V nepřítomnosti Src není SH2 doména schopna vázat substrátový peptid a oba fluorofory jsou blízko u sebe a dochází mezi nimi k FRET s vysokou účinností. Po fosforylaci substrátu kinázou dojde k jeho asociaci s SH2 doménou. Tato konformační přestavba způsobí oddálení fluoroforů a pokles měřeného FRET. Převzato a upraveno z (Wang and Chien, 2007).

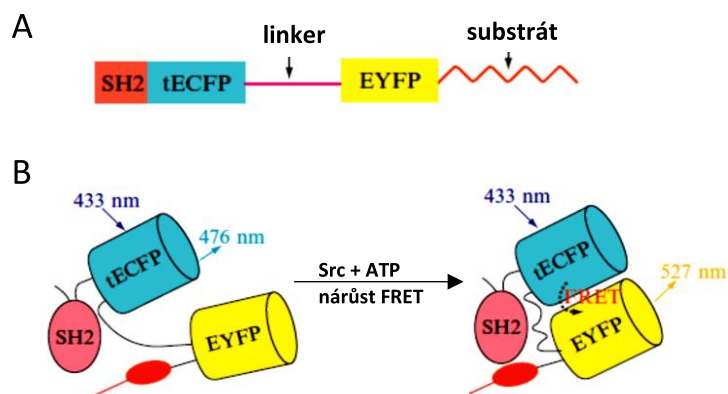
Testování senzoru *in vitro* přidáním Src kinázy či v buňkách stimulací epidermální růstovým faktorem (EGF) aktivujícím Src ukázalo pokles FRET. Použití Src inhibitoru PP1 nebo záměna substrátového tyrosinu za nefosforylovatelný fenylalanin nebyla schopna blokovat pokles FRET indukovaný stimulací EGF, což ukázalo, že měřené změny v účinnosti FRET nereflktují aktivitu Src a jsou do značné míry způsobeny nespecifickou fosforylací jinými kinázami (EGFR, Abl, Lck) i nejasným mechanismem fungování senzoru. (Ting et al., 2001).

Následná optimalizace původního biosenzoru spočívala v mutování 4 tyrosinů SH2 domény (Y149, Y184, Y202, Y229) nacházející se v blízkosti substrátového peptidu, jež jsou přístupné fosforylaci a mohly tak být zdrojem falešně pozitivního signálu. Nově připravený senzor nesoucí mutaci Y202F vykazoval měřitelnou rezpozivitu vůči Src aktivitě, včetně nulové změny v přítomnosti PP1 inhibitoru či nefosforylovatelného substrátu. Pokles FRET v odpověď na aktivaci Src však byl pouhých 10 % oproti původním 20 % (Wang and Chien, 2007).

Další série modifikací kladoucí si za cíl zlepšit sensitivitu Y202F senzoru zahrnovala nové mutace v SH2 doméně, testování různých délek linkeru nebo záměnu alaninu 206 za lysin v ECFP a EYFP eliminující slabou tendenci fluoroforů dimerizovat (Zacharias et al., 2002). Žádná z nich nicméně neměla zásadní vliv na citlivost reporteru (Wang and Chien, 2007).

Novým přístupem bylo poté vytvořit senzor pozměněné konstrukce, který byl na N-konci tvořen SH2 doménou následovanou tECFP, linkerem, EYFP a substrátovým peptidem na úplném C-konci. Ideou bylo, že v nefosforylovaném stavu bude úroveň FRET nízká,

jelikož fluorofory budou od sebe odděleny nestrukturovaným linkerem. Po fosforylaci se substrát naváže na SH2 doménu, čímž dojde k přiblížení N- a C-konce reporteru a tím pádem i obou fluoroforů, což bude mít za následek nárůst FRET (Obr. 8). Přestože v in vitro podmínkách docházelo po přidání Src ke zvýšení FRET, stimulace buněk EGF nevyvolala žádnou odezvu senzoru (Wang and Chien, 2007).



Obr. 8: Model substrátového senzoru (Ting et al., 2001) s alternativním uspořádáním domén. A) Schematické znázornění doménové struktury a B) aktivačního mechanismu. Nová variant Src reporteru měla prohozenou pozici substrátového peptidu a EYFP fluoroforu. Substrát byl lokalizován na úplném C-konci v poloze co nejdále od SH2 domény. Ideou bylo, aby fosforylace senzoru vedla k nárůstu FRET. Převzato a upraveno z (Wang and Chien, 2007).

2.3.2.2. Wang et al., 2005

Wang a kolektiv se vrátili k původnímu Src senzoru (Ting et al., 2001). Zachovali originální design, který byl schopen detekovat široký dynamický rozsah změn FRET, ale použili nedimerizující verze fluoroforů s mutací A206K a především nahradili stávající substrátový peptid vzešlý ze screenu peptidové knihovny. Testovali sérii peptidů pocházejících ze známých fosforylačních cílů Src (p130Cas, paxillin, Sin). Sensor nesoucí substrát derivovaný z p130Cas (WMEDYDYVHLQG) vykazoval více jak 30% – 40% změnu FRET a byl schopen vizualizovat vlnu aktivace Src po stimulaci HeLa buněk EGF propagující se od okraje buněk směrem k jádru. Indukovaná odpověď byla ve vysoké míře specifická vůči Src, jelikož jiné kinázy (FAK, Yes, Fyn, EGFP, ERK, Abl, Jak2) vyvolávaly jen malý pokles FRET (<2 %, u kinázy Fyn 10 %) (Wang et al., 2005).

Aby zvýšili koncentraci senzoru v oblasti cytoplazmatické membrány, tedy tam, kde dochází k aktivaci Src (Thomas and Brugge, 1997), připojili k reporteru 16 aminokyselin dlouhý N-koncový peptid kinázy Lyn obsahující myristoylační a palmitoylační místo. Membránově kotvený sensor jim umožnil sledovat chování Src při mechanické tenzi. Endoteliální buňky inkubovali s kuličkami pokrytými fibronectinem, na které pak aplikovali trakční sílu pomocí laser tweezers. Pozorovali okamžité zvýšení aktivity Src v místě pod tenzí a následnou pomalou vlnu Src aktivace propagovanou do vzdálenějších oblastí buňky v opačném směru než působící síla (Wang et al., 2005).

Připojení různých typů kotev umožnilo cílit Src senzor do specifických oblastí cytoplasmatické membrány. Peptid derivovaný od kinázy Lyn lokalizuje senzor do membránových raftů, kde po stimulaci HeLa buněk EGF detekovali spíše slabý a pomalý nárůst Src aktivity, jež byl závislý na integritě aktinového cytoskeletu. Senzor kotvený do membrány peptidem odvozeným od KRas lokalizoval mimo membránové rafty a v odpověď na EGF vykazoval větší a rychlejší změnu FRET dokumentující výrazný a rychlý nárůst Src aktivity, ke kterému docházelo pouze v případě intaktního mikrotubulárního cytoskeletu (Lu et al., 2008; Seong et al., 2009).

2.3.2.3. Ouyang et al., 2008

Upgrade senzoru publikovaném v roce 2005 (Wang et al., 2005) (verze bez A206K mutace fluoroforů a Lyn-derivovaného peptidu pro kotvení do membrány) spočíval ve výměně žlutého fluoroforu EYFP za YPet, který byl vyvinut coby optimální akceptor pro FRET měření (Nguyen and Daugherty, 2005). V *in vitro* kinázové esaji vykazoval nový reporter 5krát větší změnu FRET než původní verze (Ouyang et al., 2008). Vysoká účinnost FRET ECFP-YPet fluorescenčního páru je dána jejich vzájemnou schopností dimerizovat (Ohashi et al., 2007). Pokud je tato dimerizační tendence slabá a nebrání konformační změně spojené s vazbou SH2 domény na fosforylovaný substrát, může zvyšovat sensitivitu reporteru.

Cílení nového ECFP-YPet Src senzoru do cytoplasmatické membrány pomocí prenylační sekvence odvozené od KRas umožnilo vizualizovat aktivaci Src v endoteliálních buňkách stimulovaných vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), což s původním ECFP-EYFP reportérem nebylo možné (Ouyang et al., 2008).

Cytosolický ECFP-YPet Src senzor byl použit ke sledování velmi rychlých změn Src aktivity během mechanického stresu. Buňky hladké svaloviny byly inkubovány s magnetickými kuličkami pokrytými RGD peptidem (arginin-glycin-aspartát), substrátem integrinových receptorů. Síla vyvolaná magnetickým polem působícím na kuličky vedla k aktivaci Src detekované za méně než 0,3 s po stimulu. Na rozdíl od EGF-indukované aktivity Src, která je zaznamenatelná přibližně 12 s po přidání růstového faktoru a má zhruba uniformní distribuci v rámci buňky, je Src aktivovaný mechanickým stimulem lokalizován do konkrétních oblastí, které korelují s místy s výrazně deformovaným mikrotubulárním cytoskeletem (Na et al., 2008).

Src senzor spolu s analogicky konstruovaným reportérem aktivity kinázy FAK (Seong et al., 2011a) byl transfekován do lidských mesenchymálních kmenových buněk s cílem sledovat aktivitu obou kináz v procesu diferenciaci těchto buněk do osteoblastů. Měření v pěti časových intervalech po dobu 27 dní ukázala soustavný pokles Src aktivity během diferenciačního procesu a naopak nárůst FAK aktivity dosahující plato mezi 20. – 27. dnem (Liao et al., 2012).

Připojením FAT domény kinázy FAK na C-konec ECFP-YPet sensorů Src a FAK aktivity vznikly konstrukty lokalizující do fokálních adhezí (Wu et al., 2016), které byly použity ke studiu jejich dynamiky. Src a FAK jsou zásadní proteiny fokálních adhezí (Mitra et al., 2005; Playford and Schaller, 2004). Jsou zde aktivovány (Lietha et al., 2007), fosforylují tu množství substrátových proteinů, čímž vytváří vazebná místa pro další komponenty fokálních adhezí a ovlivňují tak jejich stabilitu (Webb et al., 2004). Wu a kolektiv ukázali, že aktivace Src a FAK silně koreluje se vznikem adheze. K nárůstu FAK aktivity docházelo s mírným zpožděním (v průměru 40 s) oproti aktivaci Src a vzniku adheze, jež probíhaly téměř současně. Tato prodleva rovněž předurčovala následný osud adheze. Čím později začala aktivace FAK, tím pravděpodobněji nedocházelo k růstu a maturaci adheze, ale naopak k jejímu zániku. Rozpadu maturovaných adhezí rovněž předcházela aktivace obou kináz, kdy v tomto případě aktivace FAK nastávala zhruba o 2 min dříve než aktivace Src následovaná zánikem adheze za dalších 2,5 min (Wu et al., 2016).

2.3.2.4. SCAGE senzor

Nejnovější substrátový senzor vychází z předešlého ECFP-YPet reporteru (Ouyang et al., 2008). Wang a kolektiv zachovali oba fluorofory a pomocí kvasinkového screenovacího systému (Cherf and Cochran, 2015) se snažili najít lepší substrátovou sekvenci a jemu odpovídající vysoce afinní SH2 doménu. Knihovnu mutovaných SH2 domén v cysteinu na pozici 185, jenž je esenciální pro vazbu fosforylovaného peptidu (Bradshaw et al., 1999), fúzovali s proteinem kvasinkové buněčné stěny α -aglutininem, což umožnilo vystavení testovaných domén na povrchu kvasinky a screenování vůči sérii fosfopeptidů. Nejlépe fungující se ukázala být kombinace C185A mutované SH2 domény a EIYEEF peptidu coby substrátu, která vykazovala dvojnásobně větší změnu FRET v porovnání s původním senzorem (Wang et al., 2018).

Nový senzor využili ke sledování dynamiky Src aktivace v jednovrstevném epitelu. V buňkách sousedících se sledovanou buňkou byla pomocí laserové ablace odstraněna aktinová stresová vlákna napojená na mezibuněčné spoje. V důsledku toho došlo ke ztrátě mezibuněčných kontaktů a retrakci sledované buňky doprovázené nárůstem Src aktivity s maximem do 5 minut a následným pozvolným poklesem aktivace kinázy. Pozorovaná přechodná aktivace Src nebyla závislá na aktomyosinové kontraktilitě, ale spíše na pasivní podpůrné strukturní funkci cytoskeletu (Wang et al., 2018).

2.3.3. Konformační senzory kináz rodiny Src

Konformační senzory Src jsou schopny rozlišit konformační stav kinázy buď na základě sledování celkového tvaru molekuly, nebo pomocí detekce určitých strukturních prvků typických pro danou konformaci. Díky striktní korelaci mezi strukturou Src a jeho

aktivitou, tyto senzory poskytují nejen informaci o konformačním stavu kinázy, ale rovněž reflektují míru její aktivace.

2.3.3.1. SFK merobody senzor

Základem merobody senzoru (Gulyani et al., 2011) je tzv. monobody, což je proteinová struktura, která je, stejně jako protilátka, schopna vázat různé cílové epitopy. Monobody je odvozeno od domény typu III lidského fibronectinu (FN3). Jedná se o malou 95-aminokyselinovou strukturu podobnou imunoglobulinu, která je tvořena sedmi antiparalelními β -řetězci (A,B,C,D,E,F,G) uspořádanými do β -sendviče a propojenými flexibilními smyčkami (BC, DE, FG na jedné straně proteinu a AB, CD, EF na druhé straně). Všechny smyčky, vyjma EF, mohou být randomizovány. Vznikne tím knihovna klonů, jež může být screenována na vysoko afinní vazbu na konkrétní protein, čímž dojde k vyselektování protilátce podobné struktury specifické vůči danému epitopu (Koide et al., 1998, 2002) (Obr. 9A).

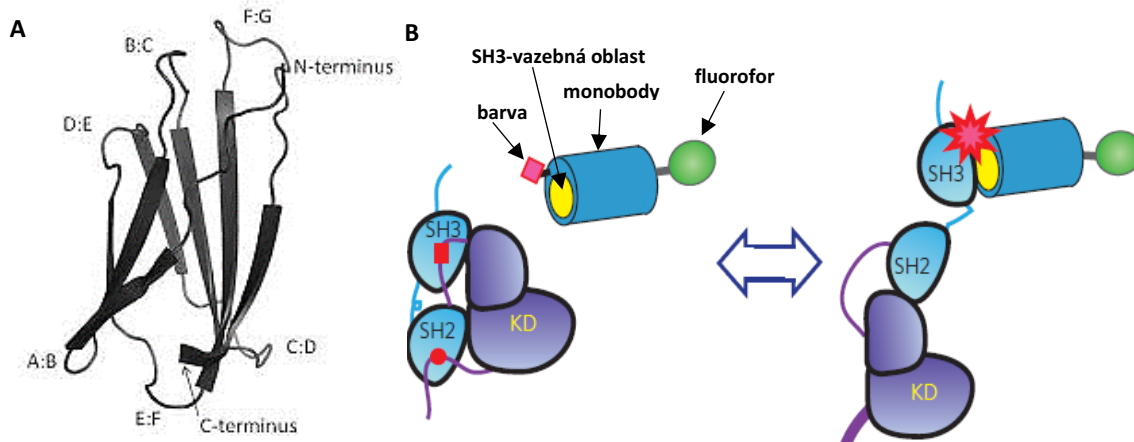
Monobody pro SFK senzor bylo vybráno z knihovny 2×10^9 klonů vzniklých mutováním BC a FG smyček (Karatan et al., 2004). Knihovna byla screenována metodou phage display na mutanty vázající SH3 doménu kinázy Src. Vyselektovaný klon 1F11 nese FG smyčku, jejíž sekvence (RPLPSKP) je vysoce podobná optimálnímu ligandu Src SH3 (RPLPPLP) (Sparks et al., 1994). Toto monobody specificky rozpoznává SH3 doménu c-Src a má jen velmi nízkou afinitu vůči SH3 doménám jiných kináz spadající do rodiny kinázy Src (Karatan et al., 2004).

Monobody 1F11 bylo získáno selekcí vůči samostatné SH3 doméně. Autoři senzoru tudíž předpokládali, že bude konformačně specifické, s afinitou pouze k Src v aktivním stavu, kdy kináza zaujímá otevřenou konformaci s více exponovanou SH3 doménou (Cowan-Jacob et al., 2005). Pull-down experimenty potvrdily, že 1F11 preferenčně váže aktivní formu Src a nezpůsobuje arteficiální aktivaci kinázy (Gulyani et al., 2011).

Na C-konec 1F11 monobody, velmi blízko SH3-vazebnému povrchu, kovalentně připojili barvu ze skupiny merocyaninů (mero53) (Toutchkine et al., 2003, 2007). Jedná se o fluorofory, jejichž kvantový výtěžek je závislý na polaritě okolního rozpouštědla. Navázání SH3 domény na monobody odstíní merocyanin od okolního vodného prostředí a vzniklé hydrofobní okolí tak indukuje nárůst intenzity fluorescence, která je detekována. N-konec 1F11 fúzovali s mCerulean fluoroforem, což zabránilo nežádoucí oligomerizaci senzoru a navíc fungovalo jako dodatečný marker pro ratiometric imaging (Gulyani et al., 2011) (Obr. 9B).

Vytvořený merobody senzor (mCerulean-1F11 monobody-mero53 konstrukt) mikroinjikovali do buněk a měřili poměr intenzit fluorescence merocyaninu a mCerulean. Aktivní Src detekovali v buněčných protruzích na okrajích adherovaných buněk či ve velkých cirkulárních protruzích na jejich dorzální straně. Aktivita Src dosahovala maxima 1

– 2 μm od okraje buňky a klesala směrem ke středu. V protruzivní fázi byla aktivita Src vyšší než během retrakce a pozitivně korelovala s rychlostí růstu výběžku (Gulyani et al., 2011).



Obr. 9: Struktura FN3 domény a model merobody senzoru. A) Struktura FN3 domény (PDB 1TTF) má tvar podobný imunoglobulinu. Je tvořena 7 antiparalelními β -řetězci uspořádanými do β -sendviče. Vyjma EF mohou být všechny smyčky, jež je propojují, randomizovány. B) Merobody sensor je tvořen FN3 doménou specificky rozpoznávající SH3 doménu Src. N-konec je fúzovaný s fluoroforem a na vazebný povrch je připojen merocyanin. Po vazbě na aktivovaný Src dojde k nárůstu fluorescence merocyaninu. Převzato a upraveno z (Gulyani et al., 2011; Jacobs and O'Neil, 2012).

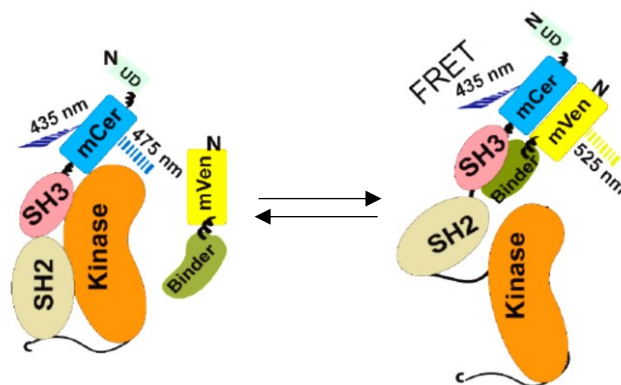
2.3.3.2. Fyn senzor

Nedávno publikovaný reporter aktivity SFK kinázy Fyn (Mukherjee et al., 2020), je založen na podobném principu jako merobody sensor využívajícím rozpoznání exponované SH3 domény specifický vazebným proteinem. V tomto případě screenovali vůči SH3 doméně knihovnu generovanou mutováním 10 aminokyselinových zbytků proteinu Sso7d hypertermofilní archae *Sulfolobus solfataricus*. Jedná se o malý DNA-vazebný protein (7 kDa, 63 aminokyselin) svou strukturou připomínající SH3 doménu, který je tvořen neúplným β -barelem z 5 β -řetězců a C-koncovým α -helixem. Jeho vysoká termostabilita umožňuje mutovat větší množství aminokyselinových zbytků, aniž by byla narušena struktura proteinu. Navíc není známa žádná interakce Sso7d se savčími proteiny, díky čemuž může sloužit jako inertní základ pro vytváření vazebných proteinů vůči různorodým cílům (Baumann et al., 1994; Gera et al., 2011).

Výsledkem screenu byl klon F29, který specificky vázal SH3 doménu kinázy Fyn a jen velmi málo či vůbec SH3 domény ostatních SFK. NMR spektroskopie ukázala, že F29 interaguje s ligand-vazebným povrchem SH3 domény a proto je schopen rozpoznávat aktivní konformaci kinázy Fyn. F29 protein fúzovali s myristoylační sekvencí lokalizující jej do cytoplasmatické membrány a mVenus coby akceptorovým fluoroforem FRET páru. Mezi unikátní doménu a SH3 doménu kinázy Fyn vložili donorový fluorofor mCerulean, čímž vytvořili dvoukomponentový biosenzor Fyn aktivity. Aktivace mCerulean značené kinázy vede k „otevření“ její struktury, uvolnění SH3 domény z intramolekulární inhibiční

interakce a umožní navázání F29-mVenus, čímž se oba fluorofory dostanou do těsné blízkosti a lze detekovat FRET (Mukherjee et al., 2020) (Obr. 10).

Transfekce Fyn senzoru do několika buněčných typů a následná mikroskopie byla schopna vizualizovat aktivaci kinázy. Fyn aktivace vykazuje polarizovaný charakter s kvadranty s vysokou či nízkou Fyn aktivitou. Velikost oblastí s vysokou Fyn aktivitou pulzuje v několikaminutových intervalech, přičemž nejvyšší aktivita je u okraje buňky a postupně klesá směrem do jejího středu. Tato místa mají rovněž sníženou motilitu membrány (Mukherjee et al., 2020).



Obr. 10: Model fungování Fyn senzoru. Senzor kinázové aktivity Fyn je dvoukomponentový systém tvořený kinázou Fyn s mCerulean fluoroforem vloženým mezi UD a SH3 doménu a vazebným proteinem fúzovaným s mVenus, jež je ukotven v membráně pomocí myristoylové kotvy. V inaktivním stavu kinázy Fyn (Fyn-mCerulean) nedochází k interakci těchto komponent. Aktivaci kinázy dojde k rozvolnění její struktury a zpřístupnění SH3 domény, jejíž ligand-interakční povrch je následně rozpoznán vazebným proteinem. mCerulean a mVenus fluorofory se dostanou do těsné blízkosti, což vede k nárůstu účinnosti FRET. Převzato a upraveno z (Mukherjee et al., 2020).

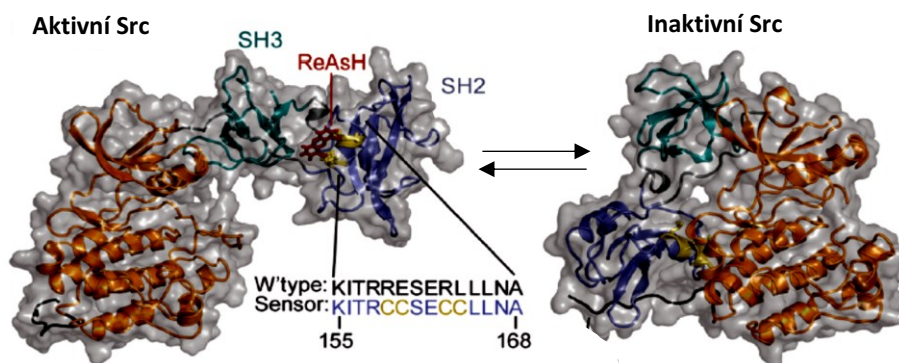
2.3.3.3. Tetracysteinový Src senzor

Tetracysteinový senzor (Irtegun et al., 2014) využívá schopnosti tetracysteinového motivu CCXXCC vázat s vysokou afinitou biarsenické fluorofory (R1AsH, ReAsH). Tyto molekuly mohou procházet buněčnou membránou, díky čemuž je lze využít pro barvení živých buněk. Pokud neinteragují s tetracysteinovým motivem, neemitují žádnou fluorescenci (Griffin et al., 1998). Záměnou čtyř aminokyselinových zbytků (R159, E160, R163, L164) vznikl ve struktuře lidského c-Src tetracysteinový motiv nacházející se na povrchu SH2 domény v oblasti asociující s C-koncovým lalokem kinázové domény. Po aktivaci kinázy dojde k uvolnění SH2 domény z intramolekulárních inhibičních interakcí, čímž se tetracysteinový motiv stane přístupným pro navázání fluoroforu a lze detekovat fluorescenci (Irtegun et al., 2014) (Obr. 11).

Aby otestovali, zda je vazba biarsenické barvy konformačně specifická, připravili 3 konstrukty tetracystein-modifikovaného Src (SrcXTC) fúzovaného s EGFP jež transfekovali do buněk: wt SrcXTC, SrcXTC Y530F s otevřenou konformací a SrcXTC EEI, který díky mutacím C-terminu zvyšujícím jeho afinitu vůči SH2 zaujímá zavřenou konformaci (Irtegun

et al., 2013). Po přidání biarsenické barvy dosahovala intenzita fluorescence otevřeného SrcXTC Y530F 80 % intenzity pozitivní kontroly (Src-EGFP s volně přístupným tetracysteinovým motivem na EGFP). Emise zavřeného SrcXTC EEI byla podobná negativní kontrole (Src-EGFP bez tetracysteinového motivu). Fluorescence detekovaná u wt SrcXTC byla mezi těmito dvěma stavy (Irtegun et al., 2014), paradoxně o něco blíže otevřené formě SrcXTC Y530F než by se, dle dosavadních poznatků dokládajících spíše inhibovaný stav Src (Cooper et al., 1986), předpokládalo. Testování míry fosforylace STAT3 ukázalo, že vložení tetracysteinového motivu vedlo ke zvýšení bazální aktivity Src. SH2 doména vykazovala trojnásobně nižší schopnost vázat fosforylovaný Y530 na C-terminu (Irtegun et al., 2014). K destabilizaci inaktivní konformace mohlo dojít v důsledku vložení cysteinů do oblasti SH2 domény, která se účastní interakce s C-koncovým lalokem kinázové domény.

Ačkoli posun SrcXTC k více otevřené konformaci limituje jeho použití ke zkoumání fyziologie aktivace Src v buňkách, zároveň rozšiřuje jeho dynamický rozsah, pokud je cílem detekovat zavírání struktury Src. Irtegun a kolektiv se rozhodli použít SrcXTC senzor ke screenování látek způsobujících zavírání Src a stabilizaci jeho inaktivního stavu s cílem ukázat, že senzor lze použít k hledání a testování případných inhibitorů Src. Aby doložili validitu tohoto konceptu, prověřili 72 známých inhibitorů různých kináz. Identifikovali 6 molekul indukujících více zavřenou konformaci Src, z nichž dvě (PP1, PP2) jsou známé inhibitory Src a u dalších tří bylo dokumentováno, že inhibují Src, přestože cílí na jiné kinázy (Irtegun et al., 2014).



Obr. 11: Model tetracysteinového senzoru. Sérií několika mutací byl na povrchu SH2 domény vytvořen tetracysteinový motiv, jehož lokalizace je zachycena na struktuře otevřeného a zavřeného Src. V inaktivním stavu kinázy jsou cysteinové zbytky ukryty uvnitř kompaktní struktury Src. V aktivní konformaci, kde SH2 doména neasociuje s C-koncovým segmentem je tetracysteinový motiv přístupný navázání barvy ReAsH, která pak vlivem této interakce začne emitovat fluorescenci. Převzato a upraveno z (Irtegun et al., 2014).

2.3.3.4. Lck senzor

Lck senzor (Paster et al., 2009) je založen na intramolekulárním FRET mezi dvěma fluorofory vloženými do struktury kinázy. Stejně jako předešlé konformační senzory využívá striktní korelace mezi konformační kompaktností SFK a jejich kinázovou aktivitou. Lck senzor je tvořen kompletní molekulou kinázy, na jejímž úplném C-konci je akceptorový

fluorofor EYFP. Pro vložení donorového fluoroforu ECFP testovali několik pozic (mezi unikátní a SH3 doménu, mezi SH3 a SH2, mezi SH2 a katalytickou doménu), z nichž nejlepší se ukázala být inserce do linkeru spojujícího SH3 a SH2 domény. Pokud Lck zaujímá kompaktní inaktivní konformaci, nacházejí se oba fluorofory blízko u sebe a lze předpokládat vysokou účinnost FRET. Aktivaci kinázy doprovází rozrušení inhibičních intramolekulárních vazeb a rozvolnění struktury, což vede k oddálení fluoroforů a pokles FRET.

Senzor tranzientně exprimovaný v Jurkat T lymfocytech vykazoval 19% účinnost FRET oproti 25% účinnosti u pozitivní kontroly (ECFP a EYFP spojené krátkým linkerem). Indukce otevřené aktivní konformace pomocí mutace C-koncového tyrosinu (Y505F) Lck senzoru vedla ke snížení FRET na 15 %. Záměna autofosforylačního tyrosinu 394 katalytické smyčky za fenylalanin způsobující snížení kinázové aktivity Lck (D'Oro et al., 1996) se projevila nárůstem účinnosti FRET (22 %) dokumentující více kompaktní konformaci v porovnání s nemutovaným senzorem. Obdobný efekt mělo i nahrazení C-konce (Y505QPQ) za Y505EEI motiv s vyšší afinitou vůči SH2 doméně (Paster et al., 2009).

Kináza Lck je nezbytná pro správný vývoj a aktivaci T lymfocytů (Molina et al., 1992). Je zodpovědná za zprostředkování buněčné odpovědi po stimulaci receptoru T buněk (TCR), kde jednou z prvních detekovatelných událostí je fosforylace tyrosinových imunoreceptorových aktivačních motivů (ITAMs) na CD3 asociovaným s TCR, což iniciuje zpuštění množství signálních kaskád vedoucích k aktivaci T buněk a jejich proliferaci (Lin and Weiss, 2001). Procesy předcházející fosforylaci ITAMs nejsou zcela objasněné, včetně toho, jestli se Lck aktivuje přímo v důsledku stimulace TCR a následně fosforyluje ITAMs nebo zda k této fosforylaci dochází jiným mechanismem (např. relokací již aktivních Lck kináz) (Nika et al., 2010). Měření aktivace Lck v stimulovaných Jurkat T buňkách pomocí FRET senzoru metodou sensitized emission nebyla schopna detekovat žádný nárůst aktivity Lck (Paster et al., 2009). Nový přístup využívající stejný senzor, ale místo sensitized emission, která reflektuje pouze střední hodnotu fluorescence, byla použita FLIM mikroskopie. Měřenou kinetiku dohasínání fluorescence donoru autoři fitovali jako 3exponenciální pokles charakterizovaný třemi časy dohasínání (τ_1 , τ_2 , τ_3). K analýze FRET byl použit čas τ_3 , představující pouze 25 % signálu, jeho měřením detekovali pokles FRET a tudíž aktivaci Lck indukovanou stimulací TCR (Stirnweiss et al., 2013).

3. PUBLIKACE

Koudelková, L., Pataki, A.C., Tolde, O., Pavlik, V., Nobis, M., Gemperle, J., Anderson, K., Brábek, J., and Rosel, D. (2019). Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions. *Cell Chem. Biol.* 26, 255-268.e4.

Koudelková L., Brůhová Z., Sztacho M., Pavlík V., Gemperle J., Brábek J., Rösel D. Phosphorylation of tyrosine 90 within Src SH3 domain represents a new regulatory switch controlling Src kinase activity. (draft připravované publikace)

Novel FRET-based Src biosensor reveals mechanisms of Src activation and its dynamics in focal adhesions

Lenka Koudelkova¹⁺, Andreea Csilla Pataki¹⁺, Ondřej Tolde¹, Vojtech Pavlik^{1,2}, Max Nobis³, Jakub Gemperle¹, Kurt Anderson^{3,4}, Jan Brábek¹, Daniel Rosel^{1*}

¹ Charles University, Faculty of Science - BIOCEV, Department of Cell Biology, Vestec 252 50, Czech Republic

² Current address: Contipro, Dolní Dobrouč 561 02, Czech Republic

³ Cancer Research UK, Beatson Institute, Glasgow G611BD, Scotland

⁴ Current address: The Francis Crick Institute, London NW11AT, UK

+ Contributed equally to this work

*Correspondence: rosel@natur.cuni.cz

SUMMARY

Src kinase plays an important role in a multitude of fundamental cellular processes, and is often found deregulated in tumors. Active Src adopts an open conformation whereas inactive Src is characterized by very compact structure stabilized by inhibitory intramolecular interactions. Taking advantage of this spatial regulation, we constructed a FRET-based Src biosensor and analyzed conformational changes of Src following Src activation and the spatio-temporal dynamics of Src activity in cells. We found that activatory mutations either in regulatory or kinase domains induce opening of Src structure. Surprisingly we discovered that Src inhibitors differ in their effect on the Src structure, some counterintuitively inducing opened conformation. Finally, we analyzed the dynamics of Src activity in focal adhesions by FRET imaging and found that Src is rapidly activated during focal adhesions assembly, its activity remains steady and high throughout the focal adhesions life cycle and decreases during focal adhesions disassembly.

KEYWORDS

Src, biosensor, FRET, structure, inhibitors, focal adhesions

INTRODUCTION

The product of the *c-src* proto-oncogene, Src kinase, is the founding member of the Src family nonreceptor tyrosine kinases. Src plays crucial roles in migration, mechanosensing, mitogenic and anti-apoptotic signaling, thus precise control of Src activation is necessary to avoid tumor transformation (Yeatman, 2004; Frame et al., 2002; Playford and Schaller, 2004). Despite the mechanisms of negative control, enhanced expression and/or activation of Src is commonly observed in various tumors (e.g. colon carcinomas, breast carcinomas, pancreatic carcinomas) (Irby and Yeatman, 2000; Giaccone and Zucali, 2008). Under the circumstances of elevated or aberrant Src kinase activity, numerous Src substrates become phosphorylated. These Src phosphorylated substrates have been implicated in induction of tumorigenesis and development of malignant cell phenotype (Yeatman, 2004; Frame et al., 2002; Playford and Schaller, 2004). Even though the vast number of Src kinase substrates have been already identified, the exact mechanism of Src-mediated transformation has not been decidedly elucidated.

Seven functionally and structurally important regions can be described in Src. From N-terminus it is the SH4 domain, unique domain, SH3 domain, SH2 domain, CD linker, catalytic domain and C-terminal tail containing a key regulatory residue Y527 (chicken Src numbering). SH3 and SH2 domains serve not only for binding of signaling partners (e.g. p130Cas, FAK, paxillin, STAT3), but they also play an important role in downregulating Src kinase activity (Superti-Furga et al., 1993). Structural studies have shown that active Src adopts an open conformation whereas inactive Src is characterized by very compact structure, with the SH3 and SH2 domains turned inwards, and packed against the catalytic domain on the side opposite to the catalytic cleft (Xu et al., 1997). The compact and inactive conformation of Src is maintained by three main intramolecular interactions: i) SH2 domain binding of phosphorylated Y527, ii) binding of SH3 domain to a part of the CD linker, iii) binding of SH3 domain to the N-terminal lobe of the catalytic domain (Brabek et al., 2002; Cooper et al., 1986; Xu et al., 1999; Brabek et al., 2002; Cooper et al., 1986; Xu et al., 1997). The release of the intramolecular regulatory interaction of SH2 domain with phosphorylated Y527 leads to the opening of Src structure and the kinase domain adopts an active conformation (Cowan-Jacob et al., 2005). The mechanism of SH3 domain-mediated negative regulatory interactions and especially their effect on Src structure remains less understood.

The current model for Src regulation proposes a correlation between structural condensation of the protein backbone and catalytic activity (Cowan-Jacob et al., 2005). Upon external stimuli or mutagenesis, intramolecular regulatory interactions are disturbed, the conformation loosens and Src kinase domain becomes activated. Taking advantage of these conformational changes, we constructed a genetically encoded intramolecular

FRET-based Src biosensor and analyzed conformational changes of Src following Src activation induced by Src mutagenesis or upon external chemical or mechanical stimulation of cells. Using FRET imaging we further analyzed the spatio-temporal dynamics of Src activation in focal adhesions.

RESULTS

Design and construction of Src-FRET biosensor

According to known structures of active and inactive Src, the greatest spatial distance between any two parts of Src molecule after its activation is the distance between C-terminus and SH2 domain (Cowan-Jacob et al., 2005, Fig. 1 A, B). We thus decided to insert the FRET pair of fluorescence proteins in this area of Src. The donor fluorophore was inserted in the loop between β D and β E strands of SH2 domain (Xu et al., 1997). This loop is oriented outwards of the compact structure of Src and is on the opposite side to the SH2 ligand binding site. To minimize potential disrupting effect of the fluorescence protein insertion on the SH2 domain fold, two highly flexible linker peptides (8, 11 amino acids) were added to the donor fluorescence protein inserted to SH2 domain. The acceptor fluorescence protein was inserted at the very C-terminus of Src molecule (7 amino acids long linker peptide). To minimize dimerization artifacts, monomeric versions of fluorescent proteins mCFP and mCitrine (mCit) were chosen as donor and acceptor fluorophores, respectively.

Given to the proposed design, the following constructs were prepared: the full-length chicken *c-src* gene with mCFP inserted into the SH2 domain (Src-CFP), chicken *c-src* with mCit linked to the C-terminus of Src (Src-YFP), complete biosensor construct with both mCFP and mCit inserted (Src-FRET), complete biosensor construct where Src kinase was activated by mutation of Tyr527 to Phe (Y527F, Src-FRET527F) and positive control construct (PC; no Src, only mCFP and mCit connected by short linker for maximum FRET) (Fig. 1C). The constructs were expressed in HEK cells and the relative levels of an activatory phosphorylation of Tyr416 within the activation loop were determined (Boerner et al., 1996). Immunoblot analysis indicated that none of the constructs with WT-Src showed any significant difference ($p > 0.45$) in relative phosphorylation of Tyr416, which suggests that the insertion of the fluorophores has no effect on basal activity of Src kinase (Fig. 2A). In contrast, the biosensor construct with activated Src exhibits a significant increase (approximately 2-fold) of relative Tyr416 phosphorylation, confirming its activated status. In the prepared biosensor variants, the FRET between the incorporated fluorophores was measured with a FRET steady-state approach (Fig. 2B). Fluorescence spectra were recorded in fresh cell lysates at an excitation wavelength of 433 nm, which excites the mCFP donor,

and FRET ratio was calculated as ratio of fluorescence intensity at 480 nm (mCFP emission peak) and 525 nm (mCit emission peak). FRET ratio of Src-FRET construct in average reached approximately 73% of the maximum FRET within the theoretical range, given by the difference in FRET ratio between the positive control and Src-CFP, and was significantly ($p < 0.0001$) different from FRET ratio of Src-FRET527F reaching approximately 33% of the maximum FRET. This shows that the dynamic range of the Src-FRET biosensor is at least 40% of the theoretical dynamic range for the FRET of the mCFP and mCit pair, indicating that Src-FRET biosensor can effectively monitor structural changes following Src activation. Importantly, the fluorescence spectra from cells transfected simultaneously by Src-CFP and Src-YFP constructs closely resemble spectra from cells transfected by Src-CFP only, confirming that the FRET observed in Src-FRET and Src-FRET527 is a result of an intramolecular FRET (Fig. 2B).

Src-FRET biosensor is responsive to interaction-based activation

The inactive structure of Src is maintained by intramolecular interactions mediated by SH2 and SH3 domains (Xu et al., 1997; Xu et al., 1999). It was previously shown that cooperative binding of peptides derived from Src interactor Sin to Src SH2 and SH3 domains can activate Src (Alexandropoulos and Baltimore, 1996). The Src-FRET biosensor represents an excellent tool to test the effect of peptides competing with intramolecular binding sequences on compactness of Src structure. We thus analyzed the effect of purified variants of Sin-derived peptides on FRET of the Src-FRET biosensor *in-vitro*. In agreement with the study of Alexandropoulos and Baltimore, our results showed that Sin peptide carrying both SH2 and SH3 binding sites (SinWT) effectively promotes the decrease in FRET ratio of the Src biosensor, whereas the Sin peptides mutated either in SH2 (SinY), SH3 (SinR) or both SH2 and SH3 binding sites (SinRY), have no effect (Fig. 2 C, D).

The effect of Src mutations on compactness of Src structure

Large number of mutations activating the oncogenic potential of Src were described throughout the history of Src proto-oncogene analysis, however, the effect of many of these mutation on the overall structure/compactness of Src is not known. This is especially true for mutations affecting SH3-mediated intramolecular interactions. To this end, we introduced several mutations known to affect Src activity into the biosensor and analyzed their effect on FRET and kinase activity. We prepared 3 biosensor variants carrying activatory mutations affecting the SH3-mediated regulation of Src: i) Src-FRET-RT biosensor with mutation in RT loop of SH3 domain inhibiting its interaction with kinase domain (Thr96/Ile + Arg95/Trp, (Miyazaki et al., 1999)); ii) Src-FRET-nSrc with mutation in n-Src loop of SH3 domain inhibiting its interaction with kinase domain (Asp117/Asn, (Miyazaki et al.,

1999)); iii) Src-FRET-CD with mutation in the CD linker inhibiting its binding to SH3 domain (Pro250/Gly, Lys249/Asp, (Gonfloni et al., 1997)). In addition, we prepared a biosensor variant Src-FRET-CA carrying mutation within the kinase domain (Glu381(376)/Gly) shown to constitutively activate Src, though the mechanism of the activation is unknown (Bjorge et al., 1995), and two double mutant variants combining the activatory Tyr527 to Phe mutation uncoupling the SH2-mediated regulations with either RT loop or CD linker mutations (Src-FRET-FRT and Src-FRET-FCD, respectively).

The mutated variants of the biosensor were transiently expressed in U2OS cells and the effect of the mutations on FRET and Src kinase activity was analyzed. All mutated variants have shown significantly lower FRET ($p < 0.001$) than the non-mutated biosensor (Fig. 3A, B). When compared to FRET ratio of the SH2-activated Src-FRET527F, the biosensors show 4 different levels of FRET. First, there is a group not significantly different ($p > 0.323$) from Src-FRET527F which includes Src-FRET527F itself and Src-FRET-CD variants. The Src-FRET-CA and the double mutated Src-FRET-FRT and Src-FRET-FCD variants form a group of biosensors with FRET significantly lower ($p < 0.004$) than Src-FRET527F. The biosensor variants with activating mutations directly within SH3 domain exhibit intermediate level of FRET decrease. The Src-FRET-RT exhibits FRET levels close, but significantly higher ($p < 0.001$), than that of Src-FRET527F group. The mutations within nSrc-loop, the Src-FRET-nSrc variant, has the lowest effect on compactness of Src structure as its FRET is significantly higher than even of the Src-FRET-RT ($p < 0.001$). In addition to FRET, the effect of the mutations on Src kinase activity was evaluated using a kinetic kinase assay. The sensitivity of the assay was not sufficient to confirm the 4 different levels of the Src activity, as indicated by the FRET analysis. When compared to kinase activity of Src-FRET527F, only Src-FRET-CA has shown significantly higher kinase activity ($p = 0.009$) and Src-FRET-WT together with Src-FRET-nSrc exhibited significantly lower kinase activity ($p < 0.001$ and $p = 0.013$, respectively). The kinase activities of individual Src-FRET variants, however, exhibited, in an inverse manner, similar trends as the FRET (Fig. 3C, Supp. Fig. 1). This could be in part because the variants with higher activity were in average expressed less than Src-FRET-WT and thus could be masked by the residual activity of endogenous Src family kinases in the cell lysates.

Taken together, these data show that the biosensor can effectively monitor even small changes in activity of Src and that mutations affecting SH3-mediated intramolecular interactions of Src also result in the opening of Src structure.

Src-FRET biosensor is functionally equivalent to Src

The initial testing of the biosensor has shown that the biosensor expressed in HEK and U2OS cells can monitor structural changes of Src following activation via mutation of regulatory Y527 or using a SH2-SH3 competing peptide. HEK and U2OS cells express low but not

negligible amount of endogenous Src and thus are not optimal for testing functional relevance of the biosensor for Src signaling. Therefore, we stably expressed the Src-FRET biosensor in SYF fibroblasts (nulls for Src-family kinases, Src, Yes and Fyn (Klinghoffer et al., 1999)) and analyzed the effect of Src-FRET biosensor activation on phosphorylation of Src substrates p130Cas and paxillin. The phosphorylation of both p130Cas and paxillin was virtually absent in untransfected SYFs. In contrast, expression of Src-FRET biosensor in SYFs resulted in substantial phosphorylation of both p130Cas and paxillin. This phosphorylation was significantly increased upon stimulation of the cells with EGF or LPA and, conversely, inhibited when treated with Src kinase inhibitor dasatinib (Fig. 4A). These results indicate that Src-FRET biosensor effectively phosphorylates known Src substrates and responds both to physiological signals activating Src and to inhibition by Src inhibitor.

Src activation dynamics upon mechanical stimulation

P130Cas, an adaptor protein and Src substrate, was shown to function as a mechanosensor. Its substrate domain can be mechanically stretched, and this exposes tyrosine residues within the domain for Src-mediated phosphorylation (Janostiak et al., 2014b; Sawada et al., 2006). Interestingly, static mechanical stretch of cells induces bi-phasic tyrosine phosphorylation of p130Cas with maximum at 15 and 45 minutes after the stretch (Branis et al., 2017; Janostiak et al., 2014a). However, the role of Src in tension-mediated phosphorylation was not clearly addressed. We stretched SYFs expressing Src-FRET biosensor and analyzed Src activity in the cells by monitoring the total level of FRET and phosphorylation of p130Cas. We found that FRET of the biosensor is significantly decreased 15 minutes and 45 minutes after the stretch (Fig. 4B, C). The dynamics of Src activation upon static stretch thus reflects the bi-phasic dynamics of p130Cas phosphorylation and shows that mechanical stimulation of cells activates Src.

The effect of inhibitors on Src structure

Having established that the Src-FRET biosensor functions effectively as Src in cells and responds to mechanical stimuli, we then examined the effect of LPA, EGF and compounds known to inhibit Src on FRET ratio of the Src-FRET biosensor in cells. The treatment of SYFs expressing the Src-FRET biosensor with both EGF and LPA resulted in significant decrease of FRET ratio, indicating and confirming activation of the biosensor in the cells upon EGF and LPA treatments (Fig. 5 A, B; compare with Fig. 4A). Surprisingly, treatment with dasatinib induced significant decrease of FRET indicating open conformation of Src, despite inactivating Src kinase activity (Fig. 5, Supp. Fig. 2). It was previously shown for Hck and Src kinases that binding of specific ligands targeting ATP-binding pocket results in increased accessibility of SH2 and SH3 domains to intermolecular binding which could be responsible

for the observed dasatinib-induced opening of Src structure (Leonard et al., 2014). Therefore, we decided to analyze a panel of Src inhibitors for the effect on compactness of Src-FRET biosensor. All kinase inhibitors tested effectively inhibited the Src kinase as monitored by decreased phosphorylation of Src substrate p130Cas and decreased phosphorylation of Src in activation loop on Tyr416. Along with dasatinib, bosutinib and UM-164 also significantly lowered ($p < 0.05$) the FRET ratio of the biosensor. In contrast, treatment of the cells with saracatinib and SKI-1 had no effect on FRET (Fig. 5 C, D). We also tested the effect of Sodium Orthovanadate, which inhibits Src kinase activity by preventing P-Tyr527 dephosphorylation (Ryder and Gordon, 1987), and found that it significantly increases the FRET ratio of the biosensor (Fig. 5 C, D). This is consistent with the increased Tyr527 phosphorylation and subsequent induction of closed conformation of Src.

When analyzing the effect of inhibitors on the FRET ratio of the Src-FRET biosensor we noticed a substantial difference in pattern of Src-FRET biosensor localization in the cells. Strikingly, the inhibitors which induced opened conformation of the Src-FRET biosensor (dasatinib, UM-164, bosutinib) showed high enrichment in focal adhesions resembling the localization of the 527F activated Src (Fig. 6, (Fincham and Frame, 1998)). In contrast, treatment of cells with inhibitors not affecting the FRET ratio of the Src-FRET biosensor (SKI-1, saracatinib) and with Sodium Orthovanadate did not visibly changed the localization pattern of the Src-FRET biosensor, which remained mostly cytoplasmic.

Taken together the inhibitors analyzed exhibited two distinct phenotypes of action on Src. The first group represented by dasatinib, bosutinib and UM-164 induces opened conformation of Src and enrichment of the Src-FRET biosensor in focal adhesions, whereas saracatinib and SKI-1 do not affect Src conformation and localization. Our results further indicate that opened conformation of Src and not its kinase activity is required for its targeting to focal adhesions.

Analysis of Src activation using FRET imaging

The new Src-FRET biosensor proved its potential in analyzing Src activity upon Src mutagenesis and activation/inhibition of the cells by chemical and mechanical cues. Because of its design it can provide not only information about Src activity but also about Src intracellular localization dynamics. Therefore, we next focused on monitoring Src activation dynamics in cells. To overcome the higher demand for the donor fluorophore stability and brightness in long-term life imaging experiments we replaced mCFP in the Src-FRET construct for mTurquoise2 (Goedhart et al., 2012). When expressed in cells, the resulting Src-FRET(T) construct monitored Src activation status after the treatment with LPA or EGF in a similar manner as its mCFP counterpart, though when compared to maximum FRET of positive control (mTurquoise2-mCit), its dynamic range was somehow smaller than

of the mCFP variant of the biosensor (Supp. Fig. 3). The Src-FRET(T) biosensor exhibited, however, much brighter and stable donor fluorescence effectively enabling us to monitor dynamics of Src activation status in live cells.

To analyze the dynamics of Src activation in focal adhesions, U2OS cells were transiently co-transfected with the Src-FRET(T) biosensor and mCherry-FAT (focal adhesion targeting domain of FAK) or mCherry-vinculin constructs. The cells were seeded onto fibronectin-coated cover glass to allow cell adhesion, and FRET and mCherry signals were analyzed live by TIRF microscopy during later stages of cell spreading. The focal adhesions were detected using the mCherry signal of the mCherry-FAT or mCherry-vinculin fusion constructs. The cell body was detected as the mCit signal of the Src-FRET(T) biosensor. The FRET was analyzed by sensitized emission approach and quantified as nF/I_{CFP} according to (Xia and Liu, 2001). In average we found that FRET in focal adhesions is about 20% lower than in surrounding cytoplasm showing highly significant ($p < 2 \times 10^{-26}$) and localized activation of Src in focal adhesions (Fig. 7 D). In fact, in the cell area illuminated by the TIRF evanescent field, the active Src conformation was detected almost exclusively in focal adhesions (Supp. Video 1). Analysis of Src activation dynamics revealed that, during the initial phase of focal adhesion formation, characterized by increasing intensity signal of mCherry-FAT or mCherry-vinculin, the FRET is high at the beginning but decreases progressively reaching its minimal values mostly before the mCherry signal reaches its maximum intensity (Fig. 7, Supp. Fig. 4). The FRET remains low throughout the mature stage of focal adhesion, characterized by stable intensity of the mCherry signal, and gradually increases during focal adhesion disassembly (Fig. 7 B, C).

Even though, Src is locally activated in focal adhesions we did not observe any enrichment of Src, detected as mCit signal, in any stage of focal adhesion life cycle (Fig. 7 B, C). This indicates high dynamics of Src in focal adhesions. FRAP analysis revealed that Src-FRET(T) biosensor dynamics in focal adhesions is indeed very high with average half-time recovery 0.90 ± 0.57 s (Supp. Fig. 5). This is well in agreement with single-molecule analyses showing 1 s residency time of Src in focal adhesions (Machiyama et al., 2015).

DISCUSSION

Understanding the precise regulation of Src in living cells is the key to understanding Src-dependent signal transduction and to development of effective therapeutic approaches targeting Src. Aberrant Src activation leads to weakening of cell-cell and cell-matrix contacts, increased expression of matrix metalloproteinases, cytoskeleton remodeling and elevated adhesion turnover resulting in enhanced cell motility (Mitra and Schlaepfer, 2006; Guarino, 2010). Even though the role of Src kinase in cellular locomotion has been broadly

documented, the exact mechanism and spatio-temporal dynamics of Src activation within invasive and adhesive structures has not been sufficiently elucidated.

To monitor Src activity in cells, several attempts were already made, including FRET based substrate biosensors (Ting et al., 2001; Wang et al., 2005), biosensor based on a monobody targeting the SH3 domain of Src (Gulyani et al., 2011) or biarsenical dyes staining of tetracysteine motif introduced into SH2 domain (Irtegun et al., 2014). All approaches provided valuable information about Src activity in the cells. However, and unlike our biosensor, they don't provide combined information about the activity and intracellular localization of diverse subpopulations of Src molecules at one time. An approach similar to ours was adopted to monitor the activation of Src family kinase Lck (Paster et al., 2009; Stirnweiss et al., 2013). The authors designed a FRET biosensor consisting of full backbone of Lck with enhanced yellow fluorescent protein inserted at the very C-terminus and enhanced cyan fluorescent protein inserted either between SH3 and SH2 domains (Paster et al., 2009) or between the unique and SH3 domain (Stirnweiss et al., 2013). Our Src-FRET biosensor uses the same insertion site for the acceptor fluorophore (the very C-terminus of Src) but differs in insertion site of donor fluorophore. Insertion into the linker between SH3 and SH2 domains could not be used for Src, since the linker is critical to couple communication between SH3 and SH2 domains and mutation of this linker leads to activation of Src (Young et al., 2001). Insertion between SH3 and unique domain is in our opinion less optimal than our solution, as it is sterically more distant from the C-terminus than our insertion into the SH2 domain, and would lead to less efficient FRET. In agreement with these assumptions, in the *in-vitro* steady-state FRET measurements (ratio of relative FRET and CFP fluorescence) our biosensor exhibits higher dynamic range than that of Lck (Stirnweiss et al., 2013).

New insights in Src regulation: correlation between mutations and compactness of Src structure, the role of SH3 domain in regulation of Src

Throughout the 40 years history of studying Src kinase, many mutations activating Src were described. The crystallographic data have come with clear evidence that mutations affecting SH2-mediated intramolecular interactions lead to the opening of Src structure (Cowan-Jacob et al., 2005). However, there was no clear evidence on the effect of SH3-mediated intramolecular interactions or activatory mutations in the kinase domain on Src structure. Our data show that mutations inhibiting SH3-CD linker interaction leads to the opening of the Src structure to a similar extent as the Tyr527 to Phe mutation uncoupling the SH2-mediated regulation. Mutations affecting the interaction of SH3 domain with N-terminal lobe of kinase domain also effectively induced opening of Src structure but to a lesser extent. Importantly, the effect of the mutations inhibiting the SH2- and SH3-mediated intramolecular interactions is additive, indicating high degree of

independency of these negative intramolecular interactions in regulation of Src kinase. Surprisingly the activatory mutation within the kinase domain Glu381(376)/Gly opens the Src structure to a level similar of the analyzed double mutants. The Glu381(376) is located at the C-terminus of α E helix in the C-lobe of kinase domain and is in no contact with either SH2 or SH3 domain in closed inactive conformation of Src (Xu et al., 1997). Therefore, the effect of Glu381(376)/Gly substitution on opening of the Src structure is indirect. To conclude, the data suggest that activated conformation of the kinase domain negatively affects intramolecular SH2- and SH3-binding to kinase domain and forces the opened conformation of Src.

Differential effect of Src inhibitors on Src structure

Src kinase inhibition has long been an important target for cancer therapy (Rosel et al., 2013). The known small-molecule Src kinase inhibitors are ATP competitive inhibitors and according to their binding mode are generally classified as type I or type II inhibitors; type I bind active and type II bind inactive kinase (Dar and Shokat, 2011). The classification of the inhibitors relies mostly on the position of conserved DFG motif at the beginning of activation segment. “DFG-in” position, specific for type I inhibitors, represents an active state of the kinase with aspartate of the DFG motif oriented inward toward the active site. When this aspartate is directed out-ward (DFG-out, type II inhibitors) the phenylalanine of DFG is directed into the active site and the kinase is in inactive conformation (Roskoski, Jr., 2016). Besides the position of the DFG, α C helix orientation is also associated with active (α C-in) and inactive (α C-out) state of the kinase (Leonard et al., 2014).

The inhibitors analyzed exhibited two distinct phenotypes of action on Src. The first group represented by dasatinib, bosutinib and UM-164 induced opened conformation of Src and enrichment of the Src-FRET biosensor in focal adhesions. This phenotype closely resembled the phenotype 527F activated Src, indicating that the phenotype is associated with active rather than inactive conformation of Src. The second group represented by saracatinib and SKI-1 had no effect on either compactness of Src structure or Src-FRET biosensor localization to focal adhesions. Dasatinib and bosutinib represent type I Src inhibitors binding Src in DFG-in, α C-in conformation (Leonard et al., 2014; Roskoski, Jr., 2016; Tong et al., 2017). UM-164 (DAS-DFGO2) and saracatinib are type II inhibitors (DFG-out) which differ in their effect on α C-helix position, UM-164 binding Src with α C-in and saracatinib with α C-out conformation (Roskoski, Jr., 2016; Tong et al., 2017). For SKI-1 we could not ascertain its binding mode to Src in the literature. The common denominator of the effect of all three inhibitors promoting the opened structure of Src is induction of α C-in conformation. Similarly, it was shown that inhibitors stabilizing α C-in active conformation of kinase domain greatly increase accessibility of Src SH3 domain for intramolecular interactions, indicating a potential opening of Src structure (Leonard et al., 2014).

Within the kinase inhibitors tested dasatinib, UM-164, bosutinib and SKI-1 significantly reduced phosphorylation of the regulatory Tyr527, indicating that they either directly or indirectly inhibit Csk kinase, the master regulator of Src (Barkho et al., 2013; Karaman et al., 2008). The dephosphorylation of Tyr527 releases the SH2-mediated intramolecular regulatory interaction and should lead to Src opening. This raises the question whether the effect of the inhibitors on the Src structure is direct or mediated by Csk inhibition. The fact that mainly α C-in inhibitors (dasatinib, bosutinib and UM-164) induce Src structure opening would appear to be in line with their pronounced effect on Tyr527 dephosphorylation (Supp. Fig. 2A). However, SKI-1 also significantly decreased Tyr527 phosphorylation ($p=0.030$) to about 70% of untreated Src-FRET-WT but did not affect the overall compactness of the Src structure (compare Supp. Fig. 2A and Fig. 5C, D). Moreover, we noticed that dasatinib significantly decreases FRET of not only the WT SrcFRET biosensor but also of the activated SrcFRET527F biosensor which is by definition insensitive to Csk regulation. Conversely, SKI-1 surprisingly increased FRET of the activated Src-FRET527F biosensor indicating closing of the Src structure. We conclude that the effect of the inhibitors on the opening of the Src structure is primarily independent of Csk inhibition. We hypothesize that the high increased dephosphorylation of Tyr527 in cells treated with α C-in inhibitors, when compared to saracatinib and SKI-1, could be in part a consequence of inhibitors-induced opening of the Src structure and subsequent faster dephosphorylation of phospho-Tyr527 by tyrosine phosphatases. In addition, we hypothesize that SKI-1 inhibitor forces closed conformation of the kinase domain and this subsequently induces partial closing of the activated Src-FRET527F. Overall, the data are consistent with the direct effect of inhibitors on kinase domain conformation which affects the global compactness of the Src structure: namely kinase domain in active conformation characterized by α C helix-in orientation induces global opening of Src. In agreement with this, activatory mutation in kinase domain (Glu381(376)/Gly) promotes Src structure opening (Fig. 3). Finally, our results show that the Src-FRET biosensor could be used as a tool to distinguish between the modes of binding/action of new inhibitors without the need for resolving the structure of the Src-inhibitor complex. In this sense, we can conclude that SKI-1 inhibitor binds Src in its inactive conformation with α C-out orientation of α C helix.

The Src-FRET biosensor unraveled two classes of Src inhibitors differing in their effect on the Src structure and subcellular localization. Conceivably, biological activity of inactivated Src kinase would differ for inactivated Src with opened conformation, with both SH2 and SH3 domains unrestricted for binding their targets, and inactivated Src in closed conformation. Therefore, the two classes of Src inhibitors would have different effect on intracellular signaling and thus potentially diverse therapeutic outcome.

Src as a potential mechanosensor

The Src-FRET biosensor monitors Src activity through conformational changes, opening of the compact structure of inactive Src, following Src activation. It is thus intriguing that mechanical stimulation of cells leads to the opening of the Src structure. The dynamics of Src “opening” upon mechanical stretching of the cells follows the pattern of p130Cas phosphorylation. P130Cas was shown to function as a primary mechanosensor; upon mechanical stretch its substrate domain unfolds and exposes cryptic tyrosines that are subsequently phosphorylated by Src (Sawada et al., 2006). The spatio-temporal resolution achieved in our cell stretching experiments didn’t allow to distinguish whether the Src opening precedes p130Cas phosphorylation or vice versa. However, the cellular stretch-mediated opening of Src indicates that Src could act as a primary mechanosensor which is directly mechanically activated by local forces. Interestingly, the substrate-based Src biosensors revealed that local Src activation in response to mechanical perturbation can be very fast, which is in agreement with the concept of Src being a sensor of local mechanical tension (Wang et al., 2005; Na et al., 2008). In this context, our experimental setup relies on average status of the biosensor molecules in cell populations. Therefore, it could not detect fast local mechanical tension-mediated activation of the molecules but is rather dependent on accumulation of the activated molecules in time. To further ascertain the function of Src as a mechanosensor, the live cell FRET imaging with the Src-FRET biosensor under controlled exertion of local mechanical forces on the cells together with *in-vitro* experiments showing on molecular level the tension-mediated opening of Src structure and the induction of its kinase activity are needed.

Src role in focal adhesions

It has been well established that Src has mostly uniform distribution in cells, with significant fraction localized on membrane, and that activated Src is enriched in focal adhesions (Machiyama et al., 2015). Src localization to focal adhesions requires intact SH2 domain and is mediated by FAK (Klinghoffer et al., 1999; Machiyama et al., 2015; Wu et al., 2016). This mechanism of Src focal adhesion targeting implies a requirement for opened conformation of Src which we have confirmed with our biosensor. Surprisingly, no enrichment of Src was observed in any stage of focal adhesion life cycle. This raises a question about the mechanism of Src activation in focal adhesions. We envision three potential mechanisms of Src structure opening in focal adhesions. First, local dephosphorylation of tyrosine 527 would release the intramolecular SH2 binding and allow for its intermolecular bindings (e.g. to phosphorylated FAK). This would induce opened conformation of Src and activate the kinase. Second, and analogous to our observation with Sin-derived peptides, simultaneous binding of SH2 and SH3 domain to their target sites within focal adhesion proteins opens Src and activates the kinase. Third, opened conformation of Src is achieved by direct mechanical tension. We propose that the opening of Src structure could be achieved by

dynamic mechanical tension in focal adhesions, generated by molecular clutch phenomenon (Mitchison and Kirschner, 1988), which is transmitted to Src molecules, anchored on N-terminus to plasma membrane, through intermolecular SH2 domain binding. According to the molecular clutch theory, individual molecules of mechanosensors in focal adhesions, either directly or indirectly contacting the F-actin retrograde flow, are subject to very fast fluctuations of increased tension when contacting the F-actin flow and released tension when disengage from the flow. This tension would release the SH3-mediated intramolecular interaction and forced the full activation of the kinase. Interestingly, we found that Src is extremely dynamic in focal adhesions. This is inconsistent with the model of Src targeting through simultaneous binding of SH2 and SH3 domains to focal adhesion proteins, which would be expected to stabilize Src in focal adhesions to a level similar to focal adhesion's resident proteins exhibiting focal adhesion half time recovery time in mouse fibroblasts ranging from 12s (p130Cas, (Janostiak et al., 2014a)) to 50s (Talin, (Stutchbury et al., 2017)). On the contrary, Src exhibits high dynamics and localized activation in focal adhesions without detectable enrichment. This is in line with the hypothesis of tension-mediated opening of Src.

Dynamics of Src activation in focal adhesions was previously analyzed using substrate-based FRET biosensors (Wu et al., 2016). The data suggested that assembly of focal adhesions and Src activation is practically concurrent and that focal adhesion disassembly is preceded by another wave of Src activation. We don't see waves of Src activation in focal adhesions but rather a steady activation level of Src throughout the mature, stable phase of focal adhesions life cycle and rapid activation or gradual inhibition during focal adhesion assembly and disassembly, respectively. Both biosensors differ in their mode of action. Our biosensor relies on correlation between compactness of Src structure and its activity, which we have confirmed under all experimental setups tested. Nevertheless, we cannot rule out specific condition in live cells where opened conformation is not strictly reflected by higher kinase activity. In contrast the substrate biosensors monitor the kinase activity through the level of specific substrate phosphorylation. This, however, depends on local combination of kinase and counteracting phosphatases activities. Putting both observations together we propose the following model of Src role in focal adhesions life cycle. Src is locally and rapidly activated during focal adhesion assembly and phosphorylates its substrates. Its activity remains high during the mature stage of focal adhesion cycle but is counteracted by phosphatases which stabilize the level of phosphorylation of the Src substrates in focal adhesions. The disassembly is potentially initiated by decreased phosphatases' activity, inducing hyperphosphorylation of Src targets and subsequent disassembly of focal adhesions (Supp. Fig. 6).

There are several indirect evidences that increased Src-dependent phosphorylation

destabilizes localization of proteins in focal adhesion or even destabilizes the focal adhesions themselves (Sup. Fig. 6). Among others, it was shown that: i) cells lacking the tyrosine phosphatase Shp2 exhibited increased turnover of focal adhesions (von Wichert et al., 2003); ii) increased tyrosine phosphorylation of paxillin is associated with more dynamic focal adhesions and is absent from stable fibrillar adhesions (Zaidel-Bar et al., 2007) or that iii) Src phosphorylation of ARHGAP42 on tyrosine 376 increases dynamics of focal adhesions (Luo et al., 2017). In addition, Src was shown to phosphorylate with slow dynamics p130Cas of Tyr12 within the SH3 domain, inhibiting its binding capacity and SH3-mediated anchoring of p130Cas to focal adhesions (Branis et al., 2017; Gemperle et al., 2017; Janostiak et al., 2011). The mutational analysis of Tyr12 further suggested that its phosphorylation destabilizes focal adhesions and induces migratory phenotype of cell (Janostiak et al., 2011). Besides phosphorylation-dependent loss of binding to focal adhesions, Src phosphorylation-stimulated p130Cas ubiquitination and its subsequent degradation was shown as another mechanism regulating focal adhesion's dynamics (Teckchandani et al., 2014).

SIGNIFICANCE

In our study we have analyzed conformational changes of Src following Src activation and the spatio-temporal dynamics of Src activity in cells. To better understand the biology of Src proto-oncogene we took advantage of the known structural changes associated with Src activation to design, construct and functionally verified novel genetically encoded FRET-based Src biosensor. Using the biosensor, we found that activatory mutations in SH3 domain, CD linker or kinase domain induce the opening of Src structure similarly as the oncogenic Tyr257 to Phe mutation. Further, we discovered that Src inhibitors exhibit two distinct phenotypes of action on Src. First group of inhibitors, characterized by inducing α C-helix-out conformation of kinase domain, has no effect on Src structure or localization. Second group, inducing α C-helix-in conformation, surprisingly and counterintuitively leads to opened conformation of Src and its localization to focal adhesions. Finally, we analyzed the dynamics of Src activity in focal adhesions by FRET imaging. Based on these results we propose a new model for the role of Src-dependent phosphorylation in focal adhesions, according to which Src-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins drives the assembly phase of focal adhesions. It remains stable during maturation of focal adhesions due to counteracting activity of tyrosine phosphatases. Hyperphosphorylation of the Src targets in focal adhesions, potentially due to decrease of phosphatases activity, induces focal adhesions' disassembly and is followed by Src inactivation. The novel Src-FRET biosensor represents a unique tool to monitor Src structure, activity and localization both

in-vitro and in cells and hence could help to identify mechanisms of action of new Src targeting drugs as well as to investigate various aspects of Src signaling in live cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Dr. Xuehua Xu and Dr. Joseph Brzostowski for help with FRET sensitized emission protocol, Dr. Tomas Vomastek for gift of SYF, HEK293FT and U2OS cell lines and Dr. Katerina Kuzelova for gift of SKI-1 inhibitor. This work was funded by Czech Science Foundation grant 15 07321S, by the Ministry of Education, Youth and Sports of CR within the LQ1604 National Sustainability Program II (Project BIOCEV FAR) and by the project „BIOCEV“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0109). We acknowledge the IMCF at BIOCEV, institution supported by the MEYS CR (LM2015062 Czech BioImaging). Part of the study was performed by the equipment for metabolomics and cell analyses (Grant no. CZ.1.05/2.1.00/19.0400) supported by the Research and Development for Innovations Operational Program, co-financed by the European regional development fund and the state budget of the Czech Republic.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LK, ACP performed most of the experiments and analyzed the results. OT performed the FRET imaging experiments. VP performed the original cloning and analyses in HEK cells. JG, MN analyzed the results. DR, JB, and KA conceived the experiments and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

Daniel Rosel and Jan Brabek have filed Czech Republic patent application on the SrcFRET biosensor. The authors have no other financial or non-financial competing interests.

REFERENCES

- Alexandropoulos,K. and Baltimore,D. (1996). Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes Dev.* *10*, 1341-1355.
- Barkho,S., Pierce,L.C., McGlone,M.L., Li,S., Woods,V.L., Jr., Walker,R.C., Adams,J.A., and Jennings,P.A. (2013). Distal loop flexibility of a regulatory domain modulates dynamics and activity of C-terminal SRC kinase (csk). *PLoS. Comput. Biol.* *9*, e1003188.
- Bjorge,J.D., Bellagamba,C., Cheng,H.C., Tanaka,A., Wang,J.H., and Fujita,D.J. (1995). Characterization of two activated mutants of human pp60c-src that escape c-Src kinase regulation by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 24222-24228.
- Boerner,R.J., Kassel,D.B., Barker,S.C., Ellis,B., DeLacy,P., and Knight,W.B. (1996). Correlation of the phosphorylation states of pp60c-src with tyrosine kinase activity: the intramolecular pY530-SH2 complex retains significant activity if Y419 is phosphorylated. *Biochemistry* *35*, 9519-9525.
- Brabek,J., Mojzita,D., Novotny,M., Puta,F., and Folk,P. (2002). The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 664-670.
- Branis,J., Pataki,C., Sporrer,M., Gerum,R.C., Mainka,A., Cermak,V., Goldmann,W.H., Fabry,B., Brabek,J., and Rosel,D. (2017). The role of focal adhesion anchoring domains of CAS in mechanotransduction. *Sci. Rep.* *7*, 46233.
- Cooper,J.A., Gould,K.L., Cartwright,C.A., and Hunter,T. (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* *231*, 1431-1434.
- Cowan-Jacob,S.W., Fendrich,G., Manley,P.W., Jahnke,W., Fabbro,D., Liebetanz,J., and Meyer,T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure.* *13*, 861-871.
- Dar,A.C. and Shokat,K.M. (2011). The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 769-795.
- Feige,J.N., Sage,D., Wahli,W., Desvergne,B., and Gelman,L. (2005). PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microsc. Res. Tech.* *68*, 51-58.
- Fincham,V.J. and Frame,M.C. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J.* *17*, 81-92.
- Fonseca,P.M., Shin,N.Y., Brabek,J., Ryzhova,L., Wu,J., and Hanks,S.K. (2004). Regulation and

localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cell Signal*. *16*, 621-629.

Frame,M.C., Fincham,V.J., Carragher,N.O., and Wyke,J.A. (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 233-245.

Gemperle,J., Hexnerova,R., Lepsik,M., Tesina,P., Dibus,M., Novotny,M., Brabek,J., Veverka,V., and Rosel,D. (2017). Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners. *Sci. Rep.* *7*, 8057.

Giaccone,G. and Zucali,P.A. (2008). Src as a potential therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* *19*, 1219-1223.

Goedhart,J., von,S.D., Noirclerc-Savoye,M., Lelimosin,M., Joosen,L., Hink,M.A., van,W.L., Gadella,T.W., Jr., and Royant,A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* *3*, 751.

Gonfloni,S., Williams,J.C., Hattula,K., Weijland,A., Wierenga,R.K., and Superti-Furga,G. (1997). The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. *EMBO J.* *16*, 7261-7271.

Guarino,M. (2010). Src signaling in cancer invasion. *J. Cell Physiol* *223*, 14-26.

Gulyani,A., Vitriol,E., Allen,R., Wu,J., Gremyachinskiy,D., Lewis,S., Dewar,B., Graves,L.M., Kay,B.K., Kuhlman,B., Elston,T., and Hahn,K.M. (2011). A biosensor generated via high-throughput screening quantifies cell edge Src dynamics. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 437-444.

Irby,R.B. and Yeatman,T.J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* *19*, 5636-5642.

Irtegun,S., Wood,R., Lackovic,K., Schweiggert,J., Ramdzan,Y.M., Huang,D.C., Mulhern,T.D., and Hatters,D.M. (2014). A biosensor of SRC family kinase conformation by exposable tetracysteine useful for cell-based screening. *ACS Chem. Biol.* *9*, 1426-1431.

Janostiak,R., Brabek,J., Auernheimer,V., Tatarova,Z., Lautscham,L.A., Dey,T., Gemperle,J., Merkel,R., Goldmann,W.H., Fabry,B., and Rosel,D. (2014a). CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics. *Cell Mol. Life Sci.* *71*, 727-744.

Janostiak,R., Pataki,A.C., Brabek,J., and Rosel,D. (2014b). Mechanosensors in integrin signaling: the emerging role of p130Cas. *Eur. J. Cell Biol.* *93*, 445-454.

Janostiak,R., Tolde,O., Bruhova,Z., Novotny,M., Hanks,S.K., Rosel,D., and Brabek,J. (2011). Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4256-4267.

Karaman,M.W., Herrgard,S., Treiber,D.K., Gallant,P., Atteridge,C.E., Campbell,B.T.,

Chan,K.W., Ciceri,P., Davis,M.I., Edeen,P.T., Faraoni,R., Floyd,M., Hunt,J.P., Lockhart,D.J., Milanov,Z.V., Morrison,M.J., Pallares,G., Patel,H.K., Pritchard,S., Wodicka,L.M., and Zarrinkar,P.P. (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* *26*, 127-132.

Klinghoffer,R.A., Sachsenmaier,C., Cooper,J.A., and Soriano,P. (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* *18*, 2459-2471.

Leonard,S.E., Register,A.C., Krishnamurty,R., Brighty,G.J., and Maly,D.J. (2014). Divergent modulation of Src-family kinase regulatory interactions with ATP-competitive inhibitors. *ACS Chem. Biol.* *9*, 1894-1905.

Luo,W., Janostiak,R., Tolde,O., Ryzhova,L.M., Koudelkova,L., Dibus,M., Brabek,J., Hanks,S.K., and Rosel,D. (2017). ARHGAP42 is activated by Src-mediated tyrosine phosphorylation to promote cell motility. *J. Cell Sci.* *130*, 2382-2393.

Machiyama,H., Yamaguchi,T., Sawada,Y., Watanabe,T.M., and Fujita,H. (2015). SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesions and the cell membrane. *FEBS J.* *282*, 4034-4055.

Mitchison,T. and Kirschner,M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* *1*, 761-772.

Mitra,S.K. and Schlaepfer,D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 516-523.

Miyazaki,K., Senga,T., Matsuda,S., Tanaka,M., Machida,K., Takenouchi,Y., Nimura,Y., and Hamaguchi,M. (1999). Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *263*, 759-764.

Na,S., Collin,O., Chowdhury,F., Tay,B., Ouyang,M., Wang,Y., and Wang,N. (2008). Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 6626-6631.

Paster,W., Paar,C., Eckerstorfer,P., Jakober,A., Drbal,K., Schutz,G.J., Sonnleitner,A., and Stockinger,H. (2009). Genetically encoded Förster resonance energy transfer sensors for the conformation of the Src family kinase Lck. *J. Immunol.* *182*, 2160-2167.

Playford,M.P. and Schaller,M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* *23*, 7928-7946.

Rosel,D., Brabek,J., Vesely,P., and Fernandes,M. (2013). Drugs for solid cancer: the productivity crisis prompts a rethink. *Onco. Targets. Ther.* *6*, 767-777.

Roskoski,R., Jr. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* *103*, 26-48.

Ryder,J.W. and Gordon,J.A. (1987). In vivo effect of sodium orthovanadate on pp60c-src kinase. *Mol. Cell Biol.* 7, 1139-1147.

Sawada,Y., Tamada,M., Dubin-Thaler,B.J., Cherniavskaya,O., Sakai,R., Tanaka,S., and Sheetz,M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.

Stirnweiss,A., Hartig,R., Gieseler,S., Lindquist,J.A., Reichardt,P., Philipsen,L., Simeoni,L., Poltorak,M., Merten,C., Zuschratter,W., Prokazov,Y., Paster,W., Stockinger,H., Harder,T., Gunzer,M., and Schraven,B. (2013). T cell activation results in conformational changes in the Src family kinase Lck to induce its activation. *Sci. Signal.* 6, ra13.

Stutchbury,B., Atherton,P., Tsang,R., Wang,D.Y., and Ballestrem,C. (2017). Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J. Cell Sci.* 130, 1612-1624.

Superti-Furga,G., Fumagalli,S., Koegl,M., Courtneidge,S.A., and Draetta,G. (1993). Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *EMBO J.* 12, 2625-2634.

Teckchandani,A., Laszlo,G.S., Simo,S., Shah,K., Pilling,C., Strait,A.A., and Cooper,J.A. (2014). Cullin 5 destabilizes Cas to inhibit Src-dependent cell transformation. *J. Cell Sci.* 127, 509-520.

Ting,A.Y., Kain,K.H., Klemke,R.L., and Tsien,R.Y. (2001). Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 15003-15008.

Tolde,O., Rosel,D., Janostiak,R., Vesely,P., and Brabek,J. (2012). Dynamics and morphology of focal adhesions in complex 3D environment. *Folia Biol. (Praha)* 58, 177-184.

Tong,M., Pelton,J.G., Gill,M.L., Zhang,W., Picart,F., and Seeliger,M.A. (2017). Survey of solution dynamics in Src kinase reveals allosteric cross talk between the ligand binding and regulatory sites. *Nat. Commun.* 8, 2160.

von Wichert,G., Haimovich,B., Feng,G.S., and Sheetz,M.P. (2003). Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *EMBO J.* 22, 5023-5035.

Wang,Y., Botvinick,E.L., Zhao,Y., Berns,M.W., Usami,S., Tsien,R.Y., and Chien,S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434, 1040-1045.

Wu,Y., Zhang,K., Seong,J., Fan,J., Chien,S., Wang,Y., and Lu,S. (2016). In-situ coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions. *Sci. Rep.* 6, 29377.

Xia,Z. and Liu,Y. (2001). Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys. J.* *81*, 2395-2402.

Xu,W., Doshi,A., Lei,M., Eck,M.J., and Harrison,S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* *3*, 629-638.

Xu,W., Harrison,S.C., and Eck,M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* *385*, 595-602.

Yeatman,T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 470-480.

Young,M.A., Gonfloni,S., Superti-Furga,G., Roux,B., and Kuriyan,J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* *105*, 115-126.

Zaidel-Bar,R., Milo,R., Kam,Z., and Geiger,B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* *120*, 137-148.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Design of Src-FRET biosensor. A) Structure of inactive Src with critical residues and motives depicted. B) Model of Src biosensor action. Compact, inactive conformation of Src biosensor gives high FRET between inserted mCFP and mCit fluorophores (left). Upon activation, the Src structure loosens and the FRET decreases (right). Linkers between the fluorophores and the kinase are not depicted. The structure models were created according to PDB structures 1FMK, 1Y57, 2H5P, 1F0B. C) Schematic representation of the different Src and control constructs used in this study. UD – unique domain, CFP – mECFP/(mTurquoise2), YFP – mCit.

Fig. 2. Insertion of the fluorophores into Src has no significant effect on Src activation. HEK293TF cells expressing Src constructs were lysed and analyzed for Tyr416 phosphorylation and emission spectra. A) Representative matched pair of immunoblots showing detection of activated Src (P-Y416 antibody) and total Src. Numbers indicate ratio of Try416 phosphorylation and Src signal (mean \pm standard deviation, out of minimum 5 independent experiments) normalized to unmanipulated Src. B) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. C, D) The biosensor variants were transfected into HEK293FT cells and native cell lysates were supplemented with purified GST-SinWT (FRET+SinWT), GST-SinY (FRET+SinY), GST-SinR (FRET+SinR), GST-SinRY (FRET+SinRY) or GST alone (FRET, FRET527F). After 30 min of incubation fluorescence emission spectra were recorded. C) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. D) Bar graph represents ratio of normalized mCit (525 nm) and mCFP (475 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

Fig. 3. Src-FRET biosensor is responsive to activatory mutations. The biosensor variants were transfected into U2OS cells and the fluorescence emission spectra were recorded. A) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. B) Bar graph represents ratio of normalized mCit (530 nm) and mCFP (480 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to FRET ratio of Src-FRET527F (527F) variant of the biosensor as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test. PC (positive control) and CFP (Src-CFP) indicates maximum and minimum FRET achievable by the biosensor, respectively. C) Kinetic analysis of kinase activity of the biosensor variants using Omnia kinase assay. Representative graph is shown.

Fig. 4. Src-FRET biosensor effectively responds to treatments activating and inhibiting Src.

A) SYF cells and SYFs stably expressing Src-FRET biosensor (SrcFRET) or c-Src (Src) were incubated for 30 min +/- 150nM dasatinib, for 12 hours +/- 100 ng/ml EGF or for 2 hours +/- 10 μ M LPA. Cells were then lysed and analyzed for expression and phosphorylation of Src substrates paxillin and p130Cas. Representative blots from three independent experiments are shown. B, C) SYF cells stably expressing SrcFRET-WT biosensor were seeded on fibronectin coated flexible membrane, incubated for 24 h, and then subjected to 20% static stretch for indicated times. B) Cells were lysed and analyzed by Western blotting against phosphorylated Y410 in the p130Cas (P-Y410) substrate domain. Representative blot from three independent experiments is shown. C) Cells were lysed and in native cell lysates the FRET was analyzed as a ratio of FRET fluorescence intensity (λ_{ex} 433, λ_{em} 530) and fluorescence intensity of mCFP (λ_{ex} 433, λ_{em} 480). FRET ratio of unstretched cells (0 min) was arbitrary set to 1. The data are shown as mean +/- standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to unstretched cells (0 min) as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

Fig. 5. Src-FRET biosensor is responsive to activatory and inhibitory treatments in cells.

SrcFRET biosensor (FRET) and biosensor with activating Tyr527 to Phe mutation (FRET527F) were stably expressed in SYF cells. SYFs expressing the FRET-WT biosensor were incubated for 10 min with 10 μ M LPA (serum starved, +LPA), 24 hours with 100 ng/ml EGF (serum starved, +EGF), 60 min with 500 μ M Sodium Orthovanadate (+Van), or for 60 min with Src kinase inhibitors: 100nM dasatinib (+Das), 4 μ M saractinib (+Sar), 1 μ M bosutinib (+Bos), 100nM UM164 (+UM-164), or 10 μ M SKI-1 (+SKI-1). A, C) Representative emission spectra. Relative fluorescence represents fluorescence intensity normalized to emission maximum of mCFP. B, D) Bar graph represents ratio of normalized mCit (530 nm) and mCFP (480 nm) emission. The data are shown as mean +/- standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to FRET ratio from untreated cells (FRET) as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

Fig. 6. The effect of Src inhibitors on Src-FRET biosensor localization. SYF cells stably expressing SrcFRET-WT biosensor (A), c-Src (B) or activated Src (Src527F, C) were directly stained or incubated for 60 min with 500 μ M Sodium Orthovanadate (+Van), or for 60 min with Src kinase inhibitors: 100nM dasatinib (+Das), 4 μ M saractinib (+Sar), 1 μ M bosutinib (+Bos), 100nM UM-164 (+UM-164), or 10 μ M SKI-1 (+SKI-1). Cells were then fixed and

stained for vinculin (focal adhesions marker, red (A)), F-actin (grey (A) or red (B, C)) or Src (mCit fluorescence (A) or anti-Src antibody (B, C), green) and imaged by confocal microscopy. Scale bar 10 μm .

Fig. 7. Src activity in focal adhesions. U2OS cells transiently co-expressing mTurquoise2-based Src-FRET(T) and mCherry-FAT were imaged in live. A) Representative cell image showing focal adhesions (FAT - mCherry signal, red), Src activity map (FRET (nF/I_{CFP})) and Src-FRET(T) localization (Src - mCit signal, green). The yellow line across focal adhesion indicates the place of the first (left) kymograph analysis. Scale bar 10 μm . B) Representative kymographs (out of 20) of FAT, Src-FRET(T) localization and Src-FRET(T) activity dynamics in focal adhesions. C) Representative graph showing dynamics of mCherry-FAT (FAT), Src-FRET(T) (Src) localization and Src-FRET(T) activity (FRET (nF/I_{CFP})) dynamics in focal adhesion. The data correspond to the first (left) kymograph in B) and are normalized to maximum values. D) The bar graph shows average FRET (nF/I_{CFP}) \pm standard error in focal adhesions and random regions of plasma membrane (PM) of similar size as the focal adhesions. Number in the bar graphs indicates number of individual measurements. P value indicates statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by Daniel Rosel (rosel@natur.cuni.cz).

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Data are available upon request to Daniel Rosel (rosel@natur.cuni.cz).

METHOD DETAILS

Cell culture and transfection

All cell lines were cultured in full DMEM (Life Technologies) with 4.5 g/l L glucose, L glutamine, and pyruvate, supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma Aldrich), 2% antibiotic–antimycotic (Life Technologies), and 1% MEM non-essential amino acids (Life Technologies). Cell transfections were carried out using Lipofectamine® 2000, jet PRIME, or polyethylenimine according to manufacturer instructions. SYFs stably expressing Src biosensor variants were prepared via retrovirus infection using the Src biosensor variants cloned in pMSCV-puro vector and the Phoenix retroviral packaging lineage followed by sorting of cell by FACS for YFP.

Cell Lines

SYF, HEK293FT and U2OS cells were kind gift from Tomas Vomastek (Institute of Microbiology, Czech Republic).

DNA constructs

To generate Src-FRET biosensor, full length chicken Src cDNA was PCR amplified from a source vector (Brabek et al., 2002) using the forward primer (5'-GGATCCATGGGTAGTAGCAAGAGC) and the reverse primer (5'-GAATTCTAGGTTCTCTCCAGGCTGG), and cloned in pYES2 vector. The AatII insertion site for donor fluorophore was created using QuikChange II mutagenesis kit (Stratagene), using the forward (5'-CAAGATCCGCAAGCTGGACGTCAGCGGCGGCTTCTACATC) and reverse (5'-GATGTAGAAGCCCGCTGACGTCCAGCTTGCGGATCTTG) primers. The insertion of AatII site resulted in insertion of valine between aminoacid 208 and 209 of chicken Src. The mCFP cDNA was PCR amplified from a source vector (gift from Professor Cerny; PrF UK, Czech Republic) using the forward (5'-GACGTCGGAAGCGGAGGTAGTGTTGGAATGGTGAGCAAGGGCG) and reverse (5'-GACGTACCTCCACTGCCGCTACCACTTCCGCCGAGAGTGATCCCG) primers, both included sequence coding for the linker peptides (underlined), and cloned into AatII site in the Src

cDNA. The mCit cDNA was PCR amplified from a source vector (gift from Professor Cerny) using the forward primer (5'- GAATTCGGTGGCAGTGGAGGGATGGTGAGCAAGGGCG; underlined sequence coding for the linker peptide) and reverse primer (5'-GAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC), and cloned into EcoRI site in the Src cDNA. To generate mutated versions of the Src-FRET biosensor, the resulted Src-FRET biosensor was first cloned into pBlueScript SK+ using BamHI/NotI restriction sites and was subsequently mutagenize using QuikChange II mutagenesis kit (Stratagene). The primers used for the mutagenesis were as follows: for Tyr527 to Phe (forward: 5'-CGACAGAGCCCCAGTCCAGCCTGGAGAGAAC, reverse: 5'-GTTCTCTCCAGGCTGGAAGTGGGGCTCTGTCTG), for RT loop mutagenesis (forward: 5'-TCCTGGATTGAAACGGACTTGTCTTC, reverse: 5'-CTCGTAGTCGTAGAGAGCCAC), for n-Src loop mutagenesis (forward: 5'-GAAGGTAAGTGGTGGCTGGCTCATTC, reverse: 5'-CGTGTGTTGACAATCTGCAGGC), for CD linker mutagenesis (forward: 5'-GTCCGGCGACCAGACCCAGGGACTCG, reverse: 5'-GTGGGGCAGACGTTGGTCAG), for kinase domain mutagenesis (forward: 5'-GTGGGGAGGATGAACTACGTGCACC, reverse: 5'-ATAGGCCATGCCGATGCAATC). The resulted Src-FRET biosensors variants were cloned to expression pIRESpuro3 and pMSCV puro vectors using BamHI/NotI and BamHI/EcoRV restriction sites, respectively. The mTurquoise2 cDNA with linkers and AatII cloning sites, corresponding to mCFP sequence in the Src-FRET biosensor, was prepared by DNA synthesis (GeneArt, Life Technologies) and after digestion with AatII it was cloned to replace mCFP in the AatII site of Src-FRET constructs. For FRET positive control constructs, both mCFP and mTurquoise2 were PCR amplified from corresponding Src-FRET constructs using the same set of primers (forward: 5'-GAATTCACCATGGTGAGCAAGGGCG, reverse 5'-GGATCCAGATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGC) and cloned into EcoRI/BamHI sites of pIRESpuro3. The mCit was PCR amplified using the forward (5'- GGATCCATGGTGAGCAAGGGCG) and reverse (5'- GCGGCCGCTTGTACAGCTCGTCCATGC) primers and cloned into BamHI/NotI sites next to the inserted mCFP or mTurquoise2.

To generate mCherry-FAT construct, FAT domain of mouse FAK PCR amplified from a source vector (Fonseca et al., 2004) using the forward primer (5'- GGATCCATGGGTGTCAAGCTTCAGCC) and reverse (5'- AGATCTGTGTGGCCGTGTCTGC), and cloned in frame to BglIII site in pmCherry-C1 vector.

All the constructs were verified by sequencing.

Sin peptides purification

The plasmids coding for GST-Sin peptide variants, 92 amino acids long peptides with high affinity binding sites for SH3 and SH2 domain of Src, were kind gift from Dr.

Alexandropoulos (Alexandropoulos and Baltimore, 1996). The GST-Sin peptide variants were expressed in *Escherichia coli* BL21, purified using Glutathione Agarose (Thermo Scientific) and bound GST-Sin peptides were eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris, pH 8.0. The quality of purified peptides was assessed by SDS-PAGE and their quantity was determined densitometrically from Coomassie blue-stained gels using a BSA standard. To determine the effect of GST-Sin peptide variants on Src-FRET biosensor, 40 µg of individual GST-Sin peptides were mixed with native cell lysate of HEK293 cells expressing Src-FRET, incubated for up to 40 minutes with vigorous shaking and the fluorescence spectra were recorded (see “FRET steady state analysis”).

Immunoblotting

Subconfluent cells were washed on ice with 1 x PBS and lysed, using RIPA buffer (0.15M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.1% SDS; 1% sodium deoxycholate; 5mM EDTA; 50mM NaF). Protein concentration of lysates were determined by using the DC Protein Assay (Bio-Rad). Protein lysates were diluted in Laemmli sample buffer (0.35M Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS, 40% glycerol; 0.012% bromophenol blue) with 1mM DTT. Protein samples were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were usually cut after the transfer to enable probing for up to 3 proteins of different molecular mass (e.g. 1-2 proteins of interest and a loading control). Membranes were then blocked in Tris-buffered saline, containing 5% non-fat dry milk (or 4% bovine serum albumin depending on the antibody) for 1 h at room temperature to prevent non-specific activity. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with a primary antibody, washed properly with Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20, and incubated for 1 h with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. After washing with TTBS, membranes were developed by using the LAS 1000 Single System (Fujifilm).

Kinase assay

Kinase activity of Src variants was measured using Omnia® Y Peptide 2 Kit (ThermoFisher Scientific). The assay is based on detection of fluorescence increase after kinase-specific substrate phosphorylation. Specifically, substrate peptide is attached to the chelation-enhanced fluorophore Sox. Upon phosphorylation of the peptide by the kinase, Mg²⁺ is chelated to form a bridge between the Sox moiety and the incorporated phosphate group on the tyrosine within the substrate peptide, which consequently causes increase in fluorescence. Kinase assays were performed according to the manufacturer’s protocol. Briefly, cells were washed with PBS and lysed in HEPES-Triton buffer (50mM HEPES, pH 7.4; 1% Triton X-100, 1mM DTT, 6mM MgCl₂, 6mM MnCl₂, protease inhibitors, phosphatase

inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation. Kinase reactions (in quadruplicates for each variant) was assembled by adding cell lysate (5 μg per well in 386 well-plate), kinase reaction buffer, 0.2mM DTT, 1mM ATP and 10 μM peptide substrate. Using plate reader (TECAN 200Pro), reactions were incubated at 30 °C and fluorescence intensity was measured (λ_{ex} 360 \pm 10 nm / λ_{em} 485 \pm 20 nm) at 60 second intervals for 1 hour. The slope of fluorescence intensity increase was determined and normalized to amount of Src construct in a sample (mCit signal, 500/530 nm).

Cell stretching

Cell stretching experiments were carried out on 10 cm² stretchable PDMS chambers (STREX Inc.). The substrates of chambers were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fibronectin (Invitrogen). Cells were seeded on fibronectin-coated substrates and cultured overnight at 37°C with 5% CO₂. Uniaxial static stretching was performed in the incubator under regular cell culture conditions, using a manual stretcher (STREX Inc.). Cells were stretched for various time intervals (0 min, 5 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min and 60 min) at an amplitude of 20 % and then immediately lysed in Tris-buffered saline with 1% tritonX-100 with protease and phosphatase inhibitors (SERVA). The lysis buffer has been used as a reference for FRET measurements. The lysate was split in two parts, one was immediately used for FRET measurement, second for immunoblot analysis after adding Laemmli sample buffer (0.35M Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS, 40% glycerol; 0.012% bromophenol blue) with 1mM DTT.

FRET steady state analysis

Cells expressing the biosensor variants were treated for 10 min with 10 μM LPA (after overnight serum starvation), 24 hours with 100 ng/ml EGF (after overnight serum starvation), 60min with either 500 μM Sodium Orthovanadate, 100nM dasatinib (LC Laboratories), 4 μM saractinib (BioVision), 1 μM bosutinib (LC Laboratories), 100nM UM-164 (Sigma), or 10 μM SKI-1 (Abcam). After the treatment cells were lysed in HEPES-Triton buffer (50mM HEPES, pH 7.4; 1% Triton X-100, 1mM DTT, 6mM MgCl₂, 6mM MnCl₂, protease inhibitors, phosphatase inhibitors, 100 μM ATP), and the FRET signal of each sample was determined using a Varioskan Flash (Fig. 2; Thermo Scientific) or Tecan 200Pro (all spectral scanning and direct FRET data except Fig. 2; PTI, Edison, NJ) spectral scanning fluorescence plate readers. To record FRET fluorescence spectra, the cell lysates were excited at an excitation wavelength of mCFP (433 \pm 5 nm Varioskan Flash, 433 nm \pm 10 nm Tecan 200Pro) and the fluorescence emission spectra 460-580 nm was recorded (in 5 nm or 2 nm steps for Varioskan Flash and Tecan 200Pro, respectively). For FRET ratio determination, after background subtraction, emission ratios of mCit (525 \pm 12 nm Varioskan Flash, 530 \pm 20 nm Tecan 200Pro) and mCFP (475 \pm 12 nm Varioskan Flash, 480 \pm 20 nm Tecan 200Pro) were

calculated. In samples with bosutinib, bosutinib autofluorescence was subtracted by calculating the difference in fluorescence intensities between the cell lysates of bosutinib-treated cells expressing and not expressing SrcFRET biosensor. Further, mCit fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} 500 \pm 9 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 530 \pm 20 \text{ nm}$) was determined for control of biosensor variants expression in individual cell lines.

For FRET analysis in cell lysates after stretch, the fluorescence spectra could not be reliably recorded due to low amount of sample material and, as a consequence, low fluorescence intensities in the spectral mode measurements. Instead, FRET was measured as a ratio of FRET fluorescence intensity ($\lambda_{\text{ex}} 433 \pm 9 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 530 \pm 20 \text{ nm}$) and the fluorescence intensity of mCFP ($\lambda_{\text{ex}} 433 \pm 9 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} 480 \pm 20 \text{ nm}$). In order to compare in-between independent experiments, the data were normalized with respect to the FRET ratio of unstretched cells which was arbitrary set to 1. In all FRET steady state measurements, the gating for each experimental cohort was set to same value, which was computed from sample with the highest fluorescence intensity within the cohort.

Fluorescence microscopy

Cell immunostaining and confocal microscopy

Cells were seeded on coverslips coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fibronectin (Invitrogen) and grown for 12 - 24 h. Subsequently, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized using 0.3% Triton X-100, washed with PBS and blocked in 3% bovine serum albumin in PBS. Samples were then sequentially incubated with primary antibodies for 3 h, secondary antibodies for 1 h, phalloidin for 15 min, and extensively washed with PBS between each step. The slides were mounted in Mowiol 4–88 (Millipore) containing 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (Sigma). The secondary antibodies were anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 546 and anti-mouse-IgG Alexa Fluor 633 (Invitrogen). F-actin was probed with phalloidin conjugated with Alexa Fluor 405 (Dyomics) or Alexa Fluor 555 (Life Technologies). Images were acquired using Leica TCS SP8 microscope system equipped with a Leica 63 \times / 1.45 NA oil objective.

FRET sensitized emission analysis

U2OS cells were transiently co-transfected with the Src-FRET(T) biosensor and mCherry-FAT or mCherry-vinculin using polyethylenimine transfection agents (Sigma). Prior imaging the cells were trypsinized and allowed to attach on 35 mm dishes with glass bottom coated with fibronectin (MatTek, MA) and imaged in a window 30-60 min after seeding. FRET experiments were performed using Nikon Ti-E microscope with Nikon CFI HP Apo TIRF 100 \times Oil, NA 1.49. The microscope was equipped with two cameras, Andor iXon Ultra DU897 (Andor Technologies, UK) for acquisition of images excited with 445 nm and 488 nm laser beams, and Hamamatsu ORCA 4.0 V2 (Hamamatsu Photonics, Japan) for acquisition of

images excited with 561 nm laser beam. Image splitter (DualView DV2, Photometrics, AZ) with filter cube splitting the beam at 505 nm was inserted in the light path preceding the Andor camera. Obtained dual images were processed using ImageJ. FRET, corrected for spectral bleed-throughs and normalized to donor fluorescence, was calculated as nF/I_{CFP} according to (Xia and Liu, 2001) in ImageJ using PixFRET plug-in (Feige et al., 2005).

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

U2OS cells were transiently co-transfected with the Src-FRET(T) biosensor and mCherry-vinculin using polyethylenimine transfection agents (Sigma). Prior imaging the cells were trypsinized and allowed to attach for 4 hours on 35 mm dishes with glass bottom coated with fibronectin (MatTek, MA). FRAP experiments were performed using Leica SP8 confocal microscope with a 63×/1.45 NA oil immersion objective. White light laser set to 512 nm was used to excite mCit and to 584 nm to excite mCherry. The focal adhesion was detected according to mCherry-FAT signal and in the selected focal adhesion the mCit signal was bleached using a high energy beam. The image acquisition started 5 s before bleaching and continued for approximately 30 s (one frame every 1.301 s). The recovery curves of the bleached regions were calculated from extracted image series using LAS X software (Leica), and the recovery halftime values were calculated from the FRAP curves by nonlinear regression analysis as described in (Tolde et al., 2012).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All the data were presented as mean \pm standard deviation or \pm standard error from at least three independent experiments. The significance of differences was analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's honest significant difference test using GraphPad Prism software (version 6.07, GraphPad Software Inc.). Statistical significance was defined as $p < 0.05$. FRAP data fitting was performed in Excel using Solver add-in (Microsoft).

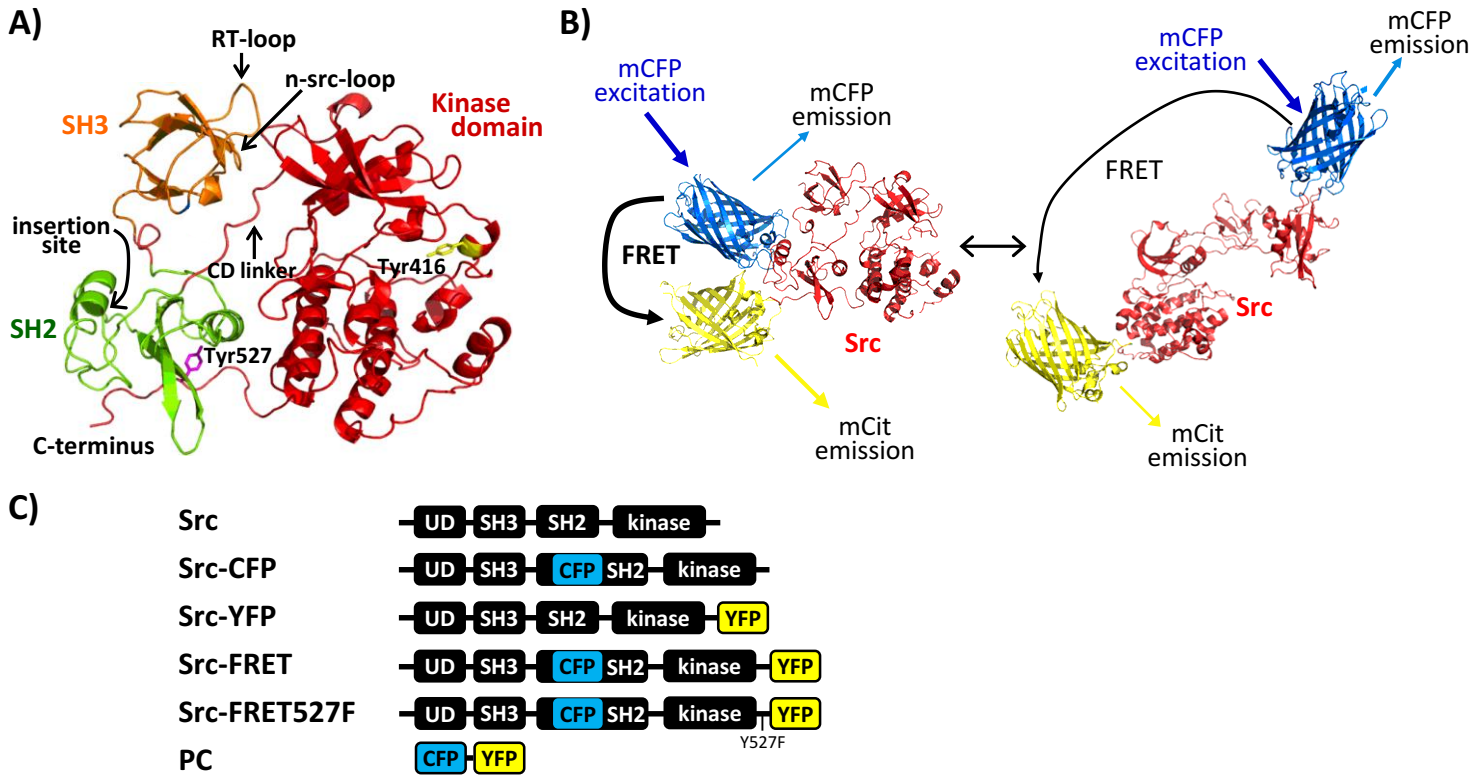


Fig. 1. Design of Src-FRET biosensor. *A) Structure of inactive Src with critical residues and motives depicted. B) Model of Src biosensor action. Compact, inactive conformation of Src biosensor gives high FRET between inserted mCFP and mCit fluorophores (left). Upon activation, the Src structure loosens and the FRET decreases (right). Linkers between the fluorophores and the kinase are not depicted. The structure models were created according to PDB structures 1FMK, 1Y57, 2H5P, 1F0B. C) Schematic representation of the different Src and control constructs used in this study. UD – unique domain, CFP – mECFP/(mTurquoise2), YFP – mCit.*

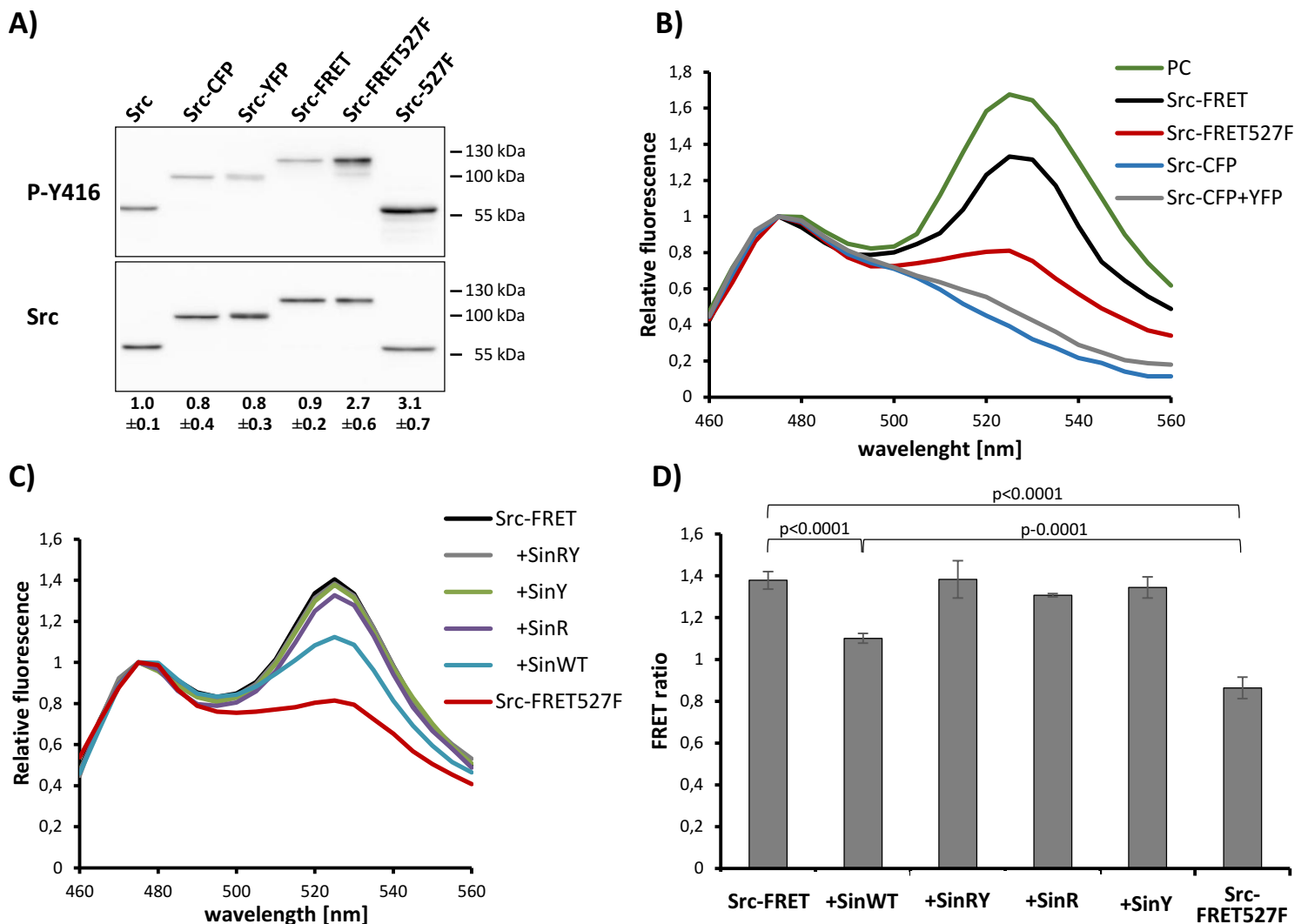


Fig. 2. Insertion of the fluorophores into Src has no significant effect on Src activation. HEK293TF cells expressing Src constructs were lysed and analyzed for Tyr416 phosphorylation and emission spectra. A) Representative matched pair of immunoblots showing detection of activated Src (P-Y416 antibody) and total Src. Numbers indicate ratio of Try416 phosphorylation and Src signal (mean \pm standard deviation, out of minimum 5 independent experiments) normalized to unmanipulated Src. B) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. C, D) The biosensor variants were transfected into HEK293FT cells and native cell lysates were supplemented with purified GST-SinWT (FRET+SinWT), GST-SinY (FRET+SinY), GST-SinR (FRET+SinR), GST-SinRY (FRET+SinRY) or GST alone (FRET, FRET527F). After 30 min of incubation fluorescence emission spectra were recorded. C) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. D) Bar graph represents ratio of normalized mCit (525 nm) and mCFP (475 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

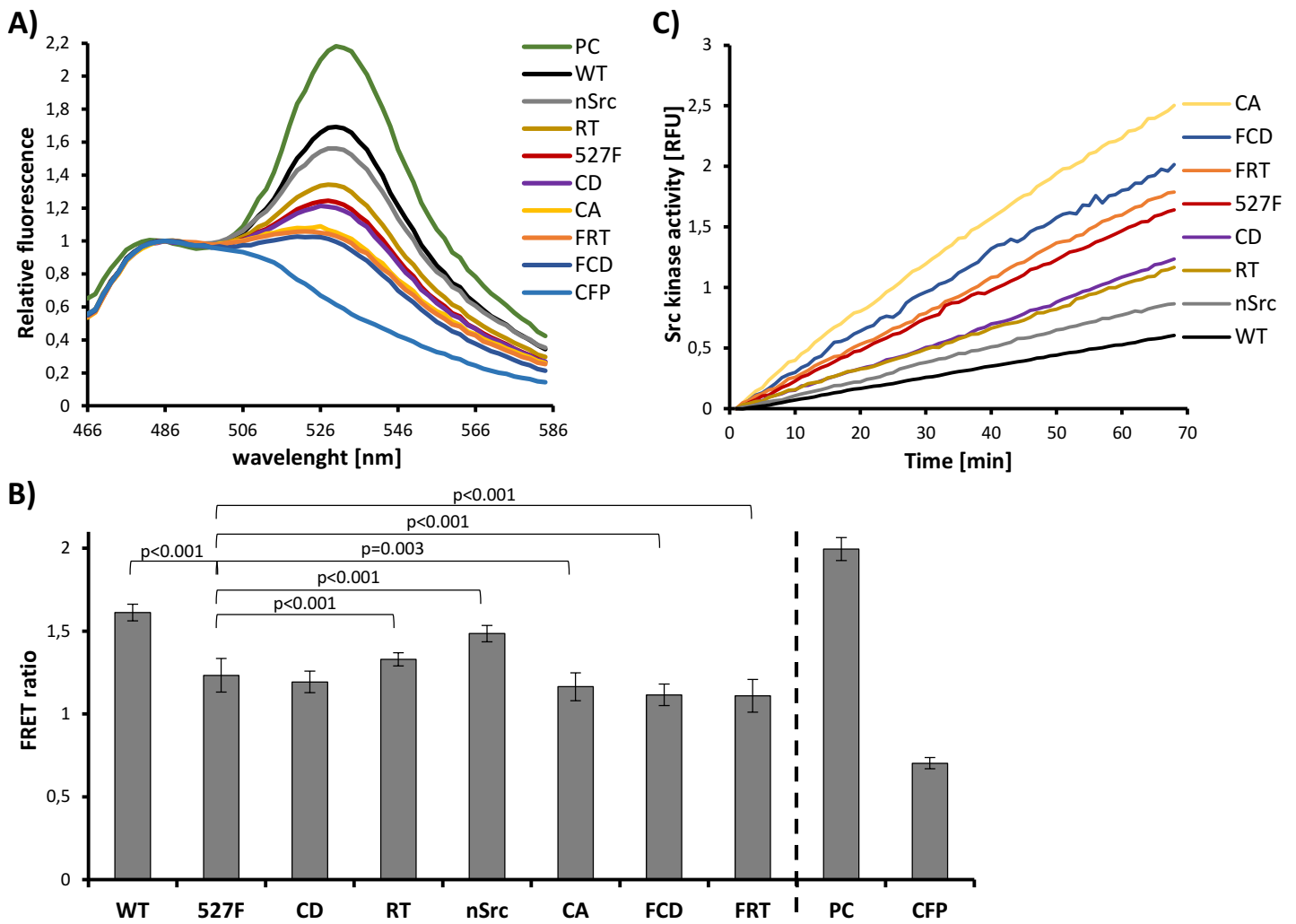


Fig. 3. Src-FRET biosensor is responsive to activatory mutations. The biosensor variants were transfected into U2OS cells and the fluorescence emission spectra were recorded. A) Representative emission spectra normalized to emission maximum of mCFP. B) Bar graph represents ratio of normalized mCit (530 nm) and mCFP (480 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to FRET ratio of Src-FRET527F (527F) variant of the biosensor as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test. PC (positive control) and CFP (Src-CFP) indicates maximum and minimum FRET achievable by the sensor, respectively. C) Kinetic analysis of kinase activity of the biosensor variants using Omnia kinase assay. Representative graph is shown.

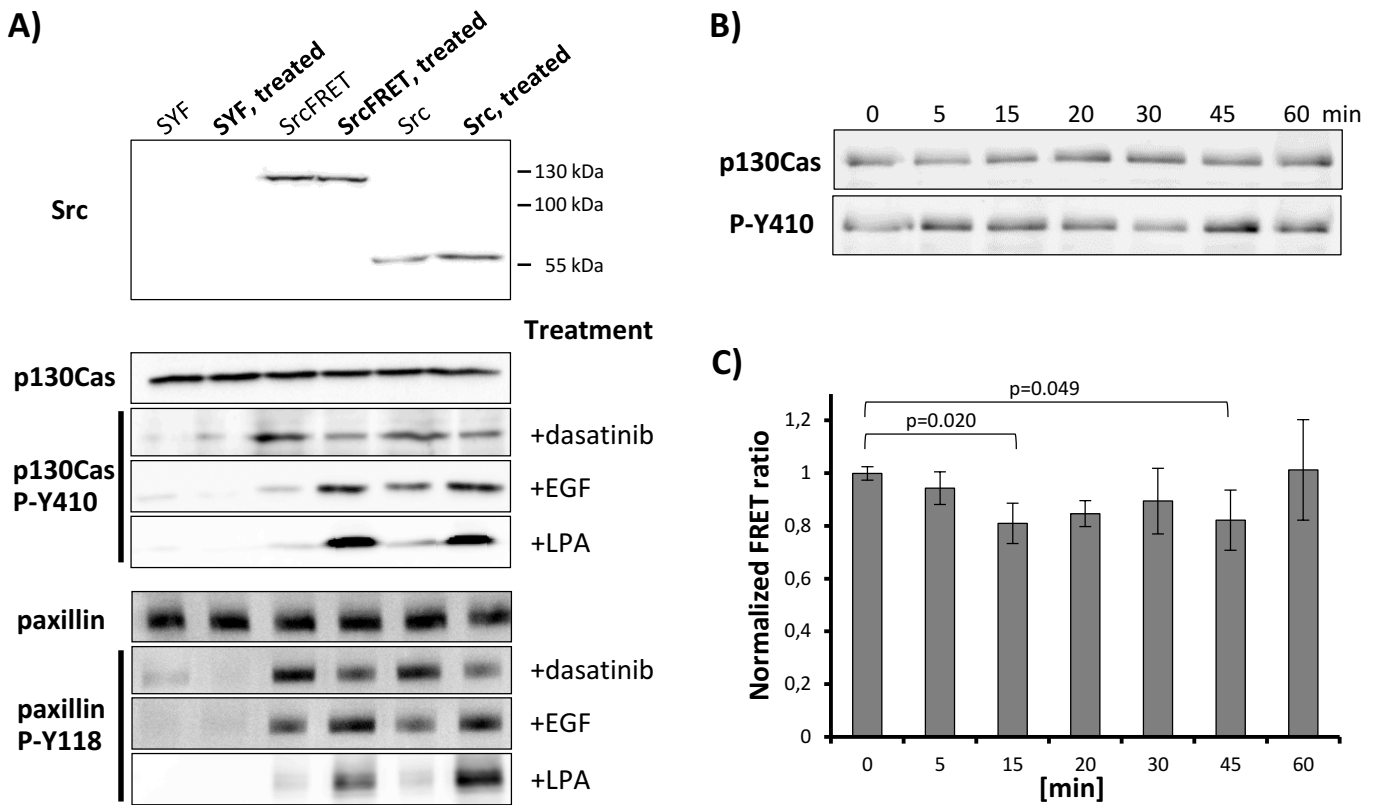


Fig. 4. Src-FRET biosensor effectively responds to treatments activating and inhibiting Src. A) SYF cells and SYFs stably expressing Src-FRET biosensor (SrcFRET) or c-Src (Src) were incubated for 30 min +/- 150nM dasatinib, for 12 hours +/- 100 ng/ml EGF or for 2 hours +/- 10 μ M LPA. Cells were then lysed and analyzed for expression and phosphorylation of Src substrates paxillin and p130Cas. Representative blots from three independent experiments are shown. B, C) SYF cells stably expressing SrcFRET-WT biosensor were seeded on fibronectin coated flexible membrane, incubated for 24 h, and then subjected to 20% static stretch for indicated times. B) Cells were lysed and analyzed by Western blotting against phosphorylated Y410 (P-Y410) in the p130Cas (anti-P-Cas) substrate domain. Representative blot from three independent experiments is shown. C) Cells were lysed and in native cell lysates the FRET was analyzed as a ratio of FRET fluorescence intensity (λ_{ex} 433, λ_{em} 530) and fluorescence intensity of mCFP (λ_{ex} 433, λ_{em} 480). FRET ratio of unstretched cells (0 min) was arbitrary set to 1. The data are shown as mean +/- standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to unstretched cells (0 min) as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

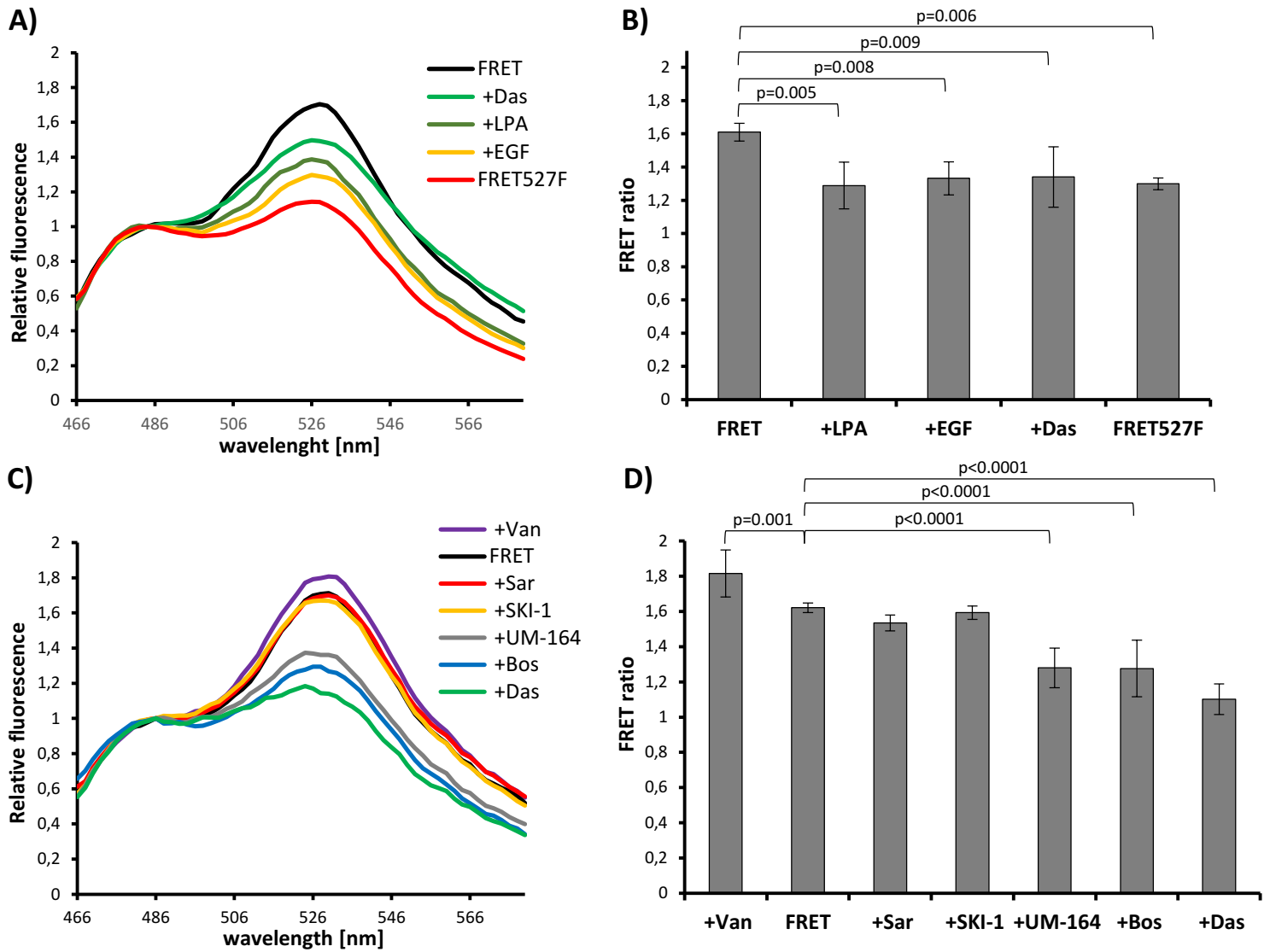


Fig. 5. Src-FRET biosensor is responsive to activatory and inhibitory treatments in cells. SrcFRET biosensor (FRET) and biosensor with activating Tyr527 to Phe mutation (FRET527F) were stably expressed in SYF cells. SYFs expressing the FRET-WT biosensor were incubated for 10 min with 10 μ M LPA (serum starved, +LPA), 24 hours with 100 ng/ml EGF (serum starved, +EGF), 60 min with 500 μ M Sodium Orthovanadate (+Van), or for 60 min with Src kinase inhibitors: 100nM dasatinib (+Das), 4 μ M saractinib (+Sar), 1 μ M bosutinib (+Bos), 100nM UM-164 (+UM-164), or 10 μ M SKI-1 (+SKI-1). A, C) Representative emission spectra. Relative fluorescence represents fluorescence intensity normalized to emission maximum of mCFP. B, D) Bar graph represents ratio of normalized mCit (530 nm) and mCFP (480 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of minimum 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to FRET ratio from untreated cells (FRET) as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

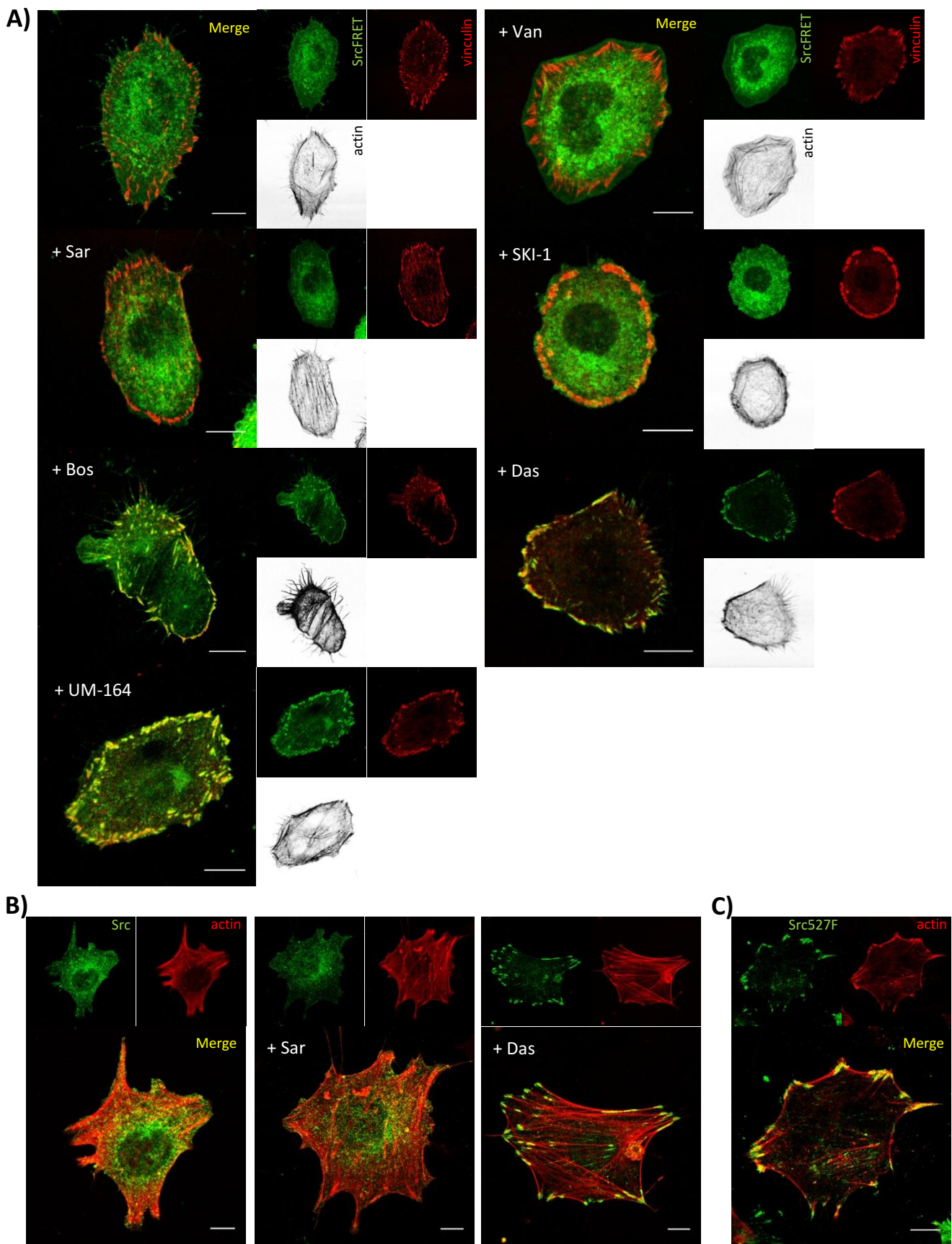


Fig. 6. The effect of Src inhibitors on Src-FRET biosensor localization. SYF cells stably expressing SrcFRET-WT biosensor (A), c-Src (B) or activated Src (Src527F, C) were directly stained or incubated for 60 min with 500 μM Sodium Orthovanadate (+Van), or for 60 min with Src kinase inhibitors: 100 nM dasatinib (+Das), 4 μM saractinib (+Sar), 1 μM bosutinib (+Bos), 100 nM UM-164 (+UM-164), or 10 μM SKI-1 (+SKI-1). Cells were then fixed and stained for vinculin (focal adhesions marker, red (A)), F-actin (grey (A) or red (B, C)) or Src (mCit fluorescence (A) or anti-Src antibody (B, C), green) and imaged by confocal microscopy. Scale bar 10 μm.

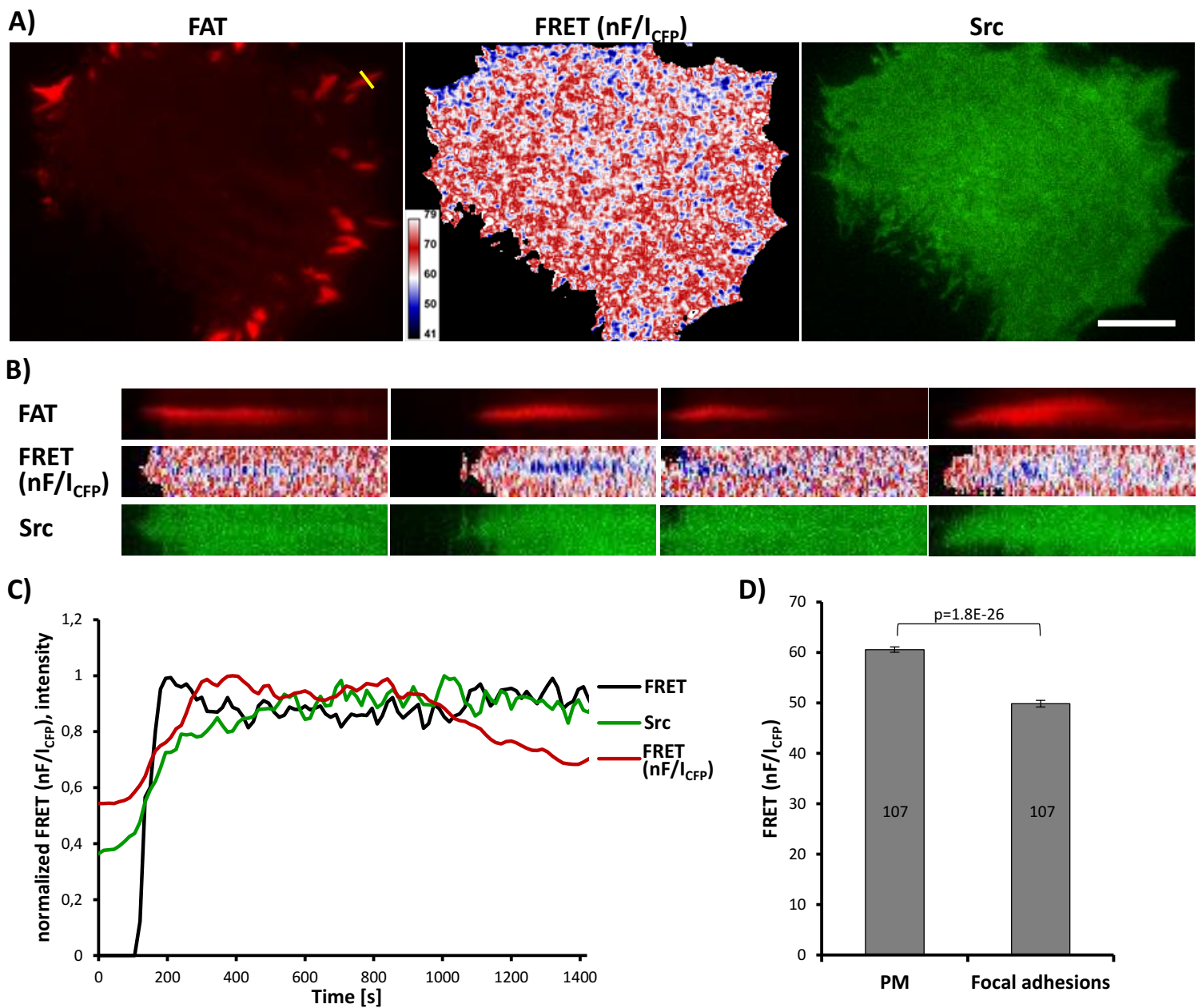


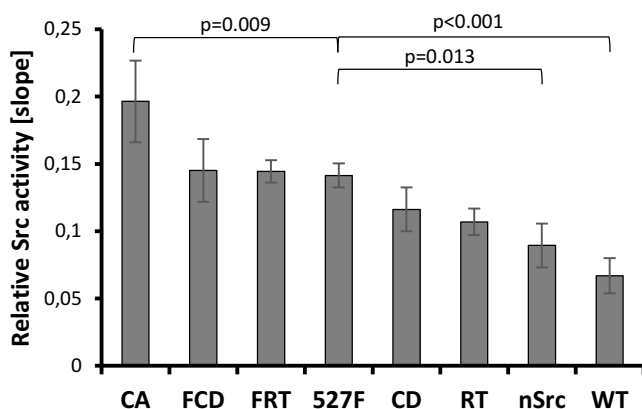
Fig. 7. Src activity in focal adhesions. U2OS cells transiently co-expressing mTurquoise2-based Src-FRET(T) and mCherry-FAT were imaged in live. *A)* Representative cell image showing focal adhesions (FAT - mCherry signal, red), Src activity map (FRET (nF/I_{CFP})) and Src-FRET(T) localization (Src - mCit signal, green). The yellow line across focal adhesion indicates the place of the first (left) kymograph analysis. Scale bar 10 μm. *B)* Representative kymographs (out of 20) of FAT, Src-FRET(T) localization and Src-FRET(T) activity dynamics in focal adhesions. *C)* Representative graph showing dynamics of mCherry-FAT (FAT), Src-FRET(T) (Src) localization and Src-FRET(T) activity (FRET (nF/I_{CFP})) dynamics in focal adhesion. The data correspond to the first (left) kymograph in B) and are normalized to maximum values. *D)* The bar graph shows average FRET (nF/I_{CFP}) +/- standard error in focal adhesions and random regions of plasma membrane (PM) of similar size as the focal adhesions. Number in the bar graphs indicates number of individual measurements. P value indicates statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Supplemental Information

Novel FRET-based Src biosensor reveals mechanisms of Src activation and its dynamics in focal adhesions

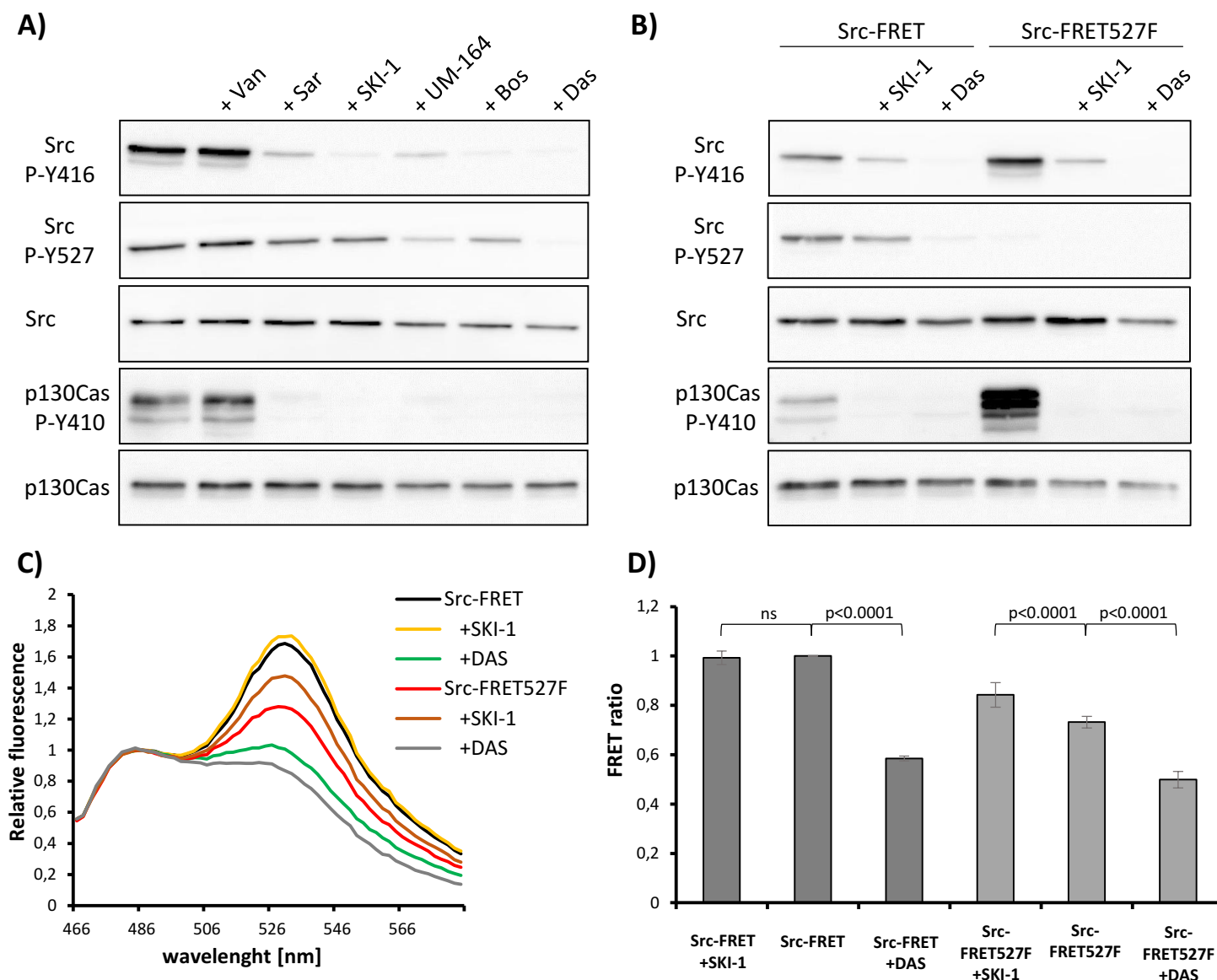
Lenka Koudelkova, Andreea Csilla Pataki, Ondřej Tolde, Vojtech Pavlik, Max Nobis, Jakub Gemperle, Kurt Anderson, Jan Brábek, Daniel Rosel

Supplemental Fig. 1.



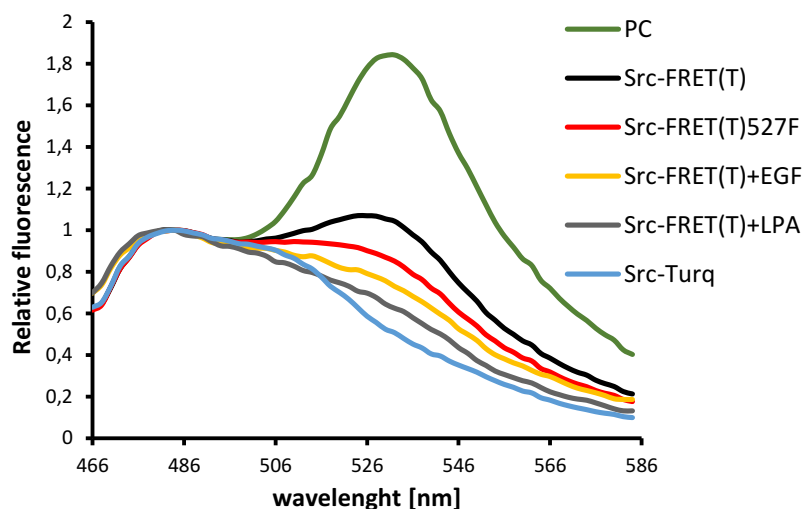
Supplemental Fig. 1. Kinase activity of Src-FRET biosensor variants. The biosensors variants were transfected into U2OS cells, lysed in kinase buffer and the Src kinase activity was analyzed using Omnia kinase assay. Bar graph represents average slope of the kinetic curve +/- standard deviation out of 3 independent experiments. P values indicate statistical significance compared to Src-FRET527F as calculated by one-way ANOVA and followed by Tukey's post-hoc test.

Supplemental Fig. 2.



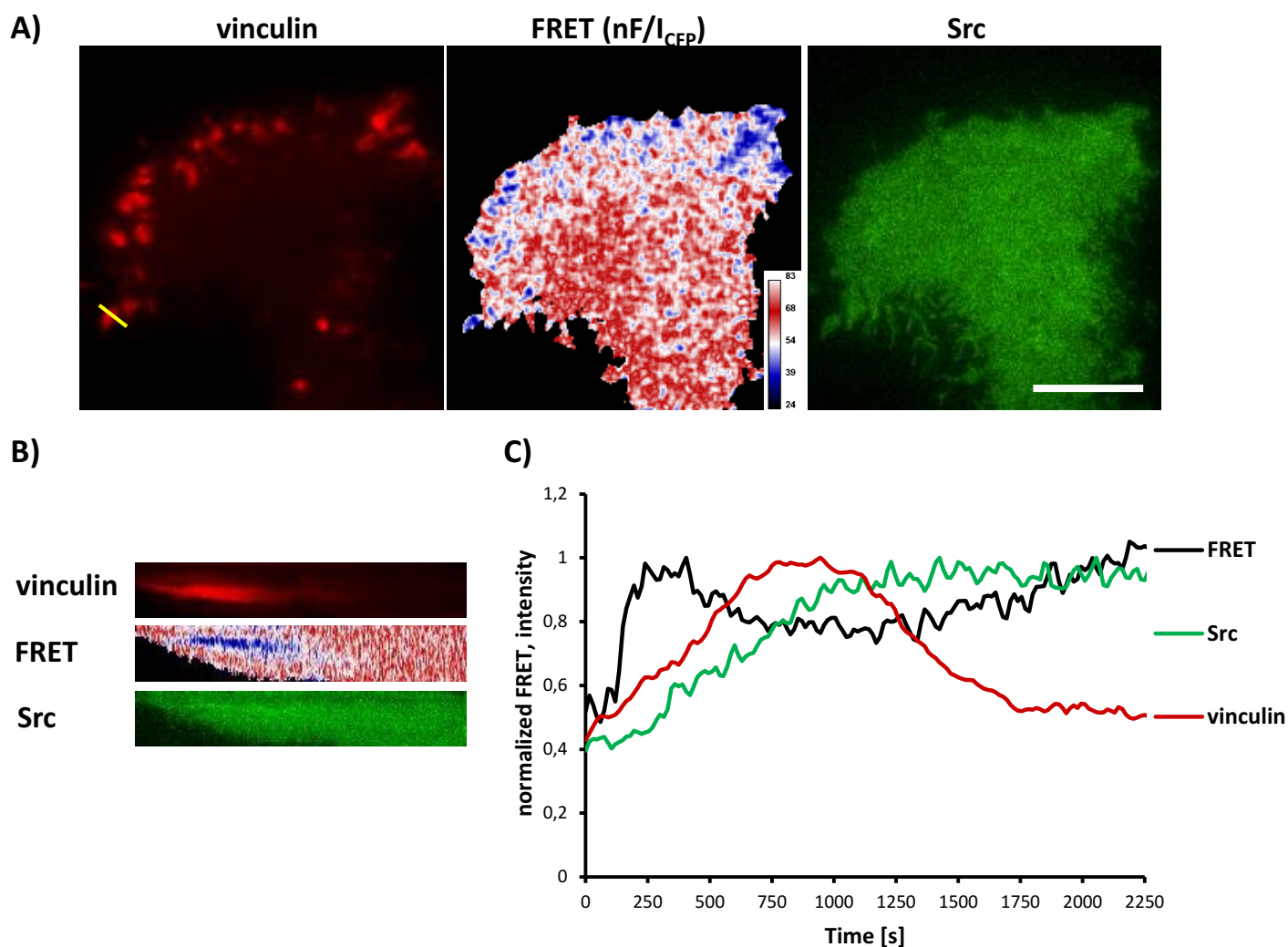
Supplemental Fig. 2. Src kinase is inhibited upon treatment with Src inhibitors. SYFs expressing the FRET-WT biosensor were incubated for 60 min with 500 μ M Sodium Orthovanadate (+Van), 100 nM dasatinib (+Das), 4 μ M saractinib (+Sar), 1 μ M bosutinib (+Bos), 100 nM UM-164 (+UM-164), or 10 μ M SKI-1 (+SKI-1). Cells were then lysed and A) analyzed for Src phosphorylation on Tyr416 and Tyr527 and p130Cas phosphorylation (P-Y410) by Western blotting. B) U2OS cells were transfected with Src-FRET or Src-FRET527F biosensor. After 60 min of incubation with 100 nM dasatinib (+Das) or 10 μ M SKI-1 (+SKI-1) cells were lysed and analyzed for Src phosphorylation on Tyr416 and Tyr527 and also for p130Cas phosphorylation by Western blotting or C,D) fluorescence emission spectra were recorded. C) Representative emission spectra. Relative fluorescence represents fluorescence intensity normalized to emission maximum of mCFP. D) Bar graph represents ratio of normalized mCit (530 nm) and mCFP (460 nm) emission. The data are shown as mean \pm standard deviation out of 3 independent experiments performed in triplicates. P values indicate statistical significance compared to FRET ratio from untreated cells as calculated by one-way ANOVA.

Supplemental Fig. 3.



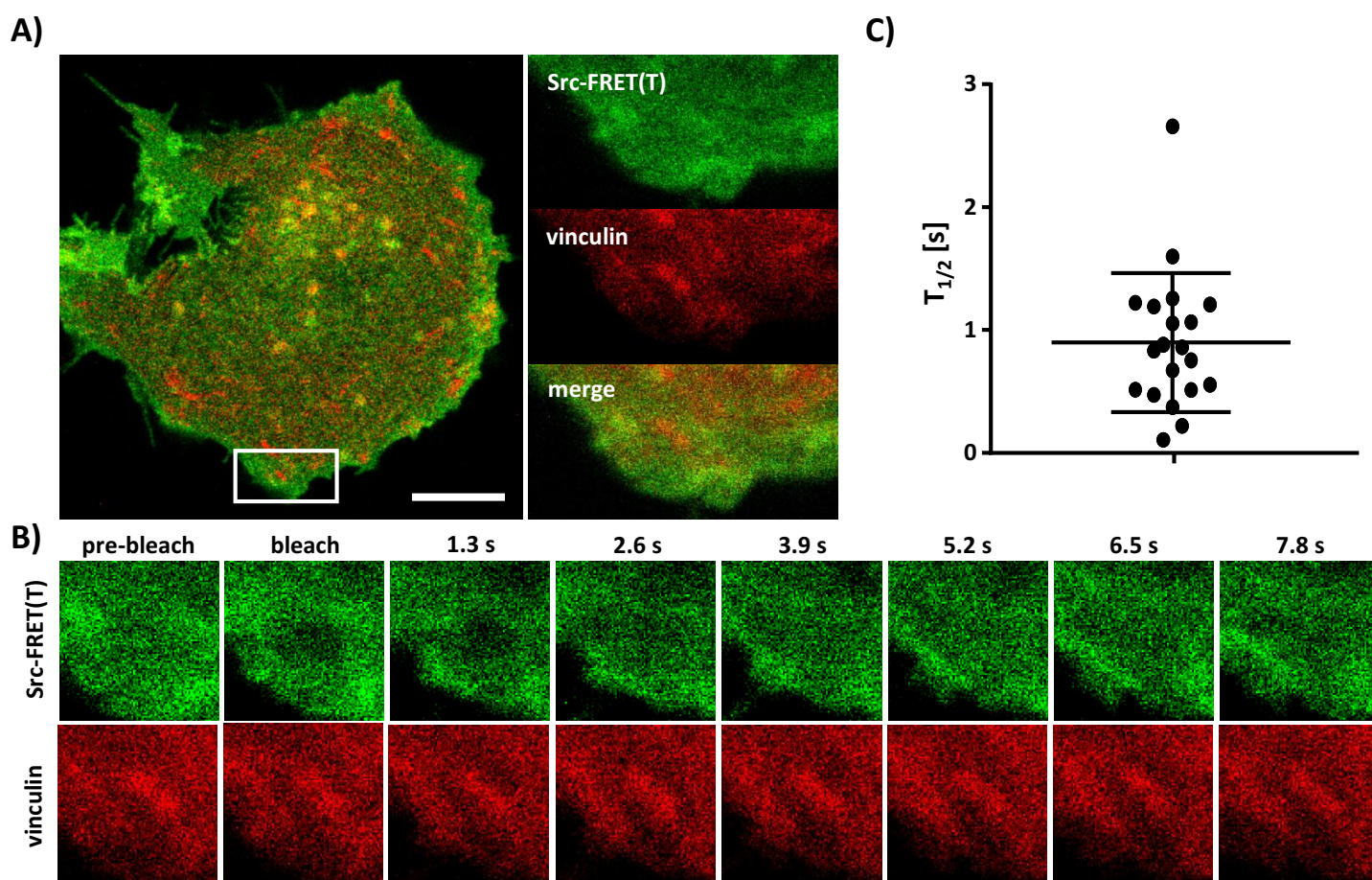
Supplemental Fig. 3. Analysis of mTurquoise2-based Src-FRET biosensor. The SYF cells transiently expressing Src-mTurquoise2 (Src-Turq), mTurquoise2-based FRET positive control (PC) or mTurquoise2-based Src-FRET biosensor variants were incubated 24 hours with 100 ng/ml EGF (serum starved, +EGF) or 10 min with 10 μ M LPA (serum starved, +LPA). Cells were then lysed and fluorescence spectra were recorded. Representative emission spectra is shown. Relative fluorescence represents fluorescence intensity normalized to emission maximum of mTurquoise2.

Supplemental Fig. 4.



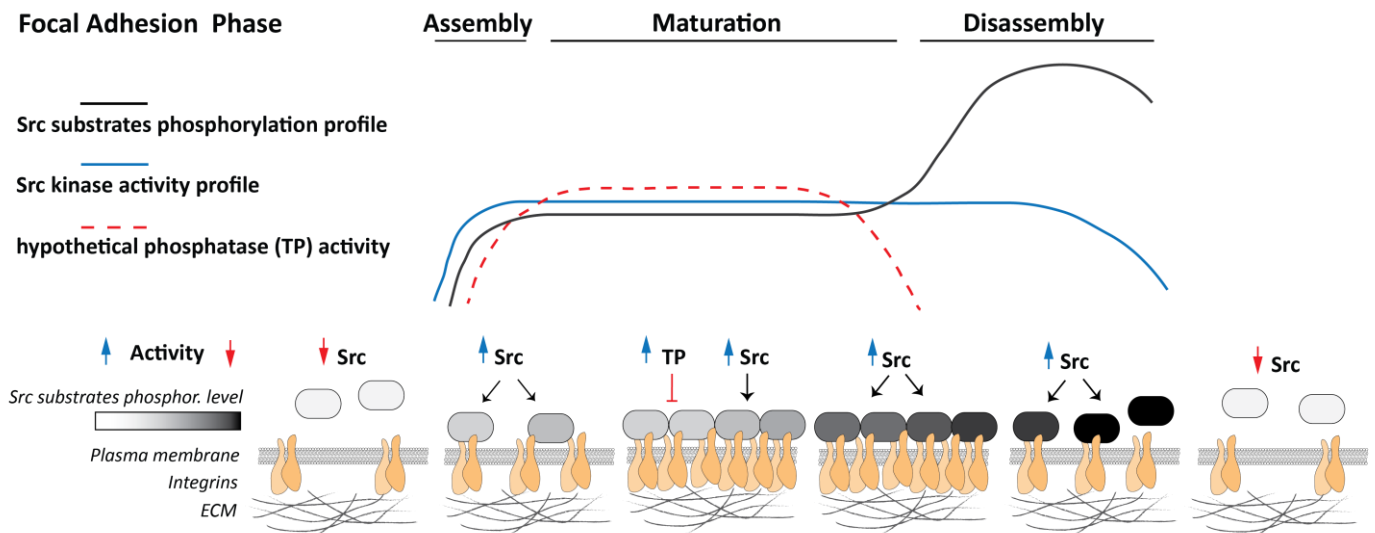
Supplemental Fig. 4. Src activity in focal adhesions. U2OS cells transiently co-expressing mTurquoise2-based Src-FRET(T) and mCherry-vinculin were imaged in life. **A)** Representative cell image showing focal adhesion (vinculin - mCherry signal, red), Src activity map (FRET) and Src-FRET(T) localization (Src - mCit signal, green). The yellow line across focal adhesion indicates the place of the kymograph analysis. **B)** Representative kymograph (out of 8) of mCherry-vinculin (vinculin), Src-FRET(T) (Src) localization and Src-FRET(T) activity (FRET) dynamics in focal adhesions within 2400 s time-frame. **C)** Representative graph showing dynamics of mCherry-vinculin (vinculin), Src-FRET(T) (Src) localization and Src-FRET(T) activity (FRET (nF/I_{CFP})) dynamics in focal adhesion. The data correspond to the kymograph in B) and are normalized to maximum values. Scale bar 10 μ m.

Supplemental Fig. 5.



Supplemental Fig. 5. FRAP analysis of Src dynamics in focal adhesions. U2OS cells were transiently transfected to co-express Src-FRET(T) and mCherry-vinculin. Focal adhesion was detected as the mCherry signal and within the boundaries of the mCherry signal the mCit signal was photobleached and its recovery was monitored. A) Cell image. B) Representative time frames of exemplary FRAP analysis corresponding to the area selected in A). C) The scatter dot plot graph (mean \pm standard deviation) shows distribution of mCit half-time recoveries in focal adhesions out of 20 focal adhesions analyzed. Scale bar 20 μ m.

Supplemental Fig. 6.



Supplemental Fig. 6 Model of Src activity in focal adhesions. Src is locally and rapidly activated during focal adhesion assembly. Its activity remains high during the maturation of focal adhesions but is counteracted by tyrosine phosphatases (TP) which stabilize the level of phosphorylation of the Src substrates. The disassembly is initiated by hyperphosphorylation of Src targets, potentially because of decreased phosphatases' activity, followed by gradual loss of Src activity.

Phosphorylation of tyrosine 90 within Src SH3 domain represents a new regulatory switch controlling Src kinase activity, oncogenic transformation and cellular invasiveness

Lenka Koudelková, Zuzana Brůhová, Martin Sztacho, Vojtěch Pavlík, Jakub Gemperle, Jan Brábek, Daniel Rösel

ABSTRACT

Src kinase is an essential component for a multitude of fundamental cellular processes. Deregulated Src activity results in oncogenic transformation, therefore Src activation is stringently controlled and repressed under most conditions. The inactive conformation of the kinase is maintained by intramolecular inhibitory interactions mediated by SH3 and SH2 domains, which impose structural constraints on the kinase domain holding it in a catalytically non-permissive state. Disruption of these interactions leads to Src activation. The transition between active and inactive state is known to be largely regulated by the phosphorylation state of key tyrosines 416 and 527. Here we identified phosphorylation of tyrosine 90 on the binding surface of SH3 domain as a new regulatory switch controlling Src kinase activation. Using substitutions mimicking the phosphorylation states of the residue we demonstrated that phosphorylation of tyrosine 90 controls Src catalytic activity, conformation and interactions mediated by the SH3 domain, representing a positive regulatory mechanism leading to elevated activation of mitogenic pathways and increased invasive potential of cells.

KEYWORDS

Src, SH3 domain, phosphorylation, structure, transformation, invasiveness

INTRODUCTION

Src kinase is a founding member of the Src family nonreceptor tyrosine kinases (SFK) that are crucial for a large variety of signalling and metabolic pathways such as cell differentiation proliferation, survival and motility (Guarino, 2010; Thomas and Brugge, 1997; Yeatman, 2004). The significance of these processes therefore requires precise and tight regulation of the kinase. Aberrant Src activation leads to cellular transformation and has been found in several types of cancers including gastric, lung, pancreatic, ovarian or breast neoplasms (Frame, 2002; Irby and Yeatman, 2000).

Src and other members of SFK share common multidomain architecture consisting of myristoylated SH4 domain at very N-terminus followed by unique domain, regulatory SH3

and SH2 domains, CD linker, catalytic domain and C-terminal tail containing the regulatory residue Y527 (chicken c-Src numbering will be used throughout the paper). The activity of Src kinase is regulated in response to numerous cellular signals through allosteric conformational transitions. In the inactive state Src adopts the closed conformation with the SH3 domain interacting with the CD linker, and the SH2 domain bound to the C-terminus phosphorylated on Y527. These autoinhibitory interactions pack both regulatory domains against the kinase domain on the site opposite to the catalytic cleft. In this position SH3 and SH2 domains concomitantly form contacts with lobes of the kinase domain working as a clamp locking the kinase domain in the catalytically non-permissive state characterised by the activation loop folded inside the catalytic cleft and the α C-helix of the N-lobe rotated away from the active site (Boggan and Eck, 2004; Xu et al., 1997, 1999; Young et al., 2001). The shift to the open active conformation is accompanied by a release of intramolecular inhibitory interactions, which enables the kinase domain to adopt a catalytically favourable state with the unfolded activation loop accessible for phosphorylation and the α C-helix rotated toward the active site (Cowan-Jacob et al., 2005). Kinase activity and engagement of regulatory domains into autoinhibitory interactions are controlled by the presence of ligands for SH3 and SH2 domains and by the phosphorylation status of two regulatory tyrosines with opposing effects. Phosphorylated Y527 in the C-terminal tail associates with the SH2 domain, resulting in an inhibition of kinase activity. The phosphorylation of Y416 in the activation loop stabilises the active conformation of the kinase domain and is necessary for full catalytic activity (Roskoski, 2005).

The role and mechanism of SH2 – phosphorylated C-terminus inhibitory interaction have been well characterised. The regulation of the SH3 domain engagement appears to be more complex and less understood. Besides binding a proline motif within the CD linker, SH3 domain forms another set of inhibitory contacts with the N-lobe of the kinase domain via the RT loop and the nSrc loop (Brábek et al., 2002). Additionally, together with the SH2 domain, the SH3 domain holds the CD linker in a position, which stabilises the inactive conformation of the catalytic domain (Fajer et al., 2017). Furthermore, the SH3 domain associates with membranes and provides structural support for intrinsically disordered SH4 and unique domains, therefore operating as a hub interconnecting signals from the flexible membrane-bound N-terminal part of Src together with information from structured units of the kinase (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). Despite the multitude of signalling events known to be mediated by the SH3 domain, the full complexity of regulation of this network remains to be understood, including the hierarchy and autonomy of individual elements or the exact effect on Src conformation.

In the present study, we are proposing novel additional mechanism of Src kinase regulation via the SH3 domain. We identified tyrosine 90 (Y90) as a new regulatory phosphorylation site within the SH3 domain. Using phosphomimicking or nonphosphorylatable substitutions of Y90 we showed that phosphorylation of Y90 increases

Src kinase activity, reduce its affinity for SH3 domain ligands and induces the open conformation of the kinase. Furthermore, deregulating Y90 phosphorylation dynamics with a phosphomimicking mutation induces cellular transformation and increases invasive potential of cells.

RESULTS

Substitutions mimicking phosphorylation states of Y90 affect Src kinase activity

In a proteomic study (Luo et al., 2008), where phosphoproteomes of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and Src-transformed MEFs were compared using a spectral counting approach complemented by SILAC (stable isotope labelling with amino acids in cell culture), tyrosine 90 in the Src SH3 domain was identified as a new residue within the kinase, which can be phosphorylated *in vivo*. Tyrosine 90 is localised on the binding surface of the Src SH3 domain and participates in the formation of the hydrophobic pocket involved in ligand binding, including the CD linker of Src kinase. The interaction between the SH3 domain and the CD linker is one of the regulatory switches participating in the maintenance of the inactivated state of the kinase (Boggon and Eck, 2004; Xu et al., 1997). Therefore, changes within the binding surface of the SH3 domain, such as phosphorylation of one of the amino acid residues, might affect Src regulation.

In order to analyse the role of tyrosine 90 phosphorylation on Src kinase activity, we prepared mutational variants of Src with either the phosphomimicking Y90E substitution (Y90 changed to glutamic acid) or the nonphosphorylatable Y90F substitution (Y90 changed to phenylalanine). These mutants, together with wild type Src (c-Src) and constitutively active Src (Src Y527F) as a control, were stably expressed in SYF cells, a lineage of mouse embryonic fibroblasts with deleted genes for Src family kinases Src, Yes and Fyn (Klinghoffer et al., 1999).

Initially, we analysed the effect of the phosphomimicking substitution Y90E on the phosphorylation of Src activation loop tyrosine 416, which is known to correlate with Src kinase activity (Boerner et al., 1996). We found that the Y90E substitution results in a significant increase of Y416 phosphorylation, suggesting that phosphorylation of Y90 increases autophosphorylation of Src. (Figure 1A, 1B).

Next, we decided to analyse the direct effect of Y90E and Y90F substitutions on kinase activity of Src. Src activity was measured in lysates prepared from SYF cells stably expressing Src variants. Consistently with the analysis of autophosphorylation, we found kinase activity of SrcY90E variant to be significantly increased relative to that of c-Src. Moreover, nonphosphorylatable variant Src Y90F displayed slightly lower kinase activity than wild type c-Src (Figure 1C, 1D).

Taken together, these results suggest that tyrosine 90 within the Src SH3 domain is involved in the regulation of Src autophosphorylation and kinase activity.

Phosphomimic mutation Y90E reduces ligand binding

Elevated kinase activity of Src90E indicates impaired association of the CD linker to the SH3 domain. To further examine effect of Y90 substitutions on binding properties of the SH3 domain, we performed pull-down assays with GST-fused Src SH3 domain variants (WT, Y90E, Y90F). The amount of proteins precipitated via GST-SH3-90E was greatly reduced compared to the GST-SH3-WT sample. Moreover, the phosphomimicking substitution Y90E almost completely abolished the binding of some of key Src SH3 domain interacting proteins, including FAK, p130Cas, Stat3 and paxillin. In contrast, Y90F mutation has a minor or no effect on ligand interaction, except for FAK binding, which was also partially abrogated (Figure 2A, 2B). These results suggest that phosphorylation of tyrosine 90 profoundly changes binding properties of the SH3 domain, affecting its ability to interact with Src kinase signalling partners.

To assess the impact of the altered affinity of the SH3 domain on binding potential of the full-length kinase we immunoprecipitated Src variants from SYF lineages and detected the amount of SH3-interacting proteins. We observed substantially a decreased association of the phosphomimicking mutant Src90E to FAK. Interactions of full-length Src90E with p130Cas, Stat3 or paxillin when compared to c-Src were also weakened, but rather moderately. Src with the nonphosphorylatable substitution 90F exhibited similar binding to the selected SH3-interacting proteins as c-Src (Figure 2C, 2D).

Src90E has transforming potential

Deregulated and therefore more active forms of Src kinase are capable of inducing cellular transformation. Cells transformed with activated Src typically exhibit a loss of contact inhibition and gain of ability to grow independently of attachment (Frame, 2002; Thomas and Brugge, 1997). As shown above, Src90E possesses elevated kinase activity and at the same time reduced SH3 domain ligand binding. To analyse whether elevated Src kinase activity of Y90E variant is able to induce transformation even under the condition of reduced SH3 domain ligand binding, we performed a soft agar assay with Src variants. Normal fibroblasts are not capable of growing in such an environment and die by anoikis, while transformed cells survive and proliferate.

As expected, the highest number of colonies were induced in SYF fibroblast expressing the constitutively active Src527F. SYF cells bearing just the empty vector (SYF-MSCV) were not able to form any colonies. In the majority of experiments no colonies were present with SYF-Src90F cells either. SYF fibroblasts with the phosphomimicking mutant Src90E were able to growth independently of attachment profoundly better than SYF cells with wild type c-Src, although less efficiently when compared to SYF-Src527F. These results indicate that Src90E has a transforming potential (Figure 3A, 3B).

In control experiments, we analysed the proliferation rates in 2D. Expression of either Src variant leads to increased proliferation of SYF fibroblasts. Although we did not observe

any significant changes among the variants themselves, SYF-Src90E and SYF-Src527F proliferated slightly faster compared to SYF-Src90F and SYF-c-Src cells (Figure 3C).

Transformed cellular phenotype is a consequence of aberrant activation of mitogenic signalling pathways which are normally under the control of Src. Crucial contribution to transformation mediated by Src is ascribed to Ras/MAPK, PI3K/Akt and Stat3 pathways (Penuel and Martin, 1999). Therefore, we evaluated the activation status of these signalling pathways in SYF cells expressing Src variants by determining phosphorylation levels of Erk1/2 pT202/pY204, Akt pS473 and Stat3 pY705. SYF-Src90E cells exhibited significantly elevated activation of all three pathways compared to SYFs with wild type c-Src. The increase in Erk1/2 phosphorylation was similar to that observed in SYF-Src Y527F cells, while the increase in phosphorylation of Akt and Stat3 was less prominent. Conversely, SYF-Src90F fibroblasts manifested reduced signalling through Ras/MAPK, PI3K/Akt and Stat3 than SYF-c-Src cells, although the difference was not statistically significant (Figure 3D).

Taken together, these results suggest that Y90 phosphorylation itself represents a positive regulatory mechanism of Src leading to elevated activation of mitogenic pathways and oncogenic transformation.

Phosphomimicking Src90E variant increases cell invasiveness

Src kinase is essential for cellular movement and regulates numerous attributes of cell motility (Guarino, 2010). Thus, we analysed cell invasion capability of SYF cells expressing individual Src variants. We used two types of experimental setups: a vertical 3D collagen invasion assay, with cells invading in to a collagen layer, for analysis of individual cell invasion and a spheroid invasion assay, which better mimics invasion from tumours with respect to growth kinetics, microenvironment (gradients of oxygen, nutrients, metabolites) and appropriate morphological and functional features of cells (Friedrich et al., 2007).

In both experimental setups SYF fibroblasts expressing Src with the phosphomimicking mutation Y90E exhibit increased ability to invade into collagen compared to SYFs with wild type c-Src, albeit lower than SYF cells bearing constitutively active Src527F. SYF fibroblasts expressing the nonphosphorylatable variant Src90F invade comparably or less, though not significantly, than SYF-c-Src cells. SYFs without Src (MSCV) were non-invasive or displayed very low invasiveness (Figure 4).

Since integrin-mediated Src signalling was shown to have an important role in Src-promoted cellular invasiveness (Brábek et al., 2004; Guarino, 2010; Thomas and Brugge, 1997), we also analysed the phosphorylation status of Src substrates involved in integrin signalling. Compared to cells with wild type c-Src, we detected increased levels of phosphorylated FAK, p130Cas and paxillin in SYF-Src527F fibroblasts. Cells expressing the phosphomimicking variant Src90E exhibited elevated phosphorylation of p130Cas and paxillin, yet less pronounced than SYF-Src527F cells. Interestingly, in the case of FAK

kinase, expression of Src90E reduced (FAK pY861) or did not change (FAK pY397) the phosphorylation of the protein. SYF fibroblasts with the Src90F mutant displayed decreased phosphorylation of FAK, p130Cas and paxillin in comparison with SYF-c-Src cells (with statistical significance only for FAK Y861) (Figure 5).

Abrogating Y90 phosphorylation dynamics by the phosphomimicking substitution Y90E resulted in substantially elevated invasive potential of cells, revealing possible role of Y90 phosphorylation in regulation of cellular motility. Despite its high catalytic activity and capability to enhance cell invasiveness, Src90E causes mild or even lower Src-mediated phosphorylation of proteins associated with focal adhesions and integrin signalling than c-Src.

Effect of Y527F-activated Src can be modulated by Y90 phosphorylation

The mutation mimicking the phosphorylation of Y90 increased Src kinase activity, transforming and invasion-promoting potential, while the non-phosphorylatable Y90F variant exhibited opposite effects. Since Y90 phosphorylation is expected to interfere with the intramolecular lock between the SH3 domain and the CD linker, we wondered whether the phosphorylation status of Y90 would be able to affect already activated Src via Y527F substitution, which abrogates the binding of the SH2 domain to the C-terminus. We therefore created SYF cell lines expressing double-mutated Src variants (Src527F90E, Src527F90F) and analysed these molecules for kinase activity. We measured a small increase in catalytic activity for the Src527F90E variant compared to Src527F and a small decrease of activity in the case of Src527F90F, though the differences were not statistically significant (Figure 6A, 6B).

To assess cellular response to doublemutated Src variants we performed a soft agar assay to test their transforming potential. We observed a significant increment in the number of colonies while expressing Src527F90E indicating its higher capability to induce cellular transformation in comparison with Src527F. Analysing invasiveness of the cells by spheroid invasion assay provided more substantial changes with Src527F90E enhancing and Src527F90F reducing the impact of Src527F (Figure 6C – 6F). These results suggest that biological activity of the SH2-activated Src molecule might be further modulated by alterations within the SH3 domain.

Phosphorylation of Y90 represents an autoactivatory mechanism opening Src structure

Elevated kinase activity and reduced ligand binding of the phosphomimicking mutant Src90E indicate that Y90 phosphorylation decreases the affinity of the SH3 domain for the CD linker, thus causing a loosening of the compact conformation maintained by inhibited Src. To evaluate effects of Y90 substitutions on Src structure, we assessed the compactness of the Src variants by employing FRET-based sensor of Src conformation (Koudelková et

al., 2019). The sensor is a genetically encoded probe of intramolecular FRET within full-length Src with CFP as a the donor and mCit as the acceptor fluorophore of the FRET pair inserted into the SH2 domain and at very C-terminus of the kinase, respectively. In the inactive compact conformation, the fluorophores are in close proximity, which results in high values of FRET. Upon activation, the structure of the kinase loosens, causing separation of the fluorophores and a decrease of FRET (Figure 7A).

The sequence of the original SrcFRET sensor was modified by introducing the Y90 phosphomimicking and nonphosphorylatable mutations alone or together with the 527F activating mutation. We expressed the constructs in the U2OS cell line and measured FRET in lysates using a ratiometric approach. The nonphosphorylatable Y90F version exerted higher FRET than the non-mutated sensor indicating a more compact conformation. Conversely, the phosphomimicking mutation Y90E led to a decrease in FRET to an intermediate level between SrcFRET and SrcFRET527F, therefore opening the Src structure but to lower extend compared to SrcFRET527F. In the context of SH2-activated Src, the Y90E mutation (SrcFRET527F90E) did not cause any further opening of the kinase conformation, whereas the Y90F substitution (SrcFRET527F90F) led to a more condensed structure in comparison with Src527F (Figure 7B, 7C). In agreement with the effects on catalytic activity and binding properties of the SH3 domain, we demonstrated that substitutions mimicking phosphorylation state of Y90 alter Src conformation indicating a role of Y90 phosphorylation in regulation of kinase structure.

Based on prediction algorithms Y90 is likely to be phosphorylated by Src family kinases or Src itself (Tatárová et al., 2012). To support this notion we took advantage of an established panel of Src activatory mutations which we evaluated for the effect on structural compactness and catalytic activity by introducing them in the SrcFRET sensor (Koudelková et al., 2019). From this set we selected three SrcFRET variants exhibiting distinct kinase activities: the original sensor with unmutated Src (SrcFRET) representing a molecule with the lowest activity, SrcFRET-527F and SrcFRET-CA (Glu381Gly, (Bjorge et al., 1995)) possessing the highest activity. Chosen variants were analysed for Y90 phosphorylation level using quantitative mass spectrometry. Y90 phosphorylation was detected in SrcFRET and with approximately 5-times or 12-times higher occurrence in activated constructs SrcFRET-527F or SrcFRET-CA, respectively (Figure 7D). The revealed positive correlation between kinase activity and Y90 phosphorylation level suggests that Y90 is phosphorylated through autophosphorylation mechanisms or via Src-dependent phosphorylation by Src family kinases.

We did not observe any apparent changes in Src cellular localisation caused by either Y90E or Y90F mutations. SrcFRET90E and SrcFRET90F display equally uniform cellular distribution as SrcFRET with enrichment in membrane ruffles. Constructs containing the 527F mutation (SrcFRET527F, SrcFRET527F90E, SrcFRET527F90F) localised strongly to focal adhesions (Figure 8).

DISCUSSION

Activity of Src kinase is regulated mainly by the phosphorylation status of Y416 and Y527, and associated intramolecular inhibitory interaction mediated by SH3 and SH2 domains (Boggon and Eck, 2004). Additional regulatory levels predominantly involve phosphorylation of serines or threonines within unique domain and kinase dimerization (Amata et al., 2014; Dandoulaki et al., 2018; Spassov et al., 2018).

In this study, we are documenting phosphorylation of Y90 on the binding surface of the SH3 domain as a novel regulatory mechanism of Src kinase. Src phosphorylated on Y90 was found in mouse embryonic fibroblasts transformed by oncogenic Src or in non-small cell lung carcinoma cells stimulated with HGF (Johnson et al., 2013; Luo et al., 2008). We were able to detect Y90 phosphorylation in unstimulated non-transformed cells expressing c-Src, but with weak occurrence, five-times lower compared to cells bearing Src527F. Mimicking Y90 phosphorylation resulted in increased Src kinase activity, reduced ability of the SH3 domain to bind ligands and more open conformation of the kinase. Expression of the phosphomimicking mutant in cells leads to cellular transformation and elevated invasiveness.

Tyrosine 90 is flanked by aminoacid motif ALYDY/F conserved among SH3 domains on sequential and structural level. This sequence was found in 15 % of human SH3 domains, several of which were reported to be phosphorylated (Tatárová et al., 2012). For example in SH3 domains of PST-PIP, Btk kinase or adaptor protein p130Cas phosphorylation of tyrosines corresponding to Y90 causes decreased or changed affinity for ligands (Gemperle et al., 2017; Janoštiak et al., 2011; Morrogh et al., 1999; Park et al., 1996; Wu et al., 1998). In chronic myeloid leukaemia cells the SH3-SH2 segment of Bcr-Abl kinase was found to be heavily phosphorylated on 7 residues including the Y90 homolog, which induces full catalytic activity of the fusion protein (Chen et al., 2008; Meyn et al., 2006).

In the context of Src structure, together with N135 and Y136, Y90 forms the first hydrophobic pocket of the SH3 domain binding surface, which in the inactive conformation of Src kinase accommodates dipeptide including key proline 250 of SH3-interacting motif within the CD linker (Xu et al., 1997). The importance of Y90 for ligand binding was mentioned in an early study mapping conserved residues within the SH3 domain (Erpel et al., 1995). Substitution of Y90 for alanine led to partially deregulated Src and reduced affinity of the SH3 domain. Based on NMR analyses and molecular dynamics simulations of ligand binding by the p130Cas SH3 domain containing homologous tyrosine (Gemperle et al., 2017) we propose that the aromatic ring of unphosphorylated Y90 forms CH/ π interactions with the dipeptide in the binding pocket. Phosphorylation of Y90, through negative charge of the phosphate group, causes disruption of these nonpolar bonds with a consequent decrease in affinity of the SH3 domain for its ligands. Y90 phosphorylation state might therefore influence Src kinase via dual mechanism of action: affecting the ability to

associate with interacting partners and regulating catalytic activity by modulating SH3 domain binding to the CD linker.

Altered binding properties of the SH3 domain, induced by phosphomimicking substitution of Y90, are manifested rather by decreased affinity for all types of ligands than through a changed spectrum of interactors. This is mainly apparent from experiments with isolated SH3 domains, where the phosphomimicking mutation Y90E completely abolished association of several known interacting partners. At the level of the full-length kinase, the loss of the SH3 domain binding ability was not that markedly apparent, therefore appears to be compensated by the SH2 domain.

Molecular dynamics simulations show, that residues of the CD linker are directly responsible for retaining the inactive conformation of the catalytic domain. The SH3 domain concomitantly with the SH2 domain stabilize this inhibitory position of the CD linker (Fajer et al., 2017). We propose that phosphorylation of Y90 within the binding surface of the SH3 domain leads to a decreased affinity for the CD linker, presumably followed by a destabilisation of contacts with the kinase domain and a shift to the catalytically active state. The phosphomimicking Src90E mutant adopts a partially open conformation with the SH3 domain released from inhibitory interactions. The SH2 domain appears to be bound to the C-terminal tail, since Src90E does not localise to focal adhesions, which is an attribute of a disengaged form of the SH2 domain (Wu et al., 2015). Therefore, we suggest that Src may exist in the SH3-only activated state hence increasing diversity and regulatory potential of its signalling.

Introduction of Y90E or Y90F mutations into the SH2-activated kinase (via Y527F substitution) leads only to minor changes in kinase activity. Invasive and transforming effects were altered more profoundly, with the Y90E mutation enhancing and the Y90F substitution reducing the impact of 527F-activated Src. Thus we assume that both regulatory domains cooperate and influence the kinase structure and activity with some degree of independency, enabling Src to adopt several active conformations (SH2-activated, SH3-activated, SH2+SH3-activated). This structural and functional hierarchy might be further projected into functional diversity allowing Src to operate as a signalling hub transmitting and regulating a plethora of distinct cellular signals.

NMR studies show that the SH3 domain acts as a scaffold providing structural support to intrinsically disordered SH4 and unique domains (UD). Moreover, similarly to these flexible N-terminal domains, SH3 domain is also capable of associating with membranes, especially with those containing negatively charged lipids. Membrane contacts of SH3 domain are maintained by RT and nSrc loops, which are also responsible for binding unique and SH4 domains, respectively (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). Ligand binding by the SH3 domain propagates across the domain structure, abrogating interactions of the RT loop with lipids and UD, which leads to elevated conformational flexibility of UD and reduced contacts with the membrane (Cordier et al., 2000; Maffei et al., 2015; Wang et al.,

2001). Phosphorylation of Y90 decreases interaction of the SH3 domain with ligands, thereby we suggest that Y90 phosphorylation might lead to an increased association of the SH3 domain with UD and the lipid layer resulting in slower mobility within membranes and prolonged residence in focal adhesion sites. This seems to be in agreement with the work of Machiyama and col. (Machiyama et al., 2015), who were analysing movement of single Src molecules within the plasma membrane. They demonstrated decreased membrane motility and increased dissociation times from focal adhesions of Src with W118A mutation, which abrogates ligand binding to the SH3 domain (Erpel et al., 1995).

Due to the size limitation inherent to the NMR technique, constructs used in the studies comprises only of SH4, unique and SH3 domains, therefore it is difficult to predict the behaviour of the full-length Src kinase. Since RT and nSrc loops also form inhibitory contacts with the N-terminal lobe of the kinase domain (Brábek et al., 2002; Xu et al., 1997) and residues of the RT loop (R95, T96) responsible for this interaction overlap with some of those associating with membranes and UD, it is tempting to perceive the SH3 domain as a crucial mediator of Src activation. We speculate that phosphorylation of Y90 will block binding of the CD linker by the SH3 domain, which might cause a shift towards the state where the SH3 domain favours interactions with the cytoplasmic membrane and UD over keeping contacts with the N-lobe, resulting in kinase activation. Therefore, phosphorylation of Y90 might represent an important mechanism regulating Src catalytic activity, interactions and moreover the means of mediating motility within lipid membranes and communication between structured and unstructured parts of Src.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs and cloning

To prepare SrcY90E and SrcY90F, c-Src cloned in pBluescript SK+ vector through *Bam*HI and *Xba*I sites was mutated using QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) with the forward primer (5'-CCACTTTCGTGGCTCTCGAGACTACGAGTCCCGGACTG-3') and the reverse primer (5'-CAGTCCGGGACTCGTAGTCCTCGAGAGCCACGAAAGTGG-3') for Y90E mutation and the forward (5'-CCACTTTCGTGGCTCTCTTCGACTACGAGTCCCGGACTG-3') and the reverse (5'-CAGTCCGGGACTCGTAGTCAAGAGAGCCACGAAAGTGG-3') primers for Y90F variant. Doublemutated Src527F90E and Src527F90F were created from pBluescript-Src90E or pBluescript-Src90F by swapping C-terminal half of Src for same part but from Src527F using *Bam*HI and *Mlu*I sites. After verification by sequencing, Src variants (together with SrcY527F) were recloned into pMSCV-GFP murine retrovirus vector (pMSCVpuro vector (Clontech) where puromycin resistance gene was exchange for *gfp*; kind gift from dr. Michal Dvořák (Institute of Molecular Genetics of the ASCR, Prague, Czech Republic)). From pBluescript constructs, Src fragments were generated using *Not*I (blunt ended by *Pfu* polymerase) and *Bam*HI restriction endonucleases and inserted to *Hpa*I and *Bgl*II sites of pMSCV-GFP vector. GST-fusion constructs of SH3 domains (WT, v-Src, Y90E, Y90F) for pull-down experiments were prepared by PCR amplification from the corresponding pBluescript plasmids with the forward primer (5'-GGATCCATGGCTGGCGGCGTCACC-3') incorporating a *Bam*HI site prior to the start codon and the reverse primer (5'-GAATTCTAGATGGAGTCTGAGGGCGCG-3') adding an *Eco*RI site and the stop codon. The cleaved products were inserted into pGEX-2T vector (GE Healthcare Life Sciences) via *Bam*HI and *Eco*RI sites resulting into SH3 domain constructs carrying GST tag at their N-terminal ends. SrcFRET sensors bearing 90E or 90F mutation were prepared from SrcFRET (SrcFRET527F) (Koudelková et al., 2019) and Src90E (Src90F) constructs in pBlueScript SK+ vector by swapping 5'-end part of the gene using *Bam*HI/*Bsm*BI restriction sites. The resulted constructs were cloned into *Bam*HI/*Not*I sites of expression vector pIRESpuro3.

Cell culture

HeLa cells, Phoenix cells, U2OS and SYF (*src* -/- *yes* -/- *fyn* -/-) mouse embryonic fibroblasts (Klinghoffer et al., 1999) were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM (Sigma) with 4,5 g/l L-glucose, L-glutamine and pyruvate, supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and 50µg/ml Gentamicin (Sigma). Cell transfections were carried out using Jet Prime (Polyplus Transfection) according to manufacturer's protocol. Stable cell lines of SYF cells expressing Src variants were prepared using MSCV constructs, which were

transfected into Phoenix retroviral packaging lineage. SYF fibroblasts were infected with obtained retroviral particles and subsequently sorted by FACS for GFP-positive cells.

Immunoblotting

Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in modified RIPA buffer (0.15M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.1% SDS; 1% sodium deoxycholate; 5mM EDTA; 50mM NaF; 1mM dithiothreitol; protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)). Lysates were clarified by centrifugation and protein concentration was determined using DC Protein Assay (Bio-Rad). Samples were supplemented with Laemmli buffer (0.35M Tris-HCl, pH 6.8; 10% SDS; 40% glycerol; 0.012% Bromophenol blue, 50mM dithiothreitol), boiled for 5 minutes, separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked with Tris-buffered saline containing 4% bovine serum albumin and incubated with primary and HRP-conjugated secondary antibodies. Blots were developed using Fuji LAS-1000 chemiluminescence imaging system. Western blot quantification was carried out using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Antibodies

Antibodies for Western blot detection included actin (I-19, Santa Cruz Biotechnology), Akt (Cell Signaling Technology), Akt pS473 (Cell Signaling Technology), Cas (BD Transduction Laboratories), Cas pY410 (Cell Signaling Technology), Erk1/2 (Promega), phospho-Erk1/2 (Promega), FAK (C-20, Santa Cruz Biotechnology), FAK pY397 (Invitrogen), FAK pY861 (Abgent), paxillin (BD Transduction Laboratories), paxillin pY118 (Cell Signaling Technology), Src (clone 184Q20, Invitrogen), Src pY418 (Cell Signaling Technology), Stat3 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) and Stat3 pY705 (Cell Signaling Technology).

Kinase assay

Kinase activity of Src variants was measured using Omnia® Y Peptide 2 Kit (ThermoFisher Scientific). The assay is based on detection of fluorescence increase after kinase-specific substrate phosphorylation. Specifically, substrate peptide is attached to the chelation-enhanced fluorophore Sox. Upon phosphorylation of the peptide by the kinase, Mg²⁺ is chelated to form a bridge between the Sox moiety and the incorporated phosphate group on the tyrosine within the substrate peptide, which consequently causes increase in fluorescence. Kinase assays were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were washed with PBS and lysed in HEPES-Triton buffer (1% Triton X-100, 50mM HEPES pH 7.4, protease and phosphatase inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation. Kinase reactions (in triplicates for each variant) was assembled by adding cell lysate, kinase reaction buffer, 0.2mM DTT, 1mM ATP and 10µM peptide substrate.

Using plate reader (TECAN Infinite M200 PRO), reactions were incubated at 30 °C and fluorescence intensity was measured (λ_{ex} 360/ λ_{em} 485) at 60 second intervals for 1 hour.

Purification of GST-fused SH3 domains and GST pull-down assay

Bacterial cells BL21 were transformed with pGEX-SH3 plasmid constructs. While cultivating, expression of GST-fused variants of SH3 domains were induced by addition of IPTG (1mM concentration). After 2 hours bacteria were centrifuged, washed in LB1 buffer (50mM HEPES, pH 7,4; 100mM NaCl) and lysed by sonication. Clarified bacterial lysates were incubated with glutathione sepharose beads 4B (GE Healthcare Life Sciences). Beads with immobilized GST-SH3 domains were extensively washed in LB1 buffer and then added into lysates from HeLa cells. 2 hour of incubation was followed by washing of beads in LB1 buffer. Precipitated proteins were eluted by boiling of the beads in Laemmli sample buffer and detected using SDS-PAGE and immunoblotting.

Immunoprecipitation

SYF cells expressing Src variants were lysed in Tris-Triton buffer (1% Triton X-100, 50mM Tris HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM DTT, protease and phosphatase inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation and protein concentration was determined using DC Protein Assay (Bio-Rad). Lysates of equal protein concentration were incubated overnight in 4 °C with anti-Src antibody (Cell Signaling Technology, #2108). Complexes were pulled out using protein-A sepharose beads (GE-Healthcare), washed 4 times with Triton-Tris buffer and eluted by boiling for 10 min in 2x Laemmli buffer.

Soft agar assay

1,6% melted agar solution (Noble agar, Sigma) was mixed with warm 2x DMEM with 20% FBS and antibiotics. Using this 0,8% base agar 35 mm dish (6-well plate) was coated. 1 ml of 0,8% melted base agar was further diluted with equal volume of warm (40 °C) 1x DMEM (with 10% FBS and antibiotics) containing 2×10^3 cells and added on top of solidified layer of base agar. After stabilisation of top layer, agar was covered with medium and kept in incubator for 14 days. Then, number of colonies was counted in each dish.

Proliferation assay

5×10^3 cells (in quadruplicates per cell line) were plated on a 96-well plate and grown for 3 days. Proliferation was then analysed using alamarBlue (Life Technologies) according to manufacturer's protocol. Briefly, alamarBlue reagent was added as 10% of the sample volume to cells and after 2 hours of incubation absorbance at 570 nm (normalised to 600 nm as reference wavelength) was read on spectrophotometer (TECAN Infinite M200 PRO).

Vertical invasion assay

Cell invasiveness was analysed in 1,5 mg/ml collagen gel (rat tail, collagen type I). Collagen mixture (1,5 mg/ml rat-tail collagen, 1x DMEM, 1% FBS) was added into each well of μ -Slide Angiogenesis plate (Ibidi) and polymerized at 37 °C. 3×10^3 cells in DMEM (containing 10% FBS and antibiotics) were seeded on top of collagen gel and allowed to attached. Next day medium was aspirated and replaced for DMEM with 1% FBS. After 3 day, z-stack pictures were taken using Nikon Eclipse TE2000-S (20x/0.40 HMC objective; NIS-Elements software) and number of cells were determined in each level using ImageJ software. Invasiveness was calculated as a weighted arithmetic mean of invasion depth in the selected field. For each cell line, invasion was analysed in 3 wells (9 fields of view) per experiment.

Spheroid invasion assay

SYF cells were grown as spheroids using 3D Petri Dish (Microtissues) according to manufacturer's instructions. After 2 days of spheroids formation 1,5 mg/ml collagen solution (rat tail, collagen type I) was prepared (1,5 mg/ml rat-tail collagen, 1x DMEM, 1% FBS) and added at the bottom of 96-well plate. Spheroids were embedded into the collagen (one spheroid per well) and covered with another layer of the gel. Collagen was polymerised at 37 °C and subsequently overlaid with cultivation medium. Using Nikon Eclipse TE2000-S (4x/0.13 PHL objective; NIS-Elements software) images of spheroids were taken immediately upon their seeding into collagen and after 48 hours. In one experiment the area of 8 spheroids were analysed per each cell line with ImageJ software.

FRET measurements

U2OS cells transfected with Src sensor plasmid constructs were lysed in HEPES-Triton buffer (1% Triton X-100, 50mM HEPES pH 7,4, 1mM DTT, protease and phosphatase inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation. 150 μ l of the sample (in triplicates for each biosensor variant) was transferred in a 96-well flat bottom plate and measured using spectrophotometer (TECAN Infinite M200 PRO). Data were collected for a series of emission wavelengths with fixed excitation length. The series were taken after 2 nm step starting at 466 nm and finishing at 584 nm. FRET efficiency was determined as emission ratio 528/486 nm.

Cell immunostaining and confocal microscopy

Cells were seeded on fibronectin-coated coverslips (10 μ g/ml, Invitrogen) and grown for 24 h. Next, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized using 0,3% Triton X-100 in PBS and blocked in 3% bovine serum albumin in PBS. Samples were then incubated for 4 h with primary antibody, 1 h with secondary antibody and phalloidin for 30 min with extensive washing with PBS between each step. The slides were mounted in

Mowiol 4-88 (Millipore) containing 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (Sigma). The secondary antibody used was anti-mouse-IgG Alexa Fluor 633 (Invitrogen). F-actin was probed with phalloidin conjugated with Alexa Fluor 555 (Life Technologies). Images were acquired using Leica TCS SP8 microscope system equipped with Leica 63×/1,45 NA oil objective.

Mass spectrometry analysis

U2OS cells transfected with SrcFRET constructs were lysed in HEPES-dodecylmaltoside buffer (1% n-dodecyl β -D-maltoside, 50mM HEPES pH 7,4, 1mM DTT, protease and phosphatase inhibitors). Lysates were clarified by centrifugation and incubated overnight in 4 °C with anti-GFP antibody (Life Technologies). Complexes were pulled out using protein-A sepharose beads (GE-Healthcare) and washed 3-times with lysis buffer and twice with TBS (50mM Tris HCl pH 7,1, 150mM NaCl). Immunoprecipitated proteins were digested using trypsin on the beads and analysed by LC/MS.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Phosphomimic mutation Y90E increases kinase activity of Src. (A, B) Lysates from SYF fibroblasts stably expressing Src variants were analysed by immunodetection on western blots using antibodies against Src pY416, total Src and actin as a loading control. After densitometric analysis of the blots, ratio between Y416-phosphorylated Src and total Src was calculated. MSCV represents SYF cells bearing empty pMSCV-EGFP vector. (C, D) Kinase assay (Omnia® Y Peptide 2 Kit; ThermoFisher Scientific) was performed from lysates of SYF cells expressing Src variants. Kinase activity was measured as an increase of fluorescence depicted in Figure 1C (showing representative results from one experiment). The data are shown as means with standard deviation out of minimum 4 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Figure 2: Phosphomimic mutation Y90E reduces ligand binding. Variants of Src SH3 domains (v-Src, Y90F, Y90E, WT) were expressed as recombinant GST-SH3 fusion constructs in bacteria, isolated and used for pull-down from HeLa lysates. (A) Precipitated samples were run on SDS-PAGE electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue. Loading of GST-SH3 constructs were equal and is visible as a large band with molecular weight around 33 kDa. (B) Western blotting of precipitates was followed by immunodetection by antibodies against FAK, p130Cas, Stat3 or paxillin. Total lysate (TL) served as a positive control, GST-only sample as a negative control. (C, D) Immunoprecipitation of full-length Src variants from SYF lineages followed by immunodetection of selected SH3-binding proteins in precipitates and total cell lysates. MSCV indicates SYF cell expressing empty pMSCV-EGFP construct serving as a control. Quantification was performed from at least 3 independent experiments and represents a normalised ratio between immunoprecipitated protein and total protein.

Figure 3: Src90E has transforming potential. (A, B) Soft agar assay was performed with SYF fibroblasts stably expressing Src variants. Cells were cultivated in 0,4% agar. After 14 days number of colonies was determined. The graph shows relative amounts of colonies compared to SYF-Src527F. (C) Proliferation rate determined by AlamarBlue assay (ThermoFisher Scientific). Equal number of cells was seeded into 96-well plate in tetraplicates for every lineage. After 3 days, AlamarBlue solution was added. In two hours absorbance at 570 nm (referenced to 600 nm) was measured. (D) Activity within PI3K/Akt, Ras/MAPK and Stat3 pathways evaluated as the phosphorylation rate of Akt, Erk and Stat3. Lysates from SYF fibroblasts stably expressing Src variants were standardized to overall protein. Immunodetection on western blots was performed with antibodies against Akt, Akt pS473, Erk 1/2, pErk 1/2, Stat3 and Stat3 pY705. Rates between phosphorylated form and total protein were calculated from at least 3 independent experiments and plotted as means

with standard deviation. P values indicate statistical significance determined by one-way ANOVA.

Figure 4: Phosphomimicking mutation Y90E increases cell invasiveness. (A) Vertical invasion assay performed with SYF fibroblasts stably expressing Src variants. Cells were seeded on top of 1,5% collagen. After 3 days z-stack pictures were taken and number of cells was counted in each level. Cellular invasiveness was determined as invasive index representing weighted arithmetic mean of invasion depth. (B, C) Spheroid invasion assay. SYFs were grown as spheroids using Microtissues® 3D Petri Dish® for 48 hours. Spheroids were then embedded in 1,5% collagen. Images of spheroids were taken immediately and after 48 hours. Rate between spheroid area at 48 hours and 0 hours was determined. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Figure 5: Effect of Src variants on phosphorylation of FAK, p130Cas and paxillin. (A, B, C, D) Phosphorylation levels of FAK, p130Cas and paxillin were detected in lysates from SYF cells stably expressing Src variants. Ratio between phosphorylated form and total protein was determined based on immunodetection of total FAK, p130Cas, paxillin and their phosphorylated forms (FAK pY397, FAK pY861, p130Cas pY410, paxillin pY118). The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Figure 6: Effect of Y527F-activated Src can be modulated by Y90 phosphorylation. (A, B) Catalytic activity of Src527F and doublemutated variants was analysed using kinase assay (Omnia® Y Peptide 2 Kit; ThermoFisher Scientific). Reactions were performed from lysates of SYF cells expressing these Src variants. Kinase activity was measured as an increase of fluorescence depicted in Figure 6B (showing representative results from one experiment). (C, D) Transforming potential was assessed by soft agar assay with SYF fibroblasts stably expressing Src variants. Cells were cultivated in 0,4% agar. After 14 days number of colonies was counted. The graph shows relative amount of colonies compared to SYF-Src527F. (E, F) Invasiveness of SYF cell lines was evaluated with spheroid invasion assay. SYFs were grown as spheroids using Microtissues® 3D Petri Dish® for 48 hours. Spheroids were then embedded in 1,5% collagen. Images of spheroids were taken immediately and after 48 hours. Rate between spheroid area at 48 hours and 0 hours was determined. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Figure 7: Phosphorylation of Y90 represents an autoactivatory mechanism opening Src structure. (A) Model of SrcFRET sensor. In compact inactive conformation of Src fluorophores inserted into full-length kinase are in close proximity which leads to high FRET (left). Upon activation the structure loosens resulting in decrease of FRET. The models were

created according to PDB structures 1FMK, 1Y57, 2H5P, 1F0B. (B, C) Analysis of effects mediated by Y90 substitutions on Src kinase structure using SrcFRET sensor. SrcFRET sensor variants with Y90 (or/and Y527) mutations were expressed in U2OS cells. Fluorescence emission spectra were recorded in native cell lysates. (B) Representative emission spectra normalised to emission maximum of CFP. PC indicates positive control for FRET (construct where CFP and mCit are connected with a short linker). (C) Bar graph shows ratio of normalized mCit (525 nm) and CFP (486 nm) emission. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 4 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA. (D) Mass spectrometry analysis of phospho-Y90 content. Normalised ratio between phospho-peptide and base-peptide was plotted. The data are shown as means with standard deviation from 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

Figure 8: SrcFRET variants localisation (A) U2OS cells transiently expressing FRET constructs were fixed and stained for vinculin (focal adhesions marker, red), F-actin (grey) and imaged by confocal microscopy. SrcFRET fluorescence (mCit) is depicted in green. Scale bar 10 μm .

REFERENCES

- Amata, I., Maffei, M., and Pons, M. (2014). Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Front. Genet.* *5*, 181.
- Bjorge, J.D., Bellagamba, C., Cheng, H.C., Tanaka, A., Wang, J.H., and Fujita, D.J. (1995). Characterization of two activated mutants of human pp60c-src that escape c-Src kinase regulation by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 24222–24228.
- Boerner, R.J., Kassel, D.B., Barker, S.C., Ellis, B., DeLacy, P., and Knight, W.B. (1996). Correlation of the phosphorylation states of pp60c-src with tyrosine kinase activity: the intramolecular pY530-SH2 complex retains significant activity if Y419 is phosphorylated. *Biochemistry* *35*, 9519–9525.
- Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918–7927.
- Brábek, J., Mojzita, D., Novotný, M., Půta, F., and Folk, P. (2002). The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 664–670.
- Brábek, J., Constancio, S.S., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Weaver, A.M., and Hanks, S.K. (2004). CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene* *23*, 7406–7415.
- Chen, S., O'Reilly, L.P., Smithgall, T.E., and Engen, J.R. (2008). Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core. *J. Mol. Biol.* *383*, 414–423.
- Cordier, F., Wang, C., Grzesiek, S., and Nicholson, L.K. (2000). Ligand-induced strain in hydrogen bonds of the c-Src SH3 domain detected by NMR. *J. Mol. Biol.* *304*, 497–505.
- Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Manley, P.W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., and Meyer, T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure* *13*, 861–871.
- Dandoulaki, M., Petsalaki, E., Sumpton, D., Zanivan, S., and Zachos, G. (2018). Src activation by Chk1 promotes actin patch formation and prevents chromatin bridge breakage in cytokinesis. *J. Cell Biol.* *217*, 3071–3089.
- Erpel, T., Superti-Furga, G., and Courtneidge, S.A. (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.
- Fajer, M., Meng, Y., and Roux, B. (2017). The Activation of c-Src Tyrosine Kinase: Conformational Transition Pathway and Free Energy Landscape. *J. Phys. Chem. B* *121*, 3352–3363.
- Frame, M.C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* *1602*, 114–130.

- Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* *83*, 849–871.
- Gemperle, J., Hexnerová, R., Lepšík, M., Tesina, P., Dibus, M., Novotný, M., Brábek, J., Veverka, V., and Rosel, D. (2017). Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners. *Sci. Rep.* *7*.
- Guarino, M. (2010). Src signaling in cancer invasion. *J. Cell. Physiol.* *223*, 14–26.
- Irby, R.B., and Yeatman, T.J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* *19*, 5636–5642.
- Janoštiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hanks, S.K., Rösel, D., and Brábek, J. (2011). Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4256–4267.
- Johnson, H., Lescarbeau, R.S., Gutierrez, J.A., and White, F.M. (2013). Phosphotyrosine profiling of NSCLC cells in response to EGF and HGF reveals network specific mediators of invasion. *J. Proteome Res.* *12*, 1856–1867.
- Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A., and Soriano, P. (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* *18*, 2459–2471.
- Koudelková, L., Pataki, A.C., Tolde, O., Pavlik, V., Nobis, M., Gemperle, J., Anderson, K., Brábek, J., and Rosel, D. (2019). Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions. *Cell Chem. Biol.* *26*, 255-268.e4.
- Luo, W., Slebos, R.J., Hill, S., Li, M., Brábek, J., Amanchy, R., Chaerkady, R., Pandey, A., Ham, A.-J.L., and Hanks, S.K. (2008). Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J. Proteome Res.* *7*, 3447–3460.
- Machiyama, H., Yamaguchi, T., Sawada, Y., Watanabe, T.M., and Fujita, H. (2015). SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesions and the cell membrane. *FEBS J.* *282*, 4034–4055.
- Maffei, M., Arbesú, M., Le Roux, A.-L., Amata, I., Roche, S., and Pons, M. (2015). The SH3 Domain Acts as a Scaffold for the N-Terminal Intrinsically Disordered Regions of c-Src. *Structure* *23*, 893–902.
- Meyn, M.A., Wilson, M.B., Abdi, F.A., Fahey, N., Schiavone, A.P., Wu, J., Hochrein, J.M., Engen, J.R., and Smithgall, T.E. (2006). Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 30907–30916.
- Morrogh, L.M., Hinshelwood, S., Costello, P., Cory, G.O., and 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.
- Park, H., Wahl, M.I., Afar, D.E., Turck, C.W., Rawlings, D.J., Tam, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P., and Witte, O.N. (1996). Regulation of Btk function by a major

autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* 4, 515–525.

Pérez, Y., Maffei, M., Igea, A., Amata, I., Gairí, M., Nebreda, A.R., Bernadó, P., and Pons, M. (2013). Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism. *Sci. Rep.* 3, 1295.

Roskoski, R. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1–14.

Spasov, D.S., Ruiz-Saenz, A., Piple, A., and Moasser, M.M. (2018). A Dimerization Function in the Intrinsically Disordered N-Terminal Region of Src. *Cell Rep.* 25, 449–463.e4.

Tatárová, Z., Brábek, J., Rösel, D., and Novotný, M. (2012). SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution. *PLoS One* 7, e36310.

Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609.

Wang, C., Pawley, N.H., and Nicholson, L.K. (2001). The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. *J. Mol. Biol.* 313, 873–887.

Wu, J.-C., Chen, Y.-C., Kuo, C.-T., Wenshin Yu, H., Chen, Y.-Q., Chiou, A., and Kuo, J.-C. (2015). Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration. *Sci. Rep.* 5, 18476.

Wu, Y., Spencer, S.D., and Lasky, L.A. (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.

Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595–602.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., and Harrison, S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* 3, 629–638.

Yeatman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* 4, 470–480.

Young, M. a, Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., and Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105, 115–126.

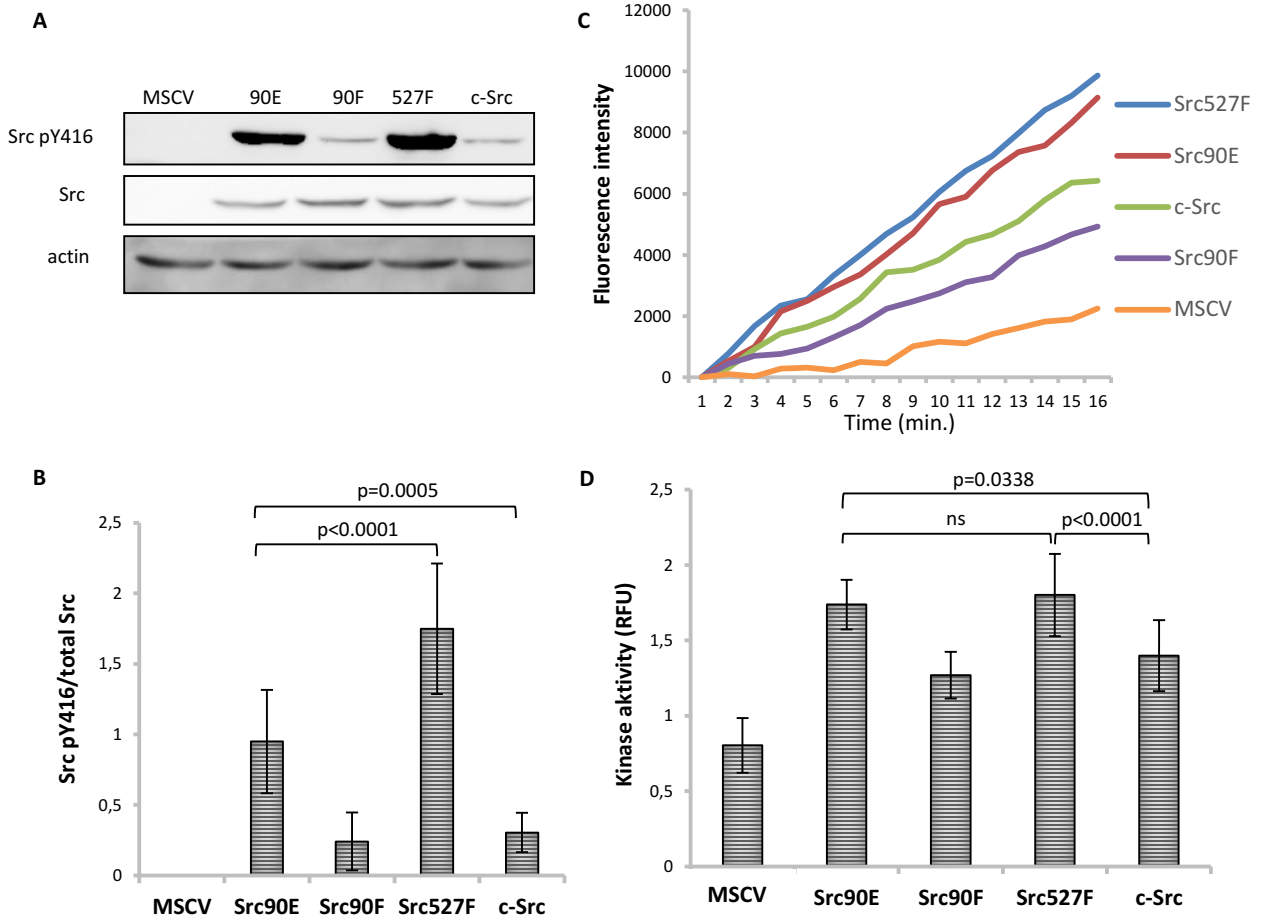


Figure 1: Phosphomimic mutation Y90E increases kinase activity of Src. (A, B) Lysates from SYF fibroblasts stably expressing Src variants were analysed by immunodetection on western blots using antibodies against Src pY416, total Src and actin as a loading control. After densitometric analysis of the blots, ratio between Y416-phosphorylated Src and total Src was calculated. MSCV represents SYF cells bearing empty pMSCV-EGFP vector. (C, D) Kinase assay (Omnia® Y Peptide 2 Kit; ThermoFisher Scientific) was performed from lysates of SYF cells expressing Src variants. Kinase activity was measured as an increase of fluorescence depicted in Figure 1C (showing representative results from one experiment). The data are shown as means with standard deviation out of minimum 4 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

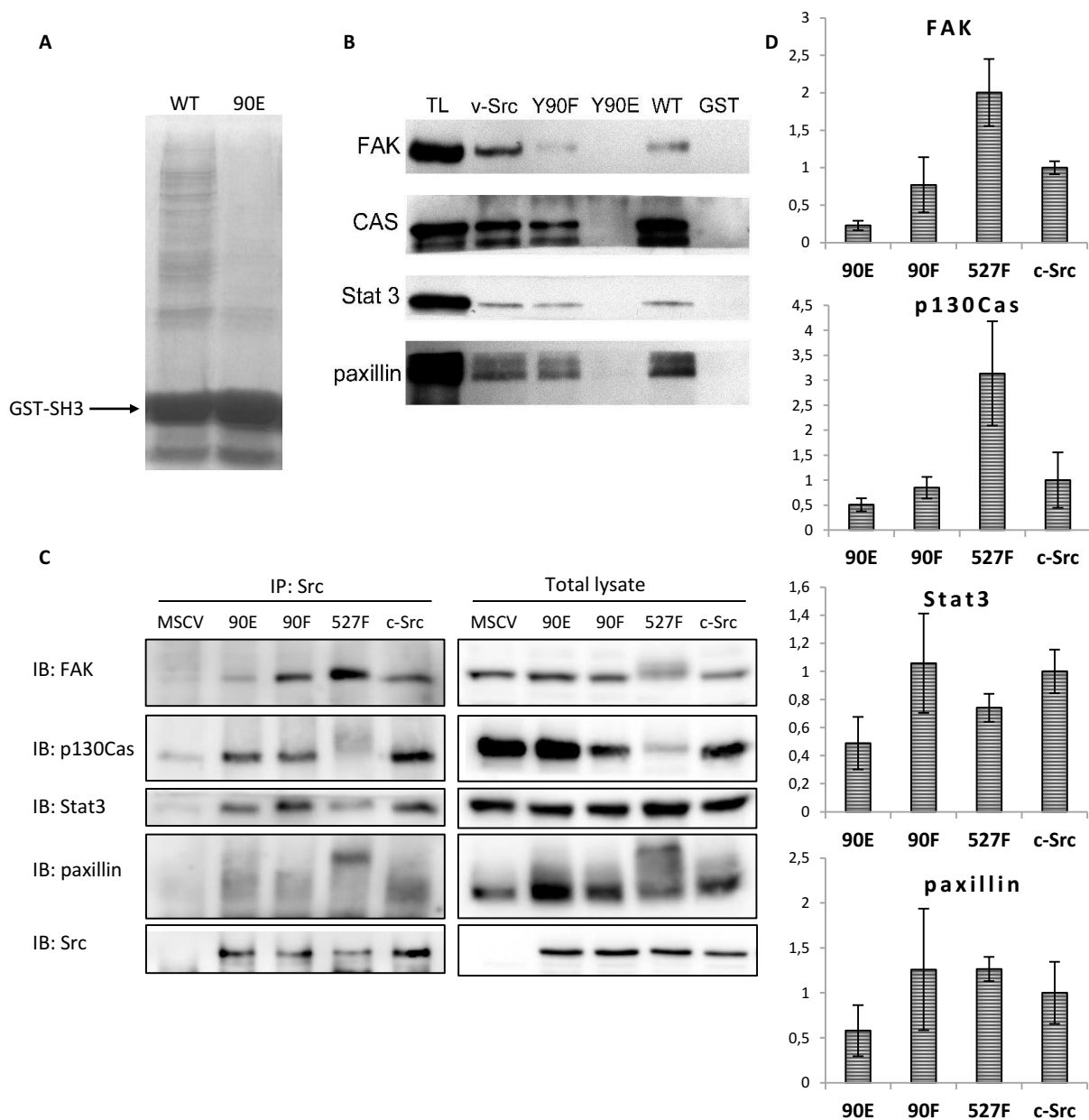


Figure 2: Phosphomimetic mutation Y90E reduces ligand binding. Variants of Src SH3 domains (v-Src, Y90F, Y90E, WT) were expressed as recombinant GST-SH3 fusion constructs in bacteria, isolated and used for pull-down from HeLa lysates. (A) Precipitated samples were run on SDS-PAGE electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue. Loading of GST-SH3 constructs were equal and is visible as a large band with molecular weight around 33 kDa. (B) Western blotting of precipitates was followed by immunodetection by antibodies against FAK, p130Cas, Stat3 or paxillin. Total lysate (TL) served as a positive control, GST-only sample as a negative control. (C, D) Immunoprecipitation of full-length Src variants from SYF lineages followed by immunodetection of selected SH3-binding proteins in precipitates and total cell lysates. MSCV indicates SYF cell expressing empty pMSCV-EGFP construct serving as a control. Quantification was performed from at least 3 independent experiments and represents a normalised ratio between immunoprecipitated protein and total protein.

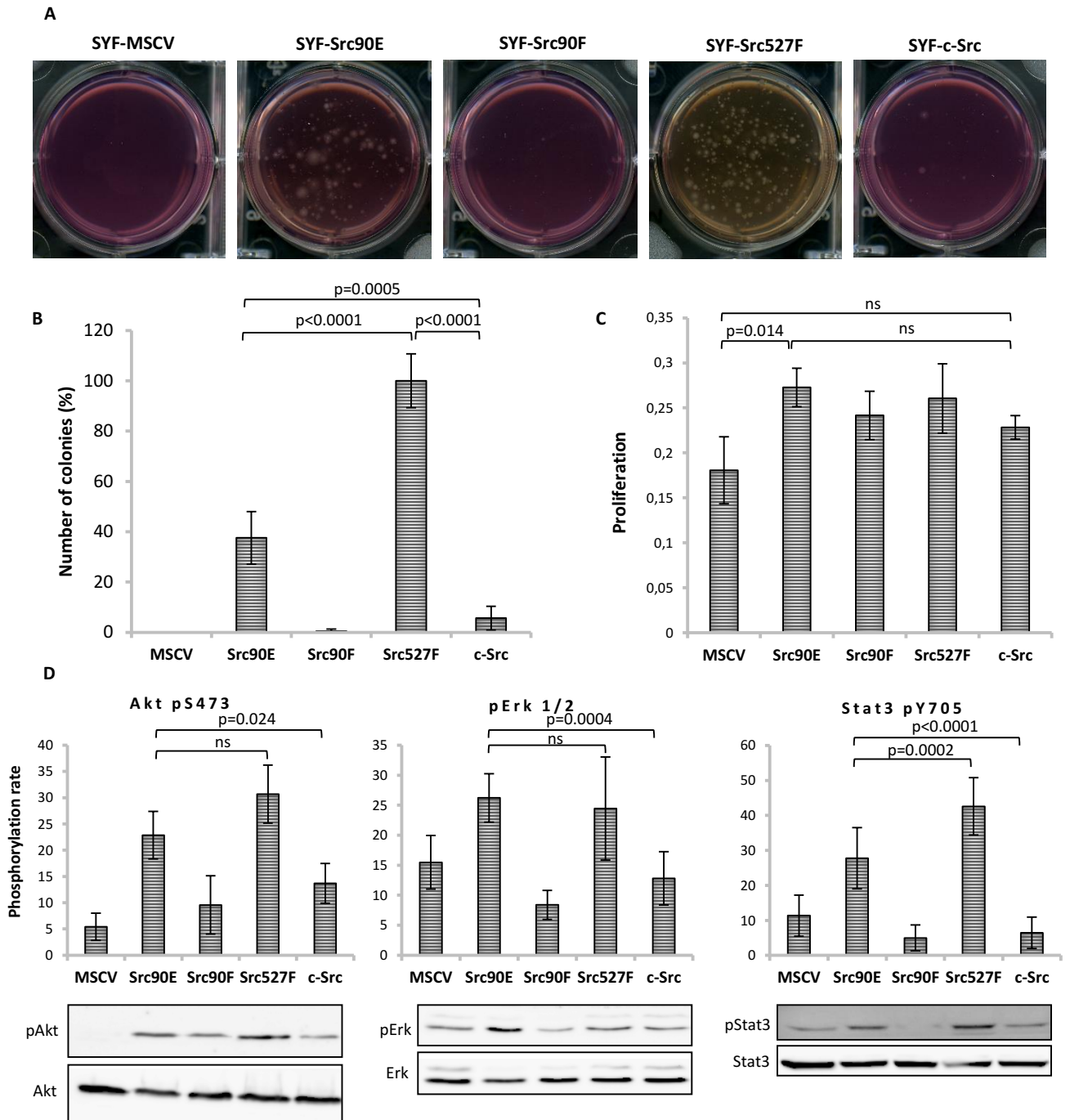


Figure 3: *Src90E* has transforming potential. (A, B) Soft agar assay was performed with SYF fibroblasts stably expressing *Src* variants. Cells were cultivated in 0,4% agar. After 14 days number of colonies was determined. The graph shows relative amounts of colonies compared to SYF-*Src527F*. (C) Proliferation rate determined by AlamarBlue assay (ThermoFisher Scientific). Equal number of cells was seeded into 98-well plate in tetraplicates for every lineage. After 3 days, AlamarBlue solution was added. In two hours absorbance at 570 nm (referenced to 600 nm) was measured. (D) Activity within PI3K/Akt, Ras/MAPK and Stat3 pathways evaluated as the phosphorylation rate of Akt, Erk and Stat3. Lysates from SYF fibroblasts stably expressing *Src* variants were standardized to overall protein. Immunodetection on western blots was performed with antibodies against Akt, Akt pS473, Erk 1/2, pErk 1/2, Stat3 and Stat3 pY705. Rates between phosphorylated form and total protein were calculated from at least 3 independent experiments and plotted as means with standard deviation. P values indicate statistical significance determined by one-way ANOVA.

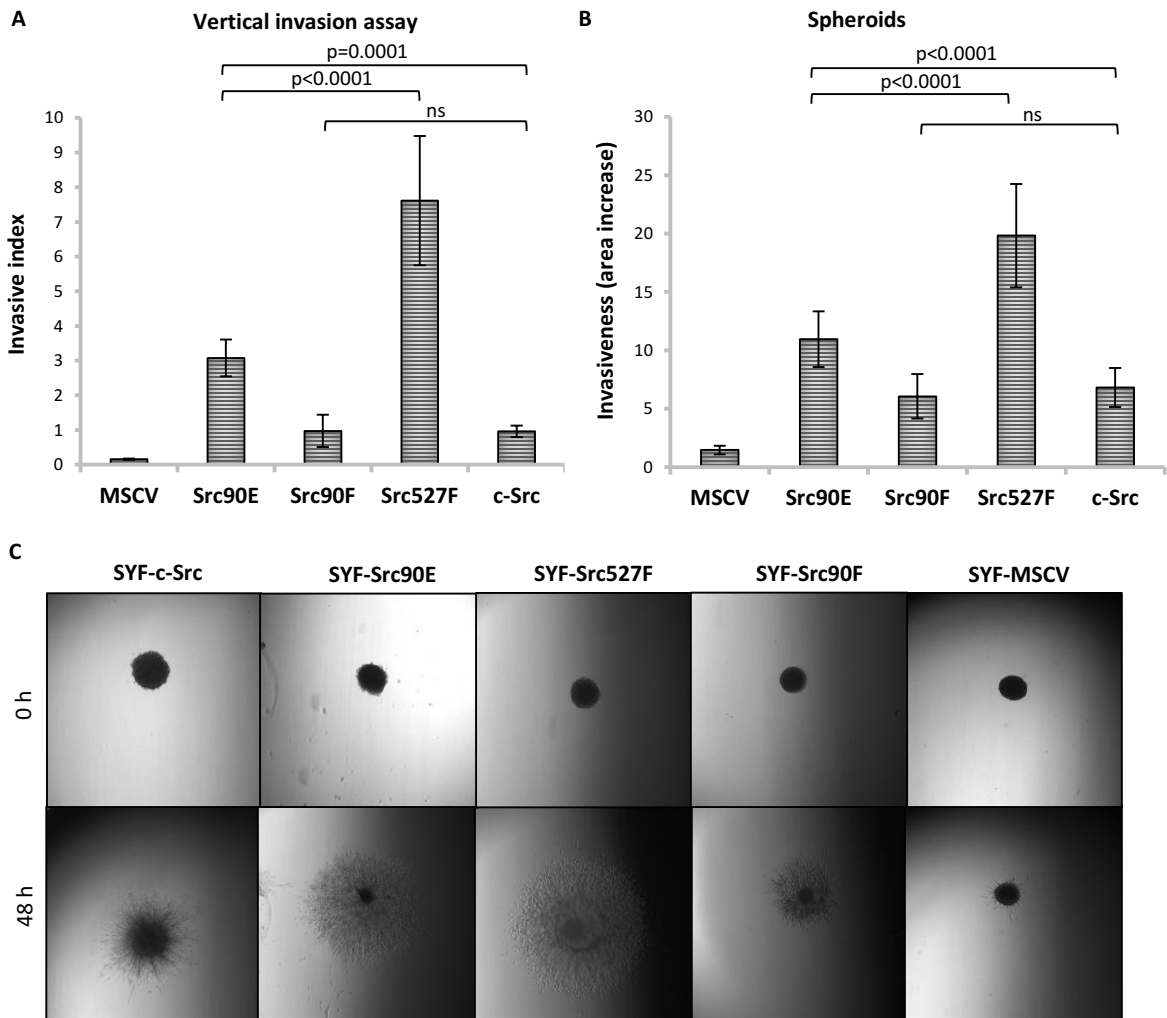


Figure 4: Phosphomimicking mutation Y90E increases cell invasiveness. (A) Vertical invasion assay performed with SYF fibroblasts stably expressing Src variants. Cells were seeded on top of 1,5% collagen. After 3 days z-stack pictures were taken and number of cells was counted in each level. Cellular invasiveness was determined as invasive index representing weighted arithmetic mean of invasion depth. (B, C) Spheroid invasion assay. SYFs were grown as spheroids using Microtissues® 3D Petri Dish® for 48 hours. Spheroids were then embedded in 1,5% collagen. Images of spheroids were taken immediately and after 48 hours. Rate between spheroid area at 48 hours and 0 hours was determined. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

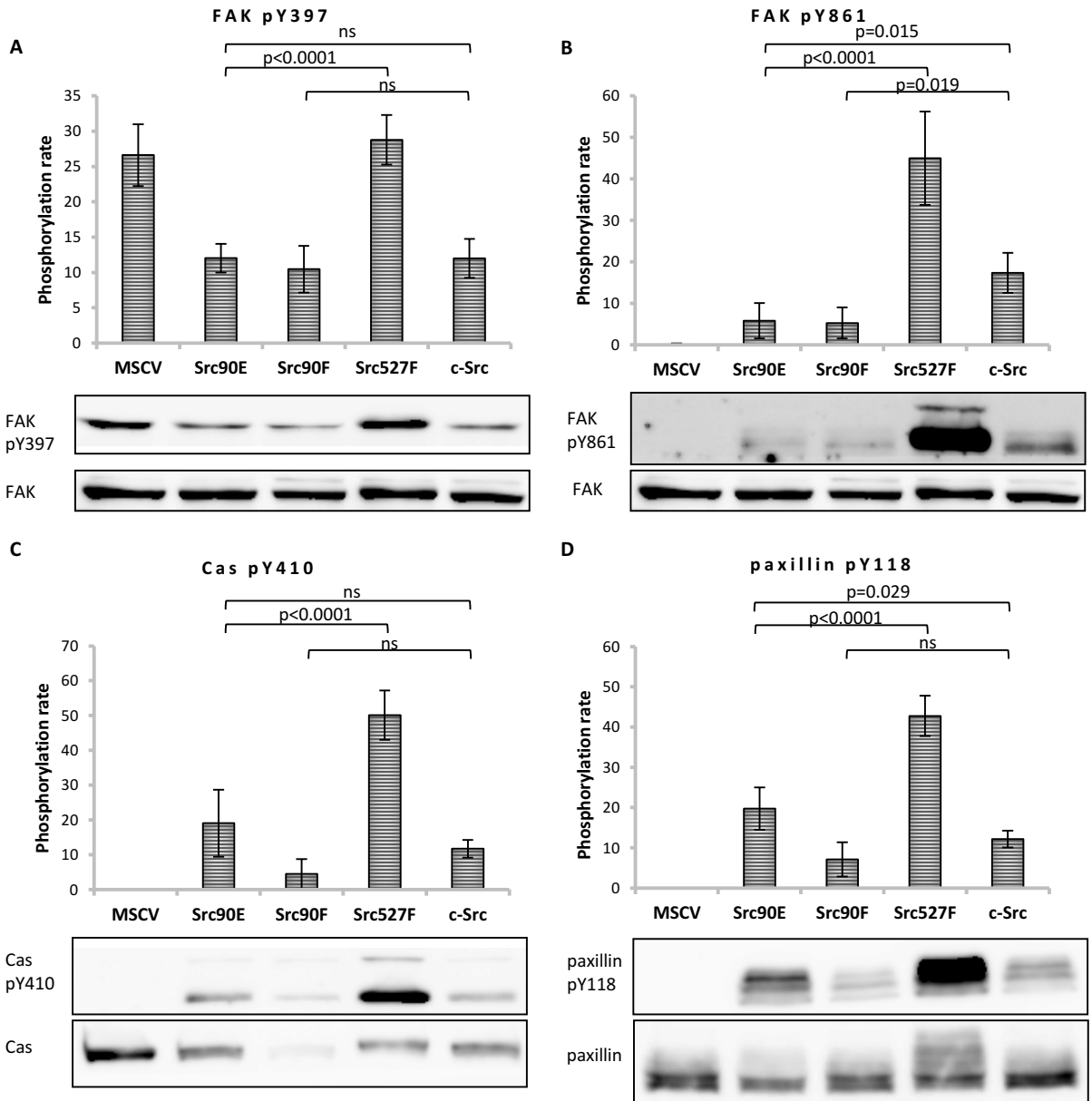


Figure 5: Effect of Src variants on phosphorylation of FAK, p130Cas and paxillin. (A, B, C, D) Phosphorylation levels of FAK, p130Cas and paxillin were detected in lysates from SYF cells stably expressing Src variants. Ratio between phosphorylated form and total protein was determined based on immunodetection of total FAK, p130Cas, paxillin and their phosphorylated forms (FAK pY397, FAK pY861, p130Cas pY410, paxillin pY118). The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

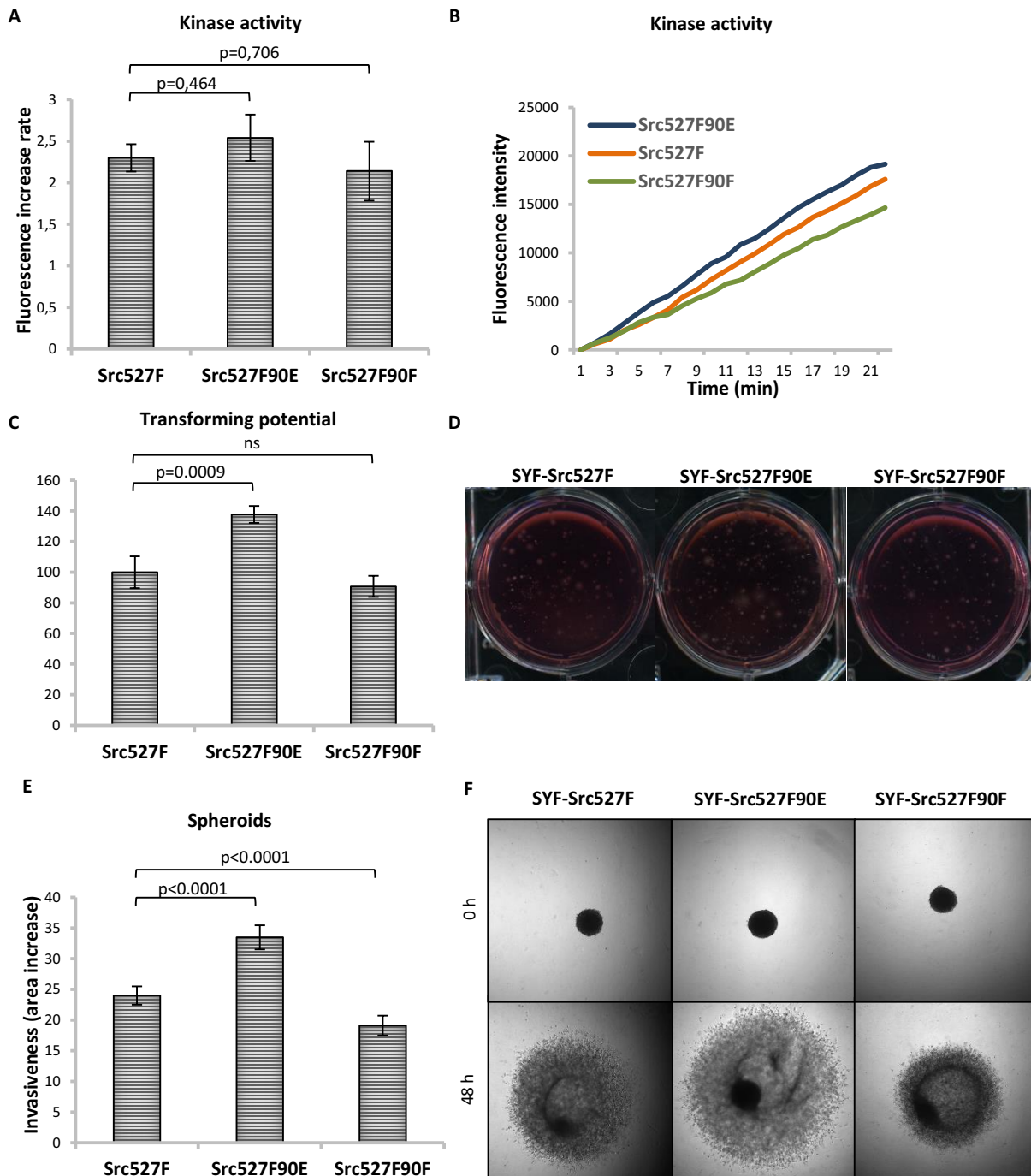


Figure 6: Effect of Y527F-activated Src can be modulated by Y90 phosphorylation. (A, B) Catalytic activity of Src527F and doublemutated variants was analysed using kinase assay (Omnia® Y Peptide 2 Kit; ThermoFisher Scientific). Reactions were performed from lysates of SYF cells expressing these Src variants. Kinase activity was measured as an increase of fluorescence depicted in Figure 6B (showing representative results from one experiment). (C, D) Transforming potential was assessed by soft agar assay with SYF fibroblasts stably expressing Src variants. Cells were cultivated in 0,4% agar. After 14 days number of colonies was counted. The graph shows relative amount of colonies compared to SYF-Src527F. (E, F) Invasiveness of SYF cell lines was evaluated with spheroid invasion assay. SYFs were grown as spheroids using Microtissues® 3D Petri Dish® for 48 hours. Spheroids were then embedded in 1,5% collagen. Images of spheroids were taken immediately and after 48 hours. Rate between spheroid area at 48 hours and 0 hours was determined. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA. 108

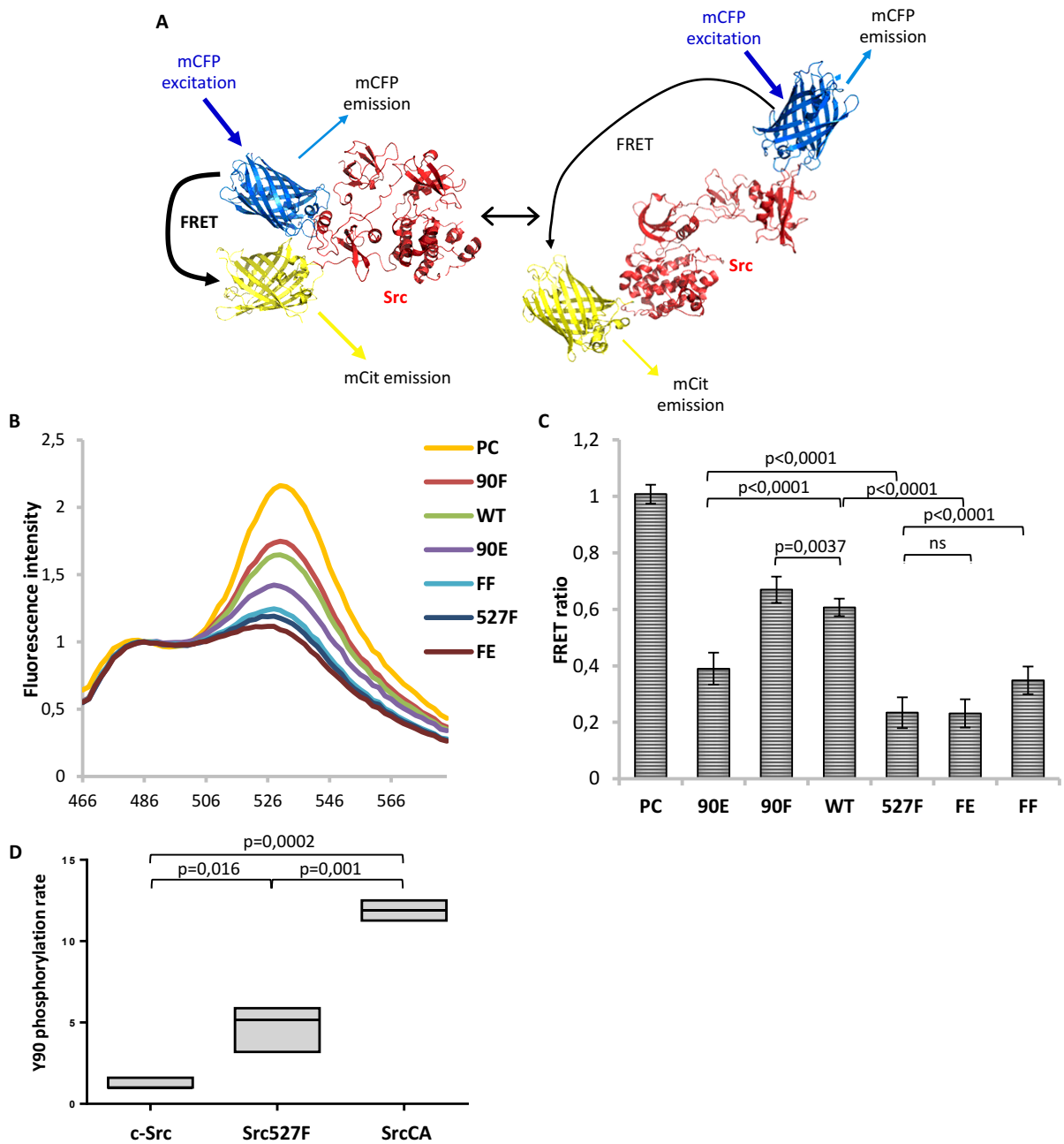


Figure 7: Phosphorylation of Y90 represents an autoactivatory mechanism opening Src structure. (A) Model of SrcFRET sensor. In compact inactive conformation of Src fluorophores inserted into full-length kinase are in close proximity which leads to high FRET (left). Upon activation the structure loosens resulting in decrease of FRET. The models were created according to PDB structures 1FMK, 1Y57, 2H5P, 1F0B. (B, C) Analysis of effects mediated by Y90 substitutions on Src kinase structure using SrcFRET sensor. SrcFRET sensor variants with Y90 (or/and Y527) mutations were expressed in U2OS cells. Fluorescence emission spectra were recorded in native cell lysates. (B) Representative emission spectra normalised to emission maximum of CFP. PC indicates positive control for FRET (construct where CFP and mCit are connected with a short linker). (C) Bar graph shows ratio of normalized mCit (525 nm) and CFP (486 nm) emission. The data are shown as means with standard deviation out of minimum 4 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA. (D) Mass spectrometry analysis of phospho-Y90 content. Normalised ratio between phospho-peptide and base-peptide was plotted. The data are shown as means with standard deviation from 3 independent experiments. P values indicate statistical significance as calculated by one-way ANOVA.

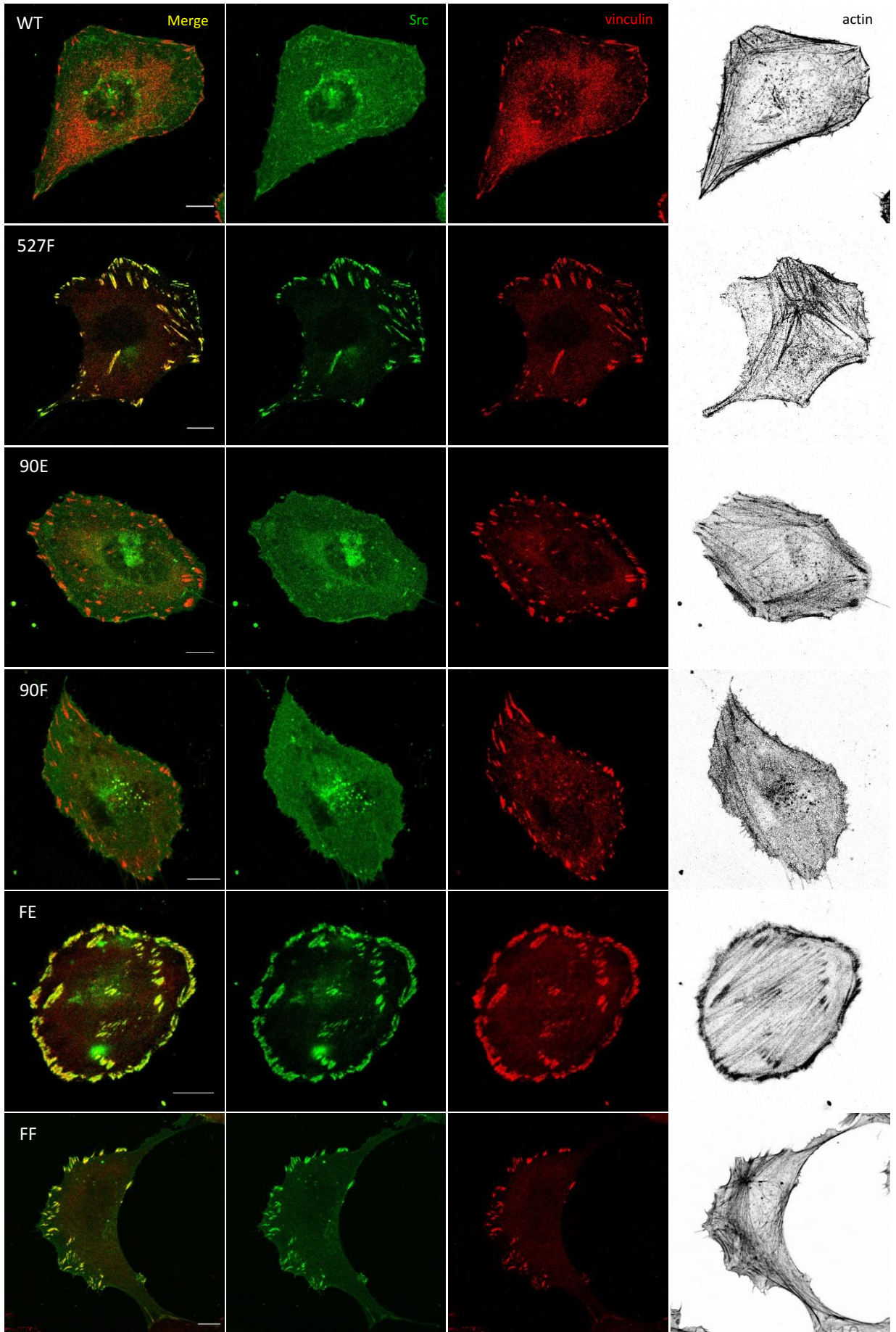


Figure 8: SrcFRET variants localisation (A) U2OS cells transiently expressing FRET constructs were fixed and stained for vinculin (focal adhesions marker, red), F-actin (grey) and imaged by confocal microscopy. SrcFRET fluorescence (mCit) is depicted in green. Scale bar 10 μ m.

4. DISKUSE

Kináza Src se podílí na značném množství buněčných procesů. Je aktivována po stimulaci různých povrchových receptorů, včetně integrinů (Playford and Schaller, 2004) či receptorových tyrosinkináz (Bromann et al., 2004). Následná signalizace může aktivovat rozličné signální dráhy, například Ras-MAPK, PI3K-Akt, STAT3, p190RhoGAP, p130Cas, a regulovat tak buněčnou proliferaci, diferenciaci či motilitu (Guarino, 2010; Thomas and Brugge, 1997). Vzhledem ke komplexitě této signální sítě je nezbytné, aby byl Src přísně regulován a aby k jeho aktivaci docházelo jen v patřičných situacích v příslušných buněčných kompartmentech a proteinových komplexech. Src je rovněž schopen řídit cílové proteiny rozdílně v závislosti na lokalizaci. Příkladem rozdílného vlivu Src může být aktivace p190RhoGAP a následná inhibice RhoA ve fokálních adhezích (Chang et al., 1995), v podosomech naopak Src RhoA aktivuje (Berdeaux et al., 2004).

Design Src-FRET senzoru

Abychom byli schopni pochopit roli Src v různých buněčných procesech, nelze jen měřit jeho průměrnou aktivitu v roztoku či v rámci populace buněk, ale je nezbytné porozumět dynamice jeho regulace. Je potřeba analyzovat v jakých buňkách, buněčných kompartmentech, strukturách či proteinových komplexech je Src aktivován, respektive inaktivován, kdy k tomu dochází a s jakou kinetikou. Ne zcela uspokojivě objasněna zůstává rovněž otázka konformačních stavů aktivované kinázy.

První předkládaná publikace dokumentuje design, testování a použití senzoru konformace a aktivity kinázy Src. Jedná se o geneticky kódovaný senzor, který je založen na měření účinnosti Försterova rezonančního přenosu energie. Do struktury Src byly vloženy dva fluorescenčními proteiny tvořící FRET pár. Jako akceptorový fluorofor byl použit žlutý fluorescenční protein mCitrin (mCit) přidaný na úplný C-konec Src. Donorová molekula je tyrkysový fluorescenční protein (CFP nebo mTurquoise) vložený pomocí krátkých linkerů do smyčky mezi β D a β E řetězce SH2 domény na straně protilehlé vazebnému místu. Míra FRET mezi fluorofory vytvořeného Src-FRET senzoru reflektuje konformaci kinázy a s ní spjatou i katalytickou aktivitu. Inaktivní Src zaujímá kompaktní „zavřenou“ strukturu stabilizovanou intramolekulárními inhibičními vazbami. Fluorofory jsou v těsné blízkosti, a tudíž lze měřit vysoké účinnosti FRET. Rozrušení regulačních vazeb má za následek otevření konformace kinázy a její aktivaci. Vzájemná vzdálenost mezi fluorofory se zvětší a dojde k poklesu FRET.

Podobný přístup byl použit k měření aktivity kinázy Lck (Paster et al., 2009; Stirnweiss et al., 2013). Donor je ve struktuře reporteru lokalizován shodně se Src-FRET senzorem, ale akceptor autoři vložili do linkeru spojujícího SH3 a SH2 domény, což se jeví jako méně optimální. Mutační analýzy a MD simulace ukázaly, že SH3-SH2 linker kinázy

Src je důležitý pro strukturní spřažení regulačních domén a pomáhá jim držet katalytickou doménu v inaktivní konformaci. Narušení linkeru vede k aberantní aktivaci Src (Young et al., 2001).

Vyjma uvedených konformačních senzorů založených na detekci strukturních změn sledované kinázy existují další reportery konformace a aktivity Src fungující na odlišných principech. Lze je kategorizovat do dvou skupin: substrátové a vazebné. Substrátové senzory jsou tvořeny FRET párem fluoroforů, substrátovým peptidem a SH2 doménou, která se po fosforylaci substrátového tyrosinu kinázou Src naváže na peptid, čímž dojde ke konformační změně a poklesu FRET (Seong et al., 2011b; Wang et al., 2018). Vazebné reportery rozpoznávají a váží strukturu na molekule Src, jež je přístupná pouze v jeho aktivní konformaci, což je následně měřeno jako změna FRET nebo nárůst fluorescence (Gulyani et al., 2011; Irtegun et al., 2014; Mukherjee et al., 2020).

Substrátové senzory jsou v porovnání s ostatními skupinami pravděpodobně nejjednodušší na design. Problémem může být jejich specifita, jelikož substrátový peptid může podléhat fosforylaci i jiných, často příbuzných, kináz (Ting et al., 2001). Odpověď reporteru na aktivaci Src probíhá se zpožděním, které je dáno kinetikami asociace se substrátem a katalytické reakce. Dochází rovněž k difúzi senzoru z místa působení kinázy, což vede k naředění signálu a znesnadňuje přesnou lokalizaci aktivovaného Src (Lu et al., 2008). Zkreslovat analýzu může rovněž skutečnost, že díky silným intramolekulárním interakcím zůstávají uvězněny v aktivovaném fosforylovaném stavu (Komatsu et al., 2011) a tudíž nemohou reflektovat pokles aktivity Src nebo případné rychlé změny aktivačního statusu kinázy. Nicméně za předpokladu, že je substrátový peptid defosforylován s fyziologickou kinetikou odpovídajícími fosfatázami, informace zprostředkovaná senzorem nereflektuje ani tak míru aktivace Src, ale spíše úroveň fosforylace Src substrátů v daném lokusu, byť ta má také zajímavou výpovědní hodnotu.

Vazebné senzory aktivované konformace Src jsou poměrně různorodá skupina. Společným znakem je, že se asociují s ligand-vazebným povrchem regulačních domén (SH2 nebo SH3), který je přístupný pouze v aktivní formě Src. Rizikem je arteficiální aktivace kinázy způsobená vyvázáním regulačních domén z inhibičních interakcí (Irtegun et al., 2014). Pokud je Src aktivován pouze skrze jednu z regulačních domén a druhá zůstává navázána na intramolekulární ligand, detekuje reporter pouze část populace aktivovaného Src. Problémem může být také neschopnost rozpoznávat molekuly Src interagující prostřednictvím SH2 a SH3 domén se svými vazebnými partnery nebo naopak blokování vazebného povrchu znemožňující interakci s ligandem.

Nejvíce spolehlivým nástrojem pro stanovení konformace a aktivity Src se tak zdají být konformační senzory, což je design, jenž jsme použili pro náš Src-FRET senzor. Poměrně přesně poskytují představu o tvaru molekuly a otevřenosti/zavřenosti struktury Src, jež až na výjimky koreluje s jeho katalytickou aktivitou. Diskrepance v této závislosti mohou být způsobeny vazbou některých inhibitorů (viz dále) či cílenými velmi specifickými

mutacemi (Meng et al., 2018). Lokalizace a doba signálu umožňují s detailním prostorovým a časovým rozlišením mapovat reálný výskyt různých konformačních forem Src v buňce. Nevýhodou je nutnost jisté obezřetnosti při volbě míst inzerce fluoroforů do struktury kinázy. Pokud by byla nevhodně zvolena, vložené fluorescenční proteiny by mohly deregulovat kinázovou aktivitu Src či jinak ovlivnit jeho signalizaci.

Vliv aktivačních mutací na kompaktnost struktury Src

Během výzkumu Src bylo popsáno množství aktivačních mutací. S využitím panelu těchto aminokyselinových záměn vnesených do struktury Src-FRET senzoru jsme pomocí kinázových reakcí ověřili, že měřená účinnost FRET a tudíž kompaktnost Src konformace koreluje s kinázovou aktivitou (negativním koeficientem).

Zmíněné mutační analýzy byly historicky prvním a nejjednodušším nástrojem, jak zjistit funkci jednotlivých strukturních elementů Src a posoudit jejich podíl na regulaci katalytické aktivity a konformačních přestavbách kinázy. Ucelenější obraz poskytly až krystalografické studie. Struktura otevřené konformace nefosforylovaného Src (Cowan-Jacob et al., 2005) poskytla důkaz o významu asociace SH2 domény s fosforylovaným C-koncovým segmentem na tvar molekuly Src. Doposud nicméně chyběla experimentální data ukazující vliv interakcí zprostředkovaných SH3 doménou na konformaci Src. Naše měření dokumentovala, že mutace CD linkeru (Gonfloni et al., 1997) inhibující jeho vazbu na SH3 doménu otevírají strukturu Src do stejné míry jako rozrušení regulační interakce mediované SH2 doménou (záměna Tyr527 za nefosforylovatelný fenylalanin). Mutace RT a nSrc smyček (Miyazaki et al., 1999), skrze které SH3 doména asociuje s N-lalokem kinázové domény, rovněž vedly k otevření konformace Src, ale v menším rozsahu než v případě aminokyselinových záměn interferujících s SH3-CD linker vazbou. Tyto experimenty tak poukázaly na zásadní význam SH3 domény a jí zprostředkovaných interakcí na tvar molekuly Src, jež byl spíše opomíjen a připisován zejména regulačnímu vlivu SH2 domény.

Experimenty se Src-FRET senzory nesoucími mutaci jak v regulačním C-koncovém tyrosinu (527F), tak v CD linkeru respektive RT smyčce poskytly důkaz o aditivním efektu inhibičních interakcí zprostředkovaných SH2 a SH3 doménami. Lze tudíž usuzovat, že regulační domény mohou fungovat nezávisle na sobě a dávat tak vzniku různým konformacím aktivního Src s jednou (SH2 či SH3) nebo oběma doménami přístupnými interakci s extramolekulárními vazebnými partnery. Umožnilo by to lokalizovat Src do odlišných buněčných struktur či proteinových komplexů a vést tak signál různými drahami a s rozdílnou kinetikou.

Zajímavým fenoménem se ukázala být mutace Glu381Gly α E helixu C-laloku kinázové domény (Bjorge et al., 1995). Ačkoli Glu381 netvoří žádné kontakty s SH2 ani SH3 doménou jeho záměna za glycin vede k velmi výraznému nárůstu kinázové aktivity a otevřené konformaci Src srovnatelné molekulami, jež mají rozpřažené obě inhibiční interakce.

Efekt inhibitorů na konformaci Src

Inhibitory kinázy Src jsou slibnými léčivy v protinádorové terapii (Rösel et al., 2013). Jedná se o nízkomolekulární látky, které kompetují s vazbou ATP. Podle způsobu, jakým se váží do aktivního místa kinázy je lze klasifikovat na inhibitory typu I a II. Určujícím faktorem je pozice DFG motivu aktivačního segmentu. Inhibitory typu I se váží do katalytického centra kinázové domény, kde je Asp404 DFG motivu vtočen dovnitř do katalytického centra (DFG-in) a skrze vazbu Mg^{2+} iontů koordinuje fosfáty ATP, což odpovídá aktivní konformaci kinázové domény. Inhibitory typu II se navazují do aktivního místa, v němž katalytický aspartát směřuje mimo (DFG-out) a jeho pozici zaujímá fenylalanin. Jedná se o konfiguraci inaktivního stavu kinázové domény Src (Dar and Shokat, 2011; Roskoski, 2016).

Aktivační status kinázové domény je kromě polohy DFG motivu určen rovněž orientací α C helixu N-laloku. V aktivním stavu je α C helix rotován dovnitř katalytického místa (α C-in), naopak v inaktivním vně (α C-out) (Leonard et al., 2014).

S využitím Src-FRET senzoru jsme testovali vliv panelu Src inhibitorů na strukturu kinázy. Poněkud překvapivě se ukázalo, že existují dvě skupiny inhibitorů, jež se liší svým účinkem na konformaci Src. První skupina testovaných inhibitorů (dasatinib, bosutinib, UM-164), podobně jako konstitutivně aktivní Src527F, indukovala otevření struktury Src a vedla k jeho lokalizaci do fokálních adhezí. Druhá skupina (saracatinib, SKI-1) neměla na konformaci Src žádný vliv a zachovávala uniformní cytoplasmatickou lokalizaci kinázy typickou pro c-Src.

Dasatinib a bosutinib jsou inhibitory typu I asociující s DFG-in, α C-in konformací Src. UM-164 a saracatinib představují inhibitory typu II vážící DFG-out konfiguraci katalytického místa. Liší se však ve své preferenci pro pozici α C helixu, kdy UM-164 upřednostňuje α C-in a saracatinib α C-out orientaci helixu (Leonard et al., 2014; Roskoski, 2016; Tong et al., 2017). Způsob vazby SKI-1 inhibitoru není znám. Společným jmenovatelem inhibitorů, jež navozují otevřenou konformaci Src, se tak zdá být α C-in orientace helixu. Vazba SKI-1 zachovává kompaktní tvar Src, z čehož je možno usuzovat, že jej lze kategorizovat jako inhibitor stabilizující inaktivní konformaci Src s α C helixem v konfiguraci α C-out. Navázání SKI-1 na konstitutivně aktivní senzor Src-FRET527F vedlo k přechodu jeho otevřené konformace do více kompaktního stavu.

Díky Src-FRET senzoru jsme tudíž byli schopni ukázat, že strukturní změny uvnitř kinázové domény vyvolané jak aktivační mutací (Glu381Gly), tak navázáním inhibitorů stabilizujících aktivní či inaktivní konfiguraci katalytického místa, jsou schopny ovlivnit vazbu regulačních domén a tím i celkovou konformaci Src. Není zcela jasné, jak komunikace mezi regulačními doménami a kinázovou doménou probíhá. Dosavadní poznatky vycházející ze strukturních studií a MD simulací naznačují, že zásadní roli v přenosu informací by mohla mít právě orientace α C helixu a pozice CD linkeru (Banavali

and Roux, 2005; Fajer et al., 2017; Gonfloni et al., 1997, 1999). NMR analýza Tonga a kolegů předkládá model, podle kterého se tyto konformační signály propagují skrze strukturu kinázy jako změny dynamiky peptidové kostry spíše než jako rozsáhlé strukturní přestavby (Tong et al., 2017).

Src-FRET senzor umožňuje rozlišit Src inhibitory na základě jejich vlivu na strukturu kinázy a je jej proto možné použít jako nástroj pro stanovení způsobu vazby inhibitorů do katalytického místa kinázy a to bez nutnosti používat náročné krystalografické či NMR přístupy. Biologický efekt Src inaktivovaného pomocí inhibitoru stabilizujícího zavřenou konformaci se bude lišit od biologického efektu kinázy vážící inhibitor, jež indukuje otevřenou konformaci a který tak může mít regulační domény přístupné vazbě ligandů. Lze usuzovat, že inhibitory navozující otevřenou strukturu Src budou více potentní, jelikož jimi inhibovaný Src bude fungovat jako dominantně negativní molekula, která bude schopna blokovat vazebná místa pro aktivované ještě neinhibované kinázy (nebo i další proteiny) a vyvazovat jejich interakční partnery

Role kinázy Src ve fokálních adhezích

Src zaujímá v buňkách zhruba uniformní distribuci s mírným nabohacením na cytoplasmatické membráně. Aktivní Src je výrazně lokalizován ve fokálních adhezích (Klinghoffer et al., 1999; Machiyama et al., 2015; Wu et al., 2016).

S využitím Src-FRET senzoru jsme byli schopni ukázat, že ve fokálních adhezích se Src pohybuje s vysokou dynamikou a nedochází zde tudíž k jeho akumulaci. Přítomný Src nicméně zaujímal otevřenou konformaci, což vede k otázce, jakým způsobem je zde aktivován. Jedním z mechanismů může být vyvázání regulačních domén z intramolekulárních inhibičních interakcí skrze jejich vazebné partnery lokalizované ve fokálních adhezích. Příkladem může být vazba SH2 domény Src na fosforylovaný Tyr397 kinázy FAK (Schaller et al., 1994). Dále může docházet k lokální defosforylaci regulačního Tyr527 C-koncového segmentu Src, uvolnění SH2 domény a aktivaci katalytické aktivity (Harder et al., 1999; Pallen, 2005). Třetí možností, kterou navrhuje, je otevření Src konformace, a jeho následná aktivace, přímým mechanickým natažením molekuly prostřednictvím tzv. molecular clutch (Mitchison and Kirschner, 1988). Molecular clutch je propojení mezi extracelulární matrix a aktinovým cytoskeletem adheřované buňky umožňující přenos mechanické tenze. Je tvořeno molekulami integrinů a proteiny fokálních adhezí, které dynamicky asociují nebo disociují ze vzájemných interakcí a podle aktuálních podnětů a míry napětí na adhezních strukturách spřahují tuto sílu s retrográdním prouděním molekul aktinového cytoskeletu. Podle naší hypotézy je Src ukotvený N-koncem v cytoplasmatické membráně aktivován skrze interakci svých regulačních domén s proteiny fokálních adhezí, jež jsou spřaheny s retrográdním tokem aktinu. Takto generovaná tažná síla mechanicky rozruší inhibiční interakce uvnitř molekuly Src, což bude mít za následek otevření jeho struktury a aktivaci katalytické aktivity. Uvedenou teorii podporuje několik

faktů: vysoká dynamika molekul Src ve fokálních adhezích a nárůst aktivity Src během mechanického natahování buněk, které jsme byli schopni detekovat pomocí Src-FRET senzoru. Naše měření ukázala, že tato aktivace Src kopíruje míru fosforylace proteinu fokálních adhezí p130Cas, jež je coby primární mechanosenzor po natažení fosforylován Src na tyrosinech substrátové domény jinak skrytých uvnitř struktury proteinu nepodléhajícího tenzi. Popsané experimenty nicméně neumožňovaly dostatečné rozlišit časovou posloupnost těchto dějů. V souladu s hypotézou Src jakožto primárního mechanosenzoru je rovněž studie využívající substrátový senzor Src lokalizovaný do membrány, která dokumentovala, že aktivace Src v odpověď na mechanické podněty je téměř okamžitá (Wang et al., 2005).

Src-FRET senzor nám umožnil sledovat aktivitu Src v průběhu doby života adheze. Její vznik doprovázela kontinuální aktivace Src. Katalytická aktivita kináz dosáhla maximální hodnoty v maturované stabilní fázi adheze, během níž následně zůstávala konstantní. Inaktivace Src probíhala současně s rozpadem adheze. Dynamika aktivity Src ve fokálních adhezích byla rovněž analyzována pomocí substrátového senzoru Src (Wu et al., 2016). Autoři taktéž viděli nárůst Src aktivity během vzniku adheze, ale na rozdíl od našich výsledků detekovali v průběhu stabilní fáze slabý pokles signálu následovaný další vlnou aktivity Src, jež předcházela rozpadu adheze. Diskrepance v obdržných datech je s velkou pravděpodobností způsobena rozdílným mechanismem fungování senzorů. Náš senzor je založen na předpokladu, že katalytická aktivita Src koreluje s účinností FRET danou kompaktností struktury kinázy. Substrátový senzor monitoruje kinázovou aktivitu prostřednictvím míry fosforylace substrátového peptidu, která však závisí nejen na aktivitě Src, ale rovněž na defosforylaci fosfatázami. Rozdílná povaha obou senzorů může být tudíž s výhodou a jimi poskytnuté informace se mohou vzájemně doplňovat. Na jejich základě proto navrhujeme následující model aktivace Src ve fokálních adhezích. Vznik adheze je doprovázen rychlou a lokální aktivací kinázy Src, která začne fosforylovat své substráty. Během maturované stabilní fáze adheze zůstává aktivita Src vysoká ale konstantní. Proti ní působí fosfatázy, jež defosforylují substráty Src, díky čemuž je udržována stabilní míra jejich fosforylace. Zdá se, že rozpad adheze je iniciován poklesem fosfatázové aktivity a porušením této rovnováhy, což vede k hyperfosforylaci substrátů Src a následnému rozložení fokální adheze.

Existuje několik důkazů podporujících teorii, že zvýšená kinázová aktivita Src destabilizuje fokální adheze a vede k jejich rozpadu. Kromě jiného bylo ukázáno, že buňky, ve kterých byl deletován gen pro Src, inhibována Src aktivita či exprimovány defektní formy kinázy, mají abnormálně velké adheze s dlouhou dobou života a velmi pomalým rozpadem (Fincham and Frame, 1998; Webb et al., 2004). Fokální adheze buněk postrádajících fosfatázu Shp2 jsou vysoce dynamické s krátkou stabilní fází (von Wichert et al., 2003). Ve více dynamických fokálních adhezích lze detekovat zvýšenou míru fosforylace paxillinu, která naopak zcela chybí ve stabilních fibrilárních adhezích (Zaidel-Bar et al., 2007). Dále

bylo popsáno, že fosforylace ARHGAP42 na Tyr376 kinázou Src zvyšuje dynamiku fokálních adhezí (Luo et al., 2017). Src rovněž fosforyluje p130Cas na Tyr12 SH3 domény. Tato fosforylace probíhá s pomalou dynamikou a ruší schopnost SH3 domény kotvit p130Cas do fokálních adhezí, což má za následek jejich zvýšenou dynamiku a potažmo i destabilizaci (Braniš et al., 2017; Gemperle et al., 2017; Janoštiak et al., 2011). Fosforylace p130Cas kinázou Src navíc pomáhá směřovat p130Cas k ubiquitinaci a následné degradaci, což je další mechanismus podílející se na regulaci dynamiky fokálních adhezí (Teckchandani et al., 2014).

Tyrosin 90 SH3 domény Src a jeho vliv na regulaci kinázy

Hlavními funkčními prvky regulujícími kinázu Src jsou intramolekulární inhibiční interakce zprostředkované SH3 a SH2 doménami a fosforylační status tyrosinů 416 a 527 (Boggon and Eck, 2004). Byly popsány i další způsoby modulující aktivitu a lokalizaci Src, mezi které lze řadit dimerizaci kinázy a fosforylace serinů a treoninů unikátní domény (Amata et al., 2014; Dandoulaki et al., 2018; Spassov et al., 2018). Role a mechanismus fungování inhibiční vazby SH2 domény na fosforylovaný C-koncový segment byly studovány a popsány velmi detailně. Regulace prostřednictvím SH3 domény je však prozkoumána a pochopena daleko méně. Jedná se o více komplexnější systém, jež zahrnuje nejen vazbu CD linkeru (Xu et al., 1997), ale navíc inhibiční kontakty s N-lalokem kinázové domény skrze RT a nSrc smyčky (Brábek et al., 2002; Xu et al., 1997). Dále je SH3 doména, spolu s SH2 doménou, zásadní pro stabilizaci CD linkeru v pozici a konformaci, která drží katalytickou doménu v inaktivním stavu (Fajer et al., 2017). SH3 doména rovněž asociuje s membránou a také poskytuje strukturní oporu vnitřně neuspořádané SH4 a unikátní doméně (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). Lze usuzovat, že SH3 doména funguje jako signalizační uzel integrující a předávající informace mezi strukturovanými částmi Src a také flexibilním membránově vázaným N-koncovým segmentem kinázy. Uvedené mechanismy tvoří velmi složitou síť vzájemně propojených regulačních elementů, jejímž výstupem je, v odpověď na stimuly a fyziologické požadavky buňky, patřičná aktivita a konformace Src. Vzhledem ke komplexitě tohoto systému, nebylo jeho přesné fungování ještě uspokojivě objasněno a to včetně detailního vlivu jednotlivých regulačních prvků na strukturu Src, jejich hierarchie a míry autonomie.

Ve druhém předloženém článku je charakterizován nový mechanismus, jakým může být regulována kináza Src. Jedná se o fosforylaci tyrosinu 90 (Tyr90) vazebného povrchu SH3 domény Src. Pomocí aminokyselinových záměn Tyr90 za nefosforylovatelný fenylalanin nebo glutamát, jež svým sterickým povrchem a nábojem mimikuje fosforylovaný tyrosin ukazujeme, že fosforylace Tyr90 vede k aktivaci katalytické aktivity Src, otevření jeho struktury a změně interakčních schopností zprostředkovaných SH3 doménou. Expresí fosfomimikující mutanty Src v buňkách způsobuje jejich transformaci a zvýšenou schopnost invadovat. Src nesoucí Tyr90 mutovaný za nefosforylovatelný

fenylalanin naopak vykazuje nižší katalytickou aktivitu, kompaktnější konformaci a snižuje invazivní potenciál buněk.

Tyrosin 90 je součástí sekvenčně i strukturně konzervovaného motivu ALYD(Y/F) (Tatárová et al., 2012). Fosforylace tyrosinů homologních Tyr90 byla dokumentována například u SH3 domény PSTPIP (Wu et al., 1998), kinázy Btk (Morrogh et al., 1999; Park et al., 1996) nebo p130Cas (Gemperle et al., 2017; Janoštiak et al., 2011), u nichž způsobuje snížení nebo změnu afinity pro jejich ligandy. V buňkách chronické myeloidní leukemie dochází k masivní tyrosinové fosforylaci SH3-SH2 segmentu Bcr-Abl. Bylo zde identifikováno 7 tyrosinů, z nichž jeden odpovídá Tyr90, jejichž fosforylace indukuje plnou katalytickou aktivitu fúzního proteinu (Chen et al., 2008; Meyn et al., 2006).

Fosforylace Tyr90 SH3 domény Src byla nalezena u myších embryonálních fibroblastů transformovaných onkogenním Src (Luo et al., 2008) nebo v buňkách karcinomu plic stimulovaných HGF (Johnson et al., 2013). S využitím hmotností spektrometrie jsme byly schopni detekovat fosforylaci Tyr90 rovněž u nestimulovaných a netransformovaných fibroblastů exprimujících c-Src. Kvantitativní proteomický přístup ukázal, že více aktivní formy Src vykazují vyšší fosforylaci Tyr90. V souladu s predikčními algoritmy a publikovanými pracemi lze proto usuzovat, že k fosforylaci Tyr90 dochází autofosforylačním mechanismem nebo prostřednictvím Src závislé fosforylace kinázami rodiny Src.

Tyrosin 90 tvoří spolu s Asn135 a Tyr136 první hydrofobní kapsu vazebného povrchu SH3 domény, která interaguje s ϕP_0 dipeptidem SH3-vazebního motivu $\phi P_0 x \phi P$, kde ϕ je bazická aminokyselina. V případě inaktivní formy Src se do této vazebné kapsy vkládá klíčový prolin 250 CD linkeru. Mechanismus, jakým fosforylace Tyr90 ovlivňuje vazebný povrch SH3 domény, je možné predikovat na základě studie, která pomocí NMR analýz a MD simulací charakterizovala vazbu ligandu na SH3 doménu proteinu p130Cas a vliv fosforylace homologního tyrosinu 12 na tuto interakci (Gemperle et al., 2017). Podle našeho modelu aromatický kruh nefosforylovaného Tyr90 tvoří CH/ π interakce s ϕP_0 dipeptidem, přičemž hydroxylová skupina je orientována vně do okolního vodného prostředí. Fosforylace Tyr90 způsobí rozrušení těchto nepolárních vazeb skrze negativní náboj fosfátové skupiny, což má za následek pokles afinity SH3 domény pro své ligandy. Tyrosin 90 a jeho fosforylace tudíž reguluje kinázu Src dvojím způsobem. Redukuje schopnost SH3 domény vázat své interakční partnery, což může mít vliv na signalizaci zprostředkovanou Src, jeho dynamiku a lokalizaci do různých buněčných struktur či proteinových komplexů. Druhým a možná významnějším efektem fosforylace Tyr90 je snížení afinity SH3 domény k CD linkeru a následný nárůst katalytické aktivity kinázy.

MD simulace ukázaly, že aminokyselinové zbytky CD linkeru jsou přímo zodpovědné za udržování kinázové domény v inaktivní konformaci. SH3 doména společně s SH2 doménou pouze stabilizují tuto inhibiční pozici CD linkeru (Fajer et al., 2017). Předkládáme hypotézu, podle níž fosforylace Tyr90 zruší vazbu SH3 domény na CD linker, což by mohlo

vést k destabilizaci inhibiční konfigurace CD linkeru, zrušení jeho kontaktů s katalytickou doménou a přechodu do aktivního stavu. Src s fosfomimikující mutací Tyr90 (Src90E) zaujímá částečně otevřenou konformaci s SH3 doménou uvolněnou z intramolekulární inhibiční interakce. Podle experimentálních dat se SH2 doména zdá být stále asociována s C-terminálním segmentem. Jednak tomu nasvědčují měření pomocí Src-FRET senzoru, kdy zrušení inhibiční interakce zprostředkované SH2 doménou způsobilo dodatečně ještě výraznější rozvolnění konformace molekuly již nesoucí fosfomimikující glutamát 90E. Rovněž tuto domněnku potvrzuje uniformní lokalizace Src90E bez detekovatelného nabohacení ve fokálních adhezích, ke kterému dochází v případě, že je rozrušena vazba SH2 domény k C-konci (Wu et al., 2015). Ačkoli byl význam SH3 domény historicky spíše opomíjen, z předkládaného se jeví, že SH3 doména je stěžejní regulační prvek Src, který je schopen aktivovat kinázu nezávisle na SH2 doméně a to pravděpodobně jak skrze interakci s vazebnými partnery, tak právě prostřednictvím fosforylace Tyr90.

Záměna Tyr90 za fosfomimikující glutamát nebo nefosforylovatelný fenylalanin u SH2-aktivovaného Src (přes 527F mutaci) vedla jen k malým rozdílům v kinázové aktivitě jednotlivých mutant, nicméně změny v transformačním potenciálu a invazivitě buněk byly výraznější. Fosfomimikující substituce 90E zvyšovala a naopak nefosforylovatelná varianta 90F snižovala účinek SH2-aktivovaného Src. Naše práce ukazuje, že SH3 a SH2 doména fungují a regulují Src do určité míry nezávisle na sobě, což dovoluje Src zaujmout několik konformací tj. inaktivní, SH3-aktivovanou, SH2-aktivovanou a SH3+SH2-aktivovanou. Tato strukturální diverzita se rovněž promítá do funkční diverzity. Zvyšuje množství stupňů volnosti regulačního systému a umožňuje tak kináze fungovat jako signalizační uzel, který integruje různé stimuly, na jejichž základě nebo podle daného buněčného kontextu či lokalizace je schopen regulovat a indukovat rozličné buněčné odpovědi.

Existuje několik názorů na mechanismus aktivace Src. Podle prvního je Src plně aktivována až vyvázáním obou regulačních domén z intramolekulárních vazeb (Alexandropoulos and Baltimore, 1996). Druhá teorie navrhuje, že rozrušení jedné inhibiční vazby povede k destabilizaci druhé, což dá vzniku jedné unifikované aktivní formě Src (Young et al., 2001). Model vícestupňové aktivace kinázy podporují rovněž naše měření pomocí Src-FRET senzoru analyzující strukturální kompaktnost aktivačních mutant Src. Další důkazy přinesly mutační analýzy oblasti RT a nSrc smyček SH3 domény, jež ukázaly, že zrušení interakce mezi SH3 doménou a N-lalokem SH2-aktivovaného Src vede k nárůstu jeho katalytické aktivity (Brábek et al., 2002). Dále jej potvrzuje krystalová struktura aktivního nefosforylovaného Src, kde nedochází k asociaci SH2 domény s C-koncovým segmentem, ale zůstává zachována vazba SH3 domény na CD linker (Cowan-Jacob et al., 2005), což dokumentuje i studie využívající SAXS (Bernadó et al., 2008).

Ukazuje se, že SH3 doména má zásadní význam coby oblast, která zprostředkovává kontakt mezi strukturovanou a nestrukturovanou částí Src. NMR analýzy odhalily, že SH3 doména je schopna asociovat s lipidy a funguje jako strukturální opora pro vnitřně

neuspořádanou SH4 a unikátní doménu (UD). Kontakty SH3 domény s membránou a rovněž s nestrukturovanou N-koncovou částí zajišťují RT a nSrc smyčky (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013). Vazba ligandu SH3 doménou se propaguje skrze její strukturu a ruší interakci RT smyčky s lipidy a unikátní doménou, což má za následek zvýšení konformační flexibility UD a redukcí kontaktů s membránou (Cordier et al., 2000; Maffei et al., 2015; Wang et al., 2001). Hypotetizujeme, že snížení vazebných schopností SH3 domény prostřednictvím fosforylace Tyr90 by mohlo vést k nárůstu interakce Src s lipidovou vrstvou a tím pomalejší mobilitě kinázy v membráně. Uvedená teorie je v souladu s prací Machiyama a kolegů (Machiyama et al., 2015), kteří demonstrovali pokles membránové motility a pomalejší disociaci z fokálních adhezí Src molekul s mutací rušící schopnost SH3 domény vázat ligandy. Neboť je využití NMR techniky limitováno velikostí analyzovaných molekul, byly konstrukty použité v uvedených studiích tvořeny pouze SH4, UD a SH3 doménami. Je proto obtížné usuzovat na chování celé kinázy. Je známo, že RT a nSrc smyčky rovněž tvoří inhibiční interakce s N-lalokem kinázové domény (Brábek et al., 2002; Xu et al., 1997). Aminokyselinové zbytky RT smyčky (Arg95, Thr96) zodpovědné za tyto kontakty se zároveň podílejí na asociaci s membránou a unikátní doménou. Lze proto spekulovat, že fosforylace Tyr90 by mohla zablokovat vazbu SH3 domény k CD linkeru, čímž by došlo k posunutí rovnováhy ke stavu, kdy bude SH3 doména přednostně interagovat s membránou a UD místo s N-lalokem. Výsledný nárůst konformační dynamiky N-laloku by poté mohl zjednodušit přechod kinázové domény do aktivního stavu. Fosforylace tyrosinu 90 by tak mohla být významným mechanismem regulujícím nejen katalytickou aktivitu nebo vazebné schopnosti Src, ale rovněž schopnost kinázy asociovat s membránami a komunikaci mezi její strukturovanou a nestrukturovanou částí.

5. SHRNU TÍ

- S využitím strukturních přestaveb kinázy Src, které doprovází její přechod mezi aktivním a inaktivním stavem, a z toho plynoucí závislosti katalytické aktivity Src na jeho konformaci, jsme připravili konformační senzor Src založený na měření účinnosti FRET. Src-FRET senzor je tvořen molekulou Src, do jejíž SH2 domény byla vložena donorová molekula FRET páru fluorescenčních proteinů (CFP/mTurq). Akceptorový fluorofor (mCit) byl přidán na úplný C-konec.

- Pomocí Src-FRET senzoru jsme ukázali, že aktivační mutace v SH3 doméně a CD linkeru jsou schopny indukovat otevření struktury Src ve stejném rozsahu jako aktivační mutace 527F rušící interakci SH2 domény s C-koncovým segmentem. Src s mutací Glu381Gly uvnitř kinázové domény vykazoval výrazně rozvolněnou konformaci, což naznačuje, že kinázová doména je schopna ovlivňovat pozici regulačních domén a tím i celkový tvar molekuly.

- Src-FRET senzor umožňuje rozlišit 2 typy Src inhibitorů. První skupina inhibitorů indukuje α C-helix-out konformaci katalytické domény, nemá vliv na kompaktnost struktury Src (nebo jej zavírá) a neovlivňuje uniformní lokalizaci Src v buňce. Druhá skupina inhibitorů stabilizuje α C-helix-in konfiguraci kinázové domény, vede k otevření konformace Src, čímž funguje jako dominantně negativní molekula a lokalizuje Src do fokálních adhezí.

- Analýza dynamiky aktivace Src ve fokálních adhezích dokumentovala, že vznik adheze je doprovázen výrazným lokálním nárůstem katalytické aktivity Src, která dosahuje maxima během stacionární maturované fáze, v jejímž průběhu pak zůstává konstantní. Rozpad adheze je doprovázen inaktivací Src.

- Na základě proteomické studie byl tyrosin 90 identifikován jako nové fosforylační místo ve struktuře Src. Tyr90 se nachází na vazebném povrchu SH3 domény, kde spoluvytváří jednu z hydrofobních kapes pro interakci s ligandem.

- Fosforylace tyrosinu 90 SH3 domény Src představuje nový mechanismus, pomocí kterého může být Src regulován. Přítomnost negativního náboje fosfátu na pozici 90 pravděpodobně vede ke snížení afinity SH3 domény ke svým intermolekulárním i intramolekulárním ligandům a tudíž ke změně spektra interakčních partnerů a aktivaci katalytické aktivity.

- Src s fosfomimikující mutací 90E vykazuje zvýšenou kinázovou aktivitu a sníženou schopnost asociovat s některými proteiny.

- Exprese Src90E zvyšuje invazivitu buněk a vede k jejich transformaci.

- Src s fosfomimikující mutací 90E zaujímá více otevřenou konformaci v porovnání s c-Src. Záměna za nefosforylovatelný fenylalanin 90F má naopak za následek více kompaktní strukturu.

- Fosfomimikující mutace 90E zvyšuje efekt SH2-aktivovaného Src. Nefosforylovatelný fenylalanin 90F jej snižuje. Tato pozorování podporují model, podle kterého mohou regulační domény fungovat do určité míry nezávisle na sobě. Důsledkem je vícestupňová aktivace Src.

6. Publikace a podíl na jejich přípravě

Předkládaná disertační práce je tvořena jednou publikací a jedním draftem připravovaného článku:

Koudelková, L., Pataki, A.C., Tolde, O., Pavlik, V., Nobis, M., Gemperle, J., Anderson, K., Brábek, J., and Rosel, D. (2019). Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions. *Cell Chem. Biol.* 26, 255-268.e4.

- Sdílené první autorství, všechny experimenty v částech pojednávajících o studiu aktivačních mutant Src a vlivu inhibitorů Src na jeho konformaci, některé další experimenty v ostatních částech (zejména charakterizace SrcFRET konstruktů: emisní spektra, ověření velikosti a fosforylace, atp.), revize manuskriptu

Koudelková L., Brůhová Z., Sztacho M., Pavlík V., Gemperle J., Brábek J., Rösel D. Phosphorylation of tyrosine 90 within Src SH3 domain represents a new regulatory switch controlling Src kinase activity.

- Připravovaná publikace, první autor, většina experimentů, sepsání manuskriptu

V disertační práci nejsou zahrnuty dvě spoluautorské publikace:

Gemperle, J., Dibus, M., Koudelková, L., Rosel, D., and Brábek, J. (2019). The interaction of p130Cas with PKN3 promotes malignant growth. *Mol. Oncol.* 13, 264–289.

Luo, W., Janoštiak, R., Tolde, O., Ryzhova, L.M., Koudelková, L., Dibus, M., Brábek, J., Hanks, S.K., and Rosel, D. (2017). ARHGAP42 is activated by Src-mediated tyrosine phosphorylation to promote cell motility. *J. Cell Sci.* 130, 2382–2393.

doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alexandropoulos, K., and Baltimore, D. (1996). Coordinate activation of c-Src by SH3-and SH2-binding sites on a novel, p130(Cas)-related protein, *Sin. Genes Dev.* *10*, 1341–1355.

Amata, I., Maffei, M., and Pons, M. (2014). Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Front. Genet.* *5*, 181.

Azam, M., Latek, R.R., and Daley, G.Q. (2003). Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* *112*, 831–843.

Banavali, N.K., and Roux, B. (2005). The N-terminal end of the catalytic domain of Src kinase Hck is a conformational switch implicated in long-range allosteric regulation. *Structure* *13*, 1715–1723.

Barker, S.C., Kassel, D.B., Weigl, D., Huang, X., Luther, M.A., and Knight, W.B. (1995). Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process. *Biochemistry* *34*, 14843–14851.

Baumann, H., Knapp, S., Lundbäck, T., Ladenstein, R., and Härd, T. (1994). Solution structure and DNA-binding properties of a thermostable protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nat. Struct. Biol.* *1*, 808–819.

Berdeaux, R.L., Díaz, B., Kim, L., and Martin, G.S. (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* *166*, 317–323.

Bernadó, P., Pérez, Y., Svergun, D.I., and Pons, M. (2008). Structural characterization of the active and inactive states of Src kinase in solution by small-angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* *376*, 492–505.

Bjorge, J.D., Bellagamba, C., Cheng, H.C., Tanaka, A., Wang, J.H., and Fujita, D.J. (1995). Characterization of two activated mutants of human pp60c-src that escape c-Src kinase regulation by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 24222–24228.

Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* *23*, 7918–7927.

Brábek, J., Mojzita, D., Novotný, M., Půta, F., and Folk, P. (2002). The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 664–670.

Bradshaw, J.M., Mitaxov, V., and Waksman, G. (1999). Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase. *J. Mol. Biol.* *293*, 971–985.

Braniš, J., Pataki, C., Spörrer, M., Gerum, R.C., Mainka, A., Cermak, V., Goldmann, W.H., Fabry, B., Brábek, J., and Rosel, D. (2017). The role of focal adhesion anchoring domains of CAS in mechanotransduction. *Sci. Rep.* *7*.

Breitenlechner, C.B., Kairies, N.A., Honold, K., Scheiblich, S., Koll, H., Greiter, E., Koch, S., Schäfer, W., Huber, R., and Engh, R.A. (2005). Crystal structures of active SRC kinase domain complexes. *J. Mol. Biol.* 353, 222–231.

Bromann, P.A., Korkaya, H., and Courtneidge, S.A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23, 7957–7968.

Broome, M.A., and Hunter, T. (1997). The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding. *Oncogene* 14, 17–34.

Broussard, J.A., Rappaz, B., Webb, D.J., and Brown, C.M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* 8, 265–281.

Buser, C.A., Sigal, C.T., Resh, M.D., and McLaughlin, S. (1994). Membrane Binding of Myristylated Peptides Corresponding to the NH₂ Terminus of Src. *Biochemistry* 33, 13093–13101.

Buss, J.E., and Sefton, B.M. (1985). Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *J. Virol.* 53, 7–12.

Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J., and Parsons, S.J. (1995). c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* 130, 355–368.

Chen, S., O'Reilly, L.P., Smithgall, T.E., and Engen, J.R. (2008). Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core. *J. Mol. Biol.* 383, 414–423.

Cherf, G.M., and Cochran, J.R. (2015). Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. *Methods Mol. Biol.* 1319, 155–175.

Chong, Y.-P., Chan, A.S., Chan, K.-C., Williamson, N.A., Lerner, E.C., Smithgall, T.E., Bjorge, J.D., Fujita, D.J., Purcell, A.W., Scholz, G., et al. (2006). C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK), a unique inhibitor inactivating multiple active conformations of Src family tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 281, 32988–32999.

Cooper, J.A., Gould, K.L., Cartwright, C.A., and Hunter, T. (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231, 1431–1434.

Cordier, F., Wang, C., Grzesiek, S., and Nicholson, L.K. (2000). Ligand-induced strain in hydrogen bonds of the c-Src SH3 domain detected by NMR. *J. Mol. Biol.* 304, 497–505.

Cowan-Jacob, S.W. (2006). Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2608–2625.

Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Manley, P.W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., and Meyer, T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure* 13, 861–871.

- Cross, F.R., Garber, E.A., Pellman, D., and Hanafusa, H. (1984). A short sequence in the p60src N terminus is required for p60src myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* *4*, 1834–1842.
- D’Oro, U., Sakaguchi, K., Appella, E., and Ashwell, J.D. (1996). Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4996–5003.
- Dandoulaki, M., Petsalaki, E., Sumpton, D., Zanivan, S., and Zachos, G. (2018). Src activation by Chk1 promotes actin patch formation and prevents chromatin bridge breakage in cytokinesis. *J. Cell Biol.* *217*, 3071–3089.
- Dar, A.C., and Shokat, K.M. (2011). The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 769–795.
- Defilippi, P., Di Stefano, P., and Cabodi, S. (2006). p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol.* *16*, 257–263.
- Eck, M.J., Shoelson, S.E., and Harrison, S.C. (1993). Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature* *362*, 87–91.
- Edelhoch, H., Brand, L., and Wilchek, M. (1967). Fluorescence studies with tryptophyl peptides. *Biochemistry* *6*, 547–559.
- Erpel, T., Superti-Furga, G., and Courtneidge, S.A. (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.
- Fajer, M., Meng, Y., and Roux, B. (2017). The Activation of c-Src Tyrosine Kinase: Conformational Transition Pathway and Free Energy Landscape. *J. Phys. Chem. B* *121*, 3352–3363.
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A., and Schreiber, S.L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* *266*, 1241–1247.
- Feng, S., Kasahara, C., Rickles, R.J., and Schreiber, S.L. (1995). Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12408–12415.
- Fincham, V.J., and Frame, M.C. (1998). The Catalytic Activity of Src Is Dispensable for Translocation to Focal Adhesions but Controls the Turnover of These Structures During Cell Motility. *EMBO J.* *17*, 81–92.
- Frame, M.C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* *1602*, 114–130.
- Gan, W., Yang, S., and Roux, B. (2009). Atomistic view of the conformational activation of Src kinase using the string method with swarms-of-trajectories. *Biophys. J.* *97*, L8.

Garber, E.A., Cross, F.R., and Hanafusa, H. (1985). Processing of p60v-src to its myristylated membrane-bound form. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2781–2788.

Gemperle, J., Hexnerová, R., Lepšík, M., Tesina, P., Dibus, M., Novotný, M., Brábek, J., Veverka, V., and Rosel, D. (2017). Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners. *Sci. Rep.* 7.

Gera, N., Hussain, M., Wright, R.C., and Rao, B.M. (2011). Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *J. Mol. Biol.* 409, 601–616.

Gerndtová Z. (2008) Role tyrozinu 90 v regulaci kinázové aktivity a onkogenních vlastností kinázy Src. Diplomová práce.

Gonfloni, S., Williams, J.C., Hattula, K., Weijland, A., Wierenga, R.K., and Superti-Furga, G. (1997). The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. *EMBO J.* 16, 7261–7271.

Gonfloni, S., Frischknecht, F., Way, M., and Superti-Furga, G. (1999). Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis. *Nat. Struct. Biol.* 6, 760–764.

Griffin, B.A., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* (80-.). 281, 269–272.

Guarino, M. (2010). Src signaling in cancer invasion. *J. Cell. Physiol.* 223, 14–26.

Gulyani, A., Vitriol, E., Allen, R., Wu, J., Gremyachinskiy, D., Lewis, S., Dewar, B., Graves, L.M., Kay, B.K., Kuhlman, B., et al. (2011). A biosensor generated via high-throughput screening quantifies cell edge Src dynamics. *Nat. Chem. Biol.* 7, 437–444.

Hantschel, O., and Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 33–44.

Harder, K.W., Moller, N.P.H., Peacock, J.W., and Jirik, F.R. (1999). Protein-tyrosine phosphatase a regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J. Biol. Chem.* 273, 31890–31900.

Hoey, J.G., Summy, J., and Flynn, D.C. (2000). Chimeric constructs containing the SH4/Unique domains of cYes can restrict the ability of Src(527F) to upregulate heme oxygenase-1 expression efficiently. *Cell. Signal.* 12, 691–701.

Hubbard, S.R. (1998). Autoregulatory Mechanisms in Protein-tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 11987–11990.

Irby, R.B., and Yeatman, T.J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19, 5636–5642.

Irtegun, S., Wood, R.J., Ormsby, A.R., Mulhern, T.D., and Hatters, D.M. (2013). Tyrosine 416 is phosphorylated in the closed, repressed conformation of c-Src. *PLoS One* 8, e71035.

Irtegun, S., Wood, R., Lackovic, K., Schweiggert, J., Ramdzan, Y.M., Huang, D.C.S.,

Mulhern, T.D., and Hatters, D.M. (2014). A biosensor of Src family kinase conformation by exposable tetracysteine useful for cell-based screening. *ACS Chem. Biol.* *9*, 1426–1431.

Jacobs, S., and O’Neil, K. (2012). FN3 Domain Engineering.

Janoštiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hanks, S.K., Rösel, D., and Brábek, J. (2011). Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4256–4267.

Janoštiak, R., Pataki, A.C., Brábek, J., and Rösel, D. (2014). Mechanosensors in integrin signaling: The emerging role of p130Cas. *Eur. J. Cell Biol.* *93*, 445–454.

Jares-Erijman, E.A., and Jovin, T.M. (2003). FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* *21*, 1387–1395.

Johnson, H., Lescarbeau, R.S., Gutierrez, J.A., and White, F.M. (2013). Phosphotyrosine profiling of NSCLC cells in response to EGF and HGF reveals network specific mediators of invasion. *J. Proteome Res.* *12*, 1856–1867.

Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996). Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* *85*, 149–158.

Kamps, M.P., Buss, J.E., and Sefton, B.M. (1985). Mutation of NH₂-terminal glycine of p60src prevents both myristoylation and morphological transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 4625–4628.

Kaplan, J.M., Mardon, G., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1988). The first seven amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristylation signal: lysine 7 is a critical determinant. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2435–2441.

Karatan, E., Merguerian, M., Han, Z., Scholle, M.D., Koide, S., and Kay, B.K. (2004). Molecular recognition properties of FN3 monobodies that bind the Src SH3 domain. *Chem. Biol.* *11*, 835–844.

Kato, J.Y., Takeya, T., Grandori, C., Iba, H., Levy, J.B., and Hanafusa, H. (1986). Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 4155–4160.

Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* *14*, 231–241.

Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C., Cooper, J.A., and Soriano, P. (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* *18*, 2459–2471.

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., and Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* *253*, 407–414.

- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C., and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* (80-). *252*, 668–674.
- Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X., and Koide, S. (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* *284*, 1141–1151.
- Koide, A., Abbatiello, S., Rothgery, L., and Koide, S. (2002). Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 1253–1258.
- Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011). Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4647–4656.
- Kornev, A.P., Haste, N.M., Taylor, S.S., and Ten Eyck, L.F. (2006). Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17783–17788.
- Kuriyan, J., and Cowburn, D. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *26*, 259–288.
- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., and Saksela, K. (1995). A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* *14*, 5006–5015.
- Leonard, S.E., Register, A.C., Krishnamurty, R., Brighty, G.J., and Maly, D.J. (2014). Divergent modulation of Src-family kinase regulatory interactions with ATP-competitive inhibitors. *ACS Chem. Biol.* *9*, 1894–1905.
- Lerner, E.C., and Smithgall, T.E. (2002). SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 365–369.
- Lerner, E.C., Tribble, R.P., Schiavone, A.P., Hochrein, J.M., Engen, J.R., and Smithgall, T.E. (2005). Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *J. Biol. Chem.* *280*, 40832–40837.
- Levinson, N.M., Seeliger, M.A., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2008). Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell* *134*, 124–134.
- Li, R. (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* *136*, 649–658.
- Liao, X., Lu, S., Zhuo, Y., Winter, C., Xu, W., and Wang, Y. (2012). Visualization of Src and FAK activity during the differentiation process from HMSCs to osteoblasts. *PLoS One* *7*.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F.J., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell* *129*, 1177–1187.

- Lin, J., and Weiss, A. (2001). T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* *114*, 243–244.
- Lu, S., Ouyang, M., Seong, J., Zhang, J., Chien, S., and Wang, Y. (2008). The spatiotemporal pattern of Src activation at lipid rafts revealed by diffusion-corrected FRET imaging. *PLoS Comput. Biol.* *4*.
- Luo, W., Slebos, R.J., Hill, S., Li, M., Brábek, J., Amanchy, R., Chaerkady, R., Pandey, A., Ham, A.-J.L., and Hanks, S.K. (2008). Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J. Proteome Res.* *7*, 3447–3460.
- Luo, W., Janoštiak, R., Tolde, O., Ryzhova, L.M., Koudelková, L., Dibus, M., Brábek, J., Hanks, S.K., and Rosel, D. (2017). ARHGAP42 is activated by Src-mediated tyrosine phosphorylation to promote cell motility. *J. Cell Sci.* *130*, 2382–2393.
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., and Huang, X.Y. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* *102*, 635–646.
- Machiyama, H., Yamaguchi, T., Sawada, Y., Watanabe, T.M., and Fujita, H. (2015). SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesions and the cell membrane. *FEBS J.* *282*, 4034–4055.
- Maffei, M., Arbesú, M., Le Roux, A.-L., Amata, I., Roche, S., and Pons, M. (2015). The SH3 Domain Acts as a Scaffold for the N-Terminal Intrinsically Disordered Regions of c-Src. *Structure* *23*, 893–902.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 514–520.
- Mayer, B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* *114*, 1253–1263.
- Meng, Y., and Roux, B. (2014). Locking the active conformation of c-Src kinase through the phosphorylation of the activation loop. *J. Mol. Biol.* *426*, 423–435.
- Meng, Y., Shukla, D., Pande, V.S., and Roux, B. (2016). Transition path theory analysis of c-Src kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 9193–9198.
- Meng, Y., Pond, M.P., and Roux, B. (2017). Tyrosine Kinase Activation and Conformational Flexibility: Lessons from Src-Family Tyrosine Kinases. *Acc. Chem. Res.* *50*, 1193–1201.
- Meng, Y., Ahuja, L.G., Kornev, A.P., Taylor, S.S., and Roux, B. (2018). A Catalytically Disabled Double Mutant of Src Tyrosine Kinase Can Be Stabilized into an Active-Like Conformation. *J. Mol. Biol.* *430*, 881–889.
- Meyn, M.A., Wilson, M.B., Abdi, F.A., Fahey, N., Schiavone, A.P., Wu, J., Hochrein, J.M., Engen, J.R., and Smithgall, T.E. (2006). Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity. *J. Biol. Chem.* *281*, 30907–30916.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* *1*, 761–772.

- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., Michael McCaffery, J., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882–887.
- Miyazaki, K., Senga, T., Matsuda, S., Tanaka, M., Machida, K., Takenouchi, Y., Nimura, Y., and Hamaguchi, M. (1999). Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 759–764.
- Molina, T.J., Kishihara, K., Siderovskid, D.P., Van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C.J., Hartmann, K.U., Veillette, A., et al. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 357, 161–164.
- Morrogh, L.M., Hinshelwood, S., Costello, P., Cory, G.O., and 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.
- Mukherjee, A., Singh, R., Udayan, S., Biswas, S., Reddy, P.P., Manmadhan, S., George, G., Kumar, S., Das, R., Rao, B.M., et al. (2020). A Fyn biosensor reveals pulsatile, spatially localized kinase activity and signaling crosstalk in live mammalian cells. *Elife* 9.
- Murphy, S.M., Bergman, M., and Morgan, D.O. (1993). Suppression of c-Src activity by C-terminal Src kinase involves the c-Src SH2 and SH3 domains: analysis with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5290–5300.
- Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y., and Wang, N. (2008). Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6626–6631.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859–871.
- Nagar, B., Hantschel, O., Seeliger, M., Davies, J.M., Weis, W.I., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2006). Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol. Cell* 21, 787–798.
- Nguyen, A.W., and Daugherty, P.S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* 23, 355–360.
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., et al. (2010). Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 32, 766–777.
- Obara, Y., Labudda, K., Dillon, T.J., and Stork, P.J.S. (2004). PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 117, 6085–6094.

- Ohashi, T., Galiacy, S.D., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (2007). An experimental study of GFP-based FRET, with application to intrinsically unstructured proteins. *Protein Sci.* *16*, 1429–1438.
- Okada, M., and Nakagawa, H. (1989). A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J. Biol. Chem.* *264*, 20886–20893.
- Osusky, M., Taylor, S.J., and Shalloway, D. (1995). Autophosphorylation of purified c-Src at its primary negative regulation site. *J. Biol. Chem.* *270*, 25729–25732.
- Ouyang, M., Sun, J., Chien, S., and Wang, Y. (2008). Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14353–14358.
- Pallen, C. (2005). Protein Tyrosine Phosphatase α (PTPα): A Src Family Kinase Activator and Mediator of Multiple Biological Effects. *Curr. Top. Med. Chem.* *3*, 821–835.
- Pan, Q., Qiao, F., Gao, C., Norman, B., Optican, L., and Zelenka, P.S. (2011). Cdk5 targets active Src for ubiquitin-dependent degradation by phosphorylating Src(S75). *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 3425–3436.
- Park, H., Wahl, M.I., Afar, D.E., Turck, C.W., Rawlings, D.J., Tam, C., Scharenberg, A.M., Kinet, J.P., and Witte, O.N. (1996). Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. *Immunity* *4*, 515–525.
- Paster, W., Paar, C., Eckerstorfer, P., Jakober, A., Drbal, K., Schütz, G.J., Sonnleitner, A., and Stockinger, H. (2009). Genetically encoded Förster resonance energy transfer sensors for the conformation of the Src family kinase Lck. *J. Immunol.* *182*, 2160–2167.
- Pawson, T. (1997). New impressions of Src and Hck. *Nature* *385*, 582–583, 585.
- Peitzsch, R.M., and McLaughlin, S. (1993). Binding of Acylated Peptides and Fatty Acids to Phospholipid Vesicles: Pertinence to Myristoylated Proteins. *Biochemistry* *32*, 10436–10443.
- Pellman, D., Garber, E.A., Cross, F.R., and Hanafusa, H. (1985). Fine structural mapping of a critical NH2-terminal region of p60src. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 1623–1627.
- Pérez, Y., Gairí, M., Pons, M., and Bernadó, P. (2009). Structural characterization of the natively unfolded N-terminal domain of human c-Src kinase: insights into the role of phosphorylation of the unique domain. *J. Mol. Biol.* *391*, 136–148.
- Pérez, Y., Maffei, M., Igea, A., Amata, I., Gairí, M., Nebreda, A.R., Bernadó, P., and Pons, M. (2013). Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism. *Sci. Rep.* *3*, 1295.
- Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* *23*, 7928–7946.
- Porter, M., Schindler, T., Kuriyan, J., and Miller, W.T. (2000). Reciprocal regulation of Hck

activity by phosphorylation of Tyr527 and Tyr416: Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. *J. Biol. Chem.* *275*, 2721–2726.

Potts, W.M., Reynolds, A.B., Lansing, T.J., and Parsons, J.T. (1988). Activation of pp60c-src transforming potential by mutations altering the structure of an amino terminal domain containing residues 90-95. *Oncogene Res.* *3*, 343–355.

Rawlings, D.J., Scharenberg, A.M., Park, H., Wahl, M.I., Lin, S., Kato, R.M., Fluckiger, A.C., Witte, O.N., and Kinet, J.P. (1996). Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* *271*, 822–825.

Resh, M.D. (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* *76*, 411–413.

Rösel, D., Brábek, J., Veselý, P., and Fernandes, M. (2013). Drugs for solid cancer: The productivity crisis prompts a rethink. *Onco. Targets. Ther.* *6*, 767–777.

Roskoski, R. (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 1155–1164.

Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* *103*, 26–48.

Le Roux, A.L., Busquets, M.A., Sagués, F., and Pons, M. (2016). Kinetics characterization of c-Src binding to lipid membranes: Switching from labile to persistent binding. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *138*, 17–25.

Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 1680–1688.

Seong, J., Lu, S., Ouyang, M., Huang, H., Zhang, J., Frame, M.C., and Wang, Y. (2009). Visualization of Src Activity at Different Compartments of the Plasma Membrane by FRET Imaging. *Chem. Biol.* *16*, 48–57.

Seong, J., Ouyang, M., Kim, T., Sun, J., Wen, P.C., Lu, S., Zhuo, Y., Llewellyn, N.M., Schlaepfer, D.D., Guan, J.L., et al. (2011a). Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Commun.* *2*.

Seong, J., Lu, S., and Wang, Y. (2011b). Live cell imaging of Src/FAK signaling by FRET. *Cell. Mol. Bioeng.* *4*, 138–147.

Shenoy, S., Chackalaparampil, I., Bagrodia, S., Lin, P.H., and Shalloway, D. (1992). Role of p34cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7237–7241.

Shukla, D., Meng, Y., Roux, B., and Pande, V.S. (2014). Activation pathway of Src kinase reveals intermediate states as targets for drug design. *Nat. Commun.* *5*.

Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine

kinase Hck. *Nature* 385, 602–609.

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., and Lechleider, R.J. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767–778.

Songyang, Z., Carraway, K.L., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., et al. (1995). Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536–539.

Sparks, A.B., Quilliam, L.A., Thorn, J.M., Der, C.J., and Kay, B.K. (1994). Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage- displayed random peptide libraries. *J. Biol. Chem.* 269, 23853–23856.

Spassov, D.S., Ruiz-Saenz, A., Piple, A., and Moasser, M.M. (2018). A Dimerization Function in the Intrinsically Disordered N-Terminal Region of Src. *Cell Rep.* 25, 449-463.e4.

Stirnweiss, A., Hartig, R., Gieseler, S., Lindquist, J.A., Reichardt, P., Philipsen, L., Simeoni, L., Poltorak, M., Merten, C., Zuschratter, W., et al. (2013). T cell activation results in conformational changes in the Src family kinase Lck to induce its activation. *Sci. Signal.* 6.

Stover, D.R., Liebetanz, J., and Lydon, N.B. (1994). Cdc2-mediated modulation of pp60c-src activity. *J. Biol. Chem.* 269, 26885–26889.

Summy, J.M., Qian, Y., Jiang, B.H., Guappone-Koay, A., Gatesman, A., Shi, X., and Flynn, D.C. (2003). The SH4-Unique-SH3-SH2 domains dictate specificity in signaling that differentiate c-Yes from c-Src. *J. Cell Sci.* 116, 2585–2598.

Tatárová, Z., Brábek, J., Rösel, D., and Novotný, M. (2012). SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution. *PLoS One* 7, e36310.

Tatosyan, a G., and Mizenina, O. a (2000). Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochem. Biokhimiia* 65, 49–58.

Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011). Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 65–77.

Teckchandani, A., Laszlo, G.S., Simó, S., Shah, K., Pilling, C., Strait, A.A., and Cooper, J.A. (2014). Cullin 5 destabilizes cas to inhibit src-dependent cell transformation. *J. Cell Sci.* 127, 509–520.

Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513–609.

Ting, A.Y., Kain, K.H., Klemke, R.L., and Tsien, R.Y. (2001). Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15003–15008.

Tong, M., Pelton, J.G., Gill, M.L., Zhang, W., Picart, F., and Seeliger, M.A. (2017). Survey

of solution dynamics in Src kinase reveals allosteric cross talk between the ligand binding and regulatory sites. *Nat. Commun.* *8*.

Toutchkine, A., Kraynov, V., and Hahn, K. (2003). Solvent-sensitive dyes to report protein conformational changes in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 4132–4145.

Toutchkine, A., Nguyen, D.V., and Hahn, K.M. (2007). Merocyanine dyes with improved photostability. *Org. Lett.* *9*, 2775–2777.

Tsygankov, A.Y. (2003). Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front. Biosci.* *8*.

Ulmer, T.S., Werner, J.M., and Campbell, I.D. (2002). SH3-SH2 domain orientation in Src kinases: NMR studies of Fyn. *Structure* *10*, 901–911.

Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., et al. (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* *358*, 646–653.

Waksman, G., Shoelson, S.E., Pant, N., Cowburn, D., and Kuriyan, J. (1993). Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* *72*, 779–790.

Walker, F., deBlaquiere, J., and Burgess, A.W. (1993). Translocation of pp60c-src from the plasma membrane to the cytosol after stimulation by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* *268*, 19552–19558.

Wang, Y., and Chien, S. (2007). Analysis of Integrin Signaling by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Methods Enzymol.* *426*, 177–201.

Wang, C., Pawley, N.H., and Nicholson, L.K. (2001). The role of backbone motions in ligand binding to the c-Src SH3 domain. *J. Mol. Biol.* *313*, 873–887.

Wang, P., Liang, J., Shi, L.Z., Wang, Y., Zhang, P., Ouyang, M., Preece, D., Peng, Q., Shao, L., Fan, J., et al. (2018). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Intercellular Mechanotransmission upon Wounding. *ACS Photonics* *5*, 3565–3574.

Wang, Y., Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y., and Chien, S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* *434*, 1040–1045.

Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* *6*, 154–161.

de Weers, M., Brouns, G.S., Hinshelwood, S., Kinnon, C., Schuurman, R.K., Hendriks, R.W., and Borst, J. (1994). B-cell antigen receptor stimulation activates the human Bruton's tyrosine kinase, which is deficient in X-linked agammaglobulinemia. *J. Biol. Chem.* *269*, 23857–23860.

von Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G.-S., and Sheetz, M.P. (2003). Force-dependent

integrin–cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *EMBO J.* 22, 5023–5035.

Wong, S., and Witte, O.N. (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 247–306.

Wu, J.-C., Chen, Y.-C., Kuo, C.-T., Wenshin Yu, H., Chen, Y.-Q., Chiou, A., and Kuo, J.-C. (2015). Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration. *Sci. Rep.* 5, 18476.

Wu, Y., Spencer, S.D., and Lasky, L.A. (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.

Wu, Y., Zhang, K., Seong, J., Fan, J., Chien, S., Wang, Y., and Lu, S. (2016). In-situ coupling between kinase activities and protein dynamics within single focal adhesions. *Sci. Rep.* 6.

Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595–602.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., and Harrison, S.C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* 3, 629–638.

Yamaguchi, H., and Hendrickson, W.A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384, 484–489.

Young, M. a, Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., and Kuriyan, J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105, 115–126.

Yu, H., Rosen, M.K., Shin, T.B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J.S., and Schreiber, S.L. (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science* 258, 1665–1668.

Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., and Schreiber, S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76, 933–945.

Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913–916.

Zadran, S., Standley, S., Wong, K., Otiniano, E., Amighi, A., and Baudry, M. (2012). Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 895–902.

Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., and Geiger, B. (2007). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 120, 137–148.