

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie (Fyziologie buňky)



Bc. Michal Dibus

Propojení signalizace PKN3 a p130Cas/BCAR1

Crosstalk of PKN3 and p130Cas/BCAR1 signaling

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Daniel Rösel, PhD.

Praha, 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 30. 04. 2016

Podpis

Pod'akovanie:

V prvom rade by som chcel poďakovať môjmu školiteľovi, doc. RNDr. Danielovi Röselovi, Ph.D., za odborné vedenie mojej diplomovej práce.

Ďakujem mojim rodičom, sestre a priateľke Nikol Baloghovej, za morálnu a finančnú podporu v mojom štúdiu.

V neposlednom rade ďakujem doc. RNDr. Janovi Brábkovi, Ph.D., Mgr. Jakubovi Gemperlemu za cenné rady, rovnako ako ostatným členom Laboratória invazivity nádorových buniek.

Abstrakt

Ako p130Cas, tak PKN3, sú dôležitými regulátormi bunkovej signalizácie, ktorej deregulácia vedie k malignému rastu nádorových buniek. Nedávno sme v našom laboratóriu zistili, že prostredníctvom SH3 domény p130Cas dochádza k interakcii s polyprolínovým motívom PKN3, naznačujúc ich potenciálnu úlohu v spoločnej regulácii týchto procesov. V rámci tejto práce sme sa zamerali na fosforyláciu p130Cas kinázou PKN3 a potvrdili sme, že serín 498 (S498) vyskytujúci sa v SRD p130Cas je PKN3 fosforylovaný *in vitro*. Vzhľadom k tomu, že S498 sa nachádza vo väzbovom motíve pre proteíny 14-3-3 a jeho fosforylácia je pre interakciu p130Cas so 14-3-3 vyžadovaná, navrhli sme potenciálne novú signálnu dráhu, a to PKN3/p130Cas/14-3-3. V druhej časti práce sme študovali odpoveď tejto dráhy na pôsobenie antiestrogénov v nádorových bunkách línie MCF7, pozitívnych na estrogénové receptory. Napriek tomu, že sme ukázali, že v rámci skorej odpovede na pôsobenie tamoxifénu dochádza k inaktivácii PKN3, nevyklúčujeme jej neskoršiu úlohu v procese vzniku antiestrogénovej rezistencie. Navyše, objasnenie signalizácie stimulovanej interakciou p130Cas s PKN3 a jej možného vplyvu na maligný rast nádorových buniek by mohlo prispieť k návrhu nových terapeutických cieľov.

Kľúčové slová:

p130Cas, BCAR1, PKN3, fosforylácia, 14-3-3, antiestrogénová rezistencia, MCF7

Abstract

Both p130Cas and PKN3 are important regulators of cellular signaling deregulation of which leads to malignant behavior of cancer cells. Recently we have found that SH3 domain of p130Cas mediates interaction with proline rich region of PKN3 suggesting their possible cooperation in regulation of these processes. In this work we have focused on the phosphorylation of p130Cas by PKN3 and identified serine 498 (S498) within the serine rich domain of p130Cas to be phosphorylated by PKN3 *in vitro*. Given that S498 is localized within the 14-3-3 binding motif and its phosphorylation is required for interaction of p130Cas with 14-3-3 proteins, we propose potential existence of novel PKN3/p130Cas/14-3-3 signaling axis. In the second part of the work we have studied this pathway in response to antiestrogen treatment in estrogen receptor positive breast cancer cell line MCF7. Although we have shown inactivation of PKN3 occurs as an early response to tamoxifen treatment, we do not rule out its possible role in further promotion of resistance to antiestrogens. Furthermore, understanding the signaling triggered by interaction of PKN3 with p130Cas and its possible downstream effects on promoting malignant growth of cancer cells would help in finding novel therapeutic targets.

Key words:

p130Cas, BCAR1, PKN3, phosphorylation, 14-3-3, antiestrogenic resistance, MCF7

Zoznam použitých skratiek:

a i.	a iné
AA/BIS	pomer akrylamid:bisakrylamid
AGC	skupina proteín kináz pomenovaná podľa rodín proteín kináz A, G a C
AK	aminokyselina
ATP	adenozín trifosfát
AurA	kináza AuroraA
BCAR1	ľudský homológ p130Cas podporujúci vznik antiestrogénovej rezistencie v liečbe rakoviny prsníka (<i>Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1</i>)
BCAR3	proteín podporujúci vznik antiestrogénovej rezistencie v liečbe rakoviny prsníka (<i>Breast cancer anti-estrogen resistance protein 3</i>)
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CAS	rodina proteínov asociovaných s Crk (<i>Crk-associated substrate</i>)
CCH	C-terminálna doména
CZ doména	<i>charged AA and Leu-zipper-like sequence</i>
ECM	extracelulárna matrix (<i>Extracellular matrix</i>)
Efs	embryonálny proteín asociovaný s kinázou Fyn (<i>Embryonal Fyn-associated substrate</i>)
ER	estrogénový receptor
FA	fokálne adhézie (<i>Focal adhesions</i>)
FAK	kináza fokálnych adhézii (<i>Focal adhesion kinase</i>)
FAT	doména FAK zodpovedná za cielenie do FA (<i>Focal adhesion targeting</i>)
GEF proteín	proteín katalyzujúci výmenu GDP za GTP (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
gél 30:0,2	SDS-PAGE gél s pomerom AA/BIS 30:0,2
HEF1	člen rodiny proteínov CAS (<i>Human enhancer of filamentation 1</i>)
HEPL	člen rodiny proteínov CAS (<i>HEF1-Efs-p130Cas-like</i>)
HLH	motív helix-slučka-helix (<i>helix-loop-helix</i>)
HR1 doména	<i>protein kinase C-related kinase homology region 1</i>
HRP	chrenová peroxidáza
IB	imunoblot

kDa	jednotka udávajúca molekulovú hmotnosť (kiloDalton)
Ki	inhibičná konštanta, definuje množstvo inhibítora potrebného k zníženiu aktivity enzýmu na polovicu
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
NSP	rodina proteínov s doménou SH2 (<i>Novel Src-homology 2-containing protein</i>)
p130Cas	proteín s hmotnosťou 130 kDa asociovaný s Crk (<i>Crk-associated substrate</i>)
PI3K	fosfatidylinozitol-3 kináza
PIP2	fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát
PKC	proteín kináza C
PKN	proteín kináza N
PNBM	p-nitrobenzyl mesylát
PP2A	proteín fosfatáza 2A (<i>Protein phosphatase 2A</i>)
S498	serín 498
SB oblasť	oblasť obsahujúca väzbové miesta pre kinázu Src (<i>Src-binding region</i>)
SD	substrátová doména (<i>Substrate domain</i>)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza za prítomnosti dodecylsírany sodného (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SH2 doména	doména homológna s druhou doménou kinázy Src (<i>Src-homology 2</i>)
SH3 doména	doména homológna s treťou doménou kinázy Src (<i>Src-homology 3</i>)
SRD	serínová doména (<i>Serine-rich domain</i>)
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
Y517	tyrozín 517

Obsah

1. Literárny prehľad	11
1.1. Rodina kináz PKN.....	11
1.1.1. Štruktúra kináz PKN	11
1.1.2. Aktivácia kináz PKN a ich špecificita	13
1.1.3. Kinázy PKN v nádorovej biológii.....	14
1.2. Rodina proteínov CAS	16
1.2.1. p130Cas.....	17
1.2.1.1. Štruktúra proteínu p130Cas a jeho interakční partneri	17
1.2.1.2. Fosforylácia p130Cas a jej regulácia	21
1.2.1.3. Vplyv fosforylácie p130Cas na reguláciu migrácie	23
1.2.1.4. Interakcia p130Cas s proteínmi rodiny NSP.....	25
1.2.1.5. Úloha BCAR1 a BCAR3 v antiestrogénovej rezistencii.....	26
1.2.1.6. Úloha p130Cas v signálnej dráhe TGF- β	27
1.3. Predbežné výsledky a ciele práce	30
2. Materiál.....	31
2.1. Organizmy	31
2.2. Kultivácia bakteriálnych kultúr	31
2.3. Kultivácia cicavčích kultúr.....	32
2.4. Materiál pre prácu s DNA	33
2.4.1. Izolácia a purifikácia DNA	33
2.4.2. Agarózová elektroforéza	33
2.4.3. Materiál pre molekulárne klonovanie	34
2.4.4. Zoznam použitých vektorov.....	34
2.5. Materiál pre prácu s proteínmi	35
2.5.1. Afinitná purifikácia proteínov	35
2.5.2. Kinázové reakcie.....	36
2.5.3. Roztoky na prípravu lyzátov a vzoriek pre SDS-PAGE	36
2.5.4. SDS-PAGE elektroforéza a vizualizačné metódy.....	37
2.6. Imunocytochemické farbenie buniek	40
3. Metódy.....	41
3.1. Purifikácia a izolácia DNA.....	41

3.1.1.	Izolácia plazmidovej DNA pomocou NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)	41
3.1.2.	Elektroforetická separácia DNA v agarózovom géle.....	42
3.1.3.	Izolácia DNA fragmentov z agarózového gélu pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)	42
3.2.	Molekulárne klonovanie	43
3.2.1.	Restričné štiepenie DNA.....	43
3.2.2.	Purifikácia DNA pomocou Agencourt AMPure XP.....	43
3.2.3.	DNA ligácia	44
3.2.4.	Príprava kompetentných buniek E. coli DH5 α	45
3.2.5.	Transformácia elektrokompetentných buniek DH5 α	46
3.2.6.	Transformácia chemicky kompetentných buniek DH5 α	47
3.3.	Afinitná purifikácia proteínov	47
3.4.	Kultivácia cicavčích tkanivových kultúr	50
3.4.1.	Pasážovanie cicavčích buniek	50
3.4.2.	Príprava stabilátov cicavčích buniek.....	50
3.4.3.	Rozmrazovanie stabilátov cicavčích buniek	51
3.4.4.	Transfekcia cicavčích buniek.....	51
3.4.5.	Stabilná retrovirálna transfekcia myších buniek	52
3.5.	Príprava bunkových lyzátov	52
3.6.	Stanovenie proteínovej koncentrácie.....	53
3.6.1.	Folinova metóda stanovenia koncentrácie proteínu	53
3.6.2.	Denzitometrické stanovenie koncentrácie proteínu z gélu.....	53
3.7.	Interakčné štúdie a imunoprecipitácie	54
3.7.1.	Pulldown	54
3.7.2.	Imunoprecipitácia pomocou Flag M2 sefarózy.....	55
3.8.	Kinázové reakcie	55
3.9.	SDS-PAGE a detekčné metódy	58
3.9.1.	Tris-glycínová proteínová elektroforéza SDS-PAGE.....	58
3.9.2.	Farbenie polyakrylamidového gélu pomocou farbiva Coomassie brilliant blue.....	59
3.9.3.	Western blot	59
3.9.4.	Reverzibilné farbenie proteínov na NC membráne pomocou Ponceau S ..	60
3.9.5.	Imunodetekcia proteínov na NC membráne	60

3.10. Imunocytochemické farbenie cicavčích buniek	61
3.11. Štatistická a bioinformatická analýza	62
3.12. Analýza hmotnostnou spektrometriou	62
4. Výsledky	63
4.1. Príprava konštruktov	63
4.2. Analýza fosforylácie p130Cas	64
4.2.1. Mutácie v SRD neovplyvňujú bunkovú lokalizáciu p130Cas	66
4.3. Potvrdenie fosforylácie p130Cas kinázou PKN3	66
4.4. Štúdium potenciálneho prepojenia PKN3 – BCAR1 – 14-3-3ζ v antiestrogénovej rezistencii	73
5. Diskusia	76
5.1. Fosforylácia p130Cas a PKN3 a ich funkčný význam	76
5.2. Funkčná analýza významu dráhy PKN3 – BCAR1 – 14-3-3ζ v antiestrogénovej rezistencii	79
5.3. Perspektíva pokračovania projektu	81
6. Zhrnutie	82
7. Zoznam použitej literatúry	83

1. Literárny prehľad

1.1. Rodina kináz PKN

Rodinu proteín kináz N (PKN), taktiež nazývaných PRK (*protein kinase C-related protein kinases*), tvoria Ser/Thr kinázy typu AGC, ktoré sú kvôli veľkej sekvenčnej podobnosti s proteín kinázou C (PKC) zaraďované do superrodiny PKC. Rodina PKN sa v súčasnosti skladá z troch kináz, a to PKN1/PRK1/PKN α , PKN2/PRK2/PKN γ a PKN3/PKN β . Táto kapitola bude venovaná popisu funkcie, štruktúry a aktivácie kináz PKN so zameraním na PKN3.

Kinázy rodiny PKN sa zúčastňujú predovšetkým procesov spojených s organizáciou bunkového cytoskeletu ako efektorové proteíny malých Rho GTPáz (zhrnuté v Mukai, 2003). GTPázy rodiny Rho sú 21-26 kDa proteíny aktivované väzbou GTP, ktoré vo svojom aktívnom stave zohrávajú úlohu, mimo iné, v procesoch spojených s bunkovou migráciou či proliferáciou. Spoločným menovateľom všetkých procesov regulovaných GTPázami Rho je však predovšetkým ich schopnosť ovplyvňovať dynamickú reorganizáciu cytoskeletu (zhrnuté v Parri and Chiarugi, 2010).

1.1.1. Štruktúra kináz PKN

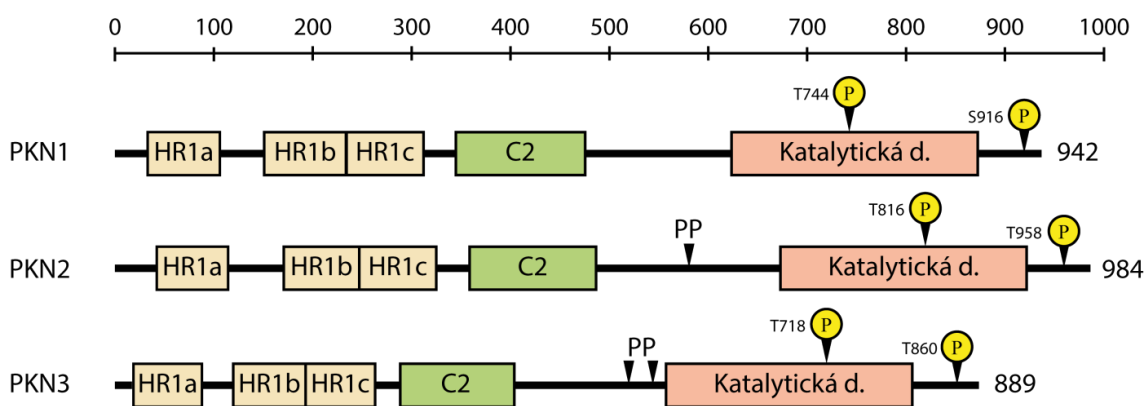
HR1 domény

Štruktúra kináz rodiny PKN je celkovo veľmi podobná (viď Obr. 1.1). Na N konci proteínu sa nachádzajú tri vysoko konzervované homológne repetície nazývané domény HR1 (HR1a, HR1b a HR1c; *protein kinase C-related kinase homology region 1*), ktoré sú bohaté na nabité aminokyseliny a leucín, vďaka čomu sú tiež známe pod názvom CZ domény (*charged AA and Leu-zipper-like sequence*) (viď Obr. 1.1). Prostredníctvom týchto domén dochádza k interakcii kináz rodiny PKN s Rho-GTPázami (Oishi et al., 1999; Quilliam et al., 1996; Vincent and Settleman, 1997; Watanabe et al., 1996). Štruktúrne štúdie HR1a a HR1b domén PKN1 ukázali, že obe domény zaujímajú konformáciu dvojhelixového zväzku (tzv. *coiled-coil*) (Maesaki et al., 1999; Owen et al., 2003). Napriek vysokej sekvenčnej podobnosti kináz PKN sa biofyzikálnymi štúdiami HR1 domén PKN2 a PKN3 ukázalo, že sa navzájom štruktúrne líšia (Hutchinson et al., 2013). Rozdiely v štruktúre by tak mohli vysvetliť

rozdielnu schopnosť väzby Rho-GTPáz k jednotlivým izoformám PKN, keďže u PKN1 dochádza k interakcii s Rho-GTPázami s výrazne vyššou afinitou, ako je tomu u PKN2 a PKN3. Napriek tomu, že všetky tri izoformy PKN sa *in vitro* s najvyššou afinitou viažu k RhoB, Unsal-Kacmaz s kolegami ukázali, že *in vivo* PKN3 interaguje preferenčne s RhoC, ktoré v komplexe s PDK1 vedie k stabilizácii a aktivácii PKN3 (Hutchinson et al., 2013; Unsal-Kacmaz et al., 2012).

C2 doména

V centrálnej oblasti proteínu sa nachádza tzv. C2 doména (známa aj pod názvom D doména (Oishi et al., 1999)), ktorej funkcia u kináz PKN zatiaľ nie je objasnená, no na základe sekvenčnej podobnosti s C2 doménami iných proteínov je možné, že táto oblasť by mohla zohrávať úlohu v aktivácii kináz PKN väzbou fosfolipidov (Nalefski and Falke, 1996). U PKN1 dochádza k približne 10-16-násobnému zvýšeniu aktivity za prítomnosti PIP2 (fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát), PIP3 (fosfatidylinozitol-3,4,5-trisfosfát), fosfatidyl serínu a kyseliny arachidonovej. Približne polovičný nárast aktivity oproti PKN1 bol pozorovaný u PKN2 v prítomnosti PIP2 a kyseliny arachidonovej, zatiaľ čo u PKN3 k stimulácii lipidmi nedochádza vôbec (Oishi et al., 1999; Falk et al., 2014).



Obr. 1.1 – primárna štruktúra kináz rodiny PKN a ich doménová organizácia. Zobrazená dĺžka jednotlivých domén zodpovedá ich veľkosti v AK podľa hore vyznačenej mierky. V rámci katalytickej domény a C-koncovej časti sú vyznačené fosforylačné miesta potrebné k plnej aktivácii kináz PKN. Skratka PP označuje dve polyprolinové oblasti u PKN3 a jednu u PKN2. Sekvencia bola anotovaná podľa proteínovej databázy Uniprot. Obrázok bol vytvorený za pomoci programu *Adobe Illustrator CS6*.

Polyprolínová oblasť a katalytická doména

Medzi C2 doménou a katalytickou doménou sa u PKN3 vyskytujú dva polyprolínové motívy, ktoré poskytujú väzbové miesto pre SH3 doménu interagujúcich proteínov, napr. rodiny Graf (Oishi et al., 1999; Shibata et al., 2001). Tie negatívne regulujú aktivitu Rho GTPázy a tým priamo ovplyvňujú organizáciu cytoskeletu. Hoci PKN3 priamo fosforyluje proteíny rodiny Graf, význam tejto fosforylácie na ich funkciu doposiaľ nie je objasnený (Shibata et al., 2001). V našom laboratóriu sa J. Gemperlemu podarilo predikovať a potvrdiť interakciu polyprolínového motívu PKN3 s SH3 doménou proteínu p130Cas (J.Gemperle – Diplomová práca, 2012; vid' kapitola 1.3.). Podobne, PKN2 interaguje prostredníctvom jediného polyprolínového motívu s proteínmi Nck a Grb4 (Quilliam et al., 1996; Braverman and Quilliam, 1999). V rámci PKN1 sa polyprolínové sekvencie nenachádzajú.

C-koncovú časť kinázy PKN3 uzatvára vysoko konzervovaná katalytická doména, ktorá vykazuje významnú sekvenčnú podobnosť voči PKN1 a PKN2, a to 66% a 62%, resp. U aktívnej katalytickej domény (AK 520-889 PKN3) ľudskej izoformy PKN3 bola pozorovaná schopnosť autofosforylácie, no fosforylované AK sa doposiaľ identifikovať nepodarilo (Oishi et al., 1999; Shibata et al., 2001).

1.1.2. Aktivácia kináz PKN a ich špecificita

Aktivita jednotlivých izoformiem PKN je stimulovaná signálnymi kaskádami rôznych bunkových receptorov, ako napr. androgénovým a tromboxánovým receptorom u PKN1 (Metzger et al., 2008; Metzger et al., 2003; O'Sullivan et al., 2015), CD-44 u PKN2 (Bourguignon et al., 2007) a inzulínovým receptorom u PKN3 (Leenders et al., 2004). Podmienkou plnej aktivácie kináz PKN je fosforylácia dvoch Ser/Thr, a to v rámci aktivačnej slučky v katalytickej doméne (Thr744 u PKN1, Thr816 u PKN2 a Thr718 u PKN3) a tzv. „turn“ motívu, nachádzajúceho sa na C-konci proteínu (Ser916 u PKN1, Thr958 u PKN2 a Thr860 u PKN3) (Falk et al., 2014; vid' Obr. 1.1). Na rozdiel od typických AGC kináz, vyžadujúcich k aktivácii fosforyláciu Ser/Thr v rámci hydrofóbneho motívu, u kináz PKN je táto aminokyselina (AK) nahradená fosfomimikujúcim zbytkom (Asp/Glu). Ten následne sprostredkuje interakciu s kinázou PDK1, ktorá fosforyluje Ser/Thr v aktivačnej slučke (zhrnuté v Pearce et al., 2010), avšak táto interakcia je závislá na vzniku terciárneho komplexu kinázy PKN, PDK1 a Rho-GTPázy (Flynn et al., 2000; Unsal-Kacmaz et al., 2012).

Štúdiom konsenzuálneho fosforylačného motívu kináz rodiny PKN sa Collazos s kolegami podarilo určiť špecifický motív pre PKN3, a to X-R-X-Ne/Z-S/T-Ho-X-X-X-Ne, kde Z určuje pozíciu netolerujúcu Arg, Ne znázorňuje neutrálnu AK, Ho znázorňuje hydrofóbnu AK a X pozíciu bez nárokov na špecifickú AK. Napriek tomu, že PKN1 i PKN3 boli u štvrtiny použitých peptidov schopné fosforylácie rovnakého motívu, výsledky naznačujú, že si obe kinázy zachovávajú určitú špecificitu (Collazos et al., 2011).

1.1.3. Kinázy PKN v nádorovej biológii

Na rozdiel od PKN1 a PKN2, ktoré sú exprimované vo väčšine ľudských, kryších a myších tkanív (Hashimoto et al., 1998; Mukai and Ono, 1994; Quilliam et al., 1996), sa kináza PKN3 v dospelých ľudských tkanivách takmer nevyskytuje. PKN3 je exprimovaná v primárnych endoteliálnych bunkách, kde je jej výskyt spojený s invazívnym charakterom týchto buniek, umožňujúcim tvorbu tubulárnych štruktúr *in vitro* (Aleku et al., 2008), a vo viacerých typoch nádorových buniek (napr. HeLa, SW480, K-562 (Mukai and Ono, 1994), MCF7, MCF10A, MDA-MB-231 a i. línie rakoviny prsníka, PC-3 (Leenders et al., 2004; Unsal-Kacmaz et al., 2012)). V bunkách línie PC-3 (adenokarcinóm prostaty) bola popísaná úloha PKN3 v signálnej dráhe aktívnej fosfatidylinozitol-3 kinázy (PI3K), vedúcej k malignému rozvoju rakoviny prostaty (Leenders et al., 2004). V bunkách nádoru prsníka vedie nadprodukcia PKN3 k zvýšeniu proinvasívneho rastu týchto buniek *in vitro*. Naopak, inhibícia expresie PKN3 vedie nielen k zablokovaniu procesu tvorby metastáz, ale zároveň zabraňuje rastu primárnych nádorov prsníka a prostaty (Unsal-Kacmaz et al., 2012). Mechanizmus, ktorým kináza PKN3 prispieva k regulácii rozvoja nádorov zatiaľ nie je objasnený, no Unsal-Kacmaz s kolegami naznačili, že by v tomto procese mohla zohrávať úlohu GTPáza RhoC, ktorá je známym regulátorom nádorovej migrácie a invazivity a ktorá fyzicky interaguje s kinázou PKN3 (Unsal-Kacmaz et al., 2012).

Kvôli jej špecifickému výskytu bola PKN3 dlhú dobu považovaná za hlavného mediátora u nádorov závislých na signalizácii PKN, nedávne štúdie však ukázali, že aj kinázy PKN1 a PKN2 sa zúčastňujú regulácie nádorovej migrácie a invazivity sprostredkovanvej Rho GTPázami (Lachmann et al., 2011). Navyše, PKN1 a PKN2 sa ukázali byť dôležité pre tromboxánom stimulovanú chromatinovú remodeláciu

(fosforylácia Thr11 na históne 3) vedúcu k malignému rastu adenokarcinómu prostaty (Turner et al., 2011; O'Sullivan et al., 2015). U nádorov prostaty dochádza obdobným spôsobom k fosforyláci H3Thr11 kinázou PKN1 aj v signálnej dráhe regulovanej androgénovým receptorom, s ktorým PKN1 priamo interaguje (Metzger et al., 2003; Metzger et al., 2008).

Svojou úlohou v rozvoji nádorov sa všetky tri kinázy rodiny PKN ukázali byť vhodným terapeutickým cieľom. Lachmann s kolegami dokonca na základe experimentov s bunkami línie MDA-MB-468 naznačili, že najväčší efekt v protiinvazívnej terapii by mohlo mať cielenie všetkých troch kináz PKN súčasne, čím by sa zamedzilo pozorovanej redundancii v regulácii invazivity u tejto línie (Lachmann et al., 2011). Napriek tomu, že doposiaľ nebol objavený špecifický inhibítor ani pre jednu z izoform PKN, v nedávnom screene komerčne dostupných knižníc malých inhibítorov sa inhibítor PKC412 (PKC) ukázal ako potentný inhibítor všetkých troch kináz PKN. Prekvapivo, inhibítory Y27632 (ROCK), PP1 (Src) a SB-202190 (p38 MAPK) sa ukázali byť vysoko selektívne voči PKN3 v porovnaní s PKN1 a PKN2 s K_i (inhibičná konštanta, definuje množstvo inhibítora potrebného k zníženiu aktivity enzýmu na polovicu) v nanomolárnych hodnotách, čím sa stávajú významným nástrojom pre štúdium PKN3 (Falk et al., 2014).

V pomerne nedávnej štúdií sa Aleku a kolegom podarilo vyvinúť siRNA proti PKN3 vo forme lipozomálnych častíc (Atu027), ktorá špecificky znižuje expresiu PKN3 v endoteliálnych bunkách a zabraňuje tak tvorbe tubulárnych štruktúr *in vitro* (Aleku et al., 2008). Ukázalo sa, že systémové podanie Atu027 vedie k inhibícii tvorby mikro- a makrometastáz v pľúcach ako v experimentálnych (LCC, B16V), tak v spontánných (MDA-MB-231, MDA-MB-435) myších modeloch pľúcnych metastáz. Molekulárna podstata tohto javu zatiaľ zostáva neobjasnená, no Santel s kolegami naznačili, že by zaň čiastočne mohla byť zodpovedná zvýšená expresia VE-kadherínu v endoteliálnych bunkách, vedúca k ovplyvneniu bunkových spojov v týchto bunkách a s tým spojenej priepustnosti ciev (Santel et al., 2010). Najnovšie štúdie však túto hypotézu spochybňujú a naznačujú, že zníženie expresie PKN3 v bunkách HUVEC zabraňuje maturácii glykosilácie adhezívnych molekúl ako napr. ICAM1 alebo VCAM1, ktoré sú známymi regulátormi migrácie nádorových buniek (Mukai et al., 2016). Nespornú úlohu stromálnej PKN3 v procese metastazovania a rozvoja primárnych nádorov však potvrdili myšie modely bez expresie PKN3, u ktorých došlo k zníženiu tvorby sekundárnych nádorov (Mukai et al., 2016) a zároveň k pomalšiemu

rozvoju leukémie spôsobenej stratou PTEN (Kraus et al., 2014). Navyše, tieto myšie modely potvrdzujú vhodnosť cielenia PKN3 pri liečbe nádorov, keďže myši bez PKN3 sú zdravé a viabilné (Kraus et al., 2014). Prvá fáza klinických štúdií Atu027 u pacientov s pokročilými pevnými nádormi bola nedávno ukončená (Schultheis et al., 2014) a v súčasnosti prebieha klinická štúdia zaoberajúca sa použitím kombinácie Atu027 a Gemcitabínu na liečbu pokročilých a metastatických nádorov pankreasu (fáza I/II; [NCT01808638](#)).

1.2. Rodina proteínov CAS

Rodina proteínov CAS (*Crk-associated substrate*) v súčasnosti pozostáva zo štyroch členov, a to Efs/Sin, HEPL/CASS4, NEDD9/HEF1/Cas-L a p130Cas/BCAR1. Vďaka ich modulárnej štruktúre a veľkému počtu špecifických väzbových miest plnia proteíny rodiny CAS funkciu tzv. „scaffold“ proteínov (z angl. *scaffold*, lešenie), čím umožňujú vznik multimolekulárnych signálnych komplexov a ovplyvňujú tak časovú a priestorovú reguláciu signalizácie. Napriek ich vysokej štruktúrnej podobnosti sa tkanivová expresia a funkcia týchto proteínov líši (Defilippi et al., 2006; Tikhmyanova et al., 2011).

Proteín Efs (*Embryonal Fyn-associated substrate*) je špecificky produkovaný predovšetkým v T-lymfocytoch, týmuse a priečne pruhovanom svalstve (Alexandropoulos and Baltimore, 1996). Ako jeho expresia naznačuje, Efs zohráva významnú úlohu v regulácii imunitného systému, a to negatívnou reguláciou T-lymfocytov. U myší s deregulovanou expresiou Efs dochádza k hyperaktivácii T-lymfocytov, zvýšeniu koncentrácie protilátok a produkcie cytokínov, čo vedie k zvýšenej tvorbe zápalových ochorení rôznych orgánov (Donlin et al., 2005).

Podobne ako Efs, aj proteín HEF1 (*Human enhancer of filamentation 1*) prispieva, mimo iné, k regulácii imunitného systému. Jeho zvýšená expresia bola pozorovaná v periférnych T- a B-lymfocytoch (Minegishi et al., 1996) a koreluje so schopnosťou migrácie týchto buniek (Seo et al., 2005). Okrem lymfocytov je expresia HEF1 špecifická pre hrubé črevo, pľúca, ľadviny a placentu (Law et al., 1996). Významnú úlohu zohráva HEF1 aj v regulácii bunkovej migrácie a nádorovej invazivity, predovšetkým vďaka jeho výskytu vo fokálnych adhéziiach a lamelipódiách

(Fashena et al., 2002; Law et al., 1996). Zvýšená hladina expresie HEF1 v nádoroch prsníka koreluje s ich agresivitou a rýchlosťou migrácie nádorových buniek (Fashena et al., 2002). Zároveň, nadprodukcia HEF1 ovplyvňuje proces epiteliálno-mezenchymálnej tranzície (EMT, pre podrobnejší popis EMT viď kapitola 1.2.1.6.) (Kong et al., 2011).

Proteín HEPL (HEF1-Efs-p130Cas-like) bol objavený pomerne nedávno a jeho funkcia je študovaná predovšetkým v spojitosti s tvorbou nádorov (Singh et al., 2008).

1.2.1. p130Cas

Proteín p130Cas (*Crk-associated substrate*) bol objavený v bunkách transformovaných onkogénmi *v-crk* (Matsuda et al., 1990) a *v-src* (Reynolds et al., 1989) ako jeden z hlavných proteínov fosforylovaných na tyrozínoch. Na rozdiel od ostatných členov rodiny CAS, p130Cas je vo veľkej miere exprimovaný vo všetkých tkanivách (Sakai et al., 1994) a zúčastňuje sa regulácie apoptózy, chemotaxie a haptotaxie (migrácia stimulovaná extracelulárnou hmotou (ECM)), bunkového cyklu, bunkovej migrácie a nádorovej invazivity (Kook et al., 2000; Brábek et al., 2004; Defilippi et al., 2006; Barrett et al., 2013). p130Cas navyše zohráva zásadnú úlohu pri angiogenéze, keďže myši bez jeho expresie hynú na prelome 12. dňa embryonálneho vývoja kvôli abnormalitám ciev a srdcového svalu (Honda et al., 1998).

1.2.1.1. Štruktúra proteínu p130Cas a jeho interakční partneri

Proteín p130Cas pozostáva z N-koncovej SH3 domény (Src-homology domain 3), ktorá je nasledovaná substrátovou doménou (substrate domain, SD), serínovou doménou (serine-rich domain, SRD) a C-koncovou doménou zloženou z väzbovej oblasti pre kinázy Src (Src-binding region, SB) a domény CCH (Donato et al., 2010; Tikhmyanova et al., 2011).

SH3 doména

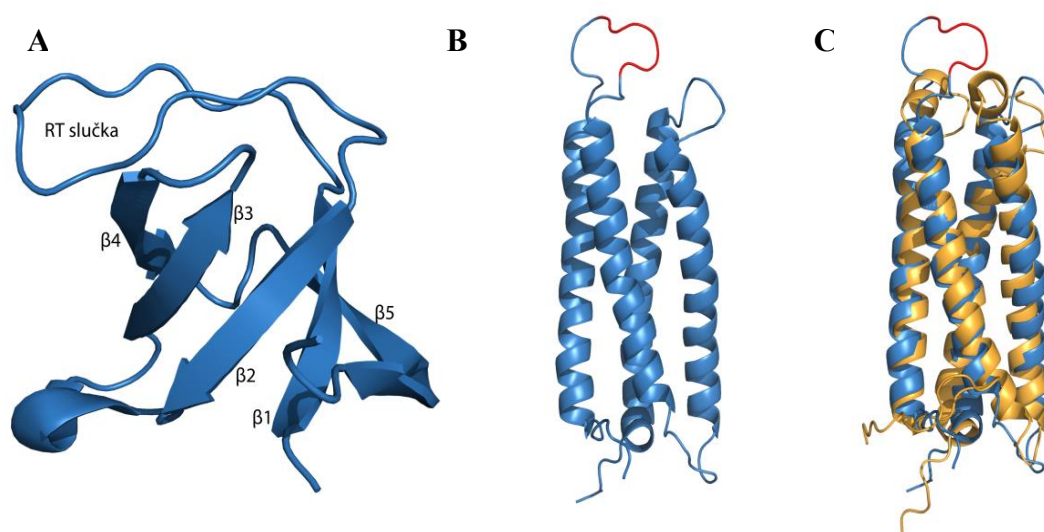
Doména SH3 je vysoko konzervovaná nie len medzi jednotlivými proteínmi rodiny CAS (Tikhmyanova et al., 2011), ale aj u ďalších eukaryotických proteínov. Jej hlavný význam spočíva v sprostredkovaní interakcií s proteínmi obsahujúcimi sekvencie bohaté na prolíny schopné zaujať štruktúru helixu typu II (motív PXXP) (Wisniewska et al., 2005). Túto interakciu v rámci SH3 domény sprostredkuje vysoko konzervovaná RT slučka, ktorá spája dva β reťazce v β -listovej štruktúre tejto domény

(Wisniewska et al., 2005; vid' Obr. 1.2 A). Navyše, schopnosť SH3 domény p130Cas interagovať s väzbovými partnermi sa u p130Cas ukázala byť negatívne regulovaná fosforyláciou Y12 v rámci SH3 domény (Janoštiak et al., 2011).

Prostredníctvom SH3 domény p130Cas interaguje s kinázami FAK (Polte and Hanks, 1995) a PYK2 (Li and Earp, 1997) a fosfatázami PTP-PEST (Garton et al., 1997) a PTP-1B (Liu et al., 1996), ktoré sú hlavnými regulátormi tyrozínovej fosforylácie SD p130Cas, a ďalej s proteínmi vinkulín (Janoštiak et al., 2014) a dynamín (Kang et al., 2011).

Substrátová doména

Substrátová doména je štruktúrne neusporiadaná oblasť v centrálnej časti proteínov rodiny CAS, ktorá je charakteristická predovšetkým výskytom motívov YXXP. Fosforylácia tyrozínov v rámci týchto motívov, predovšetkým kinázami rodiny Src a FAK, vedie k vzniku väzbového miesta pre SH2 doménu ďalších adaptorových



Obr. 1.2 – **A)** štruktúra SH3 domény p130Cas, pozostávajúca z piatich β -listov a slučky RT (kód PDB 1WYX; Wisniewska et al., 2005). **B)** štruktúra švorhelixového pretiahnutého zväzku SRD p130Cas. Červene vyznačená oblasť znázorňuje väzbové miesto pre proteíny 14-3-3 (kód PDB 1Z23; Briknarová et al., 2005). **C)** porovnanie štruktúry SRD p130Cas (modrá) so SRD HEF1 (oranžová). Červene vyznačená oblasť znázorňuje väzbové miesto pre proteíny 14-3-3 (kódy PDB 1Z23 a 2L81). Všetky obrázky boli vytvorené pomocou programu *PyMol*.

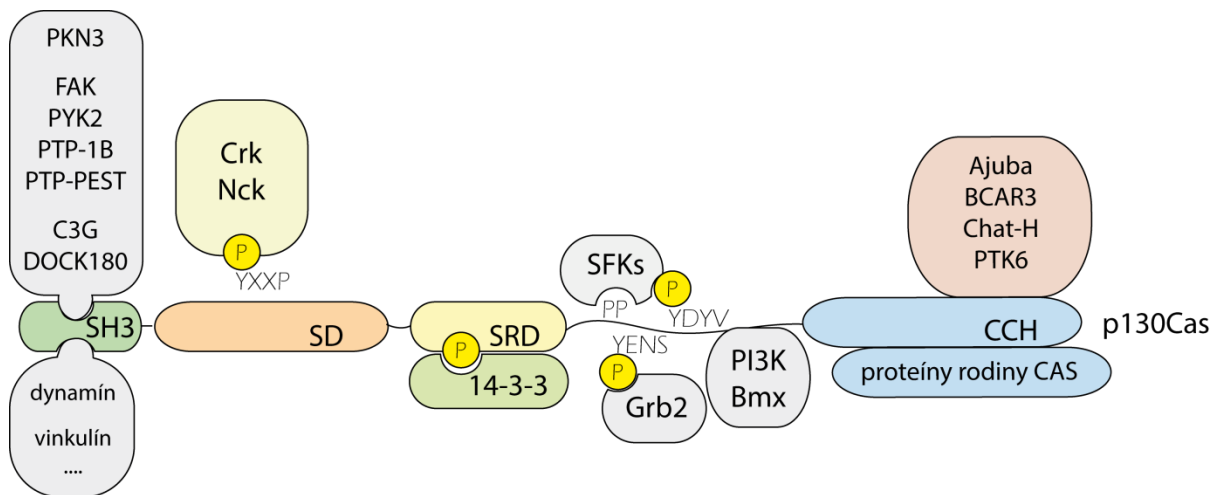
proteínov (napr. Nck a Crk), ktoré sa podieľajú na regulácii dynamiky cytoskeletu a ovplyvňujú tak bunkovú migráciu a invazivitu (Park and Curran, 2013; Rivera et al., 2006; Ruest et al., 2001). K fosforylácii týchto motívov prispieva taktiež otvorenie štruktúrne neusporiadanej SD závislé na mechanickom natiahnutí bunky, čím dôjde k sprístupneniu fosforylačných miest. Z tohto dôvodu je p130Cas považovaný za mechanosenzor (Sawada et al., 2006).

Serínová doména

Serínová doména p130Cas zaujíma štruktúru pretiahnutého helikálneho zväzku tvoreného štyrmi α -helixmi (viď Obr. 1.2 B). Jednotlivé helixy sú pospájané dlhými slučkami, ktoré celej štruktúre poskytujú určitú flexibilitu. Zároveň, slučky prepájajúce jednotlivé α -helixy sú, na rozdiel od vysoko konzervovaných helikálnych častí, hlavným miestom variability SRD v rámci proteínov rodiny CAS (Briknarová et al., 2005).

Prostredníctvom SRD p130Cas dochádza k jeho interakcii s proteínmi rodiny 14-3-3 (viď Obr. 1.3). Táto rodina adaptorových proteínov s molekulovou hmotnosťou 28-33 kDa je u človeka tvorená celkom siedmymi izoformami (β , γ , ϵ , σ , δ , τ a ϵ), ktoré zohrávajú úlohu v procesoch spojených s reguláciou bunkového cyklu, génovej expresie, apoptózy či organizácie cytoskeletu (zhrnuté v Aitken, 2006; Morrison, 2009). Interakcia proteínov 14-3-3 s p130Cas je závislá na fosforylácii S498 v motíve RGTSEP₅₀₀ (motív prvýkrát popísaný na potkanej izoforme p130Cas), nachádzajúcom sa na slučke prepájajúcej helixy α_1 a α_2 (Briknarová et al., 2005). Prostredníctvom proteínov 14-3-3 pravdepodobne dochádza k tvorbe komplexu p130Cas s adaptorovým proteínom Grb2, ktorý ďalej stimuluje dráhu Ras/Mek/Erk vedúcu k transkripčnej aktivácii tzv. SRE (Serum response element). Aktivácia SRE následne zabezpečuje transkripciu včasných génov ako odpoveď na rôzne stimuly (Hakak and Martin, 1999).

SRD paralogu p130Cas, HEF1, sa ukázala byť zásadná pre interakciu HEF1 s kinázou Aurora A (AurA) v centrozomálnej oblasti. Táto asociácia vedie k aktivácii kinázovej aktivity AurA a je negatívne regulovaná fosforyláciou serínu 296 na HEF1 (v motíve RHQSLSP₂₉₉). Interakcia AurA s p130Cas však potvrdená nebola (Pugacheva and Golemis, 2005).



Obr. 1.3 – zhrnutie kľúčových interakčných partnerov p130Cas. Skratka SFKs súhrnne označuje kinázy rodiny Src. PP značí polyprolinový motív sprotredkujúci ich interakciu s p130Cas. Obrázok bol vytvorený za pomoci programu *Adobe Illustrator CS6*.

Väzbová oblasť kináz rodiny Src

Za SRD sa v rámci sekvencie p130Cas vyskytuje krátka väzbová oblasť pre kinázy rodiny Src. Interakciu s týmito kinázami sprostredkujú dva väzbové motívy (RPLPSPP₆₄₅ a YDYVHL₆₇₃), ktoré slúžia ako väzbové miesto pre SH3, resp. SH2 doménu interagujúcich kináz (Nakamoto et al., 1996; Sakai et al., 1994). Napriek tomu, že serín 643 v motíve RPLPSPP₆₄₅ sa ukázal byť fosforylovaný pri bunkovej adhézii, na asociáciu p130Cas s kinázami rodiny Src táto fosforylácia nemá žiadny vplyv (Makkinje et al., 2012). V rámci SB oblasti s p130Cas interagujú aj kinázy PI3K (Li et al., 2000) a Bmx/Etk (Abassi et al., 2003), proteín nefrocystín (Donaldson et al., 2000) a adaptorový proteín Grb2, ktorý prostredníctvom svojej SH2 domény interaguje so sekvenciou YENS₆₆₀ fosforylovanou na tyrozíne 657 (viď Obr. 1.3). Priama interakcia Grb2 a p130Cas však na rozdiel od väzby sprostredkovanej 14-3-3 nemá na aktiváciu SRE žiaden vplyv (Hakak and Martin, 1999).

CCH doména

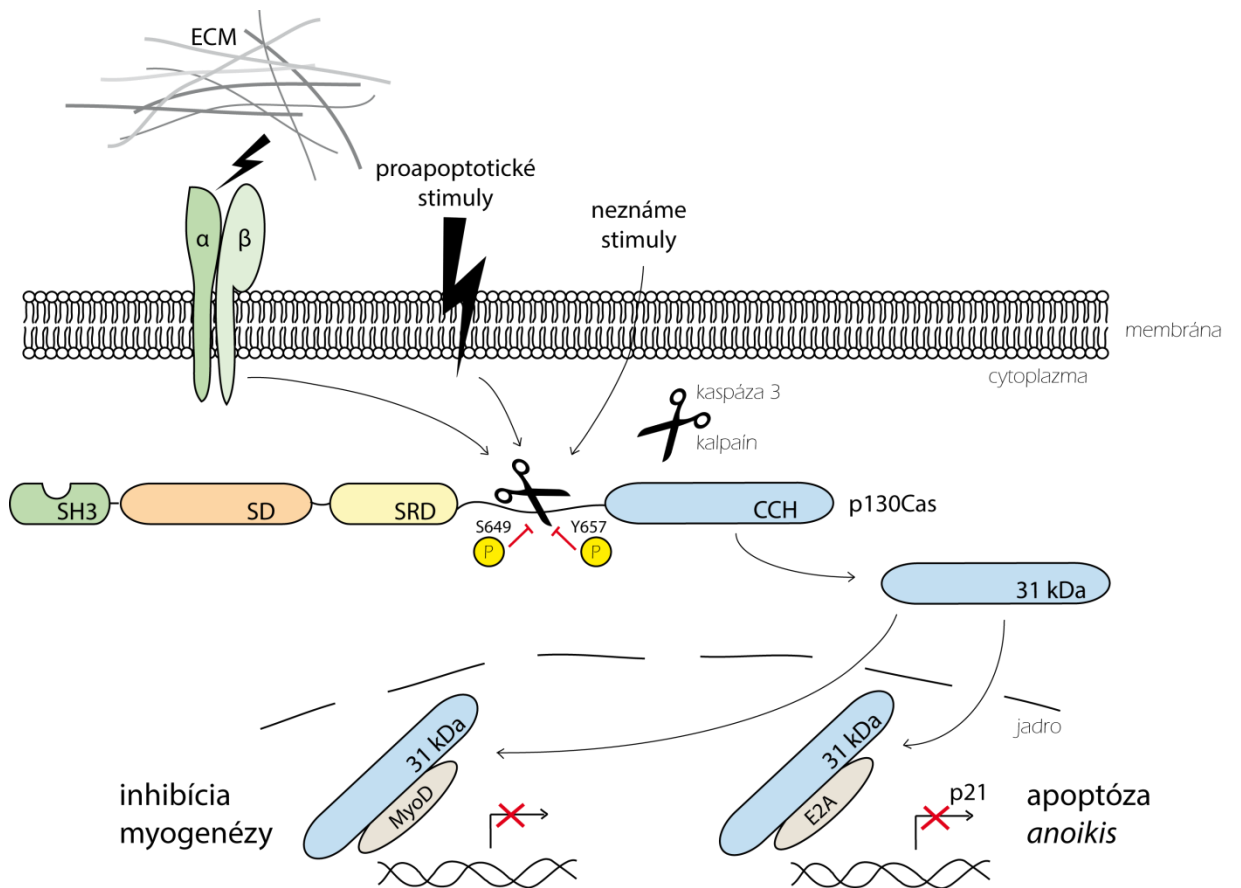
C-koncová CCH doména zaujíma, podobne ako SRD alebo doména FAT (Focal adhesion targeting) kinázy FAK, konformáciu štvorhelixového zväzku. Spolu s SH3 doménou je doména CCH zodpovedná za lokalizáciu p130Cas do fokálnych adhézii, a to pravdepodobne vďaka vysokej sekvenčnej podobnosti práve s doménou FAT (Arold et al., 2002; Donato et al., 2010).

V rámci CCH domény dochádza k vzniku 31 kDa fragmentu p130Cas ako dôsledok štiepenia kaspázou-3, kalpaínom a inými endoproteázami, v závislosti na hladine ich expresie (Kook et al., 2000; Shim et al., 2001; Wei et al., 2004; vid' Obr. 1.4). Štiepenie kaspázou-3 je negatívne regulované fosforyláciou serínu 649 a tyrozínu 657 v okolí štiepiaceho miesta DSPD₆₅₄ (prepočítané na myšiu izoformu p130Cas, pôvodne študované na potkaních bunkách)(Hoon Kim et al., 2003; Kook et al., 2000). K nabohateniu 31 kDa fragmentu p130Cas, podobne ako 28 kDa fragmentu HEF1, dochádza pri indukcii apoptózy a *anoikis* (apoptóza spôsobená stratou kontaktu integrínových receptorov s ECM)(Kim et al., 2004; Law et al., 2000; Wei et al., 2004). V rámci 31 kDa fragmentu p130Cas sa vyskytuje motív helix-loop-helix (HLH), pomocou ktorého dochádza k homo- a heterodimerizácií s proteínom HEF1 (Law et al., 1996) a zároveň k asociácii s transkripčnými faktormi E2A a MyoD (Jeong et al., 2014; Kim et al., 2004). Asociácia s týmito transkripčnými faktormi vedie k vzniku inaktívneho heterodiméru, čo v prípade E2A inhibuje produkciu proteínu p21 závislú na E2A a tým priamo podporuje apoptózu a v prípade MyoD negatívne reguluje jeho úlohu v myogenéze (Jeong et al., 2014; Kim et al., 2004).

Prostredníctvom CCH domény p130Cas taktiež dochádza k asociácii s proteínmi rodiny NSP (*Novel Src homology 2-containing protein*), a to CHAT-H (*Cas and HEF1-associated signal transducer in hematopoietic cells*) a BCAR3/And-34 (*Breast cancer anti-estrogen resistance protein 3*) (Cai et al., 1999; Regelmann et al., 2006), ďalej s proteínom Ajuba (Pratt et al., 2005) a pravdepodobne tiež s kinázou PTK6 (Zheng et al., 2012; vid' Obr. 1.3).

1.2.1.2. Fosforylácia p130Cas a jej regulácia

Napriek tomu, že p130Cas bol pôvodne identifikovaný ako proteín fosforylovaný na tyrozínoch (Matsuda et al., 1990; Reynolds et al., 1989), jeho serínová fosforylácia sa neskôr ukázala byť predominantná (Kanner et al., 1991) a zároveň zodpovedná za vznik pomalšie migrujúcej formy p130Cas na SDS-PAGE (Makkinje et al., 2009). Hoci predikovaná molekulová hmotnosť p130Cas je cca 94 kDa, na SDS- PAGE migruje v dvoch formách v oblasti zdanlivej molekulovej hmotnosti 130 kDa. Tento posun je spôsobený práve výraznou fosforyláciou p130Cas.



Obr. 1.4 – schéma vzniku 31 kDa fragmentu p130Cas a jeho jadernej funkcie. 31 kDa fragment vzniká štiepením kaspázou 3 alebo kalpaínom (znázornené nožnicami) ako odpoveď na stratu kontaktu integrínových receptorov (zelené, α , β) s ECM alebo na proapoptotické či iné stimuly. Tento fragment následne prispieva k tvorbe neaktívnych heterodimérov s transkripčnými faktormi E2A a MyoD. Štiepenie je negatívne regulované fosforyláciou znázornených AK. Obrázok bol vytvorený za pomoci programu *Adobe Illustrator CS6*.

Ako serín/treonínová, tak tyrozínová fosforylácia sú spoločne regulované signalizáciou spojenou s bunkovou adhézou závislou na integrínoch a v priebehu bunkového cyklu. Fosforylácia komplexu p130Cas/FAK na serínoch a treonínoch pri vstupe do mitózy vedie k rozpadu tohto komplexu a tým k zaguľataniu deliacich sa buniek (Yamakita et al., 1999). Na konci mitózy však dochádza k defosforylácii serínov a treonínov špecifickou Ser/Thr fosfatázou PP2A a k obnoveniu tyrozínovej fosforylácie p130Cas (Yokoyama and Miller, 2001).

Ser/Thr a Tyr fosforylácia p130Cas sú spoločne regulované aj pri bunkovej adhézii stimulovanej integrínmi, avšak oba druhy fosforylácie sa vyznačujú výrazne odlišnou dynamikou. Kým k obnove tyrozínovej fosforylácie dochádza u suspenzných buniek

MDA-MB-231 už behom niekoľkých minút po integrínovej stimulácii, bazálna fosforylácia na serínoch a treonínoch je obnovená až v priebehu 4-6 hodín (Makkinje et al., 2009; Schlaepfer et al., 1997).

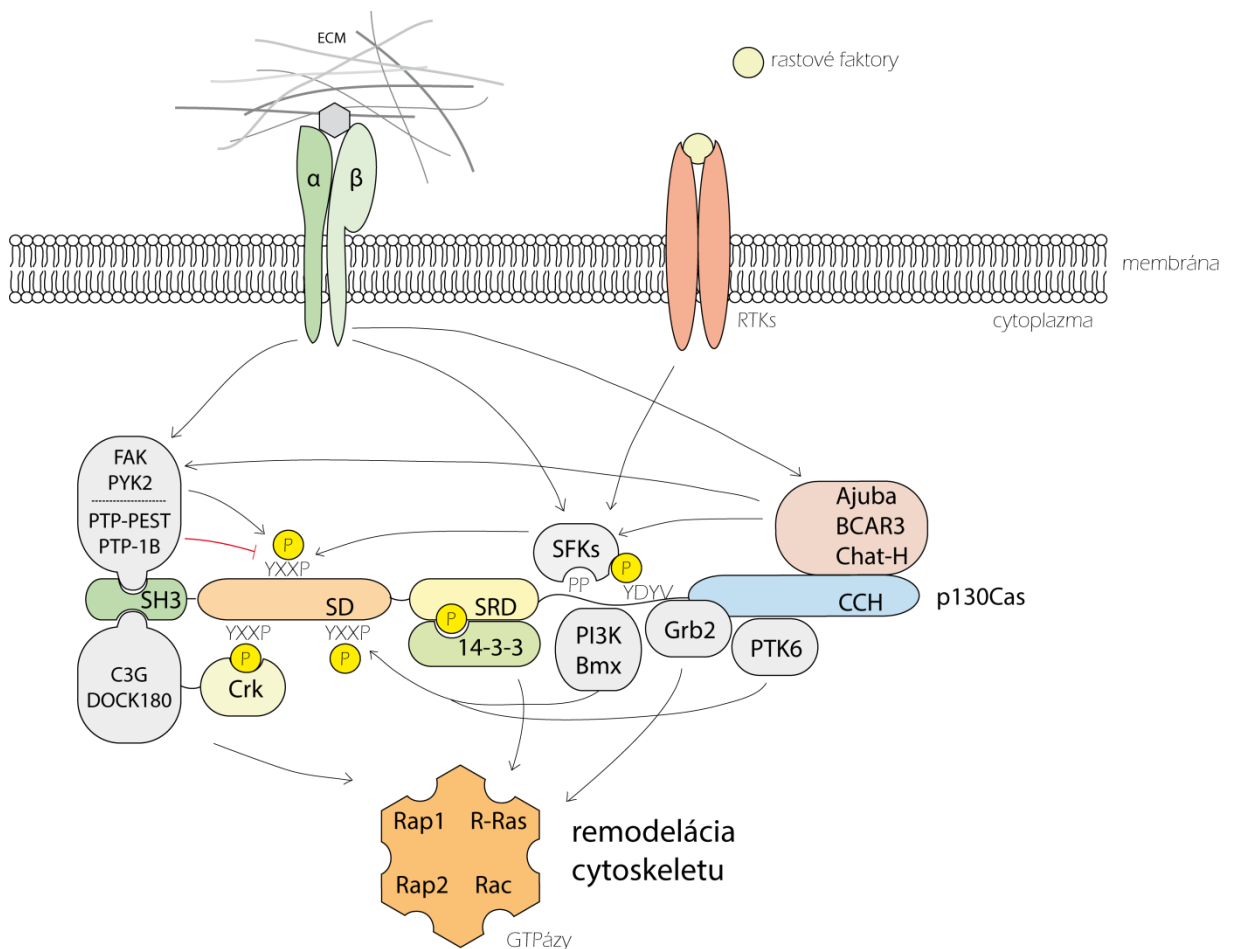
1.2.1.3. Vplyv fosforylácie p130Cas na reguláciu migrácie

V adherentných bunkách dochádza ku kontaktu integrínových receptorov s ECM a k vzniku tzv. fokálnych adhézii (FA). FA predstavujú vysoko dynamické multimolekulárne komplexy sprostredkujúce interakciu bunkového cytoskeletu s extracelulárnym prostredím. p130Cas sa ako jeden z hlavných proteínov FA zúčastňuje regulácie ich dynamiky a prenosu trakčných síl a priamo tak ovplyvňuje bunkovú migráciu a nádorovú invazivitu (zhrnuté v Defilippi et al., 2006; Mitra et al., 2005).

Po kontakte integrínov s ECM dochádza k aktivácii a výraznej tyrozínovej fosforyláci kinázy FAK (*Focal adhesion kinase*) a k jej asociácii s kinázami rodiny Src, ktorých aktivita je pre tvorbu FA zásadná (Li et al., 2002). Následná lokalizácia p130Cas do FA, medzi inými, vedie k jeho tyrozínovej fosforyláci kinázami Src, buď priamo interagujúcimi s p130Cas cez SB oblasť, alebo v rámci sekundárnej interakcie s kinázou FAK (Fonseca et al., 2004). Tyrozínová fosforylácia YXXP motívov v rámci SD p130Cas vedie k vytvoreniu väzbového miesta pre SH2 doménu adaptorového proteínu Crk (Schlaepfer et al., 1997; Vuori et al., 1996), ktorý s p130Cas interaguje v komplexe s proteínom C3G. C3G patrí do skupiny tzv. GEF proteínov (*guanine nucleotide exchange factor*), ktoré sú zodpovedné za aktiváciu špecifických GTPáz katalýzou výmeny GDP za GTP. Aktivácia C3G fosforyláciou na tyrozíne 504 kinázami rodiny Src a Abl stimuluje aktivitu malých GTPáz rodiny Ras (Rap1, Rap2, R-Ras a i.) (zhrnuté v Radha et al., 2011) a tým vedie k regulácii bunkovej adhémie a migrácie prostredníctvom aktivácie GTPázy Rac (Arthur et al., 2004; vid' Obr. 1.5). Dráha p130Cas/Crk/C3G/Rap1 sa uplatňuje taktiež v rámci odpovede na mechanické napätie bunky, ktoré vedie k sprístupneniu SD p130Cas pre tyrozínové kinázy (Sawada et al., 2006; Tamada et al., 2004; zhrnuté v Janoštiak et al., 2014).

Ďalšia signálna dráha ovplyvňujúca bunkovú migráciu stimulovanú integrínovými receptormi je p130Cas/Crk/DOCK180/Rac1 (Wang et al., 2010; vid' Obr. 1.5). DOCK180 je členom rovnomennej rodiny GEF proteínov, ktoré sa podieľajú na časovej a priestorovej regulácii aktivity GTPáz Rac a Cdc42 (zhrnuté v Laurin and

Coté, 2014). DOCK180 s p130Cas interaguje prostredníctvom SH3 domény p130Cas (Hsia et al., 2003). Prostredníctvom tejto dráhy dochádza taktiež k aktivácii GTPázy Rac stimuovanej proteínom uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor) (Smith et al., 2008). Podobnú úlohu ako p130Cas v aktivácii Rac zohráva aj homológný proteín HEF1 v komplexe s DOCK3 v bunkách melanómu A375m2 (Sanz-Moreno et al., 2008).



Obr. 1.5 – zjednodušená schéma zhrňujúca úlohu p130Cas v regulácii procesov vedúcich k remodelácii cytoskeletu aktiváciou malých GTPáz a teda priamo ovplyvňujúcich bunkovú motilitu. Po integrínovej adhézii k ECM alebo po stimulácii rastovými faktormi dochádza k aktivácii kináz fosforylujúcich tyrozínové motívy SD p130Cas. Tie ďalej sprostredkujú väzbu proteínu Crk v komplexe s C3G alebo DOCK180, ktoré ďalej regulujú aktiváciu GTPáz. Tie sú aktivované aj prostredníctvom ďalších znázornených proteínov. V regulácii fosforylácie sa ulatňujú aj tyrozínové fosfatázy PTP-1B a PTP-PEST. Obrázok bol vytvorený za pomoci programu *Adobe Illustrator CS6*.

Obe popísané signálne dráhy (C3G i DOCK180) prispievajú k regulácii bunkovej migrácie a ich signalizácia je závislá na tyrozínovej fosforylácii p130Cas a tvorbe komplexu p130Cas/Crk (Klemke et al., 1998).

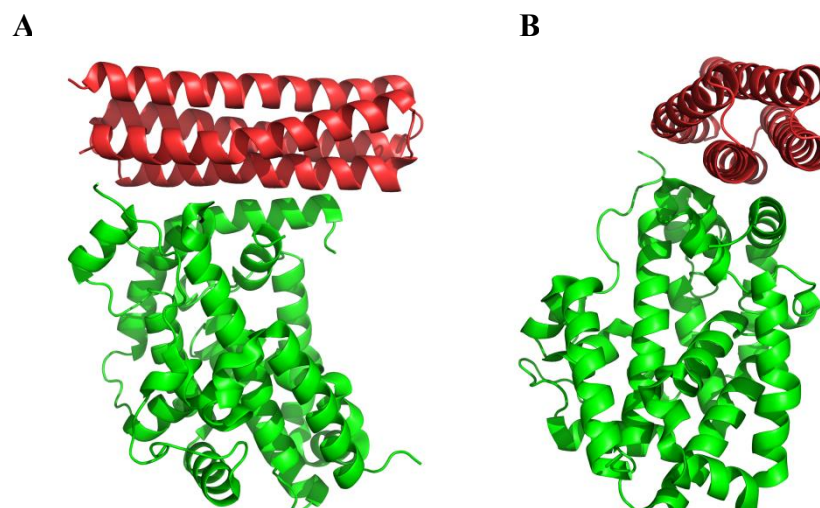
Ďalšími proteínmi stimulujúcimi bunkovú migráciu závislú na tyrozínovej fosforylácii p130Cas sú nerekceptorová tyrozínová kináza Bmx/Etk (Abassi et al., 2003), Ajuba (Pratt et al., 2005), proteíny rodiny NSP (viď kapitola 1.2.1.4.) a kináza PTK6 (Zheng et al., 2012).

1.2.1.4. Interakcia p130Cas s proteínmi rodiny NSP

Prostredníctvom CCH domény p130Cas dochádza k jeho interakcii s proteínmi rodiny NSP. Tá v súčasnosti pozostáva z troch členov, a to NSP1, BCAR3/AND-34/NSP2 a CHAT-H/NSP3. Proteíny rodiny NSP sú charakteristické predovšetkým výskytom C-koncovkej domény vyznačujúcej sa sekvenčnou podobnosťou k doméne CDC25, zohrávajúcej úlohu v aktivácii GTPáz Ras svojou GEF aktivitou (zhrnuté vo Wallez et al., 2012). Gotoh s kolegami na základe tejto podobnosti naznačili funkciu NSP proteínov v priamej aktivácii GTPáz Ras (Gotoh et al., 2000), avšak túto funkciu sa experimentmi *in vitro* potvrdiť nepodarilo (Mace et al., 2012; zhrnuté vo Wallez et al., 2012). Navyše, štruktúrna štúdia GEF domén proteínov NSP ukázala, že táto oblasť nie je schopná zaujať konformáciu vhodnú ku katalýze nukleotidovej výmeny, avšak jej usporiadanie podporuje vysoko špecifickú interakciu práve s proteínmi rodiny CAS (Mace et al., 2012; viď Obr. 1.6).

Jedným z hlavných dôsledkov interakcie p130Cas s proteínmi NSP je jeho zvýšená fosforylácia ako na tyrozínoch, tak na serínoch a treonínoch, zodpovedná za nabohatenie pomalšie migrujúcej formy p130Cas na SDS-PAGE (Makkinje et al., 2009; viď kapitola 1.2.1.2.). Napriek pôvodným predpokladom, že k stimulácii fosforylácie p130Cas BCAR3 nie je nutná ich priama interakcia (Makkinje et al., 2009; Vanden Borre et al., 2011), opak sa ukázal byť pravdou (Wallez et al., 2014). Tento efekt je navyše závislý na SH2 doméne, serínovej doméne a polyprolínovej oblasti BCAR3 a je zároveň pozitívne regulovaný SH3 doménou p130Cas (Makkinje et al., 2009).

Zvýšenie expresie BCAR3 v nádorových bunkách MCF7 vedie k zvýšeniu asociácie SH3 domény kinázy Src s p130Cas a stimulácii aktivity Src závislej na p130Cas (Makkinje et al., 2012; Schuh et al., 2010). Následná fosforylácia p130Cas



Obr. 1.6 – A) a B) štruktúra komplexu tvoreného CCH doménou p130Cas (červená) a C-koncovou doménou prteínu NSP3 (zelená) (kód PDB 3T6G; Mace et al., 2012). Obrázok bol vytvorený pomocou programu *PyMol*.

a jeho membránová lokalizácia vedie v týchto bunkách k nárastu migrácie (Schrecengost et al., 2007). Podobne, nadprodukcia CHAT-H v bunkách HEK 293 a jeho asociácia s p130Cas vedie k aktivácii dráhy p130Cas/Crk/C3G/Rap1, ktorá reguluje bunkovú adhéziu a migráciu (Sakakibara et al., 2002; vid' kapitola 1.2.1.3.).

1.2.1.5. Úloha BCAR1 a BCAR3 v antiestrogénovej rezistencii

Na rozdiel od ostatných členov rodín CAS a NSP, proteíny BCAR1 (*Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*; ľudský homológ p130Cas) a BCAR3 sa ukázali byť dôležité v procese rozvoja rezistencie k antiestrogénom (van Agthoven et al., 1998; Brinkman et al., 2000). Tie sú v súčasnej dobe prvou voľbou pri liečbe nádorov prsníka pozitívnych na estrogénové receptory (ER), avšak ich použitie často vedie k vzniku rezistencie. V mnohých prípadoch je vznik rezistencie zároveň spojený s horšou prognózou liečby nádorov, u ktorých väčšinou dochádza k zmenám v metabolizme antiestrogénov alebo k úplnej strate expresie ER (Ring and Dowsett, 2004).

Na molekulárnej úrovni je vznik rezistencie podmienený tvorbou komplexu ER/Src/BCAR1 stimulovanou estrogénmi. Tento komplex následne vedie k aktivácii

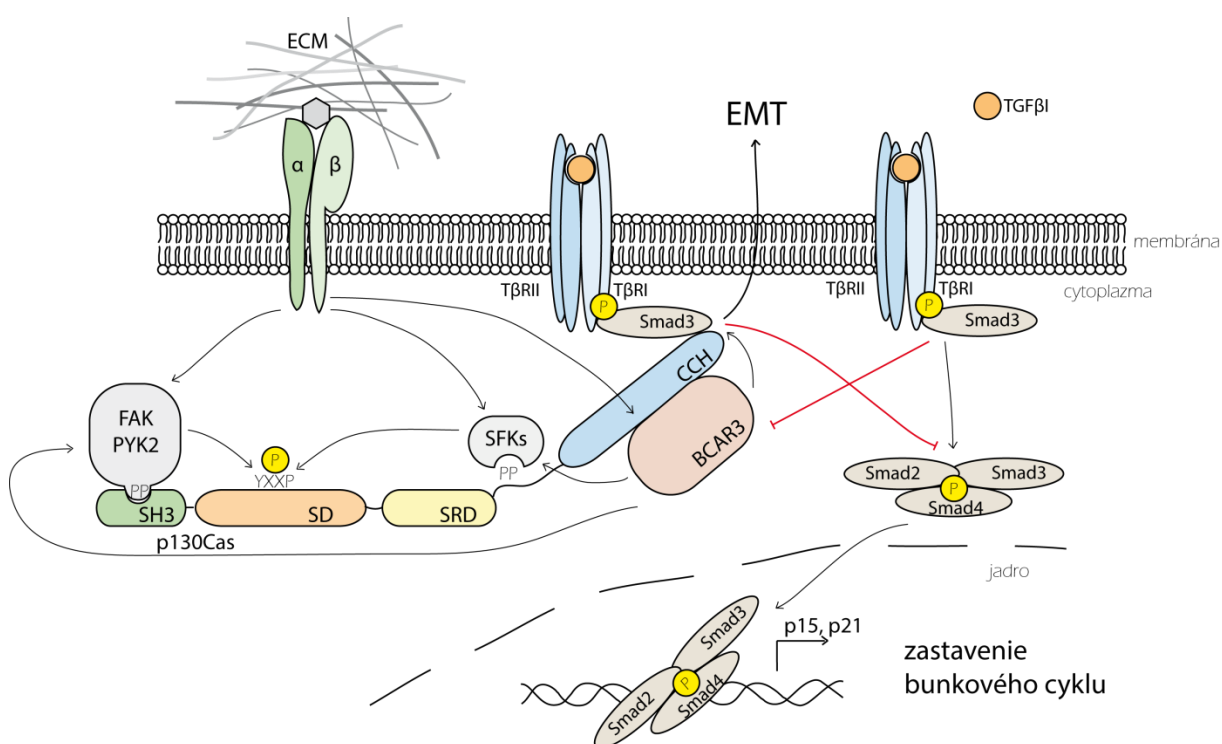
Erk1/2 a produkcii cyklínu D1, ktorý je pre vznik rezistencie dôležitý (Cabodi et al., 2004). Pre vznik rezistencie sa navyše ukázala byť nevyhnutná interakcia BCAR1 s proteínom BCAR3, ktorá vedie k stimulácii fosforylácie BCAR1 (Makkinje et al., 2009; Wallez et al., 2014; vid' kapitola 1.2.1.4.). Analýzou funkcie jednotlivých domén BCAR1 v schopnosti ER pozitívnych buniek proliferovať v prítomnosti antiestrogénov sa zistilo, že kľúčovou doménou v tomto procese je SD, keďže jej zámena so SD HEF1 viedla k inhibícii proliferácie a, naopak, k rýchlejšiemu rastu u HEF1 (Brinkman et al., 2010). Podobne, chiméra BCAR1 so SRD a SB HEF1 viedla k zníženiu schopnosti buniek rásť v prítomnosti antiestrogénov, naznačujúc tak možnú úlohu SRD BCAR1 vo vzniku rezistencie, keďže efekt SB oblasti BCAR1 a HEF1 na proliferáciu sa ukázal byť rovnaký (Brinkman et al., 2010).

1.2.1.6. Úloha p130Cas v signálnej dráhe TGF- β

Signálna dráha TGF- β (*Transforming growth factor β*) sa zúčastňuje regulácie mnohých procesov vrátane vývoja, imunitnej odpovedi, bunkového delenia a bunkovej smrti. Úloha tejto dráhy v nádorovej biológii je však u rôznych nádorových buniek odlišná. Na rozdiel od normálnych buniek a včasných karcinómov, u ktorých pôsobenie TGF- β vedie k inhibícii proliferácie a bunkovej smrti, u pokročilých nádorov TGF- β stimuluje invazivitu a proces metastázy (zhrnuté v Lebrun, 2012). Väzba TGF- β vedie k postupnej aktivácii Ser/Thr receptorových kináz typu II (T β RII) a typu I (T β RI). Následne dochádza k fosforylácii tzv. R-Smad proteínov (receptormi regulované Smad – Smad2 a Smad3), ich interakcii so Smad4 a jadernej translokácii (zhrnuté v Chen and Mishra, 2013).

Štúdiou založenou na podobnosti p130Cas s HEF1 sa zistilo, že p130Cas priamo interaguje s proteínom Smad3, pričom táto interakcia je závislá na CCH doméne p130Cas a je pozitívne regulovaná tyrozínovou fosforyláciou p130Cas. Po stimulácii buniek TGF- β dochádza k tvorbe terciárneho komplexu p130Cas/Smad3/T β RI a tým k zabráneniu jadernej translokácie Smad3. Expresia p130Cas a miera interakcie so Smad3 navyše priamo ovplyvňuje transkripčnú aktivitu stimulovanú TGF- β a vedie tak k zníženiu produkcie inhibítorov cyklín-dependentných kináz (p15 a p21) (Kang et al., 2013; Kim et al., 2008; vid' Obr. 1.7). Zvýšená hladina expresie p130Cas môže navyše po stimulácii TGF- β viesť k aktivácii tzv. nekanonických signálnych dráh, napr. p38 MAPK dráhy (Wendt et al., 2009). Naopak, zníženie expresie p130Cas, rovnako

ako BCAR3, vedie k zvýšeniu fosforylácie Smad2 a Smad3 a ich transkripčnej aktivity stimulovanej signalizáciou TGF- β (Guo et al., 2014; Wendt et al., 2009). Na základe štúdia efektu BCAR3 a p130Cas na signalizáciu TGF- β navrhli Guo s kolegami model, v ktorom je interakcia p130Cas a Smad3 závislá na BCAR3 a vedie k inhibícii fosforylácie Smad3. Navyše, pôsobenie TGF- β na bunky s vysokou endogénnou expresiou BCAR3 vedie k proteazomálnej degradácii BCAR3 sprostredkovanej proteínmi Smad (Guo et al., 2014).



Obr. 1.7 – zhrnutie úlohy p130Cas v regulácii signálnej dráhy TGF- β . Po aktivácii receptorov T β RI a II väzbou ligandu dochádza k fosforylácii Smad2 a 3 receptormi a tvorbe trimérneho komplexu so Smad4. Tento komplex následne translokuje do jadra kde aktivuje transkripciu Smad cieľových génov vedúcich k zástave bunkového cyklu (predovšetkým u epitelialných buniek). Tvorbe Smad2/3/4 komplexu zabraňuje asociácia p130Cas so Smad3, ktorá inhibuje fosforyláciu Smad3. Táto asociácia je navyše stimulovaná fosforyláciou p130Cas a interakciou p130Cas s BCAR3. Hladina expresie BCAR3 je však negatívne regulovaná signalizáciou TGF- β . p130Cas zohráva po stimulácii TGF- β úlohu taktiež v procesoch vedúcich k EMT. Obrázok bol vytvorený za pomoci programu *Adobe Illustrator CS6*.

Signalizácia TGF- β je jedným z hlavných faktorov zodpovedných za proces epiteliálno-mezenchymálnej tranzície (EMT), ktorý obecné vedie k zvýšeniu migrácie nádorových buniek. Behom tohto procesu dochádza k výraznému zníženiu expresie epiteliálnych markerov (E-kadherín, okludín, β -katenín) a zároveň k zvýšeniu expresie transkripčných faktorov Twist, Snail a Slug a mezenchymálnych markerov (fibronektín, vimentín, N-kadherín) (zhrnuté v Chen and Mishra, 2013). Viacero štúdií naznačuje, že p130Cas by mohol zohrávať úlohu kľúčového regulátora EMT závislej na stimulácii TGF- β . Zvýšená expresia p130Cas vedie k stimulácii procesu EMT po pôsobení TGF- β a, naopak, zníženie expresie p130Cas tomuto procesu zabraňuje (Deng et al., 2014; Kang et al., 2013). Zároveň, p130Cas sa v nádorových bunkách prsníka ukázal byť negatívnym regulátorom E-kadherínu vedúcim k jeho degradácii (Tikhmyanova and Golemis, 2011).

1.3. Predbežné výsledky a ciele práce

V rámci analýzy SH3 domény p130Cas v našom laboratóriu sa J. Gemperlemu podarilo metódou Phage display anotovať ideálny väzbový motív tejto domény, a to [AP]-P-[APMS]-K-P-[LPST]-[LR]-[LPST]. Na základe tohto motívu sa mu pomocou screenu v databázi UNIPROT-SWISSPROT podarilo predikovať interakciu SH3 domény p130Cas s polyprolínovou sekvenciou 16 proteínov, medzi inými s motívom PPPKPPRL₅₁₆ kinázy PKN3. Interakciu p130Cas-PKN3 neskôr potvrdil koprecipitačnými štúdiami a experimentom far-Western blot dokázal, že ich interakcia je priama (J. Gemperle - Diplomová práca, 2012; nepublikované výsledky).

Hlavnými cieľmi tejto práce sú:

- charakterizácia vplyvu interakcie p130Cas/BCAR1 s PKN3 na Ser/Thr fosforyláciu p130Cas/BCAR1 a identifikácia prípadných fosforylačných miest
- overenie vplyvu prípadnej fosforylácie p130Cas/BCAR1 kinázou PKN3 na signalizáciu stimulovanú antiestrogénmi

2. Materiál

2.1. Organizmy

Escherichia coli

kmeň **DH5 α** *dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1
hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

kmeň **BL21 (DE3)** *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS
 λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7
gene1) i21 Δ nin5*

Cicavčie bunkové kultúry

MEF p130Cas -/- myšie embryonálne fibroblasty bez expresie p130Cas

Phoenix E pakážovacia línia určená k tvorbe retrovírusov

Cicavčie immortalizované bunkové línie

MCF7 ľudské nádorové bunky adenokarcinómu prsníka

MDA-MB-231 ľudské nádorové bunky adenokarcinómu prsníka

2.2. Kultivácia bakteriálnych kultúr

LB (Luria-Bretani) médium	bakteriálny peptón	10 g/l
	kvasnicový extrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

Misky

Pripravíme LB médium s prídavkom 20 g/l agaru. Počkáme, kým nedôjde k zníženiu teploty roztoku na menej ako 60 °C, pridáme selekčné antibiotikum a nalejeme misky v sterilnom prostredí. Misky skladujeme v chlade.

Glycerol 60 %

Všetky použité roztoky sterilizujeme klávaním 20 min pri 121 °C.

Zásobné roztoky selekčných antibiotík

Ampicilín (Biotika) 100 mg/ml

Kanamycín (Thermo Scientific) 100 mg/ml

Ampicilín a kanamycín sú do LB média pridávané 1:1000

Materiál na prípravu kompetentných baktérii

10 % glycerol

50 mM CaCl₂

50 mM CaCl₂ s 15 % glycerolom

Všetky použité roztoky sterilizujeme klávaním 20 min pri 121 °C.

2.3. Kultivácia cicavčích kultúr

Kompletné médium

DMEM (Sigma)

10 % FBS (fetálne bovinne sérum)

0,1 % cyprofloxacín

0,5 % gentamycín

Zásobné roztoky antibiotík

Cyprofloxacín 10 mg/ml

Gentamycín 10 mg/ml (Sigma)

0,25 % trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen)

Zmrazovací roztok

90 % FBS

10 % DMSO (dimetyl sulfoxid)

Pozn.: ako zmrazovací roztok je možné použiť aj štandardne používané kompletné médium s prídavkom 10 % DMSO

Transfekcia cicavčích buniek

jetPEI (Polyplus)

DMEM (Sigma)

2.4. Materiál pre prácu s DNA

2.4.1. Izolácia a purifikácia DNA

Kity pre izoláciu plazmidovej DNA a purifikáciu DNA z agarózového gélu

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) – magnetické guľičky na purifikáciu DNA

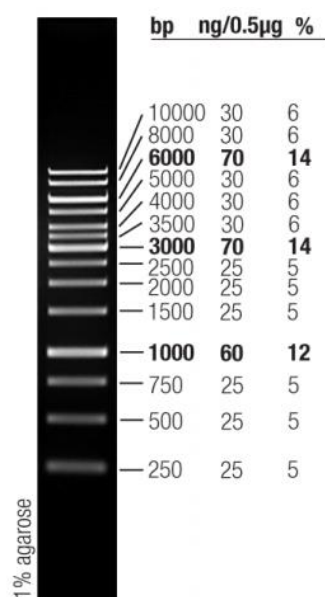
TE pufer 10 mM Tris pH 8,0
1 mM EDTA

2.4.2. Agarózová elektroforéza

TBE pufer 220 mM Tris pH 8,3
180 mM kyselina boritá
5 mM EDTA

UltraPure Agarose (Thermo Scientific)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) – štandard molekulových hmotností DNA



1% agarose

0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

2.4.3. Materiál pre molekulárne klonovanie

Všetky použité **restrikčné endonukleázy** sú od New England Biolabs (NEB). Reakcie sú inkubované v doporučených pufroch podľa návodu výrobcu.

T4 DNA Ligáza (Thermo Scientific)

2.4.4. Zoznam použitých vektorov

Vektory **pUC** a **pMA-T** boli použité ako medzistupne klonovania do cieľových vektorov.

Bakteriálne expresné vektory

pGEX 2T vektor použitý pre expresiu GST-fúzných proteínov v baktériách *E. coli* kmeň BL21 (DE3). Vektor kóduje gén, umožňujúci rezistenciu na ampicilín, gén *Lac*, ktorý reprimuje transkripciu bez prítomnosti IPTG a sekvenciu GST.

pET 11c vektor použité pre expresiu 6×His-fúzných proteínov v baktériách *E. coli* kmeň BL21 (DE3). Vektor kóduje gén, umožňujúci rezistenciu na ampicilín, gén *Lac*, ktorý reprimuje transkripciu bez prítomnosti IPTG a sekvenciu His-tagu.

Cicavčie expresné vektory

pcDNA4/TO vektor použitý pre expresiu proteínov v cicavčích bunkách pod silným CMV promótorom. Vektor kóduje gény sprostredkujúce rezistenciu na ampicilín a zeocín. Tetracyklínový operátor taktiež umožňuje indukciu exprese v prítomnosti tetracyklínu (podmienkou je stabilná expresia tetracyklínového represoru).

pEGFP c1 vektor slúži k GFP-fúznej expresii proteínov v cicavčích bunkách pod CMV promótorom. Vektor kóduje gén rezistencie pre neomycín a kanamycín a sekvenciu GFP.

pMSCV puro retrovirálny vektor, ktorý slúži na stabilnú retrovirálnu transfekciu cicavčích buniek. Zároveň je vhodný pre tranzientnú expresiu. Vektor kóduje gény pre rezistenciu na ampicilín a puromycín.

2.5. Materiál pre prácu s proteínmi

2.5.1. Afinity purifikácia proteínov

LB1 pufer	50 mM HEPES (Sigma) 100 mM NaCl pH 7,4
LB2 pufer	5 mM HEPES (Sigma) 10 mM NaCl pH 7,4
20 % Triton X-100 v LB1	80 % LB1 20 % Triton X-100 Inhibítory bakteriálnych proteáz 1:100
Uvoľňovací roztok (6×His)	LB1 250 mM imidazol

Všetky použité roztoky sterilizujeme klávaním 20 min pri 121 °C.

Uvoľňovací roztok (GST)	50 mM Tris 10 mM glutation (GSH) 1 mM dithiothreitol (DTT) pH 8,0
--------------------------------	--

Sefarózy

HisPur Ni-NTA Magnetic Beads (Thermo Scientific)
Pierce Glutathione Agarose (Thermo Scientific)

6×Laemmli vzorkový pufer	375 mM Tris pH 6,8
	9 % SDS (dodecylsírán sodný)
	50 % glycerol
	0,03 % brómfenolová modrá
	2-5 % DTT – pridať pred použitím

Pozn.: 6×Laemmli vzorkový pufer môže byť riedený na nižšie koncentrácie (typicky 4× alebo 2×) pomocou 4×Tris/SDS pH 6,8.

1 M dithiothreitol (DTT) (Sigma)

Inhibítory proteáz MixM (Serva)

Inhibítory fosfatáz MixII (Serva)

DC Protein Assay (BioRad) – kit na stanovenie koncentrácie proteínov v lyzáte

BSA (Sigma) – na prípravu štandardov

2.5.4. SDS-PAGE elektroforéza a vizualizačné metódy

Protogel	30:0,8	30 % akrylamid
		0,8 % N, N'- metylénbisakrylamid
	30:0,2	30 % akrylamid
		0,2 % N, N'- metylénbisakrylamid

4xTris/SDS pH 8,8	1,5 M Tris pH 8,8
	0,4 % SDS

4x Tris/SDS pH 6,8	0,5 M Tris pH 6,8
	0,4 % SDS

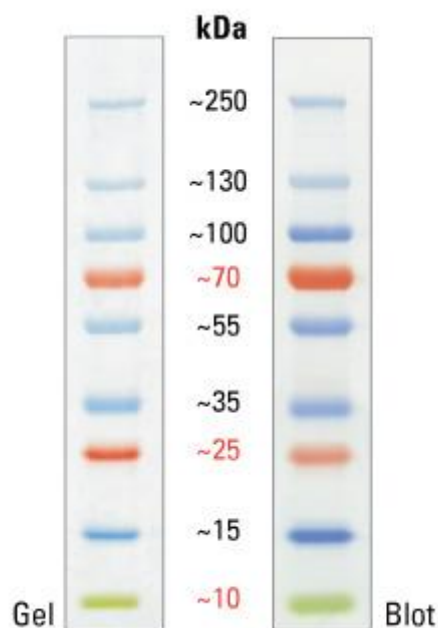
Všetky roztoky sterilizujeme filtráciou a skladujeme v tme pri 4 °C

TEMED (Serva) – N, N, N', N'-tetrametyletyléndiamín

10 % APS (Sigma) – persíran amónny

SDS-PAGE pufer	25 mM Tris pH 8,3
	190 mM glycín
	0,1 % SDS

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) – štandard molekulových hmotností



Zoznam použitých protilátok

	Protilátka	Pôvod	Výrobca	Riedenie	Poznámka
primárne protilátky	anti-p130Cas	mouse	BD Transduction Laboratories	1:1000 1% BSA v TTBS	rozpoznáva p130Cas i BCAR1
	anti-Flag M2	mouse	Sigma	1:1000 1% BSA v TTBS	
	anti-thiofosfát ester (klon 51-8)	rabbit	Abcam	1:4000 v 5% mlieku v TTBS	
	anti-Akt	rabbit	Cell Signaling Technologies	1:1000 1% BSA v TTBS	
	anti-PKN3	rabbit	Novus Biologicals	1:1000 1% BSA v TTBS	rozpoznáva iba ľudskú izoformu
	anti-pT860	rabbit	Pfizer	1:1000 1% BSA v TTBS	aktívna PKN3
sekundárne protilátky	anti-mouse	rabbit	Abcam	1:15000 v 1% BSA alebo 2% mlieku v TTBS	konjugované s HRP
	anti-rabbit	goat	Abcam		

2.6. Imunocytochemické farbenie buniek

Premývacie, fixačné a permeabilizačné roztoky

PBS

4 % paraformaldehyd

0,4 % Triton X-100 v PBS

Blokovacie, inkubačné a montovacie roztoky

3 % BSA v PBS

montovacie médium s DABCO (1,4-Diazabicyklo(2,2,2)oktán)

Použité protilátky:

	Protilátka	Pôvod	Výrobca	Riedenie
primárne protilátky	anti-paxilín	mouse	BD Transduction Laboratories	1:100
	anti-kortaktín	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	
sekundárne fluor. protilátky	anti-rabbit 546	goat	Invitrogen	1:1000
	anti-mouse 633	goat		

Faloidín 405 (Invitrogen) riedenie 1:70

3. Metódy

3.1. Purifikácia a izolácia DNA

3.1.1. Izolácia plazmidovej DNA pomocou NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)

Potrebný materiál: LB médium, selekčné antibiotiká, NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), TE pufer

Deň 1. (popoludní)

- Do 3-5 ml média LB s príslušným antibiotikom zaočkujeme 5 μ l baktérii nesúcich požadovaný plazmid z bakteriálnej konzervy, alebo z agarovej misky. Kultúru inkubujeme cez noc pri 37 °C na trepačke pri 220-250 rpm

Deň 2. (ráno)

- V prípade potreby vytvorenia bakteriálnej konzervy odoberieme 1 ml kultúry do centrifugačnej skúmavky a centrifugujeme 2 min pri 4000 \times g. Odstránime supernatant a pelet premyjeme 1 ml pufru LB2, opätovne centrifugujeme a pelet resuspendujeme v 200 μ l 60 % glycerolu (výsledná koncentrácia 30 %). Bakteriálne konzervy skladujeme v -80 °C
- Kultúru prevedieme do mikroskúmavky a centrifugujeme na stolnej centrifúge 30 s pri 11000 \times g
- Odstránime supernatant a pelet resuspendujeme v 250 μ l roztoku A1
- Bunky lyzujeme pridaním 250 μ l roztoku A2 a následnou inkubáciou po dobu max. 5 min
- Pridáme 250 μ l roztoku A3, čím dôjde k zastaveniu lýzy a vytvoreniu bieleho precipitátu. Zmes mierne premiešame a centrifugujeme po dobu 10 min pri 11000 \times g
- Supernatant prevedieme do kolónky umiestnenej v zbernej mikroskúmavke a centrifugujeme 1 min pri 11000 \times g
- Roztok zo zbernej mikroskúmavky odstránime a kolónku premyjeme 600 μ l roztoku A4, centrifugujeme 1 min pri 11000 \times g
- Roztok zo zbernej mikroskúmavky opäť odstránime a kolónku vysušíme centrifugáciou 2 min pri 11000 \times g

- Kolónku umiestnime do čistej 1,5 ml mikroskúmavky a k uvoľneniu naviazanej DNA pridáme 30-50 μ l roztoku AE (voliteľne možné uvoľniť pufrom TE alebo deionizovanou vodou), inkubujeme 1 min pri laboratórnej teplote a centrifugujeme 1 min pri 11000 \times g
- Koncentráciu izolovanej plazmidovej DNA určíme zmeraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 260 nm pomocou prístroja NanoDrop

3.1.2. Elektroforetická separácia DNA v agarózovom géle

Potrebný materiál: agaróza, TBE pufer, DNA Stain Clear G (Serva), Gene Ruler 1kb (Thermo Scientific)

- Pre separáciu fragmentov dlhších ako 800 párov báz (bp) použijeme 1 % agarózový gél, pre separáciu kratších použijeme 1,5-2% agarózový gél
- Požadované množstvo práškovej agarózy zahrievame v 100 ml pufru TBE, kým sa úplne nerozpustí. Po miernom vychladnutí do gélu pridáme cca 0,8 μ l interkalačného farbiva (DNA Stain Clear G, Serva), nalejeme do nalievacej aparatury a vložíme hrebienok
- Po stuhnutí gél premiestnime do elektroforetickej aparatury (Thermo Scientific) a prevrstvíme ho pufrom TBE
- DNA vzorky (10 ng – 2 μ g) pripravíme pridaním vzorkového pufru (väčšinou 6 \times , pridávame 1/5 objemu) a naniesieme do jamiek. Do jednej jamky pridáme DNA marker (Gene Ruler 1kb, Thermo Scientific)
- DNA rozdelíme napätím v rozmedzí 0,5-10 V/cm gélu
- Po rozdelení zdokumentujeme gél pomocou UV transiluminátoru vybaveného kamerou, prípadne pomocou skalpelu z gélu vyrežeme prúžok zodpovedajúci dĺžke DNA nášho záujmu

3.1.3. Izolácia DNA fragmentov z agarózového gélu pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

Potrebný materiál: NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), TE pufer

- Vyrezanú oblasť agarózového gélu s DNA fragmentom rozpustíme v pufri NTI v pomere 200 μ l roztoku na 100 μ g gélu po dobu max. 10 min pri teplote 50 °C
- Roztok preniesieme do kolónky a centrifugujeme 1 min pri 11000 \times g

- Naviazanú DNA premyjeme 2× 700 µl roztoku N3 a centrifugujeme 30 s pri 11000 ×g. Následne kolónku usušíme centrifugáciou 1 min pri 11000 ×g
- DNA fragment eluujeme 1 min pri laboratórnej teplote do deionizovanej vody alebo pufru TE a centrifugujeme 1 min pri 11000 ×g

3.2. Molekulárne klonovanie

3.2.1. Restričné štiepenie DNA

Potrebný materiál: 10× reakčný pufer (NEB), restričné endonukleázy (NEB)

- Reakciu napipetujeme do 0,5 ml mikroskúmavky podľa nasledujúceho rozpisu:

DNA	3-5 µg
10× reakčný pufer	2 µl
Restričná endonukleáza	1,5 U/µg DNA
ddH ₂ O	doplniť do 20 µl
Celkový objem	20 µl

- Reakciu štandardne inkubujeme po dobu 1-2 h pri 37 °C
Pozn.: teplota a doba inkubácie sa môžu líšiť v závislosti od použitého enzýmu. Zároveň dbáme na to, aby restričná endonukleáza dosahovala v použitom reakčnom pufrí čo najvyššiu aktivitu (kompatibilitu enzýmov a pufrův zistíme na stránkach výrobcu, <http://www.neb.com>)
- Po uplynutí inkubačnej doby v prípade potreby tepelne inaktivujeme enzým podľa návodu výrobcu

3.2.2. Purifikácia DNA pomocou Agencourt AMPure XP

Potrebný materiál: Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), TE pufer, 70 % EtOH

- K DNA produktu po PCR alebo po restričnom štiepení (fragment záujmu musí byť dlhší ako 100 bp) pridáme 1-1,5-násobok objemu suspenzie magnetických guličiek AMPure XP, resuspendujeme a necháme DNA naviazať na guličky po dobu 5 min pri laboratórnej teplote
- Následne mikroskúmavku umiestnime do magnetického stojanu, počkáme, kým sa guličky oddelia zo zmesi a zvyšný roztok odstránime

- Guličky dvakrát po dobu 30 s premyjeme 500 ul čerstvo zarobeného 70 % EtOH
- EtOH bezo zbytku odsajeme a necháme guličky uschnúť po dobu 5-10 min
Pozn.: guličky nesmú preschnúť (preschnutie sa prejaví popraskaním peletu), pretože by došlo k výrazným stratám DNA. Zároveň, pri nedokonalom vysušení guličiek sa DNA do roztoku neuvolní
- K suchým guličkám pridáme 15-30 µl ddH₂O alebo TE pufru, guličky resuspendujeme a inkubujeme po dobu 5 min pri laboratórnej teplote
- Guličky opäť oddelíme pomocou magnetického stojanu a roztok s rozpustenou DNA preniesieme do čistej mikroskúmavky

3.2.3. DNA ligácia

Potrebný materiál: 10× T4 ligačný pufer (Thermo Scientific), T4 DNA ligáza (Thermo Scientific)

- Ligačnú reakciu napipetujeme do mikroskúmavky podľa nasledujúceho rozpisu:

DNA - Vektor	100 ng
DNA - Inzert	v pomere 3:1 (I:V)
10× T4 ligačný pufer	1,5 µl
T4 ligáza (5 U/µl)	1-1,5 U
ddH ₂ O	doplniť do 15 µl
Celkový objem	15 µl

Pozn.: potrebné množstvo inzertu stanovíme podľa rovnice

$$\text{Množstvo inzertu} = \frac{300 \times DI}{DV \times CI}$$

kde DI značí dĺžku inzertu v bp, DV dĺžku vektoru v bp a CI koncentráciu inzertu v ng/µl

- Reakciu inkubujeme v chladovej miestnosti (9-16 °C) cez noc
Pozn.: ligačnú zmes je možné inkubovať aj pri laboratórnej teplote po dobu 15-30 min, za týchto podmienok však používame vyššie množstvo T4 DNA ligázy v reakcii (3,5-5 U)
- Pred transformáciou kompetentných baktérii tepelne inaktivujeme ligázu zahriatím reakcie na 70 °C po dobu 10 min

3.2.4. Príprava kompetentných buniek *E. coli* DH5 α

Potrebný materiál: agarová miska bez selekčných antibiotík, LB médium, sterilná ddH₂O, 10 % glycerol, 50 mM CaCl₂, 50 mM CaCl₂ s 15 % glycerolom, tekutý dusík

Vzhľadom k plánovanému použitiu môžeme pripraviť dva druhy kompetentných buniek:

- A) Elektrokompetentné bunky – veľmi vysoká účinnosť transformácie, vhodná pre transformáciu ligačných zmesí
- B) Chemicky kompetentné bunky – vhodné pre transformáciu plazmidovej DNA

Počiatočná príprava oboch typov buniek je zhodná:

Deň 1. (večer)

- Na agarovú misku bez selekčných antibiotík sterilne načiarkujeme malé množstvo zásobnej konzervy baktérii DH5 α a inkubujeme cez noc v inkubátore pri 37 °C

Deň 2. (večer)

- Z narastenej agarovej misky vypichneme samostatnú kolóniu a zaočkujeme do 20 ml média LB. Kultúru inkubujeme cez noc v trepačke pri 37 °C a 180-220 rpm.

Deň 3. (skoro ráno)

- Pomocou spektrofotometra zmeriame OD inokula a sterilne zaočkujeme 400 ml čerstvého média LB na finálnu OD 0,05. Kultúru inkubujeme v trepačke pri 37 °C a 180-200 rpm až kým nedosiahne OD 0,6-1,0
- Kultúru ochladíme na ľade a prenesieme do sterilných 50 ml Falcon centrifugačných skúmaviek

Pozn.: kompetentné bunky je možné pripravovať aj vo väčšom objeme média, napr. 1 l. V tom prípade schladenú kultúru prevedieme do 250 ml Nalgene centrifugačných fliaš a ďalej spracovávame podľa protokolu

- Kultúru centrifugujeme 15 min pri 4000 \times g pri 4 °C a odlejeme supernatant

- A) Pri príprave elektrokompetentných buniek bakteriálny pelet dvakrát premyjeme 50 ml ľadovo vychladenej ddH₂O (baktérie je nutné poriadne resuspendovať aby sa dôkladne odstránili zvyšky média)**
- Premyté baktérie opäť centrifugujeme a supernatant odstránime, pelet resuspendujeme v 5 ml sterilného 10 % glycerolu a zlúčime do jednej skúmavky (celkový objem cca 40 ml)
 - Baktérie centrifugujeme 10 min pri 4000 ×g pri 4 °C, supernatant odlejeme a pelet dôkladne resuspendujeme v 2-3 ml 10 % glycerolu.
 - Do 1,5 ml mikroskúmaviek napipetujeme alikvóty baktérií v 10 % glycerole po 40, 80 a 120 µl a zamrazíme v tekutom dusíku. Baktérie dlhodobo skladujeme v -80 °C
- B) Pri príprave chemicky kompetentných buniek bakteriálny pelet dvakrát premyjeme 50 ml ľadovo vychladeného 50 mM CaCl₂ (baktérie je nutné poriadne resuspendovať aby sa dôkladne odstránili zvyšky média)**
- Premyté baktérie opäť centrifugujeme a supernatant odstránime, pelet resuspendujeme v 5 ml 50 mM CaCl₂ a zlúčime do jednej skúmavky (celkový objem cca 40 ml)
 - Baktérie centrifugujeme 10 min pri 4000 ×g pri 4 °C, supernatant odlejeme a pelet dôkladne resuspendujeme v 5-8 ml 50 mM CaCl₂ s 15 % glycerolom
 - Do 1,5 ml mikroskúmaviek napipetujeme bakteriálnu suspenziu po 100, 200 a 400 µl a zamrazíme v tekutom dusíku. Baktérie dlhodobo skladujeme v -80 °C

3.2.5. Transformácia elektrokompetentných buniek DH5α

Potrebný materiál: elektrokompetentné bunky DH5α, médium LB s 2 % glukózou, agarová miska so selekčným antibiotikom

- Mikroskúmavku s elektrokompetentnými baktériami necháme rozmraziť na ľade
- K baktériám pridáme 4-6 µl ligačnej zmesi a preniesieme do predom vychladenej 2 mm elektroporačnej kyvety
- Kyvetu vložíme do elektroporátora a transformujeme (pri napätí 2500 V, kapacitancii 2,5 µF a odpore 200 Ω) aplikáciou pulzu (cca 12500 V/cm, 4-5 ms).
- Do kyvety okamžite napipetujeme 950 µl média LB s 2 % glukózou (prípadne SOC média), preniesieme do 2 ml mikroskúmavky a inkubujeme 1 h pri 37 °C na trepačke so 750-900 rpm

- Odoberieme 100 μ l baktérii a sterilne vysejeme na agarovú miskú s príslušným selekčným antibiotikom

Pozn.: pre zisk vyššieho počtu úspešne transformovaných kolónii je možné transformovanú kultúru po inkubácii centrifugovať na stolnej centrifúge 2 min pri 4000 \times g, odobrať 750 μ l supernatantu, bakteriálny pelet resuspendovať v zvyšnom objeme a vysiať na agarovú miskú

- Miskú inkubujeme cez noc v inkubátore pri 37 °C

3.2.6. Transformácia chemicky kompetentných buniek DH5 α

Potrebný materiál: chemicky kompetentné bunky DH5 α , médium LB s 2 % glukózou, agarová miska so selekčným antibiotikom

- 100 μ l chemicky kompetentných baktérii necháme rozmraziť na ľade
- K bunkám napipetujeme 1 μ g plazmidovej DNA rozpustenej v ddH₂O a necháme inkubovať na ľade 20-30 min
- Mikroskúmavku preniesieme do 42 °C vodného kúpeľa na dobu 30 s
Pozn.: dodržanie presnej doby inkubácie v tomto kroku je veľmi dôležité, pri presiahnutí 40 s dochádza k veľkému zníženiu úspešnosti transformácie
- Skúmavku preložíme na ľad a inkubujeme 2 min
- Do skúmavky napipetujeme 900 μ l média LB s 2 % glukózou (prípadne SOC média), preniesieme do 2 ml mikroskúmavky a inkubujeme 1 h pri 37 °C na trepačke so 750-900 rpm
- Odoberieme 100 μ l baktérii a sterilne vysejeme na agarovú miskú s príslušným selekčným antibiotikom
- Miskú inkubujeme cez noc v inkubátore pri 37 °C

3.3. Afinitná purifikácia proteínov

Potrebný materiál: LB médium (+selekčné antibiotikum), LB1, LB2, IPTG 1 M, 20 % Triton X-100 v LB1, bakteriálne inhibítory proteáz MixB, sefaróza (GST, 6 \times His), uvoľňovací roztok, 60 % glycerol, 2 \times Laemmli vzorkový pufer s DTT

Deň 1. (večer)

- Založenie štartovacej kultúry – 5 ul stabilátu bakteriálnych buniek BL21 nesúcich plazmid kódujúci proteín záujmu zaočkujeme do 20 ml LB média s príslušným antibiotikom. Kultúru inkubujeme cez noc na trepačke pri 28-30 °C, do OD595 3-5 (pri vyššej OD dochádza u buniek BL21 k poškodeniu alebo strate plazmidu)

Deň 2.

- Zmeriame OD štartovacej kultúry (skoro ráno) a zriedime ju do 100 ml LB média na finálnu OD 0,05. Inkubujeme na trepačke pri 37 °C kým kultúra nedosiahne OD 0,6-1,2
- Z kultúry odoberieme 1 ml pre negatívnu kontrolu expresie, túto vzorku centrifugujeme na stolnej centrifúge 2 min pri 4000 ×g, premyjeme pufrom LB2 a resuspendujeme v 1 ml pufru LB1. Z pripravenej suspenzie odoberieme 15 µl, pridáme 15 µl 2× Laemli s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C
- Vo zvyšku kultúry indukujeme expresiu proteínu pridaním 1 M IPTG na finálnu koncentráciu 1 µM
- Necháme kultúru inkubovať na trepačke 200 rpm pri 37 °C 2-3 h
- Odoberieme 1 ml pre pozitívnu kontrolu expresie a spracujeme rovnako, ako negatívnu kontrolu
- Zvyšok kultúry vychladíme na ľade, prevedieme do 50 ml Falcon centrifugačných skúmaviek a centrifugujeme 3000 ×g 10 min pri 4 °C
- Supernatant odstránime a bunkový pelet resuspendujeme v 45 ml pufru LB2
- Opätovne centrifugujeme, odstránime supernatant, bakteriálny pelet resuspendujeme v 2 ml pufru LB1 s pridanými inhibítormi proteáz a prevedieme do jednej 5 ml centrifugačnej skúmavky Eppendorf (celkový objem 4 ml suspenzie)
- Bakteriálnu suspenziu sonikujeme na ľade po dobu 8 min (amplitúda 50%, nastavenie pulzu 20 s/20 s) (alternatívne je možné lyzovať za použitia French-pressu)
- K lyzátu následne pridáme 20 % Triton X-100 v LB1 s pridanými inhibítormi proteáz na konečnú koncentráciu 1 %
- Inkubujeme na ľade 25 min, alebo preferenčne cez noc v -20°C
- Lyzát centrifugujeme 13000 ×g po dobu 15 min pri 4°C

- Počas centrifugácie odoberieme 250 μ l 50 % sefarózy (His alebo GST) zo zásobnej fľašky a trikrát premyjeme 1,75 ml pufru LB1 s pridanými inhibítormi proteáz (pri použití magnetických guľičiek oddeľujeme zmes pomocou stojanu s magnetom, pri použití agarózy centrifugujeme rýchlosťou špecifikovanou výrobcom)
- Vytvoríme 50 % suspenziu sefarózy pridaním 125 μ l LB1 s inhibítormi proteáz
- Supernatant prenesieme do čistej skúmavky, pridáme k nemu premytú sefarózu a inkubujeme na rotátore 2 h pri 4 °C (preferenčne cez noc)
- Sefarózu centrifugujeme (alebo oddelíme magnetom), supernatant odstránime a pelet dvakrát premyjeme pufrom LB1 s inhibítormi proteáz a 1% Triton X-100 a jedenkrát LB1 s inhibítormi proteáz
- Pre použitie purifikovaných proteínov pre pull-down experimenty vytvoríme 50 % suspenziu sefarózy pridaním 125 μ l LB1 s inhibítormi proteáz a následným pridaním 250 μ l 60 % glycerolu vytvoríme proteínovú konzervu, ktorú skladujeme pri -20 °C
- Z vytvorenej konzervy odoberieme 15 μ l, pridáme 15 μ l 2 \times Laemmli s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C
- Pre uvoľnenie purifikovaných proteínov zo sefarózy pridáme k sefarózovému peletu 200 μ l uvoľňovacieho roztoku, pipetovaním resuspendujeme a necháme 3-5 min inkubovať.
- Sefarózu centrifugujeme (alebo oddelíme magnetom) a supernatant prenesieme do čistej mikroskúmavky. Odoberieme 5 μ l, ku ktorým pridáme 15 μ l 2 \times Laemmli s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C.
- Zvyšný objem rozaliquetujeme po 15-20 μ l do 0,5 ml mikroskúmaviiek a bleskovo zamrazíme v polystyrénovej nádobe s tekutým dusíkom. Dlhodobu skladujeme v -80 °C

3.4. Kultivácia cicavčích tkanivových kultúr

Cicavčie bunky štandardne kultivujeme v inkubátore pri 5 % CO₂ a 37 °C na plastiku určenom pre tkanivové kultúry. Pre kultiváciu používame misky s priemerom 10 cm a 6 cm s 8-10 ml a 4-5 ml média, resp. Kvalitu kultúry denne kontrolujeme pomocou mikroskopu (Nikon Eclipse TS 2000) pre odhalenie prípadnej kontaminácie.

3.4.1. Pasážovanie cicavčích buniek

Potrebný materiál: DMEM s 10 % FBS (Sigma), 0,25 % trypsín-EDTA (Sigma)

Bunky pasážujeme po 2-4 dňoch od predchádzajúcej pasáže, v závislosti na konfluencii buniek.

- Pomocou odsávačky z misky odsajeme médium a bunky dôkladne opláchneme sterilným PBS
- K bunkám pridáme trypsín vopred temperovaný na 37 °C (1 ml na 10 cm misku a 0,5 ml na 6 cm misku) a krúživým pohybom pokryjeme celý povrch misky. Misky vložíme naspäť do inkubátora a necháme trypsín pôsobiť 2-3 min, pokiaľ sa bunky neoddelia od dna misky
- K bunkám pridáme médium DMEM s 10 % FBS (temperované na 37 °C) na neutralizáciu aktivity trypsínu, bunky dôkladne resuspendujeme, časť z nich (štandardne 1/5-1/10 objemu) prenesieme na novú misku a doplníme čerstvým médium podľa typu misky

3.4.2. Príprava stabilátov cicavčích buniek

Potrebný materiál: DMEM s 10 % FBS (Sigma), 0,25 % trypsín-EDTA (Sigma), zmrazovací roztok

- Bunky pestujeme na 10 cm miske až do cca 90 % konfluencie
- Bunky trypsinizujeme a po neutralizácii trypsínu čerstvým médium prenesieme do sterilnej 15 ml Falcon centrifugačnej skúmavky
- Bunky centrifugujeme 3 min pri 180 ×g
- Opatrne odsajeme médium, bunkový pelet resuspendujeme v 2 ml zmrazovacieho roztoku a rozdelíme do dvoch zmrazovacích mikroskúmaviek Nalgene

- Mikroskúmavky vložíme do nádoby s izopropanolom a umiestnime do -80 °C. Nasledujúci deň stabiláty preniesieme do tekutého dusíku

3.4.3. Rozmrazovanie stabilátov cicavčích buniek

Potrebný materiál: DMEM s 10 % FBS (Sigma)

- Stabilát vyberieme z kontajneru s tekutým dusíkom a rozmrazujeme 2 min v 37 °C vodnom kúpeli
- Po rozmrazení preniesieme zmes buniek a zmrazovacieho roztoku do 15 ml Falcon centrifugačnej skúmavky s 9 ml média DMEM s 10 % FBS temperovaného na 37 °C
- Centrifugujeme 3 min pri 180 ×g
- Opatrne odsajeme médium, bunkový pelet resuspendujeme v 8-10 ml čerstvého média a preniesieme na 10 cm misku
- Misku vložíme do inkubátoru a stav buniek pravidelne sledujeme. Bunky začíname používať na experimenty až po 3-5 dňoch od rozmrazenia

3.4.4. Transfekcia cicavčích buniek

Potrebný materiál: DMEM (bez FBS a antibiotík, Sigma), jetPEI (Polyplus)

- Bunky spasážujeme na konfluenciu 40-50 % a počkáme kým prisadnú (v inkubátore, doba prisadnutia sa významne líši v závislosti od použitej bunkovej línie)
- Plazmidovú DNA (5 µg na 6 cm misku) preniesieme do 0,5 ml mikroskúmavky, sterilizujeme 10 min v bločku pri 70 °C a skúmavku vložíme do laminárneho boxu
- K DNA napipetujeme médium DMEM bez séra a bez pridaných antibiotík (240 µl na malú misku) a dôkladne zamiešame. Paralelne v sterilnej mikroskúmavke zmiešame 240 µl bezsérového média s 5 µl transfekčného reagens (jetPEI, Polyplus)
- Obsah oboch mikroskúmaviek poriadne premiešame (10-15 s) a inkubujeme pri izbovej teplote 15-20 min
- Obsah skúmavky napipetujeme k bunkám a po 12-18 h od transfekcie bunkám vymeníme médium
- Po 48 hodinách bunky použijeme k tvorbe bunkových lyzátov

3.4.5. Stabilná retrovirálna transfekcia myších buniek

Potrebný materiál: DMEM (bez FBS a antibiotík, Sigma), jetPEI (Polyplus), DMEM s tepelne inaktivovaným 10 % FBS

- Bunky PhoenixE transfekujeme štandardným spôsobom (viď kapitola 3.4.4.) plazmidom pMSCV kódujúcim cDNA sekvenciu génu záujmu. 24 h po transfekcii vymeníme médium za DMEM s 10 % tepelne inaktivovaným FBS, do ktorého budú produkované retrovírusy
- Cieľové bunky spasážujeme na konfluenciu cca 60 % a 48 hodín po transfekcii infikujeme prenosom média z buniek PhoenixE. Médium je pred pridaním nutné centrifugovať 10 min pri 1500 ×g, alebo sterilne prefiltrovať. K bunkám PhoenixE následne pridáme čerstvé médium.
- Proces infekcie cieľových buniek opakujeme minimálne trikrát v intervale 12/24 h
- Po ukončení poslednej infekcie začneme selekciu príslušným antibiotikom

3.5. Príprava bunkových lyzátov

Potrebný materiál: PBS, lyzačný pufer, inhibítory proteáz MixM (Serva), inhibítory fosfatáz MixII (Serva), 1 M DTT (Sigma),

- Misku s bunkami preniesieme na ľad a dvakrát poriadne opláchneme ľadovo vychladeným PBS (PBS pridávame o okraj misky aby sme nezmyli bunky)
- K bunkám pridáme lyzačný pufer (1 ml na veľkú misku, 0,5 ml na malú misku, vhodný pufer vyberieme podľa účelu lyzátu) s pridanými inhibítormi proteáz (1:100), inhibítormi fosfatáz (1:100) a DTT (1:1000) a inkubujeme na preklápačke na ľade po dobu 5-10 min, dbáme však na to, aby lyzačný pufer pri preklápaní zmáčal celý povrch misky
- Škrabkou zoškrabeme bunky z dna misky (stále na ľade) a preniesieme do 1,5 ml mikroskúmavky. Zmes cca 10-15× pretiahneme injekčnou striekačkou s ihlou 21G aby sme rozrušili väčšie bunkové agregáty
- Lyzované bunky centrifugujeme pri 4 °C a 13000 ×g po dobu 15 min aby sme odstránili bunkové zbytky
- Supernatant opatrne preniesieme do čistých mikroskúmaviek

- Lyzát môžeme krátkodobo uchovávať v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo použiť okamžite pre stanovenie celkovej proteínovej koncentrácie, imunoprecipitáciu alebo pulldown

3.6. Stanovenie proteínovej koncentrácie

3.6.1. Folinova metóda stanovenia koncentrácie proteínu

Potrebný materiál: BSA (Sigma), DC Protein Assay kit (BioRad)

Touto metódou kolorimetricky stanovujeme celkovú koncentráciu proteínov v lyzáte za použitia kitu DC Protein Assay (BioRad)

- Pripravíme si sadu BSA štandardov podľa nasledujúceho rozpisu:

BSA 2 mg/ml (μl)	Použitý lyzačný pufer	Výsledná koncentrácia BSA ($\mu\text{g/ml}$)
0	50	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1500

- V mikroskúmavke zmiešame roztoky A a S v pomere 1:50, čím vytvoríme roztok A'
- Do 96-jamkovej doštičky napipetujeme 25 μl roztoku A' a pridáme 5 μl pripravených BSA štandardov alebo proteínového lyzátu
- Do každej použitej jamky pridáme 200 μl roztoku B a doštičku odložíme na 20 min na tmavé miesto
- Po 20 min zmeriame absorbanciu vzoriek na spektrofotometri Tecan pri 750 nm. Z nameraných hodnôt absorbancie štandardov vytvoríme graf závislosti absorbancie na koncentrácii, vypočítame koncentráciu proteínov v lyzáte a za použitia lyzačného pufru prípadne nariedime lyzát na požadovanú koncentráciu

3.6.2 Denzitometrické stanovenie koncentrácie proteínu z gélu

Potrebný materiál: BSA (Sigma), TBS, 2 \times Laemmli vzorkový pufer s DTT, farbivo Coomassie brilliant blue, odfarbovací roztok

Túto metódu využívame prevažne pri stanovení koncentrácie proteínu purifikovaného pomocou bakteriálneho expresného systému.

- Pripravíme si riediacu radu štandardov BSA v TBS (1-20 μg)

- Zo vzoriek a štandardov odoberieme 10 μ l, pridáme 10 μ l 2 \times Laemmli vzorkového pufru s DTT (1:20) a povaríme 3 min pri 100 °C
- Vzorky nanesieme na SDS-PAGE gél a rozdelíme elektroforézou
- Proteíny zafarbíme farbivom Coomassie brilliant blue, gél naskenujeme a denzitometricky (ImageJ) zmeriame intenzitu analyzovaného proteínu a proteínových štandardov. Z nameranej intenzity štandardov vytvoríme graf závislosti intenzity na koncentrácii a vypočítame koncentráciu analyzovaného proteínu

3.7. Interakčné štúdie a imunoprecipitácie

3.7.1. Pulldown

Potrebný materiál: lyzačný pufer Igepal, inhibítory proteáz MixM (Serva), inhibítory fosfatáz MixII (Serva), LB1, 6 \times Laemmli vzorkový pufer s DTT, 2 \times Lamli vzorkový pufer s DTT

- Vytvoríme lyzát požadovanej bunkovej kultúry za použitia lyzačného pufru s 0,5 % obsahom Igepalu (Nonidet P-40) (viď kapitola 3.5.) a lyzáty zrovnáme na celkové množstvo proteínu (viď kapitola 3.6.1.)
- Počas prípravy lyzátu premyjeme sefarózu s naviazaným purifikovaným proteínom (viď kapitola 3.3.) o objeme zodpovedajúcom 10-15 μ g proteínu 2 \times 1 ml pufru LB1 a vytvoríme 50 % suspenziu sefarózy s pufrom LB1
- Z lyzátu odoberieme 50-100 μ l do čistej mikroskúmavky, pridáme 1/5 objemu 6 \times Laemmli vzorkového pufru s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C
- K zvyšnému lyzátu pridáme premytú sefarózu a inkubujeme 2-3 h na rotátore pri 4 °C
- Sefarózu oddelíme centrifugáciou (alebo magnetom), supernatant odstránime a pelet premyjeme 3 \times pufrom LB1 s inhibítormi proteáz
- Po premytí dôkladne odstránime premývací pufer (pomocou injekčného dávkovača Hamilton 25 μ l) a k sefaróze pridáme 25 μ l 2 \times Lamli vzorkového pufru s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C

3.7.2. Imunoprecipitácia pomocou Flag M2 sefarózy

Potrebný materiál: lyzačný pufer s 1 % Triton X-100, Flag M2 sefaróza (Sigma), TBS, inhibítory proteáz MixM (Serva), inhibítory fosfatáz MixII (Serva), glycerol 2-fosfát (Sigma), 2× Lamli vzorkový pufer s DTT

- Vytvoríme lyzát požadovanej bunkovej kultúry za použitia lyzačného pufri s 1 % obsahom Triton X-100 (viď kapitola 3.5.)
- Počas prípravy lyzátu premyjeme 20 μ l Flag M2 sefarózy 2×1 ml TBS a následne vytvoríme 50 % suspenziu sefarózy s TBS
- K lyzátu pridáme premytú sefarózu a inkubujeme na rotátore po dobu 2 h pri 4 °C, alebo preferenčne cez noc
- Sefarózu sedimentujeme centrifugáciou 30 s pri 4000 \times g pri 4 °C a premyjeme 3×1 ml TBS s pridanými inhibítormi proteáz, inhibítormi fosfatáz a glycerol 2-fosfátom
- Následne k sefaróze pridáme 50 μ l 2× Lamli vzorkového pufri s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C (pri imunoprecipitácii kinázy PKN3 pre použitie v kinázovej reakcii sefarózu resuspendujeme v kinázovom pufri (viď kapitola 3.8.))

3.8. Kinázové reakcie

Potrebný materiál: kinázový pufer, ATP, [32P]ATP, ATP γ S, 120 mM Tris pH 7,4, 1 M G2P, 100 mM MgCl₂, 1 M DTT, 0,5 M EDTA pH 8,0, 50 mM PNBM, 6× Laemli vzorkový pufer s DTT

- A) Rádioaktívna kinázová reakcia za použitia [32P]ATP
- B) Kinázová reakcia za použitia ATP
- C) Kinázová reakcia za použitia ATP γ S

- Na kinázovú reakciu si pripravíme imunoprecipitovanú PKN3 imobilizovanú na Flag M2 sefaróze v kinázovom pufri (viď kapitola 3.7.2.)
- Reakcie napipetujeme podľa nasledujúceho rozpisu:

PKN3 (30 mM Tris, 4 mM MgCl, 10 mM G2P)	15 µl
Substrát (v 50 mM Tris)	3-5 µg
120 mM Tris	na výsledný 30 mM
40 mM MgCl ₂ , 100 mM G2P	na výsledné 4 mM MgCl ₂ a 10 mM G2P
100 mM DTT	na výsledné 5 mM
ddH ₂ O	doplníme do 50 µl
Celkový objem	50 µl

A) Rádioaktívna kinázová reakcia za použitia [32P]ATP

Pozn.: v priebehu práce musia byť dodržiavané všetky **bezpečnostné opatrenia** spojené s prácou s rádioaktívnym materiálom! Kontaminovaný odpad musí byť odborne zlikvidovaný. Kontamináciu pracovného odevu a prostredia sledujeme pomocou Geiger-Müllerovho detektora.

- Na základe údajov od výrobcu [32P]ATP stanovíme momentálnu aktivitu podľa vzorca

$$(V1) \quad A = A_0 \times e^{\frac{-\ln 2}{T_{1/2}} t} \quad ,$$

kde A_0 znázorňuje počiatočnú aktivitu v µCi/µl (datované ku dňu $t_0 = 0$), t znázorňuje počet dní od t_0 a $T_{1/2}$ polčas rozpadu (u [32P]ATP $T_{1/2} = 14,3$ dňa).

- Následne stanovíme potrebný objem použitého [32P]ATP podľa vzorca

$$(V2) \quad V_{32P} = \frac{A_P}{A} \quad ,$$

kde A_P znázorňuje požadovanú aktivitu v µCi (Curie) a A hodnotu vypočítanú pomocou vzorca (V1)

- Vytvoríme zmes vypočítaného množstva [32P]ATP s ATP tak, aby celková výsledná koncentrácia bola 800 µM
- K pripraveným reakciám pridáme 1/10 objemu zmesi [32P]ATP a ATP a reakciu inkubujeme na rotátore pri 35 °C po vopred stanovený čas (štandardne 1 h)
- Po skončení inkubácie ukončíme reakciu pridaním 1/5 objemu 6× Laemmli vzorkového pufru s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C

- Pripravené vzorky nanesieme na SDS-PAGE gél a rozdelíme elektroforeticky
- Následne gél vložíme medzi fólie a zatavíme, čím zamedzíme úniku kontaminovaného pufru
- Zatavený gél vložíme do vyvíjacej kazety BioRad s tzv. „phosphor screenom“ (Kodak) a inkubujeme 18-72 hodín podľa očakávanej intenzity signálu
- Kazetu rozoberieme a signál zo screenu odčítame pomocou prístroja Molecular Imager FX (BioRad)
- Signál z použitého screenu odstránime pomocou prístroja Screen Eraser – K (BioRad), čím ho pripravíme pre ďalšie použitie

B) Kinázová reakcia za použitia ATP

- K pripraveným reakciám pridáme 1/10 objemu 800 μ M ATP v kinázovom pufri a reakciu inkubujeme na rotátore pri 35 °C po vopred stanovený čas (štandardne 1 h)
- Po skončení inkubácie ukončíme reakciu pridaním 1/5 objemu 6 \times Laemmli vzorkového pufru s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C
Pozn.: v prípade, že fosforylácia substrátu v kinázovej reakcii je následne analyzovaná hmotnostnou spektrometriou, reakcie ukončíme pridaním 0,5 M EDTA pH 8,0 na konečnú koncentráciu 20 mM
- Pripravené vzorky nanesieme na SDS-PAGE gél a rozdelíme elektroforeticky
- Proteíny prenosieme z gélu na NC membránu metódou Western blot a fosforyláciu substrátu detegujeme špecifickou protilátkou

C) Kinázová reakcia za použitia ATP γ S

- K pripraveným reakciám pridáme 1/10 objemu 800 μ M ATP γ S v kinázovom pufri a reakciu inkubujeme na rotátore pri 35 °C po vopred stanovený čas (štandardne 1 h)
- Reakciu ukončíme pridaním 0,5 M EDTA pH 8,0 na konečnú koncentráciu 20 mM

- Následne k reakcii pridáme 50 mM PNBM na výslednú koncentráciu 2,5 mM. Reakciu inkubujeme 1 h na rotátore pri laboratórnej teplote
- Po skončení inkubácie pridáme 1/5 objemu 6× Laemmlí vzorkového pufru s DTT a povaríme 10 min pri 100 °C
- Pripravené vzorky nanesieme na SDS-PAGE gél a rozdelíme elektroforeticky
- Proteíny prenesieme z gélu na NC membránu metódou Western blot a thiofosforyláciu substrátu detegujeme špecifickou protilátkou proti thiofosfát esteru (klon 51-8)

3.9. SDS-PAGE a detekčné metódy

3.9.1. Tris-glycínová proteínová elektroforéza SDS-PAGE

Potrebný materiál: protogél, 4× Tris/SDS pH 8,8, 4× Tris/SDS pH 6,8, SDS-PAGE pufer, TEMED, 10 % APS, PageRuler (Thermo Scientific),

- Zostavíme aparáturu na prípravu polyakrylamidového gélu podľa protokolu výrobcu (BioRad – Mini Protean 3) a napipetujeme jednotlivé zložky separačnej časti potrebného gélu do kadičky podľa nasledujúceho rozpisu:

	Separáčny gél 7,5 %	Separáčny gél 10 %	Separáčny gél 12 %	Zaostrovací gél
Protogel AA/BIS	1,25 ml	1,67 ml	2,00 ml	0,325 ml
Pufer Tris/SDS 4×	1,25 ml pH8,8	1,25 ml pH8,8	1,25 ml pH8,8	0,625 ml pH6,8
ddH ₂ O	2,5 ml	2,08 ml	1,75 ml	1,55 ml
TEMED	3,4 µl	3,4 µl	3,4 µl	2,5 µl
10 % APS	16,5 µl	16,5 µl	16,5 µl	12,5 µl

- Okamžite po pridaní 10 % APS prenesieme namiešanú zmes medzi sklá v pripravenej aparátúre a prevrstvíme ddH₂O
- Po stuhnutí separačného gélu (cca 15-30 min) rovnakým spôsobom namiešame zaostrovaciu zložku gélu a aplikujeme na separáčny gél, z ktorého vopred odsajeme vodu. Medzi sklá vložíme hrebienok vymedzujúci dráhy pre migráciu vzoriek
- Po stuhnutí zaostrovacieho gélu vyberieme sklá s gélom z nalievacej aparátúry, vložíme do elektroforetickej aparátúry (používame súčasne dva gély alebo jeden gél a zaslepovací plastový diel) a zalejeme SDS-PAGE pufrom

- Z gélu opatrne vytiahneme plastový hrebienok a každú jamku dôkladne premyjeme SDS-PAGE pufrom pomocou Hamilton injekčného dávkovača
- Do jamiek nanesieme vzorky (vopred inkubované 5-10 min pri 100 °C so vzorkovým pufrom a 1 M DTT (dithiotreitol) 1:20), do jednej z jamiek nanesieme proteínový marker (PageRuler, Thermo Scientific)
- Pripojíme aparáturu k zdroju napätia a pustíme prúd 12 mA/gél. Hneď ako čelo elektroforézy (poznáme podľa bromfenolovej modrej zo vzorkového pufru) dosiahne separačného gélu, zvýšime prechádzajúci prúd na 24 mA/gél
- Keď čelo dosiahne konca gélu, vypneme zdroj napätia, aparáturu rozložíme a gél buď ofarbíme pomocou Coomassie brilliant blue, alebo použijeme pre prenos proteínov na membránu metódou Western blot

3.9.2. Farbenie polyakrylamidového gélu pomocou farbiva Coomassie brilliant blue

Potrebný materiál: farbiaci roztok Coomassie brilliant blue, odfarbovací roztok

- Separáčnú časť polyakrylamidového gélu opatrne preniesieme do farbiaceho roztoku a necháme farbiť 30 min na trepačke pri miernych otáčkach
- Následne prebytočný roztok odlejeme a gél odfarbíme pomocou odfarbovacieho roztoku

3.9.3. Western blot

Potrebný materiál: blotovací pufer, filtračný papier Whatman, Amersham Protran 0,45 NC (GE Life Sciences), TBS

- Pre prenos proteínov na membránu použijeme aparáturu BioRad Trans-blot
- Poskladáme blotovaciú aparáturu a zložíme blotovací „sendvič“ v nasledujúcom poradí: špongia, filtračný papier Whatman, gél, nitrocelulózová membrána (Amersham Protran 0,45 NC) vopred namočená v blotovacom puffri, filtračný papier Whatman, špongia.

Pozn.: s membránou pracujeme výhradne v rukaviciach a s pinzetou aby sme zamedzili jej kontaminácii

- Aparáturu pripojíme k zdroju napätia. Prenos proteínov prebieha pri napätí 110 V po dobu 1,5 h za neustáleho miešania a chladenia ľadom

- Po skončení prenosu rozoberieme „sendvič“ a membránu opláchneme v TBS. Následne membránu farbíme pomocou Ponceau S (nešpecifické reverzibilné farbenie), alebo vykonáme špecifickú imunodetekciu proteínov

3.9.4. Reverzibilné farbenie proteínov na NC membráne pomocou Ponceau S

Potrebný materiál: farbivo Ponceau S

- Membránu opatrne (v rukaviciach a s pinzetou) preniesieme do farbiaceho roztoku Ponceau S, v ktorom za cca 5 min pri miernom trepaní dôjde k nešpecifickému zafarbeniu proteínov
- Prebytočné farbivo zlejeme naspäť do zásobnej nádoby a membránu oplachujeme ddH₂O, kým nedôjde k odfarbeniu pozadia. Membránu vložíme medzi dve priehľadné fólie, naskenujeme a úplne odfarbíme v ddH₂O pre ďalšie spracovanie imunodetekciou proteínov

3.9.5. Imunodetekcia proteínov na NC membráne

Potrebný materiál: TBS, TTBS, 4 % BSA v TBS, 5 % mlieko v TBS, 1 % BSA v TTBS, 2 % mlieko v TTBS, primárna a sekundárna protilátka, chemiluminiscenčný substrát

- Membránu po Western blote opatrne opláchneme v TBS a preniesieme ju do blokovacieho roztoku. Blokujeme 1 h na preklápačke v 4 % BSA v TBS (prípadne v 5 % mlieku v TBS).
- Po blokovaní membránu nastriháme na potrebné kúsky podľa požadovanej molekulovej hmotnosti cieľových proteínov a zatavíme do polyetylénovej fólie s primárnou protilátkou riedenou v 1 % BSA v TTBS (prípadne 2 % mlieku v TTBS). Inkubujeme cez noc pri 4 °C na preklápačke
 Pozn.: Vo všeobecnosti platí zásada, že membránu blokujeme a inkubujeme s protilátkami v rovnakom druhu roztoku, t. j., že pri blokovaní v 4 % BSA v TBS inkubujeme s protilátkami riedenými v 1 % BSA v TTBS (rovnako v prípade mlieka, blokujeme v 5 % mlieku v TBS, s protilátkami inkubujeme v 2 % mlieku v TTBS)
- Membránu opláchneme 3×5 min v TTBS a inkubujeme s roztokom sekundárnej protilátky konjugovanej s chrenovou peroxidázou (HRP) po dobu 1 h pri izbovej teplote

- Membránu opláchneme 2×5 min v TTBS a 1×5 min v TBS
- K membráne pridáme roztok substrátu pre HRP (zmes luminolu a peroxidu v pomere 1:1), inkubujeme 1-2 min na tmavom mieste, vložíme medzi priehľadné fólie a hladinu chemiluminiscencie snímame pomocou prístroja LAS 4000 (Fuji). Doba snímania je závislá na množstve proteínu a kvalite použitej primárnej či sekundárnej protilátky

3.10. Imunocytochemické farbenie cicavčích buniek

Potrebný materiál: PBS, 3 % BSA v PBS, 0,4 % Triton X-100 v PBS, 4 % paraformaldehyd, montovacie médium, DABCO

- Krycie sklíčka pred použitím opláchneme v etanole, ožehneme kahanom a vložíme do 6- alebo 12-jamkovej doštičky. Voliteľne sklíčka pred použitím pokryjeme vrstvou proteínov ECM
- Na sklíčka vysejeme bunky v konfluencii vhodnej pre pozorovanie samostatných buniek
- Prisadnuté bunky opláchneme 2× v PBS a fixujeme po dobu 10 min v 4 % paraformaldehyde. Po fixácii opäť 2× opláchneme
- Sklíčka preniesieme na parafilm a blokujeme v 200 µl 3 % BSA v PBS po dobu 30 min
- Zablockované sklíčka položíme bunkami smerom dole na premix primárnej protilátky a necháme inkubovať min 2 h
- Sklíčka preniesieme do doštičky a 4-5× za 30 min opláchneme PBS
- Sklíčka opäť preložíme na parafilm a na bunky kvapneme 100 µl premixu sekundárnej protilátky. Necháme inkubovať 1 h
- Opakujeme oplach rovnako ako po inkubácii s primárnou protilátkou
- Následne na bunky kvapneme 1 µl faloidínu v 70 µl roztoku a necháme inkubovať 10 min. Po skončení doby inkubácie bunky opláchneme rovnakým spôsobom ako po primárnej a sekundárnej protilátke
- Sklíčka opláchneme v deionizovanej vode, usušíme priložením okraja na buničinu a položíme bunkami dole do 7 µl montovacieho média s DABCO na podložnom sklíčku

3.11. Štatistická a bioinformatická analýza

Štatistická analýza bola vykonaná za použitia programov R alebo Sigma Plot 11 pomocou jednofaktorovej ANOVA analýzy nasledovanej post-hoc porovnaním Tukeyho testom . Hladina významnosti je vyjadrená nasledovne:

- * p<0,05
- ** p<0,01
- *** p<0,001

V rámci tejto práce boli používané nasledujúce bioinformatické nástroje, databázy a predikčné algoritmy:

http://www.phosphonet.ca/	databáza fosforylácii Kinexus
http://www.phosphosite.org/	databáza posttranslačných modifikácií proteínov
http://www.uniprot.org/	proteínová databáza
http://www.rcsb.org/	databáza proteínových štruktúr
http://www.compbio.dundee.ac.uk/1433pred/	predikčný algoritmus väzbových motívov pre proteíny 14-3-3

Obrázky proteínových štruktúr boli vytvorené pomocou programu *PyMol*. K práci so sekvenciami DNA bol použitý program *Clone Manager*.

3.12. Analýza hmotnostnou spektrometriou

Fosforylačná analýza hmotnostnou spektrometriou bola vykonaná v spolupráci s Mgr. Karlom Harantom z Laboratória hmotnostnej spektrometrie PĚF UK a centra BIOCEV, ktoré disponuje prístrojmi Orbitrap Fusion MS (Thermo Scientific), 4800 Tof/Tof MALDI (AB sciex) a Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific).

4. Výsledky

4.1. Príprava konštruktov

Pre účely tohto projektu boli navrhnuté mutované varianty SRD p130Cas (SRD 498NA, SRD 15AN; vid' kapitola 4.2.). Kódujúce sekvencie týchto variant boli zhotovené komerčnou syntézou DNA a zaklonované do pomocného vektoru pMA-T (DNA Strings, Life Technologies). Následne boli v kombinácii s vektormi pMSCV, pEGFPc1, pGEX a plazmidom p130Cas WT pUC vytvorené nasledujúce varianty:

Názov vytvoreného konštrukt	Pôvodný vektor	Cieľový vektor	Restriktčné miesta	Použitie
p130Cas SRD 498NA pUC	SRD 498NA pMA-T	p130Cas WT pUC	Bpu10I, SacII	Medziprodukty klonovania
p130Cas SRD 15AN pUC	SRD15AN pMA-T	p130Cas WT pUC		
SRD WT pMA-T	p130Cas WT pUC	SRD 498NA pMA-T		
p130Cas WT pMSCV	p130Cas WT pUC	pMSCV	SalI, EcoRI (pUC) XhoI, EcoRI (pMSCV)	Retrovirálna stabilná transfekcia MEF p130Cas-/-
p130Cas SRD 498NA pMSCV	p130Cas SRD 498NA pUC			
p130Cas SRD 15AN pMSCV	p130Cas SRD 15AN pUC			
GST-SRD WT pGEX	SRD WT pMA-T	pGEX	SacII (zatupené), BamHI (pMA-T) SmaI, BamHI (pGEX)	Bakteriálna expresia, substrát pre kinázové reakcie
GST-SRD SRD 498NA pGEX	SRD 498NA pMA-T			
GST-SRD 15AN pGEX	SRD15AN pMA-T			
p130Cas WT pEGFP c1	p130Cas WT pUC	pEGFP c1	BamHI, EcoRI (pUC), BglII, EcoRI (pEGFP c1)	Štúdium lokalizácie
p130Cas SRD 15AN pEGFP c1	p130Cas SRD 15AN pUC			
GST-GSK3dp	DNA String	pGEX	BamHI, EcoRI	Bakteriálna expresia, pozitívna kontrola fosforylácie

Ďalšie konštrukty použité v rámci tejto práce (His-14-3-3 ζ pQE-30; Flag-PKN3 WT/KD pcDNA4) boli v našom laboratóriu vytvorené už v minulosti J. Gemperlem.

Všetky použité sekvencie p130Cas vrátane ich číslovania zodpovedajú myším izoformám (nami študované sekvencie sú medzi myším p130Cas a ľudským BCAR1 značne konzervované). Naopak, všetky konštrukty PKN3 a ich číslovania zodpovedajú výhradne ľudskej izoforme a sú fúzované s Flag tagom.

4.2. Analýza fosforylácie p130Cas

Na základe známeho fosforylačného motívu kinázy PKN3 (viď kapitola 1.1.2.), sme v rámci sekvencie p130Cas predikovali viacero miest potenciálne fosforylovaných kinázou PKN3 (J. Gemperle – Diplomová práca, 2012). Dve z nami predpovedaných fosforylačných miest sa vyskytujú v rámci SRD (S432 (GKRLpSAS₄₃₄) a S498 (RGTpSEP₅₀₀)), avšak funkčný význam je doposiaľ známy iba u jedného z nich, a to u serínu vyskytujúceho sa v motíve RGTSEP₅₀₀. Po fosforylácii S498 v rámci tohto motívu dochádza k vzniku väzbového miesta pre proteíny 14-3-3 (Briknarová et al., 2005; Garcia-Guzman et al., 1999; viď kapitola 1.2.1.1.). Z tohto dôvodu sme sa pre ďalšie štúdium fosforylácie p130Cas kinázou PKN3 zamerali práve na S498, nachádzajúci sa v slučke medzi helixom α 2 a α 3 v rámci helixového zväzku SRD p130Cas (Briknarová et al., 2005).

Navrhli sme dve mutované varianty SRD zodpovedajúce oblasti 362-528 p130Cas, a to SRD 498NA (zámena T497N a S498A) a SRD 15AN (15 konzervovaných Ser/Thr mutovaných za Ala/Asn – kombinácia Ala/Asn bola použitá, aby sa zabránilo vzniku artificálnych helikálnych oblastí) (viď Obr. 4.1 A), ktorých kódujúce sekvencie sme získali komerčnou syntézou. Nasyntetizované úseky boli zaklonované do celej sekvencie p130Cas v cicavčom expresnom vektore a zároveň do bakteriálneho expresného vektoru, ako je uvedené v kapitole 4.1.

Aby sme sa presvedčili, či sú nami mutované miesta v bunkách fosforylované, myšie embryonálne fibroblasty (MEF) neexprimujúce p130Cas (p130Cas^{-/-}) sme stabilne transfekovali jednotlivými variantami p130Cas. K analýze fosforylácie sme použili metódu založenú na zmene pomeru akrylamidu:bisakrylamidu v géle pre SDS-PAGE. Oproti štandardne používaným gélom s pomerom 30:0,8, použitie gélu

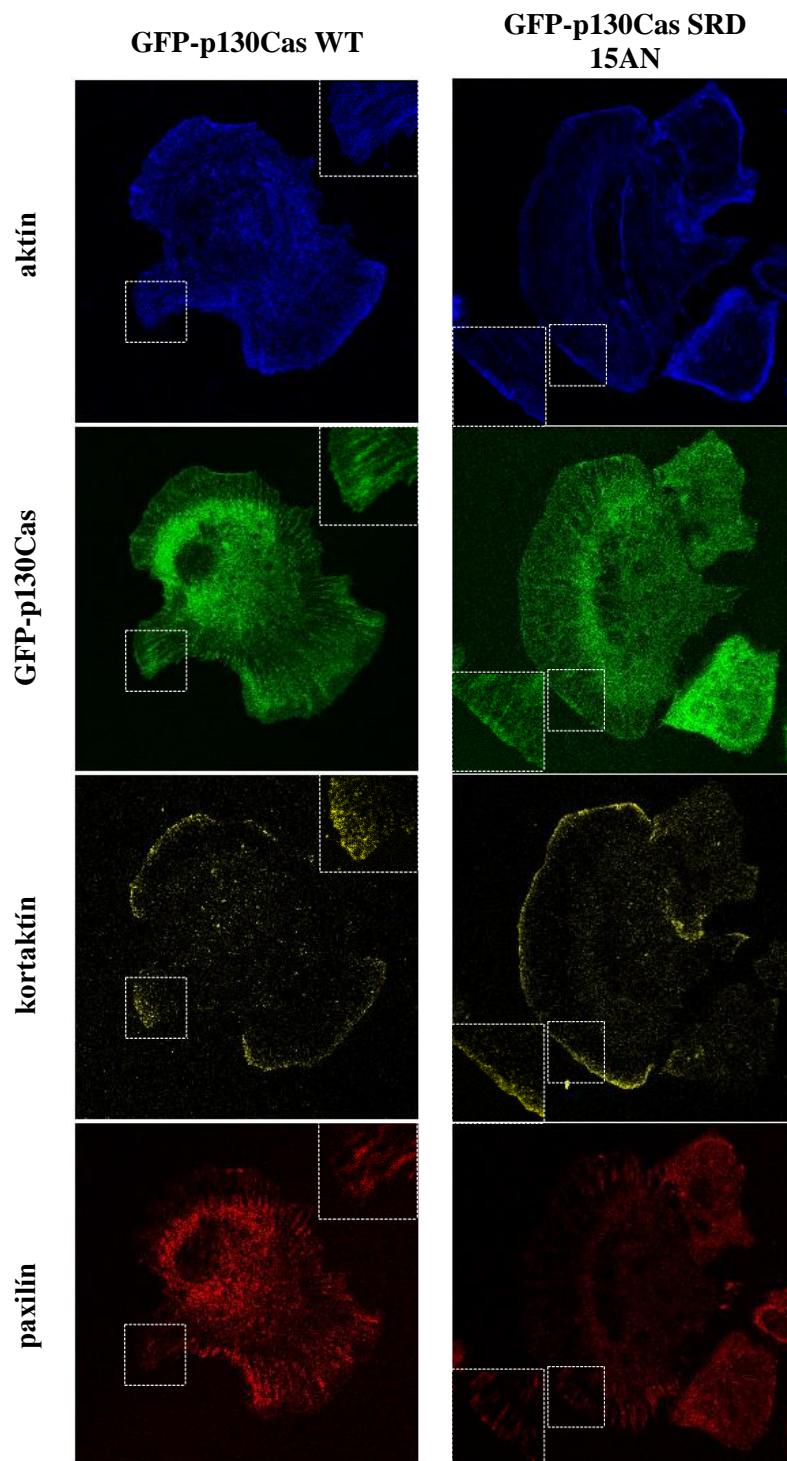
4.2.1. Mutácie v SRD neovplyvňujú bunkovú lokalizáciu p130Cas

Je známe, že integrínová stimulácia adherentných buniek vedie k lokalizácii p130Cas do FA a do oblasti lamelipódií (Garcia-Guzman et al., 1999; vid' kapitola 1.2.1.3.). Aby sme zistili, či mutácie Ser/Thr v SRD p130Cas nevedli k zmene v lokalizácii p130Cas, vysiali sme bunky MEF p130Cas^{-/-} tranzientne transfekované GFP-fúznymi p130Cas WT a SRD 15AN na sklíčka pokryté fibronektínom. Po prisadnutí boli bunky fixované a značené protilátkami proti kortaktínu (marker lamelipódií), paxilínu (marker FA) a faloidínom (aktín). Analýza konfokálnou mikroskopiou neukázala žiadne zmeny lokalizácie p130Cas SRD 15AN v porovnaní s WT, čo naznačuje, že nami mutované Ser/Thr a pravdepodobne ani interakcia s proteínmi 14-3-3 nie je pre lokalizáciu p130Cas stimulovanú integrínmi zásadná (vid' Obr. 4.2).

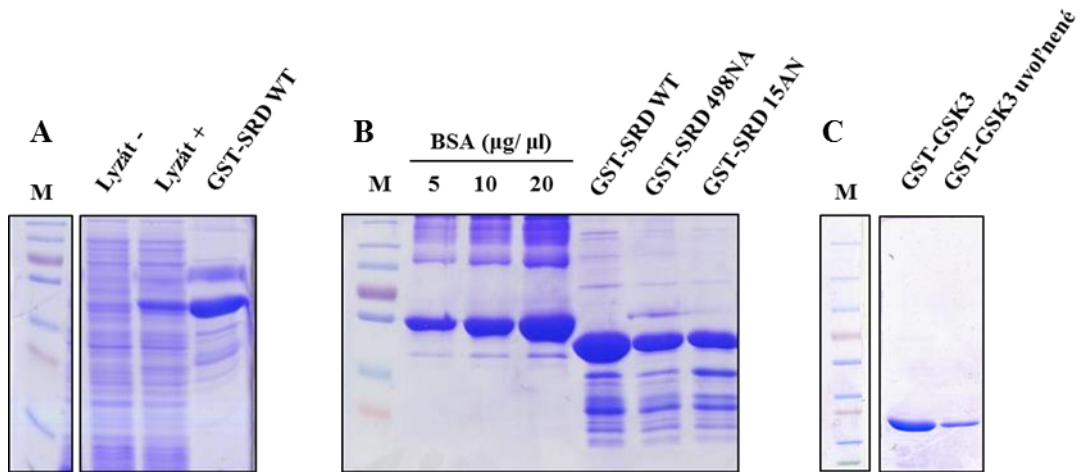
4.3. Potvrdenie fosforylácie p130Cas kinázou PKN3

Významným nástrojom pri štúdiu signálnych kaskád sú kinázové reakcie *in vitro*, ktoré zároveň poskytujú možnosť potvrdiť či vyvrátiť špecificitu kináz voči skúmaným substrátom. Aby sme objasnili, či PKN3 fosforyluje S498 v rámci SRD p130Cas, rozhodli sme sa vykonať rádioaktívnu kinázovú reakciu *in vitro* s imunoprecipitovanou ľudskou PKN3. Ako substrát boli použité jednotlivé varianty SRD p130Cas (WT, SRD 498NA, SRD 15AN) fúzované s GST (vid' kapitola 4.1.), exprimované pomocou bakteriálneho expresného systému a purifikované afinitnou chromatografiou (vid' Obr. 4.3 A a B). Ako pozitívnu kontrolu fosforylácie sme rovnakým spôsobom pripravili peptid odvodený od kinázy GSK3, ktorého fosforylácia kinázou PKN3 už bola v minulosti potvrdená (Unsal-Kacmaz et al., 2012; vid' Obr. 4.3 C).

K optimalizácii reakčných podmienok rádioaktívnej kinázovej reakcie sme použili ľudské izoformy PKN3 (WT a KD) imunoprecipitované pomocou Flag-sefaryózy (Sigma) z tranzientne transfekovaných buniek MDA-MB-231 (vid' Obr. 4.4 A). Podľa očakávania, vyhodnotenie pomocou SDS-PAGE a následným autoradiogramom ukázalo nárast fosforylácie GSK3 v čase, pričom u negatívnej kontroly (GST) k fosforylácii kinázou PKN3 nedochádzalo, rovnako ako pri použití varianty KD (vid' Obr. 4.4 B).



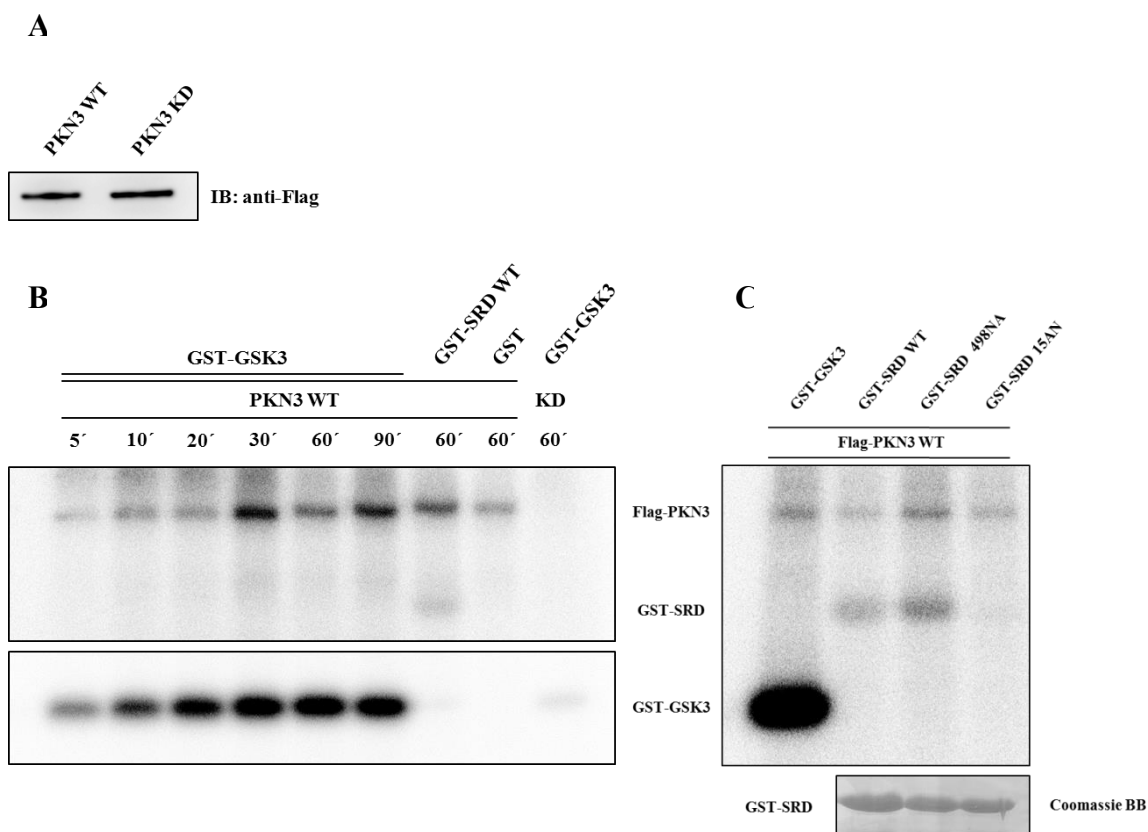
Obr. 4.2 – bunky MEF Cas^{-/-} boli tranzientne transfekované GFP-fúznymi variantami p130Cas WT a p130Cas SRD 15AN. 48 h po transfekcii boli bunky vysiate na fibronektinom pokryté sklička. 60 min po vysiatí boli bunky zafixované a značené protilátkami proti kortaktínu (AlexaFluor 546 – žltá) a paxilínu (AlexaFluor 633 – červená) a faloidínom 405 (modrá). Lokalizácia proteínov bola analyzovaná konfokálnou mikroskopiou. Zväčšené výrezy sú znázornené prerušovanou čiarou.



Obr. 4.3 – **A)** expresia GST-SRD WT bola v bakteriálnom expresnom systéme indukovaná pridaním IPTG (Lyzát +), kde oproti kontrole (Lyzát -) došlo k jej výraznému nárastu. Produkovaná GST-SRD WT bola následne purifikovaná pomocou GSH agarózy (Thermo Scientific). **B)** GST-fúzne varianty SRD WT, SRD 498NA a SRD 15AN boli purifikované pomocou bakteriálneho expresného systému (ako v bode A)). Ako štandard pre určenie množstva purifikovaného proteínu bol použitý hovädzí sérový albumín (BSA, bovine serum albumin). **C)** GST-GSK3 bol purifikovaný z bakteriálneho expresného systému (ako v A)). Purifikovaný proteín bol z GSH agarózy uvoľnený pomocou uvoľňovacieho roztoku (viď kapitola 2.5.1.). SDS-PAGE gély boli vo všetkých bodoch farbené pomocou Coomassie Brilliant Blue.

To naznačuje, že fosforylácia použitého substrátu bola výsledkom špecifickej aktivity precipitovanej PKN3. Navyše, v súlade s v minulosti pozorovanými výsledkami, v oblasti cca 110 kDa sa nám podarilo detegovať signál zodpovedajúci schopnosti autofosforylácie PKN3 (viď kapitola 1.1.1.).

Napriek tomu, že za nami použitých podmienok PKN3 vykazovala kinázovú aktivitu *in vitro*, pilotné experimenty s purifikovanými variantami SRD p130Cas za použitia $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ viedli iba k veľmi slabému signálu z autoradiografie. Ani následnou optimalizáciou reakčných podmienok sa nám však nepodarilo dosiahnuť vyššej intenzity signálu SRD (viď Obr. 4.4 C).

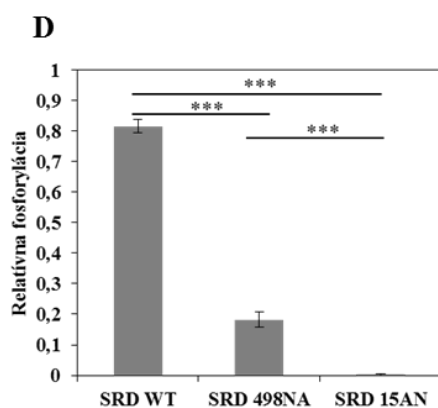
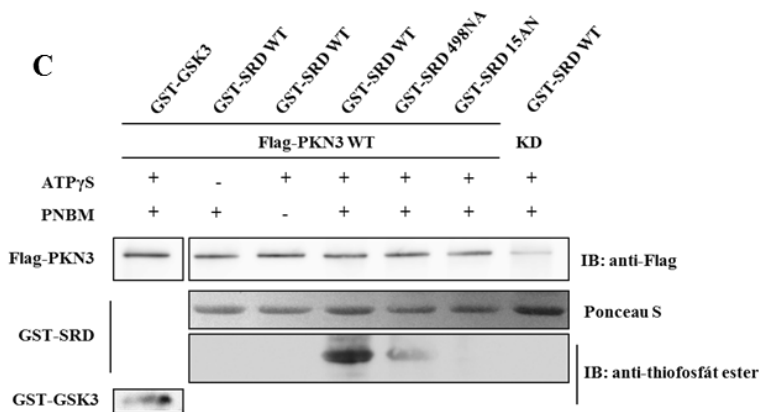
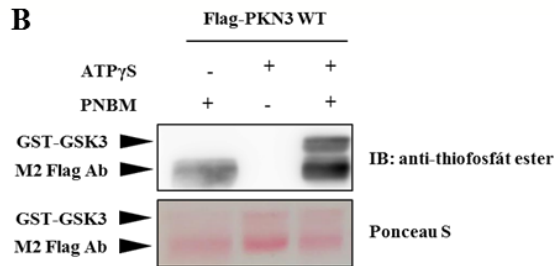
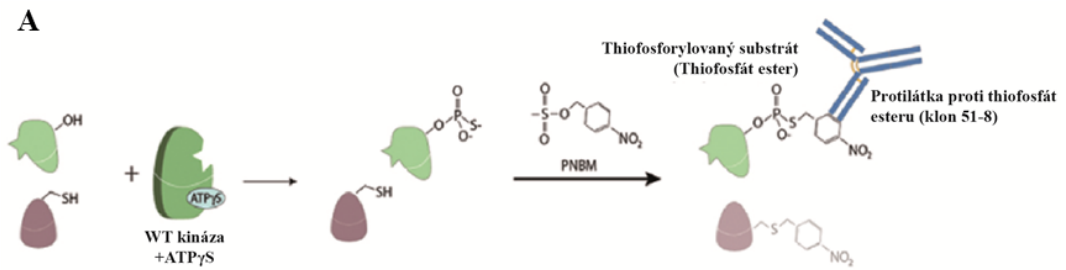


Obr. 4.4 – **A)** bunky MDA-MB-231 boli tranzientne transfekované ľudskými variantami PKN3 WT a PKN3 KD fúzovanými s Flag tagom. 48 h po transfekcii boli bunky lyzované a jednotlivé varianty PKN3 boli imunoprecipitované pomocou Flag sefárózy (Flag M2 Affinity Gel, Sigma). Množstvo precipitovanej kinázy bolo zrovnané a detekované imunoblotom s protilátkou proti Flag tagu. **B)** imunoprecipitované varianty PKN3 (z bodu A) boli použité v *in vitro* rádioaktívnej kinázovej reakcii za prítomnosti pozitívneho substrátu GST-GSK3. Ako negatívna kontrola fosforylácie bolo použité GST a neaktívna forma PKN3 (KD). Reakcie boli zastavené v uvedených časoch pridaním 6× Laemmli vzorkového pufru. Intenzita fosforylácie bola vyhodnotená SDS-PAGE s následnou autorádiografiou. V každej reakcii bolo použité [32P]ATP s aktivitou 2,5 μCi. **C)** imunoprecipitovaná PKN3 (ako v bode A) bola použitá v rádioaktívnej kinázovej reakcii s purifikovanými variantami GST-SRD. Celkové množstvo GST-SRD variant bolo zrovnané a detegované pomocou farbiva Coomassie Brilliant Blue. Ako pozitívna kontrola fosforylácie bolo použité GST-GSK3. Celková doba reakcie bola 60 min za prítomnosti 5 μCi [32P]ATP. Reakcie boli ukončené a vyhodnotené ako v bode B.

K potvrdeniu fosforylácie SRD p130Cas kinázou PKN3 sme teda zvolili metódu založenú na použití ATP γ S ako kofaktoru pri fosforylácii. V priebehu kinázovej reakcie za prítomnosti ATP γ S dochádza k thiofosforylácii substrátu a jeho následným opôsobením alkylačným činidlom PNBM (p-nitrobenzyl mesylát) ku vzniku thiofosfát esteru, ktorý je možné detegovať špecifickou protilátkou (viď Obr. 4.5 A). V prvom

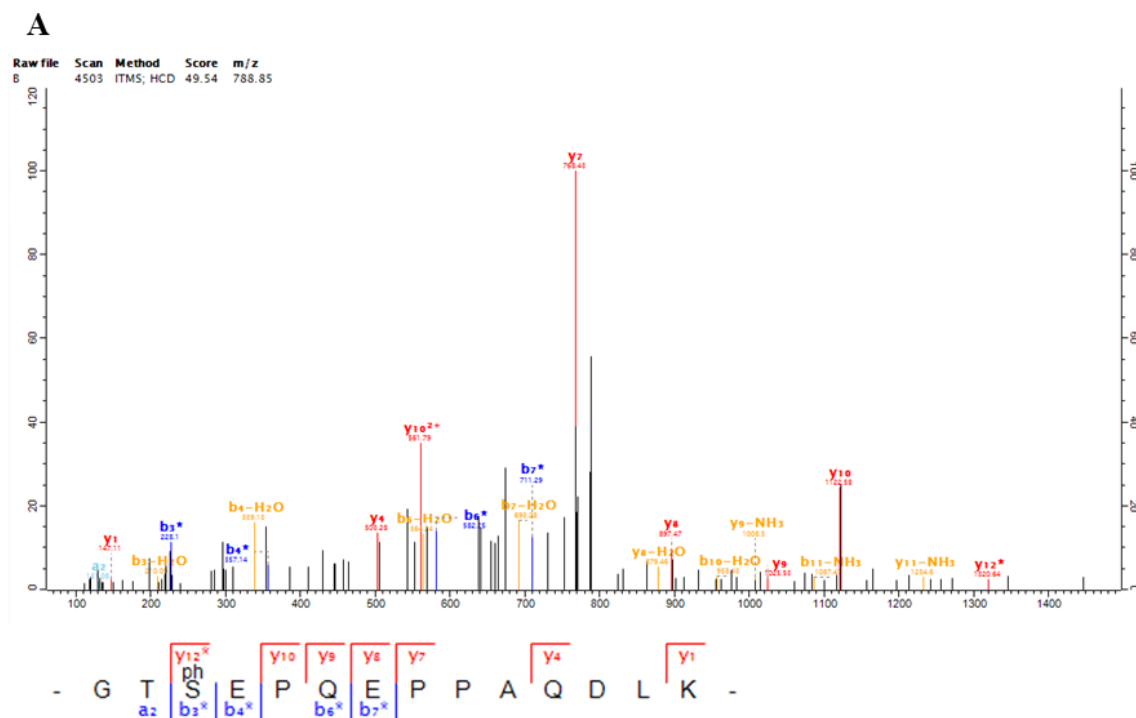
rade sme teda overili a potvrdili schopnosť PKN3 využívať ATP γ S, a to v kinázovej reakcii za použitia peptidu odvodeného od GSK3 (viď Obr. 4.5 B). Následne boli popísaným spôsobom prevedené kinázové eseje s jednotlivými variantami GST-SRD p130Cas. Intenzita signálu po imunoblote naznačuje, že PKN3 je schopná fosforylovať SRD p130Cas *in vitro*. Navyše, slabý signál detegovaný u varianty SRD 498NA naznačuje možnú úlohu PKN3 i vo fosforylácii ďalších Ser/Thr zvyškov v rámci SRD p130Cas (viď Obr. 4.5 C a D)

Aby sme potvrdili naše výsledky z thiofosforylačných reakcií, rozhodli sme sa analyzovať fosforyláciu SRD p130Cas za pomoci hmotnostnej spektrometrie (MS/MS). Varianta GST-SRD WT bola použitá ako substrát pri kinázovej reakcii s PKN3 a následná MS/MS analýza ukázala, že v rámci sekvencie GST-SRD skutočne dochádza k fosforylácii S498 (viď Obr. 4.6 A). Ďalšie predpokladané fosforylačné miesta sa nám identifikovať nepodarilo. Navyše, okrem fosfopeptidu obsahujúceho S498 SRD p130Cas sa nám podarilo identifikovať fosfopeptidy pochádzajúce z PKN3. V rámci týchto peptidov sa okrem už vopred známych fosforylačných miest nachádzali aj doposiaľ nepopísané fosforylačné miesta, a to seríny 164 a 165, treoníny 45, 280 a 470 a tyrozín 517 (Y517) (viď Obr. 4.6 B)



Obr. 4.5 – **A)** schéma metódy použitej na detekciu fosforylácie GST-SRD kinázou PKN3 – kináza schopná používať ATP γ S thiofosforyluje substrát. Ten je následne alkylovaný pomocou p-nitrobenzyl mesylátu (PNBM) za vzniku thiofosfát esteru, ktorý je následne na imunoblote detegovaný špecifickou protilátkou. **B)** schopnosť PKN3 používať ATP γ S bola overená v kinázovej reakcii za použitia GST-GSK3. Ako kontrola špecificity reakcie slúži vzorka bez opôsobenia PNBM. Ako kontrola detekcie nešpecifickej alkylácie cysteínov slúži reakcia bez prítomnosti ATP γ S. Reakcie boli vyhodnotené imunoblotom s protilátkou proti thiofosfát esteru (klon 51-8)(Abcam).

C) reprezentatívny blot z kinázovej reakcie za použitia ATP γ S s purifikovanými variantami GST-SRD. Použité varianty PKN3 boli imunoprecipitované z tranzientne transfekovaných buniek MDA-MB-231. Reakcie boli inkubované po dobu 60 min pri 35 °C, následne ukončené pridaním EDTA a alkylované po dobu 60 min pri laboratórnej teplote. Ako negatívna kontrola boli použité reakcie bez prítomnosti ATP γ S a PNBM, resp., ako popísané v bode B. Intenzita fosforylácie bola vyhodnotená pomocou imunoblotu s protilátkou proti thiofosfát esteru (klon 51-8). **D)** relatívna fosforylácia variant GST-SRD kinázou PKN3 bola kvantifikovaná z troch nezávislých experimentov, normalizovaná na celkové množstvo substrátu a štatisticky vyhodnotená pomocou testu ANOVA.



B

Identif. miesto	Sekvencia	Známa fosforylácia	
S 164	ALLRMKIS S SLEASGS	Nie	
S 165	LLRMKIS S SLEASGSP	Nie	
S 466	MNLLPPC S SPSTISP	Áno	Kettenbach, 2011
S 544	PRTRRG S PSPTR	Áno	Daub, 2008; Kettenbach, 2011
S 548	RGPSPP S PTRKPPR	Áno	Daub, 2008
T 45	ENLRRV T DRRHLGH	Nie	
T 280	KPTALT G TLQVRLLG	Nie	
T 470	PPC S SP T ISPPKGC	Nie	homológ pS576 u PKN1
T 860	TGLPPAL T PPAPHSL	Áno	Daub, 2008
Y 517	PPKPPRL YLPQEPTS	Nie	

Obr. 4.6 – A) MS/MS spektrum fosfopeptidu pochádzajúceho z GST-SRD po kinázovej reakcii s PKN3 WT za prítomnosti ATP. Fosforylovaný serín (phS) zodpovedá S498 v rámci sekvencie p130Cas. **B)** Tabuľka zhrňujúca identifikované fosforylované AK v rámci PKN3 po kinázovej reakcii za prítomnosti ATP. Fosforylované AK sú v rámci príslušnej sekvencie označené červenou. Zelená farba vyznačuje časť polyprolínového motívu účastniaceho sa interakcie s SH3 doménou p130Cas.

4.4. Štúdium potenciálneho prepojenia PKN3 – BCAR1 – 14-3-3ζ v antiestrogénovej rezistencii

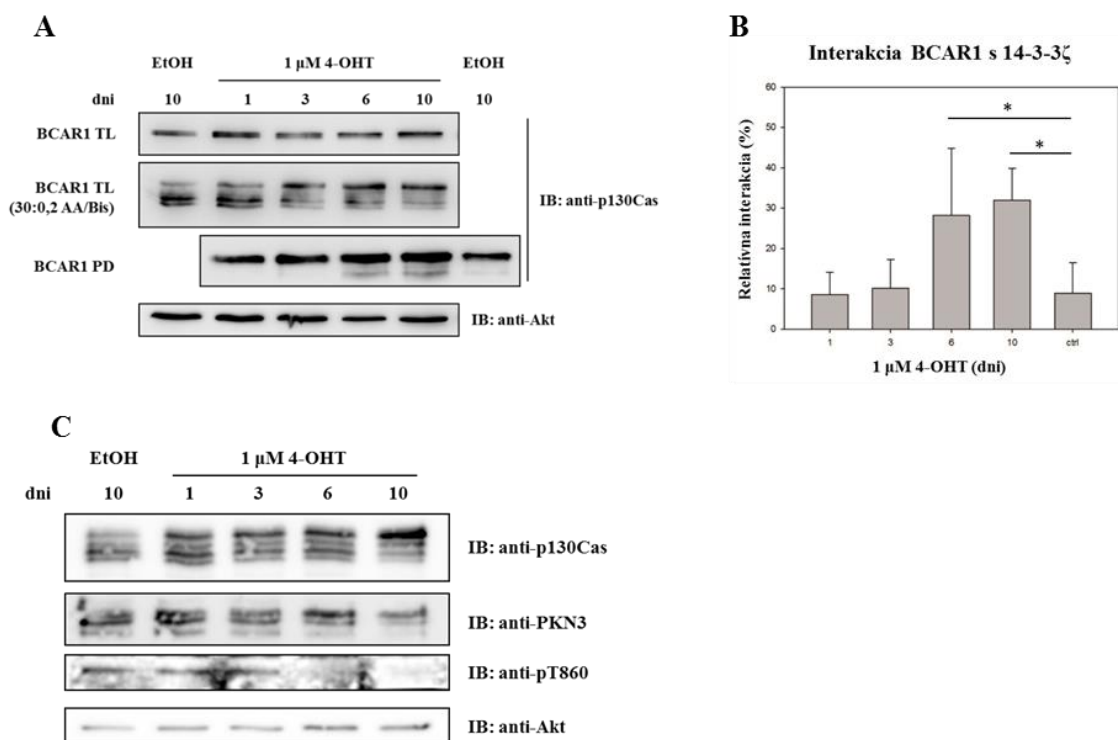
Úloha BCAR1 vo vzniku rezistencie na antiestrogény je v súčasnosti dobre známa, avšak snaha o objasnenie molekulárnych mechanizmov podieľajúcich sa na tomto procese je stále predmetom mnohých štúdií (viď kapitola 1.2.1.5.). Našu hypotézu, že dlhodobé pôsobenie tamoxifénu by mohlo viesť k stimulácii fosforylácie BCAR1 kinázou PKN3 a následnej väzbe 14-3-3ζ podporuje hneď niekoľko známych faktov. V prvom rade, pôsobenie antiestrogénov na bunky línie MCF7 vedie k zvýšeniu fosforylácie BCAR1 po siedmych dňoch (Cowell et al., 2006). Ďalším náznakom je, že chiméra vytvorená z BCAR1 a SRD príbuzného proteínu HEF1 viedla k zníženej schopnosti buniek proliferovať v prítomnosti antiestrogénov (Brinkman et al., 2010). Najzásadnejší rozdiel medzi SRD BCAR1 a HEF1 pritom spočíva v tom, že v rámci SRD HEF1 sa nevyskytuje serín homológny S498 BCAR1 vo väzbovom mieste pre proteíny 14-3-3 (viď Obr. 1.2 C). Navyše, expresia 14-3-3ζ je pozitívne regulovaná pôsobením tamoxifénu (Frasor et al., 2006; Bergamaschi and Katzenellenbogen, 2012) a jeho nadmerná produkcia koreluje s agresívnym rastom nádorov prsníka (Neal et al., 2009).

Aby sme zistili, či dlhodobé pôsobenie antiestrogénov na bunky MCF7 vedie k stimulácii väzby BCAR1 a 14-3-3ζ, pestovali sme tieto bunky v prítomnosti 1 μM 4-hydroxy tamoxifénu (4-OHT) po dobu 1, 3, 6 a 10 dní. Pomocou pull-down experimentov s imobilizovaným His-14-3-3ζ v lyzáte buniek MCF7 pestovaných v 4-OHT sa nám podarilo dokázať, že k najvyššej interakcii 14-3-3ζ s BCAR1 dochádza v 6-10 dni pôsobenia 4-OHT (viď Obr. 4.7 A a B). Navyše, použitím gélu 30:0,2 a následného imunoblotu sme potvrdili, že 4-OHT pozitívne reguluje fosforyláciu BCAR1, ktorá zároveň koreluje so schopnosťou jeho interakcie so 14-3-3ζ (viď Obr. 4.7 A a B).

Vzhľadom k tomu, že sme dokázali, že PKN3 je schopná fosforylácie väzbového miesta pre proteíny 14-3-3 v rámci SRD BCAR1 (tento motív je u ľudskej i myšej izoformy p130Cas konzervovaný), predpokladali sme, že by PKN3 mohla byť za jeho fosforyláciu po stimulácii buniek MCF7 4-OHT čiastočne zodpovedná a stimulovať tak interakciu BCAR1 s proteínmi 14-3-3. Túto hypotézu navyše podporovali naše predchádzajúce výsledky, kde po znížení expresie endogénnej PKN3 v bunkách

MDA-MB-231 došlo k štatisticky významnému poklesu väzby BCAR1 a 14-3-3 ζ (J. Gemperle – nepublikované výsledky). Zamerali sme sa teda na zmeny aktivity PKN3 v týchto bunkách po pôsobení 4-OHT, ktoré sme pozorovali pomocou imunoblotu s protilátkou proti fosforylovanému T860 (pT860; vid' kapitola 1.1.2.). Napriek tomu, že celkové množstvo PKN3 sa v priebehu sledovaných 10 dní nezmenilo, medzi 3. a 6. dňom pestovania buniek za prítomnosti 4-OHT došlo k takmer úplnému poklesu jej aktivity (vid' Obr. 4.7 C).

Súhrnne tieto výsledky naznačujú, že stimulácia fosforylácie BCAR1 po pôsobení 4-OHT v bunkách MCF7 vedie k zvýšeniu jeho interakcie so 14-3-3 ζ , avšak k tomuto efektu pravdepodobne dochádza nezávisle na aktivite PKN3.



Obr. 4.7 – **A)** bunky MCF7 boli pestované v 1 μM 4-hydroxy tamoxiféne (4-OHT) po uvedenú dobu. Lyzáty týchto buniek boli zrovnané na celkový obsah proteínu a inkubované s imobilizovaným 14-3-3 ζ pri 4°C na rotátore cez noc. Množstvo naviazaného BCAR1 bolo analyzované na imunoblote s protilátkou proti p130Cas (protilátka rozpoznáva aj BCAR1). Ako kontrola nanášky a množstva celkového proteínu bol použitý imunoblot proti Akt. **B)** kvantifikácia väzby BCAR1 so 14-3-3 ζ zo 4 nezávislých experimentov, určená ako pomer intenzity BCAR1 naviazaného na 14-3-3 ζ voči celkovému množstvu BCAR1. Štatistická analýza bola vykonaná pomocou testu ANOVA. **C)** bunky MCF7 pestované v 1 μM 4-OHT po uvedenú dobu (v dňoch). Fotky boli zhotovené vo fázovom kontraste pri zväčšení 200 \times . **D)** imunoblot totálneho lyzátu buniek MCF7 pestovaných v 1 μM 4-OHT po uvedenú dobu (v dňoch). Zmena fosforylácie BCAR1 bola detegovaná po SDS-PAGE na géle 30:0,2 s protilátkou proti p130Cas. Celkové množstvo PKN3 bolo detegované protilátkou proti PKN3, kinázová aktivita bola sledovaná pomocou protilátky proti pT860 PKN3. Ako kontrola nanášky bol použitý imunoblot proti Akt. Vo všetkých bodoch boli ako negatívna kontrola použité bunky pestované v médiu s EtOH o objeme zodpovedajúcom použitému 4-OHT.

5. Diskusia

V rámci tejto práce sa nám podarilo identifikovať vôbec prvú Ser/Thr kinázu fosforylujúcu proteín p130Cas, a to kinázu PKN3. Nami predikované a potvrdené fosforylačné miesto, teda S498, sa nachádza priamo vo väzbovom motíve pre proteíny 14-3-3 v SRD p130Cas, naznačujúc potenciálnu existenciu funkčného významu signalizácie PKN3/p130Cas/14-3-3. Zároveň sa nám pomocou hmotnostnej spektrometrie podarilo objaviť 6 doposiaľ neznámych fosforylačných miest v rámci ľudskej izoformy PKN3.

5.1. Fosforylácia p130Cas a PKN3 a ich funkčný význam

V rámci sekvencie p130Cas sa nachádza 52 serínov, 23 treonínov a 25 tyrozínov, u ktorých bola predikovaná možná fosforylácia (<http://www.phosphonet.ca/>). Napriek značne prevládajúcemu množstvu potenciálne fosforylovaných Ser/Thr je však v súčasnosti výrazne viac preskúmaná funkcia fosforylácie na tyrozínoch, ich regulácia a kinázy za ňu zodpovedné (viď kapitola 1.2.1.).

Na základe výsledkov analýzy väzbových sekvencií SH3 domény p130Cas, ktorá bola vykonaná v našom laboratóriu a potvrdila interakciu p130Cas s polyprolínovou sekvenciou PKN3 (J. Gemperle - Diplomová práca, 2012; nepublikované výsledky), sme sa zamerali na možnú úlohu PKN3 vo fosforylácii SRD p130Cas. Napriek pôvodnej snahe potvrdiť fosforyláciu nami navrhnutých variant GST-SRD pomocou rádioaktívnych kinázových reakcií, nepodarilo sa nám touto metódou dosiahnuť špecifický signál vedúci ku koherentným výsledkom. Hoci asociácia medzi kinázou a jej substrátom v procese prenosu fosfátovej skupiny je vždy sprostredkovaná aktívnou oblasťou katalytickej domény a cieľovým motívom substrátu, sekundárna interakcia môže prispievať k zvýšeniu efektivity fosforylácie, ako by tomu mohlo byť napr. práve v prípade p130Cas a PKN3.

Pomocou citlivejšej metódy založenej na schopnosti PKN3 využívať ATP γ S pri fosforylácii sa nám podarilo dokázať, že S498 v rámci SRD p130Cas je fosforylovaný kinázou PKN3 *in vitro*. Tento výsledok sa nám zároveň podarilo overiť MS/MS analýzou. Minoritnú fosforyláciu sme však pozorovali aj u varianty GST-SRD 498NA, čo v porovnaní s nulovým signálom u GST-SRD 15AN naznačuje schopnosť PKN3

fosforylovať aj ďalší/ďalšie z 13 Ser/Thr mutovaných u varianty SRD 15AN. Mohlo by sa jednať napríklad o serín 432 (v rámci sekvencie GKRLSA₄₃₃), ktorý ako jediný z týchto miest aspoň čiastočne zodpovedá fosforylačnému motívu PKN3.

Jediným doposiaľ známym funkčným dôsledkom fosforylácie SRD p130Cas, konkrétne S498, je umožnenie väzby proteínov 14-3-3, napriek tomu však funkčný význam tejto interakcie ostáva z väčšej časti neobjasnený. V súvislosti s asociáciou p130Cas a Grb2 sprostredkovanou 14-3-3 bol v minulosti naznačený vplyv SRD na stimuláciu transkripcie včasných génov prostredníctvom aktivácie dráhy Ras/MEK/Erk (Hakak and Martin, 1999). Vzhľadom k našim výsledkom, naznačujúcim, že zvýšená expresia PKN3 pozitívne ovplyvňuje bunkovú proliferáciu (J. Gemperle, nepublikované výsledky), nie je vylúčené, že by PKN3 mohla prispievať k aktivácii SRE prostredníctvom fosforylácie SRD p130Cas.

Analýzou migrácie na SDS-PAGE za použitia gélu 30:0,2 sme u nami vytvorených mutovaných variant p130Cas (SRD 498NA a SRD 15AN) potvrdili, že v stabilne transfekovaných bunkách MEF dochádza k fosforylácii časti z nami mutovaných miest, vrátane S498. Prekvapivo, u oboch mutovaných variant došlo k objaveniu dvoch rýchlejšie migrujúcich foriem, čo naznačuje funkciu fosforylácie S498 v regulácii fosforylácie ďalších miest v sekvencii p130Cas. Vzhľadom k doposiaľ známym výsledkom, naznačujúcim, že zámena S498 za alanín by mohla viesť k rozrušeniu väzbového motívu umožňujúceho interakciu p130Cas s proteínmi 14-3-3 (Briknarová et al., 2005), interakcia týchto dvoch proteínov by mohla prispievať k regulácii celkového fosforylačného stavu p130Cas. Proteíny 14-3-3 sú dôležitou rodinou adaptorových proteínov účastniacich sa procesov spojených s reguláciou organizácie cytoskeletu, proliferácie, transkripcie, bunkovej signalizácie a ďalších, v čom sa výrazne odzrkadľuje ich schopnosť interagovať s viac ako 200 proteínmi (Pozuelo Rubio et al., 2004). Významnou vlastnosťou proteínov 14-3-3 je zároveň ich schopnosť vytvárať diméry, sprostredkujúce proteín-proteínové interakcie na základe výskytu dvoch známych väzbových motívov (Aitken, 2006; Morrison, 2009). Podobným spôsobom by interakcia p130Cas s kinázou PKN3, následná fosforylácia S498 v rámci p130Cas a väzba 14-3-3 mohla prispievať k sprostredkovaniu asociácie p130Cas s ďalšími kinázami, prípadne k stabilizácii už známych komplexov.

Okrem pozitívneho vplyvu fosforylácie na asociáciu proteínov, ako napr. v prípade väzby 14-3-3, proteín-proteínové interakcie sú často negatívne regulované fosforyláciou väzbového miesta alebo jeho blízkeho okolia. Práve štúdiom SH3 domény p130Cas v našom laboratóriu sa nám podarilo dokázať, že fosforylácia Y12 v rámci tejto domény vedie k zabráneniu väzby polyprolínového motívu interagujúcich proteínov (Janoštiak et al., 2011).

Popri analýze fosforylácie SRD p130Cas po kinázovej reakcii *in vitro* sa nám podarilo identifikovať až 10 fosforylovaných AK v rámci PKN3, pričom u 6 z nich fosforylácia doposiaľ popísaná nebola. Z pohľadu prepojenia signalizácie PKN3 a p130Cas je však najzaujímavejšia fosforylácia Y517, nachádzajúceho sa hneď za polyprolínovým motívom (PPP_KPPRL_{Y517}) sprostredkujúcim interakciu s SH3 doménou p130Cas. Tesný výskyt tohto fosforylačného miesta pri väzbovej sekvencii dáva možnosť predpokladom, že by fosforylácia Y517 mohla zohrávať úlohu v negatívnej regulácii väzby p130Cas, podobne ako fosforylácia Y12 v rámci jeho SH3 domény. Ako kinázy potenciálne zodpovedné za fosforyláciu Y517 boli predikčným algoritmom spoločnosti Kinexus (<http://www.phosphonet.ca/>) predpovedané napr. kinázy FAK a PYK2, ktoré priamo interagujú s SH3 doménou p130Cas a podieľajú sa na fosforylácii tyrozínových motívov v SD (Li and Earp, 1997; Polte and Hanks, 1995). Ďalšou kinázou potenciálne fosforylujúcou Y517 PKN3 by mohla byť EGFR. V tomto kontexte je zaujímavé, že PKN3 je schopná fosforylovať EGFR na treoníne 654 *in vitro*, avšak *in vivo* sa úloha PKN3 nepotvrdila, pravdepodobne kvôli nízkej hladine expresie PKN3 v študovaných bunkách (Collazos et al., 2011).

U ľudskej izoformy kinázy PKN3 bola v minulosti popísaná schopnosť autofosforylácie (Oishi et al., 1999; Shibata et al., 2001), konkrétne v oblasti AK 520-889, ktorá zodpovedá katalytickej doméne. Autofosforyláciu PKN3 sa nám podarilo potvrdiť za pomoci kinázovej reakcie *in vitro* s [32P]ATP (viď Obr. 4.4). V rámci MS/MS analýzy sa nám v tejto oblasti podarilo identifikovať fosforylovaný serín 544 (RGPpSPPA₅₄₇), ktorý by potenciálne zodpovedal autofosforylačnému miestu, keďže zároveň vyhovuje fosforylačnému motívu PKN3 (viď Obr. 4.6 B). Druhým kandidátnym miestom pre autofosforyláciu PKN3 je treonín 718 (RTSpTF_{CG721}), ktorý sa nachádza priamo v aktivačnej slučke kinázy a jeho fosforylácia je pre kinázovú aktivitu PKN3 nevyhnutná (viď kapitola 1.1.2.). Možnú autofosforyláciu oboch týchto miest zároveň podporuje fakt, že sme schopní ju

detegovať po kinázovej reakcii *in vitro* pomocou protilátky, rozpoznávajúcej sekvenciu RXXpS/T (nepublikované výsledky). Určenie autofosforylačného miesta a jeho funkčný význam na aktivitu PKN3 plánujeme v budúcnosti preskúmať mutačnou analýzou.

5.2. Funkčná analýza významu dráhy PKN3 – BCAR1 – 14-3-3ζ v antiestrogénovej rezistencii

Na základe všetkých faktov popísaných v kapitole 4.4., naznačujúcich potenciálne prepojenie PKN3 – BCAR1 – 14-3-3ζ v skorej odpovedi na pôsobenie antiestrogénov, sme sa zamerali na túto dráhu v ER pozitívnych bunkách MCF7.

Podarilo sa nám potvrdiť už v minulosti popísaný efekt pôsobenia 4-OHT na fosforyláciu BCAR1, u ktorej došlo k výraznému zvýšeniu predovšetkým v období medzi 6-10 dňom pestovania buniek MCF7 v prítomnosti 4-OHT. Podarilo sa nám taktiež dokázať, že zvýšená fosforylácia BCAR1 po pôsobení 4-OHT koreluje so zvýšenou schopnosťou BCAR1 interagovať s proteínom 14-3-3ζ. Prekvapivo, v 6-10. dni pôsobenia 4-OHT na bunky MCF7 však došlo k takmer úplnej inhibícii aktivity PKN3 (stanovená pomocou imunoblotu s protilátkou rozpoznávajúcou pT860), napriek tomu, že hladina expresie PKN3 sa nezmenila. Zaujímavé navyše je, že v období 6-10. dňa došlo k nabohateniu pomalšie migrujúcej formy PKN3 na SDS-PAGE, naznačujúc jej zvýšenú fosforyláciu. Vzhľadom k tomu, že ako Ser/Thr, tak Tyr fosforylácia kinázy PKN3 sú doposiaľ v podstate nepreskúmané, nie je vylúčené, že fosforylácia určitých AK by mohla hrať regulačnú úlohu v jej aktivácii. K tomu prispieva i fakt, že pôsobenie 4-OHT v bunkách MCF7 vedie k zvýšeniu aktivity niektorých kináz, ako napr. Src a FAK, ktoré navyše zdieľajú spoločnú signalizáciu s BCAR1 a teda potenciálne i s PKN3 (Cowell et al., 2006).

Ako už bolo uvedené, podarilo sa nám ukázať, že pôsobenie 4-OHT na bunky MCF7 vedie k zvýšeniu interakcie BCAR1 s 14-3-3ζ v 6-10 dni a táto interakcia koreluje s nárastom fosforylácie BCAR1. V súčasnej dobe bohužiaľ nie je k dispozícii protilátka, ktorá by dokázala rozpoznať fosforyláciu serínu 494 v rámci SRD BCAR1 (zodpovedá S498 u p130Cas). Z tohto dôvodu nie sme schopní s určitosťou tvrdiť, že pozorované zvýšenie interakcie je spôsobené fosforyláciou uvedeného miesta, hoci

všetky doposiaľ známe údaje tomu nasvedčujú (Briknarová et al., 2005; Garcia-Guzman et al., 1999).

Už pri prvotnom štúdiu interakcie p130Cas s proteínmi 14-3-3 Garcia-Guzman s kolegami zistili, že odstránenie SRD zo sekvencie p130Cas síce vedie k výraznému poklesu interakcie, avšak nie k jej úplnému zrušeniu (Garcia-Guzman et al., 1999). Ďalšie väzbové miesta sa však zatiaľ objaviť nepodarilo. Podľa predikčného algoritmu väzbových motívov 14-3-3 v rámci proteínových sekvencií (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/1433pred/>) by okrem motívu RGTSEP₅₀₀ p130Cas (zodpovedá RSPSEP₄₉₆ u BCAR1) mohlo dochádzať k interakcii prostredníctvom ďalších sekvencií, a to REETYD₃₃₂ (REETYD₃₂₈ u BCAR1), QEVSRP₇₁₈ (QEVSRP₇₁₄ u BCAR1), VGSASGP₄₉₁ u p130Cas a RTKATAP₆₁₃ u BCAR1. Všetky tieto sekvencie sa vyskytujú buď v SD alebo C-koncovej doméne p130Cas/BCAR1, naznačujúc ich možnú funkciu v stabilizácii signálnych komplexov tvorených v rámci týchto oblastí.

Navzdory nami pozorovaným výsledkom, včasná inaktivácia PKN3 po pôsobení 4-OHT nevyučuje neskoršiu úlohu dráhy PKN3/BCAR1/14-3-3ζ v zisku rezistencie ER pozitívnych nádorov na antiestrogény, keďže pri štúdiu expresného profilu buniek MCF7 po znížení expície ER bola transkripcia PKN3 výrazne zvýšená, rovnako ako transkripcia BCAR1 či 14-3-3ζ (Al Saleh et al., 2011). Potenciálnu úlohu by PKN3 mohla zohrávať aj v spojení so signalizáciou stimulovanou proteínom BCAR3. Podobne ako BCAR1, i BCAR3 je zodpovedný za vznik rezistencie ER pozitívnych buniek k antiestrogénom, a to spôsobom vyžadujúcim jeho interakciu s BCAR1 prostredníctvom C-koncových domén oboch proteínov (Wallez et al., 2014). Ako sa ukázalo, BCAR3 prispieva k navýšeniu ako Ser/Thr, tak Tyr fosforylácie p130Cas, ktorá je pozitívne stimulovaná SH3 doménou p130Cas (Makkinje et al., 2009). U rezistentných buniek bola taktiež popísaná zvýšená aktivácia signálnych dráh závislých na PI3K (zhrnuté v Al Saleh et al., 2011; Riggins et al., 2007), pričom aktívna PI3K je známym stimulátorom aktivity PKN3, vedúcej k malignému rozvoju nádorov (Leenders et al., 2004). Navyše sa ukázalo, že p130Cas dokáže s PI3K priamo interagovať (Riggins et al., 2003) a že zvýšená expresia myšieho ortológu BCAR3 vedie práve k aktivácii kinázy PI3K, ktorá je zásadná pre vznik rezistencie buniek MCF7 k Faslodexu (ICI 182,780; antiestrogén) (Felekkis et al., 2005). Potenciálne prepojenie signálnych dráh závislých na BCAR3, PI3K, BCAR1 a PKN3 a ich úloha pri vzniku rezistencie ostáva predmetom nášho ďalšieho štúdia.

5.3. Perspektíva pokračovania projektu

V rámci tohto projektu sa nám podarilo potvrdiť, že PKN3 je schopná fosforylácie p130Cas *in vitro*, čo však vonkoncom nezaručuje, že k tomu dochádza aj v živých bunkách. Fosforyláciu S498 a ďalších miest v rámci p130Cas *in vivo* kinázou PKN3 plánujeme overiť za použitia varianty PKN3 s mutáciou v katalytickej doméne, schopnej používať N6-substituované syntetické analógy ATP, čím sa zabezpečí špecificita reakcie. Zároveň, tento prístup prispeje k identifikácii ďalších substrátov PKN3.

Nami identifikované fosforylačné miesto sa nachádza priamo v motíve pre väzbu proteínov 14-3-3. Keďže proteíny 14-3-3 sú významnými regulátormi proteín-proteínovej interakcie a prispievajú k ich stabilizácii, pokúsime sa zmapovať ďalšie potenciálne väzbové miesta a prispieť tak k objasneniu úlohy proteínov 14-3-3 v signalizácii p130Cas.

V rámci štúdia signalizácie stimulovanej antiestrogénmi sme zistili, že PKN3 je inaktivovaná už po 6 dňoch pôsobenia 4-OHT na bunky MCF7. V budúcnosti sa zameriame na objasnenie mechanizmu vedúceho k jej inaktivácii, rovnako ako na potenciálnu úlohu PKN3 v bunkách rezistentných na antiestrogény.

PKN3 i p130Cas sú proteíny s dôležitou úlohou v regulácii nádorovej signalizácie. V našom laboratóriu už v súčasnej dobe prebieha projekt venujúci sa dopadom interakcie týchto proteínov na proliferáciu, migráciu a invazivitu nádorových buniek.

6. Zhrnutie

- na základe fosforylačnej analýzy nami navrhnutých a vytvorených variant p130Cas s mutáciami v rámci SRD sme naznačili potenciálnu úlohu interakcie p130Cas s proteínmi 14-3-3 v sprostredkovaní asociácie s kinázami, ovplyvňujúc tak celkový fosforylačný stav p130Cas
- kinázovými reakciami *in vitro* sme potvrdili, že PKN3 je schopná fosforylovať S498 v rámci väzbového motívu pre proteíny 14-3-3, vyskytujúceho sa v SRD p130Cas. Navyše sme detegovali fosforyláciu ďalších AK fosforylovaných PKN3. Za možné miesto ďalšej fosforylácie sme navrhli serín 432 v rámci sekvencie GKRLSA₄₃₃
- fosforyláciu S498 p130Cas kinázou PKN3 sme potvrdili analýzou za pomoci hmotnostnej spektrometrie
- identifikovali sme 6 doposiaľ neznámych fosforylačných miest v rámci sekvencie PKN3. Fosforyláciu Y517 sme navrhli ako potenciálne miesto regulácie interakcie s SH3 doménou p130Cas. Zároveň, ako potenciálne miesta autofosforylácie PKN3 sme navrhli serín 544 a treonín 718
- potvrdili sme nárast fosforylácie BCAR1 po pôsobení 4-OHT na ER pozitívne bunky MCF7. Navyše sme zistili, že v 6-10 dni pestovania buniek v prítomnosti 4-OHT dochádza k nárastu interakcie BCAR1 so 14-3-3ζ
- predikovali sme ďalšie potenciálne väzbové motívy proteínov 14-3-3 v rámci sekvencie p130Cas a BCAR1
- zistili sme, že pôsobenie 4-OHT na bunky MCF7 po 6 dňoch vedie k strate aktivity PKN3, pravdepodobne spôsobenej nárastom jej fosforylácie, čo však nevylučuje úlohu PKN3 v neskorších fázach rezistencie buniek na antiestrogény

7. Zoznam použitej literatúry

- Abassi, Y. a, Rehn, M., Ekman, N., Alitalo, K., & Vuori, K. (2003). p130Cas Couples the tyrosine kinase Bmx/Etk with regulation of the actin cytoskeleton and cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35636–43. doi:10.1074/jbc.M306438200
- Agthoven, T. Van, Agthoven, T. L. A. Van, Dekker, A., Spek, P. J. Van Der, Vreede, L., & Dorssers, L. C. J. (1998). Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *The EMBO Journal*, 17(10), 2799–2808.
- Aitken, A. (2006). 14-3-3 Proteins: a Historic Overview. *Seminars in Cancer Biology*, 16(3), 162–72. doi:10.1016/j.semcancer.2006.03.005
- Al Saleh, S., Sharaf, L. H., & Luqmani, Y. A. (2011). Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *International Journal of Oncology*, 38(5), 1197–1217. doi:10.3892/ijo.2011.942
- Aleku, M., Schulz, P., Keil, O., Santel, A., Schaeper, U., Dieckhoff, B., ... Kaufmann, J. (2008). Atu027, a liposomal small interfering RNA formulation targeting protein kinase N3, inhibits cancer progression. *Cancer Research*, 68(23), 9788–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2428
- Alexandropoulos, K., & Baltimore, D. (1996). Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes & Development*, 10(11), 1341–1355. doi:10.1101/gad.10.11.1341
- Arold, S. T., Hoellerer, M. K., & Noble, M. E. M. (2002). The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure*, 10(3), 319–27.
- Arthur, W. T., Quilliam, L. A., & Cooper, J. A. (2004). Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 111–22. doi:10.1083/jcb.200404068
- Barrett, A., Pellet-Many, C., Zachary, I. C., Evans, I. M., & Frankel, P. (2013). p130Cas: a key signalling node in health and disease. *Cellular Signalling*, 25(4), 766–77. doi:10.1016/j.cellsig.2012.12.019
- Bergamaschi, A., & Katzenellenbogen, B. (2012). Tamoxifen downregulation of miR-451 increases 14-3-3 ζ and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance. *Oncogene*, 31(1), 39–47. doi:10.1038/onc.2011.223
- Bourguignon, L. Y. W., Gilad, E., Peyrollier, K., Brightman, A., & Swanson, R. A. (2007). Hyaluronan-CD44 interaction stimulates Rac1 signaling and PKN γ kinase activation leading to cytoskeleton function and cell migration in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 101(4), 1002–1017. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04485.x
- Brábek, J., Constancio, S., & Shin, N. (2004). CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene*, 23(44), 7406–15. doi:10.1038/sj.onc.1207965
- Braverman, L. E., & Quilliam, A. L. (1999). Identification of Grb4/Nckbeta, a src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5542–9. doi:10.1074/jbc.274.9.5542

- Briknarová, K., Nasertorabi, F., Havert, M. L., Eggleston, E., Hoyt, D. W., Li, C., ... Ely, K. R. (2005). The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 21908–14. doi:10.1074/jbc.M501258200
- Brinkman, A., de Jong, D., Tuinman, S., Azaouagh, N., van Agthoven, T., & Dorssers, L. C. J. (2010). The substrate domain of BCAR1 is essential for anti-estrogen-resistant proliferation of human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(2), 401–8. doi:10.1007/s10549-009-0403-4
- Brinkman, A., van der Flier, S., Kok, E. M., & Dorssers, L. C. J. (2000). BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 112–20.
- Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., Smeriglio, M., Di Stefano, P., Gippone, S., ... Defilippi, P. (2004). p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 8), 1603–11. doi:10.1242/jcs.01025
- Cai, D., Clayton, L. K., Smolyar, A., & Lerner, A. (1999). AND-34, a novel p130Cas-binding thymic stromal cell protein regulated by adhesion and inflammatory cytokines. *The Journal of Immunology*.
- Collazos, A., Michael, N., Whelan, R. D. H., Kelly, G., Mellor, H., Pang, L. C. H., ... Parker, P. J. (2011). Site recognition and substrate screens for PKN family proteins. *The Biochemical Journal*, 438(3), 535–43. doi:10.1042/BJ20110521
- Cowell, L., Graham, J., Bouton, A., Clarke, C., & O'Neill, G. (2006). Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway. *Oncogene*, 25(52), 7597–7607. doi:10.1038/sj.onc.1209747
- Daub, H., Olsen, J. V., Bairlein, M., Gnad, F., Oppermann, F. S., Krüger, R., ... Mann, M. (2008). Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *Molecular Cell*, 31(3), 438–448. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.007
- Defilippi, P., Di Stefano, P., & Cabodi, S. (2006). p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in Cell Biology*, 16(5), 257–63. doi:10.1016/j.tcb.2006.03.003
- Deng, B., Tan, Q. Y., Wang, R. W., Jiang, Y. G., Zhou, J. H., & Huang, W. (2014). P130cas is required for TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncology Letters*, 8(1), 454–460. doi:10.3892/ol.2014.2123
- Donaldson, J. C., Dempsey, P. J., Reddy, S., Bouton, A. H., Coffey, R. J., & Hanks, S. K. (2000). Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Experimental Cell Research*, 256(1), 168–78. doi:10.1006/excr.2000.4822
- Donato, D. M., Ryzhova, L. M., Meenderink, L. M., Kaverina, I., & Hanks, S. K. (2010). Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20769–79. doi:10.1074/jbc.M109.091207
- Donlin, L. T., Danzl, N. M., Wanjalla, C., & Alexandropoulos, K. (2005). Deficiency in expression of the signaling protein Sin/Efs leads to T-lymphocyte activation and mucosal inflammation. *Molecular and Cellular Biology and Cellular Biology*, 25(24), 11035–11046. doi:10.1128/MCB.25.24.11035

- Falk, M. D., Liu, W., Bolaños, B., Unsal-Kacmaz, K., Klippel, A., Grant, S., ... Timofeevski, S. (2014). Enzyme Kinetics and Distinct Modulation of the Protein Kinase N Family of Kinases by Lipid Activators and Small Molecule Inhibitors. *Bioscience Reports*. doi:10.1042/BSR20140010
- Fashena, S. J., Einarson, M. B., O'Neill, G. M., Patriotis, C., & Golemis, E. a. (2002). Dissection of HEF1-dependent functions in motility and transcriptional regulation. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 1), 99–111.
- Felekkis, K. N., Narsimhan, R. P., Near, R., Castro, A. F., Zheng, Y., Quilliam, L. A., & Lerner, A. (2005). AND-34 Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Induces Anti-Estrogen Resistance in a SH2 and GDP Exchange Factor – Like Domain-Dependent Manner, 32–42.
- Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, a, & Parker, P. J. (2000). Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11064–11070. doi:10.1074/jbc.275.15.11064
- Fonseca, P. M., Shin, N. Y., Brábek, J., Ryzhova, L., Wu, J., & Hanks, S. K. (2004). Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling*, 16(5), 621–629. doi:10.1016/j.cellsig.2003.10.004
- Frasor, J., Chang, E. C., Komm, B., Lin, C.-Y., Vega, V. B., Liu, E. T., ... Katzenellenbogen, B. S. (2006). Gene expression preferentially regulated by tamoxifen in breast cancer cells and correlations with clinical outcome. *Cancer Research*, 66(14), 7334–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4269
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Rusello, M., & Vuori, K. (1999). Cell Adhesion Regulates the Interaction between the Docking Protein p130Cas and the 14-3-3 Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5762–5768. doi:10.1074/jbc.274.9.5762
- Garton, A. J., Burnham, M. R., Bouton, A. H., & Tonks, N. K. (1997). Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130 cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene*.
- Gemperle, J. (2012). Diplomová práce - Hledání nových interakčních partnerů SH3 domény adaptorového proteinu p130Cas. Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- Gotoh, T., Cai, D., Tian, X., Feig, L. a., & Lerner, a. (2000). p130Cas Regulates the Activity of AND-34, a Novel Ral, Rap1, and R-Ras Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30118–30123. doi:10.1074/jbc.M003074200
- Guo, J., Canaff, L., Rajadurai, C., Fils-Aimé, N., Tian, J., Dai, M., ... Lebrun, J.-J. (2014). Breast Cancer Anti-Estrogen Resistance-3 inhibits transforming growth factor-β/Smad signaling and associates with favorable breast cancer disease outcomes. *Breast Cancer Research : BCR*, 16(6), 476. doi:10.1186/s13058-014-0476-9
- Hakak, Y., & Martin, G. S. (1999). Cas mediates transcriptional activation of the serum response element by Src. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6953–62.
- Hashimoto, T., Mukai, H., & Kawamata, T. (1998). Localization of PKN mRNA in the rat brain. *Molecular Brain*
- Hivert, V., Pierre, J., & Raingeaud, J. (2009). Phosphorylation of human enhancer of filamentation (HEF1) on serine 369 induces its proteasomal degradation. *Biochemical Pharmacology*, 78(8), 1017–25. doi:10.1016/j.bcp.2009.06.005
- Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., & Honda, Z. (1998). Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nature*, 19(august), 4–6.

- Hoon Kim, D., Jeon Choi, S., Kook, S., Kim, W., & Keun Song, W. (2003). Phosphorylation-dependent cleavage of p130cas in apoptotic rat-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1), 141–8.
- Hsia, D. a, Mitra, S. K., Hauck, C. R., Strebblow, D. N., Nelson, J. a, Ilic, D., ... Schlaepfer, D. D. (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *The Journal of Cell Biology*, 160(5), 753–67. doi:10.1083/jcb.200212114
- Hutchinson, C. L., Lowe, P. N., McLaughlin, S. H., Mott, H. R., & Owen, D. (2013). Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB. *Biochemistry*, 52(45), 7999–8011. doi:10.1021/bi401216w
- Chen, J., & Mishra, L. (2013). Targeting TGF- β signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 17(7), 743–760. doi:10.1517/14728222.2013.782287
- Janoštiak, R., Brábek, J., Auernheimer, V., Tatárová, Z., Lautscham, L. a, Dey, T., ... Rösel, D. (2014). CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(4), 727–44. doi:10.1007/s00018-013-1450-x
- Janoštiak, R., Pataki, A. C., Brábek, J., & Rosel, D. (2014). Mechanosensors in integrin signaling: The emerging role of p130Cas. *European Journal of Cell Biology*, 93(10–12), 445–454. doi:10.1016/j.ejcb.2014.07.002
- Janoštiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hanks, S. K., Rösel, D., & Brábek, J. (2011). Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), 4256–67. doi:10.1091/mbc.E11-03-0207
- Jeong, D. E., Lee, E. K., Song, W. K., & Kim, W. (2014). The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130Cas antagonizes the action of MyoD during myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(4), 509–13. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.085
- Kang, Y. S., Jeong, D. E., Lee, E. K., Song, W. K., & Kim, W. (2013). P130Cas controls the susceptibility of cancer cells to TGF-beta-induced growth inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(1), 116–121. doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.037
- Kang, Y. S., Kim, W., Huh, Y. H., Bae, J., Kim, J. S., & Song, W. K. (2011). P130cas attenuates epidermal growth factor (EGF) receptor internalization by modulating EGF-triggered dynamin phosphorylation. *PLoS ONE*, 6(5). doi:10.1371/journal.pone.0020125
- Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Wang, H.-C. R., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1991). The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110. *The EMBO Journal*, 10(7), 1689–98.
- Kettenbach, A. N., Schweppe, D. K., Faherty, B. K., Pechenick, D., Pletnev, A. A., & Gerber, S. A. (2011). Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Science Signaling*, 4(179), rs5. doi:10.1126/scisignal.2001497
- Kim, W., Kang, Y. S., Kim, J. S., Shin, N.-Y., Hanks, S. K., & Song, W. K. (2008). The Integrin-coupled Signaling Adaptor p130Cas Suppresses Smad3 Function in Transforming Growth Factor- beta Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1). doi:10.1091/mbc.E07
- Kim, W., Kook, S., Kim, D. J., Teodorof, C., & Song, W. K. (2004). The 31-kDa caspase-generated cleavage product of p130cas functions as a transcriptional repressor of E2A in apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8333–42. doi:10.1074/jbc.M312026200

- Klemke, R. L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P. C., Vuori, K., & Cheresch, D. A. (1998). CAS/Crk coupling serves as a “molecular switch” for induction of cell migration. *Journal of Cell Biology*, *140*(4), 961–972. doi:10.1083/jcb.140.4.961
- Kong, C., Wang, C., Wang, L., Ma, M., Niu, C., Sun, X., ... Huang, B. (2011). NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PloS One*, *6*(7), e22666. doi:10.1371/journal.pone.0022666
- Kook, S., Shim, S. R., Choi, S. J., Ahnn, J. A., Kim, J. Il, Eom, S. H., ... Song. (2000). Caspase-mediated cleavage of p130cas in etoposide-induced apoptotic Rat-1 cells. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(March), 929–939.
- Kraus, M., Dolinski, B., Rosahl, T. W., & Magee, J. a. (2014). Protein kinase N3 deficiency impedes PI3-kinase pathway-driven leukemogenesis without affecting normal hematopoiesis. *Leukemia*, *29*(1), 255–258. doi:10.1038/leu.2014.278
- Lachmann, S., Jevons, A., De Rycker, M., Casamassima, A., Radtke, S., Collazos, A., & Parker, P. J. (2011). Regulatory domain selectivity in the cell-type specific PKN-dependence of cell migration. *PloS One*, *6*(7), e21732. doi:10.1371/journal.pone.0021732
- Laurin, M., & Coté, J.-F. (2014). Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes & Development*, 533–547. doi:10.1101/gad.236349.113
- Law, S. F., Estojak, J., Wang, B., Mysliwiec, T., Kruh, G., & Golemis, E. A. (1996). Human Enhancer of Filamentation 1 , a Novel p130Cas -Like Docking Protein , Associates with Focal Adhesion Kinase and Induces Pseudohyphal Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(7), 3327–3337.
- Law, S. F., O’Neill, G. M., Fashena, S. J., Einarson, M. B., & Golemis, E. A. (2000). The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(14), 5184–95.
- Lebrun, J.-J. (2012). The Dual Role of TGF- β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*, *2012*, 1–28. doi:10.5402/2012/381428
- Leenders, F., Möpert, K., Schmiedeknecht, A., Santel, A., Czauderna, F., Aleku, M., ... Klippel, A. (2004). PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *The EMBO Journal*, *23*(16), 3303–13. doi:10.1038/sj.emboj.7600345
- Li, E., Stupack, D. G., Brown, S. L., Klemke, R., Schlaepfer, D. D., & Nemerow, G. R. (2000). Association of p130CAS with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Mediates Adenovirus Cell Entry. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(19), 14729–14735. doi:10.1074/jbc.275.19.14729
- Li, L., Okura, M., & Imamoto, A. (2002). Focal Adhesions Require Catalytic Activity of Src Family Kinases To Mediate Integrin-Matrix Adhesion Focal Adhesions Require Catalytic Activity of Src Family Kinases To Mediate Integrin-Matrix Adhesion. *Mol Cell Biol*, *22*(4), 1203–1217. doi:10.1128/MCB.22.4.1203
- Li, X., & Earp, S. H. (1997). Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Liu, F., Hill, D. E., & Chernoff, J. (1996). Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130Cas. *Journal of Biological Chemistry*.

- Mace, P. D., Wallez, Y., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Robinson, H., Pasquale, E. B., & Riedl, S. J. (2012). NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling. *Nature Structural Molecular Biology*, *18*(9), 1199–1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., & Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Molecular Cell*, *4*(5), 793–803. doi:10.1016/S1097-2765(00)80389-5
- Makkinje, A., Near, R. I., Infusini, G., Vanden Borre, P., Bloom, A., Cai, D., ... Lerner, A. (2009). AND-34/BCAR3 regulates adhesion-dependent p130Cas serine phosphorylation and breast cancer cell growth pattern. *Cellular Signalling*, *21*(9), 1423–35. doi:10.1016/j.cellsig.2009.05.006
- Makkinje, A., Vanden Borre, P., Near, R. I., Patel, P. S., & Lerner, A. (2012). Breast cancer anti-estrogen resistance 3 (BCAR3) protein augments binding of the c-Src SH3 domain to Crk-associated substrate (p130cas). *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(33), 27703–14. doi:10.1074/jbc.M112.389981
- Matsuda, M., Mayer, B. J., Fukui, Y., & Hanafusa, H. (1990). Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science (New York, N.Y.)*, *248*(4962), 1537–9.
- Metzger, E., Müller, J. M., Ferrari, S., Buettner, R., & Schüle, R. (2003). A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: Implications for PRK in prostate cancer. *EMBO Journal*, *22*(2), 270–280. doi:10.1093/emboj/cdg023
- Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., ... Schüle, R. (2008). Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nature Cell Biology*, *10*(1), 53–60. doi:10.1038/ncb1668
- Minegishi, M., Tachibana, K., Sato, T., Iwata, S., Nojima, Y., & Morimoto, C. (1996). Structure and Function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated Substrate-related Protein That is involved in β 1 Integrin-mediated Signaling in Lymphocytes. *J. Exp. Med.*, *184*(October).
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Review of Molecular Cell Biology*, *6*(1), 56–68. doi:10.1038/nrm1549
- Morrison, D. K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology*, *19*(1), 16–23. doi:10.1016/j.tcb.2008.10.003
- Mukai, H. (2003). The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *Journal of Biochemistry*, *133*(1), 17–27. doi:10.1093/jb/mvg019
- Mukai, H., Muramatsu, A., Mashud, R., Kubouchi, K., Tsujimoto, S., Hongu, T., ... Sugiura, R. (2016). PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice. *Scientific Reports*, *6*(April 2015), 18979. doi:10.1038/srep18979
- Mukai, H., & Ono, Y. (1994). A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X84713131>
- Nakamoto, T., Sakai, R., Ozawa, K., Yazaki, Y., & Hirai, H. (1996). Direct Binding of C-terminal Region of p130 to SH2 and SH3 Domains of Src Kinase. *Journal of Biological Chemistry*.

- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 5(12), 2375–90. doi:10.1002/pro.5560051201
- Neal, C. L., Yao, J., Yang, W., Zhou, X., Nguyen, N. T., Lu, J., ... Yu, D. (2009). 14-3-3 ζ overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival. *Cancer Research*, 69(8), 3425–3432. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2765.14-3-3
- Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T., & Kondo, T. (2007). A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *The EMBO Journal*, 26(17), 4029–37. doi:10.1038/sj.emboj.7601832
- O’Sullivan, A. G., Mulvaney, E. P., Hyland, P. B., & Kinsella, B. T. (2015). Protein kinase C-related kinase 1 and 2 play an essential role in thromboxane-mediated neoplastic responses in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(28), 26437–26456. doi:10.18632/oncotarget.4664
- Oishi, K., Mukai, H., Shibata, H., Takahashi, M., & Ona, Y. (1999). Identification and characterization of PKN β , a novel isoform of protein kinase PKN: expression and arachidonic acid dependency are different from those of PKN α . *Biochemical and Biophysical Research*, 814, 808–814. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X99911166>
- Owen, D., Lowe, P. N., Nietlispach, D., Brosnan, C. E., Chirgadze, D. Y., Parker, P. J., ... Mott, H. R. (2003). Molecular dissection of the interaction between the small G proteins Rac1 and RhoA and protein kinase C-related kinase 1 (PRK1). *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50578–87. doi:10.1074/jbc.M304313200
- Park, T.-J., & Curran, T. (2013). Essential roles of Crk and CrkL in fibroblast structure and motility. *Oncogene*, (October 2012), 1–12. doi:10.1038/onc.2013.453
- Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 8(1), 23. doi:10.1186/1478-811X-8-23
- Pearce, L. R., Komander, D., & Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(1), 9–22. doi:10.1038/nrm2822
- Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1995). Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10678–82.
- Pozuelo Rubio, M., Geraghty, K. M., Wong, B. H. C., Wood, N. T., Campbell, D. G., Morrice, N., & Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-Affinity Purification of Over 200 Human Phosphoproteins Reveals New Links To Regulation of Cellular Metabolism, Proliferation and Trafficking. *The Biochemical Journal*, 379(Pt 2), 395–408. doi:10.1042/BJ20031797
- Pratt, S. J., Epple, H., Ward, M., Feng, Y., Braga, V. M., & Longmore, G. D. (2005). The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration. *Journal of Cell Biology*, 168(5), 813–824. doi:10.1083/jcb.200406083
- Pugacheva, E. N., & Golemis, E. A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nature Cell Biology*, 7(10), 937–946. doi:10.1038/ncb1309.The

- Quilliam, A. L., Lambert, Q. T., Mickelson-Young, L. A., Westwick, J. K., Sparks, A. B., Kay, B. K., ... Der, C. J. (1996). Isolation of a NCK-associated Kinase, PRK2, an SH3-binding Protein and Potential Effector of Rho Protein Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 28772–28776. doi:10.1074/jbc.271.46.28772
- Radha, V., Mitra, A., Dayma, K., & Sasikumar, K. (2011). Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor. *Bioscience Reports*, 31(4), 231–244. doi:10.1042/BSR20100094
- Regelmann, A. G., Danzl, N. M., Wanjalla, C., & Alexandropoulos, K. (2006). The hematopoietic isoform of Cas-Hef1-associated signal transducer regulates chemokine-induced inside-out signaling and T cell trafficking. *Immunity*, 25(6), 907–18. doi:10.1016/j.immuni.2006.09.014
- Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Wang, H.-C. R., & Parsons, J. T. (1989). Stable association of activated pp60src with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9), 3951–8.
- Riggins, R. B., Deberry, R. M., Toosarvandani, M. D., & Bouton, A. H. (2003). Src-Dependent Association of Cas and p85 Phosphatidylinositol 3 V -Kinase in v- crk -Transformed Cells, 1(April), 428–437.
- Riggins, R. B., Schrecengost, R. S., Guerrero, M. S., & Bouton, A. H. (2007). Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Letters*, 256(1), 1–24. doi:10.1016/j.canlet.2007.03.016
- Ring, A., & Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, 643–658. doi:10.1677/erc.1.00776
- Rivera, G. M., Antoku, S., Gelkop, S., Shin, N. Y., Hanks, S. K., Pawson, T., & Mayer, B. J. (2006). Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9536–41. doi:10.1073/pnas.0603786103
- Ruest, P. J., Shin, N.-Y., Polte, T. R., Zhang, X., & Hanks, S. K. (2001). Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7641–7652. doi:10.1128/MCB.21.22.7641
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., ... Hirai, H. (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *The EMBO Journal*, 13(16), 3748–56.
- Sakakibara, A., Ohba, Y., Kurokawa, K., Matsuda, M., & Hattori, S. (2002). Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation. *J Cell Sci*, 115(Pt 24), 4915–4924. doi:10.1242/jcs.00207
- Saleh, S. Al, Mulla, F. Al, & Luqmani, Y. A. (2011). Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PLoS One*, 6(6). doi:10.1371/journal.pone.0020610
- Santel, A., Aleku, M., Roder, N., Mopert, K., Durieux, B., Janke, O., ... Kaufmann, J. (2010). Atu027 Prevents Pulmonary Metastasis in Experimental and Spontaneous Mouse Metastasis Models. *Clinical Cancer Research*, 16(22), 5469–5480. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1994
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., ... Marshall, C. J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135(3), 510–23. doi:10.1016/j.cell.2008.09.043

- Sawada, Y., Tamada, M., Dublin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., & Sheetz, M. P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, *127*(5), 1015–1026. doi:10.1016/j.cell.2006.09.044.Force
- Seo, S., Asai, T., Saito, T., Suzuki, T., Morishita, Y., Nakamoto, T., ... Hirai, H. (2005). Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *Journal of Immunology*, *175*(6), 3492–501.
- Shibata, H., Oishi, K., Yamagiwa, A., Matsumoto, M., Mukai, H., & Ono, Y. (2001). PKNbeta interacts with the SH3 Domains of Graf and a Novel Graf Related Protein , Graf 2 , Which Are GTPase Activating Proteins for Rho. *J. Biochem.*, *31*, 23–31.
- Shim, S. R., Kook, S., Kim, J. Il, & Keun Song, W. (2001). Degradation of focal adhesion proteins paxillin and p130cas by caspases or calpains in apoptotic rat-1 and L929 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *286*(3), 601–8. doi:10.1006/bbrc.2001.5441
- Schlaepfer, D. D., Broome, M. A., & Hunter, T. (1997). Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(3), 1702–1713.
- Schrecengost, R. S., Riggins, R. B., Thomas, K. S., Guerrero, M. S., & Bouton, A. H. (2007). Breast cancer antiestrogen resistance-3 expression regulates breast cancer cell migration through promotion of p130Cas membrane localization and membrane ruffling. *Cancer Research*, *67*(13), 6174–6182. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3455
- Schuh, N. R., Guerrero, M. S., Schrecengost, R. S., & Bouton, A. H. (2010). BCAR3 regulates Src/p130Cas association, Src kinase activity, and breast cancer adhesion signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(4), 2309–2317. doi:10.1074/jbc.M109.046631
- Schultheis, B., Strumberg, D., Santel, A., Vank, C., Gebhardt, F., Keil, O., ... Drevs, J. (2014). First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(36), 4141–8. doi:10.1200/JCO.2013.55.0376
- Singh, M. K., Dadke, D., Nicolas, E., Serebriiskii, I. G., Apostolou, S., Canutescu, A., ... Golemis, E. A. (2008). A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(April), 1627–1636. doi:10.1091/mbc.E07
- Smith, H. W., Marra, P., & Marshall, C. J. (2008). uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *Journal of Cell Biology*, *182*(4), 777–790. doi:10.1083/jcb.200712050
- Tamada, M., Sheetz, M. P., & Sawada, Y. (2004). Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental Cell*, *7*(5), 709–718. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.021
- Tikhmyanova, N., & Golemis, E. A. (2011). NEDD9 and BCAR1 negatively regulate E-cadherin membrane localization, and promote E-cadherin degradation. *PLoS ONE*, *6*(7), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0022102
- Tikhmyanova, N., Little, J. L., & Golemis, E. A. (2011). Cas Proteins in normal and Pathological Cell Growth Control. *Cell Mol Life Sci.*, *67*(7), 1025–1048. doi:10.1007/s00018-009-0213-1.Cas

- Turner, E. C., Kavanagh, D. J., Mulvaney, E. P., McLean, C., Wikström, K., Reid, H. M., & Kinsella, B. T. (2011). Identification of an interaction between the TPalpha and TPbeta isoforms of the human thromboxane A2 receptor with protein kinase C-related kinase (PRK) 1: implications for prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 15440–57. doi:10.1074/jbc.M110.181180
- Unsal-Kacmaz, K., Rangunathan, S., Rosfjord, E., Dann, S., Upeslakis, E., Grillo, M., ... Klippel, A. (2012). The interaction of PKN3 with RhoC promotes malignant growth. *Molecular Oncology*, 6(3), 284–98. doi:10.1016/j.molonc.2011.12.001
- Vanden Borre, P., Near, R. I., Makkinje, A., Mostoslavsky, G., & Lerner, A. (2011). BCAR3/AND-34 can signal independent of complex formation with CAS family members or the presence of p130Cas. *Cellular Signalling*, 23(6), 1030–40. doi:10.1016/j.cellsig.2011.01.018
- Vuori, K., Hirai, H., Aizawa, S., & Ruoslahti, E. (1996). Induction of p130Cas Signaling Complex Formation upon Integrin-Mediated Cell Adhesion: a Role for Src Family Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2606–2613.
- Wallez, Y., Mace, P. D., Pasquale, E. B., & Riedl, S. J. (2012). NSP-CAS Protein Complexes: Emerging Signaling Modules in Cancer. *Genes & Cancer*, 3(5-6), 382–93. doi:10.1177/1947601912460050
- Wallez, Y., Riedl, S. J., & Pasquale, E. B. (2014). Association of the BCAR1 and BCAR3 Scaffolding Proteins in Cell Signaling and Antiestrogen Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M113.541839
- Wang, H., Linghu, H., Wang, J., Che, Y. L., Xiang, T. X., Tang, W. X., & Yao, Z. W. (2010). The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3. *Tumor Biology*, 31(1), 59–67. doi:10.1007/s13277-009-0009-9
- Wei, L., Yang, Y., Zhang, X., & Yu, Q. (2004). Cleavage of p130Cas in anoikis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 91(2), 325–35. doi:10.1002/jcb.10760
- Wendt, M. K., Smith, J. A., & Schiemann, W. P. (2009). p130Cas is required for mammary tumor growth and transforming growth factor-beta-mediated metastasis through regulation of Smad2/3 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34145–34156. doi:10.1074/jbc.M109.023614
- Wisniewska, M., Bossenmaier, B., Georges, G., Hesse, F., Dangel, M., Künkele, K.-P., ... Engh, R. a. (2005). The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *Journal of Molecular Biology*, 347(5), 1005–14. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.017
- Yamakita, Y., Totsukawa, G., Yamashiro, S., Fry, D., Zhang, X., Hanks, S. K., & Matsumura, F. (1999). Dissociation of FAK/p130CAS/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *The Journal of Cell Biology*, 144(2), 315–324.
- Yokoyama, N., & Miller, W. T. (2001). Protein phosphatase 2A interacts with the Src kinase substrate p130(CAS). *Oncogene*, 20(42), 6057–65. doi:10.1038/sj.onc.1204735
- Zheng, Y., Asara, J. M., & Tyner, A. L. (2012). Protein-tyrosine kinase 6 promotes peripheral adhesion complex formation and cell migration by phosphorylating p130 CRK-associated substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), 148–158. doi:10.1074/jbc.M111.298117