

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Oddělení fyziologie a biochemie buňky

Bakalářská práce

Funkční význam fosforylace tyrosinových zbytků
v SH3 doméně

Martin Sztacho

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

2007

Poděkování patří mému školiteli **RNDr. Danielovi Röselovi, PhD.** za jeho trpělivý přístup a věcné rady. Dále **RNDr. Janu Brábkovi, PhD.** za konzultace faktického charakteru. V neposlední řadě **Mgr. Marianovi Novotnému, PhD.** za pomoc při počítačovém modelování struktur SH3 domén.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Funkční význam fosforylace tyrosinových zbytků v SH3 doméně** vypracoval samostatně s pomocí citované literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

květen 2007

Martin Sztacho

Abstrakt

Tato práce sleduje vliv fosforylace hlavních konzervovaných tyrosinů na vazebné schopnosti SH3 domény. SH3 doména je protein-proteinová interakční doména, která je strukturní součástí řady proteinů buněčné signalizace a proteinů cytoskeletárních. Dokumentován je její význam v inter- i intramolekulárních interakcích. SH3 doména váže sekvenční motiv polyprolinového helixu typu II. (PPII). Tato struktura je unikátní svou pseudo-symetrií, která jí dovoluje na povrchu SH3 domény zaujmout dvě opačné orientace. Podle toho, v které orientaci se tento PPII ligand váže na SH3 doménu, rozeznáváme ligand I., resp. II. třídy. Tato literární rešerše poukazuje na obecně negativní vliv tyrosinové fosforylace na vaznost SH3 domény. Dále nastiňuje možný trend tolerance vazby některých ligandů I. třídy po fosforylaci daných povrchových tyrosinů.

Abstract

This work shows a possible influence of tyrosine phosphorylation on SH3 domain binding capacity. SH3 domain is a protein-protein interaction domain, which is a structural part of many signal transduction proteins and cytoskeleton-associated proteins. It is important for both intermolecular and intramolecular interactions. The SH3 domain binds a type II. (PPII) polyproline-helix. This unique structure permits binding of the ligand in two opposite orientations on a SH3 domain surface. Ligands are divided in two classes - I., resp. II. according to their orientation on the SH3 surface. This bibliographic search shows the possible universal impact of a tyrosine phosphorylation on SH3 binding. Furthermore, it suggests a possible tendency for the tolerance of some class I. ligands after a phosphorylation of tyrosine residues.

<u>BAKALÁŘSKÁ PRÁCE</u>	1
ABSTRAKT	4
KLÍČOVÁ SLOVA	6
SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD	7
2. MODULÁRNÍ INTERAKČNÍ DOMÉNY	8
3. SH3 DOMÉNA JE STRUKTURNÍ SOUČÁSTÍ PROTEINŮ SIGNÁLNÍCH KASKÁD A PROTEINŮ CYTOSKELETÁRNÍCH	9
4. STAVBA SH3 DOMÉNY	10
5. VAZEBNÝ POVRCH SH3 DOMÉNY	11
6. VLASTNOSTI PPII - HELIXU A VÝJIMEČNOST PROLINU	15
6.1. URČENÍ ORIENTACE LIGANDU NA SH3 DOMÉNĚ	16
6.2. VÝZNAM PPII - HELIXU V SEKVENCI VAZEBNÉHO LIGANDU	18
7. NON-PXXP LIGANDY	20
8. DIMERNÍ FORMY SH3 DOMÉN	21
9. TYROSINY NA HYDROFOBNÍM VAZEBNÉM POVRCHU SH3 DOMÉNY	23
9.1 TYROSIN V RT-SMYČCE	24
9.2. TYROSIN V DISTALNÍ- SMYČCE	28
9.3. TYROSIN V 3 ₁₀ -HELIXU	30
10. ZÁVĚR	32
11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33

Klíčová slova

SH3 doména, protein-proteinové interakce, fosforylace, ligand, polyprolinový helix typu II.

Seznam zkratek

PPII – Polyprolinový helix typu II.

PRD – Domény rozpoznávající prolin (prolin-recognition domains)

SH3 – Homolog třetí strukturní domény kinázy Src (Src homology 3)

1. Úvod

Porozumění proteinovým interakčním doménám je důležité z hlediska pochopení mechanismů buněčné signalizace. V této práci je nastíněna problematika vaznosti jednoho zástupce těchto proteinových domén – SH3 (Src homology 3). SH3 doména byla poprvé popsána jako třetí strukturní doména kinázy Src. Odtud pojmenování Src homology 3. Diskutována budou fakta obecná i zatím poněkud málo prozkoumaná. Jako hlavní model SH3 domén bude diskutována SH3 doména kinázy Src, která byla popsána jako první a je patrně nejlépe strukturně charakterizována. V hlavní části práce bude poukázáno na důležitost tyrosinových zbytků na vazebném povrchu SH3 domén a to především v kontextu, jak tyto zbytky mohou regulovat schopnost vazby a orientaci ligandu na SH3 doméně.

2. Modulární interakční domény

Modulární proteinové interakční domény zajišťují interakce proteinů s jinými biologicky významnými molekulami, jako jsou např. lipidy, nukleové kyseliny či proteiny.

Významnou podskupinou modulárních domén jsou tzv. protein interakční domény zajišťující interakce protein-proteinového charakteru.

Do této podskupiny patří kromě jiných i tzv. PRD (prolin-recognition domains), které rozpoznávají a interagují se sekvencemi obsahujícími prolin-bohatý motiv. Mohou se uplatňovat intra- i intermolekulárně. Patří sem SH3, WW, GYF, UEV a podobné domény. Rozdílné rodiny PRD preferují různé sekvenční motivy. Tyto motivy se označují jako kanonické sekvence. Hlavním znakem těchto motivů je přítomnost jednoho či více prolinových zbytků, které umožňují vytvoření zvláštní konformace polyprolinového helixu typu II (PPII-helixu). SH3 domény preferují především PxxP motiv (kde x je jakákoliv aminokyselina), na rozdíl od např. WW domén, které dávají přednost sekvencím PPLP či PPxY. (shrnutí Shawn S.-C. Li., 2005; Bedford *et al.*, 1997)

V porovnání s jinými protein-proteinovými interakčními agens např. protilátkami, je specifita a síla interakce PRD výrazně nižší ($K_D = 10-100 \mu\text{M}$). (shrnutí Shawn S.-C. Li., 2005) SH3 doména je jediná, která zde bude diskutována.

3. SH3 doména je strukturní součástí proteinů signálních kaskád a proteinů cytoskeletárních

SH3 doména je součástí obrovského množství cytoskeletárních proteinů nebo proteinů zabezpečujících intracelulární přenos signálu. Velikou skupinou obsahující množství modulárních domén včetně SH3 domény jsou tzv. adaptorové proteiny jako je např. protein Grb2. Tyto proteiny signálních kaskád typicky postrádají enzymatickou aktivitu. Jejich funkcí je zajištění protein-proteinových interakcí, s případně následným formováním multiproteinových komplexů.

SH3 doména hraje rozhodující roli v řadě biologických procesů např. ve změně lokalizace nejrůznějších komponentů signálních kaskád uvnitř buňky (jako součást tzv. „scaffolding proteinů“), v regulaci enzymů prostřednictvím intramolekulárních interakcí (např. intramolekulární regulace kinázy Src), či ve zvyšování místní koncentrace proteinů (např. v proteinech „lipidických raftů“). Domény jednotlivých proteinů se různí co do přesné stavby i rozeznávané prolin-bohaté sekvence.

4. Stavba SH3 domény

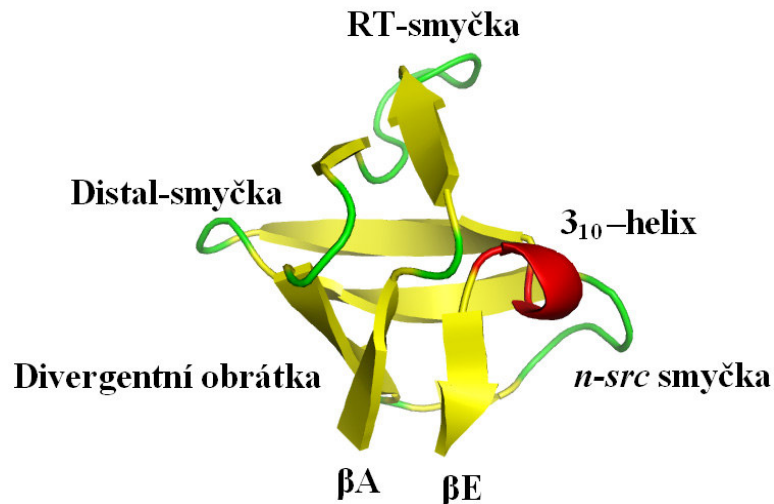
Reprezentativní SH3 doménu kinázy Src tvoří 57 aminokyselinových zbytků. Nabývá globulárního uspořádání β -barelu sestávající z pěti β -řetězců (β A- β E). β -řetězce tvoří dva navzájem kolmé antiparalelní β -listy tvořící hydrofobní jádro domény. Pro usnadnění popisu SH3 domény, bude doména rozdělena do šesti strukturních oblastí (viz *obr 1.*).

1) **N- a C-koncové β -řetězce** (β A a β E) N- a C-konec polypeptidového řetězce SH3 domény se vzájemně přibližují a tvoří antiparalelní β -list stabilizovaný interakcemi postranních aminokyselinových řetězců.

2) **Krátký 3_{10} -helix** před β -řetězcem (β E). Tento helix zapříčiňuje 90° úhel, který vzájemně svírají oba β -listy.

3) **RT-smyčka** 12 zbytků dlouhá velice flexibilní oblast mezi β -řetězcem (β A) a tzv. divergentní obrátkou, je funkčně důležitá pro vazbu ligandu na doméně.

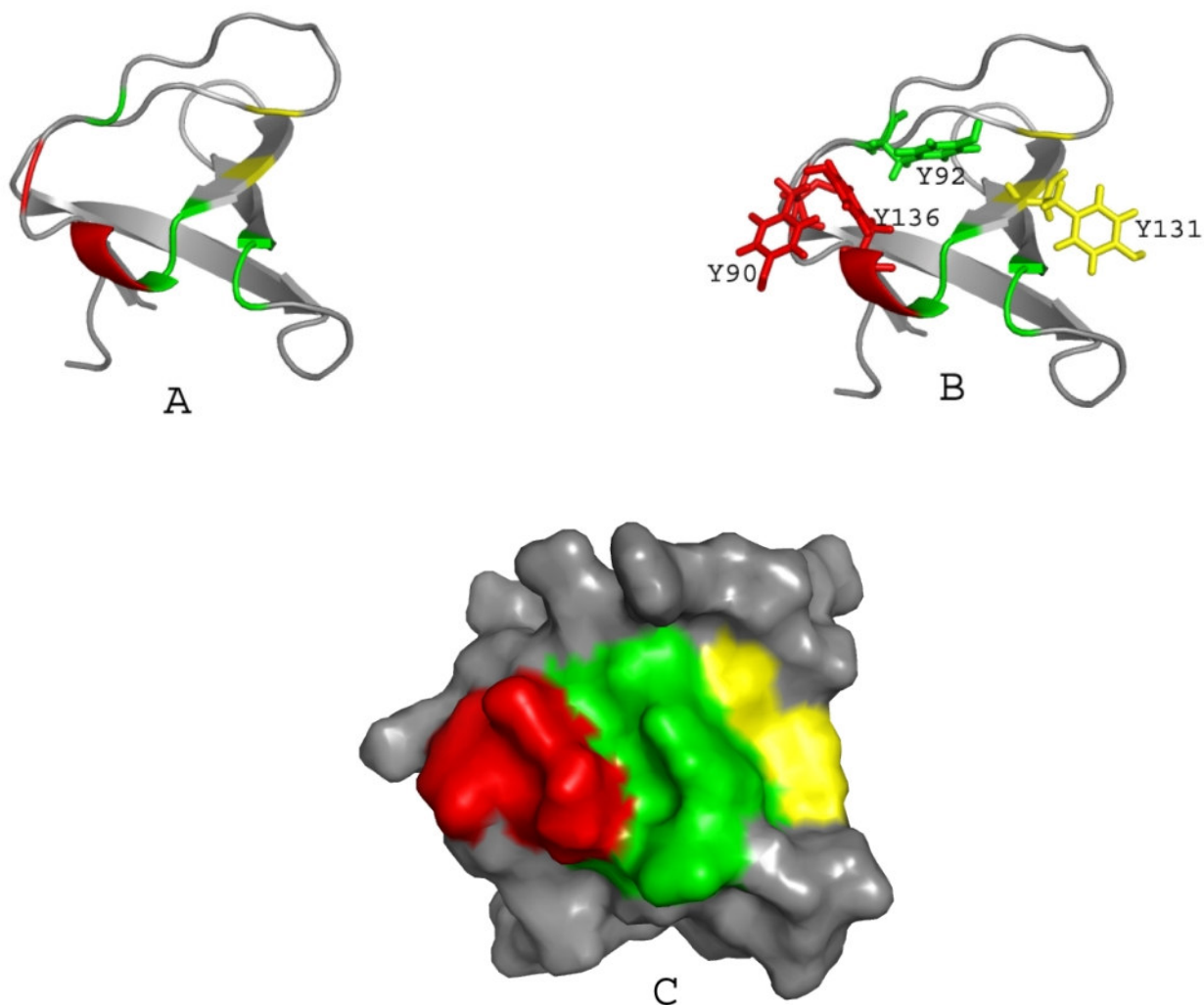
4) **Divergentní obrátka** zajišťuje přechod RT-smyčky do centra trojvláknového β -listu a je tvořena 5) *n-src* smyčkou a 6) **distální-smyčkou**. (Riddle *et al.*, 1999; Kaishan *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1997)



Obr.1 Schématicky znázorněná struktura SH3 domény: Žlutě- β -řetězce. Červeně- α -helix. Zeleně- smyčky. (PDB kód: 1JGFC. Data převzata z Kohda *et al.*, 1994; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

5. Vazebný povrch SH3 domény

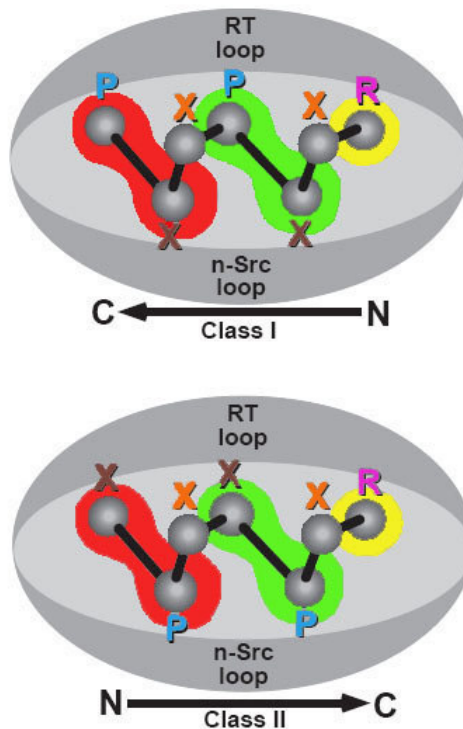
Vazebné místo SH3 domény je jakési sedlo tvořené převážně valem RT-smyčkou a *n-src* smyčkou. Uvnitř tohoto sedla jsou vesměs hydrofobní aminokyseliny, z nichž některé jsou vysoce konzervované (viz *obr. 2*). Mezi tyto, pro vznik vlastní vazebné interakce, velice důležité zbytky např. patří Tyr 90, Tyr 92, Asp 99, Trp 118, Tyr 131, Pro 133, Asn 135, Tyr 136 (číslováno pro myši Src). (shrnutí v Agrawal *et al.*, 2002; shrnutí v Mayer, 2001)



Obr. 2 Modely SH3 domény: *A*) schématická struktura, *B*) zobrazené tyrosinové zbytky, *C*) povrchová struktura SH3. Červeně- vazebná kapsa formovaná zbytky Y90, N135, Y136. Zeleně- vazebná kapsa formovaná zbytky Y92, W118, P133. Žlutě- vazebná kapsa formovaná zbytky D99, Y131. (PDB kód: 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

Záměny některých z těchto zbytků jsou zodpovědné za preferenci různých PPII ligandů mezi různými SH3 doménami. Při mutacích výše zmíněných aminokyselinových zbytků je často ovlivněna schopnost SH3 domény nadále vázat její přirozené interakční partnery. To má často za následek selhání či nějakou aberaci signální dráhy, které se protein obsahující danou SH3 doménu účastní. Fosforylovatelnost některých konzervovaných zbytků, především tyrosinů, je často využívána k regulaci vazebné schopnosti SH3 domén *in natura*.

Na hydrofobním povrchu tvořeném RT-smyčkou a *n-src* smyčkou lze rozlišit celkem tři vazebné kapsy. Vyjma třetí tzv. specifitní kapsy jsou tyto kapsy při vazbě s PPII ligandem obsazeny dipeptidem sestávajícím z většinou alifatické aminokyseliny a prolinu. Specifitní kapsa je zodpovědná za určení orientace ligandu na SH3 doméně pomocí vazby tzv. „kotvícího zbytku“, kterým je obvykle arginin (viz obr 3.).

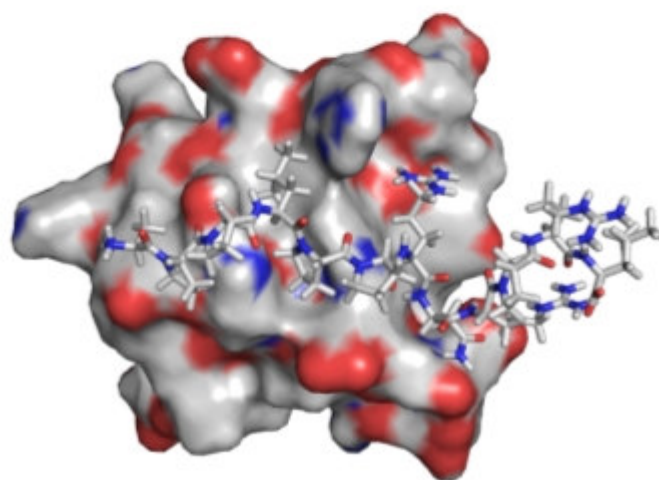
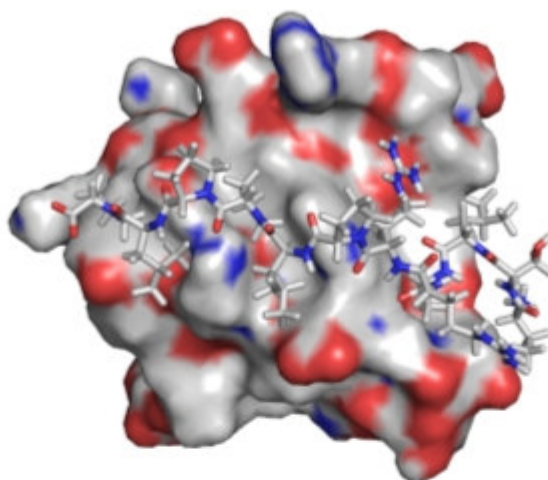


Obr. 3 Určení orientace ligandu na povrchu SH3 domény: Červeně- vazebná kapsa formovaná zbytky Y90, N135, Y136. Zeleně- vazebná kapsa formovaná zbytky Y92, W118, P133. Žlutě- vazebná kapsa formovaná zbytky D99, Y131. Modré P- prolinové zbytky nezbytné pro vazbu PxxP core. Oranžové X- u ideálního ligandu místo pro přemostňující prolin. Fialové R- kotvící zbytek. Hnědé X- místo interakce neprolinového zbytku s SH3 doménou. (převzato a upraveno z Mayer, 2001)

Jako tzv. core sekvence se obecně značí PxxP a je to sekvence rozpoznávaná vazebným povrchem SH3 domény. Optimální ligand obsahuje ještě další prolinové zbytky než jen ty v PxxP core. Tyto další proliny propojují oba dipeptidy uvnitř vazebných kapes. Tento sekvenční motiv se značí RpxPpxP pro ligand I. resp. xPpxPpR pro II. třídy (kde x je jakákoliv aminokyselina, p je tzv. přemostující prolin a R je tzv. „kotva“ většinou arginin).

Patrně nejvíce určuje specifickost SH3 domény rozsáhlejší vazebný povrch domény, se kterým přichází do kontaktu ligand. Pokud daná SH3 doména neváže nějaký předložený ligand, je to z velké části způsobeno tím, že tento ligand nemá odpovídající tzv. „lemující sekvenci“. Lemující sekvence sestává z aminokyselin obklopujících vlastní PxxP motiv na ligandu. Ligand s nesprávnou lemující sekvencí má velmi sníženou afinitu k SH3 doméně. Pokud lemující sekvence neodpovídá rozsáhlejšímu povrchu domény, tak ligand nemůže zaujmout na SH3 doméně požadovanou konformaci a tím je afinita domény k tomuto ligandu významně oslabena (viz obr. 4).

Přítomnost vlastní core sekvence PxxP ligandu není dostatečnou podmínkou pro vazbu na SH3 doménu. Avšak ligandy, které neobsahují core sekvenci se na SH3 doménu neváží vůbec. Existují však nečetné výjimky (viz dále). Toto podporuje myšlenku, že core sekvence PxxP slouží pro prvotní navázání ligandu. Dále aminokyselinová „kotva“ určí orientaci ligandu a lemující sekvence zajistí vlastní specifickost a vyšší stupeň afinity SH3 domény.(Feng *et al.*, 1995)



Obr. 4 Vazba ligandu I. třídy, resp. II. třídy na povrchu SH3 domény. Barvy prvků: C, H, N, O (PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

6. Vlastnosti PPII - helixu a výjimečnost prolinu

Jak již bylo řečeno, oblast vázaná SH3 doménou obsahuje krátkou prolin-bohatou konzervovanou sekvenci. Prolin-bohaté sekvence zaujímají protáhlou konformaci, která dovoluje kontakt s SH3 doménou. Tato konformace má podobu levotočivé šroubovice nazývané PPII-helix. Na příčném řezu zbytky tvoří přibližně vrcholy trojúhelníku. Helix má tedy tři zbytky na obrátku. Tato skutečnost má za následek to, že každá třetí aminokyselina je ve stejném vrcholu trojúhelníku. PPII struktura svojí základnou kontaktuje vazebný povrch SH3 domény. (shrnutο v Mayer, 2001; Feng *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1994)

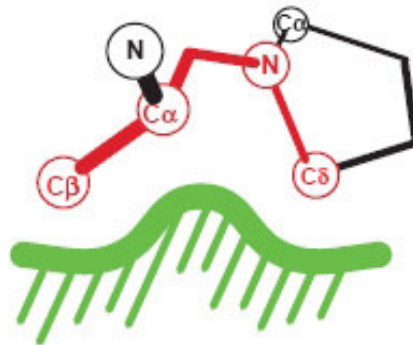
6.1. Určení orientace ligandu na SH3 doméně

Ligandy SH3 domény jsou schopné vazby ve dvou orientacích „+“ (tzv. ligandy I. třídy) a „-“, (tzv. ligandy II. třídy) (viz *obr. 4 a 6*). Za preferenci vazby ligandu v té či oné orientaci je zodpovědná především orientace „kotvícího zbytku“ vzhledem ke core sekvenci PxxP ligandu. Oba typy ligandu (I. i II. třídy) mohou tvořit vodíkové můstky mezi karbonylovým kyslíkem prolinu a povrchovými aminokyselinami na SH3 doméně. Je zajímavé, že k těmto interakcím u obou orientací dochází mezi analogickými zbytky na ligandu a vždy stejnými aminokyselinami na SH3 doméně. Tyto interakce se liší jen tím, že prolinový karbonyl interaguje a danou aminokyselinou na povrchu SH3 domény z opačné strany (viz *obr.5*). Toto je zjednodušeně podstata pseudo-symetrie PxxP ligandu. Vodíkové můstky jsou stereospecifické, avšak vzhledem k pseudo-symetrické stavbě obou typů PPII, nemají zásadní vliv na orientovanost ligandu na SH3 doméně. Tvorba vodíkových můstků tedy jen zapříčiňuje rozpoznání PPII-helix. (Lim *et al.*, 1994)

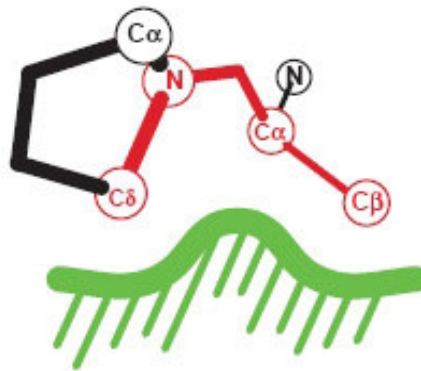
Za určení orientace je zodpovědný bazický zbytek na ligandu, umístěný mimo vlastní PxxP motiv. Tento zbytek je většinou arginin, lysin a méně často tyrosin. Jak již bylo zmíněno, je to jakási „kotva“ určující orientaci ligandu na SH3 doméně. Kotvící zbytek je umístěný N- či C-koncově vzhledem k PxxP motivu v závislosti na tom, do jaké třídy ligand spadá. Různé druhy SH3 domén pak mají na své RT-smyčce většinou asparagin či glutamát, který interaguje s „kotvou“ a tím určí orientaci ligandu. (Feng *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1994)

Je tedy zřejmé, že rozdíly v orientaci ligandu jsou určeny především umístěním kotvících aminokyselinových zbytků vzhledem ke core PxxP ligandu (viz *obr. 3*). (shrnuté v Argawal *et al.*, 2002)

Class I ligand



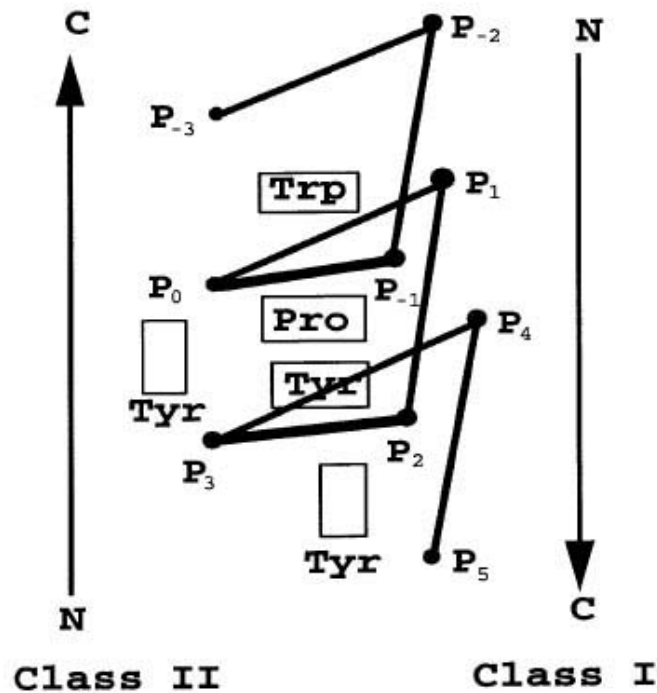
Class II ligand



Obr. 5 Ukázka interakce povrchu SH3 domény s prolinovým zbytkem.
(převzato z Mayer 2001)

6.2. Význam PPII - helixu v sekvenci vazebného ligandu

Další velice důležitý mechanismus určení orientace je založen na míře tolerance neprolinových postranních zbytků umístěných na konkrétních vazebných místech uvnitř hydrofobního povrchu SH3 domény. U většiny ligandů třídy I. jsou na vazebných místech P₋₁ a P₂ tolerovány aminokyseliny jako lysin, prolin, valin. Na místech P₀ a P₃ jsou naopak vyžadovány prolinové zbytky. Tolerance zbytků lysin, valin aj. na místech P₀ a P₃ u ligandů II. třídy je jakoby inverzní k předešlému případu. Pro vazbu ligandů II. třídy je tedy vyžadována přítomnost prolinu na místech P₋₁ a P₂ (viz obr. 6). (Lim *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994)



Obr. 6 Vazba PPII – helixu na vazebném povrchu SH3 domény s vyobrazenými pozicemi pro vazbu prolinů na PxxP core. (převzato a upraveno z Agrawal *et al.*, 2002)

Důvod proč SH3 a jiné polyprolin-vazebné domény specificky rozeznávají sekvence obsahující prolin, je v jedinečnosti prolinu. Bylo zjištěno, že vazebné domény mají dva požadavky na ligand:

1. přítomnost N-substituovaného zbytku na stanoveném místě v ligandu.
2. C^α-substituovaný zbytek předcházející zbytku N-substituovanému.

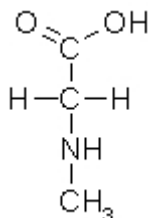
Ve výše zmíněném uspořádání, jsou obě substituované skupiny odděleny jen jedním atomem uhlíku. Toto uspořádání tvoří relativně pevnou strukturu schopnou umístění do hydrofobních kapes na vazebném povrchu domén. Prolin, jako jediná N-substituovaná aminokyselina splňuje obě sekvenční podmínky SH3 domény na ligand (viz *obr. 5*). (Nguyen *et al.*, 1998)

Některé vazebné sekvence obsahují např. pouze jeden prolin. Tyto interakce byly pozorovány např. u intramolekulární regulaci aktivity Src kinázy. (Xu *et al.*, 1997)

Přítomnost PPII-helixu je nezbytná patrně pouze z důvodu rozeznání ligandu. Peptid, který neobsahuje tuto sekvenci není rozeznán jako ligand a je tedy jeho interakce s SH3 doménou znemožněna.

7. Non-PxxP ligandy

Byly popsány uměle připravené ligandy neobsahující prolin na kritickém místě, které byly specificky rozeznávané SH3 i WW doménami. Prokázalo se, že SH3 domény v ligandech rozeznávají kromě prolinu např. sarcosine (viz obr. 7), který je též N-substituovaný. Tyto ligandy byly v mnoha případech vázány se stejnou či dokonce vyšší afinitou než přirozené ligandy, neboť byly schopny zaujmout svojí pozici hlouběji ve vazebné kapse domény. Tím pádem mohly postranní řetězce lépe interagovat s vazebným povrchem domény. (Nguyen *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1994)



Obr. 7 Vzorec sarcosine

In vivo je patrně rozhodující selektivita a výše afinity přirozených ligandů pro vyváženost poměru asociace/disociace ligandu. Pro adekvátní přenos signálu intracelulárními drahami, na kterém participují polyprolin-vazebné domény, je nezbytné, aby domény nevázaly ligand ani moc silně, ani příliš slabě. (Nguyen *et al.*, 1998; shrnuto v Lim, 1996)

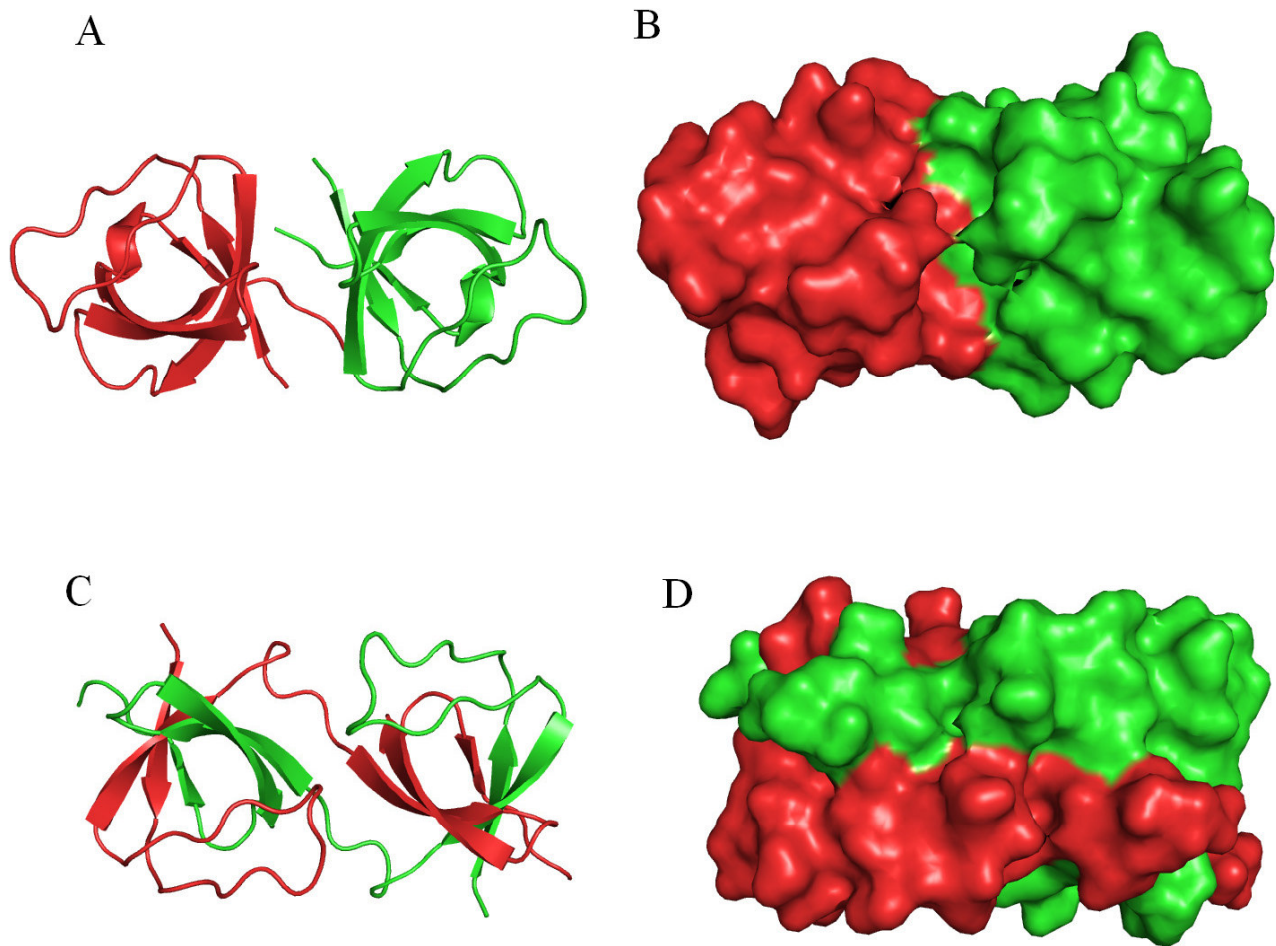
Použití syntetických ligandů SH3 domén by mohla být cesta k léčbě některých defektů buněčné signalizace. Takovéto syntetické peptoidové „léky“ mohou být dokonce vázány přednostně, neboť je lze navrhnout tak, aby vykazovaly větší afinitu k SH3 doméně, než ligandy přirozené.

8. Dimerní formy SH3 domén

Některé SH3 domény jsou schopny dimerizace, jako např. SH3 proteinu Eps8. Velice flexibilní *n-src* smyčka SH3 domény Eps8 má unikátní konformaci v porovnání s jinými SH3 doménami. Tato smyčka může s určitou frekvencí interagovat se sousední SH3 doménou a vytvoří tak dimerní formu SH3 domény (viz obr. 8). Dimerizace je reverzibilní děj a zdá se, že *in vivo* jsou monomerní i dimerní SH3 v jakési rovnováze. Dimerní forma SH3 domény utváří rozšířený vazebný povrch, který projevuje poněkud jiné vazebné schopnosti, protože část vazebného povrchu je pro ligand nepřístupná. (Kishan *et al.*, 1997)

Domény po dimerizaci tedy projevují nový stupeň specificity. Po dimerizaci se na vazebném povrchu utvoří dvě vazebná místa, která by mohla sloužit jako styčná plocha pro různé proteinové ligandy. Tyto ligandy by mohly být tímto způsobem udržovány ve vzájemně vhodném postavení pro jejich interakci.

Schopností některých SH3 domén dimerizovat, se ještě zvětšuje již tak velký vazebný potenciál. Dimerizace je *in vivo* využitelná schopnost rozšíření specificity interakčních domén, která zatím byla jako regulační mechanismus poněkud opomíjena. Dále by dimerizace docela dobře mohla zapříčiňovat vznik „lešení“ pro umožnění interakcí jiných proteinů, jakási obdoba adaptorových proteinů.



Obr. 8 A, B- Monomerní forma SH3 domén proteinu Eps8. *C, D-* Dimerní forma SH3 domén proteinu Eps8 (PDB kód: 1I0C, 1I07. Data převzata z Kistan *et al.*, 2001; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

9. Tyrosiny na hydrofobním vazebném povrchu SH3 domény

Tyrosiny na hydrofobním vazebném povrchu SH3 domény jsou rozmístěny s nápadnou analogií mezi jednotlivými SH3 doménami nejrůznějších proteinů. To naznačuje jejich potencionální důležitost při vazbě konkrétních ligandů a patrně i při regulaci vazebné funkce SH3 domény a následně funkceschopnosti celých proteinů. Analogické tyrosiny jsou v následující kapitole rozděleny podle toho v jaké části SH3 domény se vyskytují. Důraz je kladen na to, jaký má vliv fosforylace či bodové mutace na schopnost vazby intermolekulárních ligandů. Též je diskutována neméně významná intramolekulární interakce u případů, kde je prokázána.

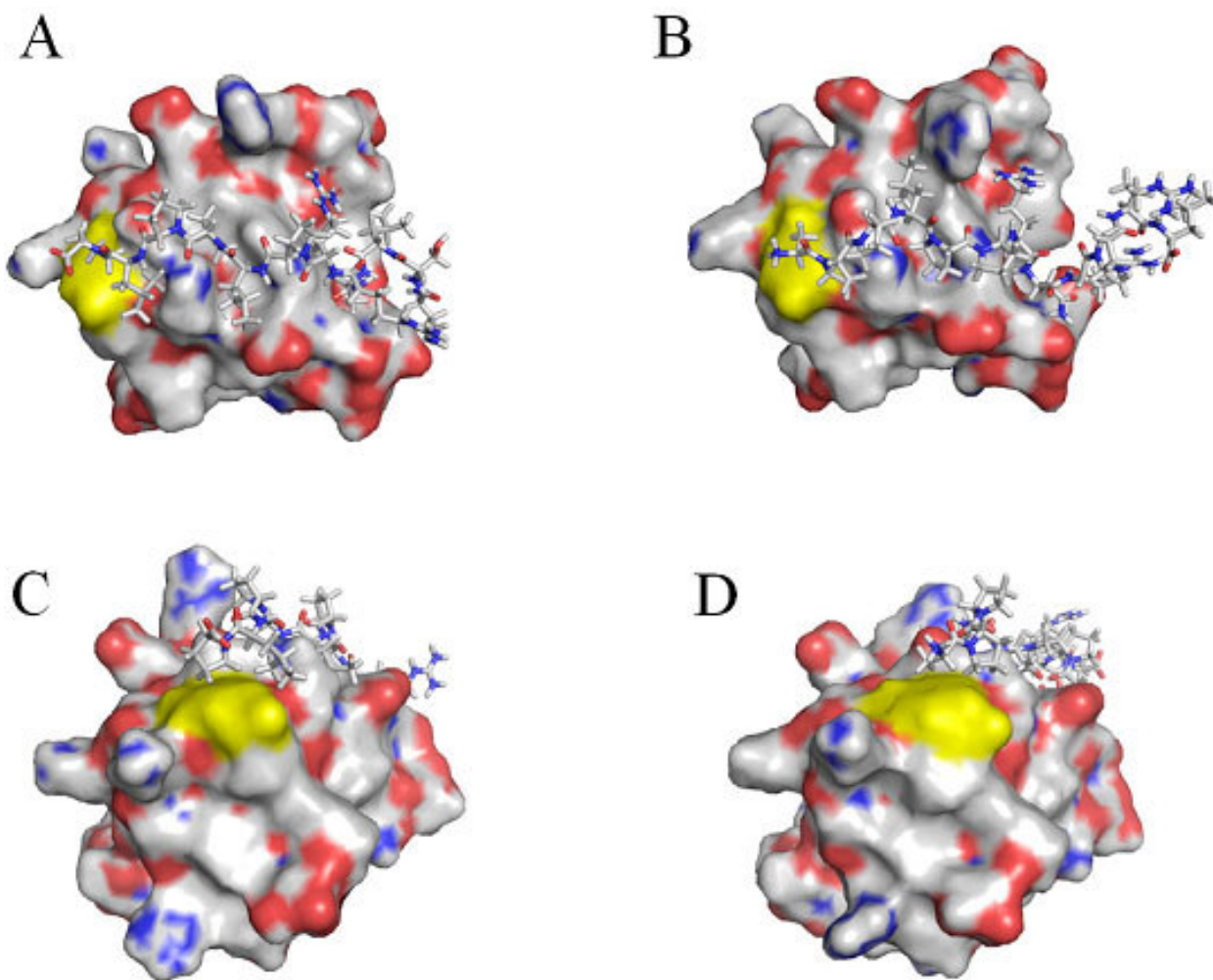
Pro přehlednost je připojena tabulka 1 poukazující na to, které tyrosiny jsou analogické u různých proteinů. Pokud v textu není některý tyrosin nějakého proteinu z tab. 1 diskutován, neexistuje studie zabývající se významem tohoto tyrosinu v závislosti na vaznostech SH3 domény.

	RT-loop		distal-loop	310-helix
Bcr/Abl	Y89		Y112	Y134
Btk	Y223	Y225	Y263	Y268
Grb2 (N-terminal SH3)	Y7		Y37	Y52
Grb2 (C-terminal SH3)				Y209
PSTPIP	Y367	Y369		
Src (myší číslování)	Y90	Y92	Y131	Y136

Tab. 1 Vzájemná analogie jednotlivých tyrosinových zbytků u vybraných SH3 domén. Homologní tyrosiny jsou umístěny vždy do sloupečků. S výjimkou tyrosinů v distal-loop, kde jsou analogické pouze Y263 Btk a Y131 Src. Ostatní tyrosiny v distální-smyčce analogické nejsou, avšak v zájmu zachování přehlednosti byly ponechány ve společném sloupci. Pokud se u daného proteinu analogické tyrosin nenachází, není ve sloupci napsána pozice tyrosinu.

9.1 Tyrosin v RT-smyčce

Mezi nejlépe dokumentované tyrosinové zbytky zodpovědné za regulaci vaznosti SH3 domén jsou ty vyskytující se v poměrně konzervované sekvenci ALYDY v RT-smyčce. Kde je tyrosin blíže k N-konci SH3 domény podstatně více prozkoumán (viz. *Obr. 9*). Je to patrně jeho prokazatelně vyšším vlivem na vaznost domény a s tím souvisejícím stupněm vysoké konzervovanosti.



Obr. 9 SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 90. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- *A, C*-pohled z boku, resp. II. třídy- *B, D*- pohled z boku. Barvy prvků: C, H, N, O (PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

U kinázy Src bylo ukázáno, že mutace v ALYDY motivu RT-smyčky (Y90A, Y92A) stimuluje její kinázovou aktivitu. Tyto mutace při pokusech potvrdily důležitost těchto zbytků u intramolekulární interakce. (Erpel *et al.*, 1995)

Při intramolekulární regulaci je patrně důležitá stabilizace interakce SH2 domény s pY527 SH3 doménou. Obě domény jsou od sebe vzdáleny pouze několik aminokyselinových zbytků. To znamená, že není možná ideální vazba SH2 domény s jejím ligandem pY527, pokud jí to SH3 doména stericky neumožní. Permisivní postavení SH3 domény je patrně umožněno pokud SH3 doména váže prolin-bohatou sekvenci na linkeru mezi SH2 a katalytickou doménou nebo pokud nepřímo váže úsek katalytické domény. Vazba SH3 domény na část katalytické domény je vytvořena pomocí jiného vazebného povrchu než je ten klasický rozeznávající PxxP motiv. (Brábek *et al.*, 2002; Erpel *et al.*, 1995; Superti-Furga *et al.*, 1993)

Dále byla testována u SH3 domény této kinázy míra ovlivnění intermolekulární interakce u mutantů Y90A, Y92A v RT-smyčce. Bylo ukázáno, že mutace Y90A i Y92A narušuje vazbu Sam68 i p85 α podjednotky PI3K. (Superti-Furga *et al.*, 1993; Erpel *et al.*, 1995)

U tyrosinové kinázy Btk účastníci se přenosu signálu z BCR odpovídají tyrosiny v ALYDY sekvenci tyrosinům- Y223 a Y225. Btk je v buňkách aktivována fosforylací na Y551 kinázami Src. Následně se autofosforyluje na Y223 (odpovídá Y90 kinázy Src) uvnitř vazebného povrchu SH3 domény. Po autofosforylaci na Y223 se vazba SH3 domény s WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) značně oslabuje. Naopak fosforylace Y223 nemá vliv na vazbu adaptorového proteinu c-Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma). Je docela možné, že autofosforylace Y223 kinázy Btk by mohla vést k interakci SH3 domény se zcela novým ligandem, který tato SH3 před fosforylací neváže. Po fosforylaci Y223 je totiž Btk schopna interakce s kinázou Syk, se kterou předtím neinteraguje. Bylo prokázáno, že tato interakce není zprostředkována SH2 doménou Syk kinázy. Není však zatím zcela jasné, zda je za interakci zodpovědná právě SH3 doména. (Morrogh *et al.*, 1999)

SH3 doména Btk je zajímavý případ, kdy je pravděpodobně intramolekulární regulační mechanismus zodpovědný za regulaci kinázové aktivity Btk. Přesný regulační mechanismus Btk

aktivity však není dosud zcela znám. Je prokázáno, že nefosforylovatelná mutace Y223F nebo úplná delece SH3 domény vede k transformaci buněk. (Park *et al.*, 1996) Z toho by mohlo vyplývat, že SH3 je nezbytná pro inhibici Btk aktivity.

U adaptorového proteinu Grb2 v N-terminální SH3 doméně se nachází v RT- smyčce tyrosin Y7. Tento tyrosin je patrně také *in vivo* fosforylovatelný. Pokud je fosforylován, např. v odpovědi na EGF stimulaci, je Y7 společně s Y209 v C-terminální SH3 Grb2 zodpovědný za zhoršení vazby ligandu jako je Sos či MEKK1. To může umožňovat negativní regulaci jejich efektorů jako např. Ras v závislosti na čase od EGF stimulace. (Li *et al.*, 2001)

Další protein, který si zaslouží pozornost je PSTPIP. PSTPIP je to protein asociovaný s cytoskeletem. Tyrosinům v sekvenci ALYDY zde odpovídají tyrosiny- Y367 a Y369. PSTPIP je fosforylován kinázami rodiny Src, což umožňuje následnou fosforylaci na zbytku Y367 opět Src kinázami uvnitř vazebního povrchu SH3 domény. Tato fosforylace ovlivňuje vaznost domény k ligandu WASP. Pokusy naznačují, že fosforylace tyrosinu uvnitř SH3 domény tuto interakci ruší. Mutant Y367F bez problémů váže WASP na rozdíl od mutantů Y367E či Y367D. (Wu *et al.*, 1998) To by mohlo naznačovat to, že by fosforylace mohla být *in vivo* využívána k negativní regulaci interakce PSTPIP/WASP. Tímto mechanismem by pak mohla být regulována dynamika cytoskeletonu prostřednictvím interakce SH3 domén proteinů účastnících se formování a přestavby cytoskeletu.

Konstitutivně aktivní fúzní onkoprotein Bcr/Abl je případ, kdy by fosforylace tyrosinu v RT-smyčce mohla vést k intramolekulární regulaci aktivity tohoto proteinu. Jisté známky částečné regulace jsou u tohoto proteinu zachovány díky intramolekulární interakci SH3 domény a linkerem mezi SH2 a kinázovou doménou. Vazba SH3 domény a linkeru na stejném polypeptidovém řetězci částečně stabilizuje inaktivní formu enzymu a je ovlivněna fosforylací. Nejvíce fosforylovaný zbytek *in vitro*, ale i v *in vivo* CML buňkách, je právě Y89 v RT-smyčce, v menší míře je dokumentována i fosforylace Y134 v 3_{10} -helixu. Fosforylaci SH3 domény Abl části fúzního proteinu provádějí kinázy Src rodiny. Fosforylace Y89 i Y134 destabilizuje interakci SH3/linker a tudíž podporuje aktivní konformaci Bcr/Abl. Nefosforylovatelný mutant Y89F má snížené transformační schopnosti na hematopoetické buňky. To podporuje domněnku,

že fosforylace tohoto tyrosinového zbytku je opravdu zodpovědná za regulaci aktivity fúzního enzymu. (Meyn *et al.*, 2006). O intermolekulárních interakcích Bcr/Abl v závislosti na fosforylaci Y89 není zatím příliš mnoho známo, leč je pravděpodobné, že fosforylace bude mít podobný vliv na vazbu ligandu jako u homologních tyrosinů na tomto místě. Pochopení regulace aktivity onkoproteinu Bcr/Abl může být klíčové z hlediska léčby chronických leukémií, ale i pro pochopení jiných regulačních mechanismů buněčné signalizace. Fosforylace je jev velice důležitý pro regulaci schopnosti vazby SH3 domény na ligand. Tyrosiny v RT-smyčce jsou patrně v tomto ohledu nesmírně důležité.

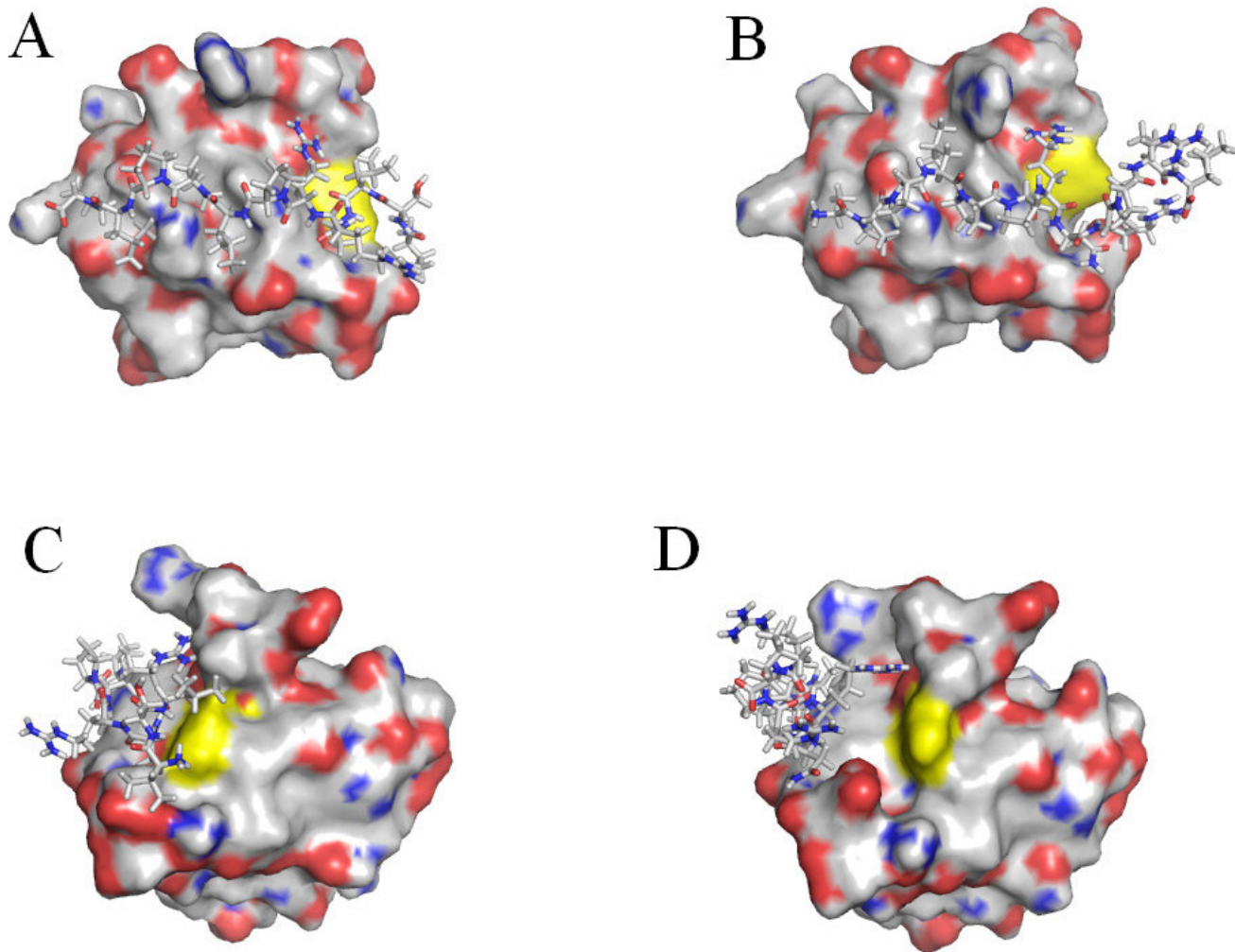
Z výše uvedených případů nelze jednoznačně odvodit obecný efekt fosforylace tyrosinu v RT-smyčce. V některých případech fosforylace v RT-smyčce vazbu zeslabuje (např. Grb2-Sos, Btk-WASP) v jiných na vazbu nemá vliv (např. Btk-Cbl). Tabulka 2 shrnuje dosavadní publikovaná experimentální data o vlivu fosforylovaného nebo mutovaného tyrosinového zbytku v RT-smyčce na vazbu ligandu podle toho, zda se jedná o ligand I. nebo II. třídy. Z tabulky je vidět trend, kdy vazbu na ligandů II. třídy fosforylace zeslabuje a vazbu na ligand I. třídy nemění. Z toho by se dalo usoudit, že fosforylace na tyrosinu v RT-smyčce by mohla měnit specifitu/preferenci vaznosti SH3 domén pro ligandy různých typů.

RT-smyčka	lig. I. třídy	lig. II. třídy	
Src Y90A	Sam68 PAT QPP LLPPSA	Sam68 SR QPP LPHRS	narušena vazba Sam68
	p85 PI3K PP RPL PVAPGSSK	p85 PI3K QP APAL PKPP	narušena vazba p85 PI3K
Btk pY223	Cbl SL HKDK PLVPPYQ	WASP PR GPP GRGGPP	vazba Cbl beze změny
	Cbl RDL PPPPPD	WASP PAT PPP GRGGPP	vazba WASP zeslabena
PSTPIP Y367E/D		WASP PR GPP GRGGPP	vazba WASP zrušena
		WASP PAT PPP GRGGPP	
Grb2 pY7		Sos PV PPV PPRRPE	vazba Sos zeslabena

Tab 2. Publikovaná experimentální data o vlivu fosforylace tyrosinu v RT-smyčce na vazbu lidandu I., resp. II. třídy. Vazebné ligandové sekvence jsou umístěny do sloupečků podle toho, do které třídy daný vazebný PPII peptid patří. Červeně je pak vyznačena core sekvence zapřičiňující orientaci daného ligandu. Vliv dané modifikace tyrosinu v RT-smyčce je shrnuta v pravém sloupci tabulky. Označení modifikací v daných experimentech: Y90A bodová (nefosforylovatelná) mutace tyrosinu za alanin, Y367E/D bodová (napodobuje fosforylovaný stav) mutace tyrosinu za glutamát, resp. aspartát, malé „p“ před označením tyrosinu značí fosforylovaný stav.

9.2. Tyrosin v distální- smyčce

Tyrosiny v distální-smyčce jsou méně konzervované, než ty v RT-smyčce nebo 3₁₀-helixu (viz dále). U kinázy Src se vyskytuje tyrosin Y131, který patrně nemá zásadní vliv na intra- ani intermolekulární vaznost domény k ligandu. Mohl by však ovlivňovat specifitu SH3, neboť spolu s W118 tvoří třetí tzv. specifitní kapsu ligand vazebného povrchu SH3 domény (viz *obr. 10*). Experimentální data ukazují, že mutace Y131A neovlivňuje vazbu na SH3 doménu zdaleka v takové míře jako substituce Y90A nebo Y92A v RT-smyčce, která vazbu na SH3 doménu zcela ruší. Vazba p85 α -podjednotky PI3K a obdobně i vazba proteinu Sam68 na SH3 doménu kinázy Src je mutací Y131A snížena zhruba na třetinu. (Erpel *et al.*, 1995; Broome *et al.*, 1997)



Obr. 10 SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 131. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- *A*, *C*-pohled z boku, resp. II. třídy- *B*, *D*- pohled z boku. Barvy prvků: C, H, N, O (PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

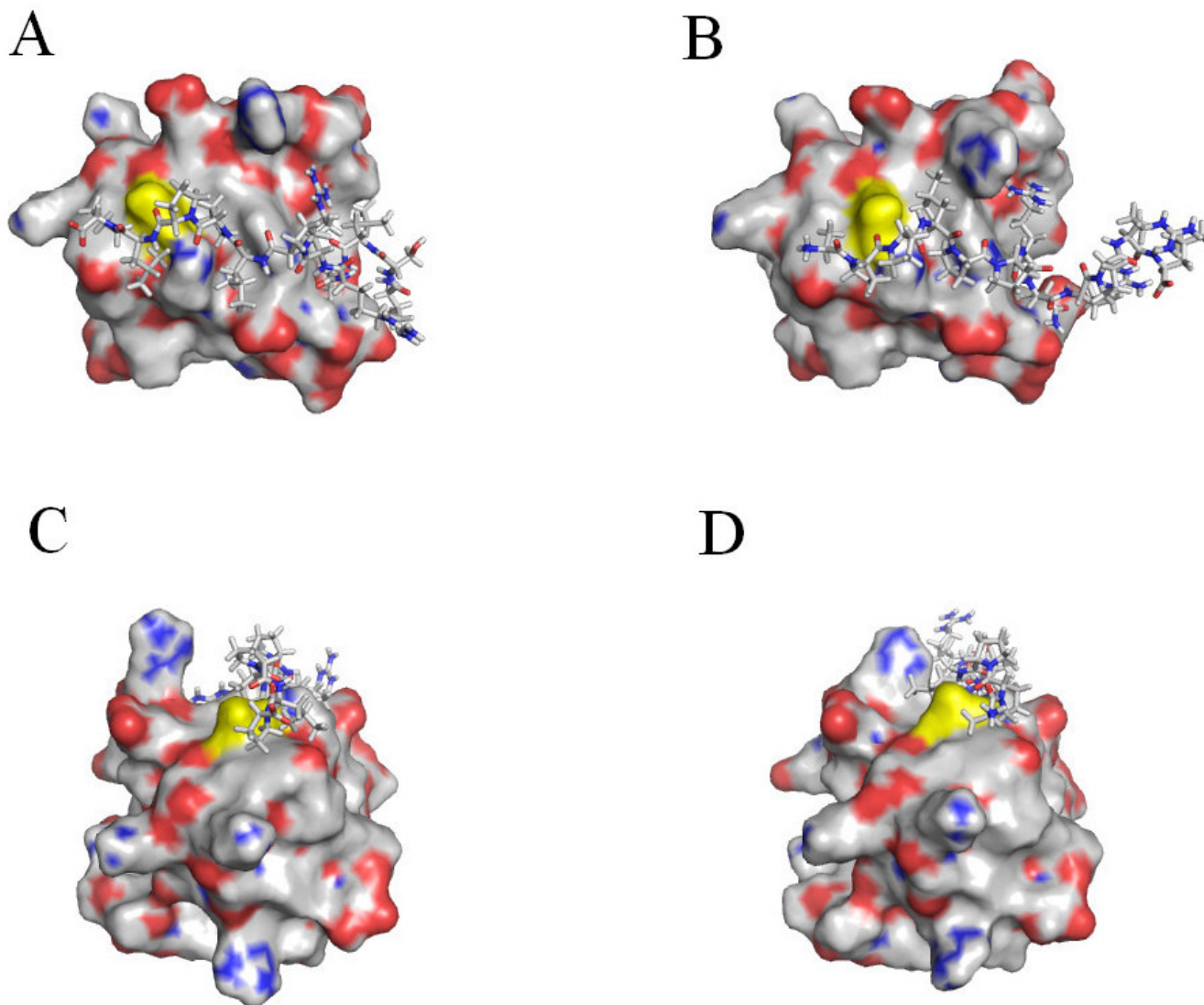
9.3. Tyrosin v 3₁₀-helixu

Konzervovaná sekvence nacházející se v 3₁₀-helixu je PxNYV, kde x je nejčastěji hydrofobní aminokyselina většinou agrinin či serin. Tyrosin u Src kinázy Y136 je prostorově blízký Y90 a Y92, což má za následek, že jeho mutace Y136A má podobné následky jako u dříve zmíněných Y90 a Y92. Je to patrně tím, že Y136 spoluutváří kapsu, do níž zapadá prolin z ligandového polypeptidu (viz obr. 11). (Erpel *et al.*, 1995)

Je prokázáno, že fosforylace Y138 (Y136 u myši) snižuje vazebné schopnosti SH3 domény lidské kinázy Src. Fosforylace na tomto zbytku však není nezbytná pro aktivaci kinázy Src a následný přenos signálu z receptoru. Po stimulaci buněk PDGF růstovým faktorem je lidská kináza Src fosforylována na Y138 PDGF- receptorem. Tato fosforylace snižuje asociaci kinázy Src s PDGF- receptorem. (Broome *et al.*, 1997)

Protein Grb2 má v C-terminální SH3 doméně tyrosinový zbytek Y209. Ten je spolu s Y7 v N-terminální SH3 doméně velice důležitý pro regulaci vazby ligandu proteinem Grb2. Fosforylace zbytku Y209 inhibuje vazbu ligandu Sos či MEKK1. Vazba Sos je esenciální pro aktivaci Ras proteinu. Pro vazbu ligandu je patrně důležitá interakce obou SH3 domén Grb2 proteinu s ligandem. Znemožnění vazby obou domén je patrně nezbytné pro úplné zrušení vazby k ligandu. Za fyziologických podmínek je fosforylace tohoto zbytku zodpovědná za zeslabování aktivity proteinu Ras v závislosti na době uplynulé od aktivace Grb2 EGF-receptorem. K zeslabování aktivace dochází i u Y209F mutantů, ale daleko pomaleji. Za to je patrně zodpovědný Y7 či jiné EGF-indukované terminační mechanismy. (Li *et al.*, 2001)

Tyrosin v 3₁₀-helixu je velice důležitý, neboť patří mezi fosforylovatelné tyrosiny. Jeho fosforylací dochází k inhibici vazby ligandu na hydrofobní povrch SH3 domény. Je pravděpodobné, že tento tyrosin nereguluje pouze na úrovni „váže/neváže“, ale že jeho fosforylace je zodpovědná za preferenci k jiným ligandům než váže jeho nefosforylovaná forma. Podobně je tomu pravděpodobně i u tyrosinu v RT-smyčce. Dále je tento tyrosin zodpovědný za regulaci aktivity v čase i za intramolekulární aktivaci proteinů.



Obr. 11 SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 136. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- A, C-pohled z boku, resp. II. třídy- B, D- pohled z boku. Barvy prvků: C, H, N, O (PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

10. Závěr

- ❖ V této práci je nastíněn možný vliv fosforylace jednotlivých tyrosinů, na vazebném povrchu SH3 domén, na vaznost domény k ligandu.
- ❖ Vliv fosforylace tyrosinů na vazebném povrchu SH3 domény je zde sledován s ohledem na intra- i intermolekulární povahu vazebné interakce.
- ❖ Unikátní pseudo-symetrická struktura přirozeného PPII ligandu SH3 domény umožňuje jeho vazbu na povrchu SH3 domény ve dvou opačných orientacích.
- ❖ Je ukázáno, že fosforylace tyrosinových zbytků vazebného povrchu SH3 domény má negativní vliv na schopnost vazby této domény.
- ❖ Fosforylace tyrosinu v RT-smyčce zřetelně zeslabuje schopnost vazby ligandu II. třídy, zatímco o ligandech I. třídy toto tvrzení neplatí univerzálně.
- ❖ Je možné, že fosforylace na tyrosinu v RT- smyčce by mohla měnit specifitu/preferenci vaznosti SH3 domén pro ligandy různých typů.

11. Seznam použité literatury

Agrawal V, Kishan KV.

Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins.

Protein Pept Lett. 2002 Jun;9(3):185-93. Review.

Bedford MT, Chan DC, Leder P.

FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands.

EMBO J. 1997 May 1;16(9):2376-83.

Brábek J, Mojžita D, Novotný M, Půta F, Folk P.

The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Aug 23;296(3):664-70.

Broome MA, Hunter T.

The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding.

Oncogene. 1997 Jan 9;14(1):17-34.

DeLano, W.L.

The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

Erpel T, Superti-Furga G, Courtneidge SA.

Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions.

EMBO J. 1995 Mar 1;14(5):963-75.

Feng S, Kasahara C, Rickles RJ, Schreiber SL.

Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 19;92(26):12408-15.

Kishan KV, Scita G, Wong WT, Di Fiore PP, Newcomer ME.

The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer.

Nat Struct Biol. 1997 Sep;4(9):739-43.

Kistan et al., 2001

Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA.

Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling.

EMBO J. 2001 Dec 3;20(23):6793-804.

Li SS.

Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction.

Biochem J. 2005 Sep 15;390(Pt 3):641-53. Review.

Lim WA, Richards FM, Fox RO.
Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains.
Nature. 1994 Nov 24;372(6504):375-9. Erratum in: Nature 1995 Mar 2;374(6517):94.

Mayer BJ.
SH3 domains: complexity in moderation.
J Cell Sci. 2001 Apr;114(Pt 7):1253-63. Review.

Meyn MA 3rd, Wilson MB, Abdi FA, Fahey N, Schiavone AP, Wu J, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE.
Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity.
J Biol Chem. 2006 Oct 13;281(41):30907-16. Epub 2006 Aug 15.

Morrogh LM, Hinshelwood S, Costello P, Cory GO, Kinnon C.
The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase displays altered ligand binding properties when auto-phosphorylated in vitro.
Eur J Immunol. 1999 Jul;29(7):2269-79.

Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, Lim WA.
Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors.
Science. 1998 Dec 11;282(5396):2088-92.

Nguyen JT, Porter M, Amoui M, Miller WT, Zuckermann RN, Lim WA.
Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold.
Chem Biol. 2000 Jul;7(7):463-73.

Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, Scharenberg AM, Kinet JP, Witte ON.
Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain.
Immunity. 1996 May;4(5):515-25.

Riddle DS, Grantcharova VP, Santiago JV, Alm E, Ruczinski I, Baker D.
Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding.
Nat Struct Biol. 1999 Nov;6(11):1016-24.

Superti-Furga G, Fumagalli S, Koegl M, Courtneidge SA, Draetta G.
Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src.
EMBO J. 1993 Jul;12(7):2625-34.

Wu X, Knudsen B, Feller SM, Zheng J, Sali A, Cowburn D, Hanafusa H, Kuriyan J. Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk.
Structure. 1995 Feb 15;3(2):215-26.

Wu Y, Spencer SD, Lasky LA.

Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein.

J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5765-70.

Xu W, Harrison SC, Eck MJ.

Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src.

Nature. 1997 Feb 13;385(6617):595-602.

Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL.

Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains.

Cell. 1994 Mar 11;76(5):933-45.