

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jaroslav Braniš

Role proteinu p130Cas v odpovědi na mechanický stres

The role of p130Cas in mechanosensing

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Brábek, PhD.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou 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 dne 14. 5. 2012

Jaroslav Braniš

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval mému školiteli RNDr. Janovi Brábkovi, PhD. za užitečné rady a připomínky k mé bakalářské práci a za čas, který mi věnoval.

Abstrakt

Snímání mechanických stimulů proteiny a jejich přeměna do biochemických signálů v procesu tzv. mechanotransdukce je v poslední době velmi diskutovaným tématem v buněčné biologii. Hlavními molekulami, které buňka využívá ke snímání mechanických stimulů, jsou povrchové membránové proteiny, které přenáší mechanický impuls do buňky. V buňce se pak vyskytují komplexy proteinů, které signál přenáší dále. Jedním z nejdůležitějších proteinů, který má schopnost měnit mechanické impulsy na biochemické signály a přenášet je na další proteiny je p130Cas. Tato práce se zabývá schopností proteinu p130Cas snímat mechanické impulsy a přenášet je na další proteiny signálních drah a tím regulovat buněčnou odpověď v závislosti na mechanickém stresu.

Klíčová slova: p130Cas, p130Cas/Crk komplex, mechanický stres

Abstract

Sensing mechanical stimuli by proteins and their conversion into biochemical signals in a mechanotransduction is the recently discussed topic in cell biology. The main molecules that cells use to sense mechanical stimuli, are membrane proteins that transmit the mechanical stimulus into the cell. In the cell are found protein complexes, which transmit the signal further. One of the most important protein that has the ability to change the mechanical stimuli to biochemical signals and transmit them to other protein is p130Cas. This work deals with the ability of p130Cas to sense mechanical stimuli and transmit them to other proteins and signaling pathways that regulate cellular response depending on the mechanical stress.

Key words: p130Cas, p130Cas/Crk komplex, mechanical stress

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	3
OBSAH	4
SEZNAM ZKRATEK	5
1 ÚVOD	6
2 MECHANISMY SNÍMÁNÍ MECHANICKÉHO STRESU V BUŇCE	7
2.1 ROZBALENÍ PROTEINŮ V ZÁVISLOSTI NA MECHANICKÉM STRESU.....	8
2.1.1 SOUHRA TALINU A VINCULINU.....	8
2.2 Rho/ROCK DRÁHA.....	9
2.3 MECHANICKY OVLÁDANÉ IONTOVÉ KANÁLY.....	10
3 p130Cas	12
3.1 STRUKTURA.....	12
3.1.1 SD DOMÉNA.....	13
3.2 LOKALIZACE V BUŇCE.....	14
4 SIGNALIZACE PŘES p130Cas	15
4.1 p130Cas/Crk KOMPLEX.....	15
4.1.1 p130Cas/Crk KOMPLEX V REGULACI MAP KINÁZOVÝCH DRAH.....	15
4.1.2 p130Cas/Crk KOMPLEX V REGULACI AKTINOVÉHO CYTOSKELETU.....	17
4.1.3 REGULACE TVORBY KOMPLEXU p130Cas/Crk.....	18
4.2 p130Cas/CIZ.....	20
4.3 VZTAH p130Cas S KINÁZAMI ERK.....	21
4.4 SHRNUÍ.....	23
5 ZÁVĚR	25
SEZNAM LITERATURY	26

Seznam zkratek

Abl – nerekceptorová Tyr protein kináza (Abelson leukemia virus tyrosine kinase)
ARP 2/3 - actin-related proteins 2/3
BCAR1 – breast cancer antiestrogen resistance 1
CIZ – Cas-interacting zinc finger protein, synonymum pro Nmp4 a ZNF384
DOCK180 – dedicator of cytokinesis 180
ECM – mezibuněčná hmota (extracellular matrix)
ERK1/2 – protein kinázy rodiny MAPK (extracellular signal regulated kinase 1/2)
FAK – nerekceptorová Tyr protein kináza (focal adhesion kinase)
GEF – guanine nucleotide exchange factor
JNK – protein kinázy rodiny MAPK (c-Jun N-terminal kinase)
LIMK – Lim domain–containing kinase
MAPK – mitogen-activated protein kinases
MLC – myosin light chain
MLCK – myosin light chain kinase
MLCP – myosin light chain phosphatase
p130Cas – Crk-associated substrate
PAK – Ser/Thr protein kináza (p21-activated kinase)
PI(4,5)P₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3 – fosfatidylinositol phosphate kinase type Iγ
PTB - phosphotyrosine-binding domain
Rho – Ras homolog gene family
RhoGEFs – proteiny vyměňující GDP za GTP na proteinech Rho (guanine nucleotide exchange factors)
ROCK – Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
SH2 – Src homology 2
SH3 – Src homology 3
TAM-R – buněčná linie rezistentní k tamoxifenu (tamoxifen resistant cell line)
TRAAK – K⁺ kanály třídy K_{2P} (opened by arachidonic acid)
TREK – K⁺ kanály třídy K_{2P} (related to TWIK-1)
TRP – rodina kanálů (transient receptor potential channels)

1 Úvod

Mechanické síly působí na buňky ze všech směrů a přináší důležité informace o vnějším prostředí. Některé buňky přeměňují mechanické síly na elektrické signály a přenáší senzorickou informaci až do mozku. Jiné zase přeměňují mechanické síly na biochemické signály, které určují chování buněk a umožňují tak buňkám vhodně reagovat na zvýšený mechanický stres. Jedním z mnoha mechanismů, kterými jsou buňky schopné snímat mechanický stres je rozbalení proteinů. Protein p130Cas je jedním z proteinů, které mají schopnost rozbalit svou strukturu v závislosti na mechanickém stresu a tím aktivovat signalizaci přes určité signální dráhy.

p130Cas byl poprvé identifikován jako 130-kDa protein, který je silně fosforylován na Tyr zbytcích v buňkách transformovaných v-Src a v-Crk (Sakai et al., 1994). Postupem času bylo prokázáno, že se p130Cas vyskytuje ve fokálních adhezích a aktivuje mnoho signálních drah v buňce. V závislosti na aktivaci integrinových receptorů ovlivňuje řadu buněčných pochodů, zejména migraci, invazivitu a přežití buněk (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2010).

Jeden ze způsobů, jakým p130Cas ovlivňuje buněčné signální dráhy, byl objeven relativně nedávno. Při zvýšeném mechanickém stresu dochází k rozbalení centrální oblasti p130Cas (Sawada et al., 2006). To způsobuje odhalení vazebných motivů, vazbu efektorových proteinů a aktivaci množství signálních drah.

Tato práce je zaměřena na úlohu proteinu p130Cas v buňce jako mechanosensoru. Takto je p130Cas schopen regulovat v buňce řadu signálních drah, mimo jiné i dráhy, které souvisí s buněčnou transformací, invazivitou a tvorbou metastáz.

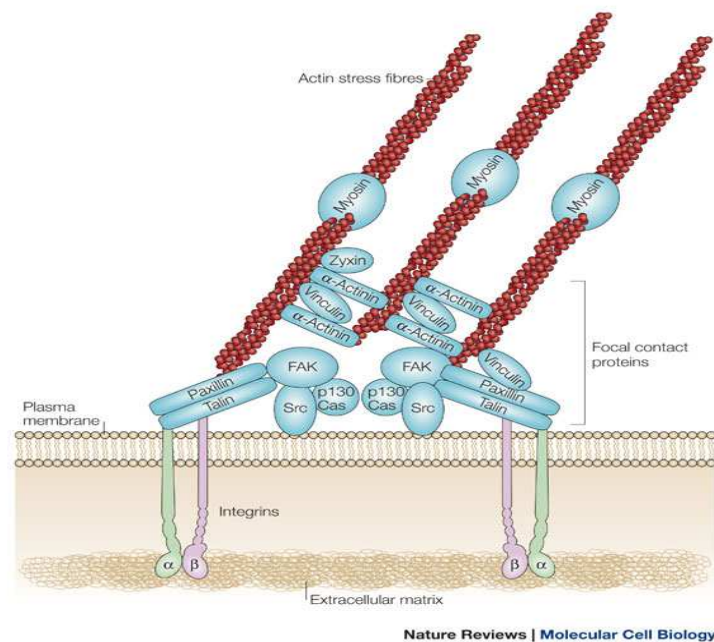
2 Mechanismy snímání mechanického stresu v buňce

Mechanotransdukce z extracelulárního prostředí do nitra buňky může být zprostředkována různými typy molekul a molekulárních komplexů. Mezi nejdůležitější patří mechanicky ovládané kanály, které hrají velmi důležitou roli v signalizaci či v udržení elektrochemického potenciálu buňky (shrnutí v Martinac, 2004).

Další typ mechanotransdukce je založen na integrinech. Integriny jsou rodinou adhezivních molekul vyskytujících se na povrchu buněk, které jsou schopné přenášet externí stimuly a přeměňovat je na biochemické signály. Ty jsou pak soustavou proteinů přenášeny především na aktinový cytoskelet, čímž je regulována např. migrace buněk (shrnutí v Geiger et al., 2009; Mitra et al., 2005).

Proteinové komplexy hrající důležitou roli v adhezi buněk k ECM a signalizaci se nazývají fokální adheze, viz obr. 1. Fokální adheze fungují v buňce jako esenciální senzorké a signalizační struktury.

Uvnitř buňky, jak ukazuje obr. 1, se vyskytuje soubor proteinů, z nichž některé jsou schopné snímat mechanický stres částečným rozbalením své struktury, což poskytuje vazebná místa pro další proteiny. Patří mezi ně např. talin a zejména pak p130Cas, na který je tato práce zaměřena.



Obr. 1: Fokální adheze jsou tvořeny integriny, které jsou různými typy proteinů spojeny s aktinovým cytoskeletem. Kromě proteinů vázajících aktin a integriny jsou na obrázku patrné i další proteiny, které mají důležitou roli v signalizaci jako kinázy Src a FAK či adaptorový protein p130Cas. Převzato z (Mitra et al., 2005).

Signalizace zprostředkovaná přes fokální adheze také vede k regulaci malých GTPáz rodiny Rho, které patří mezi hlavní regulátory aktinového cytoskeletu (shrnutí v Geiger et al., 2009).

2.1 Rozbalení proteinů v závislosti na mechanickém stresu

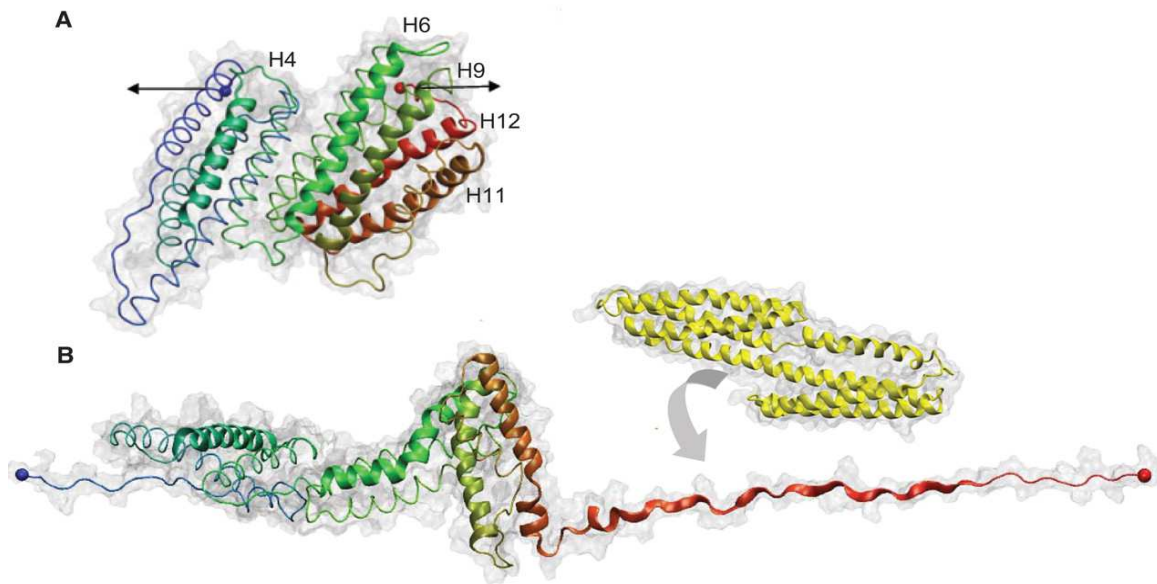
Některé proteiny jsou schopné rozbalit svou strukturu v závislosti na zvýšeném mechanickém stresu. Jako příklad je zde uvedena souhra dvou proteinů fokálních adhezí, talinu a vinculinu. Jakmile dochází k rozbalení určitých úseků těchto proteinů, jsou schopné spolu vytvářet komplex a napomáhat zejména v navázání aktinových vláken do fokálních adhezích a tím posilovat fokální adheze.

2.1.1 Souhra talinu a vinculinu

Talin stejně jako vinculin je protein fokálních adhezí. Oba proteiny jsou si v mnoha ohledech podobné. V přirozeném stavu jsou autoinhibovány a obsahují aktin vazebné místo. Oba jsou také schopné částečně rozbalit svou strukturu v závislosti na mechanickém stresu a potřebují pro své účinné fungování ve fokálních adhezích PI(4,5)P₂ (shrnutí v Wehrle-Haller, 2012).

Talin se skládá z N-koncové globulární domény a C-koncové tyčkovité domény. V buňce se vyskytuje ve formě dimeru, který je autoinhibován interakcemi mezi globulární a tyčkovitou doménou (Goksoy et al., 2008). Je schopen vázat cytoplasmatickou doménu β -integrinů a F-aktin, takže hraje v buňce důležitou úlohu prostředníka mezi integriny a aktinovými vlákny (Critchley, 2000). Talin je dále schopen interagovat s kinázou PIPK1 γ , která zvyšuje množství membránového fosfolipidu PI(4,5)P₂, jenž hraje důležitou roli v aktivaci zejména talinu a vinculinu (Ling et al., 2002). Talin má dále ve své tyčkovité doméně několik vinculin vazebných míst (VBSs), přičemž bylo jasně prokázáno, že po aplikaci mechanického impulzu dochází k odhalení kryptického VBS1 (Lee et al., 2007). Další experiment s protažením tyčkovité domény prokázal zlepšení vazby vinculinu k talinu, konkrétně z 1 molekuly vinculinu v intaktním stavu talinu na 3 molekuly vinculinu v protaženém stavu talinu (del Rio et al., 2009). Uvedené experimenty jasně prokázaly schopnost talinu rozbalit se v závislosti na mechanickém stresu, což má za následek odhalení kryptických VBSs a zlepšení navázání vinculinu (viz obr. 4).

Vinculin je důležitým aktin vazebným proteinem. Je složen z globulární Vh a koncové Vt domény. Tyto domény jsou spolu schopné interagovat a tím autoinhibovat fungování vinculinu (Critchley, 2000). Tato interakce znemožňuje vazbu k talinu a dalším proteinům. Kyselé fosfolipidy jako je PI(4,5)P₂ jsou schopné uvolnit Vt a Vh doménu a tím aktivovat vinculin (shrnutí v Critchley, 2000; Wehrle-Haller, 2012). Nedávný experiment ukázal, že pro vazbu Vh domény vinculinu k talinu, musí být vinculin aktivován, což může nastat právě mechanickým protažením Vh domény (Golji et al., 2011).



Obr. 4: (A) Struktura 12 helixů, které tvoří tyčkovitou doménu talinu. Vyznačené šipky naznačují směr působení mechanických sil. (B) Protažení a rozbalení talinové tyčkovité domény po působení mechanických sil. Žlutě je označena Vh domén vinculinu, která se váže na odhalené kryptické vinculin vazebné místo (VBS). Převzato a upraveno z (del Rio et al., 2009).

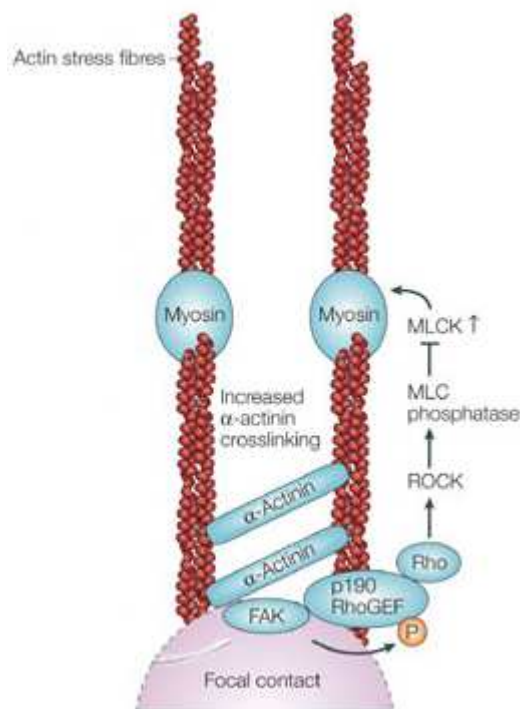
Souhra talinu a vinculinu spočívá v jejich aktivaci pomocí zesílení mechanického stresu a to nejen z vnějšku, ale i zevnitř buňky. Uvnitř buňky může docházet k zesílení aktomyosinové kontrakce což vyvolává protažení tyčkovité domény talinu (del Rio et al., 2009).

Komplex talin - vinculin a jeho vazba k aktinu znásobuje počet aktinových vláken navázaných do fokálních adhezí (Golji et al., 2011). V důsledku toho pak dochází k zesílení vazby integrinů a aktinových vláken a celkově tak k zesílení fokálních adhezí, což je v souladu s prací, která popisuje formování fokálních adhezí v závislosti na zvýšení externích i interních sil (Galbraith et al., 2002).

2.2 Rho/ROCK dráha

Po navázání integrinů k proteinům ECM, dochází k aktivaci RhoGEFs, konkrétně pak p190RhoGEF. Aktivace p190RhoGEF může být zprostředkována fosforylací kinázou FAK (shrnutí v Geiger et al., 2009; Lim et al., 2008; Mitra et al., 2005). Proteiny rodiny RhoGEF jsou důležitými regulátory v aktivaci efektorových Rho GTPáz u nichž vyměňují GDP za GTP a tím je aktivují (shrnutí v Schmitz et al., 2000). Aktivované Rho proteiny, konkrétně pak RhoA a RhoC aktivují kinázu ROCK (Matsui et al., 1996). Aktivovaná kináza ROCK ovlivňuje v buňce hned několik procesů. Inhibuje fosfatázu MLCP, přímo fosforyluje MLC a aktivuje kinázu LIMK, která inhibuje aktinovou depolymerizaci zprostředkovanou cofilinem (Ridley, 2001). Celkově tak Rho/ROCK dráha přispívá ke stabilizaci aktinového cytoskeletu, buněčné kontrakci zprostředkované aktomyosinem a migraci buněk

(Ridley, 2001). Obr. 2 pak ukazuje dráhu vedoucí od kinázy FAK až po fosforylaci MLC kinázou MLCK a tvorbu stresových vláken.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Obr. 2: Signální dráha vedoucí od kinázy FAK, která fosforyluje p190RhoGEF, který následně aktivuje malou GTPázu Rho. Rho potom aktivuje efektorovou kinázu ROCK, která fosforylací inhibuje fosfatázu MLCP. Ve výsledku tedy dochází k fosforylaci MLC kinázou MLCK a ke zvýšení aktomyosinové kontraktility a formování stresových vláken. Převzato a upraveno z (Mitra et al., 2005).

Kromě výše zmíněného je Rho/ROCK dráha také důležitá k navození invazivního fenotypu nádorových buněk. Rho/ROCK dráha je upregulována u buněk, které využívají améboidní invazivní strategii, čímž přispívá k invazivitě nádorových buněk (shrnutí v Pankova et al., 2010).

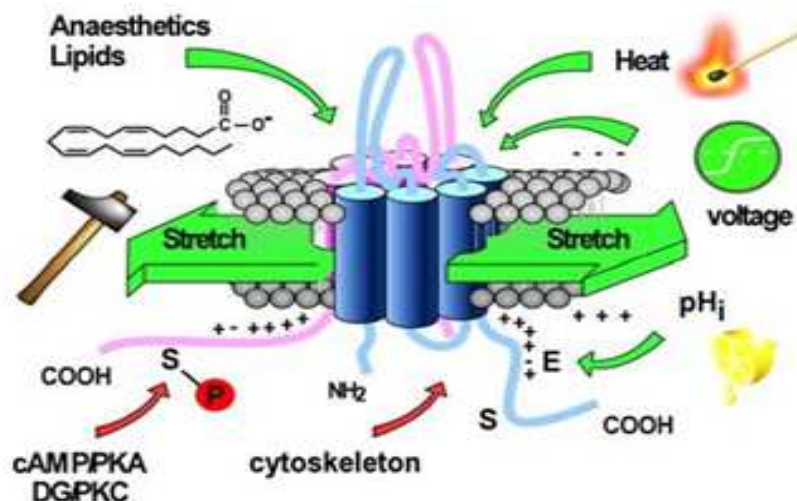
2.3 Mechanicky ovládané iontové kanály

Již v polovině minulého století se soudilo, že iontové kanály by mohly zastávat důležitou funkci ve snímání mechanických stimulů. V závislosti na těchto stimulech by docházelo k otevírání těchto kanálů, jak bylo popsáno u studia mechanosensorických neuronů (Katz et al., 1950 citováno v (Martinac, 2004)).

Mezi důležitou skupinu kanálů, která hraje úlohu v mechanosensitivě buněk patří rodina kanálů TRP. Kanály TRP jsou v buňkách významné z hlediska odpovědi na teplotu, tlak, osmolaritu, světlo a

další stimuly (Clapham, 2003). Konformační změna, která je u některých kanálů rodiny TRP způsobena právě mechanickým stimulem, má za následek vtok Ca^{2+} iontů do nitra buňky (Martinac, 2004). Je známé, že Ca^{2+} ionty fungují jako významní druzí posli v signalizaci. Takto jsou schopné regulovat řadu buněčných pochodů. Za zmínku stojí především aktivace kalmodulinů a kinázy MLCK (Blumenthal and Stull, 1980). Kináza MLCK následně fosforyluje MLC, čímž iniciuje kontrakci buněk (Gallagher et al., 1997; Gao et al., 2001).

Dalšími významnými kanály, které jsou mechanicky ovládané, jsou K^+ kanály třídy $\text{K}_{2\text{P}}$. Do této třídy spadá velké spektrum kanálů, které jsou otevírány v závislosti na rozmanitých stimulech. Typickým představitelem této třídy je kanál TREK1. Tento kanál spolu s TREK2 a TRAAK je významným mechanicky ovládaným K^+ kanálem u savců (Dedman et al., 2009; Martinac, 2004). TREK1 je pak významným polymodálním kanálem, který je kromě mechanických stimulů aktivován i dalšími stimuly jak ukazuje obr. 3 (Dedman et al., 2009).



Obr. 3: Polymodální aktivace K^+ kanálu TREK1 různými typy stimulů jako je depolarizace, teplota, snížení intracelulárního pH, lipidy, protažení membrány, dynamika cytoskeletu či fosforylace kinázami PKA a PKC. Převzato z (Dedman et al., 2009).

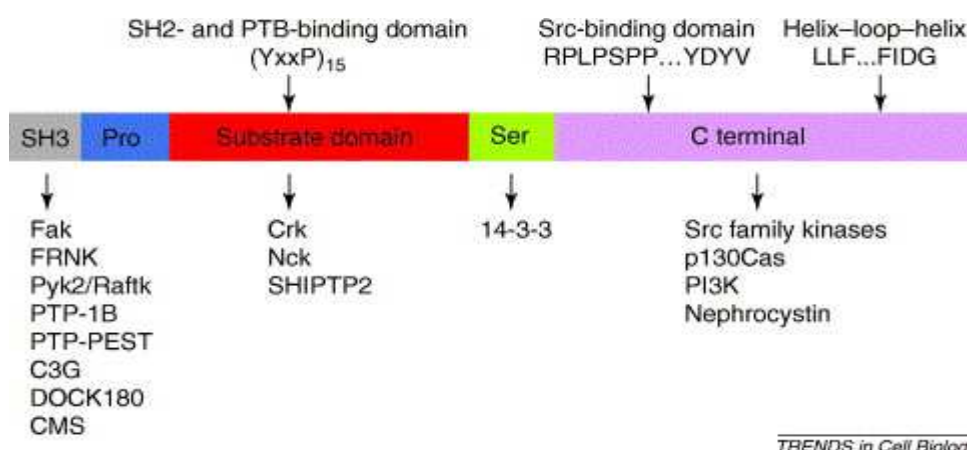
3 p130Cas

Kromě talinu a vinculinu je přítomen ve fokálních adhezích další protein, který podléhá částečnému rozbalení v závislosti na mechanickém stresu. Je jím adaptorový protein p130Cas. Výsledky experimentu se substrátovou doménou p130Cas ukázaly nový mechanismus, jakým mohou buňky snímat mechanický stres (Sawada et al., 2006).

3.1 Struktura

Protein p130Cas je složen u člověka z 870 aminokyselin. p130Cas postrádá jakoukoliv enzymatickou aktivitu, obsahuje však několik funkčních domén s oblastmi zprostředkovávající protein-proteinové interakce. V buňce tak funguje jako lešení pro další buněčné proteiny (Defilippi et al., 2006; Geiger, 2006).

Na N-konci obsahuje SH3 doménu, umožňující interakci s proteiny obsahujícími polyprolinový motiv. Přilehlá k SH3 doméně je rozlehlá centrální oblast nazývaná jako substrátová doména (SD). Dále za SD doménou leží oblast bohatá na serin, jejíž strukturní analýza odhalila, že se skládá ze 4-helixového svazku a poskytuje vazebné místo pro 14-3-3 proteiny (Briknarova et al., 2005). Dále blízko C-konce je Src-vazebná doména (SB), kde je přítomen polyprolinový (R-P-L-P-S-P-P) a Y-D-Y-V-H-L motiv. Tyto motivy váží kinázy rodiny Src (SFK) prostřednictvím svých SH3 a SH2 domén (Nakamoto et al., 1996). Na C-konci je pak tzv. CCH doména, která je silně konzervovaná v primární sekvenci u všech proteinů rodiny Cas (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2010) a účastní se lokalizace p130Cas do fokálních adhezí (Donato et al., 2010). Celková struktura je pak zobrazena na obr. 5.

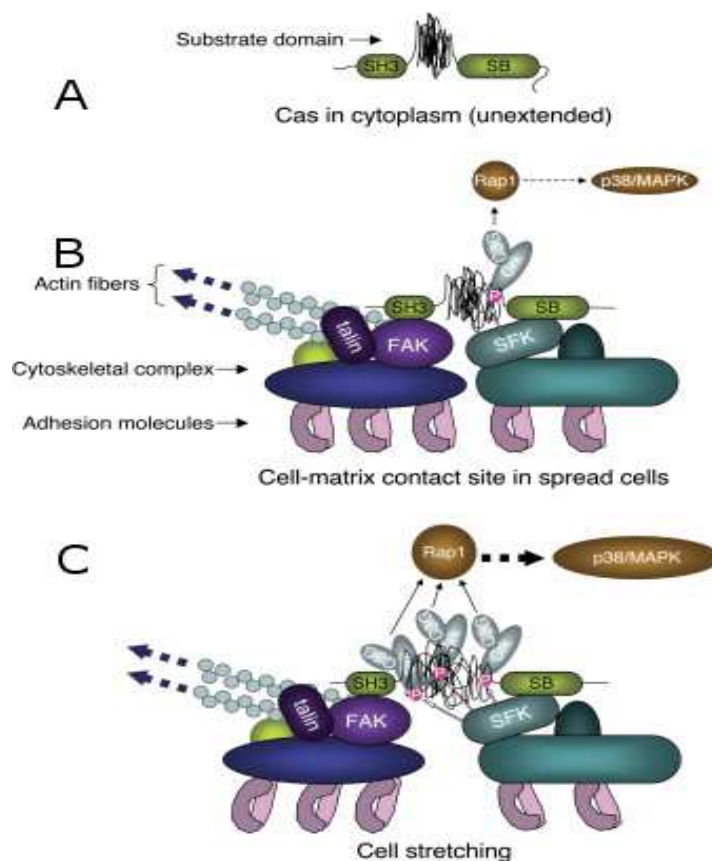


Obr. 5: Znárodnění funkčních domén p130Cas a některé z důležitých interakčních proteinů. Převzato z (Defilippi et al., 2006).

3.1.1 SD doména p130Cas

Z hlediska vnímání mechanického stresu je nejdůležitější oblastí p130Cas SD doména. Charakteristickým rysem této domény je přítomnost velkého počtu Y-X-X-P motivů, které jsou po fosforylaci potencionálním vazebným místem pro efektorové proteiny s SH2 a PTB doménami (Defilippi et al., 2006). U p130Cas je těchto Y-X-X-P motivů přítomno 15 (Sakai et al., 1994).

Po natažení tzv. Tritonového cytoskeletu byla zjištěna zvýšená fosforylace p130Cas (Tamada et al., 2004). Bližší studium SD domény p130Cas pak ukázalo, že během působení mechanického stresu dochází k rozbalení SD domény a celkově k protažení struktury p130Cas (Sawada et al., 2006). Toto rozbalení SD domény následně usnadňuje fosforylaci Y-X-X-P motivů, což má za následek aktivaci různých signálních drah, jak je patrné z obr. 6 (Sawada et al., 2006). Příkladem proteinu, který se účastní fosforylace p130Cas v tzv. na protažení závislé fosforylaci je člen rodiny kináz Src (SFK) Fyn. Tato fosforylace způsobuje přesun a následně ukotvení p130Cas do fokálních adhezí, kde p130Cas působí jako mechanosensor (Kostic and Sheetz, 2006).



Obr. 6: (A) Struktura neprotaženého p130Cas. Na obrázku je zvýrazněná SH3 a SB doména, mezi nimi pak SD doména. (B) Znárodnění souboru proteinů v kontaktech buňka – ECM. Neprotažený p130Cas je slabě fosforylován kinázami SFK a signál je dále přenesen přes Crk, C3G, Rap1 až na p38/MAPK. (C) Po protažení dochází k rozbalení SD domény, což v důsledku vede k její silné fosforylaci a amplifikaci signálu až na p38/MAPK. Převzato a upraveno z (Sawada et al., 2006).

3.2 Lokalizace v buňce

Lokalizace p130Cas úzce souvisí s jeho úlohou mechanosensorické a adaptorové molekuly v buňkách. Sensorické proteiny jsou typicky přítomné v místech buněčných kontaktů, zejména pak ve fokálních adhezích (Wang et al., 1993). Fokální adheze jsou v oblastech, kde dochází ke spojení aktinového cytoskeletu s ECM prostřednictvím transmembránových receptorů integrinů (Critchley, 2000; Wehrle-Haller, 2012). Interakce integrinů s proteiny ECM následně způsobuje fosforylaci několika proteinů uvnitř buňky, mimo jiné i p130Cas (Patch et al., 1995).

Je známo, že p130Cas má mnoho interakčních domén a je schopen interagovat s celou škálou proteinů s různými funkcemi (Defilippi et al., 2006; Geiger, 2006). Základem prací, které se zaměřily na lokalizaci p130Cas byly deleční experimenty, prostřednictvím kterých se zkoumal vliv jednotlivých oblastí na úspěšnou lokalizaci do míst fokálních adhezí. Nakamoto et al. ukázali, že SH3 doména je pro cílení p130Cas do fokálních kontaktů esenciální (Nakamoto et al., 1997). Delece SD domény naopak neměla vliv na lokalizaci, což značí, že Tyr fosforylace není potřebná (Nakamoto et al., 1997). V nedávné době bylo cílení p130Cas do fokálních kontaktů upřesněno. Donato et al. objasnili, že pro správnou lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí jsou důležité SH3 a CCH doména (Donato et al., 2010). Tato práce dále popisuje, že p130Cas se dostává do nascentních FA a oblast FA opouští až během jejich rozpadu. Usuzuje se tedy, že p130Cas hraje spolu s dalšími proteiny i významnou roli v obratu fokálních adhezí (Webb et al., 2004; Janostiak et al., 2011).

Další nedávná práce popisuje regulaci v cílení p130Cas do fokálních adhezí. Jako důležitá se jeví fosforylace Y12 SH3 domény p130Cas, která snižuje lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí (Janostiak et al., 2011).

Jak již bylo řečeno, lokalizace p130Cas úzce souvisí s jeho funkcí. Ve fokálních adhezích prodělává p130Cas fosforylaci, která je ještě zesílena po rozbalení SD domény následkem mechanického stresu (Sawada et al., 2006). I přes interakci s kinázou FAK je fosforylace SD domény p130Cas přisuzována SFK kinázám (Vuori et al., 1996). Kináza FAK se však váže na SH3 doménu p130Cas a je také schopna fosforylovat Y-D-Y-V-H-L motiv blízko C-konce p130Cas a tím rekrutovat SFK kinázy (Calalb et al., 1995; Polte and Hanks, 1995; Tachibana et al., 1997). Kromě toho může hrát FAK roli lešení, na které se váží SFK, čímž je FAK schopna regulovat fosforylaci SD domény p130Cas (Ruest et al., 2001). Kináza FAK tedy hraje roli prostředníka mezi p130Cas a kinázami SFK. Fosforylace SD domény p130Cas je důležitá z hlediska navázání efektorových proteinů s SH2 a PTB doménami jako je rodina Crk proteinů (Sakai et al., 1994).

4 Signalizace přes p130Cas

Jako adaptorový protein je p130Cas schopen interagovat s velkou škálou buněčných proteinů. Na základě toho reguluje p130Cas množství signalizačních drah. V této kapitole jsou vybrány signalizační dráhy, které vedou přes p130Cas v závislosti na jeho mechanosensorické funkci.

4.1 p130Cas/Crk komplex

Proteiny rodiny Crk jsou adaptorové proteiny, které jsou schopné prostřednictvím své SH3 domény vázat proteiny s polyprolinovým motivem. Mezi nejdůležitější patří C3G (Gotoh et al., 1995), DOCK180 (Kiyokawa et al., 1998), JNK (Girardin and Yaniv, 2001) a kinázy rodiny Abl (Feller et al., 1994). Prostřednictvím SH2 domény pak váží P-Tyr SD domény p130Cas.

Fosforylace SD domény p130Cas je zvýšena při protažení, což má za následek zesílení signálu v podobě vazby Crk a jeho efektorových proteinů jak popisuje obr. 6 (Sawada et al., 2006).

Tvorba komplexu p130Cas/Crk hraje klíčovou roli především v organizaci aktinového cytoskeletu, migraci buněk, invazivitě a ochraně před apoptózou (Brabek et al., 2004; Cho and Klemke, 2000; Chodniewicz and Klemke, 2004; Kain and Klemke, 2001; Klemke et al., 1998).

4.1.1 Komplex p130Cas/Crk v regulaci MAP kinázových drah

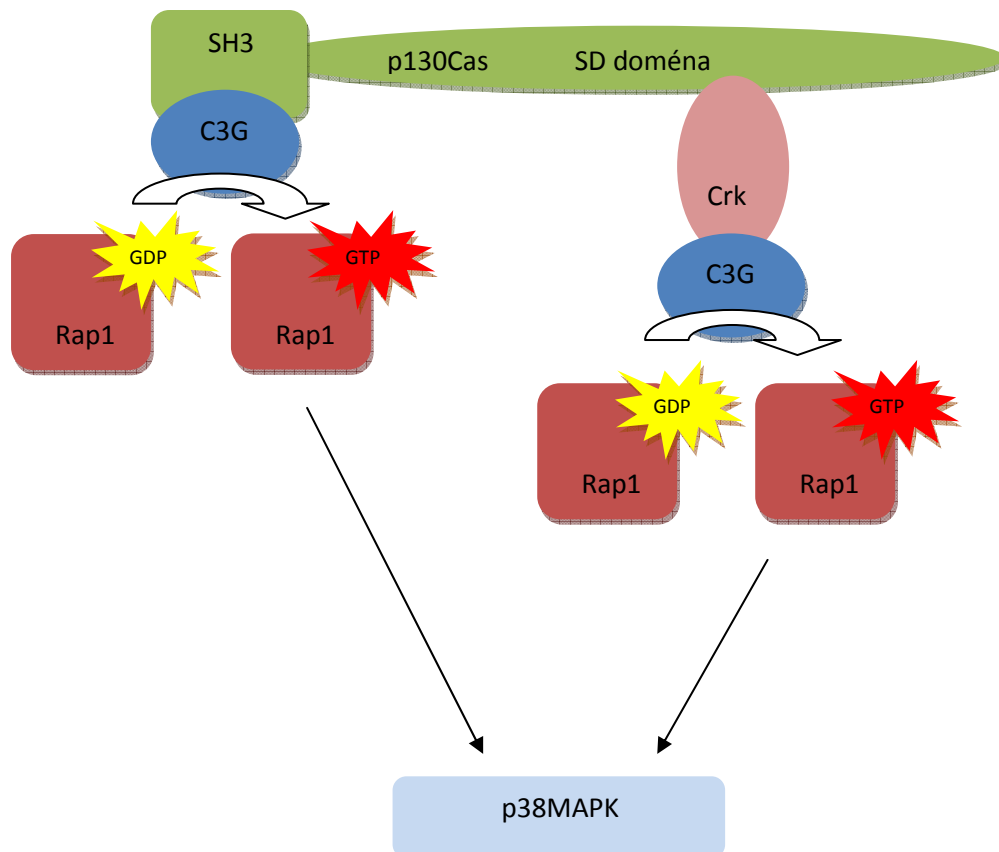
Rap1 je členem rodiny malých GTPáz Ras a je aktivován různými GEFs a rozmanitými extracelulárními stimuly (Hattori and Minato, 2003). Aktivace Rap1 byla také pozorována při natažení tzv. Tritonového cytoskeletu, při kterém byla zjištěna zvýšená fosforylace p130Cas kinázami SFK (Tamada et al., 2004).

p130Cas/Crk vystupuje v aktivaci Rap1 jako adaptorový komplex, na který se váže C3G. C3G se váže na SH3 doménu Crk (Gotoh et al., 1995) i p130Cas (Kirsch et al., 1998) a funguje jako GEF protein, který reguluje aktivitu GTPázy Rap1 (Gotoh et al., 1995).

Vazba C3G na SH3 doménu Crk zvyšuje aktivaci Rap1 (Buensuceso and O'Toole, 2000). Kromě toho zvýšená exprese p130Cas zesiluje aktivitu Rap1, která je závislá na protažení SD domény p130Cas (Sawada et al., 2006). Protažení SD domény p130Cas a s ní související zesílená fosforylace Y-X-X-P motivů kinázami SFK má za následek navázání Crk proteinů a přenos signálu až na GTPázu Rap1, viz obr. 6.

Aktivace p38MAPK zprostředkovaná Rap1 je podpořena studiemi, které naznačují, že p38MAPK se nachází ve směru signalizace Rap1 (Huang et al., 2004; Sawada et al., 2001). Kromě toho je Rap1 vyžadován v aktivaci p38MAPK v závislosti na buněčném protažení (Sawada et al., 2001). Uvedené

poznatky naznačují existenci signální dráhy, která je zprostředkována zvýšeným mechanickým stresem. Ten je odpovědný za tvorbu komplexu p130Cas/Crk, který váže C3G a tak reguluje aktivitu Rap1 a p38MAPK. p38MAPK hraje roli zejména v buněčné migraci, invazivitě a regulaci buněčného cyklu (shrnuto v Cuenda and Rousseau, 2007). Uvedená signální dráha je shrnuta na obr. 7.



Obr. 7: Aktivace p38MAPK prostřednictvím malé GTPázy Rap1. Aktivace Rap1 je řízena GEF proteinem C3G, jenž se váže na Crk v p130Cas/Crk komplexu nebo přímo na SH3 doménu p130Cas. Aktivace p38MAPK je tak regulována buď p130Cas nebo tvorbou komplexu p130Cas/Crk. Tvorba komplexu p130Cas/Crk je zesílena při protažení SD domény p130Cas.

Další MAP kinázou, která je regulována tvorbou komplexu p130Cas/Crk je JNK.

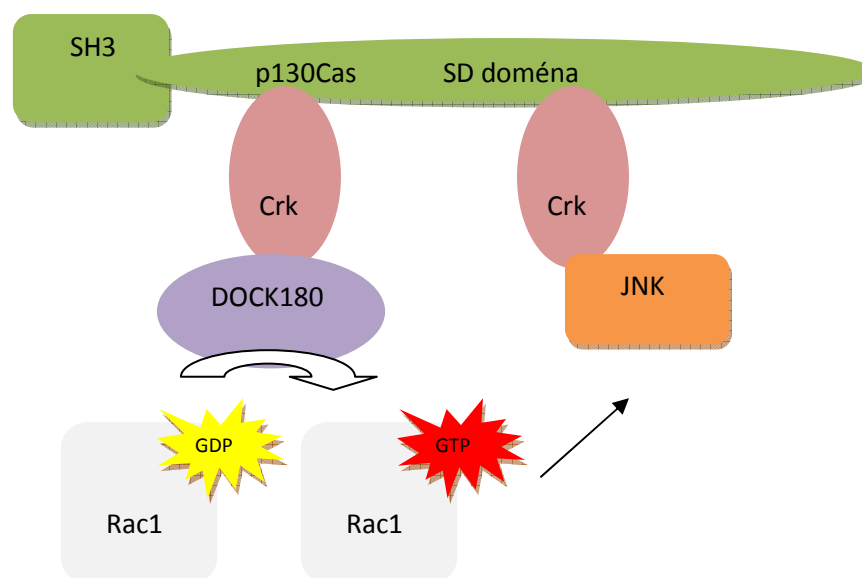
Již dlouhou dobu je známá aktivace JNK prostřednictvím Rac1 a Cdc42, členů rodiny malých Rho GTPáz (Coso et al., 1995). O několik let později byla spojena aktivace Rac1/JNK s vytvořením komplexu p130Cas/Crk (Dolfi et al., 1998; Girardin and Yaniv, 2001).

CrkII je schopen přímo vázat kinázu JNK prostřednictvím SH3 domény. Pro aktivaci JNK je však důležitá tvorba komplexu CrkII s p130Cas (Girardin and Yaniv, 2001). p130Cas/CrkII tvoří lešení pro JNK, kterou je následně možné aktivovat (Girardin and Yaniv, 2001).

Experiment s p130Cas, který měl deletovanou SD doménou a tedy nebyl schopen interakce s Crk ukázal, že v takovém případě nedochází k aktivaci JNK (Dolfi et al., 1998). Pro tuto aktivaci JNK, která je nezávislá na růstových faktorech, je tedy podstatná přítomnost p130Cas a tvorba komplexu p130Cas/Crk.

Esenciálním proteinem, který souvisí s aktivací JNK vedoucí přes p130Cas je Rac1. Aktivace JNK prostřednictvím Rac1 závisí na sestavení komplexu p130Cas/CrkII (Girardin and Yaniv, 2001). Jako hlavní regulátor Rac1 funguje GEF protein DOCK180, který je zároveň interakčním proteinem SH3 domény Crk a jeho zvýšená exprese aktivuje JNK (Kiyokawa et al., 1998).

Uvedené poznatky naznačují, že p130Cas aktivuje JNK kinázovou signální dráhu. Aktivace JNK se zobrazena na obr. 8.



Obr. 8: Aktivace JNK prostřednictvím malé GTPázy Rac1. Komplex p130Cas/Crk poskytuje lešení pro GEF protein DOCK180, který aktivuje GTPázu Rac1. Aktivace Rac1 a posléze JNK může být zesílena v případě mechanického stresu, jenž posiluje tvorbu komplexu p130Cas/Crk.

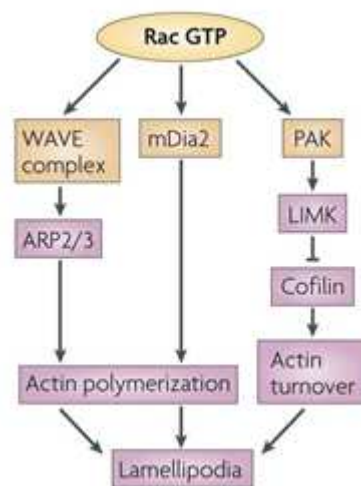
4.1.2 Komplex p130Cas/Crk v regulaci aktinového cytoskeletu

Proces migrace buněk může být rozdělen na čtyři oddělené fáze, které se opakují: protažení lamellipodia, tvorba nových adhezivních kontaktů, kontrakce buněčného těla a odpojení zadní části buňky od podkladu (shrnuto v Ridley, 2001). Dále v textu je rozepsána iniciační fáze migrace, ve které hraje významnou roli GTPáza Rac1.

Protažení lamellipodia vyžaduje polymerizaci aktinu, při které se uplatňují Rac proteiny (Nobes and Hall, 1995). Ty jsou schopné regulovat polymerizaci aktinu během protažení lamellipodia různými způsoby, které jsou zobrazeny na obr. 9 (převzato z Heasman and Ridley, 2008). Mohou aktivovat aktin-nukleační proteiny jako je ARP2/3 a formin mDia2. Rac proteiny jsou také schopné regulovat depolymerizaci aktinu. Prostřednictvím kinázy PAK stimuluji kinázu LIM, která fosforyluje a tím inaktivuje cofilin, který následně podporuje depolymerizaci aktinu (shrnutí v Heasman and Ridley, 2008).

Uvedené procesy regulované Rac proteiny celkově podporují polymerizaci aktinu a iniciují tak buněčnou migraci.

Kromě účasti v regulaci dynamiky aktinového cytoskeletu, jsou Rac proteiny zapojeny do dalších rozmanitých funkcí v buňce. Mezi ně patří především uspořádání fokálních komplexů (Nobes and Hall, 1995), aktivace JNK dráhy (Coso et al., 1995) a indukce exprese matrixových metaloproteináz (MMPs) (Kheradmand et al., 1998).



Obr. 9: GTPáza Rac ovlivňuje polymerizaci aktinu různými způsoby, mezi které patří aktivace aktin nukleačních proteinů ARP2/3 a mDia2 či inhibuje depolymerizace aktinu zprostředkované cofilinem. Celkově polymerizace aktinu vede k protažení lamellipodií a iniciaci migrace. Převzato a upraveno z (Heasman and Ridley, 2008).

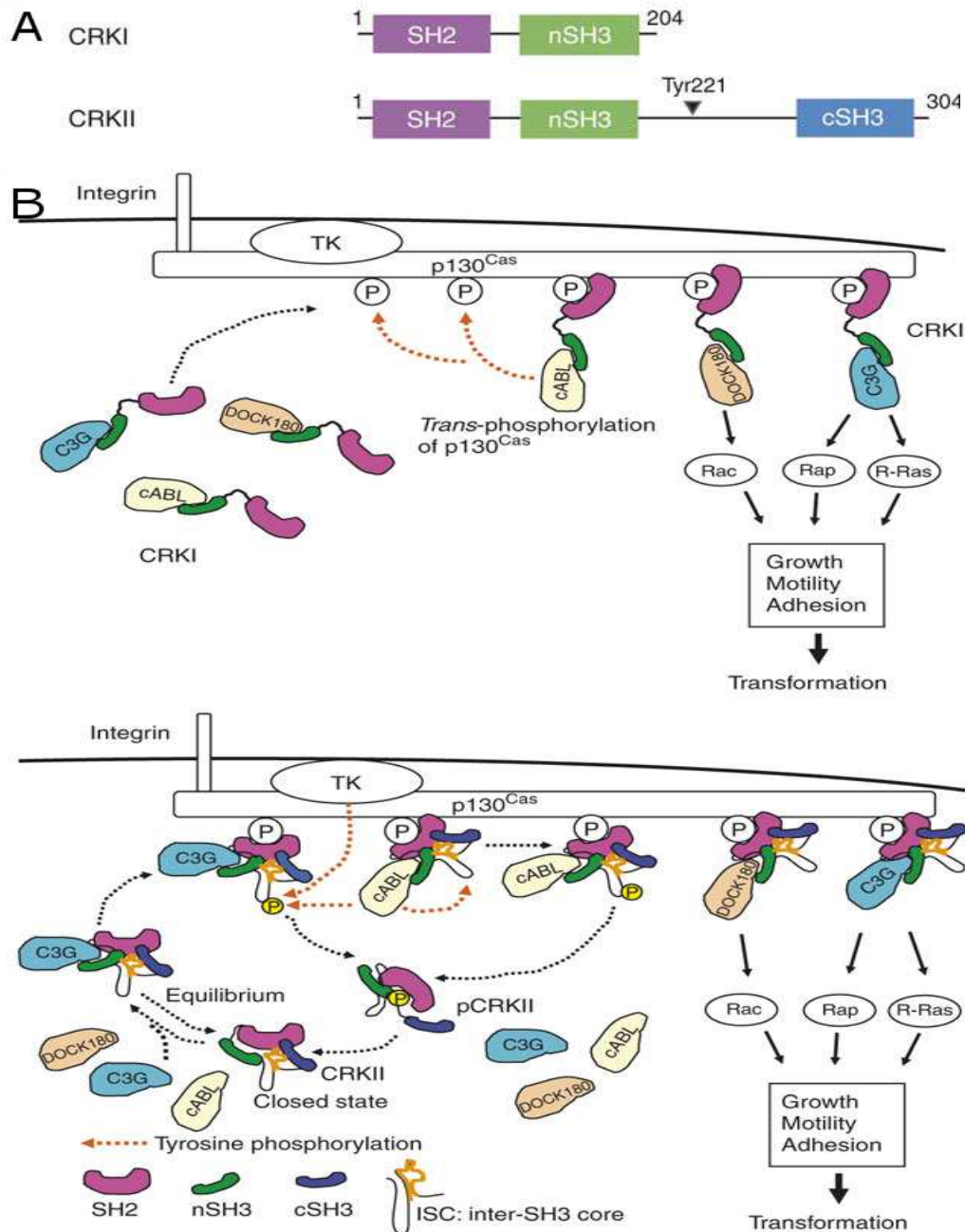
4.1.3 Regulace tvorby komplexu p130Cas/Crk

Alternativním sestřihem genu *Crk* vznikají 2 typy produktů, CrkI a CrkII, které se, jak ukazuje obr. 10A, liší v zastoupení SH3 domén (shrnutí v Cabodi et al., 2010). Schopnost regulovat tvorbu komplexu p130Cas/Crk záleží také na tom, zda se váže na SD doménu p130Cas CrkI či CrkII, jak je popsáno na obr. 10B.

Regulace tvorby komplexu p130Cas/Crk je pro buňku velmi významná. Je známo, že komplex p130Cas/Crk je důležitý zejména z hlediska organizace aktinového cytoskeletu, buněčné migrace či

apoptózy (Cho and Klemke, 2000; Chodniewicz and Klemke, 2004; Kain and Klemke, 2001; Klemke et al., 1998).

Nejvýznamnějšími proteiny v regulaci tvorby komplexu p130Cas/Crk jsou kinázy SFK, FAK, Abl a fosfatázy PTP-PEST a PTP-1B.



Obr. 10: (A) CrkI a CrkII se liší zastoupením SH3 domén. Na obrázku je také znázorněn Y221, jenž je důležitým místem v regulaci CrkII. (B) Na horním obrázku je zobrazen model fungování CrkI v komplexu s p130Cas. V tomto modelu je předpokládáno, že by kinázy rodiny Abl mohly být schopné přímo fosforylovat SD doménu p130Cas. Na spodním obrázku je zobrazen model fungování CrkII v komplexu s p130Cas a jeho regulace kinázami rodiny Abl a oblastí ISC, která se vyskytuje mezi SH3 doménami CrkII. Převzato a upraveno z (Kobashigawa et al., 2007).

Tvorba komplexu p130Cas/Crk je závislá na fosforylaci Y-X-X-P motivů SD domény p130Cas. Po fosforylaci jsou schopné se na SD doménu p130Cas vázat proteiny s SH2 a PTB doménami, mezi které patří i Crk. Kinázy SFK a FAK napomáhají fosforylaci SD domény p130Cas, která je zesílena v závislosti na protažení SD domény. Tím následně vytváří vazebný motiv pro SH2 doménu Crk a iniciují tak tvorbu komplexu p130Cas/Crk (Ruest et al., 2001).

Kinázy rodiny Abl naopak zabraňují vytvoření komplexu p130Cas/Crk. Abl kinázy obsahují oblast bohatou na prolin, kterou jsou schopné se vázat na SH3 doménu CrkII a fosforylovat Y221 (Feller et al., 1994). Takto fosforylovaný CrkII tvoří mezi svou SH2 doménou a Y221 intramolekulární můstek, jehož vytvoření znemožňuje vázat SD doménu p130Cas (Feller et al., 1994). Kinázy rodiny Abl hrají také kritickou roli v negativní regulaci buněčné migrace skrze komplex p130Cas/Crk (Kain and Klemke, 2001). Abl kinázy by tak mohly být v buňce využívány jako součást negativní zpětné vazby v integrinové signalizaci, a tak kontrolovat buněčnou migraci zprostředkovanou přes p130Cas/Crk komplex. Jak je patrné na obr. 10A, CrkI neobsahuje Y221, takže ani nedochází k jeho regulaci prostřednictvím Abl.

Další způsob regulace Crk II souvisí s úsekem mezi N-koncovou a C-koncovou SH3 doménou CrkII. Tato oblast nazvaná jako ISC tvoří kontakty s SH2 i SH3 doménou a formuje se kompaktní struktura, která částečně maskuje N-koncovou SH3 doménu (Kobashigawa et al., 2007). Ustaví se tak rovnováha, jak je zobrazeno obr. 10B, mezi dvěma stavy, samotný CrkII a CrkII s navázanými efektorovými proteiny (Kobashigawa et al., 2007).

Mezi další regulátory tvorby komplexu p130Cas/Crk patří tyrosinové fosfatázy PEST a 1B. Obě tyto fosfatázy obsahují oblast bohatou na prolin, kterou se váží na SH3 doménu p130Cas a následně defosforylují p130Cas (Garton et al., 1996; Liu et al., 1996). Jsou tedy schopné narušovat na adhezích závislé signální události spojené s tvorbou komplexu p130Cas/Crk jako je aktivace MAPKs, reorganizace aktinového cytoskeletu a buněčná migrace (Garton and Tonks, 1999; Liu et al., 1998). Kromě toho se fosfatáza 1B váže na SH3 doménu Crk (Liu et al., 1996). Takto navázaná fosfatáza defosforyluje důležité regulační místo na CrkII, Y221 (Takino et al., 2003). CrkII se pak váže na SD doménu p130Cas a brání tak její defosforylaci (Takino et al., 2003). Fosfatáza 1B tak hraje roli jak v negativní tak i v pozitivní regulaci tvorby komplexu p130Cas/Crk.

4.2 p130Cas/CIZ

V r. 2000 byl v krysích buňkách identifikován nový vazebný protein SH3 domény p130Cas pojmenovaný jako CIZ (Nakamoto et al., 2000). Nakamoto et al. zjistili, že CIZ je kyvadlový protein, který se vyskytuje v jádře i cytoplasmě buňky. Obsahuje tzv. motiv zinkového prstu, pomocí něhož je schopen interagovat s DNA a regulovat tak expresi některých genů. Ve studii byla stanovena i

konsensus sekvence, na kterou se CIZ na DNA váže, která odpovídá promotorům několika MMPs (Nakamoto et al., 2000).

Později Janssen et al. prokázali, že lidský homolog CIZ neinteraguje přímo s p130Cas (Janssen and Marynen, 2006). Byly však nalezeny proteiny, mezi které patří i protein fokálních adhezí zyxin, jenž CIZ váží (Janssen and Marynen, 2006).

Zyxin je podobně jako p130Cas a Crk adaptorový protein s mnoha doménami zajišťující početné protein-proteinové interakce (Macalma et al., 1996; Yi et al., 2002). Prostřednictvím své LIM domény je schopen interagovat i s p130Cas (Yi et al., 2002). Předpokládá se tedy, že zyxin je schopen působit jako prostředník mezi p130Cas a CIZ (Janssen and Marynen, 2006).

Dále bylo objeveno, že mechanické zatížení je vyžadováno pro lokalizaci zyxinu do fokálních adhezí (Hirata et al., 2008). To vedlo k navržení hypotézy tvorby tzv. mechanosomů, působících v kostních buňkách (Childress et al., 2010). Po vytvoření komplexu p130Cas/zyxin/CIZ vytváří tento komplex mechanosom, který přenáší informaci z fokálních adhezí až do jádra, kde je tato informace převedena až k iniciaci exprese cílových genů (Childress et al., 2010; Pavalko et al., 2003).

Geny, jejichž expresi je schopen CIZ ovlivňovat, kódují některé MMPs (Nakamoto et al., 2000). Již dříve bylo zjištěno, že Rac1, který leží ve směru signalizace od p130Cas je odpovědný za zvýšení exprese matrixové metaloproteinázy 1 (MMP-1) prostřednictvím NF- κ B (Kheradmand et al., 1998). p130Cas je tak schopen regulovat i syntézu MMPs, které významně napomáhají migraci nádorových buněk (shrnuto v Westermarck and Kahari, 1999).

4.3 Vztah p130Cas s kinázami ERK

Buňky, které jsou schopné migrovat a invadovat do okolních tkání musí aktivovat svůj mechanismus přežití. Jakmile buňky ztratí kontakt s ECM, rychle aktivují svůj apoptotický program a umírají v procesu zvaném anoikis (Frisch and Francis, 1994). U proteinů p130Cas a ERK bylo nalezeno, že chrání buňky před apoptózou během invaze (Cho and Klemke, 2000) a zároveň přispívají k migračnímu a invazivnímu potenciálu buněk (Cheresh et al., 1999; Cho and Klemke, 2000). Kromě toho jsou p130Cas a ERK kinázy spojovány s rezistencí nádorových buněk prsu k chemoterapii (Cabodi et al., 2004; Ta et al., 2008).

Interakce buněk s ECM nebo cytokiny podporuje buněčnou migraci prostřednictvím aktivace ERK1/2 a tvorby komplexu p130Cas/Crk (Cheresh et al., 1999). Kromě toho karcinomové buňky selektované pro svůj zvýšený invazivní a metastatický potenciál in vivo, měly zvýšenou aktivitu ERK1/2 a schopnost tvorby p130Cas/Crk komplexu (Cho and Klemke, 2000). Mechanismus, jakým komplex p130Cas/Crk reguluje buněčnou migraci, souvisí s aktivací malé GTPázy Rac. Tento mechanismus je popsán výše v textu. Na obr. 9 jsou pak zobrazeny dráhy, které naznačují, jakým

způsobem GTPázy Rac regulují aktinový cytoskelet a buněčnou migraci. Kromě toho inhibice GTPázy Rac indukují apoptózu invazivních buněk (Cho and Klemke, 2000).

Kinázy ERK regulují migraci buněk prostřednictvím MLCK, kterou fosforylují a tím aktivují (Cheresh et al., 1999; Klemke et al., 1997). Aktivita MLCK je tak klíčová v invazivitě buněk zprostředkované ERK, ale nemá vliv na přežití buněk. Nicméně ERK kinázy jsou známé svou schopností regulovat buněčný cyklus a prostřednictvím této regulace podporovat proliferaci buněk (shrnuto v Wada and Penninger, 2004).

Lidský homolog p130Cas (nazvaný jako BCAR1) byl identifikován jako protein zodpovědný za rezistenci nádorových buněk prsu k antiestrogenové terapii (Brinkman et al., 2000). Studie zabývající se mechanismy antiestrogenové rezistence naznačily úlohu p130Cas v aktivaci signálních drah, které vedou k přežívání buněk a proliferaci. Tyto dráhy zahrnují i aktivaci ERK1/2 dráhy (Cabodi et al., 2004; Soni et al., 2009). Exprese dominantně negativního p130Cas, který je složen z rozrušené SB domény fúzované s SD doménou způsobila zvýšení citlivosti buněk TAM-R na léčbu Tamoxifenem, který je hlavním antiestrogenovým léčivem (Soni et al., 2009). Zvýšení citlivosti buněk TAM-R k Tamoxifenu je spojeno s morfologickými změnami a potlačením několika signálních drah zahrnujících ERK1/2 dráhu (Soni et al., 2009).

V poslední době bylo prokázáno, že p130Cas kromě rezistence nádorových prsních buněk k antiestrogenové léčbě, způsobuje i rezistenci k Adriamycinu. Adriamycin je léčivo s proapoptotickými účinky, které se užívá v léčbě rakoviny prsu. Zvýšená exprese p130Cas uděluje nádorovým buňkám prsu rezistenci k Adriamycinu (Ta et al., 2008). Fosforylace ERK1/2 je zvýšená v buňkách ošetřených Adriamycinem, které mají zvýšenou expresi p130Cas (Ta et al., 2008). Kromě toho dochází ke snížené expresi proapoptotického proteinu Bak (Ta et al., 2008). Celkově tak p130Cas aktivuje dráhy spojené s růstem a přežitím buněk a zároveň inhibuje dráhy vedoucí k apoptóze u buněk ošetřených Adriamycinem (Ta et al., 2008).

Doposud nebyla prokázána přímá interakce mezi p130Cas a kinázami ERK. Nicméně mnohé práce popisují vztah mezi p130Cas a ERK. Ten souvisí s již zmíněnou buněčnou migrací, invazivitou a schopností nádorových buněk prsu odolávat rakovinné chemoterapii. Některé práce popisují, že signalizace přes ERK a p130Cas fungují nezávisle na sobě (Cheresh et al., 1999). Nicméně práce zabývající se rezistencí nádorových buněk prsu k antiestrogenové léčbě či k Adriamycinu popisují zvýšenou aktivitu ERK1/2 při zvýšené expresi p130Cas (Soni et al., 2009; Ta et al., 2008).

4.4 Shrnutí

Jako mechanosensorické signalizační dráhy lze označit ty, které jsou aktivovány v odpovědi na zvýšený mechanický stres, který působí na buňku jak zvnějšku tak zevnitř. Prostřednictvím těchto drah jsou buňky schopné vhodně reagovat a přizpůsobit se vznikajícímu mechanickému stresu různými způsoby. Mezi nejčastější patří reorganizace cytoskeletu, což souvisí s tvorbou nových adhezivních kontaktů či navozením migračního fenotypu.

Jedním z důležitých proteinů, které jsou schopné reagovat na zvýšený mechanický stres je adaptorový protein p130Cas. Tento protein je složkou fokálních adhezí, které jsou známé svou schopností reagovat na mechanické stimuly (shrnuto v Bershadsky et al., 2006; Geiger et al., 2009). V relativně nedávné době byl poskytnut důkaz, že p130Cas je schopen rozvolnit svou strukturu právě v odpovědi na zvýšený mechanický stres (Sawada et al., 2006).

Obecně lze říci, že mechanosensorické signalizační dráhy, které vedou přes p130Cas jsou realizovány rozbalením a fosforylací SD domény p130Cas. Protein p130Cas v tomto procesu funguje jako ústředí, ze kterého se signály vydávají přes různé proteiny dále do buňky. Jako zásadně důležitá se z tohoto hlediska jeví interakce mezi p130Cas a Crk, která je zvýšena právě při rozbalení a následné fosforylaci SD domény p130Cas. Dochází k odhalení Y-X-X-P motivů, které jsou ve zvýšeném množství fosforylovány. Fosforylované Tyr jsou pak rozeznávány Crk proteiny, které se na tyto Tyr váží prostřednictvím svých SH2 domén.

Tvorba komplexu p130Cas/Crk je významná z mnoha důvodů. Tento komplex je schopen vázat řadu proteinů jako jsou GEF faktory C3G či DOCK180, které regulují aktivitu svých efektorových GTPáz. Ty působí zejména jako regulátory MAPK drah a cytoskeletu. To souvisí s již zmíněnou reorganizací cytoskeletu a migrací, ale i s apoptózou, diferenciací či proliferací buněk.

Další mechanosensitivní signalizační dráha je realizována prostřednictvím nepřímé interakce p130Cas s transkripčním faktorem CIZ. Bylo prokázáno, že zyxin, který je interakčním partnerem jak p130Cas tak i CIZ, je do fokálních adhezí přemístěn v závislosti na zvýšeném mechanickém stresu (Hirata et al., 2008). Mechanický stres napomáhá formování tzv. mechanosomů, mezi které patří i komplex p130Cas/zyxin/CIZ. Ten se zatím neznámým způsobem dostává do jádra, kde spouští expresi cílových genů, mezi které patří geny pro MMPs (Nakamoto et al., 2000). Ty jsou schopné remodelovat ECM, čímž přispívají k migraci buněk.

5 Závěr

p130Cas je adaptorový protein, účastní se mnoha významných procesů v buňce. Zásadní rolí proteinu p130Cas v buňce je snímání mechanických stimulů, čímž napomáhá utvářet vhodnou buněčnou odpověď na zvýšený mechanický stres. Kromě toho je p130Cas spolu s dalšími proteiny schopen navodit v buňce migrační fenotyp. Zvýšená exprese proteinu p130Cas napomáhá i rozvoji prsních nádorů, které jsou rezistentní k chemoterapii. Regulace jednotlivých signálních drah prostřednictvím proteinu p130Cas může být zodpovědná i za vznik sekundárních nádorů, metastáz.

Protein p130Cas je důležitý pro vývoj normálních tkání i při rozvoji patologických procesů. Nové poznatky o schopnosti proteinu p130Cas reagovat na zvýšený mechanický stres rozšířily naše celkové znalosti o signalizaci přes protein p130Cas. Pochopení a přesné určení signálních drah, které vedou přes p130Cas, nejen v souvislosti s mechanickým stresem mohou v budoucnu napomáhat při tvorbě nových léčiv, která by zvyšovala šanci na lepší prognózu v léčbě nádoru prsu i dalších nádorových onemocnění.

Seznam literatury

- Bershadsky, A.D., C. Ballestrem, L. Carramusa, Y. Zilberman, B. Gilquin, S. Khochbin, A.Y. Alexandrova, A.B. Verkhovsky, T. Shemesh, and M.M. Kozlov. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *European Journal of Cell Biology*. 85:165-173.
- Blumenthal, D.K., and J.T. Stull. 1980. ACTIVATION OF SKELETAL-MUSCLE MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE BY CALCIUM(2+) AND CALMODULIN. *Biochemistry*. 19:5608-5614.
- Brabek, J., B.S. Constancio, N.Y. Shin, A. Pozzi, A.M. Weaver, and S.K. Hanks. 2004. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene*. 23:7406-7415.
- Briknarova, K., F. Nasertorabi, M.L. Havert, E. Eggleston, D.W. Hoyt, C.L. Li, A.J. Olson, K. Vuori, and K.R. Ely. 2005. The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130(cas)) is a four-helix bundle. *Journal of Biological Chemistry*. 280:21908-21914.
- Brinkman, A., S. van der Flier, E.M. Kok, and L.C.J. Dorssers. 2000. BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 92:112-120.
- Buensuceso, C.S., and T.E. O'Toole. 2000. The association of CRKII with C3G can be regulated by integrins and defines a novel means to regulate the mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 275:13118-13125.
- Cabodi, S., M.D. Camacho-Leal, P. Di Stefano, and P. Defilippi. 2010. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nature Reviews Cancer*. 10:858-870.
- Cabodi, S., L. Moro, G. Baj, M. Smeriglio, P. Di Stefano, S. Gippone, N. Surico, L. Silengo, E. Turco, G. Tarone, and P. Defilippi. 2004. p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *Journal of Cell Science*. 117:1603-1611.
- Calalb, M.B., T.R. Polte, and S.K. Hanks. 1995. TYROSINE PHOSPHORYLATION OF FOCAL ADHESION KINASE AT SITES IN THE CATALYTIC DOMAIN REGULATES KINASE-ACTIVITY - A ROLE FOR SRC FAMILY KINASES. *Molecular and Cellular Biology*. 15:954-963.
- Cheresh, D.A., J. Leng, and R.L. Klemke. 1999. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *Journal of Cell Biology*. 146:1107-1116.
- Childress, P., A.G. Robling, and J.P. Bidwell. 2010. Nmp4/CIZ: Road block at the intersection of PTH and load. *Bone*. 46:259-266.
- Cho, S.Y., and R.L. Klemke. 2000. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology*. 149:223-236.
- Chodniewicz, D., and R.L. Klemke. 2004. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1692:63-76.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426:517-524.
- Coso, O.A., M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N.Z. Xu, T. Miki, and J.S. Gutkind. 1995. THE SMALL GTP-BINDING PROTEINS RAC AND CDC42 REGULATE THE ACTIVITY OF THE JNK/SAPK SIGNALING PATHWAY. *Molecular Biology of the Cell*. 6:1976-1976.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Current Opinion in Cell Biology*. 12:133-139.
- Cuenda, A., and S. Rousseau. 2007. P38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1773:1358-1375.
- Dedman, A., R. Sharif-Naeini, J.H.A. Folgering, F. Duprat, A. Patel, and E. Honore. 2009. The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 38:293-303.
- Defilippi, P., P. Di Stefano, and S. Cabodi. 2006. p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in Cell Biology*. 16:257-263.

- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R.C. Liu, P. Roca-Cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science*. 323:638-641.
- Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, M. Ojaniemi, H. Nakamura, M. Matsuda, and K. Vuori. 1998. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:15394-15399.
- Donato, D.M., L.M. Ryzhova, L.M. Meenderink, I. Kaverina, and S.K. Hanks. 2010. Dynamics and Mechanism of p130Cas Localization to Focal Adhesions. *Journal of Biological Chemistry*. 285:20769-20779.
- Feller, S.M., B. Knudsen, and H. Hanafusa. 1994. C-ABL KINASE REGULATES THE PROTEIN-BINDING ACTIVITY OF C-CRK. *Embo Journal*. 13:2341-2351.
- Frisch, S.M., and H. Francis. 1994. DISRUPTION OF EPITHELIAL CELL-MATRIX INTERACTIONS INDUCES APOPTOSIS. *Journal of Cell Biology*. 124:619-626.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology*. 159:695-705.
- Gallagher, P.J., B.P. Herring, and J.T. Stull. 1997. Myosin light chain kinases. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 18:1-16.
- Gao, Y., L.H. Ye, H. Kishi, T. Okagaki, K. Samizo, A. Nakamura, and K. Kohama. 2001. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *Iubmb Life*. 51:337-344.
- Garton, A.J., A.J. Flint, and N.K. Tonks. 1996. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Molecular and Cellular Biology*. 16:6408-6418.
- Garton, A.J., and N.K. Tonks. 1999. Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Journal of Biological Chemistry*. 274:3811-3818.
- Geiger, B. 2006. A role for p130Cas in mechanotransduction. *Cell*. 127:879-881.
- Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10:21-33.
- Girardin, S.E., and M. Yaniv. 2001. A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation. *Embo Journal*. 20:3437-3446.
- Goksoy, E., Y.Q. Ma, X.X. Wang, X.M. Kong, D. Perera, E.F. Plow, and J. Qin. 2008. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Molecular Cell*. 31:124-133.
- Golji, J., J. Lam, and M.R.K. Mofrad. 2011. Vinculin Activation Is Necessary for Complete Talin Binding. *Biophysical Journal*. 100:332-340.
- Gotoh, T., S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi, T. Kurata, and M. Matsuda. 1995. IDENTIFICATION OF RAP1 AS A TARGET FOR THE CRK SH3 DOMAIN-BINDING GUANINE NUCLEOTIDE-RELEASING FACTOR C3G. *Molecular and Cellular Biology*. 15:6746-6753.
- Hattori, M., and N. Minato. 2003. Rap1 GTPase: Functions, regulation, and malignancy. *Journal of Biochemistry*. 134:479-484.
- Heasman, S.J., and A.J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:690-701.
- Hirata, H., H. Tatsumi, and M. Sokabe. 2008. Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *Journal of Cell Science*. 121:2795-2804.
- Huang, C.C., J.L. You, M.Y. Wu, and K.S. Hsu. 2004. Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI center dot Rab5 complex - Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *Journal of Biological Chemistry*. 279:12286-12292.
- Janostiak, R., O. Tolde, Z. Bruhova, M. Novotny, S.K. Hanks, D. Rosel, and J. Brabek. 2011. Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*. 22:4256-4267.
- Janssen, H., and P. Marynen. 2006. Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4 - zyxin as a mediator for p130CAS signaling? *Experimental Cell Research*. 312:1194-1204.

- Kain, K.H., and R.L. Klemke. 2001. Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 276:16185-16192.
- Kheradmand, F., E. Werner, P. Tremble, M. Symons, and Z. Werb. 1998. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*. 280:898-902.
- Kirsch, K.H., M.M. Georgescu, and H. Hanafusa. 1998. Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *Journal of Biological Chemistry*. 273:25673-25679.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes & Development*. 12:3331-3336.
- Klemke, R.L., S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. deLanerolle, and D.A. Cheresh. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Cell Biology*. 137:481-492.
- Klemke, R.L., J. Leng, R. Molander, P.C. Brooks, K. Vuori, and D.A. Cheresh. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *Journal of Cell Biology*. 140:961-972.
- Kobashigawa, Y., M. Sakai, M. Naito, M. Yokochi, H. Kumeta, Y. Makino, K. Ogura, S. Tanaka, and F. Inagaki. 2007. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nature Structural & Molecular Biology*. 14:503-510.
- Kostic, A., and M.P. Sheetz. 2006. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge. *Molecular Biology of the Cell*. 17:2684-2695.
- Lee, S.E., R.D. Kamm, and M.R.K. Mofrad. 2007. Force-induced activation of Talin and its possible role in focal adhesion mechanotransduction. *Journal of Biomechanics*. 40:2096-2106.
- Lim, Y., S.T. Lim, A. Tomar, M. Gardel, J.A. Bernard-Trifilo, X.L. Chen, S.A. Uryu, R. Canete-Soler, J. Zhai, H. Lin, W.W. Schlaepfer, P. Nalbant, G. Bokoch, D. Ilic, C. Waterman-Storer, and D.D. Schlaepfer. 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *Journal of Cell Biology*. 180:187-203.
- Ling, K., R.L. Doughman, A.J. Firestone, M.W. Bunce, and R.A. Anderson. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature*. 420:89-93.
- Liu, F., D.E. Hill, and J. Chernoff. 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the src homology 3 domain of p130(Cas). *Journal of Biological Chemistry*. 271:31290-31295.
- Liu, F., M.A. Sells, and J. Chernoff. 1998. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Current Biology*. 8:173-176.
- Macalma, T., J. Otte, M.E. Hensler, S.M. Bockholt, H.A. Louis, M. KalffSuske, K.H. Grzeschik, D. vonderAhe, and M.C. Beckerle. 1996. Molecular characterization of human zyxin. *Journal of Biological Chemistry*. 271:31470-31478.
- Martinac, B. 2004. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *Journal of Cell Science*. 117:2449-2460.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *Embo Journal*. 15:2208-2216.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6:56-68.
- Nakamoto, T., R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1997. Requirements for localization of p130(cas) to focal adhesions. *Molecular and Cellular Biology*. 17:3884-3897.
- Nakamoto, T., R. Sakai, K. Ozawa, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1996. Direct binding of C-terminal region of p130(Cas) to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 271:8959-8965.
- Nakamoto, T., T. Yamagata, R. Sakai, S. Ogawa, H. Honda, H. Ueno, N. Hirano, Y. Yazaki, and H. Hirai. 2000. Clz, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Molecular and Cellular Biology*. 20:1649-1658.

- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. RHO, RAC, AND CDC42 GTPASES REGULATE THE ASSEMBLY OF MULTIMOLECULAR FOCAL COMPLEXES ASSOCIATED WITH ACTIN STRESS FIBERS, LAMELLIPODIA, AND FILOPODIA. *Cell*. 81:53-62.
- Pankova, K., D. Rosel, M. Novotny, and J. Brabek. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:63-71.
- Patch, L.A., S.M. Bockholt, A. Bouton, J.T. Parsons, and K. Burridge. 1995. ADHESION-INDUCED TYROSINE PHOSPHORYLATION OF THE P130 SRC SUBSTRATE. *Journal of Cell Science*. 108:1371-1379.
- Pavalko, F.M., S.M. Norvell, D.B. Burr, C.H. Turner, R.L. Duncan, and J.P. Bidwell. 2003. A model for mechanotransduction in bone cells: The load-bearing mechanosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 88:104-112.
- Polte, T.R., and S.K. Hanks. 1995. INTERACTION BETWEEN FOCAL ADHESION KINASE AND CRK-ASSOCIATED TYROSINE KINASE SUBSTRATE P130(CAS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:10678-10682.
- Ridley, A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science*. 114:2713-2722.
- Ruest, P.J., N.Y. Shin, T.R. Polte, X. Zhang, and S.K. Hanks. 2001. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Molecular and Cellular Biology*. 21:7641-7652.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1994. A NOVEL SIGNALING MOLECULE, P130, FORMS STABLE COMPLEXES IN-VIVO WITH V-CRK AND V-SRC IN A TYROSINE PHOSPHORYLATION-DEPENDENT MANNER. *Embo Journal*. 13:3748-3756.
- Sawada, Y., K. Nakamura, K. Doi, K. Takeda, K. Tobiume, M. Saitoh, K. Morita, I. Komuro, K. De Vos, M. Sheetz, and H. Ichijo. 2001. Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase. *Journal of Cell Science*. 114:1221-1227.
- Sawada, Y., M. Tamada, B.J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M.P. Sheetz. 2006. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*. 127:1015-1026.
- Schmitz, A.A.P., E.E. Govek, B. Bottner, and L. Van Aelst. 2000. Rho GTPases: Signaling, migration, and invasion. *Experimental Cell Research*. 261:1-12.
- Soni, S., B.T. Lin, A. August, R.I. Nicholson, and K.H. Kirsch. 2009. Expression of a Phosphorylated p130(Cas) Substrate Domain Attenuates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Survival Pathway in Tamoxifen Resistant Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 107:364-375.
- Ta, H.Q., K.S. Thomas, R.S. Schrecengost, and A.H. Bouton. 2008. A Novel Association between p130(Cas) and Resistance to the Chemotherapeutic Drug Adriamycin in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 68:8796-8804.
- Tachibana, K., T. Urano, H. Fujita, Y. Ohashi, K. Kamiguchi, S. Iwata, H. Hirai, and C. Morimoto. 1997. Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase - A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 272:29083-29090.
- Takino, T., M. Tamura, H. Miyamori, M. Araki, K. Matsumoto, H. Sato, and K.M. Yamada. 2003. Tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein modulates cell migration. *Journal of Cell Science*. 116:3145-3155.
- Tamada, M., M.P. Sheetz, and Y. Sawada. 2004. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental Cell*. 7:709-718.
- Tikhmyanova, N., J.L. Little, and E.A. Golemis. 2010. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:1025-1048.
- Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. 1996. Induction of p130(cas) signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: A role for Src family kinases. *Molecular and Cellular Biology*. 16:2606-2613.

- Wada, T., and J.M. Penninger. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 23:2838-2849.
- Wang, N., J.P. Butler, and D.E. Ingber. 1993. MECHANOTRANSDUCTION ACROSS THE CELL-SURFACE AND THROUGH THE CYTOSKELETON. *Science*. 260:1124-1127.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biology*. 6:154-+.
- Wehrle-Haller, B. 2012. Structure and function of focal adhesions. *Current Opinion in Cell Biology*. 24:116-124.
- Westermarck, J., and V.M. Kahari. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB Journal*. 13:781-792.
- Yi, J.S., S. Kloeker, C.C. Jensen, S. Bockholt, H. Honda, H. Hirai, and M.C. Beckerle. 2002. Members of the zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130(Cas) family of signal transducers. *Journal of Biological Chemistry*. 277:9580-9589.