

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

**Bakalářská práce**

**Úloha proteinu Cas v invazivitě nádorových buněk**

**Zuzana Gerndtová**

**Školitel: RNDr. Jan Brábek, Ph.D.**

**2006**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Úloha proteinu Cas v invazivitě nádorových buněk** vypracovala samostatně s pomocí citované literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Srpen 2006



Zuzana Gerndtová

## **ABSTRAKT**

Protein Cas patří do rodiny adaptorových proteinů Cas a spolu se svými interakčními partnery ovlivňuje regulaci řady buněčných dějů. Účast proteinu Cas v signálních transdukčních drahách, jež řídí buněčnou motilitu, proliferaci a apoptózu, se potvrdila v mnoha studiích.

Protein Cas je také spojován s patofyziologickými procesy jako je karcinogeneze, tvorba metastází a invazivita nádorových buněk. Podrobné zkoumání role proteinu Cas v mechanismu těchto procesů postupně přináší řadu užitečných informací, které mohou pomoci i v klinické praxi.

**Klíčová slova:** protein Cas, motilita, proliferace, invazivita, karcinogeneze

# **Obsah**

1. Úvod.....	5
2. Význam integrinů a adhezivních foků pro buněčné procesy .....	6
3. Rodina adaptorových proteinů Cas.....	7
3.1. Protein Cas .....	7
3.2. Proteiny HEF1 a Efs/Sin .....	9
4. Aktivace proteinu Cas fosforylací .....	11
4.1. Fosforylace proteinu Cas v závislosti na aktivaci membránových receptorů ligandem.....	11
4.2. Fosforylace proteinu Cas v závislosti na aktivaci integrinů při adhezi buňky.....	12
4.3. Mechanismy fosforylace proteinu Cas.....	14
4.4. Procesivita mechanismu fosforylace .....	15
4.5. Negativní regulace fosforylace .....	16
5. Dynamika aktinového cytoskeletu a buněčná migrace .....	17
5.1. Specifické interakce proteinu Cas s dalšími efektory ovlivňují buněčnou migraci.....	18
6. Vliv proteinu Cas na proliferaci a apoptózu.....	21
7. Cas v procesech onkogeneze, transformace a invazivity.....	22
7.1. Protein Cas a invazivita fibroblastů transformovaných onkoproteinem Src.....	22
7.2. Cas a invazivita epitelálních nádorových buněk .....	26
8. Závěr.....	28
9. Přehled citované literatury .....	29

## 1. Úvod

Protein Cas (Crk-associated substrate) patří do rodiny adaptorových proteinů Cas. Je aktivován fosforylací, ke které dochází po stimulaci různých membránových receptorů včetně integrinů. Díky multidoménové struktuře a schopnosti být fosforylován může protein Cas interagovat s mnoha dalšími efektorovými proteiny a regulovat tak rozmanité děje v buňce. Mezi tyto interakční partnery patří proteiny různých typů a ne u všech byla objasněna jejich role v buněčných procesech. Nejvíce prostudovány byly komplexy proteinu Cas s proteintyrozínskými kinázami Src, FAK a adaptorovým proteinem Crk.

Tato práce nejdříve objasňuje úlohu proteinu Cas a některých jeho interakčních partnerů v procesech regulace dynamiky aktinového cytoskeletu, buněčné migrace, proliferace a apoptózy.

V další části se práce zaměřuje na situaci, kdy jsou výše zmíněné procesy deregulovány. Narušení regulace procesů buněčné migrace, proliferace či apoptózy, ve kterých má protein Cas nezastupitelnou roli, vede ve výsledku k transformaci buňky, která je úzce spojena se zvýšenou invazivitou a tvorbou metastází.

## **2. Význam integrinů a adhezivních foků pro buněčné procesy**

Tělo mnohobuněčného organismu je komplexní systém, v němž jedinec – buňka musí kooperovat se svými sousedy. Díky této spolupráci, která má přísná pravidla, pak vznikají vyšší funkční celky buněk a tkání navzájem se doplňující a zabezpečující přežití organismu.

Signály přicházející z okolního prostředí buňky různými cestami řídí buněčné děje a tím udržují celkovou homeostázu v mnohobuněčném organismu. Mezi zprostředkovatele těchto signálů patří mimo jiné i integriny.

Integriny jsou transmembránové proteiny, které jsou zároveň i receptory pro proteiny extracelulární matrix (ECM) jako je kolagen, fibronektin, laminin či vitronektin a slouží jako pojítko mezi ECM a aktinovým cytoskeletem uvnitř buňky. Prostřednictvím své intracelulární domény mohou integriny interagovat s mnoha dalšími cytosolickými proteiny a přenášet tak signály k remodelaci aktinového skeletu.

Při stimulaci různých membránových receptorů dochází k seskupování integrinů a formování adhezivních foků, které poutají buňku k substrátu. Zároveň se uvnitř buňky do těchto míst přemisťují proteiny fokálních komplexů, nezbytné pro přenos signálu dále v kaskádě proteinů. Adhezivní foky, v nichž se předává signál z integrinů na cytosolické proteiny typu kináz i adaptorových proteinů bez enzymatické aktivity, jsou důležité pro transmisi signálů ovlivňujících buněčné děje jako je proliferace, diferenciace, migrace, apoptóza i onkogenní transformace.

Také morfologie a tvar buňky, které jsou primárně dané vnitřní architekturou aktinového cytoskeletu, jsou řízeny signalizací přes membránové receptory. I zde zaujímají integriny důležitou úlohu. Morfologie buňky má pak vliv na buněčný růst a na závislost buňky na ukotvení k substrátu.

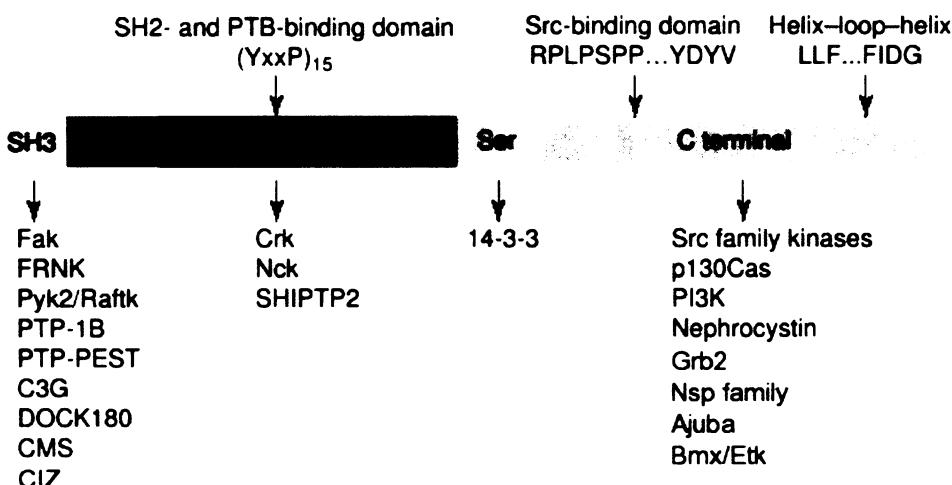
### 3. Rodina adaptorových proteinů Cas

Rodina proteinů Cas je skupinou adaptorových proteinů, které slouží mimo jiné jako „lešení“ pro seskupování a formování signálních komplexů. Ačkoli tyto proteiny nevykazují enzymatickou ani transkripční aktivitu, mohou být fosforylovány, což umožňuje interakci s dalšími efektorovými proteiny. Vytváření těchto makromolekulárních komplexů je klíčové pro rychlý a efektivní přenos signálů zprostředkovávaných integrinami. Rodina proteinů Cas zahrnuje tři proteiny, které sdílí podobnou strukturu a sekvenční homologii.

#### 3.1. Protein Cas

Nejlépe prostudovaným zástupcem je 130 kDa protein Cas (Crk-associated substrate), označovaný také jako p130Cas a na něj se tato práce především zaměřuje. Původně byl popsán jako vysoce fosforylovaný protein v buňkách transformovaných onkogeny v-src a v-crk. Zároveň bylo zjištěno, že také asocioval s proteinovými produkty těchto onkogenů - pp<sub>60</sub><sup>v-src</sup> (v-Src) a p<sub>47</sub><sup>gag-crk</sup> (v-Crk) (Sakai *et al.*, 1994; shrnuto v O'Neill *et al.*, 2000). V roce 1994 byla molekulárním klonováním zjištěna primární struktura tohoto proteinu (Sakai *et al.*, 1994).

Struktura proteinu Cas (viz obr.1) naznačuje, že tento adaptorový protein může interagovat s mnoha dalšími partnery a řídit tak různé signální dráhy (shrnuto v O'Neill *et al.*, 2000).



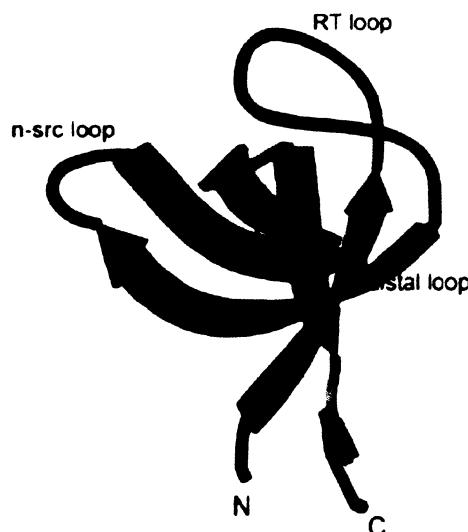
Obr.1: Struktura a interakční partneři proteinu Cas (převzato a upraveno podle Defillipi *et al.*, 2006)

Cas obsahuje na N terminálním konci SH3 (src – homology 3) doménu (viz obr. 2), která přispívá ke sdružování s dalšími efektorovými molekulami a může sloužit k následnému nasměrování těchto komplexů do určitých částí buňky (např. do adhezivních foků) (Klemke *et al.*, 1998). Následuje krátký úsek bohatý na prolin. Největší doménou rozsahem i významem je substrátová doména, kde můžeme najít 15 repetic čtyř aminokyselinového motivu YXXP (tyrozín – dvě jakékoli aminokyseliny – prolin). Přesnější zastoupení aminokyselin v těchto motivech je (Sakai *et al.*, 1994):

- YLVP v jednom motivu,
- YQXP ve čtyřech motivech,
- YDXP v devíti motivech,
- YAVP v jednom motivu.

Tyto motivy slouží jako substrát pro fosforylací proteintyrozíinkinázami jako je například Src nebo FAK (Polte a Hanks 1995; Ruest *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2004). Je-li substrátová doména částečně nebo úplně nafosforylována, může fungovat jako ligand pro SH2 (src – homology 2) doménu např. adaptorového proteinu Crk (Sakai *et al.*, 1994; Cho a Klemke 2000, Cho a Klemke 2002; Shin *et al.*, 2004) nebo fosfotyrozín-vazebnou doménu PTB (shrnuto v Chodniewicz a Klemke 2004).

Dále zde nalézáme úsek bohatý na serin a na samém C konci doménu, která váže klíčového interakčního partnera - kinázu Src (Sakai *et al.*, 1994; Ruest *et al.*, 2001).



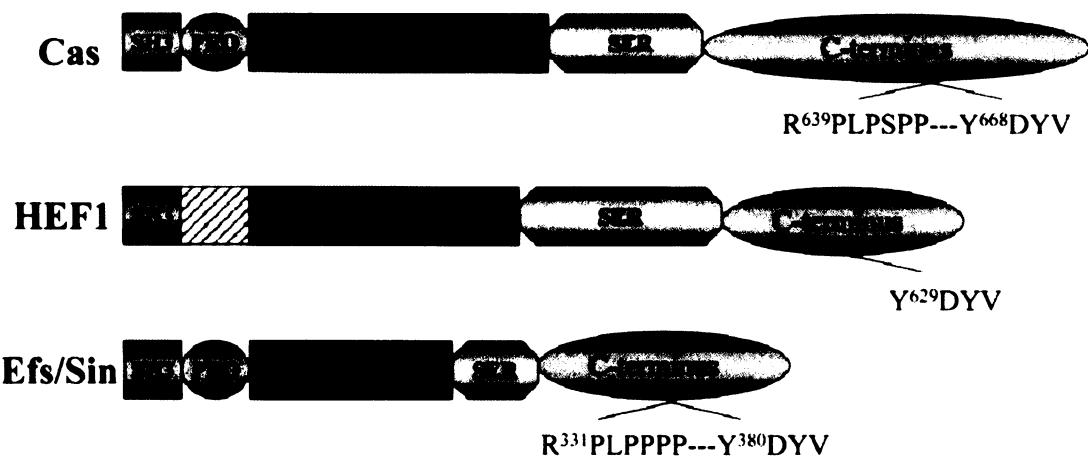
Obr.2: Stužkový model SH3 domény proteinu Cas (převzato a upraveno podle Wisniewska *et al.*, 2005)

Díky multidoménové struktuře je Cas schopen vázat mnoho ligandů a přímo či zprostředkovaně ovlivňovat dynamiku aktinového cytoskeletu, migraci, růst, přežívání i buněčnou transformaci a onkogenezi.

### **3.2. Proteiny HEF1 a Efs/Sin**

Dalšími členy rodiny Cas jsou proteiny HEF1/CasL (Human enhancer of filamentation/Cas like protein in lymphocytes) a Efs/Sin (Embryonal Fyn-associated substrate/Src-interacting protein) (zhrnuto v Defilippi *et al.*, 2006). Oba sdílejí s proteinem Cas strukturní homologie a konzervované vazebné motivy, obzvláště v SH3 doméně a C koncové části.

Asi největší rozdíl je v Src vazebných sekvencích, kde Cas i Efs/Sin obsahují prolin-bohatý úsek vážící SH3 doménu Src kinázy a také fosfotyrozínový úsek vážící SH2 doménu Src (Burnham *et al.*, 2000). HEF1 naproti tomu neobsahuje vazebnou sekvenci pro SH3 doménu Src kinázy (viz obr.3). Není jasné, jestli a jak tento deficit ovlivňuje vazbu kinázy Src k proteinu HEF1, ale z jiných studií týkajících se proteinu Cas vyplývá, že substituce prolinu za alanin v těchto sekvencích redukuje schopnost vázat kinázu Src (Burnham *et al.*, 2000)



Obr.3: Rodina proteinů Cas a jejich doménová struktura. U proteinu HEF1 chybí prolinový region (zeleně vyšrafován) a jedna ze sekvencí vážící kinázu Src (převzato podle Bouton *et al.*, 2001).

Ačkoli proteiny Cas, HEF1 a Efs/Sin sdílejí doménovou strukturu, mnohé studie ukázaly, že mají pravděpodobně různé funkce. Odlišnosti najdeme zejména v exprese a lokalizaci (shrnutu v Bouton *et al.*, 2001).

Cas mRNA i protein Cas se vyskytuje ve většině dospělých tkání (Sakai *et al.*, 1994). Protein HEF1 nalézáme nejvíce v lymfocytech a v epitelu plic a prsu, zatímco množství jeho mRNA je redukováno v tkáních mozku a jater. Efs/Sin se objevuje především v embryonálních tkáních.

Také lokalizace se různí. Všechny tři molekuly jsou sice lokalizovány z větší části v cytosolu, ale výraznou frakci Cas a HEF1 nalézáme také v adhezivních focích adherentních buněk (Polte a Hanks 1995). Tyto tři proteiny spojuje strukturní podobnost, ale mají zjevně rozdílné role v důsledku různé exprese v tkáních, buněčné lokalizace a primární struktury - resp. možných posttranslačních modifikacích.

## **4. Aktivace proteinu Cas fosforylací**

Fosforylace proteinu Cas se objevuje na tyrozínových, serinových a threoninových zbytcích a představuje nejvýznamnější posttranslační modifikaci. Nejdůležitějším místem fosforylace je substrátová doména obsahující 15 repetic sekvence YXXP a dále pak C koncová Src – vazebná doména. Tyrozínová fosforylace má vliv na relokalizaci proteinu Cas z cytosolu k membráně, do jádra (Sakai *et al.*, 1994) a do nerozpustných frakcí cytoskeletu (Polte a Hanks 1997).

Úlohou tyrozínové fosforylace v substrátové doméně je umožnění vazby interakčních proteinů obsahujících SH2 doménu či PTB doménu. Fosforylace proteinu Cas nastává v závislosti na aktivaci membránových receptorů ligandem a především na adhezi buňky na ECM zprostředkovanou integrinou.

### **4.1. Fosforylace proteinu Cas v závislosti na aktivaci membránových receptorů ligandem**

Aktivace membránových receptorů, jako jsou receptorové proteintyrozínskiny, receptory spojené s G proteiny nebo receptory pro hormony (viz tabulka 1), vede k fosforylaci proteinu Cas (Cho a Klemke 2000; shrnuto v Bouton *et al.*, 2001). V některých případech se však tato fosforylace objevuje nepřímo, jako odpověď na kontrakci cytoskeletu zprostředkovanou proteiny rodiny Rho nebo na shlukování integrinů v membráně.

Receptory a ligandy indukující fosforylací proteinu Cas		
Receptor	Ligand	
Ligandy receptorových proteintyrozínskiny	EGF	NGF
	FGF	PDGF
	IGF-1	GDNF
Agonisté receptorů spojených s G proteiny	LPA	Thrombin
	Bombesin	Angiotensin II
	Vasopresin	Bradykinin
	Endothelin	Sfingosin 1-fosfát
	SPC	CCKA
Další ligandy receptorů	Růstový hormon	Urokináza

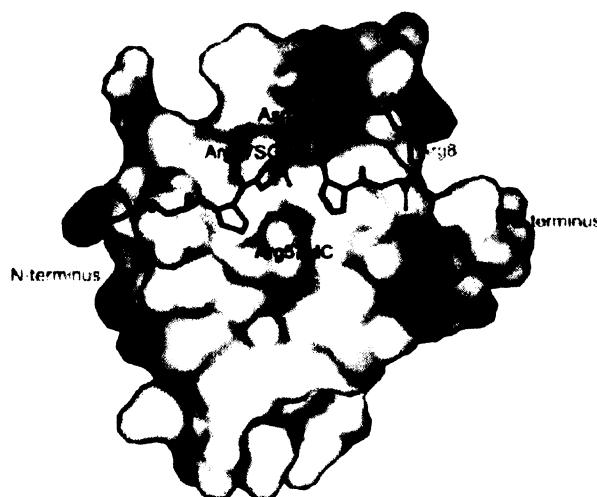
Tabulka 1: Přehled receptorů a jejich ligandů indukujících fosforylací proteinu Cas (prevzato a upraveno podle Bouton *et al.*, 2001)

#### **4.2. Fosforylace proteinu Cas v závislosti na aktivaci integrinů při adhezi buňky**

Druhým a nejvýznamnějším podnětem k fosforylaci tyrozínů substrátové domény proteinu Cas je adheze buňky zprostředkovaná integriny. Fosforylovaný Cas ovlivňuje buněčnou motilitu, diferenciaci, proliferaci, přežívání a onkogenezi zejména prostřednictvím proteintyrozínských FAK a Src a adaptorového proteinu Crk.

Pro přenos signálu od integrinů směrem do buňky má zásadní roli proteintyrozínská FAK. FAK byla identifikována jako nereceptorová proteintyrozínská, která se přednostně vyskytuje v adhezivních foci (Polte a Hanks 1995; Polte a Hanks 1997). Po adhezi buňky na ECM dochází k její aktivaci a autofosforylací na tyrozínu 397. Fosforylovaný tyrozín 397 pak slouží k vazbě SH2 domén, především SH2 domény kinázy Src. Tato interakce uvolňuje autoinhibiční spojení uvnitř Src a stimuluje katalytickou aktivitu kinázy Src.

Navázaná kináza Src dále fosforyluje několik tyrozínů kinázy FAK a tím maximalizuje její katalytickou aktivitu. Schopnost vazby a vzájemné stimulace kinázové aktivity FAK a Src je také pravděpodobně základem mechanismu amplifikace počátečního slabého signálu v této transdukční dráze (shrnuto v Hanks *et al.*, 2003). FAK interahuje s SH3 doménou Cas pomocí své sekvence bohaté na prolin (viz obr.4) (Polte a Hanks 1995) a může přispívat k fosforylací substrátové domény proteinu Cas vytvořením "můstku" mezi Src a Cas (Ruest *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2004).



Obr.4: Model vazby úseku kinázy FAK na SH3 doménu proteinu Cas. Aminokyselinové zbytky na povrchu SH3 domény jsou zbarveny podle svého náboje (červeně - negativně nabité zbytky, modře – pozitivně nabité zbytky, bílé – zbytky s neutrálním nábojem) (převzato a upraveno podle Wiesnewska *et al.*, 2005)

Další důležitý interakční partner, který přímo fosforyluje protein Cas, je kináza Src (Polte a Hanks 1995; Vuori *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2004). Tato nereceptorová proteintyrozínská kináza je efektem v mnoha transdukčních drahách, které vedou od integrinů, receptorových proteinkináz, receptorů spojených s G proteiny a cytokinových receptorů. Aktivita této kinázy podléhá striktní kontrole, zejména negativní regulace je klíčová pro buněčné procesy. Deregulace nebo exprese konstitutivně aktivní formy této kinázy vede k buněčné transformaci s charakteristickými rysy nekontrolovatelné buněčné proliferace a přežívání.

Inaktivní stav kinázy Src je zabezpečen intramolekulárními vazbami a přítomností fosforylovaného tyrozínu 527. Interakce proteinů s SH2 nebo SH3 doménou kinázy Src ruší intramolekulární inhibiční vazbu a stabilizuje katalyticky aktivní konformaci této kinázy.

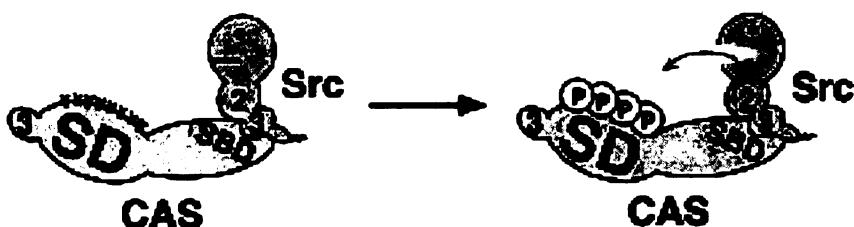
Mezi proteiny, které vážou Src SH3 a SH2 domény, patří také protein Cas (Polte a Hanks 1995; Pellicena a Miller 2001). Jak prokázaly studie, tak i on pozitivně reguluje aktivitu kinázy Src. Varianta proteinu Cas obsahující pouze C terminální segment (Cas-CT) byla dostatečná ke stimulaci Src kinázové aktivity v COS-1 buňkách, avšak mutant Cas-CT neschopný vázat kinázu Src tuto schopnost nevykazoval. Overexprese proteinu Cas a c-Src v COS-1 buňkách pak vyústila ve zvýšené množství fosforylovaných Src substrátů, konkrétně paxillinu, cortactinu a FAK (Burnham *et al.*, 2000).

Posledním neméně důležitým partnerem proteinu Cas, který zde bude podrobněji popisován, je adaptorový protein Crk (CT10 regulator of kinase). Po adhezi buňky a aktivaci integrinů je Crk fosforylován na tyrozínu 221 a přesouvá se do oblasti poblíž membrány. Cas váže prostřednictvím své fosforylované substrátové domény SH2 doménu proteinu Crk (Klemke *et al.*, 1998). Komplex Cas/Crk poté interaguje např. s proteinem DOCK180, což je protein stimulující GTPázovou aktivitu Rac1 (GTPáza rodiny Rho) (Dolfi *et al.*, 1998; Cho a Klemke 2000; Cho a Klemke 2002). Rac1 aktivace následně ovlivňuje dynamiku buněčného cytoskeletu, formování lamellipodií a buněčnou migraci. Komplex Cas/Crk váže mnohé další efektorové proteiny a přispívá tak k regulaci různých signálních transdukčních drah (shrnutu v Chodniewicz a Klemke 2004).

#### **4.3. Mechanismy fosforylace proteinu Cas**

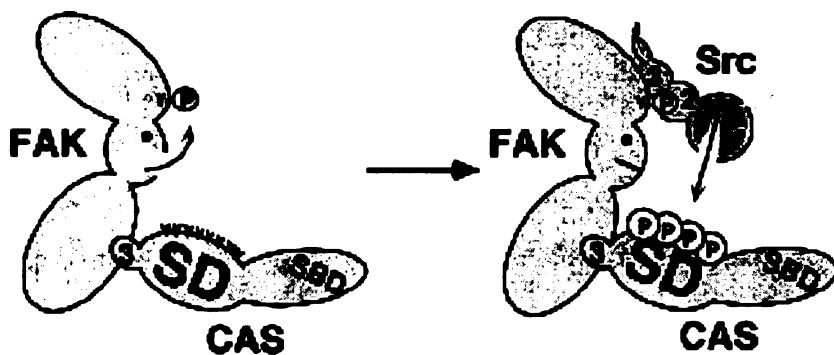
Výsledky různých skupin potvrdily, že Cas může být fosforylován *in vitro* proteintyrozíkinázami Src, FAK, Pyk 2 a Abl (Polte a Hanks 1995; Cary *et al.*, 1998; shrnuto v Bouton *et al.*, 2001). Zdá se však, že kináza Src má majoritní podíl na fosforylací proteinu Cas závislé na aktivaci integrinů jak v normálních, tak v transformovaných buňkách (Vuori *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2004). Modely mechanismu fosforylace substrátové domény proteinu Cas kinázou Src naznačují dvě možnosti, jak tento proces probíhá (Burnham *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2004).

Jako první připadá v úvahu model přímé fosforylace Cas substrátové domény kinázou Src, který je nezávislý na přítomnosti jakéhokoli dalšího interakčního partnera (viz obr.5). Src SH3 doména se naváže na RPLPSPP motiv v Src - vazebné doméně proteinu Cas. Takto vázaný Src fosforyluje nejen Cas substrátovou doménu, ale i přilehlé tyrozíny 688 a 670. Tyto tyrozíny následně vytvoří další místo k vazbě kinázy Src, konkrétně pro její SH2 doménu, a stabilizují tak její vazbu i aktivní konformaci (Burnham *et al.*, 2000; Ruest., 2001).



Obr.5: Model přímé fosforylace proteinu Cas kinázou Src (2,3 – SH2 a SH3 domény; SD – substrátová doména; SBD – Src vazebná doména) (převzato a upraveno podle Ruest *et al.*, 2001)

Druhý model zahrnuje i účast kinázy FAK na tomto procesu. Kooperace Src/FAK se jeví jako nejfektivnější mechanismus fosforylace substrátové domény proteinu Cas (Ruest *et al.*, 2001). V tomto případě se Cas váže prostřednictvím SH3 domény ke kináze FAK a zároveň FAK fosforylovaný na tyrozínu 397 interaguje s SH2 doménou kinázy Src (viz obr. 6).



Obr.6: Model kooperativní fosforylace proteinu Cas kinázami Src a FAK (2,3 – SH2 a SH3 domény; SD – substrátová doména; SBD – Src vazebná doména; Y – tyrozín 397) (převzato a upraveno podle Ruest *et al.*, 2001)

Tento model dokládá, že Src a FAK spolupracují na fosforylaci substrátové domény společně. Kináza FAK zde hraje roli spojovacího můstku mezi proteinem Cas a kinázou Src. Koexpressie kináz FAK a Src v COS-7 buňkách vede k výraznému zvýšení celkového množství fosforylovaného proteinu Cas. Když jsou tyto kinázy exprimovány v buňkách samostatně, hladina fosforylovaného proteinu Cas nedosahuje zdaleka hodnot takové úrovně (Ruest *et al.*, 2001). Předpokládalo se, že FAK může fosforylovat Cas *in vivo* (Polte a Hanks 1995), ale další studie toto spíše vyvrací. FAK prokazuje velmi omezenou schopnost fosforylovat substrátovou doménu proteinu Cas ve srovnání s kinázou Src (Ruest *et al.*, 2001).

#### **4.4. Procesivita mechanismu fosforylace**

Dalším důležitým aspektem fosforylace substrátové domény proteinu Cas kinázou Src je exaktní mechanismus, kterým tento děj probíhá. Přítomnost více zbytků, jež mohou být fosforylovány, nabízí k úvaze dva mechanismy fosforylace – distributivní mechanismus a procesivní mechanismus.

Kinetické studie prokázaly, že fosforylace tyrozínů v substrátové doméně proteinu Cas kinázou Src probíhá právě procesivním mechanismem. Src váže substrát Cas a tato vazba zůstává zachována, dokud není substrát na všech residuích plně fosforylován (Pellicena a Miller 2001; Pathwardhan *et al.*, 2006). Tento procesivní mechanismus sice

nedovoluje odpověď ve smyslu rychlého přepnutí fosforylací určitého residua, ale umožňuje zvýšit celkové množství fosforylovaných míst, tím i rychlejší seskupování proteinu Cas s SH2 doménami interakčních partnerů a odpověď v kratším čase.

Jsou známy případy, kdy fosforylace na určitém místě proteinu slouží jako „značka“ a ovlivňuje následnou fosforylací na jiných residuích. Tento fenomén se ale u proteinu Cas nepotvrdil. Varianty proteinu Cas, kde byly některé nejvíce preferované tyrozíny fosforylované kinázou Src v substrátové doméně zaměněny za nefosforylovatelné fenykalaniny, vykazovaly plnou fosforylací i na ostatních méně preferovaných residuích. Tyto mutanty byly také fosforylovány procesivním mechanismem, z čehož vyplývá, že tyrozíny v substrátové doméně proteinu Cas nejsou pro kinázu Src kineticky rozlišitelné a že fosforylace určitého residua v substrátové doméně neovlivňuje fosforylací na jiných místech (Pathwardhan *et al.*, 2006).

#### **4.5. Negativní regulace fosforylace**

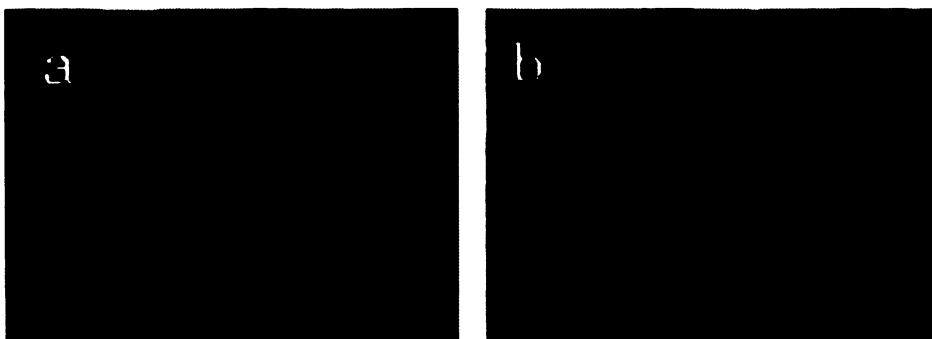
Fosforylace proteinu Cas je také regulována negativně a to prostřednictvím fosfatáz. Klíčovou úlohu v regulaci množství fosforylovaného proteinu Cas má jeho SH3 doména, se kterou interagují fosfatázy PTP1B a PTP-PEST svými prolinovými sekvencemi (Liu *et al.*, 1996; Garton *et al.*, 1997). Overexpress WT PTP1B v 3Y1 v-crk transformovaných buňkách vede k podstatnému snížení fosforylace proteinu Cas, zatímco mutantní varianty PTP1B s defektem v oblasti bohaté na prolin tuto schopnost postrádají. Asociace PTP1B s proteinem Cas se prokázala nezávislá na míře fosforylace proteinu Cas (Liu *et al.*, 1996).

Vysoká specifická interakce proteinu Cas s fosfatázami PTP-PEST a PTP1B je pak výsledkem nejen vazby SH3 domény proteinu Cas na prolinový region fosfatáz, ale samozřejmě i interakcí katalytického úseku PTP-PEST resp. PTP1B a substrátové domény proteinu Cas. Defosforylace substrátové domény Cas může vést v důsledku až ke změně lokalizace z adhezivních foků zpět do cytoplazmy a k ukončení signalizace skrze tento protein.

## 5. Dynamika aktinového cytoskeletu a buněčná migrace

Proces buněčné migrace je úzce svázán se spojením buňky a ECM. Funkční spojení proteinu Cas s tímto procesem se prokázalo, když byl tento protein nalezen v adhezivních focích, které tvoří můstek mezi ECM a aktinovým cytoskeletem (Polte a Hanks 1995). Signály řídící proces migrace ovlivňují hlavně adhezi a odpoutání integrinů, resp. adhezivních foků a organizaci aktinového cytoskeletu. Koordinace těchto signálů pak umožňuje vytváření nových adhezivních foků, aktinových stresových vláken a prodlužování lamellipodií, filopodií či pseudopodií migrující buňky. Přítomnost proteinu Cas v okrajových oblastech lamellipodií i v nově vznikajících adhezivních focích byla prokázána pomocí specifických protilátek proti fosforylované Cas substrátové doméně (Fonseca *et al.*, 2004).

Ovlivnění migrace proteinem Cas se pak prokázalo zejména ve studiích na Cas deficientních buňkách. Cas -/- myší embryonální fibroblasty (MEF) vykazují signifikantně sníženou migraci, a to i po stimulaci sérem, v porovnání s wild-type buňkami (Cho a Klemke 2000; Huang *et al.*, 2002). Schopnost migrace Cas -/- MEF buněk se pak obnovuje po re-expresi proteinu Cas (Cho a Klemke 2000; Huang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004). Cas deficientní buňky také vykazují výrazné defekty v proliferaci a ve formování aktinových stresových vláken (viz obr.7) (Huang *et al.*, 2002).



Obr.7: Organizace aktinových stresových vláken v Cas -/- MEF buňkách bez exprese proteinu Cas (a) a s re-exprimovaným proteinem Cas (b). (zeleně – aktinová vlákna vizualizovaná pomocí phaloidinu-FITC) (převzato a upraveno podle Huang *et al.*, 2002)

## **5.1. Specifické interakce proteinu Cas s dalšími efektorami ovlivňují buněčnou migraci**

V procesu migrace zaujímá důležité místo fosforylace proteinu Cas kinázou Src, neboť fosforylovaná substrátová doména proteinu Cas dovoluje vázat SH2 doménu proteinu Crk a dalších interakčních partnerů (Huang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004; Sanders a Basson 2005). YDXP motivy v substrátové doméně proteinu Cas, které jsou fosforylovány kinázou Src, byly identifikovány jako nepostradatelné pro organizaci aktinových stresových vláken a migraci. Delece YDXP motivů neumožňuje buňce formovat aktinová stresová vlákna, což je děj kritický pro migraci. Také RPLP motiv v Src-vazebné doméně je esenciální pro migraci, ale překvapivě ne pro organizaci stresových vláken. RPLP motiv udržuje vazbu s kinázou Src a následná fosforylace je důležitá pro lokalizaci proteinu Cas na membránu a interakci s dalšími signálními molekulami (Huang *et al.*, 2002).

Po podrobnějším zkoumání jednotlivých tyrozínů v YXXP motivech byly identifikovány tyrozíny v poloze 238, 253, 271, 291, 310, 331, 366, 376, 391 a 414 jako majoritní pro fosforylaci kinázou Src a zároveň schopné vázat SH2 doménu proteinu Crk. Substituce tyrozínu za fenykalalanin v jednom či dvou YXXP motivech však nijak neovlivňuje buněčnou migraci a dokonce i varianty proteinu Cas jen se čtyřmi fosforylovatelnými tyrozíny vykazovaly schopnost umožňovat alespoň částečně buněčnou migraci (Shin *et al.*, 2004).

Nedílnou součástí procesu migrace je vytváření komplexu proteinů Cas a Crk po fosforylací substrátové domény proteinu Cas v závislosti na aktivaci integrinů (Vuori *et al.*, 1996; Klemke *et al.*, 1998; Cho a Klemke 2000). Přímým důkazem role Cas/Crk komplexu v buněčné migraci je fakt, že overexpressie proteinů Cas a Crk vede ke stimulaci a zvýšení migrace COS buněk a FG-M buněk karcinomu pankreatu. V případě exprese dominantně-negativní varianty proteinu Cas s delecí substrátové domény nebo varianty proteinu Crk s bodovou mutací v SH2 doméně byla schopnost buněk migrovat značně snížena a tyto mutantní formy proteinů Cas a Crk nebyly schopny spolu vůbec interagovat. Lze tedy říci, že seskupování komplexu Cas/Crk funguje jako molekulární „přepínač“ pro buněčnou migraci (Klemke *et al.*, 1998).

Migrace buněk byla také omezená v případě exprese dominantně-negativní formy GTPázy Rac1 (Klemke *et al.*, 1998). GTPáza Rac1 je situovaná níže v signální dráze začínající integriny a s Cas/Crk komplexem je propojena prostřednictvím proteinu

DOCK180, který stimuluje její GTPázovou aktivitu (Dolfi *et al.*, 1998). Cas /Crk komplex je pro funkci GTPázy Rac1 nepostradatelný, neboť samotná aktivovaná GTPáza Rac1 v buňkách bez přítomnosti Cas/Crk komplexu není schopna zajistit normální migraci (Cho a Klemke 2000). Aktivace GTPázy Rac1 způsobuje prostřednictvím stimulace komplexu Arp2/3 polymeraci aktinu, změnu buněčné morfologie, formování nových adhezivních foků a lamellipodií (Cho a Klemke 2000; Cho a Klemke 2002; shrnuto v Linder a Aepfelbacher 2003).

V Caco2 buňkách epitelu tenkého střeva, kde byla také zkoumána role proteinu Cas, bylo rovněž prokázáno funkční spojení mezi fosforylací substrátové domény proteinu Cas a tvorbou Cas/Crk komplexů. Caco2 buňky, kde byla exprese proteinu Cas specificky utlumena siRNA, vykazovaly sníženou schopnost rozrůstání na kolagenu IV. Společná transfekce buněk Cas siRNA a Crk siRNA značně utlumila migraci na kolagenu IV a prodlužování lamellipodií (Sanders a Basson 2005).

Tvorba Cas/Crk komplexu je důležitá pro podporu lokalizace aktivity GTPázy Rac1 v rámci pseudopodií/lamellipodií. V průběhu adheze pseudopodia/lamellipodia na substrát, aktivace integrinů a seskupování proteinů fokálního komplexu řídí formování Cas/Crk komplexu. Vysoká hladina Cas/Crk komplexů vede v dlouhodobou aktivaci GTPázy Rac1 a tím i ve stabilizaci membránových výběžků. Dlouhodobější aktivita Rac1 funguje jako pozitivní zpětná vazba, která stimuluje a udržuje vysokou úroveň obsahu Cas/Crk komplexů v pseudopodium/lamellipodium (Cho a Klemke 2002).

Kináza FAK kolokalizuje s proteinem Cas do adhezivních foků (Polte a Hanks 1995) a taktéž Fak – Cas interakce přispívá ke schopnosti buněk migrovat. Overexprese kinázy FAK v CHO ovariálních buňkách indukovala zvýšenou hladinu fosforylace proteinu Cas. Následná zvýšená koexprese obou proteinů Cas i FAK měla ještě aditivní efekt na fosforylaci a navíc stimulovala migraci. Avšak koexprese kinázy FAK a varianty proteinu Cas obsahující pouze SH3 doménu (Cas-SH3) migraci markantně snižovala, takže varianta Cas-SH3 se v tomto pokusu chovala jako dominantně-negativní mutant (Cary *et al.*, 1998).

Na membráně migrujících buněk se vyskytuje protein Cas ve vazbě také s kinázou Bmx/Etk z rodiny Tec/Btk kináz. Bmx je exprimována v mnoha typech buněk s migračním potenciálem jako jsou epitelové, endotelové či nádorové buňky. Adheze buňky zprostředkovaná integriny vyvolává formování komplexu Cas – Bmx. Interakci SH2 domény kinázy Bmx a Src-vazebné domény proteinu Cas musí předcházet fosforylace kinázou Src nebo komplexem Src/FAK. Expresi kinázy Bmx v COS 7 buňkách zvyšuje

fosforylací substrátové domény proteinu Cas a také následné formování Cas/Crk komplexu. Koexpressa Bmx a proteinu Cas viditelně zvyšuje tvorbu membránových výběžků a haptotakticou migraci na fibronektinu (Abbasi *et al.*, 2003).

Ajuba, protein z rodiny LIM funkčně spjatý s aktinovým cytoskeletem a komplexy fokálních adhezních proteinů, významně zasahuje do regulace tyrozínové fosforylace proteinu Cas a do regulace migrace buněk. Ajuba *-/-* MEF buňky se vyznačují zhoršenou migrací, ale ta není doprovázena jakýmkoli defekty v adhezi na ECM proteiny, v buněčném proliferaci či v aktivaci integrinů. Overexpressa proteinu Cas v Ajuba *-/-* MEF buňkách pak obnovuje schopnost migrace. Tvorba a funkčnost lamellipodií v těchto buňkách je narušená a ve fokálních proteinových komplexech jsou méně zastoupeny a fosforylovány proteiny FAK, Cas, Crk a DOCK180. Také aktivace Rac1 je zhoršena, pravděpodobně v důsledku omezené tvorby Cas/Crk/DOCK180 komplexu. Ajuba interaguje s C koncovou doménou proteinu Cas, směrující tento protein do adhezivních foků, čímž může regulovat jeho lokalizaci do „vedoucí“ strany migrující buňky a tím i následnou lokální aktivitu Rac1 (Pratt *et al.*, 2005).

## **6. Vliv proteinu Cas na proliferaci a apoptózu**

Proteiny adhezivních foků přenášejí z ECM signál pro stimulaci buněčného růstu a přežívání a podílejí se tak na procesech regulace buněčného cyklu, proliferace a apoptózy.

Interakce proteinu Cas a Src se ukázala jako klíčová pro regulaci proliferace. Fibroblasty linie C3H10T1/2, exprimující zvýšené množství proteinu Cas a Src kinázy, vykazovaly větší míru tvorby kolonií na měkkém agaru a schopnost proliferace v absenci séra nebo růstových faktorů. Proliferace těchto buněk bez stimulace sérem či ECM by mohla být způsobena pozitivním vlivem proteinu Cas, stimulujícím katalytickou aktivitu kinázy Src (Burnham *et al.*, 2000).

Cas přispívá k regulaci buněčného cyklu aktivací kinázy JNK (c-Jun N-terminal kinase) při adhezi zprostředkované skrze integriny. Exprese proteinu Cas v COS a HeLa buňkách indukovala aktivaci JNK kinázy, blokování tohoto efektu bylo dosaženo expresí dominantně-negativních variant proteinů Cas, Crk i Rac. Tyto výsledky naznačují, že Cas/Crk/DOCK180 komplex a následná aktivace Rac přispívají k progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze aktivací JNK kinázy (Dolfi *et al.*, 1998; shrnuto v Bouton *et al.*, 2001).

Proces apoptózy je úzce spjat s adhezí buňky na ECM, neboť i malé změny ve složení proteinů v adhezních komplexech mohou vyvolat přerušení přenosu signálů, nezbytných pro přežití buňky.

Spojení proteinu Cas s procesem apoptózy dokazují studie na FG-M buňkách (Cho a Klemke 2000). FG-M buňky karcinomu pankreatu jsou schopné ve větší míře migrovat a tvořit metastáze než rodičovská linie, od které jsou odvozeny a tyto schopnosti jsou přičítány zvýšenému množství Cas/Crk komplexů v těchto buňkách (Klemke *et al.*, 1998). Znemožnění tvorby Cas/Crk komplexu nebo exprese dominantně-negativní formy Rac1 omezuje buněčné rozšiřování a indukuje apoptózu. Z toho plyne závěr, že stejná signalizace skrze Cas-Crk-Rac ovlivňující buněčnou migraci reguluje také přežívání buněk tlumením apoptotických mechanismů (Cho a Klemke 2000).

Role proteinu Cas v procesu apoptózy byla indikována i v normálních MCDK buňkách epitelu ledvin. Po odpojení buněk od substrátu byla patrná rychlá defosforylace proteinu Cas, fosforylace resp. aktivita kináz FAK a Src téměř vymizela a po určité době buňky podlehly anoikis, neboli apoptóze způsobené přerušením interakce buňky a ECM (Wei *et al.*, 2002).

## **7. Cas v procesech onkogeneze, transformace a invazivity**

Deregulace signálních drah, které kontrolují buněčnou adhezi, motilitu, přežívání a proliferaci může vést k onkogenní transformaci buňky. U transformovaných buněk se oproti normálním buňkám objevují netypické rysy růstu a morfologie. Transformované buňky při růstu ztrácí závislost na ukotvení a růstových faktorech, ztrácejí kontaktní inhibici, rostou do vysokých hustot a ve větší míře jsou schopny degradovat ECM. To vše pak může přispívat k zesílené buněčné invazitě a schopnosti rakovinných buněk tvořit metastáze.

Adaptorový protein Cas participuje na signálních drahách procesů zmíněných v předchozích kapitolách a má bezesporu klíčovou pozici i v procesu onkogeneze. Už to, že Cas byl poprvé identifikován jako hyperfosforylovaný protein, který asocioval s v-Src a v-Crk onkoproteiny, naznačovalo významnou roli v onkogenezi (Sakai *et al.*, 1994). Hyperfosforylovaný Cas byl nalezen v mnoha typech buněk včetně Src-transformovaných buněk a buněk melanomů, glioblastomů a adenokarcinomů (Brábek *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2002; Hamamura *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2002).

### **7.1. Protein Cas a invazivita fibroblastů transformovaných onkoproteinem Src**

Pravděpodobně nejvíce studovaná je účast proteinu Cas na buněčné transformaci a invazitě vyvolané konstitutivně aktivovanou kinázou Src. Asociace mezi proteinem Cas a aktivovanou kinázou Src se prokázala být nezbytnou pro buněčnou transformaci. Src-transformované Cas -/- MEF buňky, ve kterých byl re-exprimován Cas s delecí Src vazebné domény (Cas-SBD), vykazovaly omezenou míru fosforylace Cas-SBD mutanta a především sníženou schopnost růstu nezávisle na ukotvení (Huang *et al.*, 2002). Vliv proteinu Cas na proces růstu Src-transformovaných buněk nezávisle na ukotvení byl potvrzen i výsledky jiného výzkumu. V Cas -/- MEF buňkách exprese wild-type formy proteinu Cas spolu s aktivovanou kinázou Src značně zesilovala schopnost růstu nezávisle na ukotvení (Pathwardhan *et al.*, 2006).

V kontrastu s tím je studie, kde byly morfologická transformace a růst nezávisle na ukotvení Src-transformovaných Cas -/- MEF buněk pozorovány i bez exprese proteinu Cas (Brábek *et al.*, 2004). Tyto rozdíly mohly být způsobeny expresí rozdílných hladin i různých variant aktivované kinázy Src nebo odlišnostmi mezi buněčnými liniemi,

použitými a vytvořenými v těchto studiích (Brábek *et al.*, 2004; Pathwardhan *et al.*, 2006). Celkově lze tedy shrnout, že Cas není nezbytný pro transformaci onkoproteinem Src ve smyslu morfologické transformace a růstu nezávislého na podkladu. (Brábek *et al.*, 2005).

Schopnost růstu nezávisle na ukotvení však není spjata s mírou fosforylace substrátové domény proteinu Cas. I exprese varianty proteinu Cas, kde byly všechny tyrozíny v substrátové doméně substituovány za fenylalaniny, vyvolávala v přítomnosti aktivované kinázy Src růst nezávisle na ukotvení (Pathwardhan *et al.*, 2006). Může to být přičítáno jednak dříve zmíněnému modulačnímu dopadu proteinu Cas na kinázu Src, tedy jeho schopnosti zvyšovat kinázovou aktivitu oslabením intramolekulárních inhibičních vazeb uvnitř kinázy Src (Burnham *et al.*, 2000). Druhou možností je schopnost proteinu Cas fungovat jako „lešení“ pro zprostředkování fosforylace substrátů kinázy Src. Mezi tyto substráty asociované s integrinami mohou patřit FAK a paxillin, které jsou po re-expresi proteinu Cas v Src transformovaných Cas  $-/-$  MEF buňkách mnohem intenzivněji fosforylovány (Brábek *et al.*, 2004).

Expresie proteinu Cas přispívá k invazitě Src-transformovaných Cas  $-/-$  MEF buněk také tím, že stimuluje zvýšenou invazitvu skrze matrigel spojenou s nárůstem sekrece matrixové metalloproteinázy 2 (MMP -2), s tvorbou agregátů podozómů (viz obr.8) a se zvýšenou fosforylací substrátů kinázy Src - konkrétně proteinů FAK, paxillin a cortactin (Brábek *et al.*, 2004; Brábek *et al.*, 2005).



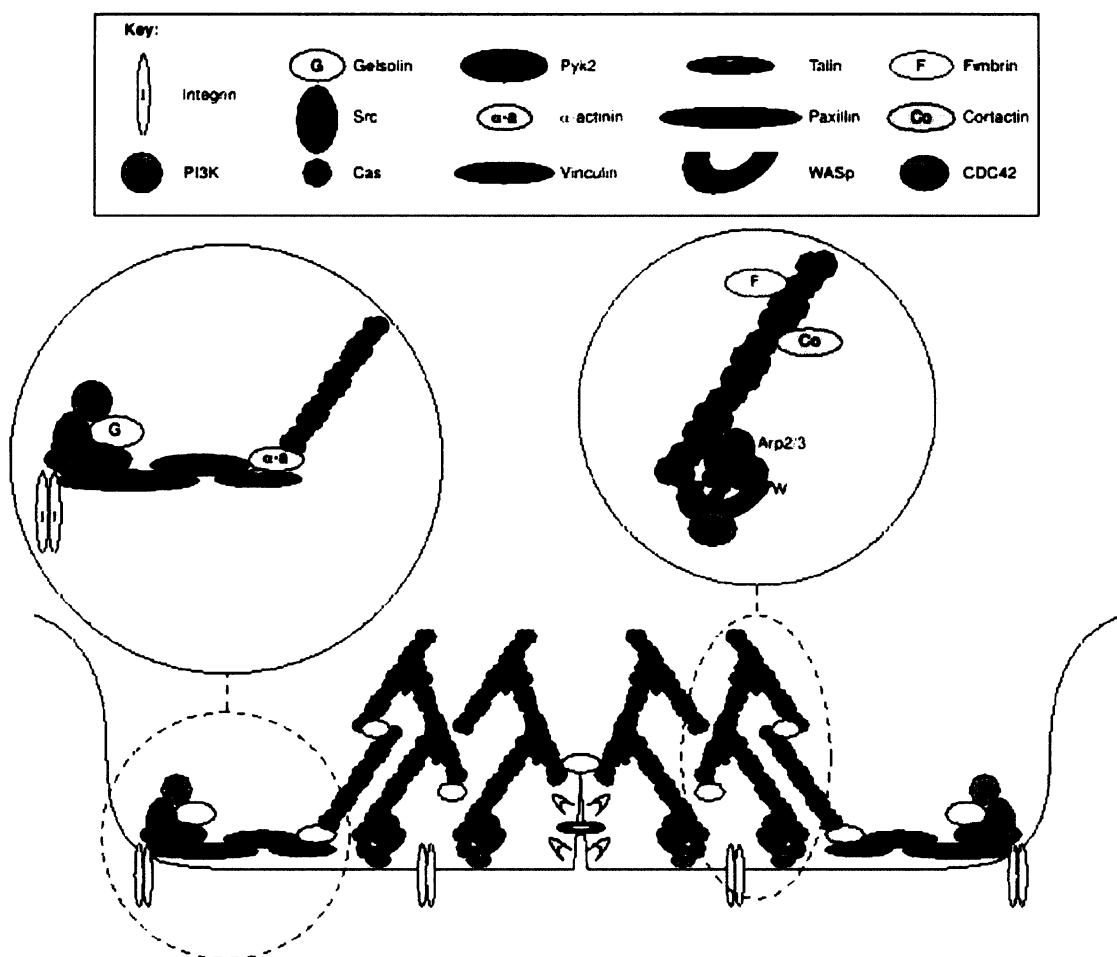
Obr. 8: Podozómy Src-transformovaných Cas  $-/-$  MEF buněk bez exprese proteinu Cas (vlevo) a s expresí proteinu Cas (vpravo), šipky ukazují na agregáty podozómů zformované do kruhu nebo pásu (červeně – aktin, zeleně – cortactin) (převzato a upraveno podle Brábek *et al.*, 2005)

Podozómy jsou dynamické adhezní struktury bohaté na aktin, jsou hlavním místem sekrece MMP a aktivně se účastní remodelace ECM a invaze skrze tkáň. Podozómy jsou útvary pozorovatelné např. na dendritických buňkách, makrofázích či osteoklastech, ale můžeme je nalézt i v buňkách melanomů, karcinomů a v buňkách Src-transformovaných fibroblastů (shrnutu v Linder a Aepfelbacher 2003). Cas fosforylovaný na tyrozínech je hojně zastoupen v podozomálních strukturách (Brábek *et al.*, 2004) a YXXP motivy substrátové domény mají nezastupitelnou roli ve formování těchto struktur (viz obr.8) (Brábek *et al.*, 2005).

Formování podozómů muže být ovlivněno proteinem Cas hned dvěma způsoby. První způsob zahrnuje schopnost vazby adaptorového proteinu Crk. Komplex Cas/Crk následně aktivuje skrze protein DOCK180 GTPázu Rac1 (Dolfi *et al.*, 1998; Hsia *et al.*, 2003). Rac1 má schopnost lokálně aktivovat WASp/WAVE a Arp2/3 a indukovat polymeraci aktinu resp. tvorbu podozómů (viz obr. 9) (Brábek *et al.*, 2004; shrnuto v Linder a Aepfelbacher 2003). Druhou eventualitou účasti proteinu Cas je stimulace aktivity kinázy Src v podozómech. Re-exprese proteinu Cas v Src transformovaných Cas -/- MEF buňkách podporuje zesílenou fosforylaci substrátů Src jako je FAK, paxillin a cortactin (Brábek *et al.*, 2005). Celkové zvýšení kinázové aktivity uvolněním intramolekulárních inhibičních vazeb při interakci proteinu Cas s kinázou Src (Burnham *et al.*, 2000) může vést k fosforylacii proteinů: WASp, talin, vinkulin, integrinů aj. Tyto proteiny reprezentují další substráty kinázy Src, které se také účastní formování architektury podozómů (viz obr.9) (shrnutu v Linder a Aepfelbacher 2003).

Ačkoli YXXP motivy substrátové domény proteinu Cas se prezentovaly jako nejdůležitější pro zvýšenou schopnost invaze skrze matrigel, pro formování agregátů podozómů i pro fosforylaci proteinů FAK, paxillin a cortactin kinázou Src, byla pro zvýšenou aktivaci MMP-2 klíčová SH3 doména proteinu Cas. Exprese varianty Cas s delecí SH3 doménou v Src transformovaných Cas -/- MEF buňkách vykazovala nejmenší schopnost indukovat aktivaci MMP-2 (Brábek *et al.*, 2005). Není však jasné, skrze který ligand SH3 domény by mohla být MMP-2 aktivována. SH3 doména proteinu Cas má však i jiného interakčního partnera, který aktivuje expresi matrixových metalloproteináz. CIZ (Cas-interacting zinc finger protein) kolokalizuje s proteinem Cas v adhezivních foci a interaguje s SH3 doménou proteinu Cas svou prolinovou sekvencí. CIZ je nukleocytoplazmatický transkripční faktor, v jádře se váže na sekvence v promotorech některých MMP. Overexprese transkripčního faktoru CIZ v Cas -/- fibroblastech zesilovala

transkripcí z MMP-7 promotoru a následná koexprese proteinů Cas a CIZ ještě zvyšovala transaktivaci MMP-7 promotoru (Nakamoto *et al.*, 2000).



Obr.9: Schematický model podozómu.

Vlevo – detail komponentů na okraji podozómu. (Integriny vázané na ECM; na ně se prostřednictvím „lešení“ paxillinu nabaluje komplex Src, Pyk 2/FAK, gelsolin, PI3K a Cas; komplex je skrze vinkulin, talin a aktinin vázán k aktinovým filamentům jádra podozómu).

Vpravo – detail komponentů představujících jádro podozómu (aktinový nukleační komplex na membráně je tvořen CDC42, WASp a Arp2/3; aktinová vlákna jsou k sobě poutána cortactinem a fimbrinem).

Dole uprostřed – membránová invaginace, kudy mohou být sekretovány MMP. (převzato podle Linder a Aepfelbacher 2003)

Role proteinu Cas se potvrdila i při regulaci invazivity kinázou FAK. FAK -/- fibroblasty, i když jsou transformované v-Src, nevykazují schopnost invazivity. Tato schopnost je obnovena overexpressí proteinu Cas. Důležitá schopnost FAK -/- fibroblastů pronikat skrze matrikel byla nejlépe obnovena při expresi aktivní kinázy FAK, fosforylací tyrozínu 397 FAK kinázy a přítomnosti vazebných sekvencí pro SH3 doménu, které mají vaznost i pro protein Cas (Hsia *et al.*, 2003).

Zatím asi nejzávažnější důkaz pro úlohu proteinu Cas v invazitě Src transformovaných fibroblastů *in vivo* byl objeven pomocí injikace Src transformovaných Cas -/- MEF buněk do podkoží athymických myší. Přestože exprese proteinu Cas v Src transformovaných Cas -/- MEF buňkách nijak neovlivňovala schopnost tvořit primární nádory, výrazně přispívala k tvorbě sekundárních metastází. Po odstranění primárních podkožních nádorů, tvořených Cas -/- MEF buňkami s expresí proteinu Cas, se u myší vyvinuly četné metastáze v plicích. Pro rozvoj metastází byly opět významné YXXP motivy v substrátové doméně proteinu Cas. Mutantní forma proteinu Cas, kde byly v substrátové doméně substituovány tyrozíny za fenylalaniny, neindukovala vytváření téměř žádných plicních metastází. Src transformované Cas -/- MEF buňky, které neexprimovaly Cas, nevytvářely metastáze vůbec (Brábek *et al.*, 2005).

## **7.2. Cas a invazivita epitelialních nádorových buněk**

Role proteinu Cas v invazitě buněk epitelů se začala podrobněji zkoumat až v nedávné době a není proto tak podrobně zdokumentována jako u Src-transformovaných fibroblastů.

Buňky maligních melanomů jsou charakteristické svou rychlou proliferací, agresivní invazitou, velkou tendencí tvořit metastáze a častou expresí povrchového markeru – gangliosidu GD3. Také v GD3<sup>+</sup> buňkách linie SK-MEL-28 byl nalezen protein Cas ve vysoké fosforylovaném stavu. Po inhibici exprese proteinu Cas specifickou siRNA se značně zredukovala míra růstu GD3<sup>+</sup> buněk melanomu a také výrazně poklesla schopnost invazivity, což dokazuje ovlivnění obou těchto klíčových procesů proteinem Cas (Hamamura *et al.*, 2005).

V buňkách adenokarcinomu plic se prokázal vliv proteinu Cas na růst, který byl nezávislý na ukotvení neboli na rezistenci k anoikis. Zatímco v normálních MDCK buňkách epitelu ledvin po odpojení od substrátu nastalo značné utlumení fosforylace

proteinu Cas i aktivity kináz FAK a Src, v linii A549 buněk adenokarcinomu plic tomu bylo právě naopak. Fosforylace/aktivita proteinu Cas a kinázy FAK i po odpojení A549 buněk od substrátu zůstala konstantní a fosforylace/aktivita kinázy Src navíc citelně narostla. Inhibice fosforylace proteinu Cas kinázou Src nebo overexprese dominantně-negativní varianty proteinu Cas indukovala anoikis A549 buněk adenokarcinomu plic, což naznačuje, že konstitutivní fosforylace proteinu Cas určitým způsobem přispívá k rezistenci buněk adenokarcinomu k anoikis (Wei *et al.*, 2002).

Protein Cas resp. jeho lidský homolog BCAR 1 (Breast cancer antiestrogen resistance) je spojován s progresí nádorů rakoviny prsu. Nádory prsu často obsahují funkční receptory pro estrogeny (ER), které jsou přítomny v jádře a po navázání estrogenu aktivují transkripci z různých genů ovlivňujících buněčný růst a proliferaci rakovinných buněk. Cas/BCAR 1 byl identifikován jako protein zodpovědný za rezistenci buněk nádorů prsu k antiestrogenům. V ZR-75-1 buňkách rakoviny prsu vyvolávala overexprese Cas/BCAR 1 schopnost proliferovat i v přítomnosti antiestrogenů tamoxifenu a ICI 182 (Brinkman *et al.*, 2000).

Později se ukázalo, že samotný antiestrogen tamoxifen může zesilovat fosforylací proteinu Cas/BCAR 1 a že tento efekt vyžaduje přítomnost substrátové domény tohoto proteinu. V ER pozitivních MCF-7 buňkách nádorů prsu byla fosforylace Cas/BCAR1 po vystavení tamoxifenu ještě zesílena, zatímco v ER negativních buňkách zůstávala stejná. Fosforylace proteinu Cas indukovaná tamoxifenem byla pak omezena, když byla exprimována varianta proteinu Cas/BCAR 1 s delecí substrátové doménou. Také inhibice kinázy Src v přítomnosti tamoxifenu redukovala značně fosforylací proteinu Cas/BCAR 1 a navíc snižovala viabilitu MCF-7 buněk (Cowell *et al.*, 2006).

U pacientek s rakovinou prsu, kde byla v buňkách nádoru pozorována zvýšená hladina exprese Cas/BCAR1, byla prokázána slabá účinnost tamoxifenové terapie, rychlejší návrat choroby a vyšší úmrtnost (van der Flier *et al.*, 2000). Kvantitativní zastoupení proteinu Cas/BCAR 1 v nádorových buňkách se dá pokládat za spolehlivý prognostický marker (Dorssers *et al.*, 2004).

## **8. Závěr**

Protein Cas významně zasahuje do regulace dynamiky aktinového cytoskleletu, buněčné motility, proliferace i apoptózy. Tyto procesy jsou řízeny signálními transdukčními drahami zahrnující protein Cas a mají svůj počátek na povrchu buňky v cytoplazmatické membráně. Signály z okolí buňky specificky kontrolují a ovlivňují buněčné chování, jež je důležité pro udržení homeostáze v mnohobuněčném organismu.

Byla determinována také role proteinu Cas v patologických buněčných procesech jako je onkogeneze a invazivita. Stále však není objasněn přesný mechanismus ani účast všech interakčních partnerů proteinu Cas, kteří by se mohli na procesech onkogeneze a invazivity podílet.

Již dnes je však možné používat zvýšené množství proteinu Cas jako prognostický marker některých nádorů. Studium specifických interakcí mezi proteinem Cas a dalšími potenciálními efektorovými molekulami by pak mohlo být využito k syntéze specifických kompetitorů či inhibitorů těchto vazeb a případně posloužit ke klinickému využití.

## **9. Přehled citované literatury**

- Abassi YA, Rehn M, Ekman N, Alitalo K, Vuori K. 2003 p130Cas Couples the tyrosine kinase Bmx/Etk with regulation of the actin cytoskeleton and cell migration. *J Biol Chem.* 278:35636-35643.
- Bouton AH, Riggins RB, Bruce-Staskal PJ. 2001 Functions of the adapter protein Cas: signal convergence and the determination of cellular responses. *Oncogene.* 20:6448-6458.
- Brábek J, Constancio SS, Shin NY, Pozzi A, Weaver AM, Hanks SK. 2004 CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene.* 23:7406-7415.
- Brábek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin NY, Pozzi A, Hanks SK. 2005 Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res.* 3:307-315.
- Brinkman A, van der Flier S, Kok EM, Dorssers LC. 2000 BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 92:112-120.
- Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH. 2000 Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. *Mol Cell Biol.* 20:5865-5878.
- Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL. 1998. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol.* 140:211-221.
- Cho SY, Klemke RL. 2000 Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 149:223-236.
- Cho SY, Klemke RL. 2002 Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold. *J Cell Biol.* 156:725-736.
- Chodniewicz D, Klemke RL. 2004. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Biochim Biophys Acta.* 1692:63-76.
- Cowell LN, Graham JD, Bouton AH, Clarke CL, O'Neill GM. 2006 Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway. *Oncogene.* [v tisku]
- Defilippi P, Di Stefano P, Cabodi S. 2006 p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol.* 16:257-263.
- Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. 1998. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:15394-15399.

Dorssers LC, Grebenschikov N, Brinkman A, Look MP, van Broekhoven SP, de Jong D, Peters HA, Portengen H, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, van Tienoven DT, Geurts-Moespot A, Span PN, Foekens JA, Sweep FC. 2004 The prognostic value of BCAR1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:6194-6202.

Fonseca PM, Shin NY, Brabek J, Ryzhova L, Wu J, Hanks SK. 2004 Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cell Signal.* 16:621-629.

Garton AJ, Burnham MR, Bouton AH, Tonks NK. 1997. Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130cas; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition. *Oncogene.* 15:877-885.

Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, Okuda T, Mizutani H, Hattori H, Ueda M, Urano T, Lloyd KO, Furukawa K. 2005 Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11041-11046.

Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brabek J. 2003. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* 8:982-896.

Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblow DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheresh DA, Schlaepfer DD. 2003 Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol.* 160:753-767.

Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, Takato T, Sakai R. 2002 Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization, and cell transformation by functional domains of Crk-associated substrate. *J Biol Chem.* 277:27265-27272.

Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresh DA. 1998 CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol.* 140:961-972.

Linder S, Aepfelbacher M. 2003 Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13:376-385.

Liu F, Hill DE, Chernoff J. 1996. Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130(Cas). *J Biol Chem.* 271:31290-31295.

Nakamoto T, Yamagata T, Sakai R, Ogawa S, Honda H, Ueno H, Hirano N, Yazaki Y, Hirai H. 2000 CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biol.* 20:1649-1658.

O'Neill GM, Fashena SJ, Golemis EA. 2000 Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol.* 10:111-119.

Patwardhan P, Shen Y, Goldberg GS, Miller WT. 2006 Individual Cas phosphorylation sites are dispensable for processive phosphorylation by Src and anchorage-independent cell growth. *J Biol Chem.* 281:20689-20697.

Pellicena P, Miller WT 2001 Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH3-polyproline interactions. *J Biol Chem.* 276:28190-28196.

Polte TR, Hanks SK. 1995. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10678-10682.

Polte TR, Hanks SK. 1997. Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs. *J Biol Chem.* 1997 272:5501-5509.

Pratt SJ, Epple H, Ward M, Feng Y, Braga VM, Longmore GD. 2005 The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration. *J Cell Biol.* 168:813-824.

Ruest PJ, Shin NY, Polte TR, Zhang X, Hanks SK. 2001 Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Mol Cell Biol.* 21:7641-7652.

Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Nishida J, Yazaki Y, Hirai H. 1994. Characterization, partial purification, and peptide sequencing of p130, the main phosphoprotein associated with v-Crk oncprotein. *J Biol Chem.* 269:32740-32746.

Sanders MA, Basson MD. 2005 p130cas but not paxillin is essential for Caco-2 intestinal epithelial cell spreading and migration on collagen IV. *J Biol Chem.* 280:23516-23522.

Shin NY, Dise RS, Schneider-Mergener J, Ritchie MD, Kilkenny DM, Hanks SK. 2004 Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration. *J Biol Chem.* 279:38331-38337.

Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E 1996 Induction of p130<sup>cas</sup> signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases *Mol Cell Biol.* 16:2606-2613

van der Flier S, Brinkman A, Look MP, Kok EM, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Dorssers LC, Fockens JA. 2000 Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J Natl Cancer Inst.* 92:120-127.

Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. 2002 Anchorage-independent phosphorylation of p130(Cas) protects lung adenocarcinoma cells from anoikis. *J Cell Biochem.* 87:439-449

Wisniewska M, Bossenmaier B, Georges G, Hesse F, Dangl M, Kunkele KP, Ioannidis I, Huber R, Engh RA. 2005 The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *J Mol Biol.* 347:1005-1014.