

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS  
Mikrobiologijos ir augalų fiziologijos katedra

BIOCHEMIJOS INSTITUTAS  
Vystymosi biologijos skyrius

VAIDA GURSKIENĖ

**NCK ŠEIMOS BALTYMŲ SAŲVEIKA SU RAS GTPAZĘ AKTYVUOJANČIU  
BALTYMU**

MAGISTRO DARBAS  
(Biologija)

Mokslinis vadovas:  
Dr. Mindaugas Valius

Vilnius  
2006

## Turinys

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
1. ĮŽANGA	6
2. LITERATŪROS APŽVALGA	7
2.1 PDGF ir jo receptorius	7
2.2. Signalų perdavimas PDGF receptoriu $\beta$	10
2.2.1. Fosfatidilinozitol 3-kinazė	10
2.2.2. Fosfolipazė $C\gamma$	11
2.2.3. Src tirozino kinazė	11
2.2.4. Adaptorinis baltymas Grb2	12
2.2.5. Tirozino fosfatazė SHP-2	12
2.2.6. Transkripcijos faktoriai Stat	12
2.2.7. Mitogenų aktyvuotos proteino kinazės	13
2.3. Kitos signalų perdavime dalyvaujančios molekulės	14
2.3.1. Ras ir Ras GTPazę aktyvuojantis baltymas	14
2.3.2. Adaptorinių baltymų Nck- $\alpha$ ir Nck- $\beta$ vaidmuo signalų perdavime	17
2.4. Tarpbaltymines sąveikas užtikrinantys domenai	20
2.4.1. SH2 domenai	20
2.4.2. SH3 domenai	21
3. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS	23
3.1. Reagentai	23
3.2. GST, GST-Nck baltymų gavimas	23
3.2.1. Ekspresijos vektoriai	23
3.2.2. GST-Nck ekspresija	23
3.2.3. GST-baltymų gryninimas	24
3.3. Nck šeimos baltymų sąveikos su RasGAP tyrimas	24
3.3.1. Ląstelių linijos	24
3.3.2. Laikinoji transfekcija	25
3.3.3. Ląstelių lizatų paruošimas	25
3.3.4. Imunoprecipitacija	26
3.3.5. Precipitacija su rekombinantiniais baltymais	26
3.3.6. “Far western” blotas	27
3.3.7. Testas aktyvuojant kinazę <i>in vitro</i>	27

3.3.8. Imunofluorescencija	28
4. REZULTATAI	29
4.1. Su GST sulietų baltymų gavimas	29
4.2. Nck- $\alpha$ ir Nck- $\beta$ baltymų sąveika su RasGAP <i>in vitro</i>	29
4.3. Nck- $\alpha$ ir Nck- $\beta$ sąveika su RasGAP <i>in vivo</i>	31
4.4. Tiesioginė sąveika tarp RasGAP ir Nck šeimos baltymų ir jos mechanizmas	34
4.5. Nck- $\alpha$ baltymo sąveika su RasGAP HL-60 ląstelių linijoje	36
4.6. Nck- $\alpha$ ir RasGAP baltymų lokalizacija	39
5. REZULTATŲ APTARIMAS	43
6. IŠVADOS	46
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS	47

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ATF-2	-	Aktyvuojantis transkripcijos faktorius 2
BSA	-	Jaučio serumo albuminas
DAG	-	Diacilglicerolis
DME	-	Dulbecc'o modifikuota Eagle terpė
Cdc42	-	Ląstelės dalijimąsi kontroliuojantis baltymas 42
EGFR	-	Epidermio augimo faktoriaus receptorius
eIF2 $\beta$	-	Elongacijos iniciacijos faktorius 2 $\beta$
Elk1	-	Trinario komplekso faktorius (TCF)
EphB1 ir EphB2	-	Efrino receptorius B1
ERK	-	Ekstraląstelinių signalų reguliuojama kinazė
FAK	-	Fokalinės adhezijos kinazė
FBS	-	Jaučio embriono serumas
GDP	-	Guanozindifosfatas
GEF	-	Guanino nukleotidų mainų faktorius
GST	-	Glutation-S-transferazė
Grb2	-	Prie augimo faktoriaus receptoriaus prisijungęs baltymas 2
GTP	-	Guanozintrifosfatas
HA	-	Hemagliutinas
Hsp25/Hsp27	-	Šiluminio šoko baltymas 25/27
IPTG	-	Izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozidas
IRS-1	-	Insulino receptoriaus substratas-1
JIP1	-	Su JNK sąveikaujantis baltymas 1
kDa	-	Kilodaltonas
MAPKK	-	MAP kinazės kinazės
MAPKKK	-	MAP kinazės kinazės kinazė
MAPK	-	Mitogenų aktyvuota proteino kinazė
MAPKAP2	-	MAPK aktyvuota proteino kinazė 2
MEKK	-	MAPK/ERK kinazės kinazė
MEK1/MEK2	-	MAPK/ERK kinazė
MKK	-	MAPK kinazė
NAP-1	-	Su Nck asocijuotas baltymas 1

NIK	-	Su Nck sąveikaujanti kinazė
Pak	-	p21 <sup>cdc42/rac</sup> aktyvuota kinazė
PAP	-	Su PDGF asocijuotas baltymas
PBS	-	Fosfatinis druskos tirpalas
PDGF	-	Plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktorius
PDGFR	-	Plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktoriaus receptoriaus
PH	-	Plekstrino homologijos domenai
PI3K	-	Fosfatidilinozitol 3-kinazė
PI(4,5)P <sub>2</sub>	-	Fosfatidilinozitol 4,5-difosfatas
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	-	Fosfatidilinozitol 3,4,5,-trifosfatas
PINCH	-	Ypatingai įdomus naujas cisteino-histidino baltymas
PKA	-	Proteino kinazė A (nuo cAMP priklausoma proteino kinazė)
PKC	-	Proteino kinazė C
PLC $\gamma$	-	Fosfolipazė C $\gamma$
PLD	-	Fosfolipazės D
PPII	-	Kairiojo sukimo antrojo tipo poliprolino spiralė
PRK2	-	Su proteino kinaze C susijusi kinazė 2
Ras	-	Mažasis G baltymas
RasGAP	-	Ras GTPazę aktyvuojantis baltymas
RhoGAP	-	Rho GTPazę aktyvuojantis baltymas
RTK	-	Receptoriaus tirozino kinazė
Sam68	-	Su Src asocijuotas mitozėje baltymas 68
SAPK/JNK	-	Streso aktyvuota proteino kinazė/ c-Jun N galinė kinazė
SDS-PAGE	-	Natrio dodecilsulfato – poliakrilamidinio gelio elektroforezė
SEK1	-	SAPK/ERK kinazė 1 (dar vadinama MKK4, MAPK kinazė 4)
SH2	-	Src homologijos domenai 2
SH3	-	Src homologijos domenai 3
SLP-76	-	SH2 domeną talpinantis leukocitų baltymas
SOCS3	-	Citokinų signalizavimo supresorius 3
TAK1	-	TGF- $\beta$ aktyvuota kinazė 1
TPA	-	12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatas
VEGFR	-	Vaskuliarinio endotelinio augimo faktoriaus receptoriaus
WASp	-	Wiskott-Aldrich'o sindromo baltymas
WIP	-	Su WASp sąveikaujantis baltymas

## 1. ĮŽANGA

Eukariotinių ląstelių proliferacija, diferenciacija ir programuota ląstelių mirtis yra pagrindiniai ląstelėse vykstantys procesai, užtikrinantys organizmo vystymąsi, funkcionavimą ir mirtį. Šie procesai ir juos reguliuojančių signalų perdavimas yra realizuojami tarpbaltyminėmis sąveikomis. Šių reguliacinių sistemų tyrimas yra vienas iš pagrindinių ląstelės biologijos uždavinių.

Ląstelės procesų reguliavime svarbų vaidmenį atlieka augimo faktoriai, kurie jungiasi prie ląstelės paviršiuje esančių tirozino kinazių receptorių. Po sąveikos su ligandu receptoriūs tampa aktyviu ir su juo gali sąveikauti citoplazmos molekulės, kurios sąlygoja signalo perdavimą į branduolį ir atitinkamo atsako suformavimą.

Signalų perdavime svarbų vaidmenį atlieka adaptoriniai baltymai. Šie baltymai veikia kaip tarpininkai užtikrindami sąveikas tarp skirtingų baltymų ir, tokiu būdu, sąlygodami signalo perdavimą.

Keletas adaptorinių baltymų priklauso Nck baltymų šeimai. Yra žinomas šių baltymų vaidmuo proliferacijos signalo perdavime, bet mažai ištyrinėtas jų veikimo mechanizmas.

Darbo tikslas:

Ištirti Nck šeimos baltymų sąveiką su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu (RasGAP).

Uždaviniai:

Nustatyti už Nck- $\alpha$  sąveiką su RasGAP atsakingus Nck- $\alpha$  baltymo domenus ir ištirti sąveikos mechanizmą.

Įvertinti Nck šeimos baltymų ir RasGAP sąveikos priklausomybę nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.2 PDGF ir jo receptoriai

Ekstraląstelinės signalinės molekulės, tokios kaip augimo faktoriai (EGF, PDGF, VEGF), jungiasi prie receptorių tirozino kinazių (RTK). Prisijungus ligandui vyksta receptoriaus dimerizacija ir tirozinių autofosforilinimas. Prie fosfotirozinių specifiskai jungiasi SH2 (Src homologijos domenas) domenų turintys baltymai, kurie perduoda signalą kitoms, signalo perdavime dalyvaujančioms, molekulėms.[42] Vienas pirmųjų augimo faktorių yra plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktorius PDGF.

Plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktorius (PDGF) pirmiausia nustatytas kaip kraujo serumo sudėtinė dalis, vėliau išskirtas iš žmogaus trombocitų.[12, 22] PDGF yra sintetinamas daugelyje ląstelių. Sintezė padidėja atsakė į išorinius stimulus tokius kaip žemas deguonies lygis, trombinas, poveikis įvairiais augimo faktoriais ir citokinais. Dažniausiai ląstelėje yra sintetintos abi PDGF izoformos, A ir B, bet reguliacija transkripciniame ir potranskripciniame lygyje vyksta nepriklausomai.[12]

PDGF yra gaminamas megakariocituose ir po jų diferenciacijos į trombocitus yra saugomas jų  $\alpha$ -granulėse. Kraujui krešant trombocitai agreguojasi ir degranuliuoja, PDGF pereina į serumą, iš serumo patenka į audinius ir dalyvauja žaizdų gijimo procesuose pritraukdamas makrofagus ir inicijuodamas ląstelės proliferaciją.[29]

PDGF dalyvauja įvairiuose ląsteliniuose procesuose reguliuodamas ląstelių proliferaciją, augimą, chemotaksį. Yra svarbus embrioninio vystymosi metu, apsaugo ląsteles nuo apoptozės, dalyvauja žaizdų gijimo procesuose. Per didelis PDGF aktyvumas gali sukelti padidėjusią ląstelių proliferaciją ir išsivystyti įvairūs vėžiniai susirgimai (sarkoma, glioma), taip pat fibrozės, aterosklerozė.[12, 13, 22, 37]

Šiuo metu yra žinomos keturios PDGF izoformos: A, B, C ir D. A ir B izoformų genai yra išsidėstę 7 ir 22 chromosomose, atitinkamai. Abu turi 7 egzonus: pirmas koduoja signalinę seką, 2 ir 3 – koduoja iškerpamas iš pirmtako sekas, 4 ir 5 – didžiąją dalį baltymo, 7 egzonas daugiausia yra nekoduojantis. 6 egzonas iš B grandinės yra iškerpamas brendimo metu, tuo tarpu A grandinė gali turėti šio egzono koduojamą seką arba ne. PDGF-C ir PDGF-D genai yra 4q32 ir 11q22.3 chromosomose, atitinkamai. PDGF-C genas turi 6 egzonus, PDGF-D – 7.[12, 16]

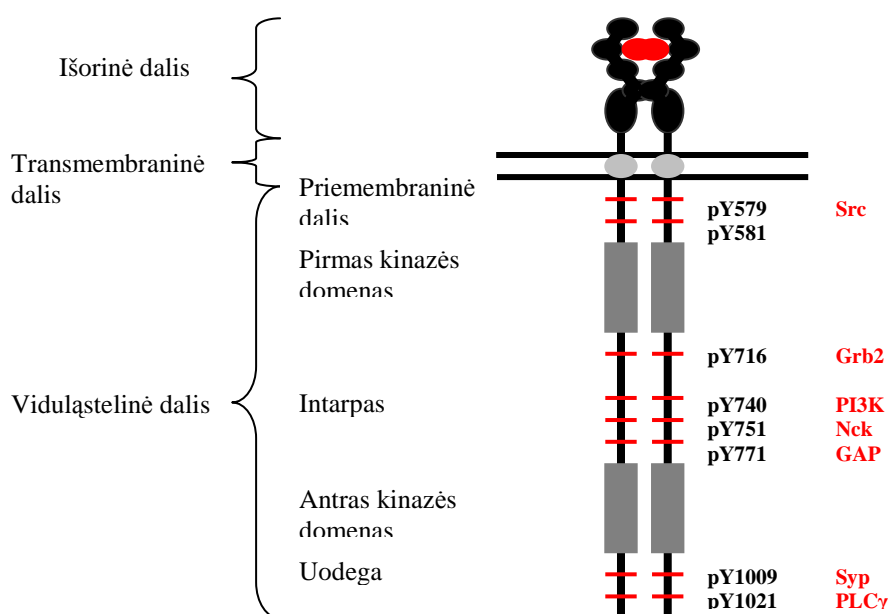
Polipeptidinės grandinės yra sintetintos kaip pirmtakai, kurie patiria proteolitinį procesingą. Susiformuoja subrendusios molekulės. A ir B izoformos sudarytos iš 100 amino rūgščių liekanų ir savo sekomis identiškos 60%.[13] C ir D polipeptidai

sudaryti iš 323 ir 348 amino rūgščių liekanų, atitinkamai, ir pasižymi 43% sekų homologija.[16]

PDGF augimo faktoriai jungiasi prie PDGF tirozino kinazės receptoriaus. PDGF poveikis PDGF receptoriui yra reguliuojamas augimo faktoriaus sąveikos su matrikso komponentais bei tirpiaisiais baltymais (pvz., PAP (PDGF-Associated Protein)).

Yra du PDGF receptoriai: PDGFR- $\alpha$  170 kDa ir PDGFR- $\beta$  180 kDa.  $\alpha$  receptoriaus genas yra lokalizuotas 4q12 chromosomoje, o  $\beta$  receptoriaus - 5 chromosomoje.[12]

PDGF receptorius yra transmembraninis polipeptidas. Ekstraląstelinė dalis yra sudaryta iš penkių į imunoglobulinus panašių domenų ir atsakinga už receptoriaus sąveiką su ligandu. Transmembraninė dalis yra sudaryta iš hidrofobinių amino rūgščių sekos, kurios C-gale yra kelios hidrofilinės amino rūgštys. Transmembraninė dalis įgalina receptorių migruoti membranoje lateraliai. Viduląstelinėje dalyje yra priemembraninis domenas, tirozino kinazės domenas atsakingas už receptoriaus sąveiką su kitomis signalinėmis molekulėmis ir C-galo domenas vadinamas uodega.(Pav.1.)[12, 22]



**Pav.1. PDGF receptoriaus  $\beta$  struktūra ir su jo fosfotiroziniais sąveikaujantys baltymai.**

Receptoriai gali funkcionuoti kaip homo- ( $\alpha\alpha$  ir  $\beta\beta$ ) ir heterodimerai ( $\alpha\beta$ ), kurie pasižymi skirtingu specifiskumu ligandui.[22] PDGF A ir B jungiasi prie PDGF

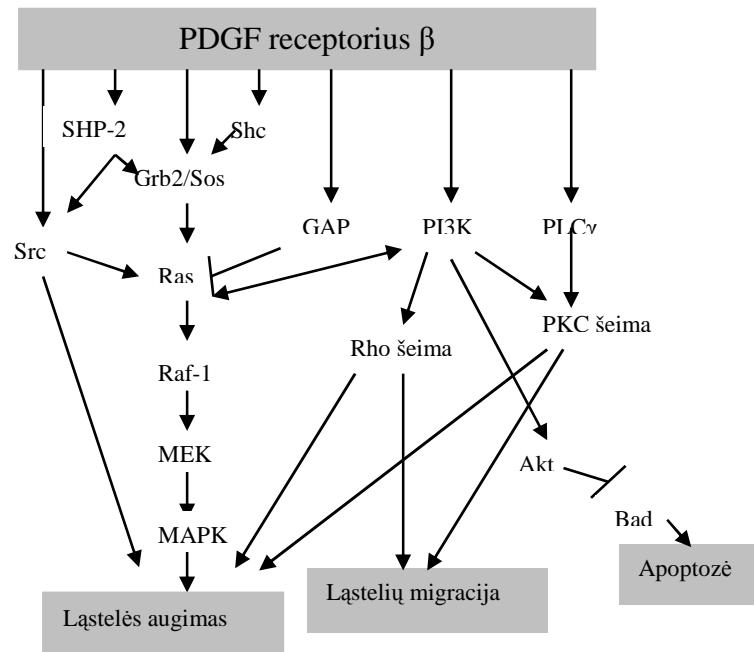


receptorių  $\alpha$  ir  $\beta$  kaip, disulfidiniais tilteliais sujungtos, homo- arba heterodimerinės molekulės (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), o C ir D izoformos tik kaip homodimerai (PDGF-CC, PDGF-DD). Prisijungus ligandui PDGF receptoriaus molekulės dimerizuojasi. AA, AB ar BB ligandų prisijungimas sąlygoja PDGF receptoriaus  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  ar  $\beta\beta$  dimerų susiformavimą. PDGF-CC homodimeras jungiasi prie PDGF- $\alpha$  ir sąlygoja homodimero  $\alpha\alpha$  susiformavimą, bet nesijungia prie PDGF- $\beta$ . Taip pat gali aktyvuoti PDGF- $\alpha\beta$  heterodimerų susidarymą. Tuo tarpu PDGF-DD aktyvuoja tik PDGF- $\beta\beta$  homodimerą ir PDGF- $\alpha\beta$  heterodimerą, bet neaktyvuoja PDGF- $\alpha\alpha$ . [12, 16, 22] Ligando prisijungimui yra svarbiausi trys, labiau į išorę nutolę, į imunoglobulinus panašūs domenai. Sąveika tarp dviejų receptoriaus polipeptidinių grandinių yra inicijuojama ligando prisijungimu, o stabilizuojama per ketvirtąjį į Ig-panašų domeną. Ligando-receptoriaus kompleksas yra stabilizuojamas tiesioginės sąveikos tarp receptorių. [12, 13]

Po ligandu indukuotos receptoriaus dimerizacijos vyksta receptoriaus citoplazminėje dalyje esančių tirozinų autofosforilinimas. Autofosforilinimas atlieka dvi svarbias funkcijas. Tirozinų, esančių kinazės domene, fosforilinimas sąlygoja katalitinį aktyvumą, o fosforilinti tirozinai, esantys už kinazės domeno reikalingi receptoriaus sąveikai su SH2 domeną turinčiomis citoplazminėmis molekulėmis. PDGF receptoriaus  $\beta$  tirozino kinazės aktyvumui ir aktyvumo palaikymui yra reikalingas tirozino Y857, esančio antrajame kinazės domene, fosforilinimas. Šiuo metu yra žinoma 12 tirozinų esančių priemembraninėje dalyje, intarpe ar uodegoje atsakingų už signalo perdavimą kitoms citoplazminėms molekulėms. Per 30 min. po stimuliacijos receptorius endocituojamas ir palaipsniui degraduojamas lizosomose. [12, 13, 18]

Daugiau nei 10 SH2 domeną turinčių molekulių specifiskai jungiasi prie skirtingų PDGFR fosfotirozinų. Sąveikos specifiskumą užtikrina 3-6 amino rūgščių liekanos esančios už fosfotirozino. [13] Kai kurie baltymai sąveikaujantys su PDGFR $\beta$  pasižymi fermentiniu aktyvumu. Tai PLC $\gamma$ , kuri jungiasi prie pTyr 1021 ir 1009, PI3K jungiasi prie pTyr740 ir 751, tirozino fosfatazė SHP-2 – pTyr1009 ir pTyr763, RasGAP – 771, Src šeimos tirozino kinazės – pTyr579 ir 581. Kiti baltymai nepasižymintys fermentiniu aktyvumu yra Grb2, kuris sąveikauja su PDGFR $\beta$  pTyr775, 716, Grb7 – pTyr775, 716, Shc – 751, 771 ir 579. Prie PDGFR $\beta$  pTyr579, 581 ir 775 taip pat jungiasi transkripcijos faktorių Stat šeimos nariai. (Pav.1.)

Kiekviena SH2 domeną talpinanti molekulė, kuri jungiasi prie PDGFR $\beta$  inicijuoja skirtingą signalo perdavimo kelią.(Pav.2.)[8, 12, 13, 30]



**Pav.2. Signalo perdavimas PDGF receptoriumi  $\beta$ .**

Trys dimerinės PDGFR kombinacijos perduoda panašius, bet neidentiškus, ląstelinius signalus.  $\alpha$  ir  $\beta$  heterodimerai perduoda mitogeninius signalus. Tačiau yra skirtumai įtakojant aktino filamentų sistemą.  $\beta$  receptorius aktyvuoja chemotaksi, o  $\alpha$  receptorius lygiųjų raumenų ląstelėse ir fibroblastuose chemotaksi slopina. Abu receptoriai sąlygoja viduląstelinio  $\text{Ca}^{2+}$  koncentracijos padidėjimą.[12, 13]

## 2.2. Signalo perdavimas PDGF receptoriumi $\beta$

### 2.2.1. Fosfatidilinozitol 3-kinazė

PI3K šeimos nariai, kurie jungiasi prie ir yra aktyvuojami tirozino kinazių receptorių yra sudaryti iš reguliacinio subvieneto p85 ir katalitinio subvieneto p110. p85 subvienetas sudarytas iš vieno SH2 domeno, kuris jungiasi prie pYXXM motyvo. Prisijungus PI3K prie PDGFR $\beta$ , ji yra fosforilinama ties Tyr508. Pati sąveika sąlygoja konformacinius pokyčius, kurių pasekoje padidėja p85 subvieneto katalitinis aktyvumas. PI3K substratas yra fosfatidilinozitol 4,5-difosfatas [PI(4,5)P<sub>2</sub>], kuris yra

fosforilinamas iki fosfatidilinozitol 3,4,5,-trifosfato [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]. Yra keletas skirtingų PI3K efektorinių molekulių. Tai serino/treonino kinazės Akt/PKB, kuriomis yra perduodamas antiapoptotinis signalas, PKC šeimos nariai ( $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ), p70 S6 kinazė, JNK, mažosios Rho šeimos GTPazės, ypač Rac, kuris yra svarbus aktino reorganizacijos ir chemotaksio procesuose. (Pav.1.)(Pav.2.) PI3K medijuoja daugybę skirtingų ląstelės atsakų į skirtingus ekstraląstelinius signalus, tai aktino reorganizacija, chemotaksis, ląstelės augimas ir antiapoptozė.[8, 12, 13, 42]

### 2.2.2. Fosfolipazė C $\gamma$

Fosfolipazė C $\gamma$  yra sudaryta iš dviejų SH2 ir vieno SH3 domenų. Fosfolipazės C $\gamma$  substratas taip pat yra PI(4,5)P<sub>2</sub>. Jo produktai yra inozitolo 1,4,5,-trifosfatas, kuris išleidžia viduląstelinį Ca<sup>2+</sup> iš endoplazminio tinklo į citoplazmą, ir diacilglicerolis (DAG) aktyvuojantis PKC šeimos narius. Prisijungus prie PDGF receptoriaus pY1021 PLC $\gamma$  yra fosforilinama ir padidėja jos katalitinis aktyvumas.(Pav.1.) Pilna PLC $\gamma$  aktyvacija priklauso nuo PI3K. PI3K substrato produktas PI(3,4,5)P<sub>3</sub> jungiasi prie PLC $\gamma$  PH domeno ir tokiu būdu inkaruoja fermentą membranoje. PLC $\gamma$  dalyvauja fosfatidilcholinui specifinės fosfolipazės D (PLD) aktyvacijoje. Po PLD veiklos susiformuoja fosfatidinė rūgštis, kuri alosteriškai aktyvuoja PLC $\gamma$  ir gali dalyvauti mitogeniniame atsake į PDGF stimuliaciją. PLC $\gamma$  dalyvauja Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> mainų aktyvacijoje nuo Ca<sup>2+</sup> ir PKC priklausomu mechanizmu.(Pav.2.) PLC $\gamma$  nėra būtina ląstelės augimo ir judrumo stimuliacijai, tačiau kai kurių tipų ląstelėse gali įtakoti šiuos atsakus.[10, 12, 13, 42]

### 2.2.3. Src tirozino kinazė

Tirozino kinazių Src šeimos nariai sudaryti iš vieno SH3, vieno SH2 ir katalitinio domenų. C galinėje dalyje yra tirozino Y527 liekana. Kai C-galo tirozinas fosforilinamas, jis sąveikauja su Src SH2 domenu ir inaktyvuoja kinazę. Prisijungiant Src prie PDGF receptoriaus pTyr579 ar pTyr581 yra defosforilinamas C-galinis Src tirozinas ir Src aktyvuojama. Aktyvi Src indukuoja c-myc geno ekspresiją, kuri reikalinga perėjimui per G1 fazę. Src dalyvauja perduodant mitogeninį atsaką PDGF receptorių  $\beta$ . Tuo tarpu Src prisijungimas prie PDGF receptoriaus  $\alpha$  nėra svarbus mitogeniniam atsakui.(Pav.1.)(Pav.2.)[12, 13, 30]

#### 2.2.4. Adaptorinis baltymas Grb2

Grb2 (Growth factor receptor bound 2) yra nematodo *Caenorhabditis elegans* baltymo Sem-5 homologas. Grb2 yra adaptorinė molekulė sudaryta iš vieno SH2 ir dviejų SH3 domenų. SH3 domenai suriša Sos, SH2 domenai reikalingi tiesioginiam adaptoriaus prisijungimui prie PDGF receptoriaus arba netiesioginei sąveikai per Shc ar SHP-2. Grb2 SH2 domenas atpažįsta pYXNX motyvą. PDGFR $\beta$  tokie motyvai yra du. Vienas ties Tyr716, kitas ties Tyr775.(Pav.1.) Pagrindinė Grb2 funkcija yra aktyvuoti Ras sąlygojant RasGDP vartimą į RasGTP. Aktyvuotas Ras jungiasi prie serino/treonino kinazės Raf-1, kuri aktyvuoja MAP kinazių kaskadą dalyvaujančią ląstelės augimo stimuliacijos, migracijos, diferenciacijos procesuose.(Pav.2.)[3, 12, 13, 17]

#### 2.2.5. Tirozino fosfatazė SHP-2

SHP-2 tai 70 kDa tirozino fosfatazė sudaryta iš dviejų SH2 domenų reikalingu sąveikai su fosforilintais tirozinais, o ši sąveika reikalinga pilnam katalitiniam aktyvumui. Pagrindinė šio baltymo funkcija yra neigiama PDGF receptoriaus signalo perdavimo reguliacija defosforilinant jo autofosforilintus tirozinius. Už SHP-2 sąveiką su PDGFR $\beta$  yra atsakingi receptoriaus fosfotirozinai pY1009 ir pY763.(Pav.1.) Prisijungus prie receptoriaus yra fosforilinami SHP-2 tirozinai ir fosfatazė gali atlikti adaptoriaus funkciją surišdama Grb2/Sos ir tokiu būdu dalyvaudama Ras reguliuojamoje MAP kinazių kaskados aktyvacijoje. Kita svarbi šios fosfatazės funkcija yra Src tirozino kinazių aktyvacija defosforilinant Src C-galinį tiroziną.(Pav.2.)[12, 13]

#### 2.2.6. Transkripcijos faktoriai Stat

Stat baltymų šeimą sudaro 7 nariai. Stat1, 3, 5 $\alpha$ , 5 $\beta$  ir 6 jungiasi prie aktyvuoto PDGFR $\beta$  ir yra fosforilinami. Po tirozino fosforilinimo Stat dimerizuojasi ir translokuojamas į branduolį kur jungiasi prie DNR ir veikia kaip transkripcijos faktorius. Stat molekulės yra svarbios signalo perdavimui citokinų receptoriais. Jų vaidmuo signalo perdavime PDGF receptoriu nėra žinomas.(Pav.1.)[12, 13]

### 2.2.7. Mitogenų aktyvuotos proteino kinazės

Mitogenų aktyvuotos proteino kinazės (MAPK) tai serino/treonino kinazių šeima. Šios kinazės yra aktyvuojamos veikiant įvairiems išoriniams stimulams per įvairius receptorius (PDGFR, EGFR, FGFR), dalyvauja daugelyje signalinių kelių. Šie signaliniai keliai randami daugelyje eukariotinių organizmų ir sudaryti iš trijų pakopų: MAP kinazė (MAPK) yra aktyvuojama MAP kinazės kinazės (MAPKK), kurią aktyvuoja MAP kinazės kinazės kinazė (MAPKKK). Šis triapakopis veikimas gali būti reguliuojamas tiesiogiai GTP surišančiu ir hidrolizuojančiu baltymu, GTPaze (pvz., Ras) arba netiesiogiai – kai GTPazė aktyvuoja tarpinę, sistemą kontroliuojančią kinazę. MAP kinazių stimuliacija sąlygoja transkripcijos aktyvaciją.

MAP kinazių šeima yra skirstoma į tris pošeimius: ERK (ekstraląstelių signalų reguliuojama kinazė), SAPK/JNK (streso aktyvuota proteino kinazė/ c-Jun N galinė kinazė) ir p38. Visos MAPK yra fosforilinamos ties Thr-X-Tyr motyvu, esančiu VIII kinazės subdomene.[42, 50]

MAP kinazių sistemos yra aptinkamos tiek mielėse, tiek ir stuburiniuose. Mielėse yra aptiktos penkios tokios sistemos veikiančios nepriklausomai viena nuo kitos ir reguliuojančios atskirus viduląstelinis procesus. Stuburiniuose atrastos bent trys sistemos dalyvaujančios daugelio procesų reguliacijoje ir nėra susijusios su vieno konkretaus proceso reguliacija.[42, 50]

Geriausiai ištirtas yra ERK pošeimis. Tai pirma kinazė atrasta stuburiniuose organizmuose. Jis dalyvauja signalinėse kaskadose sudarytose iš Raf, MEK1/MEK2 (MAPK/ERK kinazė) ir ERK1/ERK2. Raf yra aktyvuojamas jį fosforilinant PKC ar kitais baltymais ir sąveikaujant su RasGTP ir 14-3-3 baltymais. Raf taip pat asocijuoja ir fosforilina MEK. MEK savo ruožtu fosforilina ERK ties tirozino ir treonino liekanomis Thr-Glu-Tyr motyve ir tokiu būdu aktyvuoja ERK. ERK kinazės gali būti aktyvuojamos ir nuo Ras bei Raf nepriklausomu keliu, reguliuojant PKC. Fosforilinimas, bet ne katalitinis aktyvumas yra reikalingi ERK translokacijai į branduolį. Aktyvus ERK fosforilina daugelį baltymų, tokių kaip transkripcijos faktoriai ir kiti branduolio baltymai (Elk1 - trinario komplekso faktorius (TCF), cMyc, c-Fos). Šis signalinis kelias yra aktyvus neproliferuojančioje ląstelėje ir yra stimuliuojamas mitogeniniu signalu. Fibroblastuose ERK sąlygoja įėjimą į ląstelės ciklą reguliuodamas ciklino D1 transkripciją. [42, 50]

SAPK/JNK medijuoja atsakus į ląstelės stresą. SAPK/JNK pošeimis yra fosforilinamas ir tokiu būdu aktyvuojamas dvigubo specifiškumo treonino-tirozino kinaze SEK1 (SAPK/ERK kinazė 1) ir MKK7 (MAPK kinazė 7). MKK7 aktyvuoja JNK specifiškai. SEK1 gali būti aktyvuotas MEK kinazėmis (MEKK). Kas aktyvuoja MEKK nėra žinoma, manoma, kad tai Pak ( $p21^{cdc42/rac}$  activated kinase) kinazė, kuri tiesiogiai sąveikauja su į Ras panašiu baltymu. Už JNK kaskados kinazių aktyvaciją yra atsakingi baltymai Rac1 ir Cdc42. JNK substratai yra transkripcijos faktoriai c-Jun, Elk-1 ir ATF-2. JNK fosforilina šiuos faktorius ir taip padidina jų transkripcinį aktyvumą. [42, 50]

Žinduolių ląstelėse buvo nustatytas pastolinis baltymas JIP1 (JNK-interacting protein 1), kuris stabdo JNK translokaciją į branduolį ir slopina JNK aktyvuotą apoptozę. JNK ir ERK pasižymi priešingu poveikiu reguliuojant apoptozę. [42, 50]

p38 yra Saccharomyces Hog1p baltymo homologas. p38 pošeimio baltymai gali būti stimuliuojami osmosinio šoko sąlygomis. p38 fosforilinama MKK3 ir MKK6, o jos savo ruožtu gali būti aktyvuojamos MTK1 (nuo MAP nepriklausoma kinazė 1) ir TAK1 (TGF- $\beta$  (Transformuojantis augimo faktorius 1) aktyvuota kinazė 1). p38 substratas yra MAPKAP2 (MAPK aktyvuota proteino kinazė 2), kuri po to fosforilina šiluminio šoko baltymą Hsp25/Hsp27. PC12 ląstelėse p38 indukuoja apoptozę, kitose ląstelėse apsaugo nuo apoptozės. [42, 50]

ERK, SAPK/JNK ir p38 veikimas priklauso nuo konteksto. Ląstelių sugebėjimas išgyventi ar patirti apoptozę priklauso nuo MAP kinazių signalinių kelių santykio. [42]

## 2.3. Kitos signalo perdavime dalyvaujančios molekulės

### 2.3.1. Ras ir Ras GTPazę aktyvuojantis baltymas

Ras baltymas dalyvauja daugelyje ląstelės procesų tokių kaip proliferacija, diferenciacija, apoptozė, migracija. Tai 21 kDa mažasis G baltymas turintis GTPazinį aktyvumą reikalingą jo funkcijai atlikti. Yra žinomos trys Ras izoformos: Kirsten-Ras, Harvey-Ras ir N-Ras, apibendrintai vadinamos p21Ras vardu. Ras baltymai yra lokalizuoti plazminės membranos citoplazminėje dalyje. [45]

p21Ras baltymai būna dviejų būsenų: neaktyvi – prisijungus GDP ir aktyvi – prisijungus GTP. GTP prisijungimas sąlygoja konformacinius pokyčius, kurie užtikrina Ras baltymų sąveiką su efektorinėmis molekulėmis. Po sąveikos su

efektoriumi, pastarasis aktyvuojamas ir signalas yra perduodamas kitoms signalinėms molekulėms. Nors ląstelėje yra žymiai daugiau GTP nei GDP, GDP nuo Ras nelinkęs disocijuoti, nes RasGDP sąveika pasižymi dideliu giminingumu. GDP/GTP reakciją stimuliuoja guanino nukleotido mainų faktoriai (GEF baltymai): Vav1, Sos (Son of Sevenless), Pix. GEF sąveikauja su RasGDP, GDP išsilaisvina ir į jo vietą prisijungia GTP. Ras baltymai yra inaktyvuojami dalyvaujant RasGAP (GTPazę aktyvuojantis baltymas), kuris padidina Ras GTPazinį aktyvumą.[45]

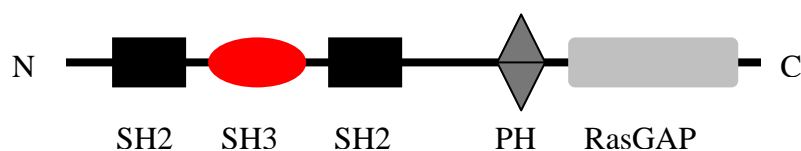
Prie aktyvuoto tirozino kinazės receptoriaus fosfotirozino jungiasi adaptorinis baltymas Grb2 ar SHC/Grb2 kompleksas, kuris pritraukia Sos. Susiformuoja receptoriaus-Grb2-GEF kompleksas. Tada Sos stimuliuoja RasGDP vartimą į RasGTP. Ras gali būti aktyvuojamas netiesiogiai per Src tipo tirozino kinazės. Po aktyvacijos Ras perduoda signalą pasrovinėms efektorinėms molekulėms. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* ir žmogaus Ras tiesiogiai jungiasi ir aktyvuoja Raf proteino kinazę, Raf fosforilina ir aktyvuoja MEK, kuri fosforilina ir aktyvuoja MAP kinazės Erk1 ir Erk2. Aktyvios Erk translokuojamos į branduolį kur fosforilina ir reguliuoja tam tikrų transkripcijos faktorių aktyvumą.(Pav.2.) Kaip yra stabdomas Ras signalizavimas nėra gerai žinoma. Manoma, kad Raf/MAP kinazių kaskada fosforilina Sos ir tokiu būdu sukelia Sos-Grb2 komplekso disociaciją. Kitas mechanizmas gali būti, kad prisijungus Grb2-Sos prie receptoriaus yra aktyvuojamas RasGAP.[13, 42, 45]

GAP (GTPazę aktyvuojantis baltymas) baltymai atlieka neigiamo G-baltymų regulatoriaus funkciją. Jie sąveikauja su daugybe ląstelės faktorių ir yra alosteriškai reguliuojami kovalentinėmis ir nekovalentinėmis sąveikomis.[44]

p120GAP (Ras GTPazę aktyvuojantis baltymas, dar vadinamas RasGAP) yra plačiai ekspresuojamas įvairiose ląstelėse. Gali būti įvairios šio baltymo izoformos. Pagrindinė RasGAP katalitinė funkcija yra vykdyti GTP hidrolizę Ras, R-Ras ir Rab5 baltymuose. RasGAP jungiasi prie Ras efektorinio domeno, todėl manoma, kad RasGAP gali atlikti ne tik GTPazę aktyvuojančią funkciją, bet ir būti Ras efektoriumi. Buvo parodyta, kad p120GAP specifiškai dalyvauja Ras medijuoto JNK signalinio kelio aktyvacijoje bei gali dalyvauti kituose, ne MAP kinazių, signaliniuose keliuose reguliuojamuose Ras.[25, 40, 43]

Kaip ir kiti GAP baltymai, p120GAP turi domeninę struktūrą. C-gale yra RasGAP domenas (katalitinis domenas) sudarytas iš ~334 amino rūgščių, N-gale yra du SH2 domenai, o tarp jų įsiterpęs vienas SH3 domenas. RasGAP domenas yra būtinas ir

pakankamas GTP hidrolizei.[44] Tuo tarpu SH2 ir SH3 domenai yra reikalingi pilnam katalitiniam aktyvumui. Tarp vidinio SH2 ir katalitinio domenų yra PH (plekstrino homologijos) domenas, kuris reikalingas sąveikos tarp Ras ir RasGAP reguliacijai ir  $\text{Ca}^{2+}$  bei lipidus surišantis domenas, kuris gali būti reikalingas sąveikai su vidiniu plazminės membranos paviršiumi. N-gale yra prolinu turtinga seka reikalinga sąveikai su Src kinazių šeimos nariais.(Pav.3.)



**Pav.3. Ras p120GAP baltymo struktūros schematinis vaizdas.**

Manoma, kad efektyviai RasGTP hidrolizei plazminės membranos vidiniame paviršiuje vykti yra būtina p120GAP sąveika su kitais faktoriais. Tai gali būti įvairūs receptoriai, pavyzdžiui, PDGFR, EGFR ir kt. Tačiau, yra mažai žinoma apie p120GAP ir aktyvuoto receptoriaus sąveikos mechanizmą ir apie baltymus, kurie medijuoja GAP jungimąsi prie specifinio receptoriaus. p120GAP SH3 ir SH2 domenų išsidėstymas vienas šalia kito sąlygoja sąveikos su signalinėmis molekulėmis įvairovę. Dėl GAP sąveikos su skirtingomis molekulėmis, jis gali įeiti į įvairius kompleksus bei išsidėstyti įvairiuose ląstelės kompartmentuose priklausomai nuo komplekso komponentų koncentracijos, kuri gali priklausyti nuo ląstelės tipo ir amžiaus.[25, 45]

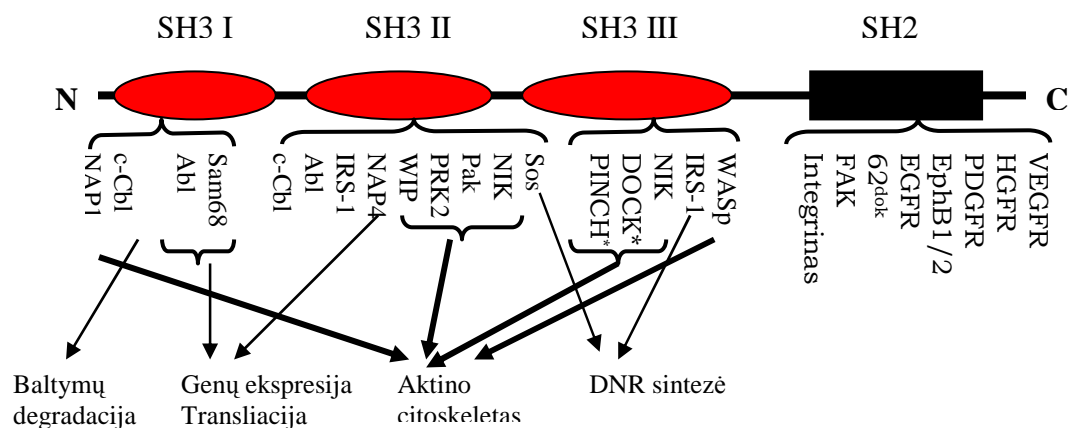
RasGAP per savo SH2 domenų jungiasi prie aktyvuoto PDGF- $\beta$  receptoriaus pTyr771 (Pav.1.), bet nesijungia prie PDGF- $\alpha$  receptoriaus. Prisijungus prie tirozinfosforilinto receptoriaus vyksta RasGAP fosforilinamas ir konformaciniai pokyčiai reikalingi, kad SH3 domenas būtų prieinamas kitoms molekulėms, bet nėra žinoma, kad fosforilinimas įtakotų RasGAP aktyvumą.(Pav.2.)[12, 13, 29, 43, 44] Kai RasGAP yra fosforilintas ties Tyr460 jis sąveikauja su Src šeimos nariais Lyn, Fyn ir Yes. Tuo tarpu RasGAP- $\text{Src}$  sąveika nevyksta, kadangi Src pats sąveikauja su aktyvuotu PDGFR- $\beta$ . [35, 40]

RasGAP taip pat sąveikauja su kitais signaliniais baltymais tokiais kaip p190 RhoGAP, p62Dok. p120RasGAP perneša kompleksus į kurių sudėtį įeina p190 RhoGAP ir p62Dok prie aktyvuotų tirozino kinazių, tai rodo, kad RasGAP atlieka ir kitas funkcijas nesusijusias su neigiama Ras reguliacija.[40, 43]



### 2.3.2. Adaptorinių baltymų Nck- $\alpha$ ir Nck- $\beta$ vaidmuo signalo perdavime

Pirmą kartą *nck* genas buvo išskirtas iš žmogaus melanomos cDNR bibliotekos. Nck baltymų šeimai priklauso du žmogaus baltymai, Nck- $\alpha$ /1 ir Nck- $\beta$ /2, du pelės ląstelėse - mNck- $\alpha$  ir mNck- $\beta$ /Grb4 ir vienas Drozofiloje - Dock. Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$  pasižymi 68% amino rūgščių homologija. Abu Nck baltymus koduoja skirtingi genai. *nck- $\alpha$*  genas yra lokalizuotas 3q21 chromosomoje, o *nck- $\beta$*  – 2q12. Nck baltymai yra 47 kDa citozolinės molekulės sudarytos iš trijų SH3 (Src homologijos domenai) ir vieno SH2 domenų ir nepasižymi katalitiniu aktyvumu. (Pav.4.) [3, 5, 17]



**Pav.4. Nck baltymų struktūros schematinis vaizdas.** SH3 domenai skaičiuojami nuo N galo. SH3 I – pirmasis SH3 domenai, SH3 II – antrasis, SH3 III – trečiasis. Žvaigždutėmis pažymėti baltymai sąveikaujantys tik su Nck- $\beta$ .

Abu baltymai yra ekspresuojami daugelyje ląstelių, bet jų ekspresija toje pačioje ląstelėje skiriasi. [1, 3] Pagrindinė adaptorinių baltymų funkcija yra per savo SH2 domeną prijungti ląstelės paviršiaus receptorius prie kitų signalo perdavime dalyvaujančių molekulių, kurios sąveikauja su adaptorinių SH3 domenais. [5, 6]

Nck šeimos baltymai jungiasi prie daugelio augimo faktorių receptorių, tai EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). [1] Tyrimais *in vitro* buvo parodyta, kad Nck $\alpha$  sąveikauja su PDGF receptoriaus- $\beta$  (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) pTyr 751, 740, 771, 1009, o Nck $\beta$  su pTyr1009. (Pav.1.) [1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11] Tuo tarpu S. Frese ir kolegų tyrimai rodo, kad abu Nck gali sąveikauti su PDGFR $\beta$  Y1009, bet nė vienas nesijungia prie Y751. [46] Po stimuliacijos augimo faktoriumi Nck yra fosforilinamas

ties tirozinu, treoninu ir serinu. Nck taip pat yra fosforilinamas atsake į forskolino ir forbolo esterio poveikį. Tai rodo, kad jis gali būti substratu citozolinėms Ser/Thr kinazėms, tokioms kaip proteino kinazė C (PKC) ir proteino kinazė A (PKA, nuo cAMP priklausoma proteino kinazė). Kai kurie autoriai teigia, kad Nck gali jungtis prie PDGF receptoriaus tiesiogiai arba per Dok ar SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) baltymus.[9, 24] Nck baltymai per savo SH2 domeną taip pat sąveikauja su tirozinfosforilintais citoplazminiais baltymais. Tai insulino receptoriaus substratas-1, Src, p62Dok, FAK, SLP-76.[2, 3, 5, 6, 17] Vienas iš svarbiausių Nck partnerių sąveikaujančių su Nck SH2 domenu yra Dok (Downstream of trosine kinase). Tai 62 kDa su RasGAP asocijuojantis fosfotirozininis baltymas. Po EphB1 ir EphB2 tirozino kinazės receptorių stimuliacijos formuojasi kompleksas į kurio sudėtį įeina Nck, su Nck sąveikaujanti kinazė (NIK), Dok-1, RasGAP ir nežinomas 145 kDa fosfotirozininis baltymas. Manoma, kad Dok-1 per savo PH domeną sąveikaudamas su fosfolipidais pritraukia Nck ir su Nck sąveikaujančius baltymus prie plazminės membranos.[3, 5, 19]

Daugelis kitų baltymų sąveikauja dažniausiai su visais trim Nck SH3 domenais. O kai kurių baltymų atveju papildomai reikalingas ir SH2 domenas.(Pav.4.) Kokia tokių sąveikų reikšmė nėra žinoma. Daugelis baltymų sąveikauja su abiem Nck izoformomis, tai WASP, Sos, Abl, dinaminas, Pak1, IRS-1 ir kt. Tiek Nck $\alpha$ , tiek ir Nck $\beta$  susijungęs su v-Abl, Ha-Ras ir Sos reguliuoja ląstelių morfologiją ir indukuoja genų ekspresiją per transkripcijos faktorių Elk1. Duomenys apie Nck dalyvavimą Ras/MAPK kaskados aktyvacijoje yra labai prieštaringi. Vieni autoriai teigia, kad Nck baltymai nedalyvauja Ras/MAPK signalizavime, kadangi Nck neįtakoja ERK aktyvacijos atsake į EGF stimulus [1, 17]. Tuo tarpu kiti autoriai teigia, kad nestimuliuotose augimo faktoriumi ląstelėse Nck lokalizuodamas Sos membranoje aktyvuoja Ras ir ERK.[3, 27] Tokie prieštaringi duomenys gali kilti dėl to, kad Nck nėra labai giminingas Sos ir tyrimai dažniausiai atliekami padidinus Nck ar jo mutantų ekspresiją. Nck sąveika su dauguma baltymų yra pastovi. Su kai kuriais, PxxP motyvą turinčiais, baltymais, tokiais kaip PAK, PRK2, WASP, PINCH sąveika yra indukuojama ir vyksta per Nck SH3 domeną.[1, 6, 28] Esant skirtingam receptoriaus kiekiui, jis gali jungtis prie skirtingų Nck-efektoriaus kompleksų. Nck-efektoriaus kompleksai gali būti tokie: Nck-Pak1-PIX-GITI, Nck-Pak3, Nck-Prk2, Nck-NIK, Nck-WASp, Nck-WIP, Nck-NAP-1, Nck-DOCK180, Nck-PINCH. Visi šie kompleksai potencialiai gali sujungti savo aktyvatorius su aktino citoskeletu bei

sąlygoti ląstelių migraciją, adheziją, endocitozę, vystymąsi, proliferaciją. Atskirų kompleksų susidarymas iš dalies priklauso nuo ląstelės tipo. Pavyzdžiui, Nck-WASP kompleksas dominuoja hematopoetinėse ląstelėse, o Nck-NIK – neuroninėse ląstelėse.[6]

PAK1 jungiasi prie Nck SH3 domenų. Yra žinoma, kad PAK1 šeimos serino/treonino kinazės yra aktyvuojamos prisijungiant prie aktyvių Rho šeimos GTPazių Cdc42 ir Rac (prisijungusių GTP). Nck pritraukia PAK1 prie aktyvuotų EGF ir PDGF receptorių. PAK1 lokalizacija membranoje sąlygoja MAP kinazių SAPK/JNK kaskados aktyvaciją. PAK1 sąveika su Nck yra reguliuojama ląstelės adhezijos. Po ląstelės atkibimo kompleksas suyra ir greitai atstatomas po pakartotinės adhezijos prie ekstraląstelinio matrikso.[3, 6, 17, 28]

Nck-Prk2 kompleksas gali perduoti signalą Rho-aktyvuojamu signaliniu keliu. Ši sąveika taip pat svarbi aktino citoskeleto reguliacijai.[6]

Aktino citoskeleto organizacijoje kritinį vaidmenį atlieka WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) šeimos baltymai. Aktyvuotuose T limfocituose Nck medijuoja nuo fosfotirozino priklausomo komplekso susirinkimą į kurio sudėtį įeina WASP, Nck, SLP-76 ir SLAP (su SLP-76 asocijuojantis baltymas) baltymai.[3] Nckβ ir Grb2 sąlygoja N-WASP aktyvaciją, o N-WASP savo ruožtu indukuoja aktino polimerizaciją.[15, 23]

Neseniai buvo nustatyta sąveika tarp Nckα ir Ras GTPazę aktyvuojančio baltymo (RasGAP arba p120GAP), bet šios sąveikos mechanizmas ir biologinė reikšmė nėra žinomi.[3, 4, 11, 17]

Nck-α ir Nck-β jungiasi prie insulino receptoriaus, kuris gali reguliuoti efektorinių Nck-α molekulių aktyvumą. Sam68, prie RNR prisijungiantis baltymas, sąveikauja su Nck-α ir turi būti substratu insulino receptoriui. Sam68 turi dalyvauti nuo Nck-α priklausomoje baltymų transliacijoje tiesiogiai nukreipdamas specifinę mRNR į ribosomas per molekulinį kompleksą mRNR-Sam68-Nck-α-eIF2β. Nck-α sąveikauja su eukariotų iniciacijos faktoriumi 2β, kuris yra eIF2 komplekso, atsakingo už baltymų sintezės iniciaciją, komponentas. Nck-α ir eIF2β lokalizuojasi ribosomose, kuriose jų lygis yra reguliuojamas insulino.[26]

Šiuo metu yra žinoma tik keletas baltymų specifiškai sąveikaujančių su Nckβ.(Pav.4.) Tai PINCH ir DOCK180, kurie reikalingi aktino citoskeleto reguliacijoje.[1, 6] PINCH (for Particularly Interesting New Cys-His Proteins)

baltymas yra sudarytas iš penkių LIM domenų ir dalyvauja ląstelės adhezijos procesuose. PINCH sąveikauja su ILK (Integrin-Linked Kinase). Nustatyta, kad Nck $\beta$  specifiškai sąveikauja su ketvirtuoju PINCH baltymo LIM domenu per savo trečiąjį SH3 domeną. Manoma, kad PINCH funkcija yra sujungti ILK su Nck $\beta$ . [3] Per savo C galinį ir vidurinį SH3 domenus Nck $\beta$  jungiasi prie DOCK180, kuris dalyvauja integrinų signalizavime ir aktyvuoja Rac, kuris indukuoja ląstelės migraciją. [6] Tyrimais *in vivo* buvo parodyta, kad, priešingai nei Nck $\alpha$ , Nck $\beta$  blokuoja PDGF indukuotą aktino polimerizaciją. [2] Neseniai buvo nustatyta, kad Nck $\beta$  sąveikauja su FAK (Focal Adhesion Kinase), kinaze lokalizuota lamelipodijose, filopodijose ir dalyvaujančią ląstelės judėjimo reguliacijoje. [14]

## 2.4. Tarpbaltymines sąveikas užtikrinantys domenai

### 2.4.1. SH2 domenai

Specifinės baltymų sąveikos, sąveikos su kitomis molekulėmis, tokiomis kaip fosfolipidai ar nukleino rūgštys yra svarbios organizuojant ląstelės funkcijas ir duodant specifinį atsaką į išorinius signalus. Sąveikos domenai, specifiniai motyvai užtikrina eukariotinių ląstelių funkcinę įvairovę. [21]

Src homologijos (SH) domenas 2 buvo nustatytas retroviruso onkobaltyme v-Fps kaip 100 amino rūgščių seka, kuri atsakinga už baltymo sąveiką su kitais baltymais ir v-Fps katalitinio aktyvumo reguliaciją. Vėliau SH2 domenas buvo nustatytas nereceptorinių tirozino kinazių reguliaciniuose regionuose. Vėliau ir negiminingose signalinėse molekulėse, tokiose kaip PLC $\gamma$ , RasGAP, PI3K p85 subvienete. [21]

SH2 domeną suformuoja dvi  $\alpha$  spiralės ( $\alpha A$  ir  $\alpha B$ ) tarp kurių yra  $\beta$  klostė ( $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta D$ ). Suformuojama teigiamai įkrauta kišenė vienoje  $\beta$  klostės pusėje, kuri užtikrina sąveiką su motyvu. Kita sąveikos kišenė yra atsakinga už sąveiką su amino rūgštimis esančiomis +3 pozicijoje nuo fosfotirozino. Sąveikos specifiškumą užtikrina į C galą nuo fosfotirozino esančios 3-6 amino rūgštys. [21, 47, 48]

Skirtingų baltymų SH2 domenai atpažįsta tik specifinius pTyr motyvus. Pvz., Grb2 SH2 specifiškai jungiasi prie pTyr-Ise/Val-Asn-X motyvo kuriame kritinė yra hidrofobinė amino rūgštis +1 pozicijoje ir asparaginas +2 pozicijoje. Src tirozino kinazės SH2 domenai specifiškai jungiasi prie pTyr-Glu-Glu-Ile motyvo. [17, 21]

Nck šeimos baltymų SH2 domenai priklauso I grupės šeimai, turinčiai aromatinę amino rūgštį fenilalaniną βD5 pozicijoje. SH2 domenai jungiasi prie pY-D-E-(P/D/V) motyvo tirozinfosforilintuose baltymuose. Sąveikai yra svarbiausios trys amino rūgštys esančios 0, +1 ir +3 pozicijose. Stipriausia sąveika vyksta esant valinui +3 pozicijoje. +1 pozicijoje esanti asparagino rūgštis yra kritinė.[3, 17, 46]

#### 2.4.2. SH3 domenai

SH3 domenai yra būdingi daugeliui ląstelės baltymų dalyvaujančių signalo perdavime, citoskeleto organizacijoje, baltymuose įeinančiuose į fermentinius kompleksus (pvz. fagocitų NADPH oksidazė). Pagrindinė šių domenu funkcija yra užtikrinti sąveikas tarp baltymų.[17]

SH3 domenai (Src homologijos domenai) dažniausiai yra sudaryti iš 60 amino rūgščių. Su SH3 domenu asocijuojantys peptidai turi kairiojo sukimo antrojo tipo poliprolino spiralę (PPII) su trimis amino rūgštimis vijai. Beveik visi SH3 domenai atpažįsta konservatyvų motyvą PxxP (P – prolinas, x – bet kokia amino rūgštis). Du konservatyvūs prolinai yra būtini sąveikai, o X gali būti bet kokia amino rūgštis, bet dažniausiai tai alifatinė amino rūgštis. Kiekviena xP pora suformuoja hidrofobinę kišenę, kurioje esančios konservatyvios amino rūgštys suteikia pagrindinę energiją sąveikai. Specifiškumas yra užtikrinamas šoninėmis amino rūgštimis, K ir R. Buvo išskirtos dvi tokių motyvų klasės: I klasė - K/RxxPxxP ir II klasė - PxxPxK/R (K ir R yra būtinos šoninės amino rūgštys lizinas ir argininas, x – bet kokia amino rūgštis). SH3 domenai prie tos pačios amino rūgščių sekos gali jungtis dviem orientacijomis: iš C galo į N galą ir iš N galo į C galą. Ligandai, kurių sąveikaujančios sekos pagrindinės amino rūgštys yra N gale (I klasės ligandas) sąveikauja su SH3 domenu amino-karboksi orientacija, o turinčios pagrindines amino rūgštis C gale (II klasės ligandas) sąveikauja karboksi-amino orientacija. Keletas SH3 domenu atpažįsta ne PxxP motyvą. Pavyzdžiui, Eps8 SH3 domenas atpažįsta PxxDY, Gads – RxxK motyvą, Fus1 – Arg ir Ser turtingas sekas. [17, 20, 49]

Baltymų sąveika per SH3 domenus dažniausiai yra pastovi ir nepriklauso nuo ekstraląstelinių signalų, kurie dažniausiai reguliuoja sąveikas per SH2 domenus. Nėra duomenų, kad sąveikos per SH3 domenus priklauso nuo cheminių modifikacijų (pvz., fosforilinimo), bet teoriškai jos gali keisti baltymų konformaciją ir tokiu būdu atskirti baltymus erdvėje. Kai kuriuose SH3 domenu liganduose yra nustatytos MAP kinazių

fosforilamos sekos, o tai gali įtakoti sąveiką. Sąveika tarp SH3 domeno ir prolinu turtingo motyvo yra silpna ir tai užtikrina baltymų sugebėjimą greitai keisti sąveikos partnerius. Sąveikos stiprumui užtikrinti dažnai vienas baltymas talpina keletą SH3 domenų. Tai ypač būdinga adaptoriniams baltymams, kurių pagrindinė funkcija yra sujungti transmembraninius receptorius su viduląstelinėmis molekulėmis ir tokiu būdu užtikrinti signalo perdavimą į ląstelės vidų. Pvz., Grb2, Crk baltymai turi po du SH3 domenus, Nck šeimos baltymai tris. Kiekvienas baltymo SH3 domenas gali atpažinti specifinę prolinu turtingą seką. Nck $\alpha$  antram SH3 domenui yra būtinas serinas antros klasės motyve (PxxPxRxx**S**), be to nėra toleruojamos rūgštinės amino rūgštys, fosfoserinas ir prolinas į C galą nuo šerdinio motyvo.[49]

### 3. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGOS

#### 3.1. Reagentai

pRK5-HA-Nck- $\alpha$  ekspresijos vektoriai talpinantys laukinio tipo arba muatantinius Nck genus bei anti-Nck $\beta$  antiserumas buvo dovana nuo Wei Li.[2, 5]

Anti-PDGF receptorių- $\beta$  ir anti-RasGAP antiserumas buvo pagaminti mūsų laboratorijoje.

Anti-HA (sc-7392) antikūnas, proteinas-A/G sefarozė iš Santa Cruz Biotechnology, JAV.

PDGF-BB iš Amgene, JAV.

Antriniai antikūnai iš Sigma, JAV.

HepG2 ląstelių linija iš Dr. M. Valiaus asmeninės kolekcijos, Lietuva.

FBS iš HyClone, JAV.

#### 3.2. GST, GST-Nck baltymų gavimas

##### 3.2.1. Ekspresijos vektoriai

Rekombinantiniai, su GST sulieti baltymai buvo ekspresuojami pGex tipo plazmidėse. Šios plazmidės turi tac promotorių (lac ir trp promotorių hibridas) už kurio yra plokščiosios kirmėlės *Schistosoma japonicum* GST genas. Baltymo genas yra įstatomas naudojant už GST geno esantį polilinkerį. GST baltymo ekspresijai buvo naudojama pGex-6P1 plazmidė, o rekombinantinių GST-Nck baltymų ekspresijai naudotos pGex-2T plazmidės. Kaip genas markeris pGex plazmidėse yra naudojamas atsparumo ampicilinui  $\beta$ -laktamazės genas.

##### 3.2.2. GST-Nck ekspresija

Rekombinantinių GST-Nck baltymų ekspresija, t.y. baltymo gaminimas, buvo vykdomas *E.coli* BL21 kamieno bakterijose, auginant jas skystoje LB terpėje su ampicilinu. Kadangi GST-baltymo genas yra sulietas su tac promotoriumi, jo ekspresija yra indukuojama izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozidu (IPTG). Tai yra laktozės

analogas, kuris jungiasi su lac represoriumi atlaisvindamas operoną transkripcijai. IPTG nėra metabolizuojamas, taigi jo koncentracija su laiku nemažėja. Efektyviausiai baltymas yra gaminamas 30°C temperatūroje, kai bakterijos yra augimo fazėje (optinis tankis 600 nm bangos ilgyje indukcijos pradžioje – 0.6-1), pagaminto baltymo kiekis tiesiogiai priklauso nuo laiko (iki 18 val.). Ekspresija vykdoma 4-6 val. Bakterijos nusodinamos centrifuguojant 3000 xg 10 min., nuosėdose esančios bakterijos suspenduojamos GST-baltymų sorbcijos buferyje (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 15 mM β-merkaptioetanolio, 1% Triton X-100) ir suardomos ultragarsu (5 min.).

### 3.2.3. GST-baltymų gryninimas

Rekombinantiniai su GST sulieti Nck baltymai buvo gryninami afininės chromatografijos būdu naudojant glutationo sefarozę 4B. Sąveikaujant su glutationu GST-Nck prisikabina prie sefarozės, o po to eliuojamas didesne redukuoto glutationo koncentracija.

Bakterijų lizatai sorbcijos buferyje inkubuojami su glutationo sefaroze 4B 2 val. 0°C temperatūroje. Sefarozė nusodinama centrifuguojant 1000 xg 1 min., plaunama plovimo buferiu (sorbcijos buferis, 0.5 M NaCl), buferiu B (50 mM Tris/HCl, 0.1 mM EGTA, 10% glicerolio, 15 mM β-merkaptioetanolio, 50 mM NaCl) ir GST-baltymai eliuojami eliuacijos buferiu (buferis B su 20 mM redukuoto glutationo). Baltymo koncentracija nustatoma SDS-PAG elektroforezės būdu kartu leidžiant žinomus BSA (jaučio serumo albuminas) kiekius. Tuo pačiu nustatomas ir baltymo grynumas.

## 3.3. Nck šeimos baltymų sąveikos su RasGAP tyrimas

### 3.3.1. Ląstelių linijos

Tyrimams buvo naudojama substratinių HepG2 ląstelių linija. Tai žmogaus hepatomos ląstelių linija neturinti endogeninio PDGF receptoriaus β. Laukinio tipo PDGF receptoriaus β genas buvo įvestas į ląsteles pLXS<sub>N</sub> vektoriaus pagalba [10].



Ląstelės buvo kultivuojamos Dulbecc'o modifikuotoje Eagle (DME) terpėje su 10% jaučio embriono serumo (FBS). Ląstelės persėjamos naudojant standartinę audinių kultūrų priežiūros techniką.

HL-60 ląstelių linija – tai suspensinės promielocitinės leukemijos ląstelės, neturinčios endogeninio PDGFR $\beta$ . Paveikus ląsteles TPA (forbolo esteris) jos diferencijuojasi į makrofagus. Ląstelės buvo kultivuojamos RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) terpėje su 10% jaučio embriono serumo (FBS).

### 3.3.2. Laikinoji transfekcija

Ląstelės buvo transfekuojamos su 20  $\mu$ g pRK5-HA-Nck $\alpha$ , pRK5-HA-Nck $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> ar pRK5-HA-Nck $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> konstruktais. Transfekcija buvo atliekama su CaCl<sub>2</sub>. Po 24 val. CaCl<sub>2</sub>-DNR precipitatai buvo nuplauti ir ląstelės paliktos augti 24 val. DME terpėje su 10% FBS užtikrinti efektyvią baltymų ekspresiją.

Imunofluorescencijos tyrimams ląstelės buvo transfekuojamos pRK5-HA-Nck- $\alpha$  naudojant Lipofectamine reagentą pagal gamintojo nurodymus (Invitrogen).

pRK5-HA-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> konstrukte SH2 domenas yra inaktyvuotas mutacija R308K. SH3 domenai pRK5-HA-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> konstrukte inaktyvuojami W38K, W143K ir W229K amino rūgščių pakeitimais. Tokios pat mutacijos yra ir su GST sulietuose Nck- $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> ir Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> baltymuose.[2, 5]

### 3.3.3. Ląstelių lizatų paruošimas

Kiekvieno pavyzdžio paruošimui buvo naudojama 2x10<sup>6</sup> ląstelių. Ląstelės buvo sinchronizuojamos DME arba RPMI terpėje be serumo 16 val. Po sinchronizacijos ląstelės veikiamos augimo faktoriumi PDGF-BB 50 ng/ml 10 min. 37°C arba forbolo esteriu TPA 30 nM 36 val. 37°C arba neveiktos. Po poveikio ląstelės perkeliamos ant ledo ir plaunamos 3x fosfatiniu druskos tirpalu (PBS). HL-60 ląstelės plaunamos centrifuguojant 500 xg 5 min. Lizuojama EB<sup>++</sup> buferyje (10 mM Tris/HCl pH7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Tritono X-100, 1 mM PMSF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> ). Ląstelių nuolaužos ir branduoliai pašalinti centrifuguojant 20000 xg 15 min. 0°C. Tyrimams buvo naudojami ląstelių citoplazminiai lizatai.

### 3.3.4. Imunoprecipitacija

Citoplazminiai lizatai inkubuojami su 3  $\mu$ l PDGFR $\beta$ , RasGAP arba Nck $\alpha/\beta$  antikūnais 2 val. 0°C temperatūroje. Vėliau imuninis kompleksas imobilizuojamas ant 15  $\mu$ l proteinas A sefarozės 1 val. 0°C temperatūroje nuolat vartant. Susidaręs imuninis kompleksas plaunamas 4x po 0.5 ml ir 1x po 1 ml EB<sup>++</sup> buferio. Kompleksai išardomi suspenduojant 50  $\mu$ l 1x SDS-PAG elektroforezės buferio ir iškaitinant 100°C temperatūroje 1 min. Dalis imunoprecipitatu buvo naudojami "Far western" blotui bei kinazės aktyvumo testui.

### 3.3.5. Precipitacija su rekombinantiniais baltymais

Kiekvienam pavyzdžiui buvo paruošta ant glutationo sefarozė 4B imobilizuotų 10  $\mu$ g GST, GST-Nck $\alpha$  arba Nck $\beta$  bei GST-Nck $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> ir GST-Nck $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> baltymų. Tam tikslui 15  $\mu$ l glutationo sefarozė 4B buvo inkubuojama 0,5 ml GST-baltymų sorbcijos buferio su 10  $\mu$ g atitinkamo baltymo 2 val. 0°C nuolat vartant. Po inkubacijos sefarozė buvo plaunama 4 kartus EB<sup>++</sup> buferiu nusodinant 1000 xg 1 min. 0°C temperatūroje. Sefarozės-baltymų kompleksas inkubuojamas su citoplazminiais lizatais 2 val. 0°C nuolat vartant. Po inkubacijos precipitatas buvo plaunamas 4x po 0,5 ml ir 1x po 1 ml EB<sup>++</sup> buferio nusodinant ant sefarozės susidariusius baltymų kompleksus 1000 xg 1 min. 0°C temperatūroje. Precipitatai sumaišomi su 50  $\mu$ l SDS-PAG elektroforezės buferio ir kaitinami 1 min. 100°C temperatūroje.

Precipitatuose esantys baltymai buvo išskirstyti SDS-PAG elektroforezės būdu ir pernešti ant polivinildifluorido membranos (PVDF) bei analizuojami Western bloto būdu. Membranoje laisvos, baltymais nepadengtos, vietos buvo blokuojamos blokavimo buferiu (1% lieso pieno miltelių "Gloria", 0.05% Tween 20, 0.01% NaN<sub>3</sub>, 0.9% NaCl, 8 mM Tris HCl, 2 mM Tris) kambario temperatūroje 1 val. Po blokavimo membrana inkubuojama 3 val. su pelės (ar triušio) antikūnais atpažįstančiais analizuojamą baltymą (pirminis antikūnas). Pirminis antikūnas buvo skiedžiamas blokavimo buferiu santykiu 1:500). Po inkubacijos membrana plaunama 4 kartus Western rinse (WR) buferiu (0.9% NaCl, 8 mM Tris HCl, 2 mM Tris) ir inkubuojama antrinio antika no tirpale (1:2000) 1 val. po inkubacijos plaunama 4 kartus WR buferiu ir vieną kartą šarminės fosfatazės buferiu (10 mM Tris, 3 mM MgCl<sub>2</sub>).

Baltymai vizualizuojami dažant NBT/BCIP (nitromėlynojo tetrazolio druska ir 5-bromo-4-chloro-3-indolilfosfatas) dažų rinkiniu.

### 3.3.6. “Far western” blotas

Imunoprecipitate esantys baltymai buvo suspenduoti 50  $\mu$ l SDS-PAGE buferio ir išskirstyti SDS-PA gelyje elektroforezės būdu. Gelyje išskirstyti baltymai buvo pernešami ant PVDF membranos, o baltymais nepadengtos vietos blokuojamos blokavimo buferyje su 1% BSA (1% BSA, 0.05% Tween 20, 0.01%  $\text{NaN}_3$ , 0.9% NaCl, 8 mM Tris HCl, 2 mM Tris). Po to membrana inkubuojama su GST, GST-Nck- $\alpha$ , GST-Nck- $\alpha$ -SH $2^-$ , GST-Nck- $\alpha$ -SH $2^+$  ar GST-Nck- $\beta$  baltymais 15  $\mu$ g/ml “Far western” buferyje (22 mM HEPES, 75 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% BSA, 0.05% NP40, 1 mM DTT) 3 val. kambario temperatūroje. Plaunama 1 kartą “Far western” buferiu ir 4 kartus Western rinse buferiu ir inkubuojama 1.5 val. pirminio GST antikūno tirpale (GST antikūnas praskiestas blokavimo buferyje su 1% BSA santykiu 1:500) ir vėl plaunama 4 kartus WR buferiu. Inkubuojama antrinio antikūno tirpale (santykis 1:2000) 0.5 val., plaunama 4 kartus WR, 1 kartą šarminės fosfatazės buferiu ir dažoma NBT/BCIP dažų rinkiniu.

### 3.3.7. Testas aktyvuojant kinazę *in vitro*

Neaktyvuotų HepG2 ląstelių citoplazminiai lizatai buvo naudojami imunoprecipitacijai su 3  $\mu$ l PDGFR $\beta$  antikūno. Imuninis kompleksas imobilizuojamas ant 15  $\mu$ l proteinas A sefarozės 1 val. 0°C temperatūroje. Susidarę imunoprecipitatai buvo plaunami 2 kartus po 0.5 ml EB $^{++}$  buferio ir 3 kartus po 0,5 ml kinazės buferio (10 mM  $\text{MnCl}_2$ , 20 mM PIPES pH 7,0, 20  $\mu$ g/ml aprotinino). PDGFR- $\beta$  aktyvuojamas inkubuojant su 50  $\mu$ l kinazės buferio su 50  $\mu$ M ATP 10 min. 30°C temperatūroje. Po aktyvacijos imunoprecipitatai buvo plaunami 1 kartą PBS ir inkubuojami su HepG2 arba HL-60 ląstelių citoplazminiais lizatais 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos plaunami 4 kartus po 0,5 ml ir 1 kartą po 1 ml EB $^{++}$  buferio. Baltyminiai kompleksai buvo išardyti su 50  $\mu$ l elektroforezės pavyzdžio buferio iškaitinant 1 min. 100°C temperatūroje. Baltymai išskirstyti SDS-PA gelyje, pernešti ant membranos ir analizuoti Western bloto būdu.

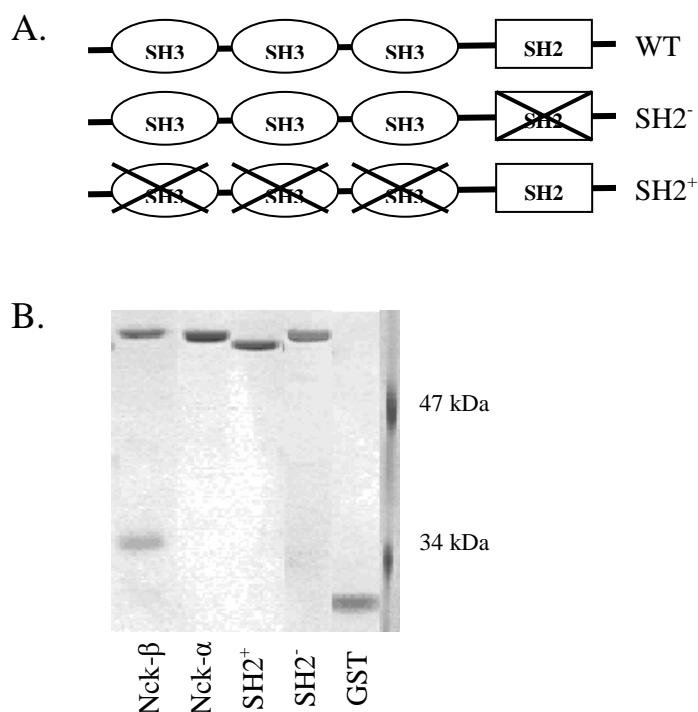
### 3.3.8. Imunofluorescencija

Kiekvienam pavyzdžiui paruošti buvo naudojama  $5 \times 10^4$  ląstelių. Ląstelės auginamos 24 duobučių lėkštelėse. Atliekama laikinoji transfekcija su pRK5-HA-Nck $\alpha$  konstruktais naudojant Lipofectamine reagentą. Po 24 val. ląstelės sinchronizuojamos DME terpėje be serumo per naktį, daromas arba ne poveikis su 100 ng/ml PDGF-BB. Ląstelės fiksuojamos su 4% paraformaldehido tirpalu KRG buferyje (Ringer's modifikuotas fosfatinis buferis) (120 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 8.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 10 mM glukozės, pH 7.3), plaunamos 1 kartą po 1 ml PBS. Ląstelės permeabilizuojamos 0,5 ml PBS/0.15% Triton X-100 buferyje 3 min. kambario temperatūroje ir plaunamos 3 kartus po 0,5 ml PBS su 1% BSA. Blokuojama 25  $\mu$ l PBS/1% BSA tirpalo su 10% ožkos serumo 30 min. 37°C temperatūroje. Perkeliama į 25  $\mu$ l pirminio anti-HA arba anti-Nck- $\alpha$  antikūno tirpalo (antikūnas skiestas PBS/BSA/10% ožkos serumo tirpalu santykiu 1:50) 1 val. 37°C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės plaunamos 5 kartus po 0,5 ml PBS/BSA ir inkubuojamos 25  $\mu$ l antrinio antikūno, sujungto su Alexa Fluor 488 dažu (Invitrogen) arba su FITC dažu, tirpalo (skiedimas 1:125) 30 min. 37°C temperatūroje. Anti-RasGAP antikūnas buvo žymėtas Alexa Fluor 594 dažu. Po inkubacijos plaunama 5 kartus PBS/1% BSA. Branduoliai buvo dažomi su 300 nM DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolas). Duomenys vizualizuojami konfokalinės mikroskopijos metodu naudojant Nikon C1 konfokalinį mikroskopą ir programinės įrangos rinkinį EZ-C1.

## 4. REZULTATAI

### 4.1. Su GST sulietų baltymų gavimas

Su GST sulieti baltymai Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$ , Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> ir Nck- $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> bei GST buvo ekspresuojami E.coli BL21 kamieno bakterijose indukuojant IPTG, išvalyti afininės chromatografijos būdu ir patikrinti SDS-PAG elektroforezės būdu. Visi baltymai yra gerai išgryninti ir atitinka savo mases. Visų baltymų koncentracija yra 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . (Pav.5.B.) Mutantinių Nck- $\alpha$  baltymų schema pateikta Pav.5.A.



**Pav.5. A. Nck- $\alpha$  WT ir SH2<sup>-</sup> bei SH2<sup>+</sup> mutantų schematinis vaizdas. Perbraukti domenai rodo, kad juose yra mutacijos. B. Su GST sulietų baltymų elektroforetinis vaizdas.**

### 4.2. Nck- $\alpha$ ir Nck- $\beta$ baltymų sąveika su RasGAP *in vitro*

Šio darbo tikslas – patikrinti Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$  baltymų specifiškumą sąveikoje su RasGAP bei sąveikos priklausomybę nuo PDGFR- $\beta$ . Tam tikslui buvo naudojama HepG2 ląstelių linija neturinti endogeninio PDGFR- $\beta$  (N) ir HepG2 ląstelės

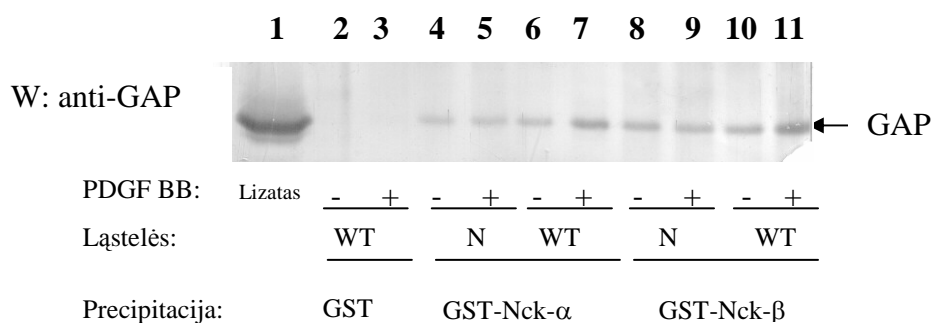
infekuotos laukinio tipo PDGFR- $\beta$  geną talpinančiais konstruktais arba tuščiu pLXSN vektoriumi stabiliai PDGF receptoriaus- $\beta$  ekspresijai.[10] (Pav.6.A. 4, 5, 8, 9) Ląstelės buvo paliktos nestimuliuotos arba stimuliuotos 50 ng/ml PDGF-BB, lizuojamos. Ląstelių citoplazminiai lizatai buvo naudojami precipitacijai su rekombinantiniais GST, GST-Nck- $\alpha$  ir GST-Nck- $\beta$  baltymais.(Pav.6.A.) Precipitatuose esantys baltymai išskirstyti SDS-PAGE elektroforezės būdu ir analizuoti su anti-RasGAP antikūnais.

Duomenys rodo, kad abi Nck izoformos sąveikauja su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu panašiu efektyvumu.(Pav.6.A. pavyzdžiai 4, 5, 6, 8, 9, 10) Po PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos, ląstelėse, ekspresuojančiose PDGF receptorių- $\beta$ , tiek Nck- $\alpha$  tiek ir Nck- $\beta$  suriša papildomą RasGAP kiekį. Taigi, Nck baltymų sąveika su RasGAP yra pastovi, o sąveikos stiprumas priklauso nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos. (Pav.6.A. pavyzdžiai 7 ir 11) Galima manyti, kad ši sąveika gali būti dvejopa: tiesioginė arba netiesioginė, dalyvaujant papildomam fosforilintą tiroziną turinčiam baltymui.

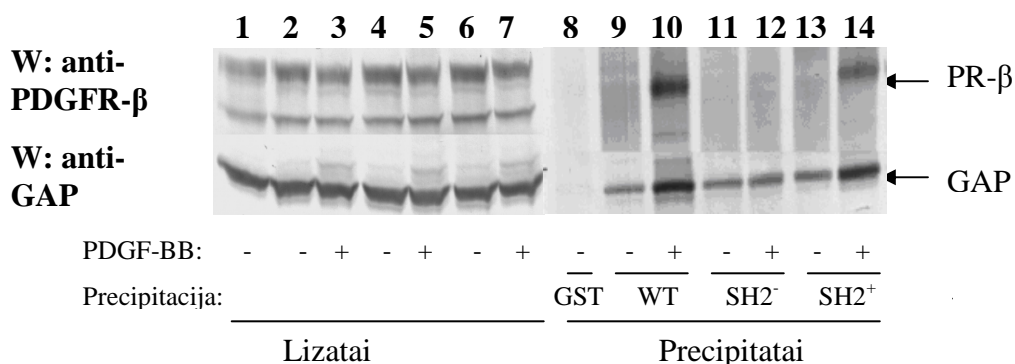
Kitas šio darbo tikslas buvo nustatyti, kuris Nck- $\alpha$  baltymo domenai yra atsakingas už jo sąveiką su RasGAP ir PDGFR- $\beta$ . Tam tikslui HepG2 ląstelėse ekspresuojančios laukinio tipo PDGF receptorių- $\beta$  buvo neveiktos arba veikiamos 50 ng/ml PDGF-BB, lizuojamos. Citoplazminis lizatas naudojamas precipitacijai su GST, GST-Nck- $\alpha$ -WT, GST-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> ir GST-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> baltymais. Precipitatuose esantys baltymai išskirstyti SDS-PAGE elektroforezės būdu, pernešti ant membranos ir analizuoti Western bloto būdu su antikūnais atpažįstančiais RasGAP ir PDGFR- $\beta$ .(Pav.6.B.)

Duomenys rodo, kad Nck- $\alpha$  baltymo sąveika su PDGFR- $\beta$  vyksta tik aktyvuotose augimo faktoriu ląstelėse ir yra užtikrinama Nck- $\alpha$  SH2 domenu.(Pav.6.B.10, 14) O, sąveika su RasGAP, kaip buvo parodyta Pav.6.A, vyksta pastoviai, nepriklausomai nuo PDGFR- $\beta$  aktyvacijos, o po receptoriaus aktyvacijos GST-Nck- $\alpha$  baltymas suriša papildomą RasGAP kiekį.(Pav.6.B. pavyzdys 10) Duomenys rodo, kad precipitatuose su GST-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> baltymu PDGF-BB aktyvuotose ląstelėse RasGAP baltymo kiekis padidėja ir yra lygus RasGAP kiekiui esančiam precipitatuose su laukinio tipo Nck- $\alpha$  iš aktyvuotų PDGF-BB ląstelių. Taigi, Nck- $\alpha$  sąveikai su RasGAP yra reikalingi SH2 ir vienas arba keli SH3 domenai.

**A.**



**B.**



**Pav.6.A. Nck-α ir Nck-β baltymų sąveikos su GAP priklausomybė nuo PDGFR-β.** HepG2 linijos ląstelės, pastoviai ekspresuojančios laukinio tipo PDGF receptorių-β (WT) arba turinčios įvestą tuščią pLXS<sub>N</sub> vektorių (N) buvo lizuojamos, o lizatai naudojami precipitacijai su 10 μg GST, GST-Nck-α ir GST-Nck-β baltymų. Precipitatuose esantys baltymai išskirstyti SDS-PA gelyje, pernešti ant PVDF membranos ir analizuojami Wester bloto būdu su anti-GAP ir anti-PDGFRβ antikūnais. **B. Už sąveika su PDGFR-β ir RasGAP atsakingų Nck-α domenu nustatymas.** HepG2 ląstelių linija ekspresuojanti laukinio tipo PDGF receptorių-beta buvo naudota precipitacijai su 10 μg GST, GST-Nck-α-WT, GST-Nck-α-SH2<sup>-</sup> ir GST-Nck-α-SH2<sup>+</sup> baltymų. Ant membranos pernešti precipitatuose esantys baltymai analizuoti su antikūnais atpažįstančiais PDGFR-β ir RasGAP.

#### 4.3. Nck-α ir Nck-β sąveika su RasGAP *in vivo*

Tyrimais *in vitro* parodėme, kad Nck šeimos baltymai sąveikauja su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu Ras p120GAP ir nustatėme už šią sąveiką atsakingus Nck-α baltymo domenus. Tolesni tyrimai buvo atliekami siekiant nustatyti šią sąveiką *in*

*vivo*. Pirmas uždavinys buvo patikrinti ar endogeniniai Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$  baltymai sąveikauja su RasGAP. Tam tikslui HepG2 linijos ląstelės buvo veikiamos arba neveiktos PDGF-BB, lizuojamos. Citoplazminis lizatas naudojamas imunoprecipitacijai su specifiniais anti-Nck- $\alpha$  (Pav.7.A. 4, 5) ir anti Nck- $\beta$  (pav.7.A. 6, 7) antikūnais. Kontrolei buvo atlikta imunoprecipitacija su anti-HA (hemagliutininas) antikūnais (Pav.7.A. pavyzdys 3). Imunoprecipituose esantys baltymai išskirstyti elektroforezės būdu, pernešti ant PVDF membranos ir analizuoti Western bloto būdu su antikūnais atpažįstančiais RasGAP ir abu Nck šeimos baltymus.

Gauti duomenys rodo, kad sąveika vyksta ir *in vivo*. Kaip ir *in vitro*, RasGAP-Nck- $\alpha/\beta$  sąveika yra pastovi, bet neaptikta RasGAP kiekio padidėjimo imunoprecipituose po stimuliacijos augimo faktoriumi PDGF-BB.(Pav.7.A. pavyzdžiai 5, 7)

Kadangi parodėme, jog sąveika vyksta *in vivo*, kitas tikslas buvo nustatyti Nck- $\alpha$  sąveikos su RasGAP mechanizmą. Kadangi HepG2 ląstelėse Nck baltymų kiekis yra nedidelis, o sąveika silpna buvo atliekama transfekcija su pRK5-HA-Nck- $\alpha$  konstruktais, kontrolei ląstelės buvo paliktos netransferuotos (Pav.7.B. 1, 5). Nustatyti kuris Nck- $\alpha$  baltymo domenai yra atsakingas už sąveiką su p120 GAP, transfekcija buvo atliekama naudojant pRK5-HA-Nck- $\alpha$  konstruktus su mutantiniu SH2 domenu (SH2<sup>-</sup>) (Pav.7.B. 3, 7) arba su mutantiniais visais SH3 domenais (SH2<sup>+</sup>) (Pav.7.B. 4, 8).

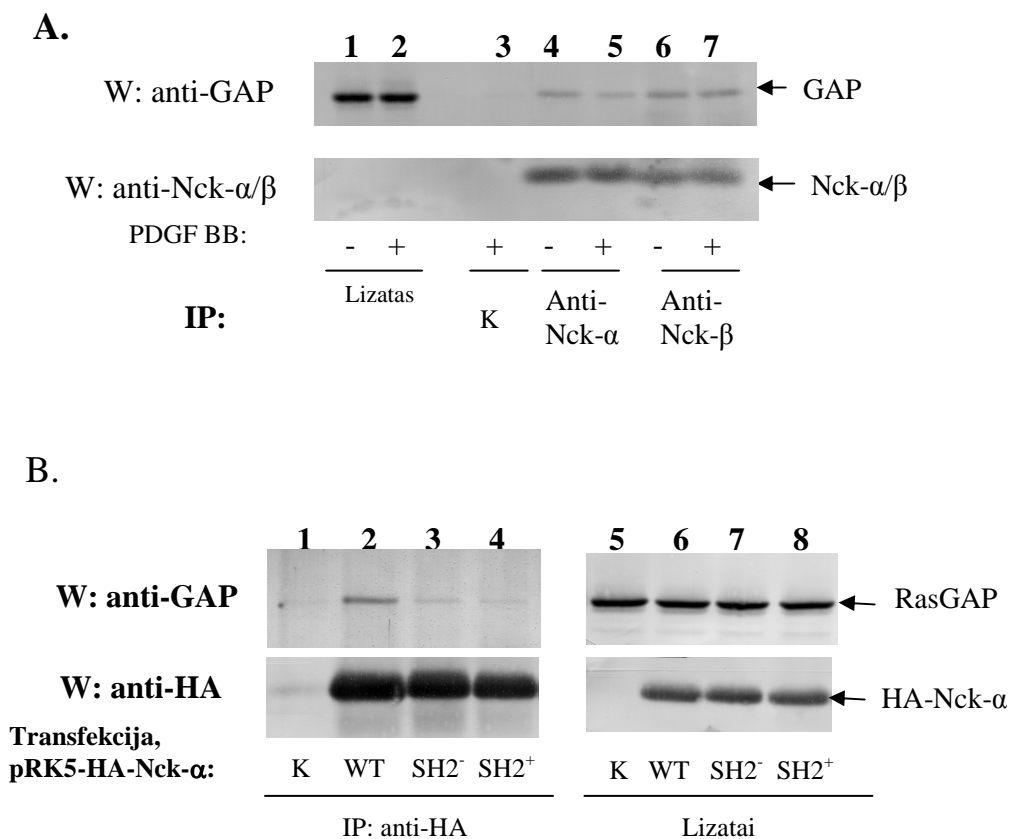
Iš duomenų matoma, kad imunoprecipituose su mutantiniais Nck- $\alpha$  RasGAP kiekis yra mažesnis lyginant su RasGAP kiekiu imunoprecipituose su Nck- $\alpha$  laukinio tipo baltymu.(Pav.7.B. pavyzdžiai 2, 3, 4) O Nck- $\alpha$  su mutantiniais SH3 domenais suriša mažesnę RasGAP kiekį nei esant mutuojamam SH2 domenui.(Pav.7.B. 3, 4)

Galima daryti išvadas, kad Nck- $\alpha$  sąveikai su RasGAP yra reikalingi SH2 ir vienas arba keli SH3 domenai, bet svarbesni yra SH3 domenai. SH2 domeno dalyvavimas sąveikos sudaryme gali būti priklausoma nuo kitų tirozinfosforilintų baltymų, tiek receptorių tiek ir nereceptorių. Be to, *in vitro* duomenys rodo, kad Nck- $\alpha$  SH2 domenai užtikrina trinario kompleksą tarp Nck- $\alpha$ , RasGAP ir fosforilintą tiroziną turinčio baltymo susidarymą. O tyrimai su Nck- $\alpha$  SH2<sup>+</sup> baltymu rodo, kad sąveika su fosfotiroziną turinčiu baltymu yra pastovi. (Pav.6.B. 10, 14) Taigi, Nck- $\alpha$ -



RasGAP kompleksas gali dalyvauti mitogeninio signalo, perduodamo PDGF receptoriu- $\beta$ , atsako reguliacijoje.

Pav.7.B. pavyzdžiai 5-8 rodo vienodą RasGAP ir Nck- $\alpha$  baltymų kiekį citoplazminiuose lizatuose. Pavyzdyje 5 parodyta, kad kontrolinėse netransfekuotose ląstelėse HA-Nck- $\alpha$  baltymo nėra.



**Pav.7.A. Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$  sąveika su RasGAP *in vivo*.** Atliekama imunoprecipitacija su 3  $\mu$ l specifiniais anti-Nck- $\alpha$  (A. 4, 5) ir anti-Nck $\beta$  (6, 7) antikūnais iš stimuliuotų (+) 50 ng/ml 10 min. arba nestimuliuotų (-) PDGF-BB HepG2 ląstelių ekspresuojančių laukinio tipo PDGFR- $\beta$ . Neigiamai kontrolei buvo atliekama imunoprecipitacija su anti-HA antikūnais (3). Imunoprecipitatuose esantys baltymai išskirstyti SDS-PAG elektroforezės būdu. Ant membranos pernešti baltymai analizuojami Western bloto būdu su anti-GAP antikūnais ir anti-Nck- $\alpha/\beta$  antiserumu (3, 7). **B. Nck- $\alpha$  sąveikos su RasGAP *in vivo* mechanizmas.** HepG2 ląstelės buvo transfekuotos su pRK5-HA-Nck- $\alpha$ -WT (WT) (2, 6), SH2<sup>-</sup> (3, 7), SH2<sup>+</sup> (4, 8) arba netransfekuotos (kontrolinės) (K) (1, 5). Ląstelių lizatai imunoprecipituoti su 3  $\mu$ l hemagliutinino seką atpažįstančių antikūnų (anti-HA). Išskirstyti gelyje ir ant membranos pernešti baltymai analizuoti su anti-GAP ir anti-HA antikūnais. (1-4) Dalis (~10%) lizatų buvo analizuoti su GAP ir HA antikūnais RasGAP ir HA-Nck- $\alpha$  baltymų kiekio lizatuose nustatymui. (A. 1, 2, B. 5-8)

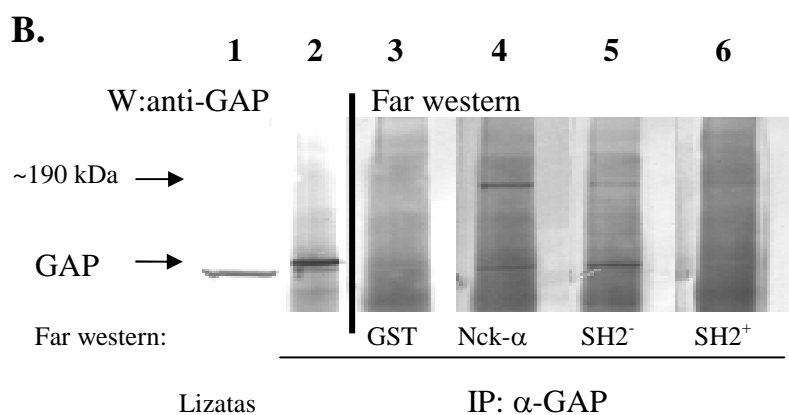
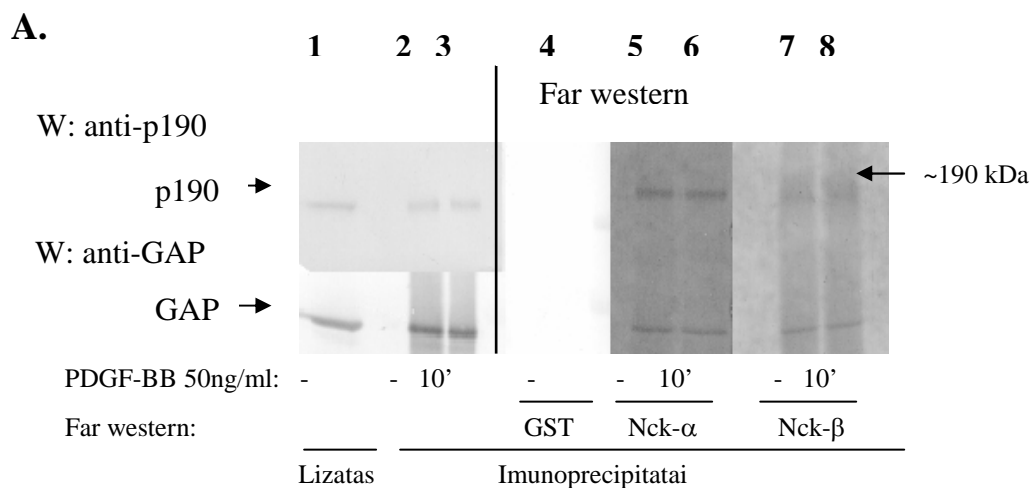
#### 4.4. Tiesioginė sąveika tarp RasGAP ir Nck šeimos baltymų ir jos mechanizmas

Tolesni tyrimai buvo atliekami sąveikos tarp Nck šeimos baltymų ir RasGAP tiesiškumo nustatymui. Tam tikslui buvo atliekamas "Far western" blotas. HepG2 ląstelės ekspresuojančios laukinio tipo PDGFR- $\beta$  buvo neveiktos arba veikiamos 50 ng/ml PDGF-BB. Ląstelių citoplazminiai lizatai naudojami imunoprecipitacijai su anti-GAP antikūnais. Imunoprecipitatuose esantys baltymai išskirstyti elektroforezės būdu ir pernešti ant membranos. Membranoje esantys baltymai inkubuojami su rekombinantiniais GST (Pav.8.A. 4), GST-Nck- $\alpha$  (Pav.8.A. 5, 6) ir GST-Nck- $\beta$  (Pav.8.A. 7, 8) baltymais. Po inkubacijos baltymai buvo analizuojami Western bloto būdu su GST atpažįstančiais antikūnais. Dalis citoplazminio lizato ir imunoprecipitato buvo analizuojami Western bloto būdu su anti-GAP antikūnais, RasGAP baltymo kiekiui lizatuose ir imunoprecipitatuose nustatyti.(Pav.8.A. 1, 2, 3, apatinė dalis) Taip pat buvo atlikta Western analizė su anti-p190 RhoGAP antikūnais siekiant nustatyti ar mums nežinomas baltymas tiesiogiai sąveikaujantis su GST-Nck baltymais yra p190 RhoGAP.(pav.8.A. 1, 2, 3, viršutinė dalis)

Duomenys rodo, kad Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$  baltymai sąveikauja su RasGAP tiesiogiai, nepriklausomai nuo aktyvacijos augimo faktoriumi.(Pav.8.A. 5-8) Be to, abu Nck šeimos baltymai tiesiogiai jungiasi prie nežinomų baltymų. Nck- $\beta$  su 190 kDa baltymų sąveikauja silpniau nei Nck- $\alpha$ . Su Nck šeimos baltymais sąveikaujantis nežinomas baltymas poliakrilamidiniame gelyje migruoja kaip ~190 kDa baltymas ir jo migracijos vieta atitinka p190RhoGAP baltymo migracijos vietą.(Pav.8.A. 5, 6) Yra žinoma, kad RhoGAP yra tirozinfosforilinamas ir sąveikauja su RasGAP. Todėl galima manyti, kad Nck baltymai sąveikauja su RhoGAP. Bet pradiniais duomenimis šito įrodyti nepavyko (duomenys neparodyti).

Nustatę, kad Nck baltymai tiesiogiai sąveikauja su RasGAP, toliau siekėme iširti, kurie Nck- $\alpha$  baltymo domenai yra atsakingi už šią sąveiką. Tikslui įgyvendinti RasGAP baltymo imunoprecipitai iš HepG2 linijos ląstelių buvo išskirstyti SDS-PAGE būdu, pernešti ant membranos ir analizuojami "Far western" bloto metodu. "Far western" blotas buvo atliekamas su GST (Pav.8.B. 3), GST-Nck- $\alpha$  (Pav.8.B. 10), GST-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>-</sup> (Pav.8.B. 11) ir GST-Nck- $\alpha$ -SH2<sup>+</sup> (Pav.8.B. 12) rekombinantiniais baltymais. Susidarę GST-Nck- $\alpha$  ir ant membranos perneštų baltymų kompleksai buvo analizuojami Western bloto būdu su anti-GST antikūnais. Dalis lizato ir

imunoprecipitato panaudota RasGAP kiekio nustatymui su anti-GAP antikūnais (Pav.8.B. 1, 2).



**Pav.8.** Buvo naudojama HepG2-WT ląstelių linija. Ląstelės buvo neveiktos (-) arba veikiamos (+) 50 ng/ml PDGF-BB 10 min., lizuojamos ir citoplazminis lizatas naudojamas imunoprecipitacijai (IP) su anti-PDGFR-β antikūnais. Dalis (10%) imunoprecipitatuose bei lizatuose esančių baltymų analizuoti Western bloto būdu naudojant antikūnus atpažįstančius RasGAP (A. 1,2,3 pavyzdžiai, B. 1,2) ir p190RhoGAP (A.1,2,3 viršutinė dalis). Imunoprecipitatuose esantys baltymai buvo išskirstyti SDS-PA gelyje, pernešti ant membranos ir atliktas "Far western" blotas. **A. Nck-α ir Nck-β baltymų tiesioginė sąveika su RasGAP.** Nck baltymų tiesioginės sąveikos su RasGAP nustatymui membranoje esantys baltymai inkubuoti su rekombinantiniais baltymais: GST (neigiama kontrolė) (A.4), GST-Nck-α (A.5,6) ir GST-Nck-β (A.7,8). Susidarę baltyminiai kompleksai analizuoti anti-GST antikūnais. **B. Tiesioginės sąveikos mechanizmas.** Įrodžius sąveikas tarp Nck ir GAP tiesiškumą (A.) tolesnis tikslas buvo nustatyti, kurie Nck-α baltymo domenai atsakingi už šią sąveiką. Tam tikslui "Far western" blotas buvo atliekamas su GST (B.3), GST-Nck-α (B.4), GST-Nck-α-SH2<sup>-</sup> (B.5) ir GST-Nck-α-SH2<sup>+</sup> (B.6) baltymais.

Duomenys rodo, kad už Nck- $\alpha$  tiesioginę sąveiką su RasGAP yra atsakingi vienas arba keli SH3 domenai, o SH2 domenas šioje sąveikoje nedalyvauja. Nck- $\alpha$  laukinio tipo baltymas silpniau sąveikauja su RasGAP nei Nck- $\alpha$  su mutantiniu SH2 domenu.(Pav.8.B. 4, 5) Taip pat pastebima priklausomybė tarp šių baltymų sąveikos su RasGAP ir su nežinomu 190 kDa baltymu. Laukinio tipo Nck- $\alpha$  sąveikauja silpniau su RasGAP, bet stipriau su 190 kDa baltymu, o Nck- $\alpha$  SH2 domeno mutantas stipriau sąveikauja su RasGAP, bet silpniau su mums nežinomu baltymu. Tuo tarpu Nck- $\alpha$  mutantas su mutacijomis SH3 domenuose (SH2<sup>+</sup>) nesąveikauja su RasGAP, bet taip pat yra aptinkama sąveika su 190 kDa baltymu ir šios sąveikos stiprumas toks pat kaip ir SH3 domenu.(Pav.8.B. 3-6)

Taigi, lyginant su duomenimis *in vivo* ir *in vitro*, kurie rodo sąveikos priklausomybę tiek nuo SH2 tiek ir nuo SH3 domenu, galima daryti išvadas, kad Nck- $\alpha$  baltymo sąveika su RasGAP yra dvejopa: tiesioginė ir netiesioginė. Tiesioginė sąveika greičiausiai vyksta pastoviai ir jai reikalingi Nck- $\alpha$  SH3 domenai, o netiesioginė sąveika greičiausiai reikalinga signalo perdavimui per fosforilintą tiroziną turintį baltymą ir priklauso nuo Nck- $\alpha$  SH2 ir SH3 domenu.

#### 4.5. Nck- $\alpha$ baltymo sąveika su RasGAP HL-60 ląstelių linijoje

Nck baltymų sąveikos su RasGAP hepatomos ląstelių linijoje (HepG2) tyrimais buvo nustatytas sąveikos mechanizmas. Toliau nusprendėme ištirti ar ši sąveika vyksta specifiskai tik tam tikrose ląstelėse. Tyrimams buvo pasirinktos HL-60 linijos ląstelės. HL-60 ląstelių linija – tai promielocitinės leukemijos ląstelės. Ši ląstelių linija pasirinkta, nes joje nėra endogeninio PDGF receptoriaus- $\beta$ . Paveikus TPA (forbolo esteris, forbol-12-myristat-13-acetatas) jos diferencijuojasi į makrofagus, padidėja RasGAP baltymo kiekis ir RasGAP subyra į fragmentus.

Nck- $\alpha$  sąveikai su RasGAP nustatyti buvo atlikta precipitacija su GST ir GST-Nck- $\alpha$  baltymais iš HL-60 ląstelių lizatų neveiktų arba paveiktų TPA.(Pav.9.A. 6, 7, 8) Kontrolei buvo atliekama precipitacija iš HepG2 ląstelių.(Pav.9.A. 4, 5) Precipitatuose esantys baltymai išskirstyti SDS-PAG elektroforezės būdu, pernešti ant membranos ir analizuoti Western bloto būdu su anti-GAP antikūnais.

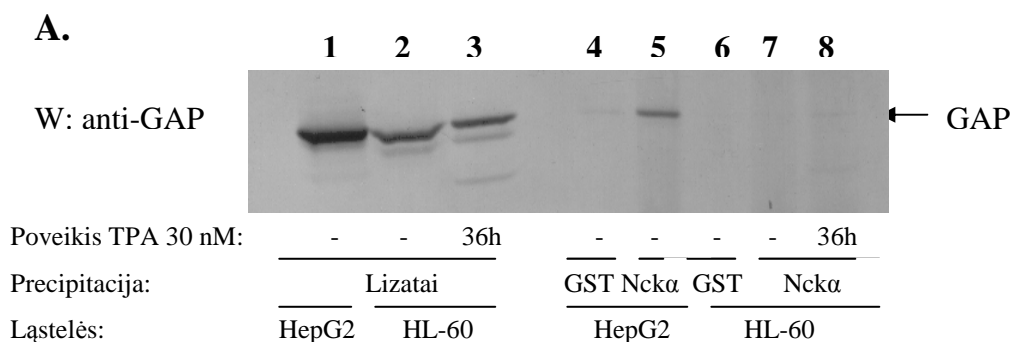
Gauti duomenys rodo, kad GST-Nck- $\alpha$  nesąveikauja su RasGAP iš HL-60 ląstelių *in vitro*. Tuo tarpu kontrolinėse ląstelėse (HepG2) sąveika yra. Galima manyti, kad

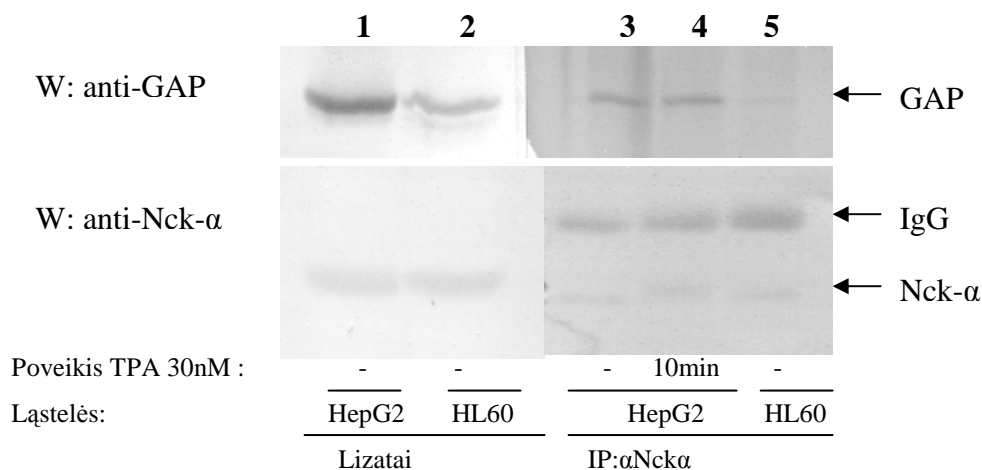
HL-60 ląstelių linijoje ši sąveika nevyksta dėl to, kad jose nėra PDGF receptoriaus- $\beta$ , kadangi buvo parodyta, kad receptorius iš dalies įtakoja Nck- $\alpha$ -RasGAP komplekso susidarymą. Tikėtina, kad RasGAP gali būti specifiskai modifikuojamas. Kita vertus, potenciali Nck- $\alpha$ -RasGAP kompleksų funkcija yra ląstelių adhezijos reguliacija, o HL-60 yra suspensinių ląstelių linija, kuriai adhezija nebūdinga. Ketvirta galimybė yra ta, kad RasGAP iš HL-60 ląstelių po aktyvacijos yra suskaldomas proteazių, taip pat dalis baltymo aptinkama suskaldyto ir nestimuliuotose ląstelėse.

Ląstelių lizatuose esantis baltymo kiekis iš HepG2 ląstelių yra parodytas Pav.9.A.1, o HL-60 ląstelėse Pav.9.A. 2, 3.

Kadangi, sąveikos tarp Nck- $\alpha$  ir RasGAP *in vitro* nenustatėme, toliau tyrėme ar ši sąveika egzistuoja ląstelėse *in vivo*. Tam tikslui buvo atliekama imunoprecipitacija su anti-Nck- $\alpha$  antikūnais iš HepG2 ir HL-60 ląstelių. Imunoprecipituose esantys baltymai išskirstyti poliakrilamidiniame gelyje ir pernešti ant membranos. Membranoje esantys baltymai buvo analizuojami Western bloto būdu su anti-GAP ir anti-Nck- $\alpha$  antikūnais. Dalis citoplazminių lizatų buvo panaudota RasGAP ir Nck- $\alpha$  baltymų kiekio nustatymui.(Pav.9.B. 1, 2)

Duomenys rodo, kad sąveika tarp Nck- $\alpha$  ir RasGAP nevyksta HL-60 ląstelėse *in vivo*.(Pav.9.B.5) Tuo tarpu kontrolinėse HepG2 ląstelėse sąveika aptinkama tiek po stimuliacijos TPA tiek ir nestimuliuotose.(Pav.9.B. 3, 4) Po stimuliacijos TPA yra matomas Nck- $\alpha$  baltymo masės padidėjimas, tai rodo, kad Nck- $\alpha$  po stimuliacijos TPA yra modifikuojama. Greičiausiai tai fosforilinimas ties serinu ar treoninu, bet kaip įtakoja ši modifikaciją Nck- $\alpha$  baltymo sąveiką su RasGAP nėra žinoma.(Pav.9.B. 4, apatinė dalis)



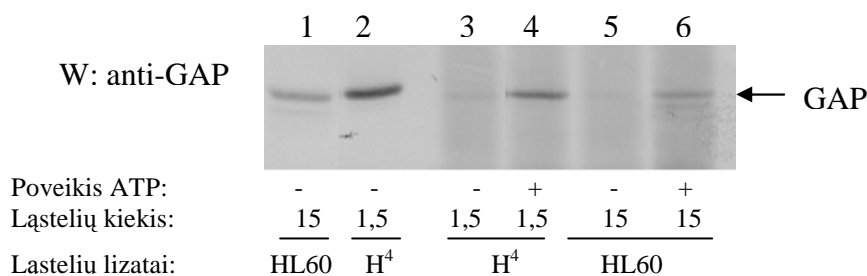
**B.**

**Pav.9. A. Nck-α sąveikos su RasGAP HL60 ląstelėse *in vitro* tyrimas.** HL-60 ląstelės buvo neveiktos arba veikiamos 30 nM TPA 36 val. Indukuojant diferenciaciją. HepG2 ląstelės buvo naudojamos kaip kontrolinės. Ląstelių lizatai naudojami precipitacijai su 10 μg GST ir GST-Nck-α baltymų. Precipitatuose esantys baltymai išskirstyti elektroforezės būdu ir analizuoti su anti-GAP antikūnais. **B. Nck-α sąveikos su RasGAP HL60 ląstelėse *in vivo* tyrimas.** HepG2 ir HL-60 ląstelėms buvo daromas poveikis su TPA arba ne (-), ląstelės lizuojamos ir lizatas naudojamas imunoprecipitacijai su anti-Nck-α antikūnais. Imunoprecipitatuose esantys baltymai analizuoti Western blo to būdu su anti-GAP ir anti-Nck-α antikūnais.

Kadangi nustatėme, kad Nck-α nesąveikauja su RasGAP HL-60 linijos ląstelėse, tolesnis tikslas buvo iširti ar GAP iš HL-60 ląstelių nėra užblokuotas kitais baltymais ir dėl to negali sąveikauti su PDGFR-β ir Nck-α. Tam tikslui buvo atliktas testas aktyvuojant kinazę *in vitro*. Neaktyvuotos HepG2 ląstelės ekspresuojančios laukinio tipo PDGFR-β buvo naudojamos imunoprecipitacijai su PDGFR-β antikūnais. Imunoprecipitatuose esantis PDGFR-β buvo aktyvuotas pridėjus 50 μM ATP (Pav.10. 4, 6) arba neaktyvuotas (Pav.10. 3, 5) ir inkubuojamas su lizatais iš HepG2 (kontrolė)(Pav.10. 3, 4) ir HL-60 ląstelių (Pav.10. 5, 6). Susidarę baltyminiai kompleksai išskirstyti SDS-PA gelyje ir pernešti ant membranos. Baltymai analizuojami su anti-GAP antikūnais. Gauti duomenys rodo, kad GAP iš HL-60 ląstelių jungiasi prie aktyvuoto PDGFR-β iš HepG2 ląstelių.(Pav.10. 6) Vadinas, GAP nėra blokuojamas kitų su juo sąveikaujančių baltymų ir potencialiai gali sąveikauti ir su kitais, abiem ląstelių linijoms būdingais, baltymais.

GAP baltymo kiekio nustatymui dalis HL-60 ir HepG2 ląstelių citoplazminių lizatų buvo analizuojami Western blo to būdu su anti-RasGAP antikūnais. Kadangi citoplazminiuose HL-60 ląstelių lizatuose esantis baltymo kiekis yra mažesnis nei

HepG2 ląstelėse, ImageJ programos pagalba apskaičiavome skirtumus ir nustatėme, kad GAP kiekis HL-60 ląstelėse yra 50% mažesnis. Tokį patį skirtumą gavome ir sulyginę GAP kiekius sąveikaujančius su PDGFR- $\beta$  po aktyvacijos ATP.

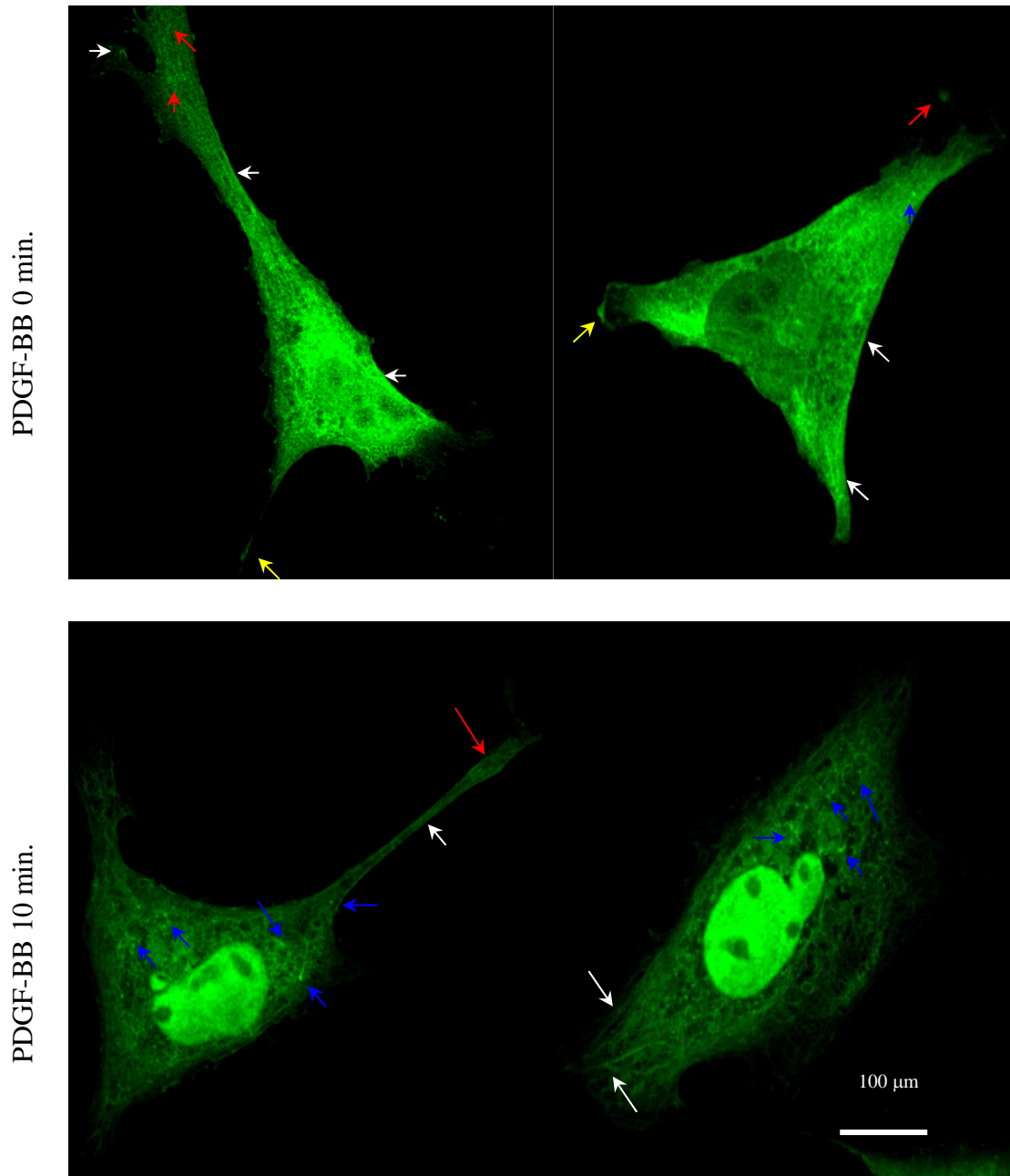


**Pav.10. RasGAP specifinės modifikacijos tikrinimas HL-60 ląstelėse.** HL-60 ir HepG2 ląstelių lizatai buvo naudojami imunoprecipitacijai su anti-PDGFR- $\beta$  antikūnais. Imunoprecipitatuose esantis receptorius buvo aktyvuojamas arba ne su 50  $\mu$ M ATP. Po aktyvacijos imuninis kompleksas buvo inkubuojamas su HepG2 arba HL-60 ląstelių lizatais. Susidaręs baltyminis kompleksas analizuotas Western bloto būdu su anti-GAP antikūnais. Siekiant gauti vienodą RasGAP baltymo kiekį ėmėme tokius ląstelių kiekius: HepG2 ląstelių  $1,5 \times 10^6$  (1,5), HL-60 ląstelių  $15 \times 10^6$  (15). A. 1, 2, 3, B. 1, 2, C. 1, 2 pavyzdžiuose pavaizduotas RasGAP kiekis citoplazminiuose lizatuose (10%).

#### 4.6. Nck- $\alpha$ ir RasGAP baltymų lokalizacija

Siekiant ištirti Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacijos priklausomybę nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos buvo atliekamas imunofluorescencijos tyrimas. Tam tikslui HepG2 ląstelės ekspresuojančios laukinio tipo PDGF receptorių- $\beta$  buvo auginamos 24 duobučių lėkštelėse ant dengiamųjų stiklelių. Ląstelės buvo transfekuojamos pRK5-HA-Nck- $\alpha$  konstruktais naudojant Lipofektamine reagentą. Sinchronizuojamos 12 val. ir stimuliuojamos augimo faktoriumi PDGF-BB 50 ng/ml 10 min. arba paliktos nestimuliuotos. Ląstelės fiksuojamos, permeabilizuojamos ir inkubuojamos su pirminiu anti-HA antikūnu, po inkubacijos laikomos antrinio antikūno, žymėto Alexa Fluor 488 dažu, tirpale. HA-Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacija nestimuliuotose ir stimuliuotose ląstelėse buvo analizuojama konfokalinio mikroskopo pagalba.

### HA-Nck- $\alpha$ Alexa fluor 488



**Pav.11. HA-Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacija.** Siekiant nustatyti Nck- $\alpha$  baltymo lokalizaciją ląstelėse priklausomai nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos atlikome imunofluorescencijos tyrimą. Tam tikslui HepG2 ląstelės buvo neveiktos (0 min.) arba veikiamos 50 ng/ml PDGF-BB 10 min., fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu, permeabilizuojamos ir blokuojamos. Po blokavimo buvo inkubuojama su anti-HA antikūnais ir su antriniai Alexa Fluor 488 dažų (žalia) žymėtais antikūnais. Duomenys buvo analizuojami konfokalinio mikroskopo pagalba. Rodyklėmis pažymėtos Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacijos vietos. Baltos rodyklės – streso fibrilės, geltona – membranos susiraukšlijimai, raudona – fokalinės adhezijos kontaktai, mėlyna – citoplazminiai granuliu pavidalo dariniai.

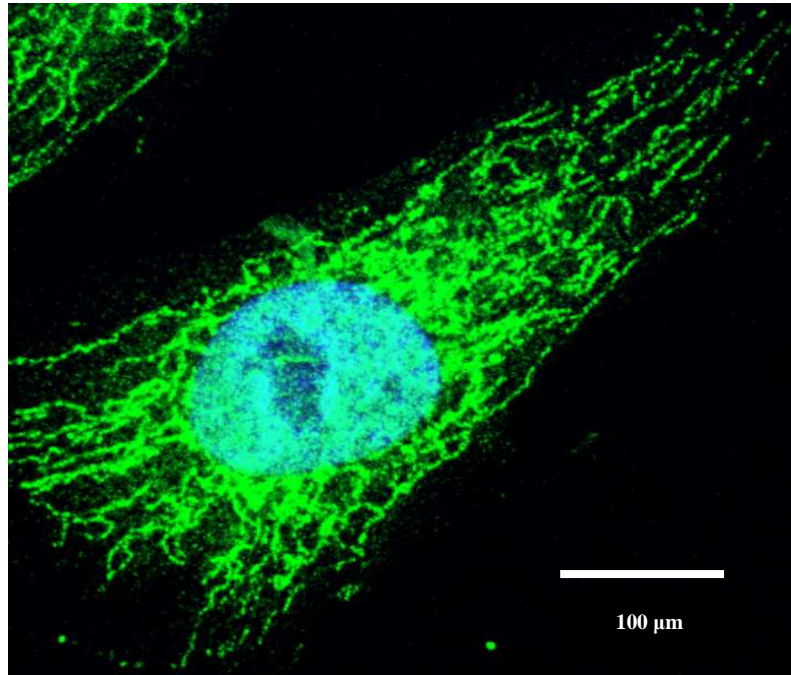


Gauti duomenys rodo Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacijos priklausomybę nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvumo. Nestimuluotose augimo faktoriumi ląstelėse didžiausia Nck- $\alpha$  baltymo frakcija lokalizuojasi įtampos skaidulose (Pav.11. balta rodyklė) bei fokalinuose ląstelės kontaktuose (Pav.11. raudona rodyklė), dalis lamelipodijose bei filopodijose, ląstelės membranos susiraukšlėjimuose (Pav.11. geltona rodyklė). Yra žinoma, kad streso fibrilės eina per ląstelės citoplazmą ir yra prijungiamos prie plazminės membranos per fokalius ląstelės kontaktus, taip pat yra duomenų apie Nck- $\alpha$  vaidmenį formuojant fokalius kontaktus. Todėl galima manyti, kad Nck- $\alpha$  galėtų dalyvauti streso fibrilių polimerizacijos link fokalių kontaktų procesuose. Taip pat, nestimuluotose ląstelėse maža Nck- $\alpha$  baltymo dalis yra aptinkama ląstelės citoplazmoje. (Pav.11. viršutinė dalis, mėlyna rodyklė) Tuo tarpu po PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos Nck- $\alpha$  kiekis citoplazminėje ląstelės dalyje granuliu pavidalo struktūrose padidėja, tačiau į kokių darinių sudėtį įeina kol kas negalima pasakyti. Bet galima teigti, kad Nck- $\alpha$  baltymas reguliuoja ląstelės procesus priklausomus nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos. Po stimuliacijos Nck- $\alpha$  taip pat yra aptinkamas streso fibrilėse ir fokalinuose ląstelės kontaktuose. Ląstelės dalyje, kuri migracijos metu atsikabina nuo substrato, streso fibrilės sutrumpėja ir čia Nck- $\alpha$  yra aptinkama mažiau. Taigi, gauti duomenys patvirtina, kad Nck- $\alpha$  baltymo viena iš funkcijų ląstelėje yra ląstelės migracijos reguliacija.

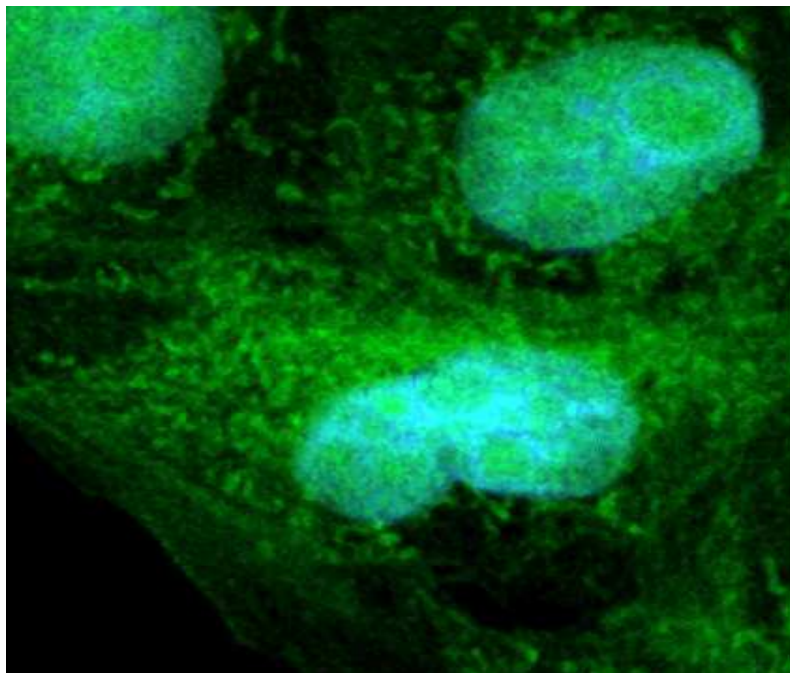
Toliau tyrėme endogeninių Nck- $\alpha$  ir RasGAP baltymų lokalizaciją HepG2 ląstelių linijoje. HepG2 ląstelės buvo fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu, permeabilizuojamos ir blokuojamos. Nck- $\alpha$  lokalizacijai nustatyti, po blokavimo ląstelės buvo inkubuojamos su pirminiais anti-Nck- $\alpha$  antikūnais ir su antriniais antikūnais sujungtais su FITC dažu. (Pav.12.A.) RasGAP baltymo lokalizacijai nustatyti ląstelės buvo inkubuojamos su anti-RasGAP antikūnais konjuguotais su Alexa Fluor 594 dažu.

Gauti duomenys rodo, kad Nck- $\alpha$  ir RasGAP baltymų lokalizacijos ląstelėje profilis yra panašus. Abu baltymai lokalizuojasi ląstelės citoplazminėje dalyje, o didžiausios sąnkaupos aptinkamos šalia branduolio. (Pav.12.A. B.) Todėl, galima manyti, kad šie baltymai lokalizuojasi sudarydami kompleksą. Norint patvirtinti šią hipotezę būtina atlikti išsamius kolokalizacijos tyrimus.

**A.**



**B.**



**Pav.12.** Baltymų lokalizacijai ląstelėje nustatyti buvo atliekamas imunofluorescencijos tyrimas. **A.Nck- $\alpha$  baltymo lokalizacija.** HepG2 linijos ląstelės buvo fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu, permeabilizuojamos su 0,15% Triton X-100 ir blokuojamos. Inkubuojamos su pirminiais anti-Nck- $\alpha$  antikūnais ir antriniais Alexa Fluor 488 dažų žymėtais antikūnais. **B. RasGAP baltymo lokalizacija.** HepG2 linijos ląstelės buvo fiksuojamos, permeabilizuojamos ir inkubuojamos su anti-RasGAP antikūnais žymėtais Alexa Fluor antikūnais. Duomenys vizualizuojami konfokalinės mikroskopijos būdu.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tiriamas Nck šeimos baltymų sąveikos su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu (RasGAP) mechanizmas. Tam tikslui buvo naudojamos HepG2 ląstelės ekspresuojančios laukinio tipo PDGF receptorių- $\beta$ . Ląstelės buvo nestimuliuojamos arba stimuliuojamos PDGF-BB siekiant įvertinti Nck šeimos baltymų sąveikos su RasGAP priklausomybę nuo PDGFR- $\beta$ .

Iš pradžių parodėme, kad Nck šeimos baltymai sąveikauja su RasGAP baltymu *in vitro* ir *in vivo* pastoviai per Nck- $\alpha$  SH2 ir vieną arba kelis SH3 domenus. Pastoviai sąveikai yra svarbūs SH3 domenai. SH2 domeno dalyvavimas sąveikos sudaryme gali būti priklausomas nuo kitų tirozinfosforilintų baltymų, tiek receptorių tiek ir nereceptorinių (Pvz., p62Dok)[24]. Po PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos Nck šeimos baltymai suriša papildomą RasGAP kiekį ir tam yra reikalingas Nck- $\alpha$  SH2 domenas. Tokie duomenys gauti atlikus *in vitro* tyrimus su mutantiniais Nck- $\alpha$  baltymais. Vien tik SH2 domeną turintis Nck- $\alpha$  suriša padidintą RasGAP kiekį aktyvuotose PDGF-BB ląstelėse kaip ir laukinio tipo Nck- $\alpha$  baltymas. Tik SH3 domenus turintis Nck- $\alpha$  baltymas suriša vienodą RasGAP kiekį tiek aktyvuotose tiek ir neaktyvuotose augimo faktoriumi ląstelėse. Tuo tarpu nestimuliuotose augimo faktoriumi arba neekspresuojančiose receptoriaus ląstelėse tiek laukinio tipo tiek ir mutantiniai baltymai suriša vienodą GAP kiekį. Taigi, Nck-RasGAP sąveika iš dalies yra reguliuojama PDGF receptoriumi- $\beta$ . Papildomo GAP kiekio surišimas gali būti sąlygojamas GAP fosforilinimo prisijungus jam prie PDGFR $\beta$ , po kurio pakinta GAP konformacija.[12, 13] Nck- $\alpha$  SH2 domenas galėtų jungtis prie GAP fosforilinto tirozino ir, tokiu būdu, Nck gali dalyvauti sujungdamas RasGAP-PDGFR- $\beta$  kompleksą su kitomis pasrovinėmis molekulėmis. Papildomas RasGAP kiekis gali būti svarbus mitogeninio signalo perdavimui.

Tyrimais *in vivo* parodėme, kad Nck šeimos baltymai, Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$ , sąveikauja su RasGAP vienodai. Tuo tarpu šios sąveikos priklausomybės nuo PDGFR- $\beta$  aktyvacijos neaptikome. Nck- $\alpha$  sąveikai su RasGAP *in vivo* yra reikalingi SH2 ir SH3 domenai. Per SH2 domeną sąveika yra silpnesnė ir greičiausiai vyksta per RasGAP fosforilintą tiroziną arba kitą, fosfotiroziną turintį baltymą. Fosfotiroziną turintis baltymas gali būti p62Dok. Yra žinoma, kad RasGAP sąveikauja su fosforilintu p62Dok ir tokiu būdu yra neigiamai reguliuojamas Ras [19]. Todėl galima manyti,

kad Nck- $\alpha$  sudarydamas kompleksą su RasGAP ir p62Dok taip pat dalyvauja Ras inaktyvavimo procese. Kita vertus, RasGAP ląstelėje gali veikti kaip Ras neigiamas reguliatorius arba Ras efektorius. Sąveika su Nck gali sąlygoti efektorinę arba reguliacinę RasGAP funkciją.

“Far western” blotas rodo, kad tiesioginei sąveikai vykti yra reikalingi tik vienas arba keli Nck- $\alpha$  SH3 domenai. Nck- $\alpha$  baltymas turintis tik SH2 domeną tiesiogiai nesijungia prie RasGAP, bet sąveikauja su nežinomu fosforilintą tiroziną turinčiu 190 kDa baltymu.

Yra duomenų, kad RasGAP, kaip ir Nck baltymai, yra susijęs su aktino citoskeleto reguliacija [1, 6]. Todėl gali būti, kad Nck- $\alpha$ -RasGAP kompleksas taip pat yra susijęs su šia funkcija. Bet kol kas nėra duomenų patvirtinančių šią hipotezę.

Tolesniuose tyrimuose siekėme nustatyti ar Nck šeimos baltymų sąveika yra universali arba specifiška tam tikrose ląstelėse. Tam tikslui atlikome *in vitro* ir *in vivo* tyrimus promielocitinės leukemijos ląstelių linijoje neekspresuojančioje PDGF receptoriaus- $\beta$ . Duomenys rodo, kad nei *in vivo* nei *in vitro* Nck- $\alpha$  sąveika su GAP HL-60 ląstelių linijoje nevyksta. Tyrimais *in vivo* nustatėme, kad šioje ląstelių linijoje Nck- $\alpha$  sąveikauja su PAK (duomenys nepateikti), todėl galima manyti, kad PAK konkuruoja su GAP dėl sąveikos su Nck- $\alpha$ . Toliau siekėme iširti ar RasGAP iš HL-60 linijos ląstelių nėra užblokuotas kitų pastoviai su juo sąveikaujančių baltymų, kurie trukdytų jo sąveikai su PDGF receptoriumi- $\beta$ . Atlikę kinazės aktyvumo testą nustatėme, kad GAP iš HL-60 linijos ląstelių sąveikauja su PDGFR $\beta$  iš HepG2 ląstelių. Tai rodo, kad GAP nėra užblokuotas kitų baltymų ir potencialiai gali sąveikauti ir su kitomis, abiem ląstelių linijoms būdingomis, molekulėmis.

Atlikus lokalizacijos tyrimą nustatėme, kad po aktyvacijos PDGF-BB didelė Nck- $\alpha$  baltymo dalis yra lokalizuojama į ląstelės citoplazmą ir aptinkama granulių pavidalo struktūrose. Yra žinoma, kad Nck- $\alpha$  dalyvauja ląstelės nuo PDGF priklausomuose proliferacijos ir migracijos procesuose, todėl galima manyti, kad Nck- $\alpha$  lokalizacijos pokytis po stimuliacijos augimo faktoriumi yra susijęs su šiais procesais. Po poveikio augimo faktoriumi Nck- $\alpha$  gali sudaryti kompleksus su kitais baltymais, taip pat dalyvaujančiais ląstelės proliferacijos ar migracijos procesuose. Į šių kompleksų sudėtį gal būt įeina ir RasGAP. Yra žinoma, kad dėl RasGAP sąveikos su skirtingomis molekulėmis, jis gali įeiti į įvairius kompleksus bei išsidėstyti įvairiuose ląstelės kompartmentuose priklausomai nuo komplekso komponentų koncentracijos,

kuri gali priklausyti nuo ląstelės tipo ir amžiaus.[45] Imunofluorescencijos tyrimais patvirtinome, kad Nck- $\alpha$  tiek aktyvuotose tiek ir neaktyvuotose PDGF ląstelėse lokalizuojasi fokalinės adhezijos kontaktuose, membraniniuose susiraukšlėjimuose bei įtampos skaidulose, bet kiek ši lokalizacija ir su ja susijęs Nck- $\alpha$  baltymo veikimas priklauso nuo jo sąveikos su RasGAP kol kas pasakyti negalima. Tam reikalingi tolesni tyrimai.

Imunofluorescencijos tyrimais nustatėme, kad Nck- $\alpha$  ir RasGAP baltymų lokalizacijos profilis yra panašus. Abu baltymai lokalizuojasi ląstelės citoplazminėje dalyje ypač šalia branduolio. Todėl, galima manyti, kad Nck- $\alpha$  baltymas lokalizuojasi mums nežinomose ląstelės struktūrose būdamas komplekse su RasGAP. Tačiau šios hipotezės patvirtinimui yra reikalingi tolesni tyrimai su ląstelės struktūroms specifiniais žymenimis.

Gauti duomenys buvo patvirtinti trijuose ir daugiau nepriklausomuose tyrimuose.

Kadangi nustatėme Nck- $\alpha$  baltymo sąveikos su RasGAP pagrindinį mechanizmą ir priklausomybę nuo PDGFR $\beta$  aktyvumo, toliau ketiname detaliau tyrinėti šios sąveikos specifiškumą, priklausomybę nuo įvairių aplinkos bei ląstelės vidaus poveikių bei biologinį vaidmenį.

## 6. IŠVADOS

1. Nck šeimos adaptoriniai baltymai sąveikauja su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu (RasGAP) pastoviai, ir ši sąveika nepriklauso nuo PDGF receptoriaus- $\beta$  aktyvacijos *in vitro* ir *in vivo*. Šiai sąveikai yra būtini Nck- $\alpha$  SH3 domenai ir SH2 domenas.
2. Nck šeimos baltymai gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai ir per nenustatytą tarpininką (tarpininkus). Už tiesioginę Nck- $\alpha$  baltymo sąveiką su RasGAP yra atsakingi adaptorinio baltymo SH3 domenai, o už netiesioginę – SH2 domenas.
3. Promielocitinės leukemijos HL-60 ląstelių linijoje RasGAP nesąveikauja su Nck- $\alpha$ , bet gali sąveikauti su aktyvuotu PDGF receptoriumi.
4. Konfokalinės mikroskopijos analizė rodo, kad Nck- $\alpha$  ir RasGAP lokalizacijos ląstelėje pobūdis yra panašus.

## 7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. L. E. Braverman, L.A. Quilliam. Identification of Grb4/Nck $\beta$ , a Src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck. *JBC*, 1999; 279 (9): 5542-5549.
2. M. Chen, H. She, W. Li et.al. Nck $\beta$  adapter regulates actin polymerisation in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *MCB*, 2000; 20 (21): 7867-7880.
3. L. Buday, L. Wunderlich, P. Tamas. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cellular signaling*, 2002; 14: 723-731.
4. M. Ger, V. Tunaitis, M. Stoškus, M. Valius. Identification of Ras GTPase activating protein-binding sites in adaptor protein Nck- $\alpha$ . *Biologija*, 2005; 1: 35-37.
5. M. Chen, H. She, W. Li et.al. Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *JBC*, 1998; 273 (39): 25171-25178.
6. W. Li, J. Fan, D. T. Woodley. Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene*, 2001; 20: 6403-6417.
7. S. Coutinho, T. Jahn, J. Duyster et.al. Characterization of Grb4, an adapter protein interacting with Bcr-Abl. *Blood*, 2000; 96 (2): 618-624.
8. R. Nishimura, W. Li, J. Schlessinger et. al. Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor. *MCB*, 1993; 13 (11): 6889-6896.
9. W. Li, P. Hu, J. Schessinger et. al. The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a Common target for phosphorylation by different surface receptors. *MCB*, 1992; 12 (12): 5824-5833.
10. J.P. Montmayeur, M. Valius, J. Vandenheede, A. Kazlauskas. The platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *JBC*, 1997; 272 (51): 32670-32678.
11. M. Ger, V. Tunaitis, M. Valius. Elucidation of the complex formation between Nck- $\alpha$ , RasGTPase activating protein and platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ . *Biologija*, 2003; 3: 7-9.

12. C. H. Heldin, B. Westermark. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*, 1999; 79 (4): 1283-1301.
13. C. H. Heldin, A. Ostman, L. Ronnstrand. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998; 1378: F79-F113.
14. S. M. Goicoechea, Y. Tu, Ch. Wu et. al. Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *IJBCB*, 2002; 34: 791-805.
15. G. M. Rivera, C. A. Briceno, B. J. Mayer et. al. Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Current biology*, 2004; 14: 11-22.
16. X. Li, U. Eriksson. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 2003; 14: 91-98.
17. L. Buday. Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochemica Et Biophysica*, 1999; 1422: 187-204.
18. A. Bernard, A. Kazlauskas. Phosphospecific antibodies reveal temporal regulation of platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor signaling. *Experimental cell research*, 1999; 253: 704-712.
19. M. J. Wick, L. Q. Dong, F. Liu et. Al. Insulin receptor-mediated p62<sup>dok</sup> tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Act. *JBC*, 2001; 276 (46): 42843-42850.
20. A. Zarrinpar, R. P. Bhattacharyya, W. A. Lim. The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE*, 2003; 179: re8.
21. T. Pawson, G. D. Gish, P. Nash. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *TRENDS in cell biology*, 2001; 11 (12): 504-511.
22. R. V. Hoch, Ph. Soriano. Roles of PDGF in animal development. *Development*, 2003; 130 (20): 4769-4784.
23. S. J. Kempniak, H. Yamaguchi, J. E. Segall et. Al. A neural wiskott-aldrich syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerisation that is regulated by cortactin. *JBC*, 2005; 280 (7): 5836-5842.
24. J. C. Sitko, C. I. Guevara, N. A. Cacalano. Tyrosine-phosphorylated SOCS3 interacts with the Nck and Crk-L adapter proteins and regulates Nck activation. *JBC*, 2004; 279 (36): 37662-37669.



25. J. K. Drugan, K. Rogers-Graham, G. J. Clark. The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain. *JBC*, 2000; 275 (45): 35021-35027.
26. S. Kebache, D. Zuo, E. Chevet, L. Larose. Modulation of protein translation by Nck-1. *PNAS*, 2002; 99 (8): 5406-5411.
27. Q. Hu, D. Milfay, L. T. Williams. Binding of Nck to SOS and activation of ras-dependent gene expression. *MCB*, 1995; 15 (3): 1169-1174.
28. L. Voisin, L. Larose, S. Meloche. Angiotensin II stimulates serine phosphorylation of the adaptor protein Nck: physical association with serine/threonine kinases Pak1 and casein kinase I. *Biochem. J.*, 1999; 341: 217-223.
29. A. Kazlauskas, A. Kashishian, J. A. Cooper, M. Valius. GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase bind to distinct regions of the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit. *MCB*, 1992; 12 (6): 2534-2544.
30. K. A. DeMalis, S. L. Godwin, S. P. Soltoff, A. Kazlauskas. Multiple roles for Src in a PDGF-stimulated cell. *Experimental cell research*, 1999; 253: 271-279.
31. Y. Tu, D. F. Kucik, Ch. Wu. Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180. *FEBS*, 2001; 491: 193-199.
32. K. Funo, H. Uramoto. Regulatory mechanism for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochimica polonica*, 2003; 50 (3): 647-658.
33. A. Kazlauskas, G-S. Feng, T. Pawson, m. Valius. The 64-kDa protein that associates with the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit via Tyr-1009 is the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993; 90: 6939-6942.
34. M. Stoškus, M. Ger, V. Tunaitis, M. Valius. Expression and activity of platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  in breast carcinoma cells. *Biologija*, 2005; 1: 61-63.
35. S. Ekman, R. Thuresson, C-H. Heldin, L. Ronnstrand. Increased mitogenicity of an  $\alpha\beta$  heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene*, 1999; 18: 2481-2488.
36. Y. Tu, F. Li, Ch. Wu. Nck-2, a novel Src homology 2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of

- growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Molecular biology of the cell*, 1998; 9: 3367-3382.
37. M. Valius, Ch. Bazenet, A. Kazlauskas. Tyrosines 1021 and 1009 are phosphorylation sites in the carboxy terminus of the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  subunit and are required for binding of phospholipase C $\gamma$  and a 64-kilodalton protein, respectively. *MCB*, 1993; 13 (1): 133-143.
  38. Y. Tu, L. Liang, S. J. Frank, Ch. Wu. Src homology 3 domain-dependent interaction of Nck-2 with insulin receptor substrate-1. *Biochem. J.* 2001; 354: 315-322.
  39. M. Valius, J. P. Secrist, A. Kazlauskas. The GTPase-activating protein of Ras suppresses platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor signaling by silencing phospholipase C- $\gamma$ 1. *MCB*, 1995; 15 (6): 3058-3071.
  40. Th. K. Schlesinger, K.A. demali, A. Kazlauskas et. Al. platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem. J.* 1999; 344: 519-526.
  41. J-W. Lee, J-E. Kim, J. Kwon et.al. Two conserved cysteine residues are critical for the enzymic function of the human platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ : evidence for different roles of Cys-822 and Cys-940 in the kinase activity. *Biochem. J.* 2004; 382: 631-639.
  42. P. W. Schenk, B. E. Snaar-Jagalska. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1999; 1449: 1-24.
  43. A. Bernards. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPases activating proteins in man and Drosophila. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2003; 1603: 47-82.
  44. Sh. Donovan, K.M. Shannon, G. Bollag. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2002; 1602: 23-45.
  45. Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 2001; 8 (1): 153-208.
  46. S.Frese, W-D. Schubert, D. W. Heinz et. al. The phosphotyrosine peptide binding specificity of Nck1 and Nck2 SH2 domains. *JBC*, 2006; Manuscript M512917200.
  47. M. B. Yaffe. Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Molecular Cell Biology*, 2002; 3: 177-186.

48. T. Pawson, M. Raina, P. Nash. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters*, 2002; 513: 2-10.
49. B. J. Mayer. SH domains: complexity in moderation. *Journal of cell science*, 2001; 114:1253-1263.
50. J. M. Kyriakis, J. Avruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, 2001; 81 (2): 807-869.

VAIDA GURSKIENĖ

## NCK ŠEIMOS BALTYMŲ SAŲEIKA SU RAS GTPAZĘ AKTYVUOJANČIU BALTYMU

### SANTRAUKA

Baltymų tarpusavio sąveika užtikrina įvairių ekstraląstelinių ir viduląstelinių signalų perdavimą. Sąveikas sąlygoja specializuoti baltymų domenai, vieni pagrindinių jų yra Src homologijos (SH) domenai, kurie aptinkami daugelyje baltymų.

Nck šeimos baltymai, Nck- $\alpha$  ir Nck- $\beta$ , yra sudaryti iš trijų SH3 ir vieno SH2 domenų ir neturi jokių katalitinių domenų. Nck veikia kaip tarpininkai per SH2 ir SH3 domenų sujungdami įvairius viduląstelinius procesus reguliuojančius baltymus.

Šiame darbe nustatėme, kad Nck šeimos nariai sąveikauja su Ras GTPazę aktyvuojančiu baltymu (RasGAP) pastoviai *in vitro* ir *in vivo*, bet po PDGFR- $\beta$  stimuliacijos su Nck asocijuojančio RasGAP kiekis padidėja. Pastovi sąveika priklauso nuo Nck- $\alpha$  SH2 ir vieno arba kelių SH3 domenų. Po PDGFR- $\beta$  aktyvacijos, už papildomo RasGAP kiekio surišimą yra atsakingas SH2 domenas. Taip pat nustatėme, kad Nck baltymai gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai. Vienas arba keli Nck- $\alpha$  SH3 domenai yra atsakingi už Nck- $\alpha$  tiesioginę sąveiką su RasGAP. Imunofluorescencijos tyrimais parodėme, kad Nck- $\alpha$  ir RasGAP baltymų lokalizacijos profilis yra panašūs.

VAIDA GURSKIENĖ

**ASSOCIATION OF NCK FAMILY PROTEINS WITH RAS GTPASE  
ACTIVATING PROTEIN**

SUMMARY

Extracellular and intracellular signals are mediated by protein-protein interactions. These interactions are determined by specialized protein domains, for example, Src homology (SH) domains found in many proteins.

Nck family proteins, Nck- $\alpha$  and Nck- $\beta$ , are composed of three SH3 and one SH2 domains and have no any putative catalytic domain. Nck proteins act as adaptors by linking via SH2 and SH3 domains proteins that regulate various intracellular processes.

Here we show that Nck family proteins associate with RasGAP constantly *in vivo* and *in vitro*, but after PDGFR- $\beta$  stimulation quantity of Nck-bound RasGAP increases. Constant interaction depends on Nck- $\alpha$  SH2 and one or several SH3 domains. SH2 domain is responsible for binding of additional RasGAP after PDGFR- $\beta$  stimulation. We have also determined that Nck proteins are able to interact with RasGAP directly. One or several SH3 domains are responsible for Nck- $\alpha$  direct association with RasGAP. Immunofluorescence assay show that localization patterns of Nck- $\alpha$  and RasGAP are similar.