

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko – biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Dušan Hrčkulák

Strukturní základy buněčné invazivity

Structural basis of cell invasion

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Marian Novotný, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 09. 05. 2012

Podpis

Touto cestou bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Marianu Novotnému, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracování mé bakalářské práce.

Obsah:

Abstrakt	5
Klíčová slova	5
Seznam zkratk	6
1. Úvod	7
2. Buněčná invazivita.....	8
3. Invasivní pohyby	8
3.1. Mezenchymální pohyb.....	9
3.2. Améboidní pohyb	11
3.3. Améboidně – mezenchymální přechod.....	11
4. Struktury specifické pro invadující buňky.....	12
4.1. Invadosomy.....	12
4.1.1. Podosomy	13
4.1.2. Invadopodia.....	13
4.2. Fokální adheze	14
4.2.1. Architektura fokálních adhezí	15
5. Proteiny fokálních adhezí	16
5.1. Integriny.....	16
5.2. Paxilin	16
5.3. Talin a vinculin	17
5.4. Kináza asociovaná s fokálními adhezemi (FAK)	23
5.4.1. Focal adhesion targeting domain (FAT)	23
5.5. Tyrozin kináza 2 (Pyk2).....	25
5.5.1. FAT doména Pyk2	25
5.6. p130Cas	28
5.6.1. SH3 doména p130Cas	29
5.6.2. FAT doména p130Cas	29
6. Závěr.....	31
7. Seznam použité literatury	32
8. Přílohy	35

Abstrakt

Individuální buněčná invazivita může být améboidního a mezenchymálního typu. Mezenchymální invazivita je závislá především na formování adhezivních struktur, jako jsou podosomy, invadopodia a fokální adheze, na které je zejména zaměřena tato práce. Fokální adheze jsou velmi komplexní a na jejich tvorbě a regulaci se podílí množství proteinů. Jejich základem jsou integriny, které extracelulárně zprostředkovávají vazbu na extracelulární matrix. Intracelulární doména integrinů interaguje přes plakové proteiny talin a vinculin s aktinovým cytoskeletem. Tvorba fokálních adhezí je závislá na mechanickém tahu, který vytváří cytoskelet, a jejich stabilita je regulována také pomocí signál přenášejících protein tyrozin kináz FAK a Pyk2. Tyto proteinkinázy jsou lokalizovány do fokálních adhezí díky interakci s paxillinem a do tamních proteinových komplexů jsou sdružovány pomocí adaptérových proteinů, například p130Cas. Lokalizace proteinů do fokálních adhezí, jejich aktivita a vzájemné specifické interakce jsou závislé na 3D struktuře těchto proteinů. Tato práce shrnuje některé známé 3D struktury vybraných proteinů, jejich interakční potenciál a vliv na fokální adheze. Její součástí je také souhrn všech známých struktur šesti zmiňovaných proteinů.

Klíčová slova

Buněčná invazivita, mezenchymální migrace, fokální adheze, 3D struktura, FAT

Abstract

Mezenchymal migration strategy is a mode of individual cell invasion, along with an ameboid migration strategy. It is dependent on cell adhesion structures formation and traction forces generation. This work is focused on integrin-mediated cell to extracellular matrix connections called focal adhesions. Focal adhesions are very complex and comprise of many proteins. The clusters of integrin dimers make up the focal adhesion core that binds extracellular matrix. Their intracellular domains indirectly interact with actin stress fibres through plaque proteins talin and vinculin. Focal adhesion assembly is force dependent and its components turnover is also regulated by focal adhesion kinase and prolin-rich tyrosin kinase 2. These kinases are probably recruited to focal adhesions by paxillin and then linked to signaling complexes by adaptor proteins as p130Cas. The 3D structure is what defines the options of interaction among participating proteins. Therefore, this work summarizes 3D structures of six proteins of interest, deals with their interactions and impact on focal adhesions. PDB codes of all available structures of these six proteins are enclosed.

Key words

Cell invasion, mezenchymal migration, focal adhesion, 3D structure, FAT

Seznam zkratek:

AK – aminokyselina/y

Cas – crk-associated substrate

CSF-1 – macrophage colony stimulating factor

ECM - extracelulární matrix

EGF – epidermal growth factor

FA – fokální adheze

FAK – kináza asociovaná s fokálními adhezemi

FAT – focal adhesion targeting domain

MMPs – matrix-metaloproteázy

PIP2 – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

Pyk2 – prolin-rich tyrosin kinase

1. Úvod

Populace nádorových buněk se vyznačují několika specifickými vlastnostmi, které jim umožňují vymknout se kontrole a ohrožovat organismus, v němž se vyvinuly. Kromě schopnosti neregulovatelně růst a množit se, mezi ně patří také schopnost metastazovat. Díky této schopnosti jsou buňky schopny opustit oblast primárního nádoru, šířit se pomocí oběhového systému a zakládat novotvary sekundární. Nezbytným krokem je tedy i získání schopnosti invasivity. Invasivita je velmi komplexní proces, který zahrnuje spolupráci mnoha buněčných komponent. Pochopení procesů spojených s buněčnou invasivitou je klíčové pro vývoj nových terapií pro nádorová onemocnění.

Buněčná invasivita však ani z daleka není jen nástrojem pro rozšíření rakovinných ložisek, ale také přirozenou vlastností některých eukaryotických buněčných typů. Ty se díky ní podílejí na mnoha fyziologicky podstatných procesech, od zformování embrya po udržování těla organismu ve funkčním stavu v průběhu celého života.

Díky moderním vědeckým postupům se daří získávat cenná data o molekulární podstatě dějů a regulačních mechanismů spojených s invasivitou. Mezi ně patří i podrobné struktury zúčastněných proteinů a proteinových komplexů. Tato práce byla vypracována s cílem shromáždit a utřídit známé informace právě o 3D strukturách některých proteinů podílejících se na buněčné invasivitě a jejich možných vzájemných interakcích. Hlavním objektem zájmu jsou zejména proteiny vyskytující se ve fokálních adhezích.

2. Buněčná invazivita

Buněčná invazivita, jako schopnost buněk pohybovat se mezibuněčnou hmotou pojivové tkáně, je v dospělém organismu stejně tak důležitým nástrojem při hojení ran jako nebezpečnou zbraní nádorových buněk. Díky této schopnosti mohou bílé krvinky invadovat do místa zánětu a fibroblasty migrovat na místo obnovy tkáně. Avšak buňky primárního nádoru schopné invasivity činí po založení sekundárních ložisek, metastází, pro pacienty jejich nemoc zhoubnou (Shrnuto v: Lauffenburger and Horwitz, 1996).

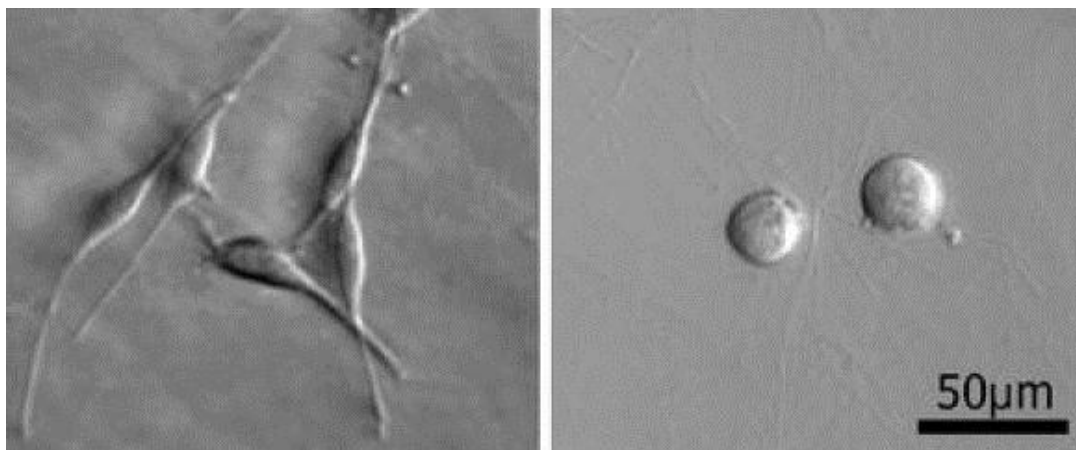
K tomu aby mohly rakovinné buňky invadovat do přilehlé tkáně, musí prodělat sérii změn týkajících se jejich morfologie, exprese proteinů, mezibuněčných interakcí a interakcí s extracelulární matrix (ECM), podobně jako embryonální buňky v některých stádiích ontogeneze. V případě transformovaných epiteliálních buněk je série těchto změn označována jako epiteliálně–mezenchymální přechod a probíhá pod taktovkou několika transkripčních faktorů včetně Snail, Slug a Twist. Invazivita však může být podnícena i vlivem vnějšího mikroprostředí (Shrnuto v: Hanahan and Weinberg, 2011).

Obecně lze říci, že výraznými rysy procesu získávání schopnosti invasivity jsou ztráta mezibuněčných spojů způsobená sníženou produkcí E-kadherinů, kateninů či jiných proteinových komponentů adhezivních spojů, změna morfologie buněk, zvýšení jejich pohyblivost a exprese proteinů degradujících ECM, např. matrix-metaloproteázy (MMPs) (Glukhova et al., 1995; Shrnuto v: Hanahan and Weinberg, 2011).

3. Invasivní pohyby

Migrující buňky mohou využívat několika rozdílných typů pohybu. Buňky některých nádorů (sarkomů, myelomů) migrují hromadně, stejně jako embryonální buňky při formování neurální lišty, ale v této práci jsem se zaměřil zejména na dvě individuální migrační strategie. První z těchto strategií je mezenchymální typ invasivity, studovaný zejména na fibroblastech. Druhou individuální strategií je améboidní typ invasivity, typický například pro leukocyty. Studium těchto strategií se ukázalo, že některé nádorové buňky jsou schopné mezi nimi přecházet, pomocí změn v expresi klíčových proteinových komponent, v závislosti na jejich aktuálním stavu a mikroprostředí, v jakém se nacházejí (Shrnuto v: Friedl and Bröcker, 2000; Friedl and Wolf, 2003; Lauffenburger and Horwitz, 1996).

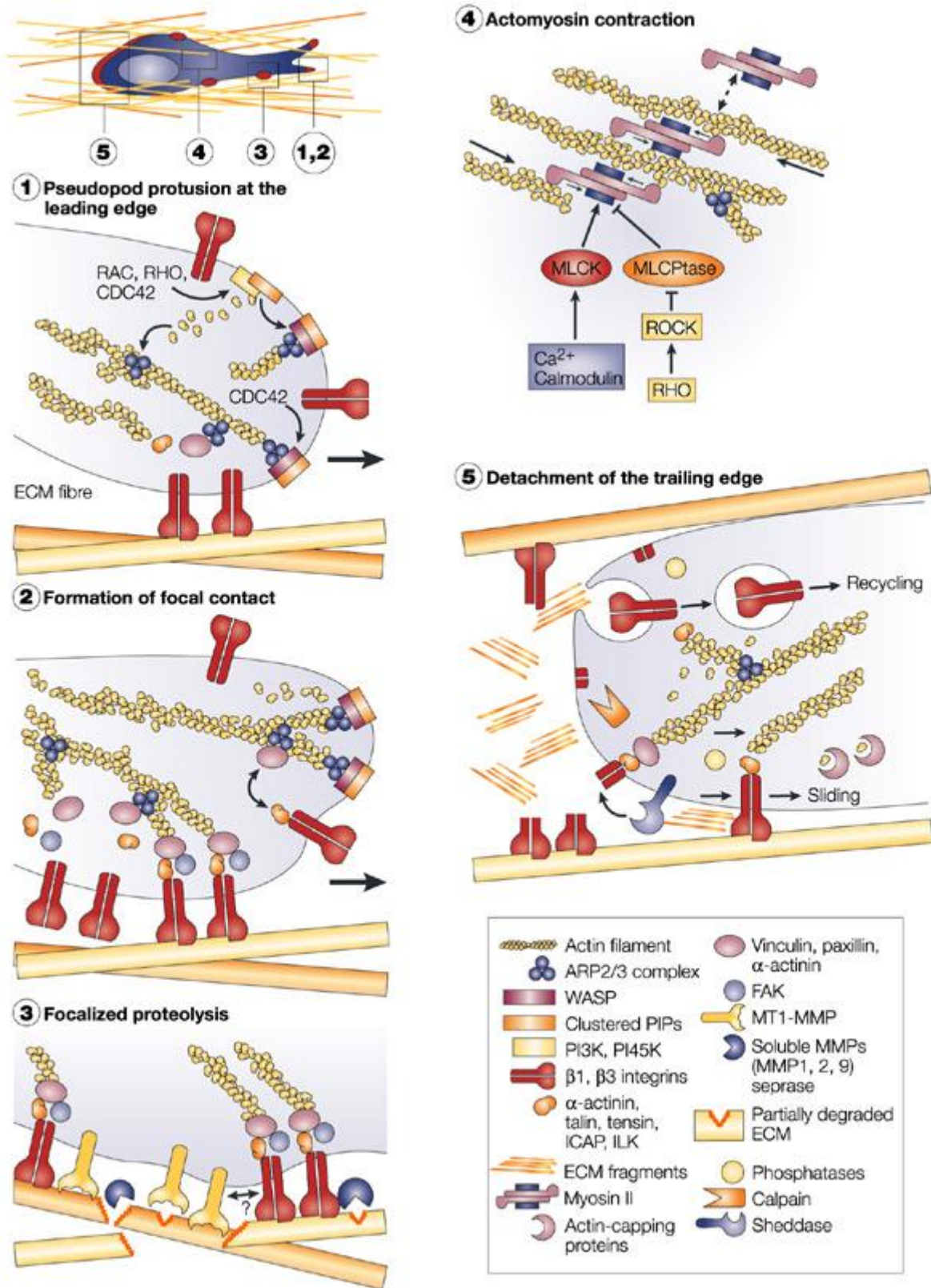
Mezenchymální a améboidní vzory pohybu jsou rozdílné invazní strategie jednotlivých nádorových buněk, lišící se zejména interakcemi s ECM, expresí integrinů, formováním fokálních adhezí a její proteolytické degradaci, a uspořádáním aktin-myosinového aparátu v buněčném těle, které ústí i v rozdílnou morfologii těchto buněk (obrázek 1; Shrnutí v: Friedl and Wolf, 2003; Pankova et al., 2010).



Obrázek 1: Rozdílná morfologie mezenchymálně a améboidně migrujících buněk (Obrázek převzat z: Pankova et al., 2010)

3.1. Mezenchymální pohyb

Nejpoužívanějším modelem mechanismu invaze tkáně je mezenchymální buněčná migrace, která se vyznačuje vřetenovitou (fibroblastům podobnou) morfologií buněk. Tato specifická polarizovaná morfologie je výsledkem působení adhezivních a kontraktilních sil vznikajících při pohybu, interakcí buňky s ECM a asymetrickou distribucí molekul podílejících se na těchto procesech (např. integrinů; Mueller and Chen, 1991) a případně chemotaxi. Mezenchymální pohyb v 3D ECM je podle (Friedl and Wolf, 2003) rozdělen do pěti fází: vychlípení membrány, tvorba adhezivních spojů, proteolytická aktivita, kontrakce cytoskeletu a rozvolnění adhezivních spojů (obrázek 2). Jednotlivé fáze jsou podrobněji vysvětleny v popisu obrázku 2.



Obrázek 2: Pět fází mezenchymálního pohybu v komplexní 3D ECM:

1) V první fázi dochází k tvorbě vychlípenin plazmatické membrány na přední straně buňky poháněné polymerací aktinu, jehož vznikající filamenta se sdružují do svazků v případě trubicovitých výběžků filopodií, nebo se spojují pomocí adaptorových proteinů do kříže v případě širokých ale plochých lamelipodií. Tyto struktury se rozšiřují směrem od buňky proti ECM; 2) V druhé fázi dochází k tvorbě vazeb buňky s ECM pomocí integrinů, které váží extracelulární složky ECM a intracelulárně interagují se stresovými vlákny aktinu přes adaptorové proteiny. Integriny se po vazbě na ECM shlukují a v přední části buňky vytvářejí fokální kontakty. Fokální kontakty, dozrávající ve fokální adheze jsou hlavním zdrojem adhezivních sil a díky variabilitě vazeb mezi množstvím jejich proteinových komponentů také důležitým zdrojem a přenašečem signálů pro buňku, 3) Následujícím krokem je extracelulární proteolytická aktivita kolokalizovaná s místy kontaktu buňka-ECM. Která je zapříčiněna jednak membránově vázanými, ale i solubilními MMPs; 4) Čtvrtá fáze zahrnuje kontrakci aktin-myozinového aparátu, zejména stresových vláken, ústící v pohyb celé buňky směrem k fokálním adhezím. Kontrakce je řízena Rho/ROCK a Cdc42/MRCK signálními dráhami; 5) Finální fází je rozvolnění fokálních kontaktů na zadní straně buňky (Obrázek převzat z: http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n5/box/nrc1075_BX1.html).

3.2. Améboidní pohyb

Améboidně migrující buňky využívají namísto stresových vláken procházejících buňkou kortikální aktin-myosinové sítě, která je s plazmatickou membránou spojena pomocí proteinů ezrinu, moezinu a radixinu. Kontraktilita této sítě, řízená Rho/ROCK signální dráhou, je základem pro deformaci buňky a její pohyb. Zároveň vytváří kortikální aktin-myosinový aparát dostatečnou sílu nejen pro přesun buňky do již existujících prostorů uvnitř ECM, ale i pro mechanickou remodelaci ECM. Améboidní buňky nevyužívají proteolytického štěpení ECM, exprimují pouze nízká množství integrinů a neformují fokální adheze. Na rozdíl od lamelipodií a filopodií nejsou sférické vychlípeniny membrány améboidně se pohybujících buněk, takzvané „bleby“, tvořeny polymerací aktinu, ale intracelulárním tlakem cytoplasmy a odpojením membrány od kortikálního cytoskeletu (Shrnuto v: Friedl and Wolf, 2003; Pankova et al., 2010).

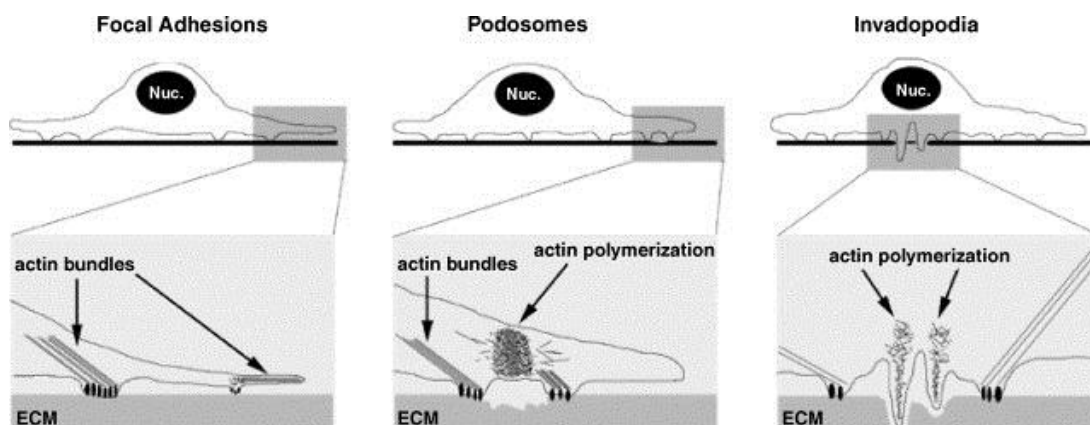
3.3. Mezenchymálně – améboidní přechod

Změna specifických regulačních drah, například Rho/ROCK, nebo inhibice některých efektorových proteinů, například Cdc42 efektorů N-WASP a PAK2, umožňuje přepnutí mezi oběma módy invazivity, takzvaně mezenchymálně-améboidní/améboidně-mezenchymální přechod. Tato změna, může být i reakcí na lokální složení ECM a působit tak jako důležitá

adaptace invadující rakovinné buňky na aktuální mikroprostředí (Shrnuto v: Friedl and Wolf, 2003; Pankova et al., 2010).

4. Struktury specifické pro invadující buňky

Invadující buňky vytvářejí v místech kontaktu s extracelulární matrix specifické membránové struktury. V této práci jsem se zaměřil pouze na struktury typické pro mezenchymálně migrující buňky. Jedná se o invadopodia, podosomy a fokální adheze (obrázek 3). Všechny tři typy struktur jsou bohaté na aktin, slouží jako interakční rozhraní a umožňují pohyb i přenos informací. Jsou velmi komplexní a vykazují mnoho společných, ale i rozdílných znaků (Shrnuto v: Linder et al., 2011). Pro účely této práce se budu dále podrobněji zabývat zejména fokálními adhezemi.



Obrázek 3: Zjednodušené schéma zobrazující rozdílnou stavbu adhezivních struktur, zejména odlišnou organizaci aktinu ve fokálních adhezích, podosomech a invadopodiích (Obrázek převzat z Gimona and Buccione, 2006)

4.1. Invadosomy

Podosomy a invadopodia jsou někdy souhrně zvané jako invadosomy a od dalších podobných struktur se odlišují kolokalizací místa aktivní polymerace aktinu s degradací ECM, jež jsou schopny díky lokálnímu působení proteáz. Podosomy a invadopodia však štěpí přilehlou ECM rozdílným způsobem, což je způsobeno jejich odlišnou stavbou, velikostí a dynamikou (Shrnuto v: Linder et al., 2011).

Pro tvorbu podosomů i invadopodií je důležitá extracelulární (parakrinní) stimulace buněk. Makrofágy odpovídají na přítomnost CSF-1 zvýšením počtu podosomů na svém

povrchu, zatímco v nepřítomnosti této látky tvoří jen velmi málo podosomů. Takto stimulované makrofágy mohou u některých typů rakovin usnadňovat migraci nádorových buněk. Formace invadopodií u rakovinných buněk může být přímo spouštěna působením EGF. Oba tyto cytokiny zvyšují migrační kapacitu zmiňovaných buněk, působí na migrující buňky jako chemoatraktans a můžou být využity v takzvaných „in vivo invasion assays“ ke sběru buněk, které vykazují schopnost invasivity (Yamaguchi et al., 2005; Yamaguchi et al., 2006).

4.1.1. Podosomy

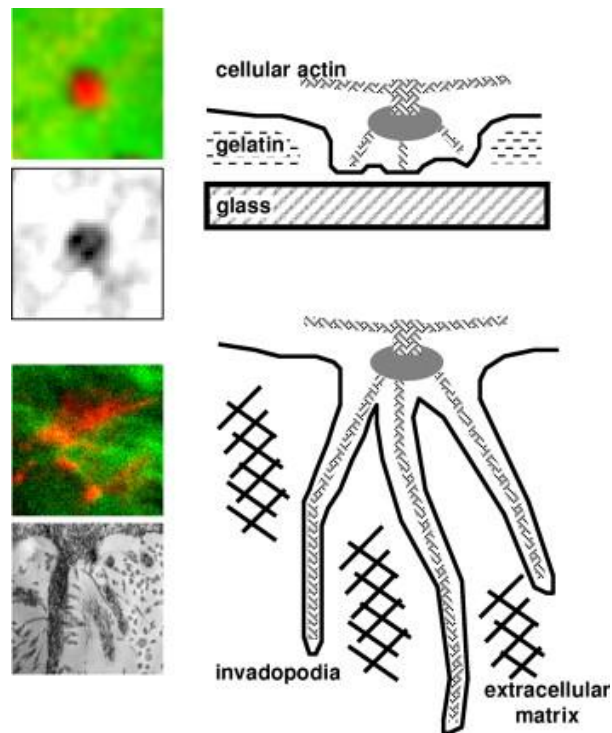
Podosomy jsou konstitutivně tvořeny například osteoklasty, buňkami hladké svaloviny a monocyty i za fyziologických podmínek. Mají soudkovitý tvar s přibližným průměrem 1 μm a výškou 0.4 μm . Skládají se z jádra tvořeného stresovými vlákny aktinu, okolního prstence obsahujícího adaptorové proteiny jako vinculin a talin a adhezní plochy obsahující integriny. Přítomnost integrinů a s nimi interagujících adaptorových proteinů ukazuje důležitost těchto organel pro buněčnou adhezi. Podosomy obsahují také proteiny spojené s regulací polymerace aktinu například gelsolin, komplex Arp2/3, fimbrin a N-WASP, čímž se mimo jiné liší od fokálních adhezí. Jimi zprostředkovaná lyze ECM je pouze pericelulární avšak díky jejich vysoké dynamice se týká větší plochy přiléhající k buněčné membráně (Shrnuto v: Buccione et al., 2004; Linder et al., 2011).

4.1.2. Invadopodia

Na rozdíl od podosomů jsou invadopodia stálější povahy a formována převážně rakovinnými buňkami. Jimi zprostředkovaná degradace ECM, je přímo úměrná míře invasivity nádorových buněk (Kelly et al., 1998). Tato degradace je spíše soustředěná a narušuje extracelulární prostředí do větší hloubky, díky přibližným rozměrům 8 μm v průměru a 5 μm na délku. Vychlípená membrána invadopodií je stabilizována paralelně uspořádanými svazky mikrofilament, přičemž na bázi se objevuje síťovina rozvětvených vláken, které trčí směrem do buňky. Stejně jako podosomy obsahují invadopodia proteiny účastníci se organizace aktinu (Shrnuto v: Buccione et al., 2004; Linder et al., 2011).

Stejně jako předchozí popis, vychází množství dalších modelů invadopodií a podosomů ze studií buněk vysazených na ploché substráty. Buňky jsou vysazeny na sklíčko pokryté pouze tenkou vrstvou substrátu, který se často liší i složením od in vivo situace, což sice usnadňuje následnou manipulaci, ale může ovlivnit výsledky. Stavba invadopodia pozorovaného v komplexním 3D prostředí bezbuněčné dermis získané z kůže prasat, jejíž složení má být bližší in vivo situaci, se od těchto pozorování liší (Obrázek 4). Základem

invadopodia je široká base, jež vykazuje degradaci přilehlé matrix a ze které do extracelulárního prostředí vystupuje několik tenkých vláken. Autoři této studie také zjistili, že tenká vlákna na rozdíl od baze neobsahují fosfo-kortaktin a fosfo-paxilin, proteiny účastnící se organizace aktinu a přenosu signálu (Tolde et al., 2010).



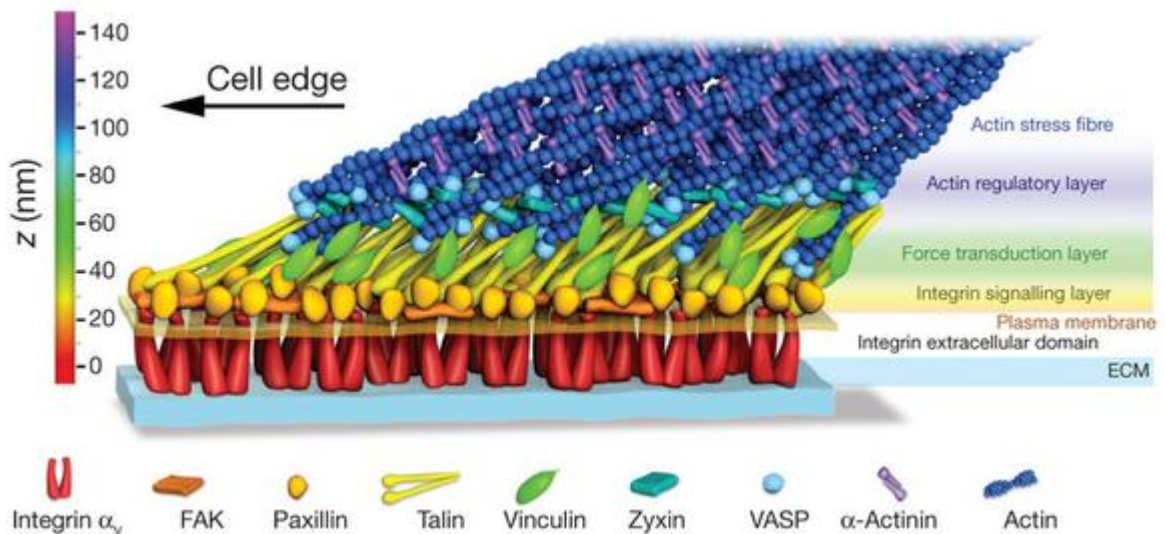
Obrázek 4: Schematicky znázorněný rozdíl ve stavbě invadopodia pozorovaného na 2D povrchu (nahore) a 3D povrchu (dole; Obrázek přejat z: Tolde et al., 2010)

4.2. Fokální adheze

Fokální adheze (FA) jsou ploché, podlouhlé útvary tvořené submembránovými proteinovými komplexy, které spojují svazky stresových aktinových filament s extracelulárním prostředím. Struktury fokálních adhezí jsou hlavním zdrojem adhezivních sil a důležitým přenašečem biochemických signálů z vnějšího prostředí pro mezenchymálně se pohybující buňku. Jejich základem jsou klastry transmembránových proteinů integrinů, jež se velkou extracelulární receptorovou doménou váží ke složkám ECM a svou intracelulární doménou interagují s množstvím plakových proteinů. Tyto proteiny mají různorodé funkce jako například signalizaci a regulaci buněčných pochodů, mechanické spojení s cytoskeletem a jeho organizaci a zároveň řídí vývoj samotných FA. Na rozdíl od invadosomů nezprostředkovávají FA proteolytickou degradaci ECM a nevyužívají proteinový komplex Arp2/3 a jím kontrolovanou polymeraci aktinu (Shrnuto v: Geiger et al., 2001; Gimona and Buccione, 2006).

4.2.1. Architektura fokálních adhezí

Mezi stresovými vlákny aktinu, která v FA končí a umožňují buněčný pohyb, a cytoplasmatickou doménou integrinů je zřetelná přibližně 40nm mezera. Ta tvoří prostor pro organizované jádro FA, které je tvořeno částečně se překrývajícími vrstvami dalších funkčních komponent. Jednotlivé vertikální vrstvy proteinů dokazují existenci tří rozdílných funkčních kompartmentů (obrázek 5). Membráně nejbliže se nachází signální kompartment, který reprezentují proteiny kináza asociovaná s fokálními adhezemi (FAK) a paxillin. Střední vrstvu přenášející sílu mezi integrin-ECM spojením reprezentují talin a vinculin. Talin, jehož molekuly jsou polarizované a organizované diagonálně (N-terminální head doména k membráně), pravděpodobně přímo spojuje integrin s aktinem. Rozmístění vinculinu ukazuje na jeho roli v zesílení integrin-talin-aktin interakce. V další vrstvě, aktin – regulační, jsou společně lokalizovány vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP), zyxin a konce stresových filament. α -aktinin se nenachází přímo v jádře FA, ale je hojně přítomen v oblasti aktinových filament (Kanchanawong et al., 2010).



Obrázek 5: rozdělení proteinových komponent FA do 3 funkčních kompartmentů: (Obrázek převzat z: Kanchanawong et al., 2010 a oříznut)

5. Proteiny fokálních adhezí

Ve zbytku práce se budu věnovat známým 3D strukturám vybraných proteinů FA a vlivu struktury na funkci invazivních struktur.

5.1. Integriny

Integriny jsou $\alpha\beta$ heterodimerické transmembránové receptory, které vytvářejí spojení buňky s ECM. Savci disponují 24 různými heterodimery integrinů, které jsou tvořeny kombinacemi 18 α a 8 β podjednotek. Každý typ integrinu se vyznačuje odlišnou specifitou a v organismu nezastupitelnou funkcí (Shrnuto v: Hynes, 2002). Podjednotky integrinu prostupují membránu pouze jednou, přičemž většina molekuly je lokalizovaná extracelulárně. Většina integrinů je exprimována na buněčný povrch v neaktivním, ohnutém stavu. Pro využití plného vazebného potenciálu integrinu je nutná jeho aktivace, přechod do prodloužené konformace. Aktivace integrinů vede ke spuštění řady signálních drah a významně ovlivňuje regulaci zásadních buněčných pochodů. K této aktivaci může dojít jak z intracelulárního (oddělením cytosolických domén α a β podjednotek), tak extracelulárního prostředí (vazbou ligandu; Shrnuto v: Hynes, 2002).

Tato obousměrná signalizace je doprovázena alosterickým přenosem konformační informace přes celou délku integrinové molekuly. Vazba ligandu a následná změna konformace extracelulárních domén, jejich napřímění a oddělení vede k oddálení intracelulárních domén α a β podjednotek. Naopak, oddálení intracelulárních domén, například díky vazbě talinu, vede k napřímění extracelulárních domén a k přechodu do vysokoafinitní konformace (Kim et al., 2003).

5.2. Paxillin

Lidský paxillin je přibližně 68 kDa adaptorový protein skládající se z 559 AK typický pro FA. Jeho přítomnost ve FA je nezbytná pro jejich zformování a správnou funkci. 3D struktura celé molekuly není známá, ale analýzou sekvence a struktury některých oblastí bylo identifikováno několik motivů, které umožňují interakce s jinými proteiny FA a lokalizaci paxillinu do FA (Shrnuto v: Deakin and Turner, 2008). N – terminální konec paxillinu obsahuje 5 LD motivů (13 AK úsek bohatý na leucin a kyselinu asparagovou), které jsou zodpovědné za vazbu FAK a vinculinu. C-terminální konec obsahuje 4 LIM domény (dvojitě zinc-finger motivy), které jsou zodpovědné za lokalizaci do FA. Zejména cílené mutace v LIM3 doméně, které destabilizují její strukturu, ruší lokalizaci paxillinu ve FA. Podobný, ale méně výrazný efekt mají mutace v LIM2 doméně (Brown et al., 1996). Jedinou částí

proteinu, jejíž 3D struktura je známá jsou LD motivy v interakci s vazebnými partnery, například LD2 a LD4 s FAK. (Hoellerer et al., 2003). Této konkrétní interakci se budu věnovat v kapitole o FAK.

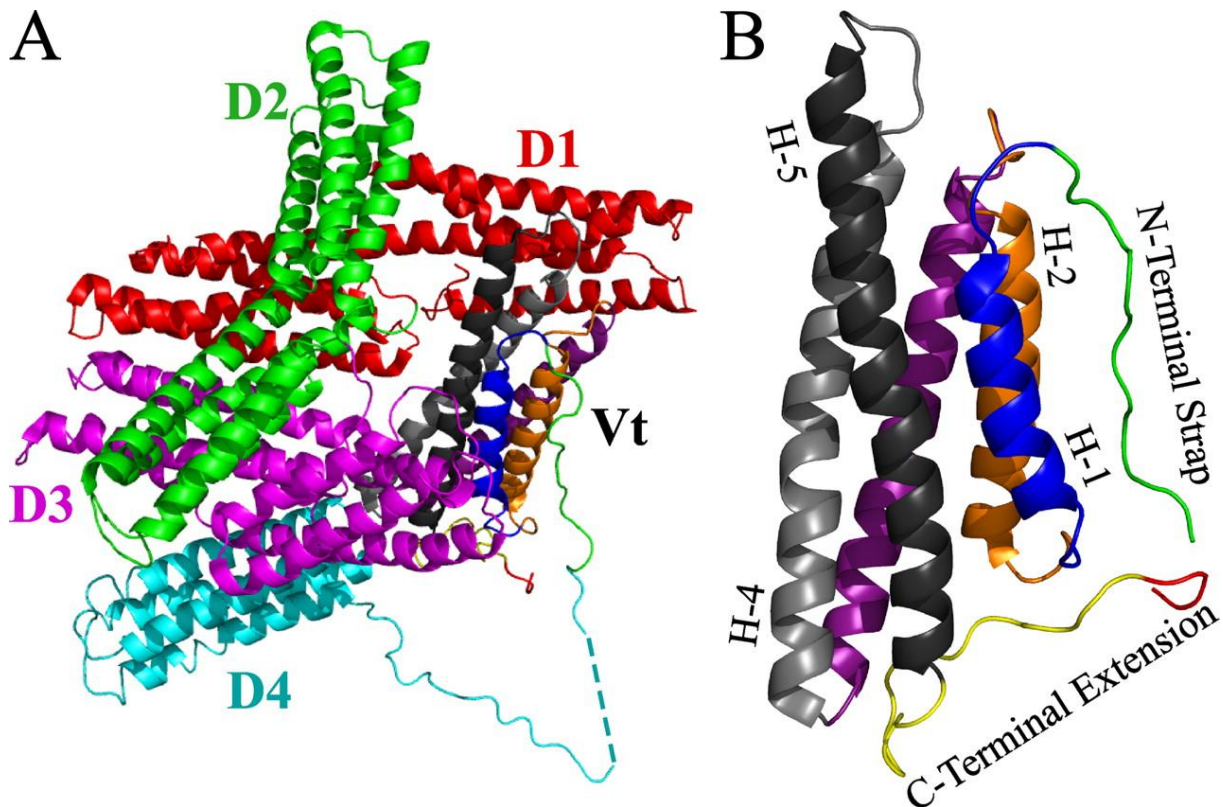
Ukázalo se, že na stabilitu a zrání FA má vliv také stav paxilinu. Konkrétně se jedná o to, zda je v dané FA paxilin fosforylovaný, nebo nefosforylovaný na Tyr zbytcích Tyr 31 a Tyr 118. Nefosforylovatelné mutanty paxilinu (T31F, T118F) indukují maturaci a tlumí obrat ostatních strukturních komponent FA. Příčinou tohoto efektu se zdá být snížená schopnost nefosforylovaného paxilinu interagovat s FAK. Oba proteiny společně vytváří komplexy v místě tvořících se FA, přičemž lokalizace této interakce je závislá právě na výskytu fosforylovaného paxilinu. Paxilin sám nevykazuje v cytosolu žádnou afinitu k FAK, stejně tak jako nefosforylovatelné mutanty. Naproti tomu protein nesoucí mutace F31E a F118E, imitující fosforylaci, vytváří komplexy s FAK již v cytosolu. Paxilin se tedy v cytosolu vyskytuje pravděpodobně v nefosforylovaném stavu a schopnost vázat FAK získává až v místě tvorby FA, tato schopnost zde může být umocněna právě fosforylací. Regulace množství vznikajících signalizačních komplexů paxilin–FAK má významný vliv na výslednou dynamiku FA (Choi et al., 2011).

5.3. Talin a vinculin

Proteiny talin a vinculin tvoří mechanické spojení integrinů s aktinovými vlákny a pravděpodobně i nejvýrazněji regulují přenos síly mezi cytoskeletem a FA (Hu et al., 2007).

Kuřecí vinculin je protein skládající se z 1066 aminokyselin. Struktura tohoto proteinu je označovaná jako „bundle of bundles“ a skládá se ze sedmi four-helix bundle a jednoho five-helix bundle motivu. Přibližné rozměry proteinu jsou 100 x 100 x 50 Å. Jednotlivé motivy jsou organizovány do čtyř párů, z nichž tři (D1 - D3) tvoří head doménu a poněkud odlišný čtvrtý pár (D4) tvoří neck oblast a zároveň tail doménu. D4 je tvořen jedním four-helix bundle motivem, jedním five-helix bundle motivem (tail doména) a na prolin bohatou inzercí mezi nimi. Motiv v párech D1, D2 a D4 jsou navzájem orientovány sériově, na rozdíl od páru D3, jehož čtyřšroubovice interagují podélně. Vinculin je v cytosolu přítomen v autoinhibovaném stavu, kdy páry D1 a D3 tvoří jakési kleště, které svírají tail doménu (obrázek 6). V tomto stavu blokuje tail doména vazebná místa pro talin a α -katenin na head doméně a pro VASP a vinexin v prolin bohaté oblasti. K přechodu do aktivního stavu, kdy se přeruší interakce mezi tail a head doménou ohybem v neck oblasti a umožní se tak interakce s dalšími proteiny, může dojít podle autorů dvěma způsoby. Prvním je vazba fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP2), druhým vazba F-aktinu na tail doménu - v obou

případech musí být ale k dispozici některý z ligandů vážících head doménu, aby se aktivní konformace stabilizovala a nebyla pouze přechodná. Odlišná vazebná místa jsou totiž konformačně propojena a aktivační potenciál jednotlivých ligandů se sčítá, pouze pokud tento potenciál překročí energii intramolekulární vazby, dojde k aktivaci vinculinu (Bakolitsa et al., 2004).



Obrázek 6: A) Stuhkové znázornění struktury autoinhibovaného vinculinu – head doména (D1, D2, D3 a D4) svírá tail doménu (Vt) B) Struktura tail doména vinculinu (Obrázek převzat z: Palmer et al., 2009)

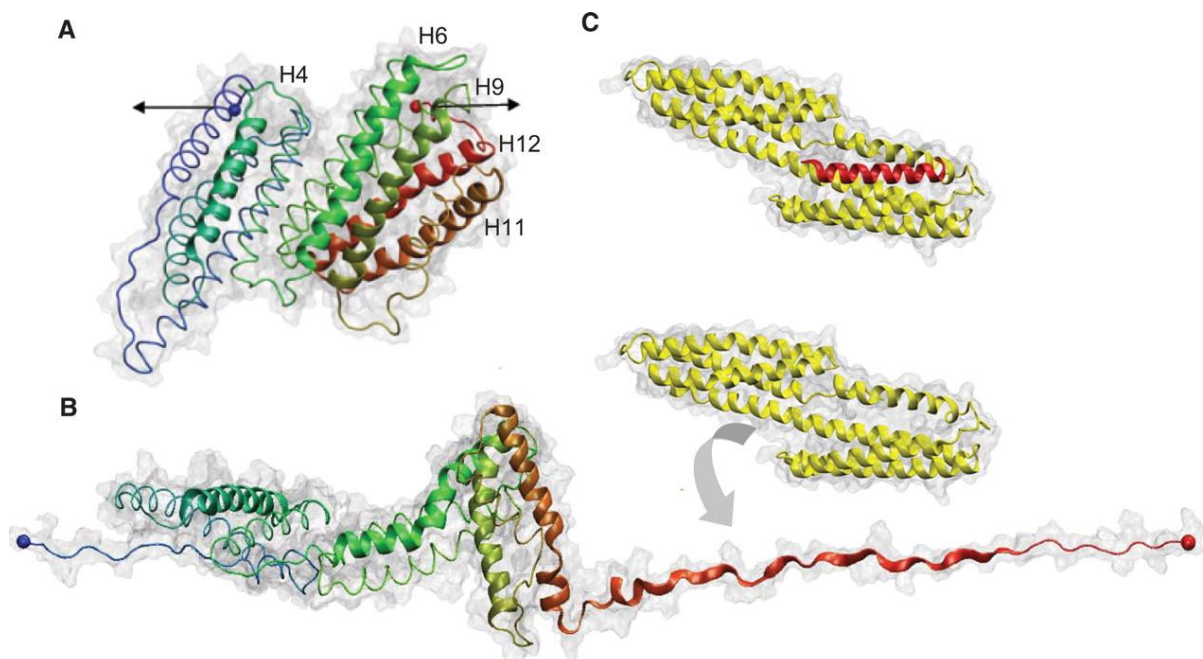
Mezi integriny, které jsou pevně vázány k ECM, a cytoskeletem, který při kontrakcích generuje tah, dochází k jistému prokluzování. To je pravděpodobně způsobeno přechodností interakcí mezi jednotlivými proteiny. Síla generovaná cytoskeletem je v rámci komponentů FA přenášena nejednotvárně - čím těsnější je vazba proteinu na F-aktin, tím lépe se na něj síla přenáší a opačně. Místem největších změn v přenosu síly při buněčném pohybu je právě vazba vinculin-talin-aktin, která má vliv i na stabilizaci FA-ECM spojení v závislosti na velikosti mechanického tahu (Hu et al., 2007).

Vliv působení mechanického tahu na buněčné spoje s ECM zprostředkované integriny a jejich vývoj byl zjištěn již dříve. Zrání prvotních integrinových kontaktních s ECM ve fokální komplexu, vývojové stádium předcházející FA, je indukovatelné aplikací síly na tyto spoje.

Přičemž fokální komplexy a FA se od prvotních kontaktů liší nejen velikostí, ale i molekulárním složením – například přítomností vinculinu. Velikost tahu aplikovaného na tato spojení také s množstvím vinculinu v místě adheze pozitivně koreluje. Schopnost místně specificky regulovat složení spojů s ECM a tím i pevnost adheze v závislosti na tom, jak velkou trakční sílu je extracelulární prostředí schopno podpořit, je velmi důležitá pro orientaci migrující buňky (Galbraith et al., 2002).

Ačkoliv je možné, že vinculin není jedinou molekulou zodpovědnou za zesílení spojení integrin-talin-aktin, rozhodně je pro stabilizaci a růst vznikajících fokálních adhezí nepostradatelný. Právě ve vznikajících adhezích je na vinculin aplikována největší síla a naopak, v rozpadajících se fokálních adhezích vinculin přenáší sílu nejmenší. Průměrná síla tahu, který je vinculinem přenášen ve stabilních FA byla pomocí biosenzoru stanovena přibližně na 2,5 pN (Grashoff et al., 2010).

Molekulární podstata konverze mechanického signálu na signál biochemický v FA byla objevena v interakčních možnostech právě proteinů talinu a vinculinu. Počet vazebných míst pro vinculin na rod domény talinu se zvyšuje, pokud je molekula talinu vystavena mechanickému natahování. Natažení molekuly proteinu totiž vede ke konformačním změnám v její struktuře a odhalení kryptických vazebných míst pro vinculin, například na helixu 12 (obrázek 7). Talin tedy působí jako mechanosenzor uvnitř FA a jeho aktivace vede k hromadění vinculinu, který může v daném místě interagovat s dalšími vazebnými partnery a tím zesilovat biochemický signál, nebo posilovat vazbu talin-aktin (del Rio et al., 2009).



Obrázek 7: A) Struktura rod domény talinu (five-helix bundle motiv následovaný seven-helix bundle motivem), zvýrazněné helixy umožňují interakci s vinculinem, šipky znázorňují směr působení síly; B) Aplikace síly způsobuje natažení rod domény, vystavuje helix 12 (červeně) k interakci s head doménou vinculinu (žlutě); C) Struktura komplexu head domény vinculinu a helixu 12 rod domény talinu (Obrázek převzat z: del Rio et al., 2009)

Fibroblasty neexprimující vinculin vykazují rozdílný fenotyp a větší schopnost uzavírat rány, což je způsobeno rozdílnou dynamikou FA. FA bez vinculinu jsou méně početné, menší a vykazují rychlejší obrat komponent. Jsou vytvářeny rychleji, ale zároveň rychleji degradovány, vykazují zvýšený retrográdní posun. Z těchto pozorování je zřejmé, že vinculin má důležitou roli jako stabilizátor FA, tím také jako negativní regulátor buněčné migrace. Vinculin sám je však při regulaci obratu komponent FA závislý na interakcích s jinými komponenty, například PIP2. Vnesením vektoru pro produkci vinculinu s deletovaným C-terminálním ramenem (zbytky 1053 – 1066, část proteinu odpovídající za vazbu PIP2) do buněk neexprimujících vinculin, byl prokázán vliv tohoto fosfolipidu na výslednou dynamiku FA. Zvýšená schopnost transformovaných fibroblastů uzavírat rány byla sice potlačena, ale původní fenotyp buněk obnoven nebyl, protože FA byly příliš stabilní (Saunders et al., 2006).

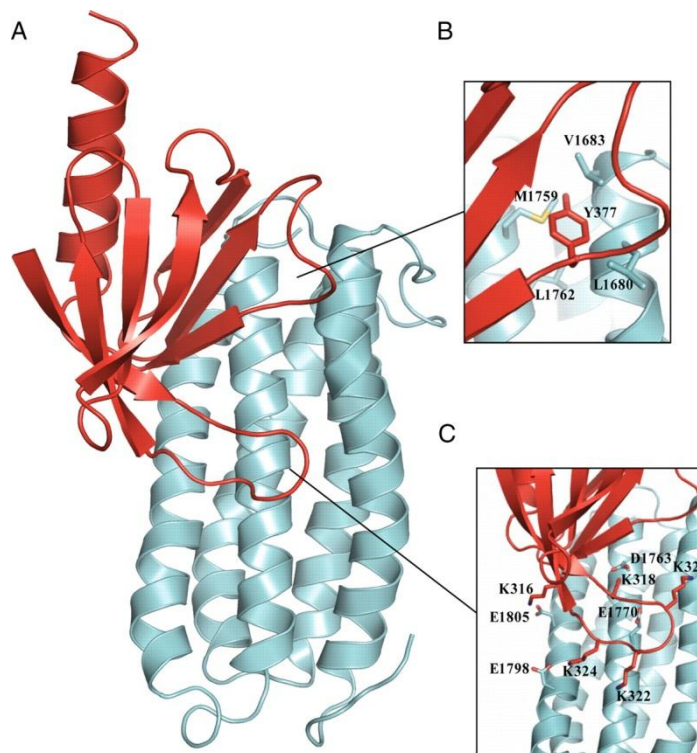
Tento závěr potvrzuje i další studie, v níž prokázal vinculin jasnou preferenci pro vazbu PIP2 oproti jiným fosfolipidům při ko-sedimentační analýze s membránovými váčky smíšeného složení. Autoři také potvrdili, že odstranění C-terminálního ramena vinculinu vede ke zhroucení terciární struktury tail domény, přestože její sekundární struktura zůstává téměř totožná. Zhroucení terciální struktury je zapříčiněné přerušением interakcí mezi Trp 1058, Leu 1056 a Trp 912 a následným rozpadem hydrofobního jádra five-helix bundle motivu. Ztráta afinity k PIP2 po delecí aminokyselin (AK) z C konce proteinu je zapříčiněna spíše touto změnou struktury molekuly, nikoliv chybějící hydrofobní vlásenkou (Thr 1062, Pro 1063, Trp 1064, Tyr 1065, Gln 1066), která by mohla být považována za místo interakcí s membránou. Studie tail domény různě mutované na N-konci ukázaly zvyšující se afinitu proteinu k PIP2 po rozvolnění interakce N-konce s helixy 1 a 2 a C-koncovými AK. Krátké (5 AK) delecce a bodové mutace na N-konci zároveň nezpůsobují změny v terciální struktuře (Palmer et al., 2009).

I aktivace talinu a tím i jeho schopnost sdružovat integriny do klastrů je závislá na vazbě ligandu. Na head doméně talinu (která se skládá z F0, F1, F2 a F3 FERM subdomén) byla identifikována bazická místa s afinitou pro PIP2, v F2 a F3 subdoménách. Vazba PIP2

molekul na tato místa se ukázala být významná pro regulaci autoinhibiční interakce head a rod domény talinu. Zejména vazba PIP2 na F2 subdoménu talinu pozitivně koreluje s jeho aktivitou. Zajímavým zjištěním je také kritický význam interakce Glu 726 na cytosolické doméně $\beta 3$ integrinu a Lys 316 na F3 subdoméně talinu pro vzájemnou vazbu těchto proteinů a tím i stabilitu FA. Autoři také navrhuji, že vazba head domény talinu na cytoplazmatickou oblast β integrinu stericly brání jeho reasociaci s α doménou a tím udržuje integrin v aktivovaném stavu (Saltel et al., 2009).

Mechanismus regulace talinu je založen na vlastnostech jeho molekulární struktury a rozložení vazebných míst na head doméně. Jak bylo zmíněno dříve, vazba rod domény na head doménu inhibuje její integrin aktivační funkci. Vazebné místo pro rod doménu se z velké části překrývá s tím pro integrin, v autoinhibované konformaci je tedy interakci s integrinem stericly bráněno. Vazba rod domény na F3 je však kompetitivně inhibována vazbou PIP2 na F2, která zároveň nebrání vazbě integrinu na F3 a indukuje tak konformační aktivaci talinu. (Goksoy et al., 2008)

Vazbu rod domény talinu na F3 FERM subdoménu (část head domény) zprostředkovává five-bundle helix (AK 1655 – 1822; obrázek 8). Vazby se účastní helix 4 a C-konec helixu 1 tohoto motivu. Jako zásadní byly pro vazbu identifikovány AK tvořící hydrofobní kapsu Leu 1680, Val 1683 a Met 1759, interagující s Tyr 377 na F3, a skupina kladně nabitých AK Asp 1763, Glu 1770, Glu 1798 a Glu 1805, které interagují s Lys 316, 318, 320, 322 a 324 aktivační smyčky F3. Autoři také potvrzují výše zmíněný překryv vazebných míst na F3 (Goult et al., 2009).



Obrázek 8: A) Struktura komplexu F3 FERM subdomény (červeně) s five-helix bundle motivem rod domény talinu (modře; zbytky 1655 – 1822); B a C) Detaily interakce obou domén (obrázek převzat z: Goult et al., 2009)

Struktura FERM domény v head oblasti talinu je atypická přibližně 30 AK inzertem v F1 a jejím spojením s F0 subdoménou. F0 i F1 obsahují skroucený 5-ti vláknový β -list a krátkou helikální obrátku, podobně jako protein ubiquitin. Obě subdomény jsou k sobě připoutány povrchovými náboji. Inzert v F1 je situován mezi β 3 a β 4 a je součástí 35 AK dynamické smyčky, která má schopnost při kontaktu kladně nabitých Lys 146, Arg 149, Lys 153, Arg 156, Lys 157 a Lys 164 se záporně nabitými lipidy utvořit α -helikální strukturu. Interakce tohoto helixu s membránou pravděpodobně přispívá ke správné orientaci head domény talinu při aktivaci integrinů. Přítomnost fosforylovatelných zbytků Tyr 144 a 150 v oblasti smyčky/ přechodného helixu, jejichž nahrazení záporně nabitým Glu částečně omezí aktivitu talinu, naznačuje existenci dalšího regulačního mechanismu (Goult et al., 2010).

Strukturní studie C-terminální domény talinu ukázala, že obsahuje aktin vazebné místo na povrchu helixů 3 a 4 ve five-helix bundle motivu, který tvoří jádro této domény. Vazebné místo je charakterizované přítomností skupiny hydrofobních AK zbytků, obklopených kladně nabitými skupinami, nejvýznamnějšími zbytky jsou pravděpodobně Gln 2388, Gln 2437, Lys 2443, Val 2444, Lys 2445. Vazebnému místu protilehlý helix 1 zeslabuje afinitu k aktinu. Na five-helix bundle motiv navazuje C-terminální dimerizační helix, který naopak zvyšuje afinitu

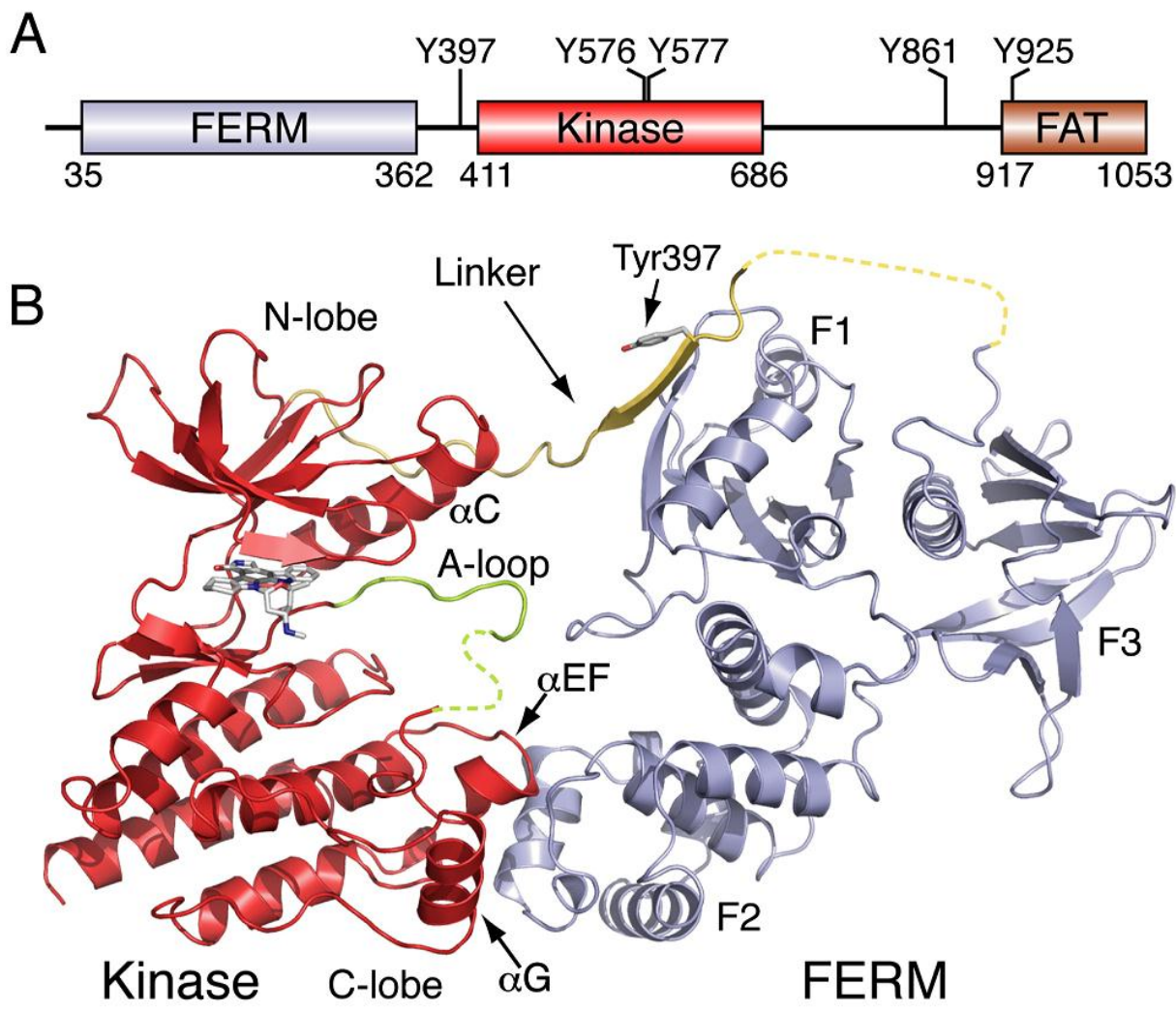
k aktinu a to nejen antiparalelní dimerizací těchto domén, ale pravděpodobně i pomocí elektrostatické interakce. Dimer C-terminální domény se váže po straně na F-aktinové vlákno a to asymetricky přes 3 monomery (Gingras et al., 2008).

5.4. Kináza asociovaná s fokálními adhezemi (FAK)

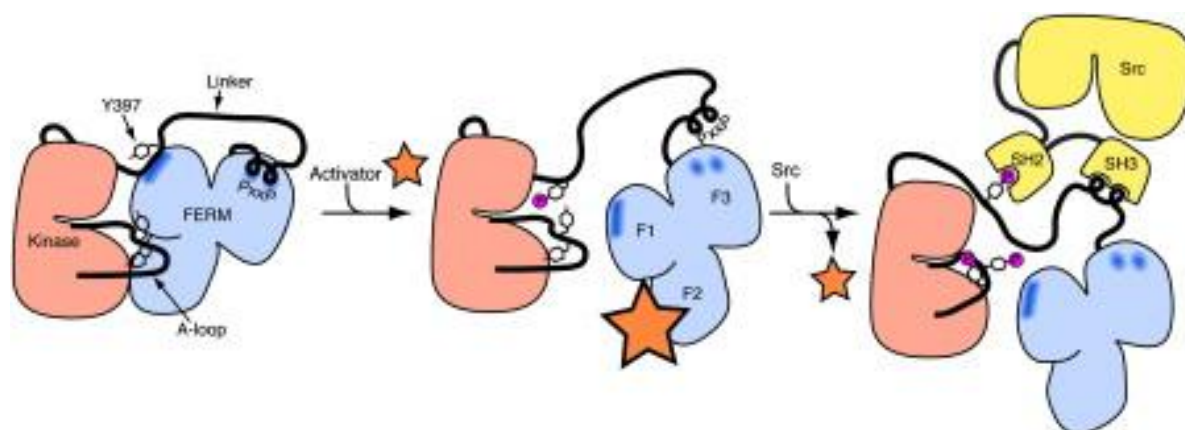
Kináza asociovaná s FA, nereceptorová protein-tyrozin kináza, je důležitým signálním proteinem buněčných adhezí, jež je zapojen v regulaci buněčné motility. Zvýšená exprese tohoto proteinu koreluje s mírou invasivity buněk. Ukázalo se, že zvyšování množství FAK mRNA v buňkách nádorů je jednou z mnoha změn, která vede k tomu, že tyto buňky získávají invasivní potenciál (Weiner et al., 1993).

Nejen že v buňkách metastazujících nádorů prostaty byla zjištěna zvýšená exprese FAK na mRNA i proteinové úrovni, ale oproti buňkám nenádorovým a dokonce i buňkám benigních nádorů se prokázala i její významně zvýšená aktivita. Zvýšená aktivita je charakteristická fosforylací na Tyr 397, Tyr 576 a Tyr 577 (Lietha et al., 2007) a asociací s paxilinem a p50CSK kinázou v signalizačních komplexech. Vzhledem k interakcím s intergriny a ostatními proteiny FA, je pravděpodobně aktivita tohoto komplexu zodpovědná za změny ve složení adhezních struktur invasivních buněk (Tremblay et al., 1996).

Struktura inaktivované FAK ukazuje rozsáhlé interakce její FERM domény, spojujícího úseku (linker) a kinázové domény udržující autoinhibovaný stav několika způsoby (obrázek 9). Dochází k významnému kontaktu mezi F2 lalokem FERM a C lalokem kinázové domény, přičemž celková blízkost obou domén stéricky blokuje přístup do zářezu s aktivním místem kinázy. Kontakt F1 laloku FERM a spojujícího úseku se podílí na inhibici zahrnutím autofosforylačního místa Tyr 397 do antiparalelní β struktury a udržováním jeho polohy 35 Å od aktivního místa enzymu. Zároveň dochází k izolaci Src fosforylačních míst Tyr 576 a Tyr 577 na aktivační smyčce enzymu a jejímu udržování v inaktivní, defosforylované, konformaci vložením mezi FERM a katalytickou doménu (rozložení domén a fosforylačních míst je znázorněno na obrázku 9a). Sekvenční model aktivace byl navržen na základě porovnání inhibované a aktivní struktury proteinu a počítá s následujícími událostmi: přesun FERM domény (indukovaný kompetitivní vazbou aktivačního proteinu na F2 lalok); autofosforylací na Tyr 397 a následné vystavení Src vazebného místa na spojovacím úseku; vazbu Src, jež fosforyluje Tyr 576 a Tyr 577 a tím plně aktivuje enzymatickou aktivitu FAK, která neodezní ani po jeho disociaci (obrázek 10; Lietha et al., 2007).



Obrázek 9: A) Rozložení domén proteinu FAK se znázorněnými fosforylačními místy; B) Stučkový model struktury kinázové domény (červeně) a FERM domény (modře) v autoinhibovaném stavu (obrázek převzat z: Lietha et al., 2007 a oříznut)



Obrázek 10: Znázornění sekvenčního modelu aktivace FAK (Obrázek převzat z: Lietha et al., 2007)

Použití „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) biosenzorů poprvé prokázalo, že aktivace FAK je i v in vivo podmínkách doprovázena konformační změnou (oddálení FERM a kinázové domény), což je v souladu z výše zmiňovaným modelem. Autoři také odhalili závislost změny konformace na přítomnosti PIP2, který se váže na bazickou oblast v F2 FRET domény. Tato metoda navíc podala důkaz o tom, že FAK je přítomna v aktivním stavu pouze v místě FA, přičemž distribuce její aktivity není stejná ve všech FA v buňce. Nejvyšší aktivitu vykazovaly FA v přední části polarizovaných buněk (Cai et al., 2008).

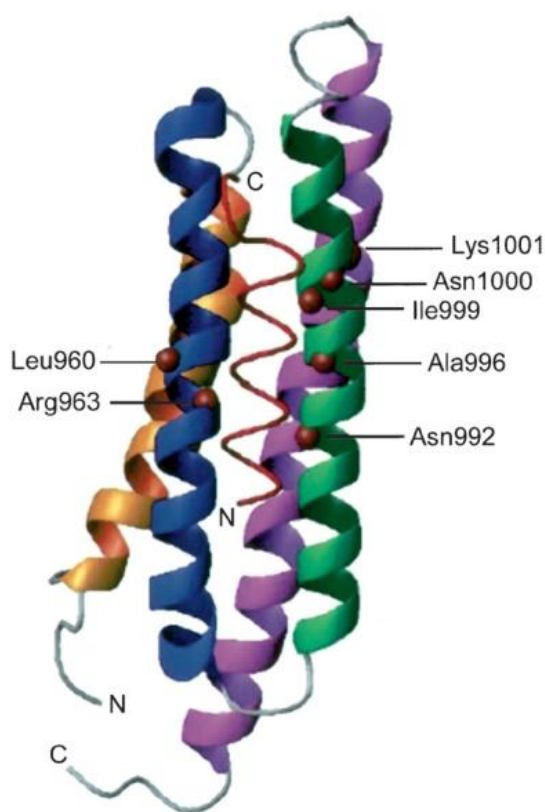
Na prolin bohatá oblast FAK (úsek spojující N-konec FAT doménu s kinázovou doménou proteinu) slouží také jako specifické vazebné místo pro SH3 doménu adaptorového proteinu p130Cas. Přestože tento úsek obsahuje dvě potencionální SH3 vazebná sekvence (P⁷¹²PKPSRPGYPSP, P⁸⁷⁴PKKPPRPGAP), jako primární vazebné místo byla označena sekvence blízká katalytické doméně, konkrétně konsensus vazebný motiv SH3 domén třídy II P⁷¹²PKPSR. Kolokalizace obou proteinů byla potvrzena in vivo. Přítomnost několika různých vazebných míst na FAK naznačuje, že není pouze důležitým signál-přenášejícím proteinem, ale že může sloužit i jako lešení pro sestavování proteinových a signalizačních komplexů FA (Harte et al., 1996).

5.4.1. Focal adhesion targeting domain (FAT)

Focal adhesion targeting domain (FAT) je C-terminální doménou FAK. Její struktura je tvořena top-down four-helix bundle motivem s krátkými smyčkami spojujícími převážně paralelní helixy. Hydrofobní jádro je utvářeno Leu zbytky a metioninovým zipem (Met 938, Met 953, Met 1001, Met 1020). Helixy 1 a 4 jsou spojeny interakcemi Arg 919 a Asp 1039, Asp 922 – Arg 1042 a hydrofobní interakcí Leu 917 s hydrofobní kapsou helixu 4. Přestože je helix 1 poměrně pevně spojen s hydrofobním jádrem, úspěšná fosforylace Tyr 925 a následná vazba SH2 domény proteinu Grb2 vyžaduje energeticky nevýhodnou změnu konformace FAT, spočívající právě ve změně pozice helixu 1 vůči zbytku motivu. Sekvenční alignment odhalil podobnost FAT a C-terminálních domén proteinů vinculinu, α -catenin, CAS, HEF1 a Efs/Sin s nejlépe konzervovanými oblastmi odpovídajícími FAT helixům 2 a 3. Vysoká sekvenční homologie napovídá o pravděpodobně podobné úloze C-terminálních domén těchto proteinů a to v jejich lokalizaci do FA a tamní interakci s dalšími proteiny, například paxillinem (Arold et al., 2002).

FAT doména obsahuje dvě odlišná vazebná místa pro paxillin, respektive pro jeho LD2 a LD4 motivy (na leucin bohaté motivy LDXLLXXL; Hayashi et al., 2002). Při interakci

FAT – paxillin se oba tyto motivy ve formě amfipatických α -helixů váží paralelně na opačné strany FAT four-helix bundle a to C koncem směrem k intradoméno­vým smyčkám. Podle autorů je současná vazba LD2 i LD4 na FAT nezbytná pro dostatečnou stabilizaci FAK – paxillin komplexu. Fragment LD2 vykazuje vyšší afinitu pro první z vazebných míst („LD2 vazebné místo“; hydrofobní zářez na rozhraní helixů 1 a 4), přičemž je schopný se s nízkou afinitou vázat i na druhé vazebné místo. Naproti tomu, fragment LD4 se specificky a s vysokou afinitou váže na druhé vazebné místo (LD4 vazebné místo - hydrofobní zářez rozhraní helixů 3 a 4; obrázek 11), zároveň tento peptid po vazbě na FAT přijímá α -helikální konformaci (Bertolucci et al., 2005).



Obrázek 11: Struktura komplexu FAT domény FAK (helix 1 žlutě, helix 2 modře, helix 3 zeleně, helix 4 fialově s LD4 peptidem paxillinu (červeně), zbytky FAT domény důležité pro interakci jsou zvýrazněny (obrázek převzat z: Bertolucci et al., 2005 a oříznut)

Rozdíly v afinitě obou LD motivů k jednotlivým vazebným místům na FAT popsané výše jsou však částečně v rozporu se starší strukturální studií, která se zabývala molekulární architekturou spojení LD2 a LD4 s FAT. Její autoři totiž tvrdí, že afinity obou vazebných míst k oběma peptidům jsou srovnatelné. Avšak nízké rozlišení jejich krystalové struktury rozhraní LD4 a druhého LD vazebného místa (FAT helixy 2 a 3) nedovolilo přímé určení

orientace polypeptidového řetězce v tomto vazebném místě. Detaily byly odvozeny na základě podobnosti obou vazebných míst, což mohlo vést k chybnému závěru. Autorům se však podařilo určit důležité strukturní rysy obou LD vazebných míst. Zjistili, že se jedná o hydrofobní zářezy na rozhraní helixů 1 a 4, 2 a 3; které jsou ohraničeny kladně nabitými zbytky AK. Navrhli také možnost, že vazba LD motivu na FAT znesnadňuje vazbu Grb2 SH2 domény a tím ovlivňuje signalizaci FAK. Vazba LD motivů na FAT totiž stabilizuje její konformaci, znesnadňuje tak změnu pozice helixu 1 a částečně stíní Tyr 925 (Hoellerer et al., 2003).

Stabilizace struktury FAT domény vazbou paxillinu byla potvrzena i na mechanické úrovni. FAT je v komplexu s paxilinem schopná odolávat rozrušení terciální struktury indukovanému působením větší síly, než bez navázaného paxillinu (85pN oproti 75pN) (Mofrad et al., 2004). Pro to aby paxillin rozpoznal a vázal se na FAT je nutná její strukturní integrita, zejména úplnost hydrofobní oblasti helixů 2 a 3. Je zajímavé, že právě tato oblast je během rozvolňování four-helix bundle motivu zachovávána intaktní nejdéle (Mofrad et al., 2004).

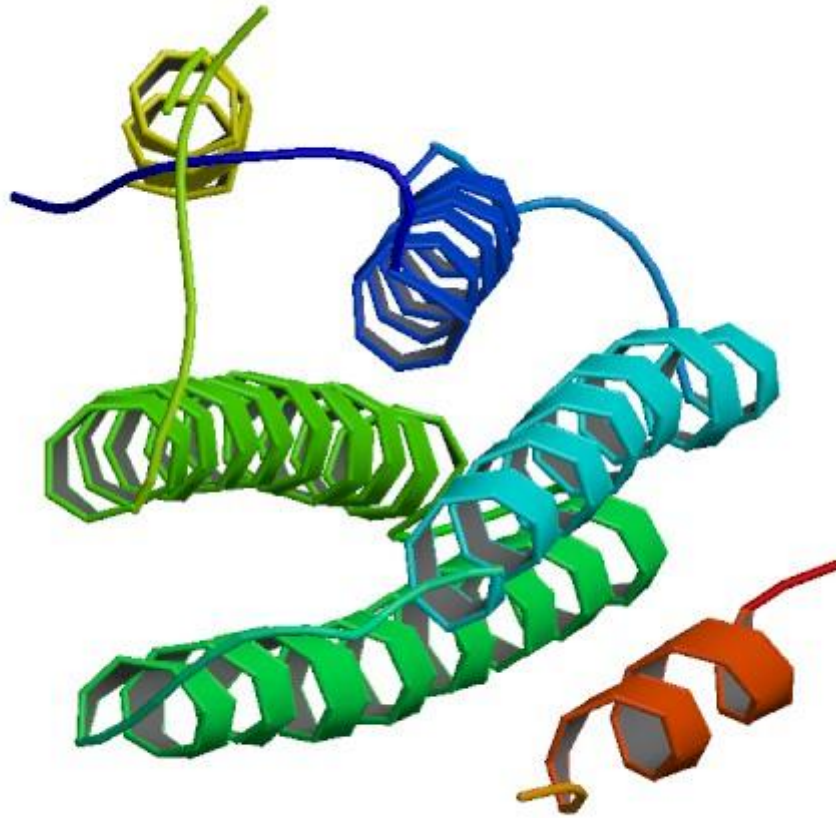
5.5. Tyrozin kináza 2 (Pyk2)

Pyk2 je další tyrozin kináza kolokalizovaná s paxilinem ve fokálních adhezích, ale nachází se i v blízkosti buněčného jádra. Svou strukturou je Pyk2 vysoce homologní s FAK, patří dokonce do stejné rodiny proteinů (FAK). Tato protein kináza vykazuje aktin-regulační funkci a míra její exprese má vliv i na stavbu FA a buněčnou morfologii. I přes vysokou strukturní podobnost však Pyk2 působí při regulaci stejných cílových struktur jako antagonist k FAK. Sama aktivita Pyk2 je pak závislá na míře exprese FAK, která inhibuje její lokalizaci do FA a zároveň zabraňuje aktivační autofosforylaci na Tyr 402 (Du et al., 2001).

5.5.1. FAT doména Pyk2

Stejně jako FAT doména FAK vyžaduje pravděpodobně FAK doména Pyk2 pro fosforylaci na Tyr 881 (Tyr 925 u FAK) a vazbu SH2 domény Grb2 částečnou změnu struktury, kdy dojde ke změně pozice helixu 1 vzhledem k ostatním. Okolí obou homologních fosforylačních míst je velmi dobře konzervováno v obou proteinech. Přestože obě domény vykazují také obecně srovnatelný způsob interakcí s LD motivy paxillinu, liší se selektivitou vazebného místa mezi helixy 1 a 4. Pyk2 FAT obsahuje v této oblasti Lys 895 (namísto Ser 939), který způsobuje odlišné rozložení nábojů a pravděpodobně ruší selektivitu pro LD4.

Struktura komplexu Pyk2 FAT se dvěma LD4 motivy na je znázorněna na obrázku 12. Tento drobný rozdíl v interakcích s paxilinem by mohl alespoň z části vysvětlovat rozdíly ve funkci obou kináz (Lulo et al., 2009).



Obrázek 12: FAT doména proteinu Pyk2 (four-helix bundle uprostřed) s navázanými LD4 motivy paxillinu (žlutě a červeně; obrázek převzat z:(Lulo et al., 2009)

5.6. p130Cas

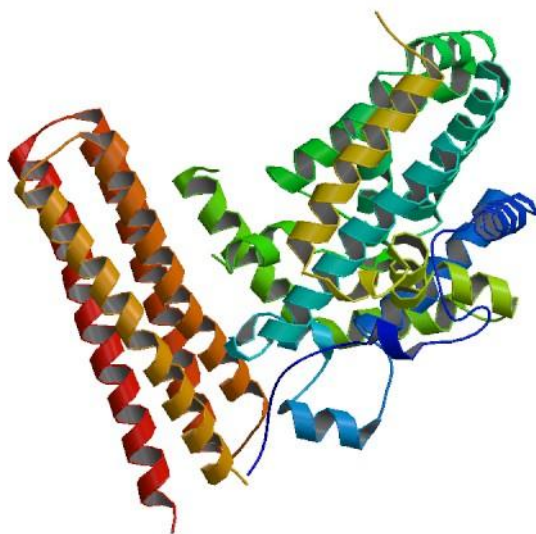
P130Cas je adapterový protein lokalizovaný ve fokálních adhezích, který je fosforylován na tyrozinu v závislosti na přítomnosti integrinem zprostředkovaných adhezí. Fosforylace p130Cas je klíčovým krokem signalizace pro kontrolu buněčného pohybu a jako adptorový protein hraje také důležitou roli při sestavování multiproteinových signálních komplexů (Harte et al., 1996).

5.6.1. SH3 doména p130Cas

SH3 doména p130Cas proteinu je složena z 5 antiparalelních β -vláken, uspořádaných do dvou β -listů, přičemž nejdelší z vláken je různými úseky součástí obou listů. Pro vazbu ligandu jsou důležité smyčky mezi vlákny β 1 a β 2, nejvíce konzervovaná RT smyčka tvořící strukturu podobnou vlásence stabilizovanou množstvím vodíkových můstků, a β 2 a β 3, n-src smyčka. Ze struktury také vyplývá, že vazby prolin bohaté sekvence FAK (zmíněno výše) se nejvíce účastní AK Lys 9, Tyr 10, Gln 19, Trp 41 a Pro 54, které tvoří hydrofobní žlábek (Wisniewska et al., 2005).

5.6.2. FAT doména p130Cas

Nedávno publikovaná studie zaměřená na interakci proteinů z rodin NSP a CAS na příkladu p130Cas poprvé ukázala, že C-terminální doména CAS proteinů obsahuje dobře konzervovaný four-helix bundle, motiv typický pro FAT doménu. Zajímavá není jen zjištěná přítomnost FAT domény v CAS, ale i její zvláštní způsob interakce s nezvyklou Cdc-25 homologní doménou v uzavřené konformaci (obrázek 13). Dříve zjištěné interakce FAT domén s vazebnými partnery (například FAT z FAK a Pyk2 – paxillin) jsou typicky poměrně slabé, oproti tomu interakce CAS a NSP proteinů zprostředkované FAT jsou velmi těsné a silné. NSP3 Cdc-25 homologní doména využívá při interakci s p130Cas paralelně dvou vazebných míst. První z nich odpovídá již zmiňovanému, mezi FAT doménami nejlépe konzervovanému hydrofobnímu zářezu mezi helixy 2 a 3, do nějž se vmezeřuje hydrofobní část helixu i (AK Val 616, Leu 620, Leu 623) z C-terminální domény NSP3. Tato interakce se velmi podobá vazbě FAT-paxillin. Druhé vazebné místo je však nezvyklé a u FAT domén do teď nepozorované, nachází se na rozhraní helixů 1 a 2 a jedná se o převážně hydrofobní žlábek, který interaguje s helixem NSPb (Mace et al., 2011).



Obrázek 13: Struktura komplexu FAT domény p130Cas (vlevo) a Cdc25 homologní domény proteinu NSP (vpravo; obrázek přejet z: Mace et al., 2011)

6. Závěr

V této práci jsem se věnoval 3D strukturám a interakcím vybraných proteinů fokálních adhezí, zejména pak paxillinu, talinu, vinculinu, kináze asociované s fokálními adhezemi, prolin-bohaté tyrozin kináze 2 a p130Cas. Všechny tyto proteiny mají důležitý vliv na stavbu a regulaci spojení buňky s extracelulární matrix a tím na buněčnou adhezi. Buněčná adheze je pak významná pro buněčnou invasivitu.

Popisem 3D struktur a některých interakcí zmíněných proteinů jsem se v rámci možností pokusil poskytnout ucelený pohled na molekulární podstatu jejich funkce. Bohužel ne vždy jsou známy 3D struktury kompletních molekul a objasněny všechny možné interakce. Všechny známé struktury proteinů, které jsem podrobněji zmiňoval, jsou seříděny v tabulkách i s příslušnými PDB kódy v příloze 1.

Buněčné děje mají svůj základ ve specifických interakcích mezi proteinovými komponenty buňky. Jednotlivé proteiny spolu interagují na základě svého prostorového uspořádání. Proto nám strukturní biologie poskytuje velmi užitečný náhled na molekulární podstatu mnoha procesů. Právě pochopení molekulární podstaty nám umožňuje přemýšlet nad tím, jak některé z těchto procesů regulovat či přímo zvrátit. Jedním z příkladů je hledání nových terapií pro nádorová onemocnění. Dobrá znalost 3D struktur proteinů důležitých pro buněčnou invasivitu umožňuje výběr specifických inhibitorů jejich funkce. Zamezení funkce těchto proteinů a cílené potlačení invasivity nádorových buněk je významným krokem při léčbě rakoviny.

7. Seznam použité literatury

- Arold, S.T., Hoellerer, M.K., and Noble, M.E.M. (2002). The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* 10, 319-327.
- Bakolitsa, C., Cohen, D.M., Bankston, L.A., Bobkov, A.A., Dadwell, G.W., Jennings, L., Critchley, D.R., Craig, S.W., and Liddington, R.C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430, 583-586.
- Bertolucci, C.M., Guibao, C.D., and Zheng, J. (2005). Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly. *Protein Sci* 14, 644-652.
- Brown, M.C., Perrotta, J.A., and Turner, C.E. (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *Journal of Cell Biology* 135, 1109-1123.
- Buccione, R., Orth, J.D., and McNiven, M.A. (2004). Foot and mouth: Podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 647-657.
- Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D.F., Karginov, A.V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K.M., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2008). Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Molecular and Cellular Biology* 28, 201-214.
- Choi, C.K., Zareno, J., Digman, M.A., Gratton, E., and Horwitz, A.R. (2011). Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-fak complexes in nascent adhesions. *Biophysical Journal* 100, 583-592.
- Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2008). Paxillin comes of age. *Journal of Cell Science* 121, 2435-2444.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R.C., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* 323, 638-641.
- Du, Q.S., Ren, X.R., Xie, Y., Wang, Q., Mei, L., and Xiong, W.C. (2001). Inhibition of PYK2-induced actin cytoskeleton reorganization, PYK2 autophosphorylation and focal adhesion targeting by FAK. *Journal of Cell Science* 114, 2977-2987.
- Friedl, P., and Bröcker, E.B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 41-64.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 3, 362-374.
- Galbraith, C.G., Yamada, K.M., and Sheetz, M.P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology* 159, 695-705.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 793-805.
- Gimona, M., and Buccione, R. (2006). Adhesions that mediate invasion. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38, 1875-1892.
- Gingras, A.R., Bate, N., Goult, B.T., Hazelwood, L., Canestrelli, I., Grossmann, J.G., Liu, H., Putz, N.S.M., Roberts, G.C.K., Volkman, N., *et al.* (2008). The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *Embo Journal* 27, 458-469.
- Glukhova, M., Koteliansky, V., Sastre, X., and Thiery, J.P. (1995). Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma. *American Journal of Pathology* 146, 706-716.

- Goksoy, E., Ma, Y.Q., Wang, X., Kong, X., Perera, D., Plow, E.F., and Qin, J. (2008). Structural Basis for the Autoinhibition of Talin in Regulating Integrin Activation. *Molecular Cell* *31*, 124-133.
- Goult, B.T., Bate, N., Anthis, N.J., Wegener, K.L., Gingras, A.R., Patel, B., Barsukov, I.L., Campbell, I.D., Roberts, G.C.K., and Critchley, D.R. (2009). The structure of an interdomain complex that regulates Talin activity. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 15097-15106.
- Goult, B.T., Bouaouina, M., Elliott, P.R., Bate, N., Patel, B., Gingras, A.R., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K., Calderwood, D.A., Critchley, D.R., *et al.* (2010). Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: A role in integrin activation. *EMBO Journal* *29*, 1069-1080.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., *et al.* (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263-266.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H., and Parsons, J.T. (1996). P130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 13649-13655.
- Hayashi, I., Vuori, K., and Liddington, R.C. (2002). The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nature Structural Biology* *9*, 101-106.
- Hoellerer, M.K., Noble, M.E.M., Labesse, G., Campbell, I.D., Werner, J.M., and Arold, S.T. (2003). Molecular recognition of paxillin LD motifs by the focal adhesion targeting domain. *Structure* *11*, 1207-1217.
- Hu, K., Ji, L., Applegate, K.T., Danuser, G., and Waterman-Stirer, C.M. (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* *315*, 111-115.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580-584.
- Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R.L., Athota, A.B., Rozypal, T.L., Colclasure, J.C., and Chu, W.S. (1998). Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clinical and Experimental Metastasis* *16*, 501-512.
- Kim, M., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* *301*, 1720-1725.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* *84*, 359-369.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F.J., Li, Y., Schaller, M.D., and Eck, M.J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell* *129*, 1177-1187.
- Linder, S., Wiesner, C., and Himmel, M. (2011). Degrading devices: Invadosomes in proteolytic cell invasion. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 185-211.
- Lulo, J., Yuzawa, S., and Schlessinger, J. (2009). Crystal structures of free and ligand-bound focal adhesion targeting domain of Pyk2. *Biochem Biophys Res Commun* *383*, 347-352.
- Mace, P.D., Wallez, Y., Dobaczewska, M.K., Lee, J.J., Robinson, H., Pasquale, E.B., and Riedl, S.J. (2011). NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 1381-1387.

- Mofrad, M.R., Golji, J., Abdul Rahim, N.A., and Kamm, R.D. (2004). Force-induced unfolding of the focal adhesion targeting domain and the influence of paxillin binding. *Mechanics & chemistry of biosystems : MCB I*, 253-265.
- Mueller, S.C., and Chen, W.T. (1991). Cellular invasion into matrix beads: Localization of $\beta 1$ integrins and fibronectin to the invadopodia. *Journal of Cell Science* 99, 213-225.
- Palmer, S.M., Playford, M.P., Craig, S.W., Schaller, M.D., and Campbell, S.L. (2009). Lipid binding to the tail domain of vinculin. Specificity and the role of the N and C termini. *Journal of Biological Chemistry* 284, 7223-7231.
- Pankova, K., Rosel, D., Novotny, M., and Brabek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 63-71.
- Saltel, F., Mortier, E., Hytönen, V.P., Jacquier, M.C., Zimmermann, P., Vogel, V., Liu, W., and Wehrle-Haller, B. (2009). New PI(4,5)P₂- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control $\beta 3$ -integrin clustering. *Journal of Cell Biology* 187, 715-731.
- Saunders, R.M., Holt, M.R., Jennings, L., Sutton, D.H., Barsukov, I.L., Bobkov, A., Liddington, R.C., Adamson, E.A., Dunn, G.A., and Critchley, D.R. (2006). Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *European Journal of Cell Biology* 85, 487-500.
- Tolde, O., Rösel, D., Veselý, P., Folk, P., and Brábek, J. (2010). The structure of invadopodia in a complex 3D environment. *European Journal of Cell Biology* 89, 674-680.
- Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A.G., Begin, L.R., Chapdelaine, A., and Chevalier, S. (1996). Focal adhesion kinase (pp125(FAK)) expression, activation and association with paxillin and p50(CSK) in human metastatic prostate carcinoma. *International Journal of Cancer* 68, 164-171.
- Weiner, T.M., Liu, E.T., Craven, R.J., and Cance, W.G. (1993). Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 342, 1024-1025.
- Wisniewska, M., Bossenmaier, B., Georges, G., Hesse, F., Dangl, M., Künkele, K.P., Ioannidis, I., Huber, R., and Engh, R.A. (2005). The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *Journal of Molecular Biology* 347, 1005-1014.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., *et al.* (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: The role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *Journal of Cell Biology* 168, 441-452.
- Yamaguchi, H., Pixley, F., and Condeelis, J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *European Journal of Cell Biology* 85, 213-218.

8. Přílohy

Příloha 1: Zde jsou uvedeny tabulky PDB kódů dostupných 3D struktur pro proteiny paxillin, talin, vinculin, FAK, Pyk2 a p130Cas. Tabulky obsahují kromě příslušného PDB kódu také název struktury, metodu jakou byla struktura získána, rozlišení a délku AK řetězce.

Paxillin

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
1OW6	Paxillin LD4 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.35	13
1OW7	Paxillin LD4 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.60	13
1OW8	Paxillin LD2 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.85	13
2O9V	The second SH3 domain from Ponsin in complex with the paxillin proline rich region	X-RAY DIFFRACTION	1.63	10
2VZD	CRYSTAL STRUCTURE OF THE C-TERMINAL CALPONIN HOMOLOGY DOMAIN OF ALPHA PARVIN IN COMPLEX WITH PAXILLIN LD1 MOTIF	X-RAY DIFFRACTION	2.10	20
2VZG	CRYSTAL STRUCTURE OF THE C-TERMINAL CALPONIN HOMOLOGY DOMAIN OF ALPHA-PARVIN IN COMPLEX WITH PAXILLIN LD2 MOTIF	X-RAY DIFFRACTION	1.80	20
2VZI	CRYSTAL STRUCTURE OF THE C-TERMINAL CALPONIN HOMOLOGY DOMAIN OF ALPHA-PARVIN IN COMPLEX WITH PAXILLIN LD4 MOTIF	X-RAY DIFFRACTION	2.20	20
3GM1	Crystal Structure of the Focal Adhesion Targeting (FAT) Domain of Pyk2 in Complex with Paxillin LD4 Motif-Derived Peptides	X-RAY DIFFRACTION	2.95	13
3PY7	Crystal structure of full-length Bovine Papillomavirus oncoprotein E6 in complex with LD1 motif of paxillin at 2.3A resolution	X-RAY DIFFRACTION	2.29	523
3ROE	Cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) in complex with paxillin LD1	X-RAY DIFFRACTION	2.80	14
3ROF	Cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) in complex with paxillin LD2	X-RAY DIFFRACTION	2.70	13
3ROG	Cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) in complex with paxillin LD4	X-RAY DIFFRACTION	2.50	13

Talin

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
1MIX	Crystal structure of a FERM domain of Talin	X-RAY DIFFRACTION	1.75	206
1MIZ	Crystal structure of an integrin beta3-talin chimera	X-RAY DIFFRACTION	1.90	9
1MK7	CRYSTAL STRUCTURE OF AN INTEGRIN BETA3-TALIN CHIMERA	X-RAY DIFFRACTION	2.20	15
1MK9	CRYSTAL STRUCTURE OF AN INTEGRIN BETA3-TALIN CHIMERA	X-RAY DIFFRACTION	2.80	16
1RKC	Human vinculin head (1-258) in complex with talin's vinculin binding site 3 (residues 1944-1969)	X-RAY DIFFRACTION	2.70	262
1SJ7	Crystal Structure of Talin Rod 482-655	X-RAY DIFFRACTION	2.50	174
1SJ8	Crystal Structure of talin residues 482-789	X-RAY DIFFRACTION	2.60	308
1SYQ	Human vinculin head domain VH1, residues 1-258, in complex with human talin's vinculin binding site 1, residues 607-636	X-RAY DIFFRACTION	2.42	264
1T01	Vinculin complexed with the VBS1 helix from talin	X-RAY DIFFRACTION	2.06	255
1U6H	Vinculin head (0-258) in complex with the talin vinculin binding site 2 (849-879)	X-RAY DIFFRACTION	2.38	280
1U89	Solution structure of VBS2 fragment of talin	SOLUTION NMR		139
1XWJ	Vinculin head (1-258) in complex with the talin vinculin binding site 3 (1945-1969)	X-RAY DIFFRACTION	2.60	280
1Y19	Structural basis for phosphatidylinositol phosphate kinase type I-gamma binding to talin at focal adhesions	X-RAY DIFFRACTION	2.60	14
1ZVZ	Vinculin Head (0-258) in Complex with the Talin Rod Residue 820-844	X-RAY DIFFRACTION	1.80	279
1ZW3	Vinculin Head (0-258) in Complex with the Talin Rod residues 1630-1652	X-RAY DIFFRACTION	3.30	279
2B0H	Solution structure of VBS3 fragment of talin	SOLUTION NMR		137
2G35	NMR structure of talin-PTB in complex with PIPKI	SOLUTION NMR		100
2H7D	Solution structure of the talin F3 domain in complex with a chimeric beta3 integrin-PIP kinase peptide	SOLUTION NMR		101
2H7E	Solution structure of the talin F3 domain in complex with a chimeric beta3 integrin-PIP kinase peptide- minimized average structure	SOLUTION NMR		101
2HRJ	NMR solution structure of the F2 subdomain of talin	SOLUTION NMR		121
2JSW	NMR structure of the talin C-terminal actin binding site	SOLUTION NMR		189
2K00	Solution structure of the talin F3 in complex with layilin cytodomain	SOLUTION NMR		92
2KBB	NMR structure of the talin rod domain, 1655-1822	SOLUTION NMR		174

2KC1	NMR structure of the F0 domain (residues 0-85) of the talin ferm domain	SOLUTION NMR		91
2KC2	NMR structure of the F1 domain (residues 86-202) of the talin	SOLUTION NMR		128
2KGX	HADDOCK structure of the talin F3 domain in complex with talin 1655-1822	SOLUTION NMR		174
2KMA	NMR structure of the F0F1 double domain (residues 1-202) of the talin ferm domain	SOLUTION NMR		178
2KVP	NMR structure of the talin VBS3 domain, 1815-1973	SOLUTION NMR		165
2L10	Structure of the talin rod residues, domain C	SOLUTION NMR		158
2L7A	Solution Structure of the talin VBS2b domain	SOLUTION NMR		131
2L7N	NMR Structure of the B domain of talin	SOLUTION NMR		168
2ODQ	Crystal structure of the talin dimerisation domain	X-RAY DIFFRACTION	2.20	50
2X0C	STRUCTURE OF THE TALIN ROD RESIDUES 1359-1659	X-RAY DIFFRACTION	2.00	309
3DYJ	Crystal structure a talin rod fragment	X-RAY DIFFRACTION	1.85	332
3IVF	Crystal structure of the talin head FERM domain	X-RAY DIFFRACTION	1.94	371
3S90	Human vinculin head domain Vh1 (residues 1-252) in complex with murine talin (VBS33; residues 1512-1546)	X-RAY DIFFRACTION	1.97	253
4DJ9	Human vinculin head domain Vh1 (residues 1-258) in complex with the talin vinculin binding site 50 (VBS50, residues 2078-2099)	X-RAY DIFFRACTION	2.25	258
4DJ9	Human vinculin head domain Vh1 (residues 1-258) in complex with the talin vinculin binding site 50 (VBS50, residues 2078-2099)	X-RAY DIFFRACTION	2.25	29

Vinculin

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
1QKR	CRYSTAL STRUCTURE OF THE VINCULIN TAIL AND A PATHWAY FOR ACTIVATION	X-RAY DIFFRACTION	1.80	188
1ST6	Crystal structure of a cytoskeletal protein	X-RAY DIFFRACTION	3.10	1069
1T01	Vinculin complexed with the VBS1 helix from talin	X-RAY DIFFRACTION	2.06	255
1U6H	Vinculin head (0-258) in complex with the talin vinculin binding site 2 (849-879)	X-RAY DIFFRACTION	2.38	280
1XWJ	Vinculin head (1-258) in complex with the talin vinculin binding site 3 (1945-1969)	X-RAY DIFFRACTION	2.60	280
1ZVZ	Vinculin Head (0-258) in Complex with the Talin Rod Residue 820-844	X-RAY DIFFRACTION	1.80	279
1ZW2	Vinculin Head (0-258) in Complex with the Talin Rod residues 2345-2369	X-RAY DIFFRACTION	2.10	279
1ZW3	Vinculin Head (0-258) in Complex with the Talin Rod residues 1630-1652	X-RAY DIFFRACTION	3.30	279
2GDC	Structure of Vinculin VD1 / IpaA560-633 complex	X-RAY DIFFRACTION	2.74	266

FAK

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
1K04	Crystal Structure of the Focal Adhesion Targeting Domain of Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	1.95	162
1K05	Crystal structure of the Focal Adhesion Targeting Domain of Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.90	162
1K40	crystal structure of the FAT domain of focal adhesion kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.25	126
1KTM	SOLUTION STRUCTURE OF FAT DOMAIN OF FOCAL ADHESION KINASE	SOLUTION NMR		139
1MP8	Crystal structure of Focal Adhesion Kinase (FAK)	X-RAY DIFFRACTION	1.60	281
1OW6	Paxillin LD4 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.35	161
1OW7	Paxillin LD4 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.60	161
1OW8	Paxillin LD2 motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.85	161
1PV3	NMR Solution Structure of the Avian FAT-domain of Focal Adhesion Kinase	SOLUTION NMR		146
1QVX	SOLUTION STRUCTURE OF THE FAT DOMAIN OF FOCAL ADHESION KINASE	SOLUTION NMR		134
2AEH	Focal adhesion kinase 1	X-RAY DIFFRACTION	2.53	369
2AL6	FERM domain of Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.35	375
2ETM	Crystal Structure of Focal Adhesion Kinase Domain Complexed with 7H-Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine Derivative	X-RAY DIFFRACTION	2.30	281
2IJM	Crystal Structure of Focal Adhesion Kinase Domain with 2 molecules in the Asymmetric Unit Complexed with ADP and ATP	X-RAY DIFFRACTION	2.19	281
2J0J	CRYSTAL STRUCTURE OF A FRAGMENT OF FOCAL ADHESION KINASE CONTAINING THE FERM AND KINASE DOMAINS.	X-RAY DIFFRACTION	2.80	656
2J0K	CRYSTAL STRUCTURE OF A FRAGMENT OF FOCAL ADHESION KINASE CONTAINING THE FERM AND KINASE DOMAINS.	X-RAY DIFFRACTION	3.00	656
2J0L	CRYSTAL STRUCTURE OF A THE ACTIVE CONFORMATION OF THE KINASE DOMAIN OF FOCAL ADHESION KINASE WITH A PHOSPHORYLATED ACTIVATION LOOP.	X-RAY DIFFRACTION	2.30	276
2J0M	CRYSTAL STRUCTURE A TWO-CHAIN COMPLEX BETWEEN THE FERM AND KINASE DOMAINS OF FOCAL ADHESION KINASE.	X-RAY DIFFRACTION	2.80	371

2JKK	FOCAL ADHESION KINASE CATALYTIC DOMAIN IN COMPLEX WITH BIS-ANILINO PYRIMIDINE INHIBITOR	X-RAY DIFFRACTION	2.00	276
2JKM	FOCAL ADHESION KINASE CATALYTIC DOMAIN IN COMPLEX WITH BIS-ANILINO PYRIMIDINE INHIBITOR	X-RAY DIFFRACTION	2.31	276
2JKO	FOCAL ADHESION KINASE CATALYTIC DOMAIN IN COMPLEX WITH BIS-ANILINO PYRIMIDINE INHIBITOR	X-RAY DIFFRACTION	1.65	276
3B71	CD4 endocytosis motif bound to the Focal Adhesion Targeting (FAT) domain of the Focal Adhesion Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.82	162
3BZ3	Crystal Structure Analysis of Focal Adhesion Kinase with a Methanesulfonamide Diaminopyrimidine Inhibitor	X-RAY DIFFRACTION	2.20	276
3PXK	FOCAL ADHESION KINASE CATALYTIC DOMAIN IN COMPLEX WITH Pyrrolo[2,3-d]thiazole	X-RAY DIFFRACTION	1.79	282

Pyk2

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
3CC6	Crystal structure of kinase domain of protein tyrosine kinase 2 beta (PTK2B)	X-RAY DIFFRACTION	1.60	281
3ET7	Crystal structure of PYK2 complexed with PF-2318841	X-RAY DIFFRACTION	2.70	277
3FZO	Crystal Structure of PYK2-Apo, Proline-rich Tyrosine Kinase	X-RAY DIFFRACTION	2.20	277
3FZP	Crystal structure of PYK2 complexed with ATPgS	X-RAY DIFFRACTION	2.10	277
3FZR	Crystal structure of PYK2 complexed with PF-431396	X-RAY DIFFRACTION	2.70	277
3FZS	Crystal Structure of PYK2 complexed with BIRB796	X-RAY DIFFRACTION	1.75	277
3FZT	Crystal structure of PYK2 complexed with PF-4618433	X-RAY DIFFRACTION	1.95	277
3GM1	Crystal Structure of the Focal Adhesion Targeting (FAT) Domain of Pyk2 in Complex with Paxillin LD4 Motif-Derived Peptides	X-RAY DIFFRACTION	2.95	153
3GM2	Crystal Structure of the Focal Adhesion Targeting (FAT) Domain of Pyk2	X-RAY DIFFRACTION	2.71	153
3GM3	Crystal Structure of the Focal Adhesion Targeting (FAT) Domain of Pyk2	X-RAY DIFFRACTION	2.60	153
3H3C	Crystal structure of PYK2 in complex with Sulfoximine-substituted trifluoromethylpyrimidine analog	X-RAY DIFFRACTION	2.00	277
4EKU	Crystal Structure of FERM Domain of Proline-rich Tyrosine Kinase 2	X-RAY DIFFRACTION	3.25	392

p130Cas

PDB kód	Název struktury	Metoda	Rozlišení	Délka AK řetězce
1WYX	The Crystal Structure of the p130Cas SH3 Domain at 1.1 A Resolution	X-RAY DIFFRACTION	1.14	69
1X27	Crystal Structure of Lck SH2-SH3 with SH2 binding site of p130Cas	X-RAY DIFFRACTION	2.70	167
1Z23	The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130Cas)	SOLUTION NMR		163
3T6G	Structure of the complex between NSP3 (SHEP1) and p130Cas	X-RAY DIFFRACTION	2.50	331