

ZUSAMMENFASSUNG

Dipl.-Biol. Posevitz-Fejfar, Anita

FUNCTIONAL ELUCIDATION OF PAG THROUGH THE GENERATION OF TRUNCATION AND POINT MUTANTS

Das Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG) wurde gleichzeitig von zwei Gruppen identifiziert. Eine Gruppe beschrieb PAG als Teil des Fyn-Komplexes, die andere charakterisierte es als Csk (c-terminal Src-kinase)-bindendes Protein. Nach unserem derzeitigen Verständnis spielen beide Assoziationen eine zentrale Rolle für die Regulation von T-Zell-Antworten.

Die Familie der Src-kinasen gehört zu den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Diese fungieren als wichtige Initiatoren der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalkaskade, kontrollieren aber auch weitere zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Migration und Adhäsion. Src-Kinasen sind an der Metastasierung von Karzinomzellen beteiligt und spielen eine Rolle für Mamma-, Kolon- und Pankreaskarzinome. In unstimulierten Zellen liegen die Src-Kinasen in einer inaktiven Konformation vor, die durch eine intramolekulare Interaktion zwischen dem C-terminalen Phosphotyrosin und der SH2-Domäne stabilisiert wird. Csk (c-terminale Src-Kinase), eine ubiquitär exprimierte, zytoplasmatische Tyrosinkinase, ist ein negativer Regulator von Src-Kinasen, da es den C-terminalen inhibitorischen Tyrosinrest (Y-529 von Fyn und Y-505 von Lck) phosphoryliert.

Wie Csk und die Src-Kinasen ist auch PAG ubiquitär exprimiert. Es unterscheidet sich darin von anderen Transmembranadaptormolekülen. Dies spricht für eine generelle Rolle von PAG für die Regulation zellulärer Funktionen im Organismus. PAG gehört zur Gruppe der „lipid raft“-assoziierten Transmembranadaptormoleküle. In ruhenden T-Zellen ist PAG phosphoryliert und bindet an Csk. Nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird PAG durch eine bislang unbekannte Phosphatase dephosphoryliert, verliert die Assoziation zu Csk und erlaubt so die Aktivierung der Src-Kinasen. Lck transloziert in die „lipid rafts“ und vermittelt die Aktivierung von Fyn. Durch die Phosphorylierung ihrer Substrate initiieren die Src-Kinasen eine Signalkaskade, die zu Zytokin-Produktion und zur Differenzierung von ruhenden Effektor-T-Zellen führt. Ein Substrat der Src-Kinase Fyn ist PAG. Die aktivierte Kinase rephosphoryliert PAG und erlaubt die Rekrutierung von Csk zur Membran. So schließt sich die negative Rückkopplungsschleife und die Signalkaskade ist beendet.

Zusätzlich zur Rekrutierung von Csk fungiert PAG auch als ein Verbindungselement zwischen den „lipid rafts“ und dem Zytoskelett durch seine Assoziation mit EBP-50 (ezrin-radixin-moezin binding phosphoprotein of 50 kDa). Die beiden Moleküle interagieren durch das C-terminale TLR-Motiv von PAG und die PDZ-Domäne von EBP-50. EBP-50 interagiert

mit ERM (ezrin, radixin, moezin)-Proteinen, die F-Aktin binden. Die Verankerung der „lipid rafts“ durch den PAG-EBP50-ERM-Komplex reguliert die Raft-Mobilität. Nach der T-Zell-Aktivierung wird diese Interaktion gelöst und erlaubt so die Aggregation von „lipid rafts“ und die Ausbildung der Immunsynapse. Aufgrund von Beobachtungen, dass Csk eine Rolle für die Prävention und Suppression von Tumorwachstum und Metastasierung spielt, kann für den PAG-Csk-Komplex eine Funktion als Tumor-Suppressor postuliert werden, welcher an der Inhibition potentieller onkogener Effekte gesteigerter Src-Kinase-Aktivität beteiligt ist.

Ziel meiner Doktorarbeit ist es, durch die Untersuchung verschiedener Motive für die Lokalisation und die Fyn-Bindung die regulatorische Rolle von PAG besser zu verstehen. Wir zeigen die Bedeutung des Palmitoylierungsmotivs für die Insertion von PAG in die „lipid rafts“ und die funktionellen Konsequenzen von fehllokalisiertem PAG. Fyn ist die Kinase, die für die Phosphorylierung von PAG hauptsächlich verantwortlich ist. Im Gegensatz zu Csk und EBP-50 ist die Bindungsstelle innerhalb von PAG bisher nicht bekannt. Durch die Phosphorylierung von PAG erlaubt Fyn die Rekrutierung von Csk in die Nähe der Src-Kinasen. Die Identifikation der Fyn-Bindungsstelle sollte uns helfen, besser zu verstehen, wie diese Kinase mit ihrem Substrat interagiert. Durch die Mutation der Bindungsstelle können wir untersuchen, ob eine direkte Assoziation für die Phosphorylierung notwendig ist, und/oder ob Fyn eine zusätzliche Adaptor-Funktion hat.

Für LAT (linker for activation of T cells), wie PAG ein „lipid raft“ - assoziiertes Transmembranadaptomolekül, wurde gezeigt, dass die Lipid-Modifikation (Palmitoylierung) an den membrannahen Cysteinresten verantwortlich für seine „lipid raft“-Assoziation ist. Sowohl LAT als auch PAG besitzen ein CXXC-Motiv in junxtamembranöser Position innerhalb des zytoplasmatischen Teils, welches palmitoyliert wird. In Anbetracht der Bedeutung der Palmitoylierung für die „lipid raft“-Lokalisation von LAT untersuchten wir PAG mit mutierter Palmitoylierungsstelle (CxxC→AxxA). Um zu bestimmen, ob das Protein mit mutierter Palmitoylierungsstelle noch immer in die „lipid rafts“ gelangen konnte, wurden Zellysate transfizierter Jurkat-T-Zellen mittels eines Sucrose-Gradienten fraktioniert. Während das Wildtyp (WT)-protein in den „lipid raft“ - Fraktionen lokalisiert ist, verhindert die Mutation des Palmitoylierungsmotivs die Insertion von PAG in diese Mikrodomänen. Wir schlussfolgern daher, daß die Palmitoylierung des CXXC-Motivs notwendig für die Insertion von PAG in die „lipid rafts“ ist. Anschließend untersuchten wir, ob der Ausschluß aus den „lipid rafts“ die Phosphorylierung von PAG oder seine Interaktionen mit bekannten Bindungspartnern beeinflusst. Im Immunoblot von PAG-Immunpräzipitaten fanden wir die gleiche Tyrosinphosphorylierung und identische Assoziationen von Fyn, Csk und EBP-50 für WT-PAG und die Palmitoylierungsmutante.

Es wird angenommen, dass PAG seine negativ-regulatorische Funktion durch die Rekrutierung von Csk zu den „lipid rafts“ ausübt. Da die CXXC-Mutante ebenfalls Csk zur

Membran rekrutieren kann, untersuchten wir als Nächstes, ob die Mutante Zellaktivierung unterdrücken kann, da Zellen, die WT-PAG überexprimieren, nicht durch CD3-Stimulation aktiviert werden können. Während die Mutation des CXXC-Motivs ausreichte, um PAG aus den „lipid rafts“ auszuschließen, hatte sie einen sichtbaren Einfluß auf die Fähigkeit von PAG, CD3-induzierte Aktivierung verschiedener Proteine zu inhibieren.

Da Src-Kinasen für die Migration von T-Zellen bedeutsam sind, testeten wir nun unsere Mutante in einem SDF-1-basierten Migrationsassay. Für SDF-1 ist bekannt, dass es präferentiell aus den „lipid rafts“ signalisiert. Unsere Ergebnisse zeigen, daß WT-PAG die SDF1-induzierte T-Zell-Migration leicht supprimiert, während die CXXC-Mutante die Migrationsrate erhöht.

Die Rolle von PAG bei der Regulation der T-Zell Migration wurde darüber hinaus mittels siRNA untersucht. Eine Suppression der PAG-Expression in Jurkat-T-Zellen führte zu einer erhöhten Migration, vergleichbar mit dem Effekt durch Ausschluss von PAG aus den „lipid rafts“.

Um die Effekte der CXXC-Mutante zu erklären, hypothetisierten wir, dass die Überexpression von WT-PAG die Menge an Csk in den „lipid rafts“ erhöht und so einen irreversibeln Aktivierungsblock schafft. Die CXXC-Mutante könnte ihrerseits Csk aus den „lipid rafts“ rekrutieren und so den Block in der Src-Kinase-Aktivierung aus den „lipid rafts“ in die Nicht-Raft-Kompartimente verlagern. Bei Ereignissen, die innerhalb der „lipid rafts“ stattfinden, sollte die Relokalisation von Csk aus den „lipid rafts“ einen deutlicheren Einfluß haben, da es eine verstärkte Aktivierung der Src-Kinasen innerhalb der „lipid rafts“ bedingen würde.

Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir die „lipid raft“-Fraktionen auf ihren Csk-Gehalt. Wir fanden, dass die Menge an Csk innerhalb der „lipid rafts“ in Zellen mit der CXXC-Mutante auf die Menge von Vektor-transfizierten Zellen reduziert war. Zusammen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Veränderungen in der CXXC-Mutante von einer Umverteilung von Csk in der Zelle beeinflusst werden. Falls dieser Mechanismus korrekt ist, sollte er auch durch Veränderungen in der Phosphorylierung inhibitorischer und aktivierender Tyrosinreste inner- und außerhalb der „lipid rafts“ reflektiert sein. Durch Inkubation eines Immunoblots der Fraktionen mit einem phosphospezifischen Antiserum gegen das aktivierende Tyrosin von Fyn (Y-418) konnten wir zeigen, dass die Zellen, welche die CXXC-Mutante überexprimieren, tatsächlich eine erhöhte Phosphorylierung des aktivierenden Tyrosinrestes innerhalb der „lipid rafts“ aufweisen.

Die Phosphorylierung von PAG war unter Verwendung von Src-Kinase-spezifischen Inhibitoren zwar stark reduziert, die Assoziation von Fyn aber unverändert, was indizierte, dass die PAG-Fyn-Interaktion phosphorylierungsunabhängig ist. Dies wurde durch Untersuchungen mit den Tyrosinmutanten von PAG bestätigt: alle können Fyn binden.

Verschiedene Motive außerhalb der Tyrosinreste innerhalb der PAG-Sequenz könnten die Fyn-Bindung vermitteln: PAG hat zwei konventionelle (PxxP) und eine nicht-konventionelle (PxxxP) Prolin-reiche Region, die potentielle Bindungsstellen für SH3-Domänen darstellen. Zusätzlich ist ein RxxK-Motiv in einer submembranösen Region lokalisiert, welches ebenfalls eine Zielsequenz für die Fyn SH3-Bindung sein könnte. Da sowohl Fyn als auch PAG S-acyliert (myristoyliert bzw. palmitoyliert) sind, könnte man auch darüber spekulieren, ob hydrophobe (Lipid-Lipid)-Interaktionen innerhalb oder an der Membran eine Rolle für die Fyn-Assoziation spielen.

Um den Mechanismus der Fyn-Bindung zu untersuchen, mussten verschiedene Abbruch- und Punkt-Mutationen von Fyn generiert werden. Wir entwickelten Trunktionsmutanten, die die potentiellen Fyn-Bindestellen eine nach der anderen eliminierten. Nachdem wir die Interaktionsregion lokalisiert hatten, analysierten wir den Mechanismus der Bindung mittels Punktmutanten. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass, obwohl die Fyn-Bindung als phosphorylierungsunabhängig beschrieben worden war, sowohl eine Prolin-reiche Region als auch Phosphotyrosin Y-105 an der Formation des PAG-Fyn-Komplexes beteiligt sind. Eine solche zweiseitige Interaktion wurde schon für Fyn und seinen Bindungspartner FAK publiziert. Die SH2-Domäne von Fyn spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Stabilisierung der Interaktion zwischen der SH2-Domäne von Fyn und der membran-proximalen Prolin-reichen Region von PAG. Die Bindung der SH2-Domäne an PAG könnte das C-terminale inhibitorische Tyrosin von Fyn dislozieren und so zu einer Stimulation der Kinase-Aktivität führen. Die Mutation der Fyn-Bindungsstelle erlaubt nun, die funktionellen Konsequenzen der Fyn-PAG-Assoziation zu bestimmen.