

关于 FAK 与 Pyk2 的研究新进展

张 颖 陈 剑

[中图分类号] R3

[文献标识码] A

局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种存在于细胞质中的酪氨酸激酶,对胚胎的生长,肿瘤、心血管疾病的发病机制都有重要作用。FAK 分布广泛,序列在多种物种中高度保守。序列和结构分析显示 FAK 包含 4 个明显的区域:①N 端的 FERM 区域;②起催化作用的酪氨酸激酶中心区域;③C 端黏着斑定位序列(FAT)区域;④脯氨酸富集区域(PR1、PR2 和 PR3),定位于催化作用点和 FAT 区域之间。FAK 分子中含有 6 个可被酪氨酸激酶磷酸化的位点:Y397、Y407、Y576、Y577、Y861 和 Y925。FERM 区域可随着催化区域缩短来自动抑制酶的活性,同样也可以通过与其他分子相互作用来控制 FAK 的信号转导。有研究发现当截短 FERM 区域后,FAK 分子的磷酸化活性增加并且催化活性提高,表明 FERM 对 FAK 起到负性调节的作用。最近研究发现 FERM 能与 p53 分子相互作用,促进肿瘤细胞的存活^[1]。FAT 区域和脯氨酸富集区域也可以缩短,捆绑有功能的位点,作用于下游的信号通路。

富含脯氨酸的非受体酪氨酸激酶 2(proline-rich tyrosine kinase 2, Pyk2)与 FAK 在序列和结构有较高的相关性,在蛋白水平,46% 达完全一致,65% 相似,且结构上,与 FAK 的 4 个区域的结构相同。与 FAK 相比,Pyk2 分布较为局限。FAK 在胎儿血管形成的初期和心脏的形成过程中都发挥着非常重要的作用。在成人的心脏中,FAK 对高血压的反应起重要作用。在 β_3 介导的 Pyk2 信号通路中,Pyk2 对 PO 参与的纤维化形成过程中的成纤维细胞有重要作用。 β_3 -/- 小鼠在 PO 作用下,心脏纤维化较野生型明显减轻^[2]。FAK 过表达的现象在许多人类恶性肿瘤中均被发现,如结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌、宫颈癌、口腔上皮癌和直

肠癌等,其高水平的表达或表达增加与肿瘤细胞的转移及侵袭性密切相关^[3]。目前许多研究线索支持 FAK 在癌症发展中的作用。另外,在 Pyk2 基因敲除的老鼠中发现 Pyk2 在微管依赖性的伪足形成中发挥重要作用^[4]。目前已有多项证据表明 Pyk2 可能对一些癌症细胞的显型起控制作用。

FAK 可对多种细胞外的刺激作出应答(包括来自 ECM 的信号),同时可调节多种细胞的细胞变化过程,比如增殖和细胞迁移。而这些细胞过程的变化,是疾病发生和发展的关键步骤。

一、FAK 和细胞迁移的进展

在绝大部分的实验系统中,增强 FAK 信号可以促进细胞运动性,而抑制 FAK 信号可削弱细胞的迁移。FAK 可控制随机游走的细胞的运动性,对多种刺激因素作出反应。若细胞进行迁移,必须执行 3 个步骤来完成:第一,决定迁移去哪里;第二,在移动方向前方细胞伸出伪足;第三,反复收缩达到净迁移。FAK 已被证实在以上 3 个步骤中都发挥作用。

在培养受伤的单层细胞时发现,在受伤的细胞的边缘,细胞发生极化和适应,这种变化可以用高尔基体聚集至靠近伤口的细胞核的一侧的方法来评估。有证据证明以上这一变化有利于细胞定向移动到伤口。摄动蛋白的基本功能是通过管理高尔基体的结构来改变高尔基体的聚集,从而削弱细胞在损伤-愈合实验中的迁移^[5]。但在游离的成纤维细胞中,高尔基体的聚集与定向迁移之间并无关系^[6]。缺失 FAK 时,伤口边缘的细胞不能形成伪足伸向伤口。另外有研究显示,Pyk2 表达缺失的巨噬细胞对化学刺激物不能有效建立细胞极化的模式^[7]。这些研究发现均显示,FAK 和 Pyk2 对经化学刺激物作用后的细胞都可产生极化迁移的作用。

用时间延迟显微镜拍摄细胞迁移时发现,在削弱细胞的 FAK 功能后,细胞在固定方向上的迁移能力下降^[8]。Pyk2 对巨噬细胞的运动也有影响,表现为:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071758)

作者单位:264000 山东省烟台毓璜顶医院肿瘤内一科

通讯作者:陈剑,电子信箱:yoyo_yz@126.com

Pyk2 缺失的细胞的运动能力缺陷。在巨噬细胞中抑制 FAK 或 Pyk2 的表达后,会降低 CSF-1 介导的细胞迁移率约 60%。但是同时抑制两者表达,并未使细胞迁移率在此基础上有所降低^[8]。所以,FAK 和 Pyk2 对细胞迁移、侵袭发挥重要作用。而且在这个实验中,二者功能并不表现为协同作用。

还有证据证明,FAK 在迁移细胞的后缘控制细胞的收缩。在野生型的成纤维细胞中,经 LPA 处理后,细胞尾部的黏着斑在细胞移动的过程中向前部移动。与此形成对比的是,在 FAK 表达受损的细胞中(经 RNA 基因敲除),细胞尾部的黏着斑较为稳定^[9]。在一些情况下,如在 FAK 缺失的成纤维细胞中,Pyk2 补偿性表达增高可促进正常细胞回缩。若在以上情况下敲除 Pyk2 的表达,将极大损伤细胞尾部的收缩能力。Pyk2 缺失的细胞同样表现出对化学刺激物的反应回缩失效。这些研究表明,FAK 和 Pyk2 对细胞尾部收缩起作用^[10]。

二、FAK 对 Rho 蛋白的调控

如上所述,FAK 可管理细胞的迁移,但具体的分子机制未知。最近有研究显示,FAK 控制细胞迁移的分子调控机制是对拆卸黏着斑的管理,在细胞尾部,黏着斑的前移需要 FAK。由此推测,黏着斑随后的分解是为细胞尾部的收缩准备,在细胞的前部,FAK 参与黏着斑的有效拆卸和装配过程^[8]。另有研究显示,潜在的调节黏着斑的装配的机制是对黏着斑 PtdIns(4,5)P2 的调节,同时也可调节 talin 依赖的整合素配体结合活化^[11]。

在 FAK 表达缺失的成纤维细胞呈现出激活的 Rho 蛋白的高表达,在 FAK 表达缺失的巨噬细胞中呈现 Rac 活性的部分提高。相反的,在 Pyk2 表达缺失的巨噬细胞,表现为趋化因子作用后,Rho 活性下降^[12]。Pyk2 在控制 Rho 活性中存在明显的环境依赖性,而且上述实验在 Pyk2 表达缺失的破骨细胞表现为 Rho 的活性增高。因此,由 Pyk2 控制的 Rho 活性,有信号途径依赖和(或)细胞类型依赖的特点^[4]。FAK 调节 Rac 和 Rho 活性有多重机制。FAK 和 Pyk2 也可以通过结合调节蛋白来促进激活 Rho 家族蛋白信号通路。FAK 也可以通过多种方式调节 Cdc42 和 Rac 的活性来控制细胞极化、伪足的形成、细胞迁移。

三、FAK 调节细胞骨架的其他机制

N-WASP 可通过激活 Arp2/3 复合物来促进肌动蛋白作出细胞迁移的准备,同时 F-actin 聚集成核,被 FAK 酪氨酸激酶磷酸化。但是鉴于体外实验

中 FAK 磷酸化对 N-WASP 活性的作用轻微,所以 FAK 调节伪足的活动是有多重机制共同作用的。

此外,FAK 也可直接与 Arp2/3 复合物结合。FAK-Arp2/3 复合物分布限制在细胞的前缘,但在黏着斑中并未发现^[13]。Arp2/3 复合物不可以与磷酸化的 FAK 结合,提示它有可能在赋活后被 FAK 释放^[13]。这两种不同的实验结果均提示一种可能:FAK 使 Arp2/3 复合物聚集到细胞前缘,FAK 将其赋活。FAK 磷酸化后将活化的 Arp2/3 复合物释放,活化的 Arp2/3 复合物将作为一个重要的调节因子,来促进伪足的形成。这一分子机制还需要进一步的实验证实。

四、FAK 激酶与钙黏着蛋白和细胞连接

FAK 除了参与细胞-细胞外基质的信号传递转导外,对细胞-细胞连接也具有调节作用。有文献报道 FAK 参与 EMT 过程,EMT 包含细胞-细胞连接的分解、间叶组织标志表达代替上皮组织标志表达。在 FAK 突变细胞的 EMT 过程中,细胞表面的 E-cadherin 表达增高,并在 E-cadherin-based 结状结构中增加钙通道开关表达^[14]。

这些研究结果都与 FAK 调节分解 E-cadherin-based 的结状结构及内化 E-cadherin 有关。与这些研究结果相对的另一研究结果是,FAK 可以促进细胞-细胞联结的形成。通过 siRNA 干预抑制 FAK 在 Hela 中的表达,可阻碍 N-cadherin-dependent 细胞-细胞联结的形成。另外,FAK 的表达缺失可提高 Rac 的活性^[15]。相似的通过干扰 FAK 的信号通路,发现 FAK 可促进 NBT-II 细胞中 E-cadherin-dependent 细胞-细胞联结的形成^[16]。这些研究结果并未得到综合,不过很明显在不同的背景下,FAK 信号通路可以引导出不同的结果。

五、FAK 和微管之间存有的联系

有研究显示,活动的微管接触连接时黏着斑分解。FAK 作为黏着斑拆卸的调整因素,参与这个过程。由磷酸化的酪氨酸 925、Grb2、发动蛋白聚集形成的 FAK 复合体,是微管诱导黏着斑分解过程所必需的三个因素^[17]。再者,FAK 对微管的结构和组织的调整因素均有影响。在 FAK 表达量下调的细胞中,或者是表达不占显性优势的突变体中,微管表现出酪氨酸化和乙酰化作用的缺失,这两种翻译后的修饰都与微管的稳定性相关^[18]。而 Pyk2 缺失的破骨细胞对骨质重吸收障碍是由于 podosome 密封区毗邻的底层骨的形成困难造成的。Pyk2 缺失的细胞显示出微管稳定性的下降,所以,Pyk2 也表现出对微管的

稳定性起控制作用,其中的分子机制并不明确^[4]。Rho 的活跃水平在 Pyk2 缺失的情况下有所提高,活性异常的 Rho 与破骨细胞中微管的稳定性相关^[4]。综上所述,在 FAK 表达缺失的成纤维细胞和 Pyk2 表达缺失的破骨细胞中,微管的稳定性和 Rho 活跃异常两者间存有相似点,但其中的分子机制尚未阐明。

六、展 望

Pyk2 作为 FAK 家族成员,两者在结构上有较高的同源性。其过表达的现象在许多人类恶性肿瘤中被发现,这都显示了它作为一个潜在肿瘤化疗治疗靶点的潜力。虽然 FAK 和 Pyk2 控制肿瘤细胞迁移的分子机制还在探索中,但在活体或体外的实验中这两者对肿瘤细胞的作用都已经显现。

尽管黏着斑区域中的 FAK 和 Pyk2 有 40% 的同一性,这些数据提示它们可能与不同的蛋白相互作用,有不同的细胞内定位。与 FAK 相似的是,增量调节 Pyk2 表达可以在多种肿瘤中发现。肝癌 Pyk2 的高表达与高细胞转移、低细胞成活有关^[19]。与此相同,Pyk2 的表达量在非小细胞肺癌中升高与其本身更高的转移性有关,而 Pyk2 表达缺失的可以抑制转移细胞的成活和小肺癌细胞的繁殖^[20,21]。Pyk2 的表达显著增高见于早期和晚期的乳腺癌,以及伴有 ErbB-2 增高的 DCIS (乳腺导管原位癌)的早期、扩散的乳腺癌^[22]。PF-562,271 作为 Pyk2 的抑制因子,可在异种移植和转基因小鼠肿瘤模型中明显抑制肿瘤细胞的增殖。Pyk2 可促进肿瘤细胞的侵袭和增殖,通过对基因表达的调节,使细胞发生间叶组织到上皮组织的转化,促进肿瘤细胞转移。Yuan 等发现,ErbB-2 活性与 Pyk2 活性以及细胞黏附力呈正相关,而且 ErbB-2-Pyk2-ERK/MAPK 作为一个新的信号通路,调节 AR 阳性的人前列腺癌细胞黏附力。综上所述,Pyk2 可作为一个潜在疾病调节靶点而存在,特别是与肿瘤的侵犯相关,以及骨质疏松和炎症的细胞反应。

参考文献

- 1 Lim ST, Mikolon D, Stupack DG, *et al.* FERM control of FAK function: implications for cancer therapy [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7 (15): 2306-2314
- 2 Quinones, Kasiganesan H, Zhang YH, *et al.* $\beta 3$ integrin in cardiac fibroblast is critical for extracellular matrix accumulation during pressure overload hypertrophy in mouse [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45076
- 3 Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Theocharis SE. Focal adhesion kinase: a promising target for anticancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11 (10): 1315-1328
- 4 Gil-Henn H, Destaing O, Sims NA, *et al.* Defective microtubule-dependent podosome organization in osteoclasts leads to increased bone density in Pyk2(-/-) mice [J]. *J Cell Biol*, 178:1053-1064
- 5 Yadav S, Puri S, Linstedt AD. A primary role for Golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20:1728-1736
- 6 Uetrecht AC, Bear JE. Golgi polarity does not correlate with speed or persistence of freely migrating fibroblasts [J]. *Eur J Cell Biol*, 2009, 88:711-717
- 7 Okigaki M, Davis C, Falasca M, *et al.* Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:10740-10745
- 8 Owen KA, Pixley FJ, Thomas KS. Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179:1275-1287
- 9 Iwanicki MP, Vomastek T, Tilghman RW, *et al.* FAK, PDZ-RhoGEF and ROCKII cooperate to regulate adhesion movement and trailing-edge retraction in fibroblasts [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121:895-905
- 10 Lim Y, Lim ST, Tomar A, *et al.* Pyk2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility [J]. *J Cell Biol*, 2008, 180:187-203
- 11 Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16:94-98
- 12 Okigaki M, Davis C, Falasca M, *et al.* Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:10740-10745
- 13 Serrels B, Serrels A, Brunton VG, *et al.* Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9:1046-1056
- 14 Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, *et al.* Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling [J]. *Nat. Cell Biol*, 2002, 4:632-638
- 15 Yano H, Mazaki Y, Kurokawa K, *et al.* Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion [J]. *J Cell Biol*, 2004, 166:283-295
- 16 Playford MP, Vadali K, Cai X, *et al.* Focal adhesion kinase regulates cell-cell contact formation in epithelial cells via modulation of Rho [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314:3187-3197
- 17 Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen, G. G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase [J]. *Nat. Cell Biol*, 2005, 7:581-590
- 18 Park AY, Shen TL, Chien S, *et al.* Role of focal adhesion kinase Ser-732 phosphorylation in centrosome function during mitosis [J]. *J. Biol. Chem*, 2009, 284:9418-9425
- 19 Sun CK, Man K, Ng KT, Ho JW, *et al.* Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) promotes proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells through c-Src/ERK activation [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29:2096-2105
- 20 Zhang S, Qiu X, Gu Y, Wang E. Up-regulation of proline-rich tyrosine kinase 2 in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2008, 62:295-301
- 21 Roelle S, Grosse R, Buech T, Chubonov V, *et al.* Essential role of Pyk2 and Src kinase activation in neuropeptide-induced proliferation of small cell lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2007, 27:1737-1748
- 22 Behmoaram E, Bijian K, Jie S, Xu Y, *et al.* Focal adhesion kinase-related proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are co-overexpressed in early-stage and invasive ErbB-2-positive breast cancer and cooperate for breast cancer cell tumorigenesis and invasiveness [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173:1540-1550

(收稿日期:2013-11-04)

(修回日期:2013-12-03)