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

Diplomová práce

Funkční význam fosforylace tyrozínu 90 SH3 domény proteinu Src.

The functional significance of tyrosine 90 in SH3 domain of Src

Martin Sztacho

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

2009

Poděkování patří mému školiteli RNDr. Danielovi Röselovi Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Dále RNDr. Janu Brábkovi Ph.D. za konzultace. Mgr. Petrovi Jedelskému za provedené hmotnostní analýzy proteinů. Mgr. Marianu Novotnému Ph.D. za pomoc při počítačovém modelování. Laboratoři RNDr. Jiřího Petráka Ph.D. za pomoc při provedení 2D PAGE (ÚHKT Praha).

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s pomocí citované literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Srpen 2009

Martin Sztacho

Seznam zkratek

ABC	„ammonium bicarbonate“
AcN	Acetonitril
BSA	„bovine serum albumin“ hovězí sérový albumin
DTT	dithiotreithol
ECL	„Enzymatic Chemiluminescence“
ECM	„Extracellular matrix“
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
IAA	Iodoacetamid
IEF	izoelektrická fokusace
IPTG	„Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside“
M13	bakretiofág M13
MALDI	„matrix assisted laser disorption ionization“
MS	„mass sepctrometry“
PAA	polyakrylamid
PAGE	polyakrylamid gelová elektorforéza
PDB	„protein data bank“
PEG	polyethylenglycol
PPII	polyprolinový helix II. typu
RIPA	„radio immunoprecipitation assay“ pufr
rpm	„rounds per minute“ otáčky za minutu
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“ medium
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
SDS	dodecylsulfát sodný
SH2	src homology 2 doména
SH3	src homology 3 doména
SH4	src homology 4 doména
TBS	„Tris-buffered saline“ pufr
TL	totální lyzát HeLa
TOF	„time of flight“ detektor
TOF/TOF	označení pro MS tandemovou analýzu
Tris	tris-hydroxymetyl-aminoetan
TTBS	„Tween Tris-buffered saline“ pufr
WT	Wild type, divoký typ
Y90E	fosfomimikující mutace tyrozínu 90 Src SH3 za glutamát
Y90F	nefosforylovatelná mutace tyrozínu 90 Src SH3 za fenylalanin

Obsah

1. Úvod **7**

2. Literární přehled **8**

2.1. Kináza Src *8*

2.2. Struktura Src kinázy *8*

2.3. Regulace aktivity Src kinázy *9*

2.3.1. Autoinhibiční interakce SH2 domény s Tyr 527 C-koncové oblasti **9**

2.3.2. Autoinhibiční interakce mezi SH3 doménou a CD linkerem **10**

2.3.3. Model regulace kinázové aktivity Src kinázy **11**

2.3.4. Ovlivnění aktivity Src kinázy vazbou jiných proteinů na SH3 a SH2 domény **12**

2.4. Src kináza v integrinové signalizaci *12*

2.5. SH3 doména kinázy Src *14*

2.5.1. Stavba SH3 domény **14**

2.5.2. Vazebný povrch SH3 domény **18**

2.6. Vlastnosti PPII - helixu a výjimečnost prolinu *19*

2.6.1. Určení orientace ligandu na SH3 doméně **19**

2.6.2. Význam PPII - helixu v sekvenci vazebného ligandu **21**

2.7. Tyrozíny na hydrofobním vazebném povrchu SH3 domény *22*

2.7.1. Tyrosin v 3_{10}-helixu **23**

2.7.2. Tyrosin v distalní- smyčce **24**

3. Metody **33**

3.1. Kultivace bakteriálních kmenů *33*

3.2. Kultivace savčích buněk *34*

3.3. Přehled použitých protilátek *34*

3.4. Standard molekulové hmotnosti proteinů na SDS-PAGE *34*

3.5. Použité vektory *35*

3.6. SDS-PAGE *36*

3.7. Barvení PAA gelu pomocí Coomasie Blue barviva *37*

3.8. Western blot *37*

3.9. Reverzibilní barvení proteinů Ponceau S *38*

3.10. Imunodetekce proteinů na membráně *38*

3.11. Pasážování HeLa fibroblastů *39*

3.12. Příprava a rozpěstování stabilátů HeLa fibroblastů *40*

3.13. Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk *41*
3.14. Stanovení koncentrace proteinů – Folinova metoda *42*
3.15. Software *43*
3.16. Afinitní purifikace GST- fuzních proteinů *44*
3.17. GST-SH3 Pull-down *46*
3.18. Příprava vzorku pro MS *47*
3. 19. 2D ELFO IEF/SDS-PAGE *48*
3. 20. Phage display *50*
4. Výsledky **53**
4.1. Modelování vazebného povrchu SH3 domény kinázy Src *53*
4.1.2. Modleování vlivu fosforylace a fosfomimikující mutace tyrozínu 90 SH3 domény Src na vazbu ligandu. **53**
4.1.1. Modelování ligandů I. a II. třídy na vazebném povrchu SH3 domény kinázy Src. **54**
4.2. Testování vazebných schopností variant SH3 domény kinázy Src *58*
4.3. Identifikace nových interakčních partnerů SH3 domény kinázy Src *62*
4.4. Phage display *70*
5. Diskuze **74**
6. Shrnutí **77**
7. Seznam literatury **78**

1. Úvod

Cíl této práce je ukázat vliv fosforylace tyrozínu 90 kinázy Src (v této práci je používáno číslování z kuřecí Src kinázy) na vazebném povrchu SH3 domény na její vazebné schopnosti. Tato práce dále rozšiřuje skupinu interakčních partneru kinázy Src vázaných právě přes SH3 doménu. SH3 doména je polyprolin rozeznávající interakční modul zajišťující protein-proteinové interakce, který je strukturní součástí řady proteinů regulujících množství buněčných pochodů. Kináza Src je v buňce striktně regulována, neboť její funkce zasahuje do tak zásadních pochodů jako je diferenciace, proliferace, migrace, apod. Jemný mechanizmus regulace je kromě jiného zajištěn i přímo intramolekulární inhibicí pomocí SH3 a SH2 domén. V případě intramolekulární vazby interaguje hydrofóbní kapsa SH3 domény s úsekem CD linkeru a přispívá k udržení inaktivní konformace kinázy Src. Mutačními studiemi byly identifikovány aminokyselinové zbytky, které jsou důležité pro vazbu ligandu na SH3 doménu (kromě jiných především Tyr 90, Asn 135 a Tyr 136 (Xu *et al.*, 1997; Erpel *et al.*, 1995). Mezi nimi Tyr 90 jako nedávno objevené místo *in vivo* fosforylace. Na objevu tohoto místa spolupracovala také naše laboratoř. K objevu vedla srovnávací analýza fosfoproteomu myších embryonálních fibroblastů a od nich odvozených fibroblastů transformovaných konstitutivně aktivovaným onkoproteinem Src. U Src transformovaných fibroblatů byla výrazně nabohacena fosoforylace na Tyr 90 (Luo *et al.*, 2008). Poměrně nedávno bylo publikováno, že fosforylace tyrozínu 89 v SH3 doméně kinázy c-Abl (homologní tyrozínu 90 u Src) negativně reguluje intramolekulární i intermolekulární interakce této SH3 domény (Chen *et al.*, 2008). Kináza c-Abl je v inaktivovaném stavu udržována obdobným mechanizmem jako příbuzné Src kinázy. To naznačuje možný význam tohoto vysoce konzervovaného tyrozínového zbytku při regulaci vaznosti SH3 domén s možnými důsledky v buněčné signalizaci. Jak bude v této práci ukázáno Tyrozín 90 a jeho fosfomimikující mutace (Tyr 90 za Glu) má negativně regulační vliv na vazbu ligandů. Toto ovlivňuje také kinázovou aktivitu a patrně i onkogenní vlastnosti kinázy Src, které zatím ještě nejsou zcela vysvětleny.

2. Literární přehled

2.1. Kináza Src

Kináza Src patří mezi nereceptorové tyrozínové protein kinázy. Je nejprobádanějším zástupcem rodiny Src kináz. Tato rodina obsahuje 11 členů: Src, Blk, Brk, Frk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Srm a Yes (shrnuto v Roskoski, 2004). Původně bylo objeven tzv. v-src, který je součástí viru Rousova kuřecího sarkomu (shrnuto v Summy a Gallick, 2003, Collett a Erikson, 1978; Hunter a Sefton, 1980). Buněčný homolog c-src je přítomen ve všech typech buněk vyšších živočichů a účastní se přenosu signálu skrze receptorové tyrozínkinázy, integriny, receptory spojené s G-proteiny a další (Collett *et al.*, 1979). Virovou transformaci vyvolávající v-src postrádá regulační C-koncovou oblast ve které je velice důležitý *in vivo* fosforylovatelný tyrozín 527. Ten slouží jako substrát SH2 doméně při auto-inhibiční interakci a v-src je tudíž vysoce aktivní (Cooper et al., 1986).

2.2. Struktura kinázy Src

Src kináza má velikost 60 kDa. Strukturně lze rozlišit šest částí. Od N-konce: N-koncovou SH4 doménu, tzv. unikátní doménu, SH3 doménu, SH2 doménu, CD linker, katalytickou doménu a C-koncovou oblast. SH4 doména podléhá myristylaci, což vede k lokalizaci kinázy na membránu. Tzv. unikátní doména má úlohu např. při interakci Src s jinými proteiny. Mezi jednotlivými členy Src rodiny je dosti variabilní co se sekvence i funkce týče (Shaw *et al.*, 1990, Stover *et al.*, 1994, Johnson *et al.*, 2000). SH3 doména, jak již bylo řečeno, je modul umožňující protein-proteinovou interakci. O této doméně bude dále v této práci podrobněji pojednáno.

Mezi SH3 a SH2 doménou je krátký 6 aminokyselinový linker, který může mít vliv na zřetězení obou domén (Young *et al.*, 2001). Je možné, že délka tohoto linkeru určuje míru vzájemného ovlivnění schopnosti vazby obou domén. SH2 doména podobně jako SH3 umožňuje interakci protein-proteinového charakteru. Váže fosforylovaný tyrozín s ohledem na přilehlé sekvence, které velice zásadně ovlivňují specifitu vazby (Xu *et al.*, 1997; Songyang *et al.*, 1993). CD-linker je oblast 12 aminokyselin spojující SH2 doménu s N-lalokem kinázové domény. Je nesmírně důležitá v autoregulačním mechanizmu, kde slouží jako substrát/ ligand pro SH3

doménu a navíc podobně jako linker mezi SH3 a SH2 má funkci jako sterický komunikační můstek mezi doménami (Gonfloni *et al.*, 1997; Gonfloni *et al.*, 1999). Vlastní katalytická doména má strukturu velice homologní k ostatním protein kinázám se shodným mechanizmem regulace aktivace nezávislým na okolních modulech (Yamaguchi a Hendrickson, 1996; Xu *et al.*, 1997, Huse a Kuriyan, 2002). C-koncová část Src kinázy je důležitá pro udržení inaktivní konformace. Tyrozín 527 je po fosforylaci substrátem pro vlastní SH2 domén. Tím dochází k intramolekulární stabilizaci inaktivovaného stavu kinázy (Cooper *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Je zajímavé že vazebná místa pro SH3 a SH2 domény sloužící pro intramolekulární interakci vedoucí k snížení kinázové aktivity neobsahují ideální sekvence vyhledávané těmito vazebnými motivy. To pravděpodobně souvisí s vybalancovaným mechanizmem regulace. Tyto ligandy jsou ve sterické výhodě před intermolekulárními partnery, neboť jsou na téže molekule. Tyto interakce mohou být díky nižší vazebné energii snadno vykompetovány silnějšími intermolekulárními interakcemi.

2.3. Regulace aktivity kinázy Src

2.3.1. Autoinhibiční interakce SH2 domény s Tyr 527 C-koncové oblasti

Jedná se o původní model regulace aktivity Src kináz, kde dochází k interakci SH2 domény s C-koncovou oblastí obsahující fosforylovaný tyrozín 527 (Cooper *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999). Fosforylaci tohoto tyrozínu v buňce zajišťují kinázy z rodiny Csk. Tato interakce má zásadní vliv na určení kinázové aktivity a je umožněna pouze za předpokladu, že je tyrozín 527 ve fosforylovaném stavu (Xu *et al.*, 1997). Jak již bylo zmíněno intramolekulární ligand pro SH2 doménu neobsahuje ideální vazebný motiv. Přestože pro tento motiv je zásadní fosforylovaný tyrozín, je síla vazby silně ovlivněna dalšími přilehlými aminokyselinami. Src C-koncová oblast postrádá na pozici +3 nepolární zbytek (leucin, izoleucin). Místo něho je přítomen glycin. Tato pozice odpovídá místu, které zapadá do druhé vazebné kapsy na vazebném povrchu SH2 domény. To má za následek možnost snadného

vykompetování vazby intermolekulárním ligandem s vyšší afinitou (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997; Waksman *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1993). Mutační analýzy ukázaly významnost tohoto regulačního mechanizmu s ohledem na kinázovou aktivitu (Cooper *et al.*, 1986; Superti-Furga *et al.*, 1993; Irby *et al.*, 1999). Tato interakce mezi C-koncovou oblastí a SH2 doménou je posílena iontovými vazbami mezi C-lalokem katalytické domény a opět SH2 doménou (Xu *et al.*, 1997).

2.3.2. Autoinhibiční interakce mezi SH3 doménou a CD linkerem

Intramolekulární vazebný motiv pro SH3 doménu se nachází v oblastí zvané CD linker. Tento ligand spadá díky své orientaci na SH3 doméně do tzv. II. třídy ligandů (viz 2.6.1.). Tento motiv se liší se od preferované vazebné sekvence SH3 domény kinázy Src mimo jiné i proto, že obsahuje pouze jeden prolin. Prolin obsažený v CD linkeru však přesně zapadá do první vazebné hydrofobní kapsy na povrchu SH3 a naznačuje tak, že tato kapsa by mohla mít zásadní vliv na výši afinity. Vzhledem k tomu, že tato kapsa obsahuje tyrozín 90, je toto zajímavá informace v kontextu regulace kinázové aktivity (viz dále) (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997). Bylo ukázáno, že mutace některých aminokyselin tvořících vazebný povrch SH3 domény má přímý vliv na stupeň aktivity kinázy (Erpel *et al.*, 1995; Gonfloni *et al.*, 1997). To ukazuje významnost vazby SH3 domény na CD linker kontextu regulace Src aktivity.

V naší laboratoři byl dále prokázán zásadní význam interakce SH3 domény a části N-koncového laloku katalytické domény pro udržování inaktivní konformace a regulaci kinázové aktivity u deregulovaných forem proteinu Src (v-Src a Y527F mutanty). Tyto mutanty postrádají přítomnost inhibiční vazby mezi SH2 doménou a C-koncovou oblastí s Tyr 527 a je zajímavé, že mutace v CD linkeru k deregulaci kinázové aktivity nevedly (Brábek a Mojžita *et al.*, 2002). To by mohlo ukazovat na jakousi nadřazenost SH2 interakce v autoinhibiční regulaci nad SH3 interakcí. Podobně jako u SH2 dochází u SH3 také ke kontaktu katalytické domény a sice s její N-lalokovou částí. Ke kontaktu dochází vytvořením iontových vazeb utvořených mezi aminokyselinami z RT-smyčky (Arg 95 a Thr 96) a n-Src smyčky (Asp 177) (viz 2.5.1.) s aminokyselinami na povrchu N-laloku katalytické domény (Trp 286, Arg 318) (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997). Význam těchto interakcí je patrný z mnohých mutačních studií, které se zabývají zvýšením kinázové aktivity v závislosti na mutace v RT-smyčce, n-Src smyčce a CD linkeru (Levy a Brugge,

1989; Superti-Furga *et al.*, 1993; Gonfloni *et al.*, 1997; Brábek a Mojžita *et al.*, 2002).

2.3.3. Model regulace kinázové aktivity Src kinázy

Jak již bylo zmíněno, aktivitu kinázy Src ovlivňují autoinhibiční regulace prostřednictvím SH2 a SH3 domén. Tyto domény interagují s vazebnými motivy uvnitř vlastní molekuly a navíc kontaktují přímo katalytickou doménu, čímž kinázovou doménu stabilizují v konformaci, která není přístupná vazbě substrátu. Pro regulaci zprostředkovanou SH2 a SH3 doménou je významný krátký linker mezi oběma doménami (SH3, SH2), který ovlivňuje zřetězení obou domén a propojuje jejich působení (Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001). Nicméně určitá nezávislost působení obou regulačních modulu patrně existuje, neboť bylo pozorováno, že není nutné zrušit obě inhibiční interakce k zvýšení enzymatické aktivity Src kinázy. (Arold *et al.*, 2001; Lerner a Smithgall, 2002; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

To vede k myšlence, že obě domény umožňují jemnou regulaci aktivity změnou konformace kinázy. Těch je tedy patrně více. Zrušením jen jedné z intramolekulárních interakcí dojde k částečnému navýšení aktivity celého enzymu. To by umožňovalo odlišit vstupní aktivační signál, podle toho přes kterou regulační doménu jde, a tím následně potencovat míru výstupní enzymatické aktivity při přenosu signálu dále (Porter *et al.*, 2000; Lerner a Smithgall, 2002; Lerner a Smithgall, 2002; Lerner *et al.*, 2005; Trible *et al.*, 2006).

Z krystalické struktury Src kinázy je patrno, že aktivní konformace bez fosforylovaného tyrozínu 527 je SH3 doména stále v kontaktu s CD linkerem a N-lalokem (Cowan-Jacob *et al.*, 2005). Toto je v souladu s pozorováním Src kinázy pomocí SAXS („Small-Angle X-ray Scattering"). Byla pozorována existence inaktivní, pomocí SH3 a SH2 domén plně uzavřená konformace. Dále dvě odlišné konformace u mutované varianty Y527F. Jedna patrně představovala mezistupeň mezi aktivní a inaktivní konformací, kde SH3 doména zůstala navázána na CD linker a N-lalok kinázové domény a SH2 doména byla pouze v kontaktu s C-lalokem katalytické domény. Druhá konformace pak tuto interakci postrádala (Bernadó *et al.*, 2007).

2.3.4. Ovlivnění aktivity Src kinázy vazbou jiných proteinů na SH3 a SH2 domény

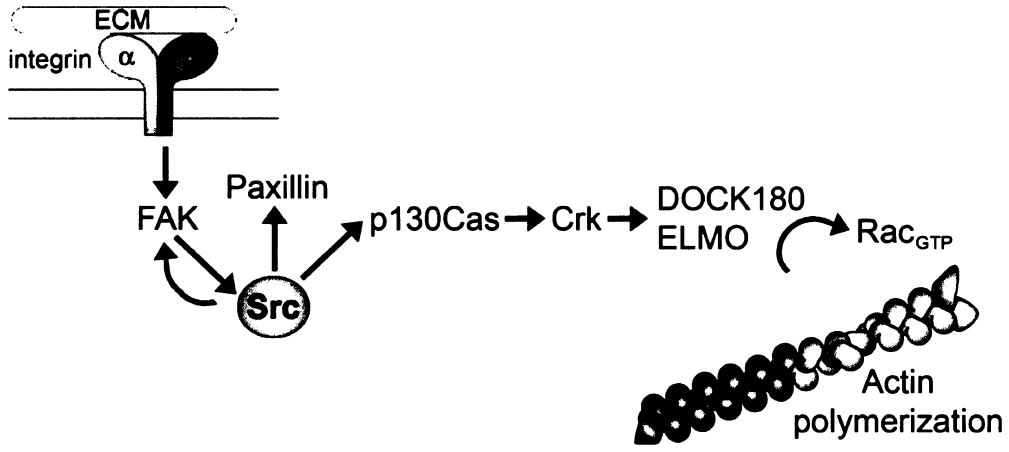
Oba interakční moduly mohou být vyvázány z intramolekulární autoinhibiční vazby jinými proteiny nesoucími vazebné motivy s ideálnější sekvencí. U těchto interakčních partnerů je vazebná afinita k obou doménám vyšší. Vykompetováním autoinhibičních vazeb dochází k zvyšování enzymatické aktivity Src kinázy. K tomuto může dojít jak pouze u jedné z domén, tak i u obou zároveň s patřičným zvýšením kinázové aktivity (Kypta *et al.*, 1990; Broome a Hunter, 1997; Bonyaratanakornkit *et al.*, 2001; Schreiner *et al.*, 2002; Sonnenburg et *al.*, 2003).

2.4. Src kináza v integrinové signalizaci

Patrně nejvíce prostudovanou signální drahou, kde participuje Src kináza je přenos signálu přes integriny. Integriny zprostředkovávají komunikaci extracelulárních komponent matrix (ECM), jako např. fibronektin, kolagen, laminin, vitronektin s intracelulárním prostorem. Kromě vlastní adhezívní vazby na matrix umožňují integriny a s nimi asociované proteiny přenos signálu/informace o tom, zda je buňka adherovaná na matrix. To ovlivňuje celou řadu buněčných pochodů vedoucích k výstupu regulace proliferace, diferenciace, apoptózi apod. Uvnitř buňky dochází v závislosti na interakci s ECM k remodelaci cytoskeletárních aktinových struktur. Membránové struktury, kde dochází k zakoncentrování integrinů, popř. i jiných receptorů se říká adhezívní foky.

Na intracelulární straně dochází k shlukování proteinů účastnících se přenosu signálu dále do buňky. Jedním z nich je kináza FAK (focal adhesion kinase). FAK je nereceptorová tyrozínová kináza mající v buňce zásadní roli v přenosu signálu přes integriny (Polte a Hanks 1995; Polte a Hanks 1997). Při kontaktu ECM je FAK částečně aktivována autofosforylací na tyrozínu 397. Tento tyrozín slouží jako substrátové místo SH2 doméně Src kinázy. Vlivem vazby SH2 Src na FAK dochází k rozvolnění inaktivní konformace (viz výše) a k vzrůstu Src aktivity. To má za následek nafosforylování dalších tyrozínů na FAK (především Tyr 925), čímž jí aktivuje. Ten pak slouží jako místo navázání SH2 domény adaptorového proteinu Grb2 a tím propojení s MEK/ERK signalizací (Schlaepfer *et al.*, 1999). Signalizace z integrinů může být i FAK nezávislá, neboť kinázy Src může prostřednictvím Shc proteinu přímo aktivovat Ras s napojením opět na ERK signalizaci (Wary *et al.*,

1996). Další protein účastnící se regulace organizace aktinového cytoskeletu v odpovědi na Src signalizaci je adaptorový protein Cas (*Obr.* 1). Bylo prokázáno, že Src kináza a protein Cas jsou funkčně velice provázány, neboť Cas může být přímo fosforylován Src kinázou. Interakci adaptorového proteinu Cas a kinázy Src zprostředkovává SH3 doména Src kinázy (Polte a Hanks 1995; Vuori *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2004). Paxillin je další z řady proteinů fosforylovaných kinázou Src v odpovědi na integrinovou signalizaci (Burnham *et al.*, 2000). Tento adaptorový protein slouží jako „dokovací lešení" pro sestavení periferních adhezních komplexů (shrnuto v Turner, 1998).



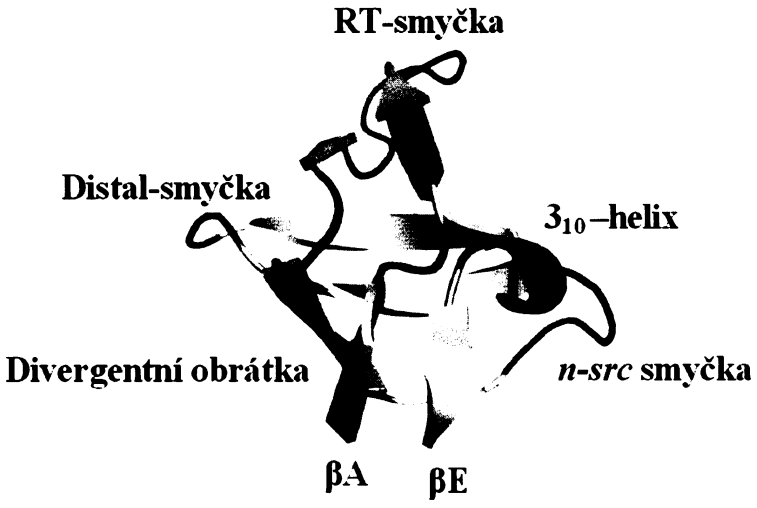
Obr. 1
Zjednodušené vyobrazení signalizace kinázy Src od integrinů vedoucí k změnám regulace aktinového cytoskeletu (upraveno Faccio *et al.*, 2005).

2.5. SH3 doména kinázy Src

2.5.1. Stavba SH3 domény

SH3 doménu kinázy Src tvoří 57 aminokyselinových zbytků. Nabývá globulárního uspořádání β-barelu sestávající z pěti β-řetězců (βA- βE). β-řetězce tvoří dva navzájem kolmé antiparalelní β-listy tvořící hydrofobní jádro domény. Pro usnadnění popisu SH3 domény, bude doména rozdělena do šesti strukturních oblastí (viz *obr* 2.).

1) N- a C-koncové β-řetězce (βA a βE) N- a C-konec polypeptidového řetězce SH3 domény se vzájemně přibližují a tvoří antiparalelní β-list stabilizovaný interakcemi postranních aminokyselinových řetězců.
2) Krátký 3_{10}-helix před β-řetězcem (βE). Tento helix zapříčiňuje 90° úhel, který vzájemně svírají oba β-listy.
3) RT-smyčka 12 zbytků dlouhá velice flexibilní oblast mezi β-řetězcem (βA) a tzv. divergentní obrátkou, je funkčně důležitá pro vazbu ligandu na doméně.
4) Divergentní obrátka zajišťuje přechod RT-smyčky do centra trojvláknového β-listu a je tvořena **5) *n-src*** smyčkou a **6) distální-smyčkou** (Riddle *et al.*, 1999; Kaishan *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1997).

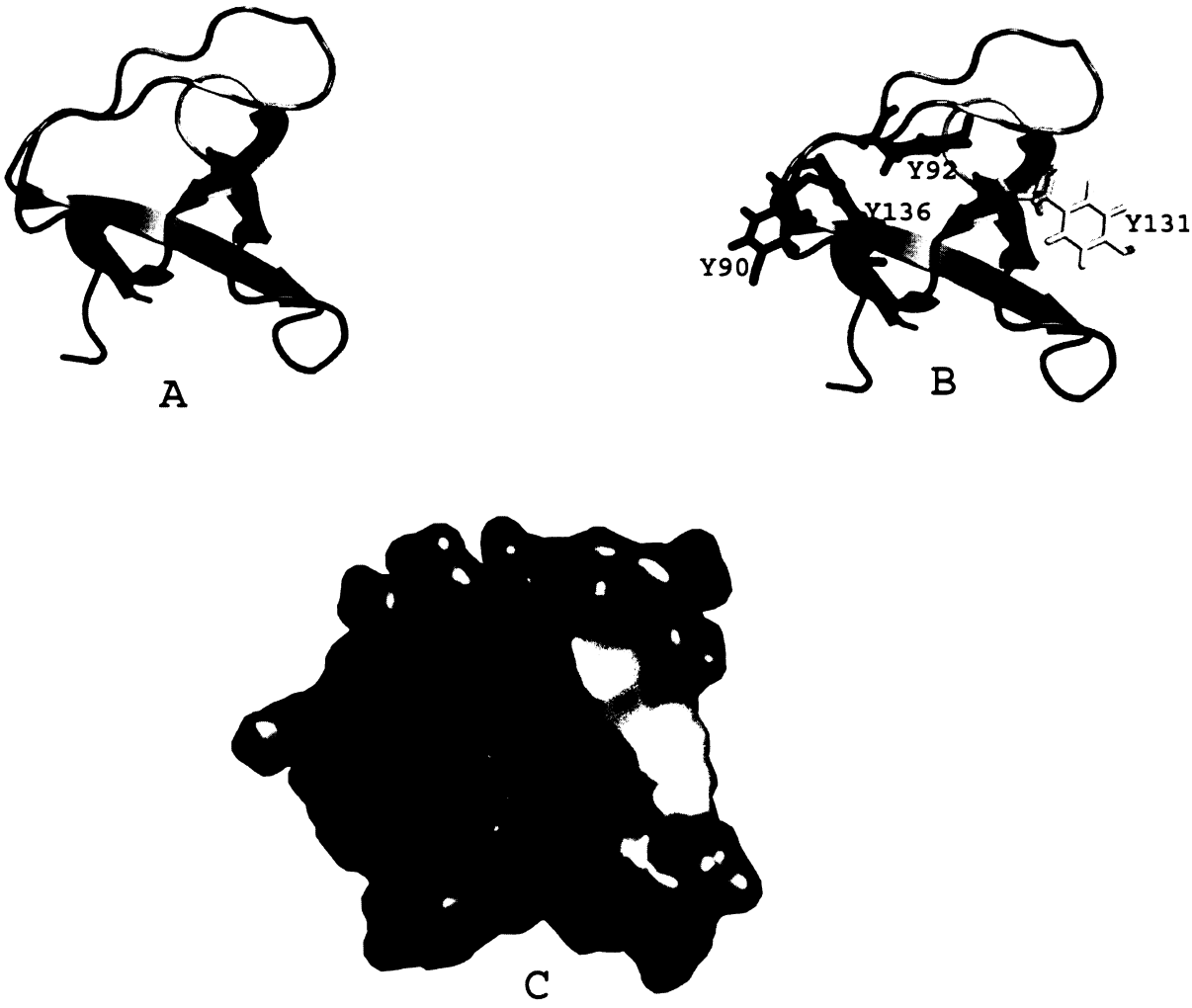


Obr. 2

Schématicky znázorněná struktura SH3 domény: *Žlutě*- β-řetězce. *Červeně*- α-helix. *Zeleně*- smyčky. (PDB kód: 1JGFC. Data převzata z Kohda *et al.*, 1994; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

2.5.2. Vazebný povrch SH3 domény

Vazebné místo SH3 domény představuje kapsu tvořenou převážně RT-smyčkou a *n-src* smyčkou. Uvnitř této kapsy jsou vesměs hydrofobní aminokyseliny, z nichž některé jsou vysoce konzervované (viz *obr.* 3). Mezi tyto, pro vznik vlastní vazebné interakce, důležité zbytky např. patří Tyr 90, Tyr 92, Asp 99, Trp 118, Tyr 131, Pro 133, Asn 135, Tyr 136 (číslováno pro myší Src). (shrnuto v Agrawal *et al.*, 2002; shrnuto v Mayer, 2001)

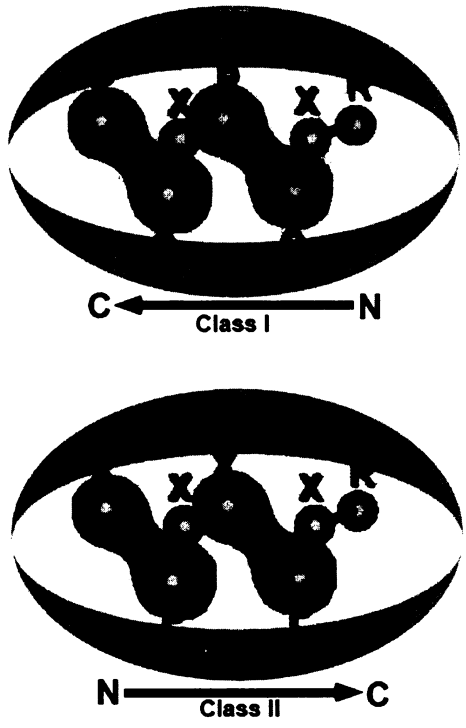


Obr. 3

Modely SH3 domény: *A)* schématická struktura, *B)* zobrazené tyrosinové zbytky, *C)* povrchová struktura SH3. *Červeně-* vazebná kapsa formovaná zbytky Y90, N135, Y136. *Zeleně-* vazebná kapsa formovaná zbytky Y92, W118, P133. *Žlutě-* vazebná kapsa formovaná zbytky D99, Y131. (PDB kód: 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

Záměny některých z těchto zbytků jsou zodpovědné za preferenci různých PPII ligandů mezi různými SH3 doménami. Při mutacích výše zmíněných aminokyselinových zbytků je často ovlivněna schopnost SH3 domény nadále vázat její přirozené interakční partnery. To má často za následek selhání či nějakou aberaci signální dráhy, které se protein obsahující danou SH3 doménu účastní. Fosforylovatelnost některých konzervovaných tyrosinů by mohla být využívána k regulaci vazebné schopnosti SH3 domén v buňce.

Na hydrofobním povrchu tvořeném RT-smyčkou a *n-src* smyčkou lze rozlišit celkem tři vazebné kapsy. Vyjma třetí tzv. specifitní kapsy jsou tyto kapsy při vazbě s PPII ligandem obsazeny dipeptidem sestávajícím z většinou alifatické aminokyseliny a prolinu. Specifitní kapsa je zodpovědná za určení orientace ligandu na SH3 doméně pomocí vazby tzv. „kotvícího zbytku", kterým je obvykle arginin (viz *obr.* 4).



Obr. 4

Určení orientace ligandu na povrchu SH3 domény: *Červeně-* vazebná kapsa formovaná zbytky Y90, N135, Y136. *Zeleně-* vazebná kapsa formovaná zbytky Y92, W118, P133. *Žlutě-* vazebná kapsa formovaná zbytky D99, Y131.*Modré P-* prolinové zbytky nezbytné pro vazbu PxxP core. *Oranžové X-* u ideálního ligandu místo pro přemosťující prolin. *Fialové R-* kotvící zbytek. *Hnědé X-* místo interakce neprolinovéno zbytku s SH3 doménou. (převzato a upraveno z Mayer, 2001)

Tzv. core sekvence obecně značená PxxP (prolin-x-x-prolin) je sekvence rozpoznávaná vazebným povrchem SH3 domény. Optimální ligand obsahuje kromě těchto prolinů i další proliny propojující oba dipeptidy uvnitř vazebných kapes. Tento sekvenční motiv se značí RpxPpxP pro ligand I. resp. xPpxPpR pro II. třídy (kde x je jakákoliv aminokyselina, p je tzv. přemosťující prolin a R je tzv. „kotva" většinou arginin).

Dále určuje specificitu SH3 domény rozsáhlejší vazebný povrch domény, se kterým přichází do kontaktu ligand. Pokud daná SH3 doména neváže nějaký předložený ligand, je to z velké části způsobeno tím, že tento ligand nemá odpovídající tzv. „lemující sekvenci". Lemující sekvence sestává z aminokyselin obklopujících vlastní PxxP motiv na ligandu. Ligand s nesprávnou lemující sekvencí má velmi sníženou afinitu k SH3 doméně. Pokud lemující sekvence neodpovídá rozsáhlejšímu povrchu domény, tak ligand nemůže zaujmout na SH3 doméně požadovanou konformaci a tím je afinita domény k tomuto ligandu významně oslabena (viz *obr.* 5).

Přítomnost vlastní core sekvence PxxP ligandu není dostatečnou podmínkou pro vazbu na SH3 doménu. Pokud celý vazebný motiv ligandu má sekvenci vyhovující vazebnému povrchu dané SH3 domény. Dojde po prvotním navázání prolinů z PxxP core sekvence k zaujetí pseudohelikální (viz dále) konformace ligandu na povrchu SH3 domény. Ligandy, které neobsahují core sekvenci se až na výjimky na SH3 doménu neváží vůbec. Toto podporuje myšlenku, že core sekvence PxxP slouží pro prvotní navázání ligandu (Feng *et al.*, 1995).

Obr. 5

Vazba ligandu I. třídy, resp. II. třídy na povrchu SH3 domény, kde je vidět jak aminokyselinové zbytky ligandu přesně zapadají do nerovností na povrchu SH3 (PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

2.6. Vlastnosti PPII - helixu a výjimečnost prolinu

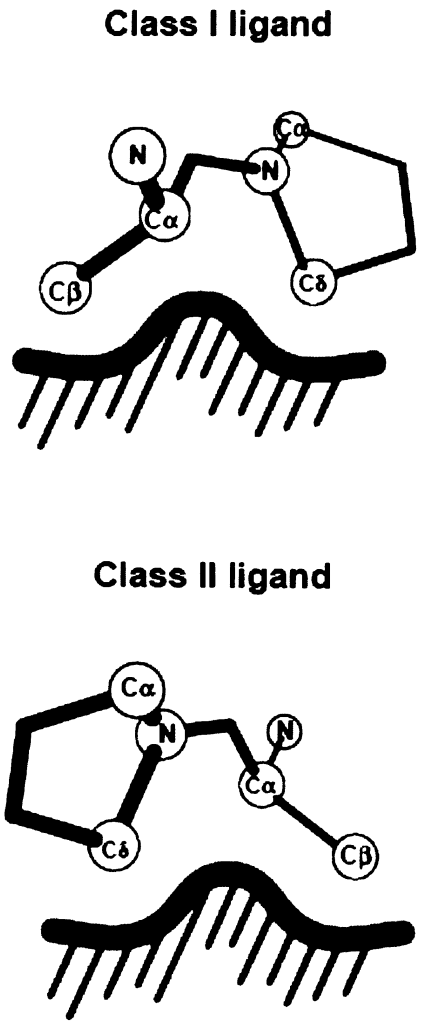
Jak již bylo řečeno, oblast vázaná SH3 doménou obsahuje krátkou prolin-bohatou konzervovanou sekvenci. Prolin-bohaté sekvence zaujímají protáhlou konformaci, která dovoluje kontakt s SH3 doménou. Tato konformace má podobu levotočivé šroubovice nazývané PPII-helix (pseudohelix). Na příčném řezu zbytky tvoří přibližně vrcholy trojúhelníku. Helix má tedy tři zbytky na obrátku. Tato skutečnost má za následek to, že každá třetí aminokyselina je ve stejném vrcholu trojúhelníku. PPII struktura svojí základnou kontaktuje vazebný povrch SH3 domény (shrnuto v Mayer, 2001; Feng *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1994).

2.6.1. Určení orientace ligandu na SH3 doméně

Ligandy SH3 domény jsou schopné vazby ve dvou orientacích „+" (tzv. ligandy I. třídy) a „–„ (tzv. lidandy II. třídy) (viz *obr.* 5 a 7). Za preferenci vazby ligandu v té či oné orientaci je zodpovědná především orientace „kotvícího zbytku" vzhledem ke core sekvenci PxxP ligandu. Oba typy ligandu (I. i II. třídy) mohou tvořit vodíkové můstky mezi karbonylovým kyslíkem prolinu a povrchovými aminokyselinami na SH3 doméně. Je zajímavé, že k těmto interakcím u obou orientací dochází mezi analogickými zbytky na ligandu a vždy stejnými aminokyselinami na SH3 doméně. Tyto interakce se liší jen tím, že prolinový karbonyl interaguje s danou aminokyselinou na povrchu SH3 domény z opačné strany (viz *obr.* 6). Toto je zjednodušeně podstata pseudo-symetrie PxxP ligandu. Vodíkové můstky jsou stereospecifické, avšak vzhledem k pseudo-symetrické stavbě obou typů PPII, nemají zásadní vliv na orientovanost ligandu na SH3 doméně. Tvorba vodíkových můstků tedy jen zapříčiňuje rozpoznání PPII-helix (Lim *et al.*, 1994).

Za určení orientace je zodpovědný bazický zbytek na ligandu, umístěný mimo vlastní PxxP motiv. Tento zbytek je většinou arginin, lysin a méně často tyrosin. Jak již bylo zmíněno, je to jakási "kotva" určující orientaci ligandu na SH3 doméně. Kotvící zbytek je umístěný N- či C-koncově vzhledem k PxxP motivu v závislosti na tom, do jaké třídy ligand spadá. Různé SH3 domény pak mají na své RT-smyčce většinou asparagin či glutamát, který interaguje s „kotvou" a tím určí orientaci ligandu (Feng *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1994).

Je tedy zřejmé, že rozdíly v orientaci ligandu jsou určeny především umístěním kotvících aminokyselinových zbytků vzhledem ke core PxxP ligandu (viz *obr.* 4) (shrnuto v Argawal *et al.*, 2002).



Obr. 6

Ukázka interakce povrchu SH3 domény s prolinovým zbytkem.
(převzato z Mayer 2001)

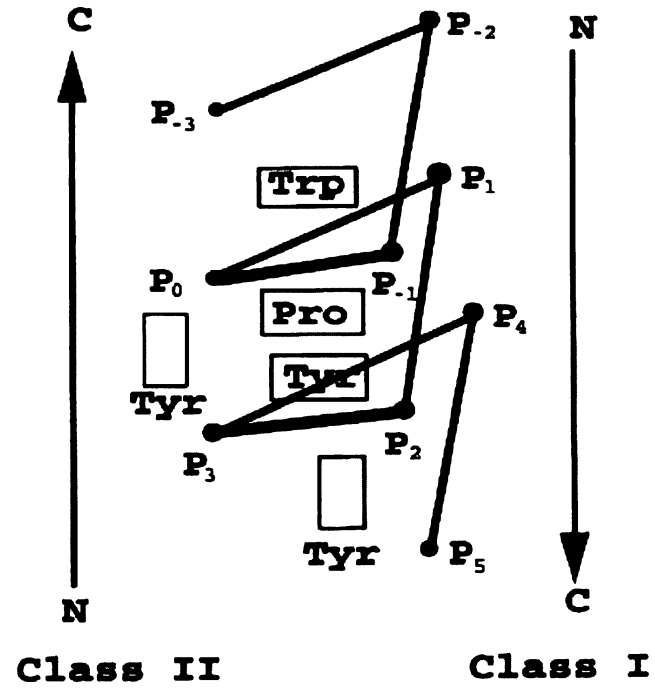
2.6.2. Význam PPII - helixu v sekvenci vazebného ligandu

Další velice důležitý mechanismus určení orientace je založen na míře tolerance neprolinových postranních zbytků umístěných na konkrétních vazebných místech uvnitř hydrofobního povrchu SH3 domény. U většiny ligandů třídy I. jsou na vazebných místech P_{-1} a P_2 tolerovány aminokyseliny jako lysin, prolin, valin. Na místech P_0 a P_3 jsou naopak vyžadovány prolinové zbytky. Tolerance zbytků lysin, valin aj. na místech P_0 a P_3 u ligandů II. třídy je jakoby inverzní k předešlému případu. Pro vazbu ligandů II. třídy je tedy vyžadována přítomnost prolinu na místech P_{-1} a P_2 (viz *obr.* 7) (Lim *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994).

Důvod proč SH3 domény specificky rozeznávají sekvence obsahující prolin, je v jedinečnosti prolinu. Bylo zjištěno, že SH3 domény mají dva požadavky na ligand:

1. přítomnost N-substituovaného zbytku na stanoveném místě v ligandu.
2. C^{α}-substituovaný zbytek předcházející zbytku N-substituovanému.

Ve výše zmíněném uspořádání, jsou obě substituované skupiny odděleny jen jedním atomem uhlíku. Toto uspořádání tvoří relativně pevnou strukturu schopnou umístění do hydrofobních kapes na vazebném povrchu domén. Prolin, jako jediná N-substituovaná aminokyselina splňuje obě sekvenční podmínky SH3 domény na ligand (viz *obr.* 6) (Nguyen *et al.*, 1998). Některé vazebné sekvence obsahují např. pouze jeden prolin. Tyto interakce byly pozorovány např. u intramolekulátní regulaci aktivity Src kinázy a mají značně sníženou sílu vazby oproti PxxP obsahujícím ligandům (Xu *et al.*, 1997).. Přítomnost PPII-helixu je nezbytná z důvodu rozeznání ligandu. Peptid, který neobsahuje tuto sekvenci není rozeznán jako ligand a je tedy jeho interakce s SH3 doménou znemožněna.



Obr. 7

Vazba PPII – helixu na vazebném povrchu SH3 domény s vyobrazenými pozicemi pro vazbu prolinů na PxxP core. (převzato a upraveno z Agrawal *et al.*, 2002)

2.7. Tyrozíny na hydrofobním vazebném povrchu SH3 domény

Tyrozíny na hydrofobním vazebném povrchu SH3 domény jsou rozmístěny s nápadnou homologií mezi jednotlivými SH3 doménami nejrůznějších proteinů. To naznačuje jejich potencionální důležitost při vazbě konkrétních ligandů a patrně i při regulaci vazebné funkce SH3 domény a následně funkceschopnosti celých proteinů. Homologické tyrozíny jsou v následující kapitole rozděleny podle toho v jaké části SH3 domény se vyskytují. Důraz je kladen na to, jaký má vliv fosforylace či bodové mutace na schopnost vazby intermolekulárních ligandů. Též je diskutována neméně významná intramolekulární interakce u případů, kde je prokázána.

Pro přehlednost je připojena tabulka 1 poukazující na to, které tyrozíny jsou homologické u různých proteinů. Pokud v textu není některý tyrozín nějakého proteinu z tab. 1 diskutován, pak zatím neexistuje studie zabývající se významem tohoto tyrosinu v závislosti na vaznostech SH3 domény.

	RT-loop		distal-loop	310-helix
Bcr/Abl	Y89		Y112	Y134
Btk	Y223	Y225	Y263	Y268
Grb2 (N-terminal SH3)	Y7		Y37	Y52
Grb2 (C-terminal SH3)				Y209
PSTPIP	Y367	Y369		
Src (myší číslování)	Y90	Y92	Y131	Y136

Tab. 1

Vzájemná homologie jednotlivých tyrozínových zbytků u vybraných SH3 domén. Homologické tyrozíny jsou umístěny vždy do sloupečků. S výjimkou tyrozínů v distal-loop, kde jsou homologické pouze Y263 Btk a Y131 Src. Ostatní tyrozíny v distalní-smyčce homologické nejsou, avšak v zájmu zachování přehlednosti byly ponechány ve společném sloupci. Pokud se u daného proteinu homologické tyrozíny nenachází, není ve sloupci napsána pozice tyrozínu.

2.7.1. Tyrosin v 3_{10}-helixu

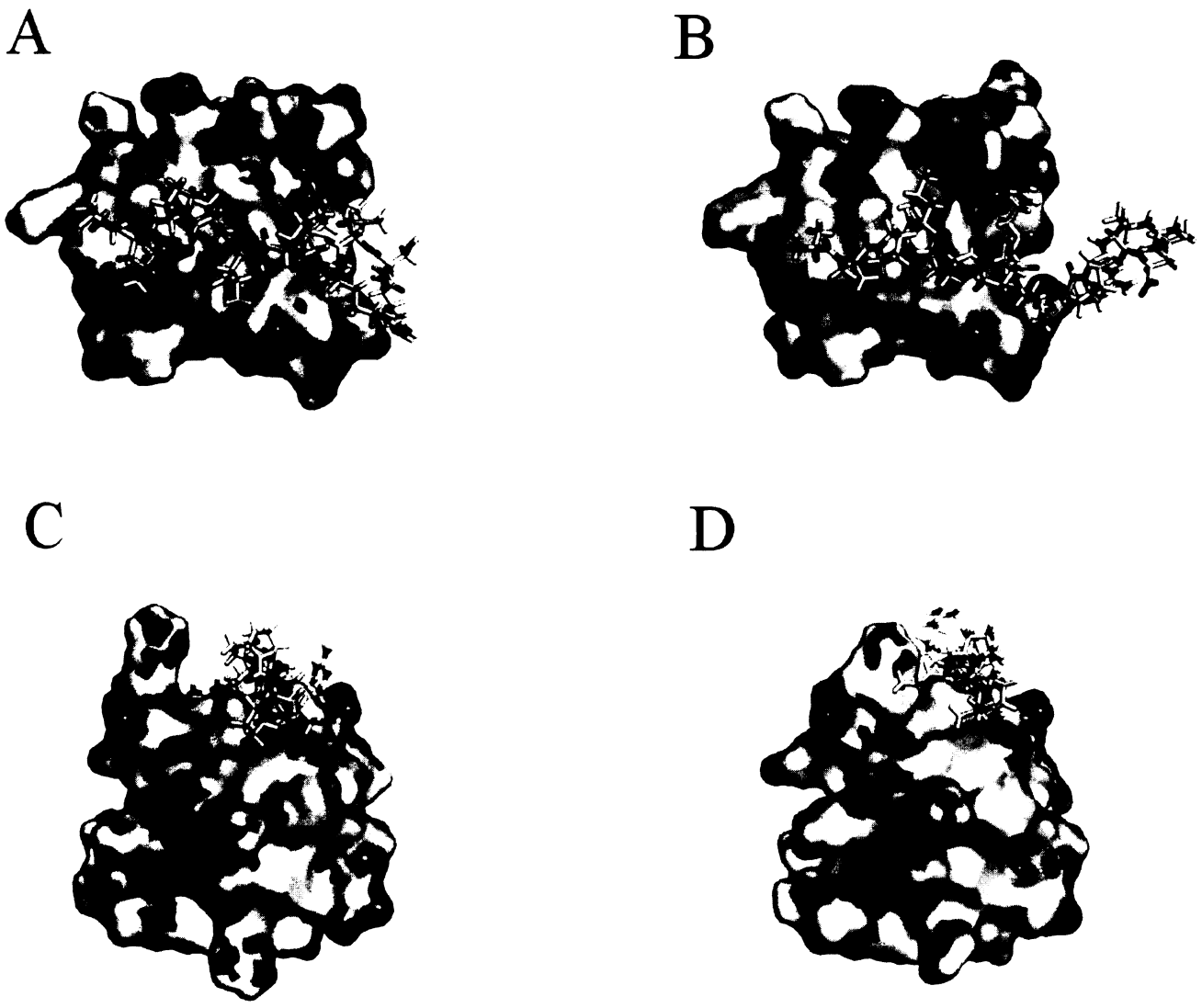
Konzervovaná sekvence nacházející se v 3_{10} –helixu je PxNYV, kde x je nejčastěji hydrofobní aminokyselina většinou agrinin či serin. Tyrosin u Src kinázy Y136 je prostorově blízký Y90 a Y92. Y136 spoluutváří kapsu, do níž zapadá prolin z ligandového polypeptidu (viz *obr.* 8) (Erpel *et al.*, 1995).

Je prokázáno, že fosforylace Y138 (Y136 u myši) snižuje vazebné schopnosti SH3 domény lidské kinázy Src. Fosforylace na tomto zbytku však není nezbytná pro aktivaci kinázy Src a následný přenos signálu z receptoru. Po stimulaci buněk PDGF růstovým faktorem je lidská kináza Src fosforylována na Y138 PDGF- receptorem. Tato fosforylace snižuje asociaci kinázy Src s PDGF- receptorem (Broome *et al.*, 1997).

Protein Grb2 má v C-terminální SH3 doméně tyrosinový zbytek Y209. Ten je spolu s Y7 v N-terminální SH3 doméně velice důležitý pro regulaci vazby ligandu proteinem Grb2. Fosforylace zbytku Y209 inhibuje vazbu ligandu Sos či MEKK1. Vazba Sos je esenciální pro aktivaci Ras proteinu. Pro vazbu ligandu je patrně důležitá interakce obou SH3 domén Grb2 proteinu s ligandem. Znemožnění vazby obou domén je patrně nezbytné pro úplné zrušení vazby k ligandu. Za fyziologických podmínek je fosforylace tohoto zbytku zodpovědná za zeslabování aktivity proteinu Ras v závislosti na době uplynulé od aktivace Grb2 EGF-receptorem. K zeslabování

aktivace dochází i u Y209F mutantů, ale daleko pomaleji. Za to je patrně zodpovědný Y7 či jiné EGF-indukované terminační mechanismy *(Li et al.*, 2001).

Tyrosin v 3_{10}-helixu je velice důležitý, neboť patří mezi fosforylovatelné tyrosiny. Jeho fosforylací dochází k inhibici vazby ligandu na hydrofobní povrch SH3 domény. Je možné, že tento tyrosin nereguluje pouze na úrovni „váže/neváže", ale že jeho fosforylace je zodpovědná za preferenci k jiným ligandům než váže jeho nefosforylovaná forma. Podobně je tomu pravděpodobně i u tyrosinu v RT-smyčce. Dále je tento tyrosin zodpovědný za regulaci aktivity v čase i za intramolekulární aktivaci proteinů.

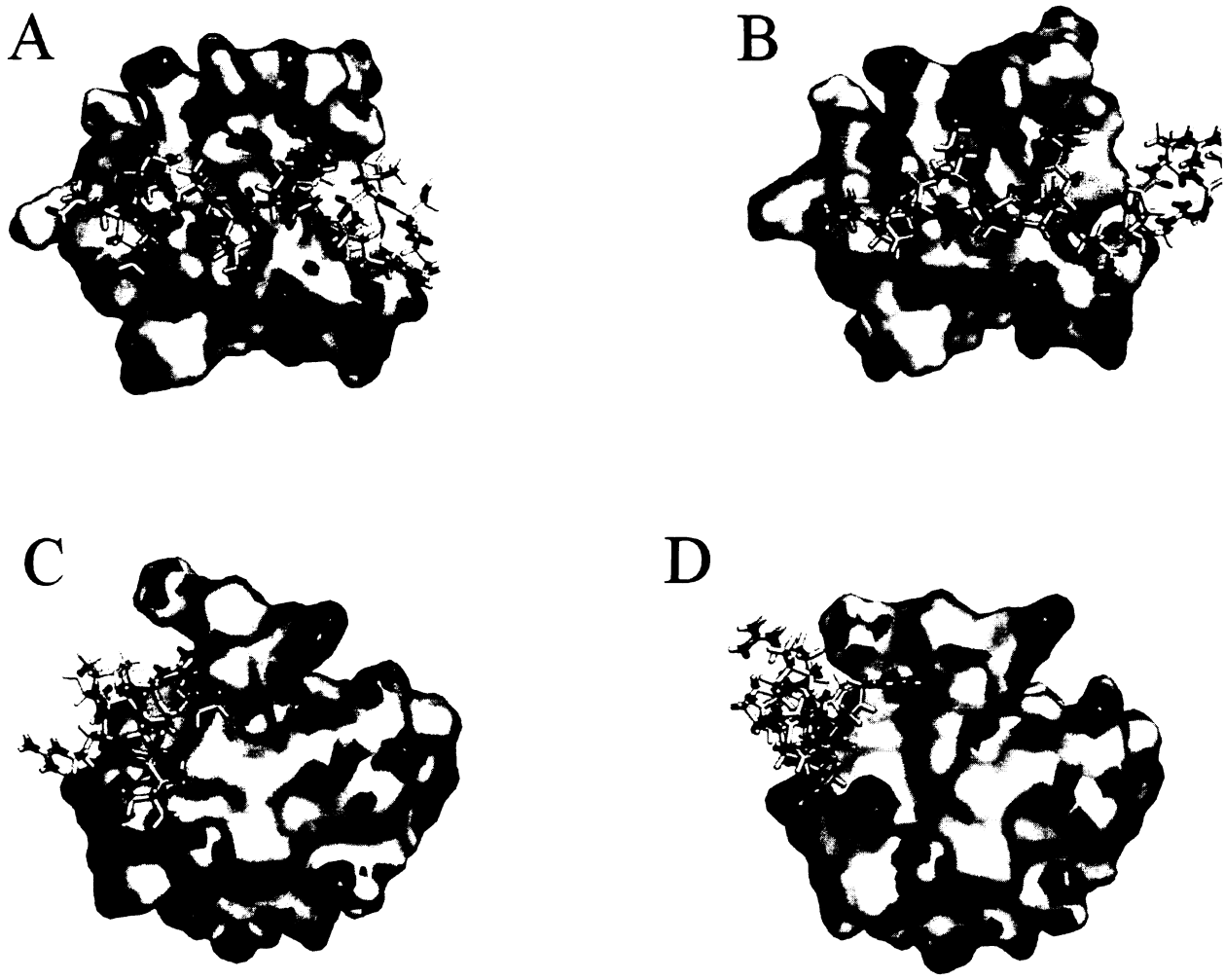


Obr. 8

SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 136. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- *A, C*-pohled z boku, resp. II. třídy- *B, D*- pohled z boku.(PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

2.7.2. Tyrosin v distalní- smyčce

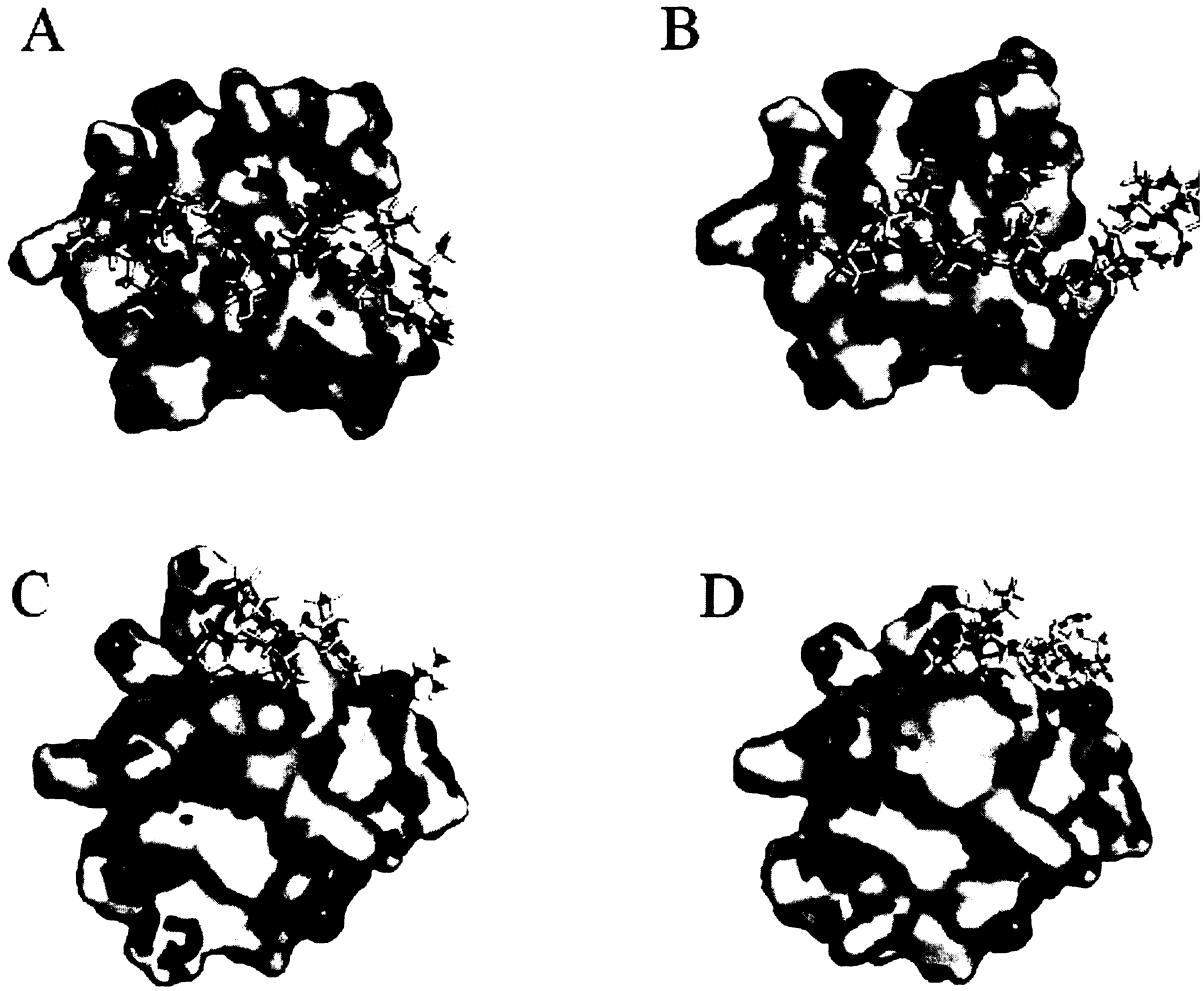
Tyrosiny v distální-smyčce jsou méně konzervované, než ty v 3_{10}-helixu nebo RT-smyčce. U kinázy Src se vyskytuje tyrosin Y131, který patrně nemá zásadní vliv na intra- ani intermolekulární vaznost domény k ligandu. Mohl by však ovlivňovat specificitu SH3, neboť spolu s W118 tvoří třetí tzv. specifitní kapsu ligand vazebného povrchu SH3 domény (viz *obr.* 9). Experimentální data ukazují, že mutace Y131A neovlivňuje vazbu na SH3 doménu zdaleka v takové míře jako substituce Y90A nebo Y92A v RT-smyčce, která vazbu na SH3 doménu zcela ruší. Vazba p85 α-podjednotky PI3K a obdobně i vazba proteinu Sam68 na SH3 doménu kinázy Src je mutací Y131A snížena zhruba na třetinu (Erpel *et al.*, 1995; Broome *et al.*, 1997).



Obr. 9
SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 131. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- *A, C*-pohled z boku, resp. II. třídy- *B, D*- pohled z boku.(PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

2.7.3. Tyrosin v RT-smyčce

Relativně nedávno objevený *in vivo* fosforylovatelný tyrozínový zbytek uvnitř vazebného povrchu SH3 domény kinázy Src nese označení Tyr 90 (číslování z kuřecího proteinu). Na jeho objevu se částečně podílela i naše laboratoř. K objevu došlo díky analýze fosfotyrozínového proteomu myších embryonálních fibroblastů. Fosforylace tohoto tyrozínového zbytku byla značně nabohacena u fibroblastů transformovaných onkoproteinem Src (Luo *et al.*, 2008). Tento zbytek je velice konzervovaný (viz tabulka 1.) a také proto se dostal tento zbytek do našeho zájmu, neboť jeho vysoká konzervovanost a fakt, že je *in vivo* fosforylován by mohl naznačovat jeho důležitost v regulaci vaznosti SH3 domén. Tyrozín 90 se nachází v poměrně konzervované sekvenci ALYDY v RT-smyčce (viz. *Obr.* 10).



Obr. 10

SH3 doména Src kinázy s žlutě zvýrazněným tyrosinem 90. Je vyobrazen navázaný ligand I. třídy- *A, C*-pohled z boku, resp. II. třídy- *B, D*- pohled z boku.(PDB kód: 1QWE, 1QWF. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

U kinázy Src bylo ukázáno, že mutace v ALYDY motivu RT-smyčky (Y90A, Y92A) stimulují její kinázovou aktivitu. Tyto mutace při pokusech potvrdily důležitost těchto zbytků u intramolekulární interakce (Erpel *et al.*, 1995).

Při intramolekulární regulaci je patrně důležitá stabilizace interakce SH2 domény s pY527 SH3 doménou. Obě domény jsou od sebe vzdáleny pouze několik aminokyselinových zbytků. To znamená, že není možná ideální vazba SH2 domény s jejím ligandem pY527, pokud jí to SH3 doména stericky neumožní. Permisivní postavení SH3 domény je patrně umožněno pokud SH3 doména váže prolin-bohatou sekvenci na linkeru mezi SH2 a katalytickou doménou a nepřímo kontaktuje N-lalok katalytické domény. Vazba SH3 domény na část katalytické domény je vytvořena pomocí jiného vazebného povrchu než je ten klasický rozeznávající PxxP motiv (Brábek *et al.*, 2002; Erpel *et al.*, 1995; Superti-Furga *et al* ., 1993).

Dále byla testována u SH3 domény této kinázy míra ovlivnění intermolekulární interakce u mutantů Y90A, Y92A v RT-smyčce. Bylo ukázáno, že mutace Y90A i Y92A narušuje vazbu Sam68 i p85 α podjednotky PI3K (Superti-Furga *et al.*, 1993; Erpel *et al.*, 1995).

U tyrosinové kinázy Btk účastnící se přenosu signálu z BCR odpovídají tyrosiny v ALYDY sekvenci tyrosinům- Y223 a Y225. Btk je v buňkách aktivována fosforylací na Y551 kinázami Src. Následně se autofosforyluje na Y223 (odpovídá Y90 kinázy Src) uvnitř vazebného povrchu SH3 domény. Po autofosforylaci na Y223 se vazba SH3 domény s WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) značně oslabuje. Naopak fosforylace Y223 nemá vliv na vazbu adaptorového proteinu c-Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma). Je docela možné, že autofosforylace Y223 kinázy Btk by mohla vést k intarakci SH3 domény se zcela novým ligandem, který tato SH3 před fosforylací neváže. Po fosforylaci Y223 je totiž Btk schopna interakce s kinázou Syk, se kterou předtím neinteraguje. Bylo prokázáno, že tato interakce není zprostředkována SH2 doménou Syk kinázy. Není však zatím zcela jasné, zda je za interakci zodpovědná právě SH3 doména (Morrogh *et al.*, 1999).

SH3 doména Btk je zajímavý případ, kdy je pravděpodobně intramolekulární regulační mechanismus zodpovědný za regulaci kinázové aktivity Btk. Přesný regulační mechanismus Btk aktivity však není dosud zcela znám. Je prokázáno, že nefosforylovatelná mutace Y223F nebo úplná delece SH3 domény vede k transformaci buněk *(Park et al.*, 1996). Z toho by mohlo vyplývat, že SH3 je nezbytná pro inhibici Btk aktivity.

U adaptorového proteinu Grb2 v N-terminální SH3 doméně se nachází v RT-smyčce tyrosin Y7. Tento tyrosin je patrně také *in vivo* fosforylovatelný. Pokud je fosforylován, např. v odpovědi na EGF stimulaci, je Y7 společně s Y209 v C-terminální SH3 Grb2 zodpovědný za zhoršení vazby ligandu jako je Sos či MEKK1. To může umožňovat negativní regulaci jejich efektorů jako např. Ras v závislosti na čase od EGF stimulace (Li *et al.*, 2001).

Další protein, který si zaslouží pozornost je PSTPIP. PSTPIP je to protein asociovaný s cytoskeletem. Tyrosinům v sekvenci ALYDY zde odpovídají tyrosiny-Y367 a Y369. PSTPIP je fosforylován kinázami rodiny Src, což umožňuje následnou fosforylaci na zbytku Y367 opět Src kinázami uvnitř vazebného povrchu SH3 domény. Tato fosforylace ovlivňuje vaznost domény k ligandu WASP. Pokusy naznačují, že fosforylace tyrosinu uvnitř SH3 domény tuto interakci ruší. Mutant Y367F bez problémů váže WASP na rozdíl od mutantů Y367E či Y367D (Wu *et al.*, 1998). To by mohlo naznačovat to, že by fosforylace mohla být *in vivo* využívána k negativní regulaci interakce PSTPIP/WASP. Tímto mechanismem by pak mohla být regulována dynamika cytoskeletonu prostřednictvím interakce SH3 domén proteinů účastnících se formování a přestavby cytoskeletu.

Konstitutivně aktivní fúzní onkoprotein Bcr/Abl je případ, kdy by fosforylace tyrosinu v RT-smyčce mohla vést k intramolekulární regulaci aktivity tohoto proteinu. Jisté známky částečné regulace jsou u tohoto proteinu zachovány díky intramolekularní interakci SH3 domény a linkeru mezi SH2 a kinázovou doménou. Vazba SH3 domény a linkeru na stejném polypeptidovém řetězci částečně stabilizuje inaktivní formu enzymu a je ovlivněna fosforylací. Nejvíce fosforylovaný zbytek *in vitro*, ale i *in vivo* v CML buňkách, je právě Y89 v RT-smyčce. Dále je v menší míře dokumentována i fosforylace Y134 v 3_{10}-helixu. Fosforylaci SH3 domény Abl části fúzního proteinu provádějí kinázy Src rodiny. Fosforylace Y89 i Y134 destabilizuje interakci SH3/linker a tudíž podporuje aktivní konformaci Bcr/Abl. Nefosforylovatelný mutant Y89F má snížené transformační schopnosti na hematopoetické buňky. To podporuje domněnku, že fosforylace tohoto tyrozínového zbytku je opravdu zodpovědná za regulaci aktivity fúzního enzymu. (Meyn *et al.*, 2006). O intermolekulárních interakcích Bcr/Abl v závislosti na fosforylaci Y89 není zatím příliš mnoho známo, leč je pravděpodobné, že fosforylace bude mít podobný vliv na vazbu ligandu jako u homologních tyrozínů na tomto místě. Pochopení regulace aktivity onkoproteinu Bcr/Abl může být klíčové z hlediska léčby

chronických leukémií, ale i pro pochopení jiných regulačních mechanismů buněčné signalizace. Fosforylace je jev velice důležitý pro regulaci schopnosti vazby SH3 domény na ligand. Tyrosiny v RT-smyčce jsou patrně v tomto ohledu nesmírně důležité.

Z výše uvedených případů nelze jednoznačně odvodit obecný efekt fosforylace tyrosinu v RT-smyčce. V některých případech fosforylace v RT-smyčce vazbu zeslabuje (např. Grb2-Sos, Btk-WASP) v jiných na vazbu nemá vliv (např. Btk-Cbl). Tabulka 2 shrnuje dosavadní publikovaná experimentální data o vlivu fosforylovaného nebo mutovaného tyrosinového zbytku v RT-smyčce na vazbu ligandu podle toho, zda se jedná o ligand I. nebo II. třídy. Z tabulky je vidět trend, kdy vazbu na ligandů II. třídy fosforylace zeslabuje a vazbu na ligand I. třídy nemění. Z toho by se dalo usoudit, že fosforylace na tyrosinu v RT- smyčce by mohla měnit specifitu/preferenci vaznosti SH3 domén pro ligandy různých typů.

RT-smyčka	lig. I. třídy	lig. II. třídy	
Src Y90A	Sam68 PATQPPPLLPPSA	Sam68 SRQPPLPHRS	narušena vazba Sam68
	p85 PI3K PPRPLPVAPGSSK	p85 PI3K QPAPALPPKPP	narušena vazba p85 PI3K
Btk pY223	Cbl SLPRDKPLPVPPYQ	WASP PRGPPPPGRGGPP	vazba Cbl beze změny
	Cbl PQLPPPPPPD	WASP PATPPPPGRGGPP	vazba WASP zeslabena
PS1PP Y367E/D		WASP PRGPPPPGRGGPP	vazba WASP zrušena
		WASP PATPPPPGRGGPP	
Grb2 pY7		Sos PVPPPVPPRRRPE	vazba Sos zeslabena

Tab 2.

Publikovaná experimentální data o vlivu fosforylace tyrosinu v RT-smyčce na vazbu lidandu I., resp. II. třídy. Vazebné ligandové sekvence jsou umístěny do sloupečků podle toho, do které třídy daný vazebný PPII peptid patří. Červeně je pak vyznačena core sekvence zapříčiňující orientaci daného ligandu. Vliv dané modifikace tyrosinu v RT-smyčce je shrnuta v pravém sloupci tabulky. Označení modifikací v daných experimentech: Y90A bodová (nefosforylovatelná) mutace tyrosinu za alanin, Y367E/D bodová (napodobuje fosforylovaný stav) mutace tyrosinu za glutamát, resp. aspartát, malé „p" před označením tyrosinu značí fosforylovaný stav.

3. Metody

3.1. Kultivace bakteriálních kmenů

Na přípravu kultivačních medií je používána „miliporová“ voda z přístroje Watrex

1× LB
10 g/l Universalpepton M66 (MERCK, Germany)
5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
5 g/l NaCl

1× LBG
LB medium
1% Glukóza

YTG
5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
8 g/l Trypton
5 g/l NaCl
1% Clukóza

ŽA2 4% živný agar č.2 (Imuna, Šarišské Michalany)

LB/ IPTG/ Xgal plotny
LB medium
15 g/l Agar
po zchladnutí <70 °C
IPTG (1 mM)
Xgal (40mg)
Nalít plotny

„Agarose Top“
10 g/l Trypton
5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
5 g/l NaCl
1 g/l $MgCl_2.6H_2O$
3,5 g/l Agaróza
3,5 g/l „low temperature melting“ agaróza

Vše sterilizováno v autoklávu 20 min při 121°C.
Selekční antibiotika (zásobní roztoky přidáváme do zchladlých médií)
Ampicilin (Biotika, SR) 100 mg/ml
Kanamycin (AppliChem, Germany) 50 mg/ml

3.2. Kultivace savčích buněk

Kompletní médium si připravujeme z následujících komponent:
RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen)
0,5% neesenciální aminokyseliny (MEM NEAA) (Gibco, Invitrogen)
10% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma)
0,5% obecná anbtibiotika - antimykotika (ATB) (Gibco, Invitrogen)
Složení komponent kompletního média:
Obecná anbtibiotika - antimykotika (ATB) obsahují:
10000 μg/ml penicilin
10000 μg/ml streptomycin
25 μg/ml amphotericin

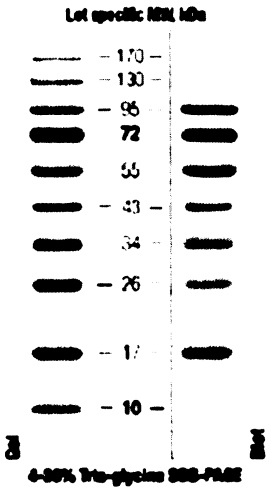
Další používané roztoky při kultivaci savčích buněk
0,25% trypsin-EDTA(Gibco, Invitrogen) 2,5 g/l trypsin 0,38 g/l kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)

3.3. Přehled použitých protilátek

Název Charakteristika Specifita Výrobce		
Anti-Cas	BD bioscience	
Anti-FAK	Santa Cruz	
Anti-STAT3	Santa Cruz	
Anti-Paxillin	BD bioscience	
Anti-hnRNP-K	Santa Cruz	
Anti-SF1	Santa Cruz	
Anti-SF3a1	Santa Cruz	
GAR-HRP Kozí polyklonální Králičí IgG		Santa Cruz
GAM-HRP Kozí polyklonální Myší IgG		Santa Cruz

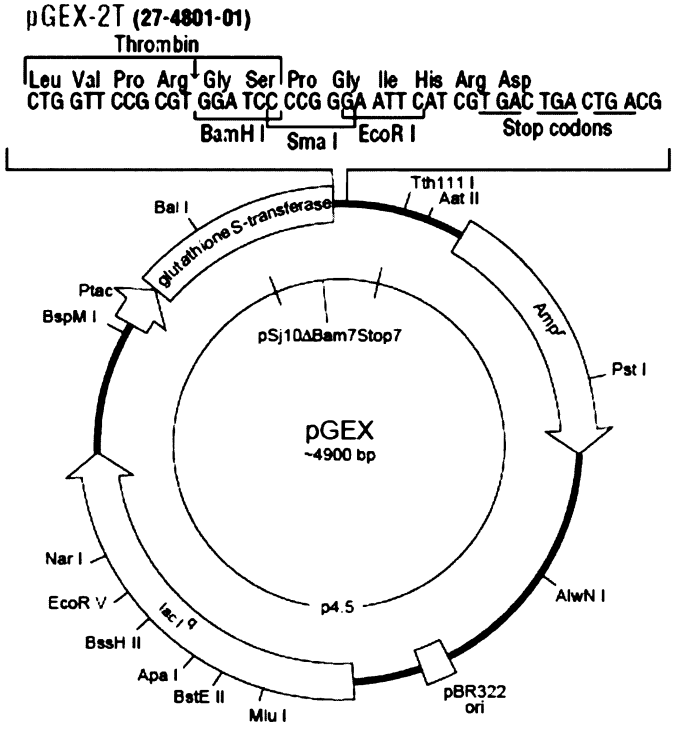
3.4. Standard molekulové hmotnosti proteinů na SDS-PAGE

PageRuller ™ Prestained Protein Ladder
MBI Fermentas (Litva)

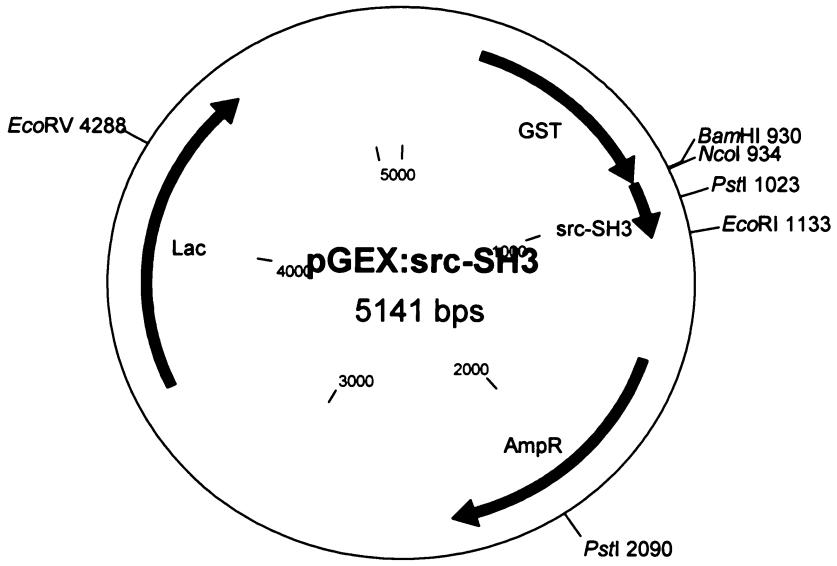


3.5. Použité vektory

pGEX-2T (Amersham)



pGEX: src-SH3



3.6. Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE) - souprava BIO-RAD Mini Protean III Cell

Po sestavení aparatury pro nalévání gelů namícháme směs pro separační gel a ihned aplikujeme do prostoru mezi skla v aparatuře a překryjeme vrstvou miliporové vody. Po utuhnutí gelu (cca 10-30 min) vodu odsajeme a nahradíme čerstvě namíchanou směsí pro zaostřovací gel. Mezi skla vložíme hřeben na vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po polymeraci zaostřovacího gelu jamky několikrát propláchneme pufrem pro SDS-PAGE.

Roztoky proteinů ve vzorkovém pufru doplníme 1/20 objemu 1 M dithiotreitolu (DTT), inkubujeme 3 minuty při 100°C a po odstranění případných pevných součástí centrifugací (10 000 g/0,5min) naneseme do jamek v gelu. Dvojici gelů (nebo jeden gel a doplňující nástavec) vložíme do aparatury pro elektroforézu a zalijeme pufrem pro SDS -PAGE.

Dokud se bromfenolová modř ze vzorkového pufru (a spolu s ní tzv. čelo elektroforézy) pohybuje v zaostřovacím gelu, probíhá elektroforetické dělení při konstantním proudu 10 mA/gel. Později nastavíme protékající proud na 20 mA/gel. Když čelo elektroforézy dosáhne spodního okraje gelu, odpojíme zdroj elektrického napětí a gel vyjmeme z aparatury. Gel lze barvit nebo použít pro přenos proteinů na membránu metodou western blot.

Směs pro 2 gely silné 0,75 mm smícháme v následujícím pořadí:	
10% separační gel:	Zaostřovací gel:
3,33 ml protogel	0,65 ml protogel
2,5 ml 4x Tris/SDS pH 8,8	1,25 ml 4x Tris/SDS pH 6,8
4,17 ml voda	3,1 ml voda
12 µl TEMED	10 µl TEMED
60 µl 10% APS ($NH_4S_2O_8$)	50 µl 10% APS ($NH_4S_2O_8$)

Protogel 30% akrylamid; 0,8% N,N'-methylenbisakrylamid; přefiltrováno přes filtr s póry 0,45 µm, skladováno v temnu při 4°C

4xTris/SDS pH 8,8 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% SDS; přefiltrováno přes filtr s póry 0,45 µm, skladováno v temnu při 4°C

4x Tris/SDS pH 6,8 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS; přefiltrováno přes filtr

	s póry 0,45 μm, skladováno v temnu při 4°C
SDS-PAGE pufr	25 mM Tris (pH 8,3); 190 mM glycin; 0,1% SDS
2× Laemmli pufr	0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,1% SDS; 20%(v/v) glycerol,0,002% bromfenolová modř
5× Laemmli pufr	0,35 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 40% glycerol; 0,012% bromfenolová modř

3.7. Barvení PAA gelu pomocí Coomassie Blue barviva

Na PAA gelu je po proběhlé SDS elektroforéze možné nespecificky obarvit rozdělené proteiny. Toto provedeme tak, že gel opatrně přeneseme do barvícího roztoku (20% metanol; 10% kys. octová; 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250). A necháme za mírného třepání barvit nejméně 30 min. Po této době přebytečný barvící roztok slijeme. Gel promýváme do odbarvení pomocí odbarvovacího roztoku (20% metanol; 7% kys. octová).

3.8. Western blot (přenos proteinů na membránu pomocí BIO-RAD Trans-blot)

Gel s proteiny rozdělenými SDS-PAGE přeneseme na filtrační papír Whatman navlhčený v blotovacím pufru a sestavíme aparaturu pro přenos na nitrocelulózovou membránu (Nitrobind, MSI, USA) v následujícím pořadí: izolační houbička, filtrační papír Whatman, gel, memrána (omytá v blotovacím pufru), filtrační papír Whatman, izolační houbička.

Přenos necháme probíhat při napětí 100 V za stálého míchání a chlazení ledem po dobu 1,5 h. Membránu s přenesenými proteiny opláchneme v TBS a zatavíme do polyetylénové fólie pro pozdější zpracování nebo ihned provedeme imunodetekci proteinů. Gel po blotování můžeme pro kontrolu přenosu proteinů barvit cca 30 min barvícím roztokem a poté nechat odbarvovat do druhého dne.

Blotovací pufr	25 mM Tris; 192 mM glycin; 20% metanol; 0,05% SDS
TBS	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl

3.9. Reverzibilní barvení proteinů na nitrocelulózové membráně pomocí Ponceau S (Sigma-Aldrich)

Po přenosu proteinu z SDS-PAGE gelu na nitrocelulózovou membránu lze reverzibilně obarvit pomocí barviva Ponceau S. Tento postup nám umožní nespecifické obarvení proteinů těsně před imunodetekcí. Po opláchnutí membrány TBS po transferu z gelu na membránu aplikujeme barvící roztok Ponceau S 0,1% v 5% kys. octové. Při mírném třepání necháme 10 min barvit na třepačce. Odbarvujeme vychlazenou miliporovou vodou do odbarvení. Membránu umístěnou do čisté polyetylenové folie naskenujeme. Takto obarvenou membránu podrobíme imunodetekci.

3.10. Imunodetekce proteinů na membráně

Membránu s přenesenými proteiny opláchneme roztokem TBS a blokujeme 30 minut až 1 hodinu ve zvoleném blokovacím roztoku (viz níže) na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1). Následně oplachujeme 3 x 5 min ve velkém objemu TTBS. Opláchnutou membránu zatavíme do polyetylénové fólie a inkubujeme s roztokem primární protilátky přes noc (cca 16 – 18 h) na překlápěcí třepačce v lednici při 4°C. Nadbytečnou primární protilátku pak odstraníme odmytím v TTBS (3x 5 min).

Roztok sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou nebo křenovou peroxidázou přidáme k membráně zatavené do polyetylénové fólie, doba inkubace činí 1 h. Poté membránu odmýváme 2 x 5 min v TTBS a 1 x 5 min v TBS v dostatečném objemu roztoku.

TTBS 0,05% Tween 20 (Serva) v TBS
Blokovací roztoky:
3% želatina (Bio-Rad) v TBS – blokování 60 minut při pokojové teplotě
4% BSA (Milipore) v TBS – blokování 40 minut v 37°C
3% mléko (Sigma) v TBS – blokování 30 minut při pokojové teplotě
Roztoky pro naředění primární a sekundární protilátky:
1% želatina (Bio-Rad) v TTBS
1% BSA (Milipore) v TTBS
3% mléko (Sigma) v TTBS

Pozn.: Membránu blokujeme a inkubujeme s protilátkou vždy v roztoku se stejným typem „nosné látky“, tj. po blokování v 4% BSA inkubujeme membránu s roztokem primární a sekundární protilátky ředěné v 1% BSA.

Membránu ve vyvíjecím roztoku pro křenovou peroxidázu inkubujeme 1-2 min za stálého třepání, aby se dostatečně omyla celá plocha membrány. Membránu krátce osušíme a vložíme do průhledné polyetylenové fólie. Poté v temné komoře přiložíme na membránu film (Amersham Hyperfilm™ ECL), nebo ECL signál přímo snímáme pomocí ECL dokumentačního systému LAS 4000 a necháme exponovat požadovanou dobu dle množství detekovaného proteinu a kvality protilátek.

SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Biotechnology) souprava obsahuje roztoky:
Roztok luminolu s enhancerem
Roztok stabilního peroxidu
Vyvíjecí roztok pro křenovou peroxidázu připravíme smísením roztoků z příslušné soupravy v poměru 1/1.

3.11. Pasážování HeLa fibroblastů

Savčí buňky jsou standardně kultivovány v termostatu při 37° C a 5% CO_2 na miskách pro tkáňové kultury (∅60 mm nebo ∅100 mm). Pasážování provádíme zpravidla po 2 až 3 dnech v závislosti na konfluenci misky. Na malé misce (∅60 mm) kultivujeme buňky v 4–5 ml média, na velké misce (∅100 mm) v 10 ml média. Kulturu pravidelně kontrolujeme pod mikroskopem (Nikon Eclipse TS 2000), abychom včas odhalili případnou kontaminaci. Před pasážováním je třeba nechat média a trypsin temperovat v 37°C ve vodní lázni po dobu 15 min.

- Odsajeme médium z misky. Přidáme trypsin (na malou misku 0,5 ml; na velkou misku 1 ml), opláchneme celý povrch krouživým pohybem, odsajeme a nahradíme novým trypsinem ve stejném objemu.
- Trypsin necháme působit 4–6 minut, dokud se buňky neoddělí ode dna misky.
- Aktivitu trypsinu zastavíme dodáním kompletního média RPMI 1640 (na

malou misku 2 ml; na velkou misku 5 ml) a dokonale resuspendujeme agregáty buněk.

- Na novou misku s připraveným kompletním médiem přeneseme požadovaný objem buněčné suspenze - na malou misku (∅60 mm) 0,4 ml suspenze ke 4 ml nového média; na velkou misku (∅100 mm) 1 ml suspenze k 9 ml média.

3.12. Příprava a rozpěstování stabilátů HeLa fibroblastů

Příprava stabilátů

Pro přípravu stabilátů z dané savčí linie kultivujeme buňky na velkých miskách (∅ 100 mm) až do dosažení úplné konfluence. Z jedné velké misky pak lze připravit do 1,5 ml mikrozkumavek Nalgene dva stabiláty buněk.

- Z misek odsajeme médium, opláchneme 1 ml trypsinu a opět odsajeme.
- Na misku přidáme 1 ml nového trypsinu, přeneseme do termostatu a necháme působit po dobu 3–6 minut.
- Působení trypsinu zastavíme přidáním 4 ml kompletního média, resuspendujeme, přeneseme do 15 ml plastové zkumavky Falcon a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Opatrně odsajeme médium, přidáme 1–1,5 ml zamrazovacího roztoku, důkladně resuspendujeme a rozplníme do zamrazovacích mikrozkumavek Nalgene.
- Mikrozkumavky přeneseme do nádoby s izopropanolem, uložíme do –80°C a druhý den (nejpozději do 24 h) uložíme do kontejneru s tekutým dusíkem.

Rozpěstování buněk ze stabilátů

- Zkumavku s buňkami vyjmeme z tekutého dusíku a přenášíme na ledu.
- Ve vodní lázni (37°C) necháme suspenzi buněk v mikrozkumavce 1-2 min roztát a přeneseme k 5 ml temperovaného kompletního média v 15 ml zkumavce Falcon.
- Suspenzi v médiu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min) a supernatant opatrně odsajeme.
- Přidáme 5 ml nového kompletního média, resuspendujeme, přeneseme na připravenou misku s 5 ml média (příp. se selekčním antibiotikem) a zkontrolujeme pod mikroskopem.

Zamrazovací roztok 90% FBS; 10% dimethylsulfoxid (DMSO)

3.13. Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk

Lyzáty ze savčích buněk připravujeme nesterilně a na ledu (případně v chladové místnosti).

- Velkou misku (∅100 mm) s narostlými buňkami přeneseme z termostatu na led, necháme cca 5 minut ochladit a nesterilně odsajeme médium.
- Misku 2x opláchneme 5 ml vychlazeným 1x PBS a odsajeme.
- Na každou misku přidáme 1 ml premixu lyzačního pufru RIPA, Hepes/Nonidet* a inhibitorů. Necháme lyzovat 12-15 min při 0°C na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1).
- Buňky z povrchu misky seškrábneme škrabkou, převedeme do mikrozkumavky a protahujeme 6x-12x injekční stříkačkou s jehlou 21G dokud není suspenze čirá a bez buněčných agregátů.
- Suspenzi centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000g, 20 min, 0°C).
- Po centrifugaci odsajeme opatrně supernatant, převedeme do nové mikrozkumavky a odebereme aliquot 50 µl pro stanovení proteinové koncentrace. Lyzáty necháme zamrazit v –20°C.

- Pro přípravu lyzátů s následným Pull-down/MS experimentem použijeme lyzační pufr Hepes/Nonided. Ten nabízí permisivnější podmínky pro vazebnou reakci (viz dále) a separaci lyzátu na jadernou a cytoplazmatickou frakci.
- Po seškrábnutí buněk škrabkou z misky (∅100 mm) převedeme do mikrozkumavek.
- Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000g, 20 min, 0°C)
- Odebereme supernatant (cytoplazmatická frakce)
- Sediment resuspendujeme do 1 ml lyzačního pufru Hepes/Nonidet (tato frakce obsahuje nezlyzovaná jádra buněk) a podrobíme French-press lyzi (viz dále)
- Lyzát pro French-press gentrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000g, 20 min, 0°C). Tím oddělíme buněčné debris od jaderných proteinů.
- Odebereme supernatant (jaderná frakce)

10 x PBS 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM $Na_2HPO_4.12\ H_2O$; 1,4 mM KH_2PO_4, pH upraveno na 7,3

pufr RIPA 0,15M Na Cl; 50mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% Nodinet P – 40; 0,1% SDS; 1% deoxycholát sodný; 5 mM EDTA; 50 mM NaFHepes/Nonidet 20mM Hepes, 100mM KCl, 0,05% Nonidet, 1mM DTT

Zásobní roztok proteázových inhibitorů (100x):

0,5 mg/ml leupeptin

0,5 mg/ml aprotinin

12,5 mg/ml pefabloc

3.14. Stanovení koncentrace proteinů – Folinova metoda

Koncentrace proteinů ve vzorcích ze savčích buněk byla stanovována kolorimetricky s využitím soupravy D_c Protein Assay (Bio-Rad, USA).

- Připravíme si ředící řadu hovězího sérového albuminu (BSA) následujícím způsobem:

BSA 2mg/ml (µl)	**pufr RIPA (µl)**	**Výsledná koncentarce BSA (µg/µl)**
0	50	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1 500

- Z odebraného 50 µl aliquotu lyzátu, přeneseme 25 µl do nové mikrozkumavky a smísíme s 25 µl pufru RIPA.
- Přidáním 20 µl roztoku S do 1 ml roztoku A si připravíme roztok A´. Do mikrozkumavek pak pipetujeme 125 µl A´ a 25 µl lyzátu ředěného pufrem RIPA (viz předchozí krok) nebo standardu BSA.
- Do každé mikrozkumavky pak dodáme 1 ml roztoku B, krátce zamícháme na vortexu a ponecháme 15 min ve tmě.
- Po 15 min změříme na spektrofotometru absorbanci vzorků při 750 nm (takto připravené vzorky jsou stabilní 2 h, absorbanci lze měřit i později).

Ze změřených dat standardů o známé koncentraci vytvoříme graf závislosti absorbance na koncentraci. Dopočítáme koncentraci proteinů v našich lyzátech a upravíme koncentraci ve všech vzorcích na srovnatelnou hladinu pomocí ředění pufrem RIPA. doplníme ¼ objemu Laemmli pufrem (6x koncentrovaný). K takto upraveným lyzátům přidáme 1/20 objemu 1 M DTT, 5 minut povaříme v bločku při 95° C a nanášíme na gel pro SDS –PAGE (viz kap.3.2.13).

3.15. Software

Clone manager

Pomocí tohoto programu byly vytvořeny genetické mapy plazmidů pGEX.
(Sci-Ed Software)

Generunner

V tomto programu byla provedena analýza sekvencí získaných z genomu fágů (M13, phage dispaly)
(www.gwnwrunner.com)

Clustal W

Tento program byl využit pro alignment naizolovaných aminokyseliových sekvencí (phage display)
(http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)
volně přístupný

Swiss-PDB viewer

Byl využit pro mutagenezi SH3 domény kinázy Src na pozici 90 (varianty Y90E, Y90F). Umožňuje ukládání dat v PDB formátu (zohledňuje změnu souřadnic jednotlivých atomů). Dále pomocí Swiss-PDB viewer byly k jednotlivým SH3 strukturám přiřazeny analogické souřadnice (funkce „Magic fit"), pro snazší vizualizaci v PyMOL.
(http://spdbv.vital-it.ch/)
pro studijní účely zdarma

PyMOL

Pomocí tohoto programu byly vytvořeny vizualizace struktur jednotlivých variant SH3 domén (WT, pY90, Y90E, Y90F).
(http://pymol.sourceforge.net/)
pro studijní účely zdarma

SH3-hunter

Tímto programem jsme v aminokyselinových sekvencích MS identifikovaných proteinů hledali PxxP SH3 vazebné motivy.
(http://cbm.bio.uniroma2.it/SH3-Hunter/)
volně přístupný

3.16. Afinitní purifikace GST- fuzních proteinů

LB1 pufr
50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaCl

LB2 pufr
5 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM NaCl

50 mM HEPES (pH 7,4)

inhibitory proteáz
1000x- Aprotinin 1ug/ml, Leupeptin 5ug/ml, Pefabloc 100ug/ml

1M IPTG (zásobní 1000x)

TritonX-100 20% v LB1 + inhibitory proteáz

Glutathione Sepharose™ 4B, GE Healthcare

- Zaočkujeme bakteriální buňky BL21 s pGEX plazmidem nesoucím jednotlivé varianty SH3 domény (WT-divoký kmen, E-mutace Tyr 90 za Glu, F-mutace Tyr 90 za fenylalanin, Prc-SH3 doména virového Src, 0GST-samotná Glutathion transferáza) do 20ml YTG media s Ampicilinem přes noc při 37°C
- Druhý den ráno zkontrolujeme OD na spektrofotometru. Hodnota by měla být mezi 1,4-2,4. Měříme proti čistému YTG mediu (blank)
- Z inokula zaočkujeme na OD 0,4 do 40 ml čerstvého YTG Ampicilin media. Třepeme na třepačce 180 rpm, 2,5 hod při 37°C
- Po této době odebereme 1ml kultury na SDS-PAGE vzorek[1] pro negativní kontrolu před nárůstem indukovatelného proteinu (SH3-GST fuzní protein)
- Tento vzorek centrifugujeme na stolní centriguze při 4000 g, 2 min. Opláchneme LB2 pufrem, poté resuspendujeme v 1 ml LB1 pufru.
- K zybteku 40 ml kultury přidáme IPTG (výsledná koncentrace 1 mM) a tím indukujeme expresi fuzního proteinu z pGEX plazmidu
- Kulturu necháme opět růst na třepačce při 180 rmp, 1,5 hod při 37°C
- Zkontrolujeme OD – měla by být v rozmezí 1,0-2,3

- Odebereme 1 ml vzorek[2] pro SDS-PAGE (pozitivní kontrolu)
- Tento vzorek opět centrifugujeme na stolní centriguze při 4000 g, 2 min. Opláchneme LB2 pufrem, poté resuspendujeme v 1 ml LB1 pufru.
- Ochladíme kulturu na ledu a převedeme do 50 ml falkon centrifugačních zkumavek
- Centrifugujeme 10 min, 3000g při 4°C
- Sediment resuspendujeme v 40 ml LB2 pufrem a opět centrifugujeme 10 min, 3000 g při 4°C
- Odstranníme supernatant a buněčný petet opět resuspendujeme v 2 ml LB1 pufru s přidanými inhibiory preoteáz
- Suspenzi převedeme do mikrozkumavek a sonikujeme na ledu 2 x 8 min při 40 W výkonu*
- Přidáme 20 % Triton X-100 v LB1 pufru a přidanými inhibitory poteáz na výslednou koncentraci tritonu 1 %
- Inkubujeme 25 min při 0°C, nebo preferenčně přes noc
- Lyzát přeneseme do mikro zkumavek a centrifugujeme 15 min, 13000 g při 0°C
- Supernatant převedeme do nových mikrozkumavek

- *Tento způsob lyze můžeme pro větší výtěžek zaměnit za French-press lyzi
- Na přístroji French-press sestavíme aparaturu pro lyzi malých objemů
- Pro lyzi bakterií nastavíme na ukazateli hodnotu hodnotu 900 (18 000 psi) pomocí otočného šroubu
- Po stlačení pístu jímáme lyzovaný vzorek do nové mikrozkumavky (na ledu) pomocí upouštěcího kohoutku.

- Odebereme 120 ul 50 % GST-agarózy na vzorek ze zásobní dózy
- GST- agarózu 3 x promyjeme 1 ml LB1 pufrem s přidanými inhibitory preoteáz
- Vytvoříme 50 % suspenzi agarózy přidáním 60 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz
- 120 ul promyté 50 % agarózy přidáme k bakteriálnímu lyzátu
- Inkubujeme 1hod při 4°C na rotátoru
- Centrifugujeme 2 min při 4000 rpm
- Supernatant odstraníme a sediment promyjeme 2 x v LB1 pufru s inhibitory proteáz s 1 % Triton X a 1 x v LB1 pufru s inhibitory proteáz (stále na ledu)
- Připravíme 50 % suspenzi agarózy přidáním 60 ul LB1 pufrem s inhibitory

proteáz

- Odebereme vzorek[3] 10 ul agarózové suspeze pro kontrolu purifikace na SDS-PAGE
- Ze zbytku agarózové suspenze vytvoříme proteinové konzervy přidáním 120 ul 60 % glycerolu a skladujeme při -20°C

- Z kontrolních vzorků[1, 2] odebereme 10 ul a přidáme 50 ul 2 x laemli + DTT
- Ke kontrolnímu vzorku[3] čistoty purifikace přidáme 50 ul 2 x laemli + DTT
- Vzorky[1, 2, 3] povaříme na bločku při 95°C a 2 min při 100°C 10 min

LB1 pufr	50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4
LB2 pufr	10 x zředěný LB1
inhibitory proteáz 1000x	Aprotinin 1 ug/ml
	Leupeptin 5 ug/ml
	Pefabloc 100 ug/ml
IPTG 1000 x	23,8 mg/ml

Triton X-100, 20 % v LB1 + Inhibitory proteáz

3.17. GST-SH3 Pull-down

- K proteinovým glycerolovým konzervám (na ledu rozmrzlým) obsahujícím fuzní protein GST-SH3 různých variant (viz výše) přidáme 500 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz pro odmytí glycerolu
- Agarózu usadíme entrifugací při 4000 rpm 2 min při 0°C
- Sedimentovanou agarózu opatrně resuspendovat v 60 ul LB1 pufru s inhibitory proteáz (celkový objem 120 ul)
- Pro pull-down odebereme 10 ul 50 % agarózové suspenze
- Pro snažší manipulaci s agarózou přidáme tzv. „nosičovou“ (prázdnou) agarózu na výsledný objem 40 ul 50 % agarózové suspenze (stále pracujeme na ledu)

- K výsledné suspenzi agarózy přidáme 500 ul supernatantu RIPA lyzátu z HeLa buněk (případne Hepes/Nonidet lyzátu z HeLa buněk)

- Jako pozitivní kontrolu pro SDS-PAGE odebereme 20 ul HeLa lyzátu (tzv. totální lyzát)
- Inkubujeme 2 hod při 4°C na rotátoru při mírných otáčkách
- Dále promyjeme 3 x LB1 pufrem s inhibitory proteáz (centrifugace při 4000 rpm, 2 min, 0°C)
- Po promytí odsajeme pomocí tenké jehly zbylý LB1 pufr a ihned (na ledu) přidáme 20 ul 2x Laemli+DTT
- Povaříme spolu s vzorkem totálního lyzátu na bločku při 95°C a 2min při 100°C 10 min
- Nádleduje SDS-PAGE separace navázaných proteinů
- Poté Western blot a imunodetekce, nebo příprava pro MS analýzu

3.18. Příprava vzorku pro MS

Veškeré kroky manipulace s materiálem, který bude podroben analýze na hmotnostním spektrometru musí být prováděny se zvýšenou pozorností na čistotu práce, aby nedošlo ke znehodnocení vzorků kontaminací keratinem. Práci provádíme ve filtrovaném prostředí laminárního biohazard boxu s použitím sterilních rukavic.

- Po SDS-PAGE či IEF/SDS-PAGE 2D separaci následuje barvení gelu pomocí Coomassie blue
- Po odbarvení a vizualizaci proteinových bandů, tyto vypíchneme pomocí sterilní zastřihnuté plastové špičky na pipetu
- Kousky gelu velikosti cca 1 mm převedeme do sterilních mikrozkumavek

vymytí Coomassie blue a SDS

- Nejprve provedeme redukci disufidických můstků proteinů pomocí 1 ul 1M DTT
- Přidáme 90ul roztoku 1:1 50% Acetonitrilu (AcN) a 25 mM NH_4HCO_3 (ABC)
- Silně vortexujeme a inkubujeme 1 min při 60°C v bločku
- Poté roztok AcN/ABC odsajeme a opět přidáme 90 ul
- Cyklus výměny AcN/ABC roztoku, vortexování a inkubace při 60°C provádíme do doby, než se roztok zcela neodbarví
- Poté zcela odsajeme zbytek AcN/ABC roztok

alkylace

- Pro alkylaci cysteinových zbytků zamezíme znovu utvoření nechtěných disulfidických můstků. Proto ke kouskům gelu přidáme 50 ul 100 % Iodoacetamidu (IAA)
- Silně zvortexujeme
- Inkubujeme 20 min při 60°C v bločku za občasného vortexování

- Supernatant poté zcela odsajeme a přidáme 1ul 1 M DTT a 90 ul AcN/ABC roztoku
- Následně silně vortexujeme
- Odsajeme supernatant a přidáme 90 ul miliporové vody
- Silně vortexujme
- Opět odsajeme supernatant a přidáme 90 ul 100% AcN
- Silně vortexujeme
- Odsajeme supernatant tak, abychom při tom nenasály scvrklé (dehydratované) kousky gelu
- Přidat miliporovou vodu
- Silně vortexujeme
- Následně opět odsajeme a přidáme AcN (gel opět zbělá a scvrkne se)

- Po těchto krocích hydratace a dehydratace gelu, zcela odsajeme 100 % AcN a necháme úplně vyschnout v otevřených mikrozkumavkách
- Přímo na scvrklý gel přidáme 1ul roztoku Trypsinu, který se ihned vsákne do gelu
- Poté přidáme 20 ul ABC roztoku a uložíme do termostatu 37°C inkubovat přes noc

3. 19. 2D ELFO IEF/DODECACELL BioRad

rehydratační pufr:	7 M močovina 2 M thiomočovina 60 mM DTT 4 % CHAPS 0,2 % amfolyty pH 3-10 barva (bromfenol blue)
ekvilibrační pufr:	6 M močovina 2 % SDS

50 mM Tris pH 8,8
50 % glycerol
barva (bromfenol blue)

+ 20 mg/ml DTT

+ 25 mg/ml Iodoacetamid

SDS-PAGE pufr: 25 mM Tris (pH 8,3)
190 mM glycin
0,1 % SDS

Rehydratace

- se IEF stripy pracujeme opatrně pomocí pinzety abychom je nepoškodily
- ze stripu odtrhneme krycí folii a umístíme jej gelem dolů
- rehydrataci provádíme v rehydratation tray srovnané pomocí vodováhy
- na 24 cm IEF strip nanášíme max 500 ul vzorku v rehydratačním pufru (nanáška na strip max 2 mg proteinů)
- strip nesmí být v drážce přilepený a zároveň nesmí vzniknout bubliny
- necháme strip 20 min absorbovat vzorek a poté převrstvíme 1 ml minerálního oleje
- necháme rehydratovat minimálně 12 hod

izoelektrická fokusace (IEF)

- malé navlhčené (milipor H_2O) filtrační papírky přiložíme na elektrody (vždy dva na jednu) fokusačního tray (BioRad IEF cell)
- opatrně vyjmeme strip z rehydratation tray a opláchneme miliporovou vodou
- pomocí pinzety naneseme strip gelem dolů na fokusační tray (pozor! dodržujeme polaritu)
- převrstvíme 3-4 ml minerálního oleje
- spustíme program IEF:

250 V linear ramping	1 hod
4000 V linear ramping	4 hod
4000 V linear ramping	12 hod
500 V linear ramping	dle potřeby (pro zabránění difuse)
celkem cca 70 kVhr	

Ekvilibrace v pufru pro SDS-PAGE

- po fokusaci vyndáme strip z tray a opláchneme je miliporovou vodou
- přemístíme strip do vhodné tuby s ekvilibračním pufrem
- jemně třepeme 15 min na stolní třepačce
- vylijeme ekvilibrační pufr s obsahem DTT a vyměníme ho za ekvilibrační pufr s obsahem Iodoacetamidu
- opět 15 min mírně třepeme na stolní třepačce
- vyjmeme strip a opláchneme miliporovou vodou a 2 x SDS-PAGE pufrem

SDS-PAGE

- na předem nalitý PAA gel (10 % viz příprava PAGE gelu výše) přitlačíme pinzetou strip, tak aby mezi stripem a gelem nebyly žádné bubliny
- strip převrstvíme 1 ml roztavené agarosy (0,2-0,5 % low melting agarosa v SDS-PAGE pufru)
- po ztuhnutí sestavíme aparaturu pro SDS-PAGE
- zapneme chladící jádro na -20°C, zapneme cirkulaci pufru
- necháme běžet 6 hod při 200 V (proměnlivé hodnoty podle druhu nanášky, velikosti gelu, apod.)

3. 20. Phage display

Experiment byl prováděn pomocí Ph.D.-12™ Phage display Library Kit (New England Biolabs).

Blokovací pufr (neklávovat)
0,1 M $NaHCO_3$ (pH 8,6), 5 mg/ml BSA, 0,02 % NaN_3,

Tris-HCL pH 9,1

1M IPTG (zásobní 1000 x)

TBS
50 mM Tris-HCl (HCl upravíme pH na 7,4) , 150 mM NaCl
TBS^1+ 0,1 % Tween
TBS^2 + 0,5 % Tween

PEG/NaCl
20 % polyethylen glycol, 2,5 M NaCl

Eluční pufr
0,2 glycin HCl na pH 2,2 + 1mg/ml BSA

Iodididový pufr
10 mM Tris-HCL (pH 8), 1 mM EDTA, 4 M NaI

TE pufr
10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA

Selekce vazebné sekvence
- Zaočkujeme 10 ml LB media bakteriální kulturou K12 inkubujeme při 37°C přes noc
- Blokujeme GST-SH3 agarózu 1 ml blokovacího pufru 1 hod na třepačce při 4°C
- Centrifugujeme při 4000 rpm, 2 min, 4°C a odstraníme blokovací pufr

- 6x opláchneme 1 ml TBS[1]
- K GST-SH3 agaróze přidáme 1 ml TBS a 4x 10^{10} fágových partikulí
- inkubujeme na rotátoru 60 min při 4°C
- Centrifugujeme při 4000 rpm, 2 min, 4°C a odstraníme TBS
- 10x promyjeme TBS[1]
- Navázané fágy eluujeme 100 ul elučního pufru 15 min při laboratorní teplotě za mírného třepání
- Centrifugujeme při 4000 rpm, 2 min, 4°C a odebereme supernatant do nové zkumavky
- K eluátu ihned přidáme 15 ul Tris-HCl (pH 9,1) pro neutralizaci pH
- Pro stanovení titru odebereme z eluátu 1 ul a uděláme ředící řadu (10^3-10^5) pro stanovení titru*

- Přes noc narostlou bakteriální kulturu K12 naředíme 1:100 LB mediem na 20 ml
- K této přidáme fágový eluát a inkubujeme 4,5 hod při 37°C za výrazného třepání
- Po této době kulturu převedeme do centrifugačních zkumavek a stočíme 10 min, při 4000g, 4°C
- supernatant převedeme do nových zkumavek a přidáme 1/6 objemu PEG/NaCl a necháme precipitovat přes noc při 4°C

- Precipitát centrifugujeme 20 min 4000 g při 4°C.
- Odstraníme supernatant a pelet resuspendujeme v 1 ml TBS
- stočíme na stolní centrifuze 5 min při 4°C 10000 g pro odstranění zbytkových bakterií
- Supernatant převedeme do nových zkumavek a opět přesrážíme 1/6 objemu pomocí PEG/NaCl na ledu 60 min
- Pelet resuspendujeme 200 ul TBS (toto je amplifikát)

- Odebereme 1 ul amplifikátu a uděláme ředící řadu (10^9-10^{12}) pro stanovní titru*

Výše uvedené kroky představují jedno kolo selekce fágovách partikulí nesoucích selektovanou sekvenci. Tyto kroky opakujeme celkově čtyřikrát pro nalezení dostatečně „zakonzervované" sekvence. Po prvním kole selekce používáme místo TBS[1] TBS[2], což zvyšuje preferenci sekvence s vyšší afinitou.

Stanovení titru fágů
- *Z každé ředící řady, odebereme vždy 10 ul a přidáme k 200 ul kultury K12 (přes noc narostlá 1:100 ředěná)
- Zkumavky s K12 kulturou a fágy necháme 5 minut stát (infekce)
- poté K12 kulturu s fágy převedeme do předem rozehřátého „Agarose top"
- přelijeme na předem vytemperované LB/ IPTG/ Xgal plotny a necháme ztuhnout
- Inkubujeme v termoboxu přes noc při 37°C
- Druhý den stanovíme titr přepočítáním barevných plaků (M13 nese *lacZα* gen, proto infikované plaky jsou modré pokud jsou kultivovány na plotnách s Xgal a IPTG)

Charakterizace vazebné sekvence
Po posledním kole selekce můžeme přistoupit k sekvenaci DNA z vypíchnutých fágů

- kulturu K12 narostlou přes noc ředíme 1:100 do 1 ml LB media
- pomocí sterilního párátka vypíchneme barevný plak a převedeme do zkumavky s LB mediem
- necháme 4,5 hod inkubovat při 37°C za výrazného třepání
- Po uplynutí této doby sedimentujeme bakterie centrifugací
- Odebereme supernatant a opět centrifugujeme pro odstranění zbytkových bakterií
- 500 ul supernatantu převedeme do nových zkumavek a přidáme 200 ul PEG/NaCl
- Necháme stát při laboratorní teplotě 10 min
- Centrifugujeme 10 min při 10000 g
- odstraníme supernatant a pelet resuspendujeme v 100 ul iodidovém pufru
- přidáme 250 ul 100 % ethanolu a inkubujeme 10 min při laboratorní teplotě (jednořetězcová DNA precipituje)
- centrifugujeme 10 min při 10000 g a pelet opláchneme 70 % ethanolem
- necháme vyschnout a pelet rozpustíme v 30 ul TE pufru (materiál vhodný pro sekvenaci)

4. Výsledky

4.1. Modelování vazebného povrchu SH3 domény kinázy Src pomocí programu PyMOL a Swiss-PDB viewer

4.1.1. Modelování ligandů I. a II. třídy na vazebném povrchu SH3 domény kinázy Src.

Při modelování proteinových struktur SH3 domény kinázy Src jsme vycházeli z volně přístupných PDB (protein data bank) dat. Ty je možné získat na webových stránkách např. proteinové databázi portálu PubMED. Jak již bylo zmíněno SH3 domény jsou schopny vázat ligandy dvou tříd (I. resp. II.). Bylo proto nutné vizualizovat obě situace, kdy ligandy jsou navázány na povrchu SH3 domény kinázy Src.

Při modelování struktur obsahujících proteinovou vazbu dochází při vykreslení struktury k překryvu obou struktur a tím k znemožnění vytvoření přehledných obrázků. Je potřeba ze zdrojového kódu vyčíst obě ineragující struktury a oddělit je do vlastních souborů. Při tvorbě nového souboru je nutné s textem pracovat jako s obyčejným textem. Po této úpravě je možné oba soubory otevřít „přes sebe", což umožňuje samostatnou práci s každou strukturou.

Program Swiss-PDB viewer umožňuje pomocí funkce „Magic fit" na základě sekvenční podobnosti překrytí dvou příbuzných struktur. Toho jsme využili pro srovnání SH3 struktur s navázanými různými druhy ligandů. Program oběma strukturám přiřadí analogické souřadnice. To nám umožnilo snazší práci následně v programu PyMOL, neboť program Swiss-PDB viewer umožňuje ukládání dat v PDB formátu. Tzn. zohledňuje změnu souřadnic atomů což PyMOL neumožňuje.

Vizualizovali jsme ligandy I. i II. třídy navázané na povrchu SH3 domény. Porovnáním obou struktur se jasně potvrdilo, že proliny z PxxP core sekvence ligandu na povrchu SH3 domény zaujímají jiné pozice (viz. *Obr.* 11- a, 12-a).

4.1.2. Modelování vlivu fosforylace a fosfomimikující mutace tyrozínu 90 SH3 domény Src na vazbu ligandu.

Jak již bylo zmíněno fosforylace tyrozínu 90 SH3 domény kinázy Src existuje *in vivo*. Chtěli jsme proto tuto situaci namodelovat a vizualizovat. Program PyMOL, zatím neumožňuje modelování fosforylovného stavu ze struktury, která tuto modifikaci neobsahuje ve svém zdrojovém PDB kódu. Bylo proto nutné tuto nedostatečnost obejít pomocí funkce „build", kde jsme přidali methylovou skupinu na OH- skupinu tyrozínu 90. Následně H atomy byly zaměněny za O a C za P, tak aby toto odpovídalo struktuře fosfátové skupiny. Takto jsme tedy vytvořili model SH3 domény kinázy Src s fosforylovaným tyrozínem 90.

Pomocí funkce „mutagenesis" jsme vybrali energeticky nejvýhodnější rotamer pro tyrozínu 90 s navázanou fosfátovou skupinou. Program polohu jednotlivých rotamerů vypočítává na základě pravděpodobnosti výskytu daného rotameru v krystalických strukturách známých proteinů.

Po vytvoření modelu jsme pozorovali změnu vazebné kapsy. To by mohlo zásadně snížit sílu vazby SH3 domény k ligandu. Otázkou zůstává, zda toto snížení je stejné pro ligandy typu I., a II., neboť při pozorování modelu SH3 domény s fosforylovaným tyrozínem 90 se zdálo, že ovlivnění síly vazby by nemuselo být tak zásadní u vazby ligandu I. třídy. To proto, že podle modelu nedochází k přímé sterické kolizi s navázaným prolinem z PxxP core sekvence ligandu (viz *Obr.* 11-c, 12-c). Přítomnost fosfátové skupiny však mění nejenom sterické poměry, ale také zásadně mění náboj. Tyto změny se bohužel nepodařilo zohlednit při modelování, neboť by vyžadovaly složitější přístup, který PyMOL bohužel nenabízí.

Po namodelování fosforylace na vazebném povrchu SH3 domény kinázy Src tedy došlo k výrazné změně vazebné kapsy a přímé sterické kolizi s ligandem II. třídy, zatímco ligandu I. třídy fosfát přímo nebrání ve vazbě. Dále jsme přistoupili k modelování fosfomimikující mutace Tyr 90, kde je Tyr 90 mutován za glutamát, protože tato mutace má i svůj význam při vlastním experimentálním ověřování vaznosti SH3 domény, neboť nevyžaduje obtížně proveditelnou *in vitro* fosforylaci pouze Tyr 90, zatímco by ostatní tyrozíny na vazebném povrchu SH3 domény zůstaly striktně v nefosforylovaném stavu. Mutagenezi jsme provedli v programu

Swiss-PDB viewer. Mutovaný glutamát nese za fyziologického pH záporný náboj, podobně jako fosfátová skupina. Modelování ukázalo, že přestože je glutamát strukturně zcela odlišný od fosfotyrozínu, je jeho mutace dostatečná k rozrušení vazebné kavity a vnáší záporný náboj (viz *Obr.* 11-d, 12-d)

Dále jsme v Swiss-PDB viewer tímto postupem vytvořili nefosforylovatelnou mutaci Tyr 90 za fenylalanin. Tato mutace měla sloužit jako kontrola pro domněnku, že fenylalanin strukturně mimikuje tyrozín a tudíž zásadně nemění povrch vazebné kapsy SH3 domény. Současně nemůže vlivem absence OH- skupiny dojít k jeho fosforylaci, což jsme opět využili při experimentálním ověřování hypotézy (při tzv. „pull-down" experimentech viz dále). Vlastní modelování prokázalo, že k vytvoření sterické zábrany uvnitř vazebné kapsy vlivem mutace Y90F nedošlo a kombinace těchto, v experimentální praxi hojně užívaných mutací, je smysluplná (viz *Obr.* 11-b, 12-b).

Naše modelování tedy ukázalo, že fosfotyrozín stejně jako fosfotyrozín mimikující mutace (Y90E), by mohla rušit vazebné schopnosti SH3 domény k ligandům II. třídy, zatímco u ligandů I. třídy by zrušení vazby nemuselo být tak markantní. Mutace za fenylalanin v ani jednom z případů vazbě ligandu nebránila. Výsledky z počítačového modelování jsou tedy v souladu s literaturou (viz *Tab.* 2). Předpokládaný vliv fosfomimikující mutace na vazebné vlastnosti SH3 domény Src jsme se dále rozhodli experimentálně ověřit.

SH3 doména kinázy Src s navázaným ligandem I. třídy

a) 1QWE_WT (lig. I.)

b) 1QWE_Y90F (lig. I)

c) 1QWE_pY90 (lig. I)

d) 1QWE_Y90E (lig. I)

Obr. 11

Modely povrchu SH3 domény kinázy Src s detailem na pozici 90 a navázaným ligandem I. třídy. K vytvoření modelů zde vyobrazených byla použita krystalická struktura a její PDB kód 1QWE, kde ligand I. třídy je arteficielní sekvence App 12 (APPLPPRNRPRL) (Feng *et al.*, 1995). Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O

a) Detail první vazebné kapsy povrchu SH3 domény kinázy Src. Zeleně je zabarven ligand I. třídy s modře zvýrazněným navázaným prolinem. b) Zde je na stejném povrchu mutován Y90 za fenylalanin. V tomto obrázku je ukázáno, že tato mutace zásadním způsobem nemění vazebný povrch domény a je tudíž použitelná pro napodobení nefosforylovaného stavu. c) Model fosforylovaného Y90 uvnitř vazebné kapsy SH3 domény. Zde je ukázána zásadní změna povrchu domény. Z tohoto obrázku však není patrné, zda tato změna je dostatečná k zrušení vazebné kapacity domény vůči liagandům I. třídy. d) Namodelovaný fosfomimikující stav, kde došlo k mutační záměně Y90 za glutamát. Zde je vidět, že mutace má podobný vliv na změnu povrchu jako vlastní fosforylace. K této změně musíme přičíst také vliv záporného náboje. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

SH3 doména kinázy Src s navázaným ligandem II. třídy

1QWF_WT (lig. II)

1QWF_Y90F (lig. II)

1QWF_pY90 (lig. II)

1QWF_Y90E (lig. II)

Obr. 12

Modely povrchu SH3 domény kinázy Src s detailem na pozici 90 a navázaným ligandem II. třídy. K vytvoření modelů zde vyobrazených byla použita krystalická struktura a její PDB kód 1QWE, kde ligand II. třídy je arteficielní sekvence Vsl12 (VSLARRPLPPLP) (Feng *et al.*,1995). Zabarvení povrchu SH3 domény podle zastoupení prvků: C, H, N, O

a) Detail první vazebné kapsy povrchu SH3 domény kinázy Src. Zeleně je zabarven ligand II. třídy s modře zvýrazněným navázaným prolinem. b) Opět je zde mutován Y90 za fenylalanin pro ukázku zachování téměř nezměněného vazebného povrchu domény (nefosforylovaný stav). c) Model fosforylovaného Y90 uvnitř vazebné kapsy SH3 domény. Zde je narozdíl od případu s ligandem I. třídy ukázána jasná kolize mezi fosfátovou skupinou a navázaným prolinem. d) Y90E fosfomimikující stav. Opět je zde vidět, jak má mutace obdobný vliv na změnu povrchu jako fosforylace, ale navíc zde vidíme opět jasnou kolizi s navázaným prolinem ligandu II. třídy. Data převzata z Feng *et al.*, 1995; vyobrazeno pomocí DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.)

4.2. Testování vazebných schopností variant SH3 domény kinázy Src

Pro ověření výsledků z modelování pomocí programů PyMOL a Swiss-PDB viewer a následnému testování hypotézy, která předpokládá zrušení vazebné schopnosti SH3 domény kinázy Src po fosfomimikující mutaci Y90E, jsme navrhli vazebné pokusy („pull-down" experimenty). Při těchto experimentech dochází k vyvázání vazebných partnerů daného proteinu (SH3 domény kinázy Src) z buněčného lyzátu (v našem případě savčích HeLa buněk).

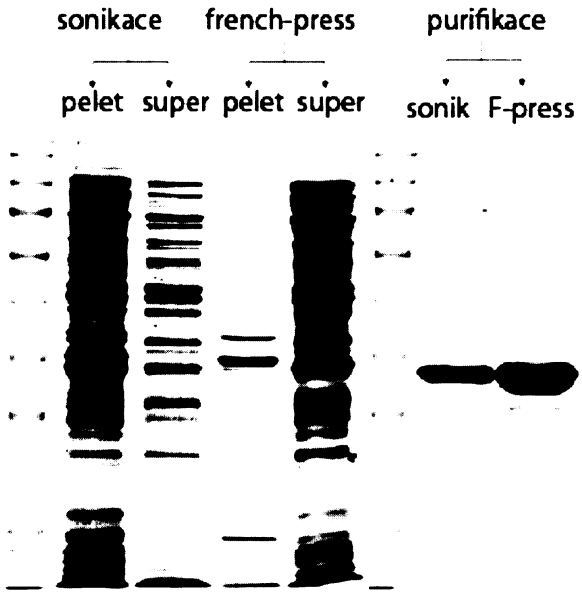
SH3 domény byly exprimovány v bakteriální kultuře jako fuzní proteiny, kdy byly fúzovány s GST (Glutathion-S transferáza), ve variantách WT („divoký typ"), Y90E (fosfomimikující mutace), Y90F (mutace mimikující defosforylovaný stav), Prc (SH3 doména z virové varianty Prc *v-src*).

Expresní vektory jednotlivých variant SH3 domén byly vytvořeny v naší laboratoři Dr. Röselem zaklonováním příslušných sekvencí do pGEX-2T plazmidu (Amersham). Expresi z tohoto vektoru lze indukovat přidáním IPTG do media. Po indukci exprese je nutné proteiny vyizolovat v co možná největším množství. SH3 domény fúzované s GST byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na agaróze s imobilizovaným glutathionem (Glutathione Sepharose^{TM} 4B, GE Healthcare). Po vyvázání GST-SH3 fuzních proteinových konstruktů je zapotřebí tyto přenést do lyzátu ze savčích buněk (např. HeLa) a nechat na SH3 domény navázat jejich přirozené vazebné partnery. Následuje série odmývání, kde se zbavíme nespecifických interakcí. Poté je nutné proteiny rozseparovat (v našem případě SDS-PAGE). Dále je možno buď proteiny přenést na nitrocelulózovou membránu a podrobit imunologické detekci, nebo analýze pomocí hmotnostního spektrometru (viz kap. 4. 3.).

Při postupu purifikace dlouhou dobu nedocházelo k dostatečným výtěžkům napurifikovaných proteinových konstruktů. Tento kritický bod se podařilo vyřešit pomocí změny způsobu lyze bakteriálních buněk v kterých probíhala exprese fuzních proteinů. Původně jsme lyzi prováděli pomocí sonikace. Tento postup nám však u následných vazebných pokusech (pull-down) nepřinášel uspokojující výsledky. GST-SH3 konstrukt se nám nepodařilo efektivně vyvázat z bakteriálního lyzátu. To mělo za následek nízké procento vyvázaných interakčních proteinů. Tím pádem jsme se dost často pohybovali hluboko pod detekčním limitem imunoznačení. Tento

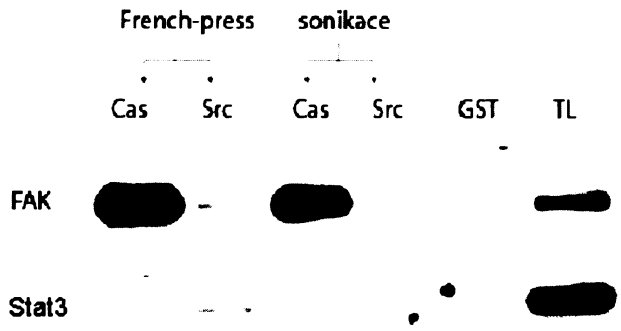
nedostatek jsme nejprve řešili změnami sonikačních podmínek (např. prodloužení času sonikace, různé cykly působení impulzů ultrazvukových vln, apod.). Vše ale bez většího úspěchu.

Přistoupili jsme k lyzi bakteriálních buněk pomocí přístroje French-press. Při tomto postupu bylo ihned patrné zlepšení. Zatímco při sonikaci zůstávala většina veškerých proteinů v nerozpustné fázi buněčného debris, při french-press metodě lyze téměř veškeré proteiny přešly do supernatantu, tedy buněčného lyzátu (viz *Obr.*13). Výtěžek purifikace byl zvýšen desetinásobně, což vedlo u následných vazebných pokusů se savčími HeLa lyzáty k markantním zlepšením výsledků (viz *Obr.* 14). Pro porovnání výsledků lyze sonikací a metodou French-press jsme použili kromě SH3 domény z kinázy Src i paralelně SH3 doménu proteinu Cas. To proto, abychom si byli jisti, že zlepšení výsledků je signifikantní. Sledovali jsme vazbu známých interaktorů SH3 domény Src a Cas – FAK a Stat3. Obrázek 14. ukazuje, že za nových podmínek lyze bakteriálních buněk jsme byli schopni detekovat vazbu SH3 domén na FAK i Stat3.



Obr. 13

Ukázka porovnání účinnosti lyze pomocí sonikace a French-press. V prvních dvou sloupcích je pro porovnání nanesen stejný poměr peletu a supernatantu vzniklých po sedimentaci po lyzi pomocí sonikace. Z toho je vidět, že téměř veškeré proteiny jsou v nerozpustné fázi buněčného debris. Na dalších dvou sloupcích je to samé porovnání po použití French-press metody lyze. Je vidět markantní rozdíl mezi oběma sloupci, kdy došlo k přechodu téměř všech proteinů do rozpustné fáze lyzátu. Dva sloupce v pravé části obrázku ukazují porovnání množství naizolovaného GST-SH3 konstruktu. Barveno pomocí coomassie blue. Velikost GST-SH3 konstruktu 33 kDa. Marker molekulových hmotností viz. 3. 4.



Obr. 14

Porovnání účinnosti pull-down experimentu sonikace vs. French-press. Po inkubaci GST-SH3 konstruktu (sloupce označené Src je SH3 doména ze Src kinázy, sloupce označené Cas je SH3 doména z proteinu Cas- pouze pro ověřené jestli k zlepšení dojde i v jiných případech než jen SH3 kinázy Src) v HeLa lyzátu, byly navázané proteiny separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Western blot) a navázané proteiny byly detekovány pomocí protilátek anti-FAK, anti-Stat3. Sloupec označený jako GST je negativní kontrola, kde do vazebné reakce (pull-down) bylo přidáno pouze GST bez SH3 konstruktu. Sloupec označený jako TL je pozitivní kontrola totálního lyzátu HeLa. Ředění primárních protilátek anti-FAK 1:500, anti-Stat3 1:200. Ředění sekundárních protilátek 1:5000.

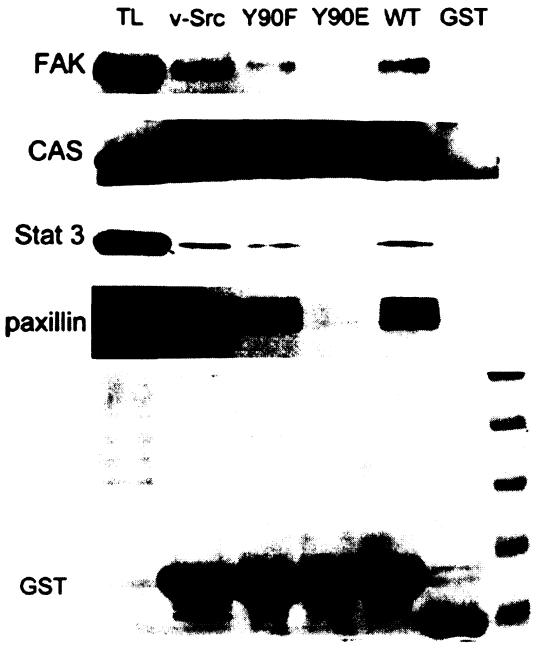
Po vyřešení tohoto problému jsme přistoupili k vlastním vazebným pokusům (pull-down) s cílem zaměřit se na některé proteiny, u kterých byla známa interakce se SH3 doménou Src kinázy. Převážně pak proteiny účastnící se integrinové signalizace (Cas, FAK, paxillin). Vlastní vazebná reakce probíhala v roztoku HeLa lyzátu připraveným pomocí lyzačního pufru RIPA (viz. metody). K těmto lyzátům byly přidány imobilizované fuzní GST-SH3 varianty. Následovala separace proteinů na SDS-PAGE a westernbloting.

Proteiny našeho zájmu byly imunodetegovány na nitrocelulózových membránách. Jejich navázané množství bylo porovnáno relativně mezi jednotlivými variantami SH3 domén. Naše domněnka byla ta, že fosfomimikující mutace (Y90E) musí alespoň v některých případech rušit, či minimálně výrazně snížit vyvázané množství interagujících proteinů. Jak vyplynulo z počítačového modelování, předpokládali jsme narušení vazby u proteinů spadajících sekvencí svých polyprolinových motivů (PxxP) to tzv. třídy II. (Stat3, pravděpodobně Paxillin). O zrušení vazby proteinů z tzv. I třídy (Cas, FAK) jsme nebyli plně přesvědčeni.

Tyto vazebné pokusy jasně ukázaly, že Y90E fosfomimikující mutace výrazně snižuje schopnost SH3 domény vázat a to jak ligandy I. (Cas, FAK), tak i II. (Stat3, Paxillin) třídy (viz *Obr.* 15). Fosfomimikující mutace (Y90E) je samozřejmě

arteficielní situace, které nemusí přesně reflektovat situaci, ke které dojde při fosforylaci tyrozínu. Nicméně toto zjištění pravděpodobně naznačuje neplatnost naší domněnky, podle které by fofomimikující mutace a následně fosforylace Tyr 90 měnila preferenci ve prospěch ligandů I. třídy. Nicméně domněnka, že fosfomimikující mutace (Y90E) významně redukuje schopnost vazby ligandů na SH3 doménu kinázy Src byla potvrzena.

Při vyhodnocování našich výsledků jsme zjistili, že je problematické řazení interakčních proteinů obsahujících polyprolinové motivy podle typu obsažené ligandové sekvence. U některých proteinů je vazebná sekvence (PxxP) známa z literatury např. STAT3 (PMHPDR čili ligand II. třídy) (Schreiner *et al.*, 2002). FAK (RALPSIPKL ligand I.) (Thomas *et al.*, 1998). Cas (RPLPSPP I. typ) (Nakamoto *et al.*, 1996). U těchto motivů jsou většinou dostupná data z mutačních analýz, kde záměnou prolinů za jinou aminokyselinu dojde k zrušení rozpoznání SH3 doménou. Avšak u jiných proteinů jako je např. Paxillin (PPPVPPPP) (Weng *et al.*, 1993) nelze jasně určit do které třídy ligandu zapadá svou orientací na SH3 doméně. Další problém je ten, že proteiny většinou obsahují více prolin bohatých sekvencí a často obou typů (třídy I. i II.) a neví se přesně, které jsou pro danou interakci využívány.



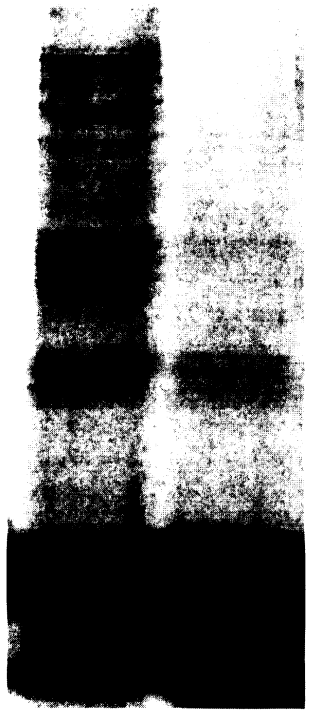
Obr. 15

Z obrázku westernblotu je zřejmé, že u fosfomimikující mutace (Y90E) v SH3 doméně kinázy Src ruší schopnost vazby této domény k těmto ligandům: FAK I. třída, Cas I. třída, Stat3 II. třída, Paxillin II.? třída. Sloupec TL je pozitivní kontrola lyzát HeLa, v-Src je SH3 doména z virové Src kinázy (zde pouze pro rozšíření dat vaznosti této domény), Y90F je SH3 doména kinázy Src mimikující nefosforylovaný stav, Y90E je fosfomimikující mutace SH3 domény Src kinázy, WT je „divoký typ" SH3 domény Src, GST je negativní kontrola, kde do vazebné reakce bylo přidáno pouze GST bez fúzované SH3 domény. Ředění primárních protilátek anti-FAK 1:200, anti-Cas 1:500, anti-Stat 3 1:200, anti-Paxillin 1:500. Ředění sekundárních protilátek 1:5000. GST-SH3 konstrukty a samotné GST vyzualizovány pomocí Ponceau S.

4.3. Identifikace nových interakčních partnerů SH3 domény kinázy Src

Při coomassie blue barvení proteinů v gelu po vazebných experimentech (pull-down) vyšlo najevo, že fosfomimikující mutace (Y90E) ruší značnou část interakcí. Na gelu to bylo patrné z „vyčištění" sloupce převážně ve vyšších molekulových hmotnostech (Viz *Obr.* 16). Toto bylo ve srovnání s WT („divoký typ") sloupcem natolik markantní, že jsme přistoupili k identifikaci některých majoritních bandů, abychom identifikovaly další interakční partnery SH3 domény kinázy Src, které mají vlivem fosfomimikující mutace sníženou schopnost vázat se na doménu. Dále jsme touto metodou chtěli identifikovat proteiny, u kterých zatím nebyla prokázána interakce s SH3 doménou kinázy Src.

WT Y90E



Obr. 16

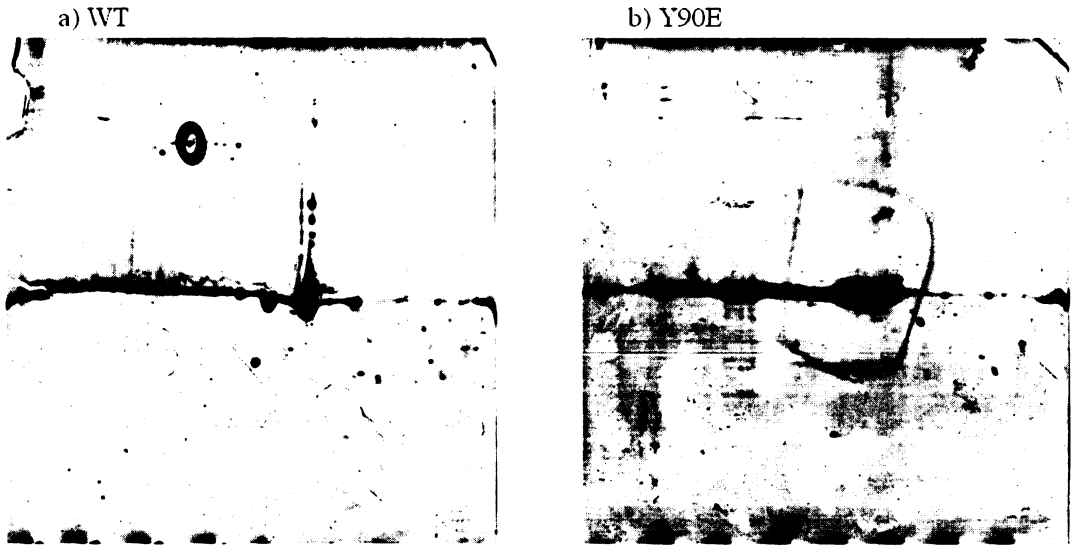
Na tomto gelu po pull-down experimentu je patrno, jak ve sloupci s fosfomimikující mutací (Y90E) dochází k „vyčištění" sloupce oproti WT sloupci. Veliké bandy okolo molekulové hmotnosti 33 kDa odpovídají GST-SH3 fuzním konstruktům, na které byly interagující proteiny vyvázány. Viditelné rozdíly mezi oběma sloupci je největší ve vyšších molekulových hmotnostech. Barveno coomassie blue.

K identifikaci proteinů se standardně používá hmotnostní spektrometrie předcházená, nějakou separační technikou. V našem případě jsme používali SDS-PAGE, později IEF/SDS PAGE, dále kolonu s inverzní fází po trypsinovém štěpení a konečně ZipTip® Pipette Tips. Vlastní identifikace proteinů se provádí buď tzv. metodou „fingerprinting", tandemovou metodou fragmentační sekvenace, a nebo jejich kombinací (pro ověření dat získaných z fingerprintu). K dispozici jsme měli služby pracoviště hmotnostní spektrometrie Viničná 7 (Mgr. Petr Jedelský). Na tomto pracovišti byla analýza prováděna pomocí MALDI-TOF a později i tandemovou analýzou TOF/TOF (Applied biosystems). K analýze byly vybírány bandy s rozdílným zastoupením u WT a Y90E.

V pionýrských pokusech byl pro lyzi HeLa buněk, využívaných k přípravě proteinových lyzátů, používán lyzační pufr RIPA (viz metody). Problém nastal hned

v začátcích pokusů, kdy se ukázalo, že nedochází k uspokojivému vyvázání interagujících proteinů k poměru přidaných GST-SH3 fuzních konstruktů. Problém tkvěl především v přespřílišné koncentraci vlastního vazebného GST-SH3 konstruktu. Veliké množství fuzního proteinu přidávaného pro maximální vyvázání interagujících proteinů znemožňovalo signifikantně odlišit signál pocházející z GST-SH3 konstruktu od námi požadovaného signálu z interagujících proteinů. Bylo proto nutné snížit množství GST-SH3 a zároveň toto množství muselo být dostatečné k vyvázání pro detekci dostatečného množství interagujících proteinů. Jinými slovy zefektivnit vlastní vazbu SH3 na její partnery.

Jako první jsme se pokusili tento problém obejít tím, že jsme provedli 2D proteinovou elektroforézu (IEF/SDS PAGE). K tomuto kroku nás vedla myšlenka, že přidaným rozměrem izoelektrické fokusace dojde k shluknutí GST-SH3 fuzního konstruktu do jednoho bodu. To mělo mít za následek zbavení gelu zamoření GST-SH3 konstruktu s následným zlepšením identifikace na hmotnostním spektrometru. Bohužel tento krok nám nepomohl, neboť koncentrace GST-SH3 na gelu byla tak veliká, že nedošlo její dobré separaci na IEF. Nicméně k jistému zlepšení výstupních dat přeci jen došlo. Z experimentů došlo k identifikaci jednoho interakčního partnera-hnRNP-K (viz *Obr.* 17). Situace by se pravděpodobně ještě zlepšila, kdybychom prodloužili čas IEF. Od tohoto jsme ale upustili, neboť při pohledu na 2D gel se jasně ukázalo, že množství přidaných fuzních GST-SH3 a množství vyvázaných proteinů je v takovém nepoměru, že podmínky panující ve vazebném pufru jsou zcela nevyhovující.



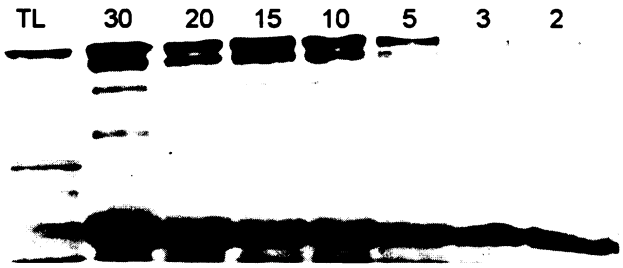
Obr. 17

a) Na obrázku je patrno především obrovské množství do vazebné reakce přidaného konstruktu GST-SH3 (černá čára půlící gel). Toto množství je nepoměrné k množství vyvázaných interagujících proteinů (viditelných jako tečky především v pravé části spodní poloviny gelu). b) Opět velmi patrný nadbytek GST-SH3 (Y90E varianty). Nicméně je i přes neuspokojivý výsledek experimentu patrno, že v pravé části spodní poloviny gelu došlo u fosfomimikující mutace (Y90E) k zmizení některých teček. Barveno coomassie blue. Červeně je označena tečka identifikovaného hnRNP-K (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K - 99,988% protein score).

Navrhnutí pufru ve kterém by efektivněji probíhala vazebná reakce (pull-down) bylo obtížné, neboť se muselo jednat o pufr, ve kterém by došlo k lyzi buněk. Nakonec jsme se rozhodli pro použití pufru Hepes/Nonidet. Tento pufr standardním postupem je schopen rozrušit cytoplazmatickou membránu savčích buněk, ale jadernou nikoliv. Tohoto faktu jsme s výhodou využili k další separaci lyzátů na frakci cytoplazmatickou a frakci jadernou, kterou jsme museli dále podrobit lyzi pomocí French-press přístroje (viz metody). Navíc tento pufr nabízí natolik šetrné podmínky, že plně vyhovoval našim nárokům pro vazebnou reakci (pull-down).

Po záměně tohoto pufru bylo ještě nutné přesně stanovit množství fuzního proteinu nezbytného pro vyvázání veškerých SH3 interagujících proteinů z HeLa lyzátu. To abychom předešli přidání nadměrného množství fuzního konstruktu GST-SH3 do reakce. To jsme provedli jednoduchým pokusem, kdy k ředící řadě zvyšující se koncentrace fuzního GST-SH3 jsme přidal vždy stejné množství HeLa lyzátu. Provedli jsme tedy pull-down. Následně jsme po SDS-PAGE a převedení proteinů na nitrocelulózovou membránu imunodetegovali s Src SH3 doménou

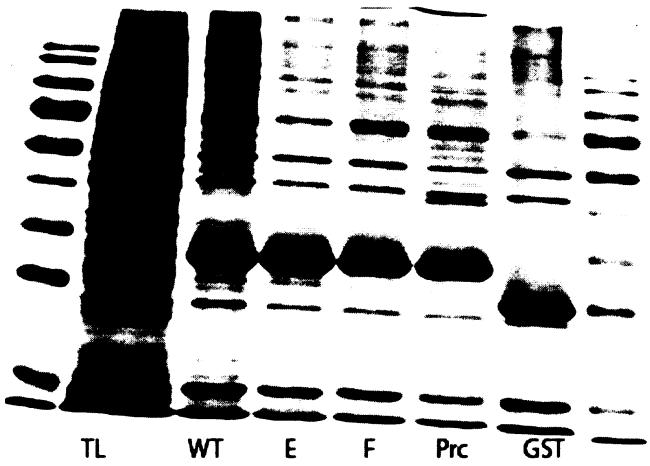
interagující protein Cas. Po odečtení jsme zjistili nejnižší nutné množství GST-SH3 do reakce přidaného proteinu k efektivnímu vyvázání proteinu Cas z HeLa lyzátu (viz *Obr.* 18), které odpovídalo přibližně 1/10 množství GST-SH3 nutného pro imunodetekci při lyzi v RIPA pufru.



Obr. 18

Porovnání množství GST-SH3 nutného pro vyvázání veškerého Cas proteinu z HeLa Hepes/Nonidet lyzátu. TL sloupec slouží jako pozitivní kontrola z Hela lyzátu. Čísla nad jednotlivými sloupci znázorňují ul 50 % roztok GST-SH3 navázaného na agarózu (Glutathion Sepharose) přidaného do reakce. Protein Cas je imunodetegován nahoře. Dole je absolutní množství GST-SH3 přidaného do reakce barveného pomocí Ponceau S. Z obrázku je vidět, že množství 10 ul 50% roztoku agarózy nesoucí GST-SH3 je dostatečné k vyvázání většiny Cas proteinu z HeLa lyzátu. Ředění primární protilátky anti-Cas 1:500. Sekundární protilátka ředěna 1:5000.

Po této změně vazebných podmínek jsme byli schopni vyvazovat dostatečná množství interagujících proteinů s použitím menšího množství přidaného GST-SH3, tak aby nedocházelo k zastínění signálu při identifikaci hmotnostním spektromentrem (viz *Obr.* 19).

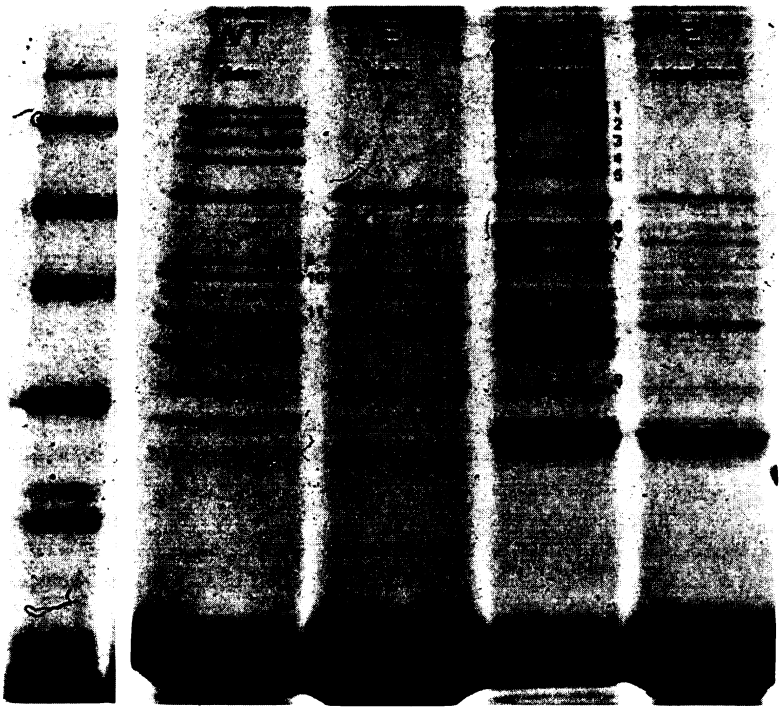


Obr. 19

Zde je vidět coomassie blue barvený gel po pull-down. Množství přidaných GST-SH3 fuzních konstruktů dovolovalo identifikaci pomocí MS analýzy. TL totální lyzát jako pozitivní kontrola. WT-„divoký typ" SH3 domény kinázy Src, E-fosfomimikující mutanta Y90E, F-nefosforylovaný stav Y90 SH3 domény, Prc-SH3 doména virového Src proteinu, GST-negativní kontrola nespecifických vazeb. Marker viz 3. 4.

Vlastnímu měření na hmotnostním spektrometru předchází příprava vzorku. Je nutné obarvené proteiny, které chceme identifikovat (v našem případ tedy ty, které byly přítomné u WT varianty, ale nebyly u Y90E mutace) vyříznout z gelu šetrným způsobem tak, aby vzorek neobsahoval jiné proteiny, které by zvýšily komplexitu analyzovaného vzorku a tím snížily pravděpodobnost úspěšné identifikace. Dále je zapotřebí z vyříznutých kousků gelu odstranit zbytky coomassie blue barvy a SDS (viz metody). Alkylovat rozvolněné cysteinové zbytky, aby nedocházelo k opětovnému vytvoření předtím rozvolněných disulfidických můstků. Konečně podrobit trypsinovému štěpení proteinů v gelu na peptidy.

Zařazením tzv. ZipTip® Pipette Tips po trypsinovém štěpení proteinů vyříznutých z gelu jsme dále docílili zesílení výstupních hodnot hmotnostní analýzy. ZipTip® Pipette Tips funguje jako rychlá reverzní fáze pro trypsinem naštěpené peptidy, která vede k jejich značnému zakoncentrování. Po provedení těchto pokusů se podařilo nakonec identifikovat dalších 11 proteinů (viz *Obr.* 20) interagujících s nemutovanou WT SH3 doménou kinázy Src. Bohužel se nám nepodařilo identifikovat žádný z proteinů interagující s Y90E variantou SH3 domény.



Obr. 20
Gel po pull-down experimentu s vyznačenými pozicemi identifikovaných proteinů. Popisky „jádro", „cytoplazma" označují frakce HeLa lyzátu (viz metody), které byly přidány do vazebné reakce. WT- „divoký typ" Src SH3 domény, E-označuje fosfomimikující mutaci Y90E SH3 domény kinázy Src.
1) Diaphanous homolog (mDia)- 141 kDa, cytoplazma
2) Inositol polyphosphate (SHIP2)- 138 kDa, cytoplazma
3) SF3a1 (splicing factor 3a)- 120 kDa, cytoplazma
4) SF3b2- 100 kDa, cytoplazma
5) Dynamin- 98 kDa, cytoplazma
6) Splicing factor 1 (SF1)- 70 kDa, cytoplazma
7) Enabled homolog- 66,5, cytoplazma
8) WIRE- 46,3 kDa, cytoplazma
9) Cyklin K- 64 kDa, jádro
10) SF3a3 60 kDa, jádro
11) WASL- 55 kDa, jádro

název proteinu	interakce s kinázou Src	I. / II. Třída ligandu	SH3-hunter score	velikost v aa	MS protein score
Diaphanous homolog (mDia)	známá	PSVPSR	99,90%	1248	100%
Dynamin	známá	PQPSR	99,90%	866	100%
Enabled homolog (enaH)	neznámá	PPPPPLP / PPLPPG	99 / 97 %	591	99,37%
WASL	známá	RGGPPPP / PPPPAR	97 / 90 %	485	100%
WIRE	neznámá	RQPPGVP / PSVPSR	100 / 99,9 %	440	99,80%
hnRNP-K	známá	RNLPLPP	100%	440	99,90%
SF1	neznámá	WMQPPPP	97%	548	99,93%
SF3a1	neznámá	FPPPTTP	70%	793	100%
SF3b2	neznámá	RGPPPPP / PPPPLR	97 / 80 %	840	94,58%
SF3a3	neznámá	GTFPGWP	50%	501	97,96%
SHIP 2	známá	PPLPPR	99,90%	1258	97,97%

regulace cytoskeletu
RNA processing
signalizace

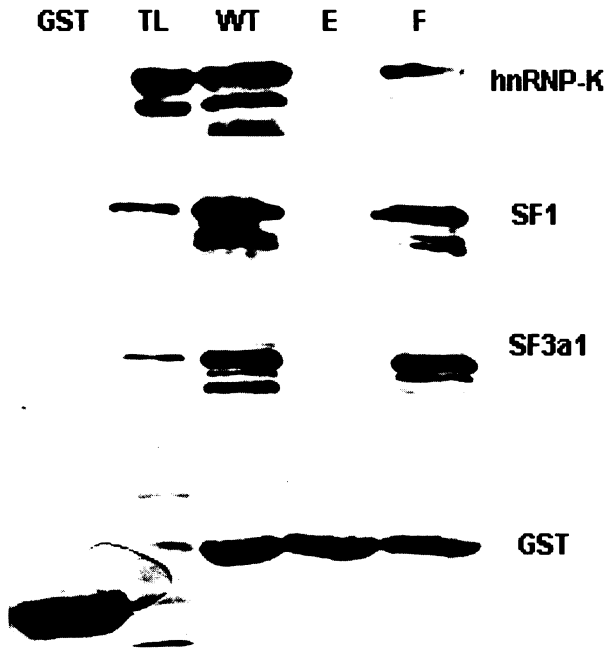
Tab. 3

Tabulka s identifikovanými proteiny popisuje jejich možné PxxP vazebné motivy předpovědděné pomocí algoritmu SH3-hunter (Ferraro *et al.*, 2007). Třída ligandové sekvence je barevně odlišena. Modře jsou vyznačeny ligandy I. třídy. Červeně jsou vyobrazeny ligandy II. třídy. SH3-hunter score udává pravděpodobnost s jakou je výsledek obdržený algoritmem signifikantní (číslo poskytuje sám SH3-hunter). Velikost proteinu je udána počtem aminokyselinových zbytků.

U některých z těchto proteinů je sice známa interakce (Dynamin, SHIP-2, hnRNP-K, Diaphanous homolog, WASL), nicméně nebylo jasné jak k interakci docházelo (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Ahern-Djamali *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2002; Tominaga *et* al., 2000; Martinz-Quiles *et al.*, 2004). U zbytku identifikovaných proteinů data o interakci s SH3 doménou kinázy Src chybí. Protože chybějí tato data, nebylo možné jednoznačně určit, do jaké z dvou tříd ligandů identifikované proteiny spadají.

Jako určité vodítko nám opět posloužil SH3-Hunter algoritmus (Ferraro *et al.*, 2007). Pomocí něj se podařilo ukázat, že všechny identifikované proteiny pravděpodobně obsahují PxxP vazebný motiv rozpoznávaný Src SH3 doménou. Toto stanovení není dostačující důkaz, nicméně dodává výsledkům smysluplnost.

Pro další ověření našich výsledků získaných z MS analýzy jsem tedy vybrali několik identifikovaných proteinů (hnRNP-K, SF1, SF3a1) a podrobili jsme je imunodetekci na nitrocelulózové (po SDS-PAGE a Westernblot) membráně po pull-down experimentu. Tedy jestli se proteiny opravdu váží na SH3 doménu a dále platnost domněnky o zrušení vazby na SH3 doménu Src u fofomimikující mutace (Y90E) zatímco by u WT i Y90F variant vazba přetrvala. Toto ověření nám ukázalo, že data z MS analýzy jsou správná, že se proteiny skutečně váží na SH3 domény kinázy Src a hlavně, že fosfomimikující mutace (Y90E) zruší vazbu všech těchto proteinů (viz *Obr.* 21).



Obr. 21

Obrázek z imunodetekce proteinů hnRNP-K, SF1, SF3a1. Po pull-down experimentu byly proteiny separovány pomocí SDS-PAGE a následně přeneseny na nitrocelulózovou membránu (Westernblot). Sloupce označené: GST-negativní kontrola nespecifické vazby, TL-pozitivní kontrola-HeLa lyzát, WT-„divoký typ" SH3 domény kinázy Src, E-fosfomimikující mutace (Y90E) SH3 domény kinázy Src, F-nefosforylovaný stav (mutace Y90E). Je zde jasně vidět, že u fosforylaci mimikující mutace (Y90E) dochází k značné redukci vazebné schopnosti SH3 domény. Narozdíl u mutace Y90F, která mimikuje tyrozín v nefosforylovaném stavu vazba vybraných proteinů přetrvává. Ředění primárních protilátek anti-hnRNP-K 1:200, anti-SF1 1:200, anti-SF3a1 1:200. Sekundární protilátky ředěny v poměru 1:5000. Nitrocelulózová membrána barvená Ponceau S pro porovnání stejného množství do reakce přidaných GST-SH3 fuzních proteinů a samotného GST.

4.4. Phage display

Phage display je selekční technika, kde jsou na povrchu bakteriofága M13 peptidy (v našem případě 12 aa dlouhé) fúzované s obalovým proteinem. Fúzované peptidy jsou tudíž vystaveny na povrchu fágové partikule, zatímco uvnitř virionu peptid kóduje DNA sekvence. U Phage display metody tedy existuje fyzické propojení mezi početnou knihovnou náhodných peptidů (komplexita peptidové knihovny v našem

případě byla 2,7 x 10^9) a DNA kódující každý z nich. To umožňuje pomocí této metody identifikaci peptidických ligandů pro nejrůznější vazebné povrchy proteinů (protilátky, enzymy, receptory, apod.). Selekce je prováděna inkubací knihovny peptidů vystavených na površích fágů (v počtu 4 x 10^{10} fágů) s cílovým proteinem (množství 100 ug proteinu), tj. proteinu ke kterému hledáme sekvenci ligandu (SH3 doména kinázy Src). Následuje odmytí nenavázaných fágových partikulí a eluce specificky navázaných virionů. Po eluci specificky navázaných fágů provedeme jejich namnožení uvnitř bakterií a cyklus selekce opakujeme 4 x. To je dostatečný počet opakování pro selekci konzervované ligandové sekvence. Po čtyřech kolech vazebné selekce charakterizujeme peptidy DNA sekvenací.

Pro další testování vlivu fosforylace Tyr 90 a především fosfomimikující mutace Y90E na vazebné schopnosti SH3 domény kinázy Src jsme navrhly modifikaci Phage display experimentu s cílem porovnat vazebné sekvence preferované WT SH3 doménou a SH3 doménou nesoucí Y90E mutaci. Po čtyřech kolech selekce fágů vázajících se na WT SH3 doménu jsme vybrali 20 náhodných klonů fágů. Poté jsme jejich DNA podrobili sekvenaci. Po převedení DNA sekvence do aminokyselinové sekvence (viz Obr. 22), jsme vyselektované sekvence porovnali se známou Src SH3 vazebnou sekvencí RPLPPLP (Sparks *et al.*, 1994). Ukázalo se, že 5 z 20 námi vyselektovaných sekvencí plně odpovídá konsenzus motivu RPLPPLP. Zbytek sekvencí byl konsenzus motivu velice podobný. RPLPPLP Src WT SH3 vazebná sekvence je již delší dobu známa (Sparks *et al.*, 1994). Z porovnání jednotlivých sekvencí je vidět i výrazný trend k přítomnosti histidinových zbytků v N-koncové oblasti vazebné sekvence (viz Obr. 22). Přesná pozice těchto histidinů není příliš konzervovaná, avšak je zcela patrné, že k selekci histidinů N-koncově od PxxP core sekvence dochází (v 16 sekvencích z 20).

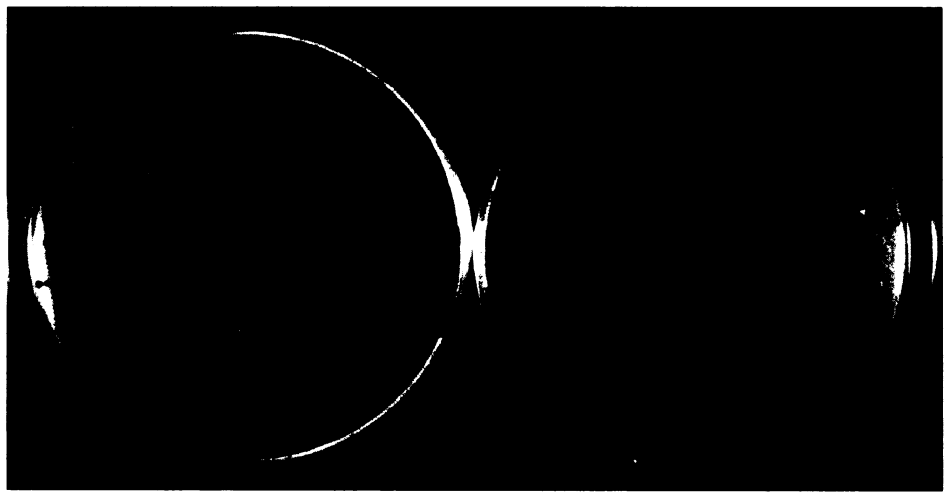
```
03          -THQLRPLPSVPQ-
11          -THQLRPLPSVPQ-
18          -THQLRPLPSVPQ-
20          -THQLRPLPSVPQ-
05          -QHVHRPLPPVPL-
01          -THPTRPLPPLPD-
12          --HHVRPLPPIPLQ
13          --HHVRPLPPIPLQ
15          --HHVRPLPPILFR
08          IDRHQRPLPPIP--
07          HHMTHRSLPPVP--
14          HHMTHRSLPPVP--
16          HHMTHRSLPPFR--
17          HHDSYRPLPPLP--
09          --GNQRPLPPLPLH
10          --TLNRPLPPLPFG
02          --APGNPLPHPPPA
19          --APGNPLPHPPPA
06          --APHTRLPALPPP
04          --QHTRPLPLPPKL
                  **
```

Obr. 22

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment naizolovaných sekvencí pro WT SH3 doménu kinázy Src. * jsou označeny plně konzervované aminokyseliny. Červeně podtržené jsou motivy plně odpovídající sekvenci RPLPPLP známé z literatury. V N-koncové části sekvencí je patrná preference pro histidinové zbytky.

Tato sekvence (konsenzus RPLPPLP třída I. ligandů) byla tedy s úspěchem vyselektována u WT („divoký typ“) SH3 domény Src kinázy (viz *Obr.* 23). Žádná z dvaceti osekvenovaných sekvencí nespadala do třídy II. Toto ukazuje, že ligandy II. třídy mají pravděpodobně nižší afinitu k SH3 doméně kinázy Src.

Přotože po 4. kole selekce WT SH3 domény směs fágových klonů již neobsahovala žádné ligandy II. třídy (to protože mají pravděpodobně nižší afinitu), vzali jsme směs fágů po 3. kole selekce a přidali je k Y90E variantě SH3 domény. Doufali jsme, že sekvence na fágových partikulích jsou po 3. kole jich poměrně konzervované a zároveň směs ještě obsahuje nějaké klony nesoucí sekvence ligandů II. třídy. Do reakce bylo přidáváno standardně 4 x 10^{10} fágů na 100 ug GST-SH3 navázaných na agarózu (Glutathione Sepharose™ 4B, GE Healthcare). Při porovnání titru po proběhlé vazebné reakci se ukázalo, že na Y90E mutaci SH3 domény kinázy Src se fágy vázaly v průměru 100 x méně (viz *Obr.* 23). To je v souladu s naším předešlým zjištěním o snížení vazebné schopnosti Y90E SH3 domény kinázy Src. Po osekvenování 5 náhodných klonů jsme zjistili, že všech pět odpovídá konsenzu preferovanému i WT doménou. 2 z 5 klonů přesně odpovídaly publikované sekvenci RPLPPLP (viz *Obr.* 24). Celá vyselektovaná sekvence byla daleko více konzervovaná než sekvence selektovaná čistě s WT SH3 doménou. Dále se ukázalo, že i zde došlo k preferenci histidinových zbytků N-koncově od PxxP core motivu.



Obr. 23

Relativní porovnání množství vytvořených M13 (nesoucích SH3 WT ligandovou sekvenci na svém povrchu) fágových plaků (modrých viz 3.20.) po eluci vazebné reakce na WT („divoký typ") SH3 doménu kinázy Src-vpravo a fosfomimikující mutaci (Y90E)-vlevo. Rozdíl v počtu kolonií mezi WT a Y90E dosahoval až dvou řádů. Toto nepřímo ukazuje na sníženou vazebnou kapacitu Y90E mutace SH3 domény Src oproti WT.

Dále jsme se pokusili otestovat hypotézu o preferenci ligandu I. třídy u fosfomimikující mutace (Y90E) SH3 domény kinázy Src. Zopakovali jsme postup hledání vazebné sekvence pomocí metody Phage display, tentokrát od začátku s variantou Y90E SH3 domény. Měli jsme v úmyslu porovnat naizolované sekvence. Tedy sekvenci preferovanou WT typem SH3 domény (RPLPPLP) a sekvenci preferovanou fosfomimikující mutací Y90E. Izolace preferované sekvence pro Y90E mutaci se bohužel nezdařila. Pro získání uspokojivého výsledku by bylo nutné tento časově velice náročný experiment zopakovat. Nicméně výsledky z pull-down experimentů naznačují, že tato hypotéza není správná.

```
01          HHDSYRPLPPLP-
02          HHMTHRSLPPVP-
03          HAHHPRPLPPLP-
05          IDRHQRPLPPIP-
04          -THQLRPLPSVPQ
                 * **  *
```

Obr. 24

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment sekvencí po vazebné reakci s Y90E SH3 doménou kinázy Src. * jsou označeny plně konzervované aminokyseliny. Červeně podtržené jsou motivy plně odpovídající sekvenci RPLPPLP známé z literatury.

5. Diskuze

Vizualizace a následné modelování povrchu SH3 domény kinázy Src nám umožnilo vyslovit hypotézu, která předpokládá snížení vazebné schopnosti SH3 domény v odpovědi na fosforylaci tyrozínu 90. K vyslovení této domněnky bylo zapotřebí vytvořit modely, které ukazovaly rozdíly na povrchu hydrofobní vazebné kapsy SH3 domény. Pomocí programů Swiss-PDB viewer a PyMOL jsme vytvořily model fosforylace tyrozínu 90, kde se ukázalo, že tato fosforylace stericky koliduje s navázaným ligandem II. třídy. Dále jsme pomocí modelování poukázali na to, že tzv. fosfomimikující mutace, kde se vnáší místo tyrozínu glutamát, má své oprávnění, neboť vnesení záporného náboje opravdu změnou povrchu připomíná fosforylovaný stav. Při modelování jsme nedokázali předem jednoznačně odpovědět na otázku, zda zrušení vazby po fosforylaci Tyr 90 nebo vnesením fosfomimikující mutace Y90E bude platit pro ligandy I. i II. třídy.

Jak bylo ukázáno pomocí vazebných pokusů tzv. „pull-down", k změnám ve vazebné schopnosti SH3 domény kinázy Src opravdu vlivem mutace Y90E dochází. Podařilo se nám potvrdit předpokládané snížení vaznosti SH3 domény k ligandům II. (STAT3), ale i I. třídy (Cas, FAK). Počítačové modelování tedy tento vliv správně odhalilo. Dá se tedy předpokládat, že stejný vliv bude mít i fosforylace, kde byla pozorována podobnost změny povrchu. Pro potvrzení těchto poznatků bude potřeba pull-down experimenty zopakovat s SH3 doménou kde bude nafosforylovaný pouze tyrozín 90.

Modelování tedy sice naznačovalo, že by fosforylace tyrozínu 90 i případná mutace za glutamát 90 nemusela ovlivňovat vaznost ligandů I. třídy, to se ale při pull-down experimentech nepodařilo prokázat. Možným důvodem pro rozpor mezi výsledky modelování a pull-down experimentů by mohlo být fakt, že okolo fosfátu i glutamátu v *in vivo* podmínkách dochází k vytvoření tzv. „vodného obalu", tedy přeuspořádání molekul vody v místě navázané fosfátové, nebo karboxylové skupiny, které by pak mohly bránit vaznosti ligandů I. třídy. Tyto změny námi použité programy neumožňují namodelovat.

Dále se nám podařilo pomocí „pull-down" experimentu spojenému s MS analýzou rozšířit seznam proteinů interagujících přímo s SH3 doménou kinázy Src (Diaphanous homolog 1, SHIP-2, Dynamin 2, Enabled homolog, SF1, SF3a1, SF3a2, SF3a3, WIRE, WASL a Cyclin k). Jak již bylo zmíněno u proteinů Dynamin,

SHIP-2, hnRNP-K, Diaphanous homolog, WASL je interakce s kinázou Src popsána. U žádného z těchto proteinů však nebylo známo jak s kinázou Src interaguje. Zbytek námi identifikovaných proteinů nemá dosud popsanou interakci se Src kinázou. To, že se pravděpodobně jedná o přímou interakci přes SH3 doménu Src je nutné ještě podložit dalšími důkazy.

Nicméně všechny proteiny obsahují alespoň jeden motiv, který bychom mohli zařadit do jedné z tříd ligandů SH3 domén. Toto bylo provedeno pomocí algoritmu SH3-hunter. Je tedy možné, že se přes některý z nich váží na Src SH3 doménu.

U proteinů hnRNP-K, SF1, SF3a1 byla provedena imunodetekce po tzv. „pull-down" experimentu s námi očekávaným výsledkem. Tedy, že fosfomimikující mutace Y90 ruší vazbu těchto interagujících proteinů. To, že jde o přímou interakci je pravděpodobné s přihlédnutím k velice slabé síle vazby SH3 domény.

Je zajímavé, že téměř polovina identifikovaných proteinů spadá do kategorie RNA metabolizmu. Většinou se jedná o sestřihové faktory. Tento fakt je zajímavý, protože kinázy Src je většinou spojována s integrinovou signalizací. O propojení s RNA metabolizmem se toho zatím mnoho neví, i když bylo zjištěno, že více než 20% proteinů diferenciálně fosforylovaných na Tyr v Src transformovaných buňkách spadá přímo do této kategorie (Luo *et al.*, 2008). To společně s našimi výsledky ukazuje na nové zatím neprobádané pole působnosti kinázy Src.

Pomocí phage display experimentu se nám podařilo naizolovat již známou preferovanou vazebnou sekvenci SH3 domény kinázy Src (RPLPPLP). Tuto jsme dále rozšířili o histidin bohatou oblast ležící N-koncově od vlastní core PxxP sekvence. Je zajímavé, že histidiny nejsou příliš konzervovány na konkrétních místech. To by mohlo být způsobeno možností tvorby smyček ligandového řetězce mimo strukturovanou oblast PxxP. Takovéto smyčky by pak umožňovaly histidinovým zbytkům zaujmout jejich místo na povrchu SH3 doméně. Dále je možné, že se jedná pouze o artefakt vzniklý uspořádáním experimentu, kde knihovna náhodných peptidů obsahuje pouze řetězce 12 aminokyselin dlouhé.

Pomocí modifikace Phage display experimentu jsme se snažili testovat hypotézu o možné preferenci ligandů I. třídy u fosfomimikující mutace (Y90E). Bohužel tato metoda nepřinesla jednoznačnou dopověď. Experiment by bylo nutné zopakovat což by bylo časově velice náročné. Spokojili jsme se proto, s výsledky z pull-down experimentů, kde se tato hypotéza ukázala jako mylná (viz výše). Nicméně při postupu bylo ukázáno, že Y90E mutace snižuje až 100 x množství

navázaných fágových partikulí (M13) v porovnání s WT variantou SH3 domény. Což nás vede opět k přesvědčení, že toto podporuje naši domněnku o snížení vazebné kapacity fosfomimikující mutace (Y90E).

Vzhledem k vysoké konzervovanosti tyrozínu v oblasti RT-smyčky (Tyr 90 u kinázy Src) je dosti pravděpodobné, že by mechanizmus regulace vaznosti SH3 domény v závislosti na fosforylaci tohoto tyrozínu, byl obecně platný pro všechny SH3 domény obsahující tento *in vivo* fosforylovatelný zbytek.

6. Shrnutí

- Podařila se potvrdit domněnka, že fosfomimikující mutace tyrozínu 90 (Y90E) v SH3 doméně kinázy Src významně snižuje schopnost této domény vázat její ligandy.

- Byla zavedena poměrně obtížná technika identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie po tzv. „pul-down" experimentech. Tato technika bude naší laboratoří v budoucnu využívána pro obdobné aplikace.

- Podařilo se identifikovat celkem 11 proteinů interagujících s SH3 doménou kinázy Src. U 6 identifikovaných proteinů nebyla nikdy popsána interakce s Src kinázou.

- Zavedena časově velmi náročná technika Phage display screeningu pro krátké ligandové sekvence. S použitím této techniky v naší laboratoři se také dále počítá.

7. Seznam literatury

Agrawal V, Kishan KV.
Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins.
Protein Pept Lett. 2002 Jun;9(3):185-93. Review.

Ahern-Djamali SM, Bachmann C, Hua P, Reddy SK, Kastenmeier AS, Walter U, Hoffmann FM. Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 27;96(9):4977-82.

Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y. Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling.
J Biol Chem. 1999 Jan 15;274(3):1185-8.

Arold ST, Ulmer TS, Mulhern TD, Werner JM, Ladbury JE, Campbell ID, Noble ME. (2001) The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases. J Biol Chem. 276, 17199-205.

Bedford MT, Chan DC, Leder P.
FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands.
EMBO J. 1997 May 1;16(9):2376-83.

Bernadó P, Pérez Y, Svergun DI, Pons M. (2008) Structural characterization of the active and inactive states of Src kinase in solution by small-angle X-ray scattering. J Mol Biol. 15, 492-505.

Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP. (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. Mol Cell. 8, 269-80.

Brábek J, Mojžita D, Novotný M, Půta F, Folk P.
The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain-pY527 interaction.
Biochem Biophys Res Commun. 2002 Aug 23;296(3):664-70.

Broome MA, Hunter T.
The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding.
Oncogene. 1997 Jan 9;14(1):17-34.

Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH. (2000) Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. Mol Cell Biol. 20, 5865-78.

Chen S, O'Reilly LP, Smithgall TE, Engen JR. Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core.
J Mol Biol. 2008 Nov 7;383(2):414-23. Epub 2008 Aug 23.

Collett MS, Erikson RL. (1978) Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 75, 2021-4.

Collett MS, Erikson E, Purchio AF, Brugge JS, Erikson RL. (1979) A normal cell protein similar in structure and function to the avian sarcoma virus transforming gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 3159-63.

Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. Science. 231, 1431-4.

Cowan-Jacob SW. (2006) Structural biology of protein tyrosine kinases. Cell Mol Life Sci. 63, 2608-25.

DeLano, W.L.
The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

Erpel T, Superti-Furga G, Courtneidge SA.
Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions.
EMBO J. 1995 Mar 1;14(5):963-75.

Feng S, Kasahara C, Rickles RJ, Schreiber SL.
Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 19;92(26):12408-15.

Fonseca PM, Shin NY, Brábek J, Ryzhova L, Wu J, Hanks SK. Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation.
Cell Signal. 2004 May;16(5):621-9.

Gonfloni S, Williams JC, Hattula K, Weijland A, Wierenga RK, Superti-Furga G. (1997) The role of the linker between the SH2 domain and catalytic domain in the regulation and function of Src. EMBO J. 16, 7261-71.

Gonfloni S, Frischknecht F, Way M, Superti-Furga G. (1999) Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis. Nat Struct Biol. 6, 760-4.

Hunter T, Sefton BM. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc Natl Acad Sci U S A. 77, 1311-5.

Huse M, Kuriyan J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. Cell. 109, 275-82.

Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ,

Jove R, Yeatman TJ. (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. Nat Genet. 21, 187-90.

Johnson TM, Williamson NA, Scholz G, Jaworowski A, Wettenhall RE, Dunn AR, Cheng HC. (2000) Modulation of the catalytic activity of the Src family tyrosine kinase Hck by autophosphorylation at a novel site in the unique domain. J Biol Chem. 275, 33353-64.

Kishan KV, Scita G, Wong WT, Di Fiore PP, Newcomer ME.
The SH3 domain of Eps8 exists as a novel intertwined dimer.
Nat Struct Biol. 1997 Sep;4(9):739-43.
Kistan et al., 2001

Kypta RM, Goldberg Y, Ulug ET, Courtneidge SA. (1990) Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. Cell. 62, 481-92.

Lerner EC, Smithgall TE. (2002) SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. Nat Struct Biol. 9, 365-9.

Lerner EC, Trible RP, Schiavone AP, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE. (2005) Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. J Biol Chem. 280, 40832-7.

Levy JB, Brugge JS. (1989) Biological and biochemical properties of the c-src+ gene product overexpressed in chicken embryo fibroblasts. Mol Cell Biol. 9, 3332-41

Li S, Couvillon AD, Brasher BB, Van Etten RA.
Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling.
EMBO J. 2001 Dec 3;20(23):6793-804.

Li SS.
Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction.
Biochem J. 2005 Sep 15;390(Pt 3):641-53. Review.

Lim WA, Richards FM, Fox RO.
Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains.
Nature. 1994 Nov 24;372(6504):375-9. Erratum in: Nature 1995 Mar 2;374(6517):94.

Luo W, Slebos RJ, Hill S, Li M, Brábek J, Amanchy R, Chaerkady R, Pandey A, Ham AJ, Hanks SK. (2008) Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. J Proteome Res. 7, 3447-60.

Martinez-Quiles N, Ho HY, Kirschner MW, Ramesh N, Geha RS. Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP.
Mol Cell Biol. 2004 Jun;24(12):5269-80.

Mayer BJ.
SH3 domains: complexity in moderation.
J Cell Sci. 2001 Apr;114(Pt 7):1253-63. Review.

Meyn MA 3rd, Wilson MB, Abdi FA, Fahey N, Schiavone AP, Wu J, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE.
Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity.
J Biol Chem. 2006 Oct 13;281(41):30907-16. Epub 2006 Aug 15.

Morrogh LM, Hinshelwood S, Costello P, Cory GO, Kinnon C.
The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase displays altered ligand binding properties when auto-phosphorylated in vitro.
Eur J Immunol. 1999 Jul;29(7):2269-79.
Nakamoto T, Sakai R, Ozawa K, Yazaki Y, Hirai H. Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase.
J Biol Chem. 1996 Apr 12;271(15):8959-65

Nguyen JT, Turck CW, Cohen FE, Zuckermann RN, Lim WA.
Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors.
Science. 1998 Dec 11;282(5396):2088-92.

Nguyen JT, Porter M, Amoui M, Miller WT, Zuckermann RN, Lim WA.
Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold.
Chem Biol. 2000 Jul;7(7):463-73.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs.
Mol Cell Biol. 2002 Jul;22(13):4535-43.

Park H, Wahl MI, Afar DE, Turck CW, Rawlings DJ, Tam C, Scharenberg AM, Kinet JP, Witte ON.
Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain.
Immunity. 1996 May;4(5):515-25.

Payne G, Shoelson SE, Gish GD, Pawson T, Walsh CT. (1993) Kinetics of p56lck and p60src Src homology 2 domain binding to tyrosine-phosphorylated peptides determined by a competition assay or surface plasmon resonance. Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 4902-6.

Prasad N, Topping RS, Decker SJ. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I.
J Cell Sci. 2002 Oct 1;115(Pt 19):3807-15.

Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase.
Bioessays. 1997 Feb;19(2):137-45. Review.

Polte TR, Hanks SK. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 7;92(23):10678-82.

Porter M, Schindler T, Kuriyan J, Miller WT. (2000) Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr(527) and Tyr(416). Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. J Biol Chem. 275, 2721-6.

Riddle DS, Grantcharova VP, Santiago JV, Alm E, Ruczinski I, Baker D.
Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding.
Nat Struct Biol. 1999 Nov;6(11):1016-24.

Roskoski R Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. Biochem Biophys Res Commun. 324, 1155-64.

Shaw AS, Chalupny J, Whitney JA, Hammond C, Amrein KE, Kavathas P, Sefton BM, Rose JK. (1990) Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. Mol Cell Biol. 10, 1853-62.

Schreiner SJ, Schiavone AP, Smithgall TE. (2002) Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. J Biol Chem. 277, 45680-7.

Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. (1997) Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. Nature. 385, 602-9.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, *et al.* (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. Cell. 72, 767-78.

Sonnenburg ED, Bilwes A, Hunter T, Noel JP. (2003) The structure of the membrane distal phosphatase domain of RPTPalpha reveals interdomain flexibility and an SH2 domain interaction region. Biochemistry. 42, 7904-14.

Sparks AB, Quilliam LA, Thorn JM, Der CJ, Kay BK. Identification and characterization of Src SH3 ligands from phage-displayed random peptide libraries.
J Biol Chem. 1994 Sep 30;269(39):23853-6.

Stover DR, Liebetanz J, Lydon NB. (1994) Cdc2-mediated modulation of pp60c-src activity. J Biol Chem. 269, 26885-9.

Summy JM, Gallick GE. (2003) Src family kinases in tumor progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 22, 337-58

Superti-Furga G, Fumagalli S, Koegl M, Courtneidge SA, Draetta G.
Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src.
EMBO J. 1993 Jul;12(7):2625-34.

Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White GC 2nd, Schaller MD. (1998) SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. J Biol Chem. 273, 577-83.

Tominaga T, Sahai E, Chardin P, McCormick F, Courtneidge SA, Alberts AS. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. Mol Cell. 2000 Jan;5(1):13-25.

Trible RP, Emert-Sedlak L, Smithgall TE. (2006) HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. J Biol Chem. 281, 27029-38.

Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases.
Mol Cell Biol. 1996 Jun;16(6):2606-13.

Waksman G, Shoelson SE, Pant N, Cowburn D, Kuriyan J. (1993) Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. Cell. 72, 779-90.

Wu X, Knudsen B, Feller SM, Zheng J, Sali A, Cowburn D, Hanafusa H, Kuriyan J. Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk.
Structure. 1995 Feb 15;3(2):215-26.

Wu Y, Spencer SD, Lasky LA.
Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein.
J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5765-70.

Xu W, Harrison SC, Eck MJ.
Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src.
Nature. 1997 Feb 13;385(6617):595-602.

Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. Mol Cell. 3, 629-38.

Yamaguchi H, Hendrickson WA. (1996) Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. Nature. 384, 484-9.

Young MA, Gonfloni S, Superti-Furga G, Roux B, Kuriyan J. (2001) Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. Cell. 105, 115-26.

Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL.
Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains.
Cell. 1994 Mar 11;76(5):933-45.