

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie



**Analýza kandidátních
transmembránových adaptorových proteinů**

Diplomová práce

Jitka Šulcová

Vedoucí diplomové práce:

Karel Drbal, PhD.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Karla Drbala, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1. 5. 2010

.....

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Karlu Drbalovi, PhD. za jeho odborné vedení a pomoc při experimentech pro diplomovou práci. Dále bych chtěla poděkovat Janu Pačesovi, PhD. za jeho vedení bioinformatické části diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Václavu Hořejšímu, CSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři a všem členům naší laboratoře za jejich užitečné rady, vstřícnost a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Transmembránové adaptorové proteiny (TRAP) fungují jako kotvící místa pro různé signalizační molekuly a umožňují tak vznik velkých signalizačních komplexů v blízkosti plasmatické membrány. Časově a prostorově regulují signalizační události, a tím napomáhají rychlému a efektivnímu přenosu signálu z receptorů na povrchu buněk do buněčného nitra.

Důležitá role známých TRAP v závislosti na jejich lokalizaci v lipidových raftech pro správný vývoj a funkci buněk imunitního systému je stále diskutována. Důvodem je absence výrazného fenotypu u knock-out myší. Jedinými výjimkami jsou deficiencie ITAM-obsahujících adaptorů imunoreceptorů a adaptoru Lat asociovaného s lipidovými rafty, které vedou k poruchám ve vývoji T-lymfocytů a jejich snížené TCR signalizaci. Cílem mé diplomové práce bylo bioinformaticky vyhledat, provést filtrování kandidátních genů na základě predikovaných a publikovaných dat a vybrané kandidátní TRAP poté částečně funkčně charakterizovat. Zjišťovala jsem jejich přítomnost na plasmatické membráně a zda-li jejich ektopická zvýšená exprese uvnitř buněk bude mít roli na expresi povrchového aktivačního znaku T-lymfocytů CD69. Ze 14 kandidátních TRAP může být pouze jediný protein Pdzk1ip1 lokalizován na plasmatické membráně, avšak jeho zvýšená exprese nemá vliv na expresi CD69 v buňkách po TCR stimulaci. Tento aktivační znak je naopak inhibován zvýšenou expresí proteinu Crtap, který je lokalizován v cytoplasmě. Na základě experimentálních dat jsme tedy identifikovali dva potenciálně zajímavé geny, které dále budou více funkčně charakterizovány. Plánujeme sledovat efekt zvýšené exprese kandidátních genů a především jejich snížené exprese na vývoj a aktivaci buněk imunitního systému v myším *in vivo* modelu hematopoetického osídlení.

Klíčová slova: transmembránový adaptorový protein (TRAP), kandidátní TRAP, lipidové rafty, membránová lokalizace, CD69

Abstract

Transmembrane adaptor proteins (TRAPs) function as a scaffolding anchor for numerous signaling molecules and facilitate formation of large signaling complexes near the plasma membrane. They regulate spatio-temporal organization of signaling events in order to transduce fast and effective signal from surface receptors into the cell nucleus.

The importance of described TRAPs in the development and proper functioning of immune cells in relation to their localization within lipid rafts is still under debate. The simple reason is the lack of a profound phenotype in knock-out mice. The described phenotypes observed in animals deficient in ITAM-containing adaptors of immunoreceptors as well as lipid raft adaptor Lat all lead to the block in the T-cell development and impaired TCR signaling. The subject of my diploma thesis is to perform bioinformatic search and filter candidate TRAP genes according to predicted and published data. Selected TRAP candidates were subjected to functional characterization. I checked for their localization to the plasma membrane and correlate their ectopic overexpression with the expression of CD69 surface T-cell activation marker. From 14 candidate TRAPs, only a single *Pdzk1ip1* protein is probably localized to the plasma membrane but its expression does not influence CD69 upregulation before and after TCR stimulation. On the other hand, overexpression of cytoplasmic *Crtap* protein showed constitutive and TCR-induced upregulation comparable to the negative control *Shp-1*. On the basis of our experimental data we identified two potentially interesting candidate genes and we will proceed with the extended functional characterization. We plan to look at the effects of overexpression/downregulation of candidate genes on the development and activation of immune cells in mouse *in vivo* model of hematopoietic engraftment.

Key words: lipid rafts, transmembrane adaptor proteins (TRAPs), candidate TRAPs, membrane localization, CD69

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury	12
2.1 Imunitní systém a jeho buněčné typy	12
2.2 Cytoplasmatická membrána a lipidové rafty	13
2.2.1 Role a složení cytoplasmatické membrány	13
2.2.2 Model cytoplasmatické membrány – lipidové rafty.....	15
2.3 Imunitní receptory	17
2.4 Adaptorové proteiny	18
2.4.1 cytoplasmatické adaptorové proteiny (CAP)	19
2.4.2 Transmembránové adaptorové proteiny (TRAP).....	20
2.5 Imunoreceptorová signalizace	24
2.5.1 Modely spuštění TCR signalizace.....	24
2.5.2 Průběh membráně-proximální TCR signalizace a signalizačních drah	28
3. Materiály a Metody	31
3.1 Materiály.....	31
3.1.1 Primární buňky, buněčné linie a bakteriální kmeny.....	31
3.1.2 Kultivační média	32
3.1.3 Primery	33
3.1.4 Plasmidy	34
3.1.5 Komerční soupravy pro molekulární biologii	34
3.1.6 Enzymy.....	34
3.1.7 Protilátky	35
3.1.8 Chemikálie	35
3.1.9 Složení použitých roztoků.....	36
3.1.10 Ostatní materiál	37
3.1.11 Laboratorní přístroje a zařízení	37
3.2 Metody.....	38
3.2.1 Izolace buněk z myších tkání	38
3.2.2 RNA izolace	38
3.2.3 Reverzní transkripce.....	38
3.2.4 Návrh primerů pro klonování kandidátních genů	39
3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	40
3.2.6 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	43
3.2.7 Izolace DNA z agarózového gelu.....	43
3.2.8 Restrikční štěpení DNA	43
3.2.9 Ligace	43
3.2.10 Transformace DNA do kompetentních bakterií	44
3.2.11 Minipreparativní izolace DNA alkalickou lyzí	45
3.2.12 Midipreparativní izolace DNA komerční soupravou	45
3.2.13 Sekvenace.....	45
3.2.14 Nasazení Phoenix-Eco.....	46
3.2.15 Transfekce Lipofectaminem TM 2000.....	46
3.2.16 Retroviróvá infekce	46
3.2.17 Příprava sfér z plasmatické membrány	49

3.2.18	Fluorescenční mikroskopie	50
3.2.19	Aktivace buněčných linií.....	50
3.2.20	Průtoková cytometrie	51
4.	Výsledky.....	51
4.1	Etapa první – bioinformatické vyhledávání kandidátních TRAP.....	51
4.1.1	Definice vlastností transmembránových adaptorových proteinů (TRAP)	51
4.1.2	Bioinformatická analýza	52
4.1.3	První výběr proteinů.....	56
4.1.4	Druhý výběr proteinů	57
4.1.5	Anotace kandidátních transmembránových adaptorových proteinů	60
4.2	Etapa druhá – charakterizace kandidátních genů	64
4.2.1	Schéma postupu klonování a analýzy kandidátních genů.....	64
4.2.2	Příprava retrovirového vektoru založeného na MSCV	64
4.2.3	Klonování kandidátních genů a příprava MSCV vektorů.....	68
4.2.4	Buněčná lokalizace.....	72
4.2.5	Změna exprese CD69	78
5.	Diskuze.....	85
6.	Závěr.....	98
7.	Použitá literatura:	100

Seznam zkratek

Amp	ampicilin
APC	antigen prezentující buňka
BCR	„B-cell receptor“; antigenně specifický receptor B lymfocytů
bp	páry bazí
C1	„cysteine rich domain“
CAP	cytoplasmatický adaptorový protein
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	„complementary DNA“
CMV	cytomegalovirus
cSMAC	„central supramolecular activation cluster“
DIGs	„detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched domains“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DRMs	„detergent-resistant membranes“
DTT	1,4-dithio-D,L-threitol
Eco	ekotropní
EcoR	ekotropní receptor
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
EST	„expressed sequence tag“
EtBr	ethidium bromid
FACS	„fluorescent-activated cell sorting“
FCS	„fetal bovine serum“; sérum telecího plodu
FITC	„fluorescein isothiocyanate“
FcR	receptor pro Fc-část imunoglobulinu
GEMs	„glycosphingolipid-enriched microdomains“
GFP	„green fluorescent protein“; zelený fluorescenční protein
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GPVI	glykoprotein 6
HCS	„hematopoietic stem cell“: hematopoetická kmenová buňka
Ig	imunoglobulin
IS	imunologická synapse
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
KO	knock-out
LAT	„linker for activation of T-cells“
LAX	„linker for activation of X cells“
LIME	„LCK interacting molecule“
LTR	„long terminal repeat“
M-CSF	„macrophage colony stimulating factor“
MHC	„major histocompatibility complex“
MSCV	„murine stem cell virus“
NFAT	„nuclear factor of activated T cell“
NF- κ B	„nuclear factor κ B“
NK	„natural killer“
NTAL	„non-T-cell activation linker“
PAG	„phosphoprotein associated with GEMs“
PBS	„phosphate-buffered saline“; fyziologický roztok

PCR	„polymerase chain reaction“; polymerázová řetězová reakce
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PE	„phycoerythrin“; fykoerythrin
PH	„pleckstrin homology“
PMA	„phorbol 12-myristate 13-acetate“
pMHC	peptid navázaný na molekulu MHC
PMS	„plasma membrane spheres“
pSMAC	„peripheral supramolecular activation cluster ”
PTB	„phosphotyrosine binding“
PURO	puromycin
PTP	„protein tyrosine phosphatase“
RFP	„red fluorescent protein“; červený fluorescenční protein
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu
SDS	„sodium dodecyl sulphate“; n-dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SH	„Src homology“
shRNA	„short hairpin RNA“
SIT	„SH2-domain-containing protein SHP2-interacting TRAP“
SLP65	„SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa“
SLP76	„SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa“
SP	signální peptid
TagRFP	monomerní červený fluorescenční protein pocházející z mořské sasanky <i>Entacmaea quadricolor</i>
TagRFP-T	TagRFP s mutací S158T
TCR	„T-cell receptor“; antigenně specifický receptor T lymfocytů
T/E	Trypsin/EDTA roztok
TGF- β	„transforming growth factor β “
TLR	„toll-like receptor“
TM	transmembránová oblast
TRAP	transmembránový adaptorový protein
TRIM	„T-cell receptor interacting molecule“
U	jednotka enzymové aktivity
UTR	„untranslated region“; nepřekládaná oblast mRNA
VSV-G	vesicular stomatitis virus G

1. Úvod

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům v organismu, jehož primárními funkcemi je udržovat integritu organismu a chránit organismus před škodlivými látkami a organismy z vnějšího prostředí. Imunitní reakce jsou zajištěny nejrůznějšími buněčnými typy a solubilními molekulami, které spolu navzájem interagují a komunikují.

Jejich efektivní komunikace, která vede ke správné interpretaci signálu, je nezbytná pro bezchybné fungování imunitního systému. Přenos signálu dovnitř do buňky je vždy závislý na souhře několika typů molekul, které se nacházejí na různé úrovni: receptory, adaptory a efektorové molekuly signalizačních drah. V buňkách imunitního systému se uplatňují zejména dva typy signalizace: signalizace pomocí protein-kináz (receptory s vlastní nebo asociovanou protein-kinázovou aktivitou) a G-proteinů asociovaných s receptory. Pro správný, rychlý a efektivní přenos signálu z receptorů jsou důležité tzv. adaptorové proteiny. Adaptorové proteiny fungují jako jakési lešení, které vzájemně organizuje signalizační molekuly do konkrétních menších či větších signalizačních celků a do správné vzájemné pozice, a tak zajišťuje optimální spuštění signalizačních drah. Transmembránové adaptorové proteiny (TRAP) tvoří podskupinu adaptorových proteinů, jejichž hlavní funkcí je přivádět cytoplasmatické efektorové proteiny pod membránu, a tím organizovat správný průběh membráně-proximální signalizace. TRAP je skupina membránových proteinů, jejíž členové mají podobnou nestrukturovanou proteinovou sekvenci: krátkou extracelulární N-koncovou část, α -helikální transmembránovou oblast tvořenou 15-30 hydrofobními aminokyselinami a dlouhou intracelulární C-koncovou část obsahující krátké vazebné motivy. TRAP mají důležitou roli v imunoreceptorové signalizaci. Výsledkem této správné signalizace je buněčná odpověď vedoucí k aktivaci daného leukocytu dle mnoha polarizujících transkripčních programů. Aktivace leukocytů spustí konkrétní větve imunitního systému, které finálně vedou k likvidaci patogenu a uvedení organismu do původního stavu. TRAP je možné rozdělit na dvě základní skupiny: signalizační podjednotky imunoreceptorů obsahující tzv. ITAM („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) motivy a TRAP tyto motivy neobsahující. Zatímco absence signalizačních podjednotek vede k závažným poruchám ve vývoji imunitních buněk, absence ostatních TRAP, s výjimkou LAT („linker for T-cell activation“), však nevede k výraznému vývojovému či funkčnímu fenotypu v imunitním systému. Proto objev a charakterizace nových funkčně významných TRAP by umožnil vysvětlení patologií imunitního systému způsobených právě nefunkční či nesprávně

fungující interpretací signálu u imunodeficiencí či naopak nepřiměřeně silným signálem a odpovědí u autoimunitních onemocnění.

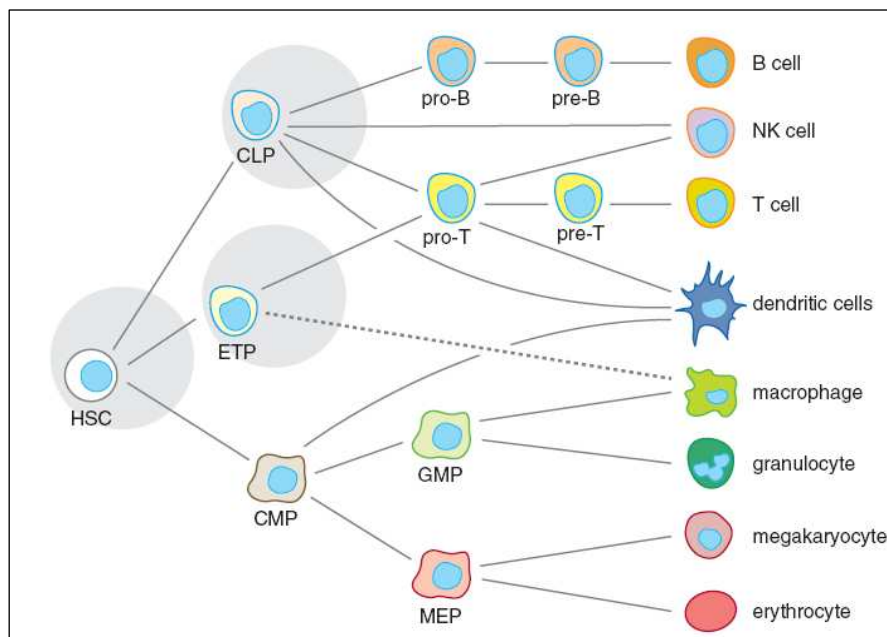
Cílem mé diplomové práce bylo bioinformaticky vyhledat všechny potenciální TRAP v genomech více druhů, provést filtrování kandidátních genů na základě publikovaných dat (exprese a literatura) a predikovaných dat a částečně funkčně charakterizovat omezený počet TRAP. Pod vedením Dr. Jana Pačesa jsme spolupracovali na bioinformatickém vyhledávání s kolegou Pavlem Pitulem a jeho diplomová práce (Komparativní genomická předpověď nových transmembránových adaptorových proteinů a jejich expresní analýza) obsahuje detailní postup této části. V mé diplomové práci pouze nastíním obecnou strategii vyhledávání. Získaným bioinformatickým výstupem bylo vytvoření lidských a myších finálních tabulek obsahující pouze proteiny splňující všechna selekční kritéria vyplývající z vlastností již známých TRAP (viz dříve). Kandidátní geny byly vybrány na základě ručního třídění genů v tabulkách. Tyto geny byly následně vyklonovány z myší cDNA, vloženy do retrovirového vektoru a jejich funkce analyzována v souvislosti s jejich zvýšenou expresí. Buněčná lokalizace kandidátních TRAP byla zkoumána pomocí fluorescenční mikroskopie u stabilně transdukovaných buněk. Dále pak pomocí průtokové cytometrie byla studována schopnost buněk zvyšovat expresi aktivačního markeru T-lymfocytů CD69. Vystavení molekuly CD69 na povrchu buněk ze zásobních vezikulů a poté i de novo exprese se zahajuje po stimulaci antigenně specifického T-receptoru (TCR) na povrchu T-lymfocytů.

Největší vypovídací hodnotu o funkci genu má funkční analýza *in vivo*. Analýza je založena na sledování efektu nadměrné či potlačené exprese genu (RNA interference) na vývoj a aktivaci buněk imunitního systému. V současné době pracuji na tomto *in vivo* modelu, který je založený na transdukcii imortalizovaných hematopoetických kmenových buněk (HSC) kandidátními geny či vlásenkami působícím proti těmto genům a jejich přenosu do subletálně ozářených myší (Ruedl et al., 2008). HSC jsou imortalizované vnesením konstruktů NUP98-HOXB4, který podporuje proliferaci HSC bez ztráty jejich pluripotentního potenciálu. Existují zejména dvě výhody tohoto systému. První, mizí nutnost opakované izolace čerstvé kostní dřeně. Druhá s tím související, kultivované HSC jsou homogenní populací, tudíž je předpoklad, že bude docházet k menším rozdílům v rekonstituci imunitního systému mezi různými recipienty.

2. Přehled literatury

2.1 Imunitní systém a jeho buněčné typy

Jak již bylo řečeno v úvodu, imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům v organismu. Udržení obranyschopnosti organismu, imunitní dohled a udržení autotolerance patří mezi jeho hlavní funkce. Imunitní reakce jsou zajištěny nejrůznějšími buněčnými typy a molekulami, které spolu navzájem interagují. Bílé krvinky (leukocyty) mají v imunitním systému hlavní buněčnou efektorovou funkci. Všechny druhy leukocytů pochází z jediných pluripotentních prekurzorů, tzv. hematopoetických kmenových buněk (HSC), které se nachází v kostní dřeni. HSC se pod vlivem faktorů dělí a diferencují na nejrůznější buněčné typy (viz Obr.1). Rozlišujeme však pouze dvě základní buněčné linie: myeloidní a lymfoidní (Laiosa et al., 2006).



Obr.1 Akashi-Kondo-Weissman model hematopoézy v dospělé myši (převzato z (Laiosa et al., 2006)):

Leukocyty se rozdělují do dvou velkých podskupin na základě svého vývoje – lymfoidní (B-, T-lymfocyty, NK-buňky) a myeloidní (dendritické buňky, makrofágy, granulocyty, megakaryocyty, erytrocyty). Obrázek zachycuje vývoj jednotlivých buněčných typů. CLP, obecný lymfoidní progenitor; ETP, časný T-lymfocytární progenitor; CMP, obecný myeloidní progenitor; GMP, granulocyt-makrofágový progenitor; MEP, megakaryocyt-erytrocytový progenitor

Buněčné typy tvořící základ tzv. přirozené imunity, která je první obranou organismu proti vnějším patogenům, vznikají z myeloidních prekurzorů. Tato evolučně konzervovaná část imunitního systému rozpoznává charakteristické strukturní a funkční rysy cizorodých

patogenů. Hlavní funkcí většiny buněk je schopnost fagocytózy, tj. schopnost pohlcovat cizorodé či vlastní škodlivé či nepotřebné struktury a tím je z organismu eliminovat. Dendritické buňky, monocyty a makrofágy jsou navíc tzv. antigen prezentující buňky (APC), které prezentují škodlivé látky ve formě antigenu buňkách tzv. adaptivní imunity, a tím je pomáhají aktivovat. Jelikož přirozená imunita ve většině případů pouze omezí expanzi patogenu v organismu, ale až adaptivní imunita vede k jeho kompletnímu zlikvidování, APC tak tvoří důležitou spojku mezi dvěma částmi imunitního systému nezbytně nutnými pro udržení obranyschopnosti organismu.

T- a B-lymfocyty vznikající z lymfoidních prekurzorů nesou na svém povrchu antigenně specifické receptory velké rozmanitosti a jsou hlavními efektory adaptivní imunity. T-lymfocyty zajišťují spuštění adaptivní imunity (tzv. pomocné T-lymfocyty) a zneškodňují intracelulární parazity (tzv. cytotoxické T-lymfocyty). B-lymfocyty se vyznačují produkcí protilátek, které označují cizorodé předměty v organismu k fagocytóze. Tento druh imunity je evolučně mladší a na rozdíl od přirozené imunity se vyznačuje tzv. imunologickou pamětí, tj. schopností uchovat si informace o předešlých infekcích a zrychleně reagovat při jejich opakování.

2.2 Cytoplasmatická membrána a lipidové rafty

2.2.1 Role a složení cytoplasmatické membrány

Buňky imunitního systému jsou stejně jako všechny ostatní buňky obklopeny cytoplasmatickou membránou. Jedná se o polopropustnou strukturu tvořenou dvojitou vrstvou lipidů, která udržuje integritu buněk, chrání je před vnějším prostředím a zprostředkovává komunikaci a výměnu látek mezi buňkami a okolím.

Lipidy jako základní složky membrán lze rozlišit dle jejich chemické struktury na: glycerolipidy, sfingolipidy a steroly. Všechny tři druhy lipidů, ačkoliv se liší svým zastoupením a funkcí v membráně, jsou amfipatické molekuly obsahující polární hydrofilní hlavičku a nepolární hydrofobní ocásek. Na základě této vlastnosti dochází ve vodném prostředí k jejich samovolnému uspořádání do dvojvrstvy, ve které jsou hlavičky orientované do vodného prostředí, a jejíž stabilita je dána hydrofobními interakcemi a van der Waalsovými silami mezi nepolárními částmi.

Nejpočetnější skupinu lipidů v plasmatické membráně tvoří glycerolipidy. Spolu se sfingolipidy tvoří základ lipidové dvojvrstvy. Steroly, jejichž základním stavebním prvkem je tetraacyklický uhlovodík, který vytváří rozsáhlé hydrofobní struktury, se pouze zanořují do

lipidové dvojvrstvy. Neznámějším a nejzastoupenějším členem sterolů je cholesterol. Vzhledem ke své struktuře je méně pohyblivý než ostatní lipidy, tudíž se významnou měrou podílí na rigiditě membrán, a tím mění jejich fluidní vlastnosti.

Proteiny jsou důležitou složkou membrán, jelikož tvoří její funkční část - zajišťují transport látek a přenos signálů. Hmotnostní poměr proteinů a lipidů je v plasmatické membráně do značné míry závislý na její funkci a pohybuje se v rozmezí 1:4 až 3:1. Rozlišují se dva typy membránových proteinů: periferní proteiny asociované s membránou a integrální proteiny.

Periferní proteiny nezasahují do hydrofobní lipidové dvojvrstvy. K membráně jsou připojeny pomocí nekovalentních slabých elektrických nebo chemických interakcí s fosfolipidy, glykolipidy či integrálními proteiny. Druhou možností je kovalentní připojení k fosfolipidům nebo glykolipidům. Do této skupiny patří ukotvení do membrány pomocí tzv. GPI (glykosylfosfatidylinositol) lipidické kotvy, která je připojená na C-konec proteinu. Poslední možností ukotvení do membrány je použití dalších lipidických kotev. Tento způsob ukotvení je však založen pouze na posttranslačním připojení zbytků mastných kyselin (palmitylové, myristilové) či prenylových zbytků (farnesyl, geranyl-geranyl) na vazebná místa periferních proteinů, kterým tímto způsobem propůjčují nutnou hydrofobicitu pro zanoření do plasmatické membrány. Tento proces může být reverzibilní a dynamicky regulován jako v případě přesunu různých izoform malého G-proteinu Ras mezi cytoplasmatickou membránou a membránou Golgiho aparátu (Rocks et al., 2005). Modifikace pomocí lipidických kotev zároveň určuje asymetrii uložení periferních proteinů. Zatímco GPI ukotvené proteiny se nacházejí výlučně ve vnějším listu plasmatické membrány, proteiny modifikované zbylými lipidickými kotvami se zanořují do vnitřního listu membrány.

Integrální proteiny jsou přímo zanořeny svou hydrofobní částí do lipidové dvojvrstvy. Mohou procházet přes celou šíři membrány jedenkrát či vícekrát nebo mohou být pouze částečně zanořeny do jedné z jejích lipidových vrstev. Jejich funkce jsou rozličné, slouží jako receptory, transportery, kotvící proteiny či jako signalizační molekuly.

Součástí plasmatické membrány jsou vedle samotných lipidů a proteinů i jejich deriváty modifikované cukernými zbytky, tzv. glykolipidy a glykoproteiny. Tyto složky jsou v plasmatické membráně uspořádány asymetricky, tj. nacházejí se pouze ve vnější lipidové dvojvrstvě.

2.2.2 Model cytoplasmatické membrány – lipidové rafty

Singer a Nicolson představili v roce 1972 první realistický návrh struktury cytoplasmatické membrány a tento model je dnes znám pod pojmem „fluidní mozaikový model“. Tento prvotní model popisuje membránu jako homogenní směs lipidů, ve které se integrální proteiny volně pohybují a navzájem spolu částečně interagují (Singer and Nicolson, 1972). Tento model je v dnešní době s přibývajícím experimentálními daty nahrazen složitější představou. V ní je membrána tvořena heterogenními oblastmi s odlišnou mírou uspořádanosti jednotlivých částí se specifickým lipidovým a proteinovým složením, tzv. lipidovými rafty, které se v rámci membrány pohybují. Tyto rafty vznikají preferenčním dynamickým shlukováním jejich základních složek, kterými jsou sfingolipidy, cholesterol a proteiny (Simons and Ikonen, 1997). Ačkoliv tato hypotéza je dnes přijímána jako správná, na začátku se potýkala s řadou problémů. Existence lipidových raftů byla zpochybňována především kvůli pouze nepřímým důkazům jejich existence. Tyto důkazy byly založeny na metodách jejich detekce souvisejících s jejich chemickými vlastnostmi: na rezistenci lipidových raftů k solubilizaci neiontovými slabými detergenty (např. Triton X-100 či Brij-98) či citlivosti k cholesterolové depleci. Právě tyto biochemické metody vyvolávaly spory, co je biologicky relevantní a které výsledky experimentů jsou jen detekční artefakty (Munro, 2003). Současné mikroskopické metody jako např. „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) (Goswami et al., 2008), „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) (Eisenberg et al., 2006), „single particle tracking“ (SPT) (Pralle et al., 2000), „single-molecule near-field optical microscopy“ (NSOM) (van Zanten et al., 2009) a elektronová mikroskopie (Hancock and Prior, 2005) už dovolují vizualizovat nejen lipidové rafty, ale detekovat i jejich jednotlivé složky na povrchu buněk. I zde je však třeba dbát na možnost vzniku artefaktu, proto je ideální mít výsledky potvrzené různými experimentálními metodami. Fluorescenční próba 6-acyl-2-dimethylaminonaftalen (tzv. Laurdan), která se integruje přímo do plasmatické membrány, rovněž umožňuje vizualizovat lipidové rafty. Laurdan detekuje míru fluidity membrány díky svému 50-nm fluorescenčnímu posunu při přechodu membrány z uspořádané do neuspořádané fáze. Takto získaná data však zobrazují pouze celkovou membránovou strukturu, nikoliv konkrétní lipidové či proteinové složení lipidových raftů (Gaus et al., 2003). Mikroskopické experimenty tedy zůstávají primárními zdroji dat. Přímá i nepřímá vizualizace raftů tudíž přispěla k potvrzení existence lipidových raftů. Je třeba mít však na paměti, že pouze funkční data, kdy přítomnost signalizačních proteinů v lipidových raftech je nezbytně nutná pro jejich správnou funkci, lze považovat za

definitivní důkaz existence lipidových raftů (Kabouridis et al., 1997; Kosugi et al., 2001; Webb et al., 2000; Yasuda et al., 2000; Zhang et al., 1998b). Lipidové rafty nejsou v živých buňkách rigidní, ale spíše dynamické struktury s neustále se vyměňujícími lipidy, jejichž mobilita je velmi vysoká (Razzaq et al., 2004). V současné době se vedou debaty o průměru lipidových raftů, které mohou mít velikost pouze 25 – 40 nm (Pralle et al., 2000) či dosahovat průměru několika stovek nm až několika μm (Schutz et al., 2000). Lze shrnout, že záleží na použité metodě jejich detekce, na buněčném typu i molekule, která je detekována. Jelikož nyní jednoznačný názor na velikost a heterogenitu lipidových raftů neexistuje, je stále otázkou, zda původní detergenty izolované rafty byly či nebyly artefakty způsobené spojením více lipidových raftů (Munro, 2003; Razzaq et al., 2004).

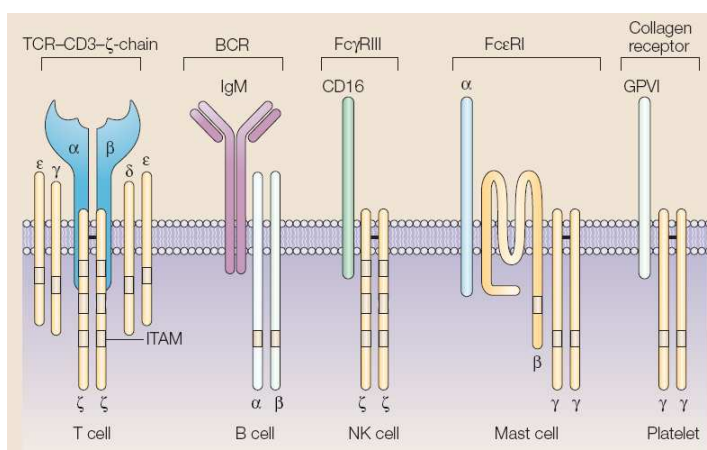
Jednotná terminologie pro lipidové rafty neexistuje v publikované literatuře. Dnes se sice nejčastěji setkáme s názvem lipidové rafty, avšak starší články používají různé názvy, které odráží složení či použité detekční metody: „GEMs (glycosphingolipid-enriched microdomains“), „GPI-microdomains (glycosylphosphatidylinositol-microdomains“), „DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched domains““ a „DRMs (detergent-resistant membranes““ (Brown, 1998; Simons and Ikonen, 1997). Dále v této práci budu používat termín lipidové rafty.

Lipidové rafty se účastní řady biologických aktivit: signálního přenosu, apoptózy, buněčné adheze, migrace, synaptického přenosu, reorganizace cytoskeletu či třídění proteinů při endocytóze a exocytóze (Munro, 2003). Proteomické analýzy zjistily vysokou koncentraci signalizačních molekul, strukturních a regulačních proteinů v lipidových raftech, což vede k jejich vzájemnému ovlivňování a poukazuje na možnou regulaci prvotních fází buněčné signalizace lipidovými rafty (Foster et al., 2003; Foster and Chan, 2007). Lokalizace signalizačních molekul do lipidových raftů umožňuje buňkám odpovídat specificky, efektivně a rychle na signál z vnějšku. Zároveň prostorové oddělení klíčových signalizačních proteinů do různých raftů či mimo ně nedovoluje spustit signalizaci bez vazby ligandu na příslušný receptor. Tato vazba spustí přechodnou fúzi lipidových raftů či přechodné vnoření mimoraftových proteinů do signálních raftů (Munro, 2003). Lipidové rafty jsou zodpovědné rovněž za ukončení signalizace, kdy endocytóza signalizačních molekul zamezuje jejich další účasti v určité signalizační dráze (van Meer and Sprong, 2004). Konkrétní role lipidových raftů v T-receptorové signalizaci je popsána v kap. 2.5.

2.3 Imunitní receptory

Jednotlivé větve imunitního systému mají své specifické membránové receptory. Tyto receptory se zásadně liší ve své schopnosti rozpoznávat cizí antigen. Přirozená imunita využívá antigenně nespecifické receptory (Toll-like receptory, C-lektinové receptory, ...), které rozpoznávají cizí antigen pouze na základě jeho podobnosti s evolučně konzervovanými chemickými či strukturními prvky patogenů. Naproti tomu antigenně specifické T-receptory (TCR) a B-receptory (BCR) jsou základem adaptivní imunity. Tyto receptory jsou schopné od sebe odlišit i velmi blízce podobné struktury antigenu. Z tohoto důvodu přirozená imunita ve většině případů pouze omezí expanzi patogenu v organismu, ale až adaptivní imunita vede k jeho kompletnímu zlikvidování. Do skupiny imunoreceptorů patří i Fc-receptory, které vážou konstantní část solubilního BCR dle jeho příslušnosti k určitému isotypu, a kolagenový receptor glykoprotein VI (GPVI) na povrchu krevních destiček (viz Obr.2).

BCR, TCR, Fc-receptory a GPVI jsou multiřetězové receptorové komplexy, které mají podobnou strukturu. Jsou složeny ze specifické ligand vazebné podjednotky, která je v transmembránové oblasti nekovalentně asociovaná s transmembránovou adaptorovou signalizační podjednotkou (Iga a Igβ u BCR, CD3-δ, -γ, -ε, -ζ u TCR, FcRγ nebo FcRζ u Fc-receptorů a FcRγ u GPVI), která je nezbytně nutná pro úspěšné zahájení signální kaskády. Více informací o signalizačních podjednotkách a signalizaci je uvedeno v kap. 2.4.2.1 a 2.5.2.



Obr. 2.: Složení imunoreceptorů (převzato z (Horejsi et al., 2004)). BCR, TCR, Fc-receptory a GPVI jsou multiřetězové komplexy skládající se ze specifické ligand vazebné podjednotky, která je v transmembránové α- helikální oblasti nekovalentně asociovaná s ITAM-obsahující transmembránovou signalizační adaptorovou podjednotkou (Iga a Igβ u BCR, CD3-δ, -γ, -ε, -ζ u TCR, FcRγ nebo FcRζ u Fc-receptorů a FcRγ u GPVI).

2.4 Adaptorové proteiny

Adaptorové proteiny jsou důležitým prvkem většiny signalizačních kaskád, nejen z imunoreceptorů. Ve většině případů se jedná o proteiny bez vlastní enzymatické aktivity obsahující řadu vazebných motivů a domén, které slouží jako kotevní místa pro cytoplasmatické proteiny. Vzájemné přiblížení a koncentrace enzymů a jejich substrátů konkrétní signalizační dráhy na povrchu adaptorových proteinů vede k vytvoření velkého komplexu signalizačních molekul, tzv. signalosomu. Tento komplex usnadňuje a urychluje signalizaci a zajišťuje správnost interpretace vnějšího signálu na patřičnou buněčnou odpověď. Nevalentní interakce signalizačních molekul a adaptorových proteinů jsou zprostředkovány krátkými vazebnými motivy a na ně nasedajícími strukturními vazebnými doménami.

Vazebné motivy jsou dlouhé 3 - 16 aminokyselin a jejich vazebný charakter a schopnost posttranslační modifikace je velice rozdílný. V imunoreceptorové signalizaci se nejčastěji setkáme s tyrosinovými fosforylačními motivy.

Vazebné domény jsou dlouhé 40 – 150 aminokyselin a váží se dle své specifity na nejrůznější vazebné motivy proteinů či fosfoinositidy. Níže uvádím příklady nejrozšířenějších vazebných domén používaných v imunoreceptorové signalizaci⁹:

- **SH2 (Src-homology 2)** dlouhá přibližně 100 aminokyselin rozpoznává pouze fosforylovaný tyrosin v motivu $Y_{X_2-5}L/I/V$. Invariantní arginin ve vazebném místě SH2 domény je nezbytný pro vysokou afinitu vazby.
- **SH3 (Src-homology 3)** dlouhá přibližně 60 aminokyselin váže většinou prolin-bohaté sekvence, které tvoří levotočivou šroubovici typu II. Ukazuje se, že i okolí této sekvence je pro vazbu ligandu důležité. V menší míře váže SH3 doména sekvence vytvářející α -helix nebo obsahující tandemový tyrosinový motiv, ve kterých prolin není přítomen. Afinita těchto interakcí je však obvykle nižší.
- **PTB (phosphotyrosine binding)** dlouhá 100 – 150 aminokyselin stejně jako SH2 doména váže fosforylovaný tyrosin v motivu $NPxY$. V některých případech sekvence rozeznávané PTB doménou fosforylaci tyrosinu nevyžadují či vůbec neobsahují tyrosin.

⁹ Seznam a anotace dosud identifikovaných signálních, jaderných, extracelulárních a jiných domén přístupný na <http://smart.embl-heidelberg.de/browse.shtml>

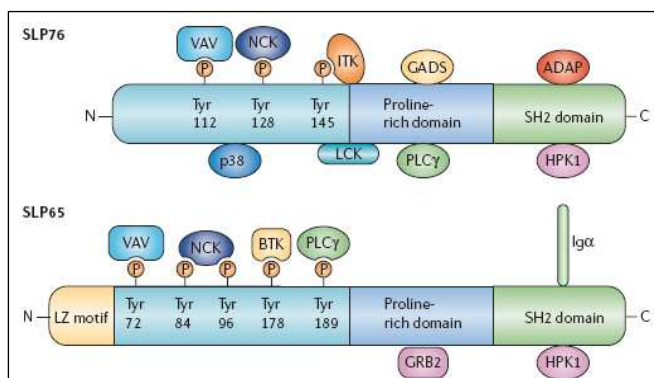
- **PH (pleckstrin-homology)** dlouhá přibližně 100 aminokyselin zprostředkovává vazbu proteinu na specifické fosfoinositidy ve vnitřním listu plasmatické membrány, které jsou fosforylované na různých pozicích inositolového kruhu.
- **WW domény** dlouhé jen 40 aminokyselin mají název odvozen od dvou konzervovaných tryptofanů (W) v jejich sekvenci. Většinou rozeznávají stejně jako SH3 domény prolin-bohaté sekvence nebo váží sekvence obsahující fosforylovaný serin nebo threonin.
- **C1 doména** dlouhá přibližně 50 aminokyselin je bohatá na cysteiny. Prostřednictvím vazby diacylglycerolu (DAG) zprostředkovává interakci proteinů s plasmatickou membránou.

Adaptorové proteiny lze rozdělit do dvou základních skupin dle jejich buněčné lokalizace: cytoplasmatické adaptorové proteiny (CAP) a transmembránové adaptorové proteiny (TRAP) (Horejsi et al., 2004).

2.4.1 cytoplasmatické adaptorové proteiny (CAP)

CAP lze charakterizovat jako intracelulární solubilní proteiny, které ve své struktuře obsahují strukturní vazebné domény (např. SH2, SH3, PTB nebo PH) i vazebné motivy. Mezi nejdůležitější vazebné motivy patří tyrosinové fosforylační motivy, které po své fosforylaci protein-kinázami váží SH2 a PTB domény interakčních partnerů (viz Obr.3).

SLP76 („SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa“) a SLP65 („SH2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa“) patří mezi nejznámější a nejvýznamnější CAP, které organizují signální dráhy vedoucí z imunoreceptorů. Zatímco SLP76 je nutný pro správnou signalizaci vedoucí z TCR, Fc-receptorů a GPVI, SLP65 je nezbytný pro BCR signalizaci. SLP76 se navíc účastní i signalizace vedoucí z integrinů v neutrofilech a krevních destičkách, avšak jeho role v této dráze se liší od imunoreceptorové signalizace. Absence těchto proteinů vede k závažným poruchám ve vývoji T-lymfocytů a B-lymfocytů a ve funkci žírných buněk, neutrofilů a krevních destiček. Absence zároveň způsobuje částečnou fúzi cévního a lymfatického oběhu během vývoje (Koretzky et al., 2006).



Obr. 3. Struktura SLP76 a SLP65 (převzato z (Koretzky et al., 2006)): Na obrázku jsou zobrazeny jednotlivé vazebné domény a motivy spolu s interakčními partnery.

2.4.2 Transmembránové adaptorové proteiny (TRAP)

TRAP lze definovat jako integrální proteiny, ale všechny doposud identifikované TRAP na rozdíl od CAP obsahují pouze vazebné motivy a nikoliv vazebné domény. Důvod tohoto omezení není zřejmý, a proto jsme ho při vyhledávání nebrali v úvahu a přítomnost vazebných domén jsme povolili v kandidátních TRAP. Rovněž všechny TRAP vykazují obdobné sekvenční rysy: krátkou extracelulární N-koncovou část, α -helikální transmembránovou oblast tvořenou 15-30 hydrofobními aminokyselinami a dlouhou intracelulární C-koncovou část obsahující vazebné motivy, např. tyrosinové fosforylační motivy. Do TRAP skupiny patří signální podjednotky imunoreceptorů, které jsou s nimi přímo asociované a obsahují aktivační ITAM („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) motivy. Naproti tomu ostatní známé TRAP (viz dále) tyto klasické ITAM motivy neobsahují a ani nejsou asociované přímo s imunoreceptory (výjimku tvoří TRIM) (Horejsi et al., 2004). TRAP jsou exprimovány především buňkami imunitního systému. Výjimku tvoří protein PAG, který je exprimovaný téměř ve všech buněčných typech. Hlavní funkcí TRAP je přivádět cytoplasmatické efektorové proteiny pod membránu do těsné blízkosti jiných signálních proteinů, správně je vůči sobě orientovat, a tím zajišťovat efektivní průběh membráně-proximální signalizace.

Dle přítomnosti ITAM motivů a jejich lokalizace v membráně lze rozlišovat TRAP na tři základní skupiny:

2.4.2.1 Signalizační podjednotky imunoreceptorů a dalších příbuzných receptorů obsahující ITAM

Tato skupina patří k nejlépe prostudovaným TRAP, zejména díky její nepostradatelné roli při signalizaci. Patří sem CD3- δ , - γ , - ϵ , - ζ řetězce TCR, Ig α a Ig β řetězce BCR, γ řetězec Fc-receptorů, γ řetězec GPVI (viz Obr. 2) a DAP10 a DAP12 asociované s některými receptory myeloidních a NK buněk. Cytoplasmatická část TRAP obsahuje alespoň jeden tzv. ITAM motiv. Tato evolučně konzervovaná ITAM sekvence (Yxx(L/I/V)_{x₆₋₈}Yxx(L/I/V), x je libovolná aminokyselina) obsahuje dva tandemově spojené tyrosiny, jejichž fosforylace protein-kinázami rodiny Src je nutná pro zahájení signalizační kaskády.

Absence těchto signalizačních podjednotek u knock-out (KO) myši, vede k závažným poruchám ve vývoji a také funkci buněk imunitního systému. CD3- ζ ^{-/-} myši mají snížené množství povrchového TCR, což vede téměř k absenci zralých periferních T-lymfocytů, ale intraepiteliální T-lymfocyty jsou funkční (Malissen et al., 1993). CD3- ϵ ^{-/-} myši (Wang et al., 1998) a CD3- γ ^{-/-} myši (Haks et al., 1998) mají porušenou tzv. β -selekcí, při které se ověřuje kvalita TCR β řetězce, tudíž se u nich vyskytuje pouze malé množství CD4⁺CD8⁺ T-lymfocytů. Malé množství zralých periferních T-lymfocytů však bylo detekováno u CD3- γ ^{-/-} myši. Tyto myši mají rovněž částečně porušený vývoj $\gamma\delta$ T-lymfocytů (Haks et al., 1998). CD3- δ ^{-/-} myši téměř nemají zralé periferní T-lymfocyty (Dave et al., 1997). CD3- $\gamma\delta$ ^{-/-} vykazují kompletní porušení vývoje $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T-lymfocytů, tudíž u nich nenalezneme žádnou populaci T-lymfocytů (Wang et al., 1998).

2.4.2.2 TRAP lokalizované konstitutivně do lipidových raftů

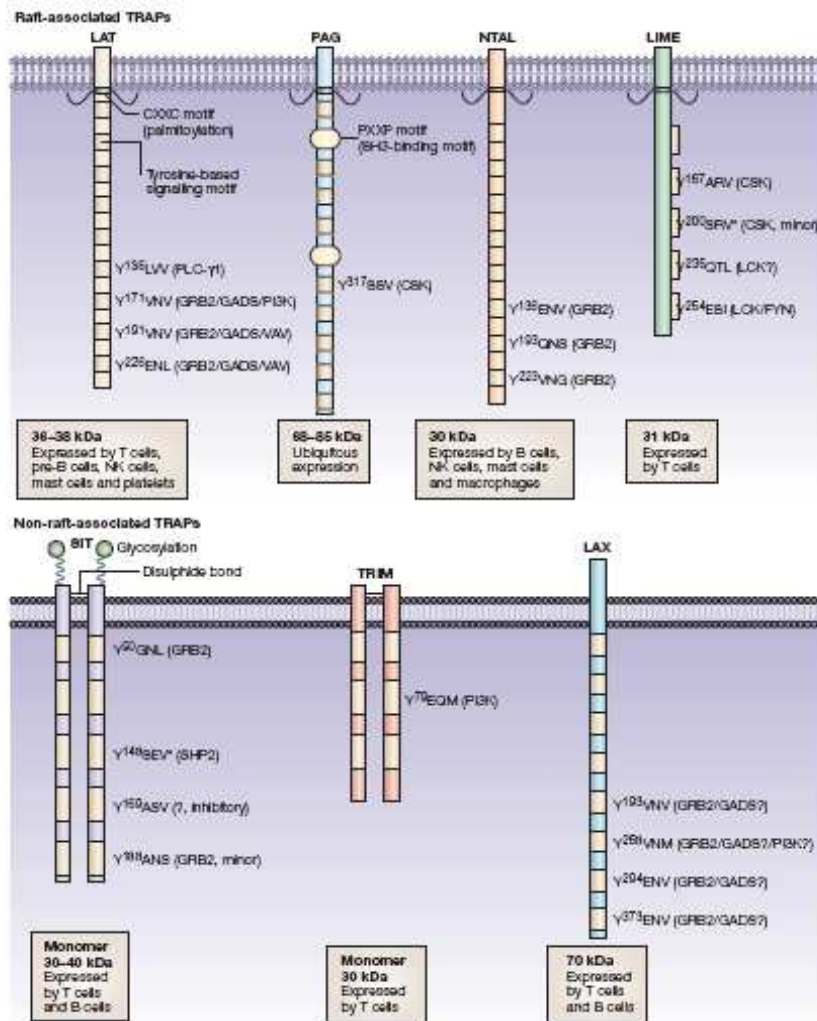
Do této skupiny patří LAT (Weber et al., 1998; Zhang et al., 1998a), NTAL („non-T-cell activation linker“) (Brdicka et al., 2002; Janssen et al., 2003), PAG („protein associated with GEMs“) (Brdicka et al., 2000; Kawabuchi et al., 2000) a LIME („Lck-interacting membrane protein“) (Brdickova et al., 2003; Hur et al., 2003).

Tyto TRAP obsahují ve své aminokyselinové sekvenci lokalizované těsně pod membránou palmitylační motiv CxxC nebo CxC, který je zodpovědný za jejich lokalizaci do lipidových raftů. Stálým předmětem diskusí je nezbytnost lokalizace TRAP do lipidových raftů pro plnou funkčnost imunoreceptorové signalizace. První článek týkající se daného problému podpořil tuto teorii. LAT s mutovanými cysteiny nutnými pro palmitylaci byl lokalizován mimo rafty a signalizace těchto T-lymfocytů byla výrazně zhoršena (Zhang et al.,

1998a). Naproti tomu další článek téže skupiny ji vyvrátil. Chimerní protein LAX-LAT (extracelulární a transmembránová část spolu s malou částí pod membránou pocházející z LAX a cytosolická část pocházející z LAT) lokalizovaný mimo lipidové rafty byl plně funkční v TCR signalizaci i byl schopen obnovit vývoj T-lymfocytů v LAT^{-/-} myších (Zhu et al., 2005). Další názor do této diskuze přidal článek o existenci nového typu lipidových raftů, tzv. těžkých raftů, které jsou izolovatelné gelovou filtrací. Tyto těžké rafty jsou rozsáhlejší než klasické rafty a mnohem více jsou závislé na protein-protein interakcích, jelikož jsou citlivější k působení chaotropních činidel (např. KI) než klasické lipidové rafty. Těžké rafty se rovněž liší v obsahu signalizačních molekul oproti klasickým raftům. Z toho vyplývá, že signalizace prostřednictvím LAT cíleného do těchto membránových struktur je méně účinná. Jedná se více o kvantitativní závislost signalizace na lokalizaci v membráně. LAX-LAT konstrukt spolu s dalšími proteiny byl detekován právě v těchto těžkých raftech, nikoliv v klasických raftech. Proto oba výše zmíněné články jsou v souladu a je i potvrzena základní role lipidových raftů v signalizaci (Otahal et al.). V současné době naše laboratoř pracuje na dalších palmitoylovaných TRAP a jejich funkci při signalizaci.

2.4.2.3 TRAP lokalizované mimo lipidové rafty

Do poslední skupiny patří TRIM (Bruyins et al., 1998), SIT („SH2-domain-containing protein SHP2-interacting TRAP“) (Marie-Cardine et al., 1999), LAX („linker for activation of X-cells“, X znamenalo původně neidentifikované buňky, ale dnes je známo, že se LAX účastní TCR a BCR signalizace) (Zhu et al., 2002) a GAPTR (Liu and Zhang, 2008). Tyto TRAP jsou lokalizované mimo lipidové rafty, jelikož postrádají palmitylační modifikace. SIT a TRIM jako jediné TRAP tvoří homodimery spojené disulfidickým můstkem. SIT je navíc v extracelulární části N-glykosylován.



Obr. 4. Přehled dosud identifikovaných TRAP lokalizovaných v raftech a mimo ně (převzato z (Horejsi et al., 2004)): Na obrázku je uvedena velikost TRAP, u jednotlivých tyrosinových vazebných motivů interagující proteiny a exprese v buňkách imunitního systému. Všechny TRAP mají podobnou sekvenci (viz kap. 2.4.2). LAT, PAG, NTAL a LIME obsahují ve své sekvenci palmitylační motiv, který je zodpovědný za jejich lokalizaci do lipidových raftů. SIT, TRIM a LAX jsou lokalizovány mimo lipidové rafty.

V dnešní době byly připraveny KO myši pro všechny výše zmíněné TRAP bez ITAM-vazebných motivů. Při analýze těchto myší se však ukázalo, že pouze absence proteinu LAT vede k výraznému vývojovému fenotypu v imunitním systému. Tyto myši zcela postrádají T-lymfocyty z důvodu nefungující pre-TCR a TCR signalizace u thymocytů. Protein LAT je tedy naprosto nepostradatelný při TCR signalizaci (Zhang et al., 1999). Ostatní TRAP jsou zřejmě pro správné fungování imunitního systému méně důležité a vzájemně zastupitelné, jelikož KO myši mají pouze marginální fenotypy. Absence těchto TRAP nevede k porušení vývoje a funkce leukocytů, ale pouze k jejich modulaci. NTAL^{-/-} myši mají hyperreaktivní žírné buňky (Zhu et al., 2004), NK buňky (Whittaker et al., 2008) i T-lymfocyty, což vede

k vývoji autoimunity (Zhu et al., 2006). LIME^{-/-} myši vykazují 1,8 krát zvýšenou pozitivní selekci T-lymfocytů (Gregoire et al., 2007). PAG^{-/-} myši mají zvýšený počet thymocytů v brzlíku (Xu et al., 2005). TRIM^{-/-} myši jsou zcela normální (Kolsch et al., 2006). SIT^{-/-} myši vykazují zvýšenou pozitivní selekci T-lymfocytů v brzlíku a hyperreaktivní zralé periferní T-lymfocyty vedoucí ke vzniku autoimunity (Posevitz et al., 2008; Simeoni et al., 2005). TRIM a SIT jsou si strukturně podobné, a tudíž potenciálně vzájemně zastupitelné proteiny. Myši s dvojitým KO však vykazují pouze zvýšenou pozitivní selekci (Koelsch et al., 2008). LAX^{-/-} myši mají rovněž hyperreaktivní T-lymfocyty, což u nich vede k vývoji autoimunity (Shapiro et al., 2008). Z uvedených dat vyplývá, že výše zmíněné TRAP mají inhibiční účinky na TCR signalizaci, včetně LAT, jehož knock-in (LAT Y136F) rušící PLC γ 1-vazebné místo vede k vývoji autoimunity (Simeoni et al., 2008). Jelikož inhibiční funkce genů jsou v buňkách zálohovány, může to být důvod vzájemné zatupitelnosti TRAP.

2.5 Imunoreceptorová signalizace

V buňkách imunitního systému se uplatňují zejména dva typy signalizace: signalizace pomocí protein-kináz a trimerních G-proteinů asociovaných s receptory (např. pro chemokiny, C3a, C5a). Existují receptory s vlastní enzymovou protein-kinázovou aktivitou (např. receptory pro M-CSF, PDGF, TGF- β) nebo asociovanou protein-kinázovou aktivitou (imunoreceptory a většina cytokinových receptorů). Vytvoření signalizační kaskády, která je založena na sekvenční fosforylaci a aktivaci jednotlivých protein-kináz, na vzniku druhých posílů či nejčastěji na jejich kombinaci, je společným rysem všech signalizací. Celá dráha vede k aktivaci transkripčních faktorů, které dle povahy vstupního signálu regulují expresi příslušných genů.

Jelikož adaptory jsou nezbytně nutné pro správnou funkci zejména signalizace receptorů s asociovanou protein-kinázovou aktivitou a řada signalizačních kaskád nezbytných pro vývoj, aktivaci a diferenciaci hematopoetických buněk je spouštěna přes imunoreceptory (TCR, BCR, Fc receptory a GPVI), budu se dále věnovat pouze jejímu popisu na příkladu TCR signalizace.

2.5.1 Modely spuštění TCR signalizace

Hlavní funkcí $\alpha\beta$ TCR je rozpoznávat peptidy pocházející z patogenu v kontextu MHC („major histocompatibility complex“) na povrchu antigen prezentujících buněk (APC). TCR musí rozlišit mezi vlastním a cizím peptidem, což je základní předpoklad pro jeho správný

vývoj v brzlíku. Různá míra TCR signalizace v závislosti na vazbě nízkoafinních či vysokoafinních pMHC vede k různým buněčným odpovědím. Způsob, jakým TCR rozliší jednotlivé ligandy a jak je tato vazba přenesena dovnitř buňky přes plasmatickou membránu a je zahájena TCR signalizace, popisuje řada modelů. Mezi nejvýznamnější patří:

- Model agregace TCR (Germain, 1997)
- Model konformační změny TCR (Garcia et al., 1999)
- Model sériového spuštění TCR (Valitutti et al., 1995)
- Model silové deformace TCR (Ma et al., 2008)
- Model lipidových raftů (Kabouridis, 2006)
- Kineticky-segragační model (Davis and van der Merwe, 2006)

2.5.1.1 Model agregace TCR

Tento učebnicový model je založen na spuštění TCR signalizace v závislosti na agregaci více TCR/CD3 současně. Tento model dobře funguje při zřetězení TCR či CD3 komplexu pomocí protilátek či multivalentních pMHC (Cochran et al., 2000). Úskalím tohoto modelu je fakt, že agonistické pMHC (jsou schopny spustit signalizaci) se nevyskytují za fyziologických podmínek na povrchu APC jako multimery. Pravděpodobnost těsné blízkosti dvou MHC molekul, které nesou stejný agonistický peptid, je velice nízká, proto se pMHC na povrchu APC vyskytují jako monomery. Jak vysvětlit podle tohoto modelu skutečnost, že Irvine a kol. byly schopni zachytit spuštění signalizace i po vazbě monomerního pMHC (Irvine et al., 2002)? Vysvětlení může spočívat v nutnosti přítomnosti koreceptoru pro toto pozorování a možnosti vzniku pseudodimerů jako upraveného modelu agregace. Jelikož koreceptory CD4 a CD8 zaujímají 90° úhel vzhledem k asociovanému TCR, je pravděpodobné, že koreceptor se neváže na agonistický pMHC, ale na vedlejší pMHC obsahující endogenní peptid. Tato koncepce nazvaná model pseudodimerů byla rovněž podpořena experimentem, kdy solubilní kovalentně spojené pseudodimery (agonistický pMHC a endogenní pMHC) byly schopné spouštět TCR signalizaci (Krogsgaard et al., 2005).

2.5.1.2 Model konformační změny TCR

Tento model definuje, že vazba solubilního monovalentního pMHC na TCR vede ke konformačním změnám uvnitř TCR/CD3 komplexu, což vede ke spuštění signalizace. Tento model je však podpořen malým množstvím experimentálních dat. Pro tento model potvrdily NMR studie, které ukázaly, že pozitivně nabitý N-konec ITAM motivu v CD3ε (Xu et al., 2008) a CD3ζ (Aivazian and Stern, 2000) asociují v klidovém stavu s negativně nabitými fosfolipidy vnitřního listu cytoplasmatické membrány. Rovněž vazba cytoplasmatického

adaptorového proteinu Nck na prolin bohaté sekvence (PRS) uvnitř CD3 ϵ je indukovaná až po vazbě pMHC na TCR (Gil et al., 2002; Takeuchi et al., 2008). Přítomnost PRS je důležitá pro amplifikaci nízkoafinních signálů z TCR během vývoje T-lymfocytů, nikoliv však pro funkci zralých T-lymfocytů při vysokoafinních signálech (Mingueneau et al., 2008; Tailor et al., 2008). Tudíž lze předpokládat, že tyto dva TRAP jsou v klidovém stavu v buňkách nepřístupné fosforylaci Src kinázami. Až po vazbě ligandu dochází k jejich radikálním konformačním změnám a jejich disociaci od plasmatické membrány a otevření struktury k fosforylaci, která je nezbytným krokem pro spuštění signalizace. Proti jsou studie, které ukazují, že solubilní monovalentní pMHC se váže na TCR, ale tato vazba nepostačuje ke spuštění signalizace (Cochran et al., 2000). Zároveň i strukturní studie pMHC-TCR/CD3 komplexu vedly k objevení pouze minimální konformační změny během vazby (Rudolph et al., 2006).

2.5.1.3 Model sériového spuštění TCR

Model je založený na faktu, že kontakt mezi APC a T-lymfocytem není rigidní a dochází k postupnému přesunu jednoho agonistického pMHC mezi více TCR. Tento model udává, že jediný pMHC může aktivovat až 200 TCR (Valitutti et al., 1995). Vzájemnou integrací signálů z jednotlivých TCR pak dochází k překročení prahu, který je nutný pro plné spuštění signalizace. Proti tomuto modelu působí fakt, že poločas rozpadu vazby pMHC-TCR je 10-50 sekund (Krogsgaard et al., 2003), v rámci minut než dojde k plnému spuštění signalizace tak patrně nemůže být aktivováno příliš TCR.

2.5.1.4 Model silové deformace TCR

Tento nejnovější model navazuje na model konformační změny TCR. Je rovněž založen na konformační změně TCR po vazbě na pMHC, avšak v závislosti na mechanické síle, která při interakci APC-T-lymfocytu vzniká během pohybu T-lymfocytu. Pohyb nejen způsobí mechanické napětí a konformační změnu TCR, ale rovněž přesun agonistického pMHC na vedlejší TCR a jeho aktivaci. Integrace pak z více signálů vede k vysoké citlivosti TCR i pouze v přítomnosti malého množství agonistických peptidů na povrchu APC. Svým způsobem tento model do svého konceptu integruje i prvky předešlého modelu sériového spuštění TCR. Je otázkou, zda mechanické napětí vede ke konformační změně v konstantní části TCR nebo při rigiditě TCR molekuly mění její pozici vůči CD3 komplexu či mění rozprostření okolních lipidů a uvolňuje ϵ - a ζ -signalizační podjednotky z asociace s lipidovou dvojrůstvou.

2.5.1.5 Model lipidových raftů

Model je založen na existenci lipidových raftů a hypotéze, že vazba pMHC na TCR vede k vzájemnému přiblížení (agregaci) receptorů, k fúzi raftů obsahujících zvýšenou koncentraci signalizačních molekul (kináz Lck a Fyn, koreceptorů CD4 a CD8, TRAP a dalších) a vzniku přechodných signalizačních raftových shluků, tzv. „microclusters“. Ty se následně dále organizují a vytváří tzv. imunologickou synapsi (IS). Celý tento proces je spojen s přestavbou aktinového cytosketetu pod plasmatickou membránou. (Dustin, 2008; Harwood and Batista, 2009). Tuto strukturu lze přirovnat k velkému strukturně přesně organizovanému raftu, který obsahuje centrální část s imunoreceptory („central supramolecular activation cluster“; cSMAC) a periferní kruh s adhesivními molekulami (pSMAC). Funkcí IS je zajišťovat správné vzájemné postavení molekul a propagaci signálu dovnitř buňky (Monks et al., 1998).

Lokalizace určitých signalizačních proteinů konstitutivně do lipidových raftů (Lck asociovaná s koreceptory CD4 a CD8, Fyn a TRAP) a na druhou stranu vyčlenění jiných signalizačních molekul z nich (komplexu TCR/CD3) umožňuje rychlou a specifickou odpověď imunitních buněk pouze na signál a předchází masivnímu spuštění dráhy samovolně bez stimulace (Razzaq et al., 2004). Výjimku tvoří tzv. „tonic signaling“, při kterém se rafty samovolně shlukují pouze v malé míře a který slouží jako udržovací signál pro přežití buněk.

Pro tuto teorii svědčí fakt, že inhibice acylace kináz Lck, Fyn a transmembránového adaptorového proteinu LAT, která vede k jejich lokalizaci mimo lipidové rafty, inhibuje TCR signalizaci částečně v případě LAT (Webb et al., 2000; Zhang et al., 1998b) nebo úplně v případě kináz (Kabouridis et al., 1997; Kosugi et al., 2001; Yasuda et al., 2000). Ovšem o nutné lokalizaci LAT do lipidových raftů pro správnou TCR signalizaci se stále vedou debaty (Otahal et al., ; Zhang et al., 1998b; Zhu et al., 2005)(viz kap. 2.4.2.2)

2.5.1.6 Kineticky-segregační model

Tento model je založen na pozorování, že během kontaktu APC s T-lymfocytom dochází k přiblížení plasmatických membrán na velmi krátkou vzdálenost nutnou pro kontakt pMHC-TCR. Molekuly obsahující rozsáhlé extracelulární domény už do tohoto prostoru nevejdou a jsou z něj vyčleněny. Jedná se především o fosfatázy CD45 a CD148, které inhibují signalizaci. Z tohoto důvodu dochází k časově omezené zvýšené koncentraci kináz v místě kontaktu pMHC-TCR, což vede ke spuštění signalizace. I když je tento model odlišný od tvorby IS, pro jejíž vytvoření je nutná přestavba aktinového cytosketetu, experimenty, které se zabývají IS ho vlastně podporují, jelikož v obou případech je TCR signalizace závislá

na blízkém kontaktu APC a T-lymfocyty. Zaprvé, fosfatázy v místech IS nebyly detekovány (Lin and Weiss, 2003) a delece jejich extracelulárních domén vede k jejich opětovné lokalizaci do IS a inhibici TCR signalizace (Irles et al., 2003; Lin and Weiss, 2003). Zároveň pMHC s prodlouženými extracelulárními doménami měly sníženou TCR aktivaci pravděpodobně způsobenou nedostatečným vyčleněním fosfatáz z IS (Choudhuri et al., 2005).

Samozřejmě se vedou debaty, který model nejvíce vystihuje reálnou situaci *in vivo*. Dle mého názoru je spuštění TCR signalizace způsobeno kombinací několika modelů. Dle kineticky-segregačního modelu dojde k odstranění fosfatáz z místa kontaktu APC-T-lymfocyty, fúzí pMHC-TCR/CD3 s lipidovými rafty dojde k těsné blízkosti všech potřebných signalizačních molekul (zejména Src, Syk kináz a TRAP). Tyto dva modely se zdají být pro TCR signalizaci nezbytné, zvláště přítomnost lipidových raftů. Je dokumentováno několik signalizačních molekul, které se po vyčlenění z lipidových raftů neúčastní TCR signalizace, resp. jen částečně (kinázy Lck, Fyn, resp. adaptor LAT). Model lipidových raftů rovněž zahrnuje roli i ostatních TRAP v TCR signalizaci. Tyto modely však nevysvětlují samotný přenos signálu přes plasmatickou membránu dovnitř buňky. Naproti tomu silová deformace TCR vlivem vazby pMHC lépe vysvětluje tento přenos a zahájení signalizačních drah. Tento model společně s konformačním modelem do svého konceptu přímo zahrnuje aktivní konformační změnu signalizačních podjednotek imunoreceptorů jako nedílnou součást TCR signalizace, zatímco ostatní modely popisují pouze jejich pasivní roli. Model deformace TCR zároveň nevylučuje předešlé modely a možnost sériového spuštění více TCR jediným agonistickým pMHC a integraci signálů. Evidence, že TCR po vazbě pMHC vytváří shluky TCR, umožňuje začlenění i modelu agregace TCR. Konformační změna, která se projeví u několika TCR po vazbě jediného pMHC, se může pravděpodobně přesunout i na okolní nestimulované TCR, a tímto způsobem se posílí TCR signalizace (Minguet et al., 2007).

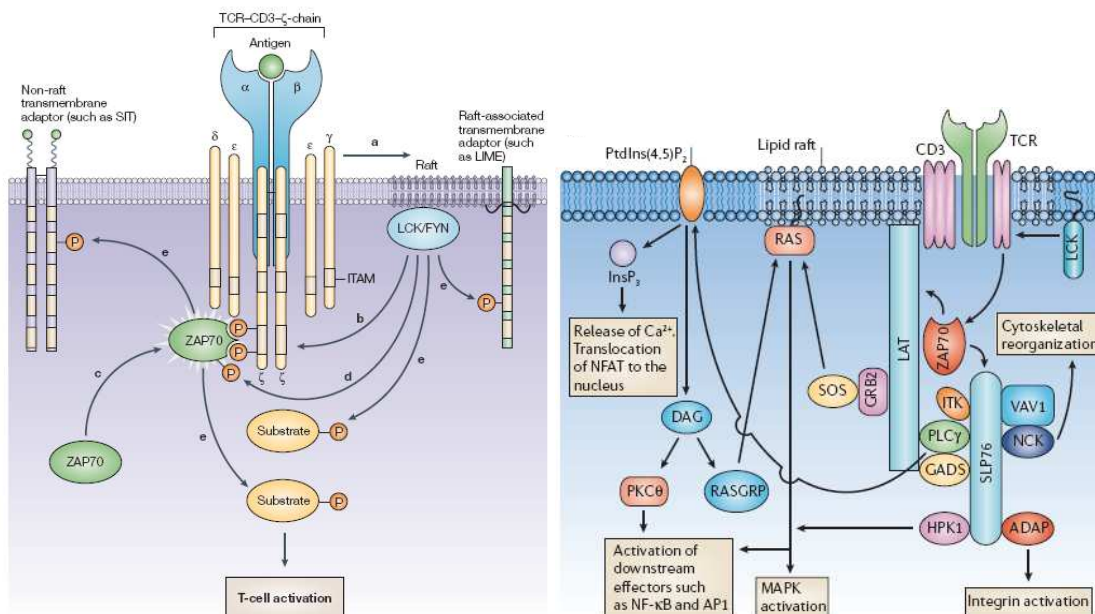
2.5.2 Průběh membráně-proximální TCR signalizace a signalizačních drah

V předešlé kapitole jsem se zabývala různými modely spuštění TCR signalizace. Nyní bych se ráda věnovala samotné TCR signalizaci a ve zkratce jednotlivým signalizačním drahám.

2.5.2.1 Membráně-proximální TCR signalizace

Správný průběh membráně-proximální signalizace a sestavení signalizačních komplexů, ze kterých dále vedou jednotlivé dráhy, je prvním krokem pro úspěšné zahájení signalizačních kaskád. Po vazbě pMHC na TCR/CD3 dochází ke kontaktu celého komplexu s raftově lokalizovanými resp. s koreceptory CD4, CD8 asociovanými, cytoplasmatickými protein-kinázami rodiny Src (Fyn, resp. Lck), které se vzájemně aktivují a fosforylují kritické tyrosiny ITAM motivů v sekvenci signalizační podjednotky CD3. Řada cytoplasmatických proteinů se svými SH2-vazebnými doménami váže na fosforylované tyrosiny. Protein-kinázy rodiny Syk (ZAP-70 a Syk), které jsou fosforylované Src kinázami, tím aktivovány a připraveny fosforylovat svoje substráty, patří mezi nejdůležitější (Horejsi et al., 2004)(viz Obr.5). Protein-kináza ZAP-70 dále fosforyluje transmembránový adaptorový protein LAT, jehož fosforylované tyrosiny umožňují vazbu, a tím i translokaci cytoplasmatických adaptorových proteinů Grb2 a Gads a enzymů fosfolipázy $C\gamma 1$ ($PLC\gamma 1$) a p85 podjednotky PI3-kinázy k plasmatické membráně (Zhang et al., 1998a). LAT interaguje prostřednictvím Gads i s SLP76, který rovněž váže a organizuje celou řadu dalších proteinů (viz Obr.5) (Koretzky et al., 2006). Vznik signalizačních komplexů kolem proteinů LAT a SLP76 tedy umožňuje správnou orientaci a blízkost proteinů jednotlivých signalizačních kaskád, které se tímto způsobem zahajují.

Role ostatních TRAP neobsahujících ITAM motivy v membráně-proximální signalizaci je diskutována. Důvodem těchto diskuzí je fakt, že absence těchto genů nevede k výraznému fenotypu u KO myší, kromě LAT KO myší. Lze předpokládat, že tyto TRAP jsou navzájem zastupitelné a pouze modulují TCR signalizaci, a to pozitivně (LIME) (Park and Yun, 2009) či negativně (PAG, SIT, TRIM, LAX, NTAL) (Simeoni et al., 2008).



Obr. 5: Současný model imunoreceptorové signalizace. Na obrázku vlevo (převzato z (Horejsi et al., 2004)) je vyznačena počáteční fáze TCR signalizace, ale stejný mechanismus funguje také pro BCR, Fc receptory a kolagenový receptor GPVI. Po vazbě pMHC na TCR/CD3 dochází ke kontaktu komplexu s raftově lokalizovanými cytoplasmatickými protein-kinázami rodiny Src (Fyn a Lck), které se vzájemně aktivují a fosforylují kritické tyrosiny ITAM motivů v sekvenci signalizační podjednotky CD3. Na fosforylované tyrosiny se svými SH2 doménami vážou protein-kinázy rodiny Syk (ZAP-70 a Syk), které jsou fosforylované Src kinázami, tím aktivovány a připraveny fosforylovat svoje substráty. Na obrázku vpravo (převzato z (Koretzky et al., 2006)) je zobrazena úloha těchto dvou proximálních substrátů - adaptorových proteinů LAT a SLP76, které fungují jako kotevní místa pro vznik velkých signalizačních komplexů, a tím umožňují spuštění řady signalizačních kaskád.

2.5.2.2 Signalizační dráhy TCR signalizace

Během aktivace T-lymfocytů dochází ke spuštění několika signalizačních drah (viz Obr.5). První dráha vede přes adaptorový protein Grb2 a výměnný faktor Sos (tzv. „guanine nucleotide exchange factor“, který vyměňuje GDP za GTP), který tímto způsobem aktivuje malý G-protein Ras, který spouští tzv. MAPK kinázovou signalizační kaskádu. Tato dráha založená na sekvenční fosforylaci a aktivaci kináz vede až k fosforylaci a aktivaci transkripčního faktoru AP-1 (heterodimer c-Fos a c-Jun).

Druhá dráha je zahájena aktivací PLC γ 1, která katalyzuje hydrolyzu fosfolipidu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PI(4,5)P $_2$) na druhé posly diacylglycerol (DAG), který zůstává zanořený do plasmatické membrány a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP $_3$), který se uvolňuje do cytoplasmy. DAG slouží jako vazebné místo pro PKC θ , jejíž aktivace vede až k fosforylaci, a tím ubiquitylaci inhibitoru navázanému a blokující funkci transkripčního

faktoru NF- κ B („nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells“). Aktivace PKC θ vede rovněž k fosforylaci a aktivaci transkripčního faktoru AP-1. Výměnný faktor RasGRP se váže na DAG, tudíž Ras je v buňkách aktivován pomocí dvou různých způsobů (Sos,RasGRP). Solubilní IP₃ se váže na receptory v membráně ER, což vede k jejich otevření a vypuštění Ca²⁺ iontů z ER. Zvýšení cytoplasmatické koncentrace Ca²⁺ iontů vyvolává další otevření Ca²⁺ kanálů CRAC („calcium-release activated calcium channels“) na plasmatické membráně. Výsledkem je výrazné zvýšení cytoplasmatické koncentrace Ca²⁺ iontů, které slouží jako druhý posel uvnitř buněk. Vazba Ca²⁺ na calmodulin vede k jeho konformační změně, která je spojená s jeho aktivací. Calmodulin následně aktivuje značné množství proteinů. Hlavním je fosfatáza kalcineurin, která defosforyluje, a tím aktivuje další transkripční faktor NFAT („nuclear factor of activated T cells“).

Třetí signalizační kaskáda je zahájena na SLP76, který po své fosforylaci Zap-70 kinázou váže SH2 domény proteinů Vav, Nck, Itk, Adap, p38, Lck a PLC γ 1 (Koretzky et al., 2006). Přítomnost Itk na povrchu SLP76 je nezbytně nutná pro plnou aktivaci PLC γ 1. Signalizační komplexy Vav, Nck a Adap slouží k reorganizaci aktinového cytoskeletu.

Poslední dráha je zahajována PI3-kinázou. Tento enzym katalyzuje fosforylaci hydroxylové skupiny v pozici 3 inositolového kruhu fosfatidylinositolfosfátů, které následně slouží jako kotvící místa. Hlavním substrátem je Akt kináza. Tato dráha vede zejména k přežití buněk, k jejich aktivaci a proliferaci. Dráha je rovněž zahájena nejen vazbou pMHC na TCR, ale také od kostimulačních molekul CD28 navázaných na CD80 či CD86.

Výsledkem všech signalizačních kaskád je aktivace transkripčních faktorů AP-1, NF- κ B a NFAT, která vede ke změněné expresi genů jako např. IL-2, CD25 a CD69, které umožňují zvýšenou proliferaci buněk, jejich aktivaci či diferenciaci (Razzaq et al., 2004).

3. Materiály a Metody

3.1 Materiály

3.1.1 Primární buňky, buněčné linie a bakteriální kmeny

- Primární buňky
 - pro izolaci RNA byl použit myší kmen C57Bl/6J, *Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA*
- Buněčné linie (v závorce je uveden původ jednotlivých buněčných linií)

- Phoenix-E (HEK 293T) - Phoenix linie stabilně exprimující ekotropní obalový protein env a gag-pol konstrukt, *Dr. Gary Nolan, Stanford University School of Medicine, Stanford, USA*
 - Wehi 231 (myší B lymfocyty), *Dr. Arthur Weiss, University of California, San Francisco, USA*
 - Jurkat-EcoR (lidské T lymfocyty) – Jurkat linie stabilně exprimující ekotropní receptor, *Dr. Arthur Weiss, University of California, San Francisco, USA*
 - BW5147 (myší T lymfocyty), *Dr. Hannes Stockinger, Medical University of Vienna, Vídeň, Rakousko*
 - EL-4 (myší T lymfocyty), *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*
- Linie Wehi 231 a Jurkat-EcoR, které byly stabilně transdukované retrovirovým vektorem pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 obsahující zaklonované kandidátní geny
 - Bakteriální kmeny *Escherichia coli* – TOP 10, *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*

3.1.2 Kultivační média

- Média pro buněčné linie
 - IMDM médium:
 - doplněno 10 % FCS, bez antibiotik (kultivace Phoenix-E před transfekcí)
 - kompletní, tj. doplněno 10 % FCS a antibiotiky (kultivace ostatních buněčných linií)
 - RPMI 1640 kompletní médium (kultivace lidských Jurkat-EcoR)
 - *Biochrom AG, Berlín, Německo*
- Bakteriální média
 - LB médium, *Amresco, Solon, Ohio, USA*
 - LB médium doplněné ampicilinem (koncentrace 100 µg/l)

3.1.3 Primery

Primery byly objednány od společnosti *Sigma, St. Louis, MO, USA*

- Fwd primer je označen zkratkou F
- Rev primer je označen zkratkou R

Název primeru	Sekvence
Fmcs1	AAAACTCGAGACGCGTGC GGCCGAGTCGACGTTAACTTAATTAAGA GCAGAAACTCATCTCTG
Fmcs2	GAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGGATCCGTGTCTAAGGGC GAAGAGCTG
Rmcs	AAAAGAATTCTATTTAATTAAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT G
FmCrtap	AGCACGCGTCTCTGGTTCGTGGGCCACGCG
RmCrtap	CCCCGTCGACCTTGGCAGACTCTCCGTCTCCAAC
FmTor1a	GGTACGCGTGTCCGGTTATGAAGCTTGGCCGG
RmTor1a	GGCAGGTCGACTGAGTCATCCAGGTAGTAGTCCAG
FmErlin2	GGATACGCGTTCCTGATGGCTCAGTTGGGAGCTG
RmErlin2	ACAGTGTGACTGAGTTCTCTTTGTGGGTGCCTC
FmSkip	CCAACGCGTGCTCCGGCTCGCACTAGATGCAGC
RmSkip	CCATGTGACTGAGATCTGTGGCTCAGGCTCATAAC
FmNipsnap3b	AAAAACGCGTCGCACCATGCTCGCGCTCCGAAG
RmNipsnap3b	GGTGTGACCGACTTCAGTGGTGAAAATGATGTTG
FmKdelc2	GGCACGCGTAGCTGAGAGCCGGCGACCATG
RmKdelc2	CTGGGTGACTGAAAGCTCTTCCCTCTCAGGCCTC
FmPdzk1ip1	AAACACGCGTAGTGGACCGAGGTCCTACAGCTGCC
RmPdzk1ip1	GAGAGTCGACACACATGGGTGTGCTGCGGACCCTGCC
FmStyk1	CTGTACGCGTAACAGAGGAGTTGGCCCTGTG
RmStyk1	AGGAGTCGACACAAAGGACACTGAAGCTATAGGAAATGCTTTCTGCC
FmKiaa0317	GCTGACGCGTGGCGTTGAAGAGACCTGATGTTTTACG
RmKiaa0317	AGAGGTCGACACAGAGCATGCCAAAGCCCTCGCAAC
Fwd2_seq_Kiaa	AACCAACAATTCCATGTCCC
Fwd3_seq_Kiaa	GTGGATGACGGCATTCTAG
FmAcpl2	AAGAACGCGTAGGCCACACAACAATGCTTCACCG
RmAcpl2-004	TGAAGTCGACGTAGGCCCTTCCCCATGACAGGC
RmAcpl2-007	TTTTGTGACACAGCAGCTGGCCATTGACGAGATGC
FmItm2b	CCTAACGCGTCCCAGGCCGCACCATGGTGAAG
RmItm2b	TCTTGTGACGCAAGAACAATTAAGTCTCCACAGCAAATTTGTTC
FmCreg1	AGGGACGCGTCAGTCAGCGTCATGGCTGCCCGTG
RmCreg1	TTATGTGACACACTGCAGCGTGACGTTAAAATATTCTTCAGGTG
FmAdap1-001	GACGACGCGTTGGCCGCGCAGCCATGGCCGG
FmAdap1-202	TTCAACGCGTTATCTTGCAGTTCATGGCATCTCATGGGAACGAGGCTG
RmAdap1	GCTTGTGACGCTAGGGTTTATGCTTGAAGTGGGCTTCCACTGCGTACTC
FmLmtk2	GACCGCGGCCGCGACGAGATGCCGGGGCCGCG
RmLmtk2	CTACGTTAACGTAGTCTTGTCTCCGTCTTCACTGCTGCCTCC
FmShp1_phospho_domain	AAAAACGCGTGCCATGGCTACTCGGGTAAACGCAGCTG

RmShp1_phospho_domain	TTTTGTGCGACCTTCCTCTTGAGAGAACCTTTGTTCTTCTCC
FmLat	GCAGACGCGTCTGTGGCAGGTGCTCTGCAG
RmLat	TAGGGTCGACGTTAAGCTCCTGCAGATTCTCATAGTC
Fwd_MSCV_seq	CCCCTTGAACCTCCTCG
pBABE 5' seq	CTTTATCCAGCCCTCAC
Fwd2_TagRFP-T_seq	CAGAACCTTCATCAACCACAC
R_TagRFP-T_seq	TCTCCTTAATCAGCTCTTCG

3.1.4 Plasmidy

- TagRFP-T/pcDNA3.1, *Dr. Roger Tsien, University of California, San Francisco, USA*
- pMSCV-IRES-GFP, *Clontech laboratories, Mountain view, CA, USA*
- pMSCV-IRES-Thy1.1, připraven z pMSCV-IRES-GFP restrikčním vyštěpením GFP (enzymy EcoR I a Cla I) a vložením Thy1.1 na jeho pozici, *Dr.P.Otahal, Oddělení molekulární imunologie, ÚMG AV ČR, Praha, ČR*
- pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 (příprava tohoto konstruktu je detailně popsána v kap 4.2.2)
- jednotlivé kandidátní geny a kontroly/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1
- pCL-Eco, *Addgene Inc, Cambridge, MA, USA*, původní zdroj(Naviaux et al., 1996)

3.1.5 Komerční soupravy pro molekulární biologii

- Mini RNA Isolation™ II kit, *Zymo Research, Orange, USA*
- Gel DNA recovery kit, *Zymo Research, Orange, USA*
- DNA clean and concentrator kit, *Zymo Research, Orange, USA*
- Plasmid Purification Midi kit, *Jet-star® GENOMED GmbH, Löhne, Německo*
- ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit, *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*

3.1.6 Enzymy

- SuperScript™ III Reverzní transkriptáza, RNáza H, *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*
- Phusion® High-Fidelity DNA Polymeráza, *Finnzyme, Espoo, Finsko*
- Restrikční enzymy (Xho I, EcoR I, Mlu I, Sal I), T4 DNA ligáza, *Fermentas International, Burlington, Ontario, Kanada*

3.1.7 Protilátky

Název	Specifita (klon)	Specifita fluorochromu	Dodavatel
anti-Thy1.1-FITC	Thy1.1 (HIS51)	FITC	<i>eBioscience, San Diego, CA, USA</i>
H57	myší TCR (H57), klonotypická	-----	<i>Laboratoř molekulární imunologie, UMG AV ČR, Praha, ČR</i>
2C11	myší TCR (2C11)	-----	<i>Laboratoř molekulární imunologie, UMG AV ČR, Praha, ČR</i>
C305	lidská TCR (C305), klonotypická	-----	<i>Laboratoř molekulární imunologie, UMG AV ČR, Praha, ČR</i>
Anti-CD69-PE-Cy7	myší CD69 (H1.2F3)	PE-Cy7	<i>eBioscience, San Diego, CA, USA</i>
Anti-CD69-Alexa647	lidská CD69 (FN 50)	Alexa 647	<i>Exbio, Vestec, ČR</i>
anti-TCR-PE-Alexa750	lidská TCR (C305)	PE-Alexa750	<i>Exbio, Vestec, ČR</i>
anti-mTCR-FITC	myší TCR (H57)	FITC	<i>Laboratoř molekulární imunologie, UMG AV ČR, Praha, ČR</i>

3.1.8 Chemikálie

- fetální telecí sérum (FCS), *Gibco BRL[®], Paisley, UK*
- agarose ITM, *Amresco, Solon, Ohio, USA*
- standarty pro DNA elektroforézu, dNTP, *Fermentas International, Burlington, Ontario, Kanada*
- lipofectamineTM 2000, LysoTracker[®] Green DND-26, *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*
- ampicilin, Polybrene[®], EDTA, Tris, trypsin, Orange G, glycerol, TAE, DMSO, azid, D-glukóza, ethidiumbromid (EtBr), PMA, Ionomycin, Hoechst 33258, Hoechst 54580, 1,4-dithio-D,L-treitol (DTT), HEPES, *Sigma, St. Louis, MO, USA*
- chlorid sodný (NaCl), hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), isopropanol ((CH₃)₂CHOH), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH₂PO₄), hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄), octan draselný (CH₃COOK), kyselina octová (CH₃COOH), želatina, chlorid amonný (NH₄Cl), hydrogenuhličitan draselný (KHCO₃), *Lachema, Praha, ČR*
- ethanol (C₂H₅OH), chlorid vápenatý (CaCl₂), n-dodecylsírán sodný (SDS), chlorid hořečnatý (MgCl₂), *Merck, Darmstadt, Německo*

- RNase free voda – *Bioline, Londýn, Velká Británie*

3.1.9 Složení použitých roztoků

- PBS („Phosphate Buffered Saline“)
 - 1,9 mM NaH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH = 7,2
- LB médium
 - 10 g „, Trypton-B“, 5 g kvasinkový autolyzát („,Yeast Extract-B“), 10 g NaCl v 1 litru; pH=7,0
- LB-Amp agar
 - LB médium obsahující 100 µg/ml ampicilinu + 1,5 % agar
- LB-Amp médium
 - LB médium obsahující 100 µg/l ampicilinu
- Trypsin-EDTA (T/E)
 - 0,025 % Trypsin, 0,01 % EDTA, pH=8
- vzorkový pufr pro DNA elektroforézu
 - 30 % glycerol a 0,25 % Orange G ve vodě
- TAE
 - 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH = 8
- HBSS („Hank´s Balanced Salt Solution“)
 - 5,4 mM KCl, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 0,4 mM MgSO₄, 137 mM NaCl, 0,3 mM Na₂HPO₄, 1,3 mM CaCl₂, 5,5 mM D-glukóza, pH = 6,5
- HBSS roztok pro mikroskopii
 - 1x HBSS, 2 % FCS, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH = 7,4
- PBS + GA
 - 1x PBS + 0,2 % želatina + 0,1 % azid
- PMS pufr
 - 1,5 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 1 mg/ml glukózy v 1x PBS, pH= 7,4
- roztok I miniprepu
 - 50mM glukóza, 25mM Tris (pH = 8), 10mM EDTA (pH = 8), Rnáza
- roztok II miniprepu
 - 0,2 M NaOH, 1% SDS

- roztok III miniprepu
 - 60 ml 3M octanu draselného, 11,5 ml ledové kyseliny octové, 28,5 ml H₂O
- zamrazovací roztok pro buněčné linie
 - 10 % DMSO, 45 % FCS v příslušném kultivačním médiu

3.1.10 Ostatní materiál

- misky pro tkáňové kultury o Ø 10cm; destičky pro tkáňové kultury (96, 24, 12 a 6 jamek), *TPP, Trasadingen, Švýcarsko*
- 96-jamkové polypropylenové destičky s U-dnem „Corning® CellBIND® ” na FACS, *Corning Costar, Acton, MA, USA*
- bakteriální misky BD Falcon™ o Ø 10cm, bakteriální destičky (24 a 6 jamek) BD Falcon™, *BD Biosciences, San Jose, California, USA*
- láhve pro tkáňové kultury (povrch 25, 75, 150 cm²), *TPP, Trasadingen, Švýcarsko*
- Lab-Tek® komůrky, *Nunc, Roskilde, Dánsko*
- plastové zkumavky 0,5 a 1,5 ml, PCR stripy 8x0,2 ml, *Eppendorf, Hamburg, Německo*
- centrifugační zkumavky: 15 ml, 50 ml, *TPP, Trasadingen, Švýcarsko*
- ampulky na zamrazování buněk NUNC CRYOTUBE™ VIALS, *Nunc, Roskilde, Dánsko*
- homogenizátor, *P-Lab, Praha, ČR*

3.1.11 Laboratorní přístroje a zařízení

- XP Cyclor, Bioer, *Hangzhou, Čína*
- Spektrofotometer Eppendorf Biophotometer, centrifugy Eppendorf 5810 R, 5415 D, 5417 R, *Eppendorf, Hamburg, Německo*
- centrifuga Hettich Universal 30 RF, *Hettich, Tuttlingen, Německo*
- NanoDrop ND1000, *Thermo Scientific, DE, USA*
- fluorescenční mikroskop Leica DMI 6000, konfokální mikroskop Leica TCS SP5, *Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Německo*
- horizontální elektroforetická jednotka HE 33 Mini Submarine Electrophoresis Unit - *Hofer, MA, USA*
- elektroforetický zdroj PS500XT – *Hofer, MA, USA*
- transluminátor, *UltraLum, CA, USA*

- průtokový cytometer BD™ LSR II, *BD Biosciences, San Jose, CA, USA*
- zamrazovací krabička NALGENE™ Cryo 1°C Freezing container, *Nalgene, Rochester, NY, USA*
- vortex Genie 2, *Scientific Industries, New York, USA*
- termobloček Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, *Eppendorf, Hamburg, Německo*
- třepačka na bakteriální kultury, *SHEL-LAB, Cornelius, OR, USA*
- sada pipet, *Gilson, WI, USA*

3.2 Metody

3.2.1 Izolace buněk z myších tkání

Tkáně byly izolovány z C57Bl/6J myšího kmene. Myši byly usmrceny zlomením vazů a následně z nich byly odebrány příslušné tkáně, které byly ihned opláchnuty v ledově vychlazeném sterilním 1x PBS.

3.2.2 RNA izolace

RNA byla izolována pomocí komerční soupravy Mini RNA Isolation II™ (*Zymo Research*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce. Byla použita tkáň o maximální hmotnosti 20 ng (nadměrné množství vstupní tkáně může kolonku ucpat a izolace RNA neproběhne optimálně). Vyizolovaná tkáň byla ihned po opláchnutí v ledovém PBS přenesena do 600 µl lyzačního pufu (součástí soupravy), aby se snížila možnost rozpadu RNA. Tkáň v něm byla za pomoci homogenizátoru zhomogenizována na jednotlivé buňky, které již podléhaly účinkům lyzačního pufu. Pokud se zbytky tkáně ve zkumavce vyskytovaly i po homogenizaci, byly stočeny (1', 500 g, RT) a pouze supernatant byl odebrán, aby kousky tkáně neucpaly kolonku.

3.2.3 Reverzní transkripce

SuperScript™ III reverzní transkriptáza (*Invitrogen*) byla použita k přípravě prvního vlákna cDNA z izolované tkáně. Na přepis bylo vzato 400 ng celkové RNA (kvalita a koncentrace RNA z jednotlivých tkání byla změřena na přístroji NanoDrop). Pro reakci byla použita kombinace ukotvených oligo(dT)₂₀ primerů a náhodných pentadekamer primerů, která umožňuje přepis dlouhých mRNA. Ukotvené oligo(dT)₂₀ primery obsahují na svém 3' konci

před oligo(dT) sekvencí kombinaci všech čtyř nukleotidů, a proto na rozdíl od neukotvených oligo(dT)₂₀ primerů nasedají ihned na počátek polyA konce a snižuje se tak riziko nedosyntetizování cDNA až k 5' konci v případě dlouhých polyA konců. Reakce byla provedena v objemu 20 µl s následujícím postupem:

1. Byla smíchána první část reakce s následujícím složením a směs inkubována 5 minut při 65°C a 1 minutu na ledě:
 - 0,5 µl ukotvených oligo(dT)₂₀ primerů (100 µM)
 - 0,5 µl náhodných pentadekamerů (100 µM)
 - x µl RNA (odpovídající 400 ng RNA)
 - 1 µl 10 mM dNTP mix
 - do 13 µl sterilní, RNA-free H₂O
2. Ke směsi byla přidána již připravená druhá část reakce s následujícím složením:
 - 4 µl 5X First-Strand Buffer
 - 1 µl 0.1 M DTT
 - 1 µl RNaseOUT™ Recombinant Rnase Inhibitor
 - 1 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (200 U/ µl)
3. Obsah ependorf zkumavky byl propipetován a inkubován:
 - 5 minut při 25°C (při použití náhodných primerů)
 - 50 minut při 50°C (syntéza cDNA)
 - 15 minut při 70°C (teplotní inaktivace reverzní transkriptázy)
4. Nakonec byl přidán 1 µl RNázy H (2 U) a následovala inkubace 20 minut při 37°C. Tento krok navíc je zvláště nutný u genů větších než 1 kbp, kdy je ještě nezbytné odstranit komplementární RNA z cDNA. Jelikož většina našich kandidátních genů tuto vlastnost splňovala, tento krok byl do přípravy cDNA vždy zařazen.

3.2.4 Návrh primerů pro klonování kandidátních genů

Specifické primery pro klonování kandidátních genů metodou polymerázové řetězové reakce (viz dále) byly navrženy ručně. Fwd primer nasedající na 5' konec amplifikovaného úseku byl navržen do 5' nepřekládané oblasti cDNA (UTR). Rev primer nasedající na 3' konec amplifikovaného úseku byl navržen do stop kodonu cDNA a části 3' UTR. Stop kodon musel být mutován, aby se vytvořil fúzní protein kandidátní protein-TagRFP-T. Fwd primer na svém 5' konci obsahoval Mlu I restrikční místo (resp. Not I pro *Lmtk2* gen), rev primer obsahoval restrikční místo Sal I (resp. Hpa I pro gen *Lmtk2*). Tato restrikční místa byla

následně použita pro vložení cDNA produktů do pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 vektoru.

Přestože většina myších genů má pouze jednu transkripční variantu, na kterou jsem navrhovala primery, geny *Nipsnap3b*, *Pdzk1ip1*, *Acpl2*, *Creg1*, *Adap1* mají transkripčních variant více. Abychom zachytili všechny varianty, jednotlivé transkripty byly porovnány a v případě rozdílností v 5' UTR a 3' UTR byly navrženy specifické primery pro jednotlivé transkripční varianty:

<i>Nipsnap3b</i>	počet transkriptů	2 varianty. Shodné sekvence v 5' UTR i 3' UTR, pouze variantě <i>Nipsnap3b</i> -002 chybí interní exon 4, tudíž navržené primery na klonování amplifikovaly oba transkripty. Tyto transkripční varianty bylo však možné následně odlišit dle velikosti v agarózovém gelu.
<i>Pdzk1ip1</i>	počet transkriptů	2 varianty. Shodují se v 5' UTR, 3' UTR v blízkosti kódující sekvence i v délce a aminokyselinové sekvenci proteinu. Pomocí PCR byly amplifikovány obě varianty, které jsme nebyli schopni na agarózovém gelu odlišit. Jelikož však transkripty kódují stejný protein, nezáleželo z funkčního hlediska analýzy na vyklonované transkripční variantě.
<i>Acpl2</i>	počet transkriptů	5 variant. Všechny se shodují v 5' UTR v blízkosti kódující sekvence, navržen společný Fwd primer. Transkripty <i>Acpl2</i> -001, -002, -003, -004 se shodují v délce a sekvenci proteinu, stejně tak v 3' UTR = navržen společný Rev-004 primer. Transkripční varianta <i>Acpl2</i> -007 kóduje protein zkrácený na C-konci, rovněž postrádá 3' UTR = navržen speciální Rev-007 primer. Na gelu bylo tedy možné velikostně odlišit první 4 varianty společně pojmenované <i>Acpl2</i> -004, od poslední varianty <i>Acpl2</i> -007.
<i>Creg1</i>	počet transkriptů	2 varianty. Kratší variantě chybí N-konec proteinu, který obsahuje predikovanou TM oblast, proto byly navrženy primery pouze na dlouhou variantu <i>Creg1</i> -001.
<i>Adap1</i>	počet transkriptů	3 varianty. Existenci transkriptu <i>Adap1</i> -201 podporuje pouze jeden EST, z tohoto důvodu byl z analýzy vyřazen. Zbylé varianty se shodují v 3' UTR = navržen společný Rev primer. Liší se v 5' UTR a <i>Adap1</i> -202 variantě chybí N-koncová sekvence proteinu, která dle databáze Ensembl obsahuje predikovanou oblast s nízkou uspořádaností, což indikuje možnou přítomnost TM oblasti. Nicméně jsme se rozhodli použít transkripční variantu <i>Adap1</i> -202 jako cytoplasmatickou kontrolu lokalizace proteinu. Proto byly navrženy dva specifické fwd primery <i>Adap1</i> -001 a <i>Adap1</i> -202.

3.2.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k amplifikaci úseku DNA *in vitro* pomocí specifických primerů nasedajících na 5' a 3' konec daného úseku. Pro amplifikaci jsem zvolila Phusion® High-Fidelity DNA Polymerázu (*Finnzyme*), která se vyznačuje vysokou

rychlostí a nejnižší chybovostí ($4,4 \times 10^{-7}$) během syntézy DNA mezi termostabilními polymerázami na trhu, což ji činí zvláště vhodnou pro klonování genů. Je dodávána spolu s dvěma druhy pufrů (5x Phusion HF pufr, 5x Phusion® GC pufr). Jako základní pufr jsem používala HF pufr, ve kterém má polymeráza uvedenou chybovost. GC pufr jsem použila pro GC bohaté sekvence nebo sekvence se sekundární strukturou. GC pufr zvyšuje pravděpodobnost pročení polymerázy přes tyto sekvence, avšak na druhou stranu zvyšuje její chybovost (9×10^{-7}). Jednořetězcová cDNA připravená z myších tkání a plazmid TagRFP-T/pcDNA3.1 byla použita jako templát. Reakce pro kandidátní geny byla provedena v objemu 50 μ l, vše bylo smícháno na ledě v následujícím pořadí a složení:

- 29,5 μ l H₂O (tkáňová voda)
- 10 μ l 5x Phusion HF/GC pufr
- 1 μ l 10 mM dNTP
- 5 μ l primerů (Fwd + Rv (celkově 5 μ M), tj. finální koncentrace primerů v 50 μ l reakci c= 0,5 μ M)
- 4 μ l templátové cDNA (80 ng)
- 0,5 μ l Phusion DNA Polymerázy (2U/ μ l)

Promíchaná reakční směs byla vložena do cycleru. V cycleru byl vytvořen teplotní gradient, aby se jednotlivé kandidátní geny mohly amplifikovat spolu, avšak byla dodržena optimální nasedací teplota jejich specifických primerů (optimální teplota se rovná nižší teplotě tání z dvojice primerů zvětšená o 3°C, tj. T_m+3°C). Doba syntézy DNA byla optimalizována na délku kandidátních genů (je třeba 30-40s na 1 kbp DNA).

Následující programy byly použity pro amplifikaci kandidátních genů a kontrol:

- PCR reakce pro geny do 2000 bp:

Teplotní gradient 62-72°C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
62°C	62,5°C	63,5°C	64,1°C	65,5°C	66,7°C	67,6°C	68,9°C	70,1°C	71,1°C	71,7°C	72°C
	mShp-1	Nipsnap3b	mLat		Erlin2		Torsin1a		Kdelc2		Crtap
					Skip						

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
66°C	66,5°C	67,2°C	68,1°C	69,5°C	70,7°C	71,6°C	72,9°C	74,1°C	75,1°C	75,7°C	76°C
Acpl2-007		Acpl2-004	Itm2b	Creg1	Pdzk1ip1		Adap1-001				
				Styk1			Adap1-202				

Název kroku	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98°C	30s	1
Denaturace	98°C	10s	45
Nasednutí primerů	62-72°C 66-76°C	20s	
Prodlužování primerů a syntéza DNA	72°C	1:20	
Finální syntéza DNA	72°C	10min	

- PCR reakce pro geny 2500 bp – 4400 bp:

Teplotní gradient 68-74°C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
68°C	68,4°C	68,7°C	69,3°C	70,1°C	70,8°C	71,4°C	72,1°C	72,9°C	73,5°C	73,8°C	74°C
		Kiaa0317					Lmtk2				

Název kroku	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98°C	30s	1
Denaturace	98°C	10s	45
Nasednutí primerů	68-74°C	20s	
Prodlužování primerů a syntéza DNA	72°C	3min	
Finální syntéza DNA	72°C	10min	

Červený fluorescenční protein TagRFP-T byl amplifikován z TagRFP-T/pcDNA3.1 vektoru za použití jednokrokové PCR reakce s následujícím složením reakční směsi a amplifikačním programem:

- 22,5 µl H₂O (tkáňová voda)
- 10 µl 5x Phusion HF pufr
- 1 µl 10 mM dNTP
- 5 µl Fmcs1 primeru (5 µM) – finální koncentrace v 50 µl reakci c= 0,5 µM
- 5 µl Fmcs2 primeru (0,05 µM) - finální koncentrace v 50 µl reakci c=0,005 µM
- 5 µl Rmcs primeru (5 µM) - finální koncentrace v 50 µl reakci c=0,5 µM
- 1 µl templátové DNA (10 ng) – TagRFP-T/pcDNA3.1
- 0,5 µl Phusion DNA Polymerázy (2U/ µl)

Stupňovaný gradient:

Název kroku	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98°C	30s	1
Denaturace	98°C	10s	35
Nasednutí primerů	56°C	20s	
Prodlužování primerů a syntéza DNA	72°C	40s	
Denaturace	98°C	10s	25
Nasednutí primerů	52°C	20s	
Prodlužování primerů a syntéza DNA	72°C	40s	
Finální syntéza DNA	72°C	10min	

3.2.6 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Elektroforéza DNA v agarózovém gelu slouží k separaci fragmentů DNA dle jejich velikosti. Byl použit 1% agarózový gel, který byl připraven rozvařením příslušného množství agarózy v 1x TAE. Ethidiumbromid (EtBr) v množství 0,5 µg/ml byl přidán do gelu po jeho zchlazení přibližně na 60-70°C. Elektroforéza probíhala při napětí 100-130V. Separovaná DNA byla v gelu vizualizovaná pomocí fluorescence do DNA interkalovaného EtBr v UV světle v transluminátoru.

3.2.7 Izolace DNA z agarózového gelu

Separovaná DNA byla z agarózového gelu izolována pomocí komerční soupravy Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research*). Při izolaci bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.2.8 Restrikční štěpení DNA

Štěpení DNA bylo prováděno restrikčními endonukleázami v objemu 20 µl po dobu 2-3 hodin při 37°C. Následovala teplotní inaktivace enzymů 20 minut při 80°C. Reakční pufrы a množství enzymů byly použity dle doporučení výrobce.

3.2.9 Ligace

Ligace je metoda, při které jsou spojeny dva fragmenty DNA, které byly předem restrikčně naštěpeny, v mém případě linearizovaný vektor a vkládaný inzert (PCR produkt). Ligace je katalyzována T4 DNA ligázou (*Fermentas*), která vytváří fosfodiesterové vazby mezi sousedními nukleotidy.

Objem ligační směsi byl 20 μl s maximálním množstvím 100 ng DNA, přičemž platilo, že množství vektoru bylo 7 krát větší než inzertu (odhadnuto dle množství DNA na agarózovém gelu). Reakce byla prováděna následujícím postupem s příkladem nejčastějšího složení:

- 0,5 μl vektoru
- 5 μl inzertu
- 2 μl 10x ligační pufr
- 12,2 μl H_2O

Tato ligační směs byla zahřáta 1 minutu na 45°C (rozrušení vodíkových můstků), poté byla inkubována 2 minuty na ledu. Na ledu bylo rovněž přidáno 0,3 μl T4 DNA ligázy a kompletní ligační směs byla inkubována bez třepání při 16°C přes noc (12-16 hodin).

3.2.10 Transformace DNA do kompetentních bakterií

Transformace je proces, při kterém bakterie přijímají z vnějšího prostředí cizorodou DNA. Pro účinnou transformaci se v laboratorním prostředí používají tzv. kompetentní bakterie, které jsou schopné se zvýšenou účinností přijímat tuto cizí DNA a v rámci svého dělení ji replikovat (v mém případě TOP10 bakteriální kmen *E.coli*). Slouží tedy k amplifikaci původně malého množství vnesené DNA – plazmidu, který nese tzv. ori segment („origin of replication“). Pro samotnou transformaci je nutné cytoplazmatickou membránu destabilizovat, k tomu se nejčastěji využívají vápenaté ionty nebo krátký mírný teplotní šok.

TOP10 bakterie (skladované při -80°C) byly ponechány pomalu rozmrznout na ledu. Poté byly rozděleny po 50 μl do předem vychlazených zkumavek, smíchány s 5 μl ligační směsi nebo 1 μg ověřené plazmidové DNA, transformační směs se jemně protřepala a inkubovala 30 minut na ledu. Následně byla směs vystavena teplotnímu šoku 42°C po dobu 45s bez třepání a ihned poté zchlazena 2-3 minuty na ledu. Po přidání 1ml LB média bez antibiotik byla transformační směs třepána naplno (1400 RPM) při 37°C po dobu 1 hodiny. Objem bakteriální suspenze byl centrifugací upraven na 100 μl , promíchán pomocí pipety a rozetřen sterilní laboratorní hokejkou po povrchu LB-agaru s ampicilinem na Petriho misce (\varnothing 10 cm). Bakterie byly kultivovány 12-16 hodin při 37°C dnem vzhůru, aby kondenzující kapalina nekapala na rostoucí bakterie a nesmíchala tak jednotlivé kolonie.

3.2.11 Minipreparativní izolace DNA alkalickou lyzí

Minipreparativní izolace DNA alkalickou lyzí je používána k přípravě malého množství DNA horší čistoty, jelikož obsahuje zbytky složek bakterií. Tato metoda je však postačující například pro restriční ověření přítomnosti vnášeného inzertu ve vektoru. Pro sekvenaci či transfekci je však třeba tuto DNA přečistit pomocí komerční soupravy „DNA clean and concentrator“ (*Zymo research*).

Jednotlivé bakteriální klony (narostlé kolonie na Petriho misce) byly zaočkovány do 1,8 ml LB média s ampicilinem v 24-jamkové bakteriální desce a třepány (200 RPM) při 37°C přes noc (12-16 hodin). Druhý den ráno bylo odebráno 1,5 ml bakteriální suspenze z každé jamky a stočeno v centrifuze ve 1,5 ml zkumavkách (30', 18 000 g, 4°C). Pelety byly resuspendovány ve 100 µl roztoku I, poté bylo přidáno 200 µl roztoku II a obsah zkumavek byl promíchán rychlým otáčením (lyze buněk). Nakonec bylo přidáno 150 µl ledového roztoku III, směs byla lehce protřepána víčkem dolů, inkubována 3-5 minut na ledu (denaturace proteinů) a stočena (5', 18 000 g, 4°C). Supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté zkumavky, smíchán s 2 objemy 100 % ethanolu a DNA byla precipitována inkubací po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Vysrážená DNA byla oddělena centrifugací (10-15', 18 000 g, 4°C). Peleta byla opláchnuta 200 µl 70 % ethanolu a ponechána vysušit na stole (vyschlá peleta musela být průhledná). Poté byla rozpuštěna v 50 µl H₂O a miniprep byl použit dál nebo skladován při -20°C.

3.2.12 Midipreparativní izolace DNA komerční soupravou

Touto metodou lze získat DNA poměrně dostatečného množství a čistoty. DNA byla izolována komerční soupravou Plasmid Purification Midi kit (*Jet-star*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.13 Sekvenace

Komerční souprava ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*) byla použita k sekvenaci DNA. Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce. Připravené vzorky byly analyzovány sekvenačním servisem MBÚ AV ČR.

3.2.14 Nasazení Phoenix-Eco

Ekotropní Phoenix linie byly pro transfekci nasazeny den předem do IMDM média s FCS bez antibiotik, jelikož kultivace s antibiotiky během transfekce způsobuje nadměrnou buněčnou smrt. Tyto adherentní buněčné linie byly uvolněny z povrchu misek pro tkáňové kultury pomocí vytemperovaného T/E roztoku. Buňky pak byly nasazeny do nových jamek tak, aby konfluence činila okolo 50 % v době transfekce.

3.2.15 Transfekce Lipofectaminem™ 2000

Pro transientní expresi proteinů z cizorodé DNA v eukaryotických buňkách, se tato DNA vnáší do buněk pomocí transfekce. Existuje mnoho transfekčních metod, avšak transfekce Lipofectaminem™ 2000 patří k nejšetrnějším z nich a je vhodná pro řadu adherentních buněk. Je založena na vytvoření relativně malých komplexů DNA s kladně nabitým Lipofectaminem.

K transfekci v 6-jamkové destičce pro tkáňové kultury bylo použito na jednu jamku vždy celkem 4 µg DNA (3 díly kandidátní gen/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 : 1 dílu pCL-Eco plazmidu) a 10 µl transfekčního činidla (Lipofectamin™ 2000). Celý transfekční proces byl prováděn v bezsérovém médiu bez antibiotik. Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

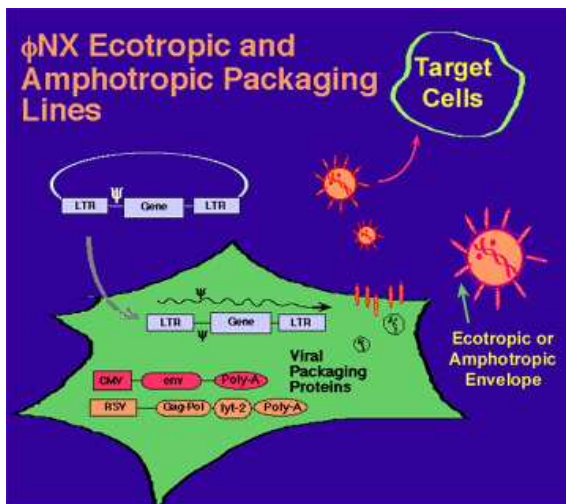
3.2.16 Retrovirová infekce

Retrovirová infekce, která vede k integraci vnesené DNA do genomu hostitelské buňky, se používá pro vytvoření buněčných linií, které stabilně exprimují cizorodou DNA. Přestože při transfekci dochází k náhodné integraci plazmidů do genomu, účinnost je velice nízká a pro vytvoření stabilně exprimující linie nedostačující. Proces zprostředkovaný retrovirovou infekcí je mnohem efektivnější. Viriony nesou kromě vektoru a polymerázy i enzym integrázu, který do genomu dělících se buněk náhodně integruje retrovirový vektor v jedné či více kopiích.

Samotné virové vektory neobsahují z bezpečnostních důvodů geny pro integraci, replikaci a složení virionu. Kódují pouze promotory (LTR, „long terminal repeat“) a sekvenci pakážovacího signálu, která slouží jako vazebné místo pro proteiny tvořící základ virionu. Pro kompletní složení virionů byly vytvořeny tzv. pakážovací linie (např. Phoenix linie), které stabilně exprimují tři základní geny *gag*, *pol* a *env* nutné pro sestavení a plnou funkčnost virových partikulí (viz Obr.5):

- *env* gen kóduje kapsidový obalový protein, který existuje ve třech experimentálně používaných variantách:
 - ekotropní (pochází z MoMuLV), který se specificky váže pouze na ekotropní receptor na povrchu myších a krysích buněk
 - amfotropní (pochází z 4070A MuLV) se schopností vázat se na receptory všech savců a některých dalších obratlovců, s výjimkou křečka
 - 10A1 (pochází z MuLV) se schopností vázat se na receptory všech savců a některých dalších obratlovců, včetně křečka
- *gag* („group of antigens“) gen kóduje proteiny tvořící matrix, kapsidu a jádro virionu
- *pol* gen kóduje reverzní transkriptázu (RNA-dependentní DNA polymerázu) s RNázovou-H aktivitou a integrázu

Env a gag-pol konstrukty jsou exprimovány z dvou odlišných promotorů na různých plazmidech, tudíž by bylo zapotřebí tří rekombinačních procesů k vytvoření viru nesoucího důležité geny *gag*, *pol* a *env* a který by byl schopný vlastní infekce. Toto uspořádání je dalším bezpečnostním prvkem při manipulaci s virovými vektory vedle vytvoření samotných pakážovacích linií. Nicméně k náhodným rekombinacím vedoucím k vytvoření replikačně kompetentního viru docházet může při titrech virů $> 10^8$ /ml, což je běžná hodnota používaná v laboratořích a je nutné s viry pracovat dle přísných bezpečnostních pravidel.



Obr. 6. Schéma pakážovací linie Phoenix a tvorby virionů (převzato z internetových stránek laboratoře Dr. Garyho Nolana¹⁰): Pakážovací linie Phoenix exprimuje z bezpečnostního hlediska konstrukty *env* a *gag-pol* (tři základní geny pro tvorbu virionů) pod různými promotory z dvou odlišných plazmidů. Po vnesení retrovirového vektoru obsahujícího promotor LTR, sekvenci pakážovacího signálu a sledovaný gen do buněk, dochází uvnitř buněk ke složení funkčních virionů a jejich pučení ven z buněk.

¹⁰ http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html

Po transfekci retrovirového vektoru do pakážovací linie dochází k sestavení virových částic, které se uvolňují do média nad buňkami, ze kterého jsou viriony poté izolovány. Pro zvýšení účinnosti infekce jsem do pakážovacích linií spolu s retrovirovými vektory transfekovala ještě pomocný plazmid pCL-Eco (Naviaux et al., 1996). Tento plazmid exprimuje základní retrovirové geny *gag*, *pol* a *env*, tím zvyšuje koncentraci těchto proteinů v pakážovací linii, což vede k produkci většího počtu virionů.

Celý postup retrovirové infekce zahrnoval několik kroků:

- Den 1 – nasazení pakážovacích buněk Phoenix-Eco do 6-jamkové destičky pro tkáňové kultury (viz kap. 3.2.14)
- Den 2 – transfekce Phoenix-Eco LipofectaminemTM 2000 (viz kap. 3.2.15)
- Den 3 – bez zásahu
- Den 4 – První retrovirová infekce
 1. Supernatant obsahující virové partikule byl odebrán z Phoenix-Eco linie a nahrazen 1 ml čerstvého média. Centrifugací byl zbaven zbytků pakážovacích buněk (5', 450 g, RT) a samotný supernatant byl smíchán s polybrenem. Polybren je kationtový polymer, který neutralizuje odpuzující náboj mezi viriony a plazmatickou membránou, a tak usnadňuje infekci. Koncentrace polybrenu se lišila dle druhu infikované buněčné linie v rozmezí 2-10 µg/ml finální koncentrace na jamku (příliš vysoká koncentrace je pro buňky toxická).
 2. Buněčné linie určené k infekci byly spočítány a po 500 000 buňkách (optimální množství buněk pro infekci v 24-jamkové destičce) nanášeny do destičky. Objem média byl upraven centrifugací (5', 300 g, RT) v případě produkce virionů do stejného média, v jakém rostou buněčné linie určené k infekci. V opačném případě byly buněčné linie ponechány v 0,5 ml svého růstového média. Množství buněk je kritické, jelikož retrovirový vektor je schopen se integrovat pouze do genomu dělících se buněk. Pokud je nanášeno na jamku příliš buněk, spotřebují brzy médium a přestanou se dělit, což sníží procento trasdukovaných buněk.
 3. Buňky v destičce byly resuspendovány (stejně růstové médium) či smíchány v poměru 1:1 (rozdílné médium) s 0,5 ml virového supernatantu s polybrenem.
 4. Destička byla stočena (90', 1250 g, 30°C) s pomalou brzdou (buňky jsou rovnoměrně rozprostřené po dně jamek).
 5. 4-6 hodin po stočení bylo buňkám doplněno čerstvé médium, aby měly optimální růstové podmínky a následovala inkubace při 37°C přes noc (12-16 hodin).

Kombinace polybrenu, který neutralizuje náboj mezi buňkami a viriony, a centrifugace, při které se stočí virové agregáty a části membrán s pučícími viry na buňky, je esenciální pro úspěšnou virovou infekci. Vynechání těchto kroků vede ke sníženému procentu infikovaných buněk.

- Den 5 – Druhá retrovirová infekce

Je-li třeba zvýšit procento infikovaných buněk, provádí se druhá retrovirová infekce. Tímto způsobem jsem také postupovala.

1. Opět se odebral virový supernatant z Phoenix-Eco, byl stočen (5', 450 g, RT) a smíchán s určeným množstvím polybrenu. V tomto kroku jsem analyzovala pakážovací linie na procento pozitivně transfekovaných buněk pomocí průtokového cytometru.
2. Destička se stočila (5', 300 g, RT) a opatrně bylo odsáto médium. 0,5 ml původního média se ponechalo buněčným liniím rostoucím v rozdílném médiu než do kterého se produkuje virový supernatant.
3. Buňky se poté resuspendovaly v 0,5 ml nového virového supernatantu s polybrenem.
4. Destička byla stočena (90', 1250 g, 30°C), po 4-6 hodinách přidáno čerstvé médium a buňky v destičce inkubovány při 37°C přes noc (12-16 hodin).

- Den 6 – výměna média na infikovaných buňkách

Den po infekci bylo třeba buňky v destičce stočit (5', 300 g, RT), odsát médium obsahující virové partikule s polybrenem a nahradit ho 2 ml čerstvého média. Buňky se dále inkubovaly přes noc při 37°C. Tento krok je důležitý zvláště při používání amfotropních pakážovacích linií z důvodu bezpečnosti práce. Tento krok vynechatelný je v případě práce s ekotropní linií, prováděla jsem ho z důvodu odstranění toxického polybrenu z buněk.

- Den 7 a 8 – mikroskopická a funkční analýza infikovaných buněk

3.2.17 Příprava sfér z plasmatické membrány

Dnes existuje několik metod pro lepší vizualizaci plazmatické membrány a v ní uložených proteinů. Metody jsou zejména založeny na jejím oddělení od zbytku buňky.

Jednou z nich je vytvoření tzv. „plasma membrane spheres“ (PMS), které jsou připojené ke zbytku buňky (Lingwood et al., 2008). Metoda je založená na vystavení buněk účinkům slabého hypotonického prostředí po delší dobu, což vede k jejich nafouknutí.

Buněčné linie byly dvakrát opláchnuty PMS pufrem, přeneseny do Lab-Tek komůrek a inkubovány 12-16 hodin v PMS pufru při 37°C. Následně byly přímo analyzovány.

3.2.18 Fluorescenční mikroskopie

Metoda je založena na principu, že určité proteiny nebo chemické látky (fluorochromy) jsou schopné pohlcovat (absorbovat) světlo o určité vlnové délce a vyzářit (emitovat) světlo o vyšší vlnové délce, které jsme schopni vizuálně zachytit pomocí mikroskopu a kamery.

Fluorescenční mikroskopie sloužila pro určení lokalizace kandidátních proteinů ve stabilně transdukovaných Wehi 231 buňkách. Pozorování umožňoval červený fluorescenční protein TagRFP-T, který byl fúzovaný ke kandidátním proteinům. Preparáty byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu Leica DMI 6000 (*Leica Microsystems*) a na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems*).

3.2.19 Aktivace buněčných linií

Aktivace buněčných linií a transdukovaných buněk pomocí protilátek je jednou z funkčních analýz *in vitro*. Protilátky zřetězí povrchové molekuly, tím dojde k aktivaci buněk, jejímž výsledkem je mimojiné změna exprese povrchových aktivačních markerů.

CD69 byl vybrán jako aktivační marker T-lymfocytů. Jeho exprese se indukuje nejrozličnějšími dráhami (MAPK dráhou, PKC, Ca²⁺ ionty). Slouží tedy jako univerzální molekula, jež detekuje změnu signalizačních drah způsobenou ektopickou expresí kandidátních genů, které se účastní zmíněných signalizací.

Zvýšení exprese CD69 jsme testovali na buněčných liniích (myší linie E14, BW5147 a lidská linie Jurkat-EcoR) a na Jurkat-EcoR transdukovaných viry s kandidátními geny, které byly kultivovány po dobu 24 hodin při 37°C se solubilními stimulačními látkami. Kombinace PMA („phorbol 12-myristate 13-acetate“, finální koncentrace 10 ng/ml) + ionomycin (finální koncentrace 500 ng/ml) sloužila jako pozitivní kontrola nespecifické aktivace buněk. Tato polyklonální aktivace buněk obchází TCR proximální signalizaci. PMA aktivuje přímo PKC a ionomycin blokuje kanály v plasmatické membráně a membráně endoplasmatického retikula, které pumpují Ca²⁺ ionty ven z cytoplasmy, vede k cytoplasmatickému zvýšení Ca²⁺ iontů. Protilátky proti myším TCR a lidskému TCR (finální koncentrace 10 µg/ml) byly použity ke specifické stimulaci buněk. Jako negativní kontroly sloužily samotné transdukované/netransdukované buněčné linie.

3.2.20 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která může měřit řadu vlastností buněk – velikost, granularitu, fluorescenci, atd.

Tato metoda sloužila k analýze zvýšené exprese CD69 po aktivaci buněčných linií a transdukovaných buněk stimulačními látkami. CD69 byla detekována na povrchu buněk pomocí anti-CD69 protilátky. Průtoková cytometrie rovněž sloužila ke zjištění úrovně exprese fúzních kandidátních genů. Byla detekována fluorescence TagRFP-T a exprese povrchového markeru Thy1.1 pomocí anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátky. Hoechst 33258 byl vždy přidán k analyzovaným buňkám pro odlišení živých a mrtvých buněk. Buňky transdukované vektorem pMSCV-IRES-GFP sloužily jako kontroly pro nastavení TagRFP-T negativní populace buněk. Všechny buňky byly měřeny na průtokovém cytometru LSR II (*BD Biosciences*).

4. Výsledky

4.1 Etapa první – bioinformatické vyhledávání kandidátních TRAP

Tuto bioinformatickou analýzu jsem prováděla společně s kolegou Pavlem Pitule pod vedením Dr. Jana Pačesa z Oddělení genomiky a bioinformatiky ÚMG AV ČR. Popisuji zde jen zkrácený postup a výsledky vyhledávání, pro podrobnější informace (programy, příkazy, tabulky, ...) odkazuji na diplomovou práci svého kolegy (Komparativní genomická předpověď nových transmembránových adaptorových proteinů a jejich expresní analýza).

4.1.1 Definice vlastností transmembránových adaptorových proteinů (TRAP)

Vlastnosti již známých TRAP sloužily k definici vlastností univerzálních TRAP:

1. Protein typu I, jež má následující části:
 - a. krátkou extracelulární N-koncovou část bez ligand-vazebné domény
 - b. α -helikální oblast do vzdálenosti 80 aminokyselin od N-konce, aby mohla funkčně nahradit signální peptid pro inzerci do membrány
 - c. dlouhou intracelulární část obsahující vazebné motivy

2. Nesmí obsahovat známé extracelulární strukturní domény, které jsou přítomné v proteinech typu II orientovaných v plasmatické membráně obráceně, tj. N-koncem dovnitř buňky
3. Přítomnost důležitých krátkých tyrosinových vazebných motivů, které jsou lokalizované až za α -helikální oblastí směrem k C-konci

4.1.2 Bioinformatická analýza

4.1.2.1 Získání proteinových sekvencí

Prvním krokem bioinformatické analýzy bylo stažení proteinových sekvencí ze tří dostupných genomových databází:

1. Ensembl (verze 47)¹¹
2. UCSC (hg18)¹²
3. NCBI (verze 36)¹³

Byly staženy celé lidské proteomy (ve formátu FASTA) dostupné v daných verzích databází, jež jsou závislé na aktuální anotaci genomů. Je nutné zmínit, že nyní už existují novější verze databází, a proto tyto staré verze jsou uloženy v archivech. Pokrytí lidského proteomu jsme zvyšovali použitím tří různých zdrojů proteinových sekvencí. Přestože se databáze z velké části překrývají, stále existují unikátní proteiny v jednotlivých databázích. Databáze Ensembl poskytovala nejvíce jedinečných proteinů, a proto jsme v ní kontrolovali v průběhu analýzy přítomnost kandidátních TRAP (viz dále). Všechny vybrané TRAP jsou přítomné v aktuální verzi 57 Ensembl databáze, pouze některým genům přibyly alternativní sestřihové varianty.

4.1.2.2 Predikce α -helikální oblasti

Membránová lokalizace je základní vlastností TRAP. K vyloučení všech cytoplasmatických a jaderných proteinů z analýzy bylo třeba predikovat α -helikální transmembránovou oblast za pomoci dvou programů:

1. Phobius 1.01¹⁴
2. Tmhmm 2.0¹⁵

¹¹ Databáze ensembl dostupná na <http://www.ensembl.org/index.html>

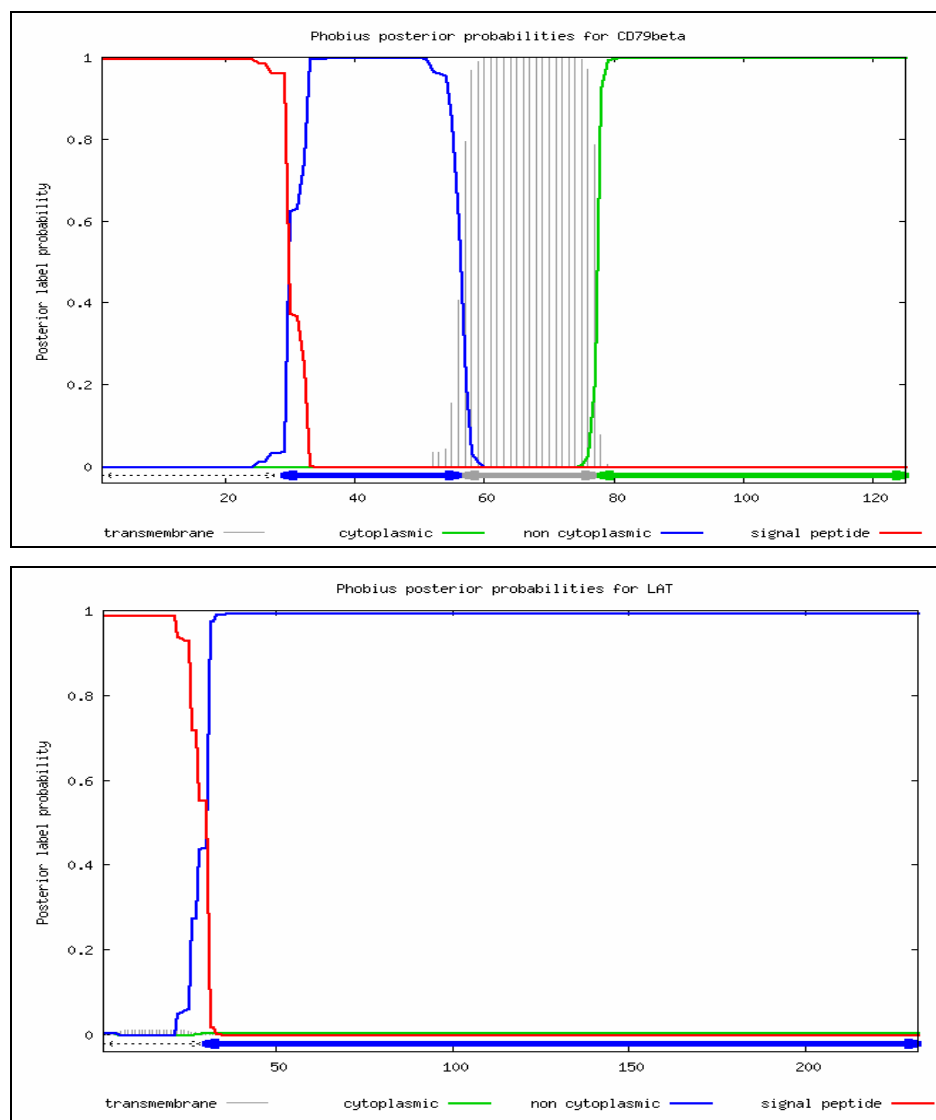
¹² Databáze ucsc dostupná na <http://genome.ucsc.edu/>

¹³ Databáze ncbi dostupná na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

¹⁴ Online verze programu je dostupná na <http://phobius.sbc.su.se> Pro stažení programu do počítače je třeba písemně zažádat o zaslání programu prostřednictvím formuláře uloženém na uvedené internetové stránce a zaslat ho na adresu *Prof. Anders Krogh, The Bioinformatics Centre, University of Copenhagen, Dánsko*

¹⁵ Online verze programu dostupná na <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> Pro stažení je nutno kontaktovat CBS Software Package Manager prostřednictvím online formuláře.

Phobius program je schopen odlišit predikcí transmembránovou oblast (TM) a signální peptid (SP) (Kall et al., 2004)(viz příklad predikce u CD79 β , LAT na Obr. 7), zatímco Tmhmm program používaný mimo jiné databází Ensembl predikuje pouze transmembránové oblasti (Krogh et al., 2001). Z tohoto důvodu jsme proteomy prohledávali programem Phobius.



Obr. 7 Predikce SP a TM oblasti u lidských CD79 β (nahore) a LAT (dole) programem Phobius. Na ose x je proteinová sekvence spolu s predikovanými částmi – SP (červená čára), extracelulární část (modrá), TM oblast (šedé šrafování) a intracelulární část (zelená). Osa y udává pravděpodobnost jejich reálné existence (hodnota 0 znamená absenci, hodnota 1 pak reálnou existenci).

Pomocí mysql příkazů jsme pak vytvořili výběrovou tabulku obsahující kombinaci proteinů s 1x TM nebo 1x SP nebo 1x TM + 1x SP vlastností. Proteiny s predikovaným samotným signálním peptidem byly začleněny do této tabulky, jelikož analýza známých TRAP (viz Tab.1) ukázala, že některé mají predikovaný pouze signální peptid (LAT, LIME, NTAL),

přestože jsou integrovány do plasmatické membrány jako standardní transmembránové proteiny. Příčinou je tenká hranice mezi predikcí SP a TM oblasti. Program určí, že nalezený hydrofobní peptid je signální peptid a ne transmembránová oblast zejména v závislosti na pozici začátku peptidu od konce proteinu. Dále pak na chemických vlastnostech aminokyselin před štěpícím místem – před hydrofobní částí SP je 1-12 slabě nabitých aminokyselin a v blízkosti štěpícího místa je 3-8 nenabitých polárních aminokyselin. Dalším znakem SP je přítomnost malých neutrálních aminokyselin v pozici -3 a -1 od štěpícího místa (Kall et al., 2004). Míra pravděpodobnosti reálné existence predikovaných částí lze vyčíst z obrázku 7. Čím více se hodnota predikce blíží k 1, tím reálnější je existence predikované části. Jedná se pouze o predikci, tudíž nelze předem vyloučit, že reálná TM oblast se nalézá v rámci delšího predikovaného SP jako je tomu v případě proteinu LAT (viz Obr. 7) či NTAL.

NÁZEV GENU	DALŠÍ NÁZEV	POŘADÍ V TAB	NORM SUMA	NCBI DATABÁZE		ENSEMBL DATABÁZE		UCSC DATABÁZE		ENSEMBL PREDIKCE		PHOBIUS PREDIKCE	
				REF	počet aa	ENSP	počet aa	NAME	počet aa	SP	TM	SP start stop	TM start stop
CD79B	CD79B	3	712	NP_067613.1	125	ENSP00000245862	125	uc002jdr.1	125	SP	TM	SP 1 28	TM 57 77
CD247	CD3Z	5	626	NP_000725.1	163	ENSP00000375969	163	uc001gej.1	163	SP	TM	SP 1 21	TM 31 51
CD247	CD3Z	7	622	NP_932170.1	164	ENSP00000354896	164	uc001gei.1	164	SP	TM	SP 1 21	TM 31 51
CD247	CD3Z	1774	122	NULL		NULL		uc001gsk.1	221			SP 1 21	TM 31 51
CD247	CD3Z	2242	97	NULL		ENSP00000356834	279	NULL		SP	TM	SP 1 21	TM 31 51
LAT	LAT	6	625	NP_001014988.1	232	NULL		uc002dsc.1	232			SP 1 29	
LAT	LAT	8	622	NP_001014989.1	233	ENSP00000346441	233	uc002dsb.1	233	SP	TM	SP 1 29	
LAT	LAT	16	553	NP_055202.1	262	ENSP00000354119	262	uc002dsd.1	262	SP	TM	SP 1 29	
LAT	LAT	17	539	NULL		ENSP00000378845	269	NULL					TM 41 63
TYROBP	DAPI2	56	402	NP_937758.1	112	NULL		uc002ocn.1	112			SP 1 27	TM 43 64
TYROBP	DAPI2	63	398	NP_003323.1	113	ENSP00000262629	113	uc002ocm.1	113	SP	TM	SP 1 27	TM 43 64
LIMEI	LIMEI	68	390	NULL		NULL		uc002ygp.1	295			SP 1 30	
LIMEI	LIMEI	69	390	NP_060276.2	295	ENSP00000309521	295	NULL		SP	TM	SP 1 30	
FCER1G	FCER1G	86	372	NP_004097.1	86	ENSP00000289902	86	uc001fyz.1	86	SP	TM	SP 1 16	TM 26 44
FCER1G	FCER1G	91	368	NULL		NULL		uc001fza.1	87			SP 1 16	TM 26 44
LAXI	LAXI	106	354	NP_060243.2	398	ENSP00000356186	398	uc001haa.1	398		TM		TM 38 61
SIT1	SIT1	158	321	NP_055265.1	196	ENSP00000259608	196	uc003zxe.1	196		TM	SP 1 24	TM 40 63
PAG1	PAG1	240	292	NP_060910.3	432	ENSP00000220597	432	uc003vzb.1	432		TM		TM 15 37
LAT2	NTAL	322	267	NP_115852.1	243	ENSP00000381496	243	uc003uag.1	243	SP	TM	SP 1 22	
HCST	DAPI0	450	239	NP_001007470.1	92	NULL		uc002ock.1	92			SP 1 18	TM 50 72
HCST	DAPI0	462	237	NP_055081.1	93	ENSP00000246551	93	uc002ocf.1	93	SP	TM	SP 1 18	TM 50 72
TRAT1	TRIM	1070	167	NP_057472.2	186	ENSP00000295756	186	uc003dxi.1	186	SP	TM		TM 12 34
LST1	LST1	57	402	NULL		ENSP00000372784	97	NULL		SP	TM		TM 12 34
LST1	LST1	81	379	NULL		ENSP00000379408	103	NULL		SP	TM		TM 12 33
LST1	LST1	84	375	NULL		ENSP00000372783	104	NULL		SP	TM		TM 12 34
LST1	LST1	2481	85	NULL		ENSP00000383065	82	NULL					TM 12 34
C17orf87	NVL	140	331	NULL		ENSP00000318877	145	NULL		SP	TM		TM 20 42
C17orf87	NVL	141	331	NP_996986.1	145	ENSP00000382509	145	uc002gbh.1	145	SP	TM		TM 20 42
C17orf87	NVL	353	260	NULL		NULL		uc002gbi.1	123				TM 20 42
C17orf87	NVL	354	260	NULL		ENSP00000382503	123	NULL		SP	TM		TM 20 42
PRR7	PRR7	575	220	NULL		ENSP00000347547	254	NULL		SP	TM		TM 6 34
PRR7	PRR7	695	204	NP_085044.2	274	ENSP00000327168	274	uc003mgu.1	274	SP	TM		TM 6 34
C10orf26	OPAL1	1818	120	NULL		ENSP00000376960	341	NULL			TM		TM 42 60
C10orf26	OPAL1	1822	120	NP_060257.4	342	ENSP00000358905	342	NULL			TM		TM 43 61
FAM1159A	TRAP2	3591	37	NP_001036158.1	190	ENSP00000345869	190	uc001cuf.1	190				TM 57 90

Tab. 1: Predikce signálního peptidu (SP) a transmembránové oblasti (TM) u lidských známých TRAP a nových TRAP naší laboratoře. V tabulce je uveden oficiální název genu, alternativní název genu, pořadí genu ve finální tabulce, hodnota normalizované sumy (viz kap. 4.1.2.4), jedinečný identifikátor anotovaných proteinů v různých databázích (NCBI, Ensembl, UCSC) a jejich délka. Pro predikci SP a TM oblasti jsou uvedeny pro dva různé zdroje – data stažená z databáze Ensembl pomocí BioMart (predikce TM oblasti programem Tmhmm, predikce SP programem SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004)) a námi predikované SP a TM oblasti pomocí programu Phobius. V dolní části tabulky pod čarou jsou uvedeny TRAP, na kterých naše laboratoř v současné době pracuje.

4.1.2.3 Predikce orientace proteinu v buňce

K určení orientace proteinů v buňce jsme použili dva nezávislé programy. Prvním byl, stejně jako v předchozím bodě, program Phobius, který rovněž umí predikovat i orientaci v rámci membrány (vně/uvnitř buňky). Druhým způsobem bylo napsání programu¹⁶, který vyhledával v proteinových sekvencích strukturní extracelulární domény, které u TRAP nejsou přítomny. Tyto sekvence byly získány z databáze SMART¹⁷. Proteiny, ve kterých byly nalezeny tyto domény, byly vyloučeny pomocí mysql příkazu z finální tabulky.

4.1.2.4 Vyhledání tyrosinových vazebných motivů

Konsensus sekvence motivů založených na přítomnosti tyrosinu jsme získali z „Human protein reference database“ (HPRD)¹⁸ a byly doplněny z publikované literatury. Školitel jednotlivým motivům přiřadil bodové ohodnocení, tzv. skóre, podle jejich významu pro signalizační dráhy imunitních buněk. Tento postup je arbitrární a může nepochybně vést k artefaktům. Nicméně nás zajímaly především motivy ITAM, ITIM, ITSM, vazebné motivy pro kinázy a fosfatázy (detailní seznam motivů s jejich skóre je uveden v Příloze č.1). Těmito motivy jsme prohledali pomocí napsaného programu celé proteomy¹⁹. Výsledkem byla tabulka obsahující jednotlivé proteiny s vyhledanými motivy a celkovou sumou, tj. celkovým součtem skóre (bodů) za jednotlivé nalezené motivy v daném proteinu. Pro rovnocenné ohodnocení proteinů nezávisle na jejich délce jsme celkovou sumu vydělili délkou proteinu. Tímto způsobem jsme získali tzv. normalizovanou sumu. Krátké proteiny s malým množstvím motivů (avšak potenciálně důležitými) tudíž nebyly znevýhodněny.

4.1.2.5 Vytvoření finální tabulky

Predikce jednotlivých vlastností TRAP (viz výše) pomocí uvedených programů byly vždy provedeny na celém lidském proteomu všech tří zmíněných databází. Známé TRAP sloužily během bioinformatické analýzy jako pozitivní kontroly jednotlivých fází prohledávání uvedenými programy. Finální tabulka byla vytvořena pomocí několika mysql příkazů pro každou databázi zvlášť. V tabulce se nalézaly pouze proteiny, které splňovaly všechny vlastnosti TRAP. To znamená: obsahovaly 1x TM nebo 1x SP nebo 1x TM + 1x SP, byly v nich přítomny tyrosinové vazebné motivy a neobsahovaly extracelulární domény (tímto způsobem se plně nepodařilo vyloučit všechny enzymy uvnitř buňky, tyto proteiny

¹⁶ Pro více informací o programu odkazují na diplomovou práci svého kolegy Pavla Pitule - Komparativní genomická předpověď nových transmembránových adaptorových proteinů a jejich expresní analýza

¹⁷ SMART databáze dostupná na <http://smart.embl-heidelberg.de/browse.shtml>

¹⁸ HPRD databáze dostupná na <http://www.hprd.org/>

¹⁹ Pro více informací o programu odkazují na diplomovou práci svého kolegy Pavla Pitule

byly následně vyřazeny ručně). Finální tabulky databází jsme sjednotili do jedné velké tabulky za pomoci proteinové sekvence, která sloužila jako unikátní identifikátor proteinu v jednotlivých databázích. Proteiny jsou v této lidské velké finální tabulce seřazeny sestupně dle klesající normované sumy.

Bioinformatická analýza byla primárně provedena na lidském proteomu, jelikož lidské geny jsou lépe anotované a existuje pro ně celá řada aktuálních a dostupných expresních dat. Na základě zhodnocení plánovaných experimentů (zvláště z důvodu *in vivo* modelu), jsme se však rozhodli experimentálně pracovat s myšimi kandidátními geny. Proto po výběru kandidátních TRAP v lidské finální tabulce (viz dále), byla přítomnost jejich ortologních genů kontrolována v myší finální tabulce. Tato tabulka byla udělána analogickým způsobem jako lidská, ale obsahovala pouze proteiny přítomné v databázi Ensembl (verze 47).

4.1.3 První výběr proteinů

Lidskou finální tabulku jsme doplnili o relevantní informace pomocí anotační databáze BioMart²⁰. Tabulka byla ručně procházena sestupně dle normované sumy až do pozice posledního známého TRAP. Školitel z této tabulky vybíral kandidátní TRAP dle:

1. Expresí v imunitním systému
2. Obsahu zajímavých tyrosinových vazebných motivů
3. Vzdálenosti hydrofobní oblasti od N-konce
4. Analýzy publikované literatury
5. Dostupnosti KO modelu, který ovšem nebyl detailně studován v imunitním systému
6. Evoluční konzervovanosti proteinů v rámci omezeného počtu ortologů (člověk, primáti a hlodavci), která byla zjištěna manuálním srovnáním sekvencí algoritmem blastp²¹

1.1 Expresí v imunitním systému

Veřejně dostupná a spolehlivá aktuální data z myších expresních čipů neexistují v současné době. Jediný známý zdroj SymAtlas obsahuje zastaralá data a řada genů zde chybí, neboť se jedná o proprietární čipy firmy Novartis. Tato databáze byla nyní převedena na BioGPS²² a doplněna dalšími experimentálními zdroji včetně myších dat z Illumina čipů.

²⁰ Anotační databáze dostupná na <http://www.biomart.org/>

²¹ Algoritmus blastp dostupný na (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

²² <http://biogps.gnf.org/>

Dalším zdrojem dat je „Unigene EST Profile“²³, který určuje expresi z počtu EST („expressed sequence tag“) sekvencí v cDNA knihovnách z jednotlivých tkání. Oba zdroje exprese myších genů lze považovat pouze za orientační. Z tohoto důvodu byla primárně prohledávaná lidská finální tabulka, kde existuje celá řada dostupných zdrojů a lidská expresní data jsou novější. Pro mojí práci jsme využili následující zdroje:

- SymAtlas
- Garvan institute²⁴
- Gene Enrichment Profiler²⁵ (v pozdější fázi projektu po zpřístupnění veřejnosti)
- Human Protein Atlas²⁶

4.1.4 Druhý výběr proteinů

Jelikož první výběr obsahoval pouze proteiny s predikovaným SP (viz Tab. 2 a 3) a na základě experimentálních dat bylo zřejmé, že se nejedná o proteiny majoritně lokalizované v plasmatické membráně, rozhodli jsme se zpřísnit výběrová kritéria pro další kandidátní proteiny. K předchozím kritériím přibyla:

7. Nutná přítomnost TM oblasti – samotné nebo v kombinaci se signálním peptidem
8. Rozšíření evoluční konzervovanosti TM oblasti a tyrosinových vazebných motivů minimálně mezi obratlovci

7.1 Přítomnost TM oblasti

K této podmínce nás vedla zpětná analýza predikce SP a TM oblasti programy Phobius a Tmhmm ve známých TRAP. Přestože některé TRAP (LAT, LIME, NTAL) obsahují dle programu Phobius pouze predikovaný SP (viz Tab. 1), z tabulky je však patrné, že se jedná o delší SP – LAT (SP 1-29), LIME (1-30), jediný NTAL má pouze krátký SP 1-22. Program Tmhmm²⁷ u těchto proteinů však predikoval TM oblast, včetně proteinu NTAL. Nutná přítomnost TM oblasti pro další kandidáty, ať už samotné nebo v kombinaci se signálním peptidem, zvyšovala pravděpodobnost reálné integrace kandidátních TRAP do plasmatické membrány (viz Tab. 2 a 3). Výjimkou byl ACPL2 s predikovaným samotným SP 1-23, ale jehož myší ortolog měl predikovaný dlouhý SP 1-34. Rovněž myší ortolog Creg1

²³ www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene

²⁴ http://linkage.garvan.unsw.edu.au/public/microarrays/Arthritis_Inflammation

²⁵ <http://xavierlab2.mgh.harvard.edu/EnrichmentProfiler>

²⁶ www.proteinatlas.org

²⁷ Predikce TM oblasti programem Tmhmm pocházejí z Ensembl databáze, ze které jsme tyto data stáhli pomocí anotací databáze BioMart. Vytvoření finálních tabulek s predikcemi TM oblastí pomocí Tmhmm programu jsme sami neprováděli.

měl predikovaný pouze delší SP 1-31 oproti lidskému proteinu s predikovanou TM oblastí (viz Tab. 2 a 3). Nicméně oba myší proteiny Acpl2 a Creg1 mají predikovaný delší SP stejně jako lidský LAT (SP 1-29), tudíž jejich integrace do plasmatické membrány je možná.

NÁZEV GENU	POŘADÍ V TAB	NORM SUMA	NCBI DATABÁZE		ENSEMBL DATABÁZE		UCSC DATABÁZE		ENSEMBL PREDIKCE		PHOBIUS PREDIKCE	
			REF	počet aa	ENSP	počet aa	NAME	počet aa	SP	TM	SP start stop	TM start stop
NIPSNAP3B	48	409	NP_056284.1	247	ENSP00000363899	247	uc004bch.1	247			SP	1 13
TOR1A	59	401	NP_000104.1	332	ENSP00000345719	332	uc004byl.1	332	SP			SP 1 20
TOR1A	152	325	NULL		NULL		uc004byn.1	197				SP 1 20
KDELC2	72	383	NP_714916.3	507	ENSP00000315386	507	NULL		SP			SP 1 21
KDELC2	73	383	NULL		NULL		uc001pkj.1	507				SP 1 21
KDELC2	98	364	NULL		NULL		uc001pki.1	451				SP 1 16
KDELC2	100	364	NULL		ENSP00000364799	409	NULL		SP			SP 1 16
CRTAP	87	372	NP_006362.1	401	ENSP00000323696	401	uc003cfl.1	401	SP	TM		SP 1 26
SKIP	101	362	NP_057616.2	448	ENSP00000254712	448	uc002ftr.1	448				SP 1 26
ERLIN2	103	355	NP_001003790.1	152	ENSP00000380405	152	uc003xkc.1	152	SP			SP 1 21
ERLIN2	338	263	NP_009106.1	339	ENSP00000276461	339	uc003xkc.1	339	SP			SP 1 21
ERLIN2	341	262	NULL		NULL		uc003xkd.1	206				SP 1 21
ITM2B	269	282	NP_068839.1	266	ENSP00000367828	266	uc001ybz.1	266		TM		TM 52 76
ITM2B	3758	31	NULL		ENSP00000367811	160	NULL			TM		TM 52 76
KIAA0317	286	275	NULL		NULL		uc001xqc.1	539				TM 6 23
CREG1	297	273	NP_003842.1	220	ENSP00000271377	220	uc001gcl.1	220	SP	TM		SP 1 31
CREG1	435	243	NULL		ENSP00000359540	247	NULL		SP	TM		TM 34 53
ACPL2	303	271	NP_068949.1	480	ENSP00000286353	480	uc003etu.1	480	SP	TM		SP 1 23
PDZK1IP1	781	193	NP_005755.1	114	ENSP00000294338	114	uc001cqw.1	114	SP	TM		SP 1 20
PDZK1IP1	781	193	NP_005755.1	114	ENSP00000294338	114	uc001cqw.1	114	SP	TM		TM 30 54
STYK1	839	187	NULL		ENSP00000075503	422	NULL			TM		TM 27 49
ADAP1	1439	142	NULL		ENSP00000265846	374	NULL		SP			SP 1 21
ADAP1	1440	142	NP_006860.1	374	NULL		uc003sjo.1	374				TM 31 51
ADAP1	1440	142	NP_006860.1	374	NULL		uc003sjo.1	374				SP 1 21
ADAP1	1440	142	NP_006860.1	374	NULL		uc003sjo.1	374				TM 31 51
LMTK2	1617	131	NP_055731.2	1503	ENSP00000297293	1503	uc003upd.1	1503	SP	TM		SP 1 26
LMTK2	1617	131	NP_055731.2	1503	ENSP00000297293	1503	uc003upd.1	1503	SP	TM		TM 45 67

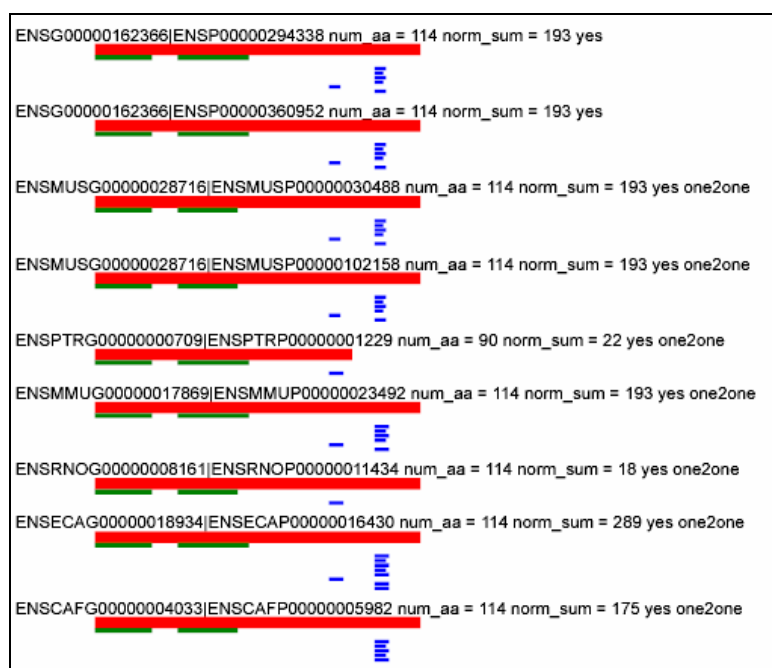
Tab. 2: Predikce signálního peptidu (SP) a transmembránové oblasti (TM) u lidských kandidátních TRAP. V tabulce je uveden oficiální název genu, pořadí genu ve finální tabulce, hodnota normalizované sumy (viz kap. 4.1.2.4), jedinečný identifikátor anotovaných proteinů v různých databázích (NCBI, Ensembl, UCSC) a jejich délka. V horní části tabulky jsou uvedeny proteiny z prvního výběru, v dolní části proteiny z druhého výběru.

NÁZEV GENU	POŘADÍ V TAB	NORM SUMA	ENSEMBL DATABÁZE		ENSEMBL PREDIKCE		PHOBIUS PREDIKCE	
			ENSP	počet aa	SP	TM	SP start stop	TM start stop
Tor1a	79	399	ENSMUSP00000028200	333	SP		SP 1 20	
Kdelc2	92	378	ENSMUSP00000039313	503	SP		SP 1 20	
Crtap	145	338	ENSMUSP00000081941	400	SP		SP 1 25	
Erlin2	287	288	ENSMUSP00000033873	340	SP		SP 1 21	
Itm2b	98	372	ENSMUSP00000022704	266		TM		TM 52 76
Acpl2	246	300	ENSMUSP00000113059	180	SP	TM	SP 1 34	
Acpl2	548	235	ENSMUSP00000108574	480	SP	TM	SP 1 34	
Acpl2	549	235	ENSMUSP00000113210	480	SP	TM	SP 1 34	
Acpl2	550	235	ENSMUSP00000077571	480	SP	TM	SP 1 34	
Acpl2	551	235	ENSMUSP00000113489	480	SP	TM	SP 1 34	
Kiaa0317	431	256	ENSMUSP00000048780	823	SP	TM		TM 6 23
Styk1	603	226	ENSMUSP00000107623	340		TM		TM 31 53
Pdzk1ip1	912	193	ENSMUSP00000030488	114	SP	TM	SP 1 20	TM 30 50
Pdzk1ip1	914	193	ENSMUSP00000102158	114	SP	TM	SP 1 20	TM 30 50
Creg1	1814	132	ENSMUSP00000107060	220	SP		SP 1 31	
Lmtk2	2428	101	ENSMUSP00000048238	1471	SP	TM	SP 1 26	TM 42 65

Tab. 3: Predikce signálního peptidu (SP) a transmembránové oblasti (TM) u myších kandidátních TRAP. V tabulce je uveden oficiální název genu, pořadí genu ve finální tabulce, hodnota normalizované sumy (viz kap. 4.1.2.4), jedinečný identifikátor v databázi Ensembl a jejich délka. Pro predikci SP a TM oblasti jsou uvedeny pro dva různé zdroje – data stažená z databáze Ensembl pomocí BioMart (predikce TM oblasti programem Tmhmm, predikce SP programem SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004)) a námi predikované SP a TM oblasti za pomoci programu Phobius. V horní části tabulky jsou uvedeny proteiny z prvního výběru, v dolní části proteiny z druhého výběru. Proteiny Nipsnap3b, Skip a Adap1 se v myší finální tabulce nenacházejí.

8.1 Evoluční konzervovanost TM oblasti a vazebných motivů

Evoluční konzervovanost TM oblasti, SP či jejich kombinace a nalezených vazebných motivů jsme sledovali a porovnávali v mnoha živočišných druzích, jejichž genomy byly v dané době dostupné a anotované, a nikoliv pouze v omezeném počtu, jako tomu bylo v předchozím výběru. Tuto vlastnost TRAP jsme hodnotili na základě grafického zobrazení (příklad viz Obr. 8), které kolega Pavel Pitule vytvořil pro jednotlivé ortologní proteiny (získané z databáze Ensembl Compara²⁸). Proteiny s vysokou konzervovaností byly manuálně zařazeny do užšího výběru.



Obr. 8: Svoje obrázek evoluční konzervovanosti SP a TM oblasti a vazebných motivů *Pdzk1p1* genu. Srovnány byly ortologní proteiny z člověka, myši, šimpanze, makaka, krysy, koně a psa (řazeno sestupně). Červeně je označena proteinová sekvence, zeleně predikovaná SP a TM oblast a modře jsou označeny vazebné motivy.

Školitel po přidání dvou výše uvedených podmínek označil v lidské finální tabulce druhý výběr 12 genů, ale na základě dostupné literatury jsme výběr zúžili a 4 geny vyřadili. Gen *C5orf29* patřil mezi zvažované kandidáty. Tento gen sloužil jako interní kontrola správného postupu analýzy a výběru, jelikož byl již charakterizován jako transmembránový adaptorový protein GAP, který konstitutivně váže Grb2 v B-lymfocytech (Liu and Zhang, 2008). Rovněž jsme uvažovali o *C1orf186* genu. Tento gen však nemá myšský ortolog, což bylo

²⁸ Základní data o struktuře databáze Ensembl Compara spolu s přístupovými informacemi uvedeny na <http://www.ensembl.org/info/docs/api/compara/index.html>

potvrzeno PCR analýzou (data neukázána), a proto by bylo těžké zkoumat jeho funkci, jelikož není možnost vytvořit KO myši.

4.1.5 Anotace kandidátních transmembránových adaptorových proteinů

Následující tabulka stručně charakterizuje 14 vybraných genů, kterými jsme se detailně zabývali. Většina z nich se nacházela v lidské i myší finální tabulce. Výjimku tvořily geny *Adap1*, *Skip* a *Nipsnap3b*, jejichž myší ortology neměly predikovaný SP ani TM oblast. Přítomnost hydrofobní oblasti však byla zřetelná na základě ručního srovnání ortologních proteinů a rovněž databáze Ensembl predikovala pro geny *Adap1* a *Skip* oblast s nízkou mírou komplexity, což indikuje přítomnost hydrofobní oblasti. Informace pocházející z databáze NCBI jsou uvedeny pro myší geny, s výjimkou stručného souhrnu o funkci genu, který nebyl většinou dostupný pro *Mus musculus* a byl tedy použit souhrn pro lidský ortolog, jestliže existoval. Přestože známé adaptorové proteiny jsou nestrukturované proteiny bez vlastní enzymatické aktivity, tuto vlastnost jsme při výběru příliš nezohledňovali. Zaměřili jsme se zejména na funkčně zajímavé TRAP, které mohou plnit svojí funkci i v přítomnosti menší strukturní domény mimo vazebné motivy. Z tohoto důvodu jsme z výběru striktně nevyřazovali geny, které měly v literatuře anotované enzymatické funkce. Z výše uvedených důvodů je výběr kandidátních genů širší než původní definice TRAP.

Tor1a	oficiální název	Torsin family 1, member A (torsin A)
	další názvy	DQ2; Dyt1; torsinA; MGC18883
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/30931
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Protein je členem AAA rodiny adenosin trifosfatáz (ATPáz), je příbuzný Clp proteázové rodině. Exprimován je především v substantia nigra pars compacta a mutace genu způsobuje autosomálně dominantní poruchu, tzv. torsion dystonia 1 (DYT1).
	publikace	Torsin1a váže KASH domény nesprin proteinů, reguluje jejich lokalizaci, a tím se podílí na polarizaci jádra a migraci buněk (Nery et al., 2008). Torsin1a moduluje synaptickou recyklaci vezikulů (Granata et al., 2008).
KO	Ano, KO myši jsou embryonálně či brzy po narození letální (Goodchild et al., 2005). Myši s kondiciovaným KO vykazují motorické nedostatky a hyperaktivitu (Yokoi et al., 2008). Existence knock-in myši, které slouží jako model lidské DYT1 choroby (Goodchild et al., 2005).	

Inpp5k	oficiální název	Inositol polyphosphate 5-phosphatase K
	další názvy	C62; Pps; SKIP
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19062
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Protein je členem fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát fosfatázové rodiny s 5' fosfatázovou aktivitou. Je lokalizován v cytosolu v místech bez aktinových stresových vláken. Předpokládanou funkcí je negativní regulace aktinového cytoskeletu.
	publikace	Inpp5k negativně reguluje inzulinem indukovanou Akt/GSK-3beta (kináza glykogen syntetázy) dráhu (Ljuin et al., 2008). Inpp5k se přesouvá na membránové vychlípeniny po EGF (epidermal growth factor) stimulaci (Gurung et al., 2003).
KO	Ano, ale homozygotní KO myši jsou embryonálně letální. Existují pouze heterozygotní KO myši, které vykazují zvýšenou inzulínovou signalizaci (Ljuin et al., 2008).	

Erlin2	oficiální název	ER lipid raft associated 2
	další názvy	Spfh2; C87251; BC036333; MGC27952
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/244373
	souhrn	
	publikace	Erlin2 součástí komplexu v endoplasmatickém retikulu (ER) označující substráty pro ERAD (ER-associated degradation) dráhu (Pearce et al., 2009).
KO	Ne, pouze gene trap v embryonálních kmenových (ES) buňkách.	

Crtap	oficiální název	Cartilage associated protein
	další názvy	CASP; Leprel3; 5730529N23Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56693
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Po specifické stimulaci tento adaptorový protein ovlivňuje aktivitu nejméně jednoho ze členů cytohesin/ARNO rodiny. Mutace v tomto genu jsou asociované s lidským onemocněním pojivové tkáně, tzv. osteogenesis imperfecta, které je charakterizováno úbytkem kostní hmoty a křehkostí kostí.
	publikace	Crtap je nutný pro prolyl-3-hydroxylaci (Morello et al., 2006).
KO	Ano, KO myši mají vážnou osteoporózu charakterizovanou úbytkem kostní hmoty (Morello et al., 2006).	

Nipsnap3b	oficiální název	Nipsnap homolog 3B
	další názvy	Nipsnap3a; 2700063N13Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66536
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Nipsnap proteiny asociují s ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) a pravděpodobně se účastní vezikulárního transportu.
	počet transkriptů	2 varianty, ani jedna se nevyskytuje ve finální myšské tabulce, rovněž Ensembl nemá predikovanou oblast s nízkou uspořádaností. Nicméně na základě ručního srovnání ortologních proteinových sekvencí, lze v myším Nipsnap3b předpokládat hydrofobní oblast. Tyto dvě transkripční varianty se liší v přítomnosti vnitřního exonu, tudíž se může lišit jejich schopnost vázat interagující partnery, avšak jejich lokalizace by měla zůstat stejná.
	publikace	pouze sekvenční data
KO	Ne, pouze gene trap v ES buňkách.	

Kdelc2	oficiální název	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2
	další názvy	AW549401; 2010004J24Rik; 4833410J10Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68304
	souhrn	
	publikace	pouze sekvenační data
	KO	Ne, pouze gene trap v ES buňkách.

Pdzk1ip1	oficiální název	PDZK1 interacting protein 1
	další názvy	Map17; AU046042; 0610007F13Rik; 2700030M23Rik; RP23-246H17.1
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67182
	souhrn	
	počet transkriptů	2 varianty. Shodují se v aminokyselinové sekvenci proteinu, tudíž obě mají predikovanou SP i TM oblast a i jejich funkce bude stejná.
	publikace	Systematická analýza PDZK1 (Hu et al., 2009) Pdzk1ip1 inhibuje myc-indukovanou apoptózu skrz produkci ROS, které aktivují PI3K/AKT dráhu (Guijarro et al., 2007) Pdzk1ip1 funguje jako endogenní regulátor PDZK1 obratu (Silver et al., 2003)
KO	Ne, zatím pouze vytvořené vektory. Existují však PDZK1 KO myši	

Lmtk2	oficiální název	Lemur tyrosine kinase 2
	další názvy	BREK; KPI2; cprk; KPI-2; aatyk2; 2900041G10Rik; A330101P12Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231876
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Gen patří do rodiny protein-kináz se Ser/Thr/Tyr aktivitou. Interaguje s inhibítozem-2 (Inh2), protein fosfatázou-1 (PP1C), p35 a myosinem VI. Sám je také fosforylovaný v asociaci s komplexem cyclin-dependent kinase 5 (cdk5)/p35. Tento protein se účastní nerve growth factor (NGF)-TrkA signalizace a endozomálního membránového transportu. Důležitou roli hraje také při spermatogenezi.
	publikace	Strukturní a funkční analýza AATYK kinázové rodiny (Tomomura et al., 2007) Protein Lmtk2 se účastní NGF signalizace v mozku (Kawa et al., 2004)
KO	Ano, KO myši bez spermií (Kawa et al., 2006)	

Styk1	oficiální název	Serine/threonine/tyrosine kinase 1
	další názvy	Nok; AI326477; 9130025L13
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/243659
	souhrn	Receptorové tyrosin-kinázy hrají důležitou roli v různých buněčných a vývojových procesech (migraci, proliferaci, diferenciaci, přežití)
	publikace	Tyrosinová bodová mutace v <i>Styk1</i> genu zastavuje tumorogenezi v nahých myších (Chen et al., 2005) Gen <i>Styk1</i> způsobuje tumorogenezi a vznik metastáz v nahých myších (Liu et al., 2004)
KO	Ne, zatím pouze KO v ES buňkách	

mKiaa0317	oficiální název	RIKEN cDNA 1110018G07 gene
	další názvy	mKIAA0317; AI649076; AW610792;1110018G07Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68497
	souhrn	
	publikace	pouze sekvenační data
	KO	Ne, pouze gene trap v ES buňkách

Acpl2	oficiální název	Acid phosphatase-like 2
	další názvy	BB177120; MGC38214; 9430094M07Rik; C130099A20Rik; DKFZp434B2119
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/235534
	souhrn	
	počet transkriptů	5 variant. Všechny se shodují v N-koncové části proteinu a obsahují predikovanou TM oblast. Varianty Acpl2-007 a Acpl2-004 se liší v C-koncové části proteinu, tudíž mohou mít mírně odlišnou funkci v buňce.
	publikace	pouze sekvenační data
	KO	Ano, zatím bez dat

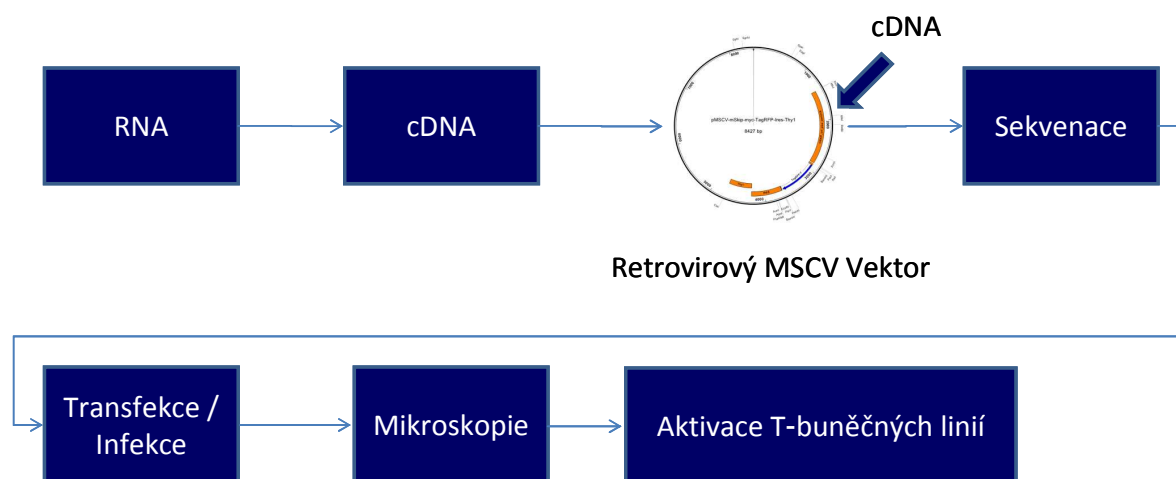
Itm2b	oficiální název	Integral membrane protein 2B
	další názvy	Bri2; E25BMM; D14Sel6; AI256040
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16432
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Tento transmembránový protein je štěpen na C-konci furin a furin-like proteázami, vzniká tak malý sekretovaný peptid, který inhibuje skladování beta-amyloid peptidů, jež vytvářejí charakteristické plaky při Alzheimerově chorobě. Mutace způsobující zvětšení sekretovaného peptidu jsou asociované s dvěma neurodegenerativními onemocněními: familiární Britská demence a familiární Dánská demence.
	publikace	Itm2b protein inhibuje štěpení APP prostřednictvím kompetice se sekretázou o přístup k němu (Matsuda et al., 2008) Itm2b indukuje apoptózu nezávisle na p53 (Fleischer and Rebollo, 2004)
KO	Ano, myši mají zvýšený množství solubilních APP v mozku (Matsuda et al., 2008). Existují i knock-in myši, které slouží jako modelové organismy pro studium uvedených neurodegenerativních onemocnění (Giliberto et al., 2009).	

Creg1	oficiální název	Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
	další názvy	Creg; AA755314
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/433375
	souhrn	(<i>Homo sapiens</i>) Creg1 protein sdílí určitou sekvenční podobnost s adanovirovým E1A proteinem a funguje antagonisticky proti jeho účinkům na buňku. E1A aktivuje i inhibuje expresi genů důležitých pro proliferaci a diferenciaci. Creg1 vyvazuje obecný transkripční faktor TBP a nádorový supresor pRb <i>in vitro</i> .
	počet transkriptů	2 varianty. Kratší variantě chybí N-konec proteinu, který obsahuje predikovanou TM oblast.
	publikace	Sekretovaný Creg1 inhibuje buněčnou proliferaci (Han et al., 2008) Creg1 uvnitř buňky kolokalizuje s lysosomálními proteiny (Schahs et al., 2008)
KO	Ne, pouze gene trap v ES buňkách	

Adap1	oficiální název	ArfGAP with dual PH domains 1
	další názvy	GC1L; Centa1; p42IP4; 4930431P11Rik
	link	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231821
	souhrn	
	počet transkriptů	3 varianty. Transkript Adap1-201 z analýzy vyřazen (jeden EST). Ačkoliv <i>Adap1</i> gen se nenacházel v naší finální myši tabulce (přítomný pouze v lidské), dle Ensembl databáze Adap1-001 obsahuje predikovanou oblast s nízkou uspořádaností, což může znamenat přítomnost TM oblasti. Adap1-202 variantě však tato N-koncová část proteinu chybí.
	publikace	pouze sekvenační data
KO	Ne, pouze gene trap v ES buňkách	

4.2 Etapa druhá – charakterizace kandidátních genů

4.2.1 Schéma postupu klonování a analýzy kandidátních genů

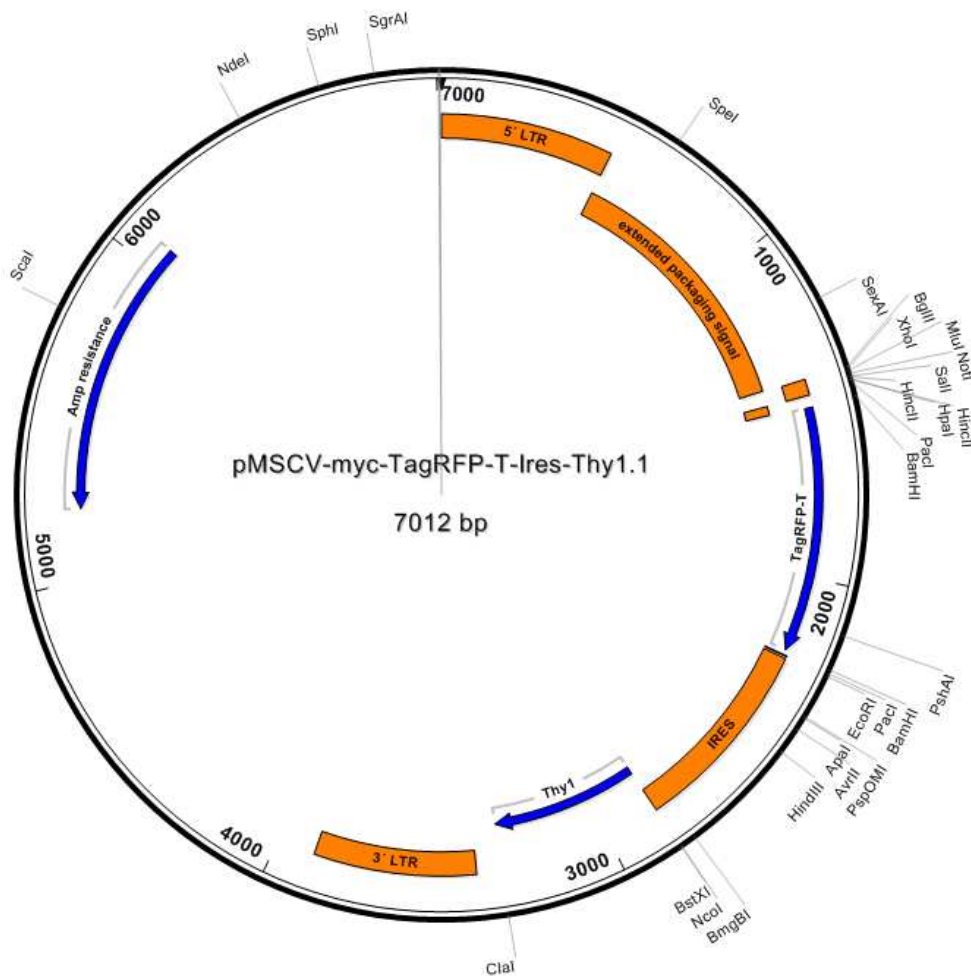


Obr. 9: Schematický náčrt pracovního postupu diplomové práce. Podrobný postup jednotlivých metod je uveden v podkapitolách Metody.

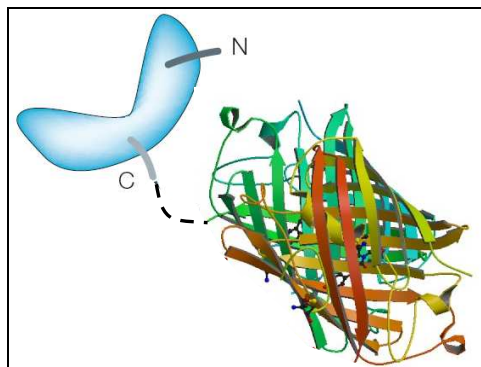
4.2.2 Příprava retrovirového vektoru založeného na MSCV („murine stem cell virus“)

Zvolili jsme retrovirový vektor pMSCV-IRES-Thy1.1 jako základní vektor pro vkládání cDNA kandidátních genů. Zejména dobrá schopnost retrovirových vektorů infikovat i špatně transfekovatelné buněčné linie a primární buňky byla důvodem výběru. Jistou nevýhodou oproti lentivirovým vektorům je fakt, že retrovirové vektory jsou schopny infikovat pouze dělicí se buňky. Tento výběr vektoru byl však dostačující vzhledem k faktu, že jsme pracovali s dobře se dělicími buněčnými liniemi. V prvním kroku byl připraven MSCV vektor, který obsahoval obohacený polylinker (přítomná restrikční místa základního polylinkeru pMSCV-IRES-GFP vektoru se nalézala uvnitř sekvencí kandidátních genů), Myc-tag (sekvence E-Q-K-L-I-S-E-E-D-L) a červený fluorescenční protein TagRFP-T bez start kodonu a obsahující stop kodon ukončující translaci (viz Obr. 10). Tímto způsobem byl připraven vektor pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1. Řada červených fluorescenčních proteinů vykazuje nízkou intenzitu fluorescence a nízkou fotostabilitu, což je zvláště nevýhodou při mikroskopické analýze. Originální monomerní fluorescenční protein TagRFP vytvořený firmou *Evrogen* pocházející z *Entacmaea quadricolor* (Merzlyak et al., 2007), však

dosahuje stejné intenzity fluorescence jako EGFP. Cílená mutace S158T tohoto fluorescenčního proteinu vedla k vytvoření TagRFP-T, který je 9 krát fotostabilnější než původní TagRFP a zároveň 2 krát fotostabilnější než EGFP (Shaner et al., 2008). Fúzní gen s TagRFP-T na C-konci kandidátního genu vznikl vložením konkrétní cDNA do polylinkeru pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1, což umožňovalo přímou mikroskopickou a cytometrickou detekci kandidátního proteinu. Pro správné sbalení fúzních proteinů se mezi dílčí proteiny vkládá sekvence několika aminokyselin, tzv. spojka. Myc-tag spolu s dalšími restričními místy tvořil spojku mezi kandidátním proteinem a TagRFP-T (viz Obr. 11). Vložením Myc-tag přímo do fúzního proteinu jsme zároveň vyřešili absenci specifických protilátek proti kandidátním proteinům. Proti Myc-tag existují monoklonální protilátky, což umožňovalo detekci a případnou izolaci fúzního proteinu.

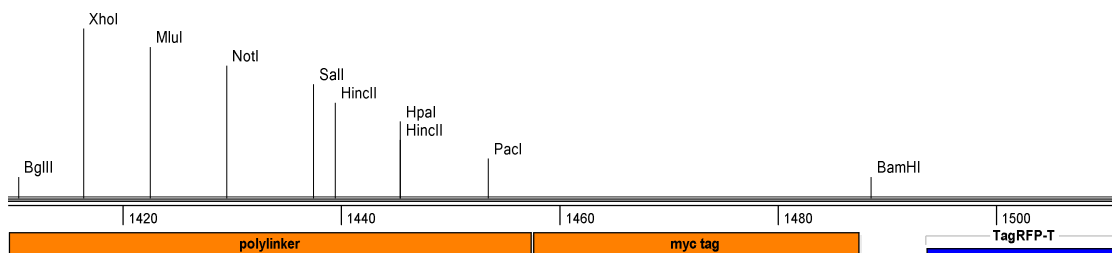


Obr. 10: Schématický náčrt pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1. Původní polylinker pMSCV-IRES-Thy1.1 vektoru byl obohacen o dalšími restriční místa, Myc-tag a monomerní červený fluorescenční protein TagRFP-T bez start kodonu a obsahující stop kodon. LTR („long terminal repeat“) a sekvence tzv. pakáčovacího signálu sloužící jako vazebné místo pro účinné sbalení virových partikulí.



Obr. 11: Schématický nákrés fúzního proteinu. Modře je označen kandidátní protein, přerušovaná čára označuje spojku (Myc-tag spolu s dalšími restričními místy) a 3D struktura reprezentuje TagRFP-T²⁹, který je umístěn na C-konci kandidátního proteinu.

TagRFP-T byl amplifikován pomocí jednokrokové stupňované PCR z TagRFP-T/pcDNA3.1. Specifické primery obsahující navíc řadu restričních míst byly použity pro obohacení polylinkeru původního pMSCV-IRES-Thy1.1. Z tohoto důvodu by fwd primer dosahoval délky 103 nt (viz Obr. 12).



5'-AAAAC TCGAGACGCGTGCGGCCGCAGTCGACGTTAACTTAATTAAGAGCAGAAACTCATCTC
TGAAGAGGATCTGGGATCCGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTG-3'

Obr. 12: Schématický nákrés a sekvence polylinkeru před TagRFP-T.

Modře je označena sekvence komplementární s TagRFP-T, oranžově pak sekvence Myc tag, červené adeninové nukleotidy jsou zde vloženy pro dodržení čtecího rámce.

Z důvodu snížení pravděpodobnosti vzniku chyby při syntéze takto dlouhého fwd primeru, byl primer rozdělen na dva Fmcs1 a Fmcs2 s přesahem (viz Obr. 13).

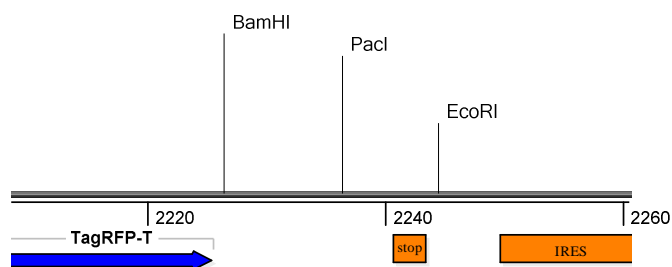
Fmcs1 5'-AAAAC TCGAGACGCGTGCGGCCGCAGTCGACGTTAACTTAATTAAGAGCAGAAACTCATCTCTG-3'

Fmcs2 5'-GAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGGGATCCGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTG-3'

Obr. 13: Nákrés sekvencí dvou fwd primerů pro polylinker. Sekvence jsou označeny stejně jako v Obr.12. Přesahy mají stejnou sekvenci, nejsou k sobě komplementární. Fmcs, fwd multiple cloning site.

²⁹ 3D krystalová struktura stažena z www.rcsb.org/pdb/. Jelikož struktura TagRFP-T nebyla v databázi dostupná, byla použita struktura příbuzného asRFP.

Rev primer obsahoval vedle restrikčních míst **STOP KODON** (viz Obr. 14).

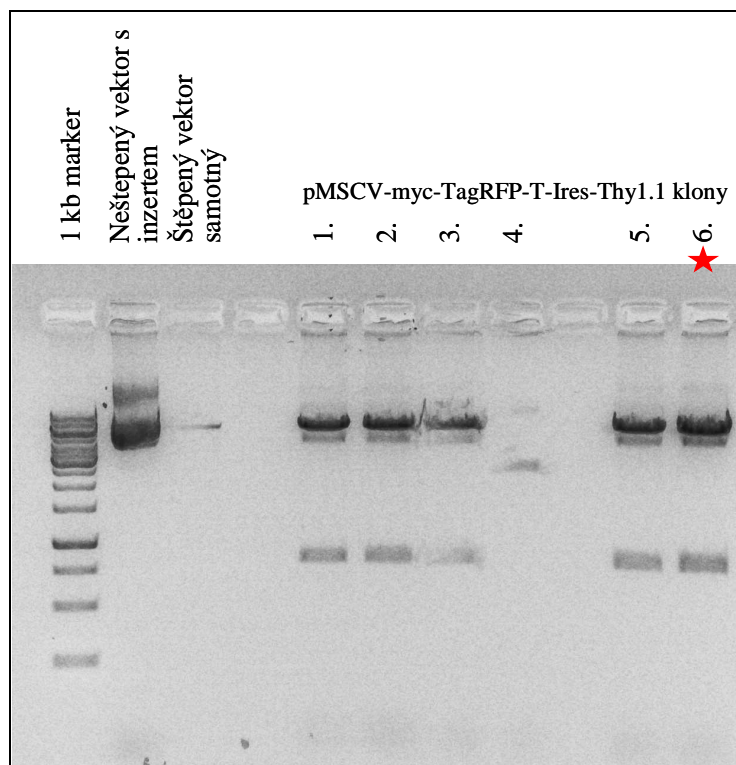


Rmcs 5'-AAAAGAATTCCTATTTAATTAAGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'

Obr. 14: Schématický náčrt a sekvence polylinkeru za TagRFP-T. TagRFP-T obsahuje na svém 3' konci stop kodon. Navíc byl však do polylinkeru za jeho sekvencí vložen další stop kodon pro případ, kdy by bylo nutné vyštěpit celý TagRFP-T pomocí enzymu BamH I a ve vektoru by zůstal pouze kandidátní gen označený Myc-tag, kterému však byl na 3' konci odstraněn stop kodon.

Inzert složený z polylinkeru, Myc-tag a TagRFP-T byl vytvořen pomocí jednokrokové stupňované PCR (viz výše). Oba fwd primery (Fmcs1 a Fmcs2) v rozdílných koncentracích spolu s rev primerem (Rmcs) byly do reakce přidány současně. Finální koncentrace Fmcs2 byla 100 krát nižší než Fmcs1 a Rmcs. Tato koncentrační nerovnost primerů způsobila, že vznikalo pouze malé množství PCR produktů obsahující Fmcs2 (vnitřní fragment). Z těchto produktů však probíhala přednostně syntéza vnější dlouhé sekvence s Fmcs1 obsahující všechna restrikční místa (vnější fragment). Stupňovaná PCR založená na dvou částech byla použita pro znásobení tvorby daných fragmentů. První část měla méně cyklů a teplota nasedání primerů byl nastavena na ideální teplotu Fmcs2 primeru. Naopak ve druhé části, která obsahovala více cyklů, byla nastavena ideální nasedací teplota Fmcs1 primeru. Tyto dvě zlepšení PCR umožnily přednostní vznik kompletního vnějšího fragmentu. Velikost získaného fragmentu na agarózovém gelu odpovídala předpokladu 842 bp. Fragment byl vyizolován z agarózového gelu, restrikčně naštěpen enzymy Xho I a EcoR I a ligován do pMSCV-IRES-Thy1.1 vektoru (rovněž naštěpen enzymy Xho I a EcoR I). Jelikož vnější fragment je pouze o 44 nt delší než vnitřní, což je špatně oddělitelné na agarózovém gelu, je možné, že vyizolovaný fragment byl směsí obou PCR produktů. Tato skutečnost však nijak nekomplikovala další postup, jelikož vnitřní fragment neobsahoval potřebná restrikční místa pro zaklonování do pMSCV-IRES-Thy1.1 vektoru. Ligační směs byla použita k transformaci bakteriálního kmene TOP10. Z vyrostlých kolonií na Petriho misce bylo vybráno 6 kolonií a z nich byly připraveny miniprepy. Klony 5 a 6 (viz Obr. 15) byly po restrikčním ověření

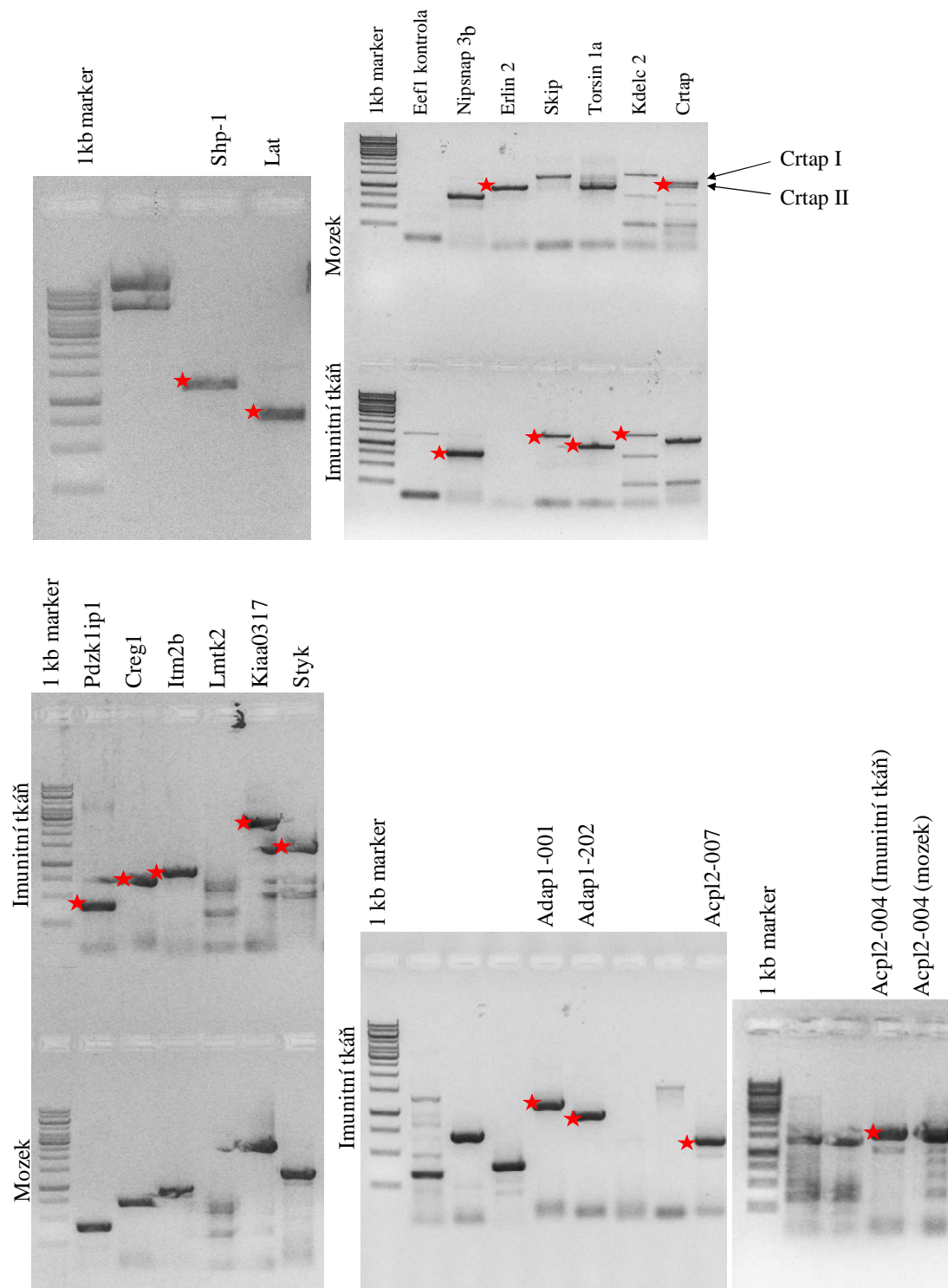
přítomnosti inzertu v miniprepech osekvenovány. Sekvence polylinkeru, Myc-tag i TagRFP-T souhlasila s návrhem restričních míst a sekvencí fluorescenčního proteinu. Pro další práci byl používán klon 6 vektoru pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1.



Obr. 15: Restriční štěpení pMSCV-Myc-TagRFP-T-Ires-Thy1.1 klonů. 1% agarózový gel obsahující neštěpený pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 klon 1 a produkty restričního štěpení - samotný pMSCV-IRES-Thy1.1 vektor bez inzertu a jednotlivé pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 miniprepy, které byly štěpeny enzymy Xho I a EcoR I po dobu 2 hodin při 37°C. S hvězdou označeným klonem 6 jsme dále pracovali.

4.2.3 Klonování kandidátních genů a příprava MSCV vektorů

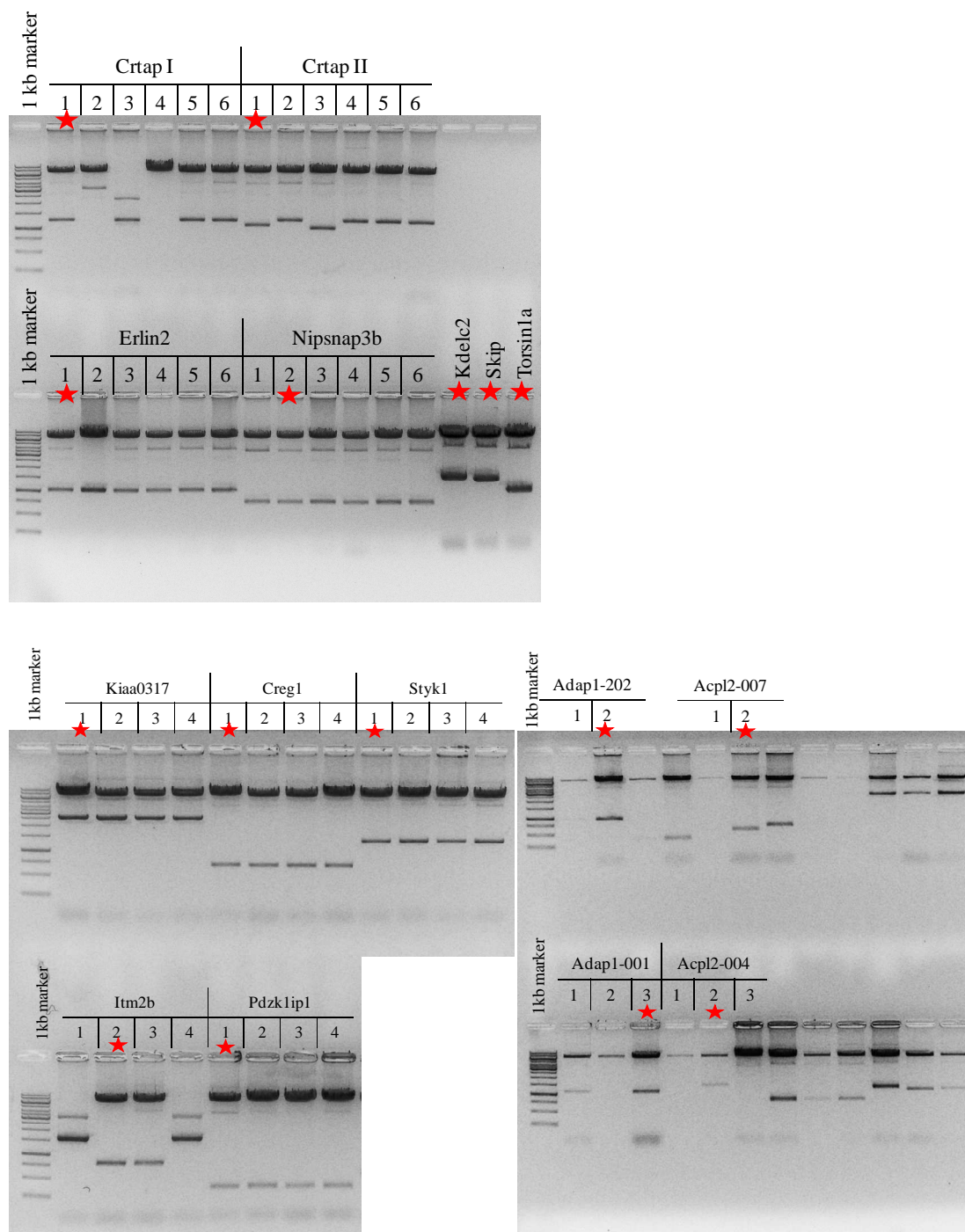
cDNA jednotlivých kandidátních genů a kontrolních genů byla amplifikována metodou PCR pomocí specifických primerů z myší cDNA (mozek a směs imunitních tkání obsahující slezinu, uzliny, brzlík, kostní dřeň). Primery byly navrženy ručně (viz kap. 3.2.4) a jejich konkrétní sekvence jsou uvedeny v kap. 3.1.3. Složení reakční směsi a nastavení cyklů je popsáno v kap. 3.2.5. Jednotlivé PCR produkty byly rozděleny v agarózovém gelu a jejich velikost porovnána s 1 kbp markerem (viz Obr. 16).



Obr. 16: Klonování kandidátních genů a kontrolních genů *Lat* a *Shp-1* (část 643-1788 odpovídající fosfatázové doměně). 1% agarózový gel s PCR produkty. *Eef1* gen sloužil jako pozitivní kontrola průběhu PCR reakce. Pro správné vyklonování jednotlivých kandidátních genů bez mutací bylo potřeba více pokusů. Zobrazeny jsou agarózové gely s úspěšným PCR produktem daného genu. S cDNA označenými hvězdou jsme dále pracovali.

Jelikož většina genů byla vyklonována z cDNA pocházející z mozku i imunitních tkání, dále jsme pracovali s PCR produkty pocházejícími z imunitních tkání. První výjimku tvořil gen *Erlin2*, jehož produkt nebyl v cDNA pocházející z imunitních tkání přítomen. Nízká exprese genu v imunitních tkáních, která byla potvrzena pomocí real-time PCR kolegou Pavlem Pitule, patrně způsobila nemožnost vyklonovat gen *Erlin2* z těchto tkání. Druhou výjimkou byl gen *Crtap*. Zatímco pouze jeden PCR produkt byl patrný v agarózovém gelu z cDNA pocházející z imunitních tkání, dva produkty byly amplifikované z cDNA pocházející z mozku, oba odpovídající správné velikosti genu. Gen *Crtap* nemá v žádné databázi uvedenou alternativní transkripční variantu, proto důvod přítomnosti dvou PCR produktů není zřejmý. Pro zajištění úplnosti analýzy, byly oba produkty vyřiznuty – delší byl označen jako Crtap I, kratší jako Crtap II (viz Obr.16). V případě genu *Nipsnap3b*, pouze delší transkript Nipsnap3b-001 o délce 750 bp byl dostatečně amplifikován z obou tkání (dále použit PCR produkt z imunitních tkání). Kratší transkript Nipsnap3b-002 byl sice velice slabě patrný v agarózovém gelu, avšak toto množství PCR produktu, patrně úměrné jeho koncentraci v tkáních, bylo příliš nízké pro další postup. Jediný kandidátní gen *Lmtk2* (velikost 4444 bp) nebyl při nejrůznějším nastavení a optimalizaci PCR podmínek vyklonován. cDNA jednotlivých kandidátních genů a jejich transkripčních variant spolu s kontrolami odpovídající předpokládaným velikostem byly vyizolovány z agarózového gelu.

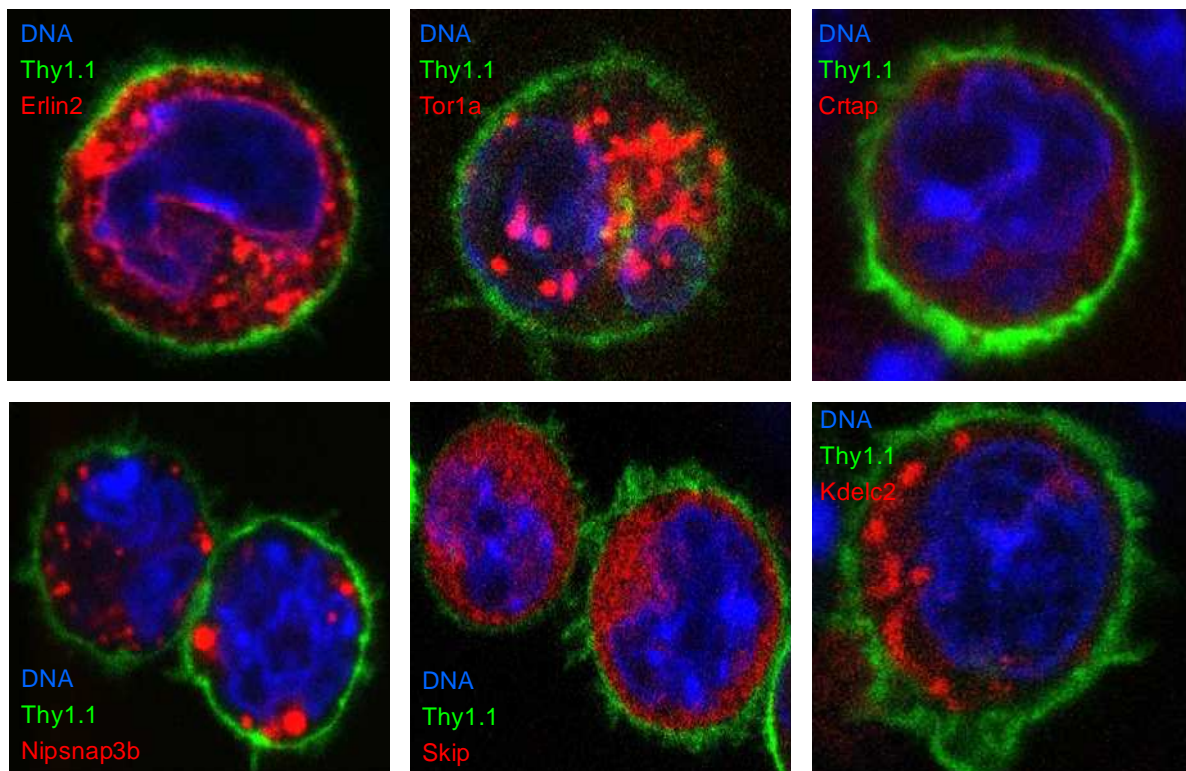
Všechny PCR produkty byly naštěpeny restričními enzymy Mlu I a Sal I a ligovány do stejnými enzymy naštěpeného vektoru pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1. Ligační směs byla použita pro transformaci TOP10 bakterií. Adekvátní množství miniprepů bylo zaočkováno v závislosti na počtu narostlých kolonií na Petriho miskách oproti kontrolám (ligační směs se samotným štěpeným vektorem s ligázou a bez ligázy). Tyto miniprepy byly restričně ověřeny na přítomnost inzertů (viz Obr. 17) a část byla osekvenována. Sekvence jednotlivých kandidátních genů a kontrolních genů byly shodné s deponovanými sekvencemi v databázích NCBI, Ensembl a UCSC.

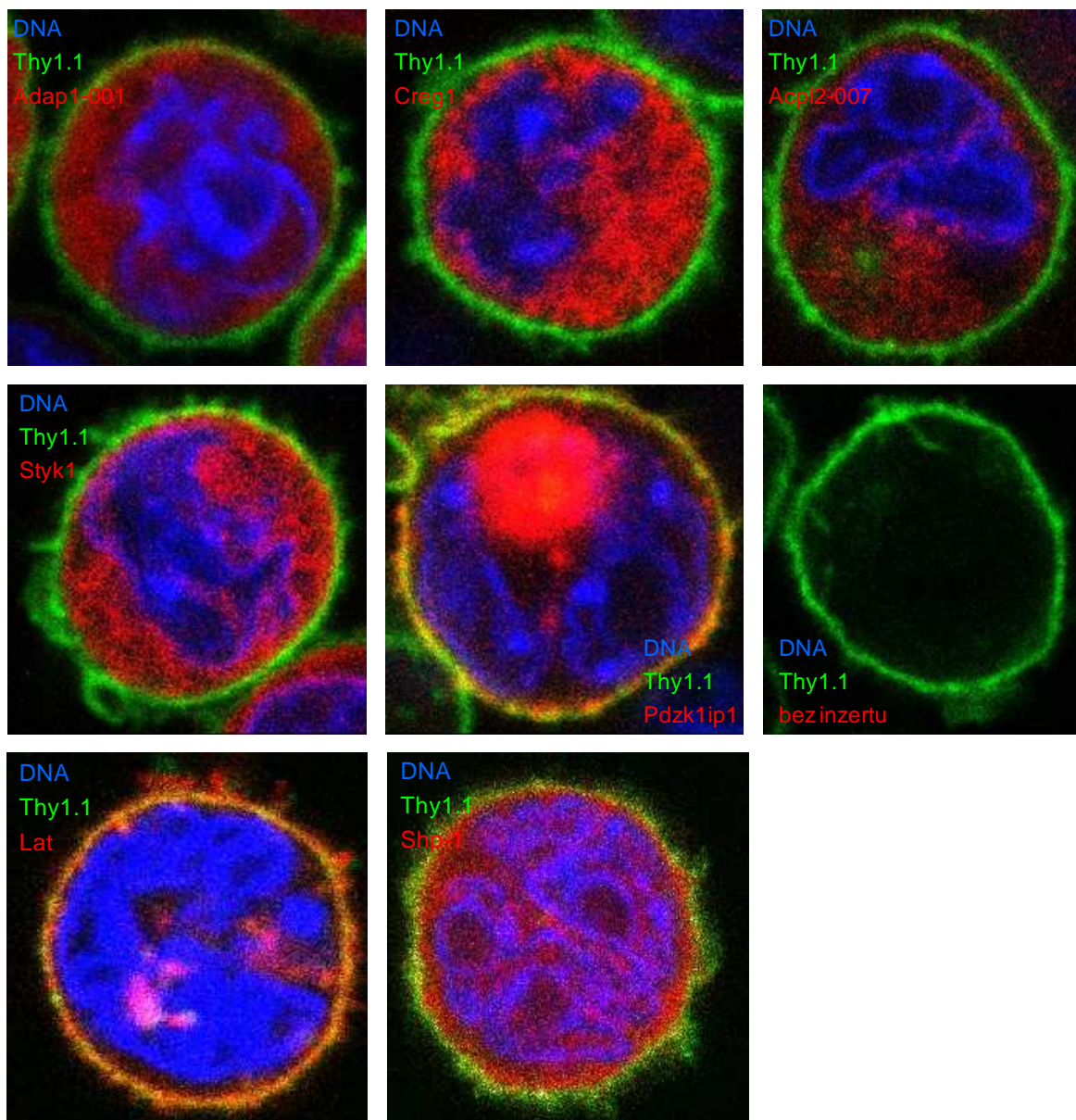


Obr. 17: Restriční štěpení miniprepů a midiprepů kandidátních genů. 1% agarózový gel s jednotlivými miniprepy a midiprepy (genů *Kdelc2*, *Skip*, *Torsin1a*), které byly štěpeny enzymy Mlu I a Sal I po dobu 3 hodin při 37°C. Hvězdou jsou označeny miniprepy a midiprepy, které jsme dále používali pro analýzu.

4.2.4 Buněčná lokalizace

Buněčná lokalizace jednotlivých kandidátních genů exprimovaných z konstruktů kandidátní gen/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 byla analyzována na stabilně transdukovaných Wehi 231 (myší suspenzní B-buněčná lymfoidní linie). Buňky byly mikroskopovány živé, nefixované v Lab-Tek komůrkách obvykle 48h – 72h po transdukci, ale dle potřeby i později. Fúzní kandidátní proteiny s TagRFP-T byly vizualizovány prostřednictvím fluorescence TagRFP-T. Jádra byla vizualizována pomocí barvy Hoechst 34580, která je schopna pronikat přes plasmatickou membránu živých buněk a vázat se na DNA. Povrchové barvení Thy1.1 pomocí anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátky bylo použito pro vizualizaci cytoplasmatické membrány. Překryv emisních spekter jednotlivých fluorescenčních barev byl zkontrolován pomocí buněk obarvených vždy pouze jednou barvou. Jelikož Wehi 231 endogenně neexprimují povrchový marker Thy1.1, jako negativní kontrola v tomto případě sloužily buňky transdukované samotným vektorem pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 bez inzertu.



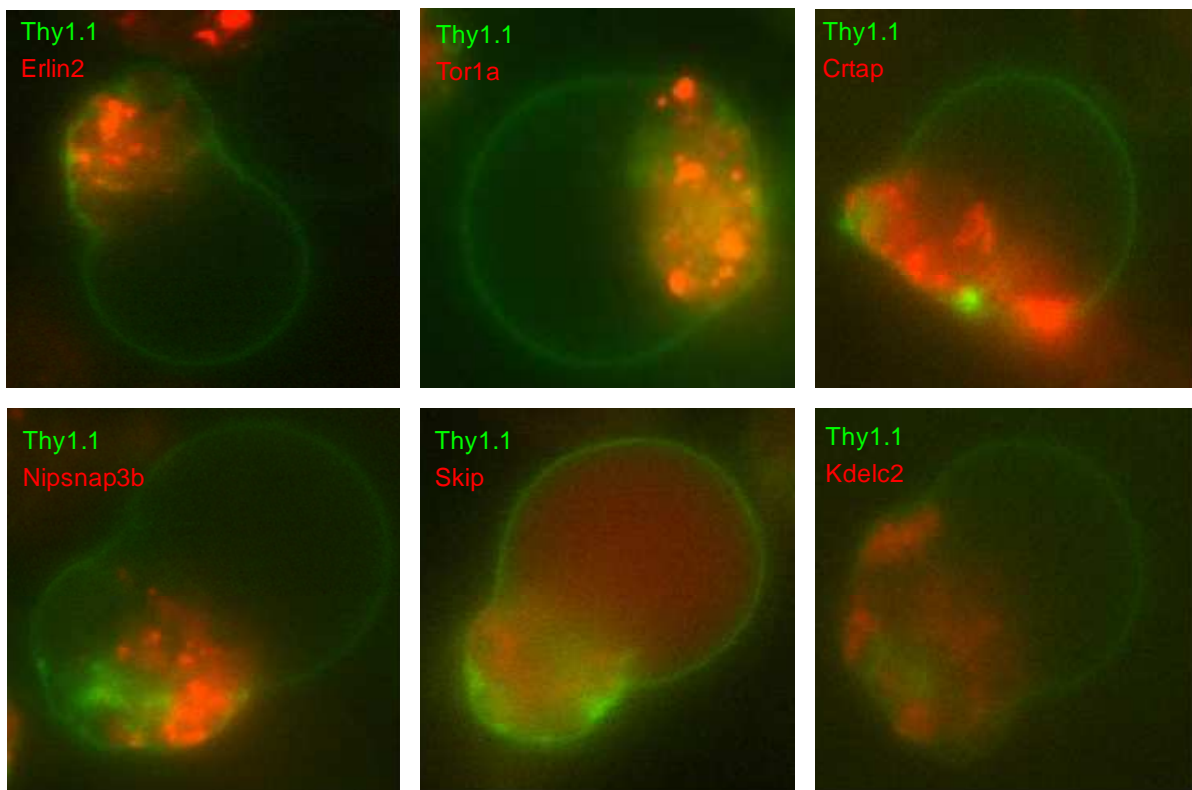


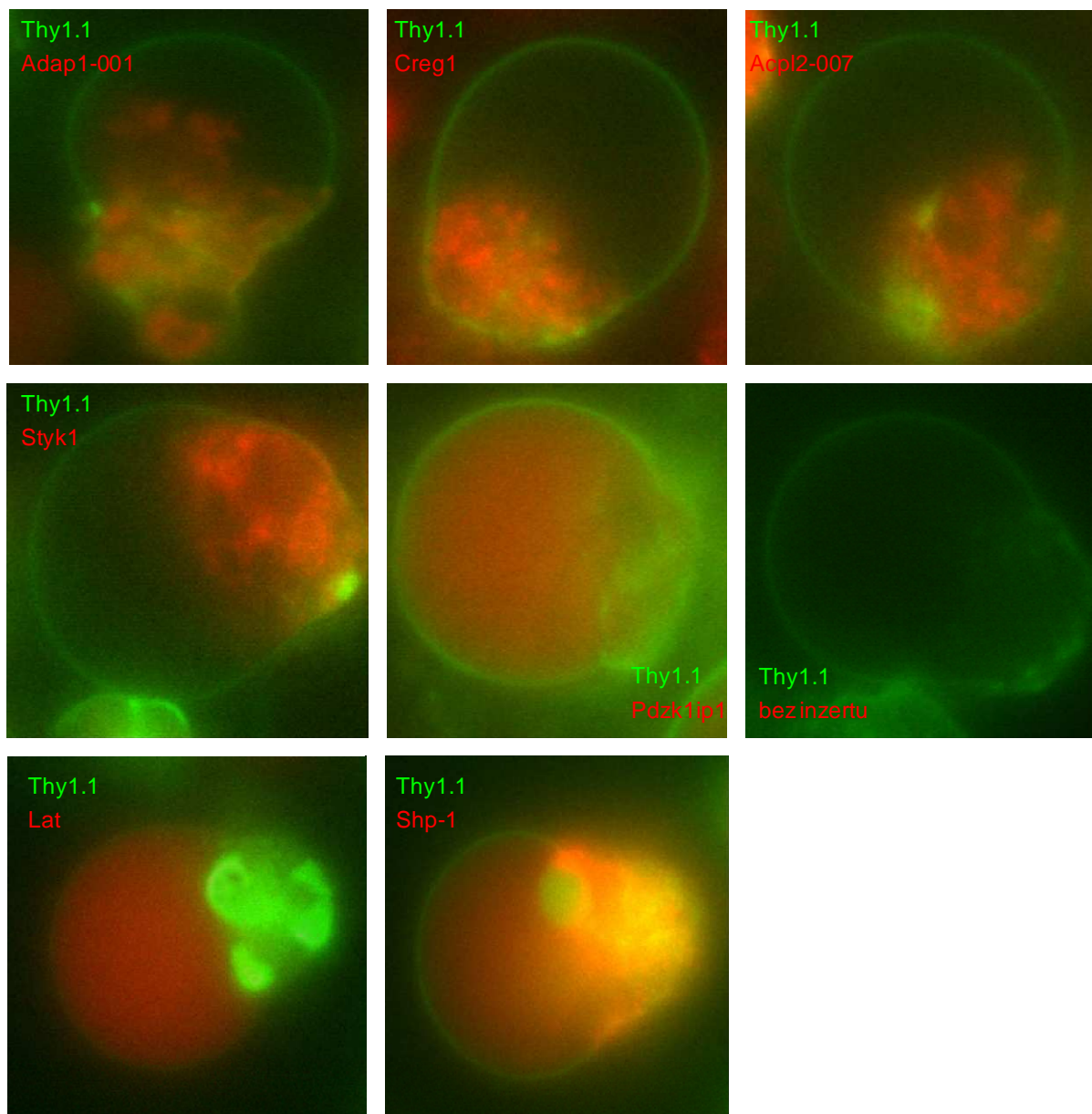
Obr. 18: Buněčná lokalizace kandidátních a kontrolních proteinů ve Wehi 231. Stabilně transdukovávané Wehi 231 jednotlivými kandidátními geny spolu s kontrolami (Lat a fosfatázová doména Shp-1 643-1788) byly analyzovány živé, nefixované v Lab-Tek komůrkách pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 (*Leica Microsystems*). Zobrazena je i kontrola (Wehi 231 exprimující pouze samotný vektor pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 bez inzertu) pro ověření, že při daném nastavení mikroskopu nedochází k překryvu fluorescenčních spekter. DNA je vizualizovaná pomocí Hoechst 34580 (modře), plazmatická membrána vizualizovaná anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátkou (zeleně) a fúzní kandidátní proteiny svítí prostřednictvím TagRFP-T (červeně). Zvětšení 100x. Zoom 6.0

Z obrázku 18 je patrné, že obě kontroly jsou správně lokalizované – transmembránový adaptorový protein Lat je integrován do plazmatické membrány (pozitivní kontrola) a fosfatázová doména (část 643-1788) Shp-1 intracelulární fosfatázy je lokalizována

v cytoplasmě (negativní kontrola). Z obrázku lze dále vyčíst, že pouze Pdzk1ip1 protein je lokalizovaný na plasmatické membráně stejně jako pozitivní kontrola, jelikož dochází k překryvu zeleného Thy1.1 signálu označujícího plasmatickou membránu s červeným signálem fúzního Pdzk1ip1 s TagRFP-T. Pro jistý průkaz lokalizace na plasmatické membráně je vhodné ji zřetelně oddělit od interních membrán a jádra při použití PMS metody (viz dále). Žádný z ostatních kandidátních proteinů není majoritně přítomen na plasmatické membráně. Crtap, Skip, Adap1-001, Creg1, Acpl2-007 a Styk jsou přítomny v cytoplasmě stejně jako negativní kontrola. Torsin1a, Erlin2, Nipsnap3b a Kdelc2 jsou lokalizovány intracelulárně v různých veziklích, případně na jaderné membráně či membráně endoplasmatického retikula (Erlin2).

PMS metoda („plasma membrane spheres“ viz kap.3.2.17) byla použita pro lepší rozlišení, zda je kandidátní protein lokalizován v plasmatické membráně nebo těsně pod ní. Metoda spočívá ve vytvoření veziklů obsahujících pouze plasmatickou membránu vyplněnou cytoplasmou, která je oddělena od zbytku buněčných struktur vlivem vystavení buněk mírně hypotonickému prostředí po delší dobu (12-16 hodin).





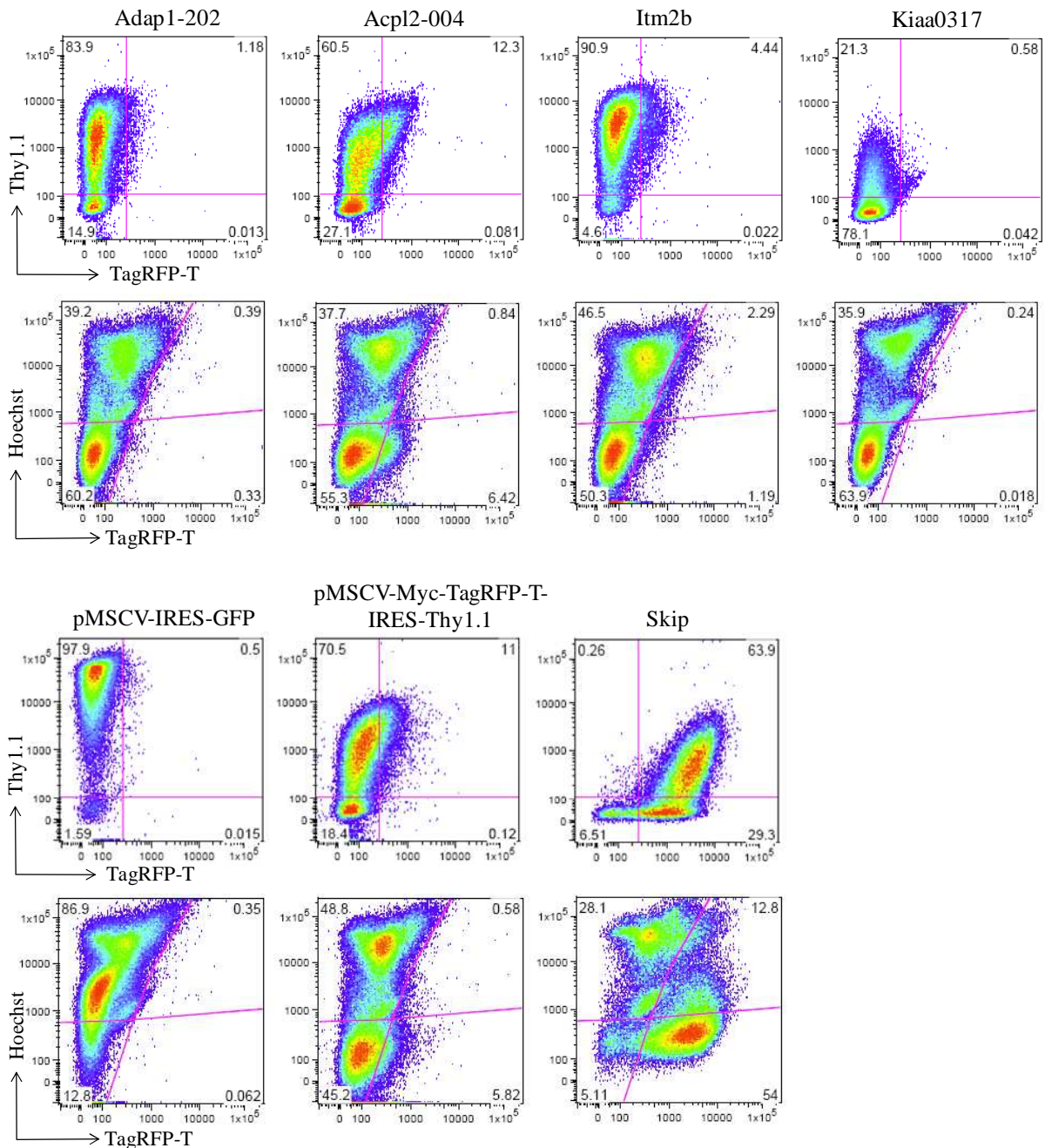
Obr. 19: Buněčná lokalizace kandidátních a kontrolních proteinů ve Wehi 231 po použití PMS metody. Stabilně transdukováné Wehi 231 jednotlivými kandidátními geny spolu s kontrolami (Lat a fosfatázová doména Shp-1 643-1788) byly inkubovány v PMS pufru po dobu 12-16 hodin při 37°C a následně analyzovány živé, nefixované pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DMI 6000 v Lab-Tek komůrkách. Zobrazena je i kontrola (Wehi 231 exprimující pouze samotný vektor pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 bez inzertu) pro ověření, že při daném nastavení mikroskopu nedochází k překryvu fluorescenčních spekter. Plasmatická membrána vizualizovaná anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátkou (zeleně) a fúzní kandidátní proteiny svítí prostřednictvím TagRFP-T (červeně). Zvětšení 100x.

Obrázek 19 ukazuje, že PMS metoda není ideálním důkazem, jelikož samotné kontroly jsou lokalizovány mimo svá tradiční umístění v buňkách. Pozitivní membránová kontrola (protein Lat) je lokalizována do vnitřku vytvořeného veziklu. Naopak negativní

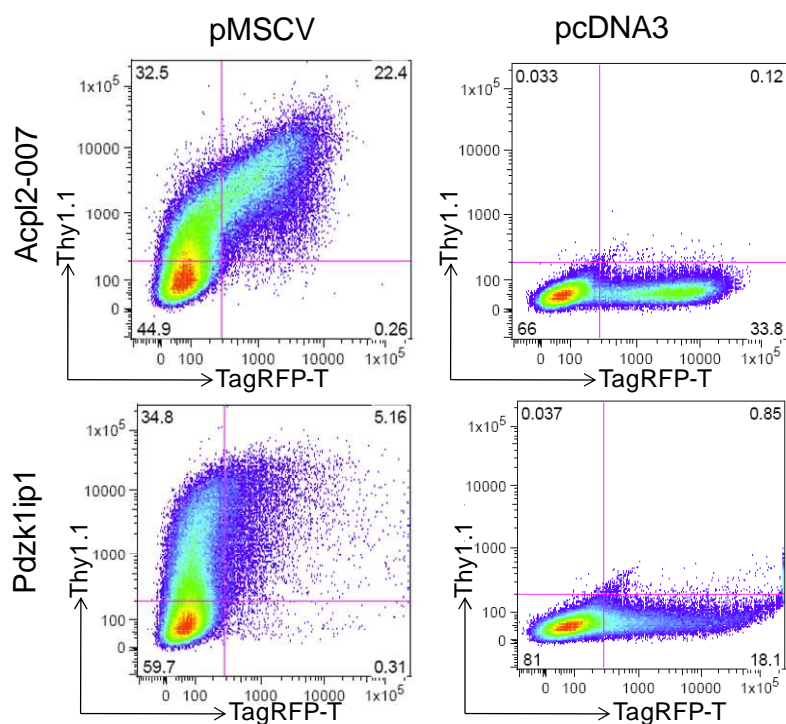
cytoplasmatická kontrola (Shp-1 fosfatázová doména) vyplňuje vnitřek veziklu obsahující cytoplasmu, ale zároveň je přítomna ve zbytku buněk. Z toho vyplývá, že pomocí této metody nelze usuzovat na přesnou lokalizaci kandidátních proteinů, může se pouze o ní diskutovat na základě analogie s kontrolami. Pdzk1ip1 protein je lokalizovaný stejně jako Lat, tudíž tento protein může být integrován do plasmatické membrány. Protein Skip sice stejně jako Pdzk1ip1 a Lat vyplňuje vezikl, ale z předešlých dat z konfokálního mikroskopu (viz Obr. 18), je zřetelné, že tento protein je cytoplasmatický. Ostatní kandidátní proteiny jsou po PMS metodě stejně jako částečně Shp-1 lokalizovány do zbytku buňky. Na základě obr. 18 a 19 lze usoudit, že kandidátní proteiny s výjimkou Pdzk1ip1 nejsou pravděpodobně lokalizovány na plasmatické membráně. Toto pozorování však bude nutné potvrdit pomocí jiných metod. Je možné použít alternativní metodu tzv. „giant plasma membrane vesicles“ (GPMV) (Baumgart et al., 2007). Druhou možností je desintegrovat buňky, oddělit pomocí centrifugace jednotlivé buněčné frakce (jádra, plasmatické membrány a cytosol) a kandidátní proteiny na Western blotu biochemicky detekovat monoklonální protilátkou proti Myc-tag.

Kandidátní geny *Itm2b*, *Kiaa0317* a transkripční varianty *Adap1-202* a *Acpl2-004* nebyly v buňkách exprimovány. Neúčinná transfekce či infekce však nebyla důvodem, jelikož povrchový marker Thy1.1 překládaný v MSCV vektorech pomocí IRES sekvence byl na povrchu buněk detekován (viz Obr. 20). Rovněž uvedené proteiny nebyly pro transdukované buňky toxické, jelikož časně apoptotické buňky neměly zvýšenou koncentraci fúzních proteinů s TagRFP-T oproti živým buňkám (viz Obr. 20). pMSCV-IRES-GFP, pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 bez inzertu sloužily jako negativní kontroly pro nastavení TagRFP-T negativních buněk, Skip/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 sloužil jako pozitivní kontrola exprese fúzního proteinu s TagRFP-T. Z obrázku 20 je patrné, že samotný MSCV vektor bez inzertu vykazuje nízkou fluorescenci oproti zcela negativní kontrole pMSCV-IRES-GFP. Tato intenzita fluorescence však nedosahuje míry fluorescence pozitivní kontroly. Přítomnost interního start kodonu ve stejném čtecím rámci několik nukleotidů od zrušeného původního start kodonu je možným důvodem fluorescence. S určitou mírou náhodnosti může docházet k translaci samotného TagRFP-T z tohoto start kodonu i bez přítomnosti inzertu. pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 vektor se pro další použití bude muset předělat a interní start kodon zrušit. Rovněž samotný MSCV vektor nebyl zřejmě důvodem absence fluorescence, jelikož exprese genů (např. *Acpl2-007* a *Pdzk1ip1*) se zvýšila pouze minimálně po překlonování kandidátních fúzních genů do velmi účinného expresního vektoru pcDNA3 (viz Obr. 21). Ostatní možnosti neúčinné exprese genů jsou probrány v diskuzi diplomové

práce. Lze tedy říci, že tyto kandidátní geny spolu s transkripčními variantami jsou pravděpodobně v buňkách endogenně velmi slabě exprimované a jejich hladina je přísně regulovaná.



Obr. 20: Analýza exprese genů. Wehi 231 stabilně transdukovávané geny *Itm2b*, *Kiaa0317*, *Skip*, transkripčními variantami *Adap1-202* a *Acpl2-004* a kontrolními vektory pMSCV-IRES-GFP, pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 bez inzertu byly obarveny anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátkou a barvou Hoechst 33258 detekující mrtvé buňky a analyzovány LSR II průtokovým cytometrem (*BD Biosciences*). Exprese fúzních kandidátních genů byla detekována prostřednictvím fluorescence TagRFP-T.



Obr. 21: Srovnání exprese fúzních *Acpl2-007* a *Pdzk1ip1* genů s TagRFP-T mezi pMSCV a pcDNA3 vektorem. Phoenix-Eco linie transientně exprimující fúzní geny *Acpl2-007* a *Pdzk1ip1* s TagRFP-T z retrovirového MSCV vektoru či expresního vektoru pcDNA3 byly obarveny anti-Thy1.1-FITC monoklonální protilátkou a analyzovány LSR II průtokovým cytometrem (*BD Biosciences*). Exprese fúzních kandidátních genů v obou vektorech byla detekována prostřednictvím fluorescence TagRFP-T.

4.2.5 Změna exprese CD69

4.2.5.1 Funkční charakterizace T-buněčných linií

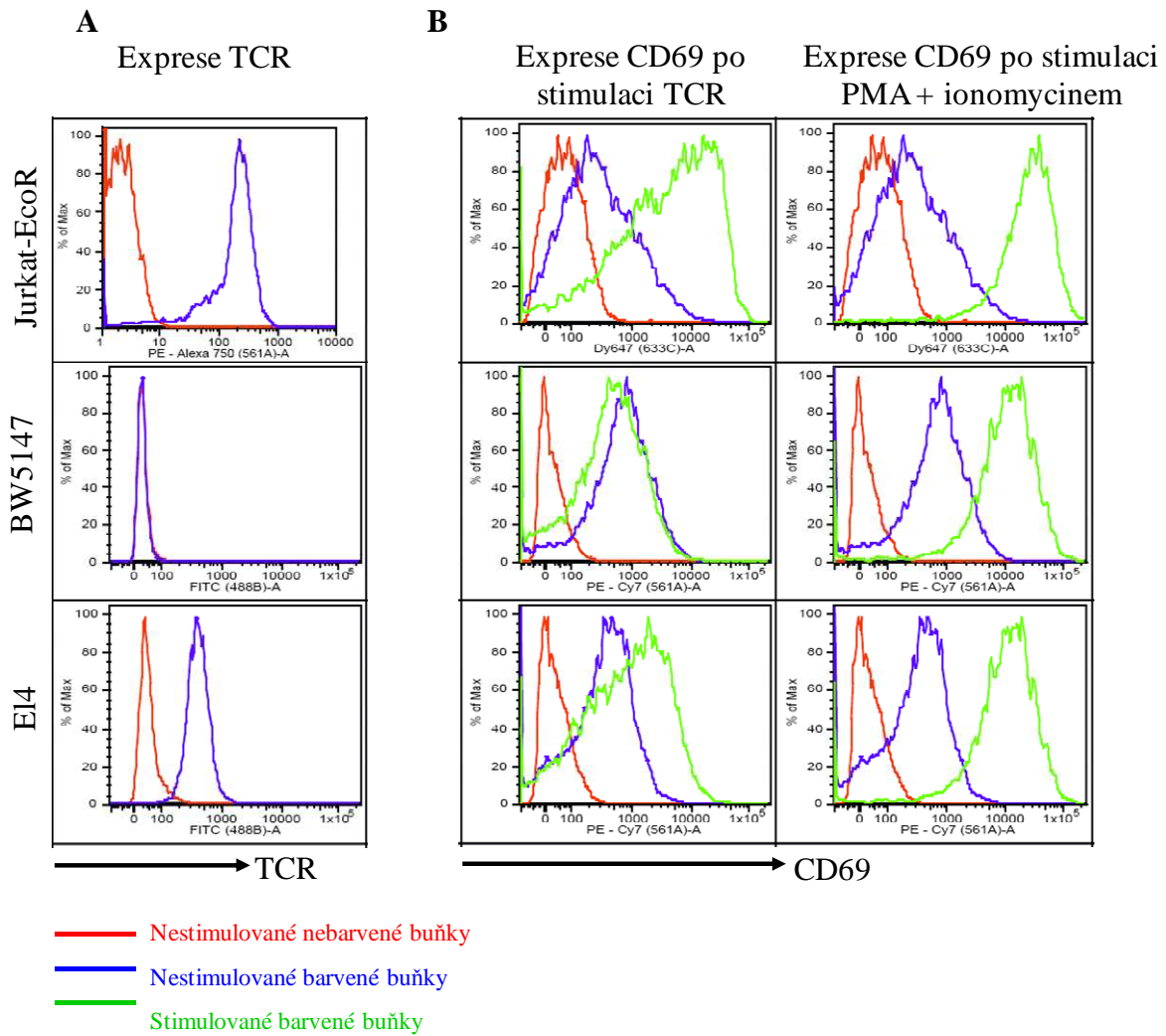
Nejdříve bylo nutné najít vhodnou buněčnou linii pro funkční analýzu *in vitro*. Testovali jsme přítomnost povrchového TCR a schopnost buněk zvyšovat expresi CD69 po stimulaci anti-TCR protilátkou a pozitivní kontrolou sestávající z PMA+ionomycin. Důležitým prvkem při rozhodování byl fakt, jak moc jsou dané buněčné linie infikovatelné ekotropními viry (tj. ověření míry exprese ekotropního retrovirového receptoru mCat1 na jejich povrchu). Výsledky jsou prezentovány na Obr. 22.

Myší T-buněčné linie se ukázaly být nevhodné pro analýzu z důvodu:

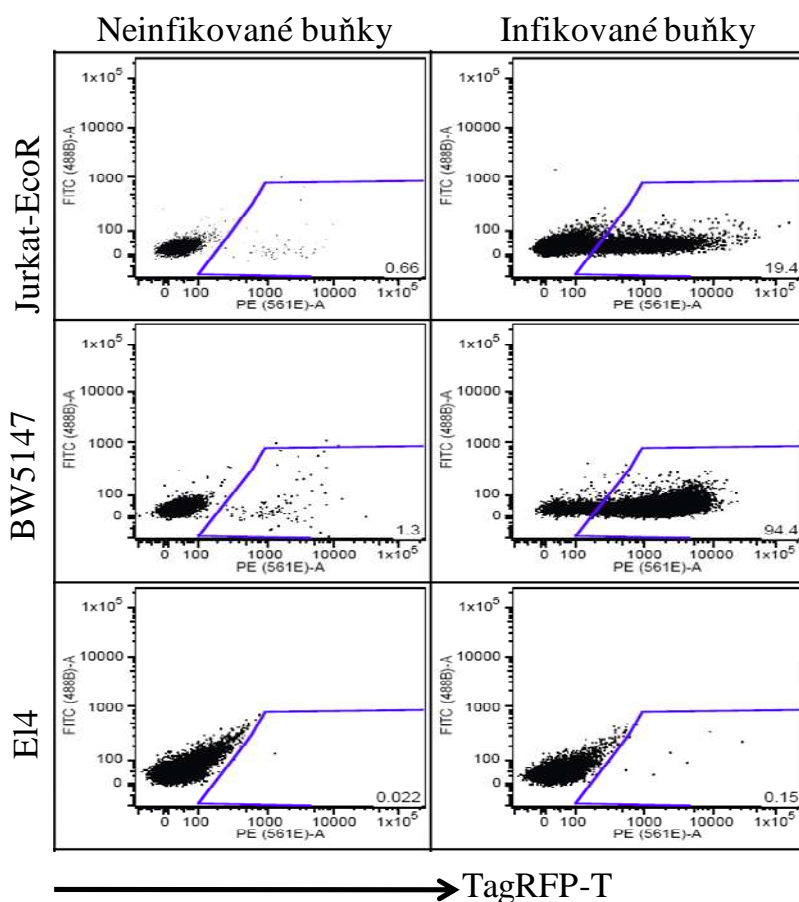
- rezistence vůči infekci retrovirovými vektory (EL-4 buněčná linie)
- absence povrchového TCR (BW5147 buněčná linie)

Pro analýzu zvýšené exprese CD69 byly nakonec vybrány lidské T-buněčné linie Jurkat-EcoR, které na svém povrchu exprimují TCR spolu s ekotopicky exprimovaným

ekotropním receptorem a jsou dobře stimulatelné. Analýza změny exprese CD69 v lidských Jurkat-EcoR po vnesení myších kandidátních genů je možná vzhledem k 75 % (*Skip*) - 97 % (*Erlin2*) homologii mezi lidskými a myšími ortologními kandidátními geny. Paralelně byly připravovány klony EL-4, které mají vyšší expresi ekotropního receptoru. Tento přístup ovšem selhal.



C



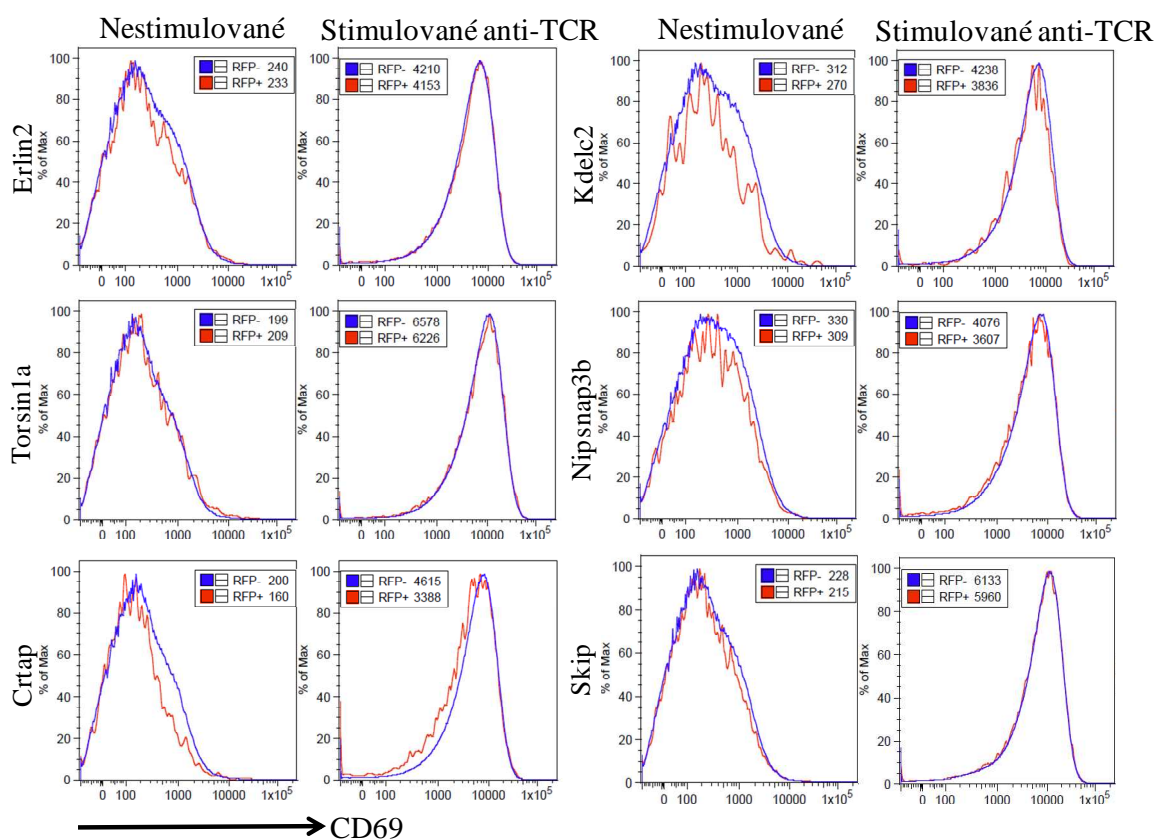
Obr. 22: Funkční charakterizace myších (EL-4, BW5147) a lidských (Jurkat-EcoR) T-buněčných linií pomocí průtokové cytometrie. (A) Expese TCR na povrchu buněk byla sledována pomocí anti-TCR monoklonálních protilátek. Histogramy zobrazují nebarvené (červené) a barvené (modré) buňky. (B) Jednotlivé buněčné linie byly stimulovány anti-TCR monoklonální protilátkou či kombinací PMA + ionomycin po dobu 16 hodin při 37°C a obarveny anti-CD69 monoklonálními protilátkami. Histogramy reprezentují nestimulované nebarvené (červené), nestimulované barvené (modré) a stimulované barvené (zelené) buňky. (C) Infikovatelnost buněčných linií byla testována dvojitou infekcí retrovirovým vektorem Skip/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 a expese Skip byla detekována prostřednictvím fluorescence TagRFP-T. Všechny vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru LSR II (BD Biosciences). FITC kanál sloužil jako referenční prázdný kanál pro zobrazení buněk v dot plot formátu.

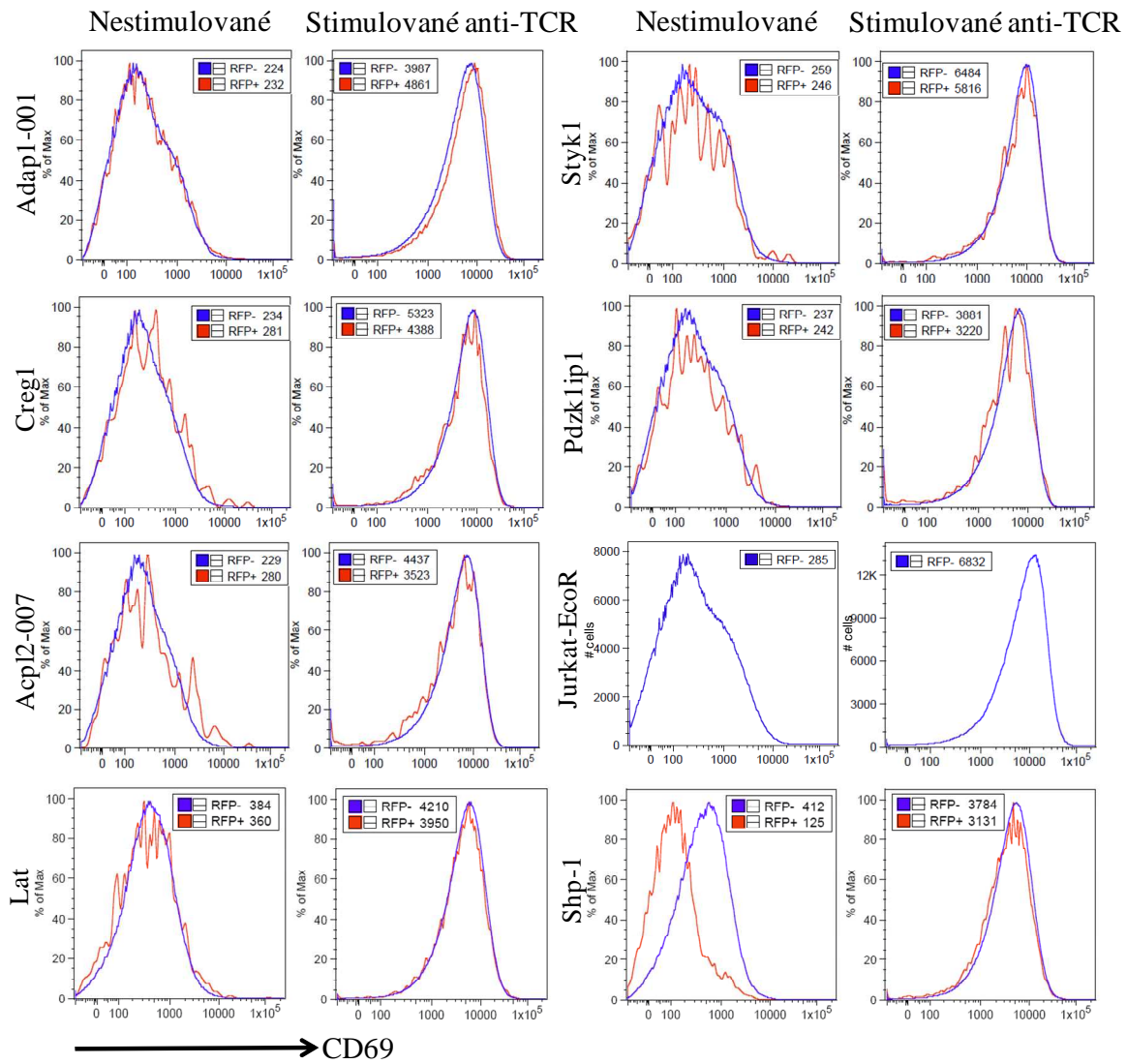
4.2.5.2 Analýza expese CD69 u stabilně transdukovaných Jurkat-EcoR

Při funkční analýze *in vitro* jsme zjišťovali, zda stabilně transdukované Jurkat-EcoR konstrukty kandidátní gen/pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1 mají rozdílnou expresi CD69 oproti netransdukovaným Jurkat-EcoR před či po stimulaci anti-TCR protilátkou. Testovali jsme tedy hypotézu, že kandidátní geny hrají roli v TCR signalizaci. Jelikož buněčná kultura obsahovala transdukované i netransdukované Jurkat-EcoR (infekce

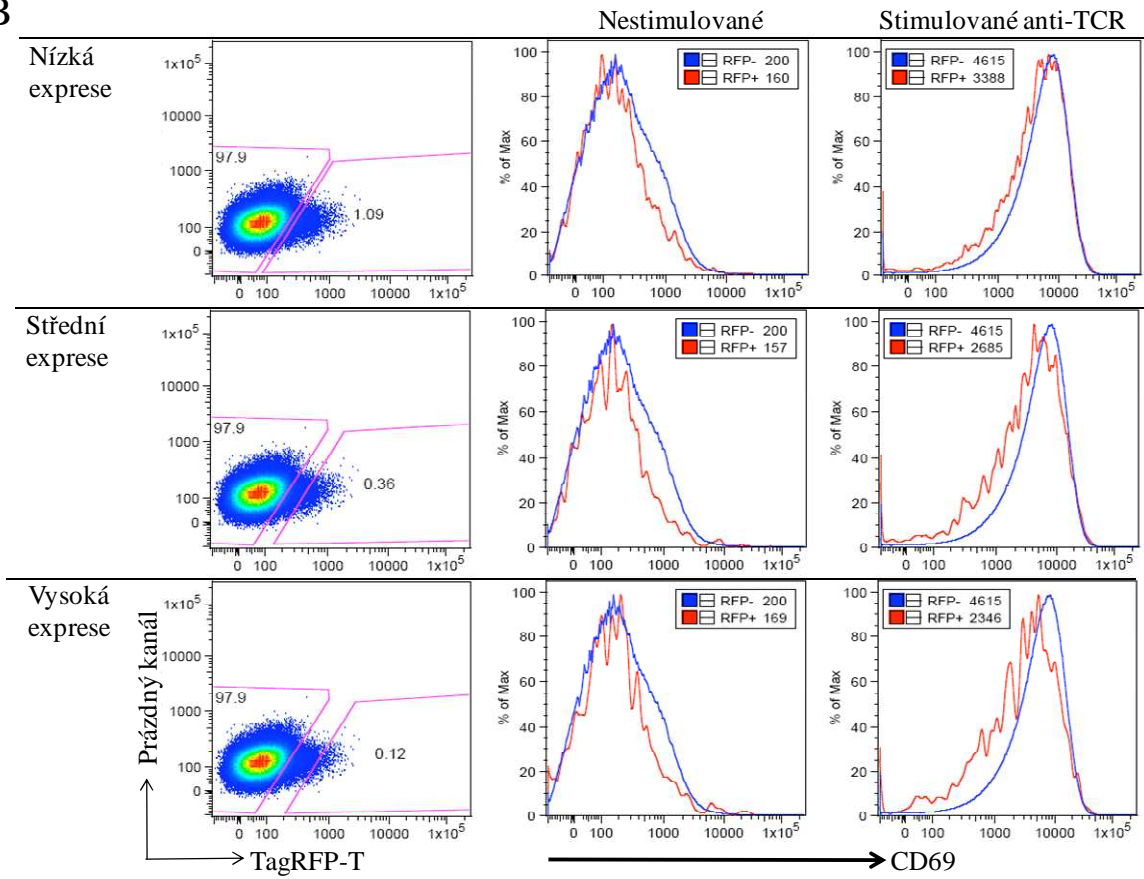
retrovirovými vektory nebyla stoprocentní), měli jsme v rámci jednoho stimulovaného vzorku i interní kontrolu (z tohoto důvodu jsme transdukované buňky předem netřídili). Jurkat-EcoR byly přes noc (16 hodin) při 37°C stimulovány anti-TCR protilátkou. Následující den byly buňky naznačeny anti-CD69-Alexa647 monoklonální protilátkou a její množství na povrchu buněk bylo analyzováno na průtokovém cytometru (viz Obr. 23). Jako negativní kontroly sloužily nestimulované netransdukované Jurkat-EcoR (endogenní přítomnost CD69 na povrchu buněk bez stimulace) a nezávisle stimulované netransdukované Jurkat-EcoR (testování základní schopnosti zvýšení exprese CD69) – ověření, že netransdukované buňky v rámci pozitivně transdukových kultur reagují na stimulaci stejným způsobem jako Jurkat-EcoR ze zcela negativní kultury.

A

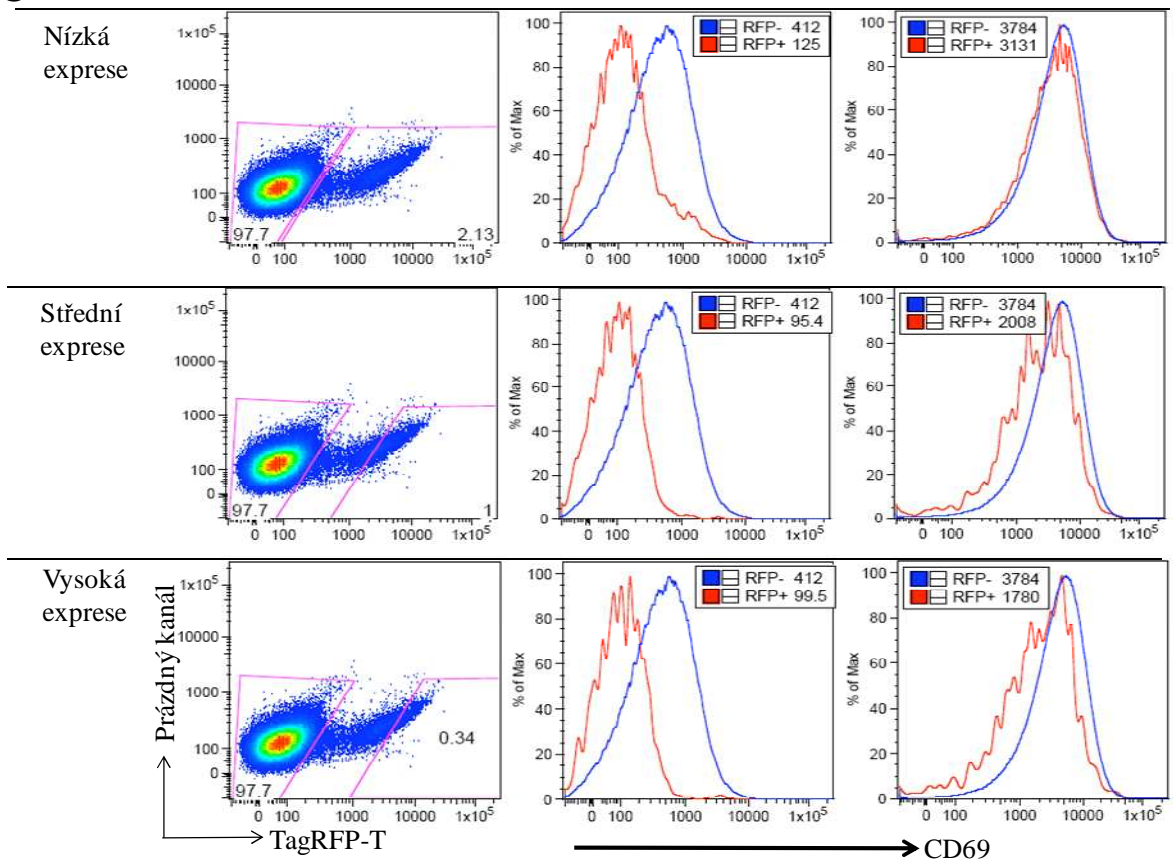




B



C



Obr. 23: Analýza exprese CD69 u stabilně transdukovaných buněk jednotlivými kandidátními geny a kontrolami po stimulaci anti-TCR protilátkou. (A) Stabilně transdukované Jurkat-EcoR jednotlivými kandidátními geny byly inkubovány po dobu 16 hodin s anti-TCR monoklonální protilátkou při 37°C, obarveny anti-CD69-Alexa647 a analyzovány pomocí průtokového cytometru LSR II (*BD Biosciences*). Exprese CD69 je porovnávána v rámci transdukovaných TagRFP-T pozitivních (červené histogramy) versus netransdukovaných TagRFP-T negativních (modré histogramy) buněk, které jsou součástí stejné buněčné kultury, před a po stimulaci protilátkou. Stabilně transdukované Jurkat-EcoR kontrolními geny *Lat* a *Shp-1* (část 643-1788) byly analyzovány v nezávislém měření. (B) Změna exprese CD69 u Jurkat-EcoR exprimujících různé koncentrace *Crtap* genu. (C) Změna exprese CD69 u Jurkat-EcoR exprimujících různé koncentrace *Shp-1* fosfatázové domény (část 643-1788). Geny, které v buňkách nebyly exprimované (*Itm2b*, *Kiaa0317* a transkripční varianty *Adap1-202* a *Acpl2-004*) byly z analýzy vynechány. Jako nezávislé kontroly sloužily netransdukované samotné nestimulované a stimulované Jurkat-EcoR. Legenda u jednotlivých populací buněk označuje intenzitu fluorescence anti-CD69-Alexa647 protilátky (arbitrární jednotky).

Na obrázku 23A je patrné překrytí histogramů u většiny genů (červené transdukované TagRFP-T pozitivní Jurkat-EcoR a modré netransdukované TagRFP-T negativní Jurkat-EcoR). Většina kandidátních genů tedy neovlivňuje expresi CD69 před ani po TCR stimulaci. Pouze *Crtap* ovlivňoval expresi CD69, a to stejným způsobem jako negativní kontrola fosfatázová doména *Shp-1* (část 643-1788)(viz Obr. 23C). Míra exprese *Crtap* genu inverzně korelovala s expresí CD69 před a po stimulaci transdukovaných buněk. To znamená, že čím větší byla exprese *Crtap* genu, tím méně CD69 se nalézalo na povrchu buněk (viz Obr. 23B). Zatím jsme se nezabývali způsobem, jakým tento gen ovlivňuje expresi CD69. Pozitivní kontrola protein *Lat* neovlivňuje oproti předpokladu expresi CD69. Tento efekt může být způsoben rozdílnou expresí endogenního *Lat* proteinu mezi různými Jurkat liniemi.

Uvedená experimentální data ukazují, že predikce transmembránové oblasti nebyla úspěšná. Nutná přítomnost predikované TM oblasti při druhém výběru vedla k identifikaci pouze jediného transmembránového proteinu *Pdzk1ip1*. Z tabulek 1, 2 a 3 je však patrné, že až na menší výjimky se programy *Phobius* a *Tmhmm* shodují v predikci hydrofobních oblastí (SP a TM oblast). Z tabulky 1 je jednoznačné, že většina doposud identifikovaných TRAP se nachází zejména do 200. pozice ve finální tabulce. Zatímco proteiny z prvního výběru s predikovaným SP tento trend kopírují (většina se dokonce nachází do 100. pozice), proteiny z druhého výběru s predikovanou TM oblastí už jsou ve finální tabulce umístěny dále (300. pozice a níže). Je tedy možné, že počet TRAP dle přísně stanovené definice je v genomu omezený a současný seznam TRAP je konečný a žádný zajímavý TRAP už mezi ně nezapadá.

5. Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo vyhledat v dostupných genomových databázích kandidátní transmembránové adaptorové proteiny (TRAP), provést jejich bioinformatické filtrování na základě predikovaných dat a publikovaných dat (exprese a literatura) a omezený počet TRAP poté vyklonovat a částečně funkčně charakterizovat. Na bioinformatické části jsem spolupracovala s kolegou Pavlem Pitule a pro podrobnější informace o této části odkazuji na jeho diplomovou práci (Komparativní genomická předpověď nových transmembránových adaptorových proteinů a jejich expresní analýza). Z důvodu úplnější anotace a aktuálnějších expresních dat pro lidské geny, byla ručně prohledávána lidská finální tabulka a přítomnost myších ortologů se kontrolovala následně. Tímto způsobem bylo vybráno 14 genů, se kterými jsem dále pracovala.

Většina kandidátních genů a kontroly byly vyklonovány z cDNA pocházející z myších imunitních tkání. Výjimku tvořily geny *Erlin2* a *Crtap*, které byly vyklonovány z cDNA pocházející z myšího mozku. cDNA genu *Erlin2* nebyla na agarózovém gelu v imunitních tkáních patrná, což naznačuje možnost, že tento gen není v imunitních tkáních exprimován. Z lidských expresních dat je však patrné a zároveň tuto expresi v myších tkáních potvrdil pomocí real-time PCR kolega Pavel Pitule, že gen *Erlin2* je v imunitních tkáních přítomen, avšak pouze v malé míře, což pravděpodobně způsobilo neúspěch při klonování cDNA z těchto tkání. U genu *Crtap* byl vyklonován pouze jeden PCR produkt z cDNA pocházející z imunitních tkání, ale dva produkty lišící se nepatrně svojí velikostí byly patrné v agarózovém gelu z cDNA pocházející z mozku. Z tohoto důvodu bylo dále pracováno s oběma produkty. Na základě sekvenační analýzy se následně ukázalo, že větší *Crtap* I odpovídá svou délkou i sekvencí *Crtap* genu uvedenému v databázích. Důvod, proč byl z imunitních tkání vyklonován pouze jeden PCR produkt a z mozku dva produkty, není jasný. Kratšímu PCR produktu chyběl 54nt úsek na 3' konci, který odpovídá překládané části posledního sedmého exonu. Přítomnost menší formy tedy může být způsobena vynecháním tohoto posledního exonu, jehož sestřihové místo nemusí být dostatečně silné a rozpoznané. Gen *Crtap* však nemá tuto transkripční variantu uvedenou vedle referenční cDNA ani v jedné z databází (NCBI, Ensembl, UCSC). Na základě 89 % homologie mezi lidským a myším ortologem jsem hledala tuto variantu i v lidské databázi Aceview³⁰. Tato databáze disponuje největším souborem lidských transkripčních variant, avšak ani zde transkripční varianta

³⁰ Databáze dostupná na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

nebyla uvedena. Proto zůstává otázkou, zda-li tato transkripční varianta opravdu existuje nebo se jednalo o artefakt PCR reakce. Jediný kandidátní gen *Lmtk2* nebyl vyklonován při různých nastaveních PCR reakce a optimalizaci složení reakční směsi. Důvodem byla pravděpodobně velká délka genu (4444 bp), kterou polymeráza nebyla schopná dokončit či s tím související nedostatečná délka přepsané cDNA při reverzní transkripci. Při vzrůstající délce genu roste pravděpodobnost, že reverzní transkriptáza odpadne z přepisované mRNA, stejně tak roste pravděpodobnost vzniku chyby DNA polymerázy při přepisu cDNA. Z toho vyplývá, že vyklonování tak dlouhého genu je komplikované. Jedním z řešení by bylo požádat laboratoř Dr. Kamiguchi o expresní vektor s cDNA *Lmtk2* genu (Tomomura et al., 2007) a překlonovat tuto cDNA do našeho MSCV vektoru. Alternativním řešením je objednání komerčního cDNA IMAGE klonu. Úskalím však zůstává fakt, že přestože si lze připlatit za sekvenačně ověřené cDNA, mohou i tyto cDNA obsahovat chyby.

Kandidátní geny *Itm2b*, *Kiaa0317* a transkripční varianty *Adap1-202* a *Acpl2-004* nebyly v buňkách exprimovány. Posun čtecího rámce vzniklý při klonování nebyl důvodem (sekvence genu, fúzního místa i TagRFP-T byla v pořádku). Neúčinná transfekce či infekce rovněž nebyla důvodem, jelikož povrchový marker Thy1.1, který je v MSCV vektorech překládán z IRES sekvence byl na povrchu buněk detekován, tzn. vektory byly přítomny uvnitř buněk. Ani slabé ponechané endogenní Kozak sekvence nebyly pravděpodobně důvodem. Jejich porovnání s klasickou Kozak sekvencí GCC(A/G)CCATGG (Kozak, 1986) v kandidátních genech ukázalo, že například silně exprimovaný *Skip* gen obsahuje zcela odlišnou Kozak sekvenci (CACTAGATGC), zatímco neexprimovaný *Itm2b* gen ji má téměř ideální (CGCACCATGG). V neposlední řadě nebyla příčinou nevhodná buněčná linie, jelikož exprese nebyla detekovaná v několika buněčných liniích (Phoenix-Eco, Wehi 231 a Jurkat-EcoR). Další možností uváděnou v literatuře, kterou jsme však na rozdíl od ostatních nedokázali vyloučit je fakt, že některé geny potřebují pro svou účinnou expresi, stabilitu mRNA či translaci nepřekládanou oblast (UTR) (např. 5'UTR potřebují ferritin (Aziz and Munro, 1987), proto-onkogen HIF-2 α (Zimmer et al., 2008), naproti tomu 3'UTR využívá transferinový receptor (Binder et al., 1994) či řada maternálních mRNA během embryonálního vývoje plodu (Kuersten and Goodwin, 2003)). Jelikož jsme použili standardní postup klonování, při kterém se pomocí PCR reakce amplifikuje co nejkratší úsek DNA z důvodu menší velikosti plazmidu a minimalizace vzniku chyby či posunu čtecího rámce při přepisu DNA polymerázou, UTR oblasti potenciálně obsahující různé regulační sekvence kandidátním genům chybí. cDNA obsahují jen minimální sekvenci před start kodonem a končí před stop kodonem, který musel být kvůli vzniku fúzního genu mutován. Odpovědí na

otázku, zda-li chybění UTR je důvodem nezachytitelné exprese genů, by bylo nové klonování genů s celými UTR a sledování, zda se tyto konstrukty budou lišit svou expresí od původních. Takové konstrukty už však mohou být velmi rozsáhlé a vložení do standardních vektorů komplikované (limitující 10 kbp velikost inzertu, pro retrovirové vektory ještě menší inzert do 7 kbp). K těmto účelům se využívají BAC („bacterial arteficial chromosome“) vektory. Do těchto vektorů je možné vnést inzert až do velikosti 300 kbp, což umožňuje vložení celého genu i s jeho regulačním okolím. Výhodou tohoto systému je kontrola studovaného genu endogenním promotorem a okolními regulačními oblastmi, a tudíž nezáleží na místu integrace do genomu (Gebhard et al., 2007). Tímto způsobem lze připravit i transgenní myši a studovat funkci modifikovaného genu *in vivo* (Gebhard et al., 2007; Tallini et al., 2006). Přítomnost fluorescenčního proteinu TagRFP-T na jejich C-konci je další možností neúčinné exprese kandidátních genů. Označení sledovaných proteinů pomocí značky (krátký peptid jako např. Myc-tag, His-tag nebo fluorescenční protein) může být problematické. Tyto značky mohou ovlivnit skládání proteinu, jeho stabilitu či lokalizaci uvnitř buňky. Proteiny, které jsou v buňce špatně sbalené jsou označeny a degradovány. Pro správné sbalení je nutné mít mezi proteinem a značkou sekvenci několika aminokyselin, tzv. spojku (viz Obr. 11). Obvykle se jedná o sekvenci několika glycinů za sebou proložených serinem, který polyglycinovému řetězci dodává rozpustnost. Glycin jako nejmenší aminokyselina má postranní řetězec tvořený pouze atomem vodíku, a proto je takový řetězec velmi flexibilní a umožňuje sbalení proteinů. Jeho délka je individuální pro jednotlivý fúzní protein, tzn. každý protein je různě citlivý na přítomnost cizí sekvence na svém konci (Miyawaki et al., 2003). Záleží na poměru velikosti sledovaného proteinu ku velikosti značky (Myc-tag má velikost 1,2 kDa, zatímco fluorescenční proteiny 27 kDa) a na terciální struktuře, zda-li si nebudou proteiny stericcky vadit. Jako spojku oddělující kandidátní protein od TagRFP-T jsme použili Myc-tag spolu s několika restričními místy. Důvodem tohoto rozhodnutí byla příprava samotného vektoru pMSCV-Myc-TagRFP-T-IRES-Thy1.1, který byl vytvořen pomocí několika primerů a nechtěli jsme nadměrně prodlužovat primery a zvyšovat tak riziko vzniku chyby při jejich syntéze. Tato sekvence (VDVNLIKEQKLISEEDLGS) není zdaleka ideální, proto nelze vyloučit, že pro některé kandidátní proteiny nebyla vyhovující (dostatečně dlouhá a flexibilní), aby se samy nebo fluorescenční protein mohl správně sbalit. Důsledkem toho mohla být absence detekce fluorescence a nemožnost pozorovat lokalizaci kandidátních genů v rámci buňky. Cizí sekvence připojená k sledovanému proteinu může ovlivňovat také jeho stabilitu. I když by byly fúzní proteiny správně sbaleny, cizí sekvence může buňkám vadit a tyto proteiny mohou být rychle degradovány a tím nedetekovány. Řešením by bylo

prodloužení spojky, která by byla dostatečně dlouhá či ponechat kandidátní proteiny bez Myc-tag a sledovat jejich lokalizaci pomocí specifické protilátky. Jelikož však většina kandidátů má C-konec intracelulární, včetně Myc-tag a TagRFP-T, bylo by nutné buňky fixovat a permeabilizovat jejich membránu. Intracelulární barvení vede k většímu pozadí a zvýšené možnosti nespecifické reakce protilátek. Tento efekt se však snižuje titrací koncentrace protilátky a vybíráním klonu, který reaguje nejméně nespecificky. Úskalím však zůstává fakt, že proti myším proteinům neexistují ve většině případů komerční specifické protilátky, ale pouze protilátky vytvořené v laboratořích k publikovaným článkům. Většinou se jedná o kozí či králičí polyklonální protilátky, které nejsou vhodné k jiným než biochemickým analýzám. Proti myším proteinům *Nipsnap3b*, *Kdelc2*, *Kiaa0317*, *Acpl2* a *Adap1* neexistují protilátky vůbec. Výjimkou je dostupnost protilátky proti myšimu proteinu *Creg1*, avšak protilátka (R & D Systems) detekuje sekretovanou variantu proteinu, která má společnou sekvenci s delší kandidátní variantou, a proto by nebylo možné tyto dvě varianty v buňce od sebe odlišit. Naproti tomu proti lidským kandidátním proteinům existují ve většině případů protilátky (s výjimkou *KDEL2*, *ADAP1*), ale opět se jedná o polyklonální protilátky. Nicméně část protilátek (proti *ERLIN2*, *PDZK1IP1*, *LMTK2*, *ACPL2*) je validovaná pomocí „Human Protein Atlas“ (HPA)³¹, což je veřejně dostupná databáze s více jak 9,1 miliony imunohistochemickými, imunofluorescenčními a Western blot daty pořízenými na normálních či patologických tkání, na buněčných liniích a primárních buňkách (Berglund et al., 2008; Uhlen et al., 2005). Lze tedy zjistit specifitu a citlivost protilátky před jejím objednáním (*Sigma*). Posledním vysvětlením je možnost, že do našeho výběru mohly spadnout geny a transkripční varianty, které nejsou vůbec exprimované. Z veřejně dostupných dat je těžké určit, jak je daná transkripční varianta exprimovaná. Tyto informace budou dostupné po širším zavedení sekvenačních metod další generace na celé transkriptomy (Schuster, 2008). Toto vysvětlení se nabízí v případě transkripčních variant *Adap1-202* a *Acpl2-004*. Geny *Kiaa0317* a *Itm2b* jsou však exprimované dle dostupných expresních dat a kolega Pavel Pitule jejich silnou expresi rovněž povrdil pomocí real-time PCR. Zároveň existují experimentální data o *Itm2b* genu popisující jeho roli při apoptóze (Fleischer and Rebollo, 2004), kterou jsme však nepotvrdili (viz Obr.20), a vzniku neurodegenerativních onemocnění (Giliberto et al., 2009; Matsuda et al., 2008).

Různou míru exprese jsme pozorovali i u dalších kandidátních genů. Zatímco geny *Skip*, *Torsin1a*, *Nipsnap3b*, *Erlin2* a *Adap1-001* spolu s kontrolami *Lat* a fosfatázovou doménou

³¹ Databáze dostupná na <http://www.proteinatlas.org>

Shp-1 (část 643-1788 nt) byly v buněčných liniích silně exprimovány, zatímco ostatní geny (*Creg1*, *Styk1*, *Pdzklip1*, *Acpl2-007*, *Kdelc2*, *Crtap*) byly exprimovány pouze slabě. I tato nízká exprese však umožňovala další analýzu pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Různá exprese není stejně jako u neexprimovaných genů způsobena buněčnou linií, ani Kozak sekvencemi. Příčinou může být i nevhodně vybraný MSCV („murine stem cell virus“) vektor, jehož LTR („long terminal repeat“) promotor by mohl být v buňkách po integraci umlčován. Tento efekt se však zejména projeví až po delší době kultivace *in vitro* nebo *in vivo* a závisí na místě integrace vektoru do genomu. Toto umlčení závislé především na *de novo* metylaci CpG sekvencí uvnitř 5'LTR a chromatinové kondenzaci lze snížit vložením různých regulačních sekvencí před promotor (Rivella et al., 2000). Zároveň bylo dokumentováno, že retroviry se silnou a stabilní expresí se přednostně integrují do míst s vysokou transkripční aktivitou, tj. do okolí genů, které jsou exprimované v mnoha různých tkáních (Plachy et al.). Z publikovaných dat je zřetelné, že MSCV vektor je však k takovému umlčování méně náchylný než ostatní vektory odvozené od MuLV vektoru („murine leukemia virus“) (Persons et al., 1997). Jelikož geny (pro ověření pouze *Pdzklip1* a *Acpl2-007*), které byly překlonovány do velmi účinného expresního vektoru pcDNA3 (*Invitrogen*) se pod CMV promotorem rovněž slabě exprimovaly (viz Obr. 21), důvodem však nebyl ani samotný MSCV vektor. Samozřejmě, že jednotlivé vektory se liší expresí vloženého genu v závislosti na druhu promotoru. Dokonce se liší i účinnosti jednotlivých LTR odvozených od různých virů. Při znalosti síly jednotlivých promotorů lze však usoudit, zda je problém ve slabé či žádné endogenní expresi genu či v samotném vektoru. Dalšími dvěmi možnostmi nízké fluorescence fúzních proteinů, které stejně jako v předchozím případě nelze vyloučit, je nutnost UTR pro správnou expresi genů a přítomnost TagRFP-T.

Mikroskopické analýzy exprimovaných kandidátních TRAP bohužel ukázaly, že pouze protein *Pdzklip1* může být integrován do plasmatické membrány. Toto pozorování je však v rozporu s publikovanou cytoplasmatickou lokalizací v transfekovaných Rat1 fibroblastech (Guijarro et al., 2007) a buněčných liniích v HPA, kde PDZK1IP1 byl navíc detekován i v jádře³². V současné době je však příliš málo experimentálních dat na stanovení závěru. Ostatní kandidátní proteiny jsou cytoplasmatické (*Crtap*, *Skip*, *Adap1-001*, *Creg1*, *Acpl2-007* a *Styk*) či lokalizované intracelulárně v různých organelách nebo veziklích (*Torsin1a*, *Erlin2*, *Nipsnap3b* a *Kdelc2*), případně na jaderné membráně či membráně endoplasmatického retikula (ER) (*Erlin2*). Integraci proteinu *Erlin2* do membrány ER rovněž potvrdily

³² http://www.proteinatlas.org/cell_if_unit.php?antibody_id=14907&mainannotation_id=200013464

experimenty s lidským ortologním proteinem (Pearce et al., 2009) i data v HPA. ERLIN2 byl však v HPA rovněž detekován na plasmatické membráně v U-2 OS buněčné linii (mezenchymální buněčná linie)³³. Nelze tedy vyloučit částečnou lokalizaci Erlin2 na plasmatickou membránu. Crtap protein je dle literatury lokalizovaný v ER, kde je nezbytný pro správnou prolyl-3-hydroxylaci fibrinových vláken (Morello et al., 2006). ER lokalizaci Crtap proteinu jsme však z důvodu slabé exprese nebyli schopni potvrdit. Pomocí fluorescenční barvy LysoTracker® Green DND-26 (*Invitrogen*) jsme vyloučili možnost, že pozorované vesikly u proteinů Torsin1a, Nipsnap3b a Kdelc2 jsou endosomy či lysosomy. Přesnou lokalizaci proteinů pomocí markerů pro další orgány jsme však dosud neprovedli. Pro lepší rozlišení, zda kandidátní proteiny nejsou přítomny na plasmatické membráně alespoň v malé koncentraci a zároveň potvrdit, že protein Pdzk1ip1 je integrován do plasmatické membrány, jsme použili PMS metodu („plasma membrane spheres“) (Lingwood et al., 2008). Tato metoda spočívá v kultivaci buněk v PMS pufru, což vede k jejich nafouknutí a oddělení plasmatické membrány od zbytku buňky. Bohužel se ukázalo, že tato metoda k tomuto účelu není ideální, jelikož transmembránový adaptorový protein Lat (pozitivní kontrola membránové lokalizace) nebyl po použití PMS metody lokalizován do plasmatické membrány, ale vyplňoval vnitřek vytvořeného veziklu obsahující cytoplasmu. Ani fosfatázová doména Shp-1 (cytoplasmatická lokalizace) nebyla lokalizována dle předpokladu, kromě cytoplasmy se také nacházela ve zbytku buňky. Příčinou tohoto výsledku mohla být delší kultivace než bylo uvedeno v článku (Lingwood et al., 2008), jelikož tento čas v mém případě nedostačoval pro tvorbu vezikulů u buněčné linie Wehi 231 (myší B-lymfocyty). Jelikož v původním článku používali buněčnou linii A431 (buňky lidského epitelálního karcinomu), je možné, že inkubační doba v PMS pufru pro tvorbu vezikulů je individuální dle buněčného typu. Během této kultivace, jež je pro buňky stresovou situací, mohlo dojít k odštěpení proteinu Lat z plasmatické membrány cytoplasmatickými proteázami, neboť většina TRAP má membránově proximální bazickou sekvenci s predikovanými místy pro štěpení aminopeptidázami. Z tohoto důvodu zbývá určit pomocí jiných metod, zda Pdzk1ip1 protein je integrován do plasmatické membrány a ostatní kandidátní proteiny jsou lokalizovány mimo ní. Je možné vytvořit pomocí alternativní metody tzv. „giant plasma membrane vesicles“ (GPMV) (Baumgart et al., 2007), jejichž příprava trvá pouhé 2 hodiny. Druhou možností je desintegrace buněk, oddělení jednotlivých buněčných frakcí (jádra,

³³ http://www.proteinatlas.org/cell_if_unit.php?antibody_id=2025&mainannotation_id=200005964

plasmatické membrány a cytosol) pomocí centrifugace a následná biochemická detekce kandidátních proteinů monoklonální protilátkou proti Myc-tag na Western blotu.

Důvodů, proč většina našich kandidátních genů není přítomna na plasmatické membráně může být několik. Prvním důvodem může být špatná predikce signálního peptidu (SP) a transmembránové (TM) oblasti programem Phobius a s tím související nevhodný výběr kandidátních genů. Program Phobius má určeno bodové ohodnocení jednotlivých aminokyselin dle jejich chemických vlastností, tj. jestli je aminokyselina hydrofobní, polární, bazická, atd. Na základě této skutečnosti program predikuje hydrofobní oblasti v rámci proteinu. Úskalím predikce je určení, zda-li je hydrofobní část signální peptid, který je v lumen ER odštěpen, nebo transmembránová oblast. Po odštěpení SP totiž daný protein (pokud v něm není přítomna další hydrofobní část) už nemá potřebnou hydrofobní sekvenci pro integraci do plasmatické membrány. Program predikuje, že nalezený hydrofobní peptid je signální peptid a nikoliv transmembránová oblast zejména v závislosti na pozici začátku peptidu od konce proteinu a na chemických vlastnostech aminokyselin před štěpícím místem (Kall et al., 2004). Klasické transmembránové adaptorové proteiny mají predikované všechny kombinace hydrofobních oblastí: 1x TM oblast nebo 1x SP nebo kombinaci 1x SP + 1x TM oblast (viz Tab. 1). V případě přítomnosti pouze TM oblasti (LAX1, PAG1, TRIM a proteinová varianta LAT), proteiny používají tuto hydrofobní oblast blízko N-konce k cílení do lumen ER i k integraci do plasmatické membrány. Program Phobius rovněž predikoval samotný SP u klasických TRAP, a to relativně dlouhý u LIME (SP 1-30), většiny proteinových variant LAT (SP 1-29), ale i krátký u NTAL (SP 1-22). TM oblast integrálních proteinů zpravidla obsahuje 15-30 aminokyselin, tudíž nejen dlouhý predikovaný SP 1-30 může ve své sekvenci obsahovat reálnou TM oblast, ale i krátký predikovaný SP 1-22 ji může obsahovat (viz příklad NTAL). V prvním výběru kandidátních proteinů jsme z tohoto důvodu příliš nehleděli na predikci SP či TM oblasti, ale zaměřili jsme se zejména na přítomnost zajímavých tyrosinových motivů (viz Příloha č. 1). Tyto kandidátní TRAP byly ve finální tabulce umístěny do 100. pozice podobně jako známé TRAP (viz Tab. 1, 2 a 3). Shodou okolností měla většina těchto vybraných proteinů predikovaný pouze krátký SP jako NTAL – NIPSNAP3B (SP 1-13), TOR1A (SP 1-20), KDELC2 (SP 1-21 či SP 1-16 u různých proteinových variant), ERLIN2 (SP 1-21). Pouze dva proteiny měly predikovaný delší SP odpovídající predikci u LAT – CRTAP (SP 1-26) a SKIP (SP 1-26). Myší ortologní proteiny měly téměř identickou predikci SP jako lidské proteiny, s výjimkou proteinů Skip a Nipsnap3b, které na rozdíl od lidských neměly predikovanou SP či TM oblast vůbec. Nicméně Skip obsahuje v Ensembl databázi predikovaný úsek s nízkou mírou komplexity

v pozici 49-64 od N-konce, který může odpovídat hydrofobní TM oblasti. Nipsnap3b protein neměl nic predikováno, ale na základě ručního zhodnocení hydrofobicity N-koncové části v rámci ortologních proteinů jsme ho do analýzy zařadili. Tato první volně nastavená selekční kritéria, která povolovala u kandidátních TRAP i krátký signální peptid v délce 1-20 aminokyselin od N-konce, však vedla k výsledku, že žádný protein nebyl lokalizován na plasmatické membráně. Proto zpřísnění druhého výběru založeného zejména na výběru kandidátů s predikovanou TM oblastí (samotnou nebo v kombinaci s SP), mělo zajistit větší podobnost s predikcí u klasických TRAP a zvýšit pravděpodobnost reálné integrace kandidátních TRAP do plasmatické membrány. Predikce SP a TM oblasti se v rámci lidských a myších ortologních proteinů lišila pouze minimálně (viz Tab. 2 a Tab. 3). Výjimkou byl ACPL2 s predikovaným samotným SP 1-23, ale jehož myší ortolog měl predikovaný dlouhý SP 1-34. Rovněž myší ortolog Creg1 měl predikovaný pouze delší SP 1-31 oproti lidskému proteinu s predikovanou TM oblastí (34-53). Nicméně oba myší proteiny Acpl2 a Creg1 mají predikovaný delší SP stejně jako lidský LAT (SP 1-29), tudíž jejich integrace do plasmatické membrány je možná. Naproti tomu Adap1 protein neměl predikovanou SP ani TM oblast, ale proteinová varianta Adap1-001 má dle databáze Ensembl predikovaný úsek s nízkou mírou komplexity v pozici 4-15 od N-konce. Přestože je tato hydrofobní část poměrně krátká, protein jsme do analýzy zařadili. Bohužel ani tento výběr s výjimkou proteinu Pdzk1ip1 nevedl k úspěchu. Analýza predikce hydrofobních oblastí programem Phobius a Tmhmm neobjevila větší rozdíly v jejich predikci (viz Tab.1, Tab.2 a Tab. 3). To vede k závěru, že změnou programu by se výsledek nezlepšil. Z uvedených výsledků vyplývá, že v analýze je třeba sledovat při predikci SP a TM oblasti i míru pravděpodobnosti jejich reálné existence (viz Obr. 7) a tento údaj zohlednit při výběru kandidátů. Známé TRAP dosahovaly vždy hodnoty 1 při predikci TM oblasti. Myší kandidátní TRAP lze z tohoto hlediska rozdělit na 4 skupiny: proteiny bez predikce SP i TM oblasti (Adap1, Skip, Nipsnap3b), proteiny se zřetelnou predikcí SP - hodnota rovna 1 (Crtap, Creg1 a Acpl2), proteiny s predikcí SP rovna 1 a predikcí TM oblasti rovna 0,2 (Torsin1a, Kdelc2 a Erlin2) a poslední skupinu s jasnou predikcí TM oblasti – hodnota rovna 0,8-1 (Pdzk1ip1, Itm2b, Kiaa0317, Styk1, Lmtk2). První dvě skupiny nejsou tedy zřejmě pro analýzu optimální, ale nesmíme zapomínat na predikci SP u LAT (SP 1-29, hodnota rovna 1). Proteiny poslední skupiny jsou ideálními membránovými proteiny. Protein Pdzk1ip1 jsme detekovali na plasmatické membráně. Zbylé proteiny mohou být integrovány do plasmatické membrány, avšak z důvodu absence exprese (Kiaa0317, Itm2b) či velmi nízké exprese (Styk1) fúzního kandidátního genu, jsme tuto lokalizaci nebyli schopni detekovat. Protein Pdzk1ip1 je důkazem, že vysoká hodnota predikce TM oblasti

důležitá pro reálnou integraci proteinu do plasmatické membrány. Do užšího výběru bych zařadila pouze ty proteiny, jejichž hodnoty predikce SP a TM oblasti jsou dostatečně vysoké (alespoň nad hodnotu 0,5, tj. existuje poloviční možnost reálné existence predikované části). Samozřejmě s tím souvisí možnost, že díky této podmínce některé kandidátní geny z výběru uniknou. Je tedy na úsudku každého, zda-li je pro něj důležitá plasmatická lokalizace či se bude zajímat o funkční roli genu.

Druhým důvodem neúspěšné lokalizace kandidátních TRAP do plasmatické membrány může souviset s přítomností TagRFP-T, který nemusí ovlivňovat jenom sbalení a stabilitu kandidátních proteinů, ale také jejich správnou lokalizaci. Označení sledovaného proteinu na C-konci či N-konci a sledováním lokalizace těchto dvou forem fúzních proteinů, můžeme zjistit, zda značka ovlivňuje lokalizaci (Simpson et al., 2000). Je všeobecně známo, že přítomnost cizí sekvence na N-konci vede k nesprávné lokalizaci ektopicky exprimovaného genu v buňce. Důvodem je přítomnost lokalizačních sekvencí na N-konci pro cílení proteinů do jejich správných kompartmentů, proto vložení jakékoliv značky před tyto sekvence vede k jejich zrušení. Proto pokud chceme vnášet značky na N-konec sledovaného proteinu, je nutné na začátek jejich sekvence umístit lokalizační sekvenci pocházející ze zkoumaného proteinu, např. signální peptid. Otázkou zůstává, když předem neznáme lokalizaci proteinu, jak zjistit, o jakou a jak dlouhou sekvenci se jedná. Z tohoto důvodu se přednostně umísťuje značka na C-konec sledovaného proteinu stejně jako v našem případě. Nicméně i v tomto uspořádání může značka ovlivňovat správnou lokalizaci proteinu (Simpson et al., 2000; Tavare et al., 2001)³⁴. Hlavním důvodem je příliš velká cizí sekvence (fluorescenční proteiny mají velikost 27 kDa) oproti sledovanému proteinu, která může způsobit, že fúzní protein se chová fyzikálně či chemicky jinak než endogenní protein. Otázkou zůstává, zda naše kandidátní proteiny jsou tento případ. Problém by vyřešilo vyklonování samotného genu a vložení do vektoru bez jakýchkoliv značek. Jak už bylo diskutováno dříve, problém je však v malém počtu specifických protilátek na tuto detekci.

Třetím důvodem může být přítomnost tyrosinových motivů v rámci sekvence proteinu. Bylo popsáno, že přítomnost těchto motivů vede k rychlé internalizaci proteinů z plasmatické membrány do lysosomů (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999). Jedná se především o motivy YxxØ (x je jakákoliv aminokyselina a Ø značí aminokyselinu s hydrofobním postranním řetězcem) a NPxY. Z tohoto důvodu jsme označili buňky fluorescenční barvou LysoTracker® Green DND-26, která specificky barví endosomy a lysosomy na základě jejich nízkého pH.

³⁴ Databáze v rámci GFP-cDNA lokalizačního projektu dnes obsahuje více než 1000 lidských fúzních proteinů s GFP na C-konci či N-konci sledovaného proteinu <http://gfp-cdna.embl.de/loc-html/localise-master-image.html>

Tato možnost byla vyloučena na základě obrazů z konfokálního mikroskopu (data neukázána). U kandidátů, u kterých se toto vysvětlení nabízelo, nedocházelo k výraznému překryvu mezi signálem z lysosomů a fúzních kandidátních proteinů.

Čtvrtým důvodem je uvíznutí i správně sbalených fúzních proteinů v ER. Tato možnost se nabízí jako vysvětlení zvláště při ektopické expresi genů, která často vede k jejich zvýšené expresi. Náhlý nárůst proteinů může vést k zahlcení celého sekretorického systému a k nesprávně pozorované lokalizaci uvnitř ER nebo ve stresových granulích. Řešením je pozorovat při stejném nastavení citlivosti detektorů v mikroskopu řadu buněk s různou mírou exprese a porovnávat tuto lokalizaci navzájem. Takto jsme postupovali v případě kandidátních genů, které byly silně exprimovány. Žádný rozdíl nebyl patrný. U slabě exprimovaných genů však bylo nutné velmi zvyšovat citlivost detektorů a excitační výkon laserů, abychom slabý signál detekovali. Proto nebylo možné tuto analýzu provést.

Poslední důvod souvisí rovněž s ektopickou expresí genů. Buňky s nadměrnou expresí určitých genů nemusí dobře snášet toto navýšení koncentrace proteinu, které může být pro ně toxické. Důsledkem toho tyto buňky podléhají více buněčné smrti. U kandidátních genů, které nebyly exprimované nebo slabě exprimované, jsme však tuto korelaci nenalezli.

U všech studovaných kandidátních TRAP není možné stoprocentně vyloučit, že endogenní protein není lokalizován na plasmatické membráně. Nemusí se totiž jednat o většinovou lokalizaci, existuje řada případů, kdy i menšinová lokalizace na plasmatické membráně má biologicky relevantní účinky (např. CTLA-4, Daxx). Otázkou však zůstává, jak kvantifikovat tuto minimální expresi pohybující se v řádu procent celkové exprese. Řešením by mohla být elektronová mikroskopie stabilně transdukovaných buněk, při které by zlaté kuličky navázané na protilátku detekovaly i slabý signál na povrchu buněk. I zde nastává problém však s neexistencí specifických protilátek.

Funkční analýza *in vitro* byla založena na stimulaci stabilně transdukované lidské linie Jurkat-EcoR kandidátními geny monoklonální protilátkou proti TCR a sledování změn exprese CD69. Jediný gen *Crtap* ovlivňoval expresi CD69. A to stejným způsobem jako negativní kontrola fosfatázová doména *Shp-1* (část 643-1788) (Methi et al., 2005; Zhang et al., 2000). Míra exprese *Crtap* genu inverzně korelovala s expresí CD69. Způsob, jakým gen *Crtap* ovlivňuje TCR signalizaci jsme se zatím nezabývali. U ostatních genů dochází k překryvu histogramů mezi transdukovanými a netransdukovanými buňkami, tj. tyto geny neovlivňují TCR signalizaci. Detekce jednoho funkčního genu při studiu TCR signalizace je relativním úspěchem. Následně můžeme sledovat i další relevantní T-buněčné signalizační dráhy. Je však nutné pomocí dalších experimentů potvrdit, že *Crtap* gen opravdu hraje roli

v TCR signalizaci. Lze detekovat fosforylaci klíčových molekul signalizace (Src a Syk kinázy, Erk kinázy), aktivaci transkripčních faktorů AP-1, NFAT, NF- κ B či sledovat fenotyp buněk či organismů, které budou mít potlačenou expresi daného genu. Tento záměr usnadňuje existence KO myši (Morello et al., 2006), ve kterých se ještě nestudovala role *Crtap* genu na vývoj a funkci buněk imunitního systému. Vzhledem k částečně společným signalizačním molekulám TCR a BCR signalizace bude zajímavé zjistit, zda-li tento gen hraje roli také v BCR signalizaci. Další experimenty by se mohly zajímat o interakční partnery (imunoprecipitace a identifikace proužků z SDS-PAGE pomocí hmotnostní spektrometrie). Pozitivní kontrola protein Lat v Jurkat-EcoR neovlivňuje oproti předpokladu expresi CD69 (Zhang et al., 1998a). Tento efekt může být způsoben rozdílnou expresí endogenního Lat proteinu mezi různými Jurkat liniemi (například nesaturovanou a saturovanou hladinou Lat). Ektopická exprese Lat v endogenně nesaturovaném prostředí tak vede ke zvýšené TCR signalizaci, v druhém případě saturovaného prostředí žádný efekt nepozorujeme. Jako jiná pozitivní kontrola TCR signalizace může sloužit SLP76 (Fang and Koretzky, 1999; Wu et al., 1996) či kináza Fyn (Cooke et al., 1991; Davidson et al., 1992; Fusaki et al., 1994). Kombinace více kontrol je nutná pro správný závěr o sledovaném jevu.

Z tabulky 1 je jednoznačné, že většina doposud identifikovaných TRAP se nachází zejména do 200. pozice ve finální tabulce. Zatímco proteiny z prvního výběru s predikovaným SP tento trend kopírují (většina se dokonce nachází do 100. pozice), proteiny z druhého výběru s predikovanou TM oblastí už jsou ve finální tabulce umístěny dále (300. pozice a níže). Je tedy možné a uvedená experimentální data tuto možnost naznačují, že počet TRAP dle přísně stanovené definice je v genomu omezený a současný seznam TRAP je konečný a žádný zajímavý TRAP už mezi ně nezapadá. Proto je otázkou, zda se spíše nezaměřit na funkční roli jednotlivých genů než na jejich lokalizaci dle úzké definice.

Funkční analýza *in vivo*, která je založena na sledování efektu nadměrné exprese či potlačené exprese genu, má největší vypovídací hodnotu o funkci genu. V současné době pracuji na tomto *in vivo* modelu, který je založený na transdukcii immortalizovaných hematopoetických kmenových buněk (HSC) kandidátními geny a jejich přenosu do subletálně ozářených myši. Pro snadné odlišení a analýzu pocházejí HSC z Ly5.1 kongenního kmene a jsou přeneseny do standardního Ly5.2 kmene C57Bl/6J. Tyto HSC byly připraveny transdukcí retrovirovým vektorem pMYc-NUP98-HOXB4-IRES-Puro (Ruedl et al., 2008). Jelikož přítomnost fúzních genů s NUP98 byla detekována v řadě případů leukémií, je této problematice věnována pozornost. Fúzní geny vznikají translokací části chromosomu 11p15.5 nesoucí NUP98 do jiné chromosomové pozice. V současné době bylo identifikováno 20

fúzních genů, polovinu těchto fúzních partnerů tvoří HOX geny (Moore et al., 2007), které se nachází v genových shlucích na lidském chromosomu 7 (HOXA), chromosomu 17 (HOXB), chromosomu 12 (HOXC) a chromosomu 2 (HOXD). Tyto fúzní geny se skládají z N-koncové části NUP98 genu obsahující mnoho FG (fenylalanin, glycin) opakujících se sekvencí, které patrně slouží jako transkripční koaktivátory, a z C-koncové části HOX genů, které obsahují DNA vazebnou homeodoménu a fungují jako hlavní transkripční faktory během embryonálního vývoje (ovlivňují apoptózu, signalizační kaskády, diferenciaci, motilitu či angiogenezi) (Kasper et al., 1999). Jelikož existuje 39 HOX genů a bylo popsáno pouze 10 fúzních genů, z toho vyplývá, že dochází pouze k určitým spontánním translokacím před vybrané HOX geny. Dosud nebyl identifikován fúzní gen obsahující HOXB geny (Moore et al., 2007). Rovněž NUP98-HOXB4 fúzní gen nebyl spojen se vznikem leukémie (Pineault et al., 2004; Ruedl et al., 2008). Proto schopnost NUP98-HOXB4 konstruktů podpořit proliferaci a sebeobnovu HSC při udržení jejich pluripotentního potenciálu a tím získání jejich velkého množství *in vitro* bez nutnosti opakovaně izolovat kostní dřeň, je velkou experimentální výhodou (Ruedl et al., 2008). V současné době se však objevují známky, že u větších savců (primáti, psi) transdukce samotným HOXB4 genem způsobuje po 2 letech vznik leukémií (Larochelle and Dunbar, 2008). Tento efekt může být specifický pouze pro samotný HOXB4 gen, jelikož článek ze stejného roku nepotvrdil vliv NUP98-HOXB4 na vznik leukémie u myšího modelu (Ruedl et al., 2008). Zároveň je však nutné připustit, že myš má kratší dobu života, za kterou se leukemogenní efekt nemusí projevit. Druhé vysvětlení spočívá v množství vpíchnutých transdukovaných HSC. Množství buněk vnesených do myši je mnohem menší než u velkých savců a může být nepostačující pro projev onemocnění (Larochelle and Dunbar, 2008). Jelikož NUP98-HOXB4 u myší pravděpodobně nezpůsobuje leukémii, použila jsem tento konstrukt na imortalizaci HSC. Transdukované HSC bylo možné kultivovat *in vitro* za přítomnosti IL-6, SCF po 40 dní. Po tomto období už buňky snižovaly expresi povrchových markerů HSC (c-kit a Sca-1) a diferencovaly do prekurzorů žírných buněk (stávaly se pozitivní na FcεRI marker). Pluripotenci těchto transdukovaných a kultivovaných HSC je však nutno pomocí vnesení do subletálně ozářených recipientních myší otestovat *in vivo*. Infekce MSCV vektory nesoucími kandidátními geny však není zatím účinná, získáváme pouze malé procento pozitivně transdukovaných buněk. V současné době optimalizují tuto infekci za použití VSV-G („vesicular stomatitis virus G“), koncentrace virionů pomocí ultracentrifugace a natočení virionů na RetroNectin. Pro získání HSC, které středně exprimují kandidátní geny (ne příliš, což by vedlo k možnosti ovlivnění funkce a lokalizace proteinu, ale dostatečně pro detekci) a zároveň získat populaci téměř 100 %

pozitivních buněk, lze transdukované buňky třídit a nabohatit. V mém případě existují dvě možnosti - pomocí přístroje FACS (detekce a třídění buněk exprimujících červený fluorescenční protein TagRFP-T) či magnetických kuliček (vychytání a třídění transdukovanych buněk na základě exprese povrchového markeru Thy1.1). Samozřejmě lze tento *in vivo* postup aplikovat nejen na nadměrnou expresi kandidátních genů, ale i na inhibici jejich exprese pomocí transdukce HSC lentivivovými vektory nesoucími shRNA. Relativně jednoduše lze tedy sledovat vývoj imunitního systému v závislosti na nadměrné expresi nebo absenci konkrétního proteinu. Tento systém je rychlejší, méně náročný a levnější než zdlouhavá příprava knock-out (KO) myší. V případě použití RNA interference (RNAi) lze navíc vyloučit možnost kompenzace jinými geny, která nastává v případě KO myší, kdy během ontogeneze má organismus čas si vytvořit alternativní způsoby, jak se vypořádat s absencí genu. Nevýhodou použití RNAi je ne vždy dostatečně účinná inhibice exprese. Existují případy, kdy i malá koncentrace endogenního proteinu může dostačovat pro funkci, tudíž žádný efekt nevidíme. Při použití této metody je rovněž nutné mít na paměti možné vedlejší efekty způsobené přítomností vlásenky uvnitř buněk a mít příslušné kontroly. Alternativou klasického KO je kondiciovaný KO, který vypne expresi sledovaného genu až po stimulaci. Tímto způsobem lze ošetřit možnost kompenzace mezi geny, avšak stále je tento postup časově náročný.

6. Závěr

Součástí mé diplomové práce bylo bioinformatické vyhledávání kandidátních TRAP, na kterém jsem spolupracovala s kolegou Pavlem Pitule. Výstupem této analýzy bylo vytvoření lidských a myších finálních tabulek obsahující pouze proteiny splňující všechna selekční kritéria vyplývající z vlastností již známých TRAP. To znamená: obsahovaly 1x TM nebo 1x SP nebo kombinaci 1x TM + 1x SP, neobsahovaly extracelulární domény a byly v nich přítomny tyrosinové vazebné motivy. Lidská finální tabulka byla primárně ručně prohledávána z důvodu aktuálnějších expresních dat pro lidské geny. Následovala kontrola ortologních genů v myši finální tabulce. Tímto způsobem bylo vybráno 14 genů, se kterými jsem dále pracovala. Jediný gen *Lmtk2* (velikost 4444 bp) nebylo možné vyklonovat, cDNA ostatních genů byly vloženy do připraveného MSCV vektoru a analyzovány. Většina kandidátních proteinů nebyla lokalizována na plasmatické membráně. Výjimkou může být *Pdzk1ip1* protein, u kterého docházelo pod konfokálním mikroskopem k překryvu povrchového markeru Thy1.1 s fúzním kandidátním genem. PMS metoda vedoucí k oddělení plasmatické membrány od zbytku buňky nebyla ideální pro rozlišení, zda se jedná o integrální protein či nikoliv. Metoda neznámým způsobem ovlivňovala tradiční lokalizaci samotných kontrol - transmembránového adaptorového proteinu Lat a fosfatázové domény Shp-1 (část 643-1788). Funkční analýza *in vitro* zjišťovala rozdílnou expresi aktivačního znaku CD69 u lidských stabilně transdukovaných Jurkat-EcoR oproti netransdukovaným buňkám před a po jejich stimulaci anti-TCR protilátkou. Nadměrná exprese většiny genů neovlivňovala v žádné situaci expresi CD69. Výjimku tvořil gen *Crtap*, který se choval stejně jako negativní kontrola Shp-1. Míra exprese inverzně korelovala s expresí CD69 před a po stimulaci buněk. Tento gen není lokalizovaný na plasmatické membráně, tudíž přestože je potenciálně funkčně zajímavý, pravděpodobně se nejedná o klasický TRAP. Zatím jsme se nezabývali způsobem, jakým tento gen ovlivňuje TCR signalizaci. Experimentální data naznačují možnost, že počet TRAP dle přísně stanovené definice je v genomu omezený a současný seznam TRAP je konečný a žádný zajímavý TRAP už mezi ně nezapadá. Tato možnost pokládá otázku, zda se nezaměřit raději na funkční roli jednotlivých genů než na identifikaci nových TRAP dle jejich úzké definice. Největší vypovídací hodnotu o funkci genu má funkční analýza *in vivo*. Analýza je založena na sledování efektu nadměrné či potlačené exprese genu (RNA interference) na vývoj a aktivaci buněk imunitního systému. V současné době pracuji na tomto *in vivo* modelu, který je spočívá v transdukcii imortalizovaných hematopoetických

kmenových buněk kandidátními geny či vlásenkami působícím proti těmto genům a jejich přenosu do subletálně ozářených myší. Tyto *in vivo* studie by měly významnou měrou odlišit funkčně zajímavé geny od bezvýznamných a přispět k určení jejich funkce v imunitním systému.

7. Použitá literatura:

Aivazian, D., and Stern, L.J. (2000). Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition. *Nat Struct Biol* 7, 1023-1026.

Aziz, N., and Munro, H.N. (1987). Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8478-8482.

Baumgart, T., Hammond, A.T., Sengupta, P., Hess, S.T., Holowka, D.A., Baird, B.A., and Webb, W.W. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3165-3170.

Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.

Berglund, L., Bjorling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szigyarto, C.A., Persson, A., Ottosson, J., Wernerus, H., Nilsson, P., *et al.* (2008). A gene-centric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 7, 2019-2027.

Binder, R., Horowitz, J.A., Basilion, J.P., Koeller, D.M., Klausner, R.D., and Harford, J.B. (1994). Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J* 13, 1969-1980.

Bonifacino, J.S., and Dell'Angelica, E.C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 145, 923-926.

Brdicka, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdickova, N., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Luskova, P., Draber, P., Novak, P., *et al.* (2002). Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* 196, 1617-1626.

Brdicka, T., Pavlistova, D., Leo, A., Bruyns, E., Korinek, V., Angelisova, P., Scherer, J., Shevchenko, A., Hilgert, I., Cerny, J., *et al.* (2000). Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 191, 1591-1604.

Brdickova, N., Brdicka, T., Angelisova, P., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Paces, J., Simeoni, L., Kliche, S., Merten, C., *et al.* (2003). LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. *J Exp Med* 198, 1453-1462.

Brown, R.E. (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J Cell Sci* 111 (Pt 1), 1-9.

Bruyns, E., Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Sagolla, K., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Bensussan, A., Meuer, S., and Schraven, B. (1998). T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* 188, 561-575.

- Cochran, J.R., Cameron, T.O., and Stern, L.J. (2000). The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity* 12, 241-250.
- Cooke, M.P., Abraham, K.M., Forbush, K.A., and Perlmutter, R.M. (1991). Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase (p59fyn). *Cell* 65, 281-291.
- Dave, V.P., Cao, Z., Browne, C., Alarcon, B., Fernandez-Miguel, G., Lafaille, J., de la Hera, A., Tonegawa, S., and Kappes, D.J. (1997). CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 16, 1360-1370.
- Davidson, D., Chow, L.M., Fournel, M., and Veillette, A. (1992). Differential regulation of T cell antigen responsiveness by isoforms of the src-related tyrosine protein kinase p59fyn. *J Exp Med* 175, 1483-1492.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (2006). The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat Immunol* 7, 803-809.
- Dustin, M.L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* 221, 77-89.
- Eisenberg, S., Shvartsman, D.E., Ehrlich, M., and Henis, Y.I. (2006). Clustering of raft-associated proteins in the external membrane leaflet modulates internal leaflet H-ras diffusion and signaling. *Mol Cell Biol* 26, 7190-7200.
- Fang, N., and Koretzky, G.A. (1999). SLP-76 and Vav function in separate, but overlapping pathways to augment interleukin-2 promoter activity. *J Biol Chem* 274, 16206-16212.
- Fleischer, A., and Rebollo, A. (2004). Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. *FEBS Lett* 557, 283-287.
- Foster, L.J., De Hoog, C.L., and Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5813-5818.
- Foster, L.J., and Chan, Q.W. (2007). Lipid raft proteomics: more than just detergent-resistant membranes. *Subcell Biochem* 43, 35-47.
- Fusaki, N., Semba, K., Katagiri, T., Suzuki, G., Matsuda, S., and Yamamoto, T. (1994). Characterization of p59fyn-mediated signal transduction on T cell activation. *Int Immunol* 6, 1245-1255.
- Garcia, K.C., Teyton, L., and Wilson, I.A. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17, 369-397.
- Gaus, K., Gratton, E., Kable, E.P., Jones, A.S., Gelissen, I., Kritharides, L., and Jessup, W. (2003). Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15554-15559.
- Gebhard, S., Hattori, T., Bauer, E., Bosl, M.R., Schlund, B., Poschl, E., Adam, N., de Crombrughe, B., and von der Mark, K. (2007). BAC constructs in transgenic reporter mouse lines control efficient and specific LacZ expression in hypertrophic chondrocytes under the complete Col10a1 promoter. *Histochem Cell Biol* 127, 183-194.

- Germain, R.N. (1997). T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr Biol* 7, R640-644.
- Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109, 901-912.
- Giliberto, L., Matsuda, S., Vidal, R., and D'Adamio, L. (2009). Generation and initial characterization of FDD knock in mice. *PLoS One* 4, e7900.
- Goodchild, R.E., Kim, C.E., and Dauer, W.T. (2005). Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron* 48, 923-932.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M., and Mayor, S. (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* 135, 1085-1097.
- Granata, A., Watson, R., Collinson, L.M., Schiavo, G., and Warner, T.T. (2008). The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem* 283, 7568-7579.
- Gregoire, C., Simova, S., Wang, Y., Sansoni, A., Richelme, S., Schmidt-Giese, A., Simeoni, L., Angelisova, P., Reinhold, D., Schraven, B., *et al.* (2007). Deletion of the LIME adaptor protein minimally affects T and B cell development and function. *Eur J Immunol* 37, 3259-3269.
- Guijarro, M.V., Link, W., Rosado, A., Leal, J.F., and Carnero, A. (2007). MAP17 inhibits Myc-induced apoptosis through PI3K/AKT pathway activation. *Carcinogenesis* 28, 2443-2450.
- Gurung, R., Tan, A., Ooms, L.M., McGrath, M.J., Huysmans, R.D., Munday, A.D., Prescott, M., Whisstock, J.C., and Mitchell, C.A. (2003). Identification of a novel domain in two mammalian inositol-polyphosphate 5-phosphatases that mediates membrane ruffle localization. The inositol 5-phosphatase skip localizes to the endoplasmic reticulum and translocates to membrane ruffles following epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem* 278, 11376-11385.
- Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J., and Kruisbeek, A.M. (1998). The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages. *EMBO J* 17, 1871-1882.
- Han, Y.L., Guo, P., Sun, M.Y., Guo, L., Luan, B., Kang, J., Yan, C.H., and Li, S.H. (2008). Secreted CREG inhibits cell proliferation mediated by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor in NIH3T3 fibroblasts. *Genes Cells* 13, 977-986.
- Hancock, J.F., and Prior, I.A. (2005). Electron microscopic imaging of Ras signaling domains. *Methods* 37, 165-172.
- Harwood, N.E., and Batista, F.D. (2009). Early Events in B Cell Activation. *Annu Rev Immunol*.

- Horejsi, V., Zhang, W., and Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 603-616.
- Hu, S., Song, E., Tian, R., Ma, S., Yang, T., Mu, Y., Li, Y., Shao, C., Gao, S., and Gao, Y. (2009). Systematic analysis of a simple adaptor protein PDZK1: ligand identification, interaction and functional prediction of complex. *Cell Physiol Biochem* 24, 231-242.
- Hur, E.M., Son, M., Lee, O.H., Choi, Y.B., Park, C., Lee, H., and Yun, Y. (2003). LIME, a novel transmembrane adaptor protein, associates with p56lck and mediates T cell activation. *J Exp Med* 198, 1463-1473.
- Chen, Y., Li, Y.H., Chen, X.P., Gong, L.M., Zhang, S.P., Chang, Z.J., Zhang, X.F., Fu, X.Y., and Liu, L. (2005). Point mutation at single tyrosine residue of novel oncogene NOK abrogates tumorigenesis in nude mice. *Cancer Res* 65, 10838-10846.
- Choudhuri, K., Wiseman, D., Brown, M.H., Gould, K., and van der Merwe, P.A. (2005). T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand. *Nature* 436, 578-582.
- Ijuin, T., Yu, Y.E., Mizutani, K., Pao, A., Tateya, S., Tamori, Y., Bradley, A., and Takenawa, T. (2008). Increased insulin action in SKIP heterozygous knockout mice. *Mol Cell Biol* 28, 5184-5195.
- Irles, C., Symons, A., Michel, F., Bakker, T.R., van der Merwe, P.A., and Acuto, O. (2003). CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat Immunol* 4, 189-197.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419, 845-849.
- Janssen, E., Zhu, M., Zhang, W., and Koonpaew, S. (2003). LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* 4, 117-123.
- Kabouridis, P.S. (2006). Lipid rafts in T cell receptor signalling. *Mol Membr Biol* 23, 49-57.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I., and Ley, S.C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J* 16, 4983-4998.
- Kall, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338, 1027-1036.
- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L., and van Deursen, J.M. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* 19, 764-776.
- Kawa, S., Fujimoto, J., Tezuka, T., Nakazawa, T., and Yamamoto, T. (2004). Involvement of BREK, a serine/threonine kinase enriched in brain, in NGF signalling. *Genes Cells* 9, 219-232.
- Kawa, S., Ito, C., Toyama, Y., Maekawa, M., Tezuka, T., Nakamura, T., Nakazawa, T., Yokoyama, K., Yoshida, N., Toshimori, K., *et al.* (2006). Azoospermia in mice with targeted

- disruption of the *Brek/Lmtk2* (brain-enriched kinase/lemur tyrosine kinase 2) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 19344-19349.
- Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., and Okada, M. (2000). Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* *404*, 999-1003.
- Koelsch, U., Schraven, B., and Simeoni, L. (2008). SIT and TRIM determine T cell fate in the thymus. *J Immunol* *181*, 5930-5939.
- Kolsch, U., Arndt, B., Reinhold, D., Lindquist, J.A., Juling, N., Kliche, S., Pfeffer, K., Bruyns, E., Schraven, B., and Simeoni, L. (2006). Normal T-cell development and immune functions in TRIM-deficient mice. *Mol Cell Biol* *26*, 3639-3648.
- Koretzky, G.A., Abtahian, F., and Silverman, M.A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* *6*, 67-78.
- Kosugi, A., Hayashi, F., Liddicoat, D.R., Yasuda, K., Saitoh, S., and Hamaoka, T. (2001). A pivotal role of cysteine 3 of Lck tyrosine kinase for localization to glycolipid-enriched microdomains and T cell activation. *Immunol Lett* *76*, 133-138.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* *44*, 283-292.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* *305*, 567-580.
- Krogsgaard, M., Li, Q.J., Sumen, C., Huppa, J.B., Huse, M., and Davis, M.M. (2005). Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* *434*, 238-243.
- Krogsgaard, M., Prado, N., Adams, E.J., He, X.L., Chow, D.C., Wilson, D.B., Garcia, K.C., and Davis, M.M. (2003). Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation. *Mol Cell* *12*, 1367-1378.
- Kuersten, S., and Goodwin, E.B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* *4*, 626-637.
- Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., and Graf, T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* *24*, 705-738.
- Larochelle, A., and Dunbar, C.E. (2008). HOXB4 and retroviral vectors: adding fuel to the fire. *J Clin Invest* *118*, 1350-1353.
- Lin, J., and Weiss, A. (2003). The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling. *J Cell Biol* *162*, 673-682.
- Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P., and Simons, K. (2008). Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10005-10010.

- Liu, L., Yu, X.Z., Li, T.S., Song, L.X., Chen, P.L., Suo, T.L., Li, Y.H., Wang, S.D., Chen, Y., Ren, Y.M., *et al.* (2004). A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet- derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice. *Cancer Res* 64, 3491-3499.
- Liu, Y., and Zhang, W. (2008). Identification of a new transmembrane adaptor protein that constitutively binds Grb2 in B cells. *J Leukoc Biol* 84, 842-851.
- Ma, Z., Janmey, P.A., and Finkel, T.H. (2008). The receptor deformation model of TCR triggering. *FASEB J* 22, 1002-1008.
- Malissen, M., Gillet, A., Rocha, B., Trucy, J., Vivier, E., Boyer, C., Kontgen, F., Brun, N., Mazza, G., Spanopoulou, E., *et al.* (1993). T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J* 12, 4347-4355.
- Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Bruyns, E., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Ratnofsky, S., Meuer, S., and Schraven, B. (1999). SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation. *J Exp Med* 189, 1181-1194.
- Matsuda, S., Giliberto, L., Matsuda, Y., McGowan, E.M., and D'Adamio, L. (2008). BRI2 inhibits amyloid beta-peptide precursor protein processing by interfering with the docking of secretases to the substrate. *J Neurosci* 28, 8668-8676.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W., *et al.* (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4, 555-557.
- Methi, T., Ngai, J., Mahic, M., Amarguioui, M., Vang, T., and Tasken, K. (2005). Short-interfering RNA-mediated Lck knockdown results in augmented downstream T cell responses. *J Immunol* 175, 7398-7406.
- Mingueneau, M., Sansoni, A., Gregoire, C., Roncagalli, R., Aguado, E., Weiss, A., Malissen, M., and Malissen, B. (2008). The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nat Immunol* 9, 522-532.
- Minguet, S., Swamy, M., Alarcon, B., Luescher, I.F., and Schamel, W.W. (2007). Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* 26, 43-54.
- Miyawaki, A., Sawano, A., and Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol Suppl*, S1-7.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moore, M.A., Chung, K.Y., Plasilova, M., Schuringa, J.J., Shieh, J.H., Zhou, P., and Morrone, G. (2007). NUP98 dysregulation in myeloid leukemogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1106, 114-142.

- Morello, R., Bertin, T.K., Chen, Y., Hicks, J., Tonachini, L., Monticone, M., Castagnola, P., Rauch, F., Glorieux, F.H., Vranka, J., *et al.* (2006). CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* *127*, 291-304.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* *115*, 377-388.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* *70*, 5701-5705.
- Nery, F.C., Zeng, J., Niland, B.P., Hewett, J., Farley, J., Irimia, D., Li, Y., Wiche, G., Sonnenberg, A., and Breakefield, X.O. (2008). TorsinA binds the KASH domain of nesprins and participates in linkage between nuclear envelope and cytoskeleton. *J Cell Sci* *121*, 3476-3486.
- Otahal, P., Angelisova, P., Hrdinka, M., Brdicka, T., Novak, P., Drbal, K., and Horejssi, V. A New Type of Membrane Raft-Like Microdomains and Their Possible Involvement in TCR Signaling. *J Immunol*.
- Park, I., and Yun, Y. (2009). Transmembrane adaptor proteins positively regulating the activation of lymphocytes. *Immune Netw* *9*, 53-57.
- Pearce, M.M., Wormer, D.B., Wilkens, S., and Wojcikiewicz, R.J. (2009). An endoplasmic reticulum (ER) membrane complex composed of SPFH1 and SPFH2 mediates the ER-associated degradation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* *284*, 10433-10445.
- Persons, D.A., Allay, J.A., Allay, E.R., Smeyne, R.J., Ashmun, R.A., Sorrentino, B.P., and Nienhuis, A.W. (1997). Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* *90*, 1777-1786.
- Pineault, N., Abramovich, C., Ohta, H., and Humphries, R.K. (2004). Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1. *Mol Cell Biol* *24*, 1907-1917.
- Plachy, J., Kotab, J., Divina, P., Reinisova, M., Senigl, F., and Hejnar, J. Proviruses selected for high and stable expression of transduced genes accumulate in broadly transcribed genome areas. *J Virol* *84*, 4204-4211.
- Posevitz, V., Arndt, B., Krieger, T., Warnecke, N., Schraven, B., and Simeoni, L. (2008). Regulation of T cell homeostasis by the transmembrane adaptor protein SIT. *J Immunol* *180*, 1634-1642.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., and Horber, J.K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* *148*, 997-1008.
- Razzaq, T.M., Ozegbe, P., Jury, E.C., Sembi, P., Blackwell, N.M., and Kabouridis, P.S. (2004). Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* *113*, 413-426.

- Rivella, S., Callegari, J.A., May, C., Tan, C.W., and Sadelain, M. (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol* 74, 4679-4687.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P.I. (2005). An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746-1752.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24, 419-466.
- Ruedl, C., Khameneh, H.J., and Karjalainen, K. (2008). Manipulation of immune system via immortal bone marrow stem cells. *Int Immunol* 20, 1211-1218.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., and Tsien, R.Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5, 545-551.
- Shapiro, M.J., Nguyen, C.T., Aghajanian, H., Zhang, W., and Shapiro, V.S. (2008). Negative regulation of TCR signaling by linker for activation of X cells via phosphotyrosine-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 181, 7055-7061.
- Schahs, P., Weidinger, P., Probst, O.C., Svoboda, B., Stadlmann, J., Beug, H., Waerner, T., and Mach, L. (2008). Cellular repressor of E1A-stimulated genes is a bona fide lysosomal protein which undergoes proteolytic maturation during its biosynthesis. *Exp Cell Res* 314, 3036-3047.
- Schuster, S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods* 5, 16-18.
- Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V.P., and Schindler, H. (2000). Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* 19, 892-901.
- Silver, D.L., Wang, N., and Vogel, S. (2003). Identification of small PDZK1-associated protein, DD96/MAP17, as a regulator of PDZK1 and plasma high density lipoprotein levels. *J Biol Chem* 278, 28528-28532.
- Simeoni, L., Lindquist, J.A., Smida, M., Witte, V., Arndt, B., and Schraven, B. (2008). Control of lymphocyte development and activation by negative regulatory transmembrane adapter proteins. *Immunol Rev* 224, 215-228.
- Simeoni, L., Posevitz, V., Kolsch, U., Meinert, I., Bruyns, E., Pfeffer, K., Reinhold, D., and Schraven, B. (2005). The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. *Mol Cell Biol* 25, 7557-7568.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R., and Wiemann, S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep* 1, 287-292.

- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* *175*, 720-731.
- Taylor, P., Tsai, S., Shameli, A., Serra, P., Wang, J., Robbins, S., Nagata, M., Szymczak-Workman, A.L., Vignali, D.A., and Santamaria, P. (2008). The proline-rich sequence of CD3epsilon as an amplifier of low-avidity TCR signaling. *J Immunol* *181*, 243-255.
- Takeuchi, K., Yang, H., Ng, E., Park, S.Y., Sun, Z.Y., Reinherz, E.L., and Wagner, G. (2008). Structural and functional evidence that Nck interaction with CD3epsilon regulates T-cell receptor activity. *J Mol Biol* *380*, 704-716.
- Tallini, Y.N., Shui, B., Greene, K.S., Deng, K.Y., Doran, R., Fisher, P.J., Zipfel, W., and Kotlikoff, M.I. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics* *27*, 391-397.
- Tavare, J.M., Fletcher, L.M., and Welsh, G.I. (2001). Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *J Endocrinol* *170*, 297-306.
- Tomomura, M., Morita, N., Yoshikawa, F., Konishi, A., Akiyama, H., Furuichi, T., and Kamiguchi, H. (2007). Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) family. *Neuroscience* *148*, 510-521.
- Uhlen, M., Bjorling, E., Agaton, C., Szigyarto, C.A., Amini, B., Andersen, E., Andersson, A.C., Angelidou, P., Asplund, A., Asplund, C., *et al.* (2005). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* *4*, 1920-1932.
- Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* *375*, 148-151.
- van Meer, G., and Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 373-378.
- van Zanten, T.S., Cambi, A., Koopman, M., Joosten, B., Figdor, C.G., and Garcia-Parajo, M.F. (2009). Hotspots of GPI-anchored proteins and integrin nanoclusters function as nucleation sites for cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18557-18562.
- Wang, N., Wang, B., Salio, M., Allen, D., She, J., and Terhorst, C. (1998). Expression of a CD3 epsilon transgene in CD3 epsilon(null) mice does not restore CD3 gamma and delta expression but efficiently rescues T cell development from a subpopulation of prothymocytes. *Int Immunol* *10*, 1777-1788.
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., and Resh, M.D. (2000). Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* *275*, 261-270.
- Weber, J.R., Orstavik, S., Torgersen, K.M., Danbolt, N.C., Berg, S.F., Ryan, J.C., Tasken, K., Imboden, J.B., and Vaage, J.T. (1998). Molecular cloning of the cDNA encoding pp36, a tyrosine-phosphorylated adaptor protein selectively expressed by T cells and natural killer cells. *J Exp Med* *187*, 1157-1161.
- Whittaker, G.C., Burshtyn, D.N., Orr, S.J., Quigley, L., Hodge, D.L., Pascal, V., Zhang, W., and McVicar, D.W. (2008). Analysis of the linker for activation of T cells and the linker for

activation of B cells in natural killer cells reveals a novel signaling cassette, dual usage in ITAM signaling, and influence on development of the Ly49 repertoire. *Blood* *112*, 2869-2877.

Wu, J., Motto, D.G., Koretzky, G.A., and Weiss, A. (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* *4*, 593-602.

Xu, C., Gagnon, E., Call, M.E., Schnell, J.R., Schwieters, C.D., Carman, C.V., Chou, J.J., and Wucherpennig, K.W. (2008). Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* *135*, 702-713.

Xu, S., Huo, J., Tan, J.E., and Lam, K.P. (2005). Cbp deficiency alters Csk localization in lipid rafts but does not affect T-cell development. *Mol Cell Biol* *25*, 8486-8495.

Yasuda, K., Kosugi, A., Hayashi, F., Saitoh, S., Nagafuku, M., Mori, Y., Ogata, M., and Hamaoka, T. (2000). Serine 6 of Lck tyrosine kinase: a critical site for Lck myristoylation, membrane localization, and function in T lymphocytes. *J Immunol* *165*, 3226-3231.

Yokoi, F., Dang, M.T., Mitsui, S., Li, J., and Li, Y. (2008). Motor deficits and hyperactivity in cerebral cortex-specific Dyt1 conditional knockout mice. *J Biochem* *143*, 39-47.

Zhang, J., Somani, A.K., and Siminovitch, K.A. (2000). Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol* *12*, 361-378.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R.P., and Samelson, L.E. (1998a). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* *92*, 83-92.

Zhang, W., Sommers, C.L., Burshtyn, D.N., Stebbins, C.C., DeJarnette, J.B., Triple, R.P., Grinberg, A., Tsay, H.C., Jacobs, H.M., Kessler, C.M., *et al.* (1999). Essential role of LAT in T cell development. *Immunity* *10*, 323-332.

Zhang, W., Triple, R.P., and Samelson, L.E. (1998b). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* *9*, 239-246.

Zhu, M., Janssen, E., Leung, K., and Zhang, W. (2002). Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem* *277*, 46151-46158.

Zhu, M., Koonpaew, S., Liu, Y., Shen, S., Denning, T., Dzhagalov, I., Rhee, I., and Zhang, W. (2006). Negative regulation of T cell activation and autoimmunity by the transmembrane adaptor protein LAB. *Immunity* *25*, 757-768.

Zhu, M., Liu, Y., Koonpaew, S., Granillo, O., and Zhang, W. (2004). Positive and negative regulation of FcepsilonRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. *J Exp Med* *200*, 991-1000.

Zhu, M., Shen, S., Liu, Y., Granillo, O., and Zhang, W. (2005). Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol* *174*, 31-35.

Zimmer, M., Ebert, B.L., Neil, C., Brenner, K., Papaioannou, I., Melas, A., Tolliday, N., Lamb, J., Pantopoulos, K., Golub, T., *et al.* (2008). Small-molecule inhibitors of HIF-2 α translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Mol Cell* 32, 838-848.

Příloha č.1: Tabulka vazebných motivů

ID	SEKVENCE MOTIVU	POPIS MOTIVU	SKÓRE
1	Y.{2}[L][I][V].[6,8]Y.{2}[L][I][V]	ITAM	10
2	[D][E].[7,8][D][E].[2]Y.{2}[L][I].[7]Y.{2}[L][I]	ITAM	20
3	[L][V][I][S].Y.{2}[L][I][V]	ITIM	10
4	T.Y.{2}[V][I]	ITSM	10
5	[K][P].Y.N	Grb2 binding site	5
6	TIY..[V][I]	SAP and EAT2 SH2 domain binding motif	10
7	M.Y.{4}ENLDEDEGYQL.F	Dectin 1 konsensus	2
8	Y.{2}[L][I][V]	Generic pY docking site	7
9	Y[E][M][V][N][V][I]	3BP2 SH2 domain binding motif	5
10	YENP	Abl SH2 domain binding motif	4
11	Y..P	Crk SH2 domain binding motif	2
12	YDHP	Crk SH2 domain binding motif	3
13	Y[T][A][S][K][R][Q][N][M][I][V][R]	Csk SH2 domain binding motif	10
14	YE.[V][I]	Fes SH2 domain binding motif	4
15	YEE[I][V]	Fgr SH2 domain binding motif	4
16	YEDP	Fyn SH2 domain binding motif	7
17	Y[Y][I][V][N][F][L][I][V]	Grb2 SH2 domain binding motif	5
18	Y[Q][Y][V][N][Y][Q][F]	Grb2 SH2 domain binding motif	4
19	Y[M][I][L][V].[M][I][L][V]	GRB2, 3BP2, Csk, Fes, Syk C-terminal SH2 domain binding motif	4
20	Y.N	Grb2 SH2 domain binding motif	2
21	[F][Y][E][T][Y][S][N][I][L][V][P][T][Y][S]	GRB7, GRB10 SH2 domain binding motif	4
22	YF.[F][P][L][Y]	HCP SH2 domain binding motif	4
23	Y[A][E][V][Y][F][E][S][N][V][P][F][I][H]	Itk SH2 domain binding motif	7
24	YDYV	Lck and Src SH2 domain binding motif	7
25	YDEP	Nck SH2 domain binding motif	7
26	Y..M	PI3 Kinase p85 SH2 domain binding motif	2
27	YM.M	PI3 Kinase p85 SH2 domain binding motif	3
28	YMPMS	PI3 Kinase p85 SH2 domain binding motif	4
29	Y[L][I][V][E][L][I][V]	PLCgamma C and N-terminal SH2 domain binding motif	5
30	Y..P	RasGAP C-terminal SH2 domain binding motif	2
31	Y[I][L][V].[M/L/I/V/P]	RasGAP N-terminal SH2 domain binding motif	5
32	Y[L][V][N][V][P]	Sem5 SH2 domain binding motif	3
33	Y[T][V][I].L	Shb SH2 domain binding motif	4
34	Y[I][E][Y][L].[I][L][M]	SHC SH2 domain binding motif	4
35	[I][V][L][S].Y..[L][I]	SHIP2 SH2 domain binding motif	6
36	.L.Y[M][F].[F][M]	Shp1 N-terminal SH2 domain	2
37	.L.YA.L	Shp1 N-terminal domain 2	2
38	[I][V].Y..[L][V]	SHP1 SH2 domain binding motif	3
39	[V][I][L].YA.[L][V]	SHP1 C-terminal SH2 domain binding motif	3
40	.YYM[K][R]	SHP1 C-terminal SH2 domain binding motif	5
41	L[Y][H][Y][M][F].[F][M]	SHP1 N-terminal SH2 domain binding motif	5
42	[V][I][L].Y[M][L][F].P	SHP1, SHP2 SH2 domain binding motif	5
43	YEMEVTV	Shp2 binding site	5
44	[T][V][I][Y].Y[A][S][T][V].[I][V][L]	SHP2 CSH2 domain binding motif	4
45	[I][L][V][I][L][V][I][L][V][F][T][Y][Y][T][I][L][V][I][L][I][L][V][P]	SHP2 C-terminal SH2 domain binding motif	4
46	[H][F].V.[T][S][A]Y	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
47	[I][V][L].Y[F][M].P	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
48	Y[I][V].[I][V]	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
49	[I][L][V][M].Y[T][V][A].[I][V][L][F]	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
50	[I][V].Y[L][M][T][Y][A][P][T]SG	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
51	W[M][T][V][Y][R][I][L].	SHP2 N-terminal SH2 domain binding motif	4
52	YIPP	SHP2, PLCgamma SH2 domain binding motifs	5
53	YM.M	Src and Abl SH2 domain binding motif	5
54	Y[R][K][H][Q][E][D][R][K][H][Q][E][D][I][P]	Src, Fyn, Lck, Fgr, Abl, Crk, Nck SH2 domain binding motif	6
55	PP.Y	Src, Fyn,Csk, Nck and SHC SH2 domain binding motif	6
56	YEEI	Src,Lck and Fyn SH2 domains binding motif	8
57	Y[D][E][P][R][R][P][Q]	STAT1 SH2 domain binding motif	3
58	Y..Q	STAT3 SH2 domain binding motif	1
59	Y[M][L][V][I][F][P][R][K][H]Q	STAT3 SH2 domain binding motif	3
60	Y[Q][T][E][E][Q][L][I]	Syk C-terminal SH2 domain binding motif	5
61	YTT[I][L][M]	Syk N-terminal SH2 domain binding motif	5
62	[D][E].[7][D][E].Y..L.{7}Y..[L][I]	Syk, ZAP-70, Shc, Lyn SH2 domain binding motif	7
63	YEN[F][I][V]	Tensin SH2 domain binding motif	2
64	Y[M][L][E]EP	Vav SH2 domain binding motif	5
65	YESP	Vav SH2 domain binding motif	5
66	D[N][D].Y	Cbl PTB domain binding motif	4
67	N.LY	Dok1 PTB domain binding motif	2
68	N..Y	FRIP PTB domain binding motif	1
69	NP.Y	Shc PTB domain binding motif	2
70	DD.Y	Shb PTB domain binding motif	2
71	NP.YF.R	ShcA PTB domain binding motif	2
72	HN[M][L][V][I][M][L][V][I][N]NP[S][T]Y	ShcC PTB domain binding motif	4