

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Lukáš Falteisek**

**Fosfodiesterázy 8a a 8b jako potenciální komponenty  
membránových raftů  
(bioinformatické hledání, klonování, příprava konstruktů  
a rekombinantních proteinů)**

**Bakalářská práce**

**Školitel: Mgr. Jan Černý PhD.**

**Praha 2006**

## **Phosphodiesterases 8a and 8b as potential components of membrane rafts (bio-informatic search, cloning, construction of recombinant proteins)**

Signal transduction in the cell requires spatial zoning that ensures efficient interaction between signaling pathways. Structures which are proposed to organize cellular signaling at the level of plasma membrane are lipid rafts. They are membrane islands that differ from surrounding environment in composition and phase. Membrane proteins differ in their affinity to a raft portion of the membrane according to hydrophobicity or prosthetic groups which they use to anchor in the membrane. Therefore it leads to their specific separation into both membrane compartments. According to current opinions, rafts represent the platforms, apart from other functions, for integration of signals received via antigen specific, co-stimulatory and inhibitory receptors of various cell types. Even though lipid rafts are mentioned in basic textbooks, there is increasing physical and chemical evidence that asymmetric composition of the plasma membrane bilayer is not capable of creating such islands. Moreover some phenomena where rafts historically play essential role could be explained in terms of protein-protein interaction. One of the crucial problems in the field lays in the fact that a direct visualization of rafts has not yet been solved.

We have tried to find new potentially raft localized signal transducing proteins. Our search was based on their specific sequential patterns and was performed using public protein databases. Our intention is to expand the knowledge about signaling in lipid rafts. After bio-informatic summary of the results, we selected, apart from others, two phosphodiesterases PDE8a and PDE8b for further research. Phosphodiesterases are known to lower the concentration of cAMP which has an inhibitory effect during activation of T lymphocytes. Phosphodiesterases in groups 3, 4, 7 and 8 participate in these processes. PDE8a and 8b are the first to carry clear sequential motifs for double acylation which is essential for raft localization. Their regulation was so far studied at the level of general expression and interaction with transcriptional regulator I- $\kappa$ B. No information is given on a particular role in signal pathways and cellular localization of the protein.

## **Obsah**

<b>Obsah.....</b>	<b>1</b>
<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>2</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>3</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>4</b>
<b>Membránové mikrodomény a detergent-rezistentní membrány.....</b>	<b>4</b>
<b>Membránové mikrodomény se podílejí na organizaci buněčné signalizace v leukocytech7</b>	<b>7</b>
<b>Pochybnosti o existenci membránových mikrodomén.....</b>	<b>10</b>
<b>Vyhledávání proteinů potenciálně lokalizovaných v membránových mikrodoménách..</b>	<b>14</b>
<b>Výsledky rešerše .....</b>	<b>16</b>
<b>Fosfodiesterázy a jejich funkce při imunoreceptorové signalizaci .....</b>	<b>17</b>
<b>Závěr.....</b>	<b>21</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>23</b>

## Seznam použitých zkratek

APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
BCR	antigenně specifický receptor B lymfocytů (B-cell receptor)
BLAST	internetový program pro vyhledávání sekvenčních homologií (Basic Local Alignment Search Tool)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát, významný druhý posel v buněčné signalizaci
CD	označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentiation )
cDNA	cytoplazmatická DNA, DNA vzniklá reverzní transkripcí mRNA
CSK	c-terminální Src fosforylující kináza
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát, významný druhý posel v buněčné signalizaci
DRM	detergent-rezistentní membrána
EST	exprimovaná sekvenční značka (expressed sequence tag)
FRET	fluorescence energy resonance transfer, metoda studia kolokalizace molekul
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GPI	glykosylfosfatidylinositol, kotva extracelulárních perimembránových proteinů
I- $\kappa$ B	inhibitor faktoru NF- $\kappa$ B
LAT	linker of activation of T cell, adaptorový protein rodiny TRAP
$l_i$	kapalná neorganizovaná fáze membrány (liquid inordered phase)
LIME	Lck interacting molecule, adaptorový protein rodiny TRAP
$l_o$	kapalná organizovaná fáze membrány (liquid ordered phase)
LST1	leucocyte specific transcript 1
MALDI	metoda laserové ionizace látek při hmotové spektroskopii (matrix-assisted laser desorption / ionisation)
NF- $\kappa$ B	protein regulující genovou expresi (nuclear factor $\kappa$ B)
NP 40	Nonidet P 40, neiontový detergent
NTAL	non-T cell activation linker, protein rodiny TRAP
PAG	phosphoprotein associated with GEM's, protein rodiny TRAP
PAS	per-arnt-sim, vazebná a signální doména
PDE	fosfodiesteráza (phosphodiesterase)
Pfam	webová databáze a program pro predikci domén podle sekvence proteinu
PKA	proteinkináza A, závislá na cAMP
PROSITE	program pro predikci domén, modifikací a signálních sekvencí v proteinu
SMART	webová databáze a program a pro predikci domén podle sekvence proteinu
Src	rodina signálních proteintyrosinkináz, protoonkogeny (sarcoma)
Syt	synaptotagmin, rodina $Ca^{2+}$ vázících signálních proteinů
TCR	antigenně specifický receptor T lymfocytů (T-cell receptor)
TOF	měření molekulové hmotnosti při hmotové spektroskopii podle času letu iontu v elektrickém poli (time of flight)
TRAP	transmembránový adaptorový protein, rodina signálních proteinů
UCSC	velká veřejná databáze proteinů

## **Abstrakt**

Buněčná signalizace vyžaduje prostorové rozčlenění buňky, díky němuž je zajištěno setkávání jednotlivých proteinů signálních drah. Strukturou, o níž se předpokládá, že organizuje buněčnou signalizaci na cytoplazmatické membráně, jsou lipidové rafty. Jsou o ostrůvky membrány, které se liší od okolí lipidovým složením a fází. Membránové proteiny se liší svou afinitou k raftové části membrány podle vlastností hydrofobních oblastí nebo prostetických skupin, jejichž pomocí jsou v membráně zakotveny. Proto dochází k jejich specifickému rozdělení do obou kompartmentů membrány. Podle současných názorů rafty představují platformy mimo jiné při integraci signálů obdržených přes antigenně specifické i kostimulační a inhibiční receptory leukocytů. Přestože jsou lipidové rafty už zakotvené v základních učebnicích, množí se fyzikálně chemické důkazy, že asymetrické složení cytoplazmatické membrány vytváření takovýchto ostrůvků neumožňuje a některé funkce raftů jsou vysvětlovány pomocí protein-proteinových interakcí. Problém je, že dosud nebyla vyřešena přímá vizualizace raftů.

Pro rozšíření poznatků o signalizaci v lipidových raftech jsme se pokusili vyhledat nové potenciálně raftově lokalizované signální proteiny podle specifických sekvenčních znaků ve veřejných proteinových databázích. Po bioinformatickém zpracování výsledků jsme vybrali k dalšímu výzkumu mimo jiné dvě fosfodiesterázy, PDE8a a PDE8b. O fosfodiesterázách je známo, že při aktivaci T lymfocytů snižují hladinu cAMP, které má inhibiční vliv. Na těchto dějích se podílí fosfodiesterázy rodin 3, 4, 7 a 8. PDE8a a 8b jsou přitom první, které nesou jasné sekvenční znaky pro dvojnásobnou acylaci nutnou k raftové lokalizaci. Jejich regulace byla zatím studována pouze na úrovni celkové exprese a interakcí s transkripčním regulátorem I- $\kappa$ B. O konkrétní roli v signálních drahách a buněčné lokalizaci proteinu není známo nic.

## Úvod

Výzkum nového proteinu obvykle začíná jeho nalezením podle funkce nebo vazebné specifity a následným sekvenováním a klonováním cDNA. Vzhledem k tomu, že lidský genom je kompletně osekvenovaný a predikce sekvencí dosud neznámých proteinů je již značně pokročilá, je možný i opačný přístup. Pokud jsme schopni funkci nebo jinou klíčovou vlastnost proteinu, který hledáme, převést do podoby sekvenčních znaků, jež takový protein musí nést, můžeme jej hledat „in silico“ ve veřejných proteinových databázích. Právě tento přístup jsme zvolili při našem pokusu najít nové adaptorové proteiny lokalizované v takzvaných membránových mikrodoménách čili lipidových raftech. Hlavním cílem bylo dohledat další členy již známých rodin raftových proteinů, které se podílejí na signalizaci v receptorech leukocytů. V databázích jsme hledali všechny proteiny nesoucí zároveň určité signály pro zacílení do mikrodomén a pro fosforylaci tyrosinu. Nalezené sekvence (asi 200) jsme poté podrobili detailnímu bioinformatickému rozboru. Na jeho základě již bylo možné vybrat několik skutečně nadějných sekvencí, jejichž výzkum může přinést lepší poznání signalizace v lipidových raftech leukocytů. Prakticky tedy nastala opačná situace, než je v začátcích podobného výzkumu běžná, neboť máme k dispozici známou kompletní sekvenci proteinu, víme, že pravděpodobně patří do skupiny, jež nás zajímá, a musíme zjistit jeho funkci v buněčné signalizaci.

## Membránové mikrodomény a detergent-rezistentní membrány

Biologické membrány jsou nadmolekulové struktury tvořené dvěma vrstvami amfipatických molekul držené pohromadě hydrofobní interakcí. Jejich skupenství je kapalné a můžeme je proto označit za dvourozměrné kapaliny. S touto představou přišli již roku 1925 E. Gorte a F. Grendl. Posléze byla potvrzena pokusy s umělými membránami a od konce padesátých let je možné dvojrstevnou strukturu membrán pozorovat elektronovým mikroskopem. Problém v této době představovalo začlenění proteinů do takové membrány. Nedokonalé fixační techniky elektronové mikroskopie zavinily, že se veškeré proteiny z membrány vysrážely na jejím povrchu. Tak vypadal i model Dawsona a Danielliho z roku 1935, který platil až do 70. let (Lichtenberg et al. 2005). Roku 1972 formulovali S. Singer a G. Nicolson teorii tekuté mozaiky, podle níž proteiny tvoří integrální součást membrány, jsou do ní tedy zanořené a mohou se laterálně pohybovat. Membrána tak představuje dynamickou neustále se měnící strukturu. Tento model v principu platí dodnes (shrnuje Vodrážka 1996).

Složení biomembrán z různých buněčných typů a různých organel je dosti rozdílné. Nás bude zajímat především cytoplazmatická membrána savčí buňky. Ta je jako všechny

biomembrány tvořena směsí více typů lipidů. Její základní stavební složku tvoří fosfolipidy. Cytoplazmatická membrána obsahuje typicky 40 – 60 molárních % glycerolfosfolipidů (fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin). Je pro ní specifický je vysoký obsah cholesterolu a sfingolipidů (30 – 40 % cholesterolu, 10 – 20 % sfingomyelinu) a malé množství glykosfingolipidů. Některé membrány plnicí speciální funkce, například ve střevním epitelu a hematoencefalické bariéře, ale mohou obsahovat i přes 30 % glykosfingolipidů (Munro 2003).

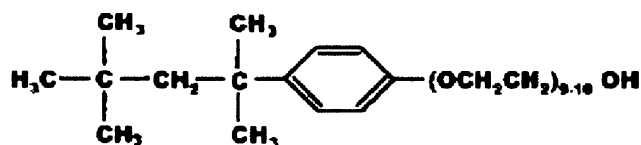
Je třeba si uvědomit, že těchto druhů lipidů je více, než by bylo nezbytně nutné k vytvoření pouhé stabilní dvojvrstvy. Na tu by ve skutečnosti stačil pouhý jeden glycerolfosfolipid. Hlavním důvodem tohoto nadbytku typů molekul je to, že každá buňka musí neustále regulovat fyzikální a chemické vlastnosti membrán. Různé fosfolipidy mají různé vlastnosti, například saturace jejich uhlovodíkového skeletu ovlivňuje fluiditu membrány. U živočichů má zásadní význam cholesterol, který má rigidní tetracyklickou strukturu a výrazně mechanicky zpevňuje membránu.

Některé složky membrán mají též signální funkci. Fosfatidylinositol může být štěpen fosfolipázami na diacylglycerol a různě fosforylovaný alkohol inositol, což jsou významné druhé posly v buněčné signalizaci. Fosfatidylserin rozpoznávají makrofágy, jež pohlcují apoptotická tělíčka mající jej na povrchu (Alberts et al 2002).

Další vlastnost membrány je rozdílné složení jejich různých oblastí. Již dlouho je známo, že se liší složení vnitřní a vnější vrstvy cytoplazmatické membrány. Fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol se vyskytují pouze ve vnitřní vrstvě, zatímco sfingolipidy jsou úplně či téměř úplně obsažené ve vnější vrstvě membrány (Bretscher 1973). Tento stav buňka udržuje aktivně pomocí specifických translokáz, fosfolipidy mají tendenci spontánně přecházet mezi vrstvami s poločasem asi 1 s (Alberts et al 2002).

Na další nehomogenitu ve složení biomembrán upozornilo pozorování, že část cytoplazmatické membrány vydrží extrakci zředěnými neiontovými detergenty (Triron X-100, Brij, NP 40) a lze ji od buněčného lyzátu oddělit izopyknicou centrifugací. Tato detergent-rezistentní membrána (DRM) obsahuje některé membránové proteiny, které s ní při ultracentrifugaci kopurifikují. Tato pozorování vedla k představě, že na cytoplazmatické membráně existují ostrůvky DRM obsahující stejné proteiny také *in vivo*. Tato hypotéza je běžně označována jako raftová teorie (Cinek a Hořejší 1992, Simons a Ikonen viz TIBS). Později byla vyvinuta metoda izolace mikrodomén bez detergentů pomocí ultrazvukové lyze buněk, což podporuje představu, že nejde o artefakt vzniklý působením smáčedel (Macdonald a Pike 2005).

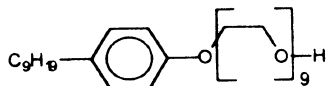
### Triton X-100



### Brij-96



### Nonidet P-40



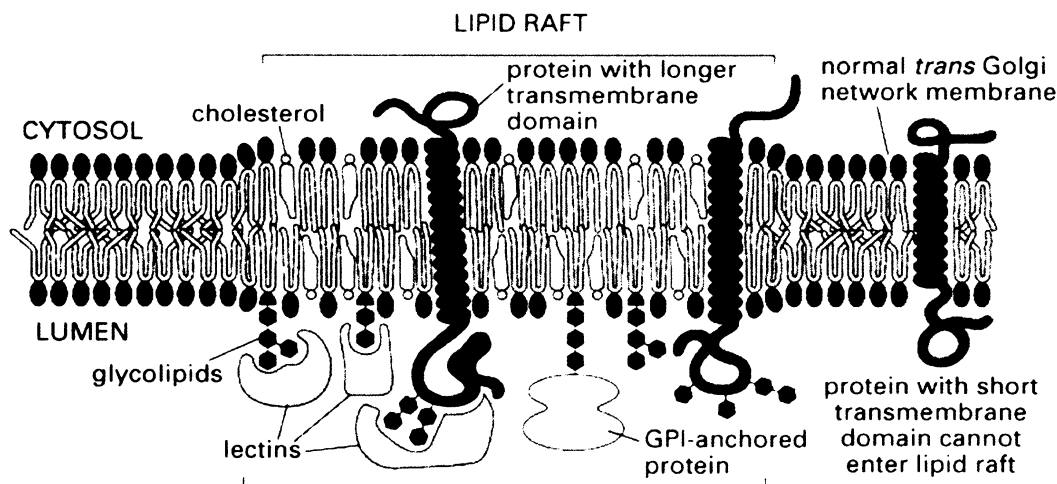
Obr. 1 Struktura neiontových detergentů nejčastěji používaných k izolaci DRM

Raftová teorie předpokládá, že mikrodomény jsou od okolí odděleny fázovým přechodem. Je tedy nutné, aby biomembrány mohly existovat ve více fázích. V současnosti jsou známy tři možné fáze membrány, gel, kapalná neorganizovaná ( $l_i$ ) a kapalná organizovaná ( $l_o$ ). Jako gel se membrána chová při teplotách bodem tání a je v něm znemožněna laterální difuze. V  $l_o$  membráně je možný laterální pohyb molekul, avšak je velmi omezen pohyb kolmo na rovinu membrány, a to jak uhlovodíkových řetězců fosfolipidů, tak jiných molekul, například vody. Její vznik byl pozorován jen v přítomnosti cholesterolu (Yeagle 1985). Konečně  $l_i$  (též  $l_d$ ) membrána vykazuje nejmenší organizovanost. Molekuly se pohybují laterálně a zároveň dochází k dosti volnému pohybu uhlovodíkových řetězců fosfolipidů (Ipsen et al. 1987).

Podle raftové teorie se mikrodomény nacházejí v  $l_o$  fázi, zatímco okolní membrána je ve skupenství  $l_i$ . Důvodem je složení mikrodomén. Jsou bohaté na sfingolipidy, které obsahují nenasycené uhlovodíkové řetězce, které jsou též delší než v okolní membráně a přednostně s nimi interaguje cholesterol. Kromě toho obsahují i ceramid, produkt štěpení glykosfingolipidů (Hořejší 2005). Není vysvětleno, jakým způsobem dochází k provázání mikrodomén na vnitřním a vnějším listu membrány a hlavně jak mikrodomény na vnitřním listu vznikají. Vnitřní vrstva membrány neobsahuje sfingolipidy a obsahuje značné množství fosfolipidů s nenasycenými mastnými kyselinami. Taková směs v experimentu in vitro není schopna zaujmout  $l_o$  fázi při žádné koncentraci cholesterolu a netvoří detergent-rezistentní membrány (Munro 2003). Pokud se odstraní cholesterol methyl- $\beta$ -cyklodextrinem, mikrodomény zaniknou a značná část raftově lokalizovaných proteinů přestane kopurifikovat s DRM, ne však všechny (Foster et al. 2003). Právě tyto membránové mikrodomény podle



současných představ obsahují zvýšené množství některých signálních proteinů a představují tak ideální prostředí pro jejich vzájemné interakce.



Obr. 2 Lipidový raft formující se v membráně Golgihho komplexu ve schematickém znázornění s reprezentanty různých typů proteinů asociovaných s „raftovou“ membránou na učebnicovém obrázku (Alberts et al. 2002). Všimněte si tradičně mylného zobrazení se stejným složením vnitřního i vnějšího listu membrány.

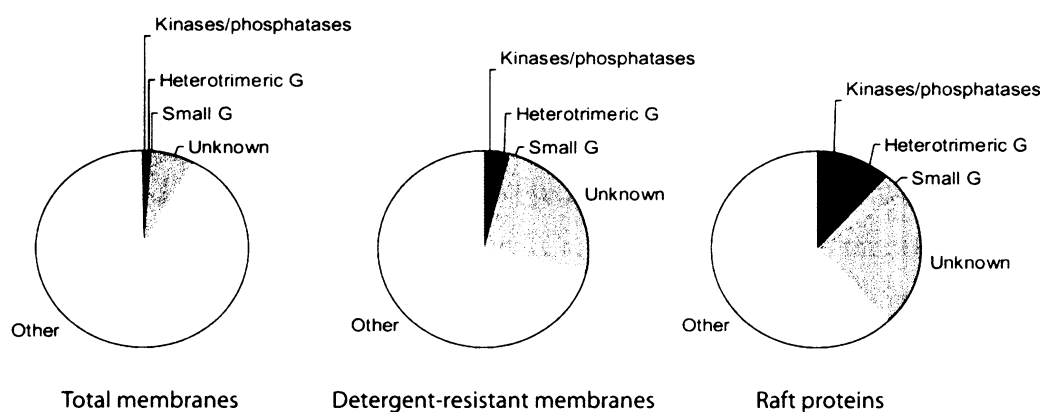
### **Membránové mikrodomény se podílejí na organizaci buněčné signalizace v leukocytech**

Proteom běžné cytoplazmatické membrány se liší od proteomu DRM a zdá se, že proteiny jsou do DRM a potenciálně do mikrodomén zacíleny několika konkrétními posttranslačními modifikacemi. Může jít o vazbu zbytků dvou mastných kyselin nebo izoprenoidů u proteinů kotvených do intracelulárního listu membrány, GPI kotvu proteinů lokalizovaných na vnějším povrchu membrány a také kombinací transmembránového helixu a palmitoylace. V jednom proteinu nacházíme maximálně jednu z těchto modifikací. Zdá se, že ve všech případech je segregace založena na fyzikálně-chemickém principu, kdy je hydrofobní kotva proteinu více rozpustná v membráně složením odpovídající DRM a snad mající i skupenství (Resh 2004). Otázka je, do jaké míry je možné podle těchto znaků predikovat přítomnost takto necharakterizovaného proteinu v DRM.

Známé proteiny lokalizované v DRM lze rozdělit do několika typických skupin (přehled Hořejší 2005). Jde o kinázy rodiny Src (Foster et al. 2003), receptory hormonů a jiných rozpustných faktorů (anandamid, inzulin, transferinový receptor, např. Foster et al 2003) trimerní G proteiny, GPI kotvené molekuly (např. CD 48, CD52, CD55, CD 59, Thy-1, Ly-6 a jiné), adhezivní protein CD44, transmembránové signální proteiny typu CD3 a zástupci rodiny TNF-R a adaptorové molekuly patřící do rodiny TRAP, kam patří DRM asociované

PAG, LAT, NTAL a LIME a další transmembránové proteiny LAX, SIT, TRIM, SKAP55 a SKAP-HOM (review Hořejší 2004 a 2005, Marie-Cardine et al. 1998, Zhu et al. 2002).

Raftová hypotéza předpokládá, že lipidové rafty slouží jako platformy, kde se spolu vyskytují určité signální proteiny. Tak je zajištěna vyšší procesivita jejich interakce a také je ovlivněno spektrum vazebných partnerů proteinu. Důležitý je nejen společný výskyt určitých proteinů, ale i opačná situace, tedy jejich izolace od proteinů neraftové membrány. Příkladem je proteintyrosinfosfatáza CD45, která prodělává přesun z DRM do okolní membránové frakce po stimulaci TCR, což se ukazuje být klíčovým mechanismem nastavování prahu reakce na TCR stimulaci (Zhang et al. 2005). Další záhy rozpoznanou funkcí lipidových raftů je i rozlišení proteinů transportovaných na apikální a bazolaterální stranu epitelární buňky (Brown a Rose 1992)



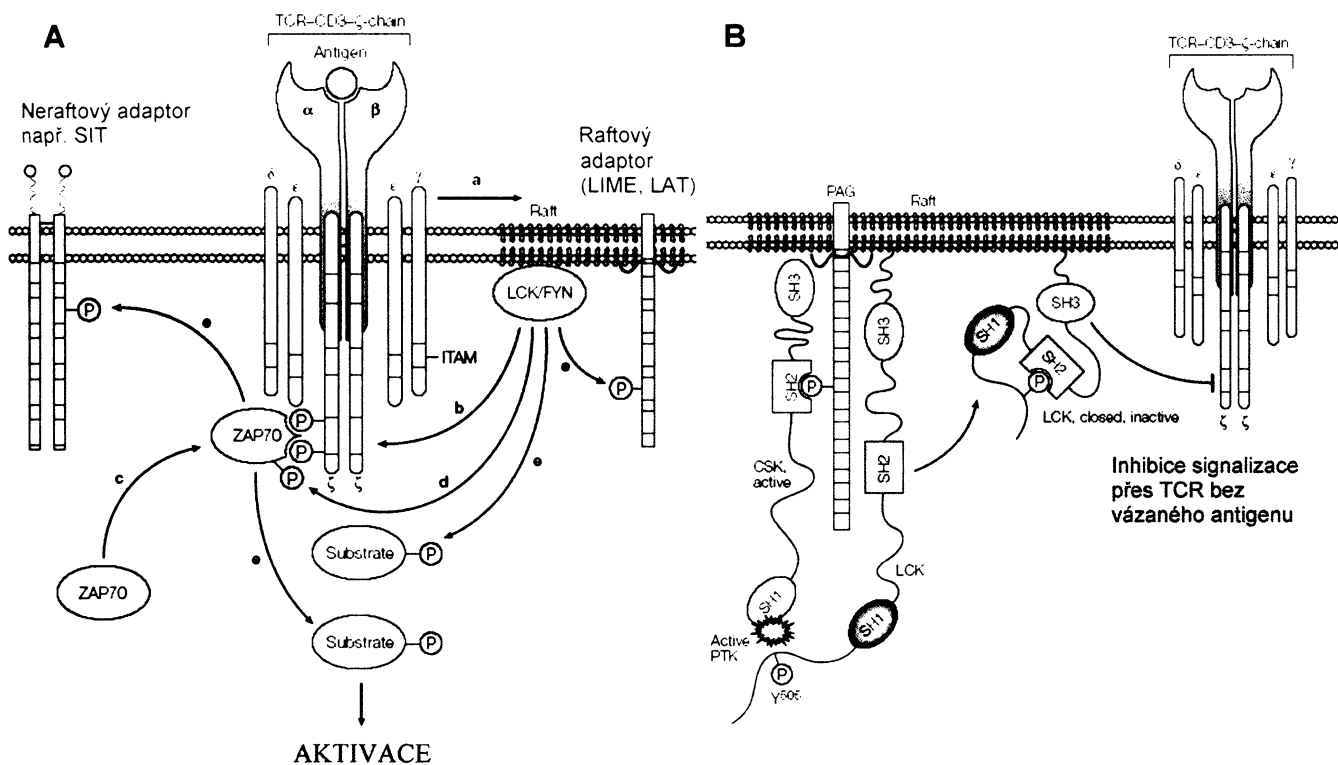
Obr. 3. Zastoupení různých typů signálních proteinů v plazmatické membráně, DRM a lipidových raftech. Raftové proteiny jsou zde definovány jako ty, jejichž přítomnost v DRM byla závislá na přítomnosti cholesterolu. Foster et al. 2003

Důležitou roli mohou membránové mikrodomény hrát při signalizaci přes GPI kotvené receptory. Tyto proteiny jsou lokalizovány celým řetězcem extracelulárně a není znám žádný transmembránový adaptor, který by je spojoval s následujícími články signální kaskády. Bylo zjištěno, že GPI kotvené receptory (CD 14, 24, 48, 55, 59 aj.) koprecipitují s kinázami rodiny Src. Podle jedné teorie předávají signál přímo pomocí shluknutí mikrodomén, což je příčinou shluknutí tyrosinkináz rodin Src, Syk a fosfolipázy C v nich obsažených po vzájemném provázání receptorů ligandem obdobně jako při signalizaci pomocí TCR (viz dále). Obdobně by mohla být zajištěna signalizace pomocí glykosfingolipidů (Štefanová et al. 1991, Cinek a Hořejší 1992). Kinázy rodiny Src a Syk jsou aktivovány vzájemnou fosforylací tyrosinu v katalytické doméně, která je výrazně zvýšená právě při jejich agregaci (Sun et al. 2002). Tuto teorii podporuje i zjištění, že při provázání GPI kotvených receptorů dochází přímo k fosforylaci ITAM motivů CD3 $\zeta$  řetězce komplexu TCR (review Hořejší 2005).

Významná role se mikrodoménám přisuzuje v organizaci signalizace přes receptory BCR, TCR a některé Fc-receptory, což z mikrodomén činí imunologicky důležité entity (Hořejší 2005). Tyto receptory samy o sobě asociované s lipidovými rafty nejsou, ale po vazbě ligandu se začnou vázat s proteiny, u nichž se asociace předpokládá. Jde o koreceptory CD4, CD8, řetězec  $\zeta$  koreceptoru CD3 tvořícího součást TCR a jeho homology. V důsledku toho dojde k fosforylaci aktivačních tyrosinových motivů ITAM pomocí kináz rodiny Src přítomných v DRM (Hck, Fyn, Lck). Fosforylované motivy ITAM pak slouží jako vazebný motiv pro kinázy ZAP70 nebo Syk, které fosforylují další protein kopurifikující s DRM, LAT. LAT je adaptorový protein, který je má na N konci transmembránový helix a v jeho blízkosti je palmitoylován, což způsobuje jeho lokalizaci v DRM (Zhang et al. 1998). Obsahuje 10 tyrosinů, jež jsou při aktivaci T lymfocytů rychle fosforylovány a stanou se tak SH2 vazebnými motivy (Brdička et al. 1998). LAT poté váže řadu proteinů obsahujících SH2 doménu, přičemž nejdůležitější je PLC $\gamma$ . Ta pak, jak je všeobecně známo, štěpí fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát na diacylglycerol a inositol trisfosfát. Další pokračování signální kaskády ústící v aktivaci lymfocytu pak na lipidových raftech zřejmě nezávisí (shrnuje Hořejší 2005). Je možné i to, že TCR je také asociován s mikrodoménami a vazba ligandu jen změni prostorové uspořádání komplexu a odhalí ITAM lokalizované v podjednotce CD3 $\zeta$ . tento poznatek je založen na zjištění, že i samotný TCR kopurifikuje s DRM extrahovanými detergentem Brij-98 za teploty 37 °C (Drevot et al 2002).

Funkce ostatních raftových členů rodiny TRAP je velmi podobná jako u LAT. Protein PAG nese také 10 fosfotyrosinových motivů a sekvenci bohatou na prolin, sloužící jako vazebné místo SH3 domén. V klidové buňce se na PAG váže c-koncová Src kináza (CSK), která je takto aktivována a lokalizována v blízkosti cytoplazmatického povrchu membrány. Zde zajišťuje fosforylaci C-koncové sekvence kináz rodiny Src, které jsou tím udržovány v neaktivním stavu (Armstrong et al. 1992). Po stimulaci buňky dojde k defosforylaci PAG a disociaci CSK, což usnadní aktivaci Src kináz (Brdička et al. 2000). Za defosforylaci je přitom zodpovědná fosfatáza Shp2 (Zhang et al. 2004). Tento princip platí v  $\alpha\beta$ T buňkách, v  $\gamma\delta$ T lymfocytech dochází naopak po stimulaci buněk k fosforylaci PAG a inhibici Src. V leukocytech mimo T buněk se exprimuje NTAL, další člen rodiny TRAP. Jeho struktura i funkce je velmi podobná LAT, avšak neváže PLC $\gamma$ . Přenáší signál přes BCR a receptory Fc $\gamma$ R1 a Fc $\epsilon$ R1. Zřejmě může být fosforylován kinázami rodiny Src i Syk. Hlavní proteiny aktivované pomocí NTAL byly identifikovány jako Grb2, Sos1, Gab1 a c-Cbl (Brdička et al. 2002). Poslední raftový TRAP nazvaný LIME je fosforylován Lck po signalizaci přes

receptory CD4 nebo CD8 a váže SH2 domény CSK a Lck, čímž zvyšuje jejich kinázovou aktivitu (Brdičková et al. 2003).



Obr. 4 Signální dráhy přenášející signál z TCRzávislé na proteinech rodiny TRAP. A. Po vazbě antigenu k TCR dojde k jeho přemístění do lipidového raftu (a), kde Src kináza Lck fosforyluje CD3ζ ITAM motiv (b). Na něj se váže kináza ZAP70 (c) a Lck ji fosforyluje a tímaktivuje (d). ZAP70 a Lck pak fosforylují různé další proteiny, což vede k aktivaci lymfocytu (nebo anergizaci při absenci kostimulace). B. Negativní regulace Lck v lipidovém raftu fosforylací Y505 pomocí kinázy Csk vázané adaptorem PAG. Při podráždění buňky je PAG defosforylován a Csk disociuje mimo raft. Podle Hořejší et al. 2004.

### **Pochybnosti o existenci membránových mikrodomén**

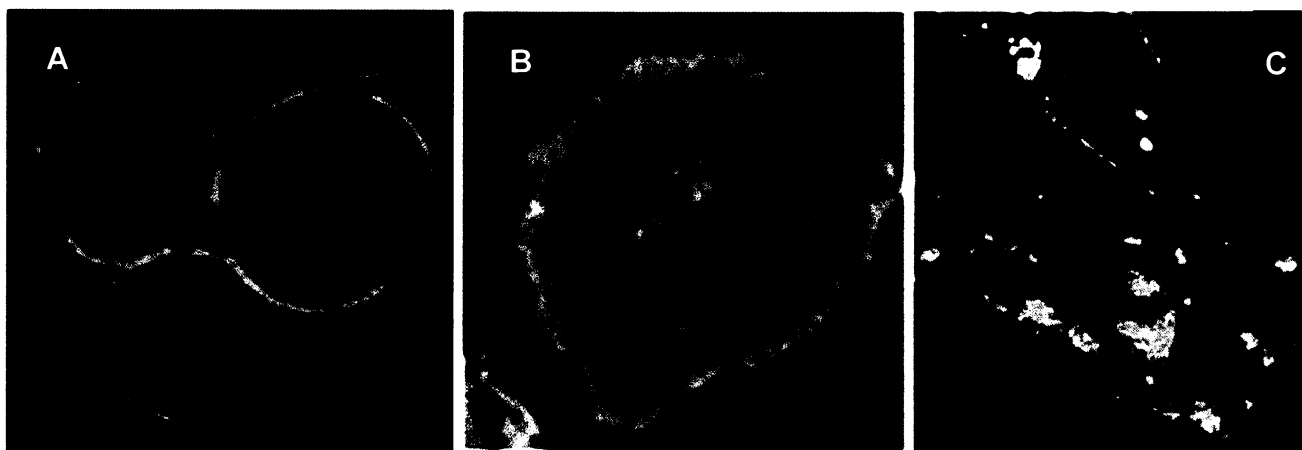
Ačkoliv dnes o membránových mikrodoménách a jejich signálních funkcích existuje velmi rozsáhlá literatura, objevují se stále pochybnosti o jejich existenci. Jedna skupina výhrad se zakládá na nedostatečnosti přímých důkazů existence diskontinuit cytoplazmatické membrány. Mikrodomény dosud nebyly pozorovány, což většina autorů vysvětluje jejich malou velikostí okolo 10 nm. Tato velikost je hluboko pod hranicí rozlišení optického mikroskopu (Kusumi et al. 2004, Mayor a Rao 2004). Pokud například obarvíme membránový protein nebo lipid, který by měl být obsažen v raftech, obdržíme difúzní signál z celé plazmatické membrány (např. NTAL Brdička et al. 2002, LIME Brdičková et al 2003). Jediným důkazem přítomnosti proteinu v předpokládaném raftu, přijímaným stále jako dostatečný důkaz, je tedy jeho kopurifikace s detergent rezistentními membránami při ultracentrifugaci (Munro 2003). Proteomické analýzy frakcí po ultracentrifugaci ale ukazují,

že kromě proteinů nacházejících se v předpokládaných lipidových raftech se ve frakci s nízkou vznášivou hustotou purifikují i proteiny ribozómů, jádra a mitochondrií, které se přirozeně v lipidových raftech nacházet nemohou. Přítomnost části raftových proteinů ve frakci DRM není narušena odstraněním cholesterolu pomocí methyl- $\beta$ -cyklodextrinu, což je v rozporu s představou, že tyto proteiny kopurifikují s DRM právě z důvodu, že se nacházejí v lipidových raftech (Forster et al. 2003). Proteomy DRM získaných pomocí různých detergentů se navíc často liší a liší se i citlivost k vymytí cholesterolu (Gaus et al. 2005).

Problém je, že detergent-rezistentní membrány získané ultracentrifugací nejsou totožné s lipidovými rafty v buňce neošetřené detergenty (Lichtenberg 2005). Při lyzi buňky slabým detergentem dochází k dějům, které charakter membrány značně mění. Mikroskopická pozorování prokázala, že během rozpouštění membrány se v ní tvoří otvory a míchají se složky vnitřní a vnější vrstvy. Tak vznikne nepřirozený stav, kdy mají obě vrstvy stejné složení. Pozorované membrány s otvory také příliš neodpovídají klasické představě malých terčů, které detergent jako jediné nerozpustí (Gaus et al 2005, Hao et al. 2001).

Zajímavá je skutečnost, že cytoplazmatická membrána obsahuje značné koncentrace cholesterolu, asi 30 - 40 %, což je dostatečné množství na to, aby navodilo vznik  $l_0$  fáze v celém vnějším listu (Munro 2003). Hao et al. (2001) označil cytoplazmatickou membránu buněk linie TRVb-1 fluorescenční sondou rozpustnou v  $l_0$  fázi (DiI $C_{16}$ ) a druhou jinak značenou sondou rozpustnou přednostně v  $l_1$  fázi ( $C_6$ -NBD-SM). Výsledkem bylo kontinuální obarvení membrány oběma sondami. Když byly buňky zbaveny asi 60 % cholesterolu, objevily se pozorovatelné oblasti obsahující pouze prouby specifickou pro  $l_1$  fázi. Jejich velikost dosahovala stovek nanometrů až jednotek mikrometrů. Tyto oblasti jsou tedy inverzní ke klasickým mikrodoménám. Autoři studie navrhuji pro záchranu raftové hypotézy dosti složité vysvětlení, že došlo ke splynutí mikrodomén původně oddělených vlivem cholesterolu.

Podobné výsledky získala skupina M. J. Swamyho (2006) pomocí elektronové spinové rezonanční spektroskopie. Touto metodou je možné odlišit pomocí měření relaxačních časů značení lipidové prouby zjistit, zda se prouba nachází v  $l_0$  nebo  $l_1$  fázi membrány. Výsledky měření na živých buňkách patřících ke čtyřem různým liniím (RBL-2H3, COS7, NIH-3T3 a CHO) ukazují, že většina membrány se nachází v  $l_0$  fázi. Autoři z toho vyvozují, že membránu tvoří souvislý „raft“ obsahující malé ostrůvky tvořené  $l_1$  membránou spíše než naopak. Metoda samozřejmě neumožňuje poznat prostorové uspořádání těchto oblastí, pouze vzájemný poměr jejich množství.



Obr. 5 A. Raftové proteiny (zde NTAL, zeleně) při imunofluorescenci typicky poskytují difúzní signál z celé membrány. Obrázek z konfokálního mikroskopu. Podle Brdička et al. 2002

B. Otvory v membráně buňky vytvořeni 30min. extrakcí pomocí 1% tritonu X-100 na ledu. V této fázi může docházet k mísení složek obou vrstev membrány a tím i vzniku dvouvrstevné DRM.

C. Živá buňka, v jejíž membráně se objevily oblasti I<sub>1</sub> (zelená) membrány v souvislé I<sub>0</sub> (červená) vrstvě po ztrátě 40 % cholesterolu vlivem růstu na oligotrofním médiu. Tyto oblasti jsou vlastně opakem předpokládaných I<sub>0</sub> raftů. Podle Hao et al. 2001

Další komplikace raftové hypotézy přinesly experimenty zacilující signální proteiny považované za typicky mikrodoménově lokalizované (tedy kopurifikující s DRM) do mimorraftových částí membrány. Žu et al. (2005) ve své práci vytvořili fúzní protein Lax-Lat, mající intracelulární doménu z adaptorového proteinu Lat a transmembránový helix z proteinu Lax. Zatímco Lat kopurifikuje s DRM, Lat-Lax konstrukt stejně jako Lax nikoliv. Po vnesení Lax-Lat do buněk z delecí Lat přesto došlo k úplné reverzi fenotypu. K obnovení funkce došlo i v LAT deficientní myši, což dokazuje, že LAT nevyžaduje lokalizaci v klasických lipidových raftech. Tak byl zpochybněn jeden z dosud nejvýznamnějších důkazů existence funkčních lipidových raftů, který spočíval v porušení funkce LAT s mutací palmitoylačního signálu (Zhang et al. 1998). Studie této mutanty na myši s delecí vlastního LAT navíc ukazuje, že porucha funkce spočívá v porušení transportu a stability proteinu (Tanimura et al. 2006). Precizní konfokální mikroskopie navíc našla strukturu, která může nahradit lipidové mikrodomény coby platformy pro zpracovávání signálů z membránových receptorů. Sledováním kolokalizací fluorescenčně značených proteinů bylo zjištěno, že se Lat vyskytuje v perimembránových komplexech tvořených proteiny CD2, Lat a Lck, přičemž tyto komplexy jsou založené čistě na protein proteinových interakcích. Segregaci proteinů do separátních lipidových domén nenasvědčuje ani sledování pohybu jednotlivých molekul v čase (Douglass a Vale 2005). Existenci „raftů“ založených na proteinových interakcích nasvědčuje i práce

Langhorsta a kol (2005), který předpokládá existenci specifických mikrodomén vzniklých agregací proteinů rodiny SPFH (stomatin, prohibitin, flotilin, HFLK/C).

V principu obdobný experiment jako s Lat byl proveden i s GPI kotveným konstruktem, napodobujícím membránový GPI kotvený receptor. Do buněčné membrány T lymfocytů byl vnesen konjugát fosfatidylinositol-polyethylenglykolu s biotinem, který obsahoval buď dvě nasycené nebo nenasycené mastné kyseliny. Podle toho buď kopurifikoval nebo nekopurifikoval s DRM. Na tento konjugát, mimikující GPI kotvu, byl poté navázán streptavidin. Provázání molekul streptavidinu pomocí protilátky pak vedlo k aktivaci T buněk doprovázené influxem  $\text{Ca}^{2+}$  a fosforylací Lat obdobně jako po aktivaci pomocí přirozeného GPI kotveného receptoru CD59 nebo gangliosidu GM1. Autoři studie přitom nenalezli rozdíl mezi účinky provázání streptavidinu zacíleného do předpokládaných mikrodomén a mimo ně, což je v rozporu s názorem, že shluknutí raftů po provázání v nich obsažených proteinů je nezbytné pro přenos signálu přes membránu (Wang et al. 2005). Glebov a Nichols (2004) navíc testovali metodou FRET, zda na cytoplazmatické membráně jsou detekovatelné shluky GPI vázaných proteinů odpovídající lipidovým raftům, a došli k závěru, že se neshlukují, ale jejich rozložení je náhodné. GPI vázané proteiny se neshlukují ani s transmembránovým raftovým proteinem Lat.

Přes množství provedených pokusů o detekci lipidových raftů tedy jejich existence stále není potvrzena a uvedené nové poznatky hovoří proti ní. Celou situaci komplikuje i chronické směšování DRM,  $\text{l}_0$  membrán a lipidových raftů autory mnoha studií. Je třeba si uvědomit, že rozlišování těchto entit není akademické slovíčkaření, ale že jde o naprosto odlišné objekty. Tím spíše je zarážející, že většina pozitivních důkazů existence lipidových raftů je založena právě na izolaci DRM. Také studie založené na likvidaci mikrodomén v živých buňkách odstraňováním cholesterolu se potýkají s obtížemi pramenícími z komplexních důsledků tohoto zásahu, mezi nimiž je obtížné rozlišit změny pramenící z narušení lipidových raftů (Munro 2003). Žádný ze zde popisovaných experimentů ani další zjištění (shrnuje Munro 2003) samozřejmě nejsou důkazem, že lipidové rafty neexistují, nicméně všechny tyto zpochybňující výsledky vyžadují vnášení dalších a dalších komplikací do raftové hypotézy, aby s ní byly slučitelné. Raftová hypotéza je stále široce přijímána a není nezbytné ji zatracovat, je ale nutná ostražitost při interpretaci závěrů studia lipidových raftů. Tím spíše ale může přinést zajímavé výsledky studium dalších potenciálně mikrodoménových proteinů, které lze bioinformaticky vytipovat pomocí charakteristických sekvenčních motivů. Je zde také reálná naděje najít proteiny, které nebyly dosud z hlediska membránové segregace nijak studovány.

## **Vyhledávání proteinů potenciálně lokalizovaných v membránových mikrodoménách**

Jak již bylo uvedeno, existuje několik posttranslačních modifikací, jejichž pomocí buňka může zacílit membránové proteiny do předpokládaných lipidových mikrodomén. Patří mezi ně dvojnásobná modifikace mastnou kyselinou na N konci proteinu, dvojnásobná modifikace izoprenoidní skupinou (geranylgeranyl, farnesyl) a jejich kombinace a také kombinace transmembránového helixu s acylací v blízkosti jeho cytoplazmatického konce (Resh 2004, Hořejší et al. 2004). Pro všechny uvedené modifikace existují specifické signály v sekvenci proteinu. Z tohoto poznatku vyplývá i možnost predikce laterální lokalizace proteinu v membráně ze známé sekvence. Pomocí takovéto predikce se již podařilo nalézt několik transmembránových proteinů z rodiny TRAP (Brdíčková et al. 2003).

Ve snaze najít další zástupce této skupiny a případně další proteiny potenciálně lokalizované v lipidových raftech byly T. Brdíčkou a J. Pačesem zadány dotazy do mezinárodních proteinových databází SwissProt-TrEmbl (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>, Gasteiger et al. 2003) a UCSC (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Karolchik et al. 2003), jež měly za úkol najít veškeré známé sekvence nesoucí požadované znaky. Celé vyhledávání jsme zaměřili na dvě skupiny proteinů přítomných v DRM, které spojuje to, že často mají adaptorovou funkci. Jedná se o proteiny nesoucí kombinaci myristoylace a modifikace jinou hydrofobní skupinou, konkrétně palmitoylem nebo prenylem (část Src kináz), a proteinů obsahujících N-terminálně umístěný transmembránový helix a signál pro palmitoylaci v těsném sousedství jeho C-terminálně směřující části (raftové TRAP). Aby bylo spektrum možných sekvenčních rysů co nejkompletněji pokryto, bylo zadáno celkem pět dotazů, které shrnuje tabulka 1. Pro zvýšení pravděpodobnosti, že protein označený jako pozitivní hraje roli v buněčné signalizaci, byly dotazy doplněny o podmínku přítomnosti dvou typických rysů adaptorových proteinů. Jedná se o přítomnost tyrosinu v okolí známém jako konsenzuální substrát pro proteintyrosinkinázy a o přítomnost C koncové sekvence umožňující vazbu s adaptorovými proteiny asociovanými s cytoskeletem. V obou případech jde o znaky členů rodiny TRAP (Hořejší 2004).

Lze říci, že první čtyři dotazy jsou navrženy tak, aby odpovídaly znakům několika proteintyrosinkináz rodiny Src, o nichž je známo, že kopurifikují s DRM. Jde o Hck, Fyn, Fgr a Yes (Štefanová et al. 1991, review Katagiri et al. 2001). Obdobné modifikace nese i větší počet trimerních G-proteinů (review Pike 2003). Poslední dotaz byl pak namířen na nalezení proteinů obdobných zástupcům rodiny TRAP. Ve všech případech byly dotazy omezeny na lidské proteinové sekvence. Jelikož je lidský genom zcela osekvenován a všechny dosud nepopsané otevřené čtecí rámce jsou v databázích reprezentovány jako predikované,



předpokládáme, že se podařilo nalézt všechny existující lidské proteiny, jejichž sekvence splňují námi zadané podmínky. V každé skupině je samozřejmě několik pozitivních kontrol v podobě již známých proteinů, o nichž byla řeč dříve. Jako negativní kontrola mohou posloužit veškeré ostatní dobře známé proteiny postrádající lokalizaci v DRM, nebo u nichž je tato lokalizace zjevně arteficiální (ribozomální proteiny, Munro 2003).

Databáze	Hledaný konsenzus	Testovaných genů	Počet pozitivních proteinů
SwissProt -TrEmbl	<b>1.</b> M-G-C-X-X-[C,S]	71 157 (člověk 4. 4. 2006) 1 219 569 (celá databáze 2. 2. 2004)	54
	<b>2.</b> M-G-C-X-X-[C,S]-X(1-1000)-Y-X-N		27 (vesměs obsaženy v 1.)
	<b>3.</b> M-G-C-X(0-20)-C-X(1-1000)-Y-X-N		18 (14 redundantních s 1)
	<b>4.</b> M-G-C-X-X-[C,S]-X(1-1000)-Y-X-X-[L,I,V,M]		38 (vesměs obsaženy v 1.)
	<b>5.</b> M-G-C-X(0-20)-C-X(1-1000)-Y-X-X-[L,I,V,M]		34 (13 redundantních s 1)
UCSC	<b>6.</b> X(5-50)transmem(18-23)+ X(20-60)-C-X(1-2)-C-X(n)- Y-X-X-[L,I,V]-X(n)-[S,T]- X-[L,I,V]-C konec	41 062	149, z toho 87 P-Y motiv

Tab. 1 Přehled dotazů použitých při prohledávání databází proteinů. První čtyři sekvencní znaky označují proteiny N-koncově myristoylované a palmitoylované nebo prenylované v kombinaci s přítomností tyrosinu v okolí umožňujícím jeho fosforylaci. Poslední dotaz představuje konsenzus proteinů obsahujících N-koncový transmembránový helix a palmitoylační signál v těsné blízkosti jeho C-terminálního konce. Zároveň byly v sekvencích splňujících tuto podmínku vyhledány fosfotyrosinové motivy a C-koncové místo pro vazbu adaptorových proteinů vázících k DRM a cytoskeletu (ezrin, radixin, moiesin).

Tvrdíme-li, že by databázová rešerše měla zastihnout veškeré proteiny obsahující požadované znaky, nelze totéž říci o její selektivitě. Zdrojů falešně pozitivních nálezů je několik. První možností jsou neúplné sekvence, jejichž počet je několikanásobně vyšší než těch úplných. Některé pak nesou na zdánlivém N konci námi hledané signály čistě náhodně. Dalším zdrojem nespecifity je skutečnost, že signály pro posttranslační modifikaci jsou krátké sekvence, jež mohou vzniknout i náhodou, takže neimplikují, že je u daného proteinu modifikace realizována. Proto bylo nutné výsledky rešerši obsahující desítky až více než sto položek prohlížet a ručně třídit.

Kritéria pro selekci získaných položek jsme stanovili tak, aby jako pozitivní prošly proteiny, které jsou neznámé nebo nedostatečně známé a v jejich sekvenci lze predikovat známé vazebné nebo jiné signalizační domény. K predikci domén a vazebných míst jsme

použili programy Pfam (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>, Bateman et al. 2004), Prosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>) a SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>, Schultz et al. 1998). Ověřován byl i počet, rozložení a orientace transmembránových úseků (<http://bioinfo.limbo.ifm.liu.se/tmap>, <http://www.ch.embnet.org> aj.) a homologie klíčových sekvenčních rysů u jiných savců programem BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, Altschul et al. 1990). Pomocí porovnání každé sekvence s databází známých proteinů a databáze EST (GenBank, Benson et al. 2004) pomocí programu BLAST jsme ověřili i kompletnost nalezené sekvence a také případnou přítomnost falešných pozitivit mylně přeložených nekódujících sekvencí. Vybrali jsme i proteiny, které jsou již částečně popsány a je známo, že hrají alespoň nějakou roli při imunoreceptorové signalizaci nebo že jsou opravdu asociované s membránami. V těchto případech musela být splněna podmínka, že nebyla publikována žádná studie týkající se jejich kopurifikace s DRM nebo laterální segregace na některé z buněčných membrán.

Zásadní výhodou takového postupu je možnost začínat výzkum proteinu, o němž máme k dispozici všechny dnes známé informace. Nevýhodou je přirozeně jeho velká subjektivita, která může vést především k vyřazení nadějných sekvencí. Toto riziko úplně neodstraní ani přítomnost pozitivních kontrol, neboť není možné zaslepení pokusu (data o proteinu se zpravidla dohledávají podle jeho jména).

Rešerše velmi podobná této byla provedena již jednou, kdy byl jejím výsledkem objev adaptorového proteinu LIME (Brdíčková et al. 2003). Tehdy použité zadání bylo zaměřeno na přítomnost N koncové 5 – 50 AK velké domény následované transmembránovým helixem, palmitoylační signál (CxxC) 0 – 4 AK od konce tohoto helixu a alespoň jeden tyrosinový motiv (Yxx[L/I/V]). Dotaz je tedy velmi podobný jednomu z dotazů provedených v naší rešerši, nicméně má význam jej opakovat, jelikož během posledních let došlo k doplnění databází a především k editování nekvalitních a neúplných sekvencí. Tehdy vybraný protein LIME také mohl vzhledem k nutné subjektivitě výběru zastínit jiný potenciálně nadějný protein.

### **Výsledky rešerše**

Prvním předpokladem pro hodnocení rešerše jako úspěšné bylo nalezení pozitivních kontrol. Při jejich hledání jsme se zaměřili zejména na kontrolu již vzpomínaných skupin DRM asociovaných proteinů, na něž byly zaměřeny naše dotazy. Mezi dvakrát acylovanými proteiny se jako pozitivní kontroly objevily Src kinázy Fgr, Fyn, Yes a Hck a celkem pět různých sekvencí podjednotek trimerních G proteinů. Jako transmembránové raftové proteiny

byly nalezeny všechny čtyři palmitoylované proteiny z rodiny TRAP. Tento výsledek podle našeho názoru nasvědčuje, že experiment měl v našich zájmových skupinách dostatečnou citlivost.

Pro další studium jsme z nalezených proteinů po vyloučení všech falešných pozitivit, proteinů majících zjevně jinou funkci (např. ABC transportéry, metabolické enzymy) a dvou již studovaných molekul (DTFT 5783, FLJ32580) vybrali ze skupiny transmembránových proteinů pro další výzkum již částečně známé molekuly LST1, Synaptotagmin7 (Syt7) a potenciálně zajímavé predikované proteiny SWRP 5927, WLS 2783 a PRR7. Z molekul, které nesou signál pro dvojnásobnou acylaci jsme vybrali pouze fosfodiesterázy PDE 8a a PDE 8b. Syt7 je přitom první zástupce rodiny synaptotagminů, u nějž bude zkoumána membránová segregace, ačkoliv z rodiny synaptotagminů nesou DRM asociační motiv ještě minimálně další dva proteiny, Syt5 a Syt13. Původní předpoklad, že budou nalezeny nové molekuly s uspořádáním obdobným adaptorům z rodiny TRAP se však nepotvrdil. Sice se podařilo najít několik proteinů, které mají značný počet fosfotyrosinových motivů a SH2 a SH3 vazebné motivy, ale vesměs šlo o proteiny známé a mající jinou funkci, nebo jinak prokazatelně falešně pozitivní.

### **Fosfodiesterázy a jejich funkce při imunoreceptorové signalizaci**

Fosfodiesterázy jsou dnes členěny do celkem 11 rodin podle sekvenční podobnosti a biochemických vlastností jako je afinita k cAMP a cGMP a citlivost k inhibitorům (Wang et al. 2001). Obecně jde o proteiny se signální funkcí, protože cyklické nukleotidy představují důležité druhé posly. Pro tuto práci byly z nalezených potenciálně raftových proteinů vybrány dvě fosfodiesterázy, PDE8a a PDE8b. Pomocí programu BLAST jsme přitom zjistili, že acylační signály jsou zachovány u PDE8 i u ostatních savců a N konec, na němž leží, je skutečný, neboť před ním leží stop kodón (Glavas et al. 2001, GenBank položka AF 332653). Jiné než tyto dvě fosfodiesterázy pak nemají sekvenční signály nutné pro zacílení do DRM, ačkoliv PDE4b má potenciální myristoylační motiv na N konci (Arp et al. 2003). Mikrodoménová lokalizace PDE rodiny 8 dosud nebyla studována.

Objev PDE8a byl publikován 1998. Byla nalezena při porovnávání sekvencí cDNA se známými geny mezi izoláty z fetální sleziny a linie THP1 odvozené od promyelocytů. Část sekvence nového proteinu jevila homologii s katalytickou doménou jiných fosfodiesteráz včetně klíčových aminokyselin konzervovaných u všech fosfodiesteráz. Míra homologie katalytických domén však nepřekročila 40%, takže bylo zjevné, že nepatří do žádné z tehdy známých sedmi rodin fosfodiesteráz, vyznačujících se silnou vnitřní podobností. Kompletní

cDNA proteinu se poté podařilo získat z jiných tkání, přičemž nejvyšší exprese byla nalezena ve varlatech, vaječnicích, tenkém a tlustém střevu. Katalytická doména ležící poblíž C konce a velká asi 283 aminokyselin tvoří jen necelou třetinu proteinu. Biochemické testy ukázaly, že PDE8a je specifická pro cAMP asi 2000x více než pro cGMP a necitlivá ke všem známým inhibitorům fosfodiesteráz kromě dipyridamolu do koncentrace 100  $\mu$ M (Fisher et al. 1998). Pozdější studie ukázaly, že se jedná o protein velký 829 aminokyselin mající kromě katalytické domény ještě REC a PAS doménu, které se obě podílí na přenosu signálu u bakterií i eukaryot. Gen je tvořen 23 exony. Autoři studie našli minimálně pět forem alternativního sestřihu. Sestřihové varianty se liší zejména v PAS doméně a jeví odlišnou tkáňovou specifitu (Wang et al. 2001).

PDE8b byla objevena v databázi EST jako homolog PDE4 (Hayashi et al. 1998). Sekvenčně je ze 68 % shodná s PDE8a. Její exprese je výrazně nejvyšší ve štítné žláze, asi 5x až 7x nižší expresi lze pozorovat i v CNS a placentě. V lymfatických tkáních je obecně velmi nízká, což ji činí imunologicky méně zajímavou. Její funkce se ale na štítnou žlázu neomezuje, o čemž svědčí nález zvýšené exprese tohoto proteinu v mozkové kůře v pokročilejších stádiích Alzheimerovy choroby (Pérez-Torres et al. 2003). U potkana je PDE8b specifická pro mozek a není exprimována ve štítné žláze, obdobně PDE8b chybí ve štítné žláze myši (Kobayashi et al. 2003). Protein obsahuje 885 aminokyselin a jeho uspořádání je podobné PDE8a, opět s podařilo nalézt REC a PAS doménu a 5 až 6 sestřihových variant lišících se v PAS doméně (Hayashi et al. 2002). Biochemicky jsou oba enzymy též velmi podobné, PDE jeví mírně vyšší  $K_m$  a nižší  $V_{max}$  než PDE8a a je třikrát méně citlivá k dipyridamolu. Důležité je zjištění, že obě fosfodiesterázy při expresi v COS buňkách můžeme nalézt v cytosolické i membránové frakci (Gamanuma et al. 2003).

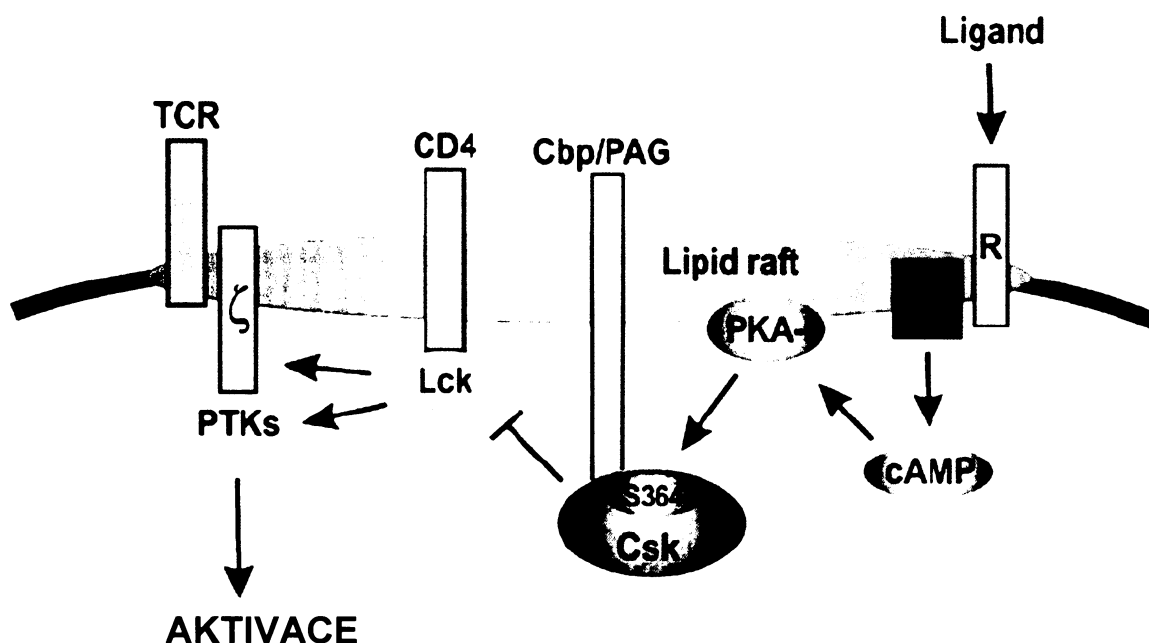
Přesná pozice a funkce PDE rodiny 8 v signálních drahách zatím není známa. Několik publikací na toto téma ale existuje a ukazují, že se zvyšuje exprese PDE8a1 během aktivace T lymfocytů a že se tento enzym podílí na přenosu kostimulačního signálu. Dochází také ke zvýšení exprese PDE7a3 (Glavas et al. 2001). Již dřívější studie odhalily podobnou funkci PDE7a1, jejíž aktivita je nezbytná pro zahájení proliferace a produkce IL-2 lidskými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty po stimulaci receptorů CD3 a CD28, přičemž inhibice PKA tento fenotyp ruší (Li et al. 1999). Rychlost vzrůstu množství a aktivity se u jednotlivých enzymů liší, PDE8a1 buňka syntetizuje oproti PDE7a1 se zpožděním a pomaleji, maxima dosahuje PDE8a1 po 16 hodinách. V případě PDE7a3 je nástup exprese ještě pomalejší. Exprese všech enzymů v T lymfocytech může dosáhnout maximální míry jen po stimulaci zároveň pomocí CD3 i CD28. Je zajímavé, že PDE7a3 má velmi nízkou enzymovou aktivitu, a to jak po extrakci z buněk

linie THP1, tak při heterologní expresi v buňkách mýry *Spodoptera frugiperda* Sf9 (Glavas et al. 2001). Wu a Wang (2004) odhalili pomocí vazebných testů jednu z funkcí PAS domény PDE8a1. Ta je schopná vytvářet komplexy s podjednotkami regulačního proteinu I $\kappa$ B, který je inhibitorem důležitého regulátoru genové exprese při aktivaci T lymfocytů NF- $\kappa$ B (Li a Verma 2002). Při overexpresi PDE8a1 v tkáňové kultuře sice byla zaznamenána kompetice mezi PDE8a a NF- $\kappa$ B o vazbu s I $\kappa$ B, ale ani tak nedošlo o ovlivnění citlivosti aktivace NF- $\kappa$ B ani degradace I $\kappa$ B. Vazba NF- $\kappa$ B však způsobila výrazné zvýšení fosfodiesterázové aktivity PDE8a1 (Wu a Wang 2004).

Další fosfodiesteráza známá funkcí při aktivaci T lymfocytů je PDE4b2. Část tohoto proteinu také kopurifikuje s DRM a při konfokální mikroskopii kolokalizuje s GM1. O PDE4b2 je známo, že má myristoylační signál a asociuje se součástí TCR CD3 $\zeta$ , která typicky kopurifikuje s DRM. Během prvních 30 minut aktivace T lymfocytu pomocí APC pak PDE4b2 prodělává redistribuci z místa imunologické synapse na opačný pól buňky. Při expresi v lymfocytech postrádajících vlastní PDE4b snižuje práh aktivace a její efekt je aditivní k účinku CD3 a CD28 stimulace (Arp et al. 2003). Roli při aktivaci T lymfocytů mimoto hraje i PDE3 (Giembycz 1996)

Předpokládá se, že cAMP je tvořeno v lymfocytech mimo jiné jako negativně zpětnovazebná odpověď na stimulaci TCR (Abrahamsen et al. 2004). Blokování aktivace T lymfocytů po zvýšení hladiny cAMP zprostředkovává aktivace PKA I – Csk dráhy. PKA I je vázána na adaptorový protein ezrin, který je lokalizován v DRM, což je stále považováno za důkaz přítomnosti v membránových mikrodoménách. Zde PKA I po aktivaci pomocí cAMP fosforyluje Csk, vázanou na adaptorovém proteinu PAG, na serinu 364. Vzniká komplex PKA I/ezrin/EBP 50/PAG/Csk. Csk je pomocí uvedené fosforylace asi dvojnásobně až čtyřnásobně aktivována a fosforyluje inhibiční C koncový tyrosin proteintyrosinkinázy Lck. Lck je přitom kináza nezbytná pro fosforylaci ITAM motivů TCR CD3 $\zeta$ . Pokud je inhibována, nemůže dojít k předání signálu z TCR (Vang et al. 2001). Csk se kromě toho přesouvá mimo oblast imunoreceptorové signalizace díky defosforylaci PAG (Torgersen et al. 2001).

Kromě uvedené dráhy existuje ještě jedno místo, kde se může setkat PKA a PDE8a1. PKA se totiž také váže k I $\kappa$ B, čímž je negativně regulována. Po degradaci I $\kappa$ B PKA fosforyluje NF- $\kappa$ B, zřejmě nezávisle na hladině cAMP (Zhong et al. 1997). Zda opravdu dochází k interakci mezi PDE8a a PAK vázanými k I $\kappa$  $\beta$  však není známo.



Obr. 6 Základní signální dráha popisovaná v textu, jejíž pomocí zvýšení hladiny cAMP inhibuje předání signálu z receptoru TCR. Receptor provázaný s adenylátcyklázou může být například TCR. Podle Vang et al. 2001.

Díky studiu cAMP regulovaných iontových kanálů je již dlouho známo, že hladina cAMP se v buňce během signalizace mění lokálně (shrnuje Conti et al. 2003). Tento poznatek může mít zásadní význam pro výzkum fosfodiesteráz rodiny PDE8, protože fyziologicky odůvodňuje zacílení PDE regulujících imunoreceptorovou signalizaci do membránových raftů, kde probíhá klíčová fáze rozhodování o výsledku simulace lymfocytu. cAMP jakožto malá molekula produkovaná adenylátcyklázami po řadě různých stimulů a degradovaná několika různými a hlavně separátně regulovanými fosfodiesterázami má podle našeho názoru naprosto ideální vlastnosti, aby mohla sloužit jako integrátor všech signálů, převádějící mnohorozměrné pole vstupních signálů do lineárně se měnící lokální hladiny cAMP.

Konkrétní fyziologický význam fosfodiesteráz 4, 7 a 8 patrně spočívá ve sprostředkování kostimulačního signálu z receptoru CD28 a možná i jiných receptorů. CD28 receptor je po vazbě ligandu transportován do předpokládaných raftů spolu s komplexem  $\beta$ -arrestin-PDE4. Zde PDE4 sníží hladinu cAMP, vznikajícího lokálně jako odpověď na stimulaci TCR jako negativně zpětnovazební odpověď. Lokální snížení hladiny cAMP pomocí PDE4b stejně jako

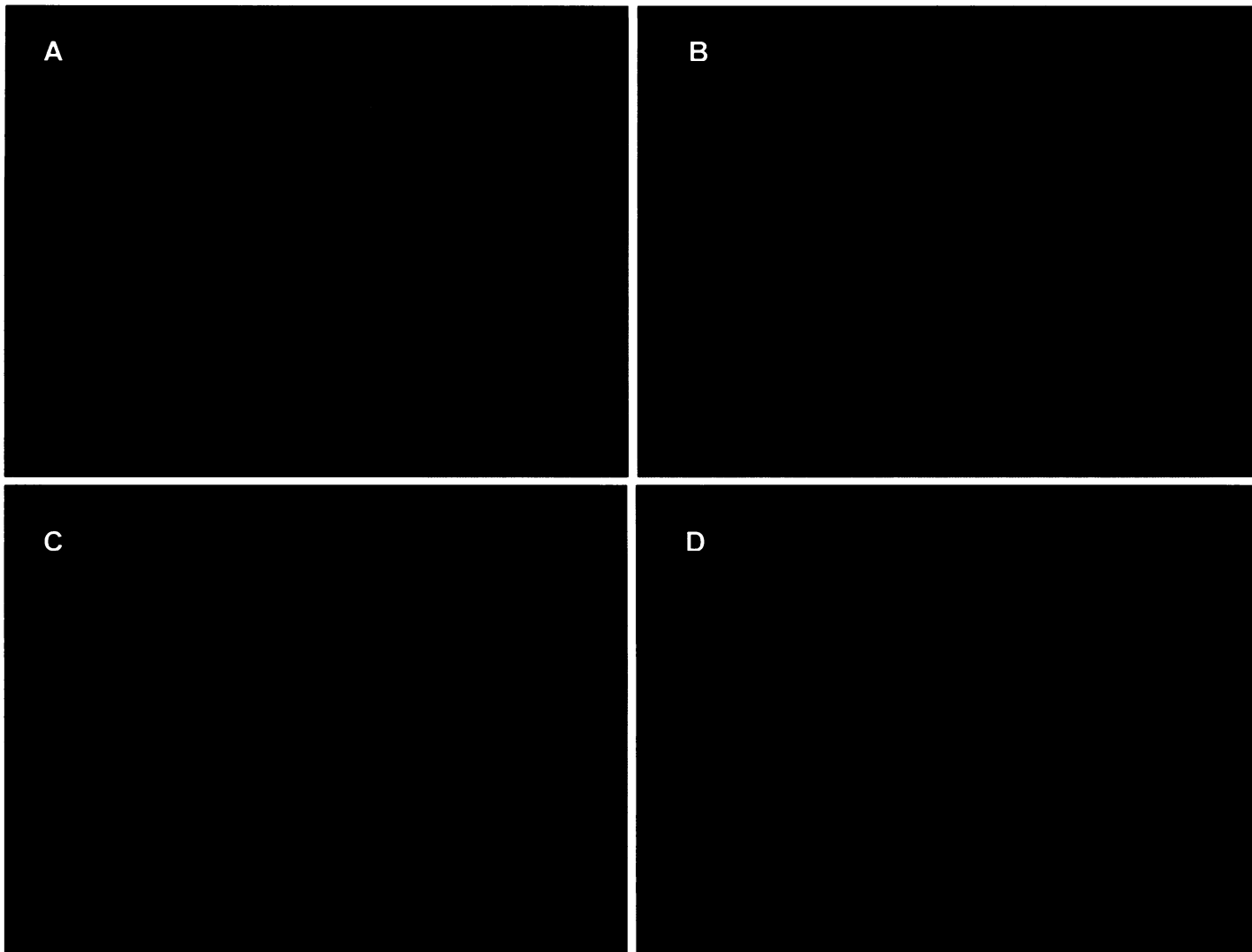
inhibice PKA-I prokazatelně vede k větší aktivovatelnosti T lymfocytů pomocí TCR (Abrahamsen et al. 2004). Jestliže v případě PDE8a bylo prokázáno největší zvýšení exprese po kombinované stimulaci cestou TCR i CD28, které přetrvává řadu hodin (Glavas et al. 2001, Li et al. 1999), může jít o určitou formu paměti signálních drah, které si takto po obdržení uvedené stimulace uchovávají po určitý čas zvýšenou reaktivitu.

## **Závěr**

Databázová rešerše, kterou jsme provedli, představuje účinný nástroj pro dohledávání proteinů z již známých skupin, které lze charakterizovat pomocí sekvenčních znaků. Oproti jiným metodám jde vlastně o opačný přístup, kdy je nutné zjistit o známém proteinu, zda opravdu má vlastnosti, pro které byl v rešerši vytipován. V tomto případě je tedy prvotní úkol ověřit DRM lokalizaci fosfodiesteráz 8a a 8b. Přednostně se budeme věnovat PDE8a, která je exprimována v imunologicky významných tkáních. V první fázi bude nutné získat klon cDNA kódujících obě fosfodiesterázy. Z ní lze vytvořit konstrukty vhodné pro imunizaci a tvorbu dosud neexistujících monoklonálních protilátek. Pomocí nich bude možné testovat jak buněčnou lokalizaci, tak kopurifikaci s DRM. Nezbytné je i ověření přítomnosti posttranslačních modifikací například metodou MALDI-TOF na proteinu exprimovaném v savčích buňkách. Další dostupný přístup je konstrukce GFP-fúzních proteinů a jejich lokalizace pomocí epifluorescenční a konfokální mikroskopie živých buněk. Tato metoda má oproti klasickému značení proteinů pomocí protilátek na fixovaných preparátech výhodu v podstatně nižším množství artefaktů. Její hlavní nevýhoda spočívá v alteraci funkce fúzního proteinu, což může být zdroj artefaktů jiného typu. Pokud se podaří prokázat dvojitou acylaci proteinu, je možné studovat její význam pro buněčnou signalizaci pomocí cílené mutagenese. Velmi důležité bude zavedení umělé imunologické synapse v tkáňové kultuře. Nerozřešený patrně zůstane problém, do jaké míry je kopurifikace v DRM relevantní pro úvahy o lokalizaci PDE8a/b v lipidových raftech.

Důležité bude i ověření jejich interakcí s jinými proteiny pomocí pull-down vazebných experimentů a identifikaci vazebných partnerů v ideálním případě metodou MALDI-TOF.

V současnosti již provádíme pokusy o získání cDNA PDE8a a 8b a její expresi v bakteriích s cílem získat protein použitelný pro imunizaci myši a tvorby monoklonální protilátky. Získali jsme i cDNA PDE7a1 a pokoušíme se připravit i cDNA PDE7a3 a 4b. Také se pokoušíme lokalizovat PDE4, 7 a 8 pomocí nepřímé fluorescence v buňkách linií odvozených od leukocytů (viz obr. 7).



Obr. 7 Epifluorescenční značení fosfodiesteráz v buňkách HeLa. Primární protilátky kozí polyklonální (Santa Cruz Bio Labs, USA), sekundární DaG Alexa Fluor 488 (zelená) a 594 (červená, vše Molecular probes, USA). Jádra značena DAPI, fotografováno na mikroskopu Olympus CellR. A. PDE8a, fixace methanol-aceton B. PDE8a, fixace paraformaldehyd C. PDE7a, methanol-aceton D.PDE4a, methanol-aceton



## **Literatura**

Abrahamsen H, Baillie G, Ngai J, Vang T, Nika K, Ruppelt A, Mustelin T, Zaccolo M, Houslay M, Tasken K (2004): TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling. *J Immunol.* 173 (8): 4847-58.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002): *Molecular biology of the cell* 4<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York, USA.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Armstrong E, Cannizzaro L, Bergman M, Huebner K, Alitalo K (1992): The c-src tyrosine kinase (CSK) gene, a potential antioncogene, localizes to human chromosome region 15q23---q25. *Cytogenet Cell Genet* 60 (2): 119-20.

Arp J, Kirchhof MG, Baroja ML, Nazarian SH, Chau TA, Strathdee CA, Ball EH, Madrenas J (2003). Regulation of T-cell activation by phosphodiesterase 4B2 requires its dynamic redistribution during immunological synapse formation. *Mol cell biol* 23: 8042 – 8057.

Bateman A, Coin L, Durbin R et al. (2004): The Pfam protein families database. *Nucl. Acid. Res.* 32: D138-141.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2004): GenBank: update. *Nucl. Acid. Res.* 32: D23-26.

Brdička T, Černý J, Hořejší V (1998): T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun.* 248(2): 356-60

Brdíčková N, Brdička T, Angelisová P, Horvath O, Špička J, Hilgert I, Pačes J, Simeoni L, Kliche S, Merten C, Schraven B, Hořejší V (2003): LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. *J Exp Med.* 198(10):1453-62.

Brdička T, Imrich M, Angelisová P, Brdičková N, Horvath O, Špička J, Hilgert I, Lusková P, Dráber P, Novák P, Engels N, Wienands J, Simeoni L, Osterreicher J, Aguado E, Malissen M, Schraven B, Hořejší V (2002): Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med.* 196(12):1617-26.

Brdička T, Pavlišťová D, Leo A, Bruyns E, Kořínek V, Angelisová P, Scherer J, Shevchenko A, Hilgert I, Černý J, Drbal K, Kuramitsu Y, Kornacker B, Hořejší V, Schraven B. (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(9):1591-604.

Bretscher (1973): Membrane structure: some general principles. *Science* 181 (100): 622 – 9.

Brown DA, Rose JK (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68 (3): 533-44.

- Cinek T, Hořejší V. (1992): *J Immunol.* 149 (7): 2262-70.
- Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C (2002): Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem* 278 (8): 5493-6.
- Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R, He HT (2002): TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21(8):1899-908.
- Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St. Denis SH, Cheng JB (1998). Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *BBRC* 246: 570 – 577.
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003): Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10): 5813-8.
- Gamanuma M, Yuasa K, Sasaki T, Sakurai N, Kotera J, Omori K (2003): Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans. *Cell Signal.* 15 (6): 565-74.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucl. Acids Res.* 31: 3784-3788.
- Gaus K, Rodriguez M, Ruberu KR, Gelissen I, Sloane TM, Kritharides L, Jessup W (2005): Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. *J Lipid Res.* 46 (7): 1526-38
- Giembycz MA, Corrigan CJ, Seybold J, Newton R, Barnes PJ (1996): Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *Br J Pharmacol.* 118 (8): 1945-58.
- Glavas NA, Ostenson C, Schaefer JB, Vasta V, Beavo JA (2001). T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *PNAS* 98: 6319 – 6324.
- Hao M, Mukherjee S, Maxfield FR (2001): Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (23): 13072-7.
- Hayashi M, Matsushima K, Ohashi H, Tsunoda H, Murase S, Kawarada Y, Tanaka T (1998): Molecular cloning and characterization of human PDE8B, a novel thyroid-specific isozyme of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* 250 (3): 751-6.
- Hayashi M, Shimada Y, Nishimura Y, Hama T, Tanaka T (2002): Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 297 (5): 1253-8.
- Hořejší V. (2004): Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling. *Immunol Lett* 92 (1-2): 43-9.

- Hořejší V. (2005): Lipid rafts and their roles in T-cell activation. *Microbes and infection*
- Hořejší V, Zhang W, Schraven B (2004): Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4 (8): 603-16.
- Karolchik, D., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T.S., Hinrichs, A., Lu, Y.T., Roskin, K.M., Schwartz, M., Sugnet, C.W., Thomas, D.J., Weber, R.J., Haussler, D. and Kent, W.J. The (2003): UCSC Genome Browser Database. *Nucl. Acids Res* 31(1), 51-54.
- Katagiri YU, Kiyokawa N, Fujimoto J. (2001): A role for lipid rafts in immune cell signaling. *Microbiol Immunol.* 45 (1): 1-8.
- Kobayashi T, Gamanuma M, Sasaki T, Yamashita Y, Yuasa K, Kotera J, Omori K (2003): Molecular comparison of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family: unique expression of PDE8B in rat brain. *Gene.* 319: 21-31.
- Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K (2004): Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic.* 5 (4): 213-30.
- Ipsen JH, Karlstrom G, Mouritsen OG, Wennerstrom H, Zuckermann MJ (1987): Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta.* 905(1):162-72.
- Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CA. (2005): Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2005
- Li Q, Verma IM (2002): NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2 (10): 725-34.
- Li L, Yee C, Beavo JA (1999): CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* 283 (5403): 848-51.
- Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H (2005): Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *TIBS* 20:
- Macdonald JL, Pike LJ(2005): A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* 46 (5): 1061-7.
- Marie-Cardine A, Verhagen AM, Eckerskorn C, Schraven B (1998): SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55. *FEBS Lett* 435 (1): 55-60.
- Mayor S, Rao M (2004): Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* 5 (4): 231-40.
- Munro S (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377 – 388.

- Pérez-Torres S, Cortés R, Tolnay M, Probst A, Palacios JM, Mengoda G (2003): Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization. *Experimental Neurology* 182: 322–334.
- Pike LJ (2003): Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44 (4): 655-67.
- Resh MD (2004): Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37: 217-32.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5857-5864.
- Sun G, Ramdas L, Wang W, Vinci J, McMurray J, Budde RJ (2002): Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein tyrosine kinase Src. *Arch Biochem Biophys.* 397(1):11-17.
- Štefanová I, Hořejší V, Ansotegui IJ, Knapp W, Stockinger H (1991): GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254 (5034): 1016-9.
- Tanimura N, Saitoh S, Kawano S, Kosugi A, Miyake K (2006): Palmitoylation of LAT contributes to its subcellular localization and stability. *Biochem Biophys Res Commun.* 341(4): 1177-83.
- Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, Hořejší V., Schraven B, Rolstad B, Mustelin T, Tasken K (2001). Release from tonic inhibition of T cell activation through transient displacement of C-terminal Src kinase (Csk) from lipid rafts. *J biol chem* 276: 29313 – 29318.
- Vang T, Torgersen KM, Sunvold V, Saxena M, Levy FO, Skalhegg BS, Hansson V, Mustelin T., Tasken K (2001). Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J exp med* 193: 497 – 507.
- Vodrážka Z.: *Biochemie*, Academia, Praha 1996
- Wang T, Leventis R, Silviu JR (2005): Artificially Lipid-anchored Proteins Can Elicit Clustering-induced Intracellular Signaling Events in Jurkat T-Lymphocytes Independent of Lipid Raft Association. *JBC*
- Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM (2001): Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene* 280: 183-194.
- Wu P, Wang P. (2004): Per-Arnt-Sim domain-dependent association of cAMP-phosphodiesterase 8A1 with IkappaB proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (51): 17634-9.
- Yeagle PL (1985): Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822(3-4): 267-87.
- Zhang W, Tribble RP, Samelson LE (1998): LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity.* 9(2): 239-46.

Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, Neel BG (2004): Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell*. 13(3): 341-55.

Zhang M, Moran M, Round J, Low TA, Patel VP, Tomassian T, Hernandez JD, Miceli MC (2005): CD45 signals outside of lipid rafts to promote ERK activation, synaptic raft clustering, and IL-2 production. *J Immunol*. 174 (3): 1479-90

Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1997): The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89 (3): 413-24.

Zhu M, Janssen E, Leung K, Zhang W (2002): Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem*. 277 (48): 46151-8.

Zhu M, Shen S, Liu Y, Granillo O, 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 (1): 31-5.