

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie
Oddělení fyziologie a biochemie buňky



Role tyrozínu 90 v regulaci kinázové aktivity a onkogenních vlastností kinázy Src

The role of tyrosine 90 in kinase activity and oncogenic
properties of Src kinase

Zuzana Gerndtová

2008

školitel: RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci vypracovala samostatně, na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí citovaných literárních zdrojů.

Srpen 2008

Zuzana Gerndtová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. a RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za odborné vedení a za cenné rady, které mi poskytovali při tvorbě této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Marianu Novotnému, Ph.D. za pomoc při vytváření modelů v programu PyMOL.

Obsah

Obsah	4
Seznam zkratek	6
1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Rousův virus kuřecího sarkomu a onkogen <i>v-src</i>	8
2.2 Proteintyrozínkinázy rodiny Src	9
2.3 Struktura proteintyrozínkináz rodiny Src.....	10
2.4 Regulace proteintyrozínkináz rodiny Src.....	15
2.4.1 Interakce SH2 domény s C-koncovou oblastí a C-koncovým lalokem katalytické domény	16
2.4.2 Interakce mezi SH3 doménou, CD linkerem a N-koncovým lalokem katalytické domény	17
2.4.3 Konformační změny kináz rodiny Src při přechodu do aktivního stavu a možnost existence více typů aktivních konformací	18
2.4.4 Mechanismy regulace kinázy Src.....	22
2.5 Heterologní exprese proteinu Src v kvasinkách.....	25
2.6 Význam tyrozinových zbytků na vazebném povrchu SH3 domény pro interakci s ligandy a signalizaci v buňkách.....	26
3. Materiál a metody	31
3.1. Materiál	31
3.1.1 Použité organizmy.....	31
3.1.2 Kultivační média a roztoky	32
3.1.3 Obecně používané roztoky	34
3.1.4 Přehled použitých DNA modifikujících enzymů.....	34
3.1.5 Použité kity pro manipulaci s nukleovými kyselinami	35
3.1.6 Seznam použitých primerů.....	35
3.1.7 Přehled použitých protilátek	36
3.1.8 Standardy velikostí proteinů	36
3.1.9 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů	37
3.1.10 Použité vektory.....	38
3.2 Metody	40
3.2.1 Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> a její repurifikace	40
3.2.2 Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i> pomocí NucleoSpin® Plasmid.....	42
3.2.3 Transformace <i>E. coli</i> elektroporací.....	43
3.2.4 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou	45
3.2.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	47
3.2.6 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu.....	47
3.2.7 Izolace fragmentů DNA z gelu pomocí NucleoSpin® Extract 2 in 1.....	48
3.2.8 Ligace DNA v roztoku	49
3.2.9 Mutagenese <i>in vitro</i> pomocí soupravy Quick Change® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA).....	49
3.2.10 Příprava a výsev glycerolových konzerv <i>S. cerevisiae</i>	50
3.2.11 Testování viability kvasinek <i>S. cerevisiae</i>	51
3.2.12 Příprava proteinových lyzátů z buněk <i>S. cerevisiae</i>	53
3.2.13 Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE).....	54
3.2.14 Western blot	55

3.2.15	Imunodetekce proteinů na membráně	55
3.2.16	Pasážování RAT2 a 3T3 fibroblastů	57
3.2.17	Příprava a rozpěstování stabilátů RAT2 a 3T3 fibroblastů	58
3.2.18	Transfekce savčích fibroblastů (RAT2, 3T3).....	59
3.2.18	Testování růstu savčích fibroblastů nezávisle na ukotvení na neadhezivních poly-HEMA miskách	61
3.2.19	Testování schopnosti tvorby foci u savčích fibroblastů.....	62
3.2.20	Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk	63
3.2.21	Stanovení koncentrace proteinů – Folinova metoda	64
4.	Výsledky	66
4.1	Příprava variant genu <i>src</i> pro expresi v kvasinkách a savčích fibroblastech..	72
4.1.1	Mutagenese Tyr 90 v SH3 doméně kinázy Src za Phe 90	72
4.1.2	Příprava variant kinázy Src s mutací Y527F.....	73
4.2	Expresie variant genu <i>src</i> v kvasinkách <i>S. cerevisiae</i>	77
4.2.1	Příprava konstruktů pro expresi variant genu <i>src</i> v kvasinkách <i>S. cerevisiae</i>	77
4.2.2	Transformace <i>S. cerevisiae</i> konstrukty pYES2 s vloženými variantami genu <i>src</i>	80
4.2.3	Porovnání kinázových aktivit jednotlivých variant proteinu Src exprimovaných v kvasince <i>S. cerevisiae</i>	81
4.2.4	Testování viability kvasinek exprimujících varianty proteinu Src	85
4.3	Expresie variant genu <i>src</i> v savčích fibroblastech	92
4.3.1	Expresie variant genu <i>src</i> v myších fibroblastech linie 3T3	92
4.3.2	Expresie variant genu <i>src</i> v savčích fibroblastech linie RAT2	95
5.	Diskuse	107
6.	Shrnutí.....	117
7.	Literatura.....	119
	Přílohy	127

Seznam zkratek

AK	aminokyselina, aminokyselinový zbytek
AP	alkalická fosfatáza
ATB	obecná antibiotika pro kultivaci savčích buněk
bp (base pair)	počet párů bází
BSA	hovězí sérový albumin
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	médium pro kultivaci savčích buněk
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfáty
DTT	dithiotreitol
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EGFP (enhanced green fluorescent protein)	varianta zeleného fluorescenčního proteinu
FBS	fetální hovězí sérum
FACS (fluorescence activated cell sorting)	selekce buněk aktivovaná fluorescencí
HRP (horse radish peroxidase)	křenová peroxidáza
kDa	kilodalton
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol
Poly-HEMA	poly-2-hydroxyethylmetakrylát
PTK	proteintyrozínkináza
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N, N, N', N'-tetramylethlendiamin
TRIS	tris-hydroxymetyl-aminoetan
UV	ultrafialové
v-srcPRC	v-src kmen Prague C
rpm	počet otáček za minutu
SD	minimální médium pro kvasinky
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
wt (wild type)	divoký typ
SH (src homology)	homologní k struktuře Src

1. Úvod

Kinázy rodiny Src se účastní regulace mnoha typů buněčných procesů jako je proliferace, diferenciaci, migrace, buněčné dělení, adheze a mnoha dalších. Aktivita kináz rodiny Src je důležitá pro zprostředkování přenosu signálů například od receptorů pro růstové faktory, receptorů asociovaných s G proteiny či od integrinů.

Aktivita kináz rodiny Src podléhá v buňkách přísné regulaci. Inaktivní konformace je u kináz rodiny Src udržována dvěma intramolekulárními inhibičními vazbami, na kterých mají nezastupitelný podíl regulační domény SH2 a SH3. Při procesu aktivace dochází vazbou interakčních partnerů na regulační domény ke zrušení intramolekulárních vazeb. Při regulaci kináz rodiny Src má také nezastupitelnou úlohu přítomnost fosforylace na klíčových tyrozínových zbytcích - na tyrozínu v aktivačním segmentu a na tyrozínu v C-koncové regulační oblasti.

Kináza Src je nejlépe prostudovaným zástupcem stejnojmenné rodiny. Konstitutivně aktivní forma kinázy Src může způsobovat nádorovou transformaci buněk. V mnoha typech nádorů odvozených od různých tkání byla nalezena zvýšená exprese a abnormálně vysoká kinázová aktivita tohoto proteinu. Aktivace kinázy Src může v buňkách nádorů probíhat různými mechanismy a je často kritickým faktorem v procesu progresu nádorů.

Cílem této práce je objasnit roli Tyr 90 v SH3 doméně v regulaci kinázové aktivity a význam tohoto aminokyselinového zbytku pro onkogenní vlastnosti kinázy Src. Tyrozín 90 se nachází v jedné z hydrofóbních kapes, která je součástí vazebného povrchu SH3 domény kinázy Src. Hydrofóbní kapsa s tyrozínem 90 je klíčová pro intramolekulární i intermolekulární vazbu ligandů na SH3 doménu. V případě intramolekulární vazby interaguje hydrofóbní kapsa s úsekem CD linkeru a přispívá k udržení inaktivní konformace kinázy Src. Tyrozín 90 může být v buňkách *in vivo* fosforylován a tato fosforylace by mohla mít regulační význam pro vazbu ligandů, pro kinázovou aktivitu i pro onkogenní vlastnosti kinázy Src.

2. Literární přehled

2.1 Rousův virus kuřecího sarkomu a onkogen *v-src*

V roce 1911 izoloval patolog Peyton Rous z pevného nádoru kuřete virus, který dodnes nese jeho jméno – Rousův virus kuřecího sarkomu. Rousův virus kuřecího sarkomu vykazoval schopnost vyvolat vznik sarkomů v kuřeti a transformovat kuřecí embryonální fibroblasty (shrnutí v Summy a Gallick, 2003).

Produkt transformujícího genu *v-src*, který je obsažen v Rousově viru kuřecího sarkomu, protein v-Src byl prvním izolovaným onkoproteinem a zároveň prvním popsáním proteinem s tyrozínkinázovou aktivitou (Collett a Erikson, 1978; Hunter a Sefton, 1980). Bylo ověřeno, že virový transformující gen *v-src* je homologní k buněčnému genu *c-src*, který je obsažen v genomu všech mnohobuněčných živočichů. Výskyt proteinu c-Src byl pak potvrzen v netransformovaných buňkách a předpokládala se u něj podobná aktivita i struktura jako u proteinového produktu genu *v-src* (Collett *et al.*, 1979).

Protein v-Src byl v transformovaných buňkách přítomen v daleko větším množství než jeho přirozený homolog c-Src. Zvýšená hladina v-Src v buňkách byla nejprve pokládána za příčinu transformace (Collett *et al.*, 1979), později se však ukázalo, že pravděpodobnější příčinou je vyšší kinázová aktivita proteinu v-Src než jakou vykazoval protein c-Src (Coussens *et al.*, 1985). Deregulace kinázové aktivity proteinu v-Src byla vysvětlena jako důsledek absence C-koncové oblasti, obsahující regulační tyrozín 527, který se ve fosforylovaném stavu váže s SH2 doménou a udržuje inaktivní konformaci (Cooper *et al.*, 1986).

Existence schopnosti retrovirového onkoproteinu v-Src transformovat buňky a pozdější potvrzení, že deregulace kinázové aktivity proteinu c-Src je onkogenní, způsobila, že se kináza Src stala jedním z nejvíce studovaných proteinů.

2.2 Proteintyrozínkinázy rodiny Src

Proteinkinázy se účastní prostřednictvím fosforylace svých substrátů regulace mnoha důležitých procesů v buňce jako je buněčný růst, diferenciace, apoptóza, migrace, řízení metabolických drah a mnoha dalších. Proteinkinázy mohou přenášet fosfátovou skupinu na postranní aminokyselinové řetězce např. na hydroxylovou skupinu threoninu, serinu či tyrozínu a jejich kinázová aktivita může být modulována fosfatázami, dalšími kinázami, kofaktory či ligandy. Proteinkinázy mají klíčovou úlohu v řadě buněčných procesů a proto podléhají velmi přísné regulaci. Deregulace kinázové aktivity, která může nastat vlivem různých mechanismů, vede k výskytu mnoha typů onemocnění včetně nádorového bujení (shrnutí v Roskoski, 2004; shrnutí v Cowan-Jacob, 2006).

V lidském genomu se vyskytuje celkem 518 sekvencí kódujících proteinkinázy, což představuje asi 1,7% genomu. Na základě sekvenční homologie se kinázy dělí na 3 podrodiny: proteinsertreoninkinázy, proteintyrozínkinázy (PTK) a proteiny podobné proteintyrozínkinázám. Proteintyrozínkinázová rodina, která čítá 90 členů, se dále dělí na receptorové a nereceptorové PTK. Receptorové PTK jsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně a fungují zároveň jako receptory i kinázy, přenášející signál dovnitř buňky. Nereceptorové PTK jsou lokalizovány v cytosolu či v jádře a můžeme je rozdělit na 8 rodin: Src, Csk, Fak, Jak, Abl, Syk, Tec a Fps (shrnutí v Roskoski, 2004).

Nereceptorové PTK se účastní přenosu signálu uvnitř buňky a vedle kinázové domény mohou obsahovat řadu dalších modulů a domén. Proteinové moduly a domény mají hned několik důležitých funkcí – zprostředkují rozpoznání a vazbu substrátů, umožňují lokalizaci do určitých buněčných kompartmentů a u některých nereceptorových PTK se podílejí i na regulaci kinázové aktivity (shrnutí v Cowan-Jacob, 2006).

Do rodiny kináz Src se dnes řadí 11 proteinů, vyskytujících se u člověka. Jsou to kinázy Src, Blk, Brk, Frk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Srm a Yes. Exprese jednotlivých proteinů se může lišit v rámci tělních tkání, u některých typů buněk nalézáme odlišné izoformy kináz nebo varianty kináz vzniklé alternativním sestřihem mRNA. Proteiny Src, Yes a Fyn jsou exprimovány ve všech typech tkání, vyšší míru exprese než v ostatních tkáních vykazují krevní destičky, neurony a některé epitelové buňky.

Ostatní členové rodiny kináz Src se vyskytují jen v určitých typech buněk, nejčastěji hematopoietického původu (viz tab. 2.1) (shrnutí v Thomas a Brugge, 1997).

Tab. 2.1 Přehled výskytu kináz rodiny Src v lidských tkáních či buňkách (převzato a upraveno z Thomas a Brugge, 1997)

Kináza rodiny Src	Typ buněk či tkáň výskytu, existující izoformy nebo sestřihové varianty
Src	všechny tkáně
Fyn	všechny tkáně
Yes	všechny tkáně
Blk	B lymfocyty
Brk	epiteliální buňky tlustého a tenkého střeva
Frk	epiteliální buňky tlustého střeva, prsu, močového měchýře
Fgr	myeloidní buňky, B lymfocyty
Hck	myeloidní buňky
Lck	T lymfocyty
Lyn	mozek, B lymfocyty, myeloidní buňky
Srm	keratinocyty

Kinázy rodiny Src se účastní regulace mnoha buněčných dějů jako je migrace, diferenciacce, apoptóza, adheze buněk na substrát či proliferace. Proteiny rodiny Src zprostředkovávají přenos signálu přes receptorové PTK, receptory spojené s G proteiny, integriny, cytokinové receptory atd. Kinázy rodiny Src jsou klíčovými body v integrování a přenosu signálů v mnoha typech buněčných procesů, proto podléhají přísné regulaci. Deregulace kináz rodiny Src je u člověka spojována s výskytem závažných onemocnění jako je epilepsie, neurodegenerativní poruchy a především řada typů nádorů (shrnutí v Thomas a Brugge, 1997; shrnutí v Engen *et al.*, 2008).

2.3 Struktura proteintyrozínkináz rodiny Src

Proteinkinázy rodiny Src mají velikost 52 – 62 kilodaltonů (kDa) a navzájem vykazují strukturní podobnost. Ve všech proteinech této rodiny můžeme nalézt šest strukturních částí: N-koncovou SH4 doménu, unikátní doménu, SH3 doménu, SH2 doménu, CD linker, katalytickou doménu a C-koncovou oblast. K objasnění struktury a regulace kináz rodiny Src přispěly zejména studie zabývající se krystalografií částí proteinů Src, Hck a Lck (Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005; Breitenlechner *et al.*, 2005, Sicheri *et al.*, 1997; Schindler

et al., 1999; Yamaguchi a Hendrickson, 1996). V následujícím textu bude popsána struktura kináz rodiny Src, důraz pak bude kladen především na kinázu c-Src (aminokyselinové zbytky budou číslovány dle kuřecího proteinu c-Src).

N-koncová doména SH4 obsahuje pouze 15 aminokyselinových zbytků, které nesou signál pro připojení lipidového zbytku. Během proteosyntézy je N-koncový methionin odštěpen a následující aminokyselina – Gly 2 je myristylována. Myristylace je důležitou modifikací umožňující asociaci Src kináz s cytoplazmatickou membránou. Při mutaci aminokyselinových zbytků v SH4 doméně aktivované formy kinázy Src, které vedou ke ztrátě této modifikace, buňky nevykazují transformovaný fenotyp (Kamps *et al.*, 1985; Buss *et al.*, 1986).

U některých kináz rodiny Src může dále docházet k palmitoylaci cysteinových zbytků SH4 domény a může se tak zesilovat interakce s cytoplazmatickou membránou. Palmitoylaci však nepodléhá kináza Src (shrnutí v Brown a Cooper, 1996). Tento fakt vede k otázce, zda samotná myristylace stáčí k dostatečně „silné“ interakci s membránou nebo je v buňkách přítomen další adaptorový protein umožňující interakci s membránou.

Po SH4 doméně můžeme ve struktuře kináz rodiny Src nalézt tzv. unikátní doménu. Tato doména zahrnuje 50 – 80 aminokyselinových zbytků a jak už napovídá název, je u každého člena rodiny variabilní. Tato doména má úlohu např. při interakci kináz s molekulami transmembránových receptorů nebo zde mohou být fosforylovány některé aminokyselinové zbytky.

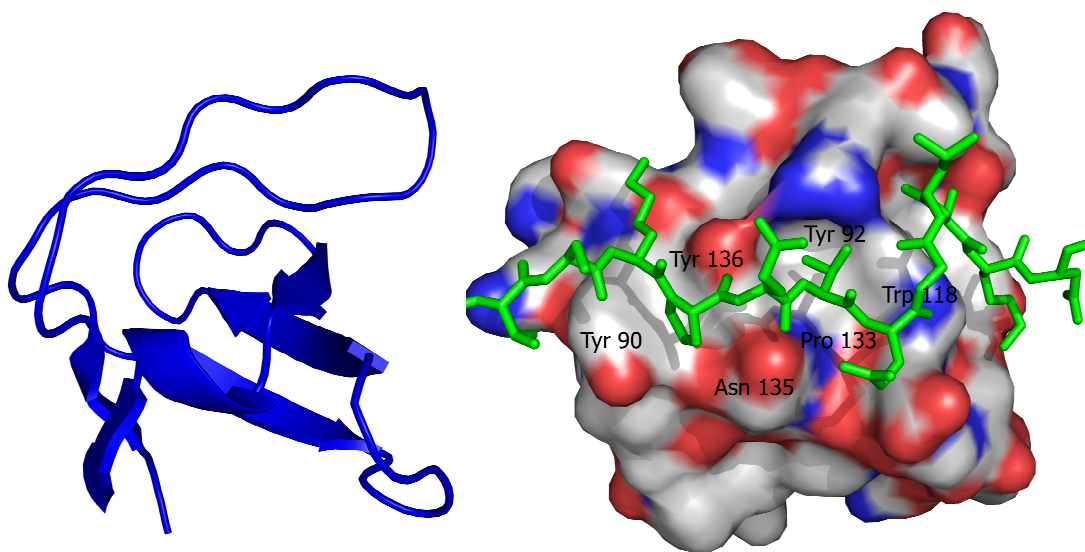
Unikátní doména se u kinázy Lck projevila jako nezbytná při vazbě cytosolické části CD4 a CD8 receptorů T lymfocytů (Shaw *et al.*, 1990). U kinázy c-Src a Lck jsou některé serinové a threoninové zbytky v unikátní doméně fosforylovány Cdc2 kinázou během mitózy (Stover *et al.*, 1994; shrnutí v Brown a Cooper, 1996). Kináza Hck obsahuje v unikátní doméně důležitý aminokyselinový zbytek, který podléhá fosforylaci. Je jím tyrozín na pozici 29, jehož fosforylace způsobuje aktivaci této kinázy (Johnson *et al.*, 2000).

Nutno také podotknout, že v doposud existujících studiích zabývajících se krystalografií kináz rodiny Src, nejsou SH4 doména ani unikátní doména zahrnuty.

Další doménou je SH3 doména, která může obsahovat až 60 aminokyselinových zbytků (AK) (u kinázy Src jsou to AK 81 – 142). SH3 doména představuje proteinový modul, který se vyskytuje nejen u kináz rodiny Src, ale i u cytoskeletálních proteinů jako je např. Cas a Crk (Huang *et al.*, 2002; Wisniewska

et al., 2005), u adaptorových proteinů jako je např. Grb2 (Li *et al.*, 2001), u jiných kináz jako je např. Btk (Morrogh *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1996) a v mnoha dalších proteinech.

SH3 doména se skládá z pěti β řetězců, které jsou uspořádány do dvou navzájem kolmých antiparalelních β listů (obr. 2.3a). Vazebný povrch SH3 domény je tvořen nejčastěji hydrofóbními aminokyselinovými zbytky, které jsou formovány do dvou vazebných kapes a tzv. specifitní kapsy, a je ohraničen smyčkami „RT loop“ a „n-Src loop“. U kinázy c-Src jsou klíčovými vazebnými aminokyselinami Tyr 90, Asn 135 a Tyr 136, které jsou uspořádány do jedné vazebné kapsy, Tyr 92, Trp 118 a Pro 133, které jsou uspořádány do druhé vazebné kapsy, a dále také Asp 99 a Tyr 131 formující specifitní kapsu (obr. 2.3b). Tyto aminokyseliny představují důležité zbytky jak pro intermolekulární tak i pro intramolekulární vazbu ligandů (Xu *et al.*, 1997; Erpel *et al.*, 1995).



Obr. a

Obr. b

Obr. 2.3a,b Obr. a Schématický model struktury SH3 domény. Obr. b SH3 doména kinázy Src při vazbě úseku CD linkeru, vyznačené jsou některé aminokyselinové zbytky důležité pro vazbu ligandů. Barvy prvků SH3 domény - C, H, N, O; CD linker - zelená (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997). Oba obrázky byly vyobrazeny pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA).

SH3 doména váže aminokyselinové sekvence bohaté na prolin, které mají formu levotočivého polyprolinového helixu (PP II). Podle orientace vazby můžeme

ligandy SH3 domény rozdělit do dvou tříd. Ligandy třídy I se váží na SH3 doménu v orientaci $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$, zatímco ligandy třídy II se váží na SH3 doménu v opačné orientaci $\text{COOH} \rightarrow \text{NH}_2$ (Yu *et al.*, 1994; shrnuto v Mayer *et al.*, 2001).

Ligandy SH3 domény kináz rodiny Src obsahují ve většině případů centrální sekvenci PxxP (kde P je prolin a x je jakákoliv aminokyselina), která je v kontaktu se dvěma vazebnými hydrofóbními kapsami. Ideální ligand pro SH3 doménu kinázy Src je v případě ligandů třídy I reprezentován aminokyselinovou sekvencí RPLPPLP, v případě ligandů třídy II je to sekvence ϕPPLPXR (kde P je prolin, R je arginin, ϕ představuje hydrofóbní AK). Podtržené aminokyselinové zbytky interagují s hydrofóbními kapsami a arginin v těchto sekvencích interaguje s Asp 99 a Tyr 131 ve specifitní kapse na povrchu SH3 domény kinázy Src. Vedle výše zmíněných aminokyselinových sekvencí mohou k afinitě a specifitě vazby ligandů přispívat i další aminokyselinové zbytky lemující centrální polyprolinovou sekvenci (Feng *et al.*, 1995; Erpel *et al.*, 1995; Sparks *et al.*, 1996).

Vazebné povrchy SH3 domén u dalších proteinů sdílejí s SH3 doménou kinázy Src shodné umístění některých tyrozínových zbytků. Vliv mutace či fosforylace vazebných tyrozínů kinázy Src a homologních tyrozínů u dalších proteinů na vazbu ligandů a signalizaci bude diskutován v samostatné kapitole.

SH3 doménu s SH2 doménou spojuje krátký linker, obsahující 6 aminokyselin. SH2 doména je také proteinový modul podobně jako SH3 doména a může obsahovat až 100 aminokyselinových zbytků (148 – 244 AK u kinázy Src), které se formují do struktury dvou helixů a dvou antiparalelních β listů. SH2 domény vykazují schopnost vázat různé aminokyselinové motivy s fosforylovaným tyrozínem, specifita a afinita k těmto motivům je pak ovlivněna přítomností dalších aminokyselinových zbytků v okolí tyrozínu (Xu *et al.*, 1997; Songyang *et al.*, 1993).

Kinázy rodiny Src mají ve své struktuře přítomnou SH2 doménu typu I. Vazebný povrch SH2 domény typu I je tvořen dvěma kapsami a preferovaným vazebným motivem pro kinázy rodiny Src je sekvence pTyr-Glu-Glu-Ile. První kapsa obsahující invariantní arginin z β5B smyčky váže fosforylovaný tyrozín, druhá kapsa tvořená z větší části EF a BG smyčkami kontaktuje izoleucin v pozici +3 za tyrozínem (Waksman *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1993; shrnuto v Cohen *et al.*, 1995).

Ligandy SH2 i SH3 domén kinázy Src nemusí nutně obsahovat preferovanou sekvenci, se kterou tyto domény interagují s nejvyšší afinitou. Je tomu tak v případě intramolekulárních inhibičních vazeb, kdy se na SH3 a SH2 domény vážou aminokyselinové sekvence, které preferované motivy postrádají (viz dále). Intramolekulární vazebné sekvence mají ale nespornou vazebnou „entropickou“ výhodu, neboť jsou přítomné na stejném polypeptidu jako SH2 a SH3 domény.

V případě kináz rodiny Src jsou domény SH3 a SH2 klíčové pro regulaci kinázové aktivity, rozpoznávání a vazbu substrátů i pro lokalizaci kináz do určitých míst v buňce (Xu *et al.*, 1999; shrnuto v Thomas a Brugge, 1997).

Spojení SH2 domény a katalytické domény zajišťuje tzv. CD linker, který zahrnuje 12 aminokyselin (AK 245 – 266 u kinázy Src). CD linker je klíčový při udržování inaktivní konformace (Gonfloni *et al.*, 1997; Gonfloni *et al.*, 1999), jak bude uvedeno dále.

Katalytická doména kináz rodiny Src zaujímá strukturu, která je charakteristická pro všechny proteinkinázy (267 – 520 AK u kinázy Src). Katalytická doména nebo též SH1 doména se skládá ze dvou laloků, které jsou spojené krátkým flexibilním úsekem. Flexibilní úsek umožňuje změnu vzájemné polohy laloků klíčovou pro katalýzu, neboť právě ve štěrbině mezi laloky je situováno katalyticky aktivní místo. N-koncový lalok obsahuje pět antiparalelních β řetězců, které jsou formovány do β listu, a jeden helix (α C), situovaný mezi řetězci β 3 a β 4. Na rozdíl od N-koncového laloku je C-koncový lalok převážně helikální. Obsahuje sedm α helixů a dva β řetězce (Yamaguchi a Hendrickson, 1996; Xu *et al.*, 1997; shrnuto v Huse a Kuriyan, 2002).

Pro katalýzu a pro utvoření správného prostorového uspořádání katalytického místa jsou důležité aminokyselinové zbytky ležící v obou lalocích katalytické domény, níže jsou uvedené některé z nich (číslování bude pro přehlednost opět dle kuřecího proteinu c-Src).

V N-koncovém laloku je situována smyčka bohatá na glycin (sekvence GxGxxG - Gly 274, 276 a 279 u kinázy c-Src), která interaguje s γ fosfátem ATP. Lys 295, se kterým tvoří v aktivní konformaci solný můstek Glu 310 z α C helixu, je klíčový zbytek pro vazbu a orientaci α a β fosfátů (Xu *et al.*, 1999; Breitenlechner *et al.*, 2005).

V C-koncovém laloku je uložen konzervovaný katalytický segment s motivem HRDLRAAN, charakteristickým pro kinázy rodiny Src. U kinázy c-Src je konzervovaný katalytický aspartát na pozici 386. Funkce Asp 386 při katalýze není zcela přesně určena. Pravděpodobná úloha při účasti na katalytickém procesu může být interpretována různými způsoby. Asp 386 může zprostředkovat správnou orientaci hydroxylové skupiny substrátu při nukleofilním ataku na γ fosfát ATP, nebo může sloužit jako obecná báze při katalýze a nebo také může hrát roli v „odpuzování“ fosforylovaného produktu při disociaci (shrnuto v Cowan-Jacob, 2006). V C-koncovém laloku nalézáme další konzervovaný úsek – aktivační segment (404 – 432 AK u kinázy c-Src). Na počátku toho segmentu se nachází DFG sekvence, kde je Asp 404 klíčový pro vazbu Mg^{2+} iontu koordinujícího β a γ fosfáty v ATP. Dále v aktivačním segmentu leží krátký tzv. A loop helix s klíčovým Tyr 416, který ve fosforylovaném stavu stabilizuje aktivní konformaci. Aktivační segment pak uzavírá motiv APE důležitý pro substrátovou specifitu (Xu *et al.*, 1999; Breitenlechner *et al.*, 2005).

Na samotném C-konci se nalézá oblast s motivem obsahujícím Tyr 527. Tento tyrozín ve fosforylovaném stavu plní nezastupitelnou úlohu při udržování inaktivní konformace kináz rodiny Src. Absence této oblasti v případě proteinu v-Src vede k deregulaci kinázové aktivity, jejímž důsledkem je transformace buněk (Cooper *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

2.4 Regulace proteintyrozínkináz rodiny Src

Pro udržování inaktivní konformace kináz rodiny Src jsou důležité intramolekulární vazby zprostředkované především regulačními doménami SH3 a SH2. První intramolekulární inhibiční vazbu nalézáme mezi SH3 doménou, úsekem CD linkeru a částí N-koncového laloku katalytické domény. SH2 doména pak interaguje s C-koncovou oblastí obsahující fosforylovaný Tyr a C-koncovým lalokem katalytické domény. Obě tyto vazby určitým způsobem ovlivňují konformaci katalytické domény a tvorbu aktivního místa.

Při aktivaci se v rámci molekuly kináz Src odehrává mnoho dynamických změn, které spolu souvisí a zahrnují kromě změn výše uvedených vazeb regulačních

domén také výrazné konformační změny v katalytické doméně. V následujícím textu budou přiblíženy dvě hlavní intramolekulární inhibiční vazby, podrobněji zejména vazba zprostředkovaná SH3 doménou. Dále se budou stručně popsány konformační změny v rámci kináz rodiny Src odehrávající se při přechodu do aktivního stavu a jako poslední budou shrnuty některé typy dalších regulačních mechanismů. Při popisu těchto procesů se jako model bude nejčastěji vyskytovat kináza Src (pozn. číslování bude opět dle kuřecího proteinu c-Src).

2.4.1 Interakce SH2 domény s C-koncovou oblastí a C-koncovým lalokem katalytické domény

Jako první byla objevena intramolekulární inhibiční interakce SH2 domény s C-koncovou oblastí obsahující fosforylovaný Tyr 527 (Cooper *et al.*, 1986). Fosforylovaný Tyr 527 se váže do žlábků SH2 domény, který je vytvořen částí centrálního β listu a helixem α A. Zbytek v poloze +3 se naopak váže na opačnou stranu centrálního β listu (Xu *et al.*, 1997).

Sekvence aminokyselin obsahující fosforylovaný Tyr 527 - pTyr-Glu-Pro-Gly není ideálním motivem, který by SH2 doména vážala s vysokou afinitou. Obsahuje sice pTyr 527, ale na pozici +3 není přítomen dlouhý nepolární zbytek např. izoleucinu nebo leucinu, ale malý postranní zbytek glycinu (u kinázy Hck je to glutamin). Tím pádem není druhý žlábek zcela obsazen či zaplněn. Afinita SH2 domény k C-koncovému motivu je tak poměrně nízká a vazbu C-koncové oblasti s fosforylovaným Tyr lze snadno vytěsnit vazbou jiného ligandu obsahujícího motiv s fosforylovaným tyrozínem (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997; Waksman *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1993). Význam této interakce již potvrdily mnohé mutační studie, kdy substituce Tyr 527 za jinou aminokyselinu nebo nepřítomnost C-koncové regulační oblasti (u v-Src) vedla k mnohonásobnému zvýšení kinázové aktivity proteinu Src. (Cooper *et al.*, 1986; Superti-Furga *et al.*, 1993; Irby *et al.*, 1999).

Kromě vazby C-koncové oblasti interaguje SH2 doména také s C-koncovým lalokem katalytické domény, kdy helix α A v SH2 doméně kontaktuje na několika místech E helix katalytické domény iontovými interakcemi (Xu *et al.*, 1997).

2.4.2 Interakce mezi SH3 doménou, CD linkerem a N-koncovým lalokem katalytické domény

Vazebný povrch SH3 domény interaguje s úsekem CD linkeru, který je formován do levotočivého PPII helixu (AK 249 – 253) a na SH3 doménu se váže v orientaci charakteristické pro ligandy třídy II. (COOH→ NH₂). Jediný prolin 250 v tomto úseku se zanořuje do prostoru mezi Tyr 90 a Tyr 136 v první vazebné kapse. Na pozici +3 je u kinázy c-Src druhý prolin nahrazen glutaminem, takže aminokyselinová sekvence obsažená v CD linkeru neobsahuje ideální vazebný motiv SH3 domén PxxP. Dlouhý polární postranní řetězec Gln 253 pak ideálně nezapadá do druhé vazebné kapsy v porovnání s řetězcem prolinu, který je přítomen na pozici +3 např. u kinázy Hck. K další stabilizaci vazby CD linkeru na SH3 doménu by mohla dále přispívat hydrofóbní interakce Lys 249 s povrchem SH3 domény (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997).

Pro udržování inaktivní konformace proteinu c-Src se nepostradatelnost aminokyselinových zbytků ve vazebných kapsách na povrchu SH3 domény, které se účastní vazby CD linkeru, a některých aminokyselin obsažených v samotném CD linkeru prokázala v mutačních studiích, kdy bylo využito modelu *S. pombe*. Mutace jednotlivých aminokyselinových zbytků Y90A, Y92A, W118A, Y131A, P133L, Y136A ve vazebných kapsách na povrchu SH3 domény nebo mutace dvou zbytků K249E a P250G v CD linkeru vedla k různému stupni „deregulace“ proteinu c-Src (podrobnější popis exprese genu *src* v *S. pombe* viz kap. 2.5 a 2.6) (Erpel *et al.*, 1995; Gonfloni *et al.*, 1997). Aktivační efekt mutací v CD linkeru na zvýšení kinázové aktivity se však neprokázal u variant v-Src či c-SrcY527F, které postrádají přítomnost inhibiční vazby mezi SH2 doménou a C-koncovou oblastí s Tyr 527 (Brábek a Mojžita *et al.*, 2002).

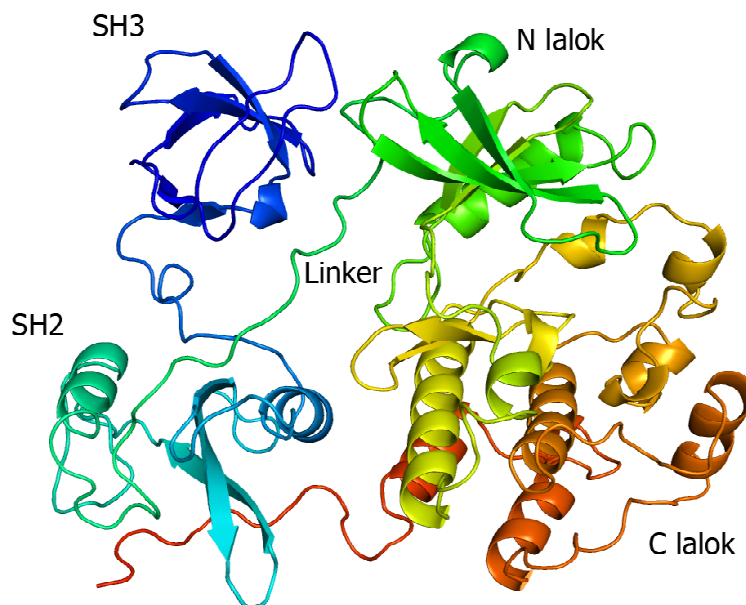
SH3 doména se váže také s částí N-koncového laloku katalytické domény, a to prostřednictvím smyček „n-Src loop“ a „RT loop“. Ze smyčky „n-Src loop“ k této vazbě přispívá Asp 177, mezi níž a Arg 318 v katalytické doméně se tvoří iontová vazba. Ze smyčky „RT loop“ interagují Arg 95 a Thr 96 s Trp 286 a s dalšími aminokyselinovými zbytky z β2 - β3 smyčky N-koncového laloku. Těchto interakcí se také účastní Thr 252 a Leu 255 z CD linkeru (Xu *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997).

Leu 255 z CD linkeru také vazbou kontaktuje N-lalok katalytické domény (Tyr 326 a Trp 286) a jeho mutace způsobuje „deregulaci“ kinázové aktivity v *S. pombe* (Gonfloni *et al.*, 1999). Trp 260 z CD linkeru interaguje v N-koncovém laloku s částí α C helixu (Leu 325 a Met 314) a ovlivňuje jeho polohu v rámci katalytické domény (Xu *et al.*, 1999; Gonfloni *et al.*, 1997).

Význam interakcí mezi „n-*Src* loop“ a „RT loop“, CD linkerem a SH3 doménou pro intramolekulární regulaci pak potvrdily mnohé studie, kdy záměna či nepřítomnost aminokyselin účastnících se těchto vazeb způsobovala zvýšení kinázové aktivity proteinu *Src* (Levy a Brugge, 1989; Superti-Furga *et al.*, 1993; Gonfloni *et al.*, 1997; Brábek a Mojžita *et al.*, 2002).

2.4.3 Konformační změny kináz rodiny *Src* při přechodu do aktivního stavu a možnost existence více typů aktivních konformací

Kinázovou aktivitu proteinu *Src* nepochybně ovlivňuje přítomnost intramolekulárních inhibičních vazeb. V inaktivní konformaci jsou SH3 a SH2 domény těsně přimknuty k oběma lalokům katalytické domény (obr. 2.4.1). Tato interakce je ještě umocněna pevným propojením SH3 a SH2 domény krátkým linkerem. Interakce regulačních domén s katalytickou doménou stabilizují vzájemnou polohu obou jejích laloků tak, že katalytická štěrbina je uzavřenější pro přístup substrátů. Přítomnost interakce regulačních domén s katalytickou doménou také ovlivňuje polohu struktur nezbytných pro utváření katalytického místa a pro průběh katalýzy. Asi nejvýraznější změně orientace při aktivaci podléhají α C helix v N-koncovém laloku a A loop helix v aktivačním segmentu v C-koncovém laloku (Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001).



Obr. 2.4.1 Stužkový model struktury kinázy Src v inaktivní konformaci s fosforylovaným Tyr 527. Barva domén a strukturních motivů: SH3 doména - modrá, SH2 doména - tyrkysová, CD linker - světle zelená, N-koncový lalok katalytické domény - zelená, C-koncový lalok katalytické domény - žlutá a oranžová, C-koncová oblast - červená (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997). Vyobrazeno pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA).

V inaktivní konformaci je α C helix s Glu 310 vlivem inhibičních interakcí vychýlen mimo katalytické místo a nemůže vytvářet klíčovou iontovou vazbu s Lys 295. Lys 295, který je důležitý pro vazbu a orientaci α a β fosfátů, pak interaguje s Asp 404 z aktivačního segmentu, který následně nemůže koordinovat vazbou Mg^{2+} iont. Inaktivní konformace je dále stabilizována hydrofóbními vazbami mezi částí α C helixu a N-koncovým úsekem aktivačního segmentu. Krátký A loop helix v aktivačním segmentu zaujímá při inaktivní konformaci polohu mezi laloky katalytické domény. Jeho poloha má negativní vliv na rozpoznávání a přístup substrátu do katalytického místa a způsobuje natočení Tyr 416 směrem do katalytické štěrbině, kdy v této poloze Tyr 416 není přístupný aktivační fosforylaci (Xu *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999).

Při přechodu do aktivního stavu rotuje α C helix do polohy, která umožňuje formování katalytického místa a vznik iontové vazby klíčové pro katalýzu mezi Glu 310 a Lys 295. A loop helix v aktivačním segmentu se odklání z prostoru mezi laloky, zaujímá více rozvolněnou konformaci, která umožňuje fosforylaci Tyr 416. Fosforylace Tyr 416 stabilizuje dále aktivní konformaci a umožňuje vytvoření plně

funkčního místa pro vazbu substrátu a aktivního místa pro katalýzu. Přechod do aktivního stavu je také doprovázen pohybem laloků kinázové domény, které se navzájem otáčejí směrem od sebe a katalytická štěrbina se proto zvětšuje (Cowan-Jacob *et al.*, 2005; Breitenlechner *et al.*, 2005).

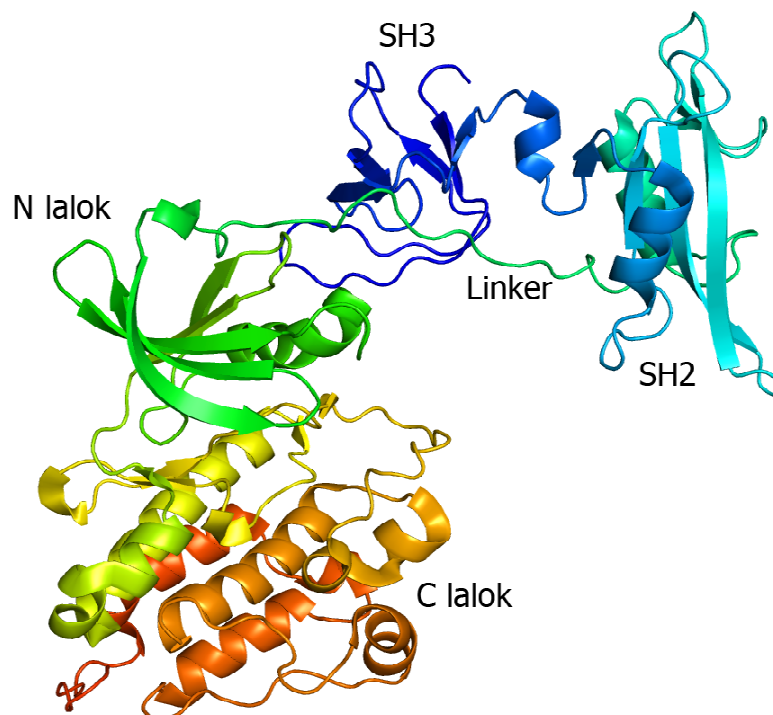
K otevření katalytické štěrbiny a k zaujmutí aktivní konformace katalytického místa není nutné zrušení obou intramolekulárních inhibičních vazeb. Přítomnost dvou intramolekulárních regulačních vazeb naopak zřejmě umožňuje kinázám Src zaujmout více typů aktivních konformací a naznačuje vzájemnou nezávislost SH2 a SH3 domény při účasti na tvorbě intramolekulárních inhibičních vazeb. Zrušení jedné z intramolekulárních regulačních vazeb postačuje k částečné aktivaci kináz Src a různé aktivační signály pravděpodobně indukují odlišné katalyticky aktivní konformace, které mohou určovat typ signalizace vedoucí od proteinu dále (Arold *et al.*, 2001; Lerner a Smithgall, 2002; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Katalytická aktivita byla pozorována v přítomnosti jedné z intramolekulárních regulačních vazeb např. u kinázy Hck. Na SH3 doménu kinázy Hck se váže s vysokou afinitou protein Nef, který je obsažen v genomu viru HIV a souvisí s progresí onemocnění AIDS. Vazba proteinu Nef způsobuje u proteinu Hck vlivem zrušení jedné z regulačních vazeb značné zvýšení kinázové aktivity, která je doprovázena fosforylací Tyr v aktivačním segmentu (Lerner a Smithgall, 2002; Tribble *et al.*, 2006). Při aktivaci kinázy Hck v přítomnosti vazby proteinu Nef s SH3 doménou může být vazba SH2 domény s fosforylovaným tyrozínem v C-koncové oblasti zachována a její zrušení není tedy nutné pro signalizaci zprostředkovanou „SH3-aktivovanou“ formou Hck (Porter *et al.*, 2000; Lerner a Smithgall, 2002).

Podobně je tomu tak v případě, kdy není u kinázy Hck přítomna regulační vazba SH2 domény s C-koncovým fosforylovaným tyrozínem. Takto aktivovaná forma kinázy Hck vykazuje další zvýšení katalytické aktivity v případě vazby proteinu Nef na SH3 doménu (Lerner *et al.*, 2005). To naznačuje přetrvání regulační vazby mezi SH3 doménou a CD linkerem a N- koncovým lalokem kinázové domény i u „SH2-aktivovaných“ forem kináz rodiny Src.

Platnost výše uvedených možností aktivace kináz Src byla také podpořena studii zabývajícími se krystalickou strukturou kinázy Src. Krystalická struktura kinázy Src v aktivní konformaci bez přítomnosti fosforylace na Tyr 527 také

potvrdila přetrvávání vazby mezi SH3 doménou a CD linkerem a N- koncovým lalokem kinázové domény (obr. 2.4.2) (Cowan-Jacob *et al.*, 2005).



Obr. 2.4.2 Stužkový model struktury kinázy Src v částečně aktivní konformaci s defosforylovaným Tyr 527. Barva domén a strukturních motivů: SH3 doména - modrá, SH2 doména - tyrkysová, CD linker - světle zelená, N-koncový lalok katalytické domény - zelená, C-koncový lalok katalytické domény - žlutá a oranžová, C-koncová oblast - červená (PDB ID: 1Y57; Cowan-Jacob *et al.*, 2005). Vyobrazeno pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA).

Existence více typů konformace kinázy Src byla také pozorována při studii charakterizující struktury kinázy Src v roztoku metodou SAXS („Small-Angle X-ray Scattering“). Kromě inaktivní formy s přítomností obou regulačních vazeb, byly pozorovány v případě varianty s mutací Y527F nejméně dvě odlišné formy aktivního enzymu zaujímající různou konformaci. První forma pravděpodobně představovala mezistupeň mezi inaktivní a aktivní formou, neboť zde byla zachována vazba mezi SH3 doménou, CD linkerem a N- koncovým lalokem kinázové domény, ale v případě SH2 domény byla přítomná interakce jen s C-koncovým lalokem. Druhá forma pak korespondovala s výše uvedenou krystalickou strukturou (Cowan-Jacob *et al.*, 2005), kdy byla přítomna interakce mezi SH3 doménou a CD linkerem a N-koncovým lalokem kinázové domény (Bernadó *et al.*, 2007).

2.4.4 Mechanismy regulace kinázy Src

2.4.4.1 Regulace kináz Src fosforylací a defosforylací klíčových regulačních tyrozínů

Fosforylace a defosforylace Tyr 527 v C-koncové oblasti

Fosforylace Tyr 527 je klíčová pro regulaci kinázy Src. Umožňuje vznik jedné z intramolekulárních inhibičních vazeb a tím stabilizaci inaktivní konformace kinázy Src (Cooper *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1997). Fosforylaci Tyr 527 zajišťují kinázy z rodiny Csk - kinázy Csk a Chk.

Prvním zástupcem této rodiny je kináza Csk, která v největší míře fosforyluje Tyr 527 a při katalýze rozeznává motiv s Tyr s vysokou specifitou. Úzká specifita pro C-koncový Tyr 527 je dána vazbou mezi C-koncovými laloky katalytických domén kináz Src a Csk, kdy právě jen motiv s Tyr 527 je vhodně orientován přímo na okraj aktivního místa kinázy Csk a Tyr 527 tak představuje ideální akceptor fosfátové skupiny (Levinson *et al.*, 2008). Lokalizaci kinázy Csk k membráně, kde se nacházejí také její substráty, umožňuje transmembránový protein Cbp (Takeuchi *et al.*, 2000). Druhým zástupcem je kináza Chk, která na rozdíl od kinázy Csk není přítomna ve všech typech tkání (shrnuto v Brown a Cooper, 1996). Tato kináza kromě fosforylace Tyr 527 může negativně regulovat aktivitu kináz rodiny Src i dalším nekatalytickým způsobem a to formou tvorby komplexu s aktivními kinázami rodiny Src (Chong *et al.*, 2006).

Tyr 527 v C-koncovém motivu může podléhat *in vivo* také autofosforylaci, která probíhá spíše intermolekulárně a s pomalou kinetikou, ale i přesto se může podílet na regulaci (Osusky *et al.*, 1995).

Defosforylaci Tyr 527 může zajišťovat řada tyrozínových fosfatáz. Je to například fosfatáza PTP α , která se váže na SH2 doménu Src a vytěsňuje tak vazbu C-koncové oblasti s fosforylovaným tyrozínem (Sonnenburg *et al.*, 2003). V hematopoietických buňkách může regulační Tyr kináz rodiny Src defosforylovat fosfatáza CD45. Dále může být tyrozín 527 defosforylován fosfatázou PTP1B nebo fosfatázami Shp1 a Shp2 (shrnuto v Thomas a Brugge, 1996; shrnuto v Frame, 2002).

Fosforylace a defosforylace Tyr 416 v aktivačním segmentu

Fosforylace Tyr 416 v aktivačním segmentu umožňuje plnou aktivaci kináz rodiny Src a přímo koreluje s tyrozínkinázovou aktivitou (Porter *et al.*, 2000; Boerner *et al.*, 1996). Po fosforylaci Tyr se vlivem změny sítě elektrostatických interakcí v rámci molekuly kinázy vytvoří aktivní katalytické místo a také místo pro vazbu substrátu (Ozkirimli a Post, 2006). Fosforylace Tyr 416 probíhá nejčastěji intermolekulárně (Barker *et al.*, 1995)

Defosforylaci Tyr 416 mohou zprostředkovat tyrozínfosfatázy, které defosforylují i Tyr 527 (viz výše). Další fosfatázou účastnící se defosforylace Tyr 416 je např. fosfatáza PEP. Fosfatáza PEP se vyskytuje v buňkách v komplexu s Csk kinázou a působením tohoto komplexu kinázy Src mohou vlivem defosforylace Tyr 416 a fosforylace Tyr 527 zaujmout plně inaktivní konformaci (Cloutier a Veillette, 1999).

2.4.4.2 Regulace aktivity kináz rodiny Src prostřednictvím vazby jiných proteinů

Aktivace kináz rodiny Src vazbou proteinů na SH2 a/nebo SH3 doménu

SH3 a SH2 domény kináz rodiny Src vážou s poměrně nízkou afinitou intramolekulární ligandy a tím přispívají k regulaci kinázové aktivity. Vazbu intramolekulárních ligandů mohou snadno vytěsnit interakční partneři kináz Src obsahující vysokoafinní motivy pro SH2 a/nebo SH3 doménu, narušit intramolekulární regulační vazbu (nebo příp. obě vazby) a tak ovlivňovat kinázovou aktivitu u proteinů Src nebo jejich lokalizaci.

Mezi proteiny, které mohou aktivovat kinázu Src vazbou její SH2 domény, patří např. receptorové tyrozínkinázy jako je receptor pro PDGF (Kypta *et al.*, 1990; Broome a Hunter, 1997) nebo fosfatáza PTP α (Sonnenburg *et al.*, 2003).

Proteiny vážající SH3 doménu kinázy Src jsou např. transkripční faktor STAT 3 (Schreiner *et al.*, 2002) nebo progesteronový receptor (Bonyaratanakornkit *et al.*, 2001).

Mezi proteiny které vazbou kontaktují SH2 i SH3 doménu kinázy Src patří např. adaptorové proteiny rodiny Cas – Cas a Sin (Burnham *et al.*, 2000), kináza Fak (shrnutí v Hanks *et al.*, 2003) nebo protein Sam 68, který se účastní sestřihu RNA (Taylor *et al.*, 1995).

Regulace prostřednictvím vazby chaperonů

Chaperony zprostředkovávají tvorbu a udržení správné konformace u mnoha typů proteinů. V případě kinázy Src se chaperony účastní procesu maturace a tím ovlivňují množství aktivního proteinu v buňkách. Proteiny v-Src i c-Src asociují již při syntéze s chaperony Hsp90 a p50/Cdc37, které se společně podílejí na maturaci kináz Src (Whitelaw *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1999). V případě Hsp90 bylo pozorováno, že interakce s kinázově aktivnějším proteinem v-Src je silnější než v případě interakce s proteinem c-Src (Hutchinson *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1999). Při heterologní expresi v-Src v kvasince *S.cerevisiae* bylo snížení hladiny funkčního chaperonu Hsp90 doprovázeno výrazným úbytkem proteinu v-Src a snížením tyrozínové fosforylace endogenních proteinů (Xu *et al.*, 1993). Při expresi proteinu v-Src v *S.cerevisiae* byly také pro maturaci kromě Hsp90 důležité i další chaperony (např. p60/Sti1), které pak nebyly nezbytné pro maturaci proteinu c-Src. (Chang *et al.*, 1997). Tyto studie naznačují, že mutace obsažené v proteinu v-Src nepochybně ovlivňují proces zaujmutí správné konformace a proto je v-Src více závislý při zprostředkování procesu maturace na chaperonech než protein c-Src.

2.4.4.3 Regulace kináz Src řízenou proteolýzou

Dalším regulačním mechanismem, kterému podléhají kinázy rodiny Src, je polyubiquitynlace a následná degradace proteazómem. Stabilita aktivovaných forem kinázy Src v buňkách je daleko menší v porovnání s wt formou nebo kinázově inaktivní formou proteinu Src. To je pravděpodobně způsobeno zvýšenou mírou degradace aktivovaných forem prostřednictvím ubiquitin-proteazómového systému. Rychlejší odbourávání aktivovaných forem pak může částečně „zeslabit“ signál zprostředkovaný kinázou Src v navazujících signálních kaskádách (Harris *et al.*, 1999; Hakak a Martin, 1999). Na polyubiquitynlaci se pravděpodobně podílí

největší mírou ubiquitinligáza c-Cbl. Po fosforylaci proteinu c-Cbl kinázou Src následuje polyubiquitinylace obou proteinů a jejich degradace proteazómem (Yokouchi *et al.*, 2001).

2.5 Heterologní exprese proteinu Src v kvasinkách

V kvasinkách nebyly popsány žádné pravé endogenní tyrozin kinázy, avšak i v těchto organismech se v malé míře vyskytuje fosforylace na tyrozinových zbytcích. Fosforylaci tyrozinů zde mohou zajišťovat duálně specifické kinázy. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je duálně specifickou kinázou např. Ste7, která se účastní signální dráhy při odpovědi na feromon a je homologem MAP kinázy, u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* může představovat příklad duálně specifické kinázy protein Wee1. Zjištění výskytu specifických fosfotyrozínfosfatáz v kvasinkách pak podporuje domněnku, že i v nižších eukaryotech může tyrozinová fosforylace hrát nezastupitelnou roli v regulaci různých procesů (Florio *et al.*, 1994).

Expese kináz Src má u kvasinky *S.cerevisiae* různý vliv na schopnost růstu. Expese kinázově aktivní varianty v-Src je pro buňky lethální (Boschelli *et al.*, 1993) nebo alespoň inhibuje růst (Kornbluth *et al.*, 1987). Lethální efekt či inhibice růstu je spojena s masivním nárůstem tyrozinové fosforylace endogenních kvasinkových proteinů a pro tuto fosforylaci je nezbytná kromě kinázové aktivity také přítomnost intaktní SH2 domény ve struktuře kinázy Src (Boschelli *et al.*, 1993; Florio *et al.*, 1994; Trager a Martin, 1997). Expese proteinu c-Src je pro buňky daleko méně škodlivá zřejmě vlivem možné intermolekulární fosforylace Tyr 527 v C-koncové oblasti (Kornbluth *et al.*, 1987; Osusky *et al.*, 1995).

Kvasinka *S. pombe* je na přítomnost kinázy Src mnohem citlivější než *S.cerevisiae*, neboť expese v-Src či c-Src je pro buňky lethální. Zde je pro efekt lethality klíčová kinázová aktivita proteinů Src, protože i expese variant s delecí SH2 nebo SH3 domény vykazuje lethální efekt (Superti-Furga *et al.*, 1993).

Efekt lethality či inhibice růstu při expresi c-Src lze u *S. pombe* i u *S.cerevisiae* zvrátit koexpresí kinázy Csk, která fosforyluje Tyr 527 (Superti-Furga *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1993).

2.6 Význam tyrozínových zbytků na vazebném povrchu SH3 domény pro interakci s ligandy a signalizaci v buňkách

Tyrozíny na povrchu SH3 domény se účastní interakce s intermolekulárními i intramolekulárními ligandy a jejich rozmístění v rámci vazebného povrchu je velmi podobné i u zcela nepříbuzných proteinů. Fosforylace či mutace těchto tyrozínů má u kinázy Src a dalších proteinů prokazatelný vliv na interakci s ligandy a v některých popsáných případech vliv na signalizaci (viz dále). Fosforylace vazebných tyrozínů v SH3 doméně by potom mohla představovat nový typ regulačního mechanismu *in vivo*.

U kinázy c-Src jsou na povrchu SH3 domény celkem čtyři tyrozíny účastníci se vazby ligandů. V první vazebné kapse je to Tyr 90 a Tyr 136, ve druhé vazebné kapse je to Tyr 92 a v tzv. specifitní kapse je to Tyr 131 (Xu *et al.*, 1997; Erpel *et al.*, 1995). Homologní tyrozíny k vazebným tyrozínům SH3 domény kinázy Src nalézáme u řady dalších proteinů. Dále v textu budou kromě vazebných tyrozínů kinázy Src diskutovány vybrané případy vazebných tyrozínů dalších proteinů (viz tab. 2.2).

Tab. 2.2 Homologní tyrozíny (vždy ve stejném sloupci) na povrchu SH3 domén různých proteinů, u nichž již byla publikována studie objasňující vliv mutace či fosforylace tyrozínů na vazbu ligandů nebo na signalizaci

Protein	Homologní tyrozíny na povrchu SH3 domén			
c-Src	Tyr 90	Tyr 92	Tyr 131	Tyr 136
Grb2				Tyr 209*
PSTPIP	Tyr 367			
Btk	Tyr 223			
Bcr/Abl	Tyr 89			Tyr 134

* C-koncová SH3 doména v proteinu Grb2

U kinázy Src byla funkce jednotlivých vazebných tyrozínů na povrchu SH3 domény poprvé studována při heterologní expresi v kvasince *S. pombe* (Erpel *et al.*, 1995). Exprese proteinu c-Src doprovázená signifikantním vzrůstem tyrozínové fosforylace endogenních proteinů byla pro kvasinkové buňky *S. pombe* lethální. Tento efekt bylo možno zcela zvrátit koexpresí s kinázou Csk, která inhibovala aktivitu kinázy c-Src a tím i masivní výskyt proteinů fosforylovaných na tyrozínu.

Pro obnovení viability při koexpresi s kinázou Csk pak byla důležitá jak přítomnost SH2 domény tak i SH3 domény kinázy c-Src (Superti-Furga *et al.*, 1993).

Varianty proteinu Src se záměnou vazebných tyrozinů SH3 domény za alanin projevovaly různý stupeň „deregulace“ (zvýšení kinázové aktivity) i při koexpresi s kinázou Csk v *S. pombe*. Za příčinu „deregulace“ či zvýšené kinázové aktivity u mutovaných variant se předpokládala neschopnost vlivem mutace v SH3 doméně zaujmout plně inaktivní konformaci po fosforylaci Tyr 527 v C-koncové oblasti Csk kinázy. Stupeň „deregulace“ se projevoval různě intenzivní fosforylací endogenních substrátů a sníženou viabilitou či lethálním efektem na buňky *S. pombe* (Erpel *et al.*, 1995).

Efekt obnovení viability kvasinkových buněk a snížení fosforylace proteinů při koexpresi s Csk kinázou se u jednotlivých mutovaných tyrozinů projevoval odlišným způsobem. Při koexpresi kinázy Csk a variant proteinu Src s mutacemi Y92A nebo Y136A v SH3 doméně nebyl pozorován žádný pozitivní efekt na viabilitu buněk a i fosforylace endogenních proteinů odrážející kinázovou aktivitu zůstávala stále vysoká. U variant se záměnami Y90A nebo Y131A bylo při koexpresi s kinázou Csk pozorováno pouze slabé zlepšení viability buněk doprovázené lehce sníženou mírou fosforylace proteinů (Erpel *et al.*, 1995).

Efekt těchto mutací se projevil i na vazbě ligandů SH3 domény *in vitro*. Mutace Y90A, Y92A, Y136A v SH3 doméně rušila vazbu proteinu Sam 68 i p85 podjednotky PI3 kinázy, SH3 doména obsahující mutaci Y131A vykazovala pouze slabou vazbu obou ligandů ve srovnání s wt formou SH3 domény (Erpel *et al.*, 1995).

V této práci se potvrdila role vazebných tyrozinů SH3 domény kinázy Src nejen při interakci s ligandy, ale i jejich důležitost pro udržování inaktivní konformace při účasti na intramolekulární inhibiční vazbě, která je zprostředkována interakcí SH3 domény s CD linkerem.

Některé tyrozíny na vazebném povrchu SH3 domény kinázy Src byly nalezeny fosforylované *in vivo* v savčích buňkách. V 3T3 fibroblastech může být modifikován fosforylací Tyr 138 v SH3 doméně (Tyr 136 u kuřecího proteinu). Tato fosforylace byla zprostředkována kinázovou aktivitou PDGF receptoru a pro její průběh byla důležitá asociace SH2 domény s PDGF receptorem. Přítomnost pTyr 138 nebyla potřebná pro zprostředkování mitogenní signalizace skrze PDGF receptor, avšak tato fosforylace na vazebném povrchu rušila *in vitro* schopnost vazby

syntetických ligandů na SH3 doménu (Broome a Hunter, 1996; Broome a Hunter, 1997).

Nedávno byl objeven nový aminokyselinový zbytek v SH3 doméně kinázy Src, který může *in vivo* podléhat fosforylaci. Je to tyrozín na pozici 92 (Tyr 90 u kuřecího proteinu), který je situován právě v jedné z hydrofóbních vazebných kapes. Jeho fosforylace byla objevena díky analýze fosfotyrozínového proteomu myších embryonálních fibroblastů, na které se podílela i naše laboratoř. Fosforylace Tyr 92 byla u myších embryonálních fibroblastů transformovaných onkoproteinem Src ve značné míře obohacena oproti normálním netransformovaným buňkám (Luo *et al.*, 2008).

I u dalších proteinů, které obsahují SH3 doménu a jsou součástí řady odlišných signálních kaskád, se na vazebném povrchu vyskytují tyrozíny homologní k vazebným tyrozínům kinázy Src. Fosforylace těchto tyrozínů u kinázy Src a níže uvedených proteinů by mohla *in vivo* představovat nový obecný mechanismus regulace interakce SH3 domén s ligandy. Tento typ regulačního mechanismu by ovlivňoval afinitu intramolekulárních i intermolekulárních ligandů vázajících SH3 doménu. Změna vaznosti ligandů by mohla mít význam pro regulaci aktivity daného proteinu (např. v případě proteinkináz) a nebo by mohlo dojít ke změně afinity a spektra vazebných partnerů a tím k modulaci signálních kaskád vedoucích od proteinu fosforylovaného na SH3 doméně dále.

Prvním zde uvedeným proteinem, u kterého se modifikace jednoho z vazebných tyrozínů projevila při interakci s ligandem SH3 domény, je protein PSTPIP. PSTPIP je protein účastnící se remodelace cytoskeletu a prostřednictvím vazby s cytoskeletálním proteinem WASP (Wiskot-Aldrich syndrom protein) se podílí na regulaci tvorby svazků filament aktinového cytoskeletu. Tyrozín 367 na vazebném povrchu SH3 domény proteinu PSTPIP představuje pro vazbu proteinu WASP důležitý zbytek. Při fosforylaci nebo fosforylaci napodobující mutaci Tyr 367 na Glu byla schopnost SH3 domény vázat protein WASP *in vitro* značně oslabena. Při koexpresi značených proteinů WASP a PSTPIP s mutací Y367E byla *in vivo* narušena jejich kolokalizace v buňkách linie CHO, což by potvrzovalo regulační význam fosforylace Tyr367 pro vzájemnou interakci těchto proteinů (Wu *et al.*, 1998).

Dalším proteinem je kináza Btk patřící do rodiny kináz Tec. Kináza Btk se účastní přenosu signálu přes BCR receptory v B lymfocytech a hraje klíčovou roli

v procesu maturace B lymfocytů. U kinázy Btk byla popsána autofosforylace tyrozínu 223 v SH3 doméně jako děj následující po fosforylaci Tyr 551 v aktivační smyčce, kterou zprostředkovaly kinázy rodiny Src. Záměna Tyr 223 za nefosforylovatelný Phe vedla u konstitutivně aktivní formy kinázy Btk, která obsahovala mutaci E41K v PH doméně („plecktrin homology domain“), k zesílení schopnosti transformovat savčí fibroblasty 3T3 a RAT2. Tato schopnost zesílené transformace však nebyla závislá na kinázové aktivitě, neboť mutace Y223F nezpůsobovala další zvyšování kinázové aktivity konstitutivně aktivní formy Btk (Park *et al.*, 1996).

Později byla studována úloha Tyr 223 v SH3 doméně kinázy Btk. Fosforylace Tyr 223 výrazně ovlivňovala vazbu různých ligandů na SH3 doménu *in vitro*. Zatímco vazba proteinu c-Cbl nebyla fosforylací Tyr 223 nijak ovlivněna, protein WASP se na fosforylovanou SH3 doménu nevázal vůbec a naopak vazba kinázy Syk vykazovala větší afinitu k SH3 doméně kinázy Btk fosforylované na Tyr 223 (Morrogh *et al.*, 1999). Tato studie velmi dobře koresponduje s předpokladem, že přítomnost fosforylace na vazebných tyrozínech by mohla měnit preferenci vazby SH3 domény k různým ligandům.

V buňkách chronické myeloidní leukémie (CML) je příčinou transformace onkogenní fuzní protein Bcr-Abl vykazující konstitutivní proteintyrozínkinázovou aktivitu. Tento onkoprotein je fosforylován *in vivo* na SH3 doméně odvozené od kinázy c-Abl na tyrozínech v pozici 89 a 134 a tyto fosforylace zajišťují kinázy z rodiny Src specifické pro myeloidní buňky. Fosforylace Tyr 89 je pak výrazně obohacena v CML buňkách linií K-562 a Meg-01. Při expresi proteinu Bcr-Abl se záměnou Tyr 89 za Phe v buňkách linie TF-1 (GM-CSF-závislé myeloidní progenitorové buňky) byla schopnost této varianty onkoproteinu indukovat transformaci buněk redukována v porovnání s nemutovanou variantou. Fosforylace Tyr 89 by mohla stabilizovat konformaci aktivního stavu kinázy Bcr-Abl a přispívat tak ke schopnosti transformovat buňky (Meyn *et al.*, 2006).

Dalším příkladem je protein Grb2, u něhož byl prokázán vliv modifikace tyrozínu na SH3 doméně na interakci s ligandy a na signální kaskády vedoucí od tohoto proteinu dále. Adaptorový protein Grb2 se účastní buněčné signalizace zprostředkováním formování komplexů různých signálních proteinů. Kromě SH2 domény obsahuje protein Grb2 dvě SH3 domény, které mohou být fosforylovány na tyrozínových zbytcích např. cytosolickou kinázově aktivní částí EGF receptoru

po stimulaci EGF nebo onkoproteinem Bcr-Abl. V C-koncové SH3 doméně byl identifikován Tyr na pozici 209 jako fosforylovaný zbytek *in vivo*. Fosforylace Tyr 209 na SH3 doméně značně zeslabovala vazbu proteinu Sos *in vitro*, což by opět potvrdovalo domněnku, že fosforylace tyrozínu na vazebném povrchu by mohla modulovat interakci s ligandy. Při koexpresi Grb2 se záměnou Tyr 209 za Phe (Y209F) a onkoproteinu Bcr-Abl ve fibroblastech linie 3T3 byla schopnost těchto buněk tvořit kolonie v měkkém agaru výrazně zesílena oproti buňkám s koexpresí wt formy Grb2 a Bcr-Abl. To by naznačovalo, že fosforylace Tyr 209 by mohla negativně ovlivňovat transformaci buněk indukovanou onkoproteinem Bcr-Abl. Při expresi Grb2 se záměnou Y209F v buňkách linie A431 se po stimulaci EGF značně prodloužila aktivace proteinu Ras, který zůstával déle vázán s GTP, a zároveň i aktivace kináz JNK a ERK. To by mohlo indikovat úlohu fosforylace Tyr 209 při negativní regulaci trvání a stupně aktivace kináz JNK a ERK, které v signálních kaskádách navazují na GTPázu Ras (Li *et al.*, 2001).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1 Použité organizmy

Escherichia coli

Kmen Sure: e14⁻, (mcrA), D (mcrCB-hsdSMR-mrr), 171, end A1, supE44thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC, Tn5 (kan^r), vrC, [F', proAB, lacI^qZ, DM15, Tn10, (tet^r)].

Kmen DH5 α : ϕ 80dlacZ Δ M15, recA, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44 relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF),U,169

Saccharomyces cerevisiae

Kmen EGY48: MAT α , his3, trp1, ura3, LexA_{op(x6)} – LEU2

Mus musculus

Fibroblasty linie 3T3 (získány z laboratoře doc. Černého)

Rattus norvegicus

Fibroblasty linie RAT2 (získány z laboratoře prof. Forstové)

3.1.2 Kultivační média a roztoky

Kultivace bakteriálních kmenů

Všechna média připravujeme z miliporové vody upravené v přístroji Watrex a sterilizujeme v autoklávu 20 min při 121°C.

1× LB	10 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, Germany)
	5 g/l	Yeast Extract (OXOID, UK)
	5 g/l	NaCl
2× LB (Super LB)	20 g/l	Universalpepton M66 (MERCK, Germany)
	10 g/l	Yeast Extract (OXOID, UK)
	5 g/l	NaCl
ŽA2	4%	živný agar č.2 (Imuna, Šarišské Michalany)

V případě potřeby přidáme selekční antibiotika (1000× koncentrované zásobní roztoky přidáváme do médií zchladlých na cca 50°C):

Ampicilin (Biotika, SR)	100 mg/ml
Kanamycin (AppliChem, Germany)	50 mg/ml

Kultivace kvasinkových kmenů

Všechna média připravujeme z miliporové vody upravené v přístroji Watrex a sterilizujeme v autoklávu 20 min při 121°C.

YPAD	20 g/l	pepton (OXOID, UK)
	10 g/l	Yeast Extract (OXOID, UK)
	100 mg/l	adenin-hemisulfát (Sigma, USA)
	[15-18 g/l	agar (Difco)]

Komponenty rozpustíme do 900 ml vody, pH upravíme zředěnou HCl na 5,8. Klávujeme, přidáme 100 ml 20% glukózy (Sigma, USA) a ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml).

SD médium	6,7 g/l	yeast nitrogen base without amino acids (Difco; zdroj dusíku, vitamíny, základní a kovové ionty)
	0,6 g/l	-His/-Leu/-Trp/-Ura Dropout Supplement (Clontech, USA) (směs aminokyselin a bází kromě uvedených)
	[15-18 g/l	agar (Difco)]

Komponenty rozpustíme do 900 ml vody. Po vykláfování přidáme dle požadované selekce 10 ml roztoku aminokyselin a bází (viz. níže), ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml) a 100 ml 20% glukózy (nebo roztoku 20% galaktózy a 10% rafinózy).

Roztoky aminokyselin a uracilu (100× koncentrované zásobní roztoky)

2 g/l	L-Histidin HCl monohydrát
10 g/l	L-Leucin
2 g/l	L-Tryptofan
2 g/l	L-Uracil
10 g/l	Adenin (adenin-hemisulfát; Sigma,USA)

65% Mg²⁺ pufrovaný glycerol (pro konzervy *S.cerevisiae*)

65% (v/v)	glycerol (Sigma, USA)
100 mM	MgSO ₄
25 mM	Tris-HCl (pH 8.0)

Kultivace savčích buněk

Kompletní médium si připravujeme z následujících komponent:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Invitrogen)

0,5% neesenciální aminokyseliny (MEM NEAA) (Gibco, Invitrogen)

10% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma)

0,5% obecná antibiotika - antimykotika (ATB) (Gibco, Invitrogen)

Složení komponent kompletního média:

DMEM L-glukóza 4,5 g/l; L-glutamin; pyruvát

Obecná antibiotika - antimykotika (ATB) obsahují:

10000 µg/ml penicilin

10000 µg/ml streptomycin

25 µg/ml amphotericin

Další používané roztoky při kultivaci savčích buněk

0,25% trypsin-EDTA(Gibco, Invitrogen) 2,5 g/l trypsin 0,38 g/l kyselina
etylendiamintetraoctová (EDTA) pro
pasážování

Geneticin (Gibco, Invitrogen) selekční antibiotikum geneticin-sulfát,
zásobní roztok 100 mg/ml v miliporové
vodě, sterilně přefiltrován, ke kultuře
přidáváme v koncentraci 500 µg/ml.

3.1.3 Obecně používané roztoky

2× Laemmli pufr 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,1% SDS; 20%(v/v) glycerol,
0,002% bromfenolová modř

5× Laemmli pufr 0,35 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 40% glycerol; 0,012%
bromfenolová modř

3.1.4 Přehled použitých DNA modifikujících enzymů

Ligace plazmidové DNA:

T4 DNA ligáza LC (MBI Fermentas, Litva), 1 U/µl

10× ligační pufr (MBI Fermentas, Litva)

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami:

Enzym	Výrobce	Reakční pufr
BamHI	MBI Fermentas	BamHI ⁺
SacI	MBI Fermentas	SacI ⁺
MluI	MBI Fermentas	R ⁺
XbaI	MBI Fermentas	Y ⁺
BglII	MBI Fermentas	O ⁺
NheI	MBI Fermentas	Y ⁺

Složení použitých reakčních pufků:

R ⁺	10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0,1 mg/ml hovězí sérový albumin (BSA)
Y ⁺	33 mM Tris-acetát (pH 7.9), 10 mM Mg ²⁺ -acetát, 66 mM K-acetát, 0,1 mg/ml BSA
O ⁺	50mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0,1mg/ml BSA
BamHI ⁺	10 mM tris-HCl, (pH 8.0), 5 mM MgCl ₂ , 100mM KCl, 0,1 mg/ml BSA, 0,02% Triton X-100
SacI	10 mM Bis-Tris Propan-HCl (pH 6.5), 10 mM MgCl ₂ , 0.1 mg/ml BSA

3.1.5 Použité kity pro manipulaci s nukleovými kyselinami

Purifikace DNA:

NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, BRD)

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, BRD)

Mutagenese in vitro:

QuickChange[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)

3.1.6 Seznam použitých primerů

Primer	Sekvence	Použití
Src YF-F	CCACTTTCGTGGCTCTCTTCG ACTACGAGTCCCGGACTG	Primer pro mutagenezi c-src: Y90F v SH3 doméně („forward primer“)
Src YF-R	CAGTCCGGGACTCGTAGTCG AAGAGAGCCACGAAAGTGG	Primer pro mutagenezi c-src: Y90F v SH3 doméně („reverse primer“)

3.1.7 Přehled použitých protilátek

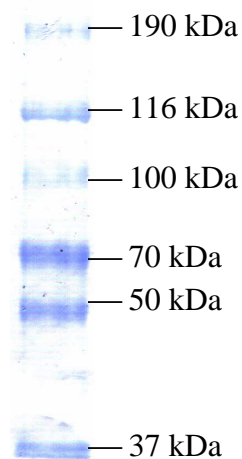
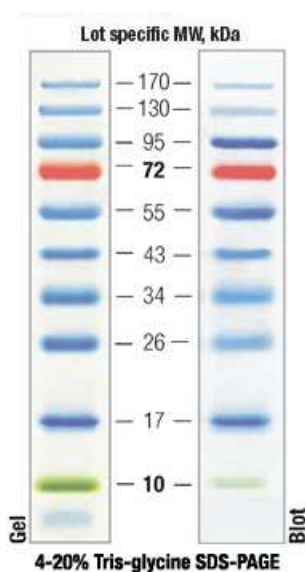
Název	Charakteristika	Specifita	Výrobce
anti-v-Src (Ab-1)	Myší monoklonální	v-Src, c-Src	Calbiochem
anti-Src pY418*	Králičí polyklonální	Y416 c-Src, v-Src	Biosource
4G10	Myší monoklonální	fosfotyrozín	Millipore
PY20	Myší monoklonální	fosfotyrozín	Millipore
Anti-Cas pY165	Králičí polyklonální	Y165 Cas	Cell Signaling
Anti-Csk	Králičí polyklonální	Csk	Cell Signaling
Anti-Fak pY861	Králičí polyklonální	Y861 Fak	Biosource
Anti-GFP	Králičí polyklonální	GFP, EGFP	Santa Cruz
GAM-AP	Kozí polyklonální	Myší IgG	Santa Cruz
GAR-HRP	Kozí polyklonální	Králičí IgG	Santa Cruz
GAM-HRP	Kozí polyklonální	Myší IgG	Santa Cruz

*Y418 v lidském proteinu Src odpovídá Y416 v kuřecím proteinu Src

3.1.8 Standardy velikostí proteinů

PageRuller™ Prestained Protein Ladder
 MBI Fermentas (Litva)

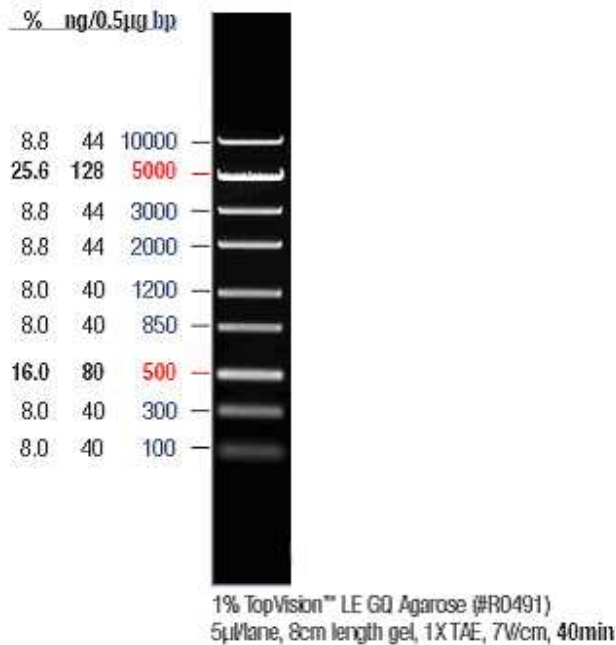
Sigma Prestained Protein Ladder (Sigma, USA)



3.1.9 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů

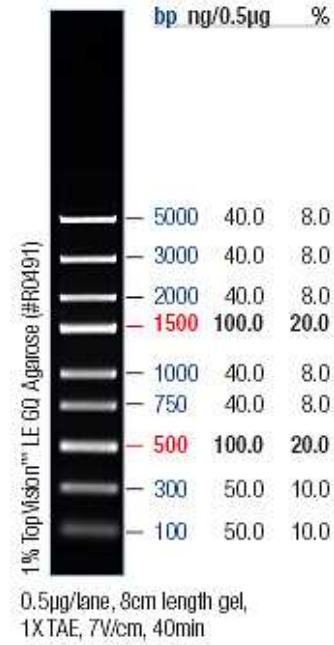
ZipRuller™, Express DNA Ladder 1

MBI Fermentas (Litva)

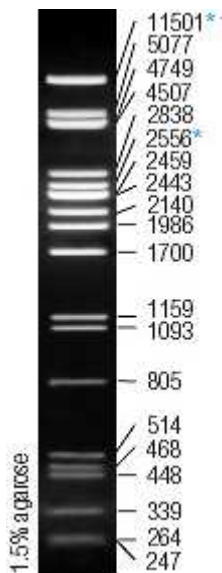


GeneRuler™, Express DNA Ladder

MBI Fermentas (Litva)



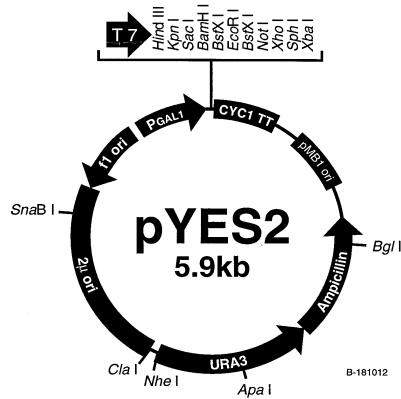
Lambda DNA/*Pst*I



3.1.10 Použité vektory

Vektor pYES2 (Invitrogen, USA)

(replikativní vektor pro expresi v *Saccharomyces cerevisiae*)



```

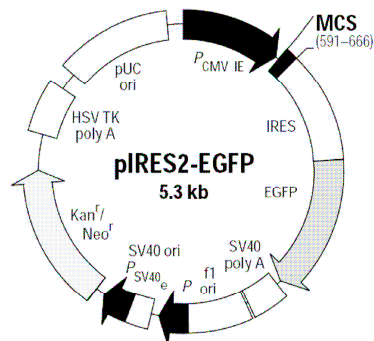
1  5' end of GAL1 promoter
   GAL4 binding site
ACGGATTAGA AGCCGCCGAG CGGGTGACAG CCCTCCGAAG GAAGACTCTC CTCCGTGCGT
61  CCTCGTCCTC ACCGGTCGCG TTCCTGAAAC GCAGATGTGC CTGCGGCCGC ACTGCTCCGA
   GAL4 binding site
121  ACAATAAAGA TTCTACAATA CTAGCTTTTA TGTTATGAA GAGGAAAAAT TGGCAGTAAC
181  CTGGCCCCAC AAACCTTCAA ATGAACGAAT CAAATTAACA ACCATAGGAT GATAATGCGA
241  TTAGTTTTTT AGCCTTATTT CTGGGTAAT TAATCAGCGA AGCGATGATT TTTGATCTAT
   TATA box
301  TAACAGATAT ATAAATGCAA AAACCTGATT AACCACTTAA ACTAATACTT TCAACATTTT
   start of transcription
361  CGGTTTGAT TACTTCTTAT TCAAATGTAA TAAAAGTATC AACAAAAAAT TGTTAATATA
   3' end of GAL1 promoter
421  CCTCTACT TTAACGTCAA GGAGAAAAAA CCCC GGATCG GACTACTAGC AGCTGTAATA
   T7 promoter/priming site
481  CGACTCACTA TAGGGAATAT TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCGC
   BstX I EcoR I BstX I Not I Xho I Sph I Xba I
541  CAGTGTGCTG GAATTCCTGCA GATATCCATC ACAC TGCGCG CCGCTCGAGC ATGCATCTAG
   5' end of CYC1 transcription terminator
601  AGGGCCGCAT CATGTAATTA GTTATGTAC GCTTACATTC...

```

*Please note that there are two *BstX* I sites in the polylinker.

Vektor pIRES2-EGFP (BD Biosciences, USA)

(vektor pro expresi v savčích buňkách)

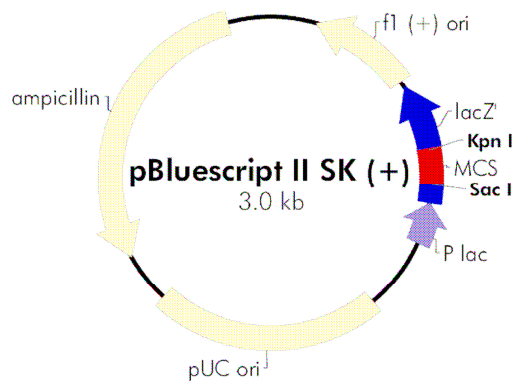


```

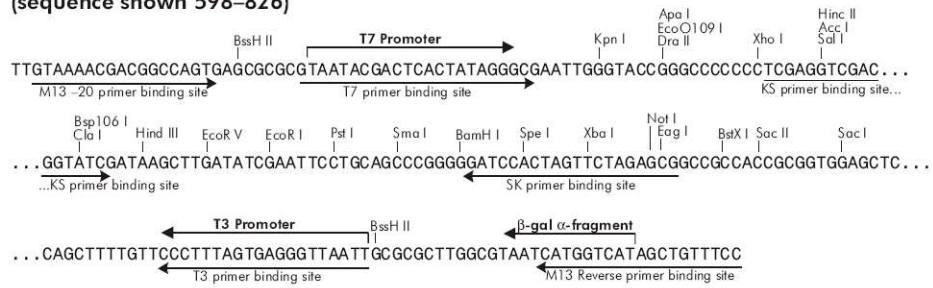
591  GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCGGGATCC...IRES
Nhe I Eco47 III Bgl II Xho I Hind III EcoR I Pst I Sal I Kpn I Apa I BamH I
601  Sac I EcI736 II Acc I Asp718 I Bsp120 I Sac II Xma I Sma I
611  621  631  641  651  661

```

Vektor **pBluescript SK(+)** (Stratagene, USA)
 (bakteriální vektor používaný pro klonování)



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
 (sequence shown 598–826)



3.2 Metody

3.2.1 Izolace plazmidové DNA z *E. coli* a její repurifikace

Izolace plazmidové DNA

1. den (odpoledne)

- Na plotnu s ŽAMP médiem zaočkujeme klon *E. coli* transformovaný příslušným plazmidem. Kultivujeme přes noc ve třepačce při 37°C (180 ot./min (rpm)).

2. den (odpoledne)

- Jednou dobře oddělenou kolonií zaočkujeme 10 ml temperovaného LB média s 100 µg/ml ampicilinu v 100 ml Erlenmayerově baňce (resp. 50ml v 250 ml baňce).
- Baňku umístíme do třepačky a třepeme při 37 °C přes noc (tj. po dobu asi 16 hodin, 180 rpm).

3. den (ráno)

- Kulturu ochladíme v ledové lázni, přelijeme do 50 ml centrifugační zkumavky a stočíme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 20 min, 0°C).
- Sediment dokonale resuspendujeme do x ml TEG (*x volíme dle výchozího objemu kultury takto: 1 ml při 10 ml kultury, 2-4 ml při 50 ml kultury*), a inkubujeme 30 min v ledové lázni.
- Zkumavku vyjmeme z ledové lázně, přidáme 2x ml alkalického SDS, promícháme a inkubujeme 5 min. *Buňky lyzují, suspenze se projasní, výrazně stoupne viskozita.*
- Zkumavku opět přeneseme do ledové lázně a přidáme 1,5x ml octanu draselného, promícháme a inkubujeme dalších 30-60 minut na ledu. *Z roztoku vypadne bílá sraženina.*
- Směs převedeme do polypropylénových zkumavek a sraženinu usadíme centrifugací (Jouan MR 22i – úhlový rotor, 14 000 g, 20 min).

- Supernatant převedeme do 15 ml kalibrované zkumavky, dokonale smísíme s 0.6 objemu isopropanolu a ihned centrifugujeme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 5 min).
- Supernatant slijeme, sediment osušíme, rozpustíme v 300 µl miliporové vody a přeneseme do mikrozukavky. Objem odměříme, dokonale smísíme se stejným objemem 10 M LiCl a inkubujeme v -20°C cca 60 minut (- 80°C, 15 min).
- Sraženinu odstraníme 5-ti minutovou centrifugací ve stolní mikrocentrifuze (Hettich MIKRO 20, 13 000 g) a supernatant převedeme do čisté mikrozukavky.
- Plasmidovou DNA vysrážíme z roztoku jedním objemem 96% etanolu 60 min při -20°C (- 80°C, 15 min).
- Sraženinu DNA usadíme centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 5 min), sediment 2-3x opláchneme 80% EtOH, vysušíme a rozpustíme ve 100µl miliporové H₂O (nebo v TE pufru). Množství DNA a kvalitu izolace zjišťujeme elektroforeticky.

Repurifikace izolované DNA

K repurifikaci lze zvolit několik postupů, z nichž některé jsou níže uvedeny.

Reprecipitace

- Přidáme 1/10 objemu octanu sodného a srážíme 2,5 objemu etanolu 60 min, -20°C (-80°C, 15 min).
- Sraženinu DNA usadíme centrifugací (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 5 min), sediment 2-3x opláchneme 80% EtOH, vysušíme a rozpustíme ve 100 µl H₂O (TE).

Fenolizace

- K 100 µl výchozího roztoku izolované DNA přidáme 5 µl 5M NaCl (10µl LiCl) a 100 µl fenolu. Intenzivně třepeme (i na vortexu) asi 1 minutu. Krátce stočíme.

- Přidáme 100 µl chloroformu, protřepeme a centrifugujeme 5 minut. Svrchní vodnou fázi odebereme do čisté mikrozkušavky a opakujeme extrakci chloroformem.
- Plasmidovou DNA srážíme 2,5 obj. EtOH 60 min, -20°C (-80°C, 15 min). Sediment opláchneme 80% EtOH, vysušíme a rozpustíme do 50 µl miliporové H₂O.

Purifikace na komerční minikolonce určené k purifikaci plasmidové DNA

- Plasmidovou DNA převedeme do roztoku A1 kitu NucleoSpin® Plasmid (smícháním max.1:1) a postupujeme podle návodu.

Roztoky:

Alkalický SDS	1% SDS, 0.2M NaOH
Kac	3M octan draselný, 2M kys. octová, pH 4,8-5,4
NaAc	3M octan sodný, pH 5.8
80% EtOH	80% etanol, 10 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8.0
TE	10 mM TRIS-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA-NaOH
TEG	25 mM TRIS-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza
LiCl	10 M LiCl, ρ=1.275
Fenol	destilovaný fenol, nasycený TRIS-HCl pufrem pH 8.0, doplněný o hydroxychinolin (0.1%)
Chloroform	směs chloroform-isoamylalkohol 24:1

3.2.2 Izolace plasmidové DNA z *E. coli* pomocí NucleoSpin® Plasmid (Macherey – Nagel, Německo)

- Kulturu *E. coli* (max. 5 ml) s daným plasmidem narostlou přes noc (16-18 h) převedeme do centrifugační zkumavky a centrifugujeme (Jouan MR22i; 17 000 g, 30 s). Odstraníme supernatant.
- Pelet resuspendujeme v 250 µl roztoku A1.

- Přidáme 250 μ l roztoku A2. Jemně promícháme otáčením zkumavky a inkubujeme při pokojové teplotě maximálně 5 minut.
- Přidáme 250 μ l roztoku A3. Jemně promícháme a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 16 000 g, 10 min).
- Kolonku NucleoSpin Plasmid umístíme do sběrné 2 ml mikrozukavky, naneseeme supernatant z předchozího kroku a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 16 000 g, 1 min), poté odstraníme tekutinu ze sběrné mikrozukavky.
- Pro zbavení se buněčných nukleáz je doporučeno nanést na kolonku 500 μ l roztoku AW předeřátého na 50°C a opakovat centrifugaci.
- Na kolonku naneseeme 600 μ l roztoku A4 a opět centrifugujeme.
- Po odstranění roztoku ze sběrné mikrozukavky zopakujeme centrifugaci 2 min maximální rychlostí (dokonalé odstranění zbytků etanolu).
- Kolonku umístíme do čisté 1,5 ml mikrozukavky, přidáme 50 μ l roztoku AE, inkubujeme 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 min na nejvyšší otáčky. Eluci lze rovněž provést do TE pufru nebo do deionizované vody.

3.2.3 Transformace *E. coli* elektroporací

Příprava kompetentních buněk pro transformaci elektroporací

1.den (odpoledne)

- Jednou kolonií čerstvě narostlých recipientních bakterií zaočkujeme 10 ml LB média v 100 ml Erlenmayerově baňce.
- Inokulum kultivujeme na rotační třepačce při 37°C do stacionární fáze (přes noc, 180 rpm, optická denzita (OD) $>$ 2,5).

2.den (ráno)

- Kulturou zaočkujeme 400 ml média LB s 0,4 ml thiaminu (0,1 mg/ml) na OD₆₀₀=0,05 (2 \times 200 ml média v 2 \times 2 l Erlenmayerových baňkách).
- Baňky umístíme na třepačku (180 rpm, 37°C), kulturu inkubujeme k dosažení OD₆₀₀=0,6. Baňky přeneseme do ledové lázně a necháme zde vychladit 10-15 min. Všechny další operace rovněž provádíme na ledu.

- Kulturu přelijeme do dvou 250 ml vychlazených plastových centrifugačních kyvet Nalgene a sedimentujeme centrifugací (Janetzki K26, 3 000 g, 10 min, 0°C).
- Supernatant opatrně slijeme, sediment nejprve pipetou sterilně resuspendujeme v 10 ml ledové deionizované vody, poté vodou doplníme na původní objem. Opětovně centrifugujeme, resuspendujeme a doplníme vychlazenou vodou na objem 100 ml.
- Buněčné suspenze převedeme do čtyř 50 ml centrifugačních zkumavek a znovu centrifugujeme (Jouan 22i, 3 000 g, 20 min, 0°C).
- Sedimenty resuspendujeme pipetou v malém množství 10% (w/w) ledového glycerolu (1-5 ml), poté glycerolem doplníme na 25 ml, suspenze spojíme do dvou zkumavek a centrifugaci opakujeme (Jouan 22i, 3 000 g, 20 min, 0°C).
- Promyté sedimenty resuspendujeme ve zbytkovém objemu 10 % glycerolu (1 – 2 ml). Suspenzi pipetujeme po 100-200 µl do 1,5 ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku, do kterého poté přechodně odkládáme naplněné mikrozkušavky. Dlouhodobě skladujeme při -80°C.

Transformace elektroporací

- Do 0,5 ml-mikrozkušavky s 0,5-5 µl roztoku plazmidové DNA (obsahující 5 pg-0,5 µg DNA) přidáme 50 µl elektrokompetentních buněk (provádíme na ledu).
- Obsah mikrozkušavky převedeme do vychlazené 0,2 cm elektroporační kyvety. Na generátoru pulzu přístroje Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, USA) nastavíme tyto hodnoty: kapacitance 25 µF, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω. Po vložení kyvety do přístroje aplikujeme puls o velikosti 12,5 kV/cm. Výsledná časová konstanta by měla být v rozmezí 4-5 milisekund. Obsah kyvety okamžitě resuspendujeme do 2 ml média LB, obsahujícího 20 mM glukózu (cca 0,5% roztok) a převedeme do skleněné 10 ml zkumavky.
- Zkušavku s kulturou umístíme na třepačku a necháme růst hodinu při 37°C (180-200 rpm). Na plotny s ŽA2 agarem obsahující selekční antibiotikum vyséváme obvykle 2, 20 a 200 µl kultury. Plotny inkubujeme v termostatu při 37 °C přes noc.

3.2.4 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

(Podle Schiestl a Gietz, 1989; v úpravě Dr. Z. Palkové)

Příprava kompetentních buněk

- Jednou velkou kolonií (2-3 mm) zaočkujeme cca 10 ml YPAD nebo příslušného selekčního SD média. Kultivujeme na třepačce (180-230 rpm) při 30°C po dobu 16-18 h (přes noc) do stacionární fáze (cca $1-2 \times 10^8$ buněk, $OD_{600} > 1,5$).
- Předehřáté aerované YPAD médium zaočkujeme inokulem na $OD_{600} = 0,1$ ($2-5 \times 10^6$ buněk/ml). Necháme růst na třepačce (180-230 rpm) po dobu 2 generací, tj. 3-5 h při 30°C na výslednou $OD_{600} = 0,4-0,6$.
- Poté kulturu centrifugujeme v 50 ml cetrifugačních zkumavkách (Jouan MR 22i, 2 500 g, 3 min, 20°C).
- Sediment 2x promyjeme 1/2 objemem temperované deionizované vody a 1x 10 ml H₂O/TE/LiAc. Po každém promytí opět centrifugujeme (Jouan MR 22i, 2 500 g, 3 min, 20°C).
- Výsledný sediment resuspendujeme v 500 µl H₂O/TE/LiAc na 2×10^9 buněk/ml (zahuštění 1:100) a inkubujeme na třepačce 15 min při 30°C.

Vlastní transformace:

- Do 1,5 ml mikrozkušavek pipetujeme:
 - 5 µl ssDNA, čerstvě denaturované (50 µg, single stranded „salmon sperm” DNA, Sigma, USA)
 - 1-5 µl plazmidové DNA (100-500 ng)
 - 50 µl buněčné suspenze (cca 1×10^8 buněk)
 - 300 µl PEG/TE/LiAc
- Transformační směs důkladně promícháme na vortexu a inkubujeme 30 min při 30°C za občasného promíchání otáčením zkumavky.
- Tepelný šok navodíme přenesením do 42°C na 20 min. Vzorek několikrát během inkubace mícháme.
- Buněčnou suspenzi usadíme centrifugací (Hettich MIKRO 20, 10 000 g, 1 min, 20°C) a pipetou odsajeme supernatant (roztok PEG). Centrifugaci 1x opakujeme, odstraníme zbylý PEG.

- Sediment resuspendujeme v 200 μl deionizované vody, 100 μl suspenze vysejeme na selekční plotny (\varnothing 6 mm). Kultivujeme 2-4 dny při 30°C.

Roztoky

50% PEG	5 g/10 ml (w/v) PEG 3350 (Sigma, USA), vyklákováno
10x TE	100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, pH 7,5
1M LiAc	1,53 g/15 ml, pH upravit zředěnou kyselinou octovou na 7,5
PEG/TE/LiAc (8:1:1 = 40%PEG/1xTE/100 mM LiAc)	
H ₂ O/TE/LiAc	(8:1:1 = 100 mM LiAc v 1x TE)

Rychlá transformace *S. cerevisiae*

1.krok

- Na YPAD (nebo 2x YPAD) plotnu zaočkujeme mikrobiologickou kličkou požadovaný kvasinkového kmene. Ponecháme růst při 30°C jeden až tři dny dle potřeby.

2.krok

- Nosičovou ssDNA povaříme ve vodní lázni 1 minutu, poté umístíme na led.
- Z plotny seškrábneme asi 50 μl buněk a resuspendujeme v 1 ml miliporové vody. (*Suspenze bude obsahovat asi $5 \cdot 10^8$ buněk*).
- Buněčnou suspenzi centrifugujeme ve stolní mikrocentrifuze (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 30 s) a odstraníme supernatant.
- K peletu přidáváme složky transformační směsi v uvedeném pořadí, v každém kroku důkladně promícháme. Nakonec doplníme vodou na výsledný objem 360 μl .

240 μl 50%PEG

36 μl 1M LiAc

10 μl ssDNA (10 mg/ml)

0,1 – 1 μg plasmidová DNA

- Inkubujeme při teplotě 42°C 40-60 minut. Dobu lze prodloužit až na 3 hodiny, což zvýší účinnost transformace.

- Centrifugujeme v mikrocentrifuze (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 1 min) a pipetou odstraníme supernatant. Pelet důkladně resuspendujeme v 1 ml vody.
- Vyséváme 10 μ l a 100 μ l na příslušnou selekční plotnu, inkubujeme při 30°C 3-4 dny. *(Při očekávaném malém výtěžku pelet resuspendujeme jen v polovičním množství vody a vyséváme 100-200 μ l).*

3.2.5 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- V 0,5 ml mikrokumavce připravíme následující restrikční směs:

10 \times restrikční pufr	2 μ l (1/10 výsledného objemu)
vzorek DNA v H ₂ O	x μ l (0,1-4 μ g DNA)
deionizovaná voda	doplnit do objemu 20 μ l
- V závislosti na struktuře a čistotě vzorku přidáváme 1-10 U enzymu/ μ g DNA.
- Inkubujeme 1-4 hodiny při optimální teplotě štěpení, poté reakci zastavíme přidáním vzorkového pufru nebo ochlazením směsi na -20 °C, příp. zahřátím 20 min, 65°C.
- Množství a kvalitu štěpené DNA zjistíme pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

3.2.6 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Elektroforézu provádíme v aparátu pro horizontální gelovou elektroforézu v pufru 1x TAE. Délka gelů je 6-10 cm a tloušťka 3-5 mm, vzdálenost elektrod 14 cm. Pro dělení fragmentů větších než 800 párů bází (bp) používáme 1% agarózové gely, pro dělení kratších fragmentů používáme 2% agarózové gely tvořené směsí Sea Kem agarózy a NuSieve agarózy (FMC, USA) v poměru 1:1. Do jamek o rozměrech 4-15 x 2 mm nanášíme 6-50 μ l vzorku, obsahujícího 10 ng-2 μ g DNA. Ke vzorkům přidáváme vzorkový pufr (1/5 celkového objemu) obsahující bromfenolovou modř

pro odhad polohy dělených fragmentů během elektroforézy. Dělicí napětí volíme v rozmezí 0,5-10 V/cm. Elektroforézu ukončíme v době, kdy bromfenolová modř urazí vzdálenost dostatečnou pro dělení fragmentů DNA. Gel potom barvíme v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 10 minut. Gel fotografujeme s červeným filtrem v procházejícím ultrafialovém (UV) záření (300-310 nm). Snímky exponujeme 2,5 až 4 sekundy (digitální fotoaparát Kodak DC290 Zoom).

TAE	40 mM Tris (pH 8,5); 20 mM ledová kyselina octová; 2 mM Na ₂ EDTA
Vzorkový pufr	60% glycerol; 60 mM EDTA; 0,06% bromfenolová modř

3.2.7 Izolace fragmentů DNA z gelu pomocí NucleoSpin[®] Extract 2 in 1 (Macherey – Nagel, Německo)

- Čistým skalpelem vyřízneme oblast gelu s požadovaným fragmentem DNA, přeneseme jej do mikrozkušavky a zvážíme.
- Na každých 100 mg agarózy přidáme 300 µl roztoku NT1.
- Inkubujeme vzorek při 50°C dokud se agaróza nerozpustí (5 – 10 min). Vzorek krátce vortexujeme každé 2 - 3 minuty.
- NucleoSpin Extract kolonku umístíme do mikrozkušavky, nanese vzorek a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 8 000 g, 1 min), a odstraníme roztok z mikrozkušavky.
- Pro větší čistotu extraktu lze na kolonku nanést 500 µl pufru NT2 a centrifugovat (Hettich MIKRO 20, 11 000 g, 1 min).
- Přidáme 600 µl roztoku NT3 a opět centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11 000 g, 1 min).
- Přidáme 200 µl roztoku NT3 a opět centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11 000 g, 2 min) tak, aby byl roztok NT3 úplně odstraněn.
- Kolonku umístíme do čisté mikrozkušavky, nanese 25 – 50 µl elučního pufru nebo deionizované vody, necháme stát 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11 000 g, 1 min).

3.2.8 Ligace DNA v roztoku

- V 0,5ml mikrozkuhavce namícháme reakční směs:

10 × ligační pufr (MBI Fermentas)	1 µl (1/10 objemu)
DNA vektor a inzert v molárním poměru 1:3 až 4	(0,1-10 mM)
T4 DNA ligáza (MBI Fermentas)	0,2 µl (0,08 U)
deionizovaná H ₂ O	doplnit do 10 µl
- Ligační směs inkubujeme 2 – 4 hodiny při laboratorní teplotě.
- Pro zvýšení účinnosti reakce můžeme přenést ligační směs do vodní lázně o pokojové teplotě, přemístit do lednice a nechat ligovat přes noc.
- Ligázu inaktivujeme zahřátím na 65°C po dobu 15 min.
- 1 až 5 µl ligační směsi transformujeme do *E. coli* vybraného kmene.

3.2.9 Mutageneze *in vitro* pomocí soupravy Quick Change[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA)

Součástí komerční sady je DNA polymeráza *Pfu*, která má mnohonásobně větší přesnost při syntéze DNA než *Taq* polymeráza, což umožňuje minimalizovat nežádoucí výskyt dalších mutací ve výsledném produktu.

Pro mutagenezi používáme templátový plazmid izolovaný z kmene *E. coli* (dam⁺), jehož velikost včetně inzertu nepřesahuje 5000 bp. Před mutagenezí je nutno templátový plazmid přečistit přes kolonku soupravy NucleoSpin[®] Plasmid.

Přípravu směsi před vložením do PCR cyklu provádíme na ledu. Celkový objem vzorků 50 µl.

V 0,2 ml mikrozkuhavce připravíme reakční směs v následujícím pořadí:

Složka reakční směsi	Objem (µl)
H ₂ O	36
Pufr (10x)	5
dNTP mix	1
Primer „reverse“ (cca 125 ng)	2,5
Primer „forward“ (cca 125 ng)	2,5
DNA templát (cca 10 ng)	2
Polymeráza <i>Pfu</i> (2,5 U/ µl)	1

Mikrozkumavku inkubujeme v PCR cykleru (Peltier PTC-200, MJ Research, USA) s vyhříváním víčka podle následujícího PCR programu:

1. 95°C 30 s
2. 95°C 30 s
3. 55°C 1 min
4. 68°C 5 min
5. 18x opakování kroků 2. – 4.
6. 4°C 5 min

Po proběhnutí polymerázové řetězové reakce (PCR) přidáme k reakční směsi 1 μ l restriční endonukleázy Dpn I, směs jemně promícháme a necháme mikrozkumavku inkubovat 1-1,5 h při 37°C. Restriktáza *DpnI* rozeznává methylovanou a hemimethylovanou DNA (cílová sekvence 5'-Gm⁶ATC-3') a štěpí tedy specificky jen DNA templátového plazmidu, která byla izolována z *E. coli* (dam⁺).

Po skončení štěpení odebereme část reakční směsi (1-5 μ l) a transformujeme do *E. coli* zvoleného kmene. Po izolaci plazmidu z *E. coli* je nutné mutaci ověřit sekvenováním.

3.2.10 Příprava a výsev glycerolových konzerv *S. cerevisiae*

Jako výchozí materiál lze použít jakoukoliv suspenzi buněk *S. cerevisiae* – buňky čerstvě narostlé v třepané kultuře nebo seškrábnuté z plotny.

- K 500 μ l suspenze kvasinek v deionizované vodě přidáme 400 μ l 65 % sterilního pufrovaného glycerolu. Za občasného promíchání překlápěním inkubujeme 30 min při pokojové teplotě, poté přeneseme do -80°C a tamtéž dlouhodobě uchováváme.
- Při výsevu z glycerolových konzerv seškrábneme mikrobiologickou kličkou nebo sterilním párátkem vrchní vrstvu zmrzlých buněk a nanese na plotnu s YPAD médiem nebo selekčním médiem. Vše provádíme velice rychle, aby buňky nerozmrzly.

3.2.11 Testování viability kvasinek *S. cerevisiae*

Testování viability pomocí kápaní ředící řady suspenze buněk na plotny s galaktózou a rafinózou

- Den předem zaočkujeme do 2 ml selekčního média (v tomto případě SD-U-H/-U) v bakteriologické zkumavce párátkem kolonii kvasinek nesoucí příslušný konstrukt a necháme růst při 30°C v třepačce 16 a více hodin. Nastavíme vysoké rpm, min. 220 rpm, jinak se médium ve zkumavce špatně aeruje.
- Druhý den změříme OD₆₀₀ u dvou či tří vzorků, zprůměrujeme a zaočkujeme (zhruba na OD 0,15) do malé erlenky s 5ml selekčního média (SD-U-H/-U). Necháme růst asi 3 h (220 rpm) až kultura dosáhne OD 0,4 – 0,5.
- Odebereme množství kvasinkových buněk do mikrozkušavky tak, aby odpovídalo OD 0,4 nebo 0,5 (OD 0,1- cca 2*10⁶ b./ml). Centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 10 000 g, 2 min), odsajeme médium, resuspendujeme buňky do vody a opět centrifugujeme.
- Po odsátí supernatantu buňky resuspendujeme do 200 µl čisté vody a připravíme si požadovanou ředící řadu buněčné suspenze v 96 jamkové sterilní destičce.
- Pipetujeme kapky (10 µl) na selekční plotny (SD-U-H/-U) s indukčním médiem s 20% galaktózou a 10% rafinózou a necháme zaschnout.
- Plotny s vykapanou suspenzí buněk ponecháme růst v termostatu, každý den kontrolujeme a cca 3 den vyfotografujeme.

Použité ředění ředící řady:

10x – OD 0,5 (cca 1*10⁷ b./ml) resuspendovaná do 200 µl.

1. jamka 15 µl buněčné susp. +135 µl vody

jamka	1	2	3	4	5
přenášený objem (µl)	15	15	15	15	15
objem vody	135	135	135	135	135
počet buněk/jamka	751 879	75 187	7 518	751	75
výsev (µl)	10	10	10	10	10
počet buněk/kapka	50 120	5 012	501	50	5

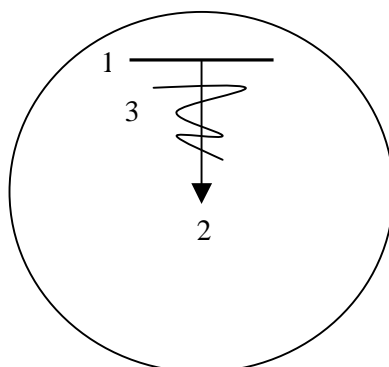
5x – OD 0,4 (cca $8 \cdot 10^6$ b./ml) resuspendovaná do 200 μ l

1. jamka 20 μ l buněčné susp. +130 μ l vody

jamka	1	2	3	4	5	6	7
přenášený objem (μ l)	30	30	30	30	30	30	30
objem vody	120	120	120	120	120	120	120
počet buněk/jamka	800 000	160 000	32 000	6 400	1280	256	51
výsev (μ l)	10	10	10	10	10	10	10
počet buněk/kapka	53 333	10 666	2133	426	85	17	3

Test pro ověření viability pomocí čarkování buněčné kultury na plotny pouze s galaktózou

- Z čerstvě narostlé biomasy kvasinek nesoucích příslušné konstrukty přeneseme skleněnou tyčinkou malý objem buněk na selekční plotnu (v tomto případě SD-U) s 30 % galaktózou a rozetřeme u kraje plotny do jedné čáry (čára 1 viz obr. 3.2.11).
- Čistou skleněnou tyčinkou rozetřeme biomasu ze středu čáry do středu plotny (čára 2) a nakonec další čistou skleněnou tyčinkou rozetřeme biomasu ze středové čáry do stran (čára 3).
- Po 3 dnech růstu v termostatu přeneseme buňky stejným způsobem na novou selekční plotnu (SD-U) s 30 % galaktózou a necháme opět růst další 3 dny. Poté plotny vyfotografujeme a vyhodnotíme růst.



Obr. 3.2.11 Schéma pro nanášení biomasy buněk.

3.2.12 Příprava proteinových lyzátů z buněk *S. cerevisiae*

- Jednou nebo několika samostatnými koloniemi zaočkujeme 5 ml příslušného selekčního média (SD-U), inkubujeme v 50 ml Erlenmayerově baňce na třepačce 18-20 h při 30°C (220 rpm, přes noc) pro nárůst do stacionární fáze (OD~4).
- Stanovíme OD₅₉₅ narostlé kultury, odebereme požadované množství ml do 1,5 ml mikrozkuřavky a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 2 000 g, 3 min, 20°C).
- Odstraníme supernatant a buňky resuspendujeme do 3 ml indukčního média (SD-U/gal-raf) na OD~2. Inkubujeme na rotátoru 3 h při 30°C (Hybridization oven; Stovall,USA).
- Po inkubaci kulturu centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 2 000 g, 3 min, 20°C). Supernatant odstraníme a buňky opláchneme 1 ml H₂O, opět centrifugujeme.
- Supernatant odstraníme, mikrozkuřavku ponoříme na 10 s do tekutého dusíku. Dále pracujeme v chladové místnosti.
- Ke zmrzlému sedimentu přidáme 100 µl čerstvě připraveného roztoku 1,85 M NaOH se 7% β-merkaptoethanolem; suspenzi intenzivně promícháváme na vortexu (2 min).
- Přidáme 100 µl 50% kyseliny trichloroctové (TCA), inkubujeme 2 min na ledu, poté centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 13 000 g, 10 min, 0°C).
- Supernatant odstraníme, k sedimentu přidáme 500 µl 1M Tris, lehce jej resuspendujeme špičkou a ihned znovu centrifugujeme (viz výše) po dobu 1 min.
- Odstraníme supernatant, sediment resuspendujeme v 100 µl 2× Laemmli pufri.
- Suspenzi inkubujeme 20 min při 80°C, poté ji umístíme do -20°C nebo eventuálně ihned analyzujeme pomocí SDS-PAGE.

3.2.13 Tris – glycinová SDS - gelová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE) s využitím soupravy BIO-RAD Mini Protean III Cell

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

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

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

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

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

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

4x Tris/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS; přefiltrováno přes filtr s póry 0,45 µm, skladováno v temnu při 4°C
SDS-PAGE pufr	25 mM Tris (pH 8,3); 190 mM glycin; 0,1% SDS
Odbarvovací roztok	20% metanol; 7% kys. octová
Barvicí roztok	20% metanol; 10% kys. octová; 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)

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

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

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

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

3.2.15 Imunodetekce proteinů na membráně

Membránu s přenesenými proteiny opláchneme roztokem TBS a blokujeme 30 minut až 1 hodinu ve zvoleném blokovacím roztoku (viz níže) na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1). Následně oplachujeme 3 x 5 min ve velkém objemu TTBS. Opláchnutou membránu zatavíme do polyetylenové fólie a inkubujeme s roztokem primární

protilátky přes noc (cca 16 – 18 h) na překlápěcí třepačce v lednici při 4°C. Nadbytečnou primární protilátku pak odstraníme odmytím v TTBS (3x 5 min).

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

TTBS 0,05% Tween 20 (Serva) v TBS

Blokovací roztoky:

3% želatina (Bio-Rad) v TBS – blokování 60 minut při pokojové teplotě

4% BSA (Milipore) v TBS – blokování 40 minut v 37°C

3% mléko (Sigma) v TBS – blokování 30 minut při pokojové teplotě

Roztoky pro naředění primární a sekundární protilátky:

1% želatina (Bio-Rad) v TTBS

1% BSA (Milipore) v TTBS

3% mléko (Sigma) v TTBS

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

Po odmytí nadbytečné sekundární protilátky membránu inkubujeme s vyvíjecím roztokem pro alkalickou fosfatázu (AP) nebo pro křenovou peroxidázu (HRP).

Vyvíjecí roztok pro AP necháme působit tak dlouho, až je barevný záznam na membráně dostatečně intenzivní (obvykle 10 - 60 min), nejvýše však přes noc. Reakci ukončíme opláchnutím membrány v 10 mM roztoku EDTA a membránu necháme osušit na filtračním papíru.

Pufr pro AP 100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 0,5 mM MgCl₂

Roztok A 30 mg NBT (Bio-Rad, USA) /ml 70% DMF

Roztok B 15 mg BCIP (Bio-Rad, USA) /ml DMF

Vyvíjecí roztok pro AP

1% roztok A

1% roztok B v pufru pro AP

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

SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Biotechnology) souprava obsahuje roztoky:

Roztok luminolu s enhancerem

Roztok stabilního peroxidu

Vyvíjecí roztok pro křenovou peroxidázu připravíme smísením roztoků z příslušné soupravy v poměru 1/1.

Pozn.: v kapitole výsledky je pro přehled u každé membrány vyznačen typ a ředění protilátky takto: 1. typ primární protilátky (ředění); 2. typ sekundární protilátky (ředění).

3.2.16 Pasážování RAT2 a 3T3 fibroblastů

Savčí buňky jsou standardně kultivovány v termostatu při 37° C a 5% CO₂ na miskách pro tkáňové kultury (Ø60 mm nebo Ø100 mm). Pasážování provádíme zpravidla po 3 až 4 dnech v závislosti na konfluenci misky. Na malé misce (Ø60 mm) kultivujeme buňky v 4–5 ml média, na velké misce (Ø100 mm) v 10 ml média. Kulturu pravidelně kontrolujeme pod mikroskopem (Nikon Eclipse TS 2000), abychom včas odhalili případnou kontaminaci. Před pasážováním je třeba nechat média a trypsin temperovat v 37°C ve vodní lázni po dobu 15 min.

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

- Aktivitu trypsinu zastavíme dodáním kompletního média DMEM (na malou misku 2 ml; na velkou misku 5 ml) a dokonale resuspendujeme agregáty buněk.
- Na novou misku s připraveným kompletním médiem přeneseme požadovaný objem buněčné suspenze - na malou misku (Ø60 mm) 0,4 ml suspenze ke 4 ml nového média; na velkou misku (Ø100 mm) 1 ml suspenze k 9 ml média. V případě transfekovaných buněk přidáváme selekční antibiotikum (geneticin 500 µg/ml).

3.2.17 Příprava a rozpěstování stabilátů RAT2 a 3T3 fibroblastů

Příprava stabilátů

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

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

Rozpěstování buněk ze stabilátů

- Zkumavku s buňkami vyjmeme z tekutého dusíku a přenášíme na ledu.
- Ve vodní lázni (37°C) necháme suspenzi buněk v mikroskopavce 1-2 min roztát a přeneseme k 5 ml temperovaného kompletního média v 15 ml zkumavce Falcon.

- Suspenzi v médiu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min) a supernatant opatrně odsajeme.
- Přidáme 5 ml nového kompletního média, resuspendujeme, přeneseme na připravenou misku s 5 ml média (příp. se selekčním antibiotikem) a zkontrolujeme pod mikroskopem.

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

3.2.18 Transfekce savčích fibroblastů (RAT2, 3T3)

Pro transfekci používáme plazmidovou DNA přečištěnou přes kolonku komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid, jejíž koncentraci změříme na spektrofotometru (Shimadzu UV 1650 PC).

Pro stabilní transfekci si připravíme malé misky (Ø 60 mm) o konfluenci cca 80%. Pro transientní transfekci, kdy buňky budou po 48 h zpracovány na lyzáty, volíme velké misky (Ø 100 mm). Před transfekcí si připravíme médium DMEM s neesenciálními aminokyselinami, ale bez FBS a obecných antibiotik. Pracujeme sterilně v boxu vysvíceném UV po dobu alespoň 15 min, abychom předešli kontaminaci.

1.den

- Z misek odsajeme médium a vyměníme ho za médium bez obecných antibiotik (dále ATB).

2.den

- Z misek nejprve odsajeme staré médium a přidáme médium bez FBS a ATB (na malou misku (Ø 60 mm) 3 ml, na velkou misku (Ø100 mm) 8 ml).
- V první mikrozkuhavce resuspendujeme v 0,5 ml média bez FBS a ATB 4-15 µg přečištěné plazmidové DNA a necháme 5 min inkubovat v boxu při laboratorní teplotě.
- Do druhé mikrozkuhavky si připravíme 0,5 ml média bez FBS a ATB a dle hmotnosti DNA přidáme lipofectamin – poměr můžeme zvolit:

1 µg DNA / 3 µl lipofectamin nebo 1 µg DNA / 2 µl lipofectamin. Médium s lipofectaminem důkladně resuspendujeme a necháme inkubovat 5 min.

- Poté obsah obou mikrozkmavek spojíme, důkladně resuspendujeme a ponecháme 20 min inkubovat. Během inkubační doby znovu odsajeme z misek médium a přidáme nové médium opět bez FBS a ATB ve stejném objemu.
- Po 20 minutách přidáme 1 ml směsi lipofectaminu a DNA k buňkám a necháme působit 6h v termostatu při 37° C.
- Po uplynutí 6 h médium odsajeme a vyměníme za médium s FBS a bez ATB.

3.den

- Médium z misek odsajeme a vyměníme za kompletní médium DMEM.

4. den

- Zkontrolujeme fluorescenci buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse TS 2000). V případě transientní transfekce z buněk připravíme proteinové lyzáty nebo buňky přeneseme na novou misku (Ø100 mm). Přidáme selekční antibiotikum (geneticin - 500 µg/ml), které pak přidáváme při každém pasážování. Asi po týdnu bychom měli pozorovat vlivem selekce v kultuře vyšší míru výskytu apoptotických buněk.

Použité reagensie:

Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) – transfekční činidlo

Selekční antibiotikum:

Geneticin (Gibco, Invitrogen) geneticin-sulfát, zásobní roztok 100 mg/ml
v miliporové vodě, sterilně přefiltrován

3.2.18 Testování růstu savčích fibroblastů nezávisle na ukotvení na neadhezivních poly-HEMA miskách

Příprava misek potažených poly-HEMA

- Připravíme si zásobní roztok poly-2-hydroxyethylmetakrylátu (poly-HEMA) v 95% etanolu (120 mg/ml) v 50 ml polypropylenové zkumavce, kterou kolem zavřeného víčka zajistíme parafilmem, aby nedocházelo k přílišnému odpařování etanolu.
- Zkumavku necháme inkubovat na horizontální třepačce v 37°C při vysokých otáčkách (220 rpm) do druhého dne, aby se krystalky poly-HEMA dokonale rozpustily.
- Po inkubaci centrifugujeme zásobní roztok (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 30 min), aby se usadily nerozpuštěné zbytky krystalků.
- Zásobní roztok ředíme 1:10 do 95% ethanolu a ve sterilním prostředí nanášíme na misky pro tkáňové kultury. Na malou misku (Ø 60 mm) nanese 2,7 ml ředěného roztoku (0,95 µl roztoku/mm² plochy misky). Poté necháme misky schnout rozprostřené po jedné v termostatu při 37°C alespoň po dobu 48 h.
- Před vyséváním buněk necháme otevřené misky sterilizovat UV zářením v boxu po dobu 20 min, poté opláchneme 1x PBS a následně DMEM médiem bez séra.

Výsev buněk na poly-HEMA misky

- Pro výsev na poly-HEMA misky připravíme od každé linie savčích buněk jednu malou misku (Ø 60 mm) s konfluencí alespoň 50%. V den výsevu necháme na adherované buňky působit 0,5 ml trypsinu po dobu 6 – 8 min (viz kap. 3.2.16) a poté dokonale resuspendujeme do 10 ml kompletního média DMEM.
- Ze suspenze nanese 13 µl na Bürkerovu komůrku a pomocí mikroskopu a programu NisElements (Nikon) stanovíme počet buněk na mililitr.
- Na malou misku vyséváme (Ø 60 mm) 30 000 – 50 000 buněk do 4 ml kompletního média DMEM se selekčním antibiotikem (geneticin – 500 µg/ml) a necháme růst v termostatu při 37°C podobu 10 – 20 dnů

(od každé linie vyséváme paralelně 2 misky). Průběžně buňky kontrolujeme pod mikroskopem a po uplynutí určené doby narostlé buňky spočítáme.

Počítání buněk na poly-HEMA miskách

Misky s narostlými buňkami (2 misky od každé linie savčích buněk) vyjmeme z termostatu a počítání buněk provádíme nesterilně.

- Z misky odsajeme médium do dvou 1,5 ml mikrozkuavek, poté ještě opláchneme 1 ml kompletního média (sběr zbytku buněk) a odsajeme do třetí 1,5 ml mikrozkuavky. Mikrozkuavky centrifugujeme na stolní centrifuze (180 g, 2 min), poté buňky spojíme do 0,5 ml čerstvého média do jedné mikrozkuavky a opět centrifugujeme.
- Po centrifugaci odsajeme médium, přidáme 0,5 ml trypsinu a ponecháme inkubovat cca 5 min při laboratorní teplotě. Během inkubace buňky několikrát resuspendujeme pipetou s modrou špičkou.
- Po vymizení agregátů buněk opět suspenzi centrifugujeme a resuspendujeme do 100 μ l nového média DMEM. Naneseme 13 μ l na Bürkerovu komůrku, pomocí mikroskopu a programu NisElements (Nikon) stanovíme počet buněk na mililitr.

10 x PBS 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄.12 H₂O;
1,4 mM KH₂PO₄, pH upraveno na 7,3

3.2.19 Testování schopnosti tvorby foci u savčích fibroblastů („Focus forming assay“)

- Pro výsev buněk pro testování tvorby foci necháme narůst od každé linie jednu velkou misku (\varnothing 10 mm) do 90 % konfluence. V den výsevu na misku s adherovanými buňkami necháme působit 1 ml trypsinu po dobu 6 - 8 min (viz pasážování buněk kap. 3.2.16) a poté buňky důkladně resuspendujeme do 10 ml kompletního média DMEM.
- Ze suspenze naneseme 13 μ l na Bürgerovu komůrku a pomocí mikroskopu a programu NisElements (Nikon) stanovíme počet buněk na mililitr.

- Na klasické velké misky pro tkáňové kultury (Ø 10 mm) vyséváme $4 \cdot 10^6$ buněk do 10 ml kompletního média se selekčním antibiotikem (geneticin - 500 µg/ml) a inkubujeme v termostatu při 37°C.
- Po 10 – 20 dnech po dosažení úplné konfluence buněk na misce bychom měli pozorovat tvorbu foci (kupiček buněk rostoucích v agregátech), které poté spočítáme pomocí mikroskopu a programu NisElements (Nikon).

3.2.20 Příprava proteinových lyzátů ze savčích buněk

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

- Velkou misku (Ø100 mm) s narostlými buňkami přeneseme z termostatu na led, necháme cca 5 minut ochladit a nesterilně odsajeme médium.
- Misku 2x opláchneme 5 ml vychlazeným 1x PBS a odsajeme.
- Na každou misku přidáme 1 ml premixu lyzačního pufru RIPA a inhibitorů. Necháme lyzovat 12-15 min při 0°C na překlápěcí třepačce (Biosan, MR-1).
- Buňky z povrchu misky seškrábneme škrabkou, převedeme do mikroskopavky a protahujeme 6x-12x injekční stříkačkou s jehlou 21G dokud není suspenze čirá a bez buněčných agregátů.
- Suspenzi centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11 000g, 20 min, 0°C).
- Po centrifugaci odsajeme opatrně supernatant, převedeme do nové mikroskopavky a odebereme aliquot 50 µl pro stanovení proteinové koncentrace. Lyzáty necháme zamrazit v -20°C.

10 x PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH upraveno na 7,3
pufr RIPA	0,15M Na Cl; 50mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% Nodinet P – 40; 0,1% SDS; 1% deoxycholát sodný; 5 mM EDTA; 50 mM NaF

Zásobní roztok proteázových inhibitorů (100x):

0,5 mg/ml leupeptin

0,5 mg/ml aprotinin

12,5 mg/ml pefabloc

Zásobní roztok fosfatázových inhibitorů (100x):

Phosphatase Inhibitor Mix II (Serva, Germany)

3.2.21 Stanovení koncentrace proteinů – Folinova metoda

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

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

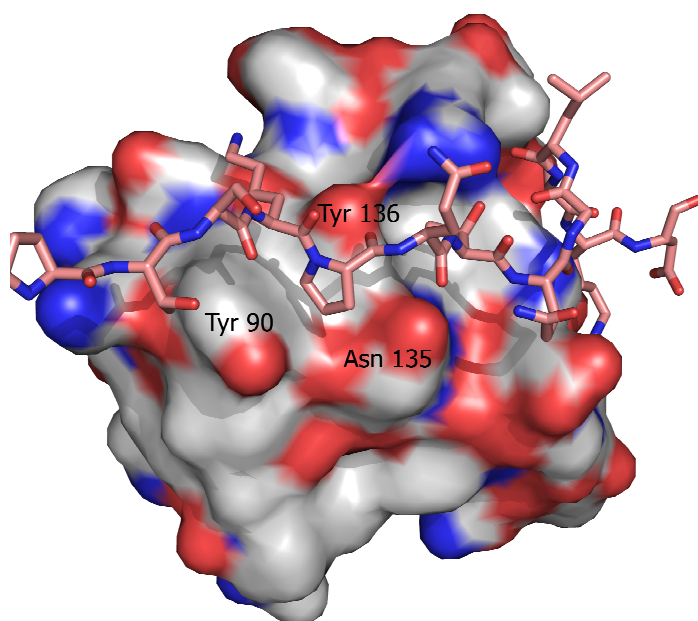
BSA 2mg/ml (μl)	pufir RIPA (μl)	Výsledná koncentrace BSA (μg/μl)
0	50	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1 500

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

Ze změřených dat standardů o známé koncentraci vytvoříme graf závislosti absorbance na koncentraci. Dopočítáme koncentraci proteinů v našich lyzátech a upravíme koncentraci ve všech vzorcích na srovnatelnou hladinu pomocí ředění pufrům RIPA a poté doplníme $\frac{1}{4}$ objemu Laemmli pufrům (6x koncentrovaný). K takto upraveným lyzátům přidáme $\frac{1}{20}$ objemu 1 M DTT, 5 minut povaříme v bločku při 95° C a nanášíme na gel pro SDS –PAGE (viz kap.3.2.13).

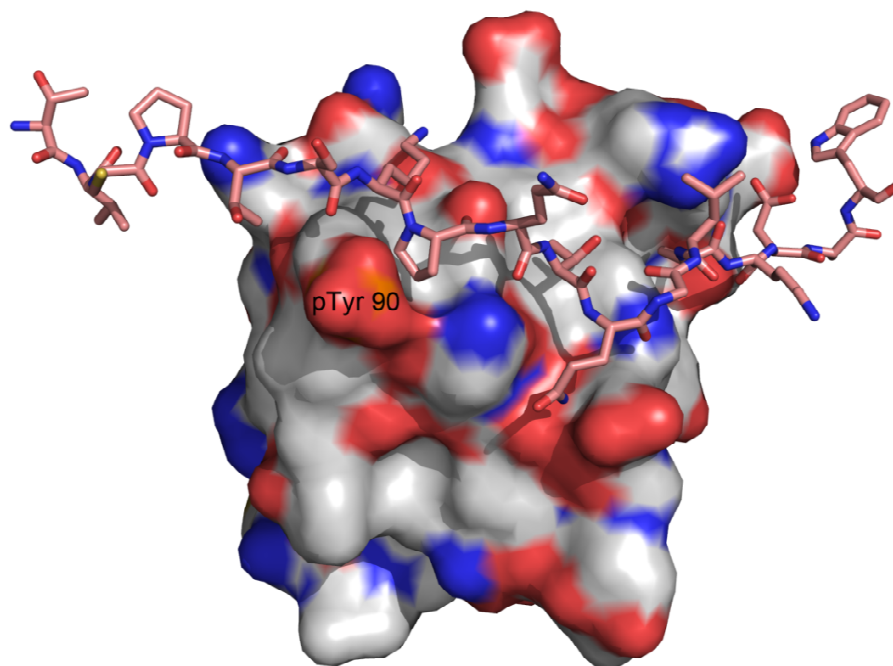
4. Výsledky

Cílem této práce je objasnit vliv tyrozínu 90 v SH3 doméně na regulaci kinázové aktivity a význam pro onkogenní vlastnosti proteinu Src. V inaktivní konformaci tvoří tyrozín 90 spolu s asparaginem 135 a tyrozínem 136 jednu z hydrofóbních kapes, do které se vkládá prolin 250 z CD linkeru (obr. 4a).



Obr. 4a SH3 doména kinázy Src s Tyr 90 při vazbě úseku CD linkeru. Barvy prvků SH3 domény: C, H, N, O; barvy prvků CD linkeru: C, H, N, O (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997). Vyobrazeno pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA).

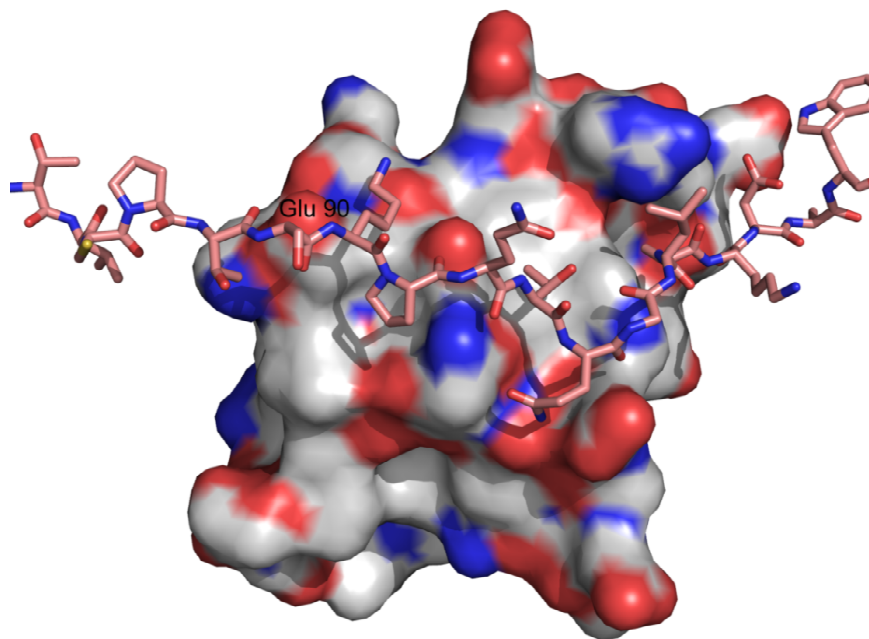
Při homologním modelování struktury CD linkeru s hydrofóbní kapsou s fosforylovaným tyrozínem 90 se ukázalo, že pravděpodobně dojde k zmenšení vazebného povrchu hydrofóbní kapsy a že fosforylovaný zbytek bude pravděpodobně zaujímat takovou polohu, která bude překážet vazbě prolinového zbytku obsaženého v CD linkeru (obr. 4b). Ve výše popsaném stavu by byla vazba SH3 domény a CD linkeru oslabena, což by se negativně promítlo i na udržování inaktivní konformace.



Obr. 4b SH3 doména kinázy Src s pTyr 90 při vazbě úseku CD linkeru. Barvy prvků SH3 domény: C, H, N, O, P; barvy prvků CD linkeru: C, H, N, O (PDB ID: 1Y57; Cowan-Jacob *et al.*, 2005). 3D model vytvořen pomocí funkce „Build“ v programu The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA) a vyobrazen pomocí téhož programu. Model vytvořil Dr. Novotný.

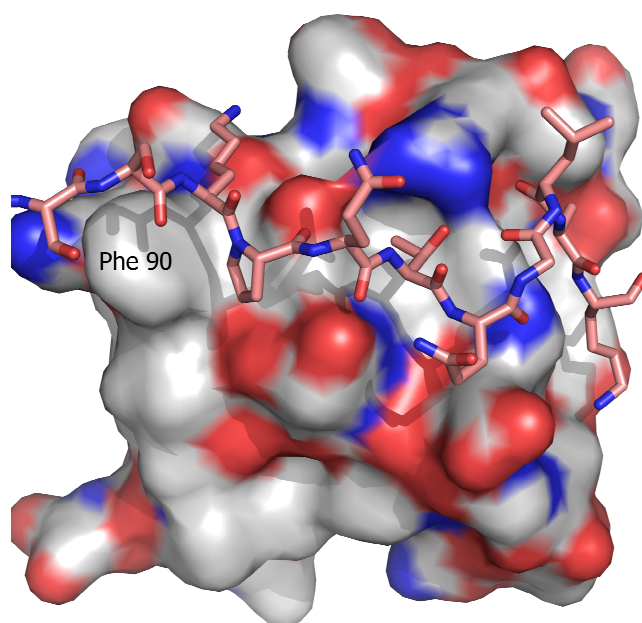
Pro objasnění vlivu fosforylace tyrozínu 90 na aktivaci kinázy Src bylo třeba provést záměnu za tuto aminokyselinu tak, aby nová aminokyselina buď napodobovala fosforylovaný zbytek nebo byla nefosforylovatelná, ale strukturně blízká tyrozínu.

Aminokyselinová záměna za glutamát se jeví jako nejvhodnější pro napodobení fosforylovaného stavu tyrozínu. Při homologním modelování struktury CD linkeru s hydrofóbní kapsou obsahující záměnu tyrozínu za glutamát se ukázalo, že vazebný povrch bude částečně redukován a CD linker s prolinem 250 se nebude tak silně vázat do takto formovaného prostoru (obr. 4c). Navíc postranní řetězec glutamátu má při fyziologickém pH v buňce záporný náboj, stejně jako fosfátová skupina na fosforylovaném zbytku.



Obr. 4c SH3 doména kinázy Src s Glu 90 při vazbě úseku CD linkeru. Barvy prvků SH3 domény: C, H, N, O; barvy prvků CD linkeru: C, H, N, O (PDB ID: 1Y57; Cowan-Jacob *et al.*, 2005). 3D model byl vytvořen v programu The MODELLER 9.2, kontrolován pomocí programů ProCheck a WhatCheck a vyobrazen pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA). Model vytvořil Dr. Novotný.

Záměna tyrozínu za fenylalanin může nejlépe napodobit situaci, kdy není postranní řetězec tyrozínu fosforylován. Fenylalanin je strukturně velmi podobný tyrozínu, až na absenci OH skupiny. Při homologním modelování struktury CD linkeru a hydrofóbní kapsy obsahující Phe 90 zůstává prostorová konformace vazebného povrchu přibližně stejná, jen celková hydrofobicita se vlivem absence OH skupiny pravděpodobně zvýší (obr. 4d). Zvýšení hydrofobicity vazebné kapsy by mohlo zesílit vazbu mezi SH3 doménou a CD linkerem a posílit intramolekulární inhibiční vazbu udržující inaktivní konformaci.



Obr. 4d SH3 doména kinázy Src s Phe 90 při vazbě úseku CD linkeru. Barvy prvků SH3 domény: C, H, N, O; barvy prvků CD linkeru: C, H, N, O (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997). Vyobrazeno pomocí The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, USA).

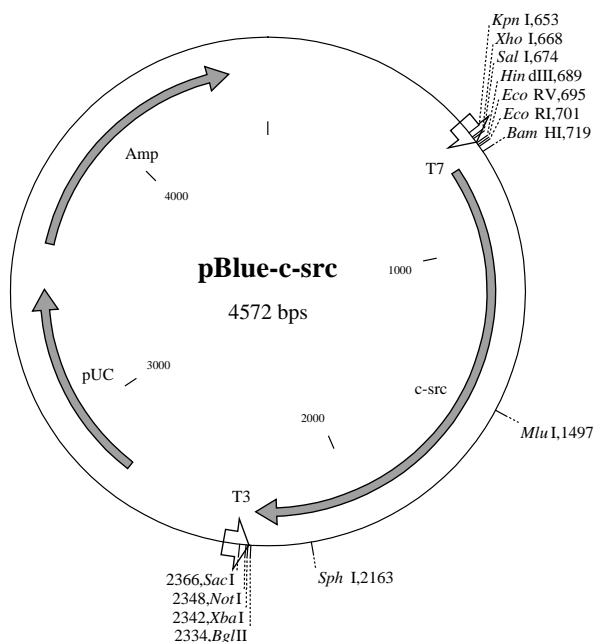
Při pokusech, které zahrnovaly práci s kvasinkovými a savčími buňkami a jejichž výsledky jsou součástí této diplomové práce, jsem navázala na experimenty svého školitele Dr. Brábka a Dr. Rösela. Na tomto místě bych ráda krátce shrnula hlavní výsledky předchozích experimentů.

Dr. Brábek připravil v rámci své disertační práce konstrukty s variantami proteinu Src pro bakteriální systém a pro expresi v kvasinkách (viz tab. 4a). Expresní kvasinkové konstrukty (pYES2, pRS313) byly dále využity pro experimenty zahrnuté do této diplomové práce. Některé konstrukty pak využil Dr. Rösel pro tvorbu templátového plazmidu pro mutagenezi a pro přípravu savčích expresních vektorů.

Tab.4a Přehled konstruktů vytvořených dr. Brábkem.

Označení konstruktů	Vektor	Inzert	Restrikční místa pro vložení inzertu	Poznámka
pJB 58	pYES2	<i>c-src</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Inzert získán na plazmidu pcDNA (dar prof .Svoboda)
pJB 59	pYES2	<i>c-src</i> Y527F	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Inzert získán na plazmidu pcDNA (dar prof .Svoboda)
pJB 27	pBlue KS(+)	<i>v-src</i> PRC	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	Inzert získán na plazmidu pATV-8 (dar prof. G.S.Martin)
pJB 38	pYES2	<i>v-src</i> PRC	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Inzert získán na plazmidu pATV-8 (dar prof. G.S.Martin)
pJB 61	pRS313	<i>csk</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	Inzert získán na plazmidu pYpAB23BXN (dar prof. D.O.Morgan)

Dr. Rösel připravil plazmid pBluescript s inzertem *c-src* (obr. 4e), který sloužil jako templát pro zavedení bodové mutace v sekvenci kódující SH3 domény. Mutageneze *in vitro* byla provedena pomocí soupravy QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. V použitých primerech byl TAC kodón pro Tyr 90 za zaměněn za GAG kódující Glu 90 (obr. 4f, kompletní sekvence primerů a výsledky sekvenování viz příloha I, II.A, II.B). Vzniklá varianta kinázy Src s bodovou záměnou Y90E v SH3 doméně byla poté vložena do savčího vektoru.



Obr. 4e Plazmid pBluescript s vloženým genem *c-src* sloužil jako templát pro zavedení bodové mutace v SH3 doméně pro aminokyselinovou záměnu Tyr 90 za Glu 90.

T F V A L Y D Y E S R T

WT CCACTTTTCGTGGCTCTC **TAC** GACTACGAGTCCCGGACTG

Y90E CCACTTTTCGTGGCTCTC **GAG** GACTACGAGTCCCGGACTG

Obr. 4f Úsek sekvence genu *src* (resp. aminokyselinová sekvence) a pod ním sekvenci jednoho z navržených primerů (YE-F) se záměnou v kodónu pro Tyr 90 za Glu 90.

Pro expresi variant Src v myších fibroblastech linie 3T3 byl zvolen vektor pIRES2-EGFP. IRES sekvence v tomto vektoru umožňuje translaci vloženého genu a zeleného fluorescenčního proteinu (EGFP) z jedné bicistronní mRNA. Ve sledovaných buňkách pak fluorescence koresponduje s hladinou exprese produktu daného genu a umožňuje snadnou selekci populace buněk s požadovanou mírou exprese daného proteinu. Varianta genu Y90E-*src* spolu s geny *c-src* a *v-src* byly vloženy do pIRES2-EGFP (viz tab. 4b).

Tab. 4b Konstrukty vytvořené dr. Röselem.

Vektor	Inzert	Restrikční místa pro vložení inzertu	Poznámka
pBluescript SK(+)	<i>c-src</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	inzert získán z plazmidu pJB 58
pBluescript SK(+)	Y90E- <i>src</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	získán mutagenezí pBluescript- <i>c-src</i>
pIRES2-EGFP	<i>v-src</i> PRC	<i>Bgl</i> II/ <i>Eco</i> RI	inzert získán z plazmidu pJB 27
pIRES2-EGFP	Y90E- <i>src</i>	<i>Bgl</i> II/ <i>Sac</i> I	
pIRES2-EGFP	<i>c-src</i>	<i>Bgl</i> II/ <i>Sac</i> I	

Proteinové produkty genů *v-src* a *c-src* sloužily k porovnání vlivu mutace Y90E na kinázovou aktivitu – zda se kinázová aktivita Y90E-Src bude přibližovat aktivovanému proteinu v-Src nebo zůstane spíše na úrovni buněčného proteinu c-Src.

Vytvořené konstrukty pIRES2-EGFP včetně prázdného vektoru byly transfekovány do 3T3 fibroblastů. Aby linie stabilně transfekovaných fibroblastů, exprimujících varianty proteinu Src, měly vzájemně srovnatelnou hladinu proteinu Src, byly dvakrát selektovány pomocí FACS („fluorescence activated cell sorting“) na podobnou úroveň fluorescence a tím byly vytvořeny populace buněk se srovnatelnou mírou exprese.

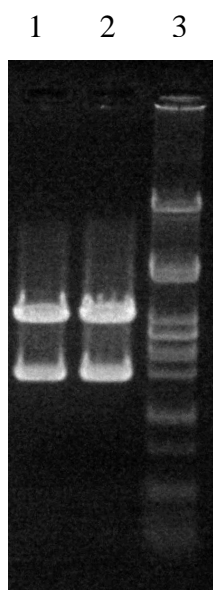
4.1 Příprava variant genu *src* pro expresi v kvasinkách a savčích fibroblastech

4.1.1 Mutageneze Tyr 90 v SH3 doméně kinázy Src za Phe 90

Pro sledování vlivu fosforylaci napodobující mutace Y90E na kinázovou aktivitu v kvasinkách a analýzu změny fenotypu a fosforylace substrátů Src v savčích buňkách bylo třeba vytvořit i variantu kinázy Src se záměnou Tyr 90 za nefosforylovatelný a hydrofóbní Phe 90 (Y90F).

Pro tento účel byly navrženy a komerčně připraveny primery (YF-R a YF-F) se substitucí kodónu TAC pro Tyr 90 za TTC pro Phe 90 (sekvence primerů viz. kap. 3.1.6). Tyto primery byly komplementární v opačné orientaci ke stejnému úseku DNA na templátovém plazmidu, kde měla proběhnout výměna Tyr 90 za Phe 90. Jako templátový plazmid byl použit vektor pBluescript nesoucí gen *c-src*, který byl před provedením mutageneze *in vitro* izolován z *E. coli* kmene DH5 α pomocí soupravy NucleoSpin[®] Plasmid. Konstrukt pBluescript s inzertem *c-src* měl vhodnou velikost (cca 4,7 kb) pro použití soupravy QuikChange[®] II Site Directed Mutagenesis Kit.

Po proběhnutí PCR byl v reakční směsi přítomen templátový plazmid, nově vytvořený plazmid s požadovanou mutací a hybridní plazmidová DNA s kombinací vláken obou předchozích plazmidů. Pro eliminaci templátového plazmidu a hybridní formy plazmidu byla do reakční směsi přidána restriční endonukleáza *DpnI* a štěpení probíhalo po dobu 1,5 h. Po tomto selekčním kroku byly z reakční směsi odebrány 3 μ l a použity pro transformaci *E. coli* kmene DH5 α elektroporací. Transformované buňky byly selektovány na plotnách s ampicilinem. Ze dvou náhodně vybraných narostlých kolonií byla izolována plazmidová DNA pomocí soupravy NucleoSpin[®] Plasmid a restričně ověřena přítomnost inzertu (obr. 4.1.1).



1. pBluescript-Y90F-*src* – klon f1
2. pBluescript-Y90F-*src* – klon f2
3. marker Lambda DNA/*Pst*I

Obr. 4.1.1 Restrikční ověření plazmidu pBluescript-Y90F-*src* (klon f1 a f2) pomocí restriktaáz *Bam*HI a *Xba*I po proběhnutí mutagenese; vrchní pruh – pBluescript (2949 bp), spodní pruh - Y90F-*src* (1623 bp).

Plazmidová DNA z těchto dvou klonů (označení f1 a f2) byla poslána k sekvenaci. Bylo ověřeno, že mutagenese Y90F v SH3 doméně proběhla úspěšně (viz příloha II.C). Pro pozdější vložení inzertu do kvasinkových a savčích vektorů byla použita plazmidová DNA z klonu f1.

4.1.2 Příprava variant kinázy Src s mutací Y527F

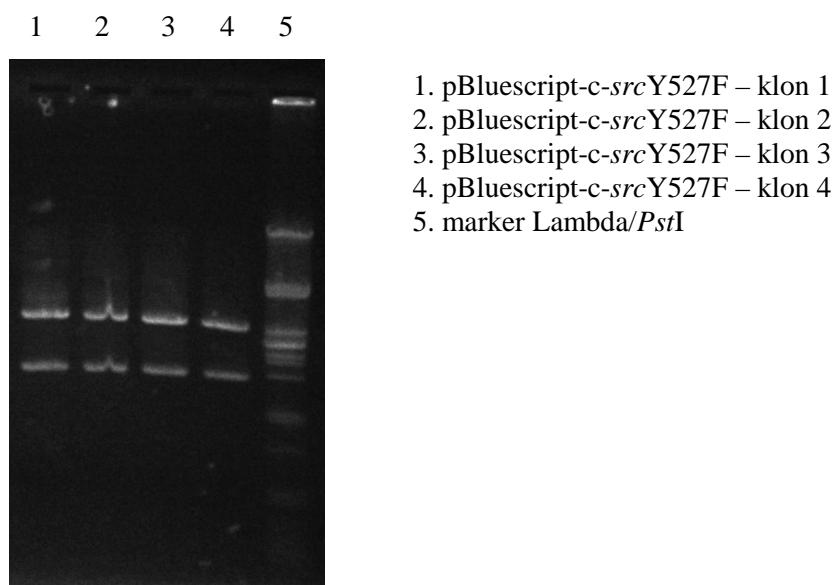
Tyrozín 527 je klíčovým regulačním zbytkem, jehož fosforylace a následná intramolekulární vazba SH2 doménou negativně ovlivňuje kinázovou aktivitu proteinu Src. Při záměně Y527F se kinázová aktivita vlivem narušení jedné z inhibičních vazeb značně zvyšuje, ale druhá regulační interakce SH3 domény s CD-linkerem a N-lalokem katalytické domény je stále přítomna a může negativně ovlivňovat kinázovou aktivitu (Cooper *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1997).

Pro určení významu mutací Y90E a Y90F v kontextu SH2 aktivované formy kinázy Src bylo třeba vytvořit varianty proteinu, ve kterých by byly přítomny substituce Y90E a Y90F zároveň s Y527F. Pro tvorbu těchto konstruktů byl využit

vektor pYES2 nesoucí *c-src* se sekvenční záměnou kodónů Y527F (označení pJB59), který byl již dříve připraven na našem pracovišti (viz úvod kap. 4).

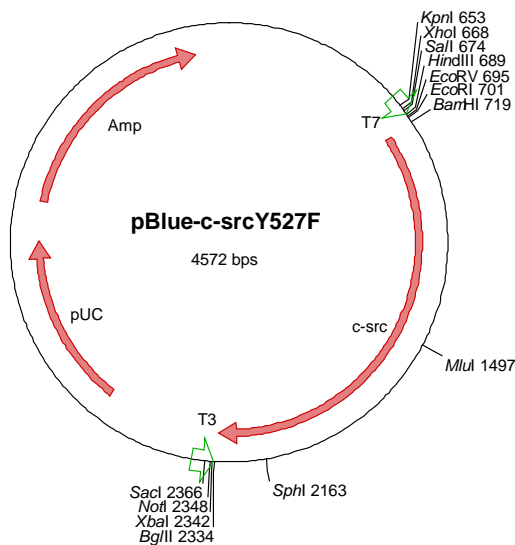
Čerstvě izolovaná plazmidová DNA konstruktů pJB59 a prázdného vektoru pBluescript byla štěpena kombinací restriktáz *Bam*HI/*Xba*I. Restrikční směsi byly elektroforeticky rozděleny v 1% agarózovém gelu. Fragment *c-src*Y527F (1623 bp) a linearizovaný prázdný vektor pBluescript (2949 bp) byly z gelu vyříznuty a DNA izolována pomocí soupravy NucleoSpin[®] Extract 2 in 1.

Fragment *c-src*Y527F byl poté vložen přes *Bam*HI a *Xba*I místa do plazmidu pBluescript. Ligační směs byla transformována do *E. coli* kmene Sure a transformované klony byly selektovány na plotnách s ampicilinem. Ze čtyř narostlých klonů byla izolována plazmidová DNA alkalickou metodou a úspěšnost ligace byla ověřena štěpením restriktázami *Bam*HI/*Xba*I. (viz obr. 4.1.2). Pro tvorbu dalších konstruktů byla používána DNA izolovaná z klonu č.1.



Obr. 4.1.2 Restrikční ověření plazmidu pBluescript-*c-src*Y527F (klony 1-4) pomocí restriktáz *Bam*HI a *Xba*I; vrchní pruh – pBluescript (2949 bp), spodní pruh - *c-src*Y527F (1623 bp).

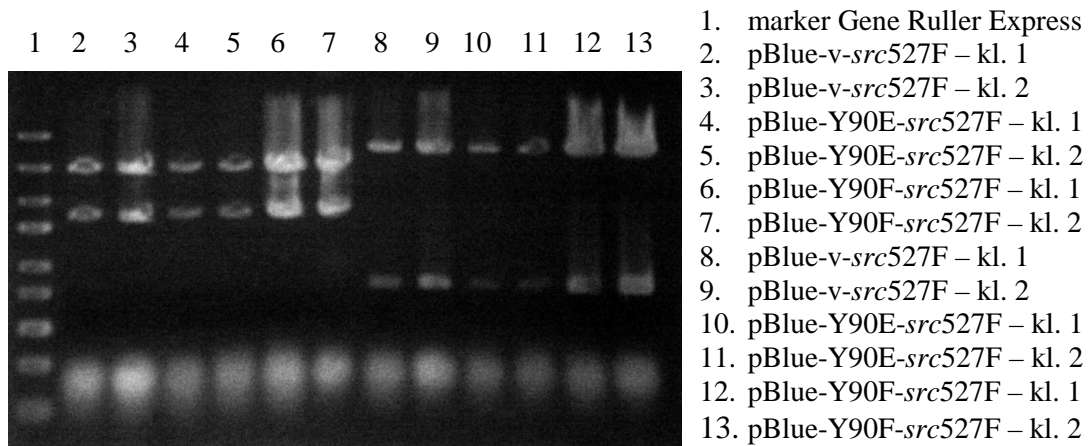
Plazmid pBluescript s *c-src*Y527F (obr.4.1.3) byl výchozí pro tvorbu konstruktů, kdy byl úsek sekvence kódující N-koncovou část (cca prvních 260 AK) proteinu c-Src vyštěpen, nahrazen shodným úsekem z variant *v-src* PRC, Y90E-*src*, Y90F-*src* a vznikly tak konstrukty nesoucí různé SH3 domény a zároveň mutaci Y527F (viz dále).



Obr. 4.1.3 Plazmid pBluescript s inzertem *c-srcY527F*, který byl použit pro tvorbu variant proteinu Src obsahujících různé typy SH3 domén a mutaci Y527F. Vyznačena jsou některá unikátní restrikční místa.

Pro získání sekvencí kódujících N-koncovou část byla čerstvě izolovaná plazmidová DNA konstruktů pYES-*v-src*PRC (pJB38), pBluescript-Y90E-*src*, pBluescript-Y90F-*src* a pBluescript-*c-srcY527F* štěpena kombinací restriktaáz *Bam*HI/*Mlu*I a restrikční směsí rozdělena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Z gelu byl v případě pBluescript-*c-srcY527F* izolován pomocí soupravy NucleoSpin[®] Extract 2 in 1 fragment o velikosti 3794 bp, u ostatních konstruktů fragmenty o velikosti 778 bp.

Vyštěpené fragmenty z pYES-*v-src*PRC (pJB38), pBluescript-Y90E-*src* a pBluescript-Y90F-*src* byly spojeny s fragmentem z pBluescript-*c-srcY527F* ligací. Ligační směsi byly transformovány do buněk *E. coli* kmene DH5 α , které byly selektovány na plotnách s ampicilinem. Z každé plotny byla ze dvou klonů izolována plazmidová DNA alkalickou metodou a úspěšnost ligace byla ověřena restrikčním štěpením kombinací restriktaáz *Bam*HI/*Mlu*I a *Bam*HI/*Xba*I (obr. 4.1.4). Pro další práci byla použita DNA z klonů 1.



Obr. 4.1.4 Restrikční ověření pBluescript s vloženými variantami genu *src*. Dráha 2. až 7. kombinace restriktáz *Bam*HI/*Xba*I; vrchní pruhy – pBluescript (2949 bp), spodní pruhy – varianty *src* (1623 bp). Dráha 8. až 13. kombinace restriktáz *Bam*HI/*Mlu*I; vrchní pruhy – pBluescript s částí *src* (3794 bp), spodní pruhy – sekvence kódující N koncové úseky variant *src* (778 bp).

Připravené konstrukty s inzerty genu *src* s různými variantami SH3 domén a nesoucí mutaci Y527F, použité pro další práci, jsou pro přehled shrnuty v tabulce 4.1.

Tab. 4.1 Konstrukty pBluescript SK (+) s variantami genu *src*

Označení plazmidu s inzertem	Inzert (vložení přes restrik. místa <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I)	Zaměněná sekvence v inzertu kód. N koncový úsek (vložení přes restrik.místa <i>Bam</i> HI/ <i>Mlu</i> I)
pBlue- <i>c-src</i> 527F	<i>c-src</i> Y527F	--
pBlue- <i>v-src</i> 527F	<i>c-src</i> Y527F	<i>v-src</i> Prague C
pBlue-Y90E- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> Y527F	Y90E- <i>src</i>
pBlue-Y90F- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> Y527F	Y90F- <i>src</i>

4.2 Exprese variant genu *src* v kvasinkách *S. cerevisiae*

Heterologní exprese tyrozínkinázy c-Src v *S. cerevisiae* je velmi výhodným nástrojem pro studium aktivity a regulace tohoto proteinu. Gen *c-src* je přítomen u všech mnohobuněčných živočichů a kináza c-Src plní spolu s dalšími signálními partnery nezastupitelnou úlohu v regulaci celé řady buněčných procesů. V jednobuněčných kvasinkách nebyly popsány žádné pravé proteintyrozínkinázy, avšak fosforylaci tyrozínových zbytků zde mohou zajišťovat duálně specifické proteinkinázy (Florio *et al.*, 1994). Při expresi c-Src v kvasinkách není tudíž kinázová aktivita ovlivněna vazbou interakčních partnerů ani přítomností určité endogenní hladiny tohoto proteinu. Další nesporná výhoda heterologní exprese v kvasinkách je metodická nenáročnost při jejich kultivaci, vysoká účinnost transformace a z toho vyplývající úspora času.

4.2.1 Příprava konstruktů pro expresi variant genu *src* v kvasinkách *S. cerevisiae*

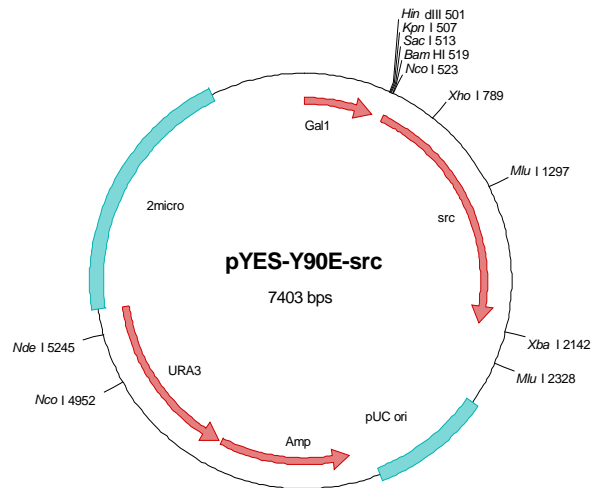
Pro expresi variant proteinu Src v kvasinkách byl zvolen vektor pYES2, který se již na našem pracovišti pro tento účel úspěšně používal. pYES2 je expresní vektor replikativního typu pro kvasinkový systém obsahující GAL1 promotor, který umožňuje snadnou indukci exprese sledovaného proteinu.

K dispozici byly dříve připravené vektory pYES2-*c-src* (pJB 58), pYES2-*v-src*PRC (pJB 38) a pYES2-*c-src*Y527F (pJB 59) (viz úvod kap. 4). Bylo tedy zapotřebí navíc vytvořit konstrukty pYES2 nesoucí varianty *c-src*Y90E, *c-src*Y90F a varianty s kombinací určité sekvence SH3 domény a s mutací Y527F (viz tab. 4.1, v předchozí kapitole)

Nejdříve byla izolovaná plazmidová DNA konstruktů nesoucích příslušné varianty kinázy Src (pBlue-*c-src*527F, pBlue-*v-src*527F, pBlue-Y90E-*c-src*527F, pBlue-Y90F-*c-src*527F, pBlue-*c-src*Y90E, pBlue-*c-src*Y90F), plazmidová DNA vektoru pYES2 štěpena kombinací restriktáz *Bam*HI/*Xba*I a restrikní směsi byly naneseny na 1% agarózový gel. Po rozdělení fragmentů elektroforézou byl v případě štěpeného pYES2 izolován z gelu fragment o velikosti 5780 bp, u ostatních

konstruktů byly izolovány fragmenty variant *src* o velikosti 1623 bp. Izolace fragmentů z gelu byla provedena pomocí soupravy NucleoSpin[®] Extract 2 in 1.

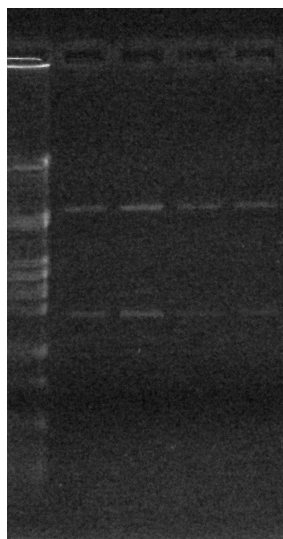
Vyštěpené fragmenty variant *src* byly poté ligovány do pYES2 otevřeného v polylinkeru v *Bam*HI a *Xba*I místě (viz obr. 4.2.1).



Obr. 4.2.1 Příklad jednoho z vytvořených konstruktů pYES2, v tomto případě s vloženým inzertem Y90E-*src*.

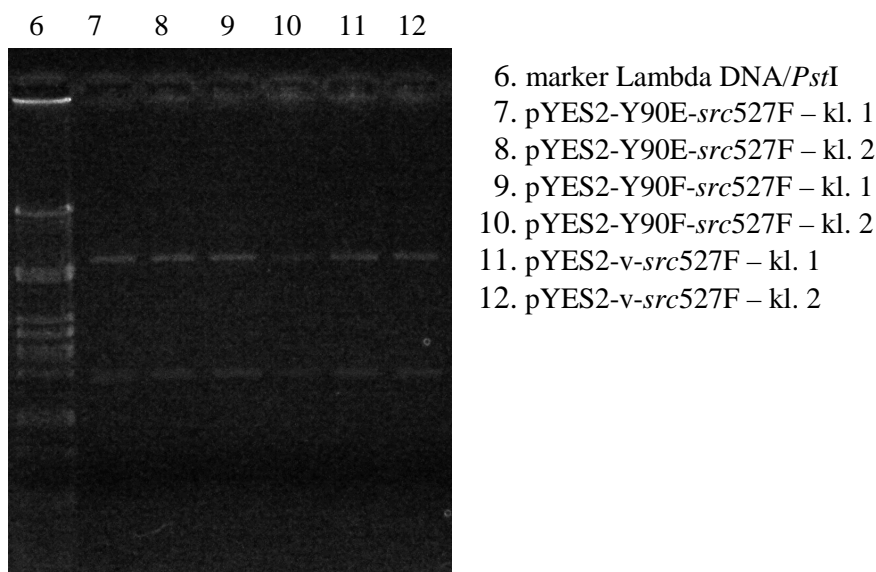
Ligační směs byla transformována do buněk *E. coli* kmene DH5 α a transformované klony byly selektovány na plotnách s ampicilinem. Ze dvou narostlých kolonií od každého konstruktů byla izolována plazmidová DNA pomocí soupravy NucleoSpin[®] Plasmid a restričně ověřena úspěšnost ligace. (obr. 4.2.2a, b)

1 2 3 4 5



1. marker Lambda DNA/*Pst*I
2. pYES2-Y90F-*src* – klon 1
3. pYES2-Y90F-*src* – klon 2
4. pYES2-Y90E-*src* – klon 1
5. pYES2-Y90E-*src* – klon 2

Obr. a



Obr. b

Obr. 4.2.2a,b Restriční ověření plazmidů pYES2 s vloženými variantami genu *src* pomocí restriktáz *Bam*HI a *Xba*I. Vrchní pruhy – vektor pYES2 (5780 bp), spodní pruhy – varianty genu *src* (1623 bp).

Příprava konstruktů pYES2 s variantami genu *src* (viz tab. 4.2.1) se zdařila a bylo možno přistoupit k jejich transformaci do *S. cerevisiae*.

Tab. 4.2.1 Vytvořené konstrukty pro expresi variant proteinu Src v kvasinkách

Označení konstruktů pYES2 s vloženým inzertem	Inzert vložený přes restriční místa <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pYES2-Y90E- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90E
pYES2-Y90F- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90F
pYES2-Y90E- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90E a Y527F
pYES2-Y90F- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90F a Y527F
pYES2-v- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> s SH3 doménou v- <i>src</i> PRC a záměnou Y527F

4.2.2 Transformace *S. cerevisiae* konstrukty pYES2 s vloženými variantami genu *src*

Pro expresi variant kinázy Src byl vybrán kmen EGY48 α , který byl již dříve v naší laboratoři používán pro expresi proteinu Src. Konzerva s kulturou kmene EGY48 α , dlouhodobě skladovaná při -80°C , byla poskytnuta členem naší laboratoře Mgr. Ondřejem Gahurou.

Pro transformaci konstrukty pYES2 nesoucí různé varianty proteinu Src (viz tab. 4.2.2) byla část kvasinkových buněk z glycerolové konzervy sterilně přenesena na čerstvě připravené plotny s médiem YPAD a po dostatečném nárůstu biomasy byly tyto buňky použity k transformaci.

Tab. 4.2.2 Konstrukty pYES2 transformované do kvasinek kmene EGY48 α

Označení konstruktu pYES2 s vloženým inzertem	Popis inzertu	Označení proteinového produktu
pYES2 – prázdný vektor	bez inzertu (kontrola)	--
pJB 58: pYES2- <i>c-src</i> *	<i>c-src</i> wt forma	<i>c-Src</i>
pYES2-Y90E- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90E	Y90E-Src
pYES2-Y90F- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90F	Y90F-Src
pJB 38: pYES2- <i>v-src</i> PRC*	<i>v-src</i> kmen Prague C	<i>v-Src</i> PRC
pJB 59: pYES2- <i>c-src</i> 527F*	<i>c-src</i> se záměnou Y527F	<i>c-Src</i> 527F
pYES2-Y90E- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90E a Y527F	Y90E-Src527F
pYES2-Y90F- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90F a Y527F	Y90F-Src527F
pYES2- <i>v-src</i> 527F	<i>c-src</i> s SH3 doménou <i>v-src</i> a záměnou Y527F	<i>v-Src</i> 527F

Konstrukty označené hvězdičkou (*) vytvořil dr. Brábek

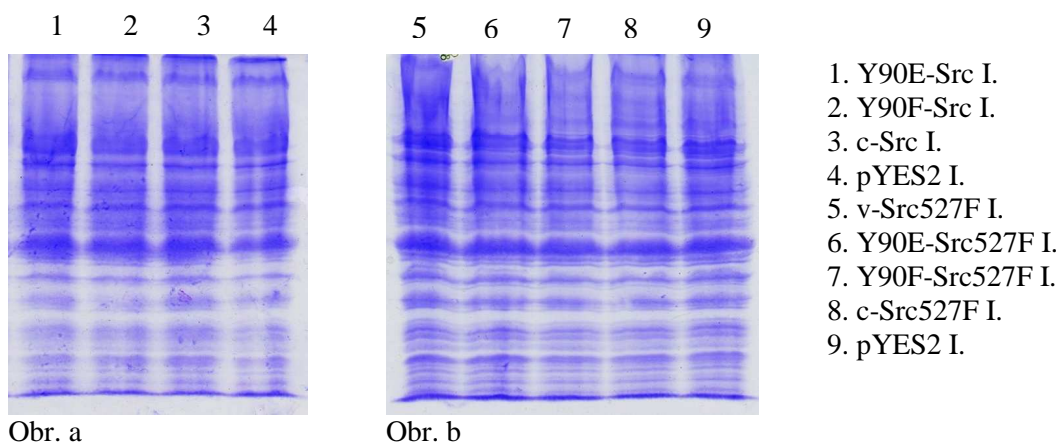
Konstrukty uvedené v tabulce byly metodou tzv. rychlé transformace, pomocí teplotního šoku a chemicky navozené kompetence (Li^+ ionty) buněk, transformovány do kmene EGY48 α . Selektce transformantů byla provedena standardně na základě auxotrofie kvasinkového kmene a přítomnosti selekčního genu *URA3* v plazmidu pYES2 na plotnách s minimálním médiem bez uracilu (SD-U). Z každé plotny s buňkami obsahujícími daný konstrukt bylo náhodně vybráno 5 kolonií a přečárkováno na nové plotny SD-U pro potvrzení úspěšnosti transformace. Tyto klony byly poté označeny římskými čísly I. – V. a uskladněny ve formě glycerolových konzerv pro další použití.

4.2.3 Porovnání kinázových aktivit jednotlivých variant proteinu Src exprimovaných v kvasince *S. cerevisiae*

Fosforylace Tyr 416 v aktivační smyčce proteinu Src umožňuje plnou aktivaci kinázy - indukuje konformační změnu pro vznik katalytického místa i místa pro vazbu substrátu (Ozkirimli a Post, 2006). Tento fakt může být využit pro srovnání míry aktivace různých variant kinázy Src exprimovaných v kvasinkových buňkách, neboť kinázová aktivita přímo koreluje s fosforylací na Tyr 416 (Boerner *et al.*, 1996). Relativní kinázová aktivita jednotlivých variant v kvasinkách může být vyjádřena jako poměr množství proteinu Src fosforylovaného na Tyr 416 ku celkovému množství exprimovaného proteinu Src.

Transformované buňky *S. cerevisiae* nesoucí konstrukty s variantami proteinu Src (c-Src, Y90E-Src, Y90F-Src, c-Src527F, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F, v-Src527F) nebo prázdný pYES2 byly zaočkovány do média SD-U a ponechány růst cca 20 h do stacionární fáze (OD ~ 4). Z takto připraveného inokula byly buňky druhý den zaočkovány na OD ~ 2 do média SD-U s 20% galaktózou a 10% rafinózou. Indukce exprese proteinu Src probíhala po dobu 3 h. Poté byly z buněk připraveny proteinové lyzáty, které byly zamrazeny v -20°C pro další použití. Proteinové lyzáty byly postupně připraveny z klonů I., II., III., IV., V. z buněk exprimujících dané varianty kinázy Src, celkem tedy bylo připraveno 40 lyzátů (8 variant x 5 klonů).

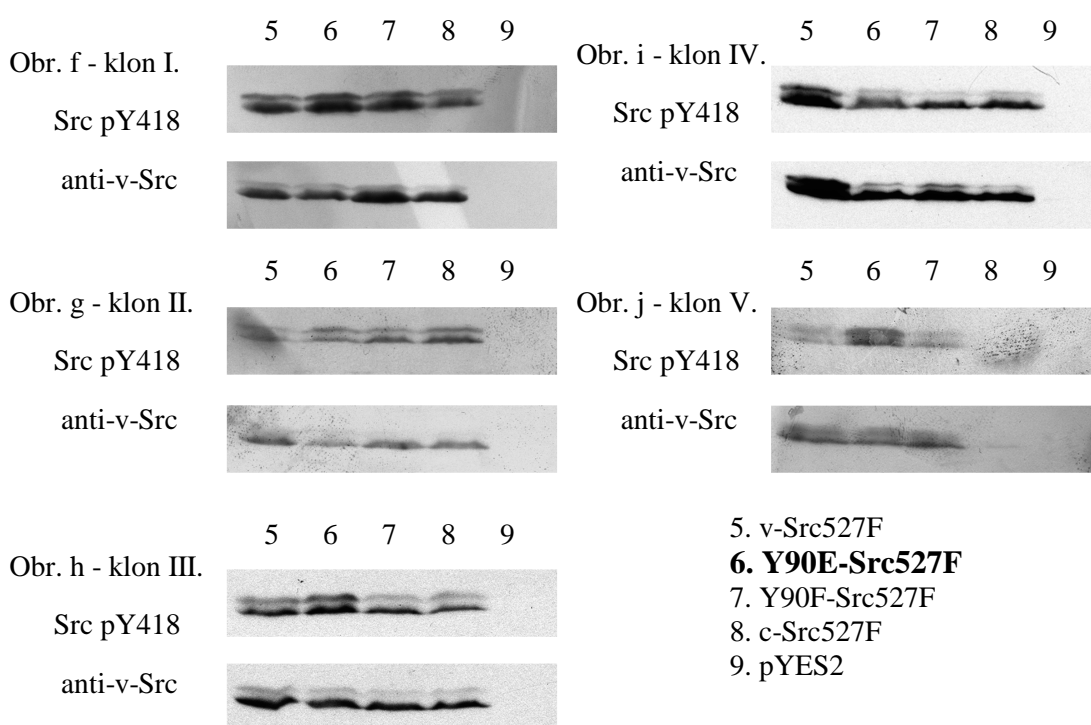
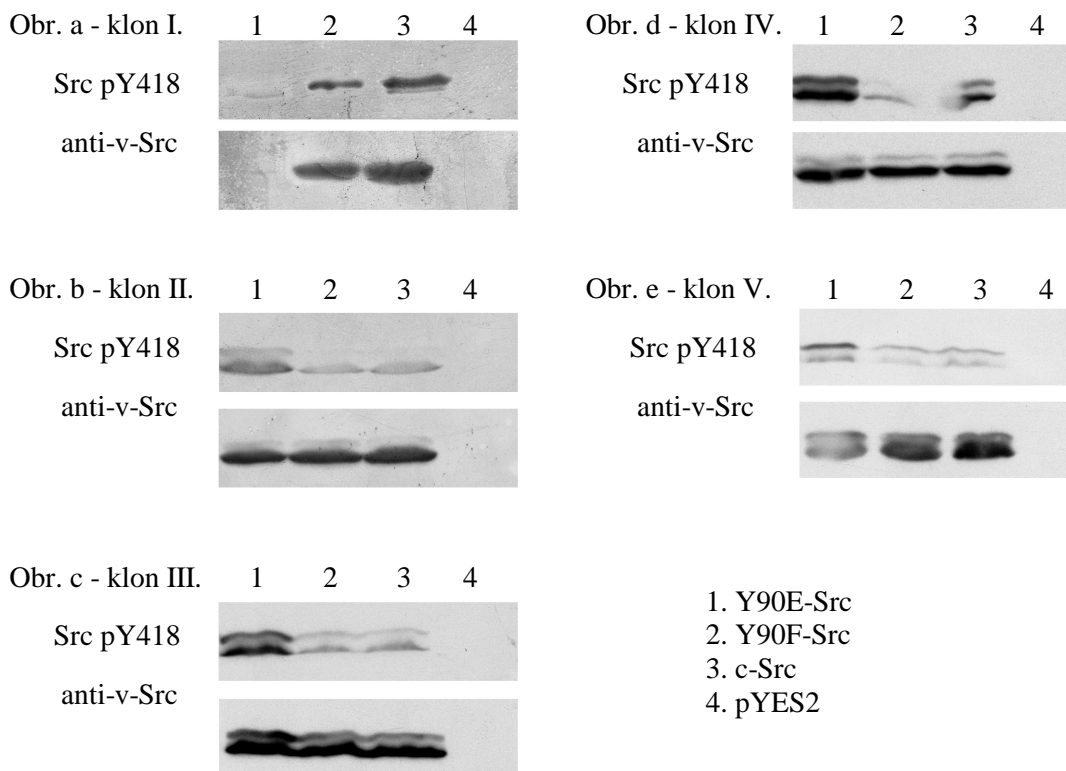
Proteinová koncentrace u vytvořených lyzátů měla být přibližně totožná, neboť vždy byly kultury pro inkubaci očkované na OD ~ 2 do 3 ml indukčního média. Pro ověření, zda je celková koncentrace proteinů v lyzátech u klonů I., II. atd. srovnatelná, byl nanesen 4 μ l aliquot lyzátů na 10% polyakrylamidový gel. Po proběhnutí elektroforézy byl gel barven v barvicím roztoku po dobu 1 h a pak odbarvován do druhého dne. Na zkušebních gelech byla celková proteinová koncentrace v lyzátech u všech klonů na srovnatelné úrovni (viz obr. 4.2.3a, b). Nebylo tedy třeba proteinovou koncentraci stanovovat spektrofotometricky a vzorky lyzátů dále ředit na shodnou koncentraci.



Obr. 4.2.3a, b Příklad 10% gelů s naneseným 4 μ l aliquotem lyzátů od klonů I. Celková proteinová koncentrace byla vždy ověřena nanáškou na zkušební 10% gel a u všech klonů byla přibližně na stejné úrovni jako u klonů I. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src přítomné v daném klonu kvasinek (zde klony I.), ze kterého byl připraven proteinový lyzát. Jako kontrola slouží lyzát z kvasinek obsahujících samotný pYES2.

Z připravených lyzátů od klonů se stejným označením (I., II. atd.) bylo vždy na dva 10% polyakrylamidové gely nanášeno 7,5 μ l. Vzorky obsahující varianty Y90E-Src, Y90F-Src, c-Src a prázdný vektor pYES2 (kontrola) byly v uvedeném pořadí nanášeny na oba gely, do první jamky byl nanesen marker molekulové hmotnosti. Schéma nanášky použité u variant s mutací Y527F bylo následující: marker, v-Src527F, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F, c-Src527F a kontrola pYES2.

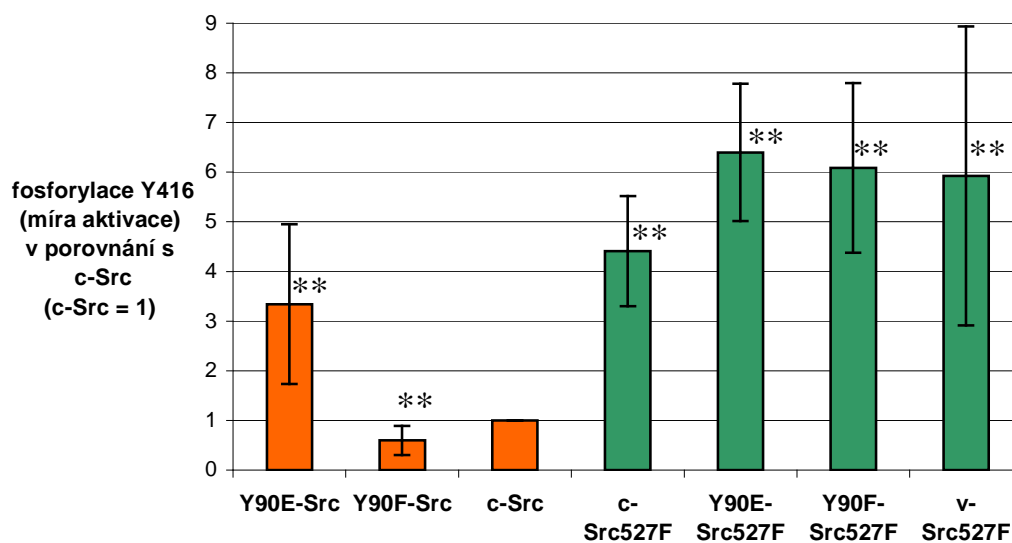
Po elektroforetickém rozdělení vzorků byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulóзовé membrány (membrány č.1 a č.2) metodou western blot. Membrána č.1 byla inkubována v roztoku s primární protilátkou proti proteinu Src (anti-v-Src) a v roztoku se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP) (GAM-HRP). Membrána č.2 byla inkubována v roztoku s primární protilátkou proti fosforylovanému tyrozínu 416 v proteinu Src (anti-Src pY418) a poté se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (GAR-HRP). Po inkubaci byly membrány vždy ponechány 1 minutu ve vyvíjecím roztoku a při detekci signálu pomocí přiložení membrány na film bylo zároveň podle markeru ověřeno, že pruhy odpovídají molekulovou hmotností kináze Src (obr. 4.2.4a-j).



Obr. 4.2.4a-j Obr. a-e klony I. – V. nesoucí varianty proteinu Src s různými SH3 doménami; obr. f-j klony I. – V. nesoucí varianty proteinu Src s různými SH3 doménami a mutací Y527F. Popis nanášky (dráhy 1-9) vpravo odpovídá variantě proteinu Src (příp.prázdnému vektoru) přítomného v dané populaci buněk. Vrchní obrázky membrány č.1 - 1. anti Src pY418 (1:1000); 2. GAR-HRP (1:3000). Spodní obrázky membrány č.2 - 1. anti-v-Src (1:500); 2. GAR-HRP (1:3000).

Vyvolaný film byl pak skenován pomocí oboustranného prosvícení na skeneru Epson Perfection V700. Densita pruhů, které odpovídaly množství proteinu fosforylovaného na Tyr 416 a celkovému množství proteinu, byla změřena z oskenovaných filmů pomocí programu ImageQuant (Amersham Biosciences).

Míra autofosforylace každé varianty byla vyjádřena pomocí poměru density pruhu odpovídajícímu množství proteinu fosforylovaného na Tyr 416 (protilátka anti-Src pY418) ku densitě pruhu odpovídajícímu celkovému množství proteinu (protilátka anti-v-Src). Tento poměr aktivace a celkové exprese byl poté vztažen k variantě c-Src (c-Src = 1). Výsledné porovnání, kolikrát je daná varianta více aktivovaná (více fosforylovaná na Tyr 416) než c-Src, bylo zaneseno do grafu (statistické zpracování viz příloha III.). Z grafu (obr. 4.2.5) je pak dobře patrné, že fosfomimikující mutace Y90E v SH3 doméně má nesporně deregulační vliv na aktivitu kinázy Src.



Obr. 4.2.5 Autofosforylace na Tyr 416 variant proteinu Src vztažená k c-Src. Sloupce v grafu naznačují, kolikrát je daná varianta proteinu Src aktivnější než c-Src. Oranžové sloupce vyjadřují aktivaci variant s různými SH3 doménami. Zelené sloupce vyjadřují aktivaci variant s různými SH3 doménami a s mutací Y527F. (** - hladina významnosti 0,01).

4.2.4 Testování viability kvasinek exprimujících varianty proteinu Src

Vlivem nepřítomnosti kinázy Csk, protein c-Src exprimovaný v kvasinkách je na Tyr 527 v C terminální regulační oblasti fosforylován pouze v minimální míře a to mechanismem intermolekulární autofosforylace (Osusky *et al.*, 1995). Exprese kinázově aktivních forem Src pak může způsobovat zpomalený růst *S. cerevisiae*, který pozitivně koreluje s tyrozinovou fosforylací endogenních kvasinkových proteinů. Koexprese c-Src zároveň s Csk kinázou, která zabezpečí fosforylaci Tyr 527 a negativní regulaci kinázové aktivity Src, ruší inhibiční růstový efekt i masivní tyrozinovou fosforylaci endogenních kvasinkových substrátů. Tento jev se pak samozřejmě neuplatňuje v případě proteinu v-Src, který C terminální segment s regulačním Tyr 527 zcela postrádá (Murphy *et al.*, 1993; Brugge *et al.*, 1987; Kornbluth *et al.*, 1987).

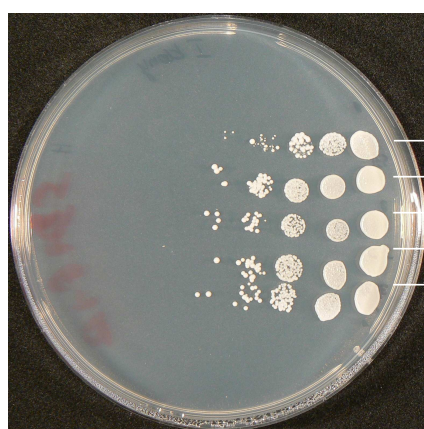
4.2.4.1 Testování viability pomocí kapání ředící řady suspenze buněk na plotny s galaktózou a rafinózou

Pro otestování inhibičního růstového efektu při expresi proteinu Src byly varianty Src v kvasinkových buňkách exprimovány samostatně a poté zároveň s Csk kinázou. Klony I., II., III. nesoucí plazmidy s variantami kinázy Src: c-Src, Y90E-Src, Y90F-Src, v-SrcPRC a prázdný vektor byly přeneseny z glycerolové konzervy na plotnu SD-U a ponechány růst v termostatu 3 dny. Poté byly transformovány konstruktem pRS313-Csk (p JB 61- integrativní vektor) lithium – acetátovou metodou. Selektce probíhala na základě auxotrofií kvasinkového kmene EGY48 α a přítomnosti selekčního genu *URA3* v plazmidu pYES2 a genu *HIS3* v plazmidu pRS313 na plotnách s minimálním médiem bez uracilu a histidinu (SD-U-H).

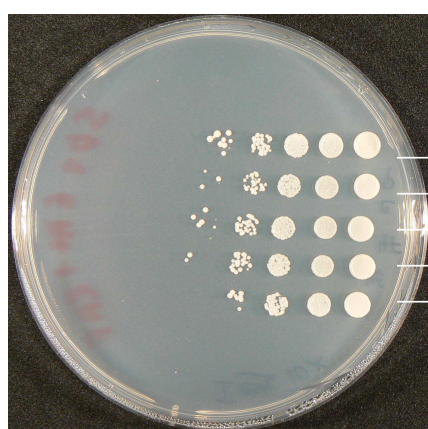
Od každého klonu I., II., III. nových transformantů byly vybrány náhodně dvě kolonie (č. 1 a 2) a přečárkovány na novou plotnu SD-U-H. Z této plotny byly od každého klonu vybrány kolonie č.1 a spolu s buňkami bez exprese Csk podrobeny testu viability pomocí kapání ředící řady buněčné suspenze na plotny s indukčním

médiem obsahujícím 20 % galaktózu a 10 % rafinózu. Po 3 dnech růstu ve 30°C byl nárůst biomasy vyhodnocen.

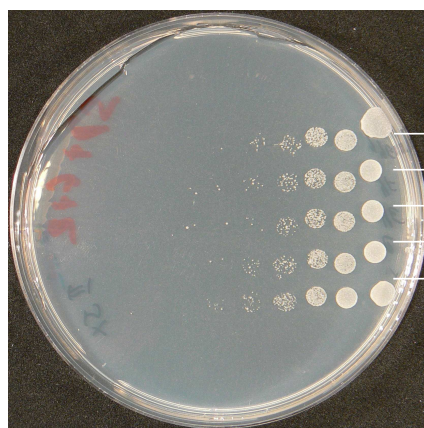
Překvapivě nebyly mezi kvasinkami nesoucími různé varianty kinázy Src výrazné rozdíly nárůstů. Ani v případě linií bez exprese a s expresí kinázy Csk (obr. 4.2.6a, b). Test viability kapáním ředící řady buněčné suspenze byl poté zopakován, výsledek byl shodný s předchozím experimentem (obr. 4.2.6c, d).



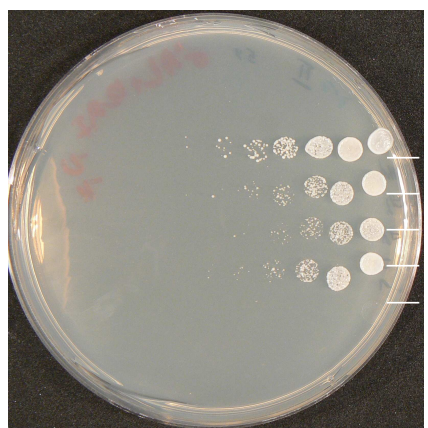
Obr. a



Obr. b



Obr. c

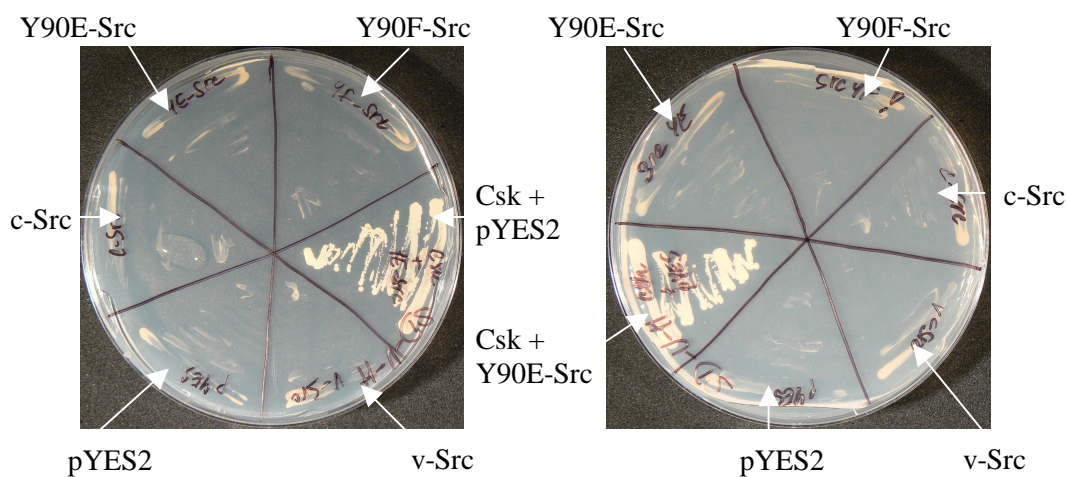


Obr. d

Obr. 4.2.6a-c Ředící řady suspenze buněk vykapané na indukční plotny s 20% galaktózou a 10% rafinózou. Obr a, b z prvního pokusu znázorňují buňky klonu I. s expresí variant kinázy Src (obr. a; použité ředění v ředící řadě - 10x) a buňky klonu I. s koexpresí kináz Src a Csk (obr. b; použité ředění v ředící řadě - 10x). Obr. c, d z druhého pokusu znázorňují ředící řady buněk klonu II. s expresí variant kinázy Src (obr. c; použité ředění v ředící řadě - 5x) a buňky klonu II. s koexpresí kináz Src a Csk (obr. d; použité ředění v ředící řadě - 5 x). Přibližně stejný nárůst byl i u ostatních dvou klonů, jejichž foto není zařazeno. U obr d chybí vykapaná ředící řada s buňkami s v-Src patrně vlivem chyby při přípravě ředící řady.

Tyto výsledky vznesly otázku, zda kvasinkové linie nejsou vzájemně kontaminované a zda nedošlo k vykapání ředící řady pouze buněk, kde byla koexprimována kináza Csk.

Pro ověření kontaminace byla část buněk z ploten z vykapanými ředícími řadami podrobena jednoduchému testu přítomnosti auxotrofních markerů. Na plotny SD-U-H byly přečárkovány buňky klonů I., II. nesoucí varianty kinázy Src bez koexpresise s Csk kinázou. Tyto buňky na plotnách SD-U-H neměly růst, neboť selekční gen *HIS3* byl nesen právě plazmidem s genem *csk*. Tento test potvrdil, že linie kontaminovány nebyly (obr. 4.2.7a, b).

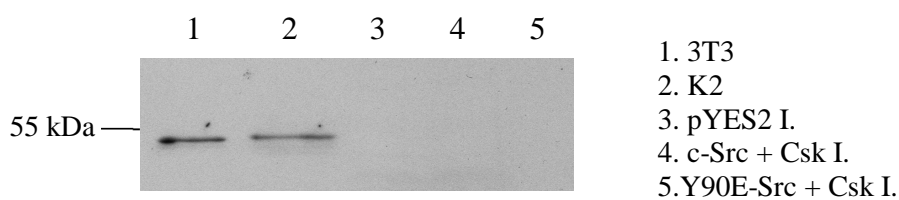


Obr. a

Obr. b

Obr. 4.2.7a, b Ověření schopnosti růstu buněk klonů I. (obr. a), II. (obr. b) na médiu bez histidinu a uracilu. Jako pozitivní kontrola byly na plotny načárkovány buňky s koexpresí kinázy Csk.

Další ověření přítomnosti exprese kinázy Csk v buňkách bylo provedeno pomocí imunodetekce Csk protilátkou. Z klonu I. z buněk koexprimujících Src (c-Src, Y90E-Src) a Csk byly připraveny lyzáty, naneseny spolu s kontrolními lyzáty ze savčích buněk na 10% polyakrylamidový gel a elektroforeticky rozděleny. Po přenosu proteinů z gelu metodou western blot byla membrána inkubována s roztokem primární protilátky proti Csk (anti-Csk) a poté s roztokem sekundární protilátky konjugované s HRP (GAR-HRP). Výsledek byl opět velmi překvapivý – ačkoliv buňky transformované plazmidy pRS313-Csk a pYES2-c-Src (Y90E-Src) vykazovaly přítomnost obou selekčních markerů - genů *URA3* a *HIS3* neexprimovaly kinázu Csk (obr. 4.2.8).



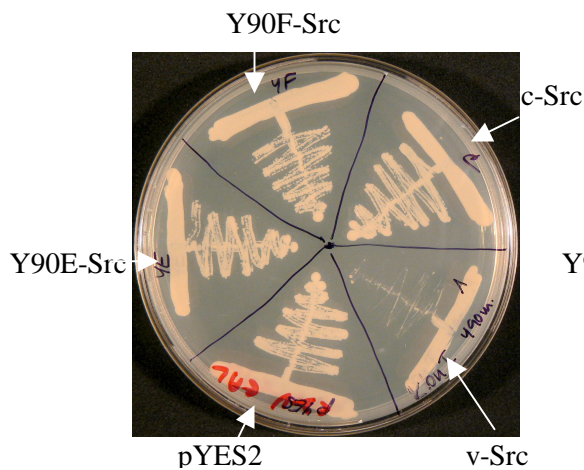
Obr. 4.2.8 Ověření exprese kinázy Csk v lyzátech připravených z klonů I., které nesly zároveň varianty kinázy Src (c-Src, Y90E-Src). Jako pozitivní kontrola sloužily lyzáty ze savčích buněk linií 3T3 a K2, pro odhalení případné kontaminace byl nanesen i lyzát z buněk klonu I. nesoucích prázdný vektor pYES2. Membrána –1. anti-Csk (1:500); 2. GAR-HRP (1:5000).

4.2.4.2 Testování viability kvasinek pomocí čárkování

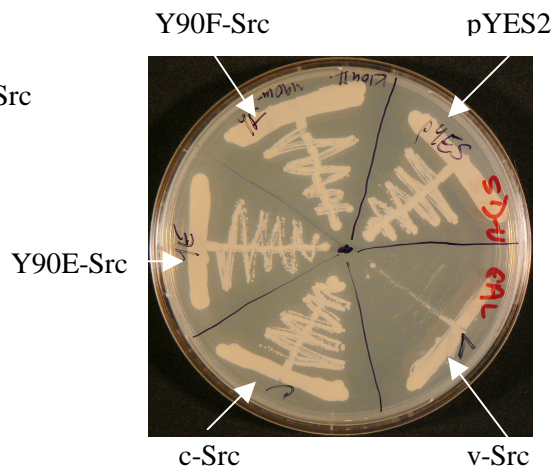
Pro další ověřování viability kvasinek s expresí variant Src byl zvolen metodicky modifikovaný přístup. Místo kapaní ředící řady buněčné suspenze na plotny s médiem s galaktózou a rafinózou byly buňky dvakrát po sobě přeneseny – přečárkovány na plotny obsahující pouze galaktózu. Při růstu na médiu s galaktózou jako jediným zdrojem uhlíku po dobu cca 7 dnů by měly být rozdíly v nárůstu resp. viabilitě lépe patrné.

Pro testování viability čárkovacím testem byly vybrány klony I., II. a V. exprimující varianty Src: c-Src, Y90E-Src, Y90F-Src, v-SrcPRC a klony I., II. a III. exprimující varianty Src: v-Src527F, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F, c-Src527F. Od testování klonů s koexpresí kinázy Csk se vzhledem k předchozím výsledkům upustilo.

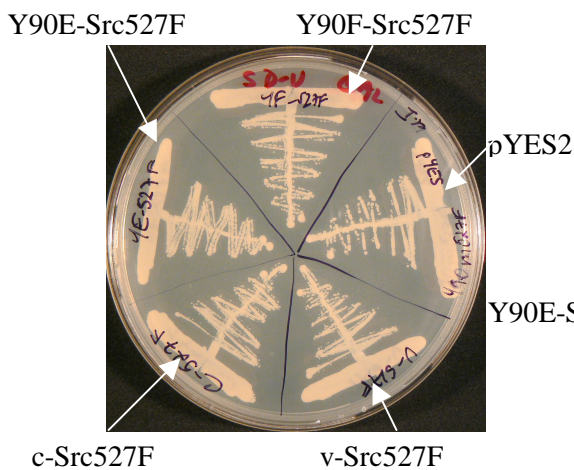
Výše zmíněné klony spolu s kontrolou obsahující prázdný vektor byly přečárkovány na plotnu SD-U s galaktózou a ponechány růst ve 30°C po dobu 3 dnů. Po této době byl významější negativní růstový vliv exprese proteinu Src pozorován pouze u varianty v-Src, linie nesoucí ostatní varianty proteinu Src rostly stejně jako kontrola (obr. 4.2.9a-d).



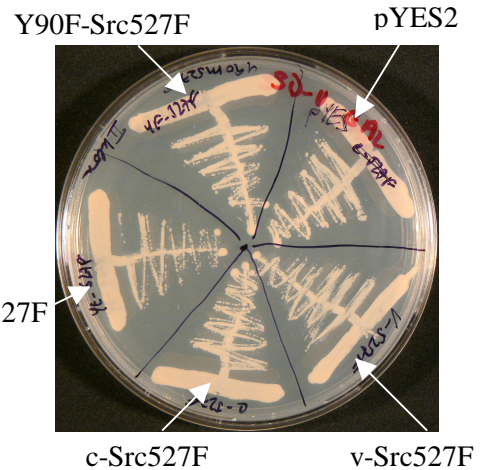
Obr. a



Obr. b



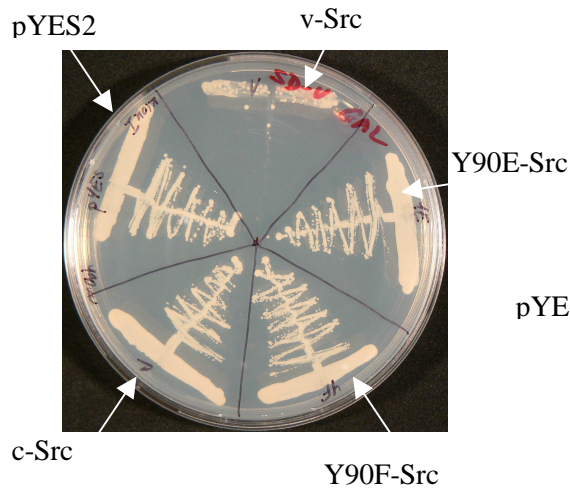
Obr. c



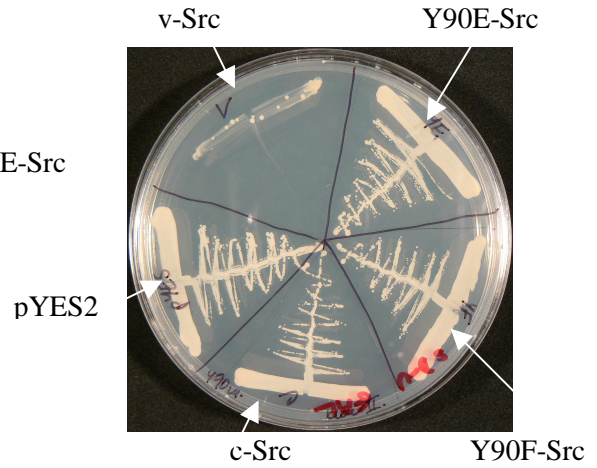
Obr. d

Obr. 4.2.9a-d Buňky klonů I. (obr.a,c) a klonů II. (obr.b, d) po třídním růstu na indukčních plotnách s galaktózou a bez uracilu. Pouze u varianty v-Src (obr.a, b) je menší nárůst biomasy. Srovnatelné výsledky byly získány i u ostatních klonů (III., V.), jejichž foto není zařazeno.

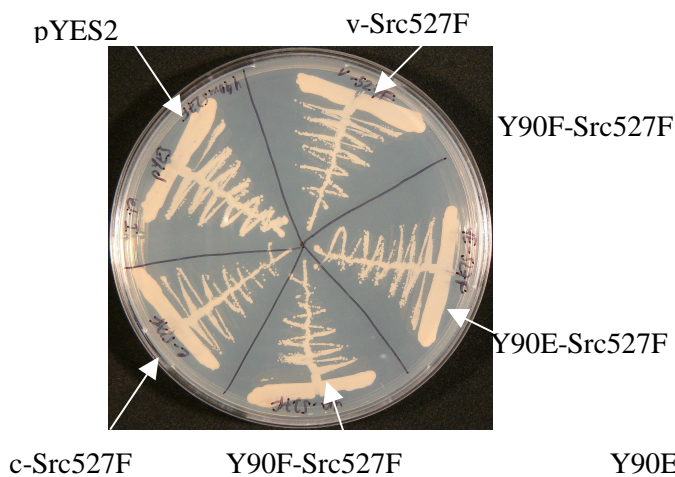
Z těchto ploten byly přečárkovány linie na další plotnu s médiem obsahujícím také pouze galaktózu a ponechány růst další 4 dny. Po této době byl ale pozorován zhoršený nárůst opět pouze u buněk s variantou v-Src. U ostatních linií byl nárůst biomasy shodný s kontrolou a viabilita těchto buněk nebyla nijak ovlivněna expresí variant kinázy Src (obr. 4.2.10a-d).



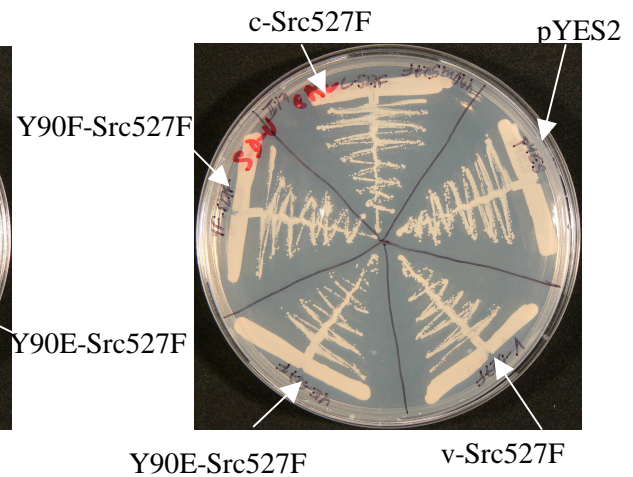
Obr. a



Obr. b



Obr. c

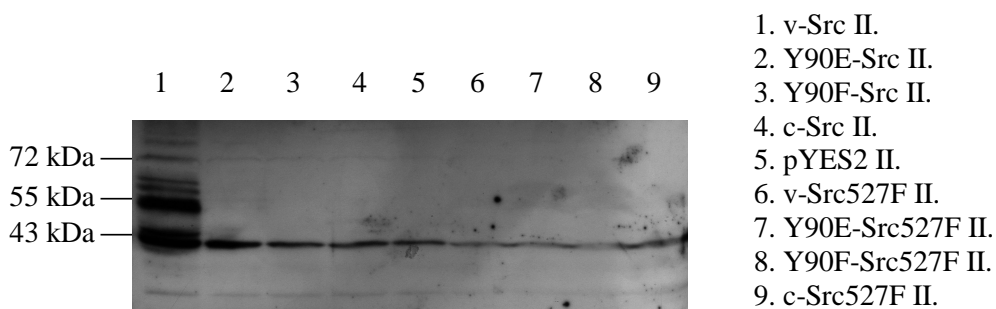


Obr. d

Obr. 4.2.10a-d Buňky klonů I. (obr.a, c) a klonů II. (obr.b, d) po přečárkování na nové plotny s galaktózou a bez uracilu. Po třídním růstu na indukčních plotnách byl opět pouze u varianty v-Src (obr.a, b) menší nárůst biomasy. Srovnatelné výsledky byly získány i u ostatních klonů (III., V.), jejichž foto není zařazeno.

Pro další ověření, zda skutečně jen varianta v-Src při expresi v kvasinkách způsobuje inhibici růstu a zvýšenou fosforylací tyrozinů v endogenních proteinových substrátech, byl analyzován fosfotyrozínový profil proteinů. Proteinové lyzáty z klonu II. byly naneseny a elektroforeticky rozděleny v 10% polyakrylamidovém gelu. Z gelu byly přeneseny proteiny metodou western blot na membránu. Membrána byla inkubována s roztokem primární protilátky proti fosfotyrozinu (pY20) a poté s roztokem se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (GAM-HRP).

Z profilu na obrázku 4.2.11 byl patrný pouze u linie s variantou v-Src nárůst tyrozínové fosforylace, u ostatních linií byla tyrozínová fosforylace na úrovni kontroly. Tento výsledek dobře korespondoval s výsledky testu viability pomocí čárkování na plotny s médiem s galaktózou, kdy jedině buňky s expresí v-Src vykazovaly zhoršený růst.



Obr. 4.2.11 Fosfotyrozínový profil klonů II. s expresí různých variant proteinu Src. Popis nanášky odpovídá variantám kinázy Src přítomným v kloněch II., ze kterých byly připraveny lyzáty. Membrána - 1. pY20 (1:400); 2. GAM-HRP (1:3000).

4.3 Exprese variant genu *src* v savčích fibroblastech

Kináza Src v deregulované formě je schopna transformovat savčí buňky. Tyto buňky pak vykazují různé abnormální růstové vlastnosti doprovázené mimo jiné zvýšenou mírou fosforylace substrátů kinázy Src. Mají např. schopnost růstu do vysokých hustot, ztrácejí kontaktní inhibici a tvoří foci (kupičky buněk přerůstajících přes sebe). Dále pak mohou růst nezávisle na ukotvení k substrátu, mohou vykazovat schopnost degradace extracelulární matrix (ECM) a invazivity do okolních tkání, v neposlední řadě pak mohou transformované buňky tvořit metastáze ve vzdálených tkáních (shrnutí v Summy a Gallick, 2003).

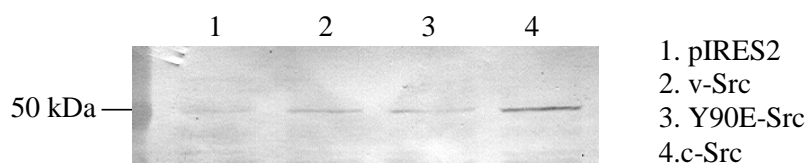
U transformovaných epiteliálních buněk je pak často patrná změna morfologie buněk (tzv. epiteliálně – mezenchymální transice), kdy se původní kuboidní tvar mění na tvar charakteristický pro fibroblasty (shrnutí v Frame, 2004).

4.3.1 Exprese variant genu *src* v myších fibroblastech linie 3T3

Pro pozorování vlivu exprese variant proteinu Src na fenotyp buněk a porovnání fosforylace substrátů kinázy Src byly nejdříve zvoleny myší fibroblasty linie 3T3. Fibroblasty linie 3T3 byly stabilně transfekovány konstrukty pIRES2-EGFP nesoucími varianty: *v-src*PRC, Y90E-*src*, *c-src* a prázdným vektorem pIRES2-EGFP a poté proběhla dvakrát selekce pomocí FACS (viz úvod kap. 4). Po druhé selekci pomocí FACS byly buňky ponechány růst na velkých miskách, z nichž byly po dosažení úplné konfluence připraveny proteinové lyzáty a záložní stabiláty. Část buněk byla kultivovaná dále pro pozdější testování některých vlastností charakteristických pro transformované buňky.

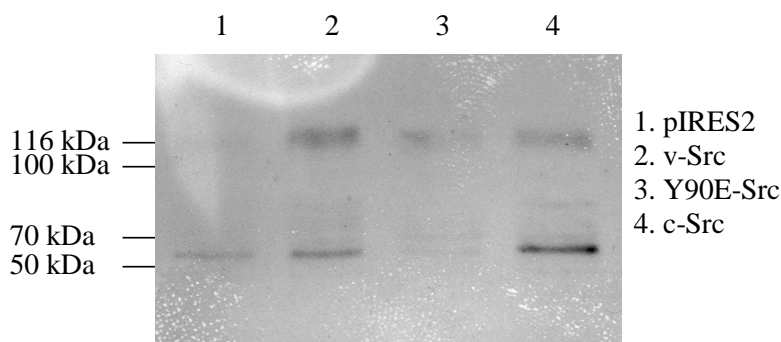
Pro ověření míry exprese variant proteinu Src a analýzu fosforylace substrátů byly z 3T3 fibroblastů připraveny proteinové lyzáty, u kterých byla stanovena celková proteinová koncentrace pomocí soupravy D_c Protein Assay. Po úpravě celkové proteinové koncentrace u všech vzorků lyzátů na srovnatelnou hladinu bylo naneseno na dva 10% polyakrylamidové gely 10 μ l lyzátu. Po elektroforetickém rozdělení vzorků byly proteiny z gelů přeneseny na nitrocelulósovou membránu metodou western blot (membrána č. 1 a 2).

Membrána č.1 byla inkubována s roztokem s primární protilátkou proti proteinu Src (anti-v-Src) a s roztokem se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (GAM-AP). Z obrázku 4.3.1 je patrné, že 3T3 fibroblasty s expresí varianty c-Src vykazovaly nejvyšší hladinu množství daného proteinu, u variant v-Src a Y90E-Src bylo dosaženo slabší exprese. Nejslabší signál u buněk transfekovaných prázdným vektorem odráží přítomnost určité hladiny přirozeného endogenního proteinu Src.



Obr. 4.3.1 Ověření exprese variant kinázy Src v 3T3 fibroblastech. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Membrána - 1. anti-v-Src (1:500); 2.GAM-AP (1:3000).

Membrána č.2 byla inkubována s roztokem s primární protilátkou proti fosfotyrozínu (4G10) a s roztokem se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP) (GAM-HRP). Na obrázku 4.3.2 je dobře patrný obvyklý fosfotyrozínový profil substrátů kinázy Src, které se účastní signalizace vedoucí od integrinů. Vrchní pruhy o velikosti cca 110 - 130 kDa odpovídají pravděpodobně oblasti s fosforylovanými proteiny Cas a Fak, spodní pruh o velikosti cca 60 kDa pravděpodobně představuje oblast s fosforylovaným proteinem paxillin. Ve 4. dráze nanášky je vlivem nejvyšší exprese varianty c-Src fosforylace substrátů nejvíce patrná, ve 2. dráze u kinázově aktivnější méně exprimované varianty v-Src je však také přítomna fosforylace substrátů ve vyšší míře. Ve 3. dráze s variantou Y90E-Src stojí potom za povšimnutí velmi slabá fosforylace v oblasti 60 kDa.



Obr. 4.3.2 Fosfotyrozínový profil 3T3 fibroblastů s expresí variant proteinu Src. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Membrána – 1. 4G10 (1:1000); 2. GAM-HRP(1:5000).

Po ověření přítomnosti variant proteinu Src byly buňky vysety na misky potažené roztokem poly-HEMA, kde měla být testována jejich schopnost růst nezávisle na podkladu. Na 2 malé misky (\varnothing 60 mm) bylo vyseto 30 000 buněk od každé linie nesoucí varianty kinázy Src a nebo prázdný plazmid, celkem tedy bylo připraveno 8 misek. Misky s vyšetými buňkami byly ponechány v termostatu po dobu 10 dnů. Při průběžné kontrole bylo však zjištěno, že všechny linie buněk rostou nezávisle na ukotvení srovnatelně stejně, včetně buněk nesoucích jen prázdný vektor. Kontrolní buňky ale tuto schopnost mít neměly, proto se objevilo podezření na možnou vzájemnou kontaminaci linií. Výsev na misky s poly-HEMA byl zopakován s novými buňkami ze stabilátů, avšak výsledek byl stejný jako u předchozího pokusu. Po 10 dnech buňky všech linií vykazovaly schopnost růstu nezávisle na podkladu ve formě shluků volně plovoucích v médiu. Tento výsledek byl potvrzen i při vyhodnocení pokusu (viz tab. 4.3.1), kdy bylo na miskách přítomno srovnatelné množství buněk.

Tab. 4.3.1 Počet buněk sklizených z neadhezivních misek 10. den po vysetí

Linie 3T3 s variantou konstruktů pIRES2-EGFP	Počet buněk/ml
pIRES2	$2,25 \cdot 10^5$ buněk/ml
pIRES2-v-Src PRC	$1,75 \cdot 10^5$ buněk/ml
pIRES2-Y90E-Src	$1,94 \cdot 10^5$ buněk/ml
pIRES2-c-Src	$1,79 \cdot 10^5$ buněk/ml

Vzhledem k výše uvedeným faktům se 3T3 fibroblasty nejevily jako vhodné pro další testování vlivu exprese variant genu *src* na fenotyp, proto bylo přistoupeno k výběru jiné linie savčích fibroblastů a to fibroblastů linie RAT2.

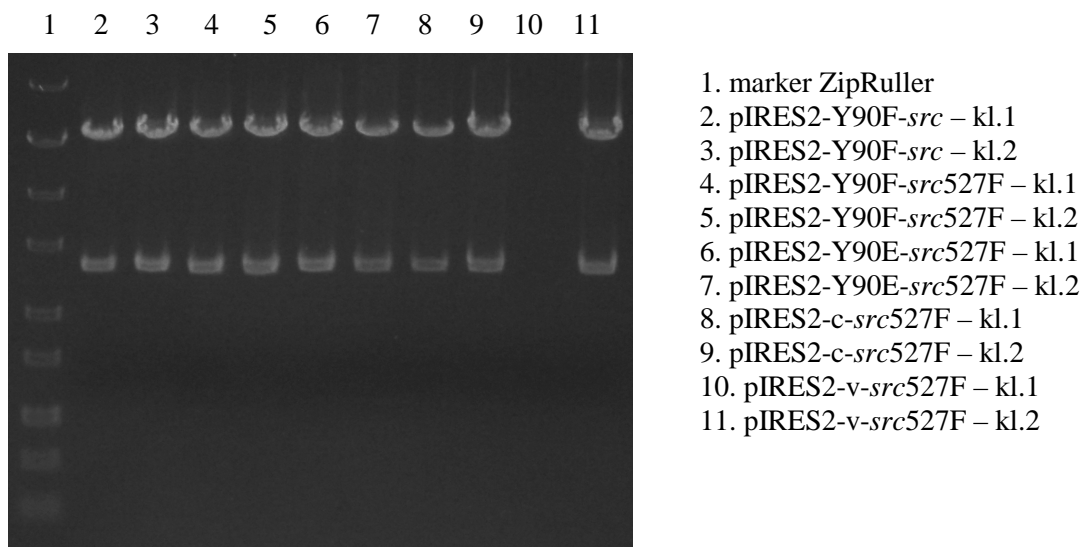
4.3.2 Exprese variant genu *src* v savčích fibroblastech linie RAT2

4.3.2.1 Příprava dalších konstruktů pIRES2-EGFP s variantami genu *src* pro expresi v RAT2 buňkách

Pro transfekci RAT2 fibroblastů bylo nejdříve nutno připravit konstrukty pIRES2-EGFP s dalšími variantami genu *src*, jejichž exprese nebyla realizována v 3T3 fibroblastech. Jednalo se o následující varianty genu *src*: Y90F-*src*, v-*src*527F, Y90E-*src*527F, Y90F-*src*527F a c-*src*527F.

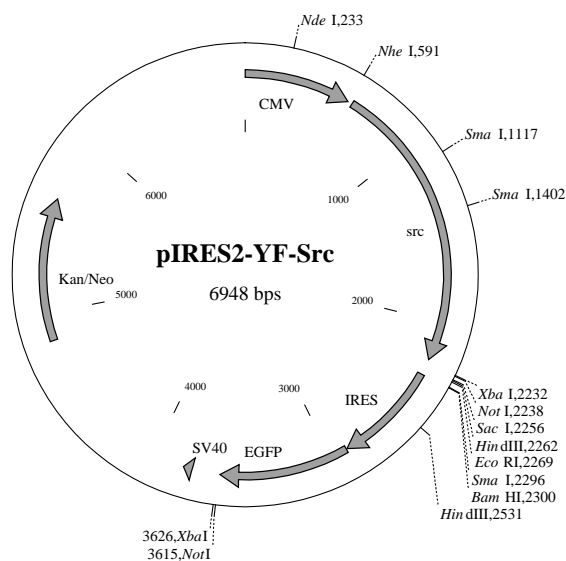
Pro přípravu konstruktů pIRES2-EGFP s vloženými variantami genu *src* byla čerstvě izolovaná plazmidová DNA konstruktů pBlue-Y90F-*src*, pBlue-c-*src*527F, pBlue-v-*src*527F, pBlue-Y90E-*src*527F a pBlue-Y90F-*src*527F štěpena kombinací restriktáz *Bam*HI/*Sac*I a plazmidová DNA vektoru pIRES2-EGFP byla štěpena kombinací restriktáz *Bgl*II/*Sac*I. Restriční směsi byly elektroforeticky rozdělány v 1% agarózovém gelu. Z gelu byly izolovány DNA fragmenty variant genu *src* (velikost cca 1623 bp) a otevřený vektor pIRES2-EGFP (cca 5325 bp) pomocí soupravy NucleoSpin[®] Extract 2 in 1.

Fragmenty s variantami genu *src* vyštěpené přes restriční místa *Bam*HI/*Sac*I byly poté ligovány do vektoru pIRES2-EGFP otevřeného přes restriční místa *Bgl*II/*Sac*I (pozn. restriktázy *Bam*HI a *Bgl*II produkují stejné kohezní konce, následná reasociace mezi fragmenty dává vznik nové sekvenci, kterou nerozeznávají původní restriktázy). Ligační směsi byly transformovány do *E. coli* kmene DH5 α a transformované buňky byly selektovány na plotnách s kanamycinem. Z každé plotny byla ze dvou klonů izolována plazmidová DNA pomocí soupravy NucleoSpin[®] Plasmid a úspěšnost ligace byla ověřena štěpením restriktázami *Nhe*I a *Sac*I (obr. 4.3.3).



Obr. 4.3.3 Restrikční ověření konstruktů pIRES2-EGFP s vloženými variantami genu *src* pomocí restriktaáz *NheI/SacI* (plazmidová DNA byla izolována vždy ze dvou klonů). Vrchní pruhy – pIRES2-EGFP (5283 bp); spodní pruhy – varianty *src* (1665 bp). U 10. dráhy v nanášce chybí pruhy štěpené DNA pravděpodobně vlivem chyby při izolaci plazmidů z *E. coli*.

Ligace variant genu *src* do vektoru pIRES2-EGFP (obr. 4.3.4) proběhla úspěšně, připravené konstrukty jsou pro přehlednost shrnuty v tabulce 4.3.2. Z klonů č. 2 byla u izolované plazmidové DNA spektrofotometricky stanovena koncentrace a tato plazmidová DNA byla použita pro transfekci fibroblastů linie RAT2.



Obr. 4.3.4 Příklad jednoho z vytvořených konstruktů pIRES2-EGFP, v tomto případě s vloženým inzertem Y90F-*src*.

Tab. 4.3.2 Konstrukty pIRES2-EGFP s vloženými variantami genu *src*.

Označení konstruktů pIRES2-EGFP s vloženým inzertem	Inzert vložený přes restrikční místa <i>BglIII/SacI</i>
pIRES2-Y90F- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90F
pIRES2- <i>c-src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y527F
pIRES2-Y90E- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90E a Y527F
pIRES2-Y90F- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90F a Y527F
pIRES2- <i>v-src</i> 527F	<i>c-src</i> s SH3 doménou <i>v-src</i> PRC a záměnou Y527F

4.3.2.2 Transfekce fibroblastů linie RAT2, získání stabilně transfekovaných linií a jejich selekce pomocí FACS

Pro transfekci byly jako druhé buňky zvoleny fibroblasty linie RAT2 získané z laboratoře prof. Jitky Forstové. Pro transfekci RAT2 fibroblastů byly použity konstrukty pIRES2-EGFP uvedené v tabulce 4.3.3.

Tab. 4.3.3 Přehled konstruktů použitých pro transfekci fibroblastů linie RAT2

Označení konstruktů pIRES2-EGFP s vloženým inzertem	Popis inzertu	Označení proteinového produktu
pIRES2 – prázdný vektor	bez inzertu (kontrola)	--
pIRES2- <i>c-src</i> *	<i>c-src</i> wt forma	<i>c-Src</i>
pIRES2-Y90E- <i>src</i> *	<i>c-src</i> se záměnou Y90E	Y90E- <i>Src</i>
pIRES2-Y90F- <i>src</i>	<i>c-src</i> se záměnou Y90F	Y90F- <i>Src</i>
pIRES2- <i>v-src</i> PRC*	<i>v-src</i> kmen Prague C	<i>v-Src</i> PRC
pIRES2- <i>c-src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y527F	<i>c-Src</i> 527F
pIRES2-Y90E- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90E a Y527F	Y90E- <i>Src</i> 527F
pIRES2-Y90F- <i>src</i> 527F	<i>c-src</i> se záměnou Y90F a Y527F	Y90F- <i>Src</i> 527F
pIRES2- <i>v-src</i> 527F	<i>c-src</i> s SH3 doménou <i>v-src</i> a záměnou Y527F	<i>v-Src</i> 527F

Konstrukty označené hvězdičkou (*) vytvořil dr. Rösel.

Pro získání stabilně transfekovaných fibroblastů bylo připraveno 9 misek (Ø 60 mm) s RAT2 buňkami o konfluenci cca 80%. Fibroblasty byly transfekovány pomocí transfekční reagentie Lipofectamine 2000, při transfekci se přidávalo ke 4 µg příslušné plazmidové DNA vždy 12 µl transfekční reagentie. Buňky byly selektovány na základě přítomnosti selekčního markeru na plazmidu pIRES2-EGFP

– genu kódujícího rezistenci k antibiotiku geneticinu, který byl do média ke kulturám přidáván v koncentraci 500 µg/ml.

Po cca 4 týdnech selekce v přítomnosti geneticinu byly buňky nesoucí různé varianty genu *src* vložené do konstruktu pIRES2-EGFP podrobeny selekci („sortingu“) pomocí FACS (pozn. buňky nesoucí prázdný vektor selektovány nebyly). Linie buněk byly selektovány na podobnou hladinu fluorescence a měly tak vzniknout populace buněk se srovnatelnou expresí variant proteinu Src. Po první selekci byly buňky vzhledem k malému počtu ponechány růst po dobu cca 3 týdnů, cca po dvou týdnech byly z části buněk připraveny stabiláty.

Během doby kultivace po první selekci byla fluorescence u linií buněk průběžně kontrolována pod mikroskopem. U linie buněk nesoucích variantu proteinu c-Src527F se však fluorescence výrazně zeslabila. Druhá selekce proběhla (cca 3 týdny po první selekci) úspěšně u všech linií buněk kromě linie nesoucí variantu proteinu c-Src527F. U této linie nebyla fluorescence detekována vůbec resp. byla na úrovni kontrolních netransfekovaných RAT2 fibroblastů. Populace buněk vzniklých po druhé selekci byly ponechány růst po dobu cca 10 dnů, část buněk byla použita na přípravu stabilátů, druhá část byla kultivována pro další experimenty. Linie buněk nesoucí variantu proteinu c-Src527F nebyla do dalších experimentů zahrnuta.

4.3.2.3 Analýza exprese variant genu *src*, vliv exprese na schopnost tvorby foci a na fosforylaci substrátů u stabilně transfekovaných RAT2 fibroblastů

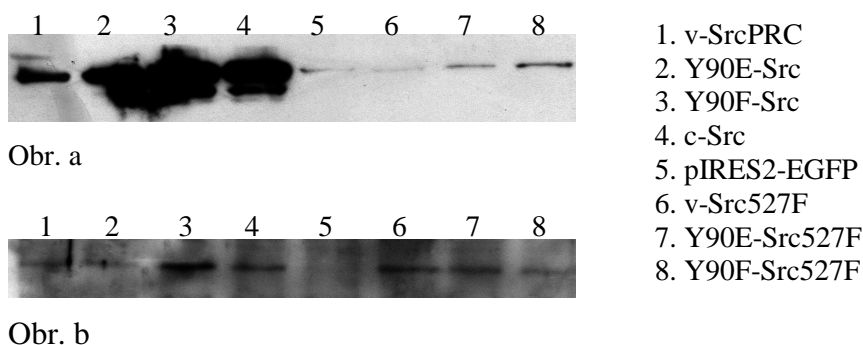
RAT2 fibroblasty po druhé selekci pomocí FACS měly sloužit k pozorování vlivu exprese variant proteinu Src na fenotyp buněk a později pro porovnání fosforylace substrátů kinázy Src. Nejprve však bylo nutno zjistit, zda bylo při selekci linií fibroblastů pomocí FACS dosaženo alespoň přibližně srovnatelné míry exprese variant proteinu Src v příslušných buňkách.

Pro ověření hladiny exprese variant kinázy Src a proteinu EGFP byly připraveny proteinové lyzáty z části buněk exprimujících proteiny v-SrcPRC, Y90E-Src, Y90F-Src, c-Src, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F, v-Src527F a z buněk nesoucích prázdný vektor pIRES2-EGFP. U lyzátoů byla celková proteinová

koncentrace upravena na srovnatelnou hladinu pomocí soupravy D_c Protein Assay a 15 µl od každého vzorku pak bylo nanášeno na 10% polyakrylamidový gel. Po elektroforetickém rozdělení vzorků byly proteiny z gelu přeneseny na membránu metodou western blot.

Membrána byla rozstřížena na dvě části. Vrchní část membrány byla inkubována s roztokem s primární protilátkou proti proteinu Src (anti-v-Src) a s roztokem se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (GAM-HRP). Spodní část membrány byla inkubována s roztokem s primární protilátkou proti proteinu GFP (anti-GFP) a s roztokem se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (GAR-HRP).

Ačkoli byly linie buněk selektovány dvakrát na podobnou hladinu fluorescence, je patrné, že linie buněk vykazovaly navzájem značný rozdíl v hladině proteinu EGFP a variant kinázy Src (obr. 4.3.5a, b). Nejvýraznější nadprodukce proteinu Src bylo dosaženo u variant Y90F-Src a c-Src. U variant v-SrcPRC a Y90E-Src byla také zvýšená nadprodukce, ale v porovnání s Y90F-Src a c-Src přesto slabší. U variant nesoucích mutaci Y527F byla nadprodukce jen velmi slabá, ačkoli množství proteinu EGFP bylo v těchto buňkách na podobné úrovni jako u variant v-SrcPRC a Y90E-Src. Zejména u varianty v-Src527F bylo celkové množství proteinu Src srovnatelné s kontrolními buňkami nesoucími vektor pIRES2-EGFP.



Obr. 4.3.5a,b Ověření míry exprese variant proteinu Src (obr. a) a proteinu EGFP (obr. b) ve fibroblastech linie RAT2. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Obr. a Membrána - 1. anti-v-Src (1:1000); 2. GAM-HRP (1:5000). Obr. b Membrána - 1. anti-GFP (1:1000); 2. GAR-HRP (1:1000).

Testování schopnosti tvorby foci u stabilně transfekovaných RAT2 fibroblastů

Část buněk, která byla od druhé selekce pomocí FACS nepřetržitě kultivována v termostatu, byla i přes značné rozdíly v hladinách exprese variant kinázy Src podrobena testu schopnosti tvorby foci. Od každé linie buněk nesoucích příslušnou variantu kinázy Src bylo na velké misky (\varnothing 100 mm) vyseto $4 \cdot 10^6$ buněk. Přibližně třetí den po vysetí byly misky plně konfluentní a byly ponechány růst dalších 14 dní.

Po uplynutí této doby při vyhodnocování pod mikroskopem buňky všech linií na plotnách rostly v jedné vrstvě a nebyly patrné žádné vytvořené foci. Nepřítomnost foci po expresi variant proteinu Src ve fibroblastech linie RAT2 byla překvapivá, zvláště pak u buněk s nadprodukovanou kinázově aktivní formou v-SrcPRC.

Vliv exprese variant proteinu Src na fosforylaci substrátů u stabilně transfekovaných RAT2 fibroblastů

Přestože se přítomnost variant proteinu Src neprojevovala výrazně na fenotypu buněk, dal se očekávat vliv na fosforylaci substrátů kinázy Src v buňkách. Při porovnávání fosforylace substrátů bylo přihlíženo k množství dané varianty proteinu Src přítomné v savčích buňkách i k míře autofosforylace Tyr 416 při expresi v systému *S. cerevisiae* odrážející relativní kinázovou aktivitu dané varianty.

Pro tento účel byly připraveny nové lyzáty z buněk kultivovaných po dobu 4 týdnů od druhé selekce pomocí FACS. Celková proteinová koncentrace v lyzátech byla upravena na srovnatelnou hladinu pomocí soupravy D_c Protein Assay a 15 μ l z lyzátů bylo nanášeno na čtyři 10% polyakrylamidové gely. Po proběhnuté elektroforéze byly proteiny přeneseny na membrány metodou western blot.

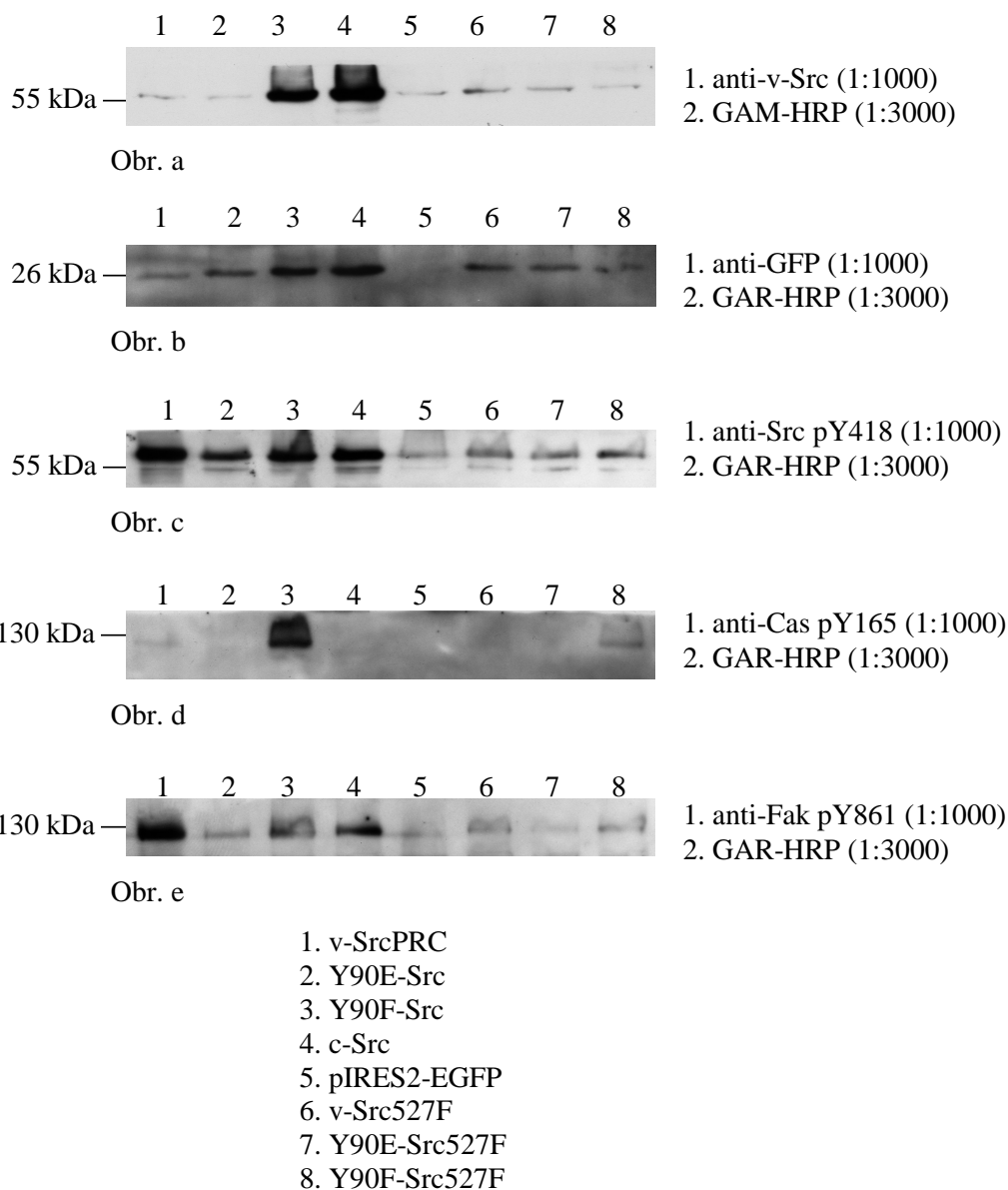
Poté byly membrány rozstříhány, jejich části inkubovány s roztoky s následujícími primárními protilátkami proti: proteinu Src (anti-v-Src), proteinu GFP (anti-GFP), fosforylovanému proteinu Src na Tyr 416 (anti-Src pY418), fosforylovanému proteinu Cas (anti-p130Cas pY165) a fosforylovanému proteinu Fak (anti-Fak pY861) a příslušnými sekundárními protilátkami konjugovanými s HRP (obr. 4.3.6a-d).

Při porovnání obrázku 4.3.5a, b s obrázkem 4.3.6a, b, kde byly použity lyzáty připravené z buněk cca 14 dní po druhé selekci je patrný pokles exprese proteinu Src

u linií buněk s variantami v-SrcPRC a Y90E-Src. Pokles exprese těchto variant však není doprovázen srovnatelně výrazným snížením množství proteinu EGFP. Při porovnání obrázků 4.3.5b a 4.3.6b je patrné, že hladiny proteinu EGFP v obou sadách lyzátů na přibližně srovnatelné úrovni. Fosforylace Tyr 416 (obr. 4.3.6c) odpovídajícím způsobem odráží kinázovou aktivitu a množství dané varianty Src v savčích buňkách. To nejlépe znázorňuje například varianta v-SrcPRC, kdy přes nepříliš vysokou nadprodukcii v buňkách je poměrně výrazně fosforylována na Tyr 416 v aktivační smyčce.

Fosforylace proteinu Fak (obr. 4.3.6e) se zdá být odpovídající vzhledem k množství variant Src a míře jejich autofosforylace na Tyr 416. Avšak u varianty Y90E-Src, ačkoli je více autofosforylována na Tyr 416 než c-Src v *S. cerevisiae*, můžeme pozorovat slabší fosforylaci kinázy Fak. U varianty Y90E-Src527F je také patrné zeslabení fosforylace proteinu Fak téměř na úroveň prázdného vektoru, i když je tato varianta přítomna v buňkách ve srovnatelném množství jako varianty v-Src527F a Y90F-Src527F, které vykazují podobnou úroveň autofosforylace.

U proteinu Cas (obr. 4.3.6d) je vyšší fosforylace pouze u variant Y90F-Src a Y90F-Src527F. U varianty Y90F-Src může být obohacení fosforylace částečně přičítáno značné nadprodukcii této varianty v buňkách. U Y90F-Src527F se však tato fosforylace jeví nejspíše jako důsledek zesílené interakce mezi touto variantou a proteinem Cas. Tento signál totiž nelze pozorovat u variant v-Src527F a Y90E-Src527F, které jsou v buňkách přítomny ve srovnatelném množství jako varianta Y90F-Src527F a vykazují podobnou míru autofosforylace na Tyr 416.



Obr. 4.3.6a-e Ověření míry exprese variant proteinu Src (obr. a) a proteinu EGFP (obr. b), ověření fosforylace Y416 v aktivační smyčce (obr. c) a zhodnocení fosforylace vybraných substrátů kinázy Src (obr. d, e). Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk, primární a sekundární protilátky jsou uvedené vpravo vedle obrázků.

Výsledky získané v této sadě pokusů však mohou sloužit jen pro velmi orientační odhad vlivu jednotlivých variant kinázy Src na fosforylaci substrátů. Pro přesnější porovnání vlivu variant kinázy Src na fosforylaci substrátů je třeba v buňkách dosáhnout alespoň přibližně stejné nadprodukce u všech variant. Pro tento účel byla provedena transientní transfekce popsaná v následujícím oddíle.

4.3.2.4 Vliv exprese variant proteinu Src na fosforylaci substrátů u transientně transfekovaných RAT2 fibroblastů

Protože se při opakované selekci buněk RAT2 fibroblastů pomocí FACS nepodařilo získat linie buněk se vzájemně srovnatelnou mírou exprese variant kinázy Src, byla zvolena k dosažení tohoto cíle metoda transientní transfekce. Při stabilní transfekci jsou buňky dlouhodobě kultivovány a selektovány v přítomnosti příslušného antibiotika. To může způsobovat u některých buněk postupnou ztrátu exprese žádaného genu či snižování množství proteinového produktu přítomného v buňkách. V případě transientní transfekce je přítomnost proteinového produktu genu analyzována časně po transfekci (v našem případě třetí den po transfekci), kdy dosahuje exprese daného genu vysoké úrovně.

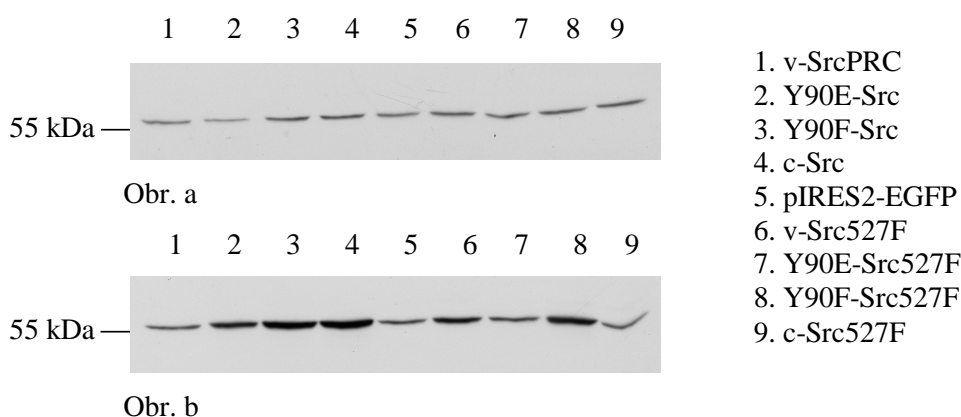
Při transientní transfekci bylo použito dvou různých množství (v našem případě 3 a 15 μg) plazmidové DNA. Tím se mělo dosáhnout částečného vyrovnání rozdílné exprese variant proteinu Src. Kinázově aktivnější varianty proteinu Src jsou důsledkem různých regulačních mechanismů často přítomny v buňkách spíše v menším množství než kinázově méně aktivní varianty. Fosforylace substrátů by se pak mohla porovnávat u kinázově aktivnějších forem proteinu Src v lyzátech z buněk transfekovaných vyšším množstvím plazmidové DNA s lyzáty buněk s méně kinázově aktivními variantami, které by se připravily z buněk transfekovaných menším množstvím DNA.

Pro transientní transfekci bylo připraveno 17 misek s konfluencí cca 80% a RAT2 fibroblasty byly transfekované pomocí reagentie Lipofectamine 2000 dvěma různými množstvími plazmidové DNA konstruktů pIRES-EGFP nesoucími varianty genu *src*: *v-src*PRC, *Y90E-src*, *Y90F-src*, *c-src*, *Y90E-src527F*, *Y90F-src527F*, *v-src527F* a *c-src527F*. Buňky byly také transfekovány prázdným vektorem, zde byly použity k jediné transfekci 3 μg plazmidové DNA. K 3 μg DNA bylo přidáváno vždy 15 μl transfekční reagentie, k 15 μg se přidávalo 30 μl .

Třetí den po transfekci byly z buněk připraveny lyzáty, jejichž celková proteinová koncentrace byla upravena na srovnatelnou hladinu pomocí soupravy D_c Protein Assay. Na dva 10% polyakrylamidové gely bylo nanášeno 20 μl lyzátů, na jeden gel sada lyzátů získaných z buněk transfekovaných 3 μg plazmidové DNA, na druhý gel sada lyzátů získaných z buněk transfekovaných 15 μg plazmidové DNA.

Po rozdělení vzorků elektroforézou byly proteiny přeneseny na membrány metodou western blot.

Obě membrány byly inkubovány s roztokem primární protilátky proti proteinu Src (anti-v-Src) a poté se sekundární protilátkou konjugovanou s HRP (GAM-HRP). Z obr. 4.3.7a je patrné, že bohužel u buněk transfekovaných 3 μg plazmidové DNA nebylo dosaženo výraznější nadprodukce variant proteinu Src. U buněk transfekovaných 15 μg plazmidové DNA (obr. 4.3.7b) bylo slabší nadprodukce dosaženo pouze u variant Y90E-Src, v-Src527F a Y90F-Src527F; silnější nadprodukce pak u variant Y90F-Src a c-Src.

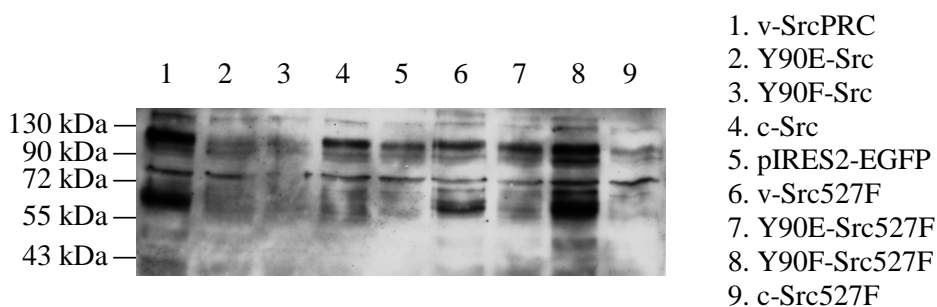


Obr. 4.3.7a, b Ověření míry exprese variant proteinu Src. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Obr. a, b obě membrány - 1. anti-v-Src (1:1000); 2. GAM-HRP (1:3000)

Pro orientační porovnání fosforylace substrátů kinázy Src a celkové tyrozínové fosforylace v buňkách bylo naneseno 20 μl lyzátů připravených z buněk transfekovaných 15 μg plazmidové DNA na tři 10% polyakrylamidové gely. Po rozdělení vzorků elektroforézou byly proteiny přeneseny na membránu metodou western blot.

Membrány byly inkubovány s roztoky primárních protilátek proti fosforylovanému tyrozínu (pY20), proti fosforylovanému proteinu Cas (anti-p130Cas pY165) a fosforylovanému proteinu Fak (anti-Fak pY861). Poté s roztoky sekundárních protilátek konjugovaných s HRP (GAM-HRP, resp. GAR-HRP).

Na obr. 4.3.8 je patrná výraznější tyrozínová fosforylace u variant v-SrcPRC, Y90F-Src527F a v-Src527F, které vykazují buď zvýšenou míru autofosforylace anebo v případě variant Y90F-Src527F a v-Src527F i vyšší míru exprese. U c-Src lze zvýšenou tyrozínovou fosforylací přičítat značné nadprodukci této varianty v buňkách. U ostatních variant je tyrozínová fosforylace na srovnatelné úrovni s buňkami nesoucími prázdný vektor.



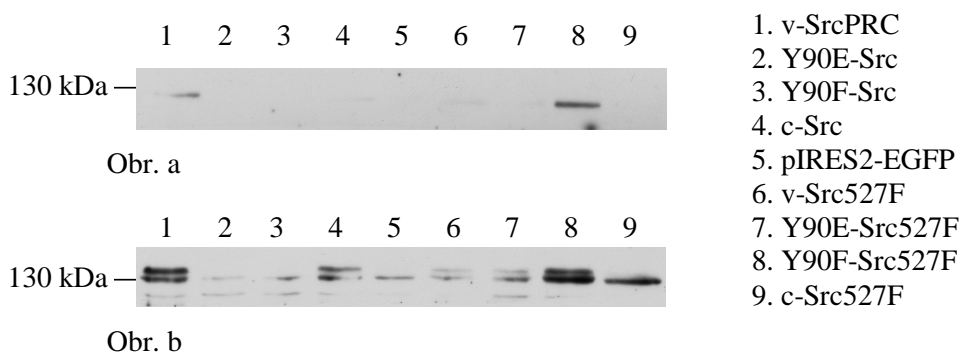
Obr. 4.3.8 Srovnání celkové tyrozínové fosforylace v buňkách nesoucích varianty kinázy Src. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Membrána – 1. pY20 (1:1000); 2. GAM-HRP (1:3000).

V případě fosforylace substrátu kinázy Src, proteinu Cas (obr. 4.3.9a), se výraznější fosforylace objevila jen u variant v-SrcPRC a Y90F-Src527F, velmi slabý náznak fosforylace můžeme pozorovat také u varianty c-Src. U varianty v-Src je fosforylace odrazem zvýšené aktivity virové kinázy. U varianty c-Src lze slabý signál přičítat výrazné nadprodukci tohoto proteinu v buňkách. V případě Y90F-Src527F byla zvýšená fosforylace proteinu Cas pozorována i u stabilně transfekovaných buněk RAT2, kde bylo přítomno daleko menší množství této varianty (viz obr. 4.3.6d v předchozí kapitole). Zde by tento silnější signál částečně mohl odrážet vyšší nadprodukci této varianty, avšak mohl by se též přičítat i silnější interakci s proteinem Cas.

V případě kinázy Fak (obr. 4.3.9b) je fosforylace na odpovídající úrovni vzhledem k přítomnému množství a předpokládané míře kinázové aktivity u variant v-Src, c-Src, Y90F-Src527F a c-Src527F. Nejvýraznější obohacení je tedy patrné u kinázově aktivní varianty v-Src a u značně nadprodukovaných variant c-Src a Y90F-Src527F. U variant v-Src527F a Y90E-Src527F je signál o něco málo slabší v porovnání s variantou c-Src, pravděpodobně vlivem menšího množství v buňkách. U variant Y90E-Src a Y90F-Src, které byly prokazatelně v buňkách

nadprodukovány, je intenzita signálu překvapivě na úrovni buněk nesoucích prázdný vektor.

Opět však musíme konstatovat, že porovnání fosforylace substrátů a fosfotyrozínového profilu je pouze orientační, neboť nebylo dosaženo srovnatelné exprese variant proteinu Src v jednotlivých liniích buněk RAT2.



Obr. 4.3.9a, b Srovnání fosforylace substrátů kinázy Src proteinů Cas a Fak. Popis nanášky odpovídá variantě proteinu Src (příp. prázdnému vektoru) přítomné v jednotlivých populacích buněk. Obr. a membrána – 1. anti-p130Cas pY165 (1:1000); 2. GAR-HRP (1:3000). Obr. b membrána – 1. anti-Fak pY861 (1:1000); 2. GAR-HRP (1:3000).

5. Diskuse

Heterologní exprese proteinu Src v *S. cerevisiae* přispěla k objasnění mechanismů regulace kinázové aktivity a dalších charakteristik tohoto onkoproteinu (Boschelli *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1993; Brábek a Mojžita *et al.*, 2002; Tribble *et al.*, 2006).

V našem případě jsme heterologní expresi variant proteinu Src v *S. cerevisiae* využili pro porovnání jejich kinázové aktivity a pro sledování efektu exprese na viabilitu kvasinkových buněk. Podařilo se úspěšně exprimovat varianty kinázy Src s mutací Y90E, Y90F v SH3 doméně, varianty nesoucí mutaci Y90E, Y90F a zároveň mutaci Y527F, varianty c-Src a c-Src527F, varianty v-SrcPRC a v-Src527F (SH3 doména v-SrcPRC).

Při srovnávání kinázové aktivity jednotlivých variant bylo využito porovnání intenzity fosforylace Tyr 416 v aktivačním segmentu. Fosforylace Tyr 416 přímo koreluje s kinázovou aktivitou, je nepostradatelná pro plnou aktivaci kinázy Src a v buňkách probíhá zejména mechanismem intermolekulární autofosforylace (Boerner *et al.*, 1996; Barker *et al.*, 1995). Míra autofosforylace jednotlivých variant byla tedy vyjádřena pomocí denzitometrického vyhodnocení jako podíl proteinu fosforylovaného na Tyr 416 v celkovém množství přítomného proteinu a porovnána s mírou autofosforylace varianty c-Src (viz obr. 4.2.5).

V případě variant c-Src527F, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F a v-Src527F byla autofosforylace Tyr 416 cca 4,5 krát až 6 krát vyšší než u varianty c-Src. To bylo s největší pravděpodobností způsobeno přítomností záměny Tyr 527 za nefosforylovatelný Phe. Tyr 527 může podléhat v kvasinkových buňkách intermolekulární autofosforylaci a negativně ovlivňovat kinázovou aktivitu vazbou SH2 domény (Osusky *et al.*, 1995). SH2 doména může vázat s nízkou afinitou i motiv s Tyr 527, který není fosforylován, a tak přispívat k udržování kompaktnější konformace molekuly Src. V případě záměny Tyr za nepolární Phe by však SH2 doména mohla vázat motiv v C-koncové oblasti s ještě menší afinitou, což by se mohlo projevit zvýšenou kinázovou aktivitou (Murphy *et al.*, 1993).

V souladu s tím byla pozorována u variant Y90E-Src a Y90F-Src, kde byl tyrozín na pozici 527 zachován, nižší míra autofosforylace Tyr 416. V případě varianty Y90F-Src nedosahovala autofosforylace srovnatelné úrovně s variantou

c-Src. To bylo pravděpodobně způsobeno přítomností fenylalaninu 90 na vazebném povrchu SH3 domény, který mohl zvyšovat celkovou hydrofobicitu vazebné kapsy, přispívat k zesílení vazby s CD linkerem a k udržování inhibiční intramolekulární vazby.

U varianty Y90E-Src došlo ke značnému nárůstu autofosforylace Tyr 416, který představoval cca 3,5 násobek autofosforylace u c-Src. Zvýšení kinázové aktivity lze u této varianty nepochybně přičítat přítomnosti glutamátu 90 ve vazebné kapse SH3 domény. Záporně nabitý Glu 90 mohl způsobovat změnu náboje a struktury na vazebném povrchu SH3 domény a tím znesnadňovat interakci s CD linkerem. To mohlo vyvolat částečné narušení jedné z intramolekulárních regulačních vazeb a následně zvýšenou pravděpodobnost částečné aktivace.

Pro přesné stanovení kinázových aktivit jednotlivých variant proteinu Src bylo zřejmě nejvhodnější provést měření *in vitro* inkorporace radioaktivně značeného $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP do substrátového peptidu nebo využít např. jedné z komerčně vyráběných souprav, kdy je fosforylace substrátového peptidu snadno detekovatelná pomocí nárůstu fluorescence. Měření kinázové aktivity pomocí jedné z metod je plánováno v dalším pokračování projektu.

Expese variant proteinu Src ovlivňovala viabilitu kvasinkových buněk *S. cerevisiae* různým způsobem. Při testování viability kvasinek s variantami Src na plotnách s médiem s galaktózou a rafinózou nebylo možné pozorovat výrazné rozdíly v nárůstu biomasy. Mezi jednotlivými buněčnými kulturami nesoucími různé varianty Src a nebo varianty Src zároveň s kinázou Csk nebyl signifikantní rozdíl. To vzeslo možnost vzájemné kontaminace mezi kvasinkovými liniemi buněk. Při ověřování této možnosti se však prokázalo, že linie kontaminovány nebyly. U buněk nesoucích zároveň kinázy Csk a Src nebyla však expese kinázy Csk detekována, i když buňky vykazovaly přítomnost selekčního markeru (gen *HIS3*) přítomného na plazmidu spolu s genem *csk*. Gen *csk* byl do buněk vnášen vložený do nízkokopiového integrativního vektoru pRS313, z toho vyplývá možnost, že mohlo dojít k integraci pouze úseku se selekčním markerem a že gen *csk* nebyl do chromozomu integrován. Vzhledem k tomu byla viabilita dále testována pouze u buněk nesoucích samotné varianty kinázy Src.

Pro další testování viability kvasinkových buněk byly podmínky nastaveny přísněji. Indukce expese variant Src probíhala na plotnách pouze s galaktózou jako jediným zdrojem uhlíku. Do tohoto testu byly také zařazeny buňky nesoucí varianty

kinázy Src s mutací Y527F. Zde se projevil zhoršený nárůst biomasy u obou sérii ploten s galaktózou pouze u buněk nesoucích variantu v-SrcPRC. Linie kvasinkových buněk nesoucích ostatní varianty kinázy Src rostly srovnatelně s kontrolními buňkami nesoucími prázdný vektor. Výsledek testu viability byl pak podpořen porovnáním tyrozínové fosforylace přítomné v buňkách, kdy jen u linie s variantou v-Src byl patrný zvýšený výskyt fosforylace na tyrozínových zbytcích.

U buněk s variantou v-Src byl výskyt výrazně menšího nárůstu biomasy a zvýšené tyrozínové fosforylace substrátů doložen v řadě jiných studií. V těchto studiích bylo pozorováno, že exprese v-Src v *S. cerevisiae* doprovázená masivní fosforylací je buď pro buňky zcela lethální (Boschelli *et al.*, 1993; Brugge *et al.*, 1987) a nebo alespoň inhibuje jejich růst (Kornbluth *et al.*, 1987; Florio *et al.*, 1994). V našem případě nebylo možné pomocí zvolené metody pro testování viability buněk určit, zda je přítomnost varianty v-SrcPRC pro buňky zcela lethální nebo ne. Při růstu buněk na plotnách s galaktózou bylo možné v místě největšího nánosu biomasy pozorovat vždy několik oddělených kolonií nebo více souvislejší nárůst buněk. Tento nárůst buněk nelze jednoznačně přisoudit schopnosti buněk růst i v přítomnosti v-Src. Buňky nesoucí v-Src mohly také využít živiny z odumřelých nanesených buněk na plotnách a tak být částečně nezávislé na galaktóze v kultivačním médiu.

Kvasinkové kultury nesoucí ostatní varianty proteinu Src (Y90E-Src, Y90F-Src, c-Src, c-Src527F, Y90E-Src527F, Y90F-Src527F a v-Src527F) projevovaly míru viability a tyrozínové fosforylace endogenních substrátů na srovnatelné úrovni jako buňky nesoucí prázdný vektor. Podobný jev, kdy kvasinkové buňky po expresi různých variant proteinu c-Src neztrácely viabilitu a nevyskytovala se u nich zvýšená fosforylace substrátových proteinů, byl popsán i v dalších studiích. Například Boschelli a kol. pozoroval, že buňky po indukcii exprese kinázy c-Src na pevném médiu i v tekuté třepané kultuře s galaktózou vykazují velice podobnou míru viability jako kontrolní buňky nesoucí prázdný vektor. Také tyrozínová fosforylace byla u buněk s variantou c-Src na úrovni kontroly (Boschelli *et al.*, 1993). V jiné studii pocházející z laboratoře prof. Martina porovnávali viabilitu a tyrozínovou fosforylací u buněk *S. cerevisiae* nesoucích různé aktivované varianty kinázy Src. U varianty c-SrcY527F byla v této studii pozorována kinázová aktivita *in vitro* na podobné úrovni jako u proteinu v-Src kmene Schmidt-Ruppin. Avšak i přes to byla tato varianta Src pro buňky jen mírně toxická

a i tyrozínová fosforylace substrátů byla pouze lehce zvýšená oproti kontrolním buňkám s prázdným vektorem (Trager a Martin, 1997).

V kontrastu s tím jsou studie, kdy byla snížena viabilita a vyšší míra fosforylace substrátů pozorována u buněk *S. cerevisiae* i při expresi kinázy c-Src. Murphy a kol. pozoroval, že i exprese proteinu c-Src způsobuje výraznou inhibici růstu kvasinkových buněk doprovázenou nárůstem fosforylovaných proteinů. Srovnatelný efekt měla na buňky i exprese aktivované formy c-SrcY527F (Murphy *et al.*, 1993). I ve studii pocházející z laboratoře prof. Smithgalla se v případě exprese kinázy c-Src v *S. cerevisiae* objevovala u buněk snížená míra viability a stoupla fosforylace endogenních kvasinkových substrátů (Trible *et al.*, 2006).

Rozdílná pozorování efektu exprese variant c-Src nebo c-SrcY527F na viabilitu a tyrozínovou fosforylaci substrátů ve výše uvedených studiích mohla být způsobena mnoha faktory, např. používáním různých typů vysokokopiových replikativních vektorů, odlišnými typy kvasinkových kmenů a metodami transformace vektorů do kvasinkových buněk, odlišnými metodickými přístupy při provádění testů viability a podobně. V našem případě by bylo vhodnější studovat význam mutace Tyr 90 v SH3 doméně kinázy Src při koexpresi s kinázou Csk v systému *S. pombe*, kdy i záměna jedné aminokyseliny se může výrazně projevit na viabilitě buněk.

Při expresi proteinu Src v kvasinkovém systému se prokázal vliv záměny Tyr 90 v SH3 doméně na autofosforylaci Tyr 416 v aktivačním segmentu u variant bez mutace Y527F. Pro objasnění vlivu mutace Tyr 90 v SH3 doméně na schopnost kinázy Src *in vivo* ovlivnit fenotyp savčích buněk a fosforylaci substrátů v porovnání s ostatními variantami kinázy Src bylo nutné uskutečnit expresi variant proteinu Src v savčích buňkách.

Pro expresi variant proteinu Src byly jako první vybrány myší fibroblasty linie 3T3. Fibroblasty linie 3T3 se pro účel analýzy tyrozínové fosforylace a transformačního potenciálu různých forem kinázy Src dříve používaly i v jiných studiích, výhodou u těchto buněk byla vysoká účinnost transfekce (Erpel *et al.*, 1995; Gonfloni *et al.*, 1997).

V případě našeho experimentu se podařilo v 3T3 buňkách exprimovat proteinové varianty v-Src, Y90E-Src a c-Src. U c-Src byla nalezena nejvyšší hladina proteinu Src v 3T3 buňkách, u variant v-Src a Y90E-Src byla hladina nadprodukce

slabší než u c-Src. Ve všech buněčných liniích však byla celková hladina proteinu Src vyšší v porovnání s buňkami nesoucími prázdný vektor.

Rozdílnost hladin proteinu Src byla pravděpodobně způsobena odlišnou stabilitou jednotlivých variant v 3T3 buňkách. Kinázově aktivnější formy v-Src a pravděpodobně i Y90E-Src v buňkách podléhaly degradaci ubiquitin-proteazómovým systémem ve vyšší míře než jejich kinázově méně aktivní protějšek buněčný protein c-Src. Tento jev byl již dříve pozorován na modelu buněk linie Cos-7, kdy u kinázově aktivní formy v-Src a c-SrcY527F byl čas přítomnosti v buňkách nesrovnatelně nižší než u varianty c-Src či kinázově inaktivní varianty c-Src K295R a kinázově aktivní varianty podléhaly více ubiquitinylaci a následné degradaci v proteazómu (Harris *et al.*, 1999).

Další vysvětlení rozdílných hladin přítomnosti variant proteinu Src v buňkách by mohlo souviset s procesem zaujímání správné konformace zprostředkované chaperonovými proteiny. U forem v-Src nebo Y90E-Src by vlivem mutací obsažených v aminokyselinové sekvenci mohl tento proces probíhat s pomalejší kinetikou než u varianty c-Src, protože by vyžadoval delší trvání vazby chaperonů a interakci i s dalšími typy chaperonů, které by byly nezbytné pro zaujmutí správné konformace. Byla popsána existence vyšší afinity chaperonu Hsp90 k variantě v-Src než k proteinu c-Src i potřeba vazby dalších typů chaperonů pro maturaci v-Src (Hutchinson *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999). Avšak v těchto studiích nebyla definitivně vyřešena otázka, jak mohou tyto děje ovlivňovat celkový průběh procesu maturace forem Src obsahujících aminokyselinové záměny, které mohou vést k rozvolnění a menší stabilitě výsledné konformace.

Tyrozínová fosforylace proteinových substrátů ve fibroblastech linie 3T3 byla u jednotlivých variant proteinu Src odpovídající vzhledem k jejich přítomnému množství a předpokládané kinázové aktivitě. U varianty Y90E-Src však bylo možné pozorovat značné zeslabení tyrozínové fosforylace v pruhu odpovídajícímu velikostí cca 60 kilodaltonům, který pravděpodobně představoval fosforylovaný protein paxillin.

Paxillin je jedním ze substrátů kinázy Src asociovaných s integrinovou signalizací. Paxillin sice může vázat SH3 doménu proteinu Src *in vitro* a tak být fosforylován přímo touto kinázou kinázou, avšak na jeho fosforylaci *in vivo* se zřejmě podílí komplex kináz Src a Fak. Kináza Fak v tomto procesu slouží jako „dokovací“ místo pro proteiny Src a paxillin. Kináza Src se váže svojí SH3 a SH2

doménou na kinázu Fak, dochází k její aktivaci a následně fosforyluje protein paxillin, který je též vázaný na kinázu Fak (Weng *et al.*, 1993; shrnuto v Hanks *et al.*, 2003). Příčinnou zeslabení fosforylace proteinu paxillin by tedy mohla být vlivem mutace v SH3 doméně kinázy Src slabší interakce s kinázou Fak a tím i menší pravděpodobnost dosažení substrátu – proteinu paxillin (viz dále).

Na fibroblastech linie 3T3 nesoucích varianty v-Src, Y90E-Src a c-Src byl proveden test růstu buněk nezávisle na podkladu, jehož účelem bylo porovnat transformační potenciál jednotlivých variant proteinu Src. Při testování růstu fibroblastů linie 3T3 však byla zjištěna schopnost růst nezávisle na podkladu u všech typů buněk včetně buněk nesoucích pouze prázdný vektor, což naznačovalo možnost existence částečně transformovaného fenotypu těchto buněk ještě před započítáním experimentů. U fibroblastů linie 3T3 je tedy sice velmi účinná transfekce, ale tyto buňky mohou vykazovat některé vlastnosti společné s transformovanými buňkami a nehodí se tudíž pro pozorování změny fenotypu vlivem exprese variant proteinu Src.

V dalších studiích byly pozorovány u fibroblastů linie 3T3 při zvýšené expresi proteinu c-Src některé vlastnosti charakteristické pro transformované buňky. Při zvýšené expresi c-Src v 3T3 buňkách bylo možné pozorovat změnu tvaru na více kulovitý typ a sníženou adhezi buněk při růstu na miskách (Kato *et al.*, 1997; Shalloway *et al.*, 1984). Jiné studie popisují schopnost 3T3 buněk po expresi c-Src tvořit foci při růstu kultury a také tvořit kolonie v měkkém agaru (Johnson *et al.*, 1985; Sartor *et al.*, 1992; Shalloway *et al.*, 1984).

Proto bylo přistoupeno k transfekci jiných fibroblastů, konkrétně stabilních diploidních fibroblastů linie RAT2. Fibroblasty linie RAT2 nepodléhají tak snadno transformaci jako fibroblasty linie 3T3 a představují lepší model pro porovnání transformačního potenciálu a fosforylace substrátů u jednotlivých variant kinázy Src při expresi v buňkách. U fibroblastů linií 3T3 a RAT2 byl rozdíl v tendenci k transformaci zdokumentován např. na modelu exprese konstitutivně aktivní kinázy Btk, která obsahovala záměnu E41K v PH doméně. Fibroblasty linie 3T3 při expresi této varianty tvořily v měkkém agaru cca 50-100 kolonií o průměru větším než 0,5 mm. Při expresi kinázy Btk s mutací E41K ve fibroblastech linie RAT2 se při stejných podmínkách vytvořilo méně než 10 kolonií o průměru menším než 0,5 mm (Park *et al.*, 1996).

V RAT2 buňkách byly oproti fibroblastům linie 3T3 exprimovány navíc varianty kinázy Src nesoucí různé typy SH3 domén a mutaci Y527F. Exprese variant s různými SH3 doménami měla objasnit úlohu mutace Tyr 90 v kontextu molekuly kinázy Src částečně aktivované zrušením regulační vazby, která je zprostředkovaná interakcí SH2 domény s C-koncovou oblastí.

Při expresi variant kinázy Src bez mutace i s mutací Y527F ve fibroblastech linie RAT2 se opět projevila menší stabilita kinázově aktivnějších forem jako v případě exprese u 3T3 buněk. Nejvyšší nadprodukce v RAT2 buňkách se podařilo dosáhnout u kinázově nejméně aktivních variant Y90F-Src a c-Src, avšak i varianty Y90E-Src a v-SrcPRC byly v porovnání s kontrolou několikanásobně nadprodukovány. Nejméně se pak v buňkách vyskytovaly aktivované varianty nesoucí mutaci Y527F.

V průběhu 4 týdnů kultivace po druhé selekci pomocí FACS však u variant Y90E-Src a v-SrcPRC došlo ke značnému poklesu hladiny nadprodukce. To může opět souviset s jejich předpokládanou vyšší kinázovou aktivitou a jako v případě fibroblastů linie 3T3 odrážet rychlejší degradaci prostřednictvím ubiquitin-proteazómového systému, případně vliv ztížení průběhu procesu zaujímání správné konformace v buňkách. U fibroblastů linie 3T3 se trend postupného snižování hladiny variant proteinu Src v průběhu kultivace neprojevoval tak výrazným způsobem jako u fibroblastů linie RAT2, což opět může sloužit jako příklad rozdílných vlastností buněk těchto linií při expresi aktivovaných forem různých tyrozínových kináz.

Dalším příkladem, který podporuje předpoklad odlišnosti charakteristik fibroblastů linií RAT2 a 3T3, je schopnost tvorby foci při růstu buněk na miskách. Zatímco v našem experimentu nebyl pozorován výskyt foci po 14 dnech růstu u žádné z linií buněk, ani u RAT2 buněk nesoucích variantu v-SrcPRC, v jiných studiích pozorovali u 3T3 fibroblastů tvorbu foci i při zvýšené expresi varianty c-Src (Johnson *et al.*, 1985; Sartor *et al.*, 1992).

K pozorování změny fenotypu buněk po expresi variant proteinu Src se záměnou Tyr 90 v SH3 doméně či bez ní by se dalo využít například i epiteliálních nádorových buněk. Tyto buňky při expresi aktivované formy kinázy Src často podléhají tzv. epiteliálně-mezenchymální transici, kdy je patrná výrazná změna morfologie z kuboidního tvaru buněk na tvar charakteristický pro fibroblasty. Tento proces je vlivem aktivity kinázy Src doprovázen ztrátou mezibuněčných kontaktů

zprostředkovaných E-kadherinem a naopak zvýšením množství buněčných kontaktů s extracelulární matrix zprostředkovaných integriny (shrnutí v Frame, 2004). Pro tento efekt vyvolaný aktivovanou kinázou Src v buňkách je minimálně v některých případech důležitá kromě přítomnosti intaktní domény SH2 i přítomnost neporušené SH3 domény. V případě přítomnosti záměny W118A v SH3 doméně nádorové buňky tlustého střeva linie KM12C výše zmíněným procesům nepodléhají (Avizienyte *et al.*, 2004).

Ve fibroblastech linie RAT2 se nepodařilo dosáhnout srovnatelných hladin exprese variant proteinu Src ani u stabilní transfekce ani u transienční transfekce a proto bylo možné porovnávat míru fosforylace proteinů Cas a Fak u jednotlivých variant pouze orientačně.

V případě kinázy Fak bylo možno v obou experimentech pozorovat tendenci zeslabení fosforylace tohoto proteinu v buňkách nesoucích varianty Y90E-Src a Y90E-Src527F. U kinázy Fak podléhá po adhezi buněk zprostředkované skrze integriny autofosforylaci Tyr 397. Na fosforylovaný Tyr 397 se váže kináza Src svou SH2 doménou a interakce mezi proteiny Src a Fak je dále stabilizována vazbou SH3 domény na motiv RALPSIPKL (AK 368 – 376) v kináze Fak. Kináza Src se tak plně aktivuje a fosforyluje tyrozíny na různých pozicích v molekule kinázy Fak (Tyr 404, 576, 577, 861, 925) a v dalších substrátech (Thomas *et al.*, 1998; shrnutí v Hanks *et al.*, 2003).

V případě fosforylaci napodobující mutace Y90E na vazebném povrchu SH3 domény by mohlo docházet k zeslabení interakce mezi SH3 doménou kinázy Src a vazebným motivem bohatým na prolin obsaženém v kináze Fak. To by mohlo následně vést k méně účinné fosforylaci tyrozínových zbytků ve struktuře kinázy Fak. Tuto domněnku podporuje i studie zabývající se úlohou motivu RALPSIPKL kinázy Fak pro vazbu SH3 domény kinázy Src. Interakce kinázy Src se syntetickým peptidem *in vitro*, který nesl mutaci prolinů v motivu RALPSIPKL na alanin a neporušené místo pro vazbu SH2 domény, vykazovala nižší afinitu vzájemné vazby a umožňovala pouze částečnou aktivaci kinázy Src v porovnání s peptidem, kde byla obě vazebná místa zachována. V případě mutace prolinů v motivu RALPSIPKL na alanin se *in vivo* výrazně zhoršovala interakce kinázy Fak s kinázou Src. Mutace v tomto motivu následně omezovaly fosforylaci proteinu Fak zprostředkovanou kinázou Src *in vivo* a také redukovaly schopnost kinázy Fak zprostředkovat *in vivo* fosforylaci proteinu paxillin kinázou Src (Thomas *et al.*, 1998). Tato studie sice

dobře zapadá do předpokládaného modelu, že po narušení vazby vlivem přítomnosti mutace Y90E v SH3 doméně dochází k zeslabení interakce mezi proteinem Src a kinázou Fak, avšak pro přesnější objasnění vlivu této mutace na vzájemnou vazbu těchto proteinů bude třeba dalších experimentů.

V případě adaptorového proteinu Cas se objevovalo u buněk nesoucích varianty kinázy Src s mutací Y90F v SH3 doméně naopak zesílení fosforylace, a to zejména u varianty Y90F-Src527F. Protein Cas může být fosforylován kinázou Src *in vivo* dvěma mechanismy podobně jako protein paxillin. V prvním případě se může protein Cas vázat na kinázu Fak a být fosforylován kinázou Src, která je také „dokována“ na kináze Fak. V druhém případě se nejprve váže kináza Src svou SH3 doménou na motiv bohatý na prolin obsažený v proteinu Cas (AK 639 – 645) a fosforyluje přilehlé tyrozíny (Tyr 668 a/nebo Tyr 670), které pak slouží pro vazbu SH2 domény a další stabilizaci interakce mezi proteiny Src a Cas. Kináza Src kromě výše zmíněných tyrozínů fosforyluje také tyrozíny (v motivech Tyr-X-X-Pro) v substrátové doméně proteinu Cas a vytváří se tak vazebná místa pro SH2 a PTB domény dalších proteinů. Oba dva mechanismy fosforylace proteinu Cas mohou v buňkách fungovat *in vivo*, ačkoli fosforylace zprostředkovaná komplexem kináz Fak a Src probíhá efektivněji než fosforylace proteinu Cas samotnou kinázou Src (Burnham *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 2001).

Zesílení fosforylace proteinu Cas v přítomnosti kinázy Src se záměnou Y90F v SH3 doméně by mohlo být způsobeno „pevnější“ vazbou mezi těmito proteiny. Fenylalanin na pozici 90 by přispíval k částečnému zvýšení hydrofobicity vazebného povrchu SH3 domény a následně pak ke zvýšení afinity vazby RPLPSPP motivu přítomného v proteinu Cas. Tato domněnka se jeví jako pravděpodobnější než vysvětlení, že zvýšená fosforylace proteinu Cas by byla přítomna vlivem zesílení interakce SH3 domény kinázy Src s kinázou Fak. V tomto případě bychom mohli pozorovat i navýšenou fosforylací u kinázy Fak, avšak ta se v buňkách s variantami Y90F-Src a Y90F-Src527F nevyskytovala. Podobný příklad zesílené interakce byl popsán u proteinu Grb2, který obsahoval mutaci Y209F (homologní k Y136 u kinázy Src) na vazebném povrchu SH3 domény. Interakce Grb2Y209F s proteinem Sos přetrvávala v buňkách linie A431 *in vivo* po delší dobu v porovnání s dobou interakce mezi wt formou Grb2 a proteinem Sos (Li *et al.*, 2001). V našem případě bude přesný mechanismus interakce s proteinem Y90F-Src527F a význam následné zesílené fosforylace proteinu Cas objasňován v průběhu další experimentální práce.

Hypotetický model vlivu fosforylace Tyr 90 v SH3 doméně na kinázovou aktivitu a vazbu ligandů

Z pozorování exprese variant proteinu Src se záměnou Tyr 90 v SH3 doméně v kvasince *S. cerevisiae* a savčích fibroblastech linií RAT2 a 3T3 můžeme vytvořit hypotetický model vlivu fosforylace Tyr 90 na kinázovou aktivitu a vazbu ligandů.

Tyrozín 90 je situován na vazebném povrchu SH3 domény a jeho fosforylace by mohla výrazně ovlivnit celkovou prostorovou strukturu vazebné kapsy a i náboj přítomný na jejím povrchu.

V případě interakce SH3 domény obsahující fosforylovaný tyrozín 90 s úsekem CD linkeru by mohlo docházet k zeslabení afinity vzájemné vazby. Pozměněná struktura vazebného povrchu SH3 domény by prolinu 250 obsaženém v CD linkeru nedovolovala zapadat dostatečně hluboko do vazebné kapsy. Následně by docházelo k většímu rozvolnění jedné z intramolekulárních inhibičních vazeb. Důsledkem toho by pak kináza Src mohla zaujímat částečně aktivní konformaci i bez vyvázání SH3 domény jiným interakčním partnerem a vykazovat zvýšenou kinázovou aktivitu. Nelze vyloučit ani možnost, že při vazbě interakčního partnera na SH2 doménu by mohla být pozorována u varianty s fosforylovaným Tyr 90 v SH3 doméně vyšší kinázová aktivita než u varianty c-Src po navázání stejného interakčního partnera.

Při interakci vazebných partnerů s SH3 doménou obsahující fosforylovaný tyrozín 90 by také mohlo docházet k ovlivnění vzájemné vazby. Někteří interakční partneři s určitými typy vazebných motivů by se mohli vázat s nižší afinitou na SH3 doménu, protože jejich vazebný motiv by se neměl možnost ideálně vkládat do hydrofóbních kapes na vazebném povrchu. U jiných interakčních partnerů by mohla afinita vazby po fosforylaci Tyr 90 v SH3 doméně zůstat přibližně na stejné úrovni. Spektrum vazebných partnerů by se po fosforylaci Tyr 90 mohlo výrazně měnit, což by modulovalo signální kaskádu vedoucí od kinázy Src dále.

Na závěr můžeme shrnout, že kináza Src fosforylovaná na Tyr 90 bude pravděpodobně mít *in vivo* vyšší kinázovou aktivitu, ale omezenou schopnost interakce s některými typy ligandů.

6. Shrnutí

- Byla připravena varianta kinázy c-Src se záměnou Y90F v SH3 doméně a dále varianty kinázy Src nesoucí varianty SH3 domény odvozené od c-Src, Y90E-Src, Y90F-Src a v-Src PRC a zároveň mutaci Y527F.
- Varianty kinázy Src (včetně varianty Y90E-Src) byly exprimovány v kvasince *S. cerevisiae*, stabilně exprimovány v savčích fibroblastech linie 3T3 a stabilně i transientně exprimovány v savčích fibroblastech linie RAT2.
- V expresním systému *S. cerevisiae* byla porovnána míra autofosforylace Tyr 416 u variant kinázy Src a na základě míry autofosforylace bylo usouzeno na relativní kinázovou aktivitu jednotlivých variant. U varianty Src se záměnou Tyr 90 v SH3 doméně za Glu se autofosforylace Tyr 416 výrazně zvýšila v porovnání s c-Src, zatímco opačný trend se objevoval u varianty se záměnou Tyr 90 za Phe. U variant proteinu Src se záměnami Tyr 90 a s mutací Tyr 527 se autofosforylace Tyr 416 signifikantně nezvyšovala oproti variantě c-Src527F.
- Byl také sledován vliv exprese variant proteinu Src na viabilitu a tyrozínovou fosforylaci v buňkách *S. cerevisiae*. Překvapivě pouze u buněk nesoucích variantu v-SrcPRC jsme pozorovali výrazně menší nárůst doprovázený zvýšenou tyrozínovou fosforylací endogenních proteinových substrátů.
- V savčích fibroblastech linií 3T3 a RAT2 byla orientačně porovnána fosforylace vybraných substrátů kinázy Src. U variant se záměnou Tyr 90 za Glu bylo možné v buňkách pozorovat tendenci zeslabení fosforylace u kinázy Fak a pravděpodobně i u proteinu paxillin. U variant se záměnou Tyr 90 za Phe se naopak objevila zesílená fosforylace u adaptorového proteinu Cas. U RAT2 fibroblastů byl pozorován vliv exprese jednotlivých variant Src na fenotyp buněk.

- Na základě výsledků pozorování exprese variant proteinu Src v kvasince *S. cerevisiae* a savčích fibroblastech linií 3T3 a RAT2 byl vytvořen hypotetický model vlivu fosforylace Tyr 90 v SH3 doméně na kinázovou aktivitu a interakci s ligandy. Fosforylace Tyr 90 by podle tohoto modelu mohla vést ke zvýšení kinázové aktivity u proteinu Src, avšak zároveň k omezení schopnosti vázat některé typy interakčních partnerů.

7. Literatura

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

Avizienyte E, Fincham VJ, Brunton VG, Frame MC. (2004) Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 15, 2794-803.

Barker SC, Kassel DB, Weigl D, Huang X, Luther MA, Knight WB. (1995) Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process. *Biochemistry.* 34, 14843-51.

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

Boerner RJ, Kassel DB, Barker SC, Ellis B, DeLacy P, Knight WB. (1996) Correlation of the phosphorylation states of pp60c-src with tyrosine kinase activity: the intramolecular pY530-SH2 complex retains significant activity if Y419 is phosphorylated. *Biochemistry.* 35, 9519-25.

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

Boschelli F, Uptain SM, Lightbody JJ. (1993) The lethality of p60v-src in *Saccharomyces cerevisiae* and the activation of p34CDC28 kinase are dependent on the integrity of the SH2 domain. *J Cell Sci.* 105, 519-28.

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

Breitenlechner CB, Kairies NA, Honold K, Scheiblich S, Koll H, Greiter E, Koch S, Schäfer W, Huber R, Engh RA. (2005) Crystal structures of active SRC kinase domain complexes. *J Mol Biol.* 353, 222-31.

Broome MA, Hunter T. (1996) Requirement for c-Src catalytic activity and the SH3 domain in platelet-derived growth factor BB and epidermal growth factor mitogenic signaling. *J Biol Chem.* 271, 16798-806.

- Broome MA, Hunter T. (1997) The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding. *Oncogene*. 14, 17-34.
- Brown MT, Cooper JA. (1996) Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1287, 121-49.
- Brugge JS, Jarosik G, Andersen J, Qeral-Lustig A, Fedor-Chaiken M, Broach JR. (1987) Expression of Rous sarcoma virus transforming protein pp60v-src in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Mol Cell Biol*. 7, 2180-7.
- Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH. (2000) Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. *Mol Cell Biol*. 20, 5865-78.
- Buss JE, Kamps MP, Gould K, Sefton BM. (1986) The absence of myristic acid decreases membrane binding of p60src but does not affect tyrosine protein kinase activity. *J Virol*. 58, 468-74.
- Chang HC, Nathan DF, Lindquist S. (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol Cell Biol*. 17, 318-25.
- Chong YP, Chan AS, Chan KC, Williamson NA, Lerner EC, Smithgall TE, Bjorge JD, Fujita DJ, Purcell AW, Scholz G, Mulhern TD, Cheng HC. (2006) C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK), a unique inhibitor inactivating multiple active conformations of Src family tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 281, 32988-99.
- Cloutier JF, Veillette A. (1999) Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*. 189, 111-21.
- Cohen GB, Ren R, Baltimore D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*. 80, 237-48.
- Collett MS, Erikson RL. (1978) Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75, 2021-4.
- Collett MS, Erikson E, Purchio AF, Brugge JS, Erikson RL. (1979) A normal cell protein similar in structure and function to the avian sarcoma virus transforming gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 3159-63.
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science*. 231, 1431-4.
- Coussens PM, Cooper JA, Hunter T, Shalloway D. (1985) Restriction of the in vitro and in vivo tyrosine protein kinase activities of pp60c-src relative to pp60v-src. *Mol Cell Biol*. 5, 2753-63.
- Cowan-Jacob SW. (2006) Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cell Mol Life Sci*. 63, 2608-25.

Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Manley PW, Jahnke W, Fabbro D, Liebetanz J, Meyer T. (2005) The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure*. 13, 861-71.

Engen JR, Wales TE, Hochrein JM, Meyn MA 3rd, Banu Ozkan S, Bahar I, Smithgall TE. (2008) Structure and dynamic regulation of Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci.* (v publikaci).

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

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

Florio M, Wilson LK, Trager JB, Thorner J, Martin GS. (1994) Aberrant protein phosphorylation at tyrosine is responsible for the growth-inhibitory action of pp60v-src expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 5, 283-96.

Frame MC. (2004) Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci.* 117, 989-98.

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

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

Hakak Y, Martin GS. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr Biol.* 9, 1039-42.

Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brábek J. (2003) Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* 8, 982-96.

Harris KF, Shoji I, Cooper EM, Kumar S, Oda H, Howley PM. (1999) Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 13738-43.

Huang J, Hamasaki H, Nakamoto T, Honda H, Hirai H, Saito M, Takato T, Sakai R. (2002) Differential regulation of cell migration, actin stress fiber organization, and cell transformation by functional domains of Crk-associated substrate. *J Biol Chem.* 277, 27265-72.

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

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

Hutchison KA, Brott BK, De Leon JH, Perdew GH, Jove R, Pratt WB. (1992) Reconstitution of the multiprotein complex of pp60src, hsp90, and p50 in a cell-free system. *J Biol Chem*. 267, 2902-8.

Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R, Yeatman TJ. (1999) Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet*. 21, 187-90.

Johnson PJ, Coussens PM, Danko AV, Shalloway D. (1985) Overexpressed pp60c-src can induce focus formation without complete transformation of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*. 5, 1073-83.

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

Kamps MP, Buss JE, Sefton BM. (1985) Mutation of NH₂-terminal glycine of p60src prevents both myristoylation and morphological transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82, 4625-8.

Kato G, Maeda S. (1997) High-level expression of human c-Src can cause a spherical morphology without loss of anchorage-dependent growth of NIH 3T3 cells. *FEBS Lett*. 411, 317-21.

Kornbluth S, Jove R, Hanafusa H. (1987) Characterization of avian and viral p60src proteins expressed in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 4455-9.

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

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

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

Levinson NM, Seeliger MA, Cole PA, Kuriyan J. (2008) Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell*. 134, 124-34.

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

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

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

Mayer BJ. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci.* 114, 1253-63.

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

Morrogh LM, Hinshelwood S, Costello P, Cory GO, Kinnon C. (1999) The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase displays altered ligand binding properties when auto-phosphorylated in vitro. *Eur J Immunol.* 29, 2269-79.

Murphy SM, Bergman M, Morgan DO. (1993) Suppression of c-Src activity by C-terminal Src kinase involves the c-Src SH2 and SH3 domains: analysis with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13, 5290-300.

Osusky M, Taylor SJ, Shalloway D. (1995) Autophosphorylation of purified c-Src at its primary negative regulation site. *J Biol Chem.* 270, 25729-32.

Ozkirimli E, Post CB. (2006) Src kinase activation: A switched electrostatic network. *Protein Sci.* 15, 051-62.

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

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

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

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

Ruest PJ, Shin NY, Polte TR, Zhang X, Hanks SK. (2001) Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Mol Cell Biol.* 21, 7641-52.

Sartor O, McLellan CA, Chiueh T. (1992) Comparison of src-family cDNAs reveals distinct mechanisms underlying focus formation in transfected fibroblasts. *J Biol Chem.* 267, 21044-51.

Schindler T, Sicheri F, Pico A, Gazit A, Levitzki A, Kuriyan J. (1999) Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell.* 3, 639-48.

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

Sefton BM, Hunter T, Beemon K. (1979) Product of in vitro translation of the Rous sarcoma virus src gene has protein kinase activity. *J Virol.* 30, 311-8.

Shalloway D, Coussens PM, Yaciuk P. (1984) Overexpression of the c-src protein does not induce transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 7071-5.

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

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

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

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

Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quillam LA, Kay BK. (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 1540-4.

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

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

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

Takeuchi S, Takayama Y, Ogawa A, Tamura K, Okada M. (2000) Transmembrane phosphoprotein Cbp positively regulates the activity of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk. *J Biol Chem.* 275, 29183-6.

Taylor SJ, Anafi M, Pawson T, Shalloway D. (1995) Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J Biol Chem.* 270, 10120-4.

Thomas SM, Brugge JS. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13, 513-609.

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

Trager JB, Martin GS. (1997) The role of the Src homology-2 domain in the lethal effect of Src expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol.* 29, 635-48.

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

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

Whitelaw ML, Hutchison K, Perdew GH. (1991) A 50-kDa cytosolic protein complexed with the 90-kDa heat shock protein (hsp90) is the same protein complexed with pp60v-src hsp90 in cells transformed by the Rous sarcoma virus. *J Biol Chem.* 266, 16436-40.

Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8324-8.

Wisniewska M, Bossenmaier B, Georges G, Hesse F, Dangl M, Künkele KP, Ioannidis I, Huber R, Engh RA. (2005) The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity. *J Mol Biol.* 347, 1005-14.

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

Xu Y, Lindquist S. (1993) Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 7074-8.

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

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

Xu Y, Singer MA, Lindquist S. (1999) Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 109-14.

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

Yokouchi M, Kondo T, Sanjay A, Houghton A, Yoshimura A, Komiya S, Zhang H, Baron R. (2001) Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J Biol Chem*. 276, 35185-93.

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

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

Přílohy

I. Primery pro mutagenezi Y90E v SH3 doméně *c-src*

YE-F	Mutagenese <i>c-src</i> : Y90-E	CCACTTTCGTGGCTCTC GAG GACTACGAGTCCCGGACTG
YE-R	Mutagenese <i>c-src</i> : Y90-E	CAGTCCGGGACTCGTAGTC CTC GAGAGCCACGAAAGTGG

II. Výsledky sekvenování

II.A Sekvenování variant *c-src* pro potvrzení přítomnosti mutace Y90E v SH3 doméně (2 klony)

*c-src*Y90E (1.)

Y90E: TAC→GAG

1-695 (BamHI)

```

src -----ATGGG 5
1t7 CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCATGGG 60
      *****

src GAGCAGCAAGAGCAAGCCCAAGGACCCAGCCAGCGCCGGCGCAGCCTGGAGCCACCCGA 65
1t7 TAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCAGCGCCGGCGCAGCCTGGAGCCACCCGA 120
      * * * * *

src CAGCACCCACCACGGGGGATTCCAGCCTCGCAGACCCCAACAAGACAGCAGCCCCCGA 125
1t7 CAGCACCCACCACGGGGGATTCCAGCCTCGCAGACCCCAACAAGACAGCAGCCCCCGA 180
      * * * * *

src CACGACCCGCACCCAGCCGCTCCTTTGGGACCGTGGCCACCGAGCCCAAGCTCTFCGG 185
1t7 CACGACCCGCACCCAGCCGCTCCTTTGGGACCGTGGCCACCGAGCCCAAGCTCTFCGG 240
      * * * * *

src GGGCTTCAACACTTCTGACACCGTTACGTGCGCCGAGCGTGCCGGGGCACTGGCTGGCGG 245
1t7 GGGCTTCAACACTTCTGACACCGTTACGTGCGCCGAGCGTGCCGGGGCACTGGCTGGCGG 300
      * * * * *

src CGTCACCATTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAGTCCCAGACTGAAACGGACTTGTCCCT 305
1t7 CGTCACCATTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAGTCCCAGACTGAAACGGACTTGTCCCT 360
      * * * * *

src CAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCA 365
1t7 CAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCA 420
      * * * * *

src TTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTC 425
1t7 TTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTC 480
      * * * * *

src CATCCAGGCTGAAGAGTGGTACTTTGGGAAGATCACTCGTCCGGAGTCCGAGCGGCTGCT 485
1t7 CATCCAGGCTGAAGAGTGGTACTTTGGGAAGATCACTCGTCCGGAGTCCGAGCGGCTGCT 540
      * * * * *

src GCTCAACCCCGAAAACCCCGGGGAACCTTCTTGGTCCGGGAGAGCGAGACGACAAAAGG 545
1t7 GCTCAACCCCGAAAACCCCGGGGAACCTTCTTGGTCCGGGAGAGCGAGACGACAAAAGG 600
      * * * * *

src TGCCTATTGCCTCTCCGTTTCTGACTTTGACAACGCCAAGGGGCTCAATGTGAAGCACTA 605
1t7 TGCCTATTGCCTCTCCGTTTCTGACTTTGACAACGCCAAGGGGCTCAATGTGAAGCACTA 660
      * * * * *

src CAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCTTCTACATCACCTCACGCACACAGTTCAGCAG 665
1t7 CAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCTTCTACATCACCTCACGCACACAGTTCAGCAG 720
      * * * * *

src CCTGCAGCAGCTGGTGGCCTACTACTCCAACATGCTGATGGCTTGTGCCACCGCCTGAC 725
1t7 CCTGCAGCAGCTGGTGGCCTACTACTCCA----- 750
      * * * * *

```

882-STOP (XbaI)

```

src_rev -----CTATAGGTTCTCTCCAGGCTGGTACTGGGGC 31
1t3      GCGGCCGCTCTAGAGCAGATCTGCCAGGCCATAGGTTCTCTCCAGGCTGGTACTGGGGC 60
          *****

src_rev TCTGTTCGAGGTGAAGTAGTCTCCAGGAAGGCTGCAGGTTACTCAAAGTGGGCCGCTCC 91
1t3     TCTGTTCGAGGTGAAGTAGTCTCCAGGAAGGCTGCAGGTTACTCAAAGTGGGCCGCTCC 120
          *****

src_rev TCAGGGTCTTCCGCCAGCACTGGCACATGAGGTCATGCAGCGACTCGGGGCACTCGGGC 151
1t3     TCAGGGTCTTCCGCCAGCACTGGCACATGAGGTCATGCAGCGACTCGGGGCACTCGGGC 180
          *****

src_rev GGGCAGGGCATGCGGTAGCCCTCTCCACCTGGTCCAGCACCTCCCTGTTGACCATCCCT 211
1t3     GGGCAGGGCATGCGGTAGCCCTCTCCACCTGGTCCAGCACCTCCCTGTTGACCATCCCT 240
          *****

src_rev GGGTATGGCACCCGGCCCTTGGTGGTCAGCTCAGTCAGCAGGATGCCGAAGGACCAGACA 271
1t3     GGGTATGGCACCCGGCCCTTGGTGGTCAGCTCAGTCAGCAGGATGCCGAAGGACCAGACA 300
          *****

src_rev TCCGACTTGATGGTGAACCGGCCATAGAGGGCTGCCTCGGGGGCTGTCCACTTGATGGGG 331
1t3     TCCGACTTGATGGTGAACCGGCCATAGAGGGCTGCCTCGGGGGCTGTCCACTTGATGGGG 360
          *****

src_rev AACTTGGCACCTTGCCGTGCTGTGTACTCGTTGTCTCGATGAGGCGTGCCAGCCCAAAG 391
1t3     AACTTGGCACCTTGCCGTGCTGTGTACTCGTTGTCTCGATGAGGCGTGCCAGCCCAAAG 420
          *****

src_rev TCAGCCACCTTGCACACCAGGTTCTCCCCACCAGGATGTTGGCCGCCCGCAGGTCTCGG 451
1t3     TCAGCCACCTTGCACACCAGGTTCTCCCCACCAGGATGTTGGCCGCCCGCAGGTCTCGG 480
          *****

src_rev TGCACGTAGTTCATCCTCTCCACATAGGCCATGCCGGATGCAATCTGAGCAGCCATATCG 511
1t3     TGCACGTAGTTCATCCTCTCCACATAGGCCATGCCGGATGCAATCTGAGCAGCCATATCG 540
          *****

src_rev ACGAGCTGTGGCAGCCGCAGGTTACTTGCCCATCTCTCCCTTCAGGAAATCCAGGAGGCTC 571
1t3     ACGAGCTGTGGCAGCCGCAGGTTACTTGCCCATCTCTCCCTTCAGGAAATCCAGGAGGCTC 600
          *****

src_rev CCCTTGCTCATGTACTCAGTGACGATGTAGATGGGCTCTTCCGACACCCTGCGTACAGC 631
1t3     CCCTTGCTCATGTACTCAGTGACGATGTAGATGGGCTCTTCCGACACCCTGCGTACAGC 660
          *****

src_rev TGAACCAGCTTCTCATGCCGGAGCTTCTTTCATCACTTGGGCTTCTGTCAGGAAGGCCTCC 691
1t3     TGAACCAGCTTCTCATGCCGGAGCTTCTTTCATCACTTGGGCTTCTGTCAGGAAGGCCTCC 720
          *****

src_rev GGGGACATTTGTGCCGGGCTCAGAGTCTTTATGGCCACTCTGGTGGTGCCGTTCCAGGTC 751
1t3     CTGACACCGTTCAGTCGTGAGGCTTTT----- 750
          *****

```

c-srcY90E(2.)

Y90E: TAC→GAG (BamHI)

1-689

```

src -----
2t7     CCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATC 60

src -ATGGGGAGCAGCAAGAGCAAGCCCAAGGACCCAGCCAGCGCCGGCGCAGCCTGGAGCC 59
2t7     CATGGGTAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCAGCGCCGGCGCAGCCTGGAGCC 120
          *****

src ACCCGACAGCACCCACCACGGGGGATTCCCAGCTCGCAGACCCCAACAAGACAGCAGC 119
2t7     ACCCGACAGCACCCACCACGGGGGATTCCCAGCTCGCAGACCCCAACAAGACAGCAGC 180
          *****

src CCCCGACACGCACCCGACCCCGCTCCTTTGGGACCGTGCCACCGAGCCCAAGCT 179
2t7     CCCCGACACGCACCCGACCCCGCTCCTTTGGGACCGTGCCACCGAGCCCAAGCT 240
          *****

src CTTGCGGGGCTTCAACTTCTGACACCGTTACGTCGCCGAGCGTGCCGGGGCACTGGC 239
2t7     CTTGCGGGGCTTCAACTTCTGACACCGTTACGTCGCCGAGCGTGCCGGGGCACTGGC 300
          *****

src TGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTT 299
2t7     TGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTT 360
          *****

```



```

src  GTCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCT 359
2t7  GTCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCT 420
*****

src  GGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTC 419
2t7  GGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTC 480
*****

src  AGACTCCATCCAGGCTGAAGAGTGGTACTTTGGGAAGATCACTCGTCGGGAGTCCGAGCG 479
2t7  AGACTCCATCCAGGCTGAAGAGTGGTACTTTGGGAAGATCACTCGTCGGGAGTCCGAGCG 540
*****

src  GCTGCTGCTCAACCCCGAAAACCCCGGGGAACCTTCTTGGTCCGGGAGAGCGAGACGAC 539
2t7  GCTGCTGCTCAACCCCGAAAACCCCGGGGAACCTTCTTGGTCCGGGAGAGCGAGACGAC 600
*****

src  AAAAGGTGCCTATTGCCTCTCCGTTTCTGACTTTGACAACGCCAAGGGGCTCAATGTGAA 599
2t7  AAAAGGTGCCTATTGCCTCTCCGTTTCTGACTTTGACAACGCCAAGGGGCTCAATGTGAA 660
*****

src  GCACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCTTCTACATCACCTCACGCACACAGTT 659
2t7  GCACTACAAGATCCGCAAGCTGGACAGCGGGCTTCTACATCACCTCACGCACACAGTT 720
*****

src  CAGCAGCCTGCAGCAGCTGGTGGCCTACTACTCAAACATGCTGATGGCTTGTGCCACCG 719
2t7  CAGCAGCCTGCAGCAGCTGGTGGCCTACTACTCAAACATGCTGATGGCTTGTGCCACCG 750
*****

889-STOP (XbaI)
src_rev -----CTATAGGTTCTCTCCAGGCTGGTA 24
2t3      CGCGGTGGCGCCGCTCTAGAGCAGATCTGCCAGGCCTATAGGTTCTCTCCAGGCTGGTA 60
*****

src_rev CTGGGGCTCTGTGCGAGGTGAAGTAGTCCCTCCAGGAAGGCCTGCAGGTACTCAAAGTGGG 84
2t3      CTGGGGCTCTGTGCGAGGTGAAGTAGTCCCTCCAGGAAGGCCTGCAGGTACTCAAAGTGGG 120
*****

src_rev CCGCTCCTCAGGGTCCTTCCGCCAGCACTGGCACATGAGGTCATGCAGCGACTCGGGGCA 144
2t3      CCGCTCCTCAGGGTCCTTCCGCCAGCACTGGCACATGAGGTCATGCAGCGACTCGGGGCA 180
*****

src_rev CTCGGGCGGGCAGGGCATGCGGTAGCCCCCTCCACCTGGTCCAGCACCTCCCTGTTGAC 204
2t3      CTCGGGCGGGCAGGGCATGCGGTAGCCCCCTCCACCTGGTCCAGCACCTCCCTGTTGAC 240
*****

src_rev CATCCCCTGGGTATGGCACCCGGCCCTTGGTGGTCCAGCTCAGTCAGCAGGATGCCGAAGGA 264
2t3      CATCCCCTGGGTATGGCACCCGGCCCTTGGTGGTCCAGCTCAGTCAGCAGGATGCCGAAGGA 300
*****

src_rev CCAGACATCCGACTTGATGGTGAACCGGCCATAGAGGGCTGCCTCGGGGGCTGTCCACTT 324
2t3      CCAGACATCCGACTTGATGGTGAACCGGCCATAGAGGGCTGCCTCGGGGGCTGTCCACTT 360
*****

src_rev GATGGGGAACTTGGCACCTTGCCGTGCTGTGTACTCGTTGTCTCGATGAGGCGTGCCAG 384
2t3      GATGGGGAACTTGGCACCTTGCCGTGCTGTGTACTCGTTGTCTCGATGAGGCGTGCCAG 420
*****

src_rev CCCAAAGTCAGCCACCTTGACACACCAGGTTCTCCCCACCAGGATGTTGGCCGCCCGCAG 444
2t3      CCCAAAGTCAGCCACCTTGACACACCAGGTTCTCCCCACCAGGATGTTGGCCGCCCGCAG 480
*****

src_rev GTCTCGGTGCACGTAGTTCATCCTCTCCACATAGGCCATGCCGGATGCAATCTGAGCAGC 504
2t3      GTCTCGGTGCACGTAGTTCATCCTCTCCACATAGGCCATGCCGGATGCAATCTGAGCAGC 540
*****

src_rev CATATCGACGAGCTGTGGCAGCCGAGGTAAGTCTGCCATCTCTCCCTTCAGGAAATCCAG 564
2t3      CATATCGACGAGCTGTGGCAGCCGAGGTAAGTCTGCCATCTCTCCCTTCAGGAAATCCAG 600
*****

src_rev GAGGCTCCCCTTGCTCATGTACTCAGTGACGATGTAGATGGGCTCTTCCGACCACTGC 624
2t3      GAGGCTCCCCTTGCTCATGTACTCAGTGACGATGTAGATGGGCTCTTCCGACCACTGC 660
*****

src_rev GTACAGCTGAACCAGCTTCTCATGCCGAGCTTCTTCATCACTTGGGCTTCTGCAGGAA 684
2t3      GTACAGCTGAACCAGCTTCTCATGCCGAGCTTCTTCATCACTTGGGCTTCTGCAGGAA 720
*****

src_rev GGCCTCCGGGACATGGTCCGGGCTTCCAGAGTCTTTATGGCCACTCTGGTGGTGCCTT 744
2t3      GGCCTCCGGGACATGGTCCGGGCTTCCAGAGTCTTTATGGCCACTCTGGTGGTGCCTT 750
*****

```

Mutace pro záměnu Tyr 90 za Glu byla potvrzena u obou klonů plazmidů, ostatní náhodné mutace jsou konzervované, nedošlo ke změně dalších aminokyselin.

II.B Sekvenování SH3 domén variant *c-src*, *Y90E-src*, *v-src* PRC

Src – SH3 doména (L80-I143) (M13-24R-BLUE primer)

WT: *c-src* SH3 – OK (rev)

```
SH3 -----GGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACG
WT   GCCGCGAATTCGCCCTTGGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTATG
      *****

SH3   ACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTG
WT   ACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTG
      *****

SH3   TCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCT
WT   TCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCT
      *****

SH3   ACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTC-----
WT   ACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTCAGGGCGAATTCGT
      *****
```

YE (Y90-E): *c-src* SH3 – OK

```
SH3 -----GGATCCATGGCTG
YE   CCCTCACTAAAGGGACTAGTCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTGGATCCATGGCTG
      *****

SH3   GCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGT
YE   GCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTGAGGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGT
      *****

SH3   CCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGG
YE   CCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGG
      *****

SH3   CTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAG
YE   CTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAG
      *****

SH3   ACTCCATCTAGAATTC-----
YE   ACTCCATCTAGAATTCAGGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTC AATTCGCCCTATAGTGA
      *****
```

v-src (R95-W): SH3 – OK (rev)

```
SH3 -----GGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACGA
V   CCGCGAATTCGCCCTTGGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTCGTGGCTCTCTACGA
      *****

SH3   CTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGT
V   CTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGT
      *****

SH3   CAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTA
V   CAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTA
      *****

SH3   CATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTC-----
V   CATCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTCAGGGCGAATTCGTT
      *****
```

II.C Sekvenování SH3 domény *c-src* v TOPO vektoru po Y90-F mutagenезi

(klon f1 - primery m0 a m1)

```
src -----GGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTTCGTGGCTCTCTACGACTACGAG
m0 TTCCGCCCTTGGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTTCGTGGCTCTCTTCGACTACGAG
      *****

src TCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAAC
m0 TCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGCAGATTGTCAACAAC
      *****

src ACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCC
m0 ACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGACGGGCTACATCCCC
      *****

src AGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTC-----
m0 AGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTCAGGGCGAATTCGCGGCCGCTA
      *****

src -----GGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTTCGTGGCTC
m1 TTAGCGGCCCGGAATTCGCCCTTGGATCCATGGCTGGCGGCGTCACCACTTTTCGTGGCTC
      *****

src TCTACGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGC
m1 TCTTCGACTACGAGTCCCGGACTGAAACGGACTTGTCCCTTCAAGAAAGGAGAACGCCTGC
      *** *****

src AGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGA
m1 AGATTGTCAACAACACGGAAGGTGACTGGTGGCTGGCTCATTCCCTCACTACAGGACAGA
      *****

src CGGGCTACATCCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTC-----
m1 CGGGCTACATCCCCAGTAACTATGTCGCGCCCTCAGACTCCATCTAGAATTCAGGGCGA
      *****
```

III. Vyhodnocování ECL filmů pomocí programu ImageQuant (Amersham Biosciences) a statistické zpracování dat

Při vyhodnocování denzity pruhů byly občas na filmech přítomné různé nepravidelnosti zbarvení či průhlednosti. Aby lokální změny zbarvení filmu, kterým nešlo nijak metodicky zabránit, náhodně nepřidávaly na denzitě některým pruhům, bylo nutné odečítat pozadí u každého pruhu zvlášť.

V programu Image Quant existuje několik způsobů, jak od jednotlivých objektů – pruhů odečítat pozadí. Při našem vyhodnocování jsme použili funkce „ImageRectangle“ a „Local background“. V případě funkce „Local background“ bylo pozadí automaticky odečítáno z okolí v blízkosti každého pruhu. V případě funkce „ImageRectangle“ se pozadí odečítalo ze zvolené plochy v blízkosti pruhu na filmu. Tím se zohlednily drobné změny v průhlednosti každého filmu. Ke statistickému zpracování byly použity hodnoty denzity pruhů získané z měření pomocí obou funkcí.

Nejprve byl vyjádřen podíl hodnoty denzity pruhu odrážející fosforylaci Tyr 416 dané varianty (protilátka anti-Src pY418) ku pruhu znázorňujícímu celkové množství proteinu (protilátka anti-v-Src) v kvasinkových buňkách. Aby bylo možné porovnávat tyto podíly mezi jednotlivými experimenty byly tyto podíly dále vztáhnuty k podílu jedné vybrané varianty Src. U variant bez mutace byly tyto podíly porovnány s variantou c-Src (tab. 1), u variant s mutací Y527F byly podíly porovnány s c-Src527F (tab. 2). Porovnání varianty c-Src527F s c-Src bylo provedeno výše uvedeným způsobem pomocí vyhodnocení pruhů z filmů, kde byly zároveň přítomny klony 2,3,5 variant c-Src527F a c-Src (tab. 3). Pro porovnání variant s mutací Y527F s c-Src byly podíly denzit pruhů z tabulky 2 vynásobeny průměrnou hodnotou podílů c-Src527F k c-Src (zvýrazněna v tabulce 3) a zaneseny do tabulky 4.

Pro vytvoření grafu na obr. 4.2.5 ve výsledcích byla použita data z tabulky 5 shrnující hodnoty v předchozích tabulkách. Některé klony byly vyřazeny z důvodu příliš velké odchylky od střední hodnoty. Typ T-testu byl zvolen následovně: strany 2, typ 3.

Tab. 3

Podíl c-Src527F fosforylovaném na Tyr 416/celkovému množství v porovnání s c-Src						
	2	3	5	průměr	Směrodatná odchylka výběru	T-test pro c-Src
c-Src	0,8716	1,0661	1,0621	1	0,1111	
c-Src527F	3,1838	4,7063	5,3408	4,4103	1,1085	0,006079

Tab. 4

Podíl proteinu fosforylovaném na Tyr 416/celkovému množství v porovnání s c-Src											
	klon 1	klon 2	klon 3	klon 5	klon 1	klon 2	klon 3	klon 5	průměr	Směrodatná odchylka výběru	T-test pro c-Src527F
v-Src527F	3,3010	4,8393	9,6967	4,4463	4,1864	4,7205	11,6483	4,5611	5,9249	3,0134	0,430147
YE-Src527F	6,7216	4,8268	5,0659	7,9097	8,3352	4,9128	6,1478	7,2607	6,3976	1,3834	0,054312
YF-Src527F	4,6253	6,9324	8,7626	4,8138	4,4648	6,5596	7,9728	4,5443	6,0844	1,7080	0,155325

Tab. 5

Fosforylace Y416 v porovnání s c-Src (c-Src = 1) – data obr. 4.2.5			
	průměr	Směrodatná odchylka výběru	T-test pro c-Src
Y90E-Src	3,3421	1,609724	0,004486073
Y90F-Src	0,5978	0,292551	0,001859558
c-Src	1	0	
c-Src527F	4,4103	1,108532	0,006079048
Y90E-Src527F	6,3976	1,383493	0,000011138
Y90F-Src527F	6,0844	1,708046	0,000065669
v-Src527F	5,9249	3,013466	0,002418775

