

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Biologický význam fosforylace tyrosinu 90 v SH3 doméně  
kinázy Src**

Biological relevance of the tyrosine 90 phosphorylation in SH3 domain  
Src kinase

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Bc. Lenka Koudelková**

školitel: doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 8. 2013

.....  
Bc. Lenka Koudelková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. a RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a připomínky. Děkuji rovněž celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci.

Dík patří i mé rodině a přátelům za všestrannou podporu během studia.

# Abstrakt

---

Kináza Src hraje zásadní roli v přenosu signálu z aktivovaných povrchových receptorů. Je součástí signálních drah podílejících se na kontrole buněčné proliferace, diferenciace nebo motility. Její aktivace proto podléhá přísné a komplexní regulaci. V inaktivní konformaci je Src držen intramolekulárními inhibičními vazbami. SH3 doména asociuje s polyprolinovým helixem CD linkeru, zatímco SH2 doména váže fosforylovaný C-koncový tyrosin 527. Obě regulační domény udržují kontakty s laloky kinázové domény, čímž stabilizují její katalyticky neaktivní formu. Přechod do aktivního stavu je spjat s rozrušením těchto inhibičních interakcí. Všechny konformační přestavby jsou významnou měrou ovlivněny fosforylačním statusem klíčových tyrosinů 416 a 527.

Byl nalezen nový *in vivo* fosforylovatelný tyrosinový zbytek, jenž se projevil jako další regulátor aktivity kinázy. Jedná se o Tyr 90 SH3 domény Src, který pomáhá vytvářet jednu z hydrofobních vazebných kapes jejího interakčního povrchu. Na základě exprese fosfomimikující mutanty Src 90E v kvasinkách *S. pombe* a linii SYF je patrné, že fosforylace Tyr 90 vede ke zvýšení kinázové aktivity Src. Příčinou je vnesení záporného náboje fosfátu do hydrofobního vazebného povrchu SH3 domény, což způsobí snížení její afinity k CD linkeru. Src 90E má částečný transformační potenciál. Deregulace fosforylace Tyr 90 může tedy vést k aberantní aktivaci Src.

## Klíčová slova

---

kináza Src, SH3 doména, kináza Csk, *Schizosaccharomyces pombe*, SYF linie, transformace

# Abstract

---

Kinase Src plays an essential role in signal transduction from activated surface receptors. Src is involved in signal pathways that participate in the control of cell proliferation, differentiation or motility. That is why Src activation undergoes strict and complex regulation. Inactive conformation is maintained by intramolecular inhibitory interactions. SH3 domain associates with a polyprolin helix in CD linker whereas SH2 domain binds phosphorylated C-terminal tyrosine 527. Both regulatory domains maintain contacts with the lobes of a kinase domain thereby stabilizing an inactive conformation of the catalytic domain. Transition to an active state is accompanied by a disruption of these inhibitory interactions. Conformation changes are substantially influenced by the phosphorylation status of key tyrosines 416 and 527.

Phosphoproteomic analysis revealed new Src tyrosine residue, which can be phosphorylated *in vivo*. It has been found, that tyrosine works as an additional regulator of Src activity. This is Tyr 90, which forms one of the hydrophobic pockets in the binding surface of Src SH3 domain. Based on the expression of phosphomimic mutant Src 90E in *S. pombe* or in SYF lineage, it has been observed, that Tyr 90 phosphorylation elevates Src kinase activity. The reason is that the phosphate introduces a negative charge into the hydrophobic binding surface of SH3 domain which causes a decrease in the affinity to CD linker. Src 90E has a partial transformational potential. Deregulation of phosphorylation of Tyr 90 could therefore lead to an aberrant Src activation.

## Key words

---

kinase Src, SH3 domain, kinase Csk, *Schizosaccharomyces pombe*, SYF lineage, transformation

# Obsah

---

1. Úvod .....	10
2. Literární přehled .....	11
2.1 Historie výzkumu kinázy Src .....	11
2.2 Struktura a regulace kinázy Src .....	13
2.2.1 Struktura kinázy Src .....	14
2.2.1.1 SH4 doména .....	14
2.2.1.2 Unikátní doména .....	15
2.2.1.3 SH3 doména .....	15
2.2.1.4 SH2 doména .....	16
2.2.1.5 CD linker .....	17
2.2.1.6 Kinázová (SH1) doména .....	17
2.2.1.7 C-koncový segment .....	18
2.2.2. Regulace aktivity kinázy Src .....	19
2.2.2.1 Regulační domény .....	19
2.2.2.2 Kinázová doména .....	22
2.2.2.3 Struktura aktivní kinázy Src .....	24
2.3 Tyrosin 90 a regulace vazebných vlastností SH3 domény .....	28
3. Materiál a metody .....	35
3.1 Materiál .....	35
3.1.1 Organismy .....	35
3.1.2 Vektory .....	36
3.1.3 Primery .....	38
3.1.4 Enzymy .....	38
3.1.5 Standardy velikostí DNA fragmentů a proteinů .....	39
3.1.6 Protilátky .....	39
3.2 Metody .....	40
3.2.1 Kultivace a transformace .....	40
3.2.1.1 Bakteriální kultury .....	40
3.2.1.1.1 Živná média .....	40
3.2.1.1.2 Selekční antibiotika .....	40
3.2.1.1.3 Glycerolové konzervy <i>E. coli</i> .....	40
3.2.1.1.4 Příprava kompetentních buněk pro transformaci elektroporací .....	41
3.2.1.1.5 Transformace elektroporací .....	42

3.2.1.2	Kultury <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	42
3.2.1.2.1	Živná média .....	42
3.2.1.2.2	Glycerolové konzervy <i>S. pombe</i> .....	43
3.2.1.2.3	Transformace <i>S. pombe</i> lithium-acetátovou metodou .....	43
3.2.1.2.4	Sledování růstu kultury <i>S. pombe</i> po indukci exprese kinázy Src.....	44
3.2.1.3	Tkáňové kultury .....	45
3.2.1.3.1	Kultivační médium DMEM.....	45
3.2.1.3.2	Pěstování a pasážování tkáňových kultur.....	45
3.2.1.3.3	Příprava a rozpěstování stabilátů .....	46
3.2.1.3.4	Transfekce plasmidovou DNA.....	47
3.2.1.3.5	Produkce retrovirových partikulí a infekce savčích buněk.....	47
3.2.2	Metody práce s DNA.....	49
3.2.2.1	Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou .....	49
3.2.2.2	Izolace plasmidové DNA pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid .....	50
3.2.2.3	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	50
3.2.2.4	DNA elektroforéza v agarosovém gelu a izolace DNA fragmentů .....	51
3.2.2.5	Ligace DNA.....	51
3.2.2.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	52
3.2.3	Metody práce s proteiny .....	53
3.2.3.1	Příprava lyzátů z kvasinek <i>S. pombe</i> .....	53
3.2.3.2	Příprava lyzátů ze savčích buněk .....	54
3.2.3.3	Stanovení proteinové koncentrace (Folinova metoda) a příprava vzorků pro SDS-PAGE .....	55
3.2.3.4	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	56
3.2.3.5	Western blot.....	57
3.2.3.6	Imunodetekce proteinů na membráně .....	58
3.2.3.7	Stripování membrán .....	59
3.2.4	Další metody práce s tkáňovými kulturami .....	59
3.2.4.1	Migrační test „wound-healing“ .....	59
3.2.4.2	Test buněk na schopnost růst nezávisle na ukotvení k podkladu .....	60
4.	Výsledky .....	61
4.1	Expres variant kinázy Src v kvasinkách <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	62
4.1.1	Příprava plasmidových konstruktů pro expresi Src a Csk v <i>S. pombe</i> .....	62
4.1.2	Transformace kvasinek <i>S. pombe</i> expresními vektory nesoucími varianty <i>src</i> a konstruktem pART- <i>csk</i> .....	66
4.1.3	Měření růstových křivek kvasinek <i>S. pombe</i> transformovaných vektory nesoucími <i>csk</i> a varianty <i>src</i> .....	69

4.2	Exprese variant kinázy Src v buňkách SYF .....	76
4.2.1	Příprava plasmidových konstruktů s variantami Src pro retrovirální transfekci .....	76
4.2.2	Retrovirální transfekce SYF buněk a exprese variant Src .....	77
4.2.3	Stanovení fosforylačního statusu proteinů interagujících s SH3 doménou Src .....	79
4.2.4	Analýza migračních schopností buněk linií SYF exprimujících varianty Src .....	82
4.2.5	Test buněk SYF linií exprimujících varianty Src na schopnost růstu nezávisle na podkladu .....	83
5.	Diskuse .....	85
6.	Shrnutí .....	92
7.	Seznam literatury .....	93



# Seznam použitých zkratek

---

Abl	Abelsonova proteintyrosinkináza (Abelson tyrosine-protein kinase)
ATP	adenosin trifosfát
Bcr	Protein oblasti clusteru zlomů (Breakpoint cluster region protein)
BCR	receptor B buněk (B cell receptor)
bp	páry bází (base pair)
Btk	Brutonova tyrosinkináza (Bruton 's tyrosine kinase)
CAS	Substrát asociovaný s Crk (Crk-associated substrate)
CML	chronická myeloidní leukemie (chronic myelogenous leukemia)
Csk	Kináza C-konce Src (C-terminal Src kinase)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAK	Kináza fokálních adhezí (Focal adhesion kinase)
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
Hck	Kináza hematopoetických buněk (Hematopoietic cell kinase)
HIV-1	virus lidské imunodeficiency typu 1 (Human immunodeficiency virus type 1)
HRP	křenová peroxidáza
IRES	vnitřní místo pro vazbu ribosomu (internal ribosome entry site)
LTR	dlouhá koncová repetice (long terminal repeat)
MEF	myší embryonální fibroblasty (mouse embryonic fibroblasts)
NMR	nukleární magnetická rezonance
nmt	žádná odezva v přítomnosti thiaminu (no message in thiamine)
OD	optická denzita
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGFR	Receptor růstového faktoru krevních destiček (Platelet-derived growth factor receptor)
PH	doména homologní s pleckstrinem (pleckstrin homology domain)
PPII	polyprolinový helix typu II
PTB	fosfotyrosin-vazebná doména (phosphotyrosin-binding domain)
rpm	počet otáček za minutu (rotation per minute)
RSV	Rousův virus kuřecího sarkomu (Rous sarcoma virus)
SAP	alkalická fosfatáza z krevet (shrimp alkaline phosphatase)
SAXS	nízkoúhlový rozptyl roentgenového záření (small-angle X-ray scattering)
SDS	sodium dodecyl sulfát
SFK	kinázy rodiny Src (Src family kinases)
SH	homolog domény kinázy Src (Src homology)
STAT3	Přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)
WASP	Protein Wiskott-Aldrich syndromu (Wiskott-Aldrich syndrome protein)
wt	divoký typ (wild type)

# 1. Úvod

---

Src je první objevený onkoprotein a první identifikovaná proteintyrosinkináza. Je nezbytný pro udržování homeostáze vnitřního prostředí buňky a podílí se na průběhu mnoha dalších buněčných dějů. Je významnou komponentou signálních drah, které kontrolují proliferaci, diferenciaci a migraci buněk. Účastní se regulace cytoskeletu, tvaru a polarizace buněk či udržování kontaktů s okolními buňkami a extracelulární matrix.

Src patří do skupiny nereceptorových proteinkináz. Působí proto jako přenašeč signálů z extracelulárních receptorů na intracelulární dráhy, přičemž reprezentuje zásadní signální uzel, na kterém dochází k integraci velkého množství různých stimulů. Významnou funkci má zejména v signalizaci přes aktivované receptorové tyrozinázy, receptory spřažené s G-proteiny a integriny.

Vzhledem ke své význačné roli v širokém spektru buněčných procesů, musí být kináza Src přísně regulována. Převážná většina populace Src molekul se v buňkách nachází v inaktivní konformaci. Ta je udržována intramolekulárními inhibičními interakcemi, které jsou zprostředkovány regulačními doménami SH3 a SH2. Přejít do katalyticky aktivního stavu je spjat s rozrušením těchto vazeb a to v důsledku vazby proteinových ligandů či změny fosforylačního statusu klíčových tyrosinů v rámci struktury Src.

Deregulované formy Src mohou způsobovat nádorovou transformaci buněk. Jsou schopny navodit zvýšenou buněčnou proliferaci, ztrátu kontaktní inhibice nebo nezávislost na ukotvení k povrchu. Dochází k reorganizaci aktinového cytoskeletu, oslabení intercelulárních kontaktů a snížení adheze k extracelulární matrix, což usnadní invadování buněk do okolních tkání. Zvýšená kinázová aktivita a exprese Src byla pozorována v mnoha typech nádorů.

Tato práce se věnuje významu fosforylace Tyr 90 v SH3 doméně kinázy Src, která byla objevena při analýze fosfoproteomu myších embryonálních fibroblastů transformovaných kinázou Src. Tyrosin 90 se nachází na interakčním povrchu SH3 domény a pomáhá utvářet jednu z hydrofobních kapes pro asociaci s ligandy. Fosforylace tohoto aminokyselinového zbytku a následná změna vlastností vazebného povrchu může mít regulační význam pro interakce zprostředkované SH3 doménou. Stávající výzkum si klade za cíl stanovit, zda má fosfotyrosin v této pozici nějaký funkční vliv na průběh intracelulárních signálních procesů a fyziologii buňky.

## 2. Literární přehled

---

### 2.1 Historie výzkumu kinázy Src

Počátky výzkumu kinázy Src se datují do roku 1909, kdy Peyton Rous našel kuře nesoucí sarkom, z něhož připravený bezbuněčný filtrát byl schopen vyvolat vznik nádorů v dalších kuřatech. Navrhl, že agens zodpovědné za indukci tumorů je virus. Rousova práce byla přijata se značnou skepsí, protože se předpokládalo, že nádorová onemocnění jsou spíše endogenního než infekčního původu. Byla doceněna až v 50. letech 20. století, kdy se podařilo z buněk těchto nádorů izolovat retrovirus schopný nádorové transformace. Byl nazván Rousův virus kuřecího sarkomu (RSV) a stal se tak prvním virem objeveným v tumorech (shrnutí v Bjorge *et al.*, 2000; Martin, 2001; Guarino, 2010).

Následný výzkum, zejména objev mutantních forem RSV neschopných transformace, vedl k identifikaci prvního genu odpovědného za vznik nádorů, onkogenu *v-src*. Hybridizační experimenty s komplementární DNA ukázaly, že *src* je normální buněčný gen vysoce konzervovaný mezi mnohobuněčnými organismy (Stehelin *et al.*, 1976; Dorai *et al.*, 1991). Byl definován termín protoonkogen, buněčný prekursor retrovirového genu s transformačním potenciálem, který byl v průběhu evoluce inkorporován do virového genomu (shrnutí v Martin, 2001).

V roce 1977 Brugge a Erikson imunoprecipitovali 60 kDa velký fosfoprotein *v-Src* z lyzátu z RSV-transformovaných fibroblastů (Brugge & Erikson, 1977). Ukázalo se, že jak *v-Src*, tak jeho buněčný homolog *c-Src* jsou proteiny s kinázovou aktivitou (Collett *et al.*, 1978; Collett & Erikson, 1978; Levinson *et al.*, 1978; Oppermann *et al.*, 1979). Následný objev tyrosinové fosforylace (Eckhart *et al.*, 1979), který překonal do té doby panující názor, že kinázy jsou schopny fosforylovat proteiny pouze na serinech nebo threoninech, vedl k poznání, že Src je tyrosin-specifická proteinkináza (Hunter & Sefton, 1980).

Porovnání sekvencí *v-src* a *c-src* genů vyjevilo kromě několika aminokyselinových alterací zejména významnou odlišnost C-koncovou částí jejich produktů, kde bylo posledních 19 aminokyselin *c-Src* zaměněno 12 odlišnými aminokyselinami *v-Src* (Takeya & Hanafusa, 1983). Další rozdíly byly objeveny v kinázové aktivitě, která byla nižší u buněčné kinázy Src (Coussens *et al.*, 1985) a rovněž v transformačním potenciálu homologů, kdy *c-Src*, na rozdíl

od v-Src, nezpůsobil náborovou transformaci ani při výrazné nadprodukci proteinu (Iba *et al.*, 1984; Shalloway *et al.*, 1984). Experimenty s chimérickými formami v-Src a c-Src ukázaly, že vyšší kinázová aktivita a schopnost transformace je především důsledkem C-terminální oblasti v-Src (Iba *et al.*, 1984; Tanaka & Fujita, 1986). Buněčný původ v-Src, jakožto agens vedoucího ke vzniku nádorů, byl důkazem toho, že se normální buněčné geny, pokud jsou nepatříčně aktivovány, mohou chovat jako onkogeny. Byl to základ pro pochopení podstaty molekulárních mechanismů tumorigeneze.

Další výzkum se zaměřil zejména na pochopení regulace aktivity kinázy Src a její strukturu. Byl odhalen aktivační a inhibiční význam jednotlivých fosforylací v rámci struktury Src, definovány SH2 a SH3 domény jako stavební prvky proteinů zprostředkovávající protein-proteinové interakce či intramolekulární vazby regulační povahy. Započalo hledání interakčních partnerů Src, signálních kaskád ovlivňujících jeho aktivitu, expresi nebo lokalizaci a studium efektorových drah, jimiž Src působí na buněčnou fyziologii nebo které, v případě v-Src, vedou k nádorové transformaci buněk (shrnutí v Martin, 2001).

## 2.2 Struktura a regulace kinázy Src

Soustava mechanismů umožňující přenosy fosfátových skupin je jedním z nejvíce rozvinutých signálních systémů. Je nezbytnou součástí signálních sítí regulujících nejrůznější buněčné procesy počínaje genovou expresí, metabolickými dráhami, buněčným růstem a diferenciací, transportními mechanismy či apoptosou.

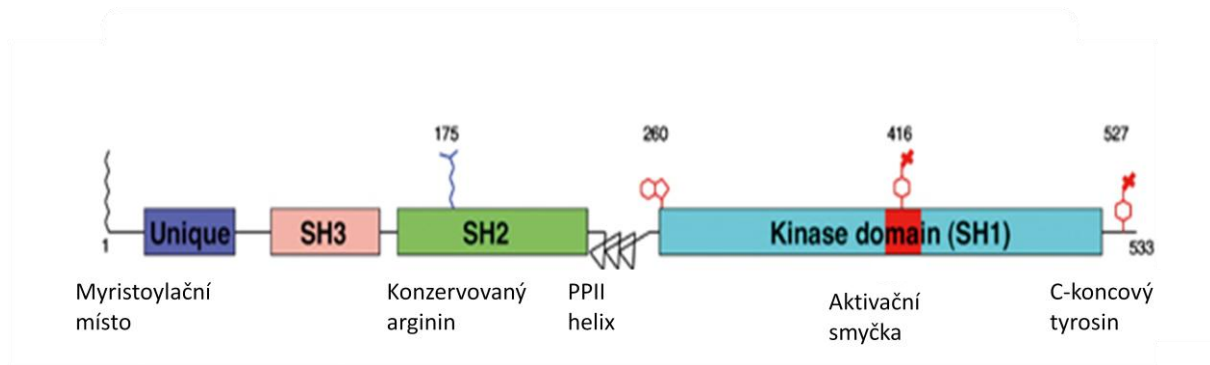
Jedněmi z jejích hlavních komponent jsou proteinkinázy. V rámci eukaryot se jedná o nadrodinu proteinů, které vznikly divergentní evolucí. Její členové sdílí katalytickou doménu, která je mezi nimi strukturně konzervovaná. Jedná se o jednu z největších proteinových rodin, jež tvoří 2 – 4 % všech eukaryotických genů. Většina kinázových rodin je zastoupena u všech metazoi (Manning *et al.*, 2002).

Src patří mezi nerekceptorové proteintyrosinkinázy, což je skupina čítající 8 různých rodin: Src, Csk, Fak, Abl, Jak, Fps, Syk a Tec. Jejich společným typickým rysem je modulární povaha jejich struktury. Kromě kinázové domény jsou totiž tvořeny řadou dalších domén a strukturních prvků, které zprostředkovávají jak intermolekulární interakce se signálními partnery, tak intramolekulární vazby umožňující regulaci aktivity kinázy. Slouží k lokalizaci proteinu do patřičných buněčných struktur a umožňují sestavování signálních komplexů tvorbou dokovacích míst pro jednotlivé proteiny.

Rodina kináz Src (SFK) je u člověka tvořena 11 členy: Src, Yes, Fyn, Blk, Brk, Frk, Fgr, Hck, Lck, Lyn a Srm. Src, Yes a Fyn jsou exprimovány ve všech buněčných typech. Ostatní proteiny této rodiny jsou produkovány specifitěji, zejména však v buňkách hematopoetického původu (shrnuto v Thomas & Brugge, 1997). SFK mají molekulovou hmotnost v rozmezí 52 – 62 kDa a jsou tvořeny šesti strukturními celky. Na N-konci je lokalizována SH4 doména, která nese myristoylovou a v některých případech i palmitoylovou kotvu. Dále za touto oblastí následuje unikátní doména charakteristická pro jednotlivé SFK, SH3 doména, SH2 doména, kinázová (SH1) doména a C-koncová regulační oblast (shrnuto v Tatosyan & Mizenina, 2000; Boggon & Eck, 2004; Roskoski, 2004). V objasňování struktury SFK a z toho vyplívajících mechanismů jejich regulace měly zásadní význam zejména krystalografické analýzy proteinů Src, Hck a Lck (Yamaguchi & Hendrickson, 1996; Sicheri *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Schindler *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Breitenlechner *et al.*, 2005; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

## 2.2.1 Struktura kinázy Src

Proteintyrosinkináza Src je protein o velikosti 60 kDa, jehož struktura je (od N-konce) tvořena SH4 doménou s myristoylovou kotvou, unikátní doménou, SH3 doménou, SH2 doménou, CD linkerem, kinázovou (SH1) doménou a C-koncovou regulační oblastí, jejíž součástí je tyrosin 527 (číslování bude uváděno podle kuřecího Src) (obr. 1). V inaktivním stavu je struktura Src více kompaktní. Udržují ji intramolekulární interakce a to zejména vazba SH2 domény na C-terminální segment obsahující fosforylovaný Tyr 527 a asociace CD linkeru s SH3 doménou. SH2 a SH3 domény dále interagují s katalytickou doménou a to na straně protilehlé katalytickému místu. Při aktivaci kinázy dojde k rozrušení některých nebo všech intramolekulárních vazeb a struktura se tak stává rozvolněnější (Xu *et al.*, 1997, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005; Bernadó *et al.*, 2008).



Obr. 1: Schématické znázornění doménové struktury kinázy Src. Src je tvořena 4 doménami: unikátní doménou, SH3 doménou, SH2 doménou a kinázovou doménou. Na obrázku jsou znázorněny zásadní regulační aminokyselinové zbytky a struktury (převzato a upraveno z Boggon & Eck, 2004).

### 2.2.1.1 SH4 doména

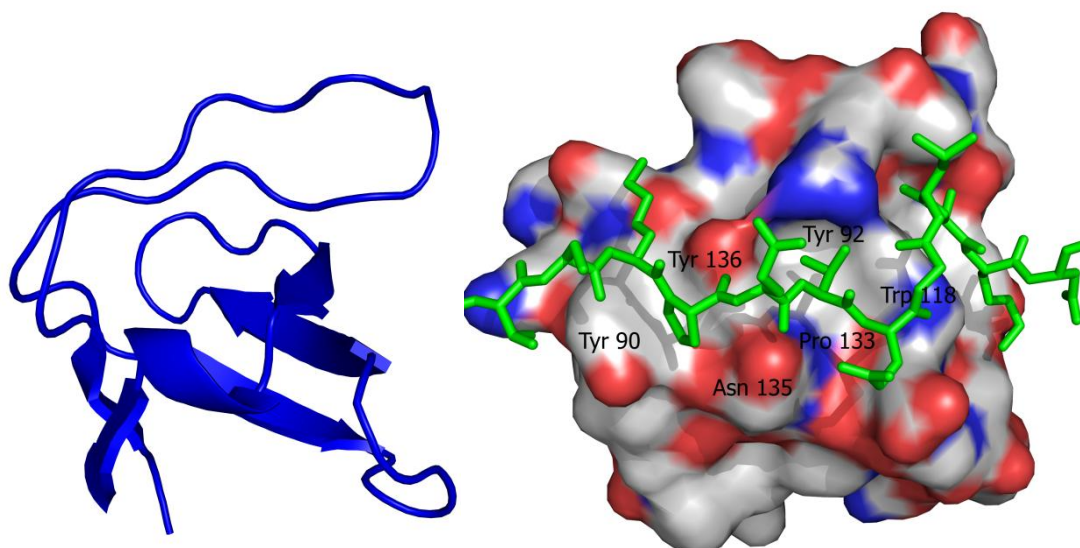
SH4 doména je tvořena pouze 15 aminokyselinovými zbytky. Během proteosyntézy Src je N-koncový Met 1 odštěpen (Garber *et al.*, 1985) a Gly 2 je acylován myristoylovou skupinou, která kináze umožňuje asociovat s membránami (Buss & Sefton, 1985). Jako myristoylační signál slouží 7 N-terminálních aminokyselin (Pellman *et al.*, 1985; Kaplan *et al.*, 1988). U většiny SFK, nikoli ale u Src samotného, je SH4 doména dále modifikována palmitoylem. Ukotvení Src v membráně je proto stabilizováno sekvencí několika bazických aminokyselin na rozhraní SH4 a unikátní domény, jež svým kladným nábojem elektrostaticky interagují se záporně nabitými polárními skupinami membránových fosfolipidů (Resh, 1994).

### 2.2.1.2 Unikátní doména

Unikátní doména kinázy Src je dlouhá 66 aminokyselin. Pro jednotlivé SFK je její délka a sekvence specifická. Funkce této oblasti ještě nebyla uspokojivě objasněna. Není známa ani její struktura, jelikož nezkrácený Src s SH4 a unikátní doménou má v roztoku jen nízkou rozpustnost a stabilitu, což znemožňuje krystalizaci a následnou difrakční analýzu. Bylo však pozorováno, že zde během mitózy dochází k fosforylaci threoninů a serinu kinázou Cdc2 (Morgan *et al.*, 1989). Unikátní doména kinázy Src je rovněž nezbytná pro fosforylaci NMDA receptoru (Yu *et al.*, 1997). Předpokládá se proto, že je to oblast účastnící se specifických interakcí jednotlivých SFK s cílovými proteiny a interakčními partnery.

### 2.2.1.3 SH3 doména

SH3 doména kinázy Src je globulární struktura obsahující 62 aminokyselinových zbytků (aminokyseliny 81 – 142). Její hydrofobní jádro je tvořeno 5  $\beta$ -řetězci ( $\beta$ A –  $\beta$ E), které se uspořádávají do dvou navzájem kolmých antiparalelních  $\beta$ -listů. Vazebný povrch je rovněž hydrofobní oblast. Je ohraničen RT smyčkou a n-Src smyčkou, což jsou řetězce spojující  $\beta$ A s  $\beta$ B a  $\beta$ B s  $\beta$ C. Obsahuje 2 vazebné kapsy a jednu specifitní. Strukturní a mutační analýzy umožnily identifikovat aminokyseliny klíčové pro vazbu ligandů. Jedná se o Tyr 90, Asn 135 s Tyr 136 jedné vazebné kapsy, Tyr 92, Trp118 a Pro 133 druhé vazebné kapsy a Asp 99 a Tyr 131 specifitní kapsy (Yu *et al.*, 1992; Erpel *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997).



Obr. 2: Schematický model struktury SH3 domén (vlevo). SH3 doména vázající CD linker. Znárodně aminokyseliny jsou významné pro asociaci s ligandy. Barvy prvků SH3 domény - C, H, N, O; CD linker - zelená (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997) (převzato z Gerndtová, 2008)

SH3 doména váže prolin-bohaté sekvence nesoucí PxxP motiv (kde x je jakákoli aminokyselina) (obr. 2), jenž po interakci prolinů s kapsami hydrofobního povrchu zaujímají konformaci levotočivého polyprolinového helixu typu II (PPII) (Yu *et al.*, 1994). Vazebná afinita a specifita je dále posílena tzv. kotvící aminokyselinou (nejčastěji arginin) nacházející se v sousedství PxxP motivu. Tento zbytek se váže do specifitní kapsy a podle toho, zda se nachází N-terminálně či C-terminálně od PxxP, určuje orientaci ligandu na povrchu SH3 domény. Definujeme proto ligandy I. (RxxPxxP) a II. (xPxxPxR) třídy (Feng *et al.*, 1994, 1995).

V uzavřené inaktivní konformaci RT a n-Src smyčky interagují s N-koncovým lalokem kinázové domény. CD linker je tak mezi tyto dvě domény vmezeřen. Asp 117 n-Src smyčky tvoří solný můstek s Arg 318 kinázové domény. Kontakt s RT smyčkou je rozsáhlejší a zahrnuje jak vodíkové vazby, tak van der Waalsovy a hydrofobní interakce (Xu *et al.*, 1997).

#### 2.2.1.4 SH2 doména

SH2 doména kinázy Src je struktura globulárního tvaru, která je tvořena 98 aminokyselinovými zbytky (aminokyseliny 148 – 245). Její centrální část obsahuje  $\beta$ -list, jenž je z obou stran obklopen jedním  $\alpha$ -helixem.

SH2 domény rozpoznávají sekvence nesoucí fosforylovaný tyrosin, které asociují s jejich vazebným povrchem v podobě volných natažených řetězců. Elementy sekundární



struktury a smyčky, jenž je spojují, vytváří dvě vazebné kapsy, z nichž jedna je určena pro fosfotyrosin a druhá, na opačné straně centrálního  $\beta$ -listu, interaguje s hydrofobní aminokyselinou v pozici + 3 C-terminálně od fosfotyrosinu. První vazebná kapsa obsahuje vysoce konzervovaný arginin (u Src je to Arg 175), který elektrostaticky přitahuje fosforylovaný tyrosinový zbytek (Waksman *et al.*, 1992, 1993; Eck *et al.*, 1993).

Vazebné studie s fosfopeptidovými knihovnamy ukázaly, že SH2 domény lze dělit do různých tříd podle toho, jakou specifitu vykazují vůči 3 – 5 aminokyselinám následujícím po fosfotyrosinu. Src kináza přednostně váže sekvenci pTyr-Glu-Glu-Ile. Isoleucin je vnořen do hydrofobní kapsy a kyselé zbytky elektrostaticky interagují s bazickými aminokyselinami vazebného povrchu. SH2 doména Src, obdobně jako SH3 doména, asociuje s množstvím ligandů, které nemají podobu optimální sekvence (Songyang *et al.*, 1993).

Kromě interakce s C-terminálním koncem Src tvoří SH2 rovněž kontakty s katalytickou doménou.  $\alpha$ A helix SH2 je orientován antiparalelně k helixu  $\alpha$ E kinázové domény. Ačkoli tyto struktury nejsou spojeny nikterak těsně, jejich povrchy jsou elektrostaticky komplementární a navzájem interagují několika nabitými a polárními aminokyselinovými řetězci (Xu *et al.*, 1997).

#### **2.2.1.5 CD linker**

CD linker je čtrnáctiaminokyselinová sekvence spojující SH2 a kinázovou doménu. Ve struktuře Src v inaktivní konformaci je vázán SH3 doménou. Aminokyselinové zbytky 249 – 253 levotočivý polyprolinový helix typu II, který asociuje s SH3 jako ligand II. třídy. CD linker nese klasický PxxPxR konsensus. Obsahuje pouze jeden prolin (Pro 250), jenž se váže do první hydrofobní kapsy mezi Tyr 90, Asn 135 a Tyr 136. V druhé hydrofobní kapse, kde bývá v případě ideální sekvence zanořen druhý prolin, je umístěn Gln 253. Jeho dlouhý polární řetězec mu brání v zaujmutí patřičné polohy a způsobuje tak oslabení interakce oproti optimálním ligandům (Xu *et al.*, 1997).

#### **2.2.1.6 Kinázová (SH1) doména**

Src má katalytickou doménu charakteristické bi-lalokální struktury (Knighton *et al.*, 1991) společnou všem proteinkinázám. Malý N-terminální lalok (aminokyselinové zbytky 267 – 337) se skládá z 5  $\beta$ -řetězců tvořících antiparalelní  $\beta$ -list a jednoho helixu ( $\alpha$ C). Větší C-koncový lalok (aminokyseliny 341 – 520) je převážně helikální (Xu *et al.*, 1997).

Vazba substrátů a přenos fosfátu probíhá ve štěrbině mezi oběma laloky. Navázání adenosin trifosfátu se účastní zejména N-lalok. Spolu se segmentem spojujícím oba laloky orientuje ATP do správné polohy. Glycin-bohatá smyčka (G-smyčka) interaguje s  $\gamma$ -fosfátem.  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosfáty jsou koordinovány Lys 295. Za asociaci s cílovým peptidem je zodpovědný N-lalok (Xu *et al.*, 1997; Breitenlechner *et al.*, 2005).

Kromě Lys 295 byly identifikovány další konzervované aminokyseliny, které tvoří katalytické jádro enzymu. Jedná se zvláště o Asp 386 nacházející se v katalytické smyčce (sekvence HRDLRAAN) C-koncového laloku. Katalytický aspartát orientuje tyrosinový zbytek substrátového proteinu do polohy umožňující katalýzu. Zřejmě rovněž slouží jako obecná báze, která odnímá proton z hydroxylové skupiny tyrosinu a usnadňuje tak nukleofilní atak  $\gamma$ -fosfátu ATP. Další konzervovanou aminokyselinou je Asp 404, což je první zbytek aktivační smyčky C-laloku. Váže dvoumocné kationty hořčíku, které koordinují  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátové skupiny ATP (shrnutí v Roskoski, 2004; Cowan-Jacob, 2006).

Každý lalok kinázové domény obsahuje segment, který může nabývat aktivní nebo inaktivní konformace. V N-terminálním laloku je to  $\alpha$ C helix, jenž se vzhledem ke zbytku oblasti pohybuje a rotuje, čímž tvoří nebo naopak rozrušuje část katalytického místa. V C-laloku na stejném principu funguje aktivační smyčka. Obsahuje Tyr 416, jehož fosforylace vede ke stabilizaci aktivní konformace (Xu *et al.*, 1999; Breitenlechner *et al.*, 2005).

Laloky kinázové domény se vzájemně pohybují, což způsobuje otevírání a zavírání katalytického místa. Otevřená konformace je nezbytná pro uvolnění ADP a vazbu ATP. Uzavřením katalytické štěrbině umožňuje substrátům zaujmout katalyticky výhodnou pozici. Blokování těchto konformačních přechodů či ovlivnění vzájemné orientace laloků vede ke změně aktivity kinázové domény (shrnutí v Roskoski, 2004).

### **2.2.1.7 C-koncový segment**

Na úplném C-konci Src se nachází krátká aminokyselinová sekvence (aminokyseliny 521 – 533), která nese regulačně významný Tyr 527. Po fosforylaci tyrosinu dochází k vazbě segmentu na SH2 doménu a potlačení katalytické aktivity kinázy (Young *et al.*, 2001). Tato interakce je však relativně slabá, jelikož C-terminus Src neobsahuje optimální ligand s hydrofobní aminokyselinou na pozici pTyr + 3, která by zapadla do vazebné kapsy (nese sekvenci Tyr-Gln-Pro-Gly). Asociace s SH2 doménou tak probíhá pouze přes fosfotyrosin 527 (Xu *et al.*, 1997).

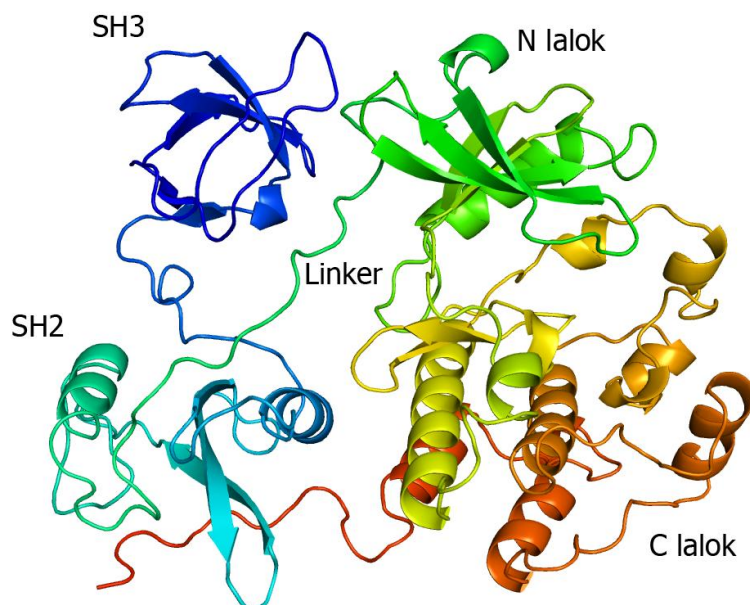
## 2.2.2. Regulace aktivity kinázy Src

Proteinkinázy se podílí na řízení snad všech buněčných procesů od metabolismu, růstu až po diferenciaci. Případné chyby by mohly vést k aberantní signalizaci a patologiím, proto musí být jejich katalytické aktivity pod přísnou kontrolou. Existuje řada mechanismů, které jsou schopny v odpověď na patřičné podněty kinázy aktivovat nebo inaktivovat. Mezi nejčastější patří fosforylace, defosforylace, intermolekulární či intramolekulární interakce. Mezi jednotlivými členy proteinkinázové nadrodiny se mohou regulační módy značně lišit: cyklin-dependentní proteinkinázy jsou kontrolovány cykliny, proteinkináza A cyklickým AMP a kontaktem s regulačními podjednotkami, kinázy rodiny Src svými SH3 a SH2 doménami atp.

Strukturní studie ukatují, že všechny tyto regulační elementy determinují kinázovou aktivitu ovlivněním pouze několika klíčových komponent katalytické domény. Koncové efektorové struktury jsou součástí katalytického centra a obsahují aminokyselinové zbytky nezbytné pro katalýzu nebo vazbu substrátů. Zahrnují zejména glycin-bohatou smyčku a helix  $\alpha C$  (PSTAIRE helix u cyklin-dependentních kináz) N-koncového laloku a katalytickou a aktivační smyčku C-laloku. Změny konformace a polohy těchto elementů v důsledku fosforylací, defosforylací a interakcí s regulačními podjednotkami kontrolují kinázovou aktivitu. Ta je navíc rovněž ovlivňována vzájemnou orientací N- a C-koncového laloku katalytické domény (shrnutu v Johnson *et al.*, 1996; Hubbard, 1998).

### 2.2.2.1 Regulační domény

Mechanismy regulujícími katalytickou aktivitu kinázy Src jsou SH2 doména, SH3 doména a fosforylační status tyrosinů na pozicích 416 a 527. V inaktivní konformaci Src SH2 doména váže C-koncový segment s fosforylovaným Tyr 527. SH3 doména interaguje s levotočivým helixem polyprolinového typu II CD linkeru. Obě domény tak zároveň nasedají na povrch kinázové domény ze strany protilehlé katalytickému centru.  $\alpha A$  helix SH2 tvoří iontové vazby s antiparalelními helixy  $\alpha E$  a  $\alpha I$  C-koncového laloku. SH3 doména kontaktuje N-lalok prostřednictvím interakce RT smyčky s  $\beta 2$  a  $\beta 3$  řetězci laloku a zároveň vzniká solný můstek mezi Asp 117 n-Src smyčky s Arg 318 (Pawson, 1997; Xu *et al.*, 1997) (obr. 3).



Obr. 3: Stuhkový model struktury kinázy Src v inaktivní konformaci. SH3 doména asociuje s polyprolinovým helixem CD linkeru, zatímco SH2 doména váže C-koncový segment nesoucí fosfotyrosin 527. Obě regulační domény navíc interagují s laloky katalytické domény. (PDB ID: 2SRC; Xu *et al.*, 1997) (převzato z Gerndtová, 2008)

Molekulární dynamické simulace ukázaly, že pokud obě dvě domény asociují se svými intramolekulárními ligandy, tvoří krátký linker mezi nimi rigidní strukturu. V důsledku toho dochází k dynamickému spřažení pohybů obou domén a celý SH3-SH2 fragment tak tvoří jakousi svorku, která drží kinázovou doménu v inaktivní konformaci. Rovněž lze pozorovat korelaci mezi pohyby SH3 domény a C-laloku. (Young *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2002). Helix  $\alpha$ C spolu s konzervovaným Glu 310 je vytlačen do pozice, která není slučitelná s katalýzou (Gonfloni *et al.*, 1997; 2000) a zároveň je bráněno otevírání a zavírání katalytické štěrbině na rozhraní laloků. Tyr 416 aktivační smyčky je díky změně její struktury ukryt a není přístupný fosforylaci (Xu *et al.*, 1997; 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Uvolnění SH2 domény z její asociace s C-koncovým segmentem vede ke zvýšení flexibility SH3-SH2 linkeru, desynchronizaci pohybů SH2 a SH3 domén a aktivaci kinázy. Simulace ukázaly, že zvýšená motilita SH2 domény po disociaci C-terminální oblasti s defosforylovaným Tyr 527 je přes linker přenesena na SH3 doménu, což vede k nárůstu její pohyblivosti vůči N-laloku (v porovnání s inaktivním stavem) a oslabení interakcí mezi těmito dvěma strukturami. (Young *et al.*, 2001).

SH3-SH2 linker je tvořen 8 aminokyselinovými zbytky. Pokud je Src v inaktivní konformaci s regulačními podjednotkami vázanými na své intramolekulární ligandy, zaujímá tato spojovací sekvence strukturu  $\beta$ -otočky následovanou  $3_{10}$  helixem a stabilizovanou

několika vodíkovými můstky. Nahrazení 3 aminokyselin (Ser 142, Ala 145, Glu 146) za glyciny vedlo k rozvolnění linkeru do podoby flexibilního řetězce a konstitutivní aktivaci Src (Young *et al.*, 2001).

Pro asociaci SH2 domény s C-koncovým segmentem je nezbytná přítomnost fosfátu na hydroxylové skupině tyrosinu 527, kterou zajišťují kinázy Csk a Chk (Cooper *et al.*, 1986; Okada & Nakagawa, 1989). Csk je charakteristická svojí úzkou specifitou pro C-terminální tyrosin 527 kinázy Src. Ta je dána schopností C-laloků katalytických domén obou kináz asociovat, čímž se Csk dostane přesně do pozice, kdy její katalytické místo kontaktuje aminokyselinový řetězec obsahující Tyr 527, jenž je následně fosforylován (Levinson *et al.*, 2008). Chk je kináza z rodiny Csk, která je však přítomna jen v některých typech tkání. Vyjma fosforylace Tyr 527 je schopna Src inhibovat tvorbou komplexu s katalyticky aktivními formami Src (Chong *et al.*, 2006). C-terminální tyrosin 527F může rovněž podléhat intermolekulární autofosforylaci, která však probíhá jen s nízkou kinetikou a tudíž se na regulaci aktivity Src podílí jen velmi málo (Osusky *et al.*, 1995).

Defosforylaci Tyr 527 zprostředkovává řada tyrosinových fosfatáz. Jedná se zejména o fosfatázy PTP $\alpha$ , PTP1B, Shp1, Shp2 či CD45 hematopoetických buněk (shrnuto v Thomas & Brugge, 1997; Frame, 2002).

SH3 a SH2 domény asociují se svými intramolekulárními vazebnými partnery s poměrně nízkou afinitou. Je to dáno tím, že ani jeden z ligandů nespĺňuje optimální sterické ani elektrostatické požadavky dané vazebným povrchem domén. CD linker sice tvoří polyprolinový helix, ale místo druhého prolinu ideální sekvence PxxP obsahuje glutamin. C-terminální segment nesoucí regulační tyrosin 527 má na pozici Tyr527 + 3 glycin oproti preferovanému leucinu (Xu *et al.*, 1997). Ačkoli se tedy jedná o velmi slabé ligandy, jejich lokalizace na stejném peptidovém řetězci, který tvoří i SH3 a SH2, jim poskytuje entropickou výhodu a vede k jejich vazbě na regulační domény. Interakční partneři Src nesoucí více afinní vazebné motivy kompetují s intramolekulárními ligandy, mohou je vytěsnit, navázat se na regulační domény a zvýšit kinázovou aktivitu Src či ovlivnit jeho lokalizaci.

Src může být tímto způsobem aktivován vazbou na aktivované receptorové tyrosinkinázy, jako například EGFR (Maa *et al.*, 1995), PDGFR (Kypta *et al.*, 1990), ERBB2 (HER2/NEU) (Muthuswamy *et al.*, 1994), FGFR-1 (Landgren *et al.*, 1995) nebo CSF-1R (Courtneidge *et al.*, 1993). Mezi další proteiny interagující s regulačními doménami Src můžeme řadit např. transkripční faktor STAT3 vázající se na SH3 doménu (Schreiner *et al.*,

2002), fosfatázu PTP $\alpha$  asociující s SH2 doménou (Sonnenburg *et al.*, 2003) či kinázu FAK (shrnutu v Hanks *et al.*, 2003), adaptorový protein p130Cas (Burnham *et al.*, 2000) a Sam 68 (protein podílející se na regulaci sestřihu RNA) (Taylor *et al.*, 1995), které jsou ligandy obou domén.

Rigidní spojení SH3 a SH2 domén je nezbytné pro udržení inaktivní konformace Src (a SFK obecně). Jakákoli událost, která povede k rozpřažení koordinovaných oscilací regulačních domén a rozrušení „svorkového“ mechanismu, jímž blokují laloky katalytické domény, bude mít za následek aktivaci kinázy. Může se jednat jak o defosforylaci tyrosinu C-koncového segmentu, přímou vazbu proteinu na kinázovou doménu, tak o vyvázání SH2 či SH3 domény z jejich inhibiční interakce jiným proteinem (Xu *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.2 Kinázová doména

Katalytická aktivita Src je dána konformačním stavem kinázové domény. Hlavní strukturní elementy řídící přechod mezi aktivní a inaktivní formou jsou  $\alpha$ C helix N-koncového laloku a aktivační smyčka C-laloku. Pokud zaujmají správnou konformaci a pozici, tvoří klíčové prvky katalytického centra nezbytné pro vazbu substrátů i vlastní přenos fosfátové skupiny.

Ve struktuře kinázové domény aktivního Src je  $\alpha$ C helix významnou součástí aktivního místa. Obsahuje konzervovaný Glu 310, jehož postranní řetězec tvoří iontovou vazbu s Lys 295. Lysin pak spolu s Asp 404 vzájemným iontem  $Mg^{2+}$  koordinuje fosfátové skupiny ATP do polohy vhodné pro katalýzu.

Po přechodu Src do inaktivní formy je helix  $\alpha$ C vychýlen ze své původní pozice. Glu 310 směřuje mimo aktivní místo a je spojen vodíkovým můstkem s Arg 409. Nemůže tak interagovat s Lys 295, který z toho důvodu váže Asp 404, čímž dojde k rozrušení vazebného místa pro ATP. Poloha  $\alpha$ C helixu je v inaktivní konformaci navíc stabilizována hydrofobními interakcemi aminokyselinových zbytků na jeho vnitřní straně (Phe 278, Leu 297, Met 302, Phe 307, Met 314, Ile 336) s N-koncovou částí aktivačního segmentu (Leu 407, Leu 410, Ile 411). Orientace  $\alpha$ C helixu je rovněž ovlivňována C-terminálním úsekem CD linkeru, jehož

Trp 260 v inaktivní konformaci Src míří k C-terminu  $\alpha$ C a pomáhá jej udržovat v katalytické nekompetentní pozici (Xu *et al.*, 1997, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Druhý ze stěžejních regulačních prvků je aktivační smyčka (aminokyseliny 404 – 432). V aktivní konformaci je to rozvolněný řetězec bez sekundárních struktur. Nese Tyr 416, což je jedno ze dvou hlavních regulačních fosforylačních míst kinázy Src. Na základě krystalografické analýzy aktivované katalytické domény kinázy Lck lze říci, že fosfotyrosin na pozici 416 (394 u Lck) interaguje s aminokyselinovými zbytky Arg 385, Arg 409, Ala 418 (Arg 363, Arg 387, Ala 396 u Lck), čímž dojde ke stabilizaci aktivační smyčky v poloze umožňující optimálně vázat proteinové substráty a katalyzovat přenos fosfátu. Tato konformace spolu s vhodnou orientací  $\alpha$ C helixu vede k plné aktivaci kinázy (Yamaguchi & Hendrickson, 1996; Cowan-Jacob *et al.*, 2005). Vazba fosfátu na Tyr 416 probíhá autofosforylačním mechanismem (Barker *et al.*, 1995). Míra fosforylace tohoto tyrosinu koreluje s katalytickou aktivitou (Boerner *et al.*, 1996).

V inaktivní konformaci N-koncová část aktivační smyčky (aminokyseliny 413 – 418) tvoří krátký  $\alpha$ -helix (A loop helix), který je vklíněn mezi laloky kinázové domény. Tyr 416 je tak ukryt uvnitř této struktury a není přístupný fosforylaci. A loop helix brání přístupu substrátů do katalytického místa či jejich rozpoznání a stabilizuje nekatalytickou pozici  $\alpha$ C helixu (Xu *et al.*, 1999).

Výpočetní analýzy konformačního přechodu mezi aktivní a inaktivní formou Src ukázaly, že hlavní energetickou bariérou tohoto procesu je přesun  $\alpha$ C helixu. Přechod mezi jednotlivými aktivačními stavy je tudíž určen zejména polohou  $\alpha$ C (Huang *et al.*, 2012).

Způsob, jak je lokalizace  $\alpha$ C helixu spjata s regulací SH3 a SH2 doménami vysvětlují dvě hypotézy. První předpokládá, že uvolnění „svorkového“ mechanismu, kterým drží SH3-SH2 segment laloky kinázové domény v inaktivním stavu, je doprovázeno změnou orientace CD linkeru a zejména zrušením vazby mezi Trp 260 a  $\alpha$ C helixem, což umožní rotaci  $\alpha$ C do katalytické výhodné pozice. Destabilizace A loop helixu dovolí aktivační smyčce zaujmout rozvolněnou konformaci, odkryje Tyr 416, jehož autofosforylace vede k vytvoření plně aktivního katalytického centra. Podle druhé teorie potlačení inhibičního působení regulačních domén nejdříve rozvolní  $\alpha$ -helix aktivační smyčky a umožní fosforylovat Tyr 416. Rozrušením A loop helixu přestane být stabilizována inhibovaná konformace  $\alpha$ C helixu a Arg 409, který původně tvořil vodíkový můstek s Glu 310, je vyvázan do interakce

s fosfotyrosinem, což následně vede ke změně polohy  $\alpha$ C helixu a obnovení katalytického místa (Schindler *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Cowan-Jacob *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2012).

### 2.2.2.3 Struktura aktivní kinázy Src

Podobu kinázy Src v inaktivním stavu lze považovat již za téměř objasněnou. Byla vyřešena detailní krystalická struktura oblasti sahající od SH3 domény k C-koncovému segmentu (aminokyselinové zbytky 83 – 533) (Xu *et al.*, 1997; 1999). Krystalizovat se nepodařil pouze fragment zahrnující SH4 a unikátní doménu. Jak vypadá Src v aktivní konformaci je nicméně stále ještě otázkou.

Je známo, že rozrušení intramolekulárních inhibičních vazeb, jak defosforylací C-terminálního tyrosinu, mutacemi, tak asociací s dalšími proteiny, vede k přechodu do aktivní konformace. Přítomnost dvou těchto negativních regulačních interakcí v rámci jedné molekuly může znamenat, kromě potřeby co nejpřísněji kontrolovat aktivitu enzymu, rovněž různé stupně aktivace. Jednou z možností tudíž je, že přerušení jedné intramolekulární inhibiční vazby je dostatečné pro indukci kinázové aktivity, což by vedlo k více než jedné aktivní formě Src. Podle alternativní hypotézy by tato změna vedla k destabilizaci i druhé regulační interakce, tím celého inhibičního mechanismu a zaujmutí jedné unifikované aktivní konformace. V případě kinázy Src (ale např. i Hck) se většina studií přiklání k první teorii. Druhá je podporována molekulárními dynamickými simulacemi Younga a kolektivu (Young *et al.*, 2001).

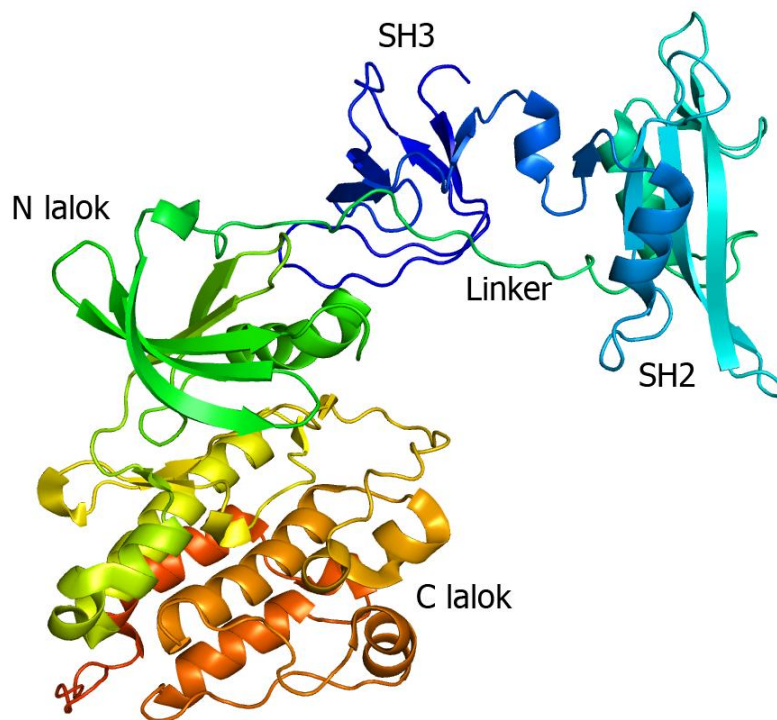
Základní představu o aktivní konformaci Src poskytla roentgenová difrakční analýza nefosforylovaného proteinu (aminokyseliny 82 – 533) krystalizovaného v komplexu s inhibitorem (des-metyl analog imatinibu) (Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Výsledkem studie byla „otevřená“ struktura s kinázovou doménou zaujímající takřka aktivní konformaci, vzhledem k níž přibližně v pravém úhlu, rotované o  $130^\circ$  oproti inaktivnímu stavu, se nacházejí regulační domény (obr. 4). Absence fosfátu na Tyr 527 neumožňuje SH2 doméně vázat C-koncový segment, což vede ke zrušení interakce s C-lalokem a rozpadu kompaktní konformace inaktivního Src. SH3 doména je v kontaktu s N-lalokem a stejně jako v katalyticky neaktivní formě Src asociuje s CD linkerem. Nefosforylovaný C-terminus se stáčí zpátky a váže se do C-laloku, kde se C-koncový Leu 533 interkaluje do kapsy formované helixy  $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ F,  $\alpha$ H C-laloku. Karboxy-konec vytváří vodíkové vazby s dusíky uhlíkaté kostry peptidu a hydroxylovou skupinou Tyr 527. Tato



interakce je dále stabilizována asociací tyrosinu s konzervovaným Pro 529 a chrání jej před fosforylací.

V kapse, která je ve struktuře aktivního Src obsazena C-terminálním Leu 533, je u kinázy Abl umístěn myristát, který Abl tímto uzavírá v inaktivní konformaci (Nagar *et al.*, 2003; Hantschel *et al.*, 2003). Tato vazebná struktura vykazuje u obou kináz vysokou sekvenční i strukturní homologii a lze tak předpokládat, že slouží jako místo pro ukotvení myristátu rovněž u Tyr 527 fosforylovaného Src. NMR experimenty s fosforylovaným a nefosforylovaným Src v přítomnosti kyseliny myristylové ukázaly, že myristát asociuje pouze s fosforylovanou formou proteinu, což může být vysvětleno blokováním vazebné kapsy C-koncovým leucinem 533 aktivního Src. Ukotvení myristové skupiny v membráně by tudíž bylo nezbytné pro aktivaci kinázy. (Cowan-Jacob *et al.*, 2005).



Obr. 4: Stuhlý model struktury kinázy Src v aktivní konformaci. SH2 doména není schopna vázat C-koncový segment, nicméně SH3 doména si zachovala interakce jak s CD linkerem, tak s N-terminálním lalokem katalytické domény. (PDB ID: 1Y57; Cowan-Jacob *et al.*, 2005) (převzato z Gerndtová, 2008)

Jelikož se jedná o strukturu nefosforylovaného Src, jehož existence nebyla *in vivo* prokázána, mohlo by být možné, že je tato konformace arteficiálně indukována přítomností inhibitoru či stabilizována krystalovými kontakty (Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Řada studií kinázy Hck (patřící do Src rodiny) ukázala, že SH3 i SH2 domény mohou regulovat katalytickou aktivitu nezávisle na sobě.

Modifikace CD linkeru Hck ve vysoko-afinní ligand neschopný disociace od SH3 domény nebrání aktivaci kinázy zprostředkované SH2 doménou (Lerner *et al.*, 2005).

Exprese Hck v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, což je organismus, ve kterém nebyly nalezeny žádné endogenní tyrosinkinázy, způsobuje potlačení buněčného růstu kultury, které pozitivně koreluje s kinázovou aktivitou (jak ukázaly předešlé experimenty s *S. cerevisiae* transformovanými Src (Murphy *et al.*, 1993)). Vzhledem k absenci proteintyrosinkinázy Csk, jež fosforyluje C-terminální tyrosin (Okada & Nakagawa, 1989), vykazuje Hck katalytickou aktivitu. Ta je zvýšena při koexpresi Hck s Nef, což je protein obsažený v genomu viru HIV-1, který váže SH3 doménu s nejvyšší dokumentovanou afinitou (Lee *et al.*, 1995) a je tak schopen ji vyvázat s inhibiční interakce s CD linkerem. Minimálně u části populace Hck kináz je tudíž zachována asociace SH3 domény s CD linkerem i v situaci, kdy SH2 doména nemůže vázat C-koncový segment (Lerner *et al.*, 2005).

Komplementární experimenty ukázaly, že mutace C-terminálního segmentu ve vysoko-afinní ligand, a tedy neschopnost uvolnit jej z interakce s SH2 doménou, nebrání aktivaci Hck přes SH3 doménu. Vazba proteinu Nef na SH3 doménu a následná aktivace Hck neovlivní fosforylační status koncového tyrosinu (Lerner & Smithgall, 2002).

Důkazy o vícestupňové aktivaci přinesl i výzkum kinázy Src. Podporuje ji jak krystalová struktura nefosforylovaného Src (Cowan-Jacob *et al.*, 2005), tak mutační analýzy v-Src a c-Src.

SH3 doména interaguje s N-koncovým lalokem katalytické domény prostřednictvím RT- a n-src smyček. Mutace R95W a T96I uvnitř RT smyčky aktivují Src a způsobují částečně transformovaný fenotyp buněk (Kato *et al.*, 1986; Miyazaki *et al.*, 1999). Záměna D117N v n-src smyčce pravděpodobně ruší její interakci s N-lalokem (Xu *et al.*, 1997). Pokud je spolu s R95W a L124V alteracemi vnesena do c-Src, dojde ke zvýšení kinázové aktivity proteinu oproti původnímu Src (Miyazaki *et al.*, 1999). Zavedení aminokyselinových záměn R95W, T96I, D117N a L124V do konstitutivně aktivního Src, který má na pozici 527 místo tyrosinu nefosforylovatelný fenylalanin, vede ke 2,5násobnému zvýšení jeho aktivity. Disociace C-terminálního segmentu z SH2 domény tudíž nevede k plnému zrušení inhibičních interakcí zprostředkovaných SH3 doménou (Brábek *et al.*, 2002).

Různé aktivační signály zprostředkované různými proteiny mohou tedy vést k několika odlišným aktivním konformacím kinázy, které se budou lišit dostupností SH3 a SH2 domén. Rozdílné interakční schopnosti pak mohou vyústit v asociaci s jinými substráty nebo vazebnými partnery, což může být mechanismus, jak v závislosti na počátečním podnětu fosforylovat různé efekторы, které povedou signál rozdílnými dráhami či změnit lokalizaci proteinu.

Kromě klasické roentgenové krystalografie byla ke stanovení struktury aktivního Src použita i jiná difrakční metoda. SAXS (nízkoúhlový rozptyl roentgenového záření) umožňuje měřit zkoumané molekuly v roztoku a vyhnout se tak obtížnostem spojeným s krystalizací, nicméně s daleko nižším rozlišením než krystalografická analýza.

Studie využívající metodu SAXS (Bernadó *et al.*, 2008) poukázala na skutečnost, že oproti nativnímu Src, jež se v roztoku vyskytuje převážně v jedné majoritní konformaci odpovídající struktuře inaktivního Src (Xu *et al.*, 1997; 1999), konstitutivně aktivovaný Src nesoucí tyrosin 527 mutovaný za fenylalanin je zastoupen minimálně dvěma konformačními stavy. 85 % všech molekul představuje kompaktní formu Src experimentálně nerozlišitelnou od inaktivního Src, kde však nemůže docházet k asociaci C-koncového segmentu a SH2 domény. Jedná se zřejmě o mezistupeň mezi inaktivní a aktivní formou, který v závislosti na regulačních signálech přejde do jednoho či druhého stavu. Zbytek populace je tvořen minimálně jednou rozvolněnější konformací, jež vykazuje tvar podobný struktuře nefosforylovaného aktivního Src (Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

## 2.3 Tyrosin 90 a regulace vazebných vlastností SH3 domény

V roce 1988 byla při studiu onkoproteinu v-Crk identifikována v rámci jeho kódující sekvence oblast, jejíž homology byly nalezeny v genu pro fosfolipázu C $\gamma$  a kinázu Src, kde odpovídala aminokyselinovému segmentu N-terminálně od SH2 domény. Byla označena jako SH3 doména (Mayer *et al.*, 1988). Výzkum ukázal, že je to oblast evolučně konzervovaná od kvasinek po savce, která se nachází v řadě dalších proteinů, jenž se podílí zejména na procesech signální transdukce (Musacchio *et al.*, 1992). První důkaz, že se jedná o doménu zprostředkující protein-proteinové interakce, přinesl screening cDNA expresní knihovny provedený s SH3 doménou proteintyrosinkinázy Abl, který našel 2 proteiny, jejichž vazebná místa byla identifikována jako krátké prolin-bohaté sekvence (Cicchetti *et al.*, 1992; Ren *et al.*, 1993). Odhalení podobných motivů v dalších bílkovinách zařadilo SH3 doménu mezi běžné proteinové interakční moduly.

Byly stanoveny struktury SH3 domén několika proteinů, které ukázaly, že její hydrofobní jádro je tvořeno 5  $\beta$ -řetězci sestavenými do dvou navzájem kolmých antiparalelních  $\beta$ -listů. Relativně plochá oblast na jinak globulární struktuře je hydrofobní vazebné místo. Obsahuje 3 vazebné kapsy, jež jsou formovány množstvím konzervovaných aminokyselin, které převážně náleží do RT- a n-Src smyček. Strukturní a mutační analýzy ukázaly, že u kinázy Src se jedná zejména o Tyr 90, Asn 135 s Tyr 136 jedné vazebné kapsy, Tyr 92, Trp118 a Pro 133 druhé vazebné kapsy a Asp 99 a Tyr 131 specifitní kapsy (číslování podle kuřecího Src) (Yu *et al.*, 1992; Erpel *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997).

Ligandy SH3 domény s charakteristickým motivem PxxP zaujímají konformaci levotočivého polyprolinového helixu typu II. PPII helix je úzká struktura s třemi aminokyselinami na otáčku. Příčný průřez má tudíž přibližně tvar trojúhelníku, jehož základna asociuje s povrchem SH3 domény. Jedná-li se optimální vazebný motiv, jsou dvě vazebné kapsy obsazeny dipeptidem  $\Phi$ P, kde  $\Phi$  je hydrofobní aminokyselina. Třetí specifitní štěrbina obvykle interaguje s bazickým aminokyselinovým zbytkem, který se nachází na jednom nebo druhém okraji sekvence  $\Phi$ Px $\Phi$ P (shrnutí v Kay *et al.*, 2000; Mayer, 2001).

Ačkoli je tyrosinová fosforylace známa především jako mechanismus zprostředkující protein-proteinové interakce mezi sekvencemi obsahujícími tyrosin a SH2 či PTB doménami, ukázalo se, že je rovněž významným regulačním faktorem ovlivňujícím vazebné vlastnosti

SH3 domén. Fosforylované tyrosiny byly objeveny v SH3 doménách desítek proteinů. Porovnání jejich sekvencí odhalilo, že většina fosfotyrosinů se nachází na pozicích 7 a 66, které v kuřecím Src odpovídají Tyr 90 a Tyr 131 (Tatárová *et al.*, 2012). Oba dva aminokyselinové zbytky se účastní interakce s ligandem a to jako strukturní komponenty první a třetí hydrofobní kapsy vazebného povrchu (Erpel *et al.*, 1995).

Analýza sekvencí přilehlých fosforylovaným tyrosinům ukázala značnou konzervovanost aminokyselin obklopujících Tyr 7 (Tyr 90). Na pozici -2 od Tyr 90 se obvykle nachází alanin, na pozici -1 leucin, aspartát na +1 a pozice +2 je většinou obsazena aminokyselinou s aromatickým kruhem. Motiv ALYD(Y/F) RT smyčky je tudíž nejvíce preferovaná sekvence podléhající tyrosinové fosforylaci v rámci SH3 domén. Nachází se přibližně u 12 – 15 % SH3 domén lidských proteinů. Podle predikčních programů se jeví, že Tyr 7 ALYD(Y/F) motivu je nejpravděpodobněji fosforylován kinázami rodiny Src, případně kinázami FAK, Btk, PDGFR nebo Abl (Tatárová *et al.*, 2012).

Jedna z prvních publikací dokumentující fosforylaci SH3 domény se zabývala mitogenní signalizací po stimulaci PDGF receptoru. Src asociuje s aktivovaným PDGFR přes svoji SH2 doménu. Bylo zjištěno, že dochází k fosforylaci Tyr 136, což je konzervovaný tyrosin specifitní kapsy vazebného povrchu SH3 domény Src. Fosforylace tohoto aminokyselinového zbytku neovlivňovala aktivaci Src zprostředkovanou PDGFR, ale snižovala schopnost SH3 domény vázat peptidové ligandy (Broome & Hunter, 1997).

Pilotní práce o regulačním vlivu fosforylace Tyr 7 v SH3 doméně se věnovala kináze Btk a signalizaci přes receptory B buněk (BCR). Btk je protein z rodiny nereceptorových proteintyrosinkináz Tec. Btk má multi-doménovou strukturu. Kromě katalytické, SH3 a SH2 domény obsahuje na N-konci PH doménu a prolin-bohaté sekvence. V maturovaných B lymfocytech se účastní přenosu signálu z BCR. Aktivace BCR vede ke stimulaci kináz z rodiny Src, fosforylaci Tyr 551 v kinázové doméně Btk a přechodu do aktivního stavu (de Weers *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 1996). Na vazebném povrchu SH3 domény dochází k autofosforylaci Tyr 223 (odpovídá Tyr 90 u kuřecího Src). Záměna tohoto tyrosinu za fenylalanin vnesená do konstitutivně aktivní formy Btk způsobuje zvýšenou schopnost transformovat 3T3 a RAT2 fibroblasty. Jelikož nedochází k výrazné změně kinázové aktivity, fosforylační status Tyr 223 ovlivňuje zřejmě vazebné vlastnosti SH3 domény (Park *et al.*, 1996).

Vazebné studie s GST fúzními SH3 doménami kinázy Btk ukázaly, že přítomnost fosfátu na Tyr 223 může mít různý vliv na asociaci s jednotlivými ligandy. Fosfotyrosin na

pozici 223 nemá žádný vliv na navázání proteinu c-Cbl na SH3 doménu. Přítomnost fosfátu však inhibuje interakci s proteinem WASP a naopak způsobuje zvýšenou afinitu pro kinázu Syk (Morrogh *et al.*, 1999).

Podobným příkladem je interakce WASP s PSTPIP. Jsou to proteiny, které se účastní regulace aktinového cytoskeletu a jsou nezbytné pro modulaci kortikálního aktinu či cytokinezi (Li, 1997). PSTPIP je fosforylován kinázami rodiny Src na dvou místech, z nichž jedno je Tyr 367 SH3 domény (odpovídá Tyr 90 kuřecího Src). Fosforylace nebo fosfomimikující náhrada tyrosinu za glutamát na pozici 367 inhibuje vazbu WASP a vede k narušení jejich kolokalizace uvnitř buněk. SH3 doména PSTPIP obsahující nefosforylovaný Tyr 367 nebo Phe 367 s proteinem WASP asociuje. Fosforylace tyrosinu 367 je tudíž prostředkem kontrolujícím lokalizaci obou proteinů v rámci buňky a zřejmě se proto podílí i na regulaci formování a přestaveb aktinového cytoskeletu (Wu *et al.*, 1998).

Fosforylace SH3 domény ovlivňuje rovněž katalytickou aktivitu a vazebné schopnosti kinázy Abl a jejího fúzního proteinu Bcr-Abl. Abl je nereceptorová proteintyrosinkináza N-koncovou oblastí obsahující myristoylovou kotvu, SH3, SH2 a katalytickou doménou. V inaktivním stavu ji udržují intramolekulární interakce, které vedou, podobně jako u kináz Src nebo Hck, k navázání SH3-SH2 struktury na laloky katalytické domény. Regulační domény pak fungují jako jakási „svorka“, jež drží kinázovou doménu v konformaci neslučitelné s katalýzou. Jedná se o asociaci SH3 domény s linkerem spojujícím SH2 a kinázovou doménu a o interakci myristoylovaného N-konce s C-terminálním lalokem katalytické domény (Nagar *et al.*, 2003; Hantschel & Superti-Furga, 2004; Nagar *et al.*, 2006).

Reciprokou translokací mezi *c-abl* protoonkogenem lokalizovaným na chromosomu 9 a *bcr* lokusem na chromosomu 22 vznikne kromě pozměněného chromosomu 9 tzv. Filadelfský chromosom, což je cytogenetický ukazatel chronické myeloidní leukemie (CML). Výsledkem je exprese fúzního onkogenního proteinu Bcr-Abl, který vykazuje konstitutivní kinázovou aktivitu a způsobuje transformaci hematopoetických buněk a buněk kostní dřeně. V porovnání s kinázou Abl není Bcr-Abl regulován asociací N-koncového segmentu s C-lalokem, nicméně u něj zůstává částečně zachována inhibiční interakce mezi SH3 doménou a linkerem spojujícím SH2 a kinázovou doménu (shrnuto v Wong & Witte, 2004; Hantschel & Superti-Furga, 2004).

Kinázy Hck, Lyn a Fyn náležící k rodině Src fosforylují SH3-SH2 oblast Bcr-Abl proteinu na 7 tyrosinech, z nichž 2 jsou lokalizovány v SH3 doméně, 4 v SH2 doméně a 1 v linkeru mezi nimi. Z těchto míst je nejvýznamnější fosfotyrosin 89 v SH3 doméně Bcr-Abl (homolog Tyr 90 SH3 domény kuřecího Src), jehož výrazně zvýšený výskyt byl detekován

v CML buněčných liniích K-562 a Meg-01. Mutace Tyr 89 za nefosforylovatelný fenylalanin vedla ke snížení schopnosti transformace oproti původnímu Bcr-Abl. Nejvyšší transformační aktivitu však vykazuje Bcr-Abl protein, jehož všech 7 tyrosinů je fosforylováno. Většina z nich se totiž nachází na interakčním rozhraní SH3-SH2 segmentu a kinázové domény a svým negativním nábojem tudíž destabilizují inhibiční efekt regulačních domén (Meyn *et al.*, 2006). Fosforylace tyrosinu 89 kinázy Abl inhibuje asociaci SH3 domény jak s linkerem, tak s intermolekulárním ligandem Abi-1 (Chen *et al.*, 2008).

Ukázalo se, že jedna z příčin rezistence Bcr-Abl vůči jeho inhibitoru imatinibu, jenž se používá při léčbě chronické myeloidní leukemie, je mutace Tyr 89. Jelikož se imatinib preferenčně váže na inaktivní formu Abl, předpokládá se, že rozrušení intramolekulární inhibiční vazby mezi SH3 doménou a linkerem, která zůstává do určité míry zachována i u Bcr-Abl, vede k přechodu do plně aktivního stavu a znemožnění vazby inhibitoru (Azam *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008).

Další bílkovina, u níž byla objevena fosforylace vazebného povrchu SH3 domény, je adaptorový protein p130CAS. Je to jeden ze stěžejních substrátů kinázy Src, který se podílí na integrinové signalizaci (shrnutí v Defilippi *et al.*, 2006). Exprese CAS v myších embryonálních fibroblastech (MEF) transformovaných Src zvyšuje migraci a invazivitu těchto buněk (Brábek *et al.*, 2004; 2005). SH3 doména se nachází na N-koncové části CAS, C-konec tvoří Src-vazebná doména. Mezi nimi je lokalizována substrátová doména obsahující 15 motivů Tyr-X-X-Pro, které mohou být fosforylovány kinázami rodiny Src. V netransformovaných buňkách dochází k fosforylaci substrátové domény CAS v místech buněčné adheze zprostředkované integriny, jenž vede k stimulaci signálních drah regulujících motilitu a viabilitu buněk (shrnutí v Defilippi *et al.*, 2006).

V myších embryonálních fibroblastech transformovaných Src byla detekována zvýšená míra fosforylace Tyr 12 (homolog Tyr 90 kuřecího Src), který je součástí první vazebné kapsy SH3 domény CAS (Luo *et al.*, 2008). Fosfomimikující mutace Tyr 12 za kyselinu glutamovou vede ke ztrátě schopnosti SH3 domény vázat kinázu FAK a fosfatázu PTP-PEST. Způsobuje uvolnění CAS z jeho původní lokalizace ve fokálních adhezích. Zároveň zvyšuje buněčnou motilitu a invazivitu (pravděpodobně i díky vyšší expresi metallopeptázy). Buňky exprimující CAS, jehož fosforylace na pozici 12 je blokována substitucí tyrosinu za fenylalanin, mají abnormálně zvětšené fokální adheze, které vykazují sníženou schopností rozpadu. Buňky dále manifestují defekty v migraci. Fosforylace Tyr 12 v SH3 doméně CAS tudíž ovlivňuje nejen jeho vazebné schopnosti a lokalizaci, ale skrze tyto fenomény se rovněž podílí na regulaci dynamiky adhezních struktur, migraci a invazivitě (Janoštiak *et al.*, 2011).

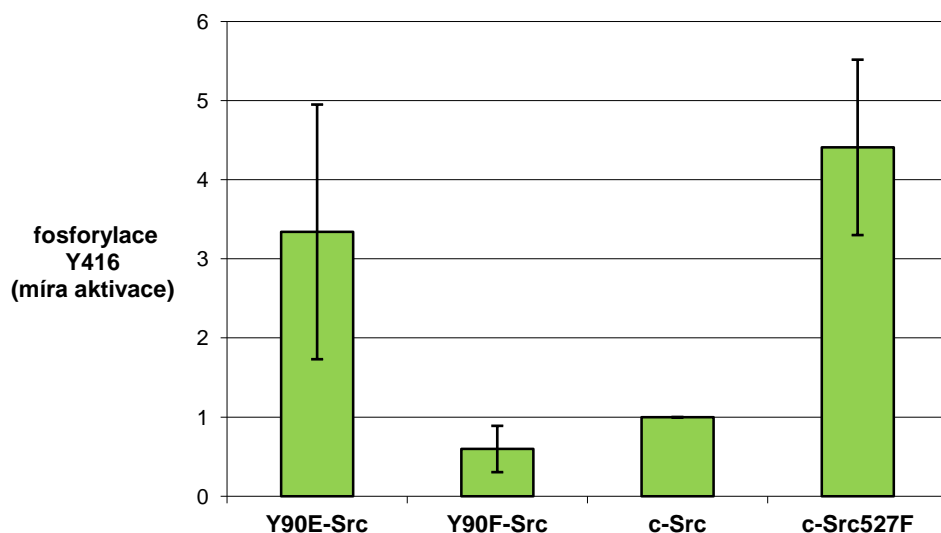
Fosfoproteomickou analýzou expresních profilů myších embryonální fibroblastů a MEF transformovaných kinázou Src (Luo *et al.*, 2008), na níž se podílela i naše laboratoř, bylo detekováno nové fosforylační místo v rámci interakčního povrchu SH3 domény Src. Jedná se o tyrosin 90, což je jeden z konzervovaných aminokyselinových zbytků první hydrofobní vazebné kapsy (Yu *et al.*, 1992; Erpel *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1997).

První důkaz o významu tyrosinu 90 (a přilehlých aminokyselin) SH3 domény kinázy Src přinesla studie zabývající se transformačním potenciálem mutantních variant c-Src. Expresce Src nesoucí delecii aminokyselinových zbytků na pozicích 90 – 95 vedla ke změně buněčné morfologie, schopnosti buněk růst nezávisle na podkladu a zvýšené míře fosforylace proteinových substrátů (Potts *et al.*, 1988).

Další práce, jenž zahrnovala i Tyr 90, mapovala význam konzervovaných hydrofobních zbytků vazebného povrchu SH3 domény Src. Expresce c-Src v kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe* způsobuje abnormálně vysoký výskyt fosfotyrosinů v intracelulárních proteinech a inhibici růstu kultury. Koexpresce c-Src s kinázou Csk, která fosforyluje C-terminální tyrosin 527 a tím Src inaktivuje, vede k potlačení tohoto fenotypu (Superti-Furga *et al.*, 1993). Pokud byly kvasinky *S. pombe* transformovány *csk* a rovněž plasmidovým konstruktem nesoucím gen pro c-Src se záměnou Tyr 90 za alanin, došlo pouze k malému zvýšení růstové rychlosti buněk oproti stavu bez Csk. Vazebné experimenty s GST-fúzovanými SH3 doménami poukázaly na skutečnost, že substituce tyrosinu na pozici 90 za alanin vede ke ztrátě schopnosti vázat protein Sam 68 a regulační podjednotku kinázy PI3K (p85 $\alpha$ ) (Erpel *et al.*, 1995).

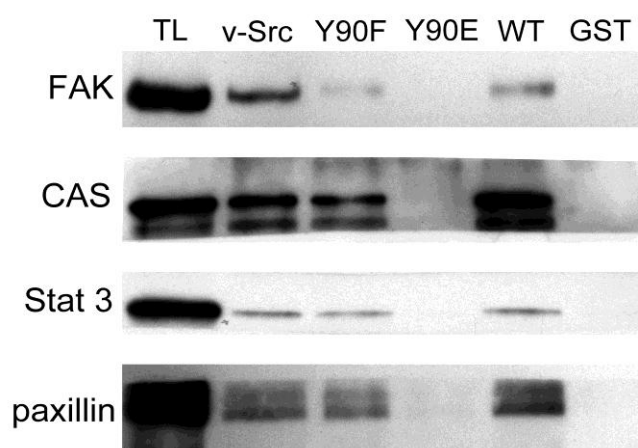
V rámci výzkumu fosforylace Tyr 90 SH3 domény Src v naší laboratoři byly vytvořeny varianty kinázy Src nesoucí fosfomimikující mutaci Tyr 90 za glutamát (Src 90E), Src s nefosforylovatelným aminokyselinovým zbytkem na pozici 90 (Src 90F) a konstitutivně aktivní Src, v němž byl C-koncový regulační tyrosin 527 nahrazen za fenylalanin (Src 527F). Konstrukty byly společně s nemutovaným c-Src (wt c-Src) exprimovány v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a byla analyzována míra fosforylace jednotlivých forem na Tyr 416 v aktivační smyčce, jenž koreluje s katalytickou aktivitou kinázy (Boerner *et al.*, 1996). Src s fosfomimikující substitucí 90E vykazoval zvýšení fosforylace na Tyr 416 (obr. 5), a tudíž i vyšší kinázovou aktivitu, oproti nefosforylovanému c-Src a fenylalaninovému mutantu Src 90F (Gerndtová, 2008).





Obr. 5: Autofosforylace Tyr 416 aktivační smyčky jednotlivých variant Src. Detekovaná míra fosforylace Tyr 416 byla vztahována k celkové expresi Src a vynesena do grafu jako poměr k fosforylaci c-Src. Převzato a upraveno z (Gerndtová, 2008).

Rovněž byly připraveny GST-fúzní SH3 domény Src nesoucí alterace na pozici 90, které byly inkubovány s lyzátem z HeLa buněk. Následná imunodetekce (obr. 6), jenž byla zaměřena na proteiny účastníci se integrinové signalizace (FAK, CAS, paxillin) a STAT3, ukázala, že fosfomimikující mutace 90E výrazně redukuje schopnost asociovat s danými vazebnými partnery (Sztacho, 2009).



Obr. 6: Imunoblots z pull-down analýzy vazebných schopností v-Src, 90F, 90E a wt Src SH3 domén. Schopnost SH3 domény Y90E vázat FAK, CAS, STAT3 či paxillin je do značné míry inhibována přítomností fosfomimikující kyseliny glutamové na pozici 90. Ve sloupci TL je jako pozitivní kontrola nanášen lyzát z HeLa buněk. GST představující negativní kontrolu je vzorek, kde bylo do vazebné reakce přidáno pouze GST bez fúzované SH3 domény. Převzato z (Sztacho, 2009).

Z uvedeného vyplývá, že fosforylace Tyr 90 SH3 domény kinázy Src (a jemu homologních tyrosinů v SH3 doménách dalších proteinů) tvořící část první hydrofobní vazebné kapsy, má zřejmě regulační význam ovlivňující schopnost SH3 domény asociovat se svými ligandy. Negativní elektrostatický potenciál fosfátu pozmění do té doby převážně hydrofobní charakter vazebného povrchu a může tak způsobit alterace v afinitách k jednotlivým ligandům. Výsledkem může být jak změna katalytické aktivity enzymu v důsledku rozdílné schopnosti zprostředkovávat intramolekulární a intermolekulární interakce, tak jiné spektrum vazebných partnerů nebo odlišná lokalizace. Toto vše potom může vést k aktivaci či inhibici různých signálních drah, jenž mají následně rozličný vliv na procesy uvnitř buněk.

# 3. Materiál a metody

---

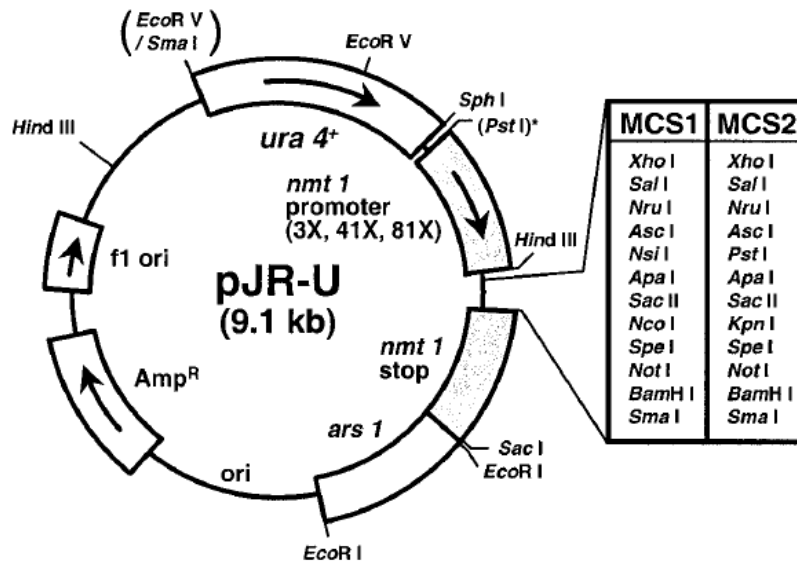
## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Organismy

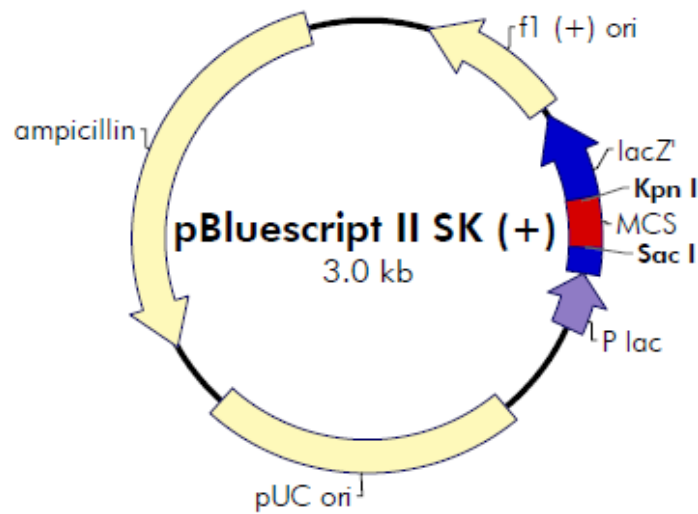
- *Escherichia coli* kmen DH5 $\alpha$ :  $\phi$  80dlacZ  $\Delta$  M15, recA, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk, mk<sup>+</sup>), supE44 relA1, deoR,  $\Delta$  (lacZYA-argF), U, 169
- *Schizosaccharomyces pombe* kmen PN559: h leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 (Decottignies *et al.*, 2003)
- Savčí buněčné linie
  - Phoenix ECO: buněčná linie pro produkci ekotropických retrovirů založená na 293T buněčné linii, do níž byly inkorporovány konstrukty nesoucí virové geny *gag*, *pol* a *env* (Kinsella & Nolan, 1996)
  - SYF (*src* *-/-*, *yes* *-/-* *fyn* *-/-*): buněčná linie myších embryonálních fibroblastů vytvořená z buněk E9,5 embryí imortalizovaných velkým T antigenem viru SV40 (Klinghoffer *et al.*, 1999)
  - SC buňky: CAS *-/-* myší embryonální fibroblasty retrovirálně transfekované a selektované na konstrukty nesoucí geny pro Src 527F a CAS (Brábek *et al.*, 2004)

### 3.1.2 Vektory

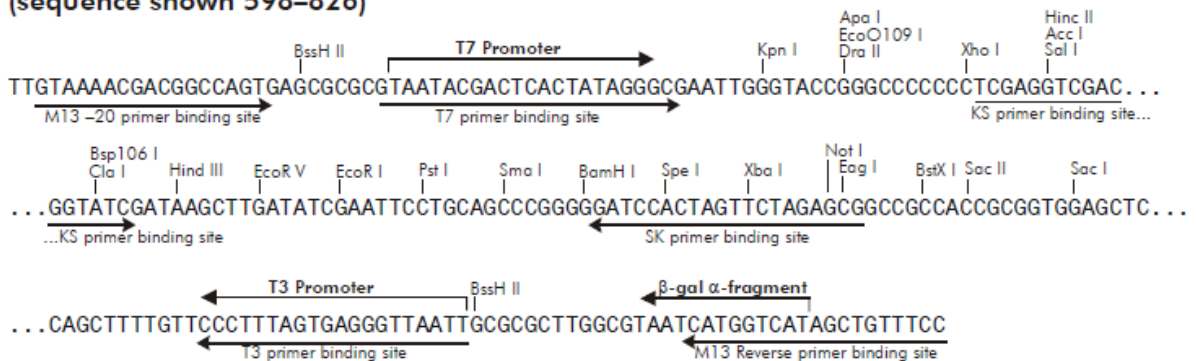
- pJR2-3XU (Moreno *et al.*, 2000): vektor s thiamin-reprimovatelným promotorem *nmt1* pro expresi v *S. pombe*



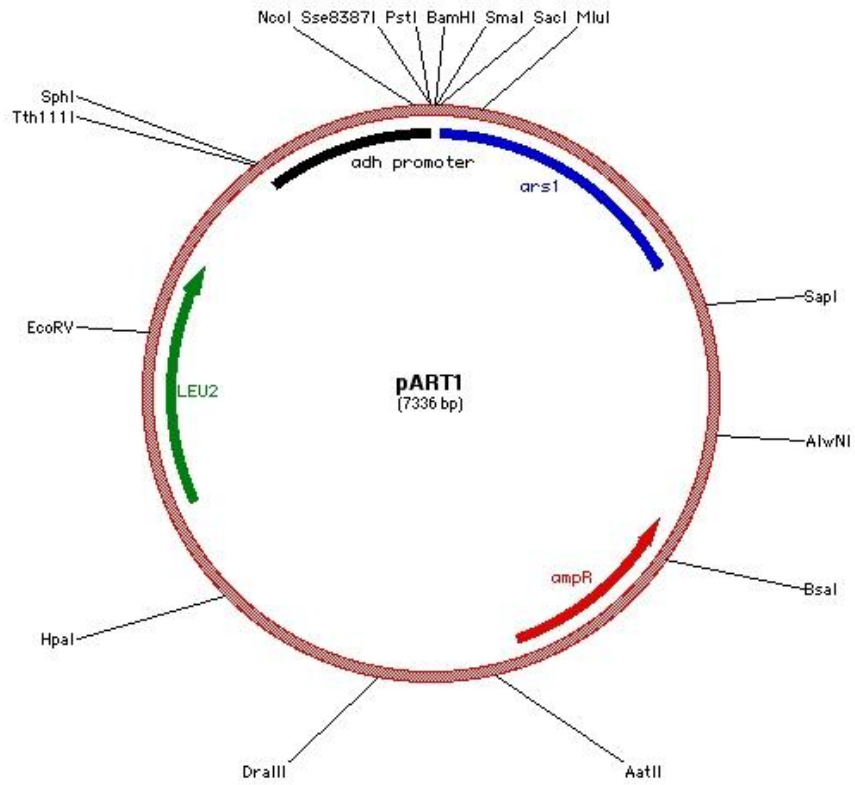
- pBluescript II SK (Stratagene, USA): bakteriální vektor fagemidového typu



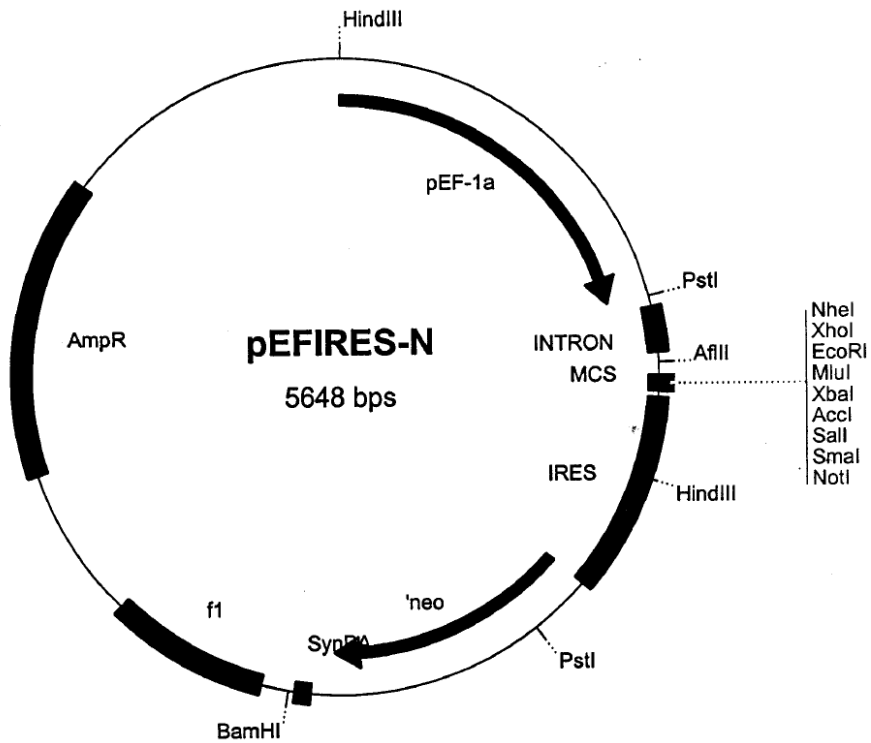
#### pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



- pART1 (McLeod *et al.*, 1987): vektor s konstitutivně aktivním *adh* promotorem pro expresi v *S. pombe*



- pEFIRES-N



### 3.1.3 Primery

Primer	Sekvence	Popis
<b>Csk F</b>	GGATCCATGTCAGCAATACAGGCC	5' <i>csk</i>
<b>Csk R</b>	CCCGGGTTACAGGTGCAGCTCGTG	3' <i>csk</i>
<b>Src SH3 F</b>	GGATCCATGGCTGGCGGGCGTCACC	5' <i>c-src SH3</i>
<b>Src SH3 R</b>	GAATTCTAGATGGAGTCTGAGGGCGCG	3' <i>c-src SH3</i>

### 3.1.4 Enzymy

#### Restrikční endonukleázy

Enzym	Doporučený pufr
BamHI	BamHI
BglII	O
EcoRI	EcoRI
HindIII	R
HpaI	B
NcoI	Tango 1x
NotI	O
SmaI	Tango 1x
XhoI	R

Byly použity enzymy a pufrы společnosti Thermo Scientific (USA).

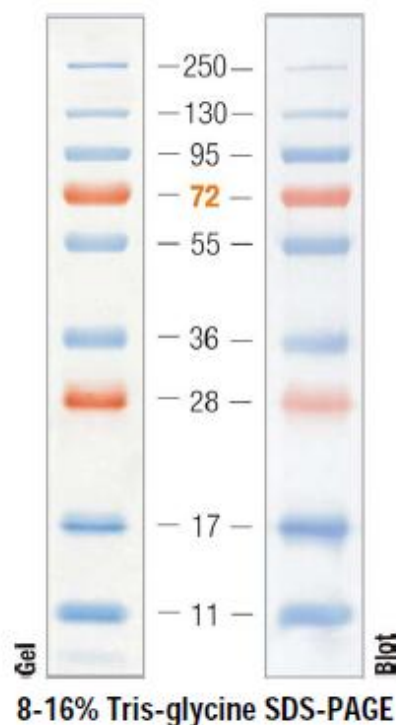
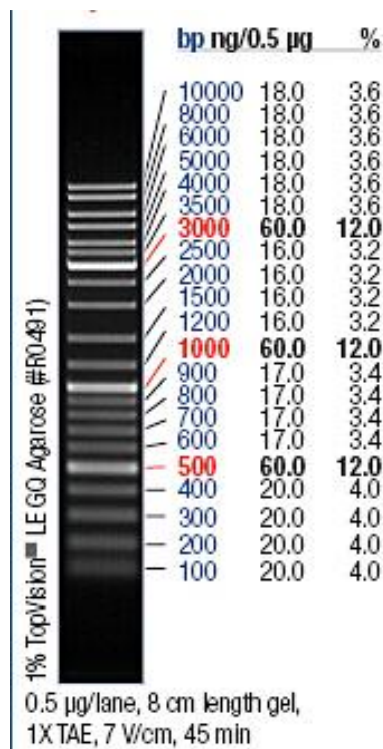
#### DNA modifikační enzymy

- Klenowův fragment (Thermo Scientific, USA)
- Alkalická fosfatáza SAP (Thermo Scientific, USA)
- T4 DNA ligáza (Thermo Scientific, USA)
- Taq polymeráza (Fermentas, Litva)

### 3.1.5 Standardy velikostí DNA fragmentů a proteinů

GeneRuler™ DNA Ladder Mix  
(Thermo Scientific, USA)

PageRuler™ Plus Prestained Protein  
Ladder (Thermo Scientific, USA)



### 3.1.6 Protilátky

Protilátka	Typ	Výrobce	Použité ředění
<b>Aktin</b>	kozí polyklonální	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
<b>CAS</b>	myší monoklonální	BD Transduction Laboratories	1:1000
<b>pTyr 410 CAS</b>	králičí polyklonální	Cell Signaling	1:1000
<b>Csk</b>	králičí polyklonální	Cell Signaling	1:1000
<b>FAK (C-20)</b>	králičí polyklonální	Santa Cruz Biotechnology	1:500
<b>pTyr 861 FAK</b>	králičí monoklonální	Abgent	1:1000
<b>Paxillin</b>	myší monoklonální	BD Transduction Laboratories	1:1000
<b>pTyr 118 paxillin</b>	králičí polyklonální	Cell Signaling	1:1000
<b>v-Src (Ab-1)</b>	myší monoklonální	Calbiochem	1:500
<b>pTyr 418 Src</b>	králičí polyklonální	Invitrogen	1:1000
<b>Fosfotyrosin 4G10</b>	myší monoklonální	Millipore	1:1000
<b>DAG-HRP</b>	oslí polyklonální	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
<b>GAM-HRP</b>	kozí polyklonální	PIERCE	1:2500
<b>GAR-HRP</b>	kozí polyklonální	PIERCE	1:2500

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Kultivace a transformace

#### 3.2.1.1 Bakteriální kultury

Bakterie kultivujeme v živném médiu s příslušnými selekčními antibiotiky při teplotě 37 °C.

##### 3.2.1.1.1 Živná média

Média připravujeme z miliporové vody a sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min. Po zchladnutí na cca 50 °C přidáváme patřičná selekční antibiotika.

1× LB	10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo)
	5 g/l kvasničný extrakt (OXOID, UK)
	5 g/l NaCl

2× LB (Super LB)	10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo)
	5 g/l kvasničný extrakt (OXOID, UK)
	5 g/l NaCl

ŽA č. 2	4% živný agar č. 2 (Imuna, Slovensko)
---------	---------------------------------------

##### 3.2.1.1.2 Selekční antibiotika

Selekční antibiotika připravujeme jako 1000× koncentrované zásobní roztoky.

Ampicilin (Biotika, Slovensko)	100 mg/ml
--------------------------------	-----------

Kanamycin (AppliChem, Německo)	50 mg/ml
--------------------------------	----------

##### 3.2.1.1.3 Glycerolové konzervy *E. coli*

Bakteriální kmeny se dlouhodobě uchovávají v podobě glycerolových konzerv v mrazícím boxu při teplotě -80 °C (krátkodobě jako kolonie na plotnách s živným agarem při 4 °C).



## Příprava

- LB médium s příslušnými selekčními antibiotiky zaočkujeme a necháme jej kultivovat na třepačce při 37 °C přes noc.
- Kulturu převedeme do 1,5ml mikrozkuhavky a centrifugujeme (11000 g, 30 s).
- Odsajeme supernatant a pelet resuspendujeme v 60% (v/v) sterilním glycerolu (Sigma, USA).
- Po zchlazení uložíme v mrazáku při -80°C.
- Bakteriemi z takto připravené konzervy je možno zaočkovat tekuté médium nebo je rozpěstovat na plotně s živným agarem.

### 3.2.1.1.4 Příprava kompetentních buněk pro transformaci elektroporací

#### 1. den (odpoledne)

- Dvěma až třemi čerstvě narostlými koloniemi recipientních bakterií zaočkujeme 30 ml LB média v 250ml Erlenmayerově baňce. Kultivujeme na třepačce při 37 °C do doby, než kultura dosáhne stacionární fáze (přes noc, cca 16 hod.,  $OD_{600} > 2,5$ ).

#### 2. den (ráno)

- Kulturou zaočkujeme 4× 250 ml LB média s 250 µl thiaminu (0,1 mg/ml) v 2litrových Erlenmayerových baňkách na  $OD_{600}$  0,05 – 0,10. Kultivujeme za stálého třepání při teplotě 37 °C do  $OD_{600}$  0,5 – 0,6.
- Kultury necháme 10 – 15 min. chladit v ledové lázni. Další manipulace provádíme na ledu.
- Kultury přelijeme do 4 vychlazených sterilních 250ml centrifugačních kyvet Nalgene a sedimentujeme centrifugací (Janetzki K26, 3500 – 4000 rpm, 0 °C, 10 min.).
- Supernatant odsajeme a sedimenty resuspendujeme v 10 ml ledové deionizované vody, kterou poté suspenzi doplníme do původního objemu (250 ml). Opět centrifugujeme (Janetzki K26, 3500 – 4000 rpm, 0 °C, 20 min.).
- Sedimenty obdobně resuspendujeme do 50 ml ledové deionizované vody, převedeme do 50ml zkumavek Falcon a centrifugujeme (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 4200 rpm, 0 °C, 20 min.).
- Sedimenty resuspendujeme v 1 ml ledového 10% glycerolu (w/w) a doplníme jím objem suspenze na 25 ml. Opakujeme centrifugaci.
- Odsajeme supernatant a opakujeme promytí glycerolem.

- Sediment resuspendujeme ve zbytkovém objemu supernatantu (cca 2 ml) a pipetujeme po 100 – 200  $\mu$ l do mikrozkušavek. Zamrazíme v tekutém dusíku.
- Dlouhodobě skladujeme při -80 °C.

### 3.2.1.1.5 Transformace elektroporací

- Pracujeme na ledu. Do vychlazené mikrozkušavky pipetujeme 40  $\mu$ l elektrokompetentních buněk a 0,5 – 4  $\mu$ l roztoku plasmidové DNA nebo ligační směsi (5 pg – 0,5  $\mu$ g DNA). Promícháme a převedeme do vychlazené 0,2cm elektroporační kyvety.
- Poraci provádíme na Gene Pulseru (Bio-Rad, USA) při nastavení pro bakterie a 0,2cm kyvetu (napětí 2,5 kV, kapacitance 25  $\mu$ F, odpor 200  $\Omega$ ). Časová konstanta by měla být v rozmezí 4 – 5 ms.
- Po aplikaci pulzu převedeme obsah kyvety do skleněné kultivační zkušavky s 1 ml LB média s 20mM glukózou. Kultivujeme za stálého třepání při 37 °C po dobu 1 hod.
- Kulturu vysejeme na plotny s živným agarem obsahujícím selekční antibiotikum (obvykle 2, 20 a 200  $\mu$ l kultury) a inkubujeme přes noc v termostatu při 37 °C.

### 3.2.1.2 Kultury *Schizosaccharomyces pombe*

*S. pombe* kultivujeme v příslušném živném médiu při teplotě 30 °C.

#### 3.2.1.2.1 Živná média

YES                      0,5% kvasničný extrakt (Formedium, UK)  
                               2% glukóza (Sigma, USA)  
                               0,025 SP supplements (Formedium, UK)  
                               miliporová voda

- Roztoky kvasinkového extraktu a glukózy sterilizujeme klávováním (121 °C, 20 min.) a smícháme dle uvedených koncentrací. Po zchlazení na cca 50 °C přidáme ampicilin (Biotika, Slovensko) na výslednou koncentraci 100  $\mu$ g/ml.
- Pevné médium vytvoříme přidáním 2% agaru (Difco, USA).
- Glukózu připravujeme jako 20% zásobní roztok.

MB 11,3 g/l EMM broth (Formedium, UK)  
2% glukóza (Sigma, USA)  
miliporová voda

- Roztoky média a glukózy sterilizujeme v autoklávu (121 °C, 20 min.) a smícháme dle uvedených koncentrací. Dle potřeby přidáme aminokyseliny na výslednou koncentraci 0,2 mg/ml a thiamin na koncentraci 5 µg/ml. Přidáme ampicilin (Biotika, Slovensko) na výslednou koncentraci 100 µg/ml.
- Pevné médium připravíme z 3% agaru (Difco, USA).

Roztoky aminokyselin

- adenin (10 mg/ml)
- leucin (20 mg/ml)
- uracil (5 mg/ml)

#### **3.2.1.2.2 Glycerolové konzervy *S. pombe***

Kvasinkové kmeny se dlouhodobě uchovávají v podobě glycerolových konzerv v mrazícím boxu při teplotě -80 °C (krátkodobě na pevných médiích při 4 °C).

Příprava

- Zaočkujeme 5 ml příslušného média v 50ml Erlenmayerově baňce a necháme po 2 dny kultivovat na třepačce při 30 °C.
- Buněčnou suspenzi pipetujeme do mikrozkuřavky a smícháme ji v poměru 1:1 se sterilním 60% (v/v) glycerolem (Sigma, USA)
- Necháme zchladit na ledu a uložíme v -80 °C.
- Kvasinky z takto připravené konzervy rozpěstováváme na plotně s vhodným pevným médiem.

#### **3.2.1.2.3 Transformace *S. pombe* lithium-acetátovou metodou**

Upraveno podle (Morita & Takegawa, 2004; Bähler & Pringle, 1998)

- Čerstvě narostlé recipientní buňky seškrábneme špičkou z pevného média a převedeme do 1,5ml mikrozkuřavky.

- Přidáme 74  $\mu$ l 50% (w/v) PEG, 7  $\mu$ l 1M LiAc, 7 $\mu$ l 10 $\times$  TE pufru, 1 – 5  $\mu$ l plasmidové DNA a 2  $\mu$ l denaturované ssDNA.
- Překlápěním promícháme a inkubujeme 60 min. v 30 °C.
- Tepelný šok navodíme přenesením do 42 °C na 15 min.
- Směs necháme vychladnout při pokojové teplotě. Rozetřeme ji na příslušné selekční plotny, které potom kultivujeme 3 – 5 dnů v termostatu při teplotě 30 °C.
- Pro ověření pozitivity přeneseme narostlé kolonie na nové selekční plotny a inkubujeme v termostatu při 30 °C.

#### Roztoky

- 50% PEG      5 g/10 ml (w/v) PEG 4000 (Sigma, USA), sterilizujeme klávováním
- 1M LiAc      1,53 g/15 ml; pH 7,5, sterilizujeme klávováním
- 10 $\times$  TE      100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7,5, sterilizujeme klávováním
- ssDNA      single stranded salmon sperm DNA (Sigma, USA), denaturujeme při 95 °C 10 min. a zchladíme na ledu

#### 3.2.1.2.4 Sledování růstu kultury *S. pombe* po indukci exprese kinázy Src

- Kmenem *S. pombe* (transformovaným expresním vektorem nesoucím pod thiamin-reprimovatelným promotorem gen pro Src) zaočkujeme médium obsahující příslušné aminokyseliny a thiamin (v koncentraci 5  $\mu$ g/ml). Kultivujeme na třepačce cca 20 hod. při 30 °C.
- Buněčnou suspenzi převedeme do uzavíratelných centrifugačních zkumavek a centrifugujeme (Jouan MR 22i, rotor SWM 180.5; 3000 rpm, 2 min., laboratorní teplota)
- Supernatant odstraníme a pelet resuspendujeme v přibližně 3 ml média s příslušnými aminokyselinami bez thiaminu a opět centrifugujeme. Supernatant slijeme a promytí opakujeme ještě jednou.
- Sledování růstu je možno provádět manuálními odběry vzorků rostoucí kultury nebo kontinuálním měřením OD<sub>600</sub> pomocí fluorimetru Varioskan Flash (Thermo Scientific, USA).
- Manuální měření: Pro indukci exprese proteinu kulturou zaočkujeme 25 ml média s příslušnými aminokyselinami bez thiaminu v 250ml Erlenmayerově baňce na OD<sub>600</sub>

0,05. Kultivujeme na třepače při 30 °C. Každé 3 – 4 hod. provádíme odběry a na spektrofotometru měříme OD<sub>600</sub>, jehož časovou závislost vynášíme do grafu

- Měření pomocí fluorimetru: Kulturou zaočkujeme 1,4 ml příslušného média bez thiaminu v 12jamkové destičce na OD<sub>600</sub> 0,05. Destičku vložíme do fluorimetru. Nastavíme parametry pro inkubaci (teplota 30 °C, rychlost třepání 180 rpm, průměr rozkmitu 20 mm) a vlnovou délku (600 nm), při které bude měření probíhat každých 15 min. po dobu cca 40 hod.

### 3.2.1.3 Tkáňové kultury

#### 3.2.1.3.1 Kultivační médium DMEM

- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Life Technologies)
- 10% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma, USA); pro pěstování Phoenix buněk je potřeba FBS tepelně inaktivovat zahříváním na 56 °C po dobu 30 min.
- 1% neesenciální aminokyseliny (Gibco, Life Technologies)
- 2% obecná antibiotika-antimykotika (Gibco, Life Technologies)
  - zásobní roztok: 10 mg/ml penicilin  
10 mg/ml streptomycin  
25 µg/ml amphotericin

#### 3.2.1.3.2 Pěstování a pasážování tkáňových kultur

Savčí buňky standardně kultivujeme v termostatu při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Pěstujeme je na plastických miskách či v destičkách s povrchem upraveným pro tkáňové kultury. Médium obvykle měníme každý 2. či 3. den. Množství se řídí velikostí misky:

Miska/destička	Průměr	Objem média
<b>Velká miska</b>	100 mm	10 ml
<b>Malá miska</b>	60 mm	4 – 5 ml
<b>6jamková destička</b>	35 mm	2 ml
<b>12jamková destička</b>	20 mm	1 ml

Mikroskopem (Nikon Eclipse TS 2000) pravidelně kontrolujeme stav buněk, konfluenci či případnou kontaminaci.

Buňky pasážujeme v závislosti na konfluenci po 2 až 3 dnech:

- Médium DMEM a trypsin předehřejeme ve vodní lázni na 37 °C
- Z misky odsajeme médium a opláchneme ji 1× PBS. Přidáme trypsin (na velkou misku 1 ml, na malou misku 0,5 ml), jež následně rozprostřeme po celém povrchu. Necháme inkubovat v termostatu, dokud se buňky neoddělí ode dna (přibližně 6 min.).
- Aktivitu trypsinu inhibujeme přidáním média, v kterém buňky poté resuspendujeme. Odebereme požadovanou část suspenze a přeneseme ji na novou misku s médiem. Krouživým pohybem miskou buňky rovnoměrně rozprostřeme.

Roztoky

- kompletní médium DMEM
- Trypsin-EDTA 2,5 g/l trypsin, 0,38 g/l kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Gibco, Life Technologies)
- 1× PBS připraveno ze zásobního roztoku 10× PBS (Sigma, USA)

### **3.2.1.3.3 Příprava a rozpěstování stabilátů**

Příprava stabilátů

- Plně konfluentní 100mm misku dané savčí linie trypsinizujeme a resuspendujeme ve 4 ml média. Suspenzi přeneseme do 15ml zkumavky Falcon. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min.).
- Odsajeme médium. Pelet resuspendujeme v 1 ml zamrazovacího roztoku a převedeme do 1,5ml zamrazovací mikrozukavky Nalgene. Zkumavku uložíme v nádobě s isopropanolem do -80 °C po dobu přibližně 24 hod. Poté ji umístíme do kontejneru s tekutým dusíkem.

Rozpěstování buněk ze stabilátů

- Mikrozukavku vyjmeme z kontejneru s tekutým dusíkem a přenášíme ji na ledu.
- Ve vodní lázni vyhřáté na 37 °C stabilát rychle rozmrazíme a suspenzi buněk převedeme do 15ml zkumavky Falcon s 5 ml média. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min.).
- Odsajeme supernatant. Pelet resuspendujeme v malém množství média a přeneseme na misku s médiem. Kultivujeme v termostatu.

## Roztoky

- Zamrazovací roztok: 90% FBS (Sigma, USA), 10% dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, USA)

### 3.2.1.3.4 Transfekce plasmidovou DNA

- Transfekci provádíme plasmidovou DNA přečištěnou pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Německo). Použijeme misku s přibližně 70% konfluencí buněk.
- Do mikrozkušavky pipetujeme daná množství (viz tabulka) jetPRIME® pufru (Polyplus-transfection, Francie) a DNA. Promícháme.
- Přidáme jetPRIME® reagent (Polyplus-transfection, Francie), důkladně promícháme a necháme inkubovat při pokojové teplotě po dobu 10 min.
- Transfekční směs nakapeme do média k buňkám a promícháme.
- Buňky necháme růst v termostatu. Po 6 – 16 hod. vyměníme médium.
- Expres proteinu by se měla objevit 24 – 48 hod. po transfekci.

Miska/destička	jetPRIME pufr (μl)	DNA (μg)	jetPRIME reagent (μl)
Velká miska	500	10	20
Malá miska	200	4	8
6jamková destička	200	2	4
12jamková destička	75	1	2

### 3.2.1.3.5 Produkce retrovirových partikulí a infekce savčích buněk

Jednou z možností jak dosáhnout stabilní exprese námi zvoleného proteinu v savčí buněčné linii je retrovirální transfekce. Jedná se o 3složkový systém tvořený cílovými buňkami, buňkami produkujícími viriony a retrovirovým vektorem.

Linií pro produkci retrovirů bývají obvykle 293T buňky, COS buňky nebo NIH 3T3 fibroblasty, do jejichž genomu byly vloženy konstrukty nesoucí virové geny *gag*, *pol* a *env* (shrnutí v Cepko & Pear, 2001). *Gag* dává vzniknout skupině proteinů vnitřku kapsidy, *pol* kóduje enzym s funkcí reverzní transkriptázy, RNázy H a integrázy a *Env* je vnější kapsidový protein. Ačkoli v buňkách dochází k transkripci *gag*, *pol*, *env* a následné proteosyntéze produktů, nevznikají viriony, které by nesly inkorporovanou nukleovou kyselinou (což by v tomto případě bylo nežádoucí a potenciálně nebezpečné). Žádná z RNA totiž neobsahuje

signál pro sbalení do virové partikule. Ten je dodán jako součást retrovirového vektoru, do kterého byl mezi 2 LTR sekvence zaklonován námi zvolený protein.

Konstrukt je transfekován do buněk, kde je poté přepisován do RNA, kolem níž se začnou sestavovat virové proteiny. Vzniklé viriony pučí ven do média, jenž je následně přidáno k cílové savčí linii. Na základě interakce Env glykoproteinu s hostitelským receptorem dojde k internalizaci retrovirových částic, reverzibilní transkripci RNA konstruktů do DNA a integraci do genomu. Výsledkem je stabilní exprese daného proteinu v požadované linii. Jelikož RNA virových partikulí nekóduje *gag*, *pol* ani *env* geny, infekce se nešíří dál mimo již zasažené buňky.

- Malou misku Phoenix buněk kultivovaných v médiu DMEM s tepelně inaktivovaným sérem transfekujeme retrovirovým vektorem nesoucím cílový gen (pMSCV-IRES-GFP)
- 24 hod. po transfekci zkontrolujeme procento buněk produkujících GFP. Pokud byla transfekce účinná, buňky zpasážujeme a přeneseme je na velkou misku. Kultivujeme je pouze v 6 ml média.
- Buňky necháme adherovat. Poté je přes noc kultivujeme v termostatu s teplotou 32 °C (fáze kdy se produkují virové partikule).
- Médium obsahující retroviry odebereme, centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 500g, 5 min.) a supernatant přefiltrujeme přes filtr. Phoenix buňky můžeme pro produkci virových částic použít několikrát.
- Médium obsahující retroviry můžeme ihned použít k infekci buněk nebo jej můžeme zamrazit: pipetujeme jej do zamrazovacích zkumavek Nalgene, které poté schladíme na suchém ledu a uskladníme v -80 °C (maximálně 6 měsíců).
- Infekce cílových buněk (SYF): přibližně 18 – 24 hod. před plánovanou infekcí buňky přeneseme do média DMEM s 10% tepelně inaktivovaným sérem. Na malou misku takto připravených buněk pipetujeme 2 ml média s virem. Buňky kultivujeme 6 – 12 hod. v 32 °C.
- Odsajeme virové médium a kultivujeme za standardních podmínek. Infekci provedeme minimálně 3krát. Na misce vznikne určité procento pozitivních buněk, které lze sortovat na základě signálu GFP.



## 3.2.2 Metody práce s DNA

### 3.2.2.1 Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou

1. den (odpoledne)

- V Erlenmayerově baňce o vhodném objemu zaočkujeme příslušné množství LB média (obvykle 50 ml), jenž obsahuje vhodné selekční antibiotikum. Necháme třepat přes noc při teplotě 37 °C.

2. den (ráno)

- Kulturu necháme 10 min. zchladit v ledové lázni, přelijeme do centrifugační zkumavky a centrifugujeme (Jouan, výkyvný rotot K23, 4200 rpm, 20 min., 4 °C).
- Sediment resuspendujeme ve 2 ml roztoku I.
- Zkumavku vyjmeme z ledové lázně, přidáme 4 ml roztoku II, promícháme a necháme maximálně 5 min. inkubovat v laboratorní teplotě.
- Zkumavku vložíme do ledové lázně a přidáme 3 ml roztoku III, promícháme a inkubujeme na ledu 10 min.
- Obsah převedeme do vychlazených polypropylenových zkumavek a centrifugujeme (Jouan, úhlový rotor K24, 15000 rpm, 20 min., 4 °C).
- Supernatant přeneseme do 15ml zkumavky Falcon, stanovíme jeho množství a smícháme s 0,6násobkem zjištěného objemu isopropanalu. Ihned centrifugujeme (Jouan, výkyvný rotor K23, 4200 rpm, 5 min.).
- Odstraníme supernatant a sediment necháme vysušit. Poté jej rozpustíme v 300 $\mu$  redestilované vody, převedeme do mikrozkušavky a stanovíme objem.
- Smísíme se stejným objemem 10M LiCl a inkubujeme nejméně 30 min. při -20 °C (eventuelně 10 min. v -70 °C).
- Sraženinu usadíme centrifugací v mikrocentrifuze (13000 rpm, 5 min.) a supernatant přeneseme do nové mikrozkušavky.
- Přidáme jeden objem 96% etanolu a inkubujeme 30 – 60 min. v -20 °C (respektive 10 min. při -70 °C), čímž dojde k vysrážení plasmidové DNA z roztoku.
- Vysráženou DNA sedimentujeme centrifugací v mikrocentrifuze (13000 rpm, 5 min.), sediment 2krát opláchneme 70% etanolem (přidáme přibližně 500  $\mu$ l etanolu a stočíme 2 min. při 13000 rpm).
- Nakonec necháme sediment oschnout a rozpustíme jej 100 – 200  $\mu$ l (dle velikosti peletu) vody či TE pufru.

## Roztoky

- roztok I: 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA-NaOH, 1% glukóza
- roztok II: 1% SDS, 0,2M NaOH
- roztok III: 3M KAc : 2M kyselina octová, pH 5,4
- 10M LiCl

### 3.2.2.2 Izolace plasmidové DNA pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid

#### 1. den (odpoledne)

- Bakteriální kolonií zaočkujeme požadované množství LB média obsahujícího příslušné selekční antibiotikum; obvykle 2,5 ml v kultivační zkumavce či 5 ml v 50ml Erlenmayerově baňce. Kultivujeme za stálého třepání při 37 °C přes noc.

#### 2. den (ráno)

- Plasmidovou DNA izolujeme pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Německo). Postupujeme dle návodu kitu.
- Koncentraci DNA změříme pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

### 3.2.2.3 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- Do reakce (obvykle v 1,5ml mikrozkuhavce) pipetujeme:

plasmidová DNA	objem obsahující 0,3 – 5 µg DNA
10x restrikční pufr	2 µl
restrikční endonukleáza	0,5 – 2 µl
miliporová voda	doplnit na celkový objem 20 µl

- Smícháme a inkubujeme 2 – 16 hod při 37 °C (není-li uvedeno jinak).

#### Pozn.:

- objem přidávané restrikční endonukleázy závisí na její koncentraci, množství DNA a její aktivitě v použitém restrikčním pufru
- hodnoty jsou uvedeny pro restrikční endonukleázy společnosti Thermo Scientific

#### 3.2.2.4 DNA elektroforéza v agarosovém gelu a izolace DNA fragmentů

- Za pomalého zahřívání rozpustíme v Erlenmayerově baňce dané množství agarosy (dle požadované koncentrace gelu) v 1x TAE pufru.
- Roztok necháme schladnout na přibližně 50 °C. Mezitím sestavíme elektroforetickou aparaturu a vložíme hřebínek pro tvorbu jamek.
- Do připravené aparatury nalijeme vychladlý roztok a necháme 15 min. tuhnout.
- Do nádoby aparatury vlijeme 1x TAE pufr tak, aby jeho hladina byla několik milimetrů nad vzniklým gelem. Vyjmeme hřebínek, jenž ve gelu vytvoří jamky.
- Do jamek nanese marker a vzorky smíchané se vzorkovým pufrem.
- Elektroforézu připojíme ke zdroji. Vzorky necháme dělit při napětí 0,5 – 10 V/cm.
- Po doběhnutí elektroforézy gel vyjmeme a necháme jej barvit 15 – 20 min. v roztoku ethidium bromidu.
- Gel přeneseme do nádoby s destilovanou vodou a necháme jej několik minut odbarvovat.
- DNA vizualizujeme pod UV lampou.
- Takto rozdělené molekuly DNA je možné z gelu izolovat a použít pro klonování: gel krátce prosvítíme pod UV lampou a pomocí skalpelu vyřízneme požadovaný DNA fragment. Přeneseme jej do předem zvážené 1,5ml mikrozkušavky a stanovíme jeho hmotnost.
- Pro izolaci DNA z agaru a následné přečištění použijeme komerční kit NucleoSpin<sup>®</sup> Extract (Macherey-Nagel, Německo).

Roztoky a další materiál:

- TAE pufr: 40 mM Tris (pH 8,5), 20 mM kyselina octová, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA
- agarosa NuSieve a Sea Kem v poměru 1:1 (FMC, USA)
- roztok ethidium bromidu (0,5 µg/ml)
- vzorkový pufr: 60 % glycerol, 0,6 % bromfenolová modř, 60 mM EDTA
- marker GeneRuler<sup>™</sup> DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA)

#### 3.2.2.5 Ligace DNA

Ligace molekul DNA s přesahujícími konci

- Do reakce pipetujeme (obvykle v 0,5ml zkumavkách):

DNA (inzert a vektor o koncentraci konců v poměru 3:1)	
10x ligační pufr	1,5 μl
T4 DNA ligáza	0,2 μl
miliporová voda	doplnit na celkový objem 15 μl

- Reakci promícháme a necháme inkubovat 4 hod. při laboratorní teplotě. Ligační směs pak můžeme použít k elektroporaci bakterií.

#### Ligace molekul DNA s tupými konci

- Konce vektoru defosforylujeme za použití alkalické fosfatázy SAP (na 1 pmol konců DNA 1 jednotka SAP, inkubace 30 – 60 min. v 37 °C, inhibice enzymu zahříváním reakce na 65 °C po dobu 15 min.)

- Do reakce pipetujeme:

DNA (inzert a vektor o koncentraci konců v poměru 3:1)	
10x ligační pufr	1,5 μl
50% PEG4000	1,5 μl
T4 DNA ligáza	0,5 – 1 μl
miliporová voda	doplnit na celkový objem 15 μl

- Reakci promícháme a necháme inkubovat 4 hod. při laboratorní teplotě. Ligační směs pak můžeme použít k elektroporaci bakterií.

#### 3.2.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Pro jednu reakci smícháme:

Templátová DNA	0,5 – 10 ng
Forward primer (10 μM)	2 μl
Reverse primer (10 μM)	2 μl
10x Taq pufr	2 μl
Taq polymeráza	1 U
Phusion <sup>®</sup> Hot Start Flex 2x Master Mix	
Miliporová voda	doplnit na objem 20 μl

- Směs v PCR mikrozkuhavce vložíme do cycleru s předehřátým víkem (Peltier PTC-200, MJ Research, USA)
- Nastavíme program:

- 1) 95°C 2 min
- 2) 95°C 30 s
- 3) X°C 40 s (X = teplota nasedání primerů)
- 4) 72°C 1 min
- 5) 2x opakovat kroky 2 – 4
- 6) 95°C 30 s
- 7) Y°C 40 s (Y = teplota nasedání primerů včetně 5' konců, které nepárují s původní sekvencí)
- 8) 72°C 1 min
- 9) 21x opakovat kroky 6 – 8
- 10) 72°C 2 min
- 11) 4°C donekonečna

### 3.2.3 Metody práce s proteiny

#### 3.2.3.1 Příprava lyzátů z kvasinek *S. pombe*

1. – 2. den

- Buňkami narostlými na pevném médiu zaočkujeme příslušné tekuté médiu. Kultivujeme za stálého třepání při 30 °C
- Pokud připravujeme lyzáty z kvasinek transformovaných expresním vektorem s inducibilním promotorem nmt1, necháme kvasinky rozrůst přibližně 24 hod. v neinducibilním médiu s thiaminem (5 µg/ml). Z této kultury poté zaočkujeme indukční médium bez thiaminu, tak aby po 22 hod. kultivace nepřesáhla kultura OD<sub>600</sub> 1

2. (resp. 3.) den

- Po celou dobu pracujeme na ledu.
- Kulturu zchladíme na ledu, převedeme ji do uzavíratelné centrifugační zkumavky a centrifugujeme (Jouan, rotor SWM 180.5, 5000 rpm, 3 min., 4 °C).
- Supernatant slijeme, sediment resuspendujeme ve 2 ml STOP pufru a centrifugujeme (Jouan, rotor SWM 180.5, 5000 rpm, 3 min., 4 °C).
- Sediment resuspendujeme v 1 ml stop pufru a přeneseme do 1,5ml mikrozkuavek.

- Centrifugujeme (5000 rpm, 3 min., 4 °C); po odstranění supernatantu lze zamrazit v -80 °C.
- Po stáčení odsajeme supernatant a sediment resuspendujeme v 40 µl (dle velikosti peletu, lze použít i menší množství) vychlazeného lyzačního pufru (obsahujícího 1/100 objemu proteázových inhibitorů FY (Serva, Německo) a 1/500 objemu 1M DTT).
- Dolní kónickou část 2ml mikrozkušavek s víčkem naplníme skleněnými kuličkami (425 – 600 µm, Sigma, USA) a necháme zchladit na ledu.
- Suspenzi buněk převedeme na kuličky.
- Buňky rozbijeme pomocí přístroje FastPrep-24 (MP Biomedicals, Francie): třepeme 20 s rychlostí 5,5. 3krát opakujeme (mezi jednotlivými opakováními necháme zkumavku chladit na ledu).
- Do mikrozkušavek přidáme 600 µl lyzačního pufru (s FY a DTT). Objem můžeme stanovit dle velikosti peletu.
- Centrifugací (Jouan, rotor SWM 180.5, 2000 rpm, 2 min.) lyzát převedeme do nové mikrozkušavky.
- Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417, 20000 g, 20 min., 4 °C).
- Supernatant (tj. finální lyzát) odebereme do nové mikrozkušavky. Skladujeme v mrazáku při -80 °C.

#### Roztoky:

- Lyzační pufr 1: 25 mM HEPES (pH 7,6), 0,1 mM EDTA (pH 8), 150 mM KCl, 0,1%, Triton X100, 25% glycerol, 1M urea; pH 7,6; pH upravit pomocí KOH, sterilizovat klávováním
- STOP pufr: 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 25 mM HEPES, 1 mM NaN<sub>3</sub>; pH 8

#### **3.2.3.2 Příprava lyzátů ze savčích buněk**

- Lyzáty připravujeme na ledu.
- Misku s narostlými buňkami necháme vychladit na ledu.
- Odsajeme médium a 2krát opláchneme vychlazeným 1x PBS.
- Dle velikosti misky na ni pipetujeme lyzační pufr RIPA, který obsahuje v poměru 1:100 proteázové a fosfatázové inhibitory.
- 15 min. necháme lyzovat na překlápěčce v ledničce.

- Z povrchu misky buňky seškrábeme škrabkou, převedeme do vychlazené 1,5ml mikrozkušavky a několikrát protáhneme injekční stříkačkou s jehlou 21G.
- Centrifugujeme (Ependorf Centrifuge 5417, 11000 g, 20 min.).
- Supernatant (tj. lyzát) přeneseme do nové mikrozkušavky. Skladujeme v -20 °C.

Roztoky:

- 10x PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH upraveno na 7,3
- pufr RIPA: 0,15M NaCl; 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 MixM (Serva, Německo): 0,5 mg/ml Aprotinin, 0,5 mg/ml Leupeptin, 12,5 mg/ml Pefabloc; ředění 100x

### 3.2.3.3 Stanovení proteinové koncentrace (Folinova metoda) a příprava vzorků pro SDS-PAGE

- Proteinovou koncentraci lyzátů stanovujeme kolorimetricky pomocí kitu DC<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad, USA).
- Připravíme si ředící řadu BSA (hovězí sérový albumin):

Koncentrace BSA (µg/µl)	BSA 2 mg/ml (µl)	Lyzační pufr (µl)
<b>0</b>	0	50
<b>200</b>	5	45
<b>400</b>	10	40
<b>800</b>	20	30
<b>1500</b>	37,5	12,5

- Do mikrozkušavky napipetujeme 12,5 µl lyzátu ze savčích buněk a 37,5 µl lyzačního pufru. Kvasinkové lyzáty ředíme více: 5 µl lyzátu a 45 µl lyzačního pufru.
- Z takto naředěného lyzátu (a rovněž BSA standardu) odebereme 25 µl do nové mikrozkušavky a přidáme 125 µl roztoku A' (připravíme jej smísením 1 ml roztoku A s 20 µl roztoku S) a 1 ml roztoku B.
- Promícháme a necháme 15 min. inkubovat ve tmě.
- Na spektrofotometru změříme absorbanci vzorků při 750 nm.

- Z naměřených hodnot standardů ředící řady vytvoříme graf závislosti proteinové koncentrace na absorbanci, který využijeme pro stanovení koncentrace proteinů v lyzátech.
- Pomocí lyzačního pufru lyzáty naředíme na shodnou proteinovou koncentraci.
- Přidáme 6x Laemmli pufr (1/4 objemu) a 1M DTT (1/20 objemu). Promícháme a inkubujeme v předehřátém bločku při 95 °C po dobu 5 min.

Roztoky:

- DC<sup>TM</sup> Protein Assay (Bio-Rad, USA)
- BSA 2 mg/ml (Bio-Rad, USA)
- 6x Laemmli pufr: 0,35 M Tris-HCl (pH 6,8), 40 % glycerol, 10 % SDS, 0,012 % bromfenolová modř
- 1M dithiothreitol (DTT)

#### 3.2.3.4 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

- Pro SDS-PAGE použijeme soupravu Bio-Rad Mini Protean III Cell.
- Sestavíme aparaturu pro nalévání gelů. Mezi skla nalijeme namíchaný roztok pro separační gel (viz rozpis) tak, aby jeho hladina sahala přibližně 5 mm pod dno jamek připravených v následujícím kroku. Převrstvíme miliporovou vodou a necháme ztuhnout (10 – 30 min.).
- Odstraníme vodu a vysušíme. Na vzniklý separační gel nalijeme až po okraj skel roztok pro zaostřovací gel (viz rozpis). Ihned mezi skla vložíme hřebínek, jenž v horním gelu vytvoří jamky pro nanášení vzorků. Necháme ztuhnout (10 – 30 min.).

Roztoky pro 2 gely silné 0,75 mm (smíchat v uvedeném pořadí)	
10% separační gel	Zaostřovací gel
3,33 ml protogel	0,65 ml protogel
2,50 ml 4x Tris/SDS pH 8,8	1,25 ml 4x Tris/SDS pH 6,8
4,17 ml miliporová voda	3,10 ml miliporová voda
12 µl TEMED	10 µl TEMED
60 µl 10% APS	50 µl 10% APS

- Vyjmeme hřebínek. Dvojici gelů (resp. jeden gel a nástavec) vložíme do aparatury pro elektroforézu. Elektroforetickým pufrům převrstvíme gely a propláchneme jamky.
- Do jamek nanese marker molekulových hmotností a připravené vzorky.



- Aparaturu vložíme do nádoby pro elektroforézu a zalijeme elektroforetickým pufrem. Uzavřeme víkem a necháme dělit při konstantním proudu 10 mA/gel. Poté, co čelo elektroforézy projde rozhraním obou gelů, zvýšíme proud na 20 mA/gel.
- Po doběhnutí elektroforézy vyjmeme gel ze skel. Můžeme jej použít pro Western blot či můžeme rozdělené proteiny detekovat barvením v roztoku Coomassie Brilliant Blue (30 min. barvení za stálého třepání, odbarvování v odbarvovacím roztoku přes noc na třepačce).

#### Roztoky:

- protogel: 30 % akrylamid, 0,8 % N,N'-metylenbisakrylamid; přefiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$
- 4x Tris/SDS pH 8,8: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS; přefiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$
- 4x Tris/SDS pH 6,8: 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS; přefiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,45  $\mu\text{m}$
- N, N, N9, N9-tetrametyl-ethylendiamin (TEMED) (Serva, Německo)
- 10% APS (amonium persulfát) (Sigma, USA)
- SDS-PAGE pufr: 25 mM Tris (pH 8,3), 190 mM glycin, 0,1 % SDS
- marker molekulových hmotností PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA)
- barvicí roztok: 20 % methanol, 10 % kyselina octová, 0,114 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- odbarvovací roztok: 20 % methanol, 7 % kyselina octová

#### 3.2.3.5 Western blot

- Western blot provádíme pomocí soupravy Bio-Rad Trans-blot.
- Sestavíme aparaturu pro přenos na nitrocelulosovou membránu (Nitrobind, MSI, USA). Na destičku mířící ke katodě vrstvíme izolační houbičku, filtrační papír Whatman, gel s rozdělenými proteiny, nitrocelulosovou membránu, filtrační papír Whatman, izolační houbičku (vše navlhčené v přenosovém pufru).
- Uzavřeme a vložíme do aparatury.

- Zalijeme blotovacím pufrém a za stálého chlazení blotujeme při konstantním napětí 110 V po dobu 1,5 hod.
- Membránu s přenesenými proteiny opláchneme v TBS.

Roztoky:

- přenosový pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20 % methanol, 0,05 % SDS
- TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl

### 3.2.3.6 Imunodetekce proteinů na membráně

- Membránu s přenesenými proteiny rozstříháme na požadované kousky dle markeru molekulových hmotností.
- Blokujeme v 4% roztoku BSA v TBS na překlápěčce v termostatu při 37 °C po dobu 45 min. – 1 hod.
- Membránu zatavíme do folie s roztokem primární protilátky v 1% BSA v TTBS. Inkubujeme na překlápěčce při 4 °C přes noc.
- Membránu vyjmeme a promyjeme 3 x 10 min. v TTBS.
- Zatavíme ji do folie s roztokem příslušné sekundární protilátky (konjugované s křenovou peroxidázou) v 1% BSA v TTBS. Inkubujeme na překlápěčce při laboratorní teplotě po dobu 1 hod.
- Opláchneme 3 x 10 min. v TTBS a 1 x 5 min v TBS.
- Membránu vložíme do vyvíjecího roztoku se substrátem pro křenovou peroxidázu. Vložíme do folie. Luminiscenční signál detekujeme pomocí přístroje LAS 4000 (Fujifilm, Japonsko).

Roztoky:

- TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl
- TTBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (Serva, Německo)
- 4% roztok BSA (Millipore, USA) v TBS
- Substrát pro křenovou peroxidázu: Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (PIERCE, Thermo Scientific, USA)

### 3.2.3.7 Stripování membrán

- Připravíme stripovací pufr: 40 ml 10% SDS, 7,8 ml 4x Tris/SDS pH 6,8 a 9,4  $\mu$ l 2-merkapt ethanol. Promícháme.
- Zkumavku Falcon naplníme stripovacím pufrem a vložíme do ní membránu.
- Inkubujeme v temnu za stálého třepání při teplotě 50 °C po dobu 30 min.
- Membránu promyjeme 3 x 10 min. v TTBS.
- Blokujeme v 4% roztoku BSA v TBS na překlápěčce v termostatu při 37 °C po dobu 45 min. – 1 hod.
- Inkubujeme s další zvolenou primární protilátkou.

Roztoky:

- 10% SDS
- 4x Tris/SDS pH 6,8: 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS; přefiltrováno přes filtr s póry o velikosti 0,45  $\mu$ m
- 2-merkapt ethanol (Sigma, USA)

## 3.2.4 Další metody práce s tkáňovými kulturami

### 3.2.4.1 Migrační test „wound-healing“

- Buňky narostlé na kultivační misce trypsinizujeme a převedeme do 15ml zkumavky Falcon. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min.).
- Supernatant odsajeme a pelet resuspendujeme v malém objemu média (1 – 3 ml).
- Pomocí Bürkerovy komůrky spočítáme množství buněk v 1 ml média.
- Na dno jamek v 6jamkové destičce přichytíme komůrky s přepážkou (Ibidi, Německo).
- Do obou částí komůrky pipetujeme 70  $\mu$ l média obsahujícího 70000 buněk.
- Inkubujeme v termostatu do doby, než buňky vytvoří souvislou vrstvu (přibližně 20 hod.).
- Opatrně sejmeme komůrku. Vznikne mezera, do níž mohou buňky migrovat.
- Vyhodnocujeme pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-S (objektiv 4x/HMC). Pořídíme záznam z doby ihned po sejmutí komůrky a po uplynutí 3 hod.

### 3.2.4.2 Test buněk na schopnost růst nezávisle na ukotvení k podkladu

- Buňky narostlé na kultivační misce trypsinizujeme a převedeme do 15ml zkumavky Falcon. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min.).
- Supernatant odsajeme a pelet resuspendujeme v malém objemu média (1 – 3 ml).
- Pomocí Bürkerovy komůrky spočítáme množství buněk v 1 ml média.
- Připravíme 2x DMEM a 1,6% agar. Držíme je při teplotě přibližně 45 °C.
- Do jamek 6jamkové destičky pipetujeme 1,5 ml 0,8% podkladového agaru vzniklého smícháním 2x DMEM a 1,6% agaru v poměru 1:1. Necháme ztuhnout.
- V 0,4% agaru (připravíme smísením 2x DMEM a 0,8% agaru v poměru 1:1) resuspendujeme 2000 buněk. Směs pipetujeme na podkladový agar. Po ztuhnutí převrstvíme 1x DMEM.
- Za občasného přidávání 1x DMEM na povrch agaru inkubujeme v termostatu po dobu 14 dnů.
- Jamky naskenujeme s rozlišením 1200 dpi a snímky vyhodnotíme pomocí programu NIS-Elements.

Roztoky a další materiál:

- Agar noble (Sigma, USA)
- 2x DMEM (100 ml): 2,56 g práškové DMEM s pyruvátem (Gibco, Life Technologies)

66,2 ml klávovaná miliporová voda

9,8 ml 7,5% NaHCO<sub>3</sub>

20 ml FBS (Sigma, USA)

2 ml neesenciální aminokyseliny (Gibco, Life Technologies)

2 ml antibiotika-antimykotika (Gibco, Life Technologies)

## 4. Výsledky

---

Cílem této práce je objasnit vliv fosforylace tyrosinu 90 vazebného povrchu SH3 domény kinázy Src na regulaci její katalytické aktivity a schopnost fosforylovat proteinové substráty. Záměrem bude rovněž stanovit, jak se tato modifikace projevuje na úrovni buněk a jejich fyziologických procesů.

Zvolený přístup ke studiu Tyr 90 byl založen na využití aminokyselinových substituentů, které napodobují přítomnost či nepřítomnost fosfátové skupiny na postranním řetězci v dané pozici peptidu. Tyr 90 SH3 domény Src byl proto v jedné variantě zaměněn za nefosforylovatelný fenylalanin (Src 90F) a v druhé za zbytek kyseliny glutamové (Src 90E), jenž je v současné době nejběžněji používaná molekula mimikující fosfotyrosin. Obě dvě mutantní formy kuřecího Src byly vytvořeny v naší laboratoři. Dále byl použit původní buněčný c-Src (wt c-Src) a konstitutivně aktivní Src nesoucí fenylalanin na místě regulačního tyrosinu 527 (Src 527F), kde absence hydroxylové skupiny neumožňuje fosforylaci kinázami Csk či Chk a tím inhibici katalytické aktivity enzymu.

## 4.1 Exprese variant kinázy Src v kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe*

Ačkoli lze u kvasinek detekovat nízkou míru tyrosinové fosforylace některých proteinů, nebyly u nich objeveny žádné proteintyrosinkinázy. Fosfát je na hydroxylovou skupinu tyrosinu přenášen prostřednictvím duálně specifických proteinkináz (Gartner *et al.*, 1992). V kvasinkových buňkách tudíž nejsou přítomny regulační proteiny Src, jež by ovlivňovaly jeho kinázovou aktivitu, ani jiné kinázy, které by mohly interferovat s prováděnými experimenty.

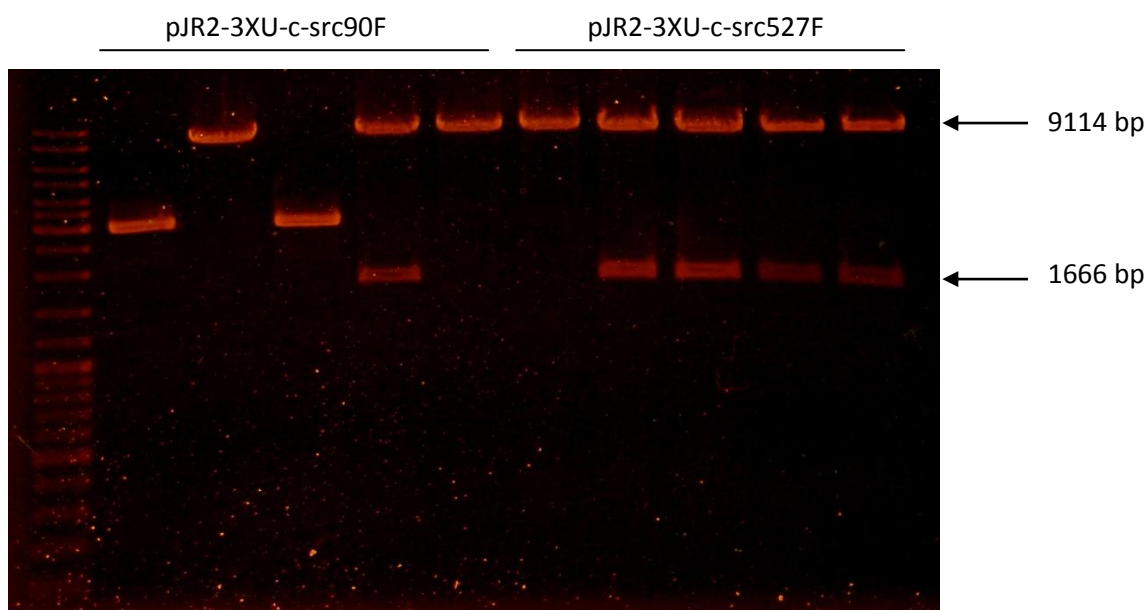
Systém používající ke stanovení katalytické aktivity mutantních forem Src heterologní expresi této kinázy ve *Schizosaccharomyces pombe* byl zaveden prof. Superti-Furgou (Superti-Furga *et al.*, 1993) a využit při studiu mechanismů regulujících aktivitu Src. Vzhledem k absenci regulátorů a inhibitorů Src v kvasinkách, jsou všechny mutantní formy s intaktní katalytickou doménou v buňkách *S. pombe* aktivní a to včetně jinak přísně regulovaného wt c-Src. Exprese Src proto v kvasinkách způsobuje vysokou fosforylaci endogenních proteinů a inhibici růstu kultury. Pokud ale zároveň s Src produkujeme v těchto buňkách Csk dochází u nemutované wt c-Src k potlačení popsaného fenotypu. U pozměněných variant Src závisí rychlost dělení buněk na povaze mutace. Zásahy do struktury Src, které ovlivní složky regulačních mechanismů držící Src v inaktivním stavu, se projeví inhibicí růstu, i pokud je přítomna Csk. Tento systém se proto jevil jako vhodný k otestování naší hypotézy, že fosforylace Tyr 90 snižuje afinitu SH3 domény k CD linkeru, což vede k nárůstu katalytické aktivity Src.

### 4.1.1 Příprava plasmidových konstruktů pro expresi Src a Csk v *S. pombe*

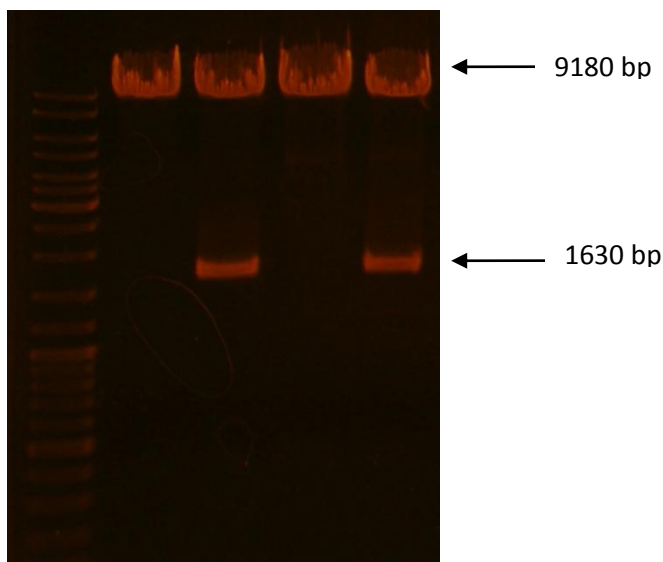
Pro expresi Src variant v kvasinkách *S. pombe* byl použit vektor pJR2-3XU (Moreno *et al.*, 2000). Jedná se o plasmid odvozený od expresního vektoru pREP3, který obsahuje uracilový selekční marker, gen ampicilinové resistance, a indukovatelný promotor *nmt1*. Možnost regulovat produkci Src byla vzhledem k toxicitě proteinu pro buňky *S. pombe* nutnou podmínkou. Exprese z *nmt1* je inhibována přítomností thiaminu. Je to jedna z nejsilnějších promotorových sekvencí v *S. pombe* (Tommasino & Maundrell, 1991).

Jako výchozí zdroj mutantních variant Src sloužily vektory pBluescript II SK(+) se zaklonovanými sekvencemi *src* variant (pBlue-*c-src*90E, pBlue-*c-src*90F, pBlue-*c-src*, pBlue-*c-src*527F).

Plasmidy pBlue-*c-src*90F, pBlue-*c-src* a pBlue-*c-src*527F byly štěpeny restrikními endonukleázami XhoI a NotI. Izolované přečištěné fragmenty o velikosti 1680 bp, nesoucí DNA sekvence jednotlivých Src variant, byly poté ligovány s vektorem pJR2-3XU otevřeným v polylinkeru XhoI a NotI restriktázami. Ligační směsí byly následnou elektroporací transformovány buňky *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Bakteriální kolonie, vzniklé po vysetí kultury na misky s živným agarem obsahujícím selekční antibiotiku ampicilin, byly rozpěstovány jako separátní kultury. Plasmidová DNA izolovaná z těchto buněk byla ověřena restrikním štěpením XhoI a BglII endonukleázami (obr. 7). V případě úspěšně ligovaných konstruktů pJR2-3XU-*c-src*90F, pJR2-3XU-*c-src*, pJR2-3XU-*c-src*527F vznikly 2 fragmenty o velikosti 1666 bp a 9114 bp. Druhá kontrola byla pomocí restriktázy BamHI (obr. 8), která konstrukt štěpila na 2 DNA molekuly o 1630 bp a 9180 bp.



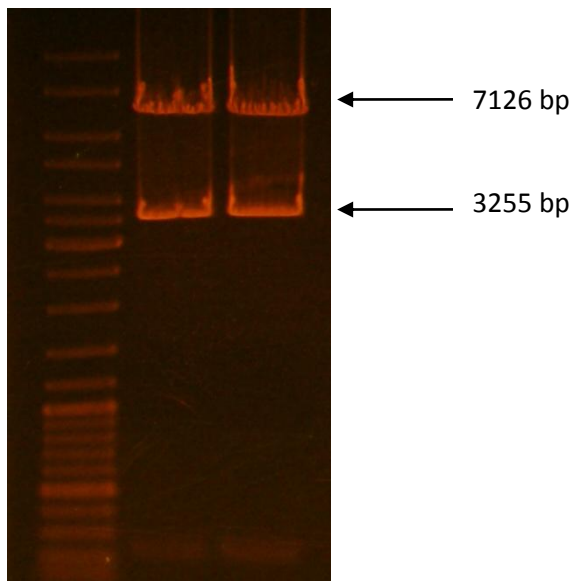
Obr. 7: Restrikní ověření konstruktů pJR2-3XU-*c-src*90F a pJR2-3XU-*c-src*527F. Plasmidy izolované z jednotlivých kolonií (5 od každého konstrukt) byly štěpeny restrikními XhoI a BglII. Správně ligované plasmidy tvořily po separaci na agarosovém gelu pruhy v oblasti 1666 bp a 9114 bp (dle pořadí nanášek klon 4 konstrukt pJR2-3XU-*c-src*90F a klony 2 – 5 pJR2-3XU-*c-src*527F).



Obr. 8: Restrikční ověření konstruktů *pJR2-3XU-c-src* štěpením restriktázou *BamHI*. V případě úspěšně vytvořeného plasmidu vznikly fragmenty o velikosti 1630 bp a 9180 bp (s ohledem na pořadí nanášek klony 2 a 4).

Příprava expresního konstruktů *pJR2-3XU-c-src90E* probíhala odlišně, jelikož vnesením aminokyselinové záměny tyrosinu 90 za glutamát vzniklo v DNA sekvenci restrikční místo rozpoznávané *XhoI*, a tudíž nebylo možno k vyštěpení *src* inzertu z vektoru *pBlue-c-src90E* použít *XhoI* a *NotI* restriktázy. Fragment nesoucí *src90E* byl proto z původního plasmidu získán pomocí restrikčních endonukleáz *SalI* a *BglII* a byl ligován s vektorem *pJR2-3XU* otevřeným v oblasti polylinkeru restriktázami *SalI* a *BamHI* (*BamHI* vytváří kohezní konce kompatibilní s *BglII*). Plasmidová DNA izolovaná z kolonií, jež rostly na živném agaru s ampicilinem, byla ověřena restrikčními endonukleázami shodnými s předchozími kontrolami. Navíc bylo provedeno štěpení *pJR2-3XU-c-src90E* konstruktů restriktázou *HindIII* (obr. 9), které v ideálním případě vedlo ke vzniku fragmentů o velikosti 3255 bp, 7126 bp a dvou malých DNA molekul o souhrnné velikosti 399 bp.

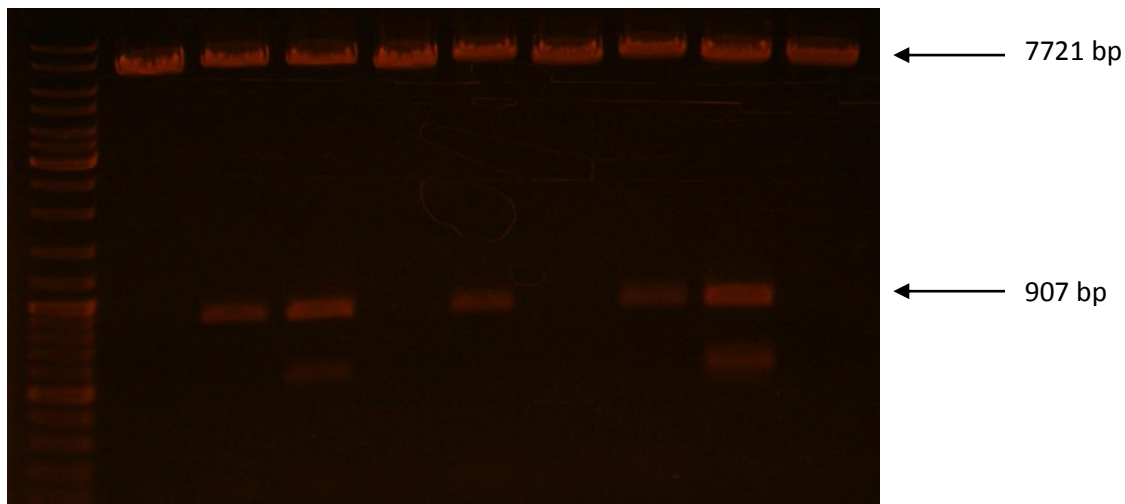




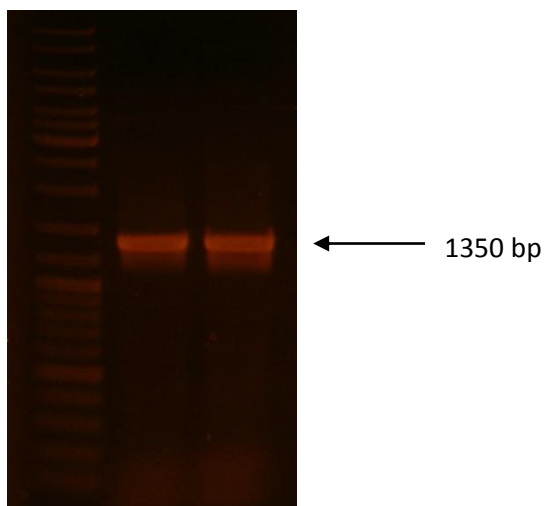
Obr. 9: Kontrolní štěpení konstruktů *pJR2-3XU-c-src90E* restriční endonukleázou *HindIII*. Separace agarosovou elektroforézou ukázala dva výrazné pruhy o velikostech 3255 bp a 7126 bp.

Kinázu Csk jsme se v kvasinkách *S. pombe* rozhodli produkovat prostřednictvím expresního vektoru pART (McLeod *et al.*, 1987). Tento plasmid je vybaven konstitutivně aktivním *adh* promotorem, genem pro ampicilinovou resistenci a leucinovým selekčním markerem. *adh* je promotorová oblast genu pro alkohol dehydrogenázu. Je schopna přibližně stejně vysoké exprese jako indukovaný *nmt1* promotor.

Plasmid pEFIRES-N-*csk* (dar od dr. Brdičky) byl štěpen restričními endonukleázami *XhoI* a *NotI* a následně inkubován s Klenowovým fragmentem. Izolovaný a přečištěný fragment (1350 bp) s tupými konci nesl DNA kódující Csk. Vektor pART byl linearizován pomocí restriktázy *SmaI*, jenž vytváří na molekule DNA tupé konce. Po defosforylaci alkalickou fosfatázou SAP byl ligován s *csk* fragmentem. Ligační směsí byly transformovány bakterie *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Kolonie narostlé na živném agaru s ampicilinem byly testovány na přítomnost požadovaného konstruktů pART-*csk*. Kontrolním štěpením správně vytvořeného plasmidu endonukleázami *NcoI* a *BamHI* (obr. 10) vznikly 2 fragmenty o velikosti 907 bp a 7721 bp. Druhou kontrolou byla PCR s primery ohraničujícími *csk* inzerť (obr. 11). Namnožený úsek DNA po rozdělení na agarosové elektroforéze vytvořil výrazný pruh na pozici odpovídající velikosti 1350 bp, což potvrdilo přítomnost celé sekvence *csk* v pART vektoru.



Obr. 10: Restrikční ověření konstruktů pART-csk. Plasmid byl štěpen restriktázami *NcoI* a *BamHI*. Elektroforetická separace na agarosovém gelu vedla v případě správného konstruktů ke vzniku 2 fragmentů o velikostech 907 bp a 7721 bp (dle pořadí nanášek klony 2, 5 a 7)

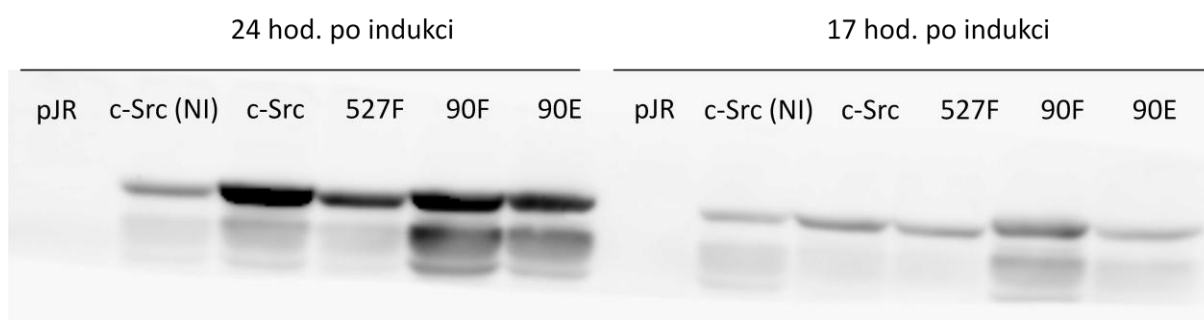


Obr. 11: Agarosová elektroforéza PCR reakce s pART-csk vektorem jako templátovou DNA a primery ohraničujícími sekvenci kódující Csk. Vzniklý produkt putoval jako pruh o velikosti 1350 bp, což odpovídá velikosti inzertu.

#### 4.1.2 Transformace kvasinek *S. pombe* expresními vektory nesoucími varianty *src* a konstruktem pART-csk

Vytvořenými expresními konstrukty pJR2-3XU-*c-src*90E, pJR2-3XU-*c-src*90F, pJR2-3XU-*c-src*, pJR2-3XU-*c-src*527F a prázdným vektorem pJR2-3XU byly lithium-acetátovou metodou transformovány kvasinky *S. pombe* kmene PN559. Kolonie, jenž vyrostly na plotnách s pevným médiem bez uracilu, byly pro kontrolu přečárkovány na nové selekční plotny.

Ověření, zda vzniklé pozitivní klony (dále označované jako Src90E, Src90F, Src527F, c-Src a kontrolní pJR bez *src* inzertu) jsou opravdu schopny exprimovat jednotlivé varianty kinázy Src, bylo provedeno imunodetekcí Src v kvasinkových lyzátech. Nejdříve byly kvasinkové buňky rozpěstovány za neindukčních podmínek v médiu obsahující thiamin v koncentraci 5 µg/ml po dobu přibližně 24 hod. Po promytí byly přeneseny do indukčního média bez thiaminu. Pro kontrolu byla část populace klonu c-Src ponechána v neindukčních podmínkách. Z každé kultury byly provedeny 2 odběry: první 17 hod. a druhý 24 hod. po indukci exprese Src. Vzorky byly následně lyzovány, upraveny na shodnou koncentraci a připraveny pro SDS-PAGE. Po elektroforetické separaci byly přeneseny western blotem na nitrocelulosovou membránu. Následovala inkubace v roztoku s primární protilátkou proti v-Src a poté se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (GAM-HRP). Po přidání substrátu pro HRP byl luminiscenční signál detekován pomocí přístroje LAS 4000 (Fujifilm, Japonsko). Z výsledného blotu (obr. 12) je patrné, že exprese Src je relativně vysoká i za inhibičních podmínek thiaminu v médiu (vzorky c-Src NI). 17 hod po zaočkování do média bez thiaminu je produkce Src v porovnání s neindukovanou kulturou c-Src NI stále ještě nízká. Odběry provedené 24 hod. po indukci však již vykazují výrazné nabohacení proteinů.



Obr. 12: Ověření exprese variant Src v kvasinkách *S. pombe* transformovaných konstrukty *pJR2-3XU-c-src90E*, *pJR2-3XU-c-src90F*, *pJR2-3XU-c-src*, *pJR2-3XU-c-src527F* a *pJR2-3XU*. Z každé kultury byly provedeny 2 odběry: po 17 hod. a 24 hod. od indukce exprese. Lyzované vzorky o shodné koncentraci byly rozděleny SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Detekce byla provedena protilátkou anti-v-Src (*Ab-1*).

Jelikož exprese Src způsobuje inhibici růstu kultury *S. pombe*, zajímalo nás, jak se přítomnost kinázy Src v kvasinkách projeví na jejich morfologii. Po 24 hod. kultivace v indukčním médiu byly buňky zkoumány pod mikroskopem Nikon Eclipse TE2000-S (objektiv 100x/DIC) pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu (obr. 13). Klony nesoucí pouze prázdný vektor *pJR2-3XU* vypadaly obdobně jako před transformací.

V kulturách *S. pombe* exprimujících Src byly pozorovány buňky se změněnými difrakčními vlastnosti představující mrtvé jedince. Kvasinky dále vykazovaly morfologické abnormality projevující se změnou proporcí a u některých buněk vakuolarizací.



Obr. 13: Buňky *S. pombe* neexprimující (pJR; vlevo) a exprimující (Src90E; vpravo) kinázu Src. Kvasinky byly 24 hod. kultivovány v indukčním médiu a poté pozorovány pod mikroskopem Nikon Eclipse TE2000-S (objektiv 100x/DIC) metodou diferenciální interferenčního kontrastu.

Klony Src90E, Src90F, Src527F, c-Src a pJR byly transformovány konstruktem nesoucím gen pro kinázu Csk (pART-*csk*) a vysety na selekční plotny neobsahující uracil a leucin. Aby byla vyloučena falešná pozitivita, byly narostlé kolonie opět přeneseny na nové selekční misky. Tím byly získány kvasinkové buňky (označeny jako Src 90E+Csk, 90F+Csk, 527F+Csk, c-Src+Csk a kontrolní pJR+Csk), které by měly konstitutivně exprimovat Csk a po indukci produkovat jednotlivé varianty Src.

Lyzáty klonů Src 90E+Csk, 90F+Csk, 527F+Csk, c-Src+Csk a pJR+Csk byly testovány na přítomnost Src a Csk. Imunologická detekce na membráně po western blotu prokázala, že exprese Src zůstala ve všech případech zachována. Prezenci Csk v kvasinkových lyzátech se však bohužel nepodařilo prokázat. Vzhledem k faktu, že použitá primární protilátka anti-Csk tento protein velmi slabě detekovala i v kontrolních lyzátech připravených z SC buněk, mohlo se zřejmě jednat spíše o problém v detekci než v expresi. Proto jsme se rozhodli zjistit, zda by nebylo možné produkci Csk ověřit nepřímo výsledováním změn v růstových rychlostech kvasinek transformovaných konstrukty s *src* i *csk* oproti buňkám *S. pombe* nesoucím jen plasmidy s *src*.

Aby bylo možné pěstovat obě sady klonů ve stejném médiu a tím minimalizovat vliv rozdílného prostředí, byly buňky mající pouze *src* konstrukt transformovány prázdným pART vektorem, čímž získaly schopnost syntetizovat leucin obdobně jako kvasinky s pART-*csk*.

### **4.1.3 Měření růstových křivek kvasinek *S. pombe* transformovaných vektory nesoucími *csk* a varianty *src***

Exprese kinázy Src v kvasinkách *S. pombe* je pro tyto buňky toxická. Vede k aberantně vysoké tyrosinové fosforylaci endogenních proteinů a inhibici růstu kultury (Superti-Furga *et al.*, 1993), což lze vysledovat měřením růstových křivek.

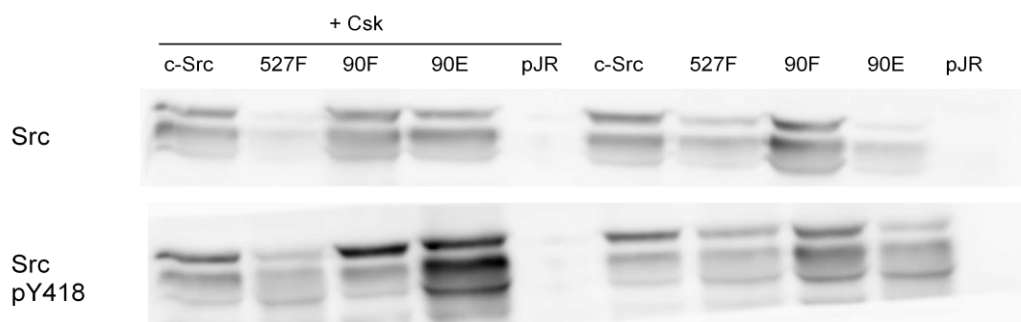
Obě připravené sady klonů produkující varianty Src, z nichž jedna je navíc transformována konstruktem pART-*csk* a druhá nese pouze prázdný plasmid pART, byly po dobu přibližně 24 hod. pěstovány v médiu s thiaminem o koncentraci 5 µg/ml. Po promytí indukčním médiem bylo jednotlivými inokuly zaočkováno 1,4 ml indukčního média v 12jamkové destičce na OD<sub>600</sub> 0,05.

Sledování růstu bylo prováděno kontinuálním měřením OD<sub>600</sub> pomocí fluorimetru Varioskan Flash (Thermo Scientific, USA). Jelikož se jednalo o ne zcela zavedený postup, bylo nejdříve nutno systém optimalizovat, najít vhodné inkubační podmínky, množství měřeného média a tomu odpovídající plastik. Experimenty byly nakonec prováděny právě ve 12jamkových destičkách s 1,4 ml zaočkovaného média, což je objem dostatečně velký na to, aby bylo možné zanedbat případné rozdíly způsobené nerovnoměrným výparem tekutiny z jednotlivých jamek. Měření v menších objemech v destičkách s větším počtem jamek se ukázalo jako neefektivní rovněž z toho důvodu, že kapalina zde má, v porovnání se svým objemem, příliš velkou styčnou plochu se stěnami destičky, což znemožňuje dostatečné promíchávání média a vede k sedimentaci buněk. Kvasinky byly kultivovány při teplotě 30 °C za stálého třepání rychlostí 180 rpm a průměrem rozkmitu 20 mm, což se ukázalo jako dostatečné pro udržení buněk v suspenzi. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 600 nm každých 15 min. po dobu obvykle 40 hod.

Inokula byla dále použita na zaočkování 25 ml indukčního média. Tyto kultury byly po 22 hod. kultivace lyzovány a byly z nich připraveny vzorky pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu o shodných proteinových koncentracích. Experiment byl proveden ve 3 nezávislých vyhotoveních.

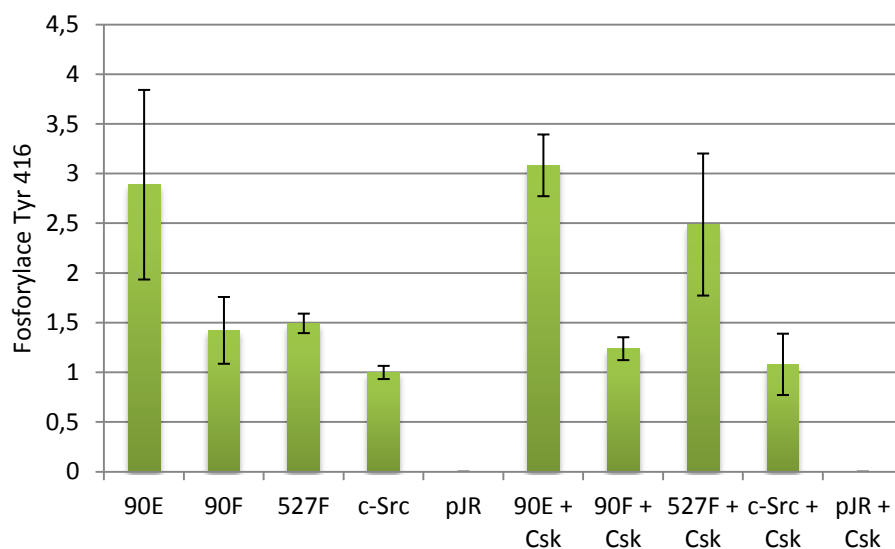
Vzorky pro SDS-PAGE připravené lyzátů jednotlivých kultur po 22 hod. od indukce exprese Src byly elektroforeticky separovány a přeneseny na nitrocelulosovou membránu

pomocí western blotu. Abychom porovnali míru exprese jednotlivých Src proteinů byla membrána inkubována v primární protilátce proti v-Src. Po detekci byla membrána stripována a znovu použita pro stanovení kinázové aktivity Src variant pomocí protilátky proti fosforylovanému Tyr 416 v aktivační smyčce katalytické domény (anti-Src pY418) (obr. 14).



*Obr. 14: Imunodetekce celkového Src a Src fosforylovaného na Tyr 416 aktivační smyčky. Vzorky byly připraveny lyzí jednotlivých kultur *S. pombe* 22 hod. po indukci exprese Src. Na polyakrylamidový gel byla nanášena shodná proteinová množství. Po rozdělení pomocí SDS-PAGE a následném western blotu byla provedena imunodetekce celkového Src. Membrána byla poté stripována a využita pro stanovení Src fosforylovaného na Tyr 416. Použité primární protilátky: anti-v-Src (Ab-1), anti-Src pY418.*

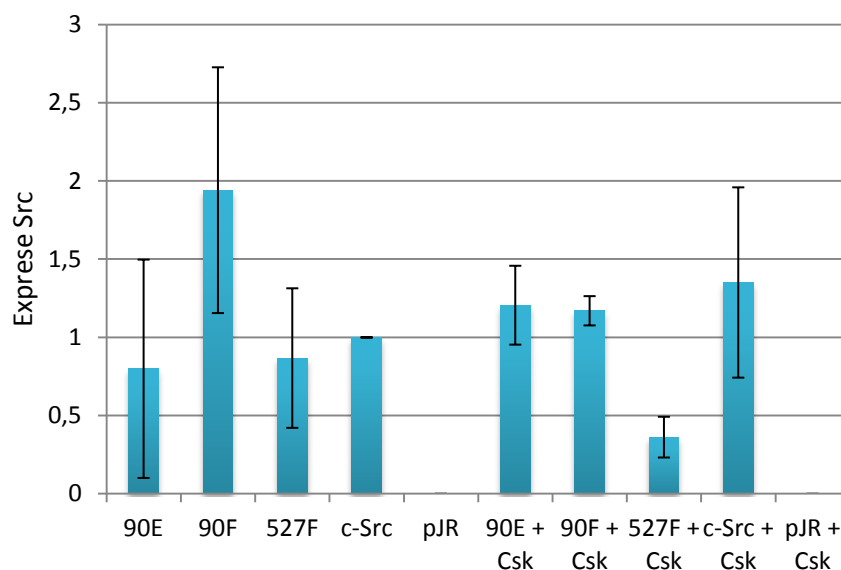
Pomocí programu ImageJ (NIH) byla stanovena denzita jednotlivých pruhů imunoblotu. Míra katalytické aktivity Src variant je dána podílem denzit odpovídajících Src fosforylovanému na Tyr 416 a celkovému Src. Je patrné, že míra fosforylace Tyr 418 aktivační smyčky je u glutamátového mutantu Src90E 2,8krát vyšší než u původní wt formy c-Src. Záměna za Tyr 90 za nefosforylovatelný fenylalanin vedla jen k velmi malé odchylce oproti wt c-Src (obr. 15). V souladu s předchozím výzkumem v naší laboratoři (Gerndtová, 2008) lze tedy říci, že fosforylace Tyr 90 v SH3 doméně kinázy Src zvyšuje její katalytickou aktivitu.



*Obr. 15: Míra fosforylace Tyr 416 aktivační smyčky Src. Byla stanovena jako podíl Src fosforylovaného na Tyr 416 a celkového Src. Hodnoty byly vztaheny k míře fosforylace c-Src. Množství jednotlivých forem Src bylo určeno denzitometrickou analýzou pruhů na imunoblotech pomocí programu ImageJ.*

Jak vyplývá z detekce celkového množství Src v jednotlivých lyzátech (obr. 16), více katalycky aktivní formy (Src90E a Src527F) jsou exprimovány méně, než varianty s nižší kinázovou aktivitou (Src90F a c-Src). Tento trend nabývá na síle, pokud provedeme lyzi buněk až 36 hod. po indukci exprese Src, místo původních 22 hod. Kvasinky se tedy zřejmě snaží vyšší měrou odstraňovat či inhibovat proteosyntézu katalycky aktivnějších forem Src v porovnání s těmi méně aktivními.

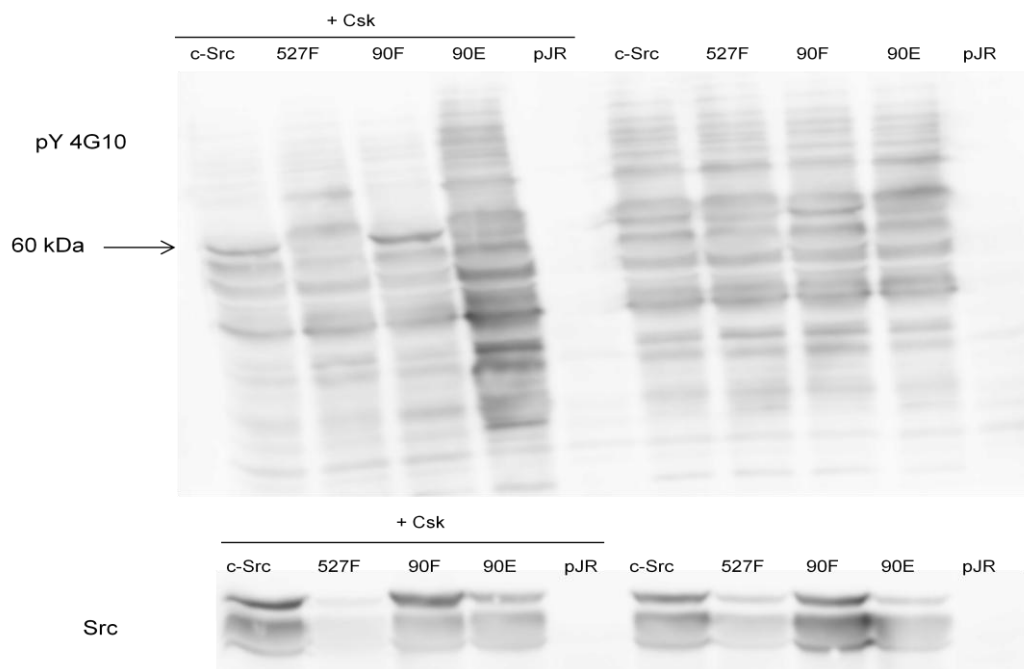
Rozdíl mezi klony transformovanými pART-*csk* nebo jen prázdným vektorem pART se nezdá být příliš výrazný. U kvasinek jenž by měly produkovat Csk (vyjma Src527F+Csk) byla detekována zvýšená hladina Src variant v porovnání s buňkami bez Csk. Důvodem může být právě přítomnost Csk, která jim zřejmě částečnou inhibicí kinázové aktivity Src umožňuje exprimovat větší množství tohoto proteinu.



Obr. 16: Míra exprese jednotlivých variant Src bez nebo za současné produkce Csk. Množství Src produkované v jednotlivých klonech bylo stanoveno denzitometrickou analýzou pruhů na imunoblotech pomocí programu ImageJ a vztaheno k expresi kinázy v klonu c-Src.

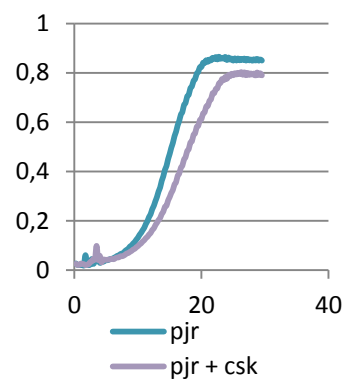
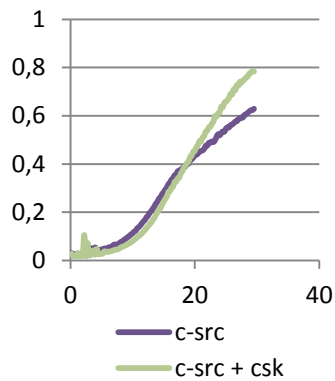
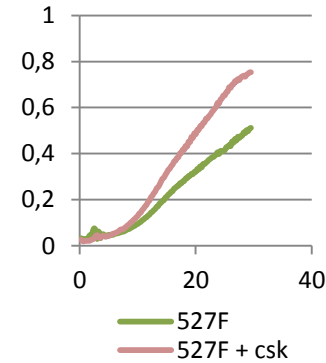
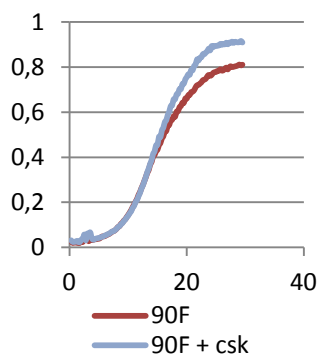
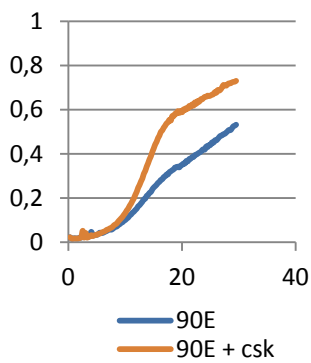
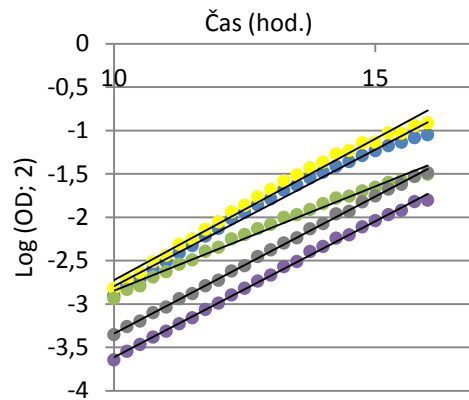
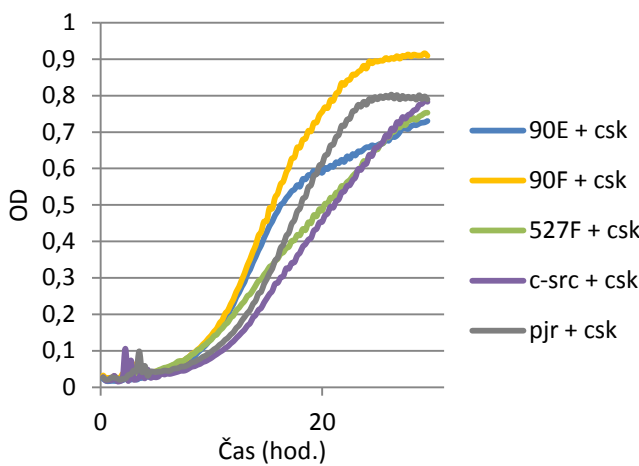
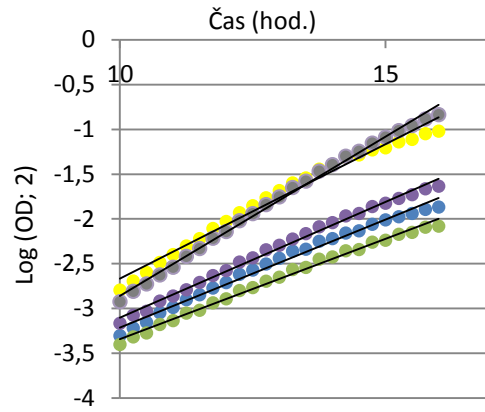
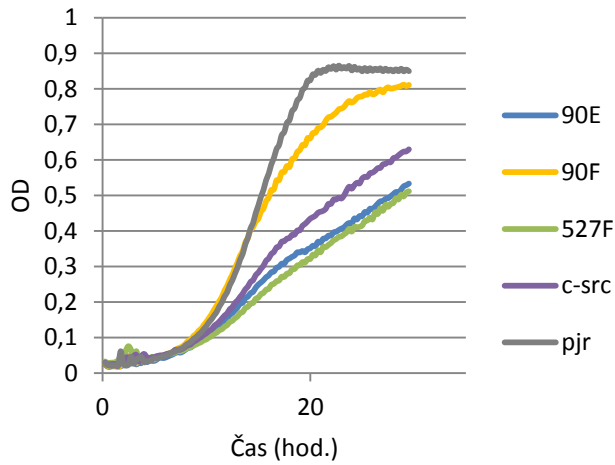
Připravené lyzáty byly dále použity pro stanovení fosfotyrosinového profilu jednotlivých klonů. Po elektroforetické separaci SDS-PAGE a western blotu, byly vzorky přenesené na nitrocelulosovou membránu inkubovány s primární protilátkou proti fosfotyrosinu (4G10). Výsledný imunoblot ukázal (obr. 17), že přes různá množství exprimovaného Src klonů Src90E, Src90F, c-Src a Src527F, je fosforylace endogenních proteinů přibližně stejná. Kvasinkové buňky Src90E+Csk, Src90F+Csk, c-Src+Csk a Src527F+Csk, jež navíc zřejmě produkují kinázu Csk, se svými fosfotyrosinovými profily liší. U klonů Src90F+Csk a c-Src+Csk lze pozorovat pokles v obsahu fosfotyrosinů, pravděpodobně v důsledku inhibičního působení Csk. V oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 60 kDa lze pozorovat pruhy, které odpovídají Src. U buněk Src90E+Csk a Src527F+Csk je tento pruh položen výše než u kvasinek Src90F+Csk a c-Src+Csk. Bylo pozorováno, že horní pruh obvykle odpovídá aktivní formě Src a dolní inaktivní. Z toho je možné opět usuzovat, že u klonů Src90F+Csk a c-Src+Csk dochází k inaktivaci Src kinázou Csk. Dále je zřejmé, že exprese samotné Csk (ověřená jen nepřímo) nepůsobuje fosforylací endogenních kvasinkových proteinů.



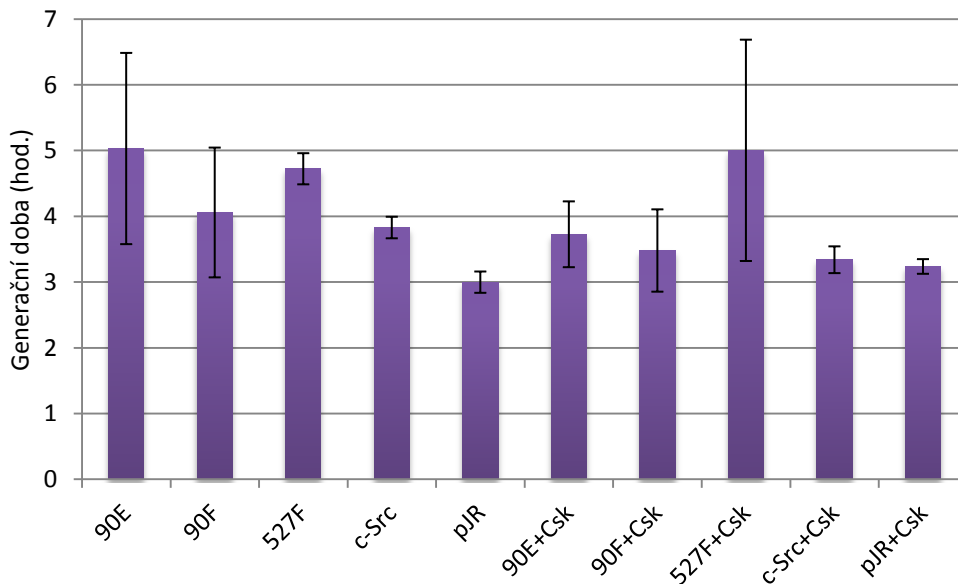


*Obr. 17: Fosfotyrosinový profil kvasinkových klonů exprimujících varianty Src. Lyzáty kvasinkových kultur pěstovaných 22 hod. v indukčním médiu byly srovnány na shodné koncentrace. Po SDS-PAGE a přenosu na membránu byla provedena imunodetekce primární protilátkou anti-pY 4G10 (horní membrána). Dolní membrána dokumentuje množství Src v jednotlivých klonech.*

Růstové křivky (obr. 18) byly vynášeny jako závislost  $OD_{600}$  na čase (hod.). Logaritmičným výnosem exponenciální fáze růstu byla proložena regresní přímka. Její směrnice je rovna reciproké hodnotě generační doby. Generační doby jednotlivých kultur ze tří nezávislých měření byly následně vyneseny do grafu (obr. 19). Je z něj patrné (stejně jako z vyobrazených růstových křivek), že klony exprimující Src90E a Src527F mají zhruba o 1 hod. delší generační dobu než buňky produkující Src90F a c-Src, což v souladu s imunologickou analýzou lyzátů ukazuje na jejich vyšší kinázovou aktivitu. Lze rovněž pozorovat zvýšení růstové rychlosti, pokud kvasinky kromě Src variant zároveň pravděpodobně syntetizují kinázu Csk (vyjma klonu Src527F+Csk).



Obr. 18: Růstové křivky jednotlivých kultur *S. pombe*. První dva grafy znázorňují růstové křivky a jim odpovídající logaritmické výnosy exponenciální fáze růstu kvasinek exprimujících pouze Src varianty. Druhé dva grafy vyjadřují obdobné, ale pro buňky produkující Src i Csk. Dolních 5 grafů porovnává vliv Csk na růstovou rychlost buněk obsahujících danou formu Src. Obdobně jako u grafů růstových křivek (vlevo nahoře) je zde vynesena závislost  $OD_{600}$  kultury na čase (hod.).



Obr. 19: Generační doby jednotlivých kvasinkových klonů. Byly stanoveny jako reciproká hodnota směrnice regresní přímky, jež byla proložena logaritmickým výnosem závislosti  $OD$  na času kultury v exponenciální části růstu.

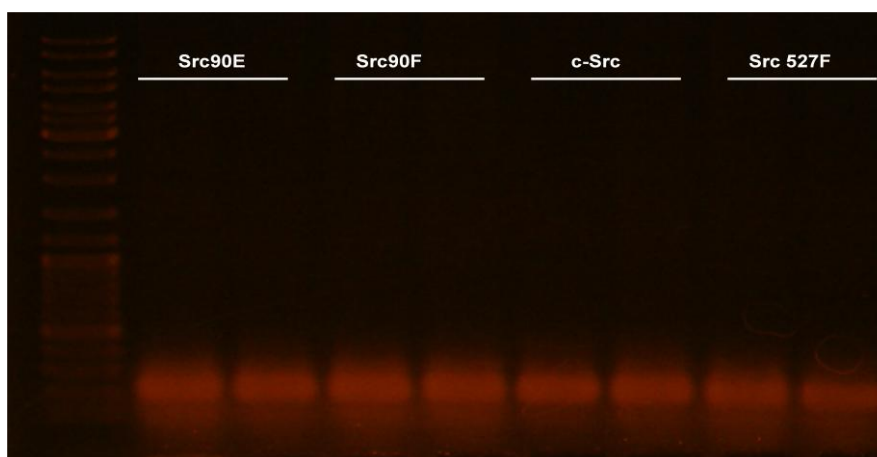
## 4.2 Exprese variant kinázy Src v buňkách SYF

Buňky SYF (*src* *-/-* *yes* *-/-* *fyn* *-/-*) je linie myších embryonálních fibroblastů, která byla vytvořena z buněk E9,5 myších embryí, v nichž byly deletovány geny pro kinázy Src, Fyn a Yes. Izolované buňky byly transformovány velkým T antigenem viru SV40 (Klinghoffer *et al.*, 1999). Src, Yes a Fyn jsou kinázy rodiny Src. Nachází ve všech buněčných typech a vykazují vysokou vzájemnou zastupitelnost ve svých funkcích (Thomas & Brugge, 1997). SYF buňky, jež nemají jak Src, tak ani Yes a Fyn, byly proto zvoleny jako vhodný model pro studování vlivu c-Src a jeho mutant (90E, 90F a 527F) na fyziologii buněk.

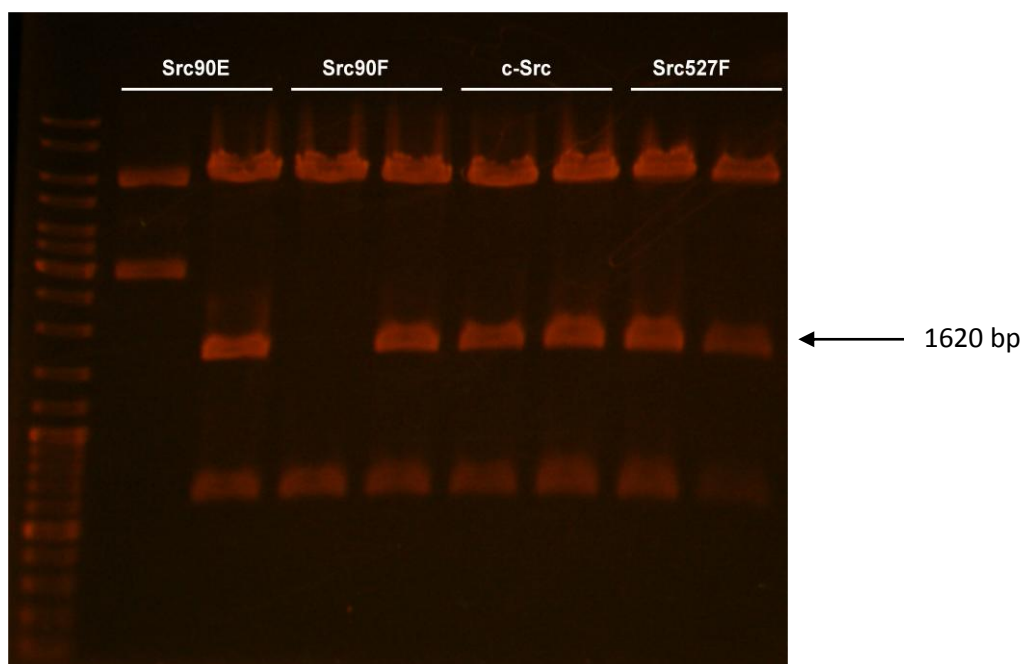
### 4.2.1 Příprava plasmidových konstruktů s variantami Src pro retrovirální transfekci

Abychom docílili stabilní exprese jednotlivých variant Src v SYF buňkách, rozhodli jsme se použít retrovirální transfekci. Sekvence kódující Src90E, Src90F, c-Src, Src527F bylo proto nutné zaklonovat do retrovirového vektoru pMSCV-IRES-GFP (dar od dr. Kašpara). Tento plasmid nese gen pro ampicilinovou resistenci, 2 LTR oblasti, signální sekvenci pro sbalení DNA do virové partikule a gen pro EGFP následující po IRES sekvenci.

Inzerty nesoucí varianty *src* byly získány sekvenčním štěpením plasmidů pBlue-*c-src*90E, pBlue-*c-src*90F, pBlue-*c-src* a pBlue-*c-src*527F nejdříve restriční endonukleázou NotI. Poté byly vzniklé konce zatupeny pomocí Klenowova fragmentu. DNA molekula byla následně štěpena restriktázou BamHI, čím vznikl inzert s jedním tupým koncem. Fragment byl ligován s vektorem pMSCV-IRES-GFP linearizovaným endonukleázami BglII a HpaI a defosforylovaným alkalickou fosfatázou SAP. Ligační směsí byly elektroporací transformovány bakterie *E. coli* kmene DH5 $\alpha$ . Kolonie, jež byly schopny vyrůst na selekční plotně s živným agarem obsahujícím ampicilin, byly testovány na přítomnost správně ligovaných konstruktů pMSCV-IRES-GFP-*src*90E, pMSCV-IRES-GFP-*src*90F, pMSCV-IRES-GFP-*c-src* nebo pMSCV-IRES-GFP-*src*527F. Nejdříve byla provedena kontrola pomocí PCR, primery ohraničujícími sekvenci kódující SH3 doménu (obr. 20). Výsledný produkt měl velikost přibližně 200 bp. Následně konstrukty ověřovány štěpením restričními endonukleázami EcoRI a NcoI (obr. 21). V případě správně vytvořeného konstruktů došlo k vyštěpení fragmentu o velikosti 1620 bp, jež odpovídal *src*, a dále další DNA molekuly velké přibližně 700 bp.



Obr. 20: Ověření konstruktů *pMSCV-IRES-GFP-src90E*, *pMSCV-IRES-GFP-src90F*, *pMSCV-IRES-GFP-c-src* a *pMSCV-IRES-GFP-src527F* pomocí PCR. Po rozdělení na agarosové elektroforéze vzniklý produkt vytvořil pruh o velikosti přibližně 200 bp.



Obr. 21: Kontrolní štěpení konstruktů *pMSCV-IRES-GFP-src90E*, *pMSCV-IRES-GFP-src90F*, *pMSCV-IRES-GFP-c-src* a *pMSCV-IRES-GFP-src527F* restričními endonukleázami *EcoRI* a *NcoI*. V případě správně vytvořeného plasmidu se kromě malé DNA molekuly o velikosti asi 700 bp vyštěpil 1620 bp fragment odpovídající *src*.

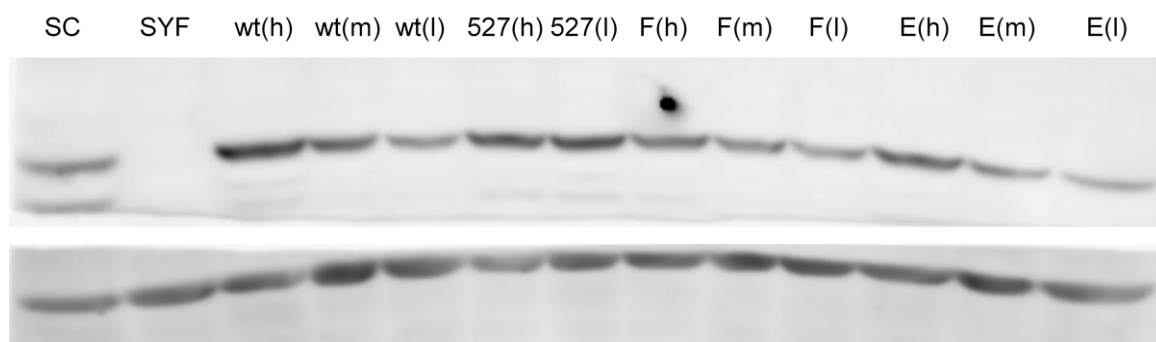
#### 4.2.2 Retrovirální transfekce SYF buněk a exprese variant Src

Pro produkci retrovirů byly použity buňky Phoenix, což je linie vzniklá z 293T buňkách, do nichž byly vloženy geny pro virové proteiny *gag*, *env* a *pol*. Phoenix buňky byly kultivovány v DMEM médiu s tepelně inaktivovaným sérem. Pomocí transfekčního činidla jetPRIME® do nich byly vneseny konstrukty *pMSCV-IRES-GFP-src90E*, *pMSCV-IRES-*

GFP-*src90F*, pMSCV-IRES-GFP-*c-src*, pMSCV-IRES-GFP-*src527F* a pro kontrolu prázdný vektor pMSCV-IRES-GFP. Jelikož tyto plasmidy obsahují signál pro enkapsidaci, byly sbalovány do virových partikulí, které následně pučely ven z buněk do média, jenž bylo posléze použito k infekci linie SYF. Pro zvýšení efektivity inkorporace konstruktů do genomové DNA SYF buněk, byla infekce 3krát opakována. Podle intenzity signálu GFP byla účinnost transfekce 20 – 40 %.

Abychom mohli porovnávat vliv jednotlivých forem Src na buněčnou fyziologii, bylo nezbytné vytvořit linie obsahující shodná množství Src variant. Transfekované SYF linie byly proto na základě GFP signálu rozděleny sorterem BD FACS VantageSE (BD Biosciences, USA) na buňky s nízkou (L), střední (M) a vysokou (H) expresí Src. Tím byly připraveny 4 linie SYF buněk stabilně exprimující Src (dále označovány jako SYF-Src90E, SYF-Src90F, SYF-c-Src, SYF-Src527F), z nichž od každé existovaly 3 varianty lišící se mírou produkce daného Src. Pro kontrolu byla navíc vytvořena linie nesoucí pouze prázdný vektor (SYF-MSCV).

Abychom zjistili skutečnou expresi Src variant, byly z jednotlivých linií připraveny lyzáty. Vzorky o shodné proteinové koncentraci byly naneseny na polyakrylamidový gel a rozděleny pomocí SDS-PAGE. Western blotem byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu a inkubovány s primární protilátkou proti v-Src. Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou pak umožnila Src imunologicky stanovit a to na základě detekce luminiscenčního signálu přístrojem LAS 4000 (Fujifilm, Japonsko). Pro kontrolu nanášky bylo rovněž stanoveno množství aktinu (obr. 22). Denzitometrickou analýzou pruhů ze 3 nezávisle opakovaných imunoblotů byly pro další experimenty vybrány linie obsahující stejná množství Src; a to konkrétně SYF-Src90E(H), SYF-Src90F(H), SYF-c-Src(M) a SYF-Src527F(L).



Obr. 22: Imunodetekce Src (horní membrána) a aktinu (dolní membrána) jako kontroly nanášky. Lyzáty SYF linií exprimující jednotlivé varianty Src byly upraveny na shodnou koncentraci, elektroforeticky rozděleny SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulosovou

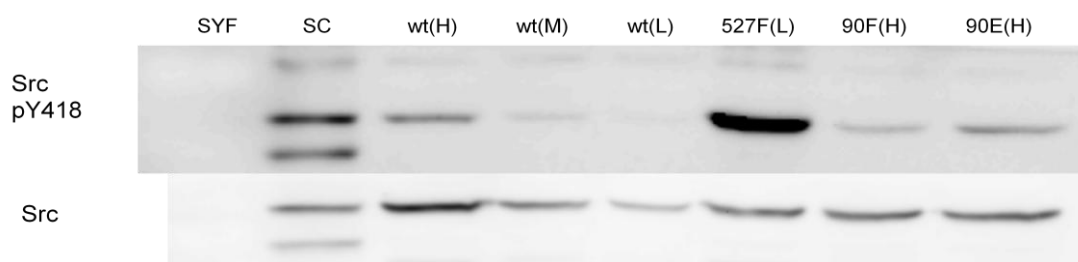
membránu. Imunodetekce byla provedena za použití primárních protilátek anti-v-Src (*Ab-1*) a anti-actin. Lyzát z SC buněk byl použit jako pozitivní kontrola. Negativní kontrolou je lyzát SYF buněk nesoucí prázdný vektor pMSCV-IRES-GFP.

### 4.2.3 Stanovení fosforylačního statusu proteinů interagujících s SH3 doménou Src

Míra fosforylace proteinů, jež jsou substráty Src a zároveň s kinázou interagují pomocí vazby na její SH3 doménu, by mohla přinést informace o schopnosti jednotlivých mutantních variant SH3 domény Src asociovat se svými ligandy. Snížená způsobilost vázat proteinové substráty Src, by se mohla projevit poklesem jejich fosforylace. Pro experimenty byly vybrány interakční partneři Src účastníci se integrinové signalizace: CAS, FAK a paxillin. Předchozí výzkum na SH3 doménách Src fúzovaných s GST ukázal, že substituce Tyr 90 za glutamát inhibuje asociaci SH3 domény a proteinů CAS, FAK, paxillin (Sztacho, 2009). Dalším krokem bylo proto ověřit, jak jednotlivé aminokyselinové záměny na pozici 90 SH3 domény ovlivní vazbu ligandů *in vivo* a pokud interakce probíhá s celým proteinem Src.

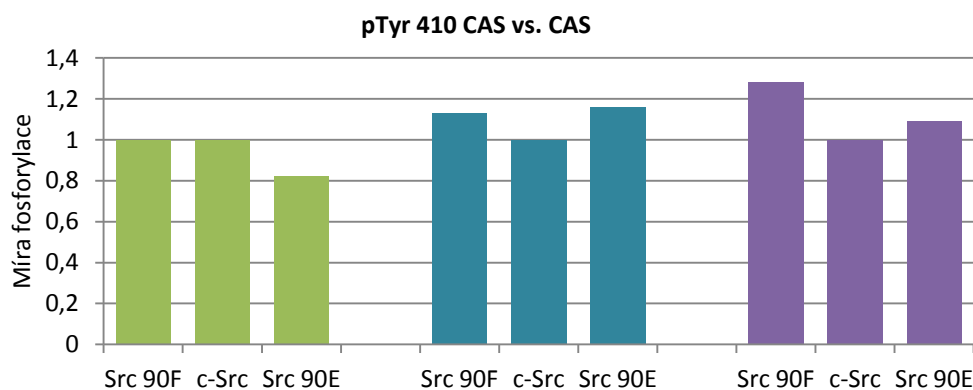
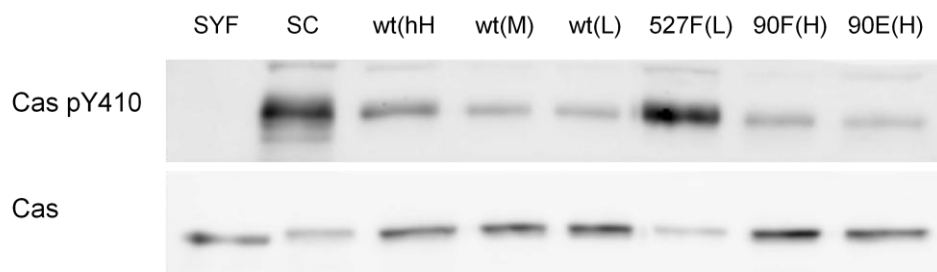
Linie SYF-Src90E(H), SYF-Src90F(H), SYF-c-Src(M) a SYF-Src527F(L) exprimující stejná množství Src byly lyzovány (spolu buňkami SC, SYF nesoucími prázdný pMSCV-IRES-GFP vektor, SYF-c-Src(L) a SYF-c-Src(H)). Vzorky o shodné proteinové koncentraci byly rozděleny na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze, přeneseny western blotem na nitrocelulosovou membránu a inkubovány s primárními protilátkami proti fosforylovaným epitopům zvolených proteinů; konkrétně proti pTyr 410 CAS, pTyr 861 FAK, pTyr 118 paxillinu resp. pTyr418 Src. Po detekci byly jednotlivé membrány stripovány a byly opět použity pro imunologické stanovení tentokrát celkového množství CAS, FAK, paxillinu a Src (primární protilátky anti-CAS, anti-FAK, anti-paxillin a anti-v-Src). Pruhy na imunoblotech odpovídající jednotlivým proteinům byly denzitometricky vyhodnoceny pomocí programu ImageJ (NIH). Míra fosforylace byla vypočtena jako podíl mezi signálem fosfotyrosinu a množstvím celkového proteinu.

Z takto provedené analýzy Src fosforylovaného na Tyr 416 a celkového Src (obr. 23) vyplývá, že míra fosforylace Tyr 416 je u fosfomimikujícího mutantu Src 90E přibližně 3krát vyšší než u wt c-Src, nicméně výrazně nižší než u konstitutivně aktivního Src 527F. V souladu s daty získanými z exprese Src variant v *S. pombe* lze proto tvrdit, že fosforylace tyrosinu 90 SH3 domény kinázy Src zvyšuje její katalytickou aktivitu.



Obr. 23: Imunodetekce Src fosforylovaného na Tyr 416 aktivační smyčky. Lyzáty o shodných koncentracích byly po SDS-PAGE přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Po stanovení celkového Src primární protilátkou anti-v-Src(Ab-1) následoval strip membrány a detekce Src fosforylovaného na Tyr 416 primární protilátkou anti-Src pY418 (Tyr 418 lidského proteinu Src odpovídá Tyr 416 u kuřecího homologa).

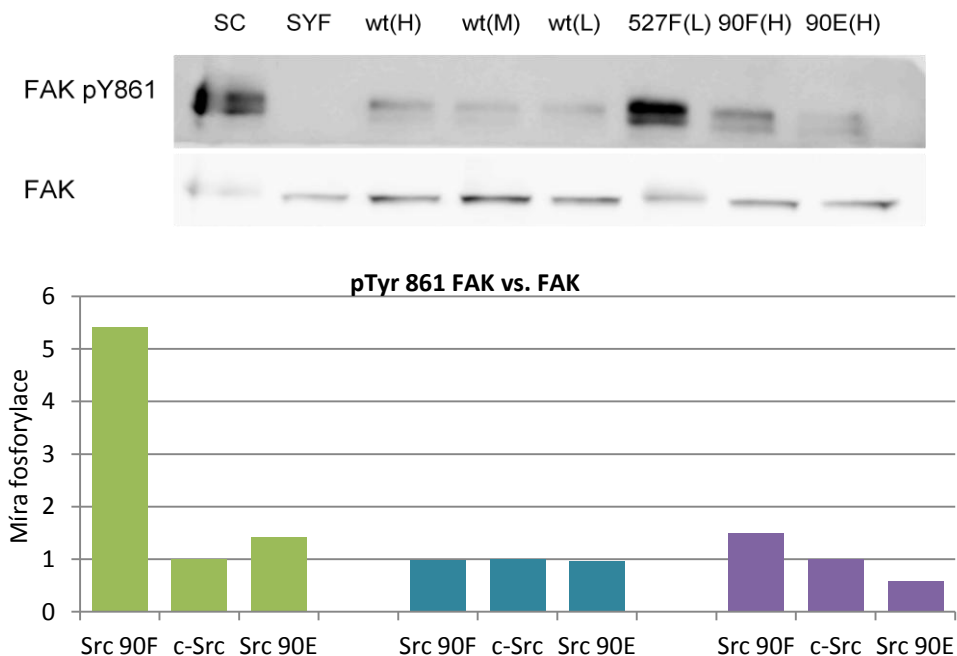
Porovnání míry fosforylace mezi SYF-Src90E(H), SYF-Src90F(H), SYF-c-Src(M) neukázalo žádný signifikantní rozdíl nebo trend. Fosforylace CAS (obr. 24), FAK (obr. 25) a paxillinu (obr. 26) byla v SYF fibroblastech exprimujících Src se záměnou Tyr 90 za fenylyalanin ve většině případů vyšší nebo rovna míře jejich fosforylace v buňkách mající wt c-Src. U SYF linií produkujících Src 90E nebyl zaznamenán žádný významný pokles v obsahu fosfotyrosinů substrátových proteinů. Imunodetekce Src fosforylovaného na Tyr 416 však ukazuje na vyšší kinázovou aktivitu Src 90E.



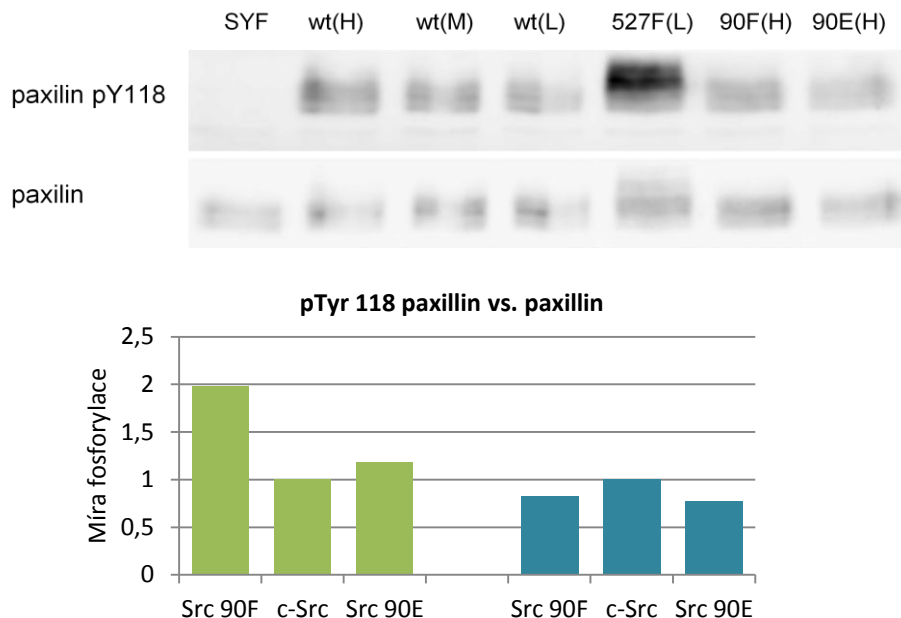
Obr. 24: Fosforylace pTyr 410 CAS. Lyzáty z jednotlivých linií byly upraveny na shodnou koncentraci, rozděleny SDS PAGE a přeneseny na membránu. Po imunodetekci pTyr 410



CAS byla membrána stripována a použita ke stanovení celkového množství proteinu CAS. Buňky SC byly použity jako pozitivní kontrola, linie SYF infikované pouze prázdným vektorem pMSCV-IRES-GFP sloužily jako negativní kontrola. Graf znázorňuje míru fosforylace Tyr 410 CAS vypočtenou jako podíl fosforylovaného Tyr 410 CAS a celkového CAS. Experiment byl proveden ve 3 nezávislých opakováních, které jsou v grafu odlišeny různými barvami. Obdobným způsobem byla získána i data pro FAK a paxillin.



Obr. 25: Míra fosforylace Tyr 861 FAK.



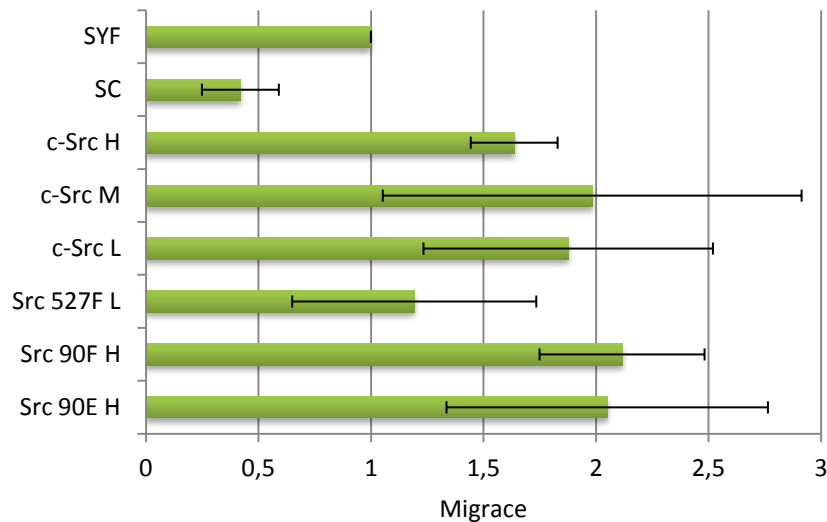
Obr. 26: Míra fosforylace Tyr 118 paxillinu.

#### **4.2.4 Analýza migračních schopností buněk linií SYF exprimujících varianty Src**

Kináza Src je jednou z klíčových molekul buněčné migrace, která se účastní její regulace na mnoha úrovních a v několika různých kontextech. Kromě toho, že zprostředkovává přenos signálu z aktivovaných integrinů, tak se účastní například regulace kontraktility, dynamiky fokálních adhezí, tvorby membránových výběžku či stimuluje produkci proteáz degradujících extracelulární matrix (Playford & Schaller, 2004; Guarino, 2010). Rozhodli jsme se proto otestovat, jaký vliv bude mít exprese některé z připravených variant Src na migraci SYF buněk.

Zvoleným přístupem byl „wound-healing“ migrační test. Komůrka o rozměrech 9 mm x 9 mm x 5 mm tvořená dvěma částmi oddělenými přepážkou o šířce 500  $\mu\text{m}$  (Ibidi, Německo) byla přichycena na dno kultivační misky. Do obou částí komůrky bylo pipetováno 70  $\mu\text{l}$  DMEM média obsahující 70 000 buněk. Přibližně po 16 hod. vytvořily buňky souvislou vrstvu. Komůrka byla následně sňata, čímž vznikla definovaná mezera, do níž buňky migrovaly. Migrace byla vyhodnocována po 3 hod. od sejmutí komůrky pomocí mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-S (objektiv 4x/HMC). Migrace byla stanovena jako rozdíl velikostí mezer ihned po odstranění komůrky a následně po 3 hodinách. Obsah plochy mezery byl určen pomocí programu ImageJ (NIH).

Byla vyhodnocována data ze 3 nezávislých opakování. Ačkoli trend byl podobný, údaje získané jednotlivými experimenty se lišily, což je příčinou velkých odchylek ve výsledném výnosu (obr. 27). Migrace buněk exprimujících fosfomimikující a nefosforylovatelnou mutantu (Src 90E a Src 90F) byla mírně vyšší než migrace fibroblastů s wt c-Src (SYF c-Src M), přičemž SYF 90F migrovaly nejrychleji. Konstitutivně aktivní Src 527F (buňky SC a SYF Src 527F L) nebo výrazná nadprodukce wt c-Src způsobovala sníženou migraci buněk



Obr. 27: Migrace buněk SYF linií exprimujících varianty Src. Byla stanovena jako rozdíl plochy mezery, do níž buňky migrovali, v čase 0 hod. (po odstranění komůrky) a 3 hod. a vztahena k migraci SYF fibroblastů nesoucí pouze prázdný konstrukt bez src.

#### 4.2.5 Test buněk SYF linií exprimujících varianty Src na schopnost růstu nezávisle na podkladu

Deregulované a tedy aktivnější formy kinázy Src jsou schopny způsobovat transformaci buněk, která se mimo jiné projevuje schopností růstu nezávisle na ukotvení k podkladu. Rozhodli jsme se tento fenomén testovat i na našich SYF liniích a to metodou kultivace buněk v měkkém 0,4% agaru. Transformované fibroblasty jsou schopny v těchto podmínkách růst a dělit se. Po přibližně 10 dnech lze pak v agaru pozorovat kolonie, jenž vznikly dělením původní transformované buňky. Netransformované fibroblasty umírají.

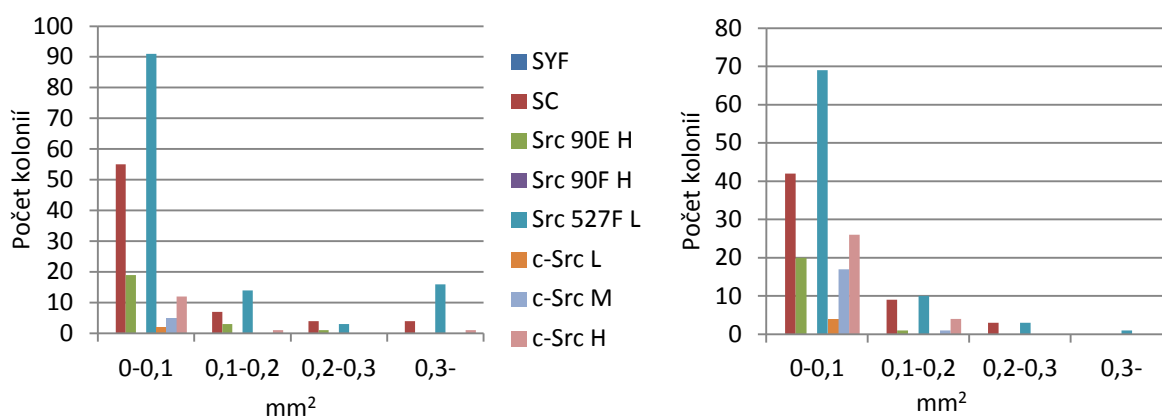
Dno jamek v 6jamkové destičce bylo pokryto 0,8% podkladovým agarem, který byl připraven ze zásobního 1,6% agaru a 2krát koncentrovaného DMEM. Na něj byl pipetován 0,4% agar, v němž bylo resuspendováno 2000 buněk. Po zatuhnutí byl agar převrstven médiem DMEM. Po 14 dnech kultivace v termostatu byly jednotlivé jamky naskenovány s rozlišením 1200 dpi a snímky byly vyhodnoceny pomocí programu NIS-Elements. Pro každou jamku (obsahující jednu ze SYF linií) byl stanoven počet kolonií o daném rozmezí velikostí.

Ačkoli se toto množství pro daný typ buněk poměrně lišilo, porovnáme-li jednotlivé nezávislé experimenty (obr. 28), tak tvar distribuce byl ve všech třech opakováních shodný. SYF fibroblasty exprimující konstitutivně aktivní Src 527F tvořily největší počet kolonií. Na miskách se SYF buňkami, jenž nesou pouze prázdný expresní konstrukt, nevznikaly žádné

kolonie. Obdobně se chovala i linie SYF-*Src*90F. Buňky produkující fosfomimikující mutantu *Src* 90E byly schopny růst v agaru lépe než SYF-*c-Src*(M), což spolu s vyšší kinázovou aktivitou této varianty indikuje částečný transformační potenciál *Src* 90E.

mm <sup>2</sup>	0-0,1	0,1-0,2	0,2-0,3	0,3-
SYF	0	0	0	0
SC	55	7	4	4
90E	19	3	1	0
90F	0	0	0	0
527F	91	14	3	16
<i>c-Src</i> L	2	0	0	0
<i>c-Src</i> M	5	0	0	0
<i>c-Src</i> H	12	1	0	1

mm <sup>2</sup>	0-0,1	0,1-0,2	0,2-0,3	0,3-
SYF	0	0	0	0
SC	42	9	3	0
90E	20	1	0	0
90F	0	0	0	0
527F	69	10	3	1
<i>c-Src</i> L	4	0	0	0
<i>c-Src</i> M	17	1	0	0
<i>c-Src</i> H	26	4	0	0



Obr. 28: Distribuce kolonií dané SYF linie v závislosti na velikosti. V 0,4% agaru bylo kultivováno 2000 buněk od každé linie. Po 14 dnech byl experiment vyhodnocen. Pomocí programu NIS-Elements byl v každé misce stanoven počet kolonií o daném rozmezí velikostí. Na obrázku je uvedena tabulka a odpovídající graf této distribuce pro 2 ze 3 nezávislých opakování.

## 5. Diskuse

---

I přes to, že kináza Src je nejstarší objevený onkogen a její výzkum započal už v 70. letech 20. století, zůstává stále mnoho otázek týkajících se jejího působení a funkce nezodpovězeno; a to i tak základních, jakou je její aktivace a regulace katalytické aktivity. Ačkoli struktura inaktivní formy Src (Xu *et al.*, 1997; 1999) je známa již z konce 90. let, to, jak vypadá resp. vypadají její aktivní konformace či přechod mezi jednotlivými stavy, ještě není uspokojivě objasněno.

Byla vykrytalizována aktivní forma Src v komplexu s inhibítoem, u níž došlo k přerušení vazby mezi C-koncovým segmentem a SH2 doménou, ale zůstávají zachovány interakce mezi CD linkerem, SH3 doménou a N-terminálním lalokem kinázové domény (Cowan-Jacob *et al.*, 2005). Další práce nicméně naznačují, že tato struktura nebude jedinou možnou aktivní konformací.

Studie využívající metodu SAXS ukázala, že v roztoku existuje jedna inaktivní forma Src odpovídající krystalické struktuře, ale více aktivních forem (Bernadó *et al.*, 2008). Mutační studie RT- a n-Src smyček dokumentují vliv interakce SH3 domény a N-koncového laloku katalytické domény, jejíž inhibice substitucí klíčových aminokyselinových zbytků vede k dalšímu zvýšení kinázové aktivity již SH2-aktivovaného Src (Brábek *et al.*, 2002). Experimenty provedené zejména na kináze Hck nasvědčují tomu, že inhibiční intramolekulární interakce zprostředkované SH3 a SH2 doménami mohou regulovat katalytickou aktivitu nezávisle na sobě (Murphy *et al.*, 1993; Lerner & Smithgall, 2002; Lerner *et al.*, 2005). Studium tyrosinů SH3 domény a jejich fosforylací ukázalo, že aktivita proteintyrosinkinázy může rovněž záviset na fosforylačním statusu jejich SH3 domén (Park *et al.*, 1996; Meyn *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008).

Při analýze fosfoproteomu myších embryonálních fibroblastů transformovaných kinázou Src a normálních netransformovaných MEF (Luo *et al.*, 2008), kterého se účastnila i naše laboratoř, byl v SH3 doméně Src objeven nový aminokyselinový zbytek, který může být *in vivo* fosforylován. Jedná se o Tyr 90, jenž se nachází na vazebném povrchu SH3 domény a pomáhá tvořit první hydrofobní kapsu pro prolin ligandů nesoucí motiv PxxP (Erpel *et al.*, 1995). V SH3 doménách je to výrazně konzervovaná aminokyselina. Homologní tyrosiny dalších proteinů jsou nejčastěji fosforylovanými místy v rámci SH3 domén (Tatárová *et al.*, 2012). Lokalizace Tyr 90 na jedné z klíčových pozic interakčního povrchu SH3 domény Src

naznačuje, že modifikace jeho hydroxylové skupiny fosfátem a následná změna sterických a elektrostatických vlastností vazebného místa SH3 domény, může ovlivnit její schopnost asociovat s ligandy. To může mít za následek jak oslabení intramolekulární inhibiční vazby s CD linkerem, tak preferenci asociovat s odlišným spektrem proteinů, což může vést k aktivaci jiných signálních drah či změně lokalizace.

Cílem výzkumu fosfotyrosinu na pozici 90, ke kterému se snaží přispět i tato práce, je tedy zjistit, zda má tato modifikace pro buňku nějaký fyziologický význam, jaké regulace je důsledkem a ke kterým procesům následně vede. Pro zamýšlené experimenty byly připraveny mutantní formy Src, z nichž jedna nese na pozici 90 nefosforylovatelný fenylalanin. U druhé mutanty byl tyrosin nahrazen zbytkem kyseliny glutamové, jenž se standardně používá jako substituent fosfotyrosinu.

První metodou, kterou jsme se rozhodli použít, byla exprese wt c-Src a jeho mutantních forem Src 90E, Src 90F a Src 527F v kvasinkách *Schizosaccharomyces pombe*. Tato metodika byla etablována prof. Superti-Furgou (Superti-Furga *et al.*, 1993) a má značný význam v kontextu studia kinázy Src. Mimo jiné odhalila regulační funkci SH3 a SH2 domén (Superti-Furga *et al.*, 1993), ukázala význam konzervovaných aminokyselinových zbytků vazebného povrchu SH3 domény (Erpel *et al.*, 1995) či pomohla objevit úlohu SH3-SH2 linkeru v inaktivaci Src (Young *et al.*, 2001). Podstata této techniky spočívá ve faktu, že exprese kinázy Src v kvasinkách *S. pombe* inhibuje růst kultury a způsobuje výraznou tyrosinou fosforylací endogenních proteinů. Tento fenotyp je potlačen současnou produkcí Src a Csk (Superti-Furga *et al.*, 1993), která Src inhibuje fosforylací jeho C-koncového Tyr 527. Csk však není schopna inhibovaný růstový projev kvasinkových buněk kompenzovat, pokud exprimovaná varianta Src nese mutaci sekvence či struktury, která se podílí na regulaci katalytické aktivity kinázy. Takto lze tedy identifikovat složky regulačních mechanismů kinázy Src.

Byly vytvořeny expresní konstrukty pJR2-3XU-c-src90E, pJR2-3XU-c-src90F, pJR2-3XU-c-src, pJR2-3XU-c-src527F, kterými byly transformovány buňky *S. pombe* kmene PN559. Část populace vzniklých klonů byla dále transformována vektorem pART-csk. Vznikly tak 2 sady klonů, z nichž jedna exprimovala pouze Src varianty a ve druhé mělo navíc docházet k proteosyntéze Csk. Přítomnost Src byla potvrzena ve všech klonech. Imunologická detekce však neprokázala expresi Csk. Vzhledem k tomu, že použitá primární protilátka anti-Csk detekovala tento protein velmi slabě i kontrolním lyzátem z SC buněk, se značnou pravděpodobností tento fakt způsobila špatná protilátka.

Jelikož katalytická aktivita Src koreluje s mírou fosforylace tyrosinu v aktivační smyčce kinázové domény (Boerner *et al.*, 1996), bylo na aktivitu jednotlivých variant usuzováno z poměru množství detekovaného fosfotyrosinu 416 a celkového Src. V souladu s předchozím výzkumem v naší laboratoři (Gerndtová, 2008) bylo zjištěno, že míra fosforylace Tyr 416 fosfomimikující varianty Src 90E je 2,8krát vyšší než u nemutovaného c-Src. Záměna Tyr 90 za glutamát respektive modifikace hydroxylové skupiny tyrosinu fosfátem zavádí do převážně hydrofobního vazebného povrchu SH3 domény záporný náboj a mění jeho sterické vlastnosti, což pravděpodobně způsobí zeslabení interakce s CD linkerem a jeho disociaci. Dojde k porušení inhibičního působení „svorkového mechanismu“ regulačních domén, změna polohy CD linkeru a SH3 domény je přenesena na strukturní komponenty N-koncového laloku, což oboje vede k iniciaci katalytické aktivity (Xu *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Cowan-Jacob *et al.*, 2005).

Míra fosforylace Tyr 416 varianty Src 90F je oproti wt c-Src zvýšena jen slabě. Koexprese Src s Csk neměla na jednotlivé formy Src téměř žádný vliv. Jediným významným rozdílem bylo poněkud zvláštní zvýšení obsahu fosfotyrosinu 416 u konstitutivně aktivní formy Src 527F v přítomnosti Csk oproti původnímu stavu bez Csk. To nás znovu přivedlo k otázce, zda v buňkách k expresi Csk vůbec dochází.

I z toho důvodu byl stanoven fosfotyrosinový profil jednotlivých klonů. Buňky produkující pouze různé varianty Src se manifestovaly uniformním profilem s vysokou, nicméně přibližně shodnou, fosforylací endogenních proteinů. Kvasinky, u nichž mělo docházet zároveň k proteosyntéze Csk, vykazovaly rozdílné distribuce fosforylovaných proteinů v závislosti na míře aktivace přítomné varianty Src. Klony Src90E+Csk a Src527F+Csk se rozložením pruhů na imunoblotu přibližně shodovaly s buňkami exprimujícími pouze Src. U lyzátů z Src90F+Csk a c-Src+Csk byla patrná určitá míra redukce fosforylace endogenních proteinů. Rovněž bylo možno v oblasti odpovídající 60 kDa identifikovat výraznější pruh, jež odpovídal kináze Src. V porovnání s obdobným pruhem u Src90E+Csk či Src527F+Csk byl posunut mírně dolů, což souhlasí s pozorováním, že inaktivní forma Src migruje při SDS-PAGE rychleji než aktivní konformace. Lze proto říci, že k produkci Csk, i přes nemožnost její přímé detekce, s nejvyšší pravděpodobností dochází. Míra její exprese je však zřejmě velmi nízká a není tudíž schopna plně potlačit aktivaci zprostředkovanou přítomností nefosforylovaného C-koncového tyrosinu 527.

Měření růstových křivek jednotlivých kultur a vypočtení jejich generační doby potvrdilo a dále zpřesnilo získané výsledky. Doba zdvojení buněk nesoucích aktivnější formy Src (Src90E, Src527F) byla přibližně o 1 hod. delší, než jakou vykazovaly klony Src90F a c-Src.

Současná exprese Src variant a pravděpodobně kinázy Csk vedla ke zvýšení růstové rychlosti všech klonů vyjma Src527F+Csk, jenž má cílový inhibiční tyrosin 527 nahrazen za nefosforylovatelný fenylalanin. Pokles délky generační doby kvasinek Src90E+Csk oproti Src90E indikuje částečnou inaktivaci Src90E v přítomnosti Csk.

Imunologická detekce celkového Src v lyzátech klonů dokumentuje, že pozorované změny v rychlosti růstu jednotlivých kultur nejsou výsledkem vyšší nebo nižší exprese Src. Zajímavým faktem nicméně je, že aktivnější mutanty Src (Src 90E, Src 527F) se v kvasinkách vyskytují v menší míře než katalyticky více reprimované formy Src 90F a c-Src. Kvasinky tudíž vykazují vyšší tendenci nějakým mechanismem degradovat aktivované konformace Src či utlumit jejich expresi. Jako pravděpodobná se jeví možnost snižování počtu kopií expresního konstruktů, kdy se buňky snaží najít kompromis, který by vedl k co nejnižší produkci toxického Src, ale přitom dostatečné expresi z *ura4<sup>+</sup>* genu.

Podářilo se nám tedy vytvořit systém založený na expresi Src a Csk v *S. pombe*, který je schopen detekovat změny v aktivitě kinázy Src. V porovnání s původní metodou publikovanou prof. Superti-Furgou (Superti-Furga *et al.*, 1993) se však v některých ohledech liší. V jejich uspořádání produkce wt c-Src či jakýkoliv mutantních forem kinázy (s neporušenou katalytickou aktivitou) vedla vždy k inhibici růstu kultury, který byl popsán téměř shodnými růstovými křivkami pro všechny varianty Src. Rozdíly v aktivačním působení jednotlivých mutací se projevily až s koexpresí s Csk. V našem systému oproti tomu došlo k manifestaci odchylek mezi jednotlivými variantami Src už v buňkách transformovaných pouze *src* konstrukty.

Možným vysvětlením by mohlo být použití rozdílného kmene *S. pombe* či expresního vektoru. Podobně jako v původním uspořádání jsme pro produkci Src využili *nmt1* promotor, nicméně se nejednalo o shodné plasmidy. V námi připraveném konstruktů byl jako selekční marker použit *ura4<sup>+</sup>*. Vektor prof. Superti-Furgy místo toho nesl gen *LEU2*, který je v kompenzaci auxotrofie kvasinek méně účinnější než *ura4<sup>+</sup>* a musí být tudíž v buňkách přítomen ve větším počtu kopií než plasmid s uracilovým markerem (Moreno *et al.*, 2000). Dochází proto k vyšší produkci Src, jenž pravděpodobně může zastřít rozdíly mezi různě aktivními formami kinázy.

Problémem obou systémů je však nerovnoměrná exprese Src a Csk v rámci kvasinkové populace. Počet kopií vektorů nesoucí geny pro tyto proteiny se v jednotlivých buňkách výrazně liší, čímž vznikají různé poměry mezi množstvím Src variant a Csk, což následně ovlivňuje viabilitu jedinců. Řešením by zřejmě bylo neexprimovat proteiny episomálně, ale integrovat konstrukty s kódujícími sekvencemi Src a Csk přímo do genomu *S. pombe*.



I přes to lze říci, že tyrosin 90 a jeho fosforylaci můžeme považovat za další komponentu souboru mechanismů, které se podílejí na regulaci aktivity Src a udržování její inaktivní konformace.

Exprese Src v kvasinkovém systému je vhodný nástroj pro studium regulace aktivity kinázy. Nemá však žádnou vypovídající hodnotu o její biologické funkci. Abychom zjistili, zda fosforylace Tyr 90 nějakým způsobem ovlivňuje signalizaci zprostředkovanou kinázou Src a má tak význam pro fyziologii buněk, rozhodli jsme se exprimovat mutantní formy Src se substituovaným tyrosinem 90 v linii SYF (*src* *-/-* *yes* *-/-* *fyn* *-/-*).

SYF fibroblasty byly transfekovány pomocí retrovirové infekce konstrukty pMSCV-IRES-GFP nesoucími kódující sekvence pro c-Src a mutantní formy Src 90E, Src 90F a Src527F. Pro následné experimenty bylo potřeba zajistit, aby jednotlivé SYF linie obsahovaly stejná množství Src. Na základě GFP signálu byla tedy každá linie sortována na 3 buněčné populace s nízkou (L), střední (M) a vysokou (H) mírou exprese. Pomocí imunologické detekce byly vybrány linie se shodnou hladinou Src (Src 90E(H), Src 90F(H), c-Src (M), Src 527F (L)). Stanovení fosfotyrosinu 416 v lyzátech SYF buněk ukázalo, že Src 90E má vyšší kinázovou aktivitu než c-Src, ale nižší než konstitutivně aktivní Src 527F, což souhlasí s předchozími dosaženými výsledky.

Následně byla ověřována schopnost mutantních forem SH3 domén Src interagovat se svými proteinovými substráty. Tento experiment byl založen na stanovení míry fosforylace vazebných partnerů SH3 domény. Konkrétně se jednalo o proteiny integrinové signalizace CAS, FAK a paxillin. Pokles fosforylace těchto substrátů kinázy Src u buněk exprimujících fosfomimikující mutantu Src 90E by byl důkazem snížené schopnosti SH3 domény asociovat se jmenovanými ligandy.

Stanovovaný poměr denzit pruhů odpovídajících fosforylované variantě a celkovému proteinu v lyzátech z buněk SYF-Src 90E neukázal ani u jednoho ze zkoumaných interakčních partnerů SH3 domény signifikantní změnu v obsahu fosfotyrosinů v porovnání s fibroblasty produkujícími wt c-Src. Vazebné studie s GST-fúzanými variantami SH3 domén mutovanými na pozici 90 však naznačily, že substituce tyrosinu 90 za glutamát vede k inhibici vazby proteinů CAS, FAK a paxillin (Sztacho, 2009), což je poněkud v rozporu s právě získanými výsledky. Nabízí se několik možných vysvětlení. Fosfomimikující mutantu Src 90E má vyšší kinázovou aktivitu než wt c-Src, a proto by měla být vyšší i míra fosforylace jejích substrátů. Pokud tedy pozorujeme v obou případech přibližně shodou fosforylaci vazebných partnerů Src, lze předpokládat, že k oslabení

interakce mezi SH3 doménou a jejími proteinovými ligandy opravdu došlo. Další fenomen, který pravděpodobně ovlivnil výsledek experimentu, je schopnost Src interagovat s proteiny CAS a paxillin přímo nebo je fosforylovat prostřednictvím vazby na kinázu FAK.

V odpověď na adhezi zprostředkovanou integriny dojde k fosforylaci Tyr 397 FAK (Schlaepfer *et al.*, 1994; Schaller *et al.*, 1994). Na fosfotyrosin 397 se svojí SH2 doménou váže Src, přičemž interakce obou proteinů je dále stabilizována vazbou SH3 domény Src na motiv RALPSIPKL (aminokyseliny 368 – 376) kinázy FAK (Thomas *et al.*, 1998). Tím dojde k přechodu Src do plně aktivovaného stavu a následné fosforylaci tyrosinů 407, 576, 577, 861 a 925, které jsou nezbytné pro maximální katalytickou aktivitu FAK. Takto aktivovaný komplex obou kináz potom fosforyluje řadu substrátových proteinů včetně CAS a paxilinu (shrnuto v Hanks *et al.*, 2003). Kromě skutečnosti, že může být CAS fosforylován prostřednictvím přímé interakce Src s jeho Src-vazebnou doménou, je schopen se svojí SH3 doménou vázat na FAK. Src, jenž spolu s FAK tvoří aktivní komplex, CAS fosforyluje. Oba dva způsoby probíhají v buňkách *in vivo*, nicméně fosforylace prostřednictvím komplexu Src-FAK vykazuje vyšší efektivitu (Ruest *et al.*, 2001). Obdobně dochází i k fosforylaci paxillinu. Vazebné studie *in vitro* potvrdily přímou interakci paxillinu s SH3 doménou Src. *In vivo* se však na jeho fosforylaci podílí asociace s kinázou FAK a na ní dokovaným Src (Weng *et al.*, 1993; Hanks *et al.*, 2003). Pokud by tedy zůstala zachována interakce FAK s Src 90E, nemuselo by se snížení afinity SH3 (Y90E) domény k proteinům CAS či paxillin vůbec projevit poklesem jejich fosforylace.

Deregulované a tedy aktivnější formy Src jsou schopny indukovat buněčnou transformaci. Jednou z charakteristik těchto buněk jsou abnormální růstové vlastnosti, které se mimo jiné projevují zvýšenou mírou proliferace, ztrátou kontaktní inhibice a schopností růstu nezávisle na ukotvení k podkladu. Zkusili jsme tento fenomén otestovat na našich SYF liniích exprimujících varianty Src a to metodou kultivace fibroblastů v 0,4% agaru. Transformované buňky dokáží růst i v tomto prostředí, normální fibroblasty však nikoli.

Linie SYF exprimující fosfomimikující mutantu Src 90E tvořily v agaru kolonie ve větším množství i velikosti než SYF buňky nesoucí c-Src (nicméně méně než SYF fibroblasty s konstitutivně aktivní formou Src 527F). Lze tedy soudit, že Src s fosfomimikující mutací 90E vykazuje částečný transformační potenciál. Určitý počet kolonií vznikl i v miskách, kde byly vysety SYF linie s plně regulovaným wt c-Src. Bylo to pravděpodobně způsobeno vysokou nadprodukcí kinázy, kterou nebyly schopny buněčné inhibiční mechanismy plně kontrolovat. SYF fibroblasty, které byly infikovány prázdným expresním vektorem a obdobně i SYF buňky obsahující nefosforylovatelnou mutantu Src90F netvořily žádné kolonie. U linie

SYF-Src90F to bylo poněkud překvapivé zjištění, protože se předpokládalo, že se bude chovat podobně jako buňky produkující wt c-Src. Záměna tyrosinu 90 za nepolární fenylalanin zřejmě zvýšila hydrofobicitu vazebného povrchu SH3 domény, čím mohlo dojít k zesílení interakce s CD linkerem a těsnější inhibici kinázy doprovázenou sníženou přístupností SH3 domény pro její proteinové ligandy.

Ačkoli jsme u buněk exprimujících Src 90E zaznamenali zvýšenou schopnost proliferovat v agaru, jejich transformační potenciál zřejmě nebude tak vysoký, jak by odpovídalo kinázové aktivitě glutamátové mutanty Src. Experimenty s GST-fúzovanou SH3 doménou ukázaly, že záměna Tyr 90 za kyselinu glutamovou inhibuje její asociaci s transkripčním faktorem STAT3 (Sztacho, 2009), což je klíčová molekula mitogenní signalizace zprostředkované cytokiny a růstovými faktory. STAT3 aktivovaný fosforylací Src translokuje do jádra a indukuje expresi transkripčního faktoru c-Myc a dalších mediátorů průchodu buněčným cyklem (Bowman *et al.*, 2001). Při aberantní signalizaci může tato signální dráha vést k nekontrolovanému buněčnému růstu a právě Src-transformované fibroblasty vykazují zvýšenou tyrosinovou fosforylací STAT3. Bylo dokumentováno, že STAT3 je jedna z klíčových molekul buněčné transformace indukované kinázou Src (Bromberg *et al.*, 1998; Turkson *et al.*, 1998). Jak ukazují studie na kináze Hck, pro aktivaci tohoto transkripčního faktoru je nezbytná funkční SH3 doména (Schreiner *et al.*, 2002). Inhibice asociace STAT3 s SH3 doménou Src, ke které by mohlo dojít díky substituci Tyr 90 za glutamát, by mohla potlačit signalizaci uvedenou mitogenní dráhou. Pozorovaný částečný transformační potenciál Src 90E by tak pravděpodobně byl z velké části důsledkem jiných signálních drah; například MEK/ERK signalizace (shrnuto v Frame, 2002). Vzhledem k tomu, že neschopnost glutamátové mutanty SH3 domény Src vázat STAT3 byla pozorována pouze v *in vitro* systému s izolovanou SH3 doménou, bylo by zajímavé ověřit tuto interakci *in vivo*.

Lze tedy shrnout, že přítomnost fosfátu na Tyr 90 kinázy Src oslabuje interakci mezi SH3 doménou a CD linkerem, což vede k částečné aktivaci katalytické aktivity. Aberantní fosforylace tohoto tyrosinu může způsobit deregulaci kinázové aktivity a indukovat transformaci buněk.

## 6. Shrnutí

---

- Byly připraveny plasmidové konstrukty pro expresi Src 90E, Src 90F, Src 527F, wt c-Src a Csk v kvasinkách *S. pombe*. Rovněž byly vytvořeny vektory obsahující kódující sekvence *src 90E*, *src 90F*, *src 527F* a *wt c-src* pro retrovirální transfekci SYF buněk.
- Kvasinky *S. pombe* byly transformovány expresními konstrukty nesoucími *csk* a varianty *src*. Vznikly tak 2 sady klonů, z nichž jedna produkovala pouze jednotlivé formy Src a ve druhé docházelo navíc k proteosyntéze Csk (pravděpodobně). Tyto sady tvoří expresní systém (již dříve etablovaný prof. Superti-Furgou (Superti-Furga *et al.*, 1993)), podle kterého lze na základě růstových křivek kvasinkových kultur stanovit kinázovou aktivitu produkovaných variant Src
- Z růstových rychlostí jednotlivých kultur získaných pomocí uvedené metody a z míry fosforylace Tyr 416 v aktivační smyčce katalytické domény Src, jež koreluje s její kinázovou aktivitou vyplývá, že Src s fosfomimikující substitucí tyrosinu 90 za glutamát (Src 90E) vykazuje vyšší katalytickou aktivitu než nemutovaný c-Src.
- Retrovirální transfekcí SYF buněk a jejich následným sortováním byly vytvořeny fibroblasty stabilně exprimující Src 90E, Src 90F, Src 527F a wt c-Src. Od každé linie existují 3 populace buněk lišící se mírou exprese dané varianty Src.
- Vliv aminokyselinových substitucí Tyr 90 v SH3 doméně Src na její asociaci s interakčními partnery byl stanovován na základě změny výše fosforylace proteinů CAS, FAK a paxillin, která byla imunologicky detekována z lyzátů SYF linií. Experimenty neprokázaly, že u SYF linie nesoucí fosfomimikující mutantu Src 90E dochází k výrazné změně fosforylace CAS, FAK a paxillinu v porovnání s buňkami obsahujícími wt c-Src. Kinázová aktivita Src 90E je však oproti wt c-Src vyšší. Srovnatelné hodnoty fosforylace interakčních partnerů SH3 domény v obou liniích proto neznamenají, že glutamátová substituce Tyr 90 nevede k poklesu afinity k těmto ligandům.
- Schopnost migrace linií SYF exprimujících Src 90E, Src 90F či wt c-Src se nikterak významně neliší.
- Test, zda jsou SYF buňky nesoucí varianty Src schopny růst nezávisle na ukotvení ukázal, že Src 90E vykazuje určitý transformační potenciál.

## 7. Seznam literatury

---

- Azam M, Latek RR & Daley GQ (2003). Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112: 831–43.
- Bähler J & Pringle JR (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes & development* 12: 1356–70.
- 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. *Journal of molecular biology* 376: 492–505.
- Bjorge JD, Jakymiw a & Fujita DJ (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19: 5620–35.
- 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.
- Boggon TJ & Eck MJ (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23: 7918–27.
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA & Jove R (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7319–24.
- Brábek J, Constancio SS, Shin N-Y, Pozzi A, Weaver AM & Hanks SK (2004). CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene* 23: 7406–15.
- Brábek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin N-Y, Pozzi A & Hanks SK (2005). Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Molecular cancer research : MCR* 3: 307–15.
- 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. *Biochemical and biophysical research communications* 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. *Journal of molecular biology* 353: 222–31.
- Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW & Darnell JE (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Molecular and cellular biology* 18: 2553–8.
- 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.
- Brugge JS & Erikson RL (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 269: 346–8.
- 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. *Molecular and cellular biology* 20: 5865–78.
- Buss JE & Sefton BM (1985). Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *Journal of virology* 53: 7–12.
- Cepko C & Pear W (2001). Overview of the retrovirus transduction system. *Current protocols in molecular biology* Chapter 9: Unit 9.9.]
- Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G & Baltimore D (1992). Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science (New York, N.Y.)* 257: 803–6.
- Collett MS, Brugge JS & Erikson RL (1978). Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product. *Cell* 15: 1363–9.
- Collett MS & Erikson RL (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 2021–4.
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA & Hunter T (1986). Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science (New York, N.Y.)* 231: 1431–4.
- Courtneidge SA, Dhand R, Pilat D, Twamley GM, Waterfield MD & Roussel MF (1993). Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *The EMBO journal* 12: 943–50.
- 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. *Molecular and cellular biology* 5: 2753–63.
- Cowan-Jacob SW (2006). Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 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 (London, England : 1993)* 13: 861–71.
- Decottignies A, Sanchez-Perez I & Nurse P (2003). Schizosaccharomyces pombe essential genes: a pilot study. *Genome research* 13: 399–406.
- Defilippi P, Di Stefano P & Cabodi S (2006). p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in cell biology* 16: 257–63.
- Dorai T, Levy JB, Kang L, Brugge JS & Wang LH (1991). Analysis of cDNAs of the proto-oncogene c-src: heterogeneity in 5' exons and possible mechanism for the genesis of the 3' end of v-src. *Molecular and cellular biology* 11: 4165–76.
- Eck MJ, Shoelson SE & Harrison SC (1993). Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck. *Nature* 362: 87–91.
- Eckhart W, Hutchinson MA & Hunter T (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18: 925–33.
- 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. *The EMBO journal* 14: 963–75.
- Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA & Schreiber SL (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science (New York, N.Y.)* 266: 1241–7.
- Feng S, Kasahara C, Rickles RJ & Schreiber SL (1995). Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 12408–15.
- Frame MC (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* 1602: 114–30.
- Garber EA, Cross FR & Hanafusa H (1985). Processing of p60v-src to its myristylated membrane-bound form. *Molecular and cellular biology* 5: 2781–8.
- Gartner A, Nasmyth K & Ammerer G (1992). Signal transduction in Saccharomyces cerevisiae requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes & development* 6: 1280–92.
- Gerndtová Z (2008). Role tyrozínu 90 v regulaci kinázové aktivity a onkogenních vlastností kinázy Src
- Gonfloni S, Weijland A, Kretschmar J & Superti-Furga G (2000). Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. *Nature structural biology* 7: 281–6.

- 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. *The EMBO journal* 16: 7261–71.
- Guarino M (2010). Src signaling in cancer invasion. *Journal of cellular physiology* 223: 14–26.
- Hanks SK, Ryzhova L, Shin N-Y & Brábek J (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8: d982–96.
- Hantschel O, Nagar B, Guettler S, Kretzschmar J, Dorey K, Kuriyan J & Superti-Furga G (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112: 845–57.
- Hantschel O & Superti-Furga G (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5: 33–44.
- Huang H, Zhao R, Dickson BM, Skeel RD & Post CB (2012).  $\alpha$ C helix as a switch in the conformational transition of Src/CDK-like kinase domains. *The journal of physical chemistry. B* 116: 4465–75.
- Hubbard SR (1998). Autoregulatory Mechanisms in Protein-tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 273: 11987–11990.
- Hunter T & Sefton BM (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 1311–5.
- Chen S, O'Reilly LP, Smithgall TE & Engen JR (2008). Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions within the c-Abl kinase core. *Journal of molecular biology* 383: 414–23.
- Chong Y-P, Chan AS, Chan K-C, Williamson NA, Lerner EC, Smithgall TE, Bjorge JD, Fujita DJ, Purcell AW, Scholz G, Mulhern TD & Cheng H-C (2006). C-terminal Src kinase-homologous kinase (CHK), a unique inhibitor inactivating multiple active conformations of Src family tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 281: 32988–99.
- Iba H, Takeya T, Cross FR, Hanafusa T & Hanafusa H (1984). Rous sarcoma virus variants that carry the cellular src gene instead of the viral src gene cannot transform chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 4424–8.
- Janoštiak R, Tolde O, Brůhová Z, Novotný M, Hanks SK, Rösel D & Brábek J (2011). Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness. *Molecular biology of the cell* 22: 4256–67.
- Johnson LN, Noble ME. & Owen DJ (1996). Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* 85: 149–158.



- Kaplan JM, Mardon G, Bishop JM & Varmus HE (1988). The first seven amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristylation signal: lysine 7 is a critical determinant. *Molecular and cellular biology* 8: 2435–41.
- Kato JY, Takeya T, Grandori C, Iba H, Levy JB & Hanafusa H (1986). Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Molecular and cellular biology* 6: 4155–60.
- Kay BK, Williamson MP & Sudol M (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 231–41.
- Kinsella TM & Nolan GP (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Human gene therapy* 7: 1405–13.
- Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA & Soriano P (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO journal* 18: 2459–71.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS & Sowadski JM (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* 253: 407–14.
- 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.
- Landgren E, Blume-Jensen P, Courtneidge SA & Claesson-Welsh L (1995). Fibroblast growth factor receptor-1 regulation of Src family kinases. *Oncogene* 10: 2027–35.
- Lee CH, Leung B, Lemmon MA, Zheng J, Cowburn D, Kuriyan J & Saksela K (1995). A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *The EMBO journal* 14: 5006–15.
- Lerner EC & Smithgall TE (2002). SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nature structural biology* 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. *The Journal of biological chemistry* 280: 40832–7.
- Levinson AD, Oppermann H, Levintow L, Varmus HE & Bishop JM (1978). Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* 15: 561–72.
- 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.

- Li R (1997). Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 136: 649–58.
- Luo W, Slebos RJ, Hill S, Li M, Brábek J, Amanchy R, Chaerkady R, Pandey A, Ham A-JL & Hanks SK (2008). Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *Journal of proteome research* 7: 3447–60.
- Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W & Huang XY (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102: 635–46.
- Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC & Parsons SJ (1995). Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 6981–5.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T & Sudarsanam S (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 514–520.
- Martin GS (2001). The hunting of the Src. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2: 467–75.
- Mayer BJ (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of cell science* 114: 1253–63.
- Mayer BJ, Hamaguchi M & Hanafusa H (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332: 272–5.
- McLeod M, Stein M & Beach D (1987). The product of the mei3+ gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. *The EMBO journal* 6: 729–36.
- Meyn MA, 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. *The Journal of biological chemistry* 281: 30907–16.
- Miyazaki K, Senga T, Matsuda S, Tanaka M, Machida K, Takenouchi Y, Nimura Y & Hamaguchi M (1999). Critical amino acid substitutions in the Src SH3 domain that convert c-Src to be oncogenic. *Biochemical and biophysical research communications* 263: 759–64.
- Moreno MB, Durán A & Ribas JC (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast (Chichester, England)* 16: 861–72.
- Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM & Varmus HE (1989). Mitosis-specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. *Cell* 57: 775–86.
- Morita T & Takegawa K (2004). A simple and efficient procedure for transformation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* 21: 613–7.

- 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. *European journal of immunology* 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*. *Molecular and cellular biology* 13: 5290–300.
- Musacchio A, Gibson T, Lehto VP & Saraste M (1992). SH3-an abundant protein domain in search of a function. *FEBS letters* 307: 55–61.
- Muthuswamy SK, Siegel PM, Dankort DL, Webster MA & Muller WJ (1994). Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Molecular and cellular biology* 14: 735–43.
- Nagar B, Hantschel O, Seeliger M, Davies JM, Weis WI, Superti-Furga G & Kuriyan J (2006). Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Molecular cell* 21: 787–98.
- Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superti-Furga G & Kuriyan J (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112: 859–71.
- Okada M & Nakagawa H (1989). A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *The Journal of biological chemistry* 264: 20886–93.
- Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L & Bishop JM (1979). Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1804–8.
- Osusky M, Taylor SJ & Shalloway D (1995). Autophosphorylation of purified c-Src at its primary negative regulation site. *The Journal of biological chemistry* 270: 25729–32.
- 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.
- Pawson T (1997). New impressions of Src and Hck. *Nature* 385: 582–3, 585.
- Pellman D, Garber EA, Cross FR & Hanafusa H (1985). Fine structural mapping of a critical NH2-terminal region of p60src. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 1623–7.
- Playford MP & Schaller MD (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23: 7928–46.
- Potts WM, Reynolds AB, Lansing TJ & Parsons JT (1988). Activation of pp60c-src transforming potential by mutations altering the structure of an amino terminal domain containing residues 90-95. *Oncogene research* 3: 343–55.

- Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, Wahl MI, Lin S, Kato RM, Fluckiger AC, Witte ON & Kinet JP (1996). Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science (New York, N.Y.)* 271: 822–5.
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P & Baltimore D (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science (New York, N.Y.)* 259: 1157–61.
- Resh MD (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76: 411–3.
- Roskoski R (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and biophysical research communications* 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. *Molecular and cellular biology* 21: 7641–52.
- Shalloway D, Coussens PM & Yaciuk P (1984). Overexpression of the c-src protein does not induce transformation of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7071–5.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR & Parsons JT (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular and cellular biology* 14: 1680–8.
- 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. *Molecular cell* 3: 639–48.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T & van der Geer P (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786–91.
- Schreiner SJ, Schiavone AP & Smithgall TE (2002). Activation of STAT3 by the Src family kinase Hck requires a functional SH3 domain. *The Journal of biological chemistry* 277: 45680–7.
- Sicheri F, Moarefi I & Kuriyan J (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385: 602–9.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S & Lechleider RJ (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767–78.
- Sonnenburg ED, Bilwes A, Hunter T & Noel JP (2003). The structure of the membrane distal phosphatase domain of RPTPalph reveals interdomain flexibility and an SH2 domain interaction region. *Biochemistry* 42: 7904–14.
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM & Vogt PK (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170–3.

- 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. *The EMBO journal* 12: 2625–34.
- Sztacho M (2009). Funkční význam fosforylace tyrozínu 90 SH3 domény proteinu Src.
- Takeya T & Hanafusa H (1983). Structure and sequence of the cellular gene homologous to the RSV src gene and the mechanism for generating the transforming virus. *Cell* 32: 881–890.
- Tanaka A & Fujita DJ (1986). Expression of a molecularly cloned human c-src oncogene by using a replication-competent retroviral vector. *Molecular and cellular biology* 6: 3900–9.
- Tatárová Z, Brábek J, Rösel D & Novotný M (2012). SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution. *PLoS one* 7: e36310.
- Tatosyan a G & Mizenina O (2000). Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry. Biokhimiia* 65: 49–58.
- Taylor SJ, Anafi M, Pawson T & Shalloway D (1995). Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *The Journal of biological chemistry* 270: 10120–4.
- Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White GC & Schaller MD (1998). SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *The Journal of biological chemistry* 273: 577–83.
- Thomas SM & Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology* 13: 513–609.
- Tommasino M & Maundrell K (1991). Uptake of thiamine by *Schizosaccharomyces pombe* and its effect as a transcriptional regulator of thiamine-sensitive genes. *Current genetics* 20: 63–6.
- Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP & Jove R (1998). Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Molecular and cellular biology* 18: 2545–52.
- Ulmer TS, Werner JM & Campbell ID (2002). SH3-SH2 domain orientation in Src kinases: NMR studies of Fyn. *Structure (London, England : 1993)* 10: 901–11.
- Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, Cowburn D, Hanafusa H, Mayer BJ, Overduin M, Resh MD, Rios CB, Silverman L & Kuriyan J (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358: 646–53.
- 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.

- De Weers M, Brouns GS, Hinshelwood S, Kinnon C, Schuurman RK, Hendriks RW & Borst J (1994). B-cell antigen receptor stimulation activates the human Bruton's tyrosine kinase, which is deficient in X-linked agammaglobulinemia. *The Journal of biological chemistry* 269: 23857–60.
- Weng Z, Taylor JA, Turner CE, Brugge JS & Seidel-Dugan C (1993). Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 268: 14956–63.
- Wong S & Witte ON (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annual review of immunology* 22: 247–306.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 273: 5765–70.
- Xu W, Doshi a, Lei M, Eck MJ & Harrison SC (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular cell* 3: 629–38.
- Xu W, Harrison SC & Eck MJ (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385: 595–602.
- Yamaguchi H & Hendrickson WA (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384: 484–9.
- Young M a, 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.
- Yu H, Rosen MK, Shin TB, Seidel-Dugan C, Brugge JS & Schreiber SL (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science (New York, N.Y.)* 258: 1665–8.
- Yu XM, Askalan R, Keil GJ & Salter MW (1997). NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science (New York, N.Y.)* 275: 674–8.