

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra biochemie

**Charakterizace nového
transmembránového
adaptorového proteinu TRAP2
v buňkách lidských leukocytů**

Diplomová práce

Tereza Havlová

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc.

Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů Prof. RNDr. Václava Hořejšího, CSc. a Doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 26. dubna 2006

.....

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	7
1. PŘEDMLUVA	10
2. LITERÁRNÍ ÚVOD	11
2.1 BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU	11
2.2 IMUNORECEPTORY	11
2.2.1 <i>Antigenní receptor T lymfocytů.....</i>	<i>12</i>
2.2.2 <i>Antigenní receptor B lymfocytů</i>	<i>13</i>
2.2.3 <i>Fc-receptory.....</i>	<i>13</i>
2.3 SIGNALIZACE V BUŇKÁCH IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	15
2.3.1 <i>Signalizace přes T buněčný receptor</i>	<i>15</i>
2.3.2 <i>Signalizace přes B buněčný receptor.....</i>	<i>17</i>
2.4 ADAPTOROVÉ PROTEINY	18
2.4.1 <i>Cytoplasmatické adaptorové proteiny</i>	<i>19</i>
2.4.2 <i>Transmembránové adaptorové proteiny.....</i>	<i>21</i>
2.5 MEMBRÁNOVÉ MIKRODOMÉNY A JEJICH PRAVDĚPODOBNÁ ROLE V IMUNORECEPTOROVÉ SIGNALIZACI	24
2.5.1 <i>Plasmatická membrána.....</i>	<i>24</i>
2.5.2 <i>Membránové mikrodomény.....</i>	<i>25</i>
2.5.3 <i>Proteinové komponenty mikrodomén.....</i>	<i>27</i>
2.5.4 <i>Úloha membránových mikrodomén v imunoreceptorové signalizaci.....</i>	<i>28</i>
3. MATERIÁL A METODY.....	29
3.1 MATERIÁL	29
3.1.1 <i>Buněčné linie a bakteriální kmeny.....</i>	<i>29</i>
3.1.2 <i>Enzymy.....</i>	<i>29</i>
3.1.3 <i>Plazmidy, konstrukty a cDNA</i>	<i>30</i>
3.1.4 <i>Oligonukleotidy.....</i>	<i>30</i>
3.1.5 <i>Kultivační média</i>	<i>31</i>
3.1.6 <i>Komerčně dodávané soupravy pro molekulární biologii</i>	<i>31</i>
3.1.7 <i>Chemikálie</i>	<i>32</i>

3.1.8	<i>Protilátky</i>	33
3.1.9	<i>Složení použitých roztoků</i>	34
3.1.10	<i>Ostatní materiál</i>	36
3.1.11	<i>Laboratorní přístroje a zařízení</i>	36
3.2	METODY	38
3.2.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	38
3.2.2	<i>Štěpení DNA restrikčními endonukleázami</i>	39
3.2.3	<i>Defosforylace fragmentů DNA pomocí alkalické fosfatázy</i>	39
3.2.4	<i>Elektroforéza DNA v agarosovém gelu</i>	39
3.2.5	<i>Izolace DNA z agarosového gelu</i>	40
3.2.6	<i>Ligace DNA</i>	40
3.2.7	<i>Transformace DNA do kompetentních bakterií</i>	40
3.2.8	<i>Minipreparativní izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí</i>	41
3.2.9	<i>Minipreparativní izolace plazmidové DNA pomocí komerční soupravy</i>	41
3.2.10	<i>Purifikace plazmidové DNA rovnovážnou centrifugací v gradientu CsCl – EtBr</i>	42
3.2.11	<i>Preparativní izolace velmi čisté plazmidové DNA pomocí komerční soupravy</i>	43
3.2.12	<i>Sekvenování DNA</i>	43
3.2.13	<i>Izolace RNA</i>	43
3.2.14	<i>Reverzní transkripce</i>	43
3.2.15	<i>Kvantitativní real-time PCR (qRT PCR)</i>	44
3.2.16	<i>Exprese rekombinantního proteinu v Escherichia coli</i>	45
3.2.17	<i>Izolace rekombinantního proteinu pomocí nosiče TALONTM</i>	46
3.2.18	<i>Izolace rekombinantního proteinu pomocí nosiče Glutathion SepharoseTM 4B</i>	46
3.2.19	<i>Transfekce buněk pomocí LipofectamineTM 2000 (Invitrogen)</i>	47
3.2.20	<i>Transfekce suspenzních buněk Ramos a Jurkat pomocí komerční soupravy Amaxa</i>	47
3.2.21	<i>Sběr a lýza buněk</i>	47
3.2.22	<i>Ultracentrifugace v sacharosovém gradientu</i>	48
3.2.23	<i>Elektroforetické dělení proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti n-dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)</i>	48

3.2.24	<i>Elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE na nitroceluloseovou nebo PVDF membránu (“Western blotting“)</i>	49
3.2.25	<i>Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue R 250</i>	49
3.2.26	<i>Detekce proteinů imobilizovaných na nitroceluloseové nebo PVDF membráně pomocí specifické protilátky</i>	49
3.2.27	<i>Detekce proteinů se sekvencí „6xHis“ imobilizovaných na nitroceluloseové nebo PVDF membráně pomocí „konjugátu“ peroxidázy s niklem</i>	50
3.2.28	<i>Aktivace buněk peroxovanadičnanem</i>	50
3.2.29	<i>Imunoprecipitace na monoklonální protilátce navázané na Sepharosu 4B</i>	51
3.2.30	<i>Příprava stabilních buněčných klonů</i>	51
3.2.31	<i>Sledování úrovně exprese proteinu v buňkách metodou průtokové cytometrie</i>	52
3.2.32	<i>Imunocytochemické sledování lokalizace proteinu v buněčných strukturách</i>	52
4.	VÝSLEDKY	54
4.1	PŘEDBĚŽNÁ CHARAKTERIZACE PROTEINU TRAP2 POMOCÍ PREDIKČNÍCH METOD	54
4.2	KLONOVÁNÍ TRAP2, PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ A REKOMBINANTNÍHO PROTEINU	60
4.2.1	<i>Získání cDNA kódující protein TRAP2 z lidské leukocytární knihovny a příprava konstruktů TRAP2/pBSK</i>	60
4.2.2	<i>Příprava expresních vektorů TRAP2/pEF-BOS-3 a TRAP2/pEFIRES-N</i>	61
4.2.3	<i>Příprava expresního vektoru TRAP2/pFLAG-CMV-5a</i>	62
4.2.4	<i>Příprava expresních vektorů TRAP2/pET28b a TRAP2/pET42b</i>	63
4.2.5	<i>Příprava rekombinantního proteinu</i>	64
4.3	CHARAKTERIZACE PROTEINU TRAP2 V LEUKOCYTÁRNÍCH BUŇKÁCH	66
4.3.1	<i>Exprese TRAP2 a jeho isoform v leukocytárních buňkách stanovená pomocí qRT PCR</i>	66
4.3.2	<i>Exprese TRAP2 v buněčných liniích</i>	68
4.3.3	<i>Příprava stabilních transfektantů v buňkách Ramos a Jurkat</i>	70
4.3.4	<i>Buněčná lokalizace TRAP2</i>	71
4.3.5	<i>Membránová orientace proteinu TRAP2</i>	73

4.3.6	<i>Distribuce proteinu TRAP2 ve frakcích po ultracentrifugaci v sachorosovém gradientu.....</i>	75
4.3.7	<i>Fosforylace TRAP2 po aktivaci peroxovanadičnanem v buňkách stabilních transfektantů Ramos a Jurkat</i>	76
5.	DISKUSE.....	78
6.	ZÁVĚR	81
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

Seznam použitých symbolů a zkratek

aa	aminokyselina
Amp	ampicilin
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCR	„B-cell receptor“; receptor B lymfocytů pro antigen
C1	„cysteine rich domain“
CAP	cytoplasmatický adaptorový protein
CD	„cluster of differentiation“
DAG	diacylglycerol
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DRMs	„detergent-resistant membranes“
DTT	1,4-dithio-D,L-threitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	„epidermal growth factor“
EGTA	kyselina ethylenglykol-di(aminoethylether)tetraoctová
EST	„expressed sequence tag“
EtBr	ethidium bromid
FcR	receptor pro Fc-část imunoglobulinu
FHA	„forkhead-associated domain“
G-protein	„GTP binding protein“
GAM	„goat anti mouse“ kozí protilátka proti myšímu imunoglobulinu
GAM-Px	kozí protilátka proti myšímu imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GAR-Px	kozí protilátka proti králičímu imunoglobulinu konjugovaná s křenovou peroxidázou
GEMs	„ganglioside-enriched membranes“
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GST	glutathion-S-transferáza
GTT	glutathion

Ig	imunoglobulin
IPTG	isopropylthiogalaktosid
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
ITIM	„immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“
kbp	tisíce párů bází
LB médium	Luria-Bertani médium
LM	n-dodecyl- β -D-maltosid; laurylmaltosid
l_o	„liquid-ordered“
M-CSF	„macrophage colony stimulating factor“
NK	„natural killer“
NP-40	Nonidet P-40
ORF	„open reading frame“, otevřený čtecí rámec
qRT PCR	„quantitative real-time PCR“
PBS	„phosphate-buffered saline“; fyziologický roztok
PBST	PBS s 0,05% obsahem Tween 20
PCR	„polymerase chain reaction“; polymerázová řetězová reakce
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PDZ	„PDS-95 Dlg-A ZO-1 domain“
PH	„pleckstrin homology“
PI3-kináza	fosfatidylinositol-3-kináza
PIP ₂	fosfatidyl inositol 3,4 difosfát
PKA	protein kináza A
PLC γ 1	fosfolipáza C γ 1
PTB	„phosphotyrosine binding domain“
PTK	proteintyrosinkináza
pY	fosfotyrosin
rpm	otáčky za minutu
SDS	„sodium dodecyl sulphate“; n-dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SH	„Src homology“
SIT	„SHP2-interacting transmembrane adaptor protein“
TCR	„T-cell receptor“; receptor T lymfocytů pro antigen
TE	„Tris/EDTA (buffer)“

TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethyldiamin
TNF	„tumor necrosis factor“
TRAP	transmembránový adaptorový protein
Tris	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	jednotka enzymové aktivity

1. Předmluva

Imunitní systém chrání organismus před cizorodými látkami a patogeny, stejně jako před působením vlastních buněk organismu, které se začaly chovat abnormálně. Tato obrana je zajištěna složitým systémem vzájemně spolupracujících buněk a jejich produktů. Pro správné plnění těchto funkcí jsou klíčové mechanismy, kterými spolu buňky navzájem komunikují. Zmíněná problematika je v současné době předmětem intenzivního studia, neboť pochopení způsobu fungování imunitního systému je základní podmínkou pro nalezení terapie řady dosud neléčitelných onemocnění.

V poslední době je stále více zřejmé, že zachycení a přenos signálu do nitra buňky probíhá jako komplexní proces zahrnující celou řadu povrchových i intracelulárních molekul. Důležitou roli hraje organizace povrchových molekul receptorů do více či méně složitých nadmolekulárních struktur. V posledních letech dochází k výrazným změnám v pohledu na stavbu a funkční organizaci buněčné membrány leukocytů. Představu o existenci víceméně homogenní struktury typu tekuté mozaiky postupně nahrazuje model, podle něž v membráně existují oblasti s odlišnou fluiditou. Tyto jakési kompaktnější „ostrůvky“ se od zbytku membrány liší nejen rozdílným zastoupením jednotlivých druhů lipidů, ale též tím, že obsahují pouze některé z membránových proteinů nacházejících se na daném typu buněk. Zdá se, že nejde pouze o odlišnost morfoloickou, ale že existence a odlišné složení těchto mikrodomén hraje výraznou roli v mechanismu signalizace.

Tato práce si kladla za cíl vyklonovat a charakterizovat nový transmembránový adaptorový protein TRAP2, který byl vybrán na základě průzkumu veřejně přístupných databází. Tato část práce byla provedena ve spolupráci s Dr. Janem Pačesem z Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Snažili jsme se vybrat neznámé, dosud necharakterizované proteiny, které by splňovaly následující kritéria: 1) krátká extracelulární část následovaná jednou transmembránovou α -šroubovicí; 2) za transmembránovou oblastí následuje palmitylační motiv CxxC příp. CxC (v jednopísmeném aminokyselinovém kódu, kde x značí jakoukoli aminokyselinu); 3) dlouhá intracelulární oblast obsahující strukturní motivy typické pro adaptorové proteiny, zejména pak tyrosinové fosforylační motivy. Z možných kandidátů byly nakonec vybrány čtyři proteiny, z nichž jeden je předmětem této práce.

2. Literární úvod

2.1 Buňky imunitního systému

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržovat integritu organismu rozpoznáním škodlivého od neškodného a tím organismus chránit před patogeny nebo abnormálními buňkami vlastního těla. Efektorovou částí imunitního systému jsou nejrůznější druhy bílých krvinek (leukocyty). Všechny druhy leukocytů vznikají z pluripotentních kmenových buněk kostní dřeně pod vlivem různých faktorů. Rozlišujeme dvě základní vývojové linie leukocytů: myeloidní a lymfoidní.

Myeloidní buňky jsou charakteristické morfologií jádra a jsou poněkud větší než buňky lymfoidní. Dělí se na monocyty, makrofágy a granulocyty. Podle barvitelnosti histologickými barvivy můžeme granulocyty dále rozdělit na neutrofile, bazofily a eosinofily. Do myeloidní vývojové řady patří také dendritické buňky, hlavní buňky prezentující antigen. Myeloidní buňky tvoří základ tzv. antigenně nespecifické části imunitního systému.

Z lymfoidní linie se diferencují NK buňky, B a T lymfocyty. Jsou to relativně malé buňky s velkým jádrem. B a T lymfocyty (nikoli však NK buňky) nesou na svém povrchu antigenně specifické receptory a tvoří tak základ specifické části imunitního systému.

2.2 Imunoreceptory

Na povrchu leukocytů se nachází celá řada molekul, které zde plní nejrůznější funkce. Důležitou skupinou jsou receptory zajišťující kontakt buňky s okolním prostředím, mezi něž patří i antigenně specifické receptory T a B lymfocytů (TCR a BCR) a Fc receptory myeloidních buněk.

Všechny tři typy imunoreceptorů vykazují podobný organizační princip. Skládají se z části rozpoznávající ligand (antigen) a krátkého intracelulárního řetězce nekovalentě asociovaného s transmembránovou signální podjednotkou (CD3 u TCR, $Ig\alpha\beta$ u BCR, $FcR\gamma$ nebo ζ u Fc-receptorů). Cytoplasmatická doména signálního řetězce obsahuje

tzv. ITAM sekvence („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“). ITAM sekvence, obsahující dva tandemově spojené tyrosiny, jsou konzervované sekvence $Yxx(L/I/V)_x$. $Yxx(L/I/V)$ v jednopísmenném aminokyselinovém kódu, kde x je libovolná aminokyselina. Po vazbě ligandu fosforylují kinázy rodiny Src (Lck, Fyn u T lymfocytů resp. Lyn, Fyn u B lymfocytů) dva tyrosiny v motivu ITAM, což je první krok k zajištění spojení mezi receptorem a intracelulárním signalizačním aparátem. Fosforylované tyrosiny v ITAM se totiž stávají vazebným motivem pro tandemové SH2 domény cytoplasmatických protein-kináz rodiny Syk (Zap-70, Syk), které zahajují další kroky v přenosu signálu [1, 2]. Analogicky existují i ITIM sekvence („immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“) [3, 4], nacházející se např. v intracelulární části molekul CD22 a CD32B [5]. Na rozdíl od ITAM sekvencí váží ITIM sekvence především cytoplasmatické protein-tyrosinfosfatázy obsahující tandemové SH2 domény.

2.2.1 Antigenní receptor T lymfocytů

Rozeznáváme dva druhy T lymfocytů, tzv. α/β (asi 90% z celkového počtu T lidských lymfocytů) a γ/δ T lymfocyty (kolem 10%). Klíčovou strukturou na jejich povrchu, která je zodpovědná za vazbu antigenu je heterodimer dvou transmembránových proteinů α a β u α/β T lymfocytů resp. γ a δ u γ/δ T lymfocytů. Tento heterodimer je nekovalentně asociován s několika řetězci skupiny proteinů souhrně označovaných jako CD3 (viz. Obrázek 1).

Glykoproteiny TCR α a TCR β patří do imunoglobulinové superrodiny, jejich struktura je podobná molekulám imunoglobulinů. N-terminální části jsou variabilní a zodpovídají za vazbu antigenu. V případě α/β T lymfocytů je antigenem peptidový fragment vázaný na molekulu MHC glykoproteinu I. nebo II. třídy, zatímco γ/δ T lymfocyty rozeznávají antigen jako takový. V tomto případě nemusí být antigen peptidové povahy, ale může se jednat i o bakteriální fosfoantigeny a alkylaminy [6].

Pro správné rozpoznání antigenu se musí na povrchu T lymfocytů vedle TCR vyskytovat i koreceptory CD4 resp. CD8. CD4 napomáhají vazbě MHC glykoproteinů II. třídy (tzv. Th lymfocyty z anglického „T helper“) a CD8 komplexy MHC glykoproteinů I. třídy (tzv. Tc lymfocyty z anglického „cytotoxic T lymphocytes“)

Krátké intracelulární řetězce TCR α , β , γ , δ neumožňují přenos signálu do nitra buňky. Vlastní signalizační jednotka je tvořena řetězcí CD3 (γ , δ , ϵ , η , ξ), v jejichž intracelulární části se nachází několik ITAM sekvencí.

2.2.2 Antigenní receptor B lymfocytů

Komplex BCR je tvořen povrchovým imunoglobulinem (zejména třídy IgM a IgD), který je zakotven v membráně pomocí sekvence 20 hydrofobních aminokyselin C-terminální části těžkých řetězců. S membránovým imunoglobulinem je nekovalentně asociován heterodimer dvou transmembránových proteinů CD79 α a CD79 β , které jsou v extracelulární části navzájem spojeny disulfidickou vazbou. Intracelulární část obou molekul obsahuje ITAM sekvence. (viz. Obrázek 1)

Původní představa asociace BCR se dvěma heterodimery CD79 α/β je dnes nahrazována modelem, podle něhož jedna strana těžkého řetězce imunoglobulinu interaguje s molekulou CD79 a druhá strana zprostředkovává oligomerizaci receptoru [7]. Pravá povaha a charakter oligomeru zůstává zatím nejasná.

2.2.3 Fc-receptory

Fc-receptory (FcR) rozeznávají Fc části imunoglobulinů. Jednotlivé Fc-receptory jsou specifické pro různé třídy imunoglobulinů: Fc γ R pro IgG, Fc α R pro IgA, Fc ϵ R pro IgE a Fc μ R pro IgM [8].

Byly popsány tři rozdílné typy lidského Fc γ R: Fc γ RI, Fc γ RII a Fc γ RIII lišící se vazebnou afinitou a specifitou k jednotlivým podtřídám IgG [9]. Všechny Fc γ R patří do imunoglobulinové nadrodiny a kromě Fc γ RIIIb jsou to transmembránové molekuly. Fc γ R (kromě Fc γ RII) ve své intracelulární části postrádají signální motivy a přenos signálu je zajištěn pomocí ITAM sekvence v γ řetězcí, který je s Fc γ R asociován [10].

Fc γ RI (CD64) je glykoprotein, který se váže s vysokou afinitou na monomerní a rovněž na agregovaný IgG. Specificky se váže na lidský IgG1 a IgG3, rovněž je schopen vázat myší imunoglobuliny izotypu IgG2a a IgG3. Fc γ RI je konstitutivně exprimován na

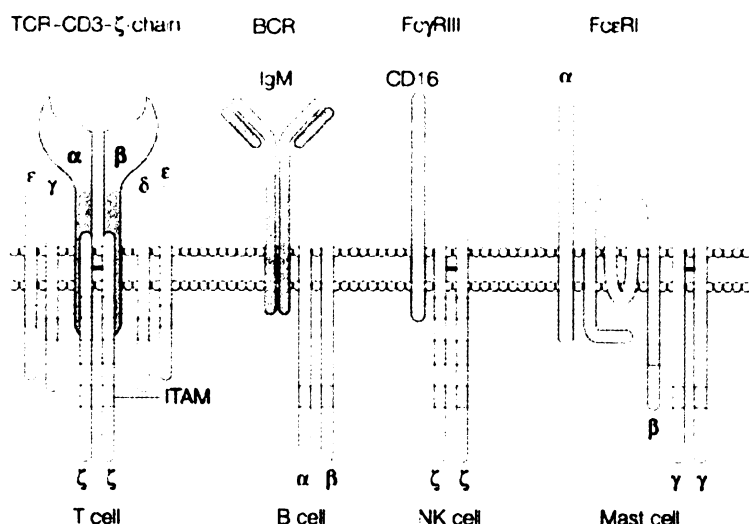
makrofázích. Unikátní vysoká afinita pro IgG je podmíněná přítomností třetí extracelulární imunoglobulinové domény, která nebyla nalezena u FcγRII ani u FcγRIII [11].

FcγRIIa a FcγRIIb (CD32a, b) jsou glykoproteiny sloužící jako nízkoafinní receptory vážící IgG ve formě imunokomplexů, se specifitou pro lidské IgG1 a IgG3; dobře váží také myší IgG2a a IgG2b [12]. Aktivační receptor FcγRIIa je na rozdíl od ostatních FcγR monomerním receptorem, který obsahuje v intracelulární části svého řetězce ITAM sekvenci. FcγRIIb obsahuje naproti tomu inhibiční ITIM sekvenci, slouží jako inhibiční receptor na povrchu B lymfocytů a hraje důležitou roli v prevenci vzniku autoimunitních chorob [13].

FcγRIII (CD16) váží IgG ve formě imunokomplexů se specifitou pro lidské IgG1 a IgG3. Existují dvě formy FcγRIII: transmembránová forma FcγRIIIa, která je asociována s dalšími signálními podjednotkami (γ-řetězec nebo CD3ξ-řetězec) (viz. Obrázek 1) a FcγRIIIb, který je zakotven v membráně pomocí GPI-kotvy [14].

Vysokoafinní IgE receptor FcεRI, je zodpovědný za schopnost mastocytů a bazofilů reagovat proti mnohobuněčným parazitům, ale také za projevy alergií. Receptorový komplex se skládá z podjednotky α, která váže Fc část molekuly IgE, a řetězců β a γ, které zajišťují spojení s intracelulárními signálními molekulami (viz. Obrázek 1).

Na povrchu myeloidních buněk se nachází FcαR, označovaný též jako CD89.



Obrázek 1: Imunoreceptory (převzato z [15]). Imunoreceptory se skládají z části rozpoznávající ligand (antigen) a krátkého intracelulárního řetězce nekovalentě asociovaného s transmembránovou signální podjednotkou (CD3 u TCR, Igαβ u BCR). Cytoplasmatická doména signálního řetězce obsahuje ITAM (nebo ITIM) sekvence.

2.3 Signalizace v buňkách imunitního systému

V buňkách imunitního systému se uplatňují především dva základní typy receptorů: receptory s vlastní enzymovou protein-kinázovou aktivitou (receptory pro cytokiny M-CSF, PDGF, TGF- β) a receptory s přidruženou protein-tyrosinkinázovou aktivitou (BCR, TCR, většina Fc-receptorů a většina cytokinových receptorů). Společným rysem reakcí aktivovaných oběma typy receptorů jsou „signalizační kaskády“, při nichž protein-kináza aktivovaná vazbou ligandu fosforyluje a tím aktivuje další kinázu a ta obdobně aktivuje další atd. až poslední kináza v řadě fosforyluje transkripční faktor. Ten se pak naváže na regulační oblast příslušného genu, čímž umožní transkripci tohoto genu.

Dalším důležitým principem signalizace je využití Ca^{2+} iontů. V cytoplasmě je iontovými pumpami udržována stálá nízká koncentrace Ca^{2+} iontů. V počátečních fázích signalizačních reakcí dochází k vzniku některých látek, tzv. druhých posílů (inositoltrisfosfát), jejichž působením na iontové kanály dochází k výraznému zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytoplasmě. Ca^{2+} se pak váže na některé cytoplasmatické proteiny a tím je aktivuje. (Známým případem je např. vazba na protein calmodulin, která v konečném důsledku vede k aktivaci transkripčního faktoru NF-AT.)

Důležitým rysem receptorů s přidruženou kinázovou aktivitou je, že po navázání ligandu dochází k shlukování (prokřížení) receptorů, které umožní vzájemnou fosforylaci přidružených protein-kináz, což zvýší jejich aktivitu. Takto aktivovaná kináza začne fosforylovat příslušné intracelulární substráty. Působením protein-fosfatáz je pak celý systém uváděn do původního stavu.

2.3.1 Signalizace přes T buněčný receptor

Signalizace přes T buněčný receptor typu $\alpha\beta$ (TCR) je jedním z nejlépe prostudovaných signalizačních dějů imunitního systému. Signál je spuštěn po spojení TCR na povrchu T lymfocytu a příslušného MHC gp s navázaným peptidem na povrchu buňky prezentující antigen (dendritické buňky, makrofágy). Podle standardního modelu dojde poté ke konformačním změnám uvnitř receptorového komplexu (agregaci dvou nebo více receptorových molekul), které vyvolají aktivaci intracelulárně asociovaných PTK Lck a Fyn (rodina Src). Tyto kinázy fosforylují tyrosinové zbytky v ITAM sekvencích řetězců

CD3 [16, 17]. Fosforylované tyrosiny slouží jako vazebná místa pro tandemové SH2 domény cytoplasmatické kinázy Zap-70 (rodina Syk) [18]. Zap-70 je poté aktivována fosforylací tyrosinu v aktivační smyčce kinázové domény Src PTK [19]. Aktivovaná Zap-70 fosforyluje transmembránový adaptorový protein LAT, v jehož sekvenci se nachází 10 tyrosinů. Fosforylace molekuly LAT umožňuje vazbu a tím i translokaci k plasmatické membráně adaptorových proteinů Grb2 a Gads, p85 podjednotky PI3-kinázy a fosfolipázy C γ 1 (PLC γ 1) [20].

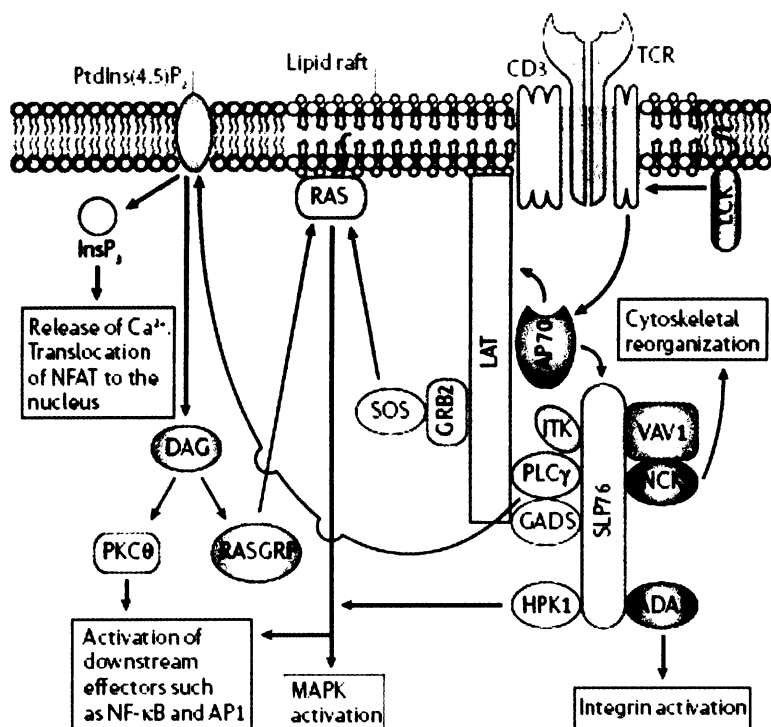
Poté dochází k aktivaci několika signálních drah. První vede přes adaptorový protein Grb2 a výměnný faktor Sos k aktivaci G-proteinu Ras, který spouští tzv. MAPK kinázovou signalizační kaskádu ústící až v aktivaci transkripčního faktoru AP1. Aktivovaný Ras se podílí také na další dráze vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B.

Druhá dráha je zahájena aktivací PLC γ 1, která katalyzuje hydrolyzu membránově vázaného substrátu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PI(4,5)P $_2$) na druhé posly diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP $_3$). Inositol-1,4,5-trisfosfát ovlivňuje cytoplasmatickou koncentraci vápenatých iontů (otevřít kanály v membráně endoplasmatického retikula), diacylglycerol aktivuje několik typů PKC, které fosforylují další cytoplasmatické proteiny. Oba tyto procesy vedou také mimo jiné k regulaci genové exprese.

Třetí kaskáda je spouštěna pomocí adaptorového proteinu Gads, který váže adaptor SLP-76. Po fosforylaci pomocí Zap-70 slouží fosforylované tyrosiny SLP-76 jako vazebná místa pro SH2 domény dalších molekul. Tato cesta vede jak k aktivaci PLC γ 1, tak k reorganizaci cytoskeletu.

Další signalizační dráha je zahajována PI3-kinázou. Tento enzym katalyzuje fosforylaci hydroxylové skupiny v pozici 3 inositolového kruhu fosfatidylinositolfosfátů [21]. Důležitými složkami zmíněné signalizační dráhy je tudíž řada lipidů z této skupiny. Na produkty reakce katalyzované PI3-kinázou se váží PLC γ 1 a PTK Itk a Tec přes svou PH doménu.

Koordinované působení enzymů, adaptorových proteinů a druhých poslů vede ke zvýšené aktivitě transkripčních faktorů NF-AT, AP-1 a NF- κ B a k expresi nových proteinů jako např. CD69, CD25 a interleukin-2 [22]. Výše popsané signalizační děje zjednodušeně shrnuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Signalizace přes TCR (převzato z [23]). Signalizace je zahájena fosforylací ITAM sekvencí v řetězci CD3 a aktivací kinázy Zap-70. Zap-70 následně fosforyluje tyrosiny adaptorového proteinu LAT. Fosforylace LAT umožňuje vazbu dalších cytoplasmatických proteinů a propagaci signálu do nitra buňky. Konečným důsledkem je změna aktivity transkripčních faktorů NF-κB, AP-1 a NF-AT.

2.3.2 Signalizace přes B buněčný receptor

Průběh signalizace přes BCR je do značné míry analogický jako u T buněčného receptoru. V současné době existují tři hlavní modely vysvětlující průběh raných fází signalizace BCR. Podle prvního modelu dochází po navázání antigenu k prokřížení jednotlivých BCR na povrchu B lymfocytu, což nějakým dosud neznámým mechanismem vede k aktivaci PTK rodiny Src a k následné fosforylaci ITAM sekvencí v molekule CD79α/β [24]. Druhý model předpokládá existenci předem vytvořených multimerů BCR, u kterých dochází po vazbě antigenu k reorganizaci ústící v zahájení signalizace fosforylací ITAM [7]. V tomto modelu je tedy multimer BCR preasociován s PTK rodiny Src. U nestimulovaných buněk je tento komplex navíc asociován i s fosfatázou SHP-1 [25], která slouží jako negativní regulátor signalizace; vazba antigenu vyvolá buď inaktivaci nebo uvolnění SHP-1 z multimeru BCR [26]. Třetí model vysvětluje počáteční fáze translokací BCR do tzv. membránových mikrodomén (viz. 2.5.4.).

Na fosforylované ITAM sekvence se pomocí svých tandemových SH2 domén váže PTK Syk. Následující průběh signalizace se větví do několika odlišných drah principiálně podobných jako u TCR (PLC γ 2, Ras/MAPK, PI3-kináza) [26].

Významnou roli v signalizaci pomocí BCR hrají též některé další molekuly, někdy souhrnně označované jako tzv. pomocné receptory BCR: komplex CD19-CD21-CD81 (váže molekulu C3d, což je degradační produkt jedné ze součástí komplementové kaskády), CD22 (váže sacharidové struktury glykoproteinů obsahující zbytky kyseliny sialové), CD32b (neboli Fc γ RIIb; váže Fc části imunoglobulinů třídy IgG). Vazba ligandů na tyto receptory a jejich případné prokřížení s BCR, jde-li o ligand společný, vede k pozitivnímu (v případě komplexu CD19-CD21-CD81) nebo negativnímu (v případě CD22 nebo CD32) ovlivnění signalizace v B lymfocytech prostřednictvím protein-tyrosinkináz, protein-tyrosinfosfatáz a adaptorových proteinů asociovaných s intracelulárními oblastmi zmíněných receptorů [27].

2.4 Adaptorové proteiny

Adaptorové proteiny hrají důležitou roli v integraci a propagaci signálu vedoucí až k aktivaci lymfocytů. Lze je definovat jako proteiny postrádající vlastní enzymatickou nebo transkripční aktivitu, které však zprostředkovávají nejrůznější protein-proteinové nebo protein-lipidové interakce. Ve své struktuře obsahují nejrůznější vazebné domény (SH2, SH3, PTB, PH, PDZ atd.) nebo jen tyrosinové fosforylační motivy. Pomocí těchto vazebných motivů vytváří adaptorové proteiny jakési lešení signalizačních drah. Zprostředkovávají tvorbu a organizaci makromolekulárních signalizačních komplexů v různých signalizačních kaskádách. Zároveň tím přispívají k selektivnímu rozdělení signalizačních a efektorových molekul do jednotlivých buněčných kompartmentů, a umožňují tak asociaci těchto molekul s jejich substráty [15]. Působí tedy i jako významné regulátory signalizačních dějů.

Některé adaptorové proteiny jsou exprimovány ve všech typech buněk (např. Shc, Grb2), zatímco exprese jiných je omezena jen na specifické tkáně nebo buněčné typy (např. LIME, exprese v T a B lymfocytech a NK buňkách). Podle buněčné lokalizace

můžeme adaptorové proteiny rozdělit na cytoplasmatické (CAP) a transmembránové (TRAP) [28].

2.4.1 Cytoplasmatické adaptorové proteiny

Cytoplasmatické adaptorové proteiny jsou rozpustné intracelulární proteiny, pro které je charakteristická přítomnost různých modulárních domén a sekvenčně konzervovaných motivů, jakými jsou např. tyrosinové fosforylační motivy. Tyrosinové fosforylační motivy tvoří krátká peptidová sekvence s tyrosinovým zbytkem, která po fosforylaci tyrosinu zprostředkovává vysoce afinní interakce s proteiny nesoucími domény SH2 nebo PTB. Specifita těchto interakcí je určována bezprostředním aminokyselinovým okolím daného tyrosinu.

Modulární vazebné domény jsou obvykle tvořeny 40-150 aminokyselinovými zbytky a zprostředkovávají konstitutivní nebo indukibilní mezimolekulové interakce nezbytné pro signalizaci [29]. Podobnými vazebnými doménami jsou vybaveny též mnohé enzymy, které je používají k regulaci vlastní enzymové aktivity nebo intracelulární lokalizaci.

V následujícím přehledě jsou uvedeny některé důležité vazebné domény zprostředkovávající kontakt mezi intracelulárními proteiny, příp. mezi proteiny a lipidy.

SH2 doména (Src homology 2) [30, 31]

SH2 doména, tvořena přibližně 100 aa, rozpoznává sekvence obsahující fosfotyrosin. Specifitu vazby určuje C-terminální okolí tohoto fosfotyrosinu. SH2 doména je tvořena centrálním anti-paralelním β -skládaným listem umístěným mezi dvěma α -helixy. Fosfotyrosin se váže do pozitivně nabitě prohlubně obsahující argininový zbytek na jedné straně β -skládaného listu.

SH3 doména (Src homology 3) [32]

se váže na sekvence bohaté na prolin, které vytvářejí levotočivou prolinovou šroubovici typu II. Většina SH3 domén rozeznává sekvenci „ Φ Px Φ P“ (v jednopísmenném aminokyselinovém kódu, kde „x“ značí jakoukoli aa, „ Φ “ hydrofobní aa). Ukazuje se, že i okolí této sekvence je pro vazbu ligandu důležité, často se např. vyskytují sekvence

„ΦP_xΦP_x+“ (kde „+“ značí basickou aa, často R). Existují však i případy, kdy se SH3 doména váže na sekvenci, která prolin vůbec neobsahuje. Afinita takové interakce je obvykle nižší.

PTB doména (phosphotyrosine-binding) [31, 33, 34]

PTB domény se skládají ze 100 - 170 aa a podobně jako SH2 domény rozpoznávají fosfotyrosin. Na rozdíl od SH2 domén je specifita vazby určena N-terminálním okolím tohoto fosfo-tyrosinu. Zpravidla se jedná o sekvenci NP_xY, i když jsou popsány i případy, kdy PTB doména váže sekvenci neobsahující fosfotyrosin. PTB domény jsou strukturně příbuzné PH doménám. Skládají se z β-sandwiche obsahujícího dva téměř kolmé, antiparalelní β-skládané listy na jednom konci uzavřené C-koncovým α-helixem.

PH (pleckstrin-homology) doména [35]

PH doména se skládá ze 100 - 120 aa. Vazbou na membránové fosfoinositoly, jako je fosfatidyl-inositol(PI)-4,5-bisfosfát, PI-3,4-bisfosfát nebo PI-3,4,5-trisfosfát, zprostředkovává cytoplasmatickým proteinům s PH doménou translokaci k vnitřní straně plasmatické membrány, kde tyto lipidy vznikají působením PI-kináz. C-konec některých PH domén může vázat i podjednotky G_{βγ} heterotrimerních G-proteinů. Struktura je obdobná jako u PTB domén. Vazebné místo tvořené pozitivně nabitými aminokyselinami se nachází ve variabilních smyčkách spojujících jednotlivé β listy.

WW doména [36, 37]

WW domény jsou nejmenší přirozeně se vyskytující proteinové modulární domény skládající se z pouhých 40 aa. Jejich jméno je odvozeno od dvou konzervovaných tryptofanů (W), které odděluje sekvence 20-22 aa. WW domény rozpoznávají oblasti bohaté na prolin a strukturou vytváří stabilní β skládané listy. Dosud byly popsány čtyři skupiny WW domén. I. třída rozpoznává sekvence PP_xY, tato vazba je silně inhibována fosforylací tyrosinu. II. třída se váže na sekvenci PPLP, III. třída rozpoznává prolinové sekvence obsahující arginin a IV. třída rozpoznávající S/TP je pozitivně regulována fosforylací na S/T.

PDZ doména [38]

Název „PDZ“ je akronym složený z počátečních písmen proteinů, u nichž byla tato doména poprvé popsána. Jedná se o sekvenci přibližně 90 aa, která váže 4-5 C-terminálních aminokyselin určitých proteinů (zejména iontových kanálů a transmembránových receptorů). Podle typu vazebného ligandu rozlišujeme tři třídy PDZ domén. Na C-konci proteinu se vždy nachází hydrofobní zbytek (často valin nebo isoleucin). Zbytky na pozicích -2 a -3 určují vazebnou specifitu. I. třída PDZ domén má na této pozici serin nebo threonin (xS/TxΦ), II. třída hydrofobní aminokyselinu (xΦxΦ) a III. třída preferuje negativně nabitou aminokyselinu (xD/ExΦ).

C1 doména [39]

C1 doména se skládá z 50 aa a je bohatá na cysteiny. Struktura je tvořena pěti krátkými β skládanými listy, krátkým α-helixem a dvěma zinkovými ionty. Pomocí C1 domény interagují proteiny s diacylglycerolem a estery forbolu v plasmatické membráně. Funkčně je tedy příbuzná PH doméně a stejně jako ona zprostředkovává relokizaci proteinu k membráně.

2.4.2 Transmembránové adaptorové proteiny

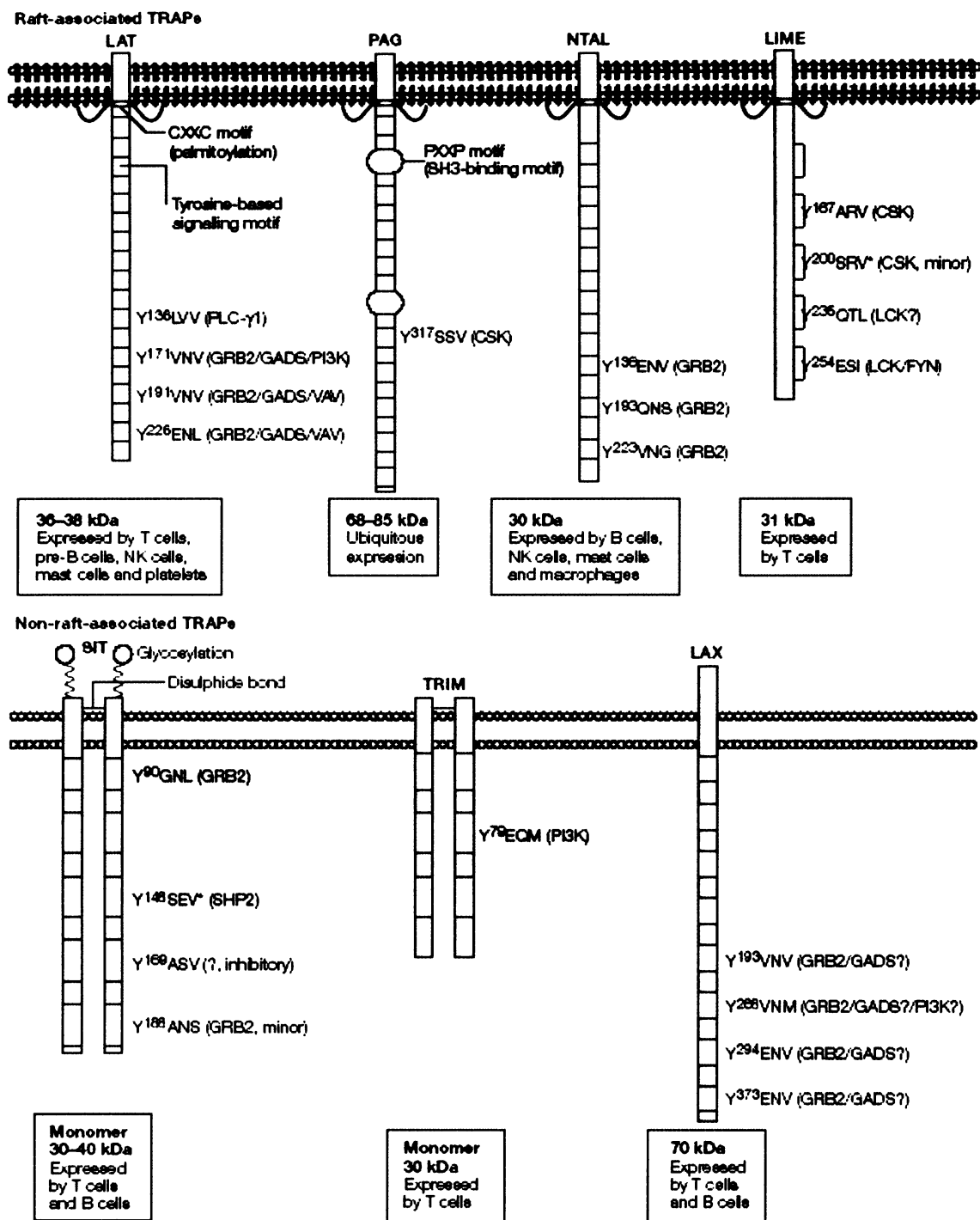
Transmembránové adaptorové proteiny jsou unikátní skupinou adaptorů lokalizovaných v plasmatické membráně. Všechny doposud identifikované TRAP vykazují obdobné strukturní rysy. Skládají se z krátké extracelulární domény, následované jednoduchou transmembránou α-šroubovicí a relativně dlouhou cytoplasmatickou doménou [40]. V intracelulární části těchto proteinů nenacházíme klasické strukturní domény známé z cytoplasmatických adaptorů jako je např. SH2, SH3, WW apod. Místo toho se v jejich sekvenci objevují tyrosinové signalizační motivy, na které se po fosforylaci Src, Syk nebo Tec kinázami váží SH2 domény cytoplasmatických proteinů. Dále často obsahují sekvence bohaté na prolin stejně jako místa Ser/Thr fosforylace [28]. TRAP jsou proteiny typické především pro buňky imunitního systému. Výjimku tvoří protein PAG, který je exprimovaný i v jiných typech buněk jako jsou např. fibroblasty nebo neurony.

Transmembránové adaptory můžeme dále rozdělit do tří skupin. Nejlépe prostudovanými TRAP jsou signalizační podjednotky antigeně specifických receptorů a

dalších příbuzných receptorů. Do této skupiny patří např. ζ řetězec TCR, γ řetězec Fc receptorů nebo DAP10 a DAP12 asociované s některými receptory myeloidních a NK buněk. Tato skupina se od ostatních TRAP odlišuje také přítomností aktivační ITAM sekvence, přítomné v jejich cytoplasmatické části.

Druhou skupinou jsou nepalmytylované TRAP: SIT („SHP2-interacting transmembrane adaptor protein“) [41], TRIM („T cell receptor interacting molecule“) [42] a LAX („linker for activation of X cells“, kde X znamená dosud neidentifikovaných buněk) [43], které hrají roli v regulaci T a B receptorové signalizace (viz Obrázek 3). SIT a TRIM se od ostatních adaptorů navíc odlišují tvorbou homodimerů, spojených disulfidickým můstkem. SIT je jako jediný N-glykosylován v extracelulární části. Význam stejně jako potenciální ligand této postranlační modifikace není doposud znám.

Poslední skupinu tvoří palmytylované TRAP. Všechny řadíme mezi transmembránové proteiny typu III (bez signální sekvence), u nichž N-konec směřuje do extracelulárního prostředí (viz. Obrázek 3). Patří sem LAT („linker for activation of T cells“) [44], PAG/Cbp („phosphoprotein associated with GEMs/Csk binding protein“) [45, 46], NTAL/LAB („non-T cell activation linker/linker for activation of B cells“) [47, 48], LIME („Lck interacting molecule“) [49, 50]. Pro jejich strukturu je typické, že za transmembránovou částí následuje sekvence CxxC, která je palmytylovaná a napomáhá tak umístění proteinu do tzv. membránových mikrodomén (viz. 3.5.3). V současné době se vede diskuse o skutečném významu umístění těchto proteinů do membránových mikrodomén. Signalizace v T lymfocytech obsahujících palmytylační mutant proteinu LAT, který měl oba důležité cysteiny změněny na alaniny, a tudíž se nevyskytoval v mikrodoménách, byla silně poškozena [51]. V nedávné době ale stejná skupina autorů vytvořila chimera LAT, kde extracelulární a transmembránová část včetně palmytylačního motivu byla nahrazena stejným úsekem z proteinu LAX. Tento konstrukt je LAT funkčně velmi podobný, ačkoli se nenachází v membránových mikrodoménách (definovaných rezistencí k detergentům a flotací v hustotním gradientu) [52]. Vysvětlením těchto rozporuplných výsledků se v současné době naše laboratoř intenzivně zabývá.



Obrázek 3: Přehled transmembránových adaptorových proteinů (převzato z [15]). Obrázek znázorňuje sedm dosud identifikovaných transmembránových adaptorových proteinů, jejich tyrosinové vazebné motivy, molekulové hmotnosti a výskyt v buňkách imunitního systému.

2.5 Membránové mikrodomény a jejich pravděpodobná role v imunoreceptorové signalizaci

2.5.1 Plasmatická membrána

Plasmatická membrána je dvojitá vrstva lipidů, která ohraničuje vnitřní prostor buňky, zajišťuje kontakt a komunikaci s okolním prostředím a také transport látek ven a dovnitř buňky. Základní stavební složkou biomembrán jsou fosfolipidy, sfingolipidy a steroidy, amfipatické molekuly s nepolárními alifatickými řetězci a polárními konci. Hydrofobní efekt a van der Waalsovské interakce způsobují ve vodném prostředí spontánní asociaci hydrofobních uhlovodíkových řetězců za tvorby dvojvrstvy, kde polární konce směřují do vodného prostředí.

Hlavní lipidovou složkou membrán jsou fosfolipidy (fosfoacylglyceroly), odvozené od glycerol-3-fosfátu. Prekurzorem fosfolipidů je kyselina fosfatidová, která vzniká esterifikací glycerolu dvěma mastnými kyselinami (v poloze 1 je zpravidla vázána nasycená mastná kyselina, v poloze 2 nenasycená) a kyselinou fosforečnou. Jednotlivé fosfolipidy se liší molekulou vázanou fosfoesterovou vazbou na kyselinu fosfatidovou (ethanolamin, cholin, serin, inositol, glycerol, atd.).

Druhou nejvíce zastoupenou skupinou lipidů v biomembránách jsou sfingolipidy, deriváty aminoalkoholů sfingosinu a dihydrosfingosinu. Mastná kyselina se na molekulu sfingosinu váže amidovou vazbou a vzniklá sloučenina, která je základem pro všechny sfingolipidy, se nazývá ceramid. Rozlišujeme dvě základní skupiny sfingolipidů: sfingomyeliny, nesoucí fosforylcholinový nebo fosforylethanolaminový základ, a cerebrosidy, jejichž polární skupina obsahuje zbytek jednoduchého cukru.

Součástí biomembrán jsou také steroly, především pak cholesterol. Cholesterol je významnou složkou živočišných plasmatických membrán. Jeho polární OH-skupina v poloze 3 mu poskytuje slabý amfifilní charakter, zatímco jeho steroidní skelet mu zaručuje větší rigiditu, než mají ostatní membránové lipidy. Cholesterol je tudíž důležitou látkou určující vlastnosti membrán.

Plasmatická membrána není tvořena pouze lipidy, ale též proteiny a sacharidy. Množství proteinů v eukaryotických membránách souvisí s funkcí membrány a hmotnostní poměr vůči lipidům se pohybuje v rozmezí 1:4 až 3:1. Membránové proteiny lze rozdělit

do dvou kategorií – integrální a periferní. Integrální proteiny jsou přímou součástí membrány. Transmembránové proteiny procházejí napříč lipidovou dvojvrstvou, tato část proteinu je tvořena sekvencí 20 – 30 hydrofobních aminokyselin. Některé membránové proteiny však transmembránovou doménu nemají a k membráně jsou přichyceny pomocí neproteinové struktury, jako je např. hydrofobní prenylový řetězec, kyselina palmitová, kyselina myristová, jejichž navázání na protein je podmíněné přítomností specifických vazebných motivů v proteinové sekvenci. S vnější vrstvou lipidové dvojvrstvy se některé proteiny asociují též pomocí glykolipidu glykosylfosfatidylinositolu (GPI), který se váže na specifickou hydrofobní sekvenci na C-konci těchto proteinů. Periferní proteiny nejsou přímo zanořeny do lipidové dvojvrstvy, ale interagují s membránou nepřímo, vazbou na integrální membránové proteiny nebo nekovalentními interakcemi s polárními částmi lipidů.

Obsah sacharidů, které jsou přítomny ve formě glykoproteinů nebo glykolipidů, představuje 0,5 – 10 % hmotnosti membrány. Uspořádání sacharidů v rámci plasmatické membrány je asymetrické – nacházejí se pouze v extracelulární části lipidové dvojvrstvy.

2.5.2 Membránové mikrodomény

První představu o uspořádání biomembrán navrhli Nicholson a Singer v roce 1972, model vešel ve známost jako fluidní mozaikový model. Cytoplasmatickou membránu představuje jako relativně homogenní lipidovou dvojnou vrstvu, ve které se volně pohybují molekuly proteinů [53]. Řada poznatků získaných v posledních letech však tento model významným způsobem modifikuje. Cytoplasmatická membrána se spíše skládá z několika typů funkčně specializovaných, více či méně vzájemně oddělených „mikrodomén“ obsahujících specifické proteiny a lipidy, které spolu navzájem komunikují prostřednictvím asociovaných molekul, a které jsou též schopny „dialogu“ se složkami signalizačního aparátu a v neposlední řadě s buněčným cytoskeletem. Význačným typem těchto mikrodomén jsou ty, které jsou díky svému specifickému lipidovému složení částečně odolné proti solubilizaci některými detergenty za nízké teploty a dají se proto poměrně snadno izolovat. Tyto oblasti fungují jako jakési předpřipravené signalizační platformy a hrají též roli v polarizaci epiteliálních buněk.[22, 54-57]

Částečná nejednotnost v terminologii odráží variabilitu metodických přístupů, kterými byly studovány jednotlivé aspekty struktury a funkce těchto mikrodomén. V anglické literatuře se nejčastěji vyskytují označení: „membrane rafts“, „lipid rafts“, GEMs („ganglioside-enriched membranes“), GPI-microdomains („glycosylphosphatidylinositol-microdomains“), „DIGs (detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched domains“) a DRMs („detergent-resistant membranes“) [58-60]. Protože v české literatuře nebyla dosud zavedena jednotná terminologie budou tyto domény v této práci nadále zjednodušeně nazývány membránové mikrodomény.

Membránové mikrodomény jsou specializované „ostrůvky“ uvnitř plasmatické membrány, které mají odlišné lipidové složení od okolní glycerolfosfolipidové dvojvrstvy, jejich hlavní lipidovou složku tvoří (glyko)sfingolipidy, sfingomyelin a cholesterol [61]. Sfingolipidy jsou na rozdíl od fosfolipidů esterifikovány nasycenými mastnými kyselinami, což jim v přítomnosti cholesterolu umožňuje spontánní těsnou asociaci do tzv. uspořádané tekuté fáze („liquid-ordered phase“, l_o). Typickou vlastností l_o fáze je vysoký stupeň uspořádání acylových zbytků (podobně jako v tzv. „gel like“ fázi), přičemž si jednotlivé komponenty zachovávají značnou laterální a rotační pohyblivost [62, 63].

Tyto skutečnosti jsou pravděpodobně zodpovědné za základní vlastnost membránových mikrodomén: odolnost vůči solubilizaci v některých neiontových detergentech polyoxyethylenového typu (Triton X-100, NP-40, Brij-98) při 0-4°C [64]. Odtud pochází jejich označení DIGs a DRMs, protože převážná část buněčných fosfolipidů se za těchto podmínek rozpouští. Vzhledem k vysokému obsahu lipidů mají mikrodomény nízkou hustotu a je možné je posléze izolovat ze směsi buněčného materiálu pomocí ultracentrifugace v hustotním sacharosovém gradientu [65]. Proteiny, které se za těchto podmínek asociují s mikrodomény, jsou potom považovány za jejich integrální součást. Přesná definice proteinů, které jsou ještě součástí mikrodomén a které již ne, je poměrně obtížná, protože závisí na typu použitého detergentu a podmínek, za jakých byla izolace provedena [66, 67].

Způsob izolace mikrodomén, za přítomnosti detergentu při teplotě okolo 4°C, s sebou přináší i možnost vzniku různých experimentálních artefaktů. Nicméně v poslední době bylo ukázáno, že mikrodomény existují i za fyziologických podmínek [55, 56]:

- Detergent Brij 98 zachovává membránové mikrodomény dokonce při 37°C, což alespoň částečně vyvrací námitku, že solubilizace při nízkých teplotách ve skutečnosti

způsobuje fázový přechod dávající vznik nerozpustným protein-lipidovým komplexům [68].

- Při studiu modelových membrán bylo zjištěno, že struktury nápadně podobné membránovým mikrodoménám mají tendenci se formovat spontánně pravděpodobně díky vytvoření tzv. uspořádané tekuté fáze [69-71].

- Existence proteinů a lipidů preferujících oblasti membrán bohaté na cholesterol byly potvrzeny i dalšími metodami jako FRET („fluorescence resonance energy transfer“) [72], SPT („single particle tracking“) [73], FRAP („fluorescence recovery after photobleaching“) [74]. Tyto techniky (umožňující rozlišení v řádech nm) také odhalily skutečnost, že velikost membránových mikrodomén se pohybuje od několika nm až po stovky nm v závislosti na typu buněk a použité metodě.

2.5.3 Proteinové komponenty mikrodomén

Lokalizace proteinů v membránových mikrodoménách je podmíněna jejich afinitou k tomuto uspořádanému prostředí, v němž převládají nasycené acylové řetězce. Doposud jsou známy dva základní typy postranslačních modifikací umožňujících umístění proteinu do těchto domén:

- Zakotvení v membráně pomocí glykosylfosfatidylové kotvy (tzv. GPI-proteiny) [65, 72, 75, 76]. Z důležitých leukocytárních proteinů s touto modifikací jmenujme např. CD14 (receptor pro bakteriální lipopolysacharid), CD16b = FcγRIIIb (receptor pro IgG), adhezivní molekuly CD48 a CD58, CD90 (Thy-1) nebo Ly-6.
- Modifikace proteinu zbytky kyseliny palmitové nebo myristové, příp. farnesylovým nebo isoprenylovým zbytkem. Tyto modifikace nacházíme např. u významných signalizačních molekul jako jsou některé proteinkinázy rodiny Src (Lck, Fyn, Fgr, Hck) a trimerní G-proteiny [77, 78]. Za lokalizaci frakce těchto molekul do mikrodomén je zodpovědný N-terminální motiv Met-Gly-Cys, v němž je glycin myristylován a cystein palmitylován [79-82].

Většina transmembránových proteinů je z mikrodomén vyloučena. Výjimkou jsou např. palmitylované adaptorové proteiny LAT [51, 83], PAG [45, 46], NTAL [47, 48],

LIME [49] nebo koreceptory CD4 a CD8 $\alpha\beta$ [84-86]. Existují však i případy, kdy protein je palmitylován a přesto není přítomen v „klasických“ membránových mikrodoménách.

2.5.4 Úloha membránových mikrodomén v imunoreceptorové signalizaci

V poslední době několik prací založených na proteomické analýze membránových mikrodomén odhalilo, že tyto evolučně konzervované struktury koncentrují nejrůznější molekuly důležité pro přenos signálu do nitra buňky, dále některé strukturní proteiny a proteiny, které pomáhají propojit membránové děje s cytoskeletem [22, 87]. Ukazuje se, že mikrodomény mají klíčovou úlohu v mnohých signalizačních procesech zahrnujících receptory různých buněčných typů, třídění proteinů a lipidů pro transport do různých oblastí plasmatické membrány [88], endocytózu a exocytózu [89]. Mohou být také využívány různými patogeny jako signalizační platformy [90], prostředky pro koncentraci, průnik nebo opuštění buňky [91, 92].

Role membránových mikrodomén v imunoreceptorové signalizaci je dnes intenzivně studována. Přes imunoreceptory je spouštěna řada signalizačních kaskád, které jsou naprosto nezbytné pro vývoj, aktivaci a diferenciaci hematopoetických buněk. Současná představa o raných fázích imunoreceptorové signalizace předpokládá, že v klidovém stavu se proteintyrosin-kinázy nenachází v blízkosti imunoreceptorů, ale jsou „uzamknuty“ v membránových mikrodoménách. Po interakci s ligandem dochází k asociaci receptoru s mikrodoménami a tím i s proteintyrosin-kinázami zde přítomnými [93, 94]. Relativně nedávno ale bylo zjištěno, že TCR (receptor T lymfocytů) je s membránovými mikrodoménami již možná preasociován a vazba ligandu tak spíše navozuje vhodnou reorganizaci signalizačního aparátu umožňující optimální konformační uskupení celého signalosomu nutného k přenosu signálu dále do nitra buňky [54, 68, 95].

Existence oddělených membránových mikrodomén spolu s možnostmi jejich dynamického spojování jak mezi sebou tak s ostatními složkami plasmatické membrány vytváří značný potenciál k regulaci buněčných dějů. Některé proteiny se tímto způsobem mohou vzájemně účinně dočasně nebo natrvalo separovat nebo se naopak mohou spojovat do větších signalizačních komplexů, potřebných pro efektivnější a více kontrolovatelný přenos signálu do intracelulárního prostředí.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčné linie a bakteriální kmeny

- Buněčné linie:

Odvozené z fibroblastů: HEK 293 (lidské, (*human embryonic kidney, HEK*);

COS7 (opičí)

Odvozené z lidských T lymfocytů: Jurkat; CEM (pre-T); MOLT-4; HPB-ALL

Odvozené z lidských B lymfocytů: Ramos; Raji; Nalm-6 (pre-B lymfocyty)

Odvozené z lidských myeloidních buněk: THP-1 (monocyty); HL-60 (myeloidní prekurzory); U937 (monocyty); KG1a (myeloidní prekurzory)

- *Sbírka buněčných linií Oddělení molekulární imunologie ÚMG AV ČR.*

- Bakteriální kmen *Escherichia coli*:

TOP 10F (příprava rekombinantní DNA)

- *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*

BL21 (produkce rekombinantního proteinu)

- *Stratagene, La Jolla, CA, USA*

3.1.2 Enzymy

- BamH I, EcoR I, Stu I, Xba I, Xho I

- *Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK*

- Alkalická fosfatáza „Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)“, T4 DNA ligáza

- *Fermentas, Burlington, Kanada*

- Phusion™ polymeráza

- *Finnzymes, Espoo, Finsko*

3.1.3 Plazmidy, konstrukty a cDNA

- Lidská leukocytární cDNA knihovna - Human Leukocyte Matchmaker cDNA library (HL4050AH), cDNA knihovna z linie Jurkat (T lymfocyty) - Human Leukemia Matchmaker LexA cDNA library (HL4513AK)
 - *BD Bioscience - Clontech, Franklin Lakes, NJ, USA*
- pBluescript II SK
 - *Stratagene, La Jolla, CA, USA*
- pEF-BOS-3
 - *Dr. E. Bruyns, Heidelberg, Německo*
- pEFIRES-N,
 - *Dr. S.Hobbs, Institute of Cancer Research, London, UK*
- pFLAG-CMV-5a
 - *Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*
- pET42b, pET28b
 - *Novagen, Madison, CA, USA*

3.1.4 Oligonukleotidy

- TRAP2-ERI-START: CGGAATTCATGTGGTGGCTCAGCATTGGC
- TRAP2-ERI-STOP: CGGAATTCTTATGGGACTGGTCCACATAGG
- TRAP2-seq(366+): GAGGGGCAGGCTGTGAAC
- TRAP2-seq(444-): GCCTGGAATGTCACTGGTG
 - *Metabion, Martinsried, Německo*
- TRAP2-ERI(-) bez stop: CCGGAATTCTGGGACTGGTCCACATAGGTC
- TRAP2-BamHI(195+): CGGGATCCGAGCTCTAAGCCCCACACAAAG
- TRAP2-XhoI(497-)-STOP: CCGCTCGAGTTATGGGACTGGTCCACATAG
- huF_Trap2(exon3)_RT: GACCTGGGCTTGAGCTTACA
- huR_Trap2(exon4)_RT: CCTTGGCAGTCAGGAGAAAC
- huF_Trap2(exon1)_RT: TTCTTCCCCTACGAGCACAG
- huR_Trap2(exon3)_RT: TGAAGGCGAGAAGAACCACT

- huR_Trp2(exon5)_RT: CCTCTTGTTTGTGGCAACCT
- huR_Trp2(exon2)_RT: CGATCACTTGAGTCCAGGAA
- FhGAPDH#1198real: CACCACACTGAATCTCCCCT
- RhGAPDH#1252real: CCCCTCTTCAAGGGGTCTAC
 - *Sigma, St. Louis, MO, USA*

3.1.5 Kultivační média

- LB médium „LB Broth, Miller“
 - *Amresco, Solon, Ohio, USA*
- RPMI 1640 medium, D-MEM medium
 - *Přípravná médií ÚMG AV ČR, Praha, ČR*

3.1.6 Komerčně dodávané soupravy pro molekulární biologii

- ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit
 - *Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*
- Zippy Plasmid Miniprep Kit II, Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Mini RNA Izolation II[™]
 - *Zymo Research, Orange, USA*
- TALON[™]Superflow[™] Metal Afinity Resin
 - *BD Bioscience Clontech, Palo Alto, CA, USA*
- Glutathion Sepharose[™] 4B
 - *Amersham Bioscience, Uppsala, Švédsko*
- JETSTAR Plasmid Purification Kit
 - *GENOMED GmbH, Löhne, Německo*
- SuperScript[™] II RNase H – Reverse Transcriptase, Trizol Reagent
 - *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*
- Brilliant[®] Sybr[®]Green QRT-PCR Master Mix, 2-Step
 - *Stratagene, La Jolla, CA, USA*

- Cell Line Nuclefactor[®] Kit V
 - *Amaya Inc., Gaithersburg, MD, USA*
- Anti-Flag M2 Affinity Gel
 - *Sigma, St. Louis, MO, USA*

3.1.7 Chemikálie

- fetální sérum
 - *Gibco BRL[®], Paisley, UK*
- „ECL Western blotting detection reagents“
 - *Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK*
- agarosa, agar-B
 - *Amresco, Solon, Ohio, USA*
- standarty pro SDS-PAGE
 - *Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA*
- standarty pro DNA elektroforézu
 - *Fermentas, Burlington, Kanada*
- digitonin, geneticin G418, IPTG
 - *Alexis Corporation, Lausen, Švýcarsko*
- Nonident P-40
 - *Fluka AG, Buchs, Švýcarsko*
- DRAQ5[™], n-dodecyl- β -D-maltosid (LM), digitonin, Mowiol[®] 4.88
 - *Calbiochem, San Diego CA, USA*
- TEMED
 - *USB Corporation, Cleveland, USA*
- Lipofectamine[™]2000
 - *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*
- bromfeňolová modř, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid sodný, chlorid sodný, isopropanol, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, octan draselný, peroxidisíran amonný
 - *Lachema, Praha, ČR*

- ethanol, chlorid vápenatý, chlorid manganatý, n-dodecylsírán sodný, sacharosa
 - *Merck, Darmstadt, Německo*
- dNTP
 - *Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko*
- sušené odtučněné mléko
 - *Promil, Nový Bydžov, ČR*
- agarosa, Coomassie Brilliant Blue R 250, 30% Akrylamid – Bis roztok (29:1),
 - *Serva, Heidelberg, Německo*
- ampicilin, azid sodný, Brij-98, BSA, DMSO, EDTA, ethidiumbromid, glycin, fluorid sodný, Hoechst 33258, chlorid cesný, chlorid rubidný, Pefabloc, peroxid vodíku, Tris, 1,4-dithio-D,L-treitol (DTT), Tween 20, želatina
 - *Sigma, St. Louis, MO, USA*

3.1.8 Protilátky

- GAM-HRP
 - kozí protilátka proti myším Ig konjugovaná s křenovou peroxidázou
 - *Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA*
- GAM-HRP IgG + IgM (H+L)
 - kozí protilátka proti myším Ig konjugovaná s křenovou peroxidázou, která se neváže na lehké řetězce imunoglobulinu
 - *Jackson Immunoresearch, Soham, UK*
- GAR-HRP
 - kozí protilátka proti králičímu Ig konjugovaná s křenovou peroxidázou
 - *Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA*
- GAM Alexa Fluor 680, GAM Alexa Fluor 488
 - kozí protilátka proti myším Ig konjugovaná s fluorescenční barvou Alexa-680 nebo Alexa-488
 - *Molecular Probes, Eugene, OR, USA*
 - *připraveny pracovníky Oddělení molekulární imunologie ÚMG AV ČR, Praha*

- Ra anti-Op-18
 - králičí polyklonální antisérum proti Op18 (stathmin)
 - *Dr. M. Gullberg, Umea, Švédsko*
- MEM-255
 - myší monoklonální protilátka proti PAG TRAP2-04, -05
 - myší anti-peptidové protilátky proti lidskému proteinu TRAP2 (proti peptidu aa 110-123: TTSDIPGSPEEAS)
 - *připraveny pracovníky Oddělení molekulární imunologie ÚMG AV ČR, Praha*
- 4G10
 - myší protilátka proti fosforylovanému tyrosinu
 - *UBI, Lake Placid, NY, USA*
- „Konjugát“ peroxidázy s niklem
 - *Sigma, St. Louis, MO, USA*

3.1.9 Složení použitých roztoků

- LB médium
 - 10 g „Trypton-B“, 5 g kvasinkový autolyzát („Yeast Extract-B“), 10 g NaCl v 1 litru; pH=7,0
- LB-Amp agar
 - LB médium obsahující 100 µg/ml ampicilinu + 1,5% agar
- LB-Kan agar
 - LB médium obsahující 60 µg/ml kanamycinu + 1,5% agar
- LB-Amp médium
 - LB médium obsahující 100 µg/l ampicilinu
- LB-Kan médium
 - LB médium obsahující 60 µg/l kanamycinu
- PBS
 - 1,9 mM NaH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH=7,2

- Lyzační roztok
 - 20 mM Tris pH 8,2, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₄O₂, 10 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1mM Na₃VO₄, 1% příslušného detergentu
- Lyzační roztok pro izolaci rekombinantního proteinu na nosiči TALON™
 - 8 M močovina, 0,1 M NaCl, 25 mM Tris pH = 8,0
- Lyzační roztok pro izolaci rekombinantního proteinu na nosiči GTT-Sepharose 4B
 - 7 mM glutathion, 0,1% Triton X-100 v PBS
- Vzorkový pufr pro SDS PAGE, 2x koncentrovaný
 - 100 mM Tris-HCl pH = 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 0,02% bromfenolová modř, případně 0,5% DTT (redukující pufr)
- Elektrodový pufr pro SDS PAGE
 - 250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,3
- Roztok pro elektropřenos proteinů
 - 48 mM Tris, 39 mM glycin, 20% methanol
- PBST
 - PBS s obsahem 0,05% Tween 20
- Vzorkový pufr pro DNA elektroforézu
 - 30% glycerol a 0,25% Orange G ve vodě
- Sol I
 - 50 mM glukosa, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH=8,0
- Sol II
 - 1% SDS, 0,2 M NaOH
- Sol III
 - 60 ml 3M octanu draselného, 11,5 ml ledové kyseliny octové, 28,5 ml H₂O
- TAE
 - 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA, pH=8
- TE
 - 10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8
- Zamrazovací médium
 - 10 % DMSO a 10 % fetální sérum v příslušném kultivačním médiu (RPMI 1640, D-MEM)

- Permeabilizační roztok
 - digitonin 200 µg/ml, 0,2% želatina v PBS
- Promývací roztok
 - digitonin 40 µg/ml, 0,2% želatina v PBS

3.1.10 Ostatní materiál

- misky pro tkáňové kultury „Corning® CellBIND® ” s Ø 10cm a 6 cm, destičky pro tkáňové kultury (96, 24, 12 a 6 jamek) „Corning® CellBIND®“
 - *Corning Costar, Acton, MA, USA*
- rentgenový film „Kodak MXB Film“
 - *Kodak, Rochester, N.Y., US*
- nitroceluloseová membrána „BioTrace®NT“, PVDF membrána „BioTrace™PVDF“
 - *Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA*
- centrifugační zkumavky: „13 ml, 15 ml, 50 ml“
 - *TPP, Trasadingen, Švýcarsko*
- fólie Saran
 - *Dow Chemical, Midland, MI, USA*
- ultracentrifugační zkumavky „Centrifuge Tubes (13 x 51 mm)“
 - *Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA*
- 96-jamkové destičky pro qRT PCR: „96 Well Polypropylene Plates“, Optická víčka pro qRT PCR: „Optical Cap, 8xStrip“
 - *Stratagene, La Jolla, CA, USA*
- plastové zkumavky 1,5 ml
 - *Eppendorf, Hamburg, Německo*

3.1.11 Laboratorní přístroje a zařízení

- L7-65 Ultracentrifuge, Optima™ MAX-E Ultracentrifuge
 - *Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA*

- “Mastercycler Personal”, spektrofotometer Eppendorf Biophotometer, centrifugy Eppendorf 5810 R, 5415 D, 5417 R
 - *Eppendorf, Hamburg, Německo*
- Mx3000P[®] QPCR System
 - *Stratagene, La Jolla, CA, USA*
- přístroj pro SDS-PAGE Mighty Small II, přístroj pro elektropřenos proteinů Transblot
 - *Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA*
- mikroskop Leica DM RXA, mikroskop Leica DM RXA s digitální kamerou,
 - *Leica, Jena, Německo*
- spektrální konfokální mikroskop Leica TCS SP
 - *Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Německo*
- Transluminátor
 - *Herolab, Wiesloch, Německo*
- Průtokový cytometer BD[™] LSR II
 - *BD Biosciences, San Jose, CA, USA*
- Vyvolávač FOMEI Optima
 - *Fomei, Hradec Králové, ČR*
- Ampulky na zamrazování buněk NUNC[™] CryoTube[™] Vials
 - *Nunc, Roskilde, Dánsko*
- Zamrazovací krabička NALGENE[™] Cryo 1°C Freezing container
 - *Nalgene, Rochester, NY, USA*
- Nukleofector Amaxa
 - *Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA*
- Sonikátor Ultrasonic Homogenizer – 4710 Series
 - *Cole – Parmer Instrument Co, Vernon Hills, IL, USA*

3.2 Metody

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Pro reakci je nutné navrhnout specifické krátké oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k 3' a 5' koncovým sekvencím úseku, který má být amplifikován. Jako templát byla použita leukocytární cDNA knihovna, cDNA připravená z buněčné linie Jurkat (lidské T lymfocyty), později i konstrukt TRAP2/pBSK. Reakce byla provedena v objemu 50 μ l a reakční směs měla následující složení:

10 μ l	5x Phusion GC Buffer
1 μ l	10 mM dNTP
0,3 μ l	primer 1 (100 pmol/ μ l)
0,3 μ l	primer 2 (100 pmol/ μ l)
0,5 μ l	templátu (0,01 – 0,05 μ g DNA)
0,5 μ l	Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)
38 μ l	vody

Reakční směs byla smíchána na ledu (jako poslední byl přidán enzym) a vkládána do cykleru. Pro amplifikaci DNA proteinu TRAP2 byl použit následující program:

Předdenaturace:	98°C	30 s	
<hr/>			
Denaturace:	98°C	10 s	
Nasednutí primerů:	55°C	30 s	30x zopakovat
Syntéza DNA	72°C	30 s	
<hr/>			
Syntéza DNA	72°C	5 min	
Ochlazení vzorku	18°C	až do ukončení programu uživatelem	

3.2.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Analytické štěpení bylo prováděno v reakční směsi o objemu 20 μ l po dobu 1 – 2 hodin, preparativní štěpení v reakční směsi obsahující 1 - 5 μ g DNA (celkový objem 50 – 100 μ l) po dobu 2 – 7 hodin. Optimální teplota a reakční pufr byly použity dle doporučení výrobce enzymu.

3.2.3 Defosforylace fragmentů DNA pomocí alkalické fosfatázy

Alkalická fosfatáza (CIAP) je enzym, který katalyzuje odštěpení fosfátové skupiny z 5' konců DNA (též RNA nebo oligonukleotidů). Tento proces je nezbytný pro funkci DNA ligáz. Defosforylace vektoru naštěpeného restrikční endonukleázou zabraňuje tzv. autoligaci vektoru, tedy potlačení vzniku nežádoucích cirkulárních molekul DNA neobsahujících vkládaný fragment DNA.

CIAP (1 U/ μ l) byla přidána do reakční směsi při preparativním štěpení DNA (1 U/10 μ l) 1 hodinu před ukončením štěpení. Inaktivace enzymu byla provedena přidáním 25 mM EGTA a 0,5% SDS a následným zahřátím na 75°C po dobu 15 minut.

3.2.4 Elektroforéza DNA v agarosovém gelu

Tato metoda slouží k separaci fragmentů DNA podle velikosti a umožňuje i jejich následnou izolaci. Byl používán 1% agarosový gel připravený ztuhnutím roztoku získaného rozvařením příslušného množství agarosy v pufru TAE. Po zchladnutí na teplotu přibližně 60°C byl přidán ethidiumbromid v množství 0,5 μ g/ml. Elektroforéza probíhala při napětí 100V. Zóny separované DNA byly vizualizovány fluorescencí interkalovaného ethidiumbromidu v UV světle.

3.2.5 Izolace DNA z agarosového gelu

K izolaci DNA z agarosového gelu byla použita komerční souprava Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research*). Při izolaci bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.2.6 Ligace DNA

Ligace DNA je metoda, která slouží ke spojování fragmentů DNA, např. linearizovaného vektoru a do něho vnášeného inzertu. Používá se k tomu enzym T4 DNA ligáza, který katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátem a 3'-OH skupinou sousedního nukleotidu.

Ligační směs s celkovým objemem 20 μ l obsahující linearizovaný vektor a příslušný inzert v molárním poměru přibližně 1:3, komerčně dodávaný ligační pufr a 0,5 μ l T4 DNA ligázy (1 U/ μ l) byla inkubována 1 – 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po 15 minutové tepelné inaktivaci enzymu při 75°C byla ligační směs použita k transformaci kompetentních bakterií TOP10F nebo byla zmrazena.

3.2.7 Transformace DNA do kompetentních bakterií

Zamražená suspenze kompetentních bakterií byla ponechána na ledu pozvolna roztát. Poté byla rozdělena po 50 μ l do předem vychlazené plastové zkumavky (1,5 ml) a byl k ní přidán přibližně 1,0 μ g plazmidové DNA, případně 5,0 μ l směsi z ligační reakce. Po jemném promíchání byla směs inkubována 20 minut na ledu. Následně byla suspenze 1 minutu vystavena teplotnímu šoku 42°C, po kterém byla ihned ochlazená v ledové lázni a po přidání 1 ml LB média byla inkubována 1 hodinu při teplotě 37°C. Objem bakteriální suspenze byl centrifugací upraven na 100 μ l a poté byl rozetřen po povrchu LB-agaru s příslušným selekčním antibiotikem na Petriho misce (\varnothing 10 cm). Bakterie byly kultivovány 12 – 14 hodin při 37°C.

3.2.8 Minipreparativní izolace plazmidové DNA alkalickou lyzí

Minipreparativní izolace plazmidové DNA je používána k přípravě malého množství DNA horší čistoty, které je ale zcela postačující například k restrikční analýze.

Do 3,3 ml LB media s příslušným antibiotikem v 10 ml zkumavce byly zaočkovány jednotlivé bakteriální klony (kolonie z Petriho misky) a kultivovány 12 – 16 hodin v třepačce při 37°C. Po kultivaci bylo odebráno 1,5 - 3 ml suspenze, která byla centrifugována (4°C, 5900 x g, 5 minut) a sediment baktérií byl resuspendován v 100 µl roztoku SOL I. K směsi bylo následně přidáno 200 µl roztoku SOL II, promícháno a ponecháno inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Potom bylo k směsi přidáno 150 µl studeného roztoku SOL III, jemně promícháno a ponecháno 10 minut inkubovat při 4°C. Následovala centrifugace (4°C, 16 100 x g, 10 minut), supernatant byl přepipetován do nové 1,5 ml zkumavky a pro precipitaci DNA byl smíchán v poměru 1:1 s isopropanolem a ponechán inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Vysrážená DNA byla oddělena centrifugací (18°C, 16 100 x g, 10 minut). Sediment byl po propláchnutí 1 ml 75% ethanolu a vysušení na vzduchu rozpuštěn v 25 – 35 µl destilované vody nebo v pufru TE pH = 8,0. Vzorek byl dále skladován při -20° C.

3.2.9 Minipreparativní izolace plazmidové DNA pomocí komerční soupravy

Tato metoda slouží k izolaci malého množství DNA dostatečné čistoty, která je vhodná pro transfekci eukaryotických buněk (například na testování zda připravený konstrukt DNA umožňuje expresi příslušného proteinu v buňkách) nebo k sekvenování DNA.

Pro tento účel byla používána souprava Zyppy Plazmid Miniprep Kit II (Zymo Research). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.10 Purifikace plazmidové DNA rovnovážnou centrifugací v gradientu CsCl – EtBr

Rovnovážná centrifugace DNA v gradientu CsCl – EtBr umožňuje získat superhelikální formu plazmidové DNA s vysokým stupněm čistoty, vhodným pro transfekci eukaryotických buněk.

K roztoku DNA, získaného například pomocí preparativní izolace DNA, byl přidán CsCl v množství 1,05 g/ml roztoku DNA. Po rozpuštění CsCl bylo přidáno 200 µl roztoku EtBr (10 mg/ml) na každých 5 ml roztoku DNA s CsCl. Po 20 minutové inkubaci ve tmě za laboratorní teploty byl roztok centrifugován (20°C, 5200 x g, 15 minut) a supernatant byl přenesen pomocí injekční stříkačky do kyvet pro rotor Beckman VTi 65. Kyvety byly doplněny roztokem CsCl (1,07 g/ml TE) a po zatavení centrifugovány (20°C, 55 000 rpm, 16 hodin, *L7-65 Ultracentrifuge*). Po skončení centrifugace bylo možné pozorovat na stěně kyvety sediment, představující RNA, a ve středu kyvety dva pruhy, z nichž vrchní představoval chromozómovou DNA obohacenou o poškozenou plazmidovou DNA a spodní pruh představoval superhelikální formu plazmidové DNA. Pruh superhelikální DNA byl přenesen do nové kyvety. Kyveta byla znovu doplněna roztokem CsCl (1,07 g/ml TE), zatavena a centrifugována (20°C, 55 000 rpm, 16 hodin, *L7-65 Ultracentrifuge*). Po ukončení centrifugace byl spodní pruh obsahující superhelikální DNA odebrán do 14 ml plastové zkumavky a naředěn 3-násobným objemem pufru TE. EtBr se z roztoku extrahoval pomocí n-butanolu nasyceného vodou. Po přidání vodného n-butanolu k roztoku DNA v poměru 1:1 přecházel EtBr do vrchní organické fáze, zatímco DNA zůstávala ve spodní vodné fázi. Celý proces byl opakován do odbarvení (5x až 7x). Následně byl k spodní fázi přidán v poměru 1:2 studený 100% ethanol, směs byla inkubována 20 minut za laboratorní teploty a centrifugována (20°C, 5200 x g, 15 minut). Sediment DNA byl dvakrát propláchnut 10 ml 75% ethanolu, vysušen a rozpuštěn v 100-300 µl TE pH = 8,0. DNA byla dále skladována při -20°C.

3.2.11 Preparativní izolace velmi čisté plazmidové DNA pomocí komerční soupravy

Pro rychlou izolaci velmi čisté plazmidové DNA (vhodné pro transfekci eukaryotických buněk) v množství okolo 100 µg byla používána souprava JETSTAR Plazmid Purification Kit (*Genomed*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.12 Sekvenování DNA

K sekvenování DNA byla použita komerční souprava ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce. Následovala analýza vzorků sekvenačním servisem MBÚ AV ČR.

3.2.13 Izolace RNA

K izolaci RNA z lidských hematopoetických buněk byla použita komerční souprava Trizol (*Invitrogen*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce. RNA byla rozpuštěna ve 150 µl vody a přečištěna přes komerční soupravu Mini RNA Izolation II[™] (*Zymo Research*). Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.14 Reverzní transkripce

K přípravě cDNA z izolované RNA byla použita komerční souprava SuperScript[™] II Rnase H – Reverse Transcriptase (*Invitrogen*). Na jednu reakci bylo použito 0,4 - 1 µg připravené celkové RNA. K amplifikaci bylo použito 100 ng tzv. „random primers“ (náhodné primery) nikoli oligo(dT) primery. Riziko použití oligo(dT) primerů spočívá v tom, že při nedostatečné účinnosti reverzní transkripce nebo v případě

příliš dlouhých transkriptů nebude mRNA dosyntetizována až na 5' konec. Pro naše účely bylo navíc nutné navrhnout primery pro real-time PCR na 5'konec. Od každého vzorku byl stejným způsobem připraven i kontrolní vzorek, do něhož nebyla přidána reverzní transkriptáza. Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.15 Kvantitativní real-time PCR (qRT PCR)

Metoda qRT PCR je založena na tom, že nárůst specifického templátu sledujeme pomocí nárůstu fluorescence. K sledování průběhu amplifikační reakce se používají např. barvičky interkalující se do dvouvláknové DNA (nejčastěji tzv. Sybr Green). V každém cyklu PCR reakce se se zvyšujícím se množstvím amplifikované DNA fluorescence narůstá. Hodnota „Ct“ (treshold cycle) odpovídá cyklu, v kterém byla naměřená fluorescence vyšší než fluorescence pozadí. Čím vyšší počáteční množství templátu se ve vzorku nachází, tím menší hodnotu Ct obdržíme. Četnost sledované mRNA poté odpovídá 2^{Ct} .

cDNA byla nejprve naředěna vodou a to tak, že vzorky s počátečním množstvím 1 µg celkové RNA byly ředěny 8x. Vzorky s nižším počátečním obsahem RNA byly ředěny adekvátně tak, aby přibližná koncentrace cDNA byla ve všech vzorcích shodná. Reakce byla provedena v 96-jamkové destičce pro qRT PCR. Vzorky byly připraveny v triplikátech, negativní kontrola – vzorky bez reverzní transkriptázy a vzorky, do kterých nebyl přidán templát byly měřeny v duplikátech. Každá reakční směs v jedné jamce měla následující složení:

10 µl	Briliant® Sybr®Green QRT-PCR Master Mix, 2-Step (<i>Stratagene</i>)
2 µl	cDNA
2 µl	primer mix (každý o koncentraci 5 pmol/µl)
6 µl	vody

Pro amplifikaci byl použit následující program:

Teplotní aktivace DNA polymerázy:	95°C	12 min 30 s	
<hr/>			
Denaturace:	95°C	25 s	
Nasednutí primerů:	62°C	30 s	40x zopakovat
Syntéza DNA:	72°C	30 s	
<hr/>			
	95°C	1 min	
Měření teploty tání produktu:	55°C	30 s	
(přednastavený program doporučený výrobcem)	95°C	30 s	

3.2.16 Exprese rekombinantního proteinu v *Escherichia coli*

Základním nástrojem studia proteinových interakcí jsou protilátky. Jejich příprava je nejčastěji založena na imunizaci zvířat rekombinantním proteinem. Nejsnadnější způsob přípravy rekombinantního proteinu je jeho indukovaná exprese v bakteriích *Escherichia coli*. Příslušná cDNA se nejprve vloží do expresního vektoru, obvykle plazmidu. Tento vektor obsahuje několik částí: sekvenci kódující selekční marker sloužící k selekci buněk obsahujících vektor, promotor (*lac*) umožňující po indukci produkci velkého množství mRNA z klonovaného genu, sekvence kontrolující translaci, jako vhodně umístěné místo vážící ribozom a iniciační sekvenci ATG, a polylinker usnadňující vložení cDNA do vektoru. Některé vektory navíc obsahují speciální sekvence, tzv. kotvy, umožňující snadnější izolaci získaného proteinu. Např. pomocí sekvence 6xHis lze protein afinitně izolovat na Sepharose s navázaným Ni^{2+} nebo Co^{2+} . Dalším způsobem je vytvoření fúzního proteinu s GST (glutathion-S-transferáza). Rekombinantní protein se poté izoluje pomocí Sepharosy s navázaným glutathionem (GTT). Připraveným vektorem je následně transformován vhodný kmen *E. coli*.

Pro vlastní transformaci buněk BL-21 byly použity dva typy vektorů TRAP2/pET28b a TRAP2/pET42b. Vektor pET28b obsahuje pouze sekvenci 6xHis, zatímco plazmid pET42b obsahuje kromě His-kotvy i možnost vytvoření fúzního proteinu

GST-TRAP2. S použitým plazmidem se lišily i postupy exprese. V obou případech se bakteriální kultura inkubovala při 37°C do dosažení optické density $OD_{600} = 0,5 - 0,7$. Poté byl přidán IPTG, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 mg/ml. Po indukci byla u vektoru TRAP2/pET42b snížena teplota na 25°C a po 5 hodinách indukce byla bakteriální kultura zcentrifugována (5200 x g, 15 minut, 4°C). U vektoru TRAP2/pET28b se bakterie ponechaly při 37°C a po 3 hodinách byly zcentrifugovány (5200 x g, 15 minut, 4°C). Bakterie byly lyzovány a vyprodukovaný protein byl izolován z bakteriálního lyzátu.

3.2.17 Izolace rekombinantního proteinu pomocí nosiče TALON™

Tato metoda slouží k izolaci a purifikaci fúzních proteinů obsahujících sekvenci 6xHis na nosiči s kobaltnatým komplexem.

Sekvence 6xHis byla vnesena pomocí vektoru pET28b. Pro izolaci byl použit nosič „TALON™ Superflow™ Metal Affinity Resin“. Izolace byla provedena za denaturujících podmínek v přítomnosti 8 M močoviny. Bakteriální peleta byla po expresi lyzována v roztoku 8 M močovina, 25 mM Tris, 0,1 M NaCl pH = 8,0. Lyzát byl sonikován 3-5x po dobu 15 sekund. Po centrifugaci (5200 x g, 20 minut, 4°C) byl rekombinantní protein izolován ze supernatantu. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.2.18 Izolace rekombinantního proteinu pomocí nosiče Glutathion Sepharose™ 4B

Tato metoda slouží k izolaci a purifikaci fúzních proteinů obsahujících sekvenci glutathion-S-transferázy. K vlastní izolaci se využívá přirozené vazby tohoto enzymu na jeho substrát – glutathion, který je ovšem navázán na vhodném nosiči např. Sepharosa 4B. Izolace se provádí za nativních nedenaturujících podmínek.

Bakterie byly lyzovány v PBS s 0,1% obsahem Tritonu X-100 a 1 mM GTT. Po sonikaci a centrifugaci (viz. 4.2.17) byl protein izolován ze supernatantu dle návodu výrobce.

3.2.19 Transfekce buněk pomocí Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)

K transfekci buněk v šesti-jamkové destičce pro tkáňové kultury bylo na jednu jamku použito 1,0 µg DNA a 2,5 µl transfekčního činidla. K transfekci buněk v Petriho misce pro tkáňové kultury o Ø 10 cm bylo použito 12,0 µg DNA a 30 µl transfekčního činidla. Celý transfekční proces byl prováděn v bezsérovém médiu. Pracovní postup byl dodržován dle návodu výrobce.

3.2.20 Transfekce suspenzních buněk Ramos a Jurkat pomocí komerční soupravy Amaxa

K transfekci suspenzních buněk (jako je např. nádorová linie B lymfocytů Ramos) byla použita komerční souprava Cell Line Nucleofector Kit V (*Amaxa*). Při transfekci bylo postupováno dle návodu výrobce.

3.2.21 Sběr a lýza buněk

Adherentní buňky byly z povrchu misky pro tkáňové kultury uvolněné studeným PBS (v případě linie HEK 293) nebo pomocí přiměřeného množství studeného roztoku 5 mM EDTA/PBS (v případě buněk COS7). Suspenzní buňky byly pouze centrifugovány (20°C, 300 x g, 5 minut) a promyty přiměřeným množstvím PBS. Následovala inkubace buněk s přiměřeným množstvím lyzačního roztoku (5×10^7 buněk/1 ml lyzačního roztoku) obsahujícího příslušný detergent po dobu 30 minut při 4°C. Na přípravu vzorků pro ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu byl použit detergent 1% NP-40 nebo 1% Brij-98 a u ostatních vzorků 1% LM. Po skončení inkubace byly vzorky (kromě vzorků pro ultracentrifugaci) centrifugovány (4°C, 25000 x g, 7 minut) a supernatant (buněčný lyzát) byl oddělen od sedimentu.

3.2.22 Ultracentrifugace v sacharosovém gradientu

Celý proces byl prováděn při teplotě 4°C. 0,5 ml buněčného lyzátu, získaného z přibližně 30-50 x 10⁶ buněk Ramos (stabilních transfektantů TRAP2), bylo smícháno s 0,5 ml 80% roztoku sacharosy v příslušném lyzačním roztoku. Takto připravená suspenze byla nanesena na dno 5 ml ultracentrifugační zkumavky, opatrně převrstvena 1 ml 30% 1 ml 20%, 1 ml 10% a 1 ml 5% roztoku sacharosy v příslušném lyzačním roztoku a 0,5 ml lyzačního roztoku. Po 18 – 20 hodinách (minimálně 16 hodin) centrifugace (výkyvný rotor, 100 000 x g, 2°C) byl obsah rozebrán na frakce po 0,5 ml. Membránové mikrodomény se nacházejí převážně v třetí a čtvrté frakci, vizuálně se lze orientovat podle opalescentní zóny.

3.2.23 Elektroforetické dělení proteinů v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti n-dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS (SDS-PAGE) je metoda, při které dochází k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti M_r .

Vzorky byly připraveny smícháním buněčného lyzátu s 2x koncentrovaným vzorkovým pufr pro SDS PAGE (redukujícím nebo neredukujícím) v objemovém poměru 1 : 1; v případě imunoizolace byl k eluci antigenu použit 1x koncentrovaný neredukující vzorkový pufr pro SDS PAGE. Před vlastní elektroforézou byly vzorky zahřáty 5 minut při 95°C. Elektroforetické dělení bylo prováděno v přístroji Mighty Small II (*Hoefler Scientific Instruments*). V závislosti na velikosti analyzovaných proteinů byl použit 12-15% separační gel o délce přibližně 4,5 cm a 4% zaostřovací gel dlouhý přibližně 1,5 cm. Dělení bylo prováděno při konstantní intenzitě elektrického proudu 15 mA na gel a napětí 80 – 150 V.

3.2.24 Elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu po SDS-PAGE na nitrocelulosovou nebo PVDF membránu (“Western blotting“)

PVDF membrána byla před použitím smáčena 5 minut v methanolu a 5 minut v roztoku pro elektroforetický přenos proteinů, nitrocelulosová membrána byla smáčena 5 minut v roztoku pro elektroforetický přenos proteinů. Elektroforetický přenos byl prováděn za použití přístroje Transblot (*Hoefler Scientific Instruments*) po dobu 72 minut při konstantním proudu 0,8 mA na cm² gelu.

3.2.25 Detekce proteinů v polyakrylamidovém gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue R 250

Polyakrylamidový gel byl 15 minut fixován a barven ve vodném roztoku obsahujícím 45% methanolu, 10% kyseliny octové a 0,05% Coomassie Brilliant Blue R 250. Následně byl gel promýván vodným roztokem obsahujícím 25% ethanolu a 10% kyseliny octové až do odbarvení pozadí. Poté byl gel usušen mezi celofánovými foliemi v přítomnosti vodného roztoku obsahujícím 20% methanol a 4% glycerol.

3.2.26 Detekce proteinů imobilizovaných na nitrocelulosové nebo PVDF membráně pomocí specifické protilátky

Celý proces byl prováděn za laboratorní teploty. Membrána byla 1 hodinu inkubována s 5% roztokem odtučněného mléka (*Promil*) v PBST (zablokování volných vazebných míst). Potom následovala inkubace membrány s roztokem primární protilátky (ředěná 1:200 až 1:3000 v závislosti na použité protilátce) v 1% roztoku odtučněného mléka (*Promil*) v PBST po dobu 1 hodiny. Potom byla membrána 3x promyta po dobu 5 minut v PBST a inkubována 45 minut se sekundární protilátkou s navázanou peroxidázou (GAM-HRP nebo GAR-HRP, resp. GAM-HRP IgG+IgM (H+L); ředěná 1:5000 resp. 1:3000) v 1% roztoku odtučněného mléka (*Promil*) v PBST). Po promytí (4 x 10 minut, PBST) byla membrána 1 minutu inkubována v roztoku „ECL Western blotting detection

reagens“. Po osušení membrány byly protilátkou označené zóny luminograficky detekovány na fotografickém filmu (MxB Film, Kodak). K vyvolání byl použit přístroj FOMEI Optimax.

3.2.27 Detekce proteinů se sekvencí „6xHis“ imobilizovaných na nitrocelulose nebo PVDF membráně pomocí „konjugátu“ peroxidázy s niklem

Celý proces byl prováděn za laboratorní teploty. Membrána byla 1 hodinu inkubována s 5% roztokem odtučněného mléka v PBST (zablokování volných vazebných míst). Poté následovala inkubace membrány s roztokem „konjugátu“ peroxidázy s niklem (ředěná 1:5000) v 1% roztoku odtučněného mléka v PBST po dobu 1 hodiny. Po promytí (3 x 15 minut, PBST) byla membrána 1 minutu inkubována v roztoku „ECL Western blotting detection reagens“. Po osušení membrány byly protilátkou označené zóny luminograficky detegovány na fotografickém filmu (MxB Film, Kodak) pomocí přístroje na vyvolávání filmů FOMEI Optimax.

3.2.28 Aktivace buněk peroxovanadičnanem

Pomocí této metody můžeme docílit nespecifické aktivace buněk. Princip spočívá v potlačení funkce proteinfosfatáz přidáním směsi peroxidu vodíku a tetraoxovanadičnanu sodného. Vznikající peroxovanadičnan též pravděpodobně aktivuje některé proteinkinázy [96]. Výsledkem je silná stimulace, která vede k aktivaci celé řady potenciálních signalizačních drah.

Koncentrace buněk v suspenzi byla upravena na 10^7 buněk/ml média. 100 μ l 0,1 M tetraoxovanadičnanu sodného bylo smícháno s 10 μ l 30% peroxidu vodíku, doplněno do 1 ml destilovanou vodou a inkubováno 15 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly aktivovány přidáním 100 μ l tohoto roztoku k 1 ml buněčné suspenzi a inkubovány 10 minut za laboratorní teploty. Po promytí PBS byla provedena lýza viz. 3.2.21.

3.2.29 Imunoprecipitace na monoklonální protilátce navázané na Sepharosu 4B

Imunoprecipitace je metoda, při níž je daný protein izolován ze směsi proteinů např. z buněčného lyzátu pomocí vazby na imobilizovanou protilátku. Výhodou je, že se takto často izoluje nejenom příslušný protein ale i další molekuly s ním asociované. Imunoprecipitace je tak základní metoda při studiu protein - proteinových interakcí.

Celý experiment byl prováděn za chlazení ledem resp. při 4°C v kolonkovém uspořádání. Pro imunoprecipitaci byla použita suspenze CNBr-Sepharosy 4B s kovalentně navázanou protilátkou. Byly připraveny miniaturní kolonky z 200 µl pipetovacích špiček obsahující 20-25 µl suspenze CNBr-Sepharosy s navázanou protilátkou. Po promytí pětinasobným objemem lyzačního roztoku bylo na kolonku nanášeno 100 – 200 µl buněčného lyzátu a kolonka byla promyta desetinásobným objemem lyzačního roztoku. Zachycený protein byl eluován 65 µl 1x koncentrovaným neredukujícím vzorkovým pufrům pro SDS PAGE.

3.2.30 Příprava stabilních buněčných klonů

Buňky, transfekované pomocí Cell Line Nucleofector Kit V (*Amaxa*) (viz. 3.2.20), byly po 24 hodinové inkubaci rozpipetovány do 96-jamkových mikrotitračních destiček pro tkáňové kultury v koncentraci přibližně 50 buněk, 500 buněk 5 000 buněk v 200 µl média, obsahujícím též příslušné selekční antibiotikum (G-418 - 4 mg/ml). Mikrotitrační destičky byly potom zabaleny do potravinové fólie Saran a ponechány minimálně 14 dní inkubovat v CO₂ inkubátoru při teplotě 37°C. Po přibližně 10 dnech bylo možné pozorovat v jednotlivých jamkách vyselektované buněčné klony, které byly následně testované na přítomnost a úroveň exprese daného proteinu pomocí SDS-PAGE a Western Blottingu resp. imunologickým barvením a cytofluorimetrickou analýzou.

3.2.31 Sledování úrovně exprese proteinu v buňkách metodou průtokové cytometrie

Celý proces byl prováděn při 4°C. Dostatečné množství buněk (přibližně 1×10^5) bylo přeneseno do 96-jamkové mikrotitrační destičky a centrifugováno (300 x g, 5 minut, 4°C). Buňky byly promyty PBS a znovu centrifugovány. Pro detekci intracelulárního epitopu byly buňky permeabilizovány 15 minut 20 μ l permeabilizačního roztoku obsahujícím digitonin. Poté bylo přidáno 10 μ l primární protilátky. Po 15 minutové inkubaci byly buňky centrifugovány (1500 x g, 10 minut, 4°C) a 3x promyty 200 μ l promývacího roztoku. Následně byly buňky 15 minut inkubovány s 10 μ l sekundární protilátky ředěné do promývacího roztoku. Po centrifugaci a promytí 3x 200 μ l promývacího roztoku, byly buňky resuspendovány v 50 μ l PBS a před vlastním měřením na průtokovém cytometru bylo k buňkám přidáno ještě 40 μ l barvičky Hoechst 33258 (barví DNA). V případě detekce povrchového antigenu byla vynechána permeabilizace buněk digitoninem, jako promývací roztok byl použit PBS, jinak byl postup stejný. Buňky byly následně analyzovány na průtokovém cytometru BDTM LSR II (*BD Biosciences*).

3.2.32 Imunocytochemické sledování lokalizace proteinu v buněčných strukturách

Pomocí této metody je možné určit lokalizaci studovaného proteinu ve strukturách buněk a případně i úroveň jeho exprese. Lokalizaci proteinu sledujeme mikroskopicky pomocí fluorescenčního barviva navázaného na protilátce.

Adherentní buňky byly před transfekcí připraveny do 24-jamkové destičky pro tkáňové kultury, na jejíž dno byly položeno skleněné krycí sklíčko. V době transfekce buňky pokrývaly přibližně 50% plochy krycího sklíčka. Transfekce byla provedena pomocí LipofectamineTM 2000 (*Invitrogen*) (viz. 3.2.19.). Suspenzní buňky byly centrifugovány přímo na podložní sklíčko pomocí tzv. cytopsinu v mikrozkuvkách s dolním otvorem (2000 x g, 2 min., 4°C).

Transfekované buňky byly zpracovány 36 - 48 hodin po transfekci. Po odsátí kultivačního media, byly buňky opatrně propláchnuty v PBS a fixovány na krycí nebo

podložní sklíčka buď pomocí methanolu vychlazeného na -20°C po dobu 3-5 minut nebo pomocí 4% vodného roztoku paraformaldehydu po dobu 30 minut. Poté bylo fixační činidlo odsáto, buňky byly 3x promyty v PBS. Při použití paraformaldehydu byly navíc inkubovány 10 minut s 0,2% Tritonem X-100 v PBS. Poté byly inkubovány 60 minut s primární protilátkou. Po promytí (5x) PBS následovala hodinová inkubace ve tmě se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescenční barvou Alexa 488. Následovalo opět promytí vzorků 5x v PBS a jednou ve vodě. Poté bylo krycí sklíčko s transfekovanými buňkami položeno na podložní sklíčko s kapkou Mowiolu (přibližně $5\ \mu\text{l}$), ve kterém bylo rozpuštěno barvivo DRAQ5TM (barvící DNA). U vzorků suspenzních buněk na podložním sklíčku byl Mowiol s DRAQ5TM pipetován přímo na buňky a vzorky byly přikryty krycím sklíčkem. Po 15 minutách byly okraje sklíčka ošetřeny lakem na nehty a vzorky byly skladovány při 4°C ve tmě, než byly analyzovány na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP (*Leica Microsystems*).

4. Výsledky

4.1 Předběžná charakterizace proteinu TRAP2 pomocí predikčních metod

Protein TRAP2 byl identifikován po systematickém průzkumu veřejně přístupných bioinformatických databází. Tato část práce byla provedena ve spolupráci s Dr. Janem Pačesem z Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Hledali jsme proteiny, které by byly strukturně podobné již dříve identifikovaným a popsáným adaptorovým proteinům LAT, PAG, NTAL, LIME: tzn. krátký N-konec (10 - 20 aa) směřující do extracelulárního prostoru, následovaný jednoduchým transmembránovým α -helixem, za kterým je umístěn potenciální palmytilační motiv CxxC nebo CxC (v jednopísmenném aminokyselinovém kódu, kde x značí jakoukoli aminokyselinu) a v cytoplasmatické části by měl obsahovat nejrůznější vazebné motivy charakteristické pro adaptorové proteiny, především pak tyrosinové fosforylační motivy typu Y-X-X-[I/L/V] (fosforylovatelné Src kinázami).

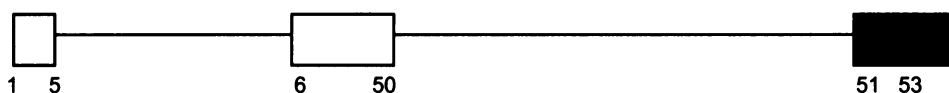
Tabulka 1: Přehled výsledků průzkumu bioinformatických databází. Z původních 41062 genů byly vybráno 149 s transmembránovou doménou a palmytilačním motivem. TM = transmembránová oblast; PM = palmytilační motiv

Kriterium	Počet potenciálních proteinů splňujících dané kriterium
Hodnocené genové produkty	41062
Jedna TM	4099
Jedna TM 5-50 aa od startu	1587
TM + PM 20 – 60 aa od startu	149
TM + PM + tyrosinové motivy	87
TM + PM + C-terminální motivy	11
Bez TM	32859
Více než jedna TM	4104

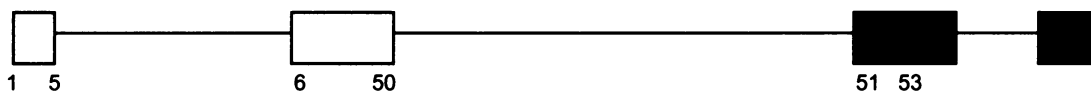
Celkový průběh hledání vhodných kandidátů shrnuje Tabulka 1. Z počátečního množství 41062 potenciálních genových produktů, zůstalo 149 kandidátů, z nichž byly vybrány čtyři a označeny TRAP1 – 4 (provedeno jinými pracovníky naší laboratoře), kde zkratka TRAP znamená „transmembránový adaptorový protein“. Předmětem této práce je protein TRAP2. Jako pozitivní kontrola byly tímto způsobem identifikovány i již dříve popsané adaptorové proteiny LAT, NTAL, PAG, LIME.

Gen pro lidský protein TRAP2 nese podle databáze Entrez Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez) označení MGC52498 a dále synonyma PRO7171 a WWLS2783 (pozn. - genový název dosud nebyl schválen organizací HGNC, Hugo Gene Nomenclature Committee). Nachází se na chromosomu 1 s přesnou lokalizací 1p32.3. Celý gen zaujímá kolem 36 kbp a je tvořen 7 exony, jejichž transkripce vznikají tři základní alternativní transkripční formy označené podle Genbank AY358621, AK128236 a

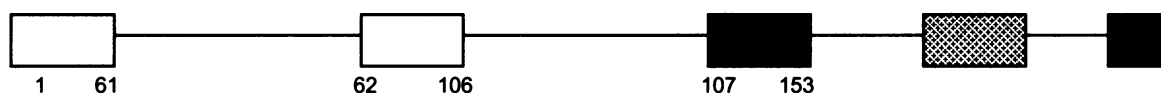
AA213820



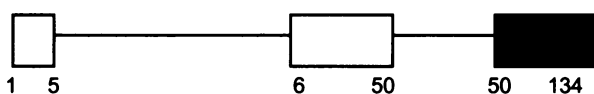
AW571408



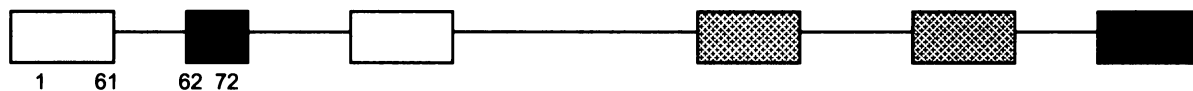
AK128236



AY358621 = TRAP 2



BC041608

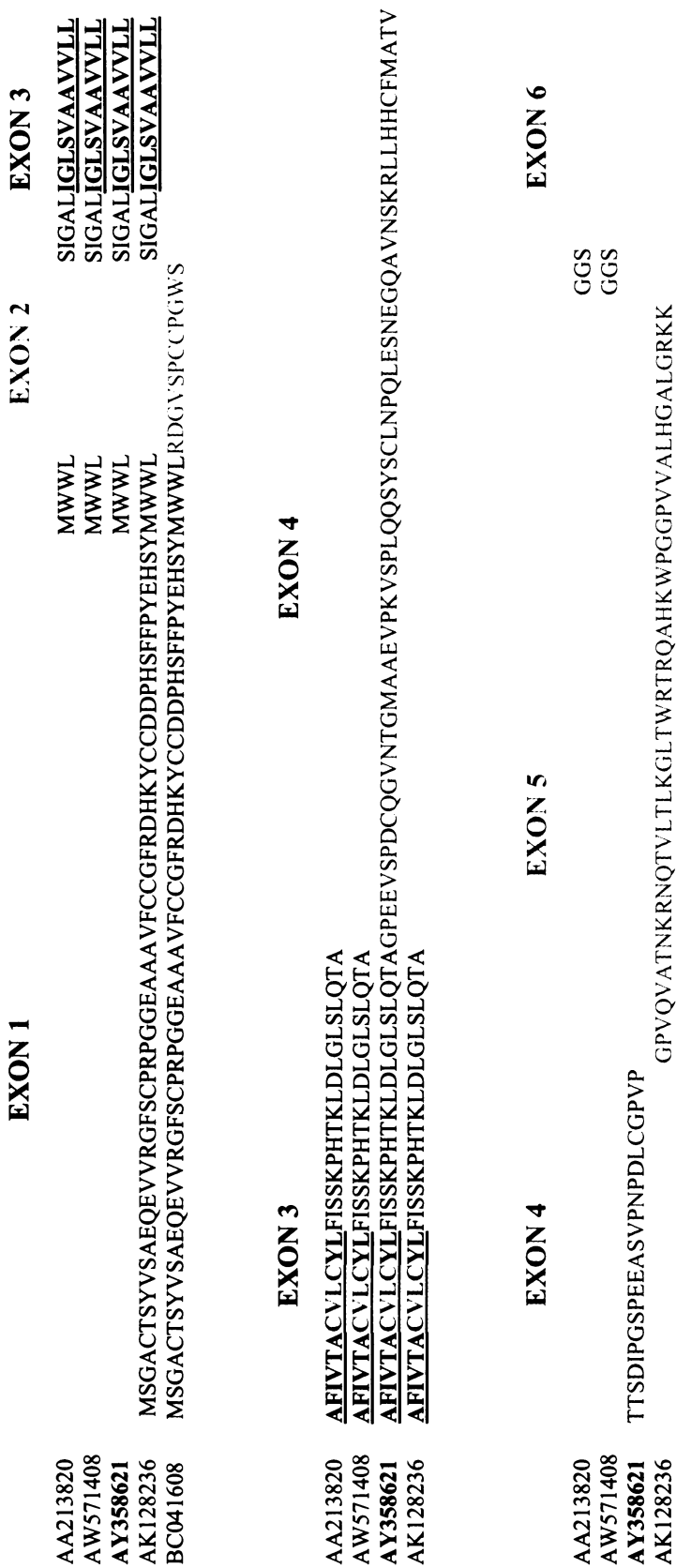


Obrázek 4: Schematický obrázek exon-intronové struktury jednotlivých alternativních sestřihových variant MGC52498. Jednotlivé exony jsou odlišeny barevně, vzorkování znamená, že daný exon není překládán do proteinové struktury, čísla znamenají počty aminokyselin kódovaných v jednotlivých exonech. Pozn. Jedná se pouze o schematický obrázek, tzn. že velikosti intronů neodpovídají skutečné vzdálenosti mezi jednotlivými exony.

BC041608. V databázi Aceview lze naléznout i další dvě kratší formy AA213820 a AW571408, které mají vzájemně zcela shodnou proteinovou sekvenci. Alternativní formy kódují různé proteinové produkty, přičemž protein TRAP2 odpovídá alternativní formě AY358621 (schematicky znázorněno na obr. 4 a 5). Isoformy se odlišují rozdílným sestřihem na C konci. Může docházet k využití exonu 2, v kterém se poměrně záhy generuje stop kodon (BC041608), nebo se využívá některého z exonů 4 (AY358621), 5 (AK128236), nebo 6 (AA213820, AW571408). Dalším rozdílem je různý počátek translace v prvním exonu. Zatímco varianty AK128236 a BC041608 používají první methionin, ostatní formy mají počátek translace až u konce prvního exonu. Z databázových údajů lze usuzovat, že druhý methionin se jako počátek translace využívá častěji. Genové produkty využívající druhý methionin (AY358621, AA213820, AW571408) obsahují signální sekvenci, která se neodštěpuje a tvoří transmembránovou oblast proteinu. Tato vlastnost je typická pro většinu transmembránových adaptorových proteinů. Ostatní dvě isoformy (AK128236 a BC041608) jsou s největší pravděpodobností cytoplasmatické proteiny. To je též důvodem, proč nebyly identifikovány hned v prvním databázovém průzkumu, kde jsme hledali proteiny mající blízko N-konce transmembránovou oblast. Existenci jednotlivých isoform je nutné experimentálně ověřit a to jak na transkripční, tak na proteinové úrovni. V případě, že všechny formy opravdu reálně existují, nabízí se zde možnost zajímavé vzájemné funkční regulace a to především mezi formou AY358621 (TRAP2) a variantami AA213820, AW571408, které postrádají důležité strukturní motivy.

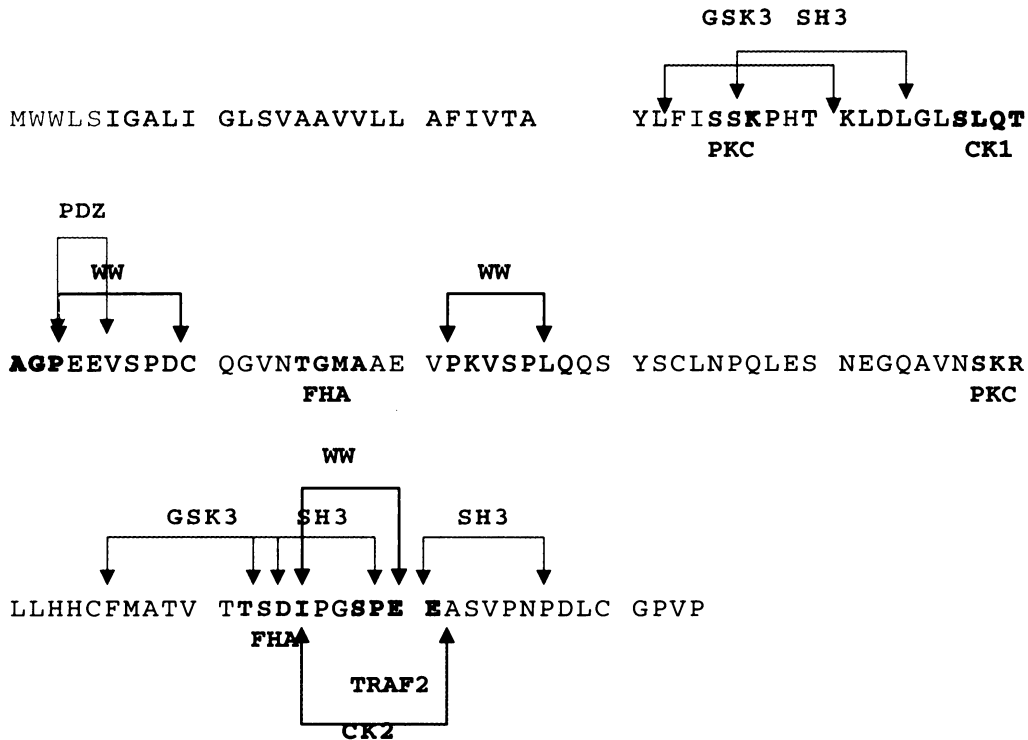
cDNA AY358621 (524 bp) byla identifikována v rámci rozsáhlého projektu zaměřeného na identifikaci nových sekretovaných a transmembránových proteinů [97]. Translační produkt AY358621 má 134 aa, teoretickou molekulovou hmotnost 14120 Da a teoretický pI 4,7.

V cytoplasmatické části proteinu TRAP2 se nacházejí 2 tyrosiny, 12 serinů, 6 threoninů. Pomocí programů <http://elm.eu.org> a <http://scansite.mit.edu/> bylo zjištěno, že dále obsahuje tři potenciální vazebná místa pro SH3 doménu, a tři potenciální vazebná místa pro WW doménu typu IV. Důležité je vazebné i fosforylační místo pro MAPK kinázy. Nejzajímavější je ale potenciální vazebný motiv pro adaptorový protein TRAF2 (klíčový protein signalizace přes receptor pro cytokin TNF). Vzhledem k velkému množství serinů, threoninů a potenciální vazby FHA domény (FHA = „forkhead associated domain“, doména vážící se na fosfoserin nebo fosfothreonin, tedy jakýsi ekvivalent SH2 domény) je pravděpodobné, že bude tento protein využíván spíše v signalizacích.



Obrázek 1: Schematické znázornění produktů genu MGC52498 v jednopísmenném a aminokyselinovém kódu. Každá varianta je označena podle databáze Genbank, barevně jsou znázorněny rozdíly v sestřihu jednotlivých alternativních forem, tučné je vyznačena sekvence odpovídající TRAP2, hypotetická transmembránová oblast je vyznačena tučně a podtržením, potenciální palmitylační motiv potom růžovou barvou písma.

založených na fosforylaci serinů a threoninů než na tyrosinové fosforylaci. Všechny vazebné motivy shrnuje Tabulka 2 a Obrázek 6.



Obrázek 6: Umístění vazebných motivů v molekule lidského TRAP2.

Homolog TRAP2 byl dosud identifikován u myši (*Mus musculus*), potkana (*Rattus norvegicus*), psa (*Canis familiaris*), krávy (*Bos taurus*), makaka (*Macaca mulatta*). Porovnáním těchto sekvencí s lidskou (obr. 7) vyplývá, že nejvíce konzervovaná je část molekuly těsně za transmembránovou oblastí a dále C-konec proteinu. Je proto pravděpodobné, že právě tyto části proteinu budou funkčně nejvýznamnější. Nachází se zde i většina předpovězených vazebných motivů (viz. obr. 6). Tyr 81, který by mohl být fosforylovaný Src kinázami, se nachází pouze u člověka a makaka, na druhou stranu většina serinů i threoninů je v proteinu TRAP2 mezidruhově velmi konzervovaná, což opět naznačuje, že by jejich fosforylace mohla být pro funkci tohoto proteinu významnější než fosforylace tyrosinu. Mezi vysoce homologní oblasti patří i vazebné místo pro adaptorový protein TRAF2.

Podle expresních (mRNA) dat by se TRAP2 měl nacházet kromě imunitního systému též slabě ve svalech a v mozku. Pomocí genových čipů bylo dále zjištěno, že

TRAP2 je exprimován především v B lymfocytech (http://linkage.garvan.unsw.edu.au/public/microarrays/Arthritis_Inflammation/index.html).

Tabulka 2: Seznam strukturních a vazebných motivů v molekule TRAP2.

Druh motivu	Název motivu	Umístění	Sekvence
Fosforylační motivy pro kinázy	GSK3	33-40	FISSKPHT
		106-113	FMATVTTS
	PKC	35-37	SSK
		98-100	SKR
	CK1	47-53	SLQTAGP
CK2	115-121	IPGSPEE	
Vazebné motivy pro	„Prolin-directed“ kinázy (MAPK)	54-60	EEVSPDC
		72-78	PKVSPLQ
		115-121	IPGSPEE
	SH3	37-44	KPHTKLDL
		113-119	SDIPGSP
		121-127	EASVNP
Vazebné motivy pro	WWIV	54-59	EEVSPD
		72-77	PKVSPL
		115-120	IPGSPE
	FHA	65-68	TGMA
		112-115	TSDI
TRAF2	118-121	SPEE	
Další motivy	PDZ doménu	53-56	PEEV
	Erk-D doména	37-53	KPHTKLDLGLSLQTAGP
	Transmembránová oblast	6-32	IGALIGLSVAADVLLAFIVTACVLCYL
	Palmitylační motiv	27-30	CVLC

člověk	MWWLSIGALIGLSVA	AVVLLAFIVT	A	YLFIS	SKPHTKLDLG	LSLQTAGP-EE
myš	IGALVGLSTA	AVVLLAFLIT	A	YLFIS	SKPQTKLDPG	LSLQTTGS-KE
potkan	NCWYGIGALVGLSTA	AVVLLAFLIT	AF	YLFIS	SKPHTKLDPG	LSLQTTGS-KE
pes	SIGALVGLSIA	AVVLLAFIVT	A	YLFIN	SKPHTKLDPG	LSLQPADSREE
kráva	TGALVGLSIA	AVVLLAFIVT	A	YLFIS	SKPHTKLDPG	LNLQTTDP-DE
makak	IGALVGLSVA	AMVLLTFIVT	A	YLFIS	SKPHTKLDLG	LSLQTAGP-EE

člověk	VSPDCQGVNT	GMAAEVPKVS	PLQQSYSCLN	PQLESNEGQA	VNSKRLHHC
myš	MSPDHHGLNT	AIPMEVPGVS	SPRQSSSS-N	THLESNKKQT	VSPTCLPQNQ
potkan	MSPDHQGLNT	AIMMEVPGVS	SPRQS-SSLN	TRLESNERQT	VGPRGLLQNG
pes	GPPGCQGGNA	GNWMEVPGTS	TLEQNHPFLS	PRLDGTEEQP	VHPRLLQHC
kráva	APSDCQGRNT	GNSVEVRGVS	PLRQSHPFNL	SWLDCNEEQA	KDPKRLQHC
makak	VSPDCQGVNT	GMAAEVPRVS	PLRQSYPCLN	PQLESNEGQV	VNSKRLHHC

člověk	FMATVTTSDI	PGSPPEEASVP	NPDLCGPVP
myš	FMATVTASNI	PGSPDEISVP	TPGPHGPVP
potkan	FMATVTASHI	PDSPEEASVP	TPDPYGPAP
pes	FMARVTASDI	PGSPPEEAPVP	NLDPCGPAP
kráva	FMATVTAGDL	PRSPPEE--VP	VPSLLYPAP
makak	FMATVTTSDI	PGSPPEEASVP	NPDPRGPVP

Obrázek 7: Porovnání sekvencí homologů TRAP2. Šedivě vyznačena transmembránová oblast, žlutě palmytilační motiv, červeně shodné části sekvence.

4.2 Klonování TRAP2, příprava expresních vektorů a rekombinantního proteinu

4.2.1 Získání cDNA kódující protein TRAP2 z lidské leukocytární knihovny a příprava konstruktů TRAP2/pBSK

Sekvence DNA kódující protein TRAP2 byla amplifikována ze dvou typů cDNA knihoven - leukocytární (HL4050AH) a z buněk nádorové lymfocytární linie Jurkat (T lymfocyty) (HL4513AK) pomocí PCR. Pro amplifikaci byly použity následující primery:

TRAP2-ERI-START: CGGAATTCATGTGGTGGCTCAGCATTGGC

TRAP2-ERI-STOP: CGGAATTCTTATGGGACTGGTCCACATAGG

Oba primery obsahují na svém 5' konci restrikční místo pro enzym EcoRI. Očekávaná velikost získaného fragmentu měla být kolem 500 bp. Byly získány dva fragmenty s velikostí okolo 500 bp: první s velikostí mezi 450-500 bp (označen T2S), druhý mezi 500-550 (označen T2L). Oba byly vyizolovány z agarosového gelu. Po štěpení enzymem EcoRI byly ligovány do plazmidu pBSK (štěpeného enzymem EcoRI). Ligační směs byla použita k transformaci bakterií *E. coli* kmene TOP10F. Od obou fragmentů bylo vybráno 5 kolonií vyrostlých na Petriho misce, které byly zaočkovány do 3,3 ml LB média s ampicilinem. Po 12-16 hodinách inkubace při 37°C byla izolována plazmidová DNA. Přítomnost inzertu byla ověřena restrikční analýzou. Od každého původního PCR fragmentu byl získán jeden pozitivní klon (T2-S1 a T2-L2). Oba klony byly sekvenovány, získané sekvence byly porovnány s údaji uvedenými v databázi a bylo zjištěno, že sekvence klonu T2-S1 odpovídá sekvenci proteinu TRAP2. Pro další práci byl používán klon TRAP2-S1/pBSK (dále již pouze TRAP2/pBSK).

4.2.2 Příprava expresních vektorů TRAP2/pEF-BOS-3 a TRAP2/pEFIRES-N

Pro experimenty vyžadující expresi proteinu TRAP2 v savčích buňkách bylo třeba připravit vhodný expresní konstrukt obsahující sekvenci kódující TRAP2. K tomuto účelu byly použity dva typy eukaryotických expresních vektorů pEF-BOS-3 a pEFIRES-N. Plazmid pEFIRES-N obsahuje nejen sekvenci umožňující bakteriální selekci pozitivních klonů, ale též sekvenci zaručující resistenci vůči antibiotiku neomycin. Díky tomu je možné připravit stabilní klony v eukaryotických buňkách exprimující protein TRAP2. Plazmid pEF-BOS-3 obsahuje pouze bakteriální resistenci, používá se pro transientní krátkodobou transfekci eukaryotických buněk.

Fragment obsahující sekvenci kódující protein TRAP2 (včetně stop kodonu) byl vyštěpen z konstruktu TRAP2/pBSK restrikční endonukleázou EcoRI a klonován do plazmidů pEF-BOS-3 a pEFIRES-N štěpených stejným enzymem. Získaným materiálem byly transformovány bakterie *E. coli* TOP10F a z Petriho misky bylo vybráno 6 kolonií od konstruktů TRAP2/pEFIRES a 5 kolonií od konstruktů TRAP2/pEF-BOS-3. U výsledných konstruktů (TRAP2/pEF-BOS-3 a TRAP2/pEFIRES-N) byla ověřena přítomnost a orientace inzertu restrikčním mapováním i sekvenováním za použití vnitřních

sekvenačních primerů (TRAP2-seq(366+); TRAP2-seq(444-)). Shoda získané sekvence byla ověřena porovnáním s databází.

4.2.3 Příprava expresního vektoru TRAP2/pFLAG-CMV-5a

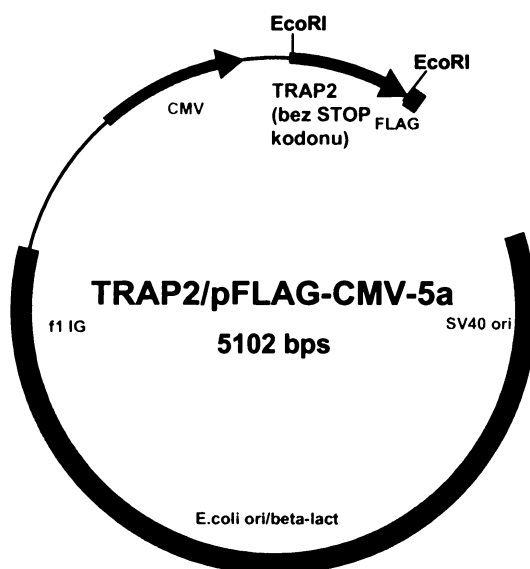
Tzv. „flag-tag“ je sekvence 8 aminokyselin (asp-tyr-lys-asp-asp-asp-asp-lys), která se jako jakási značka uměle připojí k sekvenci kódující příslušný protein. Výhodou je, že pro izolaci a detekci rekombinantního proteinu lze použít běžně dostupné monoklonální protilátky proti flag-tag, aniž bychom museli mít protilátky proti vlastnímu proteinu. Dalším důvodem pro použití flag-konstruktu může být i potřeba odlišit endogenní protein od proteinu vneseného do buněk uměle. Snadné vytvoření fúzního proteinu s připojeným flag-tag umožňují plazmidy pFLAG-CMV, v jejichž sekvenci je buď za nebo před polylinkerem obsažena i sekvence kódující flag-tag. Pro naše účely bylo nejvhodnější vložit flag-tag na C-konec proteinu. Sekvence kódující daný protein je bez stop kodonu ligována do příslušného restrikčního místa pFLAG-CMV-5a, za nímž je umístěn flag-tag následovaný stop kodonem.

Fragment obsahující sekvenci kódující protein TRAP2 bez stop kodonu byl vytvořen pomocí PCR. Jako templát sloužil konstrukt TRAP2/pBSK. Pro amplifikaci byly použity následující primery:

TRAP2-ERI-START: CGGAATTCATGTGGTGGCTCAGCATTGGC

TRAP2-ERI(-) bez stop: CCGGAATTCTGGGACTGGTCCACATAGGTC

Oba primery obsahují na 5' konci restrikční místo rozeznávané endonukleázou EcoRI. Po naštěpení PCR fragmentu a vyizolování z agarosového gelu byl fragment ligován do stejně naštěpeného vektoru pFLAG-CMV-5a. Ligační směsí byly transformovány bakterie *E.coli* kmenu TOP10F. Bylo vybráno 5 kolonií na Petriho misce, které byly zaočkovány do 3,3 ml LB media s ampicilinem, z nichž byla po inkubaci připravena plazmidová DNA. Přítomnost a orientace inzertu byly ověřeny restrikčním mapováním. Shoda získané kódující sekvence s údaji v databázi byla ověřena sekvenací DNA. Obrázek 8 zobrazuje schematický náčrt konstruktu TRAP2/pFLAG-CMV-5a.



Obrázek 8: Schematický nákres konstruktů TRAP2/pFLAG-CMV-5a. Sekvence kódující protein TRAP2 bez stop kodonu byla vložena do místa rozpoznávaného restriční endonukleázou EcoRI, za níž následuje flag-tag. CMV – CMV promotor, hGH poly A (human growth hormon poly A) – konec replikace, SV40 ori – počátek replikace v eukarytických buňkách, E. coli ori/beta-lact – počátek replikace v bakteriích a gen pro resistenci vůči ampicilinu, f1 IG – počátek replikace bakteriofága.

4.2.4 Příprava expresních vektorů TRAP2/pET28b a TRAP2/pET42b

Pro produkci rekombinantního proteinu (potřebného k přípravě protilátek) bylo nutné připravit vhodný bakteriální expresní konstrukt. Cílem bylo vytvořit DNA kódující fúzní protein obsahující cytoplasmatickou část proteinu TRAP2 (aa 35-134) a na jeho N-konci připojenou sekvenci kódující protein glutathion-S-transferázu (plazmid pET42b) nebo sekvenci „6xHis“ (plazmid pET28b). Sekvence GST resp. „6xHis“ je používána pro izolaci rekombinantního proteinu pomocí afinitní izolace na sorbentu GTT-Sepharosy resp. TALON™.

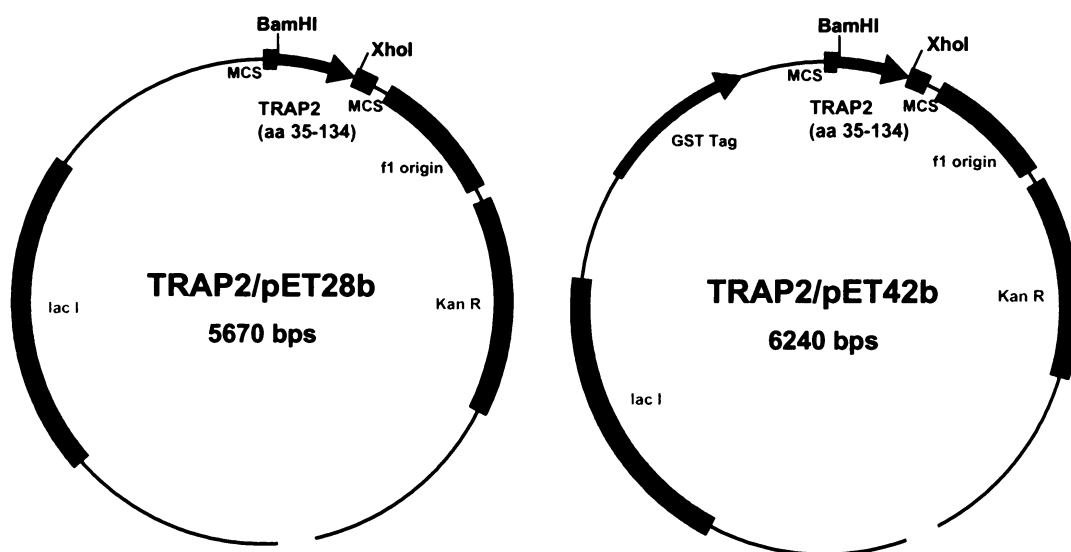
Fragment kódující část proteinu TRAP2 byl připraven amplifikací z templátu TRAP2/pBSK pomocí PCR. Pro reakci byly použity primery:

TRAP2-BamHI(195+): CGGGATCCGAGCTCTAAGCCCCACACAAAG

TRAP2-XhoI(497-)-STOP: CCGCTCGAGTTATGGGACTGGTCCACATAG

První primer vnáší na 5' konec restriční místo rozeznávané enzymem BamHI, druhý primer vnáší na 3' konec restriční místo pro endonukleázu XhoI. Naštěpený PCR fragment byl ligován do vektoru pBSK, kde byla jeho přítomnost a sekvence ověřena

restrikčním mapováním a sekvenováním. Teprve po tomto ověření byl fragment znovu vyštěpen a ligován do expresních vektorů pET28b a pET42b. Ligační směsi byly transformovány do bakterií *E.coli* kmenu TOP10F. Od každého konstruktů byly vybrány 3 kolonie z Petriho misky, z kterých byla izolována plazmidová DNA. Přítomnost inzeru byla ověřena restrikčním mapováním. Obrázek 9 zobrazuje schema obou konstruktů. Pro zkušební produkci byly použity konstrukty TRAP2/pET42b-1,2 a TRAP2/pET28b-1,2.

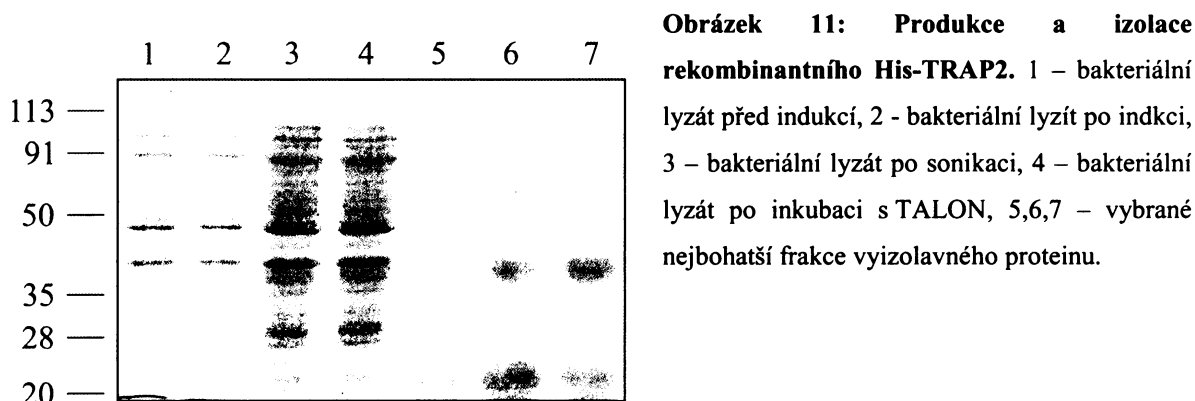
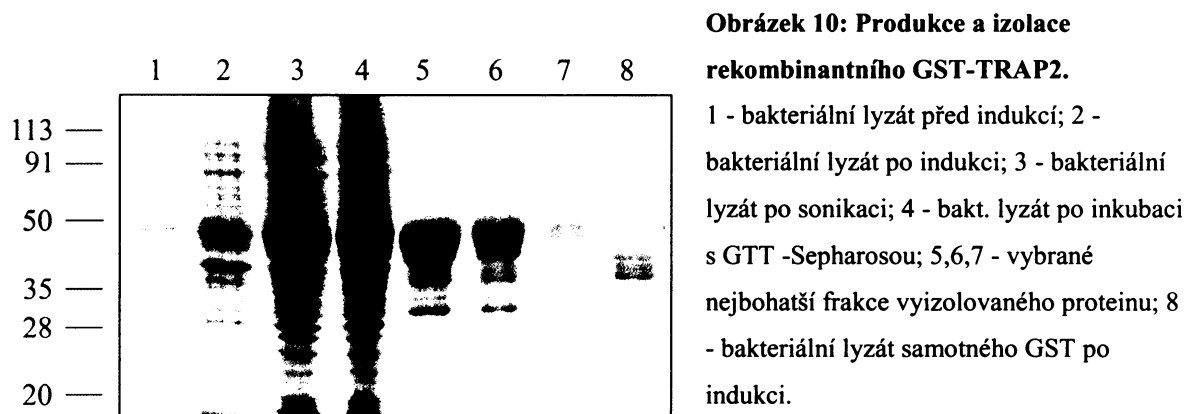


Obrázek 9: Schematický náčrt konstruktů TRAP2/pET28b a TRAP2/pET42b. Sekvence kódující intracelulární část proteinu TRAP2 byla vložena do míst rozpoznávaných restrikčními endonukleázami BamHI a XhoI. MCS (multiple cloning site) - polylinker, Kan R - resistance proti antibiotiku kanamycin, GST Tag – část sekvence kódující glutathion-S-transferázu, lac I - gen pro lac represor, ori – počátek replikace, F1 origin – počátek replikace bakteriofága.

4.2.5 Příprava rekombinantního proteinu

Připravenými konstrukty TRAP2/pET28b-1,2 a TRAP2/pET42b-1,2 byly transformovány bakterie *E.coli* kmenu BL21. Funkčnost připravených konstruktů byla prokázána zkušební produkcí v 3,5 ml LB media s kanamycinem. Po přidání IPTG byly bakterie inkubovány při 37°C po dobu 3-4 hod. Odebrané vzorky bakterií (vždy 0,2 ml) před a po indukci byly smíchány s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrem pro SDS PAGE a poté byly analyzovány pomocí SDS PAGE (15% gel). Proteiny byly detekovány

barvením gelu Coomassie Brilliant Blue R 250. Paralelně byl proveden „Western blotting“ na PVDF membránu a pro specifickou detekci rekombinantního proteinu byl použit „konjugát“ peroxidázy s Ni^{2+} (váže se na sekvenci „6xHis“). Pro vlastní produkci rekombinantního proteinu byly použity klony TRAP2/pET42b-1 a TRAP2/pET28b-2, které měly lepší produkci. Izolace rekombinantního proteinu byla provedena z bakterií získaných z 1000 ml bakteriální kultury na sorbentu TALON™ (TRAP2/pET28b-2) resp. GTT-Sepharosy 4B (TRAP2/pET42b-1). Bylo získáno přibližně 7 mg GST-TRAP2 a 3 mg His-TRAP2. Protein His-TRAP2 byl použit pro screening myších monoklonálních anti-peptidových protilátek (provedeno jinými členy laboratoře). Oba proteiny jsou nyní používány pro vývoj nových monoklonálních protilátek. Oba proteiny budou i využity při identifikaci případných asociovaných molekul (např. TRAF2).



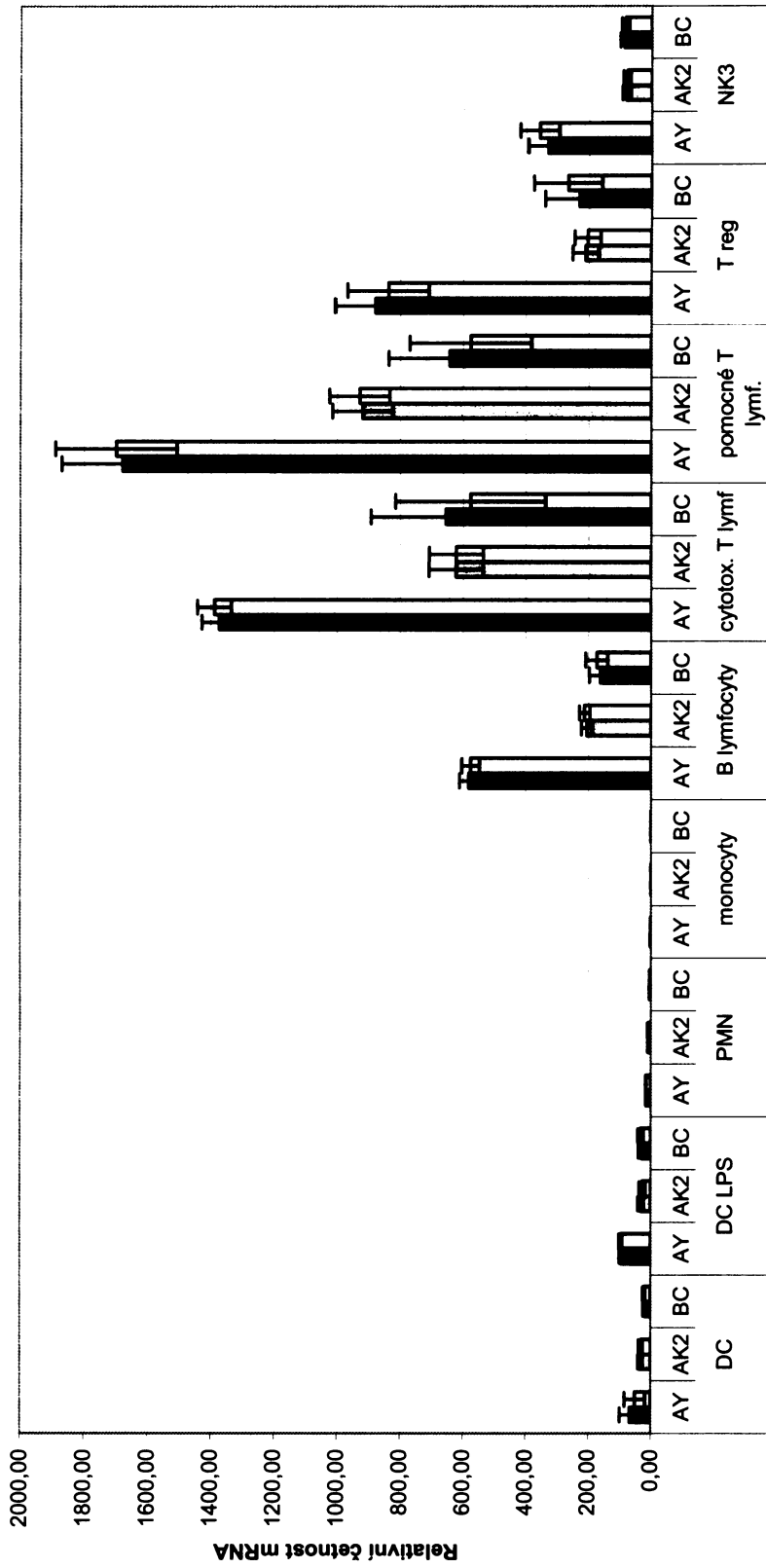
4.3 Charakterizace proteinu TRAP2 v leukocytárních buňkách

4.3.1 Exprese TRAP2 a jeho isoformem v leukocytárních buňkách stanovená pomocí qRT PCR

Nejprve jsme chtěli zjistit, v jakých leukocytárních buňkách lze TRAP2 a jeho isoformy detekovat na transkripční úrovni. K tomuto účelu byly z krve lidských dárců připraveny jednotlivé subpopulace lidských leukocytárních buněk metodou buněčného sortování průtokovou cytofluorometrií (provedeno MUDr. Ondřejem Horváthem), z kterých byla izolována RNA (viz. 3.2.13). Z připravené celkové RNA byla provedena reverzní transkripce (viz. 3.2.14). Úroveň exprese TRAP2 a jeho isoformem byla stanovena pomocí kvantitativní real-time PCR. Pro reakci bylo navrženo několik sad primerů detekujících nejenom TRAP2, ale také jeho hlavní isoformy AK128236 a BC041608. Jako referenční neboli tzv. „housekeeping“ gen byl použit gen pro glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (GAPDH). Všechny primery včetně jejich sekvencí uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Přehled primerů použitých pro real-time PCR.

Detekovaný produkt	Název primeru	Zkratkovité označení směsi primerů	Nukleotidová sekvence primeru (od 5' k 3' konci)
AY358621 (TRAP2)	huF_Trp2(exon3)_RT	AY	GACCTGGGCTTGAGCTTACA
	huR_Trp2(exon4)_RT		CCTTGGCAGTCAGGAGAAAC
AK128236, BC041608	huF_Trp2(exon1)_RT	AK1	TTCTTCCCCTACGAGCACAG
	huR_Trp2(exon3)_RT		TGAAGGCGAGAAGAACCACT
AK128236, BC041608	huF_Trp2(exon3)_RT	AK2	GACCTGGGCTTGAGCTTACA
	huR_Trp2(exon5)_RT		CCTCTTGTTTGTGGCAACCT
BC041608	huF_Trp2(exon1)_RT	BC	TTCTTCCCCTACGAGCACAG
	huR_Trp2(exon2)_RT		CGATCACTTGAGTCCAGGAA
GAPDH	FhGAPDH#1198real	GAPDH	CACCACACTGAATCTCCCCT
	RhGAPDH#1252real		CCCCTCTTCAAGGGGTCTAC



Graf 1: Relativní četnost mRNA TRAP2 a jeho isoform v jednotlivých subpopulacích lymfocytů. Pro každý sledovaný gen je do grafu vynesena průměr (tmavý odstín) i median (světlý odstín). Jednotlivé sledované produkty PCR reakce jsou odlišeny barevně: AY (TRAP2) modře, AK2 oranžově, BC zeleně. DC = dendritické buňky; DC LPS = dendritické buňky stimulované lipopolysacharidem; PMN = polymorfonukleární leukocyty; T reg = regulační T lymfocyty (CD4⁺CD25⁺); NK3 = NK buňky (CD16⁺CD56⁺CD3⁺); B lymfocyty (CD19⁺); cytotoxické T lymfocyty (CD8⁺CD25⁺); pomocné T lymfocyty (CD4⁺CD25⁺).

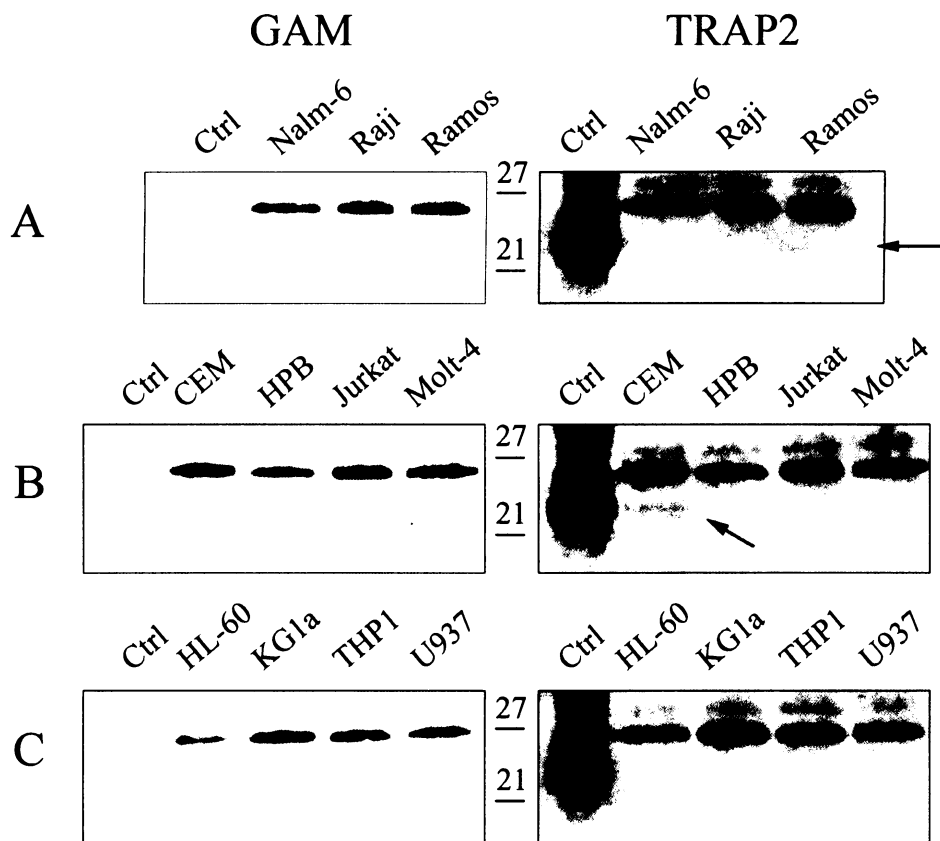
Všechny vzorky byly připraveny v triplikátech, negativní kontrola (vzorky, kam nebyla během reverzní transkripce přidána reverzní transkriptáza) byly připraveny v duplikátech, stejně jako kontrola, kam nebyl přidán žádný templát. Z negativních kontrolních vzorků se ukázalo, že sada primerů označená AK1 je pro real-time PCR nepoužitelná, pravděpodobně docházelo k tvorbě tzv. primer-dimerů. Data získána touto sadou primerů nebyla proto vyhodnocována. Získané hodnoty Ct TRAP2 a jeho isoform byly normalizovány na Ct GAPDH a poté byly vztaženy na Ct monocytů, kde byla exprese všech sledovaných mRNA nejnižší. Do grafu byl poté vynesena průměr a median hodnoty 2^{Ct} odpovídající relativní četnosti mRNA.

Z grafu 1 je patrné, že TRAP2 i jeho isoformy se svou transkripční expresí omezují na lymfoidní subpopulace leukocytů. V myeloidních populacích jsou slabě exprimovány též u dendritických buněk. Největší exprese byla zjištěna u T lymfocytů. Četnost mRNA TRAP2 je u všech sledovaných subpopulací vyšší než u isoform AK128236 a BC041608.

4.3.2 Expese TRAP2 v buněčných liniích.

Pro zjištění, ve kterých typech buněk je protein TRAP2 přirozeně exprimován, byla zkoumána exprese proteinu TRAP2 v některých vybraných leukocytárních buněčných liniích.

Buňky buněčných linií Jurkat, CEM, MOLT-4, HPB-ALL (T lymfocytární linie), Ramos, Raji, Nalm-6 (B lymfocytární linie), THP-1, HL-60, U937 a KG1a (myeloidní linie) byly solubilizovány 1% detergentem LM a buněčné lyzáty byly imunoprecipitovány na Sepharose 4B s navázanou myší monoklonální protilátkou TRAP2-05. Proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (14% gel), elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly nejprve barveny samotnou sekundární protilátkou GAM-HRP IgG + IgM (H+L), protein TRAP2 byly detegován pomocí monoklonální protilátky TRAP2-04. Jako pozitivní kontrola byl použit lyzát ze stabilních transfektantů TRAP2 v buňkách Ramos klon D5.



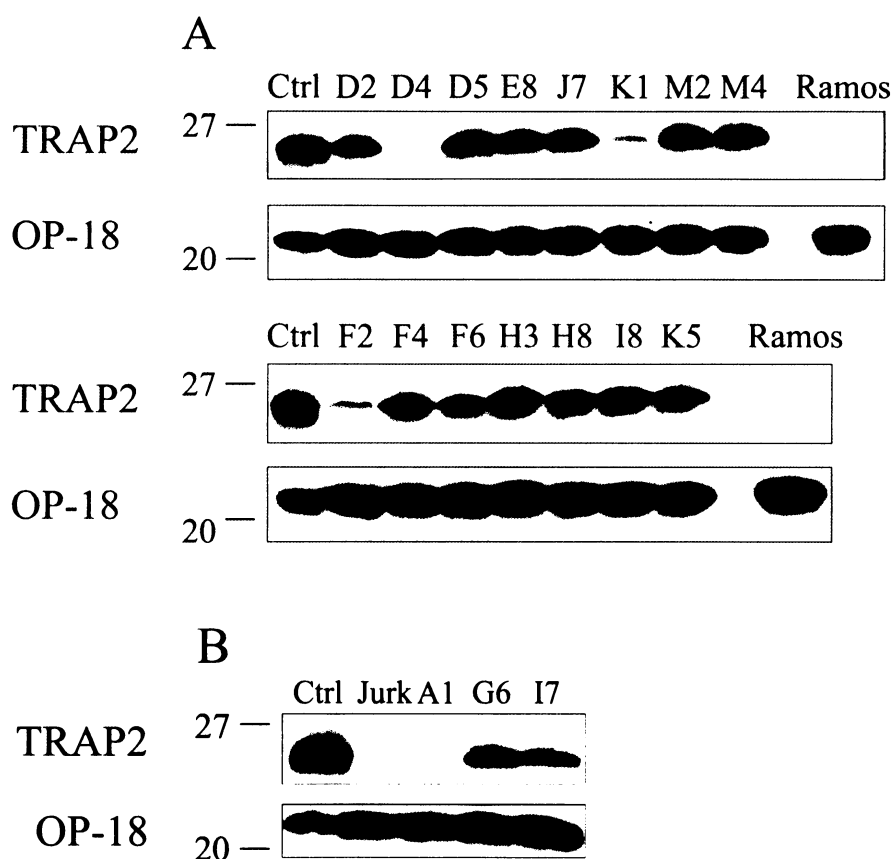
Obrázek 12: Expese proteinu TRAP2 v buněčných liniích po imunoprecipitaci. Z jednotlivých leukocytárních linií byly připraveny lyzáty v 1% LM, následně byla provedena imunoprecipitace na Sepharose s kovalentně navázanou protilátkou TRAP2-05. Vzorky byly analyzovány na SDS PAGE a elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly nejprve barveny samotnou sekundární protilátkou GAM-HRP IgG + IgM (H+L) (levý panel), protein TRAP2 byl detekován monoklonální protilátkou TRAP2-04 (pravý panel). Jako pozitivní kontrola je použit lyzát stabilních transfektantů TRAP2 v buňkách Ramos klon D5 (označen „Ctrl“). [A] B lymfocytární linie; [B] T lymfocytární linie; [C] Myeloidní linie.

Na obrázku 12 je vidět, že TRAP2 je z testovaných liniích slabě exprimován v buňkách Ramos (B lymfocyty) a dále v linii CEM (pre-T lymfocyty). V myeloidních buňkách není exprimován vůbec, což koreluje s daty mRNA exprese TRAP2 získané metodou real-time PCR z lidských leukocytárních buněk (viz. 4.3.1). Dalším významným pozorováním je také to, že zatímco předpovězená molekulová hmotnost TRAP2 je přibližně 14 kDa, na SDS PAGE tento protein migruje až v oblasti odpovídající 23-25 kDa. Tento jev může být způsoben jeho poměrně nízkým pI (kolem 4,7), díky němuž se na něj může hůře vázat SDS.

4.3.3 Příprava stabilních transfektantů v buňkách Ramos a Jurkat

Protože nebyla nalezena vhodná leukocytární buněčná linie exprimující TRAP2 přirozeně a ve větším množství, bylo pro další pokusy nutné připravit stabilní transfektanty TRAP2, které by tento protein stabilně exprimovaly ve větším množství.

K přípravě stabilních buněčných klonů byly použity buněčné linie Ramos a Jurkat. K transfekci byl použit konstrukt TRAP2/pEFIRE5-N. Po 24 hodinové inkubaci byly



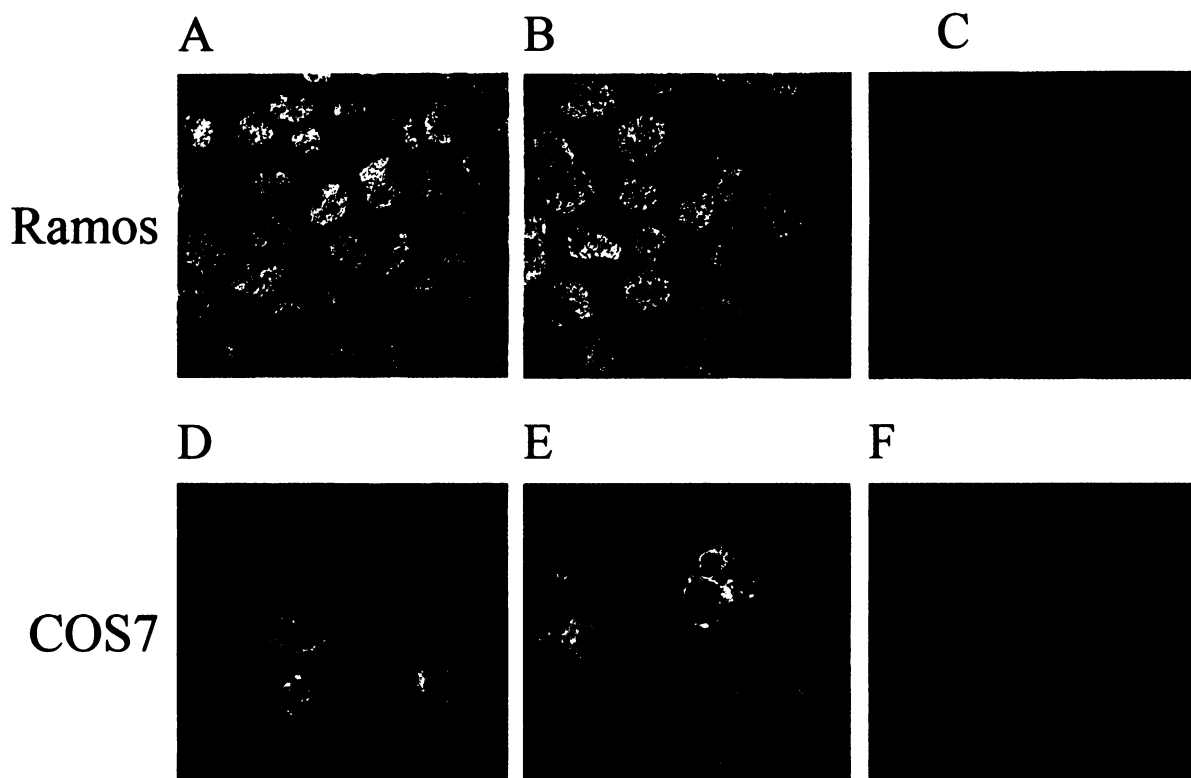
Obrázek 13: Expresse proteinu TRAP2 v jednotlivých kloněch stabilních transfektantů. Ze všech vyselektovaných klonů byl připraven buněčný lyzát v 1% LM, z něhož byly připraveny vzorky pro SDS PAGE. Proteiny byly elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Protein TRAP2 byl detekován monoklonální protilátkou TRAP2-04, jako kontrola na celkové množství proteinů bylo použito barvení cytoplazmatického proteinu OP-18 (stathmin) králičím antisérem Ra OP-18. [A] Stabilní transfektanty v buňkách Ramos. [B] Stabilní transfektanty v buňkách Jurkat. (Jednotlivé klony jsou označeny písmenem s číslem; Ramos, Jurk = negativní kontrola – lyzát připravený z netransfekovaných buněk; Ctrl = pozitivní kontrola – lyzát připravený z transienčních transfektantů v buňkách COS7.)

transfekované buňky rozpipetované do 96-jamkových mikrotitračních destiček pro tkáňové kultury v koncentraci 50, 500 a 5000 buněk/200 μ l média. Další postup byl dodržen podle odstavce 3.2.30. Jako selekční antibiotikum byl použit geneticin 418 (G-418, 4 mg/ml). Přítomnost a úroveň exprese proteinu TRAP2 byla ověřena pomocí Western blottingu barvením protilátkou TRAP2-04 (Obrázek 13) a cytofluorometrickou analýzou permeabilizovaných buněk (neukázáno). Jako pozitivní kontrola byly použity buňky COS7 transfekované stejným konstruktem pomocí LipofectamineTM 2000 (*Invitrogen*). Jako negativní kontrola byl použit buněčný lyzát připravený z netransfekovaných buněk Ramos a Jurkat. Celkové množství proteinů pro srovnání ukazuje barvení cytoplazmatického proteinu OP-18 (stathmin) králíčím antiserem Ra OP-18.

Z obrázku 13 vyplývá, že se podařilo připravit stabilní transfektanty z obou linií. Nicméně z linie Jurkat se úspěšně vyseletovaly pouze dva klony. Pro další práci byly použity především klony D5 a J7 z Ramos a klony G6 a I7 z Jurkat.

4.3.4 Buněčná lokalizace TRAP2

Pro ověření lokalizace TRAP2 v plazmatické membráně byly použity buňky COS7 transientně transfekované konstruktem TRAP2/pEF-BOS-3 a stabilní klon D5 v buňkách Ramos. Transientně transfekované buňky byly zpracovány 36 – 48 hodin po transfekci. Fixace byla provedena paralelně methanolem i 4% paraformaldehydem (viz. 3.2.32). Stabilní transfektanty byly fixovány pouze paraformaldehydem. Protein TRAP2 byl detekován pomocí myší monoklonální protilátky TRAP2-04 a sekundární protilátky GAM-Alexa Fluor 488 (konjugované s fluorescenčním barvivem Alexa 488). Jako negativní kontrola sloužily buňky značené sekundární protilátkou. Pro vizualizaci jader bylo použito barvivo DRAQ5TM rozpoznávající DNA.



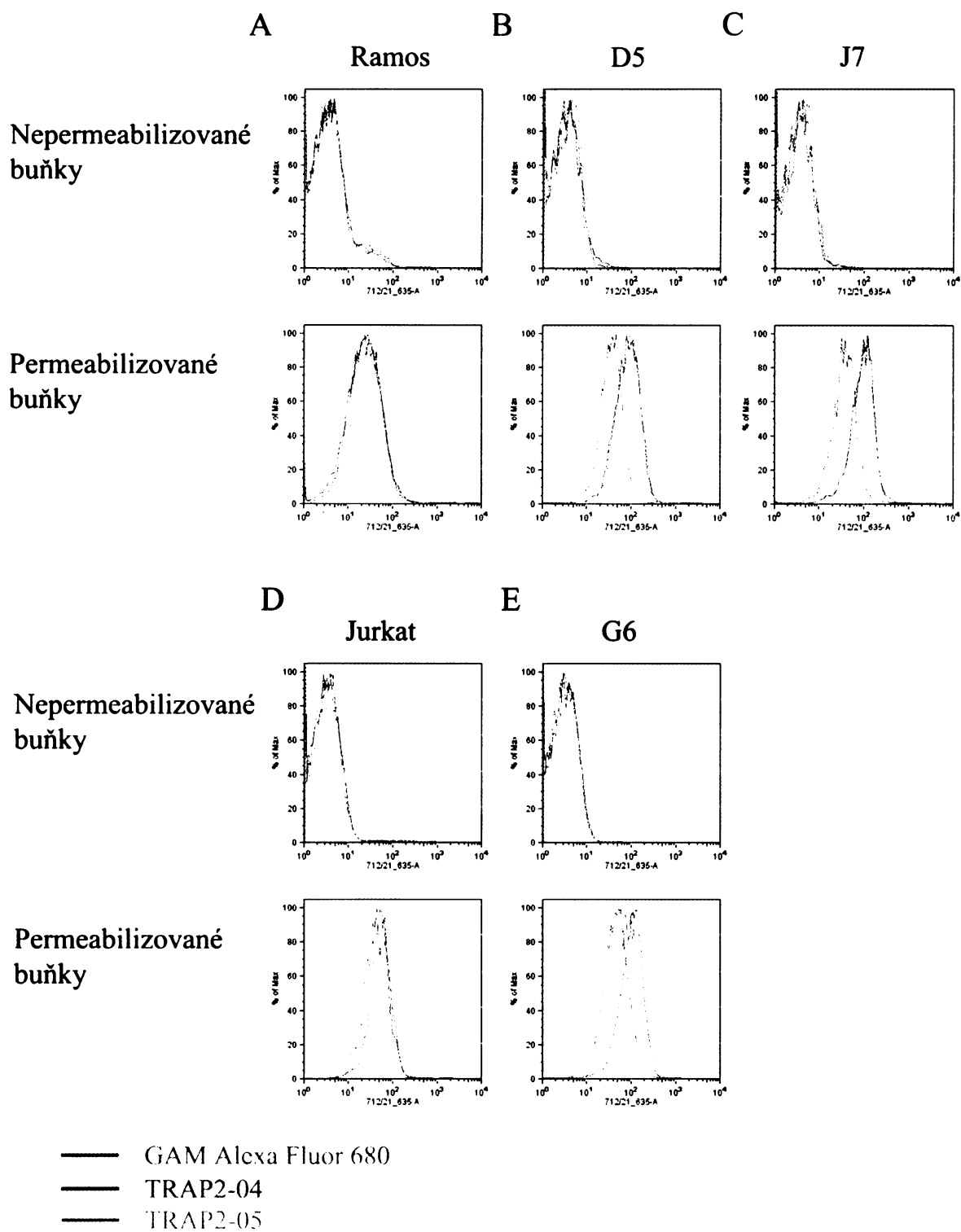
Obrázek 14: Buněčná lokalizace proteinu TRAP2. [A] Buňky Ramos, [B, C] stabilní klon TRAP2 D5 v buňkách Ramos, všechny preparáty byly připraveny fixací paraformaldehydem. [D, E, F] Buňky COS7 transientně transfekované konstruktem TRAP2/pEF-BOS-3: [D] fixace methanolem, [E, F] fixace paraformaldehydem. Protein TRAP2 byl detekován monoklonální protilátkou TRAP2-04 a sekundární protilátkou GAM-Alexa Fluor 488 (zelená fluorescence) [A, B, D, E]. Jako negativní kontrola bylo použito barvení pouze sekundární protilátkou [C, F]. DNA (jádra) byla vizualizována pomocí DRAQ5TM (červená).

Obrázek 14 ukazuje, že se TRAP2 nachází především na plasmatické membráně. U transientních transfektantů velká část proteinu pravděpodobně zůstává i neprocesovaná v endoplasmatickém retikulu. Zajímavý je rozdíl mezi netransfektovanými a stabilně transfektovanými Ramos. U netransfektovaných buněk se protilátkou TRAP2-04 barví jakýsi jaderný protein, u stabilních transfektantů je to méně patrné. Z kapitoly 0 navíc vyplývá, že buňky Ramos exprimují TRAP2 přirozeně, ale ve velmi malém množství. Je také nutné podotknout, že protilátka TRAP2-04, barví na blotu „nespecificky“ protein s přibližnou molekulovou hmotností 40 kDa. Nelze tedy vyloučit jak možnost, že se TRAP2 může nacházet v jádře, tak to, že se v jádře deteguje nějaký křížově reagující protein. Je proto nutné tento pokus zopakovat s použitím jiné protilátky.

4.3.5 Membránová orientace proteinu TRAP2

Pro určení membránové orientace proteinu TRAP2 byly použity stabilní klony D5 a J7 v buňkách Ramos a klon G6 v buňkách Jurkat získané transfekcí konstruktem TRAP2/pEFIRES-N. Monoklonální protilátky TRAP2-04 a TRAP2-05 mají epitop poblíž C-konce proteinu TRAP2. Pokud je C-konec TRAP2 orientován do cytoplasmy, bude možné protein detekovat pouze po permeabilizaci buněk (digitoninem). Po značení buněk primární protilátkou TRAP2-04 nebo TRAP2-05 a promytí byly buňky dále inkubovány se sekundární protilátkou GAM Alexa Fluor 680. Po dalším promytí byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru. Jako negativní kontrola byly použity netransfekované buňky Ramos a Jurkat.

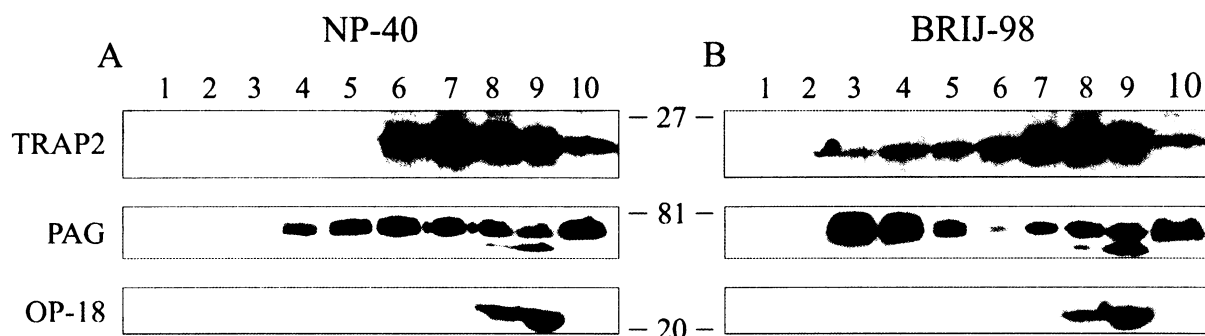
Je zřejmé, že monoklonální protilátky TRAP2-04 a TRAP2-05 nebyly schopné detekovat protein TRAP2 bez předchozí permeabilizace buněk (Obrázek 15), TRAP2 tedy představuje transmembránový protein typu III s C-koncem směřujícím do cytoplasmy.



Obrázek 15: Orientace proteinu TRAP2 v plasmatické membráně. Stabilní klony TRAP2/pEFIRES-N v buňkách Ramos [B, C], netransfekované buňky Ramos [A] resp. stabilní klon TRAP2/pEFIRES-N v buňkách Jurkat [E] a netransfekované buňky Jurkat [D] byly permeabilizované digitoninem nebo ne. Poté byly buňky značeny monoklonálními protilátkami TRAP2-04 a TRAP2-05 a sekundární protilátkou GAM Alexa Fluor 680 a analyzovány průtokovým cytometrem.

4.3.6 Distribuce proteinu TRAP2 ve frakcích po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu

Pro zjištění zda se protein TRAP2 nachází v membránových mikrodoménách byly použity stabilní transfektanty TRAP2/pEFIRES-N v buněčné linii Ramos, konkrétně klon J7. Buňky byly solubilizovány v 1% detergentu NP-40 nebo Brij-98 (tyto detergenty nerozpouštějí membránové mikrodomény). Buněčný lyzát byl centrifugován v sacharosovém gradientu, který byl poté rozebrán na frakce po cca 500 μ l. K sedimentu byl přidán 1 ml 1x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS PAGE a byla sonikována. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (12 % gel) a metodou „Western blotting“. Protein TRAP2 byl detekován myší monoklonální protilátkou TRAP2-04. Jako pozitivní kontrola sloužila detekce endogenního mikrodoménového proteinu PAG pomocí monoklonální protilátky MEM-255 a jako negativní kontrola detekce endogenního cytoplasmatického proteinu OP-18 (stathmin) pomocí králičího antiséra.



Obrázek 16: Distribuce proteinu TRAP2 po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu. Stabilní transfektanty TRAP2/pEFIRES-N v buněčné linii Ramos (klon J7) byly lyzovány paralelně v 1% NP-40 a v 1% Brij-98. Po ultracentrifugaci v sacharosovém gradientu bylo odebráno 9 frakcí po 0,5 ml, 10. frakce představuje sediment. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS PAGE, elektroforeticky přeneseny na nitroceluloseovou membránu a proteiny byly imunologicky detekovány (TRAP2 protilátkou TRAP2-04, PAG protilátkou MEM-255 a OP-18 králičím antisérem Ra OP-18). [A] Stabilní transfektanty TRAP2 v linii Ramos lyzované v 1% NP-40. [B] Stabilní transfektanty TRAP2 v linii Ramos lyzované v 1% Brij-98.

Je zřejmé, že část proteinu TRAP2 se nachází v membránových mikrodoménách buněk Ramos při solubilizaci v detergentu Brij-98 (Obrázek 16), ale nikoli při solubilizaci v detergentu NP-40. Pravděpodobným důvodem může být to, že NP-40 je silnějším

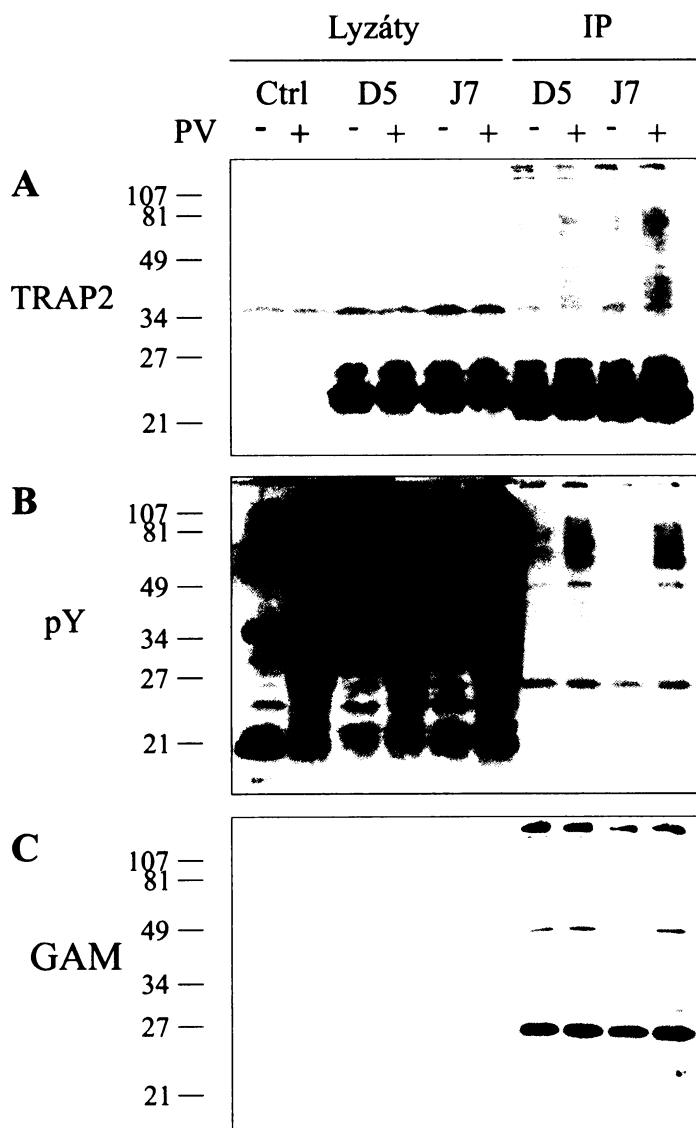
detergentem než Brij-98. Porovnáním s pozitivní kontrolou (protein PAG) je také zřejmá rozdílná distribuce TRAP2 a PAG. Zatímco většina proteinu PAG se nachází v membránových mikrodoménách u TRAP2 tomu tak není. V mikrodoménách se nachází pouze malá část z celkového množství TRAP2.

4.3.7 Fosforylace TRAP2 po aktivaci peroxovanadičnanem v buňkách stabilních transfektantů Ramos a Jurkat

Potenciální role TRAP2 v signalizačních drahách byla studována pomocí aktivace buněk peroxovanadičnanem, který do jisté míry arteficiálně stimuluje celou řadu signalizačních drah vedoucích k aktivace především proteintyrosin-kináz.

Stabilní klony TRAP2 v buňkách Ramos D5 a J7 a v buňkách Jurkat I7 byly aktivovány peroxovanadičnanem (viz. 3.2.28) a lyzovány v 1% LM. Buněčný lyzát byl imunoprecipitován na Sepharose 4B s navázanou myší monoklonální protilátkou TRAP2-05. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS PAGE (14% gel) a proteiny byly poté elektroforeticky přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Imunoglobuliny uvolněné během eluce byly detekovány protilátkou GAM-HRP IgG + IgM (H+L), která by se měla méně vázat na lehké řetězce imunoglobulinů. Fosforylované proteiny byly detekovány pomocí monoklonální protilátky proti fosfotyrosinu 4G10, protein TRAP2 byl detekován myší monoklonální protilátkou TRAP2-04.

Z obrázku 17/B je zřejmé, že po aktivaci peroxovanadičnanem došlo k výrazné fosforylaci řady proteinů nikoli však TRAP2. Na lyzátech jsou sice fosforylované proteiny s podobnou velikostí jako TRAP2, ty se ale neimunoprecipitují. Na obr. 17/A si nicméně můžeme povšimnout mírné redistribuce proužků odpovídajících TRAP2. Obecně se při fosforylaci proteinů mění jejich náboj a tudíž i mobilita během SDS PAGE, fosforylace proteinu je proto často provázena zdánlivým „zvýšením“ jeho molekulové hmotnosti. Po aktivaci lze něco obdobného pozorovat i u TRAP2. Otázkou zůstává, zda se může jednat například o serinovou nebo threoninovou fosforylaci. Tento aspekt bude dále studován.



Obrázek 17: Fosforylace TRAP2 po aktivaci peroxovanadičnanem v buňkách stabilních transfektantů Ramos. Netransfekované buňky Ramos (označeny Ctrl) a stabilní klony D5 a J7 byly aktivovány peroxovanadičnanem a následně byly imunoprecipitovány (IP) na Sepharose 4B s navázanou protilátkou TRAP2-05. Vzorky byly analyzovány na SDS PAGE a elektroforetický přeneseny na nitrocelulosovou membránu. TRAP2 byl detekován monoklonální protilátkou TRAP2-04 [A]. Fosfoproteiny byly detekovány protilátkou proti fosfotyrosinu 4G10 [B]. Imunoglobuliny byly detekovány sekundární protilátkou GAM-HRP IgG + IgM (H+L) [C].

5. Diskuse

V této práci jsme se zabývali charakterizací nového transmembránového adaptorového proteinu membránových mikrodomén lidských leukocytů, prozatím pracovníčně označeného jako TRAP2. Tento protein byl identifikován bioinformatickým průzkumem databází, kdy jsme hledali proteiny strukturně příbuzné s již dříve identifikovanými transmembránovými adaptorovými proteiny leukocytárních mikrodomén (LAT, PAG, NTAL, LIME).

Na transkripční úrovni existuje několik isoform TRAP2, jejichž existenci jsme prokázali pomocí real-time PCR především u lymfoidní řady leukocytů. Nicméně stěžejní bude prokázat expresi na proteinové úrovni, která může být odlišná od transkripční. V případě jednotlivých isoform TRAP2 to samozřejmě předpokládá vývoj nových monoklonálních protilátek, proti každé jednotlivé formě. Hlavním předmětem našeho zájmu jsou ale transmembránové adaptorové proteiny, přičemž dvě hlavní isoformy TRAP2 AK128236 a BC041608 nemají signální peptid a potenciální transmembránová část je příliš daleko od N- nebo C-konce proteinu a lze tedy předpokládat, že se nebude jednat o transmembránové proteiny. Proto se budeme v další práci koncentrovat především na samotný TRAP2. Každopádně je možné, že existence produktů alternativního sestřihu má funkční význam.

Expresi TRAP2 jsme zatím prokázali na proteinové úrovni pouze u dvou ze sledovaných lymfocytárních linií, a to u linie Ramos (B lymfocyty) a CEM (pre-T lymfocyty). U obou je úroveň exprese TRAP2 velmi nízká. Je známo mnoho slabě exprimovaných proteinů, které jsou ale pro funkci buňky velmi důležité (např. některé transkripční faktory). Je možné, že nové monoklonální protilátky, které se v současné době připravují v naší laboratoři, budou protein rozeznávat lépe. Hlavním důvodem pro jejich vývoj je to, že epitop současných anti-peptidových protilátek proti TRAP2, kterými disponujeme, leží v evolučně velmi konzervované oblasti TRAP2 (C-konec proteinu), kam se pravděpodobně mohou vázat potenciální interagující proteiny. Je možné, že TRAP2 je v buňkách silně asociován s nějakou molekulou a tudíž je obtížné ho detekovat.

Metodou konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie jsme prokázali, že TRAP2 je transmembránový protein typu III s C-koncem směřujícím do cytoplasmy (což se předpokládalo). Buněčnou lokalizaci TRAP2 bude nutné ještě podrobněji prostudovat,

protože z porovnání stabilně transfekovaných a netransfekovaných buněk Ramos (Obrázek 14, str. 72) je patrné, že část proteinu se může nacházet i v jádře. Může se samozřejmě jednat pouze o arteficiální nespecifitu protilátky, která byla patrná i při Western blottingu, na druhé straně je možné, že TRAP2 se skutečně nachází jak na membráně, tak i uvnitř buňky. Tyto výsledky by také korelovaly s tím, že endogenní protein v buňkách Ramos velmi špatně detekujeme pomocí Western blottingu. Při přípravě lyzátu totiž analyzujeme pouze postnukleární supernatant, nikoli sediment obsahující DNA a jaderné proteiny. Je tedy možné, že pouze malá část z celkového množství proteinu TRAP2 se nachází na membráně, zatímco většina plní svou funkci v jádře. Bylo již identifikováno několik proteinů (např. β -catenin), které mají takovouto duální lokalizaci [98].

Dalším aspektem, kterým se tato práce zabývala byla také asociace TRAP2 s membránovými mikrodomény. Tyto membránové útvary hrají zřejmě důležitou úlohu v řadě buněčných dějů včetně signalizace přes imunoreceptory na buňkách imunitního systému. V aminokyselinové sekvenci TRAP2 se za transmembránovou oblastí nachází potenciální palmitylační motiv. Ten umožňuje posttranslační modifikaci proteinu kyselinou palmitovou a následné směrování do membránových mikrodomén. Zjistili jsme, že s membránovými mikrodomény je asociována pouze malá část z celkového množství proteinu (str. 75, Obrázek 16). Není zatím jasné, jestli tento rozdíl oproti jiným TRAP asociovaným s mikrodomény je způsoben nedostatečnou palmitylací nebo nějakými jinými faktory.

Nejdůležitější otázkou zůstává skutečná role TRAP2 v signálních drahách lymfocytů. Nepodařilo se prokázat tyrosinovou fosforylaci proteinu při silné nespecifické aktivaci buněk peroxovanadičnanem. K tyrosinové fosforylaci TRAP2 nedocházelo ani při kotransfekci TRAP2 s jednotlivými PTK rodiny Src (Lck, Lyn, Fyn, Hck, Csk) a rodiny Syk (Syk, ZAP-70) (tato data nejsou v diplomové práci prezentována) v buňkách HEK 293 a COS7. V molekule TRAP2 se nachází pouze dva tyrosiny, z nichž Y31 je bezprostředně za transmembránovou oblastí a jeho fosforylace je tudíž málo pravděpodobná. Druhý tyrosin, Y81, není evolučně zakonzervovaný a z dostupných údajů vyplývá, že se nachází pouze u primátů. Naproti tomu většina serinů a threoninů je mezidruhově konzervovaná, a proto představují potenciálně funkčně nadějná místa v molekule zasluhující další pozornosti. V současné době optimalizujeme obdobný způsob nespecifické stimulace buněk, jakým je peroxovanadičnan pomocí Calyculinu A, který by měl silně stimulovat serin-threoninovou fosforylaci.

Dalším důležitým aspektem, kterému se hodláme věnovat, je identifikace asociovaných molekul, které byly diskutovány také v kapitole 4.1. To by nám mohlo hodně pomoci v určení signalizačních dějů, kterých se TRAP2 účastní. Je třeba prozkoumat především asociaci s adaptorovým proteinem TRAF2, který hraje důležitou roli v signalizačních drahách receptoru pro cytokin TNF (tumor necrosis factor), ale např. i asociaci s MAPK kinázami. V budoucnu bude dalším důležitým úkolem potlačení exprese proteinu pomocí siRNA nebo genového „knock-outu“ a zjištění vlivu absence tohoto proteinu na chování sledovaných buněk. To vše by mohlo vést k určení funkce tohoto nového adaptorového proteinu.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce byl studován nový transmembránový adaptorový protein TRAP2. cDNA kódující tento protein byla získána z leukocytární cDNA knihovny, byly připraveny konstrukty umožňující expresi TRAP2 v eukaryotických buňkách, stejně jako konstrukty umožňující produkci rekombinantního proteinu. Rekombinantní proteiny byly použity pro testování myších anti-peptidových monoklonálních protilátek a nyní jsou oba proteiny využívány při vývoji nových monoklonálních protilátek. Pomocí kvantitativní real-time PCR byla zjištěna exprese TRAP2 a jeho isoform u jednotlivých leukocytárních populací izolovaných z krve lidských dárců. Dále byla zjištěna velmi nízká exprese tohoto proteinu ve dvou běžných lymfoidních liniích, byla prokázána jeho membránová lokalizace a orientace odpovídající transmembránovému proteinu typu III. TRAP2 je jen málo přítomen v membránových mikrodoménách a zřejmě se nefosforyluje na tyrosinových zbytcích ani po silné farmakologické stimulaci peroxovanadičnanem. V budoucnu bude třeba identifikovat molekuly asociované s TRAP2 a zjistit jeho potenciální biologické funkce (potlačení exprese proteinu pomocí siRNA nebo genového „knock-outu“).

7. Seznam použité literatury

1. Isakov N., *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades*. J. Leukoc. Biol., 1997. **61**: p. 6-16.
2. Reth M., *Antigen receptor tail clue*. Nature, 1989. **338**: p. 383-4.
3. Vivier E. and Daeron M., *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. Immunol. Today., 1997. **18**: p. 296-91.
4. Veillette A., Latour S., and Davidson D., *Negative regulation of immunoreceptor signaling*. Annu. Rev. Immunol., 2002. **20**: p. 669-707.
5. Ravetch J.V. and Lanier LL., *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**: p. 84-9.
6. Holtmeier W. and Kabelitz D., *gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses*. Chem. Immunol. Allergy., 2005. **86**: p. 151-83.
7. Schamel W.W. and Reth M., *Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor*. Immunity, 2000. **13**: p. 5-14.
8. Hulett M.D. and Hogarth P.M., *Molecular basis of Fc receptor function*. Adv. Immunol. , 1994. **57**: p. 1-127.
9. Nimmerjahn F. and Ravetch J.V., *Fcgamma receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**: p. 19-28.
10. Ravetch J.V. and Bolland S., *IgG Fc receptors*. Annu. Rev. Immunol., 2001. **19**: p. 275-19.
11. Allen J.M. and Seed B., *Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs*. Science, 1989. **243**: p. 378-81.
12. de Haas M., Vossebeld P.J., von dem Borne A.E., and Roos D., *Fc gamma receptors of phagocytes*. J. Lab. Clin. Med., 1995. **126**: p. 330-41.
13. Takai T., *Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity*. J. Clin. Immunol., 2005. **25**: p. 1-18.
14. Simmons D. and Seed B., *The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein*. Nature, 1988. **333**: p. 568-70.
15. Hořejší V., Zhang W., and Schraven B., *Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling*. Nat. Rev. Immunol., 2004. **4**: p. 603-16.
16. Straus D.B. and Weiss A., *Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor*. Cell, 1992. **70**: p. 585-93.
17. Gauen L.K., Zhu Y., Letourneur F., Hu Q., Bolen J.B., Matis L.A., Klausner R.D., and Shaw A.S., *Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif*. Mol. Cell. Biol., 1994. **14**: p. 3729-41.
18. Wange R.L., Malek S.N., Desiderio S., and Samelson L.E., *Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor zeta and CD3 epsilon from activated Jurkat T cells*. J. Biol. Chem., 1993. **268**: p. 19797-801.
19. Chan A.C., Dalton M., Johnson R., Kong G.H., Wang T., Thoma R., and Kurosaki T., *Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function*. EMBO J. , 1995. **14**: p. 2499-508.

20. Zhang W., Tribble R.P., Zhu M., Liu S.K., McGlade C.J., and Samelson L.E., *Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling.* J. Biol. Chem. , 2000. **275**: p. 23355-61.
21. Ward S.G., *Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation?* Trends Immunol. , 2004. **25**: p. 67-74.
22. Razzaq T.M., Ozegbe P., Jury E.C., Sembi P., Blackwell N.M., and Kabouridis P.S., *Regulation of T-cell receptor signaling by membrane microdomains.* Immunology, 2004. **113**: p. 413-426.
23. Koretzky G.A., Abtahian F., and Silvermann M.A., *SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond.* Nat. Rev. Immunol., 2006. **6**: p. 67-78.
24. Reth M. and Wienands J., *Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor.* Annu. Rev. Immunol., 1997. **15**: p. 453-79.
25. Pani G., Kozlowski M., Cambier J.C., Mills G.B., and Siminovitch K.A., *Identification of the tyrosine phosphatase PTPIC as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling.* J. Exp. Med., 1995. **181**.
26. Gold M.R., *To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor.* Trends Pharmacol. Sci. , 2002. **23**: p. 316-24.
27. O'Rourke L., Tooze R., and Fearon D.T., *Co-receptors of B lymphocytes.* Curr. Opin. Immunol., 1997. **9**: p. 324-9.
28. Lindquist J.A., Simeoni L., and Schraven B., *Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors.* Immunol. Rev., 2003. **191**: p. 165-82.
29. Pawson T., *Protein modules and signalling networks.* Nature, 1995. **373**: p. 573-80.
30. Pawson T., Gish G.D., and Nash P., *SH2 domains, interaction modules and cellular wiring.* Trends. Cell. Biol., 2001. **11**: p. 504-11.
31. Yaffe M.B., *Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction.* Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2002. **3**: p. 177-86.
32. Mayer B.J., *SH3 domains: complexity in moderation.* J. Cell. Sci., 2001. **114**: p. 1253-63.
33. van der Geer P. and Pawson T., *The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction.* Trends Biochem. Sci., 1995. **20**: p. 277-80.
34. Yan K.S., Kuti M., and Zhou M.M., *PTB or not PTB - that is the question.* FEBS Lett., 2002. **513**: p. 67-70.
35. Lemmon M.A. and Ferguson K.M., *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains.* Biochem. J., 2000. **350**: p. 1-18.
36. Macias M.J., Wiesner S., and Sudol M., *WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands.* FEBS Lett. , 2002. **513**: p. 30-7.
37. Ilsley J.L., Sudol M., and Winder S.J., *The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton.* Cell Signal., 2002. **14**: p. 183-9.
38. Hung A.Y. and Sheng M., *PDZ domains: structural modules for protein complex assembly.* J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 5699-702.
39. Cho W., *Membrane targeting by C1 and C2 domains.* J. Biol. Chem., 2001. **276**: p. 32407-10.
40. Kliche S., Lindquist J.A., and Schraven B., *Transmembrane adapters: structure, biochemistry and biology.* Semin. Immunol., 2004. **16**: p. 367-77.
41. Marie-Cardine A., Kirchgessner H., Bruyns E., Shevchenko A., Mann M., Autschbach F., Ratnofsky S., Meuer S., and Schraven B., *SHP2-interacting*

- transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation.* J. Exp. Med., 1999. **189**: p. 1181-94.
42. Bruyins E., Marie-Cardine A., Kirchgessner H., Sagolla K., Shevchenko A., Mann M., Autschbach F., Bensussan A., Meuer S., and Schraven B., *T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane.* J. Exp. Med. , 1998. **188**: p. 561-75.
 43. Zhu M., Janssen E., Leung K., and Zhang W., *Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling.* J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 46151-8.
 44. Zhang W., Sloan-Lancaster J., Kitchen J., Tribble R.P., and Samelson L.E., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation.* Cell, 1998. **92**: p. 83-92.
 45. Brdička T., Pavlišťová D., Leo A., Bruyins E., Kořínek V., Angelisová P., Scherer J., Shevchenko A., Hilgert I., Černý J., Drbal K., Kuramitsu Y., Kornacker B., Hořejší V., and Schraven B., *Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation.* J. Exp. Med., 2000. **191**: p. 1591-604.
 46. Kawabuchi M., Satomi Y., Takao T., Shimonishi Y., Nada S., Nagai K., Tarakhovsky A., and Okada M., *Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases.* Nature, 2000. **404**: p. 999-1003.
 47. Brdička T., A.P. Imrich M., Brdičková N., Horváth O., Špička J., Hilgert I., Lusková P., Dráber P., Novák P, Engels N., Wienands J., Simeoni L., Osterreicher J., Aguado E., Malissen M., Schraven B., and Hořejší V., *Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling.* J. Exp. Med., 2002. **196**: p. 1617-26.
 48. Janssen E., Zhu M., Zhang W., Koonpaew S., and Zhang W., *LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation.* Nat. Immunol., 2003. **4**: p. 117-23.
 49. Brdičková N., Brdička T., Angelisová P., Horváth O., Špička J., Hilgert I., Pačes J., Simeoni L., Kliche S., Merten C., Schraven B., and Hořejší V., *LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling.* J. Exp. Med., 2003. **198**: p. 1453-62.
 50. Hur E.M., Son M., Lee O.H., Choi Y.B., Park C., Lee H., and Yun Y., *LIME, a novel transmembrane adaptor protein, associates with p56lck and mediates T cell activation.* J. Exp. Med., 2003. **198**: p. 1463-73.
 51. Zhang W., Tribble R.P., and Samelson L.E., *LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation.* Immunity, 1998. **9**: p. 239-46.
 52. Zhu M., Shen S., Liu Y., Granillo O., and Zhang W., *Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development.* J. Immunol., 2005. **174**: p. 31-5.
 53. Singer S.J. and Nicolson G.L., *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.* Science 1972. **175**: p. 720-731.
 54. He H.T., Lellouch A., and Marguet D., *Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling.* Seminars in Immunology, 2005. **17**: p. 23-33.
 55. Hořejší V., *The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation.* Immunological Reviews, 2003. **191**: p. 148-164.

56. Hořejší V., *Lipid rafts and their roles in T-cell activation.* . Microbes and Infection, 2005. **7**: p. 310-316.
57. Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H.W., Tzeng S., and Pierce S.K., *Location is everything: Lipid Rafts and immune cell signaling.* Annu.Rev.Immunol., 2003. **21**: p. 457-481.
58. Brown R.E., *Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal.* J Cell Sci., 1998. **111**: p. 1-9.
59. Edidin M., *Lipid microdomains in cell surface membranes.* Curr Opin Struct Biol., 1997. **7**: p. 528-32.
60. Jacobson K and Dietrich C., *Looking at lipid rafts?* Trends Cell Biol., 1999. **9**: p. 87-91.
61. Simons K. and Ikonen E., *Functional rafts in cell membranes.* Nature 1997. **387**: p. 569-572.
62. Brown D.A. and London E., *Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts.* J Biol Chem, 2000. **275**: p. 17221-17224.
63. Brown D.A. and London E., *Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?* Biochem Biophys Res Commun 1997. **240**: p. 1-7.
64. London E. and Brown D.A., *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts).* Biochem Biophys Act, 2000. **1502**: p. 182-195.
65. Brown D.A. and Rose J.K., *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.* . Cell, 1992. **68**: p. 533-544.
66. Hooper N.M., *Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review).* Mol Membr Biol, 1999. **16**: p. 145-156.
67. Janes P.W., Ley S.C., and Magee A.I., *Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor.* J Cell Biol 1999. **147**: p. 447-461.
68. Drevot P., Langlet C., Guo X.J., Bernard A.M., Colard O., Chauvin J.P., Lasserre R., and He H.T., *TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts.* EMBO J 2002. **21**: p. 1899-1908.
69. Yuan C. and Johnston L.J., *Distribution of ganglioside GM1 in 1- α -dipalmitoylphosphatidyl-choline/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts.* Biophys J, 2000. **79**: p. 2768-2781.
70. Schroeder R., London E., and Brown D., *Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 12130-12134.
71. Schroeder R.J., Ahmed S.N., Zhu Y., London E., and B. D.A., *Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 1150-1157.
72. Varma R. and Mayor S., *GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface.* Nature, 1998. **394**: p. 798-801.
73. Dietrich C., Yang B., Fujiwara T., Kusumi A., and Jacobson K., *Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking.* Biophys J, 2002. **148**: p. 997-1008.

74. Shvartsman D.E., Kotler M., Tall R.D., Roth M.G., and Henis Y.I., *Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts*. J Cell Biol, 2003. **163**: p. 879-888.
75. Štefánová I., Hořejší V., Ansotegui I.J., Knapp W., and Stockinger H., *GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases*. Science, 1991. **254**: p. 1016-1019.
76. Low M.G., *The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins*. Biochem. Biophys. Acta., 1989. **988**: p. 427-454.
77. Oh P. and Schnitzer J.E., *Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default*. Mol. Cell. Biol., 2001. **12**: p. 685-98.
78. Prior I.A., Harding A., Yan J., Sluimer J., Parton R.G., and Hancock J.F., *GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity*. Nat. Cell. Biol., 2001. **3**: p. 368-75.
79. Mumby S.M., *Reversible palmitoylation of signaling proteins*. Curr. Opin. Cell. Biol. , 1997. **9**: p. 148-54.
80. Rodgers W., Crise B., and Rose JK., *Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction*. Mol. Cell. Biol., 1994. **14**: p. 5384-91.
81. Shenoy-Scaria A.M., Dietzen D.J., Kwong J., Link D.C., and Lublin D.M., *Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae*. J Cell Biol., 1994. **126**: p. 353-63.
82. Galbiati F., Volonte D., Meani D., Milligan G., Lublin D.M., Lisanti M.P., and Parenti M., *The dually acylated NH2-terminal domain of g1alpha is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein alpha subunits in vivo*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 5843-50.
83. Brdička T., Černý J., and Hořejší V., *T cell receptor signalling results in rapid tyrosine phosphorylation of the linker protein LAT present in detergent-resistant membrane microdomains*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998. **248**: p. 356-60.
84. Parolini I., Sargiacomo M., Lisanti M.P., and Peschle C., *Signal transduction and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes*. Blood, 1996. **87**: p. 3783-94.
85. Cinek T., Hilgert I., and Hořejší V., *An alternative way of CD4 and CD8 association with protein kinases of the Src family*. Immunogenetics., 1995. **41**: p. 110-6.
86. Arcaro A., Gregoire C., Boucheron N., Stotz S., Palmer E., Malissen B., and Luescher I.F., *Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function*. J. Immunol., 2000. **165**: p. 2068-76.
87. Foster L.J., De Hoog C.L., and Mann M., *Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003. **100**: p. 5813-8.
88. Simons K. and Toomre D., *Lipid rafts and signal transduction*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2000. **1**: p. 31-9.
89. Ikonen E., *Roles of lipid rafts in membrane transport*. Curr. Opin. Cell. Biol., 2001. **13**: p. 470-7.

90. Campbell S.M., Crowe S.M., and Mak J., *Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions*. J. Clin. Virol., 2001. **22**: p. 217-27.
91. Abrami L., Fivaz M., and van der Goot F.G., *Surface dynamics of aerolysin on the plasma membrane of living cells*. Int. J. Med. Microbiol. , 2000. **290**: p. 363-7.
92. Rosenberger C.M., Brumell J.H., and Finlay BB., *Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals*. Curr. Biol., 2000. **10**: p. R823-5.
93. Harder T., *Raft membrane domains and immunoreceptor functions*. Adv. Immunol., 2001. **77**: p. 45-92.
94. Ilangumaran S., He H.T., and Hoessli D.C., *Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins*. Immunol. Today., 2000. **21**: p. 2-7.
95. Werlen G. and Palmer E., *The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity*. Curr. Opin. Immunol., 2002. **14**: p. 299-305.
96. Hecht D. and Zick Y., *Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 1992. **188**: p. 773-9.
97. Clark H.F., Gurney A.L., Abaya E., Baker K., Baldwin D., Brush J., Chen J., Chow B., Chui C., Crowley C., Currell B., Deuel B., Dowd P., Eaton D., Foster J., Grimaldi C., Gu Q., Hass P.E., Heldens S., Huang A., Kim H.S., Klimowski L., Jin Y., Johnson S., Lee J., Lewis L., Liao D., Mark M., Robbie E., Sanchez C., Schoenfeld J., Seshagiri S., Simmons L., Singh J., Smith V., Stinson J., Vagts A., Vandlen R., Watanabe C., Wieand D., Woods K., Xie M.H., Yansura D., Yi S., Yu G., Yuan J., Zhang M., Zhang Z., Goddard A., Wood W.I., Godowski P., and Gray A., *The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment*. Genome Res., 2003. **13**: p. 2265-70.
98. Bienz M., *beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling*. Curr. Biol., 2005. **15**: p. R64-7.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala lidem, bez jejichž pomoci by se mi nikdy nepodařilo tuto práci napsat. Na prvním místě mému školiteli *prof. Václavu Hořejšímu*, za jeho důvěru, povzbuzení i zdravou kritiku a především za to, že mi pomohl objevit kouzlo vědy, najít touhu hledat odpovědi na neznámé otázky. *Ing. Jiřímu Špičkovi*, který vedl mé první laboratorní krůčky, za jeho všestrannou pomoc, trpělivost, cenné rady a pragmatický přístup, kterým mě nutil stát nohama pevně na zemi. *Dr. Karlu Drbalovi* za jeho vědecké nadšení a plány, díky nimž jsem se mohla občas vznášet vysoko nad zemí, za obětavé měření mých vzorků na FACS a za pomoc se stabilními transfektanty. *Dr. Pavle Angelisové* za hodiny strávené luštěním tajemných „šmoužek“, za její pomoc s veškerými biochemickými technikami a za milé ženské slovo v ryze mužském kolektivu. *Lindě Turkové*, která ví za co 😊 (a která mi bude moc chybět). *MUDr. Ondřeji Horváthovi* za jeho obětavé noční sortování, za milý úsměv, klid a pohodu.

Svému konzultantovi *doc. Janu Konvalinkovi*. bych ráda poděkovala za doporučení a ochranou ruku.

Vědeckému týmu Dr. Ladislava Anděry patří velký dík za to, že jsem se od nich mohla učit, čerpat z jejich zkušeností a poučit se z jejich chyb, za výborný kolektiv a příjemnou atmosféru.

Největší poděkování ale patří mé rodině, mým rodičům a sourozencům, bez jejichž lásky a podpory bych vysokou školu nikdy nemohla dostudovat.

Petrovi za to, že je.

Tereza

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka