

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Imunologie



**Bc. Tomáš Dvořáček**

Fosforylace adaptorového proteinu PSTPIP2 a její role v neutrofilních  
granulocytech

Phosphorylation of the adaptor protein PSTPIP2 and its role in  
neutrophilic granulocytes

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Brdička, Ph. D.

Praha, 2022

### Prohlášení

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

V Praze, 10. 08. 2022

Podpis:

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Tomáši Brdičkovi, Ph. D. za možnost vypracovávat tuto diplomovou práci v jeho laboratoři, za odborné vedení této diplomové práce a veškerou pomoc, kterou mi poskytl při jejím vypracování. Dále bych chtěl poděkovat skvělému kolektivu Laboratoře leukocytární signalizace a Laboratoře hematatoonkologie, ke kterému jsem se vždy mohl obrátit pro pomoc. Mé poděkování patří i bývalým členům Laboratoře leukocytární signalizace, na jejichž práci jsem mohl navázat, a kteří mi pomáhali v začátcích mé práce v laboratoři. A nakonec bych rád poděkoval svým spolužákům a přátelům, kteří učinili dva roky mého studia Imunologie mnohem veselejšími.

## Abstrakt

PSTPIP2 je adaptorový protein z rodiny F-BAR, který je důležitým regulačním proteinem kontrolujícím efektorové mechanismy buněk vrozené imunity. Regulační funkce tohoto proteinu byly objeveny díky myšimu kmeni CMO, který ztratil expresi tohoto proteinu. Následkem deficiencie PSTPIP2 myši kmene CMO vyvíjejí autoinflamatorní onemocnění postihující kostní tkáň a kůži. Hlavním mechanismem, který pohání jeho patologii, je ztráta regulace aktivity neutrofilních granulocytů, které produkují nadměrné množství prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a reaktivních kyslíkatých sloučenin. Přesný molekulární mechanismus působení proteinu PSTPIP2 je však neznámý. Při aktivaci proteinu PSTPIP2 dochází k jeho fosforylaci a k jeho interakci s dalšími proteiny, jejichž prostřednictvím vykonává svou regulační funkci. Mezi interakční partnery, které byly doposud popsány v neutrofilních granulocytech, patří fosfatázy z rodiny PEST, lipidová fosfatáza SHIP1 a nereceptorová tyrosin kináza CSK. V této diplomové práci se nám podařilo identifikovat kinázy z rodiny SRC jako kinázy fosforylující PSTPIP2. Dále jsme zjistili, že hlavní místa fosforylace PSTPIP2 jsou tyrosiny na pozicích 323 a 329. Na závěr jsme dokázali, že SHIP1 se může vázat na fosfotyrosinový motiv v okolí tyrosinu na pozici 329 a v menší míře i na fosforosinový motiv v okolí tyrosinu na pozici 323. Tato práce přispívá k porozumění regulace aktivity neutrofilních granulocytů prostřednictvím proteinu PSTPIP2.

## Klíčová slova

Chronická multifokální osteomyelitida, Kinázy z rodiny SRC, Neutrofilní granulocyty PSTPIP2, SHIP1 fosfatáza,

# Abstract

PSTPIP2 is an adaptor protein of the F-BAR family, which is an important regulator controlling the effector mechanisms of innate immune cells. The regulatory functions of this protein were discovered thanks to the CMO mouse strain, which lost the expression of this protein. As a result of PSTPIP2 deficiency, mice of the CMO strain develop an autoinflammatory disease affecting bone tissue and skin. The main mechanism that drives its pathology is the loss of regulation of the neutrophil granulocyte activity. These cells then produce excessive amounts of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and reactive oxygen species. However, the exact molecular mechanism of action of the PSTPIP2 protein is unknown. When the PSTPIP2 protein is activated, it is phosphorylated and interacts with other proteins, which mediate its regulatory function. Interaction partners described so far in neutrophil granulocytes include phosphatases of the PEST family, the lipid phosphatase SHIP1 and the non-receptor tyrosine kinase CSK. In this thesis, we identified kinases from the SRC family as kinases that phosphorylate PSTPIP2. Furthermore, we found that the main phosphorylation sites of PSTPIP2 are tyrosines at positions 323 and 329. Finally, we proved that SHIP1 can bind to the phosphotyrosine motif around the tyrosine at position 329 and to a lesser extent also to the phosphotyrosine motif around the tyrosine at position 323. This work contributes to the understanding of regulation of the neutrophil granulocyte activity mediated by PSTPIP2.

## Key words

Chronic multifocal osteomyelitis, SRC family kinases, Neutrophil granulocytes, PSTPIP2, SHIP1 phosphatase

# Obsah

Seznam zkratk	1
1 Úvod	5
2 Literární přehled	6
2.1 Chronická nebakteriální osteomyelitida	6
2.1.1 Myši model Chronické rekurentní multifokální osteomyelitidy	8
2.2 PSTPIP2	13
2.3 Proteinová Rodina F-BAR	18
2.3.1 F-BAR doména	18
2.3.2 C-koncové domény F-BAR proteinů	21
2.4 SHIP1	22
2.4.1 Regulační funkce SHIP1 fosfatázy	23
2.4.2 SHIP1-deficientní myši	28
2.4.3 Regulace cytokinových receptorů	31
2.5 Kinázy rodiny SRC	32
2.5.1 Funkce kináz rodiny SRC v imunitním systému	33
2.5.2 Funkce kináz rodiny SRC v neutrofilech	33
2.5.3 Regulační role kináz SRC	36
3 Cíle práce	39
4 Metody a materiály	40
4.1 Metody	40
4.1.1 Buňky	40
4.1.2 Transfekce/lipofekce pomocí lipofectaminu 2000	40
4.1.3 Imunoprecipitace	41
4.1.4 Lyzování buněk a izolace proteinové frakce	42
4.1.5 SDS-PAGE elektroforéza	42
4.1.6 Western blot	43

4.1.7	Značení membrán z western blotu .....	44
4.1.8	Kvantifikace intenzity signálu z barvení membrán .....	44
4.1.9	Statistická analýza.....	45
4.1.10	Izolace RNA .....	45
4.1.11	Syntéza cDNA .....	46
4.1.12	Mutagenní PCR.....	46
4.1.13	Agarózová elektroforéza.....	47
4.1.14	Izolace DNA z agarózového gelu .....	48
4.1.15	Klonování DNA.....	48
4.1.16	Kontrolní PCR .....	49
4.1.17	DNA Sekvenování .....	50
4.1.18	Měření koncentrace DNA.....	50
4.1.19	Bakteriální transformace.....	50
4.1.20	Tekuté bakteriální kultury.....	51
4.1.21	Izolace plasmidové DNA.....	51
4.2	Přehled použitých chemikálií a materiálů .....	52
4.2.1	Chemikálie a média .....	52
4.2.2	Materiály a buňky .....	53
4.2.3	Roztoky a média .....	55
4.2.4	Přístroje.....	56
4.2.5	Protilátky.....	58
4.2.6	Plasmidy.....	58
4.2.7	Primery.....	59
4.2.8	Enzymy .....	61
4.2.9	Komerční soupravy .....	61
5	Výsledky .....	62
5.1	Kinázy HCK, FGR a LYN dokáží fosforylovat WT PSTPIP2 .....	62

5.2	Hlavními fosforylačními místy proteinu PSTPIP2 jsou tyrosiny na pozicích 323 a 329	66
5.3	Interakce PSTPIP2 s SHIP1 fosfatázou .....	71
6	Diskuze .....	76
7	Závěr .....	83
	Literatura .....	86



## Seznam zkratek

AKT	Protein kináza B
ANOVA	Analýza rozptylu/Analysis of variance
APS	Persíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BAFF	B-cell activating factor
BCR	B-cell receptor
BLK	B lymphocyte kinase
BMX	Bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X protein
BTK	Bruton tyrosine kinase
C-KIT	Mast/Stem Cell Growth Factor Receptor Kit
Casp	kaspáza
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CCD	Charge-coupled device
CCL	CC chemokine ligand
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CIP4	Cdc42-interacting protein 4
CMO	Chronická multifokální osteomyelitida
CNO	Chronická nebakteriální osteomyelitida
CR	Complement receptor
CRMO	Chronická rekurentní multifokální osteomyelitida
CSK	C-terminal Src kinase
Ctsb/Ctsc/Ctsg	Catepsin C/Catepsin B/Catepsin G
CXCL	CXC chemokine ligand
DAPI2	DNAX-activation protein 12
DOK	Downstream of tyrosine kinase
EEP	EFC extended peptide
EFC	Extended extended Fer/CIP4 homology
Elane	Neutrophil elastase
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
F(ab')	Fragment antigen-binding
F-BAR	Fer/CIP4 homology Bin-Amphiphysin-Rvs

FBP17	Formin-binding protein 17
FBS	Fetální hovězí sérum
FcεR	Fc epsilon receptor
FcγR	Fc gamma receptor
FER	FES-related
FES	FES Proto-Oncogene
FGR	Feline Gardner-Rasheed sarcoma virus
FCH	FER-CIP4 homology
fMLP	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
FYN	FYN Proto-Oncogene
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GAP	GTPase-activating protein
GATA1	Erythroid transcription factor
H3S10	Histon H3 fosforylovaný na desátém serinu
HCK	Hemopoietic Cell Kinase
gp49B1	glycoprotein 49 B1
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R1	Interleukin-1 receptor type 1
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysacharid
LCK	Leukocyte C-terminal Src kinase
LYN	LYN Proto-Oncogene
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MAP	Mitogen-activated protein kinase
μCT	mikro výpočetní tomografie
μHD	muniscin homology domain
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina

MYD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
NLRP	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
p40PHOX	Neutrophil cytosol factor 4
p47PHOX	Neutrophil cytosol factor 1
PACSIN	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein
PEST	proline-, glutamic acid-, serine- and threonine
PH-R	Pleckstrin homology-related
PHOX	phagocytic oxidase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIR-B	Paired immunoglobulin-like receptor B
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PMA	Phorbol myristate acetate
PP2	Inhibitor kináz z rodiny SRC
PRR	Pattern recognition receptor
Prtn3	Proteináza 3
PSTPIP	Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein
PTB	Phosphotyrosine-binding domain
PTPN	Protein tyrosine phosphatases non-receptor type
Ptprc	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
PX	Phox homology
PYCARD	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
PYK2	Protein-tyrosine kinase 2-beta
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAG1	V(D)J recombination-activating protein 1
RELA	RELA Proto-Oncogene
RHO	RAS homologous
SCF	Stem cell factor
SDS	Dodecylsírán sodný
SH	SRC homology
SHC	Src homology 2 domain-containing-transforming protein C
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase

SHP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
siRNA	malá interferující („small interfering“) ribonukleová kyselina
SIRP $\alpha$	Signal regulatory protein $\alpha$
SOS1	Son of Sevenless 1
SP1	specificity protein 1
SRC	SRC Proto-Oncogene
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SYK	Spleen tyrosine kinase
TGF	Tumor growth factor
TLR	Toll-like receptor
T <sub>m</sub>	Teplota tání primerů
TNF	Tumor necrosis factor
TOCA	Transducer of Cdc42-dependent actin assembly protein
VAV	Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor
WT	Myši divokého kmene
YES	YES Proto-Oncogene
YRK	Yes-related kinase

# 1 Úvod

PSTPIP2 je adaptorový protein z rodiny F-BAR, který reguluje efektorové funkce buněk vrozeného imunitního systému. Mutace vedoucí k deficienci tohoto proteinu byla popsána u myšního kmene CMO. Myši tohoto kmene během svého života vyvíjejí autoinflamatorní onemocnění Chronická multifokální osteomyelitida a používají se jako modelový organismus při výzkumu lidského autoinflamatorního onemocnění chronická rekurentní multifokální osteomyelitida. Onemocnění CMO myši je charakterizováno sterilním zánětem způsobujícím osteolytické poškození kostní tkáně a kůže<sup>1-3</sup>.

Důležitým prvkem v patologii onemocnění CMO myši je ztráta regulace neutrofilů. Tato buněčná populace v CMO myších je naprosto nezbytná pro vývoj onemocnění CMO a deplece neutrofilních granulocytů zabrání jeho rozvoji<sup>4</sup>. Neutrofilny CMO myši produkují nadměrné množství prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$  a reaktivních kyslíkatých sloučenin<sup>5-7</sup>. IL-1 $\beta$  je kriticky důležitým cytokinem iniciujícím patologii CMO myši<sup>3,5</sup>. Jeho nadměrná produkce je v tomto myším kmeni závislá na NLRP3 inflamazomu/kaspáze 1, kaspáze 8 a na kináze SYK<sup>4,8,9</sup>. Doposud nebyl ovšem pospán stimul ani signální dráha, které by u CMO myši vedly k nadměrné produkci tohoto cytokinu.

Přesný mechanismus, kterým protein PSTPIP2 reguluje buňky vrozené imunity a potlačuje nadměrnou produkci IL-1 $\beta$ , je stále neznámý. PSTPIP2 nevykazuje žádnou katalytickou aktivitu a jeho funkce jsou závislé na jeho schopnosti interagovat se svými vazebnými partnery<sup>6,7,10,11</sup>. Mezi jeho vazebné partnery, které byly doposud popsány v neutrofilech, patří protein tyrosin fosfatázy z rodiny PEST, lipidová fosfatáza SHIP1 a nereceptorová protein tyrosin kináza CSK<sup>6</sup>. Tato diplomová práce se detailněji věnuje fosforylaci proteinu PSTPIP2 a vlivu této fosforylace na jeho interakci s fosfatázou SHIP1.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Chronická nebakteriální osteomyelitida

Chronická nebakteriální osteomyelitida (CNO) je lidské autoinflatorní onemocnění vyznačující se bolestivými záněty kostí, které nejsou způsobeny infekčními agens. Mezi nejčastější místa zánětlivých lézí patří metafýzy dlouhých kostí (zvláště dolních končetin), obratle, pánev, klíční kosti a dolní čelist<sup>12-17</sup>. Nejzávažnější forma této nemoci se označuje jako chronická rekurentní multifokální osteomyelitida (CRMO), kdy dochází k vývoji zánětlivých lézí na více místech a průběh onemocnění je charakterizován střídáním období remise a relapsu<sup>17</sup>. Nejčastěji je toto onemocnění diagnostikováno u dětí a mladistvých<sup>12,17</sup>. Zatím neexistuje přímý, spolehlivý postup pro diagnostiku CNO a v praxi se používá diferenciální diagnostika, kdy jsou vyloučeny alternativní onemocnění. Klinické laboratorní testování pacientů s CNO obvykle vykazuje mírně zvýšenou hladinu CRP a sedimentaci erytrocytů<sup>12-14,17</sup>. U části pacientů může být detekována mírně zvýšená hladina cytokinů TNF $\alpha$  a IL-6 v séru<sup>13,17-19</sup>. V současnosti je preferovanou zobrazovací metodou pro diagnózu a monitorování pacientů s CNO magnetická rezonance, která dokáže citlivěji odhalit zánětlivé léze a identifikovat i léze, které se neprojevují symptomaticky<sup>15,17</sup>. Jako první volba v terapii CNO se používají nesteroidní protizánětlivé léky. Tyto léky navozují rychlou úlevu od symptomů a u některých pacientů dokáží kontrolovat onemocnění<sup>14,16,17,20</sup>. U přibližně 50 % pacientů ale do dvou let od zahájení terapie pomocí nesteroidních protizánětlivých léčiv dojde k relapsu onemocnění<sup>17,20</sup>. Navíc u pacientů s CNO postihující páteř jsou protizánětlivá nesteroidní léčiva považována za neefektivní<sup>17</sup>. Vedle těchto léků se pro terapii používají kortikosteroidy, nemoc modifikující antirevmatické léky, biologická léčba a bisfosfonáty<sup>14,17,20</sup>. Kortikosteroidy dokáží rychle zmírnit zánět kostí ve většině případů, ale nejsou efektivní v navození dlouhodobého stavu remise. Dlouhodobá léčba kortikosteroidy se tedy u CNO nevyužívá<sup>17</sup>. Biologická léčiva blokující aktivitu TNF $\alpha$  navozují klinickou a radiologickou remisi u velké části pacientů. Na jejich využití by ale mělo dojít jen u případů, kde selhaly standartní terapie<sup>17,20</sup>. Předběžné výsledky také ukazují, že inhibice účinku IL-1 pomocí přípravku Anakinra (rekombinantní IL-1RA) má potenciální využití v terapii tohoto onemocnění<sup>17,21</sup>.

Přesné patofyziologické mechanismy této nemoci stále nejsou plně pochopeny. CNO řadíme do skupiny autoinflatorních onemocnění. Tyto nemoci jsou zprostředkovány

dysregulací buněk vrozeného imunitního systému a nejsou závislé na adaptivním imunitním systému. Součástí patologie CNO je pozměněná exprese cytokinů buněk vrozeného imunitního systému. U pacientů s CNO bylo zaznamenáno, že mají zvýšené sérové koncentrace prozánětlivých cytokinů a chemokinů TNF $\alpha$ , IL-6, CCL4, CCL5, CXCL9 a naopak sníženou koncentraci CCL11. Studie zkoumající cytokinový profil séra pacientů s CNO ovšem nepřinášejí plně konzistentní výsledky. To také znemožňuje najít spolehlivý vzor chemokinů a cytokinů, které by prokazovaly na onemocnění CNO<sup>13,18,19,22</sup>. Monocyty těchto pacientů produkují snížené množství cytokinů IL-10 a IL-19 při stimulaci pomocí lipopolysacharidu (LPS). Stimulace monocytů pomocí LPS vyvolá fosforylaci histonu H3 na serinu 10 (H3S10) v promotoru genů *IL10* a *IL19* a následnou vazbu transkripčního faktoru SP1 na tyto promotory<sup>18,23</sup>. V případě stimulace monocytů CNO pacientů však vidíme změny v signální kaskádě receptoru TLR4, které selektivně poškozují expresi IL-10 a IL-19, a dochází ke snížené aktivaci MAP kináz ERK1/2. Nedostatečná aktivace těchto kináz poté vede ke snížené expresi transkripčního faktoru SP1 a snížené fosforylaci H3S10. Tyto změny znemožní vazbu SP1 na promotor genů *IL-10* a *IL-19* a jejich expresi. Monocyty zdravých dárců inkubované s inhibítozem kinázy ERK po stimulaci pomocí LPS kopírují fenotyp CNO monocytů<sup>18,23,24</sup>. Dále bylo ukázáno, že mononukleární leukocyty periferní krve z CNO pacientů obsahují zvýšené množství mRNA genů *PYCARD*, *CASP-1*, které kódují podjednotky inflamazomu účastníci se maturace prozánětlivého cytokinu IL-1 $\beta$ , a také zvýšené množství mRNA genu *IL-1 $\beta$* . Pokud jsou tyto buňky stimulovány pomocí LPS, produkují více IL-1 $\beta$  než buňky ze zdravých dárců. Tento rozdíl ovšem není signifikantní při plné stimulaci produkce IL-1 $\beta$  pomocí LPS a ATP<sup>25</sup>. Zvýšená produkce IL-1 $\beta$  byla poté ověřena při experimentech s monocyty CNO pacientů. Jejich stimulace pomocí LPS vyvolá větší expresi proteinů účastnících se maturace IL-1 $\beta$ . Tyto geny u monocytů z CNO pacientů vykazují sníženou metylaci<sup>23,26</sup>. Ovšem přidání rekombinantního IL-10 k CNO monocytům před stimulací pomocí LPS *in vitro* dokáže snížit produkci IL-1 $\beta$ <sup>23</sup>. Inhibiční efekt IL-10 na produkci IL-1 $\beta$  je dále podpořen zjištěním, že IL-10 dokáže snížit expresi proteinů podílejících se na maturaci IL-1 $\beta$  v myším modelu antigenem-indukované artritidy. IL-10-deficientní myši s antigenem-indukovanou artritidou mají vyšší hladinu mRNA kódující IL-1 $\beta$  a maturovaného IL-1 $\beta$  v zanícené synoviální tkáni než WT myši<sup>27</sup>.

### 2.1.1 Myší model Chronické rekurentní multifokální osteomyelitidy

Myší kmen CMO se používá jako modelový organismus pro studium lidského onemocnění CRMO. Tento kmen byl popsán v roce 1991 při křížení příbuzných myší kmene C.D2-Qa2, kdy se v generaci F15 narodily myši, které vyvinuly deformace ocasu a dolních končetin ve věku šest až osm týdnů. Následné křížení ukázalo, že jejich fenotyp je podmíněn jednou recesivní alelou, která má stoprocentní penetraci na různých genetických pozadích a vyvolává postižení u obou pohlaví. Tyto symptomy připomínaly symptomy lidského onemocnění CRMO a proto byla nově vzniklá mutace a nový myší kmen pojmenován CMO jako zkratka „Chronic multifocal osteomyelitis“<sup>28</sup>. První deformace na ocase a na zadních končetinách se u tohoto kmene vyvíjí od čtvrtého až šestého týdne života. V pozdějším věku u tohoto kmene můžeme pozorovat zčervenlou a zesílenou kůži na uších. Analýza vybraných kostí CMO myši i kostry celého těla pomocí výpočetní tomografie odhalila úbytek kostní tkáně naznačující, že CMO myši trpí obecnou osteopenií. Přibližně od věku tři měsíců můžeme vidět u CMO myši splenomegalii a zvětšení lymfatických uzlin drénujících lymfu ze zanícených tlapek<sup>2,3,10</sup>. Histologické analýzy ukázaly, že už ve věku 3 týdnů se na kaudálních obratlích CMO myši vytvářejí léze se zánětlivým infiltrátem obsahující polymorfonukleární leukocyty, makrofágy, lymfocyty a plazmatické buňky. Součástí zánětlivých lézí je i zvýšené množství osteoklastů, jejichž morfologie vykazuje známky aktivní osteolýzy. Dochází k destrukci obratlů způsobené nadměrnou resorpcí kostní tkáně a k šíření zánětu do okolních měkkých tkání. Nekrotické léze v oblasti okostice pak zpětně posilují lokální zánět. Kaudální obratle jsou prvním postiženým místem. Se zvyšujícím se věkem myši se zánětlivé léze začínají vytvářet i na dalších obratlích, zatímco v distálnějších obratlích, které už byly zničeny, můžeme vidět úbytek imunitních buněk a začínající opravné procesy vedoucí k fibrotizaci tkáně<sup>3,10,29</sup>. Histologická analýza uší starších CMO myši odhalila infiltraci zánětlivých buněk s převahou polymorfonukleárních leukocytů do dermis a epidermis a destrukci chrupavky tvořící ucho. V histologických preparátech ze sleziny můžeme pozorovat extramedullární hematopoézu<sup>1</sup>. Ve slezině CMO myši dochází k akumulaci progenitorů makrofágů vykazujících rychlejší proliferaci. Tento efekt mutace *Cmo* ve slezině je ještě doprovázen zvýšením v počtu progenitorů monocytů v kostní dřeni<sup>2</sup>. Dále kostní dřeň a slezina CMO myši obsahují zvýšený počet prekurzorů osteoklastů. Multipotentní myeloidní prekurzory izolované z kostní dřene CMO myši vykazují zvýšenou schopnost diferencovat na osteoklasty v podmínkách *in vitro* kultivace v médiu obsahujícím M-CSF a RANKL. Expanze těchto prekurzorů je závislá na receptoru C-KIT a cytokinu M-CSF. Podání duálníhoho



inhibitoru M-CSFR a C-KIT CMO myším signifikantně omezí jejich autoinflamatorní onemocnění – dojde ke zmírnění kostních lézí na ocasních obratlech a tlapkách, ke snížení úbytku kostní tkáně, ke snížení sérové koncentrace CCL3, k zástavě expanze osteoklastogenních prekurzorů ve slezině a k potlačení splenomegalie <sup>10</sup>.

Přenos kostní dřeně z CMO myši do zdravé recipientní WT myši indukuje vývoj onemocnění u recipientní myši a u CMO myši lze nemoc vyléčit pomocí transplantace buněk kostní dřeně z WT myši <sup>8</sup>. Nezávislost této nemoci na adaptivní složce imunitního systému byla potvrzena u myši kmene LUPO, které vyvíjejí stejné onemocnění jako myši kmene CMO. Myši tohoto kmene ve svém genomu nesou mutaci ve stejném genu, jako myši kmene CMO. Genetická podstata onemocnění těchto myších kmenů je velice podobná (viz níže). V této studii byla mutace *Lupo* křížena na genetické pozadí *Rag1*<sup>-/-</sup> myši. U těchto myši došlo k vývoji zánětu tlapek dokonce dříve než v kontrolních myších s intaktní RAG1 a mutací *Lupo* <sup>30</sup>. Křížení myši kmene CMO na genetické pozadí *Rag1*<sup>-/-</sup> myši nebylo provedeno, ale – vzhledem k podobnému mechanismu vývoje onemocnění u kmenů CMO a LUPO – by s největší pravděpodobností také ukázalo nezávislost vývoje onemocnění CMO myši na adaptivní složce imunitního systému. Tato zjištění dokazují, že nemoc CMO myši je skutečně autoinflamatorní onemocnění závislé na defektu buněk vrozené imunity stejně jako lidské onemocnění CNO <sup>8,30</sup>.

V séru symptomatických CMO myši můžeme detekovat zvýšenou hladinu IL-6, CCL3, TNF $\alpha$ , M-CSF, CXCL10 a sníženou hladinu IL-13 <sup>2,10</sup>. Bylo též provedeno měření cytokinů v zanícených tlapkách, kde byla odhalena zvýšená hladina IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , G-CSF, CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, a M-CSF. IL-1 $\beta$  má zásadní roli v onemocnění CMO myši. Jeho exprese v tlapkách je zvýšená ještě před vývojem prvních viditelných symptomů. Delece genu *IL-1RI* nebo *IL-1 $\beta$*  u kmene CMO zabrání vývoji onemocnění a osteolytickému zánětu deformujícímu kostní tkáň a normalizuje hladinu výše zmíněných cytokinů v tlapkách <sup>3</sup>. Jiná studie též potvrdila zásadní roli IL-1 $\beta$  v patologii CMO myši, ovšem podle jejich výsledků delece *IL-1 $\beta$*  nedokáže plně zabránit onemocnění, pouze signifikantně zpomalí progresi onemocnění. Na druhou stranu potvrzuje zjištění, že CMO myši s delecí *IL-1RI* jsou ochráněny před vývojem onemocnění <sup>5</sup>. Na nepostradatelnost IL-1 $\beta$  v patogenezi CMO onemocnění poukazuje také porovnání mezi myším kmenem CMO a myším kmenem CMO s delecí genu *Myd88*, myši tohoto kmene nevykazují známky onemocnění. MYD88 je adaptorový protein, který je nezbytný pro signalizaci cytokinu IL-1 $\beta$ . Jeho mutace tedy zablokuje prozánětlivé účinky tohoto cytokinu <sup>7</sup>. Pro vývoj onemocnění CMO myši je

kritické, aby produkovaný IL-1 $\beta$  působil na nehematopoetické buňky. Když byly totiž buňky kostní dřeně CMO myši transplantovány do CMO myši s delecí receptoru pro IL-1 $\beta$ , nedošlo u těchto chimér k vývoji onemocnění. Signalizace IL-1 $\beta$  receptoru v leukocytech je tedy postradatelná pro vývoj onemocnění<sup>8</sup>. Navíc se ukázalo, že hlavní producenti IL-1 $\beta$  v CMO myších jsou neutrofilové, které produkují zvýšené množství IL-1 $\beta$ , když jsou stimulovány pomocí ligandů Fc receptorů nebo pomocí kombinace LPS a částic oxidu křemičitého (silika) *ex vivo*<sup>4-6</sup>. Naopak produkce IL-1 $\beta$  v makrofázích je normální<sup>6</sup>. Deplece neutrofilů pomocí protilátky anti-LY6G nebo jejich geneticky podmíněná deplece ochrání CMO myši před vývojem onemocnění<sup>4,7</sup>. Nedávná studie také odhalila, že mastocyty v CMO myších přispívají k produkci IL-1 $\beta$  a k osteolytickému poškození. Eliminace této buněčné populace u CMO myši zpozdí vývoj onemocnění, zmenší závažnost symptomů a sníží množství IL-1 $\beta$  v zanícených tkáních. Tato studie také detekovala zvýšenou hladinu cytokinu IL-33 v zanícených tkáních CMO myši. CMO mastocyty odvozené z kostní dřeně reagují na tento cytokin zvýšenou produkcí IL-6, GM-CSF a CXCL2 *in vitro*<sup>31</sup>.

IL-1 $\beta$  je prozánětlivý cytokin, který je produkován nejdříve jako inaktivní prekurzor pro-IL-1 $\beta$ . K maturaci pro-IL-1 $\beta$  na aktivní formu dochází pomocí jeho štěpení kaspázou 1<sup>32-34</sup>. Ovšem delece genu *Casp1* u CMO myši nedokáže zabránit vývoji onemocnění<sup>3,5</sup>. Až delece genů *Casp1* společně s *Casp8* ochrání CMO myši před vývojem onemocnění<sup>4,8</sup>. Tento efekt byl také pozorován u společné delece genů *Casp8* a *Nlrp3*<sup>8</sup>. Zajímavý je fakt, že delece genu *Ctsc*, kódující proteázu Catepsin C, dokáže zpomalit vývoj nemoci u CMO myši<sup>5</sup>. Catepsin C reguluje několik dalších proteáz neutrofilů, které jsou schopné štěpením maturovat IL-1 $\beta$ <sup>35,36</sup>. U jednotlivých delecí genů kódujících tyto proteázy (*Elane*, *Prtn3*, *Ctsb*, *Ctsg*) však významný protektivní účinek nebyl prokázán<sup>4,5</sup>. Na maturaci pro-IL-1 $\beta$  na IL-1 $\beta$  a tím pádem i vývoj patologie CMO myši mají tedy zásadní podíl NLRP3 inflamazom, aktivující kaspázu 1, a kaspáza 8, které jsou v tomto případě navzájem redundantní a částečně i navzájem redundantní proteázy neutrofilů. Doposud ale nebyl popsán mechanismus, kterým u CMO myši dochází k samovolné aktivaci kaspázy 1/NLRP3 inflamazomu, kaspázy 8 a dalších proteáz. Bylo vyloučeno, že by stimul pro aktivaci kaspázy 8 mohl být prozánětlivý cytokin TNF $\alpha$ . Delece genu kódující jeho receptor na genetickém pozadí kmene *Pstpip2<sup>Cmo/Cmo</sup>*, *Casp1<sup>-/-</sup>* totiž nemá vliv na kinetiku a závažnost onemocnění CMO myši<sup>8</sup>. Další genetická modifikace chránící CMO myši před vývojem onemocnění je delece *Syk* kódující stejnojmennou cytosolickou tyrosin kinázu. Hlavní rolí kinázy SYK v patologii CMO myši je aktivace transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. To

má pak za následek zvýšení exprese pro-IL-1 $\beta$ , který pak může být štěpen enzymy zpracovávajícími pro-IL-1 $\beta$  na aktivní formu. Samotná SYK v případě tohoto onemocnění nepodporuje aktivaci kaspázy 8 ani kaspázy1/NLRP3 inflamasomu<sup>9</sup>. Zapojení kinázy SYK do mechanismu patologie CMO myši nám napovídá, že stimul iniciující toto onemocnění by mohl aktivovat některé povrchové receptory obsahující vazebný motiv ITAM, na který se po jeho fosforylaci kinázami z rodiny SRC váží SH2 domény kinázy SYK. Tuto hypotézu podporuje studie, kde křížením CMO myši na genetické pozadí *Ptprc*<sup>-/-</sup> došlo ke zpomalení progresu nemoci a ke zmírnění závažnosti symptomů. Při stimulaci buněk kostní dřeně z těchto myši pomocí kombinace LPS a částice oxidu křemičitého došlo ke snížení produkce IL-1 $\beta$  v porovnání s buňkami z CMO myši. To se také odrazilo na množství detekovaného IL-1 $\beta$  v tlapkách *Ptprc*<sup>-/-</sup> CMO myši, které bylo menší než v CMO myších. Množství detekovaného IL-1 $\beta$  bylo však stále signifikantně vyšší než u WT myši. Delece *Ptprc* vyústila ve snížení exprese pro-IL-1 $\beta$  v neutrofilech a buňkách kostní dřeně, když byly tyto buňky stimulovány pomocí LPS nebo pomocí ligandů Fc receptorů<sup>37</sup>. Fosfatáza CD45 kódovaná genem *Ptprc* dokáže defosforylovat inhibiční tyrosin kináz z rodiny SRC a podpořit tak aktivaci těchto kináz. Ztráta exprese *Ptprc* pak vede ke globálnímu snížení aktivity kináz rodiny SRC<sup>38</sup>. Kinázy z rodiny SRC po aktivaci iniciují signální kaskádu imunoreceptorů obsahující vazebný motiv ITAM, na který se váže výše zmíněná kináza SYK. Kritická role kinázy SYK a pozorovaný efekt fosfatázy CD45 tedy podporují hypotézu, že součástí fenotypu CMO myši je dysregulace signalizace z receptoru nebo receptorů obsahující tento motiv. Stimul, který by ale v CMO myších vyvolával aktivaci těchto receptorů a jejich SYK-dependentní signalizaci, zatím nebyl popsán. Zapojení TLR do iniciace nadměrné tvorby IL-1 $\beta$  CMO myši je nepravděpodobné, ale absolutní vyloučení podílu těchto receptorů na patologii CMO myši je obtížné. Nejjednodušší metodou genetické inaktivace TLR je delece genu kódujícího adaptorový protein MYD88, který zprostředkovává signalizaci většiny TLR. Tento adaptor ale používá pro svou signalizaci i receptor pro IL-1 $\beta$ . Kvůli tomu nemůže protektivní účinek delece MYD88 u CMO myši být důkazem pro vyloučení vlivu signalizace TLR na fenotyp CMO myši. Pro zkoumání vlivu TLR receptorů na fenotyp CMO myši byla využita skutečnost, že signalizace receptoru pro IL-1 $\beta$  je důležitá v linii nehematopoetických buněk<sup>8</sup>. Byl proveden experiment, kde byly izolovány buňky kostní dřeně z CMO myši a CMO myši s deficiencí MYD88. Tyto buňky byly transplantovány do WT myši. Obě transplantace vedly k rekapitulaci vývoje onemocnění CMO myši. Minimálně může být tedy vyloučen vliv signalizace TLR exprimovaných na buňkách hematopoetické linie. Byl také testován vliv signalizace TLR závislé na adaptorovém proteinu TRIF pomocí křížení deleční

mutace genu *Trif* na genetické pozadí CMO myši. Výsledné *Trif*<sup>-/-</sup> CMO myši si ovšem vyvinuly onemocnění s podobnou kinetikou jako CMO myši<sup>37</sup>.

Experimenty zkoumající signální dráhy neutrofilů ukázaly, že stimulace neutrofilů z CMO myši pomocí ligandů Fc receptorů *in vitro* vyvolá zvýšenou fosforylaci kinázy AKT a MAP kináz ERK1/2 a p38. Při stimulaci CMO neutrofilů pomocí LPS *ex vivo* lze také detekovat zvýšenou fosforylaci AKT a v případě stimulace částicemi oxidu křemičitého *ex vivo* lze detekovat zvýšenou fosforylaci ERK1/2<sup>6</sup>. Vedle dysregulace produkce IL-1 $\beta$  a dalších cytokinů můžeme v CMO myších pozorovat i nadměrnou produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin, která je základem tzv. oxidačního vzplanutí. Stimulace buněk kostní dřeně nebo neutrofilů z CMO myši pomocí částic oxidu křemičitého *ex vivo* vyvolá mohutnější produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin než v případě buněk izolovaných z WT myši. Tento rozdíl v míře produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin je vidět při použití více různých stimulujících činidel – PMA, živé bakterie druhu *Escherichia coli*, imunokomplexy, TNF $\alpha$ , LPS nebo fMLP. Dokonce i bazální produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin buňkami kostní dřeně z CMO myši je zvýšena oproti buňkám WT myši. Naopak stimulace CMO a WT monocytů nevyvolá větší odpověď u CMO monocytů. Zvýšená citlivost neutrofilů a buněk kostní dřeně CMO myši na stimuly podporující produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin je zachována i při porovnávání buněk z *Myd88*<sup>-/-</sup> CMO myši a *Myd88*<sup>-/-</sup> myši. V případě porovnávání buněk z těchto myši se eliminuje vliv zánětu probíhajícího v CMO myších. Detekované rozdíly jsou pak pouze důsledkem mutace podmiňující onemocnění. Nadměrná produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin v CMO myších je závislá na NADPH oxidáze a je výsledkem její dysregulace. Při stimulaci buněk kostní dřeně nebo neutrofilů z CMO myši pomocí částic oxidu křemičitého *ex vivo* dochází ke zvýšené fosforylaci P47PHOX. Zvýšená fosforylace P47PHOX je v CMO myších nejspíš zprostředkována protein kinázou C (PKC), protože použití inhibitoru PKC zablokuje fosforylaci P47PHOX. Produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin v CMO myších byla vizualizována *in vivo* pomocí injekce limuniscenčního reportéru, který po oxidaci kyslíkatými radikály emituje záření detekovatelné pomocí CCD kamery. Tento experiment ukázal, že k produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin dochází v CMO myších už ve věku tří týdnů, kdy nevykazují zjevné symptomy onemocnění. K nejsilnější produkci dochází v oblasti ocasu a zadních tlapkách, v typických místech, kde dochází u CMO myši k deformaci kostní tkáně. Jak bylo zmíněno výše, deplece neutrofilů u CMO myši zabrání vývoji onemocnění. To je doprovázeno vymizením detekovatelné produkce kyslíkových radikálů *in vivo*. Nadměrná

produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin má ale na fenotyp CMO myši menší vliv než dysregulace produkce IL-1 $\beta$ . Pokud jsou CMO myši kříženy s myšmi s deficiencí NADPH oxidázy, výslední mutanti vyvíjejí onemocnění s podobnou kinetikou a nadměrnou produkcí IL-1 $\beta$ . Při vyšetření těchto myši pomocí  $\mu$ CT analýzy lze však vidět, že deficiencie NADPH oxidázy ochrání myši před destrukcí kostní tkáně. Absence poškození kostní tkáně a chrupavky byla potvrzeno i histologickou analýzou tarsálních kostí <sup>7</sup>.

## 2.2 PSTPIP2

Genetickou podstatou onemocnění myšního kmene CMO je záměna jednoho nukleotidu v genu *Pstpip2* (T293C), která změní aminokyselinu leucin na pozici 98. Tato aminokyselina je v sekvenci proteinu PSTPIP2 silně konzervovaná napříč různými živočišnými druhy. V případě kmene CMO je tento leucin mutován na prolin. Bioinformatické přístupy umožňující modelování proteinové struktury odhadují, že aminokyselinová sekvence kolem tohoto leucinu tvoří  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu, která je mutací leucinu na prolin narušena. Předpokládaný následek této mutace je poškození přirozené struktury a funkce proteinu <sup>39</sup>. Tento předpoklad byl následně podpořen, když se nepodařilo detekovat protein PSTPIP2 v buněčných lysátech CMO myši pomocí western blotu a imunoprecipitace. Detekce PSTPIP2 pomocí imunoprecipitace selhala, i když byla použita protilátka proti epitopu, který se nachází na C konci proteinu – tudíž daleko od popsané mutace <sup>2</sup>. Mutace podmiňující fenotyp CMO myši má tedy tak významný vliv na strukturu PSTPIP2, že stabilita tohoto proteinu je drasticky snížena. Funkčně je *Cmo* vlastně mutantní alela způsobující delecii PSTPIP2 na úrovni proteinu, byť její podstatou není vnesení STOP kodonu. Byly také vytvořeny *Pstpip2* knock-out myši. Tyto myši trpěly stejnou autoinflamatorní nemocí jako myši kmene CMO. K vývoji prvních symptomů došlo ale ještě dříve než v případě CMO myši. I v případě těchto myši byla naměřena zvýšená hladina IL-1 $\beta$  v zanícených tlapkách a infiltrace neutrofilů do zanícených tkání <sup>40</sup>.

V minulosti se pro výzkum CRMO používal i myši kmen LUPO. Myši kmene LUPO též vyvíjejí onemocnění postihující tlapy, kde se vytváří zánět spojený s destrukcí kostní tkáně a kůže. Zánětlivé léze u tohoto kmene poškozují také bederní obratle a uši. Analýza kostní tkáně pomocí výpočetní tomografie potvrdila sníženou hustotu kostní tkáně v oblasti tibie <sup>10,30</sup>. Genetická podstata onemocnění obou zmíněných kmenů je velice podobná. Myši kmene LUPO ve svém genomu kódují *Pstpip2* s jednonukleotidovou záměnou měnící aminokyselinu izoleucin na pozici 282 za asparagin. Tato mutace umožní tvorbu proteinu

PSTPIP2 a jeho detekci. Množství PSTPIP2 v buňkách myši kmene LUPO detekované pomocí western blotu a imunoprecipitace je ale signifikantně menší než množství PSTPIP2 ve WT myších. Nedochozí ale ke snížení obsahu mRNA kódující PSTPIP2. Dochází tudíž ke snížení exprese na proteinové úrovni podobně jako u CMO myší, kde je exprese PSTPIP2 poškozena ještě více. Stejně jako u kmene CMO je onemocnění kmene LUPO nezávislé na adaptivním imunitním systémem, ale je závislé na buňkách hematopoetické linie<sup>30</sup>.

PSTPIP2 má důležitou roli v regulaci zánětu a imunitní odpovědi. Protizánětlivá funkce tohoto proteinu byla několikrát potvrzena ve zvířecích modelech<sup>41-45</sup>. Bohužel přesný mechanismus, kterým PSTPIP2 vykonává svou regulační funkci, a jak je spojen s produkcí IL-1 $\beta$  v myších neutrofilech, je stále neznámý. PSTPIP2 nevykazuje žádnou katalytickou aktivitu a funguje pouze jako adaptorový protein zprostředkovávající interakce s dalšími proteiny. Mezi jeho interakční partnery popsané v neutrofilech patří fosfatázy z rodiny PEST, kináza CSK a lipidová fosfatáza SHIP1<sup>6</sup>. Tyto proteiny se podílí na regulaci buněk imunitního systému. Do rodiny PEST řadíme 3 fosfatázy – PTPN12, PTPN18 a PTPN22. Společná vlastnost těchto fosfatáz je, že interagují s kinázou CSK<sup>46-48</sup>. CSK se podílí na regulaci aktivity kináz z rodiny SRC, které iniciují signalizaci z antigenních receptorů a receptorů imunitního systému obsahující motiv ITAM v cytosolické části. Kinázy SRC se mohou nacházet v neaktivní a aktivní konformaci. Přechod mezi těmito stavy je kontrolován fosforylací dvou tyrosinů – aktivačního tyrosinu v rámci katalytické domény a inhibičního tyrosinu na C konci<sup>49</sup>. CSK fosforyluje inhibiční tyrosin a tím negativně reguluje aktivitu kináz z rodiny SRC<sup>50,51</sup>. Aktivační tyrosin může být pak substrátem pro fosfatázy regulující aktivitu kináz z rodiny SRC. Mezi tyto fosfatázy patří i fosfatázy ze zmíněné rodiny PEST<sup>48,52,53</sup>. Spolupráce kinázy CSK a fosfatáz z rodiny PEST tak inhibuje kinázy z rodiny SRC. Fosfatáza SHIP1 defosforyluje membránový fosfolipid fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP3) a fosfatidylinositol-1,3,4,5-tetrakisfosfát na páté pozici inositolového kruhu<sup>54-57</sup>. Podílí se tak na negativní regulaci signálních drah, které používají tyto fosfoinositidy jako mediátory signálu.

Pro interakci s fosfatázami z rodiny PEST je kriticky důležitý konzervovaný tryptofan na pozici 232 ve struktuře proteinu PSTPIP2. Tuto aminokyselinu nacházíme i v proteinu PSTPIP1, homologu proteinu PSTPIP2. Její mutace u obou proteinů eliminuje vazbu s fosfatázami rodiny PEST<sup>6,58</sup>. Pro vazbu CSK na PSTPIP2 existují dva mechanismy. CSK může interagovat s fosfatázami rodiny PEST, a to i když interagují s PSTPIP2. Tímto způsobem PEST fosfatázy navázané na PSTPIP2 vytvoří interakční rozhraní umožňující

nepřímou asociaci CSK s PSTPIP2. Druhý mechanismus je přímá vazba CSK na PSTPIP2. Nebyla ovšem identifikována sekvence PSTPIP2, která by tuto přímou interakci zprostředkovávala. Oba mechanismy asociace CSK s PSTPIP2 vyžadují SH2 a SH3 domény kinázy CSK<sup>6</sup>. Je také známo, že PSTPIP2 může být fosforylován. K této fosforylaci dochází na C konci PSTPIP2<sup>6,58</sup>. Dále v buněčné linii RAW264.7 byla zaznamenána interakce PSTPIP2 s transkripčními faktory STAT1 a STAT6<sup>42</sup> a v buněčné linii K562 byla zaznamenána interakce PSTPIP2 s kinázou LYN<sup>11</sup>.

Fosforylace PSTPIP2 byla poprvé pozorována *in vitro* při transfekci PSTPIP2 společně s kinázou V-SRC a při stimulaci buněčné linie BAC1.2F5 pomocí M-CSF<sup>58,59</sup>. PSTPIP2 se nejspíše podílí na negativní regulaci účinků cytokinu M-CSF. Makrofágy z CMO myši reagují na tento cytokin zvýšenou fosforylací MAP kinázy ERK1/2, transkripčního faktoru STAT1 a zvýšenou tvorbou chemokinu CCL3, jehož hladina je v CMO myších zvýšená<sup>2,10</sup>. Podávání duálního inhibitoru M-CSFR a C-KIT CMO myším také zabrání expanzi myeloidních buněk ve slezině CMO myši<sup>10</sup>. První studie, která publikovala objevení proteinu PSTPIP2, popsala, že PSTPIP2 je fosforylován na tyrosinech na pozicích 323 a 333. Předpoklad pro toto tvrzení byl, že tyto tyrosiny v proteinu PSTPIP2 jsou analogické tyrosinům na pozicích 344 a 367 v homologickém proteinu PSTPIP1, které jsou též fosforylovány. Mutace těchto tyrosinů v proteinu PSTPIP2 dramaticky snížila jeho fosforylaci při expresi s kinázou v-SRC *in vitro*<sup>58</sup>. Snížená fosforylace PSTPIP2 s mutacemi těchto tyrosinů *in vitro* byla pozorována i v jiné studii<sup>10</sup>. Analýza provedená v naší laboratoři ovšem nenaznačuje, že by sekvence kolem tyrosinů na pozicích 323 a 333 odpovídaly sekvencím kolem tyrosinů 344 a 367 v proteinu PSTPIP1. Tyrosin na pozici 367 proteinu PSTPIP1 je dokonce součástí SH3 domény, kterou protein PSTPIP2 neobsahuje. Na pozici 329 proteinu PSTPIP2 se nachází ještě další tyrosin, jehož možná fosforylace nebyla v předešlých studiích brána v potaz. Ve studii z naší laboratoře byla pozorována zvýšená fosforylace PSTPIP2 *in vitro* v buněčné linii J774 při stimulaci pomocí M-CSF, aktivaci Fc receptorů nebo aktivaci  $\beta_2$  integrinů. Ovšem vzhledem k tomu, že  $\beta_2$  integriny byly stimulovány pomocí protilátky anti-CD18, nelze vyloučit, že vazba těchto protilátek na Fc receptory neovlivnila fosforylaci PSTPIP2. Exprese PSTPIP2, který postrádá všechny C-koncové tyrosiny, v této buněčné linii eliminuje fosforylaci PSTPIP2 vyvolanou cytokinem M-CSF. Slabá fosforylace PSTPIP2 byla také pozorována v buňkách kostní dřeně WT myši, když byly stimulovány pomocí LPS *ex vivo*. Tato fosforylace vyvolaná pomocí LPS byla znatelně zesílena po následné stimulaci pomocí částic oxidu křemičitého. *In vitro* stimulace buněčné linie J774 pomocí M-CSF

a protilátky aktivující Fc receptor vedle fosforylace PSTPIP2 podpořila i asociaci PSTPIP2 s CSK. Mutace C-koncových tyrosinů, která eliminuje fosforylaci PSTPIP2, nezabrání interakci CSK s PSTPIP2. Nicméně mutace těchto tyrosinů znemožní proteinu PSTPIP2 interagovat s fosfatázou SHIP1. Fosforylace proteinu PSTPIP2 a jeho interakce s kinázou CSK a fosfatázou SHIP1 byly též detekovány v lidských granulocytech z periferní krve po *ex vivo* aktivaci Fc receptorů <sup>6</sup>.

Stimulace neutrofilů z CMO myši pomocí protilátky aktivující Fc receptor *ex vivo* také vyvolá zvýšenou fosforylaci kinázy AKT a MAP kináz ERK1/2 a p38. Při stimulaci CMO neutrofilů pomocí LPS *ex vivo* lze také detekovat zvýšenou fosforylaci AKT a v případě stimulace samotnými částicemi oxidu křemičitého *in vitro* lze detekovat zvýšenou fosforylaci ERK1/2 <sup>6</sup>. Role PSTPIP2 v regulaci aktivace MAP kinázy ERK byla pozorována i v jiných studiích <sup>11,43</sup>. Pro studium role jednotlivých interakčních motivů proteinu PSTPIP2 byly vytvořeny linie imortalizovaných progenitorů neutrofilů z buněk CMO myši. Tyto linie byly geneticky modifikovány tak, aby exprimovaly WT PSTPIP2, PSTPIP2 bez C-koncových tyrosinů a PSTPIP2 s mutací v pozici 232. Neutrofilů vytvořených z těchto progenitorů byly podrobeny stimulaci částicemi oxidu křemičitého. Obě mutantní varianty PSTPIP2 při této stimulaci vyprodukovaly větší množství IL-1 $\beta$  a reaktivních kyslíkatých sloučenin <sup>6,7</sup>. Zároveň, když byly neutrofilů z kostní dřeně CMO myši a WT myši inkubovány v přítomnosti částic oxidu křemičitého a inhibitoru SHIP1 fosfatázy, tento inhibitor zvýšil produkci IL-1 $\beta$  pouze ve WT neutrofilech <sup>6</sup>. Je tedy vidět, že i jednotlivé mutace narušující interakce PSTPIP2 s jeho interakčními partnery nebo inhibice jeho interakčních partnerů mají signifikantní vliv na funkci tohoto proteinu a na produkci IL-1 $\beta$ .

Jedna studie zkoumala vliv PSTPIP2 na diferenciaci megakaryocytů. V této studii bylo ukázáno, že PSTPIP2 negativně reguluje diferenciaci megakaryocytů a jeho exprese je omezena transkripčním faktorem GATA1. Exprese WT PSTPIP2 v buněčné linii K562 zamezí diferenciaci těchto buněk na megakaryocyty *in vitro*. Ovšem Exprese mutantního PSTPIP2, který postrádal 2 tyrosiny z C-koncové trojice, vykazuje slabší represi diferenciaci, a exprese mutantního PSTPIP2, který neváže fosfatázy z rodiny PEST, nedokáže vůbec zamezit diferenciaci megakaryocytů. Zde PSTPIP2 vykonává svoji funkci pomocí inhibice MAP kinázy ERK a to mechanismem, který je závislý na kináze LYN. V této studii vyla detekována interakce PSTPIP2 a LYN. Nebylo ovšem ověřeno, jestli má LYN vliv na fosforylaci PSTPIP2, nebo jestli dochází k pouhé interakci těchto proteinů <sup>11</sup>.



Některé studie o PSTPIP2 byly vypracovány hlavně v kontextu role PSTPIP2 v makrofázích. Dříve se totiž předpokládalo, že nemoc CMO myši je zprostředkována hlavně touto buněčnou populací. Jedna studie detekovala akumulaci makrofágů v zanícených tlapkách CMO myši a dokázala zabránit vývoji onemocnění při depleci makrofágů a monocytů pomocí liposomů obsahujících kyselinu klodronovou<sup>30</sup>. Makrofágy odvozené z kostní dřeně CMO myši také rychleji proliferovaly a produkovaly více CCL2, CCL3 a rozpustného TNFR1 při kultivaci v médiu s obsahem M-CSF. Při stimulaci pomocí LPS produkovaly více CCL3 a IL-6<sup>2,10</sup>. Jak bylo popsáno výše, M-CSF je jedním z cytokinů, který indukuje fosforylaci PSTPIP2. V jedné studii bylo ukázáno, že PSTPIP2 negativně reguluje expresi STAT1, fosforylaci STAT1 a aktivaci MAP kináz ERK1/2 při signalizaci spuštěné M-CSF. Ve studii z naší laboratoře se nám ale nepodařilo tyto efekty proteinu PSTPIP2 na signalizaci M-CSF v makrofázích prokázat. Negativní vliv PSTPIP2 na aktivaci MAP kináz ERK1/2 jsme ale pozorovali v myších neutrofilech. Tato studie dále ukázala, že působení LPS nebo prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  a GM-CSF zvýšilo expresi PSTPIP2 v buněčné linii J774. Novější studie zkoumaly vliv PSTPIP2 na zánětlivou odpověď makrofágů a dále potvrdily protizánětlivou roli proteinu PSTPIP2. V těchto studiích bylo ovšem ukázáno, že kombinace LPS a IFN $\gamma$  indukující polarizaci M1 makrofágů snižuje expresi PSTPIP2. Naopak IL-4 indukující polarizaci M2 makrofágů zvyšuje expresi PSTPIP2. Bylo navrženo, že tyto pozorované efekty PSTPIP2 na polarizaci makrofágů jsou výsledkem vlivu PSTPIP2 na aktivaci transkripčních faktorů STAT1 a STAT6, se kterými PSTPIP2 interaguje. Při snížení exprese PSTPIP2 prostřednictvím siRNA totiž dochází ke snížení fosforylace STAT6 a zvýšení fosforylace STAT1<sup>42</sup>. To je v souladu s pozorovaným vlivem PSTPIP2 na signalizaci cytokinu M-CSF v makrofázích<sup>2</sup>. Zvýšení exprese PSTPIP2 v myších makrofázích *in vivo* pomocí cílené infekce adenovirovým vektorem kódujícím PSTPIP2 prokázalo protektivní účinek v modelovém zánětu jater, snížilo hladinu prozánětlivých cytokinů a podpořilo polarizaci makrofágů na M2 fenotyp. V buněčné linii RAW267.4 bylo dále ukázáno, že PSTPIP2 snižuje tvorbu prozánětlivých cytokinů a chemokinů a negativně reguluje aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B<sup>41,42</sup>.

Bylo také zjištěno, že PSTPIP2 se může podílet na regulaci dynamiky membrány a tvorby filopodií. Nadměrná exprese PSTPIP2 v makrofágové linii BAC1.2F5 vyvolala zvýšení frekvence tvorby filopodií, změnila morfologii těchto buněk a inhibovala vlnění membrány („membrane ruffling“) na dorzální straně buněk. Některé tyto efekty vyvolané nadměrnou expresí PSTPIP2 se podobají těm, které byly pozorovány i u dalších proteinů

z F-BAR rodiny (viz níže). Nadměrná exprese PSTPIP2 také urychlila migraci těchto buněk *in vitro* v médiu obsahujícím M-CSF a ovlivnila organizaci aktinového cytoskeletu tak, že se v buňkách začaly tvořit dlouhé svazky aktinových filament. Tyto svazky byly pozorovány i při *in vitro* kultivaci G-aktinu s purifikovaným PSTPIP2. V tomto *in vitro* testu PSTPIP2 zpomalil polymerizaci aktinu, ale stabilizoval vzniklá aktinová filamenta. Koncentrace F-aktinu v buňkách ovšem inverzně korelovala s mírou exprese PSTPIP2<sup>60</sup>. Negativní vliv proteinu PSTPIP2 na polymeraci aktinu byl dokumentován i další studií, kdy inhibice exprese PSTPIP2 pomocí siRNA v buněčné linii RAW264.7 odvozené z myších makrofágů zvýšila vlnění membrány a polymerizaci aktinu v podosomech. Naopak zvýšení exprese PSTPIP2 redukovalo tvorbu podosomů v této buněčné linii. Inhibice polymerace aktinu závislá na PSTPIP2 spočívá v tom, že PSTPIP2 kompetuje s jinými proteiny rodiny F-BAR o vazbu na membránu. Tyto proteiny pak nemohou iniciovat polymeraci aktinu zprostředkovanou pomocí N-WASP. PSTPIP2 s N-WASP neinteraguje, protože postrádá C-terminální SH3 doménu<sup>61</sup>. Jiná studie zkoumala vliv proteinů PSTPIP1 a PSTPIP2 na dynamiku podosomů u osteoklastů diferencovaných z buněčné linie RAW264 a zjistila, že tyto proteiny mají protichůdné funkce. Ovšem v tomto případě měl PSTPIP2 pozitivní vliv na tvorbu podosomů a PSTPIP1 podporoval jejich zhroucení. Velice překvapivý výsledek této studie byl, že snížení exprese PSTPIP1 pomocí siRNA u osteoklastů zvýší schopnost resorpce osteologického disku nahrazující kostní tkáň *in vitro*. Naopak snížení exprese PSTPIP2 omezilo schopnost resorpce osteologického disku *in vitro*. Tyto výsledky zjevně neodpovídají fenotypu absence PSTPIP2 na úrovni celého organismu<sup>62</sup>. Jiná studie provedla podobný experiment. V tomto experimentu byla provedena intramuskulární implantace dentinového disku, který byl extrahován po 3, 5 nebo 23 dnech od implantace. Následná analýza disku odhalila, že v CMO myších vykazoval disk rozsáhlejší osteolytické poškození a akumulaci osteoklastů<sup>10</sup>.

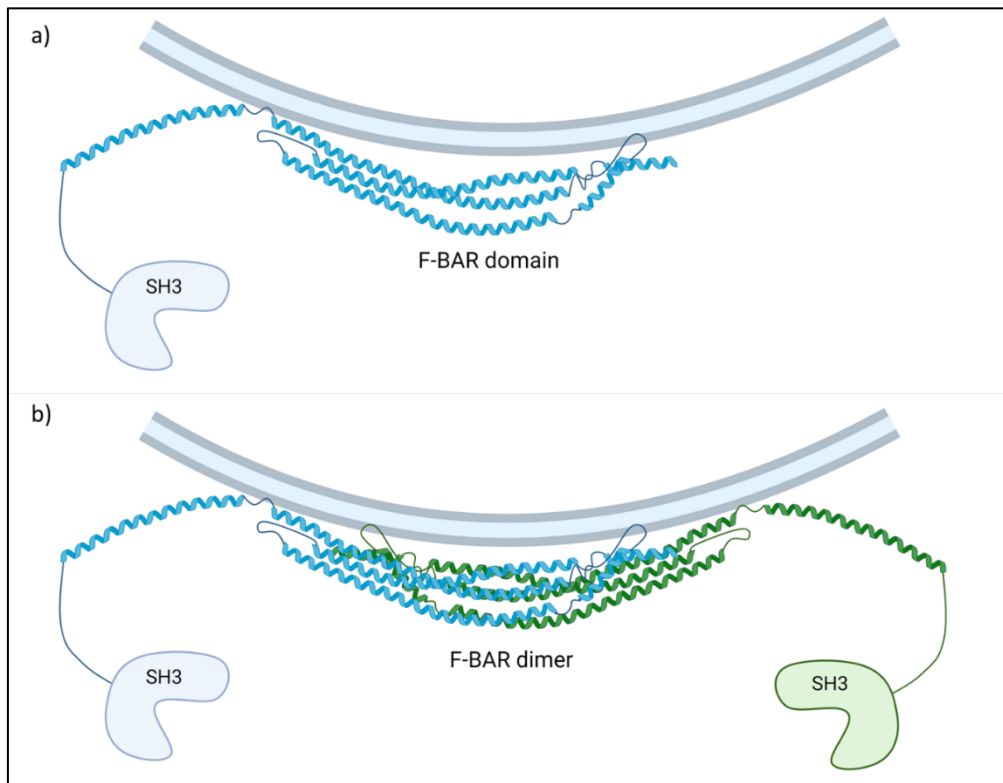
## 2.3 Proteinová Rodina F-BAR

### 2.3.1 F-BAR doména

PSTPIP2 patří do rodiny F-BAR. Tyto proteiny jsou charakteristické přítomností domény F-BAR. Pomocí krystalografických metod byla určena prostorová struktura F-BAR domény z proteinů FBP17 a CIP4. Ta ukázala, že F-BAR doména se skládá z krátkého N-koncového  $\alpha$  helixu, následovaného třemi dlouhými  $\alpha$  helixy, C-koncovým krátkým  $\alpha$  helixem a krátkým peptidem EEP („EFC extended peptide“), který netvoří definovanou

sekundární strukturu. Osy těchto  $\alpha$  helixů nejsou rovné, ale jsou zakřivené. Toto zakřivení dává proteinům z BAR superrodiny charakteristický tvar, který připomíná banán nebo srp. Následkem zakřivení osy  $\alpha$  helixů je, že ve struktuře této domény můžeme rozlišit konkávní a konvexní stranu. F-BAR doména zajišťuje dimerizaci proteinů z této rodiny. Vzniklé dimery mají antiparalelní orientaci, kdy proti sobě stojí N konce dvou F-BAR domén a v místě styku jednotlivých monomerů se vytváří svazek šesti  $\alpha$  helixů ( $\alpha$  helixy 2 – 4). Rozhraní mezi dvěma dimery je tvořeno převážně hydrofobními aminokyselinami a několika nabitými aminokyselinami. V rozhraní mezi dvěma dimery můžeme také najít okrsky obsahující aminokyseliny, které jsou vysoce konzervované napříč různými F-BAR proteiny. Jeden z těchto konzervovaných okrsků se váže na EEP peptid druhé F-BAR domény. Z toho, že se při dimerizaci uplatňují silně konzervované aminokyseliny se usuzuje, že všechny F-BAR proteiny dokáží dimerizovat<sup>63</sup>. První studie zkoumající F-BAR doménu ukázaly, že tato doména má schopnost vázat se na membránu a měnit její tvar. Při inkubaci F-BAR proteinů nebo pouze jejich F-BAR domén s liposomy *in vitro* došlo k deformaci membrány liposomů, na kterých se začaly vytvářet membránové tubuly<sup>63-66</sup>. K indukci tvorby membránových tubulů dochází i při nadměrné expresi F-BAR proteinů v buněčných kulturách *in vitro*<sup>63-67</sup>. Tvorba membránových tubulů byla pozorována i při inkubaci PSTPIP2 s liposomy *in vitro* a při jeho nadměrné expresi v buněčných liniích<sup>10,61,62,64</sup>. Při vazbě na membránu jsou F-BAR proteiny omezeny fosfolipidovým složením membrány. F-BAR doména interaguje selektivně jen s membránou obsahující negativně nabitě fosfolipidy - konkrétně fosfatidylserin a fosfoinositidy s různou úrovní fosforylace<sup>64,65</sup>. Za vazbu na membránu se záporně nabitými fosfolipidy zodpovídají konzervované, kladně nabitě aminokyseliny na konkávní straně F-BAR domény. Mutace těchto aminokyselin poškodí schopnost F-BAR domény vázat se na membránu a zamezí indukci membránových tubulů<sup>63,64</sup>.

Vzniklé dimery F-BAR proteinů spolu mohou dále interagovat a vytvářet oligomery. Na oligomerizaci se podílí boční interakce vedlejších F-BAR domén a vzájemné interakce špičky jednoho dimeru F-BAR domény se špičkou druhého dimeru (tzv. „tip-to-tip interakce“). Pomocí této oligomerizace a vazby konkávní strany na membránu vytváří F-BAR domény plášť obklopující membránu a indukují tak její zakřivení. Vzniklý plášť byl pozorován na snímcích z elektronového mikroskopu. V rámci tohoto pláště mezi sebou interagují boční strany vedlejších F-BAR domén a stabilizují vytvořený plášť. Mutace aminokyselin zprostředkovávajících boční interakce naruší tubulaci membrány<sup>63,66</sup>.



**Obrázek 1: Schématické znázornění struktury proteinů z rodiny F-BAR a jejich vazby na membránu.** (Vytvořeno v internetovém nástroji [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

a) Vazba monomerního proteinu z rodiny F-BAR na membránu, b) vazba dimerního proteinu z rodiny F-BAR na membránu.

Standartními metodami zkoumání schopnosti F-BAR proteinů měnit zakřivení membrány jsou inkubace F-BAR proteinů (nebo jejich F-BAR domén) s liposomy *in vitro* a nadměrná exprese v buněčných liniích. V obou případech se jedná o uměle vytvořené podmínky, které nemusí přímo odrážet fyziologickou funkci F-BAR proteinů v buňce. Vzhledem k tomu, že F-BAR proteiny rekrutují k membráně své interakční partnery, případné zakřivení membrány může být výsledkem kooperace F-BAR proteinů s těmito interakčními partnery a vytváření větších proteinových komplexů. F-BAR proteiny nemusí být vždy přímými induktory zakřivení membrány, ale pouze iniciátory nebo regulátoři tohoto procesu. Funkčně důležitější charakteristika F-BAR domény je tedy vazba na membránu a její schopnost oligomerizovat do struktur vyšších řádů. Při vazbě F-BAR domény na membránu může dojít k rekrutování dalších proteinů k membráně pomocí C-koncových domén konkrétního F-BAR proteinu. Oligomerizace F-BAR proteinů by pak mohla zvýšit stabilitu interakce s membránou, aviditu vazby interakčních partnerů a efektivitu jejich translokace na

membránu. Indukce tvorby membránových tubulů v *in vitro* testech je výsledkem aktivity pouze vybraných členů F-BAR rodiny <sup>68</sup>.

### 2.3.2 C-koncové domény F-BAR proteinů

Proteiny z F-BAR rodiny obsahují ve své struktuře ještě další domény, pomocí kterých interagují se svými vazebnými partnery a umožňují jejich translokaci k membráně. U většiny F-BAR proteinů nacházíme na C konci SH3 doménu nebo  $\mu$ HD doménu <sup>69</sup>. Většinou tyto domény umožňují propojit F-BAR proteiny s aktinovým cytoskeletem pomocí aktivace proteinu N-WASP a následné polymerace aktinu <sup>64,70-73</sup>. SH3 domény proteinů FBP17, CIP4, TOCA-1, PSTPIP1, PACSIN1 a PACSIN2 interagují s GTPázou Dynamin a rekrutují ji k membráně <sup>64,67,73-75</sup>. SH3 doména proteinu PACSIN2 se váže na GTPázu RAC1, která reguluje jeho buněčnou lokalizaci. Naopak PACSIN2 negativně reguluje aktivitu RAC1 <sup>76</sup>. Některé F-BAR proteiny místo C-koncových vazebných domén obsahují domény s vlastní katalytickou aktivitou. Jedná se například o kinázovou doménu tyrosin kináz FER a FES, nebo o GAP domény stimující GTPázovou aktivitu malých G proteinů. Mnohé funkční testy ukazují, že tyto C-koncové domény F-BAR proteinů jsou nepostradatelné pro fyziologické funkce F-BAR proteinů <sup>64,70,73,77,78</sup>. Protein PSTPIP2 vykazuje určitou strukturní unikátnost v rámci F-BAR proteinů. Na rozdíl od většiny těchto proteinů totiž nemá na svém C konci žádnou ustanovenou strukturní doménu. To je nejspíš také důvod, proč nedokáže interagovat s proteinem WASP <sup>58,59</sup>, který je vazebným partnerem PSTPIP1 <sup>79</sup>.

U některých proteinů z F-BAR rodiny vidíme, že struktury na C konci se podílí na regulaci interakce s membránou a modifikují preferované zakřivení membrány, na které se F-BAR doména váže. Například F-BAR doména proteinů PACSIN inkubovaná s liposomy *in vitro* vytváří membránové tubuly efektivněji než celé proteiny PACSIN. Samotná F-BAR doména těchto proteinů se dokáže vázat na liposomy o průměru 50 až 400 nm *in vitro* a síla interakce se nemění v závislosti na průměru liposomů. Nicméně při inkubaci celých proteinů PACSIN s liposomy o průměru 50 až 400 nm *in vitro* vidíme, že tyto proteiny preferují vazbu na liposomy o průměru 400 nm <sup>80</sup>.

Díky vazbě F-BAR proteinů na membránu a jejich unikátní schopnosti vnímat a generovat zakřivení membrány, jsou tyto proteiny zapojeny do procesů, kde dochází k dynamickým změnám tvaru membrán a reorganizaci cytoskeletu, jako je například vezikulární transport, fagocytóza, buněčná migrace a cytokineze <sup>64,65,70,73,75,78</sup>. Konkrétní význam F-BAR domény proteinu PSTPIP2 pro regulaci zánětu a buněk imunitního systému

nebyl příliš zkoumán. Bylo ukázáno, že mutace kladně nabitých aminokyselin na pozicích 116 a 117, naruší vazbu F-BAR domény tohoto proteinu na membránu. Tato mutantní forma také vykazuje defektní fosforylaci vyvolanou cytokinem M-CSF a redukovanou schopnost regulovat diferenciaci osteoklastů *in vitro* <sup>10</sup>.

## 2.4 SHIP1

Protein SHIP1 je 1189 aminokyselin dlouhá lipidová fosfatáza. Poprvé byl tento protein pozorován při zkoumání fosforylace adaptorového proteinu SHC po aktivaci B-buněčného receptoru (BCR), kde byla odhalena tvorba komplexu SHC s proteiny SOS1, GRB2 a s do té doby neznámým fosforylovaným proteinem <sup>81,82</sup>. O dva roky později byl tento protein popsán a pojmenován SHIP1 <sup>54-56,83</sup>. Protein SHIP1 ve své struktuře obsahuje N-koncovou SH2 doménu, centrální Pleckstrin homology-related (PH-R) doménu, fosfatázovou doménu, C2 doménu a C konec bohatý na prolin, který netvoří definovanou strukturní doménu, ale obsahuje několik interakčních motivů. Exprese SHIP1 byla detekována v mnoha orgánech, ale je omezená jen na buňky hematopoetické linie, mezenchymální kmenové buňky a spermatické buňky <sup>84,85</sup>. SHIP1 pomocí své fosfatázové domény hydrolyzuje fosfátovou skupinu na pátém uhlíku PIP3 a fosfatidylinositol-1,3,4,5-tetrakisfosfátu. PIP3 je ovšem preferovaný substrát a reakce jeho defosforylace pomocí SHIP1 má nižší konstantu Michaelise-Mentenové <sup>54-57,86</sup>. SHIP1 tak ustanovuje rovnováhu mezi koncentrací PIP3 a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfátu v buňce.

Pomocí své N-koncové SH2 domény může SHIP1 interagovat s motivy obsahující fosforylovaný tyrosin na cytosolické části povrchových receptorů a přiblížit se tak k plasmatické membráně, kde se nachází i její substrát. Byla popsána vazba SH2 domény SHIP1 na receptory FcγRIIB, gp49B1 a CD1 obsahující vazebný motiv ITIM a na receptory FcγRIIA, FcγRI-associated ζ-chain, ζ řetězec komplexu TCR, FcεRI a CD79 obsahující motiv ITAM <sup>87</sup>. SH2 doména proteinu SHIP1 se také může vázat na cytoplasmatické proteiny SHC <sup>88</sup> a DOK-3 <sup>89</sup>. SHIP1 může také interagovat s další molekulou fosfatázy SHIP1 pomocí intermolekulární vazby své SH2 domény na motiv kolem fosforylovaného tyrosinu na pozici 1020, který patří jiné molekule SHIP1. Tato interakce dvou molekul SHIP1 omezuje vazbu SHIP1 na své interakční partnery <sup>90</sup>.

Fosfatázová doména je tvořena sekvencí aminokyselin na pozici 401 – 866 a je zodpovědná za katalytickou aktivitu proteinu SHIP1. Tato doména je regulovaná pomocí

dvou alosterických aktivačních míst – fosforylovatelným serinem na pozici 440 a C2 doménou, která je tvořena aminokyselinami na pozicích 725 – 863<sup>91</sup>. Serin na pozici 440 může být fosforylován Protein kinázou A (PKA) a defosforylován  $\lambda$ -fosfatázou. Jeho fosforylace zvýší katalytickou aktivitu SHIP1<sup>86,92</sup>. Hlavním mechanismem, který aktivuje katalytickou aktivitu SHIP1, je její asociace s membránou<sup>57</sup>. Fosforylace se ale často používá jako ukazatel aktivace této fosfatázy, protože tato aktivace s fosforylací pozitivně koreluje<sup>55,57</sup>. SHIP1 může být fosforylována na více pozicích, ale jen u serinu na pozici 440 byl zdokumentován vliv na katalytickou aktivitu SHIP1<sup>86,92</sup>. Naopak nebylo pozorováno zvýšení aktivity SHIP1 při její fosforylaci kinázou LYN<sup>57</sup>. Alosterická regulace SHIP1 pomocí její C2 domény byla objevena díky pokusu o nalezení molekul, které by modulovaly aktivitu SHIP1. V rámci této studie bylo zjištěno, že fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát interaguje s C2 doménou SHIP1 a posiluje její aktivitu<sup>93</sup>.

Aminokyseliny 292 až 401 tvoří PH-R doménu. Tato doména byla odhalena až studií, která určila strukturu této sekvence pomocí nukleární magnetické rezonance a odhalila její podobnost s PH doménou. PH-R doména SHIP1 interaguje s fosfoinositidy, preferenčně s PIP3. Ovšem tato doména na rozdíl od C2 domény nemá vliv na katalytickou aktivitu SHIP1<sup>94</sup>.

Na C konci SHIP1 se nachází 2 NPXY motivy a 2 polyprolinové motivy. Tyrosiny NPXY motivů mohou být fosforylovány pomocí kináz z rodiny SRC a zprostředkovávat interakci s proteiny obsahujícími PTB doménu<sup>91</sup>. Mezi proteiny, které takto interagují s SHIP1 patří SHC<sup>88,95</sup>, DOK-1<sup>96</sup> a DOK-3<sup>89,97</sup>. Polyprolinové motivy zprostředkovávají vazbu na SH3 doménu proteinu GRB2<sup>55,56,97</sup>.

#### **2.4.1 Regulační funkce SHIP1 fosfatázy**

SHIP1 se podílí na signalizaci inhibičního receptoru Fc $\gamma$ RIIB a tím pádem na negativní regulaci aktivace B lymfocytů a mastocytů<sup>98–102</sup>. K aktivaci tohoto receptoru dochází, když je B lymfocyt aktivován pomocí antigenu s navázanou protilátkou IgG. Antigen spouští signální dráhu z BCR. Protilátka navázaná na antigen se ale svou Fc částí váže na Fc $\gamma$ RIIB. Tento receptor se tak dostává do blízkosti BCR a iniciuje signální dráhu závislou na SHIP1. SH2 doména fosfatázy SHIP1 interaguje s ITIM motivem tohoto receptoru a omezuje proliferaci, vápníkovou odpověď, aktivaci kinázy AKT, MAP kinázy ERK a transkripčního faktoru NFAT. Tímto způsobem dochází k omezení aktivace B lymfocytu<sup>99,103–106</sup>. Směrem k C konci od ITIMu receptoru Fc $\gamma$ RIIB, který váže SH2 doménu SHIP1, se nachází druhý

tyrosinový motiv. Na tento motiv se může vázat adaptorový protein GRB2, který následně interaguje s polyprolinovými motivy SHIP1 pomocí své SH3 domény a stabilizuje asociaci SHIP1 s receptorem FcγRIIB<sup>107</sup>. Funkce SHIP1 v negativní regulaci signalizace BCR je částečně nezávislá na FcγRIIB a negativní regulace aktivace BCR se uplatňuje i při stimulaci B lymfocytů pomocí F(ab')<sub>2</sub> fragmentu aktivujícího pouze BCR<sup>106,108</sup>. I aktivace samotného BCR vyvolá přesun SHIP1 z cytosolu na membránu<sup>109</sup>. Adaptory DOK-3 a GRB2 vytváří modul inhibující signalizaci BCR, který rekrutuje SHIP1 k BCR. DOK-3 může interagovat s SHIP1 fosfatázou dvěma způsoby. Prvním je vazba PTB domény adaptoru DOK-3 na fosforylovaný tyrosin na pozici 1020 v sekvenci SHIP1. Druhým možným způsobem je vazba SH2 domény SHIP1 na fosfotyrosinový motiv C-koncové části adaptoru DOK-3, který může být fosforylován kinázami rodiny SRC<sup>89,97</sup>. Fosforylace SHIP1 je v tomto případě závislá na kináze LYN. Na stabilizaci interakce SHIP1 a BCR se podílí také vazba SH3 domény proteinu GRB2 na polyprolinový motiv na C konci SHIP1<sup>97</sup>. Jiná studie navrhl, že se na interakci SHIP1 s BCR podílí fosforylace proteinu SHC závislá na kináze SYK<sup>109</sup>. SHIP1 může také asociovat přímo s CD79 komplexem pomocí své SH2 domény<sup>90,97</sup>. Mutantní verze SHIP1, která nedokáže interagovat s DOK-3, GRB2 i CD79 komplexem exprimovaná v DT40 buňkách *in vitro* nedokáže inhibovat vápníkovou signalizaci při aktivaci BCR a časový vývoj koncentrace vápníku má v těchto buňkách stejnou podobu jako v buňkách bez SHIP1<sup>97</sup>. Negativní regulace signalizace BCR pomocí SHIP1 je také důležitá pro ustanovení anergie autoreaktivních B lymfocytů. Bylo navrženo, že v anergizovaných B lymfocytech je fosforylován jen jeden ITAM v rámci CD79 komplexu. Fosforylace pouze jednoho ITAMu by pak neaktivovala kinázu SYK, ale preferenčně by aktivovala SHIP1 fosfatázu<sup>110</sup>.

SHIP1 díky své katalytické aktivitě reguluje signální dráhy jejichž součástí je generování fosfoinositidů s různým stupněm fosforylace. Tyto fosfoinositidy mohou sloužit jako signální molekuly, které rekrutují k membráně proteiny se specifickými interakčními doménami. SHIP1 díky své katalytické aktivitě omezuje v buňce obsah PIP<sub>3</sub>, který je tvořen PI3K, a katalyzuje jeho štěpení na fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát<sup>108</sup>. Jedním z důležitých enzymů regulovaných fosfoinositidy a SHIP1 fosfatázou je kináza AKT. Přesný mechanismus regulace kinázy AKT pomocí SHIP1 fosfatázy není plně pochopen. AKT se totiž může vázat na PIP<sub>3</sub> i fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát<sup>111-113</sup>. Tímto způsobem se AKT dostává k membráně, kde dochází k její fosforylaci a aktivaci<sup>114-116</sup>. Tvorba PIP<sub>3</sub> a následná aktivace AKT je jednou ze signálních drah iniciovanou aktivací BCR a bylo pozorováno, že aktivace SHIP1 zprostředkovaná receptorem FcγRIIB omezuje aktivaci AKT<sup>105,106,117</sup>. Tento inhibiční



efekt SHIP1 fosfatázy na aktivitu AKT byl pozorován i v mastocytech SHIP1-deficientních myší<sup>118</sup>. Ztráta negativní regulace AKT v SHIP1-deficientních B lymfocytech a mastocytech byla spojena s vyšší rezistencí vůči apoptóze<sup>106,118</sup>. Jiné studie navrhly hypotézu, ve které fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát preferenčně podporuje fosforylaci AKT na serinu na pozici 473, a SHIP1 by tím pádem nemusela mít čistě inhibiční vliv na aktivitu AKT<sup>119,120</sup>. PIP3 však zprostředkovává přemístění i dalších proteinů na membránu. Jedná se například o kinázu BTK. U SHIP1-deficientní buněčné linie DT40 vidíme, že větší množství kinázy BTK asociuje s membránou a toto množství je ještě zvýšeno aktivací BCR<sup>121-123</sup>. Tvorba PIP3 je také součástí signalizace CD32a/FcγRIIA, který obsahuje motiv ITAM. Při aktivaci FcγRIIA pomocí anti-FcγRIIA protilátky dochází k fosforylaci SHIP1 pomocí kináz z rodiny SRC a k její asociaci s tímto receptorem a adaptorovým proteinem SHC. V tomto případě se na asociaci SHIP1 s receptorem FcγRIIA podílí fosforylace SHIP1 na tyrosinu 1020, který je součástí jednoho z NPXY motivů fosfatázy SHIP1<sup>124,125</sup>. Možnou příčinou této závislosti je, že pro stabilní vazbu SHIP1 na receptor FcγRIIA je vyžadován adaptor SHC, který může interagovat s NPXY motivem SHIP1 pomocí své PTB domény<sup>88,95</sup>. Regulační role SHIP1 se uplatňuje i při rozeznání bakteriálního peptidoglykanu neutrofilními granulocyty. Stimulace SHIP1-deficientních neutrofilů pomocí peptidoglykanu *ex vivo* vyvolá větší fosforylaci kinázy AKT, MAP kináz ERK1/2 a p38 a transkripčního faktoru RELA a větší tvorbu cytokinů IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10 a chemokinu CXCL2<sup>126</sup>.

Signalizace pomocí PIP3 a aktivita SHIP1 se podílí na chemotaxi, migraci a adhezi buněk. Při chemotaktickém pohybu se na předním konci („Leading edge“) buňky akumuluje PIP3<sup>127-131</sup> a SHIP1<sup>131</sup>. SHIP1 kontroluje, aby k této akumulaci docházelo jen na předním konci membrány. Bez přítomnosti SHIP1 dojde k akumulaci PIP3 na více okřscích plasmatické membrány. Vzhledem k tomu, že se PIP3 podílí na určení a udržení buněčné polarity a na aktivaci monomerních GTPáz z rodiny RHO, kontrola jeho tvorby a akumulace je potřebná pro regulaci buněčné migrace ve směru chemotaktického gradientu<sup>132</sup>. Neutrofilů SHIP1-deficientních myší vykazují dramatické snížení rychlosti migrace v chemotaktickém gradientu tvořeném chemotaktickým peptidem fMLP *ex vivo*, ovšem stále udržují správný směr migrace. Tento fenotyp je podobný fenotypu PI(3)Kγ-deficientních myších neutrofilů. Jejich rychlost migrace je ovšem trochu vyšší než rychlost migrace SHIP1-deficientních neutrofilů<sup>129</sup>. Z myších WT neutrofilů se v chemotaktickém gradientu stanou podlouhlé buňky se zřetelným předním koncem orientovaným proti gradientu a s uropodem na zadní straně buňky. Na předním konci také dojde k viditelné akumulaci

F-aktinu. Vizualizace SHIP1-deficientních neutrofilů *ex vivo* ukázala, že tyto buňky vytváří krátké periferní lamelipodie a mají odlišnou morfologii než WT neutrofilů. V chemotaktickém gradientu se tyto buňky velice neefektivně polarizují a F-aktin se neakumuluje do jednoho místa na předním konci buňky. Inhibitor syntézy PIP3 wortmannin dokázal zvýšit rychlost migrace SHIP1-deficientních neutrofilů a napravit jejich aberantní morfologii<sup>129,133</sup>. U WT neutrofilů naopak wortmannin snížil rychlost migrace. Role SHIP1 v regulaci migrace byla prokázána také u myších makrofágů<sup>129</sup>. Jedna ze studií, která zkoumala polarizaci a chemotaxi SHIP1-deficientních neutrofilů, argumentuje, že defekt v migraci, morfologii a polarizaci neutrofilů při absenci SHIP1 je výsledkem negativní regulace buněčné adheze pomocí této fosfatázy. Defekty v migraci a morfologii SHIP1-deficientních neutrofilů jsou totiž pozorovány pouze, když neutrofilů mají možnost adheze na povrch a zabraňuje-li jejich adhezi, rychlost migrace v chemotaktickém se zvýší. Podle této studie ztráta SHIP1 nemá vliv na polarizaci neutrofilů a jejich intenzitu fosforylace AKT, dokud jsou v suspenzi. Při adhezi na povrch dochází ale k rekrutování SHIP1 k membráně, kde defosforyluje PIP3 na fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát. Tato asociace s membránou je také doprovázena interakcí SHIP1 s  $\beta_3$  podjednotkou integrinů a kinázami LYN a FAK<sup>133</sup>. Jiná studie zjistila, že asociace SHIP1 s  $\beta_2$  podjednotkou integrinů je závislá na dalších signálech, které působí na neutrofilů. V této studii stimulace neutrofilů pomocí aktivační protilátky proti CD18/ $\beta_2$  vyvolala interakci SHIP1 s  $\beta_2$  podjednotkou jen při současné stimulaci pomocí TNF $\alpha$  nebo anti-FAS protilátky<sup>134</sup>. Deficience SHIP1 způsobí, že dojde ke zvýšené tvorbě PIP3 na membráně, která tvoří rozhraní buňky a povrchu, na který tato buňka adhezuje. Při působení chemotaktického gradientu na adhezivní neutrofil tedy SHIP1 defosforyluje PIP3 tvořený pomocí signalizace integrinů a umožní tak ustanovit PIP3 gradient, který se vytváří signalizací daného chemotaktického signálu. Naopak při absenci SHIP1 by v buňce existovaly dva gradienty PIP3. Jeden by byl vytvářen chemotaktickým signálem na předním konci buňky a druhý by byl vytvářen signalizací integrinů na rozhraní buňky a povrchu, na který adhezuje<sup>133</sup>. Vzhledem k tomu, že adheze je nedílnou součástí pohybu buněk v tkáních, narušení aktivity SHIP1 by se mělo projevit i na úrovni celého organismu. V porovnání s těmito výsledky jiná studie zkoumala vliv SHIP1 na migraci neutrofilů v modelovém organismu *Danio rerio*. V této studii byla úspěšně detekována akumulace PIP3 a SHIP1 na předním konci neutrofilů. Ovšem deficience SHIP1 *in vivo* zde zrychlila náhodný pohyb neutrofilů v nepřítomnosti chemotaktického gradientu a zrychlila pohyb neutrofilů do místa poranění. Naopak ektopická exprese proteinu asociovaného s membránou obsahující katalytickou

doménu SHIP1 zpomalila náhodný pohyb neutrofilů. Efekt deficiencie SHIP1 na neutrofilů v organismu *Danio rerio* je tedy opačný, než je efekt této deficiencie na myší neutrofilů <sup>131</sup>.

Bylo navrženo, že SHIP1 se podílí i na regulaci tvorby reaktivních kyslíkatých sloučenin pomocí NADPH oxidázy. Součástí komplexu NADPH oxidázy jsou podjednotky p40PHOX a p47PHOX, které se pomocí svých PX domén váží na membránu na fosfoinositidy s různým stupněm fosforylace <sup>135</sup>. Když jsou SHIP1-deficientní neutrofilů stimulovány pomocí TNF $\alpha$  nebo CXCL2 a poté aktivovány ligandy integrinů, produkují více reaktivních kyslíkatých sloučenin než WT neutrofilů. Signalizace integrinů totiž vede k tvorbě PIP3, jehož hladina v buňce je za normálních okolností regulována SHIP1 fosfatázou. Autoři této studie navrhli hypotézu, že PIP3, který se akumuluje v nepřítomnosti SHIP1 podporuje aktivitu NADPH oxidázy. Podporoval ji i experiment, kde inhibice adheze inhibice adheze SHIP1-deficientních neutrofilů normalizovala produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin na úroveň WT neutrofilů <sup>133</sup>. PIP3 není považován za významný ligand PX domén proteinů p40PHOX a p47PHOX a za významný aktivátor NADPH oxidázy, a tak může být mechanismus ve skutečnosti složitější a využívat efektů PIP3 zprostředkovaných dalšími proteiny <sup>135</sup>.

SHIP1 má vliv na regulaci buněčné smrti imunitních buněk. Když jsou SHIP1-deficientní neutrofilů inkubovány s agens indukujícími osmotický stres nebo s inhibitory proteolýzy *ex vivo*, méně z těchto neutrofilů podstoupí apoptózu v porovnání s WT neutrofilů. Podobné výsledky byly ve stejném experimentu potvrzeny i u SHIP1-deficientní linie mastocytů. Mimo to buňky této IL-3 dependentní linie také méně umíraly *in vitro* při odstranění IL-3 z média. Tato negativní regulace buněčné smrti může být částečně důsledkem vlivu SHIP1 na signalizaci některých cytokinových receptorů a na signalizaci kinázy AKT, jejíž aktivace je v nepřítomnosti SHIP1 silnější a déle trávající <sup>118</sup>. Zvýšená rezistence SHIP1-deficientních neutrofilů proti apoptóze byla pozorována i v experimentech s kombinací proti-apoptotických a pro-apoptotických signálů. Při inkubaci neutrofilů s TNF $\alpha$ , s protilátkou aktivující  $\beta_2$  integriny nebo s protilátkou aktivující FAS *in vitro* dochází k tvorbě PIP3 a aktivaci kinázy AKT. Kombinace působení protilátky aktivující  $\beta_2$  integriny a protilátky aktivující FAS nebo TNF $\alpha$  ovšem způsobí snížení produkce PIP3, sníženou aktivaci AKT, zvýšenou tvorbu reaktivních kyslíkatých sloučenin a podpoří apoptózu místo přežívání. Tyto kombinace totiž indukují asociaci SHIP1 s integrinem  $\alpha_M\beta_2$  a tím i s plasmatickou membránou, kde může snižovat hladinu PIP3 a podporovat apoptózu. Asociace SHIP1 s integrinem  $\alpha_M\beta_2$  je v tomto případě závislá na aktivitě kinázy LYN a na

tvorbě reaktivních kyslíkatých sloučenin pomocí NADPH oxidázy. U SHIP1-deficientních neutrofilů nevidíme zvýšenou míru apoptózy způsobenou touto kombinací stimulů. Množství neutrofilů podstupujících apoptózu sníží i použití inhibitoru kináz z rodiny SRC, inhibitoru NADPH oxidázy nebo delece kinázy LYN, které znemožní plně aktivovat SHIP1<sup>134</sup>.

## 2.4.2 SHIP1-deficientní myši

SHIP1 má významný vliv na homeostázu imunitního systému a celkový fenotyp myši *in vivo*. SHIP1-deficientní myši neprospívají, mají zvýšenou sérovou koncentraci protilátek a různých cytokinů, sníženou hmotnost oproti WT myším a trpí splenomegalií, lymfadenopatií, osteoporózou a záněty postihujícími plíce a další orgány, které zkracují délku jejich života. Jednou z hlavních charakteristik SHIP1-deficientních myši je zvýšená proliferace myeloidních buněk. V kostní dřeni těchto myši dochází ke zvýšení množství progenitorů buněk myeloidní linie a hematopoetických kmenových buněk<sup>136</sup> a ke snížení množství buněk erythroidní linie, B lymfocytů a lymfoidních progenitorů<sup>106,118,137</sup>. Celkový počet buněk kostní dřene je snížen<sup>137</sup>. Ve slezině SHIP1-deficientních myši byla pozorována dramatická akumulace progenitorů myeloidních buněk, myeloidních supresorových buněk, zvýšení počtu regulačních T lymfocytů a snížení počtu B lymfocytů<sup>137-140</sup>. V krvi SHIP1-deficientních myši je zvýšené relativní množství monocytů, maturovaných neutrofilů a zvýšený absolutní počet bazofilů. Naopak relativní množství krevních lymfocytů je sníženo<sup>137,141</sup>. V různých tkáních SHIP1-deficientních myši je také zvýšený počet mastocytů<sup>142</sup>. Makrofágy v nepřítomnosti SHIP1 lépe přežívají a snadněji diferencují na osteoklasty díky zvýšené citlivosti na cytokin M-CSF a kostimulační ligand RANKL. V *ex vivo* testech SHIP1-deficientní osteoklasty dokáží efektivněji rozkládat dentinovou destičku než WT osteoklasty. V dlouhých kostech SHIP1-deficientních myši bylo nalezeno zvýšené množství osteoklastů, které dosahovaly větší velikosti. Výsledkem těchto efektů je, že SHIP1-deficientní myši trpí osteoporózou<sup>143</sup>. Plíce SHIP1-deficientních myši jsou postiženy infiltrací imunitních buněk s převahou makrofágů, eozinofilů a neutrofilů bez přítomnosti patogenních agens a dochází k jejich fibróze. Selektivní delece SHIP1 v hematopoetické linii reprodukuje vývoj této imunopatologie. V dýchacích cestách dochází k hypertrofii epitelu, hyperplázii pohárkových buněk a nadměrné produkci mukusu. Tento plicní zánět je zprostředkován odpovědí Th<sub>2</sub>. V plicích je zvýšená exprese IL-4, IL-5, IL-13, Arginázy 1 a různých chemokinů. V bronchoalveolární tekutině je zvýšený obsah leukocytů a zvýšená koncentrace IgE, IL-13, CCL2 a histaminu<sup>137,144,145</sup>.

V myších s deficiencí SHIP1 je podpořena diferenciaci Th<sub>2</sub> lymfocytů. Ve slezině, kostní dřeni a krvi SHIP1-deficientních myší se totiž nachází více bazofilů, které tvoří zvýšené množství IL-4. Příčinou této zvýšené produkce IL-4 je nejspíše ztráta negativní regulace signalizace IL-3 pomocí SHIP1<sup>141</sup>. K polarizaci na Th<sub>2</sub> odpověď přispívá i skutečnost, že diferenciaci alveolárních makrofágů je v nepřítomnosti SHIP1 nakloněna k diferenciaci M2 makrofágů. SHIP1-deficientní makrofágy odvozené z kostní dřene ovšem dokáží normálně diferencovat na M1 makrofágy *ex vivo*. Za tento efekt na diferenciaci makrofágů při absenci SHIP1 je zodpovědný defekt signalizace TGF-β, který posiluje diferenciaci SHIP1-deficientních makrofágů na M2 fenotyp. Hladina TGF-β v séru se neliší do hladiny WT myší<sup>146</sup>. Je ale vyšší v postižených plicích SHIP1-deficientních myší, kde podporuje polarizaci alveolárních makrofágů na fenotyp M2<sup>144</sup>. Na preferenční polarizaci makrofágů na M2 fenotyp se může také podílet zvýšená produkce IL-4 bazofily<sup>141</sup>. Ovšem preferenční polarizace SHIP1-deficientních makrofágů na M2 fenotyp byla pozorována jen u alveolárních a peritoneálních makrofágů. Naopak intestinální SHIP1-deficientní makrofágy nevykazují zvýšenou polarizaci na fenotyp M2. Ve střevě byl naopak pozorován defekt diferenciaci na tento fenotyp. Tento rozdíl mezi intestinálními a alveolárními makrofágy byl pozorován při zkoumání vlivu SHIP1 na průběh myší infekce střevním parazitem *Trichuris muris*. V této experimentální infekci byla u myší s úplnou deficiencí SHIP1 nebo s deficiencí SHIP1 pouze v myeloidních buňkách pozorována zvýšená produkce IL-12 a IFN $\gamma$  a preferenční odpověď typu Th<sub>1</sub>, která je neefektivní proti tomuto parazitu. Infekce SHIP1-deficientních myší tímto parazitem byla doprovázena silnějším zánětem střeva a perzistencí parazita<sup>147</sup>. Jedna studie, která zdokumentovala imunopatologii plic u SHIP1-deficientních myší, navrhla, že by se na vývoji plicního zánětu mohla podílet populace buněk ILC2. V plicích SHIP1-deficientních myší se tyto buňky akumuluji a produkují cytokiny IL-13 a IL-5<sup>145</sup>. Naopak byl vyloučen výhradný vliv T lymfocytů, dendritických buněk a dokonce i buněk celé myeloidní linie. Selektivní delece SHIP1 v těchto buněčných populacích nevede k žádným klinickým projevům<sup>138,148,149</sup>. Absence SHIP1 v dendritických buňkách nebo T lymfocytech paradoxně snižuje závažnost experimentálně vyvolaného alergického zánětu dýchacích cest a indukuje přesmyk na Th<sub>1</sub> odpověď<sup>148,149</sup>. Jedna studie vytvořila myší kmen s dvojitou delecí SHIP1 a G-CSF, jehož hladina je zvýšena v bronchoalveolární tekutině SHIP1-deficientních myší. Tito dvojití mutanti mají snížený počet imunitních buněk a chemokinů v bronchoalveolární tekutině a nevykazují žádné známky plicního onemocnění a ani splenomegalii s expanzí myeloidních buněk a jejich progenitorů. Absence G-CSF ale nedokázala plně zvrátit změny, které vidíme

v kompartmentu B lymfocytů u SHIP1-deficientních myší, a myší kmen s dvojitou delecí vyvíjí autoprotilátky a glomerulonefritidu <sup>150</sup>.

U SHIP1-deficientních myší byly pozorovány změny v relativním množství různých subpopulací B lymfocytů ve slezině. Dochází ke snížení počtu nezralých B lymfocytů a téměř k vymizení populace B lymfocytů marginální zóny <sup>137,138,140,151</sup>. Efekt absence SHIP1 na počet B lymfocytů marginální zóny ve slezině je výsledkem defektu makrofágů marginální zóny, které při nepřítomnosti SHIP1 nedokáží udržet tyto B lymfocyty ve slezině <sup>151</sup>. V rozporu s tímto tvrzením jiná studie zdokumentovala, že při delecí SHIP1 v myeloidních buňkách nedochází k vymizení B lymfocytů marginální zóny. Bylo ale vidět snižování počtu těchto B lymfocytů s věkem myší <sup>138</sup>. Celotělová deficience SHIP1 i selektivní deficience SHIP1 v B lymfocytech zvyšuje množství standardních folikulárních B lymfocytů s maturovaným fenotypem, aktivovaných B lymfocytů a plazmatických buněk <sup>108,140</sup>. Myši se selektivní deficiencí SHIP1 v B lymfocytech také trpí splenomegalií, glomerulonefritidou a tvorbou autoprotilátek, ale jsou chráněny před akumulací myeloidních buněk ve slezině <sup>110,140</sup>. K vývoji plicní imunopatologie u těchto myší dochází, ale až v pozdějším věku <sup>140</sup>. Bylo ukázáno, že změny pozorované v populaci B lymfocytů jsou důsledkem zrychleného vývoje B lymfocytů, který nastává při narušení negativní regulace signalizace BCR pomocí SHIP1. SHIP1 tak reguluje vývoj B lymfocytů a zpomaluje jejich maturaci a vstup do sleziny <sup>108</sup>.

Role myeloidních buněk byla studována s využitím myší se selektivní deficiencí SHIP1 v myeloidních buňkách. Tato zvířata stále vyvíjejí splenomegaliu, která ale není doprovázená statisticky signifikantním zvýšením počtu myeloidních buněk ve slezině. Tyto myši také nevyvíjí imunopatologii plic a střev, které jsou typické pro myši s celotělovou deficiencí SHIP1 <sup>138,151,152</sup>. Při specifické delecí SHIP1 v myeloidních buňkách lze pozorovat i zvýšený počet myeloidních supresorových buněk. Příčinou tohoto efektu není ztráta aktivity SHIP1 v myeloidních supresorových buňkách, protože tato buněčná populace neexprimuje SHIP1. Byla navržena hypotéza, že zvýšené množství těchto buněk je důsledkem zvýšené koncentrace cytokinu G-CSF. Neutralizace tohoto cytokinu pomocí intraperitoneální injekce specifické protilátky po indukci deficience SHIP1 zamezí expanzi těchto buněk <sup>152</sup>.

V ileu SHIP1-deficientních myší dochází k vývoji zánětlivého onemocnění podobnému Crohnově chorobě, které se vyznačuje zvýšeným počtem neutrofilů a sníženým počtem CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v tenkém střevě. Tato patologie se projevuje i u WT myší při adoptivním přenosu splenocytů SHIP1-deficientních myší. Naopak adoptivní přenos směsi SHIP1-deficientních T lymfocytů a NK buněk do WT myší nedokáže reprodukovat střevní

imunopatologii<sup>153</sup>. Následné studie také odhalily, že ani selektivní delece SHIP1 v buňkách myeloidní linie nedokáže reprodukovat tuto střevní imunopatologii. Ovšem dvojitá delece SHIP1 v T lymfocytech a myeloidních buňkách již zvýší incidenci střevní i plicní imunopatologie<sup>138,154</sup>. Následná studie potvrdila, že stejně jako v plicích je v tenkém střevě SHIP1-deficientních myší zvýšené množství regulačních T lymfocytů<sup>154</sup>.

Na celkový fenotyp SHIP1-deficientních myší má velice důležitý vliv genetické pozadí zkoumaných myší. Studie porovnávající plicní patologii SHIP1-deficientních myší s genetickým pozadím C57BL/6 nebo BALB/c ukázala, že BALB/c myši jsou chráněny před vývojem plicní imunopatologie. Myši s genetickým pozadím BALB/c ve věku 8 až 12 týdnů vykazovaly také normální růst a sérovou hladinu cytokinů, méně závažnou splenomegalii bez expanze myeloidních buněk a žádné známky lymfoadenopatie. K vývoji zánětu plic u SHIP1-deficientních myší s genetickým pozadím BALB/c dochází až ve věku 30 týdnů, kdy už je většina myší s genetickým pozadím C57BL/6 po smrti. U obou myších kmenů byla detekována přítomnost autoprotilátek v séru, které byly v pozdějším věku příčinou glomerulonefritidy. Ve věku 40 týdnů začínají SHIP1-deficientní myši na genetickém pozadí BALB/c vykazovat některé znaky SHIP1-deficientních myší na pozadí C57BL/6, jako jsou změny v buněčném složení kostní dřeně a změny kompartmentu slezinných B lymfocytů<sup>140</sup>.

### 2.4.3 Regulace cytokinových receptorů

SHIP1 se také podílí na regulaci některých cytokinových receptorů. Při stimulaci SHIP1-deficientní linie mastocytů pomocí IL-3 *in vitro* dochází ke zvýšené a déle trvající fosforylaci AKT na Serinu 473 a Threoninu 308 a k větší tvorbě PIP3. Tato fosforylace byla pozorována i po 10 hodinách od výměny média za médium bez IL-3. Po aktivaci IL-3R je SHIP1 rekrutována na membránu pomocí asociace s adaptorovým proteinem SHC a je fosforylována<sup>118</sup>. V bazofílech se SHIP1 podílí na negativní regulaci produkce IL-4 při stimulaci pomocí IL-3 nebo IgE<sup>141</sup>. Součástí fenotypu SHIP1-deficientních myší je zvýšený počet myeloidních progenitorů v kostní dřeni. Když jsou buňky kostní dřeně SHIP1-deficientních myší kultivovány *ex vivo* v methylocelulózovém médiu, vytváří více kolonií při nízkých koncentracích cytokinů IL-3, GM-CSF, M-CSF nebo SCF.<sup>137,140</sup> Působení SHIP1 při signalizaci M-CSF bylo potvrzeno v buněčných liniích odvozených z fibroblastů nebo monocytů *in vitro* a také v makrofázích odvozených z kostní dřeně *ex vivo*. Při signalizaci M-CSF dochází k fosforylaci SHIP1 a k její asociaci s membránou, kde negativně reguluje aktivaci AKT. Při této fosforylaci kináza LYN fosforyluje SHIP1

a podporuje její asociaci s membránou. Deficience SHIP1 nebo kinázy LYN vyvolá silnější aktivaci AKT při signalizaci M-CSF<sup>155</sup>. Regulace signalizace cytokinu M-CSF pomocí SHIP1 byla pozorována také u studie popisující vliv absence SHIP1 na homeostázu kostní tkáně, diferenciaci a přežívání osteoklastů<sup>143</sup>. Alveolární makrofágy jsou jednou z populací, která se podílí na plicní imunopatologii SHIP1-deficientních myší a jejich reakce na cytokin G-CSF, jehož hladina v brochoalveolární tekutině SHIP1-deficientních myší je zvýšena, byla zkoumána. Když jsou alveolární makrofágy stimulovány pomocí G-CSF *ex vivo*, jejich signalizace vykazuje zvýšenou fosforylací MAP kinázy ERK a transkripčního faktoru STAT3<sup>150</sup>.

## 2.5 Kinázy rodiny SRC

Proteinová rodina SRC obsahuje 9 nerekceptorových tyrosinových kináz – SRC, FYN, HCK, FGR, LYN, LCK, YES, YRK a BLK. Ve své struktuře tyto kinázy obsahují 4 domény. N-koncová SH4 doména obsahuje motivy, kde může docházet k posttranslačnímu napojení zbytku kyseliny myristové nebo kyseliny palmitové. Hydrofobní řetězec těchto kyselin umožní kináze asociovat s membránou. Následují interakční domény SH3 a SH2, které zprostředkovávají vazbu na další proteiny. SH3 doména interaguje s polyprolinovými motivy a SH2 domény interaguje s fosfotyrosinovými motivy. Tyto dvě domény se také podílí na regulaci aktivit kináz z rodiny SRC. Na C konci se pak nachází SH1 doména, která katalyzuje fosforylací proteinů. V rámci této domény se nachází autofosforylační/aktivační tyrosin, jehož fosforylace je důležitá pro plnou aktivaci kinázy. Rodina SRC je zapojena do regulace širokého spektra buněčných dějů, jako jsou například proliferace, diferenciaci, aktivace buněk imunitního systému, nádorová transformace<sup>49</sup>.

Aktivita kináz z rodiny SRC je regulována pomocí jejich fosforylačního stavu. Ve své sekvenci mají tyto kinázy 2 důležité tyrosiny, jejichž fosforylace ovlivňuje jejich strukturu a aktivitu. Jedním z těchto tyrosinů je tyrosin v aktivační smyčce SH1 domény. Fosforylace tohoto tyrosinu podporuje katalytickou aktivitu kinázy. Za SH1 doménou na samotném C konci proteinu se nachází inhibiční tyrosin, jehož fosforylace inhibuje kinázu. V neaktivní konformaci je aktivační tyrosin defosforylován, inhibiční tyrosin je fosforylován a vytváří intramolekulární interakci s SH2 doménou. Tato intramolekulární vazba dostává kinázu do inhibovaného/uzavřeného stavu, který je dále stabilizován intramolekulární interakcí SH3 domény se sekvencí oddělující SH2 a SH1 domény. V opačném případě, kdy je inhibiční tyrosin defosforylován a aktivační tyrosin je fosforylován, se kináza nachází



v aktivovaném/otevřeném stavu a intramolekulární interakce nezabraňuje její aktivitě. K fosforylaci aktivačního tyrosinu dochází pomocí autofosforylace<sup>49</sup>. O fosforylaci inhibičního tyrosinu se stará hlavně nереceptorová tyrosin kináza CSK, která omezuje aktivitu kináz z rodiny SRC<sup>50,51</sup>. Oba tyrosiny mohou být pak substrátem pro různé fosfatázy, které se podílejí na regulaci katalytické aktivity kináz z rodiny SRC. Nejvýznamnější fosfatázou inhibičního tyrosinu je CD45<sup>156</sup>.

### **2.5.1 Funkce kináz rodiny SRC v imunitním systému**

Jedna z rolí kináz rodiny SRC v rámci imunitního systému je jejich účast na signalizaci receptorů obsahující cytosolický motiv ITAM. Jedná se například o antigenní receptory, Fc receptory, NK buněčné receptory a některé PRR. Při signalizaci těchto receptorů kinázy z rodiny SRC fosforylují motivy ITAM v cytosolické části receptorů nebo v jejich přidružených podjednotkách. Tato fosforylace umožňuje asociaci kináz z rodiny SYK s těmito receptory, propagaci signálu a aktivaci efektorových funkcí daných leukocyty<sup>157,158</sup>. Byť jsou receptory s motivem ITAM vnímány jako vyloženě aktivační receptory, tak jejich signalizace může mít i regulační a inhibiční účinek<sup>159-161</sup>.

Podobným mechanismem, jako je iniciace signalizace receptorů obsahující ITAM, aktivují kinázy z rodiny SRC i inhibiční receptory imunitního systému obsahující tyrosinový motiv ITIM. Fosforylace motivů ITIM pomocí kináz z rodiny SRC umožňuje receptoru interagovat s fosfatázami SHP-1/2 a SHIP1. Společná agregace aktivačních receptorů s motivem ITAM a inhibičních receptorů s motivem ITIM vede k inhibici aktivační signalizace pomocí defosforylace signálních proteinů fosfatázami SHP-1/2 nebo pomocí defosforylace signální molekuly PIP3 na fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát fosfatázou SHIP1<sup>162,163</sup>. Aktivace těchto inhibičních receptorů omezuje efektorové odpovědi buněk imunitního systému a zabraňuje nadměrnému zánětu a poškození organismu<sup>163</sup>. kinázy rodiny SRC se tedy podílí na ustanovení rovnováhy mezi aktivačními a inhibičními signály a na udržení homeostáze imunitního systému.

### **2.5.2 Funkce kináz rodiny SRC v neutrofilech**

Při vazbě integrinů na svůj ligand asociují kinázy rodiny SRC s integriny a zprostředkovávají tzv. „outside-in“ signalizaci, která vede k agregaci integrinů do místa interakce s adhezaním povrchem, zvýšení afinity integrinů a k iniciaci efektorových odpovědí neutrofilů jako je produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin a degranulace. V této

signální kaskádě kinázy SRC aktivují kinázy SYK a PYK2. Fosforylují i výměnný faktor VAV, který aktivuje malé G proteiny z rodiny RHO. Inhibitory kináz z rodiny SRC zabrání zvýšení afinity integrinů, jejich agregaci do místa adheze, produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin, degranulaci, fosforylaci kinázy PYK2 a sníží sílu adheze. Stejně účinky má i společná delece kináz HCK, FGR a LYN a některé studie pozorovaly tyto účinky i při deleci pouze dvojice HCK a FGR. Deficience pouze jedné z těchto kináz většinou neovlivní signifikantně aktivitu integrinů<sup>164-172</sup>. Bylo ovšem zdokumentováno, že delece pouze kinázy HCK naruší signalizaci integrinu CR3 v myších neutrofilech a jejich degranulaci závislou na komplementu<sup>170</sup>. Součástí signalizace integrinů je fosforylace adaptorových proteinů DAP12 a FcR $\gamma$  pomocí kináz z rodiny SRC. Tyto adaptory obsahují motivy ITAM, na které se po fosforylaci váže kináza SYK. Tato kináza pak dále propaguje signál, který vede k aktivaci efektorových funkcí neutrofilů<sup>173</sup>. Fosforylace kinázy SYK prostřednictvím integrinů je také narušena v *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> neutrofilech<sup>171,173</sup>. Některé studie pozorovaly, že narušení aktivity kináz z rodiny SRC také poškodí schopnost neutrofilů transmigrovat skrz cévy do zanícených tkání *in vivo*<sup>166,172</sup>. V souladu s tímto tvrzením jedna studie pozorovala u *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> myši zvýšenou rezistenci proti endotoxickému šoku doprovázenou sníženou akumulací neutrofilů v játrech<sup>174</sup>. Pro rekrutování neutrofilů do tkání kinázy z rodiny SRC také fosforylují adhezivní molekulu ICAM-1 a zprostředkovávají její shlukování na membráně a asociaci s aktinovým cytoskeletem při stimulaci pomocí TNF $\alpha$  *ex vivo*<sup>175</sup>. V jedné z těchto studií bylo argumentováno, že *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> neutrofilů nedokáží narušit strukturu bazální membrány cév, která je hlavní překážkou pro jejich extravazaci<sup>172</sup>. Jiná studie, kde autoři indukovali autoprotiilátkami zprostředkovanou artritidu v *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> myších ukázala, že neutrofilů těchto myši dokáží transmigrovat přes endotel do zanícené tkáně, ale nedokáží vytvořit zánětlivé prostředí, které by amplifikovalo chemotaxi neutrofilů do dané tkáně<sup>176</sup>. V souladu s tímto vysvětlením další studie detekovala sníženou tvorbu chemokinů a snížený počet neutrofilů v plicích *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> myši při inhalaci LPS. Ovšem nepozorovala sníženou migraci *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilů do plic zprostředkovanou chemokinem CXCL2 *in vivo*. Za sníženou prvotní produkci chemokinů v místě zánětu u *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> myši může být zodpovědný defekt makrofágů, které *in vitro* odpovídají na LPS sníženou tvorbou chemokinů<sup>177</sup>. Tři studie pozorovaly, že *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> neutrofilů dokáží transmigrovat přes cévní stěnu do zanícené tkáně *in vivo*, když jsou v krevním oběhu společně s WT neutrofilů<sup>171,172,176</sup>. Další studie také ukázaly, že kinázy z rodiny SRC neovlivní chemotaktickou migraci neutrofilů<sup>171,176</sup> a „inside-out“ signalizaci aktivující integriny<sup>166,178</sup>.

Kinázy z rodiny SRC tedy nemají rozhodující vliv na migraci neutrofilů do zanícené tkáně. Jsou ale kritické pro vytvoření zánětu, který by rekrutoval neutrofilů do tkáně.

Stimulace neutrofilů pomocí fMLP aktivuje neutrofilů a iniciuje produkci reaktivních kyslíkatých sloučenin ve dvou vlnách. První vlna je rychlá a nezávislá na integrinové adhezi, zatímco druhá vlna trvá déle, je závislá na integrinové adhezi a tím pádem i na kinázách z rodiny SRC<sup>168</sup>. Kinázy rodiny SRC se ale podílí i na první vlně, protože deficiencie HCK a FGR snižuje první vlnu produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin indukovaných peptidem fMLP, i když je druhá fáze tvorby reaktivních kyslíkatých sloučenin inhibována pomocí cytochalasinu B<sup>179</sup>. fMLP také spustí degranulaci neutrofilů. Tento proces je také závislý na fosforylaci MAP kinázy p38, kterou podporují kinázy z rodiny SRC, a může být narušen inhibicí těchto kináz nebo delecí trojice kináz HCK, FGR a LYN<sup>180</sup>.

Fcγ receptory rozeznávající imunokomplexy tvořené protilátkou IgG a antigenem využívají pro signalizaci motiv ITAM. Díky těmto receptorům mohou neutrofilů rozeznávat opsonizované cíle a uplatňovat proti nim své efektorové funkce. Delece signální podjednotky Fcγ obsahující motiv ITAM znemožní aktivaci myších neutrofilů zprostředkovanou FcγR receptory<sup>181</sup>. Kinázy z rodiny SRC iniciují signalizaci FcγR receptorů vedoucí k aktivaci dalších signálních proteinů jako jsou SYK, PI3K a MAP kinázy ERK1/2. Makrofágy s delecí kináz HCK, FGR a LYN vykazují sníženou efektivitu fagocytózy erytrocytů a amastigotů *Leishmania amazonensis* opsonizovaných pomocí IgG<sup>182,183</sup>. narušení fagocytózy je doprovázeno sníženou tvorbou reaktivních kyslíkatých sloučenin<sup>182</sup>. Kinázy rodiny SRC se podílí i na fagocytóze patogenů zprostředkované jinými receptory<sup>184,185</sup>.

Důležitost trojice kináz HCK, FGR a LYN pro ustanovení zánětu byla zkoumána i *in vivo* v myších s deficiencí těchto kináz. Tyto myši jsou chráněny před vývojem artritidy a kožního zánětu indukovaných autoprotiilátkami. Pouze delece všech tří kináz poskytne plnou ochranu před indukcí zánětu. To nám naznačuje, že funkčně se tyto kinázy překrývají. V modelu artritidy i kožního zánětu u těchto myší nedochází k infiltraci myeloidních buněk do synoviálních tkání nebo do kůže a ke zvýšení hladiny IL-1β, reaktivních kyslíkatých sloučenin a chemotaktických mediátorů CXCL1, CXCL2, CCL2 a leukotrienu B<sub>4</sub>. V *in vitro* testech ovšem *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> neutrofilů a monocytů nevykazují žádný defekt v chemotaktické migraci a pokud jsou indukcí autoprotiilátkami zprostředkované artritidy podrobeny myší chiméry, které mají v kostní dřeni směs WT a *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> buněk, tak u těchto myší dochází k infiltraci neutrofilů do synoviální tkáně bez ohledu na jejich genotyp. Vysvětlením ochrany *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup>, *Lyn*<sup>-/-</sup> myší před autoprotiilátkami indukovaným zánětem je

ztráta signalizace přes Fc receptory, které v těchto modelech stojí na počátku prozánětlivé kaskády <sup>176</sup>.

### 2.5.3 Regulační role kináz SRC

Jak bylo zmíněno výše, kinázy z rodiny SRC mají i regulační a inhibiční role. Například negativně regulují signalizaci chemokinů prostřednictvím fosforylace ITIM motivu receptoru PIR-B. *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilů reagují na chemokiny rychlejším chemotaktickým pohybem, zvýšenou vápníkovou odpovědí a zvýšenou fosforylací MAP kináz ERK1/2. V *in vivo* podmínkách se vliv těchto kináz na chemotaxi projevil jako zvýšená akumulace *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilů do peritoneální dutiny po intraperitoneální injekci 3% thioglykolátu. Zvýšená chemotaxe *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilů byla spojena se ztrátou fosforylace cytosolického ITIM motivu PIR-B, která umožňuje jeho asociaci s fosfatázami SHP-1 a SHP-2. U *Pirb*<sup>-/-</sup> neutrofilů byly pozorovány podobné dysregulace jako u *Hck*<sup>-/-</sup>, *Fgr*<sup>-/-</sup> neutrofilů <sup>186</sup>. Snížená fosforylace PIR-B a snížená vazba SHP-1 na PIR-B byla pozorována i u *Lyn*<sup>-/-</sup> neutrofilů při aktivaci  $\beta_2$  integrinů *ex vivo* <sup>187</sup>. U kináz FGR a LYN bylo pozorováno, že se podílí na fosforylaci dalšího inhibičního receptoru s motivem ITIM – SIRP $\alpha$ . Tento receptor po fosforylaci asociuje s fosfatázou SHP-1 a negativně reguluje fagocytózu zprostředkovanou Fc receptory a komplementovým receptorem CR3 <sup>187,188</sup>. Inhibiční role kinázy FGR byla pozorována i při signalizaci  $\beta_2$  integrinů v buněčné linii BAC1 *in vitro*, kdy FGR po aktivaci těchto integrinů asociuje s kinázou SYK pomocí své SH2 domény a inhibuje její aktivitu. Makrofágy BAC1 exprimující FGR mají jinou morfologii než makrofágy s deficiencí FGR při kultivaci na misce pokryté ligandem ICAM-1 <sup>189</sup>.

Regulační funkce kináz z rodiny SRC byly asi nejpodrobněji zkoumány v případě kinázy LYN. Tato kináza se prostřednictvím fosforylace receptoru Fc $\gamma$ RIIB podílí na regulaci aktivace B lymfocytů a mastocytů. Fc $\gamma$ RIIB je Fc receptor pro protilátky izotypu IgG obsahující ITIM sekvenci v cytosolické části. Když dojde k aktivaci BCR nebo Fc $\epsilon$ RI mastocytů pomocí ligandu s navázanou protilátkou IgG, dojde k agregaci těchto receptorů s receptorem Fc $\gamma$ RIIB <sup>190</sup>. Při této události kináza LYN fosforyluje tyrosin v rámci motivu ITIM a na tento motiv se váže fosfatáza SHIP1, která negativně reguluje aktivaci B lymfocytů a mastocytů <sup>100–102,191</sup>. Vedle tohoto receptoru se LYN podílí na signalizaci lektinového receptoru CD22, který se váže na endogenní oligosacharidy obsahující kyselinu sialovou <sup>192,193</sup>. LYN fosforyluje motivy ITIM v cytosolické části tohoto receptoru, umožňuje fosfatáze SHP-1 interagovat s těmito motivy a negativně regulovat aktivaci B lymfocytu <sup>194–196</sup>.

LYN<sup>-/-</sup> B lymfocyty jsou citlivější na aktivaci BCR a jejich stimulace pomocí anti-BCR protilátky nebo F(ab')<sub>2</sub> fragmentu *ex vivo* vyvolá větší proliferaci, vápníkovou odpověď a aktivaci MAP kináz ERK1/2 a JNK<sup>197-199</sup>. Bylo pozorováno, že kináza LYN fosforyluje TLR4 při jeho aktivaci. Tato fosforylace pak zabrání interakci MYD88 s TLR4 a sníží aktivaci MAP kinázy JNK a transkripčního faktoru NF-κB, zatímco zvýší aktivaci MAP kinázy ERK. Pozorovaná změna v této signalizaci měla za následek sníženou tvorbu IL-6 a IL-8. Tato studie ovšem byla vypracována pouze pomocí *in vitro* metod a inhibiční vliv kinázy LYN na aktivaci TLR4 nebyl ověřen na úrovni celého organismu<sup>200</sup>. Podobně jako v případě kinázy FGR bylo u kinázy LYN pozorováno, že dokáže negativně regulovat efektorové funkce neutrofilů závislé na integrinové adhezi jako jsou například produkce reaktivních kyslíkatých sloučenin a degranulace. Deficience LYN byla doprovázena sníženou fosforylací inhibičních receptorů PIR-B a SIPR1α a jejich sníženou asociací s fosfatázou SHP-1<sup>187</sup>. Aktivace signální osy SRC-SYK pomocí integrinů a receptorů signalizujících přes motiv ITAM dokáže také omezit signalizaci receptoru pro interferony prvního typu prostřednictvím indukce exprese proteinů, které se podílí na negativní regulaci této signalizace<sup>159</sup>.

Protizánětlivou roli kinázy LYN dokládá i fenotyp LYN-deficientních myší. Tyto myši mají snížené množství B lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech, zvýšené množství aktivovaných T lymfocytů a B lymfocytů ve slezině, snížené množství recirkulujících B lymfocytů v kostní dřeni a zvýšenou sérovou hladinu IgM. Během svého života vyvíjejí splenomegalii s akumulací myeloidních buněk a autoimunitní glomerulonefritidu s depozicí autoprotilátek IgG<sup>201-203</sup>. Akumulace myeloidních buněk je také příčinou zvýšené sérové hladiny cytokinu BAFF. Zvýšená produkce cytokinu BAFF poté podporuje aktivaci T lymfocytů a jejich produkci IFNγ. Jedna studie vytvořila myší chiméry, které postrádaly kinázu LYN v myeloidních buňkách. Tyto myší chiméry také trpěly akumulací myeloidních buněk ve slezině, zvýšeným počtem aktivovaných T lymfocytů a B lymfocytů ve slezině, zvýšenou sérovou hladinou cytokinu BAFF a tvorbou autoprotilátek způsobujících autoimunitní glomerulonefritidu<sup>203</sup>. Protizánětlivá role kinázy LYN byla dále podpořena studií, která vytvořila myší model s delecí LYN v dendritických buňkách. Při stimulaci pomocí LPS produkují dendritické buňky z těchto myší zvýšené množství TNFα a IL-6 a také vykazují zvýšenou aktivaci NF-κB a MAP kinázy ERK<sup>204</sup>. Jiná studie sledovala negativní vliv deficience kinázy LYN na průběh plicního zánětu indukovaného intraperitoneální injekcí LPS. V plicích LYN-deficientních myší byla po injekci detekována vyšší hladina IL-6, vyšší

aktivita myeloperoxidázy a transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a větší exprese MMP-9 a adhezivní molekuly ICAM-1. Plicní zánět byl u těchto myší také doprovázen zvýšenou produkcí IL-1 $\beta$  <sup>205</sup>.

Kinázy z rodiny SRC jsou dále zapojeny i do regulace produkce IL-1 $\beta$  pomocí NLRP3 inflammasomu. Kinázy z rodiny SRC dokáží fosforylovat E3 ubikvitin ligázu CBL a aktivovat ji. CBL po aktivaci může zprostředkovávat své efektorové funkce, mezi které patří modulace velikosti mitochondrií, regulace tvorby mitochondriálních reaktivních kyslíkatých sloučenin a inhibice NLRP3 inflammasomu prostřednictvím degradace kinázy PYK2 <sup>206</sup>. Bylo ovšem popsáno, že kinázy z této rodiny mohou i podporovat aktivaci NLRP3 inflammasomu a produkci IL-1 $\beta$ . Agregovaný protein  $\alpha$ -synuclein funguje jako molekulární vzor asociovaný s nebezpečím, který se uplatňuje v patologii Parkinsonovy choroby. Agregovaný  $\alpha$ -synuclein své prozánětlivé funkce vykonává prostřednictvím aktivace receptoru CD36 na mikroglíích. Při této signální dráze dochází k aktivaci kinázy FYN, která dále aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B a iniciuje maturaci IL-1 $\beta$  pomocí NLRP3 inflammasomu. FYN-deficientní mikroglie jsou částečně chráněny před prozánětlivým působením agregovaného  $\alpha$ -synucleinu <sup>207</sup>. Jiné studie pozorovaly, že kinázy rodiny SRC se podílí na aktivaci NLRP3 inflammasomu a produkci IL-1 $\beta$  vyvolané mykotoxinem roridin A, nebo hemozoinem, metabolickým produktem detoxifikace hemu produkovaným parazity rodu *Plasmodium* <sup>208,209</sup>.

### 3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo detailněji popsat fosforylaci PSTPIP2 a vliv této fosforylace na jeho interakci s fosfatázou SHIP1 a na signalizaci neutrofilních granulocytů.

Prvním dílčím cílem bylo určit, které kinázy exprimované v neutrofilech dokáží fosforylovat PSTPIP1. Úkolem bylo využít in vitro expresní systém založený na kotransfekci plasmidů kódujících PSTPIP2 a vybrané kinázy do buněk linie HEK293 s následnou detekcí fosforylace PSTPIP2.

Dalším dílčím cílem bylo použít kinázy, které fosforylují PSTPIP2 a identifikovat tyrosiny v sekvenci PSTPIP2, které tyto kinázy fosforylují. Pro tuto část práce bylo nutné vytvořit některé konstrukty kódující PSTPIP2 s mutacemi v C-koncových tyrosinech a fosforylaci těchto i dalších již připravených konstruktů analyzovat v kotransfekčním systému popsaném výše.

Třetím dílčím cílem byla identifikace fosfotyrosinů, které zprostředkovávají interakci mezi PSTPIP2 a SHIP1 s využitím koimunoprecipitace PSTPIP2 a SHIP1 ze stejného kotransfekčního systému založeného na koexpresi mutantních forem PSTPIP2 vybrané kinázy a SHIP1 v linii HEK293.

Posledním dílčím cílem byla základní analýza fosforylace a signalizace vybraných mutantních forem PSTPIP2 v primárních myších neutrofilech. Od plnění tohoto dílčího cíle ale bylo nakonec z důvodů technické a časové náročnosti předchozích dílčích cílů upuštěno.

## 4 Metody a materiály

### 4.1 Metody

#### 4.1.1 Buňky

V této práci byla použita buněčná linie HEK293. Buňky této linie byly kultivovány v plastové misce o průměru 8 cm, ve 20-ti ml média DMEM obsahujícího 10 % hovězího fetálního séra a směs antibiotik (Penicilin G, gentamycin a streptomycin). Buňky HEK293 připravené na transfekci byly kultivovány v médiu DMEM obsahujícím 10 % hovězího fetálního séra bez antibiotik. Kultivace buněk probíhala při 37 °C v 5% koncentraci CO<sub>2</sub> v inkubátoru „MITRE 4000 Series“. Pasážování buněk probíhalo následovně: Z plně narostlé misky bylo odstraněno médium a buňky byly promyty v 10 ml PBS. PBS bylo pipetováno opatrně na okraj misky, aby nedošlo ke ztrátě adheze buněk na dno misky. PBS bylo odsáto. Do misky byl napipetován 1 ml roztoku trypsinu, který narušil adhezi buněk na povrch misky. Byly připraveny nové, čisté misky, do kterých bylo napipetováno médium DMEM s obsahem 10 % hovězího fetálního séra a směsi antibiotik. Po 5-ti min byly buňky resuspendovány v 10 ml média DMEM s obsahem 10 % hovězího fetálního séra a směsi antibiotik. Určený objem buněčné suspenze byl přepipetován do nových předpřipravených misek. Poměr buněčné suspenze ku novému médiu byl 1:4, 1:9 nebo 1:19. Vedle této buněčné linie byly používány chemicky kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10. Tyto buňky byly kultivovány buď na pevném agarózovém LB médiu v plastové misce o průměru 8 cm, nebo v tekutém LB médiu obsahujícím antibiotikum ampicilin o koncentraci 1 mg/ml. Kultivace buněk na pevném médiu probíhala při 37 °C v biologickém termostatu „BT-50“. Kultivace buněk v tekutém médiu probíhala při 37 °C v inkubátoru „SI6R-2“ s rotačním pohybem 180 otáček za min.

#### 4.1.2 Transfekce/lipofekce pomocí lipofectaminu 2000

Jeden den před transfekcí byly buňky linie HEK293 resuspendovány v médiu DMEM obsahujícím 10 % hovězího fetálního séra bez antibiotik a přeneseny do plastových destiček s 24 nebo s 6 jamkami. 24 jamek bylo použito pro provedení western blotu a 6 jamek bylo použito pro imunoprecipitaci. Druhý den byla provedena transfekce těchto buněk pomocí transfekčního činidla „lipofectamin 2000“. Transfekční směs obsahovala 0,8 µg plasmidové



DNA a 2  $\mu\text{l}$  lipofectaminu 2000 v 100  $\mu\text{l}$  média „Optimem“. Tato směs byla připravena následovně. Nejdřív bylo do mikrozkuřavky napipetováno 0,8  $\mu\text{g}$  plasmidové DNA do 50-ti  $\mu\text{l}$  Optimemu a do jiné mikrozkuřavky bylo napipetováno 2  $\mu\text{l}$  „lipofectaminu 2000“ v 50-ti  $\mu\text{l}$  Optimemu. Po 5-ti min byly obsahy mikrozkuřavek smíchány. Vzniklý roztok byl po 20-ti min opatrně napipetován do jamek obsahujících buňky HEK293. Transfekční směs o celkovém objemu 100  $\mu\text{l}$  byla použita pro transfekci buněk v destičce s 24 jamkami. Pro transfekci buněk v destičce s 6-ti jamkami byl objem směsi zvýšen na 500  $\mu\text{l}$ . Postup přípravy a koncentrace DNA i „Lipofectaminu 2000“ byly zachovány.

### 4.1.3 Imunoprecipitace

Před začátkem imunoprecipitace byl připraven lyzační pufr obsahující 1% lauryl maltosid (N-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid) s inhibitory proteáz a fosfatáz (složení viz níže v kapitole Přehled použitých chemikálií a materiálů). Lyzační pufr byl uchován na ledu. Z jamek obsahujících transfekované buňky linie HEK293 bylo 1 den po transfekci odstraněno médium. Buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS a přeneseny do 1,5ml „low retention“ mikrozkuřavek. Buňky byly centrifugovány (1 min, 3380 RCF, pokojová teplota), supernatant byl odsát a mikrozkuřavky byly přeneseny na led. Buněčná peleta byla resuspendována v 250  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru a inkubována na ledu. Po 15-ti min byly vzorky promíchány a znova inkubovány 15 min na ledu a promíchány. Vzorky byly poté centrifugovány (10 min, 25 000 RCF, 2  $^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant byl přenesen do nových 1,5ml „low retention“ mikrozkuřavek. Ze supernatantu bylo odebráno 30  $\mu\text{l}$  do samostatných mikrozkuřavek obsahujících 30  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru obsahujícího SDS. Takto byly pořízeny vzorky buněčných lyzátů, které sloužily jako kontrola. Do zbylého objemu supernatantů byly přidány 2  $\mu\text{g}$  protilátky M2 specifické proti afinitní značce FLAG a vzorky byly inkubovány 1 hodinu na ledu. Poté bylo do supernatantů přidáno 40  $\mu\text{l}$  suspenze agarózových kuliček s navázaným geneticky modifikovaným proteinem s názvem „Protein A/G PLUS“, který se specificky váže na protilátky. Vzorky byly 90 min inkubovány v chladové místnosti o teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$  v přístroji „Test-tube-rotator 34528“ od firmy. Krátce před dokončením této inkubace byl připraven promývací roztok obsahující 0,1% lauryl maltosid s inhibitory proteáz a fosfatáz. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (5 min, 370 RCF, 2  $^{\circ}\text{C}$ ). 40  $\mu\text{l}$  ze supernatantu bylo přeneseno do samostatné mikrozkuřavky se 40-ti  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru obsahujícího SDS. Zbytek supernatantu byl opatrně odsán. Peleta byla resuspendována v 400  $\mu\text{l}$  promývacího pufru. Vzniklá suspenze byla přenesena do chromatografických

kolonek umístěných do 2ml mikrozkuvek. Byly použity „Micro Bio-Spin Chromatography Columns“. Kolonky byly centrifugovány (10 s, 371 RCF, 2 °C) a proteklý pufr byl odstraněn. Vzorek byl takto promyt celkem pětkrát. Po posledním promytí byly kolonky uzavřeny, bylo do nich přidáno 30 µl lyzačního pufru obsahující SDS a byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě. Poté byly kolonky otevřeny, umístěny do 1,5ml mikrozkuvek a mikrozkuvky s chromatografickými kolonkami byly centrifugovány (3 min, 20 200 RCF, pokojová teplota) a lyzační pufr s imunoprecipitovanou frakcí se tak dostal z kolonky do mikrozkuvky. Kolonka byla odstraněna a do všech vytvořených vzorků bylo přidáno DTT, ve výsledné koncentraci 1 %. Vzorky byly pak uchovány v mrazáku o teplotě – 30 °C. Vždy před nanesením na SDS-PAGE byly vzorky ohřáty v termobloku (1 min, 99 °C).

#### **4.1.4 Lyzování buněk a izolace proteinové frakce**

1 Den po transfekci buněk linie HEK293 bylo odsáno médium, buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS a přeneseny do tlustostěnných mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. V těchto mikrozkuvkách byly centrifugovány (5 min, 376 RCF, pokojová teplota). Supernatant byl odsát a peleta z buněk byla resuspendována v 30-ti µl PBS. K takto vytvořené buněčné suspenzi bylo přidáno 70 µl vzorkového pufru a vytvořený lyzát byl promíchán. Mikrozkuvky byly následně centrifugovány za vysokých otáček pomocí ultracentrifugy „Optima MAX-E“ v rotoru „TLA 110“ (30 min, 88 088 RCF, 24 °C). Vzniklá peleta tvořená zejména DNA byla odstraněna pipetou a supernatant obsahující proteinovou frakci byl přendán do čistých mikrozkuvek o objemu 1,5 ml. Do takto vzniklých roztoků bylo přidáno DTT, aby jeho výsledná koncentrace byla 1 %. Vzorky byly vždy před nanesením na akrylamidový gel s obsahem SDS ohřáty (1 min, 99 °C). Vzorky, které nebyly plně spotřebovány byly uschovány v mrazáku o teplotě – 30 °C.

#### **4.1.5 SDS-PAGE elektroforéza**

SDS-PAGE byla použita pro separaci proteinů izolovaných z transfekovaných buněk linie HEK293 na základě molekulární hmotnosti. Pro SDS-PAGE elektroforézu byla využita aparatura „Mini-PROTEAN® Tetra Cell“ se separačními gely obsahujícími 7,5%, 8% nebo 9% akrylamid. Gely s 8% nebo 9% obsahem akrylamidu byly použity pro detekci PSTPIP2 a vybraných protein tyrosin kináz. Gely se 7,5% obsahem akrylamidu byly použity pro detekci SHIP1 fosfatázy. Rozměry akrylamidových gelů byly přibližně 8,6 cm x 7,2 cm x 0,75 cm. Připravený roztok separačního gelu byl nanesen mezi skla vsazená

do držáku skel, který byl ukotven v nalévacím stojánku a převrstven isopropanolem. Po ztuhnutí separačního gelu byl odsát isopropanol a nad ztuhlý separační gel byl nanesen roztok zaostřovacího gelu až po okraje skla. Mezi skla do neztuhlého roztoku zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření 10-ti jamek potřebných pro nanesení vzorků. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl hřebínek odstraněn. Skla se ztuhnutým gelem byla přenesena do elektroforetické cely. Sestavená cela byla ponořena do elektrodového pufru v elektroforetické nádobě a elektrodový pufr byl nalit do elektroforetické cely až po okraje skel. Do jamek v zaostřovacím gelu byly napipetovány vzorky o objemu 10  $\mu$ l nebo 15  $\mu$ l (v případě vzorků z imunoprecipitace) a marker molekulových hmotností „Precision Plus Protein Dual Color Standards“. Elektroforetická nádoba byla přikryta víkem a elektrody byly připojeny ke zdroji elektrického napětí „Power Pac Basic“. Zdroj elektrického napětí byl nejdříve nastaven na 80 V. Když se vzorky dostaly ze zaostřovacího gelu do separačního gelu, tak bylo napětí zvýšeno na hodnotu 120 V. Po separaci proteinů v separačním gelu byly elektrody odpojeny od zdroje elektrického napětí a elektroforetická nádoba byla otevřena. Elektrodový pufr z elektroforetické cely byl vylit a z cely byla odstraněna skla. Gel se separovanými proteiny byl sejmут ze skel a byl vložen do petriho misky obsahující blotovací pufr.

#### 4.1.6 Western blot

Provedení western blotu následovalo hned po ukončení separace proteinů pomocí metody SDS-PAGE. V průběhu separace proteinů byla připravena polyvinylidendifluoridová (PVDF) membrána o rozměrech 8,5 cm  $\times$  5,5 cm. Tato membrána byla inkubována ve skleněné petriho misce s metanolem pro její aktivaci na třepačce s houpavým pohybem. Na každou membránu byly připraveny 2 proužky tlustého filtračního papíru o rozměrech 8,5 cm  $\times$  5,5 cm. Přibližně 10 min před dokončením SDS-PAGE byl metanol vylit z petriho misky s membránami a do této misky byl nalit blotovací pufr. Po ukončení SDS-PAGE byly gely se separovanými proteiny a připravené proužky filtračního papíru promyty v blotovacím pufru. Přenos proteinů z gelu na membránu proběhl v přístroji pro polo-suché blotování „SD20 Semi dry maxi“. Na anodu přístroje byly v následném pořadí nad sebou položeny proužek filtračního papíru, připravená membrána, gel z SDS-PAGE a zase proužek filtračního papíru. Skleněná pipeta byla použita pro „rozválení“ vzniklého svazku, aby došlo k eliminaci vzduchových bublin mezi jednotlivými vrstvami. Připravené svazky byly překryty druhou částí přístroje obsahující katodu. Přebytek blotovacího pufru mezi anodou a katodou byl vylit, aniž by došlo k narušení svazků. Na přístroj byla položena láhev obsahující 2 litry vody, která

sloužila jako závaží, které přitlačovalo elektrody k sobě. Blotovací přístroj byl zapojen do zdroje elektrického napětí „Electrophoresis Power Supply EPS 301“ a přístroj byl nastaven na 15 mV a 400 A. Čas přenosu byl 100 min nebo 120 min. Po ukončení přenosu byly membrány jednou krátce promyty v pufru TBS + T (TBS obsahující detergent TWEEN-20) a pak 40 min inkubovány v TBS + T obsahující 5% sušené mléko nebo 5% BSA, aby došlo k zablokování membrány. BSA bylo použito pro membrány, které byly barveny protilátkou 4G10. Vzniklé membrány byly zabaleny do průhledné plastové fólie a uchovávány v mrazáku o teplotě – 30 °C.

#### **4.1.7 Značení membrán z western blotu**

Zablokovaná membrána byla třikrát rychle promyta v roztoku TBS + T a inkubována 40 min v roztoku obsahujícím 1% mléko nebo BSA a primární protilátku. Po tomto čase byla membrána třikrát rychle promyta v roztoku TBS + T a dvakrát pomalu promyta v roztoku TBS + T po dobu 15 min. Pokud byla pro barvení použita protilátka 4G10, pomalé promývání bylo provedeno v roztoku TBS + T s 0,5M koncentrací soli. Promývací roztok byl odstraněn a membrána byla inkubována 40 min v roztoku se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (ředěno 1:10 000) v TBS + T, která sloužila jako enzym katalyzující chemiluminiscenční reakci. Po tomto čase byla membrána opět třikrát rychle promyta a dvakrát pomalu (15 min) promyta v roztoku TBS + T. Po tomto promývání byla membrána usušena pomocí filtračního papíru a bylo na ní napipetováno 800 µl roztoku obsahujícího substráty pro chemiluminiscenční reakci („Radiance Plus“ a „Radiance Peroxide“). Emitované záření bylo zachyceno pomocí zobrazovacího systému „Azure c300“.

#### **4.1.8 Kvantifikace intenzity signálu z barvení membrán**

Z fotografií pořízených pomocí systému „Azure c300“ byla kvantifikována intenzita signálu z obarvených membrán. Kvantifikace byla provedena v programu „AIDA Image Analyzer“ pomocí kterého byla proužkům na membráně přiřazena hodnota o arbitrárních jednotkách, která odpovídala intenzitě signálu. Tyto hodnoty byly pak exportovány do tabulky programu „Microsoft Excel“. Pro kvantifikaci byly vybrány expozice tak, aby průměrná intenzita barvení na jeden proužek byla mezi jednotlivými opakováními experimentu co nejvíce vzájemně podobná.

### 4.1.9 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena v programu „GraphPad Prism“. Analyzována byla data obdržena pomocí programu „AIDA Image Analyzer“. Pomocí programu „GraphPad Prism“ byly hodnoty intenzity signálů graficky vyobrazeny pomocí bodového grafu, kde na ose X jsou hodnoty z jednotlivých transfekcí. Při statistické analýze fosforylace PSTPIP2 pomocí vybraných kináz byla porovnávána fosforylace PSTPIP2 mezi vzorky „kináza“ a „kináza“ + WT PSTPIP2 pomocí párového t testu. V případě statistické analýzy fosforylace WT PSTPIP2 pomocí HCK a vazby SHIP1 na fosforylované formy proteinu PSTPIP2 byl použit statistický test jednosměrná ANOVA. Jako post hoc test k tomuto testu byl použit t test, pro něhož byla hladina statistické signifikance upravena pomocí Bonferroniho metody zohledňující mnohočetná porovnávání. Statisticky významné výsledky byly znázorněny hvězdičkou. Hladina statistické signifikance byla  $p \leq 0,05$  s výjimkou statistických analýz, kde byla upravena pomocí Bonferroniho metody zohledňující mnohočetná porovnávání.

### 4.1.10 Izolace RNA

RNA byla izolována z myších progenitorů neutrofilů, které nám poskytla naše kolegyně Nataliia Pavliuchenko. Pro izolaci RNA byla použita komerční souprava „Quick-RNA<sup>TM</sup> MiniPrep Kit“. Buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 500 RCF, pokojová teplota). Supernatant byl odsát a peleta byla resuspendována v 600- $\mu$ l lyzačního roztoku. Vzorek byl centrifugován (1 min, 20 200 RCF, pokojová teplota). Supernatant byl přenesen do chromatografické kolonky se žlutou barvou. Přes tuto kolonku byl supernatant přefiltrován v centrifuze do sběrné mikrozkuřavky (1 min, 20 200, pokojová teplota). K přefiltrovanému supernatantu bylo přidáno 600  $\mu$ l 95% etanolu. Vzorek byl promíchán a přenesen do chromatografické kolonky se zelenou barvou. Po centrifugaci (30 s, 10 000 RCF, pokojová teplota) bylo do chromatografické kolonky přidáno 400  $\mu$ l „RNA Prep“ pufru. Po další centrifugaci (30 s, 10 000 RCF, pokojová teplota) bylo do chromatografické kolonky přidáno 700  $\mu$ l „RNA Wash“ pufru, kterým byla kolonka za centrifugace promyta (30 s, 10 000 RCF, pokojová teplota). Promytí pomocí „RNA Wash“ pufru bylo zopakováno, ale se 400  $\mu$ l pufru a s jiným nastavením centrifugy (2 min, 20 200 RCF, pokojová teplota). Po centrifugaci byla chromatografická kolonka přendána do čisté mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml. Do chromatografické kolonky bylo přidáno 100  $\mu$ l vody „DNase/RNase-Free Water“ a kolonka s mikrozkuřavkou o objemu 1,5 ml byla

centrifugována (30 s, 20 200, pokojová teplota). Roztok izolované RNA byl uskladněn v mrazáku o teplotě – 80 °C.

#### 4.1.11 Syntéza cDNA

cDNA byla vytvořena pomocí enzymu „RevertAid Reverse Transcriptase“. Jako templátová RNA bylo použito 740 ng RNA izolované z myších progenitorů neutrofilů. Jako primery byly použity Oligo(dT)18 primery komplementární k polyA koncům mRNA. Po smíchání všech komponent reakce do mikrozkušavky byla reakční směs inkubována 1 hodinu při teplotě 42 °C, poté byla inkubována 10 min při teplotě 10 °C. Vzniklá cDNA byla pak použita jako templátová DNA v PCR reakci pro vytvoření molekuly DNA kódující kinázu FGR. Složení celé reakční směsi bylo následovné:

Izolovaná RNA	12 µl (740 ng)
Oligo(dT)18 Primery	1 µl (výsledná koncentrace 100 pmol)
„5X Reaction Buffer“	4 µl
Směs dNTPs	2 µl (výsledná koncentrace 1 mM)
„RevertAid Reverse Transcriptase“	1 µl (200 U)

#### 4.1.12 Mutagenní PCR

Pro tvorbu plasmidů kódující *Pstpip2* nesoucí mutace v C-koncových tyrosinech byla provedena mutagenní PCR s „Q5 high fidelity DNA polymerase“. Primery s orientací „reverse“ byly navrženy tak, aby změnilý smysl tyrosin-kódujících kodonů v C-koncové sekvenci genu *Pstpip2* na fenylalanin-kódující kodony. Primer s orientací „forward“ byl komplementární k úseku upstream od protein-kódující sekvence plasmidu. Oba primery nesly sekvenci rozeznávanou restriční endonukleázou XhoI, která byla použita pro klonování. Výsledný PCR produkt pak obsahoval sekvenci genu *Pstpip2* s danými mutacemi. Jako templátová DNA byla použita DNA plasmidu kódující WT PSTPIP2 (tvorba plasmidu kódující PSTPIP2 S324\*) nebo PSTPIP2 se všemi třemi C-koncovými tyrosiny mutovanými na fenylalanin (tvorba plasmidů kódující PSTPIP2 Y323,333F a PSTPIP2Y323,329F). Pro tuto PCR reakci byla použita „Q5 high-fidelity“ DNA polymeráza. PCR reakce proběhla v přístroji „T100 Thermal Cycler“. Nastavení cyklů mutagenní PCR pro vytvoření mutantů PSTPIP2Y323,333F, PSTPIP2 Y323,329F a PSTPIP2 S324\* bylo následovné:

Prvotní denaturace	30 s	98 °C	
Denaturace	10 s	98 °C	Opakováno celkem 30 ×
Nasednutí primerů	15 s	55 °C	
Prodloužení primerů	30 s	72 °C	
Finální prodloužení primerů	2 min	72 °C	
Ukončení reakce	-	12 °C	

Pro vytvoření molekuly DNA kódující kinázu FGR byla cDNA z myších progenitorů neutrofilů použita jako templátová DNA. Tato PCR reakce také proběhla pomocí „Q5 high-fidelity“ DNA polymerázy. Nastavení cyklů mutagenní PCR pro vytvoření plasmidu kódující kinázu FGR bylo následovné:

Prvotní denaturace	30 s	98 °C	
Denaturace	10 s	98 °C	Opakováno celkem 35 ×
Nasednutí primerů	15 s	69 °C	
Prodloužení primerů	45 s	72 °C	
Finální prodloužení primerů	2 min	72 °C	
Ukončení reakce	-	12 °C	

PCR produkt o očekávaném počtu nukleotidů byl po reakci detekován pomocí agarózové elektroforézy.

#### 4.1.13 Agarózová elektroforéza

Horizontální agarózová elektroforéza s 1% agarózovým gelem byla použita pro separaci molekul DNA v roztoku na základě molekulové hmotnosti. Prášková agaróza byla rozpuštěna v Tris-acetátovém (TAE) pufru a vařena v mikrovlnné troubě, dokud nevytvořila čirou tekutinu. Láhev s roztokem agarózy byla pak uložena do vodní lázně o teplotě 55 °C. Do připraveného roztoku byl přidán Ethidiumbromid pro vizualizaci DNA (výsledná koncentrace = 0.169 mM). Samotná elektroforéza byla provedena v aparatuře „Mini-Sub Cell GT Systém“. Roztok byl nalit do formy s hřebínkem pro vytvoření jamek pro nanesení roztoku DNA. V této formě roztok ztuhnul do podoby gelu. Po ztuhnutí roztoku byl z gelu odebrán hřebínek a gel byl ponořen do elektroforetické vany obsahující TAE pufr a do vytvořených jamek byly napipetovány vzorky a marker délky DNA „GeneRuler 1 kb DNA ladder“.

Aparatura byla připojena ke zdroji elektrického napětí „PS500XT DC Power Supply“. Zdroj elektrického napětí byl nastaven na 100 V a molekuly DNA byly rozděleny na základě počtu bází. Výsledky elektroforézy byly fotograficky zaznamenány pomocí „UltraCAM Digital Imaging System“ s fotoaparátem „Sony Alpha A6000“.

#### 4.1.14 Izolace DNA z agarózového gelu

Pro izolaci molekul DNA separovaných pomocí agarózové elektroforézy byl pomocí skalpelu vyříznut proužek gelu obsahující DNA a DNA byla izolována s použitím komerční soupravy „Zymoclean™ Gel DNA Recovery“. Vyřízlý gel byl inkubován 10 min při teplotě 10 °C ve 300 µl roztoku „ABD“ v mikrozkuhavce o objemu 1,5 ml, aby došlo k rozpuštění gelu. Vzniklý roztok byl přenesen na chromatografickou kolonku „Zymo-Spin™ Column“ ve sběrné mikrozkuhavce. Chromatografická kolonka byla centrifugována (1 min, 10 000 RCF, pokojová teplota). Protečená kapalina byla odstraněna. Na kolonku bylo přidáno 200 µl pufru „DNA Wash Buffer“ a chromatografická kolonka byla centrifugována (1 min, 10 000 RCF, pokojová teplota). Tento promývací krok byl ještě jednou zopakován. Chromatografická kolonka byla přenesena do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml a na chromatografickou kolonku bylo přidáno 10 µl PCR Ultra H<sub>2</sub>O, ve které se rozpustila DNA v chromatografické kolonce. Chromatografická kolonka byla inkubována 3 min při pokojové teplotě a poté byla centrifugována (1 min, 10 000 RCF, pokojová teplota).

#### 4.1.15 Klonování DNA

Metody klonování DNA byly použity pro přípravu některých plasmidů kódujících *Pstpip2* s mutacemi v C-koncových tyrosinech a afinitní značkou FLAG a pro přípravu plasmidu kódující *Fgr* s afinitní značkou MYC. Sekvence kódující dané varianty *Pstpip2* byly vytvořeny pomocí mutagenní PCR. Vzniklé molekuly DNA insertů a DNA plasmidů byly naštěpeny pomocí „FastDigest“ restričních endonukleáz a plasmid byl také defosforylován pomocí „FastAP“ fosfatázy. Pro přípravu plasmidů kódujících *Pstpip2* s mutacemi v C-koncových tyrosinech byla použita restriční endonukleáza XhoI. Pro přípravu plasmidu kódující *Fgr* byly použity restriční endonukleázy XhoI a EcoRI. Reakční směs obsahovala přibližně 1 µg DNA plasmidu nebo 0,2 µg DNA insertu a 1 µl XhoI. V případě štěpení plasmidu byl do reakční směsi navíc přidán 1 µl „FastAP“ fosfatázy a v případě štěpení DNA insertu kódujícího *Fgr* byl do směsi navíc přidán 1 µl EcoRI. Reakce probíhala 15 min při teplotě 37 °C. Po štěpení byl obsah reakce rozdělen pomocí agarózové elektroforézy, kde byl



identifikován proužek odpovídající naštěpené DNA insertu a plasmidu. DNA z těchto proužků byla vyizolována (viz výše) a pomocí T4 DNA ligázy byla DNA insertu zaligována do plasmidu. Pro ligační reakci byly použity 2  $\mu$ l DNA insertu, 2  $\mu$ l DNA plasmidu a 1 U T4 DNA ligázy. Ligační reakce probíhala 1 hodinu v roztoku o objemu 20  $\mu$ l při teplotě 22 °C. Paralelně s touto reakcí byla provedena i self-ligační reakce, která postrádala DNA insertu. Nové plasmidy byly transformovány do bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10, které byly kultivovány v plastových petriho miskách na pevném agarózovém LB médiu obsahující ampicilin. Druhý den od transformace byly vyrostlé kolonie přeneseny do plastové destičky obsahující 24 jamek s 1 ml LB média obsahující 1 mg/ml ampicilinu. Bakterie byly v tomto médiu kultivovány 24 hodin v inkubátoru s rotačním pohybem. 2  $\mu$ l z této bakteriální kultury byly použity pro kontrolní PCR (viz níže), pomocí které jsme otestovali úspěšnost transformace jednotlivých kolonií. Z bakteriálních suspenzí, ve kterých kontrolní PCR prokázala přítomnost plasmidu s vloženým insertem, byla izolována plasmidová DNA (výsledný objem 10  $\mu$ l), která byla znovu testována na přítomnost a správnou orientaci DNA insertu pomocí zpětného štěpení restrikními endonukleázami. Výsledek štěpení byl určen pomocí agarózové elektroforézy. Správnost sekvence izolované plasmidové DNA byla testována pomocí DNA sekvenování. Část DNA obsahující insert o správné molekulové hmotnosti a správné orientaci byla zároveň znovu transformována do bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10, které byly kultivovány na pevném agarózovém LB médiu obsahujícím ampicilin. Minimálně 2 kolonie byly přeneseny každá do 100 ml LB média obsahujícího 100  $\mu$ g/ml ampicilin. Tyto bakteriální suspenze byly 24 hodin kultivovány v inkubátoru s rotačním pohybem a pak z nich byla izolována plasmidová DNA. Podle výsledků sekvenování byly vybrány plasmidy obsahující námi vytvořené mutace a byly zapojeny do našich transfekčních experimentů.

#### **4.1.16 Kontrolní PCR**

Kontrolní PCR byla provedena při tvorbě nových plasmidů. Z tekutých bakteriálních kultur o objemu 1 ml, obsahující bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10 transformované nově vytvořenými plasmidy, byly odebrány 2  $\mu$ l bakteriální suspenze, které byly bez dalších úprav použity namísto templátové DNA pro PCR reakci. V této PCR reakci byly použity mutagenní primery, které byly určeny k přípravě konkrétní molekuly DNA a „PPP Master Mix“, jehož součástí je Taq DNA polymeráza. Nastavení cyklů kontrolní PCR se shodovalo

s nastavením cyklů mutagenní PCR (viz výše). PCR produkt o očekávaném počtu nukleotidů byl po reakci detekován pomocí agarózové elektroforézy.

#### **4.1.17 DNA Sekvenování**

Sekvenování bylo prováděno pro kontrolu správnosti protein-kódující sekvence používaných plasmidů. Pro sekvenování byl vzorek plazidové DNA se sekvenačním primerem poslán do firmy „Eurofin Genomics“, která odvedla samotné sekvenování pomocí Sangerovy metody. Obdržená data byla porovnána se sekvencí plasmidu obsahujícího WT *Pstpip2*.

#### **4.1.18 Měření koncentrace DNA**

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje „NanoDrop2000“ od firmy „Thermo Scientific“. Jako blank byla použita PCR Ultra H<sub>2</sub>O, která je součástí produktu „PPP master mix“ od firmy „Top-Bio“ a byla používána i pro rozpuštění plasmidové DNA po její izolaci.

#### **4.1.19 Bakteriální transformace**

Plasmidová DNA byla vnesena do chemicky kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10 pomocí indukce teplotního šoku. Pro jednu transformaci bylo použito přibližně 70 µl bakteriální suspenze a 2 µl roztoku plasmidové DNA. Bakterie TOP 10 byly vyndány z mrazáku o teplotě – 80 °C a rozmrazeny na ledu. Po jejich rozmražení byly k 70-ti µl bakteriální suspenze napipetovány 2 µl plasmidové DNA. Bakterie byly inkubovány 30 min na ledu. Poté byl indukován teplotní šok inkubací bakterií při teplotě 42 °C po dobu 45 s v ohřívacím bločku. Po teplotním šoku byla bakteriální suspenze inkubována 5 min na ledu, poté k ní byl přidán 1 ml LB média bez antibiotika a bakterie byly inkubovány 30 min při teplotě 37 °C v termobloku s rotačním pohybem 800 RPM. Následně byly bakterie centrifugovány (3 min, 20 200 RCF, pokojová teplota). Supernatant byl odsát a peleta byla resuspendována v 50-ti µl LB média. Tato bakteriální suspenze byla nanášena na petriho misku s pevným médiem obsahující ampicilin jako selekční agens. Misky pak byly inkubovány 1 den v teplotě 37 °C biologickém termostatu.

#### 4.1.20 Tekuté bakteriální kultury

Pro pomnožení plasmidové DNA byla použita kultivace kolonie transformovaných bakterií v tekutém LB médiu. Kolonie vyrostlá na pevném agarózovém LB médiu s ampicilinem jako selekčním agens byla přenesena pomocí pipetovací špičky do LB média o objemu 1 ml nebo 100 ml s ampicilinem o koncentraci 1 mg/ml. Objem 1 ml byl použit pro kultivaci bakterií transformovaných nově vytvořenými plasmidy, které musely být otestovány na přítomnost zaligovaného insertu. Objem 100 ml byl použit pro kultivaci bakterií transformovaných již otestovanými plasmidy. Vzniklé tekuté bakteriální kultury byly inkubovány 1 den při teplotě 37 °C v inkubátoru s rotačním pohybem.

#### 4.1.21 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z transformovaných bakterií. K izolaci byla použita komerční souprava „NucleoBond Xtra Midi“ využívající technologii iontově výměnné chromatografie. Tato souprava byla použita pro izolaci plasmidové DNA transformované do bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10, které byly kultivovány ve 100 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 1 mg/ml. Po 24 hodinách kultivace byla bakteriální suspenze přenesena do plastových zkumavek o objemu 50 ml, které byly centrifugovány (30 min, 6 000 RCF, 4 °C). Supernatant byl odsát a peleta tvořená bakteriemi byla resuspendována v 8 ml pufru „RES“. Do vzniklé suspenze bylo přidáno 5 ml lyzačního pufru „LYS“. Suspenze byla opatrně promíchána a inkubována 5 min při pokojové teplotě. Během inkubace byly připraveny chromatografické kolonky „NucleoBond Xtra Column“ s filtrem, na který bylo nanášeno 12 ml pufru „EQU“. Po inkubaci bylo k bakteriálnímu lyzátu přidáno 8 ml neutralizačního pufru „NEU“, lyzát byl opatrně promíchán a nanášen na filtr chromatografické kolonky. Poté, co lyzát protekl kolonkou bylo na filtr kolonky nanášeno 5 ml pufru „EQU“. Po protečení tohoto pufru byl filtr odstraněn z kolonky a na kolonku bylo přidáno 8 ml pufru „WASH“. Po protečení tohoto pufru kolonkou bylo na kolonku přidáno 5 ml pufru „ELU“, který byl jímán do plastové zkumavky o objemu 15 ml. Poté bylo do této zkumavky přidáno 3,5 ml isopropanolu, aby došlo k precipitaci DNA, a celý roztok byl promíchán. Zkumavka s DNA byla následně centrifugována (30 min, 15 000 RCF, 4 °C). Supernatant byl odsát a peleta tvořená DNA byla přenesena do 1 ml 70% Etanolu v mikrozskumavce o objemu 1,5 ml pomocí nastřížené špičky. Mikrozskumavka s peletou byla centrifugována (5 min, 20 200 RCF, pokojová teplota). 70% etanol byl odsát a tento krok byl ještě jednou opakován. Peleta byla poté ponechána v digestoři, aby došlo k vypaření zbylého

etanolu. Po vypaření etanolu byla peleta rozpuštěna ve 100 ml PCR Ultra H<sub>2</sub>O. Vzniklý roztok DNA byl uchovávan v teplotě -30 °C. Pro izolaci DNA nově vytvořených plasmidů byla použita komerční souprava „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“. Tato komerční souprava byla použita pro izolaci DNA z transformovaných bakterií *Escherichia coli* kmene TOP10, které byly kultivovány 24 hodin v 1 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 1 mg/ml. 600 µl bakteriální suspenze bylo přeneseno do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml. K suspenzi bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru. Vzniklý lyzát byl opatrně promíchán a byl inkubován 2 min při pokojové teplotě. Poté bylo k lyzátu přidáno 350 µl neutralizačního pufru a obsah mikrozkuhavky byl promíchán. Mikrozkuhavka byla pak centrifugována (4 min, 16 000 RCF, pokojová teplota). Supernatan byl přenesen do chromatografické kolonky „Zymo-SPIN™ IIN“, která byla umístěna ve sběrné mikrozkuhavce o objemu 2 ml. Chromatografická kolonka ve sběrné mikrozkuhavce byla centrifugována (30 s, 16 000 RCF, pokojová teplota). Kapalina ve sběrné mikrozkuhavce byla odstraněna. Do chromatografické kolonky bylo přidáno 200 µl pufru „Endo-WASH Buffer“ a chromatografická kolonka ve sběrné mikrozkuhavce byla znovu centrifugována při stejném nastavení. Kapalina ve sběrné mikrozkuhavce byla odstraněna, na chromatografickou kolonku bylo přidáno 400 µl pufru „Zyppy™ Wash Buffer“ a chromatografická kolonka ve sběrné mikrozkuhavce byla centrifugována (1 min 16 000 RCF, pokojová teplota). Chromatografická kolonka byla přenesena do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml a na chromatografickou kolonku bylo nanášeno 30 µl „PCR Ultra H<sub>2</sub>O“. Chromatografická kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a poté byla centrifugována (1 min, 16 000 RCF, pokojová teplota). Takto izolovaná plasmidová DNA byla poté použita pro testování úspěšnosti ligační reakce pomocí štěpení restrikcími endonukleázami a pro kontrolu sekvence plasmidu pomocí DNA sekvenování.

## 4.2 Přehled použitých chemikálií a materiálů

### 4.2.1 Chemikálie a média

- Agaróza, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- Bromfenolová modř, *AMRESCO®, Inc., Solon, OH, USA*
- Dithiotreitol (DTT), *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- 10 mM dNTPs, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Dodecylsírán sodný (SDS), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*

- EDTA, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- Etanol, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Ethidium bromid, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Gentamycin, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- Glycerin bezvodý, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika*
- Glycin, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Hovězí fetální sérum, *Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Hovězí sérový albumin, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- Hydroxid sodný,
- Chlorid sodný, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika*
- Isopropanol, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika*
- Kyselina chlorovodíková, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Kyselina octová, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika*
- Lipofectamine 2000, *Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Metanol, *Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika*
- N-Dodecyl-b-D-maltosid (Lauryl maltosid), *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Penicilin, *BB Pharma a.s., Praha, Česká republika*
- Persíran amonný (APS), *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, *Roche, Mannheim, Germany*
- Sodná sůl Ampicilinu, *AppliChem GmbH, Darmstadt, Německo*
- Sušené mléko, *Promil, Nový Bydžov, Česká republika*
- Streptomycin, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- tetrametyletylendiamin (TEMED), *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*
- TWEEN-20, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*

#### 4.2.2 Materiály a buňky

- Buněčná linie HEK293: 293FT Cell Line, *Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*

- filtrační papíry pro western blot, Whatman 17CHR, *Whatman™, Inc., Maidstone, Velká Británie*
- Chromatigrafické kolonky: Micro Bio-Spin Chromatography Columns, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA*
- Laboratorní plast:
  - Tissue Culture Dish 100 (60,1 cm<sup>2</sup>), *TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko*
  - Tissue Culture Testplate 6, *TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko*
  - Tissue Culture Testplate 24, *TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko*
  - Zkumavky o objemu 15 ml a 50 ml, *Techno Plastic Products® AG, Trasadingen, Švýcarsko*
- Mikrozkušavky o objemu 1,5 ml:
  - 1.5ml Microcentrifuge Tubes, *Biologix Group Limited, Jinan, Shandong, China*
  - *Low Protein Binding Microcentrifuge Tubes, 1,5ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Mikrozkušavky o objemu 2 ml, Collection Tubes, 2.0 mL T5449, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*
- Petriho misky – průměr 60 mm, *GAMA® GROUP a.s., České Budějovice, ČR*
- Pipetovací nástavec SwiftPet Pro Pipette, *Corning HTL SA, Warsaw, Polsko*
- Polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána na western blot: Immobilon®-P PVDF Membrane, 0.45 µm pore size, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Agarózové kuličky s fúzním proteinem A/G: Protein A/G PLUS agarose, *Santa Cruz® Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA*
- Sada automatických pipet, Pipetman G, *Gilson, Middleton, Wisconsin, USA*
- Sleněné sérologické pipety o objemu 5/10/25 ml, *SPL Life Sciences, Naechon-Myeo Korejská republika*
- Špičky k automatickým pipetám, *MUF-Pro s.r.o., Praha, Česká republika*
- Špičky k automatickým pipetám s filtrem, eXPellPLUS Filtered Pipette Tips, *Capp, Nordhausen, Německo*

### 4.2.3 Roztoky a média

- 5X Q5 Reaction Buffer *New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA*
- Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (30 %), *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo*
- Blokovací roztok s BSA: 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5% BSA, 0,05% TWEEN-20, pH 7,5
- Blokovací roztok se sušeným mlékem: 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5% sušené mléko, 0,05% TWEEN-20, pH 7,5
- Blotovací roztok: 20% metanol, 10mM Tris, 75mM glycin
- Detekční roztoky pro western blot:
  - Radiance Peroxide, *Azure™ Biosystems, Inc., Dublin, California, USA*
  - Radiance Plus, *Azure™ Biosystems, Inc., Dublin, California, USA*
- DMEM médium obsahující 10% hovězí fetální sérum připraveno a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- DMEM médium obsahující 10% hovězí fetální sérum a směs antibiotik, připraveno a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- FastDigest Green Buffer (10×), *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Fosfátový pufr (PBS), připraven a obdržen z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- Inhibitory fosfatáz PhosSTOP™, 1 tableta obsahující inhibitory fosfatáz byla rozpuštěna ve 200 µl H<sub>2</sub>O, *Roche, Mannheim, Germany*
- LB médium určené pro bakterie, připraveno a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- Lyzační roztok obsahující lauryl maltosid: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% lauryl maltosid, 2% inhibitory fosfatáz PhosSTOP, 1% inhibitory proteáz, pH 7,5
- Marker molekulových hmotností pro agarózovou elektroforézu: GeneRuler 1 kb DNA ladder, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Marker molekulových hmotností pro SDS-PAGE: Precision Plus Protein Dual Color Standards, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA*
- Oligo(dT)18 Primery, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Opti-MEM I (1×), Reduced Serum Medium, *Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*

- Plastové misky s pevným agarózovým LB médiem obsahujícím ampicilin: připraveno a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- Promývací roztok TBS + T pro barvení PVDF membrán: 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,05% TWEEN-20, pH 7,5
- Promývací roztok TBS + T pro barvení PVDF membrán s vysokou koncentrací soli: 10 mM TRIS, 500 mM NaCl, 0,05% TWEEN-20, pH 7,5
- Promývací roztok pro imunoprecipitaci: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% lauryl maltosid, 0,1% inhibitory fosfatáz PhosSTOP, 0,1% inhibitory proteáz, pH 7,5
- Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, *Calbiochem®*, *Pacific Center Ct San Diego, Californie, USA*
- Roztok pro přípravu separačního akrylamidového gelu: 1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8
- Roztok pro přípravu zaostřovacího akrylamidového gelu: 0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8
- Separací pufr pro SDS-PAGE: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3
- Roztok obsahující Trypsin pro pasážování buněk, připraven a obdrženo z *Přípravny médií, ÚMG, AV ČR*
- Tris-acetátový pufr (TAE): 40 mM Tris, 20 mM octová kyselina, 1 mM EDTA
- Vzorkový pufr obsahující SDS: 128 mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, pH 6,8, 0,05% Bromfenolová modř

#### 4.2.4 Přístroje

- Aparatura pro agarózovou elektroforézu: Mini-Sub Cell GT Cell, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA*
- Aparatura pro SDS-PAGE: Mini-PROTEAN® Tetra Cell, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA*
- Aparatura pro western blot: SD20 Semi dry maxi, *Cleaver Scientific Ltd, Rugby, Warwickshire, Velká Británie*
- Centrifugy a ultracentrifugy:
  - Optima MAX-E, *Beckman Coulter, Brea, Californie, USA*
    - Rotor TLA 110, *Beckman Coulter, Brea, Californie, USA*
  - Centrifuge 5810 R, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
  - Centrifuge 5417R, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
  - Centrifuge 5424, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*



- Capsulefuge PMC-880 Mini Centrifuge, *GMC Labs Co., Ltd., Nam-gu, Busan, Korejská republika*
- PCR cyklér: Cycler T100 Thermal, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA*
- Inkubátory a termostaty:
  - Biologický termostat BT-50, *Ekono s.r.o, Mladá Boleslav, Česká republika*
  - MITRE 4000 Series, *Contherm Scientific Limited, Korokoro, Nový Zéland*
  - SI6R-2, *Shel lab, Cornelius, North Carolina, USA*
- Invertovaný světelný mikroskop Nikon Eclipse TS100-F, *Nikon, Minato-ku, Tokyo Japonsko*
- pH metr: 3510 Bench pH meter, *Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, Velká Británie*
- Ohřívací bloček: Thermomixer Comfort 5355, *Eppendorf AG, Hamburk, Německo*
- Ohřívač s mícháním: Stuart™ hotplate stirrer, *Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Rotační míchačky:
  - Rotator Genie, *Scientific Industries, Inc., New York, New York, USA*
  - Test-tube-rotator 34528, *Snijdesr Labs, Tilburg, Nizozemsko*
- Spektrofotometr pro měření koncentrace DNA: *NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Systém pro detekci fluorescenčního záření:
  - UltraCAM Digital Imaging System, *Ultra-Lum, Inc. Claremont, California*
  - Sony Alpha A6000, *Sony Minato-ku, Tokyo Japonsko*
- Systém pro detekci chemiluminiscenčního záření: *Azure™ Imager c300, Azure™ Biosystems, Inc., Dublin, California, USA*
- Tkáňový box: *Telstar BIO II A, Telstar, Terrassa, Barcelona, Španělsko*
- Třepačky:
  - Assistent 348/1 Rocking shaker, *Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Německo*
  - ZX CLASSIC Vortex Mixer, *VELP Scientifica Srl, Usmate, Itálie*
- Váhy: *Ohaus® Scout® Pro balance, Merck KGaA, Darmstadt, Německo*
- Vodní lázně:
  - Memmert Waterbath WBU 45, *Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Německo*
  - NB 9, *NUVE, Ankara, Turecko*

- Zdroje elektrického napětí:
  - Electrophoresis Power Supply EPS 301, *Amersham Biosciences/Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA*
  - PowerPac™ Basic Power Supply, *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, USA*
  - PS500XT DC Power Supply, *Hoefer, Inc., Holliston, Massachusetts, USA*

#### 4.2.5 Protilátky

Anti-pTYR – monoklonální, klon 4G10, Sběrka hybridomů Oddělení leukocytární signalizace, ÚMG, AV ČR, protilátku připravily RNDr. Pavla Angelisová, CSc. a Jana Pokorná

Anti-PSTPIP2 – monoklonální, klon 3IF9/E3, Sběrka hybridomů Oddělení leukocytární signalizace, ÚMG, AV ČR, protilátku připravily RNDr. Pavla Angelisová, CSc. a Jana Pokorná

Anti-SHIP1 – monoklonální, klon 8G2/H10, Sběrka hybridomů Oddělení leukocytární signalizace, ÚMG, AV ČR, protilátku připravily RNDr. Pavla Angelisová, CSc. a Jana Pokorná

Anti-FLAG – monoklonální, klon M2, *Sigma-Aldrich® 20 Co., St. Louis, Missouri, USA*

Goat anti-mouse IgG (HRP conjugate) – polyklonální, *Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., West Baltimore Pike, West Grove, Pennsylvania, USA*

Goat anti-mouse IgG light chain (HRP conjugate) – polyklonální, *Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC., West Baltimore Pike, West Grove, Pennsylvania, USA*

#### 4.2.6 Plasmidy

Část plasmidů pocházela z plasmidové knihovny naší laboratoře. Správnost C-koncové sekvence plasmidů kódující mutantní formy proteinu PSTPIP2 byla ověřena DNA sekvenováním. V případě potřeby byl pro obnovu zásob plasmid znovu namnožen v bakteriích *Escherichia coli* kmene TOP10 (viz metody). Plasmidy kódující FGR, PSTPIP2 Y323,333F, PSTPIP2 Y323,329F a PSTPIP2 S324\* byly nově vytvořeny v průběhu projektu.

Exprimovaný gen	typ plasmidu	značka	C-koncová sekvence
WT PSTPIP2	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDYSVVEDYSLLYQ
PSTPIP2 W232A	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDYSVVEDYSLLYQ

PSTPIP2 Y3F	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDFSVVEDFSLLFQ
PSTPIP2 Y323F	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDFSVVEDYSLLYQ
PSTPIP2 Y329,333F	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDYSVVEDFSLLFQ
PSTPIP2 Y323,329F	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDY
PSTPIP2 Y323,333F	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDFSVVEDFSLLYQ
PSTPIP2 S324*	MSCV-IRES-LNGFR	N-koncový FLAG	DDPDFSVVEDYSLLFQ
HCK	MSCV-IRES-LNGFR		
FGR	MSCV-IRES-Thy1	C-koncový MYC	
LYN	MSCV-IRES-LNGFR-Thy1.2		
SYK	pMSCV-IRES-Thy1		
BTK	pcDEF3	N-koncový HA	
BMX	pcDEF3	N-koncový HA	
PYK2	pRK5		
SHIP1	pXM1.39		

#### 4.2.7 Primery

Nové primery byl objednány od firmy „Merck“ rozpuštěné v H<sub>2</sub>O o koncentraci 100 μM, vyčištěné pouze metodou odsolení. Kontrola primerů (intramolekulární a intermolekulární párování, obsah GC párů, odhadovaná T<sub>m</sub>) byla provedena pomocí internetového nástroje Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)<sup>210</sup>. Použité primery jsou popsány níže (název primeru, sekvence, účel). Poslední písmeno označuje orientaci primeru (F = forward/dopředný, R = reverse/zpětný)

- Název – TD001 PSTPIP2 Xho F  
 sekvence – 5'- TTCTCGAGACCGCCATGG -3'  
 Primer páruje s plasmidem kódující PSTPIP2 a jeho mutantní formy na místě upstream od protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI. Byl použit pro tvorbu PSTPIP2, který má STOP kodon za prvním C-koncovým tyrosinem.
- Název – TD002 PSTPIP2 Xho R  
 Sekvence – 5'- CCCTCGAGTCAGTAATCAGGATCATCTGGTATC -3'  
 Primer páruje s plasmidem kódující WT Pstpip2 na konci protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI. Byl použit pro tvorbu PSTPIP2 S324\*, který má STOP kodon za prvním C-koncovým tyrosinem. Sekvence tohoto primeru vnáší tento STOP kodon.

- Název – TD003 PSTPIP2 Xho F  
Sekvence – 5'- CTCTCGAGACCGCCATGGAT -3'  
Primer páruje s plasmidem kódující *Pstpip2* a jeho mutantní formy na místě upstream do protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI. Byl použit pro tvorbu PSTPIP2 Y323,329F a PSTPIP2 Y323,333F.
- Název – TD004 PSTPIP2 Xho R  
Sekvence – 5'- ACCTCGAGTCACTGATAGAGCAAAGTAAA -3'  
Primer páruje s plasmidem kódující PSTPIP2 Y3F na konci protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI. Byl použit pro tvorbu PSTPIP2 Y323,329F. Sekvence tohoto primeru vnáší příslušné mutace.
- Název – TD005 mouse FGR-XhoI-F  
Sekvence – 5'- CACTCGAGGCCACCATGGGCTGTGTGTTCTGCAAG -3'  
Primer svým 3' koncem páruje s antisense vláknem DNA kódujícím myší kinázu FGR na začátku protein kódující-sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI a sekvenci Kozakové před sekvencí kódující *Fgr*.
- Název – TD006 mouse FGR-MYC tag - EcoRI – R  
Sekvence – 5'-GTGAATTCCTAAAGATCCTCTTCTGAAATGAGTTTTTGT  
TCTGTCTGGTCTCC AGGCTGG -3'  
Primer svým 3' koncem páruje se sense vláknem DNA kódujícím myší kinázu FGR na konci protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI a sekvenci kódující afinitní značku MYC před sekvencí komplementární k DNA kódujícím *Fgr*.
- Název – TD007 FGR seq F  
Sekvence – 5'- CACATGGAAGTGCAGCACA -3'  
Primer páruje s plasmidem kódujícím myší gen FGR v pozici přibližně 800 bp downstream od začátku protein-kódující sekvence. Tento primer byl použit pro sekvenování plasmidu kódující *Fgr*.
- Název – TD008, XhoI R  
Sekvence – 5'- ACCTCGAGTCACTGAAAGAGCAAAGTGTAA -3'  
Primer páruje s plasmidem kódujícím PSTPIP2 Y3F na konci protein-kódující sekvence. Na 5' konci má štěpné místo pro XhoI. Byl použit pro tvorbu PSTPIP2 Y323,333F. Sekvence tohoto primeru vnáší mutace.

#### 4.2.8 Enzymy

- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ $\mu$ L), *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- FastDigest EcoRI, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- FastDigest XhoI, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- RevertAid Reverse Transcriptase, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ L), *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- T4 DNA Ligase Buffer (10 $\times$ ), *Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, *New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA*
- PPP Master Mix, *Top-Bio, s.r.o., Vestec, Česká Republika*

#### 4.2.9 Komerční soupravy

- Izolace plasmidové DNA (MidiPrep): NucleoBond Xtra Midi, *MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Německo*
- Izolace plasmidové DNA (MiniPrep): Zyppy<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit, *Zymo Research, Irvine, California, USA*
- Izolace RNA: Quick-RNA<sup>TM</sup> MiniPrep Kit, *Zymo Research, Irvine, California, USA*
- Purifikace DNA z agarózového gelu: Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kit, *Zymo Research, Irvine, California, USA*

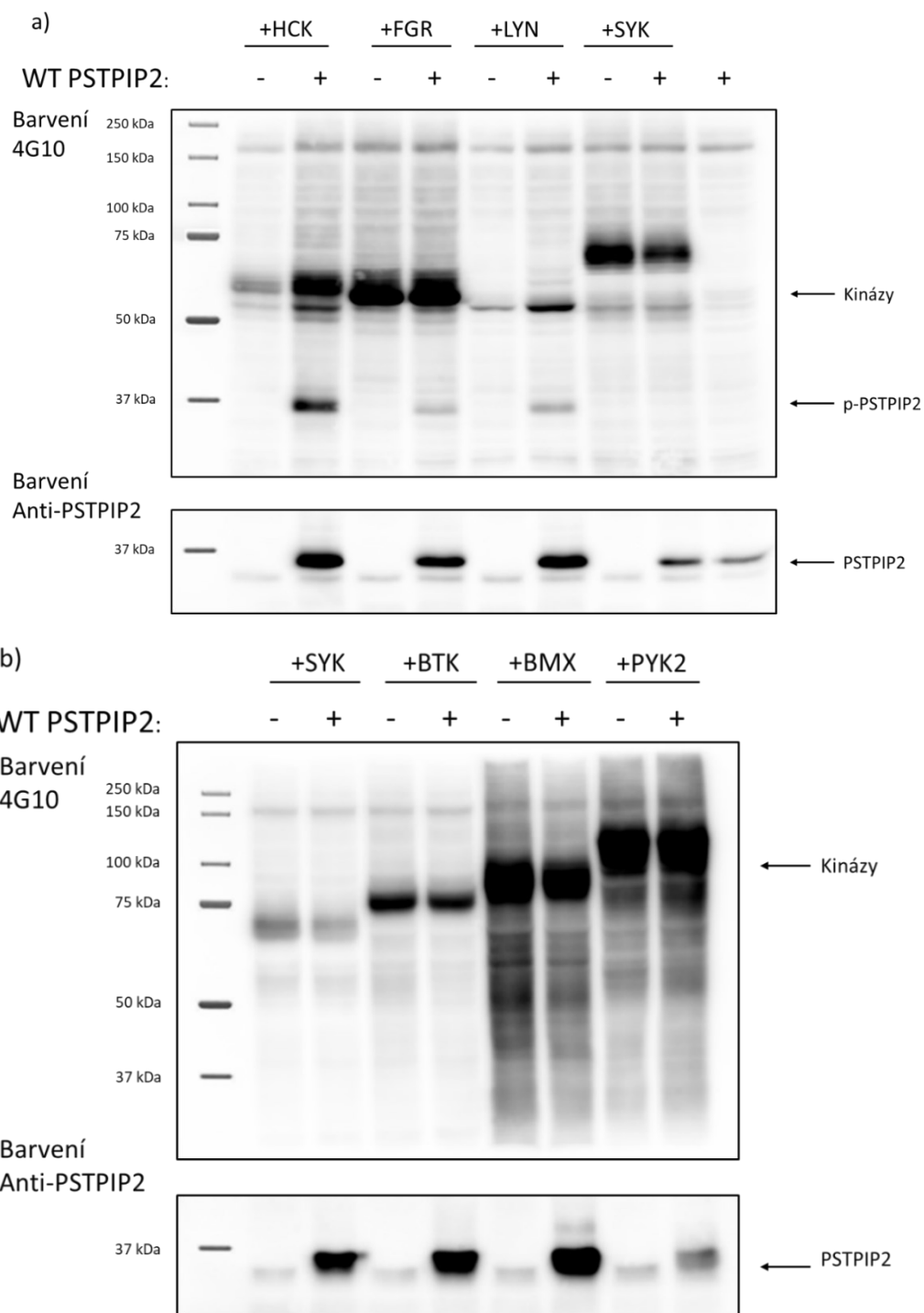
## 5 Výsledky

### 5.1 Kinázy HCK, FGR a LYN dokáží fosforylovat WT PSTPIP2

Fosforylace PSTPIP2 byla popsána v řadě studií<sup>6,10,58,59</sup>. Doposud ale nebylo dostatečně zkoumáno, které konkrétní kinázy fosforylují tento protein. Určitý rozpor panuje také ohledně otázky, které konkrétní tyrosiny proteinu PSTPIP2 jsou fosforylovány. Ve studii z naší laboratoře jsme detekovali ztrátu fosforylace PSTPIP2 při mutaci tří tyrosinů na C konci PSTPIP2. Vzhledem k tomu že C-koncové tyrosiny jsou důležité pro interakci s fosfatázou SHIP1<sup>6</sup>, odhadovali jsme, že PSTPIP2 je fosforylován pouze na tyrosinech na pozicích 323 a 329. Sekvence na těchto pozicích totiž dobře odpovídají konsensus sekvencím pro interakci s SH2 doménou SHIP1 fosfatázy<sup>103,211,212</sup>.

Jako první jsme chtěli zodpovědět otázku, které konkrétní kinázy mohou fosforylovat protein PSTPIP2. Pro analýzu fosforylace PSTPIP2 jsme vytvořili *in vitro* expresní systém, kde jsme do buněčné linie HEK293 transfekovali plasmidy kódující protein PSTPIP2 samostatně nebo společně s vybranými kinázami. Podmínky nadměrné exprese kináz a PSTPIP2 nám umožnily sledovat schopnosti jednotlivých kináz fosforylovat PSTPIP2 i bez působení stimulu, který by aktivoval dané kinázy. Jedná se o určitou modifikaci *in vitro* kinázového testu, kdy kinázová reakce probíhá v ideálním prostředí cytoplazmy buněk obsahující vysoké koncentrace kinázy a jejího substrátu. Před samotnou prací jsme museli vybrat kinázy, které zahrneme do našich experimentů. Vzhledem k tomu, že PSTPIP2 reguluje produkci IL-1 $\beta$  v neutrofilech, zvolili jsme kinázy, které jsou exprimovány v neutrofilech a nacházejí se v rozsáhlé plasmidové sbírce naší laboratoře. Zároveň jsme se snažili se vybírat kinázy z různých protein tyrosin kinázových rodin uplatňujících se v signalizaci neutrofilů. Na základě těchto požadavků jsme vybrali kinázy HCK a LYN z rodiny SRC, kinázy BTK a BMX z rodiny TEC, kinázu SYK a kinázu PYK2. V průběhu našich experimentů jsme ještě vytvořili plasmid kódující kinázu FGR z rodiny SRC, který byl inkorporován do transfekčních experimentů (viz níže). Expresi těchto kináz v myších neutrofilech jsme ověřili pomocí internetové databáze ImmGen<sup>213</sup>. Před začátkem samotných experimentů jsme ověřili správnost kódované sekvence jednotlivých plasmidů pomocí DNA sekvenování. V první sérii transfekčních experimentů jsme transfekovali dané kinázy samotné nebo společně s WT PSTPIP2 v poměru 1 : 1. Tento poměr byl změněn pouze při transfekci kinázy BMX, jejíž exprese způsobila tak silnou fosforylaci buněčných proteinů, že nebylo

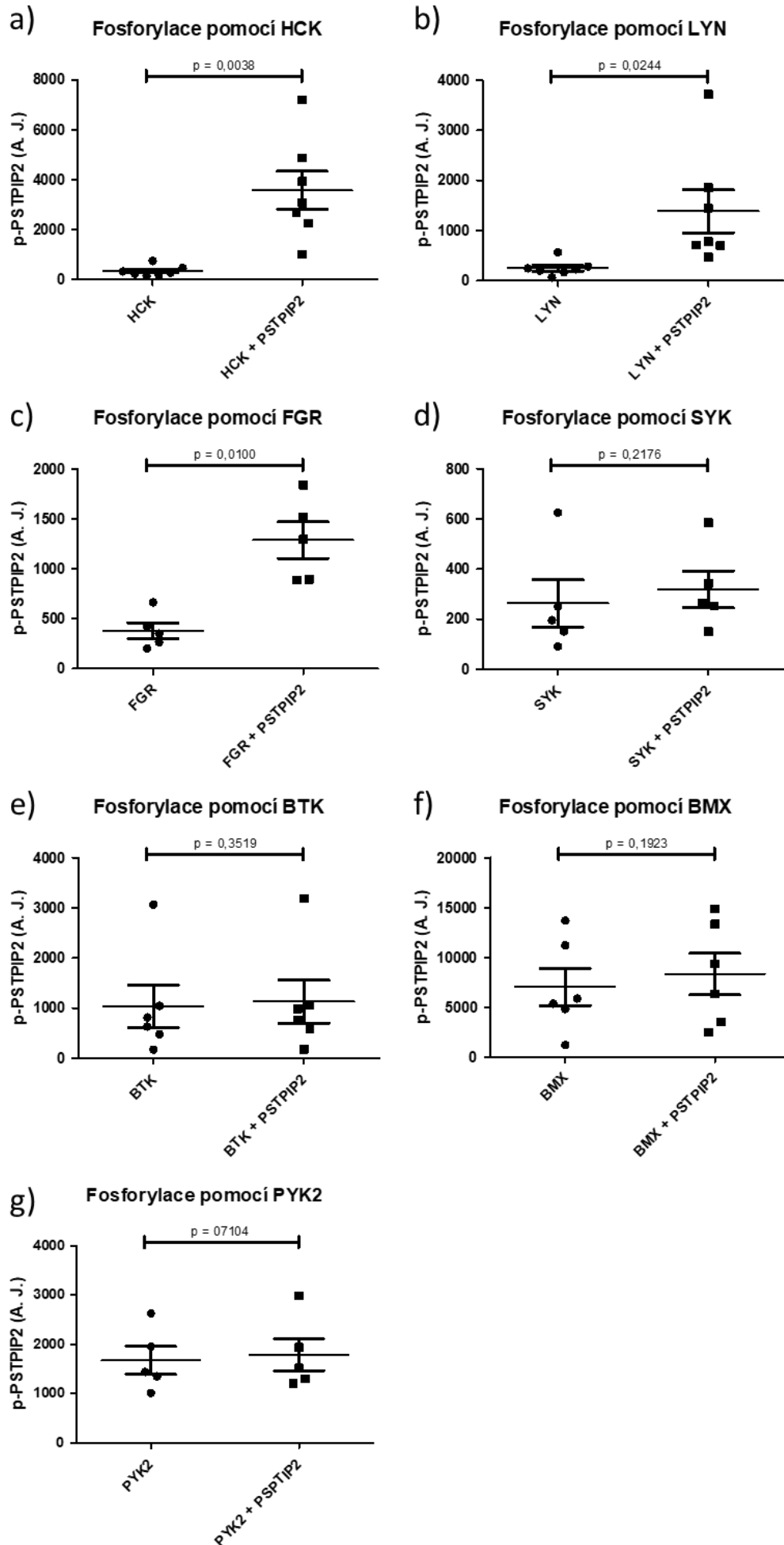
možné detekovat případnou fosforylaci PSTPIP2. Poměr BMX : WT PSTPIP2 byl proto upraven na 1 : 4. Před transfekcí jsme buňky linie HEK293 kultivovali 24-jamkové destičce. Po jednom dni kultivace jsme provedli jejich transfekci a po 24 hodinách jsme buňky lyzovali. Lyzáty byly pak rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na PVDF membránu pomocí metody western blot. Fosforylace proteinu PSTPIP2 byla detekována protilátkou 4G10, která je specifická pro fosforylované tyrosiny. Pro kontrolu byla vytvořena druhá membrána obsahující stejný vzorek, která byla značena pomocí naší anti-PSTPIP2 protilátky. Značení pomocí anti-PSTPIP2 protilátky ukázalo, že WT PSTPIP2 je v našem *in vitro* systému exprimován. Pozorovaný pruh na membráně odpovídal svou molekulovou hmotností proteinu PSTPIP2 a byl přítomen pouze v těch vzorcích, kde byl transfekován plasmid kódující WT PSTPIP2. Protilátka 4G10 proti fosfotyrosinu úspěšně označila jednotlivé kinázy, které byly autofosforylovány (viz obrázek 2). K této autofosforylaci docházelo nejspíše díky nastavení podmínek, kde se v jedné buňce nacházelo nadměrné množství kinázy. Při značení protilátkou 4G10 jsme také pozorovali, že WT PSTPIP2 byl úspěšně fosforylován pomocí kináz HCK, FGR a LYN (viz obrázek 2). Všechny tyto kinázy patří do rodiny SRC, tudíž tyto výsledky jsou v souladu s dříve pozorovanou fosforylací proteinu PSTPIP2 při jeho transfekci společně s kinázou V-SRC *in vitro*<sup>58</sup>. Naopak kinázy SYK, BTK, BMX a PYK2 nedokázaly fosforylovat WT PSTPIP2 (viz obrázek 2). Intenzitu fosforylace jsme kvantifikovali pomocí programu „Aida Image Analyzer“. To nám umožnilo graficky znázornit fosforylaci WT PSTPIP2 a analyzovat míru fosforylace WT PSTPIP2 vybranými kinázami pomocí párového t testu. Touto statistickou metodou jsme dokázali, že PSTPIP2 může být fosforylován *in vitro* pomocí všech tří hlavních kináz rodiny SRC exprimovaných v neutrofilech. Toto zjištění napovídá, že tyto 3 kinázy by se mohly navzájem zastupovat ve fosforylaci proteinu PSTPIP2 (viz obrázek 2 a, 3 a – c).



**Obrázek 2: Fosforylace WT PSTPIP2 pomocí vybraných kináz.**

(a - b) Vybrané kinázy jsme transfekovali do buněk HEK293 samotné nebo společně s WT PSTPIP2. Fosforylaci WT PSTPIP2 jsme detekovali pomocí metody western blot a značení protilátkou 4G10 detekující fosforylované tyrosiny. Druhou membránu se stejnými vzorky jsme značili pomocí protilátky anti-PSTPIP2. Veškeré výsledky v obrázku jsme vytvořili z jedné transfekce. a) expozice značení 4G10 – 3 s, expozice značení anti-PSTPIP2 – 45 s; b) expozice značení 4G10 – 5 s, expozice značení anti-PSTPIP2 – 2 min.





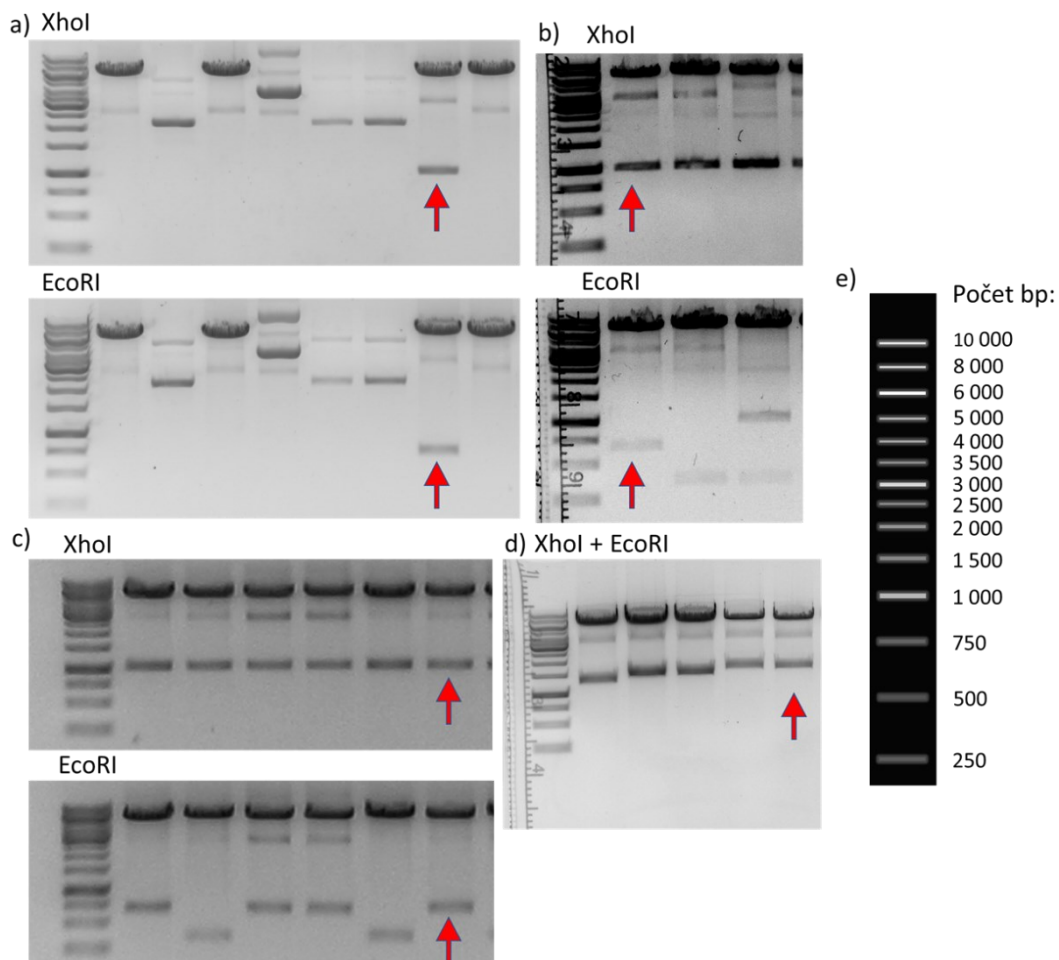
### **Obrázek 3: Kvantifikace fosforylace WT PSTPIP2 pomocí vybraných kináz.**

(a-g) Fosforylaci WT PSTPIP2 vybranými kinázami jsme detekovali značením PVDF membrány protilátkou 4G10 detekující fosforylované tyrosiny. Intenzitu signálu odpovídající fosforylovanému PSTPIP2 a celkovému PSTPIP2 jsme kvantifikovali v programu „AIDA Image Analyzer“. Výsledná data jsme vyhodnotili pomocí statistického testu párový t test. Porovnávali jsme intenzitu signálu fosforylovaného PSTPIP2 v nepřítomnosti a přítomnosti PSTPIP2. Analýzu jsme vypracovali z pěti až sedmi opakování. Do statistické analýzy jsme zahrnuli jen opakování, kde došlo k úspěšné transfekci. Počet opakování: 7 (a-b), 6 (e-f), 5 (c, d, g). A. J. = arbitrární jednotky.

## **5.2 Hlavními fosforylačními místy proteinu PSTPIP2 jsou tyrosiny na pozicích 323 a 329**

Po identifikaci kináz, které jsou schopné fosforylovat PSTPIP2, tak jsme si položili otázku, které tyrosiny z C-koncové trojice proteinu PSTPIP2 jsou opravdu fosforylovány. Náš bývalý kolega Doktor Aleš Drobek při své práci na proteinu PSTPIP2 vytvořil plasmidy kódující různé mutantní formy tohoto proteinu. Ze sbírky těchto plasmidů jsme vybrali ty, které kódují PSTPIP2 s mutacemi v C-koncových tyrosinech. Konkrétně se jednalo o plasmidy kódující PSTPIP2 Y323F, PSTPIP2 Y329,333F a PSTPIP2 s mutací všech C-koncových tyrosinů (zde bude nazýván PSTPIP2 Y3F). Do našich transfekcí jsme se také rozhodli zahrnout plasmid kódující PSTPIP2 s mutací W232A. Tryptofan na pozici 232 je kritickou aminokyselinou pro vazbu fosfatáz z rodiny PEST<sup>6</sup>, které se váží i na podobný protein PSTPIP1 a zároveň jej defosforylují<sup>214</sup>. Pilotní experimenty s těmito plasmidy ukázaly, že naši kotransfekční metodu můžeme použít i pro analýzu fosforylace jednotlivých C-koncových tyrosinů proteinu PSTPIP2. Zároveň také ukázaly, že bude nutné vytvořit další plasmidy, jejichž použití by nám poskytlo více informací o fosforylaci proteinu PSTPIP2. Rozhodli jsme se vytvořit plasmidy kódující PSTPIP2 Y323,329F, obsahující pouze tyrosin na pozici 333, PSTPIP2 obsahující STOP kodon za prvním C-koncovým tyrosinem (PSTPIP2 S324\*) a kinázu FGR. Plasmid kódující PSTPIP2 S324\* jsme vytvořili, protože naše laboratoř vlastní myši kmen kódující PSTPIP2 s touto mutací. Výsledky obdržené při použití tohoto plasmidu naší laboratoři v budoucnu umožní porovnání *in vitro* experimentů s experimenty na buňkách z těchto myší. Kináza FGR je vedle HCK a LYN další kinázou

z rodiny SRC, která je exprimována v neutrofilech<sup>215</sup>. K vytvoření plasmidu kódující FGR nás také motivovaly studie popisující myši kmen s mutací v této kináze. Fenotyp těchto myší se velmi podobá fenotypu CMO myší<sup>216–218</sup>. Pro vytvoření plasmidů kódující mutantní verze proteinu PSTPIP2 jsme použili klasické metody genového inženýrství. Pomocí reverse primerů vnášející dané mutace jsme metodou PCR vytvořili molekuly DNA kódující mutantní PSTPIP2. V případě tvorby plasmidu kódujícího kinázu FGR jsme museli vytvořit nový cDNA konstrukt kódující tuto kinázu. Ten jsme vytvořili metodou PCR, kde templátovou DNA byla směs cDNA vytvořená pomocí náhodných oligonukletidů a reverzní transkriptázy z RNA izolované z myších progenitorů neutrofilů. Tuto RNA nám poskytla naše kolegyně Nataliia Pavliuchenko. Vzniklé fragmenty DNA jsme pak pomocí restričních endonukleáz XhoI a EcoRI a T4 DNA ligázy vložili do plasmidu. Zvolili jsme stejné typy plasmidů, které použili naši bývalí kolegové pro tvorbu jejich plasmidů kódujících mutantní formy PSTPIP2. Plasmidová kostra vektorů kódujících jednotlivé mutantní verze PSTPIP2 se tedy neliší. Vzniklé plasmidy jsme transformovali do bakterií. Po jednodenní kultivaci jsme izolovali plasmidovou DNA z těchto bakterií a ověřili úspěšnost transformace a ligace pomocí štěpení restričními endonukleázami (viz obrázek 4). Správnost sekvence úspěšně zaklonovaných plasmidů jsme ověřili pomocí DNA sekvenování. V pozdější fázi našeho projektu jsme se rozhodli vytvořit ještě plasmid kódující PSTPIP2 Y323,333F, abychom dostali detailní informaci o fosforylaci tyrosinu na pozici 329 a jeho schopnosti interagovat s SHIP1 (viz níže).

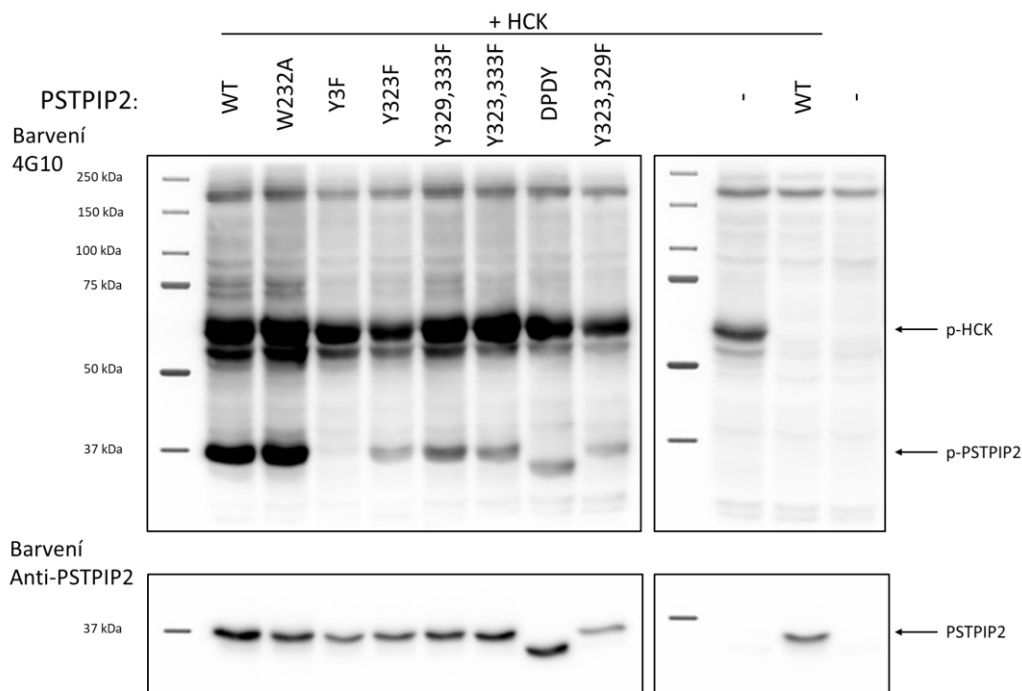


**Obrázek 4: Výsledky kontrolního štěpení vytvořených plasmidů pomocí restrikčních endonukleáz.**

a – c) Nově vytvořené plasmidy kódující PSTPIP Y323,333F (a), PSTPIP2 S324\* (b), PSTPIP Y323,329F (c) jsme štěpili pomocí restrikčních endonukleáz XhoI a EcoRI. Oba konce DNA insertů obsahovaly štěpné místo rozeznávané XhoI. Štěpení pomocí XhoI jsme použili pro kontrolu přítomnosti DNA insertu a štěpení pomocí EcoRI jsme použili pro kontrolu správné orientace tohoto insertu. Požadovaná délka vyštěpených molekul DNA je přibližně 1041 bp (štěpení pomocí XhoI) a 700 bp (štěpení pomocí EcoRI). d) Nově vytvořený plasmid kódující myší kinázu FGR jsme štěpili pomocí XhoI a EcoRI v jedné reakční směsi, protože konce jeden konec DNA insertu obsahoval štěpné místo rozeznávané XhoI a druhý konec obsahoval štěpné místo rozeznávané EcoRI. Požadovaná délka insertu je přibližně 2000 bp. V každé dráze je vždy plasmid pocházející z jednoho bakteriálního klonu. Plasmidy se správnými inserty vybrané pro další použití jsou označeny šipkou.

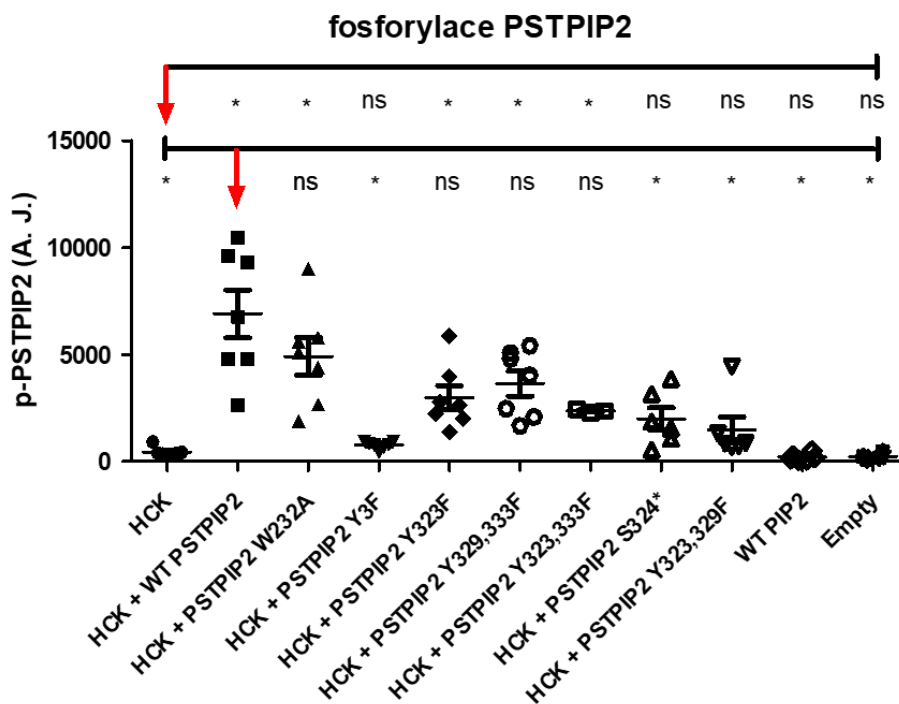
e) Schématické znázornění markeru délek DNA fragmentů. bp = počet párů bazí.

Při dalších experimentech jsme do buněčné linie HEK293 transfekovali plasmid kódující kinázu HCK, FGR nebo LYN společně s plasmidy kódujícími mutantní formy PSTPIP2 v poměru 1:1. Expresse jednotlivých mutantních forem PSTPIP2 byla shodná napříč experimenty. Použili jsme i nové plasmidy kódující PSTPIP2 S324\*, PSTPIP2 Y323,333F a PSTPIP2 Y323,329F. Pomocí těchto transfekcí jsme zjistili, že většina konstruktů je fosforylována kinázou HCK (viz obrázek 5). Kináza FGR také dokázala fosforylovat WT PSTPIP2 a některé mutantní formy PSTPIP2. Schopnost této kinázy fosforylovat PSTPIP2 byla ale slabší než v případě HCK a z výsledků obdržených pomocí transfekce této kinázy jsme dostávali nekonzistentní výsledky. Kvantifikaci mutantních forem PSTPIP2 pomocí kinázy FGR jsme neprovedli kvůli nízkému počtu úspěšných opakování. Technické problémy jsme měli i s funkčností plasmidu kódujícího kinázu LYN, které se částečně podařilo vyřešit izolací tohoto plasmidu z nově transformovaných bakterií. I přes obnovení funkčnosti plasmidu kódující kinázu LYN se nám dařilo detekovat pouze fosforylaci WT PSTPIP2, ale nebyli jsme schopni detekovat fosforylaci žádné z jeho mutantních forem. Z těchto důvodů jsme v našich transfekčních experimentech používali převážně kinázu HCK, která poskytovala stabilní výsledky (viz obrázek 5). Fosforylace WT PSTPIP2 a jednotlivých mutantních verzí tohoto proteinu pomocí kinázy HCK jsme kvantifikovali stejným způsobem, jak bylo popsáno výše. Obdržené hodnoty intenzity signálu odpovídající fosforylaci PSTPIP2 jsme podrobili statistickému testu jednosměrná ANOVA. Jako *post hoc test* jsme zvolili t test. Hladina statistické významnosti byla upravena pomocí Bonferroniho metody zohledňující mnohočetná porovnávání. S použitím tohoto testu jsme porovnávali signál odpovídající fosforylovanému PSTPIP2 ve vzorcích, kde byla transfekována HCK nebo HCK společně s WT PSTPIP2, se signálem v ostatních vzorcích. Výsledky této statistické metody nám ukázaly, že WT PSTPIP2, PSTPIP2 W232A, PSTPIP2 Y323F, PSTPIP2 Y329,333F a PSTPIP2 Y323,333F jsou signifikantně fosforylovány. Fosforylace PSTPIP2 S324\* a PSTPIP2 Y323,329F, kterou jsme pozorovali v našich experimentech, byla příliš slabá a nedosáhla hladiny statistické významnosti. V rámci alternativní analýzy, kdy jsme testovali redukci fosforylace PSTPIP2 způsobenou jednotlivými mutacemi jsme zjistili, že tato fosforylace byla signifikantně oslabena pouze u PSTPIP2 Y3F, PSTPIP2 S324\* a PSTPIP2 Y323,339F (viz obrázek 6).



**Obrázek 5: Fosforylace mutantních forem PSTPIP2 pomocí kinázy HCK.**

Fosforylaci mutantních forem PSTPIP2 jsme detekovali pomocí metody western blot a značení protilátkou 4G10 (čas expozice 3 s). Druhou membránu se stejnými vzorky jsme značili pomocí protilátky anti-PSTPIP2 (čas expozice 5 s). Veškeré výsledky v obrázku jsme vytvořili z jedné transfekce.



## **Obrázek 6: Kvantifikace fosforylace WT PSTPIP2 a mutantních forem tohoto proteinu pomocí kinázy HCK.**

Fosforylaci proteinů kinázou HCK jsme detekovali značením protilátkou 4G10. Intenzitu signálu odpovídající fosforylovanému PSTPIP2 jsme kvantifikovali v programu „AIDA Image Analyzer“. Obdržené hodnoty jsme vyhodnotili pomocí statistického testu jednosměrná ANOVA. Post hoc jsme provedli t testy porovnávající intenzitu fosforylace PSTPIP2 ve vzorcích označených červenou šipkou s ostatními vzorky. Hladina statistické významnosti byla upravena pomocí Bonferroniho metody zohledňující mnohočetná porovnávání. Analýzu jsme vypracovali ze sedmi opakování. Z analýzy jsme vyřadili vzorky, u kterých došlo k chybě v transfekci. A. J. = arbitrární jednotky.

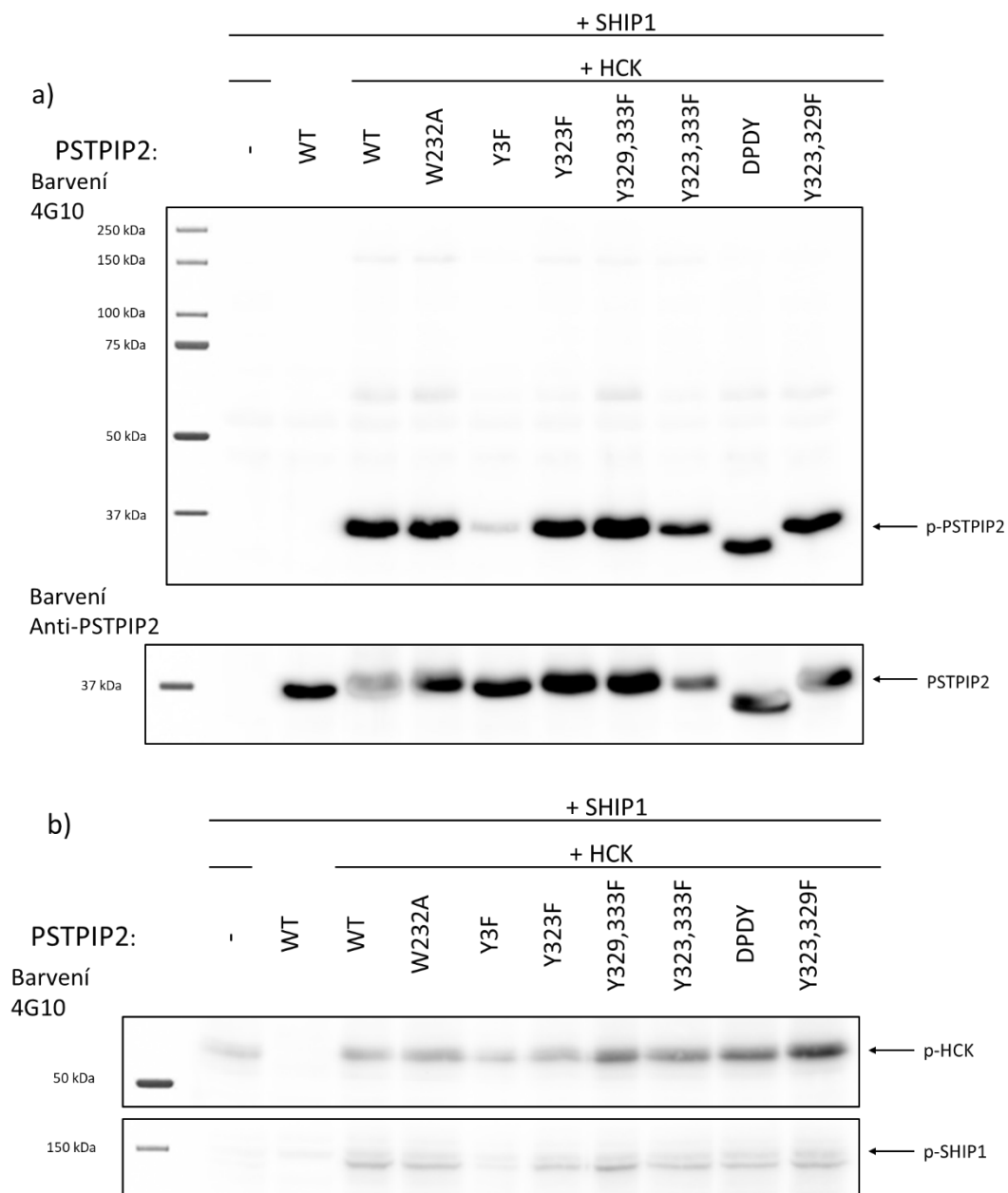
### **5.3 Interakce PSTPIP2 s SHIP1 fosfatázou**

Fosforylace C-koncových tyrosinů nemusí nutně znamenat, že se mohou podílet na vazbě fosfatázy SHIP1<sup>103</sup>. Náš prvotní předpoklad byl, že tyrosiny na pozicích 323 a 329 budou zprostředkovávat vazbu na SHIP1 fosfatázu a tyrosin na pozici 333 nebude mít vliv na tuto interakci. K testování interakce PSTPIP2 a SHIP1 fosfatázy jsme do buněčné linie HEK293 transfekovali plasmidy kódující SHIP1 fosfatázu, kinázu HCK a jednotlivé formy proteinu PSTPIP2 v poměru 1:1:1. Tyto buňky jsme lyzovali pomocí neiontového detergentu lauryl maltosid, který zachovává vzájemné interakce mezi proteiny. Z tohoto lyzátu jsme imunoprecipitovali PSTPIP2 pomocí anti-FLAG protilátky. Afinity značka FLAG byla součástí proteinů PSTPIP2 kódovaných našimi plasmidy (viz použité plasmidy). Vzniklé vzorky jsme analyzovali metodou SDS-PAGE a western blot. Každý vzorek jsme nanесли na 2 membrány, z nichž jednu jsme značili pomocí anti-SHIP1 protilátky a druhou pomocí 4G10 protilátky a následně pomocí anti-PSTPIP2 protilátky. Pokud fosforylovaný PSTPIP2 interaguje s SHIP1, měli bychom ve vzorku detekovat SHIP1, která by byla koimunoprecipitována společně s fosforylovaným PSTPIP2. Značení protilátkou 4G10 a anti-PSTPIP2 nám sloužilo jako kontrola fosforylace PSTPIP2 a přítomnosti nefosforylovaného PSTPIP2. Pro tyto experimenty jsme transfekovali buňky linie HEK293 inkubované v destičce obsahující 6 jamek, abychom zvýšili výtěžek imunoprecipitace. Také jsme zvětšili objem vzorku naneseného na SDS-PAGE. Značení protilátkami 4G10 a anti-PSTPIP2 ukázalo, že se podařilo úspěšně imunoprecipitovat PSTPIP2 a zachovat jeho fosforylaci v průběhu experimentu. Při značení frakce lyzátu pomocí protilátky 4G10 jsme si

také všimli, že SHIP1 byla v našem systému fosforylována (viz obrázek 7). Prostřednictvím značení protilátkou anti-SHIP1 jsme dokázali, že fosforylovaný WT PSTPIP2 interaguje s fosfatázou SHIP1 (viz obrázek 8). Absence vazby SHIP1 na nefosforylovaný WT PSTPIP2 a PSTPIP2 Y3F ukazuje, že fosforylace C-koncových tyrosinů je nepostradatelnou podmínkou pro tuto interakci. Dokázali jsme ještě pozorovat slabou vazbu SHIP1 při imunoprecipitaci fosforylovaných mutantů PSTPIP2 Y323F a PSTPIP2 Y329,333F, zatímco při imunoprecipitaci fosforylovaných mutantů PSTPIP2 Y329,333F, PSTPIP2 S324\* a PSTPIP2 Y323,329F byl signál téměř úplně ztracen (viz obrázek 7 a 8). Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že SHIP1 asociuje s PSTPIP2 pomocí fosfotyrosinových motivů v okolí tyrosinů na pozicích 323 a 329 a že tyrosin na pozici 329 je pravděpodobně pro tuto vazbu významnější. To potvrzuje i výsledek s dodatečně vytvořeným konstruktem PSTPIP2 Y323,333F, kde vazba SHIP1 zůstala téměř úplně zachována. V souladu s tím je i pozorování, že interakce PSTPIP2 Y323,329F s SHIP1 je téměř eliminována a PSTPIP2 Y323F si zachovává schopnost vázat SHIP1. Tuto možnost také favorizuje sekvence vytvářející tento motiv, která je téměř identická s publikovanou konsensus vazebnou sekvencí pro SH2 doménu SHIP1 fosfatázy<sup>103,211,212</sup>.

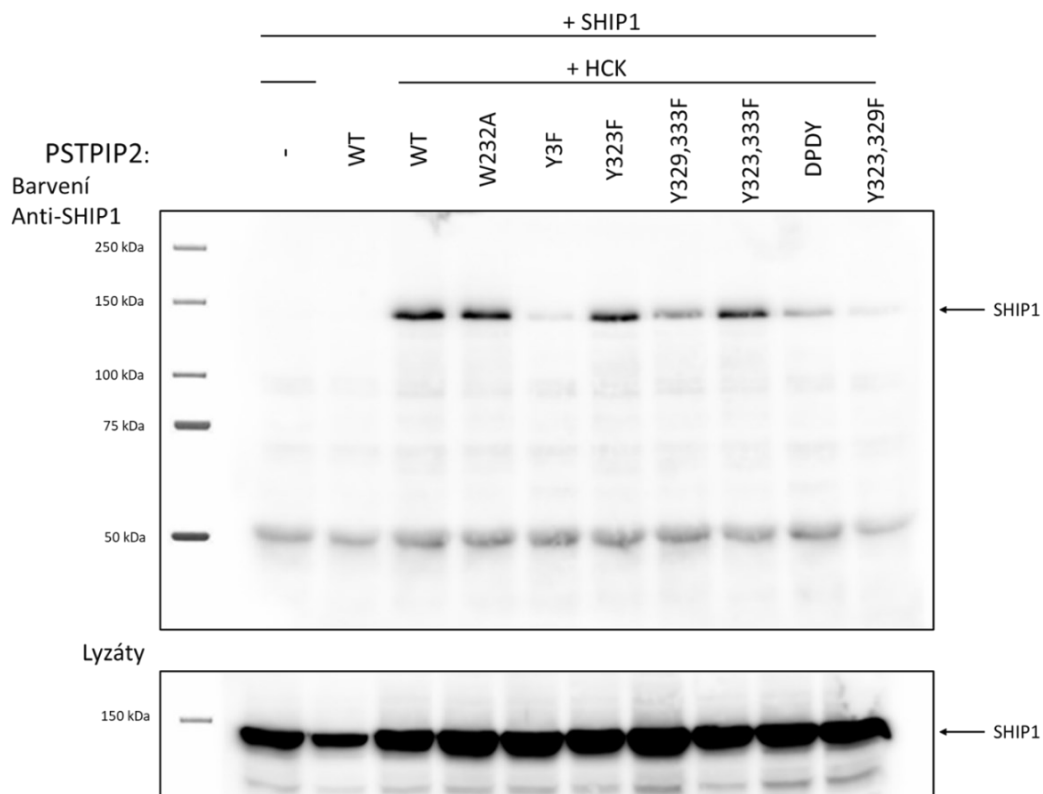
Intenzitu obdrženého signálu ze značení pomocí anti-SHIP1 protilátky jsme kvantifikovali v programu „AIDA Image Analyzer“ a statisticky vyhodnotili pomocí stejného postupu, který jsme použili pro analýzu fosforylace mutantních verzí PSTPIP2 (viz výše). Výsledky této analýzy nám ukázaly, že vazba SHIP1 na WT PSTPIP2, PSTPIP W232A, PSTPIP2 Y323F a PSTPIP2 Y323,333F dosáhla hladiny statistické významnosti. Vazba SHIP1 na tyto mutantní formy PSTPIP2 se signifikantně nelišila od vazby SHIP1 na WT PSTPIP2. V případě PSTPIP2 Y329,333F jsme dokázali detekovat signifikantní interakci s SHIP1. Ta byla ale signifikantně slabší než interakce SHIP1 s WT PSTPIP2. Zbylé mutantní formy PSTPIP2 neprokázaly statisticky významnou schopnost interagovat s SHIP1 (viz obrázek 9). Tyto výsledky jsou v souladu s naší hypotézou, že tyrosin na pozici 329 je součástí hlavního interakčního motivu pro interakci s SHIP1. Mutace tohoto tyrosinu má totiž nejvýznamnější vliv na interakci PSTPIP2 s SHIP1. Podle našich výsledků by tyrosin na pozici 323 mohl vytvářet alternativní motiv pro tuto interakci. PSTPIP2 Y329,333F si totiž v omezené míře zachoval schopnost vázat SHIP1. Dále naše výsledky ukazují, že tyrosin na pozici 333 nemá vliv na interakci PSTPIP2 s SHIP1.





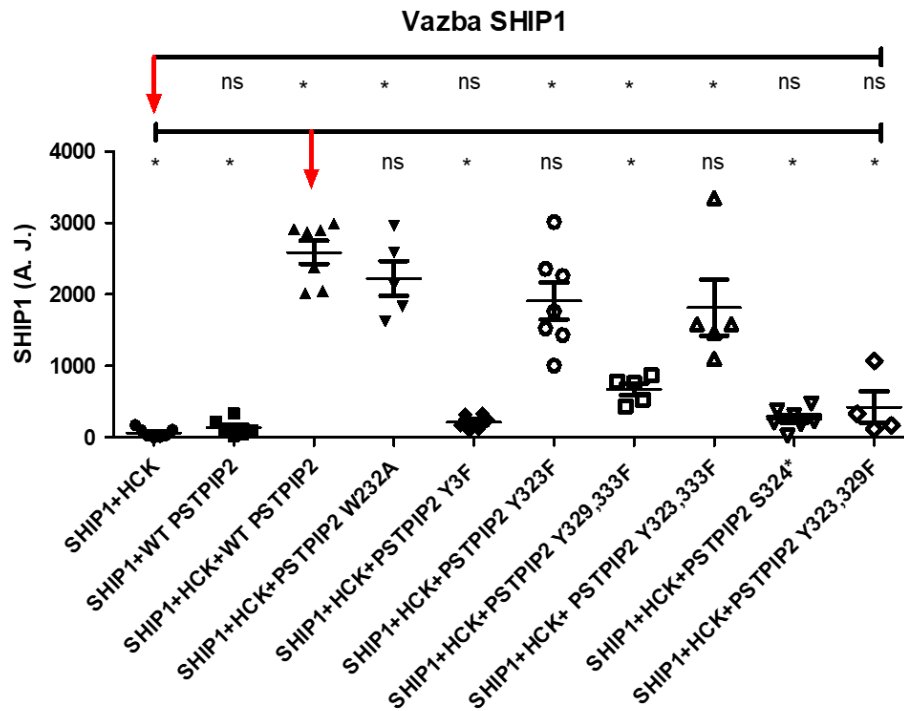
### Obrázek 7: Imunoprecipace PSTPIP2

Z transfekovaných buněk linie HEK293 jsme imunoprecipitovali PSTPIP2 pomocí anti-FLAG protilátky a imunoprecipitovanou frakci a frakci lyzátů jsme analyzovali metodou western blot. a) Membránu s imunoprecipitovanou frakcí jsme značili pomocí protilátky 4G10 (expoziční doba 4 s) a poté pomocí anti-PSTPIP2 (expoziční doba 15 s). Při značení anti-PSTPIP2 protilátkou jsme z obrázku membrány vyřízli část gelu obsahující PSTPIP2. b) Membránu s frakcí lyzátů jsme značili pomocí protilátky 4G10 (expoziční doba 4 s). Z obrázku membrány obsahující buněčné lyzáty jsme vyřízli pouze relevantní části gelu.



**Obrázek 8: Interakce SHIP1 fosfatázy s mutantními formami proteinu PSTPIP2.**

Z transfekovaných buněk linie HEK293 jsme imunoprecipitovali PSTPIP2 pomocí anti-FLAG protilátky a imunoprecipitovanou frakci a frakci lyzátů jsme analyzovali metodou western blot. Vytvořené membrány jsme značili pomocí anti-SHIP1 protilátky. Z obrázku membrány obsahující buněčné lyzáty jsme vyřizli pouze relevantní části gelu (Expozice – 90 s).



**Obrázek 9: Kvantifikace interakce SHIP1 fosfatázy s mutantními formami proteinu PSTPIP2.**

Intenzitu signálu ze značení protilátkou anti-SHIP1 jsme kvantifikovali v programu „AIDA Image Analyzer“. Obdržené hodnoty jsme vyhodnotili pomocí statistického testu jednosměrná ANOVA. *Post hoc* jsme provedli t testy porovnávající interakci PSTPIP2 s SHIP1 ve vzorcích označných červenou šipkou s ostatními vzorky. Hladina statistické významnosti byla upravena pomocí Bonferroniho metody zohledňující mnohočetná porovnávání. Analýzu jsme vypracovali ze sedmi opakování. Z analýzy jsme vyřadili vzorky, u kterých došlo k chybě v transfekci. A. J. = arbitrární jednotky.

## 6 Diskuze

V této práci jsme se snažili detailněji sledovat fosforylaci PSTPIP2 a interakci tohoto proteinu s fosfatázou SHIP1. Pro tento úkol jsme použili *in vitro* expresní systém využívající transfekci plasmidů transfekčním činidlem „Lipofectamin 2000“ do buněčné linie HEK293 a následnou izolaci proteinů z transfekovaných buněk. Jedná se vlastně o určitou buněčnou modifikaci *in vitro* kinázového testu. Tato metoda má několik výhod. Jednou z nich je jednoduchá kultivace a transfekce buněk HEK293. Transfekce indukuje v těchto buňkách nadměrnou expresi daných proteinů, při které se transfekované kinázy autofosforylují a aktivují i bez působení stimulačního agens, které by bylo nutné použít při práci s primárními buňkami. Nadměrná exprese také umožňuje pracovat s menším množstvím buněk, než by bylo potřeba pro experimenty s primárními buňkami, a zanedbat možnou fosforylaci PSTPIP2 endogenními kinázami, jejichž množství je menší než množství transfekované kinázy. V našich experimentech jsme nepozorovali fosforylaci PSTPIP2 endogenními kinázami. Kinázová reakce pak probíhá v ideálním prostředí buněčné cytoplazmy. Nevýhodou této metody je naopak, že se jedná o umělý *in vitro* systém, který může být náchylný k artefaktům a falešným výsledkům. V průběhu naší práce nám tento postup poskytoval konzistentní kvalitativní výsledky. Ovšem při kvantifikaci našich výsledků jsme zjistili, že naše data mají velký rozptyl, který komplikoval statistickou analýzu.

V první části této práce jsme se snažili určit, které kinázy fosforylují PSTPIP2. Jako testované kinázy jsme zvolili HCK, FGR, LYN, SYK, BTK, BMX a PYK2. Jde o kinázy, jejichž exprese byla zaznamenána v myších neutrofilech a až na kinázu FGR jsme v naší laboratoři měli dostupné plasmidy, které je kódují. Plasmid kódující kinázu FGR byl vytvořen v pozdější části experimentu. Pomocí našich transfekčních experimentů jsme zjistili, že PSTPIP2 může být fosforylován kinázami HCK, FGR a LYN z rodiny SRC (viz obrázek 2). Naopak zbylé kinázy PSTPIP2 fosforylovat nedokáží. V několika experimentech jsme se pokusili detekovat případnou fosforylaci PSTPIP2 pomocí kinázy CSK, která je interakčním partnerem tohoto proteinu<sup>6</sup>. V těchto experimentech jsme nepozorovali fosforylaci PSTPIP2 pomocí kinázy CSK. CSK se však neautofosforyluje a specifickou protilátkou proti CSK jsme k dispozici neměli. Tudíž jsme nebyli schopni prokázat expresi této kinázy v našem systému a rozhodli jsme ji nepoužít v dalších transfekcích. Kvantifikovali jsme intenzitu signálu značení protilátkou proti fosforylovaným tyrosinům na PVDF membráně v pozici proteinu PSTPIP2 a statisticky vyhodnotili zvýšení signálu v této oblasti, které odpovídalo jeho fosforylaci pomocí párového t testu. V tomto testu dosáhla fosforylace PSTPIP2 kinázami

HCK, FGR a LYN hladiny statistické významnosti (viz obrázek 3 a – c). Z našich výsledků tedy vyplývá, že HCK, FGR a LYN jsou kinázy schopné fosforylovat PSTPIP2 *in vitro*. To je v souladu se studií, která pozorovala fosforylaci PSTPIP2 *in vitro* při transfekci s kinázou V-SRC<sup>58</sup>. Na první pohled se může zdát, že naše výsledky jsou v rozporu se studiemi popisujícími fenotyp myši s “gain of function“ mutací v genu kódující, kinázu FGR, které vyvíjejí autoinflamatorní onemocnění, které je podobné nemoci myši kmene CMO<sup>216–218</sup>. Podle našich výsledků FGR zprostředkovává fosforylaci PSTPIP2, která by měla podporovat protizánětlivé aktivity tohoto proteinu (viz obrázek 2 a 3). Ovšem FGR a další kinázy z rodiny SRC se podílí i na signálních kaskádách vedoucích k aktivaci prozánětlivých efektorových mechanismů imunitních buněk (viz přehled literatury), jejichž regulace může být narušena popsanou mutací.

Kinázy HCK, FGR a LYN by mohly být navzájem redundantní ve fosforylaci PSTPIP2. Pro ověření našich výsledků v *in vivo* podmínkách by nejspíše bylo nutné provést podobný experiment na myších buňkách. Provedení těchto experimentů je ovšem náročné. Vzhledem tomu, že v neutrofilech jsou exprimovány všechny tři tyto kinázy<sup>215</sup>, bylo by nutné použít myší kmene s mutací v genech kódujících jednotlivé kinázy nebo s mutacemi ve dvojicích a trojici genů kódujících tyto kinázy. Dále by tento experiment vyžadoval větší množství buněk, na které by se muselo působit stimulačními agens, jako například kombinací LPS a částic oxidu křemičitého aktivující maturaci IL-1 $\beta$ <sup>6,37</sup>. Experiment zkoumající obecnou schopnost kináz z rodiny SRC fosforylovat PSTPIP2 by byl jednodušší, protože by bylo možné použít jeden z relativně širokospektrých inhibitorů kináz z rodiny SRC nebo analyzovat neutrofile z myšího kmene s delecí všech tří těchto kináz (viz literární přehled).

Naším druhým cílem bylo otestovat, které C-koncové tyrosiny proteinu PSTPIP2 jsou opravdu fosforylovány. V jedné ze starších studií byl učiněn závěr, že hlavní fosforylované tyrosiny proteinu PSTPIP2 jsou tyrosiny na pozicích 323 a 333. Ovšem PSTPIP2 s mutací tyrosinů na pozicích 323 a 333 byl v této studii stále ještě fosforylován při transfekci s kinázou V-SRC<sup>58</sup>. V jednom z článků z naší laboratoře bylo popsáno, že mutace všech tří C-koncových tyrosinů znemožní fosforylovat PSTPIP2 *in vitro* v buněčné linii J774 stimulované pomocí M-CSF<sup>6</sup>. M-CSF je jedním z cytokinů, které způsobují fosforylaci PSTPIP2 v makrofázích<sup>6,59</sup>. Pro testování fosforylace jednotlivých tyrosinů proteinu PSTPIP2 jsme do transfekcí zahrnuli set plasmidů kódujících mutantní formy PSTPIP2. Část z těchto plasmidů byla vytvořena naším bývalým kolegou Dr. Alešem Drobkem. Konkrétně se jedná o plasmidy kódující PSTPIP2 W232A, PSTPIP2 Y3F, PSTPIP2 Y323F a PSTPIP2

Y329,333F. Během naší práce jsme vytvořili další 4 nové plasmidy kódující kinázu FGR, PSTPIP2 S324\*, PSTPIP2 Y323,329F a PSTPIP2 Y323,333F. Trojici plasmidů kódujících FGR, PSTPIP2 S324\* a PSTPIP2 Y323,329F jsme vytvořili hned po otestování fosforylace již připravených plasmidů. Plasmid kódující PSTPIP2 Y323,333F byl vytvořen až v poslední části projektu (viz níže). Postup přípravy plasmidů jsme museli víckrát opakovat, pro technické problémy s ligačními reakcemi a nechtěné vnesení dalších mutací, které změnilly aminokyselinovou sekvenci PSTPIP2. Přípravu všech čtyř plasmidů se ale nakonec podařilo dokončit.

V dalších experimentech jsme tedy transfekovali plasmidy kódující mutantní formy PSTPIP2 společně s kinázou HCK, FGR nebo LYN. Tyto pokusy ukázaly, že HCK je z C-koncových tyrosinů PSTPIP2 schopná fosforylovat tyrosiny na pozicích 323 a 329. Slabá fosforylace PSTPIP2 Y323,329F, kde byl zachován pouze tyrosin na pozici 333, byla v některých experimentech také pozorovatelná, ale nepřekročila hladinu statistické významnosti. Při obráceném přístupu k analýze, kde jsme testovali, zda mutace v C-koncových tyrosinech snižují fosforylaci, PSTPIP2 jsme zjistili, že tuto fosforylaci signifikantně snížily pouze mutace ovlivňující zároveň oba motivy splňující požadavky pro vazbu SH2 domény SHIP1 (motivы zahrnující tyrosiny na pozicích 323 a 329). Jednoduchá mutace Y323F a kombinace Y323,333F a Y329,333F naopak fosforylaci signifikantně nesnižily. Tyto konstrukty jsou podobné v tom, že vždy obsahují jeden funkční konsensus motiv pro vazbu SHIP1, který zřejmě zvýšil fosforylaci PSTPIP2, zatímco tyrosin na pozici 333 tuto fosforylaci téměř neovlivňuje. Výsledek mohl být částečně ovlivněn i vyšším rozptylem naměřených hodnot (PSTPIP2 Y323F, PSTPIP2 Y329,333F) nebo nižším počtem opakování (PSTPIP2 Y323,333F), které také mohly přispět k tomu, že hodnota p nepřekročila hladinu statistické významnosti.

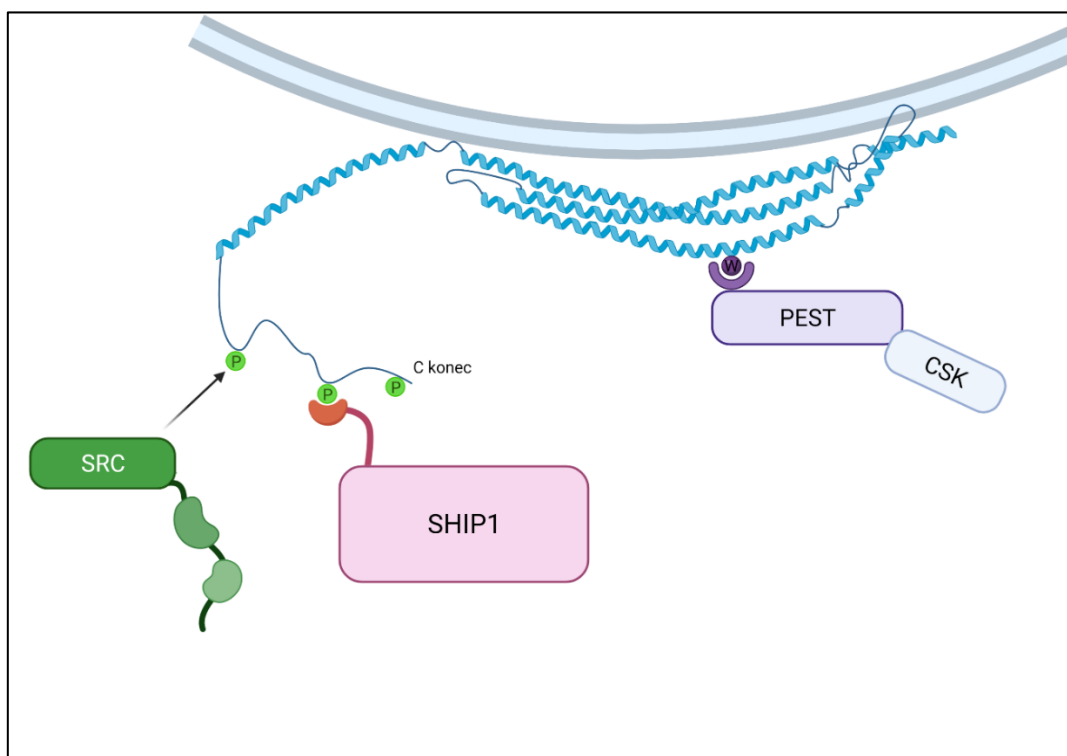
Mutace vazebného místa pro fosfatázy z rodiny PEST neměla na fosforylaci proteinu PSTPIP2 vliv (viz obrázek 5). Tento výsledek je v souladu se starší studií z naší laboratoře, kde též nebyl pozorován vliv mutace W232A na fosforylaci PSTPIP2 při stimulaci buněčné linie J774 pomocí M-CSF *in vitro*<sup>6</sup>. Na základě našich experimentů v HEK293 však nemůžeme učinit jednoznačný závěr, že fosfatázy z rodiny PEST asociované s proteinem PSTPIP2 nehydrolizují fosforylované C-koncové tyrosiny tohoto proteinu, protože v našich experimentech jsme netransfekovali plasmidy kódující fosfatázy z této rodiny. Expresi endogenních fosfatáz z rodiny PEST jsme v buňkách HEK293 netestovali, ale velmi pravděpodobně je podstatně nižší než exprese našich konstruktů. Naše Experimenty

zkoumající fosforylaci mutantních forem proteinu PSTPIP2 pomocí kinázy FGR nebo LYN nám bohužel nedávaly konzistentní výsledky. U kinázy FGR se nám v malém počtu opakování podařilo detekovat fosforylaci PSTPIP2 mutantů. Fosforylace byla ovšem slabá a v různých opakováních jsme detekovali fosforylaci rozdílných kombinací mutantních forem proteinu PSTPIP2. V průběhu projektu se nám také stalo, že kináza LYN přestala fosforylovat WT PSTPIP2. Proto jsme připravili nový roztok tohoto plasmidu. Tímto zásahem jsme obnovili funkčnost našeho plasmidu kódujícího LYN a schopnost této kinázy fosforylovat WT PSTPIP2. V případě kinázy LYN se nám ovšem podařilo detekovat fosforylaci mutantních forem PSTPIP2 pouze jednou na konci projektu. Nepodařilo se nám zjistit, co je příčinou nekonzistentních výsledků experimentů s těmito kinázami. Konzistentně silná fosforylace kinázou HCK a relativně slabá a v případě mutantních forem PSTPIP2 i špatně reprodukovatelná fosforylace kinázami FGR a LYN naznačují, že HCK je hlavní kinázou zodpovědnou za fosforylaci PSTPIP2.

V poslední části našeho projektu jsme zkoumali vazbu SHIP1 na PSTPIP2 s mutacemi v C-koncových tyrosinech. Pro imunoprecipitaci jsme použili protilátku proti afinitní značce FLAG, která je součástí PSTPIP2 kódovaného našimi plasmidy. V některých našich experimentech jsme si totiž všimli, že dokážeme detekovat endogenní PSTPIP2, jehož exprese v buněčné linii HEK293 nám byla dříve neznámá. Použitím anti-FLAG protilátky můžeme snížit riziko imunoprecipitace endogenního PSTPIP2, který by ovlivnil naše výsledky. Jedinou možností, jak bychom pomocí této protilátky dokázali imunoprecipitovat endogenní PSTPIP2 je, že by endogenní PSTPIP2 dimerizoval s transfekovaným PSTPIP2. Naše hypotéza byla, že pro vazbu SHIP1 fosfatázy jsou důležité hlavně motivy kolem tyrosinů na pozicích 323 a 329. Naopak vazbu pomocí tyrosinu na pozici 333 jsme považovali za nepravděpodobnou, protože jako předposlední aminokyselina proteinu PSTPIP2 postrádá důležité hydrofobní aminokyseliny na pozicích +2 a +3 od tohoto tyrosinu, které se podílí na vytvoření vazebného motivu<sup>103,211,212</sup>. Naopak tyrosiny na pozicích 323 a 329 mají potřebné hydrofobní aminokyseliny. Pomocí imunoprecipitace transfekovaného PSTPIP2 se nám dařilo detekovat vazbu SHIP1 na WT PSTPIP2, ale pouze když byl do buněk transfekován společně s kinázou HCK, která fosforylovala jeho C-koncové tyrosiny (viz obrázek 8). Kontrolním značením frakce lyzátů pomocí 4G10 protilátky jsme také zjistili, že SHIP1 byla v našem systému fosforylována (viz obrázek 7). PSTPIP2 W232A, který je fosforylován se stejnou intenzitou jako WT PSTPIP2, si zachoval svou schopnost interagovat s SHIP1. Společnou

vlastností konstruktů, které významně snížily vazbu SHIP1 byla přítomnost mutace Y329F (viz obrázek 9).

Z těchto výsledků tedy vyplývá, že tyrosin na pozici 329 je pravděpodobně nejdůležitější pro asociaci PSTPIP2 s SHIP1. Pokud se podíváme na sekvenci v okolí tohoto tyrosinu, tak zjistíme, velice dobře splňuje popsané požadavky pro interakci s SH2 doménou SHIP1 fosfatázy<sup>103,211,212</sup>. Motiv v okolí tohoto tyrosinu se také velice podobá fosfotyrosinovému motivu receptoru FcγRIIB u kterého byla asociace s SHIP1 detailně popsána<sup>98</sup>. V obou těchto sekvencích je fosforylovaný tyrosin následován aminokyselinou serin a pak dvojicí leucinů. Tyrosin na pozici 323 se však na vazbě SHIP1 také podílí. Dokládá to naše pozorování, kde PSTPIP2 Y329,333F, kde jediným funkčním C-koncovým tyrosinem byl právě tento tyrosin, byl stále schopen interagovat s SHIP1. Naopak u konstruktu PSTPIP2 Y323,329F, kde tyrosin na pozici 333 byl jediným funkčním tyrosinem, jsme významnou vazbu SHIP1 nepozorovali.



**Obrázek 10: Schématické znázornění Proteinu PSTPIP2 a mechanismus interakce s jeho vazebnými partnery. (Vytvořeno v internetovém nástroji [www.biorender.com](http://www.biorender.com))**



Stimul, receptor ani signální dráha, které iniciují a pohání patologii CMO myši a které by protein PSTPIP2 reguloval nebyly dosud přesně identifikovány. Pozorovaný vliv mikrobioty a širokospektrálních antibiotik na vývoj onemocnění CMO myši poukazuje na možnost, že se může jednat o prozánětlivý produkt komenzálních mikroorganismů, jehož signální dráha může být dysregulována v CMO myších<sup>4</sup>. Výsledky nových studií ukazují, že důležitou součástí této neobjevené signální dráhy jsou kinázy rodiny SRC a kináza SYK, která aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B a expresi pro-IL-1 $\beta$ <sup>9,37</sup>. Naše výsledky ukazují, že kinázy rodiny SRC fosforylují C-koncové tyrosiny proteinu PSTPIP2 a umožňují tak jeho interakci s SHIP1 fosfatázou, která částečně zprostředkovává funkce tohoto proteinu. Při aktivaci signální dráhy pohánějící patologii CMO myši by se kinázy z rodiny SRC, vedle aktivace kinázy SYK a transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, mohly podílet i na fosforylaci PSTPIP2. Tímto mechanismem by kinázy rodiny SRC iniciovaly paralelní signální kaskádu závislou na PSTPIP2, která by nastavovala práh pro aktivaci neutrofilů a zpětně by regulovala prozánětlivou signalizaci kinázy SYK vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B. Nadstavbou této regulační by mohla být i fosforylace inhibičního tyrosinu kináz z rodiny SRC pomocí kinázy CSK a tím pádem zpětná inhibice aktivity těchto kináz. CSK je totiž další interakční partner proteinu PSTPIP2. Interakce těchto proteinů je zesílena při stimulaci buněčné linie J774 pomocí M-CSF *in vitro*, kdy dochází i k fosforylaci PSTPIP2<sup>6</sup>. Publikované výsledky z naší laboratoře ovšem nenaznačují, že by PSTPIP2 měl vliv na celkový fosforylační stav kináz z rodiny SRC v buňce<sup>37</sup>. Teoreticky ale může ovlivňovat relativně malou specifickou populaci těchto kináz, která nepřispívá ke globální fosforylaci těchto kináz detekované na úrovni celé buňky.

Vzhledem k tomu, že PSTPIP2 nemá vlastní enzymatickou aktivitu, je jeho protizánětlivá funkce závislá na jeho schopnosti interagovat se svými vazebnými partnery. Už částečné narušení signalizace PSTPIP2, pomocí mutace znemožňující interakci s jeho vazebnými partnery, dokáže způsobit detekovatelné změny v buňkách exprimujících mutantní PSTPIP2. Mutace ve vazebném motivu pro SHIP1 nebo ve vazebném motivu pro fosfatázy z rodiny PEST dokáží poškodit schopnost proteinu PSTPIP2 regulovat tvorbu reaktivních kyslíkatých sloučenin, produkci IL-1 $\beta$  a diferenciaci megakaryocytů a osteoklastů<sup>6,7,10,11</sup>. V budoucnosti bude zajímavé studovat fenotyp myších kmenů s mutacemi v genu kódujícím PSTPIP2, které selektivně naruší interakce jen s některými vazebnými partnery. V naší laboratoři vlastníme několik těchto myších mutantů, které nám v budoucnosti pomohou lépe pochopit fungování proteinu PSTPIP2, jeho roli v regulaci buněk imunitního systému

a mechanismy podmiňující patologii chronické multifokální osteomyelitidy a autoinflamatorních onemocnění.

Fenotyp CMO vykazuje některé podobnosti s fenotypem SHIP1-deficientních myší. Oba myší kmeny vyvíjí onemocnění zprostředkované imunitním systémem. CMO i SHIP1-deficientní myši trpí osteolytickým poškozením kostí se zvýšeným množstvím osteoklastů v postižených oblastech<sup>10,143</sup>. Při *ex vivo* diferenciaci makrofágů kostní dřeně na osteoklasty byly SHIP1-deficientní buňky citlivější na cytokin M-CSF a ochotněji diferencovaly na osteoklasty už při nízkých koncentracích tohoto cytokinu v médiu<sup>143</sup>. PSTPIP2 negativně reguluje diferenciaci osteoklastů a tato funkce je alespoň částečně závislá na jeho schopnosti interagovat s SHIP1<sup>10</sup>. SHIP1 byla také identifikována jako negativní regulátor diferenciaci osteoklastů, jejich životnosti a jejich osteolytické aktivity. Dalším společným rysem onemocnění CMO myší a SHIP1-deficientních myší je nadměrná akumulace myeloidních buněk. SHIP1-deficientní myši trpí infiltrací myeloidních buněk do několika orgánů včetně plic, střeva a ledvin<sup>118,137,140,144,145,153</sup>. Zvýšené množství nebo procentuální zastoupení myeloidní buněk bylo u těchto myší dále pozorováno v kostní dřeni, ve slezině a v krvi<sup>118,137,140</sup>. U CMO myší byla pozorována splenomegalie spojená se zvýšeným množstvím progenitorů makrofágů ve slezině a zvýšené množství prekurzorů monocytů v kostní dřeni. Makrofágy ze sleziny a z kostní dřeně CMO myší také vykazovaly zvýšenou proliferaci při *ex vivo* kultivaci s M-CSF. V experimentech z naší laboratoře byla také pozorována zvýšená aktivace kinázy AKT při absenci PSTPIP2<sup>6</sup>. U SHIP1 byl také zdokumentován negativní vliv na aktivaci této kinázy<sup>105,106,117,118</sup>. Jedna studie dokonce pozorovala negativní vliv SHIP1 fosfatázy na aktivitu kinázy AKT při stimulaci buněk linie THP-1 nebo SHIP1-deficientních myších makrofágů cytokinem M-CSF<sup>155</sup>. Tyto výsledky společně s popsanou interakcí PSTPIP2 s SHIP1 (viz obrázek a 8, 9 a 6) jsou v souladu se studii, které ukázaly poškození funkce PSTPIP2 při znemožnění jeho interakce s SHIP1 nebo při inhibici SHIP1<sup>6,7,10,11</sup>. Můžeme tedy pozorovat určitou spolupráci proteinů PSTPIP2 a SHIP1 na regulaci signálních drah, které jsou důležité pro fyziologické funkce těchto proteinů. Vzhledem k tomu, že PSTPIP2 obsahuje F-BAR doménu se schopností interagovat s membránou, PSTPIP2 může sloužit jako prostředník, který bude rekrutovat fosfatázu SHIP1 k membráně, kde může uplatňovat svou funkci.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo detailněji popsat fosforylaci adaptorového proteinu PSTPIP2 a vliv této fosforylace na interakci s SHIP1. Absence PSTPIP2 je důvodem autoinflamatorního onemocnění chronická multifokální osteomyelitida myšního kmene CMO, který se používá jako model pro výzkum lidského autoinflamatorního onemocnění chronická rekurentní multifokální osteomyelitida. Fosforylace PSTPIP2 a jeho interakce s fosfatázou SHIP1 byla zkoumána pomocí kotransfekce plasmidů kódujících PSTPIP2, jeho mutantní formy, vybrané tyrosin kinázy exprimované v neutrofilech a lipidovou fosfatázu SHIP1 do buněčné linie HEK293. Součástí této práce bylo i vytváření nových plasmidů, které byly zahrnuty do našich transfekčních experimentů. Celkem byly vytvořeny 4 plasmidy kódující myší kinázu FGR, PSTPIP2 Y323,333F, PSTPIP2 S324\* a PSTPIP2 Y323,329F. Zbylé plasmidy byly obdrženy z plasmidové knihovny naší laboratoře.

V první části této práce jsme chtěli určit, které konkrétní kinázy exprimované v neutrofilech dokáží fosforylovat PSPTIP2 v našem *in vitro* systému. K tomuto účelu jsme do buněk linie HEK293 transfekovali kinázy HCK, FGR, LYN, SYK, BTK, BMX a PYK2. Tyto kinázy jsme transfekovali samostatně nebo společně s WT PSTPIP2. fosforylace PSTPIP2 byla pak detekována pomocí western blotu.

- Z těchto kináz WT PSTPIP2 fosforylovaly HCK, FGR a LYN. Toto zjištění je v souladu s předešlou studií zkoumající protein PSTPIP2 včetně jeho fosforylace kinázou V-SRC<sup>58</sup>.
- Kinázy SYK, BTK, BMX a PYK2 nedokázaly v našem *in vitro* systému fosforylovat WT PSTPIP2. Nepozorovali jsme ani fosforylaci WT PSTPIP2 pomocí endogenních kináz exprimovaných v buněčné linii HEK293.

V druhé části této práce jsme chtěli zjistit, které konkrétní tyrosiny z C-koncové trojice tyrosinů proteinu PSTPIP2 jsou skutečně fosforylovány. Tímto jsme chtěli navázat na dříve publikovanou studii, která navrhla, že tyrosiny na pozicích jsou 323 a 333 v sekvenci proteinu PSTPIP2 jsou fosforylovány<sup>58</sup>. Pro zkoumání fosforylace jednotlivých C-koncových tyrosinů proteinu PSTPIP2 jsme do buněčné linie HEK293 transfekovali verze proteinu PSTPIP2, které nesly mutace v C-koncových tyrosinech, společně s kinázou HCK, která během projektu poskytovala nejvíce konzistentní výsledky. Fosforylaci mutantních verzí proteinu PSTPIP2 jsme detekovali pomocí western blotu.

- Zjistili jsme, že hlavními fosforylačními místy jsou tyrosiny na pozicích 323 a 329.
- Mutantní verze proteinu PSTPIP2 s mutací ve vazebném motivu pro fosfatázy z rodiny PEST byla fosforylována stejně jako WT PSTPIP2.

V poslední části této práce jsme chtěli zjistit, který fosfotyrosinový motiv na C konci PSTPIP2 je nejdůležitější pro jeho vazbu s fosfatázou SHIP1. K tomuto účelu jsme do buněk linie HEK293 transfekovali naše mutantní verze proteinu PSTPIP2 společně s kinázou HCK a SHIP1. Zároveň jsme zvýšili počet transfekovaných buněk a testovali vazbu SHIP1 fosfatázy na PSTPIP2 pomocí imunoprecipitace transfekovaného PSTPIP2 v přítomnosti neiontového detergentu.

- Pro indukci interakce s SHIP1 musel být PSTPIP2 fosforylován. SHIP1 se nedokázala vázat na nefosforylovaný protein PSTPIP2 nebo na proteinu PSTPIP2, který měl mutované všechny C-koncové tyrosiny. Mutace vazebného motivu pro vazbu fosfatáz z rodiny PEST neměla vliv na interakci s SHIP1.
- Mutace tyrosinu na pozici 329 v sekvenci proteinu PSTPIP2 měla nejvíce poškozující vliv na tuto interakci s SHIP1. Menší podíl na této interakci má i tyrosin na pozici 323.

Na začátku tohoto projektu mezi naše vytyčené cíle patřily i experimenty na primárních neutrofilech z myších kmenů nesoucích alelu kódující PSTPIP2 s mutacemi v C-koncové sekvenci. V primárních neutrofilech z těchto myší jsme chtěli zopakovat imunoprecipitaci PSTPIP2. Dále jsme chtěli analyzovat vybrané signální kaskády a určit, jak budou ovlivněny mutacemi na C konci PSTPIP2. Bohužel v průběhu naší práce nás zdrželo několik faktorů, kvůli kterým jsme od tohoto cíle nakonec upustili. Jak bylo zmíněno v diskuzi, během našich experimentů jsme museli vytvářet nové plasmidy, jejichž tvorba vyžadovala více pokusů. Další technické problémy způsobila nestabilita roztoků s plazmidy a nestabilita transfekčního činidla. To vše si vyžádalo řadu neplánovaných prací a větší množství opakování jednotlivých experimentů. Oproti očekávání byla časově náročnější také optimalizace imunoprecipitace PSTPIP2.

Z výsledků této práce vyplývá, že za fosforylaci proteinu PSTPIP2 pravděpodobně odpovídají kinázy z rodiny SRC. Všechny tři použité kinázy z této rodiny prokázaly v našich experimentech schopnost fosforylovat PSTPIP2 a jejich role ve fosforylaci tohoto proteinu může být vzájemně redundantní. Hlavními fosforylačními místy jsou tyrosiny na pozicích 323 a 329. Jejich fosforylace je kriticky důležitá pro vazbu SHIP1. Z našich výsledků vyplývá, že fosfotyrosinový motiv v okolí tyrosinu na pozici 329 je nejdůležitější pro tuto vazbu. Tato

práce připravila půdu pro budoucí experimenty zaměřené na studium signálních kaskád v myších neutrofilech, které jsou ovlivněny ztrátou interakce mezi PSTPIP2 a fosfatázou SHIP1 a na roli této interakce nebo její absence v patofyziologii chronické multifokální osteomyelitidy.

# Literatura

1. Ferguson, P. J. *et al.* A missense mutation in *pstpip2* is associated with the murine autoinflammatory disorder chronic multifocal osteomyelitis. *Bone* **38**, 41–47 (2006).
2. Chitu, V. *et al.* Primed innate immunity leads to autoinflammatory disease in PSTPIP2-deficient *cmo* mice. *Blood* **114**, 2497–2505 (2009).
3. Lukens, J. R. *et al.* Critical role for inflammasome-independent IL-1 $\beta$  production in osteomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1066–1071 (2014).
4. Lukens, J. R. *et al.* Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease. *Nature* **516**, 246–249 (2014).
5. Cassel, S. L. *et al.* Inflammasome-independent IL-1 $\beta$  mediates autoinflammatory disease in *Pstpip2*-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1072–1077 (2014).
6. Drobek, A. *et al.* PSTPIP2, a Protein Associated with Autoinflammatory Disease, Interacts with Inhibitory Enzymes SHIP1 and Csk. *J. Immunol.* **195**, 3416–3426 (2015).
7. Kralova, J. *et al.* Dysregulated NADPH Oxidase Promotes Bone Damage in Murine Model of Autoinflammatory Osteomyelitis. *J. Immunol.* **204**, 1607–1620 (2020).
8. Gurung, P., Burton, A. & Kanneganti, T. D. NLRP3 inflammasome plays a redundant role with caspase 8 to promote IL-1 $\beta$ -mediated osteomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4452–4457 (2016).
9. Dasari, T. K. *et al.* The nonreceptor tyrosine kinase SYK drives caspase-8/NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory osteomyelitis. *J. Biol. Chem.* **295**, 3394–3400 (2020).
10. Chitu, V. *et al.* PSTPIP2 deficiency in mice causes osteopenia and increased differentiation of multipotent myeloid precursors into osteoclasts. *Blood* **120**, 3126–3135 (2012).
11. Liu, L. *et al.* PSTPIP2 dysregulation contributes to aberrant terminal differentiation in GATA-1-deficient megakaryocytes by activating LYN. *Cell Death Dis.* **5**, e988 (2014).
12. Girschick, H. *et al.* The multifaceted presentation of chronic recurrent multifocal osteomyelitis: a series of 486 cases from the Eurofever international registry. *Rheumatology (Oxford)*. **57**, 1203–1211 (2018).
13. Jansson, A. *et al.* Classification of non-bacterial osteitis: Retrospective study of clinical, immunological and genetic aspects in 89 patients. *Rheumatology* **46**, 154–160 (2007).
14. Wipff, J. *et al.* A large national cohort of French patients with chronic recurrent multifocal osteitis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1128–1137 (2015).
15. Fritz, J., Tzaribatchev, N., Claussen, C. D., Carrino, J. A. & Horger, M. S. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis: Comparison of whole-body MR imaging with radiography and correlation with clinical and laboratory data. *Radiology* **252**, 842–851 (2009).
16. Beck, C. *et al.* Chronic nonbacterial osteomyelitis in childhood: Prospective follow-up

- during the first year of anti-inflammatory treatment. *Arthritis Res. Ther.* **12**, (2010).
17. Zhao, D. Y., McCann, L., Hahn, G. & Hedrich, C. M. Chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) and chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO). *J. Transl. Autoimmun.* **4**, (2021).
  18. Hofmann, S. R. *et al.* Chronic non-bacterial osteomyelitis is associated with impaired Sp1 signaling, reduced IL10 promoter phosphorylation, and reduced myeloid IL-10 expression. *Clin. Immunol.* **141**, 317–327 (2011).
  19. Hofmann, S. R. *et al.* Serum interleukin-6 and CCL11/eotaxin may be suitable biomarkers for the diagnosis of chronic nonbacterial osteomyelitis. *Front. Pediatr.* **5**, 1–11 (2017).
  20. Schnabel, A., Range, U., Hahn, G., Berner, R. & Hedrich, C. M. Treatment response and longterm outcomes in children with chronic nonbacterial osteomyelitis. *J. Rheumatol.* **44**, 1058–1065 (2017).
  21. Pardeo, M. *et al.* Anakinra in a cohort of children with chronic nonbacterial osteomyelitis. *J. Rheumatol.* **44**, 1231–1238 (2017).
  22. Hofmann, S. R. *et al.* Serum biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO). *Rheumatol. Int.* **36**, 769–779 (2016).
  23. Hofmann, S. R. *et al.* Altered expression of IL-10 family cytokines in monocytes from CRMO patients result in enhanced IL-1 $\beta$  expression and release. *Clin. Immunol.* **161**, 300–307 (2015).
  24. Hofmann, S. R. *et al.* Attenuated TLR4/MAPK signaling in monocytes from patients with CRMO results in impaired IL-10 expression. *Clin. Immunol.* **145**, 69–76 (2012).
  25. Scianaro, R. *et al.* Deregulation of the IL-1 $\beta$  axis in chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Pediatr. Rheumatol.* **12**, 1–6 (2014).
  26. Brandt, D. *et al.* CD14<sup>+</sup> monocytes contribute to inflammation in chronic nonbacterial osteomyelitis (CNO) through increased NLRP3 inflammasome expression. *Clin. Immunol.* **196**, 77–84 (2018).
  27. Greenhill, C. J. *et al.* Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 1–10 (2014).
  28. Byrd, L., Grossmann, M., Potter, M. & Shen-Ong, G. L. C. Chronic multifocal osteomyelitis, a new recessive mutation on Chromosome 18 of the mouse. *Genomics* **11**, 794–798 (1991).
  29. Hentunen, T. A. *et al.* A murine model of inflammatory bone disease. *Bone* **26**, 183–188 (2000).
  30. Grosse, J. *et al.* Mutation of mouse Mapp/Pstpip2 causes a macrophage autoinflammatory disease. *Blood* **107**, 3350–3358 (2006).
  31. Young, S. *et al.* Mast cells enhance sterile inflammation in chronic nonbacterial osteomyelitis. *DMM Dis. Model. Mech.* **12**, 1–9 (2019).
  32. Dinarello, C. A. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur. J. Immunol.*

- 40**, 599–606 (2010).
33. Black, R. A. *et al.* Generation of biologically active interleukin-1 $\beta$  by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J. Biol. Chem.* **263**, 9437–9442 (1988).
  34. Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768–774 (1992).
  35. McGuire, M. J., Lipsky, P. E. & Thiele, D. L. Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J. Biol. Chem.* **268**, 2458–2467 (1993).
  36. Korkmaz, B., Horwitz, M. S., Jenne, D. E. & Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev.* **62**, 726–759 (2010).
  37. Kralova, J. *et al.* The receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45 promotes onset and severity of IL-1 $\beta$ -mediated autoinflammatory osteomyelitis. *J. Biol. Chem.* **297**, 1–12 (2021).
  38. Thomas, M. L. & Brown, E. J. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol. Today* **20**, 406–411 (1999).
  39. Mc. A missense mutation in pstip2 is associated with the murine autoinflammatory disorder chronic multifocal osteomyelitis. *Bone* **23**, 1–7 (2006).
  40. Liao, H. J. *et al.* Increased neutrophil infiltration, IL-1 production and a SAPHO syndrome-like phenotype in PSTPIP2-deficient mice. *Rheumatol. (United Kingdom)* **54**, 1317–1326 (2015).
  41. Xu, J. J. *et al.* DNMT3a-mediated methylation of PSTPIP2 enhances inflammation in alcohol-induced liver injury via regulating STAT1 and NF- $\kappa$ B pathway. *Pharmacol. Res.* **177**, 106125 (2022).
  42. Yang, Y. *et al.* PSTPIP2 connects DNA methylation to macrophage polarization in CCL4-induced mouse model of hepatic fibrosis. *Oncogene* **37**, 6119–6135 (2018).
  43. Li, M., Xiao, Y. bo, Wang, X. tao, Zhuang, J. peng & Zhou, C. long. Proline-Serine-Threonine Phosphatase-Interacting Protein 2 Alleviates Diabetes Mellitus-Osteoarthritis in Rats through Attenuating Synovial Inflammation and Cartilage Injury. *Orthop. Surg.* **13**, 1398–1407 (2021).
  44. Yao, Y. *et al.* PSTPIP2 Inhibits the Inflammatory Response and Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes in vitro. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–12 (2018).
  45. Yao, Y. *et al.* PSTPIP2 attenuates joint damage and suppresses inflammation in adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **859**, 172558 (2019).
  46. Cloutier, J. F. & Veillette, A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50(csk) with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J.* **15**, 4909–4918 (1996).
  47. Davidson, D., Cloutier, J. F., Gregorieff, A. & Veillette, A. Inhibitory tyrosine protein kinase p50(csk) is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in



- hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 23455–23462 (1997).
48. Wang, B., Lemay, S., Tsai, S. & Veillette, A. SH2 Domain-Mediated Interaction of Inhibitory Protein Tyrosine Kinase Csk with Protein Tyrosine Phosphatase-HSCF. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1077–1088 (2001).
  49. Espada, J. & Martín-Pérez, J. An Update on Src Family of Nonreceptor Tyrosine Kinases Biology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **331**, 83–122 (2017).
  50. Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A. & Nakagawa, H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* **351**, 69–72 (1991).
  51. Bergman, M. *et al.* The human p50(csk) tyrosine kinase phosphorylates p56(lck) at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J.* **11**, 2919–2924 (1992).
  52. Cloutier, J. F. & Veillette, A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J. Exp. Med.* **189**, 111–121 (1999).
  53. Arimura, Y., Vang, T., Tautz, L., Williams, S. & Mustelin, T. TCR-induced downregulation of protein tyrosine phosphatase PEST augments secondary T cell responses. *Mol. Immunol.* **45**, 3074–3084 (2008).
  54. Lioubin, M. N. *et al.* p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev.* **10**, 1084–1095 (1996).
  55. Damen, J. E. *et al.* The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1689–1693 (1996).
  56. Kavanaugh, W. M. *et al.* Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr. Biol.* **6**, 438–445 (1996).
  57. Phee, H., Jacob, A. & Coggeshall, K. M. Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J. Biol. Chem.* **275**, 19090–19097 (2000).
  58. Wu, Y., Dowbenko, D. & Lasky, L. A. PSTPIP 2, a second tyrosine phosphorylated, cytoskeletal-associated protein that binds a PEST-type protein-tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **273**, 30487–30496 (1998).
  59. Yeung, Y. G., Soldera, S. & Stanley, E. R. A novel macrophage actin-associated protein (MAYP) is tyrosine- phosphorylated following colony stimulating factor-1 stimulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 30638–30642 (1998).
  60. Chitu, V. *et al.* The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2947–2959 (2005).
  61. Tsujita, K. *et al.* Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation. *J. Cell Sci.* **126**, 2267–2278 (2013).
  62. Sztacho, M. *et al.* BAR proteins PSTPIP1/2 regulate podosome dynamics and the resorption activity of osteoclasts. *PLoS One* **11**, 1–25 (2016).

63. Shimada, A. *et al.* Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis. *Cell* **129**, 761–772 (2007).
64. Tsujita, K. *et al.* Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.* **172**, 269–279 (2006).
65. Itoh, T. *et al.* Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* **9**, 791–804 (2005).
66. Frost, A. *et al.* Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell* **132**, 807–817 (2008).
67. Kamioka, Y. *et al.* A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 40091–40099 (2004).
68. Snider, C. E., Wan Mohamad Noor, W. N. I., Nguyen, N. T. H., Gould, K. L. & Suetsugu, S. The state of F-BAR domains as membrane-bound oligomeric platforms. *Trends Cell Biol.* **31**, 644–655 (2021).
69. McDonald, N. A. & Gould, K. L. Linking up at the BAR: Oligomerization and F-BAR protein function. *Cell Cycle* **15**, 1977–1985 (2016).
70. Almeida-Souza, L. *et al.* A Flat BAR Protein Promotes Actin Polymerization at the Base of Clathrin-Coated Pits. *Cell* **174**, 325–337.e14 (2018).
71. Ho, H.-Y. *et al.* Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* **118**, 203–216 (2004).
72. Takano, K., Toyooka, K. & Suetsugu, S. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* **27**, 2817–2828 (2008).
73. Tsuboi, S. *et al.* FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages. *J. Biol. Chem.* **284**, 8548–8556 (2009).
74. Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J. & Kelly, R. B. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol. Biol. Cell* **10**, 501–513 (1999).
75. Kessels, M. M., Dong, J., Leibig, W., Westermann, P. & Qualmann, B. Complexes of syndapin II with dynamin II promote vesicle formation at the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* **119**, 1504–1516 (2006).
76. de Kreuk, B. J. *et al.* The F-BAR domain protein PACSIN2 associates with Rac1 and regulates cell spreading and migration. *J. Cell Sci.* **124**, 2375–2388 (2011).
77. Dharmalingam, E. *et al.* F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *J. Neurosci.* **29**, 13315–13327 (2009).
78. Hanawa-Suetsugu, K. *et al.* Phagocytosis is mediated by two-dimensional assemblies

- of the F-BAR protein GAS7. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
79. Badour, K. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* **18**, 141–154 (2003).
  80. Wang, Q. *et al.* Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12700–12705 (2009).
  81. Smit, L., De Vries-Smits, A. M. M., Bos, J. L. & Borst, J. B cell antigen receptor stimulation induces formation of a Shc-Grb2 complex containing multiple tyrosine-phosphorylated proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20209–20212 (1994).
  82. Saxton, T. M., van Oostveen, I., Bowtell, D., Aebersold, R. & Gold, M. R. B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the p21ras oncoprotein activators SHC and mSOS1 as well as assembly of complexes containing SHC, GRB-2, mSOS1, and a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein. *J. Immunol.* **153**, 623 LP – 636 (1994).
  83. Ware, M. D. *et al.* Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood* **88**, 2833–2840 (1996).
  84. Liu, Q., Shalaby, F., Jones, J., Bouchard, D. & Dumont, D. J. The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, ship, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. *Blood* **91**, 2753–2759 (1998).
  85. Iyer, S., Viernes, D. R., Chisholm, J. D., Margulies, B. S. & Kerr, W. G. SHIP1 regulates MSC numbers and their osteolineage commitment by limiting induction of the PI3K/Akt/ $\beta$ -catenin/Id2 axis. *Stem Cells Dev.* **23**, 2336–2351 (2014).
  86. Zhang, J., Walk, S. F., Ravichandran, K. S. & Garrison, J. C. Regulation of the Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP1) by the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **284**, 20070–20078 (2009).
  87. Rohrschneider, L. R., Fuller, J. F., Wolf, I., Liu, Y. & Lucas, D. M. Structure function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* **14**, 505–520 (2000).
  88. Pradhan, M. & Coggeshall, K. M. Activation-induced bi-dentate interaction of SHIP and Shc in B lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* **67**, 32–42 (1997).
  89. Lemay, S., Davidson, D., Latour, S. & Veillette, A. Dok-3, a Novel Adapter Molecule Involved in the Negative Regulation of Immunoreceptor Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2743–2754 (2000).
  90. Mukherjee, O. *et al.* The SH2-domain of SHIP1 interacts with the SHIP1 C-terminus: Impact on SHIP1/Ig- $\alpha$  interaction. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 206–214 (2012).
  91. Pauls, S. D. & Marshall, A. J. Regulation of immune cell signaling by SHIP1: A phosphatase, scaffold protein, and potential therapeutic target. *Eur. J. Immunol.* **47**, 932–945 (2017).
  92. Zhang, J., Ravichandran, K. S. & Garrison, J. C. A key role for the phosphorylation of

- Ser440 by the cyclic AMP-dependent protein kinase in regulating the activity of the Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP1). *J. Biol. Chem.* **285**, 34839–34849 (2010).
93. Ong, C. J. *et al.* Small-molecule agonists of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood* **110**, 1942–1949 (2007).
  94. Ming-Lum, A. *et al.* A pleckstrin homology-related domain in SHIP1 mediates membrane localization during Fcγ receptor-induced phagocytosis. *FASEB J.* **26**, 3163–3177 (2012).
  95. Lamkin, T. D. *et al.* Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J. Biol. Chem.* **272**, 10396–10401 (1997).
  96. Tamir, I. *et al.* The RasGAP-binding protein p62(dok) is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* **12**, 347–358 (2000).
  97. Manno, B. *et al.* The Dok-3/Grb2 adaptor module promotes inducible association of the lipid phosphatase SHIP with the BCR in a coreceptor-independent manner. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2520–2530 (2016).
  98. Ono, M., Bolland, S., Tempst, P. & Ravetch, J. V. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor FcγRIIB. *Nature* vol. 383 263–266 (1996).
  99. Masao, O. *et al.* Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**, 293–301 (1997).
  100. Liu, Q. *et al.* The inositol polyphosphate 5-phosphatase ship is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* **188**, 1333–1342 (1998).
  101. D'Ambrosio, D., Fong, D. C. & Cambier, J. C. The SHIP phosphatase becomes associated with FcγRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during 'negative' signaling. *Immunol. Lett.* **54**, 77–82 (1996).
  102. Fong, D. C. *et al.* Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated FcγRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol. Lett.* **54**, 83–91 (1996).
  103. Bruhns, P. *et al.* Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by FcγRIIB. *J. Biol. Chem.* **275**, 37357–37364 (2000).
  104. Tridandapani, S. *et al.* Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4305–4311 (1997).
  105. Aman, M. J., Lamkin, T. D., Okada, H., Kurosaki, T. & Ravichandran, K. S. The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 33922–33928 (1998).
  106. Helgason, C. D. *et al.* A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: Aberrant development and enhanced function of B

- lymphocytes in SHIP(-/-) mice. *J. Exp. Med.* **191**, 781–794 (2000).
107. Isnardi, I. *et al.* Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor FcγRIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J. Biol. Chem.* **279**, 51931–51938 (2004).
  108. Brauweiler, A. *et al.* Differential regulation of B cell development, activation, and death by the Src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *J. Exp. Med.* **191**, 1545–1554 (2000).
  109. Pauls, S. D. *et al.* FcγRIIB-Independent Mechanisms Controlling Membrane Localization of the Inhibitory Phosphatase SHIP in Human B Cells. *J. Immunol.* **197**, 1587–1596 (2016).
  110. O'Neill, S. K. *et al.* Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell energy. *Immunity* **35**, 746–756 (2011).
  111. Franke, T. F. *et al.* The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**, 727–736 (1995).
  112. Frech, M. *et al.* High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 8474–8481 (1997).
  113. Ebner, M., Lučić, I., Leonard, T. A. & Yudushkin, I. PI(3,4,5)P3 engagement restricts Akt activity to cellular membranes. *Mol. Cell* **65**, 416–431.e6 (2017).
  114. Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Curr. Biol.* **7**, 261–269 (1997).
  115. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101 (2005).
  116. Bellacosa, A. *et al.* Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain. *Oncogene* **17**, 313–325 (1998).
  117. Jacob, A., Cooney, D., Tridandapani, S., Kelley, T. & Coggshall, K. M. FcγRIIb modulation of surface immunoglobulin-induced Akt activation in murine B cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 13704–13710 (1999).
  118. Liu, Q. *et al.* SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.* **13**, 786–791 (1999).
  119. Scheid, M. P. *et al.* Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P2 is required for PKB phosphorylation at Ser-473. Studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 9027–9035 (2002).
  120. Ma, K., Cheung, S. M., Marshall, A. J. & Duronio, V. PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity. *Cell. Signal.* **20**, 684–694 (2008).
  121. Krahn, A. K., Ma, K., Hou, S., Duronio, V. & Marshall, A. J. Two Distinct Waves of

- Membrane-Proximal B Cell Antigen Receptor Signaling Differentially Regulated by Src Homology 2-Containing Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase. *J. Immunol.* **172**, 331–339 (2004).
122. Bolland, S., Pearce, R. N., Kurosaki, T. & Ravetch, J. V. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* **8**, 509–516 (1998).
  123. Scharenberg, A. M. *et al.* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J.* **17**, 1961–1972 (1998).
  124. Maresco, D. L., Osborne, J. M., Cooney, D., Coggeshall, K. M. & Anderson, C. L. The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. *J. Immunol.* **162**, 6458–65 (1999).
  125. Vaillancourt, M. *et al.* The Src Homology 2-Containing Inositol 5-Phosphatase 1 (SHIP1) is involved in CD32a signaling in human neutrophils. *Cell. Signal.* **18**, 2022–2032 (2006).
  126. Strassheim, D., Kim, J.-Y., Park, J.-S., Mitra, S. & Abraham, E. Involvement of SHIP in TLR2-Induced Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *J. Immunol.* **174**, 8064–8071 (2005).
  127. Srinivasan, S. *et al.* Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J. Cell Biol.* **160**, 375–385 (2003).
  128. Servant, G. *et al.* Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037–1040 (2000).
  129. Nishio, M. *et al.* Control of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P3 phosphatase SHIP1. *Nat. Cell Biol.* **9**, 36–44 (2007).
  130. Devreotes, P. & Horwitz, A. R. Signaling Networks that Regulate Cell Migration. 1–16.
  131. Lam, P. ying, Yoo, S. K., Green, J. M. & Huttenlocher, A. The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP) limits the motility of neutrophils and their recruitment to wounds in zebrafish. *J. Cell Sci.* **125**, 4973–4978 (2012).
  132. Van Keymeulen, A. *et al.* To stabilize neutrophil polarity, PIP3 and Cdc42 augment RhoA activity at the back as well as signals at the front. *J. Cell Biol.* **174**, 437–445 (2006).
  133. Mondal, S., Subramanian, K. K., Sakai, J., Bajrami, B. & Luo, H. R. Phosphoinositide lipid phosphatase SHIP1 and PTEN coordinate to regulate cell migration and adhesion. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1219–1230 (2012).
  134. Gardaj, S. *et al.* Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 5236–5246 (2002).
  135. Kanai, F. *et al.* The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell Biol.* **3**, 675–678 (2001).
  136. Desponts, C., Hazen, A. L., Paraiso, K. H. T. & Kerr, W. G. SHIP deficiency enhances HSC

- proliferation and survival but compromises homing and repopulation. *Blood* **107**, 4338–4345 (2006).
137. Helgason, C. D. *et al.* Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* **12**, 1610–1620 (1998).
  138. Maxwell, M. J. *et al.* SHIP-1 deficiency in the myeloid compartment is insufficient to induce myeloid expansion or chronic inflammation. *Genes Immun.* **15**, 233–240 (2014).
  139. Ghansah, T. *et al.* Expansion of Myeloid Suppressor Cells in SHIP-Deficient Mice Represses Allogeneic T Cell Responses. *J. Immunol.* **173**, 7324–7330 (2004).
  140. Maxwell, M. J. *et al.* Genetic Segregation of Inflammatory Lung Disease and Autoimmune Disease Severity in SHIP-1  $-/-$  Mice. *J. Immunol.* **186**, 7164–7175 (2011).
  141. Kuroda, E. *et al.* SHIP Represses Th2 Skewing by Inhibiting IL-4 Production from Basophils. *J. Immunol.* **186**, 323–332 (2011).
  142. Haddon, D. J. *et al.* SHIP1 Is a Repressor of Mast Cell Hyperplasia, Cytokine Production, and Allergic Inflammation In Vivo. *J. Immunol.* **183**, 228–236 (2009).
  143. Takeshita, S. *et al.* SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat. Med.* **8**, 943–949 (2002).
  144. Oh, S. Y. *et al.* Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 deficiency leads to a spontaneous allergic inflammation in the murine lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 123–131 (2007).
  145. Ye, X. *et al.* Selective deletion of SHIP-1 in hematopoietic cells in mice leads to severe lung inflammation involving ILC2 cells. *Sci. Rep.* **11**, 1–14 (2021).
  146. Rauh, M. J. *et al.* SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity* **23**, 361–374 (2005).
  147. Hadidi, S. *et al.* Myeloid cell-specific expression of Ship1 regulates IL-12 production and immunity to helminth infection. *Mucosal Immunol.* **5**, 535–543 (2012).
  148. Tarasenko, T. *et al.* T cell-specific deletion of the inositol phosphatase SHIP reveals its role in regulating Th1/Th2 and cytotoxic responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11382–11387 (2007).
  149. Gold, M. J. *et al.* Lineage-specific regulation of allergic airway inflammation by the lipid phosphatase Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP-1). *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 725–736.e2 (2015).
  150. Tsantikos, E. *et al.* Granulocyte-CSF links destructive inflammation and comorbidities in obstructive lung disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 2406–2418 (2018).
  151. Karlsson, M. C. I. *et al.* Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J. Exp. Med.* **198**, 333–340 (2003).
  152. Collazo, M. M., Paraiso, K. H. T., Park, M. Y., Hazen, A. L. & Kerr, W. G. Lineage extrinsic and intrinsic control of immunoregulatory cell numbers by SHIP. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1785–1795 (2012).

153. Kerr, W. G., Park, M. Y., Maubert, M. & Engelman, R. W. SHIP deficiency causes Crohn's disease-like ileitis. *Gut* **60**, 177–188 (2011).
154. Park, M. Y. *et al.* Impaired T-cell survival promotes mucosal inflammatory disease in SHIP1-deficient mice. *Mucosal Immunol.* **7**, 1429–1439 (2014).
155. Baran, C. P. *et al.* The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 38628–38636 (2003).
156. Hermiston, M. L., Xu, Z. & Weiss, A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 107–137 (2003).
157. Isakov, N. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 6–16 (1997).
158. Fodor, S., Jakus, Z. & Mócsai, A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol. Lett.* **104**, 29–37 (2006).
159. Huynh, L., Wang, L., Shi, C., Park-Min, K.-H. & Ivashkiv, L. B. ITAM-Coupled Receptors Inhibit IFNAR Signaling and Alter Macrophage Responses to TLR4 and Listeria monocytogenes. *J. Immunol.* **188**, 3447–3457 (2012).
160. Mkaddem, S. Ben *et al.* Lyn and Fyn function as molecular switches that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
161. Barrow, A. D. & Trowsdale, J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: The ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1646–1653 (2006).
162. Binstadt, B. A. *et al.* Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* **5**, 629–638 (1996).
163. Daëron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L. & Vivier, E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: A quest in the past and future. *Immunol. Rev.* **224**, 11–43 (2008).
164. Totani, L. *et al.* Src-family kinases mediate an outside-in signal necessary for  $\beta$ 2 integrins to achieve full activation and sustain firm adhesion of polymorphonuclear leucocytes tethered on E-selectin. *Biochem. J.* **396**, 89–98 (2006).
165. Piccardoni, P. *et al.* SRC-dependent outside-in signalling is a key step in the process of autoregulation of  $\beta$ 2 integrins in polymorphonuclear cells. *Biochem. J.* **380**, 57–65 (2004).
166. Sarantos, M. R. *et al.* Transmigration of neutrophils across inflamed endothelium is signaled through LFA-1 and Src family kinase. *J. Immunol.* **181**, 8660–8669 (2008).
167. Pereira, S., Zhou, M., Mócsai, A. & Lowell, C. Resting Murine Neutrophils Express Functional  $\alpha$ 4 Integrins that Signal Through Src Family Kinases. *J. Immunol.* **166**, 4115–4123 (2001).
168. Fumagalli, L. *et al.* Class I Phosphoinositide-3-Kinases and Src Kinases Play a



- Nonredundant Role in Regulation of Adhesion-Independent and -Dependent Neutrophil Reactive Oxygen Species Generation. *J. Immunol.* **190**, 3648–3660 (2013).
169. Mócsai, A., Ligeti, E., Lowell, C. A. & Berton, G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* **162**, 1120–6 (1999).
  170. Hirahashi, J. *et al.* Mac-1 Signaling via Src-Family and Syk Kinases Results in Elastase-Dependent Thrombohemorrhagic Vasculopathy. *Immunity* **25**, 271–283 (2006).
  171. Mócsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V. L. & Lowell, C. A. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **16**, 547–558 (2002).
  172. Rohwedder, I. *et al.* Src family kinase-mediated vesicle trafficking is critical for neutrophil basement membrane penetration. *Haematologica* **105**, 1845–1856 (2020).
  173. Mócsai, A. *et al.* Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat. Immunol.* **7**, 1326–1333 (2006).
  174. Lowell, C. A. & Berton, G. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7580–7584 (1998).
  175. Liu, G. *et al.* Src phosphorylation of endothelial cell surface intercellular adhesion molecule-1 mediates neutrophil adhesion and contributes to the mechanism of lung inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1342–1350 (2011).
  176. Kovács, M. *et al.* The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.* **211**, 1993–2011 (2014).
  177. Mazzi, P., Cavegion, E., Lapinet-Vera, J. A., Lowell, C. A. & Berton, G. The Src-Family Kinases Hck and Fgr Regulate Early Lipopolysaccharide-Induced Myeloid Cell Recruitment into the Lung and Their Ability To Secrete Chemokines. *J. Immunol.* **195**, 2383–2395 (2015).
  178. Giagulli, C. *et al.* The Src Family Kinases Hck and Fgr Are Dispensable for Inside-Out, Chemoattractant-Induced Signaling Regulating  $\beta$ 2 Integrin Affinity and Valency in Neutrophils, but Are Required for  $\beta$ 2 Integrin-Mediated Outside-In Signaling Involved in Sustained Adhesion. *J. Immunol.* **177**, 604–611 (2006).
  179. Fumagalli, L., Zhang, H., Baruzzi, A., Lowell, C. A. & Berton, G. The Src Family Kinases Hck and Fgr Regulate Neutrophil Responses to N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine. *J. Immunol.* **178**, 3874–3885 (2007).
  180. Mócsai, A. *et al.* Kinase Pathways in Chemoattractant-Induced Degranulation of Neutrophils: The Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activated by Src Family Kinases. *J. Immunol.* **164**, 4321–4331 (2000).
  181. Jakus, Z., Németh, T., Verbeek, J. S. & Mócsai, A. Critical but Overlapping Role of Fc $\gamma$ RIII and Fc $\gamma$ RIV in Activation of Murine Neutrophils by Immobilized Immune Complexes. *J. Immunol.* **180**, 618–629 (2008).

182. Fitzer-Attas, C. J. *et al.* Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **191**, 669–681 (2000).
183. Wetzel, D. M., Rhodes, E. L., Li, S., McMahon-Pratt, D. & Koleske, A. J. The Src kinases Hck, Fgr and Lyn activate Arg to facilitate IgG-mediated phagocytosis and Leishmania infection. *J. Cell Sci.* **129**, 3130–3143 (2016).
184. Lőrincz, Á. M. *et al.* Different Calcium and Src Family Kinase Signaling in Mac-1 Dependent Phagocytosis and Extracellular Vesicle Generation. *Front. Immunol.* **10**, 1–11 (2019).
185. Killpack, T. L. *et al.* Phagocytic Receptors Activate Syk and Src Signaling during *Borrelia burgdorferi* Phagocytosis. *Infect. Immun.* **85**, (2017).
186. Zhang, H., Meng, F., Chu, C. L., Takai, T. & Lowell, C. A. The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B. *Immunity* **22**, 235–246 (2005).
187. Pereira, S. & Lowell, C. The Lyn Tyrosine Kinase Negatively Regulates Neutrophil Integrin Signaling. *J. Immunol.* **171**, 1319–1327 (2003).
188. Gresham, H. D. *et al.* Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J. Exp. Med.* **191**, 515–528 (2000).
189. Vines, C. M. *et al.* Inhibition of β2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* **15**, 507–519 (2001).
190. Phillips, N. E. & Parker, D. C. Cross-linking of B lymphocyte Fc gamma receptors and membrane immunoglobulin inhibits anti-immunoglobulin-induced blastogenesis. *J. Immunol.* **132**, 627–32 (1984).
191. Malbec, O. *et al.* Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J. Immunol.* **160**, 1647–1658 (1998).
192. Powell, L. D., Jain, R. K., Matta, K. L., Sabesan, S. & Varki, A. Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 7523–7532 (1995).
193. Powell, L. D., Sgroi, D., Sjoberg, E. R., Stamenkovic, I. & Varki, A. Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22β carry N-linked oligosaccharides with α-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J. Biol. Chem.* **268**, 7019–7027 (1993).
194. Cornall, R. J. *et al.* Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* **8**, 497–508 (1998).
195. Smith, K. G. C., Tarlinton, D. M., Doody, G. M., Hibbs, M. L. & Fearon, D. T. Inhibition of the B cell by CD22: A requirement for Lyn. *J. Exp. Med.* **187**, 807–811 (1998).
196. Doody, G. M. *et al.* A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269**, 242–244 (1995).

197. Wang, J., Koizumi, T. & Watanabe, T. Altered antigen receptor signaling and impaired Fas-mediated apoptosis of B cells in Lyn-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 831–838 (1996).
198. Chan, V. W. F., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. Characterization of the B lymphocyte populations in lyn-deficient mice and the role of lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* **7**, 69–81 (1997).
199. Chan, V. W. F., Lowell, C. A. & DeFranco, A. L. Defective negative regulation of antigen receptor signaling in Lyn-deficient B lymphocytes. *Curr. Biol.* **8**, 545–553 (1998).
200. Mitchell, J. *et al.* Src family kinase tyrosine phosphorylates Toll-like receptor 4 to dissociate MyD88 and Mal/Tirap, suppressing LPS-induced inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* **147**, 119–127 (2018).
201. Hibbs, M. L. *et al.* Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* **83**, 301–311 (1995).
202. Nishizumi, H. *et al.* Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* **3**, 549–560 (1995).
203. Scapini, P. *et al.* Myeloid cells, BAFF, and IFN- $\gamma$  establish an inflammatory loop that exacerbates autoimmunity in Lyn-deficient mice. *J. Exp. Med.* **207**, 1757–1773 (2010).
204. Lamagna, C., Scapini, P., Van Ziffle, J. A., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, (2013).
205. Gao, R. *et al.* Deletion of src family kinase Lyn aggravates endotoxin-induced lung inflammation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, L1376–L1381 (2015).
206. Chung, I. C. *et al.* Src-family kinase-Cbl axis negatively regulates NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
207. Panicker, N. *et al.* Fyn kinase regulates misfolded  $\alpha$ -synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J. Exp. Med.* **216**, 1411–1430 (2019).
208. Tiemi Shio, M. *et al.* Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathog.* **5**, (2009).
209. Kankkunen, P. *et al.* Trichothecene mycotoxins activate NLRP3 inflammasome through a P2X7 receptor and Src tyrosine kinase dependent pathway. *Hum. Immunol.* **75**, 134–140 (2014).
210. Kibbe, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**, W43–6 (2007).
211. Sweeney, M. C. *et al.* Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry* **44**, 14932–14947 (2005).
212. Zhang, Y., Wavreille, A.-S., Kunys, A. R. & Pei, D. The SH2 domains of inositol polyphosphate 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 have similar ligand specificity but different binding kinetics. *Biochemistry* **48**, 11075–11083 (2009).

213. Heng, T. S. P. & Painter, M. W. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1091–1094 (2008).
214. Shoham, N. G. *et al.* Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13501–13506 (2003).
215. Lowell, C. A. Src-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. *Mol. Immunol.* **41**, 631–643 (2004).
216. Abe, K. *et al.* Gain-of-function mutations in a member of the Src family kinases cause autoinflammatory bone disease in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 11872–11877 (2019).
217. Abe, K., Fuchs, H., Lisse, T., Hans, W. & De Angelis, M. H. New ENU-induced semidominant mutation, Ali18, causes inflammatory arthritis, dermatitis, and osteoporosis in the mouse. *Mamm. Genome* **17**, 915–926 (2006).
218. Abe, K. *et al.* Novel lymphocyte-independent mechanisms to initiate inflammatory arthritis via bone marrow-derived cells of Ali18 mutant mice. *Rheumatology* **47**, 292–300 (2008).