

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Mechanismy signální transdukce povrchovými receptory
a transmembránovými adaptory leukocytů**

**Mechanisms of signal transduction by leukocyte surface
receptors and transmembrane adaptor proteins**

Mgr. Peter Dráber

Praha, 2011

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Imunologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Vladimír Holáň, Dr.Sc.

Školící pracoviště: Ústav molekulární genetiky, AV ČR, Praha

Autor: Mgr. Peter Dráber

Školitel: Mgr. Tomáš Brdička, PhD.

S dizertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

1 Obsah

1	Obsah	3
2	Abstrakt.....	4
3	Abstract	5
4	Česká část.....	6
4.1	Úvod	6
4.2	Cíle práce	8
4.3	Materiál a metodika	8
4.4	Výsledky a diskuse	9
4.4.1	SCIMP: transmembránový adaptorový protein, který hraje roli v MHCII signalizaci	9
4.4.2	PRR7 je transmembránový adaptorový protein exprimovaný v aktivovaných T buňkách, podílející se na regulaci TCR signalizace a apoptózy	10
4.4.3	Vliv proteinové fosfatázy CD148 na regulaci Src kináz v TCR signalizaci	10
4.5	Závěry	11
4.6	Životopis	12
5	English part	14
5.1	Introduction	14
5.2	Aims of the study	16
5.3	Material and methods	16
5.4	Results and discussion	17
5.4.1	SCIMP: transmembrane adaptor protein involved in MHCII signaling	17
5.4.2	PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells and involved in the regulation of T cell receptor signaling and apoptosis	18
5.4.3	Regulation of Src family kinases involved in T cell receptor signaling by protein-tyrosine phosphatase CD148	19
5.5	Conclusions	19
5.6	Curriculum Vitae	20
6	Použitá literatura / References	22

2 Abstrakt

Interakce T buněk s buňkami prezentujícími antigen hraje zásadní úlohu při zahájení a koordinaci adaptivní imunitní odpovědi. Poté, co T buňka rozpozná MHC glykoproteiny s navázaným antigenním peptidem na povrchu antigen prezentující buňky, dochází k tvorbě imunologické synapse a jsou spuštěny signální dráhy v obou zúčastněných buňkách. Aktivita signálních drah je regulována různými molekulami, které mají pozitivní nebo negativní efekt. Aktivita některých proteinů mohou mít i duální charakter v závislosti na dané situaci. V této práci jsme se zaměřili na tři témata týkající se regulace nebo propagace signálních drah. V první části jsme rozšířili znalost signálních dějů probíhajících v oblasti imunologické synapse, neboť jsme objevili nový transmembránový adaptorový protein SCIMP, který je exprimovaný na buňkách prezentujících antigen. Po důkladném studiu tohoto proteinu jsme prokázali, že se jedná o pozitivní regulátor signalizace přes MHCII glykoproteiny. Další dva projekty se týkaly T buněk. Nejprve jsme popsali význam dalšího transmembránového adaptorového proteinu nazvaného PRR7 v regulaci apoptózy a v signalizaci přes T buněčný receptor. Nakonec jsme se zaměřili na studium exprese fosfatázy CD148 v lidských T buňkách a prokázali jsme, že může mít aktivační i inhibiční efekt na signalizaci přes T buněčný receptor.

3 Abstract

The central role in the initiation and maintenance of the adaptive immune response is played by interaction of T cells with antigen presenting cells. Upon recognition of peptide-loaded MHC glycoproteins on the surface of antigen presenting cells by specific T cell, immunological synapse is formed and signaling events are initiated in both cells involved. The signal propagation is regulated by various molecules that can have positive or negative function, or even both, depending on specific circumstances. In this work we focused our attention on three topics all encompassing processes of signal propagation or regulation. First, we extended our understanding of the signaling processes taking place in the immunological synapse by the discovery of a new transmembrane adaptor protein SCIMP expressed on antigen presenting cells. Detailed study of this protein demonstrated that it is a positive regulator of MHCII signaling. Next two projects were focused on T cells. We described the role of another transmembrane adaptor protein termed PRR7 in the regulation of apoptosis and T cell receptor (TCR) mediated signaling in T cells. Finally, we provided evidence that in human T cells CD148 phosphatase can have both activatory and inhibitory effect on T cell receptor signaling.

4 Česká část

4.1 Úvod

Mezi ústřední buňky adaptivního imunitního systému patří T buňky, které mají zásadní roli v organizaci a koordinaci imunitní odpovědi. Výsledkem jejich činnosti je obrana a dlouhodobá ochrana proti patogenům, a také imunologický dozor nad vlastními tkáněmi a prevence vzniku rakoviny.

T buňky rozpoznávají svým T buněčným receptorem (TCR, od anglického výrazu „T cell receptor“) peptidy prezentované různými buňkami imunitního systému na glykoproteinech hlavního histokompatibilního komplexu třídy I nebo II (MHCI, MHCII). Schopnost rozpoznat MHCI nebo MHCII je závislá na tom, zda T buňka exprimuje kostimulační molekuly CD4 nebo CD8. Proces prezentace antigenu T buňkám, za který jsou zodpovědné specializované antigen prezentující buňky (APC, od anglického výrazu „antigen presenting cells“), vede nejprve k aktivaci naivních T buněk. Takto vzniklé efektorové T buňky mohou následně aktivovat a koordinovat ostatní buňky imunitního systému, aby došlo k účinné likvidaci patogenů (v případě CD4+ T buněk), nebo mohou přímo zabít infikované buňky (v případě CD8+ T buněk).

Dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B buňky [1, 2] jsou považovány za profesionální APC. Naivní T buňky jsou nejúčinněji aktivovány dendritickými buňkami. Za určitých okolností se mohou makrofágy a B buňky také podílet na tomto procesu. V pozdějších etapách imunitní odpovědi rozpoznávají CD4+ T buňky antigen prezentovaný na povrchu makrofágů a B buněk a tím tyto buňky aktivují: makrofágy se stanou účinnější v zabíjení fagocytovaných patogenů a B buňky s B buněčným receptorem (BCR, od anglického výrazu „B cell receptor“) specifickým pro daný patogen vstoupí do cyklu afinitní maturace, což vede k produkci vysoce afinitních protilátek.

Během procesu antigení prezentace dochází ke vzniku imunologické synapse (IS) [3], která je tvořena několika oblastmi. Ve středu IS je oblast známá jako centrální supramolekulární aktivační klastr (cSMAC, od anglického výrazu „supramolecular activation cluster“), obsahující páry TCR-MHC, koreceptory CD4 a CD8 a některé další signální molekuly, například kinázy z rodiny Src. Oblast obklopující cSMAC se nazývá periferní SMAC (pSMAC) a obsahuje páry adhezivních molekul, jako jsou CD2-CD58 nebo LFA1-ICAM1 nebo LFA1-ICAM3. Poslední oblastí rozlišitelnou na okraji IS je distální SMAC (dSMAC), který obsahuje molekuly s velkou extracelulární částí, například CD45 [4].

Poté, co T buňka rozpozná MHC s navázaným antigenním peptidem na povrchu APC, dochází k spuštění signálních drah v obou zúčastněných buňkách. Signální dráhy aktivované v T buňkách jsou poměrně dobře popsány. Po aktivaci TCR jsou kinázy z rodiny Src, konkrétně Lck a Fyn, schopné fosforylovat tyrosinové aminokyselinové zbytky v tzv. ITAM sekvencích (odvozeno od „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) v podjednotkách CD3 a řetězcích ζ , které jsou asociovány s TCR. Fosforylované ITAM jsou následně schopné vázat kinázu z rodiny Syk nazvanou ZAP-70 [5]. Tímto způsobem je ZAP-70 ukotvena v blízkosti plazmatické membrány a může fosforylovat velmi důležitý adaptorový protein – LAT (odvozeno od “linker for activation of T cells”). LAT patří mezi tzv. transmembránové adaptorové proteiny (TRAP), pro které je typická krátká extracelulární část, následovaná transmembránovou doménou, pod níž se nachází palmitylační motif a cytoplasmatická část, která obsahuje některé aminokyselinové sekvence, umožňující protein-proteinové interakce. Po tyrosinové fosforylaci LATu se na tento protein mohou vázat další efektorové molekuly a tím dochází k aktivaci různých signálních kaskád [6, 7].

Narozdíl od signalizace pomocí TCR, detailní znalost signálních drah spuštěných po aktivaci MHCII glykoproteinů v IS stále chybí. MHCII molekuly obvykle nejsou považované za receptory, ale spíše jsou vnímány jako pasivní hráči, kteří pouze prezentují antigenní peptidy. Nicméně v množství publikací bylo dokumentováno, že prokřížení MHCII molekul na povrchu buněk pomocí protilátek spouští různé signální dráhy, zahrnující aktivaci kináz z rodiny Src i Syk a také spuštění některých vzdálenějších signálních kaskád, podobně jako je tomu u TCR [8-10].

V případě TCR i MHCII signalizace jsou kinázy z rodiny Src mezi prvními aktivovanými molekulami. Regulace aktivity Src kináz je zprostředkována fosforylací na dvou kritických tyrosinech. První z nich je inhibiční tyrosin, který je lokalizován v C-koncové části těchto kináz (Y527 v kináze Src). Druhý je aktivační tyrosin, který je přítomen v kinázové doméně (Y416 v kináze Src) [11]. Fosforylace inhibičního tyrosinu je zprostředkována kinázou Csk. Naopak pro defosforylaci tohoto tyrosinu jsou nezbytné fosfatázy CD45 a CD148, které tak představují protiváhu Csk [12]. Nicméně pro plnou aktivaci kináz z rodiny Src je ještě nezbytné aby autofosforylovaly svůj aktivační tyrosin v kinázové oblasti. Tento tyrosin je rovněž defosforylován fosfatázou CD45, a jak je ukázáno v této práci i fosfatázou CD148.

K propagaci signálních drah je nezbytné, aby docházelo k vhodnému prostorovému uspořádání jednotlivých proteinů s enzymatickou aktivitou. Tím dochází k jejich vzájemné interakci. Enzymy tak mohou být lokalizovány do blízkosti svých substrátů i regulátorů. Důležité molekuly, které jsou odpovědné za časoprostorové uspořádání signálních molekul

jsou adaptorové proteiny. Sami o sobě sice nemají žádnou enzymatickou aktivitu, ale fungují jako “lešení” zprostředkující interakce různých signálních proteinů [13].

4.2 Cíle práce

Tato dizertační práce měla za úkol studovat některé aspekty propagace a regulace signálních drah spuštěných po aktivaci MHCII nebo TCR.

První projekt popisuje objev nového proteinu z rodiny TRAP, který jsme pojmenovali SCIMP. Zaměřili jsme se na expresní analýzu, biochemickou charakterizaci a popis vazebných partnerů. Nakonec jsme navrhli jeho potenciální roli v signalizaci přes MHCII.

Druhý projekt analyzuje další TRAP nazvaný PRR7. Dosud byl tento protein popsán pouze v mozku, zatímco jeho role v imunitním systému nebyla dříve studována. Záměrem této práce tedy bylo ověřit expresi tohoto proteinu v T buňkách a prokázat jeho vliv na regulaci T buněčných odpovědí.

Třetí projekt se zabývá některými ne zcela vyjasněnými otázkami regulace TCR signalizace pomocí fosfatázy CD148. Nejprve byla studována rozdílná exprese CD148 v různých vývojových stádiích thymocytů u myši a lidí. Posléze tento projekt analyzoval, zda CD148 funguje jako pozitivní nebo negativní regulátor TCR signalizace.

4.3 Materiál a metodika

Většina experimentů prezentovaných v této dizertační práci byla provedena na buněčných liniích lidského i myšského původu. Některé experimenty využívaly také buňky izolované přímo z myších orgánů nebo z krve lidských dárců. Experimentální přístupy používané v této práci lze rozdělit do několika oblastí:

- (1) Izolace RNA, reverzní transkripce, polymerázová řetězová reakce, příprava plasmidů, nukleotidová záměna nebo sekvenční delece ve vybraných plasmidech, klonování, retrovirální a lentivirální transdukce.
- (2) Biochemické metody, včetně solubilizace buněk v různých detergentech, imunoprecipitace, vyplavávání v sacharózovém hustotním gradientu, gelové filtrace, buněčné frakcionace, dále analýza exprese a fosforylace bílkovin pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS, následované metodou „western blotting“ s použitím různých protilátek.
- (3) Stimulace buněk různými typy aktivátorů, včetně aktivace pomocí mitogenů nebo s použitím protilátek proti specifickým povrchovým molekulám.

- (4) Analýza buněk pomocí průtokové cytometrie, s cílem zjistit expresi proteinů, vápníkovou odpověď a buněčnou apoptózu po různých typech buněčné stimulace.
- (5) Mikroskopické pozorování buněk s použitím konfokálního mikroskopu nebo základního fluorescenčního mikroskopu.

4.4 Výsledky a diskuse

4.4.1 *SCIMP: transmembránový adaptorový protein, který hraje roli v MHCII signalizaci*

V tomto projektu jsme se zaměřili na popis nového proteinu C17orf87, který má strukturu typickou pro ostatní TRAP. Tato molekula obsahuje velmi krátkou extracelulární část, transmembránovou doménu, následovanou palmitylačním motivem a intracelulární částí, kde se nachází čtyři potenciální protein-protein interakční motivy založené na tyrosinu a prolin bohatá oblast. Neobsahuje však žádnou predikovatelnou enzymaticky aktivní doménu.

Na základě známých preferencí některých SH2 domén vázat konkrétní sekvence aminokyselin obsahující fosforylovaný tyrosin bylo možné předpovědět, a posléze potvrdit experimentálně, vazebné partnery pro tři z těchto tyrosinů. Jednalo se Grb2, SLP65/SLP76 a Csk. Na základě těchto interakcí, jsme se rozhodli pojmenovat tento protein SCIMP, což je zkratka pro „SLP65/SLP76 and Csk Interacting membrane protein“.

Expresí proteinu SCIMP je omezena na tkáň imunitního systému, především slezinu a lymfatické uzliny. V rámci imunitního systému je SCIMP exprimovaný pouze v profesionálních APC, jako jsou monocyty, dendritické buňky a B buňky. Navíc je SCIMP přítomen v IS a je fosforylován po stimulaci pomocí MHCII.

Tyto skutečnosti nás přiměly k analýze, jakou roli hraje SCIMP v transdukcii MHCII signálu. Prokázali jsme, že snížení exprese SCIMP pomocí shRNA v myší B buněčné linii K46 způsobí snížení aktivity MAP kinázy Erk1/2 po aktivaci MHCII. Navíc se nám podařilo prokázat, že vazba SLP65 na protein SCIMP je nezbytná pro signalizaci, zatímco vazba Csk umožňuje negativní regulaci.

4.4.2 PRR7 je transmembránový adaptorový protein exprimovaný v aktivovaných T buňkách, podílející se na regulaci TCR signalizace a apoptózy

Další TRAP analyzovaný v rámci předkládané dizertační práce byl protein nazvaný PRR7 („proline rich 7“). Název tohoto proteinu je odvozen ze skutečnosti, že obsahuje vysoký podíl aminokyseliny prolin. PRR7 byl dosud popsán pouze jako složka post-synaptických neurálních struktur [14]. V této práci byla mRNA kódující tento protein detekována ve většině lidských tkání, včetně imunitních orgánů thymu a lymfatických uzlin. Navíc byla exprese PRR7 na mRNA i proteinové úrovni zvýšena po aktivaci T lymfocytů izolovaných z periferní krve.

Aby bylo možné poskytnout další funkční charakterizaci PRR7, byla T buněčná linie Jurkat transfekována PRR7 kódujícím vektorem. Exprese PRR7 vedla k velmi rychlé apoptotické smrti. Možné vysvětlení, proč zvýšená exprese PRR7 měla tak dramatický efekt na buňky Jurkat, je schopnost PRR7 preaktivovat některé signální dráhy. Ukázalo se, že exprese PRR7 způsobila výrazně zvýšenou expresi podjednotky transkripčního faktoru AP-1 nazvané c-Jun, která byla zároveň fosforylována na aktivačním serinu [15].

Vzhledem ke zvýšené aktivitě distálních signálních drah v buňkách silně exprimujících PRR7, bylo velmi překvapující, že všechny proximální signální dráhy spuštěné po stimulaci TCR byly částečně inhibované. Zvýšená exprese PRR7 vedla zatím neznámým mechanismem ke snížené expresi kinázy Lck a snížené bazální fosforylaci ζ podjednotky TCR. S tím souvisí skutečnost, že po aktivaci prostřednictvím TCR měly buňky silně exprimující PRR7 sníženou vápníkovou odpověď, sníženou celkovou fosforylaci i fosforylaci některých signálních molekul včetně ZAP-70, LAT, PLC γ 1 a Erk ve srovnání s kontrolními buňkami.

Tato data ukazují, že PRR7 spouští signální dráhy vedoucí k aktivaci c-Jun a následně k apoptóze. To je vyváženo sníženou schopností buněk reagovat na signál od TCR, pravděpodobně kvůli dosud neznámé negativní zpětné vazbě nebo z důvodu vyčerpání a neschopnosti buněk spouštět další signální dráhy. Skutečnost, že PRR7 je exprimován v aktivovaných lymfocytech poukazuje na možnou roli PRR7 v regulaci T lymfocytů.

4.4.3 Vliv proteinové fosfatázy CD148 na regulaci Src kináz v TCR signalizaci

Protein fosfatáza CD148 patří mezi důležité regulátory aktivity kináz rodiny Src. Předchozí data týkající se exprese CD148 ukázala rozdíl mezi myší a člověkem. Zatímco

myší maturované naivní T buňky jsou CD148 negativní [16], lidské naivní T buňky byly ukázány jako CD148 pozitivní [17]. Podrobná analýza expresního profilu CD148 během thymického vývoje u myších a lidských T lymfocytů však chyběla. V této práci bylo prokázáno, že myší T buňky v DN („double negative“) stádiu exprimují CD148. Nicméně, poté, co buňky dosáhnou SP („single positive“) vývojové stádium, CD148 již není detekovatelná. Zcela naopak je tomu u lidských buněk, protože CD148 je přítomna velmi slabě na T buňkách v DN stádiu, ale při dosáhnutí SP stádia je již exprese silná.

Fosfatáza CD148 je schopna komplementovat fosfatázu CD45 jako pozitivní regulátor BCR a Fc receptorové signalizace [18]. Nicméně, zda může CD148 pozitivně regulovat také TCR signalizaci nebylo dosud zřejmé. V této práci jsme poskytli důkaz, že CD148 může sloužit jako pozitivní i negativní regulátor Src kináz v T buňkách. Výsledný efekt CD148 je závislý na celkové hladině exprese CD148 a CD45 a jejich kombinované fosfatázové aktivitě.

4.5 Závěry

Všechny projekty prezentované v této doktorské práci se zabývají studiem propagace signálních drah. Nejprve jsme charakterizovali dva proteiny ze skupiny TRAP v imunitním systému. První z nich představuje nový protein pojmenovaný SCIMP. Důkladná analýza tohoto proteinu prokázala, že SCIMP je exprimovaný v antigen prezentujících buňkách, je lokalizovaný v IS a podílí se na šíření signálu od MHCII molekul díky vazbě na SLP65/SLP76. Zajímavé je, že signály přenášené molekulou SCIMP jsou negativně regulovány současnou vazbou Csk. Druhý TRAP analyzovaný v této práci je protein PRR7, který byl doposud popsán pouze v mozku. Prokázali jsme, že PRR7 je exprimovaný rovněž v T buňkách. Zvýšená exprese PRR7 v T buněčné linii Jurkat vedla k buněčné apoptóze a snížené odpovědi na TCR stimulaci, pravděpodobně kvůli tomu, že buňky byly preaktivované a vyčerpané, případně také kvůli tomu, že byla snížena exprese Src kinázy Lck. Tato data naznačují, že exprese PRR7 by mohla představovat mechanismus regulace T buněčných funkcí.

Každý z proteinů SCIMP i PRR7 má schopnost regulovat kinázy rodiny Src. Zatímco PRR7 snižuje expresi Lck, SCIMP je schopen vázat negativní regulátor Src kináz, kinázu Csk, která fosforyluje jejich inhibiční tyrosin. Dalším regulačním proteinem je fosfatáza CD148. Prokázali jsme, že CD148 je schopná defosforylovat inhibiční tyrosin Src kináz. Na druhou stranu je však také schopná defosforylovat aktivační tyrosin Src kináz a může tedy

fungovat jako pozitivní i negativní regulátor imunoreceptorové signalizace. Rovně se nám podařilo objasnit rozdílnou regulaci exprese CD148 u lidských a myších thymocytů.

4.6 Životopis

Osobní údaje

Jméno a příjmení: Peter Draber

Datum narození: 21. února, 1983

Místo narození: Bratislava

Občanství: České

Adresa: Ústav molekulární genetiky AV ČR, Vídeňská 1083, 14220, Praha 4, ČR

Email: pdj@img.cas.cz

Vzdělání:

2002-2007 ... Magisterské studium v oboru Biochemie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, ČR

2007-dosud ... Doktorské studium v oboru Imunologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, ČR

Působení na vědeckých pracovištích:

2004-2006 ... Oddělení signální transdukce, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha, ČR

2006-dosud ... Oddělení molekulární imunologie, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha, ČR

Seznam publikací:

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce

1. Draber P, Vonkova I, Stepanek O, Hrdinka M, Kucova M, Skopцова T, Otahal P, Angelisova P, Horejsi V, Yeung M, Weiss A, Brdicka T. 2011. **SCIMP: transmembrane adaptor protein involved in MHCII signaling.** *Moll Cell Biol* [published ahead of print on 19 September 2011, doi:10.1128/MCB.05817-11]

IF = 6,188

2. Hrdinka M, Draber P, Stepanek O, Ormsby T, Otahal P, Angelisova P, Brdicka T, Paces J, Horejsi V, Drbal K. 2011. **PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells involved in regulation of T cell receptor signaling and apoptosis.** *J Biol Chem* 286: 19617-29

IF = 5,328

3. Stepanek O, Kalina T, Draber P, Skopцова T, Svojgr K, Angelisova P, Horejsi V, Weiss A, Brdicka T. 2011. **Regulation of Src family kinases involved in T cell receptor signaling by protein-tyrosine phosphatase CD148.** *J Biol Chem* 286: 22101-12

IF = 5,328

Publikace, které nejsou součástí dizertační práce

4. Draber P, Draberova L, Heneberg P, Smid F, Farghali H, Draber P. 2007. **Preformed STAT3 transducer complexes in human HepG2 cells and rat hepatocytes.** *Cell Signal* 19: 2400-2412

IF = 4,243

5. Shaik GM, Draberova L, Draber P, Boubelik M, Draber P. 2008. **Tetraalkylammonium derivatives as real-time PCR enhancers and stabilizers of the qPCR mixtures containing SYBR Green I.** *Nucleic Acids Res.* 36:e93, 2008

IF = 7.836

5 English part

5.1 Introduction

T cells are the central cells of the adaptive immune system, since they orchestrate and coordinate immune responses. The outcome of their action, if working properly, is the defense and long lasting protection against particular pathogens and also the surveillance of body tissues and prevention of cancer outbreak.

By their specific T cell receptor (TCR), T cells recognize antigenic peptides presented by various cells on major histocompatibility complex class I or II glycoproteins (MHCI, MHCII). The ability of T cells to recognize MHCI or II is restricted via the expression of co-stimulatory molecules CD4 or CD8, respectively, on their surface. The process of antigen presentation leads to the activation of naive T cells by professional antigen presenting cells (APCs) and their differentiation into effector T cells. These effectors can subsequently both activate and coordinate different cells of the immune system to combat the pathogens (in the case of CD4+ T cells) or directly kill the infected target cells (in the case of CD8+ T cells).

Dendritic cells, monocytes, macrophages and B cells [1, 2] are all considered professional APCs. Naive T cells are most efficiently activated by dendritic cells. Under some circumstances, macrophages and B cells can also be responsible for this process. Later in the immune response, effector CD4+ T cells recognize antigen presented on the surface of macrophages and B cells and activate these cells. As a result macrophages become more effective in killing of engulfed pathogens and B cells with BCR specific for particular pathogen enter into the cycle of affinity maturation, leading to the production of high affinity antibodies.

Process of antigen presentation is accompanied by the formation of immunological synapse (IS) [3]. Since the first observation of IS it has become clear that it is composed of several distinct regions, creating structure resembling “bull’s eye“. At the center of IS is an area known as central supramolecular activation cluster (cSMAC), containing pairs of TCR-MHC, coreceptors CD4 and CD8 and several signaling molecules, such as Src family kinases. Around cSMAC there is an area called peripheral SMAC (pSMAC) containing pairs of adhesion molecules such as CD2-CD58 or LFA1-ICAM1 or LFA1-ICAM3. Finally distal SMAC (dSMAC) contains molecules with large extracellular domains like CD45 [4].

Recognition of peptide-loaded MHC by TCR leads to various signaling events in both cells involved. Signaling pathways in T cells are well studied. Upon TCR activation, Src family kinases Lck and Fyn phosphorylate immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

(ITAMs) present in TCR associated CD3 subunits and ζ chains. Phosphorylated ITAMs subsequently serve as binding sites for Syk family kinase ZAP-70 [5]. Once ZAP-70 is docked in active conformation at the membrane, it phosphorylates critical adaptor protein - linker for activation of T cells (LAT). LAT is a member of the family of transmembrane adaptor proteins (TRAPs), characterized by a short extracellular part, a transmembrane domain followed by a palmitoylation motif and an intracellular part containing several protein-protein interaction motifs. Upon tyrosine phosphorylation, LAT functions as a scaffold molecule that binds to various effector molecules and promotes initiation of various signaling events [6, 7].

In contrast, precise knowledge of signaling pathways emanating from MHCII glycoproteins at IS is still lacking. Traditionally, MHCII glycoproteins were perceived as passive tools serving just for antigen presentation, not as receptors capable of signal transduction into the cells. However, a number of studies have provided the evidence that crosslinking of MHCII molecules using antibodies leads to various signaling events, including the activation of both Src and Syk family kinases as well as triggering of distal signaling pathways [8-10].

In both TCR and MHCII signaling, Src kinases are among the first signal transducing molecules to be activated. Regulation of the Src kinase activity is mediated by two critical tyrosines – inhibitory tyrosine located in the C-terminus (Y527 in Src) and activatory tyrosine located in the kinase domain (Y416 in Src) [11]. Phosphorylation of the inhibitory tyrosine is mediated by C-terminal Src kinase (Csk). Opposing Csk are phosphatases CD45 and CD148 that can dephosphorylate this inhibitory tyrosine [12]. However, for full activation, Src kinases must also auto-phosphorylate the activatory tyrosine in the kinase domain. This activatory tyrosine might be also substrate for CD45, and as demonstrated in this thesis also for CD148.

Proper signal propagation is based on positioning of various proteins with enzymatic functions in order to enable their mutual interactions, access to the substrates and to the upstream regulators. Important molecules responsible for spatio-temporal organization of signal propagating molecules are adaptor proteins. They do not possess any enzymatic activity but organize and facilitate the activity of other signaling molecules. They can be divided into two groups depending on their localization - transmembrane or cytoplasmic adaptor proteins [13].

5.2 Aims of the study

The aim of this thesis was to study propagation and regulation of signaling from MHCII and TCR.

The first project describes the discovery of new TRAP that we named SCIMP. We focused on general description of this protein, with the emphasis on the expression analysis, biochemical characterization and identification of associated partners. Finally we proposed a role for SCIMP in MHCII signaling.

The second project analyzes the role of another TRAP known as PRR7. This protein has been so far described only in the brain while in the cells of the immune system it has never been studied. We analyzed its expression in T lymphocytes and proposed its potential role in the regulation of T cell apoptosis and TCR mediated responses.

The third project deals with the regulation of TCR signaling by CD148 phosphatase and clarified several issues that had been unresolved for some time. We thoroughly analyzed the expression of CD148 at various stages of thymocyte maturation and we provided evidence that CD148 can function as both positive and negative regulator of TCR signaling.

5.3 Material and methods

Majority of work presented in this thesis was performed on cell lines of both human and mouse origin. Several experiments were performed also on primary cells isolated directly from mice or from human donors. Experimental approaches employed in this work can be divided in several categories:

- (1) Isolation of RNA, reverse transcription, polymerase chain reaction, preparation of various plasmids, site directed mutagenesis or sequence deletion in selected plasmids, cloning, retroviral and lentiviral transduction.
- (2) Cell stimulation following various types of activators, including the use of mitogens and crosslinking of surface receptors.
- (3) Biochemical methods including cell solubilisation in various detergents, immunoprecipitation, flotation in sucrose density gradient, gel filtration, cell fractionation, analysis of proteins expression and phosphorylation using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis followed by western blotting with various antibodies.

- (4) Analysis of the cells using *fluorescence-activated cell sorter (FACS)* in order to detect protein expression, cell apoptosis and calcium response following various types of cell stimulation
- (5) Microscopic analysis using confocal microscope or basic fluorescent microscope.

5.4 Results and discussion

5.4.1 SCIMP: transmembrane adaptor protein involved in MHCII signaling

In this project we have discovered new protein termed C17orf87, that is a typical member of the TRAP family. It contains a very short extracellular part, a transmembrane domain, followed by a palmitoylation motif and in its intracellular part it possesses four potential tyrosine based protein-protein interaction motifs, a proline rich domain, but no obvious enzymatically active domain.

Based on the known preferences of a number of SH2 domains to bind to particular amino acid sequences containing phosphotyrosine, it was possible to predict binding partners for three of these tyrosines. Namely Grb2, SLP65/SLP76 and Csk. Based on these interactions, which were later confirmed biochemically, we decided to name this protein SCIMP, an abbreviation for SLP65/SLP76 and Csk Interacting Membrane Protein.

Several links pointed that SCIMP might have a role in the process of antigen presentation. The expression of SCIMP is restricted to the immune system tissues, most notably spleen and lymph nodes; within the immune system, SCIMP appears to be expressed only in professional APC, such as monocytes, dendritic cells and B cells. Moreover, SCIMP is constituent of IS and is phosphorylated following MHCII stimulation.

This led us to analyze the role played by SCIMP in MHCII signal transduction. We demonstrated that in murine K46 B cell line SCIMP deficiency resulted in decreased Erk1/2 activity after MHCII activation. Moreover this phenotype could be rescued by transfecting the cells with human wild-type SCIMP, but not with SCIMP with mutated SLP65 binding site. Conversely, mutation of the Csk binding site led to an increase of Erk1/2 activation. These results provide evidence that association of SCIMP with SLP65 initiates the downstream signaling cascades, while Csk binding functions as a negative regulatory loop.

Altogether, this work provided basic characterization of a so far unknown protein and demonstrated its role in the propagation of the signals emanating from MHCII.

5.4.2 PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells and involved in the regulation of T cell receptor signaling and apoptosis

Another TRAP described in this thesis is proline rich 7 (PRR7). Similar to SCIMP, PRR7 was found in human genome database as typical member of TRAP family. The name of this protein is derived from the notion that PRR7 contains high proportion of proline residues. PRR7 has so far been described only as a constituent of post synaptic density of rat forebrain [14]. The goal of this project was to find out whether PRR7 is present in the immune system and what might be its potential role there.

Even though PRR7 is expressed most strongly in the brain, its mRNA transcripts are detectable in the majority of human tissues, including immune system organs thymus and lymph nodes. Furthermore, expression of PRR7 at both transcript and protein level is increased in peripheral blood lymphocytes upon stimulation with CD3 and CD28 antibodies as well as upon treatment of these cells with other mitogens.

In order to provide further functional characterization of PRR7, Jurkat T cells transfected with PRR7 were prepared. However, such transfection resulted in rapid apoptotic death of these cells. Explanation of the effect of overexpression of PRR7 on Jurkat T cells might lay in the ability of PRR7 to pre-activate signaling pathways in Jurkat. Indeed, induction of PRR7 expression led to a highly increased expression c-Jun, a subunit of AP-1 transcription factor, phosphorylated on activatory serine [15].

Since PRR7 potentiated the activity of distal signaling pathways, it was surprising that all the proximal signaling events generated after TCR crosslinking were attenuated. Indeed, upregulation of PRR7 led by so far unknown mechanism to reduced expression of Lck and reduced basal phosphorylation of TCR ζ chain. Accordingly, upon TCR stimulation, cells inducibly expressing PRR7 had weaker calcium response, decreased overall tyrosine phosphorylation and decreased phosphorylation of several signaling molecules including ZAP-70, LAT, PLC γ 1, and Erk compared to control cells.

It seems that PRR7 induces signaling events leading to c-Jun activation and subsequently to apoptosis. This is counterbalanced by decreased ability of the cells to signal from TCR, probably due to a so far unknown negative feedback or due to cell exhaustion and incapability to support further signaling events. The fact that PRR7 is expressed in activated lymphocytes points to a possible role of PRR7 in the regulation of T cell activation.

5.4.3 Regulation of Src family kinases involved in T cell receptor signaling by protein-tyrosine phosphatase CD148

CD148 is an important regulator of Src kinase activity. However, several issues concerning this phosphatase had been unresolved. Early data concerning the expression of CD148 demonstrated difference between mouse and human. While mouse naive mature T cells were reported as CD148 negative [16], human T cells were demonstrated to be positive for CD148 [17]. However, no thorough analysis of the differences in CD148 expression was carried out. In the first part of this study expression pattern of CD148 was analyzed in various developmental stages of human and mouse thymocytes.

Evidence was provided that in mice, double negative (DN) T cells express CD148. However, this expression is lost as T cells progress to single positive (SP) stage. Interestingly, human thymocytes exhibited different pattern, with non-detectable CD148 on DN thymocytes, while strong expression was observed on mature SP cells.

CD148 was shown to complement CD45 as a positive regulator of BCR and Fc receptor signaling [18]. Whether CD148 might promote also TCR signaling in CD45 negative cells had not been previously addressed. We provided evidence that CD148 can be positive as well as negative regulator of Src family kinases in T cells. The net effect of CD148 is dependent on overall combined phosphatase activity of CD45 and CD148.

5.5 Conclusions

All projects presented in this thesis are related to the regulation of signal propagation. We report here the characterization of two TRAPs in the immune system. The first of them is a new protein that we named SCIMP. We thoroughly analyzed this protein and provided evidence that SCIMP is expressed in APCs, it is translocated into the IS and propagate signaling emanating from MHCII molecules due to its binding to SLP65/SLP76. Interestingly, signaling events emanating from SCIMP are negatively regulated by concomitant binding of Csk. The second TRAP analyzed is PRR7, a protein that has been so far described only in the brain. We provided evidence that PRR7 is also expressed in T cells. Overexpression of PRR7 in Jurkat T cell line led to cell apoptosis and attenuated TCR signaling, probably due to the pre-activation and exhaustion of the cells and/or reduced expression of Src-family kinase Lck. We concluded that expression of PRR7 might be an interesting mechanism of the regulation of T cell functions.

Both SCIMP and PRR7 are able to regulate Src family kinases. While PRR7 downmodulates the expression level of Src-family member Lck, SCIMP presumably regulates these enzymes via recruiting their negative regulator Csk which phosphorylates their inhibitory tyrosines. Yet another regulatory mechanism is represented by CD148. We provided evidence that CD148 is capable of dephosphorylating this inhibitory tyrosine. On the other hand, it can also dephosphorylate activatory tyrosine of Src family kinases and thus function as both positive and negative regulator of immunoreceptor signaling. Furthermore we clarified unresolved issue of CD148 expression in thymus and demonstrated different expression of CD148 on human and mouse thymocytes at various developmental stages.

To summarize, we detected and provided basic characterization of two TRAPs involved in the regulation of APC (SCIMP) and T cell (PRR7) functions and we clarified the role of CD148 in signaling from TCR.

5.6 Curriculum Vitae

Personal data:

Name: Peter Draber

Date of birth: february 21,1983

Place of birth: Bratislava

Nationality: Czech

Address: Institute of Molecular Genetics AS CR, Vídeňská 1083, 14220, Prague 4, Czech Rep.

Email: pdj@img.cas.cz

Education:

2002-2007 ... Master studies of Biochemistry at Charles University in Prague, Faculty of Science, Czech Republic

2007 to present ... PhD studie sof Immunology, Charles University in Prague, Faculty of Science, Czech Republic

Research Experiences:

2004-2006 Laboratory of Signal Transduction, Institute of Molecular Genetics AS
CR, Prague

2007 to present ... Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Molecular Genetics AS
CR, Prague

List of publications:

Publications that are part of this thesis

1. Draber P, Vonkova I, Stepanek O, Hrdinka M, Kucova M, Skopцова T, Otahal P, Angelisova P, Horejsi V, Yeung M, Weiss A, Brdicka T. 2011. **SCIMP: transmembrane adaptor protein involved in MHCII signaling.** *Moll Cell Biol* [published ahead of print on 19 September 2011, doi:10.1128/MCB.05817-11]

IF = 6,188

2. Hrdinka M, Draber P, Stepanek O, Ormsby T, Otahal P, Angelisova P, Brdicka T, Paces J, Horejsi V, Drbal K. 2011. **PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells involved in regulation of T cell receptor signaling and apoptosis.** *J Biol Chem* 286: 19617-29

IF = 5,328

3. Stepanek O, Kalina T, Draber P, Skopцова T, Svojgr K, Angelisova P, Horejsi V, Weiss A, Brdicka T. 2011. **Regulation of Src family kinases involved in T cell receptor signaling by protein-tyrosine phosphatase CD148.** *J Biol Chem* 286: 22101-12

IF = 5,328

Publications that are not part of this thesis

4. Draber P, Draberova L, Heneberg P, Smid F, Farghali H, Draber P. 2007. **Prefomed STAT3 transducer complexes in human HepG2 cells and rat hepatocytes.** *Cell Signal* 19: 2400-2412

IF = 4,243

5. Shaik GM, Draberova L, Draber P, Boubelik M, Draber P. 2008. **Tetraalkylammonium derivatives as real-time PCR enhancers and stabilizers of the qPCR mixtures containing SYBR Green I.** *Nucleic Acids Res.* 36:e93, 2008

IF = 7.836

6 Použitá literatura / References

1. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 143-56.
2. Rodriguez-Pinto, D., *B cells as antigen presenting cells*. Cell Immunol, 2005. **238**(2): p. 67-75.
3. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
4. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 79-105.
5. Deindl, S., et al., *Structural basis for the inhibition of tyrosine kinase activity of ZAP-70*. Cell, 2007. **129**(4): p. 735-46.
6. Balagopalan, L., et al., *The LAT story: a tale of cooperativity, coordination, and choreography*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a005512.
7. Horejsi, V., P. Otahal, and T. Brdicka, *LAT--an important raft-associated transmembrane adaptor protein. Delivered on 6 July 2009 at the 34th FEBS Congress in Prague, Czech Republic*. FEBS J, 2010. **277**(21): p. 4383-97.
8. Haylett, R.S., N. Koch, and L. Rink, *MHC class II molecules activate NFAT and the ERK group of MAPK through distinct signaling pathways in B cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(7): p. 1947-55.
9. Jin, L., et al., *MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(16): p. 5014-26.
10. Al-Daccak, R., N. Mooney, and D. Charron, *MHC class II signaling in antigen-presenting cells*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 108-13.
11. Bradshaw, J.M., *The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches*. Cell Signal, 2010. **22**(8): p. 1175-84.
12. Hermiston, M.L., J. Zikherman, and J.W. Zhu, *CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 288-311.
13. Horejsi, V., W. Zhang, and B. Schraven, *Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 603-16.

14. Murata, Y., et al., *Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **327**(1): p. 183-91.
15. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 239-52.
16. Lin, J., et al., *Regulated expression of the receptor-like tyrosine phosphatase CD148 on hemopoietic cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(4): p. 2324-30.
17. Autschbach, F., et al., *Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues*. *Tissue Antigens*, 1999. **54**(5): p. 485-98.
18. Zhu, J.W., et al., *Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling*. *Immunity*, 2008. **28**(2): p. 183-96.
19. Kung, C., et al., *Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease*. *Nat Med*, 2000. **6**(3): p. 343-5.
20. Tchilian, E.Z., et al., *A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID*. *J Immunol*, 2001. **166**(2): p. 1308-13.
21. Cale, C.M., et al., *Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen, CD45*. *Arch Dis Child*, 1997. **76**(2): p. 163-4.