

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Transmembránový adaptorový protein PAG a jeho úloha při aktivaci žírných buněk

Bakalářská práce

Jiří Eitler

Školitel: RNDr. Petr Dráber, DrSc.

Praha 2009

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Dráberovi, DrSc za pomoc při výběru tématu a závěrečných korekcích práce. Děkuji také dalším členům Oddělení signální transdukce ÚMG AV ČR, kteří mi poskytli mnoho cenných rad jak při získávání informací tak i při kompletaci této práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval sám s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2009

Jiří Eitler

Obsah

Abstrakt	4
1 Úvod.....	6
1.1 Žírné buňky	6
1.2 Časná FcεRI signalizace v žírných buňkách	7
1.3 Adaptorové proteiny.....	8
1.4 Membránové rafty	8
2 PAG.....	9
3 Od struktury k funkci	10
3.1 Struktura a lokalizace v buňce.....	10
3.2 PAG je exprimovaný v širokém spektru tkání.....	12
3.3 PAG atrahuje z cytosolu Csk - negativní regulátor SFK.....	12
3.4 PAG a kinázy.....	13
3.5 PAG a fosfatázy	14
3.6 PAG je nejlépe prostudovaný v T-buňkách.....	14
4 PAG jako uzlový bod mnoha signálních drah	15
5 PAG v žírných buňkách	17
5.1 Interakce PAG s FcεRI receptorem	17
5.2 Lyn kináza je zodpovědná za fosforylaci PAG	17
5.3 Souhrnný pohled na FcεRI závislou signální smyčku	19
5.4 Regulace Lyn.....	21
5.4.1 Lyn deficientní fenotyp v patologii	21
5.4.2 Deaktivace a degradace Lyn	22
5.4.2.1 PAG jako dvoukrokový regulátor Lyn.....	22
5.4.2.2 Stabilní interakce PAG s Lyn v B-NHL buňkách může napovědět více o interakci v buňkách žírných.....	24
5.5 PAG a interakce s cytoskeletem	25
6 Závěr	27
7 Seznam zkratk	29
8 Seznam použité literatury	31

Abstrakt

Žírné buňky hrají důležitou úlohu v procesu přirozené i získané imunity. Nejstudovanějším povrchovým receptorem žírných buněk je vysokoafinitní receptor pro IgE (FcεRI). Zvýšená nebo snížená regulace aktivity tohoto receptoru nebo vazba nežádoucích IgE protilátek mohou vést k nestandardní imunitní odpovědi, jako například anafylaktická reakce nebo poruchy zánětlivé odpovědi. V poslední době bylo objeveno několik adaptorových membránových proteinů a jejich důležitá úloha v regulaci signálních drah, včetně těch iniciovaných FcεRI. Jedním z nich je adaptorový protein PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains), označovaný také Cbp (Csk-binding protein). Tento fosfoprotein byl původně objeven u T-buněk a později byla zjištěna jeho přítomnost v širokém spektru buněčných typů, včetně žírných buněk. I když se funkce PAG může lišit u různých typů buněk, zdá se, že prvotní objevená funkce PAG, jako adaptoru pro vazbu Csk (C-terminal Src kinase), která inhibuje aktivitu SFK (Src Family kinases), je mnoha buněčným typům společná. Tato práce sumarizuje a analyzuje poznatky o tomto adaptorovém proteinu a zaměřuje se na jeho úlohu v žírných buňkách. Hlavní pozornost je věnována interakci proteinu PAG s kinázou Lyn, která je u žírných buněk zodpovědná za jeho fosforylaci a je klíčovým hráčem v mnoha dalších signálních drahách závislých na fosforylaci PAG. Pozornost je rovněž věnována možné interakci PAG s komponentami buněčného cytoskeletu. Odhalení mechanismů těchto interakcí může přispět k lepšímu pochopení funkce proteinu PAG v imunoreceptorové signalizaci žírných buněk a buněčné signalizaci obecně.

Klíčová slova:

| PAG | žírné buňky | FcεRI | Csk | Lyn | Fyn | adaptorový protein | SFK | actin | signalosom |

Abstract

Mast cells play a crucial role in both, innate and acquired immunity. The most studied membrane receptor of mast cells is the high affinity receptor for IgE, (FcεRI). Enhanced or decreased regulation of the activity of this receptor or binding of unwanted IgE antibodies could lead to abnormal immune responses, such as allergic anaphylaxis or inflammatory response. Recently, several new transmembrane adaptor proteins and their crucial roles in coordination of signalling cascades, including FcεRI signalling, were discovered. One of them is an adaptor protein PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains) also called Cbp (Csk-binding protein). This phosphoprotein was originally discovered in T-cells, but later it was found in numerous other tissues, including mast cells. The function of PAG can be tissue specific, but its first described function was to serve as a docking site for recruitment of Csk (C-terminal Src kinase) from cytosol to membrane and so inhibiting the activity of SFK (Src family kinases), is common through all tissues. This work summarizes knowledge about PAG signalling and its role in mast cells. The main target is interaction of PAG with Lyn, the kinase responsible for PAG fosphorylation. Lyn is also a key player in plenty of PAG-dependent signalling pathways. Attention is also payed to possible interaction of PAG with cytoskeleton components.. Uncovering the mechanism of these interactions could help to better understanding of PAG function immunoreceptor signalling in mast cells and cellular signaling in general.

Key words:

| PAG | mast cells | FcεRI | Csk | Lyn | Fyn | adaptor protein | SFK | actin | signalosom |

1 Úvod

1.1 Žírné buňky

Molekulární mechanismy aktivace žírných buněk jsou považovány za jedno z ústředních témat současného imunologického výzkumu. Nové poznatky ukazují na jejich důležitou úlohu při mnoha onemocněních a v regulaci imunitního systému. V procesech přirozené imunity jsou žírné buňky zapojeny schopností rozeznat bakterie a viry skrze Toll-like receptory (TLR) exprimované na plasmatické membráně. Vazba cizorodého ligandu na TLR indukuje produkci cytokinů, ovšem většinou již nedostačuje pro uvolnění zánětlivých mediátorů z cytoplasmatických granulí do extracelulárního prostoru. Propojení se systémem adaptivní imunity je zprostředkováno vazbou imunoglobulinu E (IgE) k vysoko-afinitnímu receptoru pro IgE (FcεRI) na plasmatické membráně žírných buněk [1].

Vazba multivalentního antigenu na IgE-FcεRI vede k agregaci FcεRI komplexu a stimulaci signálních kaskád. Ve výsledku pak dochází k uvolnění obsahu sekretorických granulí, které představují vazodilatační látky, jako jsou histamin a heparin, cytokiny, chemokiny, proteolytické enzymy a deriváty kyseliny arachidonové [2,3].

Za fyziologických podmínek IgE rozpoznává antigenně specifické epitopy na povrchu pylových zrn, prachových částic nebo roztočů. Četné alergie a astma jsou způsobeny kombinacemi mediátorů uvolněných ve velkém rozsahu do tkáně žírnými buňkami v reakci na rozpoznání cizorodé látky. Spuštění imunitních pochodů v důsledku nadměrné aktivace žírných buněk zapříčiňuje zdravotní potíže, jako jsou mastocytózy nebo autoimunitní a zánětlivá onemocnění. Z vývojového hlediska se žírné buňky společně s bazofily zdají být významné v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Podobně jako bazofily se žírné buňky vyvíjejí z prekurzorových CD34+ buněk kostní dřeně. Jejich přesný vývoj však nebyl dosud plně objasněn [4]. Na rozdíl od lymfocytů žírné buňky po diferenciaci necirkulují v krvi, ale jsou roztroušeny v různých tkáních v blízkosti krevních kapilár a v mukozálních pokryvech epitelů. Jejich největší podíl se nachází v kůži, mukóze plic a trávicího traktu.

Významné postavení žírných buněk v zánětlivých a alergických onemocněních vyžaduje detailní pochopení mechanismů jejich aktivace, přenosu signálu a jeho negativní regulace, jelikož mnoho alergických reakcí je způsobeno hypersenzitivitou na fyziologické podněty. Tato práce se zabývá regulační úlohou nedávno objeveného transmembránového adaptorového proteinu PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched

microdomains). Jedná se především o regulaci po aktivaci skrz FcεRI receptor a následný přenos signálu přes SFK (Src family protein tyrosine kinase). Ukazuje se, že PAG má v žírných buňkách komplexnější spektrum působení a to například tím, že interaguje s aktinovým cytoskeletem. Úloha PAG při imunoreceptorové signalizaci žírných buněk je zatím neúplně prozkoumaná. Tato práce má za cíl shrnout poznatky o tomto proteinu, zaměřit se na jeho roli v žírných buňkách, a poukázat na další možné cesty výzkumu.

1.2 Časná FcεRI signalizace v žírných buňkách

FcεRI receptor je nejintenzivněji studovanou povrchovou strukturou žírných buněk. Hraje velmi důležitou roli v degranulaci a vylití mediátorů. FcεRI receptor se skládá z podjednotek α, β a homodimeru γ. Transmembránový α řetězec váže IgE. Řetězec β patří do skupiny tetraspaninových transmembránových molekul a funguje jako amplifikační modul receptoru. Homodimery γ řetězců jsou spojeny disulfidickými můstky a spolu s β řetězcem obsahují několik imunoreceptorových tyrosin aktivačních motivů (ITAM), které jsou nezbytné pro transdukcii signálu uvnitř buňky. Po vazbě multivalentního antigenu na IgE-FcεRI komplexy dochází k agregaci FcεRI a vytvoření podmínek pro fosforylaci tyrosinů ITAM motivů β a γ řetězců receptoru Lyn kinázou, která patří do rodiny Src (SFK) [3]. Přičemž Lyn kináza se sama fosforyluje a aktivuje a je schopna specificky fosforylovat další proteiny včetně transmembránového adaptorového proteinu PAG [5,6]. Ten slouží jako platforma pro integraci mnoha signálů, přičemž jeden z výstupů je také negativní regulace Lyn kinázy.

Fosforylované ITAM motivy řetězců FcεRI komplexu představují vazebné místo pro další proteiny signální kaskády. K membráně a do oblasti signálního komplexu se přesouvají kinázy Syk a Fyn aktivující fosfatidylinositol-3 kinázu (PI3K), jejíž produkt fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát se stává jedním z asociačních partnerů pro proteiny s PH (plecstrin homologní) doménou [2]. Kromě toho obě kinázy fosforylují specifické tyrosiny dalších transmembránových adaptorových proteinů: LAT (Linker for activation of T cells) a NTAL (Non-T cells activation linker) [7]. Ty slouží jako „lešení“ pro solubilní cytosolické adaptory a proteiny s enzymatickou aktivitou. Signál je následně přenášen do distálních oblastí signalizace.

1.3 Adaptorové proteiny

Adaptorové proteiny postrádají enzymatickou aktivitu, zato však zahrnují více obecných funkcí jako je kompartmentalizace jiných proteinů, koordinace enzymatických aktivit a protein-proteinových interakcí. Dále zvyšují kinetiku enzymatických reakcí indukci proximity enzymů a jejich substrátů nebo zesilují specifitu interakcí molekul. Současné poznatky ukazují na nezastupitelnou roli adaptorových proteinů v koordinaci biochemických signálů nutných pro aktivaci buněk. Signální komplexy utvářející se po antigenem indukované agregaci FcεRI zahrnují širokou paletu transmembránových a solubilních cytosolických adaptorových proteinů [7].

Kruciální úlohu v proximálních dějích FcεRI signalizace vedoucí k sekreční odpovědi žírných buněk mají transmembránové adaptory LAT [8] a NTAL [9,10]. Přítomnost palmitoylačního motivu v sekvenci těsně pod membránou vede k lokalizaci těchto molekul do hypotetických membránových raftů. Oba adaptory vykazují buněčně specifickou expresi v rámci lymfoidních a myeloidních buněčných typů. Zatímco T-lymfocyty obsahují především LAT, B-lymfocyty v závislosti na vývojovém stádiu exprimují hlavně NTAL. Na plasmatické membráně žírných buněk se nacházejí oba adaptorové proteiny.

Další z řady transmembránových adaptorových proteinů je poměrně nedávno objevený PAG [5,6]. Velmi nápadná je jeho strukturní podobnost s již celkem dobře prostudovaným výše zmíněným adaptorem LAT [6]. Role fosfoproteinu PAG je zatím u žírných buněk prozkoumána jen málo. Vzhledem k výše zmíněnému významu adaptorových proteinů, je důležité pochopit význam tohoto signálního proteinu v aktivaci žírných buněk.

1.4 Membránové rafty

Řada experimentů naznačuje, že některé transmembránové adaptorové proteiny se nachází v tzv. membránových raftech. Původní model fluidní mozaiky dle Singera a Nicolsona považoval plasmatickou membránu za homogenní lipidovou dvojvrstvu, ve které se proteiny pohybují prostou difúzí. Pozdější studie ukázaly, že rychlost difúze proteinů v membránách buněk je 5-50krát nižší než v umělých lipozómech, což naznačovalo na přítomnost bariér bránících proteinům ve volném pohybu. Další práce odhalily rozdílné lipidové složení v různých oblastech plasmatické membrány. Přibývající výsledky vedly k formulaci hypotézy existence membránových raftů.

Na základě konference Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function 2006 jsou membránové rafty definovány jako malé (10-200 nm) heterogenní vysoce dynamické oblasti plasmatické membrány, obohacené o steroly a sfingolipidy, tzv. GEM (Glycosphingolipid-enriched membrane microdomains). Předpokládá se, že membránové mikrodomény ve formě lipidových raftů napomáhají kompartmentalizaci buněčných procesů [11]. Malé rafty mohou být za určitých podmínek stabilizovány formováním rozsáhlejších útvarů prostřednictvím protein-proteinových a protein-lipidových interakcí. Mezi molekuly, které jsou přítomné v membránových raftech, patří glykosylfosfatidylinositol (GPI)-zakotvené proteiny, které jsou lipidickou částí vnořeny do vnější vrstvy plasmatické membrány. Naproti tomu acylované proteiny jako například Lyn kináza a další SFK jsou zakotveny lipidickou částí do vnitřní vrstvy membrány. Transmembránové proteiny, mezi které patří PAG, LAT či NTAL membránou procházejí.

Předpokládá se, že adaptorové proteiny, aktivovaný FcεRI a některé další membránové proteiny se podílí na tvorbě raftových struktur. Rafty by teoreticky umožňovaly existenci jakýchsi izolovaných kompartmentů a tudíž časoprostorové oddělení jednotlivých interakčních partnerů.

Lipidové rafty však nebyly dodnes skutečně prokázány a raftová teorie se opírá především o nepřímé důkazy. Některé výsledky naznačují, že struktury považované za rafty mohou být artefakty používaných metod. Mnoho studií používá pro zjištění, zda protein se nachází v raftu nebo mimo raft, solubilizaci buněk detergenty typu Triton X-100 nebo NP 40 a následnou separací na sacharosovém gradientu. Působením detergentů mohou být membránové proteiny shlukovány v průběhu buněčné lýze do detergent rezistentních struktur tzv. DIM (detergent-insoluble membrane fraction). V současné době je těžké rozhodnout, jak je to s membránovými rafty doopravdy, a proto bude v dalším textu použit termín DIM, který exaktněji popisuje detergent-rezistentní struktury.

2 PAG

Při studiu GEM byl v imunoprecipitátech pozorován neznámý fosfoprotein o velikosti asi 80 kDa. 80 kDa fosfoprotein se například nacházel v takzvaném Fyn komplexu u T-buněk, což naznačovalo na jeho možnou interakci s Fyn kinázou [12]. K jeho identifikaci a odhalení některých funkcí přispěli nezávisle dva výzkumné týmy [5,6].

Jednou skupinou byl purifikován z periferních T-buněk a pomocí sacharozového gradientu identifikován v GEM, takže byl nazván PAG [5]. Sekvenováním byla objasněna nukleotidová sekvence a aminokyselinové složení. hPAG (human PAG) je dlouhý 432 aa (aminokyselin) a velikost 47 kDa. Za použití koprecipitací s Fyn byla potvrzena jeho asociace s touto kinázou.

Druhá skupina vycházela z předpokladu, že existuje membránový protein, který dokáže vázat Csk a atrahovat ji z cytosolu k buněčné membráně [13], kde sehrává svou roli v inhibici SFK [14,15]. Jako nejvhodnější zdroj hledaného proteinu byla zvolena embryonální mozková tkáň, protože obsahuje velké množství Csk a SFK. Koprecipitací s Csk byl opět získán fosfoprotein, který migroval na SDS-PAGE¹ v oblasti 80 - 90 kDa. I v tomto případě byla zjištěna zvýšená koncentrace v GEM. Při použití slabších detergentů jako Triton X-100 se protein nacházel v nerozpustné frakci tzv. DIMs. Sekvenací byla zjištěna délka 424 aa a předpokládaná velikost 46 kDa. Protože tento protein vázal Csk, byl nazván Cbp - Csk-binding protein. Tento protein je v literatuře běžně uváděn pod oběma názvy, PAG nebo Cbp. V této práci bude dále používán název PAG.

3 Od struktury k funkci

3.1 Struktura a lokalizace v buňce

Z aminokyselinové sekvence nebyla rozpoznána žádná N-koncová signální oblast, takže byla vyloučena jeho specifická interakce s buněčnými kompartmenty. Bylo však zjištěno, že za N-koncovým methioninem se vyskytuje vysoce hydrofobní oblast 20 aa (17-36) nasvědčující, že se jedná o integrální membránový protein typu III. Tedy α helix jedenkrát procházející membránou. Extracelulární oblast je velmi krátká, pouze 16 aa a pravděpodobně neobsahuje žádné postranslační modifikace jako glykosylace apod. Hned za membránovou oblastí se nachází sekvence CSSC na kterou se váže kyselina palmitoylová, která přispívá k rezistenci v neiontových detergentech. Nicméně PAG byl zjištěn i mimo DIM [16], což nasvědčuje tomu, že palmitoylace může být přechodným jevem. Následuje sekvence 6 aa, která je bohatá na bazické aminokyseliny (2 Arg a 2 Lys). Cytoplasmatická oblast obsahuje

¹ SDS-PAGE: Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS), je technika užívána k separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti (ta závisí na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti, stupni denaturace proteinu, postranslační modifikaci a dalších faktorech.

celkem 397 aa. Z toho 10 tyrosinů. 9 tyrosinů je součástí konzensus sekvencí rozeznávaných SFK (YxxV/L/I). Mezi těmito motivy tři vykazují velice těsnou podobnost s ITAM motivy (YxxL/V/I(x)nYxxL/V/I), až na jeden malý rozdíl, a to že u PAG je n větší (14, 14 a 26), než je typické pro ITAM (pro přehled [7]). Cytoplasmatická doména navíc obsahuje místa pro fosforylaci kinásami casein kinase 2 a protein kinase C (12 serinových a 10 threoninových zbytků). Dále byly rozlišeny 2 důležité oblasti bohaté na prolin (131-138 a 257-263), které mohou vázat SH3 domény [17]. Srovnáním lidské (432 aa) a myši (429 aa) aminokyselinové sekvence proteinu PAG lze usoudit na velmi konzervované signální motivy založené na fosfotyrosinech. Jedinou významnou výjimkou je Y341 (Obrázek 1). Zajímavá jsou rozdílná data z putování v SDS-PAGE a předpokládanou molekulovou hmotností. Pokud byla provedena translace mRNA PAG v bakteriích, byla velikost 68 kDa [6]. Přičemž předpokládaná velikost byla 46 kDa. Tuto zdánlivou diskrepanci autoři vysvětlují přítomností kladně nabitých aa (Asp a Glu = 13.9%). Molekulová hmotnost fosforylovaného PAG izolovaného z DIM se na SDS-PAGE jevila mezi 70 a 90 kDa. Tato odlišnost se dá zčásti vysvětlit fosforylací početných cytoplasmatických tyrosinů. Tuto domněnku potvrzuje i experiment, kdy při použití alkalické fosfatázy, která má schopnost defosforylovat tyrosiny, byla zjištěna velikost opět 68 kDa [6]. Jelikož je fosforylace, stejně jako nestandardní poměr aminokyselin důležitá pro specifickou funkci a interakci s jinými proteiny, mohou všechny tyto nesrovnalosti v molekulových hmotnostech napovědět více o funkci tohoto proteinu.

Později byl u člověka identifikován gen PAG1 na chromosomu 8² a u myši na chromozomu 3³.

²[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=55824&log\\$=databasead&logdbfrom=nucore](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=55824&log$=databasead&logdbfrom=nucore) (15. 4. 2009)

³[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=94212&log\\$=databasead&logdbfrom=protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=94212&log$=databasead&logdbfrom=protein) (15. 4. 2009)

```

1  MGPAGSLLGSG..QMQITLWGSIAAVAIFFVITFLIFLCS SCDREKKPRQHS GDHENLMNVPSDKMEFSR SVTSLATDAPASSEQNGALINGDILSEDST 98
1  MGPAGSVLSSGQMOMQMLWGSIAAVAMFLLITFLVLLCS TCDREKKPRQHS GDHENPMNVPSDKMFSHSATSLTTDALASSEQNGVLTNGDILSEDST 100
99  LTCMQHYEEVQTSASDLLDSQDSTGKPKCHQSRELPRIPPEAVDTMLTARSVDGQGLGMEGPTTEVLKDS SSSQENMVEDCLTETVKEI KEVAAAHLEK 198
101 LTCMQHYEEVQTSASDLLDSQDSTGKAKCHQSRELPRIPPENAVDELITARAADTELGPVVEGPTTEVLKDS SSSQENMVEDCLTETVKEI KEVA. . . . DK 195
199  GHSGKAKSTSASKELPGPQTEGKAEFAETASVDRNKKCRQSVNVESILGN SCDPEEEA PPPVVKLLDENENLQEKEGGEAEESATD TTTSETNKRFS SLS 298
196  GGGKSKSTSALKELQGAPMEGKADFAETASVDRNKKCRHSANAESILGTCS DLDEES PPPVVKLLDENANLPQEGGQAE EQAAEGTGGRSKRFS SLS 295
299  YKSR EEDPTL TEE EISAMTS SVNKPGQLV NKSQQSLTVP ESTTTSIQGDPQRSPSSCNDLYATVKDFEKT PN. . STLPPAGRPSEEP EPEPTTEA IQT LNRE 396
296  YKSR EEDPTL TEE EISAMTS SVNKPGQS AHKPGPCMKGPESACHSMKGLPQRSSSSCNDLYATVKDFEKT PNSISTLPPARRPSEEP EPEPTTEA IQT LNRE 395
397  EEKATLGTNGHHGLVPKENDYESISDLQQRDITRL 432 Human
396  DEKVPLETNGHM. . VPKESDYESIGDLQCCRDTLRL 429 Mouse

```

Obrázek 1: Srovnání lidské (nahore) a myši (dole) aa sekvence proteinu PAG

Transmembránová oblast je v rámečku, všechny tyrosiny jsou tučně a tyrosinové signální motivy jsou navíc označeny tlustou linkou. Y341 a na něm založený motiv se nachází pouze na lidském proteinu PAG, kdežto u myši chybí. (Převzato z: Brdička, T., et al (2008))

3.2 PAG je exprimovaný v širokém spektru tkání

Původní práce dokládají, že PAG se vyskytuje v mnoha buněčných typech [5,6]. Nejvíce však v buňkách imunitního systému, vyvíjejícím se mozku, v plicích, srdci, varlatelych a placentě [5,6,18]. Navíc se v některých buněčných typech při cDNA hybridizacích objevovalo více proužků, což nasvědčuje o možném alternativním sestřihu nebo existenci homologních proteinů [5]. Alternativní sestřih však dosud nebyl prokázán. V buňkách krevního systému byla zjištěna zvýšená exprese v lymfocytech, žírných buňkách, monocytech, slabší v neutrofilech, ale také v krevních destičkách [5] a erytrocytech [16].

3.3 PAG atrahuje z cytosolu Csk - negativní regulátor SFK

Přítomnost četných fosforylovaných tyrosinů v PAG naznačovala na možnou vazbu SH2 domén. První experimenty ukázaly poměrně silnou vazbu SH2 domén rekombinatních proteinů Lck, Fyn, Lyn, Csk, Shc, Vav, GAP, PI3K, ZAP70, Syk a slabší vazbu Grb2, SLP-76, SHP-1 a SHP-2 na fosforylovaný PAG v Jurkat T-buňkách [5].

Již v původních pracích byla prokázána poměrně silná vazba Csk na fosforylovaný PAG [5,6]. PAG tudíž slouží jako protein atrahující Csk k buněčné membráně z cytosolu a tím se dostává do blízkosti membránově asociovaných SFK, které může inhibovat pomocí fosforylace jejich C-terminálního tyrosinu. Vazba Csk na PAG zvyšuje výrazně její afinitu k SFK. PAG tedy neslouží pouze jako „lešení“ pro vazbu Csk, ale přispívá zásadní měrou i

k její aktivaci a kinázové specifitě [19,20]. Csk obsahuje SH2 vazebnou doménu a proto může nasedat na některý s tyrosinových motivů PAG. Když byly provedeny variace bodových mutací všech deseti tyrosinů za fenylalanin, jako jednoznačné vazebné místo pro Csk byl u myši identifikován Y314 (u člověka Y317) [5,6]. Pomocí fluorescenčních fúzních proteinů byla potvrzena i kolokalizace PAG a Csk na membráně. Pokud chyběla N-koncová oblast zodpovědná za vazbu PAG do membrány, kolokalizace Csk s PAG na membráně nenastává [5].

3.4 PAG a kinázy

Důležitou otázkou je, která kináza se podílí na tyrosinové fosforylaci PAG. Při použití PP1 inhibitoru, který inhibuje enzymovou aktivitu Src kináz, se Csk na PAG neváže. Práce na toto téma ukazují značnou diverzitu v závislosti na typu použitých buněk [5,6,16,21-23]. Nejvíce prozkoumaná je situace v T-buňkách. V imunoprecipitátech z periferních T-buněk byla zjištěna vazba PAG s Fyn kinázou a dá se předpokládat, že právě ona je zodpovědná za fosforylaci PAG [22]. Je zajímavé, že vazba Csk na PAG je podmíněna fosforylací Y314, zatímco interakce Fyn-PAG je na fosforylaci PAG nezávislá. Je tedy zřejmé, že Fyn se váže na PAG pomocí jiných mechanismů než interakcí přes SH-2 doménu Fyn.. Z pozorování, že po aktivaci TCR dochází k defosforylaci PAG a následnému uvolnění Csk z membránové oblasti do cytosolu a zvýšení aktivity SFK se PAG jeví jako negativní regulátor TCR signalizace. SFK jsou zodpovědné za fosforylaci TCR podjednotek, které udržují tento receptor v aktivovaném stavu. Důležitou úlohu má Lck kináza, která fosforyluje CD3 komplex a ζ podjednotku TCR. Při zvýšení exprese PAG dochází k defosforylaci TCR a následnému narušení Lck dráhy vedoucí k důležitým transkripčním faktorům [5].

V T-buňkách lze sledovat jakousi negativní zpětnou regulační smyčku fungující asi takto: v neaktivovaném stavu je PAG fosforylovaný na svých tyrosinech, za což jsou zodpovědné kinázy z rodiny Src (SFK). Hlavní úlohu bude nejspíš hrát Fyn, protože interakce s PAG je poměrně silná a tato kináza je v T-buňkách exprimována v poměrně velkém množství. Csk je vázána na PAG Y314 a inhibuje SFK fosforylaci jejich C-terminálního tyrosinu. Po aktivaci TCR dochází k defosforylaci adaptorového proteinu PAG a ztrátě vazby Csk na PAG, tedy její návrat z membránové oblasti do cytosolu. SFK již nejsou inhibovány a roste jejich aktivita, spouští se mnoho důležitých buněčných signálních drah TCR signalizace. Jakmile SFK opět nafosforyluje PAG, Csk se na něj naváže a vyrovná hladinu aktivity SFK do klidového stavu.

3.5 PAG a fosfatázy

Velmi zajímavou a dosud nezodpovězenou otázkou ovšem zůstává, co defosforyluje PAG. Musí existovat fosfatázy, které jsou protilehlými hráči v balancování fosforylace PAG a následně tedy Csk aktivity. Existuje několik spekulací, jako např. účast CD45, ale přesvědčivé důkazy zatím chybějí. Odhalení tohoto tajemství by bylo bezesporu zajímavé pro hlubší porozumění dynamiky fosforylací a defosforylací adaptorového proteinu PAG a také jako potenciální místo terapeutického zásahu. Docela reálná je totiž úvaha, že změna v klidové fosforylaci PAG může vést ke zvýšené aktivitě SFK a tudíž k narušení klíčových signálních drah vedoucích k hyperaktivitě imunitního systému, zánětlivým reakcím, zvýšené proliferační schopnosti s následkem nádorového zvrhnutí.

3.6 PAG je nejlépe prostudovaný v T-buňkách

Zatímco výše popsaná dráha je pozorována u T-buněk, existují práce, které dokazují velice širokou variabilitu ve funkci tohoto adaptorového proteinu. Což lze odhadnout již z tak širokého spektra tkání, ve kterých je exprimován. To by mohlo být způsobeno jeho velmi konzervovanou rolí v buněčné funkci, nicméně takové tvrzení není z dosud zveřejněných dat moc pravděpodobné. Spíše se zdá, jako by byly využívány paralelní dráhy, využívající podobné motivy. Ovšem konkrétní hráči a jejich interakce se napříč tkáňovou specifikou liší a i konečný dopad na buněčnou signalizaci může být jiný, dokonce až zdánlivě opačný [5,6,16,21,23]. Proto je velmi těžké hovořit o funkci tohoto proteinu v obecné rovině a je třeba myslet na to, že data z prací prováděných na odlišných typech buněk mohou vykazovat i zdánlivě rozporuplné výsledky. Nicméně se zdá, že jeho hlavní funkce je atrahovat z cytosolu Csk a její vazba na Y314 molekuly PAG je všem buněčným typům společná. Odlišnosti se tedy týkají především interakcí PAG s SFK, eventuelními fosfatázami, jinými adaptorovými proteiny a dalšími interakčními partnery.

I když je situace u žírných buněk daleko méně prozkoumaná, je známo, že na rozdíl od T-buněk, je PAG v neaktivním stavu jen velmi slabě fosforylovaný a po aktivaci FcεRI receptoru dochází k fosforylaci PAG a následnému navázání Csk na Y314, takže dojde k inhibici SFK [21]. Kinázou zodpovědnou za fosforylaci PAG u žírných buněk je Lyn, zatímco u T-buněk je to Fyn, [21,24,25]. Další odlišnosti PAG signalizace u žírných buněk jsou rozebrány níže (kapitola 5)

Podobně u B-buněk je situace zmapována méně než u T-buněk. Nicméně některé studie ukazují, že PAG je silně exprimován v rychle proliferujících buňkách zárodečných center sekundárních lymfatických folikulů, ale naopak je velmi slabá nebo chybí v klidových buňkách pláštěvé zóny [18,26]. Možné vysvětlení vysoké exprese v rychle proliferujících buňkách je, že Csk a PAG-regulované SFK mohou fosforylovat inhibiční motivy negativních regulátorů jako CD22 nebo PIRB (Paired-immunoglobulin like receptor-B), které následně potlačují funkci SFK supresorů s konečným pozitivním efektem na aktivitu B-buněk [7].

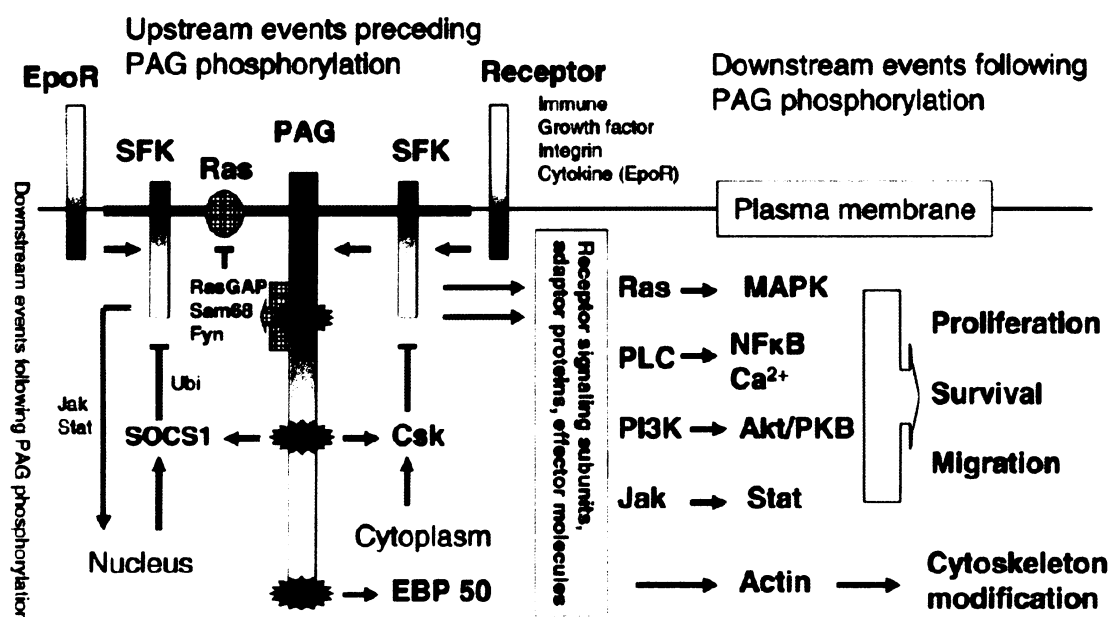
Je také nesprávné mluvit pouze o negativní regulaci, protože celá situace je poněkud komplikovanější a v jistých případech lze pozorovat i pozitivní regulaci [24,27,28]. Přičemž může záležet na síle signálu, interakčních partnerech a mnoha dalších faktorech, které ještě nejsou uspokojivě objasněny.

4 PAG jako uzlový bod mnoha signálních drah

Jak již bylo zmíněno výše, prvotní zjištěná úloha fosfoproteinu PAG je atrahování Csk z cytosolu a negativní regulace receptorové imunsignalizace přes TCR (výše) i jiné imunoreceptory. Tato negativní regulace probíhá především skrz SFK. SFK mají ovšem v organismu velmi důležitou úlohu, a další výzkumy ukázaly, že rozsah jejich interakcí je mnohem provázanější, než by se na první pohled mohlo zdát. I role adaptorového proteinu PAG je mnohem širší a komplexnější (Obrázek 2).

Výzkumy odhalily, že PAG hraje roli také v erythropoetinové signalizaci, kde se objevuje dvoukrokový mechanismus utlumení funkce Lyn kinázy [16] (více viz kapitola 5.4.2.1.). PAG se účastní také v signalizaci přes integrinový receptor a EGFR (epidermal growth factor receptor) signalizaci. Zatímco integrinové receptory nemají kinázovou aktivitu, EGFR patří do rodiny tyrosin kinázových receptorů, které jsou aktivovány transfosforylací. Oba receptory převádějí signál na SFK a ty následně spouští mnoho drah, jako MAPK, NFκB a Akt/PKB se zásadním dopadem na schopnost migrace, proliferace, přežití a vzniku metastáze [29,30]. Recentní studie popisují, že SFK jsou negativně regulovány PAG-Csk komplexem v integrinové a EGFR signalizaci [31,32]. V buňkách s vyřazeným PAG byla pozorována hyperfosforylace SFK a snížená schopnost buněčné migrace, podobně, jako je tomu u Csk deficientních buněk. Jako kináza zodpovědná za fosforylaci PAG byla identifikována Fyn. Po stimulaci integrinového receptoru se předpokládá negativní zpětná vazba $Fyn \rightarrow PAG \rightarrow Csk \dashv Fyn$ [31]. Druhá studie ukazuje negativní efekt PAG na aktivaci Src, Erk (MAPK) a Akt/PKB kinázy, stejně jako na nádorovou transformaci a růst nádorů. Autoři

navrhují PAG-Csk regulaci, jako obecnou negativní zpětnou vazbu v drahách aktivovanými SFK [32].



Obrázek 2: PAG jako uzlový bod mnoha signálních drah

Diagram ukazuje pozici adaptorového proteinu PAG v časných fázích mnoha signálních drah a jeho centrální pozici ve 4 známých regulačních smyčkách. SFK inhibice pomocí Csk (atrachována z cytosolu na PAG); interakce s cytoskeletem přes EBP50; SFK degradace pomocí SOCS1; Ras regulace přes Sam68, RasPAG, Fyn, PAG multimolekulární komplex. V pravé části jsou naznačeny následné efekty PAG regulace až ke konečnému projevu v chování buňky. Lze si všimnout komplexnosti těchto drah a možného propojení. Je třeba připomenout, že tyto dráhy se mohou vyskytovat separovaně v závislosti na typu tkáně. (Převzato z: Svec (2008))

V nedávné době byla objevena nová regulační role PAG. A to sice v Ras-MAPK dráze [33]. Ras je monomerní G-protein asociovaný s plasmatickou membránou. Jeho aktivace stojí na počátku několika velmi důležitých signálních kaskád, včetně MAPK, PI3K a PLC. Tyto dráhy mají zásadní efekt na mnoho životně důležitých funkcí v buňce, jako buněčná proliferace a kontrola buněčného cyklu [34]. Jejich narušení často vede k nádorovému zvrhnutí [35]. Ras je aktivovaný, váže-li GTP. Jeho vnitřní GTPázová aktivita je aktivována proteinem RasGAP (Ras GTPase activating protein) [36]. Smida et al. pozoroval pokles Ras aktivity v přítomnosti PAG bez Csk vazebného místa. Tedy negativní regulace Ras je PAG závislá, ale Csk nezávislá. Překvapivé bylo objevení komplexu PAG, Fyn, RasGAP a Sam68 (také nazýván KHDRBS1, z angl. KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1). Zdá se tedy, že PAG umožňuje nasazení Sam68 a přes RasGAP je aktivita Ras

inhibována [33]. Schéma viz. Obrázek 2. Porucha v tomto komplexu může mít fatální následky ústící v autoimunitní reakce v buňkách imunitního systému, či nádorové zvrhnutí.

Krátce po objevení PAG byla zjištěna jeho nepřímá interakce s F-aktinem [37,38], polymerní formou aktinu, která tvoří aktinový cytoskeleton. Jeho depolymerizace vede často k zesílení buněčné signalizace [39,40]. Nejspíš díky zvýšené mobilitě membránových proteinů. Jelikož je PAG také membránový protein a navíc interaguje s mnoha dalšími membránovými proteiny, můžou být důsledky této interakce velmi zajímavé. Podrobněji viz kapitola 5.5.

5 PAG v žírných buňkách

5.1 Interakce PAG s FcεRI receptorem

Mnoho funkčních odpovědí žírných buněk na okolní prostředí se odehrává skrz vysokoafinitní receptor FcεRI. Po navázání IgE s antigenem na FcεRI receptor dochází k transdukcí signálu, který může vést k imunitní odpovědi: výlevu histaminu, produkci leukotrienů, cytokinů, chemokinů a dalších látek nebo také přestavbě cytoskeletu a následné migraci buněk či mnoha dalším dějům. Agregace FcεRI vede k fosforylaci několika buněčných proteinů včetně jeho vlastních podjednotek β a γ. Ty obsahují ITAM motivy, jejichž fosforylované tyrosiny slouží následně jako místa pro vazbu SH2 domén, podobně jako u receptorů T a B-buněk.

Jelikož existují funkční paralely mezi FcεRI a TCR, dalo by se předpokládat, že PAG bude mít v žírných buňkách analogickou funkci jako u T-buněk. Překvapením bylo zjištění, že fosforylace PAG má zde zcela jiné načasování, než u T-buněk. PAG v žírných buňkách je v klidovém stavu mírně fosforylovaný a po aktivaci přes FcεRI dojde k prudkému nárůstu fosforylovaných tyrosinů [21]. U T-buněk je situace přesně opačná. Z toho vyplývá, že PAG v žírných buňkách může mít jinou roli než u T-buněk.

5.2 Lyn kináza je zodpovědná za fosforylaci PAG

Předpokládá se, že Lyn kináza je zodpovědná za prvotní fosforylaci FcεRI receptoru [41,42]. Alespoň část molekul Lyn je permanentně, ale slabě asociována s β podjednotkou FcεRI a zprostředkovává fosforylaci receptoru procesem zvaným transfosforylace [42]. Lyn tedy pozitivně ovlivňuje časnou FcεRI signalizaci. Jelikož je Lyn kináza acylována a zakotvena v membráně a při izolaci z detergentem solubilizovaných buněk pomocí

sacharosového gradientu se nachází v DIM. FcεRI se v klidovém stavu nachází mimo DIM, ovšem po agregaci je nalézán v těchto strukturách [43]. Agregovaný a fosforylovaný FcεRI váže další Lyn, takže se účinnost fosforylace touto pozitivní zpětnou vazbou ještě zvýší.

Lyn se v žírných buňkách váže i na PAG a je tou kinázou, která jej fosforyluje [21,44]. Lyn deficientní žírné buňky vykazují snížení fosforylace PAG v rozmezí 62-92 % a ztráta této fosforylace nebyla nahrazena jinými možnými redundantními drahami ostatních SFK [44]. Tyto výsledky naznačují, že PAG je v žírných buňkách fosforylován především Lyn kinázou.

Lyn tedy nahrazuje funkci Fyn kinázy v T-buňkách. I když Fyn kináza je v žírných buňkách taktéž exprimována a hraje poměrně zásadní roli v buněčné signalizaci a degranulaci, její přítomnost signifikantně neovlivňuje fosforylaci PAG ani PAG závislé atrahování Csk z cytosolu a jeho inhibiční funkci na SFK. [44]. Toto pozorování lze vysvětlit mnohem nižší expresí Fyn oproti Lyn v žírných buňkách. Hypotéza, že by se pouze Lyn nacházela v blízkosti PAG a FcεRI (například prostřednictvím existence membránových raftů) se nezdá příliš pravděpodobná, protože PAG prostřednictvím Csk negativně ovlivňuje Fyn a tudíž se musí dostat tyto dvě molekuly do kontaktu. Také je možné, že je jeden z proteinů posttranslačně modifikován tkáňově specifickým způsobem a tudíž nemůže dojít k vazbě SH3 a SH2 domény na PAG (nutné pro její správnou funkci).

Lyn, ostatně jako všechny SFK, je negativně regulována fosforylací C-terminálního tyrosinu, konkrétně tedy Y508, Csk tyrosin kinázou. Csk se váže na pY314 PAG, takže tímto způsobem zajišťuje negativní zpětnou vazbu kinázy Lyn. Po agregaci FcεRI dochází ke zvýšení atrahované Csk do membránové oblasti [21]. Takže PAG tímto způsobem může fungovat jako negativní regulátor FcεRI signalizace. Nadměrná exprese PAG vede k vyšší fosforylaci a tudíž i vyššímu vychytávání Csk z cytosolu. U buněk se zvýšenou expresí PAG bylo prokázáno taktéž jednoznačné snížení degranulace po aktivaci FcεRI ve srovnání s WT (z angl. divoký typ). Nicméně aktivace pomocí jiných aktivátorů ke změně nevedla. Zvýšená exprese navíc vykazuje sníženou mobilizaci Ca^{2+} [21]. Títož autoři ukazují, že overexprese PAG nemá vliv na klidovou preasociaci Lyn s FcεRI a tato hladina zůstává stejná i po agregaci receptoru. Což je v rozporu s pozorováním u normální exprese, kde dochází k dalšímu navázání Lyn na FcεRI. Autoři úkaz vysvětlují tím, že regulační C-terminální tyrosin nemusí být defosforylovaný v důsledku zvýšeného množství Csk v membránové oblasti a tudíž je Lyn kináza inhibována.

Zajímavé je, že Lyn izolovaná z DIM vykazuje vyšší specifickou aktivitu než Lyn z nonDIM oblastí. Tato aktivita koreluje se zvýšenou fosforylací aktivačního tyrosinu v kinázové doméně [45]. Autoři předpokládají, že Lyn se po agregaci FcεRI dostane do membránových raftů a je stericky izolována od fosfatáz zodpovědných za defosforylaci tohoto tyrosinu a následnou inhibici Lyn kinázové aktivity. Tato hypotéza by přicházela v úvahu, kdyby byly prokázány raftové struktury takových rozměrů, jež by mohly tuto sterickou bariéru zajistit. Teorie raftů zatím v tomto ohledu není spolehlivě objasněna. Stejně jako rafty by ovšem mohla zastávat interakce Lyn s jiným proteinem, který by buď přímo bránil přístupu fosfatáz do aktivního místa, případně by napomáhal Lyn přetrvávat v konformaci neslučitelnou s působením fosfatáz. Takovouto interakci by mohl zastávat i PAG nebo některá z podjednotek FcεRI. Analogie byla pozorována u B-buněk, kde PAG ve spolupráci se STAT 3 brání defosforylaci C-terminálního tyrosinu a zároveň nutí udržovat Lyn v konformaci chráněnou před intramolekulární inhibicí [23].

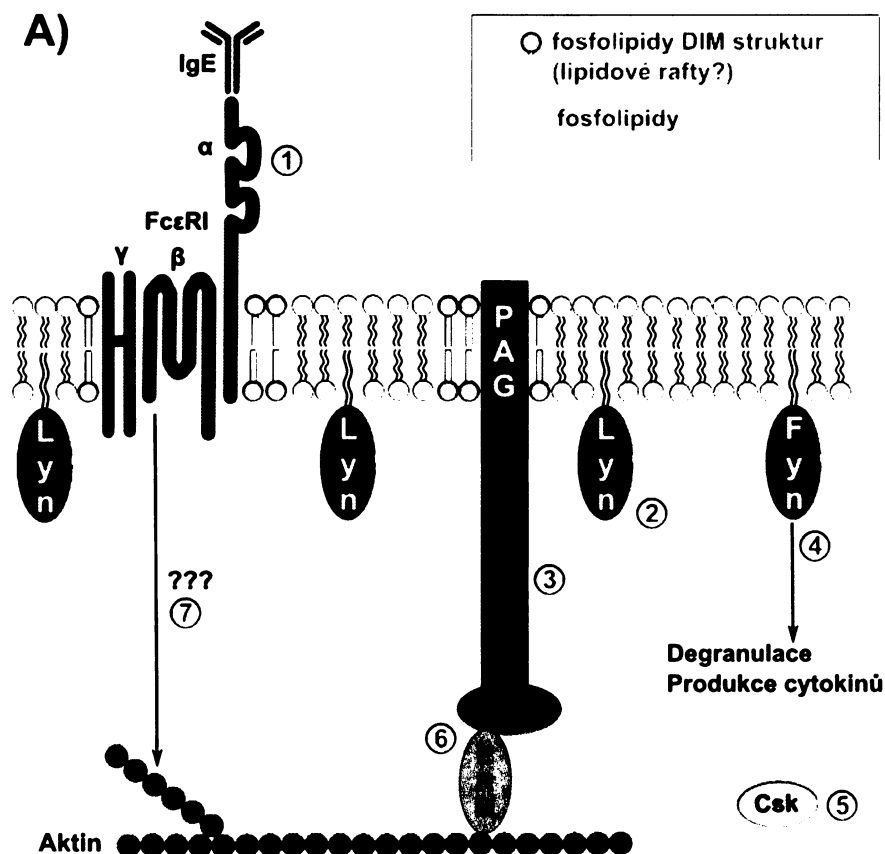
Z výsledků pokusů s Lyn KO (z angl. knock out) BMMCs vyplývá, že absence Lyn nevykazuje snížení v FcεRI závislé degranulaci [46]. Navíc byla pozorována zvýšená senzitivita Lyn deficientních žírných buněk i když fosforylace FcεRI byla prokazatelně snižena [46,47]. Na druhou stranu degranulace byla závislá na PI3K. Použitím inhibitoru PI3K je degranulace inhibována. Jelikož PI3K je aktivována Fyn kinázou a Fyn deficientní BMMCs vykazují poruchu degranulace, lze říci, že pozitivní regulace degranulace u žírných buněk je nezávislá na Lyn, ale závislá na Fyn kináze [48].

Neaktivované BMMCs z Lyn KO myši vykazují zvýšenou kinázovou aktivitu Fyn [44]. To lze vysvětlit ztrátou negativní regulace skrz PAG, který nemůže být fosforylovaný, a tudíž se na něj neváže Csk schopná inhibovat SFK včetně Fyn kinázy. Po aktivaci dojde k vysokému nárůstu aktivity Fyn, jelikož aktivitu této kinázy ovlivňují další cesty.

5.3 Souhrný pohled na FcεRI závislou signální smyčku

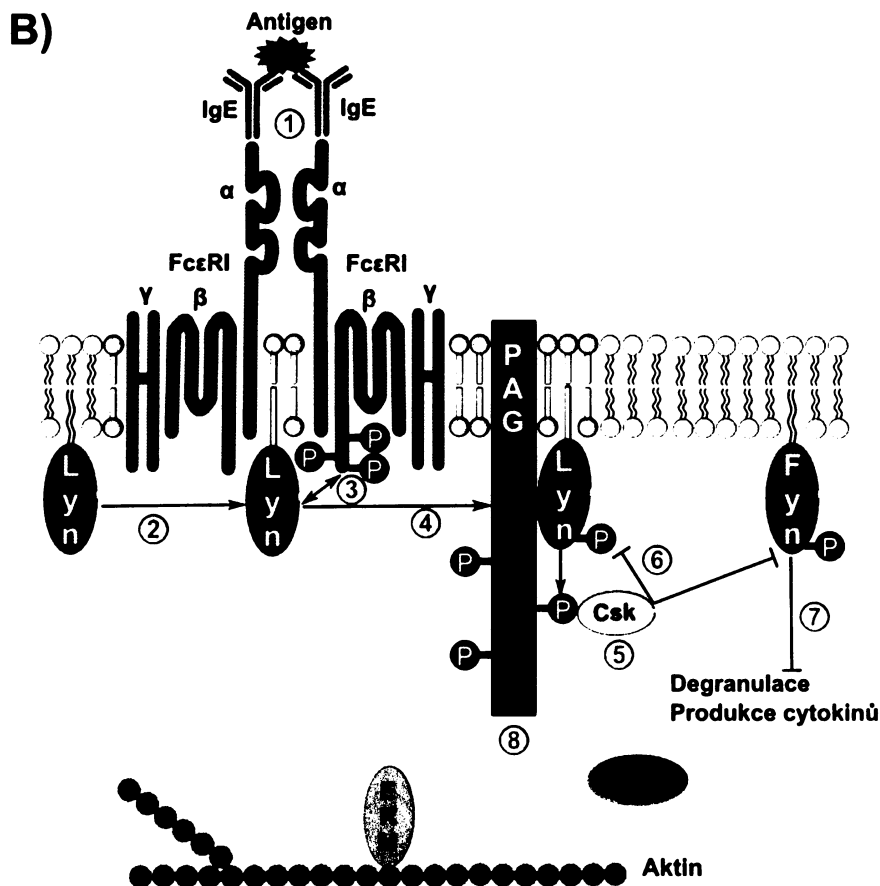
Pro shrnutí signální dráhy: PAG tedy v žírných buňkách zastává funkci negativního regulátoru FcεRI. Jakmile je receptor aktivován antigenem, dojde k aktivaci Lyn a spouští se kinázová dráha. Lyn pozitivní zpětnou vazbou zvyšuje množství aktivované Lyn v blízkosti FcεRI. Lyn je schopna fosforylovat PAG. Fosforylovaný PAG atrahuje Csk z cytosolu a umožní této kináze inhibovat funkci Lyn skrz fosforylaci C-terminálního tyrosinu. Nicméně transdukce signálu přes FcεRI vedoucí k degranulaci a uvolnění histaminu vede přes Fyn a je na Lyn nezávislá. Lyn kináza hraje v tomto signalosomu roli aktivátora negativní regulace

ostatních SFK, jež spouští degranulaci, produkci cytokinů a další dráhy. Fyn kináza je sice v žírných buňkách exprimována ve srovnání s Lyn v daleko menším množství, její význam je ale pro imunitní odpověď zásadní. Studie *in vivo* i studie s navrácením fenotypu potvrzují tuto teorii [25,44] (Obrázek 3).



Obrázek 3A: Adaptorový protein PAG v neaktivovaných žírných buňkách

FcεRI není fosforylován (1), Lyn kináza (2) a Fyn kináza (3) jsou zakotveny do plasmatické membrány a jsou aktivní; Adaptorový protein PAG (4) není fosforylován na Y314 a Csk se nachází volně v cytosolu (5); PDZ doména PAG může vázat EBP50 nebo jiný blíže příbuzný protein a přes proteiny rodiny ERM se váže k aktinovému cytoskeletu (6). Je velice pravděpodobná i nepřímá vazba FcεRI na aktin. Toto ukotvení membránových proteinů, může mít za následek sterickou izolaci v klidovém stavu.



Obrázek 3B: Adaptorový protein PAG v antigenem aktivovaných žírných buňkách

Multivalentní antigen vede k tvorbě agregátů FcεRI (1); Lyn kináza (2) fosforyluje β podjednotku FcεRI (3) a fosforylovaný FcεRI přitahuje další Lyn a umožňuje její fosforylaci; Lyn se váže na PAG a fosforyluje jej na jeho tyrosinech včetně Y314 (pro přehlednost jsou znázorněny pouze 3 fosfáty). Csk je atrahována z cytosolu a váže se na PAG Y314 (5). Csk fosforyluje C-terminální tyrosin Lyn a Fyn, čímž je jejich aktivita inhibována (6); Signál směřující k degranulaci a produkci cytokinů je zeslaben (7); Vazba PAG na aktin je zrušena (8).

5.4 Regulace Lyn

5.4.1 Lyn deficientní fenotyp v patologii

SFK jsou velmi důležitou složkou transdukce buněčného signálu a jejich nadměrná aktivita může vést u žírných buněk k hypersenzitivitě na alergenní podněty. Adaptorový protein PAG hraje v jejich negativní regulaci zásadní roli a proto je zajímavé zkoumat jeho regulační efekt na SFK a jeho změny v patologických jevech. Když byla provedena srovnávací studie dvou kmenů myši EL (podléhající epilepsii) a ASK (odolný proti epilepsii), byl pozorován fenotyp ASK vs. EL velmi podobný Lyn deficientním myším vs. WT [25].

ASK myši vykazovaly redukcí fosforylace PAG a zvýšenou aktivitou Fyn a c-Src kinázy. Jelikož množství exprimované Lyn, Fyn i PAG bylo v obou typech buněk srovnatelné, musí existovat nějaká jiná buněčně specifická odlišnost. Situace je o to zajímavější, že fosforylace β podjednotky Fc ϵ RI zůstala nedotčena. Autoři tuto situaci vysvětlují rozdílnou separací v raftových doménách. Nicméně pro tuto teorii nesevídčí žádná další data. Stejně pravděpodobná může být teorie, že Lyn či PAG jsou nějakým způsobem postranlačně ovlivněny, například fosforylací a tudíž dochází k méně specifické vazbě mezi těmito interakčními partnery. Mutace byly vyloučeny srovnáním aminokyselinových sekvencí [25]. Samozřejmě je taktéž možné, že se do věci zapojují mutované fosfatázy Lyn či PAG a další proteiny, které s nimi interagují a ovlivňují je. Nicméně takových molekul může být mnoho. Byl proveden pokus o porovnání exprese CD45, jakož to jedné z fosfatáz SFK, ale mezi ASK a EL myšmi nebyl pozorován rozdíl. Teoreticky by zde mohl sehrát svou roli aktinový cytoskelet. Viz kapitola 5.5.

Zajímavá je v tomto případě také funkční podobnost mezi epilepsií a anafylaxií. Je totiž známo, že fosforylace NMDA receptorů v CNS je způsobena Fyn a tím zvyšují propustnost kanálu při aktivaci, což může vést k epilepsii [49]. Takže zde může existovat analogie ve funkci SFK v těchto patologických jevech imunitního a nervového systému.

5.4.2 Deaktivace a degradace Lyn

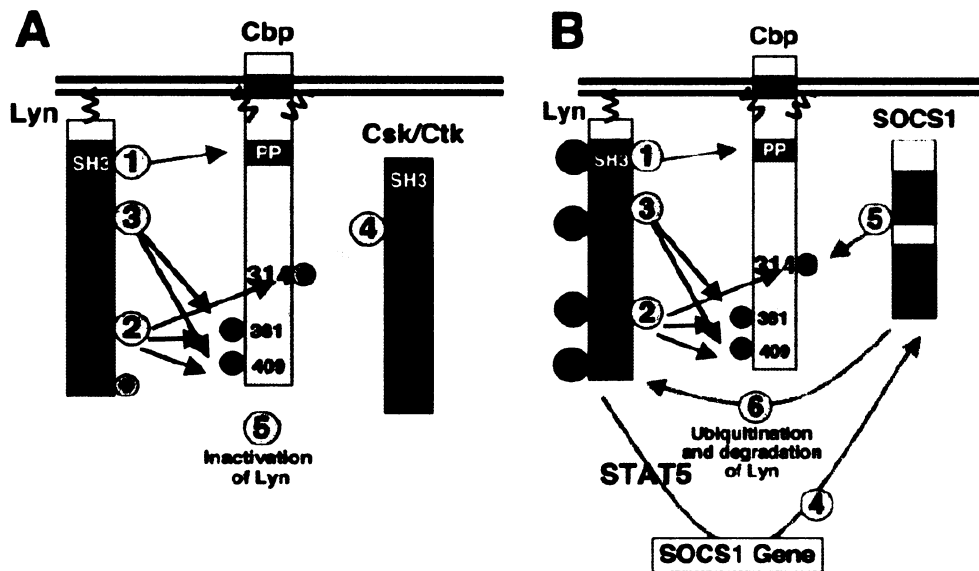
Aktivita Lyn kinázy je úzce spjata s adaptorovým proteinem PAG. Bude zajímavé prozkoumat podrobněji strukturní interakce těchto proteinů. Bohužel detailní studie na toto téma nebyly zatím na žírných buňkách provedeny. Existují ovšem studie na buňkách s velmi podobnou situací jako u buněk žírných. A to sice erytroidní buňky aktivované Epo (Erythropoetin) receptorem [16] a velmi současná studie na B - buňkách [23].

5.4.2.1 PAG jako dvoukrokový regulátor Lyn

Erythropoietin se váže na Epo receptor a spouští transdukci signálu na dráhy vedoucí k buněčné proliferaci a indukci terminální diferenciace erytroidních prekurzorů [50]. Jedna z mnoha signálních drah vede přes Lyn kinázu. Lyn kináza je v v tomto případě zodpovědná za fosforylací STAT5, Band 3 [51] a také PAG [16]. Ukazuje se, že po Epo stimulaci se Lyn aktivuje a po 10-30 min (Obrázek 4 A). Dochází k prudkému poklesu kinázové aktivity a následně po několika hodinách dojde k degradaci Lyn. PAG byl identifikován jako koordinátor těchto dějů zodpovědných za omezení Lyn kinázové aktivity [16]. V neaktivovaných buňkách

vzniká preasociovaný komplex Lyn a PAG skrze SH3 doménu Lyn a prolin bohaté oblasti PAG. Po stimulaci Epo dojde k zvýšení kinázové aktivity Lyn a následné fosforylaci PAG, včetně Y314, Y381 a Y409. Fosforylace Y381 a Y409 umožní pevnější asociaci mezi Lyn a PAG skrze Lyn SH2 doménu. Jelikož Y314 umožní vazbu Csk, je Lyn aktivita inhibována, stejně jako u žírných buněk.

Po této rychlé deaktivaci Lyn byla u erythroidních buněk pozorována i oddálená degradace Lyn (Obrázek 4 B). Epo signalizace indukuje přes JAK/STAT a Lyn dráhy transkripci proteinů SOCS. Bylo zjištěno, že SOCS1 se váže na fosforylovaný PAG a způsobí ubiquitylaci Lyn a tím pádem následnou degradaci v proteasomu. Je zajímavé, že SOCS1 se váže na Y314, tedy na stejné místo jako Csk [16]. Je otázka, zdali má k Y314 vyšší afinitu, takže Csk vytěsňuje, nebo se váže pouze na volné fosfotyrosiny. Nicméně těch po deaktivaci Lyn ubývá .



Obrázek 4: Dvoukrokový model inaktivity a degradace kinázy Lyn

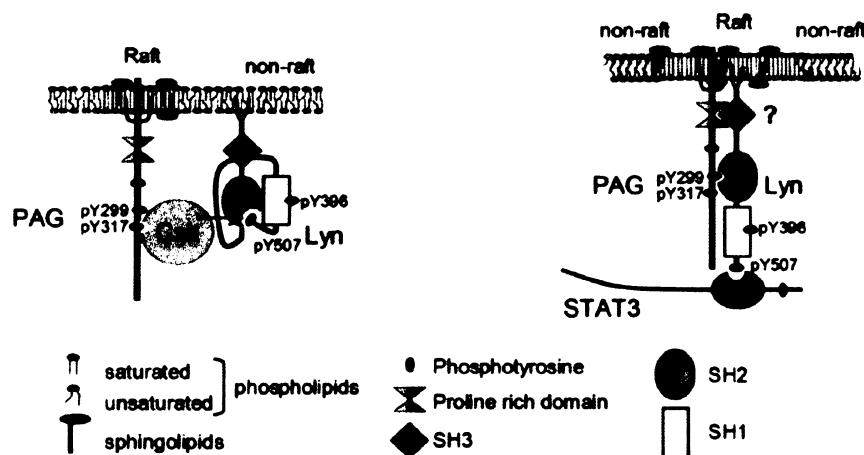
(A) Model časné deaktivace Lyn skrz Csk, která se váže na PAG a redukuje kinázovou aktivitu během několika minut po Epo aktivaci. 1) SH3 doména Lyn asociuje s prolin bohatou oblastí na PAG. 2) po Epo stimulaci, Lyn fosforyluje PAG na jeho tyrosinech. 3) SH2 doména Lyn se váže specificky na Y381/Y409 PAG. 4) SH2 doména Csk je atrahována na Y314 PAG. 5) Csk fosforyluje Y508 Lyn a tím ji inhibuje. (B) Model pozdní degradace Lyn skrz SOCS1 ubiquitylaci Lyn po několika hodinách po Epo aktivaci. 1)-3) jako (A). 4) Lyn aktivuje STAT5 a tím zvýší transkripci SOCS1. 5) SH2 doména SOCS1 je atrahována na Y314 PAG (stejný jako u Csk). 6) SOCS1 zprostředkovává ubiquitylaci Lyn a tím její degradaci v proteasomech. (Převzato : Ingleby, E., et al. (2006))

PAG tedy slouží u erytroidních buněk jako koordinátor dvoukrokového snížení aktivity Lyn. Důležité je zjištění, že Lyn již v neaktivním stavu je preasociována s PAG pomocí SH3. Podobná interakce může fungovat i v žírných buňkách. SH3 doména může tedy hrát roli v rozdílné specifitě SFK k PAG v různých tkáních. Například postranlační modifikací, změnou konformace, či naopak změnou konformace PAG v prolinové oblasti. Zatím neprozkoumaná je u žírných buněk pozdní odpověď po aktivaci Lyn. PAG může i zde sloužit jako dvoukrokový modulátor Lyn. Může tedy vznikat jakýsi systém s imunitní pamětí.

5.4.2.2 Stabilní interakce PAG s Lyn v B-NHL buňkách může napovědět více o interakci v buňkách žírných

Autoři nedávné studie na rakovinných buňkách ukázali dosud neznámý mechanismus onkogenního zvrhnutí SFK [23]. V těchto buňkách je pozorována permanentní interakce mezi PAG a Lyn. Dvojitě fosforylovaná Lyn kináza, na svém C-terminálním i aktivačním tyrosinu, se váže na fosforylovaný PAG skrz SH3 doménu na prolin bohaté oblasti a SH2 doménou na Y299 (lidská sekvence), ačkoliv tento motiv není typický pro Src SH2 domény. SH3 doména je tedy chráněna před vazbou oblasti mezi SH2 a SH3 domény a následnému vzniku intramolekulární inaktivní konformace. C-terminální doména je totiž fosforylována. V tomhle případě ale interaguje s proteinem STAT3 přes svou SH2 doménu. STAT3 tímto také brání před vznikem uzavřené konformace Lyn. Nebyla ovšem pozorována žádná Csk vážící se za normálních okolností na fosforylovaný PAG. Nejspíš z důvodu sterického zablokování Y314 (Y317 člověk), jakožto cílového místa pro vazbu Csk. Toto pozorování je v souladu se zvýšenou aktivitou SFK a následnou onkogenní činností, jelikož SFK zodpovídají za mnoho buněčných dějů včetně proliferace.

Tato studie ukazuje nezvyklou vazbu Lyn na PAG a není vůbec jasné, co je toho příčinou. Nicméně tento případ ukazuje, že PAG obsahuje mnoho motivů, jež mohou být rozpoznávány dalšími molekulami a tato vazba může být narušena i byť jen malou změnou tak razantním způsobem, že naprosto obrátí smysl původního signálu. Například v žírných buňkách by takovéto zablokování funkce Csk kinázy mohlo vést k nadměrné degranulaci, k hypersensitivitě na alergenní podněty, či jiným patologickým jevům.



Obrázek 5: PAG-Lyn-STAT3 permanentní signalosom v B-NHL buňkách

(A) Normální funkce Csk vázané na fosforylovaný PAG vede k fosforylaci Y507 Lyn a její deaktivaci vznikem intramolekulárního komplexu s SH2 doménou. Lyn se nachází mimo DIM. (B) V B-NHL buňkách je Lyn skrz SH2 a SH3 doménu stabilizována v Lyn/PAG signalosomu. Lyn se tak dostává do stejné DIM struktury jako PAG. Lyn SH2 doména tedy neinteraguje s vlastním C-terminálním Y507, ale s PAG Y299. Lyn C-terminální motiv tak může interagovat se STAT3 SH2. Lyn je navíc fosforylována ve svém aktivním místě katalytické SH1 domény, Y396. (Převzato z: Tausin, S., et al (2008))

5.5 PAG a interakce s cytoskeletem

Když byly provedeny experimenty pokoušející se nalézt v T-buňkách další proteiny interagující s PAG, byl izolován protein EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50) neboli NHERF (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor) [37]. EBP50 je běžný, v mnoha tkáních rozšířený cytoplasmatický protein obsahující dvě N-terminální PDZ domény a C-terminální doménu schopnou vázat se na ERM (Ezrin-radixin-moesin) rodinu proteinů [52]. Rodina ERM proteinů se váže přímo na aktinový cytoskelet.

PDZ1 doména je schopna vázat C-terminální doménu s motivem Thr-Arg-Leu (TRL) několika membránových proteinů. Tento motiv je přítomen i na C-terminálním konci adaptorového proteinu PAG. V experimentech s deletovanou C-terminální oblastí je vazba na PAG zrušena. Byla potvrzena vazba pouze PDZ1 domény [38]. V neaktivovaných T-buňkách byl EBP50 také nalezen v DIM stejně jako PAG [37], ale po aktivaci již v těchto strukturách chybí. Tudíž není pochyb o interakci těchto dvou proteinů v klidovém neaktivovaném stavu. Po aktivaci nejspíš dochází k zrušení interakce [38]. Množství izolovaného EBP50 však nebylo příliš velké ve srovnání s celkovým množstvím v lyzátu nebo EBP50 vázaným na ezrin. Malé množství EBP50 vázaného na PAG může být artefakt vzniklý rozpadem vazby v důsledku lýze a izolace z buněk. PDZ doména totiž váže minimální sekvenci S/T-x-L,

nicméně jsou doklady o tom, že i 4. aminokyselina mohla mít vliv na pevnost vazby [53]. Vazba může být také aktivní pouze při nějaké kovalentní modifikaci, jako například při fosforylaci (nabízí se threonin) nebo v jiné konformaci, která se izolací ztratí. Tato otázka zůstává zatím nezodpovězena. Nicméně i kdyby bylo EBP50 navázáno pouze malé množství, může tato interakce velmi zásadně ovlivnit distribuci některých signalosomů skrz vazbu na aktinový cytoskelet a tudíž mít zásadní vliv v buněčné signalizaci. Pokud by existovaly membránové rafty obsahující větší množství proteinů, byla by jeho efektivita ještě větší. V klidovém stavu je totiž nalézána snížená mobilita membránových struktur. Itoh et al. ukázali pomocí metody photobleaching pomalejší návrat vysvícených oblastí u WT než v buňkách s mutovanou C-terminální oblastí PAG. Co ovlivňuje vazbu na PAG a jeho uvolnění po aktivaci není známo a toto téma by si zasloužilo další výzkum.

Zdá se tedy, že komplex PAG-EBP50-ERM spojuje membránové oblasti či signalosomy vázané na membránu s aktinovým cytoskeletem. V T-buňkách zabraňuje tato formace agregaci proteinů důležitých pro vznik imunologické synapse [38]. Nicméně toto propojení s aktinem může hrát mnohem širší roli a to i v žírných buňkách. I když zde zatím tvorba tohoto komplexu nebyla studována, je velice pravděpodobné, že i zde se PAG může vázat na cytoskelet přes svůj TRL vazebný motiv. Je možné, že tak jako v T-buňkách přes EBP50. Vazba na aktin by mohla podobně jako u T-buněk snižovat mobilitu membránových oblastí, což by například mohlo mít význam v agregaci FcεRI s PAG či dalšími adaptorovými proteiny (Obrázek 3 A).

Vazba proteinu na jakékoliv pevné místo by totiž znemožnila interakci s dalšími partnery, protože k narušení správné interakce stačí i velmi malá prostorová izolace. Uvědomíme-li si navíc poměrové vzdálenosti k množství a velikosti proteinů v membráně, je pravděpodobnost izolace docela velká. Další možnost "hry" cytoskeletu se nabízí při orientovaném pohybu žírných buněk za atraktantem v tkáni, pro žírné buňky důležitý pohyb. Reorganizace cytoskeletu umožní koncentraci patřičných molekul, či celých signalosomů vázaných v raftech či na adaptorové proteiny, do cílových oblastí. Toto jsou ovšem pouze spekulace a pro potvrzení či vyvrácení je potřeba další výzkum.

6 Závěr

Od objevení adaptorového proteinu PAG již uběhlo 9 let během kterých byla snaha zjistit funkci tohoto fosfoproteinu. Hlavní zájem byl zaměřen na buňky krevního systému, především T-buňky. U různých buněčných typů jsou nalézány různé funkce PAG. Původně objevená funkce PAG spočívající v atrahování Csk k buněčné membráně, se zdá být všem buňkám společná. Csk je zodpovědná za deaktivaci SFK a tudíž negativně reguluje mnoho buněčných pochodů jako regulace buněčného cyklu, adheze buněk, migrace, imunoreceptorová signalizace a další.

Csk je životně důležitá kináza, jejíž absence způsobuje mortalitu buněk. Zajímavé ovšem je, že myši defektní v PAG (KO myši) jsou téměř normální [54,55]. Recentní studie ukázala, že u narozených PAG KO myši je snížené množství Csk v membránové oblasti a také je pozorována zvýšená aktivita SFK. V 3. měsíci života však tento rozdíl mizí [56]. Tento náález svědčí o existenci redundantních drah regulace SFK, které jsou schopny suplovat funkci PAG.

PAG je membránově vázaný fosfoprotein s několika tyrosinovými zbytky, prolin bohatými oblastmi a dalšími specifickými sekvencemi, jež jsou schopny vázat další proteiny. Tento protein je platformou pro vznik membránového signalosomu integrující signály přicházející z extracelulárního prostředí prostřednictvím membránových receptorů i signálů z cytoplasmy jež jsou prostřednictvím svých nosičů atrahovány k membráně.

Jelikož je mnoho interakcí s PAG zprostředkováno fosfotyrosiny, je důležité zabývat se klíčovými enzymy fosforylace PAG, kinázami a fosfatázami. V žírných buňkách byla nalezena kináza Lyn, která se účastní fosforylace FcεRI a další propagace antigenního signálu. PAG je v žírných buňkách slabě fosforylován v klidovém stavu a silně po aktivaci. Fosfotyrosin 314 (Y314) je schopen vázat Csk a tak působí negativní zpětnou vazbou na utlumení signálu. Csk inhibuje také Fyn, která stojí na začátku dráhy vedoucí k degranulaci žírných buněk. V T-buňkách je PAG fosforylován především kinázou Fyn. Na rozdíl od žírných buněk je PAG u T-buněk v klidovém stavu silně fosforylován a po TCR aktivaci dochází k jeho defosforylaci.

Zatímco kinázy fosforylující PAG jsou známy, o fosfatázách defosforylujících PAG se neví téměř nic. I když zatím nebyly nalezeny, je zřejmé, že hrají stejně důležitou roli v regulaci PAG fosforylace jako kinázy. Identifikace fosfatáz PAG je důležitou oblastí pro další výzkum.

Stále více membránových struktur se nachází v přímé nebo nepřímé vazbě s aktinovým cytoskeletem. U PAG je tato interakce realizována pomocí EBP50 a ERM. Jelikož se tato vazba dynamicky mění v závislosti na tom, zda je buňka aktivována nebo ne, zdá se, že tato interakce může hrát důležitou roli v imunoreceptorové signalizaci. PAG, ostatně jako další adaptorové proteiny, tvoří místo pro integraci nejrůznějších signálů a tudíž manipulací s tímto místem lze ovlivnit následné signální dráhy.

PAG je jednou z centrálních molekul v FcεRI proximální signalizaci a strukturní potenciál tohoto proteinu nabízí představu mnoha dosud neznámých interakcí, které čekají na své objevení a mohou být v budoucnu využity v cíleném aplikovaném výzkumu při léčbě alergických reakcí, kterých poslední dobou stále přibývá.

Je třeba však mít na paměti, že absence PAG nevedla k významným buněčným defektům a že tedy pravděpodobně existují alternativní cesty regulace buněčné aktivace. Identifikace těchto cest je důležitou oblastí pro další výzkum. Srovnání buněk u nichž PAG je vyřazen na úrovni embryonálních buněk a pomocí metod RNA interference může přispět k objasnění adaptačních mechanismů, které se uplatňují při vývoji organismů defektních v esenciálních proteinech.

7 Seznam zkratek

aa – Amino acid

Akt - V-akt murine thymoma viral oncogene homolog

Arg – Arginin (R)

BMMCs – Bone marrow-derived mast cells

Cbp - Csk-binding protein

Csk – Carboxyl-terminal Src Kinase

CD3/ x/... - CD - antigen (CD = cluster of differentiation)

DIM - Detergent-insoluble membrane fraction

EBP50 - ERM-binding phosphoprotein 50

Epo – Erythropoeitin

Erk - Extracellular signal-regulated kinases

ERM – Ezrin-radixin-moesin

FcεRI – Vysokoafinní IgE receptor žírných buněk

Fyn – Fyn proto-oncogene (member of SFK)

GAP - GTPase activating protein

GEM - Glycosphingolipid-enriched membrane microdomains

Grb2 - Growth factor receptor binding protein 2

hPAG – Human PAG (lidký PAG)

IL3 – Interleukin 3

ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM - Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

KO – Knock out

KD – Knock down

Lck – Leukocyte-specific protein tyrosine kinase

Lyn - V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog

Lys – Lysin (K)

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

Mr – Molekulová hmotnost

NFκB - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NHERF - Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor

PAG - Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains

PI3K – Phosphatidylinositol 3-OH kinase

PIRB - Paired-immunoglobulin like receptor-B

PLC – Phospholipase C
PTK – Protein tyrosine kinase
RasGAP - Ras GTPase activating protein
Sam68 = KHDRBS1 (KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1)
SCF – Stem cell factor
SDS-PAGE - Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SFK – Src Family PTK
SH2 – Src homology domain 2
SH3 - Src homology domain 3
Shc – SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein
SHP-1/2 = PTPN6 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6)
SLP-76 = LCP2 (lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)
SOCS1 – Suppressor of cytokine signaling 1
Src-PTK – Src protein tyrosin kinase
STAT 3/ 5 - Signal transducer and activator of transcription 3/ 5
Syk – Spleen tyrosine kinase
TCR – T-cell receptor
Tyr – Tyrosine (Y)
Y – Tyrosine
Vav – Vav 1 guanine nucleotide exchange factor
WT – Wild type (divoký typ)
ZAP70 - zeta-chain (TCR) associated protein kinase

8 Seznam použité literatury

- [1] Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:83-104.
- [2] Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:218-230.
- [3] Kraft S, Kinet J-P. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007;7:365-378.
- [4] Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:624-631.
- [5] Brdička T, Pavlišťová D, Leo A, Bruyns E, Kořínek V, Angelisová P, Scherer J, Shevchenko A, Hilgert I, Černý J, Drbal K, Kuramitsu Y, Kornacker B, Hořejší V, Schraven B. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 2000;191:1591-1604.
- [6] Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K, Tarakhovsky A, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 2000;404:999-1003.
- [7] Hořejší V, Zhang W, Schraven B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:603-616.
- [8] Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, Rivera J, Samelson LE. LAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation. *Immunity* 2000;12:525-535.
- [9] Brdička T, Imrich M, Angelisová P, Brdičková N, Horváth O, Špička J, Hilgert I, Lusková P, Dráber P, Novák P, Engels N, Wienands J, Simeoni L, Österreicher J, Aguado E, Malissen M, Schraven B, Hořejší V. Non-T Cell Activation Linker (NTAL): A Transmembrane Adaptor Protein Involved in Immunoreceptor Signaling. *J Exp Med* 2002;196:1617-1626.
- [10] Janssen E, Zhu M, Zhang W, Koonpaew S, Zhang W. LAB: A new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* 2003;4:117-123.
- [11] Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 2006;47:1597-1598.
- [12] Anne Marie-Cardine HKBS. Molecular alterations of the Fyn-complex occur as late events of human T cell activation. *European Journal of Immunology* 1999;29:1175-1187.
- [13] Howell BW, Cooper JA. Csk suppression of Src involves movement of Csk to sites of Src activity. *Mol Cell Biol* 1994;14:5402-5411.
- [14] Sabe H, Hata A, Okada M, Nakagawa H, Hanafusa H. Analysis of the binding of the Src homology 2 domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3984-3988.

- [15] Cloutier JF, Chow LM, Veillette A. Requirement of the SH3 and SH2 domains for the inhibitory function of tyrosine protein kinase p50csk in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1995;15:5937-5944.
- [16] Ingley E, Schneider JR, Payne CJ, McCarthy DJ, Harder KW, Hibbs ML, Klinken SP. Csk-binding protein mediates sequential enzymatic down-regulation and degradation of Lyn in erythropoietin-stimulated cells. *J Biol Chem* 2006;281:31920-31929.
- [17] Mayer BJ, Eck MJ. SH3 domains. Minding your p's and q's. *Curr Biol* 1995;5:364-367.
- [18] Tedoldi S, Paterson JC, Hansmann ML, Natkunam Y, Rudiger T, Angelisová P, Du MQ, Robertson H, Roncador G, Sanchez L, Pozzobon M, Masir N, Barry R, Pileri S, Mason DY, Marafioti T, Hořejší V. Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid-cell markers. *Blood*, 2006: 213-221.
- [19] Takeuchi S, Takayama Y, Ogawa A, Tamura K, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp positively regulates the activity of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk. *J Biol Chem* 2000;275:29183-29186.
- [20] Rahmouni S, Vang T, Alonso A, Williams S, van Stipdonk M, Soncini C, Moutschen M, Schoenberger SP, Mustelin T. Removal of C-terminal SRC kinase from the immune synapse by a new binding protein. *Mol Cell Biol* 2005;25:2227-2241.
- [21] Ohtake H, Ichikawa N, Okada M, Yamashita T. Cutting Edge: Transmembrane Phosphoprotein Csk-Binding Protein/Phosphoprotein Associated With Glycosphingolipid-Enriched Microdomains as a Negative Feedback Regulator of Mast Cell Signaling Through the FcεRI. *J Immunol* 2002;168:2087-2090.
- [22] Yasuda K, Nagafuku M, Shima T, Okada M, Yagi T, Yamada T, Minaki Y, Kato A, Tani-ichi S, Hamaoka T, Kosugi A. Cutting Edge: Fyn Is Essential for Tyrosine Phosphorylation of Csk-Binding Protein/Phosphoprotein Associated with Glycolipid-Enriched Microdomains in Lipid Rafts in Resting T Cells. *J Immunol* 2002;169:2813-2817.
- [23] Tauzin S, Ding H, Khatib K, Ahmad I, Burdevet D, van Echten-Deckert G, Lindquist JA, Schraven B, Din N-u, Borisch B, Hoessli DC. Oncogenic association of the Cbp/PAG adaptor protein with the Lyn tyrosine kinase in human B-NHL rafts. *Blood* 2008;111:2310-2320.
- [24] Tolar P, Dráberová L, Tolarová H, Dráber P. Positive and negative regulation of Fcε receptor I-mediated signaling events by Lyn kinase C-terminal tyrosine phosphorylation. *European Journal of Immunology* 2004;34:1136-1145.
- [25] Kitaura J, Kawakami Y, Maeda-Yamamoto M, Hořejší V, Kawakami T. Dysregulation of Src Family Kinases in Mast Cells from Epilepsy-Resistant ASK versus Epilepsy-Prone EL Mice. *J Immunol* 2007;178:455-462.
- [26] Švec A, Velenská Z, Hořejší V. Expression pattern of adaptor protein PAG: correlation between secondary lymphatic follicle and histogenetically related malignant lymphomas. *Immunol Lett* 2005;100:94-97.
- [27] Davidson D, Schraven B, Veillette A. PAG-associated FynT regulates calcium signaling and promotes anergy in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2007;27:1960-1973.
- [28] Solheim SA, Torgersen KM, Tasken K, Berge T. Regulation of FynT Function by Dual Domain Docking on PAG/Cbp. *J Biol Chem* 2008;283:2773-2783.

- [29] Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:816-826.
- [30] Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5268-5272.
- [31] Shima T, Nada S, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14897-14902.
- [32] Jiang LQ, Feng X, Zhou W, Knyazev PG, Ullrich A, Chen Z. Csk-binding protein (Cbp) negatively regulates epidermal growth factor-induced cell transformation by controlling Src activation. *Oncogene* 2006;25:5495-5506.
- [33] Smida M, Posevitz-Fejfar A, Horejsi V, Schraven B, Lindquist JA. A novel negative regulatory function of the phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains: blocking Ras activation. *Blood* 2007;110:596-615.
- [34] Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:373-384.
- [35] Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
- [36] Hancock JF, Parton RG. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem J* 2005;389:1-11.
- [37] Brdičková N, Brdička T, Anděra L, Špička J, Angelisová P, Milgram SL, Hořejší V. Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Letters* 2001;507:133-136.
- [38] Itoh K, Sakakibara M, Yamasaki S, Takeuchi A, Arase H, Miyazaki M, Nakajima N, Okada M, Saito T. Cutting Edge: Negative Regulation of Immune Synapse Formation by Anchoring Lipid Raft to Cytoskeleton Through Cbp-EBP50-ERM Assembly. *J Immunol* 2002;168:541-544.
- [39] Hao S, August A. Actin depolymerization transduces the strength of B-cell receptor stimulation. *Mol Biol Cell* 2005;16:2275-2284.
- [40] Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J* 2006;25:3446-3457.
- [41] Jouvin MH, Adamczewski M, Numerof R, Letourneur O, Valle A, Kinet JP. Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J Biol Chem* 1994;269:5918-5925.
- [42] Yamashita T, Mao SY, Metzger H. Aggregation of the high-affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56lyn protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11251-11255.
- [43] Field KA, Holowka D, Baird B. Structural aspects of the association of FcεRI with Detergent-resistant Membranes. *J Biol Chem* 1999;274:1753-1758.
- [44] Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV, Gonzalez-Espinosa C, Hibbs ML, Harder KW, Rivera J. Negative regulation of immunoglobulin E-dependent allergic responses by Lyn kinase. *J Exp Med* 2004;199:1491-1502.

- [45] Young RM, Holowka D, Baird B. A Lipid Raft Environment Enhances Lyn Kinase Activity by Protecting the Active Site Tyrosine from Dephosphorylation. *J Biol Chem* 2003;278:20746-20752.
- [46] Kawakami Y, Kitaura J, Satterthwaite AB, Kato RM, Asai K, Hartman SE, Maeda-Yamamoto M, Lowell CA, Rawlings DJ, Witte ON, Kawakami T. Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol* 2000;165:1210-1219.
- [47] Kovářová M, Tolar P, Arudchandran R, Dráberová L, Rivera J, Dráber P. Structure-Function Analysis of Lyn Kinase Association with Lipid Rafts and Initiation of Early Signaling Events after Fcε Receptor I Aggregation. *Mol Cell Biol* 2001;21:8318-8328.
- [48] Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002;3:741-748.
- [49] Miyakawa T, Yagi T, Taniguchi M, Matsuura H, Tateishi K, Niki H. Enhanced susceptibility of audiogenic seizures in Fyn-kinase deficient mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;28:349-352.
- [50] Ingley E, Tilbrook PA, Klinken SP. New Insights into the Regulation of Erythroid Cells. *IUBMB Life* 2004;56:177-184.
- [51] Brunati AM, Bordin L, Clari G, James P, Quadroni M, Baritono E, Pinna LA, Donella-Deana A. Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes: identification of primary and secondary phosphorylation sites. *Blood* 2000;96:1550-1557.
- [52] Reczek D, Berryman M, Bretscher A. Identification of EBP50: A PDZ-containing Phosphoprotein that Associates with Members of the Ezrin-Radixin-Moesin Family. *J Cell Biol* 1997;139:169-179.
- [53] Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, Lefkowitz RJ. A C-terminal motif found in the Î₂-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:8496-8501.
- [54] Dobenecker M-W, Schmedt C, Okada M, Tarakhovsky A. The Ubiquitously Expressed Csk Adaptor Protein Cbp Is Dispensable for Embryogenesis and T-Cell Development and Function. *Mol Cell Biol* 2005;25:10533-10542.
- [55] Xu S, Huo J, Tan JE-L, Lam K-P. Cbp Deficiency Alters Csk Localization in Lipid Rafts but Does Not Affect T-Cell Development. *Mol Cell Biol* 2005;25:8486-8495.
- [56] Simeoni L, Lindquist JA, Smida M, Witte V, Arndt B, Schraven B. Control of lymphocyte development and activation by negative regulatory transmembrane adapter proteins. *Immunol Rev* 2008;224:215-228.