

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra buněčné biologie

Bakalářská práce

Úloha kináz rodiny Src v metabolismu RNA

Jakub Gemperle

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha 2010

Poděkování patří mému školiteli **RNDr. Danielovi Röselovi**, PhD za jeho trpělivý přístup a cenné rady při psaní této práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Úloha kináz rodiny Src v metabolismu RNA** vypracoval samostatně s pomocí citované literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

červen 2010

Jakub Gemperle

Abstrakt

Dosud bylo získáno mnoho faktů o úloze kináz rodiny Src v cytoplasmě či na plazmatické membráně a o jejich interakcích s receptory růstových faktorů nebo s komplexy ve fokálních adhezích. Jejich funkční význam u perinukleární membrány nebo dokonce uvnitř jádra však nebyl dosud dobře charakterizován. Tato práce s použitím dostupných informací poukazuje na fakt, že se kinázy rodiny Src opravdu vyskytují po určitý čas i v jádře. To otevírá novou škálu působnosti kináz rodiny Src také na metabolismus RNA, neboť se dosud předpokládalo, že jejich vliv je omezen pouze na cytoplazmatický kompartment. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky, které poukazují na složitou síť regulace metabolismu RNA závislé na kinázách rodiny Src; kinázy rodiny Src mají pleiotropní efekt nejen na RNA vazebné proteiny, ale i na remodelaci struktury chromatinu. Přímou interakcí tyto kinázy ovlivňují transport, sestřih a stabilitu RNA či genovou expresi. Tento souhrn naznačuje, že se kinázy rodiny Src nezanedbatelně podílí na metabolismu RNA a to mnoha způsoby.

Abstract

Until now, a lot of information have been obtained about the role of Src family kinases in the cytoplasm or at the plasma membrane and their interactions with growth factor receptors or focal adhesion complexes. Their functional importance at the perinuclear membrane, or even inside the nucleus, however, has not been well characterized. This work, using available information, pointed at the fact that Src family kinases can be found in the nucleus. This opens a new field of Src kinases action, such as in RNA metabolism, considering that it has been assumed that their activity is limited to the cytoplasmic compartment. This work summarizes the current knowledge that hints to Src family kinases dependent network of regulation of RNA metabolism; Src family kinases have pleiotropic effects not only on the RNA binding proteins, but also on the remodeling of chromatin structure. These kinases affect by direct interactions with other proteins transport, splicing or RNA stability and gene expression. This summary suggests that Src family kinases could regulate RNA metabolism on many levels.

Osnova:

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE	1
ABSTRAKT	3
KLÍČOVÁ SLOVA:	5
1. ÚVOD	6
1.1. <i>Charakterizace SFK</i>	6
1.2. <i>Struktura a regulace SFK</i>	6
2. LOKALIZACE SRC U PERINUKLEÁRNÍ MEMBRÁNY	8
3. KONSTITUTIVNÍ LOKALIZACE SFK V JÁDŘE	9
3.1. <i>Mechanismus regulace jaderné lokalizace SFK</i>	9
4. OVLIVNĚNÍ GENOVÉ EXPRESE A JADERNÉ SUBSTRÁTY SFK	11
4.1. <i>Buněčný cyklus a Jaderné funkce SFK</i>	11
4.2. <i>Interakce Src s HDAC3</i>	13
4.3. <i>Cytoplazmatické/jaderné interakce s transkripčními faktory</i>	13
4.3.1. p73/YAP	13
4.3.2. STAT proteiny	14
4.3.3. NF-κB	14
4.3.4. HS1	14
4.4. <i>Adaptorové jaderné proteiny</i>	15
4.4.1. Vav (p59)	15
4.4.2. Nck	16
4.5. <i>Regulace dynamiky a funkce aktinu v jádře během interfáze</i>	16
5. SRC A METABOLISMUS RNA	18
5.1. <i>Posttranskripční regulace RNA</i>	18
5.1.1. <i>RNA vazebné proteiny</i>	19
5.1.1.1. STAR rodina	19
5.1.1.1.1. Sam68	19
5.1.1.1.2. SLM-1	21
5.1.1.1.3. QKI	21
5.1.1.2. hnRNP K	22
5.1.1.3. SNP70	23
5.1.1.4. YT521-B	23
5.1.1.5. ZBP1	24
5.1.1.6. CUGBP2	24
5.1.1.7. RBM10	25
5.1.2. <i>Endonukleázy</i>	25
5.1.2.1. PMR1	25
6. ZÁVĚR A DISKUZE	26
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29

Klíčová slova:

Kinázy z rodiny Src (Src family kinases), jaderná lokalizace (nuclear localization), jaderný cytoskelet (nuclear cytoskeleton), genová exprese (gene expression), metabolismus RNA (RNA metabolism), RNA vazebné proteiny (RNA binding proteins).

Seznam zkratek:

3'UTR...3' nepřepisující se oblast (**3' Untranslated Region**)
CDK...Kináza závislá na cyklinech (**Cyclin Dependent Kinase**)
DICE...Diferenciační kontrolní element (**Differentiation Control Element**)
EGF...Epidermální růstový faktor (**Epidermal Growth Factor**)
HDAC3...Histon deacetyláza 3 (**Histone Deacetylase 3**)
HGF...Jaterní růstový faktor (**Hepatocyte Growth Factor**)
hnRNA... heterogenní jaderná RNA (**heterogeneous nuclear RNA**)
NES...Jaderný exportní signál (**Nuclear Export Sequence**)
NLS... Jaderný lokalizační signál (**Nuclear Localization Sequence**)
PDGF...Destičkový růstový faktor (**Platelet-Derived Growth Factor**)
RRM...RNA rozpoznávací motiv (**RNA Recognition Motif**)
SFK... Kinázy rodiny Src (**Src Family Kinases**)
PTP...Tyrozinové fosfatázy (**Protein Tyrosine Phosphatase**)
VEGF...Vaskulární endoteliální růstový faktor (**Vascular Endothelial Growth Factor**)

1. Úvod

1.1. Charakterizace SFK

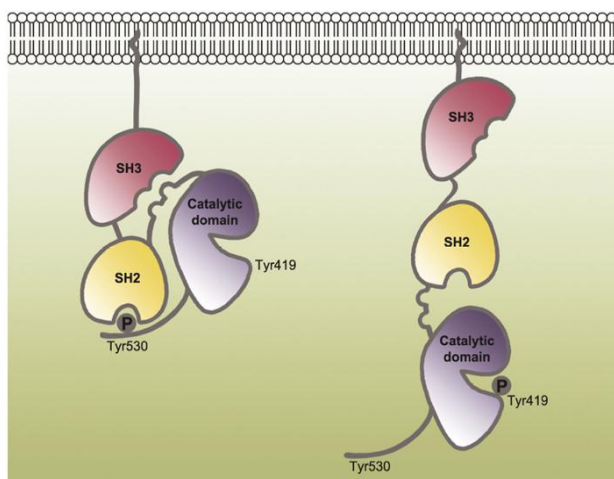
Kinázy z rodiny Src (SFK) patří mezi nereceptorové s membránou asociované tyrozinové protein kinázy. Šíření signálu katalyzují přenosem terminálního gama fosfátu z ATP na specifický substrát. Mají kritickou roli v přenosech různých buněčných signálů, které regulují procesy uplatňující se při dělení, angiogenezi, buněčné proliferaci, invazivitě, atd. Celkem je známo 9 vysoce homologních členů SFK: Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Blk, Fgr a Yrk. SFK jsou kontinuálně exprimovány v rozličných tkáních, ve vyšších koncentracích u neuronů, trombocytů a osteoklastů⁴. Nadprodukce či konstitutivní aktivace SFK způsobuje buněčnou transformaci a je spojována s velkým počtem lidských nádorů a leukémií. To dělá z kináz rodiny Src důležitý proto-onkogen a potenciální cíl protinádorových léků⁵.

SFK byly nalezeny nejen u plazmatické membrány, ale i v perinukleární oblasti a v jádře⁶. Jsou silně aktivovány po stimulaci buněčných receptorů různých růstových faktorů, zvláště vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), destičkovým růstovým faktorem (PDGF), epidermálním růstovým faktorem (EGF) a jaterním růstovým faktorem (HGF)⁷. Tyto kinázy mají v buňce daleko více úloh, než se původně myslelo. Jejich funkce závisí i na jejich lokalizaci^{8,11,26}. Z toho plyne, že jejich nukleocytoplazmatický transport by měl být regulován časově a prostorově, aby zajistil správnou biologickou odpověď na extracelulární signály.

Kromě ústřední role kináz rodiny Src v integrinové signalizaci nebo v imunitní odpovědi⁴, se tyto kinázy také podílí na modifikacích hnRNA^{9,10}. Pochopení role, jakou hrají SFK v regulaci metabolismu RNA, nám může pomoci porozumět mechanismům buněčné signalizace a transformace zprostředkované těmito kinázami.

1.2. Struktura a regulace SFK

Kinázy z rodiny Src jsou 52–62 kDa velké proteiny složené ze sedmi zřetelných funkčních oblastí. Od N-konce to jsou: (a) SH4 doména, (b) unikátní oblast, (c) SH3 doména, (d) SH2 doména, (e) CD linker, (f) katalytická doména, a (g) krátký negativně regulační konec^{2,11} (**Obr. 1.**).



Obr. 1. Schematicky ukázané intramolekulární interakce Src: (nalevo) v inaktivovaném a (napravo) v aktivovaném stavu. V inaktivní konfiguraci SH2 doména váže C-terminální Tyr530, zatímco SH3 doména interaguje s CD linkerem propojujícím katalytickou a SH2 doménu. Díky tomu se ustanoví „uzavřená“ konformace, která brání interakci se substráty. V plně aktivním prostorovém uspořádání je Tyr530 defosforylován, což vede k uvolnění SH2 domény z intramolekulární interakce. Tato „otevřená“ konformace také umožňuje fosforylaci Tyr419 v aktivační smyčce, která zvyšuje kinázovou aktivitu. Převzato z².

Struktura a regulace SFK je zde dále popsána konkrétně na jejich nejznámějším zástupci kináze Src. (a) SH4 doména představuje zhruba 15-17 aminokyselin dlouhou sekvenci obsahující oblast nezbytnou pro posttranslační modifikaci na Gly2 kyselinou myristylovou. Tato modifikace je esenciální pro lokalizaci kinázy Src k vnitřní straně buněčné membrány. (b) Předpokládá se, že unikátní oblast poskytuje unikátní funkci a specifitu každému členu SFK. (c) SH3 doména je důležitá pro intra i intermolekulární interakce, které regulují katalytickou aktivitu kinázy Src, její lokalizaci a vazebnou specifitu pro substráty. Váže specifické sekvence bohaté na prolin. (d) SH2 je stejně jako SH3 doména důležitá pro intra a intermolekulární interakce, váže fosforylovaný tyrozin a její intramolekulární interakce s fosforylovaným tyrozinem 419 (člověk, kuře Tyr416) je kritická pro udržení inaktivní konformace Src. (f) Katalytická doména je složena ze dvou laloků, mezi nimiž se nachází katalytické místo, jehož součástí je aktivační smyčka. V ní dochází k autofosforylaci tyrozinu na pozici 419 podporující navázání substrátu i ATP a pomáhající k dosažení maximální kinázové aktivity. (g) C-konec negativně reguluje kinázu přes Tyr530 (člověk, kuře Tyr527). Je-li fosforylovaný, může na něj nasednout SH2 doména, což vede k inaktivaci Src^{2,8,11}.

Rozdílně aktivní konformační stavy kinázy Src jsou zprostředkovány intramolekulárními (SH2/SH3) interakcemi. Aktivace Src je pouze dočasná, souvisí s její periferní translokací, defosforylací C-terminálního negativně regulačního Tyr419 nebo s vazbou vysokoafinitního ligandu na SH2 nebo SH3 doménu, který destabilizuje sestavenou autoinhibiční konformaci Src. Tuto defosforylaci fosfotyrozinu na pozici 530 provádějí protein tyrozin fosfatázy (PTP), jako jsou např. PTP α , PTP λ , SHP1, SHP2¹¹.

Za inhibici aktivity Src zodpovídá kináza CSK37 či její homolog CHK fosforylací terminálního tyrozinového zbytku Tyr530. Vazbou SH2 domény na tento tyrozin je umožněna

interakce SH3 domény s polyprolinovým motivem CD linkeru (umístěný mezi katalytickou a SH2 doménou). Ta vede ke vzniku uzavřené kompaktní struktury bránící autofosforylaci Tyr419 a přístupu ATP i substrátu^{2,11} (**Obr. 1.**). Aktivita Src je dále regulována interakcemi s vazebnými proteiny, změnou její lokalizace, ubiquitinylací a následnou degradací či změnou exprese CSK a různých specifických PTP^{2,8}.

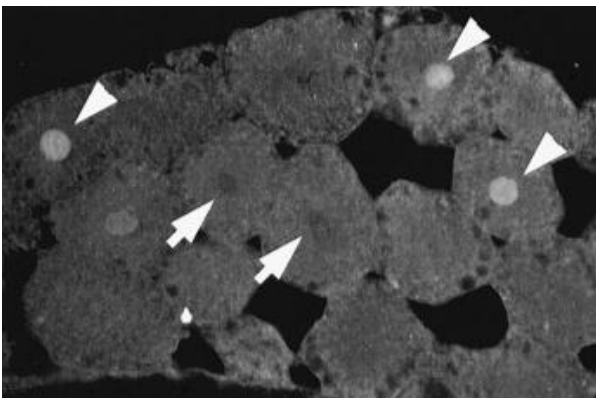
Kromě buněčné formy c-Src se setkáváme i s její modifikovanou formou v-Src, což je první objevený onkoprotein izolovaný z viru Rousova sarcomu¹². v-Src obsahuje drobné mutace roztroušené po celé molekule a především postrádá negativně regulační C-terminální tyrozinový zbytek. V důsledku ztráty této negativní intramolekulární interakce je v-Src konstitutivně aktivní a transformačně kompetentní¹³.

2. Lokalizace Src u perinukleární membrány

Je známo, že subcelulární lokalizace kináz rodiny Src má vliv na jejich funkci^{8,11,26}. Nejlépe je funkce Src a kináz z rodiny Src prostudována u plazmatické membrány, kde svou schopností regulovat buněčný růst i proliferaci zapadají do signální transdukce aktivované přes membránové receptory. Kromě asociace s plazmatickými membránami se Src vyskytuje také v oblasti perinukleárního Golgi (30-40% celkového množství Src) či v cytoplazmě⁶. Protein Src je kotven do plazmatických, endosomálních, ale i perinukleárních membrán pomocí posttranslačně připojeného myristylového zbytku umístěném na jeho N-konci^{6,14,15}. Pozornost vzbuzuje zjištění, že v blízkosti jádra se většinou vyskytuje inaktivní forma Src. Po stimulaci interaguje SH3 doménou s aktinovými filamenty, to vede k její translokaci do blízkosti plazmatické membrány⁸. Přesto se ukázalo, že myristylace, (tj. připojení 14-uhlíkaté nasycené mastné kyseliny na N-konec proteinu) není dostačující pro její ukotvení k membráně. Kromě konjugace s kyselinou myristylovou jsou potřeba pro asociaci s membránou další aminokyselinové zbytky. Byly identifikovány tři oblasti ve struktuře kinázy Src, které zasahují nejméně do třech jejích domén a regulují její rozdílnou subcelulární lokalizaci, přičemž aminokyseliny 204-259 zprostředkovávají kontakt primárně s perinukleárními membránami. Ačkoliv myristylace není dostačující pro ukotvení na membránu, myristylová skupina je nutná pro perinukleární zadržení neaktivní formy Src¹⁶.

3. Konstitutivní lokalizace SFK v jádře

Jádro obsahuje velký počet proteinů, které jsou fosforylované na serinovém nebo threoninovém aminokyselinovém zbytku, ale existuje jen malé množství studií, které ukazují jadernou lokalizaci a funkci kináz rodiny Src. Protože u většiny členů této rodiny existují důkazy vypovídající o jejich působení v jádře^{1,17-25} (Obr. 2; Obr. 3), kontrola jejich jaderné lokalizace by mohla být podobná. Rozdíly v jejich unikátních oblastech (krátká sekvence mezi SH4 a SH3 doménou) a odlišná lipidová modifikace jim pravděpodobně zajišťuje unikátní funkci a specifitu^{11,26}.



Obr. 2. Rongish se svou skupinou³ poskytli první důkaz, že se kináza Fyn vyskytuje alespoň v určité fázi vývoje ve velké koncentraci v jádře, přestože postrádá NLS (sledováno u *Danio rerio*). Na obrázku je vidět střední blastula. Šipky ukazují na jádro a akumulovanou kinázu Fyn. V dřívějších fázích rýhování nebyla kináza Fyn v jádře přítomna. Převzato z³.

3.1. Mechanismus regulace jaderné lokalizace SFK

Fyzická separace jádra a cytoplazmy poskytuje další úroveň prostorové regulace proteinové aktivity. Z toho plyne, že nukleocytoplazmatický transport SFK by měl být přísně regulován pro jejich správné působení. Jaderná translokace je ovlivněna také fází buněčného cyklu^{23,27}. Lipidová modifikace na N-konci kináz rodiny Src navíc zabraňuje jejich neregulovanému transportu do jádra^{21,23}. V buňkách exprimujících mutantní formu c-Src neumožňující myristylaci na N-konci se tyto kinázy translokují do jádra počátkem G₂ fáze, v průběhu mitózy či po zablokování buněk v G₀ fázi nebo v G₁/S přechodu^{23,27}. K tomu dochází i bez rozpadu jaderné membrány²³. Překvapivě aktivace kinázy Src během mitózy vyžaduje myristylaci na N-konci²⁸. Kináza Src ale interaguje i se substráty mimo membránu²³. O vlivu kinázy Src na mitózu je všeobecně známo. Nové důkazy však jasně ukazují, že interakce divoké formy kinázy Src s jadernými komponenty nejsou limitovány rozpadnutím jaderné membrány^{1,23} a že se kináza Src významně podílí na jaderných procesech také v interfázi¹. To podporuje i zjištění, že po ošetření buněk vápníkem dojde k aktivaci Src a k její akumulaci v jádře²⁴.

Lipidová modifikace kináz z rodiny Src právem vzbuzuje velkou pozornost. Ačkoliv nově translatované SFK jsou rychle myristylovány v cytoplazmě²⁹, ne všechny (16%) jejich molekuly obsahují myristylovou kyselinu³⁰. Nemyristylovaná kináza Lyn může být snadno distribuována v jádře, ale je urychleně exportována²¹. Kromě toho v buňce existují přirozené pochody, které cíleně vedou k odstranění lipidové modifikace. Během indukce apoptózy B-buněk je N-terminální oblast kináz Lyn a Fyn odštěpena kaspázou a tyto sestřižené kinázy fungují jako negativní regulátoři apoptózy^{31,32}. Kináza Lyn s odštěpenou N-koncovou oblastí se vyskytuje nejen v cytoplazmě ale také hojně v jádře, dokonce více než její mutantní forma bez lipidové modifikace. Z toho vyplývá, že N-terminální oblast kinázy Lyn má inhibiční roli v její jaderné lokalizaci. Na nukleocytoplazmatický transport mají ale vliv i její další domény²¹. Vysoká podobnost mezi Lyn a ostatními členy SFK a práce od skupiny vědců pod vedením Davidpfeuty²³, která ukazuje translokaci nemyristylované formy kinázy Src do neporušeného jádra, nasvědčuje tomu, že tato jaderná distribuce platí i pro Src a ostatní zástupce kináz z rodiny Src.

Jelikož komplex jaderného póru umožňuje pasivní průchod proteinům do maximální velikosti 40 kDa³³, translokace SFK do jádra a ven musí být aktivní proces zahrnující specifické jaderné a exportní lokalizační signály. Kinázy z rodiny Src však postrádají jaderný lokalizační signál (NLS). Jedna z možností, jak by mohly vstupovat do jádra, je vazba na jiný protein s NLS, což by umožnilo společný transport do jádra. U kinázy Syk, která je příbuzná kinázám SFK také postrádající NLS, se zjistilo, že je importována do jádra a že oblast linkeru na C-konci SH2 domény je kritická pro její jadernou translokaci³⁴. Podobná hydrofóbní oblast se nachází na začátku katalytické domény kinázy Lyn. Substituční mutace v této oblasti blokovala lokalizaci nemyristylované Lyn v jádře. Zároveň však tato mutace také způsobila inaktivaci této kinázy²¹.

Zjistilo se, že kináza Lyn je exportována z jádra zprostředkovaně přes Crm1 cestu (inhibice Crm1 exportu leptomycinem B vede ke zvýšení množství Lyn v jádře)²¹. Jaderný exportní signál (NES) je definován jako krátká aminokyselinová sekvence obvykle zastoupena hydrofóbními zbytky, z nichž je statisticky nejvíce zastoupený leucin³⁵. V primární struktuře kináz z rodiny Src však není typický NES obsažen. Z tohoto důvodu je možné, že Lyn asociuje nepřímo s Crm1 přes adaptor obsahující NES. Předpokládá se, že Lyn je rychle exportována z jádra nezávisle na své kinázové aktivitě. Avšak akumulaci Lyn v jádře podporuje inhibice její aktivity a zabránění myristylace²¹. Nedávné poznatky o jiných kinázách toto tvrzení podporují, např. kinázová aktivita nереceptorových kináz Abl a FAK má též inhibiční roli v jejich jaderné lokalizaci^{36,37}. Jinými slovy, stejně jako Abl a FAK, nízká

úroveň kinázy Lyn v jádře se dá vysvětlit cytoplazmatickým zadržením jejich aktivní formy²¹. Je velice zajímavé, že záření UVB způsobuje aktivaci kinázy Fyn a zároveň její fosforylaci na Thr12. Takto fosforylovaná Fyn se může translokovat do jádra HaCaT buněk. Inhibitory kinázové aktivity SFK inhibují nejen aktivitu kináz z rodiny Src, ale také brání této fosforylaci a tak její jaderné lokalizaci¹⁸. To nasvědčuje tomu, že fosforylace Fyn na Thr12 umožňuje transport aktivní Fyn do jádra.

Vysoký stupeň homologie kináz z rodiny Src předpovídá podobnost regulace tohoto transportu i u ostatních členů SFK. Přestože jsou kinázy rodiny Src translokovány do jádra především v inaktivní podobě^{21,8}, v jádře aktivně fosforylují své substráty¹. Toto má obrovský význam, neboť pouze krátkodobá lokalizace aktivních SFK v jádře zajistí striktní regulaci jejich funkce v tomto kompartmentu. Navíc SFK mohou ovlivňovat jaderné procesy nejen kinázovou aktivitou, ale také pouhými interakcemi svými vazebnými doménami²². Všechny tyto informace naznačují, že se subpopulace SFK nachází ve specifický čas buněčného cyklu uvnitř jádra, kde vykonává specifické funkce.

4. Ovlivnění genové exprese a jaderné substráty SFK

4.1. Buněčný cyklus a Jaderné funkce SFK

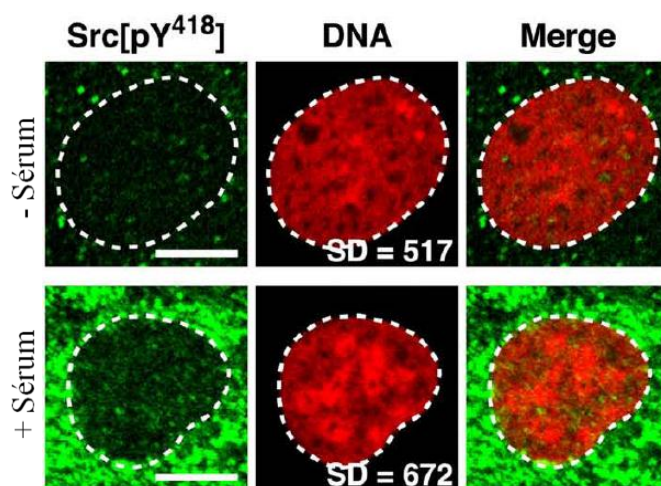
Kináza Src mimo jiné kontroluje a reguluje průběh buněčného cyklu³⁸. Její vliv není omezen pouze na mitózu⁸, ale moduluje i další fáze buněčného cyklu¹, zvláště pak přechod z G1 do S fáze³⁹. Průběh buněčného cyklu reguluje pomocí interakcí s proteiny řídící buněčné dělení. Tyto interakce pravděpodobně probíhají přímo v jádře^{23,27}. Jedním z těchto substrátů by mohl být Sam68³⁸ (viz str. 19).

Bylo pozorováno, že v odpovědi na poškození DNA se aktivují kinázy z rodiny Src⁴⁰. V tomhle směru poznání se největšího pokroku dosáhlo u kinázy Lyn. V buňkách ozářených ionizujícím zářením se selektivně aktivuje pouze jaderná Lyn, zatímco Lyn u plazmatické membrány se neaktivuje⁴¹. Po poškození DNA jaderně lokalizovaná subpopulace kinázy Lyn váže a fosforyluje CDK1, CDK2, CDK4, DNA-PK, GADD34, SHPTP1 a p53^{17,41-46}. Vyše zmíněná fosforylace (kinázami Lyn nebo Src) kináz závislých na cyklinech (CDK1, CDK2 či CDK4) vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi^{41,44,42}. Na druhou stranu kinázy Src, včetně Lyn, fosforylují CDK inhibitor p27, což vede k degradaci p27 a postupu buněčného cyklu⁴⁷. Kináza Lyn specificky interaguje s tumor suppresorem p53 přes svou SH3 doménu, čímž stimuluje transkripci zprostředkovanou p53. Kromě toho tato interakce zabraňuje exportu p53 do cytoplazmy, čímž zvyšuje jaderné množství ubiquitinylovaného p53 a brání jeho degradaci. To má za následek zastavení buněčného cyklu a apoptózu¹⁷. Naproti tomu

Lyn fosforylací a vazbou negativně reguluje proapoptickou funkci GADD34⁴⁵. Také zvýšená aktivita fosfatázy SHPTP1 vlivem její fosforylace kinázou Lyn vede ke snížení apoptózy indukované kinázou Lyn v odpovědi na poškození DNA⁴⁶.

Takahashi se svojí skupinou (2009)¹ potvrdili, že kinázy z rodiny Src hrají důležitou roli i v jádře během interfáze, ačkoli nemají NLS. Pomocí imunohistochemických metod a buněčné frakcionace se ukázalo, že je kináza Lyn přítomna v jaderné matrix¹⁹. Po stimulaci růstovými faktory se SFK (pozorováno u Src, c-Yes, Fyn, Lyn) vyskytují i v chromatinové frakci a indukují zde strukturní změny v chromatinu¹. Toto tvrzení podporuje i in vitro fosforylace histonu H3 na Ser10 kinázou Fyn¹⁸. Tato fosforylace způsobuje relaxaci chromatinu v interfázi a aktivuje tak transkripci⁴⁸.

Pozornost vzbuzuje fakt, že sérem aktivované SFK se v jádře nacházejí především v euchromatinových oblastech, tedy v místech s aktivní transkripcí (**Obr. 3**). Tyrozinovou fosforylací současně zvyšují úroveň hypokondenzace euchromatinu i hyperkondenzaci heterochromatinu¹. Jedním z možných jaderných substrátů SFK ovlivňující strukturní změny chromatinu by mohl být Sam68 (viz str. 19) nebo hnRNP K (viz str. 22), neboť se nedávno zjistilo, že oba dva asociují s různými komponentami chromatinových remodelačních komplexů^{49,50}. To poukazuje na další způsob ovlivnění genové exprese kinázami rodiny Src, neboť kromě potenciální jaderné fosforylace určitých transkripčních faktorů, mohou regulovat i jejich přístup ke genům remodelací chromatinu¹.



Obr. 3. Na obrázku jsou vidět zvětšené oblasti patřící jádrům COS-1 buněk před a po stimulaci fetálním sérem. SD hodnoty ukazují intenzitu kondenzace chromatinu. Z obrázku je vidět, že sérem aktivované SFK se mnohem více objevují v oblastech hypokondenzovaného chromatinu než hyperkondenzovaného. Z toho vyplývá, že po stimulaci růstovými faktory SFK způsobují strukturní změny v chromatinu. Převzato a upraveno z¹.

4.2. Interakce Src s HDAC3

Histon deacetylázy negativně regulují genovou expresi odstraňováním acetylových skupin z lysinových zbytků přítomných na histonech či jiných proteinech. Histon deacetyláza 3 (HDAC3) se přemisťuje mezi jádrem a cytoplazmou, zatímco ostatní deacetylázy ze stejné rodiny zůstávají v jádře. Její fosforylace koreluje se zvýšenou enzymatickou aktivitou. HDAC3 se také vyskytuje u plazmatické membrány a to díky asociaci s kinázou Src kotvenou na membráně²⁵. Růstový faktor HGF indukuje v buňkách typu MDA-MB231 fosforylaci HDAC3 kinázou Src. To vede k redukci aktivit transkripčních faktorů jako je NF- κ B⁵¹. Kináza Src tedy regulací aktivity HDAC3 ovlivňuje genovou expresi²⁵.

4.3. Cytoplazmatické/jaderné interakce s transkripčními faktory

Do regulace metabolismu RNA patří v širší míře i přímé interakce SFK s transkripčními faktory a to jak v cytoplazmě, tak i v jádře. Jelikož jsou si jednotliví zástupci kináz rodiny Src vysoce homologní, vykonávají podobné funkce a interagují velice často se stejnými substráty, dále popsané interakce mohou platit i pro ostatní kinázy z této rodiny⁴.

4.3.1. p73/YAP

p73, člen rodiny p53, je transkripční faktor hrající roli v buněčném cyklu, diferenciaci a apoptóze. Kináza rodiny Src Hck ho fosforyluje a váže přes svoji SH3 doménu. Stejně jako koexprese p73 s Hck, tak i koexprese p73 se Src vede k jeho tyrozinové fosforylaci, proto se dá předpokládat i vazba Src s p73 přes SH3 doménu. Fosforylace p73 kinázami z rodiny Src však nemá přímý vliv na jeho aktivitu, ale interakce zprostředkovaná přes jejich SH3 doménu inhibuje schopnost p73 aktivovat svoje cílové geny, stejně jako apoptózu. SFK také způsobují jeho stabilizaci v cytoplazmě, která je nezávislá na jejich kinázové aktivitě a nevede ke změně jeho činnosti. To poukazuje na další mechanismy kontroly jeho funkce²². SFK by mohly nepřímo regulovat aktivitu p73 zabráněním jeho degradace²² či stabilizací jeho mRNA (viz str. 22).

Kinázy rodiny Src (Hck, Src, Yes) také interagují svojí SH3 doménou s transkripčním koaktivátorem p73 proteinem YAP. YAP se váže na jinou sekvenci p73 než SFK^{22,52}. Kinázy rodiny Src pravděpodobně vyvazují YAP a brání jeho interakci s p73. YAP interaguje i s transkripčním faktorem Runx2, kde naopak funguje jako korepresor. Fosforylace YAP kinázami rodiny Src cílí YAP do subnukleární oblasti a je nutná pro jeho interakci s proteinem Runx2⁵³. To naznačuje, že SFK mohou regulovat obojetnou funkci YAP rozdílnými mechanismy, které vedou k represí cílových genů p73 a Runx2^{22,52,53}.

4.3.2. STAT proteiny

Kináza Src může regulovat genovou expresi skrze transkripční faktory, jako jsou proteiny STAT². Kináza Src po stimulaci receptorovou kinázou fosforyluje na tyrozinu molekuly STAT3 a STAT5b, což vede k jejich dimerizaci a následné aktivaci^{54,55}. Předpokládá se, že aktivovaný STAT3 ovlivňuje stabilizaci mRNA c-Myc transkripčního faktoru a po translokaci do jádra stimuluje produkci růstového faktoru VEGF, který zpětně aktivuje Src⁵⁴. Proteiny STAT3 a STAT5b také přispívají k transkripci regulátorů buněčného cyklu, jako jsou cykliny typu D, cyklin E a p21^{56,57}.

4.3.3. NF-κB

NF-κB je indukovatelný transkripční faktor, který reaguje na velkou škálu různých signálů a má vliv na expresi mnoha genů účastnících se imunitní odpovědi. Již Eicher se svou skupinou⁵⁸ zjistili, že zvýšená exprese v-Src koreluje se zvýšenou expresí NF-κB. Tento protein je zadržen v cytosolu díky IκBα a ve většině typů buněk propuštěn po serinové fosforylaci tohoto inhibičního proteinu, který je po fosforylaci rychle ubiquitinylován a posléze degradován proteasomem⁵⁹. Abu-Amer se svými kolegy⁶⁰ však potvrdili a prokázali, že po stimulaci makrofágů kostní dřeně přes TNF-α (Tumor necrosis factor-α) je pro aktivaci NF-κB klíčová tyrozinová fosforylace zprostředkována kinázou c-Src, která fosforyluje IκBα na tyrozinu 42. Na rozdíl od serinové fosforylace IκBα, tyrozinová fosforylace IκBα je schopná aktivovat NF-κB i v nepřítomnosti degradace IκBα proteasomem^{59,60}.

4.3.4. HS1

75kDa velký protein HS1, působící jako transkripční faktor, je významný substrát SFK v signální dráze membránových receptorů B-lymfocytů nebo T-lymfocytů⁶¹⁻⁶³. HS1 je strukturně příbuzný cortactinu a reguluje polymerizaci aktinu. Obsahuje tři aktin vazebné cortactinové repetice, dále NLS, oblasti bohaté na prolin a SH3 doménu⁶⁴. Stejně jako cortactin, HS1 váže F-aktin a interaguje s komplexem Arp2/3, zvyšuje tak jeho aktinovou nukleační aktivitu⁶⁵. K tomu pravděpodobně dochází i přímo v jádře (viz kapitola **Regulace dynamiky a funkce aktinu v jádře během interfáze**). Přestože HS1 obsahuje ve své struktuře NLS, v klidových B-lymfocytech se vyskytuje především v cytoplazmě^{62,66}. Stimulace kináz Syk a Lyn membránovými receptory v B-lymfocytech vede k jeho fosforylaci a následné translokaci do jádra, kde reguluje genovou expresi. Tato fosforylace HS1 kinázou Lyn je také podmínkou pro apoptózu indukovanou membránovými receptory v B-lymfocytech⁶⁷.

HS1 váže SH3 doménu kináz Lck nebo Lyn⁶⁶, ale nikoli Fyn. Samotná vazba HS1 přes SH3 doménu SFK však nestačí pro jeho fosforylaci⁶³. HS1 je fosforylován aktivovanými kinázami rodiny Src (Fgr, Fyn, Lyn, Lck) pouze po primární fosforylaci HS1 kinázou Syk, která generuje ideální vazebné místo pro SH2 domény SFK^{63,66} a umožňuje tak jejich vazbu s HS1. Pro stabilní spojení mezi SFK a HS1 musí být splněny i další podmínky (pozorováno na Fgr a Lyn): Autofosforylace kináz rodiny Src na Tyr419 a cílový tyrozinový zbytek pro SFK na HS1 bez fosfátu, ten totiž ruší vzájemnou interakci⁶⁴. Po tyrozinové fosforylaci kinázou Syk se přes SH2 doménu k HS1 váže kromě SFK i protein Vav^{64,68} (viz str. 15).

4.4. Adaptorové jaderné proteiny

Kinázy z rodiny Src interagují také s proteiny sloužící jako adaptorové molekuly, které umožňují v jádře propojení různých signálních cest a procesů. Jedna z funkcí těchto proteinů je i kontrola genové exprese a proliferace. Mezi tyto známé proteiny patří Sam68 (viz str. 19), SLM1 (viz str. 21), Nck a Vav.

4.4.1. Vav (p59)

Vav, známý proto-onkogen, nepatří mezi klasické signalizační adaptorové proteiny, neboť má enzymovou aktivitu. Aktivně pomáhá při výměně GDP za GTP a tak aktivaci malých G-proteinů, jako jsou Cdc42 a Rac1, přes které reguluje dynamiku aktinu. Vav je vysoce exprimován v hematopoietických buňkách, kde se účastní signalizace přes receptory aktivované imunitní odezvou⁶⁹. V jeho struktuře se dá najít několik motivů důležitých pro protein – proteinové interakce a signální přenos, včetně SH3 a SH2 domén². V sekvenci Vav lze také rozpoznat dvě jaderné lokalizační sekvence². Kromě jeho cytoplazmatických funkcí se Vav podílí i na regulaci transkripce a buněčného cyklu pravděpodobně přes interakce se Sam68 (viz str. 19) a hnRNP K (viz str. 22) jeho SH3 doménou^{61,70-72}.

Kinázy rodiny Src (Lyn, Fyn, Lck a Hck) mohou Vav přímo fosforylovat a aktivovat jeho enzymovou aktivitu^{70,73}. K interakci mezi Vav a SFK pravděpodobně dochází přes jejich SH2 doménu⁷³. Některé extracelulární signály mohou vyvolat translokaci Vav do jádra, kde byl také nalezen fosforylovaný na tyrozinu⁶¹. Též vzájemná koexprese Sam68 a Vav vede ke zvýšení lokalizace Vav v jádře a ke změně buněčné morfologie⁷². Přestože jeho jaderná funkce ještě není úplně pochopena, tyto informace naznačují, že Vav funguje také jako adaptorový protein zapojený do metabolismu RNA a transkripce v průběhu diferenciaci^{61,70-72}.

4.4.2. Nck

Nck je konstitutivně exprimovaný adaptorový protein, který je složen z jedné SH2 a tří SH3 domén. Hraje významnou roli v signálním přenosu různých receptorů, jako jsou receptory pro PDGF nebo VEGF, a spojuje receptorové i nereceptorové tyrozinové kinázy s aparátem aktinové reorganizace⁷⁴. Nck je také silný aktivátor proteinu N-WASP (viz str. 16), který je zodpovědný za aktinovou polymerizaci v jádře a regulovaný tyrozinovou fosforylací kinázami z rodiny Src⁷⁵. Přestože Nck neobsahuje ve své struktuře NLS, vyskytuje se i v jádře. Zde je jeho přítomnost dána pravděpodobně asociací s jinými proteiny⁷⁶.

Kináza Src aktivovaná receptory růstových faktorů fosforyluje Nck⁷⁷. Analýza jaderné a cytosolické frakce potvrdila, že stimulace růstovými faktory nevede k žádné translokaci Nck a že tyrozinová fosforylace je specifická pouze na cytosolický Nck. Další analýzy odhalily specifické vazebné partnery rozdílné pro jaderný a cytosolický kompartment. Sam68 (viz str. 19), RNA vazebný protein a substrát kinázy Src běžně lokalizovaný v jádře, byl identifikován jako jaderný specifický partner Nck v obou mitotických a nemitotických buňkách. Pro tuto interakci je esenciální první SH3 doména Nck. Po rozpadu jádra se počet interakcí mezi Sam68 a Nck snižuje. Z toho důvodu se předpokládá, že Sam68 je vycytován aktivovanou kinázou Src během mitózy, což má za následek ztrátu asociace s Nck. To poukazuje na konstitutivní spojení Nck se Sam68⁷⁶. Odhalení adaptorových proteinů v jádře naznačuje, že jsou v jádře mechanismy signálního přenosu, které rekapitulují ty, co jsou v cytoplasmě.

4.5. Regulace dynamiky a funkce aktinu v jádře během interfáze

Nejen v cytoplasmě, ale i v jádře probíhá dynamická polymerace aktinu. Ukazuje se, že se aktin v jádře účastní remodelace chromatinu a asociuje se všemi třemi RNA polymerázami (má tedy vliv na transkripci) a také s některými ribonukleoproteiny. V obou kompartmentech zajišťuje nukleační aktivitu komplex Arp2/3, jehož funkci regulují proteiny WASP⁷⁵. Proteinová rodina WASP zahrnuje 2 členy: WASP, který je omezen na hematopoetické buňky, a konstitutivně exprimovaný N-WASP²⁰. Kináza Fyn interaguje s oběma přes svou SH3 doménu^{78,79}. N-WASP je ale jediným členem proteinové rodiny WASP, který se nachází i v nukleoplasmě, kde zajišťuje kontakt s komplexem Arp2/3⁷⁵.

Nativní konformace N-WASP je autoinhibiční, způsobující depolymerizaci aktinu. Aktivace N-WASP vyžaduje jeho interakci s molekulou rušící autoinhibiční konformaci, jako jsou např. cdc42 nebo Nck (viz str. 16)⁷⁵. Dále může být N-WASP aktivován fosforylací na tyrozinu 253 kinázou Fyn, což vede k trvalé aktivaci nukleační aktivity komplexu Arp2/3 nezávislé na Cdc42⁸⁰.

Lokalizace N-WASP je také kontrolována tyrozinovou fosforylací kinázami z rodiny Src. N-WASP má 3 NLS a neobvyklý NES, který se zpřístupní po konformačních změnách zapříčiněných tyrozinovou fosforylací. Fosforylovaný N-WASP je převážně lokalizovaný v cytoplazmě, zatímco nefosforylovaný v jádře. Kromě toho, tyrozinová fosforylace N-WASP způsobuje jeho zrychlenou ubiquitylaci a následnou degradaci²⁰.

N-WASP se váže na SH3 doménu kinázy Fyn⁷⁹. To podporuje domněnku, že aktivace závislá na fosforylaci, propůjčuje v nukleoplazmě významný mechanismus regulace. V tomto případě aktivace N-WASP, která zároveň způsobuje jeho jaderný export a degradaci, zajistí, že nukleární aktivita Arp2/3 zprostředkovaná fosforylovaným N-WASP, je přísně regulovaná. Jeho krátká životnost v nukleoplazmě zároveň zabrání extensivní aktinové polymerizaci^{20,75}. Z těchto poznatků vyplývá, že se kináza Fyn vyskytuje i v jádře, kde fosforyluje N-WASP.

Nejen kinázy z rodiny Src ovlivňují aktivitu N-WASP, ale i N-WASP působí na SFK. Zvýšená úroveň nefosforylovaného N-WASP v jádře snižuje aktivity SFK v buňce. Zároveň potlačuje transkripci HSP90, který je esenciální pro správnou aktivaci těchto kináz. Tento efekt N-WASP je potlačen, pokud je tento protein fosforylovaný, a tedy exportovaný z jádra. Z toho vyplývá, že lokalizace N-WASP moduluje aktivitu kinázy Src regulací exprese HSP90²⁰.

Je známo, že N-WASP interaguje s hnRNP K⁸¹ (viz str. 22) a komplexem PSF-NonO⁸², takto může regulovat transkripci a sestřih. Aktinová polymerizace indukovaná proteinem N-WASP je také nutná pro správnou činnost RNA polymerázy II. Z toho vyplývá, že tyrozinová fosforylace jaderné frakce N-WASP kinázami z rodiny Src hraje důležitou roli v regulaci transkripce^{75,82}.

SFK ovlivňují polymerizaci aktinu také regulací translace mRNA β -aktinu. Především v neuronech je tato kontrola vykonávána tyrozinovou fosforylací proteinu ZBP1⁸³ (viz str. 24). V neposlední řadě mohou SFK ovlivnit dynamiku aktinu přes Sam68, tento protein totiž váže β -aktin mRNA a jeho schopnost vázat tuto mRNA je negativně regulována tyrozinovou fosforylací⁸⁴ (viz str. 19). Kromě v této kapitole zmíněného Nck⁷⁵ (viz str. 16), který funguje jako silný aktivátor aktivity N-WASP, polymerizaci jaderného aktinu pravděpodobně usměrňují i interakce mezi HS1⁶³ (viz str. 14), Vav^{70,73} (viz str. 15) a SFK.

5. Src a metabolismus RNA

Kinázy rodiny Src se podílejí na metabolismu RNA kromě regulací genové exprese (viz str. 11) i na jiných úrovních. V tomto ohledu významně přispívají studie používající pro aktivaci SFK růstové faktory. Kináza Src stimulovaná růstovým faktorem PDGF způsobuje stabilizaci mRNA specifických časných genů ve fibroblastech⁸⁵ nebo COX-2 mRNA v aortálních myoblastech⁸⁶. v-Src také zvyšuje množství mRNA sphingosine kinázy 1 její stabilizací. Toho pravděpodobně dosáhne fosforylací tyrozinových zbytků AUF1 (mRNA decay-accelerating factors), vážícího se k 3' nepřepisující se oblasti (UTR) určitých mRNA. Tím zabrání jeho aktivitě vedoucí k rozpadu molekul mRNA⁸⁷.

Kinázy rodiny Src jsou většinou spojovány s integrinovou signalizací, ale o jejich propojení s RNA metabolismem se zatím moc neví. Proto je zajímavé, že více než 20 % proteinů diferenciatně fosforylovaných na tyrozinu v buňkách transformovaných kinázou Src spadá přímo do této kategorie. Kromě sestřihových faktorů byly zaznamenány také RNA helikázy, ribonukleoproteiny, tRNA syntetázy, ribozomální proteiny, translační iniciační faktory, chaperony a komponenty ubiquitin-proteasomového systému⁸⁸. Další analýza identifikovala a posléze potvrdila fyzickou asociaci mezi komponentou eukaryotického translačního iniciačního faktoru 3D a SH3 doménou kinázy Src⁸⁹. Toto spolu s faktem, že kinázu Src je možné nalézt nejen uvnitř jádra, ale i v jadérku²⁷, poukazuje na nové neprobádané pole působnosti kinázy Src.

5.1. Posttranskripční regulace RNA

Kinázy rodiny Src mohou přispívat k regulaci úprav hnRNA různými způsoby (viz dále). Src pravděpodobně působí na obecný mechanismus sestřihu nebo transportu mRNA regulací aktivity komponent sestřihového a transportního aparátu⁸. Neel se svými kolegy⁹⁰ použili myši TNF β a β -globin jako reportérový gen. Po kotransfekci NIH3T3 buněk expresními vektory obsahujícími jeden z těchto reportérových genů a Src došlo k indukci modifikace zpracování RNA v těchto buňkách. Porovnání mezi různými stavy aktivace kinázy Src ukázalo, že Src může buď zpomalit rychlost sestřihu hnRNA, anebo umožnit export aberantně sestřižených transkriptů⁹⁰. Stejného výsledku se dosáhlo i použitím genu pro LT α ⁹. Zpomalení sestřihu způsobené kinázou Src je dáno především preferencí fosforylovat specifické substráty. Tato regulace sestřihu, ani transportu ale nevyžaduje její funkční SH3 doménu. To vylučuje zapojení SH3 ligandů kinázy Src v regulaci úprav reportérové hnRNA pro LT α a TNF β . Na druhou stranu efektivní transport nedokončených transkriptů, který vede

k jejich akumulaci v cytoplazmě, vyžaduje přítomnost aktivační mutace a je senzitivní k SH2 doméně^{9,90}.

Tyrozínová fosforylace proteinů účastnících se zpracování hnRNA by mohla být zodpovědná za dřívější pozorování onkogenní aktivity kinázy Src způsobující akumulaci aberantně sestřižených transkriptů v cytoplazmě⁹. Zvýšená akumulace mRNA s nesestřiženými introny byla pozorována např. v mnoha nádorech u genu CD44⁹¹.

5.1.1. RNA vazebné proteiny

Kinázy z rodiny Src sdílejí mnoho substrátů a ukazují značnou funkční redundanci⁴. Proto zde popsané RNA vazebné proteiny mohou sloužit jako substráty i jiným členům SFK. Většina RNA vazebných proteinů se nachází v cytoplazmě nebo v jádře. Možným jaderným interakcím s SFK není zatím věnována velká pozornost.

5.1.1.1. STAR rodina

Zástupci proteinové rodiny STAR obsahují ve své struktuře RNA vazebnou „hnRNP K homologní“ KH doménu obohacenou o konzervované aminokyseliny a SH3 vazebné motivy bohaté na prolin. To zajišťuje těmto proteinům různorodé interakce s RNA a signalizačními molekulami^{92,93}.

5.1.1.1.1. Sam68

Protein Sam68, člen proteinové rodiny STAR⁸⁴, též znám jako p70 či p62, je substrátem kináz rodiny Src během mitózy². Sam68 je jaderný protein, který obsahuje alespoň 6 oblastí bohatých na prolin, RNA vázající oblast přiřazovanou ke KH doméně⁹⁴ a C-terminální konec bohatý na tyrozin⁸. KH homologní doména je rozšířena o konzervované aminokyseliny společně více proteinům. Nazývá se GSG⁹³, in vitro váže poly(U) homopolymerní ribonukleotidy a její schopnost vázat tyto ribonukleotidy může být negativně regulována tyrozínovou fosforylací zprostředkovanou členy SFK Fyn^{10,95} a Src⁹⁶ nebo interakcemi s SH3 a SH2 doménami kinázy Src⁹⁷. Obě tyto domény jsou nutné pro stabilní interakci se Sam68 během mitózy^{38,97}.

Během mitózy kináza Src fosforyluje Sam68. To vede k zablokování ukončení mitózy. Průtoková cytometrie ukázala, že na schopnost buněk vstupovat do mitózy to nemá žádný efekt³⁸. Toto a další fakta vedou k myšlence, že Src je důležitý v regulaci buněčného cyklu přes Sam68, konkrétně jeho KH doménou⁹⁸. Wyke se svými kolegy dokázali, že nejen KH doména Sam68 ale i kináza Src je nezbytná pro nástup S fáze³⁹. Sam68 je významně fosforylovaný na threoninu a serinu různými kinázami během mitózy a interfáze, ale tyto

fosforylace nemají vliv na interakce Sam68 s RNA⁹⁹. Doposud byla prokázána interakce Sam68 s kinázou Src pouze po rozpadu jaderného obalu během mitózy⁸. Přesto jsou zde i doklady, které poukazují na možnou konstitutivní asociaci mezi Src a Sam68 během celého buněčného cyklu³⁸.

Sam68 se nachází nejvíce v jádře¹⁰⁰. Subpopulace Sam68, která se vyskytuje v cytoplasmě, funguje jako adaptorový protein. Přenáší signály od aktivovaných členů SFK (Fyn, Src, Lck, Lyn) směrem k jejich efektorům, jako jsou RasGAP1 a STAT3^{101,102,103}. Kromě SFK také váže signální molekuly, jako jsou Grb2 a fosfolipáza C- γ ¹⁰². Sam68 byl nalezen konstitutivně fosforylovaný v leukemických T-buňkách a po stimulaci klidových T-lymfocytů fytohemagglutininem a interleukinem-2 je fosforylován na tyrozinu. Toto naznačuje, že tyrozinová fosforylace Sam68 není omezena pouze na mitózu¹⁰¹. Je důležité zmínit, že lokalizace kinázy Fyn u plazmatické membrány se ukázala esenciální pro konstitutivní tyrozinovou fosforylací jaderného Sam68 a že fosforylace Sam68 může probíhat mimo jádro¹⁰.

Několik studií podporují roli Sam68 v regulaci metabolismu RNA. Kromě regulace exportu a polyadenylace virových mRNA bylo pozorováno, že Sam68 kolokalizuje a asociuje se sestřihovými faktory^{104,84} a dokonce reguluje alternativní sestřih^{105,104,106}. Tato schopnost je ovlivněna tyrozinovou fosforylací kinázou Fyn^{104,106}. Přestože tyrozinová fosforylace Sam68 neovlivňuje jeho lokalizaci, ruší jeho interakci s faktorem YT521-B (viz str. 23) asociovaným se sestřihem v jádře¹⁰⁴. Sam68 také asociuje s Brm, komponentou chromatinového remodelačního komplexu SWI/SNF, která zároveň zpomaluje elongaci transkripce zprostředkovanou RNA polymerázou II a uplatňuje se i v alternativním sestřihu⁴⁹. Sam68 váže hnRNA Bcl-x a ovlivňuje jeho alternativní sestřih. Vazbou upřednostňuje tvorbu proapoptotické izoformy Bcl-x. Tyrozinová fosforylace Sam68 kinázou z rodiny Src (pozorováno u Fyn) může přepínat v živých buňkách jeho roli z proapoptotické na antiapoptotickou¹⁰⁶. Zajímavé je, že Sam68 interaguje v jádře s adaptorovým proteinem Nck (viz str. 16), který reguluje jaderný aktinový cytoskelet⁷⁶. To a další data silně naznačují vliv Sam68 na metabolismus RNA nejen přes vazbu RNA, ale také jeho interakcí s dalšími jadernými proteiny¹⁰⁴. Sam68 by mohl být prostředník mezi extracelulárně aktivovanými drahami a posttranskripční regulací genové exprese. Díky schopnosti vázat RNA propojuje signální přenos interakcí s kinázami SFK s regulací metabolismu RNA¹⁰⁷.

5.1.1.1.2. SLM-1

Di Fruscio se svojí skupinou⁹³ identifikovali dva savčí proteiny SLM-1 a SLM-2, které mají $\approx 70\%$ sekvenční identitu se Sam68 v jejich GSG doméně a obsahují SH2 a SH3 domény. Oba dva jsou RNA vazebné proteiny, ale pouze SLM-1 funguje jako multifunkční adaptorový protein pro kinázu Src během mitózy, neboť váže Grb-2, fosfolipázu C γ -1 (PLC γ -1) a p120^{rasGAP}. Kinázy Src a Fyn mohou fosforylovat SLM-1, ale ne SLM-2⁹³. SLM-1 interaguje se Sam68 a YT521-B (jaderný protein účastnící se selekce sestřihového místa; viz str. 23). SLM-1 moduluje výběr sestřihového místa podobně jako Sam68 (viz str. 19). Fosforylace SLM-1 pomocí kinázy Fyn ruší tuto schopnost modulace, ale nemá žádný vliv na aktivitu SLM-2¹⁰⁸. Pravděpodobně tedy existuje rodina Sam68/SLM, jejíž členové mají vliv na signální cestu řídící metabolismus RNA.

5.1.1.1.3. QKI

QKI je první protein proteinové rodiny STAR, u kterého bylo ukázáno, že pozitivně reguluje homeostázu mRNA kontrolovaným snížením tyrozinové fosforylace u diferencujících se buněk. Je to selektivní RNA vazebný protein, který je esenciální pro myelinaci v centrálním nervovém systému¹⁰⁹. Všechny hlavní izoformy sdílí rozšířenou RNA vazebnou KH doménu na N-konci následovanou několika SH3 vazebnými motivy a shlukem tyrozinových zbytků na C-konci⁹². Kinázy rodiny Src (Src a Fyn) ovlivňují proces myelinace v centrálním nervovém systému fosforylací tohoto seskupení tyrozinových zbytků. QKI selektivně váže 3'UTR mRNA kódující MBP (Myelin Basic Protein). Taková interakce stabilizující mRNA MBP je požadována pro rychlou akumulaci této mRNA během aktivní myelinogeneze. Interakce SFK s SH3 motivem QKI a následná tyrozinová fosforylace ruší schopnost QKI vázat mRNA MBP. Tato fosforylace způsobená kinázou Src je přísně regulována během aktivní produkce myelinu, což posiluje interakci mezi QKI a mRNA MBP¹⁰⁹.

Funkční význam regulace interakce QKI s RNA tyrozinovou fosforylací se neomezuje jen na metabolismus mRNA MBP. Ve skutečnosti mohou izoformy QKI hrát rozdílné role v různých fázích posttranskripční regulace¹¹⁰, včetně sestřihu¹¹¹, subcelulární lokalizace a translace mRNA^{110,112}. Například bylo objeveno, že izoforma QKI-6 inhibuje translaci vazbou reportérové mRNA *in vitro*¹¹². Kromě toho může QKI zapříčinit zadržování mRNA MBP v jádře, a tím inhibovat produkci tohoto proteinu¹¹³.

Proteiny QKI se obecně exprimují v různých tkáních, nejen v buňkách produkujících myelin. Ovlivňují nejrůznější procesy jako je apoptóza, tumorigeneze a kardiovaskulární

rozvoj^{109,110}. Výše zmíněný mechanismus regulace myelinogeneze centrálního nervového systému (interakce QKI s RNA ovlivněná tyrozinovou fosforylací kinázami Src) by mohl být široce uplatněn i v jiných systémech pro modulaci buněčného osudu mRNA v reakci na nejrůznější vývojové a extracelulární signály.

5.1.1.2. hnRNP K

Heterogenní jaderný ribonukleoprotein hnRNP K obsahuje tři KH domény, které zprostředkovávají vazbu na RNA a DNA (přednostně váže poly(C) nukleotidy). Ovlivňuje remodelaci chromatinu, transkripci, export a stabilitu mRNA, dokonce i translaci. Protein K se skládá z mnoha modulů. Některé váží kinázy, jiné rekrutují chromatin, transkripční, sestřihové a translační faktory. To napovídá o jeho prostorovém uplatnění. Funguje jako proteinové lešení integrující signální dráhy usnadněním vzájemné komunikace mezi kinázami a faktory regulující procesy metabolismu nukleových kyselin⁵⁰. Elektronová mikroskopie ukázala lokalizaci proteinu K v jádře, cytoplazmě, mitochondriích a v blízkosti plazmatické membrány¹¹⁴. Mezi cytoplazmou a jádrem se aktivně přemisťuje⁵⁰.

hnRNP K obsahuje 3 motivy bohaté na prolin, kterými selektivně váže SH3 domény tyrozinových kináz: Src, Fyn, Lyn a Lck^{7,97,115}. Tyto kinázy také fosforylují protein K. Tato fosforylace a zvýšené množství interakcí s vazebnými partnery snižuje schopnost hnRNP K vázat RNA^{115,116,117}. Na druhou stranu tyrozinová fosforylace proteinu K posiluje jeho interakci s SFK a proteinem Vav¹¹⁶ (viz str. 15). hnRNP K není pouze substrátem kinázy Src, ale zároveň jejím aktivátorem. To poukazuje na vzájemnou specifickou interakci mezi těmito proteiny¹¹⁸. Aktivace kinázy Src je inhibována dimethylací argininových zbytků hnRNP K lokalizovaných mezi motivy bohatými na prolin¹¹⁹. První oblast bohatá na prolin umožňuje interakci se Src, zatímco dvě následující jsou nezbytné a dostačující pro specifickou aktivaci této kinázy¹²⁰. Tyto funkce proteinu K (interakce s kinázou Src a její aktivace) jsou na sobě nezávislé. In vitro a in vivo protein K interaguje s kinázami Src a Lck, ale aktivuje pouze Src¹¹⁷. Předpokládá se, že hnRNP K by mohl pozměnit konformaci kinázy Src vedoucí ke spuštění její autofosforylace a aktivace. Aktivovaná Src jej pak zpětně fosforyluje¹¹⁸.

V cytoplazmě protein K váže translační elongační faktor-1a a plní funkci translačního regulátoru specifických mRNA, jako jsou mRNA pro c-myc, renin, r15-LOX a Src^{50,121}. Mechanismus působení hnRNP K a jeho ovlivnění kinázou Src je nejvíce prostudován na regulaci translace u mRNA pro r15-LOX a Src. r15-LOX je klíčový enzym v diferenciaci erythrocytů podílející se na odbourání mitochondrií ve zralých retikulocytech¹¹⁷. Tyrozinová kináza Src se odlišně exprimuje v prekurzorech erythrocytů a zralých retikulocytech¹²¹.

Protein K umlčuje translaci mRNA pro r15-LOX a Src v erythroidních prekurzorech vazbou na diferenciační kontrolní element (DICE) nalézajícího se na 3'UTR těchto molekul. Vazba hnRNP K k DICE zablokuje nasednutí 60S ribozomální podjednotky a zformování kompetentního 80S ribozomu. Ve zralých retikulocytech kináza Src fosforyluje Tyr458 na jeho KH doméně a tím reverzibilně inhibuje vazbu tohoto ribonukleoproteinu k DICE. Tímto způsobem obnovuje Src translaci mRNA pro r15-LOX a Src inhibovanou proteinem K in vivo^{118,121}. Další analýza ukázala, že protein K je in vivo konstitutivně navázán k mnoha mRNA. Tato vazba je inhibována tyrozinovou fosforylací hnRNP K. To naznačuje spojitost mezi extracelulárními signály aktivované kinázy Src a vazbou tohoto proteinu k molekulám mRNA¹¹⁶. Na rozdíl od translačního umlčení mRNA pro r15-LOX a Src, hnRNP K stimuluje nasednutí ribozómu na mRNA c-myc. To poukazuje na pleiotropní působení hnRNP K v translačních procesech⁵⁰.

Tyrozinová fosforylace hnRNP K kinázami rodiny Src by mohla probíhat nejen v cytoplazmě, ale také v jádře, kde by regulovala export mRNA, transkripci a modifikaci hnRNA v odpovědi na extracelulární signály (viz str. 9).

5.1.1.3. SNP70

Protein SNP70, který se převážně koncentruje v jádře mimo jadérko, byl nalezen jako interakční partner SH3 domény kinázy Src. V jeho sekvenci lze nalézt SH3 vazebné motivy a několik jaderných lokalizačních signálů. Zdá se, že tento protein je konstitutivně exprimovaný ve velké škále různých tkání. Vykazuje afinitu k RNA nebo jednovláknové DNA¹²². SNP70 kolokalizuje v jádře se sestřihovými faktory¹²³. Kromě toho SNP70 asociuje s jadernými a perinukleárními filamenty a hraje roli v regulaci zpracování hnRNA¹²².

5.1.1.4. YT521-B

YT521-B je RNA vazebný protein účastnící se sestřihu hnRNA. Konstitutivně se exprimuje v jádře, kde mění využití alternativních sestřihových míst v závislosti na své koncentraci¹²⁴. Toho dosáhne buď interakcí s dalšími proteiny, anebo vazbou RNA přes svojí YTH doménu^{124,125}. Interaguje se Sam68¹⁰⁴ (viz str. 19) a ovlivňuje přesunutí chromozomálních lokusů do center s aktivní transkripcí, což umožňuje efektivní regulaci genové exprese¹²⁶. YT521-B je lokalizovaný v dynamickém jaderném kompartmentu, tzv. YT body, a je schopný se přemísťovat mezi jádrem a cytoplazmou. V cytoplazmě může být fosforylovaný kinázami Src či Fyn, zatímco v jádře převažuje fosforylace zprostředkovaná kinázou Abl¹²⁴. Tyrozinová fosforylace Sam68 zprostředkovaná kinázou Fyn negativně reguluje jeho asociaci s YT521-B a způsobuje rozptýlení YT521-B z YT bodies do

nucleoplazmy¹⁰⁴. Nefosforylovaný YT521-B mění výběr alternativních sestřihových míst IL-4 receptoru, CD44 a SRp20, zatímco tyrozinová fosforylace minimalizuje tento efekt. Tyrozinová fosforylace pravděpodobně způsobuje sekvestraci YT521-B v nerozpustné jaderné frakci, což ruší jeho schopnost měnit alternativní sestřihová místa¹²⁴. Protože asociace a lokalizace YT521-B a Sam68 jsou ovlivněny tyrozinovou fosforylací Fyn, předpokládá se, že aktivita SFK ovlivňuje alternativní sestřih přes Sam68 a jeho interakcí s YT521-B¹⁰⁴. Stoss se svými kolegy¹⁰⁸ potvrdili stejný systém regulace také mezi YT521-B a SLM-1 (viz str. 21).

5.1.1.5. ZBP1

Onkofetální protein ZBP1 ovlivňuje lokalizaci, stabilitu a kontrolu translace mRNA. Obsahuje KH doménu, kterou váže konzervovaný element známý jako „zipcode“ na 3' UTR některých mRNA¹²⁷ (např. mRNA β -aktinu⁸³). Aktivně se exprimuje během embryogeneze a tumorigeneze, ale jeho exprese je reprimována v metastatických buněčných liniích rakoviny plic a nádorů¹²⁸.

mRNA β -aktinu je majoritně lokalizována v místě polymerizace aktinu, což může přispívat k buněčné migraci během embryogeneze, diferenciaci a dokonce ke karcinogenezi. Tato lokalizace vyžaduje onkofetální protein ZBP1, který váže její zipcode element. Ten asociuje s β -aktinovým transkriptem v jádře a brání jeho předčasné translaci v cytoplazmě blokováním iniciace translace. Translace nastane až poté, co komplex ZBP1-mRNA dosáhne cílové periferní oblasti buňky. Na konci transportu mRNA je translace iniciována díky interakci kinázy Src, která nafosforyluje tyrozinový zbytek na ZBP1, který je odpovědný za vazbu k RNA⁸³. Tato regulace lokalizace translace je pod kontrolou SFK především v primárních fibroblastech a neuronech^{83,127}. Kromě kontroly lokalizace a translace mRNA, ZBP1 reguluje i stabilitu c-Myc, CD44, a dalších mRNA¹²⁹.

5.1.1.6. CUGBP2

CUGBP2 je RNA vazebný protein mající funkce v jaderném i cytoplazmatickém kompartmentu¹³⁰. Obsahuje tři RNA rozpoznávací motivy (RRM)¹³¹. Kináza Src stimulovaná růstovým faktorem PDGF fosforyluje CUGBP2 na tyrozinu 39, který se poté naváže na AU bohatou oblast v rámci 3' UTR mRNA COX-2 (pozorováno na savčích aortálních svalových buňkách)⁸⁶. Tato vazba stabilizuje mRNA COX-2 a zároveň způsobí inhibici translace této mRNA. To poukazuje na nový mechanismus regulace RNA vazebnými proteiny, kdy zvýšená stabilita proteinu není spojena se zvýšenou proteinovou expresí¹³⁰. Je pozoruhodné, že naproti dřívějším faktům poukazujících na sníženou vazebnou schopnost RNA vazebných proteinů po

tyrozinové fosforylaci (viz str. 19), v tomto případě je tomu právě naopak. Fosforylace CUGBP2 kinázou Src zvyšuje jeho schopnost vázat mRNA COX-2⁸⁶.

CUGBP2 ovládá i další důležité aktivity v metabolismu RNA. Moduluje posttranskripční editaci C na U v mRNA apoB v savčím střevě¹³². Dále reguluje sestřih hnRNA určitých genů během vývoje různých tkání¹³¹. Souhrnně to ukazuje, že CUGBP2 je multifunkční protein kontrolující různé aspekty posttranskripční regulace genové exprese, včetně editace mRNA¹³², sestřihu¹³¹, stability mRNA a translace¹³⁰.

5.1.1.7. RBM10

Amanchy se svojí skupinou (2008)¹³³ identifikovali a posléze experimentálně ověřili nový substrát kinázy Src. Jedná se o jaderný protein RBM10, který váže RNA přes vysoce konzervovaný RNA rozpoznávací motiv (RRM) nalezený u různých RNA vazebných proteinů. Hraje kritickou roli v regulaci genové exprese a má vliv i na posttranskripční regulaci a sestřih hnRNA¹³⁴. Amanchy se svými kolegy¹³³ navíc potvrdili, že RBM10 je fosforylován kinázou Src po její aktivaci růstovým faktorem PDGF.

5.1.2. Endonukleázy

Degradace mRNA patří k hlavnímu mechanismu kontroli genové exprese. Na rozdíl od hlavního degradačního procesu molekul mRNA, zahrnujícího odstranění 5' konce a posléze degradace exonukleázami, minoritní způsob degradace endonukleázami způsobuje štěpení přepisující se mRNA na ribosomech. To znamená, že endonukleázy musí být specificky cíleny k přepisující se substrátové mRNA. Musí tedy existovat proteiny, které specificky navážou mRNA určené k tomuto způsobu degradace a posléze cíleně vychytají endonukleázy¹³⁵.

5.1.2.1. PMR1

PMR1 je endonukleáza mRNA, která po aktivaci estrogenem u drápatky degraduje mRNA albuminu¹³⁵. PMR1 iniciuje degradaci mRNA pouze pokud je navázána na polyzomy. Tento rozklad vyžaduje aktivní translaci její substrátové mRNA a tyrozinovou fosforylaci PMR1 na Tyr650 kinázou Src^{135,136}. Fosforylace tohoto tyrozinu generuje vazebné místo SH2 ligandu nepostradatelného pro cílení PMR1 k polysómům¹³⁵. Interakce Src s PMR1 zahrnuje u této endonukleázy obě její SH3 vazebná místa bohatá na prolin na N-konci a místo pro tyrozinovou fosforylaci Tyr650 na C-konci. Růstový faktor EGF rychle indukuje fosforylaci PMR1 kinázou Src. To poskytuje přímé spojení mezi přenosem signálu kinázovou aktivitou a degradací mRNA¹³⁶.

6. Závěr a Diskuze

Naše porozumění struktuře, regulaci, lokalizaci a funkci SFK uvnitř buňky se dramaticky zvýšilo od jejich prvního objevení. Cílem této práce bylo shrnout dosavadní poznatky týkající se vlivu SFK na metabolismus RNA a zároveň vyvodit verdikt nad jejich jadernou lokalizací. S tím souvisí nové možnosti jejich vlivu na zpracování RNA. Jejich indukovatelná jaderná lokalizace je neomezuje pouze na interakci s cytoplazmatickými či aktivně se přemisťujícími proteiny, ale mohou interagovat se substráty přímo v jádře. Jak zde bylo popsáno, v jádře během interfáze SFK způsobují strukturální změny chromatinu a umožňují přístup transkripčním faktorům do míst aktivní transkripce. Tato práce popisuje známé interakční partnery SFK, které patří do skupiny RNA vazebných proteinů majících různou roli ve zpracování RNA (viz **Tabulka 1**). Tyto interakce se zkoumaly především v cytoplazmě, přestože většina těchto proteinů se vyskytuje i v jádře. Jejich možné jaderné asociaci s SFK se doposud nevěnovala pozornost, pravděpodobně kvůli novým zatím ne moc známým faktům o jaderné lokalizaci SFK.

Tabulka 1: Substráty SFK hrající úlohu v metabolismu RNA

Protein	Úloha v metabolismu RNA	Reference
Transkripční faktory:		
p73; YAP; STAT 3; NF-κB; HS1	Regulace transkripce	22,53,54,55,60,62
Jaderné adaptorové proteiny:		
Nck; Vav	Propojení proteinů s metabolismem RNA, regulace transkripce	71,61,72,76,77
Další jaderné proteiny		
N-WASP	Regulace transkripce, sestřih	75,82
Histon deacetylázy		
HDAC3	Regulace transkripce	25
RNA vazebné proteiny		
Sam68	Alternativní sestřih, export retrovirových nesestřižených RNA	84,104,105,106
SLM-1	Alternativní sestřih	108,109,110,111
QKI	Sestřih, inhibice translace, stabilizace mRNA	112,113
hnRNP K	Regulace transkripce, sestřih, kontrola translace a exportu mRNA	50,121
SNP70	Sestřih	122,123
YT521-B	Regulace transkripce, alternativní sestřih	124,126
ZBP1	Regulace transportu mRNA, stabilizace a inhibice translace mRNA	83,129
CUGBP2	Stabilizace a inhibice translace mRNA, modulace sestřihu a editace RNA	130,131,132
RBM10	Regulace transkripce a sestřihu	134
Endonukleázy		
PMR1	Degradace RNA	135
Protein	Úloha v metabolismu RNA	Reference

V posledních letech se dosáhlo významného pokroku v odhalení působení SFK na zpracování RNA (viz **Schéma 1**). Po stimulaci růstovými faktory SFK ovlivňují metabolismus RNA nejen regulací transkripce, ale i jinými možnými způsoby. Působí na něj především specifickou stabilizací určitých mRNA⁸⁵ a aktivací translace^{83,118,121}. Transkripci modulují přes interakci s transkripčními faktory (viz **p73/YAP**²²; **STAT proteiny**²; **NF-κB**⁶⁰; atd...), ovlivněním remodelace chromatinu¹ (viz str. 11) a jaderné polymerace aktinu (viz **N-WASP**²⁰). Mezi další mechanismy, které SFK usměrňují, patří kontrola lokalizace mRNA (viz **ZBP1**⁸³) a alternativní sestřih (viz **YT521-B**¹²⁴; **Sam68**^{105,104,106}). Také ovlivňují transportní fenotyp mRNA⁹⁰. Translaci modulují nejenom propuštěním vyvázaných mRNA (viz **hnRNP K**^{118,121}; **ZBP1**⁸³), ale i jejich cílenou degradací (viz **PMR1**¹³⁶) či přímou vazbou a fosforylací translačních iniciačních faktorů⁸⁹. Fosforylace kinázami rodiny Src nejen ruší vazbu RNA vazebných proteinů k RNA (viz **QKI**¹⁰⁹; **hnRNP K**^{118,121}), ale může mít i pozitivní efekt (viz **CUGBP2**⁸⁶).

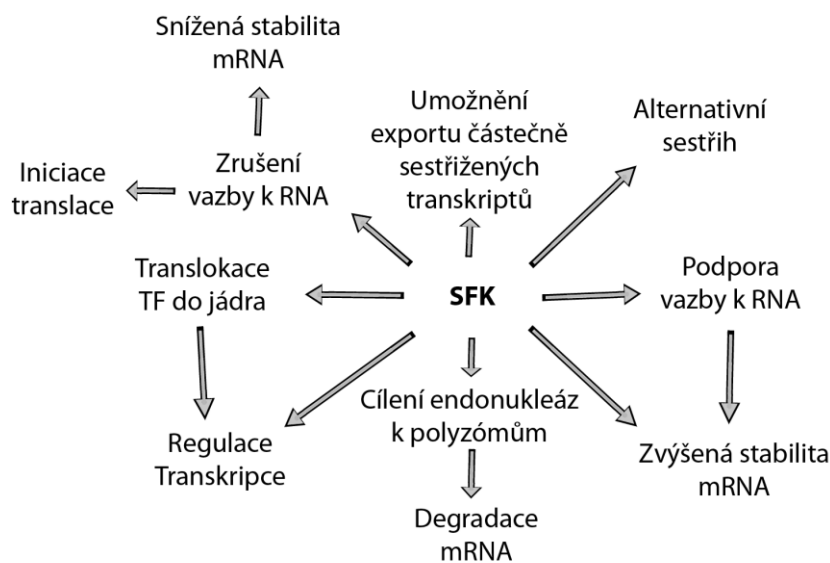


Schéma 1: Působení SFK na metabolismus RNA

Schéma sumarizuje pleiotropní působení SFK na metabolismus RNA. Zkratka TF zastupuje Transkripční Faktory.

Stále nové poznatky poukazují na neustále se rozvíjející a vzájemně se proplétající interakční síť mezi SFK a proteiny ovlivňující úpravy RNA. Objevují se oboustranné pozitivní a negativní zpětné vazby (viz **N-WASP**; **hnRNP K**). Například kináza Src nejen interaguje se **hnRNP K** a ovlivňuje spoustu jeho funkcí, ale i **hnRNP K** má vliv na její aktivitu. Dokonce reguluje i translaci Src (viz **hnRNP K**¹²¹). Poslední dobou se ukazují nové informace vypovídající o rozdílné roli SFK na zpracování RNA v embryogenezi a buněčné diferenciaci (viz **QKI**; **ZBP1**).

Řada otázek zůstává stále nezodpovězená, zejména potvrzení či vyvrácení jaderných interakcí mezi SFK a RNA vazebnými proteiny nebo zjištění způsobu a ovlivnění translokace SFK do jádra.

7. Seznam použité literatury

1. Takahashi A, Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kasahara K, Kuga T, Higashiyama Y, Saito T, Yokoyama KK, Yamaguchi N. Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Experimental Cell Research* 2009;315(7):1117-1141.
2. Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *Journal of Cellular Physiology* 2010;223(1):14-26.
3. Rongish BJ, Kinsey WH. Transient nuclear localization of Fyn kinase during development in zebrafish. *Anatomical Record* 2000;260(2):115-123.
4. Thomas SM, Brugge J. Cellular functions regulated by Src family kinases. *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 1997:513-609.
5. Warmuth M, Damoiseaux R, Liu Y, Fabbro D, Gray N. Src family kinases: Potential targets for the treatment of human cancer and leukemia. *Current Pharmaceutical Design* 2003;9(25):2043-2059.
6. Resh MD, Erikson RL. HIGHLY SPECIFIC ANTIBODY TO ROUS-SARCOMA VIRUS SRC GENE-PRODUCT RECOGNIZES A NOVEL POPULATION OF PP60V-SRC AND PP60C-SRC MOLECULES. *Journal of Cell Biology* 1985;100(2):409-417.
7. Weng ZG, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seideldugan C, Michael WM, Dreyfuss G, Brugge JS. IDENTIFICATION OF SRC, FYN, AND LYN-SH3 BINDING-PROTEINS - IMPLICATIONS FOR A FUNCTION OF SH3 DOMAINS. *Molecular and Cellular Biology* 1994;14(7):4509-4521.
8. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 2000;19(49):5620-5635.
9. Gondran P, Dautry F. Regulation of mRNA splicing and transport by the tyrosine kinase activity of src. *Oncogene* 1999;18(16):2547-2555.
10. Lang V, Semichon M, Michel F, Brossard C, Gary-Gouy H, Bismuth G. Fyn membrane localization is necessary to induce the constitutive tyrosine phosphorylation of Sam68 in the nucleus of T lymphocytes. *Journal of Immunology* 1999;162(12):7224-7232.
11. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;324(4):1155-1164.
12. Brugge JS, Erikson RL. IDENTIFICATION OF A TRANSFORMATION-SPECIFIC ANTIGEN-INDUCED BY AN AVIAN-SARCOMA VIRUS. *Nature* 1977;269(5626):346-348.
13. Kato JY, Takeya T, Grandori C, Iba H, Levy JB, Hanafusa H. AMINO-ACID SUBSTITUTIONS SUFFICIENT TO CONVERT THE NONTRANSFORMING P60C-SRC PROTEIN TO A TRANSFORMING PROTEIN. *Molecular and Cellular Biology* 1986;6(12):4155-4160.
14. Courtneidge SA, Levinson AD, Bishop JM. THE PROTEIN ENCODED BY THE TRANSFORMING GENE OF AVIAN-SARCOMA VIRUS (PP60-SRC) AND A HOMOLOGOUS PROTEIN IN NORMAL-CELLS (PP60-PROTO-SRC) ARE ASSOCIATED WITH THE PLASMA-MEMBRANE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1980;77(7):3783-3787.
15. Kaplan KB, Swedlow JR, Varmus HE, Morgan DO. ASSOCIATION OF P60(C-SRC) WITH ENDOSOMAL MEMBRANES IN MAMMALIAN FIBROBLASTS. *Journal of Cell Biology* 1992;118(2):321-333.

16. Kaplan JM, Varmus HE, Bishop JM. THE SRC PROTEIN CONTAINS MULTIPLE DOMAINS FOR SPECIFIC ATTACHMENT TO MEMBRANES. *Molecular and Cellular Biology* 1990;10(3):1000-1009.
17. Ren XP, Cao C, Zhu LB, Yoshida K, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Lyn tyrosine kinase inhibits nuclear export of the p53 tumor suppressor. *Cancer Biology & Therapy* 2002;1(6):703-708.
18. He ZW, Cho YY, Ma WY, Choi HS, Bode AM, Dong ZG. Regulation of ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 by Fyn kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(4):2446-2454.
19. Radha V, Nambirajan S, Swarup G. Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity. *European Journal of Biochemistry* 1996;236(2):352-359.
20. Suetsugu S, Takenawa T. Translocation of N-WASP by Nuclear Localization and Export Signals into the Nucleus Modulates Expression of HSP90. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(43):42515-42523.
21. Ikeda K, Nakayama Y, Togashi Y, Obata Y, Iuga T, Iasahara I, Fukumoto Y, Yamaguchi N. Nuclear localization of Lyn tyrosine kinase mediated by inhibition of its kinase activity. *Experimental Cell Research* 2008;314(18):3392-3404.
22. Paliwal P, Radha V, Swarup G. Regulation of p73 by Hck through kinase-dependent and independent mechanisms. *Bmc Molecular Biology* 2007;8.
23. Davidpfeuty T, Bagrodia S, Shalloway D. DIFFERENTIAL LOCALIZATION PATTERNS OF MYRISTOYLATED AND NONMYRISTOYLATED C-SRC PROTEINS IN INTERPHASE AND MITOTIC C-SRC OVEREXPRESSIONER CELLS. *Journal of Cell Science* 1993;105:613-628.
24. Zhao YH, Sudol M, Hanafusa H, Krueger J. INCREASED TYROSINE KINASE-ACTIVITY OF C-SRC DURING CALCIUM-INDUCED KERATINOCYTE DIFFERENTIATION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89(17):8298-8302.
25. Longworth MS, Laimins LA. Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. *Oncogene* 2006;25(32):4495-4500.
26. Sato I, Obata Y, Kasahara K, Nakayama Y, Fukumoto Y, Yamasaki T, Yokoyama KK, Saito T, Yamaguchi N. Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *Journal of Cell Science* 2009;122(7):965-975.
27. Davidpfeuty T, Nouviandooghe Y. HIGHLY SPECIFIC ANTIBODY TO ROUS-SARCOMA VIRUS SRC GENE-PRODUCT RECOGNIZES NUCLEAR AND NUCLEOLAR ANTIGENS IN HUMAN-CELLS. *Journal of Virology* 1995;69(3):1699-1713.
28. Bagrodia S, Taylor SJ, Shalloway D. MYRISTYLATION IS REQUIRED FOR TYR-527 DEPHOSPHORYLATION AND ACTIVATION OF PP60C-SRC IN MITOSIS. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13(3):1464-1470.
29. Wilcox C, Hu JS, Olson EN. Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* 1987;238(4831):1275-1278.
30. Buss JE, Sefton BM. Myristic acid, a rare fatty acid, is the lipid attached to the transforming protein of Rous sarcoma virus and its cellular homolog. *Journal of Virology* 1985;53(1):7-12.
31. Luciano F, Ricci JE, Auberger P. Cleavage of Fyn and Lyn in their N-terminal unique regions during induction of apoptosis: A new mechanism for Src kinase regulation. *Oncogene* 2001;20(36):4935-4941.
32. Luciano F, Herrant M, Jacquelin A, Ricci JE, Auberger P. The p54 cleaved form of the

- tyrosine kinase Lyn generated by caspases during BCR-induced cell death in B lymphoma acts as a negative regulator of apoptosis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003;17(6):711-713.
33. Weis K. Regulating access to the genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 2003;112(4):441-451.
 34. Zhou F, Hu J, Ma H, Harrison ML, Geahlen RL. Nucleocytoplasmic trafficking of the syk protein tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26(9):3478-3491.
 35. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj JW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997;90(6):1051-1060.
 36. Vigneri P, Wang JYJ. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nature Medicine* 2001;7(2):228-234.
 37. Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. *Molecular Cell* 2008;29(1):9-22.
 38. Pillay I, Nakano H, Sharma SV. Radicicol inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells. *Cell Growth & Differentiation* 1996;7(11):1487-1499.
 39. Wyke AW, Cushley W, Wyke JA. MITOGENESIS BY V-SRC - A NEED FOR ACTIVE ONCOPROTEIN BOTH IN LEAVING G0 AND IN COMPLETING G1 PHASES OF THE CELL-CYCLE. *Cell Growth & Differentiation* 1993;4(8):671-678.
 40. Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M. THE MAMMALIAN ULTRAVIOLET RESPONSE IS TRIGGERED BY ACTIVATION OF SRC TYROSINE KINASES. *Cell* 1992;71(7):1081-1091.
 41. Kharbanda S, Saleem A, Yuan ZM, Kraeft S, Weichselbaum R, Chen LB, Kufe D. Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53(lyn) tyrosine kinase with p34(cdc21). *Cancer Research* 1996;56(16):3617-3621.
 42. Martin NG, McAndrew PC, Eve PD, Garrett MD. Phosphorylation of cyclin dependent kinase 4 on tyrosine 17 is mediated by Src family kinases. *Febs Journal* 2008;275(12):3099-3109.
 43. Kumar S, Pandey P, Bharti A, Jin S, Weichselbaum R, Weaver D, Kufe D, Kharbanda S. Regulation of DNA-dependent protein kinase by the Lyn tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(40):25654-25658.
 44. Yuan ZM, Huang YY, Kraeft SK, Chen LB, Kharbanda S, Kufe D. Interaction of cyclin-dependent kinase 2 and the Lyn tyrosine kinase in cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Oncogene* 1996;13(5):939-946.
 45. Grishin AV, Azhipa O, Semenov I, Corey SJ. Interaction between growth arrest-DNA damage protein 34 and Src kinase Lyn negatively regulates genotoxic apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(18):10172-10177.
 46. Yoshida K, Kharbanda S, Rufe D. Functional interaction between SHPTP1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(49):34663-34668.
 47. Kaldis P. Another Piece of the p27^{Kip1} Puzzle. *Cell* 2007;128(2):241-244.
 48. Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 2003;116(18):3677-3685.
 49. Batsch E, Yaniv M, Muchardt C. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator

- of alternative splicing. *Nature Structural and Molecular Biology* 2006;13(1):22-29.
50. Bomszyk K, Denisenko O, Ostrowski J. HnRNP K: One protein multiple processes. *Bioessays* 2004;26(6):629-638.
 51. Matteucci E, Ridolfi E, Maroni P, Bendinelli P, Desiderio MA. c-Src/histone deacetylase 3 interaction is crucial for hepatocyte growth factor - Dependent decrease of CXCR4 expression in highly invasive breast tumor cells. *Molecular Cancer Research* 2007;5(8):833-845.
 52. Sudol M. Yes-Associated Protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* 1994;9(8):2145-2152.
 53. Zaidi SK, Sullivan AJ, Medina R, Ito Y, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *Embo Journal* 2004;23(4):790-799.
 54. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 2004;23(48):7957-7968.
 55. Kazansky AV, Rosen JM. Signal transducers and activators of transcription 5B potentiates v-Src-mediated transformation of NIH-3T3 cells. *Cell Growth & Differentiation* 2001;12(1):1-7.
 56. Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R. Induction of p21(WAF1/CIP1) and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: Role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 2000;19(48):5419-5427.
 57. Kabotyanski EB, Rosen JM. Signal transduction pathways regulated by prolactin and Src result in different conformations of activated Stat5b. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(19):17218-17227.
 58. Eicher DM, Tan TH, Rice NR, Oshea JJ, Kennedy ICS. EXPRESSION OF V-SRC IN T-CELLS CORRELATES WITH NUCLEAR EXPRESSION OF NF-KAPPA-B. *Journal of Immunology* 1994;152(6):2710-2719.
 59. Fan CG, Li Q, Ross D, Engelhardt JF. Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(3):2072-2080.
 60. Abu-Amer Y, Ross FP, McHugh KP, Livolsi A, Peyron JF, Teitelbaum S. Tumor necrosis factor-alpha activation of nuclear transcription factor-kappa B in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(45):29417-29423.
 61. Cans C, Mangano R, Barila D, Neubauer G, Superti-Furga G. Nuclear tyrosine phosphorylation: The beginning of a map. *Biochemical Pharmacology* 2000;60(8):1203-1215.
 62. Yamanashi Y, Okada M, Semba T, Yamori T, Umemori H, Tsunasawa S, Toyoshima K, Kitamura D, Watanabe T, Yamamoto T. Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(8):3631-3635.
 63. Ruzzene M, Brunati AM, Marin O, DonellaDeana A, Pinna LA. SH2 domains mediate the sequential phosphorylation of HS1 protein by p72(syk) and Src-related protein tyrosine kinases. *Biochemistry* 1996;35(16):5327-5332.
 64. Brunati AM, Donella-Deana A, James P, Quadroni M, Contri A, Marin O, Pinna LA. Molecular features underlying the sequential phosphorylation of HS1 protein and its association with c-Fgr protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274(11):7557-7564.

65. Uruno T, Zhang P, Liu J, Hao JJ, Zhan X. Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *Biochemical Journal* 2003;371(2):485-493.
66. Takemoto Y, Sato M, Furuta M, Hashimoto Y. Distinct binding patterns of HS1 to the Src SH2 and SH3 domains reflect possible mechanisms of recruitment and activation of downstream molecules. *International Immunology* 1996;8(11):1699-1705.
67. Yamanashi Y, Fukuda T, Nishizumi H, Inazu T, Higashi KI, Kitamura D, Ishida T, Yamamura H, Watanabe T, Yamamoto T. Role of tyrosine phosphorylation of HS1 in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1997;185(7):1387-1392.
68. Gomez TS, McCarney SD, Carrizosa E, Labno CM, Comiskey EO, Nolz JC, Zhu P, Freedman BD, Clark MR, Rawlings DJ and others. HS1 Functions as an Essential Actin-Regulatory Adaptor Protein at the Immune Synapse. *Immunity* 2006;24(6):741-752.
69. Turner M, Billadeau DD. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology* 2002;2(7):476-486.
70. Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20(5):1461-1477.
71. Hobert O, Jallal B, Schlessinger J, Ullrich A. NOVEL SIGNALING PATHWAY SUGGESTED BY SH3 DOMAIN-MEDIATED P95(VAV)/HETEROGENEOUS RIBONUCLEOPROTEIN-K. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(32):20225-20228.
72. Lazer G, Pe'er L, Schapira V, Richard S, Katzav S. The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cellular Signalling* 2007;19(12):2479-2486.
73. Michel F, Grimaud L, Tuosto L, Acuto O. Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(48):31932-31938.
74. McCarty JH. The Nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events. *Bioessays* 1998;20(11):913-921.
75. Gieni RS, Hendzel MJ. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 2009;87(1):283-306.
76. Lawe DC, Hahn C, Wong AJ. The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene* 1997;14(2):223-231.
77. Meisenhelder J, Hunter T. THE SH2/SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN NCK IS RECOGNIZED BY CERTAIN ANTI-PHOSPHOLIPASE C-GAMMA-1 MONOCLONAL-ANTIBODIES, AND ITS PHOSPHORYLATION ON TYROSINE IS STIMULATED BY PLATELET-DERIVED GROWTH-FACTOR AND EPIDERMAL GROWTH-FACTOR TREATMENT. *Molecular and Cellular Biology* 1992;12(12):5843-5856.
78. Banin S, Truong O, Katz DR, Waterfield MD, Brickell PM, Gout I. Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Current Biology* 1996;6(8):981-988.
79. Fukuoka M, Suetsugu S, Miki H, Fukami K, Endo T, Takenawa T. A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42. *Journal of Cell Biology* 2001;152(3):471-482.
80. Suetsugu S, Hattori M, Miki H, Tezuka T, Yamamoto T, Mikoshiba K, Takenawa T. Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite

- extension. *Developmental Cell* 2002;3(5):645-658.
81. Yoo YD, Wu XY, Egile C, Li R, Guan JL. Interaction of N-WASP with hnRNPK and its role in filopodia formation and cell spreading. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(22):15352-15360.
 82. Wu XY, Yoo YD, Okuhama NN, Tucker PW, Liu G, Guan JL. Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nature Cell Biology* 2006;8(7):756-U215.
 83. Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng XH, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 2005;438(7067):512-515.
 84. Lukong KE, Richard S. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 2003;1653(2):73-86.
 85. Bromann PA, Korkaya H, Webb CP, Miller J, Calvin TL, Courtneidge SA. Platelet-derived growth factor stimulates Src-dependent mRNA stabilization of specific early genes in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(11):10253-10263.
 86. Xu K, Kitchen CM, Shu HKG, Murphy TJ. Platelet-derived growth factor-induced stabilization of cyclooxygenase 2 mRNA in rat smooth muscle cells requires the c-Src family of protein-tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(45):32699-32709.
 87. Sobue S, Murakami M, Banno Y, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Suzuki M and others. v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene* 2008;27(46):6023-6033.
 88. Luo W, Slebos RJ, Hill S, Li M, Brabek J, Amanchy R, Chaerkady R, Pandey A, Ham AJL, Hanks S. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH* 2008;7(8):3447-3460.
 89. Wu CG, Ma MHT, Brown KR, Geisler M, Li L, Tzeng E, Jia CYH, Jurisica I, Li SSC. Systematic identification of SH3 domain-mediated human protein-protein interactions by peptide array target screening. *Proteomics* 2007;7(11):1775-1785.
 90. Neel H, Gondran P, Weil D, Dautry F. REGULATION OF PRE-MESSENGER-RNA PROCESSING BY SRC. *CURRENT BIOLOGY* 1995;5(4):413-422.
 91. Goodison S, Tarin D. Current status of CD44 variant isoforms as cancer diagnostic markers. *Histopathology* 1998;32 ID -:1-6.
 92. Venables JP, Vernet C, Chew L, Elliott DJ, Cowmeadow RB, Wu J, Cooke HJ, Artzt K, Eperon IC. T-STAR/ETOILE: a novel relative of SAM68 that interacts with an RNA-binding protein implicated in spermatogenesis. *Human Molecular Genetics* 1999;8(6):959-969.
 93. Di Fruscio M, Chen T, Richard S. Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(6):2710-2715.
 94. Gibson TJ, Thompson JD, Heringa J. THE KH DOMAIN OCCURS IN A DIVERSE SET OF RNA-BINDING PROTEINS THAT INCLUDE THE ANTITERMINATOR NUSA AND IS PROBABLY INVOLVED IN BINDING TO NUCLEIC-ACID. *Febs Letters* 1993;324(3):361-366.
 95. Wang LL, Richard S, Shaw AS. P62 ASSOCIATION WITH RNA IS REGULATED BY TYROSINE PHOSPHORYLATION. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(5):2010-2013.
 96. Taylor S, Anafi M, Pawson T, Shalloway D. FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN C-SRC AND ITS MITOTIC TARGET, SAM-68. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(17):10120-10124.

97. Taylor S, Shalloway D. AN RNA-BINDING PROTEIN ASSOCIATED WITH SRC THROUGH ITS SH2 AND SH3 DOMAINS IN MITOSIS. *Nature* 1994;368(6474):867-871.
98. Barlat I, Maurier F, Duchesne M, Guitard E, Tocque B, Schweighoffer F. A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(6):3129-3132.
99. Resnick RJ, Taylor SJ, Lin Q, Shalloway D. Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene* 1997;15(11):1247-1253.
100. McBride AE, Taylor SJ, Shalloway D, Kirkegaard K. KH domain integrity is required for wild-type localization of Sam68. *Experimental Cell Research* 1998;241(1):84-95.
101. Vogel LB, Fujita DJ. P70 PHOSPHORYLATION AND BINDING TO P56(LCK) IS AN EARLY EVENT IN INTERLEUKIN-2-INDUCED ONSET OF CELL-CYCLE PROGRESSION IN T-LYMPHOCYTES. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(6):2506-2511.
102. Richard S, Yu DY, Blumer KJ, Hausladen D, Olszowy MW, Connelly PA, Shaw AS. ASSOCIATION OF P62, A MULTIFUNCTIONAL SH2-DOMAIN AND SH3-DOMAIN BINDING-PROTEIN, WITH SRC FAMILY TYROSINE KINASES, GRB2, AND PHOSPHOLIPASE-C-GAMMA-1. *Molecular and Cellular Biology* 1995;15(1):186-197.
103. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: Activation of the JAK-STAT pathway. *Cellular Immunology* 2001;211(1):30-36.
104. Harfmann AM, Nayler O, Schwaiger FW, Obermeier A, Stamm S. The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn). *Molecular Biology of the Cell* 1999;10(11):3909-3926.
105. Matter N, Herrlich P, Konig H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 2002;420(6916):691-695.
106. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *Journal of Cell Biology* 2007;176(7):929-939.
107. Najib S, Martin-Romero C, Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V. Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005;62(1):36-43.
108. Stoss O, Novoyatleva T, Gencheva M, Olbrich M, Benderska N, Stamm S. P59(fyn)-mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2004;27(1):8-21.
109. Zhang YY, Lu ZF, Ku L, Chen YT, Wang HP, Feng Y. Tyrosine phosphorylation of QKI mediates developmental signals to regulate mRNA metabolism. *Embo Journal* 2003;22(8):1801-1810.
110. Li ZZ, Zhang YY, Li DQ, Feng Y. Destabilization and mislocalization of myelin basic protein mRNAs in quaking dysmyelination lacking the QKI RNA-binding proteins. *Journal of Neuroscience* 2000;20(13):4944-4953.
111. Wu JI, Reed RB, Grabowski PJ, Artzt K. Function of quaking in myelination: Regulation of alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(7):4233-4238.
112. Saccomanno L, Loushin C, Jan E, Punkay E, Artzt K, Goodwin EB. The STAR protein QKI-6 is a translational repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(22):12605-12610.
113. Larocque D, Pilotte J, Chen T, Cloutier F, Massie B, Pedraza L, Couture R, Lasko P,

- Almazan G, Richard S. Nuclear retention of MBP mRNAs in the Quaking viable mice. *Neuron* 2002;36(5):815-829.
114. Mikula M, Dzwonek A, Karczmarski J, Rubel T, Dadlez M, Wyrwicz LS, Bomsztyk K, Ostrowski J. Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics* 2006;6(8):2395-2406.
115. Vanseuningen I, Ostrowski J, Bustelo XR, Sleath PR, Bomsztyk K. THE K-PROTEIN DOMAIN THAT RECRUITS THE INTERLEUKIN 1-RESPONSIVE K-PROTEIN-KINASE LIES ADJACENT TO A CLUSTER OF C-SRC AND VAV SH3-BINDING SITES - IMPLICATIONS THAT K-PROTEIN ACTS AS A DOCKING PLATFORM. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(45):26976-26985.
116. Ostrowski J, Schullery DS, Denisenko ON, Higaki Y, Watts J, Aebersold R, Stempka L, Gschwendt M, Bomsztyk K. Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(5):3619-3628.
117. Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck DH. The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of Molecular Biology* 2006;361(3):470-481.
118. Ostareck-Lederer A, Ostareck D, Cans C, NEubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze M. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 2002;22(13):4535-4543.
119. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Rucknagel KP, Schierhorn A, Moritz B, Huttelmaier S, Flach N, Handoko L, Wahle E. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(16):11115-11125.
120. Adolph D, Flach N, Mueller K, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A. Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. *Molecular and Cellular Biology* 2007;27(5):1758-1770.
121. Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kuhn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A. mRNA silencing in human erythroid cell maturation - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(26):18461-18472.
122. Craggs G, Finan PM, Lawson D, Wingfield J, Perera T, Gadher S, Totty NF, Kellie S. A nuclear SH3 domain-binding protein that colocalizes with mRNA splicing factors and intermediate filament-containing perinuclear networks. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(32):30552-30560.
123. Spector DL, Fu XD, Maniatis T. ASSOCIATIONS BETWEEN DISTINCT PRE-MESSENGER-RNA SPLICING COMPONENTS AND THE CELL-NUCLEUS. *Embo Journal* 1991;10(11):3467-3481.
124. Rafalska I, Zhang ZY, Wolff H, Hartmann AM, Brack-Werner R, Stamm S. The intranuclear localization and function of YT521-B is regulated by tyrosine phosphorylation. *Human Molecular Genetics* 2004;13(15):1535-1549.
125. Stoilov P, Rafalska I, Stamm S. YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 2002;27(10):495-497.
126. Nayler O, Hartmann AM, Stamm S. The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment. *Journal of Cell Biology* 2000;150(5):949-961.
127. Pan F, Huttelmaier S, Singer RH, Gu W. ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Molecular and Cellular Biology* 2007;27(23):8340-

- 8351.
128. Gu W, Pan F, Singer RH. Blocking beta-catenin binding to the ZBP1 promoter represses ZBP1 expression, leading to increased proliferation and migration of metastatic breast-cancer cells. *Journal of Cell Science* 2009;122(11):1895-1905.
 129. Stohr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Huttelmaier S. ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *Journal of Cell Biology* 2006;175(4):527-534.
 130. Mukhopadhyay D, Houchen CW, Kennedy S, Dieckgraefe BK, Anant S. Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Molecular Cell* 2003;11(1):113-126.
 131. Ladd AN, Stenberg MG, Swanson MS, Cooper TA. Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Developmental Dynamics* 2005;233(3):783-793.
 132. Anant S, Henderson JO, Mukhopadhyay D, Navaratnam N, Kennedy S, Min J, Davidson NO. Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing: CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(50):47338-47351.
 133. Amanchy R, Zhong J, Molina H, Chaerkady R, Iwahori A, Kalume DE, Gronborg M, Joore J, Cope L, Pandey A. Identification of c-Src tyrosine kinase substrates using mass spectrometry and peptide microarrays. *Journal of Proteome Research* 2008;7(9):3900-3910.
 134. Inoue A, Tsugawa K, Tokunaga K, Takahashi KP, Uni S, Kimura M, Nishio K, Yamamoto N, Honda KI, Watanabe T and others. S1-1 nuclear domains: Characterization and dynamics as a function of transcriptional activity. *Biology of the Cell* 2008;100(9):523-535.
 135. Yang F, Peng Y, Schoenberg DR. Endonuclease-mediated mRNA decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (PMR1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(47):48993-49002.
 136. Peng Y, Schoenberg DR. c-Src activates endonuclease-mediated mRNA decay. *Molecular Cell* 2007;25(5):779-787.