

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Šimon Borna

Transmembránové adaptorové proteiny a jejich role v signalizaci imunoreceptory

Transmembrane adaptor proteins and their roles in immunoreceptor signaling

Bakalářská práce

Vedoucí: prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

V Praze, 10. 05. 2014

Podpis

Abstract

Transmembrane adaptor proteins are group of proteins, which lack intrinsic enzymatic activity, but they share similar structure. They play essential role in signal transduction, because they are able to recruit cytoplasmic proteins to proximity of plasma membrane and thus trigger signal pathways. In this review I mainly focused on these, which were not reviewed for a long time, or were recently discovered and I am trying to summarise current knowledge about roles of these proteins in leukocyte signalling.

Key words: transmembrane adaptor proteins, receptor signaling, immunoreceptors

Abstrakt

Transmembránové adaptorové proteiny tvoří skupinu proteinů, které nemají vlastní enzymatickou aktivitu, ale mají velmi podobnou strukturu. Mají esenciální roli při signalizaci, neboť se na ně váží cytoplasmatické proteiny, které se tak dostávají do blízkosti membrány, stávají se aktivní a převádí signál dále do cytoplazmy. V této práci jsem se pokusil shrnout současné poznatky o roli těchto proteinů v signalizaci leukocytů. Zaměřil jsem se především na ty adaptory, které byly objeveny v nedávné době, a na ty, které se často nevyskytují v přehledných člancích.

Klíčová slova: transmembránové adaptorové proteiny, receptorová signalizace, imunoreceptory,

Obsah

Abstract	1
Abstrakt	1
Obsah.....	2
Úvod.....	1
Transmembránové adaptorové proteiny	2
LAT	3
SCIMP	5
GAPT.....	6
LST1/A.....	6
PRR7	8
PAG (Cbp).....	9
LIME	10
LAX.....	12
SIT	13
TRIM.....	14
LPAP (CD45-AP).....	15
NTAL (LAB).....	16
Kooperace mezi transmembránovými adaptory	17
Závěr.....	18
Seznam použité literatury	19

Úvod

Práce pojednává o skupině transmembránových proteinů, které nemají vlastní enzymatickou aktivitu, ale podílí se na signalizaci receptorů bílých krvinek. Cílem této práce je vytvořit přehledný text, který stručně sumarizuje základní poznatky o transmembránových adaptorových proteinech, přičemž větší důraz je kladen na ty transmembránové adaptory, které se neobjevují často v přehledných článcích odborných časopisů.

Každému proteinu je věnována samostatná kapitola, která je rozčleněna do dvou a více odstavců. V prvním odstavci jsou vždy popsány důležité vlastnosti proteinu, jako je struktura, interakce, zastoupení v membránových mikrodoménech, nebo buňky, ve kterých dochází k expresi daného proteinu. V dalších odstavcích jsou pak diskutovány funkce těchto proteinů. Na závěr je zařazena kapitola, která se věnuje kooperaci mezi transmembránovými adaptory a diskutuje možnou redundanci mezi těmito proteiny.

Transmembránové adaptorové proteiny

Transmembránové adaptorové proteiny (TRAP) jsou bílkoviny, které nemají vlastní enzymatickou aktivitu. Přesto hrají více či méně důležité role v buněčné signalizaci. Jedná se o velmi heterogenní skupinu proteinů. Liší se funkcí i zastoupením v různých buněčných typech.

Společným znakem těchto proteinů jsou specifické sekvence v intracelulárních doménách, na které se váží další proteiny. U transmembránových adaptorových proteinů rozeznáváme dva hlavní typy takových sekvencí. Za prvé jsou to sekvence obsahující tyrosiny, které jsou fosforylovány, například pokud dojde k navázání ligandu na určitý receptor. Na fosforylované tyrosiny se váží SH2 domény dalších proteinů. Tím dochází k vytvoření proteinových komplexů. Vzájemnými fosforylacemi a protein-proteinovými interakcemi se mění konformace proteinů, dostávají se blízko membrány a stávají se aktivní. Od membrány se signál šíří dál do cytoplazmy a následně do jádra. Výsledkem jsou změny v transkripci genů a přestavby cytoskeletu. Afinita SH2 domén k fosforylovaným tyrosinům je dána okolní sekvencí aminokyselin. Například na sekvenci aminokyselin YxN se váže adaptorový protein Grb2 (Gram et al., 1997), zatímco na sekvenci YDDV se váže adaptorový protein Slp76 (Geng et al., 1999). Na výše zmiňovanou sekvenci YxN se váže kromě proteinu Grb2 i další významný solubilní adaptorový protein Gads. Specifita je určena širším kontextem okolních aminokyselin (Zhu et al., 2003, Zhang et al., 2000). Druhým typem sekvencí, na které se váží další proteiny, jsou sekvence bohaté na prolin. Na ty se váží proteiny, které mají SH3 domény. Pro vazbu je třeba precizní konformace SH3 domény a dobrý přístup k oblasti bohaté na prolin (Williamson, 1994).

Transmembránové adaptorové proteiny se dají rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří proteiny asociované s receptory. Patří sem například TCR ζ , který spolu s dalšími proteiny tvoří receptorový komplex TCR. Druhou skupinou jsou proteiny, které s žádným receptorem přímo neasociují. Právě těmto proteinům se budu dále věnovat. Všechny proteiny této skupiny mají podobnou stavbu. Mají velmi krátkou extracelulární doménu, membránou procházejí pouze jedenkrát a největší část proteinu tvoří intracelulární doména. V místě, kde končí transmembránová doména a začíná intracelulární doména, mají některé proteiny sekvence CxC nebo CxxC (Stepanek et al., 2014, Draber et al., 2011). Cysteiny v těchto sekvencích bývají kovalentně modifikované kyselinou palmitovou. Alifatický řetězec kyseliny palmitové se noří do membrány a tím ovlivňuje lokalizaci proteinů. Palmitoylované

proteiny se obvykle nacházejí ve specifických typech membránových mikrodomén (Zhang et al., 1998).

Buněčná membrána je složena z různých typů membránových mikrodomén, které se vzájemně liší obsahem lipidů, glykolipidů, proteinů a cholesterolu. Mají vliv na signalizaci, buněčnou polaritu a tvorbu imunologické synapse. Mikrodomény s vysokým obsahem cholesterolu, sfingolipidů a proteinů, které mají kovalentně navázaný glykosyl-fosfatidylinositol (GPI), se nazývají lipidové (resp. membránové) rafty. Existence lipidových raftů je založena především na vzájemných interakcích lipidů a cholesterolu (Lingwood et al., 2009). Dalším typem membránových mikrodomén jsou oblasti obohacené o proteiny, jejichž polypeptidový řetězec čtyřikrát prochází membránou (TEM). Na rozdíl od lipidových raftů jsou mikrodomény TEM udržovány především pomocí protein-proteinových interakcí (Stepanek et al., 2014). Třetím typem mikrodomén, jsou takzvané “těžké“ rafty (HR). Pro existenci HR jsou potřeba interakce cholesterolu, lipidů a protein-proteinových interakcí (Otahal et al., 2010). Ke studiu mikrodomén se používají dva hlavní přístupy. Za prvé jsou to optické metody, jako je sledování fluorescenčně značených proteinů. Za druhé, metody založené na použití detergentů. Buněčná membrána se solubilizuje a následně se ultracentrifugací rozdělí v hustotním gradientu nebo gelovou filtrací na nosiči vhodné porozity. Tím se oddělí oblasti membrány, které jsou rezistentní k detergentu (DRM) od zbytku membrány, která je solubilní (non-DRM).

LAT

LAT je první objevený transmembránový adaptorový protein lymfocytů. Nachází se v T-lymfocytech, NK-buňkách, žírných buňkách, megakaryocytech (Facchetti et al., 1999) a pre-B-lymfocytech (Su and Jumaa, 2003). Má esenciální roli v signalizaci přes antigenně specifický receptor TCR, ale účastní se i signalizace přes Fc-receptory. Lidská forma proteinu LAT má v intracelulární oblasti deset tyrosinů, ale pouze pět jich je fosforylováno po stimulaci receptoru TCR (Zhu et al., 2003). Na fosforylované tyrosiny se přímo váží proteiny PLC- γ 1, Gads a Grb2 (Zhang et al., 2000, Fukazawa et al., 1995). Na ty se váží další proteiny, které tvoří komplexy a šíří signál dál do cytoplazmy. Mutantní T-buněčné linie Jurkat, které nemají adaptor LAT, téměř nereagují na stimulaci receptoru TCR (Finco et al., 1998, Roncagalli et al., 2014).

Protein LAT má na pomezí intracelulární a transmembránové domény motiv CxxC. Oba cysteiny jsou kovalentně modifikované kyselinou palmitovou (Zhang et al., 1998). Palmitoylace ovlivňuje transport do cytoplazmatické membrány a je zásadní pro lokalizaci proteinu LAT do lipidových raftů (Zhang et al., 1998, Hundt et al., 2009). Pokles palmitoylace vede ke snížení odpovědi na stimulaci receptoru TCR a je pravděpodobně jedním z mechanismů, které vedou k anergii T-lymfocytů (Hundt et al., 2006, Otahal et al., 2010).

U myši, které nemají adaptor LAT, dochází k zastavení vývoje T-lymfocytů, zatímco vývoj ostatních buněčných typů probíhá standardně. Vývoj T-buněk je zastaven v okamžiku, kdy jsou úspěšně přeskupené geny pro podjednotku β receptoru TCR. Ta spolu s podjednotkou pre-T α tvoří na membráně receptor pre-TCR. Signalizace přes pre-TCR je důležitým kontrolním bodem vývoje. T-lymfocyty, které nemají adaptor LAT, nejsou schopné signalizace přes pre-TCR a jejich vývoj je zastaven (Zhang et al., 1999).

Zásadní enzym, který převádí signál od membrány do cytoplazmy, je fosfolipáza C. Ta se váže na fosforylovaný tyrosin (v pozici 136) adaptoru LAT. Aktivovaná fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrisfosfát (IP3). Inositoltrisfosfát difunduje cytoplasmou a váže se na receptory na endoplasmatickém retikulu. To má za následek otevření kanálů pro vápník a prudké zvýšení koncentrace vápníku v cytoplazmě (Berridge and Irvine, 1984). Diacylglycerol zůstává v membráně a váže se na něj protein kináza C, která se tím aktivuje. Zároveň se na DAG váže i protein RasGRP, který usnadňuje výměnu GDP za GTP u malého G-proteinu Ras (Iwig et al., 2013). Na protein Ras, ve formě s navázaným GTP, se váže kináza Raf. Tím se aktivuje a fosforyluje další proteiny a ty následně další. Přenos signálu od G-proteinu Ras až k efektorové kináze (Erk, p38, JNK), která vstupuje do jádra, se označuje jako mitogenem aktivovaná proteinkinázová dráha (MAP-kinázová dráha) (Packard and Cambier, 2013).

Velmi zajímavý pohled na funkci proteinu LAT přinesly studie na myších, u kterých je metodami genového inženýrství nahrazen tyrosin 136 fenylalaninem. Tím je poškozeno vazebné místo pro fosfolipázu C. U takových myši se vyvíjí autoimunitní lymfoproliferativní onemocnění, pro které je charakteristické enormní množství T-lymfocytů, které mají fenotyp aktivovaných a paměťových buněk. Další projevy onemocnění jsou zvětšení sleziny a lymfatických uzlin, absence regulačních T-lymfocytů (T-reg) a zvýšené množství eozinofilů a makrofágů v tkáních. Většina těchto myši hyne do šesti měsíců od narození. Způsob, jakým se u T-lymfocytů, které mají poškozený adaptor LAT, převádí signál od receptoru pre-TCR do

cytoplazmy není zcela objasněn. Zdá se, že buňky využívají alternativní dráhu k aktivaci MAP-kinázových drah a překonávají kontrolní bod vývoje (Sommers et al., 2002, Aguado et al., 2002). Narušený je i proces negativní a pozitivní selekce, který je založen na signalizaci přes TCR a je důležitý pro eliminaci autoreaktivních T-buněk. Tyto výsledky ukazují, že adaptor LAT zřejmě reguluje signalizaci nejen pozitivně, ale i do jisté míry i negativně. Součástí proteinového komplexu, který se váže na protein LAT, jsou i fosfatázy Shp2, Shp1 a protein Dok-2 (Dong et al., 2006, Yamasaki et al., 2001). Je tedy možné, že na fenotypu těchto myši se podílí adaptor LAT i jako negativní regulátor.

SCIMP

Adaptor SCIMP se nachází v profesionálních buňkách prezentujících antigen (APC). Mezi ně patří B-buňky, makrofágy a dendritické buňky. Protein SCIMP je palmitoylován, ale není obsažen v lipidových raftech. Nachází se spolu s MHC glykoproteiny druhé třídy (MHC gp II) v mikrodoménách TEM. Při prezentaci antigenu je lokalizován v oblasti imunologické synapse. Stimulace buňky protilátkami proti MHC gp II vede k jeho fosforylaci. Na fosforylované tyrosiny se váží proteiny Grb2, Csk a Slp76 nebo Slp65. Intracelulární doména obsahuje mimo čtyř tyrosinů i oblast bohatou na prolin (PRR), se kterou je konstitutivně asociovaná kináza Lyn.

Jeden ze způsobů, jak zjistit, zda je daný adaptor schopný aktivně signalizovat do cytoplazmy, nebo zda signalizaci pouze moduluje, je agregace takového proteinu pomocí protilátek. Tím je simulována situace, při které dochází během signalizace přes (neidentifikovaný) receptor. U transmembránových adaptorových proteinů je problém s velmi krátkou extracelulární doménou, která je schovaná v glykokalixu. Je téměř nemožné vytvořit funkční protilátku proti tak malé extracelulární doméně, a proto se využívá fúzních proteinů, které mají extracelulární doménu prodlouženou o doménu jiného proteinu. V případě adaptoru SCIMP byla extracelulární doména prodloužena o extracelulární doménu proteinu CD25. Agregace fúzního proteinu CD25-SCIMP protilátkami vede k prudkému zvýšení koncentrace vápníku v cytoplazmě a k aktivaci MAP-kinázových drah. Pro signalizaci přes protein SCIMP je zásadní solubilní adaptor Slp65. K signalizaci nedojde, pokud je v sekvenci, na kterou se váže adaptor Slp65, nahrazen tyrosin za fenylalanin. Naopak signál je silnější, pokud je mutace v sekvenci, na kterou se váže kináza Csk. Kináza Csk fosforyluje inhibiční tyrosin

kináz z rodiny Src a vytváří tak negativní zpětnou vazbu (Bergman et al., 1992). Je velmi pravděpodobné, že se protein SCIMP účastní signalizace přes MHC gp II, a to tak, že převádí signál od receptoru (MHC gp II) do cytoplazmy, podobně jako protein LAT. U B-buněčné linie K47, u které byla pomocí shRNA snížena exprese adaptoru SCIMP, dochází po stimulaci protilátkami proti MHC gp II ke zkrácení doby, za kterou dojde k deaktivaci efektorových kináz MAP kinázových drah. V současné době probíhá výzkum fyziologické funkce tohoto adaptoru na myši, u které byl gen pro protein SCIMP vyřazen metodou homologní rekombinace (Draber et al., 2011).

GAPT

Adaptor GAPT se nachází převážně v B-buňkách, ale v menší míře také v NK-buňkách, monocytech a dendritických buňkách. Na pomezí transmembránové a intracelulární domény má dva cysteiny, u kterých nebylo experimentálně ověřeno, zda jsou palmitoylované. Protein GAPT nebyl nalezen v lipidových raftech, ale je možné, že se nalézá v jiném typu membránový mikrodomén. V intracelulární doméně má oblast bohatou na prolin a čtyři sekvence aminokyselin YxN, na které se obvykle váže protein Grb2. Po stimulaci B-buněk protilátkami proti BCR nedochází k fosforylaci těchto tyrosinů. Protein Grb2 se neváže na adaptor GAPT pomocí SH2 domén, ale pomocí SH3 domén na oblast PRR.

Myš, u které byl inaktivován gen pro adaptor GAPT, nemá výrazný fenotyp. B-buňky z této myši, které byly stimulované protilátkou proti BCR, rychleji proliferují. Další odlišnosti od divokého typu byly nalezeny až u starších jedinců a jsou důsledkem zrychlené proliferace. Osm měsíců staré myši mají zdvojnásobené množství B-buněk marginálních zón (MZ B-buňky). Dvojnásobné množství MZ B-buněk je pravděpodobně příčinou zvýšené hladiny protilátek izotypu IgM a IgG v krvi. Je možné, že adaptor GAPT hraje významnou roli v udržování homeostázy B-buněk u déle žijících živočichů (Liu and Zhang, 2008).

LST1/A

Lidský gen *LST1* se nachází v lokusu MHC III třídy (Spies et al., 1989). Z primárního transkriptu vzniká alternativním sestřihem řada různých mRNA, ze kterých mohou vznikat

transmembránové i solubilní proteiny (Rollinger-Holzinger et al., 2000). Ze kterých mRNA opravdu vznikají proteiny, je zatím nejasné. Mezi různými druhy savců je konzervovaná pouze izoforma LST1/A. Protein LST1/A je typický transmembránový adaptorový protein (Draber et al., 2012).

Adaptor LST1/A je palmitoylován a nachází se v mikrodoménách TEM. V buněčné membráně se vyskytuje ve formě kovalentního dimeru. V intracelulární doméně má sekvenci ITIM a sekvenci podobnou ITIM. Sekvence ITIM tvoří vazebná místa pro SH2 domény proteinů, které negativně regulují signalizaci. U adaptoru LST1/A se na tyto sekvence konstitutivně váží fosfatázy Shp1 a Shp2. Protein LST1/A funguje pravděpodobně jako negativní regulátor signalizace přes adhezivní molekuly a receptory, které se nachází v mikrodoménách TEM. Pro zjištění toho, jak adaptor LST1/A reguluje signalizaci, byl použit fúzní protein, který vznikl prodloužením extracelulární domény proteinu LST1/A o extracelulární doménu proteinu CD25. Agregace Fc-receptorů spolu s fúzním proteinem CD25-LST1/A vede ke zvýšené fosforylaci motivů ITIM a k inhibici signalizace přes Fc-receptor (Draber et al., 2012).

Dráber *et al.* vytvořili protilátku (klon LST1/02) proti sekvenci aminokyselin 66-80, která se nachází v intracelulární doméně. S použitím protilátky LST1/02 provedli analýzu exprese. Protein LST1 byl nalezen pouze u buněk, které pocházejí z myeloidní linie. Navíc se ve všech případech jedná velmi pravděpodobně pouze o izoformu LST1/A. Výsledky byly potvrzeny i metodou RT-qPCR (Draber et al., 2012). Schiller *et al.* vytvořili protilátku (klon 7E2) proti sekvenci aminokyselin 85-97, která se také nachází v intracelulární doméně proteinu LST1/A. Na rozdíl od předchozí studie byl adaptor LST1/A nalezen nejenom v krevních buňkách, ale i v buňkách z jiných tkání (Schiller et al., 2009).

Nejsnazším vysvětlením odlišných výsledků by bylo, že obě protilátky rozeznávají různé izoformy proteinu LST1/A. To ale není možné, protože epitop, který rozeznává protilátka LST1/02, i epitop, který rozeznává protilátka 7E2, jsou přítomné ve stejných izoformách proteinu LST1/A. Je možné, že se protilátka 7E2 váže i na jiný protein s podobným epitopem. Druhá možnost je, že protein LST1/A je v některých buněčných typech kovalentně modifikován a tím je zakryté vazebné místo pro protilátku LST1/02.

Protein LST1/A by mohl být zapojen i do tvorby filopodií (Ragunathan et al., 2001, Draber et al., 2012). Schiller *et al.* ve své další práci imunoprecipitovali protein LST1/A spolu s proteiny RalA a Sec5, podjednotkou komplexu Exocyst. Navíc pokud v buněčné linii HeLa pomocí shRNA snížili expresi proteinu LST1/A, pokleslo množství filopodií (Schiller et al.,

2013). Problém je, že i k těmto pokusům byla použita protilátka 7E2 a zůstává tak stále otázkou, zda se nejedná pouze o experimentální artefakt. V současné době je tato otázka dále studována.

PRR7

Adaptor PRR7 byl poprvé popsán jako protein, který se nachází v postsynaptické membráně neuronů předního mozku. Pravděpodobně zde reguluje neurální aktivitu interakcí s glutamátovým receptorem NMDA (Murata et al., 2005). Později byl protein PRR7 nalezen v malém množství i v ostatních tkáních včetně sleziny a lymfatických uzlin. Množství adaptoru PRR7 prudce stoupá po aktivaci T-buněk. V intracelulární doméně má čtyři typy sekvencí, na které se mohou vázat další protein. Za prvé jsou to vazebná místa pro SH2 domény. Za druhé jsou to sekvence PPxY, kterým předchází aminokyselina tryptofan. Na ty se váží proteiny pomocí WW domény. Za třetí to je C-terminální sekvence TTAV, na kterou se váží protein pomocí PDZ domény a za čtvrté jsou to oblasti bohaté na prolin, na které se pravděpodobně váže pomocí SH3 domény kináza Src. Protein PRR7 je palmitoylován, ale není obsažen v lipidových raftech.

T-buňky linie Jurkat, u kterých byla metodou transfekce zvýšena exprese proteinu PRR7, mají fenotyp podobný aktivovaným T-buňkám, slabou odpověď na stimulaci receptoru TCR a rychle umírají programovanou buněčnou smrtí. Zároveň adaptor PRR7 snižuje expresi kinázy Lck. To je pravděpodobně hlavní příčina slabé signalizace od receptoru TCR do cytoplazmy u těchto transfektantů. Autoři od C-konce postupně zkracovali polypeptidový řetězec adaptoru PRR7, aby zjistili, které z vazebných míst je zodpovědné za indukci apoptózy. Ukázalo se, že pouze ty formy proteinu, které neměly poškozené vazebné místo pro WW doménu, byly schopny účinně indukovat apoptózu.

Protein PRR7 se v buněčné membráně nachází velmi krátkou dobu a je rychle internalizován. Sekvence aminokyselin, která je nutná k internalizaci, se částečně překrývá s vazebnou sekvencí pro WW domény. Navíc zkrácený protein PRR7, u kterého byla odstraněna transmembránová doména, indukuje apoptózu účinněji než nezkrácená forma proteinu. Je tedy velmi pravděpodobné, že internalizace a indukce apoptózy jsou dva procesy, které vzájemně kooperují. Fyziologická role adaptoru PRR7 je pravděpodobně regulace apoptózy a signalizace přes receptor TCR u aktivovaných T-lymfocytů (Hrdinka et al., 2011).

PAG (Cbp)

Protein PAG, zvaný též Cbp (Csk-binding protein), se v menším množství nalézá téměř ve všech tkáních. Ve větším množství byl nalezen v orgánech imunitního systému, srdci, plicích, placentě a mozku. Protein PAG je palmitoylován a je obsažen v lipidových raftech. V intracelulární doméně má deset tyrosinů. Devět z těchto tyrosinů se nachází v sekvenci YxxV/L/I, která je přednostně fosforylována kinázami z rodiny Src. Kromě těchto tyrosinů jsou v intracelulární doméně dvě sekvence bohaté na prolin a C-terminální PDZ vazebná sekvence (Brdicka et al., 2000, Kawabuchi et al., 2000). Adaptor PAG je fosforylován po stimulaci různých receptorů, jako jsou imunoreceptory, integriny a receptory pro růstové faktory. Výjimkou je stimulace receptoru TCR, která vede naopak k defosforylaci proteinu PAG (Shima et al., 2003, Jiang et al., 2006, Awasthi-Kalia et al., 2001). Na fosforylované tyrosiny se v podmínkách *in vitro* váží rekombinantní SH2 domény proteinů Csk, Lyn, Fyn, Lck, Shc, Vav, PI3K, Gap, Syk, Zap-70 a s nízkou afinitou i SH2 domény proteinů Grb2, Slp76, Shp1, Shp2 a Ras-GAP (Brdicka et al., 2000, Durrheim et al., 2001).

Adaptor PAG je negativní regulátor signalizace přes specifické receptory. Po stimulaci těchto receptorů dochází k aktivaci kináz rodiny Src. Ty se kooperativně váží na protein PAG, pomocí SH2 a SH3 domén, a fosforylují tyrosiny v intracelulární doméně (Solheim et al., 2008a, Solheim et al., 2008b). Na jeden z fosforylovaných tyrosinů (lidský č. 317) se váže kináza Csk, tím se dostává k membráně a zpětně fosforyluje kinázy z rodiny Src na inhibičním tyrosinu. Mechanismus negativní zpětné vazby je pravděpodobně zesílen fosfatázami Pep nebo Pest, které se mohou vázat na kinázu Csk pomocí SH3 domén. Tyto fosfatázy defosforylují aktivační tyrosin kináz z rodiny Src a tím přispívají k jejich inhibici (Cloutier and Veillette, 1996, Davidson et al., 1997). Zda opravdu dochází k zesílení negativní zpětné vazby, je třeba experimentálně ověřit. Doposud neexistuje přímý důkaz o existenci komplexu PAG-Csk-Pep/Pest. Tento model je společný většině buněčných typů, které mají adaptor PAG. Odlišná situace je u T-buněk, u kterých je protein PAG konstitutivně fosforylován kinázou Fyn (Yasuda et al., 2002). Po stimulaci receptoru TCR primárních T-buněk je adaptor PAG defosforylován, kináza Csk disociuje a signalizace probíhá bez výše popsané negativní zpětné vazby. Protein PAG tedy konstitutivně snižuje aktivitu kináz z rodiny Src a tím i citlivost na stimulaci receptoru TCR (Brdicka et al., 2000).

Další mechanismus, kterým protein PAG reguluje signalizaci, je vazba na kortikální cytoskelet. Na adaptor PAG se váže pomocí PDZ domény protein EBP50. Ten interaguje

s proteiny ERM (ezrin, radixin, moesin), které přímo váží F-aktin. Tím adaptor PAG spojuje lipidové rafty s cytoskeletem a ovlivňuje tak tvorbu imunologické synapse (Itoh et al., 2002, Brdickova et al., 2001).

Fyziologická role proteinu PAG byla intenzivně studována na T-buněčných liniích, u kterých byla zvýšena jeho exprese. Tyto studie potvrzují roli adaptoru PAG jako negativního regulátoru signalizace přes TCR (Brdicka et al., 2000, Itoh et al., 2002). Překvapivé ovšem je, že myši, u kterých byl vyřazen gen pro protein PAG, se téměř neliší od myši divokého typu (Dobenecker et al., 2005, Xu et al., 2005). Je možné, že ztráta proteinu PAG je kompenzována jiným adaptorovým proteinem (viz závěrečný odstavec o kooperaci mezi adaptory).

Signalizace, které se účastní kinázy z rodiny Src, je důležitá pro některé typy nádorových buněk. Tyto buňky využívají dvě strategie k regulaci kináz Src pomocí adaptoru PAG. První strategií je potlačení exprese proteinu PAG. Onkogení signalizace, například přes receptory pro růstové faktory, aktivuje kinázu Akt a MAP-kinázové dráhy. To může vést k deacetylaci a trimethylaci histonů v promotoru pro gen *PAG1* a tím k potlačení transkripce (Suzuki et al., 2011). Ke snížení exprese adaptoru PAG dochází například v nádorových buňkách fibroblastů nebo v buňkách rakoviny jícnu (Zhou et al., 2011). Druhou strategií je naopak zvýšení exprese proteinu PAG. V takových buňkách se na adaptor PAG neváže kináza Csk, ale naopak na něm může vznikat onkogení signalizační komplex (Tauzin et al., 2008). Ten se u různých typů nádorů liší proteinovým složením (Tauzin et al., 2011). Exprese proteinu PAG je zvýšená v B-buňkách lymfomů, které pocházejí z germinálních center, a naopak velmi snížená v B-buňkách lymfomů, které pocházejí z plášťové zóny lymfatických uzlin (mantle zone) a v B-buňkách chronické lymfocytární leukémie. Adaptor PAG by mohl být v budoucnu využit jako diagnostický marker (Tedoldi et al., 2006).

LIME

Protein LIME se nachází především T- a B- buňkách. V intracelulární doméně má pět tyrosinů, které jsou fosforylované kinázami Lck a Fyn. Na fosforylované tyrosiny se váží proteiny Csk, Fyn, Lyn, Shp2, Grb2, PI3K, Vav, PLC- γ 2 a Gads. Adaptor LIME je silně fosforylován po stimulaci T-buněk protilátkami proti koreceptorům CD4 a CD8. Na pomezí transmembránové a intracelulární domény má sekvenční motiv CxxC. Protein LIME je

palmitoylován a je obsažen v lipidových raftech (Brdickova et al., 2003, Hur et al., 2003, Ahn et al., 2006).

Adaptor LIME zesiluje vápníkovou odpověď (prudké zvýšení koncentrace vápníku v cytoplazmě) po T-receptorové stimulaci, a to i přes to, že váže inhibiční kinázu Csk. U T-buněčné linie J77, do které byl metodou transfekce vnesen gen pro protein LIME, je téměř zdvojnásobená intenzita vápníkové odpovědi po stimulaci protilátkami proti proteinu CD3. V buněčných liniích je protein LIME konstitutivně fosforylován, a to pravděpodobně proto, že u buněk, které pocházejí z nádorových linií, může být signalizace částečně pozměněna (Brdickova et al., 2003). Ze stejných důvodů jako u proteinů SCIMP a LST1/A byl pro studium signalačního potenciálu proteinu LIME vytvořen fúzní protein, který byl složen z extracelulární a transmembránové domény proteinu CD8 a intracelulární domény adaptoru LIME. Agregace fúzního proteinu CD8-LIME protilátkami vede v T-buněčné linii Jurkat k aktivaci MAP-kinázové dráhy (Hur et al., 2003). Protein LIME tedy zřejmě pozitivně reguluje signalizaci v T-lymfocytech.

Molekulární mechanismus je velmi pravděpodobně založen na aktivaci kinázy Lck. Ta se váže na protein LIME pomocí SH2 domény a je fosforylována na inhibičním tyrosinu kinázou Csk. To za normálních okolností vede k její inhibici, která je způsobená intramolekulární interakcí SH2 domény s fosforylovaným inhibičním tyrosinem. V případě, že se kináza Lck váže pomocí SH2 domény na protein LIME, nemůže dojít k vazbě SH2 domény na inhibiční tyrosin a kináza tak zůstává aktivní. Navíc dochází na proteinu LIME k autofosforylaci kinázy Lck na aktivačním tyrosinu a tím vzrůstá její aktivita. Tento mechanismus částečně potvrzují následující data. V T-buněčné linii Jurkat, ve které byla zvýšena exprese proteinu LIME metodou transfekce, dochází ke zvýšené produkci interleukinu-2 (Brdickova et al., 2003). Pokud se v této buněčné linii exprimuje ve velkém množství kináza Lck, které chybí kinázová aktivita, dojde k opětovnému snížení produkce IL-2. Jedná se tedy o dominantně negativní efekt. Navíc frakce kinázy Lck, které je asociovaná s adaptorem LIME, má více fosforylovaný inhibiční tyrosin než zbylá kináza Lck a zároveň má vyšší kinázovou aktivitu (Hur et al., 2003). Adaptor LIME se podílí na tvorbě imunologické synapse. Pozitivně reguluje aktivitu integrinů a zároveň pomocí proteinu Vav stimuluje polymerizaci aktinu (Son et al., 2012)

Adaptor LIME pozitivně reguluje signalizaci i u B-buněk, ale na rozdíl od T-buněk se u B-buněk váže na protein LIME i fosfolipáza PLC- γ 2. V myší B-buněčné linii, ve které byla

snížena exprese proteinu LIME pomocí siRNA, dochází ke snížení vápníkové odpovědi a k téměř úplné inhibici MAP-kinázových drah (Ahn et al., 2006).

Myši, u kterých byl vyřazen gen pro protein LIME, mají téměř stejný fenotyp jako myši divokého typu. Jedinou odlišností je zvýšená pozitivní selekce T-lymfocytů. Biologická role adaptoru LIME je tedy stále nejasná (Gregoire et al., 2007).

LAX

Adaptor LAX se nachází v bílých krvinkách. Jeho množství v T- a B-buňkách prudce stoupá po aktivaci. V intracelulární doméně má deset tyrosinů, ale pouze čtyři jsou důležité pro interakci s dalšími proteiny. Adaptor LAX je fosforylován kinázami z rodin Src a Syk po stimulaci receptorů BCR, TCR a FcεRI. Na fosforylované tyrosiny se váží proteiny Grb2, Gads a PI3K. Adaptor LAX se nenachází v konvenčních lipidových raftech, ale v mikrodoménách HR (Zhu et al., 2002, Zhu et al., 2006b, Otahal et al., 2010, Hrdinka et al., 2012).

Fyziologická role proteinu LAX byla studována na myších, u kterých byl inaktivován gen pro protein LAX. U těchto myší je zmenšená populace B-buněk, která má povrchový receptor CD23 (jeden ze znaků folikulárních B-buněk) (Schwarzmeier et al., 2005). To může souviset se zvýšenou hladinou protilátek izotypu IgE v séru (Yu et al., 1994). Navíc u neimunizovaných myší spontánně vznikají germinální centra. B- a T-buňky, které byly izolované z těchto myší, mají po stimulaci antigeně specifických receptorů zvýšenou aktivaci MAP-kinázových drah, aktivitu kinázy Akt, silnější vápníkovou odpověď, zvýšenou produkci IL-2 a déle přežívají (Zhu et al., 2005). Podobná situace je i u žírných buněk. Ty mají zvýšenou odpověď na stimulaci receptoru FcεRI. Navíc mají sníženou expresi adaptoru LAB a dochází u nich snadněji k degranulaci (Zhu et al., 2006b). Protein LAX tedy zřejmě působí jako negativní regulátor signalizace přes výše zmíněné receptory.

Nezávisle na adaptoru LAX vytvořila skupina Claire *et al.* myš, u které byl vyřazen gen pro cytoplazmatický adaptor Alx (Greene et al., 2003, Perchonock et al., 2006). Fenotyp této myši velmi připomínal fenotyp myši, která má vyřazený gen pro protein LAX. Následně bylo ukázáno, že protein Alx se váže na adaptor LAX. Způsob vazby je nezávislý na fosforylaci proteinu LAX, ale přesný mechanismus je stále nejasný. Adaptor LAX tedy negativně reguluje signalizaci dvěma způsoby. První je závislý na fosforylaci tyrosinů, na

keré se váží proteiny s SH2 doménami, a druhý je na fosforylaci nezávislý (Perchonock et al., 2006, Shapiro et al., 2008).

SIT

Adaptor SIT se nachází v převážně v T-lymfocytech a v menší míře i v B-lymfocytech. Na rozdíl od většiny ostatních transmembránových proteinů má delší extracelulární doménu, která je glykosylovaná. V buněčné membráně se vyskytuje ve formě kovalentního dimeru. V intracelulární doméně má pět tyrosinů, které jsou fosforylované kinázami z rodin Src a Syk. Jeden z těchto tyrosinů je součástí sekvence ITIM, na kterou se váže fosfatáza Shp2. Na adaptor SIT váže také kináza Csk a adaptor Grb2. Glykoprotein SIT není palmitoylován a je obsažen v oblastech membrány non-DRM. (Marie-Cardine et al., 1999, Pfrepper et al., 2001, Otahal et al., 2010).

Podobně jako u proteinů SCIMP nebo LIME byl pro studium signalizačních vlastností tohoto adaptorového proteinu vytvořen fúzní protein složený z extracelulární a transmembránové domény proteinu CD8 a intracelulární domény adaptoru SIT. U T-buněčné Jurkat, do kterých byl metodou transfekce vnesen gen pro fúzní protein CD8-SIT, je částečně inhibována aktivace transkripčního faktoru NFAT. Autoři postupně mutovali vazebná místa pro jednotlivé proteiny a opakovali předchozí pokus. Pouze fúzní protein s mutovaným vazebným místem pro kinázu Csk nepůsobil inhibičně na aktivaci transkripčního faktoru NFAT (Pfrepper et al., 2001). Navíc u T-buněk linie Jurkat, ve kterých byla snížena exprese proteinu SIT metodou shRNA, dochází po stimulaci protilátkami proti proteinu CD3 ke zvýšené fosforylaci proteinů Zap-70, LAT, Slp76, PLC- γ 1 a Akt. Adaptor SIT pomocí kinázy Csk tedy pravděpodobně negativně reguluje signalizaci přes receptor TCR (Arndt et al., 2011).

U myši, u kterých byl inaktivován gen pro protein SIT, je zvětšená populace T-lymfocytů, které mají koreceptory CD4 i CD8. Zároveň dochází v těchto buňkách ke zvýšené expresi proteinů CD5 a CD69, které se obvykle nacházejí ve větším množství na aktivovaných T-buňkách. Adaptor SIT tedy pravděpodobně negativně reguluje pozitivní selekci tím, že snižuje citlivost na stimulaci receptoru TCR. Absence adaptoru SIT má vliv i na T-lymfocyty, které se nacházejí ve slezině a v lymfatických uzlinách. Množství naivních T-lymfocytů je snižené, zatímco množství T-lymfocytů, které mají fenotyp podobný

aktivovaným a paměťovým buňkám, je zvýšené, a to především u T-buněk, které mají koreceptor CD8. Jedním z možných vysvětlení je, že zvýšená fosforylace kinázy Akt (viz výše) vede k fosforylaci a inaktivaci transkripčního faktoru Foxo1, který negativně reguluje buněčný cyklus (Simeoni et al., 2005, Arndt et al., 2011, Posevitz et al., 2008).

TRIM

Protein TRIM se nachází především v T-buňkách a v menší míře i v NK buňkách. V cytoplazmatické membráně se vyskytuje ve formě kovalentního dimeru. Adaptor TRIM není palmitoylovaný a nachází se v mikrodoménách HR (Otahal et al., 2010). V intracelulární doméně má osm tyrosinů, které jsou fosforylované kinázami z rodiny Src. Na fosforylované tyrosiny se váže především kináza PI3K, ale i solubilní adaptor Grb2 (Bruyns et al., 1998).

Adaptor TRIM asociuje s proteinem CD3 ζ a tím nepřímo i s receptorem TCR. Způsob, jakým tyto dva adaptory spolu interagují, není zcela objasněn. Na interakci se podílí extracelulární, transmembránová i intracelulární doména a je tedy velmi pravděpodobné, že se jedná o více slabších interakcí, které spolu vzájemně kooperují. V T-buněčné linii Jurkat, ve které byla metodou transfekce zvýšena exprese proteinu TRIM, dochází ke zdánlivému zvýšení exprese receptoru TCR. Protein TRIM asociuje s receptorem TCR, brání jeho spontánní endocytóze, a tím zdánlivě zvyšuje jeho expresi. Zároveň v těchto buňkách dochází i k zesílení vápníkové odpovědi a to nezávisle na zvýšení exprese TCR. Protein TRIM tedy pravděpodobně pozitivně reguluje signalizaci dvěma mechanismy. Zprvu váže proteiny, které dál přenáší signál do cytoplasmy a zadruhé brání spontánní endocytóze receptoru TCR (Swamy et al., 2010, Kirchgessner et al., 2001).

Myši, u kterých byl inaktivován gen pro protein TRIM, nemají odlišný fenotyp od myši divokého typu. Výsledky studií na myších, u kterých byly společně inaktivovány geny pro protein SIT i TRIM naznačují, že protein TRIM negativně reguluje pozitivní selekci. Je možné, že podobně jako u proteinu PAG je ztráta proteinu TRIM kompenzována jiným adaptorem (Kolsch et al., 2006).

LPAP (CD45-AP)

Adaptor LPAP byl objeven jako protein asociovaný s fosfatázou CD45 (Altin et al., 1994, Takeda et al., 1994). Ta může defosforylovat inhibiční i aktivační tyrosin kináz z rodiny Src a tím pozitivně i negativně regulovat signalizaci, ale v podmínkách *in vivo* reguluje signalizaci především pozitivně (Tan et al., 2013). Fosfatáza CD45 se váže na protein LPAP prostřednictvím transmembránové domény (Cahir McFarland and Thomas, 1995, Kitamura et al., 1995). Protein LPAP se nachází především v B a T-buňkách (Schraven et al., 1994), avšak nikoli v myeloidních buňkách. V intracelulární doméně má sekvenci aminokyselin homologní s WW doménou (Cahir McFarland and Thomas, 1995) a oblast bohatou na kyselé aminokyseliny, se kterou pravděpodobně asociuje kináza Lck. Způsob interakce kinázy Lck s proteinem LPAP není zcela objasněn, ale pravděpodobně se jí účastní katalytická doména kinázy Lck (Veillette et al., 1999). Adaptor LPAP v přítomnosti fosfatázy CD45 asociuje s receptorovým komplexem TCR. Protein LPAP tedy pravděpodobně umožňuje kooperativní interakci fosfatázy CD45 s TCR a tím napomáhá kolokalizaci kináz z rodiny Src s fosfatázou CD45 (Veillette et al., 1999, Leitenberg et al., 2007).

Tři různé skupiny nezávisle vytvořily myš, u které byl vyřazen gen pro protein LPAP. Výsledky jednotlivých skupin se velmi liší. Skupina Matsuda *et al.* ukázala, že u těchto myší dochází ke snížení exprese fosfatázy CD45 ve slezině a brzlíku, snížené proliferaci B- a T-lymfocytů po stimulaci antigenně specifických receptorů a k potlačení interakce mezi fosfatázou CD45 a kinázou Lck (Matsuda et al., 1998). Další dvě skupiny nepozorovaly téměř žádný rozdíl ve fenotypu od myší divokého typu (Ding et al., 1999, Kung et al., 1999). Jedinou výjimkou je, že obě skupiny (Matsuda *et al.* a Ding *et al.*) pozorovaly zvýšenou expresi fosfatázy CD45 ve slezině. Fyziologická role proteinu LPAP i důvod, proč tyto skupiny došly k odlišným výsledkům, jsou stále nejasné. Později byly myši, které vytvořila skupina Matsuda *et al.*, použity k dalším experimentům. Jejich výsledky poskytují jedno z možných vysvětlení odlišných výsledků. Stimulace T-buněk antigenem s nízkou afinitou k receptoru TCR vede k nižší produkci IL-2 a ke slabší interakci mezi kinázou Lck a fosfatázou CD45 u T-buněk, které mají inaktivovaný gen pro protein LPAP. Pokud jsou ale tyto T-buňky stimulovány antigenem s vysokou afinitou k receptoru TCR, jsou tyto rozdíly nepatrné. Pokud je afinita antigenu opravdu rozhodující faktor, pak je možné, že i například kvalita aktivační protilátky, která byla k experimentům použita, může ovlivnit výsledek. Je tedy možné, že adaptor LPAP přispívá k interakci fosfatázy CD45 s receptorem TCR a tím i

k interakci s kinázami z rodiny Src po stimulaci T-buněk antigenem s nízkou afinitou (Veillette et al., 1999).

NTAL (LAB)

Adaptor NTAL, zvaný též LAB, má podobnou strukturu jako protein LAT. Nachází se v B-buňkách, NK-buňkách, monocytech, žírných buňkách a aktivovaných T-buňkách. Na pomezí transmembránové a intracelulární domény má sekvenci aminokyselin CxxC. Proteiny NTAL je palmitoylovaný a nachází se v lipidových raftech. V intracelulární doméně má deset tyrosinů. Adaptor NTAL je fosforylovaný po stimulaci receptorů TCR, BCR, FcεRI a FcγRI, a to převážně kinázami Syk a Zap 70 (Brdicka et al., 2002, Janssen et al., 2003, Zhu et al., 2006a). Na fosforylované tyrosiny se váží proteiny Grb2, Sos, Gap1 a Cbl. Důležité je, že na rozdíl od adaptoru LAT se na protein NTAL neváže fosfolipáza PLC-γ (chybí totiž odpovídající tyrosin).

Funkce proteinu NTAL byla studována na T-buněčné linii J.CaM2.5, která má nefunkční gen pro protein LAT, a je tedy neschopná signalizace. Do těchto buněk byl metodou transfekce vnesen gen pro protein NTAL. Po stimulaci protilátkami proti receptoru TCR dochází v těchto buňkách ke slabé vápníkové odpovědi a aktivaci MAP-kinázových drah. Následně byl protein NTAL vnesen i do myši, ve kterých byl inaktivován gen pro protein LAT. V těchto myších je částečně obnoven vývoj T-lymfocytů, ale zároveň dochází ke vzniku lymfoproliferativního onemocnění. Toto onemocnění velmi připomíná onemocnění myši, u kterých je poškozené vazebné místo pro fosfolipázu PLC-γ na proteinu LAT. Výsledky těchto experimentů naznačují, že adaptor NTAL má podobnou funkci jako protein LAT bez vazebného místa pro fosfolipázu PLC-γ (Koonpaew et al., 2004, Janssen et al., 2004). Poměrně překvapivý je tedy fenotyp myši, která má vyřazený gen pro protein NTAL. U těchto myši dochází k redukci B-buněk marginálních zón, zvýšení hladiny přirozených protilátek v séru a k zesílení vápníkové odpovědi po stimulaci B-buněk protilátkami proti receptoru BCR (Wang et al., 2005). Zároveň dochází u starších myši k expanzi aktivovaných T-lymfocytů a vzniku autoimunitního onemocnění (Zhu et al., 2006a). Podobná situace je i u žírných buněk, u kterých dochází ke snadnější degranulaci závislé na protilátkách a tedy i v těchto buňkách adaptor NTAL negativně reguluje signalizaci (Volna et al., 2004). Naopak v žírných buňkách izolovaných z myši, u kterých byl inaktivován gen pro protein LAT,

reguluje protein NTAL signalizaci pozitivně (Zhu et al., 2004). Zdá se tedy, že adaptor NTAL v přítomnosti proteinu LAT většinou negativně reguluje signalizaci, a naopak v nepřítomnosti adaptoru LAT reguluje signalizaci převážně pozitivně. Přesný mechanismus, jakým dochází k vzájemné regulaci adaptorů NTAL a LAT, je zatím nejasný.

Protein NTAL také patří mezi potenciální tumor supresorové geny. U dětských pacientů s T-buněčnou lymfoblastickou leukémií (T-ALL), kteří mají nízkou expresi proteinu NTAL, velmi špatně zabírá léčba prednisonem (Svojgr et al., 2009). Navíc v T-buněčné linii Jurkat, která pochází z nádoru T-ALL, dochází mnohem častěji k indukci buněčné smrti po podání methylprednisonu u buněk s vysokou expresí adaptoru NTAL (Svojgr et al., 2012).

Kooperace mezi transmembránovými adaptory

Výsledky studií v podmínkách *in vitro* dokazují, že transmembránové adaptorové proteiny se v různé míře podílejí na imunoreceptorové signalizaci leukocytů. Je tedy poměrně překvapivé, že vyřazení genu pro příslušný transmembránový adaptor (kromě LAT) většinou nezpůsobuje u myši výrazné změny ve fenotypu. Jedno z možných vysvětlení tohoto fenoménu je, že transmembránové adaptorové proteiny jsou částečně redundantní. To bylo studováno na myších, u kterých byly společně vyřazeny geny pro dva příbuzné transmembránové adaptorové proteiny.

U myši, u které byly současně inaktivovány geny pro adaptory SIT a TRIM, dochází ke zvýšení pozitivní selekce T-lymfocytů v porovnání s myši, která má inaktivován gen pouze pro protein SIT (u myši, u které je inaktivován pouze protein TRIM, probíhá pozitivní selekce standardně) (Koelsch et al., 2008). Výrazný fenotyp mají i myši, u kterých byly současně inaktivovány geny pro proteiny SIT a LAX. V těchto myších dochází akumulaci aktivovaných T-lymfocytů ve slezině, expanzi B1 buněk v oblasti peritoneální dutiny a zvýšení hladiny protilátek v séru, a to i v porovnání s myši, která má inaktivovaný gen pro protein LAX. Myš, u které byl vyřazen gen pro protein SIT, má standardní hladinu protilátek v séru. Zároveň vzniká u starších myši autoimunitní onemocnění, pro které je charakteristická produkce protilátek proti jaderným antigenům a ledvinové záněty (Arndt et al., 2013).

Závěr

Transmembránové adaptorové proteiny se podílejí na imunoreceptorové signalizaci leukocytů. Tu mohou ovlivňovat pozitivně (LAT, SCIMP, LIME, LPAP) i negativně (SCIMP, GAPT, LST1/A, PRR7, PAG, LIME, LAX, SIT, TRIM). Výjimkou je protein NTAL, který reguluje signalizaci pozitivně i negativně, a to v závislosti na proteinu LAT. Stále nezodpovězené otázky o fyziologické funkci některých adaptorů mohou být pravděpodobně vysvětleny redundancí mezi těmito proteiny (TRIM). Navíc o adaptorech SCIMP a LST1/A dosud nebyly publikovány studie na myších, u kterých byly tyto geny inaktivovány. Studium transmembránových adaptorových proteinů je tedy i po více než 20 letech (objevení adaptoru LAT) stále aktuální téma.

Seznam použité literatury

- AGUADO, E., RICHELME, S., NUNEZ-CRUZ, S., MIAZEK, A., MURA, A. M., RICHELME, M., GUO, X. J., SAINTY, D., HE, H. T., MALISSEN, B. & MALISSEN, M. 2002. Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. *Science*, 296, 2036-40.
- AHN, E., LEE, H. & YUN, Y. 2006. LIME acts as a transmembrane adapter mediating BCR-dependent B-cell activation. *Blood*, 107, 1521-7.
- ALTIN, J. G., PAGLER, E. B. & PARISH, C. R. 1994. Evidence for an association of CD45 with 32,000-33,000 MW phosphoproteins on murine T and B lymphocytes. *Immunology*, 83, 420-9.
- ARNDT, B., KALINSKI, T., REINHOLD, D., THIELITZ, A., ROESSNER, A., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2013. Cooperative immunoregulatory function of the transmembrane adaptor proteins SIT and LAX. *J Leukoc Biol*, 93, 353-62.
- ARNDT, B., KRIEGER, T., KALINSKI, T., THIELITZ, A., REINHOLD, D., ROESSNER, A., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2011. The transmembrane adaptor protein SIT inhibits TCR-mediated signaling. *PLoS One*, 6, e23761.
- AWASTHI-KALIA, M., SCHNETKAMP, P. P. & DEANS, J. P. 2001. Differential effects of filipin and methyl-beta-cyclodextrin on B cell receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 287, 77-82.
- BERGMAN, M., MUSTELIN, T., OETKEN, C., PARTANEN, J., FLINT, N. A., AMREIN, K. E., AUTERO, M., BURN, P. & ALITALO, K. 1992. The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *Embo j*, 11, 2919-24.
- BERRIDGE, M. J. & IRVINE, R. F. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-21.
- BRDICKA, T., IMRICH, M., ANGELISOVA, P., BRDICKOVA, N., HORVATH, O., SPICKA, J., HILGERT, I., LUSKOVA, P., DRABER, P., NOVAK, P., ENGELS, N., WIENANDS, J., SIMEONI, L., OSTERREICHER, J., AGUADO, E., MALISSEN, M., SCHRAVEN, B. & HOREJSI, V. 2002. Non-T Cell Activation Linker (NTAL): A Transmembrane Adaptor Protein Involved in Immunoreceptor Signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 1617-1626.
- BRDICKA, T., PAVLISTOVA, D., LEO, A., BRUYNS, E., KORINEK, V., ANGELISOVA, P., SCHERER, J., SHEVCHENKO, A., HILGERT, I., CERNY, J., DRBAL, K., KURAMITSU, Y., KORNACKER, B., HOREJSI, V. & SCHRAVEN, B. 2000. 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*, 191, 1591-604.

- BRDICKOVA, N., BRDICKA, T., ANDERA, L., SPICKA, J., ANGELISOVA, P., MILGRAM, S. L. & HOREJSI, V. 2001. Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 507, 133-6.
- BRDICKOVA, N., BRDICKA, T., ANGELISOVA, P., HORVATH, O., SPICKA, J., HILGERT, I., PACES, J., SIMEONI, L., KLICHE, S., MERTEN, C., SCHRAVEN, B. & HOREJSI, V. 2003. LIME: a new membrane Raft-associated adaptor protein involved in CD4 and CD8 coreceptor signaling. *J Exp Med*, 198, 1453-62.
- BRUYNS, E., MARIE-CARDINE, A., KIRCHGESSNER, H., SAGOLLA, K., SHEVCHENKO, A., MANN, M., AUTSCHBACH, F., BENSUSSAN, A., MEUER, S. & SCHRAVEN, B. 1998. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med*, 188, 561-75.
- CAHIR MCFARLAND, E. D. & THOMAS, M. L. 1995. CD45 protein-tyrosine phosphatase associates with the WW domain-containing protein, CD45AP, through the transmembrane region. *J Biol Chem*, 270, 28103-7.
- CLOUTIER, J. F. & VEILLETTE, A. 1996. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *Embo j*, 15, 4909-18.
- DAVIDSON, D., CLOUTIER, J. F., GREGORIEFF, A. & VEILLETTE, A. 1997. Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Biol Chem*, 272, 23455-62.
- DING, I., BRUYNS, E., LI, P., MAGADA, D., PASKIND, M., RODMAN, L., SESHADRI, T., ALEXANDER, D., GIESE, T. & SCHRAVEN, B. 1999. Biochemical and functional analysis of mice deficient in expression of the CD45-associated phosphoprotein LPAP. *Eur J Immunol*, 29, 3956-61.
- DOBENECKER, M. W., SCHMEDT, C., OKADA, M. & TARAKHOVSKY, A. 2005. The ubiquitously expressed Csk adaptor protein Cbp is dispensable for embryogenesis and T-cell development and function. *Mol Cell Biol*, 25, 10533-42.
- DONG, S., CORRE, B., FOULON, E., DUFOUR, E., VEILLETTE, A., ACUTO, O. & MICHEL, F. 2006. T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med*, 203, 2509-18.
- DRABER, P., STEPANEK, O., HRDINKA, M., DROBEK, A., CHMATAL, L., MALA, L., ORMSBY, T., ANGELISOVA, P., HOREJSI, V. & BRDICKA, T. 2012. LST1/A is a myeloid leukocyte-specific transmembrane adaptor protein recruiting protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 287, 22812-21.
- DRABER, P., VONKOVA, I., STEPANEK, O., HRDINKA, M., KUCOVA, M., SKOPCOVA, T., OTAHAL, P., ANGELISOVA, P., HOREJSI, V., YEUNG, M., WEISS, A. & BRDICKA, T. 2011. SCIMP, a transmembrane adaptor protein

- involved in major histocompatibility complex class II signaling. *Mol Cell Biol*, 31, 4550-62.
- DURRHEIM, G. A., GARNETT, D., DENNEHY, K. M. & BEYERS, A. D. 2001. Thy-1 associated pp85--90 is a potential docking site for SH2 domain-containing signal transduction molecules. *Cell Biol Int*, 25, 33-42.
- FACCHETTI, F., CHAN, J. K., ZHANG, W., TIRONI, A., CHILOSI, M., PAROLINI, S., NOTARANGELO, L. D. & SAMELSON, L. E. 1999. Linker for activation of T cells (LAT), a novel immunohistochemical marker for T cells, NK cells, mast cells, and megakaryocytes: evaluation in normal and pathological conditions. *Am J Pathol*, 154, 1037-46.
- FINCO, T. S., KADLECEK, T., ZHANG, W., SAMELSON, L. E. & WEISS, A. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity*, 9, 617-26.
- FUKAZAWA, T., REEDQUIST, K. A., PANCHAMOORTHY, G., SOLTOFF, S., TRUB, T., DRUKER, B., CANTLEY, L., SHOELSON, S. E. & BAND, H. 1995. T cell activation-dependent association between the p85 subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2/phospholipase C-gamma 1-binding phosphotyrosyl protein pp36/38. *J Biol Chem*, 270, 20177-82.
- GENG, L., RAAB, M. & RUDD, C. E. 1999. Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651. *J Immunol*, 163, 5753-7.
- GRAM, H., SCHMITZ, R., ZUBER, J. F. & BAUMANN, G. 1997. Identification of phosphopeptide ligands for the Src-homology 2 (SH2) domain of Grb2 by phage display. *Eur J Biochem*, 246, 633-7.
- GREENE, T. A., POWELL, P., NZEREM, C., SHAPIRO, M. J. & SHAPIRO, V. S. 2003. Cloning and characterization of ALX, an adaptor downstream of CD28. *J Biol Chem*, 278, 45128-34.
- GREGOIRE, C., SIMOVA, S., WANG, Y., SANSONI, A., RICHELME, S., SCHMIDT-GIESE, A., SIMEONI, L., ANGELISOVA, P., REINHOLD, D., SCHRAVEN, B., HOREJSI, V., MALISSEN, B. & MALISSEN, M. 2007. Deletion of the LIME adaptor protein minimally affects T and B cell development and function. *Eur J Immunol*, 37, 3259-69.
- HRDINKA, M., DRABER, P., STEPANEK, O., ORMSBY, T., OTAHAL, P., ANGELISOVA, P., BRDICKA, T., PACES, J., HOREJSI, V. & DRBAL, K. 2011. PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells involved in regulation of T cell receptor signaling and apoptosis. *J Biol Chem*, 286, 19617-29.
- HRDINKA, M., OTAHAL, P. & HOREJSI, V. 2012. The transmembrane region is responsible for targeting of adaptor protein LAX into "heavy rafts". *PLoS One*, 7, e36330.
- HUNDT, M., HARADA, Y., DE GIORGIO, L., TANIMURA, N., ZHANG, W. & ALTMAN, A. 2009. Palmitoylation-dependent plasma membrane transport but lipid

- raft-independent signaling by linker for activation of T cells. *J Immunol*, 183, 1685-94.
- HUNDT, M., TABATA, H., JEON, M. S., HAYASHI, K., TANAKA, Y., KRISHNA, R., DE GIORGIO, L., LIU, Y. C., FUKATA, M. & ALTMAN, A. 2006. Impaired activation and localization of LAT in anergic T cells as a consequence of a selective palmitoylation defect. *Immunity*, 24, 513-22.
- HUR, E. M., SON, M., LEE, O. H., CHOI, Y. B., PARK, C., LEE, H. & YUN, Y. 2003. LIME, a novel transmembrane adaptor protein, associates with p56lck and mediates T cell activation. *J Exp Med*, 198, 1463-73.
- ITOH, K., SAKAKIBARA, M., YAMASAKI, S., TAKEUCHI, A., ARASE, H., MIYAZAKI, M., NAKAJIMA, N., OKADA, M. & SAITO, T. 2002. Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol*, 168, 541-4.
- IWIG, J. S., VERCOULEN, Y., DAS, R., BARROS, T., LIMNANDER, A., CHE, Y., PELTON, J. G., WEMMER, D. E., ROOSE, J. P. & KURIYAN, J. 2013. Structural analysis of autoinhibition in the Ras-specific exchange factor RasGRP1. *Elife*, 2, e00813.
- JANSSEN, E., ZHU, M., CRAVEN, B. & ZHANG, W. 2004. Linker for activation of B cells: a functional equivalent of a mutant linker for activation of T cells deficient in phospholipase C-gamma1 binding. *J Immunol*, 172, 6810-9.
- JANSSEN, E., ZHU, M., ZHANG, W., KOONPAEW, S. & ZHANG, W. 2003. LAB: a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol*, 4, 117-23.
- JIANG, L. Q., FENG, X., ZHOU, W., KNYAZEVA, P. G., ULLRICH, A. & CHEN, Z. 2006. Csk-binding protein (Cbp) negatively regulates epidermal growth factor-induced cell transformation by controlling Src activation. *Oncogene*, 25, 5495-506.
- KAWABUCHI, M., SATOMI, Y., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y., NADA, S., NAGAI, K., TARAKHOVSKY, A. & OKADA, M. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature*, 404, 999-1003.
- KIRCHGESSNER, H., DIETRICH, J., SCHERER, J., ISOMAKI, P., KORINEK, V., HILGERT, I., BRUYNS, E., LEO, A., COPE, A. P. & SCHRAVEN, B. 2001. The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain. *J Exp Med*, 193, 1269-84.
- KITAMURA, K., MAITI, A., NG, D. H., JOHNSON, P., MAIZEL, A. L. & TAKEDA, A. 1995. Characterization of the interaction between CD45 and CD45-AP. *J Biol Chem*, 270, 21151-7.
- KOELSCH, U., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2008. SIT and TRIM Determine T Cell Fate in the Thymus. *The Journal of Immunology*, 181, 5930-5939.
- KOLSCH, U., ARNDT, B., REINHOLD, D., LINDQUIST, J. A., JULING, N., KLICHE, S., PFEFFER, K., BRUYNS, E., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2006. Normal T-cell

- development and immune functions in TRIM-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 26, 3639-48.
- KOONPAEW, S., JANSSEN, E., ZHU, M. & ZHANG, W. 2004. The importance of three membrane-distal tyrosines in the adaptor protein NTAL/LAB. *J Biol Chem*, 279, 11229-35.
- KUNG, C., OKUMURA, M., SEAVITT, J. R., NOLL, M. E., WHITE, L. S., PINGEL, J. T. & THOMAS, M. L. 1999. CD45-associated protein is not essential for the regulation of antigen receptor-mediated signal transduction. *Eur J Immunol*, 29, 3951-5.
- LEITENBERG, D., FALAHATI, R., LU, D. D. & TAKEDA, A. 2007. CD45-associated protein promotes the response of primary CD4 T cells to low-potency T-cell receptor (TCR) stimulation and facilitates CD45 association with CD3/TCR and Ick. *Immunology*, 121, 545-54.
- LINGWOOD, D., KAISER, H. J., LEVENTAL, I. & SIMONS, K. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*, 37, 955-60.
- LIU, Y. & ZHANG, W. 2008. Identification of a new transmembrane adaptor protein that constitutively binds Grb2 in B cells. *J Leukoc Biol*, 84, 842-51.
- MARIE-CARDINE, A., KIRCHGESSNER, H., BRUYNS, E., SHEVCHENKO, A., MANN, M., AUTSCHBACH, F., RATNOFSKY, S., MEUER, S. & SCHRAVEN, B. 1999. SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation. *J Exp Med*, 189, 1181-94.
- MATSUDA, A., MOTOYA, S., KIMURA, S., MCINNIS, R., MAIZEL, A. L. & TAKEDA, A. 1998. Disruption of lymphocyte function and signaling in CD45-associated protein-null mice. *J Exp Med*, 187, 1863-70.
- MURATA, Y., DOI, T., TANIGUCHI, H. & FUJIYOSHI, Y. 2005. Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 183-91.
- OTAHAL, P., ANGELISOVA, P., HRDINKA, M., BRDICKA, T., NOVAK, P., DRBAL, K. & HOREJSI, V. 2010. A new type of membrane raft-like microdomains and their possible involvement in TCR signaling. *J Immunol*, 184, 3689-96.
- PACKARD, T. A. & CAMBIER, J. C. 2013. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep*, 5, 40.
- PERCHONOCK, C. E., FERNANDO, M. C., QUINN, W. J., 3RD, NGUYEN, C. T., SUN, J., SHAPIRO, M. J. & SHAPIRO, V. S. 2006. Negative regulation of interleukin-2 and p38 mitogen-activated protein kinase during T-cell activation by the adaptor ALX. *Mol Cell Biol*, 26, 6005-15.
- PFREPPER, K. I., MARIE-CARDINE, A., SIMEONI, L., KURAMITSU, Y., LEO, A., SPICKA, J., HILGERT, I., SCHERER, J. & SCHRAVEN, B. 2001. Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein). *Eur J Immunol*, 31, 1825-36.

- POSEVITZ, V., ARNDT, B., KRIEGER, T., WARNECKE, N., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2008. Regulation of T cell homeostasis by the transmembrane adaptor protein SIT. *J Immunol*, 180, 1634-42.
- RAGHUNATHAN, A., SIVAKAMASUNDARI, R., WOLENSKI, J., PODDAR, R. & WEISSMAN, S. M. 2001. Functional analysis of B144/LST1: a gene in the tumor necrosis factor cluster that induces formation of long filopodia in eukaryotic cells. *Exp Cell Res*, 268, 230-44.
- ROLLINGER-HOLZINGER, I., EIBL, B., PAULY, M., GRIESSER, U., HENTGES, F., AUER, B., PALL, G., SCHRATZBERGER, P., NIEDERWIESER, D., WEISS, E. H. & ZWIERZINA, H. 2000. LST1: a gene with extensive alternative splicing and immunomodulatory function. *J Immunol*, 164, 3169-76.
- RONCAGALLI, R., HAURI, S., FIORE, F., LIANG, Y., CHEN, Z., SANSONI, A., KANDURI, K., JOLY, R., MALZAC, A., LAHDESMÄKI, H., LAHESMAA, R., YAMASAKI, S., SAITO, T., MALISSEN, M., AEBERSOLD, R., GSTAIGER, M. & MALISSEN, B. 2014. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat Immunol*, 15, 384-92.
- SHAPIRO, M. J., NGUYEN, C. T., AGHAJANIAN, H., ZHANG, W. & SHAPIRO, V. S. 2008. Negative regulation of TCR signaling by linker for activation of X cells via phosphotyrosine-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*, 181, 7055-61.
- SHIMA, T., NADA, S. & OKADA, M. 2003. Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14897-902.
- SCHILLER, C., DIAKOPOULOS, K. N., ROHWEDDER, I., KREMMER, E., VON TOERNE, C., UEFFING, M., WEIDLE, U. H., OHNO, H. & WEISS, E. H. 2013. LST1 promotes the assembly of a molecular machinery responsible for tunneling nanotube formation. *J Cell Sci*, 126, 767-77.
- SCHILLER, C., NITSCHKE, M. J., SEIDL, A., KREMMER, E. & WEISS, E. H. 2009. Rat monoclonal antibodies specific for LST1 proteins. *Hybridoma (Larchmt)*, 28, 281-6.
- SCHRAVEN, B., SCHOENHAUT, D., BRUYNS, E., KORETZKY, G., ECKERSKORN, C., WALLICH, R., KIRCHGESSNER, H., SAKORAFAS, P., LABKOVSKY, B., RATNOFSKY, S. & ET AL. 1994. LPAP, a novel 32-kDa phosphoprotein that interacts with CD45 in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 269, 29102-11.
- SCHWARZMEIER, J. D., HUBMANN, R., DUCHLER, M., JAGER, U. & SHEHATA, M. 2005. Regulation of CD23 expression by Notch2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 46, 157-65.
- SIMEONI, L., POSEVITZ, V., KOLSCH, U., MEINERT, I., BRUYNS, E., PFEFFER, K., REINHOLD, D. & SCHRAVEN, B. 2005. The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. *Mol Cell Biol*, 25, 7557-68.

- SOLHEIM, S. A., PETSALAKI, E., STOKKA, A. J., RUSSELL, R. B., TASKEN, K. & BERGE, T. 2008a. Interactions between the Fyn SH3-domain and adaptor protein Cbp/PAG derived ligands, effects on kinase activity and affinity. *FEBS J*, 275, 4863-74.
- SOLHEIM, S. A., TORGERSEN, K. M., TASKEN, K. & BERGE, T. 2008b. Regulation of FynT function by dual domain docking on PAG/Cbp. *J Biol Chem*, 283, 2773-83.
- SOMMERS, C. L., PARK, C. S., LEE, J., FENG, C., FULLER, C. L., GRINBERG, A., HILDEBRAND, J. A., LACANA, E., MENON, R. K., SHORES, E. W., SAMELSON, L. E. & LOVE, P. E. 2002. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science*, 296, 2040-3.
- SON, M., PARK, I., LEE, O. H., RHEE, I., PARK, C. & YUN, Y. 2012. LIME mediates immunological synapse formation through activation of VAV. *Mol Cells*, 33, 407-14.
- SPIES, T., BLANCK, G., BRESNAHAN, M., SANDS, J. & STROMINGER, J. L. 1989. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*, 243, 214-7.
- STEPANEK, O., DRABER, P. & HOREJSI, V. 2014. Palmitoylated transmembrane adaptor proteins in leukocyte signaling. *Cell Signal*, 26, 895-902.
- SU, Y.-W. & JUMAA, H. 2003. LAT Links the Pre-BCR to Calcium Signaling. *Immunity*, 19, 295-305.
- SUZUKI, K., ONEYAMA, C., KIMURA, H., TAJIMA, S. & OKADA, M. 2011. Down-regulation of the tumor suppressor C-terminal Src kinase (Csk)-binding protein (Cbp)/PAG1 is mediated by epigenetic histone modifications via the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *J Biol Chem*, 286, 15698-706.
- SVOJGR, K., BURJANIVOVA, T., VASKOVA, M., KALINA, T., STARY, J., TRKA, J. & ZUNA, J. 2009. Adaptor molecules expression in normal lymphopoiesis and in childhood leukemia. *Immunol Lett*, 122, 185-92.
- SVOJGR, K., KALINA, T., KANDEROVA, V., SKOPCOVA, T., BRDICKA, T. & ZUNA, J. 2012. The adaptor protein NTAL enhances proximal signaling and potentiates corticosteroid-induced apoptosis in T-ALL. *Exp Hematol*, 40, 379-85.
- SWAMY, M., SIEGERS, G. M., FIALA, G. J., MOLNAR, E., DOPFER, E. P., FISCH, P., SCHRAVEN, B. & SCHAMEL, W. W. 2010. Stoichiometry and intracellular fate of TRIM-containing TCR complexes. *Cell Commun Signal*, 8, 5.
- TAKEDA, A., MAIZEL, A. L., KITAMURA, K., OHTA, T. & KIMURA, S. 1994. Molecular cloning of the CD45-associated 30-kDa protein. *J Biol Chem*, 269, 2357-60.
- TAN, Y. X., ZIKHERMAN, J. & WEISS, A. 2013. Novel Tools to Dissect the Dynamic Regulation of TCR Signaling by the Kinase Csk and the Phosphatase CD45. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.

- TAUZIN, S., DING, H., BURDEVET, D., BORISCH, B. & HOESSLI, D. C. 2011. Membrane-associated signaling in human B-lymphoma lines. *Exp Cell Res*, 317, 151-62.
- TAUZIN, S., DING, H., KHATIB, K., AHMAD, I., BURDEVET, D., VAN ECHTEN-DECKERT, G., LINDQUIST, J. A., SCHRAVEN, B., DIN, N. U., BORISCH, B. & HOESSLI, D. C. 2008. Oncogenic association of the Cbp/PAG adaptor protein with the Lyn tyrosine kinase in human B-NHL rafts. *Blood*, 111, 2310-20.
- TEDOLDI, S., PATERSON, J. C., HANSMANN, M. L., NATKUNAM, Y., RUDIGER, T., ANGELISOVA, P., DU, M. Q., ROBERTON, H., RONCADOR, G., SANCHEZ, L., POZZOBON, M., MASIR, N., BARRY, R., PILERI, S., MASON, D. Y., MARAFIOTI, T. & HOREJSI, V. 2006. Transmembrane adaptor molecules: a new category of lymphoid-cell markers. *Blood*, 107, 213-21.
- VEILLETTE, A., SOUSSOU, D., LATOUR, S., DAVIDSON, D. & GERVAIS, F. G. 1999. Interactions of CD45-associated protein with the antigen receptor signaling machinery in T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 274, 14392-9.
- VOLNA, P., LEBDUSKA, P., DRABEROVA, L., SIMOVA, S., HENEBERG, P., BOUBELIK, M., BUGAJEV, V., MALISSEN, B., WILSON, B. S., HOREJSI, V., MALISSEN, M. & DRABER, P. 2004. Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *J Exp Med*, 200, 1001-13.
- WANG, Y., HORVATH, O., HAMM-BAARKE, A., RICHELME, M., GREGOIRE, C., GUINAMARD, R., HOREJSI, V., ANGELISOVA, P., SPICKA, J., SCHRAVEN, B., MALISSEN, B. & MALISSEN, M. 2005. Single and combined deletions of the NTAL/LAB and LAT adaptors minimally affect B-cell development and function. *Mol Cell Biol*, 25, 4455-65.
- WILLIAMSON, M. P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, 297 (Pt 2), 249-60.
- XU, S., HUO, J., TAN, J. E. & LAM, K. P. 2005. Cbp deficiency alters Csk localization in lipid rafts but does not affect T-cell development. *Mol Cell Biol*, 25, 8486-95.
- YAMASAKI, S., NISHIDA, K., HIBI, M., SAKUMA, M., SHIINA, R., TAKEUCHI, A., OHNISHI, H., HIRANO, T. & SAITO, T. 2001. Docking protein Gab2 is phosphorylated by ZAP-70 and negatively regulates T cell receptor signaling by recruitment of inhibitory molecules. *J Biol Chem*, 276, 45175-83.
- YASUDA, K., NAGAFUKU, M., SHIMA, T., OKADA, M., YAGI, T., YAMADA, T., MINAKI, Y., KATO, A., TANI-ICHI, S., HAMAOKA, T. & KOSUGI, A. 2002. 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*, 169, 2813-7.
- YU, P., KOSCO-VILBOIS, M., RICHARDS, M., KOHLER, G. & LAMERS, M. C. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature*, 369, 753-6.
- ZHANG, W., SOMMERS, C. L., BURSHTYN, D. N., STEBBINS, C. C., DEJARNETTE, J. B., TRIBLE, R. P., GRINBERG, A., TSAY, H. C., JACOBS, H. M., KESSLER, C.

- M., LONG, E. O., LOVE, P. E. & SAMELSON, L. E. 1999. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity*, 10, 323-32.
- ZHANG, W., TRIBLE, R. P. & SAMELSON, L. E. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*, 9, 239-46.
- ZHANG, W., TRIBLE, R. P., ZHU, M., LIU, S. K., MCGLADE, C. J. & SAMELSON, L. E. 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. *J Biol Chem*, 275, 23355-61.
- ZHOU, D., ZHANG, A. P., LIU, T., LI, Z. Y., YANG, Y. Z. & SONG, R. Z. 2011. [Expression of Csk-binding protein in esophageal carcinoma and its possible implications]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 31, 1781-3.
- ZHU, M., GRANILLO, O., WEN, R., YANG, K., DAI, X., WANG, D. & ZHANG, W. 2005. Negative regulation of lymphocyte activation by the adaptor protein LAX. *J Immunol*, 174, 5612-9.
- ZHU, M., JANSSEN, E., LEUNG, K. & ZHANG, W. 2002. Molecular cloning of a novel gene encoding a membrane-associated adaptor protein (LAX) in lymphocyte signaling. *J Biol Chem*, 277, 46151-8.
- ZHU, M., JANSSEN, E. & ZHANG, W. 2003. Minimal requirement of tyrosine residues of linker for activation of T cells in TCR signaling and thymocyte development. *J Immunol*, 170, 325-33.
- ZHU, M., KOONPAEW, S., LIU, Y., SHEN, S., DENNING, T., DZHAGALOV, I., RHEE, I. & ZHANG, W. 2006a. Negative regulation of T cell activation and autoimmunity by the transmembrane adaptor protein LAB. *Immunity*, 25, 757-68.
- ZHU, M., LIU, Y., KOONPAEW, S., GRANILLO, O. & ZHANG, W. 2004. Positive and negative regulation of FcepsilonRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. *J Exp Med*, 200, 991-1000.
- ZHU, M., RHEE, I., LIU, Y. & ZHANG, W. 2006b. Negative regulation of Fc epsilonRI-mediated signaling and mast cell function by the adaptor protein LAX. *J Biol Chem*, 281, 18408-13.