

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE**



**Funkce adaptorového proteinu SLP-65 v  
intracelulární signalizaci leukocytů nezávislé  
na PLC gama**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**IVANA VONKOVÁ**

**ŠKOLITEL: MGR. TOMÁŠ BRDIČKA, PHD.**

**PRAHA 2008**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Brdičkovi, PhD. za jeho cenné a podnětné rady a trpělivé vedení při psaní této práce. Rovněž bych chtěla vyjádřit poděkování i všem ostatním členům Laboratoře molekulární imunologie z Ústavu molekulární genetiky AV ČR za vytváření skvělého pracovního zázemí.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Signalizace přes BCR a další imunoreceptory</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Charakteristika adaptorových proteinů rodiny SLP</b> .....	<b>9</b>
3.1    Exprese genů kódujících adaptory rodiny SLP.....	9
3.2    Struktura a funkce .....	10
3.3    Membránová lokalizace .....	11
3.4    Následky deficience SLP-65.....	12
<b>4. Signalizační dráhy asociovaných proteinů</b> .....	<b>14</b>
4.1    Vav.....	14
4.1.1    Regulace Vav proteinů adaptorovým proteinem SLP-65 .....	15
4.1.2    Role SLP-65 v signálních drahách řízených proteiny Vav.....	17
4.1.3    Srovnání důsledků deficience Vav a SLP-65 .....	20
4.2    Nck.....	21
4.2.1    Vazební partneři a signální dráhy .....	22
4.2.2    Regulace aktinové dynamiky.....	24
4.2.3    Důsledky deficience Nck.....	26
4.3    HPK1 .....	27
4.3.1    Aktivace a signální dráhy .....	27
4.3.2    Vliv vazby na adaptorové proteiny.....	29
4.4    Další proteiny asociované se SLP-65 .....	30
<b>5. Závěr</b> .....	<b>30</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>32</b>

## Abstrakt

Adaptorový protein SLP-65 hraje důležitou roli v dějích iniciovaných antigenně specifickým receptorem B lymfocytů (BCR), které jsou nepostradatelné nejen pro správnou odpověď na antigen, ale i pro vývoj a diferenciaci B-buněk. SLP-65 nemá žádnou vlastní enzymatickou aktivitu a jeho funkce je spojena s proteiny, které na sebe váže a jejichž prostřednictvím ovlivňuje průběh řady signálních kaskád. Multimolekulární signalizační komplex, který SLP-65 organizuje, umožňuje asociaci efektorů signálních drah s plasmatickou membránou a se složkami signalizačního aparátu BCR, které jsou v ní přítomné, i jejich vzájemné interakce. Jedna z nejdůležitějších rolí adaptorového proteinu SLP-65 spočívá v organizaci komplexu nezbytného pro aktivaci fosfolipasy C $\gamma$ 2. Jejím prostřednictvím se SLP-65 podílí na regulaci vápníkové odpovědi a drah závislých na malém G-proteinu Ras. Vedle toho však má i řadu dalších mnohem méně prostudovaných funkcí a právě ty jsou těžištěm této práce. Mezi asociované proteiny spojující SLP-65 s těmito funkcemi patří zejména Vav, který je výměnným faktorem a aktivátorem malých G-proteinů rodiny Rho, adaptorový protein Nck a serin/threonin kinasa HPK1. Prostřednictvím těchto proteinů se SLP-65 podílí na regulaci dalších významných dějů, jako jsou reorganizace aktinového cytoskeletu, aktivace některých transkripčních faktorů a MAP-kinasových drah či regulace apoptózy.

klíčová slova: SLP-65/BLNK/BASH, Vav, Nck, HPK1, signalizace přes BCR, adaptorové proteiny

## **Abstract**

Adaptor protein SLP-65 plays a key role in B-cell antigen receptor (BCR)-initiated signaling pathways, indispensable for efficient response to antigen as well as for regulation of B-cell development and differentiation. SLP-65 lacks any intrinsic enzymatic activity and its functions are mediated mainly by proteins it interacts with. The supramolecular complex organized by SLP-65 recruits multiple signaling molecules to the proximity of the plasma membrane where they interact with each other and with the components of the activated BCR. One of the crucial roles of SLP-65 is in mediating interactions indispensable for activation of PLC $\gamma$ 2. SLP-65 thus exerts control over signaling pathways leading to calcium response and activation of small G-protein Ras. However, SLP-65 also has several other, less well studied functions and those form the basis of this work. Among binding partners connecting SLP-65 to these functions belong especially GEF for Rho family GTPases Vav, adaptor protein Nck and serine/threonine kinase HPK1. Through association with these proteins SLP-65 takes part in regulation of other important events, including reorganization of actin cytoskeleton, activation of transcription factors and MAPK pathways and regulation of apoptosis.

key words: SLP-65/BLNK/BASH, Vav, Nck, HPK1, BCR-signaling, adaptor proteins

## Seznam použitých zkratk

14-3-3	proteinová rodina molekul vázících se na fosfoferin; efektory signálů přežití
ADAP	„adhesion- and degranulation-promoting adapter protein“
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
AP-1	„activator protein-1“
APC	antigen prezentující buňka
Arp2/3	„actin related protein 2/3“
BCR (pre-BCR)	B-buněčný antigenní receptor (antigenní receptor prekurzorových B-buněk)
BLNK (BASH)	„B cell linker protein“ („B cell adaptor containing SH2 domain“)
Btk	„Bruton's tyrosine kinase“
CD	„cluster of differentiation“
Cdc42	„cell division cycle 42“
CH	„calponin-homology“
Clnk	„cytokine-dependent hematopoietic cell linker“
Crk	„CT10 regulator of kinase“
CrkL	„CT10 regulator of kinase like“
DH	„Dbl homology“
DN3	„double negative 3“, odpovídá CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> vývojovému stadiu thymocytů
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
FAK	„focal adhesion kinase“
FasL	Fas ligand
FcγR	receptor pro IgG typu
Fyn	„Fgr/Yes-related novel protein tyrosine kinase“
G-protein	GTP vazebný protein
Gads	„Grb2-related adaptor downstream of Shc“
GCK	„germinal center kinase“
GDP	guanosin-5'-difosfát
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
GIT1	„G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein“
Grb2	„growth factor receptor binding protein 2“
GTP	guanosin-5'-trifosfát
GTPasa	enzym schopný vázat GTP a hydrolyzovat jej na GDP
HPK1	hematopoietická progenitorová kinasa 1
Ig	immunoglobulin
IKK	„IκB kinase“
IL-2	interleukin 2
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
Itk	„inducible T cell kinase“
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
LAT	„linker for activation of T cells“
Lck	„leukocyte-specific protein tyrosine kinase“
Lyn	„Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase“

MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
LZ	„leucine-zipper“
Nck	rodina adaptorů obsahující SH2/SH3 domény
NFAT	„nuclear factor of activated T cells“
NFκB	„nuclear factor κB“
NK	„natural killer“
NTAL	„non-T cell activation linker“
N-WASP	„neural Wiskott-Aldrich syndrome protein“
p38 MAPK	člen rodiny MAP kinas
Pak1	„p21-actived kinase“
PDGFR	„platelet-derived growth factor receptor“
PH	„pleckstrin homology“
PI3-K	fosfatidylinositol 3-kinasa
PIP	fosfatidylinositol-4-fosfát
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP5-K	„phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase“
PIX	„Pak-interacting exchange factor“
PKC	protein kinasa C
PLCγ	fosfolipáza Cγ
PR	„proline-rich“
PTK	protein tyrosin kinasa
Rac	G-protein; člen GTPas rodiny Rho
Ras	G-protein; rodina malých GTPas
Rho	„Ras homology“; G-protein
SH2	„SRC homology 2“ doména
SH3	„SRC homology 3“ doména
SLP-65	Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa
SLP-76	Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
Src	rodina protoonkogenních tyrosinových kinas
Ste20	„sterile 20“; serin/threonin kinasa kvasinek
Syk	„spleen tyrosine kinase“
TCR (pre-TCR)	T-buněčný antigenní receptor (antigenní receptor prekurzorových T-buněk)
Tec	„tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma“
Vav	produkt onkogenu vav; GEF v hematopoietických buňkách
WASP	„Wiskott–Aldrich syndrome protein“
XID	„X-linked immunodeficiency“
XLA	„X-linked agamaglobulinemia“
ZF	„zinc-finger“
ZAP-70	„zeta-associated phosphoprotein of 70 kDa“

# 1. Úvod

Cytoplasma i buněčná membrána leukocytů obsahují celou řadu molekul nezbytných pro správnou funkci těchto buněk a tím i pro zajištění optimálního průběhu imunitní odpovědi. Významnou část tvoří proteiny plnicí širokou škálu funkcí. Jednou z nich je i funkce adaptorová. Dosud bylo popsáno velké množství adaptorových proteinů. Patří mezi ně i SLP-65 (Src homology 2-domain-containing leukocyte protein of 65 kDa, též známý jako BLNK nebo BASH), jeden ze členů adaptorové rodiny SLP. Stejně jako všechny ostatní adaptorové proteiny, členové rodiny SLP postrádají vlastní enzymatickou aktivitu, ale obsahují několik domén vázajících další proteiny a umožňují tak regulovat složení a lokalizaci multimolekulárních signalizačních komplexů. Jsou tak schopné dočasně prostorově regulovat dostupnost substrátu pro enzym nebo tvořit lešení k propojování signálních kaskád. Adaptorové proteiny SLP jsou klíčové pro signalizaci přes integriny a receptory obsahující tyrosinové aktivační motivy (ITAM) a představují hlavní spojení mezi aktivovanými protein tyrosin kinasami (PTK) a pozdějšími komponentami signálních drah (Wollscheid et al., 1999, Koretzky et al., 2006).

Jednou z nejdůležitějších rolí adaptorového proteinu SLP-65 je regulace vápníkové odpovědi iniciovaná stimulací imunoreceptorů. SLP-65 zprostředkovává interakce PLC $\gamma$ 2 s plasmatickou membránou a s protein tyrosin kinasou Btk (Fu et al., 1998). Vzniká tak komplex, který je zcela nepostradatelný pro aktivaci PLC $\gamma$ 2 a s tím související vápníkové odpovědi a dalších klíčových drah. Vedle toho má však SLP-65 i jiné, méně důkladně prostudované funkce. Cílem této práce je shrnout poznatky o signalizačních drahách, kterých se SLP-65 účastní prostřednictvím svých dalších vazebných partnerů a zejména pak drah, které nejsou závislé na jeho interakci s PLC $\gamma$ 2. Toto téma bylo zvoleno z toho důvodu, že se v rámci své diplomové práce zabývám studiem funkce nového transmembránového adaptorového proteinu, který je zřejmě dalším, dosud nepopsaným, vazebným partnerem SLP-65 a vytváří s ním komplex, jež zřejmě neobsahuje PLC $\gamma$ 2. Kromě toho jsou výše zmíněné aspekty funkce SLP-65 poněkud stranou hlavního zájmu vědecké komunity a nebyla jim dosud věnována dostatečně rozsáhlá analýza v podobě specializovaného přehledného článku.

Jedním z nejvýznamnějších členů rodiny SLP je kromě SLP-65 také blízce příbuzný adaptorový protein SLP-76. Dosavadní výsledky studií obou těchto proteinů ukazují na jejich velikou vzájemnou podobnost nejen z hlediska doménové struktury, ale rovněž i v případě jejich vazebných partnerů, kdy jde buď o totožné, nebo vzájemně blízce příbuzné proteiny. Lze tedy předpokládat určité podobné rysy i ve funkcích, které adaptorové proteiny SLP-76 a SLP-65 plní. Většina prací zaměřených na problematiku adaptorových proteinů rodiny SLP, se zabývá zejména funkcí adaptoru SLP-76. Výsledky těchto studií mohou, díky vzájemným podobnostem



mezi oběma adaptory, sloužit jako vodítko v odhalování dosud neznámých funkcí proteinu SLP-65. Zamyšlení nad těmito možnými, avšak dosud vůbec nebo jen nedostatečně studovanými aspekty jeho funkce by pak mělo být dalším přínosem předkládané práce.

## 2. Signalizace přes BCR a další imunoreceptory

Buňky imunitního systému rozpoznávají a odpovídají na antigen pomocí povrchových receptorů z rodiny imunoreceptorů. Velmi významnou součástí signálních kaskád spouštěných imunoreceptory je i adaptorový protein SLP-65 (Fu et al., 1998, Wienands et al., 1998), který je také hlavním předmětem této práce. Účastní se zejména signalizace přes B-buněčný antigenní receptor (BCR) a Fc receptory specifické pro imunoglobulin G (FcγRI/II/III), z nichž patrně největší význam má jeho účast v signalizaci přes BCR. Signály šířené přes BCR jsou nezbytné pro vývoj B lymfocytů a jejich odpověď na antigen, zároveň i pro jejich přežívání jak v kostní dřeni, tak v periférii. Tyto signály nevedou pouze k maturaci a aktivaci těchto buněk, ale hrají roli též v odstraňování potenciálně autoreaktivních B lymfocytů, které by mohly napadat i tělu vlastní buňky a tkáně (Hardy and Hayakawa, 2001).

BCR je multiproteinová struktura obsahující membránový imunoglobulin, který je komponentou vážící antigen, a s ním nekovalentně asociovaný heterodimer Ig  $\alpha$  (CD79a) a Ig $\beta$  (CD79b) předávající signál. Charakteristickým rysem signalizačních podjednotek jsou tzv. motivy ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activatin motif), které jsou společné všem imunoreceptorům. Skládají se ze dvou tyrosinových zbytků uvnitř konsensus sekvence aminokyselin (vyjádřené pomocí jednopísmenných zkratk) D/ExxYxxL/Ix<sub>6-8</sub>YxxL/I, kde x je libovolná aminokyselina (tento způsob zápisu je využíván v celé práci) (Monroe, 2006). Signalizace přes BCR je spuštěna vazbou antigenu na membránový imunoglobulin, která vede k agregaci receptorů a následné fosforylaci motivů ITAM na řetězcích Ig $\alpha$  a Ig $\beta$  membránovými kinasami z rodiny Src (zejména Lyn). Na fosforylované motivy ITAM se přes dvojici SH2 (Src homology 2) domén váže cytoplasmatická PTK Syk. To vede k její aktivaci a spuštění následných signálních kaskád (Monroe, 2006). Vazba ligandu na BCR také způsobuje prostorovou reorganizaci komplexů BCR do speciálních membránových mikrodomén bohatých na cholesterol a glykosfingolipidy, lipidových raftů. O lipidových raftech se předpokládá, že stabilizují signální komplex zejména vyloučením negativních regulátorů a utvářením prostředí vhodného pro udržení signalizace přes ITAM soustředěním pozitivních regulátorů (Dykstra et al., 2003). Aktivace Syk vede ke zformování řady signálních komplexů. Některé z nich jsou organizovány i jedním z nejdůležitějších substrátů Syk, B-buněčným adaptorovým proteinem SLP-65. Dráhy ovládané tímto adaptorem a dalšími molekulami pak ve výsledku vedou k reorganizaci buněčného

cytoskeletu a změnám v metabolismu a genové expresi určujícím další osud B buňky (Koretzky et al., 2006). Některé z těchto drah budou podrobně popsány v následujících kapitolách.

Velmi podobnou strukturu imunoreceptoru a mechanismus signalizace lze nalézt i na T-buňkách. Membránové receptory rozpoznávající antigen jsou asociovány s CD3 komplexem složeným z dimerů CD3 $\epsilon\delta$  a CD3 $\epsilon\gamma$  a dimerem obsahujícím  $\zeta$  řetězce. CD3 a  $\zeta$  podjednotky jsou všechny vybaveny ITAM motivy a slouží, podobně jako Ig $\alpha$  a Ig $\beta$  řetězce v případě BCR, k propojení s cytoplasmickým signalizačním aparátem. Podobně jako v B buňkách, fosforylaci ITAM motivů zprostředkovávají kinasy z rodiny Src (Lck, Fyn) a na vzniklé fosfotyrosiny se váže kinasa z rodiny Syk ZAP-70 účastníci se dalšího převodu signálů. Jedním z prvních substrátů pro fosforylaci je transmembránový adaptorový protein LAT konstitutivně asociovaný s lipidovými rafty, který posléze poskytuje vazebná místa pro mnoho cytoplasmických signalizačních či efektorových molekul. Vazba na LAT, ač nepřímá a zprostředkovaná proteinem Gads, je nezbytná pro funkci SLP-76, T-buněčného protějšku SLP-65 (Koretzky et al., 2006), který hraje neméně důležitou roli v signalizaci antigenně specifického receptoru T-buněk.

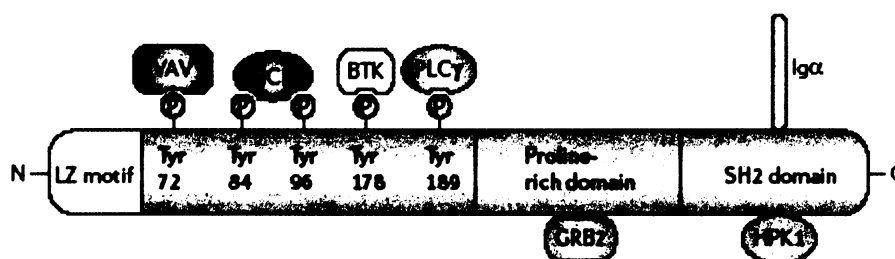
### **3. Charakteristika adaptorových proteinů rodiny SLP**

#### **3.1 Exprese genů kódujících adaptory rodiny SLP**

Rodina proteinů SLP má tři členy, SLP-76, SLP-65 a Clnk (cytokine-dependent hematopoietic cell linker), které se všechny nacházejí výlučně v hematopoietických buňkách, avšak liší se navzájem expresními profily svých genů, což se odráží v nápadně odlišných důsledcích jejich ztráty *in vivo* (Wu and Koretzky, 2004). Gen pro SLP-65 je exprimován zejména v B-buňkách a makrofázích (Bonilla et al., 2000). Nedávno byla zjištěna i jeho exprese v plazmacytoidních dendritických buňkách (Rock et al., 2007). SLP-76 je podstatně rozšířenější, neboť gen pro SLP-76 je exprimován v krevních destičkách, neutrofilech, žírných buňkách, makrofágách, T-buňkách, NK buňkách (Clements et al., 1998a) a některých vývojových stádiích B lymfocytů (Jumaa et al., 1999, Su and Jumaa, 2003). Clnk je exprimován v aktivovaných, avšak neklidových T-buňkách, IL-2 aktivovaných NK buňkách a žírných buňkách (Cao et al., 1999). Zdá se však, že adaptor Clnk je nejméně prozkoumaným a zároveň i nejméně důležitým členem adaptorové rodiny SLP-76 a myši postrádající Clnk nevykazují žádný abnormální fenotyp (Utting et al., 2004). Pro podrobnější popis funkcí adaptorů rodiny SLP se tedy omezím jen na srovnání adaptoru SLP-65 s pravděpodobně nejvíce prostudovaným členem této rodiny SLP-76.

### 3.2 Struktura a funkce

Ačkoliv adaptory rodiny SLP vykazují jen mírnou sekvenční homologii, sdílejí charakteristickou doménovou strukturu a rovněž mají mnoho společných vazebných partnerů. Obsahují tři modulační domény – N-terminální acidickou oblast s různým počtem motivů pro tyrosinovou fosforylaci, centrální prolinem bohatou oblast a C-terminální SH2 doménu (Fu et al., 1998, Wienands et al., 1998). N-konec SLP-65 obsahuje šest konsensus sekvencí pro tyrosinovou fosforylaci, z nichž pět je typu YxxP. Rovněž obsahuje několik prolinových motivů (konsensus PxxP), které jsou vazebnými místy pro SH3 domény dalších signálních proteinů. Na C-konci SLP-65 je přítomna SH2 doména s vazebnou specifitou pro fosforylované tyrosiny v konsensus motivu YxDV (Abudula et al., 2007), tato část vykazuje největší sekvenční podobnost s adaptorem SLP-76 (Wollscheid et al., 1999). Na N-konci má SLP-65 ještě motiv leucinového zipu, který se nenachází u ostatních adaptorů rodiny SLP a který patrně zprostředkovává asociaci SLP-65 s plasmatickou membránou (Kohler et al., 2005) (Obr. 1).



Obr. 1 Strukturální rysy SLP-65 (Koretzky et al. 2006)

Domény na SLP-76 i na SLP-65 tvoří jádra multimolekulárních signálních komplexů, které se podílejí na rozličných událostech v aktivovaných buňkách. N-terminální doména s fosfotyrosinovými motivy slouží u obou adaptorů k vazbě proteinů důležitých pro indukci přestavby aktinového cytoskeletu. Centrální oblast, obsahující též fosfotyrosinové motivy a oblast bohatou na prolin, umožňuje jak u SLP-76, tak i SLP-65 interakce nezbytné pro fosforylaci PLC $\gamma$ , následný vtok vápníku, aktivaci malého G-proteinu Ras, protein kinasy C (PKC) a dalších efektorů jako jsou ERK, NFAT, NF $\kappa$ B a AP-1. SH2 doména SLP-76 i SLP-65 se pak zdá být důležitá pro děje vedoucí k aktivaci integrinů indukované příslušným receptorem (TCR, BCR) a aktivaci MAP kinasy JNK (Wu and Koretzky, 2004).

### 3.3 Membránová lokalizace

Mnoho látek, které modulují chování a funkce buněk, pochází z mimobuněčného prostředí a váže se na receptory nacházející se v membráně. Pro nitrobuňčné proteiny převádějící dále signály spouštěné vazbou ligandu na příslušný receptor je tedy nezbytná lokalizace do blízkosti plasmatické membrány a to buď stálá, v případě transmembránových nebo s membránou asociovaných molekul, nebo, pokud jde o cytoplasmatické proteiny, indukovaná právě obsazením receptoru ligandem. SLP-76 je čistě cytoplasmatický protein, zatímco v případě SLP-65 je alespoň určitá frakce zřejmě konstitutivně asociovaná s membránou (Kohler et al., 2005). Oba proteiny jsou přiváděny po zahájení signalizace do speciálních membránových mikrodomén, ale poněkud se liší ve způsobu, jakým jsou během signalizace s plasmatickou membránou asociovány. SLP-76 se prostřednictvím dalšího adaptoru Gads (Grb2-related adaptor protein) váže na fosforylovaný transmembránový adaptorový protein LAT, konstitutivně asociovaný s lipidovými rafty (Wu and Koretzky, 2004). Maturované B-buňky však neexprimují LAT. Přesto SLP-65 po stimulaci BCR interaguje s lipidovými rafty v plasmatické membráně (Johmura et al., 2003). Otázka, jaký mechanismus přivádí SLP-65 po signalizaci přes BCR k plasmatické membráně, není doposud uspokojivě zodpovězena. Jednou z možností je, že B-buňky exprimují homolog transmembránového adaptoru LAT, který plní stejné funkce jako LAT. Asociace SLP-65 s NTAL, adaptorovým proteinem homologním k LAT, však nebyla prokázána (Brdicka et al., 2002). Ze studií prozatím vyplývají další dvě možná řešení. Prvním je přímá vazba proteinu SLP-65 přes SH2 doménu na fosforylovaný tyrosin Ig $\alpha$  v BCR komplexu, který není součástí motivů ITAM (Engels et al., 2001b). Tento tyrosin je mezidruhově konzervovaný a má důležitou signalizační funkci specifickou pro B-buňky (Patterson et al., 2006). Druhou možností je pak vazba přes motiv leucinového zipu a neznámého vazebného partnera přímo do membrány (Kohler et al., 2005). Dle Abudula et al. (2007) signální funkce SLP-65 závisí na dvojitém membránovém kotvení. Motiv leucinového zipu nejprve zajistí konstitutivní asociaci SLP-65 s membránou a SH2 doména pak nezbytná pro přesnou lokalizaci v rámci plasmatické membrány, která usnadňuje nebo amplifikuje fosforylaci SLP-65, a je nezbytná pro plnou aktivaci B-buněk. Zároveň se však zdá, že SH2 doména SLP-65 pro tuto funkci nevyžaduje nutně specifický B-buněčný ligand (Abudula et al., 2007).

Rozdílné proteinové interakce důležité pro asociaci SLP-76 či SLP-65 s plasmatickou membránou spolu s odlišnostmi ve způsobu vazby některých asociovaných proteinů naznačují, že mechanismy, jakými fungují SLP-65 a SLP-76 v podobných drahách nejsou zcela identické (Wu and Koretzky, 2004). Některé dosavadní výsledky dokonce nasvědčují tomu, že SLP-65 sám zároveň vykonává funkce SLP-76, Gads a LAT. Bylo totiž pozorováno, že pouze

kotransfekce SLP-76 a LAT (Wong et al., 2000), respektive Gads/Grb2 (Ishiai et al., 2000), do B-buněk deficientních na SLP-65 dovede kompenzovat absenci tohoto adaptoru a obnovit děje indukované obsazením BCR - vápníkovou signalizací, fosforylací PLC $\gamma$ 2 a aktivací MAP kinas. Přesto však je nutné zdůraznit, že funkce obou proteinů i mechanismy, jakými je vykonávají, jsou v řadě případů identické nebo alespoň velmi podobné a jejich srovnání může být důležitým vodítkem při poznávání funkce obou těchto proteinů.

### 3.4 Následky deficiencie SLP-65

Mutace v genech kódujících rodinu proteinových adaptorů rodiny SLP mají za následek závažné defekty ve vývoji a funkci leukocytů. Význam adaptorového proteinu SLP-65 je nejlépe patrný z faktu, že jeho deficiencie s sebou přináší významné poruchy zejména ve vývoji B lymfocytů.

Vývoj B-buněk u myši postrádajících SLP-65 je zablokován v pre-B stadiu, tedy v okamžiku, kdy je pro další vývoj vyžadována signalizace přes pre-BCR (Jumaa et al., 1999, Hayashi et al., 2000). Tento blok ve vývoji však není kompletní a je zřejmě způsoben částečným zachováním vápníkové signalizace a aktivace PLC $\gamma$ 2 (Jumaa et al., 1999). Je možné, že v pre-B stadiu jsou některé defekty částečně kompenzovány komplexem LAT/SLP-76, který je v tomto stadiu vývoje B-buněk rovněž exprimován, neboť kombinovaná deficiencie SLP-65 a LAT vede k mnohem silnějšímu bloku v B-buněčném vývoji s významnější ztrátou fosforylace PLC $\gamma$ 2 a vápníkové odpovědi než v případě ztráty pouze samotného SLP-65 (Su and Jumaa, 2003). SLP-65 je patrně nezbytný pro generování a udržování populací B1 buněk, zejména peritoneálních CD5<sup>+</sup> B-1a buněk, neboť jejich počet je u myši v nepřítomnosti SLP-65 významně snížen (Jumaa et al., 1999, Hayashi et al., 2000). B-1 buňky jsou zvláštní B-buněčná linie, u myši přítomná převážně v peritoneální dutině, která je zřejmě zodpovědná za specifické rozpoznávání bakteriálních nebo tělu vlastních antigenů a produkuje velké množství IgM (Hardy and Hayakawa, 2001). Myši postrádající SLP-65 navíc neprodukují protilátky v odpověď na antigeny nezávislé na T-buňkách (Jumaa et al., 1999). U lidí s vrozenou deficiencí SLP-65 jsou tyto defekty ještě závažnější. Byl pozorován kompletní blok ve vývoji B-buněk s absencí pre-B i periferních B-buněk (Minegishi et al., 1999).

Je zajímavé, že defekty způsobené deficiencí SLP-65 jsou velmi podobné následkům ztráty funkce kinasy rodiny Tec Btk (Khan et al., 1995), která u lidí vede k vážným poruchám vývoje B-buněk a způsobuje agamaglobulinemii vázanou na chromozom X (známá též jako Brutonova agamaglobulinemie, XLA), u myši pak méně závažnou imunodeficienci vázanou na chromozom X (XID) (Koretzky et al., 2006). SLP-65 a Btk spolu vzájemně interagují a je pravděpodobné,

že jsou oba potřebné ve stejném kroku podobných signálních drah, jejichž narušení se projeví právě zmíněnou imunodeficiencí.

SLP-65 funguje patrně také jako nádorový supresor, neboť u SLP-65 deficientních myši se objevují se zvýšenou frekvencí pre-B-buněčné lymfomy (Flemming et al., 2003). Navíc zhruba v 50 % případů lidských pre-B-buněčných lymfomů byly pozorovány mutace v SLP-65. U lidí může být chybějící SLP-65 tedy jednou z příčin dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL) (Jumaa et al., 2003). Jedním z možných vysvětlení je, že SLP-65 odděluje diferenciační signály od proliferačních signálů pre-BCR a jeho ztráta vede k selektivní inaktivaci prvního z nich (Flemming et al., 2003). K vývoji nádorů mohou vést i sekundární genetické aberace způsobené trvalou rekombinační aktivitou oblasti v lokusu pro imunoglobulinový těžký řetězec v B-buňkách (Khanna and Jackson, 2001), pro jejíž ukončení je vyžadován funkční SLP-65 (Hayashi et al., 2003). Určitý vliv může mít i fakt, že dráhy závislé na SLP-65 jsou nezbytné pro snižování exprese pre-BCR a tím pro supresi expanze pre-B-buněk. U SLP-65<sup>-/-</sup> myši je tato funkce zablokována, což vede k akumulaci pre-B-buněk nesoucích pre-BCR v kostní dřeni (Flemming et al., 2003).

Ztráta SLP-76 má rovněž významné dopady na vývoj mnoha buněčných linií, což je v souladu s jeho širokým expresním profilem. Klíčová role tohoto adaptoru je patrná i z faktu, že myši postrádající SLP-76 mají vysokou perinatální úmrtnost a vykazují vážné defekty ve vaskulárním systému, vývoji a funkci T lymfocytů a různých populací myeloidních buněk (Koretzky et al., 2006).

Kritický význam adaptorů SLP pro vývoj a udržení signalizačních drah buněk imunitního systému je však zřejmě specifický jen pro určité buněčné linie. Příkladem mohou být makrofágy, ve kterých je sice exprimován jak SLP-65, tak SLP-76, avšak jejich fenotyp není nijak pozměněn ani kombinovanou ztrátou obou adaptorů. V makrofázích jsou podobné dráhy jaké spouští obsazení BCR v B lymfocytech spouštěny signalizací přes Fc receptor pro imunoglobulin G (FcγR). Ačkoliv je SLP-65 po stimulaci FcγR rychle fosforylován a asocijuje s PLCγ2 (Bonilla et al., 2000), nezdá se, že je jeho funkce stejně kritická pro vývoj a Fc-receptorovou signalizaci makrofágů jako v případě BCR signalizace u B-buněk. Kompenzace funkce SLP-65 jeho příbuzným SLP-76 nebyla potvrzena, neboť dvojitá ztráta obou těchto adaptorů nijak neovlivňuje signalizaci přes FcγR ani jiné funkční děje v makrofázích spouštěné dalšími aktivačními receptory (Nichols et al., 2004).

Defekty pozorované při ztrátě adaptoru SLP-65 jsou patrně důsledek přerušení drah k efektorovým molekulám, se kterými je SLP-65 spojen prostřednictvím svých asociovaných molekul. Předpokládá se, že významnou roli hraje narušení signální dráhy vedoucí k vápníkové signalizaci řízené aktivovanou PLCγ2. Aktivace PLCγ2 je ale pouze jedním z aspektů funkce

SLP-65 a v současné době je zřejmé že tento adaptorový protein ovlivňuje i řadu dalších signálních drah.

## 4. Signalizační dráhy asociovaných proteinů

Již bylo naznačeno, že jednou z nejdůležitějších rolí adaptorových proteinů SLP je organizace komplexu, jehož prostřednictvím PLC $\gamma$  interaguje s plasmatickou membránou, kde se nachází její substrát. Tento komplex zároveň zprostředkovává její aktivaci zejména pomocí protein tyrosin kinas rodiny Tec (Fu et al., 1998). Proteiny rodiny PLC $\gamma$  hrají významné role ve vápníkové signalizaci spouštěné obsazením antigenních receptorů a aktivaci Ras-MAPK dráhy. Adaptory rodiny SLP však mají i jiné důležité a zároveň dosud ne tak důkladně prostudované funkce spojené s dalšími asociovanými proteiny, a právě těm budou věnovány následující odstavce.

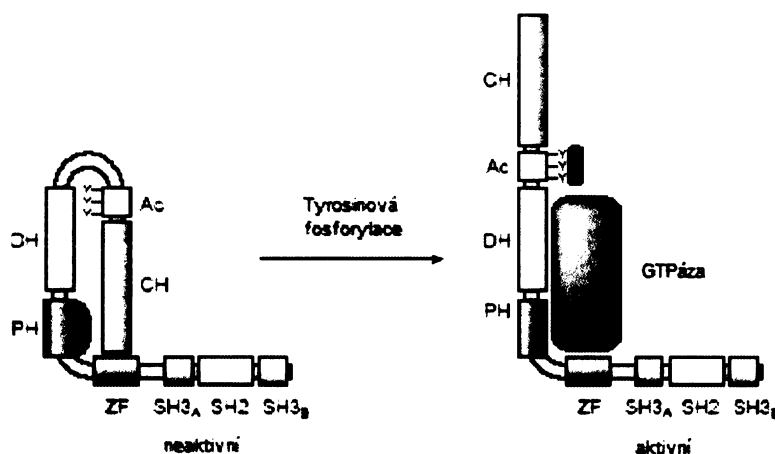
Po obsazení BCR se na fosforylovaný adaptorový protein SLP-65 váží pomocí svých SH2 domén proteiny Vav a Nck. Jejich společnou dosud nejlépe známou funkcí je regulace reorganizace aktinového cytoskeletu. Navíc tyto dva proteiny zřejmě spolupracují i na regulaci vápníkové signalizace a odpovědi transkripčního faktoru NFAT. Regulace drah vedoucích ke změnám aktivity transkripčních faktorů je rovněž hlavní funkcí dalšího významného asociovaného proteinu SLP-65, kinasy HPK1, která se váže na SH2 doménu SLP-65.

### 4.1 Vav

Proteiny rodiny Vav jsou skupinou adaptorových molekul, které hrají důležitou roli ve vývoji buněk a v buněčné signalizaci. Mají patrně více funkcí, z nichž nejznámější je jejich role GDP/GTP výměnných faktorů (GEF) pro malé GTPasy rodiny Rho/Rac. Jde o enzymovou aktivitu katalyzující uvolnění GDP z neaktivní GTPasy. Následuje inkorporace GTP, která způsobí změnu konformace GTPasy do aktivního stavu, kdy je schopná interagovat s efektorovými molekulami. Tato funkce proteinů Vav je přísně kontrolována přímou tyrosinovou fosforylací (Crespo et al., 1997, Schuebel et al., 1998, Movilla and Bustelo, 1999) a patrně závisí i na interakci s dalšími adaptorovými proteiny, včetně adaptorů SLP, které přispívají ke správné fosforylaci Vav proteinů a jejich interakci s dalšími signálními molekulami (Bustelo, 2001). Proteiny rodiny Vav jsou důležité pro přímé propojení mezi receptory s vlastní nebo asociovanou tyrosin kinasovou aktivitou a mitogenními a cytoskeletárními dráhami regulovanými G-proteiny Rho/Rac. Exprese Vav proteinů je klíčová pro dráhy vedoucí k reorganizaci cytoskeletu, buněčné proliferaci, které dále určují vývoj lymfoidních buněk a jejich odpovědi na stimulaci imunoreceptorů (Bustelo, 2000).

V savčích buňkách jsou exprimovány geny tří proteinů této rodiny – Vav1, Vav2 a Vav3, které sdílejí podobnou strukturu (Bustelo, 2001). Exprese genu pro protein Vav1 protein je omezena zejména na hematopoietické buňky, zatímco geny pro Vav2 a Vav3 vykazují daleko širší expresní profil (Hornstein et al., 2004).

Jde o modální proteiny složené z několika strukturně dobře definovaných domén důležitých pro jejich aktivitu a regulaci a interakci s dalšími proteiny. Na N- konci obsahují Vav proteiny CH (calponin-homology) doménu, acidickou oblast (Ac), dále DH (Dbl-homology) doménu mající GEF aktivitu a PH (plekstrin-homology) doménu řídící regulační interakce s polyfosfoinositidy, doménu zinkových prstů (ZF), krátkou prolinem bohatou oblast (PR) a na C-konci dvě SH3 domény obklopující jednu SH2 doménu, která je zodpovědná za interakci se SLP-65 i SLP-76 (Bustelo, 2001). V nepřítomnosti antigenu nebo jiného signálu zůstávají Vav proteiny neaktivní díky intramolekulární autoinhibiční interakci zprostředkované DH doménou a regulačními tyrosiny v acidické oblasti a rovněž interakcí CH domény se ZF doménou (Tybulewicz, 2005). Po obsazení B-buněčného receptoru a dalších imunoreceptorů jsou proteiny rodiny Vav rychle aktivovány fosforylací zejména kinasami rodiny Syk a Src (Bustelo, 2000), která vede k jejich uvolnění z uzavřené inaktivní konformace zejména narušením interakce mezi tyrosiny acidické oblasti a DH doménou. Je možné, že fosforylaci regulačních tyrosinů v acidické oblasti musí přecházet neznámý ligand vázající se na CH doménu, čímž uvolní přístup kinasy k tyrosinům (Tybulewicz, 2005) (Obr. 2).



**Obr. 2** Hypotetický mechanismus aktivace proteinů Vav (upraveno dle Tybulewicz, 2005)

#### 4.1.1 Regulace Vav proteinů adaptorovým proteinem SLP-65

Předpokládá se, že klíčovou roli v aktivaci a modulaci fosforylačních stavů proteinů Vav hrají adaptorové molekuly, které umožňují translokaci Vav do blízkosti příslušných kinas a fosfatas. Jejich role se však neomezuje na pouhou aktivaci proteinů Vav. Pomáhají také koordinovat



převod signálů přes Vav proteiny a poskytují paralelní dráhy spolupracující s drahami aktivovanými Vav (Bustelo, 2001). V B a T-buňkách plní tuto funkci i adaptory rodiny SLP. Vav proteiny se váží na fosforylované adaptory SLP-65/76 pomocí své SH2 domény (Fu et al., 1998, Raab et al., 1997). Zdá se však, že tato vazba není vždy nezbytně nutná pro fosforylaci a aktivaci Vav, neboť po stimulaci TCR v T-buňkách jsou některé dráhy závislé na Vav funkční i v případě, že je znemožněna jeho interakce se SLP-76. Za aktivaci Vav je v tomto případě patrně zodpovědná vazba na jinou molekulu (Fang and Koretzky, 1999). Také v B-buňkách mohou být některé funkce Vav proteinů řízeny drahami nezávislými na SLP-65. Svědčí pro to například rozdíl ve schopnosti SLP-65 a Vav deficientních myších B-buněk odpovídat na T-závislé a T-nezávislé antigeny. Zatímco ztráta SLP-65 způsobí poruchu B-buněčné odpovědi na T-nezávislé antigeny (Jumaa et al., 1999), ztráta všech proteinů Vav vede k neschopnosti odpovídat na oba typy antigenů (Fujikawa et al., 2003). Pro lepší představu, jaký je poměr drah řízených Vav proteiny závislých na jeho asociaci s proteiny SLP a nezávislých na této vazbě, by bylo potřeba zjistit míru fosforylace Vav v nepřítomnosti SLP. Tento aspekt byl doposud studován pouze na fosforylaci Vav3 po stimulaci v kuřecích B-buňkách postrádajících SLP-65. Zatímco míra tyrosinové fosforylace Vav3 v tomto systému nebyla výrazně ovlivněna, byl pozorován významný pokles v přítomnosti Vav3 v lipidových raftech s rostoucím časem po aktivaci (Johmura et al., 2003). Zdá se tedy, že SLP-65 se účastní spíše udržování lokalizace Vav v lipidových raftech při obsazení BCR. Dle Johmura et al. (2003) existují dva alternativní mechanismy, jak toho dosahuje, které se však vzájemně nemusí nutně vylučovat. Prvním z nich je možnost, že přímá vazba SLP-65 na Vav může odebírat Vav z internalizačního aparátu. Druhou alternativou je nepřímé přispění SLP-65 k prodloužení přítomnosti Vav v lipidových raftech pomocí regulace PLC $\gamma$ 2/PKC $\beta$  dráhy (Kurosaki, 2002), neboť je možné, že PKC $\beta$  aktivovaná produkty PLC $\gamma$ 2 se účastní udržování Vav v lipidových raftech, podobně jako to dělá v případě lokalizace kinas nezbytných pro aktivaci transkripčního faktoru NF $\kappa$ B IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  do membránových raftů (Su et al., 2002). PKC $\beta$  je totiž vyžadována pro správné formování signalosomu BCR asociovaného s lipidovými rafty a pro připojení IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  k tomuto komplexu (Su et al., 2002). Tato funkce SLP-65 může hrát roli v propojení proteinů Vav s pozdějšími efekty v signalizačních drahách díky udržení proteinů Vav v lipidových raftech po dobu dostatečně dlouhou k uskutečnění vazby Vav na různé efekty (Johmura et al., 2003). Stejný mechanismus se zřejmě uplatňuje i v případě SLP-76, u kterého se předpokládá, že by mohl fungovat jako můstek propojující Vav a Pak1 asociovanou s Nck, který je rovněž vázán na SLP-76 (Bubeck Wardenburg et al., 1998).

K regulaci aktivace proteinů Vav v B-buňkách může vedle SLP-65 přispívat i B-buněčný koreceptor CD19. Ten patrně umožňuje optimální fosforylaci Vav interakcí s PTK Syk nebo Lyn,

kteřé se váží na cytoplasmatickou část CD19 (O'Rourke et al., 1998, Fujimoto et al., 1999). U T lymfocytů je tato situace rovněž velmi komplexní a optimální fosforylace Vav závisí na simultánním využití různých adaptorových molekul jako LAT, Grb2, CD28 a SLP-76 (Bustelo, 2001).

#### **4.1.2 Role SLP-65 v signálních drahách řízených proteiny Vav**

Role proteinů Vav jsou vysoce specifické, neboť důsledky jejich deficiencie se projevují jen v některých signalizačních drahách u určitých hematopoiетických buněk (Fischer et al., 1998, Turner et al., 1997). Biologické odpovědi vyvolané proteiny Vav lze rozdělit do dvou odlišných, avšak vzájemně souvisejících skupin. Jde o stimulaci signálních drah vedoucích k aktivaci MAP kinas (JNK) a transkripčních faktorů (NF-AT, NFκB, AP-1) a indukci odpovědi spojených s reorganizací cytoskeletu (Bustelo, 2000). Zejména v případě MAP kinas a transkripčních faktorů je dosti obtížné od sebe oddělit příspěvek Vav k aktivaci PLCγ od drah na PLCγ nezávislých. Proto budou v této kapitole v omezené míře diskutovány i dráhy SLP-65 závislé na PLCγ. V B-buňkách také nebyla kooperace proteinů SLP-65 a Vav dosud studována tak detailně jako v T-buňkách, což je důvodem, proč se v řadě případů musím omezit na spekulace na základě analogie s T-buňkami.

Nejlépe charakterizovanou rolí Vav proteinů je jejich funkce výměnných faktorů guanosinových nukleotidů (GEF) pro Rho/Rac proteiny (Crespo et al., 1997, Schuebel et al., 1998, Movilla and Bustelo, 1999) a většina důsledků deficiencie Vav u myši vychází zřejmě právě z defektní aktivity GTPas rodiny Rho. Aktivované Rho/Rac GTPasy způsobují zejména aktivaci drah vedoucích k přestavbám cytoskeletu a aktivaci MAP-kinasových drah a transkripčních faktorů (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Rovněž lipidová kinasa PIP5-K je aktivována pomocí aktivované GTPasy Rac1 (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Tato kinasa zprostředkovává spojení Rho GTPas s přestavbou cytoskeletu a navíc i vápníkovou signalizací. Stejně dráhy pak vykazují defekty i v případě deficiencie Vav (Fischer et al., 1998, Fujikawa et al., 2003). Na aktivaci MAPK kinas, která je klíčovým krokem v indukci diferenciaci a expanzi prekurzorů T i B-buněk, má u obou těchto linií ztráta proteinů Vav rozdílný vliv, neboť Vav proteiny se zdají být nezbytné pouze u vyvíjejících se a maturovaných T-buněk (Fujikawa et al., 2003). Zatímco Vav proteiny mají tedy zřejmě klíčový význam pro regulaci cytoskeletu a vápníkové odpovědi, v regulaci ostatních drah je jejich vliv více buněčně specifický a v některých buňkách mohou být v případě potřeby zastoupeny jiným regulátorem. Významným spoluhráčem v těchto funkcích proteinů Vav jsou zřejmě právě adaptory SLP.

Předpokládá se, že nejčasnější děje v TCR signalizaci by mohly vést skřze fosforylaci Vav1 kinasami Fyn a ZAP-70 ke spuštění drah regulujících přestavbu cytoskeletu, zatímco druhá vlna

fosforylace Vav1, kdy už Vav1 interaguje se signalizačním komplexem SLP-76 a ZAP-70, vede k jeho spojení se signálními kaskádami, jako je uvolňování vápníku a stimulace NFAT, a k dalším změnám v uspořádání aktinového cytoskeletu (Valensin et al., 2002). Vav1 a SLP-76 tvoří během stimulace T-buněk velmi stabilní komplex pomocí SH2 domény Vav a fosfotyrosinů v acidické doméně SLP-76 (Raab et al., 1997). Funkce Vav1 je nezbytná pro plnou fosforylaci SLP-76 (Fischer et al., 1998) a jejich koordinovaná vazba se zdá být vyžadována pro plnou aktivaci kinasy Itk a PLC $\gamma$ 1 (Reynolds et al., 2002) a tím i pro správnou vápníkovou odpověď. Díky strukturálním podobnostem a příbuzným vazebným partnerům SLP-65 a SLP-76 je pravděpodobné, že podobné synergistické dráhy jsou konzervovány i v B-buňkách. Ztráta funkce Vav1 proteinu má velmi podobný efekt jako deficiencie adaptoru SLP-65. Výsledkem je v obou případech neúplná zástava Ca<sup>2+</sup> odpovědi (Jumaa et al., 1999, Fischer et al., 1998). Ztráta všech tří členů rodiny Vav má pak za následek úplný blok ve vápníkové odpovědi (Fujikawa et al., 2003). Je pravděpodobné, že SLP-65 a Vav v tomto směru spolupracují a bazální zachování této aktivity při ztrátě SLP-65 je udržováno aktivitou Vav proteinů. Vav1 sám o sobě přispívá k vápníkové odpovědi jednak pomocí regulace PIP5-K (O'Rourke et al., 1998), ale též usnadněním fosforylace a aktivace PLC $\gamma$ 1 (Costello et al., 1999). Existence podobného vlivu Vav proteinů na PLC $\gamma$ 2 v B-buňkách by mohla poskytnout další možný mechanismus vysvětlující neúplný blok Ca<sup>2+</sup> signalizace a aktivace PLC $\gamma$ 2 v SLP-65<sup>-/-</sup> buňkách, což patrně souvisí i s neúplným blokem vývoje B-buněk v pre-B stadiu. Ačkoliv na rozdíl od případu Vav1 a SLP-76 v T-buňkách (Fang and Koretzky, 1999) nebyla v B lymfocytech dosud popsána možnost aktivity Vav1 nezávislé na asociaci se SLP-65, část Vav1 by mohla být v nepřítomnosti SLP-65 aktivována prostřednictvím vazby na CD19. Oprávněnost této domněnky podporuje i pozorování, že úplné zástavy vývoje B-buněk v pre-B-buněčném stadiu lze dosáhnout kombinovanou delecí SLP-65 a CD19 (Hayashi et al., 2003). Pro konečné ověření této hypotézy by však bylo třeba prozkoumat fenotyp buněk posrádající zároveň SLP-65 a Vav.

Pomocí interakce s Vav proteiny jsou adaptory SLP spojeny rovněž s řadou procesů, které vyžadují přestavbu cytoskeletu. Přestavba cytoskeletu je totiž dějem vysoce ovlivňovaným aktivitou GTPas rodiny Rho (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Ztráta proteinu Vav1 zabrání T-buňkám indukovat po stimulaci polymeraci aktinu, což se ve výsledku projeví neschopností agregovat po aktivaci receptory a následnými defekty v generování a přenosu signálu (Fischer et al., 1998). Vav1 je tedy, díky své roli v kontrole organizace aktinu, významným činitelem komplexu vztahů mezi T-buněčnou signalizací a aktinovým cytoskeletem při formování imunologické synapse a iniciaci produktivní signalizace (Hornstein et al., 2004). Rovněž bylo pozorováno, že protein Vav1 je zcela nezbytný pro seskupování lipidových raftů a jejich stabilizaci (Villalba et al., 2001). Toto pozorování

podporuje význam asociace Vav proteinů s adaptorem SLP-65, neboť ten se zdá nezbytný pro udržení proteinů Vav v lipidových raftech (Johmura et al., 2003), které pak mohou přispívat k jejich stabilizaci. Zdá se, že také B-buňky po aktivaci pomocí BCR vytvářejí struktury podobné imunologické synapsi tvořené T-buňkami (Carrasco et al., 2004) a i v tomto ději hrají Vav proteiny významnou roli (Arana et al., 2008).

Agregace a polarizace lipidových raftů do imunologické synapse po stimulaci TCR nebo BCR řízená Vav1 proteiny se zřejmě ubírá přes enzymatickou aktivaci Rac, neboť dominantně negativní mutace v Rac1 má na tento děj podobný vliv jako dominantně negativní Vav1 s inaktivní katalytickou DH doménou (Villalba et al., 2001). Rac může kontrolovat cytoskeletární změny aktivací PIP5-K která fosforylací PIP (fosfatidylinositol-4-fosfát) produkuje PIP<sub>2</sub> (Hall, 1999), což je jednak substrát pro PLC $\gamma$  a zároveň aktivátor proteinů talinu a vinculinu, konstitutivně vázaných na Vav, které pak připojují aktinový cytoskelet k buněčné membráně (Fischer et al., 1998). V nepřítomnosti Vav proteinu je snížena aktivací indukovaná asociace talinu se SLP-76, což jen potvrzuje roli Vav jako významného adaptoru propojujícího cytoskeletární a signální molekuly s aktinem (Fischer et al., 1998). V B-buňkách byla rovněž prokázána regulace aktivity PIP5-K pomocí proteinů Vav (O'Rourke et al., 1998) a je tedy pravděpodobné, že se i zde upatňují právě popsané mechanismy. Vedle toho bylo však pozorováno, že při adhezi a formování imunologické synapse u B-buněk, vyžadující opět významnou přestavbu cytoskeletu, hraje významnou roli dráha přes Vav proteiny a PI3-K, které společně aktivují malé GTPasy Rac2. Ty slouží jako kritické regulátory aktivace integrinů a buněčné adheze (Arana et al., 2008). Tato dráha aktivace integrinů je zřejmě velmi významná u všech lymfocytů (Arana et al., 2008) a je velmi pravděpodobné, že i na ní se podstatnou měrou podílejí adaptory rodiny SLP, ačkoliv to prozatím nebylo přímo prokázáno.

Dalším potenciálním cílem pro GEF aktivitu Vav proteinů je Cdc42. Tento člen rodiny malých GTPas funguje jako aktivátor proteinů WASP, které jsou klíčovými mediátory aktinové polymerace u T-buněk (Thrasher, 2002). WASP se váže na proteinový komplex Arp2/3 připojený k aktinu a po aktivaci stimuluje tento komplex *de novo* polymeraci aktinu a indukuje i větvení filament (Mullins, 2000). Spolupráce Vav a WASP na přestavbě aktinového cytoskeletu je patrná z podobnosti fenotypů myši postrádajících funkci Vav či WASP, neboť v obou případech je vážně narušena reorganizace cytoskeletu (Snapper et al., 1998, Fischer et al., 1998). S adaptory SLP jsou proteiny WASP spojeny prostřednictvím vazby na protein Nck (viz kap. 4.2.1). Nutno však dodat, že schopnost Vav proteinů aktivovat Cdc42 *in vivo* či *in vitro* je značně kontroverzní a není jasné, zda jde o přímý efekt, nebo zprostředkovaný skrze jiný, dosud neidentifikovaný mechanismus (Hornstein et al., 2004). Je možné, že tato schopnost nějak souvisí s vazbou proteinů Vav na adaptory rodiny SLP. S touto teorií souhlasí i pozorování rozdílné aktivace jednotlivých Rho

GTPas pomocí Vav proteinů u makrofágů. Aktivovaný Vav1 se totiž patrně podílí i na spouštění fagocytózy přes Fc $\gamma$  receptor, neboť dominantně negativní forma Vav1 významně snižuje fagocytický potenciál makrofágů (Patel et al., 2002). Fc $\gamma$ R receptor sdílí mnoho signalizačních komponent s TCR a fagocytóza řízená přes tento receptor vyžaduje funkci malých GTPas rodiny Rho Cdc42 a Rac (Thrasher, 2002). U buněk s dominantně negativní formou Vav1 je zcela inhibována Fc $\gamma$ R indukovaná aktivace Rac, zatímco aktivace Cdc42 není nijak ovlivněna (Patel et al., 2002). V případě Fc $\gamma$ R řízené fagocytózy se tedy zdá, že Vav1 působí jako Rac specifický GEF, který neaktivuje Cdc42. Ačkoliv byla ve fagocytickém váčku brzy po jeho zformování pozorována kolokalizace aktinu s Vav1 s adaptorovými molekulami Nck a SLP-76 (Coppolino et al., 2001, Patel et al., 2002), je význam spoluúčasti adaptorů rodiny SLP na tomto ději nejasný, neboť fagocytóza zprostředkovaná Fc $\gamma$ R není nijak narušena ani kombinovanou ztrátou SLP-65 a SLP-76 (Nichols et al., 2004). Jednou z možných rolí adaptorů SLP v tomto komplexu by mohlo být právě ovlivnění specifické GEF aktivity Vav proteinů pro Cdc42. Vazba proteinů Vav na adaptory SLP by mohla pomocí konformační změny či přiblížením k dosud neznámému efektoru umožňovat aktivaci Cdc42 prostřednictvím GEF aktivity Vav. V úplné nepřítomnosti Vav proteinů, nebo i pouze v případě ztráty vazby Vav na adaptor SLP by pak mohl převládat vliv jiného GEF rovněž schopného aktivovat Cdc42.

Aktinová vlákna hrají patrně základní roli v onkogenní transformaci, neboť jejich rozpad a pokles v počtu fokálních adhezí je společným znakem buněčných transformací způsobených různými onkogeny (Frame and Brunton, 2002). Indukce onkogenní transformace buněk může být tedy i důsledkem zrušení regulace GEF aktivity proteinů Vav vedoucí k chronické aktivaci malých GTPas Rho, která se následně odrazí v narušené organizaci aktinového cytoskeletu. Vav1 protein byl skutečně poprvé izolován jako *in vitro* aktivovaný onkogen (Katzav et al., 1989) a morfologie buněk transformovaných Vav je velmi podobná buňkám transformovaným aktivovanou verzí Rho GTPas (Khosravi-Far et al., 1994). Je tudíž možné, že neschopnost ovlivnit funkce Vav proteinů a přispět tak ke správné regulaci přestavby buněčného cytoskeletu rovněž přispívá k nádorovému bujení pozorovaném při ztrátě funkce adaptoru SLP-65.

#### **4.1.3 Srovnání důsledků deficiencie Vav a SLP-65**

Význam asociace Vav proteinů s adaptory SLP pro vývoj a funkci imunitních buněk je patrný z velké podobnosti fenotypu myši postrádajících jeden z těchto proteinů. Hlavní defekty se u Vav1<sup>-/-</sup> myši projevují v lymfoidní populaci. Postrádají B-1a buňky, mají redukováný počet T-buněk a trpí neschopností maturovaných T a B lymfocytů kooperovat při imunitní odpovědi na antigen (Fischer et al., 1998, Turner et al., 1997, Zhang et al., 1995).

Zdá se, že dopady ztráty Vav1 na B-buňky záleží primárně na typu B-buněčné linie. Zatímco pro vývoj normálních B lymfocytů je exprese genu pro Vav1 postradatelná, pro tvorbu specializované podskupiny B-buněk B-1a (IgM<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) lokalizovaných v peritoneu je nezbytná (Fischer et al., 1998, Zhang et al., 1995). Neschopnost generovat B-1a podskupinu B-buněk je rovněž důsledkem ztráty adaptoru SLP-65 (Hayashi et al., 2000). Závislost vývoje B-1a buněk jak na funkci adaptoru SLP-65, tak proteinu Vav1 pro vývoj B-1a buněk může být odrazem neúčinnosti signalizace jejich receptorů BCR a CD19. Je ale také možné, že právě interakce proteinů SLP-65 a Vav1 je klíčová pro vývoj těchto buněk.

V případě T-buněk je fenotyp myši postrádajících Vav1 mírnější než v případě defciencie SLP-76. Výrazný nedostatek maturovaných cytotoxických a pomocných T lymfocytů u Vav1<sup>-/-</sup> myši je patrně důsledkem snížené pozitivní a negativní selekce (Turner et al., 1997) způsobené, podobně jako v případě ztráty funkce SLP-76, defekty v pre-TCR a TCR- $\alpha\beta$  signalizaci spojené s poruchou reorganizace cytoskeletu a vedoucí k sníženému vtoku vápníku (Bustelo, 2000).

Ačkoliv Vav1 samotný je důležitý pro normální vývoj a funkci T a B-buněk, byla prokázána určitá kompenzační role dalších členů rodiny Vav, neboť kombinovaná ztráta všech dosud známých savčích formem Vav proteinů (Vav1, Vav2 a Vav3) zcela zabrání vývoji funkčně maturovaných T a B-buněk (Fujikawa et al., 2003). Nicméně důsledky ztráty proteinů SLP jsou pro všechny zatím studované parametry výraznější než důsledky kombinované inaktivace genů kódujících proteiny Vav. Deficience SLP-76 vede k úplnému bloku ve vývoji thymocytů v DN3 stadiu (Clements et al., 1998b), zatímco deficience SLP-65 způsobí téměř kompletní zástavu vývoje B-buněk v kostní dřeni ve stádiu pre-B lymfocytů (Jumaa et al., 1999, Hayashi et al., 2000). Naproti tomu významná frakce thymocytů postrádajících Vav proteiny je schopná pokračovat ve vývoji až do stádia CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> buněk a B-buněčný vývoj v kostní dřeni myši postrádajících všechny členy rodiny Vav probíhá zcela normálně a zásadní defekty byly pozorovány až při dozrávání B-buněk ve slezině (Fujikawa et al., 2003). Vav proteiny se tedy zdají být nezbytné zejména pro přechod do více maturovaných stadií, které patrně vyžadují silnější signály z antigenního receptoru (Fujikawa et al., 2003).

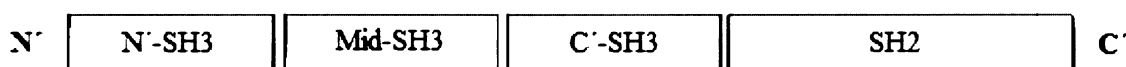
Obecně lze říci, že fenotyp živočichů postrádajících Vav je podobný, ač mírnější, jak projev nepřítomnosti adaptorů SLP, což naznačuje, že Vav je pouze jednou z molekul regulovaných těmito proteiny.

## 4.2 Nck

Další skupinou adaptorových proteinů, které hrají významnou roli v regulaci signalizace přes tyrosinové kinasy, je rodina Nck. Tyto cytosolické adaptorové proteiny složené pouze ze tří SH3 domén na N-konci a jediné SH2 domény na C-konci (Buday et al., 2002) (Obr. 3) jsou blíže

příbuzné SH2/SH3 adaptorům jako jsou Grb2, Gads, ADAP a Crk, ale plní jiné biologické role. Geny pro proteiny rodiny Nck jsou široce exprimované a tyto proteiny se účastní organizace aktinového cytoskeletu a buněčných pohybů, u *Drosophila* byla pozorována i role jednoho z proteinů rodiny Nck při vývoji nervového systému (Chen et al., 1998). V lidských buňkách má proteinová rodina Nck dva známé členy – Nck1/Nck $\alpha$  a Nck2/ $\beta$ . Přestože vykazují 68% identitu v sekvenci aminokyselin, mají patrně každý svou vlastní signalizační a vazebnou specifitu (Chen et al., 1998, Chen et al., 2000). Zde se zaměřím pouze na možné funkce Nck proteinů v lymfoidních a myeloidních liniích.

### Nck1/2



Obr. 3 Struktura Nck (upraveno dle Buday et al., 2002)

#### 4.2.1 Vazební partneři a signální dráhy

Nck je fosforylován po aktivaci membránových receptorů jako například receptorů pro růstové faktory (PDGFR, EGFR) a lymfocytárních antigenních receptorů (Buday et al., 2002). Vazba na adaptory SLP slouží k propojení Nck proteinů se signalizační drahou aktivovaných imunoreceptorů. Toto spojení umožňuje zejména kolokalizaci GEF proteinů, jako je například Vav, s proteiny závislými na Rho GTPasách. Nck využívá k vazbě svojí SH2 doménu, která preferuje vazbu na konsensus motiv pYDEP v proteinech s fosforylovanými tyrosiny (Buday et al., 2002). V aktivovaných T lymfocytech se Nck váže na dva fosforylované tyrosiny (YESP) SLP-76, které vykazují určité podobnosti s konsensus sekvencí YDEP (Bubeck Wardenburg et al., 1998). Vazba Nck proteinů na SLP-65 v B-buňkách (Fu et al., 1998) bude patrně založena na stejném principu, neboť SLP-65 též obsahuje dva evolučně konzervované fosforylační motivy podobného charakteru (YENP, YEPP). Význam těchto sekvencí pro interakci mezi SLP-65 a Nck však ještě nebyl experimentálně ověřen.

Většina efektorových proteinů Nck se váže na prostřední SH3 doménu Nck. Tyto proteiny sdílejí konsensus motiv PxxPxRxxS, fosforylace serinu v tomto motivu negativně reguluje vazbu na SH3 doménu (Zhao et al., 2000a). Jedním z nejnámějších proteinů vázajících se na SH3 doménu Nck je protein serin/threonin kinasa Pak1 (p21 activated kinase) (Galisteo et al., 1996, Yablonski et al., 1998). Rodina Pak kinas patří spolu s GCK rodinou kinas mezi Ste20 kinasy (Kyriakis, 1999). Obecně lze říci, že jde o protein kinasy, které regulují stresové odpovědi,

ale mají i řadu jiných funkcí (Kyriakis, 1999). Kinasy rodiny Pak obsahují C-terminální katalytickou doménu a N-terminální vazebné místo pro malé G-proteiny Rac1 a Cdc42 (Bagrodia and Cerione, 1999) a patří tedy mezi efektorové molekuly GTPas rodiny Rho. V některých buněčných liniích specificky regulují dráhu vedoucí k aktivaci MAP kinasy JNK a podílí se na regulaci aktinového cytoskeletu a odpovědi na stres (Bagrodia and Cerione, 1999).

Nck tedy představuje spojení mezi receptory spojenými s tyrosin kinasami, Rho rodinou GTPas a Pak serin/threonin kinas. Pro aktivaci Pak molekulami Rac/Cdc42 je nezbytná její lokalizace do blízkosti plasmatické membrány (Bagrodia and Cerione, 1999). Nck asociuje přes SH2 doménu s fosforylovanými tyrosiny na adaptorech SLP-76 (Bubeck Wardenburg et al., 1998) či SLP-65 (Fu et al., 1998), zatímco jeho druhá SH3 doména může interagovat s první na prolin bohatou oblastí na N-konci Pak1, která je tak pomocí Nck přiváděna k membráně (Galisteo et al., 1996), což je kritickým aspektem aktivace Pak1 (Howe, 2001). Interakce Pak s Nck se zdá být dynamicky regulovaná buněčnou adhezí. Komplex Pak/Nck se rychle ztrácí po odloučení buněk a je znovu rychle obnovován po zachycení na extracelulární matrix (Howe, 2001). Jak již bylo uvedeno výše (kap. 4.1.1) adaptorový protein SLP-76 váže po stimulaci TCR na své tři fosforylované tyrosinové zbytky přes jejich SH2 domény kromě adaptorového proteinu Nck i Vav, výměnný faktor GTPas rodiny Rho. Trimolekulární komplex SLP-76/Vav/Nck umožňuje kolokalizaci GEF aktivity Vav s efektorovými proteiny Rho GTPas navázanými na Nck a umožňuje tak aktivaci G-proteinů rodiny Rho v těsné blízkosti jejich efektorů (Bubeck Wardenburg et al., 1998). Rac aktivovaný proteinem Vav tak může aktivovat kinasu Pak1 přítomnou ve stejném komplexu organizovaném proteiny SLP a Nck (Bubeck Wardenburg et al., 1998, Yablonski et al., 1998). Analogická situace byla pozorována při interakci T-buňky a APC. V místě kontaktu buněk dochází k polymeraci aktinu řízené proteinem WASP, který je k membráně přiváděn vazbou na SH3 doménu Nck a aktivován komplexem Cdc42-GTP produkovaným GEF proteinem Vav1. Koordinátorem těchto dvou dějů je opět SLP-76 (Zeng et al., 2003). Trimolekulární komplex SLP-76/Vav/Nck se tedy patrně účastní jak regulace aktivace Pak1, tak WASP proteinů. Je velmi pravděpodobné, že podobné dráhy se uplatňují i u B-buněk, kde by jako spojovatel drah Vav a Nck mohl sloužit SLP-65. Jak již bylo zmíněno výše, SLP-65 obsahuje ve své N-terminální oblasti rovněž několik fosfotyrosinových motivů YxxP schopných vázat se na SH2 domény jak Vav, tak Nck (Fu et al., 1998). Oba tyto asociované proteiny mohou využívat jiný fosforylovaný tyrosinový zbytek SLP-65, takže i zde se může tvořit trimolekulární komplex SLP-65/Vav/Nck spojující pozdější efektory obou drah.

Na druhou stranu však bylo ukázáno, že v T-buňkách Pak1 k aktivaci po stimulaci TCR nutně nevyžaduje LAT, SLP-76 a dokonce ani přímou vazbu na Nck, ale pouze aktivní Rho GTPasy a konstitutivně asociovaný výměnný faktor Rac G-proteinů PIX (Pak interacting exchange factor),



který se váže přes svoji N-terminální SH3 doménu na konzervovanou na prolin bohatou oblast na C-konci Pak (Ku et al., 2001). Roli Nck v přivádění PIX/Pak1 komplexu do membrány k aktivátorům Pak1 přebírá v tomto případě patrně GIT1 (G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein). Zdá se tedy, že TCR aktivuje Pak1 a Rac1 pomocí několika odlišných a zřejmě alespoň částečně redundantních drah v souladu s předpokládanou komplexností tak složitého děje, jako je regulace aktinového cytoskeletu. Zda se oba tyto mechanismy uplatňují i u B-buněk není dosud známo. Všechny proteiny účastníci se alternativní dráhy aktivace Pak jsou v B-buňkách exprimovány a lze tedy předpokládat, že situace zde bude analogická.

Komplex složený nejen z Pak a Nck, ale i proteinů PIX a GIT1 může u fibroblastů podporovat pohyblivost buňky regulací dynamiky fokálních komplexů. GIT1 asociuje s kinasou nezbytnou pro formování fokálních komplexů FAK a je jí fosforylován. FAK a GIT1 zřejmě oba ovlivňují cytoskelet podobným způsobem, neboť oba obsahují doménu schopnou vázat paxilin. Jeho vyvazováním umožňují rozpad fokálních komplexů, což je proces nezbytný pro pohyblivos T-buněk (Zhao et al., 2000b). Vzhledem k množství stejných molekul uplatňujících se jak ve fokálních adhezích, tak komplexu TCR je možné, že by se tento princip vedle dynamiky fokálních adhezí mohl uplatňovat i na rozhraní TCR:APC a rovněž i při formování imunologických synapsí v B-buňkách.

Vazba Pak1 na Nck a PIX je významně ovlivněna fosforylací serinových zbytků ve vazebném místě pro SH3 doménu Nck a PIX, která vede ke zrušení těchto vazeb (Zhao et al., 2000a). Aktivovaná Pak1 zřejmě nefosforyluje sama sebe na těchto serinových zbytcích, neboť po aktivaci Pak1 nebyl pozorován rozpad komplexu Pak1 s Nck (Howe, 2001, Yablonski et al., 1998, Galisteo et al., 1996). Za tuto modifikaci je zřejmě zodpovědná jiná serin/threonin kinasa (Howe, 2001). Uvolněná aktivovaná Pak1 poté zřejmě působí na své efekторы. Nck a PIX se tedy patrně účastní drah Pak1 signalizace, které nejsou spojené s její kinasovou aktivitou (Obermeier et al., 1998).

S SH3 doménou Nck rovněž interaguje několik dalších členů rodiny Ste20, což vede k přivádění těchto serin/threonin kinas k receptorovým či nereceptorovým tyrosin kinasám. Tento děj může dále pokračovat aktivací MAP kinasové dráhy JNK a zároveň regulací aktinového cytoskeletu (Buday et al., 2002). Příkladem je kinasa HPK1 (viz. kap. 4.3), která je aktivována tyrosinovou fosforylací po obsazení TCR a tvoří komplex s adaptory Crk a Nck (Ling et al., 2001), přičemž jak HPK1, tak Crk interagují s SH3 doménami Nck (Oehrl et al., 1998).

#### **4.2.2 Regulace aktinové dynamiky**

Vazba Nck na fosforylované tyrosiny adaptorů SLP umožňuje i spojení aktivace přes imunoreceptory s regulací přestavby cytoskeletu. Zdá se totiž, že většina proteinů

asociovaných s SH3 doménou Nck se potenciálně účastní kontroly aktinového cytoskeletu. Některé tyto komplexy jsou široce distribuované, jiné přítomné pouze ve specifických buněčných typech. V hematopoetických buňkách se vyskytuje převážně komplex Nck s WASP, kdy SH3 doména Nck patrně interaguje s C-terminální prolinem bohatou oblastí WASP (Rivero-Lezcano et al., 1995). Jak již bylo dříve zmíněno (kap. 4.1.2), WASP a jemu příbuzné proteiny jako N-WASP exprimovaný zejména v neuronech jsou aktivovány Cdc42 a PIP<sub>2</sub> a hrají klíčovou roli v organizaci aktinového cytoskeletu, neboť umožňují *de novo* polymeraci a větvení aktinových vláken tím, že stimulují komplex Arp2/3 (Mullins, 2000). Zdá se, že způsob aktivace WASP a jemu příbuzných proteinů účastnících se polymerace aktinu je buněčně specifický. Nukleace aktinu pomocí N-WASP-Arp2/3 komplexu stimulovaná Nck je dále podporována i PIP<sub>2</sub>, ovšem nikoliv Cdc42-GTP. V místech vazby Nck na fosfotyrosiny se tedy patrně uplatňuje mechanismus indukce aktinové polymerace nezávislý na Cdc42, avšak závislý na Nck a PIP<sub>2</sub> (Rohatgi et al., 2001). Oproti tomu WASP protein asociovaný s Nck v T-buňkách se zdá být závislý na aktivaci Cdc42-GTP produkovaném s přispěním aktivity Vav1 (Zeng et al., 2003). V aktivovaných T-ymfocytech řídí Nck organizaci komplexu obsahujícího WASP, Nck, SLP-76 a ADAP, který je pak spojen s klíčovými hráči procesů regulujících aktinovou dynamiku (Krause et al., 2000). Přímá data popisující regulaci aktinové polymerace řízenou pomocí Nck v B-buňkách opět chybějí. Podobnost SLP-76 a SLP-65 a jejich vazebných partnerů naznačuje, že dochází ke tvorbě podobného komplexu jako v T-buňkách, nicméně je pravděpodobné, že i zde existuje určitá odlišnost v aktivaci WASP proteinů, která se může odrazit ve složení komplexu důležitého pro indukci polymerace aktinu. Pro tuto možnost svědčí i pozorování odlišného dopadu ztráty WASP proteinu na vývoj B a T-buněk. Zatímco T-buňky u WASP<sup>-/-</sup> myši vykazují významné poruchy v TCR indukované proliferaci, B-buněčná proliferace probíhá normálně, z čehož vyplývá, že B-buňky využívají pro regulaci cytoskeletu i jiný protein příbuzný WASP, například N-WASP nebo i mechanismy na WASP proteinech nezávislé (Snapper et al., 1998).

Dočasná prostorová reorganizace aktinového cytoskeletu se rovněž uplatňuje při fagocytóze u makrofágů. Celý děj je spouštěn obsazením Fcγ receptorů a bylo pozorováno, že jejich aktivace spouští při fagocytóze dvě signalizační dráhy. Jedna reguluje dostupnost aktinových monomerů a druhá je přes protein Nck spojena s nukleací aktinových filament. Obě dráhy, ač formovány na sobě nezávisle, jsou patrně propojeny adaptorem SLP-76 (Coppolino et al., 2001). Zda se na tomto ději podílí vedle SLP-76 i v makrofágách rovněž přítomný SLP-65 nebylo dosud studováno. Spolupráce obou adaptorů je nicméně pravděpodobná, neboť SLP-65 též hraje roli v signalizaci přes FcγR a podporuje fagocytózu u SLP-76<sup>-/-</sup> makrofágů (Bonilla et al., 2000). Na druhou stranu se však zdá, že tento proces je na přítomnosti obou adaptorů nezávislý, neboť bylo prokázáno, že signalizace přes FcγR a rovněž fagocytóza řízená tímto receptorem probíhá

bez jakékoliv změny i v nepřítomnosti SLP-76 a SLP-65 (Nichols et al., 2004). Jak již bylo naznačeno dříve (kap. 4.1.2), adaptory SLP by v tomto případě mohly pouze usnadňovat průběh celého procesu, avšak v případě potřeby by mohly být zastoupeny jiným regulátorem.

Dalším proteinem asociovaným s Nck, který se může podílet na regulaci cytoskeletu, je již zmiňovaná kinasa Pak1. V tomto případě funguje Pak1 spíše jako adaptor spojující vazbou na svoji nekatalitickou doménu Nck a PIX, které pak spolupracují na aktivaci Rac, nebo se účastní dalších signalizačních drah (Obermeier et al., 1998). Z tohoto pozorování je zřejmé, že Pak1 může hrát v signalizaci Rac dvě role – jako efektor Rac, kdy využívá svoji kinasovou aktivitu a jako adaptor regulující funkci proteinu Rac nezávisle na kiazové aktivitě (Obermeier et al., 1998). Nicméně přesné stanovení důležitosti Pak1 ve výše zmíněných procesech by vyžadovalo analýzu Pak1 deficientních myší, která prozatím není k dispozici.

### 4.2.3 Důsledky deficience Nck

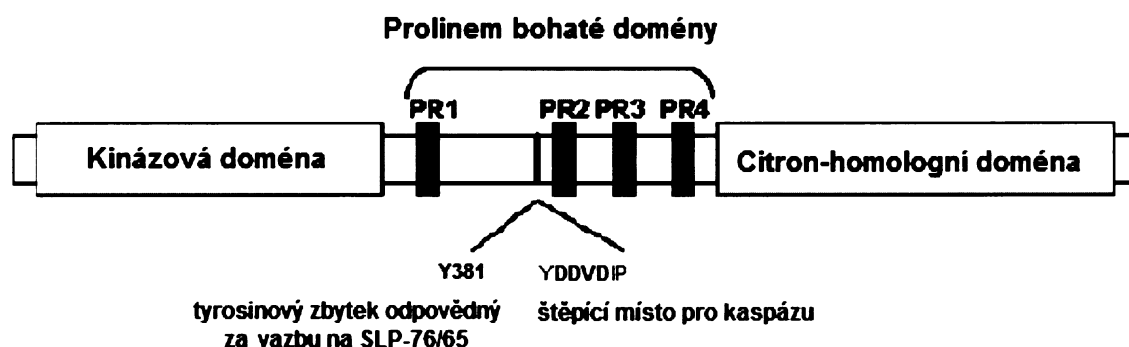
Z předchozích odstavců vyplývá že Nck je významným regulačním elementem rozsáhlé sítě regulující dynamiku aktinového cytoskeletu. Přesná role Nck *in vivo* však stále není zcela objasněna. Dosavadní výsledky naznačují, že deficience Nck proteinů má dopad na vývoj mezodermálních struktur během embryogeneze, patrně jako důsledek jejich funkce v buněčných pohybech a organizaci aktinového cytoskeletu. Myši postrádající samotné Nck1 nebo Nck2 jsou normální, zatímco dvojitá deficience těchto dvou proteinů způsobuje embryonální letalitu (Bladt et al., 2003). Zdá se tedy, že Nck1 a Nck2 jsou ve vývoji funkčně redundantní, avšak jejich přítomnost je nezbytná. Na druhou stranu ale mohou jednotlivé Nck proteiny hrát specifické role v různých buněčných typech. Studium potenciální role adaptorů Nck v nervovém a imunitním systému je však velmi ztíženo časnou letalitou Nck1<sup>-/-</sup>Nck2<sup>-/-</sup> embryí a může být studováno pouze pomocí dominantně negativních forem Nck. V T-buňkách je Nck zřejmě jednou z komponent ovlivňující transkripci. Vazba Pak1 na Nck je vyžadována pro aktivitu transkripčního faktoru NFAT, neboť dominantně negativní alely Pak1 nebo Nck obě specificky blokují aktivaci NFAT indukovanou TCR, zatímco aktivitu MAP kinasy JNK neovlivňují (Yablonski et al., 1998). Na rozdíl od T-buněk se zdá, že v B-buněčné signalizaci je aktivace JNK ovlivněna přítomností Nck, neboť dominantně negativní forma Nck zabrání tomuto ději. Zároveň je pro aktivaci JNK důležitá i asociace adaptorů SLP-65 a Nck (Mizuno et al., 2002). Chybějící Nck zvyšuje BCR indukovanou apoptózu, zřejmě právě díky snížené aktivitě JNK, která v tomto případě působí antiapoptoticky (Mizuno et al., 2002). Podobný efekt na aktivaci JNK má i dominantně negativní forma Vav (Mizuno et al., 2002), což potvrzuje význam spolupráce obou proteinů v BCR signalizaci vedené přes adaptor SLP-65.

Vliv ztráty funkce proteinu Nck na regulaci cytoskeletu v imunitních buňkách nebyl dosud studován. Využití dominantně negativních forem Nck je zřejmě pro tento účel nedostatečné a bylo by třeba zvolit více tkáňově specifický systém.

### 4.3 HPK1

Hematopoietická progenitorová kinasa 1 (HPK1) patří, podobně jako Pak, mezi savčí proteinové serin/threonin kinasy ze skupiny Ste20 specifické pro hematopoietické buňky. Proteinové kinasy příbuzné Ste20 jsou klasifikovány do dvou hlavních podskupin – p21 proteinové kinasy aktivující Cdc42/Rac1 (PAK) a podskupinu kinas germinálních center (GCK)/ hematopoietických progenitorových kinas 1 (HPK1) (Kyriakis, 1999). Podskupina GCK/HPK1 je charakterizována N-terminální kinasovou doménou, čtyřmi na prolin bohatými motivy, štěpným místem pro kaspasy a regulační citron-homologní doménou na C-konci (Boomer and Tan, 2005) (Obr. 4).

HPK1 je součástí mnoha signalizačních kaskád v buňce, které zahrnují MAPK signalizaci, signalizaci přes antigenní receptory, apoptózu, signalizaci pomocí růstových faktorů a cytokinovou signalizaci. Je možné, že typ regulační role, kterou si HPK1 zvolí, závisí na dalších buněčných faktorech, jako jsou právě adaptorové proteiny (Boomer and Tan, 2005).



Obr. 4 Struktura HPK1 (upraveno dle Boomer and Tan, 2005)

#### 4.3.1 Aktivace a signální dráhy

Fosforylace a kinasová aktivita HPK1 závisí na přítomnosti adaptorových proteinů, které jsou potřebné nejen pro spojení HPK1 s povrchovými receptory, ale též pro pozdější genovou transkripci řízenou transkripčními faktory NFAT, NF $\kappa$ B a AP-1. HPK1 se váže na mnoho adaptorových proteinů včetně členů rodin Grb2, Nck, Crk, SLP (Boomer and Tan, 2005). Asociace HPK1 s adaptory rodiny SLP ovlivňuje zejména T a B-buněčnou genovou transkripci.

HPK1 obsahuje 13 potenciálních tyrosinových fosforylačních zbytků, z nichž některé mohou být fosforylovány kinasami rodiny Syk a Src (ZAP-70, Syk, Lyn) a sloužit jako místa vazby

proteinů obsahujících SH2 domény (Ling et al., 2001, Tsuji et al., 2001). Mezi takto asociované proteiny patří i adaptory SLP-65 a SLP-76, tato interakce je vyžadována pro indukci kinasové aktivity HPK1 po stimulaci BCR, respektive TCR (Sauer et al., 2001, Tsuji et al., 2001). Role, kterou komplex HPK1/SLP-65 hraje v aktivaci HPK1, patrně nespočívá v usnadnění její interakce s PTK asociovanými s BCR, neboť tyrosinová fosforylace HPK1 po stimulaci BCR byla pozorována i v buňkách postrádajících SLP-65 (Tsuji et al., 2001). Vzájemná asociace HPK1 a SLP-65 však může přispívat k aktivaci HPK1 například změnou konformace vedoucí k aktivaci kinasy. Nedá se ani vyloučit možnost, že SLP-65 váže dosud neznámý enzym usnadňující aktivaci HPK-1 určitou formou její modifikace. V každém případě je však interakce HPK1 se SLP-65 nezbytná pro optimální aktivaci HPK1, neboť mutace v SH2 doméně SLP-65 vedoucí k jejímu zrušení zcela znemožní aktivaci HPK1 (Tsuji et al., 2001). HPK1 po stimulaci BCR zvyšuje aktivaci IKK- $\beta$  (Tsuji et al., 2001) v IKK komplexu, což vede k degradaci inhibiční molekuly I $\kappa$ B a tím k aktivaci transkripčního faktoru NF $\kappa$ B důležitého pro imunitní a zánětlivé odpovědi a rovněž kontrolu apoptózy. Jde tedy o další možnou dráhu regulace aktivace NF $\kappa$ B prostřednictvím proteinů asociovaných se SLP-65 vedle již dříve zmíněné účasti aktivované PKC $\beta$  na udržování IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  v lipidových raftech (Su et al., 2002). Překvapivě zcela opačná role je připisována HPK1 v T-buňkách. Studium HPK1<sup>-/-</sup> myši ukázalo, že HPK1 přispívá k negativní regulaci TCR signalizace a imunitní odpovědi řízené T-buňkami, neboť ztráta HPK1 vede k zesílené TCR indukované fosforylaci SLP-76, PLC $\gamma$  a ERK, prodloužení vápníkové odpovědi a zvýšené produkci cytokinů a antigenně specifických protilátek (Shui et al., 2007). Jaký dopad má odstranění HPK1 na signalizaci přes BCR u B-buněk nebylo dosud studováno.

HPK1 se též účastní MAP-kinasové signální dráhy, kdy citron-homologní doména HPK1 může řídit signalizaci vedoucí k aktivaci c-Jun N-terminální kinasy (JNK) (Kiefer et al., 1996). JNK hraje roli nejen na zánětlivých odpovědích a buněčné proliferaci, ale i v apoptotických procesech (Ip and Davis, 1998). Účast HPK1 na aktivaci JNK je však doposud spíše nejasná, neboť ztráta HPK1 se alespoň u T-buněk ve schopnosti aktivovat tuto kinasu nijak neprojeví (Tsuji et al., 2001, Ling et al., 2001, Shui et al., 2007). Interakce či ovlivnění dalších členů savčích MAP kinas včetně ERK a p38-MAPK funkcí HPK1 nebylo pozorováno (Kiefer et al., 1996, Tsuji et al., 2001).

HPK1 též hraje roli v realizaci apoptózy u hematopoietických buněk. V apoptotických buňkách je totiž štěpena kaspasou 3 a přeměňována tak na inhibitor aktivace NF $\kappa$ B (Arnold et al., 2001). Vedle toho u T-buněk HPK1 usnadňuje indukci apoptózy i zvyšováním exprese genu pro povrchový protein FasL, známého induktora T-buněčné apoptózy (Schulze-Luehrmann et al., 2002). Nedávno bylo zjištěno, že podobný princip založený na kaspasou rozštěpené HPK1 se může uplatňovat i v regulaci aktivací indukované buněčné smrti u primárních B-buněk (Brenner

et al., 2007). V konečném důsledku tak může HPK1 podporou apoptózy u lymfocytů přispívat k ukončení imunitní odpovědi. Tuto domněnku potvrzuje i fakt, že odstranění HPK1 vede u myší k hyperproliferaci T-buněk (Shui et al., 2007). Tyrosin klíčový pro vazbu HPK1 na SH2 doménu adaptorů SLP se nachází v těsné blízkosti štěpného místa pro kaspasu 3 (viz Obr. 4) a je velmi pravděpodobné, že rozštěpení HPK1 zruší asociaci těchto dvou proteinů. Přerušení vazby HPK1 se SLP-65 může mít, kromě přeměny aktivátoru NF $\kappa$ B na inhibitor tohoto transkripčního faktoru, efekt i na modulaci dalších signalizačních drah, kterých se tento komplex účastní a které mohou ovlivňovat další osud buněk. Bylo totiž prokázáno, že štěpení HPK1 kaspasou má pravděpodobně obecnější charakter pro její způsob převodu signálů, neboť neovlivňuje pouze regulaci apoptózy, ale hraje patrně roli i během diferenciaci monocytů. Zde se její N-terminální část obsahující kinasovou doménu účastní modulace signalizace HPK1 vedoucí k trvalé aktivaci JNK a umožňující přežívání a diferenciaci monocytů nezávislou na růstovém faktoru (Arnold et al., 2007).

Zdá se tedy, že právě HPK1 může představovat propojení adaptorů rodiny SLP s drahou MAP-kinasy JNK, regulací genové transkripcie a apoptózou a potvrdit tak jejich účast na regulaci imunitní odpovědi a vývoji imunitního systému.

#### **4.3.2 Vliv vazby na adaptorové proteiny**

Z dosavadních studií vyplývá, že kinasa HPK1 plní poněkud odlišné funkce nejen v závislosti na buněčné linii, ale zároveň i dle typu obdrženého signálu. Jaké signály předcházející aktivaci HPK1 však řídí odlišné procesy buněčné aktivace a apoptózy zůstává nejasné. Je možné, že významnou roli v tom hrají adaptorové proteiny, které pomáhají lokalizovat HPK1 do blízkosti různých efektorových molekul a tím ovlivňují její pozitivní nebo negativní regulační funkce.

Vedle již zmíněné klíčové funkce adaptorů SLP pro aktivaci HPK1 po stimulaci imunoreceptorů hrají zřejmě v regulaci aktivity HPK1 roli i další adaptory. Bylo pozorováno, že v B-buňkách je pro podporu kinasové aktivity HPK1 po stimulaci BCR kromě SLP-65 nutná i přítomnost Grb2 (Ling et al., 2001), který se váže přes svoji N-terminální SH3 doménu na HPK1 (Oehrl et al., 1998). Zdá se, že adaptory SLP-65 a Grb2 jsou schopné nezávisle na sobě částečně aktivovat HPK1 a pro dosažení efektivní aktivace HPK1 je potřeba spolupráce obou typů adaptorů (Tsuji et al., 2001). Podobná závislost správné aktivity asociovaného proteinu na společné vazbě jak SLP-65, tak Grb2 byla pozorována i u Vav (Johmura et al., 2003). Pomocí přímé interakce s Nck1 je HPK1 spojena i s drahami vedoucími k aktivaci MAP kinasy JNK a drahami regulujícími reorganizaci cytoskeletu (Ling et al., 2001, Oehrl et al., 1998). Jak Nck, tak HPK1 jsou přiváděni do lipidových raftů po stimulaci TCR (Ling et al., 2001), zřejmě díky společné vazbě na SLP-76.

Je tedy možné, že souhra více adaptorů je velmi důležitá pro optimální průběh řady signalizačních drah.

Vedle toho, že adaptorové molekuly ovlivňují funkce HPK1, je možné, že existuje i mechanismus, jakým naopak kinasa HPK1 přímo mění funkce adaptorových proteinů. Fosforylace těchto adaptorů na serin/threoninových zbytcích pomocí HPK1 může ovlivňovat jejich lokalizaci, konformaci, stabilitu či poločas života, schopnost formovat proteinové komplexy a vázat své efektorové molekuly. Dosud byl pozorován vliv fosforylace serinových zbytků SLP-76 pomocí HPK1 na interakci SLP-76 s 14-3-3 $\tau$  proteinem, negativním regulátorem TCR signalizace (Shui et al., 2007). Je však pravděpodobné, že tento typ regulace má obecnější charakter a mohlo by tedy jít o další mechanismus, jakým by se HPK1 podílela jak na pozitivní, tak negativní regulaci dalších signalizačních drah, včetně drah závislých na SLP-65 v B-buňkách.

#### **4.4 Další proteiny asociované se SLP-65**

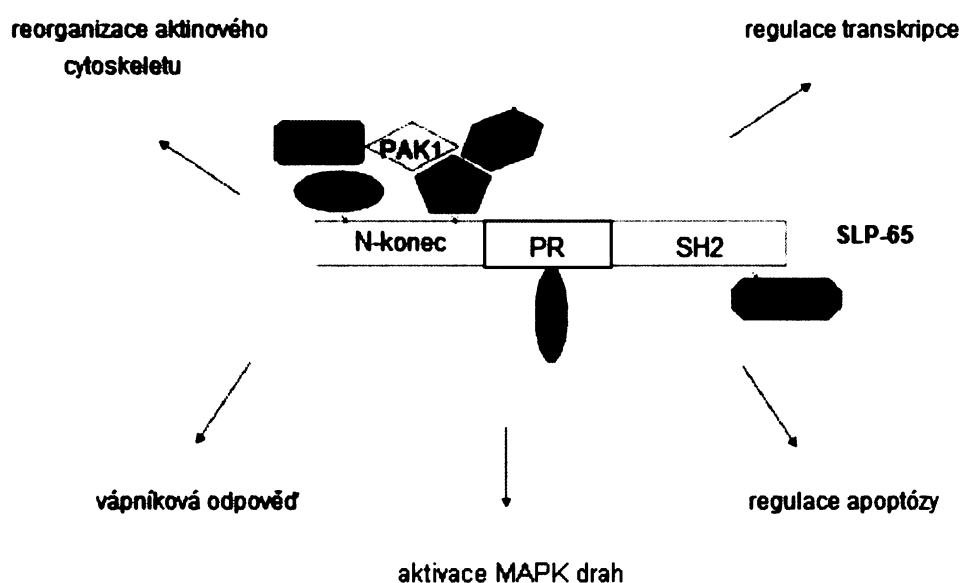
SLP-65 je adaptorový protein, který obsahuje množství potenciálních vazebných domén a asociuje s mnoha proteiny. Kromě vazby Vav, Nck a HPK1, na které byl v této práci kladen největší důraz, neboť jde o asi nejlépe prostudované vazebné partnery SLP-65 z hlediska jejich stavby i funkce v signálních drahách SLP-65, byla popsána asociace SLP-65 i s několika dalšími molekulami. Kromě proteinů účastnících se regulace PLC $\gamma$ 2 jde ještě o adaptorový protein CrkL (Engels et al., 2001a) a zejména pak i významný adaptorový protein Grb2 (Fu et al., 1998), který patrně v mnoha případech spolupracuje se SLP-65 na zajištění optimální imunoreceptorové signalizace. Ačkoli tomuto proteinu nebyla věnována samostatná kapitola, jeho funkce související s aktivitou SLP-65 byly popsány v rámci předcházejících kapitol. Kromě toho vazba na tyto proteiny jistě propůjčuje SLP-65 další funkce, avšak o těch toho zatím není mnoho známo. Rovněž je velmi pravděpodobné, že tento výčet vazebných partnerů SLP-65 není úplný a existence nových, dosud nepopsaných asociovaných proteinů může odhalit účast SLP-65 na dalších významných buněčných dějích.

### **5. Závěr**

SLP-65 je významnou složkou signálního komplexu formovaného po stimulaci BCR. Jakožto adaptorový protein bez jakékoliv katalytické domény nemá SLP-65 žádnou vlastní enzymatickou aktivitu a jeho funkce je spojena s proteiny, které na sebe váže a tím umožňuje optimální průběh řady signalizačních drah (Obr. 5). Klíčový význam má SLP-65 zejména pro regulaci vápníkové odpovědi po stimulaci BCR. Ukazuje se, že tento děj je velmi komplexní a SLP-65 do něj zasahuje prostřednictvím hned několika svých vazebných partnerů, jejichž funkce se mnohdy

prolínají a v některých případech je od sebe lze jen těžko oddělit. Jedním z těchto vazebných proteinů je GEF pro malé G-proteiny rodiny Rho Vav. Ten je rovněž, spolu s dalším vazebným partnerem SLP-65 adaptorem Nck, významným hráčem v regulaci reorganizace cytoskeletu. Poruchy aktinového cytoskeletu se mimo jiné projevují pozměněným tvarem buněk či neschopností specificky reagovat přestavbou cytoskeletu na signalizaci přes určité receptory. To se může odrazit i ve schopnosti zaujmout potřebný buněčný tvar při vazbě ligandu a tím i ve správné signalizaci přes receptor. Tento mechanismus by mohl být, vedle dosud obecně uznávaného vlivu porušené vápníkové signalizace, další příčinou defektů v aktivaci B lymfocytů způsobených ztrátou SLP-65. Reorganizace aktinového cytoskeletu je rovněž nezbytnou součástí procesu fagocytózy. Zdá se však, že v tomto ději hrají adaptory SLP pouze okrajovou roli. Jak Vav, tak Nck spojují SLP-65 též s regulací drah vedoucích k aktivaci MAP kinas a celé škály transkripčních faktorů. Tyto dráhy ovlivňuje SLP-65 i prostřednictvím asociace se serin/threonin kinasou HPK1, která je zároveň významným činitelem v procesu apoptózy. Účast adaptoru SLP-65 na drahách vedoucích k regulaci transkripčních faktorů a rovněž k ovlivnění apoptózy jen potvrzuje jeho klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi a vývoji imunitního systému.

V řadě procesů se však o přesné funkci SLP-65 mnoho neví a předpokládá se analogie s lépe prostudovaným homologním adaptorem SLP-76. Jistě však existují rozdíly v mechanismech funkcí obou adaptorů, dané už odlišným expresním profilem jejich genů a různými způsoby regulace buněk, kde se tyto proteiny vyskytují. Tyto rozdíly by stálo za to detailně prozkoumat a rovněž experimentálně ověřit mnohé spíše spekulativní závěry vycházející z podobnosti struktury a funkce obou adaptorů.



Obr. 5 Dráhy proteinů asociovaných se SLP-65 (upraveno dle Wu and Koretzky, 2004)



## Literatura

Abudula, A., Grabbe, A., Brechmann, M., Polaschegg, C., Herrmann, N., Goldbeck, I., Dittmann, K., and Wienands, J. (2007). SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *J Biol Chem* 282, 29059-29066.

Arana, E., Vehlow, A., Harwood, N.E., Vigorito, E., Henderson, R., Turner, M., Tybulewicz, V.L., and Batista, F.D. (2008). Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation. *Immunity* 28, 88-99.

Arnold, R., Frey, C.R., Muller, W., Brenner, D., Krammer, P.H., and Kiefer, F. (2007). Sustained JNK signaling by proteolytically processed HPK1 mediates IL-3 independent survival during monocytic differentiation. *Cell Death Differ* 14, 568-575.

Arnold, R., Liou, J., Drexler, H.C., Weiss, A., and Kiefer, F. (2001). Caspase-mediated cleavage of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) converts an activator of NFkappaB into an inhibitor of NFkappaB. *J Biol Chem* 276, 14675-14684.

Bagrodia, S., and Cerione, R.A. (1999). Pak to the future. *Trends Cell Biol* 9, 350-355. (souhrnný článek)

Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G.A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F.B., and Pawson, T. (2003). The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 23, 4586-4597.

Bonilla, F.A., Fujita, R.M., Pivniouk, V.I., Chan, A.C., and Geha, R.S. (2000). Adapter proteins SLP-76 and BLNK both are expressed by murine macrophages and are linked to signaling via Fcgamma receptors I and II/III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1725-1730.

Boomer, J.S., and Tan, T.H. (2005). Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem* 95, 34-44. (souhrnný článek)

Brdicka, T., Imrich, M., Angelisova, P., Brdickova, N., Horvath, O., Spicka, J., Hilgert, I., Luskova, P., Draber, P., Novak, P., *et al.* (2002). Non-T cell activation linker (NTAL): a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* 196, 1617-1626.

Brenner, D., Golks, A., Becker, M., Muller, W., Frey, C.R., Novak, R., Melamed, D., Kiefer, F., Krammer, P.H., and Arnold, R. (2007). Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood* 110, 3968-3977.

Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J.Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., and Chan, A.C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 9, 607-616.

Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* 14, 723-731. (souhrnný článek)

Bustelo, X.R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* 20, 1461-1477. (souhrnný článek)

Bustelo, X.R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 20, 6372-6381. (souhrnný článek)

Cao, M.Y., Davidson, D., Yu, J., Latour, S., and Veillette, A. (1999). Clnk, a novel SLP-76-related adaptor molecule expressed in cytokine-stimulated hemopoietic cells. *J Exp Med* 190, 1527-1534.

Carrasco, Y.R., Fleire, S.J., Cameron, T., Dustin, M.L., and Batista, F.D. (2004). LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 20, 589-599.

Clements, J.L., Ross-Barta, S.E., Tygrett, L.T., Waldschmidt, T.J., and Koretzky, G.A. (1998a). SLP-76 expression is restricted to hemopoietic cells of monocyte, granulocyte, and T lymphocyte lineage and is regulated during T cell maturation and activation. *J Immunol* 161, 3880-3889.

Clements, J.L., Yang, B., Ross-Barta, S.E., Eliason, S.L., Hrstka, R.F., Williamson, R.A., and Koretzky, G.A. (1998b). Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science* 281, 416-419.

Coppolino, M.G., Krause, M., Hagedorff, P., Monner, D.A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J., and Sechi, A.S. (2001). Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* 114, 4307-4318.

Costello, P.S., Walters, A.E., Mee, P.J., Turner, M., Reynolds, L.F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-κB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3035-3040.

Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S., and Bustelo, X.R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-172.

Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.J., and Pierce, S.K. (2003). Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 21, 457-481. (souhrnný článek)

Engels, N., Merchant, M., Pappu, R., Chan, A.C., Longnecker, R., and Wienands, J. (2001a). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *J Exp Med* 194, 255-264.

Engels, N., Wollscheid, B., and Wienands, J. (2001b). Association of SLP-65/BLNK with the B cell antigen receptor through a non-ITAM tyrosine of Ig-α. *Eur J Immunol* 31, 2126-2134.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635. (souhrnný článek)

Fang, N., and Koretzky, G.A. (1999). SLP-76 and Vav function in separate, but overlapping pathways to augment interleukin-2 promoter activity. *J Biol Chem* 274, 16206-16212.

Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., *et al.* (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* 8, 554-562.

Flemming, A., Brummer, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2003). The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* 4, 38-43.

Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2002). Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 36-43. (souhrnný článek)

Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93-103.

Fujikawa, K., Miletic, A.V., Alt, F.W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S., Moores, S.L., *et al.* (2003). Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* 198, 1595-1608.

Fujimoto, M., Poe, J.C., Jansen, P.J., Sato, S., and Tedder, T.F. (1999). CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J Immunol* 162, 7088-7094.

Galisteo, M.L., Chernoff, J., Su, Y.C., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1996). The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* 271, 20997-21000.

Hall, A. (1999). Signal transduction pathways regulated by the Rho family of small GTPases. *Br J Cancer* 80 Suppl 1, 25-27. (souhrnný článek)

Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19, 595-621. (souhrnný článek)

Hayashi, K., Nittono, R., Okamoto, N., Tsuji, S., Hara, Y., Goitsuka, R., and Kitamura, D. (2000). The B cell-restricted adaptor BASH is required for normal development and antigen receptor-mediated activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2755-2760.

Hayashi, K., Yamamoto, M., Nojima, T., Goitsuka, R., and Kitamura, D. (2003). Distinct signaling requirements for Dmu selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression in B cell progenitors. *Immunity* 18, 825-836.

Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004). Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* 16, 1-11. (souhrnný článek)

Howe, A.K. (2001). Cell adhesion regulates the interaction between Nck and p21-activated kinase. *J Biol Chem* 276, 14541-14544.

Chen, M., She, H., Davis, E.M., Spicer, C.M., Kim, L., Ren, R., Le Beau, M.M., and Li, W. (1998). Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity. *J Biol Chem* 273, 25171-25178.

Chen, M., She, H., Kim, A., Woodley, D.T., and Li, W. (2000). Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol Cell Biol* 20, 7867-7880.

Ip, Y.T., and Davis, R.J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-219. (souhrnný článek)

Ishiai, M., Kurosaki, M., Inabe, K., Chan, A.C., Sugamura, K., and Kurosaki, T. (2000). Involvement of LAT, Gads, and Grb2 in compartmentation of SLP-76 to the plasma membrane. *J Exp Med* 192, 847-856.

Johmura, S., Oh-hora, M., Inabe, K., Nishikawa, Y., Hayashi, K., Vigorito, E., Kitamura, D., Turner, M., Shingu, K., Hikida, M., *et al.* (2003). Regulation of Vav localization in membrane rafts by adaptor molecules Grb2 and BLNK. *Immunity* 18, 777-787.

Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., *et al.* (2003). Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 423, 452-456.

Jumaa, H., Wollscheid, B., Mitterer, M., Wienands, J., Reth, M., and Nielsen, P.J. (1999). Abnormal development and function of B lymphocytes in mice deficient for the signaling adaptor protein SLP-65. *Immunity* 11, 547-554.

Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* 8, 2283-2290.

Khan, W.N., Alt, F.W., Gerstein, R.M., Malynn, B.A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., *et al.* (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3, 283-299.

Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247-254. (souhrnný článek)

Khosravi-Far, R., Chrzanowska-Wodnicka, M., Solski, P.A., Eva, A., Burridge, K., and Der, C.J. (1994). Dbl and Vav mediate transformation via mitogen-activated protein kinase pathways that are distinct from those activated by oncogenic Ras. *Mol Cell Biol* 14, 6848-6857.

Kiefer, F., Tibbles, L.A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B.W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J.R., and Iscove, N.N. (1996). HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J* 15, 7013-7025.

Kohler, F., Storch, B., Kulathu, Y., Herzog, S., Kuppig, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2005). A leucine zipper in the N terminus confers membrane association to SLP-65. *Nat Immunol* 6, 204-210.

Koretzky, G.A., Abtahian, F., and Silverman, M.A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6, 67-78. (souhrnný článek)

Krause, M., Sechi, A.S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F.B., and Wehland, J. (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149, 181-194.

Ku, G.M., Yablonski, D., Manser, E., Lim, L., and Weiss, A. (2001). A PAK1-PIX-PKL complex is activated by the T-cell receptor independent of Nck, Slp-76 and LAT. *EMBO J* 20, 457-465.

Kurosaki, T. (2002). Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* 2, 354-363. (souhrnný článek)

Kyriakis, J.M. (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem* 274, 5259-5262. (souhrnný článek)

Ling, P., Meyer, C.F., Redmond, L.P., Shui, J.W., Davis, B., Rich, R.R., Hu, M.C., Wange, R.L., and Tan, T.H. (2001). Involvement of hematopoietic progenitor kinase 1 in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 18908-18914.

- Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H.M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A.C., and Conley, M.E. (1999). An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 286, 1954-1957.
- Mizuno, K., Tagawa, Y., Mitomo, K., Watanabe, N., Katagiri, T., Ogimoto, M., and Yakura, H. (2002). Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 positively regulates B cell receptor-induced apoptosis by modulating association of B cell linker protein with Nck and activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 169, 778-786.
- Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6, 283-294. (souhrnný článek)
- Movilla, N., and Bustelo, X.R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol* 19, 7870-7885.
- Mullins, R.D. (2000). How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol* 12, 91-96. (souhrnný článek)
- Nichols, K.E., Haines, K., Myung, P.S., Newbrough, S., Myers, E., Jumaa, H., Shedlock, D.J., Shen, H., and Koretzky, G.A. (2004). Macrophage activation and Fcγ receptor-mediated signaling do not require expression of the SLP-76 and SLP-65 adaptors. *J Leukoc Biol* 75, 541-552.
- O'Rourke, L.M., Tooze, R., Turner, M., Sandoval, D.M., Carter, R.H., Tybulewicz, V.L., and Fearon, D.T. (1998). CD19 as a membrane-anchored adaptor protein of B lymphocytes: costimulation of lipid and protein kinases by recruitment of Vav. *Immunity* 8, 635-645.
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C., and Lim, L. (1998). PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J* 17, 4328-4339.
- Oehrl, W., Kardinal, C., Ruf, S., Adermann, K., Groffen, J., Feng, G.S., Blenis, J., Tan, T.H., and Feller, S.M. (1998). The germinal center kinase (GCK)-related protein kinases HPK1 and KHS are candidates for highly selective signal transducers of Crk family adapter proteins. *Oncogene* 17, 1893-1901.
- Patel, J.C., Hall, A., and Caron, E. (2002). Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcγR-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* 13, 1215-1226.
- Patterson, H.C., Kraus, M., Kim, Y.M., Ploegh, H., and Rajewsky, K. (2006). The B cell receptor promotes B cell activation and proliferation through a non-ITAM tyrosine in the Igalph cytoplasmic domain. *Immunity* 25, 55-65.
- Raab, M., da Silva, A.J., Findell, P.R., and Rudd, C.E. (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6, 155-164.
- Reynolds, L.F., Smyth, L.A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D., and Tybulewicz, V.L. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-γ1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* 195, 1103-1114.
- Rivero-Lezcano, O.M., Marcilla, A., Sameshima, J.H., and Robbins, K.C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 15, 5725-5731.
- Rock, J., Schneider, E., Grun, J.R., Grutzkau, A., Kuppers, R., Schmitz, J., and Winkels, G. (2007). CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCγ2. *Eur J Immunol* 37, 3564-3575.

Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., and Mayer, B.J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 276, 26448-26452.

Sauer, K., Liou, J., Singh, S.B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R.M. (2001). Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J Biol Chem* 276, 45207-45216.

Shui, J.W., Boomer, J.S., Han, J., Xu, J., Dement, G.A., Zhou, G., and Tan, T.H. (2007). Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol* 8, 84-91.

Schuebel, K.E., Movilla, N., Rosa, J.L., and Bustelo, X.R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J* 17, 6608-6621.

Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., Avots, A., and Serfling, E. (2002). Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood* 100, 954-960.

Snapper, S.B., Rosen, F.S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C.H., Hagemann, T.L., Kwan, S.P., Ferrini, R., Davidson, L., *et al.* (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* 9, 81-91.

Su, T.T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L.A., Kato, R.M., Kang, S., Patrone, L., Wall, R., *et al.* (2002). PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* 3, 780-786.

Su, Y.W., and Jumaa, H. (2003). LAT links the pre-BCR to calcium signaling. *Immunity* 19, 295-305.

Thrasher, A.J. (2002). WASP in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* 2, 635-646. (souhrnný článek)

Tsuji, S., Okamoto, M., Yamada, K., Okamoto, N., Goitsuka, R., Arnold, R., Kiefer, F., and Kitamura, D. (2001). B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J Exp Med* 194, 529-539.

Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L. (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* 7, 451-460.

Tybulewicz, V.L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267-274. (souhrnný článek)

Utting, O., Sedgmen, B.J., Watts, T.H., Shi, X., Rottapel, R., Iulianella, A., Lohnes, D., and Veillette, A. (2004). Immune functions in mice lacking Clnk, an SLP-76-related adaptor expressed in a subset of immune cells. *Mol Cell Biol* 24, 6067-6075.

Valensin, S., Paccani, S.R., Ulivieri, C., Mercati, D., Pacini, S., Patrussi, L., Hirst, T., Lupetti, P., and Baldari, C.T. (2002). F-actin dynamics control segregation of the TCR signaling cascade to clustered lipid rafts. *Eur J Immunol* 32, 435-446.

Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S., and Altman, A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* 155, 331-338.

Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., and Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *J Exp Med* 188, 791-795.

Wollscheid, B., Reth, M., and Wienands, J. (1999). Characterization of the B cell-specific adaptor SLP-65 and other protein tyrosine kinase substrates by two-dimensional gel electrophoresis. *Immunol Lett* 68, 95-99.

Wong, J., Ishiai, M., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (2000). Functional complementation of BLNK by SLP-76 and LAT linker proteins. *J Biol Chem* 275, 33116-33122.

Wu, J.N., and Koretzky, G.A. (2004). The SLP-76 family of adapter proteins. *Semin Immunol* 16, 379-393. (souhrnný článek)

Yablonski, D., Kane, L.P., Qian, D., and Weiss, A. (1998). A Nck-Pak1 signaling module is required for T-cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *EMBO J* 17, 5647-5657.

Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J.K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 171, 1360-1368.

Zhang, R., Alt, F.W., Davidson, L., Orkin, S.H., and Swat, W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* 374, 470-473.

Zhao, Z.S., Manser, E., and Lim, L. (2000a). Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 20, 3906-3917.

Zhao, Z.S., Manser, E., Loo, T.H., and Lim, L. (2000b). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 20, 6354-6363.