

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta



# **Role aktinu a Rho GTPáz v FcεRI signalizaci žírných buněk**

Bakalářská práce

**Michal Šimíček**  
Školitel: RNDr. Petr Dráber, DrSc.

Praha 2008

# Obsah

<b>Abstrakt</b>	<b>2</b>
<b>1. Úvod</b>	<b>4</b>
1.1 Žírné buňky	4
1.2 FcεRI signalizace	5
1.3 Membránové rafty v FcεRI signalizaci	6
1.4 F-aktin v FcεRI signalizaci	8
1.5 Transmembránové adaptorové proteiny v FcεRI signalizaci	10
<b>2. Lyn v proximální fázi FcεRI signalizace</b>	<b>12</b>
<b>3. Regulace Rho GTPáz</b>	<b>14</b>
3.1 Proteiny GEF	15
3.2 Proteiny GAP	18
3.3 Proteiny GDI	19
<b>4. Adaptorové proteiny v regulaci Rho GTPáz při FcεRI signalizaci</b>	<b>20</b>
<b>5. Závěr</b>	<b>24</b>
<b>Seznam zkratk</b>	<b>27</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	<b>29</b>

## Abstrakt

Žírné buňky jsou součástí jak přirozené tak i adaptivní imunity. Podílejí se na široké škále imunitních onemocnění, zahrnujících alergické a zánětlivé reakce. V současné době se ukazují jejich další významné funkce. Doposud nejintenzivněji studovaná povrchová molekula žírných buněk je vysoko-afinitní receptor imunoglobulinu E, FcεRI. Rozeznání vazebných epitopů na multivalentním antigenu pomocí IgE vede k agregaci FcεRI receptorového komplexu a jeho translokaci do oblasti membránových mikrodomén označovaných membránové rafty. Velký význam při transdukci signálu, který ve výsledku vede k výlevu obsahu cytoplasmatických granulí, mají transmembránové adaptorové proteiny. Výsledná intenzita aktivačního signálu je modulována již krátce po agregaci FcεRI a některé výsledky naznačují, že v regulaci časných fází FcεRI signalizace je důležitý kortikální filamentární aktin a Src kinázy Lyn a Fyn. Přestože jsou signální procesy vedoucí od FcεRI studovány již téměř 30 let, přesná role aktinu v těchto dějích nebyla dosud přesně stanovena. Z nedávných prací vyplývá, že aktin tvoří pouze statickou složku ale výrazně přispívá k dynamice signálních komplexů v oblasti plasmatické membrány žírných buněk. Významnými regulátory aktinového cytoskeletu jsou malé GTPázy Rho. Jelikož v důsledku agregace FcεRI dochází též k podstatným morfologickým změnám buněk, je zřejmá účast Rho GTPáz v tomto procesu. Problematika vztahu FcεRI signalizace a cytoskeletu není doposud uspokojivě objasněna. Tato práce si klade za cíl shromáždit současné poznatky o vzájemné kooperaci aktinového cytoskeletu a FcεRI signalizace s důrazem na možnou souvislost s aktivitou Rho GTPáz a ukázat na možné způsoby dalšího výzkumu v této oblasti.

**Klíčová slova:** žírné buňky, FcεRI, aktin, Rho GTPázy, adaptorové proteiny, Lyn kináza

## Abstract

Mast cells are connected with both inner and adaptive part of the immune system. They contribute to a wide spectrum of immune responses including allergic and inflammatory reactions. Some of their additional functions have been described recently. So far, the most intensively studied mast cell plasma membrane molecule is the high-affinity receptor for immunoglobulin E, FcεRI. Recognition of binding epitopes on multivalent antigen by IgE leads to the aggregation of FcεRI complex and its translocation into the area of membrane microdomains called membrane rafts. The transmembrane adaptor proteins are important in signal transduction, which eventually leads to the release of content of cytoplasmic granules. The resulting intensity of activation signal is modulated early after the aggregation of FcεRI and some results indicate that cortical filament actin and Src kinases Lyn and Fyn may be important in the regulation of the early phases of FcεRI signaling. Despite the fact that the signaling processes leading from FcεRI have been studied for almost 30 years, the exact role of actin in these processes is not yet established. Recent works indicate that actin is not only a static component but that it greatly contributes to dynamics of signal complexes in the plasma membrane of mast cells. Small Rho GTPases are important regulators of actin cytoskeleton. Since FcεRI aggregation also leads to significant morphological changes of cells the participation of Rho GTPases is obvious. The relationship between FcεRI signaling and cytoskeleton is still poorly understood. The main aim of this work is to gather recent knowledge on the cooperation between actin cytoskeleton and FcεRI signaling with to emphasize the possible connection with the activity of Rho GTPases and to show some of the possible ways of research in this area.

Key words: mast cells, FcεRI, actin, Rho GTPases, adaptor proteins, Lyn kinase

# 1. Úvod

## 1.1 Žírné buňky

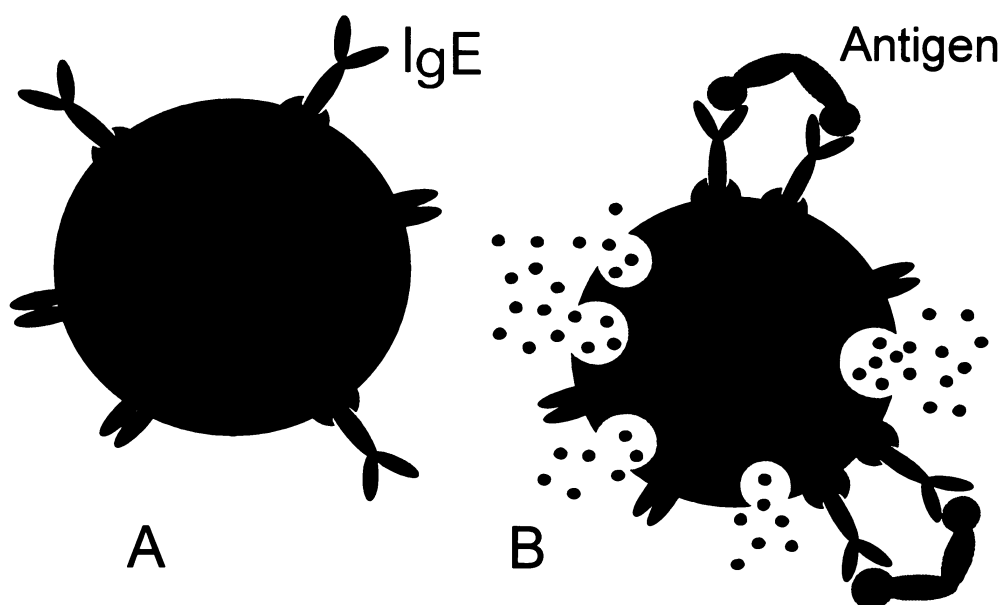
Molekulární mechanismy aktivace žírných buněk jsou považovány za jedno z ústředních témat současného imunologického výzkumu. Nové poznatky ukazují na jejich důležitou úlohu při mnoha onemocněních a v regulaci imunitního systému. V procesech přirozené imunity jsou žírné buňky zapojeny schopností rozeznat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

Rozeznání vazebných epitopů pro IgE na multivalentním antigenu vede k agregaci FcεRI receptorového komplexu a stimulaci signálních kaskád. Ve výsledku pak dochází k masivnímu uvolnění obsahu sekretorických granulí, které představují vazodilatační látky jako jsou histamin a heparin, cytokiny, chemokiny, proteolytické enzymy a deriváty kyseliny arachidonové (Obr.1.).

Za fyziologických podmínek jsou prezentovány antigenně specifické epitopy na povrchu pylových zrn, prachových částic nebo roztočů. Četné alergie a astma jsou způsobeny kombinacemi mediátorů uvolněných ve velkém rozsahu do tkáně žírnými buňkami v reakci na rozpoznání cizorodé látky. Spuštění imunitních pochodů v důsledku nadměrné aktivace žírných buněk zapříčiňuje zdravotní potíže jako jsou mastocytózy nebo autoimunitní a zánětlivá onemocnění.

Z vývojového hlediska se žírné buňky společně s bazofily zdají být významné v obraně proti mnohobuněčným parazitům. Podobně jako bazofily se žírné buňky vyvíjejí z prekurzorových CD34<sup>+</sup> buněk kostní dřeně. Jejich přesný vývoj však nebyl dosud plně objasněn. Na rozdíl od lymfocytů žírné buňky po diferenciaci necirkulují v krvi, ale jsou přítomny v pevné tkáni v blízkosti krevních kapilár a v mukozálních pokryvech epitelů. Jejich největší podíl se nachází v kůži, mukóze plic a trávicího traktu [1;2].

Významné postavení žírných buněk v zánětlivých a alergických onemocněních vyžaduje detailní pochopení mechanismů jejich aktivace. Jak uvolnění obsahu granulí, tak lokalizace uvnitř tkáňových struktur souvisí s přestavbu cytoskeletu a zvláště aktinu. Důležitými hráči v regulace aktinu jsou malé GTPázy rodiny Rho. S ohledem na dosud málo studovanou problematiku Rho GTPáz v FcεRI signalizaci tato práce analyzuje současné poznatky o jejich úloze v rámci regulace časných fází aktivace žírných buněk.



Obrázek 1. Aktivace žírných buněk: (A) Klidová buňka s IgE vázným na FcεRI. (B) Stimulace degranulace po agregaci FcεRI multivalentním antigenem

## 1.2 FcεRI signalizace

Díky svému zapojení v aktivaci degranulace byla nejintenzivněji studovaná povrchová struktura žírných buněk receptor FcεRI, který se sestává z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a homodimeru  $\gamma$ . Transmembránový  $\alpha$  řetězec váže IgE. Řetězec  $\beta$  patří do skupiny tetraspaninových transmembránových molekul a funguje jako amplifikační modul receptoru. Homodimery  $\gamma$  řetězců jsou spojeny disulfidickými můstky a spolu s  $\beta$  řetězcem obsahují několik imunoreceptorových tyrosin aktivačních motivů (ITAM), které jsou nezbytné pro transdukcí signálu uvnitř buňky. Po vazbě multivalentního antigenu na IgE-FcεRI komplexy dochází k agregaci FcεRI a vytvoření podmínek pro fosforylaci tyrosinů ITAM motivů  $\beta$  a  $\gamma$  řetězců receptoru. Kinázy rodiny Src jsou regulovány fosforylací specifických tyrosinů C-terminální Src kinázou (Csk), která je do blízkosti membrány atrahována mimo jiné adaptorovým proteinem PAG (Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains). Po agregaci FcεRI na plasmatické membráně žírných buněk je fosforylován transmembránový adaptor PAG a dochází ke zvýšenému přesunu cytoplasmatické Csk kinázy do oblasti membránových signálních komplexů. Vzniká tak negativní zpětná vazba regulující aktivitu Src kinázy Lyn.

Fosforylované ITAM motivy řetězců FcεRI komplexu představují vazebné místo pro další proteiny signální kaskády. K membráně a do oblasti signálního komplexu se přesouvají kinázy Syk a Fyn aktivující fosfatidylinositol-3 kinázu (PI3K), jejíž produkt fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát [PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>] se stává jedním z asociačních partnerů pro

proteiny s PH (plecstrin homologní) doménou. Kromě toho obě kinázy fosforylují specifické tyrosiny transmembránových adaptorových proteinů LAT (Linker for activation of T cells) a NTAL (Non-T cells activation linker). Ty slouží jako interakční platforma pro solubilní cytosolické adaptory a proteiny s enzymatickou aktivitou [1;2].

### 1.3 Membránové rafty v FcεRI signalizaci

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

Na základě konference „Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function 2006“ jsou membránové rafty definovány jako malé (10-200 nm), heterogenní, vysoce dynamické, steroly a sfingolipidy obohacené membránové domény, které napomáhají kompartmentalizaci buněčných procesů. Malé rafty mohou být za určitých podmínek stabilizovány formováním rozsáhlejších útvarů prostřednictvím protein-protein a protein-lipidových interakcí. Mezi molekuly, které jsou přítomné v membránových raftech patří glykosylfosfatidylinositol (GPI)-zakotvené proteiny, které jsou lipidickou částí vnořeny do vnější vrstvy plasmatické membrány. Naproti tomu palmitoylované a acylované cytoplasmatické proteiny zasahují pouze do vnitřní vrstvy membrány [3].

Velký přínos k pochopení uspořádání molekul v plasmatické membráně přinesly metody elektronové mikroskopie. Techniky tzv. strhávání membrán umožnily provedení topografických studií řady membránových proteinů, včetně strukturně blízkých transmembránových adaptorových proteinů LAT a NTAL na modelu žírných buněk. Práce vedly k odhalení kompartmentalizace obou molekul do různých membránových mikrodomén. Na povrchu intaktních buněk přitom nebyla pozorována kolokalizace GPI-vázaných proteinů s adaptorem LAT nebo FcεRI komplexem [4]. Výrazná změna v topografii signálních molekul nastala po agregaci FcεRI stimulované vazbou antigenu na IgE, kdy se vzájemně seskupují mikrodomény s proteiny LAT nebo NTAL a dochází k formování primárních a sekundárních signálních membránových domén. Primární domény, které jsou lokalizovány uvnitř nově utvořených lamelárních vychlípenin plasmatické membrány, obsahují agregovaný FcεRI receptorový komplex, kinázu Syk a PLCγ2 (phospholipase Cγ2). Naproti tomu sekundární domény se nacházejí ve vnější oblasti membránových lamel a jsou

charakteristické přítomností adaptoru LAT a PLC $\gamma$ 1 (phospholipase C $\gamma$ 1). Protein Vav, který reguluje GTPázovou aktivitu, se preferenčně vyskytuje v primárních doménách [5]. Aktinová filamenta mohou též napomáhat v udržování membránových signálních domén v distinktních pozicích [6;7]. Výsledky experimentů používajících neiontová detergens naznačily, že všechny proteiny asociované s plasmatickou membránou se nacházejí v oblastech, které mohou souviset s membránovými rafty nebo s neraftovými doménami. Za využití látek, způsobujících depolymerizaci F-aktinu (filamentárního aktinu) jako je latrunculin nebo cytochalasin, došlo k výraznému snížení hustoty proteinů lokalizovaných v raftech. Ovšem raftové a neraftové oblasti zůstaly v distinktních pozicích a nadále obsahovaly asociovaný aktin. Autoři zdůvodňují toto zjištění přítomností malého množství krátkých aktinových filament nebo monomerní formy G-aktinu. Zjištění, že formace oblastí membrán bohatých na cholesterol alespoň z části závisí na přítomnosti kortikálního F-aktinu, podporuje možnost přímého spojení aktinového cytoskeletu s proteiny membránových raftů [6].

Na rozdíl od kortikálního F-aktinu potencionální membránové rafty mohou hrát zásadní roli v pozitivní Fc $\epsilon$ RI signalizaci. Jedním z hlavních dějů v aktivaci žírných buněk prostřednictvím agregovaného Fc $\epsilon$ RI je fosforylace proteinů signálních kaskád. Většina membránového cholesterolu kolokalizuje s raftovými a neraftovými regiony bohatými na proteiny. Snížení koncentrace buněčného cholesterolu pomocí methyl- $\beta$ -cyklodextrinu a tím předpokladané narušení lipidových raftů vedlo k výraznému snížení fosforylace Fc $\epsilon$ RI po antigenní stimulaci žírných buněk [8]. Tento nálezný koreluje se skutečností, že v klidových žírných buňkách se Fc $\epsilon$ RI nachází vně a po agregaci se pravděpodobně přesouvá do oblasti membránových raftů, čímž může být indukována jeho proximita se signálními molekulami, které mohou být v raftech kontinuálně přítomny. Významný doklad o přímém propojení transmembránových proteinů předpokladaně lokalizovaných v membránových raftech s aktinovým cytoskeletem přinesla práce Brdičková et. al. [9]. Na základě hledání specifických interakčních partnerů transmembránového adaptoru PAG byl identifikován cytosolický adaptorový protein EBP50 (ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein of 50 kDa). Prostřednictvím své C-terminální domény může EBP50 interagovat s proteiny rodiny ERM (erzin/radixin/moesin), které jsou schopny přímé asociace s aktinovým cytoskeletem. V transdukci signálu po agregaci Fc $\epsilon$ RI komplexu je tedy pravděpodobná vzájemná kooperace kortikálního aktinu s proteiny membránových raftů. Zároveň je pravděpodobné, že také signální komplexy tvořené okolo jiných transmembránových adaptorů po agregaci Fc $\epsilon$ RI budou hrát významnou roli v regulaci časoprostorové dynamiky polymerace aktinu. Detaily



tohoto procesu, stejně jako vlastnosti a vůbec existence membránových raftů zůstávají záhadou.

## 1.4 F-aktin v FcεRI signalizaci

Jak již bylo zmíněno, v regulaci FcεRI signalizace hraje významnou roli kortikální aktin. Způsob jakým aktin ovlivňuje signální děje na plasmatické membráně však není zdaleká objasněn. Významnou roli v transdukcii signálu mají transmembránové adaptorové proteiny. Doposud byly navrženy dva základní mechanismy, kterými jsou stabilizovány proteiny signálních komplexů v diskretních membránových kompartmentech. Jeden z nich představují výše definované membránové rafty. Druhý mechanismus je založen na udržování transmembránových proteinů v distinktní vzdálenosti prostřednictvím malých cytoskeletárních proteinů asociovaných se submembránovým F-aktinem [7;9;10].

Kromě stérického působení může F-aktin přímo [11] nebo prostřednictvím aktin vazebných proteinů [12] přivádět signální molekuly z cytosolu do blízkosti plasmatické membrány. Příkladem může být Btk kináza, která představuje významnou komponentu FcεRI signalizace. Btk náleží do rodiny Tec kináz, které se vyznačují přítomností PH domény v blízkosti N-konce proteinu. U této kinázy byla jako první popsána in vitro interakce PH domény s F-aktinem. S tímto pozorování korelují data získaná in vivo, kdy po agregaci FcεRI byla frakce Btk kináz translokována do submembránové oblasti, kde kolokalizovala s aktinovými vlákny.

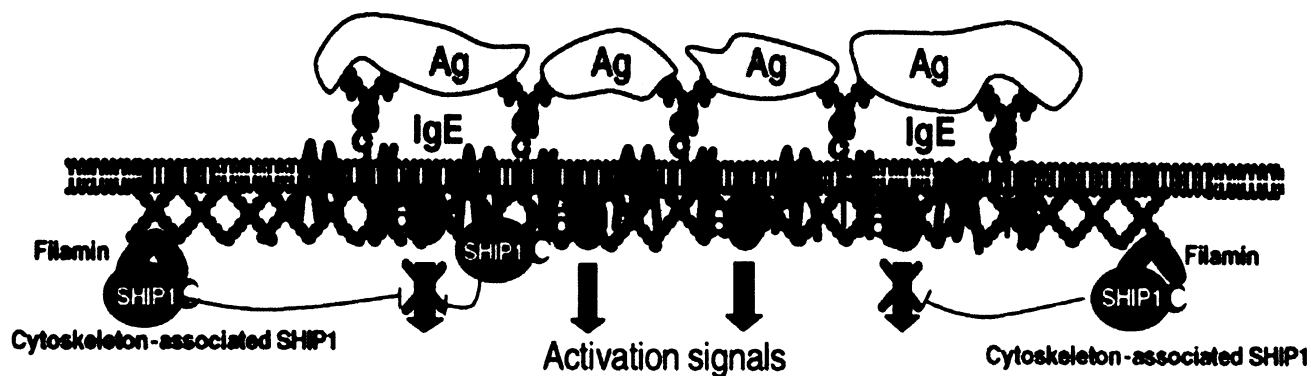
V regulaci polymerace aktinu hrají významnou roli GTPázy z rodiny Rho. Většina proteinů zapojených v regulaci Rho GTPáz obsahuje jednu nebo dvě PH domény, u kterých se ukazuje na možnost interakce s F-aktinem. Atrakce regulačních proteinů RhoGTPáz skrze aktinová filamenta ukazuje na vzájemnou komunikaci mezi cytoskeletárními strukturami a proteiny, které modulují jejich formaci a integritu [11].

Mnohé studie ustanovily kortikální F-aktin jako negativní regulátor FcεRI signalizace. Dynamická rovnováha mezi monomerní a filamentární formou aktinu je udržována pomocí aktin vazebných proteinů, které stabilizují rostoucí konce aktinových vláken, umožňují větvení a prokřížení filament nebo naopak vyvazují monomery aktinu. Při studiu funkcí aktinu jsou často využívány látky ovlivňující jeho polymeraci. Mezi nejpoužívanější patří dvě látky s odlišnými účinky. Jednou z nich je latrunculin, pocházející z červených mořských hub (*Negombata magnifica*), který vyvazuje monomery aktinu v poměru 1:1 a posouvá tak rovnováhu ve směru depolymerizace filament. Další látku představují houbové mykotoxiny, cytochalasiny, schopné vázat se na konce aktinových vláken, čímž zajišťují naopak jejich stabilizaci. Mechanismus působení latrunculinu nemá přímý vliv na uvolnění monomerních

jednotek z vláken, která jsou udržována jinými cytoskeletárními proteiny [6;7;13].

Kortikální aktin představuje hustou síť vzájemně propojených vláken a lze jej rozlišit od zbylého buněčného aktinu při izolaci v neiontových detergentech. Síťovitá forma se přitom nachází v Triton X-100 nerozpustné frakci, zatímco volná filamenta se v tomto detergentu rozpouští. Proto byl překvapivý výsledek, kdy inkubace žírných buněk s latrunculinem výrazně snížila množství aktinu v nerozpustné frakci [13]. Zmíněné pozorování může být dáno užitím vysoké koncentrace latrunculinu nebo výraznější dynamikou obměny monomerů v aktinových filamentech u immortalizované buněčné linie RBL (rat basophilic leukemia). Latrunculin i cytochalasin zapříčiňují zvýšenou fosforylaci FcεRI receptorového komplexu a Syk kinázy v návaznosti na agregaci FcεRI, z čehož je zřejmé negativní působení F-aktinu na časné děje FcεRI signalizace [6;7;13;14]. Cytochalasin navíc zesiluje míru degranulace žírných buněk indukovanou ionoforem A23187. Latrunculin měl podobný účinek pouze v případě vyšších koncentrací ionoforu [13]. Tyto výsledky naznačují na úlohu aktinu též v pozdních dějích FcεRI signalizace, neboť ionofor A23187 obchází proximální signální děje vedoucí od FcεRI. Možná úloha kortikálního aktinu ve finální fázi degranulace by mohla spočívat v tvorbě stérické bariéry pro ideální fúzi granulí s plasmatickou membránou. Inhibice polymerizace aktinu u žírných buněk vedla ke zvýšení nejen konstitutivní, ale i stimulací indukované asociace adaptorové molekuly Gab2 (Grb2 associated binder 2) s velkými signálními komplexy, ve kterých byly přidruženy PI3K a SHP-2 (Src homology 2 domain-containing phosphotyrosine phosphatase). Zvýšení aktivity PI3K, ke které došlo po přidání latrunculinu, dosahovalo téměř úrovně detekovatelné při agregaci FcεRI [7]. Aktivní působení na lokalizaci a vzájemné interakce membránových a cytoplasmatických proteinů může být příčinou negativní role F-aktinu v FcεRI signalizaci. V rámci žírných buněk byla popsána asociace fosfatázy SHIP1 (Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase) s aktin-vazebným proteinem filamin-1 (Obr.2.) [15]. SHIP1 defosforyluje PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, produkt PI3K, který vytváří na plasmatické membráně vazebné místo pro proteiny s PH doménou. Jelikož efektorové proteiny podílející se na FcεRI signalizaci často nesou PH doménu, která přispívá k jejich asociaci se submembránovými signálními komplexy nebo je nezbytná pro plnou aktivaci katalytických funkcí proteinů, bude mít přítomnost SHIP1 v blízkosti plasmatické membrány negativní vliv na transdukci signálu do buňky. Fosfatáza SHIP1 zřejmě stojí rovněž za negativní regulací při koagregaci FcεRI a inhibičního receptoru pro imunoglobulin G (IgG) FcγRIIB [15]. Bylo doloženo, že pouhá vazba IgE na FcεRI vede k nárůstu množství F-aktinu [16]. Utvoření signálního komplexu v reakci na agregaci FcεRI má na polymeraci aktinu v žírných buňkách výrazně pozitivní vliv [7;14;17].

výrazně pozitivní vliv [7;14;17]. Stabilizace aktinových struktur cytochalasinem zároveň se stimulací žírných buněk skrze FcεRI vedla k vyšší tvorbě inositol-3,4,5-trifosfátu (IP<sub>3</sub>), který otevírá IP<sub>3</sub> senzitivní Ca<sup>2+</sup> kanály v endoplasmatickém retikulu, a s tím související vyšší mobilizaci Ca<sup>2+</sup> [7;13]. Kortikální F-aktin tak přispívá k správné prostorové distribuci a ovlivňuje funkční vlastnosti signálních molekul. Membránové rafty a síť kortikálního F-aktinu v souhrnu vzájemně dynamicky kooperují při prostorové lokalizaci membránových signálních komplexů.



Obrázek 2. Možná role aktinu v negativní regulaci FcεRI signalizace. Aktin vazebný protein filamin asociuje s fosfatázou SHIP1, která defosforyluje produkty aktivních kináz. Ag – antigen

(Gilfillan A.M., Tkaczyk Ch. (2006))

## 1.5 Transmembránové adaptorové proteiny v FcεRI signalizaci

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

Kruciální úlohu v proximálních dějích FcεRI signalizace vedoucí k sekreční odpovědi žírných buněk mají transmembránové adaptory LAT a NTAL. Přítomnost palmitoylačního motivu v juxtamembránové sekvenci vede k lokalizaci těchto molekul do hypotetických membránových raftů. Oba adaptory vykazují buněčně specifickou expresi v rámci lymfoidní a

myeloidní linie. Zatímco T-lymfocyty vlastní výhradně LAT, B-lymfocyty v závislosti na vývojovém stádiu exprimují pouze NTAL. Na plasmatické membráně žírných buněk jsou oba adaptory přítomny kontinuálně [18].

Fosforylace specifických tyrosinových motivů adaptorů LAT a NTAL po agregaci FcεRI je zprostředkována kinázami Syk a Fyn. Modifikované tyrosiny pak slouží jako interakční platforma pro další solubilní cytosolické adaptory anebo pro proteiny s enzymatickou aktivitou. Adaptor LAT obsahuje vazbené místo pro PLCγ, která v membráně štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>] za vzniku dvou tzv. druhých posílů, diacylglycerolu (DAG) a IP<sub>3</sub>. Výsledkem je spuštění vápníkové kaskády spolu s aktivací protein kinázy C. Mezi proteiny signálního komplexu v blízkosti adaptoru LAT patří též Grb2 (Growth factor receptor binder 2), který směřuje signál k MAP-kinázovým drahám. Klíčovým proteinem s vazbou na LAT a schopností atrahovat mnoho dalších proteinů je SLP76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD). Jedním z jeho interakčních partnerů je GEF (guanidine nucleotide exchange factor) protein Vav katalyzující aktivaci malých GTPáz rodiny Rho, které patří mezi hlavní regulátory aktinového cytoskeletu [1;2;18].

Úloha adaptoru NTAL v FcεRI signalizaci je oproti funkci proteinu LAT méně známa. Cytosolická doména tohoto proteinu obsahuje specifické tyrosinové motivy, které v důsledku fosforylace zprostředkovávají asociaci s proteiny Grb2, Gab2 a E3 ubiquitin ligázou c-Cbl. Oproti adaptoru LAT však NTAL postrádá vazebná místa pro PLCγ a nebyla doložena přímá ani nepřímá interakce s proteinem SLP76 [18].

Shodné časoprostorové zapojení a společné ligandy adaptorů LAT a NTAL v FcεRI signalizaci naznačují na úlohu proteinu NTAL zejména jako kompetičního partnera pro adaptor LAT. Z výsledků současných studií se ovšem zdá, že v jiných drahách nabývají oba proteiny rozdílnou úlohu. Příkladem může být dimerizace c-Kit receptoru pro růstový faktor SCF (stem cell factor), kdy je NTAL významně fosforylován, přičemž LAT zůstává bez modifikací na aktivačních tyrosinech [19]. Adaptory LAT a NTAL tedy modulují signál vedoucí od FcεRI k aktivaci širokého spektra distálních kaskád.

Jelikož nebyla dosud popsána ani přímá ani nepřímá interakce adaptoru NTAL s proteiny regulujícími cytoskelet, byly překvapivým zjištěním rozdíly v morfologii pozorované po agregaci FcεRI u žírných buněk, kde byl NTAL geneticky deletován nebo naopak jeho exprese byla výrazně zvýšena [17]. Zmíněná práce tak naznačuje na dosud neznámou úlohu adaptoru NTAL v regulaci aktinového cytoskeletu.

## 2. Lyn v proximální fázi FcεRI signalizace

Stimulace degranulace žírných buněk je zahájena vazbou multivalentního antigenu na IgE-FcεRI komplex a následnou agregací FcεRI. Na plasmatické membráně klidových žírných buněk má FcεRI uniformní distribuci. Po jeho agregaci dochází k rychlé ale přechodné translokaci do oblasti membránových domén s výraznou přítomností Lyn kinázy. V klidových buňkách permanentně, s nízkou afinitou, asociuje Lyn s určitou frakcí FcεRI [20].

Kináza Lyn, stejně jako další Src kinázy, obsahuje SH2 (Src homologní 2), SH3 (Src homologní 3), dále kinázovou doménu a autoinhibiční C-terminální tyrosin. Funkčně je analogická Lck kináze zapojené v T-receptorové signalizaci T-lymfocytů. V návaznosti na agregaci FcεRI receptoru dochází k vzájemné transfosforylaci aktivačních tyrosinů Lyn kináz, které dále fosforylují ITAM motivy  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek FcεRI komplexu. V důsledku fosforylace se pak výrazně zvyšuje afinita receptoru pro kinázu Lyn a zároveň dochází k atrakci dalších molekul, mezi které náleží Syk kináza vážící se na fosforylované ITAM motivy  $\gamma$  podjednotky FcεRI. Způsob jakým dochází k asociaci Lyn kinázy s agregovaným FcεRI komplexem není dosud přesně znám. Ukazuje se, že pro fyzickou a funkční interakci Lyn kinázy s FcεRI je nezbytně nutná myristoylace a inkorporace do cytoplasmatické membrány. Pro fyzickou interakci s FcεRI je dále potřebná palmitoylace Lyn kinázy, která vede k její lokalizaci do hypotetických membránových raftů. Tato lokalizace však není nezbytná pro samotnou fosforylaci FcεRI [20].

V proximálních dějích FcεRI signalizace je integrován transmembránový adaptorový protein PAG. Ve spojitosti s agregací FcεRI je zvýšena fosforylace autoinhibičního C-terminálního tyrosinu Lyn kinázy, což koreluje se stoupající fosforylací adaptoru PAG, díky čemuž je Csk kináza atrahována do oblasti membránových raftů. Zdá se, že celková úroveň aktivní kinázy Lyn v žírných buňkách není tímto výrazně ovlivněna. Lokálně může dokonce docházet k udržování vyšší hladiny aktivní Lyn kinázy vzájemnou transfosforylací aktivační smyčky, přičemž vyšší aktivita Csk se zdá významná v bilanci jak proximálních tak distálních signálních dějů vedoucích od FcεRI. Inhibice polymerace aktinu vedla k umocnění fosforylace adaptoru PAG po agregaci FcεRI a s tím související vyšší asociací Csk [14]. Proto se zdá nepravděpodobné, že v přítomnosti latrunculinu a cytochalasinu dochází k nižší inaktivaci kinázy Lyn v důsledku fosforylace C-terminálního konce kinázou Csk.

Inkubace buněk s latrunculinem nebo cytochalasinem snižuje antigenem indukovanou polymeraci aktinu a vede k vyšší degranulaci [7;13;4;16]. Obě látky působí odlišným mechanismem (viz výše) a není přesně známo jak ovlivňují strukturu pre-existujících

aktinových filament. Proto nelze rozhodnout, zda za zvýšenou fosforylací FcεRI stojí narušení vláken nebo zabrána polymerace aktinu. Na modelu CHO (Chinese hamster ovary fibroblasts) buněk, do kterých byly tranfekovány molekuly FcεRI subjednotek spolu s kinázou Lyn, bylo potvrzeno, že přinejmenším nemožnost aktinu polymerovat má vliv na fosforylaci FcεRI β a γ subjednotek. Transfekované buňky vykazovaly konstitutivně vyšší míru fosforylace FcεRI, přičemž rozrušení aktinu neovlivnilo úroveň fosforylace po stimulaci antigenem. Zároveň u transfekovaných buněk neměla agregace FcεRI vliv na množství F-aktinu. Naopak v případě kontrolní RBL linie docházelo ke stimulaci polymerace aktinu [14]. Z těchto výsledků je zřejmé, že nárůst F-aktinu v návaznosti na agregaci FcεRI přispívá k negativní regulaci časných signálních dějů v aktivaci žírných buněk.

Zajímavé bylo pozorování, kdy redistribuce agregovaných receptorů z oblastí potencionálních membránových raftů vede k jejich zvýšené defosfosforylaci pomocí fosfatáz. Redistribuce aktinu v důsledku stimulace jeho polymerace může tedy vést k translokaci FcεRI komplexu z míst, kde je zabráněno jeho defosforylaci [6].

Další z možných hypotéz vysvětlujících zvýšenou fosforylací FcεRI po inkubaci buněk s latrunculinem může být udržování lokálně vyšší hladiny aktivní kinázy Lyn. Po agregaci FcεRI je fosforylován cytoskeletární protein paxillin, který je akumulován v oblasti fokálních adhezí. V důsledku inkubace buněk s latrunculinem dochází k výrazné redistribuci a asociaci paxillinu s velkými makromolekulárními komplexy [7]. Lze spekulovat, zda přes svou SH2 doménu se může paxillin vázat na fosforylovaný C-terminální tyrosin kinázy Lyn. Nastíněná interakce by tím zabraňovala asociaci fosforylovaného autoinhibičního tyrosinu s vnitřní SH2 doménou kinázy, čímž by ji udržovala přechodně v aktivní formě. Detailní pochopení mechanismů, kterými jsou regulovány časné děje FcεRI signalizace vyžaduje další studie s využitím fluorescenčně značených proteinů a vysoce citlivých mikroskopických metod jako je TIRF (total internal reflection fluorescence microscopy).

Klíčovými hráči na poli regulace polymerizace aktinu jsou malé GTPázy rodiny Rho. Jelikož pro inhibiční účinek aktinu v rámci FcεRI signalizace je nezbytná jeho následná polymerizace, je pravděpodobné, že regulace Rho GTPáz bude přímo nebo nepřímo souviset s průběhem proximálních kaskád vedoucích od FcεRI.

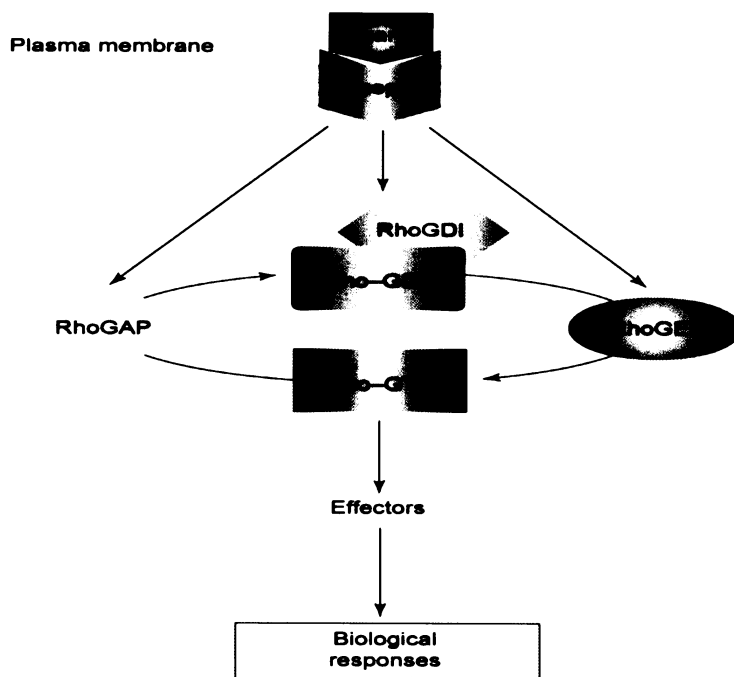
### 3. Regulace Rho GTPáz

Jelikož existuje velmi málo poznatků o regulaci aktivity RhoGTPáz u žírných buněk, budou zde nastíněny zejména obecné mechanizmy zjištěné u jiných buněčných typů s důrazem na jejich možné uplatnění v FcεRI signalizaci.

Vzhledem k výraznému působení na široké spektrum buněčných funkcí je nezbytná jemná regulace RhoGTPáz, která se odehrává na více úrovních. Řízen je přechod mezi aktivní a inaktivní formou, specificky je řízena jejich subcelulární lokalizace, případně exprese. Regulaci též zajišťují mechanizmy jako je fosforylace, ubiquitinilace, štěpení kaspásami nebo endocytóza v kaveolosomech [21]. K plné aktivaci RhoGTPáz je mimo vazby GTP (guanosintrifosfát) do vazebné domény pro nukleotidy většinou vyžadována také asociace s buněčnými membránami. Pro naplnění tohoto požadavku je nutná kooperace více signálů. Krucální je ustavení posttranslační modifikace C-konce RhoGTPáz v oblasti CAAX boxu izoprenylovou skupinou. Na cysteinový zbytek se v endoplasmatickém retikulu váže geranyl-geranyl nebo farnesylová skupina. Tento mechanismus stojí rovněž za diferenční lokalizací RhoGTPáz do různých membránových struktur v buňce. Příkladem regulace na této úrovni může být protein RhoB. S geranyl-geranyl modifikací preferenčně asociuje s membránami endoplasmatického retikula. Pokud ovšem nese farnesylový zbytek, je translokován na plasmatickou membránu. Další oblast zodpovědná za přesnou lokalizaci u membrány je polybazičká sekvence aminokyselin blízko CAAX boxu. V případě proteinů z podrodiny Rac jsou jen malé rozdíly v této oblasti zodpovědné za odlišné umístění izoform Rac1, která sídlí v hypotetických membránových raftech, a Rac2, nacházející se spíše na povrchu endozómů. Mimo strukturálních motivů jsou nutné další signály k navedení RhoGTPáz z cytosolu na membránu. Významnou roli na tomto poli hrají proteiny ze skupiny RhoGDI (guanidine nucleotide-dissociation inhibitor) [22].

Fosforylace specifických aminokyselinových zbytků RhoGTPáz ovlivňuje interakce s GDI, stabilitu proteinu v membráně nebo efektorové funkce. Některé RhoGTPázy jsou kontrolovány řízenou degradací na specifických místech v buňce. Například RhoA může být odstraňováno po ubiquitinilaci ligázou Smurf1 [23]. Aktivní RhoGTPázy obsahují v nukleotid vazebné doméně GTP, zatímco neaktivní GDP. Přechod mezi oběma funkčními konformacemi je umožněn vnitřní hydrolytickou aktivitou GTPáz. V buňce je ovšem rychlost výměnné reakce relativně nízká a GTPázy by samy o sobě nebyly schopny reflektovat požadavky, které vyžadují okamžité změny v buněčném chování. Aktivace a inaktivace RhoGTPáz je indukována řadou povrchových receptorů zahrnujících receptory pro cytokiny, receptory s vnitřní kinázovou aktivitou, integriny a receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs - G-protein coupled receptors). Přes signály vedoucí od povrchových receptorů je přímá

aktivace Rho zprostředkována proteiny GEF. Naopak proteiny GAP (GTPase-activating protein) zvyšují hydrolytickou aktivitu GTPáz a vedou tak k jejich inaktivaci. Mezi další regulační proteiny přímo modulující funkci GTPáz patří GDI, které asociují se switch regionem a C-koncovou izoprenylovou modifikací RhoGTPáz, čímž je vyvazují do cytosolu a udržují je v inaktivním stavu (Obr.3.) [21;24].



*Obrázek 3. Schéma regulace aktivity RhoGTPáz v reakci na receptorovou stimulaci. Aktivní RhoGTPázy obsahují v nukleotid vazebné doméně GTP, zatímco neaktivní GDP. Mimo vnitřní hydrolytickou aktivitou GTPáz je přechod mezi oběma funkčními konformacemi zajištěn dalšími regulační proteiny. GEF směřuje GTPázy do aktivní formy, zatímco GAP podporuje hydrolýzu GTP a tím deaktivaci GTPáz. Proteiny ze skupiny GDI různými mechanismy stabilizují GTPázy v inaktivní formě.*

*(Moon S. Y., Zheng Y. (2003))*

### 3.1 Proteiny GEF

Vysoká koncentrace volného  $Mg^{2+}$  v cytosolu brání spontánní výměně GDP za GTP a tím aktivaci RhoGTPáz. Konverze mezi inaktivním a aktivním stavem proto vyžaduje pomocné GEF proteiny, které katalyzují výměnou reakci GDP za GTP. První savčí RhoGEF byl identifikován jako transformující gen v difuzních B-lymfocytech a označen Dbl. Tento protein obsahuje oblast homologní s částí proteinu Cdc24 ze *Saccharomyces cerevisiae*. Homologní region s 200 aminokyselinami vytváří Dbl homologní (DH) doménu. Všechny Dbl příbuzné proteiny nesou též PH doménu. Důležitá je jejich vzájemná pozice, kdy DH



doména leží směrem k N-konci vůči PH doméně. Asociace DH domény Dbl proteinu s RhoGTPázou prodlužuje dobu existence intermediátu, který neváže ani nukleotid ani  $Mg^{2+}$  sloužící jako kofaktor. V buňkách je obecně vyšší koncentrace GTP oproti GDP, což umožňuje preferenční vazbu GTP do volné nukleotid vazebné domény GTPázy. PH doména má schopnost asociace s  $PtdIns(3,4,5)P_3$ , který je produktem PI3K. Aktivní PI3K tak přivádí Dbl proteiny na membránu. S nízkou afinitou a specifitou je PH doména Dbl proteinů schopna asociovat též s jinými fosfolipidy [24]. Vazba ovšem nebývá dostačující ke konstitutivní lokalizaci proteinu u membrány. Zdá se tedy pravděpodobné, že na přítomnosti GEF v blízkosti membrány se podílí mimo PH také jiné domény. Příkladem může být protein Vav, ve vysoké míře exprimovaný u žírných buněk, obsahující SH2 a SH3 domény, které zajišťují vazbu k fosforylovaným substrátům nebo adaptorovým proteinům s oblastmi bohatými na prolin [25]. Dbl příbuzné proteiny představují největší rodinu RhoGEF (přímých aktivátorů RhoGTPáz) u člověka. Dosud bylo nalezeno 69 Dbl homologů s různou specifitou vůči konkrétním formám RhoGTPáz [24].

Kromě Dbl rodiny se vyskytují též GEF proteiny, které neobsahují DH a PH doménu a jejich primární struktura se výrazně odlišuje od zástupců rodiny Dbl. Řazeny jsou zde proteiny příbuzné Dock1 (označován též jako Dock180) s konzervovanými doménami DHR1 a DHR2 [Dock(dedicator of cytokinesis) homology region 1 a 2]. Tyto motivy obsahují části ARM a C2 domény, která je v některých případech schopna vázat  $Ca^{2+}$  nebo interagovat s proteiny obsahujícími lipidickou modifikaci [24]. SWAP70 je Dbl nepříbuzným GEF proteinem, přestože obsahuje DH i PH doménu. Vzájemná pozice těchto domén je ovšem odlišná od zástupců Dbl rodiny, což vede k rozdílnému funkčnímu zapojení. Exprese SWAP70 byla dosud dokumentována pouze u B-lymfocytů a žírných buněk, kde specificky aktivuje GTPázu Rac. Pozorovaná závislost SWAP70 na aktivitě PI3K je dána zřejmě přítomností PH domény ve struktuře tohoto proteinu. Současně se ukazuje na možnou existenci pozitivní zpětné vazby mezi PI3K a SWAP70, neboť SWAP70 sám o sobě podporuje tvorbu  $PtdIns(3,4,5)P_3$ . Podobně jako Rac se SWAP70 nachází v membránových strukturách označovaných jako lamelipodia. [24,26]. Význam SWAP70 v FcεRI signalizaci byl doložen v experimentech s žírnými buňkami, které po delecii proteinu SWAP70 vykazovaly sníženou degranulaci v reakci na stimulaci prostřednictvím FcεRI. Zároveň byla u těchto mutantů redukována fosforylace adaptoru LAT a aktivace kaskád zahrnujících protein kinázu Akt a protein p38 [26].

Ze skupiny proteinů příbuzných Dbl byl na modelu žírných buněk doposud nejintenzivněji studován Vav [2;27]. Byly popsány tři izoformy Vav1, Vav2 a Vav3. Přičemž Vav1 je exprimován výhradně v buňkách hematopoetické linie, zatímco Vav2 a Vav3 nejsou

specifické pro určitý typ buněk. Protein Vav obsahuje množství domén, díky kterým je integrován v různých signálních drahách. Mezi nejdůležitější patří DH doména s katalytickou GEF aktivitou, která stimuluje výměnu GDP za GTP v nukleotid vazebné doméně GTPáz Rho a Rac. Stimulace aktivity proteinu Cdc42, dalšího významného zástupce rodiny RhoGTPáz, nebyla v případě proteinu Vav zjištěna. Vav obsahuje rovněž PH doménu, calponin homologní (CH) doménu a prolin bohatou oblast, která může asociovat s SH3 doménami jiných proteinů. Na C-konci proteinu Vav se nachází kombinace dvou SH3 domén sousedících s SH2 doménou, což je strukturní motiv vyskytující se u adaptorového proteinu Grb2 [25]. Díky této komplexní struktuře může Vav sloužit nejen jako funkční GEF ale též jako adaptor.

Regulace aktivity proteinu Vav je zajištěna fosforylací, která stimuluje jeho aktivitu. Mimo fosforylaci je důležitá pro jeho katalytickou funkci vedoucí k aktivaci RhoGTPáz také lokalizace v submembránové oblasti [24]. V žírných buňkách se po agregaci FcεRI stává Vav součástí makromolekulárního signálního komplexu formovaného v okolí transmembránového adaptorového proteinu LAT. Zde Vav asociuje s fosforylovanými tyrosiny na N-konci proteinu SLP-76 a je následně fosforylován kinázou Syk [1;2;27]. Vav byl ustanoven jako jeden z proteinů, který v žírných buňkách po agregaci FcεRI interaguje s adaptorovým proteinem Grb2. Zároveň byla doložena asociace proteinu Vav s  $\gamma$  řetězcem FcεRI receptorového komplexu a konstitutivní spojení s komponenty MAPK drah [27].

Významnou molekulou v regulaci aktivity proteinu Vav se zdá být též E3 ubiquitin ligáza c-Cbl. Kromě její hlavní funkce, tj. značení proteinů určených k degradaci, slouží c-Cbl rovněž jako adaptorový protein vážící PI3K a zároveň Vav. Vazba proteinu Vav na c-Cbl umožňuje pravděpodobně regulaci jeho aktivity indukcí proximity s PI3K a současně možností fosforylace kinázami asociovanými s c-Cbl. Tento předpoklad podporuje zjištění, že delece c-Cbl vede ke snížení fosforylace Vav-1. Naopak zvýšení exprese c-Cbl do oblasti hypotetických membránových raftů potlačovalo fosforylaci proteinu Vav-1 [28]. Dráha vycházející od FcεRI receptoru směřuje ke zvýšení aktivity PI3K, což může podporovat vyvazování proteinu Vav skrze svou PH doménu na plasmatickou membránu. Ovšem inhibice PI3K pomocí inhibitorů wortmannin a LY294002 neměla vliv na fosforylaci proteinu Vav ani na aktivitu GTPázy Rac u žírných buněk [29]. Naproti tomu studie provedené na transformovaných fibroblastech ustanovily aktivitu PI3K nezbytnou pro aktivaci GTPázy Rac, přičemž se zdá nutná přítomnost proteinu c-Cbl. Rovněž byla potvrzena přímá interakce s lipidovými produkty PI3K dráhy a proteinu Rac1 [28]. Zmíněné experimenty tak naznačují na významné zapojení adaptoru SLP76 v atrakci proteinu Vav do oblasti membránových signálních komplexů v žírných buňkách. Naproti tomu v případě

fibroblastů, které neexprimují protein SLP76, je aktivace proteinu Vav plně závislá na aktivitě PI3K.

Vav-1 deficientní žírné buňky vykazovaly sníženou degranulaci a produkci cytokinů, přestože fosforylace tyrosinů FcεRI receptorového komplexu, kinázy Syk a adaptoru LAT zůstala nezměněna. Naopak aktivace PI3K a fosforylace PLCγ1 a PLCγ2 byla v nepřítomnosti proteinu Vav výrazně snížena, což vedlo k inhibici mobilizace Ca<sup>2+</sup> skrze IP<sub>3</sub> kaskádu [30]. Vav se tedy zdá být nezbytný pro aktivaci PLCγ1 a PLCγ2 v rámci FcεRI signalizace.

Hlavní katalytická aktivita proteinu Vav směřuje k stimulaci GTPáz Rho a Rac, které kontrolují cytoskeletární změny zejména skrze aktivaci fosfatidylinositol-4-fosfát kinázy fosforylující fosfatidylinositol-4-fosfát za vzniku fosfatidylinositol-4,5-bifosfátu. Ten následně slouží jako substrát PLC a aktivátor talinu a vinkulinu, proteinů které napomáhají v asociaci aktinového cytoskeletu s plasmatickou membránou [27].

### 3.2 Proteiny GAP

RhoGAP zastupují hlavní třídu proteinů negativně regulujících RhoGTPázy stimulací jejich vnitřní GTPázové aktivity. Rodina RhoGAP je definována přítomností konzervované RhoGAP domény v primární sekvenci, která obsahuje okolo 150 aminokyselin s minimálně 20 % homologií uvnitř proteinové rodiny [31]. RhoGAP doména je odlišná od GAP modulů, které jsou zodpovědné za regulaci jiných tříd GTPáz (RasGAP, ArfGAP, RanGAP). Z výsledků strukturních studií je ale zřejmé, že výsledné konformační uspořádání GAP domény u RhoGAP je velmi blízké motivům vyskytujících se u GAP domén s odlišnou primární sekvencí aminokyselin. RhoGAP doména interaguje se switch regionem I a II a P-smyčkou, kterou představuje GTP vazebná oblast RhoGTPáz. Mutagenezní studie ovšem doložily význam dalších zbytků nacházejících se vně těchto domén v přímé interakci Rho a RhoGAP.

Současná data dostupná z analýzy lidského genomu naznačují na existenci zhruba 80 RhoGAP, zatímco RhoGTPáz je u člověka známo pouze 22. Nadbytek RhoGAP ukazuje na jejich možné specializované role v regulaci aktivity jednotlivých RhoGTPáz a vliv na jejich specifické funkce. Aktivita RhoGAP tak musí být důkladně řízena v časových a prostorových souvislostech v buňce, aby nedocházelo k nadměrnému snížení aktivity Rho.

Spektrum specifity RhoGAP vůči RhoGTPázám v případě in vitro systémů je velmi široké a v buňkách může být ještě zvýšeno. Díky multidoménové struktuře vytváří RhoGAP interakční platformu, na které může mnoho nezávislých signálních drah konvergovat interakcí s regulačními motivy a přispívat tak k jemnému řízení aktivity RhoGAP. V rámci jednoho proteinu byl dokumentován současný výskyt RhoGAP domény společně s RhoGEF, ArfGAP

nebo SH2, SH3, PH a doménami. Vazba nekatalytických motivů RhoGAP se specifickými lipidy s definovaným okolím naznačuje na zapojení membránových struktur v lokalizaci ale i v regulaci biochemické aktivity RhoGAP. Zajímavá je přítomnost RhoGAP domény v proteinu p85, regulační podjednotce PI3K, který je tak schopen interagovat s proteiny Rac1 a Cdc42, ovšem bez detekovatelné GAP aktivity. Navíc se ukázalo, že tato interakce stimuluje aktivitu PI3K in vitro. RhoGAP doména v tomto případě zřejmě slouží spíše jako efektor než jako negativní regulátor [31].

### 3.3 Proteiny GDI

Mimo proteiny ze skupin GAP a GEF je známa další úroveň, na které mohou být GTPázy regulovány. Zatím pouze pro rodiny Rho a RabGTPáz byly nalezeny proteiny označené GDI. U člověka byly dosud identifikovány tři RhoGDI: obecně exprimovaná GDI1 (RhoGDI, GDI $\alpha$ ), hematopoeticky specifická GDI2 (Ly/D4GDI, GDI $\beta$ ) a GDI3 (GDI $\gamma$ ). Nejen GDI1 ale i GDI2 se vyskytují volně v cytosolu a tvoří komplexy v poměru 1:1 s RhoGTPázami. GDI3 je asociována s vezikulárními membránami a vyznačuje se úzkou specifitou vůči izoformám RhoB a RhoG. Byly popsány tři odlišné biochemické aktivity RhoGDI, které ovlivňují aktivitu RhoGTPáz.

Nejnámější je inhibice disociace GDP, což udržuje GTPázu v inaktivním stavu a zároveň brání výměně reakci katalyzované GEF proteiny. GDI mohou ovšem interagovat s aktivní, tedy GTP vážící, formou RhoGTPáz a blokovat jak její vnitřní hydrolytickou aktivitu tak proteiny GAP katalyzované rozštěpení GTP. Zároveň asociace GDI stéricky znemožňuje působení Rho na efekторы. Třetí významnou aktivitou je modulace cyklizace RhoGTPáz mezi cytosolem a membránami. GDI udržuje RhoGTPázy ve formě solubilních cytosolických proteinů formováním vysokoafinitních komplexů, ve kterých GDI zakrývá C-koncovou izoprenylovou modifikaci GTPáz. Tento mechanismus vytváří zdroj inaktivních GTPáz, které mohou být v odpovědi na stimul rychle mobilizovány.

Bylo doloženo, že po uvolnění z GDI dochází k inzerci některých RhoGTPáz do membrány, kde jsou následně aktivovány GEF proteiny. Po inaktivaci, tedy hydrolýze GTP na GDP, dochází k zpětnému vyvázání do cytosolu. Afinity RhoGTPáz pro GDI je srovnatelná nebo vyšší než vůči GEF a efektorům. Výsledný komplex se tak zdá být biologicky dosti inertní. Studie kvantifikující množství GDI u různých typů buněk prokázaly, že molární množství GDI je rovno kvantu RhoGTPáz.

Regulace cyklizace mezi volnou a GDI vázanou formou RhoGTPáz není přesně známa. Bylo nastíněno několik možných mechanismů. Určitou roli v uvolnění Rho z GDI budou hrát proteiny souhrně označované jako GDF (GDI displacement factor), mezi které

patří malé cytoskeletární proteiny z rodiny ERM nebo tyrosin kináza Etk. Zdá se, že jako GDF působí též některé biologicky významné lipidy.

Důležitým regulačním elementem při asociaci Rho a GDI může být fosforylace. V některých případech vede fosforylace GDI ke zvýšení afinity vůči RhoGTPázám, v jiných naopak stimuluje jejich uvolnění. Potřeba fosforylace specifických tyrosinů RhoGDI k zvýšení nebo snížení afinity vůči RhoGTPázám nabízí možnost jemné regulace kinázami různých signálních drah. Fosforylace polybazické sekvence v blízkosti C-konce RhoGTPáz směřuje ve většině případů ke stimulaci tvorby komplexu Rho-RhoGDI a může tak sloužit jako další terminační signál mimo proteiny GAP. Dobře je popsána modifikace RhoA fosforylací protein kinasou A, což brání asociaci RhoA s membránou, zvyšuje její afinitu k RhoGDI a chrání před degradací. V případě některých GTPáz z rodiny Rho byla zjištěna nízká nebo žádná afinita vůči GDI [16].

#### **4. Adaptorové proteiny v regulaci RhoGTPáz při FcεRI signalizaci**

Po agregaci FcεRI dochází u žírných buněk k významným morfologickým změnám, které jsou doprovázeny reorganizací aktinového cytoskeletu [14;17]. V transdukci signálu z FcεRI receptorového komplexu mají klíčovou úlohu transmembránové adaptorové proteiny LAT a NTAL. Zapojení těchto molekul v signálních drahách vedoucích od FcεRI k regulaci RhoGTPáz, modulátorů polymerace aktinu, není dosud plně známo. Pro studium funkce obou adaptorových proteinů byly zkonstruovány mutantní knock out kmeny myší, které postrádají gen kódující tyto proteiny a byly provedeny studie fenotypu těchto mutantů [32;33]. Zároveň jsou známy efekty delece tyrosinů v aktivačních motivech proteinů LAT i NTAL na stimulaci žírných buněk po agregaci FcεRI [34;35]. V tomto ohledu však dosud schází detailní morfologické studie spolu s detekcí vlivu delece adaptoru na organizaci aktinu ve stimulovaných žírných buňkách.

V důsledku fosforylace tyrosinových motivů Syk kinázou vytváří adaptor LAT vazebná místa pro různé cytosolické adaptorové proteiny. Jedním z nich je protein Gads (Grb2-related adaptor protein), který asociuje prostřednictvím své SH3 domény s proteinem SLP76. V utvořeném signálním komplexu jsou následně fosforylovány tři N-koncové tyrosiny SLP76 kinázou Syk. Struktura SLP76 navíc obsahuje prolin bohatou oblast a C-koncovou SH2 doménu a nabízí tak několik interakčních motivů pro další proteiny. Fosforylované tyrosiny na pozicích 112 a 128 v blízkosti N-konce SLP76 byly ustanoveny jako vazebné místo proteinu Vav, důležitého regulátoru malých GTPáz Rho a Rac [36].

Kromě proteinu Vav asociuje s oběma tyrosiny rovněž protein Nck (Non-catalytic region of tyrosine kinase), známý svou významnou úlohou v regulaci aktinového cytoskeletu (Obr. 4.). Z výsledků experimentů získaných na SLP76 deficientních žírných buňkách se zdá, že v nepřítomnosti SLP76 je FcεRI signalizace alespoň z části zachována [2]. Zbylé funkce nezávislé na SLP76 budou zřejmě důsledkem potenciace alternativní Fyn-Gab2-PI3K dráhy vedoucí od FcεRI nebo zapojením jiných, dosud nepopsaných, signálních molekul.

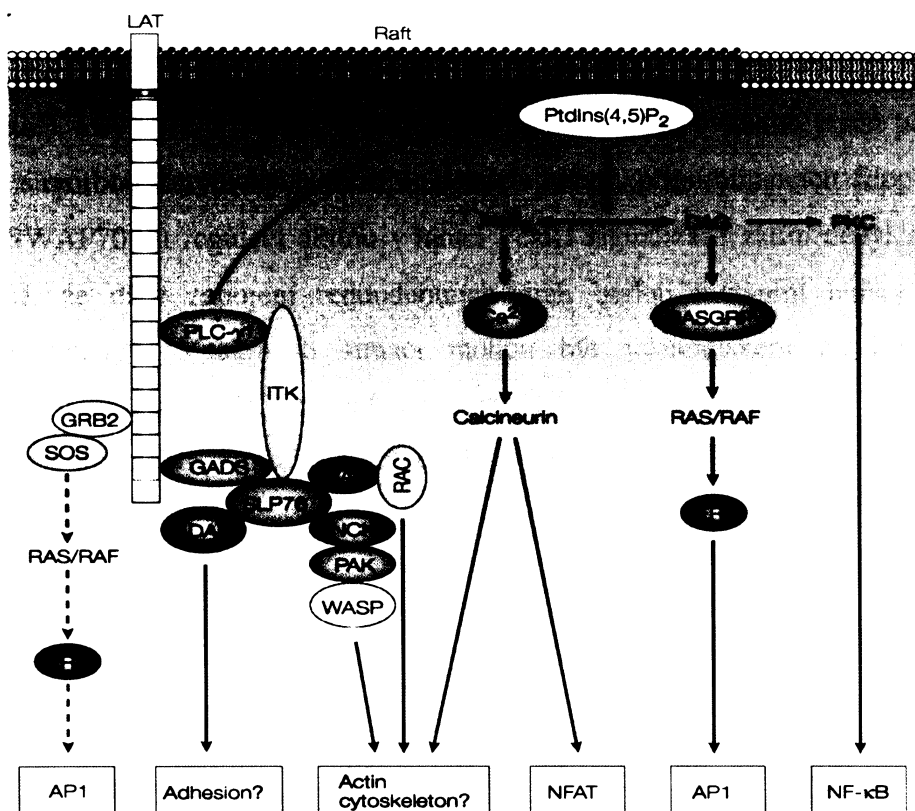
Oproti adaptoru LAT vlastní NTAL aminokyselinovou sekvenci, s kterou je schopen asociovat protein Gab2. Tato skutečnost podtrhuje význam proteinu NTAL v potencionální signalizaci k cytoskeletu. Adaptor Gab2 totiž, podobně jako SLP76, vyvazuje protein Vav a směřuje tak signál k aktivaci RhoGTPáz Rho a Rac. Výsledky experimentů s Gab2 deficientními žírnými buňkami ukázaly na signifikantně nižší hladinu aktivního RhoA krátce po agregaci FcεRI, zatímco úroveň GTPázy Rac zůstala nezměněna [37].

První přímé poznatky o možné úloze adaptoru NTAL v regulaci aktinu přinesla studie, kdy indukované změny v expresi tohoto proteinu měly za důsledek výrazné změny v buněčné morfologii [17]. Buňky, u kterých bylo množství adaptoru NTAL redukováno pomocí metody siRNA, udržovaly v klidovém stavu více filamentárního aktinu. Naopak zvýšená exprese proteinu NTAL neměla vliv na množství F-aktinu v klidovém stavu, avšak po aktivaci skrze FcεRI byla polymerace aktinu oproti neovlivněným buňkám významně redukována. Rovněž omezení exprese adaptoru NTAL prostřednictvím siRNA vedlo k částečné inhibici polymerace aktinu indukované agregací FcεRI. Ovšem v tomto případě polymerace vycházela z konstitutivně vyšší hladiny F-aktinu a pozorovaný defekt v polymeraci může být způsoben vyčerpáním zdrojů aktinového monomeru nebo dřívějším dosažením limitní hranice disociační konstanty F-aktinu.

Přestože význam aktinu v regulaci degranulace žírných buněk byl doložen již dříve [6;7;13;14;16], úloha proteinu NTAL při stimulaci pomocí FcεRI byla popsána relativně nedávno a přesná role tohoto adaptoru v řízení degranulace zůstává dosud rozporuplná. Protichůdné výsledky byly získány při studiu NTAL knock out myší ve srovnání s experimenty provedenými na lidských žírných buňkách a linii RBL, kde byla exprese adaptoru NTAL redukována metodou siRNA [17;19;32;33]. Zajímavá tedy bude studie srovnávající obě metody, jak knock out tak siRNA, na jednom buněčném typu. Zároveň je potřeba vyhodnotit u již existujících NTAL a LAT knock out mutantů buněčnou morfologii po stimulaci agregací FcεRI.

Současné poznatky naznačují na dvě možné dráhy vedoucí k regulaci aktinového cytoskeletu po agregaci FcεRI v závislosti na transmembránových adaptorech LAT a NTAL.

První cestou, může být aktivace GEF proteinu Vav v rámci signálního komplexu uvořené okolo SLP76, který je asociován skrze protein Gads s adaptorem LAT. Druhá potenciální dráha zahrnuje adaptory NTAL a Gab2, rovněž s možnou modulací aktivity proteinu Vav. Rozlišení obou cest se děje zřejmě již v rané fázi FcεRI signalizace, neboť fosforylace SLP76 je závislá na kináze Syk, naproti tomu Gab2 asociuje s NTAL po fosforylaci kinázou Fyn [2;28]. Lepší pochopení propojení obou drah by mohly přinést mutanty postrádající jak SLP76 tak Fyn kinázu.



Obrázek 4. Signální komplex v okolí transmembránového adaptoru LAT: Aktivace kináz po agregaci FcεRI vyúsťuje ve fosforylaci vazebných míst pro PLCγ1, Grb2 a Gads, na adaptoru LAT. Aktivní PLCγ1 štěpí PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> na IP<sub>3</sub> a DAG, čímž stimuluje vápníkovou signalizaci, protein kinázu C a podobně jako Grb2 dráhy vedoucí k transkripčním faktorům. Adaptor Gads navádí k membráně protein SLP76, kolem kterého se formuje komplex zahrnující proteiny signalizující k cytoskeletu. Transmembránový adaptor LAT tak představuje interakční platformu pro proteiny zahrnuté v transdukci signálu ovlivňující širokou paletu buněčných funkcí.

ADAP - adhesion and degranulation promoting adapter protein, WASP - Wiskott-Aldrich syndrome protein

(Hořejší (2004))

Dalším eventuálním kandidátem přispívajícím k regulaci aktinového cytoskeletu se zdá být SWAP70, který je ve velké míře exprimován v žírných buňkách. Pro aktivaci SWAP70 je nezbytná přítomnost PH domény ve vnitřní struktuře proteinu, která zajišťuje vazbu na produkty enzymatické činnosti PI3K. Zároveň aktivní SWAP70 podporuje tvorbu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, což naznačuje na možnou pozitivní zpětnou vazbu směrem k PI3K. SWAP70 obsahuje rovněž DH doménu, pomocí které interaguje s RhoGTPázou Rac [25]. Žírné buňky s deficiencí v proteinu SWAP70 vykazovaly sníženou schopnost degranulace v závislosti na agregaci FcεRI [27]. Ovlivnění aktinu skrze SWAP70 bylo doloženo při aktivaci žírných buněk indukovanou dimerizací c-Kit receptoru pro růstový faktor kmenových buněk (SCF - stem cell factor), kdy byla u SWAP70 knock out mutantů pozorována zvýšená polymerace aktinu spolu s tvorbou netypických morfologických útvarů připomínajících filopodia [38]. Vliv delece SWAP70 na regulaci aktinu v rámci FcεRI signalizace zatím nebyl popsán. Je ovšem možné, že díky zapojení redundantních drah budou mutantní buňky postrádat detekovatelný fenotyp. V takovéto situaci mohou být východiskem metody sledující vzájemné protein-protein interakce, buďto na umělých konstruktech (dvoj- a trojhybridní kvasinkové systémy) nebo přímo v živých buňkách pomocí FRET (fluorescence resonance emission transfer).



## 5. Závěr

Žírné buňky mají nezastupitelnou roli v imunitním systému. V reakci na vnější stimul jsou schopny uvolnit obsah cytoplasmatických granulí a stimulovat tak sled dalších imunologicky a fyziologicky významných dějů. Nejvíce studovaným receptorem v aktivaci žírných buněk je FcεRI. Přestože signální kaskády vedoucí od antigen-IgE-FcεRI komplexu jsou již dlouhou dobu intenzivně studovány, stále zůstávají některé nezodpovězené otázky, zejména pak zapojení cytoskeletárních struktur v regulačních procesech.

V řízení FcεRI signalizace má velký význam kortikální F-aktin. Studie využívající latrunculin a cytochalasin, inhibitory polymerace aktinu, odálily jeho negativní působení na časné fáze signalizace po agregaci FcεRI komplexu [6;7;13]. Dosud však není zcela jasná příčina tohoto fenoménu. Bez vysvětlení zůstávají též pozorování, kdy narušení struktury aktinových filament vedlo ke zvýšení fosforylace receptorových podjednotek, vyúsťující v degranulaci [13;14].

Jelikož kináza Lyn se přímo účastní primární fáze fosforylace FcεRI, zdálo se pravděpodobné její zapojení v tomto procesu. Později se ovšem ukázalo, že vyšší fosforylaci receptoru nedoprovází změna v asociaci Lyn s FcεRI ani rozdíly v její katalytické aktivitě [7;14]. Snížení účinku fosfatáz rovněž nebylo prokázáno. Komplexnost regulačních mechanismů FcεRI signalizace dále podtrhuje zvýšená aktivita Csk kinázy, negativního regulátoru Src kináz, překvapivě korelující s vyšší fosforylací FcεRI a Syk [14].

Skrze potencionální stabilizaci aktivní konformace Src kináz mohou být v udržování lokálně vyšší aktivity kinázy Lyn přímo nebo nepřímo zapojeny též malé cytoskeletární proteiny z rodiny ERM [7]. Tato možnost ovšem byla pouze nepřímo nastíněna a její ověření si vyžaduje další studie. V řešení tohoto problému by bylo výhodné využít fluorescenčně značených proteinů a vysoce citlivých mikroskopických metod jako je TIRF.

Pro negativní působení F-aktinu na degranulaci žírných buněk se zdá být nezbytná jeho schopnost polymerace v návaznosti na agregaci FcεRI [14]. Skrze aktin vazebné proteiny se zdají být některé transmembránové proteiny propojeny s cytoskeletárními strukturami [9;10]. Po agregaci FcεRI receptorového komplexu navíc dochází k změnám ve struktuře kortikálního aktinu a tvorbě membránových signálních domén s definovaným proteinovým složením [5]. Nabízí se tedy model, kdy redistribuce aktinových filament vede k diferencní translokaci signálních domén, což směřuje ve výsledku k potlačení signálu generovaného FcεRI komplexem. Tuto hypotézu potvrzuje pozorování, kdy přesun FcεRI z těchto domén vedl k vyšší citlivosti vůči účinkům fosfatáz [6].

Mimo své regulační funkce se aktin zároveň stává jedním z efektorů signálů vedoucích od FcεRI receptorového komplexu a kromě stimulace degranulace vede agregace FcεRI také ke značným změnám v morfologii žírných buněk [17]. Přesto zůstává dosud velmi sporé pochopení mechanismů FcεRI signalizace k aktinovému cytoskeletu.

K hlavním regulátorům aktinového cytoskeletu patří zástupci rodiny malých GTPáz Rho [21]. Změny v množství polymerního aktinu a jeho distribuci po agregaci FcεRI tak budou pravděpodobně souviset s ovlivněním aktivity Rho GTPáz. V současnosti není známa přesná dráha vedoucí od FcεRI k GTPázám Rho. S ohledem na regulaci jejich aktivace byl na modelu žírných buněk doposud nejintenzivněji studován protein Vav, který katalyzuje výměnou reakci GDP za GTP v nukleotid vazebné doméně GTPáz Rho a Rac, čímž stimuluje jejich aktivaci [2;27].

Ve studiu zapojení proteinu Vav v FcεRI signalizaci by mohly být užitečným nástrojem toxiny bakterií rodu *Clostridium*, které inhibují aktivitu Rho GTPáz [21]. Mechanizmy jejich působení a specifita vůči zástupcům rodiny Rho je ovšem různá, a proto je důležité dbát na volbu vhodných inhibitorů.

V poslední době se ukazuje důležitá úloha transmembránových adaptorových proteinů LAT a NTAL v FcεRI signalizaci žírných buněk [18;32;33;34]. Stále však není zcela jasné zastoupení konkrétních proteinů v signálních komplexech, které jsou v důsledku fosforylace vytvářeny v okolí obou adaptorů. Jedním z dosud známých proteinů, važících se skrze fosforylovaný adaptor SLP76 na LAT, je právě Vav. V rámci komplexu okolo proteinu NTAL se nabízí potencionální interakce proteinu Vav s adaptorem Gab2 [2;27]. Fosforylace SLP76 je zprostředkována Syk kinázou, naproti tomu asociace Gab2 s NTAL vyžaduje aktivní Fyn kinázu. Rozlišení významu jednotlivých drah by mohly poskytnout mutanty defektní v expresi SLP76 a Fyn kinázy zároveň.

Adaptor NTAL kompetuje s adaptorem LAT o určitou frakci vazebných substrátů, čímž přispívá k negativní regulaci FcεRI signalizace. Proto buněčný fenotyp zjištěný ve studiích, kde byl NTAL deletován nebo byla snížena jeho exprese, lze přisoudit potenciaci fosforylace specifických tyrosinů adaptoru LAT a zvýšené asociaci proteinů signálního komplexu, který se v jeho okolí následně vytváří [32;33].

Je velmi pravděpodobné, že mnohé proteiny zahrnuté v těchto komplexech asociují nepřímo, prostřednictvím dalších adaptorů, případně dochází ke kooperativním interakcím. Z toho důvodu může být problematická vzájemná izolace všech proteinů signálního komplexu standardní imunoprecipací. Pro detekci asociace dalších proteinů v signálních komplexech by v tomto případě bylo vhodné připravit konstrukty, které by obsahovaly specifické domény

proteinů, potenciálně přítomných v komplexech, a sledovat jejich koprecipitaci s adaptorovými proteiny LAT a NTAL. Případně lze využít metod sledujících vzájemné protein-protein interakce in vitro modelováním (dvoj- a trojhybridní systémy) nebo vytvořením značených proteinů in vivo a detekcí FRET.

## Seznam zkratek

ADAP - adhesion and degranulation promoting adapter protein

Btk - Burtonova kináza

CH – calponin homologní

CHO - Chinese hamster ovary fibroblasts

Csk – C-terminální Src kináza

DAG – diacylglycerol

DH – Dbl homologní

DHR1 – Dock(dedicator of cytokinesis) homology region 1

DHR2 - Dock(dedicator of cytokinesis) homology region 2

EBP50 - ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein of 50 kDa

ERM - ezrin/radixin/moesin

F-aktin - filamentární aktin

FcεRI – vysoko-afinitní receptor pro IgE

FcγRIIB – inhibiční receptor pro IgG

FRET - fluorescence resonance emission transfer

Gab2 - Grb2 associated binder 2

Gads - Grb2-related adaptor protein

GAP - GTPase-activating protein

GDI - guanidine nucleotide-dissociation inhibitor

GDP – guanosindifosfát

GDF - GDI displacement factor

GEF - guanine nucleotide exchange factors

GPI – glykosylfosfatidylinositol

GPCRs - G-protein coupled receptors

Grb2 - Growth factor receptor binder 2

GTP – guanosintrifosfát

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IP<sub>3</sub> - inositol-3,4,5-trifosfát

ITAM – imunoreceptorový tyrosin aktivační motiv

LAT - Linker for activation of T cells

Nck - Non-catalytic region of tyrosine kinase

NTAL - Non-T cells activation linker

PAG - Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains

PdtIns(3,4,5)P<sub>3</sub> - fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát

PdtIns(4,5)P<sub>2</sub> - fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

PH – plecstrin homologní

PI3K – fosfatidylinositol-3 kináza

PLCγ1 - phospholipase Cγ1

PLCγ2 -phospholipase Cγ2

SCF – stem cell factor

SH2 – Src homologní 2

SH3 – Src homologní 3

SHIP1 - Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase

SHP-2 - Src homology 2 domain-containing phosphotyrosine phosphatase

SLP76 - SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kD

TIRF - total internal reflection fluorescence microscopy

TLR – Toll like receptor

WASP - Wiskott-Aldrich syndrome protein

## Seznam použité literatury

1. M. Daëron, R. Lesourne. Negative signaling in Fc receptor complexes. *Adv Immunol*, 2006; **89**: 39-86.
2. A. M. Gilfillan, Ch. Tkaczyk. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, 2006; **6**: 218-230.
3. L. J. Pike. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res*, 2006; **47**: 1597-1598.
4. P. Lebduška, J. Korb, M. Tůmová, P. Heneberg, P. Dráber. Topography of signaling molecules as detected by electron microscopy on plasma membrane sheets isolated from non-adherent mast cells. *J Immunol Methods*, 2007; **328**: 139-151.
5. B. S. Wilson, J. R. Pfeiffer, Z. Surviladze, E. A. Gaudet, J. M. Oliver. High resolution mapping of mast cell membranes reveals primary and secondary domains of FcεRI and LAT. *J Cell Biol*, 2006; **154**: 645-658.
6. D. Holowka, E. D. Sheets, B. Baird. Interactions between FcεRI and lipid rafts are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 2000; **113**: 1009-1019.
7. H. Tolarová, L. Dráberová, P. Heneberg, P. Dráber. Involvement of filamentous actin in setting the threshold for degranulation in mast cells. *Eur J Immunol*, 2004; **34**: 1627-1636.
8. B. F. Lillemeier, J. R. Pfeiffer, Z. Surviladze, B. S. Wilson, M. M. Davis. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; **103**: 18992-18997.
9. N. Brdičková, T. Brdička, L. Anděra, J. Špička, P. Angelisová, S. L. Milgramb, V. Horější. Interaction between two adapter proteins, PAG and EBP50: a possible link between membrane rafts and actin cytoskeleton. *FEBS Letters*, 2001; **107**: 133-136.

10. E. J. Luna, A. L. Hitt. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*, 1992; **258**: 955-964.
11. L. Yao, P. Janmey, L. G. Frigeri, W. Han, J. Fujitai, Y. Kawakami, J. R. Apgar, T. Kawakami. Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin. *J Biol Chem*, 1999; **274**: 19752–19761.
12. T. P Stossel, J. Condeelis, L. Cooley, J., A. Noegel, M. Schleicher, S. S. Shapiro. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; **2**: 138-145.
13. L. Frigeri, J. R. Apgar. The Role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol*, 1999; **162**: 2243-2250.
14. Ch. Torigoe, J. Song, B. G. Barisas, H. Metzger. The influence of actin microfilaments on signalling by the receptor with high-affinity for IgE. *Eur J Immunol*, 2004; **41**: 817-829.
15. R. Lesourne, W. H. Fridman, M. Daëron. Dynamic interactions of FcγReceptorIIB with filamin-bound SHIP1 amplify filamentous actin-dependent negative regulation of FcεReceptor I signaling. *J Immunol*, 2005; **174**: 1365-1373.
16. T. Oka, K. Sato, M. Hori, H. Ozaki, H. Karaki. FcεRI cross-linking-induced actin assembly mediates calcium signalling in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol*, 2002; **136**: 837-846.
17. L. Dráberová, G. M. Shaik, P. Volná, P. Heneberg, M. Tůmová, P. Lebduška, J. Korb, P. Dráber. Regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mast cells by tyrosine-phosphorylated and unphosphorylated non-T cell activation linker. *J Immunol*, 2007; **179**: 5169 –5180.
18. V. Hořejší, W. Zhang, B. Schraven. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004; **4**: 603-616.
19. Ch. Tkaczyk, V. Horejsi, S. Iwaki, P. Draber, L. E. Samelson, A. B. Satterthwaite, D. Nahm, D. D. Metcalfe, A. M. Gilfillan. NTAL phosphorylation is a pivotal link

- between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and FcεRI aggregation. *Blood*, 2004; **104**: 207-214.
20. P. Tolar, L. Dráberová, H. Tolarová, P. Dráber. Positive and negative regulation of Fcε receptor I-mediated signaling events by Lyn kinase C-terminal tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol*, 2004; **34**: 1136–1145.
21. S. Etienne-Manneville, A. Hall. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002; **420**: 629-635.
22. C. DerMardirossian, G. M. Bokoch. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 2005; **15**: 356-363.
23. X. R. Bustelo, V. Sauzeau, I. M. Berenjano. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays*, 2007; **29**: 356-370.
24. K. L. Rossman, Ch. J. Der, J. Sondek. GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005; **6**: 167-180.
25. I. Hornstein, A. Alcover, S. Katzav. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal*, 2004; **16**: 1-11.
26. R. R. Sivalenka, M. Sinha, R. Jessberger. SWAP-70 regulates mast cell FcεRI-mediated signaling and anaphylaxis. *Eur J Immunol*, 2008; **38**: 841-854.
27. J. S. Song, J. Gomez, L. F. Stancato, J. Rivera. Association of a p95 Vav-containing signaling complex with the FcεRI γ chain in the RBL-2H3 mast cell line. Evidence for a constitutive in vivo association of Vav with Grb2, Raf-1, and ERK2 in an active complex. *J Biol Chem*, 1996; **271**: 26962–26970.
28. G. Swaminathan, A.Y. Tsygankov. Cbl Family Proteins: Ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol*, 2006; **209**: 21-43.
29. X. Qu, K. Sada, S. Kyo, K. Maeno, S. M. S. Miah, H. Yamamura. Negative regulation of



- FcεRI-mediated mast cell activation by a ubiquitin ligase Cbl-b. *Blood*, 2004; **103**: 1779-1786.
30. T. S. Manetz, C. Gonzalez-Espinosa, R. Arudchandran, S. Xirasagar, V. Tybulewicz, J. Rivera. Vav1 regulates phospholipase C $\gamma$  activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol*, 2001; **21**, 3763–3774.
31. S. Y. Moon, Y. Zheng. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, 2003; **13**: 13-22.
32. P. Volná, P. Lebduška, L. Dráberová, S. Simova, P. Heneberg, M. Boubelik, V. Bugajev, B. Malissen, B. S. Wilson, V. Hořejší, M. Malissen, P. Dráber. Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *J Exp Med*, 2004; **200**: 1001-1013.
33. M. Zhu, Y. Liu, S. Koonpaew, O. Granillo, W. Zhang. Positive and negative regulation of FcεRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL. *J Exp Med*, 2004; **200**: 991-1000.
34. O. Malbec, M. Malissen, I. Isnardi, R. Lesourne, A. Mura, W. H. Fridman, B. Malissen, M. Daéron. Linker for Activation of T cells integrates positive and negative signaling in mast cells. *J Immunol*, 2004; **173**: 5086-5094.
35. S. Iwaki, J. Spicka, Ch. Tkaczyk, B. M. Jensen, Y. Furumoto, N. Charles, M. Kovarova, J. Rivera, V. Horejsi, D. D. Metcalfe, A. M. Gilfillan. Kit- and FcεRI-induced differential phosphorylation of the transmembrane adaptor molecule NTAL/LAB/LAT2 allows flexibility in its scaffolding function in mast cells. *Cell Signal*, 2008; **20**:195-205.
36. A. Kettner, V. Pivniouk, L. Kumar, H. Falet, J. Lee, R. Mulligan, R. S. Geha. Structural requirements of SLP-76 in signaling via the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI) in mast cells. *Mol Cell Biol*, 2003; **23**: 2395-2406.
37. K. Nishida, S. Yamasaki, Y. Ito, K. Kabu, K. Hattori, T. Tezuka, H. Nishizumi, D. Kitamura, R. Goitsuka, R.S. Geha, T. Yamamoto, T. Yagi, T. Hirano. FcεRI-mediated

mast cell degranulation requires calcium-independent microtubule-dependent translocation of granules to the plasma membrane. *J Cell Biol.*, 2005; **170**: 115–126.

38. R. R. Sivalenka, R. Jessberger. SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion and migration. *Mol Cell Biol*, 2004; **24**: 10277-10288.