

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INRS – Institut Armand-Frappier

**Rôle du domaine PTB dans la phosphorylation et la fonction des protéines
Dok-1 et Dok-2 dans le lymphocyte T**

par
IOHANN BOULAY

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Claude Daniel
Examineur externe	Serge Lemay
Directeur de recherche	Pascale Duplay

RÉSUMÉ

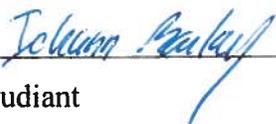
Les protéines Dok-1 et Dok-2 sont deux membres d'une nouvelle famille de protéines adaptatrices regroupées sous le nom Dok (Downstream of tyrosine kinase) et sont fortement exprimées dans le lymphocyte T. Ces protéines agissent, suite à leur phosphorylation par diverses tyrosine kinases, comme plateforme de liaison à différentes protéines impliquées dans la transduction de signaux intracellulaires. Dans plusieurs systèmes et types cellulaires étudiés, dont le lymphocyte T, Dok-1 et Dok-2 agissent comme régulateur négatif de la transduction de signaux, notamment par l'association avec RasGAP, une protéine inhibant l'activité de la p21Ras. Pour ce faire, Dok-1 et Dok-2 possèdent toutes deux des domaines structuraux et des motifs de séquences leurs permettant d'interagir spécifiquement avec diverses protéines ou lipides membranaires. Afin de mieux décrire et comprendre le fonctionnement de ces protéines inhibitrices dans le lymphocyte T, nous avons ciblé nos études sur le rôle de certains de ces éléments dans les fonctions de Dok-1 et Dok-2.

Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer quels pouvaient être les partenaires d'association du domaine central de liaison à des phosphotyrosines (PTB; phosphotyrosine binding) de Dok-1 et Dok-2 suite à l'engagement du récepteur CD2. Nous avons pu démontrer que ce domaine est impliqué dans des interactions homotypiques et hétérotypiques. La mutation de deux arginines (Arg207-08; Dok-1 et Arg200-01; Dok-2) du domaine PTB, prédites comme étant impliquées dans l'association aux phosphotyrosines, résulte en la perte de ces interactions. La formation d'hétérodimères entre Dok-1 et Dok-2 a ensuite pu être confirmée *in vivo*, suite à la phosphorylation des protéines Dok induite par l'engagement du récepteur CD2.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'implication du domaine PTB dans les fonctions des protéines Dok-1 et Dok-2. Il a été précédemment démontré que la tyrosine (Tyr146) située entre les domaines PH et PTB de Dok-1 est impliquée dans l'oligomérisation de Dok-1 via son domaine PTB. Selon l'homologie en séquence avec Dok-1, la protéine Dok-2 porte un résidu tyrosine équivalent (Tyr 139). Nous avons donc généré des clones surexprimant

les protéines Dok-1 et Dok-2 portant les mutations prévenant la formation d'oligomères (Dok-1R207-08A et Y146F; Dok-2R200-01A et Y139F). Ces modifications entraînent la perte de phosphorylation induite par CD2. Aussi, la surexpression de ces mutants ne parvient pas à inhiber l'activation des kinases ERK1/2 induite par CD2 comme il est observé lors de la surexpression de la protéine sauvage. De plus, nous avons pu démontrer que la surexpression des mutants Dok-1Y146F et Dok-2Y139F interfère avec la phosphorylation induite par CD2 des protéines Dok endogènes.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un modèle où l'oligomérisation de Dok-1 et Dok-2, médié par leur domaine PTB, est une étape essentielle à la phosphorylation et aux fonctions de ces deux protéines inhibitrices dans la signalisation induite par CD2 chez le lymphocyte T.


Étudiant


Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1 Activation du lymphocyte T mature	6
1.1 Le récepteur à l'antigène (TCR) et CD3	6
1.2 Signalisation intracellulaire	7
1.3 Rôle des co-récepteurs.....	11
1.3.1 CD4 et CD8	11
1.3.2 CD2	11
1.3.3 CD28	13
1.3.4 CTLA-4	15
1.4 Régulation des protéines tyrosine kinases (PTK).....	16
1.5 Métabolisme des lipides	17
1.6 Régulation de Ras dans la cellule T	18
2 Les protéines adaptatrices	20
2.1 Domaines Structuraux	21
2.1.1 Domaine PH (<i>pleckstrin homology</i>)	21
2.1.2 Domaine SH2 (<i>Src-homology 2</i>)	22
2.1.3 Domaine PTB (<i>Phosphotyrosine binding</i>)	22
2.1.4 Domaine SH3 (<i>Src-homology 3</i>)	23
2.2 Protéines adaptatrices membranaires et cytosoliques.....	23
3 Famille Dok (Downstream of tyrosine kinase)	25
3.1 Dok-1	28
3.1.1 Séquence, structure et expression.....	28
3.1.2 Phosphorylation et associations.....	30

3.1.3	Effets et fonctions.....	33
3.1.4	Implication des différents domaines.....	35
3.2	Dok-2.....	36
3.2.1	Séquence, structure et expression.....	37
3.2.2	Phosphorylation et associations.....	37
3.2.3	Effets et fonctions.....	39
3.2.4	Rôle des différents domaines	41
3.3	Dok-3.....	42
3.4	Dok-4 et Dok-5.....	44
ARTICLE.....		45
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....		77
DISCUSSION.....		81
RÉFÉRENCES		88
ANNEXE A		108
REMERCIEMENTS.....		110

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Figure A: Signalisation cellulaire chez le lymphocyte T.	10
Figure B: Régulation de la GTPase p21 Ras.	20
Figure C: Représentation schématique des cinq membres de la famille Dok.	27
Figure D: Représentation schématique de différentes protéines s'associant aux protéines Dok.	32
Figure E: Modèle des études de co-activation à l'aide des cellules présentatrices RAJI.	79
Tableau A: Résumé des principales caractéristiques des protéines de la famille Dok.	29
Figure 1. In vitro binding of Dok to Dok-1 and Dok-2 PTB domains.	70
Figure 2. Dok-1 and Dok-2 association following CD2 stimulation.	71
Figure 3. Mutations that prevent Dok oligomerization inhibit CD2-induced Dok phosphorylation.	72
Figure 4. Oligomerization is required for the ability of Dok to inhibit CD2-induced Erk1/2 activation.	73
Figure 5. Overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F interfere with the phosphorylation of endogenously expressed Dok protein.	75
Figure 6. Model for CD2-induced oligomerization and phosphorylation of Dok-1 and Dok-2.	76
Figure 7. Inhibition de la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 par la co-stimulation du TCR/CD3.	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abl	Abelson tyrosine kinase
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AP-1	Activator Protein-1
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BCR	B Cell Receptor
CBP	Csk Binding Protein
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CSK	C-terminal Src Kinase
DAG	DiAcylGlycérol
DOK	Downstream Of tyrosine Kinase
DokL	DOK-Like protein
DOKR	DOK-Related protein
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GADS	Grb2-related Adaptator Downstream of Shc
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GST	Glutathione-S-Transférase
IL	InterLeukine
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphates
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITK	IL-2-inducible T-cell Kinase
kDa	kiloDalton
LAT	Linker for Activation of T cells
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
NFAT	Nuclear Factor for Activated T cells

NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
PAG	Phosphoprotein Associated with Glycolipid-enriched microdomains
PEP	Proline-Enriched tyrosine Phosphatase
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3' Kinase
PLC	PhosphoLipase C
PKC	Protéine kinase C
PTB	Phospho-Tyrosine Binding domain
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
RasGAP	Ras GTPase Activating Protein
RasGRP	Ras Guanine-nucleotide Releasing Factor
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl-Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SH	Src Homology
SHIP	Src Homology 2 domain Inositol Phosphatase
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SLP-76	SH2-domain-containing Leukocyte-specific Phosphoprotein of 76kDa
SOS	Son Of Sevenless
TCR	T Cell Receptor
ZAP-70	Zeta (ζ) chain-Associated Protein of 70 kDa

INTRODUCTION

Le rôle central des protéines de type adaptatrice dans la transduction de signaux intracellulaires est maintenant bien établi. Ces protéines, dépourvues de toute activité enzymatique ou transcriptionnelle, agissent plutôt comme ponts moléculaires permettant des interactions intimes entre diverses protéines vouées à la transmission de signaux générés à la membrane cellulaire. L'étude de souris déficientes pour certaines protéines adaptatrices témoigne bien du rôle crucial de celles-ci dans la régulation de l'activité lymphocytaire (Janssen *et al.*, 2003). Ces protéines sont dotées de différents domaines modulaires et/ou motifs de séquences particuliers leur permettant de participer dans des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides. Ces domaines incluent entre autres les domaines PH (*pleckstrin homology*), aptes à lier des phosphoinositides, ainsi que les domaines SH2 (*Src homology*) et PTB (*phosphotyrosine binding*), tous deux capables de lier des phosphotyrosines. Des associations de type constitutives peuvent aussi se produire via l'interaction de domaines SH3 avec des séquences riches en proline. Les protéines adaptatrices agissent donc habituellement en aval de protéines tyrosine kinases (PTK), responsables des événements de phosphorylation générés suite à l'engagement de récepteurs à la membrane. La phosphorylation de motifs de séquence distincts assure la spécificité et donc la sélection des diverses molécules qui interviendront en fonction des différents contextes membranaires entre la cellule présentatrice d'antigènes et la cellule T.

Les protéines de la famille Dok (*Downstream of tyrosine kinase*) forment une nouvelle famille de protéines adaptatrices incluant actuellement cinq membres, soient Dok-1, -2, -3, -4 et -5. Elles portent toutes un même profil structural consistant en une section amino(N)-terminale incluant un domaine PH suivi d'un domaine PTB, puis une portion carboxy(C)-terminale généralement riche en résidus tyrosine et proline. L'expression et la séquence de ces protéines permettent toutefois de distinguer deux sous-groupes à l'intérieur de la famille Dok. En effet, l'expression des protéines Dok-1, -2 et -3 est plutôt réservée aux tissus hématopoïétiques alors que les protéines Dok-4 et Dok-5 semblent être plus spécifiques aux tissus non-hématopoïétiques et s'apparentent en séquence beaucoup plus entre elles qu'avec les trois autres membres de la famille (Cai *et al.*, 2003). La capacité inhibitrice de ces molécules semble être une propriété générale à la famille Dok. L'étude des souris déficientes pour la protéine Dok-1 démontre clairement le rôle négatif de cette protéine dans la prolifération et la

signalisation cellulaire (Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001). D'autres études *in vivo* sur Dok-2 témoignent aussi d'une fonction de régulateur négatif, particulièrement chez le lymphocyte T. L'expression forcée de Dok-2 dans des précurseurs de cellules hématopoïétiques inhibe la repopulation des tissus lymphoïdes avec un effet drastique sur la repopulation du thymus (Gugasyan *et al.*, 2002). Aussi, l'expression faible de Dok-2 pourrait être la cause des lymphoadénopathies et splénomégalies observées dans des souris *hairless* (*hr/hr*) (Nelms *et al.*, 1998b). Les protéines Dok-3 et Dok-4 ont aussi été démontrées influençant négativement des événements de signalisation intracellulaire (Cong *et al.*, 1999; Lemay *et al.*, 2000; Bedirian *et al.*, 2004).

Des études sur les événements de phosphorylation induits par la kinase Lck, dans le lymphocyte T, a conduit à l'identification de deux protéines fortement phosphorylées suite à l'engagement du récepteur CD2, Dok-2 (p56dok) et Dok-1 (p62dok) (Nemorin *et al.*, 2000b). La surexpression de Dok-1 dans des cellules T Jurkat conduit à un effet négatif important sur la signalisation induite par CD2, incluant l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, l'activation de la PLCγ1 et des MAP kinases ERK 1/2 (Nemorin *et al.*, 2001). Ces événements mènent à une baisse d'activation du facteur de transcription NF-AT et de la production d'IL-2. L'association et la co-localisation à la membrane de Dok-1 avec la protéine RasGAP représente une étape clé dans la régulation négative de la signalisation induite par CD2.

L'implication des différents domaines des protéines Dok dans leurs fonctions représente le sujet de plusieurs études récentes sur ces protéines. Étant donné les nombreuses observations soulignant la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2, il n'est pas étonnant que la portion C-terminale, riche en résidus tyrosine, sert de cible pour des récepteurs et protéines avec une activité tyrosine kinase. Ces événements conduisent à l'association avec plusieurs protéines, telle RasGAP, via des motifs de séquences spécifiques. La contribution des domaines PH et PTB aux fonctions des protéines Dok-1 et Dok-2 a aussi été investiguée. Le domaine PH de Dok-1 est fonctionnellement apte à lier des phosphoinositides *in vitro* et semble être important pour les fonctions négatives de Dok-1 *in vivo* (Zhao *et al.*, 2001). De même, le domaine PH de Dok-2 est nécessaire à la localisation et la phosphorylation optimale de la protéine par les récepteurs EGFR et Tek/Tie2 (Jones *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003). Le domaine PTB de Dok-

Il peut quant à lui lier la protéine de régulation négative SHIP-1 (Tamir *et al.*, 2000), alors que le domaine PTB de Dok-2 est impliqué dans le recrutement aux récepteurs membranaires EGFR et IL-4R (Nelms *et al.*, 1998b; Jones *et al.*, 1999). Dans une récente étude sur le domaine PTB de Dok-1, il a été déterminé que ce domaine pouvait fonctionnellement s'associer à un motif de séquence particulier parmi une banque de peptides aléatoires (Songyang *et al.*, 2001). Ce motif est contenu à l'intérieur même de la protéine et les auteurs ont pu montrer que Dok-1 pouvait homodimériser, via vraisemblablement l'interaction du domaine PTB avec la phosphotyrosine contenue dans ce motif. Deux résidus arginines du domaine PTB, conservés chez les membres de la famille Dok et IRS (*Insulin receptor substrates*), sont impliqués dans cette interaction.

Dans le lymphocyte T, outre l'association aux protéines RasGAP et Crk-L, peu d'information est connue sur les interactions moléculaires mises en jeu par les protéines Dok-1 et Dok-2. La présence de ces deux membres similaires de la famille Dok dans la cellule T pose également la problématique de leur fonction respective. Pour mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de Dok-1 et Dok-2, nous nous sommes intéressés à l'implication du domaine PTB de ces protéines adaptatrices dans la signalisation cellulaire engendrée par le récepteur CD2, chez le lymphocyte T. Dok-2 possède aussi une tyrosine contenue dans la séquence de liaison préférentielle au domaine PTB de Dok-1. Comme ces deux membres de la famille Dok sont exprimés dans le lymphocyte T, cela soulevait donc la possibilité d'interaction homotypique entre les molécules Dok-2 et aussi hétérotypique entre Dok-1 et Dok-2. Des études de liaison *in vitro* et d'immunoprécipitation *in vivo* ont donc été effectuées et nous ont permis de démontrer l'oligomérisation des protéines Dok-2 et Dok-1 suite à la stimulation du récepteur CD2. De plus, la mutation des résidus tyrosines et des arginines du domaine PTB impliqués dans l'oligomérisation abolit la phosphorylation induite par CD2 et la fonction négative des protéines Dok-1 et Dok-2. L'ensemble des résultats démontre l'importance du domaine PTB et des interactions homo- et hétérotypiques dans les fonctions inhibitrices de ces protéines dans la signalisation par CD2 chez le lymphocyte T.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 *Activation du lymphocyte T mature*

À l'interface du contact entre une cellule présentatrice d'antigènes (CPA) et le lymphocyte T, un peptide antigénique, présenté par une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité (peptide-CMH) exprimée à la surface de la CPA, sert de ligand pour le récepteur à l'antigène de la cellule T (TCR). Déjà à ce niveau, de multiples facteurs incluant l'affinité et la durée de l'interaction ainsi que la présence ou non de divers éléments de co-stimulation interviennent pour guider la cellule T vers la réponse lymphocytaire adéquate. Plusieurs cascades biochimiques sont alors engendrées à l'intérieur de la cellule T et perturbent l'équilibre de la cellule à l'état quiescent. Malgré la complexité des événements ainsi générés, l'issue résulte principalement en trois types de réaction. D'une part, la cellule T s'active et entre dans une phase de prolifération rapide générant ainsi une forte population de cellules effectrices assurant leurs fonctions cytotoxiques et/ou productrices de cytokines effectrices. À l'opposé, la résultante des incidents mènera plutôt à la mort de la cellule T par apoptose, ou encore à sa survie mais dans un état passif avec absence de réactivité à l'antigène appelé état d'anergie. C'est dans un carrefour d'interactions entre des molécules activatrices et des molécules présentes pour limiter l'activation que se décide la réponse cellulaire. Il est donc impératif de comprendre le déroulement de ces événements membranaires puis cytoplasmiques pour bien concevoir le fonctionnement et interpréter les éventuels dysfonctionnement du lymphocyte T.

1.1 Le récepteur à l'antigène (TCR) et CD3

Le TCR est formé par différents polypeptides dont la constitution assure la spécificité requise pour la reconnaissance du ligand ainsi que la transmission du signal à la machinerie intracellulaire. Deux chaînes clônotypiques, α et β ou γ et δ , dont la diversité est assurée par un procédé de réarrangement génétique, forment un hétérodimère qui assure la liaison du ligand. Suite à l'interaction avec le peptide-CMH, le TCR $\alpha\beta$ (ou TCR $\gamma\delta$) transmet le signal à l'intérieur de la cellule via le CD3, consistant en quatre types de chaînes polypeptidiques couplées sous formes de trois dimères : $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ et $\zeta\zeta$ (Alarcon *et al.*, 2003). Ces chaînes CD3 associées au

TCR possèdent dans leur portion intracytoplasmique des motifs d'activation appelés ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Ces séquences consistent en une paire de résidus tyrosine séparés par 9 à 11 acides aminés. Les sous-unités γ , ϵ et δ en porte chacun un, alors qu'on en trouve trois dans la sous-unité ζ . Suite à la stimulation du TCR, les résidus tyrosine contenus dans ces ITAMs sont rapidement phosphorylés par Lck, une protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille Src, et sont à l'origine des cascades de signalisation engendrées à l'intérieur de la cellule (Malissen, 2003).

1.2 Signalisation intracellulaire

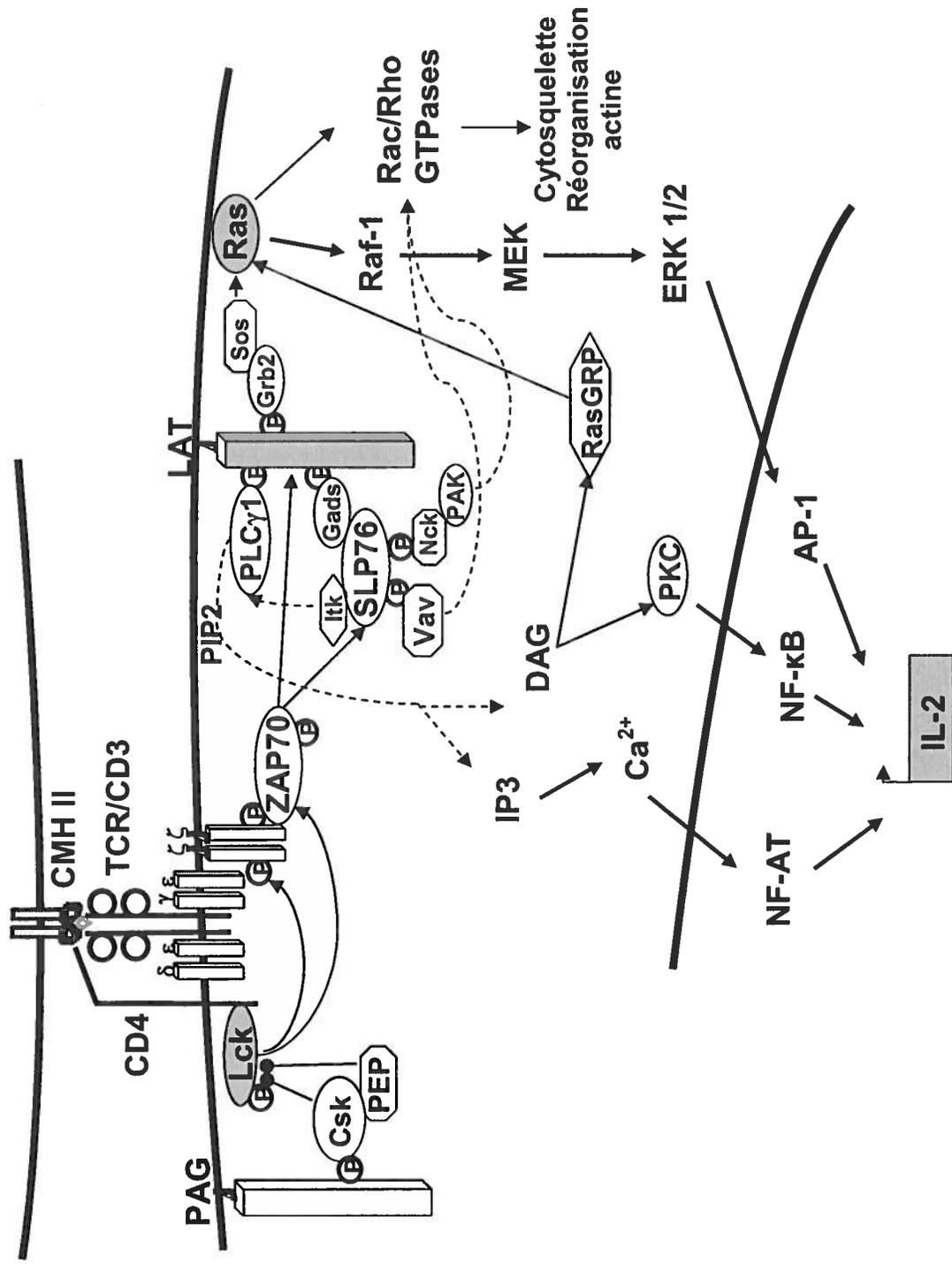
À la membrane, avant l'engagement du TCR, les éléments initiateurs de la signalisation par le TCR sont physiquement séparés. La kinase Lck, via sa myristoylation et sa palmitoylation, est retrouvée à l'intérieur de microdomaines membranaires nommés radeaux lipidiques, formés spontanément par un enrichissement de différents lipides hétérogènes en raison de leurs propriétés biophysique (Horejsi, 2003). Ils sont caractérisés par une composition en lipides particulière (enrichis en cholestérol et glycosphingolipides), l'accumulation de protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) et un enrichissement important de molécules de signalisation (Anton van der Merwe *et al.*, 2000). Essentiellement, les radeaux lipidiques jouent un rôle de plate-forme pour le recrutement et la concentration de composants de signalisation, formant une place particulière pour des interactions intimes entre ces molécules. La kinase Lck y est maintenue dans un état inactif par l'action combinée de Csk et PEP, également ciblés dans les radeaux lipidiques par l'interaction avec la protéine PAG qui est constitutivement associée à ces microdomaines (Lindquist *et al.*, 2003). Csk est une tyrosine kinase qui phosphoryle une tyrosine en C-terminal régulant négativement l'activité de la kinase Lck, alors que PEP est une phosphatase qui déphosphoryle la boucle d'activation de Lck. Suite à la stimulation, le TCR, qui dans les cellules T au repos est largement exclu des radeaux lipidiques, y est recruté et est alors libéré de l'action de phosphatases maintenant les ITAMs à un faible niveau de phosphorylation (Mustelin *et al.*, 2003). Simultanément, Lck est libéré de sa régulation négative, via la déphosphorylation de la tyrosine régulatrice en C-terminal, par la phosphatase membranaire CD45 qui contribue également à exclure Csk des

radeaux lipidiques (Hermiston *et al.*, 2002). À ce niveau entre aussi en jeu des co-récepteurs comme CD4 et CD8, constitutivement associés à Lck, qui alors recrutent la kinase aux niveaux des ITAMs du TCR-CD3 via la co-localisation engendrée par l'interaction de CD4 ou CD8 avec le peptide-CMH. Une fois les ITAMs hautement phosphorylés, la kinase de la famille Syk (spleen tyrosine kinase) ZAP-70, reconnaissant ces motifs via un tandem de domaines SH2, est alors recrutée puis activée à son tour par sa phosphorylation médiée par Lck (Wange *et al.*, 1996). La kinase ZAP-70 alors activée s'autophosphoryle sur trois résidus tyrosines qui serviront au recrutement d'effecteurs au complexe TCR-CD3. De plus, ZAP-70 a pour substrat diverses molécules incluant LAT et SLP-76, deux protéines jouant un rôle central dans la poursuite du signal par le TCR (voir Figure A).

Séquentiellement, deux motifs phosphorylés contenant des tyrosines de la protéine LAT servent d'ancrage à la protéine Gads, qui est constitutivement associée à SLP-76, recrutant ainsi cette molécule dans les microdomaines membranaires contenant LAT (Zhang, W. *et al.*, 2000). LAT et SLP-76, suite à leur phosphorylation, vont servir de plateforme de liaison à diverses molécules et ainsi constituer un complexe de signalisation unissant plusieurs protéines possédant des fonctions différentes (Clements, 2003). Entre autres, le recrutement et l'activation de la phospholipase C-gamma1 (PLC γ 1) permet l'hydrolyse subséquente du phosphatidylinositol (PI)-4,5-P₂ générant ainsi les seconds messagers inositol-1,4,5-P₃ (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). Ultimement, l'IP₃ entraîne la mobilisation de calcium à l'intérieur de la cellule, alors que le DAG est responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la p21Ras (Ebinu *et al.*, 2000). L'activation de Ras peut aussi se faire par le recrutement à LAT de Grb2 et Sos, une protéine stimulant l'activité de Ras (voir Figure A). La tyrosine kinase Itk se retrouve aussi à ce complexe et lorsqu'activée contribue à l'activation de PLC γ 1 et à la régulation de la réorganisation du cytosquelette par l'implication de la protéine Vav-1 (Miller *et al.*, 2002). LAT a aussi la capacité de lier la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase, localisant ainsi cette kinase à son site d'action à la membrane et dont le produit contribuera au recrutement à la membrane de plusieurs protéines. Enfin, ce complexe signalétique est aussi à l'origine de l'activation d'une série d'autres protéines signalétiques, incluant les MAP (*mitogen activated protein*) kinases ERK, JNK et p38, en plus de petites protéines G impliquées dans le cytosquelette (Rac, Rho, Cdc42). La voie d'activation Ras/Raf/MEK/ERK sera entre autres

responsable de l'activation subséquente de facteur de transcription du type AP-1 (*activator protein 1*) (Arendt *et al.*, 2002). Ultiment, la réorganisation du cytosquelette ainsi que la modification de l'activité transcriptionnelle mènera à l'induction des capacités prolifératives et cytotoxiques ainsi qu'aux habiletés à produire des cytokines effectrices T, permettant alors les fonctions immunes du lymphocyte T.

Figure A: Signalisation cellulaire chez le lymphocyte T.



1.3 Rôle des co-récepteurs

La spécificité de l'activation du lymphocyte T est assurée par le TCR mais l'activation appropriée nécessite aussi d'autres récepteurs retrouvés dans la zone de contact avec la CPA. Certains récepteurs comme les molécules CD4 et CD8 reconnaissent directement le CMH alors que d'autres comme CD2, LFA-1, CD28 et CTLA-4 reconnaissent des ligands spécifiques exprimés ou non sur la cellule présentatrice. Ensemble, ces molécules assurent les mécanismes d'adhésion, de reconnaissance et de co-stimulation permettant l'activation adéquate de la cellule T.

1.3.1 CD4 et CD8

De par leur propriété à lier la partie non-polymorphique du CMH, ces deux co-récepteurs contribuent à la reconnaissance et la stabilisation de l'interaction CMH/peptide/TCR. Le lymphocyte exprimant la molécule CD8 est restreint à lier le CMH de classe I alors que la cellule T CD4 est restreinte au CMH de classe II. Le modèle de recrutement proposé suggère que, lors de la faible sollicitation des complexes TCR-CD3 suite à l'engagement initial de peptide-CMH, il y a alors recrutement de co-récepteur aux complexes, ce qui amplifie l'engagement du TCR en stabilisant l'interaction TCR-peptide-CMH (van der Merwe *et al.*, 2003). De plus, à l'aide de leur portion intracytoplasmique, apte à lier de façon constitutive la PTK Lck, ces deux récepteurs vont aussi amplifier la transduction des signaux (Veillette *et al.*, 1988; Rudd *et al.*, 1991). En effet, l'interaction de CD4 ou CD8 avec le CMH va contribuer au recrutement de la kinase Lck à proximité du complexe TCR-CD3 et ainsi permettre l'activation des ITAMs.

1.3.2 CD2

Cette glycoprotéine transmembranaire, un homodimère d'environ 50 kDa, est membre de la famille des immunoglobulines dont le sous-groupe comprends au moins 11 membres dont

CD2, CD48, CD58 (LFA-3) et CD150 (SLAM) (van der Merwe *et al.*, 2003). Les ligands connus pour les récepteurs de cette famille sont tous contenus à l'intérieur même de la famille. Par exemple, CD2 a pour ligand principal la molécule CD58 chez l'humain, et CD48 chez la souris (Springer *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1996). L'expression de CD2 est essentiellement observée sur les cellules T, les thymocytes et les cellules NK, alors que CD58 est très largement exprimé. Les souris déficientes pour CD2 ne montrent pas de changement de phénotype évident. Les cellules T issues de ces souris présentent un défaut dans la prolifération et la production de cytokine, et des souris déficientes pour CD48 ont des défauts prononcés dans l'activation des cellules T CD4⁺ (Teh *et al.*, 1997; Gonzalez-Cabrero *et al.*, 1999). On observe aussi avec des souris transgéniques pour le TCR et déficientes pour CD2 une hausse du seuil d'activation du TCR *in vitro* et de la cellule T *in vivo* (Bachmann *et al.*, 1999). Néanmoins, l'affinité beaucoup plus grande (40-50 fois) du couple humain (CD2-CD58), en comparaison avec la souris (CD2-CD48), ainsi que l'expression considérablement plus étendue du ligand de CD2 chez l'humain confèrent vraisemblablement une importance accrue à ce récepteur chez notre espèce (Dustin *et al.*, 1997).

Via sa portion extracellulaire, CD2 agit comme une molécule d'adhésion et l'interaction CD2-CD58 amplifie grandement la reconnaissance de l'antigène par la cellule T (Bierer *et al.*, 1989; Moingeon *et al.*, 1989). CD2 pourrait diminuer l'affinité et la densité en surface nécessaire du peptide-CMH requis pour activer la cellule T. À cet effet, l'interaction CD2-ligand pourrait fonctionner en positionnant les membranes à une distance optimale (~14 nm) pour l'engagement du TCR avec le peptide-CMH (Davis *et al.*, 1996).

La portion intracytoplasmique de CD2 participe aussi aux fonctions du récepteur en possédant un rôle dans la transduction de signaux et la régulation de l'adhésion. En effet, CD2 peut agir en tant que co-récepteur modulant l'activation cellulaire induite par le TCR/CD3. La co-ligand de CD2 et CD3 avec une protéine chimère LFA-3/Ig et des anticorps anti-CD3 résulte en une augmentation profonde de la phosphorylation de la PLC- γ 1, de la mobilisation du calcium intracellulaire et la prolifération de la cellule T (Kanner *et al.*, 1992). De plus, en utilisant une combinaison d'anticorps contre seul le CD2 humain, la signalisation engendrée représente même une voie alternative d'activation, indépendante du TCR/CD3. La stimulation

par ces anticorps permet d'obtenir la phosphorylation sur tyrosine de protéines multiples, l'activation de la PKC, une élévation du Ca^{2+} intracellulaire, la production d'IL-2 et un effet mitogène (Pantaleo *et al.*, 1987; Beyers *et al.*, 1989; Ley *et al.*, 1991). De plus, la co-stimulation des cellules T avec CD58 a été montrée capable d'induire l'activation des facteurs de transcription tels NF-AT (*nuclear factor of activated T cell*), AP-1 et NF- κ B (*nuclear factor κ B*), avec NF-AT comme cible clé des facteurs de transcription impliqués dans la voie CD58/CD2 (Parra *et al.*, 1997).

Ces propriétés sont rendues possible grâce à l'association de diverses molécules de signalisation aux motifs riches en résidus proline du domaine cytoplasmique de CD2. C'est le cas de kinases de la famille Src dont Lck (Bell *et al.*, 1996) et FynT (Fukai *et al.*, 2000), des molécules adaptatrices CD2BP1 (*CD2-binding protein 1*) (Li, J. *et al.*, 1998b) et CD2BP2 (Nishizawa *et al.*, 1998). Le récepteur CD2 pourrait accomplir ses fonctions en recrutant certaines de ces molécules de signalisation à proximité du complexe TCR/CD3.

La portion intracytoplasmique influence aussi la distribution de la molécule CD2 au niveau de la surface de contact entre la cellule T et l'APC. Cet effet semble être médié par l'association avec la CD2AP (*CD2-associated protein*) qui sert de lien avec le cytosquelette (Dustin *et al.*, 1998). Il a été démontré que cette protéine joue un rôle critique dans la dégradation des complexes TCR-CD3 activés, un événement essentiel à la « désensibilisation » de la cellule T et son inactivation (Lee *et al.*, 2003). Cependant, les défauts dans l'activation de la cellule T chez la souris déficiente pour CD2AP étant plus sévère que la déficience de CD2 suggèrent que CD2AP pourrait jouer un rôle plus large dans la fonction du lymphocyte T (Shih *et al.*, 1999). La contribution de CD2 dans ces événements de régulation à la baisse du TCR-CD3 dirigée par CD2AP reste donc à déterminer.

1.3.3 CD28

CD28, une glycoprotéine homodimérique de 44 kDa, est exprimé par la plupart des lymphocytes T matures et représente un récepteur de co-stimulation lors de l'activation de la

cellule T. Deux ligands physiologiques pour CD28, possédant 25% d'identité en séquence dans leur portion extracellulaire, ont été décrits : B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (Sharpe *et al.*, 2002). Ces deux molécules sont exprimées fortement sur les CPA activées (cellules dendritiques, macrophages, cellules B), alors que l'expression d'uniquement B7-2 est aussi observée à de faible niveau sur les cellules dendritiques et les monocytes au repos.

Plusieurs réponses cellulaires T sont compromises de façon marquée dans les souris déficientes pour CD28 ou B7-1/B7-2 (Lenschow *et al.*, 1996). La stimulation du récepteur CD28 avec ses ligands naturels génère un signal de co-stimulation important et essentiel à l'amplification de la réponse du lymphocyte T. Particulièrement, à des niveau d'occupation faible en TCR, CD28 est unique pour délivrer un signal puissant et synergique pour activer efficacement des facteurs de transcription tel NF- κ B, NF-AT et AP-1 contrôlant les phénomènes de prolifération, mort et différenciation cellulaire (Acuto *et al.*, 2003). La signalisation par CD28 permet l'expression complète de divers régulateurs qui initie et/ou contrôle ces événements cellulaires. Par exemple, CD28 régule à la hausse l'expression de cytokines (IL-2, INF- γ , IL-4), de diverses chimiokines, de récepteurs pour cytokines et chimiokines (IL-2R, IL-12R et CXC-chemokine receptor 5), ou d'autres récepteurs comme CD40 ligand (CD40L), CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) et autres. Ces événements délivrent une deuxième vague de signaux qui sont cruciaux pour les fonctions effectrices de la cellule T.

Les résidus tyrosines et les motifs riches en proline contenus dans la portion cytoplasmique de 41 résidus d'acides aminés de CD28 sont à l'origine de la signalisation par ce récepteur. Suite à la ligation de CD28, les PTKs Lck et/ou Fyn sont engagées et contribuent à la phosphorylation des tyrosines. En contraste avec la signalisation du TCR/CD3, on n'observe pas d'induction de phosphorylation de ZAP-70, LAT ou SLP-76 (Michel *et al.*, 2001). Plusieurs protéines sont alors recrutées, dont la PI3-K, les kinases Tec et Itk, la protéine GEF Vav1 et la sérine/thréonine kinase Akt. Par exemple, un motif d'association de CD28 à la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-K est requis pour l'activation de Akt, l'activation optimale de l'IL-2, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L et l'induction de la réponse à l'antigène *in vivo*. Les kinases Tec et Itk participent à l'augmentation par CD28 de la

production des seconds messagers IP₃ et DAG par la régulation positive de la PLC- γ 1, un effet qui est abolit par la mutation de la portion cytoplasmique de CD28 responsable de l'activation de Itk (Acuto *et al.*, 2003).

La stimulation de CD28 seul résulte en l'expression transitoire de seulement quelques gènes et n'a pas de conséquences biologiques évidentes. Un des modèle proposé suggère que CD28 pourrait être partiellement ou totalement dispensable, et que CD28 amplifie les voies de signalisation et le profil d'expression de gènes qui sont activés par le TCR seul. CD28 pourrait donc servir quantitativement plutôt que qualitativement à l'activation de la cellule T et être requis pour franchir le seuil d'activation lorsque la ligation du TCR seul n'est pas suffisante.

1.3.4 CTLA-4

L'expression du récepteur CTLA-4 à la membrane est réduite dans la cellule T au repos et induite suite à l'activation de la cellule T, ce qui constitue un mécanisme de rétro-inhibition de l'activation de la cellule T. Le transport et l'expression à la surface de cette molécule sont régulés et induits de façon dynamique, CTLA-4 étant accumulé dans les lysosomes et sécrété au niveau du contact cellule T-CPA suite à la stimulation du TCR (Saito *et al.*, 2003). Ce co-stimulateur négatif agit par compétition avec le ligand du récepteur activateur CD28 ainsi qu'en induisant des signaux d'inhibition vers l'intérieur de la cellule. L'affinité de CTLA-4 pour B7-1/2 est 10-20 fois plus grande que celle de CD28 et la régulation de son expression est donc d'autant plus importante.

Le phénotype des souris déficientes pour CTLA-4 ne laisse aucun doute sur la nature de régulateur négatif de cette molécule (Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 1995). Ces souris exhibent une lymphoprolifération massive et une infiltration des lymphocytes T dans de multiples organes. Toutes les cellules T issues de ces souris présentent un phénotype activé, et une variété de molécules phosphorylées. Au niveau moléculaire, outre la suppression de l'activation par simple compétition pour les ligands de CD28, la portion cytoplasmique de CTLA-4 semble impliquée dans la transmission de signaux intracellulaires. Des motifs

contenant des tyrosines ont été montrés comme étant impliqués dans l'association à PI3-K et la phosphatase SHP-2 et seraient responsables de l'effet suppresseur du récepteur. Il a été proposé que l'association avec SHP-2 et la formation d'un complexe avec CD3 ζ inhibent éventuellement la phosphorylation de CD3 ζ , mais plusieurs études n'ont pu confirmer cet effet et d'autres mécanismes pouvant être impliqués restent inconnus (Saito *et al.*, 2003).

1.4 Régulation des protéines tyrosine kinases (PTK)

En plus de leur fonction enzymatique, les kinases de la famille Src possèdent des domaines de liaison aux protéines leur conférant aussi un rôle d'adaptateur. Ces kinases possèdent en N-terminal du site catalytique un domaine de type SH3 et un domaine SH2, que plusieurs études ont aussi démontré comme étant impliqués dans la régulation même de la protéine. À l'état de repos, une interaction moléculaire entre le domaine SH2 et une tyrosine phosphorylée contenue dans la région C-terminale résulte en une conformation qui limite l'accessibilité au substrat et rend le domaine kinase inactif (Cooper *et al.*, 1993). Le domaine SH3 contribue également à cette conformation en liant une séquence riche en proline contenue dans la région connective située entre les domaines SH2 et kinase (Young *et al.*, 2001). Des études de mutagenèse ont montré que les deux domaines sont vitaux pour la régulation allostérique de l'activité enzymatique.

Il est donc évident que la régulation des kinases Src se fait en partie via l'interaction avec des kinases et phosphatases interagissant avec la tyrosine régulatrice en C-terminal. C'est la kinase Csk (*C-terminal Src kinase*) qui est responsable de la phosphorylation et ainsi de l'inactivation de la kinase. Comme attendu, en son absence (souris déficientes), le TCR devient hyperactivé (Schmedt *et al.*, 1998), et lorsque Csk est constitutivement associée à la membrane, la signalisation par le TCR est modulée à la baisse (Chow *et al.*, 1993). À l'opposé, la protéine transmembranaire CD45 semble être responsable de la déphosphorylation de la tyrosine C-terminale et son absence de la cellule résulte dans l'incapacité du TCR à activer la machinerie signalétique en aval (Koretzky *et al.*, 1990; Kishihara *et al.*, 1993). La localisation cellulaire de ces deux protéines semble être cruciale pour leur fonction. Alors que les interactions

moléculaires responsables de guider CD45 dans la cellule sont sous investigation, il est maintenant connu que la localisation cellulaire de Csk est dépendante de la protéine adaptatrice PAG/Cbp (*phosphoprotein associated with glycolipid-enriched microdomains/Csk binding protein*) (Brdicka *et al.*, 2000; Kawabuchi *et al.*, 2000). L'association de Csk à PAG permet son recrutement aux radeaux lipidiques en plus de hausser son activation (Takeuchi *et al.*, 2000). Lors de l'activation de la cellule T par le TCR, PAG est montré comme étant déphosphorylé, larguant ainsi temporairement Csk hors des GEMs pour laisser place aux mécanismes d'activation (Brdicka *et al.*, 2000). Certains membres de la famille Dok pourraient aussi être impliquées dans la localisation de la kinase Csk (voir section 3).

1.5 Métabolisme des lipides

La découverte de modifications dans la quantité de certains phospholipides à la membrane suite à l'activation cellulaire a conféré un rôle bien plus que structural aux lipides de la membrane. En plus des rôles centraux dans la génération d'inositol triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG), les intermédiaires et sous produits du métabolisme des inositol-phospholipides possèdent aussi d'autres fonctions dans la signalisation. La génération de second messenger à la membrane est responsable de la modulation de l'activité de plusieurs molécules signalétiques dont la PLC γ , les tyrosine kinases de la famille Tec (Btk/Itk/Tec/Rlk), la kinase dépendante de phosphoinositides 1 (PDK-1), la protéine kinase B (PKB ou Akt), et les protéines multifonctionnelles Vav1 et Vav2 (Ott *et al.*, 2002a). Les enzymes responsables des modifications apportées aux lipides membranaires ainsi que leur régulation constituent des éléments primordiaux à la transmission du signal provenant du TCR. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est l'enzyme qui, lorsque activé, catalyse la phosphorylation en 3' des dérivés du phosphatidylinositol (PI) pour générer les PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ servant au recrutement des protéines à la membrane via leur domaine PH (*pleckstrin homology*). L'importance du PIP₃ dans la signalisation BCR est démontré par son rôle dans la translocation de composants clés de la transduction des signaux, incluant PLC γ (Falasca *et al.*, 1998) et la Bruton's tyrosine kinase (Btk) (Salim *et al.*, 1996; Bolland *et al.*, 1998; Scharenberg *et al.*, 1998). À l'inverse, la

protéine SHIP (*SH2-containing inositol 5'-phosphatase*) déphosphoryle les phosphoinositides et l'inositol phosphate en position 5 (Kavanaugh *et al.*, 1996), et dont le substrat majeur *in vivo* est le PIP₃, formé par l'action de la PI3-K (Damen *et al.*, 1996; Lioubin *et al.*, 1996). Donc, on considère que SHIP module négativement la transduction des signaux en hydrolysant le PIP₃, prévenant ainsi l'assemblage de divers complexes de signalisation dont ceux capables de médier l'hydrolyse de PIP₂ et la mobilisation du Ca²⁺ (Ono *et al.*, 1996).

1.6 Régulation de Ras dans la cellule T

Le groupe de protéines liant le nucléotide guanine (protéine G) alterne entre un état lié au guanosine diphosphate (GDP) ou au guanosine triphosphate (GTP) et opère comme interrupteur contrôlant l'activation cellulaire en réponse aux stimulus extérieurs. Ces GTP hydrolases (GTPases), lorsque liées au GTP adoptent une conformation active qui leur permettent d'interagir avec des effecteurs en aval régulant ainsi d'importants processus biologiques. Le prototype des petites GTPases, Ras, est activé de façon rapide et soutenue en réponse à l'activation par le TCR, ou encore par la stimulation avec des cytokines telles les interleukines IL-2 et IL-15 (Acuto *et al.*, 2000; Genot *et al.*, 2000). En plus d'être nécessaire au développement des thymocytes, Ras continue à être important chez les cellules T matures pour les fonctions du récepteur à l'antigène. Ainsi, la perte de ses fonctions prévient l'activation par le TCR et l'induction de l'expression de gènes (Genot *et al.*, 2000). Lorsque Ras est activé, la GTPase stimule de multiples effecteurs de voies de signalisation incluant l'importante voie des kinases Raf-1/MEK/ERK1/2 et les voies de signalisation contrôlées par les Rac/Rho GTPases (voir Figure A) (Genot *et al.*, 1996; Genot *et al.*, 1998). Les effecteurs importants de Ras dans les lymphocytes T matures sont des facteurs de transcription incluant la protéine de la famille ETS Elk-1, le SRF (*serum response factor*), AP-1 et des membres de la famille NF-AT (Cantrell, 2002).

L'activité des GTPases comme Ras est contrôlée par deux classes de protéines régulatrices : les protéines GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) et les protéines GAPs (*GTPase activating proteins*). Les GEFs servent de promoteur de transition de la conformation

inactive liée au GDP à la forme active liant le GTP, alors que les GTPases stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP, inactivant ainsi la GTPase (voir Figure B). Une des protéines GEF bien connue et conservée chez plusieurs espèces est Sos (*Son of sevenless*), qui interagit constitutivement avec la protéine adaptatrice Grb2. Cette dernière possède un domaine SH2 qui peut lier des phosphotyrosines retrouvées sur différents récepteurs et adaptateurs et sert ainsi au recrutement de Sos à la membrane en réponse à l'activation de tyrosine kinase (Cantrell, 2002). La formation de ce complexe résulte en l'accumulation de Ras-GTP activé qui en activant la kinase Raf, initie l'activation de la cascade des MAP kinases. L'activation de cette cascade a été montrée comme critique pour la prolifération cellulaire (Alessi *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1994). Une autre Ras GEF est aussi retrouvé chez le lymphocyte, la RasGRP (*guanyl nucleotide-releasing protein*), qui contient un domaine de liaison fonctionnel de type C1 liant le diacylglycerol (DAG)/phorbol ester pouvant cibler la protéine au niveau de la membrane, lieu où Ras est constitutivement situé (Dower *et al.*, 2000; Roose *et al.*, 2000). À l'opposé, la p120RasGAP est une protéine qui régule négativement la signalisation par Ras en stimulant son activité GTPasique intrinsèque (Trahey *et al.*, 1988). La délétion du gène encodant RasGAP produit un phénotype affectant plusieurs systèmes comme on s'y attendrait pour une enzyme clé retrouvée en aval de multiples voies de signalisation (Henkemeyer *et al.*, 1995). Son interaction avec la protéine SOCS3 a été décrite suite à la stimulation avec l'IL-2 et la résultante de cette interaction semble être l'activation de Ras (Cacalano *et al.*, 2001). La formation de ce complexe pourrait inhiber allostériquement les fonctions de RasGAP, ou encore séquestrer ce régulateur négatif et ainsi physiquement prévenir l'interaction avec Ras. Dans d'autres systèmes, un modèle de régulation négative de Ras par RasGAP a été proposé, via l'interaction avec deux des membres de la famille de protéine adaptatrice Dok, Dok-1 et Dok-2 (voir section 3).

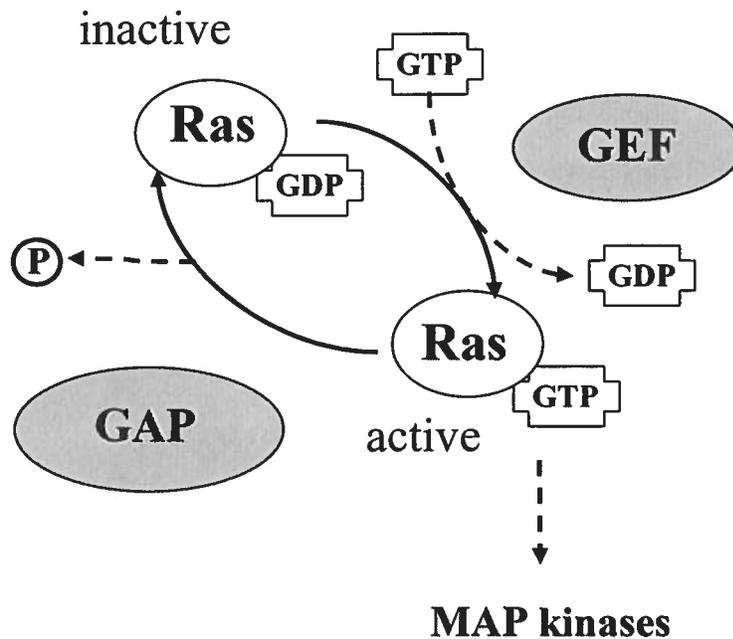


Figure B: Régulation de la GTPase p21Ras.

L'activation cellulaire mène à l'activation de la protéine Ras, par l'échange de GDP pour du GTP, ce qui rend la GTPase active. Cet échange est catalysé par l'action de protéine de type GEF (Guanine exchange factor) tel Sos. Ras peut alors agir sur ses effecteurs tel Raf-1, induisant l'activation des MAPkinases. L'activité GTPasique intrinsèque de Ras provoque le retour vers la forme inactive liée au GDP. Cette réaction est favorisée par l'action de protéine de type GAP (GTPase activating protein) tel RasGAP.

2 Les protéines adaptatrices

Il est maintenant bien connu qu'un groupe de protéines appelées protéines adaptatrices sert un rôle essentiel à l'activation cellulaire. Les protéines adaptatrices se définissent par une absence d'activité enzymatique ou transcriptionnelle et expriment une variété de domaines de liaison (SH2, SH3, PH et PTB) et/ou plusieurs motifs contenant un résidu tyrosine pouvant être phosphorylé. Ces domaines et motifs spécialisés vont permettre diverses interactions entre

protéines ou encore entre protéines et lipides. De cette façon, la protéine adaptatrice sert de plateforme de liaison et de rassemblement pour plusieurs molécules impliquées dans la transduction de signaux et joue donc un rôle central dans l'intégration du signal au niveau intracellulaire. Ces protéines peuvent agir de plus d'une façon, soit en recrutant une molécule effectrice au bon compartiment cellulaire, en stabilisant ou en induisant l'interaction entre deux protéines ou encore en régulant directement l'activité d'une enzyme.

2.1 Domaines Structuraux

Pour remplir leurs fonctions, les protéines adaptatrices sont composées de différents domaines modulaires qui lient et recrutent d'autres protéines signalétiques. Les interactions protéine-protéine et protéine-lipide impliquées se produisent via des domaines tels PH, PTB, SH2 et SH3. Une protéine portant plus d'un de ces domaines, et possiblement des motifs d'association à ces domaines, permet ainsi l'association simultanée à deux ou plusieurs protéines et de cette façon favorise l'assemblage d'un complexe protéique de signalisation autour d'un récepteur activé.

2.1.1 Domaine PH (*pleckstrin homology*)

Les domaines PH sont plutôt voués à la reconnaissance de phospholipides membranaires, de par leur capacité à lier les groupements chargés à la tête de polyphosphoinositides générés lors de l'activation de la cellule (Lemmon *et al.*, 2000). Cela permet le ciblage de protéines qui portent des domaines PH au niveau de la face interne de la membrane plasmique, là où se situe potentiellement leur cible ou encore d'autres régulateurs pouvant moduler leur activité. Dès lors, l'action d'enzymes comme les phosphatidylinositol (PI) kinases, les inositol phosphatases et les phospholipases peut être intégrée à la régulation de la signalisation intracellulaire. Les domaines PH sont souvent retrouvés en conjonction avec des domaines PTB, SH2 ou SH3 permettant ainsi l'action en synergie de ces domaines dans la régulation de protéines de signalisation. C'est par exemple le cas pour la tyrosine kinase cytoplasmique Btk, qui porte un domaine PH, suivi d'un domaine SH3, puis SH2, et le domaine

kinase (Salim *et al.*, 1996). Le recrutement à la membrane via le domaine PH, suite à la production PI-3,4,5-P₃, permet subséquemment l'interaction des domaines SH2, SH3 et kinase avec leurs cibles.

2.1.2 Domaine SH2 (*Src-homology 2*)

Les domaines SH2 sont des modules reconnaissant de petits motifs peptidiques comprenant une phosphotyrosine (pTyr) suivi de trois à cinq résidus COOH-terminal. Ces séquences précises dictent quelles protéines contenant un domaine SH2 s'associent à un récepteur donné, et ainsi contribuent à déterminer quelles voies d'activation seront empruntées. Ces domaines sont couplés directement ou indirectement à des effecteurs de la signalisation tels des protéines kinases, phosphatases ou guanosine triphosphatases (GTPases) (Pawson *et al.*, 1997). Par exemple, suite à l'engagement du TCR, entraînant la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine de LAT, c'est par leur domaine SH2 que seront recrutées diverses protéines telles GRB2, PLC γ 1, ITK et PI3K (Koretzky *et al.*, 2001).

2.1.3 Domaine PTB (*Phosphotyrosine binding*)

Lors d'études sur les domaines PTB des molécules adaptatrices Shc et IRS-1 (*insuline receptor substrate-1*), il a été démontré que ces domaines reconnaissent des motifs pTyr qui sont précédés par des résidus formant une structure secondaire de type β (van der Geer *et al.*, 1995). Ces résidus forment souvent la séquence consensus NPXpY, et la spécificité de la reconnaissance est plutôt attribuable aux résidus hydrophobiques en position cinq à huit en NH₂-terminal du résidu pTyr (Trub *et al.*, 1995; van der Geer *et al.*, 1996). Ces domaines se différencient donc des domaines SH2 de par la séquence entourant le résidu pTyr et par la configuration structurale du motif phosphorylé, qui semble plus importante pour la reconnaissance par le domaine PTB (Zhou *et al.*, 1995). Aussi, le domaine PTB de Shc a été montré comme interagissant avec PTP-PEST à travers un motif NPLH (Charest *et al.*, 1996). Certains domaines PTB des protéines X11, FE65 et Numb peuvent aussi lier des peptides contenant des motifs non-phosphorylés (Borg *et al.*, 1996; Li, S. C. *et al.*, 1997; Dho *et al.*,

1998). Cela suggère que, alors que les domaines SH2 semblent plutôt consacrer à la reconnaissance de phosphotyrosine, les domaines PTB sont plutôt des éléments de reconnaissance de peptide et leur spécificité peut être plus dépendante de la structure que de la séquence linéaire du motif.

Certaines molécules possèdent à la fois un domaine PH suivi d'un domaine PTB et confèrent deux éléments de localisation membranaire de la protéine (Pitcher *et al.*, 1995; Stam *et al.*, 1997). Le domaine PH contribue à la liaison de phospholipides, alors que le domaine PTB médie subséquent le ciblage à la membrane suite à l'interaction avec le récepteur activé. C'est aussi le cas de l'IRS-1 qui nécessite les domaines PH et PTB intacts pour être efficacement couplé au récepteur à l'insuline (IR) et être ensuite phosphorylé (Yenush *et al.*, 1996).

2.1.4 Domaine SH3 (*Src-homology 3*)

Les domaines de type SH3 sont dévoués à la liaison de séquences riches en prolines avec le consensus PXXP, qui forment une structure secondaire bien particulière (Feng *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994). Certaines protéines peuvent avoir de multiples domaines SH3 permettant l'ancrage de plusieurs ligands. Il semble d'ailleurs qu'un rôle principal des domaines SH3 soit de former des complexes oligomériques fonctionnels, souvent en conjonction avec d'autres domaines modulaires (Cohen *et al.*, 1995; Pawson, 1995).

2.2 Protéines adaptatrices membranaires et cytosoliques

Dans la signalisation lymphocytaire, quatre protéines transmembranaires sont bien connues : LAT, PAG/Cbp, TRIM et SIT (Leo *et al.*, 2001). Les domaines cytoplasmiques de ces protéines sont très riches en résidus tyrosine formant ainsi des motifs potentiels de liaison à des domaines SH2 contenus dans plusieurs protéines de signalisation intracellulaire, en l'occurrence des protéines adaptatrices cytosoliques comme SLP-76, Grb2, Gads et Cbl. Ainsi, ces protéines membranaires jouent le rôle de recruteur au niveau de la face interne de la

membrane plasmique, là où les signaux sont conduits suite à l'engagement d'un récepteur. D'ailleurs, LAT et PAG ont été démontrés comme résidants dans les radeaux lipidiques. L'exclusion de la protéine LAT des radeaux lipidiques abolit la signalisation via le TCR, témoignant que l'intégrité de ces microdomaines et la présence de cette protéine adaptatrice est essentielle à l'activation du lymphocyte (Lin *et al.*, 1999). L'examen de souris déficientes pour LAT démontre aussi le rôle essentiel de cette protéine dans le développement des cellules T (Zhang, W. *et al.*, 1999). L'activation maximale de protéines centrales tel PLC γ 1 et ERK dépend également de l'apport d'une autre molécule adaptatrice provenant du cytosol, SLP-76, recrutée via l'association constitutive avec Gads (Yablonski *et al.*, 2001). Une région riche en proline de SLP-76 est nécessaire pour l'activation maximale de PLC γ 1, témoignant que l'interaction de la phospholipase avec deux protéines adaptatrices servant à son recrutement est essentielle pour les fonctions de l'enzyme. Deux protéines adaptatrices bien connues, Shc et Grb2, affectent aussi le développement et les fonctions effectrices du lymphocyte T (Gong *et al.*, 2001; Zhang, L. *et al.*, 2003). Ces éléments jouent un rôle important dans l'activation des cascades des Ras-MAPK via le recrutement du facteur d'échange Sos.

Certaines protéines adaptatrices exercent des fonctions régulatrices positives (LAT, SLP-76, Gads,...) alors que d'autres jouent un rôle pivot dans la régulation négative de la signalisation via l'immunorécepteur (PAG, Dok, Cbl, SLAP,...). Trois mécanismes de régulation négative peuvent être envisagés : 1) via le recrutement/activation de molécules effectrices de régulation négative; 2) par le déplacement de molécules de régulation positive et; 3) via l'élimination (dégradation) de composants essentiels à la machinerie cellulaire (Leo *et al.*, 2001). L'état d'activation de la cellule T est contrôlé par une fine balance d'apports de régulation positive et négative au centre duquel agissent d'importantes molécules adaptatrices. Il est à noter que certaines protéines adaptatrices (comme Dok, Cbl) peuvent exercer à la fois un rôle positif ou un rôle négatif. Cela dépend principalement de l'état de phosphorylation, du type cellulaire à l'intérieur duquel la protéine est exprimée et du compartiment cellulaire où la protéine est ciblée.

3 Famille Dok (Downstream of tyrosine kinase)

La famille de protéine Dok (Downstream of tyrosine kinase) est une nouvelle famille de protéine de type adaptatrice contenant actuellement cinq membres. Dok-1 (Dok, p62dok) représente le prototype de la famille et a été caractérisé dans les premiers temps pour son association à la molécule Ras GTPase activating protein (RasGAP) (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi *et al.*, 1997). Plus récemment, deux protéines partageant une homologie de séquence considérable avec la portion N-terminal de Dok-1 ont été clonées, soient Dok-2 (p56dok, FRIP, Dok-R) (Di Cristofano *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998b; Nelms *et al.*, 1998b; Lock *et al.*, 1999) et Dok-3 (Dok-L) (Cong *et al.*, 1999; Lemay *et al.*, 2000). Ces trois protéines, et plus particulièrement Dok-2 et -3, sont essentiellement exprimées dans les cellules hématopoïétiques, alors que Dok-1 est aussi exprimé significativement, bien qu'à des niveaux réduits, dans des tissus non-hématopoïétiques (Lemay *et al.*, 2000). Dok-1 et Dok-2 sont exprimés largement dans les cellules T, mais pas Dok-3, alors que Dok-2 n'est pas contenu dans les cellules B. Ces trois Dok pourraient donc servir des buts distincts dans les cellules hématopoïétiques. À la recherche de nouveaux membres à cette famille grandissante de molécules adaptatrices, deux protéines, Dok-4 et Dok-5, ont été identifiées chez la souris (Grimm *et al.*, 2001), puis chez l'humain (Favre *et al.*, 2003). Ces protéines sont exprimées principalement dans des cellules non-hématopoïétiques et possèdent une forte homologie entre elles en comparaison avec les autres membres de la famille formant ainsi un sous-groupe de la famille Dok.

Les cinq membres de la famille possèdent une structure similaire dans leur portion N-terminale qui comporte un domaine d'homologie pleckstrin (PH) suivie d'un domaine de liaison à des phosphotyrosines (PTB) (voir Figure C). Ce dernier domaine renferme aussi un motif de séquence d'homologie Dok (DKH; Dok homology sequence motif), WPxxxLRxxGxDxxxFxFeGR, retrouvé chez les cinq membres de la famille (Di Cristofano *et al.*, 1998; Lock *et al.*, 1999; Favre *et al.*, 2003). La portion C-terminale possède quant à elle de nombreuses tyrosines contenues dans des motifs de liaison à des domaines SH2 retrouvés chez plusieurs protéines impliquées dans la transduction de signaux. La portion carboxy-terminale des Dok peut donc servir de plate-forme d'assemblage de complexes de signalisation induits

par les tyrosine kinases. En terme de séquence, c'est principalement dans la portion C-terminale que se différencient les cinq membres de la famille Dok. Notamment, on y retrouve, chez Dok-1 et Dok-2, une fréquence élevée de résidus prolines, contenus dans des motifs PxxP, pouvant potentiellement servir de motif de liaison à des domaines de type SH3. Ces cinq molécules forment donc une famille de protéines adaptatrices qui, malgré leur provenance d'un ancêtre commun, possèdent également une diversité en expression et séquence qui leur assurent des fonctions spécifiques à travers tout l'organisme.

En séquence et surtout en structure, il est possible de constater que Dok-1 et Dok-2 possède une homologie limitée à de petite région des protéines de la famille IRS (*insulin receptor substrates*). Cette famille de protéines possède aussi un domaine N-terminal PH adjacent à domaine PTB puis de multiples sites de phosphorylation. En particulier, il existe une conservation de séquence avec le domaine minimal de liaison aux phosphotyrosines (PTB) des IRS (O'Neill *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1995). De plus, la cristallographie du domaine PTB de la protéine IRS-1 a été effectuée et a permis d'identifier deux résidus arginine faisant contact avec la phosphotyrosine sur son site cible (Eck *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). Ces mêmes résidus semblent être conservés chez les protéines Dok-1 et Dok-2, témoignant du fait que les protéines de la famille Dok et de la famille IRS sont membres de deux sous-familles reliées (Jones *et al.*, 1998b; Nelms *et al.*, 1998b).

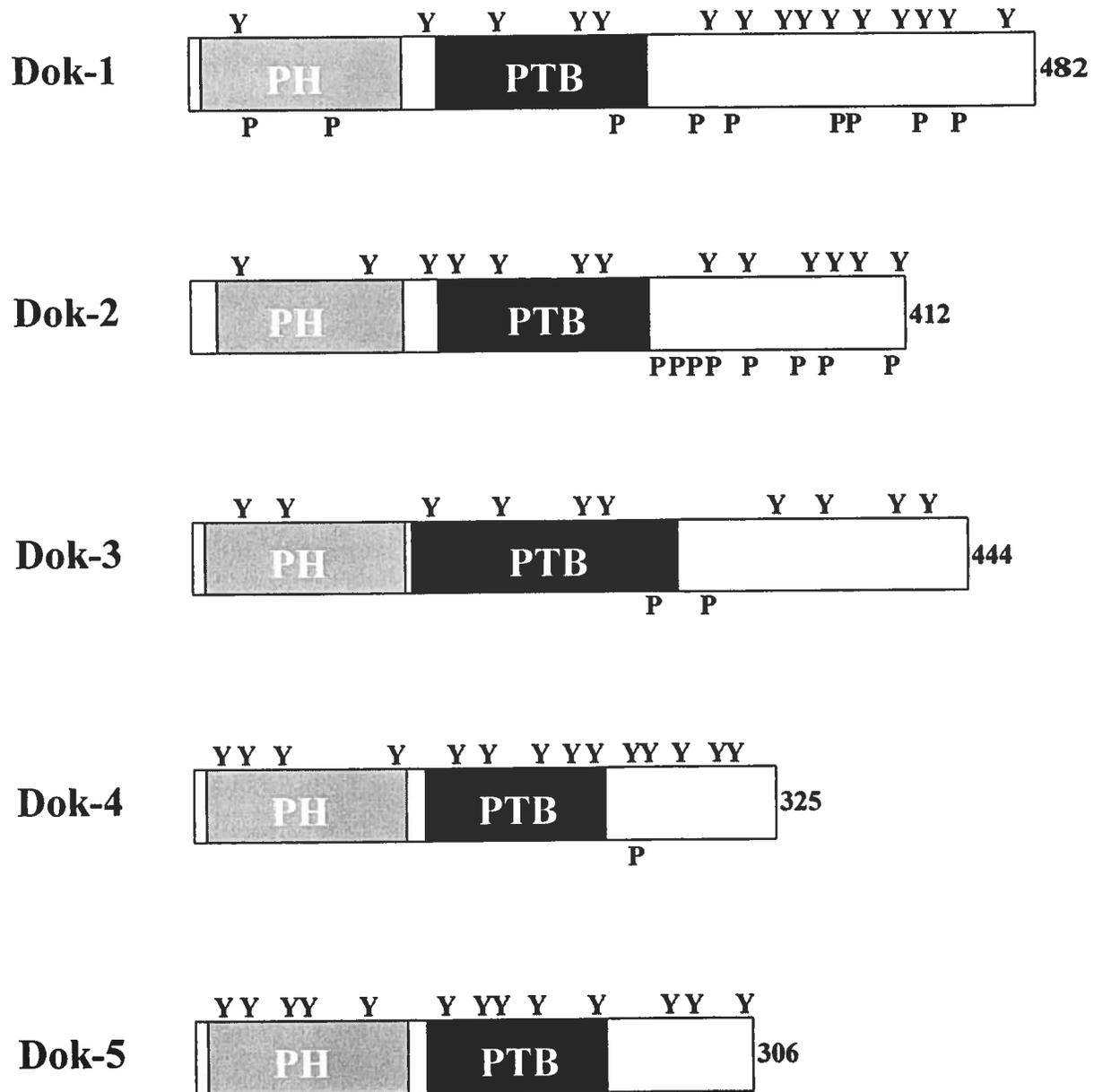


Figure C: Représentation schématique des cinq membres de la famille Dok.

PH; Pleckstrin homology, PTB; Phosphotyrosine binding, Y; tyrosine, P; proline dans un motif PxxP

3.1 Dok-1

La protéine Dok-1 (Dok, p62dok) est la première protéine de la famille Dok à avoir été décrite. Une attention particulière a été portée à cette molécule puisqu'on la retrouvait constitutivement phosphorylée sur résidus tyrosine dans des cellules de leucémie chronique myélomateuse (CML; *chronic myelogenous leukemia*) (Wisniewski *et al.*, 1994). Ces cellules expriment la protéine p210^{bcr-abl}, une protéine chimérique avec une activité tyrosine kinase sans contrôle négatif qui est responsable de la leucémie. Cette protéine de 62 kDa, longtemps décrite comme molécule phosphorylée par une multitude de PTK et associée à RasGAP, fut récemment clonée et caractérisée (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi *et al.*, 1997).

3.1.1 Séquence, structure et expression

La protéine Dok-1 humaine est composée de 481 acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 53 kDa, mais migrant plutôt à 62 kDa sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (Carpino *et al.*, 1997). Elle contient 14 résidus tyrosine dont 10 dans le dernier tiers (C-terminal) de la protéine et possèdent également 10 motifs PxxP dont 7 dans la portion C-terminale. Certaines tyrosines sont contenues dans un motif spécifique aux substrats de protéines kinases dont c-Abl et Src (Songyang *et al.*, 1995b) ou encore dans un motif proposé pour l'association au SH2 de Csk (pYxxV) ou SHIP (pYxxL/I/V) (Songyang *et al.*, 1994; Pawson, 1995). De plus, 6 tyrosines sont retrouvées dans un motif avec un résidu proline en position +3 (pYxxP) représentant un site cible préférentiel de liaison au SH2 de RasGAP, Abl, Crk et d'autres sites cibles de domaines SH2 sont aussi présent (Songyang *et al.*, 1993). L'homologue murin de Dok-1 est de 482 acides aminés et est 83% identique à la protéine humaine, alors que le PTB est conservé à 100% (Yamanashi *et al.*, 1997). Des sites cibles de domaine SH2, un seul n'est pas conservé chez Dok-1 humain. L'expression de Dok-1 est prépondérante dans les tissus hématopoïétiques, mais aussi présente dans d'autres tissus dont les neurones (voir tableau A).

	PM (kDa)	Expression		Phosphorylation			Associations potentielles
		Tissulaire	Cellulaire (hématopoïétique)	PTK	RTK, autres		
Dok-1 Dok p62dok	62	Rate, thymus, moelle osseuse, cerveau	Lymphocytes T et B, macrophages, mastocyte, cellules myéloïdes	v-Abl, Bcr-Abl, Src, Lck, Fyn Tec	c-Kit IR BCR, FcγRIIB, CD2, CD28, SLAM	RasGAP, SHIP-1, Csk v-Abl, Src, Lck, Tec Nck	
Dok-2 Dok-R p56dok	56	Rate, thymus, ganglions lymphatiques, cœur	Lymphocyte T, macrophages, mastocyte, cellules myéloïdes	Bcr-abl, c-Abl Lyn, Lck Tec	Tek/Tie2 IL-2R, 3R, 4R IR, EGFR CD2, SLAM	RasGAP, SHIP Abl, Lck, Tec Nck, Crk Tek/Tie2, IL4R	
Dok-3 DokL	58-64	Rate, moelle osseuse, poumons	Lymphocyte B, macrophage, mastocyte, cellules myéloïdes	Abl, Lck, Fyn, Lyn	BCR FcγRI	Abl SHIP-1, Csk	
Dok-4	41	Cerveau, cœur, poumons, reins	Lymphocyte T*	Src, Fyn	c-Ret	c-Ret, Tek/Tie2	
Dok-5	36	Cerveau	Lymphocyte T* ⁺			c-Ret, Tek/Tie2	

* démontré seulement pour l'ARNm
+ expression inducible

Tableau A: Résumé des principales caractéristiques des protéines de la famille Dok

PM; poids moléculaire, PTK; protéine tyrosine kinase, RTK; Récepteur tyrosine kinase

3.1.2 Phosphorylation et associations

3.1.2.1 Dans différents systèmes

Étant donné les multiples sites potentiels de phosphorylation à travers la protéine Dok-1, il n'est pas étonnant qu'on la retrouve phosphorylée dans plusieurs systèmes. Une protéine de 62 kDa (p62) a été décrite comme étant hautement phosphorylée dans des cellules transformées par v-Src, v-Abl, v-Fps, v-Fms, Bcr-Abl et le récepteur EGF activé (Koch *et al.*, 1989; Ellis *et al.*, 1990b; Lugo *et al.*, 1990; Bouton *et al.*, 1991; Moran *et al.*, 1991; Muller *et al.*, 1991; DeClue *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1996). Vraisemblablement, la même protéine de 62 kDa a été décrite comme étant rapidement phosphorylée suite à l'activation de divers facteurs de croissance incluant le PDGF (*platelet-derived growth factor*), l'insuline, l'IGF (*insulin-like growth factor*), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et le CSF-1 (*colony-stimulating factor-1*) (Heidaran *et al.*, 1992; Hosomi *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1995; Sanchez-Margalet *et al.*, 1995). La phosphorylation de p62 a aussi été décrite suite à l'engagement d'immunorécepteurs couplés à des tyrosine kinases cytosoliques, incluant le récepteur des cellules B et le récepteur FcγRIIIA (CD16) (Gold *et al.*, 1993; Darby *et al.*, 1994). Globalement, cette molécule de 62 kDa est donc retrouvée phosphorylée dans une multitude de conditions à l'intérieur d'un spectre large de systèmes cellulaires.

Plus récemment, la purification, le clonage et la caractérisation de p62 ont été effectués et ont permis d'identifier cette molécule comme étant Dok-1 (Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi *et al.*, 1997). Dans ces études, on observe la phosphorylation de façon préminente de Dok-1 dans des cellules transformées par la p210bcr-Abl et p160v-Abl, et suite à l'activation du récepteur tyrosine kinase c-Kit. Dok-1 y est démontré comme s'associant à la GTPase RasGAP ainsi qu'avec v-Abl. L'association à RasGAP n'est observée qu'avec la forme phosphorylée de Dok-1 et est aussi observée *in vitro* avec une protéine de fusion portant le domaine SH2 N-terminal de RasGAP fusionné à la glutathione S-transférase. L'interaction de la PTK p210bcr-Abl et son substrat Dok-1 a aussi été rapportée dans une autre étude (Bhat *et al.*, 1998).

En utilisant une nouvelle méthode chimique pour identifier les substrats cellulaires directs de l'oncoprotéine v-Src, Shah et al. ont démontré que deux sites de phosphorylation étaient directement phosphorylés sur Dok-1 par v-Src (Shah *et al.*, 2002). En effet, la phosphorylation directe par v-Src de la tyrosine Tyr361 de Dok-1 contribue à l'association à RasGAP, alors que la phosphorylation dépendante de v-Src du résidu Tyr450 de Dok-1 permet l'association à Csk. Ces événements de phosphorylation contribuent donc au recrutement de molécule de signalisation comme RasGAP et Csk, portant des domaines de type SH2 (voir Figure D), au complexe signalétique impliquant l'adaptateur Dok-1. Ainsi, une séquence spécifique d'événements de phosphorylation par v-Src est potentiellement liée à deux mécanismes de signalisation rétrograde différents, soit la régulation négative de Ras (par RasGAP) et de kinases cytoplasmiques de la famille Src (par Csk), dans deux complexes distincts impliquant Dok-1. En vue de ces résultats, l'implication de Dok-1 dans le contrôle négatif de la différenciation et la prolifération cellulaire est donc suggérée par la diversité des kinases oncogéniques qui induisent sa phosphorylation. Outre les kinases de la famille Src, la tyrosine kinase Tec a été rapportée comme pouvant phosphoryler Dok-1 de façon efficace (Yang *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000), en plus de pouvoir s'associer, via son domaine SH2, à Dok-1 dans les cellules B et myéloïdes (van Dijk *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2002).

Src



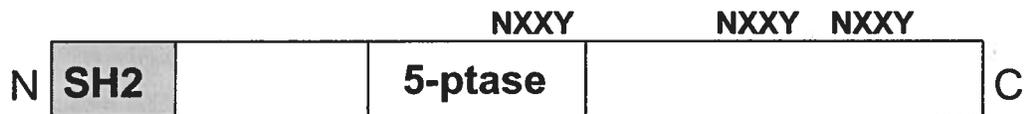
RasGAP



Csk



SHIP-1



Nck



Figure D: Représentation schématique de différentes protéines s'associant aux protéines Dok.

SH; Src homology, PH; Pleckstrin homology, 5-ptase; domaine catalytique phosphatase, Y; tyrosine, N; asparagine

3.1.2.2 Dans la signalisation lymphocytaire

Au niveau de la signalisation lymphocytaire, Dok-1 démontre aussi une implication dans l'inhibition par Fc γ RIIB de l'activation de la cellule B par le récepteur à l'antigène (BCR) (Tamir *et al.*, 2000). La phosphorylation ainsi que la liaison à RasGAP est observée suite à la co-agrégation Fc γ RIIB-BCR. Cette réponse corrèle avec la phosphorylation de SHIP et la formation de complexes SHIP-Dok-1, médiée par l'interaction entre le PTB de Dok-1 avec des résidus phosphotyrosyls contenus dans SHIP. Dans ce système, SHIP sert d'adaptateur pour l'activation de Dok-1 par Fc γ RIIB.

Dans la cellule T, Dok-1 représente un substrat de p56Lck et p59Fyn, deux kinases de la famille Src (Fukai *et al.*, 2000; Nemorin *et al.*, 2000b; Martelli *et al.*, 2001). Il a été démontré dans le laboratoire que Lck peut aussi s'associer via son domaine SH2 à la forme phosphorylée sur tyrosine de Dok-1 (Nemorin *et al.*, 2000b). Dok-1 est aussi phosphorylé sur tyrosines et associé à Tec, une PTK aussi exprimée dans la cellule T (Gerard *et al.*, 2004). L'activation de ces événements conduisant à la phosphorylation de Dok-1 peut être engendrée par un signal indépendant de l'antigène impliquant des molécules telles CD2 (Harriague *et al.*, 2000; Nemorin *et al.*, 2000b; Martelli *et al.*, 2001), CD28 (Nunes *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999) et la protéine SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) (Latour *et al.*, 2001). Bien que la stimulation par le CD3 seul ne résulte pas en la phosphorylation de Dok-1, (Nemorin *et al.*, 2000b), il existe des indications que la signalisation TCR-CD3 affecte la phosphorylation de Dok-1 induite par CD2, bien que des résultats divergents aient été obtenus (Harriague *et al.*, 2000; Martelli *et al.*, 2001). Aussi, il a été démontré que le co-engagement du TCR-CD3 et CD28 parvenait à inhiber la phosphorylation de Dok-1 induite par CD28 (Michel *et al.*, 2001).

3.1.3 Effets et fonctions

Les études *in vivo* suggèrent un rôle suppresseur par Dok-1 des voies de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire. Des souris déficientes pour le gène encodant la protéine Dok-1 (Dok-1^{-/-}) ont été générées (Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001).

L'absence de Dok-1 dans les cellules B issues de souris Dok-1^{-/-} illustre son rôle inhibiteur de l'activation des MAP kinases induite par la stimulation du BCR ainsi que son implication indispensable dans la régulation négative de la prolifération cellulaire par FcγRIIB (Yamanashi *et al.*, 2000). La comparaison de la prolifération cellulaire induite par des facteurs de croissance chez différentes lignées hématopoïétiques (dont des thymocytes) entre les souris sauvages et Dok-1^{-/-} démontre aussi que Dok-1 agit comme régulateur négatif (Di Cristofano *et al.*, 2001). De même, l'absence de Dok-1 résulte en une activation soutenue de Ras et des MAPK après avoir enlevé ces mêmes facteurs de croissance. La réintroduction de Dok-1 dans ces cellules parvient à diminuer la suractivation des MAPK, prouvant que Dok-1 est bien responsable des effets observés (Zhao *et al.*, 2001). De plus, la capacité transformante de p210bcr-abl, lorsque introduit dans des cellules de la moelle osseuse, cause une maladie myéloproliférative fatale avec une latence plus courte en absence de Dok-1 (Di Cristofano *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats démontre un rôle négatif de Dok-1 dans la prolifération cellulaire et l'oncogenèse. L'inactivation de Dok-1 dans ces souris ne résulte pas en un phénotype sévère non dissimulé. Cependant, comme d'autres membres de la famille Dok semblent influencer négativement des événements de signalisation distincts mais aussi commun avec Dok-1, ce résultat n'est pas surprenant. En effet, il est fort possible qu'un autre membre de la famille Dok puisse compenser l'absence de Dok-1, particulièrement Dok-2 très semblable en séquence d'acides aminés et co-exprimé avec Dok-1 dans plusieurs tissus.

Plusieurs études ont démontré Dok-1 comme régulateur négatif de Ras et des MAP kinases. L'association à la p120RasGAP confère à Dok-1 une fonction de régulation négative dans plusieurs systèmes, incluant dans la signalisation CD2 chez le lymphocyte T, comme précédemment démontré dans notre laboratoire (Nemorin *et al.*, 2001). Dans ce modèle, RasGAP pourrait être recruté par Dok-1 à proximité de sa molécule cible Ras, via une interaction des domaines SH2 de RasGAP à une ou plusieurs phosphotyrosines de Dok-1, et ainsi inactiver Ras en stimulant son activité GTPasique (voir Figure B). Cependant, dans d'autres systèmes, l'effet négatif de Dok-1 sur la voie des MAPK n'est pas dépendant de l'association à RasGAP, ni de l'association à Nck, un régulateur positif connu de la voie Ras/MAPK (Zhao *et al.*, 2001). L'explication de ces divergences nécessitera d'autres études.

L'inhibition de la signalisation cellulaire par Dok-1 pourrait aussi se faire de différentes façons. Entre autres, Dok-1 s'associe à Csk dans certaines conditions (Neet *et al.*, 1995; Vuica *et al.*, 1997). L'interaction du SH2 de Csk avec les résidus phosphotyrosyls de Dok-1 pourrait ainsi permettre la translocation de la protéine Csk à la membrane ou au niveau de différentes régions du cytosquelette. Aussi, Dok-1 a été montré s'associant à SHIP, qui lorsque recruté à proximité de récepteurs d'activation exerce son activité inhibitrice via ses propriétés de phosphatase (voir section 1.5). Bien que les études ayant montrées l'association SHIP-Dok-1 proposent un rôle d'adaptateur à SHIP, le rôle biologique de cette interaction ainsi que la formation de complexes tri-moléculaire avec d'autres protéines incluant Shc ou CrkL reste toujours à définir (Dunant *et al.*, 2000; Tamir *et al.*, 2000; Sattler *et al.*, 2001).

Enfin, Dok-1 peut aussi agir comme substrat au récepteur tyrosine kinase pour l'insuline (IR) dont l'engagement conduit à la phosphorylation de Dok-1 et à l'association à Nck, une molécule impliquée dans la machinerie contrôlant la motilité cellulaire (Noguchi *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 2001). Dans une de ces études, la surexpression de Dok-1 amplifie la réponse cellulaire migratoire en réponse à l'insuline, conférant à Dok-1 un rôle de régulateur positif (Noguchi *et al.*, 1999). Il est donc apparent que cette protéine puisse servir des buts opposés, vraisemblablement en fonction du type cellulaire impliqué, ainsi que l'identité du récepteur engagé.

3.1.4 Implication des différents domaines

Via la phosphorylation des résidus tyrosines dans sa portion C-terminale, Dok-1 peut exercer ses fonctions par son association à des protéines comme RasGAP et Csk. La contribution fonctionnelle de la portion N-terminale, comprenant les domaines PH et PTB a aussi été investiguée. Dans leurs études chez les souris déficientes pour Dok-1, Zhao et al. ont démontré que la réintroduction de Dok-1 parvenait à ramener l'activation des MAPK à un niveau normal (Zhao *et al.*, 2001). Dans le même système, la réintroduction de Dok-1 dont le domaine PH a été enlevé ne résulte pas en la suppression de l'activité soutenue des MAPK, suggérant que ce domaine, et possiblement son rôle de recruteur à la membrane, soit important

pour les fonctions négatives de la protéine. Les auteurs ont ensuite pu montrer que le domaine PH de Dok-1 était essentiel à la translocation de la protéine du cytosol vers la membrane en réponse au PDGF. Enfin, le domaine PH de Dok-1 est suffisant et nécessaire à la liaison de polyphosphoinositides *in vitro*, et le ciblage de Dok-1 à la membrane est dépendant de l'activité de la PI3-Kinase *in vivo*. Ces observations supportent fortement le modèle selon lequel Dok-1 est régulé par sa translocation à la membrane via son domaine PH de façon à influencer négativement la voie des MAPK.

Un site de phosphorylation par la kinase Src, permettant aussi l'association à RasGAP, a été montré comme étant impliqué dans le pouvoir inhibiteur de Dok-1 sur la transformation induite par v-Src (Shah *et al.*, 2002). Ces résultats confirment ceux obtenus par Baltimore et al. qui démontrait que le domaine PH et la multimérisation de Dok-1 via le domaine PTB sont impliqués dans la régulation négative de la transformation cellulaire dépendante de Src (Songyang *et al.*, 2001). Ce dernier groupe a pu démontrer, à partir d'une banque de peptide combinatoire, que le domaine PTB de Dok-1 pouvait fonctionnellement s'associer de façon préférentielle au motif contenant des phosphotyrosines Y/MxxNxLpY. Ce motif est retrouvé à l'intérieur même de la protéine et est en fait impliqué dans la dimérisation de Dok-1, phénomène qui s'avère nécessaire aux fonctions négatives de la protéine. L'ensemble de ces résultats témoigne donc du fait que Dok-1 requière de multiples éléments d'intégration incluant la localisation, la multimérisation ainsi que la phosphorylation pour pouvoir servir de régulateur négatif de la transformation cellulaire par les tyrosines kinases.

3.2 Dok-2

La protéine Dok-2 (p56dok, Dok-R, FRIP) a aussi été caractérisée pour la première fois à l'intérieur de cellules exprimant la protéine p210^{bcr-abl} issues de patient atteint de la leucémie chronique myélomateuse (CML) (Di Cristofano *et al.*, 1998). Sa découverte a défini une nouvelle famille de protéine se liant à RasGAP.

3.2.1 Séquence, structure et expression

L'ADNc humain de Dok-2 encode 412 acides aminés qui représente une masse moléculaire calculée de 45 548 Da, alors que la protéine migre plutôt en doublet d'environ 54 et 56 kDa (Di Cristofano *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998b; Nelms *et al.*, 1998b). La protéine porte treize tyrosines représentant des sites potentiels de phosphorylation et six motifs riches en proline de type PxxP. Tout comme Dok-1, certains résidus tyrosine sont retrouvés dans un contexte de liaison possible avec RasGAP, Crk, Abl, Src, Shp-2, Nck et autres (Songyang *et al.*, 1995a). Sur l'ensemble de la protéine, Dok-2 est 35% identique à Dok-1 alors que les deux protéines sont fortement similaires en N-terminal (PH = 48% et PTB = 58%). Cependant, certaines tyrosines sont aussi retrouvées dans un contexte de séquence unique à Dok-2, permettant possiblement l'association à un spectre de molécules différent. La protéine Dok-2 humaine est également 72% identique à son homologue murin.

La plus forte expression de Dok-2 s'observe dans les tissus d'origine hématopoïétique (rate, thymus, ganglions lymphatiques, cœur, leucocytes du sang périphérique) et dans les poumons (Di Cristofano *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998b; Nelms *et al.*, 1998b). On retrouve beaucoup d'expression de Dok-2 dans les cellules T et pas d'expression dans les cellules B. Ce profil d'expression est donc semblable à celui de Dok-1 à l'exception des lymphocytes issus de la moelle osseuse. Dok-2 est spécifiquement retrouvé dans un patron d'expression marqué dans le foie embryonnaire, ce qui est en accord avec une expression dans des précurseurs hématopoïétiques (Grimm *et al.*, 2001).

3.2.2 Phosphorylation et associations

3.2.2.1 Dans différents systèmes

Tout comme Dok-1, Dok-2 est retrouvé fortement phosphorylé sur tyrosine dans des cellules exprimant la kinase p210bcr-abl (Di Cristofano *et al.*, 1998). Cette phosphorylation est

essentielle pour pouvoir observer l'association à une protéine de fusion comprenant les domaines SH2-SH3-SH2 de RasGAP. Dok-2 représente aussi un substrat *in vitro* et *in vivo* du RTK Tek/Tie2, un récepteur spécifique aux cellules endothéliales possédant l'angiopoietine-1 comme ligand et jouant un rôle dans le développement vasculaire chez la souris (Jones *et al.*, 1998b). Dans ce système, Dok-2, via son domaine PTB, s'associe au récepteur Tek autophosphorylé. Le récepteur Tek utilise donc une protéine qui lui est liée comme substrat. Ces événements de phosphorylation provoquent l'association des protéines RasGAP et Nck à Dok-2. Par contre, Crk est constitutivement associé, indépendamment de l'état de phosphorylation et vraisemblablement via son domaine SH3 et les séquences riches en proline de Dok-2. La protéine adaptatrice Dok-2 représente aussi un substrat des Src kinases Lyn (et Hck et Src) et du récepteur pour l'EGF, engendrant la création de sites d'association différents en C-terminal pour RasGAP et Nck (Jones *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 1999).

Dok-2 peut également s'associer et interagir de façon processive à la kinase c-Abl (Master *et al.*, 2003). Une première association constitutive se produit entre le domaine SH3 de c-Abl et un motif PMMP de Dok-2. La protéine adaptatrice peut alors servir de substrat à la kinase, permettant l'accrochage du SH2 de c-Abl. Ces interactions mènent à l'augmentation de la phosphorylation de c-Abl, ainsi qu'à une activité kinase accrue. Enfin, témoignant de l'implication de Dok-2 dans de multiples systèmes biologiques, la protéine a également été montrée comme étant phosphorylée dans des plaquettes sanguines (Garcia *et al.*, 2004). Ainsi, Dok-R pourrait aussi participer à une variété de voies de transduction des signaux en assurant la coordination de la formation d'un ou de plusieurs complexes de signalisation spécifique.

3.2.2.2 Dans la signalisation lymphocytaire

Dans la cellule T, des études dans notre laboratoire ont pu démontrer que Dok-2 est phosphorylé suite l'activation par un récepteur chimère EGFR/Lck (Nemorin *et al.*, 2000b). En effet, la kinase Lck semble être responsable de la phosphorylation de Dok-2 qui permet alors l'association au domaine SH2 de la kinase *in vitro*, ce qui est en faveur de l'idée que les PTK cytosoliques phosphorylent des sites reconnues par leur propre SH2 (Songyang *et al.*, 1995b).

Tout comme Dok-1, suite à l'activation des cellules T par CD2, Dok-2 est phosphorylé (Nemorin *et al.*, 2000b). De même, l'activation du lymphocyte T par SLAM induit la phosphorylation de Dok-2, via une interaction avec SHIP, et induit son association à RasGAP (Latour *et al.*, 2001). Dok-2 et Dok-1 sont les protéines majeures phosphorylées sur tyrosine associées à Tec, une PTK aussi exprimée dans la cellule T (Gerard *et al.*, 2004). Ces deux protéines seraient impliquées dans la rétro-inhibition de Tec via la régulation à la baisse de sa phosphorylation et des voies de signalisation en aval dont la voie de Ras (association à RasGAP). Dok-2 est aussi phosphorylé suite à la stimulation des récepteurs pour l'insuline et les cytokines IL-2, IL-3 et IL-4 (Nelms *et al.*, 1998b). Cette phosphorylation permet l'association au domaine SH2 N-terminal de RasGAP *in vitro*. Des évidences *in vitro* suggèrent que Dok-2 s'associe au récepteur à l'IL-4 (IL-4R) via un motif NXXpY et que ce dernier est essentiel pour la phosphorylation de Dok-2. Un mécanisme similaire a aussi été proposé pour la phosphorylation de l'IRS-1 induite par l'IL-4 (Keegan *et al.*, 1994).

3.2.3 Effets et fonctions

Le gène encodant Dok-2 est localisé sur le chromosome 14 à un locus précédemment caractérisé et nommé *hairless* (*hr*) (Jones *et al.*, 1998a; Nelms *et al.*, 1998b). Les souris homozygotes pour l'allèle *hairless* (*hr/hr*) sont hautement susceptibles à la leucémie lymphocytaire et présentent des lymphoadénopathies et des splénomégalies (Meier *et al.*, 1969; Heiniger *et al.*, 1974). Des défauts dans la réponse *in vitro* de cellules T *hr/hr* a aussi été observée (Reske-Kunz *et al.*, 1979; Morrissey *et al.*, 1980). Un gène putatif en doigt de zinc nommé *hairless* exprimé seulement dans les tissus de la peau et du cerveau a été cloné (Cachon-Gonzalez *et al.*, 1994). Aucune expression du gène *hairless* n'a été détectée dans les tissus lymphoïdes, présumant du fait que le phénotype immunologique de leucémie de la souris *hr/hr* pourrait refléter des anomalies génétiques additionnelles, dont Dok-2 est un candidat fort plausible. Les niveaux d'ARN messagers encodant Dok-2 sont de 3 à 5 fois moins élevés dans la souris *hr/hr* et les niveaux protéiques sont aussi significativement réduits alors que les niveaux de Dok-1 sont normaux (Nelms *et al.*, 1998b). La prolifération de cellules T isolées de ganglions lymphatiques axillaires, présentant une lymphoadénopathie, de souris *hr/hr* est

nettement accrue en réponse à l'IL-2 et l'IL-4 (conjointement avec l'activation TCR). Ces résultats, en parallèle avec une prolifération normale de cellules B issues de la rate suite à la stimulation avec un anti-IgM et de l'IL-4, sont en accord avec un rôle important pour Dok-2 dans la régulation négative de la prolifération cellulaire des cellules T. Enfin, la cavité péritonéale de la lignée de souris *hairless* (*hr/hr*), dont les cellules expriment moins de Dok-2, contiennent un nombre plus élevé de macrophages que les souris *+hr*, en accord avec le rôle possible de régulateur de la prolifération des macrophages en plus des cellules T (Suzu *et al.*, 2000).

Un autre groupe a également décrit les fonctions de Dok-2 *in vivo*, en examinant le développement hématopoïétique suite à l'expression forcée de Dok-2 (Gugasyan *et al.*, 2002). *In vitro*, l'expression de Dok-2 dans des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse inhibe dramatiquement la capacité à former des colonies en réponse au M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) et SCF (*stem cell factor*). Dans une souris irradiée, l'introduction de précurseurs de cellules hématopoïétiques exprimant constitutivement Dok-2 résulte dans l'incapacité de repeupler les tissus lymphoïdes. Cet effet est particulièrement drastique sur la repopulation du thymus, qui présente un apport réduit en précurseur ainsi qu'une inhibition de la transition des cellules T $CD4^+CD8^-$ vers $CD4^+CD8^+$, entraînant donc une réduction marquée des lymphocytes T périphériques matures. L'effet est mineur sur le développement myéloïde et des cellules B. De plus, les effets biologiques observés dépendent de l'intégrité des sites fonctionnels d'association à RasGAP et Nck.

D'autres résultats tendent à démontrer que Dok-2 est un inhibiteur de la transduction de signaux par les cytokines dont l'expression peut être induite par ces mêmes cytokines, formant ainsi une boucle de rétro-inhibition (Suzu *et al.*, 2000). La transcription du gène Dok-2 est en effet augmentée chez le macrophage en réponse au M-CSF, au granulocyte/macrophage (GM)-CSF et l'IL-3. En contraste, cet effet n'est pas observé pour Dok-1 en réponse au M-CSF. Dok-2 agit dans ce modèle comme régulateur négatif de la prolifération cellulaire induite par le M-CSF, le G-CSF, l'IL-3 et le SCF. De plus, l'inhibition de l'expression de Dok-2 endogène par l'utilisation d'un ARNm antisens résulte en l'accélération de la prolifération cellulaire illustrée par un nombre de divisions cellulaires accru en culture.

Au niveau moléculaire, la surexpression de Dok-2 diminue l'activation des MAPK et du facteur de transcription AP-1 suite à une stimulation avec l'IL-2 (Nelms *et al.*, 1998b). Dok-2 pourrait médier l'inhibition via le recrutement de RasGAP au récepteur activé, ou en bloquant physiquement l'accès des protéines adaptatrices comme IRS-1/2 et Shc, qui possèdent également un domaine PTB et la capacité d'association au motif NxxY phosphorylé retrouvé sur les récepteurs activés. Ces deux molécules s'associent à l'IL-4R et sont connues comme adaptateurs moléculaires qui lient au complexe Grb2-Sos les récepteurs activés (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992; Myers *et al.*, 1994; Salcini *et al.*, 1994). En contraste, dans certains systèmes, Dok-2 pourrait réguler négativement la voie des MAPkinases indépendamment de son association à RasGAP (et Nck), comme il a été observé suite à la stimulation de l'EGFR (Jones *et al.*, 1999).

Enfin, dans certains systèmes, Dok-2 pourrait avoir un rôle de régulateur positif, comme cela semble le cas dans la migration cellulaire induite par l'angiopoïétine-1 dans des cellules endothéliales (Master *et al.*, 2001). Cet effet implique le recrutement par Dok-2 de l'adaptateur Nck, puis le recrutement et l'activation subséquente de la serine/thréonine kinase Pak, impliquée dans le réarrangement du cytosquelette et la motilité cellulaire (Kiosses *et al.*, 1999; Sells *et al.*, 1999). Dok-2 pourrait aussi servir pour le recrutement de c-Abl à la membrane menant à l'activation de cette kinase et aux changements subséquents dans la dynamique de l'actine et du cytosquelette (Master *et al.*, 2003).

3.2.4 Rôle des différents domaines

Dans leurs études sur le PTB de Dok-2, Jones *et al.* ont pu démontrer que le recrutement de Dok-R au récepteur à l'EGF se produit via le domaine PTB de Dok-2 et deux sites NPxpY autophosphorylés du récepteur (Jones *et al.*, 1999). La mutation des deux résidus arginines conservés (chez Dok-2, Dok-1 et IRSS) du domaine PTB de Dok-2 résulte en la perte d'association au récepteur. Suite à la stimulation EGF, ce domaine est aussi requis pour la phosphorylation de Dok-2 et l'atténuation de la voie des MAP kinases. La délétion du domaine

PH a un effet moins dramatique sur la phosphorylation de Dok-2 que la mutation du domaine PTB, mais la combinaison des deux modifications l'abolie complètement.

Dans une étude sur l'association de Dok-2 au récepteur Tek/Tie2, le domaine PTB reconnaît une tyrosine contenue dans un motif YVNTTLpY (Jones *et al.*, 2003). La phosphotyrosine et la leucine en position -1 s'avèrent importantes pour l'association et la phosphorylation de Dok-2, alors que l'asparagine -4 et la tyrosine -6 ont un effet moins accentué. Cette séquence possède des similarités avec la séquence consensus de liaison au PTB de Dok-1 Y/MxxNxLpY (Songyang *et al.*, 2001). Notamment, la leucine en position -1 et la phosphotyrosine semblent être requis, et la présence d'une asparagine (-3 ou -4) semble importante, mais la substitution de la tyrosine en -6 est tolérée par le PTB de Dok-2. Ces évidences supportent que les domaines PTB ne sont pas restreint à la liaison de phosphopeptides contenus dans un motif NPxpY. Enfin, Jones et al. ont pu démontrer que le domaine PH ainsi que l'action de la PI3-K sont nécessaires pour la localisation et la phosphorylation optimale de Dok-2 par le récepteur Tek/Tie2.

3.3 Dok-3

Un troisième membre de la famille Dok, Dok-3 (DokL), a été plus récemment cloné et caractérisé (Cong *et al.*, 1999; Lemay *et al.*, 2000). Cette protéine de 444 acides aminés chez la souris possède également un domaine PH et PTB possédant une forte homologie avec ceux de Dok-1 et Dok-2. Cependant, la portion C-terminale de Dok-3 est significativement différente, ne possédant que quatre résidus tyrosine, non contenu dans le motif d'association à RasGAP (YxxP). Cette diversité dans la portion C-terminale suggère que Dok-3 pourrait servir de molécule adaptatrice liant une série différentes de molécules de transduction et ainsi faire partie de complexes de signalisation différents. De plus, cette protéine ne porte que deux motifs PxxP et est donc peu sujette à lier des protéines portant des domaines SH3. Son expression est de haut niveau dans la rate, les poumons et la moelle osseuse et particulièrement à de haut niveau dans les cellules B, suggérant donc que Dok-3 est exprimé sélectivement dans les cellules hématopoïétiques. La protéine semble cependant être absente du thymus et des

lymphocytes T, en contraste à Dok-1 et Dok-2 considérablement exprimés dans ce type cellulaire.

Dok-3 a été démontré comme étant phosphorylé sur résidus tyrosine par la kinase Abl et en réponse à la stimulation des immunorécepteurs BCR chez le lymphocyte B et FcγRI chez le macrophage (Cong *et al.*, 1999; Lemay *et al.*, 2000). Ces événements de phosphorylation entraînent l'association de Dok-3 avec Abl qui nécessite à la fois la fonction kinase de Abl et le domaine de liaison PTB de Dok-3. En effet, il y a aussi dans le domaine PTB de Dok-3 conservation de deux arginines (Arg209 et Arg224) homologues à celles retrouvées chez Dok-1, Dok-2 et IRS-1 (Eck *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 2001). La mutation de ces deux résidus compromet fortement l'association à la kinase Abl suggérant que l'association entre les deux protéines implique l'interaction entre des phosphotyrosines de Abl et le domaine PTB de Dok-3. La phosphorylation par le BCR entraîne quant à elle l'association de Dok-3 avec au moins deux molécules inhibitrices, l'inositol phosphatase SHIP-1 et la protéine kinase Csk (Lemay *et al.*, 2000). L'association à SHIP semble se produire selon un mode « bidentate » puisqu'elle nécessite à la fois le domaine SH2 de SHIP liant la forme phosphorylé de Dok-3 et le PTB de Dok-3 liant phospho-SHIP. Un tel modèle d'association a déjà été proposé pour l'association de SHIP à Shc (Pradhan *et al.*, 1997) et pourrait également se produire dans l'association de Dok-3 et Abl.

Fonctionnellement, Dok-3 semble aussi jouer un rôle inhibiteur sur la signalisation intracellulaire. La surexpression de Dok-3 inhibe l'activation de la MAP kinase ERK-2 ainsi que l'activité transformante induite par v-Abl (Lemay *et al.*, 2000). Suite à l'engagement du BCR, la surexpression de Dok-3 entraîne une diminution de la production d'IL-2 dont la cause semble être médiée par l'association à SHIP-1, en supprimant sélectivement la cascade de signalisation des Jun N-terminales protéine kinases (JNK) sans toutefois affecter les cibles connues de SHIP comme Akt/PKB, Btk, PLCγ2 ou Vav-1 (Robson *et al.*, 2004). De façon intéressante, ces deux études sur Dok-3 démontrent également l'absence d'association de Dok-3 à RasGAP, en opposition à Dok-1 et Dok-2. Cela est en accord avec le fait qu'aucun motif YxxP n'est retrouvé dans la séquence de Dok-3 et que les protéines Dok peuvent avoir des partenaires d'association se chevauchant mais aussi différents.

3.4 Dok-4 et Dok-5

Récemment, deux nouvelles protéines, Dok-4 et Dok-5, portant un domaine PH suivi d'un domaine PTB ont été identifiées (Grimm *et al.*, 2001). Chez la souris, Dok-4 est exprimé abondamment dans des tissus variés comme le cerveau, le cœur, les poumons et les reins. L'expression de Dok-5 semble quant à elle restreinte au cerveau. Ce profil d'expression est donc en contraste avec celui des trois premiers membres de la famille plutôt réservés aux cellules de type hématopoïétiques (voir Tableau A). Chez l'humain, l'expression de Dok-4 et Dok-5 semblent différer un peu de la souris, bien que peu ou pas d'expression de ces protéines ne soit détectée dans les organes lymphoïdes (Favre *et al.*, 2003). Pourtant, dans cette étude avec des cellules T humaines, les ARN messagers de Dok-4, puis Dok-5 seulement après stimulation, sont détectés dans les cellules T. Néanmoins, l'expression au niveau protéique de Dok-4 et Dok-5 reste toujours à être démontré.

Dans une première étude, via leur association au récepteur tyrosine kinase c-Ret, Dok-4 et Dok-5 agissent comme molécules effectrices du RTK dans la différenciation neuronale, plus spécifiquement dans l'excroissance de neurites (Grimm *et al.*, 2001). Toutefois, Dok-2, malgré son association au récepteur c-Ret, ne démontre pas ces mêmes aptitudes effectrices. Aucune association à RasGAP ou Nck n'est observée suite à la stimulation de c-Ret, ce qui est peu surprenant étant donné l'absence des motifs tyrosyls préférés par les domaines SH2 de ces protéines. Une seconde étude dans les cellules épithéliales a démontrée que Dok-4 pouvait être phosphorylé par plusieurs tyrosines kinases, incluant des membres de la famille Src (Bedirian *et al.*, 2004). Curieusement, Dok-4, en opposition avec Dok-1 dans la même étude, est constitutivement associé à la membrane dans des cellules de mammifères et dans la levure, par un mécanisme nécessitant les domaines PH et PTB. De plus, la phosphorylation sur tyrosine de Dok-4 requière aussi des domaines PH et PTB intacts, qui représentent en fait les sites majeurs de phosphorylation par Fyn et le RTK Ret. Dans la poursuite de la caractérisation du domaine PTB, Bediran *et al.* n'ont pu observer d'homodimérisation de Dok-4 (telle qu'observée pour Dok-1), ou encore d'hétérodimérisation avec Dok-1. Dans ce modèle, Dok-4 inhibe l'activation du facteur de transcription Elk-1 induite par des tyrosines kinases, ce qui suggère que la signalisation inhibitrice est une propriété générale aux molécules de la famille Dok.

ARTICLE

Participation des auteurs

Iohann Boulay, premier auteur de l'article intitulé "**PTB mediated oligomerization of Dok-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced phosphorylation**" a effectué les expériences ayant menées aux résultats présentés dans les figures 1, 2, 5A et en partie dans les figures 3, 4 et 5B.

Jean-Guy Nemorin, étudiant au doctorat, a effectué en partie les expériences ayant menées aux résultats rapportés dans les figures 3, 4 et 5B.

Le Dr Pascale Duplay a supervisé le projet et contribué à la rédaction du manuscrit.

PTB-mediated oligomerization of Dok-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation¹

Iohann Boulay, Jean-Guy Némorin and Pascale Duplay²

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC Canada

Running title: PTB-mediated oligomerization of Dok

Keywords: T cells, cell activation, signal transduction

Summary

To date, five members of the Dok family have been characterized. In T cells, two members, Dok-1 and Dok-2, are expressed. CD2 or CD28 stimulation, but not CD3/TCR stimulation, induces Dok phosphorylation. Recent evidence suggests that they act as negative regulators of the CD2 and CD28 signaling pathways. In order to identify the molecular mechanisms involved in Dok-mediated inhibition, we have identified proteins that bind to the phosphotyrosine-binding (PTB)³ domain of Dok-1 and Dok-2. We showed that the Dok PTB domain mediates phosphotyrosine-dependent homotypic and heterotypic interactions of Dok-1 and Dok-2. Moreover, in CD2-stimulated Jurkat cells, Dok-1 co-immunoprecipitates with tyrosine-phosphorylated Dok-2. To study the involvement of PTB-mediated oligomerization in Dok function, we have generated Jurkat clones overexpressing Dok-1 or Dok-2 with mutation that prevent oligomerization (in either the PTB domain or Tyr146 of Dok-1 and Tyr139 of Dok-2). These mutations abrogate CD2-induced phosphorylation and the ability of Dok-1 or Dok-2 to inhibit CD2-induced ERK1/2 and NFAT activation. Moreover, overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F interferes with CD2-induced phosphorylation of endogenous Dok whereas overexpression of PTB mutant or WT Dok does not. Taken together, these data indicate that PTB-mediated oligomerization of Dok-1 and Dok-2 represents an essential step for Dok phosphorylation and function.

Introduction

Dok proteins belong to a newly identified family of adaptor molecules. They contain an amino-terminal pleckstrin homology (PH) domain, a central PTB domain and a carboxyl-terminal domain rich in proline and tyrosine residues. The first member identified, Dok-1 (also known as p62dok), was originally shown to be a target of activated protein tyrosine kinases and to associate with RasGAP when phosphorylated (Ellis *et al.*, 1990a; Carpino *et al.*, 1997; Yamanashi *et al.*, 1997). Four other members, Dok-2, also known as Dok-R, FRIP or p56dok, (Di Cristofano *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998b; Nelms *et al.*, 1998a), Dok-3, also known as Dok-L, (Cong *et al.*, 1999; Lemay *et al.*, 2000), Dok-4 and Dok-5 (Grimm *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2003) have been characterized. Dok-4 and Dok-5 define a subfamily within Dok proteins that is more related to the IRS family than the other Dok members (Cai *et al.*, 2003). Dok proteins are implicated in the regulation of multiple biological processes including cell proliferation, transformation and tumorigenesis, cell motility and differentiation. In hematopoietic cells, Dok proteins are implicated in the negative regulation of signaling through growth factor, cytokine and immunoreceptors (Nelms *et al.*, 1998a; Lemay *et al.*, 2000; Suzu *et al.*, 2000; Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001; Nemorin *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2002b; Abramson *et al.*, 2003; Kepley *et al.*, 2004; Robson *et al.*, 2004).

In T cells, both Dok-1 and Dok-2 are expressed. Recently, Dok-4 and Dok-5 mRNA has been shown to be present in human but not in mice (Favre *et al.*, 2003). Dok-1 and Dok-2 seem to play a specific role in signal transduction pathways initiated by CD2 and CD28 receptors. The phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 occurs following CD2 or CD28 stimulation whereas CD3/TCR stimulation does not induce Dok phosphorylation (Nemorin *et al.*, 2000b; Martelli *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2001). Overexpression of Dok-1 in Jurkat cells has a negative effect on CD2-mediated activation of NFAT and ERK1/2 (Nemorin *et al.*, 2001). When introduced into lethally irradiated mice, retroviral-mediated expression of Dok-2 in bone marrow cells inhibits their capacity to repopulate thymus by reducing the number of thymic precursors and by inhibiting the transition of CD4⁻CD8⁻ to CD4⁺CD8⁺ thymocytes (Gugasyan *et al.*, 2002). Moreover, in transient assays, overexpression of Dok-1 or Dok-2 inhibits the CD28/TCR induced-IL-2 promoter activity (Gerard *et al.*, 2004).

Absence of Dok-1 expression does not lead to obvious defect in T cell development and function (Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001). The remaining expression of Dok-2 in Dok-1^{-/-} T cells might compensate for the absence of Dok-1. However, it should be noted that specific contributions of Dok-1 and Dok-2 exist since ConA-induced proliferation of Dok-1^{-/-} thymocytes is reduced (Di Cristofano *et al.*, 2001). Therefore, it remains to be established whether in T cells, Dok-1 and Dok-2 are redundant adaptors or play unique function in T cell signaling and form complexes with a different (likely overlapping) set of molecules.

Dok PTB domain are involved in Dok recruitment to membrane receptors such as EGFR and IL-4R (Nelms *et al.*, 1998a; Jones *et al.*, 1999). The PTB domain of Dok-1 has also been shown to bind negative regulator such as SHIP-1 (Tamir *et al.*, 2000). In addition, Dok-1 PTB domain mediates phosphotyrosine dependent homotypic interactions through residue Tyr146 and this homotypic interaction is necessary for Dok-1-mediated inhibition of v-src induced transformation (Songyang *et al.*, 2001). In this study, we have addressed the role of the PTB domain of Dok-1 and Dok-2 by identifying proteins that bind to their PTB domain and studying the functional effects of PTB mutants on Dok-mediated signaling. We show that Dok-1 and Dok-2 can form homo and heterodimers in a phosphorylation-dependent manner through the interaction of the PTB domain with the Tyr146 of Dok-1 and Tyr139 of Dok-2. This oligomerization is required for full phosphorylation of Dok proteins and Dok-mediated signaling.

Materials and Methods

Cell Lines and Antibodies

The Jurkat cells, clone 77-6, were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Puromycin was added at 1 µg/ml to the medium when required. mAbs used included: anti-CD2 (anti-T11-2 and T11-3, kindly provided by E. Reinherz, Harvard Medical School, Boston, MA); anti-HA (12CA5, kindly provided by M. Tremblay, McGill University, Montreal, QC Canada); anti-phosphotyrosine (4G10; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Polyclonal Abs used included: anti-Dok-1 directed against Dok-1 C-terminal domain (produced by immunizing rabbits with a GST fusion protein bearing residues 260-482); anti-Dok-1 used for western-blotting in figure 2 was directed against amino acids 425-439 (kindly provided by B.Stillman, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); anti-Dok-2 directed against Dok-2 C-terminal domain (produced by immunizing rabbits with a GST fusion protein bearing residues 253-412); anti-Dok-2 (Tyr351) and anti-phospho-Dok-2 (pTyr351) directed against a peptide and phospho-peptide respectively corresponding to residues surrounding Tyr351 of human-Dok-2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA); anti-phospho-p44/42 MAP Kinase and anti-p44/42 MAP Kinase (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Antibodies were biotinylated with EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) according to the manufacturer instructions.

DNA Constructs and Transfection

The plasmid construct pSRalpha-HADok-1 has been described previously (Nemorin *et al.*, 2001). To generate the plasmid pSRalpha-HA-Dok-2, a EcoRI-BamHI fragment from pcMV5.I/HAp56Dok (kindly provided by M Resh, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) was subcloned into the plasmid pSRalpha-puromycin. The PTB domain mutants (Dok-1R207-208A and Dok-2R200-201A) and the PH/PTB interdomain Tyr mutants (Dok-1Y146F and Dok-2Y139F) were generated by site-directed mutagenesis using PCR and subcloned into the pSRalpha-puromycin vector. Stable transfectant Jurkat cells overexpressing WT or mutant versions of Dok-1 or Dok-2 were selected as described (Nemorin *et al.*, 2001). Expression levels of HA-Dok-1 or HA-Dok-2 mutants were evaluated by immunoblotting of

cell extracts with anti-Dok-1 or anti-Dok-2 antibodies. Expression levels of CD2 and CD3 were evaluated by flow cytometric analysis with an EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Clones expressing similar levels of CD3 and CD2 compared with the parental Jurkat cells were kept for further studies.

GST Fusion Protein Constructs and Expression

To generate GST fusion proteins constructs, the DNA fragment encompassing residues 151-259 for Dok-1 and 144-252 for Dok-2 was PCR-amplified and cloned into the BamHI-EcoRI sites of the pGEX-2TK vector (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) using HA-Dok-1, HA-Dok-2, HA-Dok-1R207-208A or HA-Dok-2R200-201A as templates. GST fusion proteins were purified using glutathione-sepharose beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Cell Activation, luciferase assays, Immunoprecipitation and Immunoblotting

Cell stimulation, immunoprecipitations and immunoblotting were performed as previously described (Nemorin *et al.*, 2001).

Binding Assays

Post-nuclear lysates were incubated 1 h at 4 °C with glutathione-sepharose beads coupled to GST (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Supernatants were incubated 2 h at 4 °C with the GST-PTB fusion protein pre-absorbed to glutathione-sepharose beads. Beads were washed and eluted as described (Nemorin *et al.*, 2000a).

Results

Homotypic and heterotypic interactions of Dok proteins through their PTB domain

To gain better insight into the function of Dok-2 in CD2 signalling, we performed *in vitro* binding assays to identify binding partners of Dok-1 and Dok-2 PTB domains. Although many tyrosine phosphorylated proteins were present in lysates isolated from CD2-stimulated cells, only two proteins of 54-56-kDa and 62-kDa associated with Dok-2 PTB domain (Fig. 1A). In unstimulated cells, smaller amounts of these two phosphorylated proteins bound to the PTB domain indicating that their phosphorylation was increased by CD2 stimulation. We previously showed that Dok-1 and Dok-2 are phosphorylated upon CD2 stimulation (Nemorin *et al.*, 2000a). Moreover, Dok-1 PTB domain has been shown to mediate phosphotyrosine dependent homotypic interactions (Songyang *et al.*, 2001). Therefore, to investigate whether these two proteins corresponded to Dok-1 and Dok-2, we performed immunoprecipitations with anti-Dok-1 or Dok-2 antibodies after elution of PTB domain-bound proteins. As expected, the 54-56-kDa and 62-kDa proteins that bound *in vitro* to the PTB domain of Dok-2 corresponded to Dok-2 and Dok-1 proteins respectively (Fig.1A). Similarly to Dok-2, Dok-1 PTB domain is also involved in homo- and heterodimerization (Fig. 1B). To verify the specificity of this PTB domain-mediated interaction, we replaced one of the Arg residues that coordinates phosphotyrosine binding to alanine (Arg207 of Dok-1 and on the basis of sequence homology, Arg200 of Dok-2). As expected, mutation of Arg207 (Dok-1R207-208A) and Arg200 (Dok-2R200-201A) dramatically reduced PTB domain ligand binding (Fig. 1B). Taken together, these results suggest that in T cells, homotypic and heterotypic interactions may take place between two Dok family members Dok-1 and Dok-2.

Dok-1 and Dok-2 interact in vivo in a phospho-dependent manner

To determine whether Dok-1/Dok-2 interaction occurs *in-vivo*, we performed immunoprecipitations with Dok-2 antibodies. Since this interaction is likely phosphotyrosine-dependent, we used phosphotyrosine-specific antibodies directed against the Tyr351 of Dok-2. Lysates from unstimulated and CD2-stimulated Jurkat cells were probed by immunoblotting with anti-phospho-Dok-2 antibodies (Fig. 2A). A 54-56 kDa doublet corresponding to Dok-2 was detected in unstimulated cells and its intensity increased following CD2 stimulation. This

result indicates that the antibodies are highly specific for the phosphorylated form of Dok-2 and do not cross-react with Dok-1 or other phosphorylated proteins. Two phosphoproteins of 62-kDa and 120-kDa co-immunoprecipitated with phospho-Dok-2 in unstimulated and CD2-stimulated cells (Fig. 2B). By contrast, only a small amount of the phosphorylated 62-kDa protein in CD2-stimulated cells was detected in immunoprecipitates performed with antibodies directed against total Dok-2 (Fig. 2B). It is important to note that a much greater amount of total Dok-2 was immunoprecipitated with anti-Dok-2 antibodies compared to phospho-specific Dok-2 antibodies. This indicates that association of the proteins of 62-kDa and 120-kDa occurred only with the phosphorylated form of Dok-2. Since phosphorylated Dok-2 associates with RasGAP (Di Cristofano *et al.*, 1998), the 120-kDa protein associated with phospho-Dok-2 likely corresponds to RasGAP. However, we were unable to detect RasGAP by Western-blotting with commercially available antibodies probably because the amount of RasGAP present in phospho-Dok-2 immunoprecipitates is too low. To determine if the 62-kDa protein corresponded to Dok-1, phospho-Dok-2 immunoprecipitates were probed with anti-Dok-1 antibodies. As shown in figure 2C, there was a correlation between the amount of Dok-1 and the amount of phosphorylated Dok-2 present in the immunoprecipitates.

Taken together these data show that there is a phospho-dependent association of Dok-1 with Dok-2.

Tyr146 (Dok-1) or Tyr139 (Dok-2) and the PTB domain are required for Dok tyrosine phosphorylation and function

Dok-1 homodimerization occurs through binding of phospho-Tyr146 with the PTB domain of Dok-1 (Songyang *et al.*, 2001). Using a combinatorial peptide library approach, the consensus binding motif for the PTB domain of Dok-1 was defined as Y/MXXNXLpY (Songyang *et al.*, 2001). Sequence surrounding residue Tyr139 (MEENELY) of Dok-2 represents a potential binding site for Dok PTB domain. In order to test the importance of PTB-mediated oligomerization in Dok function, we mutated the Tyr residue potentially involved in Dok oligomerization (Tyr146 of Dok-1 and Tyr139 of Dok-2) and the PTB domain. Jurkat clones that expressed similar amounts of the mutant Dok (average of five times greater than the parental Jurkat cells) and similar levels of CD2 and CD3 at their cell surface were selected (data not shown). Mutation of Tyr146 (Dok-1) or Tyr139 (Dok-2) affected dramatically both

basal and CD2-induced phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 respectively (Fig. 3). A functional PTB domain was also required for Dok-1 or Dok-2 phosphorylation since Dok-1R207-208A and Dok-2R200-201A were not phosphorylated even after CD2 stimulation. Phosphorylation on tyrosine residues is essential for Dok-1 and Dok-2 functions. We therefore examined whether these mutations affected the ability of Dok protein to inhibit CD2 signaling. As we previously reported for Dok-1 (Nemorin *et al.*, 2001), Dok-2 overexpression inhibited CD2-induced ERK1/2 activation although to a lesser extent (Fig. 4A). By contrast, overexpression of Dok-1R207-208A, Dok-2R200-201A, Dok-1Y146F and Dok-2Y139F did not interfere with CD2-induced ERK1/2 activation (Fig. 4A). The influence of Dok-1 overexpression on CD2-induced NFAT activation was also evaluated (Fig. 4B). As reported previously (30), expression of WT Dok-1 inhibited NFAT activation in response to CD2 stimulation. By contrast, CD2-induced NFAT activation was unaffected by expression of Dok-1R207-208A and was increased by expression of Dok-1Y146F (Fig. 4B). These results indicate that phosphorylation of Tyr146 (Dok-1) or Tyr139 (Dok-2) and a functional PTB domain are required for Dok function.

Overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F interferes with the phosphorylation of endogenously expressed Dok protein

The contribution of Dok-2 Tyr139 and the PTB domain in homo- and heterodimerization was assessed by *in vitro* binding assays with the PTB domain of Dok-2 and lysates from Jurkat cells overexpressing WT or mutated versions of Dok-2 (Y139F and R200-201A). As expected, in unstimulated or CD2-stimulated cells, no phospho-Dok-2Y139F and phospho-Dok-2R200-201A could be detected in this assay. Unexpectedly, overexpression of Dok-2Y139F affected binding of endogenous Dok-1 to the PTB domain of Dok-2 (Fig. 5A). Therefore, this result likely indicates that overexpression of Dok-2Y139F interferes specifically with the phosphorylation of endogenously expressed Dok protein. To test this hypothesis, we analyzed the phosphorylation of endogenously expressed Dok-1 and Dok-2 proteins in clones overexpressing various forms of Dok-2 and Dok-1 respectively (Fig. 5B). Overexpression of Dok-2Y139F caused a reduction of CD2-induced phosphorylation of Dok-1 whereas WT Dok-2 and Dok-2R200-201A did not. Similarly, overexpression of Dok-1Y146F inhibited Dok-2 phosphorylation whereas Dok-1WT and Dok-1R207-208A did not. Importantly, the effect of Dok-2Y139F or Dok-1Y146F on CD2-induced Dok-1 phosphorylation did not reflect a global

defect in CD2 activation, as CD2-induced ERK1/2 activation and CD2-induced protein tyrosine phosphorylation of whole cell lysate are not affected (Fig. 4 and data not shown). Altogether these results suggest that there is an interplay between Dok-1 and Dok-2 and that PTB-mediated oligomerization of Dok-1 and Dok-2 represent an essential step for Dok phosphorylation.

Discussion

In this report, we have shown that two members of the Dok family, Dok-1 and Dok-2, form homo- and hetero-oligomers. These interactions occur through binding of the PTB domain to the phospho-tyrosine located in the PH-PTB interdomain (Tyr146, Dok-1 and Tyr139, Dok-2). Consistent with a phosphorylation-dependent interaction, we show that Dok-1 associates only with the tyrosine phosphorylated form of Dok-2 *in vivo*.

In T cells, CD2 or CD28 stimulation, but not CD3 stimulation, specifically increases Dok phosphorylation and induces membrane translocation of Dok proteins (Nemorin *et al.*, 2000a; Michel *et al.*, 2001). There are many examples where maximal phosphorylation of Dok-1 or Dok-2 requires the presence of both an intact PH and PTB domains. In these systems, activation of PI 3-kinase generates inositol phospholipids at the plasma membrane which serve as binding sites for PH domains. The PTB domain contributes to the recruitment of Dok to the membrane by interacting with receptors such as EGFR, Tie, Ret and IL4-R (Nelms *et al.*, 1998a; Jones *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003). Deletion of the PH domain of Dok-1 and Dok-2 abolishes their CD2-induced phosphorylation (data not shown). CD2-induced activation of PI 3-kinase (Ward *et al.*, 1992; Hutchcroft *et al.*, 1998; Kivens *et al.*, 1998) is likely involved in the PH-dependent recruitment of Dok. In addition, we showed that the PTB domain is required for Dok phosphorylation and therefore, likely for Dok membrane recruitment. However, using *in vitro* binding assay with GST-PTB domain fusion protein, we were not able to detect other phosphorylated proteins but Dok. This might indicate that the phosphorylation of the PTB domain-binding protein involved in Dok recruitment is too low to be detectable in our assay or that the PTB domain interaction is independent of phosphorylation. Recruitment at the membrane may involve Dok association with the receptor CD2. If any CD2/Dok complex exists, it may be indirect and require the association with known CD2-binding protein such as CD2BP1, CD2BP2, CD2BP3, CIN85, CD2AP/CMS, Lck, and Fyn (Bell *et al.*, 1996; Dustin *et al.*, 1998; Li, J. *et al.*, 1998a; Nishizawa *et al.*, 1998; Holdorf *et al.*, 1999; Freund *et al.*, 2002; Tibaldi *et al.*, 2003). However, none of these proteins, including the cytoplasmic domain of CD2, contain the Y/MXXNXLpY consensus motif predicted to bind to Dok-1 PTB domain. Alternatively, CD2 stimulation may induce recruitment of Dok to an unknown membrane protein.

Although Dok-1 and Dok-2 contain multiple phosphorylation motifs, mutation of the tyrosine residue within the PH-PTB interdomain affected dramatically CD2-induced tyrosine phosphorylation of Dok-1 or Dok-2. It should be emphasized that mutation of tyrosine residue within the C-terminal tail of Dok-1 and Dok-2 (Gerard *et al.*, 2004 and data not shown) had only a modest effect on total CD2-induced Dok tyrosine phosphorylation. The absence of phosphorylation observed for Dok-1Y146F and Dok-2Y139F indicates that tyrosine phosphorylation occurs in an ordered and interdependent fashion, Tyr139 (Dok-2) and Tyr146 (Dok-1) being the first tyrosine to be phosphorylated. Phosphorylation of these specific tyrosine residues may lead to conformational change of Dok causing exposure and availability of tyrosine for further phosphorylation. Alternatively, but not exclusively, this first phosphorylation event may allow oligomerization of Dok proteins. This may represent a requisite step for further phosphorylation of Dok proteins.

Dok mutants of the tyrosine residue in the PH/PTB interdomain inhibited the phosphorylation of endogenously expressed Dok whereas Dok PTB mutants did not, although they are both deficient in oligomerization. There are several ways to explain the dominant-negative effect on phosphorylation of Dok-1Y146F and Dok-2Y139F. A likely interpretation of our results is that the interfering mutant competes with wild-type for a PTB-binding site located at the plasma membrane. This model is corroborated by our finding that Dok PTB mutants deficient for binding do not interfere. Based on this study, we propose the following model for CD2-induced oligomerization and phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 proteins in T lymphocytes (Fig. 6). Following CD2-engagement, both PH and PTB domains target cytosolic non-phosphorylated Dok-1 and Dok-2 to cell surface receptor (designated X in Fig. 6, step 1-2). Phosphorylation of Tyr146 (Dok-1) or Tyr139 (Dok-2) by a tyrosine kinase close to the receptor (Fig. 6, step 3) allows oligomerization of Dok proteins (Fig. 6, step 4). This oligomerization is essential for further phosphorylation of the C-terminal tyrosine residues (Fig. 6, step 5). Oligomers might stay associated to the receptor or might move to another location in the plasma membrane (as represented in Figure 6).

Several evidence suggest that at least two kinases, Lck and Tec kinases, are involved in CD2- or CD28-dependent phosphorylation of Dok-1 and Dok-2. CD2-induced Dok phosphorylation is dependent on the expression of Lck. Two members of the Tec kinases family, Itk and Tec, also represent potential kinases involved in Dok phosphorylation since they

have been shown to be activated by CD2 and/or CD28 (King *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 2001). However, in COS-7 cells, Dok is phosphorylated by the Tec kinase but not by Itk (Yang *et al.*, 1999). Moreover, we have shown that the C-terminal region of Dok interacts with Tec (Gerard *et al.*, 2004). Therefore, Tec but not Itk is likely to be involved in Dok-signaling. Additional experiments are required to identify the specific sites phosphorylated by Tec and/or Lck. It should be noted that Tyr146 and Tyr139 represent a potential tyrosine phosphorylation site for Lck (Songyang *et al.*, 1995c).

In T cells, phosphorylation of Dok-1 and Dok-2 has been shown to generate docking sites for RasGAP (Nemorin *et al.*, 2001). Translocation to the membrane of RasGAP likely regulates negatively Ras/MAPK pathway. It is therefore not surprising that Dok-1Y146F, Dok-2Y139F and PTB domain Dok mutant which are not phosphorylated upon CD2 stimulation do not inhibit CD2-induced ERK1/2 activation. However, since we showed that overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F inhibited phosphorylation of endogenously expressed Dok proteins, we would have expected a dominant negative effect on ERK1/2 activation upon overexpression of these mutants. This result might indicate that our ERK1/2 activation assay is not performed in limiting conditions and that titration of the anti-CD2 antibody concentration might be necessary to observe a dominant negative effect on ERK1/2 activation. In support to this interpretation, overexpression of Dok-1Y146F increased CD2-induced NFAT activation compared to the parental cell line (Fig. 4B).

It is not clear whether Dok-1 and Dok-2 play redundant or specific roles in T cell signaling. The Dok proteins contain common and unique phosphorylation motifs, suggesting that they may interact with different SH2 domain-containing proteins. Heterodimerization of Dok-1 and Dok-2 may therefore provide a mechanism whereby the spectrum of responses can be enlarged. Whether homo- or heteromeric complexes are formed may depend on the receptor engaged as well as on the level of expression of Dok-1 and Dok-2 proteins. Additional experiments are required to elucidate the complete molecular interactions involved in Dok-1 and Dok-2 phosphorylation. In particular, it would be of great interest to study how TCR signaling inhibits Dok phosphorylation to release T cell from inhibition.

Acknowledgments

We thank Drs E. Reinherz, M. Resh and J. Wu for generous gifts of reagents. We also thank Ingrid Saba for critical reading of the manuscript.

References

1. Ellis, C., M. Moran, F. McCormick, and T. Pawson. 1990. Phosphorylation of GAP and GAP associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinase. *Nature* 343:377.
2. Yamanashi, Y. and D. Baltimore. 1997. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88:205.
3. Carpino, N., D. Wisniewski, A. Strife, D. Marshak, R. Kobayashi, B. Stillman, and B. Clarkson. 1997. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* 88:197.
4. Jones, N. and D. J. Dumont. 1998. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. *Oncogene* 17:1097.
5. Nelms, K., A. L. Snow, L. J. Hu, and W. E. Paul. 1998. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* 9:13.
6. Di Cristofano, A., N. Carpino, N. Dunant, G. Friedland, R. Kobayashi, A. Strife, D. Wisniewski, B. Clarkson, P. P. Pandolfi, and M. D. Resh. 1998. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 273:4827.
7. Cong, F., B. Yuan, and S. P. Goff. 1999. Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. *Mol. Cell. Biol.* 19:8314.
8. Lemay, S., D. Davidson, S. Latour, and A. Veillette. 2000. Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 20:2743.
9. Grimm, J., M. Sachs, S. Britsch, S. Di Cesare, T. Schwarz-Romond, K. Alitalo, and W. Birchmeier. 2001. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J. Cell. Biol.* 154:345.
10. Favre, C., A. Gerard, E. Clauzier, P. Pontarotti, D. Olive, and J. A. Nunes. 2003. DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun.* 4:40.

11. Cai, D., S. Dhe-Paganon, P. A. Melendez, J. Lee, and S. E. Shoelson. 2003. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J. Biol. Chem.* 278:25323.
12. Yamanashi, Y., T. Tamura, T. Kanamori, H. Yamane, H. Nariuchi, T. Yamamoto, and D. Baltimore. 2000. Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. *Genes Dev.* 14:11.
13. Suzu, S., M. Tanaka-Douzono, K. Nomaguchi, M. Yamada, H. Hayasawa, F. Kimura, and K. Motoyoshi. 2000. p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. *EMBO J* 19:5114.
14. Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube, and P. Duplay. 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166:4408.
15. Di Cristofano, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst, and P. P. Pandolfi. 2001. p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J. Exp. Med.* 194:275.
16. Kato, I., T. Takai, and A. Kudo. 2002. The pre-B cell receptor signaling for apoptosis is negatively regulated by Fc gamma RIIB. *J. Immunol.* 168:629.
17. Ott, V. L., I. Tamir, M. Niki, P. P. Pandolfi, and J. C. Cambier. 2002. Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. *J. Immunol.* 168:4430.
18. Abramson, J., G. Rozenblum, and I. Pecht. 2003. Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fc epsilon receptor. *Eur. J. Immunol.* 33:85.
19. Robson, J. D., D. Davidson, and A. Veillette. 2004. Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. *Mol. Cell. Biol.* 24:2332.
20. Kepley, C. L., S. Taghavi, G. A. Mackay, D. Zhu, P. A. Morel, K. Zhang, J. J. Ryan, L. S. Satin, M. Zhang, P. P. Pandolfi, and A. Saxon. 2004. Co-aggregation of Fc gamma RII With Fc epsilon RI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J. Biol. Chem.* 279:35139
21. Nemorin, J. G. and P. Duplay. 2000. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275:14590.

22. Martelli, M. P., J. Boomer, M. Bu, and B. E. Bierer. 2001. T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L. *J. Biol. Chem.* 276:45654.
23. Michel, F., G. Attal-Bonnefoy, G. Mangino, S. Mise-Omata, and O. Acuto. 2001. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity* 15:935.
24. Gugasyan, R., C. Quilici, S. T. I, D. Grail, A. M. Verhagen, A. Roberts, T. Kitamura, A. R. Dunn, and P. Lock. 2002. Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. *J. Cell. Biol.* 158:115.
25. Gerard, A., C. Favre, F. Garcon, J. G. Nemorin, P. Duplay, S. Pastor, Y. Collette, D. Olive, and J. A. Nunes. 2004. Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. *Oncogene* 23:1594.
26. Di Cristofano, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst, and P. P. Pandolfi. 2001. p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). *J. Exp. Med.* 194:275.
27. Jones, N. and D. J. Dumont. 1999. Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. *Curr. Biol.* 9:1057.
28. Tamir, I., J. C. Stolpa, C. D. Helgason, K. Nakamura, P. Bruhns, M. Daeron, and J. C. Cambier. 2000. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity* 12:347.
29. Songyang, Z., Y. Yamanashi, D. Liu, and D. Baltimore. 2001. Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling. *J. Biol. Chem.* 276:2459.
30. Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube, and P. Duplay. 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166:4408.
31. Nemorin, J. G. and P. Duplay. 2000. Evidence that lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* 275:14590.

32. Jones, N., S. H. Chen, C. Sturk, Z. Master, J. Tran, R. S. Kerbel, and D. J. Dumont. 2003. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol. Cell. Biol.* 23:2658.
33. Murakami, H., Y. Yamamura, Y. Shimono, K. Kawai, K. Kurokawa, and M. Takahashi. 2002. Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 277:32781.
34. Ward, S. G., S. C. Ley, C. MacPhee, and D. A. Cantrell. 1992. Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens. *Eur. J. Immunol.* 22:45.
35. Hutchcroft, J. E., J. M. Slavik, H. Lin, T. Watanabe, and B. E. Bierer. 1998. Uncoupling activation-dependent HS1 phosphorylation from nuclear factor of activated T cells transcriptional activation in Jurkat T cells: differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28. *J. Immunol.* 161:4506.
36. Kivens, W. J., S. W. Hunt, 3rd, J. L. Mobley, T. Zell, C. L. Dell, B. E. Bierer, and Y. Shimizu. 1998. Identification of a proline-rich sequence in the CD2 cytoplasmic domain critical for regulation of integrin-mediated adhesion and activation of phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18:5291.
37. Li, J., K. Nishizawa, W. An, R. E. Hussey, F. E. Lialios, R. Salgia, P. R. Sunder, and E. L. Reinherz. 1998. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. *EMBO J.* 17:7320.
38. Nishizawa, K., C. Freund, J. Li, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 1998. Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14897.
39. Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94:667.
40. Tibaldi, E. V. and E. L. Reinherz. 2003. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int. Immunol.* 15:313.

41. Bell, G. M., J. Fagnoli, J. B. Bolen, L. Kish, and J. B. Imboden. 1996. The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. *J. Exp. Med.* 183:169.
42. Holdorf, A. D., J. M. Green, S. D. Levin, M. F. Denny, D. B. Straus, V. Link, P. S. Changelian, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1999. Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation. *J. Exp. Med.* 190:375.
43. Freund, C., R. Kuhne, H. Yang, S. Park, E. L. Reinherz, and G. Wagner. 2002. Dynamic interaction of CD2 with the GYF and the SH3 domain of compartmentalized effector molecules. *EMBO J.* 21:5985.
44. Tanaka, N., H. Abe, H. Yagita, K. Okumura, M. Nakamura, and K. Sugamura. 1997. Itk, a T cell-specific tyrosine kinase, is required for CD2-mediated interleukin-2 promoter activation in the human T cell line Jurkat. *Eur. J. Immunol.* 27:834.
45. King, P. D., A. Sadra, A. Han, X. R. Liu, R. Sunder-Plassmann, E. L. Reinherz, and B. Dupont. 1996. CD2 signaling in T cells involves tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase, EMT/ITK/TSK. *Int. Immunol.* 8:1707.
46. Yang, W. C., M. Ghiotto, B. Barbarat, and D. Olive. 1999. The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. *J. Biol. Chem.* 274:607.
47. Songyang, Z., K. L. Carraway, 3rd, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng, M. J. Lorenzo, B. A. J. Ponder, B. J. Mayer, and L. C. Cantley. 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373:536.

Footnotes

1. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). PD is a recipient of a CIHR New Investigator Award.
2. Address correspondence and reprint request to Dr. Pascale Duplay, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval QC, H7V 1B7, Canada . E. mail : pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca
3. The abbreviations used are: PTB, phosphotyrosine-binding; PH, pleckstrin homology; Dok, downstream of tyrosine kinase; SH, Src homology; RasGAP, Ras GTP-ase-activating protein; WT, wild-type.

Figure legends

Figure 1. *In vitro* binding of Dok to Dok-1 and Dok-2 PTB domains. A, Jurkat cells overexpressing HA-Dok-2 WT cells were left unstimulated (-) or stimulated (CD2) with an anti-CD2 mAbs pair for 10 min. Post-nuclear lysates were incubated with GST-Dok-2 PTB domain and eluted with SDS sample buffer (GST-PTB) or with 50 mM phenyl-phosphate and subjected to immunoprecipitations with anti-Dok-1 or anti-Dok-2 antibodies (GST-PTB*). Post-nuclear lysates or precipitates were immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb. IP, Immunoprecipitation; WB, Western Blot. B, Jurkat cells overexpressing HA-Dok-1 WT or HA-Dok-2 WT as indicated were left unstimulated (-) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for the time indicated. Post-nuclear lysates were incubated with GST-Dok-1 PTB WT and R207-208A, or with GST-Dok-2 PTB WT and R200-201A as indicated and eluted with SDS sample buffer. Bound proteins were revealed by immunoblotting with mAb anti-phosphotyrosine. WB, Western Blot.

Figure 2. Dok-1 and Dok-2 association following CD2 stimulation. Jurkat cells overexpressing HA-Dok-2 WT cells were left unstimulated (-) or stimulated (CD2) with an anti-CD2 mAbs pair for 10 min. A, Post-nuclear lysates were immunoblotted with anti-phosphotyrosine mAb and anti-phospho-Dok-2 (Y351) antibodies. B and C, Post-nuclear lysates were immunoprecipitated with anti-phosphoDok-2 (Y351) or anti-Dok-2 antibodies (Y351). Precipitates were immunoblotted with biotinylated anti-phosphotyrosine, biotinylated anti-Dok-2 or anti-Dok-1 antibodies as indicated. IP, Immunoprecipitation; WB, Western Blot.

Figure 3. Mutations that prevent Dok oligomerization inhibit CD2-induced Dok phosphorylation. Jurkat cells overexpressing HA-Dok-1 WT, Y146F, R207-208A or HA-Dok-2 WT, Y139F and R200-201A were left unstimulated (-) or stimulated (CD2) with an anti-CD2 mAbs pair for 10 min. Post-nuclear lysates were immunoprecipitated with anti-HA mAb. Immunoprecipitates were immunoblotted as indicated with mAb anti-phosphotyrosine for Dok-1 overexpressing clones and biotinylated anti-phosphotyrosine for Dok-2 overexpressing clones. Immunoprecipitates were also immunoblotted with anti-Dok-1 or biotinylated anti-Dok-2 antibodies to verify the levels of Dok proteins. This experiment was performed on at least two

independent transfectants for each of the Dok constructs. All clones selected for our experiments expressed similar amounts of transfected Dok. IP, Immunoprecipitation; WB, Western Blot.

Figure 4. Oligomerization is required for the ability of Dok to inhibit CD2-induced ERK1/2 activation. A, Jurkat J77.6 cells or cells overexpressing HA-Dok-1 WT, Y146F and R207-208A, or HA-Dok-2 WT, Y139F and R200-201A were left unstimulated (-) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for the indicated amounts of time. Post-nuclear lysates were immunoblotted with anti-phospho ERK1/2 Abs and equivalent levels of ERK1/2 protein in each lane were evaluated by probing the membranes with anti-total ERK1/2 Abs. This experiment was performed on at least two independent transfectants for each of the Dok constructs. All clones selected for our experiments expressed similar amounts of transfected Dok. WB, Western Blot.

B, Jurkat J77.6 cells or cells overexpressing HA-Dok-1 WT, Y146F and R207-208A were transfected with NFAT luciferase reporter plasmid and TK-renilla luciferase constructs. After 24 h, cells were left unstimulated (-) or stimulated with anti-CD2 mAbs (CD2). Cells were harvested after 6 h and luciferase activity was measured. The results were expressed as a percentage of fold induction relative to maximal luciferase induction induced by treatment with PMA and ionomycin. This experiment was repeated in triplicate in 3 independent experiments with similar results.

Figure 5. Overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F interfere with the phosphorylation of endogenously expressed Dok protein. A, Jurkat J77.6 cells or cells overexpressing HA-Dok-2Y139F or R200-201A were left unstimulated (-) or stimulated (CD2) with an anti-CD2 mAbs pair for 5 min. Post-nuclear lysates were pulled-down with GST-Dok-2 PTB WT and precipitates were immunoblotted with mAb anti-phosphotyrosine.

B, Cells overexpressing HA-Dok-1 WT, Y146F, or R207-208A were left unstimulated (-) or stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for 10 min. Post-nuclear lysates were immunoblotted with anti-phospho-Dok-2 (Y351) and anti-Dok-2 (Y351) (left panel). J77.6 Jurkat cells or cells overexpressing HA-Dok-2 WT, Y139F and R200-201A were left unstimulated (-) or

stimulated with an anti-CD2 mAbs pair for 10 min. Anti-Dok-1 immunoprecipitates were immunoblotted with mAb anti-phosphotyrosine or with anti-Dok-1 antibodies (right panel). This experiment was performed on at least two independent transfectants for each of the Dok constructs. All clones selected for our experiments expressed similar amounts of transfected Dok. WB, Western Blot.

Figure 6. Model for CD2-induced oligomerization and phosphorylation of Dok-1 and Dok-2. (1) Cytosolic non-phosphorylated Dok-1 or Dok-2; (2) PH and PTB-dependent recruitment of Dok to the membrane; (3) Phosphorylation of Y146 (Dok-1) or Y139 (Dok-2); (4) Dok-1 and Dok-2 homo- or hetero-dimerization; (5) Phosphorylation of C-terminal tyrosine residues. « X » represents an unidentified protein or proteins complex that binds to Dok PTB domain following CD2 stimulation. For clarity, only two tyrosine residues are represented in the C-terminal domain of Dok.

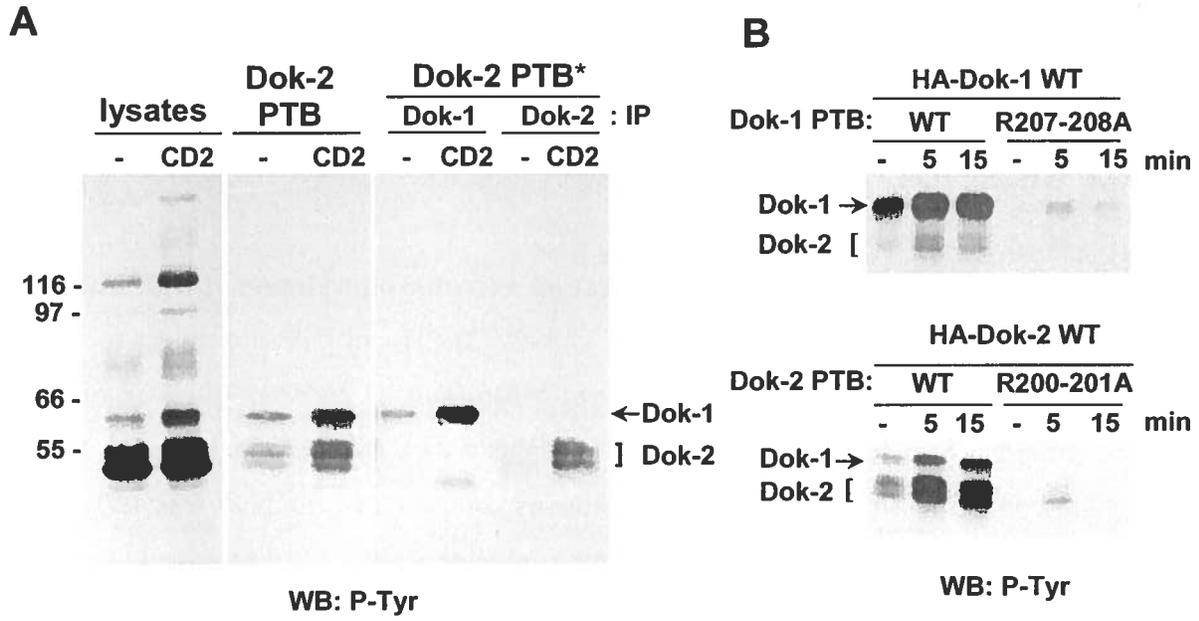


Figure 1. In vitro binding of Dok to Dok-1 and Dok-2 PTB domains.

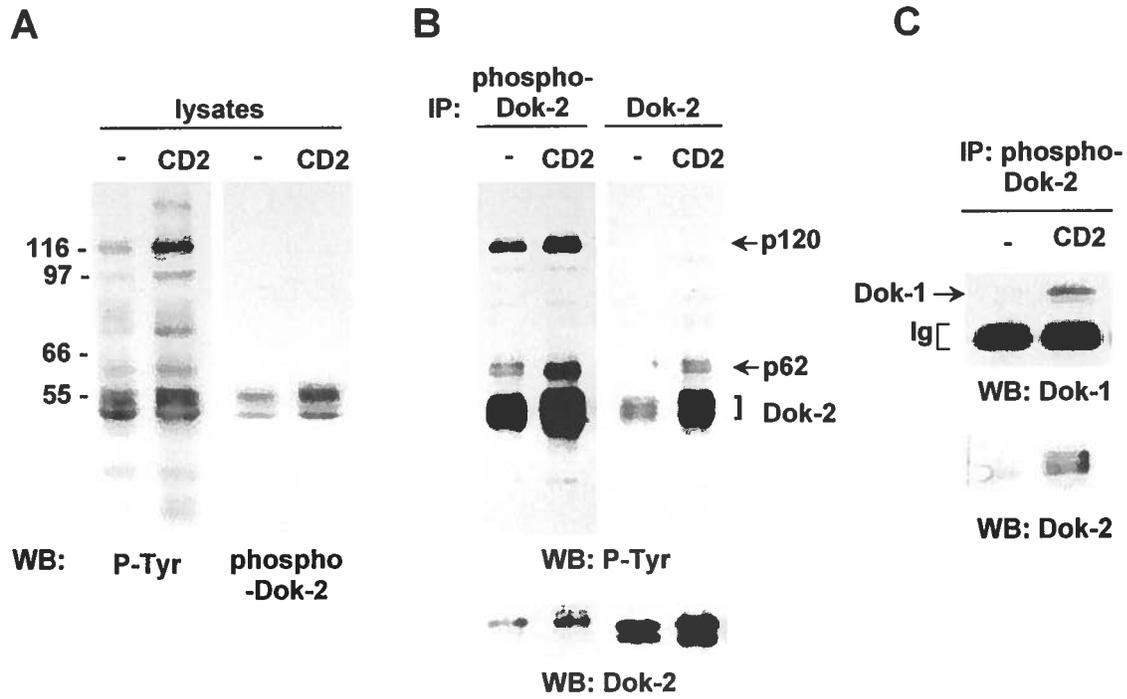


Figure 2. Dok-1 and Dok-2 association following CD2 stimulation.

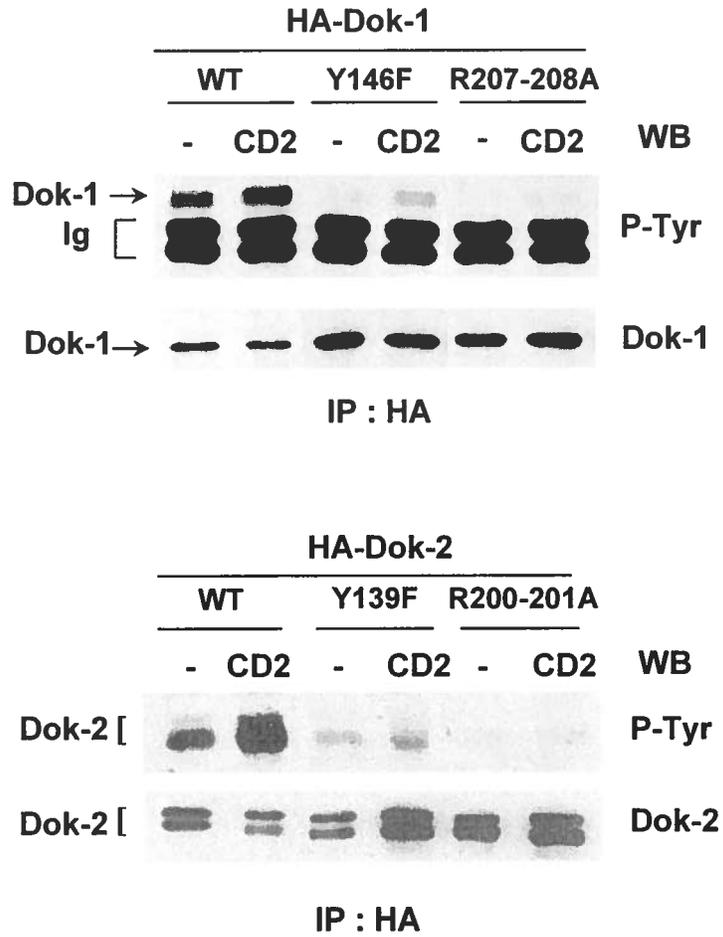
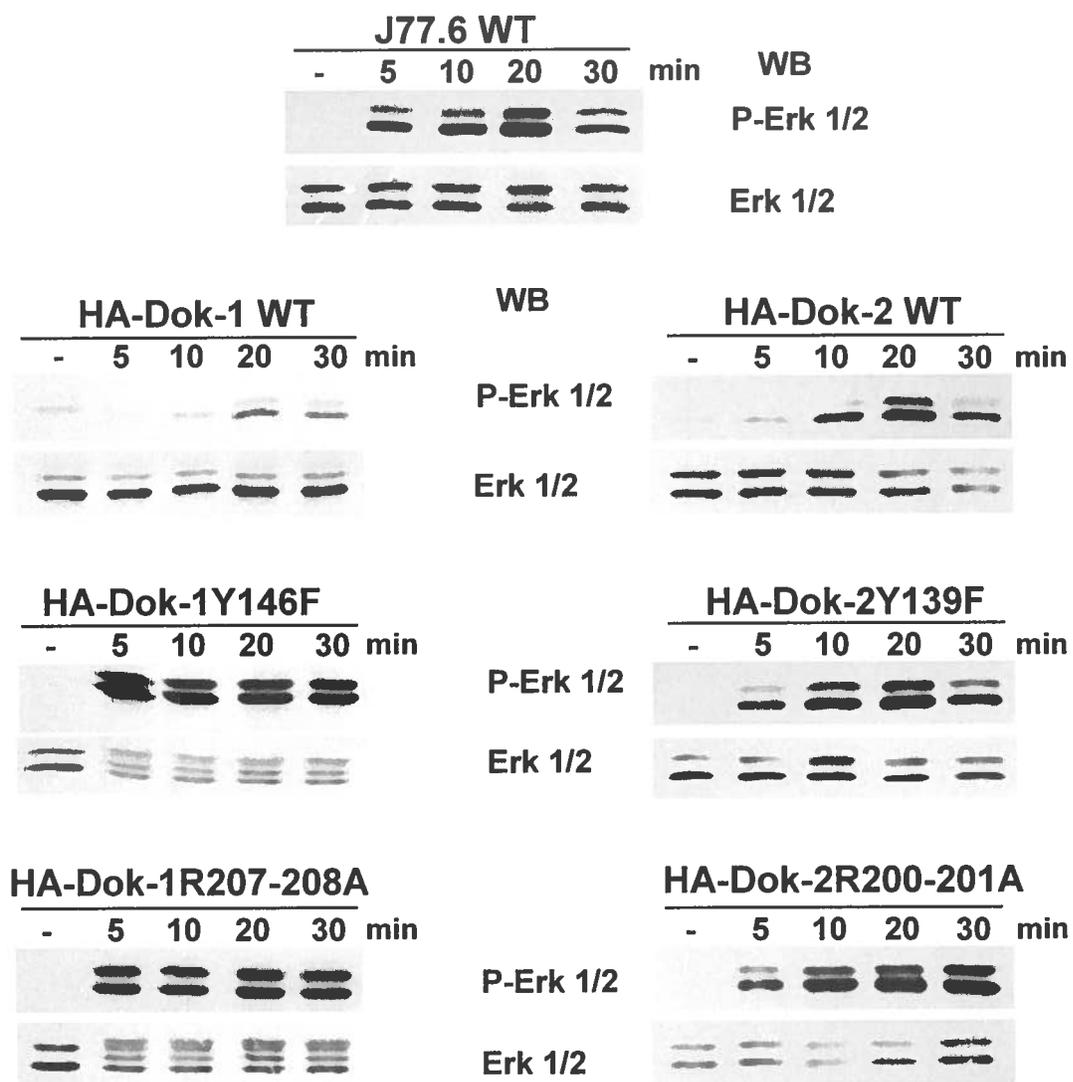
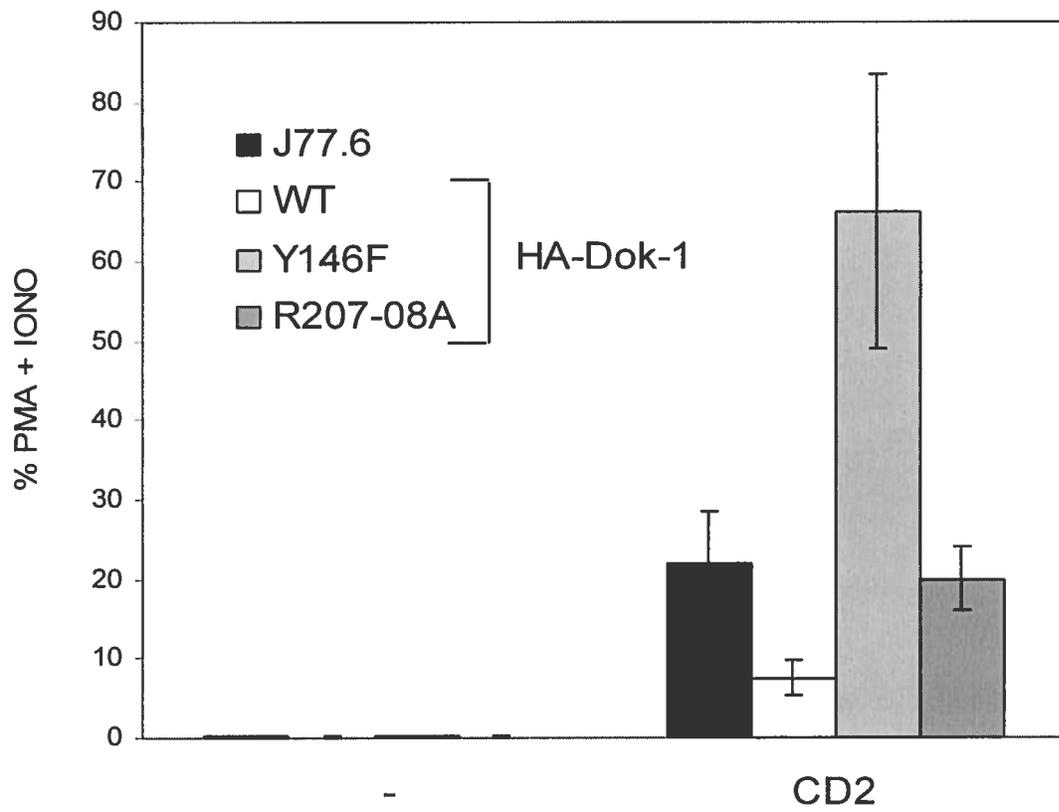


Figure 3. Mutations that prevent Dok oligomerization inhibit CD2-induced Dok phosphorylation.



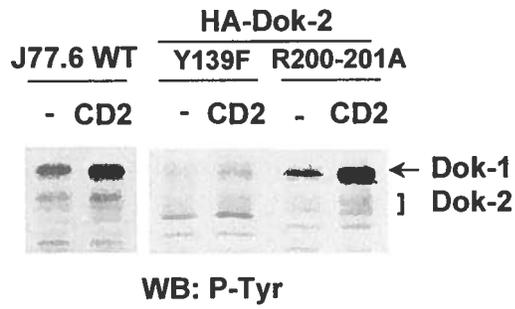
4A

Figure 4. Oligomerization is required for the ability of Dok to inhibit CD2-induced Erk1/2 activation.



4B

A



B

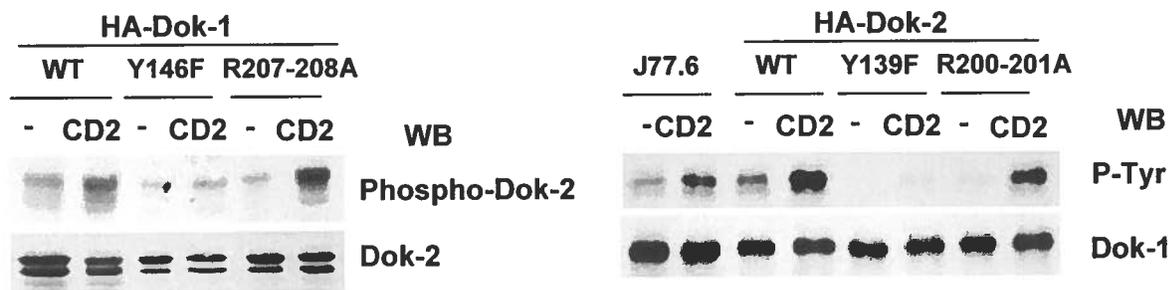


Figure 5. Overexpression of Dok-1Y146F or Dok-2Y139F interfere with the phosphorylation of endogenously expressed Dok protein.

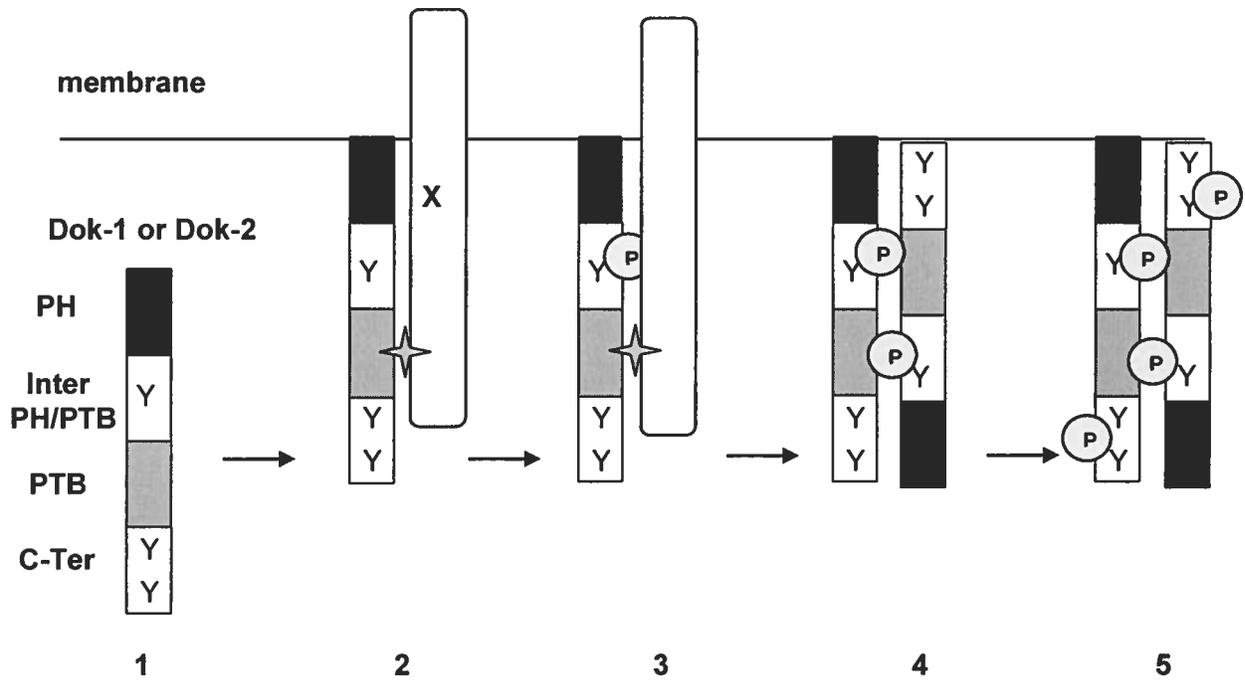


Figure 6. Model for CD2-induced oligomerization and phosphorylation of Dok-1 and Dok-2.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Modulation de la phosphorylation des protéines Dok-1 et Dok-2 par la co-stimulation du TCR/CD3

Dans le but d'examiner l'influence de la stimulation du TCR sur la phosphorylation des protéines Dok induite par l'engagement des récepteurs CD2 et/ou CD28, nous avons choisi d'effectuer des études de stimulation plus physiologique que l'utilisation d'anticorps. Les lymphocytes T Jurkat ont été activés par la SEE présentée par des cellules présentatrices RAJI (voir Figure E). Ces cellules RAJI possèdent à leur surface le ligand pour CD2 (LFA-3), ainsi qu'un des ligands de CD28 (B7-1). Cela nous a donc permis de conduire diverses études de co-stimulation CD2, CD28 et TCR/CD3 via l'ajout ou non de SEE et/ou d'anticorps anti-ligands bloquant les interactions CD2/LFA-3 et/ou CD28/B7-1.

En absence de stimulation TCR (sans SEE), la phosphorylation de Dok-2 est maximale et principalement due aux interactions CD2/LFA-3 et CD28/B7-1 puisque lorsque ces interactions sont bloquées, la phosphorylation de cette protéine est fortement diminuée (voir Fig. 7A). De plus, l'engagement de CD2 et CD28 semblent avoir un effet additif sur la phosphorylation de Dok-2. Une forte baisse de phosphorylation Dok-2 est observée lorsque la cellule T est co-stimulée par le TCR-CD3 via la SEE. Des résultats identiques ont été obtenus pour Dok-1 (voir Fig. 7B). Ces résultats suggèrent que, par un mécanisme toujours inconnu, la signalisation TCR-CD3 parvient à empêcher la phosphorylation, ou encore induire la déphosphorylation, des molécules inhibitrices Dok-1 et Dok-2 engagées par CD2 et CD28.

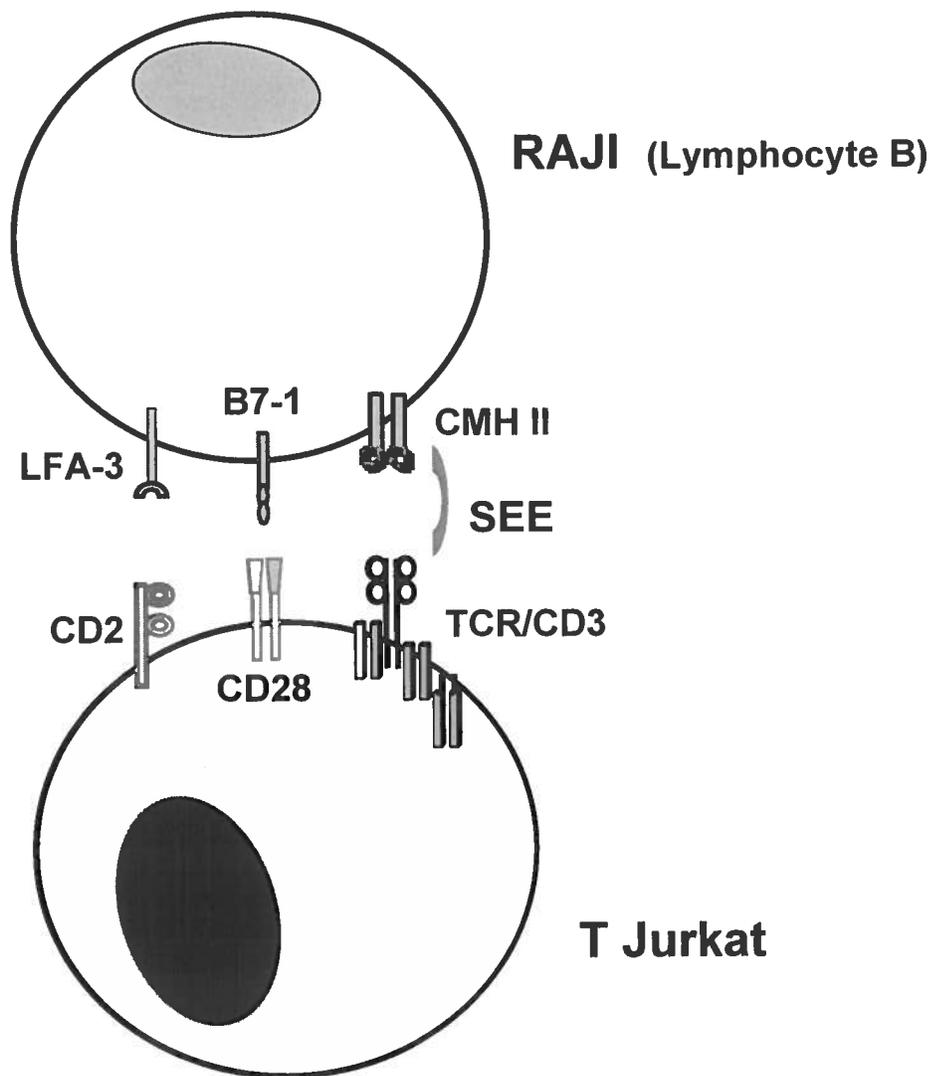
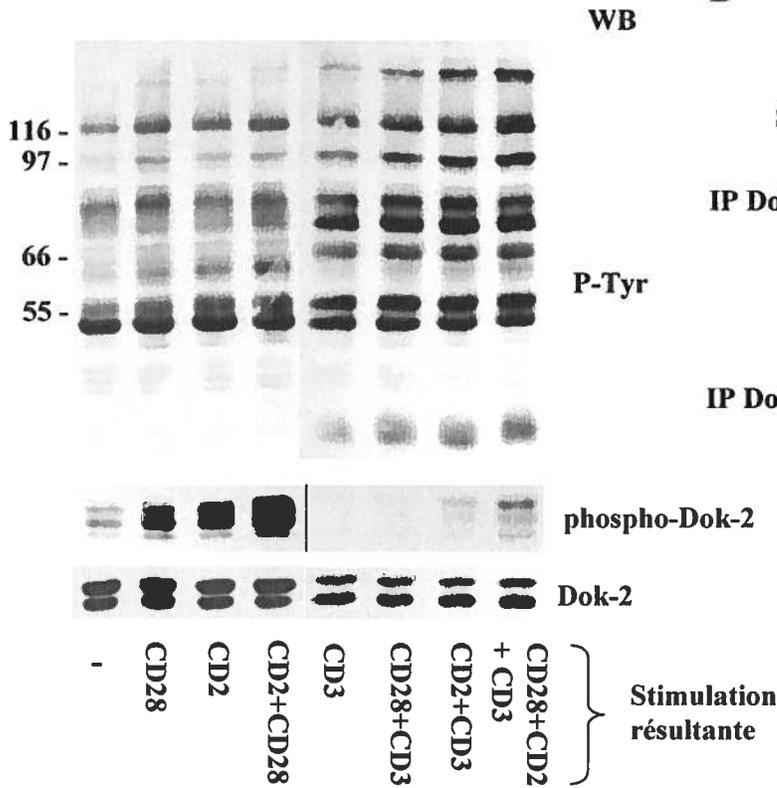


Figure E: Modèle des études de co-activation à l'aide des cellules présentatrices RAJI.

Les cellules B RAJI expriment à leur surface les ligands pour les récepteurs CD2 (LFA-3) et CD28 (B7-1), ainsi que les molécules du CMH de classe II. Cela permet donc des études de co-stimulation à l'aide de l'entérotoxine SEE pour la stimulation TCR/CD3 et d'anti-ligands pour bloquer les interactions (LFA-3/CD2 et/ou B7-1/CD28) désirées.

A

SEE	-	-	-	-	+	+	+	+
α -LFA-3	+	+	-	-	+	+	-	-
α -B7-1	+	-	+	-	+	-	+	-



B

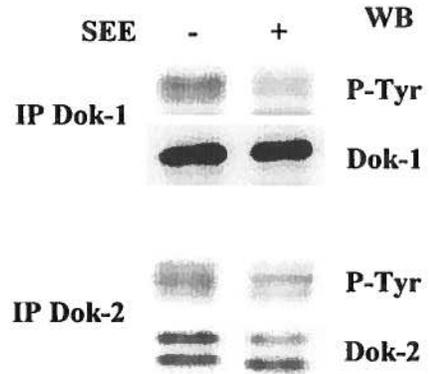


Figure 7. Inhibition de la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 par la co-stimulation du TCR/CD3.

A. Les cellules B RAJI ont été lavées deux fois dans du milieu RPMI 1640 puis incubées ou non avec le super-antigène SEE à 5 μ g/ml, 30 minutes à 37°C. Dans les cas indiqués, les cellules RAJI ont été mises en présence de l'anti-ligand α -CD58(LFA-3) et/ou α -CD80(B7.1) à 10 μ g/ml, 15 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois (RPMI 1640) et resuspendues à 1x10⁷ cellules/ml. Parallèlement, les lymphocytes T Jurkat ont été lavés deux fois (RPMI 1640) et resuspendus à 1.5x10⁷ cellules/ml. Les cellules ont ensuite été pré-incubées à 37°C pour 2 minutes puis mises en contact (1:1) pour 10 minutes par légère centrifugation pour favoriser la formation de conjugués. Les extraits totaux récoltés ont été révélés à l'aide d'un anti-phosphotyrosine (4G10), d'un anti-phospho-Dok-2 et d'un anti-Dok-2. **B.** Les mêmes étapes ont été suivies avec des concentrations cellulaires supérieures de 1x10⁸ cellules/ml pour les cellules B RAJI et de 1.5x10⁸ cellules/ml pour les cellules T Jurkat. Les précipités récoltés ont été révélés à l'aide d'un anti-phosphotyrosine (4G10), d'un anti-Dok-1 et d'un anti-Dok-2, comme indiqué.

DISCUSSION

L'homéostasie immunologique est maintenue par des mécanismes de régulation négative, contrepoids de la régulation positive, qui préviennent l'activation inappropriée des lymphocytes. Ces mécanismes peuvent prévenir ou restreindre la durée et l'intensité de la signalisation par l'immunorécepteur et ses co-récepteurs et de cette façon limiter la réponse immune. Certaines molécules adaptatrices possédant des fonctions négatives, incluant les protéines de la famille Dok, sont maintenant mieux caractérisées. Ces protéines sont impliquées dans de multiples processus biologiques, incluant la prolifération cellulaire (Suzu *et al.*, 2000; Yamanashi *et al.*, 2000; Di Cristofano *et al.*, 2001), la transformation et l'oncogenèse (Cong *et al.*, 1999; Di Cristofano *et al.*, 2001; Songyang *et al.*, 2001), la motilité cellulaire (Noguchi *et al.*, 1999; Hosooka *et al.*, 2001; Master *et al.*, 2001) et la différenciation (Grimm *et al.*, 2001).

De récentes études sur la signalisation par le récepteur CD2 dans le lymphocyte T ont attiré notre attention sur deux protéines adaptatrices de la famille Dok, Dok-1 et Dok-2. Ces protéines sont fortement phosphorylées sur tyrosine suite à l'activation de ce récepteur. Pour Dok-1, dans un système de surexpression, il a été observé l'association phosphodépendante à RasGAP et un effet inhibiteur sur la signalisation induite par CD2 menant ultimement à une baisse d'activation du facteur de transcription NF-AT et de la production d'IL-2 (Nemorin *et al.*, 2001). Afin de mieux décrire le fonctionnement de Dok-1 et Dok-2 dans la signalisation par CD2, nous nous sommes intéressés au rôle du domaine de liaison aux phosphotyrosines (PTB), domaine fortement conservé entre ces deux protéines.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir quels pouvaient être les partenaires d'association exclusif à ces domaines PTB. Pour ce faire, nous avons utilisé des protéines de fusion GST-PTB dans un test de liaison *in vitro*. Cela nous a permis d'observer la formation, fortement promue par l'activation du récepteur CD2, d'interactions homo- et hétérotypiques entre deux membres de la famille Dok, Dok-1 et Dok-2. Dans les conditions de détection utilisées, où seules les protéines phosphorylées sont détectées, l'association aux domaines PTB des Dok semblent être exclusive à Dok-1 et Dok-2. D'autres essais d'une plus grande sensibilité et permettant de détecter d'autres partenaires associés possiblement via des interactions indépendante de la phosphorylation sur tyrosine seront nécessaires afin de

déterminer le profil complet des protéines s'associant à ces domaines PTB. Les mêmes essais pourront aussi être conduits avec des temps de stimulation plus courts (entre 0 et 5 minutes), ou encore plus longs, afin d'identifier d'autres interactions qui pourraient se produire avant ou après les phénomènes d'oligomérisation. Dans un contexte cellulaire avec la protéine entière, il est aussi possible d'envisager que le domaine PH puisse influencer les interactions se produisant avec le domaine PTB et donc que certaines interactions ne peuvent être observées dans nos essais *in vitro* avec le domaine PTB isolé. À la suite de ces résultats, nous avons alors vérifié si le même phénomène pouvait être observé *in vivo*. Des études de co-immunoprécipitation ont démontré l'existence d'oligomérisation de Dok-1 et Dok-2, suite à la stimulation de CD2. Ce résultat est en accord avec la notion d'association phospho-dépendante. Ces observations constituent les premières démonstrations d'un phénomène de coopération entre deux membres de la même famille de protéines Dok.

Nous avons également pu montrer la nécessité d'un domaine PTB intact pour la phosphorylation de Dok-1 et Dok-2. Aussi, les tyrosines 146 (Dok-1) et 139 (Dok-2), vraisemblablement impliquées dans le phénomène d'oligomérisation, sont importantes pour la phosphorylation de ces protéines. Enfin, nous avons confirmé fonctionnellement que la surexpression des versions mutantes de Dok-1 et Dok-2 ne parviennent plus à inhiber l'activation des ERK 1/2 induite par CD2. L'implication des domaines PH et PTB des protéines Dok au niveau de leur phosphorylation et fonction a déjà été examinée dans d'autres systèmes cellulaires. La nécessité d'un domaine PTB intact pour l'inhibition par Dok-1 de la transformation cellulaire par Src témoigne également de l'importance de ce domaine pour les fonctions de la protéine (Songyang *et al.*, 2001). De même, pour Dok-2, en réponse à l'EGF, il est nécessaire de muter deux résidus arginine conservés du domaine PTB en plus de la délétion du domaine PH pour abolir complètement la phosphorylation de la protéine (Jones *et al.*, 1999). Vraisemblablement, dans ces systèmes, le domaine PTB qui lie des phosphotyrosines contenus dans la portion intracytoplasmique du récepteur à l'EGF contribue aussi à la localisation adéquate de la protéine, permettant ainsi sa phosphorylation optimale. Dans notre étude, l'absence de phosphorylation des protéines mutantes du domaine PTB (Dok-1 R207-08A et Dok-2 R200-01A) suite à l'engagement de CD2 témoigne également de l'importance du domaine PTB. Il est fort probable que, comme démontré dans d'autres systèmes, ce domaine

soit nécessaire au recrutement membranaire adéquat pour permettre la phosphorylation de ces protéines. Via des études de localisation cellulaire, par microscopie confocale, il sera intéressant d'observer le ciblage compartimental des Dok suite à l'engagement de CD2, et d'examiner une éventuelle altération dans ce phénomène suite à l'insertion des mutations étudiées. Il est possible d'envisager que les protéines Dok soient recrutées à proximité du récepteur CD2, via l'interaction du domaine PTB avec le récepteur lui-même, ou encore avec une des molécules associées à ce récepteur. Cependant, CD2 et la plupart des molécules s'y associant ne possèdent pas le motif préférentiel (Y/MXXNXL) de liaison au domaine PTB de Dok-1. Cela laisse en suspens l'identité des interactions du domaine PTB conduisant à la phosphorylation de ces protéines par CD2. Cependant, il se peut que le domaine PTB des Dok reconnaisse un motif non-phosphorylé ou différent de celui défini *in vitro*. Par exemple, les kinases Lck et Fyn, s'associant à CD2, possèdent une tyrosine dans un motif NXXY, motif ayant été montré comme favorable à l'association aux domaines PTB de Shc et IRS (Gustafson *et al.*, 1995). La protéine Dok-2 a aussi été montrée s'associant via son domaine PTB au récepteur Tek/Tie2 qui ne possède pas de motif NXXY (Jones *et al.*, 2003). Cela illustre donc la flexibilité dans les motifs de séquences pouvant interagir avec le domaine PTB de cette protéine. Des études plus approfondies seront nécessaires afin d'identifier quelles molécules contribuent au recrutement/phosphorylation des protéines Dok suite à l'engagement de CD2.

De son côté, le domaine PH est requis pour la phosphorylation de Dok-1 et son rôle de régulateur négatif dans la signalisation induite par c-Kit ou le PDGFR (Zhao *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002). Pour Dok-2, le domaine PH s'avère important pour la localisation et la phosphorylation optimale de cette protéine suite à une stimulation par le récepteur à l'EGF ou Tek/Tie2 (Jones *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003). La contribution de ce domaine repose sur ses capacités à lier les 3'-phosphoinositides, produits de la PI-3 kinase qui est activée par l'engagement de divers récepteurs. Comme la stimulation du lymphocyte T par CD2 ou CD28 induit l'activation de la PI-3K (Ward *et al.*, 1992; Hutchcroft *et al.*, 1998; Okkenhaug *et al.*, 2004), on peut imaginer que le recrutement à la membrane des protéines Dok dans ce type cellulaire nécessite aussi la contribution du domaine PH. De récentes études dans notre laboratoire démontrant l'absence de phosphorylation de Dok-2 dont le domaine PH a été délété

(résultats non présentés) viennent appuyer ce modèle où le domaine PH est important pour le recrutement/phosphorylation des Dok.

Nous avons aussi pu démontrer que la surexpression des formes mutées pour la tyrosine de l'interdomaine PH/PTB interférait avec la phosphorylation des Dok endogènes. Cela est en accord avec la démonstration que Dok-1 et Dok-2 puissent interagir suite à la stimulation de la cellule T via le récepteur CD2. Par ailleurs, nous observons une très forte baisse de la phosphorylation chez les mutants déficients dans le phénomène d'oligomérisation. Cela nous indique donc que l'oligomérisation des protéines Dok survient en aval des événements conduisant à leur phosphorylation complète. On peut envisager un modèle où les protéines Dok-1 et Dok-2 sont recrutées à la membrane via leur domaine PH, et localisées via leur domaine PTB à un endroit propice à leur phosphorylation (voir Figure 6). Les mutants pour le domaine PTB ne pourraient franchir cette étape, ce qui est en accord avec l'absence de phosphorylation que l'on observe. Par contre, le domaine PTB intact des mutants tyrosine 146 (Dok-1) et 139 (Dok-2) permettrait le recrutement adéquat des Dok à la membrane. Ces mutants étant incapables de dimeriser, ils seraient retenus à cette étape et donc ne pourraient être phosphorylés sur les résidus tyrosines de la portion c-terminale. Ils bloqueraient aussi les sites de recrutement membranaires, ce qui conduirait à l'effet d'interférence observé. Ce modèle fait donc appel à une phosphorylation séquentielle des tyrosines des protéines Dok, la tyrosine 146 (Dok-1) et 139 (Dok-2) étant la première tyrosine à être phosphorylée. Le modèle prédit également que la mutation de l'une des tyrosines dans la portion C-terminale des Dok n'entraînerait pas une perte totale de la phosphorylation de ces protéines. Nos résultats préliminaires sont en accord avec ces prédictions (résultats non présentés).

Il sera intéressant d'évaluer si des interactions hétérotypiques peuvent avoir lieu avec d'autres membres de la famille Dok. Sans toutefois posséder de leucine en position -1, la séquence entourant la tyrosine en position équivalente chez Dok-3 (Tyr152(souris): MEENSIY) est assez similaire à celle de la Tyr146 (MLENSLY) de Dok-1 et la Tyr139 (MEENELY) de Dok-2. Puisque les molécules Dok-1 et Dok-3 sont co-exprimées chez le lymphocyte B et toutes deux phosphorylées par une stimulation BCR, il serait intéressant d'évaluer l'existence d'oligomères Dok-1/Dok-3. Cependant, ce phénomène ne semble pas commun à l'ensemble

des protéines Dok. En effet, le domaine PTB de Dok-4 ne peut lier la forme phosphorylée de Dok-1 ou Dok-4 lors d'essais *in vitro* (Bedirian *et al.*, 2004). Il est à noter que Dok-4 et Dok-5 ne possède aucune tyrosine dans un motif de séquence de liaison potentielle au domaine PTB de Dok-1. Cette étude démontre que le domaine PTB de Dok-4 n'est vraisemblablement pas impliqué dans un phénomène d'oligomérisation, en plus de montrer une spécificité différente des domaines PTB de Dok-1 et Dok-4.

Dans un deuxième volet d'étude, nous avons cherché à décrire si la signalisation engendrée par le TCR-CD3 pouvait exercer une influence sur la phosphorylation de Dok-2 induite par les récepteurs CD2 et/ou CD28. Il a préalablement été montré que les protéines Dok-1 et Dok-2 sont phosphorylées suite à l'activation par le récepteur CD2, mais aucune phosphorylation n'est observée suite à la stimulation du TCR/CD3 seul (Nemorin *et al.*, 2000b). De plus, Dok-1 a aussi été démontré dans un état phosphorylé suite à l'engagement du récepteur CD28 (Nunes *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999). Nous avons pu démontrer, dans un contexte de stimulation avec des cellules présentatrices RAJI, que la stimulation simultanée du TCR-CD3 avec les récepteurs CD2 et/ou CD28 empêche fortement la phosphorylation de Dok-2 et aussi de Dok-1. Deux études antérieures ont montré des résultats divergents quant à l'influence du TCR-CD3 sur la signalisation de Dok-1 induite par CD2. Le mode d'activation pourrait être à l'origine de ces divergences. Dans une première étude, la stimulation préalable de la cellule T par CD3 parvient à empêcher les événements de phosphorylation induits par CD2, à l'exception de Dok-1 dont la phosphorylation est même augmentée (Harriague *et al.*, 2000). Dans une seconde étude, lors de l'engagement simultanée de CD3 et CD2 avec des anticorps, Martelli *et al.* ont cependant pu observer l'inhibition de l'association phosphodépendante de Dok-1 avec Crk-L, donc vraisemblablement de la phosphorylation de Dok-1, normalement induite lors de l'engagement de CD2 seul (Martelli *et al.*, 2001). Il a aussi été clairement montré que le co-engagement du TCR-CD3 et de CD28 parvient à inhiber la phosphorylation de Dok-1 induite par CD28 (Michel *et al.*, 2001).

Le patron de phosphorylation engendré par une paire d'anticorps mitogénique contre CD2 chevauche grandement celui observé suite à l'engagement du TCR-CD3. Cependant, la

phosphorylation de Dok-1 et Dok-2 par l'engagement de CD2 est un des événements distinctifs de la signalisation TCR-CD3. Curieusement, la signalisation par le TCR-CD3 semble parvenir à inhiber spécifiquement cette phosphorylation des régulateurs négatifs Dok-1 et Dok-2. Les mécanismes impliqués, empêchant la phosphorylation, ou encore induisant la déphosphorylation, restent toujours à être élucidés. Il sera intéressant d'investiguer si la signalisation TCR-CD3 parvient à moduler le ciblage membranaire des protéines Dok par CD2, prévenant ainsi la localisation adéquate de ces protéines pour leur phosphorylation.

Conclusion

La découverte de l'implication du domaine PTB de Dok-1 et Dok-2 dans un mécanisme d'oligomérisation entre ces protéines nous renseigne plus sur le mode d'action de ces adaptateurs. Ce type d'association pourrait permettre le recrutement optimal à la membrane et ainsi engendrer la phosphorylation complète de ces protéines. La coopération entre Dok-1 et Dok-2 pourrait contribuer à accroître le spectre de protéines recrutées via les phosphotyrosines de la portion C-terminale. Du point de vue fonctionnel, il reste toujours à déterminer si ces deux protéines assurent ou non des fonctions redondantes. Le fait que la souris déficiente pour Dok-1 ne présente aucun phénotype évident est en accord avec le fait que d'autres protéines telle Dok-2 puissent compenser en partie l'absence de Dok-1. L'expression différentielle ainsi que les portions C-terminales contenant des motifs uniques soutient cependant le concept de rôles spécifiques à chacune de ces protéines. Le type cellulaire impliqué et le récepteur engagé sont probablement des éléments à l'origine de la détermination des tyrosines qui seront phosphorylées, entraînant ou non la formation de complexes homo- ou hétérotypiques et/ou autres complexes protéiques spécifiques. Du point de vue évolutif, il est aussi fort probable que ces protéines aient été conservées afin d'assurer des fonctions distinctives. D'autres études seront nécessaires pour approfondir nos connaissances sur ces théories et aussi déterminer de quelle façon la signalisation TCR-CD3 agit afin d'empêcher l'action des régulateurs négatifs tels Dok-1 et Dok-2 pour laisser place aux mécanismes d'activation.

RÉFÉRENCES

Abramson, J., G. Rozenblum et I. Pecht. 2003. Dok protein family members are involved in signaling mediated by the type 1 Fcepsilon receptor. Eur J Immunol, 33(1), 85-91.

Acuto, O. et D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. Annu Rev Immunol, 18(165-184).

Acuto, O. et F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Rev Immunol, 3(12), 939-951.

Alarcon, B., D. Gil, P. Delgado et W. W. Schamel. 2003. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. Immunol Rev, 191(38-46).

Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, U. Rapp, A. Ashworth, C. J. Marshall et S. Cowley. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. Embo J, 13(7), 1610-1619.

Anton van der Merwe, P., S. J. Davis, A. S. Shaw et M. L. Dustin. 2000. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. Semin Immunol, 12(1), 5-21.

Arendt, C. W., B. Albrecht, T. J. Soos et D. R. Littman. 2002. Protein kinase C-theta;: signaling from the center of the T-cell synapse. Curr Opin Immunol, 14(3), 323-330.

Bachmann, M. F., M. Barner et M. Kopf. 1999. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. J Exp Med, 190(10), 1383-1392.

Bedirian, A., C. Baldwin, J. I. Abe, T. Takano et S. Lemay. 2004. PH and PTB domain-dependent membrane association and tyrosine phosphorylation of Dok-4, an inhibitory adapter molecule expressed in epithelial cells. J Biol Chem.

Bell, G. M., J. Fargnoli, J. B. Bolen, L. Kish et J. B. Imboden. 1996. The SH3 domain of p56lck binds to proline-rich sequences in the cytoplasmic domain of CD2. J Exp Med, 183(1), 169-178.

Beyers, A. D., A. N. Barclay, D. A. Law, Q. He et A. F. Williams. 1989. Activation of T lymphocytes via monoclonal antibodies against rat cell surface antigens with particular reference to CD2 antigen. Immunol Rev, 111(59-77).

Bhat, A., K. J. Johnson, T. Oda, A. S. Corbin et B. J. Druker. 1998. Interactions of p62(dok) with p210(bcr-abl) and Bcr-Abl-associated proteins. J Biol Chem, 273(48), 32360-32368.

- Bierer, B. E., B. P. Sleckman, S. E. Ratnofsky et S. J. Burakoff.** 1989. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. Annu Rev Immunol, 7(579-599).
- Bolland, S., R. N. Pearse, T. Kurosaki et J. V. Ravetch.** 1998. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. Immunity, 8(4), 509-516.
- Borg, J. P., J. Ooi, E. Levy et B. Margolis.** 1996. The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. Mol Cell Biol, 16(11), 6229-6241.
- Bouton, A. H., S. B. Kanner, R. R. Vines, H. C. Wang, J. B. Gibbs et J. T. Parsons.** 1991. Transformation by pp60src or stimulation of cells with epidermal growth factor induces the stable association of tyrosine-phosphorylated cellular proteins with GTPase-activating protein. Mol Cell Biol, 11(2), 945-953.
- Brdicka, T., D. Pavlistova, A. Leo, E. Bruyns, V. Korinek, P. Angelisova, J. Scherer, A. Shevchenko, I. Hilgert, J. Cerny, K. Drbal, Y. Kuramitsu, B. Kornacker, V. Horejsi et B. Schraven.** 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. J Exp Med, 191(9), 1591-1604.
- Cacalano, N. A., D. Sanden et J. A. Johnston.** 2001. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. Nat Cell Biol, 3(5), 460-465.
- Cachon-Gonzalez, M. B., S. Fenner, J. M. Coffin, C. Moran, S. Best et J. P. Stoye.** 1994. Structure and expression of the hairless gene of mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(16), 7717-7721.
- Cai, D., S. Dhe-Paganon, P. A. Melendez, J. Lee et S. E. Shoelson.** 2003. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. J Biol Chem, 278(28), 25323-25330.
- Cantrell, D. A.** 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. Immunology, 105(4), 369-374.
- Carpino, N., D. Wisniewski, A. Strife, D. Marshak, R. Kobayashi, B. Stillman et B. Clarkson.** 1997. p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. Cell, 88(2), 197-204.

- Charest, A., J. Wagner, S. Jacob, C. J. McGlade et M. L. Tremblay.** 1996. Phosphotyrosine-independent binding of SHC to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. Evidence for extended phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain recognition specificity. J Biol Chem, 271(14), 8424-8429.
- Chow, L. M., M. Fournel, D. Davidson et A. Veillette.** 1993. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. Nature, 365(6442), 156-160.
- Clements, J. L.** 2003. Known and potential functions for the SLP-76 adapter protein in regulating T-cell activation and development. Immunol Rev, 191(211-219).
- Cohen, G. B., R. Ren et D. Baltimore.** 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. Cell, 80(2), 237-248.
- Cong, F., B. Yuan et S. P. Goff.** 1999. Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling. Mol Cell Biol, 19(12), 8314-8325.
- Cooper, J. A. et B. Howell.** 1993. The when and how of Src regulation. Cell, 73(6), 1051-1054.
- Damen, J. E., L. Liu, P. Rosten, R. K. Humphries, A. B. Jefferson, P. W. Majerus et G. Krystal.** 1996. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(4), 1689-1693.
- Darby, C., R. L. Geahlen et A. D. Schreiber.** 1994. Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. J Immunol, 152(11), 5429-5437.
- Davis, S. J. et P. A. van der Merwe.** 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. Immunol Today, 17(4), 177-187.
- DeClue, J. E., W. C. Vass, M. R. Johnson, D. W. Stacey et D. R. Lowy.** 1993. Functional role of GTPase-activating protein in cell transformation by pp60v-src. Mol Cell Biol, 13(11), 6799-6809.
- Dho, S. E., S. Jacob, C. D. Wolting, M. B. French, L. R. Rohrschneider et C. J. McGlade.** 1998. The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. J Biol Chem, 273(15), 9179-9187.

Di Cristofano, A., N. Carpino, N. Dunant, G. Friedland, R. Kobayashi, A. Strife, D. Wisniewski, B. Clarkson, P. P. Pandolfi et M. D. Resh. 1998. Molecular cloning and characterization of p56^{dok-2} defines a new family of RasGAP-binding proteins. J Biol Chem, 273(9), 4827-4830.

Di Cristofano, A., M. Niki, M. Zhao, F. G. Karnell, B. Clarkson, W. S. Pear, L. Van Aelst et P. P. Pandolfi. 2001. p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl). J Exp Med, 194(3), 275-284.

Dower, N. A., S. L. Stang, D. A. Bottorff, J. O. Ebinu, P. Dickie, H. L. Ostergaard et J. C. Stone. 2000. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. Nat Immunol, 1(4), 317-321.

Dunant, N. M., D. Wisniewski, A. Strife, B. Clarkson et M. D. Resh. 2000. The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells. Cell Signal, 12(5), 317-326.

Dustin, M. L., D. E. Golan, D. M. Zhu, J. M. Miller, W. Meier, E. A. Davies et P. A. van der Merwe. 1997. Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. J Biol Chem, 272(49), 30889-30898.

Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen et A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. Cell, 94(5), 667-677.

Ebinu, J. O., S. L. Stang, C. Teixeira, D. A. Bottorff, J. Hooton, P. M. Blumberg, M. Barry, R. C. Bleakley, H. L. Ostergaard et J. C. Stone. 2000. RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. Blood, 95(10), 3199-3203.

Eck, M. J., S. Dhe-Paganon, T. Trub, R. T. Nolte et S. E. Shoelson. 1996. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. Cell, 85(5), 695-705.

Ellis, C., M. Moran, F. McCormick et T. Pawson. 1990a. Phosphorylation of GAP and GAP associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinase. Nature, 343(377-381).

- Ellis, C., M. Moran, F. McCormick et T. Pawson.** 1990b. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. Nature, 343(6256), 377-381.
- Falasca, M., S. K. Logan, V. P. Lehto, G. Baccante, M. A. Lemmon et J. Schlessinger.** 1998. Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. Embo J, 17(2), 414-422.
- Favre, C., A. Gerard, E. Clauzier, P. Pontarotti, D. Olive et J. A. Nunes.** 2003. DOK4 and DOK5: new Dok-related genes expressed in human T cells. Genes Immun, 4(1), 40-45.
- Feng, S., J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon et S. L. Schreiber.** 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. Science, 266(5188), 1241-1247.
- Freund, C., R. Kuhne, H. Yang, S. Park, E. L. Reinherz et G. Wagner.** 2002. Dynamic interaction of CD2 with the GYF and the SH3 domain of compartmentalized effector molecules. EMBO J., 21(22), 5985-5995.
- Fukai, I., R. E. Hussey, R. Sunder-Plassmann et E. L. Reinherz.** 2000. A critical role for p59(fyn) in CD2-based signal transduction. Eur J Immunol, 30(12), 3507-3515.
- Garcia, A., S. Prabhakar, S. Hughan, T. W. Anderson, C. J. Brock, A. C. Pearce, R. A. Dwek, S. P. Watson, H. F. Hebestreit et N. Zitzmann.** 2004. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. Blood, 103(6), 2088-2095.
- Genot, E. et D. A. Cantrell.** 2000. Ras regulation and function in lymphocytes. Curr Opin Immunol, 12(3), 289-294.
- Genot, E., S. Cleverley, S. Henning et D. Cantrell.** 1996. Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. Embo J, 15(15), 3923-3933.
- Genot, E., K. Reif, S. Beach, I. Kramer et D. Cantrell.** 1998. p21ras initiates Rac-1 but not phosphatidylinositol 3 kinase/PKB, mediated signaling pathways in T lymphocytes. Oncogene, 17(13), 1731-1738.
- Gerard, A., C. Favre, F. Garcon, J. G. Nemorin, P. Duplay, S. Pastor, Y. Collette, D. Olive et J. A. Nunes.** 2004. Functional interaction of RasGAP-binding proteins Dok-1 and Dok-2 with the Tec protein tyrosine kinase. Oncogene, 23(8), 1594-1598.

Gold, M. R., M. T. Crowley, G. A. Martin, F. McCormick et A. L. DeFranco. 1993. Targets of B lymphocyte antigen receptor signal transduction include the p21ras GTPase-activating protein (GAP) and two GAP-associated proteins. J Immunol, 150(2), 377-386.

Gong, Q., A. M. Cheng, A. M. Akk, J. Alberola-Ila, G. Gong, T. Pawson et A. C. Chan. 2001. Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. Nat Immunol, 2(1), 29-36.

Gonzalez-Cabrero, J., C. J. Wise, Y. Latchman, G. J. Freeman, A. H. Sharpe et H. Reiser. 1999. CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(3), 1019-1023.

Grimm, J., M. Sachs, S. Britsch, S. Di Cesare, T. Schwarz-Romond, K. Alitalo et W. Birchmeier. 2001. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. J Cell Biol, 154(2), 345-354.

Gugasyan, R., C. Quilici, S. T. I, D. Grail, A. M. Verhagen, A. Roberts, T. Kitamura, A. R. Dunn et P. Lock. 2002. Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites. J Cell Biol, 158(1), 115-125.

Guo, D., Q. Jia, H. Y. Song, R. S. Warren et D. B. Donner. 1995. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. J Biol Chem, 270(12), 6729-6733.

Gustafson, T. A., W. He, A. Craparo, C. D. Schaub et T. J. O'Neill. 1995. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. Mol Cell Biol, 15(5), 2500-2508.

Harriague, J., P. Debre, G. Bismuth et P. Hubert. 2000. Priming of CD2-induced p62Dok tyrosine phosphorylation by CD3 in Jurkat T cells. Eur J Immunol, 30(11), 3319-3328.

Heidaran, M. A., C. J. Molloy, M. Pangelinan, G. G. Choudhury, L. M. Wang, T. P. Fleming, A. Y. Sakaguchi et J. H. Pierce. 1992. Activation of the colony-stimulating factor 1 receptor leads to the rapid tyrosine phosphorylation of GTPase-activating protein and activation of cellular p21ras. Oncogene, 7(1), 147-152.

Heiniger, H. J., H. Meier, N. Kaliss, M. Cherry, H. W. Chen et R. D. Stoner. 1974. Hereditary immunodeficiency and leukemogenesis in HRS-J mice. Cancer Res, 34(1), 201-211.

Henkemeyer, M., D. J. Rossi, D. P. Holmyard, M. C. Puri, G. Mbamalu, K. Harpal, T. S. Shih, T. Jacks et T. Pawson. 1995. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. Nature, 377(6551), 695-701.

Hermiston, M. L., Z. Xu, R. Majeti et A. Weiss. 2002. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. J Clin Invest, 109(1), 9-14.

Holdorf, A. D., J. M. Green, S. D. Levin, M. F. Denny, D. B. Straus, V. Link, P. S. Changelian, P. M. Allen et A. S. Shaw. 1999. Proline residues in CD28 and the Src homology (SH)3 domain of Lck are required for T cell costimulation. J Exp Med, 190(3), 375-384.

Horejsi, V. 2003. The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. Immunol Rev, 191(148-164).

Hosomi, Y., K. Shii, W. Ogawa, H. Matsuba, M. Yoshida, Y. Okada, K. Yokono, M. Kasuga, S. Baba et R. A. Roth. 1994. Characterization of a 60-kilodalton substrate of the insulin receptor kinase. J Biol Chem, 269(15), 11498-11502.

Hosooka, T., T. Noguchi, H. Nagai, T. Horikawa, T. Matozaki, M. Ichihashi et M. Kasuga. 2001. Inhibition of the motility and growth of B16F10 mouse melanoma cells by dominant negative mutants of Dok-1. Mol Cell Biol, 21(16), 5437-5446.

Hutchcroft, J. E., J. M. Slavik, H. Lin, T. Watanabe et B. E. Bierer. 1998. Uncoupling activation-dependent HS1 phosphorylation from nuclear factor of activated T cells transcriptional activation in Jurkat T cells: differential signaling through CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28. J Immunol, 161(9), 4506-4512.

Janssen, E. et W. Zhang. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. Curr Opin Immunol, 15(3), 269-276.

Jones, N., S. H. Chen, C. Sturk, Z. Master, J. Tran, R. S. Kerbel et D. J. Dumont. 2003. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. Mol Cell Biol, 23(8), 2658-2668.

Jones, N. et D. J. Dumont. 1998a. Assignment of the Dokr gene to mouse chromosome 14D2-D3 by fluorescence in situ hybridization. Genomics, 53(3), 413-414.

Jones, N. et D. J. Dumont. 1998b. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. Oncogene, 17(9), 1097-1108.

Jones, N. et D. J. Dumont. 1999. Recruitment of Dok-R to the EGF receptor through its PTB domain is required for attenuation of Erk MAP kinase activation. Curr Biol, 9(18), 1057-1060.

Kanner, S. B., N. K. Damle, J. Blake, A. Aruffo et J. A. Ledbetter. 1992. CD2/LFA-3 ligation induces phospholipase-C gamma 1 tyrosine phosphorylation and regulates CD3 signaling. *J Immunol*, 148(7), 2023-2029.

Kato, I., T. Takai et A. Kudo. 2002. The pre-B cell receptor signaling for apoptosis is negatively regulated by Fc gamma RIIB. *J Immunol*, 168(2), 629-634.

Kavanaugh, W. M., D. A. Pot, S. M. Chin, M. Deuter-Reinhard, A. B. Jefferson, F. A. Norris, F. R. Masiarz, L. S. Cousens, P. W. Majerus et L. T. Williams. 1996. Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol*, 6(4), 438-445.

Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky et M. Okada. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature*, 404(6781), 999-1003.

Keegan, A. D., K. Nelms, M. White, L. M. Wang, J. H. Pierce et W. E. Paul. 1994. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell*, 76(5), 811-820.

Kepley, C. L., S. Taghavi, G. A. Mackay, D. Zhu, P. A. Morel, K. Zhang, J. J. Ryan, L. S. Satin, M. Zhang, P. P. Pandolfi et A. Saxon. 2004. Co-aggregation of Fc gamma RII With Fc epsilon RI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem*, in press

King, P. D., A. Sadra, A. Han, X. R. Liu, R. Sunder-Plassmann, E. L. Reinherz et B. Dupont. 1996. CD2 signaling in T cells involves tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase, EMT/ITK/TSK. *Int. Immunol.*, 8(11), 1707-1714.

Kiosses, W. B., R. H. Daniels, C. Otey, G. M. Bokoch et M. A. Schwartz. 1999. A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol*, 147(4), 831-844.

Kishihara, K., J. Penninger, V. A. Wallace, T. M. Kundig, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P. S. Ohashi, M. L. Thomas et et al. 1993. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell*, 74(1), 143-156.

Kivens, W. J., S. W. Hunt, 3rd, J. L. Mobley, T. Zell, C. L. Dell, B. E. Bierer et Y. Shimizu. 1998. Identification of a proline-rich sequence in the CD2 cytoplasmic domain

critical for regulation of integrin-mediated adhesion and activation of phosphoinositide 3-kinase. Mol Cell Biol, 18(9), 5291-5307.

Koch, C. A., M. Moran, I. Sadowski et T. Pawson. 1989. The common src homology region 2 domain of cytoplasmic signaling proteins is a positive effector of v-fps tyrosine kinase function. Mol Cell Biol, 9(10), 4131-4140.

Koretzky, G. A. et P. S. Myung. 2001. Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins. Nat Rev Immunol, 1(2), 95-107.

Koretzky, G. A., J. Picus, M. L. Thomas et A. Weiss. 1990. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. Nature, 346(6279), 66-68.

Latour, S., G. Gish, C. D. Helgason, R. K. Humphries, T. Pawson et A. Veillette. 2001. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. Nat Immunol, 2(8), 681-690.

Lee, K. H., A. R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T. N. Sims, W. R. Burack, H. Wu, J. Wang, O. Kanagawa, M. Markiewicz, P. M. Allen, M. L. Dustin, A. K. Chakraborty et A. S. Shaw. 2003. The Immunological Synapse Balances T Cell Receptor Signaling and Degradation. Science, 302(5648), 1218-1222.

Lemay, S., D. Davidson, S. Latour et A. Veillette. 2000. Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. Mol Cell Biol, 20(8), 2743-2754.

Lemmon, M. A. et K. M. Ferguson. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. Biochem J, 350 Pt 1(1-18).

Lenschow, D. J., T. L. Walunas et J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol, 14(233-258).

Leo, A. et B. Schraven. 2001. Adapters in lymphocyte signalling. Curr Opin Immunol, 13(3), 307-316.

Ley, S. C., A. A. Davies, B. Druker et M. J. Crumpton. 1991. The T cell receptor/CD3 complex and CD2 stimulate the tyrosine phosphorylation of indistinguishable patterns of polypeptides in the human T leukemic cell line Jurkat. Eur J Immunol, 21(9), 2203-2209.

Li, J., K. Nishizawa, W. An, R. E. Hussey, F. E. Lialios, R. Salgia, P. R. Sunder et E. L. Reinherz. 1998a. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. EMBO J., 17(24), 7320-7336.

Li, J., K. Nishizawa, W. An, R. E. Hussey, F. E. Lialios, R. Salgia, R. Sunder-Plassmann et E. L. Reinherz. 1998b. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion. Embo J, 17(24), 7320-7336.

Li, S. C., Z. Songyang, S. J. Vincent, C. Zwahlen, S. Wiley, L. Cantley, L. E. Kay, J. Forman-Kay et T. Pawson. 1997. High-affinity binding of the Drosophila Numb phosphotyrosine-binding domain to peptides containing a Gly-Pro-(p)Tyr motif. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(14), 7204-7209.

Liang, X., D. Wisniewski, A. Strife, Shivakrupa, B. Clarkson et M. D. Resh. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-Kit signaling. J Biol Chem, 277(16), 13732-13738.

Lin, J., A. Weiss et T. S. Finco. 1999. Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. J Biol Chem, 274(41), 28861-28864.

Lindquist, J. A., L. Simeoni et B. Schraven. 2003. Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. Immunol Rev, 191(165-182).

Lioubin, M. N., P. A. Algate, S. Tsai, K. Carlberg, A. Aebersold et L. R. Rohrschneider. 1996. p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. Genes Dev, 10(9), 1084-1095.

Lock, P., F. Casagrande et A. R. Dunn. 1999. Independent SH2-binding sites mediate interaction of Dok-related protein with RasGTPase-activating protein and Nck. J Biol Chem, 274(32), 22775-22784.

Lugo, T. G., A. M. Pendergast, A. J. Muller et O. N. Witte. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science, 247(4946), 1079-1082.

Malissen, B. 2003. An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. Immunol Rev, 191(7-27).

Martelli, M. P., J. Boomer, M. Bu et B. E. Bierer. 2001. T cell regulation of p62(dok) (Dok1) association with Crk-L. J Biol Chem, 276(49), 45654-45661.

Master, Z., N. Jones, J. Tran, J. Jones, R. S. Kerbel et D. J. Dumont. 2001. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. Embo J, 20(21), 5919-5928.

Master, Z., J. Tran, A. Bishnoi, S. H. Chen, J. M. Ebos, P. Van Slyke, R. S. Kerbel et D. J. Dumont. 2003. Dok-R binds c-Abl and regulates Abl kinase activity and mediates cytoskeletal reorganization. J Biol Chem, 278(32), 30170-30179.

Meier, H., D. D. Myers et R. J. Huebner. 1969. Genetic control by the hr-locus of susceptibility and resistance to leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, 63(3), 759-766.

Michel, F., G. Attal-Bonnefoy, G. Mangino, S. Mise-Omata et O. Acuto. 2001. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. Immunity, 15(6), 935-945.

Miller, A. T. et L. J. Berg. 2002. New insights into the regulation and functions of Tec family tyrosine kinases in the immune system. Curr Opin Immunol, 14(3), 331-340.

Moingeon, P., H. C. Chang, P. H. Sayre, L. K. Clayton, A. Alcover, P. Gardner et E. L. Reinherz. 1989. The structural biology of CD2. Immunol Rev, 111(111-144).

Moran, M. F., P. Polakis, F. McCormick, T. Pawson et C. Ellis. 1991. Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. Mol Cell Biol, 11(4), 1804-1812.

Morrissey, P. J., D. R. Parkinson, R. S. Schwartz et S. D. Waksal. 1980. Immunologic abnormalities in HRS/J mice. I. Specific deficit in T lymphocyte helper function in a mutant mouse. J Immunol, 125(4), 1558-1562.

Muller, A. J., J. C. Young, A. M. Pendergast, M. Pondel, N. R. Landau, D. R. Littman et O. N. Witte. 1991. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. Mol Cell Biol, 11(4), 1785-1792.

Murakami, H., Y. Yamamura, Y. Shimono, K. Kawai, K. Kurokawa et M. Takahashi. 2002. Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. J Biol Chem, 277(36), 32781-32790.

Mustelin, T. et K. Tasken. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. Biochem J, 371(Pt 1), 15-27.

- Myers, M. G., Jr., X. J. Sun et M. F. White.** 1994. The IRS-1 signaling system. Trends Biochem Sci, 19(7), 289-293.
- Neet, K. et T. Hunter.** 1995. The nonreceptor protein-tyrosine kinase CSK complexes directly with the GTPase-activating protein-associated p62 protein in cells expressing v-Src or activated c-Src. Mol Cell Biol, 15(9), 4908-4920.
- Nelms, K., A. L. Snow, L. J. Hu et W. E. Paul.** 1998a. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. Immunity, 9(1), 13-24.
- Nelms, K., A. L. Snow, J. Hu-Li et W. E. Paul.** 1998b. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. Immunity, 9(1), 13-24.
- Nemorin, J. G. et P. Duplay.** 2000a. Evidence that lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. J Biol Chem, 275(19), 14590-14597.
- Nemorin, J. G. et P. Duplay.** 2000b. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56dok and p62dok may play a role in CD2 signaling. J Biol Chem, 275(19), 14590-14597.
- Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube et P. Duplay.** 2001. p62dok negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. J Immunol, 166(7), 4408-4415.
- Nishizawa, K., C. Freund, J. Li, G. Wagner et E. L. Reinherz.** 1998. Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(25), 14897-14902.
- Noguchi, T., T. Matozaki, K. Inagaki, M. Tsuda, K. Fukunaga, Y. Kitamura, T. Kitamura, K. Shii, Y. Yamanashi et M. Kasuga.** 1999. Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. Embo J, 18(7), 1748-1760.
- Nunes, J. A., A. Truneh, D. Olive et D. A. Cantrell.** 1996. Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. J Biol Chem, 271(3), 1591-1598.
- Okkenhaug, K., A. Bilancio, J. L. Emery et B. Vanhaesebroeck.** 2004. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. Biochem Soc Trans, 32(Pt 2), 332-335.

- O'Neill, T. J., A. Craparo et T. A. Gustafson.** 1994. Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system. Mol Cell Biol, 14(10), 6433-6442.
- Ono, M., S. Bolland, P. Tempst et J. V. Ravetch.** 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. Nature, 383(6597), 263-266.
- Ott, V. L. et J. C. Cambier.** 2002a. Introduction: multifaceted roles of lipids and their catabolites in immune cell signaling. Semin Immunol, 14(1), 1-6.
- Ott, V. L., I. Tamir, M. Niki, P. P. Pandolfi et J. C. Cambier.** 2002b. Downstream of kinase, p62(dok), is a mediator of Fc gamma IIB inhibition of Fc epsilon RI signaling. J Immunol, 168(9), 4430-4439.
- Pantaleo, G., D. Olive, A. Poggi, W. J. Kozumbo, L. Moretta et A. Moretta.** 1987. Transmembrane signalling via the T11-dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. Eur J Immunol, 17(1), 55-60.
- Parmar, K. et N. Rosenberg.** 1996. Ras complements the carboxyl terminus of v-Abl protein in lymphoid transformation. J Virol, 70(2), 1009-1015.
- Parra, E., M. Varga, G. Hedlund, T. Kalland et M. Dohlsten.** 1997. Costimulation by B7-1 and LFA-3 targets distinct nuclear factors that bind to the interleukin-2 promoter: B7-1 negatively regulates LFA-3-induced NF-AT DNA binding. Mol Cell Biol, 17(3), 1314-1323.
- Pawson, T.** 1995. Protein modules and signalling networks. Nature, 373(6515), 573-580.
- Pawson, T. et J. D. Scott.** 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science, 278(5346), 2075-2080.
- Pitcher, J. A., K. Touhara, E. S. Payne et R. J. Lefkowitz.** 1995. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. J Biol Chem, 270(20), 11707-11710.
- Pradhan, M. et K. M. Coggeshall.** 1997. Activation-induced bi-dentate interaction of SHIP and Shc in B lymphocytes. J Cell Biochem, 67(1), 32-42.
- Reske-Kunz, A. B., M. P. Scheid et E. A. Boyse.** 1979. Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice. J Exp Med, 149(1), 228-233.

Robson, J. D., D. Davidson et A. Veillette. 2004. Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. Mol Cell Biol, 24(6), 2332-2343.

Roose, J. et A. Weiss. 2000. T cells: getting a GRP on Ras. Nat Immunol, 1(4), 275-276.

Rozakis-Adcock, M., J. McGlade, G. Mbamalu, G. Pelicci, R. Daly, W. Li, A. Batzer, S. Thomas, J. Brugge, P. G. Pelicci et et al. 1992. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. Nature, 360(6405), 689-692.

Rudd, C. E., E. K. Barber, K. E. Burgess, J. Y. Hahn, A. D. Odysseos, M. S. Sy et S. F. Schlossman. 1991. Molecular analysis of the interaction of p56lck with the CD4 and CD8 antigens. Adv Exp Med Biol, 292(85-96).

Saito, T. et S. Yamasaki. 2003. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. Immunol Rev, 192(143-160).

Salcini, A. E., J. McGlade, G. Pelicci, I. Nicoletti, T. Pawson et P. G. Pelicci. 1994. Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. Oncogene, 9(10), 2827-2836.

Salim, K., M. J. Bottomley, E. Querfurth, M. J. Zvelebil, I. Gout, R. Scaife, R. L. Margolis, R. Gigg, C. I. Smith, P. C. Driscoll, M. D. Waterfield et G. Panayotou. 1996. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. Embo J, 15(22), 6241-6250.

Sanchez-Margalet, V., R. Zoratti et C. K. Sung. 1995. Insulin-like growth factor-1 stimulation of cells induces formation of complexes containing phosphatidylinositol-3-kinase, guanosine triphosphatase-activating protein (GAP), and p62 GAP-associated protein. Endocrinology, 136(1), 316-321.

Sattler, M., S. Verma, Y. B. Pride, R. Salgia, L. R. Rohrschneider et J. D. Griffin. 2001. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. J Biol Chem, 276(4), 2451-2458.

Scharenberg, A. M., O. El-Hillal, D. A. Fruman, L. O. Beitz, Z. Li, S. Lin, I. Gout, L. C. Cantley, D. J. Rawlings et J. P. Kinet. 1998. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-

3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. Embo J, 17(7), 1961-1972.

Schmedt, C., K. Saijo, T. Niidome, R. Kuhn, S. Aizawa et A. Tarakhovsky. 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. Nature, 394(6696), 901-904.

Sells, M. A., J. T. Boyd et J. Chernoff. 1999. p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. J Cell Biol, 145(4), 837-849.

Shah, K. et K. M. Shokat. 2002. A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. Chem Biol, 9(1), 35-47.

Sharpe, A. H. et G. J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol, 2(2), 116-126.

Shih, N. Y., J. Li, V. Karpitskii, A. Nguyen, M. L. Dustin, O. Kanagawa, J. H. Miner et A. S. Shaw. 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. Science, 286(5438), 312-315.

Songyang, Z. et L. C. Cantley. 1995a. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. Trends Biochem Sci, 20(11), 470-475.

Songyang, Z., K. L. Carraway, 3rd, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng et et al. 1995b. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. Nature, 373(6514), 536-539.

Songyang, Z., K. L. Carraway, 3rd, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng, M. J. Lorenzo, B. A. J. Ponder, B. J. Mayer et L. C. Cantley. 1995c. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. Nature, 373(6514), 536-539.

Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider et et al. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. Cell, 72(5), 767-778.

Songyang, Z., S. E. Shoelson, J. McClade, P. Olivier, T. Pawson, X. R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi et et al. 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. Mol Cell Biol, 14(4), 2777-2785.

- Songyang, Z., Y. Yamanashi, D. Liu et D. Baltimore.** 2001. Domain-dependent function of the rasGAP-binding protein p62Dok in cell signaling. J Biol Chem, 276(4), 2459-2465.
- Springer, T. A., M. L. Dustin, T. K. Kishimoto et S. D. Marlin.** 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. Annu Rev Immunol, 5(223-252).
- Stam, J. C., E. E. Sander, F. Michiels, F. N. van Leeuwen, H. E. Kain, R. A. van der Kammen et J. G. Collard.** 1997. Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. J Biol Chem, 272(45), 28447-28454.
- Suzu, S., M. Tanaka-Douazono, K. Nomaguchi, M. Yamada, H. Hayasawa, F. Kimura et K. Motoyoshi.** 2000. p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. Embo J, 19(19), 5114-5122.
- Takeuchi, S., Y. Takayama, A. Ogawa, K. Tamura et M. Okada.** 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp positively regulates the activity of the carboxyl-terminal Src kinase, Csk. J Biol Chem, 275(38), 29183-29186.
- Tamir, I., J. C. Stolpa, C. D. Helgason, K. Nakamura, P. Bruhns, M. Daeron et J. C. Cambier.** 2000. The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. Immunity, 12(3), 347-358.
- Tanaka, N., H. Abe, H. Yagita, K. Okumura, M. Nakamura et K. Sugamura.** 1997. Itk, a T cell-specific tyrosine kinase, is required for CD2-mediated interleukin-2 promoter activation in the human T cell line Jurkat. Eur J Immunol, 27(4), 834-841.
- Teh, S. J., N. Killeen, A. Tarakhovsky, D. R. Littman et H. S. Teh.** 1997. CD2 regulates the positive selection and function of antigen-specific CD4⁻ CD8⁺ T cells. Blood, 89(4), 1308-1318.
- Tibaldi, E. V. et E. L. Reinherz.** 2003. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. Int Immunol, 15(3), 313-329.
- Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone et A. H. Sharpe.** 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity, 3(5), 541-547.

- Trahey, M., G. Wong, R. Halenbeck, B. Rubinfeld, G. A. Martin, M. Ladner, C. M. Long, W. J. Crosier, K. Watt, K. Kohts et al.** 1988. Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. Science, 242(4886), 1697-1700.
- Trub, T., W. E. Choi, G. Wolf, E. Ottinger, Y. Chen, M. Weiss et S. E. Shoelson.** 1995. Specificity of the PTB domain of Shc for beta turn-forming pentapeptide motifs amino-terminal to phosphotyrosine. J Biol Chem, 270(31), 18205-18208.
- van der Geer, P. et T. Pawson.** 1995. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. Trends Biochem Sci, 20(7), 277-280.
- van der Geer, P., S. Wiley, G. D. Gish, V. K. Lai, R. Stephens, M. F. White, D. Kaplan et T. Pawson.** 1996. Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(3), 963-968.
- van der Merwe, P. A. et S. J. Davis.** 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. Annu Rev Immunol, 21(659-684).
- van Dijk, T. B., E. van Den Akker, M. P. Amelsvoort, H. Mano, B. Lowenberg et M. von Lindern.** 2000. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. Blood, 96(10), 3406-3413.
- Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak et J. B. Bolen.** 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. Cell, 55(2), 301-308.
- Vuica, M., S. Desiderio et J. P. Schneck.** 1997. Differential effects of B cell receptor and B cell receptor-FcgammaRIIB1 engagement on docking of Csk to GTPase-activating protein (GAP)-associated p62. J Exp Med, 186(2), 259-267.
- Wange, R. L. et L. E. Samelson.** 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. Immunity, 5(3), 197-205.
- Ward, S. G., S. C. Ley, C. MacPhee et D. A. Cantrell.** 1992. Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens. Eur. J. Immunol., 22(1), 45-49.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser et T. W. Mak.** 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. Science, 270(5238), 985-988.

Wick, M. J., L. Q. Dong, D. Hu, P. Langlais et F. Liu. 2001. Insulin receptor-mediated p62dok tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for binding GTPase-activating protein and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. J Biol Chem, 276(46), 42843-42850.

Wisniewski, D., A. Strife, D. Wojciechowicz, C. Lambek et B. Clarkson. 1994. A 62-kilodalton tyrosine phosphoprotein constitutively present in primary chronic phase chronic myelogenous leukemia enriched lineage negative blast populations. Leukemia, 8(4), 688-693.

Yablonski, D., T. Kadlecsek et A. Weiss. 2001. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. Mol Cell Biol, 21(13), 4208-4218.

Yamanashi, Y. et D. Baltimore. 1997. Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. Cell, 88(2), 205-211.

Yamanashi, Y., T. Tamura, T. Kanamori, H. Yamane, H. Nariuchi, T. Yamamoto et D. Baltimore. 2000. Role of the rasGAP-associated docking protein p62(dok) in negative regulation of B cell receptor-mediated signaling. Genes Dev, 14(1), 11-16.

Yang, W. C., M. Ghiotto, B. Barbarat et D. Olive. 1999. The role of Tec protein-tyrosine kinase in T cell signaling. J Biol Chem, 274(2), 607-617.

Yenush, L., K. J. Makati, J. Smith-Hall, O. Ishibashi, M. G. Myers, Jr. et M. F. White. 1996. The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. J Biol Chem, 271(39), 24300-24306.

Yoshida, K., Y. Yamashita, A. Miyazato, K. Ohya, A. Kitanaka, U. Ikeda, K. Shimada, T. Yamanaka, K. Ozawa et H. Mano. 2000. Mediation by the protein-tyrosine kinase Tec of signaling between the B cell antigen receptor and Dok-1. J Biol Chem, 275(32), 24945-24952.

Young, M. A., S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux et J. Kuriyan. 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. Cell, 105(1), 115-126.

Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer et S. L. Schreiber. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell, 76(5), 933-945.

Zhang, L., U. Lorenz et K. S. Ravichandran. 2003. Role of Shc in T-cell development and function. Immunol Rev, 191(183-195).

Zhang, W., C. L. Sommers, D. N. Burshtyn, C. C. Stebbins, J. B. DeJarnette, R. P. Tribble, A. Grinberg, H. C. Tsay, H. M. Jacobs, C. M. Kessler, E. O. Long, P. E. Love et L. E. Samelson. 1999. Essential role of LAT in T cell development. Immunity, 10(3), 323-332.

Zhang, W., R. P. Tribble, M. Zhu, S. K. Liu, C. J. McGlade et L. E. Samelson. 2000. Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling. J Biol Chem, 275(30), 23355-23361.

Zhao, M., A. A. Schmitz, Y. Qin, A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi et L. Van Aelst. 2001. Phosphoinositide 3-kinase-dependent membrane recruitment of p62(dok) is essential for its negative effect on mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. J Exp Med, 194(3), 265-274.

Zheng, C. F. et K. L. Guan. 1994. Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. Embo J, 13(5), 1123-1131.

Zhou, M. M., B. Huang, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. B. Shuker, M. Miyazaki, T. Trub, S. E. Shoelson et S. W. Fesik. 1996. Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. Nat Struct Biol, 3(4), 388-393.

Zhou, M. M., K. S. Ravichandran, E. F. Olejniczak, A. M. Petros, R. P. Meadows, M. Sattler, J. E. Harlan, W. S. Wade, S. J. Burakoff et S. W. Fesik. 1995. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. Nature, 378(6557), 584-592.

ANNEXE A

Lettre de confirmation de soumission pour publication

Boulay,Iohann(IAF)(LAVAL)

From: Pascale Duplay [pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca]
Sent: September 13, 2004 3:42 PM
To: Boulay,Iohann(IAF)(LAVAL)
Subject: [Fwd: The JI Ms. No. 04-3786]

----- Original Message -----
Subject: The JI Ms. No. 04-3786
Date: Mon, 30 Aug 2004 11:46:34 -0700
From: "The JI" <admin@ji-emts.org>
To: "Dr. Pascale Duplay" <pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca>

Dear Dr. Duplay:

This email is to acknowledge receipt of all appropriate materials for your manuscript entitled "PTB-mediated oligomerization of Dok-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation " to be considered for publication in The Journal of Immunology. Your manuscript has been assigned the manuscript identification number 04-3786.

A further notice will be emailed as soon as a decision has been reached concerning the suitability of this paper for publication. Please refer to the manuscript identification number in all inquiries. You can check the status of your manuscript online by logging in and selecting Check The Status Of A Manuscript from the Main Menu.

Thank you for your interest in The Journal of Immunology.

Sincerely,
The Journal of Immunology Staff

*If you are not already an AAI member, please visit www.aai.org and fill out a membership application.

--

Pascale Duplay
INRS-Institut Armand-Frappier
531 Boul. des Prairies
Laval, QC, H7V 1B7
Canada
Tel: (450) 687-5010 ext: 4484
Fax: (450) 686-5501
E.mail: pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca
duplay@hotmail.com

REMERCIEMENTS

Mille mercis à ma directrice de recherche, Pascale Duplay, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir dirigé avec beaucoup d'expertise afin que je puisse réaliser mon projet de maîtrise. Merci pour le support et les conseils judicieux, ainsi que les discussions scientifiques et celles qui l'étaient un peu moins!

Aussi, merci infiniment et à perte de vue aux membres et ex-membres du labo sans qui ce périple n'aurait pas été autant agréable. Merci ROGJ01, NEMJ01, DUPM01, SABI01, LONA01, BERG01.

Enfin, un turbo-Merci aux turbo-sympathiques Freakbees et...aux turbo-inoubliables tripl'B's.

Ultimement, merci family, bitos et pling.

Pirloui-iobee