

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DE LA PROTÉINE p56^{lck} DANS L'ACTIVATION DU
LYMPHOCYTE T SUITE À L'ENGAGEMENT DES
RÉCEPTEURS TCR/CD3 ET CD2**

Par
GENEVIÈVE BÉRUBÉ

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

Jury d'évaluation

Président du jury	Jacques Bernier, INRS-IAF
Examineur interne	Jacques Bernier, INRS-IAF
Examineur externe	Sylvie Fournier, McGill
Directeur de recherche	Pascale Duplay, INRS-IAF

© Droits réservés de Geneviève Bérubé (2003)

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
SOMMAIRE.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	11
I) La signalisation dans le lymphocyte T via le récepteur CD3 et le récepteur CD2.....	12
A) TCR/CD3.....	12
1) Activation des PTK.....	12
a) Les PTK de la famille Src (Lck et Fyn).....	12
b) Les PTK de la famille Syk (Syk et ZAP-70)..	12
2) Rôle central de LAT.....	13
a) Interactions.....	13
i) LAT et Gads/SLP-76.....	13
ii) PLC γ -1 (IP3 et DAG).....	14
iii) Grb2/Sos et Ras.....	15
3) Activation des MAPK.....	15
a) La cascade des MAPK.....	15
b) Implication de la voie Ras.....	16
c) Facteurs de transcription et régulation	

	de l'IL-2.....	16
B)	CD2.....	17
	1) Différences souris vs homme.....	17
	2) Signalisation dans le lymphocyte T.....	17
II)	Protéines Dok.....	20
A)	p62 GAP Associated protein.....	20
	1) Identification et importance.....	20
	2) Structure des protéines de la famille.....	20
	a) Domaine PH.....	21
	b) Domaine PTB.....	21
	c) Domaine carboxy terminal.....	21
	3) Similitudes entre les membres.....	22
	4) Distribution.....	23
	5) Interactions.....	24
	a) RasGAP.....	24
	b) Protéines Tyrosine Kinases.....	27
	c) Tyrosine Phosphatases.....	30
	d) SHIP.....	30
	e) PLC γ	31
	f) Protéines adaptatrices.....	31
	i) Nck.....	31
	ii) Crk.....	31
	g) p62dok-p62dok.....	32
B)	Rôles connus.....	33
	1) Divers systèmes (autres que les cellules T).....	33
	a) p62dok.....	33
	i) Positif.....	33

ii) Négatif.....	33
b) p56dok.....	35
c) Dok-3.....	36
d) Dok-4 et Dok-5.....	36
2) Lymphocytes T.....	37
a) p62dok régulateur négatif.....	37
b) p56dok régulateur négatif.....	38
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
RÉSULTATS.....	54
DISCUSSION.....	111
CONCLUSION.....	119
RÉFÉRENCES.....	122

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1.** Représentation schématique de l'organisation structurale des protéines appartenant à la famille Dok7
- FIGURE 2.** Modèle de signalisation suite à une stimulation du complexe TCR/CD3 19
- FIGURE 3.** Niveaux de surexpression de la protéine p56dok pour différents clones par comparaison au niveau d'expression endogène57
- FIGURE 4.** Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok59
- FIGURE 5.** Comparaison du niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....62
- FIGURE 6.** Comparaison du niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok chez les cellules parentales et les clones qui surexpriment HAp56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....64
- FIGURE 7.** Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....67

- FIGURE 8.** Comparaison de la mobilisation de calcium intracellulaire pour les cellules de type parental et les clones surexprimant la protéine p56dok après l'engagement du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....69
- FIGURE 9.** Comparaison de la production d'IL-2 par les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok après une induction du récepteur CD2.....72
- FIGURE 10.** Comparaison de l'activation NF-AT par les cellules parentales et les clones qui surexpriment la protéine p56dok suite à une stimulation du récepteur CD2.....75
- FIGURE 11.** Niveaux de surexpression de la protéine p56dok mutée pour les résidus tyrosine 271 et 402 pour différents clones78
- FIGURE 12A.** Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface à l'étude, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée.....80
- FIGURE 12B.** Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface à l'étude, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée.....82
- FIGURE 13.** Niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine des cellules parentales et des clones surexprimant la protéine p56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....84
- FIGURE 14.** Niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok chez les clones surexprimant HAp56dok et HAp56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2.....87

- FIGURE 15A.** Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok ou la protéine p56dok mutée sur le résidu tyrosine 271 après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....89
- FIGURE 15B.** Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok ou la protéine p56dok mutée sur le résidu tyrosine 402 après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3.....91
- FIGURE 16.** Comparaison de la production d'IL-2 par les cellules parentales, un clone qui surexprime HAp56dok et certains clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2.....94
- FIGURE 17.** Comparaison de l'activation NF-AT pour les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée ou un clone surexprimant la protéine p56dok sauvage et un clone surexprimant la protéine p56dok mutée suite à une stimulation du récepteur CD2..... 98
- FIGURE 18.** Effet de la surexpression des protéines p56dok et p56dok mutées sur les résidus tyrosine sur la conversion de la protéine p56lck 101
- FIGURE 19.** Liaison de protéines par le domaine PTB des protéines p56dok et p62dok104
- FIGURE 20.** Liaison des protéines Dok entre elles chez les cellules surexprimant les protéines p56dok ou p62dok et les cellules de type parental 107

FIGURE 21. Vérification, par immunoprécipitation, de la possibilité d'une réactivité croisée entre les anticorps produits à partir des protéines de fusion GST contre les protéines p56dok et p62dok110

FIGURE 22. Modèle de signalisation chez le lymphocyte T impliquant la protéine p56dok comme régulateur négatif115

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Distribution des protéines de la famille Dok au niveau des tissus et des cellules.....	4
TABLEAU 2. Interactions entre les protéines de la famille Dok et d'autres protéines impliquées dans la signalisation.....	26


LISTE DES ABRÉVIATIONS

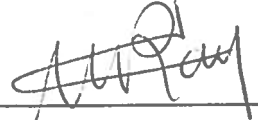
Ac :	Anticorps
BCR :	B-cell antigen receptor
BSA :	Bovine serum albumine
CTER :	COOH terminal
DAG :	Diacylglycerol
DEPC :	Diethyl pyrocarbonate
dNTP :	Desoxyribonucleotide
D.O. :	Densité optique
Dok :	Downstream of kinases
DTT :	Dithiothreitol
EGF :	Epidermal growth factor
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
FcγR :	Fcγ receptor
FCS :	Fetal calf serum
GAP :	GTPase-activating proteins
GEF :	Guanine-nucleotide-exchange-factor
Grb2 :	Growth factor receptor-bound protein 2
GDP :	Guanosine 5'-diphosphate
GFP :	Green fluorescent protein
GTP :	Guanosine 5'-triphosphate
IL-2 :	Interleukin-2
IP3 :	Inositol 3,4,5-triphosphate
IPTG :	Isopropylthio-β-D-galactosidase
ITAM :	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

LAT :	Linker for activated T cells
LB :	Loading buffer
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MEK :	MAPK/ERK kinase
NF-AT :	Nuclear factor of activated T cells
O/N :	Over night
PCR :	Polymerase chain reaction
PH :	Pleckstrin homology
PIP2:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC :	Protein kinase C
PLC :	Phospholipase C
PMA :	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTB :	Phosphotyrosine-binding
PTK :	Protein tyrosine kinase
RTK :	Receptor tyrosine kinase
SH2 :	Src homology 2
SH3 :	Src homology 3
SHIP :	SH2-containing inositol phosphatase
SNC :	Système nerveux central
TCR :	T-cell antigen receptor

SOMMAIRE

La protéine p56dok fait partie d'une famille de protéines adaptatrices comprenant cinq membres. Dans les lymphocytes T, deux membres de cette famille sont exprimés : la protéine p56dok et la protéine p62dok. La protéine p56dok est phosphorylée sur des résidus tyrosine, comme la protéine p62dok, suite à l'engagement des récepteurs CD2 et CD28 mais non suite à une stimulation via le complexe TCR/CD3. Dans cette étude, nous avons tenté d'évaluer le rôle de la protéine p56dok dans l'activation des lymphocytes T en utilisant des clones de cellules Jurkat surexprimant la protéine p56dok ou des formes mutantes de cette protéine pour les résidus tyrosine 271 et 402 de la portion C-terminale. Les résultats que nous avons obtenus démontrent que la protéine p56dok régule de façon négative la signalisation dans le lymphocyte T lorsque la stimulation implique le récepteur CD2. Certains effecteurs de la signalisation sont affectés par la protéine p56dok tel que l'activation des MAPK ERK1/2. Cependant, contrairement à la protéine p62dok, la protéine p56dok n'intervient pas dans la mobilisation de calcium intracellulaire. Il est à noter que la surexpression de la protéine p56dok affecte l'activation des MAPK ERK1/2 de la voie Ras suite à la stimulation du récepteur CD2 et non du complexe TCR/CD3. Il est également à noter que l'activation du site NF-AT ainsi que la sécrétion d'IL-2 sont inhibés par la surexpression de la protéine p56dok suite à l'engagement du récepteur CD2. De plus, la protéine p56dok semble interférer avec une modification de la protéine p56lck, suite à l'engagement du récepteur CD2, puisque la surexpression de la protéine p56dok inhibe le changement de mobilité électrophorétique de la protéine p56lck la faisant passer de 56 à 58 kDa. L'implication de cette conversion dans la signalisation est présentement à l'étude au laboratoire. Les mutations dans le domaine C-terminale nous ont permis de déterminer qu'au moins un des résidus tyrosine de ce domaine était important au rôle inhibiteur de la protéine p56dok au niveau de la signalisation. En mutant le résidu tyrosine 271 de la protéine p56dok pour une phénylalanine, nous avons pu restaurer l'activation des MAPK ERK1/2 et des sites de NF-AT ainsi que la production d'IL-2. De plus, nous avons pu mettre en évidence, à l'aide d'un anticorps reconnaissant les résidus tyrosine phosphorylés, la formation de liaisons homo- et hétérodimériques entre la protéine p56dok et la protéine p62dok via leur domaine PTB ce qui suggère l'implication de ce domaine dans les fonctions de p56dok. Il semble donc que la protéine p56dok, comme la protéine p62dok, est un régulateur négatif des réponses cellulaires chez le lymphocyte T suite à la stimulation du récepteur CD2.


Geneviève Bérubé


Pascale Duplay

REMERCIEMENTS

Pour réaliser une maîtrise il faut s'engager, performer et surtout, persévérer même dans l'adversité. De nombreuses personnes se sont investies dans tout ce processus avec moi et je tiens à les remercier pour leur support, leur amitié et leurs nombreux conseils. Tout d'abord, mes parents et ma sœur car la famille est toujours là pour nous remonter le moral peu importe la circonstance, mes amis de l'IAF (Annie, Dominique, Isabelle, Julien et Mélanie) au tout début, ils étaient des collègues d'études mais maintenant, ils sont de véritables AMIS, Caroline pour son positivisme de chaque instant, mes collègues du laboratoire (Angélique, Annick, Iohann, Jean-Guy et Maryse) pour tous les fous rires et les découragements surmontés, notre technicienne Joanne qui m'a appris à travailler dans les règles de l'art, ma directrice de maîtrise Pascale pour tous ses conseils, sa rigueur scientifique et pour m'avoir donné l'opportunité d'apprendre dans son laboratoire et finalement, la fondation Armand-Frappier pour son support financier. Merci à tous pour tout cela et bien plus encore...

INTRODUCTION

La famille Dok est une famille nouvellement identifiée qui comporte plusieurs membres. L'ordre dans lequel les protéines appartenant à cette famille furent clonées est le suivant. La protéine p62dok, également connue sous le nom de la protéine Dok-1 ou de la protéine de liaison à la protéine RasGAP, fut le premier membre à être identifié (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997). Plusieurs groupes se sont intéressés à cette molécule puisqu'une fois phosphorylée, elle se lie à la protéine RasGAP via son domaine SH2; la protéine RasGAP étant une molécule impliquée dans l'inhibition de la voie Ras/MAPK (Genot et Cantrell, 2000). Peu de temps après, un second membre fut identifié et cloné simultanément par trois groupes dans des systèmes variés et par des approches différentes. Cette molécule connue sous le nom de la protéine p56dok, de la protéine Dok-2, de la protéine Dok-R ou de la protéine FRIP constitue l'objet de ces travaux (Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998). Plus récemment, la protéine Dok-3, également nommée la protéine Dok-L, fut identifiée dans les lymphocytes B et clonée par deux équipes (Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000). Finalement, ce n'est que très récemment qu'il fut découvert que les protéines Dok pouvaient également se retrouver au niveau du cerveau. L'identification de deux nouveaux membres, les protéines Dok-4 et Dok-5, au niveau du SNC démontre cette nouvelle distribution tissulaire (Grimm et al., 2001).

La distribution tissulaire et cellulaire des différents membres est assez variée avec des similitudes plus marquées pour la protéine p62dok et la protéine p56dok ainsi que les protéines Dok-4 et Dok-5 (tableau 1) (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lock et al., 1999; Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001). En ce qui a trait aux protéines p62dok et p56dok, il est possible d'observer une différence majeure dans leur expression cellulaire puisqu'il y a une absence d'expression de la protéine p56dok dans les cellules B (Nelms et al., 1998; Lock et al. 1999). Pour la protéine Dok-3, il s'agit d'une absence d'expression dans les cellules T (Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000). Toutefois, ce qui nous importait pour ce projet de maîtrise c'est que les protéines p62dok et p56dok soient exprimées à des niveaux comparables dans les lymphocytes T puisque

		Tissulaire																			
		Cellulaire					Organes					Tissus lymphoïdes					Cerveau				
Protéines	Dok-1	Dok-2	Dok-3	Dok-4	Dok-5	Cellules hématopoïétiques					reins	foie	cœur	poumons	Muscles squelettiques	Rate	Moëlle osseuse	Nœud lymphatique	thymus	SNC	SNP
						T	B	M	myéloïdes	mastocytes											
	x	x	a	x		x	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x		a	a
	x	a	x			x	x	x	x					X	x	x	x	x		a	a
	a	x	x			x									x	x	x				
													x						x	x	x
												a							a	x	a

Légende

T : lymphocytes T B : lymphocytes B M : macrophages

SNC : Système nerveux central

a : Absence x : présence vérifiée

M : macrophages

SNP : Système nerveux périphérique

ces cellules furent employées comme modèle cellulaire pour ce projet. De cette façon, nous nous assurons de pouvoir comparer les résultats obtenus au laboratoire sur la protéine p62dok avec ceux que nous allons obtenir avec la protéine p56dok.

Il existe une grande ressemblance dans l'organisation structurale des différentes protéines Dok identifiées jusqu'à maintenant (figure 1) (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000). La structure schématique de ces protéines identifie trois régions distinctes qui présentent chacune des caractéristiques particulières associées à des rôles précis. Tout d'abord, il y a un domaine d'homologie pleckstrin auquel plusieurs fonctions sont associées. Chez d'autres protéines, comme la protéine GAP, ce domaine a été démontré comme étant impliqué dans la signalisation et l'organisation du cytosquelette. De plus, il permet des interactions avec d'autres protéines et finalement, il semble essentiel pour la localisation à la membrane cellulaire par sa liaison aux phosphoinositides présents dans la membrane cellulaire (Harlan et al., 1994; Pawson, 1995; Lemmon et al., 1996; Coffey et al., 1998). Le second domaine est un domaine de liaison aux résidus tyrosine phosphorylés contenus dans des motifs NXLPY d'autres protéines. Ce domaine possède donc une fonction similaire aux domaines SH2 qui lient également des résidus tyrosine phosphorylés (Songyang et al., 1993; Schlessinger, 1994; Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Songyang et al., 2001). Le dernier domaine est le domaine C-terminal et pour les protéines p62dok et p56dok, c'est un domaine particulièrement riche en résidus tyrosine et proline. Les résidus proline qui se retrouvent dans un contexte PXXP agissent comme des motifs de liaison aux domaines SH3 d'autres protéines tandis que les résidus tyrosine lient des domaines SH2, une fois qu'ils sont phosphorylés (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001). Plusieurs des résidus tyrosine retrouvés dans le domaine carboxy-terminal se retrouvent dans des motifs YXXP qui, une fois phosphorylés, sont reconnus pour permettre des interactions spécifiques avec RasGAP ainsi que diverses protéines adaptatrices (Bhat et al., 1998; Songyang et al., 1999; Songyang et al., 2001; Wick et al., 2001). C'est également dans cette région qu'il

FIGURE 1 : Représentation schématique de l'organisation structurale des protéines appartenant à la famille Dok

Légende :

C : Région carboxy-terminale

N : Région amino-terminale

P : Résidu proline

PH : Pleckstrin homology

PTB: Phosphotyrosine binding domain

Y : Résidu tyrosine

est possible d'observer le plus de divergence entre les membres de la famille Dok (Di Cristofano et al., 1998).

Ces protéines ne présentent pas d'activité enzymatique alors, il faut les classer parmi les protéines dites adaptatrices (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001). Elles servent ainsi d'intermédiaires pour la liaison d'autres protéines impliquées au niveau des cascades de signalisation intracellulaire.

Au début de ce projet, nous savions que l'activation du lymphocyte T impliquait un ensemble de protéines qui sont activées, à tour de rôle, suite à l'engagement de différents récepteurs de la cellule. Ainsi, suite à l'activation des cellules T via les récepteurs à l'étude dans ce projet, le complexe TCR/CD3 et le récepteur CD2, il y a un recrutement et une activation d'une série de PTK qui peuvent ensuite enclencher une cascade de signalisation pouvant impliquer des voies de signalisation diverses. Il y aura ensuite translocation de facteurs de transcription au noyau et transcription de gènes variés qui vont mener à une ou plusieurs réponses cellulaires (Pantaleo et al., 1987; Samelson et al., 1990; Ley et al., 1991; Graves et al., 1991; Kanner et al., 1992). Mais dans quelle(s) voie(s) de signalisation la protéine p56dok était réellement impliquée, nous n'en avons aucune certitude au début du projet. Toutefois, dans un article paru en 2001 au laboratoire du Dr. Duplay, il fut démontré que suite à une stimulation via le complexe TCR/CD3, aucune phosphorylation des protéines p62dok et p56dok n'était observée tandis qu'après une stimulation via le récepteur CD2, il était impossible d'observer une phosphorylation de ces deux protéines (Némorin et al., 2001). De plus, une des protéines permettant cette phosphorylation était la kinase lck de la famille Src (Némorin et Duplay, 2001). Il semble donc que la protéine p62dok ainsi que la protéine p56dok sont impliquées dans des voies de signalisation des cellules T stimulées par le récepteur CD2 et non par le complexe TCR/CD3 (Némorin et al., 2001; Némorin et Duplay, 2001).

Nous nous sommes ensuite attardés à connaître l'implication fonctionnelle de cette phosphorylation des protéines Dok sur la signalisation. Pour la protéine p62dok, un rôle de modulateur négatif avait été mis en évidence chez les lymphocytes. En effet, la protéine p62dok est impliquée dans la régulation négative de la prolifération cellulaire lorsqu'il y a un pontage simultané des récepteurs BCR et FC γ RIIB (Tamir et al., 2000). Au laboratoire du Dr. Duplay, il fut également démontré que la protéine p62dok régulait négativement la signalisation intracellulaire cette fois-ci lorsqu'il y avait une stimulation du récepteur CD2, dans les cellules Jurkat (Némorin et al., 2001).

En ce qui concerne la protéine p56dok, il fut démontré que la prolifération cellulaire induite par des cytokines (IL-2, IL-3 et IL-4) était régulée négativement par la protéine p56dok dans le lymphocyte T (Nelms et al., 1998). Puisque nous désirions poursuivre l'étude des protéines Dok au laboratoire et que les connaissances sur p62dok progressaient rapidement, nous avons choisi d'étendre l'étude effectuée sur la protéine p62dok au second membre de la famille, la protéine p56dok. Nous nous sommes fixés comme but de déterminer la fonction de la protéine adaptatrice p56dok dans la signalisation induite suite à l'activation des lymphocytes T par le complexe TCR/CD3 et le récepteur CD2 dans la lignée cellulaire servant déjà de modèle au laboratoire, la lignée Jurkat (J.77-6). Nous désirions également effectuer une étude comparative entre les protéines p62dok et p56dok au niveau de la transduction des signaux afin de connaître s'il y avait de la redondance dans leur fonction. Afin d'obtenir des réponses à ces nombreuses questions, les objectifs suivants furent fixés : Tout d'abord, nous désirions examiner l'effet de la surexpression de la protéine p56dok sur la transduction des signaux suite à l'activation des cellules de la lignée Jurkat par le complexe TCR/CD3 ou le récepteur CD2. Ensuite, nous voulions identifier les résidus tyrosine de la portion carboxy-terminale importants dans la fonction de la protéine p56dok. Après, il devenait intéressant d'identifier les protéines qui interagissent avec la protéine p56dok. Pour ce faire, l'approche expérimentale employée fut de produire des transfectants surexprimant la protéine p56dok pour examiner l'effet de la protéine p56dok dans la transduction de certains signaux, qui seront décrits ci-après, suite à l'engagement des récepteurs à l'étude. Des mutations furent ensuite introduites dans la portion C-terminale de la protéine aux

résidus tyrosine 271 et 402, résidus respectivement impliqués dans la liaison de RasGAP et dans la liaison du site potentiel de liaison de la PTK lck. Ces protéines mutées furent ensuite surexprimées par des transfections stables, toujours dans la lignée cellulaire Jurkat. Ainsi, nous étions en mesure de caractériser plus finement les résidus tyrosine importants aux fonctions de la protéine p56dok dans la transduction des signaux. Les différentes voies de signalisation analysées à l'aide des transfectants surexprimant la protéine p56dok sauvage ou portant les mutations en portion carboxy-terminale sont les suivantes. La voie de signalisation impliquant l'enzyme PLC γ et son effet sur la mobilisation de calcium, l'activation des MAPK par la petite protéine G Ras ainsi que l'activation en aval du site NF-AT et finalement, la production d'IL-2 résultant de l'activation de ces voies de signalisation. Des protéines de fusion GST furent générées pour réaliser des essais de liaison in vitro dans lesquels ces protéines de fusion servaient de matrice de liaison pour d'autres protéines. Des protéines GST fusionnées au domaine PTB ou au domaine C-terminal de la protéine p56dok, furent construites pour nous permettre d'identifier les protéines en mesure d'interagir avec la protéine p56dok via ces domaines particuliers.

REVUE DE LITTÉRATURE

D) La signalisation dans le lymphocyte T via le complexe TCR/CD3 et le récepteur CD2

A) TCR/CD3

1) Activation des PTK

a) Les PTK de la famille Src (lck et fyn)

La signalisation via le récepteur des cellules T (TCR) se fait par l'intermédiaire des protéines tyrosine kinases (PTK) cytosoliques appartenant aux familles Src, Syk et Tec (Chu et al., 1998; Van Leeuwen et Samelson, 1999). Ces protéines sont nécessaires à la transmission des signaux via le TCR puisque ce récepteur ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Les premiers événements de signalisation à se produire, lorsqu'il y a engagement du TCR, sont alors le recrutement au niveau du récepteur et l'activation de deux PTK de la famille Src soit lck et fyn (June et al., 1990; Starus et Weiss, 1992; Chu et al., 1998; Van Leeuwen et Samelson, 1999). Ce recrutement mène à une phosphorylation des résidus tyrosine contenus dans des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) des chaînes du complexe CD3 associées au TCR et des chaînes ζ (Reth, 1989).

b) Les PTK de la famille Syk (Syk et ZAP-70)

La phosphorylation de deux résidus tyrosine de l'ITAM génère des sites de liaison pour des protéines comportant des domaines SH2 (Src homology domain) dont le tandem SH2 de la kinase ZAP-70 de la famille Syk (Chan et al., 1992). ZAP-70, lié à l'ITAM, s'autophosphoryle en plus d'être phosphorylé sur des résidus tyrosine par la PTK lck. Cette phosphorylation permet la liaison de la PTK lck et augmente alors de façon considérable l'activité catalytique de la PTK ZAP-70 (Duplay et al., 1994; Iwashima et al., 1994; Chan et al., 1995). Une fois activée, la kinase ZAP-70 peut phosphoryler différents substrats en aval, tels que les protéines adaptatrices LAT et SLP-76, initiant alors une cascade impliquant diverses voies de signalisation. Il en résultera des

changements au niveau de la transcription des gènes nucléaires, changements qui mènent aux fonctions effectrices et à des changements morphologiques de la cellule (Wong et al., 1998).

2) Rôle central de LAT

LAT est une protéine adaptatrice qui possède de nombreux résidus tyrosine dans sa queue cytoplasmique lui permettant, lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase ZAP-70, d'interagir avec le domaine SH2 de plusieurs protéines telles que PLC γ -1, Grb2/Sos et Gads/SLP-76. Leur recrutement, à la membrane plasmique, est ainsi assuré puisque la protéine LAT y est localisée constitutivement grâce à ses sites de palmitoylation ainsi qu'à sa région transmembranaire (Zhang et al., 1998; Clements et al., 1998; Lin et al., 1999). La protéine LAT participe, entre autres, à la réorganisation du cytosquelette via le complexe protéique Gads/SLP-76, à l'activation de la protéine Ras via le complexe protéique Grb2/Sos et aux voies de signalisation activées par l'enzyme PLC γ -1 (Asada et al., 1999 et Liu et al., 1999).

a) Interactions

i) LAT et Gads/SLP-76

La protéine LAT contient au moins deux sites de liaison pour les domaines SH2 de la protéine adaptatrice Gads et, puisque la protéine SLP-76 se lie à Gads, les protéines LAT et SLP-76 sont indirectement liées. Comme pour la protéine LAT, la protéine SLP-76 est phosphorylée par la kinase ZAP-70. Il fut démontré que le recrutement de la protéine SLP-76 à la membrane par la protéine LAT est nécessaire à la transduction des signaux via le complexe TCR/CD3 (Boerth et al., 2000). La phosphorylation des résidus tyrosine de la portion amino-terminale de la protéine SLP-76 permet le recrutement de la protéine Vav via un domaine SH2. La protéine Vav est un facteur d'échange de nucléotides guanine (GEF) dont la fonction est d'activer les GTPases Rac/Rho. Ces GTPases sont reconnues pour leur implication dans la réorganisation du cytosquelette (Henning et Cantrell; 1998). La protéine SLP-76 recrute également la protéine adaptatrice

Nck, de la même façon qu'elle recrute Vav. La protéine Nck s'associe, elle aussi à un effecteur de Rac, la kinase activée PAK. Il y a alors formation d'un complexe trimoléculaire SLP-76-Vav-Nck/PAK permettant de coupler l'activation de Rac à celle de PAK, cette dernière étant associée à la protéine Nck. Tout cela conduit éventuellement à la réorganisation du cytosquelette d'actine suite à l'activation impliquant le complexe TCR/CD3 (Galisteo et al., 1996; Raab et al., 1997; Bubeck et al., 1998).

ii) PLC γ -1 (IP₃ et DAG)

La PLC γ -1 est une enzyme qui permet au TCR de réguler l'hydrolyse de PIP₂ et de là, elle permet de contrôler la production d'IP₃ et de diacylglycérol (DAG). Il est à noter que l'activation de cette enzyme nécessite la présence des familles de PTK précédemment mentionnées en plus de la famille Tec (Scharenberg et Kinet, 1998; Schaeffer et al., 1999). Le recrutement de la PLC γ -1 à la membrane et son activation nécessite son association à la protéine adaptatrice LAT (Boerth et al., 2000). L'importance de la PLC γ -1 vient du fait que cette enzyme contrôle la production d'IP₃ et de DAG qui régulent respectivement l'augmentation de calcium intracellulaire et active les sérine/thréonine kinases de la famille PKC (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999).

Une élévation soutenue de la concentration de calcium intracellulaire est critique pour l'expression des gènes des cytokines (Rao et al., 1997; Crabtree, 1999). L'induction de ces gènes requiert la coordination des signaux calciques ainsi que des signaux engendrés par les GTPases Ras/Rho ainsi que les PKC (Izquierdo Pastor, 1995). Dans le cas de la voie de la PLC γ -1 menant à la mobilisation de calcium intracellulaire, via la production d'IP₃, il y a les facteurs de transcription NF-AT qui seront déphosphorylés par la calcineurine, une sérine phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline puisqu'elle est activée en leur présence. Ces facteurs de transcription pourront transloquer au noyau, être activés et se lier à un site d'activation de la transcription nommé NF-AT (Crabtree, 1999).

iii) Grb2/Sos et Ras

Le complexe adaptateur Grb2/Sos est impliqué, via Sos, dans l'échange de nucléotides de la protéine Ras (Sasaoka et al., 1994; Innocenti et al., 2002). La protéine p21Ras s'accumule rapidement sous sa forme liée au GTP dans les cellules T activées. L'activation de la protéine Ras est contrôlée par les protéines GEF, dont Sos, et par la protéine activatrice de la fonction GTPase (GAP) (Trahey et McCormick, 1987; Downward, 1996). Ces protéines GEF ont pour rôle d'augmenter la formation de complexes actifs GTP-Ras en favorisant l'échange de GDP pour le GTP. In vivo, la protéine Ras est normalement maintenue dans sa forme liée au GDP par GAP dont le rôle est d'activer la fonction GTPase de la protéine Ras qui mènera à l'hydrolyse du GTP en GDP. La protéine Grb2, quant à elle, est recrutée via son domaine SH2 par LAT à proximité de la protéine Ras où la protéine Sos peut agir (Schlessinger, 1994; Kumar et al., 1995).

3) Activation des MAPK

a) La cascade des MAPK

Les MAP kinases (MAPK) requièrent à la fois une phosphorylation de leurs résidus sérine/thréonine et tyrosine pour être activées. Les MAP kinases sont les seuls substrats connus d'un groupe de protéines appelées MAP kinase kinases (MAPKK). Toutes les MAP kinase kinases sont activées par la phosphorylation d'un résidu sérine ou thréonine par un autre groupe de protéines qui agissent à titre de MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Il existe par ailleurs trois cascades majeures des MAPK impliquées dans l'activation des lymphocytes T soient : ERK 1/2, JNK1/2 et p38 (Hardy et Chaudhri, 1997).

b) Implication de la voie Ras

Lorsque la protéine Ras est activée, elle sera couplée à des multitudes d'effecteurs biochimiques des voies de signalisation incluant Raf-1/MEK/ERK1/2 et des voies contrôlées par les GTPases Rac/Rho (Tordai et al., 1994; Genot et al., 1996; Genot et Cantrell, 2000). En effet, la protéine Ras interagit avec la protéine Raf qui active la MAPK kinase, MEK1/2, qui à son tour phosphoryle et active les MAPK ERK1/2 (Kyriakis et al., 1992). La MAPK activée phosphoryle alors plusieurs substrats intracellulaires aux résidus Ser/Thr, notamment le facteur de transcription Elk, qui une fois phosphorylé, permettra la transcription du gène c-Fos (Tordai et al., 1994; Crabtree, 1999). La transcription de c-Jun dépend, quant à elle, de l'activation de la voie JNK. Suite à l'activation de ces différentes voies de signalisation du lymphocyte T, il est possible d'observer la translocation au noyau des facteurs de transcription (Park et Levitt, 1993; Whitmarsh et al., 1997).

c) Facteurs de transcription et régulation de la transcription du gène codant pour l'IL-2

Tel que mentionné précédemment, la transcription du gène Fos dépend de l'activation de la voie ERK1/2 alors que la transcription du gène Jun dépend de l'activation de la voie JNK. Une fois les MAPK activées, il y a la formation d'un facteur de transcription nommé AP-1, dans le noyau, qui provient de la formation d'un hétérodimère Fos/Jun (Park et Levitt, 1993). Le facteur de transcription AP-1 se lie, comme les facteurs de transcription NF-AT, au site de la transcription NF-AT. Les facteurs de transcription NF-AT agissent alors de façon synergique avec le facteur de transcription AP-1 au site NF-AT de l'ADN qui contient des sites de liaison adjacents pour ces deux facteurs (Genot et al. 1996; Macian et al., 2001). Ils forment alors un complexe qui permet la régulation de divers gènes tel que l'IL-2 (Macian et al., 2001). L'induction concomitante de ces facteurs nécessite l'activation concertée des voies

mentionnées précédemment, la voie activée par la PLC γ -1 (NF-AT) et celles activées par la protéine Ras (AP-1) (figure 2).

B) CD2

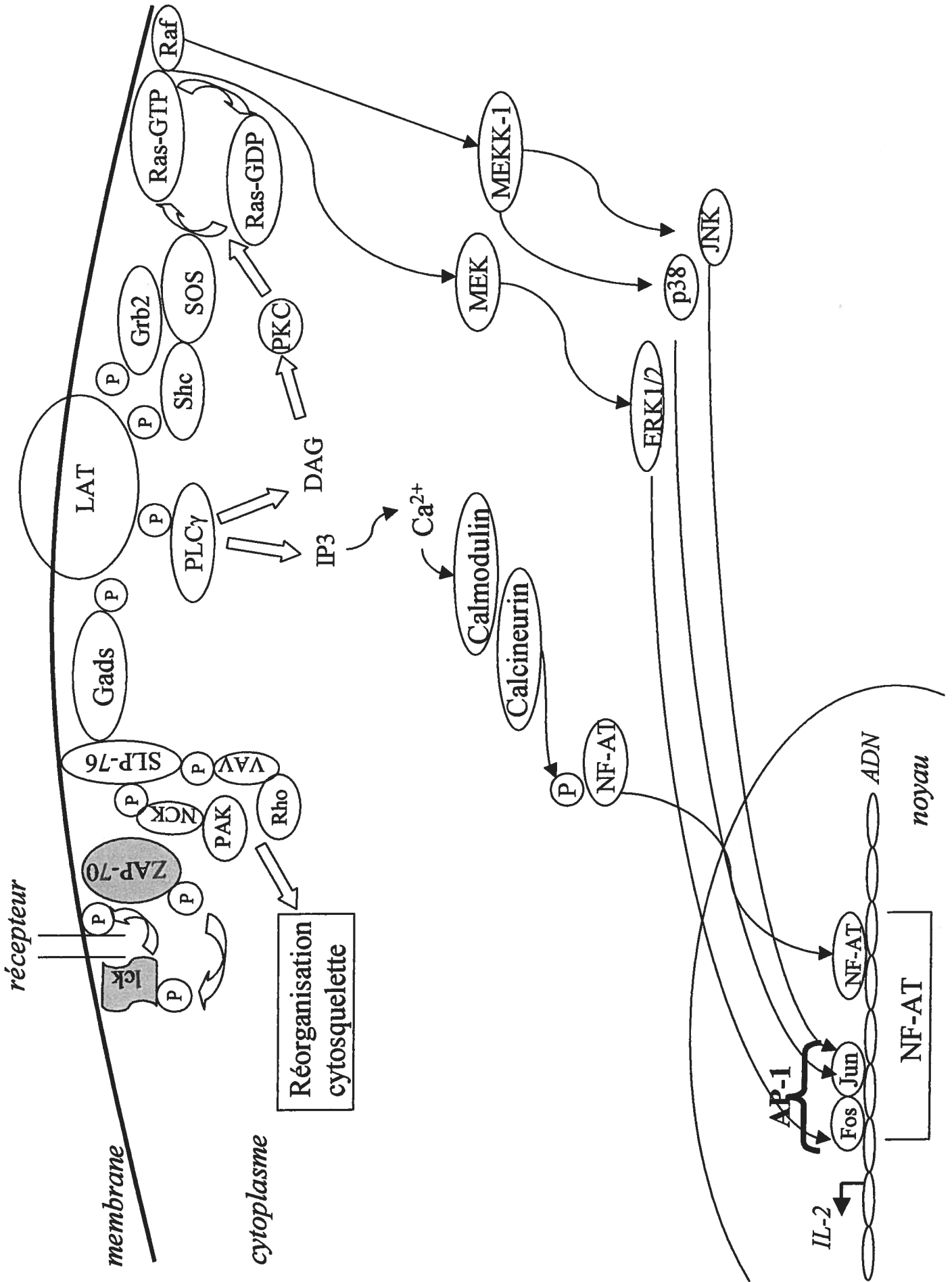
1) Différences souris vs homme

Au niveau de la structure, le récepteur CD2 humain et son homologue murin possèdent une organisation génomique très semblable composée de 5 exons (Moingeon et al., 1989). L'identité entre les séquences est de 51% avec 59% d'homologie dans le domaine cytoplasmique, 47% dans le domaine extracellulaire et 44% dans la région transmembranaire (Moingeon et al. (*Immunol. Rev.*), 1989). C'est au niveau des fonctions permises par ces récepteurs que la différence majeure existe. Chez l'homme, l'engagement du récepteur CD2 permet l'activation de la cellule T en plus d'agir comme molécule d'adhésion tandis que le récepteur CD2 murin ne semble agir que comme molécule d'adhésion (Moingeon et al. (*Nature*), 1989; Davis et al., 1998). Puisque la lignée cellulaire qui fut employée tout au long de mon projet de maîtrise est une lignée de cellules T humaines, je détaillerai donc, dans la suite de cette revue, la fonction de ce récepteur chez l'homme.

2) Signalisation dans le lymphocyte T

De quelle façon le récepteur CD2 est-il impliqué dans la transduction de signaux? Le pontage du récepteur CD2 par des anticorps anti-CD2 active les kinases Src dont lck et fyn ainsi que la kinase ZAP-70 de la famille Syk. Il est à noter que les signaux activateurs délivrés par le récepteur CD2 semblent requérir l'expression du complexe TCR/CD3 à la surface cellulaire et plus précisément des chaînes ζ du CD3 (Alcover et al., 1988; Samelson et al., 1990; Howard et al., 1992; Moingeon et al., 1992; Verhagen et al., 1996). La signalisation via ce récepteur partage également des événements biochimiques avec la voie de signalisation du complexe TCR/CD3 tel que l'activation des mêmes PTK ainsi que des voies de signalisation de la protéine Ras et de la PLC γ -1

FIGURE 2 : Modèle de signalisation passant par le complexe TCR/CD3



discutées précédemment dans cette section (Pantaleo et al. 1988; Ley et al., 1991; Graves et al., 1991; Kanner et al., 1992).

II) Protéines Dok

A) p62 GAP Associated protein (p62dok)

1) Identification et importance

L'intérêt accordé à cette famille de protéines vient du fait que plusieurs équipes avaient initialement identifié une protéine de 62 kDa phosphorylée qui interagissait avec la protéine RasGAP. Cependant, ce n'est qu'en 1997 qu'elle fut clonée et caractérisée par deux équipes simultanément (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997).

2) Structure des protéines de la famille (figure 1)

La famille Dok comporte cinq membres clonés et caractérisés à ce jour connus sous les noms de protéines Dok-1 à Dok-5. En ce qui concerne les trois premiers membres, une nomenclature variée leur fut attribuée ainsi la protéine Dok-1 est également nommé GAP.A.p62 ou p62dok, la protéine Dok-2 porte également les appellations Dok-R, FRIP ou p56dok et finalement la protéine Dok-3 s'appelle aussi Dok-L (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000). Pour la suite de ce travail, j'utiliserai la nomenclature de protéines p62dok et p56dok pour désigner les protéines Dok-1 et Dok-2 respectivement.

L'organisation structurale est commune à tous les membres de la famille et se compose de trois domaines distincts comportant chacun des caractéristiques qui lui sont particulières. Même si les recherches d'homologies n'ont démontré aucune homologie importante dans les séquences des protéines p62dok et p56dok avec des protéines connues, plusieurs régions présentent des homologies de structure avec des domaines présents dans la structure d'autres protéines adaptatrices.

a) Domaine PH

Le premier domaine de la protéine consiste en un domaine d'homologie pleckstrin (PH) retrouvé dans la portion amino-terminale. Ce domaine a été identifié, chez d'autres protéines, comme permettant des interactions protéines-protéines et protéines-phospholipides. Par ces interactions, le domaine PH pourrait servir de domaine de liaison localisant la protéine, généralement cytoplasmique, à la membrane où elle interagirait avec des polyphosphoinositides de la membrane cellulaire (Harlan et al., 1994; Pawson, 1995; Lemmon et al., 1996; Coffey et al., 1998). À titre d'exemple, les protéines Sos et RasGAP possèdent aussi un domaine PH pouvant également être impliqué dans leur localisation à la membrane à proximité de leur substrat la protéine Ras (Lemmon et al., 1996).

b) Domaine PTB

La second domaine présente une homologie partielle avec une partie du domaine PTB des substrats du récepteur à l'insuline (IRS-1 à -4) ainsi qu'avec les domaines PTB d'autres protéines adaptatrices telles que le FRS2 et les SNT-1 et -2 (Yamanashi et Baltimore, 1997; Lock et al., 1999; Jones et Dumont, 1999). Ce domaine adopte la même conformation que le domaine PH toutefois, même si la conformation des domaines PH et PTB est semblable, leurs séquences présentent peu de ressemblances (Lemmon et al., 1996). De plus, le domaine PTB permet la liaison des résidus tyrosine phosphorylés, alors que le domaine PH, tel que mentionné précédemment, lie les phosphoinositides (Pawson, 1995; Lemmon et al., 1996; Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997).

c) Domaine carboxy-terminal

En ce qui concerne la séquence C-terminale, il existe très peu d'homologie entre la souris et l'humain ainsi qu'entre les différents membres de la famille. Cependant, la majorité des résidus tyrosine présents dans la séquence des protéines de la famille y sont localisés, à des positions qui sont particulières à chaque membre (Carpino et al., 1997;

Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001). Ces résidus tyrosine sont les cibles de l'activité des PTK avoisinantes. Les protéines Dok servent alors d'adaptateurs, c'est-à-dire de lien pour les molécules contenant des domaines SH2. Cette région est la plus hydrophile de la molécule et elle est en position d'interagir avec diverses protéines du cytosol puisqu'elle est libre, ne servant pas à l'attachement à la membrane comme le domaine PH (Lemmon et al., 1996). Cependant, même si la position relative de ces résidus tyrosine n'est pas très conservée entre les protéines p62dok et p56dok, il n'en reste pas moins que ces résidus sont entourés de séquences flanquantes similaires (Di Cristofano et al., 1998).

Il s'agit d'un domaine également riche en résidus proline, contrairement au reste de la séquence, dont la majorité se retrouvent dans des motifs PXXP (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Nelms et al., 1998). Ce motif est le plus conservé dans les ligands des domaines SH3 ce qui suggère que les protéines p62dok et p56dok forment des complexes de signalisation avec des protéines contenant des domaines SH3 (Ren et al., 1993; Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998). Il est à noter que contrairement aux protéines p62dok et p56dok qui sont très riches en résidus proline dans cette section, la protéine Dok-4 n'en possède qu'un seul tandis que les protéines Dok-3 et Dok-5 n'en présentent aucun dans toute leur séquence (Grimm et al., 2001). La protéine comporte aussi, dans ce domaine, plusieurs sites potentiels de liaison pour les sérine et thréonine kinases (ex. : PKC, MAPK), mais aucun site de myristilation ou de palmitoylation pour stabiliser l'ancrage à la membrane (Yamanashi et Baltimore, 1997).

3) Similitudes entre les membres

Une identité de 72,1% est observable entre la séquence de la protéine p56dok humaine et murine et une homologie de séquence en acides aminés de 83% est retrouvée entre la protéine p62dok humaine et murine (Yamanashi et Baltimore, 1997). Cependant, une homologie plus faible, soit de 34,8%, existe entre les séquences des protéines p62dok et p56dok humaines et d'environ 40% pour les séquences en acides aminés chez la souris (Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998). Cette identité entre les protéines

p62dok et p56dok se situe principalement au niveau des domaines PH et PTB (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998). Le troisième membre de la famille, la protéine Dok-3, est également très semblable aux protéines p62dok et p56dok quant à ces deux domaines. Toutefois, un faible niveau de conservation de séquence est observable dans le domaine C-terminale entre cette nouvelle protéine, Dok-3, et les membres précédemment identifiés, les protéines p62dok et p56dok (Cong et al., 1999; Lemay et al., 2000). La taille de Dok-3 est de 58 à 62 kDa et elle ne provient pas d'un épissage alternatif mais plutôt d'une initiation alternative de la traduction ou d'une modification post-traductionnelle de la protéine (Lemay et al., 2000). Les protéines Dok-4 et Dok-5 présentent, entre elles, cette même homologie de séquence des domaines PH et PTB ainsi qu'une très faible similarité au niveau carboxy-terminal et leur taille est respectivement de 41 kDa et de 36 kDa (Grimm et al., 2001). Cette grande diversité au niveau de la séquence dans le domaine carboxy-terminal suggère que les protéines de la famille Dok lient un ensemble de protéines différentes résultant en des signaux variés.

4) Distribution

Le tableau 1 résume la distribution des protéines Dok au niveau de leur expression tant tissulaire que cellulaire. Selon le membre considéré, l'expression peut différer puisqu'il semble que l'expression de la protéine Dok-5 soit restreinte au système nerveux alors que la protéine Dok-4 se retrouve également dans le système nerveux mais aussi dans d'autres tissus. Les protéines p62dok, p56dok et Dok-3 sont, quant à elles, exprimées dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes en plus d'une variété de tissus. Il est également à noter que contrairement à la protéine p62dok, la protéine p56dok est absente des lymphocytes B alors que la protéine Dok-3 est absente des lymphocytes T (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Di Cristofano et al., 1998; Jones et Dumont, 1998; Nelms et al., 1998; Cong et al., 1999; Lock et al., 1999; Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001).

5) Interactions

De nombreuses interactions entre les protéines de la famille Dok et d'autres protéines sont rapportées dans la littérature. Les membres de la famille Dok représentent le prototype des protéines adaptatrices qui sans posséder d'activité enzymatique, permettent la liaison, entre elles, de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation (tableau 2).

a) RasGAP

Puisque l'intérêt accordé aux protéines de la famille Dok vient du fait qu'elles sont en mesure d'interagir avec la protéine RasGAP, il semble à propos de débiter avec cette dernière. Il est à noter que les protéines de la famille Dok se lient au domaine SH2 de la portion N-terminale de la protéine RasGAP (Ellis et al., 1990; Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Nelms et al., 1998; Lock et al., 1999; Kashige et al., 2000; Tamir et al., 2000). Il fut également démontré que ce sont les résidus tyrosine présents dans des motifs YXXP qui interagissent avec le domaine SH2 de la protéine RasGAP (Songyang et al., 1993). Ainsi, il fut vérifié si des motifs similaires se retrouvaient chez les protéines de la famille Dok. En ce qui concerne les protéines Dok-3, -4 et -5, aucun motif YXXP n'est retrouvé dans la séquence de ces protéines ce qui les rend incapables d'interagir avec la protéine RasGAP (Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001). La séquence de la protéine p62dok, quant à elle, présente 5 motifs identifiés comme des sites de liaison pour les domaines SH2 de la protéine RasGAP (Songyang et al., 2001). En ce qui concerne la protéine p56dok, 4 résidus tyrosine sont dans ce contexte YXXP soient les résidus tyrosine 194, 276, 304 et 351 (Nelms et al., 1998). Deux de ces résidus tyrosine, en positions 276 et 304, se sont avérés plus intéressants à étudier puisque leur phosphorylation est requise pour la liaison de la protéine rasGAP (Jones et Dumont, 1999). Il est à noter que seules les formes phosphorylées sur les résidus tyrosine des protéines p62dok et p56dok sont en mesure de s'associer à la protéine RasGAP, tant *in vivo* qu'*in vitro*, et cette phosphorylation nécessite la présence de kinases cytosoliques, entre autres v-abl (Moran et al., 1991; Carpino et al., 1997;

	RasGAP	Lck	v- src	v- abl	lyn	fyn	Tek	Csk	PTP	PLCy	Nck	Crk	p62dok
p62dok	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
p56dok	X	X		X	X		X		X		X	X	X*
Dok-3	non			X				X	X		non		
Dok-4	non										non		
Dok-5	non										non		

X = interaction

X* = interaction non publiée (résultats du mémoire)

Non = interaction inexistante

*** Les cases vident représentent des interactions non documentées

Yamanashi et Baltimore, 1997). Il fut également rapporté que ce n'est pas la quantité totale de la protéine p62dok phosphorylée sur les résidus tyrosine qui s'associe à la protéine RasGAP (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Nelms et al., 1998). Cette association entre la protéine p62dok phosphorylée sur les résidus tyrosine et la protéine RasGAP *in vitro* et *in vivo* conduit à l'inactivation de la fonction GTPase de la protéine Ras (Kashige et al., 2000; Tamir et al., 2000). Il serait donc envisageable que les protéines de la famille Dok agissent comme plate-forme moléculaire pour augmenter l'activité locale de la protéine RasGAP puisque de nombreux résidus tyrosine présents sur les protéines de la famille Dok interagissent avec la protéine RasGAP (Songyang et al., 2001).

b) Protéines Tyrosine Kinases

Tout d'abord, l'observation que la protéine p62dok était directement phosphorylée par des kinases cytosoliques activées comme v-Src et v-Abl suggérait que la protéine p62dok était leur substrat direct (Ellis et al., 1990). Puisque les substrats peptidiques préférentiels de ces PTK sont bien connus, ils comportent la séquence en acides aminés I/V/LYGEFD et I/V/LYAAP/F respectivement, la séquence de la protéine p62dok fut analysée pour déterminer si elle portait des motifs permettant de la classer parmi les substrats de ces PTK (Songyang et al., 1993). Il fut découvert que la protéine p62dok possède un motif comportant les acides aminés LYAEP. Ce motif représente pratiquement le substrat optimal des PTK activées mentionnées précédemment. Dans les faits, la protéine p62dok se lie de façon stable et directe avec v-Abl via le domaine SH2 de v-Abl et non son domaine kinase ou son domaine SH3 (Mayer et Baltimore, 1994; Bhat et al., 1998). La protéine Dok-3, comme la protéine p62dok, lie directement Abl via son domaine PTB et est également fortement phosphorylée par cette même kinase (Cong et al., 1999). De plus, 7 des 8 sites de phosphorylation privilégiés par les kinases cytosoliques représentent également des motifs de liaison de domaines SH2 pour ces mêmes kinases. Ce phénomène suggère donc qu'une fois phosphorylée, la protéine p62dok peut encore être phosphorylée sur d'autres résidus tyrosine lorsque d'autres tyrosine kinases y sont liées (Mayer et Baltimore, 1994; Bedi et al., 1994; Songyang et

al., 1995; Bhat et al., 1998). La structure de la protéine p62dok possède, en plus du résidu tyrosine de la séquence LYAEP, trois résidus tyrosine supplémentaires dans un contexte I/LYXXP, qui représente la séquence en acides aminés du substrat de la protéine p210bcr-abl. Cette protéine de fusion présente une activité tyrosine kinase accrue qui cause la leucémie chronique myéloïde (CML) (Carpino et al., 1997). La protéine p56dok possède aussi un motif de liaison I/LYXXP ce qui implique que cet autre membre de la famille soit aussi un substrat de la protéine p210bcr-abl (Di Cristofano et al., 1998)

Les protéines Dok sont également de bons substrats des kinases de la famille Src en transfections transitoires (Lemay et al., 2000). En effet, il fut démontré que la protéine p62dok était le substrat direct des kinases activées lyn et fyn de la famille Src et plus récemment, des tyrosine kinases Tec (Carpino et al., 1997; Yamanashi et Baltimore, 1997; Yang et al., 1999; Van Dijk et al., 2000; Fukai et al., 2000). La protéine p56dok fut également démontrée comme étant le substrat de lyn ainsi que du récepteur Tek (Jones et Dumont, 1998; Lock et al., 2000). En effet, le domaine PTB de la protéine p56dok interagit *in vivo* et *in vitro* avec le récepteur Tek, un récepteur de tyrosine kinases présent chez les cellules endothéliales. Suite au recrutement de la protéine p56dok au récepteur Tek phosphorylé, le récepteur Tek serait capable d'utiliser la protéine p56dok comme substrat et pourrait ensuite phosphoryler la protéine p56dok sur des résidus tyrosine. (Jones et Dumont, 1998). En ce qui concerne la kinase lyn de la famille Src, la protéine p62dok représente un substrat de cette kinase dans les cellules B lymphoïdes. La phosphorylation sur les résidus tyrosine de ce substrat génère des sites spécifiques de liaison pour la protéine RasGAP ainsi que pour la protéine adaptatrice Nck (Lock et al., 1999; Yamanashi et al., 2000).

Dans les lymphocytes T, la stimulation du récepteur CD28 peut mener à l'activation d'une PTK de la famille Tec, via sa liaison au domaine intracytoplasmique du récepteur CD28. Cette stimulation permet alors la phosphorylation des substrats en aval tel que la protéine p62dok (Klasen et al., 1998; Yang et al., 1999; Van Dijk et al., 2000). En plus du récepteur CD28, l'engagement du récepteur CD2 mais non du complexe TCR/CD3 permet la phosphorylation de résidus tyrosine de la protéine p62dok par des

PTK (Hubert et al., 1993; Nunes et al., 1996; Klasen et al., 1998; harriague et al., 2000; Martelli et al., 2001; Némorin et Duplay, 2001). Cette phosphorylation n'implique pas l'action des kinases de la famille Syk (ZAP-70/Syk) (Martelli et al., 2001). La kinase lck est également responsable de la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines de la famille Dok dans les lymphocytes T (Ellis et al., 1991; Amrein et al., 1992; Martelli et al., 2001; Némorin et Duplay, 2001). Les protéines p56dok et p62dok sont reconnues *in vitro*, lorsqu'elles sont phosphorylées, par le domaine SH2 de lck. Les sites pYXXI/L/V des protéines p62dok et p56dok semblent former les sites cibles du domaine SH2 de lck (Pawson, 1995; Némorin et Duplay, 2001). Dans la séquence de la protéine p56dok, deux résidus tyrosine de la portion carboxy-terminale sont dans ce contexte soient les résidus tyrosines 325 et 397. Puisqu'il fut démontré que les PTK du cytosol phosphorylaient de façon préférentielle des motifs reconnus par leurs propres domaines SH2, les protéines p62dok et p56dok représentent sans doute des substrats directs de cette PTK comme ils le sont déjà pour d'autres PTK (Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1995; Némorin et Duplay, 2001). De plus, les protéines p62dok et p56dok sont phosphorylées spécifiquement après l'activation de lck suite à l'engagement du récepteur CD2 et non du complexe TCR/CD3 (Némorin et Duplay, 2001). Ainsi, les protéines p62dok et p56dok deviendraient les protéines de liaison entre les événements précoces de la signalisation initiés par les PTK, suite à l'activation de certains récepteurs, et les événements plus tardifs de la signalisation qui découlent nécessairement de cette activation (Ellis et al., 1990; Pawson, 1995; Neet et Hunter, 1995; Carpino et al., 1997; Némorin et al., 2001).

Avec ses résidus tyrosine présents dans un contexte YXXV, la protéine Dok-3 présente un motif de reconnaissance des PTK de la famille Src (Cong et al., 1999). Ces observations démontrent que chaque protéine adaptatrice d'une même famille possède des spécificités de recrutement pour un ensemble particulier de protéines comportant des domaines SH2 (Yamanashi et Baltimore, 1997). En ce qui concerne les protéines Dok-4 et Dok-5, ce type d'interaction n'est pas démontré à ce jour (Grimm et al., 2001).

La protéine p62dok se lie également avec Csk dans des cellules transformées par v-Src ou c-Src. Ces PTK sont devenues constitutivement active suite à la mutation de leur

résidu tyrosine 529 en phénylalanine (Maa et al., 1994; Neet et Hunter, 1995; Vuica et al., 1997). Il semble aussi qu'à la fois le domaine SH2 de Csk ainsi que les domaines SH3, flanquant ce dernier, influence l'affinité de liaison de Csk à la protéine p62dok phosphorylée sur des résidus tyrosine (Vuica et al., 1997). Neet et Hunter ont également remarqué que le complexe Csk-p62-GAP se retrouve presque exclusivement au niveau sous-membranaire dans les essais de fractionnement cellulaire (Neet et Hunter, 1995). En ce qui concerne la protéine Dok-3, une liaison à Csk, entre un ou plusieurs des résidus tyrosine de la portion C-terminale de la protéine Dok-3 et le domaine SH2 de Csk, fut observée en réponse à l'activation des cellules B (Lemay et al., 2000).

c) Tyrosine Phosphatases

Les tyrosine phosphatases SHP-1 et SHP-2 sont des régulateurs négatifs de la signalisation puisqu'ils déphosphorylent les résidus tyrosine de diverses protéines, dont les protéines Dok (Lemay et al., 2000; Tamir et al., 2000; Yamanashi et al., 2000). Il fut observé que SHP-1 pouvait déphosphoryler directement des substrats spécifiques, dont la protéine p62dok *in vitro* et *in vivo*. Cette association est dépendante de la phosphorylation de la protéine p62dok et elle corrèle avec l'activité catalytique de la phosphatase SHP-1 (Tridandapani et al., 1997; Berg et al., 1999). L'action de l'une de ces tyrosine phosphatases ne semble pas être dépendante de la présence de l'autre cependant, elles pourraient agir à tour de rôle ou par coopération (Liu et al., 1998).

d) SHIP

SHIP est une inositol phosphatase qui est également un régulateur négatif de la signalisation et qui lie les protéines p62dok, p56dok et Dok-3 (Lemay et al., 2000; Tamir et al., 2000). L'interaction entre SHIP et la protéine p62dok s'effectue, comme pour Shc, entre le résidu phosphotyrosyl (NPXpY) de SHIP et la portion amino-terminale de p62dok via ses domaines PH et PTB (Tridandapani et al., 1997; Tamir et al., 2000; Dunant et al., 2000). Il s'agit du même motif d'interaction précédemment identifié pour la liaison de l'IL-4R et de la protéine p56dok (Nelms et al., 1998). En ce qui concerne la

protéine Dok-3, il s'agirait d'une liaison entre le domaine carboxy-terminal de la protéine Dok-3 ainsi que le domaine PTB et le domaine SH2 de SHIP (Lemay et al., 2000).

e) PLC γ

La liaison entre l'enzyme PLC γ et la protéine p62dok fut caractérisée comme nécessitant deux domaines SH2 de la PLC γ . En effet, il fut démontré, dans des modèles de cellules stimulées à l'EGF ou transformées par v-Src, que la protéine p62dok pouvait former un complexe protéique avec une protéine de fusion comportant les domaines SH2 N-terminal et C-terminal de la PLC γ (Hubert et al., 1993; Maa et al., 1994).

f) Protéines adaptatrices

i) Nck

La protéine Nck lie des résidus tyrosine présent dans des motifs YXXP et elle possède un rôle dans la régulation du cytosquelette des cellules T (Galisteo et al., 1996). Il fut également démontré que l'adhésion des cellules aux protéines de la matrice extracellulaire induit la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p62dok par les tyrosine kinases de la famille Src (Nogushi et al., 1999). Ainsi, le réarrangement du cytosquelette pourrait, suite à l'activation du récepteur CD2, enclencher une cascade impliquant le complexe lck/Dok/Nck (Galisteo et al., 1996; Nogushi et al., 1999). La formation d'un complexe entre les protéines p62dok et Nck fut également démontré par une stimulation à l'aide de facteurs de croissance (Wick et al., 2001). En ce qui concerne les protéines Dok-3, -4 et -5, aucun motif YXXP n'est retrouvé dans la séquence de ces protéines ce qui les rend incapables d'interagir avec Nck (Lemay et al., 2000; Grimm et al., 2001).

ii) Crk

La protéine Crk possède un rôle dans l'activation de la voie Ras possiblement en augmentant le nombre de sites de phosphorylation des résidus tyrosine qui peuvent mener

à l'activation de la voie Ras (Pawson, 1995). Il est à noter que même si YXXP est un motif de liaison de Crk, la protéine p62dok ne lie pas constitutivement Crk contrairement à la protéine p56dok. De plus, la liaison de la protéine p56dok à la protéine Crk ne dépend pas de son état de phosphorylation. Il se pourrait que l'interaction entre ces deux molécules se fasse via le domaine SH3 de la protéine Crk et une séquence riche en résidus proline de la protéine p56dok (Yamanashi et Baltimore, 1997; Jones et Dumont, 1998). Il fut démontré que la protéine p62dok doit, quant à elle, être hyperphosphorylée pour qu'une liaison directe à la protéine Crk se produise (Bhat et al., 1998; Martelli et al., 2001).

g) p62dok-p62dok

Le domaine PTB de la protéine p62dok, contrairement à son domaine C-terminal, permet l'oligomérisation de la protéine p62dok par le biais d'une interaction entre les résidus tyrosine 146 de chaque protéine p62dok. En effet, la séquence entourant ce résidu tyrosine présente un motif parfait pour permettre la liaison du domaine PTB de la protéine p62dok lorsque le résidu tyrosine est phosphorylé. Lorsque le résidu tyrosine 146 est muté pour une phénylalanine, il n'y a plus d'interaction possible entre les protéines p62dok (Songyang et al., 2001). Ce domaine PTB est nécessaire à la protéine p62dok pour inhiber la transformation cellulaire par la TK Src ainsi que pour reconnaître des séquences phosphorylées sur des résidus tyrosine comme le fait le domaine C-terminal. Toutes les mutations qui empêchent l'oligomérisation des protéines p62dok interrompent également l'activité inhibitrice de p62dok sur la transformation cellulaire (Songyang et al., 2001).

B) Rôles connus

1) Divers systèmes (autre que les cellules T)

a) p62dok

Les protéines de la famille Dok furent étudiées dans de nombreux systèmes cellulaires et selon les études, ces protéines peuvent être des régulateurs positifs ou négatifs de la signalisation intracellulaire.

i) Positif

La surexpression de la protéine p62dok dans les cellules CHO, exprimant le récepteur à l'insuline, permet la migration des cellules en réponse à l'insuline. Cette surexpression de la protéine p62dok n'a cependant aucun effet sur l'activation des MAPK dépendante de l'insuline, et ce, même si cette surexpression augmente la quantité de la protéine RasGAP associée à la membrane (Nogushi et al., 1999). Cette observation est tout à fait dans le sens des observations de Kashige et al. ainsi que Tamir et al. qui ont démontré que la protéine p62dok était en mesure de diminuer l'activité GTPasique de la protéine RasGAP par une augmentation de la liaison entre les protéines RasGAP et p62dok (Kashige et al., 2000; Tamir et al., 2000).

ii) négatif

Les résultats de régulation positive de la signalisation par la protéine p62dok en réponse à l'insuline sont cependant en contradiction avec ceux d'un article plus récent. Il fut démontré, dans le même système cellulaire (CHO/IR), que la surexpression de la protéine p62dok inhibait l'activation de la voie Ras/MAPK après une stimulation à l'insuline (Wick et al., 2001). Ce résultat est appuyé par une autre étude qui démontre que la surexpression de la protéine p62dok inhibe la voie de signalisation Ras/MAPK dans des cellules d'origine histologique variée, incluant les cellules de moëlle osseuse, suite à une activation des récepteurs de facteurs de croissance (Di Cristofano et al., 2001). Vuica et al. se sont, quant à eux, penchés sur l'interaction de Csk et la protéine p62dok au

niveau du lymphocyte B en observant l'effet de l'engagement du FC γ RIIB1, récepteur qui inhibe la signalisation via le BCR (Vuica et al., 1997). Il semble, selon ce système, que le complexe Csk-p62dok fonctionne à titre de régulateur négatif de la signalisation suite à l'engagement du récepteur à l'antigène des cellules B. En plus de ce rôle de régulateur de l'activation, la protéine p62dok pourrait également avoir un effet sur l'assemblage du cytosquelette après une activation du BCR ou un pontage du récepteur des cellules B et du récepteur FC γ RIIB1. Ce serait la quantité de la protéine p62dok liée à Csk ou à la protéine RasGAP qui affecterait le réarrangement du cytosquelette (Vuica et al., 1997).

D'autre part, il fut démontré que la protéine p62dok supprime l'activation de la voie des MAPK et qu'elle est indispensable pour réguler négativement la prolifération cellulaire suite à l'activation du Fc γ RIIB. En effet, la prolifération cellulaire est incontrôlée dans les souris déficientes pour l'expression de la protéine p62dok (p62dok^{-/-}) (Yamanashi et al., 2000). C'est également le cas suite à une activation des mastocytes, des cellules de la moëlle osseuse et des fibroblastes primaires d'embryons de souris par des facteurs de croissance. L'inactivation de la protéine p62dok dans ces mêmes cellules résulte en une activation soutenue de la voie Ras/MAPK (Di Cristofano et al., 2001). Toujours avec diverses lignées déficientes pour l'expression de la protéine p62dok, il fut démontré que la protéine p62dok régulait négativement la voie impliquant PDGFR/Ras/MAPK. Le recrutement de la protéine p62dok via son domaine PH à la membrane à l'aide de la PI3-K est nécessaire à cet effet inhibiteur. Cette inhibition ne dépend pas du recrutement de la protéine RasGAP pas plus que du déplacement de la protéine Nck contrairement à ce qui avait été suggéré par une autre équipe (Murakami et al., 1999; Zhao et al., 2001). Il n'est par contre pas impossible que la protéine p62dok interfère avec le recrutement d'un médiateur positif de la signalisation de la protéine Ras comme Shc, par exemple. Toujours dans le même sens, la surexpression de la protéine p62dok inhibe l'activité de la protéine Ras dans les cellules 293 (Yamanashi et al., 1997). De plus, contrairement à ce qui avait été observé *in vitro*, soit que la protéine p62dok augmentait la capacité transformante de la protéine p210bcr-abl, *in vivo*, l'absence de la protéine p62dok résulte en une réduction de la période de latence de la leucémie

chronique myéloïde et donc, en une myéloprolifération fatale rapide. Cette observation concorde bien avec un rôle de modulation négative de la prolifération cellulaire et ainsi, indirectement dans l'oncogénèse (Kashige et al., 2000; Di Cristofano et al., 2001).

b) p56dok

Il fut démontré que la protéine p56dok diminue l'activation des voies de signalisation initiées par la protéine Ras. En effet, suite à l'expression transitoire de la protéine p56dok dans les cellules A.E7, il est possible d'observer une diminution de l'activation des MAPK. Une réduction importante de l'expression du facteur de transcription AP-1, ce facteur de transcription fait partie du complexe de transcription du gène de l'IL-2, est alors observable (Nelms et al., 1998). Le même phénomène se répète dans les cellules 32D cotransfectées avec la protéine p56dok et le récepteur à l'IL-2 lorsque la voie des MAPK est directement activée par l'IL-2 ainsi que dans les cellules Cos-1 exprimant la protéine p56dok après une stimulation à l'EGF (Nelms et al., 1998; Jones et Dumont, 1999). Chez cette dernière lignée, une association à la protéine RasGAP ne semble pas nécessaire pour réguler négativement la phosphorylation de la MAPK ERK-2. Seul le recrutement de la protéine p56dok au récepteur à l'EGF paraît suffisant (Jones et Dumont, 1999). Il fut dénoté par un autre groupe que la surexpression de la protéine p56dok diminuait sévèrement la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine Shc et en accord avec cette observation, son association à la protéine Grb2 ainsi que la phosphorylation des MAPK ERK (Suzu et al., 2000). Ces résultats vont dans le même sens que les résultats précédents de Tamir et al. sur la protéine p62dok (Tamir et al., 2000). Pour en revenir à la protéine Shc, il se pourrait qu'elle soit le lien entre les kinases de la famille Src et la voie Ras/MAPK puisque la protéine Shc participe à la cascade de signalisation des kinases la famille Src en formant des complexes avec ces kinases. Tel que mentionné précédemment, il fut remarqué qu'en présence de la protéine p56dok, il y avait une diminution de la phosphorylation sur les résidus tyrosine de Shc. Ce phénomène suggère qu'il y a une compétition entre la protéine p56dok et la protéine Shc pour les kinases de la famille Src. Ceci pourrait expliquer l'inhibition de la voie de signalisation des kinases Src observée en absence de Shc (Suzu et al., 2000). Plus

récemment, il fut démontré que le recrutement de la protéine p56dok régulaît de façon négative l'activité transformante de Neu/ErbB-2, qui possède un rôle dans le cancer du sein et des ovaires, en se liant à un de ses sites d'autophosphorylation (Dankort et al., 2001).

c) Dok-3

En ce qui concerne la protéine Dok-3, le fait de recruter deux molécules inhibitrices de la signalisation, SHIP et Csk, indiquerait que la protéine est possiblement un régulateur négatif de la signalisation (Lemay et al., 2000). En effet, les impacts de la surexpression de la protéine Dok-3 sont les suivants : une réduction de la production d'IL-2 de même qu'une inhibition d'activation du facteur de transcription NF-AT chez les cellules activées suite à une stimulation initiée par le BCR (Lemay et al., 2000). Dans ce système, l'absence d'effet de la surexpression de la protéine Dok-3 sur l'activation des MAPK et la mobilisation du calcium semble indiquer que la protéine agit en aval de ces voies de signalisation. Cependant, contrairement à ce qui a été mentionné par Lemay et al., la surexpression de la protéine Dok-3 fut démontrée, dans les cellules NIH 3T3, comme inhibant fortement l'activation des MAPK suite à une phosphorylation par v-Abl et cette inhibition nécessite la présence du domaine PTB de la protéine Dok-3 (Cong et al., 1999). De plus, la surexpression de la protéine Dok-3 dans ces mêmes cellules inhibe de façon importante l'activité transformante de v-Abl (Cong et al., 1999).

d) Dok-4 et Dok-5

En ce qui concerne les protéines Dok-4 et Dok-5, il s'agirait d'un rôle de régulateur positif de la croissance, axonale du moins, puisqu'il y a activation de la voie des MAPK ERK1/2 et transactivation du gène rapporteur Elk-1 lorsqu'ils sont fusionnés au RTK c-Ret (Grimm et al., 2001). Il semble donc que ces deux membres de la famille Dok empruntent des voies de signalisation différentes des autres membres et donc, l'hypothèse des deux sous-familles de récepteurs de la famille Dok permettant des fonctions de signalisation opposées devient très intéressante (Grimm et al., 2001).

2) Lymphocytes T

a) p62dok régulateur négatif

Dans les lymphocytes T, un effet de modulateur négatif est également observé. Il fut démontré, dans les cellules Jurkat, que la surexpression de la protéine p62dok inhibait la phosphorylation de la PLC γ -1, inhibait la mobilisation de calcium intracellulaire ainsi que l'activation des MAPK ERK1/2 après l'activation du récepteur CD2. Ces événements ne sont pas observés suite à une stimulation du complexe TCR/CD3 ce qui fait de la protéine p62dok un effecteur négatif de la signalisation spécifique au récepteur CD2 (Némorin et al., 2001).

Puisque la PLC γ -1 contrôle la production d'IP₃ et que l'IP₃ régule à son tour la mobilisation de calcium intracellulaire, il n'est pas surprenant de remarquer que si la protéine p62dok inhibe la phosphorylation de la PLC γ -1, une inhibition de la mobilisation de calcium intracellulaire suivra (Crabtree, 1999; Némorin et al., 2001). Toutefois, il est possible que l'inhibition de la mobilisation de calcium intracellulaire par la protéine p62dok se produise en aval de la PLC γ . D'autres protéines qui viendraient inhiber ou interférer avec une des protéines impliquées dans cette cascade menant à la mobilisation de calcium pourraient également produire cet effet. En ce qui concerne l'inhibition d'activation de ERK1/2 par la protéine p62dok, elle pourrait aussi être secondaire à l'inhibition de la PLC γ -1. En effet, une inhibition de la PLC γ -1 engendrerait une diminution de la production de DAG. Le DAG ne pourrait plus activer la PKC qui alors ne permettrait plus la stimulation des MAPK ERK1/2 via la voie Ras/Raf (Cantrell, 1996). Cette supposition semble confirmer le rôle de la PKC dans ce système d'inhibition car il est possible d'observer une restauration de l'activation ERK1/2 et de la sécrétion d'IL-2 suite à une stimulation via le récepteur CD2 après une stimulation avec le PMA (Némorin et al., 2001). L'implication de la PKC dans la régulation des MAPK ERK1 /2 suite à une stimulation du récepteur CD2 n'a cependant pas été étudiée ainsi, elle n'est que spéculative car la protéine p62dok pourrait agir en amont de la PKC mais aussi de manière indépendante de la PKC (Izquierdo Pastor et al., 1995). Il n'est pas surprenant

d'observer une diminution de l'activation du site NF-AT puisqu'il s'agit d'une répercussion directe d'une inhibition dans l'activation des MAPK ERK (Hardy et al., 1997). Une inhibition de l'activation du site NF-AT est produite à la fois suite à une stimulation du récepteur CD2 ou à une stimulation du complexe TCR/CD3 dans les cellules qui surexpriment la protéine p62dok (Némorin et al., 2001). Puisque dans le contexte d'une surexpression de la protéine p62dok les MAPK ERK ne sont pas affectées suite à une stimulation du complexe TCR/CD3, d'autres voies impliquées dans la régulation du site NF-AT, tel que la voie Rac, doivent être affectées (Innocenti et al., 2002).

La protéine RasGAP serait aussi une bonne candidate pour créer l'inhibition de l'activation des MAPK ERK1/2 car la protéine RasGAP est spécifiquement recrutée à la membrane suite à une stimulation du récepteur CD2 où elle se retrouve à proximité de Ras-GTP (Harriague et al., 2000; Némorin et al., 2001). La protéine Crk est également une protéine candidate à considérer puisque via les GTPases C3G et Rap1, elle est un antagoniste de la protéine Ras et donc un régulateur négatif de la protéine Ras (Gotoh et al., 1995; Martelli et al., 2001).

b) p56dok régulateur négatif

En ce qui concerne la protéine p56dok, les travaux démontrent qu'il s'agit d'un régulateur négatif de la prolifération des cellules T de souris et des cellules leucémiques myéloïdes de souris suite à une stimulation à l'aide des cytokines IL-2, -3 et -4, M-CSF et granulocyte-CSF (Carpino et al., 1997; Di Cristofano et al., 1998; Suzu et al., 2000; Zhao et al., 2001). La réponse des cellules T suite à une stimulation du complexe TCR/CD3 et à une stimulation via les cytokines fut évaluée. Il fut démontré que les cellules T des souris déficientes dans l'expression de la protéine p56dok (p56dok^{-/-}), répondaient mieux aux stimulations via le complexe TCR/CD3 et les récepteurs aux cytokines (IL-2 et IL-4) que les souris de phénotype sauvage. Contrairement à ce résultat, la prolifération des cellules B spléniques est semblable chez les deux types de souris. Cette dernière observation est logique avec l'absence d'expression de la protéine p56dok

dans les cellules B contrairement aux cellules T. Ainsi, la protéine p56dok agirait à titre de régulateur négatif de la prolifération des cellules T (Nelms et al., 1998).

Aussi, il semblerait que la protéine p56dok soit régulée de façon similaire à la protéine p62dok puisqu'une stimulation via le récepteur CD2 en permet la phosphorylation contrairement à une stimulation via le complexe TCR/CD3 (Némorin et al., 2001). Cependant, même si le complexe TCR/CD3 n'est pas impliqué directement dans la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p62dok, la coopération entre le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3 chez la cellule T est importante pour la phosphorylation. En effet, l'engagement du complexe TCR/CD3 préalablement à la stimulation du récepteur CD2 augmente la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p62dok sans amplifier l'activité des PTK (Luton et al., 1997; Harriague et al., 2000). La protéine p56dok, comme la protéine p62dok, pourrait donc être impliquée dans la régulation du processus d'activation des cellules T.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lignées cellulaires et anticorps

Les cellules Jurkat, le clone 77-6 #1 (O. Acuto, Institut Pasteur, Paris, France), furent mises en culture dans un milieu RPMI-1640 (Gibco BRL, Burlington, ON) enrichies avec 10 % de sérum de veau fœtal (Sigma), 2mM d'une solution de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Gibco BRL). 1 µg/ml de puromycine (Sigma) fut ajouté au milieu lorsque c'était nécessaire. Les conditions de croissances sont de 37°C à 5 % CO₂.

Les anticorps utilisés sont les suivants : anti-CD3ε humain UCHT1 (1gG2a, gracieusement fourni par le Dr. A. Alcover, Institut Pasteur, France); la combinaison anti-CD2 humain T11-2 et T11-3 (gracieusement fourni par le Dr. E. Reinherz, Harvard Medical School, Boston, MA); anti-phosphotyrosine 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Les anticorps utilisés inclus : anti-p56dok CTer dirigé contre le domaine C-terminal de la protéine p56dok (produit en immunisant des lapins avec une protéine de fusion GST portant les résidus 757-1239); anti-p56dok PTB dirigé contre le domaine PTB de la protéine p56dok (produit en immunisant des lapins avec une protéine de fusion GST portant les résidus 433-756); anti-p62dok CTer dirigé contre le domaine C-terminal de la protéine p62dok (produit en immunisant des lapins avec une protéine de fusion GST portant les résidus 454-777); anti-p62dok PTB dirigé contre le domaine PTB de la protéine p62dok (produit en immunisant des lapins avec une protéine de fusion GST portant les résidus 778-1447); anti-p62dok dirigé contre les acides aminés des résidus 425-439 de la protéine p62dok (gracieusement fourni par le Dr. B. Stillman, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY); anti-ERK1/2 spécifique pour les formes phosphorylées de ERK1/2 (Promega, Madison, WI); anti-ERK1/2 total (New England Biolabs Inc., Beverly, MA); anti-lck (gracieusement fourni par le Dr. A. Veillette, Université McGill, Montréal, Canada); anti-HA (Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne); anti-CD2 humain HB222 (ATCC, Manassas, VA); anti-CD3 humain OKT3 (ATCC); anti-Fab'2-FITC (ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH); anti-lapin peroxydase (Amersham International, Buckinghamshire, UK); anti-souris peroxydase (Jackson

ImmunoResearch Inc., Westgrove, PA); complexe streptavidine-biotine peroxydase (Amersham International, Buckinghamshire, UK)

Constructions d'ADN

Protéines de fusion GST

L'ARN de trois à cinq millions de cellules de la lignée Jurkat J.77-6 clone #1 fut employé pour amplifier la section C-Terminale de la protéine p56dok humaine. L'extraction d'ARN fut effectuée selon le protocole suivant. Les cellules sont récupérées dans un eppendorf stérile et centrifugées (1200 rpm/5 min./TP). Le surnageant est retiré et 1ml de RNazol (Tel-Test Inc, Friendswood, TX) est ajouté aux cellules sur la glace. Le contenu du tube est ensuite passé quelquefois à travers une aiguille 18 et transféré dans un eppendorf stérile déjà sur la glace. 0,1 ml de chloroforme est alors ajouté et resuspendu pour 15 à 20 sec. Suite à une incubation de 5 min. sur la glace, centrifuger à vitesse maximum pour 15 min. à 4°C. La phase supérieure est ensuite transférée dans un nouveau tube et un volume égal d'isopropanol DEPC (40µl EDTA 1 mM ARN pH7,8) est ajouté. Le tout est placé pour une heure à -20°C et centrifugé à nouveau à vitesse maximale pour 15 min. à 4°C. Le culot est rincé à l'éthanol avec 75 % de DEPC et centrifugé 4-5 min. à 4°C vitesse maximale. Le culot est séché brièvement à l'air et resuspendu dans 50 µl d'eau + DEPC. La réaction de transcription inverse est ensuite effectuée selon le protocole suivant : Il faut utiliser 5 µg d'ARN total dans un volume de 13 µl d'H₂O-DEPC auquel il faut ajouter 1 µl d'oligo-dT (0,5 µg/µl). Il faut par la suite incuber à 70°C pour une période de 10 min. Il faut ensuite transférer le tout sur la glace pour 1 min. et il y sera ajouté un mélange de 2 µl de tampon de synthèse 10X, de 1 µl de dNTP 10 mM, de 2 µl de DTT 0,1 M et de 1 µl de transcriptase inverse. Ensuite, le mélange est incubé à température ambiante pour 10 min et il est placé à 42°C pour 50 min. La réaction est terminée à 70°C pour 15 min. et il faut déposer le tube sur la glace. Le tube est alors centrifugé pendant quelques secondes avant d'y ajouter 1 µl de Rnase H et il sera incubé 20 min à température ambiante.

PCR

En ce qui concerne la section PTB de la protéine p56dok humaine, la construction pCMV5-HAp56dok (gracieusement fourni par le Dr. Marilyn Resh, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) fut séquencée et utilisée tandis que pour les domaines PTB et C-Terminal de la protéine p62dok humaine, la maxiprep (QIAGEN, Mississauga, Ontario) IAF32 p62dok SR α fut employée. L'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) fut réalisée en utilisant la Taq polymérase (Amersham Pharmacia) pour la section p56dok CTER et la polymérase VENT (New England Biolabs Inc.) pour tous les autres PCR. Les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) employés proviennent de chez Amersham Pharmacia et les paires d'amorces utilisées furent produites au laboratoire du Dr. François Shareck (INRS-IAF, Laval, Québec) : p56dok CTER en 5', 5'-CGGGATCCCCCAACCGCAGCCA et en 3', 5'-TTTCCGG GTTCACTCTTAAGGC; p56dok PTB en 5', 5'-CGGGATCCGTCGGCCCCACAAG G et en 3', 5'-CGACGTGGGCGAT GTGCTTAAGGC; p62dok CTER en 5', 5'-CGAG ATCTCAGGGGCACGATGTT et en 3', 5'-CTCCCGAGATGGACTCTTAAGGC; p62dok PTB en 5', CGGGATCCGGATCCCAATTCTGG et en 3', 5'-GTCCCTTCCG GCCTGCTTAAGGC, avec le protocole d'amplification suivant : 1) 5 min. à 95°C, 2) 1 min. à 95°C, 3) 1 min. à 50°C, 4) 1 min. à 72°C, 5) étapes 2 à 4 : 29 fois, 6) 10 min. à 72°C, 7) 4°C pour un minimum de 30 min. dans un appareil à PCR PTC-100 Programmable thermal controller (MJ Research Inc.). La polymérase fut inactivée par phénol/chloroforme (référence Maniatis E3). L'extraction d'ADN fut réalisée avec la trousse d'extraction d'ADN de gel d'agarose de QIAGEN selon le protocole fourni. Le sous clonage fut effectué dans le site EcoR1/BamH1 (enzymes New England Biolabs Inc.) de pGEX-2TK (Amersham Pharmacia) par ligation avec les réactifs de l'ensemble de ligation rapide d'ADN (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) selon leurs recommandations. Les bactéries compétentes DH5 α TM (Gibco BRL) furent employées, tel qu'indiqué, pour la transformation et le protocole du Maniatis (référence 1.29) fut utilisé pour la réalisation des minipreps.

Mutants HAp56dok

À partir d'une digestion EcoR1/BamH1 du plasmide pCMV5-HAp56dok, HAp56dok fut sous cloné dans pUC18. C'est par mutagenèse dirigée que les mutations des résidus tyrosine en résidus phénylalanine furent introduites dans l'ADN de la protéine p56dok par la technique d'extension par chevauchement réalisée par PCR. Ainsi, l'extension s'effectue en deux étapes sur l'ADN d'une miniprep Maniatis pUC18-HAp56dok. Premièrement dans des tubes indépendants, les paires d'amorces suivantes sont employées : 1^{er} tube en 5', de p56dok CTER 5' et en 3', 5'-GGGCACGGCAAACCTCCCCCT; 2^e tube en 5', 5'-AGGGGAGTTTGCCGTGCC et en 3', l'amorce 3' de la section p56dok CTER sont utilisées pour muter la tyrosine 299 de la protéine p56dok. Les produits de PCR obtenus sont ensuite déposés sur gel pour être purifiés. Ces ADN purifiés seront par la suite combinés et amplifiés avec une autre paire d'amorces soit la paire utilisée pour amplifier la portion C-Terminale de la protéine p56dok. Le même processus fut employé pour les tyrosines 330 et 402 cependant, la première série d'amorce est différente. Pour la tyrosine 330, les paires d'amorces suivantes furent utilisées : 1^{er} tube en 5' de la section p56dok CTER 5' et en 3', 5'-CAATGCTGTCGAA CAGAGGGTC; 2^e tube en 5', 5'-GA CCCTCTGTTCGACAGCATTG et en 3', l'amorce 3' de la section p56dok CTER. Pour la tyrosine 402 ce fut les paires d'amorces suivantes : 1^{er} tube en 5' de la section p56dok CTER et en 3', 5'-ACAACATTGTCAA ACTCAGTTCC; 2^e tube en 5', 5'-GGAAGTGTGAGTTTGACAATGT et en 3', l'amorce 3' de la section p56dok CTER. Pour la tyrosine 271, un PCR standard est réalisé avec les amorces en 5', de la section p56dok PTB et en 3', 5'-CATGCGGCCGAGAGAAGGGGCTA. Les nouvelles amorces furent produites par Alpha DNA (Montréal, QC). Ces nouvelles séquences mutantes furent sous clonées dans pUC18-HAp56dok de la façon suivante : pour la tyrosine 271, le sous clonage dans pUC18-HAp56dok fut réalisé dans le site BglII/Eag1 et pour la tyrosine 402, le sous clonage dans ce même plasmide fut réalisée dans le site BamH1/Eag1. Les deux autres résidus tyrosine ne sont pas mutés à ce jour.

Les deux constructions furent vérifiées par séquençage avant d'être sous clonées dans le vecteur de transfection.

Transfections

Le plasmide pSR α -HAp56dok fut généré à partir du plasmide CMV5-HAp56dok. Le fragment HAp56dok inséré dans le plasmide CMV5 étant flanqué de deux sites de restriction, soit les sites EcoR1 et BamH1, il ne suffisait que de sous cloner aux sites EcoR1/BamH1 dans le plasmide PSR α puromycine (O. Acuto). En ce qui concerne les plasmides pSR α -HAp56dok YF271 et pSR α -HAp56dok YF402, c'est par le sous clonage de HAp56dok YF271 et de HAp56dok YF402 dans le même site EcoR1/BamH1 qu'ils furent introduits dans le plasmide PSR α puromycine.

La lignée cellulaire Jurkat J.77-6 fut ensuite transfectée de façon stable avec 20 μ g d'ADN d'une maxiprep QIAGEN de PSR α -HAp56dok, de pSR α -HAp56dok YF271 ou de pSR α -HAp56dok YF402 par électroporation à l'aide d'un Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) dont les réglages étaient de 250 mv ainsi que 960 microfarads. Les clones étant en mesure de résister à la puromycine furent clonés par dilution limite en plateau de 96 puits en utilisant un milieu contenant de la puromycine comme agent de sélection. Le niveau d'expression de la protéine p56dok fut par la suite évalué sur des extraits cellulaires traités par immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de la protéine p56dok à une concentration de 2 μ g/ml dans une solution de 5 % BSA dans du TBS-Tween 20 (1/1000) + 1/200 sodium azide 10 %. Toutes les solutions d'anticorps employées en immunobuvardage furent reconstituées dans cette même solution.

Cytofluorométrie

Cent mille à un million de cellules sont récoltées et centrifugées (1200 rpm/5 min./4°C). Le surnageant est ensuite décanté et 150 μ l du 1^{er} Ac anti-CD2 (HB222 environ 5 μ g/ml) ou anti-CD3 (OKT3 environ 5 μ g/ml) dilué dans du milieu FACS (1 %

FCS, une dilution 1/200 d'une solution d'azide à 10 % et PBS pH7,4) fut ajouté pour une période de 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées avec 3 ml de milieu FACS et centrifugées (1200 rpm/5 min/4°C). Le surnageant est décanté et 150 µl du 2^e anticorps Fab'2-FITC souris (concentration (1/150)) dilué dans du milieu FACS est ensuite ajouté pour 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées avec 3 ml de milieu FACS, centrifugées (1200 rpm/5 min/4°C) et suspendues dans 500 µl de milieu FACS. L'acquisition des données est effectuée sur un cytomètre en flux (Coulter Electronics EPICS XL, Hialeah, FL).

Production des protéines de fusion solubles

Une colonie des différents transformants à induire est cultivée O/N à 37°C. Récolter ensuite 1/10 de la culture O/N et suspendre dans 10 ml de milieu LB + ampicilline 100 µg/ml (Sigma, St-Louis, Missouri). À D.O. s'approchant de 1,0, récupérer 500 µl de chaque culture (garder à 4°C) et ajouter l'IPTG (0,1 mM d'IPTG Gibco BRL) au reste de la culture pour l'induction 2h à 37°C. Lorsque l'induction est terminée, centrifuger à 3000 rpm durant 10 min. à 4°C. Retirer le surnageant et ajouter 1 ml de PBS froid pour dissoudre le culot. Réserver un aliquot de 10 µl de cette suspension comme contrôle (garder à 4°C). 100 µl d'une solution de lysozyme 100 µg/ml est ensuite ajouté au surnageant (Sigma) 30 min. avant de soniquer. La sonication s'effectue 3 x 15 sec à intensité 2 (max. 3). Centrifuger à 4°C durant 5 min à 12000 rpm et réserver un aliquot de 10 µl du surnageant comme contrôle (garder à 4°C) lorsque la sonication est terminée. Retirer le surnageant restant pour le déposer sur 50 µl de billes glutathion-sépharose (Amersham Pharmacia) préalablement nettoyées deux fois au PBS froid. Le surnageant doit être homogénéisé avec les billes et agité par rotation 1h à 4°C. Centrifuger quelques secondes à température de la pièce et récupérer un aliquot de 10 µl de surnageant comme contrôle (garder à 4°C). Le reste du surnageant est retiré par aspiration et les billes de glutathion-sépharose doivent être lavées quatre fois à l'aide de PBS 1x. Ajouter 100 µl d'une solution de 20 mM glutathion (6 mg/ml), 100 mM NaCl et 100 mM Tris pH 8, les billes sont resuspendues et agitées par rotation 10 min à 4°C.

Centrifuger quelques secondes à température de la pièce et reproduire cette élution une seconde fois. 10 µl de l'éluat est prélevé à cette étape comme contrôle (garder à 4°C). Suspendre le culot dans 1 ml de PBS froid et un aliquot de 10 µl est récupéré comme contrôle final. Il faut garder ce qu'il reste au congélateur à -20°C. Les aliquots sont ensuite traités comme suit : Centrifuger 1 min à 4°C 10000 rpm. Retirer le surnageant et ajouter 100 µl de Tris 50 mM pH 7.5. Centrifuger 1 min et retirer le surnageant. 10 µl de LB2x + DTT (DTT ICN Biomedicals Inc.) sont ensuite ajoutés (sauf pour aliquot de 500 µl, ajouter 25 µl de Tris 50 mM + 25 µl de LB2x + DTT). Lorsqu'il s'agit d'un aliquot de surnageant, ajouter 10 µl de LB2x + DTT sans centrifuger. 10 µl de chacun de ces aliquots seront finalement déposés sur un gel de polyacrylamide 10 % et colorés au Bleu de Coomassie. 10 µl de marqueur de masse moléculaire Mark12™ (Helixx Technologies Inc., Scarborough, ON) furent également déposés. Lorsque la solubilité des protéines de fusion fut vérifiée, ce protocole fut réalisé à plus grande échelle dans 500 ml de milieu de culture LB + ampicilline 100 µg/ml.

Pour obtenir les protéines de fusion dont le domaine C-Terminal était phosphorylé, des bactéries *Epicurian coli* TKX1 (Stratagene, La Jolla, CA) furent transformées. Les bactéries *Epicurian coli* TKX1 porte un plasmide qui code pour le gène inductible de la tyrosine kinase. Cette souche de bactérie peut être transformée avec un plasmide contenant l'ADN d'une séquence qui code pour un domaine cible de phosphorylation. Ce domaine phosphorylé peut ensuite être utilisé pour révéler des interactions avec des protéines qui cible des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine. 0,5 µl d'ADN des minipreps des constructions portant le domaine C-terminal non phosphorylé furent employés et le protocole de transformation du manufacturier fut réalisé. Une colonie fraîchement étalée est ensuite inoculée dans 50 ml de milieu 2x YTG contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 12,5 µg/ml de tétracycline (Sigma) et 50 µg/ml de kanamycine (Sigma) et incubé pour la nuit à 37°C avec agitation. La culture fut diluée 1:20 dans 550 ml de nouveau milieu 2x YTG contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 12,5 µg/ml de tétracycline et la culture fut mise à 37°C avec une agitation jusqu'à ce qu'une D.O. à 600 nm de 1,0 soit obtenue. Il est alors possible de réaliser l'induction avec 0,1

mM d'IPTG pour une période d'environ 2 heures à 30°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. 600 nm maximale (autour de 2,5). Il faut alors centrifuger (5000 rpm/10 min./4°C) et resuspendre chaque culot dans 500 ml de milieu d'induction TK (consulter le protocole pour la composition du milieu). L'incubation de 45 min à 30°C pour alors débiter et lorsqu'elle est terminée, il faut centrifuger le tout (5000 rpm/10 min./4°C). Les culots seront par la suite suspendus dans 10 ml de PBS + NaVO₄ 1 M (1/1000) pour chaque volume de 500 ml de milieu TK. Pour la sonication et la suite, il faut employer le même protocole que pour les bactéries standards. Ce protocole fut également réalisé préalablement à petite échelle pour vérifier la solubilité des protéines phosphorylées.

Immunsation des lapins avec les protéines de fusion

Une fois les protéines de fusion solubilisées, elles furent changées de tampon par dialyse dans du PBS 1x pH 7.4 et utilisées, entre autres, pour immuniser des lapins. 100 µg de protéine de fusion furent injectés, par dose, aux lapins selon le protocole d'immunsation recommandé par le Centre de Biologie Expérimentale (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC).

Couplage covalent des protéines de fusion GST aux constructions portant les domaines PTB et CTER

Les billes employées sont les billes Sépharose 4B activées par CNBr (Amersham Pharmacia) et le protocole employé est celui recommandé par la compagnie. Toutes les constructions de protéines de fusion GST furent employées individuellement pour la réalisation de colonnes d'affinité. Les protéines solubilisées purifiées étaient, lors du couplage, dans un tampon PBS 1x pH7.4. Ainsi, il devenait possible de purifier indépendamment chacun des sérums produit à partir de ces protéines chez les lapins immunisés afin d'obtenir des anticorps spécifiques contre les portions ciblées par les protéines de fusion. Ces protéines de fusion, couplées covalement, furent également testées, à titre de matrice d'affinité, dans la réalisation des essais de liaison in vitro.

Purification des anticorps

Les anticorps étaient tout d'abord purifiés sur une colonne d'affinité de protéines reconnaissant la GST pour éliminer la reconnaissance non spécifique envers ces protéines pour par la suite être purifiés une seconde fois sur une colonne d'affinité spécifique pour les anticorps réalisés. Le protocole consistait alors à diluer 10 ml de sérum contenant la protéine à purifier dans une solution de PBS 1x pH 7.4 dans un rapport 1/10. Par la suite, cette solution devait passer à un rythme de 1 ml par minute sur la première colonne d'affinité (protéine GST) à 2 reprises. La solution ainsi obtenue se retrouvait donc exempte de protéines réagissant contre la GST. Par la suite, cette solution était déposée sur une colonne d'affinité spécifique pour chacun des anticorps produit. Cette solution devait passer à un rythme de 1 ml par minute sur cette deuxième colonne d'affinité (protéine GST couplée covalamment au domaine PTB ou au domaine C-terminal de la protéine p56dok ou de la protéine p62dok) à 2 reprises. L'anticorps se retrouvait ainsi lié, dans la colonne, à la protéine contre laquelle il avait été produit. Pour l'obtenir, il ne suffisait que d'éluer le tout.

Immunoprécipitation et immunobuvardage de type Western

Les cellules sont lavées deux fois dans du RPMI 1640 et suspendues à vingt-cinq millions de cellules/ml dans du RPMI 1640. Les cellules sont ensuite laissées à 37°C sans stimulation ou stimulées avec un Ac anti-CD3 ϵ (UCHT1, dilution 1/500 de l'ascite) ou avec la paire d'Ac anti-CD2 (T11-2 et T11-3, dilution 1/1000 de chacun des ascites) pour différents temps (voir figures). Les cellules seront, après ces activations, récoltées et solubilisées à 4°C pour 30 min. dans une solution de Nonidet NP-40 1 % contenant 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 1 mM d'EGTA tout cela en présence d'inhibiteurs des protéases et des phosphatases suivants : 10 μ g/ml d'aprotinine (Boehringer Mannheim), 10 μ g/ml de leupeptine (Boehringer Mannheim), 1 mM de Pefabloc SC (AEBSF) (Boehringer Mannheim), 50 mM de NaF, 10 mM de Na₄P₂O₇ et 1 mM de NaVO₄. Les billes de protéines A (Repligen, Needham, MA) ou de protéines G

(Amersham Pharmacia) sont nettoyées à deux reprises avec du Nonidet P40 1 % sans ajout.

Pour chacune des immunoprécipitations, donc chaque condition, 10 µl de billes sont nécessaires. La même quantité de billes que dans l'immunoprécipitation est utilisée pour un nettoyage, c'est-à-dire qu'on utilise les mêmes billes que pour l'immunoprécipitation (protéine A ou G) pour retirer toutes les protéines qui pourraient être non spécifiques à l'anticorps par leur association à la protéine employée pour l'immunoprécipitation. Le lysat cellulaire est donc tout d'abord déposé sur les billes de nettoyage et agité par rotation à 4°C pour 1h30. Pendant cette même période, les billes d'immunoprécipitation seront incubées à 4°C pour 1h30 avec l'anticorps choisi à une concentration prédéfinie. Les billes d'immunoprécipitation sont ensuite lavées deux fois au Nonidet P40 1 % par centrifugation à température de la pièce pour 3-4 sec. Le lysat cellulaire est également retiré des billes de nettoyage, récolté et transféré sur les billes d'immunoprécipitation préalablement aliquotées pour chacune des conditions. L'immunoprécipitation avec les anticorps choisis s'effectue à partir de cette étape à 4°C pour 1h30 par rotation. À la fin de cette période, les billes sont lavées à 2 reprises avec du Nonidet P40 1 % et à deux reprises avec du Nonidet P40 0,1 %. 20 µl d'une solution de LB 2x + DTT sont ensuite ajoutés et les échantillons sont bouillis pour 5 min.. Ils sont ensuite prêts à être déposés sur gel.

Il faut déposer une partie des échantillons dans chacun des puits du gel et faire migrer les protéines, à 96 volts dans le gel de compactage et à 137 volts dans le gel de séparation (8 % polyacrylamide Maniatis 18.42), dans un tampon de migration placé à l'intérieur de l'appareil d'électrophorèse Miniprotean II Cell (Bio Rad, Hercules, CA). Les protéines qui ont migrées dans le gel seront ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose HybondTMECLTM (Amersham Pharmacia biotech) à l'aide d'un appareil de transfert permettant un transfert semi sec à l'aide de l'un ou l'autre des appareils suivant : 1^{er} appareil : Tyler Research Instrument dont on maintient l'ampérage entre 4 mAmp et 10 mAmp pour 60 min ; 2^e appareil : Transblot SD Bio Rad dont on maintient le voltage oscille autour de 10 volts (entre 4 et 6 mAmp) pour 30 min. Une fois le transfert terminé,

le blocage des sites non spécifiques, sur la membrane de nitrocellulose, est effectué toute la nuit à 4°C avec agitation dans une solution de TBS avec Tween 20 1 % (Sigma) + 5 % BSA (même solution utilisée pour préparer les anticorps employés pour l'immunobuvardage). Il est par la suite possible de révéler les interactions par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques.

Pour détecter les anticorps biotinylés, les protéines de la membrane furent marquées avec une dilution de 1/1500 du complexe streptavidine biotinylé peroxydase (Amersham).

Essais de liaison *in vitro*

Les cellules sont comptées et préparées de la même façon que si on effectuait une immunoprécipitation. Les billes employées pour l'essai de liaison sont des billes de glutathion-sépharose qui sont également nettoyées à deux reprises avec du Nonidet P40 1%. Pour chaque essai de liaison, donc chaque condition, 10 µl de billes sont nécessaires. La même quantité de billes glutathion-sépharose est utilisée pour le nettoyage de chaque condition, c'est-à-dire qu'à cette étape, toutes les protéines qui pourraient réagir avec les billes de glutathion-sépharose seront retirées. Le lysat cellulaire est donc tout d'abord déposé sur les billes de nettoyage et agité par rotation à 4°C pour 1h30. Pendant cette même période, d'autres billes de glutathion-sépharose seront incubées à 4°C pour 1h30 avec le lysat bactérien, contenant la protéine de fusion soluble, à tester pour l'essai (protéine de fusion avec domaine PTB de la protéine p56dok, domaine PTB de la protéine p62dok, domaine CTer, etc.). Entre 100 et 150 µl de lysat bactérien seront utilisés par condition. Les billes portant les protéines de fusion sont ensuite lavées deux fois au Nonidet P40 1 % par centrifugation à température de la pièce pour 3-4 sec. Le lysat cellulaire est également récolté à partir des billes de nettoyage et transféré sur les billes portant les protéines de fusion préalablement aliquotées pour chacune des conditions. L'essai de liaison s'effectue alors à 4°C pour 1h30 par rotation et à la fin de cette période les billes sont lavées à 2 reprises avec du Nonidet P40 1 % et à deux reprises avec du Nonidet P40 0,1 %. 20 µl d'une solution de LB2x + DTT sont ajoutés et

les échantillons sont bouillis pour 5 min. Ils sont ensuite prêts à être déposés sur gel et à être transférés pour l'immunobuvardage.

Mesure de la concentration de calcium intracellulaire

Les cellules du clone à tester sont lavées deux fois avec du HBSS (Gibco BRL) et incubées à dix millions de cellules/ml avec 3 μM d'Indo-1 (Molecular Probes) et 0,4 mg/ml de « Pluronic asd » F-127 (Molecular Probes) pour 25 min. à température de la pièce. Les cellules sont ensuite lavées au HBSS et resuspendues dans ce même milieu à une concentration de un million de cellules/ml pour l'activation. Les cellules sont alors stimulées avec un Ac anti-CD3 ϵ (UCHT1, dilution 1/1000 de l'ascite) ou avec la paire d'Ac anti-CD2 (T11-2 et T11-3, dilution 1/1000 de chacun des ascites) et la mobilisation de calcium, par les différents clones suite à ces stimulations, sera analysée. Les études de mobilisation du calcium intracellulaire sont effectuées à l'aide d'un cytomètre en flux, le cytomètre ELITE ASP (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

Essais luciférase

Un million de cellules du clone Jurkat à tester furent transfectées de façon transitoire avec 2,5 μg de Luciférase NF-AT-firefly (gracieusement fourni par le Dr. O. Acuto, Institut Pasteur, France) et 0,5 μg d'une construction de Luciférase TK-Renilla (Promega, Madison, WI) en utilisant un essai de transfection Fugene (Roche Diagnostics, Laval QC). Après 24h, trois cent mille cellules furent stimulées avec soit l'anti-CD3 adhérent sur le plateau (UCHT1, dilution 1/100 de l'ascite dans du PBS) ou avec l'anti-CD2 soluble (T11-2 et T11-3, dilution 1/1000 de chaque ascite) pour une période de 6h dans un plateau de 24 puits à 37°C. La stimulation maximale fut obtenue en combinant du PMA 10 ng/ml (Sigma) et de l'ionomycine 1 μM (Sigma). Les cellules sont enfin lysées et testées pour leur activité luciférase en utilisant un système impliquant un double reporteur luciférase (Promega, Madison, WI) et un luminomètre (Berthold, LUMAT LB 9507). Les valeurs de luciférase NF-AT-firefly sont normalisées en se basant sur l'activité luciférase constitutive de la Renilla.

Essais IL-2

Cinq cent mille cellules du clone Jurkat à tester furent stimulées avec un Ac anti-CD3 ϵ adhérent en plateau (UCHT1, dilution 1/100 de l'ascite dans du PBS), avec la combinaison d'Ac anti-CD2 soluble (T11-2 et T11-3, dilution 1/1000 de chaque ascite) ou avec du PMA 10 ng/ml et de l'ionomycine 1 μ M pour 20 heures en plateau de 96 puits. 50 μ l de surnageant est prélevé et testé pour sa production d'IL-2 en utilisant une lignée cellulaire dépendant de l'IL-2 pour sa croissance, la lignée cellulaire CTLL-2 (gracieusement fourni par le Dr. Claude Daniel, Institut Armand-Frappier, Laval QC). Le protocole employé est celui proposé dans l'article Evavold et al., 1992. L'IL-2 employé provient de la compagnie Roche. L'incorporation de 3 H (ICN Pharmaceutical, Irvine, CA) fut évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation (MicroBeta Trilux).

RÉSULTATS

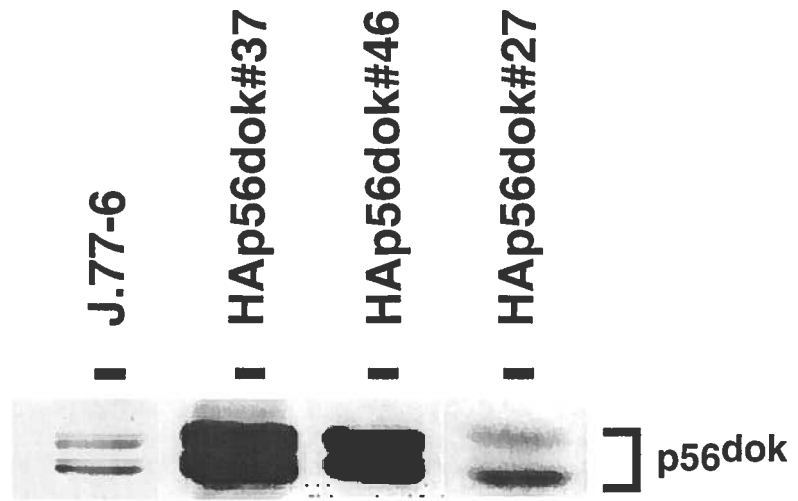
La surexpression de la protéine p56dok n'affecte pas la phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

Puisque nous désirions connaître l'importance de la protéine p56dok dans l'activation des cellules T, nous avons construit un vecteur d'expression contenant une version sauvage de la protéine p56dok et portant un épitope de reconnaissance HA, le vecteur pSR α -HAp56dok. Nous avons ensuite transfecté de façon stable ce vecteur dans la lignée cellulaire Jurkat et nous avons procédé au criblage des clones. Les cellules résistantes à la puromycine furent tout d'abord criblées par immunobuvardage de type Western. Les cellules furent alors lysées afin d'obtenir les protéines solubles et un immunobuvardage à l'aide d'un anticorps reconnaissant la portion C-terminale de la protéine p56dok fut réalisé. Des clones surexprimant la protéine p56dok, comparativement aux cellules parentales J.77-6, furent ainsi retenus pour un second criblage (figure 3). Par la suite, ces mêmes clones, retenus sur la base de la surexpression de la protéine p56dok, furent criblés en cytométrie en flux pour leur expression à la surface membranaire du récepteur CD2 et du complexe TCR/CD3 puisque nous activons nos cellules via ces récepteurs. Les clones présentant un niveau comparable au type parental de ces deux récepteurs à leur surface furent préservés pour des analyses ultérieures (figure 4). Trois clones représentatifs (HAp56dok#37, HAp56dok#46 et HAp56dok#27) furent ainsi gardés pour débiter les expériences.

Le premier paramètre vérifié fut la phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines. Nous désirions savoir si la surexpression de la protéine p56dok pouvait altérer le patron de phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à l'engagement du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3. Des extraits de protéines totales solubles des différents clones furent préparés après avoir stimulé ou non les cellules via le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3 pour différents temps et déposés sur gel de polyacrylamide à 8%. Le tout fut révélé en immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps anti-4G10

FIGURE 3: Niveaux de surexpression de la protéine p56dok pour différents clones par comparaison au niveau d'expression endogène

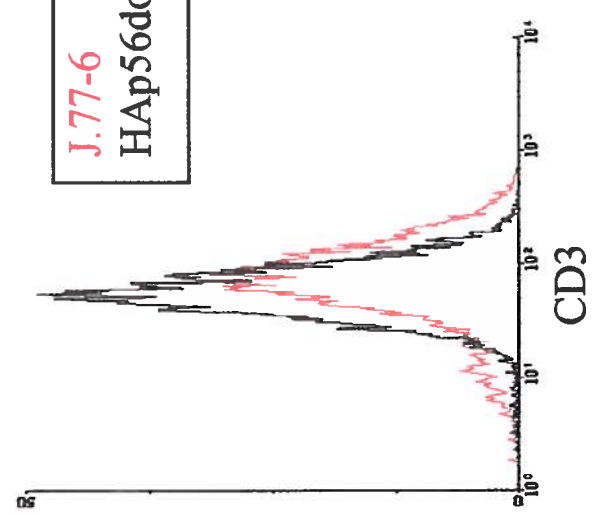
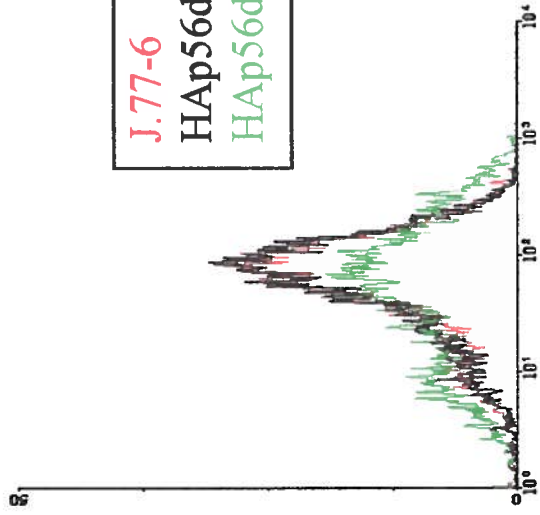
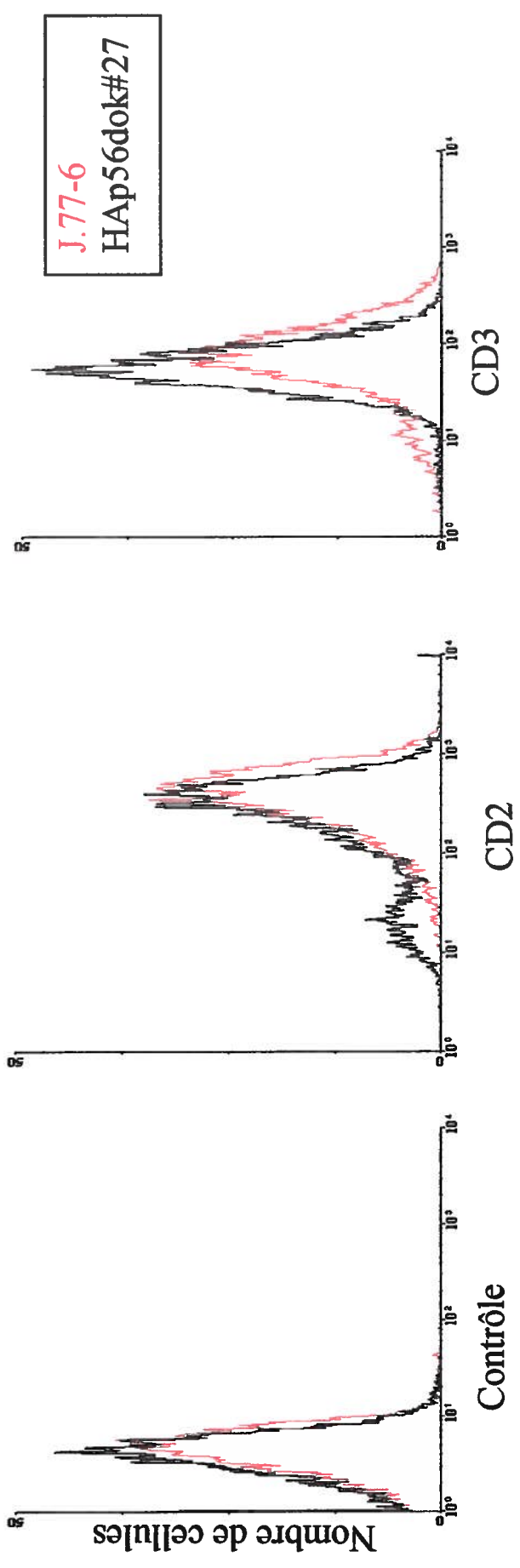
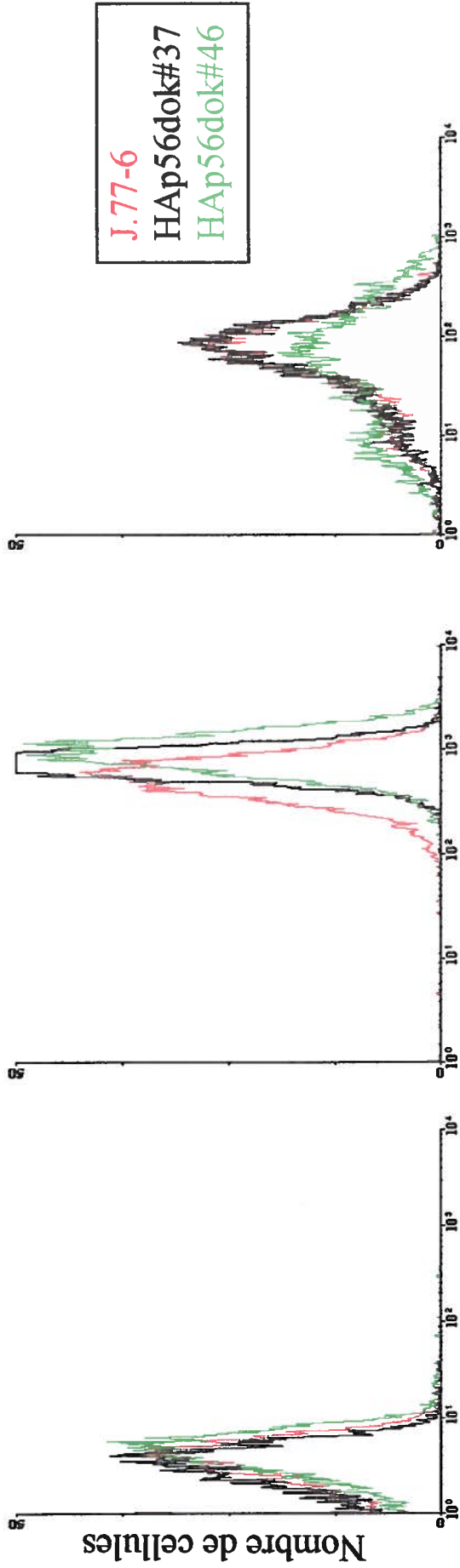
Des lysats cellulaires de la lignée cellulaire Jurkat J.77-6 parentale et de différents clones surexprimant la protéine p56dok, avec un épitope de reconnaissance HA (HAp56dok#37, HAp56dok#46 et HAp56dok#27) furent analysés en immunobuvardage de type Western. L'immunobuvardage fut réalisé à l'aide d'un anticorps ciblant la portion C-terminale de la protéine p56dok (anti-p56dok CTer).



anti-p56^{dok} CTer

FIGURE 4: Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok

Les cellules de la lignée parentale J.77-6 et des clones qui surexpriment la protéine p56dok (HAp56dok#37, #46 et #27), furent marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le récepteur CD2 (HB222) ou d'un anticorps dirigé contre le complexe TCR/CD3 (OKT3). Ces anticorps sont couplés à un fluorochrome (FITC) pour la détection de ces récepteurs de surface. L'analyse s'effectue par cytofluorométrie.



J.77-6
HAp56dok#37
HAp56dok#46

J.77-6
HAp56dok#27

CD3

CD2

Contrôle

Nombre de cellules

Nombre de cellules

ciblant directement les résidus tyrosine phosphorylés. La surexpression de la protéine p56dok n'affecte pas, par comparaison au type parental, le patron de phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines, et ce, peu importe le niveau de surexpression de la protéine p56dok dans les cellules (figure 5). Cependant, il est possible d'observer, suite à une activation du récepteur CD2, la phosphorylation plus importante d'une protéine de 56 kDa dans les clones HAp56dok#37 et HAp56dok#46 (figures 5A et 5B) qui surexpriment la protéine p56dok ce qui n'est pas le cas pour le clone HAp56dok#27 (figure 5C). Cependant, la faible surexpression de la protéine p56dok dans le clone HAp56dok#27 cause certainement cette absence de différence de phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok lorsque comparé au type parental. Puisqu'il a déjà été démontré qu'une stimulation des cellules Jurkat via le récepteur CD2 induisait une phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok (Némorin et al., 2001), nous avons voulu savoir si cette protéine de 56 kDa correspondait à la protéine p56dok. Pour ce faire, la protéine p56dok fut immunoprécipitée chez ces clones stimulés ou non via le récepteur CD2 ou le complexe TCR/CD3 et la phosphorylation sur les résidus tyrosine fut analysée par immunobuvardage avec un Ac reconnaissant des résidus tyrosine phosphorylés (figure 6). Tel que démontré par Némorin et al., la stimulation du récepteur CD2 des cellules Jurkat parentales et surexprimant la protéine p56dok mène à une augmentation de phosphorylation de la protéine p56dok contrairement à la stimulation du complexe TCR/CD3 (Némorin et al., 2001). Un niveau de phosphorylation de base de la protéine p56dok plus élevé est observable dans les clones surexprimant la protéine p56dok même sans stimulation lorsque comparé aux cellules parentales. Cette augmentation corrèle avec le niveau d'expression de la protéine p56dok dans ces clones.

La surexpression de la protéine p56dok affecte la signalisation qui implique la voie Ras après une stimulation du récepteur CD2

Pour étudier le rôle de la protéine p56dok dans la voie de signalisation qui implique la protéine Ras, il fut vérifié si la surexpression de la protéine p56dok interférait avec l'activation des MAPK ERK1/2 suite à une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3. Afin d'évaluer cette réponse, un anticorps reconnaissant

FIGURE 5 : Comparaison du niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

Des cellules de type parental J.77-6 et des clones qui surexpriment la protéine p56dok (HAp56dok#37(5A), HAp56dok#46 (5B) et HAp56dok#27 (5C)) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps et les extraits cellulaires furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour les résidus tyrosine phosphorylés (4G10). La position des marqueurs de masse moléculaire est en kilodaltons (kDa) pour cette figure et toutes les figures qui suivent.

CD2

CD3

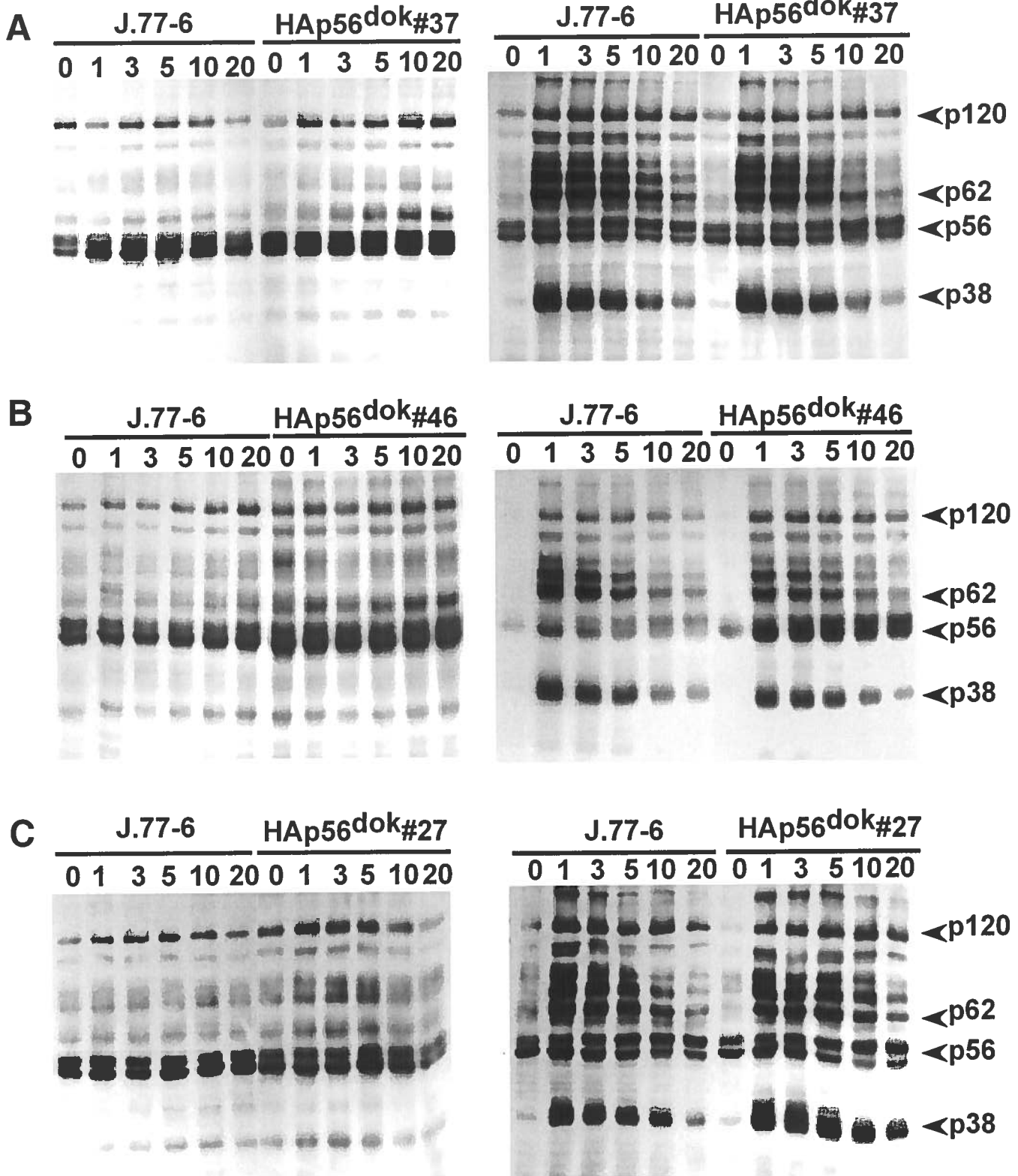
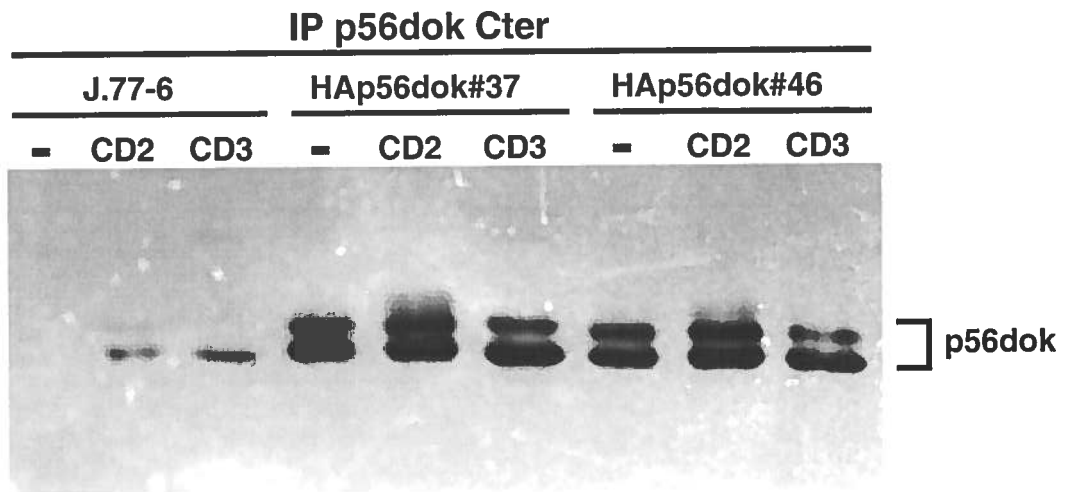


FIGURE 6 : Comparaison du niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok chez les cellules parentales et les clones qui surexpriment la protéine HAp56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

Les cellules de type parental et les clones qui surexpriment la protéine HAp56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) et les lysats protéiques obtenus après stimulation furent mis en contact avec des billes de protéine A couplées à l'anticorps anti-p56dok CTer dirigé contre la portion C-terminale de la protéine, tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. L'immunobuvardage de type Western fut réalisé à l'aide d'un anticorps spécifique pour les résidus tyrosine phosphorylés (anti-P-Tyr (4G10)).



anti-P-Tyr



anti-p56dok Cter biotinylé

spécifiquement la forme phosphorylée des MAPK ERK1/2 fut employé. Comme il est possible de l'observer sur la figure 7A et 7B, il y a une inhibition de l'activation des MAPK ERK1/2 après l'engagement du récepteur CD2 chez les clones qui surexpriment des niveaux importants de la protéine p56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) contrairement au clone HAp56dok#27 (figure 7C) qui n'en surexprime qu'une faible quantité. Il semble donc que l'intensité de l'inhibition corrèle avec le niveau de surexpression de la protéine p56dok. Cependant, l'induction de phosphorylation de ERK1/2 est similaire pour tous les clones après une stimulation du complexe TCR/CD3 ce qui indique que la surexpression de la protéine p56dok n'interfère pas avec l'activation des MAPK ERK1/2 suite à l'engagement de ce complexe. Ainsi, la réponse d'inhibition semble spécifique à la voie de stimulation du récepteur CD2 et non à celle impliquant le complexe TCR/CD3 qui peut toujours activer la phosphorylation de ERK1/2. Il est à noter que le niveau des MAPK ERK total fut analysé afin de nous assurer que cette inhibition d'activation de ERK1/2 n'était pas causée par une plus faible quantité de ces MAPK dans les cellules. Comme il est possible de le constater sur les figures 7A, B et C, un niveau constant des MAPK total est présent pour les clones présentés.

La surexpression de la protéine p56dok n'inhibe pas la mobilisation de calcium intracellulaire

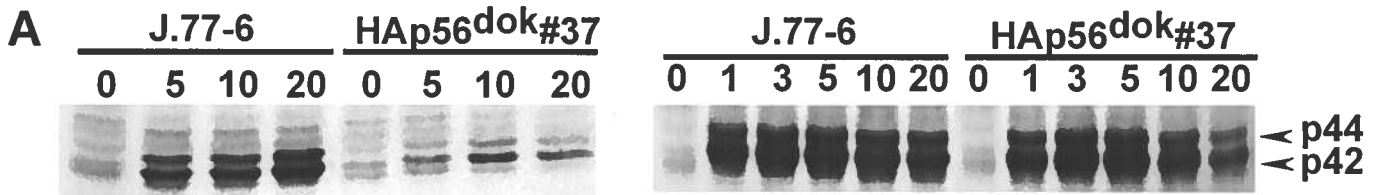
Puisqu'il avait été démontré que la surexpression de la protéine p62dok inhibait la réponse calcique après une stimulation du récepteur CD2 (Némorin et al., 2001), nous désirions effectuer la même expérience sur les clones surexprimant la protéine p56dok (figure 8). Nous avons ainsi démontré que la mobilisation de calcium intracellulaire n'était pas altérée par la surexpression de la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2 ainsi que du complexe TCR/CD3. Ce résultat suggère que l'activation de la PLC γ n'est probablement pas affectée. Le choix de présenter les données brutes plutôt que la transformation des données avec le logiciel MultiTime est volontaire car la transformation des données brutes dans ce logiciel ne permettait pas d'observer la ressemblance réelle existant entre les différents clones dans la mobilisation de calcium intracellulaire.

FIGURE 7 : Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

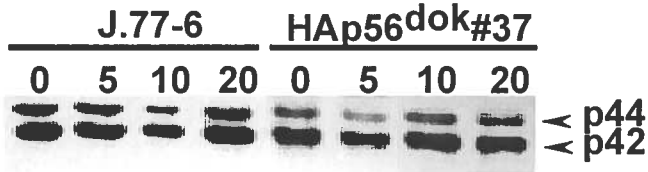
Des cellules de type parental J.77-6 et des clones qui surexpriment la protéine p56dok (HAp56dok#37(7A), HAp56dok#46 (7B) et HAp56dok#27 (7C)) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps. Les extraits cellulaires furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour les formes phosphorylées des MAPK ERK1/2 (anti-P-ERK1/2) ainsi que d'un anticorps spécifique pour les MAPK ERK (anti-ERK total).

CD2

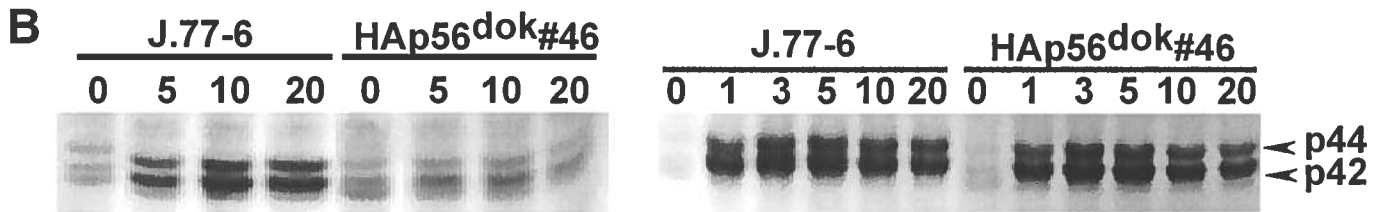
CD3



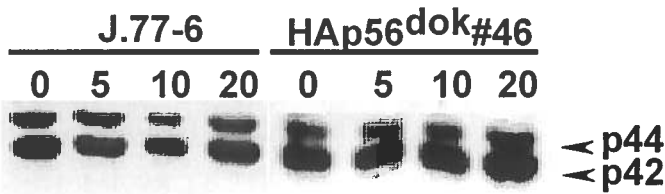
anti-P-ERK 1/2



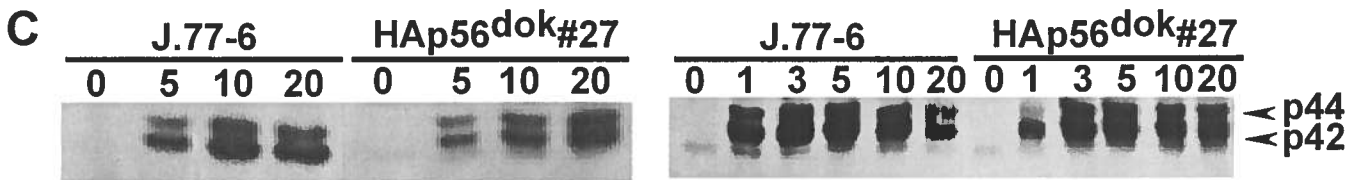
anti-ERK total



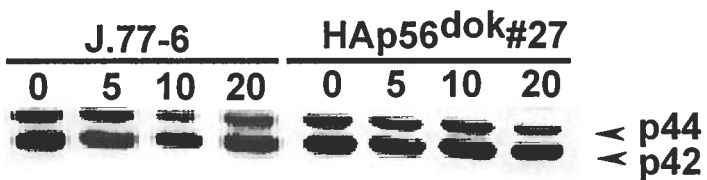
anti-P-ERK 1/2



anti-ERK total



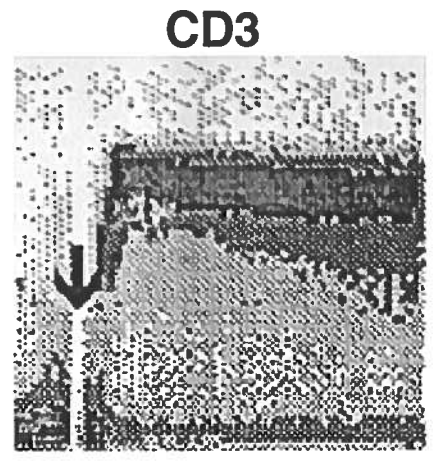
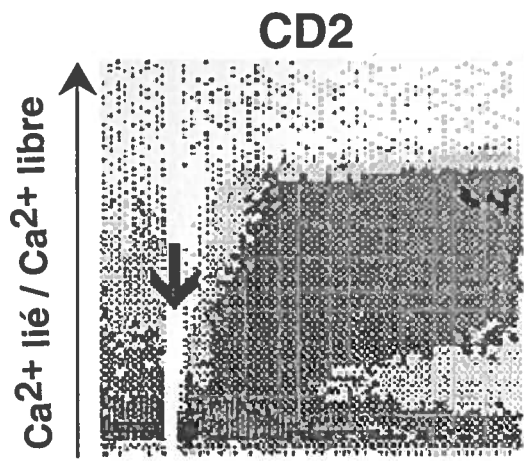
anti-P-ERK 1/2



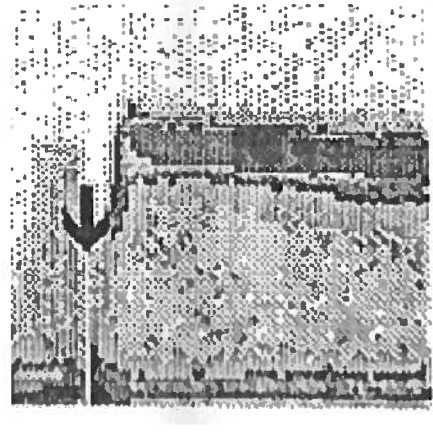
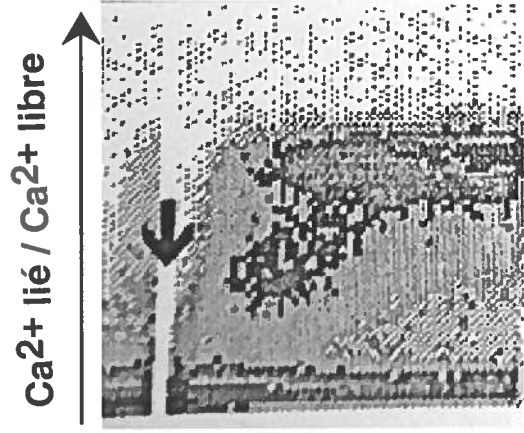
anti-ERK total

FIGURE 8 : Comparaison de la mobilisation de calcium intracellulaire pour les cellules de type parental et les clones surexprimant la protéine p56dok après l'engagement du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

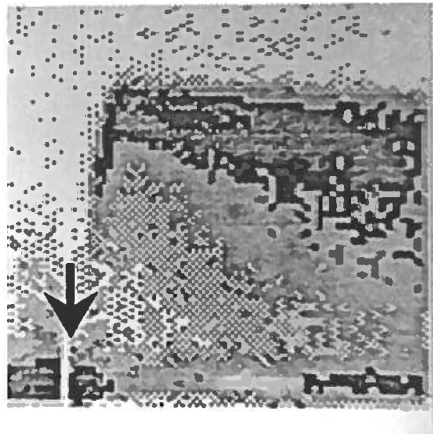
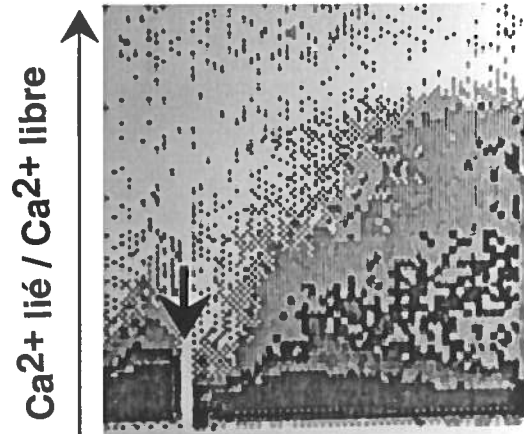
Les cellules intactes parentales et surexprimant la protéine HAp56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) furent chargées avec l'indo-1, chargement possible grâce à la présence de F-127. Le rapport de calcium lié par la cellule en fonction du calcium libre fut dosé par cytométrie en flux. Les stimulations du récepteur CD2 et du complexe TCR/CD3 furent effectuées respectivement grâce aux anticorps T11-2 + T11-3 (ajouté 2 minutes après l'ajout de T11-2) et UCHT1. La mobilisation de calcium intracellulaire débute au moment de l'ajout de l'anticorps pour une période qui dure de 10 à 12 minutes (temps 0 indiqué par une flèche).



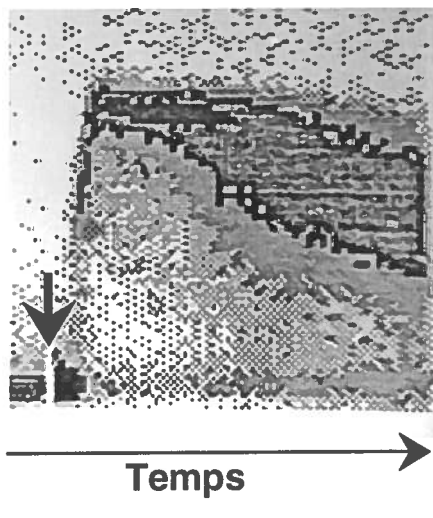
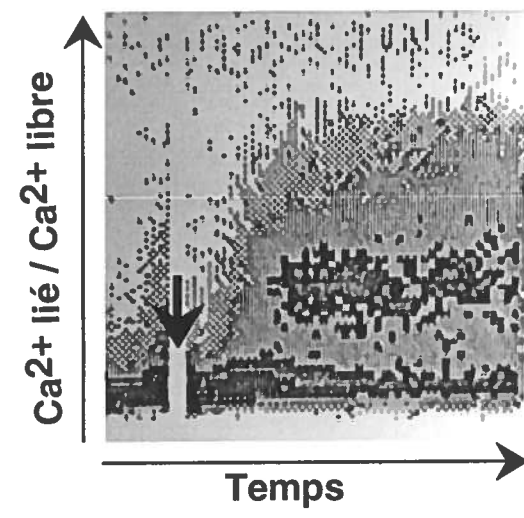
J.77-6 WT



HAp56dok#46



J.77-6 WT



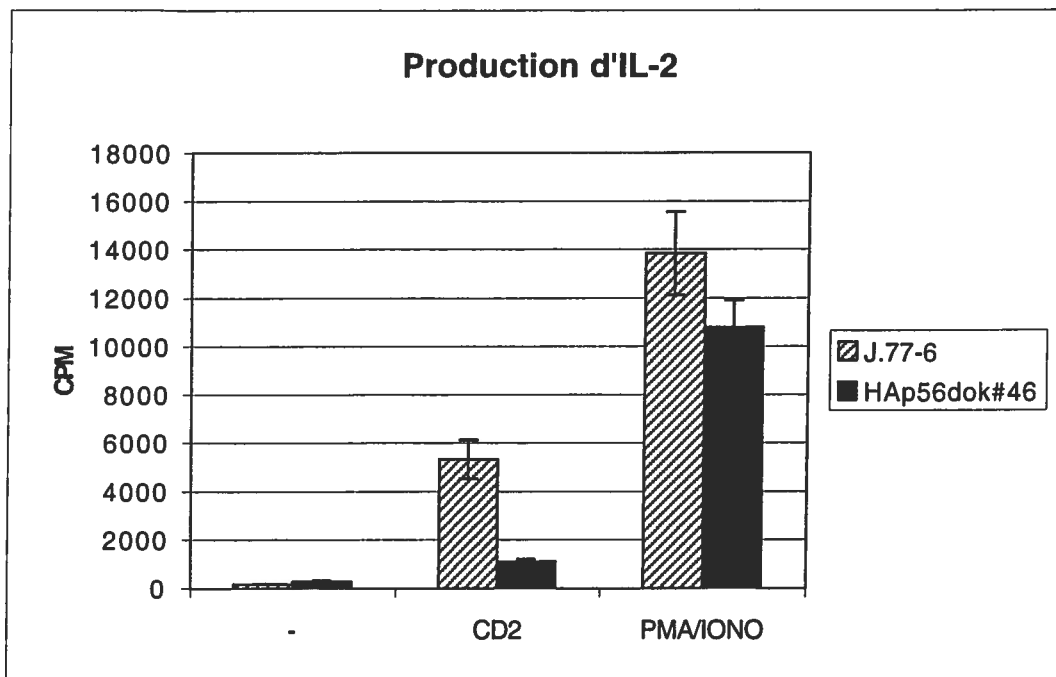
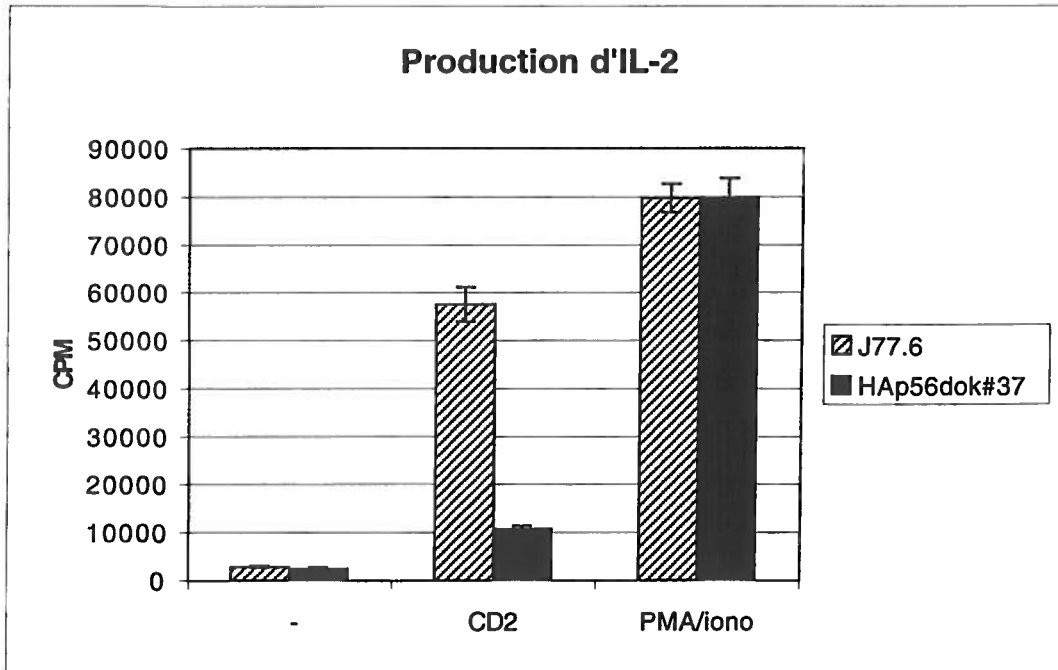
HAp56dok#37

La phosphorylation de la protéine p56dok interfère avec l'expression du gène de l'IL-2

Il est connu que l'activation de diverses voies de signalisation engagées par la stimulation du récepteur CD2 et du complexe TCR/CD3 mène à la production d'IL-2 chez les cellules Jurkat. Puisque nous avons une interférence dans l'activation des MAPK ERK1/2 qui se trouve en amont de la transcription du gène de l'IL-2, nous avons examiné l'effet de la surexpression de la protéine p56dok sur cette production d'IL-2. Les clones furent donc laissés sans stimulation ou stimulés via le récepteur CD2 ou par ajout de PMA et d'ionomycine. Après 24h de stimulation, les surnageants de culture furent récoltés et testés pour la production d'IL-2 (figure 9). Puisque la stimulation par la combinaison de PMA et d'ionomycine montre des niveaux de production d'IL-2 équivalents, cela démontre que la surexpression de la protéine p56dok n'altère pas la capacité de la cellule à produire de l'IL-2. Cependant, suite à une stimulation du récepteur CD2, les clones qui surexpriment la protéine p56dok montrent une inhibition de la production d'IL-2 par rapport au type parental. L'intensité de l'inhibition semble corrélée avec la quantité de la protéine p56dok présente dans la cellule puisqu'une inhibition plus importante est observable pour le clone HAp56dok#37 (inhibition de 5,3 fois) comparativement au clone HAp56dok#46 (inhibition de 4,7 fois). Puisqu'il n'existe aucun antécédent de la production d'IL-2 dans un modèle cellulaire surexprimant la protéine p56dok suite à une stimulation du récepteur CD2, il est difficile d'établir si cette différence est significative ou non. Cependant, une expérience identique fut réalisée dans le même modèle cellulaire avec des cellules qui surexprimaient la protéine p62dok. Si les deux expériences sont comparées, cette différence semble significative quoique légèrement inférieure à celle observée avec les clones surexprimant la protéine p62dok (p62dok #74 et HA-1) (Némorin et al., 2001). Il est à noter que les valeurs de CPM étaient beaucoup plus faibles pour les clones surexprimant la protéine p56dok que pour les clones surexprimant la protéine p62dok. Il aurait été intéressant de comparer ces clones en comparant le niveau de surexpression des protéines p62dok et p56dok respectivement et le facteur d'inhibition de la sécrétion d'IL-2 obtenu pour chacun d'entre eux.

FIGURE 9 : Comparaison de la production d'IL-2 par les cellules parentales et les clones qui surexpriment la protéine p56dok après une induction du récepteur CD2

Les cellules Jurkat parentales ainsi que les clones surexprimant la protéine HAp56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) furent stimulées ou non avec les anticorps anti-CD2 ou par PMA/ionomycine. Les surnageants de culture furent récoltés après 20 heures pour en déterminer les titres en IL-2 tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Des résultats similaires furent obtenus à deux reprises.



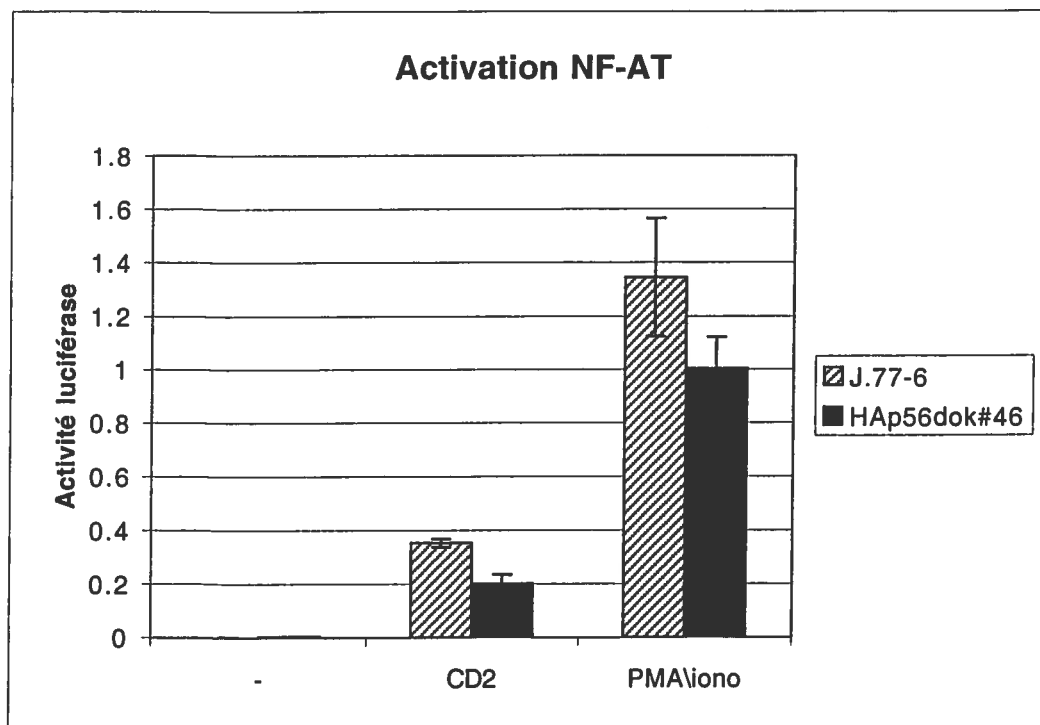
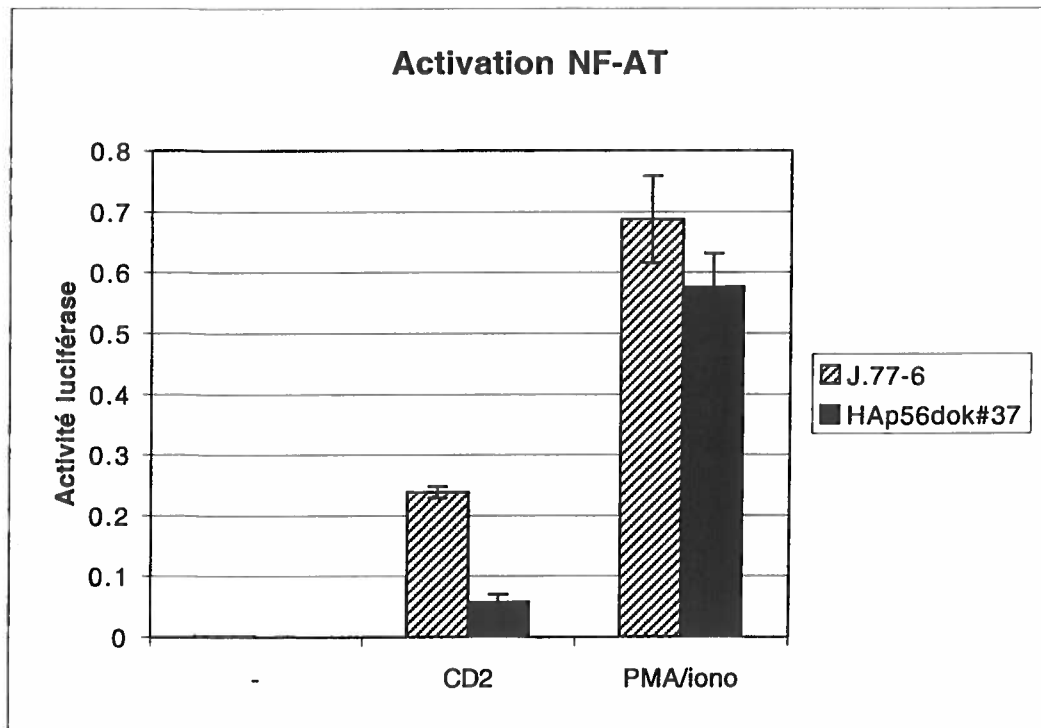
Pour connaître les effecteurs impliqués dans l'inhibition de la production d'IL-2 après stimulation du récepteur CD2 pour les clones qui surexpriment la protéine p56dok, nous avons observé l'effet de cette surexpression sur l'activation d'un facteur de transcription connu pour son rôle dans la régulation du gène de l'IL-2. Ainsi, les cellules Jurkat parentales ainsi que les clones qui surexpriment la protéine p56dok furent transfectés de façon transitoire avec une construction portant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du site NF-AT du promoteur du gène codant pour l'IL-2 durant 24h (figure 10). Les cellules furent non stimulées ou stimulées via le récepteur CD2 ou par la combinaison de PMA et d'ionomycine pour une période de 6h et l'activation du site NF-AT fut évaluée par un essai d'activité luciférase. Il fut alors démontré que suite à une stimulation du récepteur CD2, il y avait inhibition de l'activation de NF-AT pour les clones HAp56dok#37 et HAp56dok#46. Ici également, l'importance de l'inhibition corrèle avec le niveau de surexpression de la protéine p56dok et les facteurs sont de 4,2 pour le clone HAp56dok#37 et de 1,8 pour le clone HAp56dok#46. Pour le clone HAp56dok#27, nous obtenons toujours des résultats similaires à ceux du type parental suggérant que la quantité de la protéine p56dok exprimée chez ce clone n'est pas suffisante pour provoquer une inhibition (résultats non illustrés).

La surexpression des protéines p56dok mutées n'affecte pas la phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la protéine p56dok agit, nous avons réalisé une série d'expériences avec des protéines p56dok mutantes pour certains acides aminés de la portion carboxy-terminale. Les résidus ciblés furent des résidus tyrosine connus pour leur implication dans des interactions avec soit la protéine RasGAP (mutation YF271) ou le site candidat potentiel de la liaison pour la PTK lck (mutation YF402). Nous avons alors construit un vecteur d'expression contenant chaque version mutée de la protéine p56dok ainsi que l'épitope de reconnaissance HA. Ces vecteurs sont nommés pSR α -HAp56dok YF271 et pSR α -HAp56dok YF402. Ils furent ensuite transfectés dans la lignée cellulaire Jurkat et nous avons ensuite procédé au

FIGURE 10 : Comparaison de l'activation NF-AT pour les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok suite à une stimulation du récepteur CD2

Les cellules Jurkat surexprimant la protéine HAp56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) ou le type parental J.77-6 furent transfectées de façon transitoire, tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes, et l'activité luciférase fut mesurée au luminomètre. Les résultats sont exprimés en normalisant directement sur l'activité constitutive luciférase de la Renilla. Ces expériences furent reproduites à deux reprises.

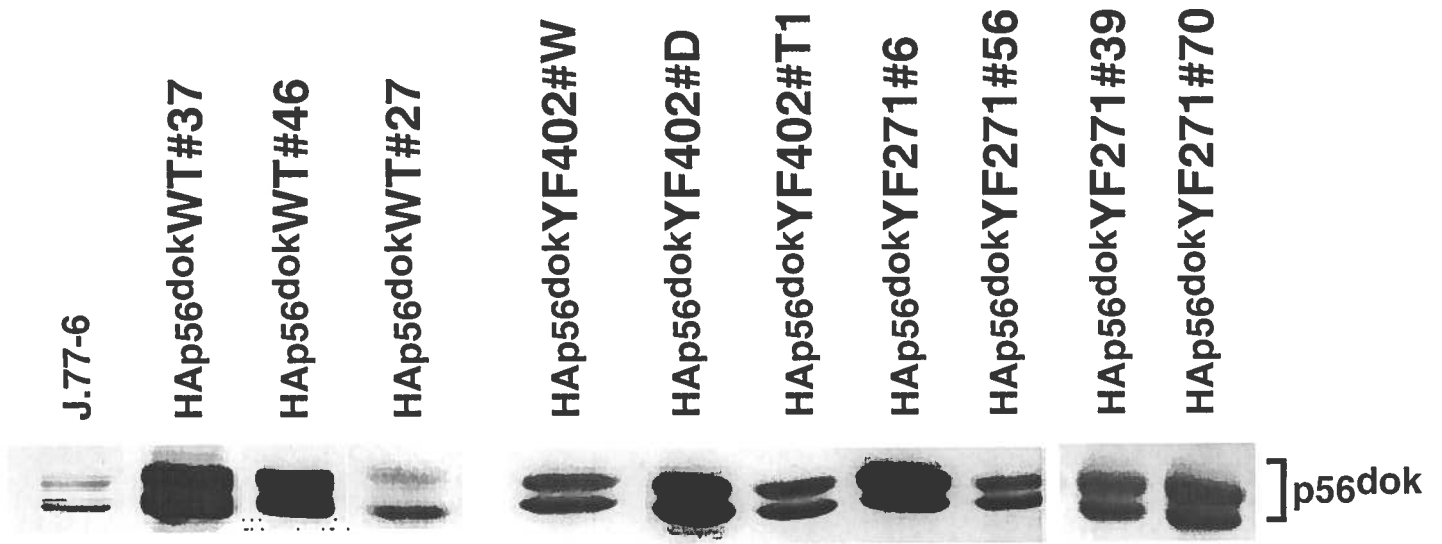


criblage des clones. Les clones obtenus furent tout d'abord criblés par immunobuvardage de type Western. Un anticorps reconnaissant la portion C-terminale de la protéine p56dok fut employé (figure 11). Par la suite, les clones, retenus sur la base de la surexpression de la protéine p56dok, furent criblés en cytométrie en flux pour leur expression à la surface membranaire du récepteur CD2 et du complexe TCR/CD3. Les clones présentant un niveau comparable au type parental de ces deux récepteurs à leur surface furent gardés pour des analyses ultérieures (figures 12A et 12B). Les transfectants HAp56dok YF271#6 et #56 ainsi que HAp56dok YF402#D, #W et #T1, surexprimant ces protéines p56dok mutées, furent alors retenus et testés pour leur implication dans la signalisation des cellules T. L'évaluation de cette implication sur la signalisation fut réalisée grâce aux différentes expériences précédemment mentionnées. Les mêmes niveaux de surexpression des récepteurs CD2 et du complexe TCR/CD3 sont également retrouvés pour les clones HAp56dok YF271#39 et #70 (résultats non illustrés).

Le premier paramètre vérifié fut la phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines solubles après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3. Nous désirions nous assurer que la surexpression des protéines p56dok mutantes n'altérerait pas, ici également, le patron de phosphorylation sur les résidus tyrosine suite à l'engagement du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3. Comme il est possible de le constater (figures 13A, 13B et 13C), la surexpression des mutants de la protéine p56dok n'affecte pas, par comparaison au type surexprimant le forme sauvage de la protéine p56dok, le patron de phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines induites par une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3, et ce, peu importe le niveau de surexpression de la protéine p56dok dans les cellules. Cependant, il est possible d'observer, suite à une stimulation du récepteur CD2, une importante phosphorylation d'une protéine de 56 kDa dans les clones mutants pour la protéine p56dok, tel qu'observé précédemment pour les clones HAp56dok#37 et HAp56dok#46 qui surexpriment la forme sauvage de la protéine p56dok, et ce, comparativement au type parental. Il est toutefois à noter que la surexpression des protéines HAp56dok mutées pour l'un ou l'autre des résidus tyrosine diminue la phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok suite à une activation du récepteur CD2 par comparaison

FIGURE 11 : Niveaux de surexpression de la protéine p56dok mutée pour les résidus tyrosine 271 et 402 pour différents clones

Des lysats cellulaires totaux non stimulés de la lignée cellulaire Jurkat J.77-6 parentale et de différents clones surexprimant la protéine p56dok mutée ou non, avec un épitope de reconnaissance HA (HAp56dok#37, #46, #27, YF402#D, YF402#W, YF402#T1, YF271#6, YF271#56, YF271#39 et YF271#70), furent analysés en immunobuvardage de type Western. L'immunobuvardage fut réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de la protéine p56dok (anti-p56dok CTer).



anti-p56^{dok} CTer

FIGURE 12A : Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface à l'étude, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée

Les cellules de la lignée parentale J.77-6 et le clone qui surexprime la protéine HAp56dok (HAp56dok mutant YF402#T1, YF402#D, YF402#W et YF271#6) furent marquées à l'aide d'un anticorps dirigé contre le récepteur CD2 (HB222) ou d'un anticorps dirigé contre le complexe TCR/CD3 (OKT3). Ces anticorps sont couplés à un fluorochrome (FITC) pour la détection des récepteurs de surface. L'analyse s'effectue par cytofluorométrie.

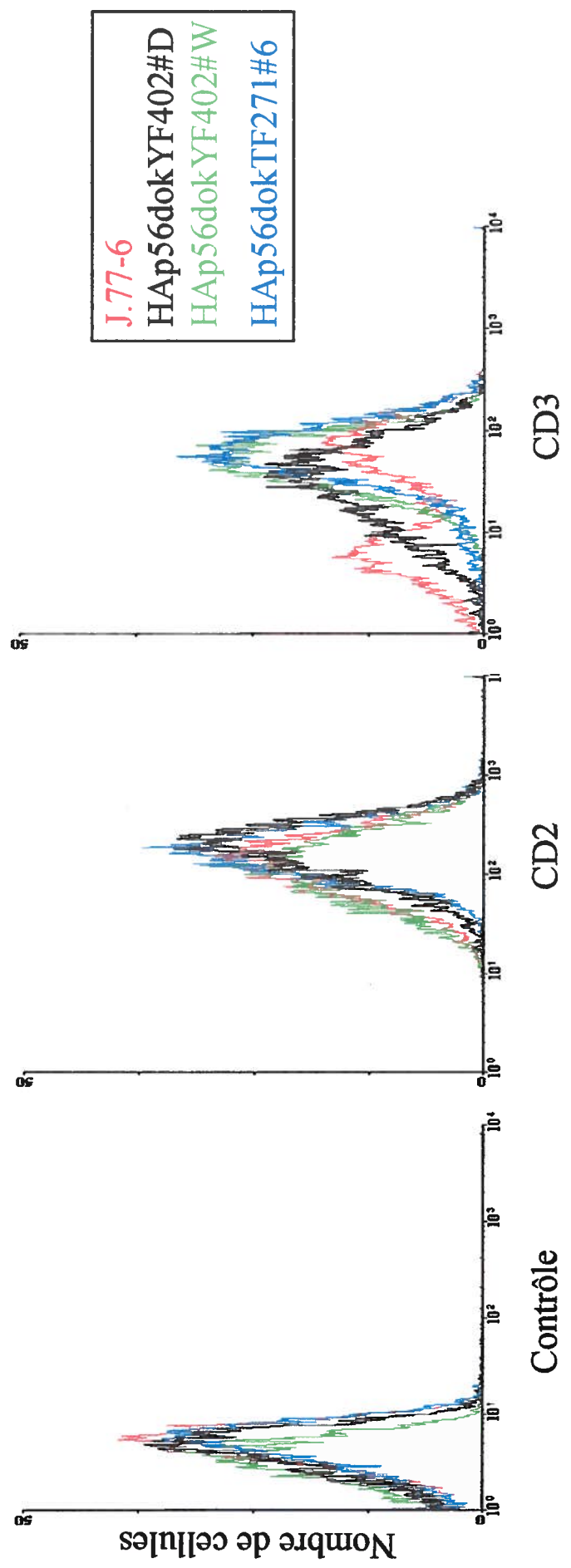
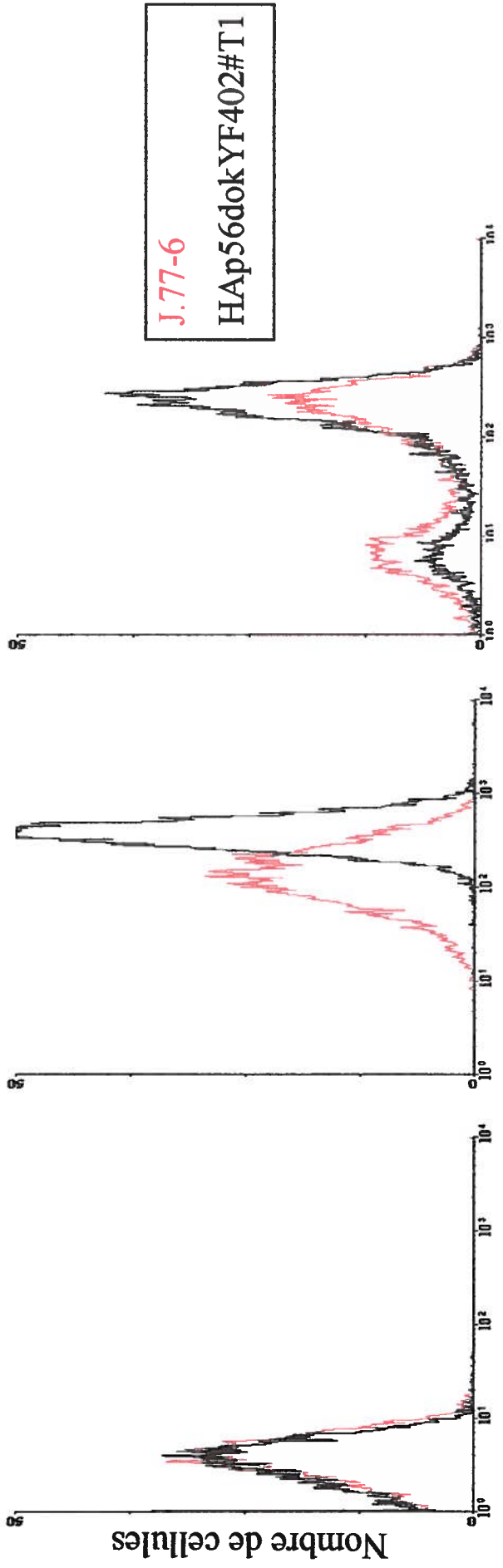


FIGURE 12B : Comparaison des niveaux d'expression des récepteurs de surface à l'étude, le récepteur CD2 et le complexe TCR/CD3, entre les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée

Les cellules de la lignée parentale J.77-6 et le clone qui surexprime la protéine p56dok (HAp56dok YF271#56) fut marqué à l'aide d'un anticorps dirigé contre le récepteur CD2 (HB222) ou d'un anticorps dirigé contre le complexe TCR/CD3 (OKT3). Ces anticorps sont couplés à un fluorochrome (FITC) pour la détection des récepteurs de surface. L'analyse s'effectue par cytofluorométrie

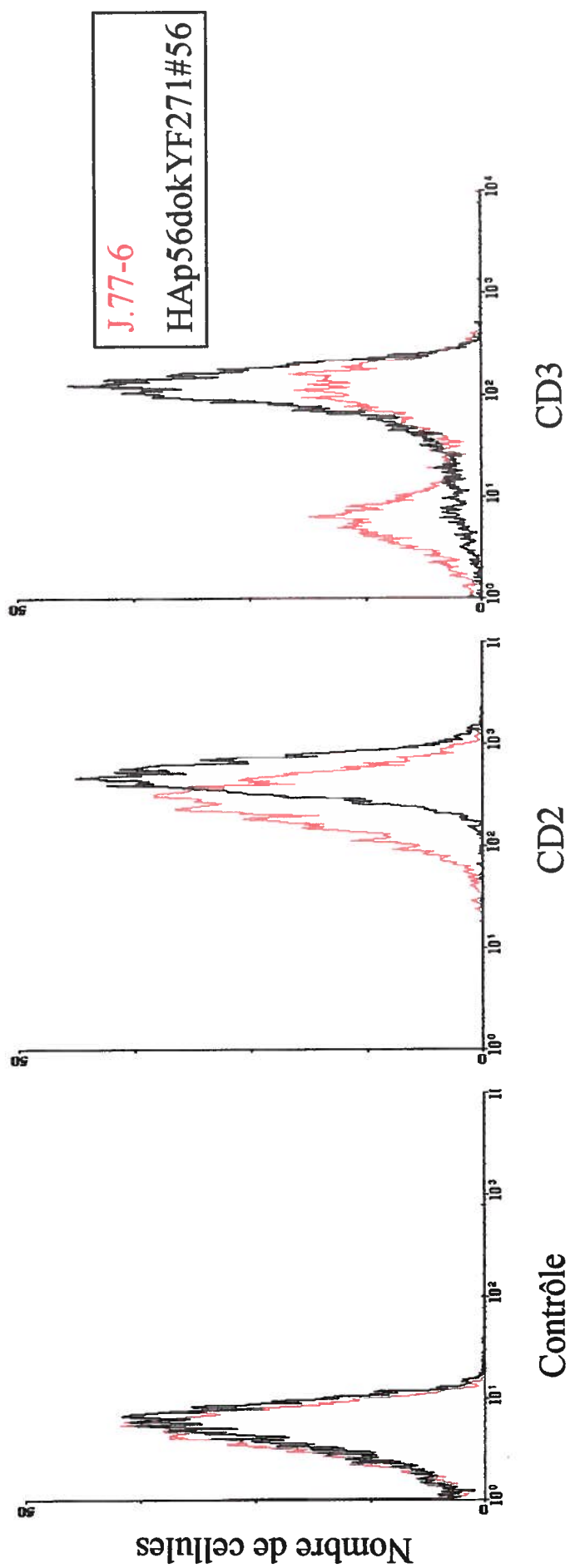
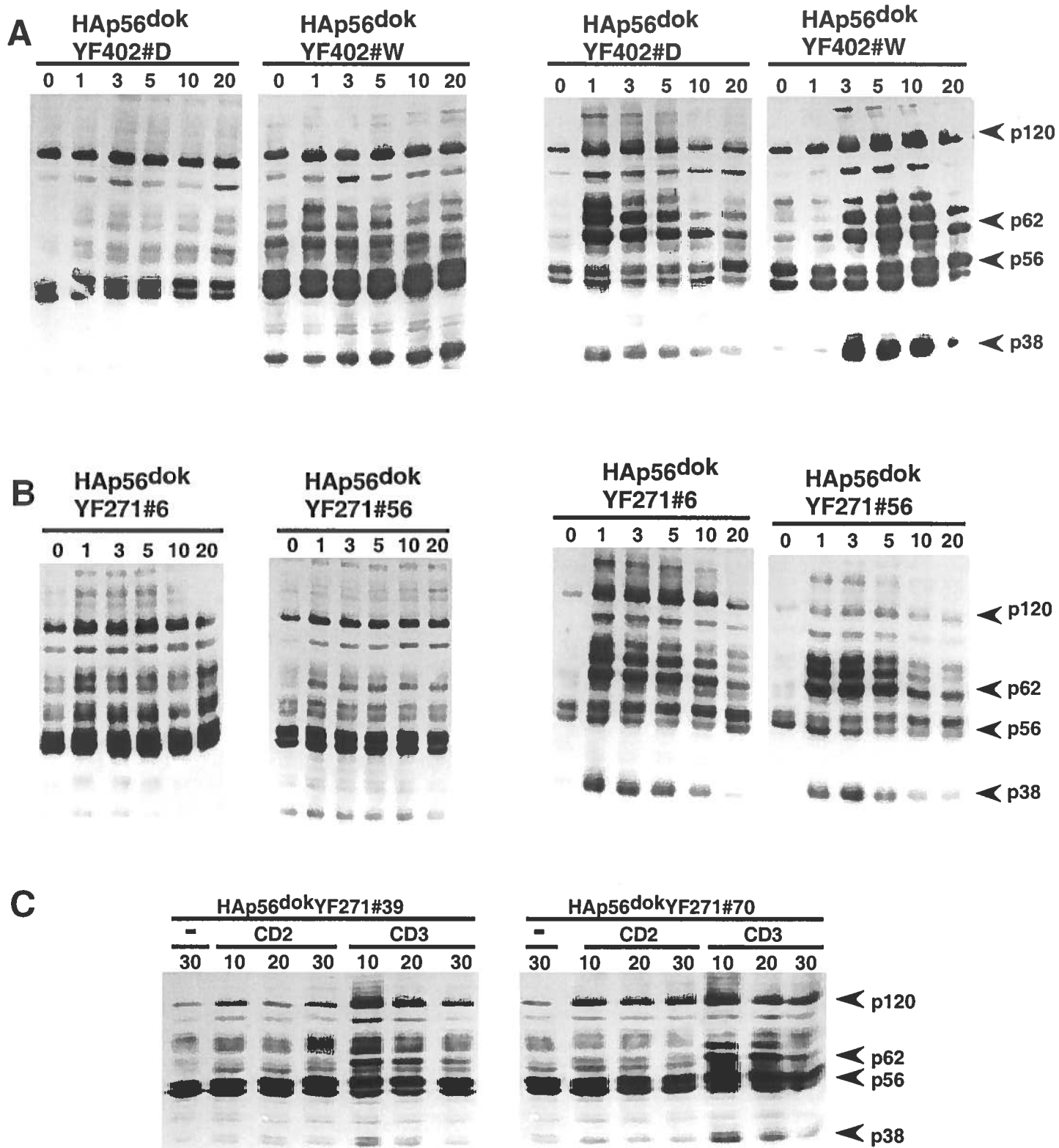


FIGURE 13 : Niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine des cellules parentales et des clones surexprimant la protéine p56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

Les cellules de type parental J.77-6 et les clones qui surexpriment la protéine p56dok (HAp56dok mutant YF402#D et YF402#W (16A), YF271#6 et YF271#56 (16B) et YF271#39 et YF271#70 (16C)) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps et les lysats protéiques obtenus furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour les résidus tyrosine phosphorylés (anti-P-Tyr (4G10)).

CD2

CD3



au clone HAp56dok non muté. Il semble donc que ces deux résidus tyrosine, Y271 et Y402, soient très importants pour la phosphorylation de la protéine p56dok (figure 14).

L'effet de la surexpression des protéines p56dok mutantes sur la mobilisation de calcium intracellulaire ne fut pas évalué. En effet, puisqu'aucune inhibition ou activation n'avait été observée sur ce paramètre entre le type parental et les clones surexprimant la protéine p56dok, nous ne nous attendions à aucun changement de mobilisation de calcium intracellulaire pour les clones surexprimant les protéines p56dok mutantes.

La surexpression des protéines p56dok mutantes pour le résidu tyrosine de la liaison à la protéine RasGAP (YF271) permet de restaurer la signalisation par la voie Ras après une stimulation du récepteur CD2

Pour connaître l'implication des différentes mutations dans la voie de signalisation Ras, il fut vérifié si la surexpression de la protéine p56dok mutante pouvait restaurer l'interférence observée dans l'activation des MAPK ERK1/2 pour les clones surexprimant la forme sauvage de la protéine p56dok après une stimulation du récepteur CD2. Afin d'évaluer cette réponse, le même anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée des MAPK ERK1/2 fut employé. Comme il est possible de l'observer sur les figures 15A, il y a restauration de l'activation des MAPK ERK1/2 après l'engagement du CD2 chez tous les clones qui surexpriment la protéine HAp56dok YF271. L'intensité de la restauration semble corrélérer avec le niveau de surexpression de la protéine p56dok. Il est à noter que le clone HAp56dok YF271#39 exprime un niveau légèrement inférieur de la protéine mutante p56dok comparativement aux clones #6 et #70. Toutefois, cette différence n'est pas assez marquée pour discriminer entre l'importance de la restauration de l'activation des MAPK ERK1/2 pour ces trois clones. Lorsque nous observons l'effet de la surexpression de la protéine p56dok mutante pour le résidu tyrosine potentiel de liaison à lck (YF402), nous pouvons constater qu'il y a toujours inhibition des MAPK ERK1/2 après stimulation du récepteur CD2 uniquement pour le clone qui surexprime un niveau élevé de la protéine mutante (HAp56dok YF402#D) (figure 15B). Pour le clone qui surexprime un niveau plus faible de cette

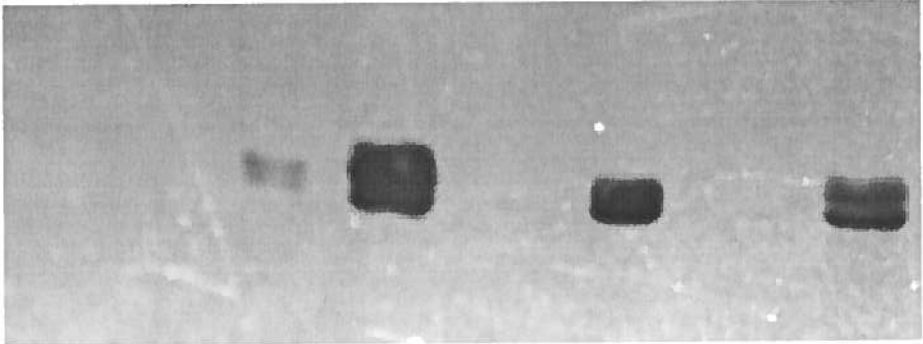
FIGURE 14 : Niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine de la protéine p56dok chez les clones surexprimant HAp56dok et HAp56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2

Les cellules de type parental J.77-6 et les clones qui surexpriment la protéine HAp56dok mutante ou non (HAp56dok#37, HAp56dok YF402#D et HAp56dok YF271#6) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) pour différents temps et les lysats protéiques obtenus furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour les résidus tyrosine phosphorylés (anti-P-Tyr (4G10)). Le niveau de surexpression fut vérifié à l'aide d'un anticorps reconnaissant la portion C-terminale de la protéine p56dok (anti-p56dok Cter).

IP HA

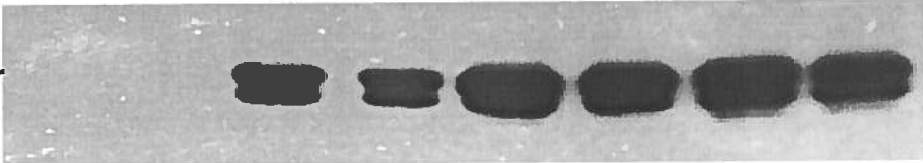
J.77-6		HAp56dok#37		HAp56dok YF271#6		HAp56dok YF402#D	
-	CD2	-	CD2	-	CD2	-	CD2

anti-P-Tyr



] p56

anti-p56dok Cter



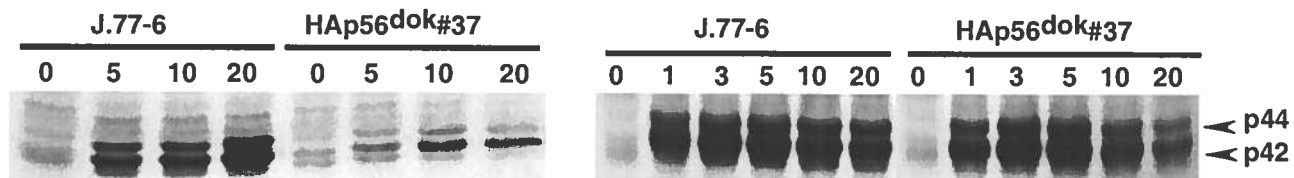
] p56

FIGURE 15A : Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok ou la protéine p56dok mutée sur le résidu tyrosine 271 après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

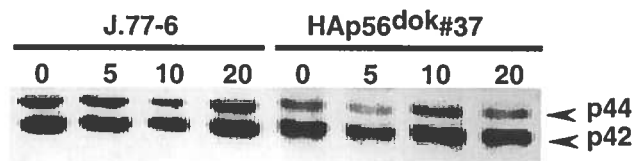
Les cellules de type parentale J.77-6, le clone qui surexprime la protéine p56dok (HAp56dok#37) et les clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée (HAp56dok mutants YF271#6, YF271#56, YF271#39 et YF271#70) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps et les lysats protéiques obtenus furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour la forme phosphorylée des MAPK ERK1/2 (anti-P-ERK1/2) ou d'un anticorps spécifique pour les MAPK ERK (anti-ERK total).

CD2

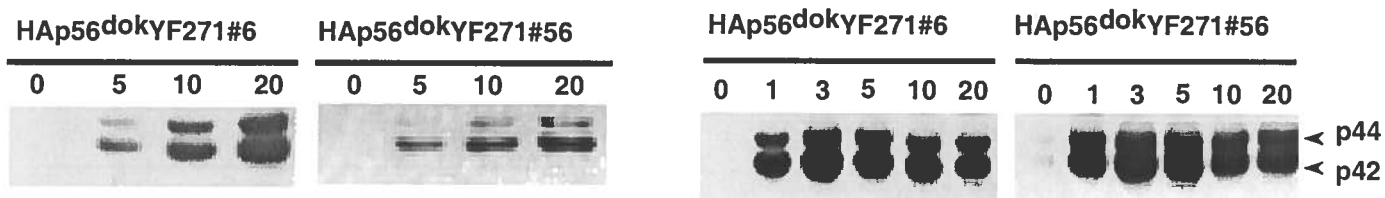
CD3



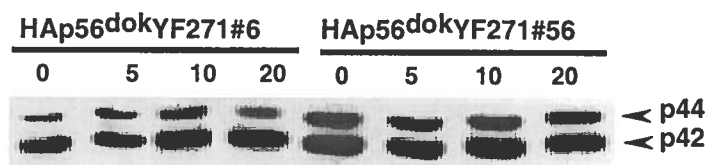
anti-P-ERK 1/2



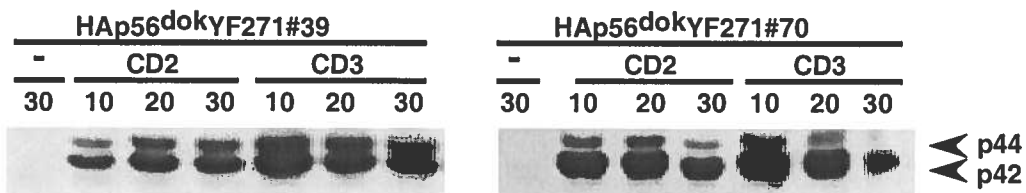
anti-ERK total



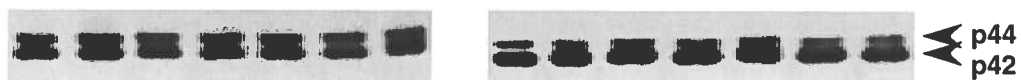
anti-P-ERK 1/2



anti ERK total



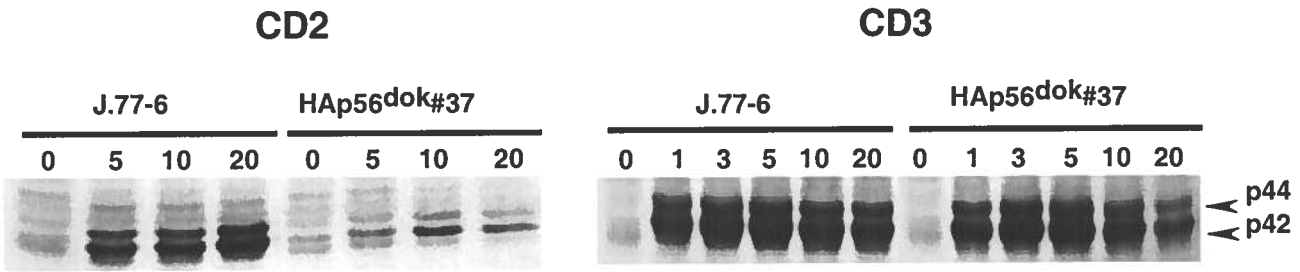
anti-P-ERK 1/2



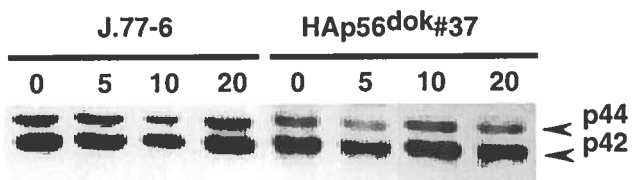
anti ERK total

FIGURE 15B : Comparaison de l'activation des MAPK ERK1/2 des cellules parentales avec les clones surexprimant la protéine p56dok ou la protéine p56dok mutée sur le résidu tyrosine 402 après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3

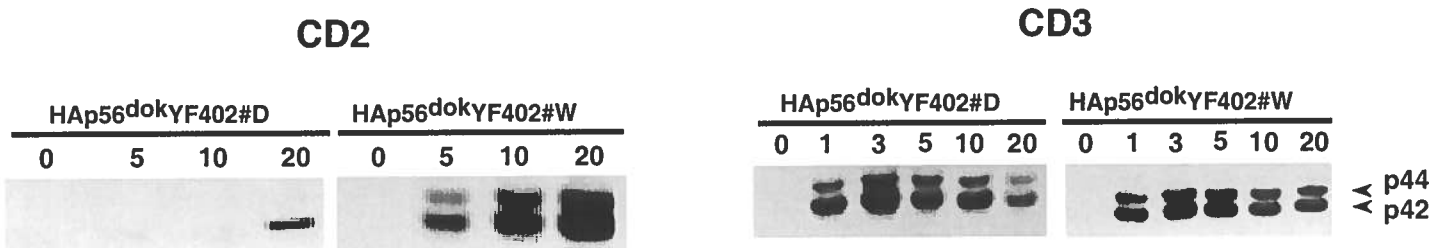
Les cellules de type parentale J.77-6, le clone qui surexprime la protéine p56dok (HAp56dok#37) et les clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée (HAp56dok mutant YF402#D et YF402#W) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps et les lysats protéiques obtenus furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps spécifique pour la forme phosphorylée des MAPK ERK1/2 (anti-P-ERK1/2) ou d'un anticorps spécifique pour les MAPK ERK (anti-ERK total).



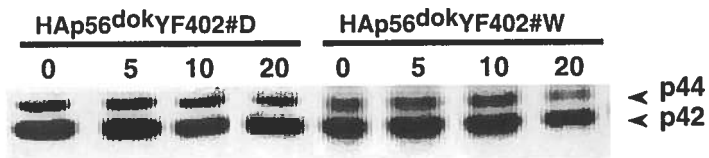
anti-P-ERK 1/2



anti-ERK total



anti-P-ERK 1/2



anti ERK total

protéine mutante (HAp56dok YF402#W), nous pouvons observer, comme pour les clones surexprimant la forme mutante de liaison à la protéine RasGAP, une phosphorylation plus ou moins importante des MAPK ERK1/2 donc, une inhibition moins importante ou même inexistante de l'activation de ces MAPK. L'induction de phosphorylation des MAPK ERK1/2 est similaire pour tous les clones après une stimulation du complexe TCR/CD3 ce qui indique que la surexpression de la protéine p56dok mutante n'interfère pas non plus avec l'activation des MAPK ERK1/2 suite à l'engagement de ce récepteur. Pour tous ces clones également, le niveau des MAPK ERK totales fut vérifié toujours dans le but de s'assurer que les résultats de restauration ou non obtenus n'étaient pas causés par une plus faible expression de ces MAPK.

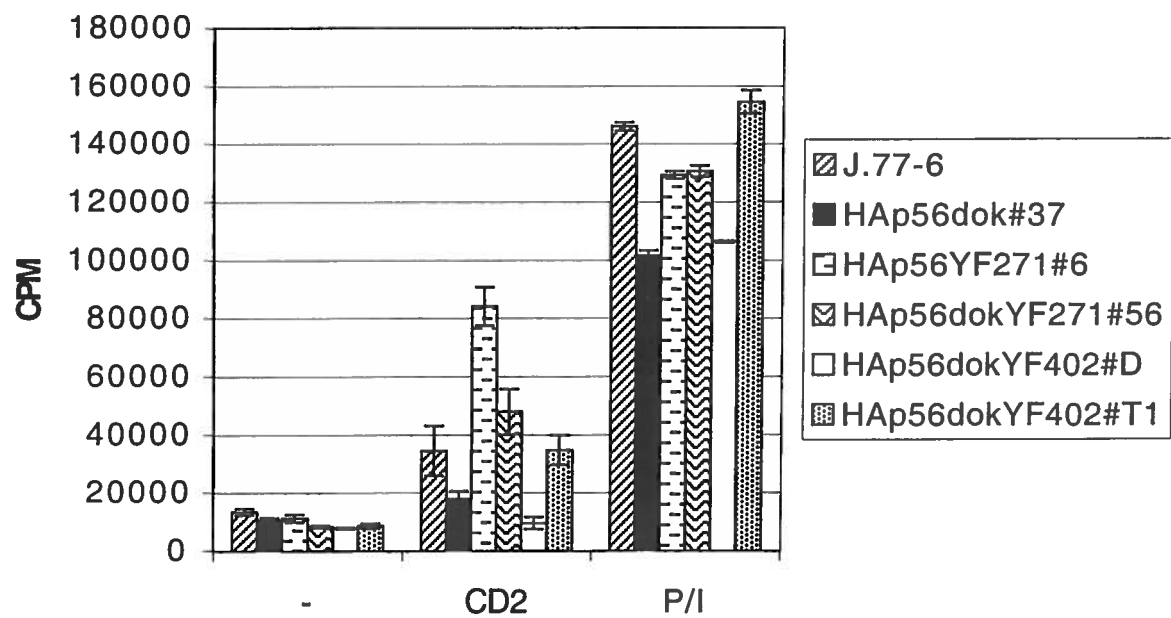
La phosphorylation de la protéine p56dok mutée pour le résidu tyrosine de liaison à RasGAP (YF271) restaure la production d'IL-2 observée avec la protéine p56dok sauvage

Puisque nous avons une restauration de l'activation des MAPK ERK1/2 pour les mutants de liaison à la protéine RasGAP (YF271), nous avons examiné l'effet de la surexpression de cette mutation de la protéine p56dok sur la production d'IL-2. Les clones furent donc laissés, cette fois également, sans stimulation ou stimulés via le récepteur CD2 ou par PMA et ionomycine. Après 24h de stimulation, les surnageants de culture furent récoltés et testés pour la production d'IL-2 (figure 16). Puisque la stimulation par la combinaison PMA et ionomycine montrent des niveaux de production d'IL-2 équivalents, cela démontre que la surexpression de la protéine p56dok n'altère pas la capacité de la cellule produire de l'IL-2. Par contre et tel qu'attendu, suite à une stimulation du récepteur CD2, les clones qui surexpriment la protéine HAp56dok YF271 montrent aussi une restauration de la production d'IL-2 par comparaison aux clones surexprimant la forme sauvage de la protéine p56dok. L'importance de cette restauration corrèle avec la quantité de la protéine p56dok présente dans la cellule puisqu'une restauration beaucoup plus importante est observable pour le clone HAp56dok YF271#6 comparativement au clone HAp56dok YF271#56. Cette restauration de sécrétion d'IL-2 concorde avec la restauration de phosphorylation de ERK1/2 observée préalablement. En

FIGURE 16 : Comparaison de la production d'IL-2 par les cellules parentales, un clone qui surexprime HAp56dok et certains clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée après une stimulation du récepteur CD2

Les cellules Jurkat parentales J.77-6 ainsi que le clone surexprimant la protéine p56dok (HAp56dok#37) et les clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée (HAp56dok YF402#D, YF402#T1, YF271#6 et YF271#56) furent stimulées ou non avec les anticorps anti-CD2 ou avec PMA/ionomycine. Les surnageants de culture furent récoltés après 20 heures pour en déterminer les titres d'IL-2 tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. Des résultats similaires furent obtenus à deux reprises.

Production d'IL-2

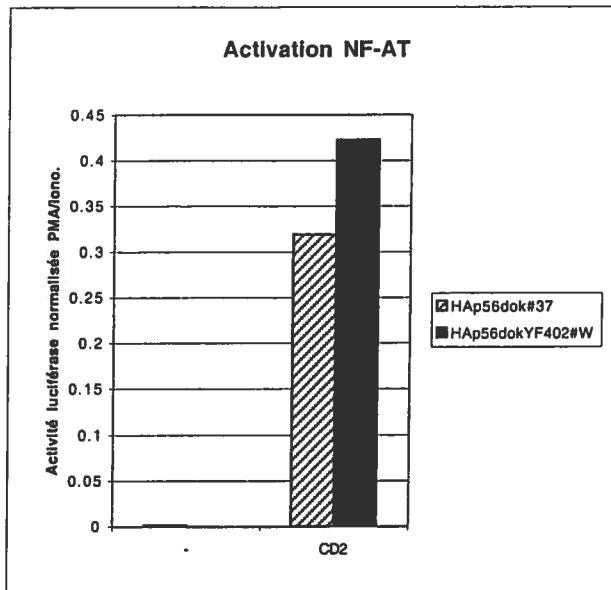
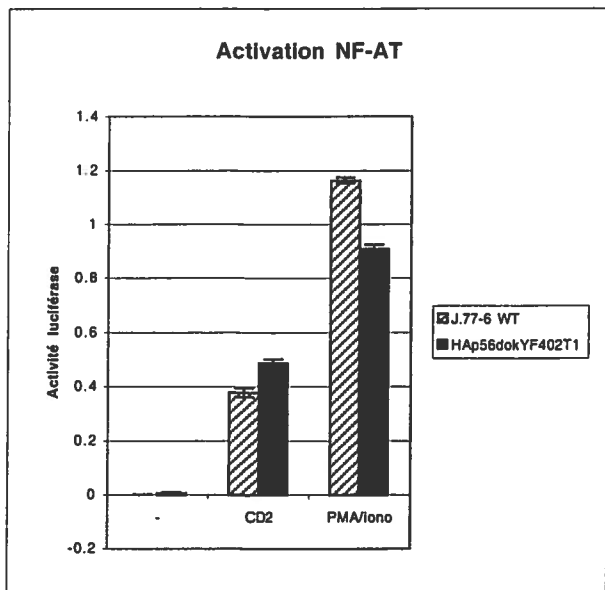
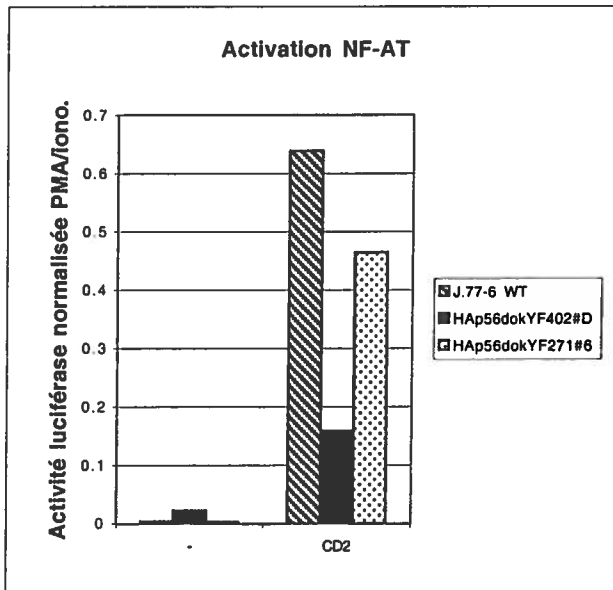
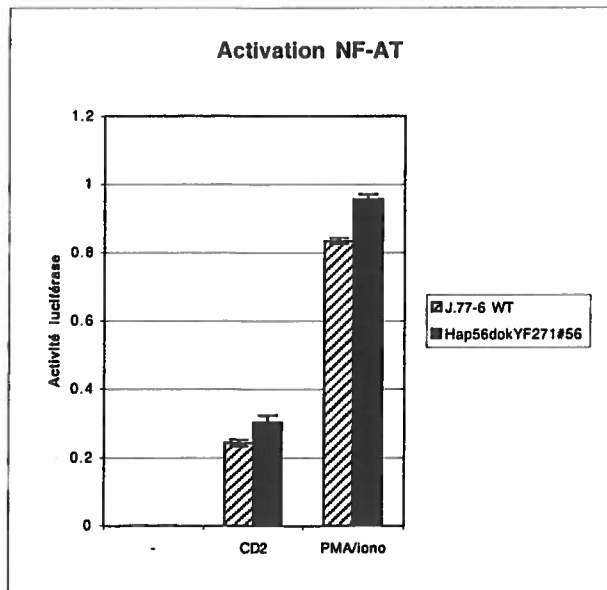


ce qui concerne les clones portant une mutation sur le résidu tyrosine 402, suite à une stimulation du récepteur CD2, il est possible de constater que le clone HAp56dok YF402#D, qui surexprime un niveau comparable de la protéine p56dok au clone surexprimant la protéine HAp56dok#37, présente toujours le même facteur d'inhibition de production d'IL-2 que le clone HAp56dok#37. Cette inhibition de production d'IL-2 concorde également avec l'inhibition d'activation des MAPK ERK1/2. Pour le clone HAp56dok YF402#T1, c'est probablement le faible niveau d'expression de la protéine mutante qui cause cette absence de maintien d'inhibition de production d'IL-2 comparé au clone HAp56dok YF402#D ce qui expliquerait également l'absence d'inhibition d'activation des MAPK ERK1/2 observé précédemment. Sur cette figure, il est possible d'observer les résultats de la production d'IL-2 pour le clone HAp56dok YF402#T1 plutôt que ceux du clone HAp56dok YF402#W dont nous avons présenté les résultats jusqu'à présent, et ce, parce que l'expérience de production d'IL-2 ne fut pas réalisée pour ce dernier clone. Toutefois, puisque le niveau d'expression de ces deux clones est similaire, il est logique de croire que des résultats similaires auraient été obtenus pour les deux clones. Il est à noter que pour les mutants HAp56dok YF271#6 et HAp56dok YF402#D, qui surexpriment des niveaux élevés de la protéine p56dok, une restauration de la production d'IL-2 (HAp56dok YF271#6) ou une inhibition de cette production (HAp56dok YF402#D) est supérieure au type parental ou au clone surexprimant la protéine HAp56dok sauvage. Les hypothèses suivantes pourraient être soulevées pour expliquer ce phénomène. Il se pourrait qu'il y ait une compétition qui s'installe pour le recrutement de la protéine RasGAP à la membrane cellulaire entre la protéine p56dok non mutante endogène et la protéine p56dok mutante surexprimée. Puisque le mutant pour la protéine p56dok est en très grande quantité et n'est plus en mesure de lier la protéine RasGAP, il n'y a plus d'inactivation de la voie Ras/MAPK donc plus d'inactivation des MAPK ERK1/2 et ainsi, une production importante d'IL-2. Il se pourrait également que l'augmentation de production d'IL-2 par les clones surexprimant une forte quantité de la protéine p56dok mutante s'explique par une différence clonale entre le clone qui surexprime la protéine p56dok mutante et le clone parental.

Nous avons, par la suite, observé l'effet de cette surexpression des protéines p56dok mutantes de façon plus précise sur l'activation du site NF-AT, puisque ce dernier était affecté par la surexpression de la protéine p56dok sauvage. Ainsi, les cellules Jurkat parentales ainsi que les clones qui surexpriment les différentes mutations de la protéine p56dok furent transfectés avec une construction portant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du site NF-AT du promoteur du gène codant pour l'IL-2 durant 24h (figure 17). Les cellules furent non stimulées ou stimulées via le récepteur CD2 ou par la combinaison PMA et ionomycine pour une période de 6h et l'activation du site NF-AT fut évaluée par un essai d'activité luciférase. Il fut alors démontré que suite à une stimulation du récepteur CD2, il y avait une restauration de l'activation du site NF-AT pour les clones HAp56dok YF271 contrairement au clone HAp56dok YF402#D qui présente encore une fois un niveau d'inhibition comparable au clone HAp56dok#37. Pour les clones HAp56dok YF402#W et HAp56dok YF402#T1, nous obtenons toujours des résultats d'inhibition beaucoup plus faibles ou inexistantes par comparaison au type parental renforçant encore l'hypothèse de l'inhibition dépendante de la dose tel qu'observé pour le clone HAp56dok#27. Il aurait été préférable que pour chacune des expériences de l'activation NF-AT nous ayons été en présence du type parental à titre de contrôle de l'activation normale du site NF-AT pour cette lignée cellulaire ainsi que du clone HAp56dok#37 à titre de contrôle d'inhibition de l'activation NF-AT. De cette façon, nous aurions été en mesure de déterminer de manière plus exacte le facteur de restauration de l'activation du site NF-AT permis par la mutation du résidu tyrosine 271. Aussi, certains résultats sont présentés suite à une normalisation des résultats en fonction des résultats obtenus lors de l'activation maximale obtenue par l'ajout de PMA et d'ionomycine alors que d'autres résultats ne sont pas normalisés. Il en est ainsi puisque pour certaines des expériences de l'activation du site NF-AT, l'efficacité de transfection était plus faible mais significative. La normalisation des résultats en fonction de l'activation maximale nous permettait alors de mieux évaluer l'effet des mutations des résidus tyrosine, dans chacun des clones, sur l'activation du site NF-AT.

FIGURE 17 : Comparaison de l'activation NF-AT pour les cellules parentales et les clones surexprimant la protéine p56dok mutée ou un clone surexprimant la protéine p56dok sauvage et un clone surexprimant la protéine p56dok mutée suite à une stimulation du récepteur CD2

Les cellules Jurkat surexprimant les protéine p56dok, p56dok muté ou le type parental J.77-6 furent transfectées de façon transitoire, tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes, et l'activité luciférase fut mesurée au luminomètre. Les expériences 20A et 20C sont exprimées en normalisant directement sur l'activité constitutive luciférase de la Renilla. Dans le cas des expériences 20B et 20D, l'activité fut normalisée en fonction de l'induction luciférase maximale obtenue par le traitement PMA/ionomycine. Ces expériences furent reproduites à deux reprises.

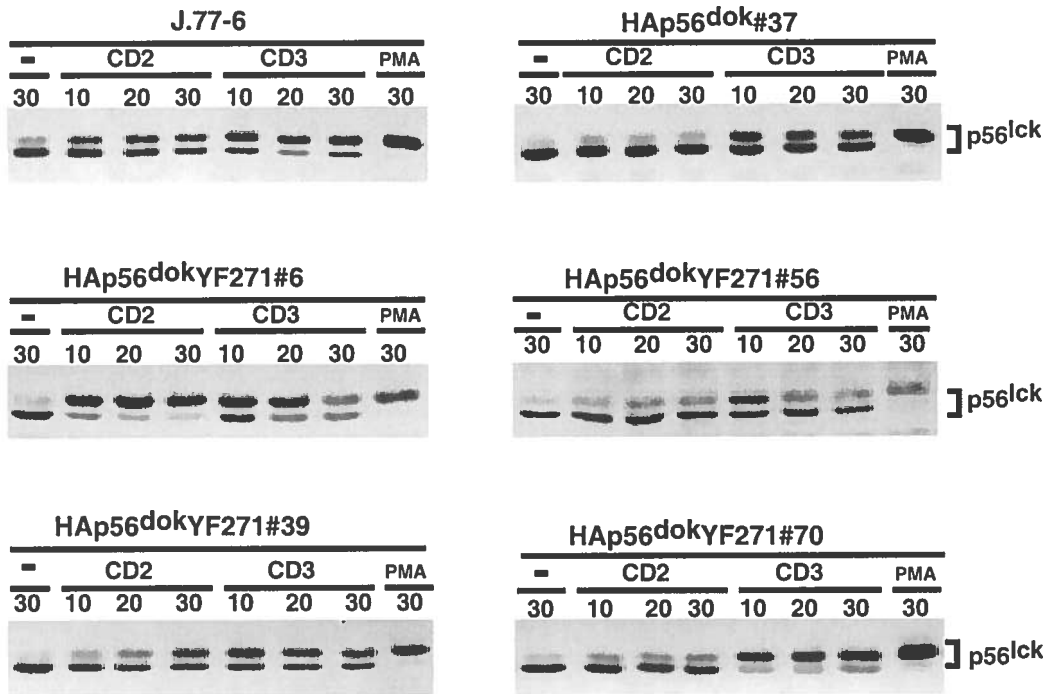


La surexpression de la protéine p56dok inhibe la conversion de la PTK lck et une mutation du résidu tyrosine 271 en permet la restauration.

Plusieurs groupes ont observé qu'il y avait un changement dans la mobilité électrophorétique de la PTK lck la faisant passer de 56 kDa à 60 kDa suite à une stimulation via le récepteur CD2 ou le complexe TCR/CD3 (Watts et al., 1993). Il fut démontré que c'est la phosphorylation du résidu sérine 59 de la PTK lck qui corrélait avec cette conversion (Watts et al., 1993). Plusieurs protéines semblent impliquées dans cette conversion dont la PKC et les MAPK ERK1 et ERK2 (Danielian et al., 1989). Nous nous sommes donc intéressés à la conversion de la PTK lck puisque nous observons un effet d'inhibition de l'activité MAPK dans les clones surexprimant la protéine p56dok ainsi qu'une restauration de cette activité dans les mutants pour le résidu tyrosine 271. Comme il est possible de le constater à la figure 18, après une stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3, il est possible d'observer une conversion de la PTK lck chez le type parental. Ce déplacement observé suite à une stimulation du récepteur CD2 est inhibé par la surexpression de la protéine p56dok sauvage. Il semble que le résidu tyrosine 271 soit impliqué dans ce changement. En effet, la mutation de ce résidu tyrosine à pour effet de restaurer la conversion de la PTK lck, cette conversion qui était inhibée par la surexpression de la protéine p56dok de type sauvage. Toutefois, nous ne pouvons affirmer que la mutation du résidu tyrosine 271 agit directement ou exclusivement sur la conversion de la protéine lck et donc, nous ne pouvons pas conclure que l'inhibition de l'activité des MAPK ERK1/2 est directement rattachée à cette conversion de la protéine lck. . Il est à noter que ces expériences furent effectuées en fin de projet et qu'elles n'ont pu être répétées pour confirmer tous les résultats présentés. Il se pourrait alors que les résultats plus faibles de la restauration de conversion de la protéine lck obtenus pour le clone HAp56dok YF271#70 soient dus à l'expérimentation. Nous nous serions attendus à obtenir le même type de restauration de la conversion de la protéine lck que celle obtenue pour le clone HAp56dok YF271 #6 car le niveau de surexpression de la protéine p56dok dans ces deux clones est très semblable.

FIGURE 18 : Effet de la surexpression des protéines p56dok et p56dok mutées, sur les résidus tyrosine, sur la conversion de la protéine p56lck

Les cellules de type parental J.77-6 et les clones qui surexpriment les protéines HAp56dok (HAp56dok#37) et HAp56dok mutée (HAp56dok YF271#6, YF271#56, YF271#39 et YF271#70) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) pour différents temps et les lysats protéiques obtenus furent révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine p56lck (anti-lck).



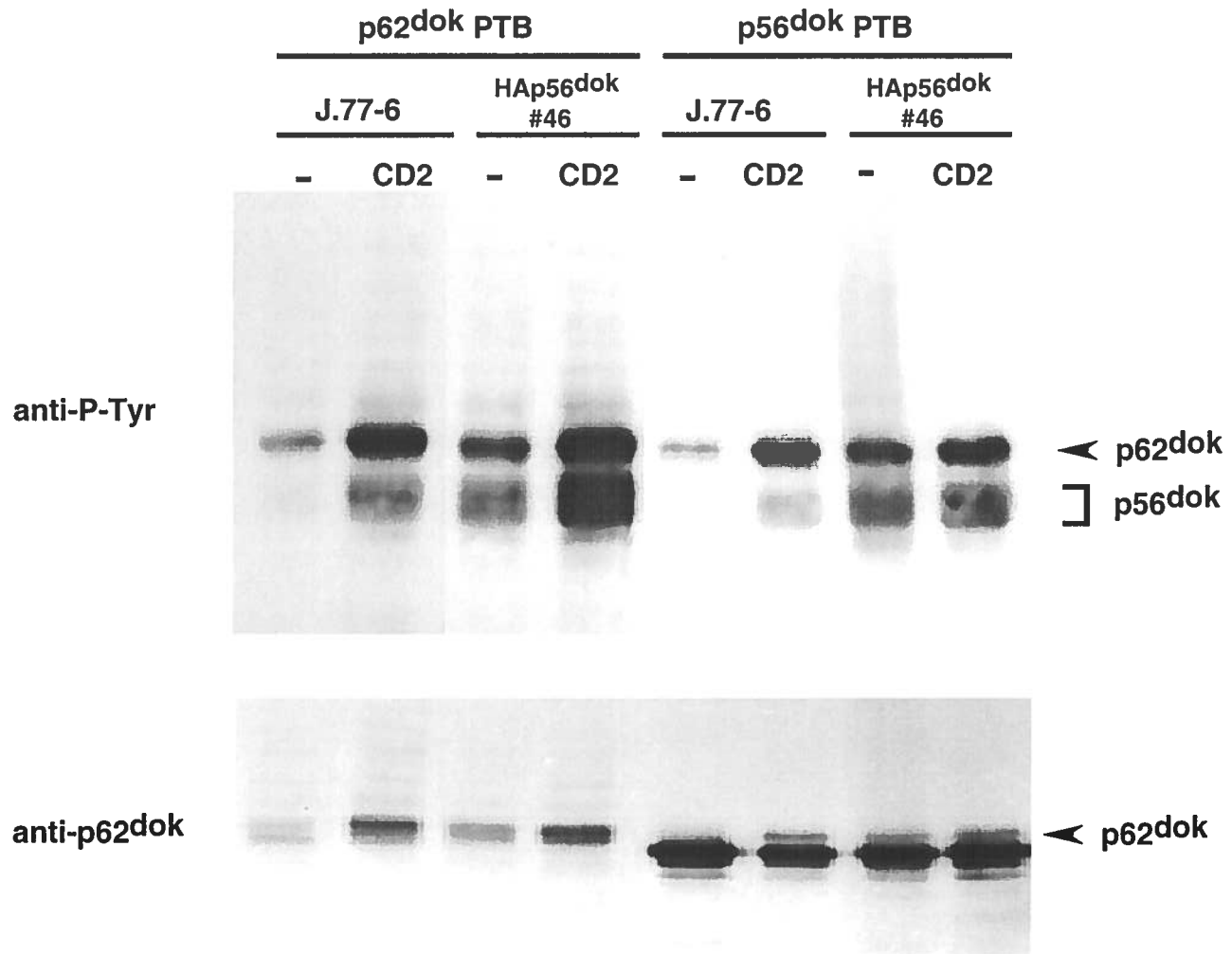
anti-lck

Formation d'interactions de type homodimère et hétérodimère via le domaine PTB des protéines p56dok et p62dok

Afin de déterminer avec quelles protéines la protéine p56dok était en mesure de s'associer, nous avons produit des protéines de fusion GST portant les domaines PTB ou C-terminal des protéines p56dok et p62dok. Nous avons, par la suite, réalisé des essais de liaison *in vitro*. Nous avons donc laissé sans stimulation ou stimulé via le récepteur CD2 les clones HAp56dok#37 (résultat non illustré) et HAp56dok#46 (figure 19), qui surexpriment la protéine p56dok, et nous les avons lysés pour en récolter les protéines solubles. Nous avons par la suite mis ces extraits de protéines totales en contact avec des billes couplées de façon covalente ou non aux différentes protéines de fusion produites (PTB ou C-terminal) et nous avons vérifié l'interaction protéine-protéine en effectuant une électrophorèse en gel de polyacrylamide 8% suivi d'un immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps anti-P-Tyr. La figure 19 démontre la présence de deux protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine, respectivement de 62 kDa et de 56 kDa, en mesure de lier le domaine PTB de la protéine p62dok ainsi que le domaine PTB de la protéine p56dok. La protéine de 62 kDa fut identifiée comme étant la protéine p62dok à l'aide de l'anticorps reconnaissant les acides aminés des résidus 425-439 de la protéine p62dok (anti-p62dok du Dr. Stillman). En ce qui concerne la protéine de 56 kDa, aucun anticorps n'était disponible pour déterminer l'identité de cette protéine puisque tous les anticorps qui reconnaissent la protéine p56dok furent produits au laboratoire et qu'ils ont été produits en immunisant des lapins avec la protéine de fusion GST. Ainsi, puisque les essais de liaison *in vitro* sont réalisés avec des protéines GST, il y aurait reconnaissance de la protéine GST par l'anticorps ce qui masquerait la reconnaissance d'autres protéines tel que la protéine p56dok. Cependant, suite à une stimulation CD2, il est possible d'observer une augmentation de phosphorylation de cette protéine de 56 kDa chez les clones surexprimant la protéine p56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) comparativement au type parental J.77-6. Ainsi, il est probable que cette protéine soit en effet la protéine p56dok. Pour ce qui est des protéines de fusion GST portant le domaine C-terminal des protéines p62dok et p56dok, aucune association de protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine ne fut détectée autant pour le type parental que

FIGURE 19 : Liaison de protéines par le domaine PTB des protéines p56dok et p62dok

Les cellules de type parental et du clone HAp56dok#46, qui surexpriment la protéine p56dok, furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) ou d'un anticorps anti-CD3 (UCHT1) et les extraits protéiques obtenus après stimulation furent mis en contact avec des billes glutathion-sépharose, tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes. L'immunobuvardage de type Western fut ensuite réalisé à l'aide d'un anticorps spécifique pour les résidus tyrosine (anti-P-Tyr (4G10)) et un second immunobuvardage fut effectué à l'aide de l'anticorps dirigé contre les résidus 425-439 de la protéine p62dok (anti-p62dok).



pour les clones surexprimant la protéine p56dok (HAp56dok#37 et HAp56dok#46) (résultats non illustrés). Ce résultat négatif ne signifie nullement que ce domaine ne permet aucune interaction protéique mais plutôt qu'aucune protéine phosphorylée sur des résidus tyrosine n'est en mesure de se lier à ce domaine.

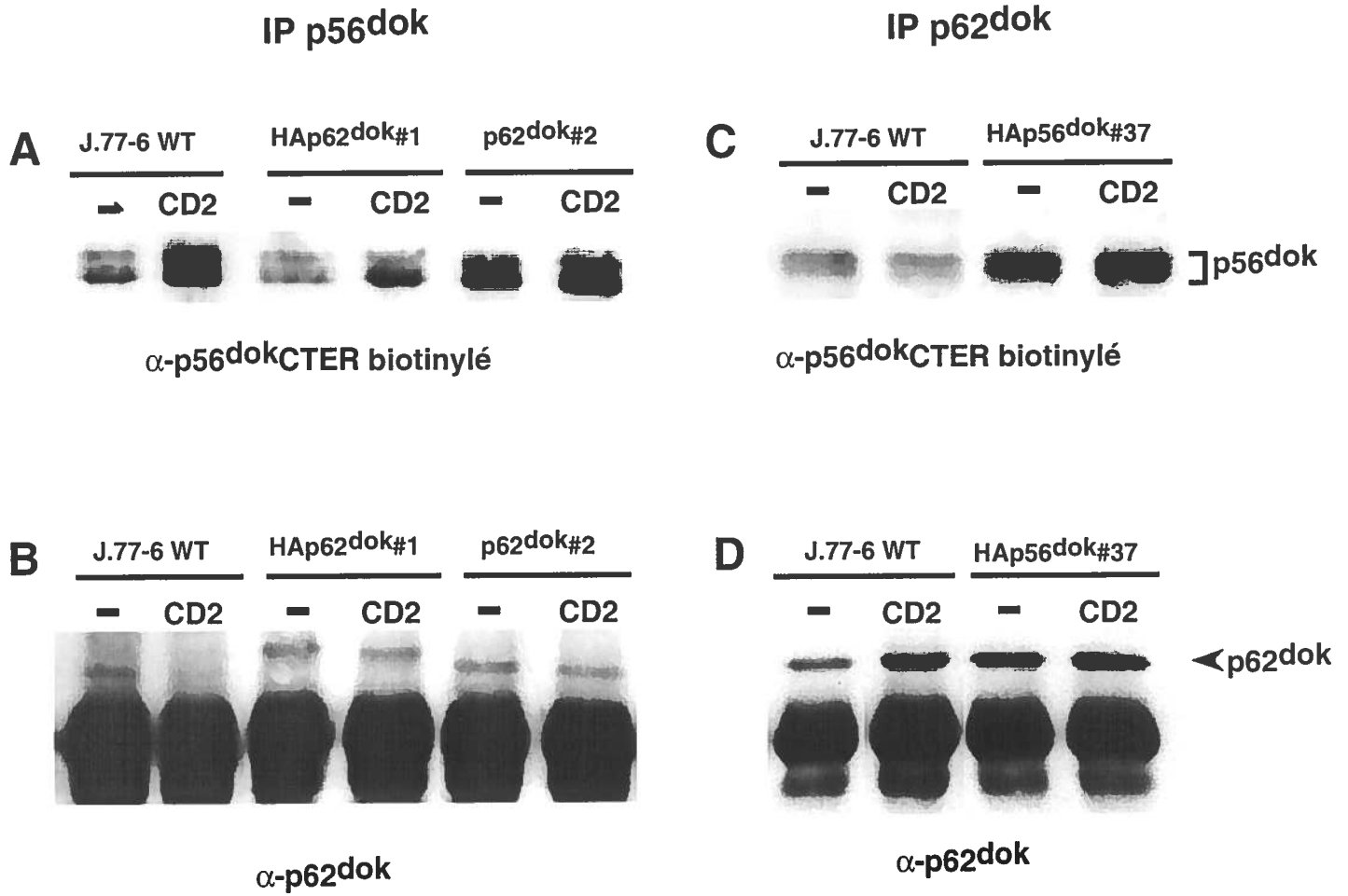
Tentative de confirmation des résultats d'associations homo- et hétérodimériques par des essais d'immunoprécipitation

Puisque nous étions en mesure d'observer des associations *in vitro* des protéines p62dok et p56dok avec le domaine PTB des protéines p56dok et p62dok en tant qu'homodimères (p56dok-p56dok ou p62dok-p62dok) et hétérodimères (p56dok-p62dok), nous avons voulu savoir s'il était possible d'observer ces associations dans la cellule. Nous avons testé sur la lignée parentale et les clones qui surexpriment la protéine p62dok si en immunoprécipitant la protéine p56dok nous pouvions déceler une association p56dok-p62dok (figure 20A et B). Inversement, nous avons testé sur la lignée parentale ainsi que les clones qui surexpriment la protéine p56dok si en immunoprécipitant la protéine p62dok nous pouvions révéler une association p62dok-p56dok (figure 20C et D). Nos résultats montrent que la protéine p62dok est associée à la protéine p56dok et inversement que la protéine p56dok est associée à la protéine p62dok (figure 20A et D). Tel qu'attendu, la quantité de la protéine p56dok associée à la protéine p62dok et la quantité de la protéine p62dok associée à la protéine p56dok était plus importante lorsque la protéine p56dok ou la protéine p62dok était retrouvée en plus grande quantité dans la cellule.

Par contre, nous avons été incapables de démontrer que la quantité de la protéine p56dok ou de la protéine p62dok associée à la protéine p62dok ou à la protéine p56dok variait si les protéines p62dok ou p56dok respectivement étaient exprimées en plus grande quantité dans la cellule. Nous avons alors posé l'hypothèse que les anticorps produits contre les protéines de fusion GST permettaient une réactivité croisée de la protéine p56dok avec la protéine p62dok et vice et versa. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé cette réactivité croisée par immunobuvardage de type Western à l'aide

FIGURE 20 : Liaison des protéines Dok entre elles chez les cellules surexprimant les protéines p56dok ou p62dok et les cellules de type parental

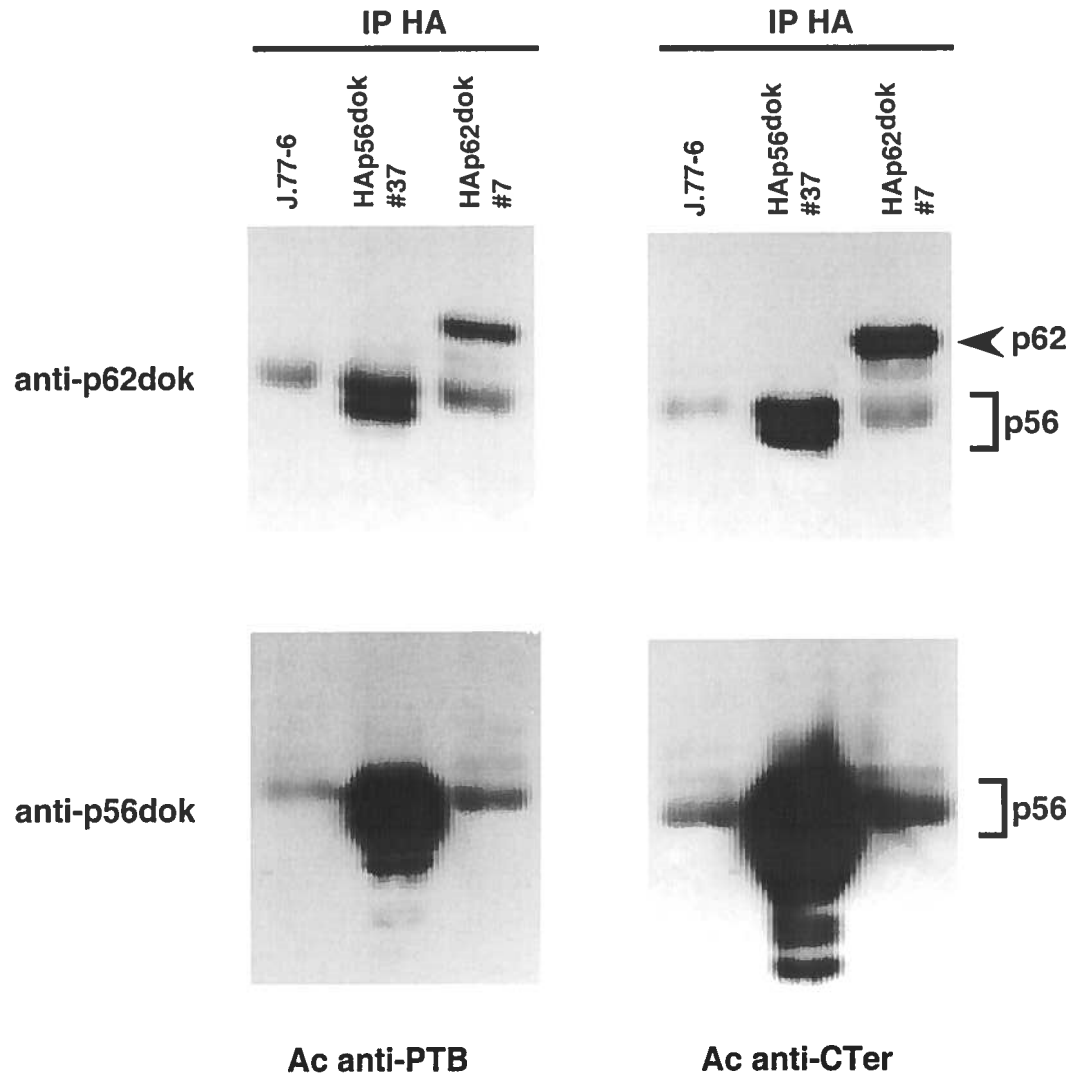
Les cellules de type parental J.77-6 et les clones qui surexpriment les protéines HAp56dok (HAp56dok#37) ou HAp62dok (HAp62dok#1 et p62dok#2) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) et les lysats protéiques obtenus après stimulation furent mis en contact avec des billes de protéine A couplées à des anticorps anti-p56dok Cter ou anti-p62dok CTer dirigés contre la portion C-Terminale de la protéine, tel que décrit dans le Matériel et Méthode. L'immunobuvardage de type Western fut réalisé à l'aide d'anticorps anti-p56dok Cter biotinylés dirigés contre la portion C-Terminal de la protéine p56dok et d'un anticorps dirigé contre les résidus 425-439 de la protéine p62dok (anti-p62dok).



d'un anticorps anti-HA, permettant la reconnaissance spécifique de l'épitope de reconnaissance ajouté aux protéines de fusion pour la transfection. Cette expérience fut réalisée avec tous les anticorps reconnaissant les domaines PTB et C-terminal des protéines p56dok et p62dok (figure 21). En réalisant une immunoprécipitation anti-HA, sur la lignée parentale (témoin négatif) et sur les clones surexprimant les protéines HAp56dok ou HAp62dok et en utilisant les anticorps produits nous avons pu montrer qu'effectivement les anticorps anti-p62dok PTB et C-terminal reconnaissent la protéine p56dok en plus de la protéine p62dok tel qu'il est possible de le constater pour le clone HAp56dok#37. Nous n'observons toutefois aucune réactivité croisée des anticorps anti-p56dok PTB et C-terminal. Cependant, le clone HAp62dok ciblé dans cette expérience n'exprimait qu'un faible niveau de la protéine p62dok. Il est donc possible qu'en présence d'un clone surexprimant un niveau plus élevé de la protéine p62dok, cette réactivité croisée des anticorps anti-p56dok envers la protéine p62dok soit également visible. En conclusion, nous devons générer des anticorps plus spécifiques pour pouvoir conclure sans ambiguïté que les associations entre les protéines p56dok et p62dok existent dans la cellule.

FIGURE 21 : Vérification, par immunoprécipitation, de la possibilité d'une réactivité croisée entre les anticorps produits à partir des protéines de fusion GST contre les protéines p56dok et p62dok

Les cellules de type parental J.77-6 et des clones qui surexpriment la protéine HAp56dok (HAp56dok#37) ou la protéine HAp62dok (HAp62dok#7) furent stimulés à l'aide d'anticorps anti-CD2 (T11-2 et T11-3) et les lysats protéiques obtenus furent mis en contact avec des billes de protéines G couplé à un anticorps anti-HA, tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. L'immunobuvardage fut effectué avec des anticorps anti-p56dok biotinylés dirigés contre la portion C-terminale ou PTB de la protéine p56dok ou des anticorps anti-p62dok dirigés contre la portion C-terminale ou PTB de la protéine p62dok.



DISCUSSION

Par la réalisation de ce projet, nous avons tout d'abord voulu connaître l'effet de la surexpression de la protéine p56dok sur la transduction des signaux suite à la stimulation de deux récepteurs, le complexe TCR/CD3 et le récepteur CD2. Pour ce faire, nous avons surexprimé la protéine p56dok dans la lignée cellulaire T Jurkat J.77-6 et nous avons démontré que cette surexpression de la protéine p56dok était en mesure d'inhiber la signalisation initiée après une stimulation du récepteur CD2. L'inhibition fut observée à différents niveaux tel que l'activation des MAPK ERK1/2 et l'activation du site NF-AT ce qui a eu des répercussions sur la sécrétion d'IL-2. Étant donné que des résultats similaires ont été obtenus chez des clones surexprimant la protéine p62dok, cela suggère que les protéines p62dok et p56dok agissent de la même façon sur les MAPK (Némorin et al., 2001). Une différence est cependant observable quant aux effets produits par la surexpression de ces deux protéines puisque la surexpression de la protéine p56dok n'affecte pas la mobilisation de calcium intracellulaire, contrairement à la surexpression de la protéine p62dok (Némorin et al., 2001). Comme pour la protéine p62dok, il est possible de dire, grâce aux résultats obtenus, que la protéine p56dok participe de manière sélective à la signalisation par le récepteur CD2 et non par le complexe TCR/CD3 (Némorin et al., 2001).

La voie menant à l'activation des MAPK ERK1/2 passe par la protéine Ras qui est négativement régulée par la protéine RasGAP dont le rôle est de stimuler la fonction GTPase intrinsèque de la protéine Ras (Trahey et McCormick, 1987; Downward, 1996). De plus, la protéine RasGAP se lie à la protéine p56dok phosphorylée sur les résidus tyrosine et donc, la protéine RasGAP représente un médiateur potentiel de l'effet négatif de la protéine p56dok dans la voie Ras/ERK1/2 (Di Cristofano et al., 1998; Nelms et al., 1998). En effet, l'inhibition d'activation des MAPK ERK1/2 suite à une stimulation du récepteur CD2 dans les clones qui surexpriment la protéine p56dok (HAp56dpk#37 et #46) semble reliée à un résidu tyrosine, au moins, de la portion C-Terminale de la protéine p56dok. En effet, par la mutation du résidu tyrosine 271 pour une phénylalanine, nous avons été en mesure de restaurer cette activation de la voie des MAPK ERK1/2. Ce résidu tyrosine, ainsi que le résidu tyrosine 299, ont préalablement été démontrés comme étant importants dans la liaison de la protéine RasGAP à la protéine p56dok et donc, il

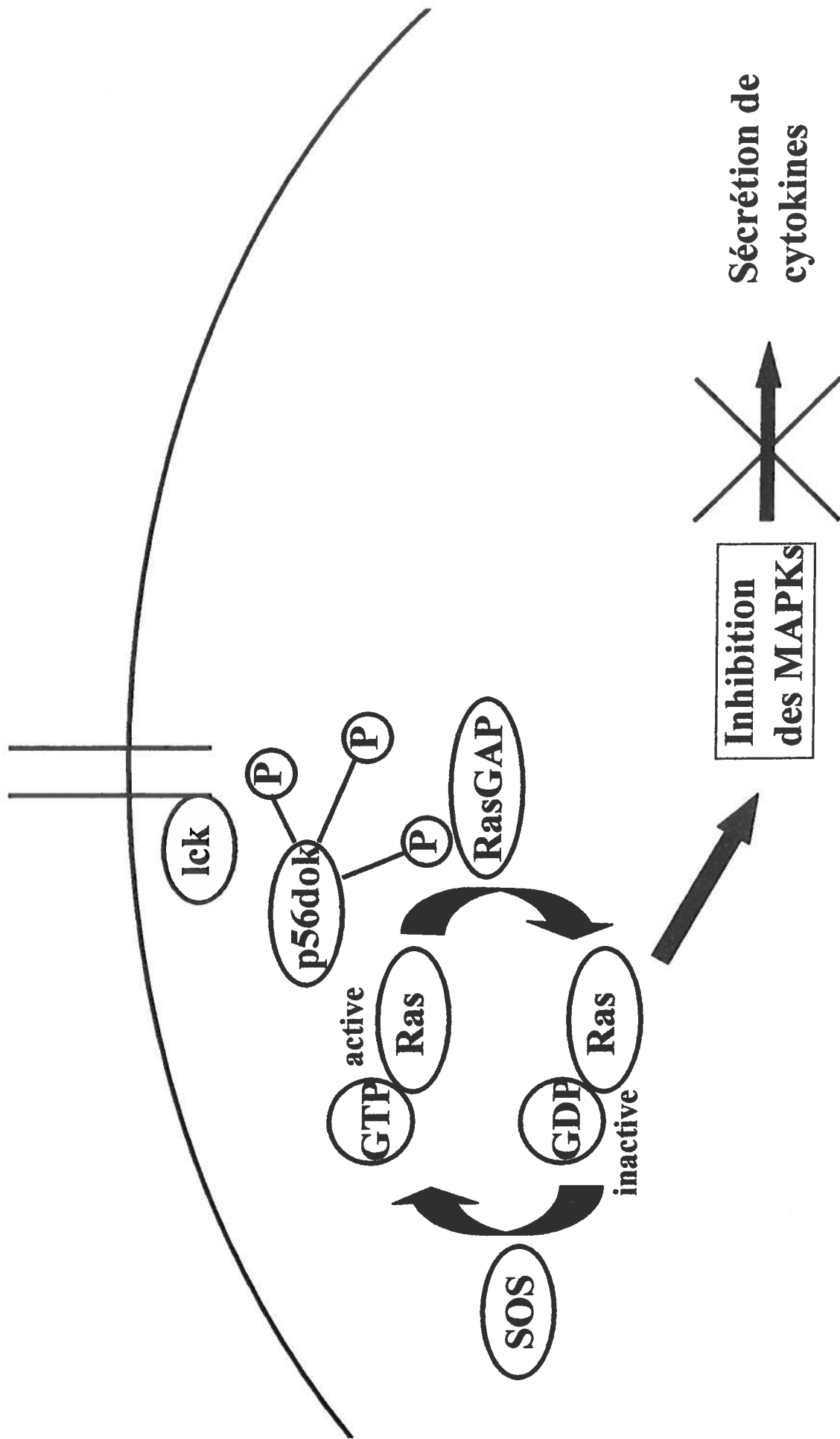
semblerait que lorsque ce résidu tyrosine 271 est muté, la protéine RasGAP n'est plus en mesure de lier la protéine p56dok et donc d'inhiber l'activation des MAPK ERK1/2 (Nelms et al., 1998).

Un modèle de régulation de l'activation de la voie Ras/ERK1/2 impliquant la protéine p56dok pourrait donc être le suivant : Après une stimulation de la cellule T via le récepteur CD2, les PTK tel que lck sont recrutées et activées. Elles pourront alors phosphoryler leurs substrats dont la protéine p56dok (Starus et al., 1992; Chu et al., 1998; Némorin et Duplay, 2001). La protéine p56dok, comme la protéine p62dok, transloquerait du cytoplasme à proximité de la membrane où elle serait phosphorylée (Némorin et al., 2001). C'est via l'interaction du domaine PH de la protéine p56dok avec la membrane que la protéine p56dok phosphorylée sur les résidus tyrosine pourrait positionner la protéine RasGAP à proximité de son substrat Ras-GTP qui se retrouve à proximité de la membrane (Izquierdo Pastor et al., 1995; Lemmon et al., 1996; Nelms et al., 1998; Songyang et al., 2001). L'hydrolyse de Ras-GTP (actif) en Ras-GDP (inactif), par l'activation de la fonction GTPase de la protéine Ras par GAP, inhiberait la signalisation passant par la voie Ras et donc, inactiverait tous les effecteurs situés en aval qui requièrent cette voie de signalisation (Trahey et al., 1987; Downward, 1996) (figure 22).

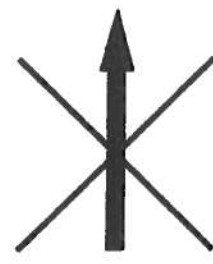
L'activation de NF-AT est également affectée par la surexpression de la protéine p56dok suite à une stimulation du récepteur CD2. Il semble étrange d'observer une telle inhibition de l'activation de NF-AT puisque la mobilisation de calcium n'est pas affectée et donc, que le facteur NF-ATc peut transloquer de façon normale au noyau et se lier au site NF-AT. Cependant, un autre facteur de transcription se lie au même site NF-AT pour initier la transcription du gène de l'IL-2. Ce facteur est le facteur AP-1 qui transloque au noyau suite à l'activation de la voie des MAPK (figure 2). Il y a donc une synergie de ces deux molécules (NF-AT et AP-1) et elles doivent être toutes deux induites pour activer le site NF-AT (Park et al., 1993; Rao et al., 1997; Macian et al., 2001). C'est donc par l'inhibition de la voie des MAPK et l'absence de liaison d'AP-1 au site NF-AT que nous attribuons cette inhibition de l'activation NF-AT. Conséquemment, nous observons également une inhibition de la sécrétion d'IL-2 qui est régulée par l'activation

FIGURE 22 : Modèle de signalisation chez le lymphocyte T impliquant la protéine p56dok comme régulateur négatif

CD2



Sécrétion de cytokines



Inhibition des MAPKs



concomitante des facteurs de transcription NF-AT et AP-1 (Macian et al., 2001). Cette régulation à la baisse de l'activation de NF-AT ainsi que de la production d'IL-2 peut être, une fois de plus, renversée par la mutation du résidu tyrosine 271 de la région carboxy-terminale. En effet, puisque la mutation de ce résidu tyrosine ne permet plus la liaison de la protéine RasGAP à ce site et qu'il n'y a plus d'inhibition de la voie Ras/MAPK, le facteur AP-1 peut transloquer au noyau. Ainsi, ce facteur pourra se lier au site NF-AT, à proximité du site de liaison du facteur NF-AT, ce qui permettra l'activation de la transcription du gène de l'IL-2. Par contre, nous ne sommes toujours pas en mesure d'observer ce phénomène par la mutation du résidu tyrosine 402 puisque cette dernière ne permet pas de restaurer l'activation de la voie Ras/MAPK. Comme NF-AT est un effecteur en aval de cette voie, il ne sera pas non plus activé en absence du facteur AP-1 et ne pourra initier la transcription du gène de l'IL-2.

Finalement, nous avons voulu savoir si la surexpression de la protéine p56dok et de la protéine p56dok mutée avait un impact sur la conversion de lck. Le mécanisme proposé pour expliquer cette conversion pourrait être le suivant suivant. Dans le modèle de transduction des signaux des cellules T, l'activation de la PLC γ génère du DAG qui permet l'activation de la PKC qui, à son tour, a un effet sur l'activation des MAPK ERK1 et ERK2. De plus, il fut démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* que les MAPK ERK1 et ERK2 permettaient la phosphorylation du résidu sérine 59 de la PTK lck (Watts et al., 1993; Schröder et al., 2000). Aussi, il a été suggéré que la PKC pourrait agir directement sur la PTK lck (Schröder et al., 2000). Ainsi, il semble qu'à la fois la PKC et les MAPK soient essentielles mais insuffisantes individuellement pour permettre la conversion (Schröder et al., 2000). Nous avons pu observer que la surexpression de la protéine p56dok sauvage interférait avec la conversion de la PTK lck ce qui concorde avec le résultat d'inhibition de la voie des MAPK obtenu précédemment. En ce qui concerne les clones surexprimant la protéine p56dok mutée pour le résidu tyrosine 271, nous pouvons observer une restauration de la conversion de lck ce qui concorde une fois de plus avec la restauration de la voie des MAPK pour les clones qui portent cette mutation. Pour ce qui est des clones qui surexpriment la protéine p56dok mutée pour le résidu tyrosine 402, les

résultats restent à vérifier. Il est cependant à noter qu'il ne s'agit que de résultats préliminaires.

Dans la seconde partie de cette maîtrise, nous nous sommes attardés à identifier des protéines ayant la possibilité d'interagir avec la protéine p56dok, mais seulement pour des portions particulières de la protéine. Puisque nous savions que le domaine PTB permettait la liaison de protéines possédant des résidus tyrosine phosphorylés et que le domaine carboxy-terminal présentait plusieurs résidus tyrosine susceptibles de lier des domaines SH2, nous avons construit des protéines de fusion GST comportant ces domaines. Nous avons, en premier lieu, voulu connaître les protéines phosphorylées sur les résidus tyrosine qui étaient en mesure de se lier à ces domaines. Nous avons alors découvert la présence d'interactions de type homodimère et hétérodimère pour les protéines p56dok et p62dok via leur domaine PTB. L'interaction homodimérique p62dok-p62dok avait également été découverte assez récemment par Songyang et al. Et elle implique le motif consensus Y/MXXNXLpY qui se trouve autour du résidu tyrosine 146 de la portion N-terminale de la protéine (Songyang et al., 2001). Notre résultat vient confirmer cette interaction via le domaine PTB cependant, nous n'avons pas déterminé les résidus responsables de l'interaction en question. D'autres expériences devront être effectuées afin d'identifier les résidus nécessaires à ces interactions. Il est cependant possible de spéculer que le résidu tyrosine 139 de la portion N-terminale, représentant l'équivalent de la tyrosine 146 de la protéine p62dok chez la protéine p56dok, ainsi qu'un motif semblable au motif consensus du domaine PTB de la protéine p62dok seront impliqués dans ces liaisons (Di Cristofano et al., 1998; Nelms et al., 1998).

En ce qui concerne les protéines de fusion portant le domaine C-terminal, aucune protéine phosphorylée sur des résidus tyrosine ne fut détectée. Ce résultat n'indique en rien que le domaine carboxy-terminal ne peut se lier à aucune protéine par contre, aucune d'entre elles ne semble phosphorylée sur des résidus tyrosine. La technique de culture des cellules en présence de méthionine ³⁵S nous aurait sûrement permis d'observer des interactions impliquant des protéines qui sont en mesure d'interagir avec ce domaine. Nos protéines de fusion comportant le domaine C-terminal phosphorylé sur les résidus

tyrosine auraient également pu être testées selon cette approche. Aucun résultat avec ces protéines de fusion n'est présenté dans ce mémoire.

CONCLUSION

Le but de ce projet était tout d'abord d'évaluer l'impact de la protéine p56dok dans la signalisation du lymphocyte T après la stimulation du récepteur CD2 ou du complexe TCR/CD3. Ensuite, nous désirions établir les différences et ressemblances avec la protéine p62dok, protéine ayant préalablement été étudiée au laboratoire.

Les résultats obtenus nous ont indiqués que la protéine p56dok agissait de façon similaire à la protéine p62dok puisqu'elle régule de manière négative la signalisation dans le lymphocyte T suite à une stimulation du récepteur CD2. En effet, il fut possible d'observer une inhibition de l'activation des MAPK ERK1/2, de l'activation NF-AT et donc, de la production d'IL-2, par la surexpression de la forme sauvage de la protéine p56dok, tel qu'obtenu pour la protéine p62dok. Une différence est toutefois observable quant à la signalisation impliquant ces deux molécules puisque la protéine p56dok n'affecte pas la mobilisation de calcium intracellulaire, contrairement à ce qui fut constaté pour la protéine p62dok. De plus, un des résidus tyrosine impliqué dans cette inhibition est le résidu tyrosine 271 puisqu'en le mutant, nous avons pu obtenir une restauration de la signalisation passant par la voie Ras/MAPK. Ce résidu qui lorsque phosphorylé permet habituellement la liaison de la protéine RasGAP et donc l'hydrolyse de Ras-GTP en Ras-GDP n'est plus en mesure d'exercer cette liaison et donc, l'inhibition n'est plus observée. Il est à noter qu'un autre résidu tyrosine permettant la liaison de la protéine RasGAP, le résidu tyrosine 299, n'a pas été muté. Ce résidu pourrait également jouer un rôle dans l'inhibition des mêmes voies de signalisation que le résidu tyrosine 271. La mutation du résidu tyrosine 402, site candidat pour la liaison à Ick, ne produit, pour sa part, aucune restauration de l'activité signalitique. De plus, il semble que les domaines PTB soient requis pour les fonctions, du moins certaines, des protéines p56dok et p62dok puisque la formation d'homodimère et d'hétérodimère fut observée via ces domaines.

Ces différents résultats ont, d'une part, permis de connaître des implications fonctionnelles associées à ce second membre de la famille Dok puisque peu d'informations étaient disponibles à ce sujet chez le lymphocyte T suite aux stimulations du récepteur CD2 et du complexe TCR/CD3. D'autre part, certains domaines et résidus

très précis furent également identifiés comme étant nécessaires aux fonctions de la protéine. Aussi, la formation d'homo- et d'hétérodimères ouvre la porte à la formation de méga complexes protéiques où les protéines p56dok et p62dok agiraient comme plateforme de regroupement de protéines facilitant ainsi leurs interactions avec d'autres protéines d'importance dans la signalisation. Finalement, nous pouvons constater un phénomène de redondance dans la fonction de la protéine p56dok avec un autre membre de cette même famille, la protéine p62dok. Il serait envisageable de croire que l'absence de ces protéines pourrait être néfaste pour la cellule puisque suite à son activation via le récepteur CD2, la cellule posséderait un mécanisme de régulation négative en moins pour inhiber la sécrétion d'IL-2, un médiateur de l'inflammation qui active l'ensemble des cellules du système lymphocytaire (lymphocytes B, lymphocytes T et cellules NK).

Une multitude d'expériences pourraient être effectuées pour approfondir ce travail en particulier au niveau des interactions protéiques et de la formation d'homodimères et d'hétérodimères entre autres par la mutation du résidu tyrosine 139 ainsi que par l'utilisation des protéines de fusion. Ces diverses interactions nous permettraient de mettre au point un modèle plus complet qui nous aiderait à mieux comprendre les événements de signalisation qui se succèdent après une activation du lymphocyte T ainsi que les mécanismes de rétroaction. La réalisation d'autres mutations sur les résidus tyrosine de liaison à RasGAP (Y299) ou de liaison au site potentiel de liaison de lck (Y330) pourraient nous permettre de savoir si d'autres résidus tyrosine participent à l'inhibition de la signalisation produite par la protéine p56dok. Des doubles, triples ou quadruples mutations pour ces résidus tyrosine pourraient également nous donner une idée des effets additifs ou non produits par ces différents résidus sur la fonction de la protéine. Aussi, la localisation de la protéine p56dok dans la cellule suite à une activation via les récepteurs à l'étude pourrait nous aider à valider le modèle préalablement proposer. Cela pourrait nous indiquer le déplacement des protéines p56dok avant, pendant et après une activation. Pour ce faire, des essais de fractionnement cellulaire ainsi que des marquages des protéines p56dok à la GFP pourraient être réalisés.

RÉFÉRENCES

Alcover, A., Alberini, C., Acuto, O., Clayton, L.K., Transy, C., Spagnoli, G.C., Moingeon, P., Lopez, P. & Reinherz, E.L. Interdependence of CD3-Ti and CD2 pathways in human T lymphocytes. *EMBO J.* **7**, 1973-1977 (1988).

Amrein, K.E., Flint, N., Panholzer, B. & Burn, P. Ras GTPase-activating protein : a substrate and a potential binding protein of the protein-tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3343-3346 (1992).

Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T. & Sugamura, K. Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J. Exp. Med.* **189**, 1383-1390 (1999).

Bedi, A., Zehnbauser, B.A., Barber, J.P., Sharkis, S.J. & Jones, R.J. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* **83**, 2038-2044 (1994).
Berg, K.L., Siminovitch, K.A. & Stanley, E.R. SHP-1 regulation of p62^{dok} tyrosine phosphorylation in macrophages. *J. Biol. Chem.* **274**, 35855-35865 (1999).

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

Boerth, N.J., Sadler, J.J., Bauer, D.E., Clements, J.L., Gheith, S.M. & Koretzky, G.A. Recruitment of SLP-76 to the membrane of glycolipid-enriched membrane microdomains replaces the requirement for linker for activation of T cells in T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **192**, 1047-1058 (2000).

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

Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathway. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 259-274 (1996).

Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B. & Clarkson, B. p62^{dok}: a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitors cells. *Cell* **88**, 197-204 (1997).

Catipovic, B., Schneck, J.P., Brummet, M.E., Marsh, D.G. & Rafnar, T. Csk is constitutively associated with a 60-kDa tyrosine-phosphorylated protein in human T cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 9698-9703 (1996).

Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R. & Kurosaki, T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* **14**, 2499-2508 (1995).

Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W. & Weiss, A. Zap-70, a 70 kDa protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-662 (1992).

Chu, D.H., Morita, C.T. & Weiss, A. The Syk family of protein tyrosine kinase in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**, 167-180 (1998).

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

Coffer, P.J., Jin, J. & Woodgett, J.R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* **335**, 1-13 (1998).

Cong, F., Yuan, B. & Goff, S.P. Characterization of a novel member of the Dok family that binds and modulates Abl signaling. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8314-8325 (1999).

Cooper, J.A. & Howell, B. The when and how of Src regulation. *Cell* **73**, 1051-1054 (1993).

Crabtree, G.R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611-614 (1999).

Danielian, S., Fagard, R., Alcover, A., Acuto, O. & Fischer, S. The lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56lck is hyperphosphorylated on serine and tyrosine residues within minutes after activation via T cell receptor or CD2. *Eur. J. Immunol.* **142**, 2430-2437 (1989).

Dankort, D., Jeybala, N., Jones, N., Dumont, D.J. & Muller, W.J. Multiple ErbB-2/Neu phosphorylation sites mediate transformation through distinct effector proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 38921-38928 (2001).

Davis, S.J., Ikemizu, S., Wild, M.K. & van der Merwe, P.A. CD2 and the nature of protein interactions mediating cell-cell recognition. *Immunol. Rev.* **163**, 217-236 (1998).

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

Di Cristofano, A., Niki, M., Zhao, M., Karnell, F.G., Clarkson, B., Pear, W.S., Van Aelst, L. & Pandolfi, P.P. p62^{dok}, a negative regulator of Ras and mitogen-activated

protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210^{bcr-abl}. *J. Exp. Med.* **194**, 275-284 (2001).

Downward, J. Control of ras activation. *Cancer Surv.* **27**, 87-100 (1996).

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

Duplay, P., Thome, M., Herve, F. & Acuto, O. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* **179**, 1163-1172 (1994).

Ellis, C., Liu, X.G., Anderson, D., Abraham, N., Veillette, A. & Pawson, T. Tyrosine phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins in lymphoid and fibroblast cells expressing lck. *Oncogene* **6**, 895-901 (1991).

Ellis, C., Moran, M., McCormick, F. & Pawson, T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated protein by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* **343**, 377-380 (1990).

Evavold, B.D., Williams, S.G., Hsu, B.L., Buus, S. & Allen, P.M. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell Hybridomas. *J. Immunol.* **48**, 347 (1992).

Fukai, I., Hussey, R.E., Sunder-Plassmann, R. & Reinherz, E.L. A critical role for p59(fyn) in CD2-based signal transduction. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3507-3515 (2000).

Galisteo, M.L., Chernoff, J., Su, Y.C., Skolnik, E.Y. & Schlessinger, J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J. Biol. Chem.* **27**, 20997-21000 (1996).

Genot, E. & Cantrell, D. Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 289-2894 (2000).

Genot, E., Cleverley, S., Henning, S. & Cantrell, D. Multiple p21ras effector pathway regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J.* **15**, 3923-3933 (1996).

Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., Takahashi, H. & al., e. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide releasing factor C3G. *Molec. Cell. Biol.* **15**, 6746-6753 (1995).

Graves, J.D., Downward, J., Rayter, S., Warne, P., Tutt, A.L., Glennie, M. & Cantrell, D.A. CD2 antigen mediated activation of the guanine nucleotide binding proteins p21ras in human T lymphocytes. *J. Immunol.* **146**, 3709-3712 (1991).

Grimm, J., Sachs, M., Britsch, S., Di Cesare, S., Schwarz-Romond, T., Alitalo, K. & Birchmeier, W. 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**, 345-354 (2001).

Hardy, C. & Chaudhri, G. Activation and signal transduction via mitogen-activated protein (MAP) kinases in T Lymphocytes. *Immunol. and Cell Biol.* **75**, 528-545 (1997).

Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. & fesik, S.W. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**, 168-170 (1994).

Harriague, J., Debré, P., Bismuth, G. & Hubert, P. Priming of CD2-induced p62dok tyrosine phosphorylation by CD3 in Jurkat T cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3319-3328 (2000).

Henning, S.W. & Cantrell, D.A. GTPases in antigen receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 322-329 (1998).

Howard, F.D., Moingeon, P., Moebius, U., McConkey, D.J., Yandava, B., Gennert, T.E. & Reinherz, E.L. The CD3 ζ Cytoplasmic Domain Mediates CD2-induced T Cell Activation. *J. Exp. Med.* **176**, 139-145 (1992).

Hubert, P., Debre, P., Bousmell, L. & Bismuth, G. Tyrosine phosphorylation and association with phospholipase C gamma-1 of the GAP-associated 62-kD protein after CD2 stimulation of Jurkat T cell. *J. Exp. Med.* **178**, 1587-1596 (1993).

Innocenti, M., Tenca, P., Frittoli, E., Faretta, M., Tocchetti, A., Di Fiore, P.P. & Scita, G. Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac. *J. Cell. Biol.* **156**, 125-136 (2002).

Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C. & Weiss, A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**, 1136-1139 (1994).

Izquierdo Pastor, M. Reif, K. & Cantrell, D. The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**, 159-164 (1995).

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

Jones, N. & Dumont, D.J. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. *Oncogene* **17**, 1097-1106 (1998).

June, C.H., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A. & Samelson, L.E. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* **144**, 1591-1599 (1990).

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

Kashige, N., Carpino, N. & Kobayashi, R. Tyrosine phosphorylation of p62^{dok} by p210^{bcr-abl} inhibits RasGAP activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2093-2098 (2000).

Klasen, S. Pages, F., Peyron, J.F., Cantrell, D.A. & Olive, D. Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein. *Int. Immunol.* **10**, 481-489 (1998).

Kumar, G., Wang, S., Gupta, S. & Nel, A. The membrane immunoglobulin receptor utilize a Shc/Grb2/hSOS complex for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in B-cell line. *Biochem. J.* **307**, 215-223 (1995).

Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F. & al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421 (1992).

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

Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. & Schlessinger, J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**, 621-624 (1996).

Ley, S.C., Davies, A.A., Druker, B. & Crumpton, M.J. 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**, 2203-2209 (1991).

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

Liu, Q., Oliviera-Dos-Santos, A.J., Mariathasan, S., Bouchard, D., Jones, J., Sarao, R., Kozieradzki, I., Ohashi, P.S., Penninger, J.M. & Dumont, D.J. The inositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *J. Exp. Med.* **188**, 1333-1342 (1998).

Liu, S.K., Fang, N., Koretzky, G.A. & McGlade, C.J. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with SLP-76 and LAT adaptors. *Curr. Biol.* **9**, 67-75 (1999).

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

Luton, F., Legendre, V., Gorvel, J.P., Schmitt-Velhulst, A.M. & Boyer, C. Tyrosine and serin kinase activities associated with ligand-induced internalized TCR/CD3 complexes. *J. Immunol.* **158**, 3140-3147 (1997).

Maa, M.C., Leu, T.H., Trandel, B.J., Chang, J.H. & Parsons S.J. A protein that is related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholypase *Cy*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5466-5473 (1994).

Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. & Rao, A. Partners in transcription: NF-AT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489 (2001).

Martelli, M.P., Boomer, J., Bu, M. & Bierer, B.E. T cell regulation of p62dok (dok1) association with Crk-L. *J. Biol. Chem.* **276**, 45654-45661 (2001).

Mayer, B.J. & Baltimore, D. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2883-2894 (1994).

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

Moingeon, P., Chang, H.C., Wallner, B.P., Stebbins, C., Frey, A.Z. & Reinherz, E.L. CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocytes antigen recognition function. *Nature* **339**, 312-314 (1989).

Moingeon, P., Lucich, J.L., McConkey, D.J., Letourneur, F., Malissen, B., Kochan, J., Chang, H., Rodewald, H. & Reinherz, E.L. CD3 ζ dependence of the CD2 pathway of activation in T Lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1492-1496 (1992).

Moran, M.F., Polakis, P., McCormick, F., Pawson, T. & Ellis, C. Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21^{ras} GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1804-1812 (1991).

Murakami, H., Iwashita, T., Asai, N., Shimono, Y., Iwata, Y., Kawai, K. & Takahashi, M. Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase activity and high phosphorylation state of its downstream signalling molecules mediated by Ret with the MEN 2B mutation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **262**, 68-75 (1999).

Neet, K. & Hunter, T. 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**, 4908-4920 (1995).

Nelms, K., Snow, A.L., Hu-Li, J. & Paul, W.E. FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* **9**, 13-24 (1998).

Némorin, J. & Duplay, P. Evidence that Lck-mediated phosphorylation of p56^{dok} and p62^{dok} may play a role in CD2 signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 14590-14597 (2001).

Némorin, J., Laporte, P., Bérubé, G. & Duplay, P. p62^{dok} negatively regulates CD2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* **166**, 4408-4415 (2001).

Nogushi, T., Matozaki, T., Inagaki, K., Tsuda, M., Fukunaga, K., Kitamura, Y., Kitamura, T., Shii, K., Yamanashi, Y. & Kasuga, M. Tyrosine phosphorylation of p62^{dok} induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *EMBO J.* **18**, 1748-1760 (1999).

Nunes, J.A., Truneh, A., Olive, D. & Cantrell, D.A. Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules. *J. Biol. Chem.* **271**, 1591-1598 (1996).

Pantaleo, G., Olive, D., Poggi, A., Kozumbo, W.J., Moretta, L. & Moretta, A. Transmembrane signaling via the T11-dependant pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and the inositol phosphates. *Eur. J. Immunol.* **17**, 55-60 (1987).

Park, J.H. & Levitt, L. Overexpression of mitogen-activated protein kinase (ERK1) enhances T-cell cytokine gene expression: Role of AP1, NF-AT, and NK-KB. *Blood* **82**, 2470-2477 (1993).

Pawson, T. Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**, 573-579 (1995).

Raab, M., Da Silva, A.J., Findell, P.R. & Rudd, C.E. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**, 155-164 (1997).

Rao, A., Luo, C. & Hogan, P.G. Transcription factor of the NF-AT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747 (1997).

Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. & Baltimore, D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161 (1993).

Reth, M. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-384 (1989).

Samelson, L.E., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A. & June, C.H. Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J. Immunol.* **145**, 2448-2454 (1990).

Sasaoka, T., Langlois, W.J., Leitner, J.W., Draznin, B. & Olefsky, J.M. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J. Biol. Chem.* **269**, 32621-32625 (1994).

Schaeffer, E.M., Debnath, J., Yap, G., McVicar, D., Liao, X.C., Littman, D.R., Sher, A., Varmus, H.E., Lenardo, M.J. & Schwartzberg, P.L. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science* **284**, 638-641 (1999).

Scharenberg, A.M. & Kinet, J.P. PtdIns-3,4,5-P₃ : a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* **94**, 5-8 (1998).

Schlessinger, J. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 25-30 (1994).

Schröder, A.J., Quehl, P., Müller, J. & Samstag, Y. Conversion of p56lck to p60lck in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinase in vivo. *Eur. J. Immunol.* **30**, 635-643 (2000).

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

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

Songyang, Z., Yamanashi, Y., Liu, D. & Baltimore, D. Domain dependent function of the rasGAP binding protein p62Dok in cell signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 2459-2465 (2001).

Starus, D.B. & Weiss, A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**, 585-593 (1992).

Suzu, S., Tanaka-Douzono, M., Nomagushi, K., Yamada, M., Hayasawa, H., Kimura, F. & Motoyoshi, K. p56^{dok-2} as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction. *EMBO J.* **19**, 5114-5122 (2000).

Tamir, I., Stolpa, J.C., Helgason, C.D., Nakamura, K., Bruhns, P., Daeron, M. & Cambier, J.C. The RasGAP-binding protein p62^{dok} is a mediator of inhibitory FC γ RIIB signals in B cells. *Immunity* **12**, 347-358 (2000).

Tordai, A., Franklin, R.A., Patel, H., Gardner, A.M., Johnson, G.L. & Gelfand, E.W. Cross-linking of surface IgM stimulates the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem* **269**, 7538-7543 (1994).

Trahey, M. & McCormick, F. A. Cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**, 542-545 (1987).

Tridandapani, S., Kelley, T., Cooney, D., Pradhan, M. & Coggeshall, K.M. Negative signaling in B cells : SHIP Grbs Shc. *Immunol. Today* **18**, 424-427 (1997).

Tridandapani, S., Kelley, T., Pradhan, M., Cooney, D., Justement, L.B. & Coggeshall, K.M. Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell FC γ Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4305-4311 (1997).

van Dijk, T.B., van der Akker, E., Parren-van Amelsvoort, M., Mano, H., Löwenberg, B. & von Lindern, M. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietics cells. *Blood* **96**, 3406-3413 (2000).

Van Leeuwen, J.E. & Samelson, L.E. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 242-248 (1999).

Verhagen, A.M., Schraven, B., Wild, M., Wallich, R. & Meuer, S.C. Differential interaction of the CD2 extracellular and intracellular domains with the tyrosine phosphatase CD45 and the zeta chain of the TCR/CD3/zeta complex. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2841-2849 (1996).

Vuica, M., Desideri, S. & Schneck, J. Differential effects of B cell receptor and B cell receptor-FC γ RIIB1 engagement on docking of Csk to GTPase-activating protein (GAP)-associated p62. *J. Exp. Med.* **186**, 259-267 (1997).

Watts, J.D., Sanghera, J.S., Pelech, S.L. & Aebersold, R. Phosphorylation of serine 59 of p56lck in activated T cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 23275-23282 (1993).

Whitmarsh, A.J., Yang, S., Su, M.S.S, Sharrocks, A.D., Davis, R.J. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complexes factors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2360-2371 (1997).

Wick, M.J., Dong, L.Q., Hu, D., Langlais, P. & Liu, F. Insulin receptor-mediated p62^{dok} tyrosine phosphorylation at residues 362 and 398 plays distinct roles for

binding GAP and Nck and is essential for inhibiting insulin-stimulated activation of Ras and Akt. *J. Biol. Chem.* **276**, 42843-42850 (2001).

Wong, J., Straus, D. & Chan, A.C. Genetic evidence of a role for Lck in T-cell receptor function independent or downstream of Zap-70/Syk protein tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2855-2866 (1998).

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

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

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

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. & Samelson, L.E. LAT : the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92 (1998).

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