



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER
CSIC-UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

NUEVOS MECANISMOS REGULADORES DE LA ACTIVACIÓN Y FUNCIONES EFECTORAS DE LA ONCOPROTEÍNA Vav1 EN LINFOCITOS

TESIS DOCTORAL

MARÍA BARREIRA GONZÁLEZ

Salamanca, 2013



El **Dr. XOSÉ RAMÓN GARCÍA BUSTELO**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis titulado **“Nuevos mecanismos reguladores de la activación y funciones efectoras de la oncoproteína Vav1 en linfocitos”**, presentado por **Dña. MARÍA BARREIRA GONZÁLEZ** para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo mi dirección en el Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL). Considerando que cumple con las condiciones necesarias, autorizo su presentación a fin que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 17 de Junio de 2013.

Fdo. Dr. Xosé Ramón García Bustelo

Este trabajo de tesis ha sido financiado por:

- Una beca JAE-predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2008-2011).
- Programa de Biomedicina del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-01789) (2006-2009).
- 7º Programa Marco de la UE, Tema 1 (Health-2007-2.4.1-6). MetaFight (FP7-HEALTH-2007-A-201862) (2008-2010).
- Ayudas a Grupos de Investigación de Excelencia de Castilla y León. Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (2008-2010).
- Role of Vav family proteins in cell signaling and cancer. RO1 (5RO1CA73735). National Cancer Institute (NIH) (2005-2011).
- Programa de Biomedicina del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-07172) (2010-2012).
- Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer (RD06/0020/001). Proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III (2007-2012).
- Ayudas para la realización de proyectos de Investigación (Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental No Orientada). Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-31371) (2013-2015).
- Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer (RD12/0036/0002). Proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III (2013-2016).

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

Marja Skłodowska (Marie Curie)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. LA PROTEÍNA Vav1	3
1.1. Estructura de la proteína Vav1	5
1.2. Expresión tisular	6
1.3. Función biológica	6
1.4. Regulación de su actividad biológica	8
1.4.1. Fosforilación en tirosinas	8
1.4.2. Interacciones proteína-proteína	12
1.4.3. Localización subcelular	20
1.4.4. Otros mecanismos de regulación postraduccional	20
1.4.5. Efectos de algunos medicamentos	20
1.4.6. Estados patológicos	21
2. LA PROTEÍNA Vav1 EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS	23
2.1. Análisis genético de la proteína Vav1	23
2.1.1. Linfocitos T	23
2.1.2. Linfocitos B	31
2.1.3. Plaquetas	32
2.1.4. Neutrófilos	32
2.1.5. Macrófagos	32
2.1.6. Mastocitos	33
2.1.7. Células asesinas naturales (NK)	33
2.1.8. Células dendríticas	34
2.2. Vav1 como diana terapéutica	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	59
Capítulo 1: Nuevo mecanismo de regulación de Vav1 a través de una interacción entre sus regiones DH-PH y CSH3	59
1. El dominio CSH3 participa en un mecanismo de regulación negativo de la proteína Vav1	61

2. El CSH3 inhibe la actividad de Vav1 mediante su unión en <i>cis</i> a la región DH-PH	66
3. El dominio CSH3 interacciona con la región DH-PH	69
4. La hélice α_6 del dominio DH participa en la estabilidad de la interacción inhibitoria CSH3/Vav1	74
5. La inhibición de Vav1 es mediada por la acción cooperativa de residuos del <i>RT-loop</i> y el extremo C-terminal del CSH3	79
6. Los efectos sinérgicos entre los sitios de fosforilación de Vav1 afectan a la eliminación de la inhibición ejercida por sus regiones N- y C-terminal	84
Capítulo 2: Disociación de rutas de señalización por mutaciones en los sitios de fosforilación de la proteína Vav1	89
1. Existe un diálogo cruzado entre los sitios de fosforilación de Vav1 que facilita su completa activación	91
2. Las tirosinas implicadas en la regulación de Vav1 modulan las respuestas celulares asociadas a la activación de ésta en linfocitos	94
Capítulo 3: Identificación de los elementos de señalización implicados en la regulación de la proteína Vav1 en linfocitos	105
1. La proteína Vav1 es activada, principalmente, por Lck y otra quinasa de la familia Src, y, en menor medida, por Zap70	107
2. La proteína Lat es requerida para la óptima activación de Vav1 y su reclutamiento a la membrana plasmática durante la señalización celular	110
3. Las proteínas Slp76 y PLC γ 1 regulan negativamente la activación de Vav1 en ausencia de estímulos	113
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
Anexos I y II	163
Abreviaturas	171
Índice de figuras	177
Agradecimientos	181

INTRODUCCIÓN

1. LA PROTEÍNA Vav1

Los factores de intercambio nucleotídico (GEFs) son los principales activadores de las GTPasas Rho/Rac. Unos de los GEFs que más interés despierta debido a su implicación en una gran diversidad de procesos biológicos son los miembros de la familia de proteínas Vav. La función biológica principal de esta familia es actuar como GEFs de las GTPasas Rho/Rac favoreciendo el paso de esas GTPasas de un estado inactivo (unido a GDP) a un estado activo (unido a GTP) durante la transducción de señales (**Figura 1**) (Crespo *et al*, 1997; Movilla *et al*, 1999; Schuebel *et al*, 1998). Las proteínas Vav promueven la activación de las GTPasas Rac (e. j. Rac1, RhoG) y en menor medida, de las GTPasas Rho (e. j. RhoA) *in vitro*.

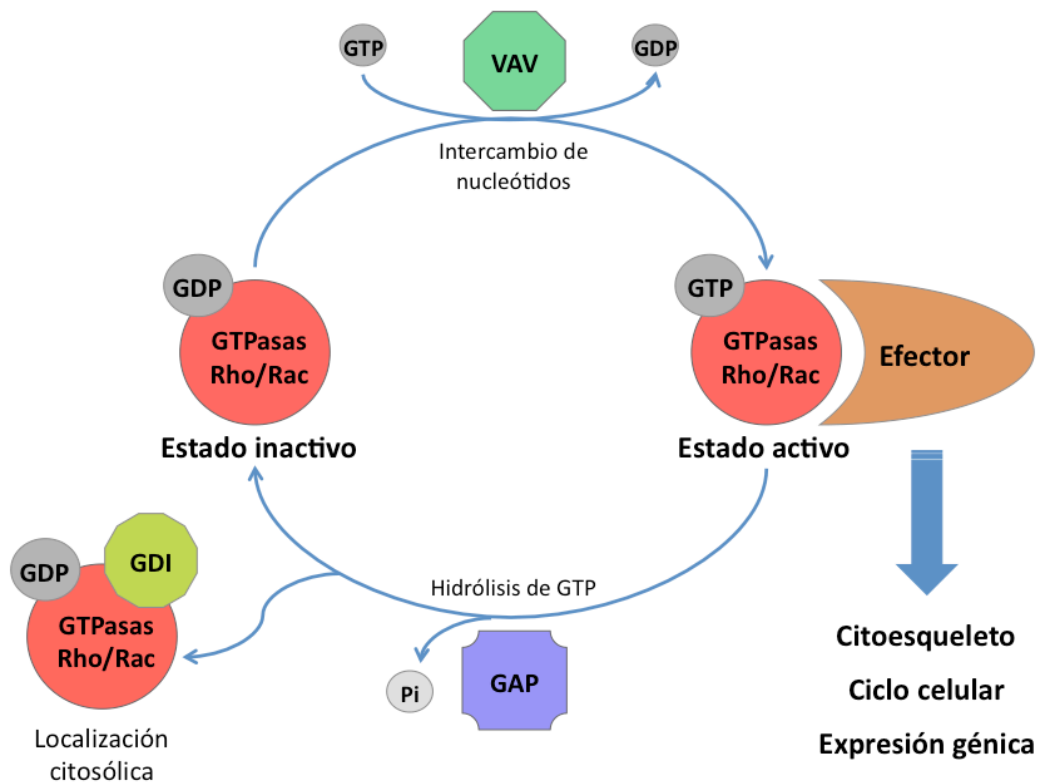


Figura 1. Esquema del ciclo de activación de las GTPasas de la familia Rho/Rac. Las GTPasas Rho/Rac se encuentran unidas a GDP en su estado inactivo y se convierten en funcionales al unirse a GTP. Los GEFs, en este caso las proteínas Vav, se unen a las regiones *switch* de las GTPasas y realizan el intercambio de GDP por GTP. En su estado activo, unidas a GTP, estas GTPasas son capaces de regular la actividad de sus efectores por unión directa, desencadenando así distintas respuestas celulares. Las proteínas GAP catalizan la hidrólisis de las GTPasas dando lugar a la conformación unida a GDP. En este estado, las proteínas GDI son capaces de unirse a las regiones *switch* impidiendo la activación de las GTPasas mediada por las proteínas Vav y su reclutamiento a la membrana plasmática. Pi, fosfato inorgánico.

La proteína Vav1 fue descubierta en el año 1989 debido a la expresión de su versión oncogénica (truncación de los 66 primeros aminoácidos) durante ensayos de formación de focos en células NIH3T3 usando ADN genómico derivado de tumores (Coppola *et al*, 1991; Katzav *et al*, 1991; Katzav *et al*, 1989). Las proteínas Vav2 y Vav3 fueron identificadas posteriormente en humanos y ratones entre los años 1995 y 2000 (Henske *et al*, 1995; Movilla *et al*, 1999; Schuebel *et al*, 1998; Trenkle *et al*, 2000). La secuenciación genómica de especies de distintas líneas evolutivas ha permitido en los últimos años el descubrimiento de miembros adicionales de esta familia presentes en especies tanto de invertebrados como de vertebrados (Dekel *et al*, 2000; Wilson *et al*, 1994).

La presencia de más de un miembro de la familia Vav es una característica exclusiva de vertebrados. Concretamente, en mamíferos existen tres representantes de esta familia, Vav1, Vav2 y Vav3. En varias especies de peces se ha descubierto un nuevo miembro de la familia, Vav4. En el caso de las aves, sólo los homólogos de Vav2 y Vav3 han sido descritos. En anfibios aparecen los ortólogos de los tres miembros conocidos en mamíferos. Por el contrario, las especies de invertebrados y urocordados (e. j., *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Ciona intestinalis*) sólo presentan un único miembro de esta familia.

Este grupo de factores de intercambio presenta una serie de características únicas tanto desde el punto de vista funcional como estructural. En primer lugar, la actividad catalítica de estas proteínas es directamente dependiente de la fosforilación en tirosinas. Además, la presencia en tándem de dominios DH, PH y ZF (dominio en dedos de zinc) es una característica estructural única de la familia Vav. También lo es la presencia de un dominio de homología a Src de tipo 2 (SH2) en una proteína con dominio DH, facilitando la función adaptadora de estas proteínas.

La implicación de esta familia de proteínas en diversos procesos biológicos queda constatada por los estudios realizados en ratones *knock-out*. Estos estudios han revelado que la expresión de las proteínas Vav es fundamental para el perfecto funcionamiento de las rutas apoptóticas, proliferativas y citoesqueléticas necesarias para el desarrollo, la selección y las respuestas celulares de las células linfoides. Además, se ha demostrado a través de estos estudios que esta familia está implicada en otros procesos fisiológicos tales como el desarrollo del cerebelo (Quevedo *et al*, 2010), la homeostasis cardiovascular (Sauzeau *et al*, 2006, Sauzeau *et al*, 2007), las respuestas dependientes de óxido nítrico en células del músculo liso (Sauzeau *et al*,) o los procesos metastáticos a partir de tumores de mama

(Citterio *et al*, 2012). Este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de la regulación de la proteína Vav1 en linfocitos.

1.1. Estructura de la proteína Vav1

La proteína Vav1, al igual que los demás miembros de mamíferos, presenta una organización de dominios estructurales altamente conservada a lo largo de la evolución. Esta estructura consta de ocho dominios diferentes: un dominio de homología a calponina (CH), una región acídica (Ac), un dominio de homología a Dbl (DH), un dominio de homología a pleckstrina (PH), un dominio en dedos de zinc (ZF), una región rica en prolinas (PRR), dos dominios de homología a Src de tipo 3 (SH3) y uno de tipo 2 (SH2) (**Figura 2**).

Los dominios CH y Ac están implicados en la regulación de la actividad de la proteína Vav1 ya que participa en un mecanismo de inhibición intramolecular. La actividad GEF de Vav1 reside en su dominio DH, que necesita la presencia de los dominios PH y ZF para llevar a cabo su función. El resto de regiones participan en el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Cada dominio estructural presenta un rol distinto pudiendo participar en mecanismos de regulación intramoleculares, interacciones proteína-proteína y/o funciones efectoras (**Figura 2**) (Bustelo, 2000; Bustelo and Couceiro, 2008).

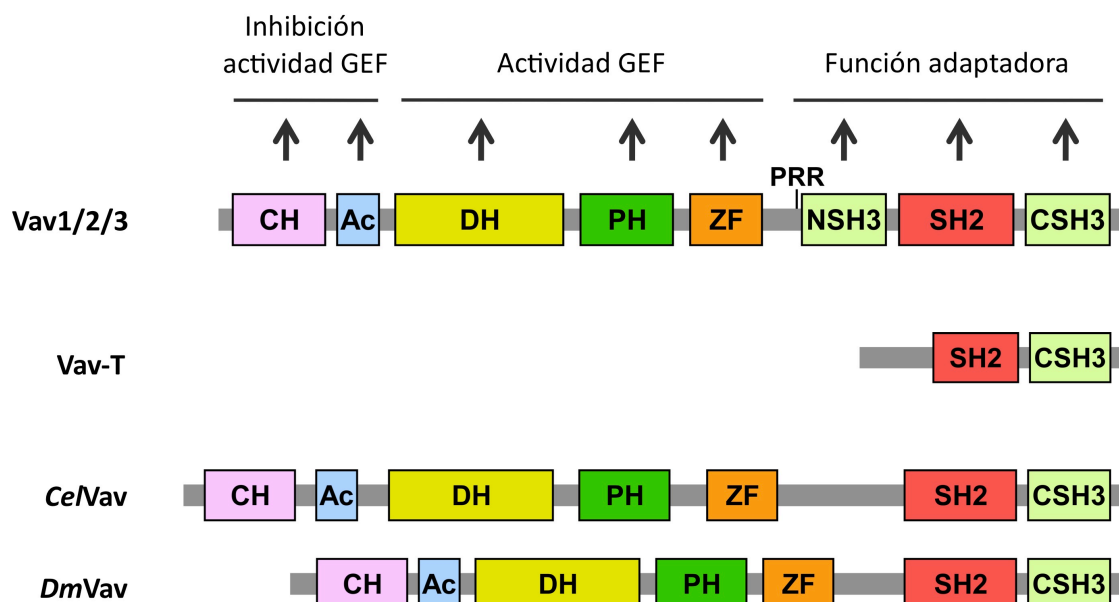


Figura 2. Estructura de dominios de los miembros de la familia Vav y la variante transcripcional Vav-T. En la parte superior se indican las funciones asociadas a cada dominio.

1.2. Expresión tisular

Se ha demostrado, mediante estudios con técnicas de hibridación *in situ* y *Northern-blot*, que la expresión de la proteína Vav1 está prácticamente restringida a las células hematopoyéticas tanto en la fase embrionaria como adulta. Este patrón de expresión es común en humanos y ratones (Bustelo *et al*, 1993; Katzav *et al*, 1989). Vav2 y Vav3 también se expresan en células hematopoyéticas pero, a diferencia de Vav1, también presentan altos niveles de expresión en tejidos no hematopoyéticos (Bustelo, 2000). Fuera del sistema hematopoyético, Vav1 ha sido detectado en células madre embrionarias (Wulf *et al*, 1993; Zmuidzinas *et al*, 1995), en la capa ameloblástica del brote dental de animales neonatos (Bustelo *et al*, 1993), células trofoblásticas (Higuchi *et al*, 1995; Zmuidzinas *et al*, 1995), neuronas cerebelares (Betz *et al*, 2003), enterocitos cecales (Liu *et al*, 2009), pulmón (Coppola *et al*, 1991) y páncreas (Schuebel *et al*, 1996). Además, aparece en células tumorales de cáncer de pulmón (Lazer *et al*, 2009), y en líneas celulares derivadas de neuroblastoma (Hornstein *et al*, 2003; Betz *et al*, 2003) y melanoma (Bartolome *et al*, 2006). No se puede excluir la posibilidad de que existan bajos niveles de expresión de Vav1 en otros tejidos, ya que clones de ADNc de *Vav1* han sido aislados de ojos, del núcleo caudado, la sustancia negra y otros tipos de tejidos. En mamíferos encontramos también una isoforma de la proteína Vav1, Vav-T, que sólo presenta la región SH2-SH3 y que se expresa en espermatozoides y las espermátidas de ratón (**Figura 2**) (Okumura *et al*, 1997).

1.3. Función biológica

Como se mencionó en anteriormente, la función principal de la proteína Vav1 es su papel como GEF de las GTPasas Rho/Rac. A diferencia de otros activadores de las proteínas Rho/Rac, en los cuales su actividad catalítica reside exclusivamente en el dominio DH, la catálisis de intercambio de nucleótidos en las GTPasas sustrato requiere del casete DH-PH-ZF (Chrencik *et al*, 2008; Rapley *et al*, 2008). La proteína Vav1 necesita una fosforilación previa en tres residuos de tirosina pertenecientes a la región ácida (la tirosina 174, y en menor medida las tirosinas 142 y 160) por parte de proteínas tirosina quinasa, que se encuentran por encima de la proteína Vav1 en las rutas de señalización, dando lugar a la activación catalítica de las mismas. Por ello, la proteína Vav1 actúa por debajo de receptores de membrana que presentan actividad quinasa intrínseca (EGF, PDGF) o asociada (receptores de antígeno) (Bustelo, 2000; Bustelo and Couceiro, 2008).

De acuerdo con el rol de los GEFs de la familia Rho/Rac, la proteína Vav1 induce respuestas biológicas dependientes de Rho/Rac tales como la polimerización de F-actina, la invasión, la

motilidad, la adhesión mediada por integrinas, transiciones del ciclo celular, o metástasis. También es capaz de activar rutas de señalización canónicas por debajo de las GTPasas Rho/Rac como la activación de la quinasa p21 (PAK), la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la familia de proteínas de la proteína activadora-1 (AP-1), y el factor de respuesta al suero (SRF) (Bustelo, 2000; Bustelo and Couceiro, 2008; Turner *et al*, 2002).

Al ser una proteína cuya expresión está prácticamente restringida a la línea hematopoyética, Vav1 participa en las rutas de señalización asociadas a receptores hematopoyéticos siendo esta una característica específica de Vav1 dentro de la familia Vav. Los resultados obtenidos en estudios con ratones *knock-out* para Vav1 indican que esta proteína tiene un papel crucial en las respuestas celulares resultado de la activación de los receptores de células T (TCR) y B (BCR), integrinas y receptores con motivos ITAMs (motivos de activación en inmunoreceptores basados en tirosinas) que regulan el desarrollo y/o funciones efectoras de una amplia variedad de células hematopoyéticas.

A parte de este rol principal, Vav1 funciona también como molécula adaptadora, participando en la formación de complejos heteromoleculares que desencadenan respuestas biológicas independientes de su actividad catalítica (Bustelo, 2001). Esta función adaptadora fue demostrada a partir de la expresión, en linfocitos T, de una versión de Vav1 catalíticamente inactiva, viendo que esta era capaz de inducir igualmente la activación de NF-AT, un factor de transcripción implicado en la regulación de interleuquina-2 (IL-2), y otras citoquinas de células linfoides (Kuhne *et al*, 2000).

Además de estas funciones, Vav1 también participa en la amplificación de señales y en la diversificación de los eventos producidos por la estimulación de receptores de membrana en las células hematopoyéticas. Vav1 es una proteína fundamental para la generación de segundos mensajeros (Ca^{2+} , diacilglicerol, PIP_3), siendo estos los encargados de diversificar la señalización celular, promoviendo la estimulación de rutas como la de la proteína disociadora de Ras GDP (RasGRP) / Ras / Erk / Akt (Caloca *et al*, 2003, Caloca *et al*, 2008; Costello *et al*, 1999; Reynolds *et al*, 2002; Zugaza *et al*, 2004), las proteínas quinasa C (PKCs) (Caloca *et al*, 2008; Reynolds *et al*, 2002), y las proteínas quinasa D (PKDs) (Caloca *et al*, 2008; Reynolds *et al*, 2004; Vigorito *et al*, 2006). Este efecto de Vav1 sobre los mensajeros secundarios se debe a que esta proteína es necesaria para la óptima fosforilación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y los miembros de la familia de la fosfolipasa C- γ (PLC γ) (Costello *et al*, 1999; Manetz *et al*, 2001; Spurrell *et al*, 2009). Aunque muchos de estos efectos de la señalización está relacionados con la actividad catalítica de Vav1, en otros casos son fruto de las funciones de

Vav1 independientes de Rac1 en linfocitos T (Saveliev *et al*, 2009). Algunas de estas funciones de Vav1 parecen ser específicas del tipo celular y de la especie, y no hay que olvidar que estas respuestas también conllevan la interacción de Vav1 con otras moléculas de transducción de señales que son requeridas para el correcto desarrollo de esas respuestas biológicas.

1.4. Regulación de su actividad biológica

1.4.1. Fosforilación en tirosinas

La actividad catalítica de Vav1 depende principalmente de su estado de fosforilación a través de la regulación de interacciones intramoleculares autoinhibitorias (**Figura 3**). Este mecanismo de regulación fue demostrado inicialmente mediante experimentos bioquímicos y de biología celular (Crespo *et al*, 1997; Movilla *et al*, 1999; Schuebel *et al*, 1998; Zugaza *et al*, 2002) y, posteriormente, corroborado a nivel estructural mediante resonancia magnética nuclear (NMR) (Aghazadeh *et al*, 2000) y, más recientemente, mediante técnicas cristalográficas (**Figura 3**) (Yu *et al*, 2010).

Estos análisis indicaron que el estado inactivo no fosforilado, de la proteína Vav1 se establece a través de una red compleja de interacciones entre:

- El dominio CH con los dominios PH, DH y dos residuos de tirosinas (Y142 y Y160) presentes en la región ácida
- La región ácida con el dominio PH
- La tirosina 174 (Y174) de la región ácida con la región de unión a las GTPasas que se encuentra en el dominio DH.

Todas estas interacciones cooperan entre ellas para inducir una conformación “cerrada” de la proteína Vav1 que no permite la unión de las GTPasas substrato a la región catalítica (**Figura 3**) (Yu *et al*, 2010).

La fosforilación de Vav1 en los residuos de la región ácida causa la disrupción de la estructura inhibitoria y la exposición, por tanto, del sitio de unión a las GTPasas (**Figura 3**). Además de estos cambios, la comparación de las estructuras cristalinas de las regiones de Vav1 CH-Ac-DH-PH-ZF (catalíticamente inactiva; Yu *et al*, 2010) y Ac-DH-PH-ZF (catalíticamente activa; Chrencik *et al*, 2008; Rapley *et al*, 2008) indican que la activación de la proteína induce cambios en la orientación relativa del dominio ZF respecto al resto de

dominios presentes en el casete central de Vav1, DH-PH-ZF. Esto es debido cambios en la curvatura de la hélice α_6 del dominio DH de Vav1 entre estos dos estados (Yu *et al*, 2010).

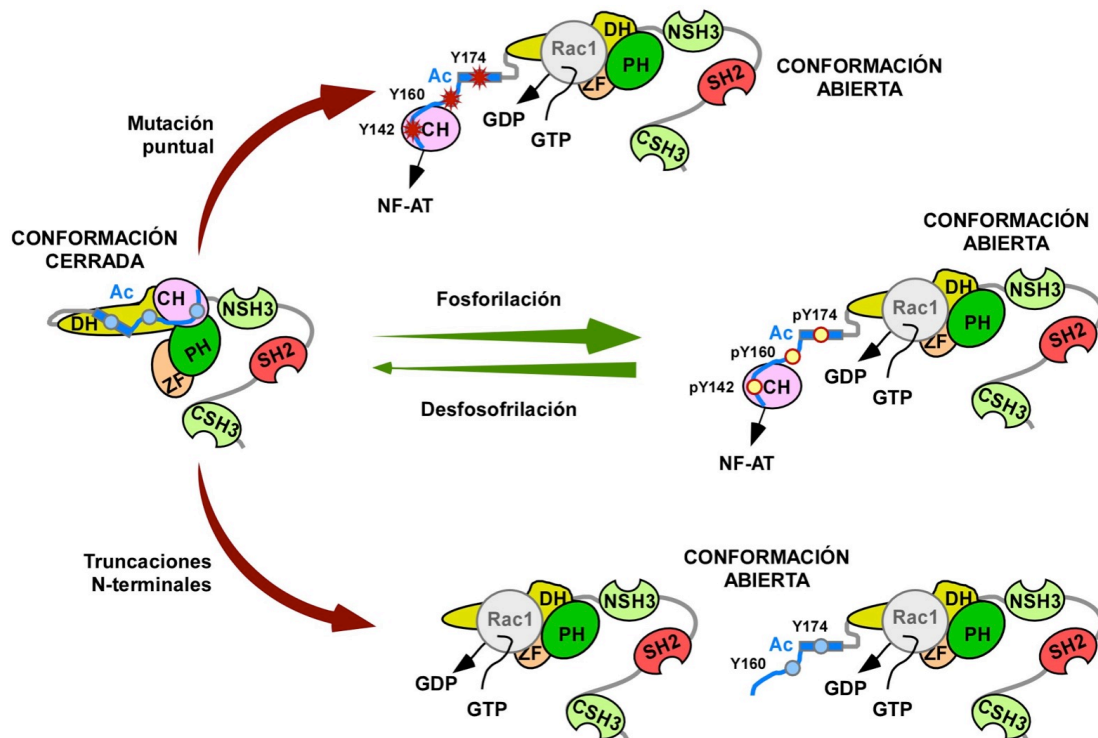


Figura 3. Modelo actual de activación de las proteínas Vav. Representación esquemática de los mecanismos de activación fisiológicos (flechas verdes) y oncogénicos (flechas rojas) de la familia de proteínas Vav. Las localizaciones de la región CH-Ac y del casete NSH3-SH2-CSH3 son hipotéticas ya que no existen estructuras 3D disponibles. La hélice α que contiene al sitio de fosforilación Y¹⁷⁴ está indicada con un rectángulo azul. Puntos en azul claro, residuos de tirosina no fosforilados; puntos amarillos, residuos de tirosina fosforilados (p); asteriscos rojos, mutaciones en los sitios de fosforilación.

Este mecanismo de regulación fue establecido muy tempranamente en la evolución ya que una regulación similar ha sido observada tanto en todas las proteínas Vav de mamíferos (Movilla and Bustelo, 1999; Schuebel *et al*, 1998) como en miembros de la familia Vav presentes en *D. melanogaster* (Couceiro *et al*, 2005) y *C. elegans* (Norman *et al*, 2005) (ver **Figura 2**, pág. 5).

Una vez activada, la proteína Vav1 promueve la activación de las proteínas de la subfamilia Rac (e. j. Rac1, RhoG) y, en menor medida, de las GTPasas Rho *in vitro* (Crespo *et al*, 1997; Han *et al*, 1997) (ver **Figura 2**, pág. 5). La información obtenida de estudios *in vivo* constata la existencia de la activación de la subfamilia de proteínas Rac mediada por Vav1 (Arana *et al*, 2008; Crespo *et al*, 1997; Couceiro *et al*, 2005; Dumont *et al*, 2009; Gomez *et al*, 2000;

Walmsley *et al*, 2003). Los detalles estructurales de la interfaz de la unión Vav1/Rac1 han sido descritos recientemente (Chrencik *et al*, 2008). Resulta interesante ver que, a diferencia de otros miembros de la familia Dbl, la actividad catalítica de Vav1 y del resto de la familia Vav requieren la presencia del dominio ZF (Booden *et al*, 2002; Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002). Aunque inicialmente se propuso que el ZF de Vav1 contactaba con la GTPasa (Movilla and Bustelo, 1999; Zugaza *et al*, 2002), datos estructurales recientes sugieren que su rol en la catálisis es debido a que facilita la estabilización de la estructura catalíticamente competente del dominio DH (Chrencik *et al*, 2008; Rapley *et al*, 2008).

Entre los receptores de membrana capaces de desencadenar la fosforilación de Vav1 durante la señalización celular se encuentran el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor de células B (BCR) y el receptor de células T (TCR) (Bustelo *et al*, 1992a; Bustelo *et al*, 1992b; Margolis *et al*, 1992). Además, la proteína Vav1 ha sido implicada en las rutas de señalización de más de 35 receptores de membrana (Bustelo, 2000). Cabe destacar que el estado de fosforilación de Vav1 durante la señalización celular es transitorio, sugiriendo que hay proteínas tirosina fosfatasas a cargo de la inhibición de Vav1 al final del ciclo de estimulación celular. Sin embargo, muchas de estas fosfatasas siguen sin ser identificadas a día de hoy.

La cuestión que aún no ha sido esclarecida es el pape que juega la región C-terminal de la proteína Vav1 en el establecimiento de la conformación inactiva de esta proteína en ausencia de estimulación del TCR.

Este mecanismo de regulación se desajusta artificialmente por la generación de mutaciones o truncaciones en determinadas regiones de la molécula. La mutación de la tirosina 174 a fenilalanina (Vav1^{Y174F}) impide que este residuo sea fosforilado por las quinasas correspondientes, pero también disocia su interacción con otros dominios favoreciendo así la conformación abierta mencionada anteriormente (**Figura 3**). Esta mutación desencadena, por tanto, la actividad catalítica de Vav1 al permitir el acceso de las GTPasas al dominio DH y, a su vez, la funciones adaptadoras de dicha proteína ya que mantiene la integridad de todos sus dominios. La versión oncogénica de Vav1 (Vav1^{Δ1-186}), que corresponde a una truncación de las regiones CH y ácida, favorece también la conformación abierta al no presentar los dominios que participan en el mecanismo intramolecular autoinhibitorio que estabiliza la conformación cerrada (**Figura 3**).

La unión de la proteína Vav1 a las GTPasas de la familia Rho/Rac es indispensable para que se produzca el intercambio nucleotídico de GDP por GTP en estas GTPasa, fruto de la actividad catalítica de Vav1 (Crespo *et al*, 1997; Han *et al*, 1997). Estudios de microscopía electrónica han descrito los cambios conformacionales que se producen en el paso de la proteína Vav1 a un estado activo y que permiten al dominio DH unirse a GTPasas sustrato,

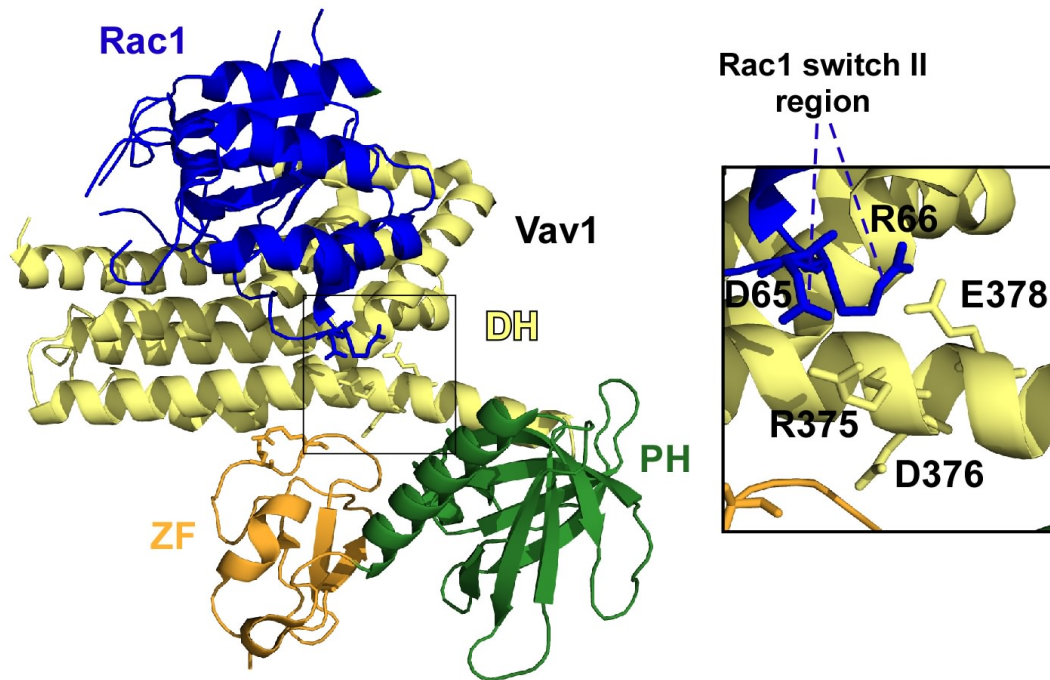


Figura 4. Modelo estructural de la interacción Vav1/Rac1. La estructura de la GTPasa Rac1 esta en color azul. La estructura del casete DH-PH-ZF también se encuentra representada en color amarillo (DH), verde (PH) y naranja (ZF). El rectángulo a la derecha indica los residuos de Rac1 y Vav1 que participan en la interacción.

como Rac1 (**Figura 4**) (Llorca *et al*, 2005). Durante este proceso se establecen una serie de interacciones entre la proteína Vav1 y las regiones *switch I* y *switch II* de Rac1 (Chrencik *et al*, 2008). Estudios de mutagénesis han permitido identificar los residuos implicados en dichas interacciones (Chrencik *et al*, 2008). Por un lado, Vav1 se une a la región *switch I* a través de sus residuos E²⁰¹ y Q³³¹, que establecen interacciones con los residuos Y³² y V³⁶, y N³⁹ de Rac1, respectivamente (Chrencik *et al*, 2008). Por otro lado, los residuos R³⁷⁵ y E³⁷⁸ de la hélice α_6 del DH establecen interacciones con los residuos D⁶⁵ y R⁶⁶ de la región *switch II* de Rac1, respectivamente (Chrencik *et al*, 2008). Además, la proteína Vav1 crea interacciones intramoleculares entre residuos del dominio DH (D³⁶⁵, D³⁷⁶) y residuos del PH (K⁴⁰⁴) y el ZF (L⁵³⁵, R⁵³⁷) encaminadas a estabilizar la unión a Rac1 (Chrencik *et al*, 2008). La unión de Vav1 a las

regiones *switch I* y *switch II* de la GTPasa alteran la conformación de sus dominios de unión a nucleótidos y a Mg^{2+} (Worthylake *et al*, 2000). De esta manera, la GTPasa pierde afinidad por el Mg^{2+} y el GDP, y permanece sin unirse a otras moléculas, estabilizada por su unión a Vav1. Esta conformación de la GTPasa permite, sin embargo, el libre acceso de GTP. Una vez activada la GTPasa, la unión de GTP de forma espontánea (más abundante en la célula que el GDP) modifica sus regiones *switch I* y *switch II*, haciendo que esta pierda afinidad por Vav1, disociándose así del factor de intercambio (Worthylake *et al*, 2000).

1.4.2. Interacciones proteína-proteína

Otro mecanismo que regula la actividad de la proteína Vav1 es el establecimiento de uniones con otras proteínas implicadas en la transducción de señales *in vivo*. Estas incluyen (Figura 5):

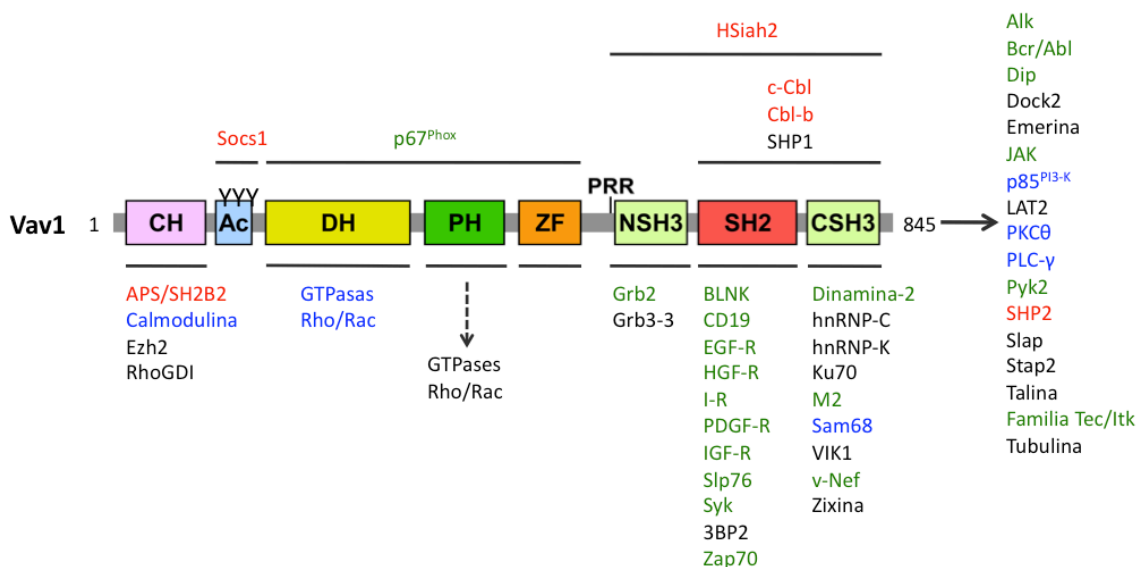


Figura 5. Interacciones de los distintos dominios de la proteína Vav1 con otras proteínas. Las proteínas con roles positivos, negativos y efectores aparecen coloreadas en verde, rojo y azul, respectivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas de ellas además de tener un rol positivo actúan como efectores (e. j. Slp76, Blnk). Las proteínas cuya función en la ruta de Vav1 todavía no ha sido esclarecida, se muestran en negro. Las proteínas cuya interacción con Vav1 ha sido demostrada pero aún se desconoce a través de qué mecanismo aparecen a la derecha. Los dominios estructurales implicados en estas interacciones, pudiendo ser uno o varios, también están indicados. En el caso del dominio PH, este parece contribuir a la unión de las GTPasas Rho/Rac al dominio DH aunque no ha sido demostrado que interaccione directamente con ellas. EGF-R, receptor del factor de crecimiento epidérmico; HGF-R, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; I-R, receptor de insulina; PDGF-R, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF-R, receptor del factor de crecimiento similar a insulina.

- Receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca o asociada que pueden desencadenar la translocación de Vav1 a la membrana plasmática, y su

consiguiente activación por fosforilación en tirosinas. Estos receptores incluyen entre otros, el receptor de células T (TCR) y el de células B (BCR), los receptores de neutrófilos y células NK y tirosina quinasas transmembrana (Bustelo, 2000; Turner and Billadeau, 2002; Tybulewicz, 2005).

- Moléculas adaptadoras y co-receptores que favorecen la translocación de Vav1 a la membrana plasmática, como el conector de células T activadas (Lat), el conector de células B (Blnk), Itk, CD28 o CD19 (Bustelo, 2000).
- Moléculas capaces de activar a Vav1 de una forma no dependiente de fosforilación, como p67^{Phox}, también conocido como factor citosólico de neutrófilos 2 (Ming *et al*, 2007).
- Factores que contribuyen positivamente a la función efectora de Vav1, como Slp76 (proteína leucocitaria de 76 kDa que contiene un dominio SH2), la calmodulina, la histona-lisina metiltransferasa Ezh2, la dinamina 2, la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y los miembros de las familias de la fosfolipasa C gamma (PLC γ) y la proteína quinasa C (PKC) (Bustelo, 2000; Gomez *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2007).
- Proteínas que contrarrestan la actividad biológica de Vav1, como c-Cbl, Cbl-2 y SHP2 (fosfatasa que contiene dominios SH2) (Bustelo, 2000).

1.4.2.1. Receptores de membrana con actividad tirosina quinasa

Se han descrito un gran número de receptores de membrana que, una vez activados *in vitro*, son capaces de unirse y fosforilar a la proteína Vav1 expresada de forma ectópica (Bustelo, 2000). Entre ellos se encuentran el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGF-R (Bustelo *et al*, 1992; Margolis *et al*, 1992), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF-R (Bustelo *et al*, 1992), los receptores de linfocitos B y T (Bustelo and Barbacid, 1992; Bustelo *et al*, 1992; Margolis *et al*, 1992), los receptores de Fc ϵ (Fc ϵ R) (Kiener *et al*, 1997; Margolis *et al*, 1992) o el receptor de interleuquina-2, IL-2R (Evans *et al*, 1993).

Una de las estrategias de unión de Vav1 a dichos receptores se produce por la interacción estándar de su dominio SH2 a receptores autofosforilados (Bustelo *et al*, 1992; Margolis *et al*, 1992). Una vez fosforilada, la proteína Vav1 no solo es catalíticamente activa sino que también es capaz de interactuar con otras proteínas que contienen dominios SH2. La unión de ligandos, y su consiguiente activación, promueven la fosforilación rápida y transitoria de la proteína Vav1 en residuos de tirosina aunque variando el nivel y la cinética de fosforilación según el receptor asociado. A su vez, un mismo receptor es capaz de dar lugar a distintas cinéticas de fosforilación en función del ligando al que se une. Un claro

ejemplo de esta diversidad de respuesta es el caso del receptor $\text{TCR}\alpha\beta$, que en linfocitos inmaduros puede dar lugar a distintos niveles de fosforilación de Vav1 dependiendo de si se une a péptidos agonistas o antagonistas, resultando, por tanto, en respuestas celulares diversas de las cuales depende la supervivencia de la célula (Smyth *et al*, 1998). Además, pueden existir también procesos de coestimulación o inhibición a través de proteínas de membrana adyacentes al receptor. Es el caso de los linfocitos T en los que la fosforilación de Vav1 producida por la activación del TCR aumenta en intensidad y duración debido a la activación conjunta del receptor CD28 (Nunes *et al*, 1994; Salojin *et al*, 1999). De una forma similar, en linfocitos B, la estimulación conjunta del BCR y el receptor CD19 contribuye a una mayor fosforilación de Vav1 (O'Rourke *et al*, 1998 ; Sato *et al*, 1997). Por el contrario, al estimular simultáneamente el receptor CD22, la fosforilación de Vav1 disminuye considerablemente (Sato *et al*, 1997).

En resumen, existe una modulación muy precisa de los niveles de fosforilación de Vav1 indicando que el nivel de activación de esta proteína es uno de los parámetros que las células utilizan para regular la intensidad y duración de las cascadas de señalización que dan lugar a las diferentes respuestas celulares.

1.4.2.2. Proteínas tirosina quinasa citoplasmáticas

En los casos en los que los receptores no presentan actividad tirosina quinasa intrínseca, la proteína Vav1 es fosforilada y activada tras su unión a quinasas pertenecientes a las familias Src, Syk, Tec o Jak (Bustelo, 2000). La activación de Vav1 por parte de las quinasas de las familias Src y Syk ha sido demostrada mediante ensayos tirosina quinasa *in vitro* (Crespo *et al*, 1997; Han *et al*, 1997; Zugaza *et al*, 2000). Estas interacciones se producen por asociación directa del dominio SH2 de Vav1 a las quinasas autofosforiladas (este es el caso de Src y Syk/Zap70) o, alternativamente, a través de un reclutamiento previo de Vav1 a las colas citoplasmáticas fosforiladas de co-receptores transmembrana (como CD28 o CD19) o a moléculas adaptadoras fosforiladas como pueden ser Lat o Blnk.

Además, la proteína Vav1 puede unirse a **las quinasas de la familia Syk** (compuesta por Syk y Zap70) a través de la interacción de su dominio SH2 con una tirosina fosforilada de la región de interdominios B de estas quinasas (Deckert *et al*, 1996 ; Katzav *et al*, 1994). La mutación de estos residuos a fenilalanina elimina la unión de Vav1 a estas quinasas y su consiguiente activación, lo que indica que la interacción física entre estas proteínas es necesaria para que se produzca su fosforilación (Deckert *et al*, 1996; Wu *et al*, 1997; Zhao *et al*, 1999). A parte de mediar en la activación de Vav1 en linfocitos a través de los receptores BCR

y TCR, estas quinasas también están implicadas en la señalización de otros receptores como FcεR (Hirasawa *et al*, 1995; Teramoto *et al*, 1997), integrinas (Miranti *et al*, 1998) y el complejo receptor de células NK (Galandrini *et al*, 1999).

En algunos estudios se postula que **las quinasas de la familia Src** (a las que pertenecen Fyn, Lck o Hck entre otras) podrían fosforilar directamente a la proteína Vav1. Se ha demostrado que las quinasas Lck, Fyn y Hck son capaces de producir la fosforilación y la activación catalítica de Vav1 *in vitro* y en condiciones de sobreexpresión (Crespo *et al*, 1997; Movilla and Bustelo, 1999; Schuebel *et al*, 1998). Aún así, los estudios llevados a cabo no aclaran exactamente qué quinasas de la familia Src son capaces de fosforilar directamente a Vav1, en linfocitos, y en qué medida. De la misma manera, no se puede descartar su participación en la fosforilación de Vav1 en condiciones celulares anormales, como en tumores en los que existan mutaciones de elementos situados por encima de Vav1 en la ruta de señalización.

Las quinasas de la familia Tec se asocian a Vav1 tras la estimulación de los receptores de interleuquina-3 (IL-3) y de eritropoyetina en células hematopoyéticas. Estas tirosina quinasas citosólicas participan en la ruta de Vav1 funcionando más como proteínas adaptadoras que como quinasas. Por ejemplo, ha sido descrito que Itk, una quinasa miembro de la familia Tec, promueve la translocación de Vav1 a la membrana plasmática independientemente de su actividad quinasa (Dombroski *et al*, 2005; Labno *et al*, 2003). Así mismo, la quinasa Pyk2 está implicada en el anclaje de Vav1 a receptores específicos como las integrinas $\alpha_V\beta_3$ en neutrófilos (Gao *et al*, 2009). Sin embargo, estas dos interacciones funcionales están probablemente implicadas en un diálogo cruzado durante la señalización celular, ya que otros estudios han puesto de manifiesto que Vav1 es importante para la estimulación de Itk (Reynolds *et al*, 2002) y Pyk2 (Gakidis *et al*, 2004) en linfocitos T y neutrófilos, respectivamente.

Las quinasas de la familia JAK se encargan de mediar la transducción de señales a través de receptores de citoquinas como EpoR o c-Mpl, cuyos ligandos son la eritropoyetina y la trombopoyetina, respectivamente. A diferencia de las quinasas de la familia Syk, estas quinasas están unidas de forma constitutiva a las colas citoplasmáticas de los receptores. La estimulación de los receptores hace que las quinasas JAK se activen por fosforilación cruzada, y, a su vez, activen a Vav1 por fosforilación en tirosinas (Fujii *et al*, 1995). La asociación entre Vav1 y las proteínas JAK esta mediada a través del dominio SH2 de Vav1 y regiones con residuos de fosfotirosina no descritas de la quinasa (Matsuguchi *et al*, 1995).

1.4.2.3. Proteínas adaptadoras

Las proteínas adaptadoras colaboran en la activación de la proteína Vav1 mediante su reclutamiento a las zonas de la membrana donde se produce la activación de los receptores y manteniendo a la proteína Vav1 próxima a las quinasas que la activan. Las interacciones entre la proteína Vav1 y sus adaptadores se realizan a través de dominios SH2 y SH3 de ahí que, en algunas ocasiones, el adaptador deba ser fosforilado en residuos de tirosina específicos para adquirir afinidad por el dominio SH2 de la proteína Vav1.

Lat es una proteína palmitoilada, presente en células T, NK y mastocitos (Zhang *et al*, 1998b) que se asocia a las balsas lipídicas de la membrana plasmática (Xavier *et al*, 1998; Zhang *et al*, 1998b). Esta proteína, una vez activada mediante fosforilación, promueve el reclutamiento a la membrana plasmática de un gran número de proteínas por las que posee afinidad (Zhang *et al*, 1998a, 1998b). Este reclutamiento se produce a través de la de numerosas fosfotirosinas que posee Lat en su secuencia (Zhang *et al*, 1998a). La translocación de Vav1 a la membrana depende, por tanto, de la activación de Lat siendo esta translocación indispensable para la correcta fosforilación y activación de Vav1 (Fanto *et al*, 2000; Zhang *et al*, 1999). La proteína Vav1 no es capaz de unirse a Lat a través de su dominio SH2, así que es necesaria la presencia de una proteína que medie esta interacción, Grb2.

La proteína Grb2 se une a la PRR de Vav1 a través de su dominio SH3 C-terminal y a LAT mediante su dominio SH2 (Nishida *et al*, 2001; Ramos-Morales *et al*, 1995; Ye *et al*, 1994; Zhang *et al*, 1998a). Esta asociación es importante para la subsiguiente interacción de Vav1 no sólo con Lat sino también con el coreceptor CD28 (Dennehy *et al*, 2007; Kim *et al*, 1998; Michel *et al*, 2000). Estas dos moléculas favorecen la translocación de Vav1 a la membrana plasmática y la consiguiente interacción con tirosina quinasas en linfocitos T (Finco *et al*, 1998; Kim *et al*, 1998; Zhang *et al*, 1999).

En linfocitos B, la proteína responsable de la translocación de Vav1 a la membrana es CD19. Esta proteína se une a Vav1 permitiendo su aproximación a las quinasas Syk y Lyn asociadas a CD19 y al BCR, respectivamente (Li *et al*, 1997; O'Rourke *et al*, 1998; Weng *et al*, 1994). La unión entre Vav1 y CD19 se produce a través del dominio SH2 de Vav1 y un residuo de fosfotirosina de CD19 (O'Rourke *et al*, 1998).

Vav1 puede también interaccionar, a través de su dominio SH2, con las proteínas adaptadoras citoplasmáticas Slp76 y Blnk en células T y B, respectivamente (Fu *et al*, 1998; Onodera *et al*, 1996; Raab *et al*, 1997; Tuosto *et al*, 1996; Wu *et al*, 1996). Estas proteínas juegan

un papel funcional doble en la ruta de Vav1 permitiendo su fosforilación durante la transducción de señales y, al mismo tiempo, promueven las funciones efectoras de Vav1, como la activación de los miembros de la familia PLC γ (Myung *et al*, 2001; Raab *et al*, 1997; Wu *et al*, 1996).

1.4.2.4. Proteínas efectoras

Al ser una de las funciones de esta proteína la activación de las GTPasas Rho/Rac, Vav1 posee un amplio espectro de efectores que han sido descritos previamente como proteínas diana de estas GTPasas. Es el caso de algunas quinasas como JNK (Crespo *et al*, 1996, 1997; Song *et al*, 1999; Teramoto *et al*, 1997), PAK (Bubeck Wardenburg *et al*, 1998; Salojin *et al*, 1999) y PIP5K (O'Rourke *et al*, 1998). JNK es una serina/treonina quinasa implicada en la regulación de la transcripción, ya que fosforila a numerosos factores de transcripción tales como c-Jun o ATF2 (Van Aelst, 1997). PAK, por su parte, es una familia de serina/treonina quinasas formada por seis miembros (Jaffer *et al*, 2002) que ha sido implicada en la fosforilación de factores de transcripción (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997), respuestas citoesqueléticas (Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997), y la estimulación de la ruta de Ras (Schaeffer *et al*, 1999). PIP5K es la quinasa responsable de mantener elevados los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂), lo cual consigue mediante la fosforilación del fosfatidilinositol-4-fosfato (PI(4)P). El PI(4,5)P₂ es el sustrato de la PLC, por lo que se cree que la quinasa PIP5K cumple un papel clave en las rutas de señalización mediadas por fosfoinosítidos (Czech, 2000; Toker, 2002).

La transducción de señales mediada por la proteína Vav1 también es necesaria para la activación de factores de transcripción como NF-AT, NF- κ B y SRF (Holsinger *et al*, 1998; Montaner *et al*, 1998; Wu *et al*, 1995). El más estudiado es NF-AT, un factor de transcripción específico de linfocitos T implicado en respuestas típicas de la activación linfocitaria como la transcripción del gen codificante de la interleuquina-2 (IL-2) (Rao *et al*, 1997). Este factor es especialmente interesante ya que su activación es una de las funciones de Vav1 independiente en gran medida de su actividad catalítica (Holsinger *et al*, 1998; Kuhne *et al*, 2000; Lopez-Lago *et al*, 2000; Wu *et al*, 1995). Por otro lado, Vav1 también puede activar la transcripción de NF- κ B y SRF, factores de transcripción con funciones tanto en células hematopoyéticas como en no hematopoyéticas implicados en la proliferación celular y la respuesta inmune (Johansen *et al*, 1995; Rao *et al*, 1997; Treisman, 1994).

1.4.2.5. Otras proteínas asociadas a Vav1

En los últimos años se ha descrito una larga lista de moléculas de señalización capaces de interactuar con Vav1, además de las ya mencionadas anteriormente. A la región CH se unen proteínas tales como la calmodulina (Zhou *et al*, 2007), miembros de la familia de inhibidores de la disociación de GDP en proteínas Rho (RhoGDI) (Groysman *et al*, 2000, Groysman *et al*, 2002) y proteínas adaptadoras con dominios PH y SH2 (APS/SH2B2) (Yabana *et al*, 2002) (**Figura 5**). También se unen a esta región Ezh2, una histona-lisina metiltransferasa implicada en la remodelación citoesquelética y el mantenimiento de la represión transcripcional (Hobert *et al*, 1996) (**Figura 5**). La región DH-PH-ZF se une a la proteína p67^{Phox}, un componente regulador del complejo NADPH que puede activar a Vav1 (Ming *et al*, 2007) (**Figura 5**). El SH3 C-terminal se ha demostrado que se une a las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas hnRNP-K (Bustelo *et al*, 1995; Hobert *et al*, 1996; Van Seuning *et al*, 1995) y hnRNP-C (Bustelo *et al*, 1995; Romero *et al*, 1996), a Grb3-3 (Ramos-Morales *et al*, 1995), hSiah (Germani *et al*, 1999), Sam68 (Lazer *et al*, 2007), VIK1 (Houlard *et al*, 2005), Ku70 (Romero *et al*, 1996), la dinamina 2 (Gomez *et al*, 2005) y la zixina (Hobert *et al*, 1996) (**Figura 5**). A este dominio también se unen las proteínas virales Nef y M2 como se describió anteriormente (Fackler *et al*, 1996; Rodrigues *et al*, 2006) (**Figura 5**). Algunas proteínas necesitan unirse a más de un dominio de Vav1 siendo su interacción más compleja. Este es el caso de SHP1 (Kon-Kozlowski *et al*, 1996), Cbl-b (Bustelo *et al*, 1997) y 3BP2 (Foucault *et al*, 2005) (**Figura 5**).

Algunas de estas proteínas son citoplasmáticas (RhoGDI, calmodulina, APS, p67^{Phox}, dinamina 2, zixina) mientras que otras se mueven entre el núcleo y el citoplasma (Ezh2, hnRNPs, Sam68, VIK1, Ku70). Algunas de ellas también han sido asociadas a la regulación del citoesqueleto (RhoGDI, Ezh2, APS, p67^{Phox}, hnRNP-K, dinamina 2 y zixina) sugiriendo que estas proteínas puedan cooperar en las funciones de Vav1 dependientes de Rac1 (Beckerle, 1997; DerMardirossian *et al*, 2005; Gomez *et al*, 2005; Ming *et al*, 2007; Nagano *et al*, 2006; Su *et al*, 2005; Yabana and Shibuya, 2002).

Se han descrito también interacciones con otras proteínas aunque no han sido definidas estructuralmente. Este es el caso de Slap (Sosinowski *et al*, 2000), Stap2 (Sekine *et al*, 2009), Pyk2 (Gismondi *et al*, 2003; Gao and Blystone, 2009), p85^{PI3K} (Bertagnolo *et al*, 1998, Bertagnolo *et al*, 2004;), la talina (Fischer *et al*, 1998; Garcia-Bernal *et al*, 2009), PKC θ (Hehner *et al*, 2000; Kong *et al*, 1998; Moller *et al*, 2001), la tubulina (Huby *et al*, 1995), Dock2 (Nishihara *et al*, 2002), la emerina (Wilkinson *et al*, 2003) y LAT2 (Malhotra *et al*, 2009).

1.4.2.6. Proteínas inactivadoras de la proteína Vav1

Al producirse la activación de Vav1 a través de su fosforilación, son las proteínas con actividad tirosina fosfatasa (PTPasa) las que se encargan de su desfosforilación y, por tanto, de su inactivación. Las fosfatasas de la familia SHP, compuesta por SHP1 y SHP2, han sido las más estudiadas a este respecto (Tamir *et al*, 2000). Se ha demostrado que Vav1 coimmunoprecipita con SHP1 en células B estimuladas y además en esta interacción participa el dominio SH3 C-terminal de Vav1 (Kon-Kozlowski *et al*, 1996; Pani *et al*, 1996). La unión entre las dos proteínas podría ocurrir también de forma indirecta a través de la interacción de SHP1 con el receptor CD22 (Doody *et al*, 1995). Este hecho explicaría el efecto negativo de este receptor en la señalización a través del complejo BCR-CD19 (Sato *et al*, 1997). En las células NK, SHP1 se asocia al receptor de HLA, un receptor con actividad inhibitoria, y defosforila a Vav1, inhibiendo de esta forma los cambios citoesqueléticos necesarios para desencadenar la actividad citotóxica de la célula (Stebbins *et al*, 2003). En células T, se cree que la defosforilación de Vav1 es mediada por SHP2 de una forma controlada por la oxidación reversible de una cisteína específica del sitio activo de esta fosfatasa, siendo este contacto entre las dos proteínas indirecto. SHP2 se une al complejo Lat-Gads-Slp76 con el fin de regular los niveles de fosforilación de Vav1 (Kwon *et al*, 2005). La activación del TCR da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula T, las cuales van a oxidar la cisteína del sitio activo de SHP2, inactivando la actividad fosfatasa y permitiendo por consiguiente una mayor fosforilación de Vav1 (Kwon *et al*, 2005). A día de hoy, no se han identificado otras PTPasas que podrían estar encargadas de defosforilar Vav1 en linfocitos.

Se han descrito otros mecanismos de inhibición de la actividad de la proteína Vav1 independientemente de su fosforilación. Es el caso de Cbl-b, una proteína de la familia de inhibidores de la transducción que incluye c-Cbl, Cbl3, Sli-1 y Cbl de *D. melanogaster*. Estas proteínas se encargan de disminuir la señalización intracelular a través de la ubiquitinización de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (Joazeiro *et al*, 1999; Levkowitz *et al*, 1998; Ota *et al*, 1997; Thien *et al*, 1998). Se ha demostrado que Cbl-b es capaz de unirse a Vav1 en sus dominios SH3-SH2-SH3 (Bustelo *et al*, 1997). Otros estudios demuestran una inhibición de la señalización a través de Vav1 debida a Cbl-b en células COS1 (Bustelo *et al*, 1997) y linfocitos T y B (Krawczyk *et al*, 2000, Krawczyk *et al*, 2005). No obstante, el mecanismo molecular a través del cual se produce esta inhibición es desconocido. Esto no ocurre con otro miembro de la familia, c-Cbl, capaz de unirse al dominio SH2 de Vav1 a través de una tirosina fosforilada (Marengere *et al*, 1997), y promover su ubiquitinización y

posterior degradación, inhibiendo así la señalización dependiente de Vav1 (Miura-Shimura *et al*, 2003).

1.4.3. Localización subcelular

Una correcta localización subcelular es importante para asegurar completamente las respuestas biológicas inducidas por Vav1. Este paso es importante para facilitar la fosforilación de la proteína pero, además, también para desencadenar las posteriores respuestas biológicas, probablemente favoreciendo una interacción más eficiente de Vav1 con sus sustratos y moléculas efectoras. Este último punto es apoyado por la observación de que la actividad transformante de las versiones de Vav1 oncogénicas y no dependientes de fosforilación es reducida al eliminar la región SH3-SH2-SH3, que contiene los dominios implicados en las interacciones proteína-proteína (Schuebel *et al*, 1998; Zugaza *et al*, 2002). La actividad oncogénica de estas proteínas se restablece a niveles normales e, incluso, es incrementada cuando la región SH3-SH2-SH3 es reemplazada por una señal de anclaje a la membrana (Zugaza *et al*, 2002).

1.4.4. Otros mecanismos de regulación postraduccional

Existen estudios que han demostrado la existencia de otros mecanismos postraduccionales que también podrían contribuir a la actividad de la proteína Vav1. Se ha descrito que fracciones activas de la proteína Vav1 pueden ser ubiquitinizadas por unión a Cbl (Miura-Shimura *et al*, 2003) o Cbl-b (Sattler *et al*, 2002). También se ha reseñado que una fracción pequeña, y de localización nuclear, de Vav1 puede ser metilada en residuos de arginina bajo estimulación de las células T con anticuerpos CD28 (Blanchet *et al*, 2005; Lawson *et al*, 2007). Experimentos de proteómica también han sugerido que la proteína Vav1 podría ser sometida a acetilación en residuos específicos de lisina (Choudhary *et al*, 2009). El significado fisiológico de todas estas modificaciones postraduccionales aún no ha sido determinado con exactitud.

1.4.5. Efectos de algunos medicamentos

Algunos efectos inmunosupresores de la azatioprina han sido asociados a la disminución de la activación de las proteínas Rac1 mediada por Vav1 (Poppe *et al*, 2006). Se ha descrito que el tratamiento de los linfocitos T con inhibidores de la indoleamina-2,3-dioxigenasa da lugar a niveles reducidos de la expresión de Vav1 (Li *et al*, 2009). El efecto de ácidos grasos poliinsaturados en la sinapsis inmune está asociado a una reducción de la fosforilación de proteínas de señalización, incluyendo Vav1 (Geyeregger *et al*, 2005). La inhibición de la

hidrolasa S-adenosil-L-homocisteína, un tratamiento potencial contra enfermedades autoinmunes e inflamatorias, promueve el descenso de los niveles de metilación de Vav1 en residuos de arginina (Lawson *et al*, 2007).

1.4.6. Estados patológicos

Se ha descrito que en algunas enfermedades o trastornos existe una desregulación de la proteína Vav1 debida a:

- **Hiperfosforilación.** Vav1 puede mostrar niveles anormalmente elevados de fosforilación en tumores o líneas celulares debido a la activación constitutiva de quinasas, como pueden ser Bcr/Abl (Bassermann *et al*, 2002; Harnois *et al*, 2003) o Alk (Ambrogio *et al*, 2008). Niveles elevados de fosforilación en tirosinas han sido también observados en ratones *Lpr* (Mimura *et al*, 1997), en células T CD4⁺ (Garcia *et al*, 2009), y en ratones *tight-skin* (un modelo de fibrosis de piel y autoinmunidad, Saito *et al*, 2002).
- **Hipofosforilación y bajo reclutamiento a la membrana.** El reclutamiento a la membrana se ve afectado por el corte proteolítico dependiente de caspasa en células T anérgicas (Puga *et al*, 2008). La hipofosforilación ha sido observada en pacientes con la enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X (Aoukaty *et al*, 2005; Sanzone *et al*, 2003).
- **Niveles de expresión.** La expresión de Vav1 puede incrementarse por polimorfismos específicos en su locus (Jagodinic *et al*, 2009), por desmetilación (Fernandez-Zapico *et al*, 2005) y por mecanismos aún no caracterizados (Hollmann *et al*, ; Konno *et al*, 2007; Lazer *et al*, 2009; Lustig *et al*, 2009; Prieto-Sanchez *et al*, 2006).
- **Proteínas virales.** La fosforilación de Vav1 (y Vav2, pero no Vav3) pueden ser desencadenada en células B, T y sistemas de expresión ectópicos por M2, una proteína, codificada por los gammaherpesvirus, que es crucial para el establecimiento del estado latente de estos virus en células B. Esta fosforilación resulta de la formación de un complejo heteromolecular compuesto por M2, quinasas de la familia Src y Vav1. Además, M2 promueve la translocación de Vav1 a la membrana plasmática (Rodrigues *et al*, 2006; Pires de Miranda *et al*, 2008). Estímulos independientes de la translocación de Vav1 a la membrana plasmática son desencadenados por v-Nef, una proteína codificada por el virus de inmunodeficiencia humano-1 (VIH-1) en linfocitos T (Fackler *et al*, 1999; Rauch *et al*, 2008) y células dendríticas (Quaranta *et al*, 2003). v-Nef también inhibe la ubiquitinización de Vav1 mediante la exclusión del complejo c-Cbl/UbcH7 (enzima conjugada con ubiquitina H7, también conocida como enzima conjugada con ubiquitina E2 L3) de las

balsas lipídicas (Simmons *et al*, 2005). Finalmente, proteínas codificadas por la región pX del virus de la leucemia de células T de tipo 1 (HTLV-1) acentúan la fosforilación en tirosinas de Vav1 en linfocitos T (Mahana *et al*, 1998). Estos tres pasos de regulación parecen ser importantes para el ciclo de infección de estos virus (Fackler *et al*, 1999; Mahana *et al*, 1998; Pires de Miranda *et al*, 2008; Rodrigues *et al*, 2006; Simmons *et al*, 2005). Experimentos de proteómica han mostrado que Vav1 también está entre las proteínas que se unen a K1, una proteína codificada por el herpesvirus del sarcoma de Kaposi (Lee *et al*, 2005), aunque la activación de Vav1 en este complejo todavía no ha sido demostrada.

Las proteínas de algunos virus pueden promover la inactivación de Vav1. La hipofosforilación de Vav1 (debida a la inactivación de las quinasas Lck y Syk) ha sido observada en células B que expresan la proteína integral de membrana-2 codificada por el virus de Epstein-Barr (Miller *et al*, 1995). También se ha demostrado que la expresión de la proteína p12¹ codificada por el HTLV-1 induce reducidos niveles de fosforilación de Vav1 bajo la estimulación del TCR, un efecto que puede ser debido a la asociación directa de la proteína viral con la molécula adaptadora Lat (Fukumoto *et al*, 2007).

- **Patógenos bacterianos.** La fosforilación de Vav1 puede ser desencadenada independientemente de la estimulación antigénica en células T por la exotoxina VacA producida por *Helicobacter pylori*. Dado que la exotoxina bloquea la activación de NF-AT, su acción lleva a la activación de sólo algunas de las respuestas celulares inducidas por Vav1 en linfocitos (Boncristiano *et al*, 2003).

2. LA PROTEÍNA Vav1 EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

2.1. Análisis genético de la proteína Vav1

Como se mencionó anteriormente, la expresión de la proteína Vav1 está restringida, prácticamente, a las células de la línea hematopoyética. Por ello, en los últimos años, se han realizado diversos estudios *in vivo* con el fin de desentrañar las funciones fisiológicas específicas de Vav1 en estas células. A continuación se detallan los resultados obtenidos a partir de estos estudios para cada tipo celular.

2.1.1. Linfocitos T

2.1.1.1. Vav1 y el desarrollo de linfocitos T

Los ratones *knock-out* para Vav1 muestran un desarrollo normal y son completamente viables. Aunque la mayor parte de células del sistema hematopoyético presentan un desarrollo normal, existe un importante descenso del número de células T y la presencia de linfocitos T y B maduros incapaces de producir respuestas inmunes contra antígenos (Fischer *et al*, 1995, 1998; Tarakhovsky *et al*, 1995; Turner *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1995). La reducción del número de linfocitos T se debe a una señalización deficiente en los receptores pre-TCR y TCR $\alpha\beta$ (Fischer *et al*, 1998; Turner *et al*, 1997). Este hecho desencadena, durante la maduración linfocitaria, la producción de timocitos doble negativos inmaduros, produciéndose unas selecciones positiva y negativa deficientes que resultan en la reducción del número de linfocitos T citotóxicos y ayudantes maduros (Kong *et al*, 1998; Turner *et al*, 1997) (**Figura 6**). Por otro lado, el desarrollo de linfocitos T con receptores TCR $\gamma\delta$ no se ve afectado por la ausencia de Vav1, aunque sí la activación dependiente de estos receptores en linfocitos maduros (Swat *et al*, 2003). Por tanto, los linfocitos T $\gamma\delta$ maduros de ratones *knock-out* para Vav1 presentan una reducción de la proliferación celular y de la secreción de citoquinas (Swat *et al*, 2003).

Estos defectos en el desarrollo linfocitario no se observan, sin embargo, en ratones deficientes para Vav2 o Vav3, aunque los ratones dobles *knock-out* para Vav1 y Vav3 muestran un mayor bloqueo en el proceso de maduración linfocitaria que los ratones deficientes solamente en Vav1 (Doody *et al*, 2001; Fujikawa *et al*, 2003; Tedford *et al*, 2001) (**Figura 6**). Por tanto, Vav1 posee funciones parcialmente redundantes con otros miembros de la familia durante el desarrollo de los timocitos, ostentando Vav1 en papel más relevante pudiendo Vav3 compensar, en parte, los defectos provocados por su ausencia en el desarrollo de linfocitos T, siendo al contrario en linfocitos B (**Figura 6**).

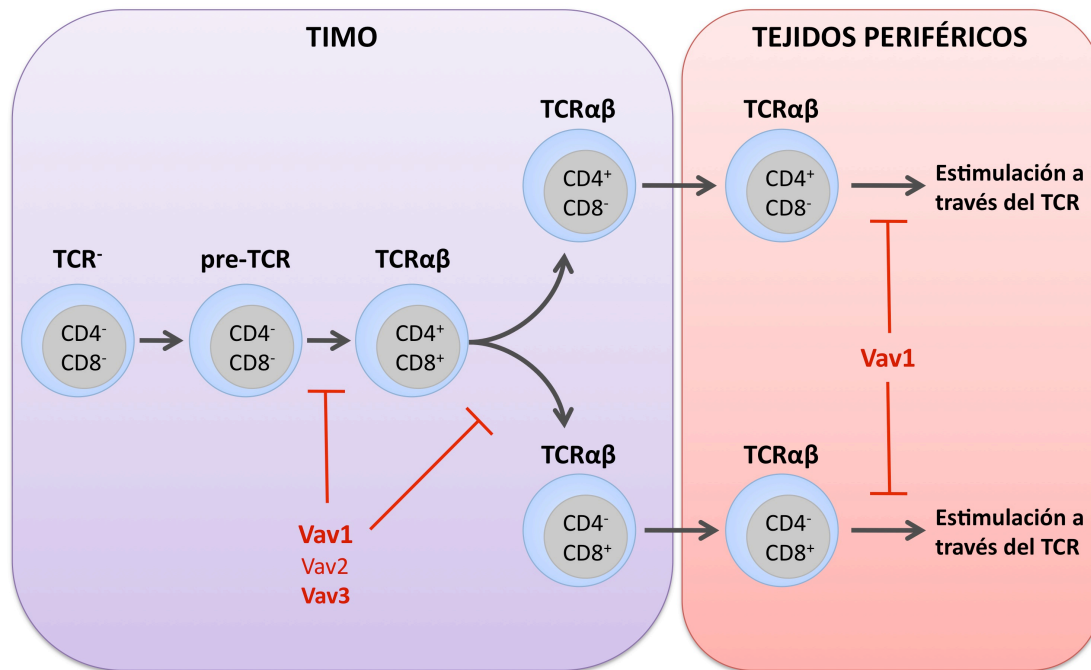


Figura 6. Representación esquemática de la maduración de los linfocitos T. Las etapas de la maduración que se ven comprometidas por la falta de los miembros de la familia Vav se indican en rojo según su relevancia.

En células T maduras, se ha demostrado que la ausencia de Vav1 afecta a la sinapsis inmune (Fischer *et al*, 1998; Holsinger *et al*, 1998), la polimerización de F-actina (Fischer *et al*, 1998; Holsinger *et al*, 1998; Kong *et al*, 1998) y la agregación de balsas lipídicas (Villalba *et al*, 2001) durante la estimulación del TCR (**Figura 6**). La conjugación LFA y MHC dependiente con las células presentadoras de antígeno también se ve afectada (Ardouin *et al*, 2003; Krawczyk *et al*, 2002) así como la proliferación de células T ligada a la estimulación del TCR (Charvet *et al*, 2006; Costello *et al*, 1999; Fischer *et al*, 1998; ; Tarakhovsky *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1995). La producción de citoquinas (Costello *et al*, 1999; Fischer *et al*, 1998; Penninger *et al*, 1999; Tarakhovsky *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1995) y la expresión de marcadores específico de estimulación (e. J., CD69) (Fischer *et al*, 1998; Zhang *et al*, 1995) también se ven reducidas. Las respuestas citotóxicas (Penninger *et al*, 1999), de células B dependientes de células T (Gulbranson-Judge *et al*, 1999) y asociadas a células T con TCRγδ (Swat *et al*, 2003) se ven comprometidas. Además, existe un reclutamiento deficiente de células T estimuladas en TCR y CD28 a tejidos periféricos (David *et al*, 2009).

Estos resultados indicaron que las células T deficientes en Vav1 no eran capaces de inducir una correcta activación de PI3K y PLCγ1 (Costello *et al*, 1999), conllevando la generación de

flujos de Ca^{2+} deficientes bajo estimulación del TCR (Costello *et al*, 1999; Fischer *et al*, 1998; Kong *et al*, 1998) y una baja activación de las rutas dependientes de Ras/Erk, PI3K/Akt y PKC/PKD (Costello *et al*, 1999) (**Figura 7**). La baja activación de Erk es debida a la eliminación de una ruta dependiente de Vav1 que estimula a Ras a través de RasGRP, un GEF específico de Ras que es activado por el DAG (Caloca *et al*, 2003, 2008; Reynolds *et al*, 2004; Zugaza *et al*, 2004) (**Figura 7**). Las células deficientes en Vav1 no son capaces de desencadenar la activación óptima de los factores de transcripción NF-AT (Fischer *et al*, 1998; Holsinger *et al*, 1998), NF- κ B (Costello *et al*, 1999) y Foxo1 (Charvet *et al*, 2006) (**Figura 7**).

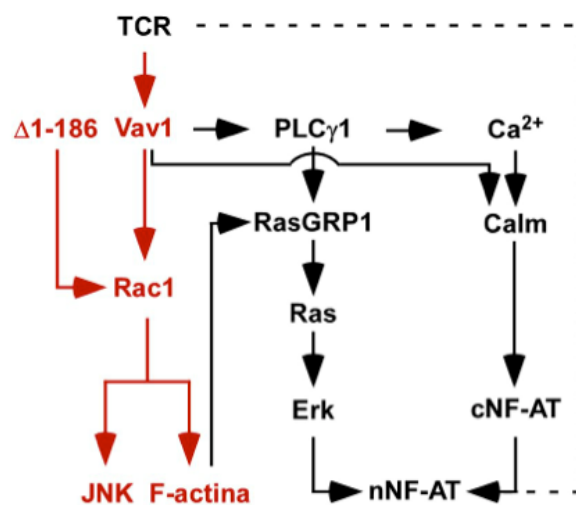


Figura 7. Ruta de Vav1 en linfocitos T. Las rutas directas, por debajo de Vav1 y Rac1, están representadas en rojo así como las respuestas biológicas que requieren de una señalización adicional aparecen en negro. Calm, calmodulina; cNF-AT, NF-AT en el citoplasma; nNF-AT, NF-AT en el núcleo.

En todos estos casos, los defectos observados parecen ser parciales, sugiriendo que puede existir redundancia funcional entre Vav1 y Vav3. Mientras que las deficiencias individuales de Vav2 y Vav3 no inducen defectos significativos en el desarrollo y la activación de linfocitos T, la ausencia al mismo tiempo de Vav1 y Vav3 acentúa los defectos en el desarrollo y funciones efectoras de linfocitos T anteriormente descritas en los ratones knock-out de Vav1 (Fujikawa *et al*, 2003). Estos defectos son mucho más graves en el triple *knock-out* para Vav1, Vav2 y Vav3 (Fujikawa *et al*, 2003).

Estos resultados están de acuerdo con la siguiente jerarquía de señalización Vav1 >> Vav3 >> Vav2 bajo los receptores pre-TCR y TCR (ver **Figura 6**, pág. 24). Un fenotipo aún más agravado de la deficiencia de este gen se observó al combinarlo con el de *Rasgrf2*, un locus que codifica para un GEF de Ras y Rac1 que también participa en las respuestas dependientes de la señalización del TCR (Ruiz *et al*, 2007).

A parte de los marcados defectos en el desarrollo y la proliferación encontrados en los ratones deficientes en Vav1, recientemente se ha descrito que la deficiencia de Vav1 promueve el desarrollo de linfomas de células T en ratones envejecidos. Esta tumorigénesis

es acrecentada en ratones deficientes en Vav1 y RasGRP2 (Ruiz *et al*, 2009). Las razones para este aumento de los procesos tumorales en estas dos cepas de ratones son aún desconocidas.

Recientemente, se han generado dos cepas de ratones *knock-in* para Vav1 en las que Vav1 endógeno ha sido remplazado por versiones de esta proteína con una mutación en el dominio PH o una región DH catalíticamente inactiva. La primera proteína mutante indujo un fenotipo hipomórfico en comparación con el observado en los ratones *knock-out* para Vav1. Curiosamente, los defectos inducidos por esta versión mutante afectan principalmente a las células T CD4⁺ por razones aún desconocidas (Prisco *et al*, 2005). Este resultado indica que el dominio PH de Vav1 tiene un papel limitado y específico del linaje de la célula T en la regulación de la actividad de Vav1. El análisis del fenotipo de los ratones que expresan la versión catalíticamente inactiva de Vav1 fue de gran interés, ya que permitió la discriminación entre las funciones dependientes de la actividad catalítica o de la función adaptadora de Vav1. Este estudio reveló que muchas de las funciones de Vav1 en el desarrollo y activación de células T era dependiente de su actividad catalítica. La única excepción fue la activación de rutas dependientes de PLC γ como la inducción de flujos de Ca²⁺ y la activación de las rutas de Erk y PKD (Saveliev *et al*, 2009).

2.1.1.2. Vav1 en la activación linfocitaria

La señal que desencadena la cascada de señalización en las células T es el reconocimiento por parte del receptor de células T (TCR) de un péptido unido a una proteína del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presente en una célula presentadora de antígeno (APC). Además de la estimulación del TCR, es necesaria, al mismo tiempo, una coestimulación de otros receptores como CD2 o CD28. La ausencia de estas señales coestimuladoras desencadena, en cada caso, respuestas anérgicas o apoptóticas (Michel *et al*, 2002).

La estimulación del TCR da lugar a la fosforilación de tirosinas de los motivos ITAM, presentes en las subunidades del TCR, por parte de las quinasas de la familia Src, Fyn y Lck (**Figura 8**). Para que esto ocurra, estas quinasas deben ser previamente defosforiladas por la tirosina fosfatasa CD45 en unos residuos de tirosina que se encuentran en la región C-terminal de estas quinasas (Salmond *et al*, 2008). Para la completa activación de estas quinasas también es necesaria la fosforilación de una tirosina activadora presente en la región del dominio de actividad quinasa correspondiente al *loop* de activación (A-loop) (Salmond *et al*, 2008). El establecimiento de interacciones con otras proteínas a través de sus dominios SH3 y SH2 y la fosforilación de la tirosina activadora favorecen el

desencadenamiento de su actividad enzimática así como la unión a los sustratos (**Figura 8**) (Salmond *et al*, 2008).

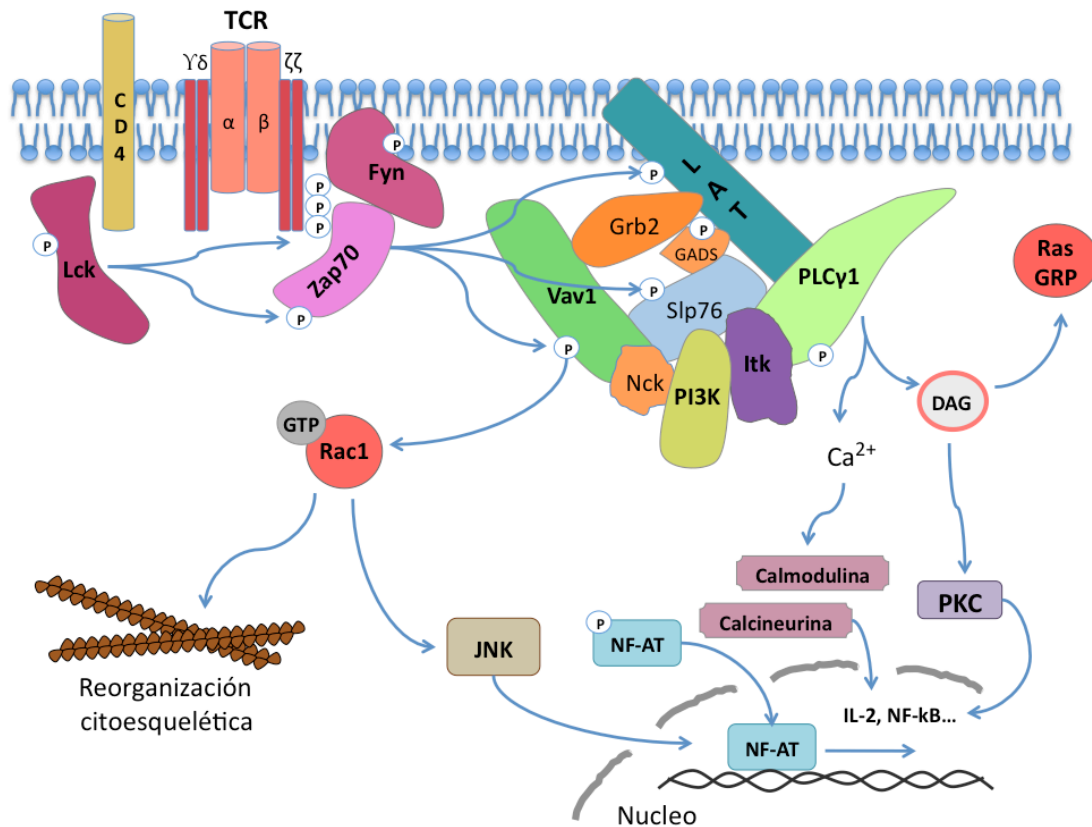


Figura 8. Ruta de señalización de Vav1 bajo el receptor de células T (TCR). Las flechas indican la inducción de la activación de unas proteínas a otras dentro de la cascada de señalización generada por la estimulación del TCR. Los círculos con una P dentro indican aquellas proteínas que son fosforilables. La flechas que llegan al núcleo indican la activación de la transcripción génica.

La proteína Lck activada es capaz de fosforilar a CD3 y a las cadenas ζ de los motivos ITAM que resultan en el reclutamiento de la quinasa Zap70 a la membrana (**Figura 8**) (van Oers *et al*, 1994, van Oers *et al*, 1995). Es entonces cuando la proteína Lck fosforila y activa a Zap70, que a su vez fosforila a la proteína transmembrana Lat, encargada del reclutamiento a la membrana plasmática de un gran número de proteínas implicadas en esta cascada de señalización (**Figura 8**) (Zhang *et al*, 1999). La proteína Fyn participará entonces en la activación de algunas de estas proteínas. Una vez ocurrido este proceso, Lck y Fyn vuelven a su estado inactivo inicial a través de la defosforilación de la tirosina del A-loop por parte de CD45 aunque no se descarta que haya otras fosfatasa implicadas en este proceso de inactivación (**Figura 8**) (Hermiston *et al*, 2003).

En el proceso de reclutamiento a la membrana iniciado por la proteína Lat activada, las proteínas Grb2, Gads y PLC γ 1 interaccionan directamente con la proteína Lat (**Figura 8**). A su vez, Grb2 se une al GEF de Ras, Sos, reclutándolo a la membrana, y permitiendo, a su vez, el desencadenamiento de la activación de Ras. Por otro lado, Gads es capaz de unirse a la proteína Slp76, uniéndose esta última también a PLC γ 1 (**Figura 8**). Estas proteínas conforman un complejo heteromolecular que permite la activación por fosforilación de Slp76 por Zap70, siendo este proceso indispensable para reclutar a la proteína Vav1, la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), la quinasa Itk de la familia Tec y la proteína adaptadora Nck, que se unirán a Slp76 a través de los residuos de esta previamente fosforilados (**Figura 8**) (Koretzky *et al*, 2006). La quinasa Itk junto con Lck y Zap70 son las encargadas de activar a PLC γ 1. Una vez activada, PLC γ 1 cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂ o PP₂) en dos productos, fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato (PIP₃) y diacilglicerol (DAG) (**Figura 8**). La producción de PIP₃ lleva a la apertura de canales de calcio (Ca²⁺) en la membrana del retículo endoplasmático, mientras que el DAG induce la activación de la proteína quinasa C (PKC) seguida de la activación de la ruta de señalización de Ras (**Figura 8**). El aumento del Ca²⁺ citosólico y la activación de PKC desencadenarán a su vez la transcripción de múltiples factores de transcripción tales como NF-AT, IL-2 o NF- κ B (**Figura 8**) (Katzav, 2004).

La activación de Vav1 se produce una vez que la proteína ha sido reclutada a la membrana a través de su interacción con Slp76. Hasta ahora la fosforilación de Vav1 ha sido asociada a la actividad de la quinasa Zap70, aunque no se puede descartar que existan otras quinasas que pudiesen participar también en la activación de Vav1 en linfocitos T (Costello *et al*, 1999; Michel *et al*, 1998; Salojin *et al*, 1999, Salojin *et al*, 2000). La activación de Vav1 en linfocitos T es necesaria para el correcto desarrollo de una serie de procesos importantes para la función linfocitaria.

Los dos efectos celulares más estudiados de la proteína Vav1 en linfocitos son la estimulación de la transcripción del gen *il-2* y la activación del factor de transcripción NF-AT (**Figuras 8**) (Billadeau *et al*, 2000; Costello *et al*, 1999; Fischer *et al*, 1995, 1998; Turner *et al*, 1997; Wu *et al*, 1995). La activación de NF-AT en células T es un proceso complejo que requiere la concurrencia de diversos eventos. Uno de ellos es el aumento de los niveles de calcio intracelular que permiten la activación de la calcineurina, una proteína fosfatasa encargada de defosforilar a NF-AT permitiendo así su traslocación al núcleo (**Figura 8**). Una vez en el núcleo, es necesaria la transducción de señales procedentes de las rutas de señalización de Ras y Rac1 para que NF-AT promueva la transcripción de sus genes diana

(**Figura 8**) (Serfling *et al*, 2000; Zhu *et al*, 2000). Vav1 contribuye a generar el aumento de los niveles de calcio intracelular y producir la activación de NF-AT en los linfocitos T (**Figura 8**). La activación, por sí sola, de las GTPasas Rho/Rac no es suficiente para estimular la activación de NF-AT o generar flujos de Ca^{2+} , por lo tanto, la actividad de intercambio de Vav1 no es suficiente para la activación de NF-AT y la producción de calcio intracelular en linfocitos T (**Figura 8**). Además, las versiones oncogénicas de Vav1, que no presentan el dominio CH ($\Delta 1-66$) o el dominio CH más la región ácida ($\Delta 1-189$), no son capaces de inducir ninguna de estas dos respuestas a pesar de ser capaces de desencadenar una activación exacerbada de otras proteínas corriente abajo de Rac, como JNK (López-Lago *et al*, 2000; Wu *et al*, 1995). Estos mutantes de Vav1, sin embargo, son capaces de activar a NF-AT en presencia de ionomicina (un ionóforo que aumenta la concentración de calcio citosólico) o mutantes activos de la calcineurina (Billadeau *et al*, 2000), por lo tanto, el dominio CH posee alguna función efectora en la generación de flujos de calcio que favorecen la activación de NF-AT. Ya que PLC γ es la principal proteína implicada en el aumento de los niveles de calcio intracelulares, es posible que el dominio CH de Vav1 actúe como adaptador, permitiendo la unión de alguna proteína o complejo multiproteico responsable de la activación de PLC γ y, por tanto, de la generación de flujos de Ca^{2+} (**Figura 8**).

2.1.1.3. Vav1 y el citoesqueleto

Dado su papel como factor de intercambio nucleotídico de las GTPasas Rho/Rac, es lógico asumir que la proteína Vav1 transduce las señales del TCR al citoesqueleto de actina. Se ha demostrado que, en ausencia de Vav1, los linfocitos presentan una polimerización de actina bastante reducida (Fischer *et al*, 1998; Holsinger *et al*, 1998).

En un primer momento, la proteína Vav1 es fundamental para las reorganizaciones citoesqueléticas que tienen lugar, tras la estimulación del TCR, para la formación de la sinapsis inmune. En células T deficientes en Vav1, no se producen uniones entre el TCR y el citoesqueleto de actina y, por tanto, no se produce la correcta agregación del receptor con la consiguiente disminución en la señalización linfocitaria (Fischer *et al*, 1998; Holsinger *et al*, 1998). Vav1 es clave para la agregación de las balsas lipídicas en la membrana plasmática durante la sinapsis inmune, teniendo un papel integrador en la conexión entre los cambios citoesqueléticos y la polarización de las balsas lipídicas inducida por el receptor de células T.

Durante la sinapsis inmune se produce una acumulación de receptores TCR en el centro de la interfaz entre la célula T y la célula APC. Rodeando a la acumulación de receptores se genera un anillo de integrinas linfocitarias asociadas a la función del antígeno-1 (LFA-1)

(Monks *et al*, 1998). Este movimiento de proteínas requiere reordenamientos en el citoesqueleto. La célula T se polariza moviéndose el centro organizador de microtúbulos (MTOC) que queda mirando hacia la célula APC (Kupfer *et al*, 1989). La proteína Vav1, bajo las señales recibidas del TCR, inducirá la reorganización del citoesqueleto, la activación de LFA-1 y la polarización de MTOC, pero esta proteína no es estrictamente necesaria para la agrupación de proteínas en la membrana o para los cambios morfológicos producidos por la formación de los conjugados (Ardouin *et al*, 2003).

La señalización a través de las GTPasas Rho/Rac es clave para la formación de la sinapsis (Arrieumerlou *et al*, 2000; Valitutti *et al*, 1995; Villalba *et al*, 2001). La activación de Rac1 mediada por Vav1 en linfocitos permite la agregación de las balsas lipídicas, favoreciendo así la formación de la sinapsis inmune (Villalba *et al*, 2001). Entre los efectores que llevan a cabo esta misión está la proteína PAK y la quinasa PIP5K que activa a las proteínas vinculina y talina (dos proteínas responsables de las uniones entre el citoesqueleto y la membrana) (Critchley, 2000). Además, Rac1 interviene en la polimerización del citoesqueleto de actina a través de la activación de WAVE, una proteína adaptadora capaz de activar a Arp2/3 (una proteína con actividad polimerizadora de filamentos de actina) (Eden *et al*, 2002).

No se puede descartar que Vav1 regule las respuestas citoesqueléticas a través de otras GTPasas distintas de Rac1. RhoG, por ejemplo, una vez activada por la versión oncogénica de Vav1, es capaz de promover la polimerización de actina aunque no se ha esclarecido a través de qué moléculas efectoras (Vigorito *et al*, 2003). Aunque la activación de Cdc42 mediada por la proteína Vav1 aún no ha sido completamente establecida, esta GTPasa funciona como un activador de la proteína WASP, mediador clave en la polimerización de actina, mediante el control de la actividad de Arp2/3 (Thrasher, 2002). Esta hipótesis es apoyada por dos hechos, que los linfocitos de ratones carentes de WASP presentan respuestas citoesqueléticas similares a aquellos procedentes de ratones deficientes en Vav1 (Snapper *et al*, 1998), y que, en estos últimos, no se observa activación de Cdc42 (Krawczyk *et al*, 2000).

Aunque Vav1 es un GEF de la familia Rho/Rac, esto no significa que su actividad enzimática sea la única manera a través de la cual contribuye a respuestas celulares que precisan de la remodelación del citoesqueleto de actina. Existen evidencias que sugieren que otros dominios de esta proteína podrían contribuir a la regulación del citoesqueleto indirectamente, mediante la generación de flujos de Ca^{2+} o la activación de factores de transcripción (ver apartado anterior). Como se comentó anteriormente, se ha descrito la interacción directa de Vav1 con otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina,

como talina y vinculina (Fischer *et al*, 1998) o zixina (Hobert *et al*, 1996). Estas uniones sugieren una posible función adaptadora de la proteína Vav1 que, a través de sus dominios SH2 y SH3, podría estar sirviendo de conexión entre la cascada de señalización y distintos elementos citoesqueléticos. En el futuro, sería interesante estudiar este punto más a fondo para confirmar esta hipótesis.

2.1.2. Linfocitos B

En los ratones deficientes en Vav1, se observó también la existencia de defectos del desarrollo en la línea linfoide caracterizados por la ausencia de células B-1a. Además, los defectos observados en células B de ratones *knock-out* para Vav1 no tienen que ver con el número de células B, sino con la capacidad de estas para responder a estímulos específicos a través de sus receptores BCR y CD19 (Fischer *et al*, 1998; O'Rourke *et al*, 1998; Tarakhovsky *et al*, 1995; Turner *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1995). Algunas de las respuestas deficientes de estas células B *in vivo* se deben a la falta de secreción de interleuquina-4 (IL-4) por parte de las células T ayudantes (Gulbranson-Judge *et al*, 1999). La reducida proliferación observada en estas células *in vivo* se explica con este hecho. A pesar de que la expresión de Vav1 no es necesaria para generar los linfocitos B convencionales, sí lo es para producir los linfocitos B-1a, una subpoblación especializada de linfocitos B que se localiza en el peritoneo, ya que para su generación, a partir de células madre embrionarias, y su perpetuación en el adulto son necesarias estimulaciones periódicas a través del BCR (Fischer *et al*, 1998; Tarakhovsky *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1995).

Recientemente, se ha descrito la redundancia funcional de las proteínas Vav existente en linfocitos B. Los ratones deficientes para Vav1 y Vav2, al contrario que los deficientes sólo en Vav1, presentan una gran reducción en el número de linfocitos B maduros (Tedford *et al*, 2001). Además, estos linfocitos B no son capaces de proliferar en respuesta a la estimulación del BCR y no movilizan el calcio intracelular tras su activación a través del BCR (Tedford *et al*, 2001) o lipopolisacáridos (Hebeis *et al*, 2005). Esto indica que Vav2 es capaz de compensar parcialmente la ausencia de Vav1 durante la maduración de los linfocitos B y la generación de respuestas celulares en linfocitos B maduros. Los ratones carentes de los tres miembros de la familia Vav presentan un número aún menor de linfocitos B maduros (Fujikawa *et al*, 2003). Además, los pocos linfocitos B maduros que presentan tienen una vida media corta, debido a que no son capaces de promover la activación de NF- κ B (Vigorito *et al*, 2005).

2.1.3. Plaquetas

La deficiencia en el gen *Vav1* no produce defectos graves en plaquetas. Sin embargo, la deficiencia combinada de los genes *Vav1* y *Vav3* inducen defectos en la agregación plaquetaria y la diseminación de la glicoproteína VI recombinante del receptor de colágeno (GPVI) y de integrinas (Pearce *et al*, 2004, Pearce *et al*, 2007). Estas moléculas también producen la reducción de los niveles de activación de PLC γ 2 en las plaquetas deficientes en *Vav1* y *Vav3* (Pearce *et al*, 2004, 2007). En esta respuesta, *Vav2* es prescindible ya que las plaquetas deficientes en los tres miembros de la familia *Vav* presentan los mismos defectos que las células deficientes en *Vav1* y *Vav3* (Pearce *et al*, 2004). *Vav1* y *Vav3*, además, también trabajan por debajo del segundo receptor de plaquetas, CLEC-2 (Suzuki-Inoue *et al*, 2007).

2.1.4. Neutrófilos

Los neutrófilos deficientes en *Vav1* presentan defectos en migración bajo condiciones de flujo así como una extravasación deficiente de la vasculatura inflamada (Phillipson *et al*, 2009). En cooperación con *Vav3*, *Vav1* es importante para la adhesión, diseminación y fagocitosis dependientes de la integrina α_M/β_2 pero no para la quimiotaxis. Estudios de señalización han demostrado que estas dos proteínas de la familia *Vav* son requeridas para la activación de proteínas quinasa, ya que los neutrófilos deficientes en ambas proteínas presentan niveles reducidos de fosforilación total en tirosinas y una disminución en los niveles de fosforilación de Pyk2, paxilina y Akt (Gadikis *et al*, 2004). *Vav1*, en combinación con *Vav3*, también participa en el óptimo ensamblaje de las respuestas hemorrágicas y de edema mediadas por IgG/Fc γ R en pulmón y piel (Utomo *et al*, 2008).

Finalmente, los neutrófilos deficientes para los tres miembros de la familia *Vav* presentan deficiencias en la liberación de ROS bajo diferentes estímulos (Graham *et al*, 2007; Miletic *et al*, 2007), en el tránsito intersticial deficiente a través de los lugares de infección bacteriana (Graham *et al*, 2009), y en respuestas deficientes a organismos nosocomiales (Graham *et al*, 2007).

2.1.5. Macrófagos

Vav1, cooperativamente con *Vav3*, es importante para la fagocitosis mediada por el complemento en macrófagos. Estas proteínas, sin embargo, no son requeridas para la fagocitosis inducida por Fc γ R. La deficiencia solo del gen *Vav1* o *Vav3* no induce ningún defecto en fagocitosis, indicando que ambas proteínas son requeridas para la activación de

este proceso. En cambio, Vav2 es totalmente dispensable, ya que los fenotipos de los macrófagos Vav1^{-/-}, Vav2^{-/-}, Vav3^{-/-} y Vav1^{-/-}Vav3^{-/-} son idénticos. La fagocitosis anormal ha sido asociada a la ausencia de reclutamiento del complejo Arp2/3 y de la F-actina a la copa fagocítica (Hall *et al*, 2006).

Los macrófagos deficientes para las tres proteínas Vav no inducen niveles apropiados de ROS bajo estimulación con lipopolisacáridos (LPS) o proteoglicanos (PGN). Bajo estas condiciones, se ha observado que los macrófagos derivados de médula ósea no activan de forma apropiada a MAPK, Akt y Erk. También se ha observado una producción reducida de TNF α e interleuquina-10 (IL-10). Si embargo, la activación de JNK y NF κ B y la producción de interleuquina-6 (IL-6) también ocurren de forma normal en los neutrófilos deficientes en la familia Vav (Miletic *et al*, 2007).

En cultivo, los macrófagos deficientes en Vav1 muestran un área de adhesión más pequeña, bajos niveles de microtúbulos y una reducida rapidez de migración (Wells *et al*, 2005). Cuando se combina con la eliminación de Vav2 y Vav3, la deficiencia de la familia Vav induce macrófagos morfológicamente muy alargados con frentes delanteros muy pequeños, una mayor persistencia migratoria en movimientos aleatorios y defectos severos en las respuestas de adhesión y diseminación mediadas por integrinas. Además, estos macrófagos presentan respuestas efectoras deficientes en señalización, como la activación de la ruta de Erk (Bhavsar *et al*, 2009).

2.1.6. Mastocitos

El desarrollo de mastocitos no se ve afectado por la ausencia de Vav1. Aunque estas células muestran una reducción en la desgranulación y la producción de citoquinas bajo estimulación en ausencia de Vav1. Por el contrario, la producción de IL-10 está hiperactivada en los mastocitos deficientes en Vav1. Como en el caso de los linfocitos T, este defecto ha sido asociado a la activación deficiente de PI3K y PLC γ 2. Debido a estos defectos, estas células no pueden desencadenar los flujos de Ca²⁺ adecuados tras su estimulación. La activación de JNK, pero no de Erk1 o Erk2, es también defectuosa en estas células. Todos estos defectos tienen una gran importancia fisiológica ya que las células deficientes en Vav1 no pueden responder de manera apropiada a los estímulos anafilácticos sistémicos (Manetz *et al*, 2001).

2.1.7. Células asesinas naturales (NK)

La proteína Vav1 no es importante para el desarrollo de las células NK (Chan *et al*, 2001; Colucci *et al*, 2001). Sin embargo, sí es importante para las funciones dependientes de

células NK como las respuestas citotóxicas naturales (Chan *et al*, 2001) y antitumorales (Colucci *et al*, 2001). La respuesta defectuosa de las células NK deficientes en Vav1 esta ligada a defectos en la activación de la ruta de Erk y a la granulación deficiente (Colucci *et al*, 2001). Sin embargo, a diferencia de otras células hematopoyéticas, no se han observado ninguna disfunción en los flujos de Ca²⁺ intracelular (Colucci *et al*, 2001). La proteína Vav1 también es requerida para las respuestas citotóxicas inducidas por las células NK a través del receptor DAP10. Esta implicación es específica de Vav1, ya que Vav2 y Vav3 no presentan ningún rol en esta respuesta biológica (Cella *et al*, 2004). En su lugar, Vav1, en cooperación con Vav2 y Vav3, es requerido para la muerte celular inducida por las células NK a través de los receptores DAP10, DAP12 y FcγR (Cella *et al*, 2004). A este nivel de la señalización, también ha sido demostrado que la deficiencia simultánea de las tres proteínas Vav bloquea la estimulación normal de Erk por los receptores de las células NK mencionados anteriormente (Cella *et al*, 2004).

2.1.8. Células dendríticas

La proteína Vav1 es importante en la adhesión mediada por integrinas y en la dinámica normal de los podosomas en estas células. Los defectos en la adhesión se han asociado a la activación impropia de FAK (quinasa de adhesión focal), PLCγ2, Erk1 y Erk2 por las integrinas durante la adhesión dirigida por fibronectina (Spurrell *et al*, 2009).

La deficiencia en las tres proteínas Vav afecta de forma severa a la señalización de DAP12 y FcγR, dos receptores que contienen dominios ITAM presentes en células dendríticas, dando lugar a una presentación deficiente del antígeno. Este defecto ha sido ligado a la producción baja de ROS por NOX2 (NADPH oxidasa 2) y por una segunda, aunque no caracterizada, ruta independiente de la de ROS/NOX2 (Graham *et al*, 2007). Que estos defectos sean debidos a Vav1 o a la acción cooperativa de diferentes combinaciones de las proteínas de la familia Vav todavía no ha sido esclarecido.

2.2. Vav1 como diana terapéutica

Dado el importante papel que representan las proteínas Vav, y en concreto Vav1, en respuestas relacionadas con el sistema inmune, se puede especular que su inactivación podría ser una vía farmacéutica para el tratamiento de enfermedades directa o indirectamente relacionadas con el sistema inmune. En este contexto, la disponibilidad de modelos animales de la familia Vav ha revelado algunos de los puntos a favor y en contra de estas estrategias. Por un lado, se ha descrito que la inactivación de las proteínas Vav podría

ser eficiente para combatir la encefalomiелitis autoinmune (Korn *et al*, 2003), la artritis reumatoide (Cremasco *et al*, 2008), las reacciones inflamatorias exacerbadas (Phillipson *et al*, 2009; Utomo *et al*, 2008), y el rechazo en trasplantes (Wang *et al*, 2007; Weckbecker *et al*, 2007). Por el contrario, también se ha visto que la inactivación de estas proteínas puede desencadenar inmunodeficiencia, enfermedades cardiovasculares (Sauzeau *et al*, 2006, Sauzeau *et al*; Sauzeau *et al*, 2007), y disfunciones a nivel de cerebelo (Quevedo *et al*, 2010). Sin embargo, dado que los animales *knock-out* presentan las mutaciones a nivel de la línea germinal, sería interesante usar en un futuro animales inducibles *knock-in* para eliminar la expresión de Vav1 en el periodo adulto, pudiendo así mimetizar el escenario clínico de forma más aproximada.

OBJETIVOS

- 1. Caracterización de nuevos mecanismos reguladores de la función de Vav1 en linfocitos.**
- 2. Identificación de los principales sitios de fosforilación presentes en Vav1.**
- 3. Determinación de la cinética de fosforilación de los aminoácidos identificados usando una colección de nuevos anticuerpos fosofospecíficos contra Vav1.**
- 4. Estudio de los roles reguladores y/o efectores de los sitios de fosforilación de Vav1 identificados en nuestro análisis.**
- 5. Análisis de los elementos de la señalización celular que regulan la activación de Vav1 en linfocitos.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PLÁSMIDOS

El vector de expresión del dominio SH3 C-terminal de Vav1 fusionado con GST (pGEX-SH3) fue cedido por el Dr. P. Simas (Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Portugal). El plásmido pMEX fue un obsequio del Dr. M. Barbacid (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas-CSIC, Madrid). El plásmido reportero pNFAT-Luc fue un regalo del Dr. G. R. Crabtree (Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, U.S.A.). El plásmido pRL-SV40 se obtuvo de Promega y los plásmidos pFR-Luc y pFA2-cJun de Stratagene. Los vectores vacíos pEGFP-C2 y pEGFP-C3 se compraron a Clontech, los plásmidos pcDNA3 y pEF1 a Invitrogen, el plásmido pGEX-4T3, que codifica para la proteína de fusión GST, a Pharmacia.

Los vectores de expresión para las formas silvestre (Vav1^{WT}) y oncogénica (Vav1^{Δ1-186}) de Vav1 subclonadas en los plásmidos pcDNA3, pEF1, pMEX y pEGFP, la forma truncada de Vav1^{Δ835-845} en el plásmido pcDNA3, así como las construcciones Vav1^{DH-PH-ZF}, Vav1^{DH+N-PH}, Vav1^{PH} y Vav1^{ZF} subclonadas en el vector pEGFP-C2, fueron generados previamente en nuestro laboratorio. Los mutantes puntuales Vav1^{Y142F}, Vav1^{Y160F}, Vav1^{Y174F}, Vav1^{Y541F}, Vav1^{Y544F} y Vav1^{P833L}, y los mutantes combinados Vav1^{Y142F+Y174F}, Vav1^{Y160F+Y174F}, Vav1^{Y3xF} (triple mutante de las tirosinas 142, 160 y 174 a fenilalanina) y Vav1^{Y3xF+Δ835-845} en los plásmidos pcDNA3 y pEF1 fueron obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio mediante mutagénesis dirigida.

Los vectores de expresión de las proteínas de fusión EGFP-Vav1^{Δ835-845} (pMB6) y EGFP-Vav1^{Y3xF+Δ835-845} (pMB46) fueron obtenidos del siguiente modo: la forma truncada Vav1^{Δ835-845} se amplificó por PCR con el oligo directo 5'- CCA GGA CAA GAA AAG GAA TG -3' (amplificando justo antes del sitio de restricción para BamHI que presenta la secuencia de Vav1 antes del dominio SH3 N-terminal) y el reverso 5'- AGC TAG GAT CCA ATA TTC AGT TAG AAG GGA ACC AGC C -3' (la secuencia de restricción de BamHI, utilizada para el clonaje, aparece subrayada) utilizando como molde el plásmido pKES29, que consiste en la secuencia de la forma truncada en el vector pcDNA3. A continuación se subclonó el fragmento resultante de la PCR en los vectores que codifican para Vav1^{WT} (pSRM3) o Vav1^{Y3xF} (pKES14), después de la digestión enzimática con BamHI.

Para generar el vector de expresión de la forma truncada Vav2^{Δ860-868} fusionada con EGFP (pMB127), se introdujo por mutagénesis dirigida un codón de terminación en el lugar del codón correspondiente al aminoácido 860 de Vav2, utilizando el kit de Quickchange (Stratagene). Con este fin, se usó de molde el plásmido pAA7, vector de expresión de la forma silvestre de Vav2 etiquetada con EGFP en su región N-terminal, y para introducir la

mutación se utilizaron los siguientes oligos: directo 5'- CGG TTG GTT TCC TTC GAC GTA GGT GGA AGA GGA AGG CGT CCA G -3', y reverso 5'- CTG GAC GCC TTC CTC TTC CAC CTA CGT CGA AGG AAA CCA ACC G -3' (codón de terminación subrayado).

El vector de expresión de la forma truncada Vav3^{Δ841-847} fusionada con EGFP (pMB121) fue generado mediante amplificación por PCR usando el oligo directo 5'- ATA CTC GAG GCC ACC ATG GAG CCG TGG AAG CAG TGC GCT C -3' y el reverso 5'- CCG GGC GAA TTC TTA TGT GGA TGG AAA CCA GCC CAC CC -3' (las secuencias para XhoI y EcoRI se encuentran subrayadas) utilizando como molde el plásmido pC.HA-Vav3, que contiene la secuencia de la forma silvestre de Vav3 etiquetada con el epítipo HA (Addgene). A continuación, el fragmento resultante de la reacción de PCR fue introducido en el vector pEGFP-C3 linearizado por digestión enzimática con XhoI y EcoRI. Un procedimiento similar se empleó para obtener los vectores de expresión de las proteínas de fusión EGFP-*DmVav*^{WT} e EGFP-*DmVav*^{Δ781-793}. Se utilizaron los siguientes oligos para la amplificación por PCR a partir del plásmido pLD18, que contiene la secuencia silvestre de *DmVav*, etiquetada con el epítipo Myc, subclonada en el vector pSecTag (cortesía de la Dra. S. Katzav, Department of Development Biology and Cancer Research, Faculty of Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Israel) : el directo 5'- ATA CTC GAG GCC ACC ATG GCC AGC AGC AGT AGC AGC AAC -3' (el sitio de restricción XhoI aparece subrayado), en ambos casos, y los reversos 5'- CCG GGC GAA TTC TCA AAG CTC TTC GCT GGC CAA TTT CTG -3' (el sitio de restricción EcoRI aparece subrayado) y 5'- CCG GGC GAA TTC TCA CTT GGG AAA GTA GCC CAC CGT ATC -3' (el sitio de restricción EcoRI aparece subrayado), respectivamente. El producto de PCR se introdujo en el plásmido pEGFP-C3 linearizado con XhoI y EcoRI como en el caso anterior.

Para generar el plásmido que codifica para la proteína de fusión EGFP-Vav1^{DH} (pMB49) se introdujo un condón de terminación en el ADNc de *Vav1* presente en el vector que codifica para la proteína EGFP-Vav1^{DH+NPH} (pNM109) usando los oligos 5'- CTA GTG AAA CAC ACA CAG TAG GCT ACA GAG AAG GAG AAC-3' y 5'-GTT CTC CTT CTC TGT AGC CTA CTG TGT GTG TTT CAC TAG-3' (codón de terminación subrayado).

El vector de expresión de la proteína de fusión EGFP-Vav1^{Alpha6} (pMB48) se generó por amplificación por PCR usando los oligos directo 5'- GGC GAA TTC CAG GAG CTA GTG AAA CAC ACA CAG GAT GC -3' y reverso 5'- AGC TAG GAT CCA ATA TTC AGT TCA GAG ACT GGT CCA GGT TC -3' (las secuencias de EcoRI y BamHI se indican subrayadas). Se usó como molde el plásmido pNM103, que consiste en la secuencia del casete DH-PH-ZF de Vav1 en el vector pEGFP-C2. El fragmento obtenido se introdujo en el vector pEGFP-C2 linearizado con EcoRI y BamHI.

Los vectores de expresión que codifican para el resto de mutantes puntuales y combinados de la proteína Vav1 (**Anexo I**) se generaron utilizando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Agilent Technologies). Los oligos utilizados para realizar la mutagénesis se recogen en el **Anexo II**. Tanto los plásmidos generados por mutagénesis como aquellos obtenidos por técnicas de clonaje fueron secuenciados para descartar la presencia de mutaciones no deseadas.

2. CULTIVOS CELULARES

Todas las líneas celulares de Jurkat fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de glutamina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina. Se utilizaron como células Jurkat silvestres a la línea celular Jukat Tet-on (obtenida de ATCC). Las líneas celulares correspondientes a las células Jurkat deficientes en alguna proteína se recogen en la **Tabla 1**.

Línea celular Jurkat	Proteína deficiente	Origen
Jurkat Tet-on	-	ATCC
J.31.13	TCR	Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-CSIC, Madrid)
ANJ3	Lat	Dr. L.E. Samelson (Department of Cellular and Molecular Biology, Centre of Cancer Research, NCI, Bethesda, U.S.A.)
P116	Zap70	Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-CSIC, Madrid)
J.Cam1.6	Lck	ATCC
J45.01	CD45	ATCC
J14	Slp76	Dr. A. Weiss (Department of Medicine, Microbiology and Immunology, University of San Francisco, U.S.A)
J.gamma1	PLC γ 1	ATCC

Tabla 1. Líneas celulares de Jurkat utilizadas en este trabajo de tesis. Esta tabla recoge el nombre de la línea celular, si no expresan alguna proteína y el origen de la misma.

La línea celular DT40 fue cultivada en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de FBS, 1% suero de pollo, 0,1 mM β -mercaptoetanol (Sigma), 1% glutamina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina.

Las líneas celulares COS-1 y NIH3T3 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% de glutamina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina. Todas las

líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera con un contenido del 5% de CO₂.

3. ESTIMULACIÓN CELULAR Y TRATAMIENTOS CON INHIBIDORES

En los experimentos en los que se deseaba activar la ruta de señalización del receptor de células T (TCR) en las células Jurkat, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon UCHT1, Merck-Millipore) a una concentración de 10 µg / mL en medio RPMI-1640 sin suero (salvo en periodos de incubación superiores a 1 hora que se usó medio completo) durante los periodos de tiempo indicados en un baño o estufa a 37 °C.

Para estimular el receptor de células B (BCR) en los ensayos de actividad luciferasa, las células DT40 fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgM (Southern Biotech) a una concentración de 5 µg / mL en medio completo en una estufa a 37 °C.

Para el tratamiento de las células Jurkat con el inhibidor de la familia de quinasas Src, PP2 (Merk Millipore), las células a tratar se pusieron en medio sin suero y se añadió el inhibidor PP2 a una concentración de 100 µM durante 1 hora a 37 °C. Para inhibir la actividad de PLCγ1, las células Jurkat fueron incubadas con el inhibidor U73122 (Merk Millipore) a una concentración de 10 µM durante 30 minutos a 37 °C. Para inhibir la actividad de la quinasa PKC, las células Jurkat se trataron con el inhibidor GF109203X (Sigma) a una concentración de 5 µM durante 30 minutos a 37 °C. En los experimentos en que fue necesario, la estimulación con anti-CD3 se realizó después del tratamiento con los inhibidores manteniendo los mismos en el medio.

4. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

4.1. Tranfección por electroporación

Este procedimiento se utilizó para transfectar las células Jurkat y DT40 para los ensayos de actividad luciferasa. En primer lugar, se recogieron por punto 20 millones de células en el caso de las Jurkat y 10 millones en el caso de las DT40. Las células se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 sin suero, centrifugando a 1400 rpm a temperatura ambiente. Se resuspendieron en el volumen adecuado de medio sin suero para obtener una densidad celular de 100.000 células / µL (Jurkat) o 50.000 células / µL (DT40). Para realizar la

electroporación se usaron cubetas Gene Pulser de 0,4 cm de Bio-Rad. En cada cubeta se introdujeron 200 μ L del cultivo así como la cantidad correspondiente de los plásmidos que se deseaban transfectar, mezclando todo suavemente con la pipeta. La electroporación se realizó en un sistema Gene Pulser II de Bio-Rad a 950 μ F y 250 V durante 30-40 ms. Posteriormente, el contenido de cada cubeta se trasladó a un frasco de cultivo de 25 cm² con 10 mL de medio completo. La células transfectadas se cultivaron durante 36-48 horas en condiciones estándar de cultivo para posteriormente proceder a realizar los ensayos de actividad luciferasa.

4.2. Método del DEAE-dextrano

Este procedimiento fue inicialmente descrito por Ridley y Hall en 1992. Este método se ha utilizado para la transfección de células en experimentos de *pull-down*, inmunoprecipitación y detección de proteínas a través de *Western-blot*. El día previo a la transfección, cada placa confluyente de células COS1 (aproximadamente 4×10^6 células) fue dividida en proporción 1:3 en placas de 10 cm de diámetro. Al día siguiente se procedió a la transfección utilizando una mezcla de 4 mL de DMEM (sin L-glutamina ni suero pero con antibióticos), 0,16 mL de una solución DEAE-dextrano/cloroquina (PBS con 10 mg/mL de DEAE-dextrano (Sigma) y 2,5 mM de cloroquina (Sigma)), y 8 μ g del plásmido a transfectar. Las células fueron lavadas dos veces con medio sin suero y se incubaron con la mezcla anterior en condiciones estándar de cultivo durante 3-4 horas. Transcurrido este tiempo, el medio fue retirado y las células se trataron con 5 mL de una solución DMSO (Sigma) al 10% en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras aspirar la solución de DMSO, las células se incubaron en medio completo durante un periodo de 36-48 horas.

4.3. Método de la precipitación de fosfato cálcico

Este procedimiento se empleó para los ensayos de formación de focos en células NIH3T3. Con este fin, $1,5 \times 10^5$ células NIH3T3 fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro y transfectadas al día siguiente. Para la transfección se mezclaron 20 μ g de ADN de timo de ternera de alto peso molecular (Sigma) con 1 μ g del plásmido a transfectar en un volumen final de 0,5 mL de H₂O MiliQ estéril (por placa). A esta mezcla se añadieron 0,5 mL de 0,5 M CaCl₂. La solución anterior se añadió gota a gota sobre 1 mL de tampón HNP (50 mM HEPES [pH 7,1], 280 mM NaCl, 1,4 mM tampón fosfato [pH 7,1]), burbujeando aire a través de una bomba de vacío. La mezcla se incubó durante unos 15 min hasta la formación de un precipitado blanco. Cada punto se hizo por duplicado en un mismo experimento. Los tubos se agitaron suavemente para resuspender el precipitado y la solución de 2 mL se añadió acto seguido a las células. Tras 20-22 horas en condiciones estándar de cultivo, el medio fue

aspirado y las células lavadas dos veces con medio completo. Posteriormente, las células se mantuvieron en medio completo, cambiando el medio cada tres días durante un total de 14 días, transcurridos los cuales se tiñeron con Giemsa para revelar la presencia de focos de células transformadas. Para ello, tras aspirar el medio de cultivo y lavar con PBS, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% (Sigma) durante 10 minutos. Las células se lavaron con agua destilada dos veces y se tiñeron con una dilución 1:10 de Giemsa (Sigma) durante 20-30 min a temperatura ambiente, transcurridos los cuales el colorante fue aspirado y las placas lavadas varias veces con agua destilada. Por último las placas se dejaron secar en ángulo boca abajo a temperatura ambiente.

4.4. Liposomas

Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células COS1 fueron transfectadas usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

4.5. Sistema *Neon Transfactor* (Invitrogen)

Con el fin de obtener una eficiencia de transfección mayor que en el caso de la electroporación tradicional, para los experimentos de inmunofluorescencia con células Jurkat, se utilizó este sistema de electroporación en capilar. A este fin, se realizó una optimización previa para determinar el programa del sistema que resultaba más adecuado para transfectar células Jurkat concluyendo que el programa nº 5 (1,7 mV, 20 ms) era el más idóneo. Las transfecciones se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

La expresión de proteínas en las células Jurkat y DT40 fue obtenida mediante transfección por electroporación siguiendo el procedimiento detallado previamente en el apartado de Transfecciones Transitorias. Todas las transfecciones se realizaron por triplicado. Se usaron los siguientes plásmidos según el tipo de ensayo.

5.1. Ensayos de activación de NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells)

En este caso se cotransfectaron por punto 10 µg del plásmido pNFAT-Luc (vector reportero de la luciferasa), 5 ng del plásmido pRL-SV40 (vector reportero de la renilla luciferasa) y 20 µg del vector de expresión de la proteína de interés (en algunos casos se varió la cantidad del plásmido de interés para obtener una expresión homogénea de las proteínas). Como control

negativo se sustituyó el vector de expresión de la proteína de interés por el vector vacío correspondiente.

5.2. Ensayos de activación de JNK

Para medir la activación de JNK se usó un sistema de transactivación. En estos ensayos se cotransfectaron por punto 10 μg del plásmido pFR-Luc (plásmido reportero que contiene 5 sitios de unión en tandem para el dominio de unión a ADN de Gal4 y una TATA *box* localizándose el gen de la luciferasa por debajo de esta región promotora), 5 μg del plásmido pFA2-Luc (plásmido que codifica para una proteína transactivadora de fusión compuesta por el dominio de activación de c-Jun y el dominio de unión al ADN de Gal4) y 20 μg del vector de expresión de la proteína de interés (en algunos casos se varió la cantidad del plásmido de interés para obtener una expresión homogénea de las proteínas). El vector vacío correspondiente se usó como control negativo.

En ambos casos, después de 48 horas de incubación en condiciones estándar de cultivo, las células fueron centrifugadas a 1.400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en 2 mL de medio RPMI-1640 completo. El volumen de cultivo fue dividido en dos disponiendo cada mililitro en un pocillo de una placa de 12 pocillos. La mitad de las células fueron estimuladas con 10 μg / mL de anti-CD3 (Clon UCTH1, Merck Millipore), en caso de las Jurkat, o con 5 μg / mL de anti-IgM (Southern-Biotech), en el caso de las DT40. La otra mitad del cultivo se dejó sin estimular. La incubación con el anticuerpo se prolongó durante 7 horas manteniendo las células en las condiciones estándar de cultivo. Pasado este tiempo, se recogieron células de cada punto para su posterior lisado en tampón de muestra de Laemmli. Estas muestras se usaron, posteriormente, para analizar los niveles de expresión de proteínas por *Western-blot*.

El resto de células fueron recogidas y centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sedimento de células fue resuspendido en una dilución del tampón de lisis llamado Passive Lysis Buffer 5X presente en el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante. Posteriormente, los lisados se congelaron a -80 °C durante 10 minutos para después ser centrifugados a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C para facilitar el lisado y la eliminación de restos celulares. Alícuotas de 10 μL del sobrenadante fueron utilizadas para realizar la medida de la actividad luciferasa y renilla usando los reactivos del kit mencionado previamente. Para realizar las mediciones se utilizó un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). En los ensayos de activación de NF-AT, los valores de la actividad

Luciferasa obtenidos para las diferentes muestras fueron normalizados en relación a la actividad renila obtenida en cada muestra. Los resultados se expresan como el incremento relativo a la activación de NF-AT o JNK-1 que presentan las células no estimuladas transfectadas con el vector vacío. Los resultados presentados son las medias y las desviaciones estándar de tres transfecciones independientes.

6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN-BLOT

Los extractos proteicos se hirvieron en tampón de muestra de Laemmli durante 5-10 minutos y, a continuación, se resolvieron en geles de poliacrilamida al 8% (para la separación de proteínas Vav1), al 10% (para la separación de las formas truncadas o los dominios aislados de la proteína Vav1) y al 12% (para la separación de la proteína Rac1) utilizando un tampón de carrera compuesto de 0,25 M de Tris, 2 M de glicina y 0,5% de SDS.

A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa siguiendo dos procedimientos distintos según fuese un gel de tamaño grande o pequeño. En el caso de los geles grandes esta transferencia se hizo siguiendo el protocolo tradicional de transferencia húmeda, utilizando un equipo Maxi Trans-Blot Cell (Bio-Rad), un tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol) y una membrana de nitrocelulosa de GE Healthcare. La transferencia se realizó a un amperaje fijo de 400 mA durante 90-100 minutos. En el caso de los geles pequeños, la transferencia a una membrana de nitrocelulosa se realizó utilizando el sistema iBlot Dry Blotting (Invitrogen) que permite realizar la transferencia seca en 6 minutos. El correcto funcionamiento de la transferencia fue comprobado en ambos casos mediante la tinción con rojo Ponceau que tiñe las proteínas de forma inespecífica (esta tinción se utilizó también para analizar los niveles de expresión de las proteínas de fusión GST-SH3 en los experimentos de *Pull-Down*). Dicha tinción se eliminó mediante varios lavados con una solución de TBS-T (25 mM Tris-HCl [pH 8,0] y 0,1% de Tween-20 (Sigma).

Las membranas fueron posteriormente bloqueadas en una disolución al 5% de albumina sérica bovina (BSA; Sigma) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. La hibridación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo indistintamente durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en una solución de la misma composición que la de bloqueo. Las diluciones utilizadas se indican en la **Tabla 2**. Seguidamente, las membranas fueron lavadas tres veces con una solución de TBS-T

durando 10 minutos cada lavado. A continuación, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario de la especificidad adecuada conjugados con peroxidasa de rábano (GE Healthcare) diluidos 1:5.000 en una solución de leche desnatada (Nestlé) al 5% en TBS-T durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de esta incubación las membranas se volvieron a lavar tres veces con TBS-T durando 10 minutos cada lavado. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación. La detección de las proteínas se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Thermo). Cuando fue necesario remover los anticuerpos primarios de las membranas para repetir el proceso, éstas fueron incubadas con 10 mL de una disolución de Re-Blot Plus Strong 10X (Millipore) durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente fueron lavadas con TBS-T tres veces durante 5 minutos, bloqueadas durante 45 minutos e incubadas con otro anticuerpo primario repitiendo el procedimiento anterior.

Anticuerpo	Compañía	Western-Blot	Inmunoprecipitación
Anti-Vav1 (#301-2)	Invitrogen	1:10.000	1:5.000
Anti- α -Tubulin	Santa Cruz	1:2.000	-
Anti-GFP	Covance	1:5.000	-
Anti-GST	Sigma	1:2.000	-
Anti-hnRNPK	Merck Millipore	1:1.000	-
Anti-pTyr (fosfotirosina)	Santa Cruz	1:1.000	-
Anti-pY142-Vav1	Invitrogen	1:1.000	-
Anti-pY160-Vav1	Invitrogen	1:500	-
Anti-pY174-Vav1	Invitrogen	1:2.000	-
Anti-pY541-Vav1	Invitrogen	1:1.000	-
Anti-pY544-Vav1	Invitrogen	1:1.000	-
Anti-pY836-Vav1	Invitrogen	1:1.000	-
Anti-Lat	Abcam	1:1.000	-
Anti-Zap70	Upstate Biotechnology	1:1.000	-
Anti-Lck	Santa Cruz	1:1.000	-
Anti-Rac1	BD Biosciences	1:2.000	-
Anti-PLC γ 1	Cell Signaling	1:1.000	1:2.000
Anti-Slp76	Cell Signaling	1:1.000	1:2.000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western-Blot e inmunoprecipitación, casa comercial en la que fueron adquiridos y dilución utilizada en los experimentos. Los anticuerpos contra el dominio DH de Vav1 fueron generados en conejos inmunizados con proteínas de fusión a GST producidas en *Escherichia coli*. Los anticuerpos fosfoespecíficos contra los distintos residuos de Vav1 fueron encargados a la casa comercial Invitrogen, siendo generados en conejos inmunizados con péptidos específicos.

7. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para los experimentos con células Jurkat, aproximadamente 1×10^6 células fueron transfectadas por punto utilizando el *Neon Transfecto System* (Invitrogen) y una cantidad de

plásmido de 30 µg por punto. A las 36 horas, las células fueron incubadas durante 20 minutos con cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro con poli-D-lisina incorporada (BD BioCoat) usando 3 cubreobjetos por pocillo en placas de 6 pocillos.

En el caso de los experimentos con células COS1, éstas se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta llegar a una confluencia del 40-50% y fueron tranfectadas con los vectores de expresión correspondientes usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), un método de transfección basado en liposomas, según las indicaciones del fabricante. La cantidad de plásmido tranfectada fue, en todos los casos, de 1 µg por pocillo. A las 24 horas, las células fueron tripsinizadas y transferidas a otra placa de 6 pocillos conteniendo cada pocillo 3 cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Menzel-Glaser) previamente incubados con una solución de 1 µg / mL de poli-L-lisina (Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A cada pocillo se añadieron 2 mL de medio DMEM completo y se dejaron incubar las células con los cubreobjetos de 12-24 horas en las condiciones estándar de cultivo.

Con ambas líneas celulares se usaron vectores de expresión que contenían proteínas etiquetadas con EGFP. A partir de aquí el protocolo es común para ambas líneas celulares. Las células fueron lavadas con PBS y se fijaron en formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con PBS para, posteriormente, permeabilizarlas mediante incubación con una solución compuesta de 0,5% Triton X-100 en PBS durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas tres veces con TBS-T para luego incubarlas con una solución de bloqueo (2% albúmina sérica bovina, 0,1% acida sódica y 0,1% Triton X-100 en una solución tamponada con 25 mM Tris [pH 7,4]) durante 10 minutos.

Para teñir el citoesqueleto de actina, las células se incubaron durante 20 min con faloidina conjugada con rodamina (Invitrogen) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 minutos. En el caso de las células Jurkat, se añadió en el último lavado 1 µg de DAPI (Invitrogen) por pocillo para teñir los núcleos, incubándolo 5 min para después realizar dos lavados más con TBS-T. Finalmente, las preparaciones fueron montadas sobre portaobjetos utilizando Mowiol (Millipore) para sellar y como agente retardante. Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio de barrido por láser Leica TCS SP5 con un objetivo de magnificación 63x. Para visualizar la proteínas con GFP se utilizó un láser de Argón a una longitud de onda de excitación de 488 nm, para la rodamina se usó un láser de He/Ne a una longitud de onda de excitación de 563 nm, y para el DAPI un diodo a una longitud de onda de 405 nm.

8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON GST

Un cultivo de bacterias DH5 α transformadas con el vector de expresión correspondiente (pGEX-PAK1_{CRIB}, pGEX-SH3 y sus derivados) fue crecido en 100 mL de medio Luria-Bertani (LB) conteniendo 100 μ g/mL de ampicilina durante toda la noche en agitación a 37 °C. A la mañana siguiente, el cultivo fue diluido hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,8. En ese momento, se indujo la expresión de las proteínas de fusión mediante la adición al medio de cultivo de IPTG (GE-Healthcare) a una concentración final de 1,5 mM. Transcurrida una hora a 30 °C en agitación, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 3.000 rpm a 4 °C, resuspendidas en 40 mL de PBS frío con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y sometidas a sonicación (6 pulsos de 15 segundos con 30 segundos de parada entre pulsos). A continuación, se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1%, incubándose la mezcla en hielo durante 30 minutos. Los restos de membranas y núcleos procedentes de la rotura de las células fueron eliminados por centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C, y el sobrenadante fue incubado con 800 μ L de una suspensión de una matriz de sefarosa conjugada con glutatión (GE-Healthcare) al 50% en PBS durante 2-4 horas a 4 °C en rotación. Transcurrido ese tiempo se realizaron 3 lavados de las proteínas unidas a la matriz de sefarosa con PBS frío para luego conservarlas en una solución de glicerol al 50% en PBS a -80 °C. En todos los casos, la concentración de proteína fue calculada mediante el análisis de una muestra de la misma por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, utilizando como estándares cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (fracción V, Sigma). Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0,5% Coomassie, 10% ácido acético, 50% metanol) y se lavaron con una solución de desteñido (10% ácido acético, 50% metanol) para visualizar las proteínas. Todos los reactivos utilizados para la tinción y la destinción fueron comprados en Sigma.

9. EXPERIMENTOS DE *PULL-DOWN*

Pull-down con GST-SH3 y sus derivados

Células COS1 fueron transfectadas con los vectores de expresión indicados en cada figura utilizando DEAE-dextrano. Transcurridas 36-48 horas de la transfección, las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas con el tampón descrito en el apartado anterior. Las células se incubaron con el tampón de lisis durante 10 minutos en hielo y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Una alícuota del sobrenadante se utilizó para analizar la expresión de las proteínas en los lisados totales. El resto del

sobrenadante se incubó con 15 µg de la proteína GST-SH3 correspondiente y con 30 µL de una suspensión de matriz de glutatión-sefarosa al 50% en PBS durante 5 horas a 4 °C en rotación. La matriz fue sedimentada por centrifugación a 14.000 rpm a 4 °C, lavada tres veces con tampón de lisis y resuspendida en tampón de muestra de Laemmli. Después de hervir las muestras, las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en un gel grande de poliacrilamida al 8%, seguida de *Western-blot*. Para la inmunodetección de las distintas formas de la proteína Vav1 se utilizaron un anticuerpo policlonal anti-Vav1 (generado anteriormente en nuestro laboratorio, dilución 1:10.000) o un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Covance, dilución 1:5.000) según correspondiese, seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (para el anti-Vav1) o de ratón (para el anti-GFP) conjugado HRP (GE-Healthcare) en dilución 1:5.000. El protocolo completo del *Western-blot* se especifica en el apartado correspondiente (pág. 50).

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los experimentos de microscopía electrónica fueron realizados por el laboratorio del Dr. O. Llorca (Centro Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid).

Las versiones 6xHis-Vav1^{WT} y 6xHis-Vav1^{Δ1-144} fueron expresadas en células de insecto *Sf9* y purificadas por cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado. Las proteínas purificadas fueron posteriormente sometidas a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 200 PC3.2/30 (GE Healthcare) equilibrada previamente con 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM de ditiotretitol y 10% de glicerol. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y posteriormente teñido con nitrato de plata. Una alícuota de la fracción correspondiente al pico fue absorbida en rejillas con carbón adherido e, inmediatamente después de la elución, teñidas usando un 2% de formato de uranilo (Sigma).

Todas las observaciones fueron realizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230 operando a 100 kV. Las imágenes de microscopía electrónica fueron capturadas usando un protocolo de dosis baja y un detector CMOS TVIPS 4k x 4k bajo el control del *software* EM-TOOLS (TVIPS). La magnificación final de los micrográficos CMOS fue de 68 222x, que fueron posteriormente reducidas a una resolución final de 4.56 Å por pixel. La función de transferencia del contraste de fases (CTF) de cada imagen fue estimada usando CTFIND3 (Mindell and Grigorieff, 2003) y corregida usando BSOFT (Heymann and Belnap, 2007). 4970

imágenes de moléculas individuales fueron seleccionadas a partir de los micrográficos de electrones y procesadas usando EMAN (Ludtke et al., 1999). Los promedios fueron obtenidos usando XMIPP. La resolución de las estructuras obtenidas fue estimada en 32.5 Å usando la correlación de Fourier Shell (FSC) y un coeficiente de correlación de 0.5.

11. ANÁLISIS Y MODELAJE ESTRUCTURAL

La visualización de las estructuras proteicas fue realizada usando el *software* MacPyMol (versión 1.5, Delano Scientific LLC). Los archivos PDB de las regiones de Vav1 CH-Ac-DH-PH-ZF (3KY9), DH-PH-ZF (2VRW) y CSH3 (2DMI y 2KBT) fueron obtenidas del RCSB Protein Data Bank. La estructura del dominio CSH3 fue modelada bioinformáticamente a partir del archivo PDB 2DMI usando el *software* Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2).

Las secuencias de las proteínas de la familia Vav de diferentes especies fueron obtenidas con la aplicación BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), alineadas usando CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), y los niveles de conservación evaluados mediante métodos bayesianos implementados en el servidor ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il/>).

12. IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE FOSFORILACIÓN

La proteína Vav1 fue inmunoprecipitada a partir de células COS-1 y Jurkat, sin estimular y estimuladas con EGF y anti-CD3, respectivamente. Los inmunoprecipitados fueron separados electroforéticamente y teñidos con imidazol/zinc. Las bandas correspondientes a la proteína Vav1 fueron cortadas, tripsinizadas y analizadas usando un aparato de MALDI-TOFF (Ultraflex, Bruker). Los sitios de fosforilación detectados en tres determinaciones independientes fueron usados para una caracterización más detallada. Además de los sitios de fosforilación descritos en este trabajo también se detectó el aminoácido Y⁷⁴⁵ fosforilado pero únicamente en el caso de las células COS-1 estimuladas con EGF. También se detectaron residuos de serina y treonina que no fueron caracterizados en detalle. Para confirmar la fosforilación de estos residuos usando técnicas independientes, se analizó su estado de fosforilación en inmunoprecipitados de la proteína Vav1 obtenidos de células Jurkat mediante *Western-blot* usando anticuerpos fosfoespecíficos para dichos residuos (Invitrogen). Después de este paso, se eliminó el anticuerpo fosfoespecífico usando Re-Blot Plus Strong 10X (Millipore), y las membranas se incubaron de nuevo con el anticuerpo contra la proteína total Vav1.

13. EXPERIMENTOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

En el caso de los experimentos en los que se usaron células Jurkat para inmunoprecipitar la proteína Vav1 endógena, se procedió a recoger 5×10^6 células por punto. Estas células fueron lavadas dos veces con medio RPMI-1640 sin suero ni L-glutamina ni antibióticos centrifugándolas a 1.400 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 1 mL de medio de lavado por punto y se procedió a realizar las estimulaciones periódicas correspondientes (el tiempo de estimulación se indica en cada experimento) con 10 μ g del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon UCTH1, Merk Millipore) por punto incubando las muestras en un baño a 37 °C. Para lisar rápidamente las células, una vez finalizado el periodo de estimulación se añadieron 250 μ L de tampón de lisis RIPA 5 veces más concentrado (50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 5% Triton X-100, 5 mM Na_3VO_4 , 5 mM NaF) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) por cada mililitro de células. Después de agitar las células en un vortex, los tubos se introdujeron inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Para eliminar los restos celulares, los lisados fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

En el caso de las células COS-1 transfectadas con los vectores de expresión de las formas silvestres y mutantes de la proteína Vav1, se procedió a lavar las placas de células una vez con PBS frío para, posteriormente, lisarlas sobre hielo con 500 μ L de tampón de lisis RIPA (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Los lisados fueron recogidos y puestos en hielo durante 10 min para luego ser centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A partir de aquí el procedimiento fue similar para ambas líneas celulares.

Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos y una alícuota de cada lisado fue recogida añadiéndole tampón de muestra de Laemmli para el posterior análisis de la expresión de proteínas por *Western-blot*. A cada sobrenadante se le añadieron 2 μ L del anticuerpo policlonal de conejo anti-Vav1 (generado anteriormente en nuestro laboratorio) y se incubaron en rotación durante 2 horas a 4 °C. En los experimentos de inmunoprecipitación de las proteínas PLC γ 1 y Slp76, se añadieron 5 μ L del anticuerpo anti-PLC γ 1 o anti-Slp76 (Cell Signaling) por cada mililitro de lisado. Transcurrido ese tiempo se añadieron 45 μ L de una suspensión de una matriz Gammabind G-sefarosa (GE Healthcare) al 50% en PBS por tubo. Tras 45 minutos de incubación a 4 °C en rotación, la matriz fue sedimentada por centrifugación a 14.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C y lavada tres veces con el tampón de lisis RIPA. Cada matriz fue resuspendida en 30 μ L de tampón de muestra de

Laemmli y, posteriormente hervida durante 5-10 minutos. Tanto los inmunoprecipitados como los lisados totales se sometieron a una electroforesis en un gel grande de poliacrilamida al 8%, seguida de *Western-blot*. Para detectar la fosforilación de Vav1 en estos experimentos, se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo, fosfoespecíficos para distintos residuos de Vav1 (generados por Invitrogen a petición de nuestro laboratorio) a la dilución adecuada en cada caso, así como el anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina (PY99Santa Cruz, 1:1.000) para analizar la fosforilación general de Vav1 en tirosinas. La cantidad total de proteína Vav1 inmunoprecipitada fue detectada usando el mismo anticuerpo policlonal anti-Vav1 usado para la inmunoprecipitación (dilución 1:10.000). Para detectar los anticuerpos primarios, se usó proteína A conjugada con la peroxidada de rábano (GE Healthcare, 1:5.000) salvo en el caso del anticuerpo primario anti-fosfotirosina que se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado también con la peroxidada de rábano (GE Healthcare, 1:5.000).

14. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

El procesamiento de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se llevó acabo con el *software* LAS AF versión 2.6.0.7266 (Leica). El montaje y la composición final de las figuras se realizó con el programa Canvas 9, versión 9.0.4 (ACD Systems).

DISCUSIÓN

En este trabajo se han abordado diversos aspectos de la regulación de la proteína Vav1 en el contexto de las rutas de señalización asociadas a linfocitos. En primer lugar, se ha descubierto que la correcta autoinhibición de las proteínas Vav requiere la interacción coordinada de las regiones CH-Ac y CSH3 con el núcleo central catalítico (**Figura 45A**).

La estructura autoinhibida restringe las señales dependientes e independientes de la actividad catalítica de estas proteínas, como se evidencia de la estimulación simultánea de las respuestas asociadas a JNK y NF-AT bajo la liberación de la inhibición mediada por el CSH3 usando técnicas de mutagénesis. En esta estructura, los dominios CH-Ac parecen principalmente implicados en la oclusión del sitio catalítico y, en menor medida, en la estabilización de la interacción intramolecular CSH3/Vav1 (**Figura 45B,C**). Por el contrario, la interacción mediada por el CSH3 no bloquea la actividad catalítica y parece funcionar como un cierre adicional que favorece la estabilidad de la interacción CH-Ac/núcleo catalítico. Además, este mecanismo de regulación a está conservado en esta familia de proteínas, al menos hasta *D. melanogaster*. De acuerdo con estas ideas, este trabajo ha demostrado que las proteínas con truncaciones de la región N-terminal son constitutivamente activas, a pesar de que mantienen la interacción intramolecular CSH3/Vav1 (**Figura 45B**). Además, se ha visto que la eliminación de la inhibición mediada por el CSH3 lleva a la activación constitutiva de las proteínas Vav incluso bajo condiciones que no favorecen la liberación dependiente de fosforilación de la región CH-Ac del núcleo catalítico (e. j., células Jurkat deficientes en el TCR) (**Figura 45B,C**).

Las dos contribuciones inhibitorias son eliminadas por el efecto sinérgico de la fosforilación de varios residuos de tirosina (**Figura 45F**), permitiendo de este modo correlacionar la fosforilación de estas proteínas con la adquisición de su completa funcionalidad en el desarrollo de respuestas celulares durante la transducción de señales.

En consecuencia, este modelo de activación podría generar diferentes estados conformacionales que controlasen la correcta estimulación espacio-temporal de estas proteínas. Además, el requerimiento de múltiples sitios de fosforilación para la activación de estas proteínas ofrece un mecanismo de garantía para evitar la activación errónea derivada de la fosforilación estocástica de las proteínas Vav en un solo sitio de fosforilación. El ruido generado por este tipo de fosforilación existe en células T, tal como se evidencia por la fosforilación detectada en Vav1 bajo condiciones basales (e. j., ver Capítulo 1, **Figura 25**, pág. 85). La participación de múltiples sitios de fosforilación en el proceso de activación podría contribuir potencialmente a una regulación precisa de la intensidad y/o diversidad de la

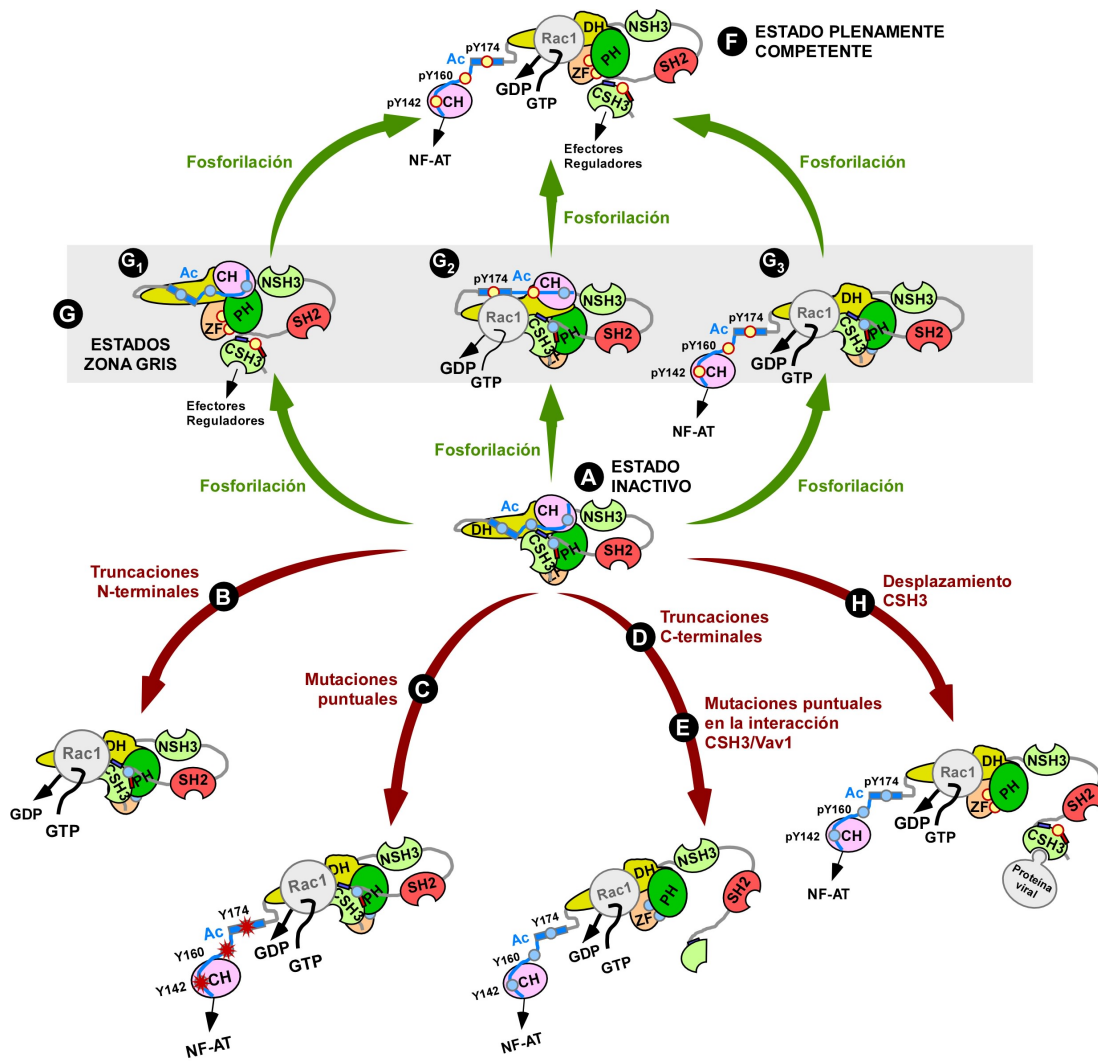


Figura 45. Nuevo modelo propuesto para la regulación de la familia de proteínas Vav. En este esquema se muestran los mecanismos fisiológicos (flechas verdes) e inducidos (flechas rojas) que llevan a su activación. Rectángulo azul claro, hélice α que contiene los sitios de fosforilación de la región Ac, Y¹⁴², Y¹⁶⁰ y Y¹⁷⁴; rectángulos en rojo y azul oscuro, motivos de interacción no canónica con el CSH3 de la familia Vav; puntos azul claro, residuos de tirosina no fosforilados; puntos amarillos, residuos de tirosina fosforilados (p); asteriscos rojos, mutaciones en los sitios de fosforilación de la región Ac. Los movimientos de las regiones CH-Ac y NSH3-SH2-CSH3 representados durante los procesos de activación son hipotéticos. Pueden existir otros "estados de zona gris" a parte de los representados (G₁-G₃) si se tienen en cuenta las posibles permutaciones de los residuos fosforilados y/o proteínas de unión. Para simplificar, no se han incluido la interacción de las proteínas Vav con otras moléculas de señalización. El viejo modelo de regulación se puede encontrar en la Figura 3.

señalización dependiendo de la fuerza, duración, o tipo de estímulos extracelulares recibidos por las células. En el mismo contexto, el hecho de que la mutación del sitio de unión canónica a PRR del CSH3 (CSH3^{P833L}) aumente la interacción CSH3/Vav1 (ver Capítulo 1,

Figura 13D, pág. 67) sugiere que la asociación entre las proteínas Vav fosforiladas y proteínas con PRR podría impedir el retorno al estado autoinhibido y, en consecuencia, prolongar la señalización de las proteínas Vav bajo condiciones de estimulación o localizaciones subcelulares específicas (**Figura 45F**). Esto podría explicar la gran diversidad funcional y estructural encontrada en las proteínas que se unen canónicamente a los dominios SH3 de la familia Vav (Bustelo, 2000; 2012). La dependencia de la interacción mediada por el CSH3 para mantener el estado autoinhibido tiene también un lado negativo, ya que puede llevar a una activación errónea a través de mecanismos que desplazan al SH3. En este contexto, merece la pena recalcar que el dominio CSH3 de Vav1 es una diana de señalización común para Nef y M2, dos proteínas ricas en prolinas que están codificadas por los virus HIV y gammaherpesvirus, respectivamente (Fackler *et al*, 1999; Rodrigues *et al*, 2006). Dicho mecanismo podría de hecho explicar el caso de Nef, ya que resultados previos han mostrado que podría estimular a las proteínas Vav de manera independiente a la fosforilación (Fackler *et al*, 1999). Estas observaciones apoyan además la hipótesis de que este mecanismo de regulación a través del CSH3 podría determinar la especificidad de respuesta de las proteínas Vav en función del tipo celular ya que las proteínas Vav1, Vav2 y Vav3 no sólo presentan distintos patrones de expresión tisular sino también de interacción con otras proteínas a través de sus dominios CSH3.

Procesos de autoinhibición mediados por dominios SH3 han sido descritos en otros GEFs de Rho, incluyendo intersectina (Ahmad and Lim, 2010; Kintscher *et al*, 2010), kalirin (Schiller *et al*, 2006), y los miembros de las familias ArhGEF4 (también conocido como Asef) (Mitin *et al*, 2007; Murayama *et al*, 2007) y ArhGEF5 (Yohe *et al*, 2008). El mecanismo descrito aquí presenta algunas similitudes, pero también diferencias significativas, con la autoinhibición mediada por SH3 en las proteínas de las familias ArhGEF4 y ArhGEF5. La autoinhibición de ArhGEF4 es mediada por interacciones no canónicas de su SH3 N-terminal con residuos localizados en la región DH-PH, incluyendo la hélice α_6 de su dominio DH (Mitin *et al*, 2007; Murayama *et al*, 2007). En este caso, sin embargo, el SH3 bloquea directamente el sitio de unión de las GTPasas en vez de estabilizar un segundo motivo inhibitorio como en nuestro caso (Mitin *et al*, 2007; Murayama *et al*, 2007). El proceso de activación es también diferente, ya que recae exclusivamente sobre la liberación del SH3 a través de la interacción de otras proteínas con el motivo adyacente (Mitin *et al*, 2007). La familia de proteínas ArhGEF5 tienen, al igual que las proteínas Vav, un sistema de autoinhibición doble consistente en un motivo inhibitorio basado en tirosinas y una región CSH3 (Yohe *et al*, 2008). Sin embargo, la inhibición mediada por el CSH3 está basado en el reconocimiento de PRR localizadas fuera

del casete DH-PH (Yohe *et al*, 2008). El mecanismo por el cual esta interacción se elimina durante la transducción de señales todavía es desconocido. Estos resultados indican que las subfamilias de GEFs de Rho regulados por SH3 utilizan mecanismos idiosincráticos para transitar entre sus estados autoinhibidos y activos.

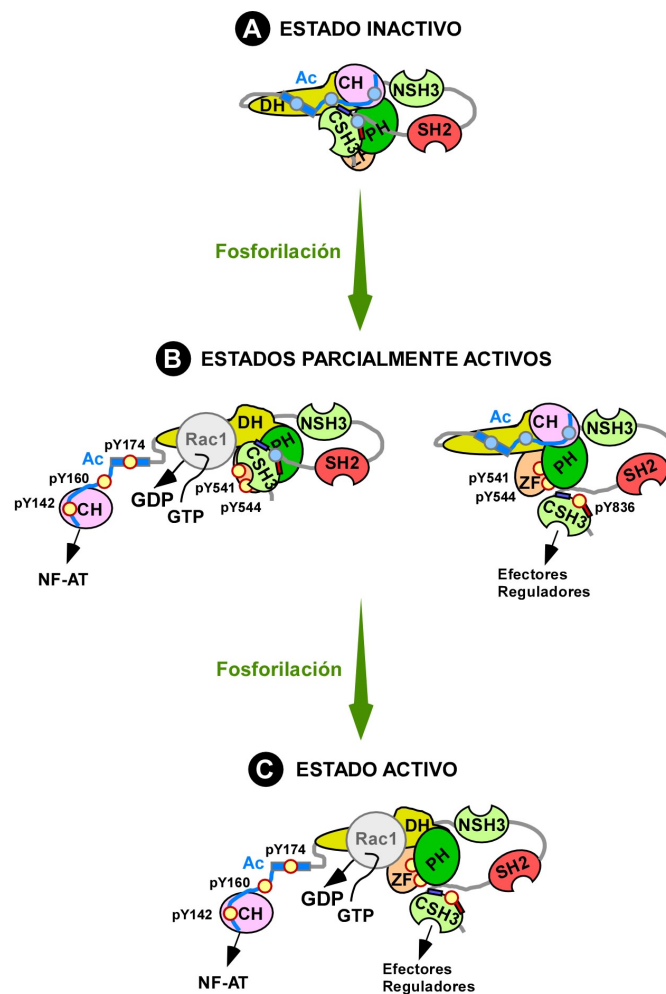


Figura 46. Esquema representativo de la cascada secuencial de fosforilación que lleva a la completa activación de Vav1 en linfocitos. En este esquema se muestran los distintos estados conformacionales derivados de la fosforilación (flechas verdes) de los residuos de las regiones Ac, ZF y SH3 durante la cascada de señalización. El significado de las formas y colores representados se describen en la Figura 45. Los movimientos de las regiones CH-Ac y NSH3-SH2-CSH3 representados durante los procesos de activación son hipotéticos.

En cuanto al proceso por el cual se eliminan las interacciones inhibitorias, lo más lógico era pensar que fuese por fosforilación en tirosinas. Hasta ahora sólo se conocían tres tirosinas (Y^{142} , Y^{160} , Y^{174}) implicadas en la activación de Vav1. Este estudio ha permitido descubrir que otras tirosinas localizadas en las regiones ZF (Y^{541} , Y^{544}) y CSH3 (Y^{836}) también participan en la

regulación de Vav1. También se ha observado que la fosforilación de unos residuos favorece la de otros sugiriendo la existencia de una cascada secuencial de fosforilación de la proteína Vav1 durante la transducción de señales, que termina en la completa activación de la proteína Vav1 y en el desarrollo su actividad biológica (**Figura 46**). Según este modelo, estos aminoácidos serían necesarios para la apertura de la estructura autoinhibida (**Figura 46A**). La fosforilación de las regiones Ac y CSH3 no sólo contribuiría a la eliminación de las interacciones inhibitorias que permiten el desencadenamiento de la actividad GEF de Vav1, sino también al establecimiento de interacciones proteicas que permiten la puesta en marcha de las funciones adaptadoras de Vav1 que posibilitan el desarrollo de las respuestas celulares específicas de linfocitos (**Figura 46B**). Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede especular sobre la existencia de conformaciones intermedias que serían reguladas por la acción de los aminoácidos identificados y que permitirían una regulación específica de las distintas funciones de Vav1 en linfocitos.

Para que la proteína Vav1 adquiriera el estado completamente activo, es necesario, por tanto, la fosforilación de todos los residuos mencionados anteriormente ya que la fosforilación simultánea de estos residuos tiene un efecto sinérgico sobre la activación de la proteína Vav1 (**Figura 46C**). Por tanto, este estado de fosforilación va a facilitar la adquisición de la conformación estructural completamente activa y adecuada para el desarrollo de las actividades biológicas de Vav1, tanto dependientes como independientes de su actividad catalítica, en el contexto linfocitario (**Figura 46C**). Esta fosforilación secuencial podría verse favorecida además por la interacción de las regiones N- y C-terminales con otras proteínas que facilitarían también la apertura de la molécula para su completa activación.

Nuestro trabajo también ha permitido establecer el papel de los elementos de la ruta de señalización de linfocitos en el proceso de activación de la proteína Vav1. Según modelos anteriores, la activación de la proteína Vav1 por fosforilación de tirosinas parecía estar mediada únicamente por la acción de Zap70 (**Figura 47**) (Michel *et al* 1998; Salojin *et al*, 1999; 2000). Según esto, la estimulación de este receptor provoca la activación de la quinasa de la familia Src Lck que, a su vez, activa por fosforilación a Zap70 siendo ésta la responsable principal de la activación de Vav1 (**Figura 47**). Los experimentos con células Jurkat deficientes han permitido establecer un nuevo modelo de activación de la proteína Vav1 en linfocitos (**Figura 47**). Según el nuevo modelo, la estimulación del TCR provoca la activación de las quinasas de la familia Src, entre las que se encuentra Lck (**Figura 47**). Una vez activadas, Lck y otra Src quinasa son capaces de activar directamente a Vav1 por fosforilación en

tirosinas. Además, aunque en menor medida, Lck activa indirectamente a Vav1 a través de Zap70 (**Figura 47**).

La otra Src quinasa implicada en la activación de Vav1 aún no ha sido identificada (**Figura 47**). Durante la cascada de señalización en células T, las quinasas encargadas principalmente de la activación de muchas de las moléculas de señalización reclutadas a la membrana plasmática son las quinasas de la familia Src, Lck y Fyn. Existen evidencias previas de la asociación física de la proteína Vav1 con Fyn (Michel *et al* 1998) y de la capacidad de esta quinasa para fosforilar a Vav1 (Huang *et al*, 2000; Raab *et al*, 1997). Además, se ha demostrado que la proteína M2 del gammaherpesvirus se sirve del complejo formado por Fyn y Vav1 para prolongar el estado de latencia de este virus en linfocitos (Pires de Miranda *et al*, 2008). Según estas observaciones, es más que probable que la quinasa Src desconocida sea Fyn, aunque sería necesario un estudio más detallado para confirmar la implicación de esta quinasa en la fosforilación de Vav1.

Por tanto, las proteínas responsables de la activación de Vav1 en linfocitos T son principalmente las quinasas de la familia Src, Lck y Fyn y, en menor medida, Zap70. Además, según este trabajo, la presencia de la proteína transmembrana Lat es requerida para la óptima activación de Vav1 y su reclutamiento a la membrana plasmática.

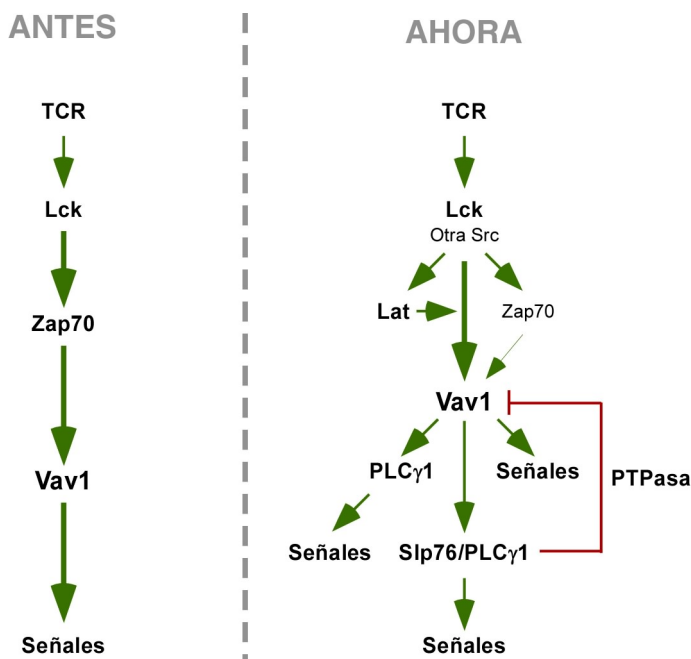


Figura 47. Esquema comparativo de los modelos de activación de la proteína Vav1 anterior y posterior a este estudio. A la izquierda, se encuentra el modelo más aceptado hasta ahora (antes) y, a la derecha, el modelo propuesto a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. Las flechas verdes indican el sentido de la cascada de señalización de la ruta del TCR reflejando las proteínas que contribuyen a la activación de otras. Su grosor también indica la magnitud de esa contribución. La línea roja indica el efecto negativo de una proteína tirosina fosfatasa sobre la activación de Vav1 en linfocitos.

Un hallazgo inesperado de este trabajo ha sido la existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa en el ciclo de activación/inactivación de Vav1 mediado por las proteínas Slp76 y PLC γ (**Figura 47**). Según los resultados obtenidos, esta regulación no está relacionada con la actividad canónica de estas proteínas por lo que probablemente esté ligada a sus funciones adaptadoras. La hipótesis que se maneja en este momento es la existencia de una proteína tirosina fosfatasa (PTPasa) que devolvería a la proteína Vav1 a su estado inactivo no fosforilado una vez terminada la estimulación, manteniéndola en dicho estado hasta la llegada de un nuevo estímulo que inicie otra vez la cascada de señalización (**Figura 47**). Esta PTPasa necesitaría la presencia de las proteínas Slp76 y PLC γ para desarrollar su actividad inhibitoria sobre Vav1. Probablemente, estas proteínas estarán relacionadas con la activación de esta PTPasa y/o facilitarán la localización subcelular de Vav1 adecuada para que sea sometida a la acción de dicha PTPasa.

Las PTPasas son las enzimas encargadas de eliminar los grupos fosfato de los residuos de tirosina fosforilados en determinadas proteínas (Mustelin *et al*, 2005). Estas enzimas son componentes reguladores clave en las rutas de señalización celular y de control del ciclo celular ya que permiten mantener los niveles adecuados de fosforilación en las proteínas implicadas en dichos procesos celulares (Mustelin *et al*, 2005). De los alrededor de 107 genes que codifican para PTPasas existentes en el genoma humano, las células T expresan al menos 45 PTPasas diferentes (Mustelin *et al*, 2005). La mayor parte de estas enzimas se localizan próximas a la membrana plasmática o en el citoplasma (Mustelin *et al*, 2005). Teniendo en cuenta estos datos, las siguientes PTPasas fueron escogidas como posibles candidatas: Shp1, Shp2, LYP, PTP-MEG1 y PTP1B. Se ha demostrado que las tres primeras candidatas se unen a la proteína Vav1 (Kon-Kozlowski *et al*, 1996; Kwon *et al*, 2005; Pani *et al*, 1996; Wu *et al*, 2006). Utilizando lentivirus con shRNAs contra estas PTPasas, se generaron líneas de Jurkat *knock-down* y se comprobó que la ausencia de dichas fosfatasas no afectaba al estado de fosforilación de la proteína Vav1 endógena en ausencia de estímulo (datos no mostrados). Curiosamente, en la línea *knock-down* de LYP se observó un aumento de los niveles de fosforilación de Vav1 bajo estimulación, pudiendo estar esta PTPasa implicada en la regulación del estado de fosforilación de Vav1 una vez iniciada la cascada de señalización y no en condiciones basales. Aunque la ausencia de estas PTPasas no afecta a la fosforilación basal de Vav1, no se puede descartar que tengan funciones redundantes siendo capaces de contrarrestar los efectos producidos por la carencia de una de ellas. Otra explicación posible es que sea otra PTPasa aún no identificada la que esté cumpliendo esta función reguladora del estado de fosforilación basal de la proteína Vav1 en linfocitos T.

En resumen, este trabajo de tesis ha permitido detallar en profundidad los diferentes pasos de regulación que sigue la proteína Vav1 en su proceso de activación, los mecanismos que regulan dicho proceso durante la cascada de señalización y las proteínas que garantizan que se lleve a cabo de forma correcta. Este mayor conocimiento sobre la regulación de las funciones de la proteína Vav1 podría ser de utilidad en un futuro para el desarrollo de estrategias terapéuticas en enfermedades relacionadas con el sistema inmune así como en procesos tumorales.

El estudio realizado supone un gran avance en el conocimiento de la regulación de las funciones de la proteína Vav1 en linfocitos. Estudios cristalográficos adicionales sobre la estructura autoinhibida de la proteína completa serían de gran utilidad para confirmar estos resultados. Además, sería interesante realizar estudios en modelos de ratón que permitiesen analizar en profundidad los efectos de la regulación la proteína Vav1 en la fisiología y desarrollo del sistema inmunológico.

CONCLUSIONES

- 1. La estructura autoinhibida de la proteína Vav1 se establece gracias a la interacción coordinada de las regiones N- y C-terminales con el núcleo central catalítico de esta proteína. Esta inhibición impide el desarrollo de las respuestas celulares asociadas a la proteína Vav1 en linfocitos.**
- 2. El dominio CSH3 inhibe la actividad de esta proteína mediante su unión en cis a la región DH-PH. La inhibición de Vav1 es mediada por la acción cooperativa de residuos del *RT-loop* y el extremo C-terminal del CSH3.**
- 3. La activación fisiológica de la proteína Vav1 se produce a través de efectos sinérgicos de la fosforilación de tirosinas localizadas en las regiones Ac, ZF y CSH3.**
- 4. Las mutaciones en estos sitios de fosforilación afectan diferencialmente a la activación de Rac1/JNK y NF-AT, sugiriendo la existencia de distintos estados conformacionales de la proteína Vav1 que regulen específicamente las respuestas celulares asociadas a ésta.**
- 5. La activación de la proteína Vav1 es principalmente mediada por la acción cooperativa de las quinasas de la familia Src y, en menor medida, por la quinasa Zap70. La presencia de la proteína Lat es esencial para la óptima activación de la proteína Vav1 y para el reclutamiento de esta a la membrana plasmática.**
- 6. Existe un mecanismo de regulación negativa de la activación de la proteína Vav1 en el que está implicada un PTPasa aún no identificada. Para el desarrollo de este mecanismo es necesaria la presencia de las proteínas Slp76 y PLC γ 1.**

BIBLIOGRAFÍA

Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y. and Rosen, M. K. (2000). Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**(5): 625-33.

Ahmad, K. F. and Lim, W. A. (2010). The minimal autoinhibited unit of the guanine nucleotide exchange factor intersectin. *PLoS One* **5**(6): e11291.

Ambrogio, C., Voena, C., Manazza, A. D., Martinengo, C., Costa, C., Kirchhausen, T., Hirsch, E., Inghirami, G. and Chiarle, R. (2008). The anaplastic lymphoma kinase controls cell shape and growth of anaplastic large cell lymphoma through Cdc42 activation. *Cancer Res* **68**(21): 8899-907.

Aoukaty, A. and Tan, R. (2005). Role for glycogen synthase kinase-3 in NK cell cytotoxicity and X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunol* **174**(8): 4551-8.

Arana, E., Vehlow, A., Harwood, N. E., Vigorito, E., Henderson, R., Turner, M., Tybulewicz, V. L. and Batista, F. D. (2008). Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation. *Immunity* **28**(1): 88-99.

Ardouin, L., Bracke, M., Mathiot, A., Pagakis, S. N., Norton, T., Hogg, N. and Tybulewicz, V. L. (2003). Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol* **33**(3): 790-7.

Arriemerlou, C., Randriamampita, C., Bismuth, G. and Trautmann, A. (2000). Rac is involved in early TCR signaling. *J Immunol* **165**(6): 3182-9.

Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R. and Teixido, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res* **66**(1): 248-58.

Bassermann, F., Jahn, T., Miething, C., Seipel, P., Bai, R. Y., Coutinho, S., Tybulewicz, V. L., Peschel, C. and Duyster, J. (2002). Association of Bcr-Abl with the proto-oncogene Vav is implicated in activation of the Rac-1 pathway. *J Biol Chem* **277**(14): 12437-45.

Beckerle, M. C. (1997). Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays* **19**(11): 949-57.

Bertagnolo, V., Brugnoli, F., Marchisio, M., Celeghini, C., Carini, C. and Capitani, S. (2004). Association of PI 3-K with tyrosine phosphorylated Vav is essential for its activity in neutrophil-like maturation of myeloid cells. *Cell Signal* **16**(4): 423-33.

Bertagnolo, V., Marchisio, M., Volinia, S., Caramelli, E. and Capitani, S. (1998). Nuclear association of tyrosine-phosphorylated Vav to phospholipase C-gamma1 and phosphoinositide 3-kinase during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett* **441**(3): 480-4.

Betz, R., Sandhoff, K., Fischer, K. D. and van Echten-Deckert, G. (2003). Detection and identification of Vav1 protein in primary cultured murine cerebellar neurons and in neuroblastoma cells (SH-SY5Y and Neuro-2a). *Neurosci Lett* **339**(1): 37-40.

Bhavsar, P. J., Vigorito, E., Turner, M. and Ridley, A. J. (2009). Vav GEFs regulate macrophage morphology and adhesion-induced Rac and Rho activation. *Exp Cell Res* **315**(19): 3345-58.

Billadeau, D. D., Mackie, S. M., Schoon, R. A. and Leibson, P. J. (2000). Specific subdomains of Vav differentially affect T cell and NK cell activation. *J Immunol* **164**(8): 3971-81.

Blanchet, F., Cardona, A., Letimier, F. A., Hershfield, M. S. and Acuto, O. (2005). CD28 costimulatory signal induces protein arginine methylation in T cells. *J Exp Med* **202**(3): 371-7.

Boncristiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Olivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elios, M. M., Telford, J. L. and Baldari, C. T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* **198**(12): 1887-97.

Booden, M. A., Campbell, S. L. and Der, C. J. (2002). Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. *Mol Cell Biol* **22**(8): 2487-97.

Bubeck Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J. Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D. and Chan, A. C. (1998). Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* **9**(5): 607-16.

Bustelo, X. R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**(5): 1461-77.

Bustelo, X. R. (2001). Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**(44): 6372-81.

Bustelo, X. R. (2012). Vav family. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. (ed. Choy, S.) 1963-1976 (Springer, New York).

Bustelo, X. R. and Barbacid, M. (1992). Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* **256**(5060): 1196-9.

Bustelo, X. R. and Couceiro, J. R. (2008). Vav3. *UCSD Nature Mol.* Pages (doi: 10.1038/mp.a002362.002301)

Bustelo, X. R., Crespo, P., Lopez-Barahona, M., Gutkind, J. S. and Barbacid, M. (1997). Cbl-b, a member of the Sli-1/c-Cbl protein family, inhibits Vav-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. *Oncogene* **15**(21): 2511-20.

Bustelo, X. R., Ledbetter, J. A. and Barbacid, M. (1992). Product of vav proto-oncogene defines a new class of tyrosine protein kinase substrates. *Nature* **356**(6364): 68-71.

Bustelo, X. R., Rubin, S. D., Suen, K. L., Carrasco, D. and Barbacid, M. (1993). Developmental expression of the vav protooncogene. *Cell Growth Differ* **4**(4): 297-308.

Bustelo, X. R., Suen, K. L., Michael, W. M., Dreyfuss, G. and Barbacid, M. (1995). Association of the vav proto-oncogene product with poly(rC)-specific RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **15**(3): 1324-32.

Caloca, M. J., Zugaza, J. L. and Bustelo, X. R. (2008). Mechanistic analysis of the amplification and diversification events induced by Vav proteins in B-lymphocytes. *J Biol Chem* **283**(52): 36454-64.

Caloca, M. J., Zugaza, J. L., Matallanas, D., Crespo, P. and Bustelo, X. R. (2003). Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* **22**(13): 3326-36.

Cella, M., Fujikawa, K., Tassi, I., Kim, S., Latinis, K., Nishi, S., Yokoyama, W., Colonna, M. and Swat, W. (2004). Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* **200**(6): 817-23.

Chan, G., Hanke, T. and Fischer, K. D. (2001). Vav-1 regulates NK T cell development and NK cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* **31**(8): 2403-10.

Charvet, C., Canonigo, A. J., Becart, S., Maurer, U., Miletic, A. V., Swat, W., Deckert, M. and Altman, A. (2006). Vav1 promotes T cell cycle progression by linking TCR/CD28 costimulation to FOXO1 and p27kip1 expression. *J Immunol* **177**(8): 5024-31.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V. and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**(5942): 834-40.

Chrencik, J. E., Brooun, A., Zhang, H., Mathews, II, Hura, G. L., Foster, S. A., Perry, J. J., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Bokoch, G. M., Tainer, J. A., Weckbecker, G. and Kuhn, P. (2008). Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *J Mol Biol* **380**(5): 828-43.

Citterio, C., Menacho-Marquez, M., Garcia-Escudero, R., Larive, R. M., Barreiro, O., Sanchez-Madrid, F., Paramio, J. M. and Bustelo, X. R. (2012). The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Sci Signal* **5**(244): ra71.

Colucci, F., Rosmaraki, E., Bregenholt, S., Samson, S. I., Di Bartolo, V., Turner, M., Vanes, L., Tybulewicz, V. and Di Santo, J. P. (2001). Functional dichotomy in natural killer cell signaling: Vav1-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* **193**(12): 1413-24.

Coppola, J., Bryant, S., Koda, T., Conway, D. and Barbacid, M. (1991). Mechanism of activation of the vav protooncogene. *Cell Growth Differ* **2**(2): 95-105.

Costello, P. S., Walters, A. E., Mee, P. J., Turner, M., Reynolds, L. F., Prisco, A., Sarner, N., Zamoyska, R. and Tybulewicz, V. L. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3035-40.

Couceiro, J. R., Martin-Bermudo, M. D. and Bustelo, X. R. (2005). Phylogenetic conservation of the regulatory and functional properties of the Vav oncoprotein family. *Exp Cell Res* **308**(2): 364-80.

Cremasco, V., Graham, D. B., Novack, D. V., Swat, W. and Faccio, R. (2008). Vav/Phospholipase Cgamma2-mediated control of a neutrophil-dependent murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58**(9): 2712-22.

Crespo, P., Bustelo, X. R., Aaronson, D. S., Coso, O. A., Lopez-Barahona, M., Barbacid, M. and Gutkind, J. S. (1996). Rac-1 dependent stimulation of the JNK/SAPK signaling pathway by Vav. *Oncogene* **13**(3): 455-60.

Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S. and Bustelo, X. R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**(6612): 169-72.

Critchley, D. R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* **12**(1): 133-9.

Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* **100**(6): 603-6.

David, R., Ma, L., Ivetic, A., Takesono, A., Ridley, A. J., Chai, J. G., Tybulewicz, V. L. and Marelli-Berg, F. M. (2009). T-cell receptor- and CD28-induced Vav1 activity is required for the accumulation of primed T cells into antigenic tissue. *Blood* **113**(16): 3696-705.

Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T. and Altman, A. (1996). Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* **5**(6): 591-604.

Dekel, I., Russek, N., Jones, T., Mortin, M. A. and Katzav, S. (2000). Identification of the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian signal transducer protein, Vav. *FEBS Lett* **472**(1): 99-104.

Dennehy, K. M., Elias, F., Na, S. Y., Fischer, K. D., Hunig, T. and Luhder, F. (2007). Mitogenic CD28 signals require the exchange factor Vav1 to enhance TCR signaling at the SLP-76-Vav-Itk signalosome. *J Immunol* **178**(3): 1363-71.

DerMardirossian, C. and Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**(7): 356-63.

Dombroski, D., Houghtling, R. A., Labno, C. M., Precht, P., Takesono, A., Caplen, N. J., Billadeau, D. D., Wange, R. L., Burkhardt, J. K. and Schwartzberg, P. L. (2005). Kinase-independent functions for Itk in TCR-induced regulation of Vav and the actin cytoskeleton. *J Immunol* **174**(3): 1385-92.

Doody, G. M., Bell, S. E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., Fernandez, C., Lee, I. J. and Turner, M. (2001). Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation. *Nat Immunol* **2**(6): 542-7.

Doody, G. M., Billadeau, D. D., Clayton, E., Hutchings, A., Berland, R., McAdam, S., Leibson, P. J. and Turner, M. (2000). Vav-2 controls NFAT-dependent transcription in B- but not T-lymphocytes. *EMBO J* **19**(22): 6173-84.

Doody, G. M., Justement, L. B., Delibrias, C. C., Matthews, R. J., Lin, J., Thomas, M. L. and Fearon, D. T. (1995). A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269**(5221): 242-4.

Dumont, C., Corsoni-Tadrzak, A., Ruf, S., de Boer, J., Williams, A., Turner, M., Kioussis, D. and Tybulewicz, V. L. (2009). Rac GTPases play critical roles in early T-cell development. *Blood* **113**(17): 3990-8.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**(6899): 790-3.

Evans, G. A., Howard, O. M., Erwin, R. and Farrar, W. L. (1993). Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in human T cells: lack of requirement for the tyrosine kinase lck. *Biochem J* **294** (Pt 2): 339-42.

Fackler, O. T., Kremmer, E. and Mueller-Lantzsch, N. (1996). Evidence for the association of Nef protein with HIV-2 virions. *Virus Res* **46**(1-2): 105-10.

Fackler, O. T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A. S. and Peterlin, B. M. (1999). Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol Cell* **3**(6): 729-39.

Fanto, M., Weber, U., Strutt, D. I. and Mlodzik, M. (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the Drosophila eye. *Curr Biol* **10**(16): 979-88.

Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R. and Billadeau, D. D. (2005). Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* **7**(1): 39-49.

Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E. and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**(5): 617-26.

Fischer, K. D., Kong, Y. Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L. E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M. P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A. and Penninger, J. M. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* **8**(10):554-62.

Fischer, K. D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. and Guidos, C. (1995). Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature* **374**(6521):474-7.

Foucault, I., Le Bras, S., Charvet, C., Moon, C., Altman, A. and Deckert, M. (2005). The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* **105**(3):1106-13.

Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T. and Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* **9**(1):93-103.

Fujii, H., Nakagawa, Y., Schindler, U., Kawahara, A., Mori, H., Gouilleux, F., Groner, B., Ihle, J. N., Minami, Y., Miyazaki, T. and et al. (1995). Activation of Stat5 by interleukin 2 requires a carboxyl-terminal region of the interleukin 2 receptor beta chain but is not essential for the proliferative signal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12):5482-6.

Fujikawa, K., Miletic, A. V., Alt, F. W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S., Moores, S. L., Brugge, J., Rosen, F. S. and Swat, W. (2003). Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* **198**(10):1595-608.

Fukumoto, R., Dundr, M., Nicot, C., Adams, A., Valeri, V. W., Samelson, L. E. and Franchini, G. (2007). Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(l) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *J Virol* **81**(17):9088-99.

Gakidis, M. A., Cullere, X., Olson, T., Wilsbacher, J. L., Zhang, B., Moores, S. L., Ley, K., Swat, W., Mayadas, T. and Brugge, J. S. (2004). Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol* **166**(2):273-82.

Galandrini, R., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A. (1999). Role for the Rac1 exchange factor Vav in the signaling pathways leading to NK cell cytotoxicity. *J Immunol* **162**(6):3148-52.

Gao, C. and Blystone, S. D. (2009). A Pyk2-Vav1 complex is recruited to beta3-adhesion sites to initiate Rho activation. *Biochem J* **420**(1): 49-56.

Garcia, G. G. and Miller, R. A. (2009). Age-related changes in Ick-Vav signaling pathways in mouse CD4 T cells. *Cell Immunol* **259**(1): 100-4.

Garcia-Bernal, D., Parmo-Cabanas, M., Dios-Esponera, A., Samaniego, R., Hernan, P. d. I. O. D. and Teixido, J. (2009). Chemokine-induced Zap70 kinase-mediated dissociation of the Vav1-talin complex activates alpha4beta1 integrin for T cell adhesion. *Immunity* **31**(6): 953-64.

Germani, A., Romero, F., Houliard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S. and Varin-Blank, N. (1999). hSh2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol* **19**(5): 3798-807.

Geyeregger, R., Zeyda, M., Zlabinger, G. J., Waldhausl, W. and Stulnig, T. M. (2005). Polyunsaturated fatty acids interfere with formation of the immunological synapse. *J Leukoc Biol* **77**(5): 680-8.

Gismondi, A., Jacobelli, J., Strippoli, R., Mainiero, F., Soriani, A., Cifaldi, L., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A. (2003). Proline-rich tyrosine kinase 2 and Rac activation by chemokine and integrin receptors controls NK cell transendothelial migration. *J Immunol* **170**(6): 3065-73.

Gomez, M., Tybulewicz, V. and Cantrell, D. A. (2000). Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1. *Nat Immunol* **1**(4): 348-52.

Gomez, T. S., Hamann, M. J., McCarney, S., Savoy, D. N., Lubking, C. M., Heldebrant, M. P., Labno, C. M., McKean, D. J., McNiven, M. A., Burkhardt, J. K. and Billadeau, D. D. (2005). Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat Immunol* **6**(3): 261-70.

Graham, D. B., Robertson, C. M., Bautista, J., Mascarenhas, F., Diacovo, M. J., Montgrain, V., Lam, S. K., Cremasco, V., Dunne, W. M., Faccio, R., Coopersmith, C. M. and Swat, W. (2007). Neutrophil-mediated oxidative burst and host defense are controlled by a Vav-PLCgamma2 signaling axis in mice. *J Clin Invest* **117**(11): 3445-52.

Graham, D. B., Zinselmeyer, B. H., Mascarenhas, F., Delgado, R., Miller, M. J. and Swat, W. (2009). ITAM signaling by Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulates interstitial transit rates of neutrophils in vivo. *PLoS One* **4**(2): e4652.

Groysman, M., Hornstein, I., Alcover, A. and Katzav, S. (2002). Vav1 and Ly-GDI two regulators of Rho GTPases, function cooperatively as signal transducers in T cell antigen receptor-induced pathways. *J Biol Chem* **277**(51): 50121-30.

Groysman, M., Russek, C. S. and Katzav, S. (2000). Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation. *FEBS Lett* **467**(1): 75-80.

Gulbranson-Judge, A., Tybulewicz, V. L., Walters, A. E., Toellner, K. M., MacLennan, I. C. and Turner, M. (1999). Defective immunoglobulin class switching in Vav-deficient mice is attributable to compromised T cell help. *Eur J Immunol* **29**(2): 477-87.

Hall, A. B., Gakidis, M. A., Glogauer, M., Wilsbacher, J. L., Gao, S., Swat, W. and Brugge, J. S. (2006). Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* **24**(3): 305-16.

Han, J., Das, B., Wei, W., Van Aelst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J. and Broek, D. (1997). Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* **17**(3): 1346-53.

Harnois, T., Constantin, B., Rioux, A., Grenioux, E., Kitzis, A. and Bourmeyster, N. (2003). Differential interaction and activation of Rho family GTPases by p210bcr-abl and p190bcr-abl. *Oncogene* **22**(41): 6445-54.

Hebeis, B., Vigorito, E., Kovesdi, D. and Turner, M. (2005). Vav proteins are required for B-lymphocyte responses to LPS. *Blood* **106**(2): 635-40.

Hehner, S. P., Li-Weber, M., Giaisi, M., Droge, W., Krammer, P. H. and Schmitz, M. L. (2000). Vav synergizes with protein kinase C theta to mediate IL-4 gene expression in response to CD28 costimulation in T cells. *J Immunol* **164**(7): 3829-36.

Henske, E. P., Short, M. P., Jozwiak, S., Bovey, C. M., Ramlakhan, S., Haines, J. L. and Kwiatkowski, D. J. (1995). Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Ann Hum Genet* **59**(Pt 1): 25-37.

Hermiston, M. L., Xu, Z. and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 107-37.

Higuchi, T., Kanzaki, H., Fujimoto, M., Hatayama, H., Watanabe, H., Fukumoto, M., Kaneko, Y., Higashitsuji, H., Kishishita, M., Mori, T. and et al. (1995). Expression of vav proto-oncogene by nonhematopoietic trophoblast cells at the human uteroplacental interface. *Biol Reprod* **53**(4): 840-6.

Hirasawa, N., Scharenberg, A., Yamamura, H., Beaven, M. A. and Kinet, J. P. (1995). A requirement for Syk in the activation of the microtubule-associated protein kinase/phospholipase A2 pathway by Fc epsilon R1 is not shared by a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **270**(18): 10960-7.

Hobert, O., Jallal, B., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1994). Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95vav/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *J Biol Chem* **269**(32): 20225-8.

Hobert, O., Schilling, J. W., Beckerle, M. C., Ullrich, A. and Jallal, B. (1996). SH3 domain-dependent interaction of the proto-oncogene product Vav with the focal contact protein zyxin. *Oncogene* **12**(7): 1577-81.

Hollmann, A., Aloyz, R., Baker, K., Dirnhofer, S., Owens, T., Sladek, R. and Tzankov, A. (2010). Vav-1 expression correlates with NFkappaB activation and CD40-mediated cell death in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Hematol Oncol* **28**(3): 142-50.

Holsinger, L. J., Graef, I. A., Swat, W., Chi, T., Bautista, D. M., Davidson, L., Lewis, R. S., Alt, F. W. and Crabtree, G. R. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol* **8**(10): 563-72.

Hornstein, I., Pikarsky, E., Groysman, M., Amir, G., Peylan-Ramu, N. and Katzav, S. (2003). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol* **199**(4): 526-33.

Houlard, M., Romero-Portillo, F., Germani, A., Depaux, A., Regnier-Ricard, F., Gisselbrecht, S. and Varin-Blank, N. (2005). Characterization of VIK-1: a new Vav-interacting Kruppel-like protein. *Oncogene* **24**(1): 28-38.

Huang, J., Tilly, D., Altman, A., Sugie, K. and Grey, H. M. (2000). T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(20): 10923-9.

Huby, R. D., Carlile, G. W. and Ley, S. C. (1995). Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* **270**(51): 30241-4.

Jaffer, Z. M. and Chernoff, J. (2002). p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7): 713-7.

Jagodica, M., Colacios, C., Nohra, R., Dejean, A. S., Beyeen, A. D., Khademi, M., Casemayou, A., Lamouroux, L., Duthoit, C., Papapietro, O., Sjöholm, L., Bernard, I., Lagrange, D., Dahlman, I., Lundmark, F., Oturai, A. B., Soendergaard, H. B., Kempainen, A., Saarela, J., Tienari, P. J., Harbo, H. F., Spurkland, A., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, D. A., Ebers, G. C., Seddighzadeh, M., Klareskog, L., Alfredsson, L., Padyukov, L., Hillert, J., Clanet, M., Edan, G., Fontaine, B., Fournie, G. J., Kockum, I., Saoudi, A. and Olsson, T. (2009). A role for VAV1 in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Sci Transl Med* **1**(10): 10ra21.

Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T. and Liu, Y. C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**(5438): 309-12.

Johansen, F. E. and Prywes, R. (1995). Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1242**(1): 1-10.

Katzav, S. (2004). Vav1: an oncogene that regulates specific transcriptional activation of T cells. *Blood* **103**(7): 2443-51.

Katzav, S., Cleveland, J. L., Heslop, H. E. and Pulido, D. (1991). Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol* **11**(4): 1912-20.

Katzav, S., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* **8**(8): 2283-90.

Katzav, S., Sutherland, M., Packham, G., Yi, T. and Weiss, A. (1994). The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem* **269**(51): 32579-85.

Kiener, P. A., Lioubin, M. N., Rohrschneider, L. R., Ledbetter, J. A., Nadler, S. G. and Diegel, M. L. (1997). Co-ligation of the antigen and Fc receptors gives rise to the selective

modulation of intracellular signaling in B cells. Regulation of the association of phosphatidylinositol 3-kinase and inositol 5'-phosphatase with the antigen receptor complex. *J Biol Chem* **272**(6):3838-44.

Kim, H. H., Tharayil, M. and Rudd, C. E. (1998). Growth factor receptor-bound protein 2 SH2/SH3 domain binding to CD28 and its role in co-signaling. *J Biol Chem* **273**(1):296-301.

Kintscher, C., Wuertenberger, S., Eystenstein, R., Uhlendorf, T. and Groemping, Y. (2010). Autoinhibition of GEF activity in Intersectin 1 is mediated by the short SH3-DH domain linker. *Protein Sci* **19**(11):2164-74.

Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T. and Siminovitch, K. A. (1996). The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **271**(7):3856-62.

Kong, Y. Y., Fischer, K. D., Bachmann, M. F., Mariathasan, S., Kozieradzki, I., Nghiem, M. P., Bouchard, D., Bernstein, A., Ohashi, P. S. and Penninger, J. M. (1998). Vav regulates peptide-specific apoptosis in thymocytes. *J Exp Med* **188**(11):2099-1111.

Konno, R., Fujiwara, H., Netsu, S., Odagiri, K., Shimane, M., Nomura, H. and Suzuki, M. (2007). Gene expression profiling of the rat endometriosis model. *Am J Reprod Immunol* **58**(4):330-43.

Koretzky, G. A., Abtahian, F. and Silverman, M. A. (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* **6**(1):67-78.

Korn, T., Fischer, K. D., Girkontaite, I., Kollner, G., Toyka, K. and Jung, S. (2003). Vav1-deficient mice are resistant to MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis due to impaired antigen priming. *J Neuroimmunol* **139**(1-2):17-26.

Krawczyk, C., Bachmaier, K., Sasaki, T., Jones, R. G., Snapper, S. B., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Ohashi, P. S., Alt, F. W. and Penninger, J. M. (2000). Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells. *Immunity* **13**(4):463-73.

Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P. S., Snapper, S., Alt, F. and Penninger, J. M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* **16**(3):331-43.

Krawczyk, C. M., Jones, R. G., Atfield, A., Bachmaier, K., Arya, S., Odermatt, B., Ohashi, P. S. and Penninger, J. M. (2005). Differential control of CD28-regulated in vivo immunity by the E3 ligase Cbl-b. *J Immunol* **174**(3): 1472-8.

Ksionda, O., Saveliev, A., Kochl, R., Rapley, J., Faroudi, M., Smith-Garvin, J. E., Wulfig, C., Rittinger, K., Carter, T. and Tybulewicz, V. L. (2012). Mechanism and function of Vav1 localisation in TCR signalling. *J Cell Sci* **125**(Pt 22): 5302-14.

Kuhne, M. R., Ku, G. and Weiss, A. (2000). A guanine nucleotide exchange factor-independent function of Vav1 in transcriptional activation. *J Biol Chem* **275**(3): 2185-90.

Kupfer, A. and Singer, S. J. (1989). The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *J Exp Med* **170**(5): 1697-713.

Kwon, J., Qu, C. K., Maeng, J. S., Falahati, R., Lee, C. and Williams, M. S. (2005). Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *EMBO J* **24**(13): 2331-41.

Lawson, B. R., Manenkova, Y., Ahamed, J., Chen, X., Zou, J. P., Baccala, R., Theofilopoulos, A. N. and Yuan, C. (2007). Inhibition of transmethylation down-regulates CD4 T cell activation and curtails development of autoimmunity in a model system. *J Immunol* **178**(8): 5366-74.

Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E. and Katzav, S. (2009). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumorigenesis. *J Pathol* **219**(1): 25-34.

Lazer, G., Pe'er, L., Schapira, V., Richard, S. and Katzav, S. (2007). The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cell Signal* **19**(12): 2479-86.

Lee, B. S., Lee, S. H., Feng, P., Chang, H., Cho, N. H. and Jung, J. U. (2005). Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. *J Virol* **79**(19): 12173-84.

Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B. and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**(23): 3663-74.

Li, R., Wei, F., Yu, J., Li, H., Ren, X. and Hao, X. (2009). IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biol Ther* **8**(14): 1402-8.

Li, X., Sandoval, D., Freeberg, L. and Carter, R. H. (1997). Role of CD19 tyrosine 391 in synergistic activation of B lymphocytes by coligation of CD19 and membrane Ig. *J Immunol* **158**(12): 5649-57.

Liu, J. Y., Seno, H., Miletic, A. V., Mills, J. C., Swat, W. and Stappenbeck, T. S. (2009). Vav proteins are necessary for correct differentiation of mouse cecal and colonic enterocytes. *J Cell Sci* **122**(Pt 3): 324-34.

Llorca, O., Arias-Palomo, E., Zugaza, J. L. and Bustelo, X. R. (2005). Global conformational rearrangements during the activation of the GDP/GTP exchange factor Vav3. *EMBO J* **24**(7): 1330-40.

Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N. and Bustelo, X. R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol* **20**(5): 1678-91.

Lustig, A., Carter, A., Bertak, D., Enika, D., Vandanmagsar, B., Wood, W., Becker, K. G., Weeraratna, A. T. and Taub, D. D. (2009). Transcriptome analysis of murine thymocytes reveals age-associated changes in thymic gene expression. *Int J Med Sci* **6**(1): 51-64.

Mahana, W., Zhao, T. M., Teller, R., Robinson, M. A. and Kindt, T. J. (1998). Genes in the pX region of human T cell leukemia virus I influence Vav phosphorylation in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1782-7.

Maignan, S., Guilloteau, J. P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J. and Ducruix, A. (1995). Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* **268**(5208): 291-3.

Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W. and Coggeshall, K. M. (2009). Vav and Rac activation in B cell antigen receptor endocytosis involves Vav recruitment to the adapter protein LAB. *J Biol Chem* **284**(52): 36202-12.

Manetz, T. S., Gonzalez-Espinosa, C., Arudchandran, R., Xirasagar, S., Tybulewicz, V. and Rivera, J. (2001). Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol* **21**(11): 3763-74.

- Marengere, L. E., Mirtsos, C., Koziaradski, I., Veillette, A., Mak, T. W. and Penninger, J. M.** (1997). Proto-oncoprotein Vav interacts with c-Cbl in activated thymocytes and peripheral T cells. *J Immunol* **159**(1):70-6.
- Margolis, B., Hu, P., Katzav, S., Li, W., Oliver, J. M., Ullrich, A., Weiss, A. and Schlessinger, J.** (1992). Tyrosine phosphorylation of vav proto-oncogene product containing SH2 domain and transcription factor motifs. *Nature* **356**(6364):71-4.
- Matsuguchi, T., Inhorn, R. C., Carlesso, N., Xu, G., Druker, B. and Griffin, J. D.** (1995). Tyrosine phosphorylation of p95Vav in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *EMBO J* **14**(2):257-65.
- Michel, F. and Acuto, O.** (2002). CD28 costimulation: a source of Vav-1 for TCR signaling with the help of SLP-76? *Sci STKE* **2002**(144):pe35.
- Michel, F., Grimaud, L., Tuosto, L. and Acuto, O.** (1998). Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J Biol Chem* **273**(48):31932-8.
- Michel, F., Mangino, G., Attal-Bonnefoy, G., Tuosto, L., Alcover, A., Roumier, A., Olive, D. and Acuto, O.** (2000). CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation. *J Immunol* **165**(7):3820-9.
- Miletic, A. V., Graham, D. B., Montgrain, V., Fujikawa, K., Kloeppel, T., Brim, K., Weaver, B., Schreiber, R., Xavier, R. and Swat, W.** (2007). Vav proteins control MyD88-dependent oxidative burst. *Blood* **109**(8):3360-8.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B. and Kieff, E.** (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**(2):155-66.
- Mimura, T., Minota, S., Nojima, Y., Morino, N., Hamasaki, K., Furuya, H. and Yazaki, Y.** (1997). Constitutive tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol* **158**(6):2977-83.
- Ming, W., Li, S., Billadeau, D. D., Quilliam, L. A. and Dinauer, M. C.** (2007). The Rac effector p67phox regulates phagocyte NADPH oxidase by stimulating Vav1 guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell Biol* **27**(1):312-23.

- Miranti, C. K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J. S. and Shattil, S. J.** (1998). Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* **8**(24): 1289-99.
- Mitin, N., Betts, L., Yohe, M. E., Der, C. J., Sondek, J. and Rossman, K. L.** (2007). Release of autoinhibition of ASEF by APC leads to CDC42 activation and tumor suppression. *Nat Struct Mol Biol* **14**(9): 814-23.
- Miura-Shimura, Y., Duan, L., Rao, N. L., Reddi, A. L., Shimura, H., Rottapel, R., Druker, B. J., Tsygankov, A., Band, V. and Band, H.** (2003). Cbl-mediated ubiquitinylation and negative regulation of Vav. *J Biol Chem* **278**(40): 38495-504.
- Moller, A., Dienz, O., Hehner, S. P., Droge, W. and Schmitz, M. L.** (2001). Protein kinase C theta cooperates with Vav1 to induce JNK activity in T-cells. *J Biol Chem* **276**(23): 20022-8.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A.** (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. and Lacal, J. C.** (1998). Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* **273**(21): 12779-85.
- Movilla, N. and Bustelo, X. R.** (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7870-85.
- Murayama, K., Shirouzu, M., Kawasaki, Y., Kato-Murayama, M., Hanawa-Suetsugu, K., Sakamoto, A., Katsura, Y., Suenaga, A., Toyama, M., Terada, T., Taiji, M., Akiyama, T. and Yokoyama, S.** (2007). Crystal structure of the rac activator, Asef, reveals its autoinhibitory mechanism. *J Biol Chem* **282**(7): 4238-42.
- Mustelin, T., Vang, T. and Bottini, N.** (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* **5**(1): 43-57.
- Myung, P. S., Derimanov, G. S., Jordan, M. S., Punt, J. A., Liu, Q. H., Judd, B. A., Meyers, E. E., Sigmund, C. D., Freedman, B. D. and Koretzky, G. A.** (2001). Differential requirement for SLP-76 domains in T cell development and function. *Immunity* **15**(6): 1011-26.

Nagano, K., Bornhauser, B. C., Warnasuriya, G., Entwistle, A., Cramer, R., Lindholm, D. and Naaby-Hansen, S. (2006). PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *EMBO J* **25**(9): 1871-82.

Nishida, M., Nagata, K., Hachimori, Y., Horiuchi, M., Ogura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J. and Inagaki, F. (2001). Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains. *EMBO J* **20**(12): 2995-3007.

Nishihara, H., Maeda, M., Oda, A., Tsuda, M., Sawa, H., Nagashima, K. and Tanaka, S. (2002). DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines. *Blood* **100**(12): 3968-74.

Norman, K. R., Fazzio, R. T., Mellem, J. E., Espelt, M. V., Strange, K., Beckerle, M. C. and Maricq, A. V. (2005). The Rho/Rac-family guanine nucleotide exchange factor VAV-1 regulates rhythmic behaviors in *C. elegans*. *Cell* **123**(1): 119-32.

Nunes, J. A., Collette, Y., Truneh, A., Olive, D. and Cantrell, D. A. (1994). The role of p21ras in CD28 signal transduction: triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21ras. *J Exp Med* **180**(3): 1067-76.

O'Rourke, A. M., Shao, H. and Kaye, J. (1998). A role for p21ras/MAP kinase in TCR-mediated activation of LFA-1. *J Immunol* **161**(11): 5800-3.

Okumura, K., Kaneko, Y., Nonoguchi, K., Nishiyama, H., Yokoi, H., Higuchi, T., Itoh, K., Yoshida, O., Miki, T. and Fujita, J. (1997). Expression of a novel isoform of Vav, Vav-T, containing a single Src homology 3 domain in murine testicular germ cells. *Oncogene* **14**(6): 713-20.

Onodera, H., Motto, D. G., Koretzky, G. A. and Rothstein, D. M. (1996). Differential regulation of activation-induced tyrosine phosphorylation and recruitment of SLP-76 to Vav by distinct isoforms of the CD45 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **271**(36): 22225-30.

Ota, Y. and Samelson, L. E. (1997). The product of the proto-oncogene *c-cbl*: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* **276**(5311): 418-20.

Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, I. and Siminovitch, K. A. (1996). Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J Exp Med* **184**(3): 839-52.

Pearce, A. C., McCarty, O. J., Calaminus, S. D., Vigorito, E., Turner, M. and Watson, S. P. (2007). Vav family proteins are required for optimal regulation of PLCgamma2 by integrin alphallbbeta3. *Biochem J* **401**(3):753-61.

Pearce, A. C., Senis, Y. A., Billadeau, D. D., Turner, M., Watson, S. P. and Vigorito, E. (2004). Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem* **279**(52):53955-62.

Penninger, J. M., Fischer, K. D., Sasaki, T., Koziaradzki, I., Le, J., Tedford, K., Bachmaier, K., Ohashi, P. S. and Bachmann, M. F. (1999). The oncogene product Vav is a crucial regulator of primary cytotoxic T cell responses but has no apparent role in CD28-mediated co-stimulation. *Eur J Immunol* **29**(5): 1709-18.

Phillipson, M., Heit, B., Parsons, S. A., Petri, B., Mullaly, S. C., Colarusso, P., Gower, R. M., Neely, G., Simon, S. I. and Kubes, P. (2009). Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J Immunol* **182**(11):6870-8.

Pires de Miranda, M., Alenquer, M., Marques, S., Rodrigues, L., Lopes, F., Bustelo, X. R. and Simas, J. P. (2008). The Gammaherpesvirus m2 protein manipulates the Fyn/Vav pathway through a multidocking mechanism of assembly. *PLoS One* **3**(2): e1654.

Poppe, D., Tiede, I., Fritz, G., Becker, C., Bartsch, B., Wirtz, S., Strand, D., Tanaka, S., Galle, P. R., Bustelo, X. R. and Neurath, M. F. (2006). Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol* **176**(1): 640-51.

Prieto-Sanchez, R. M., Hernandez, J. A., Garcia, J. L., Gutierrez, N. C., San Miguel, J., Bustelo, X. R. and Hernandez, J. M. (2006). Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *Br J Haematol* **133**(6):642-5.

Prisco, A., Vanes, L., Ruf, S., Trigueros, C. and Tybulewicz, V. L. (2005). Lineage-specific requirement for the PH domain of Vav1 in the activation of CD4+ but not CD8+ T cells. *Immunity* **23**(3):263-74.

Puga, I., Rao, A. and Macian, F. (2008). Targeted cleavage of signaling proteins by caspase 3 inhibits T cell receptor signaling in anergic T cells. *Immunity* **29**(2): 193-204.

Quaranta, M. G., Mattioli, B., Spadaro, F., Straface, E., Giordani, L., Ramoni, C., Malorni, W. and Viora, M. (2003). HIV-1 Nef triggers Vav-mediated signaling pathway leading to functional and morphological differentiation of dendritic cells. *FASEB J* **17**(14): 2025-36.

Quevedo, C., Sauzeau, V., Menacho-Marquez, M., Castro-Castro, A. and Bustelo, X. R. (2010). Vav3-deficient mice exhibit a transient delay in cerebellar development. *Mol Biol Cell* **21**(6): 1125-39.

Raab, M., da Silva, A. J., Findell, P. R. and Rudd, C. E. (1997). Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR zeta/CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**(2): 155-64.

Ramos-Morales, F., Romero, F., Schweighoffer, F., Bismuth, G., Camonis, J., Tortolero, M. and Fischer, S. (1995). The proline-rich region of Vav binds to Grb2 and Grb3-3. *Oncogene* **11**(8): 1665-9.

Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**: 707-47.

Rapley, J., Tybulewicz, V. L. and Rittinger, K. (2008). Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep* **9**(7): 655-61.

Rauch, S., Pulkkinen, K., Saksela, K. and Fackler, O. T. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity. *J Virol* **82**(6): 2918-29.

Reynolds, L. F., de Bettignies, C., Norton, T., Beeser, A., Chernoff, J. and Tybulewicz, V. L. (2004). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J Biol Chem* **279**(18): 18239-46.

Reynolds, L. F., Smyth, L. A., Norton, T., Freshney, N., Downward, J., Kioussis, D. and Tybulewicz, V. L. (2002). Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways. *J Exp Med* **195**(9): 1103-14.

Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**: 281-312.

Rodrigues, L., Pires de Miranda, M., Caloca, M. J., Bustelo, X. R. and Simas, J. P. (2006). Activation of Vav by the gammaherpesvirus M2 protein contributes to the establishment of viral latency in B lymphocytes. *J Virol* **80**(12): 6123-35.

Romero, F., Dargemont, C., Pozo, F., Reeves, W. H., Camonis, J., Gisselbrecht, S. and Fischer, S. (1996). p95vav associates with the nuclear protein Ku-70. *Mol Cell Biol* **16**(1): 37-44.

Ruiz, S., Santos, E. and Bustelo, X. R. (2007). RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-cell signaling responses. *Mol Cell Biol* **27**(23): 8127-42.

Ruiz, S., Santos, E. and Bustelo, X. R. (2009). The use of knockout mice reveals a synergistic role of the Vav1 and Rasgrf2 gene deficiencies in lymphomagenesis and metastasis. *PLoS One* **4**(12): e8229.

Saito, E., Fujimoto, M., Hasegawa, M., Komura, K., Hamaguchi, Y., Kaburagi, Y., Nagaoka, T., Takehara, K., Tedder, T. F. and Sato, S. (2002). CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* **109**(11): 1453-62.

Salmond, R. J., McNeill, L., Holmes, N. and Alexander, D. R. (2008). CD4⁺ T cell hyper-responsiveness in CD45 transgenic mice is independent of isoform. *Int Immunol* **20**(7): 819-27.

Salojin, K. V., Zhang, J. and Delovitch, T. L. (1999). TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac-1-/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol* **163**(2): 844-53.

Salojin, K. V., Zhang, J., Meagher, C. and Delovitch, T. L. (2000). ZAP-70 is essential for the T cell antigen receptor-induced plasma membrane targeting of SOS and Vav in T cells. *J Biol Chem* **275**(8): 5966-75.

Sanzone, S., Zeyda, M., Saemann, M. D., Soncini, M., Holter, W., Fritsch, G., Knapp, W., Candotti, F., Stulnig, T. M. and Parolini, O. (2003). SLAM-associated protein deficiency causes imbalanced early signal transduction and blocks downstream activation in T cells from X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem* **278**(32): 29593-9.

Sato, S., Jansen, P. J. and Tedder, T. F. (1997). CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13158-62.

Sattler, M., Pride, Y. B., Quinnan, L. R., Verma, S., Malouf, N. A., Husson, H., Salgia, R., Lipkowitz, S. and Griffin, J. D. (2002). Differential expression and signaling of CBL and CBL-B in BCR/ABL transformed cells. *Oncogene* **21**(9): 1423-33.

Sauzeau, V., Horta-Junior, J. A., Riobos, A. S., Fernandez, G., Sevilla, M. A., Lopez, D. E., Montero, M. J., Rico, B. and Bustelo, X. R. (2010a). Vav3 is involved in GABAergic axon guidance events important for the proper function of brainstem neurons controlling cardiovascular, respiratory, and renal parameters. *Mol Biol Cell* **21**(23): 4251-63.

Sauzeau, V., Jerkic, M., Lopez-Novoa, J. M. and Bustelo, X. R. (2007). Loss of Vav2 proto-oncogene causes tachycardia and cardiovascular disease in mice. *Mol Biol Cell* **18**(3): 943-52.

Sauzeau, V., Sevilla, M. A., Montero, M. J. and Bustelo, X. R. (2010b)The Rho/Rac exchange factor Vav2 controls nitric oxide-dependent responses in mouse vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **120**(1): 315-30.

Sauzeau, V., Sevilla, M. A., Rivas-Elena, J. V., de Alava, E., Montero, M. J., Lopez-Novoa, J. M. and Bustelo, X. R. (2006). Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. *Nat Med* **12**(7): 841-5.

Saveliev, A., Vanes, L., Ksionda, O., Rapley, J., Smerdon, S. J., Rittinger, K. and Tybulewicz, V. L. (2009). Function of the nucleotide exchange activity of vav1 in T cell development and activation. *Sci Signal* **2**(101): ra83.

Schaeffer, H. J. and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-44.

Schiller, M. R., Chakrabarti, K., King, G. F., Schiller, N. I., Eipper, B. A. and Maciejewski, M. W. (2006). Regulation of RhoGEF activity by intramolecular and intermolecular SH3 domain interactions. *J Biol Chem* **281**(27): 18774-86.

Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D. and Lee, I. J. (1996). Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene* **13**(2): 363-71.

Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L. and Bustelo, X. R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J* **17**(22):6608-21.

Sekine, Y., Yamamoto, C., Ikeda, O., Muromoto, R., Nanbo, A., Oritani, K., Yoshimura, A. and Matsuda, T. (2009). The protein content of an adaptor protein, STAP-2 is controlled by E3 ubiquitin ligase Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* **384**(2): 187-92.

Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T. and Avots, A. (2000). The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1498**(1): 1-18.

Shigematsu, H., Iwasaki, H., Otsuka, T., Ohno, Y., Arima, F. and Niho, Y. (1997). Role of the vav proto-oncogene product (Vav) in erythropoietin-mediated cell proliferation and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* **272**(22): 14334-40.

Simmons, A., Gangadharan, B., Hodges, A., Sharrocks, K., Prabhakar, S., Garcia, A., Dwek, R., Zitzmann, N. and McMichael, A. (2005). Nef-mediated lipid raft exclusion of UbcH7 inhibits Cbl activity in T cells to positively regulate signaling. *Immunity* **23**(6):621-34.

Smyth, L. A., Williams, O., Huby, R. D., Norton, T., Acuto, O., Ley, S. C. and Kioussis, D. (1998). Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14):8193-8.

Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., Bhan, A. K. and Alt, F. W. (1998). Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9**(1):81-91.

Song, J. S., Haleem-Smith, H., Arudchandran, R., Gomez, J., Scott, P. M., Mill, J. F., Tan, T. H. and Rivera, J. (1999). Tyrosine phosphorylation of Vav stimulates IL-6 production in mast cells by a Rac/c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway. *J Immunol* **163**(2): 802-10.

Sosinowski, T., Pandey, A., Dixit, V. M. and Weiss, A. (2000). Src-like adaptor protein (SLAP) is a negative regulator of T cell receptor signaling. *J Exp Med* **191**(3):463-74.

Spurrell, D. R., Luckashenak, N. A., Minney, D. C., Chaplin, A., Penninger, J. M., Liwski, R. S., Clements, J. L. and West, K. A. (2009). Vav1 regulates the migration and adhesion of dendritic cells. *J Immunol* **183**(1): 310-8.

Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N. and Long, E. O. (2003). Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **23**(17):6291-9.

Su, I. H., Dobenecker, M. W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wulfig, C. and Tarakhovsky, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* **121**(3):425-36.

Suzuki-Inoue, K., Kato, Y., Inoue, O., Kaneko, M. K., Mishima, K., Yatomi, Y., Yamazaki, Y., Narimatsu, H. and Ozaki, Y. (2007). Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* **282**(36):25993-6001.

Swat, W., Xavier, R., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Fredericks, J., Fujikawa, K., Bhan, A. K. and Alt, F. W. (2003). Essential role for Vav1 in activation, but not development, of gammadelta T cells. *Int Immunol* **15**(2):215-21.

Tamir, I., Dal Porto, J. M. and Cambier, J. C. (2000). Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr Opin Immunol* **12**(3):307-15.

Tarakhovsky, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K. and Tybulewicz, V. L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* **374**(6521):467-70.

Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M. and Fischer, K. D. (2001). Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nat Immunol* **2**(6):548-55.

Teramoto, H., Salem, P., Robbins, K. C., Bustelo, X. R. and Gutkind, J. S. (1997). Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcepsilonRI to the Rac1-JNK pathway. *J Biol Chem* **272**(16):10751-5.

Thien, C. B. and Langdon, W. Y. (1998). c-Cbl: a regulator of T cell receptor-mediated signalling. *Immunol Cell Biol* **76**(5):473-82.

Thrasher, A. J. (2002). WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* **2**(9):635-46.

Toker, A. (2002). Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **59**(5):761-79.

Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev* **4**(1): 96-101.

Trenkle, T., McClelland, M., Adlkofer, K. and Welsh, J. (2000). Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors. *Gene* **245**(1): 139-49.

Tuosto, L., Michel, F. and Acuto, O. (1996). p95vav associates with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in antigen-stimulated T cells. *J Exp Med* **184**(3): 1161-6.

Turner, M. and Billadeau, D. D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **2**(7): 476-86.

Turner, M., Mee, P. J., Walters, A. E., Quinn, M. E., Mellor, A. L., Zamoyska, R. and Tybulewicz, V. L. (1997). A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity* **7**(4): 451-60.

Tybulewicz, V. L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* **17**(3): 267-74.

Tybulewicz, V. L., Ardouin, L., Prisco, A. and Reynolds, L. F. (2003). Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol Rev* **192**: 42-52.

Utomo, A., Hirahashi, J., Mekala, D., Asano, K., Glogauer, M., Cullere, X. and Mayadas, T. N. (2008). Requirement for Vav proteins in post-recruitment neutrophil cytotoxicity in IgG but not complement C3-dependent injury. *J Immunol* **180**(9): 6279-87.

Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H. and Lanzavecchia, A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* **181**(2): 577-84.

Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-322.

van Oers, N. S., Killeen, N. and Weiss, A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* **1**(8): 675-85.

van Oers, N. S. and Weiss, A. (1995). The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signalling processes. *Semin Immunol* **7**(4): 227-36.

Van Seuning, I., Ostrowski, J., Bustelo, X. R., Sleath, P. R. and Bomsztyk, K. (1995). The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J Biol Chem* **270**(45): 26976-85.

Vigorito, E., Billadeu, D. D., Savoy, D., McAdam, S., Doody, G., Fort, P. and Turner, M. (2003). RhoG regulates gene expression and the actin cytoskeleton in lymphocytes. *Oncogene* **22**(3): 330-42.

Vigorito, E., Gambardella, L., Colucci, F., McAdam, S. and Turner, M. (2005). Vav proteins regulate peripheral B-cell survival. *Blood* **106**(7): 2391-8.

Vigorito, E., Kovetski, D. and Turner, M. (2006). Synergistic activation of PKD by the B cell antigen receptor and CD19 requires PI3K, Vav1 and PLCgamma. *Cell Signal* **18**(9): 1455-60.

Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S. and Altman, A. (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* **155**(3): 331-8.

Walmsley, M. J., Ooi, S. K., Reynolds, L. F., Smith, S. H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D. A., Cancro, M. P. and Tybulewicz, V. L. (2003). Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science* **302**(5644): 459-62.

Wang, S., Diao, H., Guan, Q., Jevnikar, A. M. and Du, C. (2007). Enhanced cardiac allograft survival by Vav1-Rac signaling blockade in a mouse model. *Transpl Immunol* **18**(1): 53-61.

Weckbecker, G., Bruns, C., Fischer, K. D., Heusser, C., Li, J., Metzler, B., Morris, R. E., Nusslein-Hildesheim, B., Raulf, F., Wiczorek, G. and Zenke, G. (2007). Strongly reduced alloreactivity and long-term survival times of cardiac allografts in Vav1- and Vav1/Vav2-knockout mice. *Transpl Int* **20**(4): 353-64.

Wells, J. A. (1991). Systemic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol* **202**, 390-411.

Weng, W. K., Jarvis, L. and LeBien, T. W. (1994). Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. *J Biol Chem* **269**(51): 32514-21.

- Wilkinson, F. L., Holaska, J. M., Zhang, Z., Sharma, A., Manilal, S., Holt, I., Stamm, S., Wilson, K. L. and Morris, G. E.** (2003). Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *Eur J Biochem* **270**(11): 2459-66.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J. and et al.** (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* **368**(6466): 32-8.
- Worthylake, D. K., Rossman, K. L. and Sondek, J.** (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**(6813): 682-8.
- Wu, C., Zhang, L., Bourne, P. A., Reeder, J. E., di Sant'Agnes, P. A., Yao, J. L., Na, Y. and Huang, J.** (2006). Protein tyrosine phosphatase PTP1B is involved in neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Prostate* **66**(11): 1125-35.
- Wu, J., Katzav, S. and Weiss, A.** (1995). A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol* **15**(8): 4337-46.
- Wu, J., Motto, D. G., Koretzky, G. A. and Weiss, A.** (1996). Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* **4**(6): 593-602.
- Wu, J., Zhao, Q., Kurosaki, T. and Weiss, A.** (1997). The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* **185**(10): 1877-82.
- Wulf, G. M., Adra, C. N. and Lim, B.** (1993). Inhibition of hematopoietic development from embryonic stem cells by antisense vav RNA. *EMBO J* **12**(13): 5065-74.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. and Seed, B.** (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* **8**(6): 723-32.
- Yabana, N. and Shibuya, M.** (2002). Adaptor protein APS binds the NH2-terminal autoinhibitory domain of guanine nucleotide exchange factor Vav3 and augments its activity. *Oncogene* **21**(50): 7720-9.
- Ye, Z. S. and Baltimore, D.** (1994). Binding of Vav to Grb2 through dimerization of Src homology 3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12629-33.
- Yohe, M. E., Rossman, K. and Sondek, J.** (2008). Role of the C-terminal SH3 domain and N-terminal tyrosine phosphorylation in regulation of Tim and related Dbl-family proteins. *Biochemistry* **47**(26): 6827-39.

Yu, B., Martins, I. R., Li, P., Amarasinghe, G. K., Umetani, J., Fernandez-Zapico, M. E., Billadeau, D. D., Machius, M., Tomchick, D. R. and Rosen, M. K. (2010). Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell* **140**(2): 246-56.

Yuzawa, S., Yokochi, M., Hatanaka, H., Ogura, K., Kataoka, M., Miura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J. and Inagaki, F. (2001). Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility necessary for target recognition. *J Mol Biol* **306**(3): 527-37.

Zhang, R., Alt, F. W., Davidson, L., Orkin, S. H. and Swat, W. (1995). Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature* **374**(6521): 470-3.

Zhang, W., Irvin, B. J., Triple, R. P., Abraham, R. T. and Samelson, L. E. (1999). Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol* **11**(6): 943-50.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R. P. and Samelson, L. E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**(1): 83-92.

Zhang, W., Triple, R. P. and Samelson, L. E. (1998). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**(2): 239-46.

Zhao, Q., Williams, B. L., Abraham, R. T. and Weiss, A. (1999). Interdomain B in ZAP-70 regulates but is not required for ZAP-70 signaling function in lymphocytes. *Mol Cell Biol* **19**(1): 948-56.

Zhou, Z., Yin, J., Dou, Z., Tang, J., Zhang, C. and Cao, Y. (2007). The calponin homology domain of Vav1 associates with calmodulin and is prerequisite to T cell antigen receptor-induced calcium release in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* **282**(32): 23737-44.

Zhu, J. and McKeon, F. (2000). Nucleocytoplasmic shuttling and the control of NF-AT signaling. *Cell Mol Life Sci* **57**(3): 411-20.

Zmuidzinas, A., Fischer, K. D., Lira, S. A., Forrester, L., Bryant, S., Bernstein, A. and Barbacid, M. (1995). The vav proto-oncogene is required early in embryogenesis but not for hematopoietic development in vitro. *EMBO J* **14**(1): 1-11.

Zugaza, J. L., Caloca, M. J. and Bustelo, X. R. (2004). Inverted signaling hierarchy between RAS and RAC in T-lymphocytes. *Oncogene* **23**(34): 5823-33.

Zugaza, J. L., Lopez-Lago, M. A., Caloca, M. J., Dosil, M., Movilla, N. and Bustelo, X. R. (2002). Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J Biol Chem* **277**(47): 45377-92.

Anexo I

Vectores de expresión adicionales utilizados en este trabajo. El nombre, tipo de vector y proteína codificada aparecen indicados.

Nombre	Tipo de vector	Proteína codificada
pKES27	pMEX	Vav1 ^{Y3xF+,835-845}
pMB35	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{P833L}
pMB52	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{AAAP}
pMB50	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{P651L}
pMB53	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{AAAP+P651L}
pMB54	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{AAAP+,835-845}
pMB51	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{P651L+,835-845}
pMB55	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{AAAP+P651L+,835-845}
pMB69	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{NEmut+,835-845}
pMB70	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{VKmut+,835-845}
pMB71	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{RDmut+,835-845}
pMB72	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{NE+RDmut+,835-845}
pMB73	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{NEVKRDmut+,835-845}
pMB74	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{T384A+,835-845}
pMB75	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{L388A+,835-845}
pMB90	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{V373A+,835-845}
PMB91	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{K374A+,835-845}
pMB92	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{R375A+,835-845}
pMB93	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D376A+,835-845}
pMB98	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{R375A}
pMB99	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D376A}
pMB77	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D792A}
pMB86	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{F793A}
pMB87	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{C794A}
pMB78	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{R796A}
pMB88	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{K804A}
pMB89	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{N835A}
pMB58	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{R790A}
pMB59	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{Y791A}
pMB60	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D797A}
pMB61	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{R798A}
pMB62	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{S799A}
pMB63	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{E805A}
pMB64	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{G806A}
pMB65	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{Q817A}
pMB66	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{Q818A}
pMB67	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{Y826A}
pMB68	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{G827A}

Anexo I (continuación)

Nombre	Tipo de vector	Proteína codificada
pMB79	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{V837A}
pMB80	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{E838A}
pMB81	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{E839A}
pMB82	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D840A}
pMB83	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{S842A}
pMB84	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{E843A}
pMB94	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{DFCmut}
pMB100	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{DFC-Rmut}
pMB101	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{YVEEDmut}
pMB104	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{DFC-R+YVEEDmut}
pMB111	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D376A+DFC-Rmut}
pMB109	pEGFP-C2	EGFP-Vav1 ^{D376A+DFC-R+YVEEDmut}
pMB108	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{DFC-Rmut}
pMB130	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{YVEEDmut}
pMB131	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{DFC-R+YVEEDmut}
pMB115	pGEX 6P-1	GST-SH3 ^{DFC-R+P833Lmut}
pMB141	pGEX 6P-1	GST-SH3 ^{P833L+YVEEDmut}
pMB142	pGEX 6P-1	GST-SH3 ^{DFC-Rmut+P833L+YVEEDmut}
pJRC64	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y541F}
pMB13	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y174F+Y541F}
pMB23	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y541E}
pMB124	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y174F+Y541E}
pJRC65	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y544F}
pMB14	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y174F+Y544F}
pMB24	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y544E}
pMB31	pEF1-Myc-His A	Vav1 ^{Y174F+Y544E}
pMB41	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{Y836F}
pMB36	pGEX 6P-1	GST-CSH3 ^{Y836E}
pKES23	pcDNA3	Vav1 ^{Y142F}
pMB120	pcDNA3	Vav1 ^{Y160F}
pMB38	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y3xF+Y836F}
pMB28	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y142E}
pMB29	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y160E}
pMB30	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y174E}
pKES24	pcDNA3	Vav1 ^{Y142F+Y174F}
pKES25	pcDNA3	Vav1 ^{Y160F+Y174F}
pMB37	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y160F+Y174E}
pMB45	pEF1/myc-His A	Vav1 ^{Y160E+Y174E}

Anexo II

Lista de oligonucleótidos utilizados para introducir mutaciones puntuales o combinadas en el cDNA de Vav1. D, directo; R, reverso.

Mutación	Oligo	
Y174F	D	5'-GCA GAG GGG GAC GAG ATC TTC GAG GAC CTA ATG CGC TTG-3'
	R	5'-CAA GCG CAT TAG GTC CTC GAA GAT CTC GTC CCC CTC TGC-3'
P833L	D	5'-CGG CCG GAT CGG CTG GTT CCC TTC TAA CTA TGT GGA GGA AG-3'
	R	5'-CTT CCT CCA CAT AGT TAG AAG GGA ACC AGC CGA TCC GGC CG-3'
AAAP	D	5'-GGA ATA CTA TGG GAT CGC TGC TGC ACC TGG AGC-3'
	R	5'-GCT CCA GGT GCA GCA GCG ATC CCA TAG TAT TCC-3'
P651L	D	5'-GTC GGC TGG TTT CTC TGT AAC AGA GTG C-3'
	R	5'-GCA CTC TGT TAC AGA GAA ACC AGC CGA C-3'
NEmut	D	5'-GGG ACC TGG CAC AGT GCG TGG CCG CGG TCA AGA GGG ACA ATG AAA CC-3'
	R	5'-GGT TTC ATT GTC CCT CTT GAC CGC GGC CAC GCA CTG TGC CAG GTC CC-3'
VKmut	D	5'-CTG GCA CAG TGC GTG AAC GAG GCC GCG AGG GAC AAT GAA ACC CTA CGG-3'
	R	5'-CCG TAG GGT TTC ATT GTC CCT CGC GGC CTC GTT CAC GCA CTG TGC CAG-3'
RDmut	D	5'-GCA CAG TGC GTG AAC GAG GTC AAG GCG GCC AAT GAA ACC CTA CGG CAG ATC AC-3'
	R	5'-GTG ATC TGC CGT AGG GTT TCA TTG GCC GCC TTG ACC TCG TTC ACG CAC TGT GC-3'
NE+RDmut	D	5'-GGG ACC TGG CAC AGT GCG TGG CCG CGG TCA AGG CGG CCA ATG AAA CC-3'
	R	5'-GGT TTC ATT GGC CGC CTT GAC CGC GGC CAC GCA CTG TGC CAG GTC CC-3'
NEVKRDmut	D	5'-CTG GCA CAG TGC GTG GCC GCG GCC GCG GCG GCC AAT GAA ACC CTA CGG-3'
	R	5'-CCG TAG GGT TTC ATT GGC CGC CGC GGC CGC GGC CAC GCA CTG TGC CAG-3'
T384A	D	5'-GGG ACA ATG AAA CCC TAC GGC AGA TCG CAA ACT TTC AGC TGT CCA TTG AGA AC-3'
	R	5'-GTT CTC AAT GGA CAG CTG AAA GTT TGC GAT CTG CCG TAG GGT TTC ATT GTC CC-3'

Anexo II (continuación)

Mutación	Oligo	
L388A	D	5'-GGC AGA TCA CAA ACT TTC AGG CGT CCA TTG AGA ACC TGG ACC-3'
	R	5'-GGT CCA GGT TCT CAA TGG ACG CCT GAA AGT TTG TGA TCT GCC-3'
V373A	D	5'-GGC ACA GTG CGT GAA CGA GGC CAA GAG GGA CAA TGA AAC CCT AC-3'
	R	5'-GTA GGG TTT CAT TGT CCC TCT TGG CCT CGT TCA CGC ACT GTG CC-3'
K374A	D	5'-GGC ACA GTG CGT GAA CGA GGT CGC GAG GGA CAA TGA AAC CC-3'
	R	5'-GGG TTT CAT TGT CCC TCG CGA CCT CGT TCA CGC ACT GTG CC-3'
R375A	D	5'-CAG TGC GTG AAC GAG GTC AAG GCG GAC AAT GAA ACC CTA CGG-3'
	R	5'-CCG TAG GGT TTC ATT GTC CGC CTT GAC CTC GTT CAC GCA CTG-3'
D376A	D	5'-GTG AAC GAG GTC AAG AGG GCC AAT GAA ACC CTA CGG CAG-3'
	R	5'-CTG CCG TAG GGT TTC ATT GGC CCT CTT GAC CTC GTT CAC-3'
D792A	D	5'-GCA CTG CCA AAG CCC GCT ACG CCT TCT GTG CCC GGG ACA GGT C-3'
	R	5'-GAC CTG TCC CGG GCA CAG AAG GCG TAG CGG GCT TTG GCA GTG C-3'
F793A	D	5'-CTG CCA AAG CCC GCT ACG ACG CCT GTG CCC GGG ACA GGT CGG-3'
	R	5'-CCG ACC TGT CCC GGG CAC AGG CGT CGT AGC GGG CTT TGG CAG-3'
C794A	D	5'-CCA AAG CCC GCT ACG ACT TCG CTG CCC GGG ACA GGT CGG AAC-3'
	R	5'-GTT CCG ACC TGT CCC GGG CAG CGA AGT CGT AGC GGG CTT TGG-3'
R796A	D	5'-CGC TAC GAC TTC TGT GCC GCG GAC AGG TCG GAA CTG TCC C-3'
	R	5'-GGG ACA GTT CCG ACC TGT CCG CGG CAC AGA AGT CGT AGC G-3'
K804A	D	5'-GGA CAG GTC GGA ACT GTC CCT TGC GGA GGG TGA TAT CAT CAA GAT C-3'
	R	5'-GAT CTT GAT GAT ATC ACC CTC CGC AAG GGA CAG TTC CGA CCT GTC C-3'

Anexo II (continuación)

Mutación	Oligo	
N835A	D	5'- CGG ATC GGC TGG TTC CCT TCT GCC TAT GTG GAG GAA GAC TAT TC -3'
	R	5'- GAA TAG TCT TCC TCC ACA TAG GCA GAA GGG AAC CAG CCG ATC CG -3'
R790A	D	5'- GTA TTT TGG CAC TGC CAA AGC CGC CTA CGA CTT CTG TGC CCG GGA C -3'
	R	5'- GTC CCG GGC ACA GAA GTC GTA GGC GGC TTT GGC AGT GCC AAA ATA C -3'
Y791A	D	5'- GCA CTG CCA AAG CCC GCG CCG ACT TCT GTG CCC GGG -3'
	R	5'- CCC GGG CAC AGA AGT CGG CGC GGG CTT TGG CAG TGC -3'
D797A	D	5'- CGC TAC GAC TTC TGT GCC CGG GCC AGG TCG GAA CTG TCC CTT AAG -3'
	R	5'- CTT AAG GGA CAG TTC CGA CCT GGC CCG GGC ACA GAA GTC GTA GCG -3'
R798A	D	5'- CTA CGA CTT CTG TGC CCG GGA CGC GTC GGA ACT GTC CCT TAA GGA G -3'
	R	5'- CTC CTT AAG GGA CAG TTC CGA CGC GTC CCG GGC ACA GAA GTC GTA G -3'
S799A	D	5'- GAC TTC TGT GCC CGG GAC AGG GCG GAA CTG TCC CTT AAG GAG G -3'
	R	5'- CCT CCT TAA GGG ACA GTT CCG CCC TGT CCC GGG CAC AGA AGT C -3'
E805A	D	5'- GTC GGA ACT GTC CCT TAA GGC GGG TGA TAT CAT CAA GAT CC -3'
	R	5'- GGA TCT TGA TGA TAT CAC CCG CCT TAA GGG ACA GTT CCG AC -3'
G806A	D	5'- GAA CTG TCC CTT AAG GAG CGT GAT ATC ATC AAG ATC C -3'
	R	5'- GGA TCT TGA TGA TAT CAC GCT CCT TAA GGG ACA GTT C -3'
Q817A	D	5'- GAT CCT CAA TAA GAA GGG ACG GCA AGG CTG GTG GCG TGG GG -3'
	R	5'- CCC CAC GCC ACC AGC CTT GCC GTC CCT TCT TAT TGA GGA TC -3'
Q818A	D	5'- CTC AAT AAG AAG GGA CAG CGA GGC TGG TGG CGT GGG GAG -3'
	R	5'- CTC CCC ACG CCA CCA GCC TCG CTG TCC CTT CTT ATT GAG -3'

Anexo II (continuación)

Mutación	Oligo	
Y826A	D	5'-CTG GTG GCG TGG GGA GAT CCG CGG CCG GAT CGG CTG GTT C-3'
	R	5'-GAA CCA GCC GAT CCG GCC GCG GAT CTC CCC ACG CCA CCA G-3'
G827A	D	5'-CTG GTG GCG TGG GGA GAT CTA CCG CCG GAT CGG CTG GTT CCC TTC-3'
	R	5'-GAA GGG AAC CAG CCG ATC CGG CGG TAG ATC TCC CCA CGC CAC CAG-3'
V837A	D	5'-CGG CTG GTT CCC TTC TAA CTA TGC GGA GGA AGA CTA TTC CGA ATA TTG-3'
	R	5'-CAA TAT TCG GAA TAG TCT TCC TCC GCA TAG TTA GAA GGG AAC CAG CCG-3'
E838A	D	5'-CTG GTT CCC TTC TAA CTA TGT GGC GGA AGA CTA TTC CGA ATA TTG-3'
	R	5'-CAA TAT TCG GAA TAG TCT TCC GCC ACA TAG TTA GAA GGG AAC CAG-3'
E839A	D	5'-CCT TCT AAC TAT GTG GAG GCA GAC TAT TCC GAA TAT TGC-3'
	R	5'-GCA ATA TTC GGA ATA GTC TGC CTC CAC ATA GTT AGA AGG-3'
D840A	D	5'-CTT CTA ACT ATG TGG AGG AAG CCT ATT CCG AAT ATT GCT GAG C-3'
	R	5'-GCT CAG CAA TAT TCG GAA TAG GCT TCC TCC ACA TAG TTA GAA G-3'
S842A	D	5'-CTA TGT GGA GGA AGA CTA TGC CGA ATA TTG CTG AGC CTG-3'
	R	5'-CAG GCT CAG CAA TAT TCG GCA TAG TCT TCC TCC ACA TAG-3'
E843A	D	5'-GTG GAG GAA GAC TAT TCC GCA TAT TGC TGA GCC TGG TGC-3'
	R	5'-GCA CCA GGC TCA GCA ATA TGC GGA ATA GTC TTC CTC CAC-3'
DFCmut	D	5'-GCA CTG CCA AAG CCC GCT ACG CCG CCG CAG CCC GGG ACA GGT CGG AAC TG-3'
	R	5'-CAG TTC CGA CCT GTC CCG GGC TGC GGC GGC GTA GCG GGC TTT GGC AGT GC-3'
DFC-Rmut	D	5'-CGC TAC GCC GCC GCA GCC GCG GAC AGG TCG GAA CTG TCC C-3'
	R	5'-GGG ACA GTT CCG ACC TGT CCG CGG CTG CGG CGG CGT AGC G-3'

Anexo II (continuación)

Mutación	Oligo	
YVEEDmut	D	5'-CGG ATC GGC TGG TTC CCT TCT AAC GCA GCG GCG GCA GCC TAT TCC GAA TAT TG-3'
	R	5'-CAA TAT TCG GAA TAG GCT GCC GCC GCT GCG TTA GAA GGG AAC CAG CCG ATC CG-3'
P833L+YVEED mut	D	5'-CGG ATC GGC TGG TTC CCT TCT AAC GCA GCG GCG GCA GCC TAT TCC GAA TAT TG-3'
	R	5'-CAA TAT TCG GAA TAG GCT GCC GCC GCT GCG TTA GAA GGG AAC CAG CCG ATC CG-3'
Y541F	D	5'-GGC ACA TTC TAC CAG GGA TTT CGC TGT TAC AGG TGC CGG-3'
	R	5'-CCG GCA CCT GTA ACA GCG AAA TCC CTG GTA GAA TGT GCC-3'
Y541E	D	5'-GGC ACA TTC TAC CAG GGA GAG CGC TGT TAC AGG TGC CGG-3'
	R	5'-CCG GCA CCT GTA ACA GCG CTC TCC CTG GTA GAA TGT GCC-3'
Y544F	D	5'-GGC ACA TTC TAC CAG TTT GAA CGC TGT TAC AGG-3'
	R	5'-CCT GTA ACA GCG TTC AAA CTG GTA GAA TGT GCC-3'
Y544E	D	5'-GGC ACA TTC TAC CAG GGA GAA CGC TGT TAC AGG-3'
	R	5'-CCT GTA ACA GCG TTC TCC CTG GTA GAA TGT GCC-3'
Y836F	D	5'-CGG CTG GTT CCC TTC TAA CTT TGT GGA GGA AGA CTA TTC CG-3'
	R	5'-CGG AAT AGT CTT CCT CCA CAA AGT TAG AAG GGA ACC AGC CG-3'
Y836E	D	5'-GGC TGG TTC CCT TCT AAC GAG GTG GAG GAA GAC TAT TCC-3'
	R	5'-GGA ATA GTC TTC CTC CAC CTC GTT AGA AGG GAA CCA GCC-3'
Y142F	D	5'- CTG AAC GAC GAA GAT ATT TTC AGT GGC CTT TCA GAC CAG -3'
	R	5'- CTG GTC TGA AAG GCC ACT GAA AAT ATC TTC GTC GTT CAG -3'
Y160F	D	5'- GAG GAA GAC GAG GAC CTT TTT GAC TGC GTG GAA AAT GAG -3'
	R	5'- CTC ATT TTC CAC GCA GTC AAA AAG GTC CTC GTC TTC CTC -3'

Anexo II (continuación)

Mutación	Oligo	
Y142E	D	5'- GCG AGA CTT GCT GCT TCT ATA ACT CTC ACC GGA AAG TCT GGT CTA AC -3'
	R	5'- CAA TCT GGT CTG AAA GGC CAC TCT CAA TAT CTT CGT CGT TCA GAG CG -3'
Y160E	D	5'- CGT CTC CTT CTG CTC CTG GAA CTC CTG ACG CAC CTT TTA CTC CTC -3'
	R	5'- CTC CTC ATT TTC CAC GCA GTC CTC AAG GTC CTC GTC TTC CTC TGC -3'
Y174E	D	5'- CTC CGT CTC CCC CTG CTC TAG CTC CTC CTG GAT TAC GCG AAC CTC -3'
	R	5'- CTC CAA GCG CAT TAG GTC CTC CTC GAT CTC GTC CCC CTC TGC CTC -3'

Abreviaturas

Ac	Región ácida.
ADN	Ácido dexoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
Alk	Anaplastic lymphoma kinase. Quinasa de linfomas anaplásicos.
A-loop	Activation loop. Bucle de activación.
AP-1	Activator protein 1. Proteína activadora 1.
APC	Antigen presenting cell. Célula presentadora de antígenos.
APS/SH2B2	Adaptor protein 2. Proteína adaptadora 2.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
Arp2/3	Actin related proteins 2 and 3. Proteínas relacionadas con actina 2 y 3.
ATF2	Activating transcription factor 2. Factor de transcripción activador 2.
BCAP	B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase. Proteína adaptadora de PI3K en células B.
BCR	B-cell receptor. Receptor de células B.
Brc/Abl	Breaking cluster region / Abelson fusion gene. Gen de fusión del gen de región de ruptura del cromosoma 22 y el gen Abelson del cromosoma 9.
Blnk	B-cell linker protein. Proteína conectora de células B.
BSA	Bovine serum albumin. Albúmina sérica bovina.
Btk	Bruton's tyrosine kinase. Proteína tirosina quinasa de Bruton.
CD2	Cluster of differentiation 2. Grupo de diferenciación 2.
CD3	Cluster of differentiation 3. Grupo de diferenciación 3.
CD4	Cluster of differentiation 4. Grupo de diferenciación 4.
CD8	Cluster of differentiation 8. Grupo de diferenciación 8.
CD19	Cluster of differentiation 19. Grupo de diferenciación 19.
CD22	Cluster of differentiation 22. Grupo de diferenciación 22.
CD28	Cluster of differentiation 28. Grupo de diferenciación 28.
CD45	Cluster of differentiation 45. Grupo de diferenciación 45.

CD58	Cluster of differentiation 58. Grupo de diferenciación 58.
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog. Proteína de control del ciclo celular 42.
CH	Calponin homology domain. Dominio de homología a Calponina.
CLEC-2	C-type lectin domain family 2. Dominio lectina tipo C familia 2.
CSH3	C-terminal Src homology 3 domain. Dominio de homología a Src tipo 3 C-terminal.
Csk	C-Src tyrosine kinase. Tirosina quinasa de proteínas Src tipo C.
C-terminal	Carboxilo terminal.
DAG	Diacilglicerol.
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DEAE-dextrano	Dietilaminoetil dextrano.
DH	Dbl homology domain. Dominio de homología a Dbl.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium. Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DTT	Ditiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescent substrate. Sustrato quimioluminiscente.
EGF	Epidermal growth factor. Factor de crecimiento epidérmico
EGFP	External Green Fluorescent Protein. Proteína verde fluorescente externa.
EGF-R	Epidermal growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EM	Electron Microscopy. Microscopía electrónica.
EpoR	Erythropoyetin Receptor. Receptor de eritropoyetina.
Erk	Extracellular signal-Regulated Kinase. Quinasa regulada por señales extracelulares.
FAK	Focal Adhesion Kinase. Quinasa de adhesión focal.
FBS	Fetal Bovine Serum. Suero fetal bovino.
FcγR	Fcγ receptor. Receptor de Fcγ.
FcεR	Fcε receptor. Receptor de Fcε.
Gads	Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc. Proteína adaptadora ligada a Grb2.
GAP	GTPase Activating Protein. Proteína activadora de GTPasas.
GDI	GDP Dissociation Inhibitor. Inhibidor de la disociación de GDP.

GDP	Guanosine DiPhosphate. Guanosina bifosfato.
GEF	Guanosine Exchange Factor. Factor de intercambio de nucleótidos de guanina.
GEM	Glycosphingolipid Enriched Microdomains. Microdominios enriquecidos con glicosfingolípidos.
GPVI	Glycoprotein VI. Glicoproteína VI.
Grb2, Grb3-3	Growth factor Receptor-Bound protein 2 and 3-3. Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 y 3-3.
GTP	Guanosine Triphosphate. Guanosina trifosfato.
GST	Glutation S-transferasa.
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid. Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1 piperacinetanosulfónico.
HGF-R	Hepatocyte Growth Factor Receptor. Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.
HLA	Human Leukocyte Antigen. Antígeno de leucocitos humanos.
hnRNP	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins. Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas.
HRP	Horseradish peroxidase. Peroxidasa de rábano.
HTVL-1	Human T-lymphotropic Virus 1. Virus humano linfotrópico de células T.
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1. Molécula de adhesión intracelular 1.
IGF-R	Insulin-like Growth Factor Receptor. Receptor del factor de crecimiento similar a insulina.
IgM	Inmunoglobulina M.
IL-2	Interleucina-2.
IL-2R	Receptor de Interleucina-2.
IL-3	Interleucina-3.
IL-4	Interleucina-4.
IL-6	Interleucina-6.
IL-10	Interleucina-10.
IP	Inmunoprecipitación.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
I-R	Insulin Receptor. Receptor de insulina.
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activated motifs. Motivos de activación basados

	en tirosinas de los inmunorreceptores.
Itk	IL2-inducible T-cell kinase. Quinasa de células T inducible por IL-2.
JAK	Janus kinase. Quinasa de Janus.
JNK	c-Jun N-terminal kinase. Quinasa N-terminal de c-Jun.
Lat	Linker of Activated T-cells. Proteína de unión de linfocitos T activados.
LAT2	Linker of Activated T-cells 2. Proteína de unión de linfocitos T activados tipo 2.
LB	Luria Bertani medium. Medio de Luria Bertani.
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase. Proteína tirosina quinasa específica de linfocitos.
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1. Antígeno asociado a la función linfocitaria tipo 1.
LPS	Lipopolisacárido.
MAPK	Mitogen-activated tyrosine kinase. Tirosina quinasa activada por mitógenos.
MHC	Major Histocompatibility Complex. Complejo mayor de histocompatibilidad.
MTOC	Microtubule-organizing Centre. Centro de organización de microtúbulos.
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor proteína 1. Región no catalítica de la proteína adaptadora tirosina quinasa 1.
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T-cells. Factor nuclear de linfocitos T activados.
NF- κ B	Nuclear factor κ B. Factor Nuclear κ B.
NK	Natural Killer cells. Células naturales asesinas.
NMR	Nuclear Magnetic Resonance. Resonancia nuclear magnética.
NOX2	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase. Oxidasa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NSH3	N-terminal Src homology 3 domain. Dominio N-terminal de homología a Src tipo3.
N-terminal	Amino terminal.
PAK	p21 activated kinase. Quinasa activada por p21.
PBS	Phosphate buffered saline. Tampón fosfato salino.
PCR	Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
PD	Pull-down.
PDGF	Platelet derived growth factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDGF-R	Platelet derived growth factor receptor. Receptor del factor de crecimiento

	derivado de plaquetas.
PGN	Proteoglicano.
PH	Pleckstrin homology domain. Dominio de homología a pleckstrina.
PI	Phosphatidylinositol. Fosfatidilinositol.
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphate. Fosfatidilinositol-4-fosfato.
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato.
PI(3,4,5)P ₃ o PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.
PI(4,5)P ₂ o PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase. Fosfatidilinositol 3-quinasa.
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa.
PKC	Protein kinase C. Proteína quinasa C.
PKD	Protein kinase C. Proteína quinasa C.
PLC	Phospholipase C. Fosfolipasa C.
PTK	Protein Tyrosine Kinase. Proteína tirosina quinasa.
PTPasa	Proteína tirosina fosofatasa.
PRR	Proline Rich Region. Región rica en prolina.
RasGRP	RAS guanyl nucleotide-releasing protein. Proteína liberadora de nublótidos de guanina de Ras.
RIPA	Radio immunoprecipitation assay buffer. Tampón en ensayos de inmunoprecipitación.
ROS	Reactive Oxygen Species. Especies reactivas de oxígeno.
rpm	Revolutions per minute. Revoluciones por minuto.
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640. Medio del Instituto Roswell Park Memorial.
SBS	SH3 Binding Site. Sitio de unión a SH3.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SH2	Type 2 Src homology domain. Dominio de homología a Src de tipo 2.
SH3	Type 3 Src homology domain. Dominio de homología a Src de tipo 3.
SRF	Serum response factor. Factor de respuesta a suero.
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20. Tampón Tris salino con Tween 20.

TCR	T cell receptor. Receptor de linfocitos T.
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1. Proteína promotora de metastasis e invasión en linfomas de células T tipo 1.
TNF α	Tumor Necrosis Factor α . Factor de necrosis tumoral α .
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humano tipo 1.
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein. Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich.
WAVE	WASP family verprolin-homologous protein. Proteína homóloga a verprolina de la familia WASP.
WB	Western-Blot.
WT	Wild Type. Versión silvestre.
Zap70	Zeta-chain-associated protein kinase 70. Proteína quinasa asociada a la cadena zeta.
ZF o C1	Zinc Finger domain. Dominio en dedos de Zinc.

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del ciclo de activación de las GTPasas de la familia Rho/Rac.	3
Figura 2. Estructura de dominios de los miembros de la familia Vav y la variante transcripcional Vav-T.	5
Figura 3. Modelo actual de activación de las proteínas Vav.	9
Figura 4. Modelo estructural de la interacción Vav1/Rac1.	11
Figura 5. Interacciones de los distintos dominios de la proteína Vav1 con otras proteínas.	12
Figura 6. Representación esquemática de la maduración de los linfocitos T.	24
Figura 7. Ruta de Vav1 en linfocitos T.	25
Figura 8. Ruta de señalización de Vav1 bajo el receptor de células T (TCR).	27
Figura 9. El dominio CSH3 inhibe la actividad biológica de Vav1.	62
Figura 10. Efecto de Vav1 ^{.835-845} sobre la activación de NF-AT en linfocitos.	63
Figura 11. La delección parcial del dominio CSH3 promueve la activación <i>in vivo</i> de las proteínas Vav.	64
Figura 12. La inhibición mediada por el CSH3 es una característica común de los miembros de la familia Vav.	65
Figura 13. El dominio CSH3 inhibe a Vav1 en cis debido a su interacción con otras regiones de la proteína.	67
Figura 14. El dominio CSH3 de Vav1 no interacciona ni con la región rica en prolinas (PRR) ni con el dominio NSH3.	68
Figura 15. El CSH3 inhibe a Vav1 a través de su interacción con las regiones DH y PH.	70
Figura 16. Estructura de microscopía electrónica (EM) de la proteína 6xHis-Vav1 ^{.1-144} no fosforilada.	72
Figura 17. Análisis de la conservación filogenética de los residuos de la región CH-Ac-DH-PH-ZF de Vav1.	74
Figura 18. Caracterización de los residuos de la hélice α_6 del DH que contribuyen a la estabilidad de la interacción inhibitoria CSH3/Vav1.	75
Figura 19. La hélice α_6 participa en la estabilidad de la interacción inhibitoria CSH3/Vav1.	76
Figura 20. La mutación del residuo D376A de la hélice α_6 incrementa la actividad de la proteína Vav1.	78
Figura 21. El CSH3 de Vav1 utiliza una combinación de residuos para interactuar con el núcleo central de la proteína.	80
Figura 22. El CSH3 de Vav1 utiliza dos regiones diferentes para interactuar con los dominios DH y PH.	81
Figura 23. Los dos sitios de unión del CSH3 son necesarios para participar en la interacción inhibitoria CSH3/Vav1.	82
Figura 24. El dominio CSH3 de Vav1 utiliza las regiones DFC-R e YVEED para interactuar	

con los dominios DH y PH, respectivamente.	83
Figura 25. Identificación de los sitios de fosforilación de la proteína Vav1.	85
Figura 26. Contribución de los residuos del ZF y del CSH3 a la activación de Vav1 <i>in vivo</i> .	86
Figura 27. Relación entre los sitios de fosforilación de Vav1 y la interacción intramolecular del CSH3 con la región DH-PH.	87
Figura 28. Fosforilación cruzada entre los residuos de las regiones Ac, ZF y CSH3.	92
Figura 29. Representación esquemática de la influencia de la fosforilación de unos residuos sobre otros.	93
Figura 30. Efecto de los residuos de la región Ac sobre las respuestas celulares asociadas a la activación de Vav1 en linfocitos.	95
Figura 31. Efecto sinérgico de los residuos de la región Ac sobre la activación de NF-AT mediada por la activación de Vav1 en linfocitos.	96
Figura 32. Efecto de Y ¹⁶⁰ sobre las respuestas celulares asociadas a la activación de Vav1 en linfocitos.	97
Figura 33. Efecto sinérgico de los residuos de la región acídica y la Y ⁸³⁶ sobre las respuestas celulares asociadas a la activación de Vav1 en linfocitos.	98
Figura 34. Esquema resumen de los efectos de las mutaciones de las tirosinas de la región Ac sobre la actividad catalítica y funciones efectoras de Vav1 en linfocitos.	99
Figura 35. Efecto de los residuos del dominio ZF sobre la activación de NF-AT mediada por la activación de Vav1 en linfocitos.	101
Figura 36. Esquema resumen de los efectos de las mutaciones de las tirosinas del dominio ZF sobre la actividad catalítica y funciones efectoras de Vav1 en linfocitos.	101
Figura 37. Efecto de la Y ⁸³⁶ del dominio CSH3 sobre la activación de NF-AT mediada por la activación de Vav1 en linfocitos.	102
Figura 38. Esquema resumen de los efectos de las mutaciones de la Y ⁸³⁶ del dominio CSH3 sobre la actividad catalítica y funciones efectoras de Vav1 en linfocitos.	103
Figura 39. Estado de fosforilación de Vav1 en células Jurkat deficientes en Zap70, Lck y CD45.	108
Figura 40. Efectos de la ausencia de Zap70 y Lck sobre respuestas celulares asociadas a Vav1 en linfocitos.	110
Figura 41. Efecto de la ausencia de la proteína Lat sobre la cinética de fosforilación de la proteína Vav1.	111
Figura 42. Efectos de la ausencia de Lat sobre respuestas celulares asociadas a Vav1 en linfocitos.	112
Figura 43. Efectos de la ausencia de Slp76 y PLC γ 1 sobre la fosforilación y respuestas celulares de Vav1.	114
Figura 44. Efecto de la ausencia de las proteínas del complejo Vav1/Slp76/PLC γ 1 sobre el estado de fosforilación de las mismas.	116
Figura 45. Nuevo modelo propuesto para la regulación de la familia de proteínas Vav.	122
Figura 46. Esquema representativo de la cascada secuencial de fosforilación que lleva a la	

completa activación de Vav1 en linfocitos.

124

Figura 47. Esquema comparativo de los modelos de activación de la proteína Vav1 anterior y posterior a este estudio.

126

Agradecimientos

Y llegado el final del camino, es hora de hacer balance. Estos años en el laboratorio me han servido para aprender a pensar científicamente y a realizar muchas técnicas pero también a conocer mis límites, pedir ayuda cuando la necesito, tener paciencia, tolerar más los momentos de frustración y valorar las cosas en su justa medida. Todo esto creo que me será muy útil en el futuro no sólo para mi carrera científica sino también para mi vida en general. Y este camino no hubiese sido el mismo sin una serie de personas que han compartido conmigo mis penas y mis glorias y a los que estoy profundamente agradecida.

Xosé, muchas gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio. Gracias por guiarme en este camino e ir siempre muchos pasos por delante de mí, ha sido un gran ayuda. Gracias también por no poner límites ni científicos ni económicos a mi tesis y por brindarme la oportunidad de continuar el trabajo que un día tu comenzaste. Ya sabes que, al menos a ti y a mi, sí que nos importa Vav1.

Gracias a todos los que han colaborado en este trabajo, desde el Dr. José Couceiro que peleó con los anticuerpos fosfoespecíficos hasta la Dra. Eva Torreira y el Dr. Óscar Llorca que hicieron un gran trabajo con la EM. Muchas gracias a la mejor técnico que se puede tener, Maite Blázquez, por tener siempre una mano libre para mí, por estar pendiente, por las riñas con cariño y por dejarme ser tu otra María. Muchas gracias a los miembros presentes y pasados del Laboratorio 2 por aguantarme cuando me pongo pesada, soportar mis manías y resolver mis dudas, de todos he aprendido algo. Gracias Mauri, por tus ánimos constantes, por nuestras colaboraciones, por decirme lo que no quiero oír, por las canciones de cultivos y por los ratos de terapia, ya sabes que los dos corremos la misma suerte. Gracias Vir, por ser mi hermana pequeña en el laboratorio, por los ratos de diversión dentro y fuera, por ser un público fácil para mis comentarios graciosos, por escuchar mis teorías surrealistas y por ser mi cómplice en tantos momentos. Gracias Carmen, por ser la hermana mayor, por tus consejos, por tus regañinas y por hacerme pensar el porqué de las cosas. Gracias Vincent, por contagiarme tu pasión científica y responder a todas mis preguntas con gran paciencia. Gracias Mariajo, por tu sabiduría con las Jurkat, las DT40, los ensayos de luciferasa... por todo lo que sabes y los consejos que me has dado tanto sobre los experimentos como sobre lo que hay alrededor.

Gracias a todos los becarios de otros laboratorios que han caminado a mi lado, por las segundas opiniones sobre los experimentos y sobre todo por ser paño de lágrimas cuando ha hecho falta. Gracias Yure y Cris, mis chicas del 9, y Laura, mi uruguaya favorita, por todo, por

estar ahí dentro y fuera del CIC, habeis sido un buen espejo donde mirarme y unas grandes amigas. Gracias también, Dani y Nacho, por compartir conmigo risas y momentos de desahogo. Gracias Antoñito, por tu optimismo desproporcionado, por estar siempre dispuesto a distraerme, por tener más confianza en mí que yo misma y por no enfadarte cuando te doy caña.

Si de algo me he dado cuenta en estos años de tesis es que tengo una familia maravillosa, del primero al último. Gracias mamá, por haber hecho este camino antes que yo, por estar siempre al otro lado del teléfono, por no dejarme caer, por recordarme quién soy y de donde vengo, y por enseñarnos a tomar nuestras propias decisiones y a asumir responsabilidades. Gracias por tu cariño, tu comprensión, tu flexibilidad y por entender mis ausencias. Gracias papá, por soportar estoicamente que tu hija te saliese bióloga, sé que ha sido duro. Gracias por contagiarme tu curiosidad científica, por enseñarme la importancia de buscar la verdad, por los trucos de magia en el laboratorio, por responder a mis preguntas incesantes, por saber de todo y sino ayudarme a descubrirlo, por nuestras discusiones científicas, por tus halagos a terceros y porque sé que aunque no te perciba siempre estás ahí. Gracias Pablín, por ser más que un hermano un compañero de viaje, por consultarme a cada paso, por valorar mi opinión aunque sea a escondidas, por darme cariño a tu manera y por apoyarme siempre. Gracias güelita, por ser el mejor ejemplo que puedo tener, por enseñarme el valor del esfuerzo, por no consentirme, por tus refranes y tus frases acertadas en cada momento, por recordarme lo que realmente importa, por tu positividad hasta límites insospechados y por ser el mejor oasis donde descansar. Gracias tía Inma por ser más que una madrina mi segunda madre, porque siempre estás cuando te necesito. Gracias tíos y primines, por entender que no esté siempre, por apoyarme siempre y confiar en mí.

Gracias a mis amigos, que aunque os cueste entender lo que hago siempre estais ahí cuando os necesito y por no tener en cuenta mis ausencias. Gracias Noe y Ana, por ser las mejores amigas que puedo tener, por sentirnos tan cerca aunque esteis tan lejos, por no darme la razón cuando no la tengo, por soportar mis defectos y quererme a pesar de ellos, y por estar siempre dispuestas a salir corriendo en mi ayuda. Gracias Javi y Manu, por no dudar en coger el coche y venir a verme, por estar en las buenas y en las malas, y por aguantarme durante estos años que sé que no han sido fáciles. Gracias a los hermanos, a Mar-Cha y a mi “familia del pueblo” por ser un espacio de protección, por permitirme ser auténtica, por enseñarme tanto, por escucharme sin juzgar y por tener siempre la puerta abierta ya que nunca se sabe cuando voy a volver.

Gracias a todos.

