สัญญาเลขที่ R2559B064

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการกระตุ้น CD3ζ, ZAP-70 และ Lck

1. ดร.จตุพร เงินคำ
2. รศ.ดร.พญ.สุธาทิพย์ พงษ์เจริญ

2562
1029488
QP
185
.8.T2
ว126ร
2559

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ 2559

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิยาลัยนเรศวร ส่วนงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2559 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทสรุปผู้บริหาร
(Executive Summary)

การวิจัยด้านชีววิทยาของการกระตุ้น T cell ได้รับความนิยมอย่างมากในต่างประเทศ เพราะทำให้ทราบถึงกลไกของการกระตุ้น และการตอบสนองของ T cells ต่อสิ่งแปลกปลอม ความรู้ที่ได้จะนำมาใช้ออกแบบยาในการยังยั้งการกระตุ้น T cells เพื่อใช้การรักษาผู้ที่ปลูกถ่ายอวัยวะ หรือแม้แต่ผู้ป่วยแพ้ภูมิตนเอง ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาบทบาทของโปรตีน Nck มาเป็นระยะเวลาเกือบ 10 ปี ประกอบกับได้รับคำแนะนำและความร่วมมือด้วยดีเสมอมากับผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศ ผู้วิจัยจึงยังคงสนใจศึกษาความสำคัญของ Nck ในการกระตุ้น T cell ด้วยเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ขอทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 โดยใช้ชื่อโครงการวิจัยว่า "การศึกษาความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการกระตุ้น CD3ζ, ZAP-70 และ Lck" ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย 1 ปี เริ่มตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 – 30 กันยายน 2559 แต่ผู้วิจัยได้ทำการขยายเวลาเพิ่มอีก 2 ครั้งๆ ละ 6 เดือน และสิ้นสุดโครงการวันที่ 30 กันยายน 2560 รวมระยะเวลาที่ใช้ดำเนินการวิจัยทั้งหมด 2 ปี

ระหว่างการดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้นำผลการศึกษาไปเผยแพร่ผ่านการนำเสนอแบบโปสเตอร์งานประชุมที่มีผู้เข้าร่วม 950 คน และเมื่อเสร็จโครงการผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารนานาชาติที่มีค่า impact factor จำนวน 1 ผลงาน สำหรับโครงการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Nck1 มีบทบาทมากกว่าโปรตีน Nck2 ในการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, ZAP-70 และ Lck ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยครั้งนี้จะได้รับการอ้างอิงในวารสารนานาชาติ และมีนักวิจัยอื่นๆ นำผลการศึกษาไปใช้ต่อยอดต่อไป

บทคัดย่อ

การส่งสัญญาณผ่าน T cell receptor (TCR) ทำให้เกิดการกระตุ้น T cells โปรตีน Nck เป็น adaptor protein ซึ่งมีสามาชิกอยู่ 2 โปรตีน คือโปรตีน Nck1 และ Nck2 จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการลดการแสดงออกของ Nck1 ใน Jurkat T cell ส่งผลให้เมื่อทำการกระตุ้น T cell แล้ว มีการกระตุ้นเอนไซม์ Erk และ MEK ลดลง แล้วยังส่งผลให้สร้าง IL-2 และการแสดงออกของ CD69 ลดลงด้วย ในทางตรงกันข้ามพบว่าเมื่อลดการแสดงออกของ Nck2 ไม่ส่งผลใดต่อการกระตุ้นโปรตีนดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบบทบาทของ Nck ต่อการกระตุ้นโปรตีน Lck, ZAP-70 และ CD3ζ ซึ่งอยู่ใกล้บริเวณ TCR และมีบทบาทก่อนโปรตีน Erk และ MEK ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาความเกี่ยวข้องของโปรตีน Nck1 และ Nck2 ต่อการกระตุ้นโปรตีนบริเวณใกล้กับ TCR ผลการการศึกษาพบว่าการลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลให้การกระตุ้นโปรตีน Lck, ZAP-70 และ CD3ζ ลดลง ในขณะที่การลดการแสดงออก Nck2 ไม่ส่งผลใดต่อการกระตุ้นโปรตีนเหล่านี้ นอกจากนี้พบว่ามี ZAP-70 และ Lck ที่จับอยู่กับ TCR-CD3 complex ลดลงในเซลล์ที่ลดการแสดงออก Nck1 แต่เป็นที่น่าสนใจว่า การลดการแสดงออกของ Nck2 ก็ส่งผลให้ Lck มาจับกับ TCR-CD3 complex ลดลงเช่นกัน สำหรับการศึกษา transcriptomic ก็พบว่า Nck จำเป็นสำหรับการแสดงออกของ transcription factor และ cytokine หลายชนิด จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า Nck1 ยังคงมีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีน Lck, ZAP-70 และ CD3ζ

Abstract

Ligation of TCR with its ligand results in the activation of T cells. Nck is an adaptor protein that has two members, Nck1 and Nck2. Our previous reports showed that down-regulation of Nck1 in Jurkat T cell impaired TCR-induced phosphorylation of the kinases Erk and MEK. Theses consequently led to decrease IL-2 production and CD69 expression. In the contrary, down-regulation of Nck2 did not affect the activation of these proteins. However, the role of Nck in activation of TCR-proximal signaling molecules (Lck, ZAP-70 and CD3ζ), which lie upstream of Erk1/2 and MEK1/2 proteins, is poorly understood. The present study aim to investigate the involvement of Nck1 and Nck2 in TCR-proximal signaling proteins. We found that down-regulate of Nck1 expression was associated with the low phosphorylation of CD3ζ, Lck and ZAP-70 proteins upon TCR stimulation. In contrast, the activation of these proteins did not alter in Nck2-knockdown cells. In addition, CD3 co-immunoprecipitation and *in situ* proximal ligation assay (PLA) revealed that the recruitment of ZAP-70 and Lck to TCR-CD3 complex was declined in Nck1-knockdown cells. Interestingly, the impaired Lck recruitment to TCR-CD3 complex was also observed in Nck2-knockdown cell. The transcriptomic study showed that downregulation of both Nck1 and Nck2 simultaneously resulted in decrease gene expression in various genes. Altogether, at least in part, Nck1 is a key player to activate TCR-proximal signaling proteins.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... i
บทสรุปผู้บริหาร..... ii
บทคัดย่อ..... iii
Abstract..... iv
บทนำ..... 1
ทบทวนวรรณกรรม..... 4
วิธีดำเนินการวิจัย..... 10
ผลการทดลอง..... 13
อภิปรายผลการทดลอง..... 21
สรุปผลการทดลอง..... 22
เอกสารอ้างอิง..... 23
Output..... 27
ภาคผนวก..... 28

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลให้การเกิด 2
tyrosine phosphorylation ของ ζ ลดลง
รูปที่ 2 โครงสร้างของ Nck family..... 8
รูปที่ 3 Nck1 มีความสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีนบริเวณใกล้กับ T cell receptor 14
รูปที่ 4 การลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลต่อการดึงโปรตีน..... 16
ZAP-70 ไปยัง TCR-CD3 complex
รูปที่ 5 Nck จำเป็นสำหรับการดึง ZAP-70 และ Lck ไปจับกับ TCR-CD3 complex.... 18
รูปที่ 6 Transcriptomic ในเซลล์ที่ลดการแสดงออกทั้ง Nck1 และ Nck2..... 20

บทนำ
(Introduction)

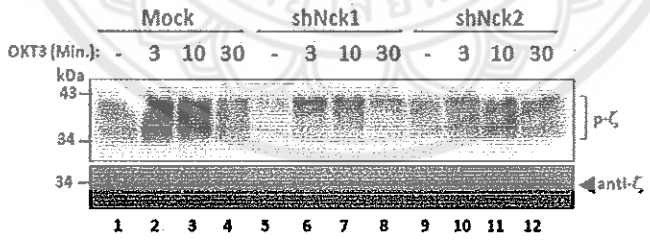
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

T cell มีการแสดงออกของตัวรับแอนติเจน (T cell antigen receptor, TCR) ร่วมกับโปรตีนที่ใช้ส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (signal transducing subunit) เกิดเป็น TCR-CD3 complex โดย TCR ประกอบด้วยโปรตีน α และβ chain ในขณะที่ signal transducing subunit จะรวมกันอยู่เป็นคู่ ๆ คือ CD3$\varepsilon\gamma$, CD3$\varepsilon\delta$ และ $\zeta\zeta$ ซึ่ง cytoplasmic tail ของทุก signal transducing subunit มี signal-transduction motifs ที่เรียกว่า immune receptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) โดย CD3ε, δ และ γ chains แต่ละเส้นมี 1 ITAM ในขณะที่ ζแต่ละเส้นมี 3 ITAMs ดังนั้นในหนึ่ง TCR-CD3 complex จึงมีทั้งหมด 10 ITAMs [Call *et al.*, 2007]

เมื่อ TCR จับกับ peptide antigen ที่ถูกนำเสนอผ่านโมเลกุลของ major histocompatibility complex (MHC) บนผิวของ antigen presenting cells (APC) จะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ Src protein tyrosine kinases (PTK) Lck และ Fyn ทำการเติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโน tyrosine บน ITAMs ของ TCR-CD3 complex หลังจาก ITAMs ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้วจะทำหน้าที่เป็น docking site ให้เอนไซม์ ZAP-70 (ζ-associated protein of 70 kDa) มาเกาะยัง cytoplasmic tail ของ TCR-CD3 complex และเอนไซม์ ZAP-70 ก็จะถูกกระตุ้นด้วยการถูกเติมหมู่ฟอสเฟตที่ tyrosine ด้วยเอนไซม์ Lck อีกครั้ง จากนั้น ZAP-70 จะไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ LAT (linker for activation of T cells) ส่งผลให้มีการดึง (recruitment) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signaling molecule) และ adaptor protein ต่าง ๆ มายัง LAT เช่น SLP-76 (Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte phosphor-protein of 76 kDa), Grb2, PLCγ (phospholipase Cγ), VAV และ Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase) [Samelson *et al.*, 2002] การเกิด tyrosine phosphorylation ของ TCR-CD3 complex จนนำไปสู่การเกิดการรวมตัวกันของโปรตีนต่าง ๆ นั้น ถือว่าเป็นการส่งสัญญาณใกล้บริเวณ TCR หรือเรียกว่า TCR-proximal signaling ซึ่งมีความสำคัญต่อการกระตุ้น signaling molecules ใน pathway หลัก ๆ คือ Ras/Rac-MAPK activation, PKC-mediated signaling, และ Ca^{2+}-mediated signaling pathways การกระตุ้นโมเลกุลใน pathway เหล่านี้เพื่อกระตุ้น transcriptional factor ให้ไปจับกับยีนเป้าหมายในนิวเคลียสจนเกิดการแสดงออกของยีนเหล่านั้น เช่นการสร้าง cytokine interleukin-2 (IL-2) [Smith-Garvin *et al.*, 2002] นอกจากการสร้าง cytokine แล้ว การกระตุ้น T cell ยังก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation), การเจริญเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation) และสร้าง growth factors ต่าง ๆ [Choudhuri *et al.*, 2005]

Adaptor protein Nck ในมนุษย์มี 2 ชนิด คือ Nck1 หรือ Nckα และ Nck2 หรือ Nckβ (หรือเรียกอีกอย่างว่า Grb4) หน้าที่หลักของโปรตีน Nck คือการช่วยเชื่อมโยงโปรตีนต่าง ๆ ให้มารวมตัวกันเป็น

complex เพื่อให้โปรตีนเหล่านั้นสามารถทำหน้าที่ต่อไปได้ จากการศึกษาในเซลล์หลากหลายชนิดพบว่าโปรตีน Nck สามารถจับกับโปรตีนอื่นมากกว่า 60 ชนิด [Buday *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001] โดยโปรตีนส่วนใหญ่นั้นเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิด actin polymerization [Li *et al.*, 2001] เนื่องจากโปรตีน Nck1 และ Nck2 มีลำดับกระอะมิโนที่เหมือนกันถึง 68% [Lettau *et al.*, 2009] จึงเชื่อกันว่าโปรตีน Nck1 และ Nck2 สามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า T cell เมื่อลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลให้มีการสร้าง IL-2 ลดลงหลังจากถูกกระตุ้น T cell ด้วย CD3 และ CD28 antibody ทั้ง ๆ ที่ T cell ยังมี Nck2 เป็นปกติ แสดงให้เห็นว่า Nck2 ไม่สามารถทำหน้าที่ทดแทน Nck1 ในด้านการสร้าง IL-2 ของ Nck1 ได้ [Yiemwattana *et al.*, 2012] และเมื่อไม่นานมานี้ทางคณะผู้วิจัยเองได้ยืนยันว่า Nck1 และ Nck2 ไม่สามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ในแง่การกระตุ้น human T cells กล่าวคือเมื่อกระตุ้น Jurkat T cells ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 พบว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตลดลงอย่างมากในเอนไซม์ Erk1/2 และ MEK1/2 และยังเป็นสาเหตุให้การกระตุ้น transcription factor AP-1 ลดลงอีกด้วย ผลที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ T cell สร้าง IL-2 ได้ลดลงและลดการแสดงออกของ CD69 ด้วย ในทางตรงกันข้าม เมื่อกระตุ้น TCR ในเซลล์ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Nck2 ไม่ส่งผลกระทบใด ๆ ต่อการกระตุ้นโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านี้ [Ngoenkam *et al.*, 2014] แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่ได้ศึกษาถึงความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการส่งสัญญาณใกล้กับ TCR-CD3 complex (TCR-proximal signaling) ซึ่งเป็น upstream signaling pathway ของการกระตุ้นเอนไซม์ Erk1/2 และ MEK1/2 จากการศึกษานำร่องพบว่าเมื่อลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ใน Jurkat T cells สัมพันธ์กันกับการลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ ζ chain (รูปที่ 1) ทำให้คณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่า Nck มีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณบริเวณใกล้กับ TCR ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวจำเป็นต่อการเริ่มส่งสัญญาณจาก TCR ไปยัง downstream signaling pathway ต่อไป



รูปที่ 1 การลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลให้การเกิด tyrosine phosphorylation ของ ζ ลดลง เซลล์ Jurkat ถูก transfect ด้วย empty plasmid (mock) หรือ plasmid ที่บรรจุ short hairpin RNA (shRNA) จำเพาะต่อ Nck1 (shNck1) หรือ Nck2 (shNck2) ก่อนนำเซลล์เหล่านั้นมากระตุ้นด้วย anti-CD3 antibody (OKT3) เป็นเวลา 0, 3, 10 และ 30 นาที จากนั้นทำการย่อยเซลล์แล้วนำ total cell lysate มาทำ immunoblotting ด้วย anti-phospho ζ antibody

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของโปรตีน Nck ต่อการส่งสัญญาณบริเวณใกล้กับ TCR

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro* study) โดยนำ Jurkat T cells มาลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1, Nck2 และ Nck1 ร่วมกับ Nck2 ด้วยเทคนิค shRNA ก่อนนำมากระตุ้นด้วย anti-CD3 anibody จากนั้นทำการ lysis เซลล์และนำ cell lysate มาทำ immunoblotting ด้วย antibody ต่อ CD3ε, CD3ζ, Lck, และ ZAP70

4. คำสำคัญ (Keywords)

Nck, shRNA, TCR-proximal signaling, ITAM, T cell activation

ทบทวนวรรณกรรม
(Literature Review)

ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immune system นั้น T cell มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย การทำหน้าที่ของ T cell จะมีทั้งหลั่งสารไปกระตุ้นเซลล์อื่นให้ทำหน้าที่ได้ดียิ่งขึ้น (เรียก T cell ที่หลั่งสารไปกระตุ้นเซลล์อื่นว่า helper T cell หรือ $CD4^+$ T cell) เช่น กระตุ้น B cell ให้หลั่ง antibody ไป neutralize pathogen หรือกระตุ้น phagocyte cells ให้กลืนกินจุลชีพแปลกปลอมได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือในอีกกรณีหนึ่ง T cell จะหลั่งสารไปฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อโดยตรง เช่น เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นต้น (เรียก T cell ที่หลั่งสารไปฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อนี้ว่า cytotoxic T cell หรือ $CD8^+$ T cell) การที่ T cell เหล่านี้จะทำหน้าที่ดังกล่าวได้นั้น T cell จะต้องมีปฏิสัมพันธ์ (interact) กับ APC ที่นำเสนอ antigenic peptide ผ่านโมเลกุล MHC เช่น เซลล์ที่ติดเชื้อ, dendritic cell, macrophage, และ B cell เป็นต้น เซลล์เหล่านี้จะจับกินจุลชีพแล้วย่อยเป็น peptide ขนาดเล็ก ก่อนจะนำ peptide ดังกล่าวเสนอผ่าน MHC class I หรือ class II ให้กับ T cell จนเกิดการจดจำและตอบสนองต่อไป [Janeway *et al.*, 2007]

1. ส่วนประกอบและหน้าที่ของ TCR-CD3 complex

T cell จะมีการแสดงออกของ TCR-CD3 complex บนผิวเซลล์ ซึ่ง TCR ทำหน้าที่จดจำและจับกับชิ้นส่วนโปรตีน หรือ protein fragment ของสิ่งแปลกปลอม ที่ถูกแสดงอยู่บนผิวของเซลล์อื่นซึ่งก็คือ antigen presenting cell หรือ APC หลังจากที่ TCR จับกับ peptide-bound MHC (pMHC) ด้วยค่า affinity ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์เพื่อให้เซลล์มีการตอบสนองต่อไป โมเลกุล TCR-CD3 complex ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน (ligand binding subunit) ซึ่งเป็นสายโปรตีน α และ β และส่วนที่ใช้ส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ (signal transducing subunit) ซึ่งเป็นโมเลกุลของ CD3 subunits ต่าง ๆ ที่จับกันอยู่เป็นคู่ ๆ ได้แก่ $CD3\varepsilon\gamma$, $CD3\varepsilon\delta$ และ $\zeta\zeta$ โดยส่วนที่เป็น cytoplasmic tail ของทุก signal transducing subunit ประกอบด้วย signal-transduction motifs ที่เรียกว่า immune receptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) โดย cytoplasmic tail ของ $CD3\varepsilon$, δ และ γ chains แต่ละเส้นมี 1 ITAM ในขณะที่ ζ แต่ละเส้นมี 3 ITAMs ดังนั้นในหนึ่ง TCR-CD3 complex จึงมีทั้งหมด 10 ITAMs [Call *et al.*, 2007]

$TCR\alpha$ และ $TCR\beta$ แต่ละเส้นประกอบไปด้วย extracellular, transmembrane และ cytoplasmic region พบว่าส่วน extracellular region ของแต่ละเส้นประกอบด้วย immunoglobulin (Ig)-like domain ซึ่งมีส่วนสำคัญในการจับกับแอนติเจน peptide ได้อย่างจำเพาะ ส่วน transmembrane region ที่แทรกตัวอยู่ใน plasma membrane ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและมีประจุบวก (hydrophobic positively charged amino acid) มีส่วนสำคัญในการเชื่อมต่อกับ signaling subunit ต่าง ๆ ด้วยพันธะ ionic interaction [Call *et al.*, 2007] และส่วนสุดท้าย คือ

cytoplasm region ส่วนนี้มีกรดอะมิโนเพียง 5 กรดอะมิโน [Bell *et al.*, 1994] ซึ่งเป็นเหตุให้ TCRα และ TCRβ ไม่สามารถส่งสัญญานเข้าสู่เซลล์ได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยโมเลกุลอื่นที่จะส่งต่อสัญญานของการจับกันระหว่าง TCR กับ ligand เข้าไปภายในเซลล์ โมเลกุลดังกล่าวคือ CD3 และ ζ subunit โครงสร้างของ CD3 และ ζ subunit มีลักษณะคล้ายกับ TCR กล่าวคือ ประกอบด้วย extracellular, transmembrane และ cytoplasmic region โดย extracellular region ของ CD3γ, ε และ δ มี Ig-like domain ในขณะที่ ζไม่มี ส่วนถัดมาคือ transmembrane segment ของ CD3 และ ζsubunit ส่วนนี้ประกอบด้วยกระอะมิโนที่มีประจุลบ เพื่อเกิด interaction กับ ประจุบวกของ TCR ในการประกอบกันเป็น complex และส่วนสุดท้ายของ CD3 และ ζsubunit ที่ถือได้ว่าเป็นส่วนสำคัญเพราะเป็นจุดกำเนิดในการส่งสัญญานเข้าสู่เซลล์จนนำไปสู่การตอบสนองของ T cell ก็คือ cytoplasmic tail ในส่วนนี้มี ITAMs ซึ่งจะถูก phosphorylate ด้วย kinase enzyme Lck หลังจากที่ TCR จับกับ ligand แล้ว [Molnar *et al.*, 2010] นอกจากส่วนต่าง ๆ ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว พบว่าในโมเลกุลของ CD3ε ยังมีส่วน proline-rich sequence (PRS) ที่มีตำแหน่งอยู่เหนือ ITAM [Gil *et al.*, 2002; Szymczak *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2008] บทบาทของ CD3ε PRS นี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการกระตุ้น T cell (T cell development and activation) [Gil *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2008; Mingueneau *et al.*, 2008] ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดต่อไปในส่วนของหน้าที่ของ Nck ต่อการตอบสนองของเซลล์

2. กลไกการกระตุ้น TCR-CD3 complex และ การเกิด TCR-proximal complex

การกระตุ้น T cell เริ่มต้นเมื่อ TCR จับกับ ligand แล้วส่งผลให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ที่กรดอะมิโน tyrosine 2 โมเลกุลภายใน ITAMs ของ CD3 และ ζ ด้วยเอนไซม์ Lck และ Fyn หลังจากที่กรดอะมิโน tyrosine 2 โมเลกุลบน ITAMs ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว จะมีหน้าที่เป็นที่ยึดเกาะกับสำหรับ SH2 domain ของ protein tyrosine kinase ZAP-70 [Iwashima *et al.*, 1994] การจับกันดังกล่าวจะทำให้ ZAP-70 สามารถไปกระตุ้น protein LAT และ SLP-76 [Horejsi *et al.*, 2004] ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 นี้จะทำหน้าที่เป็น adaptor protein ในการเป็นที่ยึดเกาะของโปรตีนต่าง ๆ จนเกิดเป็น signaling complex แล้วส่งผลให้มีการกระตุ้น signaling pathway มากมายต่อไป [Horejsi *et al.*, 2004; Koretzky *et al.*, 2006]

ใน TCR-CD3 complex ประกอบด้วย 10 ITAMs คือพบใน CD3 แต่ละ subunits จำนวน 1 ITAM (CD3εδ และ CD3εγ heterodimers) รวมเป็น 4 ITAMs และ ζ แต่ละ subunits มีจำนวน 3 ITAMs (ζζ homodimer) รวมเป็น 6 ITAMs หลังจากการกระตุ้น TCR แล้วจะมี ζ เป็น subunit แรก ๆ ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตบนกรดอะมิโน tyrosine และมีจำนวนกรดอะมิโน tyrosine ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากที่สุด [Pitcher *et al.*, 2003] กล่าวคือในหนึ่ง ζ subunit มี 6 tyrosines จาก 3 ITAMs โดยกำหนดกรดอะมิโน tyrosine ตำแหน่งที่ใกล้ไปยังตำแหน่งที่ไกลจาก plasma membrane ให้เป็น tyrosine 1 ถึง tyrosine ตำแหน่งที่ 6 ในสภาวะที่ ζ subunit ไม่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะเคลื่อนที่บน

reducing SDS-PAGE ที่ขนาด 16 kDa แต่เมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟตด้วย Src-family kinase Lck และ Fyn แล้ว จะทำให้มีขนาดที่แตกต่างกันคือที่ขนาด 21 และ 23 kDa (p21 และ p23 ตามลำดับ) การเกิด ζ ที่ขนาด 21 kDa นั้น เกิดจากการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tyrosines จำนวน 4 โมเลกุลบน 2 ITAMs ที่อยู่ใกล้จาก membrane (tyrosine ตำแหน่งที่ 3-6) ในขณะที่การเกิด ζ ที่ขนาด 23 kDa เป็นการเติมหมู่ฟอสเฟตบน tyrosine ทั้ง 6 โมเลกุล [van Oers *et al.*, 2000] เป็นที่น่าสนใจว่าสามารถพบ ζ ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตและเกิด ζ ที่ขนาด 21 kDa (p21) ใน thymocyte และ peripheral T cells แม้ยังไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยโปรตีนของสิ่งแปลกปลอม ทั้งนี้เป็นเพราะ TCR จับโปรตีนของตัวเองในรูป self-peptide/MHC complexes นอกจากนี้ยังสามารถพบโปรตีน ZAP-70 จับกับ p21 ได้ด้วย [van Oers *et al.*, 1994]. การเกิด p21 และ p23 นั้นจะไปดึงโปรตีน ZAP-70 ให้เข้ามายึดเกาะ และเชื่อว่าการที่ ZAP-70 มาจับกับ p21 และ p23 นั้น เพื่อคงสภาพ (stabilize) ให้ ζ อยู่ในสภาวะที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตและป้องกันการการตัดหมู่ฟอสเฟตจาก protein tyrosine phosphatase [Pitcher *et al.*, 2003] นอกจาก ζ subunit แล้ว การเกิด TCR ligation จะไปกระตุ้นให้ protein tyrosine kinase Lck และ Fyn เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ ITAMs ของ CD3γ, δ, และ ε อีกด้วย การที่ ITAMs เหล่านี้ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตทั้งหมด ทำให้โปรตีน ZAP-70 เข้ามายึดเกาะเกิดเป็น complex ที่ซึ่ง ZAP-70 ถูกกระตุ้นจาก Lck การเกิด complex นี้จำเป็นต่อการเพิ่มสัญญาณจาก TCR ก่อนส่งต่อสัญญาณดังกล่าวไปยัง signaling pathway ต่าง ๆ

สำหรับ substrate ของ ZAP-70 คือโปรตีน LAT ซึ่งเป็นโปรตีนที่ติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีน SLP-76 เป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึม [Koretzky *et al.*, 2006; Sommers *et al.*, 2004] โดยโปรตีน LAT มีกรดอะมิโน tyrosine 9 ตัว และจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจาก ZAP-70 หลังการกระตุ้น TCR เมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้วทำให้ LAT เป็นที่ยึดเกาะของโปรตีน เช่น PLCγ1, PI3K, GRB2 และ Gads [Liu *et al.*, 1999] จากนั้น SLP-76 จะถูกดึงมายัง LAT ผ่าน Gads ซึ่ง SLP-76 จะถูกกระตุ้นด้วยการเติมหมู่ฟอสเฟตด้วย ZAP-70 ทำให้ SLP-76 กลายมาเป็นที่ยึดเกาะสำหรับโปรตีนต่าง ๆ ต่อไป เช่น Vav1, Nck และ Itk [Reynolds *et al.*, 2004] จะเห็นได้ว่าโปรตีน LAT และ SLP-76 ทำหน้าที่เป็น backbone ในการเกิด signaling complex บริเวณใกล้กับ TCR (TCR-proximal signaling) ซึ่งการเกิด proximal signaling complex นี้จะไปกระตุ้นโมเลกุลในหลาย pathway ถัดไปซึ่งถือเป็น TCR-distal signaling คือ Ras/Rac-MAPK activation, PKC-mediated signaling, and Ca^{2+}-mediated signaling pathways การกระตุ้นโมเลกุลใน pathway เหล่านี้เพื่อกระตุ้น transcriptional factor ให้ไปจับกับยีนเป้าหมายในนิวเคลียสจนเกิดการแสดงออกของยีนเหล่านั้น เช่นการสร้าง cytokine เป็นต้น [Smith-Garvin *et al.*, 2002] นอกจากการสร้าง cytokine แล้ว การกระตุ้น T cell ยังก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ T cells (proliferation), การเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ (differentiation), และการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ [Choudhuri *et al.*, 2005]

3. หน้าที่ของ Nck ต่อการตอบสนองของ T cells

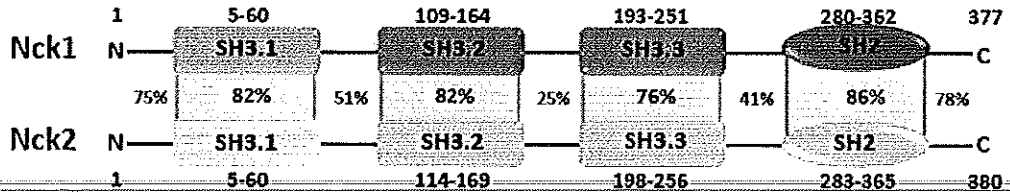
Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase) มีบทบาทมากมายต่อการทำงานของเซลล์ เช่น เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์, การจัดเรียงของ actin cytoskeleton, การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ (cell stress) สำหรับบทบาทหน้าที่ของ Nck ใน T cell นั้น พบว่า Nck มีบทบาทที่สำคัญต่อการจัดเรียงตัวของ actin cytoskeleton อันเนื่องมาจากการกระตุ้นผ่าน TCR (TCR-mediated reorganization of the actin cytoskeleton) อีกทั้ง Nck ยังมีบทบาทต่อการเกิด Immunological synapse ด้วย [Lettau *et al.*, 2009; Buday *et al.*, 2002] ดังนั้นในส่วนต่อไปจึงจะกล่าวถึงโครงสร้างของ Nck จากนั้นจะกล่าวถึงบทบาทและหน้าที่ของ Nck ใน T cell ต่อไป

Nck เป็น adaptor protein มีน้ำหนักโมเลกุล 47 kDa โครงสร้างโมเลกุลของ Nck ประกอบด้วย Src homology 2 (SH2 domain จำนวน 1 domain อยู่ด้านปลาย Carboxy (carboxy-terminal) และ SH3 domain จำนวน 3 domain อยู่ด้านปลาย amino (amino-terminal) (รูปที่ 2) [Lettau *et al.*, 2009; Buday *et al.*, 2002] SH2 domain ของ Nck มีหน้าที่จับกับกรดอะมิโน tyrosine ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว (phosphorylated tyrosine, pTyr หรือ pY) ในขณะที่ SH3 domain ของ Nck จะเกิด interaction กับโปรตีนที่มี proline-rich sequence (PRS)

ในมนุษย์พบว่า Nck มี 2 ชนิด คือ Nck1 หรือ Nckα และ Nck2 หรือ Nckβ (หรือเรียกอีกอย่างว่า Grb4) หน้าที่หลักของ Nck คือการ interact กับ protein ต่าง ๆ ในการรวมตัวกันเป็น complex เพื่อใช้ในการส่งสัญญาณ ทำให้โปรตีน Nck ถูกจัดเป็น adaptor protein ที่สามารถเชื่อมโยงสัญญาณจาก upstream phosphotyrosine (pTyr) ผ่าน SH2 domain กับ downstream effector ผ่านทาง SH3 domain [Lettau *et al.*, 2009] ในการศึกษาในเซลล์หลากหลายชนิดพบว่า Nck สามารถเกิด interaction กับโปรตีนอื่นมากกว่า 60 ชนิด [Buday *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001] เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนของโปรตีน Nck1 และ Nck2 ทั้งโมเลกุลแล้วมีความเหมือนกันถึง 68% โดยความแตกต่างที่พบส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณ linker regions ที่อยู่ระหว่างแต่ละ domain (รูปที่ 2)

เนื่องจากความคล้อนข้างเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนทำให้ Nck1 และ Nck2 มีหน้าที่บางอย่างคาบเกี่ยวกัน (overlapping) หรือทำหน้าที่แทนกันได้ (redundant) ดังเช่น มีการพบว่าเมื่อหนู mice ไม่มี Nck1 หรือ Nck2 อย่างใดอย่างหนึ่งแล้ว หนู mice ยังมีชีวิต แต่เมื่อไม่มีทั้ง Nck1 และ Nck2 ทำให้หนู mice ตายตั้งแต่เป็น embryo ช่วงวันที่ 9.5 [Bladt *et al.*, 2003] แต่อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาพบว่า Nck1 และ Nck2 ไม่สามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ ยกตัวอย่างเช่น การลดการแสดงออกของ Nck1 ด้วยเทคนิค Small interfering RNA (siRNA) ใน Jurkat T cells ทำให้มีการสร้าง IL-2 ลดลงหลังจากถูกกระตุ้นด้วย CD3 และ CD28 antibody ทั้งๆ ที่ Nck2 ยังมีการแสดงออกปกติ แสดงให้เห็นว่า Nck2 ไม่สามารถทำหน้าที่ทดแทนด้านการสร้าง interleukin-2 (IL-2) ของ Nck1 ได้ [Yiemwattana *et al.*, 2012] และเมื่อไม่นานมานี้ทางคณะผู้วิจัยเองได้ยืนยันว่า Nck1 และ Nck2 ไม่สามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ในแง่การกระตุ้น human T cells กล่าวคือเมื่อกระตุ้น Jurkat T cells ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 พบว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตลดลงอย่างมากใน Erk และ MEK และยังเป็นสาเหตุให้การกระตุ้น

transcriptional factor AP-1 ลดลงอีกด้วย ผลที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ T cell สร้าง IL-2 และมีการแสดงออกของ CD69 ลดลง ในทางตรงกันข้าม เมื่อกระตุ้น TCR ในเซลล์ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Nck2 ไม่ส่งผลกระทบใด ๆ ต่อการกระตุ้นโมเลกุลต่าง ๆ เหล่านี้ [Ngoenkam *et al.*, 2014]



รูปที่ 2 โครงสร้างของ Nck family: A. Nck1 และ Nck2 ประกอบด้วย domain ที่คล้ายคลึงกัน คือ Src homology 3 (SH3) domain จำนวน 3 domains อยู่ด้าน N-terminal และ SH2 domain จำนวน 1 domain อยู่ด้าน C-terminal โดยในแต่ละ domain ระหว่าง Nck1 และ Nck2 จะมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (แสดงในรูปของร้อยละ, %) หมายเลขที่แสดงด้านปลาย C-terminal ของ Nck1 และ Nck2 คือ จำนวนกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน Nck

สำหรับหน้าที่ของ Nck ต่อการตอบสนองของ T cell นั้น เชื่อว่า Nck มีความสำคัญต่อการควบคุม actin polymerization กล่าวคือหลังจาก TCR จับกับ MHC-peptide complex จะทำให้เกิด phosphorylation ที่ ITAM โดย protein tyrosine kianses Lck การที่ ITAM ถูก phosphorylate จะทำให้เกิด docking site ให้ ZAP-70 เข้ามาจับยัง phosphorylated ITAM และทำให้ ZAP-70 ถูกกระตุ้นด้วย Lck จากนั้น ZAP-70 จะไปกระตุ้น adaptor protein LAT และ signaling protein อื่น ๆ ซึ่งภายในโมเลกุลของ LAT มี 9 tyrosine residues สำหรับเป็น docking site ของ adaptor protein ต่าง ๆ มากมาย อาทิ Grb2 และ Gads เป็นต้น จากนั้น SLP-76 จะถูกดึงให้เข้ามาจับกับ LAT complex ผ่าน Gads และ SLP-76 molecule ก็ทำหน้าที่เป็น adaptor protein ให้โปรตีนอื่น ๆ เข้ามายึดเกาะ เช่น Nck, VAV, Itk และ ADAP [Smith-Garvin *et al.*, 2009] โปรตีน Nck จะจับกับ WASp ซึ่งมีความสำคัญสำหรับ actin-dependent process ต่าง ๆ เช่น lamellipodia formation และ endocytosis เป็นต้น โปรตีน WASp จะกระตุ้น Arp2/3 ในการเหนียวนำให้เกิด actin polymerization [Billadeau *et al.*, 2007; Reicher *et al.*, 2010]

นอกจาก Nck จะเกิด interaction กับ SLP-76 แล้ว ในปี ค.ศ. 2002 มีการรายงานว่า Nck สามารถเกิด interaction โดยตรงกับ proline-rice sequence (PRS) ของ CD3ε [Gil *et al.*, 2002] ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นเมื่อ TCR จับกับ ligand เป็นผลทำให้เกิด conformational change ของ CD3ε แล้วมีการเผยของ PRS เป็นผลให้ Nck เข้ามาจับได้โดยอาศัย SH3.1 domain ของ Nck และการ

จับกันนี้เกิดขึ้นก่อน และไม่ขึ้นอยู่กับ tyrosine phosphorylation ส่วนการศึกษาบทบาทของการเกิด CD3ε-Nck interaction ได้ใช้วิธี overexpression ของ Nck SH3.1 เพื่อไปแย่งหรือยับยั้งการจับกับ Nck ปกติ ผลปรากฏว่าเมื่อกระตุ้น T cell ที่มี overexpression ของ Nck SH3.1 ด้วยแอนติบอดี OKT3 (anti-CD3 antibody) ทำให้ actin polymerization เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย และยังมีผลเชิงลบต่อการหลั่ง IL-2 อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามวิธีการ overexpression ของ Nck SH3.1 นอกจากจะยับยั้งไม่ให้ Nck ปกติมาจับกับ CD3ε แล้ว อาจมีผลไปยับยั้งไม่ให้โปรตีนอื่น ๆ เข้ามาจับกับ Nck ได้อีกด้วย นอกจากวิธีการ overexpression ของ Nck SH3.1 แล้ว คณะผู้วิจัยยังทำการ ยับยั้งการเกิด CD3ε-Nck interaction ด้วยวิธีใช้การ transduction ของ antibody APA1/1 (antibody ที่จะไปจับกับ CD3ε PRS) ให้กับ T cell จากนั้นกระตุ้นเซลล์เหล่านี้ด้วย anti-CD3 antibody พบว่าเซลล์เหล่านี้มีการเพิ่มจำนวน (proliferation) เพียงเล็กน้อย คณะผู้วิจัยได้เสนอว่าการดึง Nck และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง เช่น WASp, WIP หรือ Pak1 มาจับกับ CD3ε เป็นอีก pathway หนึ่งที่ทำให้เกิด actin polymerization อันเนื่องมาจากการกระตุ้น T cell ที่ไม่ต้องการและเกิดขึ้นก่อน tyrosine phosphorylation [Gil *et al.*, 2002] ดังนั้นจะเห็นได้ว่า นอกจาก Nck จะมีความสำคัญกับการควบคุมการเกิด actin polymerization แล้ว Nck ยังมีบทบาทที่สำคัญต่อการส่งสัญญาณจนนำไปสู่การกระตุ้น T cells

วิธีดำเนินการวิจัย
(Research Methodology)

1. การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Nck1 และ/หรือ Nck2 ใน Jurkat T cell

การนำ plasmid ที่บรรจุ shRNA sequence ต่อยีน Nck1 หรือ Nck2 เข้าสู่ Jurat T cell ด้วยวิธี transfection เพื่อสร้างเซลล์ที่ถูกลดการแสดงออกของ Nck1, Nck2 หรือ ทั้ง Nck1/2 มีวิธีการทดลองดังนี้

1.1 ทำการเลี้ยง Jurkat T cells ในอาหาร RPMI 1640 จนได้เซลล์ตามจำนวนที่ต้องการ

1.2 ทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

1.3 ทิ้ง supernatant และทำการ resuspend cell ด้วย DPBS (Mg^{2+}, Ca^{2+} free).

1.4 แบ่งเซลล์ไปนับเพื่อใช้คำนวณหาจำนวนเซลล์ในการทำ transfection ด้วย plasmid ที่ insert ด้วย shRNA oligos ต่อยีน Nck1 หรือ Nck2 หรือ Nck1 ร่วมกับ Nck2 [Ngoenkam *et al.*, 2014] หลังจากการ transfect แล้ว จะคัดเลือกเซลล์ด้วยยา puromycin ซึ่งจะทำให้ T cell ทุกตัวลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 หรือ Nck2 อย่างถาวร จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปราว 1-2 สัปดาห์ให้ได้จำนวนเซลล์มากพอต่อการทดลองต่อ ๆ ไป

1.5 ทำการ lysis เซลล์บางส่วน ด้วย lysis buffer

1.6 วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง lysate ด้วย protein detection kit

1.7 ตรวจการแสดงออกของโปรตีนด้วย western blot โดยใช้ antibody ต่อ Nck1 หรือ Nck2 และใช้ β-actin เป็น internal control โดยเปรียบเทียบกับ Jurkat cell ที่ถูก transfect ด้วย empty plasmid (mock)

2. การกระตุ้น Jurkat T cell ด้วย anti-CD3 antibody (OKT3)

การศึกษานี้ออกแบบมาเพื่อศึกษาถึงความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการเกิด tyrosine phosphorylation ของ TCR-CD3 complex มีวิธีการศึกษาดังนี้

2.1 ทำการนับ Jurkat cells ให้ได้เซลล์จำนวน 10^7 เซลล์ จากนั้นนำเซลล์ pellet มาทำการ resuspend ใน serum-free RPMI 1640 ปริมาตร 300 µl ที่มี 2 mM L-glutamine แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย anti-CD3 antibody (OKT3) โดยใช้ 30 µg/ml anti-CD3 antibody (OKT3) ปริมาตร 10 µl (ความเข้มข้นของการกระตุ้น คือ 1 µg/ml) กระตุ้นเป็นเวลา 0, 3, 10 และ 30 นาที ที่ 37°C พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 1,100 rpm

2.3 หลังจากกระตุ้น ทำการ spin down แล้วดูด supernatant ทิ้ง จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 50 µl ของ ที่มี protease และ phosphatase inhibitor แล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไป centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.4 เก็บ supernatant ใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ ก่อนนำไปทำ western blot ต่อไป

3. Western blotting

เป็นขั้นตอนการตรวจวัดระดับของการเกิด tyrosine phosphorylation ของ signal transducing subunit ของ TCR-CD3 complex คือ CD3ε และ ζ และ kinase enzyme คือ Lck และ ZAP-70 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1 หลังจากทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนแล้ว นำโปรตีนปริมาณ 50 µg มาต้มใน non-reducing sample buffer เป็นเวลา 5 นาที

3.2 ทำการ load protein ลง well แล้ว run SDS-PAGE ที่ 80-100 Volt

3.3 นำ SDS gel มาทำการ transfer ลงบน Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane โดยใช้เครื่อง semi-dry transfer ปรับที่ 20 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 นำ PVDF มาทำการ block เพื่อป้องกันไม่ให้ non-specific protein ต่าง ๆ เข้าไปจับกับแผ่น membrane โดยใช้ 5% nonfat dry milk ใน 0.5% TPBS (PBS plus 0.5% Tween 20) บ่มไว้ 1 ชั่วโมง หรือ ข้ามคืน

3.5 นำ membrane มาล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.5% TPBS ครั้งละ 5 นาที

3.6 นำ membrane ไปบ่มใน specific antibody (primary antibody) ต่อ protein ที่สนใจ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการเจือจาง antibody ใน 0.5% TPBS)

3.7 นำ membrane มาล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.5% TPBS ครั้งละ 5 นาที

3.8 นำ membrane มาบ่มใน peroxidase-labeled species-specific anti-Ig antibody (secondary antibody) ที่เจือจางใน 0.5% TPBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.9 นำ membrane มาล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS-Tween

3.10 นำ membrane ไปวิเคราะห์ band ของ protein ด้วยวิธี enhanced chemiluminescence และวิเคราะห์ภายใต้กล้อง Charge-coupled Device (CCD)

4. Immunoprecipitation

การทดลองนี้เป็นวิธีการตกตะกอน TCR-CD3 complex หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย anti-TCR antibody (C305) ที่เวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการดึงโปรตีน Lck และ ZAP-70 มายัง TCR-CD3 complex ขั้นตอนการทำ immunoprecipitation แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

4.1 เตรียม total cell lysate ซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมโปรตีนจากเซลล์ โดยทำการการย่อย T cells ด้วย lysis buffer ก่อนนำไปทำ immunoprecipitation ซึ่งการย่อย T cells นั้นจะทำตามวิธีของงานวิจัยที่เคยทำมาแล้ว [Yiemwattana *et al.*, 2013, Ngoenkam *et al.*, 2014] ดังนี้

4.1.1 เก็บเซลล์จำนวน $2x10^7$ cells ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 400xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

4.1.2 ล้าง cell pellet ด้วย ice-cold PBS ปริมาณ 0.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) 400xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง)

4.1.3 ดูด supernatant ทิ้งไป แล้ว resuspend cell pellet อย่างเบา ๆ ด้วย ice-cold lysis buffer ปริมาตร 1 ml (20 mM TrisHCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 500 μM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, และ 0.5% Brij96)

4.1.4 นำ cell suspension วางในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูด cell suspension ไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

4.1.5 นำไป centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

4.1.6 เก็บ supernatant ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ โดยระวังไม่ให้สัมผัสกับ pellet แล้ววาง supernatant ไว้บนน้ำแข็ง

4.2 Immunoprecipitation เป็นขั้นตอนที่จะแยกโปรตีนที่สนใจ โดยการบ่มโปรตีนด้วย protein G-Sepharose beads ร่วมกับ specific antibody ต่อ protein ที่สนใจ [Alarcon *et al.*, 1991] ซึ่งขั้นตอนการทำ immunoprecipitation มีดังนี้

4.2.1 เติม 1 μg ของ anti-CD3 antibody (OKT3) และ 50% slurrly protein G-Sepharose beads ปริมาตร 15 μl เข้าไปใน supernatant จากขั้นตอน 4.1.6 หรือเข้าไปใน lysis buffer (ใช้เป็น control)

4.2.2 บ่มที่ 4 °C ข้ามคืน ในสภาวะที่หมุนแบบหัวท้าย (tumble end over end) ด้วยเครื่อง tube rotator

4.2.3 ทำการ centrifuge ที่ 12,000xg เป็นเวลา 5 วินาที ที่อุณหภูมิ 4°C

4.3.4 ดูด supernatant ทิ้ง

4.2.5 จากนั้น resuspend bead pellet ด้วย ice-cold wash buffer ปริมาตร 1 ml

4.2.6 ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,000xg เป็นเวลา 2 วินาที ที่อุณหภูมิ 4°C

4.2.7 ดูด supernatant ทิ้ง ระวังไม่ให้สัมผัสกับ bead โดยให้เหลือ supernatant ไว้บน bead ประมาณ 40 μl

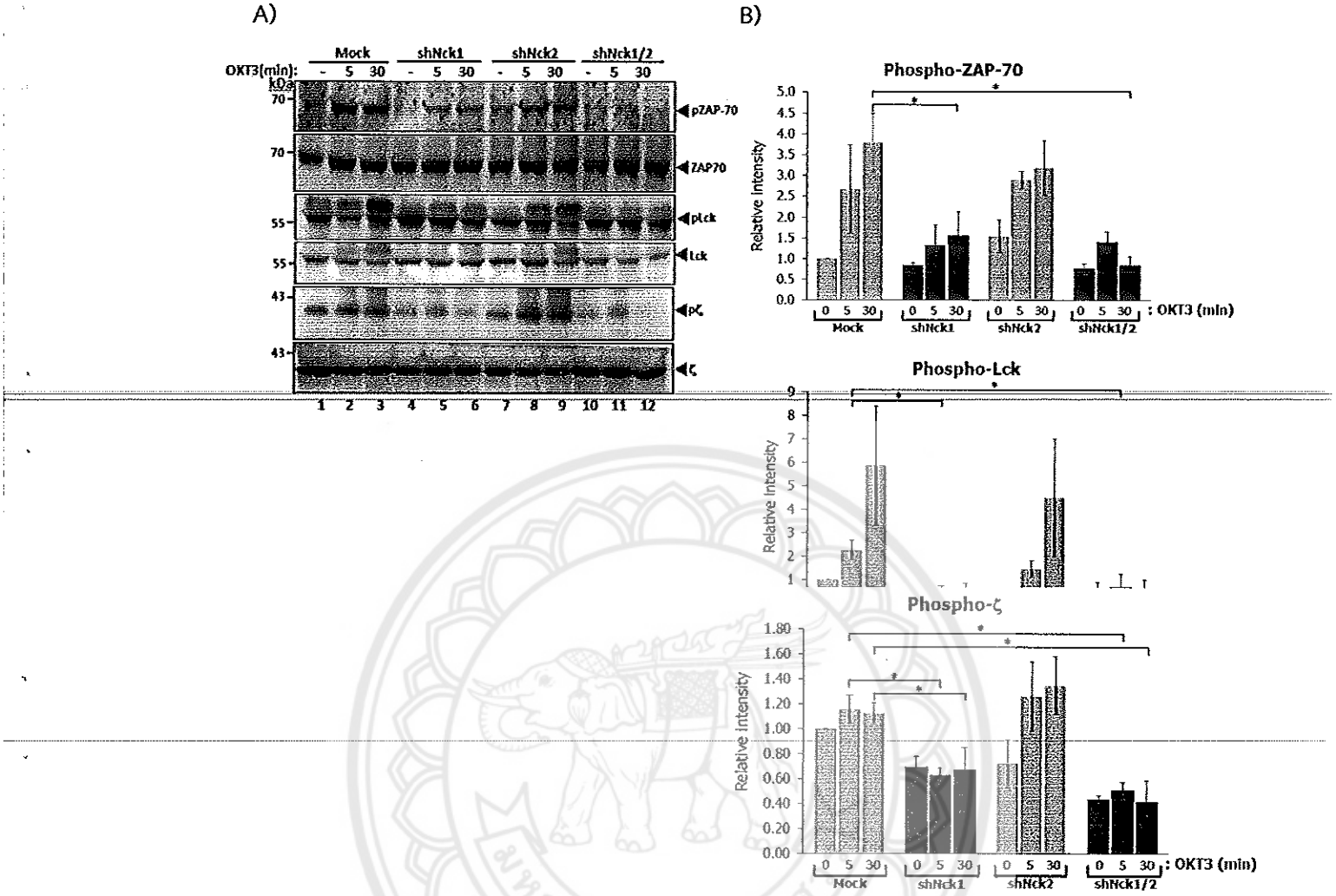
4.2.8 ล้าง bead pellet อีก 3 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายดูด supernatant ทิ้ง โดยให้เหลือ supernatant ไว้ใน tube ประมาณ 40 μl

4.2.9 เติม 4x non-reducing sample buffer ปริมาตร 10 μl แล้วต้มที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วย SDS-PAGE ตามวิธีมาตรฐาน และทำ immunoblotting ด้วย antibody ต่อ Lck และ ZAP-70

ผลการทดลอง
(Results)

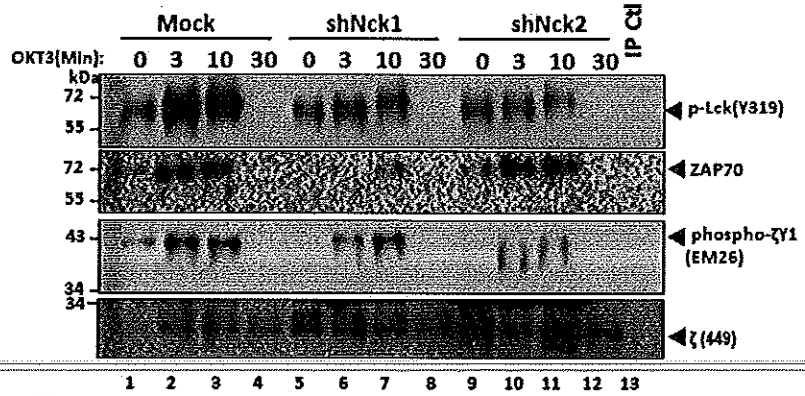
1. การลดการแสดงออกของ Nck1 มีผลต่อการกระตุ้น CD3ζ, Lck และ ZAP-70

จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการลดการแสดงออกของ Nck1 มีผลต่อการลดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ CD3ζ (รูปที่ 3A) และความเข้มข้นของ band จาก western blot ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3B การเกิด CD3ζ phosphorylation ที่ลดลงพบว่าสัมพันธ์กับการลดการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน Lck และ ZAP-70 (รูปที่ 3A, 3B) ในทางตรงกันข้ามการลดการแสดงออกของ Nck2 ไม่ส่งผลใดๆ ต่อโปรตีน CD3ζ, Lck และ ZAP-70 สำหรับการลดการแสดงออกของ Nck1 และ Nck2 พร้อมกันส่งผลต่อการกระตุ้น โปรตีน CD3ζ, Lck และ ZAP-70 เป็นอย่างมาก (รูปที่ 3A และ 3B) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Nck1 มีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, Lck และ ZAP-70 ในขณะนี้อยู่ในช่วงของการศึกษาความสำคัญของโปรตีน Nck1 และ Nck2 ต่อการดึงโปรตีน Lck และ ZAP-70 ไปยัง TCR-CD3 complex ด้วยเทคนิค immunoprecipitation



รูปที่ 3 Nck1 มีความสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีนบริเวณใกล้กับ T cell receptor: A) ภาพ western blot แสดงการเกิด tyrosine phosphorylation ของโปรตีน ZAP-70, Lck, และ CD3ζ ในเซลล์ Jurkat T cells ปกติ หรือที่ลดการแสดงออก Nck1 (shNck1) หรือ Nck2 (shNck2) หรือทั้ง Nck1 และ Nck2 (shNck1/2); B) ภาพ band intensity ของการเกิด tyrosine phosphorylation ของโปรตีน ZAP-70, Lck, และ CD3ζ ของเซลล์ชนิดต่างๆ *$p < 0.05$

เพื่อเป็นการศึกษาถึงความสำคัญของ Nck ต่อการดึงโมเลกุลที่สำคัญคือ Lck และ ZAP-70 มายัง TCR complex ในการศึกษานั้นใช้ anti-CD3 antibody (OKT3) ในการตกตะกอนโปรตีน TCR-CD3 complex จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย anti-CD3 antibody (OKT3) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับโปรตีนจาก cell lysate คือ พบว่าจำนวนของโปรตีน ZAP-70 ถูกดึงไปยัง TCR-CD3 complex ลดลง ในเซลล์ที่ถูกลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 แต่การลดการแสดงออกของโปรตีน Nck2 ไม่ส่งผลกระทบดังกล่าว (รูปที่ 4 แถวที่ 2) จึงบ่งชี้ได้ว่าเมื่อ T cell ถูกกระตุ้น โปรตีน Nck1 มีความสำคัญต่อการดึงโปรตีน ZAP-70 ไปยัง TCR-CD3 complex เป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อเทียบกับผลจาก total cell lysate พบว่าการดึงและกระตุ้นโปรตีน Lck บริเวณ TCR-CD3 complex ลดลงทั้งในเซลล์ที่ลดการแสดงออกของ Nck1 หรือ Nck2 (รูปที่ 4 แถวที่ 1) ส่งผลให้การกระตุ้นโปรตีน CD3ζ ลดลง (รูปที่ 4 แถวที่ 3) ดังนั้น จะเห็นได้ว่าโปรตีน Nck1 และ Nck2 มีความต้องการสำหรับการกระตุ้น CD3ζ และการดึงและกระตุ้นโปรตีน Lck อีกด้วย ในทางตรงกันข้าม จะมีเพียงโปรตีน Nck1 เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการดึงและกระตุ้นโปรตีน ZAP-70 ที่บริเวณ TCR-CD3 complex ในการทดลองต่อไปจะศึกษาเปรียบเทียบความสำคัญของโปรตีน Nck1และ Nck2 ต่อการดึงโปรตีน WASp ไปยัง SLP-76



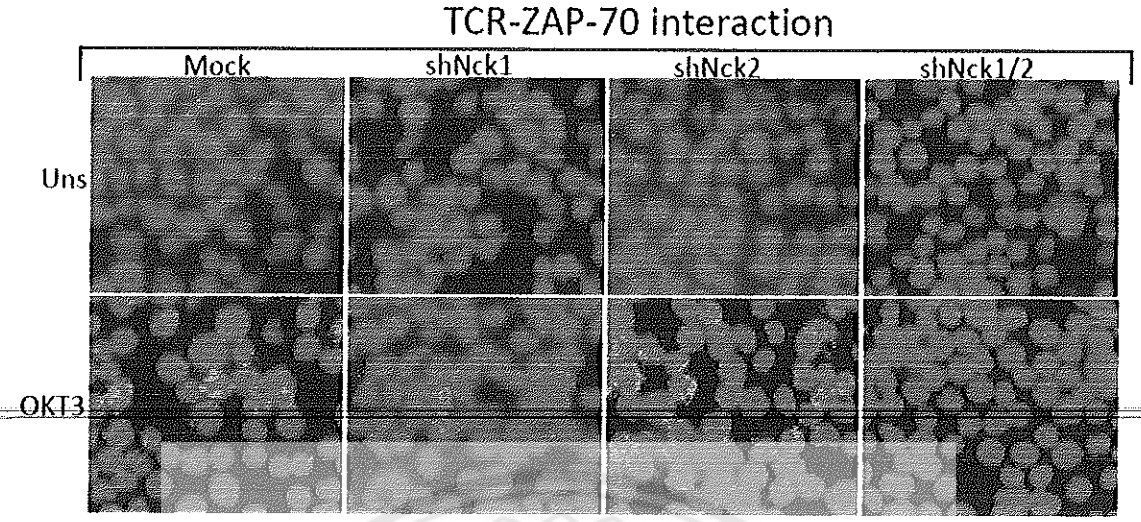
รูปที่ 4 การลดการแสดงออกของโปรตีน Nck1 ส่งผลต่อการดึงโปรตีน ZAP-70 ไปยัง TCR-CD3 complex: เซลล์จำนวน $15x10^6$ cells ถูกกระตุ้นด้วย OKT3 antibody เป็นเวลา 3, 10 และ 30 นาที จากนั้นแยกโปรตีนแล้วนำมาตกตะกอนด้วย 1 µg anti-CD3ε antibody (OKT3) นำโปรตีนที่ตกตะกอนมาทำ immunoblotting ด้วย antibody ต่อ total phospho-TCRζ และนำ membrane เดิมมา tripping และบ่มร่วมกับ ZAP-70 และ phospho-Lck antibody

2. Nck1 มีความสำคัญเกิด interaction ของ CD3 กับ ZAP-70- และ Lck

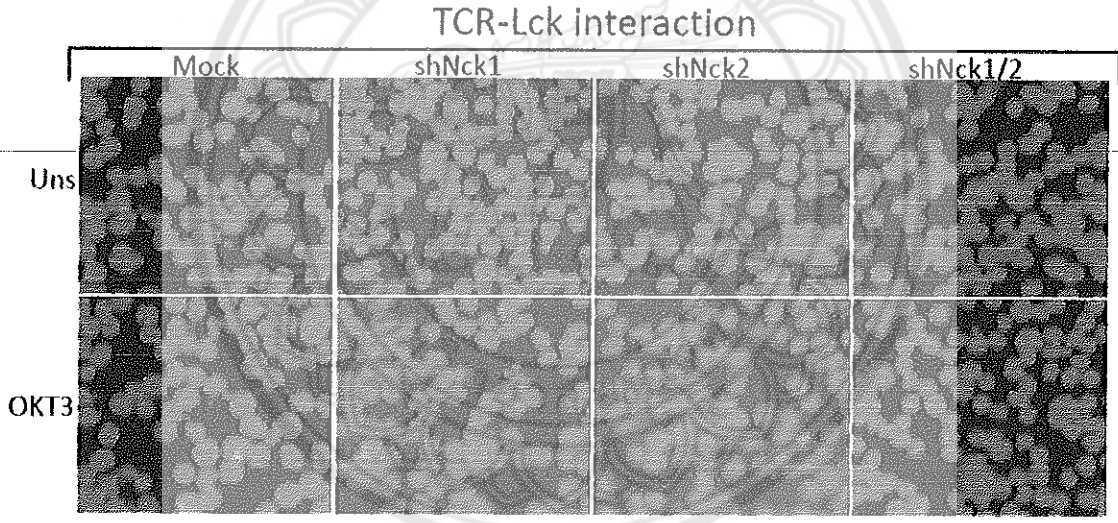
จากผลการทดลอง immunoprecipitation พบว่า Nck1 มีบทบาทต่อการดึง ZAP-70 และ Lck ไปยัง TCR-CD3 complex เพื่อการยืนยันผลการทดลองดังกล่าว ผู้วิจัยได้เทคนิค in situ proximal ligation assay (PLA) ในการศึกษาการจับกัน (interaction) ของ CD3 กับ ZAP-70 และ Lck ภายในเซลล์ ซึ่งเทคนิค PLA สามารถตรวจวัดได้จากจุด (dot) เรืองแสงสีแดงที่เกิดขึ้น จากการศึกษาพบว่าจุดสีแดงของ CD3-ZAP-70 interaction จะพบมากขึ้นในเซลล์ Jurkat T cell (mock) ที่ถูกกระตุ้น (รูปที่ 5A) ในทางตรงกันข้ามเมื่อลดการแสดงออกของ Nck1 ส่งผลให้การจับกันของ CD3-ZAP-70 interaction ลดลงอย่างมากหลังจากการกระตุ้น สำหรับการลดการแสดงออกของ Nck2 ไม่ส่งผลต่อการเกิด CD3-ZAP-70 interaction แต่เมื่อลดการแสดงออกทั้ง Nck1 และ Nck2 พร้อมกันใน Jurkat T cell ส่งผลให้ยับยั้งการเกิด CD3-ZAP-70 interaction (รูปที่ 5A) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Nck1 มีผลต่อการดึง ZAP-70 ไปจับกับ TCR-CD3 complex

สำหรับการศึกษาผลของการลดการแสดงออกของ Nck ต่อการจับกันของ CD3 กับ Lck พบผลเช่นเดียวกันคือเมื่อกระตุ้น Jurkat T cell ด้วย OKT3 ส่งผลให้มีการดึง Lck ไปจับกับ TCR-CD3 complex มากขึ้น แต่เมื่อ Jurkat T cell ถูกลดการแสดงออกของ Nck1ส่งผลให้การจับกันของ CD3 กับ Lck ลดลง (รูปที่ 5B) แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อลดการแสดงออก Nck2 ก็ส่งผลต่อการดึง Lck ไปยัง CD3 เช่นกัน และเมื่อทำการลดการแสดงออกของทั้ง Nck1 และ Nck2 พร้อมกันส่งผลให้ยับยั้งการเกิด CD3-Lck interaction

A)



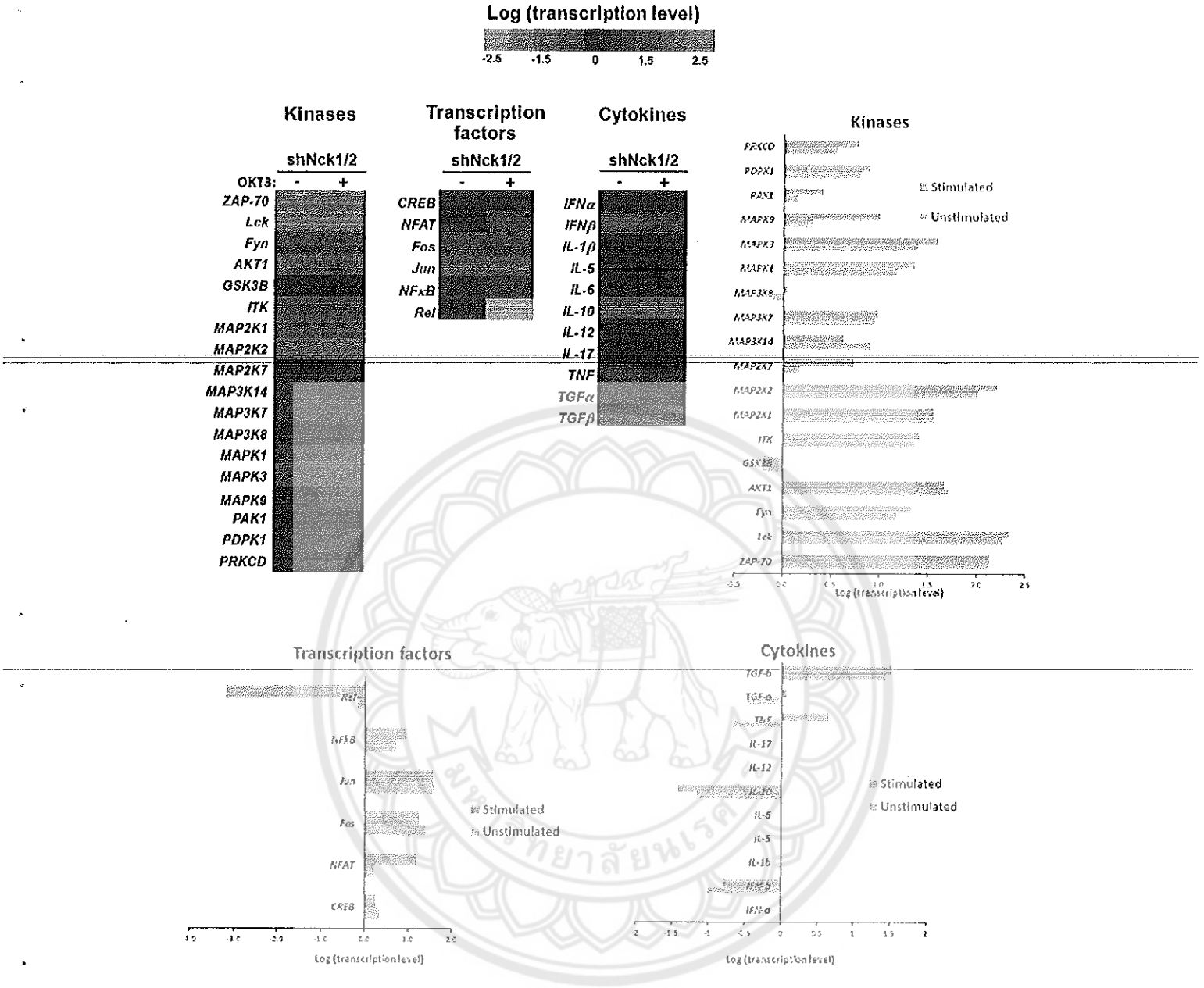
B)



รูปที่ 5 Nck จำเป็นสำหรับการดึง ZAP-70 และ Lck ไปจับกับ TCR-CD3 complex: การอยู่ใกล้กันของ CD3 กับ ZAP-70 (A) และ Lck (B) ในเซลล์ต่างๆ ถูกตรวจวัดโดยเทคนิค *in situ* PLA โดยนำเซลล์แบบต่างๆ จะถูกกระตุ้น (OKT3) หรือไม่กระตุ้น (Uns, unstimulated) ด้วยแอนติบอดีเป็นเวลา 5 นาที ใน 8-well slide ก่อนนำไป fixation และ Permeabilization แล้วตัวอย่างร่วมกับ primary antibody goat anti-CD3ε และ rabbit anti-ZAP-70 หรือ rabbit anti-Lck แล้วบ่มต่อด้วย secondary ที่เชื่อมติดอยู่กับ oligonucleotide และสำรวจภายใต้กล้อง fluorescent

3. การศึกษา Transcriptomic ในเซลล์ที่ลดการแสดงออกทั้ง Nck1 และ Nck2

การทดลองนี้เป็นการศึกษาข้อมูลการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น T cell และยีน cytokines ต่างๆ ที่จะแสดงออกหลังจาก T cells ถูกกระตุ้น จากการศึกษาในเซลล์ที่ลดการแสดงออกทั้ง Nck1 และ Nck2 (shNck1/2) พบว่ายีนของเอนไซม์ kinase ที่สำคัญเช่น Lck และ ZAP-70 มีการแสดงออกอยู่แล้วก่อนกระตุ้น (รูปที่ 6) และหลังจากการกระตุ้นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ายีนของ kinase เหล่านี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่การแสดงออกของ transcription factor พบว่า NFAT จะมีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อกระตุ้นเซลล์ที่ลดการแสดงออก Nck1 และ Nck2 (shNck1/2) เป็นที่น่าสนใจว่าหลังจากกระตุ้นเซลล์นี้แล้ว ส่งผลให้การแสดงออกของ transcription factor Rel ลดลง สำหรับการแสดงออกของยีนสร้าง cytokine ในเซลล์ที่ลดการแสดงออก Nck1 และ Nck2 (shNck1/2) พบว่าในระยะพัก (resting state) ยีน IFN-β และ IL10 มีการแสดงออกลดลง และแม้จะกระตุ้นเซลล์แล้ว การแสดงของยีนก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 6) จากผลการทดลองนี้พบว่าโปรตีน Nck มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิด



รูปที่ 6 Transcriptomic ในเซลล์ที่ลดการแสดงออกทั้ง Nck1 และ Nck2: เซลล์ในภาวะก่อนและหลังกระตุ้นด้วย OKT3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถูกสกัด total RNA ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย RNA sequencing แล้วนำค่าการแสดงออกเทียบกับเซลล์ปกติและรายงานในรูป log transcription level

อภิปรายผลการทดลอง
(Discussion)

โปรตีน Nck ในคนมี 2 ชนิด คือ Nck1 และ Nck2 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันถึง 68% และคาดการณ์กันว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ทำหน้าที่ทดแทนกันได้ (Lettau et al., 2009) แต่จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า Nck1 มีความจำเป็นสำหรับการกระตุ้น Jurkat T cell และ primary CD4 T cells (Ngoenkam et al., 2014, Yiemwattana et al., 2012) โดยพบว่าการลดการแสดงออกของ Nck1 ส่งผลให้ลดการกระตุ้น Erk และ MEK ซึ่งส่งผลให้มีการสร้าง IL-2 และการแสดงออก CD69 ลดลง สำหรับการศึกษาครั้งนี้ก็พบว่า Nck1 มีความสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, ZAP-70 และ Lck ซึ่งมีหน้าที่ในช่วงต้นของการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์หลังจากที่ TCR จับกับ ligand และโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ก่อน Erk และ MEK (Smith-Garvin et al., 2009)

มีการรายงานว่าเมื่อ TCR จับกับ ligand ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ CD3ε โดยมีการเผยส่วน PRS บน cytoplasmic tail ของ CD3ε ซึ่งเป็นบริเวณที่จับของ SH3.1 ของโปรตีน Nck (Gil et al., 2002) แต่เมื่อไม่นานมานี้พบว่านอกจาก SH3.1 แล้ว ยังมี SH2 ของ Nck ที่จำเป็นสำหรับจับกับ CD3ε และการจับกันดังกล่าวต้องการการเกิด tyrosine phosphorylation ของ CD3ε ด้วย (Paensuwan et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ T cell ถูกกระตุ้นจะมีการดึง WASP ก็ไปยัง TCR-CD3 complex เช่นกัน (Paensuwan et al., 2015) อีกทั้งยังมีโปรตีนหลายชนิดที่สามารถไปจับกับ TCR-CD3 complex ได้ และทำหน้าที่ในการควบคุมการกระตุ้น T cells (Ngoenkam et al., 2017) สำหรับการเกิด Nck-CD3 interaction เชื่อว่ามีความสำคัญในการกระตุ้น mature T cells ด้วย weak agonists ไม่ไม่จำเป็นสำหรับ strong agonists (Tailor et al., 2008; Roy et al., 21010)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อมีการลดการแสดงออกของ Nck1 ส่งผลต่อการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, ZAP-70 และ Lck ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าการดึง Nck ไปยัง TCR-CD3 complex มีความสำคัญต่อการกระตุ้นโปรตีน ZAP-70 ผู้วิจัยเสนอว่าเมื่อ Nck ถูกดึงไปยัง TCR-CD3 complex แล้วจะพาโมเลกุลอื่นที่จับอยู่กับ Nck ไปด้วย เช่น Lck ซึ่งมีหน้าที่ในการเติมหมู่ phosphate ให้กับ ITAM และ ZAP-70 ต่อไป (Borroto et al., 2013) มีการรายงานว่า Nck สามารถจับกับ Lck ได้โดยตรง (Vazquez ML, 2007) หรือผ่านโมเลกุล TSAd (Hem et al., 2015) สำหรับการลดการแสดงออก Nck1 แล้วมีผลต่อการดึง Lck และ ZAP70 ไปยัง TCR ผู้วิจัยเชื่อว่าอาจเป็นผลมาจากการลดการแสดงออกของ Nck มีผลต่อการเกิด actin polymerization (Pauker et al., 2011) ซึ่ง actin polymerization อาจมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนไปยังเป้าหมาย

สรุปผลการทดลอง
(Conclusion)

การลดการแสดงออกของ Nck1 มีผลต่อการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, ZAP-70 และ Lck ในขณะที่การลดการแสดงออกของ Nck2 ไม่มีผล นอกจากนี้พบว่า Nck1 มีความสำคัญต่อการดึงโปรตีน ZAP-70 และ Lck ไปยัง TCR-CD3 complex ในขณะที่ Nck2 มีผลต่อการดึง Lck ไปยัง TCR-CD3 complex จากการศึกษา transcriptomic แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Nck มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและการทำงานของ T cell จากผลการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่า Nck โดยเฉพาะ Nck1 มีผลต่อการกระตุ้นโปรตีน CD3ζ, ZAP-70 และ Lck

เอกสารอ้างอิง
(References)

Alarcón B, Ley SC, Sánchez-Madrid F, Blumberg RS, Ju ST, Fresno M, & Terhorst C: The CD3-gamma and CD3-delta subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *EMBO J.* 1991; **10**:903-912.

Bell LM, Solomon KR, Gold JP, & Tan KN: Cytoplasmic tail deletion of T cell receptor (TCR) beta-chain results in its surface expression as glycosylphosphatidylinositol-anchored polypeptide on mature T cells in the absence of TCR-alpha. *J Biol Chem.* 1994; 269:22758-63.

Billadeau DD, Nolz JC, & Gomez TS: Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7:131–143.

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

Borroto A, Arellano I, Dopfer EP, Prouza M, Suchànek M, Fuentes M, Orfao A, Schamel WW, Alarcón B. Nck recruitment to the TCR required for ZAP70 activation during thymic development. *J Immunol.* 2013; 190(3):1103-12.

Buday L, Wunderlich L, & Tamas P: The Nck family of adapter proteins: Regulators of actin cytoskeleton. *Cell. Signalling.* 2002; 14:723–731.

Call ME, & Wucherpfennig KW: Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:841-50.

Choudhuri K, Kearney A, Bakker TR, & van der Merwe PA: Immunology: how do T cells recognize antigen? *Curr Biol.* 2005; **15**:R382-385.

Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, & Alarcon B: Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell.* 2002; **109**:901–912.

Hem CD, Sundvold-Gjerstad V, Granum S, Koll L, Abrahamsen G, Buday L, Spurkland A. T cell specific adaptor protein (TSAd) promotes interaction of Nck with Lck and SLP-76 in T cells. *Cell Commun Signal.* 2015; **13**:31.

Horejsi V, Zhang W, & Schraven B: Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:603–616.

Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, & Weiss A: Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 1994; 263:1136–1139.

Janeway CA, Travers P, & Walport M. Janeway's Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. 7th edition. New York: Garland Science. 2007.

Koretzky GA, Abtahian F, & Silverman MA: SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:67–78.

Lettau M, Pieper J, & Janssen O: Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal*. 2009; 7:1-13.

Li W, Fan J, & Woodley DT: Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene*. 2001; 20:6403-6417.

Liu SK, Fang N, Koretzky GA, McGlade CJ: The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol*. 1999; 9:67–75.

Mingueneau M, Sansoni A, Grégoire C, Roncagalli R, Aguado E, Weiss A, Malissen M, & Malissen B: The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nat Immunol*. 2008; 9:522-532.

Molnár E, Deswal S, & Schamel WW: Pre-clustered TCR complexes. *FEBS Lett*. 2010; 584:4832-4837.

Ngoenkam J, Paensuwan P, Preechanukul K, Khamsri B, Yiemwattana I, Beck-Garcia E, Minguet S, Schamel WW, & Pongcharoen S: Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. *Cell Commun Signal*. 2014; 12:21.

Ngoenkam J, Schamel W, Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T cell receptor-CD3 complex. *Immunology*. 2017. doi: 10.1111/imm.12809.

Paensuwan P, Hartl FA, Yousefi OS, Ngoenkam J, Wipa P, Beck-Garcia E, Dopfer EP, Khamsri B, Sanguansermsri D, Minguet S, Schamel WW, Pongcharoen S. Nck Binds to the T Cell Antigen Receptor Using Its SH3.1 and SH2 Domains in a Cooperative Manner, Promoting TCR Functioning. *J Immunol*. 2016; 196(1):448-58

Paensuwan P, Ngoenkam J, Khamsri B, Preechanukul K, Sanguansermsri D, Pongcharoen S.Evidence for inducible recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein to T

1023480

cell receptor-CD3 complex in Jurkat T cells. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2015; 33(3):189-95.

Pauker MH, Reicher B, Fried S, Perl O, Barda-Saad M. Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(13):2653-66.

Pitcher LA, Young JA, Mathis MA, Wrage PC, Bartók B, van Oers NS: The formation and functions of the 21- and 23-kDa tyrosine-phosphorylated TCR zeta subunits. *Immunol Rev.* 2003; 191:47-61.

Reicher B, & Barda-Saad M: Multiple pathways leading from the T-cell antigen receptor to the actin cytoskeleton network. *FEBS Lett.* 2010; 584:4858-4864.

Reynolds LF, de Bettignies C, Norton T, Beeser A, Chernoff J, Tybulewicz VL: Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J Biol Chem.* 2004; 279:18239–18246.

Roy E, Togbe D, Holdorf AD, Trubetskoy D, Nabti S, Küblbeck G, Klevenz A, Kopp-Schneider A, Leithäuser F, Möller P, Bladt F, Hämmerling G, Arnold B, Pawson T, Tafuri A. Nck adaptors are positive regulators of the size and sensitivity of the T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(35):15529-34.

Samelson LE: Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:371-94.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, & Jordan MS: T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:591-619.

Sommers CL, Samelson LE, & Love PE: LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. *Bioessays.* 2004; 26:61–67.

Szymczak AL, Workman CJ, Gil D, Dilioglou S, Vignali KM, Palmer E, & Vignali DA: The CD3ε proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function. *J. Immunol.* 2005; 175:270–275.

Tailor P, Tsai S, Shameli A, Serra P, Wang J, Robbins S, Nagata M, Szymczak-Workman AL, Vignali DA, & Santamaria P: The proline-rich sequence of CD3epsilon as an amplifier of low-avidity TCR signaling. *J Immunol.* 2008; 181:243-255.

van Oers NS, Killeen N, Weiss A: ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity.* 1994; 1:675-685.

van Oers NS, Tohlen B, Malissen B, Moomaw CR, Afendis S, Slaughter CA: The 21- and 23-kD forms of TCR zeta are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat Immunol*. 2000; 1:322-328.

Vazquez ML. Biological consequences of the phosphorylation of serine 59 on the tyrosine kinase Lck. [PhD Thesis].West Lafayette, IN: Purdue University; 2007.

Yiemwattana I, Ngoenkam J, Paensuwan P, Kriangkrai R, Chuenjitkuntaworn B, & Pongcharoen S: Essential role of the adaptor protein Nck1 in Jurkat T cell activation and function. *Clin Exp Immunol*. 2012; **167**:99-107.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor จำนวน 1 ผลงาน

1. **Ngoenkam, J.**, Schamel, W., Pongcharoen, S. (2017) Selected signaling proteins recruited to the T cell receptor-CD3 complex. Immunology. doi:10.1111/imm.12809. (Impact factor : 3.701)

ภาคผนวก

Title: Selected signalling proteins recruited to the T cell receptor-CD3 complex

Author: Jatuporn Ngoenkam[1], Wolfgang Schamel[2,3,4], Sutatip Pongcharoen[5,6,7]

Addresses: [1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000 Thailand; [2]Department of Immunology, Institute for Biology III, Faculty of Biology, University of Freiburg, Freiburg, Germany; [3]BIOSS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg, Germany; [4]Center for Chronic Immunodeficiency (CCI), Medical Center-University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Germany; [5]Centre of Excellence in Medical Biotechnology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; [6]Center of Excellence in Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; and [7]Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Correspondence: Assoc. Prof. Dr. Sutatip Pongcharoen, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University, Tapho District, Muang, Phitsanulok, 65000, Thailand, Email: sutatipp@nu.ac.th

Abbreviations: APC, antigen presenting cell; CID, combined immunodeficiency; Crk, chicken tumor virus number 10 regulator of kinase; Csk, C-terminal Src kinase; dnNb, dominant negative Numb; Erk, extracellular signal–regulated kinase; Grk2, G protein-coupled receptor kinase 2; IB, interdomain B; ITAMs, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs; LAT, linker for the activation of T cells; Lck, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase; MHC, major histocompatibility complex; Nck, non-catalytic region of tyrosine kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC-γ1, phospholipase C-γ1; PRS, proline-rich sequence; PTB domain, phosphotyrosine binding domain; RRas, Ras-related; SH, Src-homology; SLP-76, SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; TCR, T cell receptor; VCA, verprolin homology domain-cofilin homology domain-acidic region; WAS, Wiskott-Aldrich syndrome; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; ZAP-70, Zeta chain-associated protein kinase of 70 kDa

Summary

The T cell receptor (TCR)-CD3 complex, expressed on T cells, determines the outcome of a T cell response. It consists of the TCRαβ heterodimer and the non-covalently associated signalling dimers of CD3εγ, CD3εδ and CD3ζζ. TCRαβ binds specifically to a cognate peptide antigen bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule, whereas the CD3 subunits transmit the signal into the cytosol to activate signalling events. Recruitment of proteins to specialized localizations is one mechanism to regulate activation and termination of signalling. In the last 25 years a large number of signalling molecules recruited to TCR-CD3 complex upon antigen binding to TCRαβ have been described. Here, we review knowledge about five of those interaction partners: Lck, ZAP-70, Nck, WASP, and Numb. Some of these proteins have been targeted in the development of immunomodulatory drugs aiming to treat patients with autoimmunity and organ transplants.

Key words: TCR-CD3 complex; protein-protein interaction; T cell activation; signal transduction

Introduction

Immune responses to infectious pathogens serve to maintain body homeostasis. Among various immune cells, T cells play an important role to fulfill this critical function. A T cell response to foreign antigen is initiated by the binding of the T cell receptor (TCR)-CD3 complex to a foreign peptide bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule presented on an antigen presenting cell (APC). Information of this binding is transmitted into the cytosol to activate many signalling proteins.[1-2] The final target are transcription factors, to alter the gene expression profile, metabolic enzyme, to change metabolic activity,[3] and cytoskeletal rearrangement. Together this leads to cell proliferation and effector molecule production and secretion, which are crucial for T-cell mediated immune responses.[4]

The TCR-CD3 complex is a multisubunit protein complex. It is composed of an antigen-binding TCRαβ heterodimer noncovalently associated with the non-variable signal transduction subunits; the CD3 heterodimers CD3εγ and CD3εδ as well as the CD3ζζ homodimers.[5-7] The cytoplasmic tails of CD3ε, CD3δ, and CD3γ contain each one immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and the one of CD3ζ contains three ITAMs, thus one TCR-CD3 complex comprises 10 ITAMs. The conserved amino acid sequence of the ITAMs is D/ExYxxLx(6-8)YxxL. Antigen binding to TCRαβ results in phosphorylation of the ITAM residues, leading to recruitment and activation of multiple downstream signalling molecules including enzymes and adaptor proteins.[1,4] Since there is a myriad of signalling molecules, regulated protein-protein interactions are one of the critical mechanisms for regulating specificity in signal transduction. Over the past decades a large number of proteins have been reported to be recruited to the TCR-CD3 complex. Here, we review recent data on five (direct or indirect) interaction partners of the TCR-CD3 complex, including the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck), CD3ζ-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP-70), non-catalytic region of tyrosine kinase (Nck), Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), and inhibitor of Notch-1 signalling Numb (Table 1). Other proteins associated with the TCR-CD3 complex have been discussed elsewhere and they are not covered in this review.[8-13] The effects of some mutations of these proteins on TCR signaling is shown in Table 2.

T cells develop in the thymus where self-reactive T cells are deleted by a process called negative selection, which is based on a strong signal elicited by high-affinity binding to the self-peptide MHC.[14-15] A lack or mutation of critical proteins involved in TCR-CD3 signalling, such as ZAP-70 and WASP, causes a reduction of the TCR-CD3 signalling strength that allows autoreactive T cells to escape from negative selection and reach peripheral tissues.[16-20] These autoreactive T cells can be activated in response to self-peptide, which consequently leads to tissue injury known as autoimmune disease.[15,21] Thus, chemical agents blocking specifically the T cell activation process are promising therapeutic interventions for the treatment of T cell-driven diseases. Here, we cover the information on some inhibitors that target the

signalling proteins at the TCR-CD3 as they may have a potential to be used for the treatment of autoimmune disorders and in organ transplantations.

Lck

Members of the Src family of protein tyrosine kinases modulate signal transduction downstream of transmembrane receptors in most, if not all, cell types. In T cells, Lck is a member of the Src family of 56 kDa. TCR-CD3 engagement with an antigenic peptide MHC triggers the phosphorylation of the ITAM tyrosines by Lck.[22] Phosphorylated ITAMs then become a docking site for ZAP-70, which is also activated by Lck upon binding to the ITAMs.[23] Subsequently, ZAP-70 together with Lck phosphorylates downstream signalling molecules, to activate TCR-CD3-controlled signalling cascades.

Lck contains an N-terminal membrane anchor region (SH4 domain), a unique domain, a Src-homology 3 (SH3) domain, an SH2 domain, a catalytic kinase domain, and a short C-terminal tail (Fig. 1A). The SH4 domain is post-translationally modified by addition of lipids including myristoylation and palmitoylation, which allows Lck's attachment to the plasma membrane. A serine 59 residue in a unique domain of Lck can be phosphorylated by the extracellular signal–regulated kinase (Erk)[24] and phosphorylation of this residue inhibits Lck activity.[25] In addition, Lck activity is tightly regulated by a conformational state mainly depending on phosphorylation and dephosphorylation of two tyrosine residues (Y394 and Y505) on the catalytic kinase domain and the C-terminal tail, respectively.[26] Phosphorylation of Y505 by the C-terminal Src kinase (Csk) mediates an intramolecular interaction with the SH2 domain, resulting in an inactive or closed conformation of Lck. When Y505 is dephosphorylated by the phosphatase CD45 or SHP-1, the SH2 domain detaches from Y505, thus promoting an opened conformation. The opened conformation allows phosphorylation of Y394 by Lck trans-autophosphorylation.[26-27] However, doubly phosphorylated tyrosines Y394 and Y505 might also exist and confer a dominant effect of kinase activity over the inhibitory Y505.[28]

Different pools of Lck have been identified, including Lck in the cytoplasm, Lck anchored to the plasma membrane and Lck associated with the co-receptors CD4 and CD8.[29] Approximately 40% of Lck is already active (phosphorylated at Y394) in resting T cells and upon TCR engagement the amount of active Lck increases, as seen by Forster resonance energy transfer.[30-32] In addition, the distribution of Lck to its correct destination may regulate the function of Lck in phosphorylating its substrates.[26] Several lines of evidence have also suggested that initial phosphorylation of the CD3's ITAMs is mediated by free Lck, whereas the co-receptor-associated Lck acts as an adaptor molecule to bring CD4 or CD8 molecule to the phosphorylated TCR–CD3 complex in a later step.[33-34] Furthermore, it has been suggested that the conformation of Lck determines its distribution. .Lck in the opened conformation might cluster of Lck, whereas the closed conformation inhibits the clustering. TCR triggering induces the

clustering of Lck with the phosphorylated TCR-CD3, suggesting that conformation-driven Lck clustering may determine its localization to perform its activity.[35] These findings suggest that Lck recruitment to the TCR-CD3 complex induces the phosphorylation of the ITAMs.

Lck can be co-immunoprecipitated with the TCR-CD3 complex upon TCR-CD3 ligation, suggesting that these two proteins can interact directly or indirectly with each other.[36] An indirect interaction might be mediated by RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase.[37] The direct interaction might be mediated by the SH2 domain of Lck and phosphorylated ITAMs.[38-39] In addition, the SH2 domain of Lck can also interact with lipid within the plasma membrane upon TCR activation. This binding might be crucial for a lateral diffusion of Lck to interact with the triggered TCR-CD3 complex.[39] These data indicate that localization of Lck to TCR-CD3s that are phosphorylated on few tyrosines facilitates the phosphorylation of the other ITAM tyrosines within CD3.

Our own data have suggested that the resting TCR-CD3 is in a closed conformation, in which the ITAM tyrosines are not exposed, but hidden within the quartenary structure of the TCR-CD3 complex[40-41] Upon peptide-MHC binding to TCR$\alpha\beta$ an open CD3 conformation is stabilized, that allows access of Lck to the ITAM tyrosine.[42] This might be one explanation of how peptide-MHC binding to the TCR-CD3 complex causes CD3 phosphorylation by Lck.

Since Lck expression is found only in T cells and natural killer cells, selective inhibitors that target Lck would potentially provide a safe treatment of diseases mediated by over-activation of T cells such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, psoriasis, and organ graft rejection.[43] A large number of compounds have been reported that selectively inhibit Lck activity by binding to the ATP pocket of Lck's kinase domain.[44] Some of those inhibitors prevent the allograft rejection in mouse models,[45-46] and one inhibits the hind paw swelling in an adjuvant-induced rat arthritis model.[47]

ZAP-70

ZAP-70 is a cytoplasmic tyrosine kinase expressed predominantly in T and natural killer cells. The importance of ZAP-70 in humans has been demonstrated as a lack of ZAP-70 causes a profound combined immunodeficiency, which is characterized by an absence of CD8 T cells and a defective function of CD4 T cells.[17-18] Combined mutations of R192W and R360P in ZAP-70 cause an autoimmune syndrome. The former mutation results in decreased binding to phospho-CD3, whereas the latter mutation reduces an auto-inhibitory mechanism.[48] These mutations that alter TCR signalling thresholds cause autoimmune diseases as phenotypically demonstrated by uncontrollable bullous pemphigoid, colitis and proteinuria.[48]

ZAP-70 is structurally composed of two SH2 domains separated by an so-called interdomain A. Following the tandem SH2 domains is the interdomain B (IB) and the kinase domain[49] (Fig. 1B). There are several tyrosine residues on the IB and kinase domain that can be phosphorylated after TCR stimulation. These tyrosines have various

functions including regulation of the catalytic activity of ZAP-70 and interaction with other signalling molecules. Tyrosine 292 (Y292), Y315 and Y319 are located within the IB whereas Y492 and Y493 are located in the kinase domain. In resting T cells, ZAP-70 is in an autoinhibited conformation mediated by the intramolecular interaction of Y315 and Y319 with the kinase domain.[50] Upon TCR engagement, the tandem SH2 domains of ZAP-70 are recruited to doubly phosphorylated-ITAMs of the CD3 subunits. Binding to the CD3 subunits changes ZAP-70 conformation to an opened conformation with the release of Y315 and Y319 from kinase domain. This facilitates the phosphorylation of Y315 and Y319 by either Lck[51-52] or by trans-autophosphorylation.[53] Likewise, the conformational change also gives rise to a more flexible kinase domain, resulting in phosphorylation of Y493, which is located within the activation loop of the kinase domain, by either Lck or by trans-autophosphorylation.[51] Phosphorylation of Y493 allows ZAP-70 to be catalytic active. Lck can bind with its SH2 domain to phosphor-Y319 of ZAP-70 and is required to mediate the phosphorylation of various tyrosine residues on ZAP-70.[54] Mutation of ZAP-70's Y319[53] or Lck's SH2 domain[54] abrogates the Lck-ZAP-70 interaction and consequently impairs downstream signalling. Taken together, the activation of ZAP-70 relies on two steps: firstly binding of the tandem SH2 domains of ZAP-70 to doubly phosphorylated tyrosines within the ITAMs of CD3, causing a conformational change and secondly the Lck- and ZAP-70-mediated phosphorylation of Y315, Y319 and Y493 resulting in full ZAP-70 activation.

By comparing of the different ITAMs among the CD3 subunits (CD3ζ, CD3δ, CD3ε and CD3γ), it is likely that ZAP-70 preferentially binds to fully phosphorylated CD3ζ.[9] Recently, a "catch-and-release" model for ZAP-70 activation has been proposed by Katz and co-workers.[55] After recruitment of ZAP-70 to the phosphorylated TCR-CD3 complexes and ZAP-70 phosphorylation by Lck, activated ZAP-70 is released from the TCR-CD3 complexes into the plane of the plasma membrane. The association of ZAP-70 to the membrane might be mediated by the binding of the SH2 domains to lipids or of phosphotyrosines to other membrane-associated proteins. Consequently, empty phospho-TCR-CD3 complexes allow the recruitment of additional ZAP-70 molecules to the TCR-CD3 for activation of additional ZAP-70. The released ZAP-70 translocates within the membrane into adjacent protein islands to mediate phosphorylation of its substrates including the linker for the activation of T cells (LAT) and the SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76).[55] Phosphorylated LAT and SLP-76 adaptor proteins have various interacting partners such as the phospholipase C-γ1 (PLC-γ1), which is recruited to these two proteins to form the LAT/SLP-76 signalosome.[56] Forming of this signalosome results in T cell activation, proliferation and differentiation.

Since, ZAP-70 is required to initiate T cell activation, inhibition of ZAP-70 from interacting with the TCR-CD3 by small molecules may be used to treat patients with autoimmune diseases and organ transplants. High-throughput screening of a library of 132,842 compounds has been conducted to find inhibitors that would disrupt the interaction of ZAP-70 with CD3ζ.[57] A series of pyrimidine derivatives that can inhibit

ZAP-70 activity have been identified and patented by researchers and Novartis companies.[58]

In the recent years chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells have been used for tumor immunotherapy. CARs consist of an extracellular anti-tumor antigen single Fv fragment, a transmembrane region and the cytoplasmic tail of CD3ζ. CAR signalling relies on tumor antigen-binding induced CD3ζ tail phosphorylation. An *in silico* model has suggested that the sensitivity of TCR signaling is modulated by the differential affinities of ZAP-70 to the CD3ζ's ITAMs and sequential phosphorylation of these ITAMs leading to a 'switch-like' response of TCR signalling.[59] Cytokine production by T cells could occur without phosphorylation of the CD3ζ, CD3δ, CD3γ chains when there is intact CD3ε chains.[60] It has been suggested that no matter which ITAMs are phosphorylated, the number of ITAMs to be phosphorylated would determine the outcome of T cell response.[61] Thus, to obtain effective CAR-T cells with a strong anti-tumoral cytotoxic function but without producing too much cytokines, preventing the so-called cytokine storm, one may optimize CD3ζ signaling by titrating the number of ITAMs to be phosphorylated and by using other CD3 chains than CD3ζ.

Nck

Nck is a 47 kDa cytosolic adapter protein that is composed of three SH3 domains (SH3.1, SH3.2, and SH3.3) and one SH2 domain (Fig. 1C). In humans, two Nck isoforms exist; Nck1/Nckα and Nck2/Nckβ, which share 68% amino acid sequence similarity.[62] Although redundant roles of Nck1 and Nck2 have been reported, our previous work has shown that Nck1 and Nck2 molecules are functionally non-redundant in T cell activation.[63] In response to TCR triggering, Nck is recruited to SLP-76 to mediate actin rearrangement, which is essential for immunological synapse formation, T cell activation and cell movement.[64] Nck is doing so by binding to WASP.

In addition, inducible direct association of Nck to the TCR-CD3 complex occurs when the latter is triggered. For this association, Nck simultaneously uses its SH3.1 and SH2 domains.[65] The SH3.1 domain directly interacts with the PxxPxxDY sequence located within the PRS of the CD3ε.[24] For this association to occur the TCR needs to be in its *Active* CD3 conformation and the tyrosine needs to be in the non-phosphorylated state.[24, 66] SH2 domain interacts with the second tyrosine of the CD3ε ITAM, when this tyrosine is phosphorylated.[65] The functions of Nck-CD3 interaction is not well understood. A knock-in mouse strain was generated in which the CD3ε PRS was replaced with another sequence, abolishing the binding to the SH3.1 domain of Nck, but most likely also to Numb (see below).[67] The fact that Nck is a positive and Numb a negative regulator of signaling, might explain why the phenotype of the mutant T cells was mild. To only block the Nck-CD3 interaction, another knock-in mouse line with point mutations of the two central prolines of the PxxP motif of CD3ε PRS to alanine has been generated.[68] Indeed, T cells from these knock-in mice do not recruit Nck to the TCR upon stimulation. In addition, this mutation is accompanied with impaired CD3ζ

phosphorylation, decreased ZAP-70 recruitment to the TCR-CD3 complex as well as impaired ZAP-70 phosphorylation.[68] Moreover, the SH3.2 domain of Nck can bind to a proline motif in the unique domain of Lck.[69] Recently, another adaptor protein called the T cell Specific Adaptor protein (TSAd) was identified that interacts with the Src family of proteins including Lck and promotes actin polymerization via interaction with Nck.[69] Nck and Lck contain multiple binding sites on TSAd. The Nck SH2 interacts with phospho-TSAd whereas the Nck SH3.1 and SH3.3 interact with TSAd PRS. The SH2 Lck binds to phospho-TSAd and the Lck SH3 binds to the TSAd PRS. Taken together, Nck recruitment to the TCR-CD3 complex may also bring Lck to TCR.

Interestingly, the importance of the Nck-CD3 interaction might depend on the antigen quality, since this interaction was critical for stimulation of T cells with strong (high affinity) antigens, but not with weak (low affinity) antigens.[70] Foreign antigen are often of high affinity and self antigen of low affinity.[71] Thus, the requirement of Nck-recruitment for T cell activation only by low (and not by high) affinity antigens has raised the possibility for inhibition of the Nck-CD3 interaction as a target for treatment of autoimmune diseases caused by self-reactive T cells. Borroto and co-workers have chemically generated a low-molecular weight inhibitor targeting a non-canonical pocket within the Nck SH3.1 domain.[72] As expected, this inhibitor prevented the binding of Nck to the TCR-CD3 complex. T cell activation in response to low-affinity antigens was strongly inhibited by this inhibitor, as seen in mouse models for psoriasis, asthma and multiple sclerosis. Interestingly, the T cell response to a mouse pathogen acting as a strong high affinity peptide was normal after treatment with this inhibitor. Altogether, these results indicate that this synthetic inhibitor could be a candidate to be evaluated in clinical trials to treat various T cell-mediated autoimmune diseases.[72]

WASP

WASP belongs to the WASP family of proteins consisting of WASP, N-WASP, and WAVE/SCAR molecules.[73] Mutation of WASP or lack of WASP expression causes the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), which is characterized by thrombocytopenia, eczema, increased susceptibility to infection and increased risk to develop autoimmune disease.[20, 73-74] WASP contains a WASP homology I domain, a basic domain, a PRS, a GTPase-binding domain and verprolin homology domain-cofilin homology domain-acidic region (VCA) domain (Fig. 1D). These domains are required for binding to different cytoskeleton-regulating proteins. For instance, the GTPase-binding domain binds CDC42[74], whereas the PRS acts as a binding site for various SH3-containing proteins such as Nck.[75] The function of WASP at the SLP-76 signalosome in regulating actin skeleton dynamics is well described.[76]

Since WASP is the binding partner of Nck,[77] we tested whether recruitment of Nck to the TCR-CD3 complex may also bring WASP to the TCR-CD3. We found that WASP is co-immunoprecipitated with the TCR-CD3 complex after T cell activation.[78] However, whether this was mediated by Nck is not known. Although the function of WASP recruitment to the TCR-CD3 complex has not been investigated, these results

suggest that there would be an alternative pathway of WASP (besides the SLP-76 signalosome) to regulate actin reorganization in the vicinity of the TCR-CD3 complex.

Numb

Numb is an adaptor protein that regulates receptor internalization. Numb is up-regulated in the active phase of multiple sclerosis[79] and type-1 diabetes.[80] Two homologues of Numb including Numb and Numb-like have been identified in mammals.[81] Numb is composed of a phosphotyrosine binding (PTB) domain, several proline-rich regions at the center of the molecule and two tri-peptide motifs (Fig 1E).[81] Numb is involved in the development of murine thymocytes by regulating pre-TCR signalling.[82] In addition, Numb may control TCR signalling in mature T cells. Constitutive expression of CD69 and interferon–γ (IFN-γ) as well as constitutively phosphorylated Erk found in the $CD4^+$ T cells from dominant negative Numb (dnNb) transgenic mice. Upon stimulation, $CD4^+$ T cells from these mice exhibit higher Erk, ZAP-70, and Akt phosphorylation than those of the wild-type mice, indicating that Numb may be required for a negative control of TCR-mediated signal transduction.[83] It was suggested that Numb plays a role in TCR degradation by simultaneously binding to both Cbl and a site within CD3ε that overlaps with the Nck binding site, thus mediating TCR degradation.[84]

Numb can bind with its PTB domain to the cytoplasmic tail of CD3ε within the PRS to the sequence NPDY.[83] Indeed, an endocytosis motif in CD3ε in this region had been identified earlier,[85] suggesting that Numb might be involved in TCR-CD3 endocytosis. Interestingly, Numb was suggested to constitutively associate with CD3ε. So far, not much is known about the order of binding of the TCR-CD3 binding partners. Here, we propose that in resting T cells, CD3ε is occupied with Numb that impedes TCR signalling. Upon TCR ligation, a conformational change of the CD3ε may result in the release of Numb and exposure of the CD3ε PRS, which is the site that interacts with Nck. Recruitment of Nck to the TCR also brings Lck to the TCR to facilitate ITAM phosphorylation. Full ITAM phosphorylation then releases Nck so that ZAP-70 can bind. Once the TCR signal is transmitted, ZAP-70 is replaced by Numb to mediate TCR degradation and these cause a deviation of T cell activation. However, further studies are required to elucidate the mechanism underlying Numb-regulated TCR signalling and the related TCR degradation pathways.

Conclusion

TCR-CD3 complex is the key molecule to initiate biochemical events in T cell activation and differentiation that can lead to different outcomes, depending on the quantity and quality of the stimulus. Nevertheless, how stimulation of the TCR-CD3 complex can give rise to distinct outcomes still remains unclear. Based on the recent findings, we propose that distinct outcomes may be due to the different interaction partners to be recruited to the TCR-CD3 complex upon TCR-CD3 engagement (Fig. 2).

These protein partners are involved in both enhance and decrease of TCR signalling and in different downstream signalling pathways. Lck can interact directly or indirectly with the TCR-CD3 complex and phosphorylate the ITAMs to initiate signal transduction. ZAP-70 directly interacts with the TCR-CD3 complex upon CD3 phosphorylation and activates downstream signaling cascades. Nck is recruited to CD3ε and might co-recruit Lck and WASP to the TCR-CD3 complex. TCR-CD3-recruited WASP might control actin reorganization at TCR-CD3. Numb is a new binding partner of TCR-CD3 complex and participates in TCR degradation to lessen TCR signalling after T cell stimulation. However, the exact molecular mechanisms underlying the dynamic distributions of these proteins into and out from the TCR-CD3 complex still need further clarification.

Acknowledgements

J.N. received research grants from Naresuan University (no. R2559B064) and the Thailand Research Fund (TRG5880030). S.P. received research grants from Naresuan University (no. R2559B025) and the Thailand Research Fund (RSA5880009). Further, this work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) through EXC294 (Center for Biological Signalling Studies, BIOSS) to W.W.S..

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

1 Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**:257-69.

2 Acuto O, Di Bartolo V, Michel F. Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:699-712.

3 Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 2013; **38**:633-43.

4 Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**:591-619.

5 Kane LP, Lin J, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**:242-9.

6 Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signalling properties? *Immunol Today* 1997; **18**:565-9.

7 Alarcón B, Gil D, Delgado P, Schamel WW. Initiation of TCR signalling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev* 2003; **191**:38-46.

8 Dong G, Kalifa R, Nath PR, Gelkop S, Isakov N. TCR crosslinking promotes Crk adaptor protein binding to tyrosine-phosphorylated CD3ζ chain. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; **488**:541-46.

9 Love PE, Hayes SM. ITAM-mediated signalling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 2010; **2**:a002485.

10 de Aós I, Metzger MH, Exley M, Dahl CE, Misra S, Zheng D, *et al.* Tyrosine phosphorylate ion of the CD3-ε subunit of the T cell antigen receptor mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 1997; **272**:25310-8.

11 DeFord-Watts LM, Young JA, Pitcher LA, van Oers NS. The membrane-proximal portion of CD3 ε associates with the serine/threonine kinase GRK2. *J Biol Chem* 2007; **282**:16126-34.

12 Delgado P, Cubelos B, Calleja E, Martínez-Martín N, Ciprés A, Mérida I, *et al.* Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signalling. *Nat Immunol* 2009; **10**:880-8.

13 Borrotto A, Abia D, Alarcon B. Crammed signaling motifs in the T-cell receptor. *Immunol Lett* 2014; **161**:113-7.

14 Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol* 2012; **13**:121-8.

15 von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol* 2010; **11**:14-20.

16 Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003; **426**:454–60.

17 Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signalling and $CD8^+$ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 1994; **76**:947-58.

18 Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, *et al.* Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* 1994; **264**:1596-9.

19 Roifman CM, Dadi H, Somech R, Nahum A, Sharfe N. Characterization of ζ-associated protein, 70 kd (ZAP70)-deficient human lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **126**:1226-33.

20 Wu J, Liu D, Tu W, Song W, Zhao X. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135**:209-16.

21 Skapenko A, Leipe J, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(Suppl 2):S4-14.

22 van Oers NS, Killeen N, Weiss A. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* 1996; **183**:1053–62.

23 Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; **263**:1136–9.

24 Schröder AJ, Quehl P, Müller J, Samstag Y. Conversion of p56(lck) to p60(lck) in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through

accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinases in vivo. *Eur J Immunol* 2000; **30**:635-43.

25 Joung I, Kim T, Stolz LA, Payne G, Winkler DG, Walsh CT, *et al.* Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5778–82.

26 Rossy J, Williamson DJ, Gaus K. How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol* 2012; **19**:3:167.

27 Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004; **23**:7918–27.

28 Filipp D, Ballek O, Manning J. Lck, membrane microdomains, and TCR triggering machinery: defining the new rules of engagement. *Front Immunol* 2010; **3**:155.

29 Kim PW, Sun ZY, Blacklow SC, Wagner G, Eck MJ. A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science* 2003; **301**:1725-28.

30 Nika K, Soldani C, Salek M, Paster W, Gray A, Etzensperger R, *et al.* Constitutively active Lck kinase in T cells drives antigen receptor signal transduction. *Immunity* 2010; **32**:766–77.

31 Stirnweiss A, Hartig R, Gieseler S, Lindquist JA, Reichardt P, Philipsen L, *et al.* T cell activation results in conformational changes in the Src family kinase Lck to induce its activation. *Sci Signal* 2013; **6**:ra13.

32 Philipsen L, Reddycheria AV, Hartig R, Gumz J, Kastle M, Kritikos A, *et al.* De novo phosphorylation and conformational opening of the tyrosine kinase Lck act in concert to initiate T cell receptor signaling. *Sci Signal* 2017;10: pii: eaaf4736.

33 Xu H, Littman DR. A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 1993; **74**:633-43.

34 Casas J, Brzostek J, Zarnitsyna VI, Hong JS, Wei Q, Hoerter JA, *et al.* Ligand-engaged TCR is triggered by Lck not associated with CD8 coreceptor. *Nat Commun* 2014; **5**:5624.

35 Rossy J, Owen DM, Williamson DJ, Yang Z, Gaus K. Conformational states of the kinase Lck regulate clustering in early T cell signalling. *Nat Immunol* 2013; **14**:82-9.

36 Stefanová I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003; **4**:248-54.

37 Chae HD, Siefring JE, Hildeman DA, Gu Y, Williams DA. RhoH regulates subcellular localization of ZAP-70 and Lck in T cell receptor signalling. *PLoS One* 2010; **5**:e13970.

38 Straus DB, Chan AC, Patai B, Weiss A. SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J Biol Chem* 1996; **271**:9976-81.

39 Sheng R, Jung DJ, Silkov A, Kim H, Singaram I, Wang ZG, *et al.* Lipids Regulate Lck Protein Activity through Their Interactions with the Lck Src Homology 2 Domain. *J Biol Chem* 2016; **291**:17639-50.

40 Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sánchez-Madrid F, Alarcón B. Recruitment of Nck by CD3ε reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signalling and synapse formation. *Cell* 2002; **109**:901–12.

41 Minguet S, Swamy M, Alarcon B, Luescher IF, Schamel WW. Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity* 2007; **26**:43-54.

42 Swamy M, Beck-Garcia K, Beck-Garcia E, Hartl FA, Morath A, Yousefi OS, *et al.* A cholesterol-based allostery model of T cell receptor phosphorylation. *Immunity* 2016; **44**:1091-101.

43 Kamens JS, Ratnofsky SE, Hirst GC. Lck inhibitors as a therapeutic approach to autoimmune disease and transplant rejection. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; **2**:1213–9.

44 Bhagwat SS. Kinase inhibitors for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders. *Purinergic Signal* 2009; **5**:107–15.

45 Waegell W, Babineau M, Hart M, Dixon K, McRae B, Wallace C, *et al.* A420983, a novel, small molecule inhibitor of LCK prevents allograft rejection. *Transplant Proc* 2002; **34**:1411-7.

46 Burchat A, Borhani DW, Calderwood DJ, Hirst GC, Li B, Stachlewitz RF. Discovery of A-770041, a src-family selective orally active lck inhibitor that prevents organ allograft rejection. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**:118-22.

47 Maier JA, Brugel TA, Sabat M, Golebiowski A, Laufersweiler MJ, VanRens JC, *et al.* Development of N-4,6-pyrimidine-N-alkyl-N'-phenyl ureas as orally active inhibitors of lymphocyte specific tyrosine kinase. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**: 3646-50.

48 Chan AY, Punwani D, Kadlecek TA, Cowan MJ, Olson JL, Mathes EF, *et al.* A novel human autoimmune syndrome caused by combined hypomorphic and activating mutations in ZAP-70. *J Exp Med* 2016; **213**:155-65.

49 Wang H, Kadlecek TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS, *et al.* ZAP-70: an essential kinase in T-cell signalling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**:a002279.

50 Yan Q, Barros T, Visperas PR, Deindl S, Kadlecek TA, Weiss A, *et al.* Structural basis for activation of ZAP-70 by phosphorylation of the SH2-kinase linker. *Mol Cell Biol* 2013; **33**:2188-201.

51 Brdicka T, Kadlecek TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2005; **25**:4924–33.

52 Klammt C, Novotná L, Li DT, Wolf M, Blount A, Zhang K, *et al.* T cell receptor dwell times control the kinase activity of Zap70. *Nat Immunol* 2015; **16**:961-9.

53 Di Bartolo V, Mège D, Germain V, Pelosi M, Dufour E, Michel F, *et al.* Tyrosine 319, a newly identified phosphorylation site of ZAP-70, plays a critical role in T cell antigen receptor signalling. *J Biol Chem* 1999; **274**:6285-94.

54 Williams BL, Irvin BJ, Sutor SL, Chini CC, Yacyshyn E, Bubeck Wardenburg J, *et al.* Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-γ1 and Ras activation. *EMBO J* 1999; **18**:1832-44.

55 Katz ZB, Novotná L, Blount A, Lillemeier BF. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat Immunol* 2017; **18**:86-95.

56 Tomlinson MG, Lin J, Weiss A. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signalling. *Immunol Today* 2000; **21**:584–91.

57 Visperas PR, Wilson CG, Winger JA, Yan Q, Lin K, Arkin MR, *et al.* Identification of inhibitors of the association of ZAP-70 with the T cell receptor by high-throughput screen. *SLAS Discov* 2017; **22**:324-31.

58 Kaur M, Singh M, Silakari O. Insight into the therapeutic aspects of 'Zeta-chain associated protein kinase 70 kDa' inhibitors: a review. *Cell Signal* 2014; **26**:2481-92.

59 Mukhopadhyay H, Cordoba SP, Maini PK, van der Merwe PA, Dushek O. Systems model of T cell receptor proximal signaling reveals emergent ultrasensitivity. *PLos Comput Biol* 2013; **9**:e1003004.

60 Guy CS, Vignali KM, Temirov J, Bettini ML, Overacre AE, Smeltzer M, *et al.* Distinct TCR signaling pathways drive proliferation and cytokine production in T cells. *Nat Immunol* 2013; **14**:262-70.

61 Holst J, Wang H, Eder KD, Workman CJ, Boyd KL, Baquet Z, *et al.* Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevent autoimmunity. *Nat Immunol* 2008; **9**:658-66.

62 Lettau M, Pieper J, Janssen O. Nck adapter proteins: functional versatility in T cells. *Cell Commun Signal* 2009; **7**:1.

63 Ngoenkam J, Paensuwan P, Preechanukul K, Khamsri B, Yiemwattana I, Beck-García E, *et al.* Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. *Cell Commun Signal* 2014; **12**:21.

64 Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:233-59.

65 Paensuwan P, Hartl FA, Yousefi OS, Ngoenkam J, Wipa P, Beck-Garcia E, *et al.* Nck Binds to the T Cell Antigen Receptor Using Its SH3.1 and SH2 Domains in a Cooperative Manner, Promoting TCR Functioning. *J Immunol* 2016; **196**:448-58.

66 Kesti T, Ruppelt A, Wang JH, Liss M, Wagner R, Tasken K, et al. Reciprocal regulation of SH3 and SH2 domain binding via tyrosine phosphorylation of a common site in CD3epsilon. *J Immunol* 2007; **179**:878-85.

67 Anderson AC, Kitchens EA, Chan SW, St Hill C, Jan YN, Zhong W, *et al.* The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways. *J Immunol* 2005; **174**: 890-7.

68 Borroto A, Arellano I, Dopfer EP, Prouza M, Suchanek M, Fuentes M, *et al.* Nck recruitment to the TCR required for ZAP70 activation during thymic development. *J Immunol* 2013; **190**:1103-12.

69 Hem CD, Sundvold-Gjerstad V, Granum S, Koll L, Abrahamsen G, Buday L, *et al.* T cell specific adaptor protein (TSAd) promotes interaction of Nck with Lck and SLP-76 in T cells. *Cell Commun Signal* 2015; **13**:31.

70 Borrotto A, Arellano I, Blanco R, Fuentes M, Orfao A, Dopfer EP, *et al.* Relevance of Nck-CD3 epsilon interaction for T cell activation in vivo. *J Immunol* 2014; **192**:2042-53.

71 Morris GP, Allen PM. How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat Immunol* 2012; **13**:121-8.

72 Borrotto A, Reyes-Garau D, Jimenez MA, Carrasco E, Moreno B, Martinez-Pasamar S, *et al.* First-in-class inhibitor of the T cell receptor for the treatment of autoimmune diseases. *Sci Transl Med* 2016; 8:370ra184.

73 Schurman SH, Candotti F. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2003; **15**:446-53.

74 Vignesh P, Suri D, Rawat A, Lau YL, Bhatia A, Das A, *et al.* Sclerosing cholangitis and intracranial lymphoma in a child with classical Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2017; **64**:106-9.

75 Miki H, Miura K, Takenewa T. N-WASP, a novel actin depolymerization protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream.of tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; **15**:5326-35.

76 Zeng R, Cannon JL, Abramham RT, Way M, Billadeau DD, Bubeck-Wardenberg J, Burkhardt JK. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 2003; **171**:1360-8.

77 Chaki SP, Rivera GM. Integration of signaling and cytoskeletal remodeling by Nck in directional cell migration. *Bioarchitecture* 2013; 3:57-63.

78 Paensuwan P, Ngoenkam J, Khamsri B, Preechanukul K, Sanguansermsri D, Pongcharoen S. Evidence for inducible recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein to T cell receptor-CD3 complex in Jurkat T cells. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2015; 33:189-95.

79 Verdi JM, Schmandt R, Bashirullah A, Jacob S, Salvino R, Craig CG, *et al.* *Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signalling adapter protein that specifies cell fate. Curr Biol* 1996; **6**:1134-45.

80 Yang M, Ye L, Wang B, Gao J, Liu R, Hong J, *et al.* Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients 1miR-146. *J Diabetes* 2015; **7**:158-65.

81 Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res* 2010; **316**:900-6.

82 Martin-Blanco NM, Checquolo S, Del Gaudio F, Palermo R, Franciosa G, Di Marcotullio L, *et al*. Numb-dependent integration of pre-TCR and p53 function in T-cell precursor development. *Cell Death Dis* 2014; **5**:e1472.

83 Aguado R, Martin-Blanco N, Caraballo M, Canelles M. The endocytic adaptor Numb regulates thymus size by modulating pre-TCR signaling during asymmetric division. *Blood* 2010; **116**:1705-14.

84 Martin-Blanco N, Jimenez Teja D, Bretones G, Borroto A, Caraballo M, Screpanti I, *et al*. CD3ε recruits Numb to promote TCR degradation. *Int Immunol* 2016; **28**:127-37.

85 Alcover A, Alarcon B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 2000; **20**:325-46.

86 Granum S, Sundvold-Gjerstad V, Gopalakrishnan RP, Berge T, Koll L, Abrahamsen G, *et al*. The kinase Itk and the adaptor TSAd change the specificity of the kinase Lck in T cells by promoting the phosphorylation of Tyr192. *Sci Signal* 2014; **7**:ra118.

87 D'Oro U, Sakaguchi K, Appella E, Ashwell JD. Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. *Mol Cell Biol* 1996; **16**:4996-5003.

88 Wu J, Zhao Q, Kurosaki T, Weiss A, The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J Exp Med* 1997; **185**:1877-82.

89 Deindl S, Kadlecek TA, Cao X, Kuriyan J, Weiss A. Stability of an autoinhibitory interface in the structure of the tyrosine kinase ZAP-70 impacts T cell receptor response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:20699-704.

90 Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, *et al*. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J* 1995; **14**:2499-508.

91 Miyoshi-Akiyama T, Aleman LM, Smith JM, Adler CE, Mayer BJ. Regulation of Cbl phosphorylation by the Abl tyrosine kinase and the Nck SH2/SH3 adaptor. *Oncogene* 2001; **20**:4058-69.

92 Lettau M, Kliche S, Kabelitz D, Janssen O. The adaptor proteins ADAP and Nck cooperate in T cell adhesion. *Mol Immunol* 2014; **60**:72-9.

93 Silvin C, Belisle B, Abo A. A role for Wiskott-Aldrich syndrome protein in T-cell receptor-mediated transcriptional activation independent of actin polymerization. *J Biol Chem* 2001; **276**:21450-7.

94 Jain N, Tan JH, Feng S, George B, Thanabalu T. X-linked thrombocytopenia causing mutations in WASP (L46P and A47D) impair T cell chemotaxis. *J Biomed Sci* 2014; **21**:91.

Figure legends

Figure 1. Modular composition of proteins associated with the TCR-CD3 complex. **A)** Lck consists of a Src homology 4 (SH4) domain, a unique domain, an SH3 and SH2 domain, the catalytic domain and a C-terminal region. The serine (S) and tyrosines (Y) depicted can be phosphorylated upon TCR-CD3 ligation. **B)** ZAP-70 contains an N-terminal SH2 domain, an interdomain A (IA), a carboxy-terminal SH2 domain, an interdomain B (IB) and the kinase domain. The tyrosine residues indicated can be phosphorylated upon TCR-CD3 triggering. **C)** Nck family has two members, Nck1 and Nck2, both being composed of three SH3 domains and a C-terminal SH2 domain. **D)** WASP consists of a WH1 (WASP homology 1) and basic domain, followed by a GTPase-binding domain (GBD), a proline-rich sequence (PRS), and verprolin homology domain-cofilin homology domain-acidic region domains (VCA). **E)** Numb contains a phospho-tyrosine binding (PTB) domain, two PRSs and DPF (Asp-Pro-Phe) and NPF (Asn-Pro-Phe) tri-peptide motifs at the C-terminus.

Figure 2. Selected signalling proteins at TCR-CD3 complex. TCR-CD3 ligation induces a conformational change of CD3ε, leading to the exposure of its proline-rich sequence (PRS). Nck is then recruited to the PRS within the cytoplasmic tail of the CD3ε. Subsequently, Lck is associated with Nck upon TCR activation. Thus, Nck recruitment to TCR may also bring Lck to TCR-CD3 complex to mediate phosphorylation of ITAM motif. In addition, Lck can directly interact with phospho-ITAM. When the second tyrosine of the CD3ε ITAM is phosphorylated, Nck can bind with CD3ε using its SH3.1 and SH2 domains in a co-operative manner. In proximity to TCR-CD3 complex, Lck phosphorylates tyrosines in each ITAM of the CD3 chains. ZAP-70 is then recruited to bind to the phosphor-ITAMs, where ZAP-70 itself is phosphorylated by Lck. WASP can be associated with Nck upon TCR activation to regulate actin polymerization. Numb can be associated with the CD3ε to regulate in TCR degradation leading to a decrease in TCR signalling

Table 1: Selected proteins interacting with the TCR-CD3 complex

Proteins associated with TCR-CD3	Binding domain of the associated protein	Binding motif of the TCR-CD3	Effect on TCR signaling	Reference
Lck	SH2	Phospho-ITAM	Enhancement	22
ZAP-70	SH2	Phospho-ITAM	Enhancement	51
Nck	SH3.1 and SH2	Proline-rich sequence (PRS) and Phospho-ITAM within CD3ε	Enhancement	24-25
WASP	SH3 domain bind to Nck	Indirect via Nck	Unknown	26
Numb	Phosphotyrosine binding (PTB) domain	NPDY motif within CD3ε	Decrease	85

Table 2: Mutations of TCR-CD3 binding proteins with their effects on TCR signalling

TCR-CD3 binding proteins	Mutations	Effects on TCR signalling	References
Lck	R154K (SH2 mutant)	Inhibits Lck association with ZAP-70 and CD3ζ	38
	Y192F	Inhibits Lck association with TSAd, Itk, Pyk2 and SHP-1 and enhances tyrosine-phosphorylated proteins	86
	Y394F	Closed conformation with decreased kinase activity	35, 87
	Y505F	Open conformation with increased enzymatic activity	35, 87
	Y505F,K273R	Open conformation but lacking kinase activity	35
ZAP70	Y315F	Inhibition of Vav-ZAP-70 interaction and reduction of tyrosine phosphorylation	88
	Y319F	Impairment of Ca^{2+} mobilization, Ras activation and activation of PLCγ1	54
	W131A	Increases kinase activity of ZAP-70	89
	Y315,319A	Open conformation with increased kinase activity of ZAP-70	51
	Y315,319F	Closed conformation with ZAP-70 kinase inactive	51
	D461N	Inactivates the kinase domain known as 'kinase dead'	50
	Y493F	Inactivates ZAP-70 catalytically activity	90
Nck	Nck1(W38K) (SH3.1 mutant)	Impairs the binding of Nck1 to CD3ε and decreases Erk1/2 activation	65
	Nck1(W143K) (SH3.2 mutant)	Impairs the binding of Nck1 to Cbl	91

	Nck1(W229K) (SH3.3 mutant) S	Impairs the expression of CD69 expression and Erk1/2 phosphorylation	63
	Nck1(R308K) (SH2 mutant)	Impairs the binding of Nck1 to CD3ε Abrogates the binding of Nck1 to ADAP	65, 92
WASP	WASPΔC (deletion of amino acids 444–502 at C terminus)	Inhibits actin polymerization but enhances the activation of NFAT transcription factor and ERK phosphorylation human T cells	93
	L46P (WH1 mutant)	Impairs the chemotactic migration of human T cells and actin cytoskeleton reorganization	94
	A47D (WH1 mutant)	Impairs the chemotactic migration of human T cells and actin cytoskeleton reorganization	94
Numb	ΔNumb (condition deletion of *Numb*)	Normal CD3ζ phosphorylation in murine T cells.	67

Figure 1

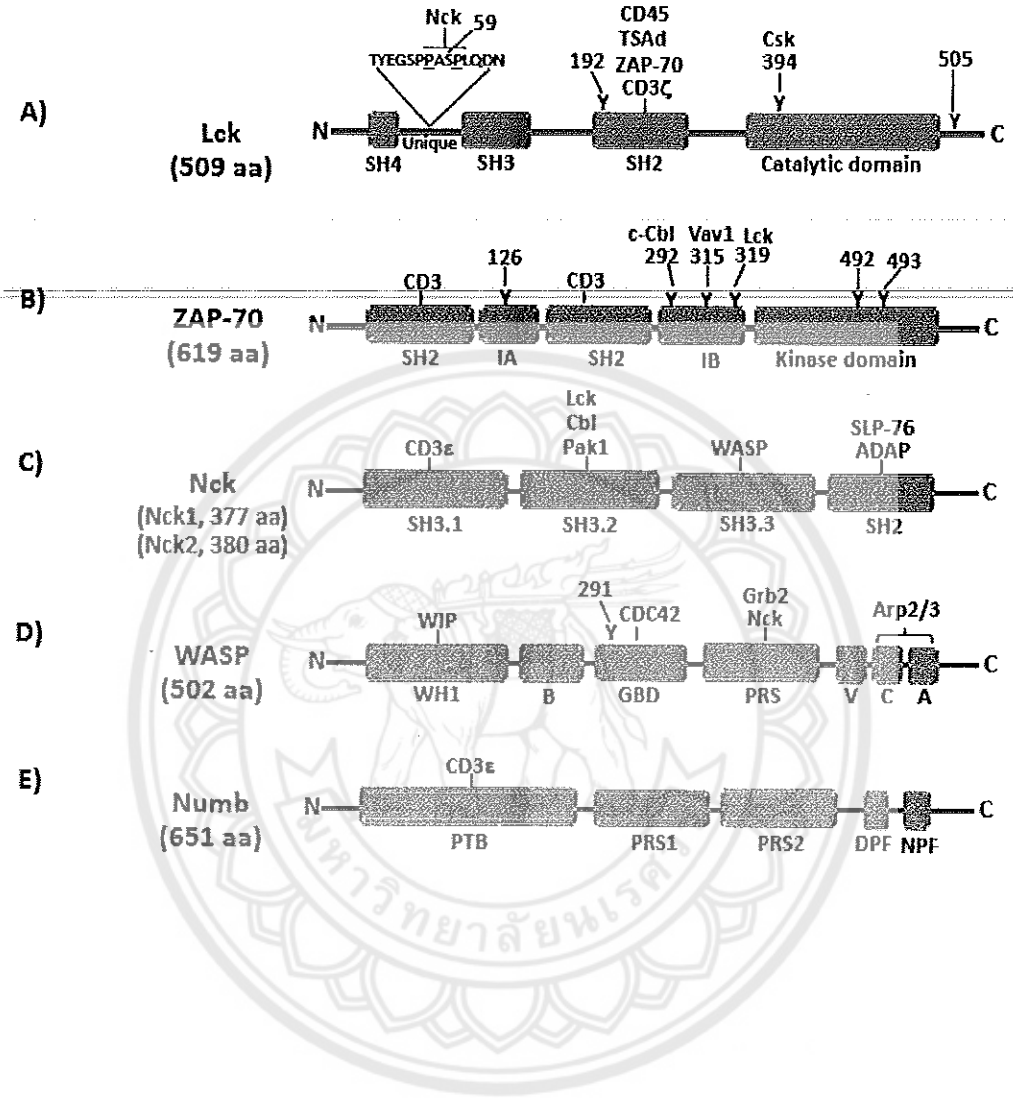
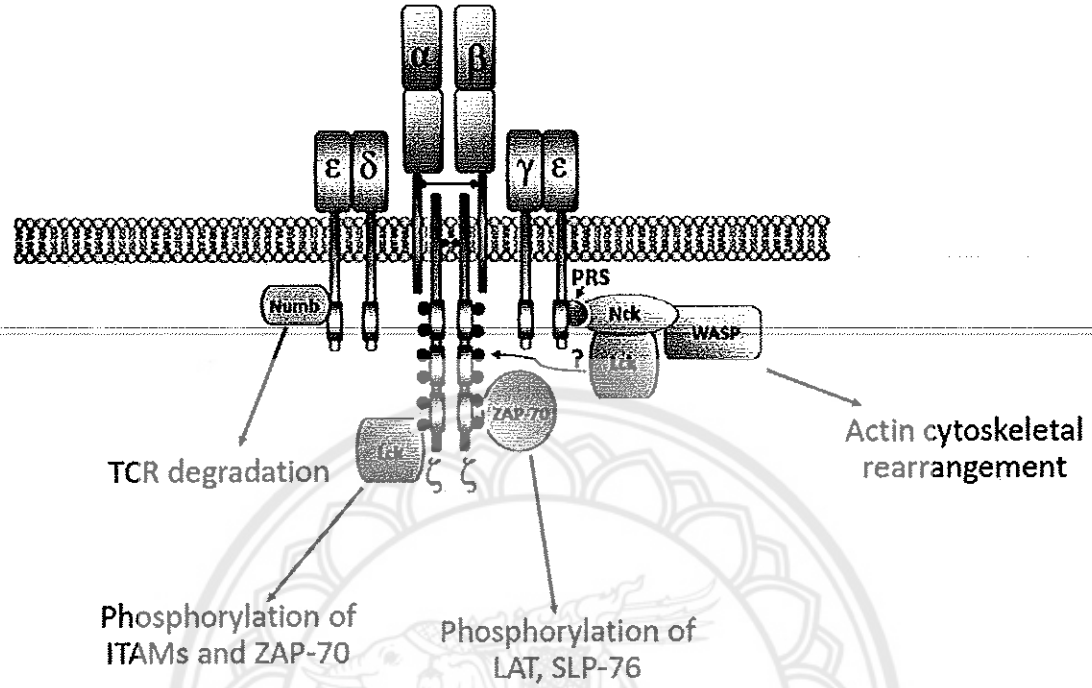

A)
Lck
(509 aa)
Nck 59
TYEGSPPASPLQDN
CD45
TSAd
192 ZAP-70
CD3ζ
Csk
394
505
N
C
Unique
SH4
SH3
SH2
Catalytic domain
B)
ZAP-70
(619 aa)
CD3
126
CD3
c-Cbl Vav1 Lck
292 315 319
492 493
SH2
IA
SH2
IB
Kinase domain
C)
Nck
(Nck1, 377 aa)
(Nck2, 380 aa)
CD3ε
Lck
Cbl
Pak1
WASP
SLP-76
ADAP
SH3.1
SH3.2
SH3.3
SH2
D)
WASP
(502 aa)
WIP
291
CDC42
Grb2
Nck
Arp2/3
WH1
B
GBD
PRS
V
C
A
E)
Numb
(651 aa)
CD3ε
PTB
PRS1
PRS2
DPF
NPF

Figure 2


α
β
ε
δ
γ
ε
PRS
Nck
WASP
Nck
?
Numb
ZAP-70
ζ
ζ
TCR degradation
Actin cytoskeletal rearrangement
Phosphorylation of ITAMs and ZAP-70
Phosphorylation of LAT, SLP-76

ผลที่ได้รับของโครงการเทียบกับตัวชี้วัดที่สัญญาไว้

ที่	ประเภทผลงาน	เป้าหมาย	ทำได้จริง
1	ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor	1	1
2	ถ่ายทอดผลงานวิจัย / เทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมายและได้รับการรับรองการใช้ประโยชน์จากหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง (ทั้งหมดรวม ..... คน)	50	950
จำนวนตัวบ่งชี้ที่สัญญาไว้		2	
จำนวนตัวบ่งชี้ที่ทำได้จริง		2	
ร้อยละที่ทำได้จริง		2/2*100= 100%	

หลักฐาน

2. Ngoenkam, J., Schamel, W., Pongcharoen, S. (2017) Selected signaling proteins recruited to the T cell receptor-CD3 complex. Immunology. doi:10.1111/imm.12809. (Impact factor : 3.701)

3. นำเสนองานวิจัยแบบโปสเตอร์ที่งานประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 16" ระหว่างวันที่ 11-13 มกราคม 2560 ณ โรงแรมเดอะรีเจ้นท์ ชะอำบีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี มีผู้ร่วมประชุมจำนวน 950 คน

ตารางเปรียบเทียบ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่ดำเนินงานได้จริง

กิจกรรม	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ	การดำเนินงาน	
		ได้	ไม่ได้
1. การศึกษาการเกิด phosphorylation ของ CD3ε, TCRζ, Lck และ ZAP-70 ใน Jurkat ที่ถูกลดการแสดงออกของ Nck1, Nck2 หรือ ทั้ง Nck1 และ Nck2	ทราบถึงความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการเกิด tyrosine phosphorylation ของโปรตีน CD3ε, TCRζ, Lck และ ZAP-70	✓	
2. การศึกษาความสำคัญของโปรตีน Nck ต่อการดึง Lck และ ZAP-70 มายัง TCR-CD3 complex ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation	ได้ทราบว่า Nck มีความสำคัญต่อการดึง Lck และ ZAP-70 มายัง TCR-CD3 complex หรือไม่ และ Nck isoform ใดมีความสำคัญกว่ากัน	✓	
3. รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	ได้รายงายฉบับสมบูรณ์	✓	
4. รวบรวมผลการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลและจัดเตรียม manuscript เกี่ยวกับเรื่อง The requirement of adaptor protein Nck in activation of TCR-proximal signaling เพื่อ submit ต่อวารสารระดับนานาชาติ และเผยแพร่งานวิจัยในงานประชุมวิชาการ	ได้ manuscript เกี่ยวกับเรื่อง The requirement of adaptor protein Nck in activation of TCR-proximal signaling และ submit ต่อวารสารระดับนานาชาติ	✓	
5. ปรับแก้ไข manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ	✓	

จากกิจกรรมที่วางแผนไว้ เทียบกับกิจกรรมที่ทำได้จริงพบว่า สามารถทำได้ทุกกิจกรรม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำกิจกรรมอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือ และมีความลุ่มลึกในศาสตร์ของชีววิทยาการกระตุ้น T cell