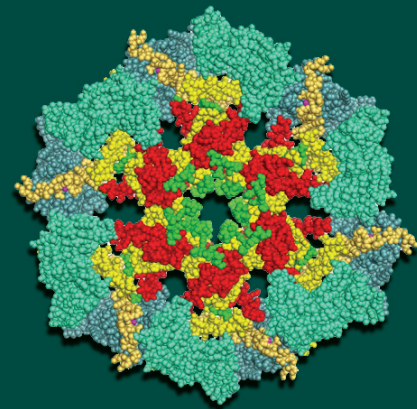


7

Πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και Πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr



1. Ταξινόμηση, δομή και χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών κινάσων Ser/Thr

- 1.1 Γενική ταξινόμηση και λειτουργία των πρωτεϊνικών κινάσων
- 1.2 Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινάσων Ser/Thr
- 1.3 Κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνικών κινάσων
- 1.4 Εξειδίκευση των πρωτεϊνικών κινάσων ως προς το υπόστρωμα
- 1.5 Ρύθμιση της δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινάσων

2. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)

- 2.1 Δομή και εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα της PKA
- 2.2 Ρύθμιση της PKA
- 2.3 AKAPs
- 2.4 Ο ρόλος της PKA στη φυσιολογία του κυττάρου

3. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

- 3.1 Ταξινόμηση
- 3.2 Δομή
- 3.3 Διέγερση από φορβολεστέρες
- 3.4 Ρύθμιση της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C
- 3.5 Λειτουργίες και υποστρώματα των PKCs
- 3.6 Ο ρόλος της PKC στον κυτταρικό μετασχηματισμό

4. Πρωτεϊνική κινάση B (PKB) ή Akt

- 4.1 Ταξινόμηση
- 4.2 Δομή
- 4.3 Ενεργοποίηση της PKB/ Akt και στόχοι
- 4.4 PKB/Akt, αναστολή της απόπτωσης και πρόοδος του κυτταρικού κύκλου
- 4.5 Η PKB/Akt ως μεσολαβητής της δράσης της ινσουλίνης

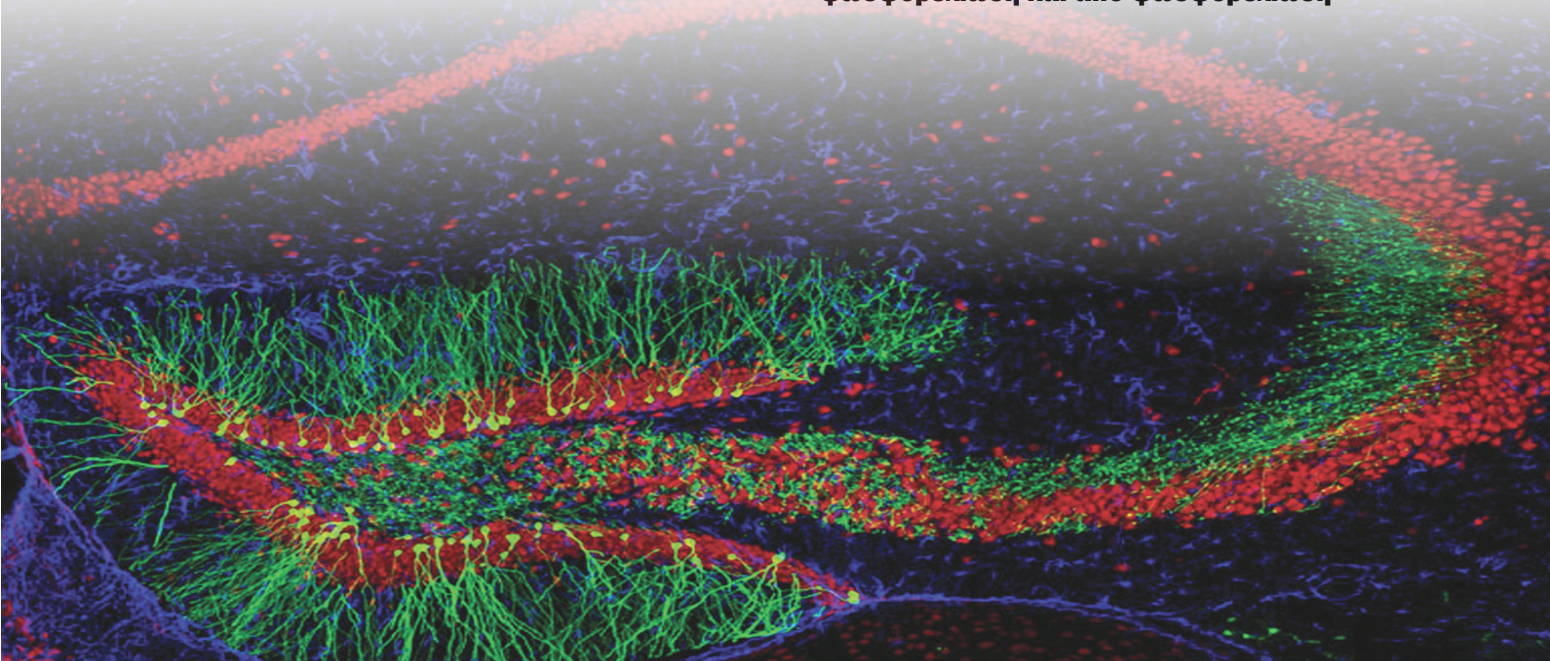
5. Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη

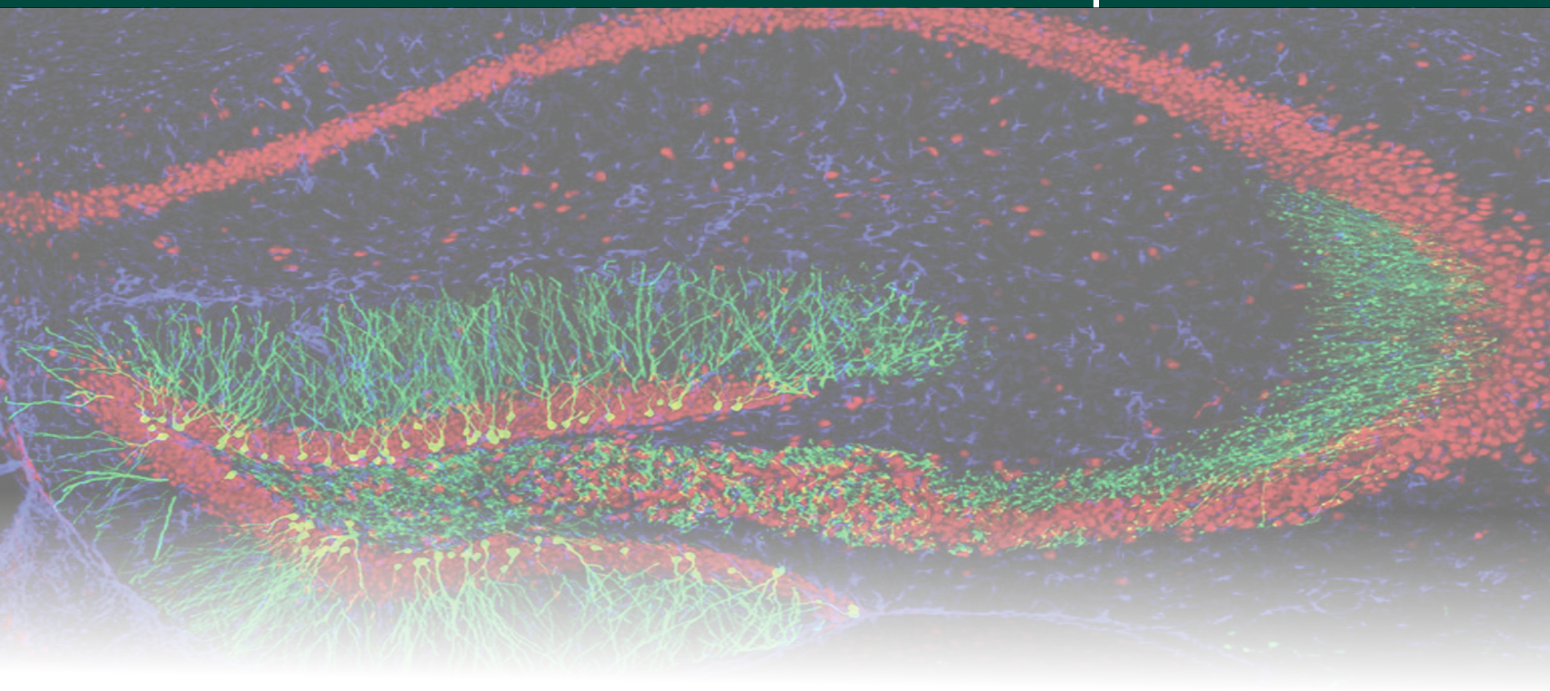
- 5.1 Η κινάση της φωσφορυλάσης και η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου
- 5.2 Η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK)
- 5.3 Κινάση του παράγοντα eEF2 (eEF2K)
- 5.4 CaM κινάση II (CaMK-II)

6. Πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr

- 6.1 Δομή και ταξινόμηση των φωσφατάσων Ser/Thr
- 6.2 Οι ρυθμιστικές υπομονάδες των PPPs
- 6.3 Ρύθμιση των πρωτεϊνικών φωσφατάσων Ser/Thr
- 6.4 Πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1)
- 6.5 Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)
- 6.6 Πρωτεϊνική φωσφατάση 2B (PP2B – καλσινευρίνη)

7. Γενικές αρχές της ρύθμισης των ενζύμων με φωσφορυλίωση και απο-φωσφορυλίωση





1. Ταξινόμηση, δομή και χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών κινάσων Ser/Thr

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αρχή για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων και των σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Μέσω αυτής της λειτουργίας, οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες παίζουν βασικούς ρόλους στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στην έκφραση γονιδίων, στην κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση και διαφοροποίηση.

Σχεδόν όλα τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια χρησιμοποιούν τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών για να δημιουργήσουν σήματα. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ασφαλώς μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών στο κύτταρο. Συντηρητικοί υπολογισμοί προτείνουν ότι περισσότερες από 1.000 πρωτεϊνικές κινάσες κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα των θηλαστικών. Από τις ποικίλες πρωτεϊνικές κινάσες, οι κινάσες Ser/Thr και Tyr έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα.

Ο όρος **κινάση** προέρχεται από το κινώ - μετακινώ, μεταφέρω μια φωσφορική ομάδα σε συγκεκριμένο αμινοξύ μιας πρωτεΐνης.

1.1

Γενική ταξινόμηση και λειτουργία των πρωτεϊνικών κινάσων

Η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή ήταν η κινάση Ser/Thr της φωσφορυλάσης του μυός το 1959 από τον Edwin Gerhard Krebs. Με την ανακάλυψη των κινάσων Tyr από τον Ray Erikson, το 1978, προστέθηκε στις κινάσες Ser/Thr και άλλη μία εκτεταμένη κατηγορία πρωτεϊνικών κινάσων, στην οποία αποδόθηκε σύντομα μια κεντρική λειτουργία στις διαδικασίες της ανάπτυ-

ξης και της διαφοροποίησης. Επιπλέον, είναι γνωστές και πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλα αμινοξέα, όπως His και Asp/Glu. Αυτές οι κινάσες συναντώνται κυρίως στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και έχουν μικρή σημασία στη σηματοδότηση των ευκαρυωτικών οργανισμών, γι' αυτό και δεν θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Με βάση τη φύση των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν, οι κινάσες μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες (βλ. **Εικόνα 1.29**):

- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr** δημιουργούν έναν φωσφορικό εστέρα με την αλκοολική υδροξυλομάδα R-OH των καταλοίπων Ser και Thr.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Tyr** δημιουργούν έναν φωσφορικό εστέρα με τη φαινολική υδροξυλομάδα -OH των καταλοίπων Tyr.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες His** δημιουργούν ένα φωσφορικό αμίδιο με το N της 1ης ή 3ης θέσης της His (R-CO-NH₂). Τα μέλη αυτής της οικογένειας ενζύμων φωσφορυλιώνουν, επίσης, κατάλοιπα Lys και Arg/Glu.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Asp** δημιουργούν έναν μεικτό φωσφορικό-καρβοξυλικό ανυδρίτη.

Με βάση την αμινοξική αλληλουχία και τη δομή τους οι πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και Tyr δημιουργούν μια κλειστή υπεριοικογένεια που διαφέρει από τις κινάσες His και τα άλλα ένζυμα φωσφομεταφοράς. Η σύγκριση της αλληλουχίας των καταλυτικών τους περιοχών διαφοροποιεί τις κινάσες Ser/Thr από τις κινάσες Tyr μέσα σε αυτήν την υπεριοικογένεια. Επιπλέον, μελέτες της ομολογίας της καταλυτικής περιοχής κατέστησαν ικανή την αναγνώριση υποοικογενειών μέσα στις οικογένειες των Ser/Thr- και Tyr-ειδικών πρωτεϊνικών κινασών.

Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα Ser/Thr και Tyr είναι ένα ρυθμιστικό σήμα που λειτουργεί ως διακόπτης στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο φωσφορικός εστέρας που δημιουργείται στις πρωτεΐνες με τη δράση κινασών είναι μια σταθερή τροποποίηση που δημιουργεί αλλαγή στη διαμόρφωση και, συνεπώς, στη δραστηριότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Εξαιτίας της σταθερότητας των φωσφορικών εστέρων απαιτείται δράση πρωτεϊνικών φωσφατασών για την αποκοπή τους. Το υψηλό επίπεδο ρύθμισης των κινασών και των φωσφατασών χρησιμοποιείται από το κύτταρο, για να δημιουργήσει ένα τοπικά και χρονικά περιορισμένο σήμα, που επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με πολύ εξειδικευμένο τρόπο.

Τα παραδείγματα κυτταρικών δραστηριοτήτων που ρυθμίζονται από πρωτεϊνικές κινάσες είναι ποικίλα, επηρεάζοντας πρακτικά όλη τη λειτουργία του κυττάρου. Είδη πρωτεϊνών που υφίστανται φωσφορυλίωση είναι:

- Ένζυμα ως στοιχεία σηματοδοτικών αλυσίδων και ένζυμα του ενδιάμεσου μεταβολισμού.
- Πρωτεΐνες προσαρμογής.
- Μεταγραφικοί παράγοντες.
- Κανάλια ιόντων.
- Διαμεμβρανικοί υποδοχείς.
- Ριβοσωμικές πρωτεΐνες (ριβοσωμική πρωτεΐνη S6).
- Δομικές πρωτεΐνες.
- Μεταφορικές πρωτεΐνες.

Η φωσφορυλίωση επηρεάζει τη λειτουργία, τη δραστηριότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό του πρωτεϊνικού υποστρώματος, καθώς: α. επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και β. εμφανίζει θέσεις πρόσδεσης για μόρια τελεστές, για παράδειγμα, οι φωσφορυλιωμένες Tyr αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες με δομικές περιοχές SH2 και PTB και οι φωσφορυλιωμένες Ser αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3.

1.2 Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr

Εξαιτίας της πολυπλοκότητας και του αριθμού των υποοικογενειών παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1 μόνο επιλεγμένες υποοικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr στα σπονδυλωτά.

Πίνακας 7.1

Υποοικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr

1. Πρωτεϊνικές κινάσες AGC

- Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από κυκλικά νουκλεοτίδια: PKA, PKG
- Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από τη DAG / Ca^{2+} : PKC (10 ισομορφές)
- PKB / Akt κινάση

2. Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη

Εξειδικευμένες ως προς το υπόστρωμά τους

- Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
- Κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK)
- Κινάση του eEF2 (eEF2K), γνωστή και ως CaMK-III

Πολυλειτουργικές

- Πρωτεϊνική κινάση I εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CAMK-I)
- Πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CAMK-II)
- Πρωτεϊνική κινάση IV εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CAMK-IV)

3. Πρωτεϊνική κινάση της S6 ριβοσωμικής υπομονάδας (S6K)

4. Κινάσες των GPCRs (GRKs)

- Κινάση του β-αδρενεργικού υποδοχέα (BARK)
- Κινάση της ροδοψίνης (RhK ή GRK1)

5. Κινάση II της καζεΐνης (CK2)

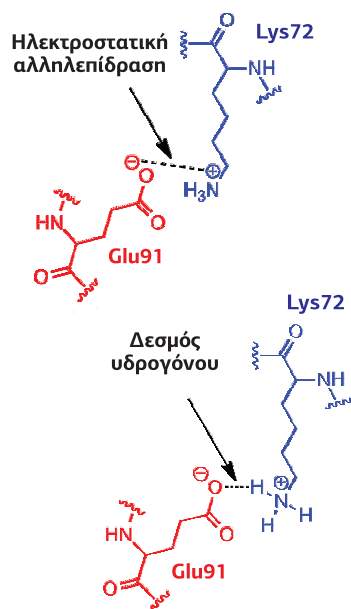
6. Κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου

7. Κινάσες CDKs (κυκλικο-εξαρτώμενες κινάσες, τα κεντρικά στοιχεία της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου)

Υπάρχουν πολλές άλλες πρωτεϊνικές κινάσες που δεν έχουν στενή σχέση με τις υποοικογένειες του Πίνακα 7.1. Αυτές περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες διπλής εξειδίκευσης, επειδή μπορούν να φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα Ser/Thr και Tyr. Ένα παράδειγμα μιας τέτοιας πρωτεϊνικής κινάσης διπλής εξειδίκευσης είναι η κινάση της MAP κινάσης (MAPKK). Επίσης, είναι γνωστές κινάσες Ser/Thr που αποτελούν ενδογενές τμήμα διαμεμβρανικών υποδοχέων και καναλιών ιόντων. Ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού, ο TGFβ-R, περιέχει ενδογενή δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr στο κυτταροπλασματικό του τμήμα (βλ. Κεφάλαιο 10). Ορισμένα μέλη των καναλιών ιόντων TRPM, όπως το κανάλι TRPM7, έχουν δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα που παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του καναλιού (βλ. Εικόνα 4.44, σσ. 168-169). Ωστόσο, αυτή η περιοχή κινάσης δεν εμφανίζει ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων με τις κλασικές πρωτεϊνικές κινάσες, αν και η τριδιάστατη διαμόρφωση είναι παρόμοια.

1.3 Κύρια δομικά στοιχεία των πρωτεϊνικών κινασών

Η καταλυτική περιοχή, ο πυρήνας, όλων των κινασών Ser/Thr και Tyr, μοιράζεται μια κοινή διαμόρφωση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.1, η δομή αυτή περιλαμβάνει έναν μικρό και έναν μεγάλο λοβό (lobe) με το ενεργό κέντρο να σχηματίζεται στη σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς. Οι δύο λοβοί συνδέονται με μια εύκαμπτη πε-

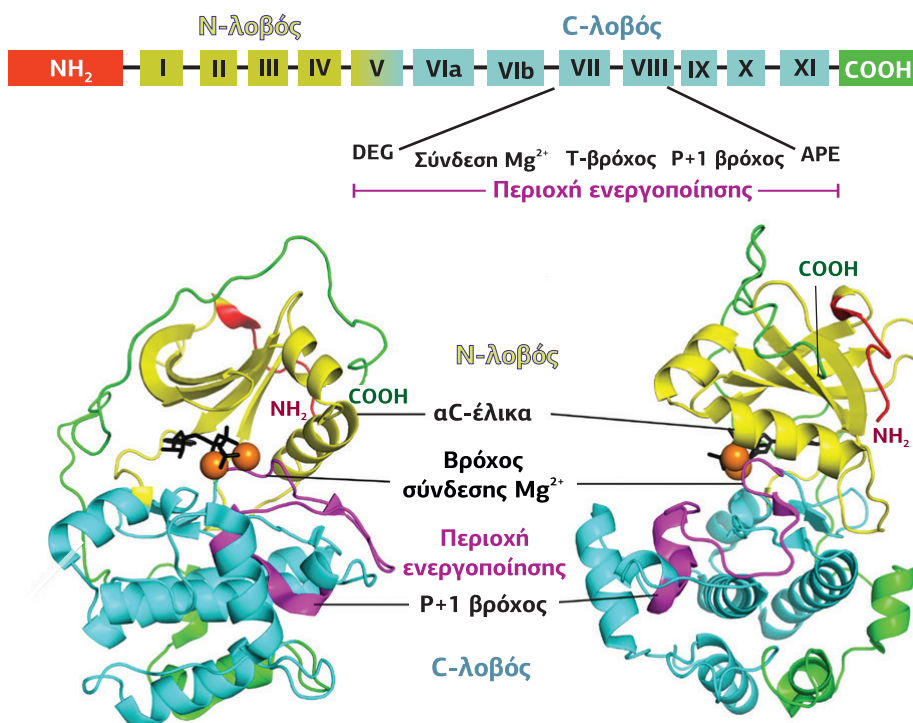


Γέφυρα άλατος είναι ένας συνδυασμός δύο μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων: δεσμού υδρογόνου και ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης

ριοχή (hinge region). Ο μικρός N-τελικός λοβός αποτελείται από πέντε β-κλώνους και μια α-έλικα, που ονομάζεται αC-έλικα. Αντιθέτως, ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Περιλαμβάνει 4 δεσμίδες α-ελίκων, επιπλέον α-έλικες και δύο μικρούς β-κλώνους. Ο N-λοβός περιέχει τη θέση σύνδεσης για το ATP και ο C-λοβός τα καταλυτικά κατάλοιπα και μια επιφάνεια αγκυροβόλιο για το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Το άνοιγμα και το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου είναι βασικό βήμα της κατάλυσης. Τα παρακάτω δομικά στοιχεία έχουν βρεθεί να παίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της κατάλυσης και στη ρύθμιση των κινάσων:

- **Βρόχος πλούσιος σε Gly, στον N-λοβό.** Αυτός ο βρόχος (ονομάζεται P-βρόχος) βρέθηκε και στις Ga πρωτεΐνες και απαιτείται για την αγκυροβόληση των φωσφορικών ομάδων του ATP.
- **αC-έλικα στον N-λοβό.** Στην ενεργή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών κινάσων το κατάλοιπο Glu91 της αC-έλικας δημιουργεί μια γέφυρα άλατος (salt bridge) για τον ευνοϊκότερο προσανατολισμό των φωσφορικών ομάδων του ATP. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί συχνά μεταβάλλουν τη δραστηριότητα της κινάσης τροποποιώντας τη διαμόρφωση της αC-έλικας.
- **Καταλυτικός βρόχος.** Ο καταλυτικός βρόχος βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου και περιέχει ένα καλά συντηρημένο Asp166, το οποίο θεωρείται ως το καταλυτικό αμινοξύ. Επιπλέον, ένα συντηρημένο κατάλοιπο Asn171 βρίσκεται σε αυτόν τον βρόχο.
- **Περιοχή ενεργοποίησης (Activation segment).** Η πρωτοταγής δομή των περιοχών ενεργοποίησης καθορίζεται ως η περιοχή ανάμεσα σε δύο συντηρημένα τριπεπτίδια (DEG.....APE) μέσα στον μεγάλο λοβό και περιλαμβάνει 20-35 αμινοξέα. Η περιοχή ενεργοποίησης αποτελείται από:
 - α. Τον βρόχο όπου συνδέεται το Mg^{2+} .
 - β. Τον βρόχο ενεργοποίησης (activation loop), ονομάζεται T-βρόχος στις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες. Εμφανίζει μεγάλη δομική ποικιλομορφία και πλαστικότητα διαμόρφωσης και είναι ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία ρύθμισης της δραστηριότητας των κινάσων. Σε πολλές κινάσες ο βρόχος ενεργοποίησης είναι θέση φωσφορυλίωσης ή αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Κατάλοι-

Εικόνα 7.1
Η καταλυτική περιοχή των πρωτεϊνικών κινάσων έχει δομή δύο λοβών: έναν μικρότερο N-λοβό, που αποτελείται από β-κλώνους (υποπεριοχές I, II και IV) και μια αC-έλικα (υποπεριοχή III), και έναν μεγαλύτερο C-λοβό, που αποτελείται κυρίως από α-έλικες (υποπεριοχές VIa-XI). Οι δύο λοβοί συνδέονται με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο (υποπεριοχή V). Διακρίνεται η περιοχή ενεργοποίησης με τον βρόχο, όπου συνδέεται το Mg^{2+} , τον βρόχο ενεργοποίησης και τον P+1 βρόχο, που συμμετέχει στη σύνδεση του υποστρώματος. Με την πρόσδεση του υποστρώματος και του ATP οι δύο λοβοί διπλώνουν μαζί, φέρνοντας τη θέση πρόσδεσης του ATP στο εσωτερικό του μορίου, ανάμεσα στους δύο λοβούς. [62]



πα Ser, Thr και Tyr του βρόχου ενεργοποίησης μπορεί να φωσφορυλιωθούν ως απάντηση σε σήματα ενεργοποίησης, προωθώντας την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης. Πχ. η φωσφορυλίωση της Thr197 στην PKA είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης. Σε πολλές πρωτεϊνικές κινάσες ο βρόχος ενεργοποίησης συνδέεται και μπλοκάρει το ενεργό κέντρο εμποδίζοντας τη σύνδεση του ATP αλλά και του υποστρώματος. Η φωσφορυλίωση απομακρύνει τον βρόχο ενεργοποίησης από το ενεργό κέντρο οδηγώντας στην ανοιχτή-ενεργή διαμόρφωση. Σε ορισμένες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως στις MAPKs, η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης διευκολύνει τον ομοδιμερισμό της κινάσης που απαιτείται για τον εντοπισμό του ενζύμου στον πυρήνα.

γ. Τον P+1 βρόχο που συμμετέχει στη σύνδεση του υποστρώματος.

- **Αλληλουχίες αυτοαναστολής.** Πολλές πρωτεϊνικές κινάσες περιέχουν στοιχεία αυτοαναστολής που σταθεροποιούν μια ανενεργή διαμόρφωση μέσω ενδομοριακής σύνδεσης στη θέση σύνδεσης του υποστρώματος. Τα στοιχεία αυτά, όταν δεν έχουν θέσεις φωσφορυλίωσης, χαρακτηρίζονται ως **ψευδοϋποστρώματα**. Τα στοιχεία αυτοαναστολής μπορεί να βρίσκονται στο ίδιο πολυπεπτίδιο ή σε μια ξεχωριστή υπομονάδα. Επίσης, μια NH₂-τελική άγκυρα μυριστικού οξέος μπορεί να συμμετέχει στην αυτοαναστολή, όπως στην κινάση Tyr Abl.

Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης

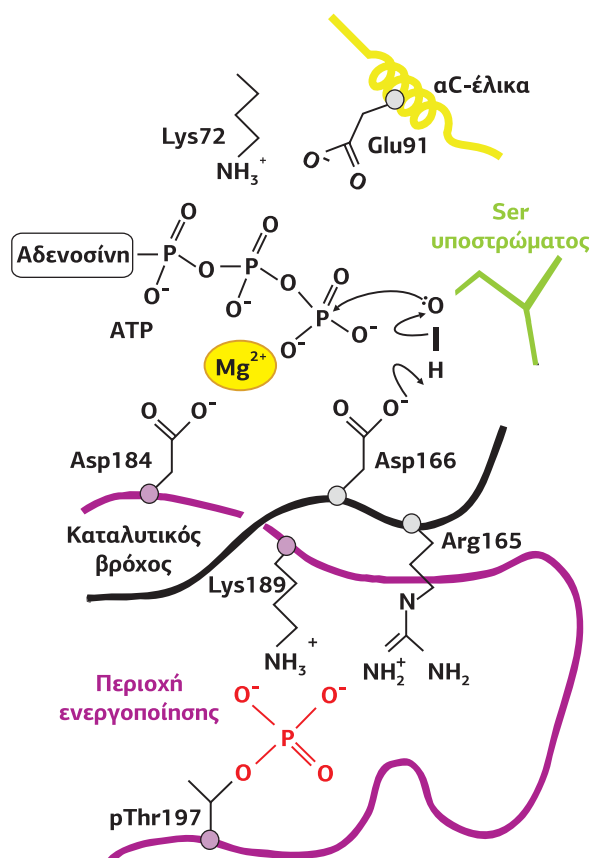
Η κοινή καταλυτική λειτουργία των κινάσων Ser/Thr και Tyr είναι η ομοιοπολική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων μέσω της μεταφοράς της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στην OH ομάδα των καταλοίπων Ser/Thr και Tyr. Η καταλυτική λειτουργία εκτελείται από την καλά συντηρημένη καταλυτική περιοχή των 270 αμινοξέων. Η περιοχή αυτή, όπως είδαμε, σχηματίζεται από δύο λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους με τον εύκαμπτο σύνδεσμο. Το ενεργό κέντρο δημιουργείται από αμινοξέα και των δύο λοβών. Ο προτεινόμενος μηχανισμός μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας από το ATP στην OH ομάδα μιας Ser του υποστρώματος φαίνεται στην **Εικόνα 7.2**. Στοιχεία κλειδιά αυτής της αντίδρασης είναι:

- Όξινα αμινοξέα (Asp, Glu), τα οποία απαιτούνται για τη μεταβατική κατάσταση και την ενεργοποίηση της OH ομάδας του αμινοξέος δέκτη για την πυρηνόφιλη προσβολή στην γ-φωσφορική ομάδα.
- Ένα ή δύο μεταλλικά ιόντα που συντονίζουν τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP και βοηθούν να στερεωθεί το ATP, καθώς και να σταθεροποιηθούν τα αρνητικά φορτία στη μεταβατική κατάσταση.
- Βασικά αμινοξέα (Arg, Lys, His) που χρησιμεύουν στη σταθεροποίηση των αρνητικών φορτίων στη μεταβατική κατάσταση.

Σύγκριση των αλληλουχιών οδήγησε στην ανακάλυψη καλά συντηρημένων αμινοξέων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση της φωσφομεταφοράς. Τα αμινοξέα αυτά είναι η Lys72, που προσανατολίζει τη β-φωσφορική ομάδα του ATP και δημιουργεί γέφυρα άλατος με το Glu91 -επίσης συντηρημένο αμινοξύ-, το Asp166 στον καταλυτικό βρόχο, που παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της OH ομάδας μιας Ser/Thr του υποστρώματος, καθώς και το Asp184 (D184), τμήμα του μοτίβου DFG στην περιοχή ενεργοποίησης, που συμμετέχει στη σύνδεση του Mg²⁺. Είναι γενικά αποδεκτό ότι το Asp166, το οποίο είναι σταθερό σε όλες τις κινάσες, χρησιμεύει ως η καταλυτική βάση για την ενεργοποίηση της OH ομάδας της Ser/

Εικόνα 7.2

Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων αλληλεπιδράσεων στην περιοχή ενεργοποίησης και στον καταλυτικό βρόχο της κινάσης PKA. Η καρβοξυλομάδα του Asp166 λειτουργεί ως βάση και ενεργοποιεί την Ser-OH (του υποστρώματος) για μια πυρηνόφιλη προσβολή στη γ-φωσφορική ομάδα του ATP. Η φωσφορυλίωση της Thr197 είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης. Η pThr197 δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με την Arg165 σταθεροποιώντας την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. [34]



Thr και η αντίδραση λαμβάνει χώρα μέσω μιας “in line” επίθεσης της Ser-OH στη γ-φωσφορική ομάδα του ATP.

1.4

Εξειδίκευση των πρωτεϊνικών κινασών ως προς το υπόστρωμα

Καθώς υπάρχουν πολλά κατάλοιπα Ser, Thr και Tyr στις πρωτεΐνες, η ερώτηση που προκύπτει είναι ποιοι παράγοντες καθορίζουν τη θέση φωσφορυλίωσης στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Με τη βοήθεια της στοχευμένης ανταλλαγής αμινοξέων στις πρωτεΐνες υποστρώματα, της σύγκρισης της αλληλουχίας εκατέρωθεν των θέσεων φωσφορυλίωσης και της χρήσης συγκεκριμένων πεπτιδίων ως υποστρώματα αποδείχθηκε ότι η αλληλουχία της γειτονικής περιοχής του καταλοίπου Ser/Thr καθορίζει σημαντικά την εξειδίκευση. Οι διαφορετικές κινάσες έχουν διαφορετικές απαιτήσεις ως προς τη γειτονική αλληλουχία του καταλοίπου Ser/Thr ή Tyr που φωσφορυλιώνουν, έτσι ώστε κάθε υποοικογένεια να αναγνωρίζει τη δική της κοινή αλληλουχία. Αξίζει να τονιστεί ότι σε μια αλληλουχία φωσφορυλίωσης μπορεί να υπάρχουν περισσότερα από ένα κατάλοιπα Ser/Thr, καθώς επίσης σε μια πρωτεΐνη υπόστρωμα μπορεί να υπάρχουν πολλές αλληλουχίες φωσφορυλίωσης, καθιστώντας πιθανή την πολλαπλή και συνεργατική φωσφορυλίωση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η φωσφορυλίωση της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II, στο COOH-τελικό άκρο της οποίας υπάρχουν 52 επαναλήψεις της επταμερούς αλληλουχίας **Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser**, η οποία επιπλέον περιέχει 5 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης (Εικόνα 7.3).

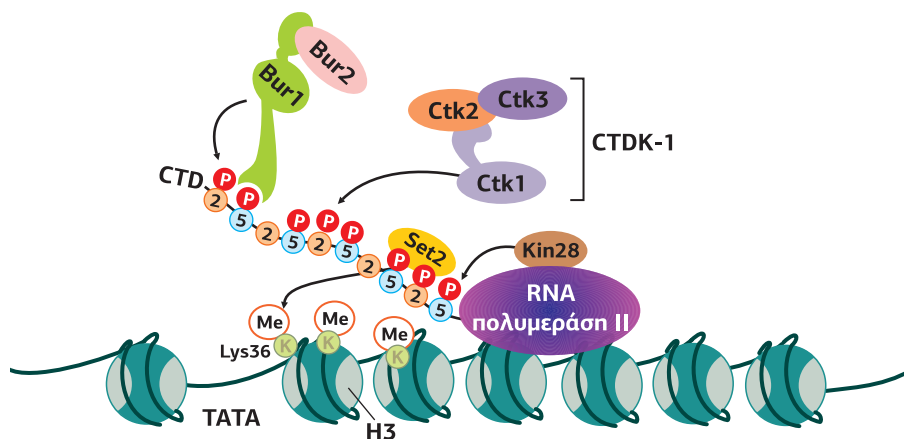
Εικόνα 7.3

Το COOH-τελικό άκρο της RNA πολυμεράσης περιέχει 52 επταμερείς αλληλουχίες καθεμία

από τις οποίες περιέχει 5

θέσεις φωσφορυλίωσης. Οι κυκλικο-εξαρτώμενες κινάσες ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση του COOH-τελικού άκρου της RNA πολυμεράσης II (Pol II) κατά τον κύκλο μεταγραφικής επιμήκυνσης. Οι κινάσες Bur1/Bur2 και Ctk1 στρατολογούνται στη φωσφορυλιωμένη, από την Kin28, Ser5 των επταμερών επαναλήψεων του COOH-τελικού άκρου της Pol II και φωσφορυλιώνουν την Ser2.

Η Ctk1 είναι μια κυκλικο-εξαρτώμενη κινάση, η οποία δημιουργεί ένα ενεργό σύμπλοκο CTDK-I (C-Terminal Domain Kinase) μαζί την κυκλίνη Ctk2 και την Ctk3 (με άγνωστη δράση). Στις φωσφορυλιωμένες Ser2 και Ser5 συνδέεται η μεθυλοτρανσφεράση Set2 ενεργοποιώντας τη μεθυλίωση της Lys36 (K36) της ιστόνης H3. Όσο η επιμήκυνση προχωρά, η συνεισφορά των Ctk1-3 αυξάνεται, σε σχέση με τη δραστηριότητα των Bur1/Bur2. [61]



Εκτός από τη γειτονική αλληλουχία της θέσης φωσφορυλίωσης και άλλα δομικά στοιχεία της πρωτεΐνης-υποστρώματος, που βρίσκονται μακριά από την αλληλουχία φωσφορυλίωσης και τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, συμμετέχουν στη σύνδεση της κινάσης στο υπόστρωμά της. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σύνδεση του πρωτεϊνικού υποστρώματος στους υποδοχείς κινάσες Tyr (RTKs) μέσω αλληλεπίδρασης των περιοχών SH2 του υποστρώματος και των φωσφορυλιωμένων Tyr του υποδοχέα. Αυτή η αλληλεπίδραση βοηθά στη σταθεροποίηση του υποστρώματος στην κινάση (βλ. Εικόνα 7.6) αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της φωσφομεταφοράς.

Ένα άλλο κύριο στοιχείο της εξειδίκευσης των πρωτεϊνικών κινασών είναι ο συνεντοπισμός των κινασών κοντά στα υποστρώματά τους. Ο συνεντοπισμός των κινασών με τα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις αυξάνει την εξειδίκευση της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης. Μόνο εκείνα τα υποστρώματα που βρίσκονται στις εξειδικευμένες υποκυτταρικές θέσεις μπορούν να φωσφορυλιωθούν.

Η θέση σύνδεσης του υποστρώματος βρίσκεται στον C-λοβό των πρωτεϊνικών κινασών. Όπως είδαμε, το υπόστρωμα έρχεται σε επαφή με την κινάση μέσω πολλαπλών αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα του C- αλλά και του N-λοβού. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη συμπληρωματικότητα ανάμεσα στον θύλακα σύνδεσης (binding pocket) μεταξύ της κινάσης και του υποστρώματός της σε σχέση με το σχήμα, την υδροφοβικότητα και το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Σε πολλές κινάσες, όπως στον υποδοχέα της ινσουλίνης και στην CDK2, η θέση σύνδεσης του υποστρώματος δεν είναι εμφανής στην ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. Πρέπει να προηγηθεί φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης, ώστε να προκύψει η ενεργή διαμόρφωση και να δημιουργηθεί η θέση αναγνώρισης του υποστρώματος.

1.5 | Ρύθμιση της δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να υπάρξουν σε ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση και αυτό εξηγεί γιατί μπορούν να παίζουν τον ρόλο διακόπτη στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Στο μεγαλύτερο διάστημα βρίσκονται στην “off” κατάσταση (κατάσταση χαμηλής ενέργειας) και κάτω από την επίδραση ειδικών σημάτων μεταπίπτουν στην “on” κατάσταση της πλήρους ενεργοποίησης. Η μετάπτωση από την “off” στην “on” κατάσταση ευνοείται από εύκαμπτα δομικά στοιχεία των κινασών, όπως η περιοχή του εύκαμπτου συνδέσμου (hinge region) ανάμεσα στους δύο λοβούς, ο βρόχος ενεργοποίησης, ο P-βρόχος και η αC-έλικα, που μπορούν να μετακινηθούν με υψηλά συντονισμένο και συνεργατικό τρόπο κατά τη μετάβαση από την “off” στην “on” διαμόρφωση.

Η ενεργοποιημένη διαμόρφωση των πρωτεϊνικών κινασών χαρακτηρίζεται από τις παρακάτω ιδιότητες:

- Οι δύο λοβοί βρίσκονται σε στενή κλειστή σχέση μεταξύ τους.
- Το ATP βρίσκεται “θαμμένο” ανάμεσα στους δύο λοβούς και οι φωσφορικές του ομάδες συνδέονται με τον P-βρόχο.
- Η αC-έλικα δημιουργεί μια γέφυρα άλατος με ένα β-πτυχωτό φύλλο του N-λοβού (Glu91 με Lys72).
- Οι θέσεις σύνδεσης για το υπόστρωμα και το ATP είναι πλήρως προσβάσιμες.
- Ο φωσφορυλιωμένος βρόχος ενεργοποίησης μετακινείται μακριά από το ενεργό κέντρο και υιοθετεί μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Βοηθάει στην οργάνωση των καταλυτικών αμινοξέων για τη βέλτιστη φωσφομεταφορά και αποτελεί τμήμα της θέσης σύνδεσης του υποστρώματος. Η κίνηση του βρόχου ενεργοποίησης συχνά συντονίζεται με την κίνηση της αC-έλικας.

Αν και οι πλήρως ενεργές πρωτεϊνικές κινάσες υιοθετούν όλες μια παρόμοια ενεργή διαμόρφωση, οι ανενεργές διαμορφώσεις των πρωτεϊνικών κινασών διαφέρουν κατά πολύ. Ο υψηλός βαθμός πλαστικότητας που εμφανίζουν οι περιοχές των κινασών οδηγεί σε διαφορετικές ανενεργές διαμορφώσεις ως απάντηση στη φωσφορυλίωση ή σε αλληλεπιδράσεις με ειδικές ρυθμιστικές περιοχές, που βρίσκονται στην ίδια ή σε διαφορετικές υπομονάδες. Γενικά, οι ανενεργές διαμορφώσεις χαρακτηρίζονται από μια πιο ανοιχτή, απομακρυσμένη σχέση μεταξύ των δύο λοβών, αποκλείοντας τον βέλτιστο προσανατολισμό των αμινοξέων που συμμετέχουν στη σύνδεση του υποστρώματος και στη διαδικασία της κατάλυσης. Οι μηχανισμοί για τη σταθεροποίηση της ανενεργής διαμόρφωσης των πρωτεϊνικών κινασών είναι ποικίλοι και μπορούν να δράσουν μεμονωμένα ή συνεργατικά. Οι μηχανισμοί σταθεροποίησης της ανενεργής μορφής των πρωτεϊνικών κινασών είναι οι παρακάτω:

- Πρόσδεση πρωτεϊνών αναστολέων στην ανενεργή διαμόρφωση (π.χ. η σύνδεση του αναστολέα $p^{21}Cip$ παραμορφώνει τη διαμόρφωση του N-λοβού της κινάσης CDK1 μπλοκάροντας τη θέση δέσμευσης του ATP).
- Ανασταλτικές φωσφορυλίώσεις (π.χ. της Thr14 και της Tyr15 στις CDKs και

Εικόνα 7.4

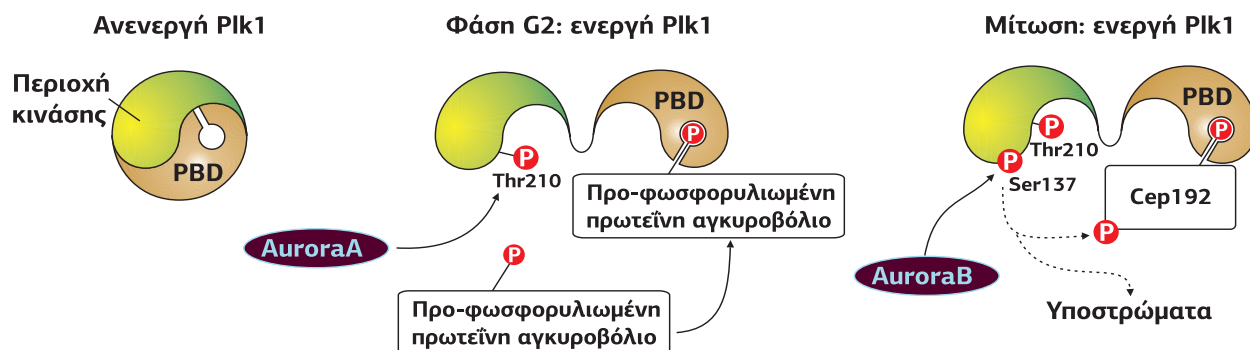
Η κινάση Polo-like 1 (Plk1) βρίσκεται σε ανενεργή μορφή λόγω ενδομοριακής πρόσδεσης της ανασταλτικής περιοχής PBD στην καταλυτική περιοχή. Η φωσφορυλίωση στην Thr210 από την κινάση Aurora A οδηγεί στην ανοικτή διαμόρφωση της Polo-like κινάσης. Επιπλέον, η σύνδεση ενός προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος στην περιοχή PBD σταθεροποιεί την ενεργοποιημένη διαμόρφωση της κινάσης Plk1. Κατά τη φάση 2 η ενεργοποίηση της plk1 προωθεί την είσοδο στη μίτωση διεγείροντας την ενεργοποίηση της κυκλίνης B/CDK1. Επίσης, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις Wee1 και Myt1, δύο κινάσες που κρατούν ανενεργή την CDK1. Τέλος, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την φωσφατάση Cdc25 ώστε να αποφωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει την CDK1. Η Plk1 φωσφορυλιώνεται στη Ser137 από την Aurora B, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, συμμετέχοντας στη συναρμολόγηση της ατράκτου. [2]

η φωσφορυλίωση της Tyr527 της Src κινάσης από την Csk).

- Πρόσδεση ρυθμιστικών υπομονάδων (π.χ. των δύο ρυθμιστικών υπομονάδων στην PKA).
- Αυτοαναστολή (π.χ. ένα δομικό στοιχείο, μέρος της ίδιας κινάσης ή μιας ρυθμιστικής υπομονάδας της δρα ως αυτοαναστολέας, οδηγώντας σε μια κλειστή διαμόρφωση).

Η μετάβαση από την ανενεργή στην ενεργή μορφή των πρωτεϊνικών κινασών ελέγχεται, επίσης, από μια ποικιλία μηχανισμών που δρουν μόνοι τους ή συνεργατικά:

- Πρόσδεση υπομονάδων-ενεργοποιητών (π.χ. οι κυκλίνες στις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDKs).
- Σύνδεση δευτέρων διαβιβαστών (π.χ. cAMP στις PKAs) με ταυτόχρονη απελευθέρωση των ανασταλτικών ρυθμιστικών υπομονάδων.
- Σύνδεση συμπαράγοντων (π.χ. Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, διακυλογλυκερόλη, φωσφολιπίδια, AMP).
- Φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης. Η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης μπορεί να καταλυθεί από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες ή από την ίδια την πρωτεϊνική κινάση. Στην τελευταία περίπτωση, αυτό είναι μια trans-αυτοφωσφορυλίωση ανάμεσα στις υπομονάδες μιας ολιγομερούς πρωτεϊνικής κινάσης. Η φωσφορυλίωση στον βρόχο ενεργοποίησης οδηγεί σε επανοργάνωση του ενεργού κέντρου με σκοπό τον κατάλληλο προσανατολισμό του.
- Αποφωσφορυλίωση ανασταλτικών θέσεων φωσφορυλίωσης.
- Αλλαγές στην κατάσταση ολιγομερισμού της κινάσης ως αποτέλεσμα της σύνδεσης του προσδέτη στο εξωκυτταρικό τμήμα της διαμεμβρανικής κινάσης (π.χ. RTKs).
- Σύνδεση μιας προ-φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης αγκυροβόλιο που παίζει και τον ρόλο υποστρώματος. Για παράδειγμα, η κινάση Polo-like 1 (Plk1) βρίσκεται σε ανενεργή μορφή λόγω ενδομοριακής πρόσδεσης μιας ανασταλτικής περιοχής της, της περιοχής Polo Box Domain (PBD). Στη φάση G2 η Plk1 φωσφορυλιώνεται από την Aurora A στην Thr210 του βρόχου ενεργοποίησης, οδηγώντας σε μια ανοικτή διαμόρφωση, στην οποία η καταλυτική περιοχή και η περιοχή PBD απομακρύνονται. Η σύνδεση μιας προ-φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης αγκυροβόλιο (docking protein) στην περιοχή PBD σταθεροποιεί την άρση της αναστολής και ταυτόχρονα προσανατολίζει την κινάση Polo-like στα υποστρώματά της (μεταξύ των οποίων και η πρωτεΐνη αγκυροβόλιο). Στη φάση της μίτωσης για την ενεργοποίηση της Plk1 απαιτείται και η φωσφορυλίωση της Ser137 από την Aurora B (Εικόνα 7.4).



Ο έλεγχος της δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινασών μπορεί να συμβεί σε πολλά επίπεδα:

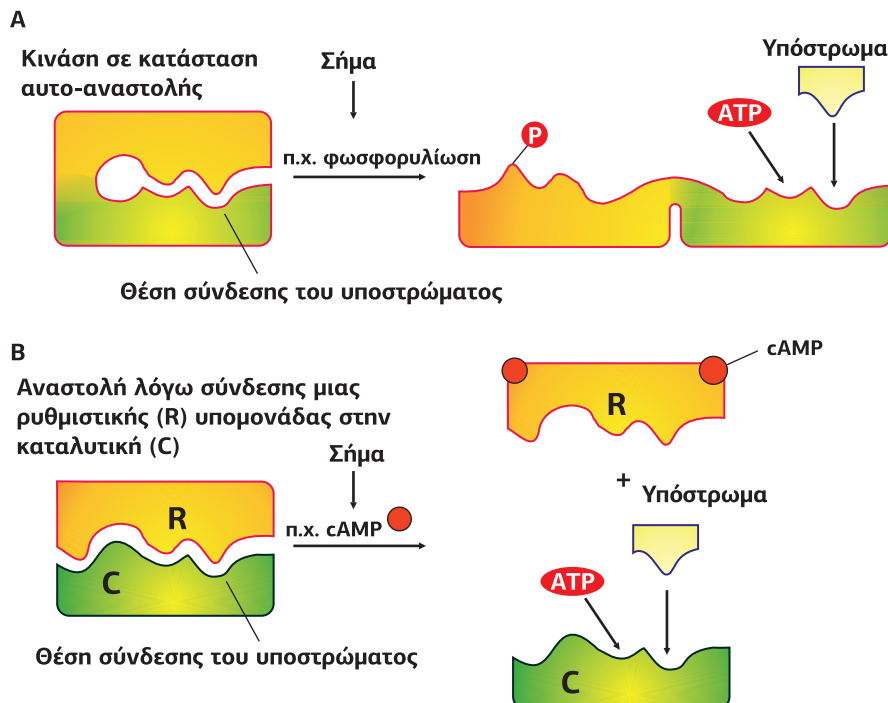
- Έκφραση της κινάσης ή της ρυθμιστικής υπομονάδας της (ανασταλτικές ή διεγερτικές υπομονάδες, π.χ. κυκλίνες).
- Σηματο-επαγόμενη αποικοδόμηση της κινάσης ή της ρυθμιστικής υπομονάδας της, μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασωμάτων.

- Ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινάσων, οι οποίες φωσφορυλιώνουν ρυθμιστικές θέσεις (π.χ. στον βρόχο ενεργοποίησης).
- Ενεργοποίηση πρωτεϊνικών φωσφατάσων που αποφωσφορυλιώνουν ρυθμιστικές θέσεις.
- Σύνδεση εξωκυτταρικών προσδετών σε διαμεμβρανικές πρωτεϊνικές κινάσες (π.χ. υποδοχείς με δράση κινάσης Tyr, RTKs).
- Σηματο-επαγόμενη παραγωγή δευτέρων διαβιβαστών που ενεργοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες (cAMP, Ca^{2+} , DAG).
- Συνεντοπισμός της κινάσης και του πρωτεϊνικού της υποστρώματος. Η στοχευμένη στρατολόγηση της κινάσης στην υποκυτταρική θέση, που βρίσκεται το πρωτεϊνικό της υπόστρωμα (π.χ. στην πλασματική μεμβράνη), είναι ένας κύριος ρυθμιστικός μηχανισμός.

Ρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης μέσω αυτοαναστολής

Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορεί να υπάρξουν σε κατάσταση αυτοαναστολής, στην οποία δομικά στοιχεία του ενεργού κέντρου διπλώνουν και αναστέλλουν την πρόσδεση υποστρώματος και/ή την καταλυτική δραστηριότητα. Το ανασταλτικό δομικό στοιχείο μπορεί να είναι μέρος της πρωτεϊνικής κινάσης και να έχει χαρακτήρα ψευδοϋποστρώματος (έχει ομοιότητα με το κανονικό υπόστρωμα και μπορεί να συνδεθεί στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος) ή να είναι μια ρυθμιστική υπομονάδα. Όταν φτάσει ένα σήμα (π.χ. σήμα φωσφορυλίωσης ή πρόσδεση ενός δευτέρου διαβιβαστή), η κινάση απαλλάσσεται από την κατάσταση αναστολής, καθώς το ανασταλτικό δομικό στοιχείο ή η ανασταλτική υπομονάδα απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο (**Εικόνα 7.5**).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτοαναστολής συναντούμε στην κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης των θηλαστικών. Η κρυσταλλική δομή του καταλυτικού τμήματος της κινάσης έχει ένα αυτοανασταλτικό στοιχείο στο COOH-τελικό άκρο, που συνδέεται στο ενεργό κέντρο και το καθιστά απρόσιτο στο υπόστρωμα και στο ATP (σελ. 440 και βλ. **Εικόνα 7.39**). Το ανασταλτικό στοιχείο είναι συμπληρωματικό προς το ενεργό κέντρο και λόγω αυτής της συμπληρωματικότητας πραγματοποιεί αποτελεσματική αναστολή.



Εικόνα 7.5

Σχηματική αναπαράσταση της αυτοαναστολής και της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινάσων.

A. Άρση της αυτοαναστολής έπεται από φωσφορυλίωση. B. Άρση της αυτοαναστολής λόγω της απομάκρυνσης της ρυθμιστικής υπομονάδας. Διακρίνονται οι δύο από τις 4 υπομονάδες της PKA. Η καταλυτική υπομονάδα C της PKA βρίσκεται σε κατάσταση αναστολής λόγω πρόσδεσης της ανασταλτικής ρυθμιστικής υπομονάδας R. Η σύνδεση 2 cAMP στην R οδηγεί στην απομάκρυνση της R από την C και την ενεργοποίηση της τελευταίας.

Ρύθμιση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης μέσω υποκυτταρικού εντοπισμού

Ο στοχευμένος εντοπισμός των πρωτεϊνικών κινασών και των πρωτεϊνικών φωσφατάσων είναι ένας κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου αυξάνεται η εξειδίκευση και επιτυγχάνεται μια αυστηρή ρύθμιση της φωσφορυλίωσης, της αποφωσφορυλίωσης και της αλληλεπίδρασης με συμπαράγοντες.

Πολλά από τα υποστρώματα των πρωτεϊνικών κινασών είναι είτε μεμβρανικές πρωτεΐνες είτε πρωτεΐνες που συνδέονται ομοιοπολικά σε λιπίδια ή σε πρωτεΐνες της μεμβράνης. Σε πολλές περιπτώσεις οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, για να μπορέσουν να συμμετέχουν σε μια διαδικασία σηματοδότησης, πρέπει να μεταφερθούν στη θέση όπου βρίσκεται το υπόστρωμά τους. Στη διάρκεια ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού παρατηρείται συχνά μεταφορά των κινασών και των φωσφατάσων στη νέα υποκυτταρική τους θέση. Περιορίζοντας τη δράση αυτών των ενζύμων σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις βελτιώνεται η διάρκεια, το πλάτος και η αναλογία σήμα/θόρυβος των σημάτων φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, σήματα από άλλους τελεστές μπορούν να ενσωματωθούν πιο αποτελεσματικά σε αυτές τις πολυπρωτεϊνικές μονάδες σηματοδότησης.

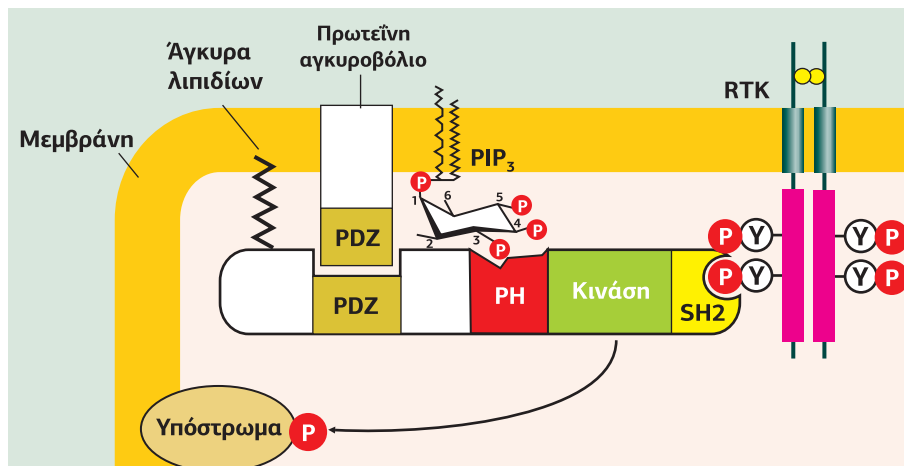
Συχνά η υποκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνικών κινασών μεσολαβείται από τη ρυθμιστική τους περιοχή ή από τις ρυθμιστικές υπομονάδες τους, οι οποίες μπορούν να συνδέονται εξειδικευμένα σε πρωτεΐνες σκαλωσιάς ή προσαρμογής που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις. Αυτές οι πρωτεΐνες αγκυροβόλια είναι πολυδύναμες και οδηγούν στη συνάθροιση πολλών σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πρωτεΐνες αγκυροβόλια συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις είναι ποικίλοι. Δομικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαμεμβρανικοί υποδοχείς, κανάλια ιόντων ή κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες μπορεί να χρησιμεύσουν ως στόχοι αγκυροβόλησης. Άλλες πρωτεΐνες αγκυροβόλια αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη με άγκυρες λιπιδίων ή μέσω δομικών αλληλουχιών που αναγνωρίζουν λιπίδια της μεμβράνης (όπως η περιοχή PH). Και η ίδια η ρυθμιστική περιοχή της κινάσης μπορεί να περιέχει περιοχές PH, PDZ ή SH2 για αλληλεπίδραση με λιπίδια ή μεμβρανικές πρωτεΐνες (Εικόνα 7.6). Γενικά η φύση της ρυθμιστικής περιοχής ή των ρυθμιστικών υπομονάδων των κινασών ή των φωσφατάσων καθορίζει σε ποια υποκυτταρική θέση θα βρεθεί η πρωτεϊνική κινάση και ποιο υπόστρωμα θα φωσφορυλιώσει.

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός στοχευμένου εντοπισμού των κινασών είναι ο συνεντοπισμός ομάδων πρωτεϊνικών κινασών που έχουν διαδοχική δράση, μέσω σύνδεσής τους σε πρωτεΐνες σκαλωσιάς. Με τη δημιουργία συμπλόκου μιας ομάδας αλληλοδιάδοχων πρωτεϊνών-συνεταίρων ενός σηματοδοτικού μονοπατιού επιτυγχάνεται η μεγάλη συγκέντρωσή τους σε συγκεκριμένη υποκυτταρική θέση, η οποία οδηγεί και σε αποτελεσματικότερη σηματοδότηση (π.χ. οι MAP κινάσες).

Εικόνα 7.6

Υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνικών κινασών.

Μια πρωτεϊνική κινάση μπορεί να βρεθεί στη μεμβράνη μέσω της σύνδεσής της σε μια πρωτεΐνη αγκυροβόλιο (π.χ. μέσω PDZ αλληλεπιδράσεων), μέσω σύνδεσης της PH δομικής περιοχής της σε PIP_3 της μεμβράνης, μέσω μιας άγκυρας λιπιδίων ή μέσω σύνδεσης της SH2 ή PTB περιοχής της με φωσφορυλιωμένες Tyr διαμεμβρανικών υποδοχέων (π.χ. RTK). Ο συγκεκριμένος υποκυτταρικός εντοπισμός διευκολύνει τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος. [41]



2. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)

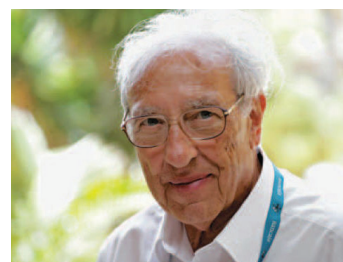
Η PKA ανήκει στην υπεροικογένεια των κινασών AGC, στην οποία κατατάσσονται και οι PKGs (cGMP-dependent kinases), PKCs και PKB/Akt. Οι κινάσες της οικογένειας AGC χαρακτηρίζονται από όμοια δομή του καταλυτικού κέντρου και ρυθμίζονται όλες με φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης.

Από τις πρωτεϊνικές κινάσες, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA, cAMP-dependent protein kinase) είναι η καλύτερα μελετημένη και χαρακτηρισμένη. Τα υποστρώματά της μπορεί να είναι άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες, κανάλια ιόντων ή ένζυμα του μεταβολισμού. Οι λειτουργίες της είναι ποικίλες καθώς συμμετέχει: α. στη δράση της αδρεναλίνης στη γλυκογονόλυση, στον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων, στην αύξηση του καρδιακού ρυθμού και στη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων, β. στην αντιδιουρητική δράση της βασοπρεσίνης, και γ. στη δράση της σεροτονίνης και του γλουταμινικού στην αποθήκευση βραχύχρονης και μακρόχρονης μνήμης. Πολλές από τις δράσεις της PKA εμπλέκουν τη μεταγραφή γονιδίων, που έχουν στην περιοχή ελέγχου τους ένα στοιχείο απόκρισης στο cAMP, CRE (cyclic AMP Response Element). Μια αύξηση στη συγκέντρωση του cAMP οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKA, η οποία φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CREB (CRE Binding Protein) που προσδένεται στην αλληλουχία του DNA CBE (CRE-Response Element) διεγείροντας τη μεταγραφή γονιδίων, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν υδατοπορίνες στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρών (βλ. σελ. 279) και τα early genes στους νευρώνες (βλ. σελ. 284).

Η PKA ανακαλύφθηκε το 1968, μία δεκαετία μετά την ανακάλυψη του cAMP από τον Sutherland, από τους Edwin Krebs και Edmond Fischer, καθιερώνοντας έναν μηχανισμό όχι μόνο για το cAMP, αλλά έναν γενικό μηχανισμό για τη σηματοδότηση των δεύτερων διαβιβαστών μέσα στο κύτταρο. Στην πραγματικότητα, η PKA χρησίμευσε ως το πρότυπο για την κατανόηση και των άλλων πρωτεϊνικών κινασών και την αναγνώριση του ρόλου της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης ως ένας άμεσος και αντιστρεπτός μηχανισμός τροποποίησης της δραστηριότητας των πρωτεϊνών. Ο Krebs, επίσης, απέδειξε ότι η PKA αποτελείται από 4 υπομονάδες: δύο ρυθμιστικές και δύο καταλυτικές, καθώς επίσης ότι η σύνδεση του cAMP στις ρυθμιστικές υπομονάδες ελευθερώνει τις καταλυτικές ενεργές υπομονάδες, καθιστώντας τις ικανές να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Για την ανακάλυψη του μηχανισμού της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, ο Ελβετός βιοχημικός Edmond Fischer και ο Αμερικανός βιοχημικός Edwin Krebs τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1992.



Edwin Gerhard Krebs
(1918-2009)



Edmond Henri Fischer
(1920 - 2021)

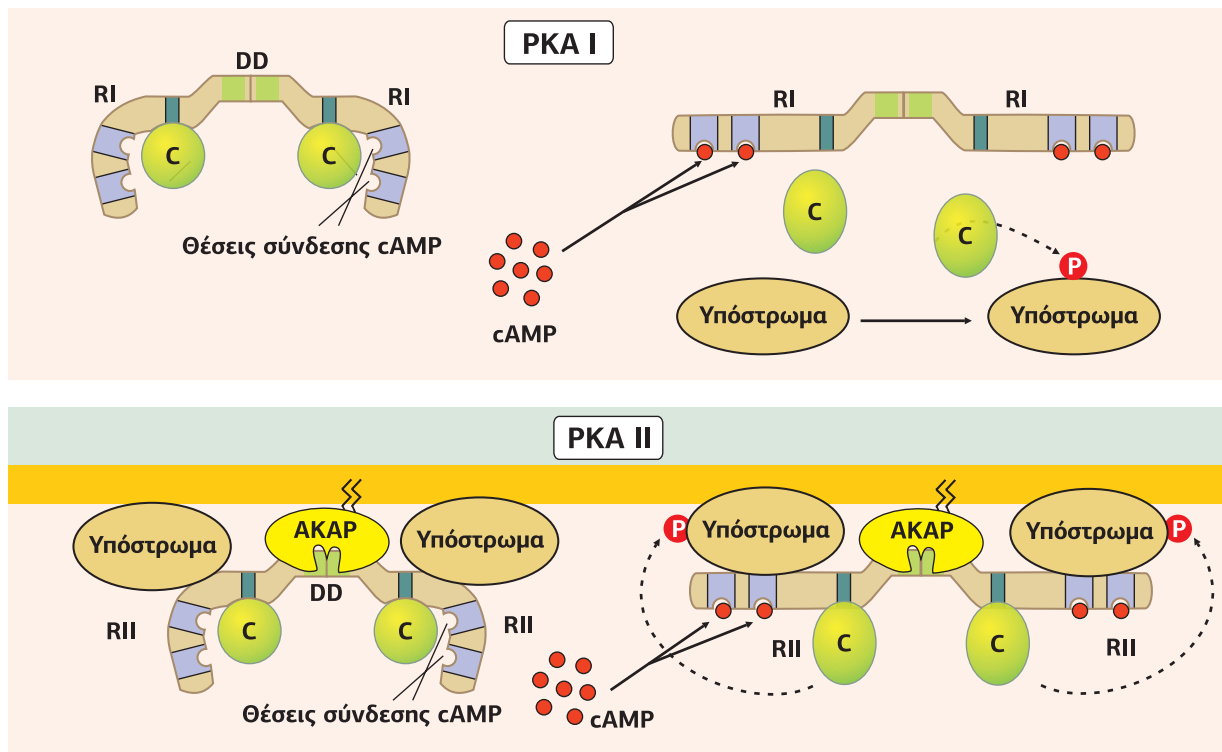
2.1

Δομή των ρυθμιστικών και καταλυτικών υπομονάδων της PKA

Απουσία του cAMP στο κυτταρόπλασμα, η PKA υπάρχει ως ένα ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο ρυθμιστικές (R) υπομονάδες, οι οποίες περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης του cAMP η καθεμία, και δύο καταλυτικές (C) υπομονάδες. Η καταλυτική δραστηριότητα δεν λειτουργεί στο ολοένζυμο C_2R_2 , καθώς ένα ανασταλτικό δομικό στοιχείο της R υπομονάδας μπλοκάρει την είσοδο του ενεργού κέντρου. Η PKA ενεργοποιείται από το cAMP. Η πρόσδεση του cAMP στις R υπομονάδες οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης των R υπομονάδων, με αποτέλεσμα μείωση της συγγένειας ανάμεσα στις R και C υπομονάδες, της τάξης 10^4 - 10^5 . Το ολοένζυμο διαχωρίζεται στο διμερές των R υπομονάδων και σε δύο μονομερείς καταλυτικές C υπομονάδες, που μετατρέπονται σε καταλυτικά ενεργές (βλ. **Εικόνα 5.52A**, σελ. 277). Πλήρης καταλυτική δραστηριότητα της C υπομονάδας απαιτεί τη φωσφορυλίωση της Thr197 στον βρόχο ενεργοποίησης. Αυτή η φωσφορυλίωση απαιτείται και για την επανασύνδεση των R υπομονάδων.

Στα θηλαστικά, είναι γνωστές τέσσερις ισομορφές της R υπομονάδας (R1a, R1b,

RIIα και RIIβ) και τρεις ισομορφές της C υπομονάδας (Ca, Cβ και Cγ). Η ύπαρξη πολλών R και C υπομονάδων, με ξεχωριστές βιοχημικές ιδιότητες η καθεμία, οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ολοενζύμων με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός που συνεισφέρει στην εξειδίκευση και στην ποικιλομορφία της PKA σηματοδότησης μέσα στο κύτταρο. Ανάλογα με τη ρυθμιστική υπομονάδα διακρίνουμε δύο τύπους PKA, την PKA-I, η οποία συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και έχει υψηλή συγγένεια για το cAMP, και την PKA-II, η οποία συνδέεται με τις πρωτεΐνες AKAPs (A-Kinase-Anchoring Proteins) και βρίσκεται αγκυροβολημένη σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα κοντά στα υποστρώματά της (Εικόνα 7.7).

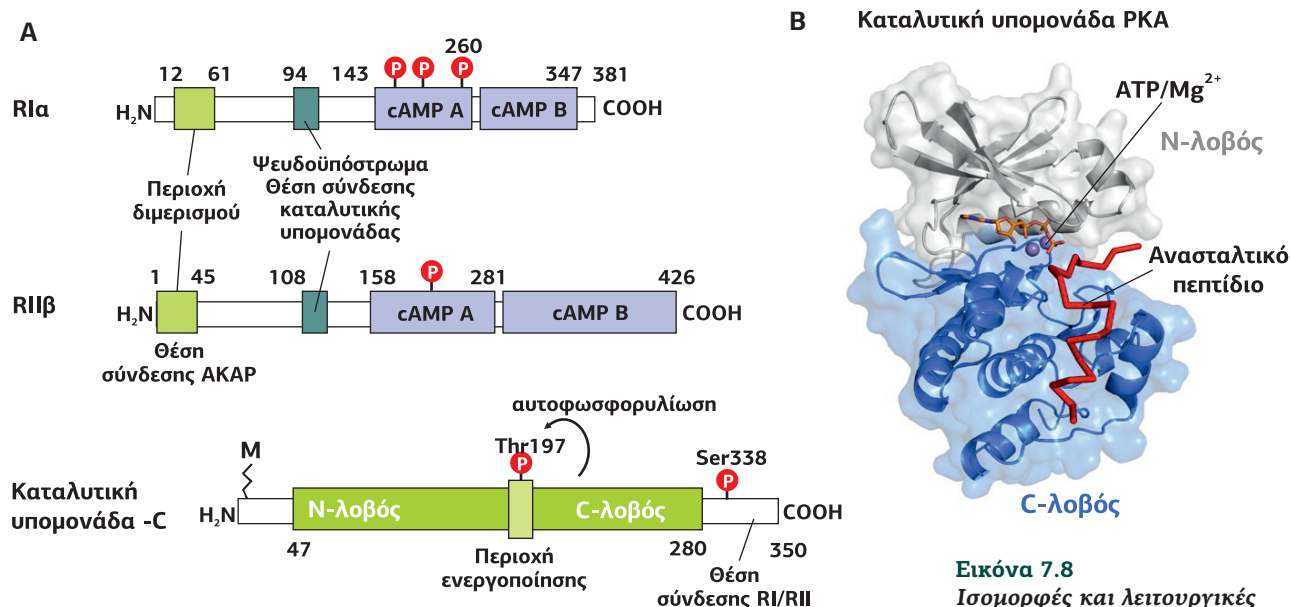


Εικόνα 7.7

Οι δύο ισομορφές PKA, η PKA-I και η PKA-II. Διαφέρουν ως προς την ισομορφή της ρυθμιστικής τους υπομονάδας. Οι υπομονάδες RIα, RIβ, RIIα και RIIβ διαφέρουν ως προς τη συγγένειά τους στο cAMP και την ικανότητά τους να συνδέονται στις πρωτεΐνες AKAPs. Η PKA-I συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και έχει υψηλή συγγένεια για το cAMP. Η PKA-II συνδέεται με τις AKAPs και βρίσκεται αγκυροβολημένη σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα κοντά στα υποστρώματά της.

Οι R υπομονάδες περιέχουν όμοιες λειτουργικές περιοχές. Μια περιοχή διμερισμού DD (Dimerization Domain) στο NH₂-τελικό άκρο, η οποία δημιουργεί μια δεσμίδα 4 ελίκων παρέχοντας ταυτόχρονα μια επιφάνεια σύνδεσης για τις πρωτεΐνες AKAPs (στις RII υπομονάδες). Στο COOH-τελικό άκρο κάθε R υπομονάδας βρίσκονται δύο συνεχόμενες θέσεις σύνδεσης του cAMP, με διαφορετική συγγένεια η καθεμία. Μια εύκαμπτη περιοχή ψευδοϋποστρώματος συνδέεται στη σχισμή του ενεργού κέντρου της C υπομονάδας εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος. Οι R υπομονάδες διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τις ιδιότητες των περιοχών τους, γεγονός που τους προσδίδει διαφορετικές ρυθμιστικές ιδιότητες (Εικόνα 7.8A).

Οι C υπομονάδες αποτελούνται όπως όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες από δύο λοβούς (N- και C-λοβός), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο (Εικόνα 7.8B). Έχουν ένα μυριστούλιωμένο κατάλοιπο, άγνωστης λειτουργίας, στο NH₂-τελικό τους άκρο και εξειδικευμένες θέσεις φωσφορυλίωσης, Thr197 και Ser338. Η Thr197 εντοπίζεται στον βρόχο ενεργοποίησης και υπόκειται σε αυτοφωσφορυλίωση, αυξάνοντας τη συγγένεια για το ATP και την καταλυτική δραστηριότητα. Η συναινετική αλληλουχία φωσφορυλίωσης για τις PKA είναι η RRXSX. Η RII υπομονάδα περιέχει μια ανάλογη αλληλουχία και συνεπώς αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από την C υπομονάδα μέσα στο ολοένζυμο αλλά χωρίς την άρση της αναστολής.

**Εικόνα 7.8**

Ισομορφές και λειτουργικές περιοχές των υπομονάδων της PKA. Α. Στις ρυθμιστικές R υπομονάδες διακρίνονται η περιοχή διμερισμού στο NH₂-τελικό άκρο, η οποία αποτελεί και τη θέση σύνδεσης στις AKAP, οι δύο περιοχές σύνδεσης cAMP στο COOH-τελικό άκρο, καθώς και η περιοχή ψευδοϋποστρώματος, η οποία συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο της υπομονάδας C. Η υπομονάδα C έχει ένα μυριστοϋλιωμένο κατάλοιπο (M) στο NH₂-τελικό άκρο της και τους τυπικούς N και C λοβούς. Β. Κρυσταλλική δομή της καταλυτικής υπομονάδας της PKA με συνδεδεμένο το ATP/Mg²⁺ και ένα ανασταλτικό πεπτίδιο (κόκκινη γραμμή). Ο N-λοβός με τους β-αντιπαράλληλους κλώνους διακρίνεται με γκρι και ο C-λοβός με τις α-έλικες με μπλε. [58]

2.2 | Ρύθμιση της PKA

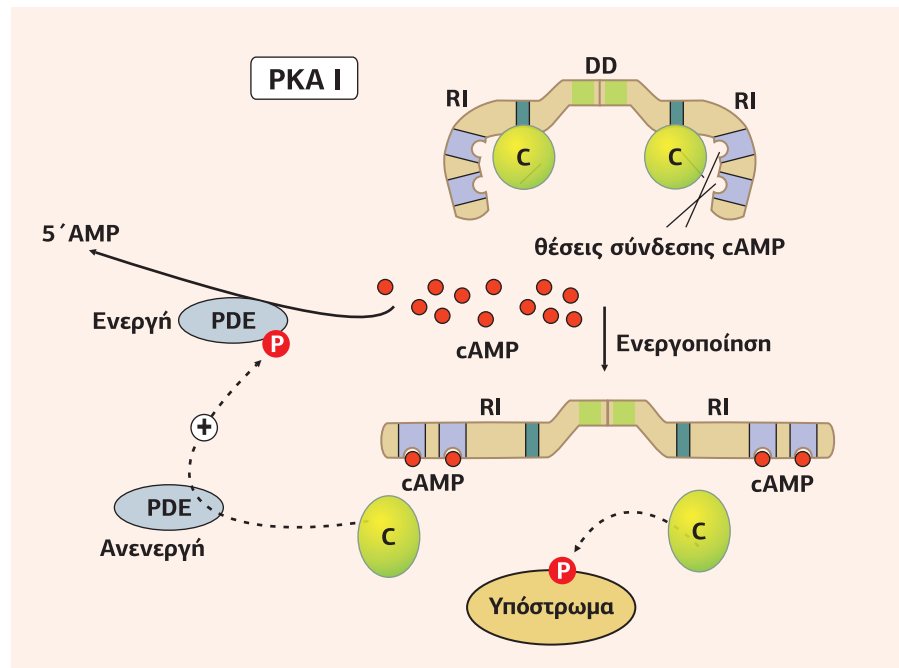
Η PKA ρυθμίζεται, ενεργοποιείται, κυρίως, από το cAMP, αλλά υπόκειται και σε επιπλέον ρυθμιστικές επιδράσεις, όπως η σύνδεση ανασταλτικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της, που εξασφαλίζουν υψηλή εξειδίκευση σε σχέση με την κατανομή της στους διάφορους ιστούς και τη δράση της σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Αλλαγές στη συγκέντρωση του cAMP. Οι αλλαγές στη συγκέντρωση του cAMP που οδηγούν στην ενεργοποίηση της PKA είναι σχετικά μικρές. Σε πολλούς ιστούς μια αύξηση 2 έως 3 φορές στη συγκέντρωση του cAMP είναι αρκετή για να επιφέρει το μέγιστο φυσιολογικό αποτέλεσμα. Το κύτταρο έχει διαθέσιμους διαφορετικούς μηχανισμούς που περιορίζουν την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP σε ένα σχετικά στενό εύρος συγκεντρώσεων συνεισφέροντας στην απόσβεση της σηματοδότησης μέσω της PKA. Ένας μηχανισμός που οδηγεί στην απόσβεση της σηματοδότησης της PKA είναι ο έλεγχος μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) από μια φωσφοδιεστεράση του cAMP (PDE4, 7, 8). Η ενεργοποιημένη PKA φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια φωσφοδιεστεράση που υδρολύει το cAMP σε 5'AMP (**Εικόνα 7.9** και βλ. σελ. 276, **Εικόνα 5.51**). Αυτός ο μηχανισμός καθιστά ικανή την PKA να ελέγχει την ίδια της τη δραστηριότητα, εξασφαλίζοντας ότι όσο το εξωτερικό σήμα ελαττώνεται τόσο το σήμα του cAMP υποχωρεί γρήγορα.

Σύνδεση ανασταλτικών πεπτιδίων. Η PKA ρυθμίζεται, επίσης, με τη σύνδεση εξειδικευμένων ανασταλτικών πρωτεϊνών. Υπάρχουν τρεις φυσικοί αναστολείς της PKA. Ο αναστολέας PKI (PKA Inhibitor), για παράδειγμα, συμμετέχει στην ενδοκυτταρική μεταφορά των καταλυτικών C υπομονάδων και θεωρείται ο κύριος ρυθμιστής της δραστηριότητας της C υπομονάδας (βλ. σελ. 276, **Εικόνα 5.51**).

Στόχευση σε υποκυτταρικές θέσεις μέσω AKAPs. Δεδομένου ότι η PKA είναι ευρέως κατανεμημένη και ενεργοποιείται από μια μεγάλη ποικιλία εξωκυτταρικών σημάτων, τίθεται η ερώτηση πώς –εκτός της ύπαρξης ισοενζύμων, της διαφορετικής φωσφορυλίωσης και της σύνδεσης αναστολέων– επιτυγχάνεται η υψηλή εξειδίκευση της δράσης της PKA στα κύτταρα. Η εξειδικευμένη διαμερισματοποίηση της PKA θεωρείται πλέον κύριο στοιχείο της εξειδικευμένης δράσης της PKA. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της PKA γίνεται είτε μέσω της άμεσης σύνδεσης των R ή C υπομονάδων με τα υποστρώματά τους είτε μέσω της σύνδεσής της με υποκυτ-

Εικόνα 7.9
Έλεγχος αρνητικής ανατροφοδότησης της PKA από τη φωσφοδιεστεράση του cAMP (PDE). Μετά την ενεργοποίηση της PKA, οι καταλυτικές υπομονάδες C απελευθερώνονται και φωσφορυλιώνουν μια PDE του cAMP, επιπλέον των υποστρωμάτων τους. Η φωσφοδιεστεράση ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση και υδρολύει το cAMP σε 5' AMP, μειώνοντας ή τερματίζοντας τη μεταγωγή σήματος μέσω της PKA.

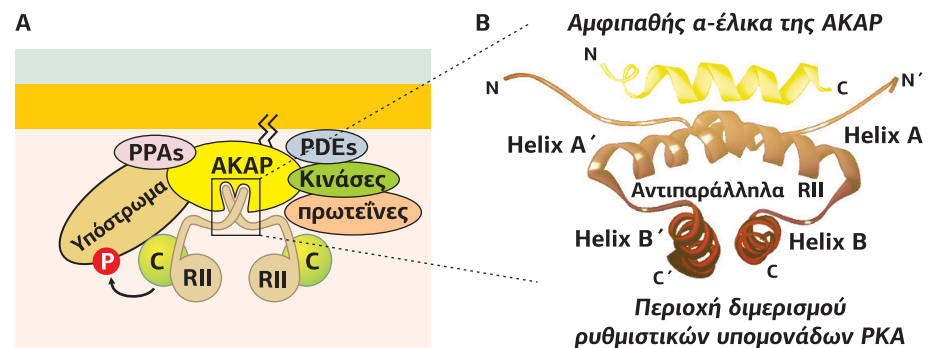


ταρικές δομές είτε, τέλος, μέσω της πρόσδεσής της σε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών AKAPs, οι οποίες προσκολλώνται σε διάφορες υποκυτταρικές περιοχές. Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 50 διαφορετικές AKAPs, που βρίσκονται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου.

2.3

AKAPs

Εικόνα 7.10
Αλληλεπίδραση της PKA με τις AKAPs, μέσω των R υπομονάδων. Α. Η AKAP είναι συνδεδεμένη με τη μεμβράνη του οργανιδίου στόχου και με τις R υπομονάδες της PKA. Το σύμπλοκο PKA/AKAP περιλαμβάνει, επίσης, και πρωτεϊνικά υποστρώματα των PKA, άλλες κινάσες, πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PPAs) και άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Β. Οι R υπομονάδες περιέχουν στο NH₂-τελικό τους άκρο μια σχετικά μικρή αλληλουχία αμινοξέων DD που περιλαμβάνει μία α-έλικα με υδρόφοβα αμινοξέα (helix A') και μία α-έλικα με φορτισμένα αμινοξέα (helix A). Η περιοχή DD των R υπομονάδων συνδέεται με μία μικρή αμφιπαθή α-έλικα 14-18 αμινοξέων, καλά συντηρημένη στην πλειοψηφία των AKAPs. [7] [59]



ραιότητα με τις RII υπομονάδες. Ωστόσο, υπάρχουν και AKAPs που συνδέονται με την PKA-RI. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη SKIP (Sphingosine Kinase Interacting Protein) συνδέεται αποκλειστικά με την PKA-I και διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της ChChd3 (πρωτεΐνης της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων), και η μικρή μεμβρανική smAKAP έχει ως στόχο την RI υπομονάδα. Επίσης, υπάρχουν και AKAPs διπλής εξειδίκευσης, όπως η D-AKAP1 και η D-AKAP2, η Ezrin και η Opa1 (Optic atrophy), οι οποίες συνδέουν με ανάλογη συγγένεια τις RI και RII υπομονάδες των PKA.

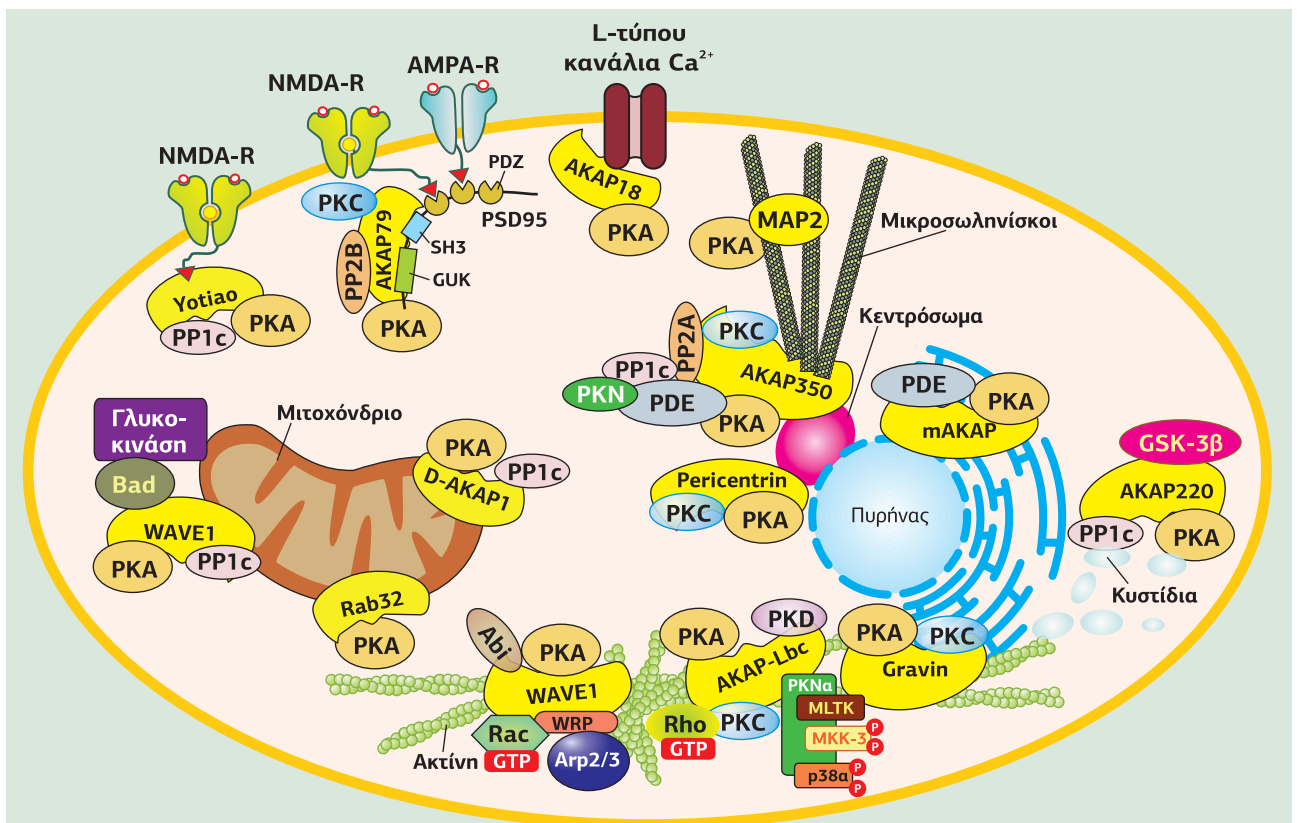
Οι AKAPs στοχοποιούν τις PKA σε ειδικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως η πλασματική μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια, ο κυτταροσκελετός, και τα κεντροσωμάτια. Μέσα στο υποκυτταρικό διαμέρισμα η AKAP μπορεί να συνδεθεί με διαφορετικά υποστρώματα της PKA και να συγκροτήσει σηματοδοτικά σύμπλοκα. Ανάμεσα στα μόρια που συνδέουν οι AKAPs μπορεί να είναι συστατικά των cAMP-εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως υποδοχείς, αδενυλικές κυκλάσες, ένζυμα που “σβήνουν” το σήμα, όπως οι φωσφατάσες (PPAs) και οι φωσφοδιεστεράσες (PDEs), αλλά και κινάσες και ένζυμα και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, σχηματίζοντας ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το **“μεταγωγόσωμα”** (transduceosome ή signalosome) **(Εικόνα 7.10Α)**.

Η **AKAP79/150**, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη των νευρώνων, δημιουργεί ένα μεγαλομοριακό σύμπλεγμα καθώς συνδέεται στα PIP₂ και αλληλεπιδρά με την F-ακτίνη και την καδερίνη στις θέσεις PSD των δενδριτικών ακάνθων. Επίσης, συνδέεται α. μέσω της περιοχής MAGUK που περιέχει, με την PSD95, αλληλεπιδρώντας έτσι με το COOH-τελικό άκρο των υποδοχέων NMDA και AMPA, β. συνδέεται με τις κινάσες PKA και PKC (οι οποίες φωσφορυλιώνουν του γλουταμινικούς υποδοχείς), γ. με τη φωσφατάση PP2B, δ. με τα κανάλια KCNQ2/3 (K⁺ voltage-gated channel, subfamily Q, member 2/3), που αποτελούν υπόστρωμα της PKC, και τέλος ε. μέσω του COOH-τελικού της άκρου αλληλεπιδρά με την LZ περιοχή των τασηο-εξαρτώμενων καναλιών Ca_v1.2, που είναι υπόστρωμα της PKA.

Ένα χαρακτηριστικό μεταγωγόσωμα δημιουργεί και η **AKAP-Lbc**, λόγω του δι-πλού ρόλου της ως πρωτεΐνης σκαλωσίας και ως RhoGEF. Η AKAP-Lbc βρίσκεται

Εικόνα 7.11

Οι AKAPs αγκυροβολούν τις PKA σε ειδικά διαμερίσματα, όπου συνδέονται με υποστρώματα των PKA (τους υποδοχείς AMPA και τα κανάλια Ca^{2+}), με ένζυμα που "σβήνουν" το σήμα, όπως οι φωσφατάσες (PP1, PP2A και PP2B) και οι φωσφοδιεστεράσες (PDE4D3). Οι AKAPs, επίσης, αλληλοεπιδρούν με κινάσες και ένζυμα και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (τις κινάσες PKC, PKN, PKD, GSK3β και Rac) μικρές GTPάσες Rho, Ras). Η WAVE1 οργανώνει διαφορετικά σηματοδοτικά σύμπλοκα ανάλογα με το υποκυτταρικό διαμέρισμα: στον κυτταροσκελετό συνδέεται με την Rac, την PKA, την Abi, την WRP και την Arp2/3, ενώ στα μιτοχόνδρια συνδέεται με την Bad, την PKA, την PP1 και τη γλυκοκινάση. Με κίτρινο διακρίνονται οι διαφορετικές AKAPs (AKAP18, AKAP79/150, AKAP220, AKAP350, AKAP-Lbc, D-AKAP, mAkap, Yotiao, WAVE1, Pericentrin και Gravin). [74]



αγκυροβολημένη στα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού και συνδέει τις κινάσες PKA, PKC η , PKD και PKNa/MAPKs (MLTK, MKK-3, p38a) καθώς και τη μικρή GTPάση RhoA.

Επίσης, το μεταγωγόσωμα που δημιουργείται μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το διαμέρισμα. Για παράδειγμα, η **WAVE1** (*Wiskott-Aldrich Verprolin-homology protein-1*) οργανώνει διαφορετικά σηματοδοτικά σύμπλοκα ανάλογα με τον ιστό και το υποκυτταρικό διαμέρισμα. Στους νευρικούς αυξητικούς κώνους η WAVE1 βρίσκεται στον κυτταροσκελετό, όπου συνδέεται με την Rac, την Arp2/3 (*Actin-related protein-2/3*), την WRP (*WAVE-associated Rac-GTPase activating Protein*) και την Abi (*Abl interacting protein*). Σήματα αυξητικών παραγόντων ενεργοποιούν την Rac, η οποία προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης μέσω της Arp2/3. Η WRP, ως GAP, απενεργοποιεί την Rac-GTP, ενώ η Abi είναι γνωστός ρυθμιστής της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού. Στα μιτοχόνδρια των ηπατοκυττάρων η WAVE1 συνδέεται με την PKA, την Bad, την PP1c και τη γλυκοκινάση. Η PKA φωσφορυλιώνει την Bad (*Bcl2-associated death*), μειώνοντας την αποπτωτική της δράση. Αποφωσφορυλίωση από την PP1 επανεκκινεί το σύστημα. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της Bad επηρεάζει τη δραστηριότητα της γλυκοκινάσης (**Εικόνα 7.11**).

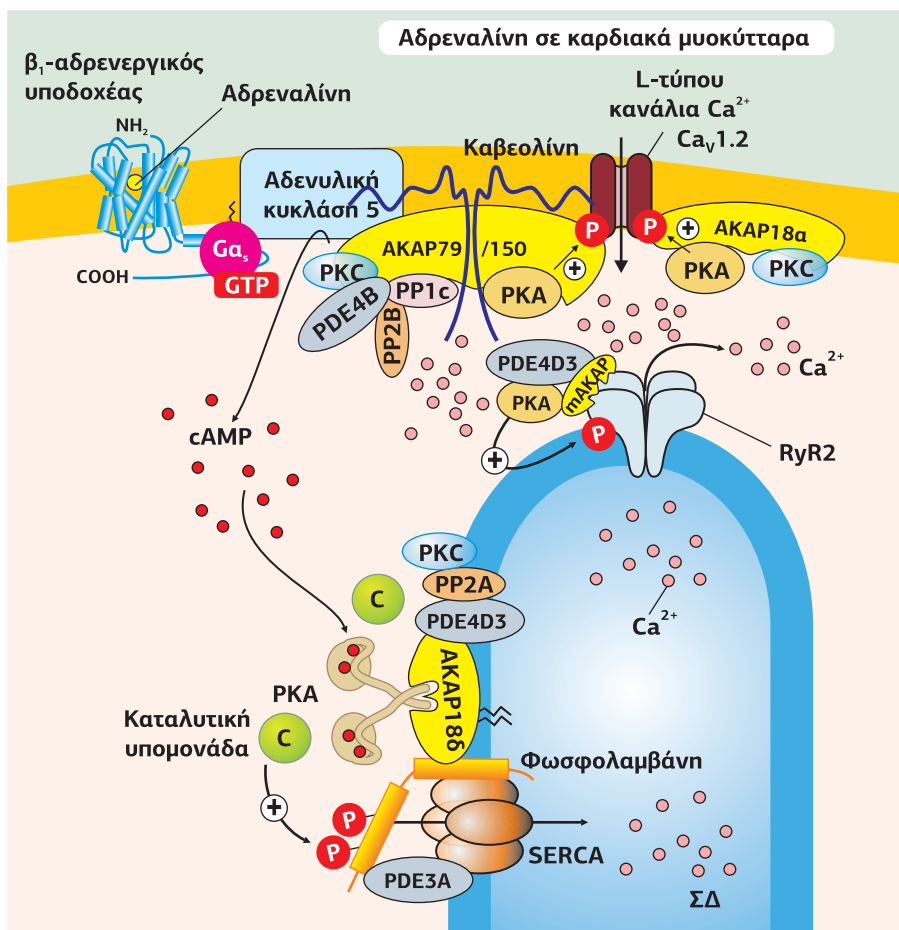
AKAPs και ο ρόλος τους στην αύξηση του καρδιακού ρυθμού

Η αύξηση της καρδιακής συσταλτικότητας που προκαλεί η ενεργοποίηση του β_1 -αδρενεργικού υποδοχέα (β_1 -AR) εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της PKA με τις AKAPs. Η σύνδεση της αδρεναλίνης στον β_1 -AR ενεργοποιεί το μονοπάτι G_{α_s} πρωτεΐνη/αδενυλική κυκλάση/παραγωγή cAMP. Το cAMP συνδέεται στις R υπομονάδες της PKA, οι C υπομονάδες αποχωρίζονται και φωσφορυλιώνουν τα L-τύπου κανάλια Ca^{2+} , που βρίσκονται στο σαρκείλημα, και τους υποδοχείς ρυανοδίνης του ΣΔ.

Εικόνα 7.12

Οι AKAPs ελέγχουν την αύξηση της συσταλτικότητας της καρδιάς. Η AKAP18a

συνδέεται με την PKA, την PDE4B, διευκολύνοντας την PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} . Η AKAP79/150 συγκροτεί ένα μεγάλο σηματοδοτικό σύμπλοκο, που περιλαμβάνει την PKA, την PKC, την καταλυτική υπομονάδα PP1c (δρώντας με αυτόν τον τρόπο ως ρυθμιστική υπομονάδα της PP1), την καλσινερίνη (PP2B), την αδενυλική κυκλάση (AC5-6), τον β_1 -αδρενεργικό υποδοχέα (β_1 -AR), το L-τύπου κανάλι Ca^{2+} και την καβεολίνη (caveolin, Cav3), η οποία δημιουργεί μικροπεριοχές cAMP. Στο σαρκοπλασματικό δίκτυο η mAKAP κατευθύνει την PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση του υποδοχέα RyR2 και η AKAP18δ/γ ρυθμίζει την PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης. Επιπλέον, η AKAP18δ αγκυροβολεί την PKA, την PP2A, την PKC και τη φωσφοδιεστεράση PDE4D3 σε ένα σύμπλοκο που συγκροτείται από την PLB και την ATPάση SERCA2. [49] [16] [15]



Η φωσφορυλίωση των καναλιών αυξάνει το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} αυξάνοντας τη συσταλτικότητα. Για να επέλθει χάλαση των καρδιακών μυοκυττάρων, πρέπει να απομακρυνθεί το Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα. Κύριο ρόλο παίζει η αντλία SERCA, η οποία ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης (PLB) από την β_1 -AR μεσολαβούμενη ενεργοποίηση της PKA. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των φωσφορυλίσεων από την PKA είναι η αύξηση του ρυθμού της καρδιακής σύσπασης. Αποτελεσματική φωσφορυλίωση των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} συμβαίνει μόνο όταν η PKA είναι αγκυροβολημένη στο κανάλι μέσω της AKAP18a και της AKAP79/150 (**Εικόνα 7.12**). Πιο αναλυτικά:

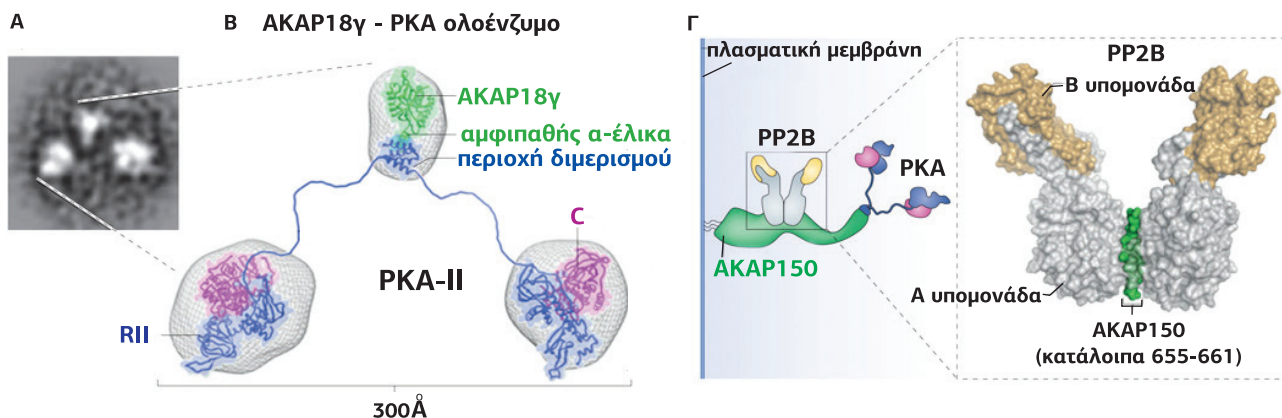
Η **AKAP18a** εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα και η μυριστούλιωση και η παλμιτούλιωση NH_2 -τελικών καταλοίπων της την αγκυροβολούν στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, διευκολύνοντας τη φυσική σύνδεσή της στα L-τύπου κανάλια $\text{Ca}_v1.2$. Η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω ενός μοτίβου Leucine Zipper (LZ) στο COOH -τελικό άκρο του καναλιού, στρατολογώντας παράλληλα την PKA κοντά στον στόχο της, τη Ser1757 και τη Ser1854 του COOH -τελικού άκρου του $\text{Ca}_v1.2$ (βλ. σελ. 159, **Εικόνα 4.33**).

Η **AKAP79** εκφράζεται στον άνθρωπο, ενώ η ομόλογή της **AKAP150** στα τρωκτικά και στα βοοειδή. Η τοποθέτησή της στη μεμβράνη εμπλέκει τρεις πολυβασικές περιοχές στο NH_2 -τελικό της άκρο, που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης. Επίσης, η παλμιτούλιωση των Cys36 και Cys129 διευκολύνει τη σύνδεσή της σε σχεδίες λιπιδίων. Η AKAP79/150 συνδέεται με τα L-τύπου κανάλια $\text{Ca}_v1.2$ στο μοτίβο Leucine Zipper (LZ) του COOH -τελικού τους άκρου. Ταυτόχρονα λειτουργεί και ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς, καθώς συνδέεται με τους β_1 ARs, την αδενυλική κυκλάση AC5/6, την PKA, την PKC, τη φωσφατάση PP2B, τη φωσφοδιεστεράση PDE4B, σε μια λιπιδική σχεδία καβεολίνης (caveolin, Cav3) που περιέχει το L-τύπου κανάλι Ca^{2+} , $\text{Ca}_v1.2$. Η κύρια λειτουργία της AKAP79/150 είναι να ενσωματώνει τα cAMP- και Ca^{2+} -εξαρτώμενα σήματα, καθώς συνδέει την PKA, την PKC και την PP2B (**Εικόνα 7.12**). Η σύνδεση της PKC επάγει την παρατεταμένη είσοδο Ca^{2+} από τα L-τύπου κανάλια Ca^{2+} αυξάνοντας επιπλέον τον αγγειακό τόνο.

Για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα RyR2 πρέπει η PKA να βρίσκεται συνδεδεμένη στην **mAKAP**. Η mAKAP συνδέεται στο μοτίβο LZ3 του μεγάλου NH_2 -τελικού άκρου των υποδοχέων RyR2 (βλ. σελ. 166, **Εικόνα 4.41**). Παρότι τα κανάλια $\text{Ca}_v1.2$ βρίσκονται στη μεμβράνη των T-σωληναρίων και οι RyR2 στη μεμβράνη του ΣΔ, έχουν στενή σχέση και, κατά συνέπεια, η PKA που συνδέεται μέσω της mAKAP στον RyR2 βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τα κανάλια $\text{Ca}_v1.2$. Επίσης, η mAKAP συνδέει την PDE4D3, η οποία μειώνοντας τη συγκέντρωση cAMP ελέγχει τη φωσφορυλίωση του RyR2 από την PKA. Για παράδειγμα, στην καρδιακή ανεπάρκεια η επαφή PDE4D/RyR2 είναι εξασθενημένη και η φωσφορυλίωση της Ser2808 αυξημένη. Η φωσφορυλίωση της Ser2808 αυξάνει το άνοιγμα του καναλιού RyR2, πιθανόν γιατί αποσταθεροποιεί τη σύνδεση της FKBP στον RyR2, καθιστώντας το κανάλι διαπερατό και οδηγώντας σε αρρυθμίες. Η αγκυροβολημένη στην mAKAP

Εικόνα 7.13

Α. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του συμπλόκου PKA-II / AKAP18γ. Β. Τριδιάστατη αναπαράσταση του ετεροπενταμερούς συμπλόκου που περιέχει την AKAP18γ, δύο ρυθμιστικές RII και δύο καταλυτικές C υπομονάδες της PKA. Γ. Η AKAP150 των τρωκτικών είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη σκαλωσιάς που συντονίζει διαφορετικούς συνδυασμούς ρυθμιστικών ενζύμων. Στην εικόνα φαίνεται συνδεδεμένη με την PKA και τη φωσφατάση PP2B. [44]

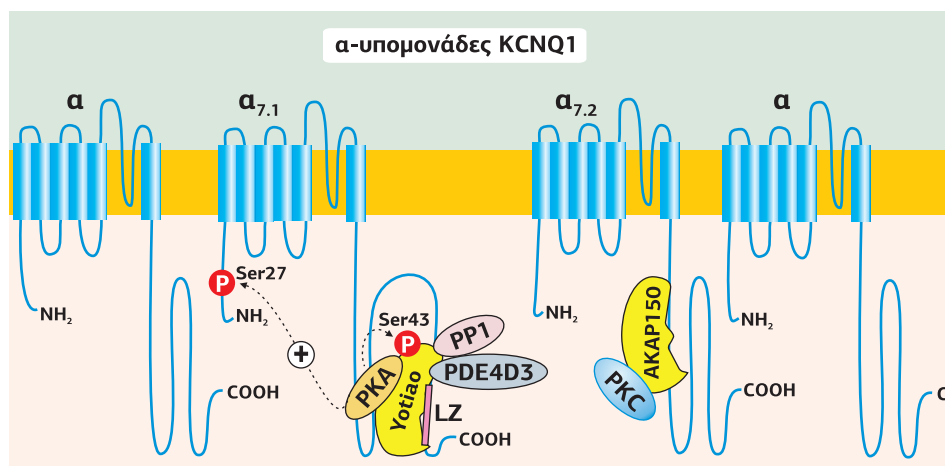


Η **Yotiao**, λόγω της μακρόστενης coiled-coil δομής της, πήρε το όνομά της από ένα δημοφιλές κινέζικο πρωινό σκεύασμα που μοιάζει με *churros* (μακριές αλυσίδες τηγανισμένης ζύμης). Η Yotiao συγκεντρώνεται ειδικά στη νευρομυϊκή σύνδεση (NMJ) καθώς και στις νευρωνικές συνάψεις, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να έχει μια γενική λειτουργία στην οργάνωση της μετασυναπτικής πυκνότητας.



Εικόνα 7.14

Ρύθμιση της καρδιακής επαναπόλωσης μέσω του συμπλόκου που συγκροτεί η Yotiao. Η α υπομονάδα KCNQ1 των καναλιών του αργού επανορθωτικού ρεύματος K^+ (I_{Ks}) μέσω μιας περιοχής LZ του COOH-τελικού της άκρου αλληλεπιδρά με την Yotiao. Η αγκυροβολημένη στην Yotiao PKA φωσφορυλιώνει την KCNQ1 και την Yotiao σε κατάλοιπα Ser του NH_2 -τελικού τους άκρου, αυξάνοντας την ενεργοποίηση του καναλιού. [16] [15]



AKAP-Lbc και ο ρόλος της στην καρδιακή υπερτροφία

Η AKAP-Lbc (*Lymphoid blast crisis*) ή AKAP13, εκτός από την ικανότητά της να συνδέει την PKA, παίζει και ρόλο RhoGEF. Σε απάντηση στην ενεργοποίηση του α_1 -αδρενεργικού υποδοχέα (α_1AR) η δραστηριότητα της RhoA GTPάσης οδηγεί σε

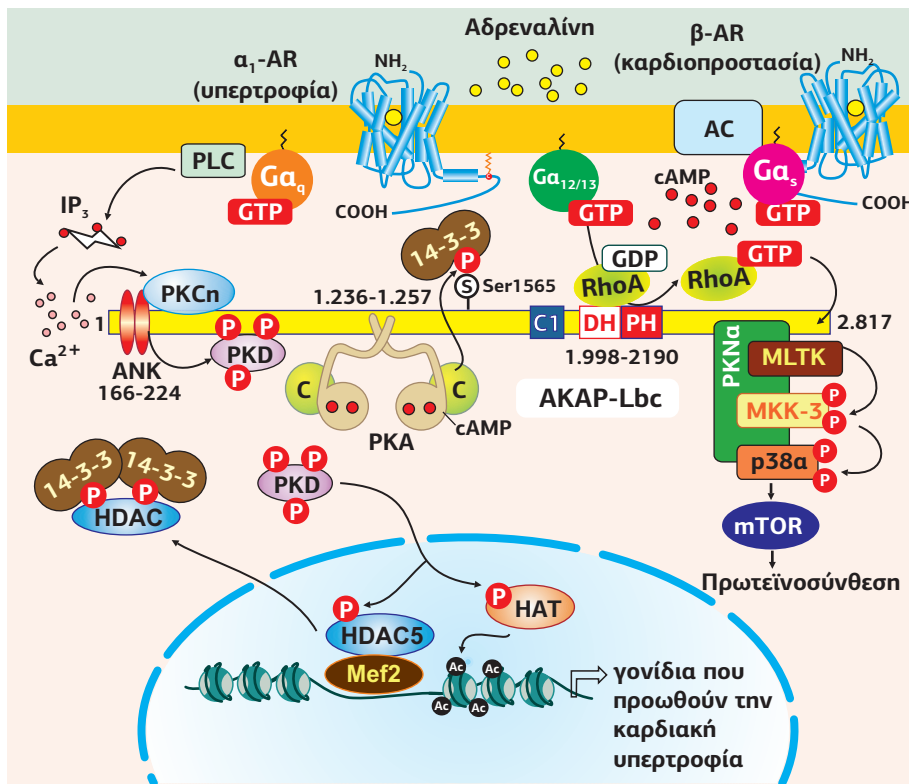
PKA, εκτός από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του υποδοχέα RyR2, ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση-αναστολή της AC5 αναστέλλοντας την παραγωγή cAMP, ως αρνητικός feedback μηχανισμός, και τη φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση της PDE4D3 που προωθεί τον καταβολισμό του cAMP.

Τέλος, για τη φωσφορυλίωση της φωσφολαμβάνης η PKA πρέπει να βρίσκεται συνδεδεμένη στην **AKAP18δ**. Η AKAP18δ περιέχει, επίσης, μια κεντρική περιοχή φωσφοεστεράσης που συνδέει το 5' AMP. Αν και δεν έχει αναγνωριστεί δράση λιγάσης ή υδρολάσης στην AKAP18δ, μπορεί να παίζει τον ρόλο αισθητήρα του 5' AMP, ενός σημαντικού μορίου που καθορίζει τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου και αποτελεί το προϊόν του καταβολισμού του cAMP από τις PDEs.

Yotiao και ο ρόλος της στην επαναπόλωση των καρδιακών δυναμικών δράσης

Στον άνθρωπο η συμπαθητική ρύθμιση των καρδιακών δυναμικών δράσης απαιτεί την PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της α -KCNQ1 υπομονάδας (ή $K_v7.1$) των καναλιών που είναι υπεύθυνα για το καθυστερημένο επανορθωτικό ρεύμα K^+ I_{Ks} (slowly activating delayed rectifier), υπεύθυνο για τη φυσιολογική επαναπόλωση των καρδιακών δυναμικών δράσης (βλ. σελ. 157, **Εικόνα 4.30**). Η AKAP Yotiao βρίσκεται συνδεδεμένη στο κανάλι KCNQ1, στο οποίο στρατολογεί τις PKA, PP1, PDE4D3 και την αδενυλική κυκλάση AC2 (**Εικόνα 7.14**). Η PKA φωσφορυλιώνει την Ser27 του KCNQ1 αυξάνοντας τη δραστηριότητα του καναλιού και μειώνοντας τη διάρκεια των δυναμικών δράσης. Επίσης, φωσφορυλιώνει την Ser43 της Yotiao επιτείνοντας ακόμη περισσότερο το άνοιγμα του καναλιού K^+ . Η αποφωσφορυλίωση αυτών των καταλοίπων Ser από τη συνδεδεμένη PP1 σταματάει τη ροή K^+ . Τα τοπικά επίπεδα του cAMP γύρω από το κανάλι ρυθμίζονται από τη φωσφοδιεστεράση PDE4D3, η οποία επίσης συνδέεται στο σηματοδοτικό σύμπλοκο.

Κληρονομικές μεταλλάξεις στην περιοχή της Yotiao που συνδέεται με την KCNQ1 (S1570L), καθώς και στην περιοχή της KCNQ1 που συνδέεται με την Yotiao (G589D) μειώνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην καθυστερημένη επαναπόλωση των δυναμικών δράσης στις κοιλίες της καρδιάς και στο long QT σύνδρομο (βλ. σελ. 154, **Εικόνα 4.26**), μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από καρδιακές αρρυθμίες και ξαφνικό θάνατο, τονίζοντας για μία ακόμη φορά την ανάγκη δημιουργίας συμπλεγμάτων για τη χρονική ρύθμιση της δραστηριότητας PKA.



Εικόνα 7.15
Ρύθμιση της καρδιακής υπερτροφίας μέσω του συμπλόκου που συγκροτεί η AKAP-Lbc. Ο ενεργοποιημένος α_1 -αδρενεργικός υποδοχέας διεγείρει τη δραστηριότητα RhoGEF της AKAP-Lbc μέσω της $G_{12/13}$. Η RhoA GTP απελευθερώνεται από το σύμπλοκο AKAP-Lbc και προωθεί την υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων μέσω του μονοπατιού των MAPKs (MLTK, MKK-3, p38 α), οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες, μέσω της πρωτεΐνης σκαλωσιάς PKNa, στην AKAP-Lbc. Η ενεργοποίηση της αγκυροβολημένης στην AKAP-Lbc PKA προωθεί τη φωσφορυλίωση της AKAP-Lbc στη Ser1565. Αυτό οδηγεί στη στρατολόγηση της 14-3-3, η οποία αναστέλλει τη δραστηριότητα RhoGEF της AKAP-Lbc. Η AKAP-Lbc, επίσης, στρατολογεί την PKC η και την PKD. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού $G_{12/13}$ -PLC από τους υποδοχείς α_1 -ARs οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKC η , η οποία φωσφορυλιώνει την PKD. Η ενεργή PKD φωσφορυλιώνει την αποακετυλάση των ιστονών HDAC5, επάγοντας την έξοδό της από τον πυρήνα. Αυτό ευνοεί την ακετυλίωση των ιστονών από τις HAT και την εξαρτώμενη από τον Mef2 μεταγραφή γονιδίων που επάγουν την υπερτροφία της καρδιάς. [16]

καρδιακή υπερτροφία, μέσω του μονοπατιού των MAPKs (MLTK, MKK-3, p38 α), οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες, μέσω της κινάσης PKNa, στην AKAP-Lbc. Η ενεργοποίηση των α_1 ARs αυξάνει τη δραστηριότητα RhoGEF της AKAP-Lbc, η οποία καταστέλλεται μετά από PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της Ser1565, καθώς στρατολογούνται οι πρωτεΐνες 14-3-3. Στην AKAP-Lbc εκτός από την PKA, βρίσκονται συνδεδεμένες και οι κινάσες PKC η και PKD. Η PKC η φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την PKD, η οποία εισέρχεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει την αποακετυλάση των ιστονών HDAC5. Η φωσφορυλιωμένη HDAC5 εξέρχεται από τον πυρήνα επιτρέποντας την ακετυλίωση των ιστονών, το ξετύλιγμα της χρωματίνης και τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία. Η έξοδος από τον πυρήνα της HDAC5, η οποία κρατούσε σε αναστολή τον Mef2, οδηγεί στην εξαρτώμενη από τον Mef2 (Myocyte-specific enhancer-binding factor 2) μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία (Εικόνα 7.15).

2.4

Ο ρόλος της PKA στη φυσιολογία του κυττάρου

Όπως είδαμε, η PKA έχει ποικίλους στόχους μέσω των οποίων ρυθμίζει πολλές και διαφορετικές λειτουργίες των κυττάρων. Επάγει τον καταβολισμό του γλυκογόνου στο ήπαρ και τους μυς φωσφορυλιώνοντας την **κινάση της φωσφορυλάσης**, η οποία μετατρέπει την ανενεργή φωσφορυλάση b στην ενεργή φωσφορυλάση a (βλ. Εικόνα 5.57 και 7.38). Επίσης, αναστέλλει τη γλυκόλυση φωσφορυλιώνοντας τη **φωσφοφρουκτοκινάση 2**, η οποία οδηγεί στη μείωση της συγκέντρωσης της Fru-2,6-P $_2$, θετικού ρυθμιστή της φωσφοφρουκτοκινάσης 1 (Εικόνα 7.17). Τέλος, επάγει τον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων, φωσφορυλιώνοντας την περιλιπίνη και την λιπάση HSL (Εικόνα 7.18), προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων απενεργοποιώντας την MLCK και ενεργοποιώντας την MLCP (Εικόνα 7.19), έχει αντιδιουρητική δράση (Εικόνα 5.55) και συμμετέχει στον μηχανισμό της μακρόχρονης ενδυνάμωσης κατά τη μνήμη και τη μάθηση (Εικόνα 7.20).

Η φυσιολογική καρδιά περιέχει ένα σημαντικό μειωμένο αριθμό α_1 -υποδοχέων σε σχέση με τους β ARs. Η αναλογία α_1/β ARs αυξάνεται αισθητά στην υπερτροφική καρδιά.

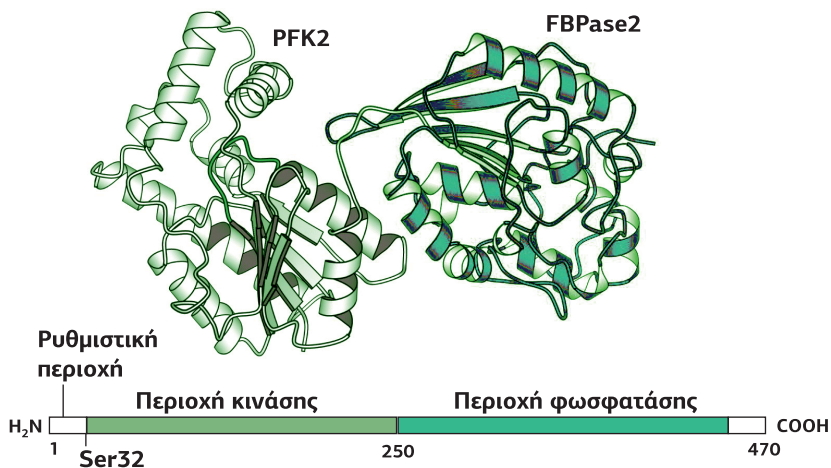
Η PKA αναστέλλει τη γλυκόλυση

Η 2,6-διφωσφορική φρουκτόζη (Fru2,6P_2) δεν είναι ένας κανονικός μεταβολίτης του μεταβολισμού της γλυκόζης αλλά συντίθεται μόνο για να ενεργοποιήσει τη γλυκόλυση. Η αύξηση των επιπέδων Fru2,6P_2 στο ήπαρ ενεργοποιεί αλλοστερικά την φωσφοφρουκτοκινάση 1 (PFK1), η οποία φωσφορυλιώνει την 6-φωσφορική φρουκτόζη σε 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη (Fru1,6P_2). Με μια σειρά αντιδράσεων η Fru1,6P_2 μετατρέπεται, στη συνέχεια, σε πυροσταφυλικό (γλυκόλυση).

Η σύνθεση και ο καταβολισμός της Fru2,6P_2 ελέγχεται από ένα μόνο ένζυμο, το οποίο έχει διπλή δράση. Η περιοχική κινάσης του ενζύμου ονομάζεται φωσφοφρουκτοκινάση 2 (PFK2), για να διακριθεί από τη φωσφοφρουκτοκινάση 1 (PFK1), και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της Fru2,6P_2 . Η περιοχική φωσφατάσης του ενζύμου ονομάζεται φωσφατάση της 2,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (FBPase2) και καταλύει την αποφωσφορυλίωση και άρα τον καταβολισμό της Fru2,6P_2 (Εικόνα 7.16). Η μετατροπή της δραστηριότητας PFK2 σε FBPase2 επιτυγχάνεται με PKA-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της περιοχής PFK2.

Εικόνα 7.16

Κρυσταλλική δομή του ηπατικού ενζύμου που περιέχει τις απαραίτητες δραστηριότητες για τη σύνθεση και τον καταβολισμό της Fru2,6P_2 . Η περιοχική κινάσης του ενζύμου ονομάζεται φωσφοφρουκτοκινάση 2 (PFK2) και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της Fru2,6P_2 . Η περιοχική φωσφατάσης του ενζύμου ονομάζεται φωσφατάση της 2,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (FBPase2) και καταλύει την αποφωσφορυλίωση της Fru2,6P_2 . Η PKA φωσφορυλιώνει την Ser32 της PFK2 του ήπατος, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της PFK2 και την ενεργοποίηση της FBPase2.



Οι ρυθμιστές της συγκέντρωσης της Fru2,6P_2 είναι οι ορμόνες ινσουλίνη, γλυκαγόνη και αδρεναλίνη. Η γλυκαγόνη δρα στο ήπαρ, όπου επάγει την παραγωγή cAMP, το οποίο ενεργοποιεί την PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει την Ser32 αναστέλλοντας τη δράση της PFK2 και ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα FBPase2 του ενζύμου, μειώνοντας τα επίπεδα Fru2,6P_2 στο κύτταρο. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλεται η γλυκόλυση και ενεργοποιείται η γλυκονεογένεση. Η ινσουλίνη στον σκελετικό μυ ενεργοποιεί την αντίστροφη αντίδραση μειώνοντας τα επίπεδα cAMP μέσω της ενεργοποίησης της φωσφοδιεστεράσης PDE3B (Εικόνα 7.17).

Συμπερασματικά:

1. Η Fru2,6P_2 ενεργοποιεί την PFK1 (γλυκόλυση) και αναστέλλει την FBPase-1 (γλυκονεογένεση).
2. Η PFK2 δημιουργεί Fru2,6P_2 από Fru6P .
3. Η FBPase2 καταβολίζει τη Fru2,6P_2 σε Fru6P .
4. Η PFK2 μετατρέπεται σε FBPase2 έπειτα από φωσφορυλίωση από την PKA (απαιτεί την ενεργοποίηση παραγωγής cAMP από τη γλυκαγόνη ή την αδρεναλίνη).
5. Η FBPase2 μετατρέπεται σε PFK2 απουσία cAMP.

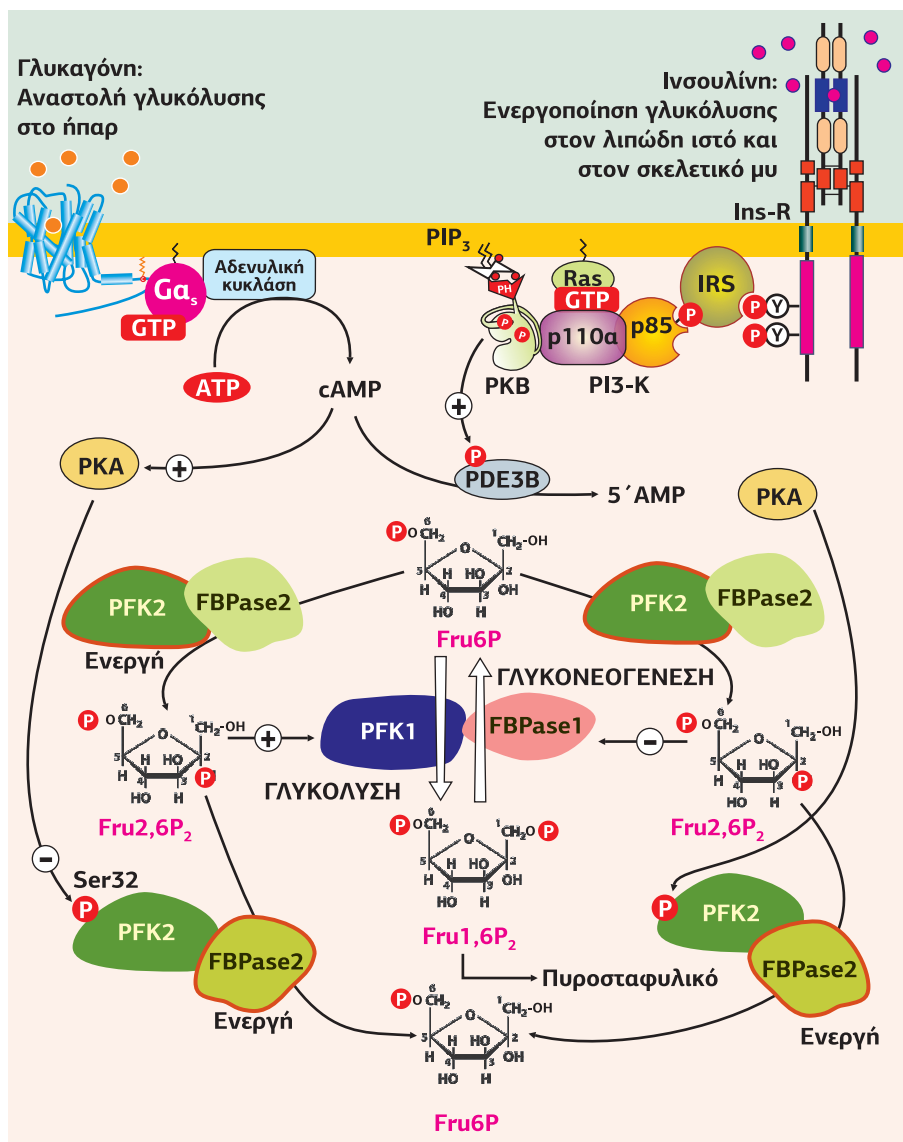
Η PKA ενεργοποιεί τη λιπόλυση

Δύο σημαντικοί στόχοι της PKA που παίζουν ρόλο στη λιπόλυση είναι η **περιλιπίνη Α** (PLIN-A), η οποία περιβάλλει την επιφάνεια των λιπιδικών σταγονιδίων στα λιποκύτταρα, και η **ορμονο-ευαίσθητη λιπάση HSL** (Hormone-Sensitive Lipase), η οποία επάγει την έναρξη της υδρόλυσης της τριακυλογλυκερόλης σε ελεύθε-

Κατά τη γλυκόλυση η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό:

Γλυκόζη → 6-φωσφορική
 γλυκόζη → 6-φωσφορική
 φρουκτόζη → (μέσω PFK1)
 → 1,6-διφωσφορική
 φρουκτόζη →
 3-φωσφορική
 γλυκεραλδεΐδη →
 1,3-διφωσφογλυκερικό
 → 3-φωσφογλυκερικό
 → → πυροσταφυλικό.

Κατά τη γλυκονεογένεση το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γλυκόζη.

**Εικόνα 7.17**

Αναστολή της γλυκόλυσης από τη γλυκαγόνη/PKA στο ήπαρ και ενεργοποίηση της γλυκόλυσης από την ινσουλίνη στους σκελετικούς μύς. Η Fru2,6P₂ συντίθεται μόνο για χάρη της ρύθμισης της γλυκόλυσης: τα αυξημένα επίπεδα Fru2,6P₂ ενεργοποιούν την PFK1 (και την παραγωγή Fru1,6P₂) και αναστέλλουν την FBPase1 (και την παραγωγή Fru6P). Η σύνθεση της Fru2,6P₂ είναι κάτω από τον έλεγχο ορμονών που ελέγχουν την παραγωγή του cAMP. Η γλυκαγόνη στο ήπαρ ενεργοποιεί το μονοπάτι GPCR/ Gα_s/ αδενυλική κυκλάση επάγοντας την παραγωγή cAMP, ενώ η ινσουλίνη στον λιπώδη ιστό και τον σκελετικό μυ ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση PDE3B μειώνοντας τα επίπεδα cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία φωσφορυλιώνει την φωσφορρυλκινάση 2 (PFK2), και ενεργοποιεί τη δραστηριότητα φωσφατάσας του ενζύμου ελαττώνοντας τα επίπεδα Fru2,6P₂. Ως εκ τούτου, στο ήπαρ η γλυκαγόνη αναστέλλει τη γλυκόλυση, ενώ στους σκελετικούς μύς η ινσουλίνη την ενεργοποιεί.

ρα λιπαρά οξέα (FA, fatty acids) και γλυκερόλη (βλ. **Εικόνα 6.36**). Η αδρεναλίνη μέσω των β₁-υποδοχέων (και η γλυκαγόνη) ενεργοποιεί μέσω της Gα_s την αδενυλική κυκλάση και αυξάνει τη συγκέντρωση του cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία υπερφωσφορυλιώνει την περιλιπίνη σε έξι κατάλοιπα, Ser86, Ser227, Ser281, Ser438, Ser497 και Ser522 (που χαρακτηρίζονται ως sites 1-6), και την HSL στις Ser563 και Ser660, ενεργοποιώντας τη λιπόλυση (βλ. και σσ. 376-377) (**Εικόνα 7.18**). Η ινσουλίνη, μέσω της κινάσης PKB φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την PDE3B, η οποία ελαττώνει το cAMP, με αντιλιπολυτικά αποτελέσματα

Η PKA ενεργοποιεί τη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων

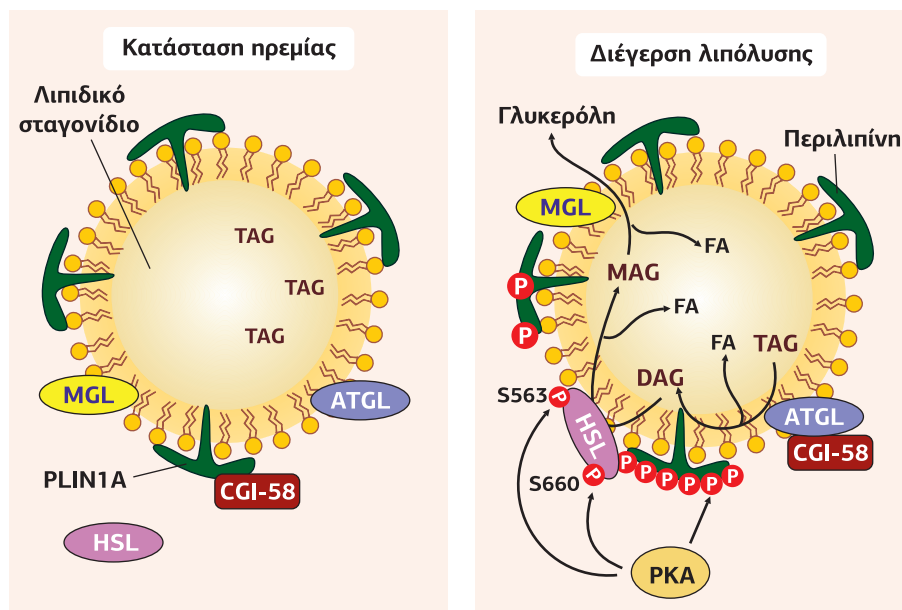
Στα λεία μυϊκά κύτταρα η PKA φωσφορυλιώνει την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), η οποία απενεργοποιείται. Ως αποτέλεσμα, δεν φωσφορυλιώνεται η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης οδηγώντας το λείο μυϊκό κύτταρο σε χάλαση (**Εικόνα 7.19**). Η MLCK και η MLCP έχουν αντίθετη δράση στον έλεγχο της σύσπασης των λείων μυϊκών κυττάρων. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ οδηγεί στη δημιουργία του συμπλόκου (Ca²⁺)⁴/καλμοδουλίνη (CaM), το οποίο ενεργοποιεί την MLCK. Η MLCK φωσφορυλιώνει την Ser19 της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης προκαλώντας σύσπαση (βλ. σσ. 440-441). Ωστόσο, η CaM μπορεί να ενεργοποιήσει και την CaMK-II, η οποία φωσφορυλιώνοντας την Ser992 της MLCK

Στην καρδιά η ρύθμιση του ενζύμου είναι διαφορετική. Η PKA φωσφορυλιώνει τις Ser466 και Ser483 οδηγώντας στην ενεργοποίηση της PFK2 και συνεπώς στην ενεργοποίηση της γλυκόλυσης.

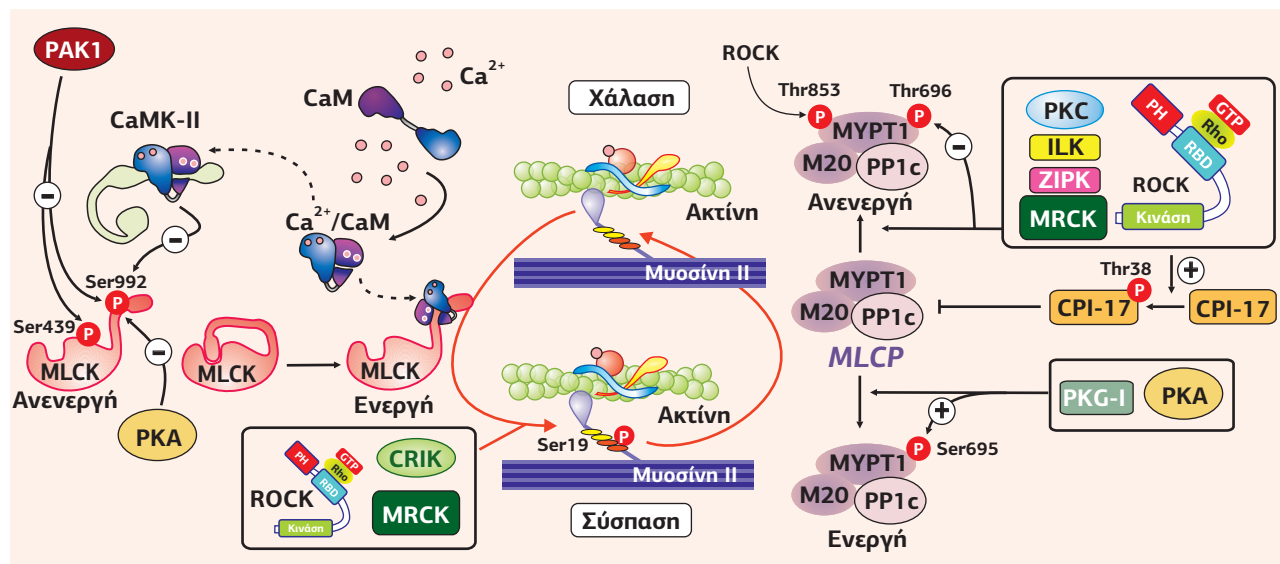
(RD: Regulatory Domain)

Εικόνα 7.18

Ενεργοποίηση της λιπόλυσης στα λιποκύτταρα από την PKA. Η ενεργοποίηση της PKA οδηγεί στη φωσφορυλίωση της περιλιπίνης και της HSL. Ως αποτέλεσμα, η CGI-58 απελευθερώνεται από την PLIN-1A και συνδέεται στη λιπάση ATGL, την οποία και ενεργοποιεί. Η ATGL μετατρέπει την TAG σε DAG. Στη συνέχεια, η στρατολογημένη κοντά στην περιλιπίνη HSL μετατρέπει την DAG σε MAG, η οποία μετατρέπεται από την MGL σε γλυκερόλη. Σε κάθε στάδιο απελευθερώνεται και ένα λιπαρό οξύ (FA). Σε συνθήκες ηρεμίας η περιλιπίνη και η HSL δεν είναι φωσφορυλιωμένες και η HSL βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. [51]



εμποδίζει την ενεργοποίησή της. Την ίδια θέση φωσφορυλιώνει και η PKA επιφέροντας το ίδιο αποτέλεσμα. Η MLCP είναι ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο που αποτελείται από την **PP1c** (Protein Phosphatase 1c), με δράση φωσφατάσης, την **M20**, μια 20 kDa υπομονάδα, η δράση της οποίας είναι άγνωστη, και την υπομονάδα **MYPT1** (Myosin Phosphatase Target subunit 1), η οποία συνδέεται στη μυοσίνη (βλ. **Εικόνα 7.57**). Η δραστηριότητα της MLCP ρυθμίζεται από διάφορες κινάσες. Αναστέλλεται από τις κινάσες PKC, ILK (Integrin-Linked Kinase), ROCK (Rho-Controlled Kinase), ZIPK (Zipper Interacting Protein Kinase) και MRCK (Myotonic dystrophy

**Εικόνα 7.19**

Ρύθμιση της σύσπασης /χάλασης των λείων μυϊκών κυττάρων από πρωτεϊνικές κινάσες. Η αύξηση του Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίηση της MLCK από την καλμοδοουλίνη. Η MLCK φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης MLC στη Ser19 προκαλώντας σύσπαση. Η PKA, η PAK1 και η CaMK-II φωσφορυλιώνουν την MLCK στη Ser992 απενεργοποιώντας την και προκαλώντας χάλαση λόγω μη φωσφορυλίωσης της MLC. Οι κινάσες PKA και PKG-I φωσφορυλιώνουν, επίσης, την MLCP στη Ser695 της ρυθμιστικής υπομονάδας MYPT και την ενεργοποιούν, προκαλώντας χάλαση. Σε αντίθεση, οι κινάσες PKC, ROCK, ILK, ZIPK και MRCK φωσφορυλιώνουν την MLCP στην Thr696 και την απενεργοποιούν, παρατείνοντας τη σύσπαση. Η ROCK έχει και έναν 2ο στόχο, την Thr853. Οι κινάσες αυτές αναστέλλουν την MLCP και με έναν επιπλέον μηχανισμό: φωσφορυλιώνουν (στην Thr38) και ενεργοποιούν τον αναστολέα της MLCP, CPI-17. Η MLCP αποτελείται από τρεις υπομονάδες, MYPT, M20 και PP1c. [23].

kinase Related Cdc42 binding Kinase). Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν την MYPT1 στις Thr853 και Thr696 (μόνο η ROCK) και την απενεργοποιούν. Επίσης φωσφορυλιώνουν (εκτός από την MRCK) στην Thr38 τον αναστολέα της MLCP CPI-17 (PKC-activated PP inhibitor 17), τον οποίον και ενεργοποιούν οδηγώντας σε σύσπαση. Η δραστηριότητα της MLCP ενεργοποιείται από τις κινάσες PKG-I και PKA, οι οποίες φωσφορυλιώνοντας την Ser695 της MYPT1 προκαλούν χάλαση.

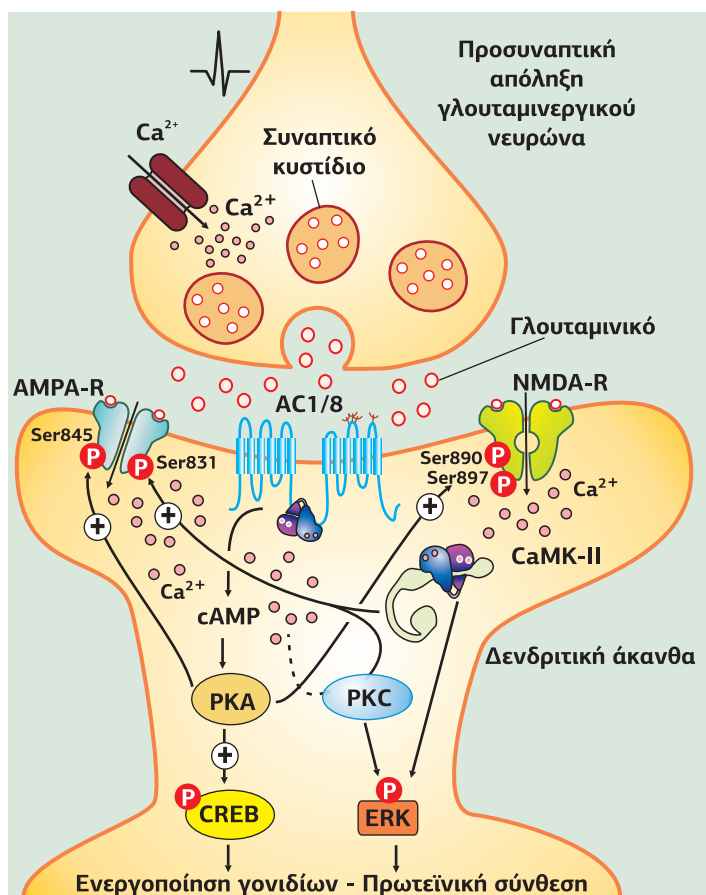
Η δράση της PKA στο έντερο και στους νεφρούς

Στο έντερο η PKA φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική περιοχή (R) του διαμεμβρανικού ρυθμιστή της αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης CFTR, ενεργοποιώντας την έκκριση Cl^- στον αυλό του εντέρου. Επίσης, προσελκύεται, μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής NHERF, κοντά στον ανταλλάκτη Na^+/H^+ NHE3, τον οποίο φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί, με αποτέλεσμα την αναστολή της απορρόφησης Na^+ από το εντερικό επιθήλιο (βλ. σελ. 221, **Εικόνα 4.96** και σελ. 378 **Εικόνα 6.37**). Όπως είδαμε, ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της παραγωγής cAMP, από την τοξίνη της χολέρας, η οποία ριβοσυλιώνει την G_{α_s} -πρωτεΐνη, οδηγεί στη διάρροια (βλ. σελ. 264 **Εικόνα 5.40**).

Στους νεφρούς, στα αθροιστικά σωληνάκια, η ενεργοποιημένη PKA έχει διπλή δράση. Αφενός φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τις υδατοπορίνες AQP2, και αφετέρου φωσφορυλιώνει την Ser256 του COOH-τελικού άκρου της υδατοπορίνης 2 (AQP2), οδηγώντας στην επαναπρόσληψη νερού (βλ. σελ. 279 **Εικόνα 5.55**).

Η PKA και η μακρόχρονη ενδυνάμωση (LTP)

Στον εγκέφαλο η PKA φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς AMPA και NMDA, οι οποίοι συμμετέχουν στην έναρξη και τη διατήρηση της μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP) στους μετασυναπτικούς νευρώνες του ιπποκάμπου. Η επαγωγή της LTP απαιτεί το άνοιγμα των καναλιών υποδοχέων NMDA με την απομάκρυνση του Mg^{2+} από το στόμιο του καναλιού και την είσοδο του Ca^{2+} . Η διατήρηση της LTP επιτυγχάνεται με επακόλουθες αλλοιώσεις που προκαλούνται στη σύναψη από το Ca^{2+} . Μια τέτοια τροποποίηση εμπλέκει και τους υποδοχείς AMPA. Η σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων AMPA ρυθμίζεται από δύο κύριους μηχανισμούς: την άμεση φωσφορυλίωση των υπομονάδων των υποδοχέων και αλλαγές στην πυκνότητα των υποδοχέων στη μετασυναπτική μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια της LTP στους πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου ενεργοποιούνται πολλές κινάσες, μεταξύ των οποίων η καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση II (CaMK-II)



Εικόνα 7.20

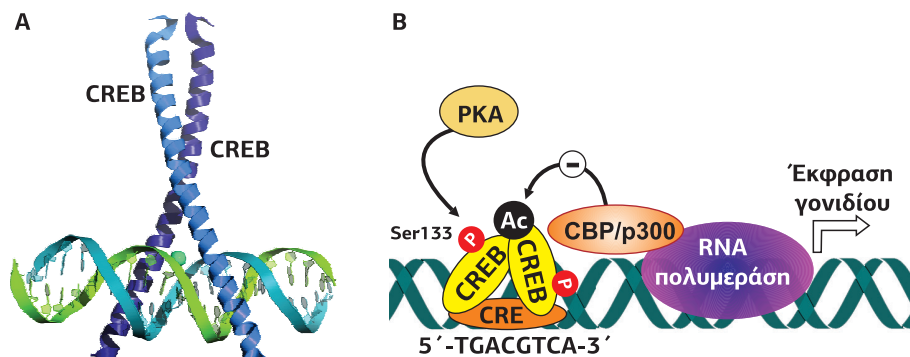
Ρόλος της PKA στη μακρόχρονη ενδυνάμωση. Η είσοδος $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ από τους ιοντοτροπικούς γλουταμινεργικούς υποδοχείς AMPA και NMDA οδηγεί στην, μέσω καλμοδουλίνης, ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC1/8). Η αδενυλική κυκλάση παράγει cAMP, το οποίο ενεργοποιεί την PKA, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει αφενός τους υποδοχείς AMPA (στη Ser845) και NMDA (στις Ser890 και Ser897), παρατείνοντας τη διάρκεια ανοίγματος των καναλιών, και αφετέρου τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη δημιουργία νέων συνάψεων. Η καλμοδουλίνη ενεργοποιεί, επίσης, την CaMK-II, η οποία μαζί με την PKC φωσφορυλιώνουν τον AMPA-R στη Ser831 και τον ενεργοποιούν και, επιπλέον, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAPK κινασών (την ERK), που συμμετέχει και αυτό στην πρωτεϊνοσύνθεση.

Εικόνα 7.21

Μεταγραφικός παράγοντας CREB. Α. Κρυσταλλική δομή του μεταγραφικού παράγοντα CREB. Ο CREB λειτουργεί ως ομοδιμερές. Η κάθε υπομονάδα του αποτελείται από μια α-έλικα που περιέχει υδρόφοβα κατάλοιπα λευκίνης, τα οποία συνδέονται στενά σε κατάλοιπα λευκίνης της άλλης υπομονάδας, σχηματίζοντας το μοτίβο Leucine Zipper (φερμονάρ λευκίνης). [68]

Β. Ο CREB ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση της Ser133 από την PKA. Στη συνέχεια, συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA 5'-TGACGTCA-3' που ονομάζεται CRE, όπου στρατολογεί την ακετυλάση ιστονών CBP/p300, η οποία ακετυλιώνει τις ιστόνες. Το DNA ξετυλίγεται και προσελκύεται η RNA πολυμεράση II (RNAPII).

Μέσω ενός μηχανισμού ανασταλτικής ανατροφοδότησης, η CBP ακετυλιώνει και αναστέλλει τη δραστηριότητα του CREB.



Ανάμεσα στους στόχους της PKA είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding protein) (Εικόνα 7.21). Ο CREB συνδέεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA 5'-TGACGTCA-3' που ονομάζεται CRE (cAMP Response Element), όπου στρατολογεί συμπράγοντες της μεταγραφής ρυθμίζοντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Ο CREB ανακαλύφθηκε το 1987 ως ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος αποκρίνεται στο cAMP και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της σωματοστατίνης. Άλλα γονίδια που ρυθμίζονται από τον CREB είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες c-Fos, BDNF, υδροξυλάση της τυροσίνης, πολυάριθμα νευροπεπτίδια (π.χ. εγκεφαλίνες, VGF, CRH), καθώς και γονίδια που εμπλέκονται στον κirkάδιο ρυθμό (PER1, PER2). Όπως είδαμε, ο CREB παίζει έναν κύριο ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα και τη δημιουργία μακρόχρονης μνήμης.



Yasutomi Nishizuka (1932-2004) Γιαπωνέζος βιοχημικός, ο οποίος ανακάλυψε την πρωτεϊνική κινάση C, καθώς επίσης και τον μηχανισμό της ADP-ριβοσουλώσεως των πρωτεϊνών.

3. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

3.1

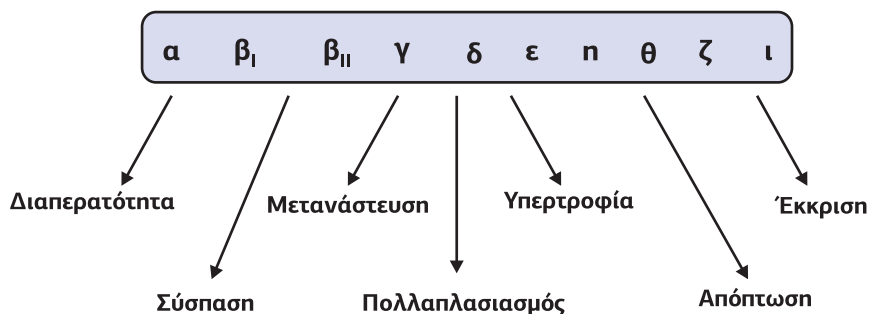
Ταξινόμηση των PKCs

Η PKC απομονώθηκε από την παρεγκεφαλίδα βοοειδών το 1977 από τον Yasutomi Nishizuka στο Department of Biochemistry του Kobe University ως μια κινάση Ser/Thr, η οποία δεν ρυθμίζεται από κυκλικά νουκλεοτίδια. Το 1979 ο Nishizuka έδειξε ότι η κινάση αυτή απαιτεί για να ενεργοποιηθεί Ca^{2+} και διακυλογλυκερόλη (συνεπώς πρέπει να στρατολογηθεί στη μεμβράνη), ενώ το 1982 απέδειξε τη μεγάλη συγγένεια της PKC για τους φορβολεστερές.

Σήμερα, η οικογένεια των PKCs είναι πολυπληθής και περιλαμβάνει μια ποικιλία ισομορφών με πολλές ρυθμιστικές ιδιότητες. Κάθε ισοένζυμο είναι προϊόν ενός γονιδίου, με εξαίρεση τα ισοένζυμα βI και βII, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου. Οι 10 διαφορετικοί υπότυποι πρωτεϊνικών κινάσεων C που έχουν ανακαλυφθεί στα θηλαστικά κατατάσσονται σε 3 υποοικογένειες, με βάση τη δομή του NH_2 -τελικού ρυθμιστικού τους άκρου που καθορίζει την ευαισθησία τους στο Ca^{2+} και τη διακυλογλυκερόλη.

- **Οι κλασικές ή συμβατικές PKCs (cPKCs, conventional PKCs).** Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (α, βI, βII και γ) ενεργοποιούνται από το Ca^{2+} , τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες.
- **Οι καινούριες PKCs (nPKCs, novel PKCs).** Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (δ, ε, θ και η) δεν αποκρίνονται στο Ca^{2+} , αλλά ενεργοποιούνται από τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες.
- **Οι άτυπες PKCs (aPKCs, atypical PKCs).** Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (ζ, λ και ι) δεν εξαρτώνται από το Ca^{2+} , τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες, αλλά απαιτούν πρωτεΐνες προσαρμογής για την αύξηση της ενζυμικής τους δραστηριότητας.

Εκτός από την απαίτηση των διαφορετικών ενεργοποιητών, τα ισοένζυμα PKC διακρίνονται από τον διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό τους και τους διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, οι α, δ και ζ ισομορφές είναι ευρέως καταναμημένες σε σχεδόν όλους τους ιστούς, ενώ οι άλλες ισομορφές βρίσκονται μόνο σε ειδικούς ιστούς με εξειδικευμένες λειτουργίες.



Εικόνα 7.22
Οι βασικές λειτουργικές δράσεις των διαφόρων ισομορφών της PKC.

3.2 | Δομή

Οι πρωτεϊνικές κινάσες C αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 68-83 kDa. Περιέχουν μία NH_2 -τελική ρυθμιστική περιοχή και μια COOH -τελική καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή αποτελείται από μια περιοχή C1 (C: conserved domain), μια περιοχή C2 και μια αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος με αυτοανασταλτική λειτουργία, η οποία συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο στη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, κρατώντας σε κατάσταση ηρεμίας το ένζυμο σε ανενεργή διαμόρφωση (βλ. **Εικόνα 5.75** και **Εικόνα 7.23**).

Η **περιοχή C1** συναντάται μόνο στις κλασικές cPKCs και στις καινούριες nPKCs ισομορφές. Περιέχει δύο μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες (γνωστά και ως C1A και C1B στοιχεία), 50 αμινοξέων το καθένα με δύο προσδεμένα ιόντα Zn^{2+} , τα οποία μεσολαβούν στη σύνδεση της DAG και των φορβολεστέρων. Οι άτυπες aPKCs περιέχουν μια C1-like περιοχή με μόνο ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνη, που είναι ανίκανο να συνδέσει την DAG και τους φορβολεστέρες, αλλά συνδέει PIP_3 ή κεραμίδια.

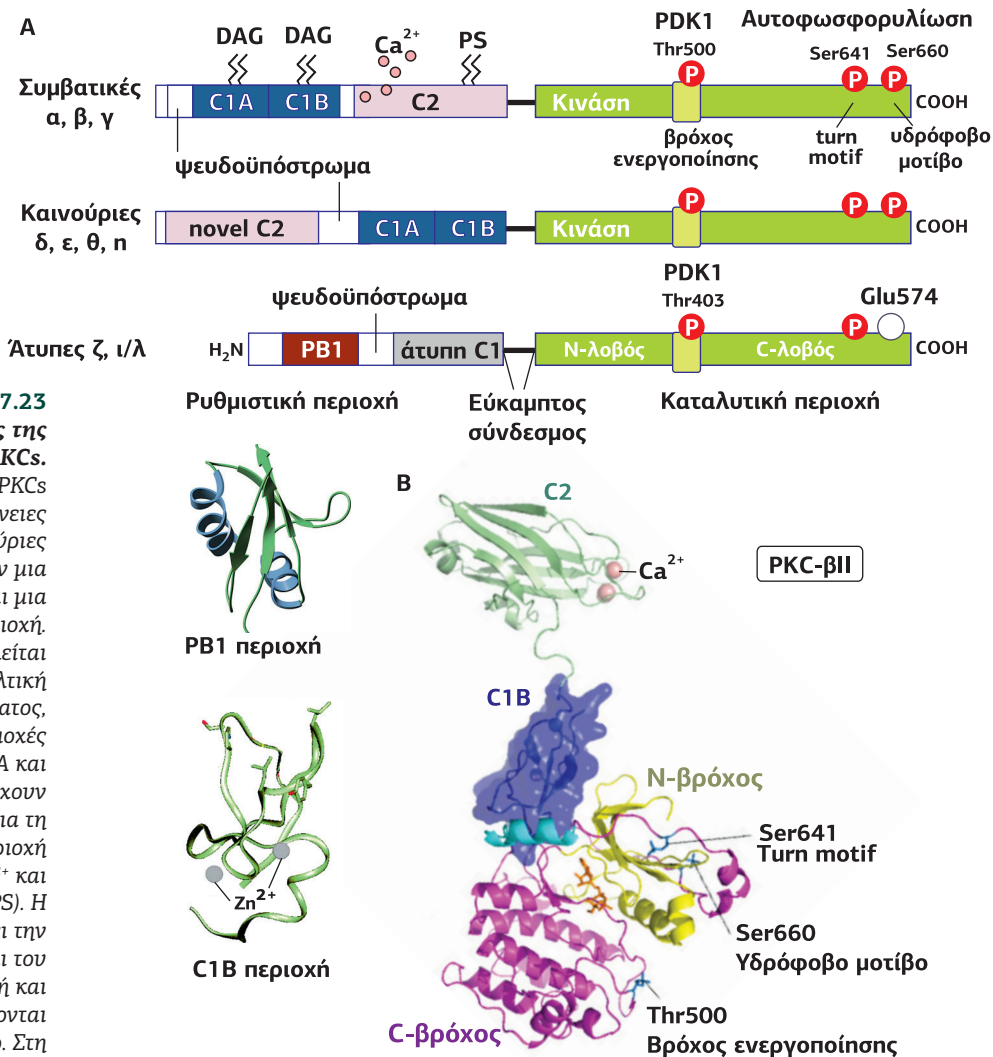
Η **περιοχή C2**, η οποία συναντάται μόνο στις κλασικές cPKCs, είναι ένα μοτίβο 120 αμινοξέων που συνδέει φωσφολιπίδια της μεμβράνης παρουσία Ca^{2+} , οδηγώντας στην ενεργοποίηση της γειτονικής καταλυτικής περιοχής της κινάσης. Η περιοχή C2 έχει βρεθεί και σε άλλες πρωτεΐνες, εκτός από τις PKCs, όπως η φωσφολιπάση C (βλ. σελ. 287 **Εικόνα 5.63**) και A_2 (βλ. σελ. 317 **Εικόνα 5.94**).

Οι PKCs είναι ιδιοσυστάτα φωσφορυλιωμένες σε τρία καλά συντηρημένα κατάλοιπα της καταλυτικής τους περιοχής, Thr500 στον βρόχο ενεργοποίησης, Ser641 στο "turn motif" και Ser660 στο "hydrophobic motif". Οι φωσφορυλιώσεις αυτές είναι απαραίτητες για την ωρίμανση της PKC σε ένα καταλυτικά ικανό αλλά ανενεργό ένζυμο σε κλειστή διαμόρφωση, στην οποία το ψευδοϋπόστρωμα καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για τη φωσφορυλίωση της Thr500 είναι υπεύθυνη η κινάση PDK1. Μια εξαίρεση αποτελούν οι άτυπες PKCs, στις οποίες αντί για τη

Φωσφορμιμητικά ονομάζονται τα αμινοξέα, τα οποία αν και μη φωσφορυλιωμένα εμφανίζονται χημικά όμοια με τις pSer, pThr, pTyr. Για παράδειγμα το Glu μιμείται την pSer.

Ser660 στο “hydrophobic motif” περιέχουν ένα φωσφορμιμητικό κατάλοιπο.

Οι ισομορφές PKCα, PKCζ και PKCι/λ περιέχουν επιπλέον στο COOH-τελικό άκρο τους μια PDZ-like περιοχή, υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την περιοχή PDZ της πρωτεΐνης PICK1 (Protein Interacting with C-Kinase). Επίσης, οι άτυπες PKCs (αPKCs; ζ και ι/λ) περιέχουν μια περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης PB1 (Phox και Bem 1).



Εικόνα 7.23

Λειτουργικές περιοχές της υπεροικογένειας των PKCs.

Α. Οι ισομορφές των PKCs ταξινομούνται σε 3 υποοικογένειες (κλασικές-συμβατικές, καινούριες και άτυπες PKCs). Περιέχουν μια NH₂-τελική ρυθμιστική και μια COOH-τελική καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή αποτελείται από μια αντοαασταλτική αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος, δύο καλά συντηρημένες περιοχές πλούσιες σε Cys C1 (C1A και C1B), οι οποίες περιέχουν τις θέσεις σύνδεσης για τη διακυλογλυκερόλη και μια περιοχή C2, η οποία συνδέει το Ca²⁺ και τη φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Η καταλυτική περιοχή περιέχει την περιοχή σύνδεσης του ATP και του υποστρώματος. Η ρυθμιστική και η καταλυτική περιοχή συνδέονται με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο. Στη δομή της PKC-βII διακρίνονται οι κρίσιμες θέσεις φωσφορμίωσης, Thr500 στον βρόχο ενεργοποίησης και Ser641 και Ser660 στο COOH-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής. [64] [22] Β. Τριδιάστατη απεικόνιση της PKC-βII, όπου στην περιοχή C2 διακρίνονται τα δύο συνδεδεμένα Ca²⁺ και στη χαρακτηριστική καταλυτική περιοχή οι τρεις κρίσιμες θέσεις φωσφορμίωσης Thr500, Ser641 και Ser660. Η περιοχή PB1 μοιάζει με την περιοχή RasBD, αποτελείται από 80 aa, που δημιουργούν 2 α-έλικες και ένα β-πτυχωτό φύλλο 4 β-κλώνων. [46]

3.3

Διέγερση από φορβολεστέρες

Μια ιδιότητα που χαρακτηρίζει τις κλασικές cPKCs και τις καινούριες nPKCs είναι η ενεργοποίησή τους από τους **φορβολεστέρες** (βλ. σελ.293 και **Εικόνα 5.70**). Οι φορβολεστέρες προέρχονται από φυτά της οικογένειας *Euphorbiaceae* και κυρίως από το έλαιο των σπόρων του φυτού *Croton tiglium*, από όπου και απομονώθηκαν στα τέλη του 1960. Ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις έχουν τοξική δράση και γι' αυτό το κρωτονέλαιο έχει χρησιμοποιηθεί ως καθαρτικό κατά τον 19ο αιώνα, αλλά και ως προαγωγός όγκων στα μέσα του 20ού. Ο phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), επίσης γνωστός και ως 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), είναι ο πιο ισχυρός φορβολεστέρας.

Οι φορβολεστέρες συνδέονται με υψηλή συγγένεια στις PKCs, δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερη συγγένεια από την DAG και, επιπλέον, καθώς συνδέονται μη αντι-

στρεπτά και δεν μεταβολίζονται εύκολα είναι πολύ πιο ισχυροί ενεργοποιητές από την DAG. Όπως και η DAG, οι φορβολεστέρες συνδέονται στην υδρόφιλη σχισμή της περιοχής C1, οδηγώντας στην προσκόλληση της PKC στη μεμβράνη και στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης.

Η ογκοπροωθητική δράση του TPA συνδέεται με την ενεργοποίηση των PKCs. Καθώς ένας από τους ρόλους των PKCs είναι η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, η ανεξέλεγκτη υπερδραστηριότητα της PKC θα μπορούσε να οδηγήσει σε μη επιθυμητή φωσφορυλίωση και έτσι να επιφέρει ανώμαλη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όμως, εκτός από τις PKCs, τα κύτταρα περιέχουν και άλλους υποδοχείς για τους φορβολεστέρες και την DAG. Παραδείγματα πρωτεϊνών που δεσμεύουν φορβολεστέρες, μέσω της CA περιοχής τους, και στερούνται τη δραστηριότητα κινάσης είναι οι χιμαιρίνες (μια οικογένεια RacGAP πρωτεϊνών), η RasGRP (ένας RasGEF) (βλ. **Εικόνα 8.45**), και οι Unc13/Munc13 (μια οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην εξωκύτωση). Συνεπώς, όλες οι βιολογικές δράσεις των φορβολεστέρων δεν μπορούν να αποδοθούν στη διέγερση των PKCs.

3.4 | Ρύθμιση της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C

Τα κύρια ρυθμιστικά σήματα που ελέγχουν τη δραστηριότητα της PKC είναι:

- Η διακυλογλυκερόλη (DAG).
- Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} .
- Η φωσφορυλίωση στον βρόχο ενεργοποίησης από την κινάση PDK1.
- Η ιδιοσυστατη φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα Ser.
- Η σύνδεση σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες: ένζυμα, πρωτεΐνες σκαλωσιάς, πρωτεΐνες προσαρμογής.

Όπως φαίνεται από τη διαφορετική οργάνωση των δομικών τους περιοχών, οι υπότυποι των PKCs μπορεί να είναι ευαίσθητοι σε αυτά τα σήματα, με πολύ διαφορετικούς τρόπους. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι PKCs απαιτούν για την ενεργοποίησή τους πολλά ρυθμιστικά σήματα και, συνεπώς, η ρύθμιση της δραστηριότητάς τους είναι ένας σύνθετος μηχανισμός.

Ρύθμιση από Ca^{2+} και DAG

Το Ca^{2+} και η DAG είναι δεύτεροι διαβιβαστές, κύρια συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού της φωσφολιπάσης C (PLC). Η ενεργοποίηση της PLC και κατά συνέπεια της PKC μπορεί να λάβει χώρα μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών: είτε μέσω υποδοχών κινασών τυροσίνης (RTKs), που ενεργοποιούν την PLCγ, είτε μέσω υποδοχών GPCRs που ενεργοποιούν την PLCβ, είτε μέσω των μικρών GTPασών της οικογένειας Ras, που ενεργοποιούν την PLCε. Και στις τρεις περιπτώσεις παράγονται IP_3 , DAG και αυξάνεται η $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ενεργοποιώντας την PKC (βλ. σελ. 290 **Εικόνα 5.67**).

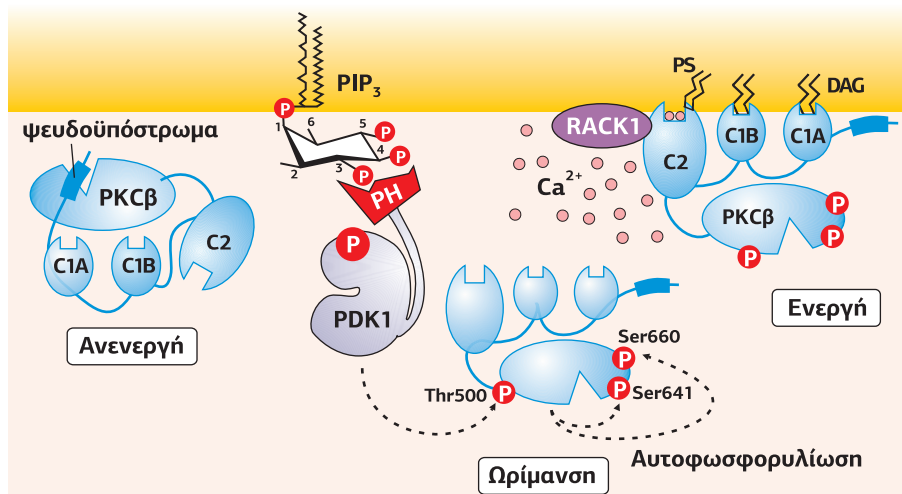
Η ενεργοποίηση της PKC είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον εντοπισμό της στη μεμβράνη. Η σύνδεση του Ca^{2+} στη C2 περιοχή οδηγεί σε στρατολόγηση της PKC στη μεμβράνη, η οποία σταθεροποιείται με τη σύνδεση της DAG στην περιοχή C1. Η σύνδεση της DAG στην περιοχή C1 επάγει τη σύνδεση της περιοχής C2 στη φωσφατιδυλοσερίνη της πλασματικής μεμβράνης (**Εικόνα 7.24**). Μια ισορροπία φαίνεται να υπάρχει ανάμεσα στις κυτταροπλασματικές και προσδεμένες στη μεμβράνη μορφές της PKC, η οποία μπορεί να μετατοπιστεί προς την κατεύθυνση της μεμβράνης με τη βοήθεια του Ca^{2+} , της φωσφατιδυλοσερίνης και της διακυλογλυκερόλης.

Ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης

Όλοι οι υπότυποι PKCs περιέχουν πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης Ser/Thr και Tyr. Η φωσφορυλίωση είναι ένα απαραίτητο βήμα για την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των PKCs. Ένας κύριος ρόλος στην ενεργοποίηση της PKC έχει αποδοθεί στην κινάση PDK1, η οποία μπορεί να φωσφορυλίώσει τις ισομορφές cPKCs και aPKCs. Η

Εικόνα 7.24

Ο ρόλος της φωσφορύλιωσης καθώς και της σύνδεσης του Ca^{2+} και της DAG στην ενεργοποίηση της PKCβ. Αρχικά, η PDK1, η οποία ενεργοποιείται από την παρουσία PIP_3 στη μεμβράνη φωσφορυλιώνει την Thr500 στον βρόχο ενεργοποίησης της PKC, επάγοντας την αυτοφωσφορύλιωση της Ser641 και της Ser660 στην καταλυτική περιοχή. Οι τρεις φωσφορυλίωσεις οδηγούν σε ένα ανενεργό αλλά ώριμο και ικανό να ενεργοποιηθεί ένζυμο. Η PKCβII μεταναστεύει στη μεμβράνη μετά την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Η σύνδεση του Ca^{2+} στην περιοχή C2 επάγει τη μεταφορά της PKC κοντά στην αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS), με επιπλέον σύνδεση στα PIP_2 της μεμβράνης. Στη συνέχεια, η σύνδεση της DAG στο πλούσιο σε κυστεΐνες μοτίβο C1A βοηθάει στην απομάκρυνση του ψευδοϋποστρώματος από το καταλυτικό κέντρο. Η σύνδεση ενός δεύτερου μορίου DAG στο δεύτερο μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνη C1B ανοίγει τη διαμόρφωση της κινάσης, η οποία είναι τώρα ικανή να φωσφορυλιώσει τους στόχους της. Στην εικόνα διακρίνεται και η πρωτεΐνη RACK1 που συνδέεται εξειδικευμένα με την C2 περιοχή της PKC και τη σταθεροποιεί στη μεμβράνη. [26] [32]



PDK1 ρυθμίζεται εν μέρει από την PI3K, καθώς τα λιπίδια PIP_3 που δημιουργούνται, έπειτα από τη φωσφορύλιωση λιπιδίων της ινositόλης από την PI3K, είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση της PDK1. Η PDK1 αρχικά φωσφορυλιώνει την Thr500 στον βρόχο ενεργοποίησης, επάγοντας την αυτοφωσφορύλιωση της Ser641 στο “turn motif” και της Ser660 στο “hydrophobic motif” (**Εικόνα 7.24**).

RACKs (Receptors for Activated PKCs), οι υποδοχείς των PKCs

Ένας κύριος ρυθμιστικός μηχανισμός της δράσης των PKCs είναι η ρύθμιση του εντοπισμού τους σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις. Η διέγερση των κυττάρων από φορβολεστέρες ή ορμόνες που ενεργοποιούν τις PLCβ ή τις PLCγ, επάγουν τη μεταφορά των PKCs από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη, στον κυτταροσκελετό ή στον πυρήνα. Ο διαφορετικός εντοπισμός των ισομορφών των PKCs μεσολαβείται από πρωτεΐνες που συνδέουν τις PKCs, μεταξύ των οποίων οι χαρακτηριστικότερες είναι οι πρωτεΐνες RACKs.

Οι **RACKs** ανακαλύφθηκαν το 1994. Η RACK1 είναι μια πρωτεΐνη 36 kDa που περιέχει επτά επαναλήψεις WD40 (μοτίβο 40 αα που τελειώνει σε Trp-Asp, δηλ. W-D). Είναι ομόλογη με την β-υπομονάδα των G-πρωτεϊνών, εμφανίζοντας 42% ομολογία. Η ονομασία RACK1 (Receptor for Activated PKC) υιοθετήθηκε από την ομάδα Mochly-Rosen, για να περιγράψει την ικανότητά της να συνδέεται με την ενεργοποιημένη PKC. Συνήθως, η αλληλεπίδραση RACK/PKC λαμβάνει χώρα μέσω της περιοχής C2 της PKC.

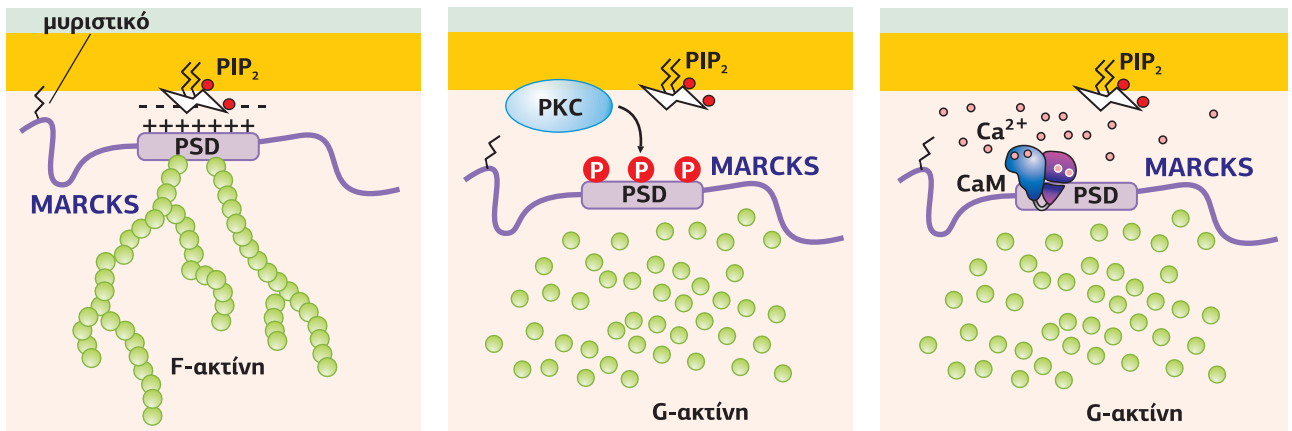
Οι πρωτεΐνες RACKs αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με τις PKCs και τις αγκυροβολούν στη μεμβράνη, οδηγώντας τις κοντά στα υποστρώματά τους. Η RACK1 συνδέει την PKCβ και η RACK2 την PKCε. Οι RACKs για τις υπόλοιπες PKCs δεν είναι ακόμη πλήρως ταυτοποιημένες. Επιπλέον, υπότυποι των πρωτεϊνών RACKs λειτουργούν ως πρωτεΐνες σκαλωσιάς, που οργανώνουν σηματοδοτικά σύμπλοκα με τις κινάσες Src, τις βγ υπομονάδες των G-πρωτεϊνών, τη δυναμίνη, την ιντεγκρίνη, τον μεταγραφικό παράγοντα STAT1, τον υποδοχέα φωσφατάση τυροσίνης R-PTPμ και τη φωσφοδιεστεράση PDE4D5.



Κρυσταλλική δομή της RACK1

3.5 | Λειτουργίες και υποστρώματα των PKCs

Τα μέλη της οικογένειας PKCs μέσω του μεγάλου αριθμού υποστρωμάτων τους συμμετέχουν στη ρύθμιση κυτταρικών διαδικασιών, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (μέσω των κυκλινών, των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων και των αναστολέων p21 και p27), η κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση (μέσω των MAP κινάσων), η σύνθεση του DNA και η μεταγραφή γονιδίων (μέσω του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP και της κινάσης GSK-3β), η απόπτωση (μέσω των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών

**Εικόνα 7.25**

Οι πρωτεΐνες MARCKS, ένα εξειδικευμένο υπόστρωμα των PKCs. Οι MARCKS βρίσκονται αρχικά συνδεδεμένες στα PIP₂ της μεμβράνης και λειτουργούν ως πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη δημιουργία των σταυροσυνδέσμων στα ινίδια ακτίνης του κυτταροσκελετού. Η φωσφορυλίωση της περιοχής PSD (Phosphorylation Site Domain) από την PKC, όπως επίσης και η σύνδεση της Ca²⁺/CaM, απομακρύνει τις MARCKS από τη μεμβράνη διασπώντας τα ινίδια ακτίνης.

Bad και Bcl-2), η κυτταρική προσκόλληση (μέσω των ιντεγκρινών), η κυτταρική κινητικότητα (μέσω της GTPάσης RhoA και των ιντεγκρινών), η ανοσολογική απόκριση, η αντίσταση στα φάρμακα (μέσω της P-γλυκοπρωτεΐνης) και η αποθήκευση μνήμης.

Από τα χαρακτηριστικότερα υποστρώματα των PKCs είναι οι πρωτεΐνες **MARCKS** (Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate). Οι πρωτεΐνες MARCKS είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που σχετίζονται με αλλαγές και επανασχηματισμό του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Είναι όξινης πρωτεΐνης 309 αμινοξέων με υψηλή περιεκτικότητα στα αμινοξέα Ala, Gly, Pro και Glu. Στην NH₂-τελική περιοχή τους βρίσκεται συνδεδεμένη μια λιπιδική μυριστοϋλική άγκυρα, η οποία μεσολαβεί στη σύνδεση με τη μεμβράνη. Περιέχουν, επίσης, μια περιοχή PSD (Phosphorylation Site Domain), όπου συνδέεται το Ca²⁺/καλμοδουλίνη και φωσφορυλιώνεται από την PKC. Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή και σε χαμηλά επίπεδα Ca²⁺, οι MARCKS προσδένονται στα ινίδια ακτίνης και επιδρούν στη δημιουργία σταυροσυνδέσμων (Εικόνα 7.25). Η φωσφορυλίωσή τους από την PKC παρεμποδίζει τη δημιουργία σταυροσυνδέσμων. Ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών είναι η ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας, της φαγοκύτωσης και του πολλαπλασιασμού.

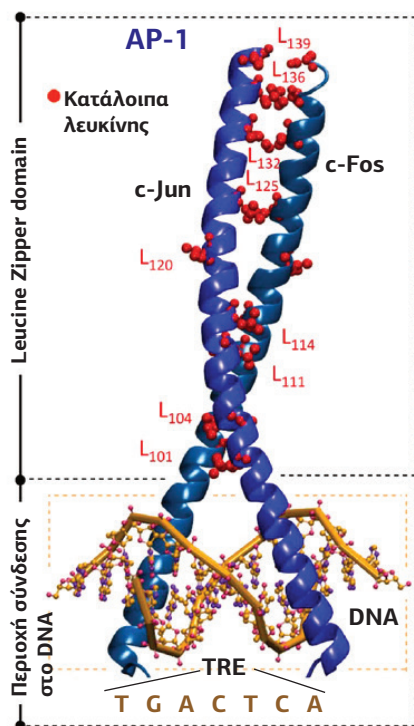
3.6 | Ο ρόλος της PKC στον κυτταρικό μετασχηματισμό

Πολύ πριν γίνει εμφανής η συσχέτιση των φορβολεστέρων με την PKC, ήταν γνωστό ότι τα εκκυλίσματα κρωτονέλαιου μπορούν να δράσουν ως συν-καρκινογόνα, ενισχύοντας την ογκογόνο δραστηριότητα άλλων ουσιών, όπως το βενζο-πυρένιο. Σε μερικούς τύπους καλλιεργούμενων κυττάρων ο φορβολεστέρας TPA αυξάνει τον αριθμό των μιτώσεων, αλλά απουσία ενός προωθητή όγκων αδυνατεί να επηρεάσει τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Η PKC θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι συμμετέχει στη δράση των φορβολεστέρων φωσφορυλιώνοντας έναν μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος επάγει συγκεκριμένη γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, το θέμα παραμένει άλυτο και οι ισομορφές της PKC που ανταποκρίνονται στους φορβολεστέρες έχουν αποτύχει να χαρακτηριστούν ως πραγματικά ογκογονίδια.

Παρά την ογκώδη βιβλιογραφία, η κατανόηση της σχέσης ανάμεσα στην PKC και στον σχηματισμό όγκων παραμένει θολή. Στην καλύτερη περίπτωση, φαίνεται να έχει συνοδευτικό ρόλο ενισχύοντας τη δράση των πραγματικών ογκογόνων, όπως είναι η GTPάση Ras και η κινάση Raf. Ας δούμε όμως πώς εμπλουτίστηκαν οι γνώσεις μας σχετικά με τον ρόλο των PKCs στον καρκίνο.

Η αναζήτηση μεταγραφικών παραγόντων που μεσολαβούν στις επιδράσεις των φορβολεστέρων: από το TRE στο SRE

Η ανάλυση των υποκινητών γονιδίων, η μεταγραφή των οποίων επάγεται από φορβολεστέρες, αποκάλυψε ένα καλά συντηρημένο παλινδρομικό μοτίβο 7bp, που



Εικόνα 7.26

Το ετεροδιμερές σύμπλοκο AP-1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες Jun και Fos συνδέονται μέσω πολυάριθμων καταλοίπων λευκίνης, γνωστά και ως Leucine Zipper, δημιουργώντας τον AP-1. Στην εικόνα ο AP-1 δεσμεύεται στην παλίνδρομη αλληλουχία του DNA -TGACTCA/-ACTGAGT- (TRE).

είναι γνωστό ως **TRE** (TPA Response Element), ένα στοιχείο που αποκρίνεται στον TPA. Αυτό το μοτίβο DNA αναγνωρίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1, ο οποίος πιστεύεται ότι βρίσκεται στο τέλος ενός πολύπλοκου μονοπατιού που μεταδίδει το μήνυμα των ογκογόνων φορβολεστέρων από την πλασματική μεμβράνη στον πυρήνα, πιθανώς εμπλέκοντας και την PKC.

Ο AP-1 είναι ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο που αποτελείται από πρωτεΐνες που ανήκουν στις οικογένειες c-Jun, c-Fos, ATF και c-MAF (Musculoaroneurotic Fibrosarcoma) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός μοτίβου αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, γνωστού ως Leucine Zipper (LZ) (Εικόνα 7.26). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι παρόμοιοι δομικά με τον CREB, ο οποίος επίσης μπορεί να συνδεθεί στο TRE.

Ο ρόλος που αρχικά προτάθηκε για την PKC στην ενεργοποίηση του AP-1 ενέπλεκε την απενεργοποίηση της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου GSK-3β. Πιο αναλυτικά, η GSK-3β φωσφορυλιώνει τον AP-1, και συγκεκριμένα τον c-Jun, στο σημείο σύνδεσής του με το DNA (TRE) και τον καθιστά ανενεργό. Η PKC (α, β1, β2 και γ) φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την GSK-3β, επιτρέποντας τον AP-1 να συνδεθεί στο DNA. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός παραμένει αιγιματικός, καθώς δεν έχει αναγνωριστεί η φωσφατάση που αποφωσφορυλιώνει τον AP-1 (Εικόνα 7.27).

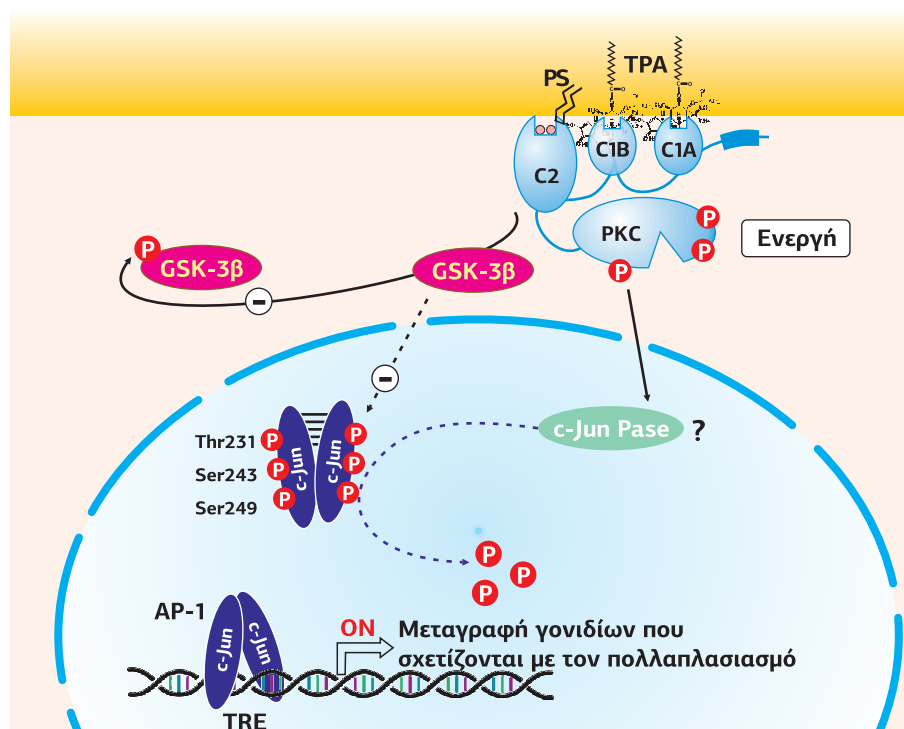
Η ανακάλυψη της πρωτεϊνικής κινάσης JNK1 (c-Jun N-terminal Kinase), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον c-Jun, τράβηξε την προσοχή μακριά από την PKC, πάνω στην πρωτοεμφανιζόμενη οικογένεια των κινάσεων MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) και της επίδρασής τους σε στοιχεία απόκρισης στον ορό **SRE** (Serum Response Element). Η PKC έχασε το δικαίωμα ιδιοκτησίας των μονοπατιών που σχετίζονται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και πλέον θεωρείται ενισχυτής του μονοπατιού Ras-MAPKs.

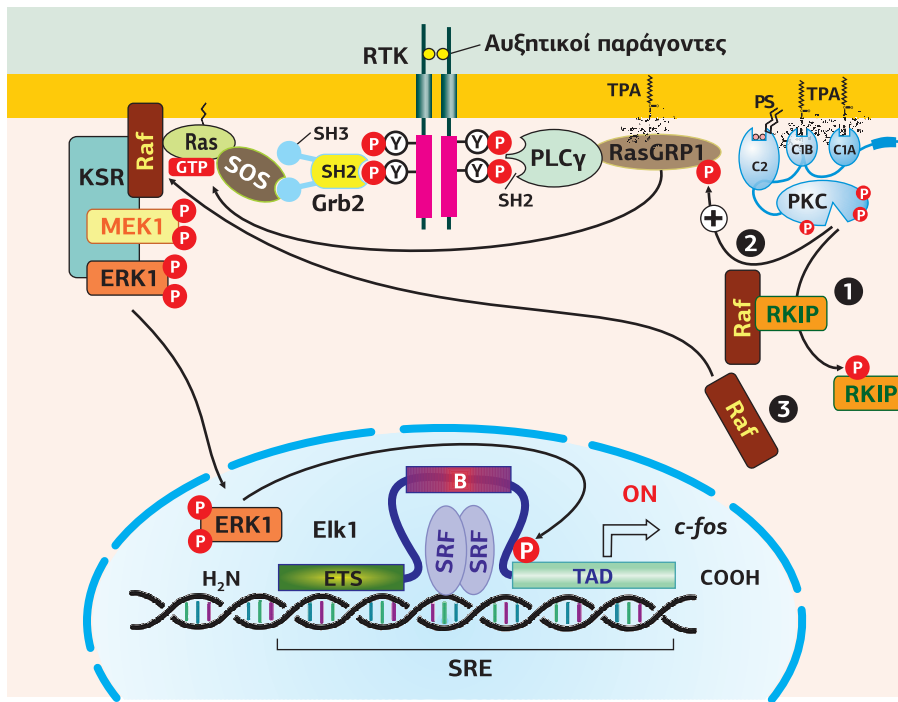
Η PKC ενεργοποιεί τη Raf μέσω φωσφορυλίωσης του RKIP

Εάν η PKC δεν είναι ο άμεσος ενεργοποιητής της TRE- και SRE-μεσολαβούμενης γονιδιακής μεταγραφής, τότε σίγουρα λειτουργεί ως ενισχυτής του σήματος των αυξητικών παραγόντων, αλλά και των στρεσογόνων σημάτων, συμπεριλαμβανομέ-

Εικόνα 7.27

Η ενεργοποιημένη, από τον φορβολεστέρα TPA, PKC φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την κινάση GSK-3β. Ως αποτέλεσμα, εμποδίζεται η φωσφορυλίωση και η απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun. Ο ενεργός c-Jun, ως διμερές σύμπλοκο AP-1, συνδέεται στο TRE και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό. [25]




Εικόνα 7.28

Η ενεργοποιημένη PKC προκαλεί την ενεργοποίηση του SRE μέσω RKIP/Raf. Οι αυξητικοί παράγοντες συνδέονται σε RTKs, οι οποίοι αφενός μέσω των Ras ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών Raf, MEK, ERK, και αφετέρου μέσω της PLCγ επάγουν την παραγωγή IP_3 και διακυλογλυκερόλης και ενεργοποιούν την PKC. Η PKC φωσφορυλιώνει τον αναστολέα της Raf, τον RKIP. Η φωσφορυλιωμένη RKIP αποδεσμεύεται από τη Raf, η οποία τώρα ενεργοποιεί τη σηματοδότηση Raf-MEK1-ERK1. Η ERK1 εισέρχεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό συμπαραγοντα Elk1, ο οποίος συνδέεται με τον διμερή μεταγραφικό παράγοντα SRF στην παλίνδρομη αλληλουχία SRE, επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων c-fos. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικές περιοχές του Elk1, Ets (περιοχή σύνδεσης με το DNA), B-box (περιοχή αλληλεπίδρασης με τον διμερή SRF) και τέλος η περιοχή TAD (Transcription Activation Domain), η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου-στόχου. Η διακυλογλυκερόλη και οι φορβολεστέρες επηρεάζουν το μονοπάτι των MAPKs μέσω άμεσης ενεργοποίησης της PKC, αλλά και του RasGRP, ο οποίος ενεργοποιεί τη Ras. [25]

νων και των παραγόντων φλεγμονής. Όλοι οι αυξητικοί παράγοντες συνδέονται σε υποδοχείς κινάσες τυροσίνης RTKs, οι οποίοι αφενός μέσω των Ras ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAP κινασών Raf, MEK, ERK (που οδηγεί στον κυτταρικό μετασχηματισμό) και αφετέρου μέσω της PLCγ επάγουν την παραγωγή IP_3 και διακυλογλυκερόλης και, συνεπώς, ενεργοποιούν την PKC. Στη συνέχεια, η PKC φωσφορυλιώνει τον αναστολέα της Raf, τον RKIP (Raf Kinase Inhibitor Protein), προκαλώντας την αποσύνδεσή του από τη Raf, αποκαθιστώντας το μονοπάτι Raf-MEK-ERK. Η ERK εισέρχεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό συμπαραγοντα Elk1, ο οποίος συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα SRF (Serum Response Factor) στην παλίνδρομη αλληλουχία SRE επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων c-fos.

Οι φορβολεστέρες μπορούν να ενεργοποιήσουν την Ras απευθείας, ενεργοποιώντας τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης RasGRP1. Για ακόμα μία φορά, το μονοπάτι ενισχύεται από την PKC μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης του RasGRP1 (Εικόνα 7.28).

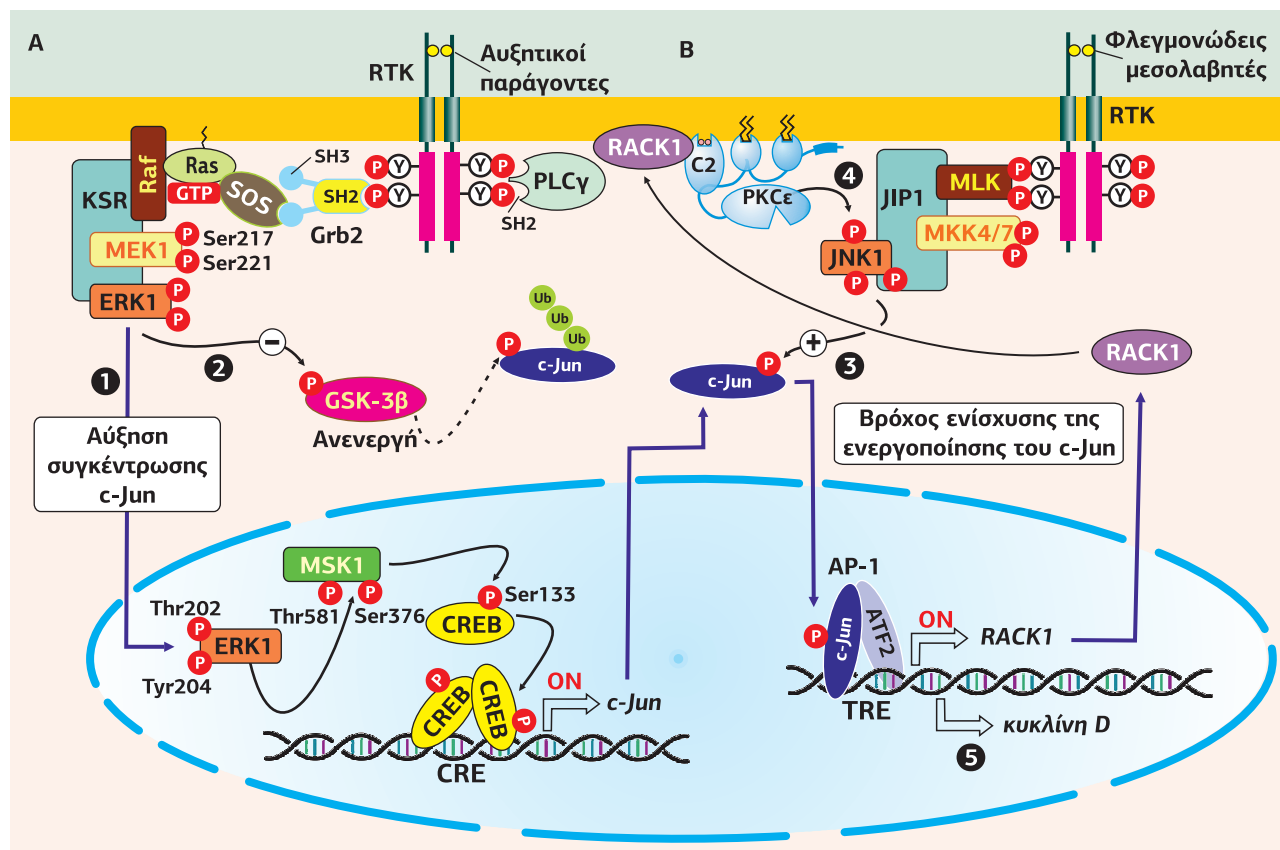
Η PKC συνδέει το μονοπάτι ERK με το μονοπάτι JNK, ενισχύοντας τη δραστηριότητα του c-Jun

Σε ένα μεγάλο ποσοστό ανθρώπινων μελανωμάτων το μονοπάτι Ras, Raf-MEK-ERK είναι υπερενεργό λόγω gain-of-function μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν για τη Ras και τη Raf. Αυξημένη δραστηριότητα εμφανίζει, επίσης, η κυκλίνη D, η οποία ενεργοποιεί τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Η έκφραση της κυκλίνης D ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Jun και ATF2 (Activating Transcription Factor), που δημιουργούν το σύμπλοκο AP-1. Η αύξηση της δραστηριότητας του c-Jun μπορεί να επιτευχθεί μέσω τουλάχιστον δύο μονοπατιών:

1. Οι αυξητικοί παράγοντες, μέσω των υποδοχέων RTKs, ενεργοποιούν τη Ras και μέσω αυτής τις MAPKs Raf-MEK1-ERK1. Η ERK1 έχει μια διπλή δράση. Η πρώτη δραστηριότητα της ERK1 λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει την κινάση MSK1 (Mitogen and Stress activated protein Kinase), η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον CREB. Ο CREB συνδέεται στην αλληλουχία του DNA CRE και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου c-Jun. Η δεύτερη δραστηριότητα της ERK λαμβάνει χώρα στο

κυτταρόπλασμα, όπου φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου GSK-3β. Έτσι εμποδίζεται η φωσφορυλίωση του c-Jun που τον καθιστά στόχο ουβικουιτίνωσης και μεταφοράς στα πρωτεώδη σώματα (Εικόνα 7.29Α).

2. Στρεσογόνοι και φλεγμονώδεις παράγοντες ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAPKs MLK, MKK4/7 και JNK1. Η JNK1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον c-Jun, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τον ATF2 (σχηματίζοντας ένα AP-1 σύμπλοκο) και μαζί δεσμεύονται στην αλληλουχία του DNA TRE, προκαλώντας έκφραση της RACK1. Αυτή δεσμεύεται στην ενεργοποιημένη PKC και μαζί συνδέονται με την JNK1. Επακόλουθη είναι η φωσφορυλίωση της JNK1 από την PKC. Η φωσφορυλίωση επιτρέπει την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της JNK1 από τις κινάσες MKK4/7 που καθιστούν την JNK1 πλήρως λειτουργική (Εικόνα 7.29Β). Η ενισχυμένη δραστηριότητα της JNK1 μαζί με την αυξημένη έκφραση του c-Jun οδηγούν σε έντονη δραστηριότητα του c-Jun, η οποία με τη σειρά της προάγει την έκφραση ακόμη μεγαλύτερης ποσότητας RACK1. Συνεχής παροχή του c-Jun, εξαιτίας του έντονα ενεργού συστήματος Ras-ERK, είναι προαπαιτούμενη για αυτό το μονοπάτι, όπως φαίνεται και από την αργή μείωση όταν



Εικόνα 7.29

Η PKC συνδέει το μονοπάτι ERK σε ένα ενισχυμένο μονοπάτι JNK. Α. Αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν το μονοπάτι

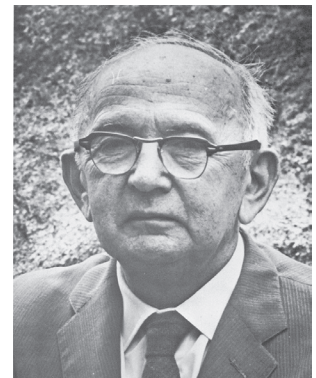
Ras, Raf-MEK-ERK που οδηγεί στην ενισχυμένη δράση του c-Jun με δύο τρόπους: (1) η ERK1 εισέρχεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει την κινάση MSK1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον CREB επάγοντας τη μεταγραφή του c-Jun και (2) η ERK στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη GSK-3β, εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση και ουβικουιτίνωση του c-Jun. Β. Στρεσογόνοι και παράγοντες φλεγμονής μέσω των MAPKs MLK - MKK4/7 - JNK1 οδηγούν στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του c-Jun (3), ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τον ATF2, δημιουργώντας το διμερές AP-1. Ο AP-1 συνδέεται στο TRE επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων RACK1. Η RACK1 συνδέεται στην ενεργοποιημένη PKCε και μαζί συνδέονται στην JNK1 οδηγώντας στην επιπλέον φωσφορυλίωσή της (4). Αυτό καθιστά την κινάση JNK1 περισσότερο αποτελεσματική. Η αυξημένη μεταγραφή της κυκλίνης D (5) επιταχύνει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. [25]

στα κύτταρα προστίθενται αναστολείς του μονοπατιού Ras-ERK. Πράγματι, σε κύτταρα μελανώματος αυτός ο τρόπος ενίσχυσης ανιχνεύεται μόνο όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της ERK. Ως αποτέλεσμα, αυξημένα επίπεδα του c-Jun οδηγούν σε αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D, και πάλι μέσω του συμπλέγματος c-Jun/ATF2, το οποίο προσδένεται στον εκκινητή του γονιδίου της κυκλίνης D. Ο κύκλος ενίσχυσης του c-Jun εξηγεί, μεταξύ άλλων, πώς τα κύτταρα μελανώματος διατηρούν τόσο υψηλά επίπεδα πολλαπλασιασμού, καθώς τα αυξημένα επίπεδα κυκλίνης D επιταχύνουν το πέραςμα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.

Μελέτες με αναστολείς κινασών έδειξαν ότι οι ERK1 και JNK1 είναι ίσοι συνεργάτες στη διατήρηση υψηλών επιπέδων κυκλίνης D. Ωστόσο, το μονοπάτι JNK1 γενικά ενεργοποιείται ως απόκριση σε καταστάσεις stress.

4. Πρωτεϊνική κινάση B (PKB) ή Akt

Η πρωτεϊνική κινάση B (PKB), γνωστή και ως Akt, είναι μια κινάση Ser/Thr που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K. Το όνομα Akt δεν αναφέρεται στη λειτουργία αυτής της κινάσης, αλλά στη μεταλλαγμένη μορφή της. Το 1977 η Akt (σήμερα Akt1) αναγνωρίστηκε ως ένα ογκογονίδιο του ρετροϊού AKT8. Ο ιός AKT8 απομονώθηκε από τα λεμφώματα του θύμου αδένος (thymoma) που δημιουργούνταν αυθόρμητα στη σειρά ποντικών AK-Rat, η οποία δημιουργήθηκε και συντηρούνταν από τον Jacob Furth, από το 1928. Όταν το ογκογονίδιο αυτό απομονώθηκε, ονομάστηκε vAkt. Έτσι, τα ανθρώπινα ανάλογα που εντοπίστηκαν αργότερα ονομάστηκαν αναλόγως. Σήμερα η κινάση είναι ευρέως γνωστή ως PKB/Akt.



Jacob Furth (1896-1979).

4.1 Ταξινόμηση των κινασών Akt

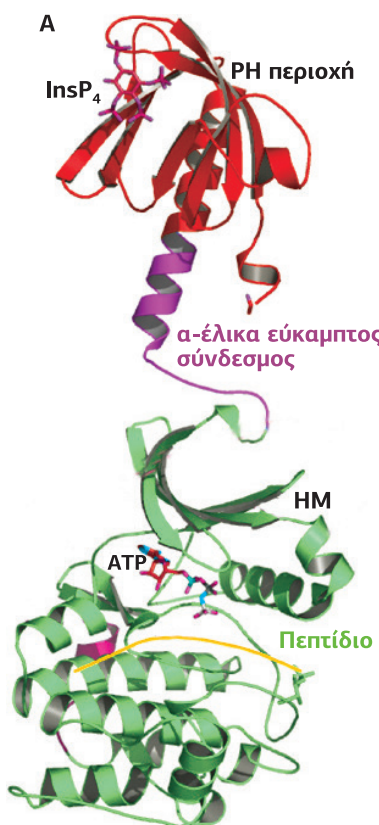
Έχουν αναγνωριστεί τρεις ισομορφές των κινασών Akt. Η **Akt1** συμμετέχει στο μονοπάτι της κυτταρικής επιβίωσης αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Είναι, επίσης, ικανή να ενεργοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών και συνεπώς παίζει ρόλο κλειδί στην υπερτροφία των σκελετικών μυών και γενικά στην αύξηση των ιστών. Το πειραματικό μοντέλο ποντικού με loss-of-function μεταλλάξεις του γονιδίου Akt1 εμφανίζει καθυστερημένη αύξηση και αυξημένη απόπτωση σε ιστούς, όπως ο θύμος και οι όρχεις. Καθώς αναστέλλει την απόπτωση και προωθεί την κυτταρική επιβίωση, η Akt1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε πολλούς τύπους καρκίνου.

Η **Akt2** είναι ένα σηματοδοτικό μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Στο πειραματικό μοντέλο ποντικού που στερείται την Akt1, αλλά εκφράζει την Akt2, η ομοιότητα της γλυκόζης δεν διαταράσσεται, αλλά τα ζώα είναι μικρότερα, επισημαίνοντας τον ρόλο της Akt1 στην αύξηση. Αντιθέτως, στο πειραματικό μοντέλο ποντικού που εκφράζει την Akt1, αλλά στερείται την Akt2, εμφανίζεται ένας διαβητικός φαινότυπος (αντίσταση στην ινσουλίνη).

Οι ισομορφές Akt υπερεκφράζονται σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών όγκων, του γαστρεντερικού συστήματος (Akt1), των ωοθηκών (Akt2), του παγκρέατος (Akt2) και του στήθους (Akt2). Ο ρόλος της **Akt3** είναι λιγότερο ξεκάθαρος και εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο.

4.2 Δομή της PKB/Akt

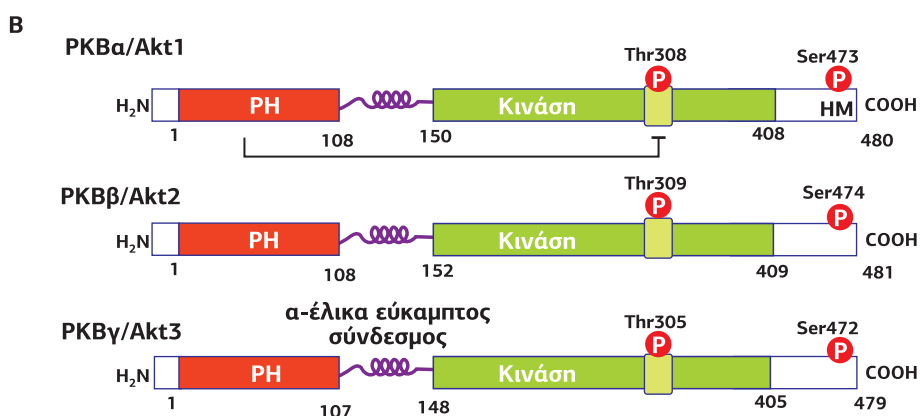
Η PKB/Akt είναι μια ~57 kDa κινάση Ser/Thr, η οποία περιέχει στο NH₂-τελικό της άκρο μια περιοχή PH (Pleckstrin Homology) που συνδέεται στα φωσφοϊνοσιτίδια



Εικόνα 7.30
Η δομή της PKB/Akt.

A. Τριδιάστατη διαμόρφωση της PKB, όπου διακρίνεται η PH περιοχή (με κόκκινο), ο εύκαμπος σύνδεσμος με μορφή α-έλικας (με μωβ) και η καταλυτική περιοχή με συνδεδεμένο το ATP (με πράσινο). Με κίτρινο διακρίνεται ένα πεπτιδικό τμήμα του υποστρώματος. [77] [43]

B. Οι διάφορες ισομορφές της PKB αποτελούνται από μια περιοχή PH, η οποία συνδέεται στα PIP_3 , μια καταλυτική περιοχή και μια ρυθμιστική υδρόφοβη περιοχή στο COOH-τελικό τους άκρο. Στην εικόνα διακρίνονται οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης, Thr305 και Ser472, που είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου. [19]



$PtdIns(3,4,5)P_3$ με μεγάλη συγγένεια. Η περιοχή PH συνδέεται μέσω ενός συνδέσμου α-έλικας με την καταλυτική περιοχή κινάσης (βλ. **Εικόνα 5.84**). Στην καταλυτική περιοχή βρίσκεται η Thr308, της οποίας η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Akt. Δίπλα στην περιοχή κινάσης υπάρχει μια COOH-τελική ρυθμιστική περιοχή που περιέχει ένα υδρόφοβο μοτίβο (HM, Hydrophobic Motif) με μια δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης, την Ser473 (**Εικόνα 7.30**). Αυτές οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου.

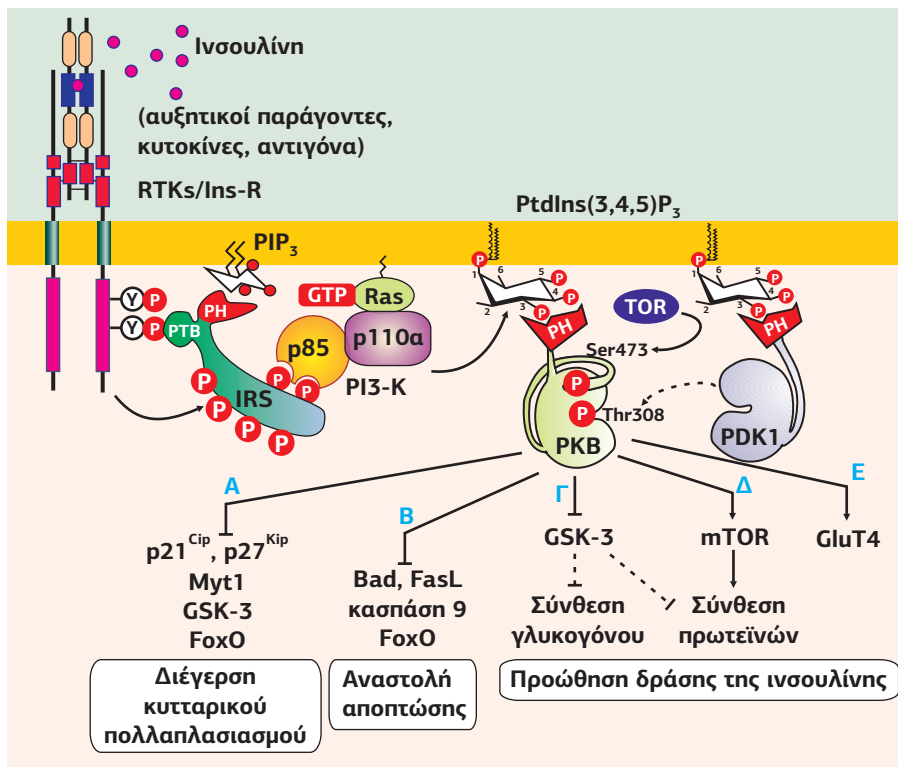
4.3

Ενεργοποίηση της PKB/Akt και στόχοι

Καθώς η Akt περιέχει μια περιοχή PH (Pleckstrin Homology), που συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στα φωσφοϊνοσιτίδια $PtdIns(3,4,5)P_3$, είναι φυσικό να ρυθμίζεται από το μονοπάτι της κινάσης PI3K, η οποία φωσφορυλιώνοντας τα PIP_2 δημιουργεί τα PIP_3 . Η PKB/Akt δεν έχει καμία ακολουθία ψευδοϋποστρώματος. Αντ' αυτού το καταλυτικό κέντρο εμποδίζεται από την NH_2 -τελική περιοχή PH. Αυτή η αυτόματη παρεμπόδιση απελευθερώνεται όταν η περιοχή PH συνδέεται με τα PIP_3 στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Έτσι, η ενεργοποίηση της PKB απαιτεί πάντα τη συνεργασία της PI3K, η οποία παρέχει τα PIP_3 . Όταν η Akt βρεθεί συνδεδεμένη με τη μεμβράνη, το ενεργό κέντρο και ο βρόχος ενεργοποίησης καθίστανται προστά για φωσφορυλίωση. Η Akt φωσφορυλιώνεται στη Ser473 από την κινάση **TOR** (Target Of Rapamycin) και η δραστηριότητά της αυξάνεται κατά 10 φορές. Η mTORC2 αν και λειτουργικά δρα ως η πολυπόθητη (δοκιμαστικά ονομαζόμενη) PDK2, υπάρχουν και άλλες κινάσες, όπως η **ILK** (Integrin-Linked Kinase) και η **MK2** ή **MARCKP2** (Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase-2), που μπορούν να δράσουν ως PDK2. Αυτή η φωσφορυλίωση επάγει, στη συνέχεια, μια δεύτερη φωσφορυλίωση από την ιδιόσυστα ενεργή **PDK1** (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) στην Thr308 του βρόχου ενεργοποίησης αυξάνοντας τη δραστηριότητα της κινάσης άλλες 100 φορές (βλ. **Εικόνα 5.84**). Η ενεργοποιημένη Akt, με αυξημένη κατά 1.000 φορές τη δραστηριότητά της, μπορεί τώρα να φωσφορυλιώσει μια μεγάλη ποικιλία στόχων.

Η Akt μπορεί να ενεργοποιηθεί και από μονοπάτια ανεξάρτητα της PI3K. Για παράδειγμα, η κινάση τυροσίνης ACK1 (Activated Cdc42-associated Kinase 1) φωσφορυλιώνει την Tyr176 ενεργοποιώντας την Akt. Επίσης, η αύξηση του κυτταροπλασματικού cAMP ενεργοποιεί την Akt μέσω της κινάσης PKA.

Η κινάση Akt ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες φωσφορυλιώνοντας έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών της στόχων (**Εικόνα 7.31**). Κύρια δράση της είναι η διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αναστέλλοντας αντι-πολλαπλασιαστικούς στόχους, όπως η p21^{Cip} και p27^{Kip}, η Myt1, η κινάση της συνθάσης του



Εικόνα 7.31

Τα μονοπάτια σηματοδότησης που ελέγχονται από την πρωτεϊνική κινάση B.

Η ινσουλίνη, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες ενεργοποιούν μέσω των υποδοχέων RTKs (στην εικόνα διακρίνεται ο υποδοχέας ινσουλίνης) την κινάση PI3K (αποτελείται από δύο υπομονάδες, p85 και p110α). Η παραγωγή PIP₃ στρατολογεί την PKB/Akt στη μεμβράνη επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση και την πλήρη ενεργοποίησή της από τις κινάσες PDK2 (TOR) και PDK1. Οι στόχοι και οι δράσεις της PKB είναι ποικίλες.

A. Ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού: η PKB φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί αντι-πολλαπλασιαστικούς παράγοντες, όπως οι p21, p27, Myt1, GSK-3 και FoxO.

B. Αναστολή της απόπτωσης: Η PKB φωσφορυλιώνει και αδρανοποιεί τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bad, FasL, κασπάση 9 και τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxO που επάγουν τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών γονιδίων.

Γ-E. Σηματοδότηση ινσουλίνης: η PKB προωθεί τη σύνθεση γλυκογόνου με την αδρανοποίηση της GSK-3 (Γ), τη στρατολόγηση του μεταφορέα GluT4 της γλυκόζης στη μεμβράνη (E) και επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση έμμεσα με την αδρανοποίηση της GSK-3 και άμεσα με την ενεργοποίηση της κινάσης mTOR. [8]

γλυκογόνου GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) και ο μεταγραφικός παράγοντας FoxO (Forkhead box O). Επίσης, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την απόπτωση, αναστέλλοντας την κασπάση 9, τον μεταγραφικό παράγοντα FoxO και τον προ-αποπτωτικό παράγοντα Bad (μία προαποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2). Η Akt παίζει, επίσης, έναν ρόλο κλειδί στη δράση της ινσουλίνης, καθώς μέσω αναστολής της GSK-3 επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου, μέσω ενεργοποίησης της κινάσης TOR (Target Of Rapamycin) επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση, και τρίτον ενεργοποιεί την ινσουλινο-εξαρτώμενη μετακίνηση του μεταφορέα γλυκόζης GluT4 προς την κυτταρική μεμβράνη.

4.4

PKB/Akt, αναστολή της απόπτωσης και πρόοδος του κυτταρικού κύκλου

Η PKB επάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω δύο μηχανισμών: αφενός φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Bad, το ένζυμο κασπάση 9 και οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO, και αφετέρου φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη λιγάση ουβικουιτίνης Mdm2, που οδηγεί στην αποικοδόμηση του προ-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα p53 (Εικόνα 7.32).

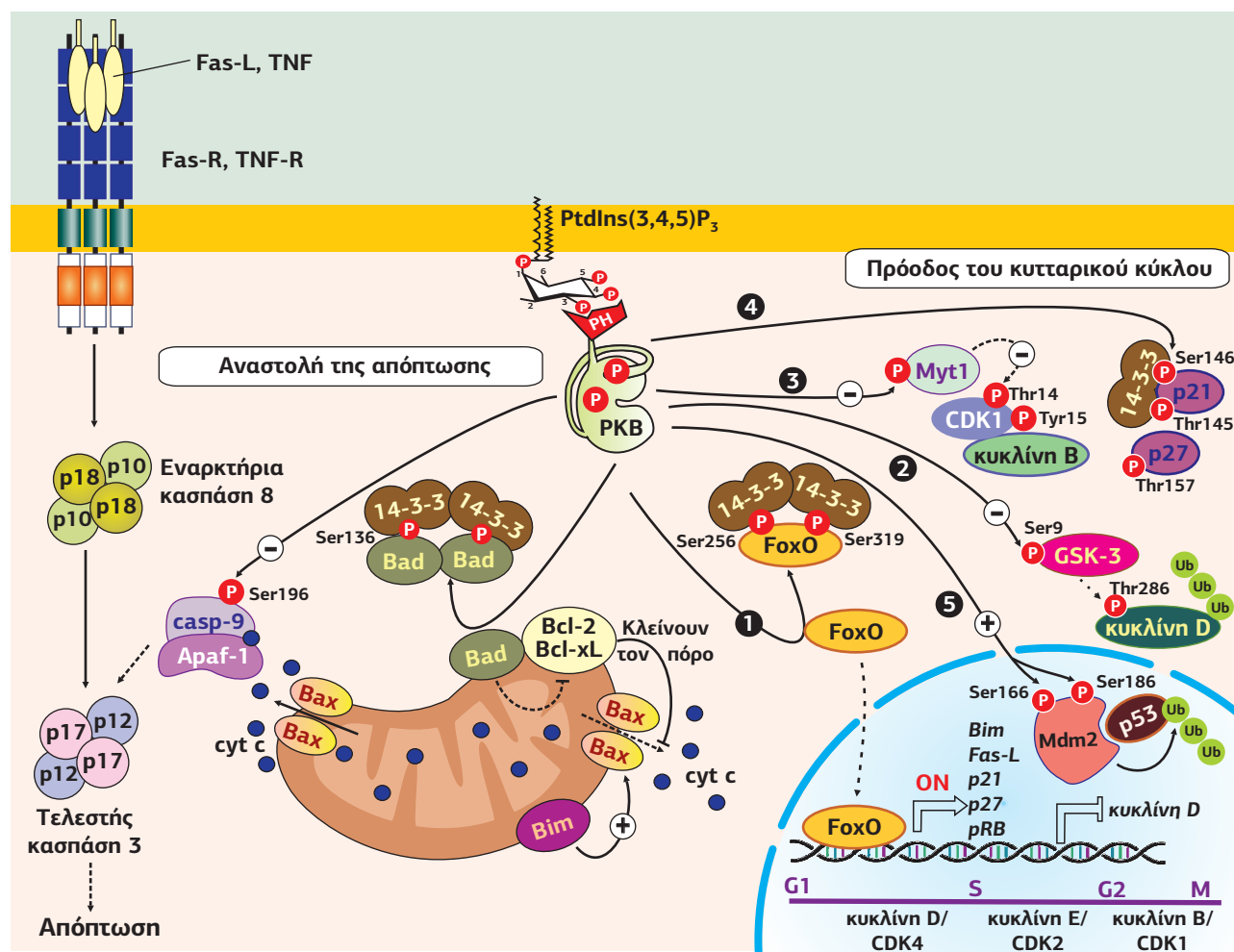
Η **Bad** (Bcl-2-associated death promoter) είναι ένα μέλος της οικογένειας Bcl-2, εναρκτήριος παράγοντας της απόπτωσης. Περιέχει μια COOH-τελική διαμεμβρανική περιοχή που την τοποθετεί στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, καθώς και μια περιοχή που επιτρέπει τη μεταφορά της στον πυρηνικό φάκελο. Μετά την ενεργοποίησή της, η Bad δημιουργεί ένα ετεροδιμερές με τις πρωτεΐνες Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ή Bcl-xL και αναστέλλει την αντι-αποπτωτική τους δράση. Η απόπτωση θεωρείται ότι ξεκινά με το άνοιγμα ενός πόρου στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων από τις πρωτεΐνες Bax/Bak. Από τον πόρο αυτό εξέρχεται το κυτόχρωμα c, το οποίο ενεργοποιεί το αποπτωτικό μονοπάτι των κασπασών. Οι Bcl-2 και Bcl-xL κλείνουν τον πόρο εμποδίζοντας την έξοδο του κυτοχρώματος c και, συνεπώς, την απόπτωση. Όταν η Bad φωσφορυλιώνεται στη Ser136 από την

PKB/Akt, απομακρύνεται από τις Bcl-2/Bcl-xL, που βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, και δημιουργεί σύμπλοκο με τις 14-3-3 παραμένοντας σε απόσυρση στο κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η προ-αποπτωτική της δράση και προωθείται η κυτταρική επιβίωση.

Η **κασπάση 9** δρα ως εναρκτήριο στοιχείο της απόπτωσης, ενεργοποιώντας το μονοπάτι των κασπασιών. Η φωσφορυλίωσή της στη Ser196 από την PKB οδηγεί στην αναστολή της δραστηριότητάς της.

Η **p21^{Cip1}** και η **p27^{Kip1}** ανήκουν στην οικογένεια Cip/Kip (Cyclin-dependent Kinase inhibitor) των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Η p21^{Cip1} είναι ένας αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών CDK2 και CDK1, ενώ η p27^{Kip1} των CDK2 και CDK4. Και οι δύο εμποδίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση από την PKB της p27^{Kip1} στην Thr157, και της p21^{Cip1} στην Thr145 και στη Ser146 εμποδίζει την είσοδο των δύο αναστολέων στον πυρήνα καθώς ευνοεί τη σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες 14-3-3.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες **FoxO** (Forkhead box, τύπος O) ανακαλύφθηκαν



Εικόνα 7.32

Ο ρόλος της PKB/Akt στην αναστολή της απόπτωσης και στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου. Η PKB/Akt αναστέλλει την απόπτωση φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας τρεις στόχους: την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad (η οποία στην ενεργή της μορφή αναστέλλει τις Bcl-X/Bcl2. Οι ενεργές Bcl-X/Bcl2 κλείνουν τον πόρο που δημιουργεί η Bax, εμποδίζοντας την έξοδο του κυτοχρώματος c), την κασπάση 9 και τον μεταγραφικό παράγοντα FoxO (που ενεργοποιεί τη μεταγραφή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών). Η PKB/Akt προωθεί τον κυτταρικό κύκλο φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας (1) τον FoxO (που ενεργοποιεί τη μεταγραφή των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21, p27 και αναστέλλει τη μεταγραφή της κυκλίνης D), (2) την κινάση GSK-3 (που φωσφορυλιώνει την κυκλίνη D καθιστώντας την στόχο ουβικουτινίνωσης), (3) την κινάση Myt1 (η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει το σύμπλοκο κυκλίνη B/CDK1), (4) τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p21, p27, και (5) φωσφορυλιώνει την Mdm2 επάγοντας την είσοδό της στον πυρήνα, όπου ουβικουτινώνει τον p53. [27] [5]

το 1988 στο *Caenorhabditis elegans*. Αποτελούν μια υποομάδα των παραγόντων φουρκέτας (forkhead factors), που συναντώνται ευρέως στους ευκαρυώτες. Ο κύριος ρόλος τους είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η ενεργοποίηση της απόπτωσης, ως προσαρμοστική απάντηση στο stress. Επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως οι **Bim** (**B**cl-2 **i**nteracting **m**ediator of cell death), οι οποίες ενεργοποιούν τις Bax και την έξοδο του κυτοχρώματος c, και οι **προσδέτες Fas** (Fas-L), καθώς επίσης και των γονιδίων που κωδικοποιούν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, όπως ο **p21^{Cip}**, ο **p27^{Kip}** και η πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος **pRb** (που εμποδίζει τον κυτταρικό κύκλο ελλείψει μιτογόνων σημάτων). Οι παράγοντες FoxO εμποδίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου της **κυκλίνης D**, η οποία ενεργοποιεί τη μετάβαση από τη φάση G1 στην S. Μέσω της φωσφορυλίωσης από την PKB ο FoxO δεν εισέρχεται στον πυρήνα, καθώς αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες 14-3-3, οι οποίες τον κρατούν σε απόσυρση στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η ανασταλτική επίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά, οι οποίες οδηγούν στην αυξημένη απελευθέρωση αναβολικών ορμονών, όπως η ινσουλίνη που ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K-PKB.

Η λιγάνση ουβικουιτίνης **Mdm2** (**M**urine **d**ouble **m**inute 2) είναι ένα ογκογονίδιο του οποίου η μεταγραφή επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα p53, γνωστό ως “guardian of the genome”, καθώς σταματά τον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί σε απόπτωση ως απάντηση σε καταστροφή του DNA που δεν επιδέχεται επιδιόρθωση. Η δράση του p53 αναστέλλεται από την Mdm2, η οποία τον οδηγεί σε ουβικουιτίνωση και αποικοδόμηση. Η PKB φωσφορυλιώνει την Mdm2 σε δύο κατάλοιπα Ser166 και Ser186, επάγοντας την είσοδό της στον πυρήνα, όπου ουβικουιτινώνει τον p53.

Η PKB καταστέλλει όχι μόνο τη *de novo* σύνθεση, αλλά και τη δραστηριότητα των προαναφερθέντων αναστολέων του κυτταρικού κύκλου. Συγχρόνως, η κινάση φωσφορυλιώνει την Ser9 και αναστέλλει την **GSK-3**, ένα αντι-πολλαπλασιαστικό ένζυμο που εμποδίζει τη μετάφραση του mRNA και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο μέσω της φωσφορυλίωσης των κυκλινών D και E, που τις καθιστά στόχους ουβικουιτίνωσης και αποικοδόμησης στα πρωτεασώματα. Η **Myt1** (Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase), μια άλλη αντι-πολλαπλασιαστική πρωτεϊνική κινάση, αδρανοποιείται επίσης από την PKB. Φωσφορυλιώνοντας το σύμπλοκο κυκλίνης B-CDK1, στη Thr14 και στη Tyr15 της CDK1, η Myt1 αποτρέπει τη μετάβαση από τη φάση G2 στη φάση M.

Κατά συνέπεια, η PKB παίζει έναν ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιστών και στη σταθερότητα μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού θανάτου. Είναι, λοιπόν, εύκολα κατανοητό ότι η υπερδραστηριότητα της PKB λόγω μιας ογκογόνου μετάλλαξης προωθεί την ανάπτυξη όγκων. Ο σύνθετος τρόπος ενεργοποίησης του ενζύμου, που περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο “κλειδιά ασφαλείας”, δηλαδή μια διπλή φωσφορυλίωση, μπορεί να παρέχει έναν μηχανισμό ενάντια στην τυχαία ενεργοποίηση. Επιπλέον, μια πρωτεΐνη που αποτρέπει την ενεργοποίηση του PKB αναμένεται να λειτουργεί ως καταστολέας όγκων. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η φωσφολιπιδική φωσφατάση PTEN, ο αντίπαλος της PI3K. Στην πραγματικότητα, το γονίδιο της PTEN έχει βρεθεί ανενεργό σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους.

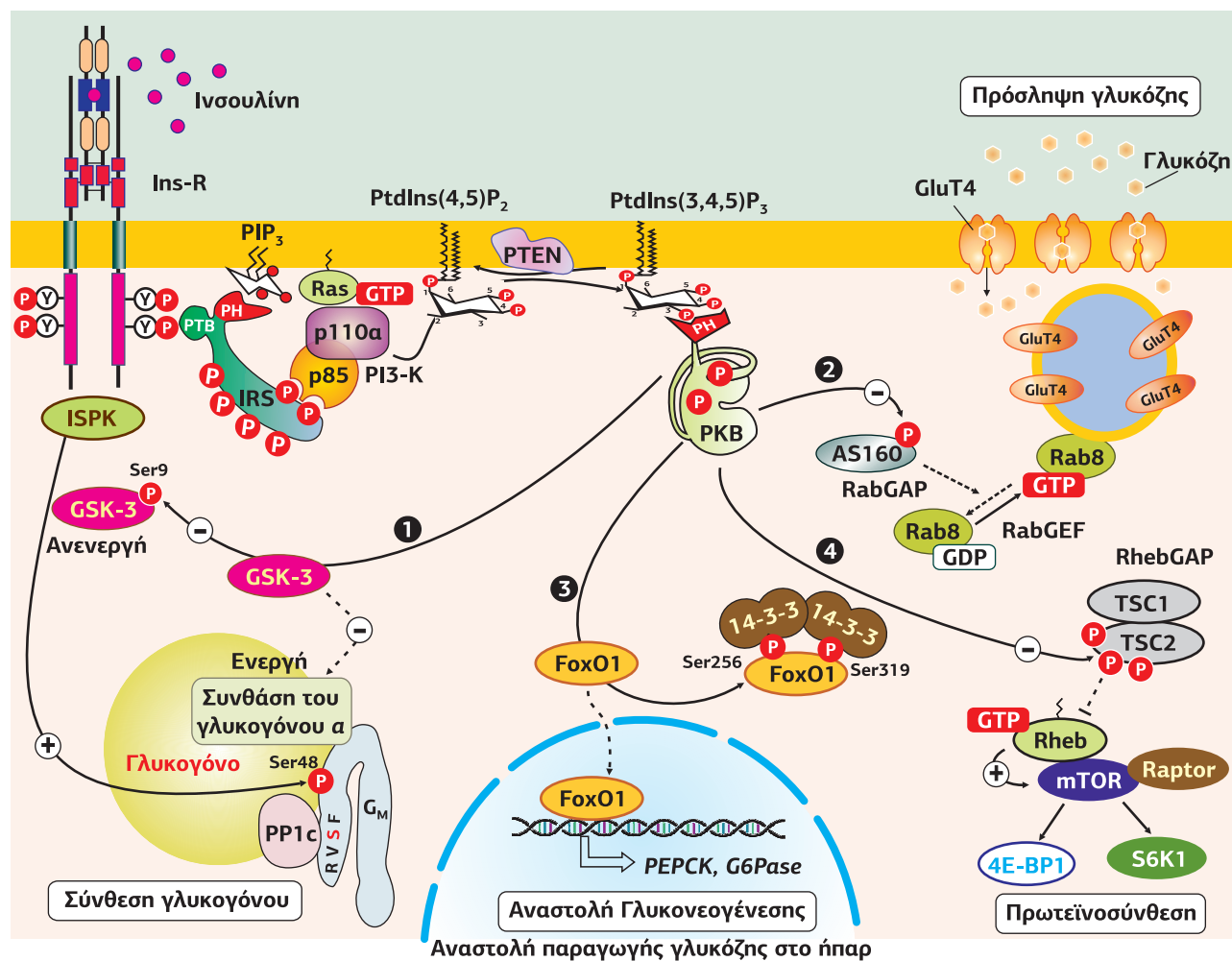
4.5 | Η PKB/Akt ως μεσολαβητής της δράσης της ινσουλίνης

Η PKB καταλαμβάνει μια κεντρική θέση στον μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μια αναβολική ορμόνη που απελευθερώνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος προωθώντας τη μετατροπή μικρών μορίων του αίματος (γλυκόζη) σε μεγαλομοριακές ενώσεις (γλυκογόνο) μέσα στα κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, ενεργοποιεί τη σύνθεση του γλυκογόνου, αυξάνοντας την πρόσληψη της γλυκόζης, αυξάνοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και μειώνοντας τη γλυκονεογένεση (*de novo* σύνθεση γλυκόζης από το ήπαρ). Ως αποτέλεσμα, διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος σταθερά.

Ενεργοποίηση της σύνθεσης του γλυκογόνου και αναστολή της γλυκονεογένεσης

Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι μια ολιγομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη με δράση κινάσης Tyr, η οποία με τη σύνδεση της ινσουλίνης trans-αυτοφωσφορυλιώνεται. Η αυτοφωσφορυλίωση ενεργοποιεί την καταλυτική περιοχή κινάσης του υποδοχέα. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης, το IRS (Insulin Receptor Substrate), φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία λειτουργούν ως θέσεις πρόσδεσης της περιοχής SH2 της PI3K. Η παραγωγή PIP₃ στρατολογεί την PKB στη μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται διηλά και ενεργοποιείται (**Εικόνα 7.33**). Ένα σημαντικό υπόστρωμα της PKB σχετικό με τη δράση ινσουλίνης είναι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου **GSK-3**, η οποία απενεργοποιείται μετά τη φωσφορυλίωσή της. Δεδομένου ότι η ενεργή GSK-3 φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη συνθάση του γλυκογόνου, η PKB υποκινεί έμμεσα τη σύνθεση του γλυκογόνου. Εντούτοις, η απενεργοποίηση της GSK-3 από μόνη της δεν αρκεί για να επιτρέψει την απότομη έναρξη της σύνθεσης του γλυκογόνου. Για να συμβεί αυτό, είναι απαραίτητη

Η **GSK-3** είναι η πιο πολυάσχολη κινάση των κυττάρων, με πάνω από 100 γνωστά υποστρώματα.



Εικόνα 7.33

Ο ρόλος της PKB/Akt στη δράση της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη μέσω του υποδοχέα Ins-R ενεργοποιεί το μονοπάτι IRS/ PI3K/ PKB. Στη συνέχεια, η PKB μεταφέρει το μήνυμα της ινσουλίνης φωσφορυλιώνοντας (1) την GSK-3, η οποία αναστέλλεται και κατά συνέπεια αίρεται η αναστολή της πάνω στη συνθάση του γλυκογόνου, (2) την RabGAP AS160, η οποία απενεργοποιείται, επιτρέποντας στη Rab-GTP να συμμετέχει στη μεταφορά των ενδοκυτταρικών κυστιδίων, που περιέχουν τον GluT4, στη μεμβράνη, (3) τον FoxO1, ο οποίος συνδέεται με τις πρωτεΐνες 14-3-3 παραμένοντας στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων που προωθούν τη γλυκονεογένεση, όπως η PEPCK και η G6Pase και (4) το σύμπλοκο TSC1/2, το οποίο αναστέλλεται και αίρεται η επιτάχυνση της υδρόλυσης του GTP από την GTPάση Rheb. Η Rheb-GTP δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την κινάση mTOR και την πρωτεΐνη Raptor, το οποίο φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη 4E-BP1 και την κινάση S6K, ενεργοποιώντας την πρωτεϊνοσύνθεση. [72]

και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης-1 (PP1c/G_M), η οποία αποφωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου. Αυτό μεσολαβείται μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης που διεγείρεται από την ινσουλίνη, της ISPK (Insulin-Stimulated Protein Kinase). Επίσης, η PKB φωσφορυλιώνει τον **FoxO1**, ο οποίος ως αποτέλεσμα συνδέεται με τις πρωτεΐνες 14-3-3 παραμένοντας στο κυτταρόπλασμα. Η αναστολή του FoxO1 οδηγεί στην αναστολή της μεταγραφής γονιδίων που προωθούν τη γλυκονογένεση, όπως η καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού, PEPCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase), ένα ένζυμο που μετατρέπει το οξαλοξικό σε φωσφοενολ-πυροσταφυλικό (το οποίο μετατρέπεται σε γλυκόζη) και CO₂, και η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase), που αποφωσφορυλιώνει την Glu6P σε γλυκόζη. Το διεγερμένο από την ινσουλίνη κύτταρο είναι τώρα πλήρως απασχολημένο με τη σύνθεση του γλυκογόνου.

Ενεργοποίηση της πρόσληψης της γλυκόζης

Για να παρέχει γλυκόζη στη συνθάση γλυκογόνου, η ινσουλίνη επάγει την πρόσληψη της γλυκόζης που κυκλοφορεί στο αίμα από τους ιστούς, ιδιαιτέρως στον μυϊκό, στον λιπώδη και στις περιοχές του εγκεφάλου που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του μεταβολισμού. Αυτό το καταφέρει μέσω της στρατολόγησης των μεταφορέων **GluT4** από ενδοκυτταρικά κυστίδια προς την κυτταρική μεμβράνη. Η PKB προωθεί τη μεταφορά στην επιφάνεια των κυττάρων του GluT4, φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας την **AS160** (Akt Substrate of 160 kDa), μια RabGAP που επιταχύνει την απενεργοποίηση της μικρής GTPάσης Rab. Κατά συνέπεια, η Rab παραμένει ενεργή, με συνδεδεμένο το GTP, και έχει τη δυνατότητα μεταφοράς των κυστιδίων που περιέχουν GluT4 στη μεμβράνη των κυττάρων (**Εικόνα 7.33**, βλ. και **Εικόνα 8.88**).

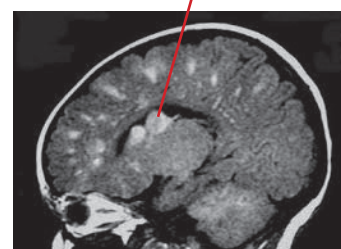
Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Τα κύτταρα για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν απαιτείται η παραγωγή ή περισσότερων πρωτεϊνών, οπότε πρέπει να εξασφαλίσουν εκ των προτέρων ότι έχουν επαρκείς ενεργειακούς πόρους, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, αφθονία οξυγόνου και αυξητικούς παράγοντες, προκειμένου να ξεκινήσει η μετάφραση του mRNA. Δεδομένου ότι η ινσουλίνη είναι ένας αυξητικός παράγοντας που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος έπειτα από αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, η σηματοδότηση της εξασφαλίζει ότι υπάρχει ενέργεια για να πραγματοποιηθεί η πρωτεϊνική σύνθεση.

Λειτουργώντας και πάλι μέσω του μονοπατιού της PI3K/ PKB, η ινσουλίνη αυξάνει την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει το ετεροδιμερές σύμπλοκο **TSC1/2**, μιας GAP που δρα επί της GTPάσης Rheb, και το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο **mTORC1**, το οποίο δρα επί της πρωτεΐνης 4E-BP1 (eIF4E-Binding Protein 1) και της κινάσης S6K1 (S6-Kinase, γνωστή και ως p70^{RSK}), δηλαδή της p70 (70 kDa) κινάσης της S6 ριβοσωμικής πρωτεΐνης, που είναι συστατικό της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S.

Οι πρωτεΐνες **TSC1** [hamartin, προέρχεται από το hamartoma (αμάρτημα) και αναφέρεται στην έναρξη μιας εστιασμένης δυσμορφίας που μοιάζει με νεόπλασμα, χωρίς να είναι κακοήθης όγκος, και μεγαλώνει με τον ίδιο ρυθμό, όπως οι περιβάλλοντες ιστοί] και **TSC2** (tuberin, προέρχεται από το tuberous, στα ελληνικά αποδίδεται ως οζώδης, κονδυλώδης) δημιουργούν ένα ογκοκατασταλτικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο TSC1/2 (Tuberous Sclerosis proteins 1 and 2). Μεταλλάξεις με απώλεια δραστηριότητας οδηγούν σε οζώδη σκλήρυνση (tuberous sclerosis). Η TSC2 περιέχει μια περιοχή GAP (GTPase Activating Protein), η οποία διεγείρει τη δραστηριότητα GTPάσης της μικρής G-πρωτεΐνης Rheb (Ras homologue enriched in brain), η οποία είναι ένας ενεργοποιητής της κινάσης mTOR. Η TSC1 περιέχει μια περιοχή RhoGAP και δρα ως σταθεροποιητικός παράγοντας προστατεύοντας και εμποδίζοντας την αποικοδόμηση της TSC2. Οι TSC1 και TSC2 διαθέτουν στο COOH-τελικό τους άκρο μια περιοχή ικανή να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή. Θέσεις ανασταλτικής φωσφορυλίωσης στην TSC1 είναι οι Thr417, Ser584 και Thr1047 (από την CDK1) και στην TSC2 οι Ser939,

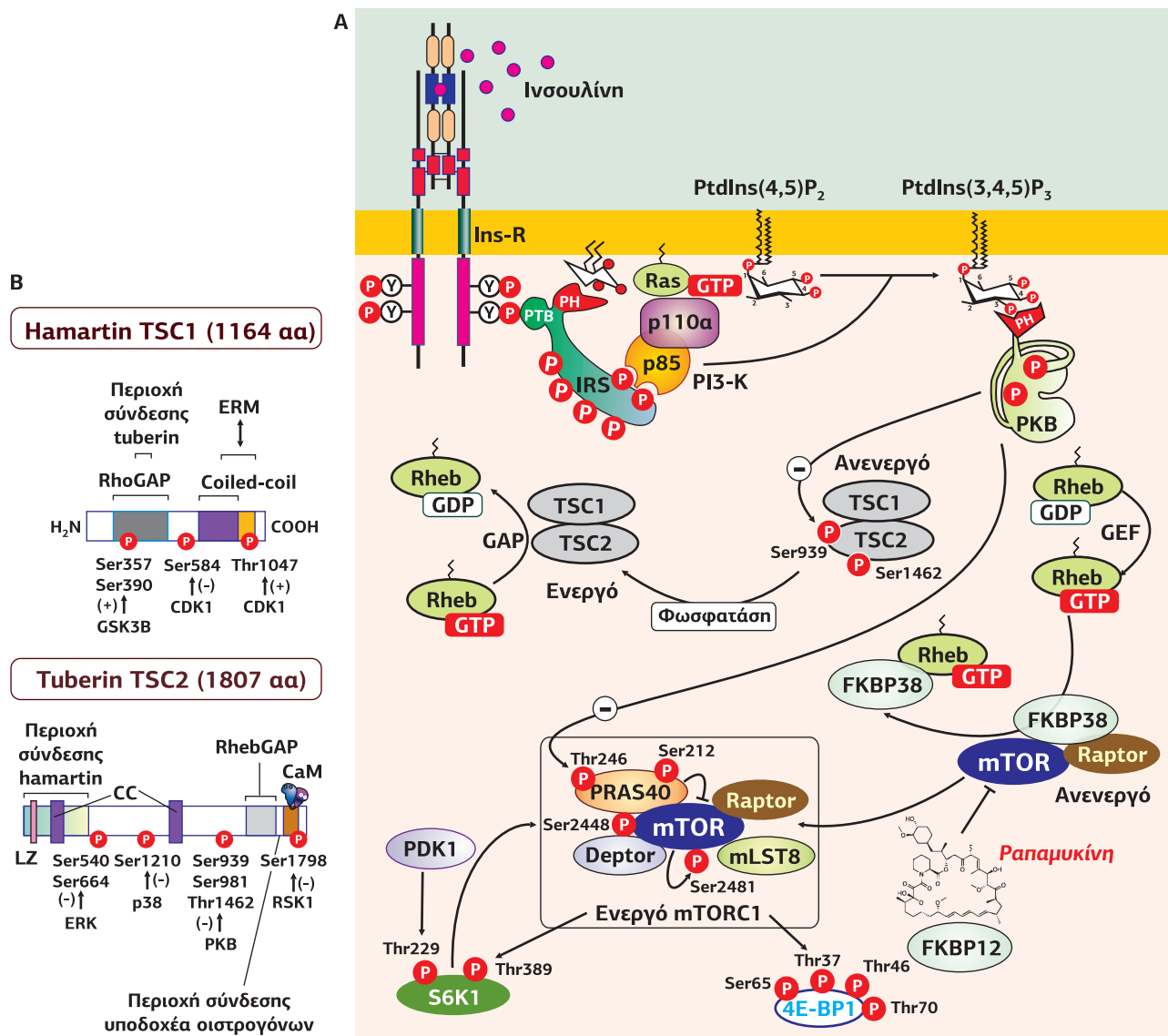
Καλοήθης όγκος



Η **Οζώδης Σκλήρυνση** είναι μια πολυσυστηματική γενετική διαταραχή (1/6.000) που χαρακτηρίζεται από πολλαπλούς καλοήγη οζώδεις όγκους (tubers, όζους-πρηξίματα) στον εγκέφαλο και τα περισσότερα όργανα του σώματος. Οι όζοι αυτοί αναπτύσσονται και με την πάροδο των χρόνων ασβεστοποιούνται (σκληραίνουν). Τα γονίδια TSC1 ή TSC2 είναι υπεύθυνα για την Οζώδη Σκλήρυνση. Τα συμπτώματα είναι λευκές δερματικές κηλίδες, επιληψία, διανοητική καθυστέρηση, χαρακτηριστικό εξάνθημα προσώπου, μαθησιακές δυσκολίες, διαταραχές συμπεριφοράς.

Ser981 και Thr1462 (από την Akt), η Ser1798 (από την RSK1), οι Ser540 και Ser664 (από την ERK1/2) και η Ser1210 (από την p38 MAPK-activated protein kinase 2 ή MK2). Υπάρχουν, επίσης, θέσεις θετικής φωσφορυλίωσης στην TSC1, οι Thr357 και T390 (από την GSK-3β), και στην TSC2 οι Ser1337, Ser1341 (από την GSK-3β) και Thr1227 και Ser1345 (από την AMPK). Η Akt αναστέλλει το σύμπλοκο TSC1/TSC2 φωσφορυλιώνοντας την TSC2 σε 2-5 θέσεις, επιτρέποντας τη Rheb-GTP να παραμείνει ενεργή και να ενεργοποιήσει το σύμπλοκο mTORC1 (Εικόνα 7.34).

Το σύμπλοκο TSC1/2, λόγω των πολλαπλών ρυθμιστικών θέσεων φωσφορυλίωσης που διαθέτει, θεωρείται ως “GRIPP”, δηλαδή Global Regulator and



Εικόνα 7.34

A. Ρύθμιση της mTOR από την PKB-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση του TSC2. Η ινσουλίνη αυξάνει τα επίπεδα πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ενεργοποίησης της Rheb. Το σύμπλοκο TSC1/TSC2 δρα ως GAP, επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP και οδηγώντας την Rheb στην GDP-ανενεργή διαμόρφωση. Η φωσφορυλίωση και η απενεργοποίηση του TSC2 από την PKB διατηρεί την Rheb στην GTP-ενεργή διαμόρφωση. Η ενεργή Rheb συνδέεται και αναστέλλει τον αναστολέα FKBP38 της κινάσης mTOR, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με τις Raptor, mLST8, Deptor και PRAS40. Η δραστηριότητα κινάσης της mTOR ενεργοποιείται με αυτοφωσφορυλίωση της Ser2481, και οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης S6K1 και της πρωτεΐνης 4E-BP1. [73] **B. Δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών TSC1 (hamartin) και TSC2 (tuberin).** Η TSC2 περιέχει μια περιοχή LZ (81–102 aa), μια περιοχή coiled-coil (346–371 aa), μια περιοχή με δράση RhebGAP (1593–1631 aa), μια περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης (1740–1757 aa) και μια περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα των οιστρογόνων. Η TSC1 περιλαμβάνει μια περιοχή RhoGAP (145–510 aa), μια περιοχή coiled-coil (719–998 aa) και μια περιοχή αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες ERM (881–1084 aa). Διακρίνονται οι θέσεις ανασταλτικής και θετικής φωσφορυλίωσης. [17] [36] [13]

Integrator of a Range of Physiological Processes.

Η **Rheb** (Ras homolog enriched in brain) είναι μια μικρή GTPάση, η οποία βρίσκεται αγκυροβολημένη στη μεμβράνη με μια φαρνεσυλομάδα. Εμφανίζει μικρή δομική ομολογία με τη Ras (30-40%). Ανακαλύφθηκε το 1994 από τον Kanato Yamagata στο Department of Neuroscience του Johns Hopkins University ως ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση επάγεται στα κύτταρα του ιππόκαμπου από επιληπτικούς σπασμούς και από την NMDA-εξαρτώμενη συναπτική δραστηριότητα. Στην ενεργή GTP-συνδεδεμένη διαμόρφωση συνδέεται και αναστέλλει τον ενδογενή αναστολέα FKBP38 της κινάσης mTOR επιτρέποντας την ενεργοποίηση της κινάσης, η οποία ως αποτέλεσμα αυτοφωσφορυλιώνεται στη Ser2481.

Η κινάση TOR (Target Of Rapamycin) αποτελεί τμήμα του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου mTORC1 (mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1), το οποίο λειτουργεί ως “master switch”, ως ένας αισθητήρας θρεπτικών, ενέργειας και οξειδοαναγωγής, που ελέγχει την πρωτεϊνοσύνθεση και συντονίζει τον ρυθμό της κυτταρικής αύξησης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης ως απάντηση σε εξωκυτταρικά μιτογόνα ή σε συνθήκες stress. Στα κύτταρα των θηλαστικών το σύμπλοκο **mTORC1** δρα ως ομοδιμερές. Το κάθε μονομερές αποτελείται από:

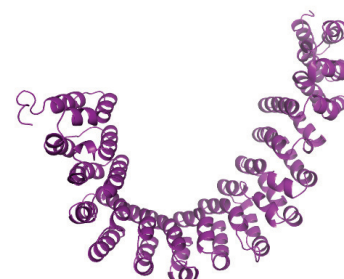
1. Την κινάση **mTOR**.
2. Τη ρυθμιστική πρωτεΐνη **Raptor** (Regulatory-associated protein of mTOR), μια μη ενζυμική ρυθμιστική υπομονάδα 150 kDa απαραίτητη για τη δραστηριότητα της mTOR στη φωσφορυλίωση των τελεστών της (S6K1 και 4E-BP1). Παίζει κύριο ρόλο στη δημιουργία του συμπλόκου mTORC1, καθώς και στον διμερισμό του.
3. Την πρωτεΐνη **mLST8** (mammalian Lethal with SEC13 protein 8) γνωστή και ως GβL (G-protein β subunit-Like) ή Gable. Η mLST8 σταθεροποιεί το ενεργό κέντρο της κινάσης mTOR και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή της.
4. Την **PRAS40** (Proline-Rich Akt Substrate 40 kDa), η οποία αναγνωρίστηκε ως υπόστρωμα της κινάσης Akt και αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας του mTORC1. Η φωσφορυλίωσή του από την Akt αναστέλλει τη δράση της, επιτρέποντας τη λειτουργία του mTORC1.
5. Την **Deptor** (DEP domain containing mTOR-interacting protein). Αν και ο ακριβής της ρόλος δεν είναι πλήρως κατανοητός, η αναστολή της Deptor οδηγεί στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης του συμπλόκου mTORC.

Η ιστορία της κινάσης **TOR** ξεκινά στις αρχές της δεκαετίας του 1970, όταν κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος αναζήτησης αντιμικροβιακών παραγόντων απομονώθηκε το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* από το χώμα του νησιού Rapa Nui. Αυτά τα βακτήρια εκκρίνουν ένα ισχυρό αντιμυκητιακό μακρολίδιο που ονομάστηκε **ραπαμυκίνη** (βλ. σελ. 315). Αργότερα αναγνωρίστηκαν οι αντιπολλαπλασιαστικές και ανοσοκατασταλτικές της δράσεις, καθώς εμποδίζει τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S στα T-λεμφοκύτταρα και, συνεπώς, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους εμποδίζοντας τη σηματοδότηση της ιντερλευκίνης 2 (βλ. σελ. 666). Το 1991 ως στόχος της ραπαμυκίνης αναγνωρίστηκε η κινάση TOR1 (Target Of Rapamycin 1).

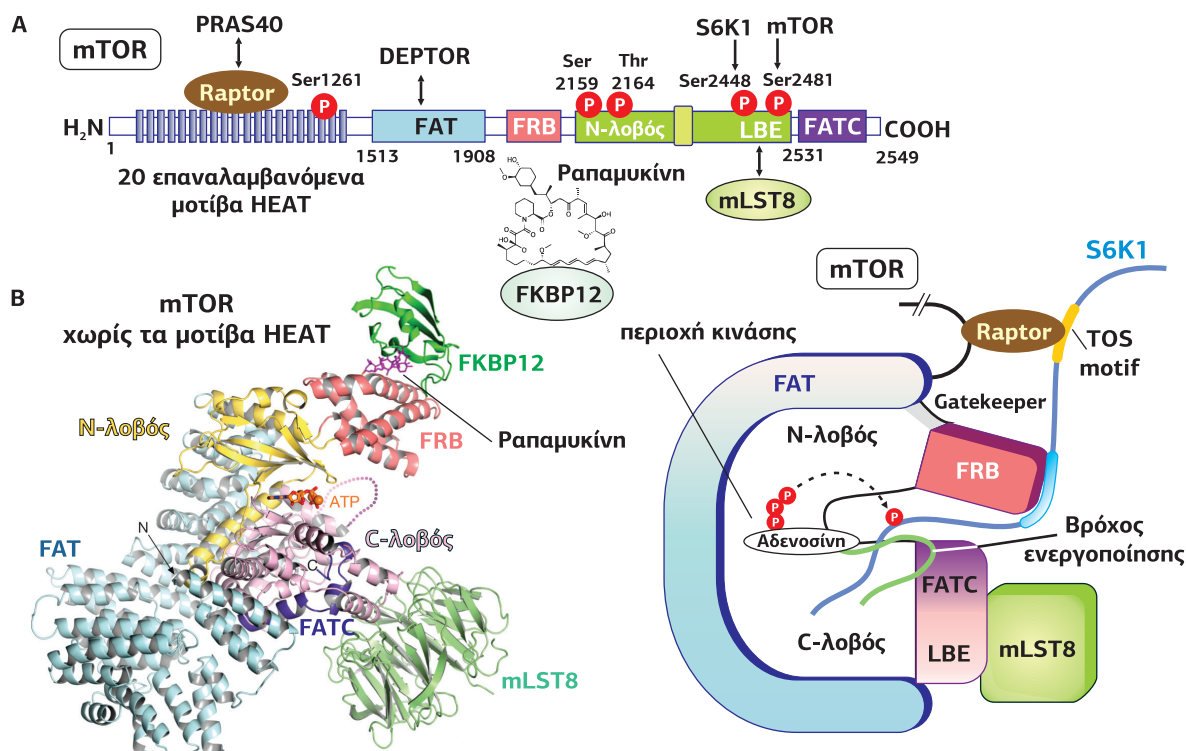
Η mTOR είναι μια άτυπη κινάση Ser/Thr, 289 kDa, η οποία ανήκει στην οικογένεια των κινασών PIKK (PI3K-Kinase-related Kinases), οι οποίες εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας με την κινάση PI3K. Τα knockout mTOR ποντίκια δεν είναι βιώσιμα, φανερώνοντας τον σημαντικό ρόλο της TOR. Δομικά η mTOR στο NH₂-τελικό άκρο περιέχει 20 επαναλαμβανόμενα μοτίβα **HEAT**. Η HEAT είναι μια περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και ανακαλύφθηκε στις πρωτεΐνες *Huntingtin*, *Elongation factor 3* (EF3), *PR65/A subunit of protein phosphatase 2A* (PP2A) και *TOR*. Οι επαναλήψεις HEAT ακολουθούνται από μια περιοχή **FAT** (*FRAP*, *ATM* και *IRRAP*, κινάσες της οικογένειας PIKK), και μια περιοχή **FRB** (FKPB12-Rapamycin Binding domain). Επίσης, στο COOH-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής υπάρχει μια περιοχή **FATC** (FAT



Rapa Nui, Χιλή



Επαναλαμβανόμενα μοτίβα HEAT

**Εικόνα 7.35****Δομή της κινάσης mTOR.**

A. Η mTOR περιέχει 20 επαναλήψεις του μοτίβου HEAT, μια περιοχή FAT και μια περιοχή FRB, στην οποία συνδέεται το σύμπλοκο ραπαμυκίνη-FKBP12, την καταλυτική περιοχή κινάσης και την COOH-τελική περιοχή FATC. [73]

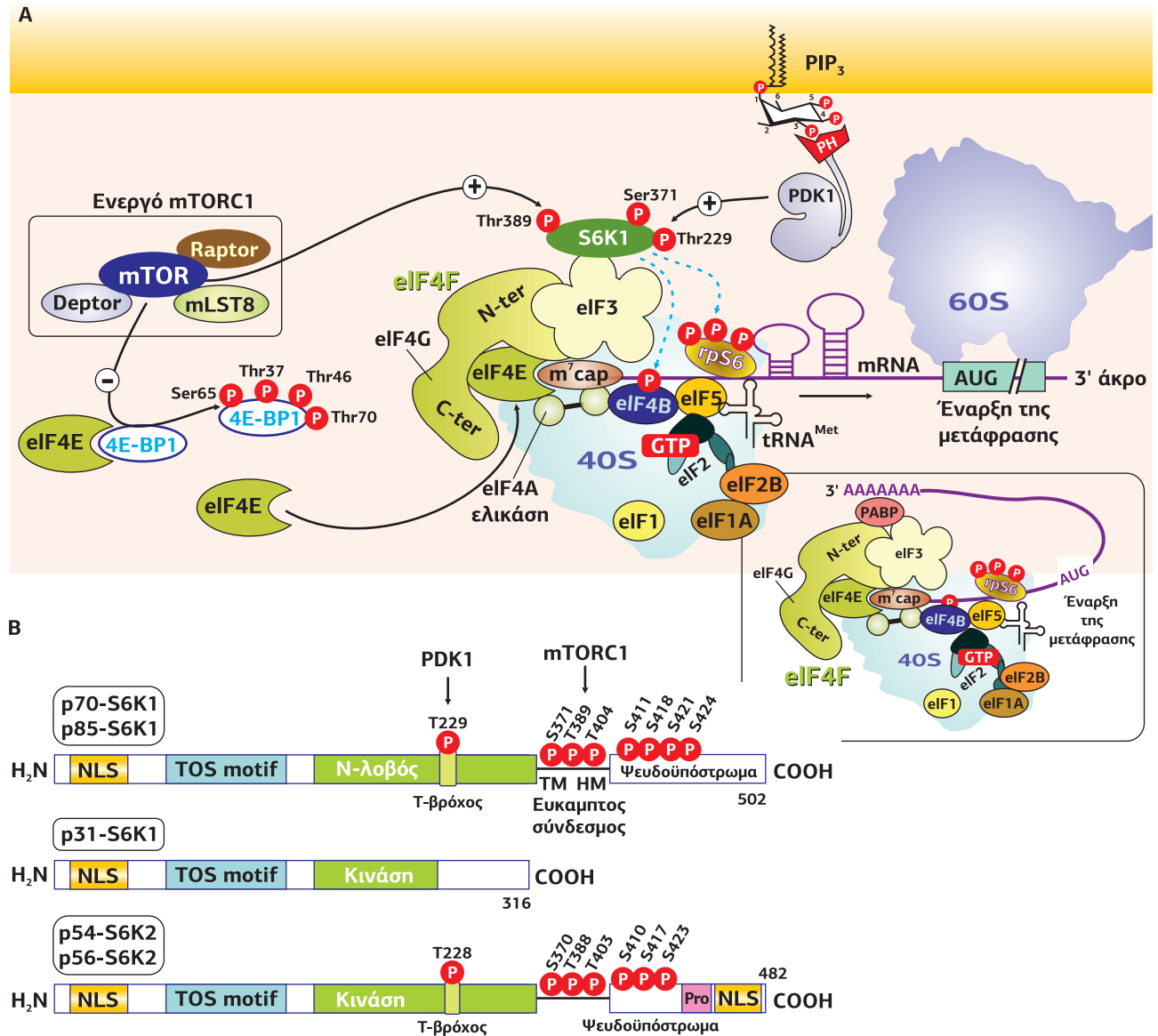
B. Κρυσταλλική δομή της κινάσης mTOR (χωρίς τις επαναλήψεις HEAT) και τριδιάστατη αναπαράσταση. Η περιοχή FAT τυλίγεται γύρω από την περιοχή κινάσης και οι θέσεις FRB (όπου συνδέεται η ραπαμυκίνη) και LBE (όπου συνδέεται η mLST8) εντοπίζονται στα αντίθετα άκρα της καταλυτικής σχισμής, για να περιορίσουν την πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Το ATP δεσμεύεται στην περιοχή κινάσης, κοντά στον βρόχο ενεργοποίησης, και αποτελεί πηγή των φωσφορικών ομάδων για τη φωσφορύλωση του υποστρώματος (στην εικόνα το υπόστρωμα είναι η S6K1). [1] [78]

Carboxyterminal). Οι FAT και FATC θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Η ραπαμυκίνη συνδέεται με τον ενδοκυτταρικό της υποδοχέα, τον FKBP12, και το σύμπλοκο που προκύπτει αλληλεπιδρά με την περιοχή FRB της mTOR (**Εικόνα 7.35**). Η σύνδεση του συμπλόκου ραπαμυκίνη-FKBP12 στην περιοχή FRB διαταράσσει τη σύνδεση της mTOR με τη Raptor εμποδίζοντας τη δράση του συμπλόκου mTORC1.

Το σύμπλοκο mTORC1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των πρωτεϊνών μέσω της πρωτεΐνης 4E-BP1 και της κινάσης S6K1 (S6 Kinase 1).

Στους ευκαρυώτες η πρωτεϊνόςύνθεση και ο ρυθμός της μετάφρασης ρυθμίζονται από την τροποποίηση των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης **eIFs** (eukaryotic Initiation Factors). Τα περισσότερα mRNAs μεταφράζονται με έναν μηχανισμό που εξαρτάται από την ύπαρξη “κάλυμματος”. Το κάλυμμα m⁷GpppX (όπου X ένα οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο) βρίσκεται στο 5' άκρο των mRNAs και συνδέεται με το σύμπλοκο **eIF4F** (eukaryotic Initiation Factor 4F), το οποίο περιέχει τρεις παράγοντες έναρξης: την πρωτεΐνη **eIF4E** (μια πρωτεΐνη που συνδέεται στο 5' κάλυμμα του mRNA), την **eIF4A** (μια ATP-εξαρτώμενη RNA ελικάση) και την **eIF4G** (μια μεγάλη πρωτεΐνη σκαλωσιάς). Περιληπτικά, για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο eIF4F, η eIF4E συνδέεται στο 5' κάλυμμα και στρατολογεί τις eIF4G και eIF4A. Η ελικάση eIF4A μαζί με τον ενεργοποιητή της, eIF4B, ξετυλίγουν την 5' δευτεροταγή δομή του mRNA, διευκολύνοντας την προσέλευση της 40S υπομονάδας του ριβοσώματος, η οποία συνδέεται μέσω του παράγοντα **eIF3** στην eIF4G. Στη 40S συνδέονται, επίσης, και οι παράγοντες έναρξης της μεταγραφής **eIF1**, **eIF1A**, **eIF5** και η ετερο-τριμερής GTPάση **eIF2** με συνδεδεμένο το GTP (βλ. σελ. 459), καθώς και το ενεργητικό tRNA^{Met}. Το 40S ριβόσωμα διατρέχει το mRNA κάτω από κατανάλωση ATP μέχρι να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης AUG. Εκεί συνδέεται με την 60S υπομονάδα. Η όλη διαδικασία απαιτεί και την υδρόλυση του GTP που καταλύεται από δύο G-πρωτεΐνες, την eIF2 και την eIF5B. Απαραίτητες είναι και οι πρωτεΐνες eIF5 (με ρόλο GAP) και eIF2B (με ρόλο GEF, η οποία επαναφορτώνει με GTP την eIF2 για τον επόμενο κύκλο έναρξης της μεταγραφής). Σε κάθε κύκλο τα ευκαρυωτικά κύτταρα καταναλώνουν δύο μόρια ATP και δύο μόρια GTP (**Εικόνα 7.36A**).

Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο mTORC1 φωσφορυλιώνει την ανασταλτική πρωτεΐνη **4E-BP1** που βρίσκεται συνδεδεμένη στον παράγοντα έναρξης eIF4E (eukaryotic translation Initiation Factor 4E). Η υπερφωσφορυλιωμένη 4E-BP1 (η 4E-BP1 φωσφορυλιώνεται σε 7 θέσεις, 4 από τις οποίες εξαρτώνται από την mTOR) αποχωρίζεται από τον eIF4E, ο οποίος είναι πλέον ικανός να συνδεθεί με την πρωτεΐνη σκαλωσιάς eIF4G και την ελικάση eIF4A. Η ελικάση απαιτείται για να ξετυλίξει τον βρόχο φουρκέτας που βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή του



Εικόνα 7.36

A. Μια σειρά από φωσφορυλιώσεις διευκολύνει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης πάνω στο mRNA. Η ενεργοποίηση της mTOR προκαλεί τη φωσφορυλίωση των 4E-BP1 και S6K1. Η φωσφορυλιωμένη 4E-BP1 αποσπάται από τον eIF4E και η φωσφορυλιωμένη S6K1 από το eIF3. Ο διαχωρισμός των 4E-BP1 και S6K1 επιτρέπει την σύνδεση του μεγάλου παράγοντα έναρξης eIF4G που αλληλεπιδρά με τις eIF4E, eIF3 και eIF4A. Η S6K1, φωσφορυλιωμένη στη ρυθμιστική περιοχή της, φωσφορυλιώνεται και από την PDK1. Η S6K1 τώρα φωσφορυλιώνει τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (rpS6) και τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4B, που είναι η ρυθμιστική υπομονάδα της DNA ελικάσης eIF4A. Οι συνθήκες τώρα ευνοούν τη σύνδεση της PABP (Poly-A Binding Protein) στην 3' πολυ(A) ουρά του mRNA. Το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο κινείται προς το κωδικόνιο έναρξης AUG, όπου και ενώνεται με την 60S ριβοσωμική υπομονάδα. [28] **B.** Οι διάφορες ισομορφές της κινάσης S6K1 (p70-, p85- και p31-S6K1) και S6K2 (p54- και p56-S6K2). Διακρίνεται η περιοχή NLS στο NH₂-τελικό άκρο των S6K1 κινασών, ενώ οι S6K2 περιέχουν στο COOH-τελικό τους άκρο μια επιπλέον NLS περιοχή και μια περιοχή πλούσια σε Pro. Η COOH-τελική περιοχή περιέχει το ψευδοϋπόστρωμα αυτοαναστολής. [73] [48]

mRNA, εμποδίζοντας την πρόωρη μετάφραση των πρωτεϊνών. Όταν το σύμπλοκο έναρξης συγκροτηθεί στο 5' κάλυμμα του mRNA, στρατολογείται η 40S μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και είναι τώρα ικανό να αναγνωρίσει το κωδικόνιο έναρξης AUG, καθώς ο βρόχος φουρκέτας έχει εξαλειφθεί από την ελικάση eIF4A. Μόλις το ριβόσωμα συνδεθεί με το AUG, η μετάφραση αρχίζει (**Εικόνα 7.36A**).

Η **S6K1** (S6 Ribosomal protein Kinase) αναγνωρίστηκε ανεξάρτητα από τη ραπαμυκίνη και την TOR, όταν το 1970 ανακαλύφθηκε ότι αυξητικοί παράγοντες και μιτογόνα προωθούν τη φωσφορυλίωση της 40S rpS6, ενός συστατικού της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας. Υπάρχουν δύο ισομορφές, η S6K1 και η S6K2, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των κινασών Ser/Thr. Η S6K1 κλωνοποιήθηκε το 1990, ενώ η S6K2 το 1988. Οι S6K1 και S6K2 αποτελούνται από μια όξινη NH₂-τελική περιοχή, η οποία περιέχει το μοτίβο TOS (TOR signalling), μια περιοχή κινάσης με τον T-βρόχο, στο τέλος της οποίας βρίσκεται μια περιοχή εύκαμπτου σύνδεσμος που περιέχει το turn motif (TM) και το hydrophobic motif (HM), καθώς και μια COOH-τελική περιοχή ψευδοϋποστρώματος. Στις κινάσες S6K2 μετά την περιοχή ψευδοϋποστρώματος ακολουθεί μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, που διευκολύνει την αλληλεπίδραση με τις περιοχές SH3 και WW διαφόρων πρωτεϊνών (**Εικόνα 7.36B**). Για την ενεργοποίηση της S6K1 είναι απαραίτητη φωσφορυλίωση τριών κρίσιμων καταλοίπων: της Thr229 του T-βρόχου (από την PDK1), της Ser371 στο TM του εύκαμπτου συνδέσμου (από μια άγνωστη ακόμη κινάση) και της Thr389 του HM, επίσης, στον εύκαμπτο σύνδεσμο (από την mTOR).

Η S6K υποφωσφορυλιωμένη βρίσκεται συνδεδεμένη στο σύμπλοκο eIF3. Το ενεργό σύμπλοκο mTORC1 φωσφορυλιώνει την S6K στην Thr389. Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί σε μια δεύτερη φωσφορυλίωση από την PDK1, καθιστώντας πλήρως ενεργή την S6K. Η ενεργή S6K1 μπορεί, στη συνέχεια, να διεγείρει την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης ενεργοποιώντας την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη (ένα συστατικό του ριβοσώματος) και τον eIF4B, στρατολογώντας τον στο προ-εναρκτήριο σύμπλοκο. Το προ-εναρκτήριο σύμπλοκο προωθεί την αναζήτηση του κωδικονίου έναρξης (AUG) πάνω στο mRNA. Η πρόοδος διευκολύνεται από το σύμπλοκο ελικάσης eIF4A/eIF4B, που σπάει τα ενδομοριακά ζευγαρώματα βάσεων που σχηματίζουν φουρκέτες στο mRNA. Η αναγνώριση του κωδικονίου AUG απαιτεί το tRNA^{Met}, που περιέχει το αντικωδικόνιο 3'-UAC-5' και έρχεται στο ριβοσωμικό προεναρκτήριο σύμπλοκο συνδεδεμένο στο eIF2γGTP. Καθώς το κωδικόνιο AUG αναγνωρίζεται, το GTP υδrolύεται και η 60S ριβοσωμική υπομονάδα, μεταφέροντας την ενεργότητα της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, ενώνει το εναρκτήριο σύμπλοκο, επάγοντας έτσι την έναρξη της φάσης επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Επίσης, η S6K1 φωσφορυλιώνει (στη Ser366) και απενεργοποιεί την κινάση eEF2K, η οποία στην ενεργή της μορφή φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τον eEF2 (**Εικόνα 7.42Γ**). Συνεπώς, η S6K1 αυξάνει τη δραστηριότητα της eEF2, μιας πρωτεΐνης που καταλύει τη μεταφορά από κωδικόνιο σε κωδικόνιο κατά τη διάρκεια της μετάφρασης.

5. Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το σύμπλοκο Ca²⁺/καλμοδουλίνη

Το Ca²⁺ σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχει ως σύμπλοκο Ca²⁺/καλμοδουλίνης, το οποίο προσδένεται εξειδικευμένα σε πρωτεΐνες-τελεστές και ρυθμίζει τη δράση τους. Οι κινάσες που εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη, οι CaMKs (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases), είναι διαδεδομένες και βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών. Όπως άλλες πρωτεΐνες στόχοι ενδοκυττάρων μνημάτων, οι CaM-εξαρτώμενες κινάσες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια που προκαλείται από την ύπαρξη ξεχωριστών γονιδίων και εναλλακτικού ματίσματος. Οι CaMKs ταξινομούνται στις εξειδικευμένες και στις πολυλειτουργικές CaM κινάσες:

- Χαρακτηριστικά παραδείγματα **εξειδικευμένων CaM-εξαρτώμενων κινασών**, που φωσφορυλιώνουν έναν συγκεκριμένο στόχο, είναι η κινάση

της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK), η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK) και η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης eEF2 (eEF2K), γνωστή και ως CaMK-III. Η κινάση της φωσφορυλάσης παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκογονόλυσης στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ. Η MLCK είναι ένα Ca^{2+} -ευαίσθητο ένζυμο που φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα της μυοσίνης II και κατ' επέκταση τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων, την κυτταροκίνηση κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης και τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η eEF2K ή CaMK-III φωσφορυλιώνει τον eEF2 αναστέλλοντας τη δράση του και, κατά συνέπεια, την πρωτεϊνοσύνθεση.

- Οι **πολυλειτουργικές CaM-εξαρτώμενες κινάσες** είναι η CaMK-I, η CaMK-II και η CaMK-IV, οι οποίες φωσφορυλιώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Η CaMK-I και η CaMK-IV είναι μονομερείς και μοιράζονται έναν κοινό τρόπο ενεργοποίησης, που ξεκινά με τη σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ και συνεχίζει με τη φωσφορυλίωση μιας καλά συντηρημένης Thr του βρόχου ενεργοποίησης από την κινάση CaMKK ($\text{Ca}^{2+}/\text{calmodulin}$ -dependent protein kinase kinase). Η CaMK-II είναι ένα πολυμερές 8-12 υπομονάδων και έχει έναν διαφορετικό τρόπο ενεργοποίησης, ο οποίος εξαρτάται αποκλειστικά από τη σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Επιπλέον, αυτή η ισομορφή έχει έναν πολύπλοκο μηχανισμό αυτοφωσφορυλίωσης που της δίνει μοναδικές ιδιότητες για να λειτουργήσει τόσο ως ανιχνευτής συχνοτήτων απελευθέρωσης Ca^{2+} όσο και ως μακροχρόνια αποθήκη πληροφοριών.

5.1

Η κινάση της φωσφορυλάσης και η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

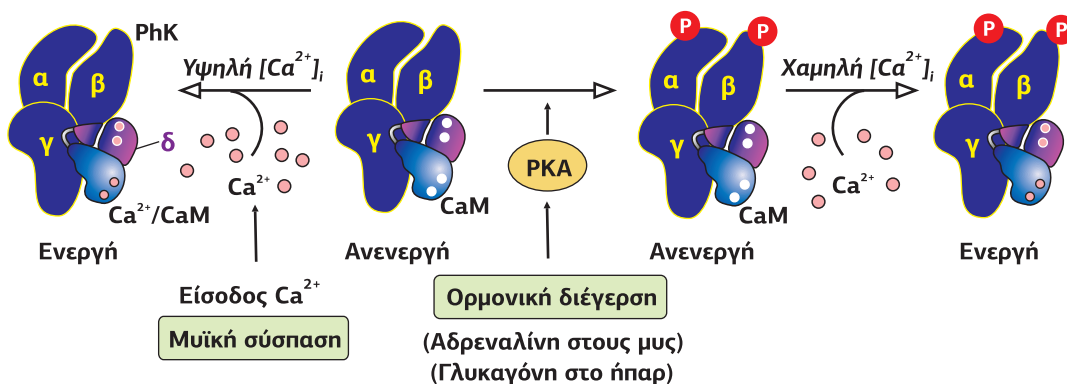
Η κινάση της φωσφορυλάσης, η PhK (Phosphorylase kinase), είναι μια κινάση Ser/Thr, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε δύο κατάλοιπα και την ενεργοποιεί. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει τη μετατροπή του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Παίζει, λοιπόν, σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου.

Η PhK είναι ένα δεκαεξαμερές ολοένζυμο 1,3 MDa, που αποτελείται από 4 τετραμερή. Το κάθε τετραμερές αποτελείται από 4 υπομονάδες (α , β , γ και δ) διευθετημένες σε σχήμα πεταλούδας. Η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα (η μόνη, της οποίας η κρυσταλλική δομή έχει αποσαφηνιστεί) και οι άλλες τρεις είναι ρυθμιστικές. Η α - και η β -υπομονάδα διατηρούν σε κατάσταση αναστολής την κινάση, ενώ η φωσφορυλίωσή τους από την PKA αναστέλλει τη δράση τους, επιτρέποντας την ενεργοποίηση της PhK (Εικόνα 7.37). Η δ υπομονάδα είναι η καλμοδουλίνη, η οποία όμως παραμένει συνδεδεμένη στο ολοένζυμο, ακόμη και όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} είναι χαμηλή. Όταν η συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} αυξάνεται

Εικόνα 7.37

Δομή των υπομονάδων και ρύθμιση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) στους μυς.

Η κινάση της φωσφορυλάσης, σύμφωνα με την κατάσταση διέγερσης του μυός, ρυθμίζεται από δύο μονοπάτια. Κατά τη νευρική διέγερση του μυός ταυο-εξαρτώμενα κανάλια Ca^{2+} ανοίγουν, το κυτταροπλασματικό Ca^{2+} αυξάνεται και συνδέεται στην καλμοδουλίνη, ενεργοποιώντας την κινάση της φωσφορυλάσης. Όταν ο μυς βρίσκεται σε χάλαση, η κινάση της φωσφορυλάσης διεγείρεται από ορμονικό σήμα. Το ορμονικό σήμα ξεκινά τη φωσφορυλίωση των α και β υπομονάδων της κινάσης. Στη φωσφορυλιωμένη της μορφή αυξάνεται η συγγένεια σύνδεσης του Ca^{2+} στην υπομονάδα δ (καλμοδουλίνη) και η ενεργοποίηση καθίσταται πιθανή και σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} .





Η Gerty Theresa Cori (1896-1957), Τσέχα βιοχημικός, ήταν η τρίτη γυναίκα στην οποία απονεμήθηκε το βραβείο Nobel, καθώς και στον σύζυγό της Carl Ferdinand Cori (1896-1984), επίσης, Τσέχο βιοχημικό και φαρμακολόγο.

σε 10^{-7} M, το Ca^{2+} συνδέεται με την καλμοδουλίνη οδηγώντας στην αλλαγή της διαμόρφωσής της, που ενεργοποιεί τη δραστηριότητα κινάσης.

Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι η πρώτη κινάση που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από μυς κουνελιών, το 1959, από τους Edwin Krebs, Donald Graves και Edmond Fischer στο Department of Biochemistry, University of Washington. Έως τότε δεν ήταν γνωστός ο ρόλος της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών στη ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας. Όπως είδαμε 10 χρόνια αργότερα, το 1967, ο Fischer και ο Krebs ανακάλυψαν την PKA και τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1992.

Ωστόσο, το υπόστρωμα της PhK, η **φωσφορυλάση του γλυκογόνου**, είχε ήδη απομονωθεί από το 1930, επίσης, στο Department of Biochemistry του University of Washington, από τους Carl και Gerty Cori, οι οποίοι προσδιόρισαν ότι υπάρχουν δύο διαμορφώσεις, η *b* ανενεργή και η *a* ενεργή. Στον Carl Cori και τη σύζυγό του Gerty απονεμήθηκε το 1947 το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής *“for their discovery of the course of the catalytic conversion of glycogen”*.

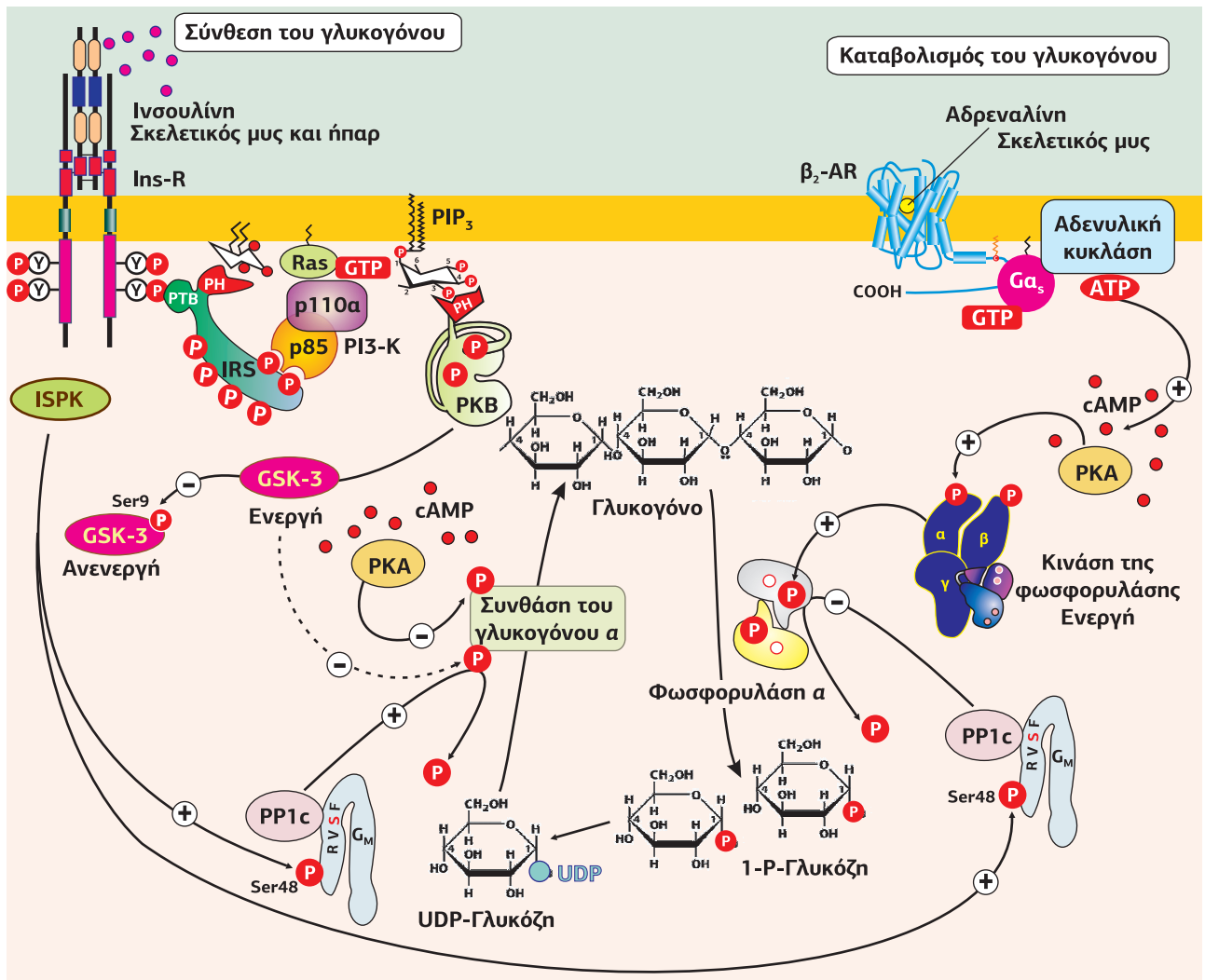
Οι λεπτομέρειες του μηχανισμού ενεργοποίησης της καταλυτικής δράσης της PhK είναι ακόμη υπό μελέτη. Ενώ αυτό μπορεί να φαίνεται περίεργο, δεδομένου ότι η PhK απομονώθηκε πριν από 50 χρόνια τουλάχιστον, υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες στη μελέτη των λεπτομερειών της δομής και του μηχανισμού ενεργοποίησής της, λόγω του μεγάλου μεγέθους της και του υψηλού βαθμού πολυπλοκότητας.

Στους μυς ο καταβολισμός και η σύνθεση του γλυκογόνου ελέγχονται από δύο σήματα: ένα ορμονικό σήμα με τη μορφή της αδρεναλίνης και το σήμα Ca^{2+} . Η δομική βάση για αυτήν τη διπλή ρύθμιση της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι η δομή των υπομονάδων της. Η PhK, όπως είδαμε, αποτελείται από 4 x τέσσερις υπομονάδες: δύο ρυθμιστικές υπομονάδες α και β , μία καταλυτική υπομονάδα γ και την καλμοδουλίνη ως υπομονάδα δ . Στην αποφωσφορυλιωμένη κατάσταση η κινάση της φωσφορυλάσης είναι ανενεργή, αφού η καταλυτική γ υπομονάδα αναστέλλεται από την αλληλεπίδραση με τις άλλες υπομονάδες. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του Ca^{2+} , κατά τη σύσπαση του μυός, η ανασταλτική δράση των α και β υπομονάδων αίρεται, επειδή το Ca^{2+} προσδένεται στην καλμοδουλίνη, η οποία αλλάζει διαμόρφωση. Μια επιπλέον συνεισφορά στην άρση της αναστολής προκαλείται από την τροπονίνη C, η οποία αλληλεπιδρά με την ανασταλτική β υπομονάδα. Σε αυτήν την κατάσταση η κινάση της φωσφορυλάσης είναι ενεργή και μπορεί να φωσφορυλιώσει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ο καταβολισμός του γλυκογόνου ξεκινά και τελικά το ATP γίνεται διαθέσιμο για τη σύσπαση των μυών.

Η ορμονική ρύθμιση συμβαίνει σε κατάσταση ηρεμίας του μυός. Μετά τη σύνδεση της αδρεναλίνης στον β_2 -αδρενεργικό υποδοχέα της πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, μέσω G_s -πρωτεϊνών, και έτσι τα επίπεδα του cAMP αυξάνουν. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τις ρυθμιστικές α και β υπομονάδες και ενεργοποιεί την κινάση. Στη φωσφορυλιωμένη μορφή η κινάση χρειάζεται, επίσης, Ca^{2+} . Εντούτοις, το φωσφορυλιωμένο ένζυμο μπορεί να ενεργοποιηθεί από χαμηλότερες συγκεντρώσεις Ca^{2+} σε σχέση με το μη φωσφορυλιωμένο ένζυμο. Εξαιτίας της υψηλότερης ευαισθησίας προς το Ca^{2+} , η φωσφορυλιωμένη κινάση μπορεί να είναι ενεργή, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} που αποκρίνονται στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} στην κατάσταση ηρεμίας του μυός (**Εικόνα 7.38**).

Στα κύτταρα του ήπατος η διαδικασία είναι κάπως πιο σύνθετη. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α -κύτταρα του παγκρέατος και ενεργοποιεί το μονοπάτι cAMP-PKA, ενώ η αδρεναλίνη συνδέεται, στον α_1 -αδρενεργικό υποδοχέα, ο οποίος μέσω του μονοπατιού G_q /PLC/ IP_3 -DAG οδηγεί στην απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγώντας στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης.

Όταν το κύτταρο θέλει να σταματήσει τη διάσπαση του γλυκογόνου, η PhK αποφωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) και οι α και β υπομονάδες επιστρέφουν στην αρχική ανασταλτική τους διαμόρφωση. Η αναστολή του καταβολισμού του γλυκογόνου και η ενεργοποίηση της σύνθεσής του από τη συνθήκη του γλυκογόνου ενεργοποιείται από την ινσουλίνη μέσω μιας διπλής ρύθμι-



σης. Η ινσουλίνη αφενός μέσω της PKB απενεργοποιεί την GSK-3 (έναν αρνητικό ρυθμιστή της συνθάσης του γλυκογόνου) και αφετέρου μέσω της ISPK ενεργοποιεί τη φωσφατάση PP1c/G_M, η οποία ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση (Εικόνα 7.38).

5.2 | Η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK)

Η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης MLCK (Myosin Light Chain Kinase) είναι μια Ca^{2+} /CaM-ενεργοποιούμενη κινάση που εκφράζεται στα λεία, στα καρδιακά και στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα, καθώς και σε μη μυϊκά κύτταρα των θηλαστικών. Οι MLCKs κωδικοποιούνται από τρία γονίδια: το *mylk1*, το οποίο εκτός από την MLCK των λείων μυών κωδικοποιεί και τις μη μυϊκές MLCKs, καθώς και την μη ενζυμική τελοκίνη (telokin) ή KRP (Kinase Related Protein) από εναλλακτική θέση έναρξης της μεταγραφής, το γονίδιο *mylk2*, που κωδικοποιεί την MLCK των σκελετικών μυών και το γονίδιο *mylk3*, που κωδικοποιεί την MLCK των καρδιακών μυών.

Δομή της MLCK

Η MLCK είναι ένα επίμηκες και δυνητικά εύκαμπτο μόριο. Δεν υπάρχουν κρυσταλλικές δομές του πλήρους ενζύμου. Η MLCK των λείων μυών αποτελείται από

Εικόνα 7.38

Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στους μύς. Η αδρεναλίνη, μέσω της αύξησης του cAMP και της ενεργοποίησης της PKA, ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση και, κατά συνέπεια, τον καταβολισμό του γλυκογόνου. Επίσης, η PKA φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου, το ένζυμο το οποίο με πρώτη ύλη την UDP-γλυκόζη συνθέτει γλυκογόνο. Αντίθετη δράση με την αδρεναλίνη έχει η ινσουλίνη, η οποία ενεργοποιεί τη σύνθεση του γλυκογόνου μέσω των κινάσων PKB και ISPK. Οι δύο κινάσες οδηγούν στην ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου και στην απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης.

καλά συντηρημένες περιοχές: α. ένα μοτίβο DFRxxL, θέση σύνδεσης της ακτίνης, αλλά και της καλμοδουλίνης (η σύνδεση της οποίας εξασθενεί τη σύνδεση με την ακτίνη), β. μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, γ. περιοχές Ig1 και/ή Ig2, οι οποίες επίσης συνδέουν την ακτίνη, δ. μια περιοχή ινωδονεκτίνης Fn (Fibronectin domain), της οποίας ο ρόλος παραμένει άγνωστος, ε. την καταλυτική περιοχή κινάσης, η οποία συνδέει το ATP και τη ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, τη RLC (Regulatory Light Chain), την οποία φωσφορυλιώνει στην Ser19, ζ. μια περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης (CaM-BD) και η. στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή IgT (Ig Telokin), ικανή να συνδέει τη μυοσίνη (**Εικόνα 7.39A**).

Η **telokin** επίσης γνωστή και ως KRP (Kinase-Related Protein) είναι άφθονη στα λεία μυϊκά κύτταρα. Είναι όμοια με το COOH-τελικό άκρο της κινάσης MLCK. Παίζει έναν ρόλο στη σταθεροποίηση των μη-φωσφορυλιωμένων ινιδίων μυοσίνης των λείων μυϊκών κυττάρων. Λόγω της προέλευσής της από το COOH-τελικό άκρο της MLCK ονομάστηκε telokin (από το τέλος και το κίνηση).

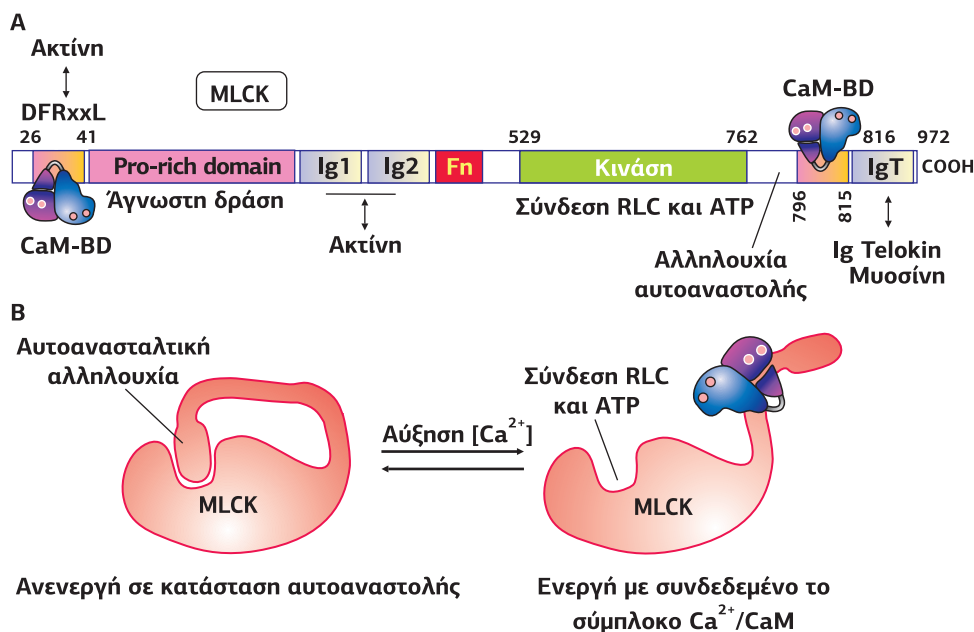
Η σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ είναι ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενζυμικής δραστηριότητας της MLCK

Ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της δραστηριότητας της MLCK είναι το σύμπλοκο $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Η MLCK είναι καταλυτικά αδρανής έως ότου συνδεθεί το $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ στην περιοχή μεταξύ της καταλυτικής περιοχής και της περιοχής IgT. Η σύνδεση του $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ενεργοποιεί την MLCK επάγοντας μία αλλαγή διαμόρφωσης, η οποία επιτρέπει την απομάκρυνση της αυτοανασταλτικής αλληλουχίας από την επιφάνεια του καταλυτικού κέντρου, με αποτέλεσμα την πρόσβαση του υποστρώματος (RLC, Regulatory Light Chain) και μια συνολική αναδιάταξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της καταλυτικής περιοχής και της CaM (**Εικόνα 7.39B**).

Εικόνα 7.39

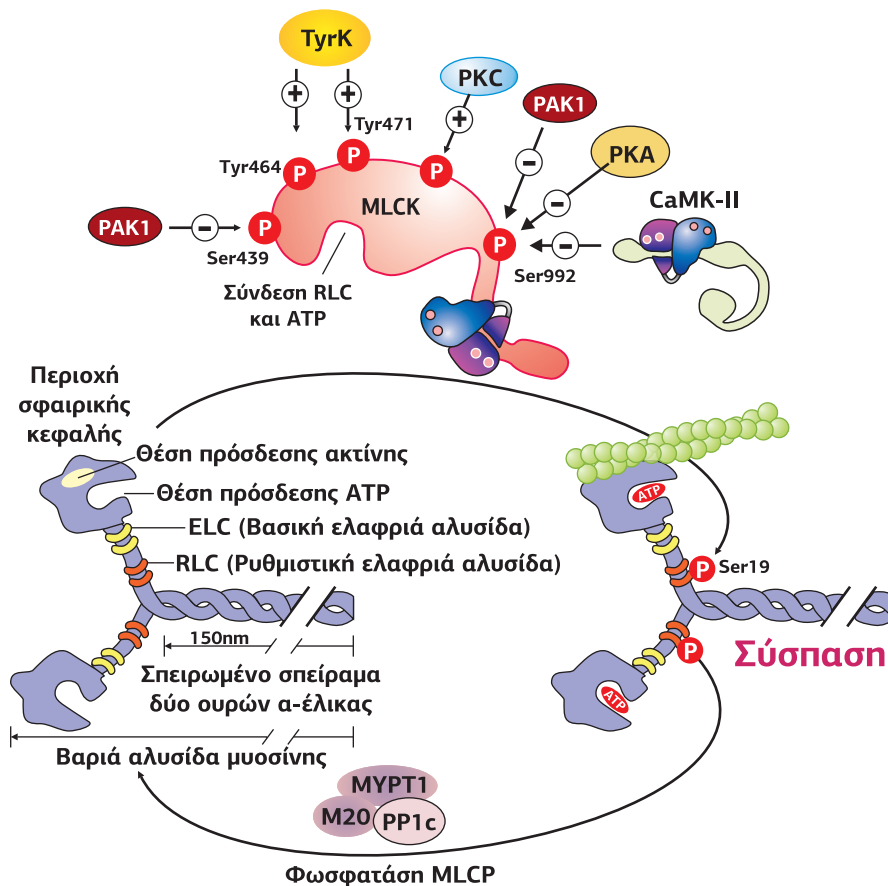
Δομή της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK) των λείων μυϊκών κυττάρων.

A. Διακρίνονται: το μοτίβο DFRxxL που αποτελεί θέση σύνδεσης της ακτίνης, αλλά και της καλμοδουλίνης, η περιοχή πλούσια σε προλίνη, δύο περιοχές Ig1 και/ή Ig2, που είναι επίσης θέσεις σύνδεσης της ακτίνης, η περιοχή ινωδονεκτίνης (Fn), η καταλυτική περιοχή κινάσης, η αλληλουχία αυτοαναστολής, η περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης και η περιοχή IgT. [29] B. Στην ανενεργή διαμόρφωση η MLCK βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής, ενώ μετά τη σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ η διαμόρφωση “ανοίγει” επιτρέποντας την πρόσβαση του υποστρώματος.



Η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης

Μετά τη σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{καλμοδουλίνη}$, η MLCK φωσφορυλιώνει την 20 kDa ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης II, τη RLC (Regulatory Light Chain), των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά και των μη μυϊκών κυττάρων, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση της κεφαλής της μυοσίνης με τα ινίδια ακτίνης (**Εικόνα 7.40**). Υπάρχουν δύο περιοχές της MLCK που αλληλεπιδρούν με τη μυοσίνη, η καταλυτική και η IgT. Αρχικά, το καταλυτικό κέντρο αλληλεπιδρά με τις υψηλά θετικά φορτισμένες και εύκαμπτες NH_2 -τελικές περιοχές των δύο ρυθμιστικών ελα-



Εικόνα 7.40

Η MLCK ενεργοποιείται από τη σύνδεση του συμπλόκου $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ και ρυθμίζεται θετικά μέσω φωσφορυνλίωσης από κινάσες Tyr και την PKC, και αρνητικά από κινάσες Ser/Thr, όπως η PKA, η PAK1 και η CaMK-II. Η ενεργοποιημένη MLCK φωσφορυνώνει τη Ser19 της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, διευκολύνοντας τη σύνδεσή της με τα ινίδια ακτίνης. [65]

φρών αλυσίδων και φωσφορυλιώνει τη Ser19. Η άλλη περιοχή αλληλεπίδρασης της MLCK με τη μυοσίνη είναι η IgT. Ο ρόλος της περιοχής αυτής είναι η αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της κινάσης μέσω σταθεροποίησης της σύνδεσης της RLC. Η telokin, ως μεμονωμένη πρωτεΐνη, συναγωνίζεται την MLCK για τη σύνδεση στη μη φωσφορυλιωμένη μυοσίνη.

Η φωσφορυλίωση της RLC είναι σημαντική για τη ρύθμιση κυτταροσκελετικών λειτουργιών που βασίζονται στην ακτινομοσοίνη, όπως ο σχηματισμός θέσεων εστιακής προσκόλλησης και ινιδίων stress, η έκκριση, η ανταλλαγή ιόντων, η κυτταροκίνηση, η ανάπτυξη του κώνου αύξησης των νευριτών, ο σχηματισμός στεγανών συνδέσμων ανάμεσα στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, καθώς και η κυτταρική μετανάστευση. Στους λείους μυς η φωσφορυλίωση της RLC της μοσοίνης είναι ένα υποχρεωτικό στάδιο για την έναρξη της συστολής.

Τη Ser19 της RLC φωσφορυλιώνουν, επίσης, η κινάση ROCK (βλ. Εικόνα 7.19 και 8.75) και η κινάση CR1K (βλ. Εικόνα 7.19 και 5.72).

5.3 Κινάση του παράγοντα eEF2 (eEF2K)

Η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης eEF2, eEF2K (eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase), γνωστή και ως CaMK-III, είναι μια κινάση Ser/Thr, η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *eEF2K*. Η eEF2K είναι μια καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση που συνδέει πολυάριθμα μηνύματα με την αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης, καθώς φωσφορυλιώνοντας τον eEF2 αναστέλλει τη δράση του.

Επιπλέον, η δραστηριότητα της eEF2K μπορεί να προωθήσει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην S. Η eEF2K υπερεκφράζεται σε διαφορετικούς τύπους καρκίνων, όπου προωθεί την ανάπτυξη απορρυθμισμένων καρκινικών φαινοτύπων.

Εικόνα 7.41**Δομή της κινάσης του παράγοντα επιμήκυνσης της μετάφρασης eEF2 (eEF2K).**

A. Η eEF2K είναι μια ξεχωριστή Ca^{2+} /καλμοδουλίνη-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, η οποία αποτελείται από μια καταλυτική περιοχή α -κινάσης στο NH_2 -τελικό άκρο, και μια περιοχή SEL1 στο COOH -τελικό άκρο. Τις δύο περιοχές συνδέει ένας εύκαμπτος σύνδεσμος. [21]

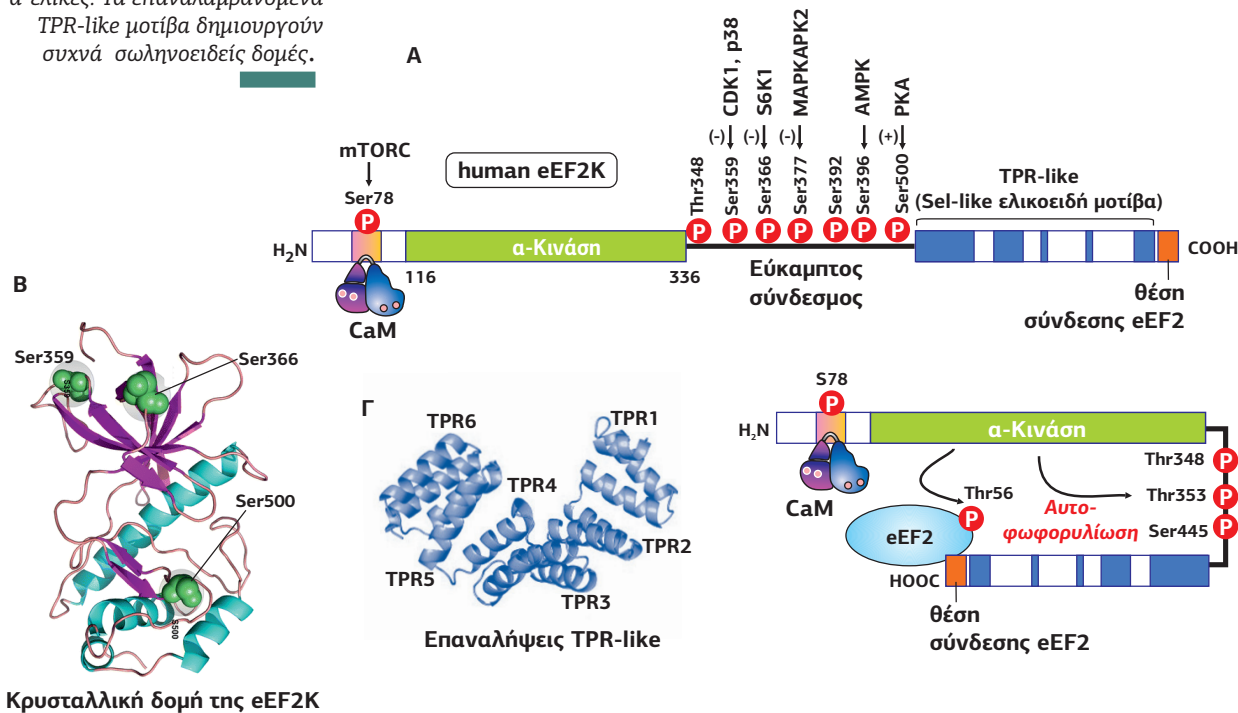
B. Η κρυσταλλική δομή της eEF2K, όπου διακρίνονται τα χαρακτηριστικά αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται [21]

Γ. Κρυσταλλική δομή έξι επαναλαμβανόμενων TPR-like μοτίβων. Η TPR-like (tetratricopeptide) είναι μια αλληλουχία 34 aa, που αποτελείται από ένα ζευγάρι α -έλικες. Τα επαναλαμβανόμενα TPR-like μοτίβα δημιουργούν συχνά σωληνοειδείς δομές.

Μοριακή δομή της eEF2K

Η eEF2K είναι μια πρωτεΐνη 95-103 kDa που ανήκει στην οικογένεια των α -κινασών. Το 1997 ο Alexey G. Ryazanov χαρακτηρίζοντας τις κινάσες της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHCK-A, B, C) του *Dictyostelium* αναγνώρισε μια καινούρια κατηγορία κινασών που ονόμασε α -κινάσες, από τον μοναδικό τρόπο αναγνώρισης του υποστρώματός τους. Σε αντίθεση με τις περιοχές στόχους των υποστρωμάτων των κλασικών κινασών Ser/Thr, που βρίσκονται συνήθως σε βρόχους, β -πτυχωτά φύλλα ή ακανόνιστες δομές, τα κατάλοιπα του υποστρώματος που στοχεύονται από τις MHCKs βρίσκονται μέσα σε μια α -έλικα. Την ίδια χρονιά η κλωνοποίηση της κινάσης eEF2K στον άνθρωπο, στον ποντικό και στο *Caenorhabditis elegans* ανέδειξε τις ομοιότητες στην αλληλουχία κατατάσσοντας και την eEF2K στις α -κινάσες. Έως σήμερα έξι α -κινάσες έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο: εκτός από την eEF2K, η α -κινάση 1 (Lymphocyte alpha-kinase, LAK ή ALPK1), η α -κινάση 2 (Heart alpha-kinase, HAK ή ALPK2), η α -κινάση 3 (Muscle alpha-kinase, MAK ή ALPK3) και τα κανάλια κατιόντων με δραστικότητα κινάσης TRPM6 / TRPM7.

Η ειδική καταλυτική περιοχή α -κινάσης βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 116 και 336 και εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τη δομή των δύο λοβών των κλασικών κινασών Ser/Thr (**Εικόνα 7.41B**). Στο NH_2 -τελικό άκρο μεταξύ των αμινοξέων 70-100, η eEF2K περιέχει μια περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης, ενώ στο COOH -τελικό άκρο μια θέση σύνδεσης για τον eEF2 και μια περιοχή **Sel-1** (Suppressor or enhancer of LIN12) ή **TPR-like**, που αποτελείται από ελικοειδείς επαναλήψεις και παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Την καταλυτική περιοχή και την περιοχή Sel-1 συνδέει ένας εύκαμπτος σύνδεσμος, σημαντικός για τη λειτουργία και τη ρύθμιση της κινάσης (**Εικόνα 7.41A**).

**Κρυσταλλική δομή της eEF2K****Η ρύθμιση της eEF2K μέσω φωσφορυλίωσης**

Η δραστηριότητα της eEF2K εξαρτάται από το σύμπλοκο Ca^{2+} /CaM, επηρεάζεται από το κυτταρικό pH, το stress και τα θρεπτικά, και μπορεί να βοηθήσει τα καρκινικά κύτταρα να προσαρμοστούν στη στέρηση θρεπτικών. Η ενεργοποίηση της eEF2K προχωρά σε δύο στάδια. Σε ένα πρώτο στάδιο το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνης συνδέεται με υψηλή συγγένεια και ενεργοποιεί την περιοχή κινάσης, προκαλώντας ταχεία αυτοφωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων, όπως η Thr348, η Thr353 και Ser445. Στο δεύτερο στάδιο η αυτοφωσφορυλίωση οδηγεί σε μια

διαμορφωτική αλλαγή της καταλυτικής περιοχής κινάσης, η οποία πιθανόν υποστηρίζεται από τη σύνδεση της φωσφορυλιωμένης Thr348 σε έναν αλλοστερικό θύλακα σύνδεσης στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου (**Εικόνα 7.41A**). Αυτό αυξάνει τη δραστηριότητα της eEF2K για το υπόστρωμά της, τον παράγοντα επιμήκυνσης 2.

Η eEF2K μπορεί να ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από το Ca^{2+} μέσω αυτοφωσφορυλίωσης της Ser500. Ωστόσο, η καλμοδουλίνη πρέπει να βρίσκεται συνδεδεμένη στο ένζυμο, για να διατηρηθεί η δραστηριότητά του. Ανεξάρτητα από το Ca^{2+} η eEF2K ενεργοποιείται, επίσης, μέσω φωσφορυλίωσης από την PKA, επίσης στην Ser500.

Η φωσφορυλίωση της eEF2K από κινάσες, όπως η p38 MAPK (στη Ser359), η S6K1 (στη Ser366) και η MAPKAPK2 (στη Ser 377) αναστέλλει τη δράση της.

Η ρύθμιση της eEF2K από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια

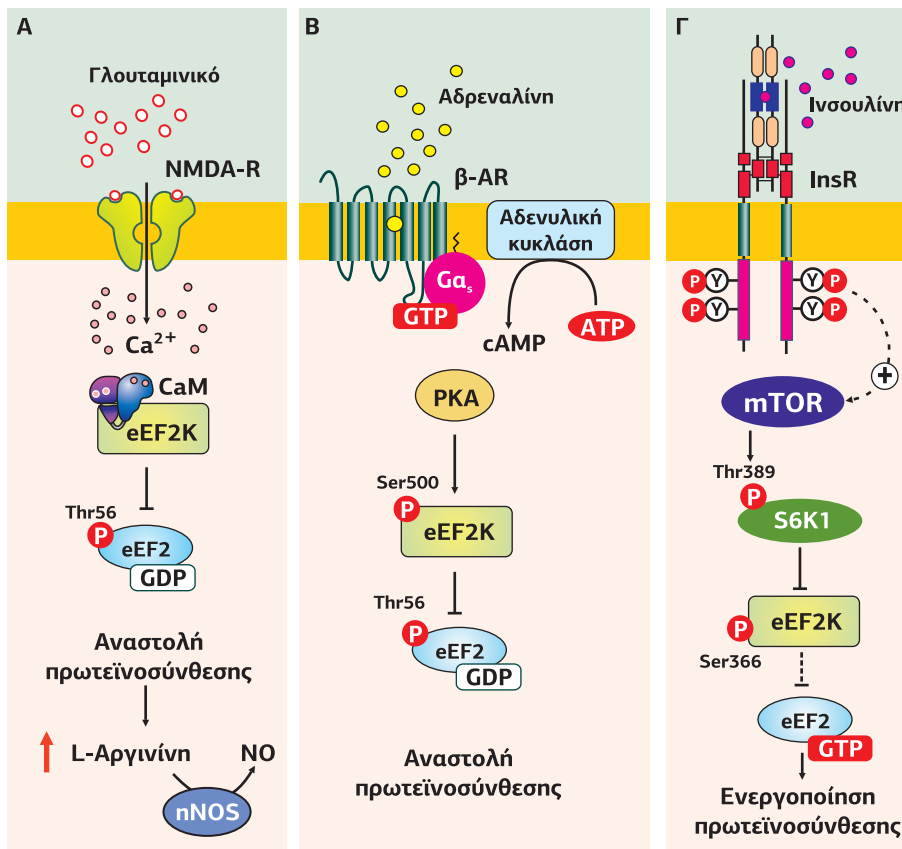
Το μόνο γνωστό υπόστρωμα της eEF2K είναι ο **eEF2**, μια πρωτεΐνη 95 kDa, 857 αμινοξέων, μέλος της οικογένειας των μικρών G-πρωτεϊνών. Στην GTP-συνδεδεμένη μορφή του προωθεί τη διαδικασία μεταφοράς του πεπτιδυλο-tRNA από τη θέση A του ριβοσώματος στη θέση P και εγκαταλείπει το ριβόσωμα μετά την υδρόλυση του GTP, στη GDP-συνδεδεμένη διαμόρφωση.

Η καλύτερα μελετημένη ρύθμιση του eEF2 είναι η φωσφορυλίωσή του στη Thr56 από την eEF2K, η οποία εμποδίζει τη σύνδεσή του στο ριβόσωμα, προκαλώντας την αναστολή της δράσης του και, κατά συνέπεια, την αναστολή της πρωτεϊνوسύνθεσης. Έτσι, η οδός eEF2K/ eEF2 μπορεί να είναι ένας βασικός βιοχημικός αισθητήρας, που συνδέει εξωτερικά σήματα με την πρωτεϊνική σύνθεση. Για παράδειγμα, έχειδειθεί ότι η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA από το γλουταμινικό οδηγεί μέσω της αύξησης του Ca^{2+} στη δημιουργία του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνη. Το σύμπλοκο Ca^{2+} /CaM έχει μια διπλή δράση: αφενός ενεργοποιεί την κινάση eEF2K, η οποία απενεργοποιεί τον eEF2 και αναστέλλει την πρωτεϊνوسύνθεση και, κατά συνέπεια, αναστέλλει την ενσωμάτωση της L-Arg σε πρωτεΐνες, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα, και αφετέρου ενεργοποιεί μια άλλη Ca^{2+} /CaM-εξαρτώμενη

Εικόνα 7.42

Τα μονοπάτια του eEF2

ρρυθμίζουν τη μετάφραση του mRNA. Α. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA αυξάνει την είσοδο Ca^{2+} στο κύτταρο. Παρουσία Ca^{2+} και καλμοδουλίνης (CaM) η κινάση eEF2K ενεργοποιείται οδηγώντας στη φωσφορυλίωση και αναστολή του eEF2, ελαττώνοντας την πρωτεϊνوسύνθεση. Β. Η ενεργοποίηση των β-αδρενεργικών υποδοχέων μέσω του μονοπατιού G_s /Αδενυλική κυκλάση/cAMP/PKA οδηγεί στη φωσφορυλίωση της eEF2K, μειώνοντας την εξάρτησή της από το Ca^{2+} /CaM και αυξάνοντας τη δραστηριότητά της. Ως αποτέλεσμα έχουμε μείωση της πρωτεϊνوسύνθεσης. Γ. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων της ινσουλίνης μέσω του μονοπατιού mTOR αυξάνει την πρωτεϊνوسύνθεση, καθώς φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση S6K1, έναν αναστολέα της δραστηριότητας της eEF2K. [71]



πρωτεΐνη, την NOS, οδηγώντας στην παραγωγή NO από το πλεόνασμα της L-Arg (Εικόνα 7.42Α).

Σε συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων που οδηγεί σε πρωτεϊνοσύνθεση. Η ινσουλίνη μεταφράζει το μήνυμα της αυξημένης συγκέντρωσης αμινοξέων σε πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της ενεργοποίησης του eEF2. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί τον Ins-R, έναν υποδοχέα κινάση Tyr, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί το μονοπάτι IRS/ PI3K/παραγωγή PIP₃/ PKB/ mTOR. Η mTOR φωσφορυλιώνει την Thr389 της S6K1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τη Ser366 της eEF2K, με αποτέλεσμα την αναστολή της κινάσης. Ο eEF2 δεν αναστέλλεται και η μετάφραση προωθείται (Εικόνα 7.42Γ).

Ένα επιπλέον μονοπάτι που ελέγχει τη σηματοδότηση eEF2K-eEF2 είναι μέσω της κινάσης PKA, η οποία φωσφορυλιώνει τη Ser500 της eEF2K και την ενεργοποιεί. Έχει δειχθεί ότι β-αδρενεργικοί αγωνιστές μέσω του μονοπατιού G_s/ αδενυλική κυκλάση/ cAMP/ ενεργοποίηση της PKA οδηγούν σε αύξηση της φωσφορυλίωσης του eEF2 και αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Εικόνα 7.42Β).

5.4 | CaM κινάση II

Η καλύτερα μελετημένη Ca²⁺/καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση είναι η CaMK-II. Ο λόγος για το ενδιαφέρον είναι ότι αυτό το εξαιρετικό ένζυμο παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης.

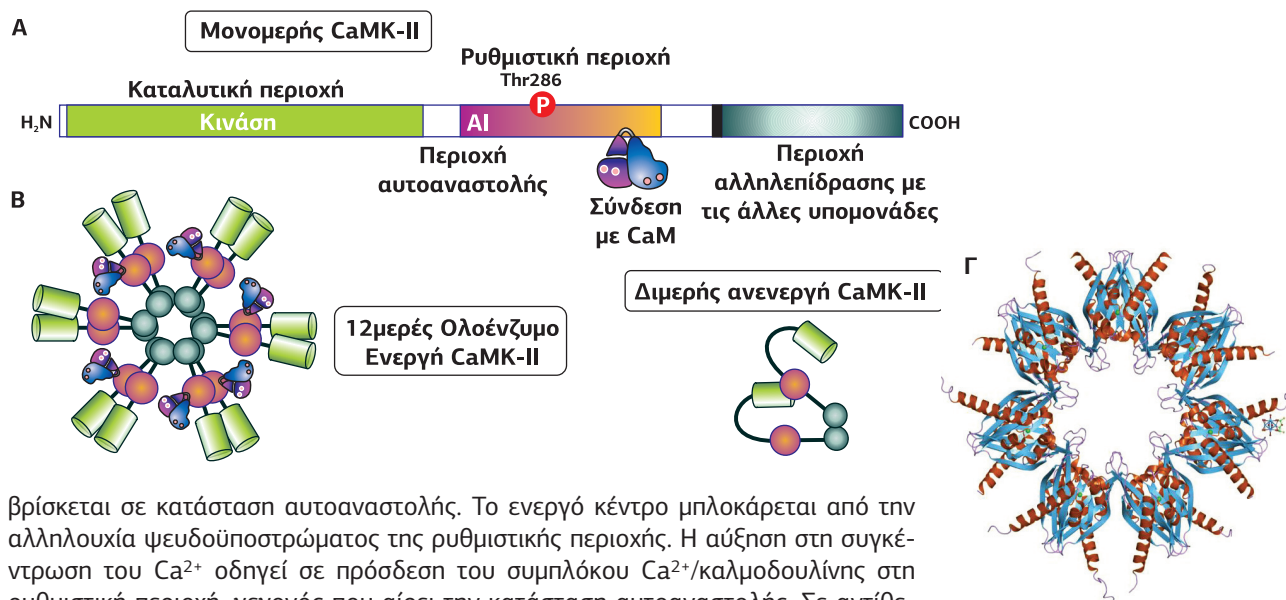
Από τις τέσσερις ισομορφές της κινάσης, οι CaMK-IIα και CaMK-IIβ βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στον εγκέφαλο και ιδιαίτερα σε περιοχές που εμπλέκονται στη μνήμη και στη μάθηση, όπως ο ιππόκαμπος, όπου αποτελούν το 2% των κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι CaMK-IIγ και δ εκφράζονται ευρέως σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένης και της καρδιάς. Στην καρδιά η κυρίαρχη ισομορφή είναι η δ. Αν και εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με τις μονομερείς CaMK-I και CaMK-IV, οι CaMKs-II έχουν μια επιπλέον περιοχή ολιγομερισμού στο COOH-τελικό τους άκρο που τους επιτρέπει να δημιουργούν διμερείς δομές, οι οποίες επιπλέον συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας ένα 12μερές ολοένζυμο 600 kDa από δύο συνδεδεμένα εξαμερή δακτυλίδια. Σε αυτή τη δομή, η οποία είναι μοναδική σε όλες τις κινάσες, οφείλεται η χαρακτηριστική τους δράση. Οι CaMKs-II εμφανίζονται να έχουν ενσωματωμένο έναν “διακόπτη μνήμης”, που τους επιτρέπει να διατηρούν ένα διεγερτικό σήμα για μεγάλη χρονική περίοδο και να παραμένουν σε ενεργή κατάσταση, ακόμη και όταν το αρχικό ερέθισμα έχει εξασθενήσει. Χάρη σε αυτήν την ιδιότητα οι CaMKs-II θεωρούνται κύριο στοιχείο στη δημιουργία και στην αποθήκευση της μνήμης στον εγκέφαλο.

Δομή της CaMK-II

Η κρυσταλλική δομή της CaM-εξαρτώμενης κινάσης II ανακαλύφθηκε το 2005 (Εικόνα 7.43Γ). Περιέχει μια NH₂-τελική καταλυτική περιοχή, μια ρυθμιστική περιοχή με τη θέση σύνδεσης του συμπλόκου Ca²⁺/καλμοδουλίνης και την αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος-αυτοαναστολής, καθώς και μια COOH-τελική περιοχή αλληλεπίδρασης (association domain), υπεύθυνη για τη δημιουργία της 12μερούς δομής της κινάσης. Η 12μερής δομή της CaMK-II αποτελείται από έξι διμερή (α, β, γ ή δ ισομορφής) που δημιουργούν δύο δακτυλίδια, με τις καταλυτικές περιοχές προσανατολισμένες προς τα έξω και την περιοχή αλληλεπίδρασης να δημιουργεί το κέντρο του κάθε δακτυλιδιού (Εικόνα 7.43). Η συνολική δομή της CaMK-II μπορεί να προκύψει ως ομο-ολιγομερές ή ως ετερο-ολιγομερές συγκροτημένο από διαφορετικές ισομορφές.

Ενεργοποίηση της CaMK-II

Απουσία του συμπλόκου Ca²⁺/καλμοδουλίνης η καταλυτική περιοχή της CaMK-II



βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής. Το ενεργό κέντρο μπλοκάρει από την αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος της ρυθμιστικής περιοχής. Η αύξηση στη συγκέντρωση του Ca^{2+} οδηγεί σε πρόσδεση του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης στη ρυθμιστική περιοχή, γεγονός που αίρει την κατάσταση αυτοαναστολής. Σε αντίθεση με τις κινάσες CaMK-I και CaMK-IV, οι οποίες μετά τη σύνδεση του Ca^{2+} /CaM φωσφορυλιώνονται από την κινάση CaMKK και ενεργοποιούνται, η CaMK-II είναι αυτόνομη, καθώς trans-αυτοφωσφορυλιώνει την αλληλουχία αυτοαναστολής. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο Thr286 (της CaMK-IIα) ή Thr287 (των CaMK-IIβ, γ, δ) και είναι ενδομοριακή, δηλαδή οι γειτονικές υπομονάδες του ολοενζύμου φωσφορυλιώνουν αμοιβαία η μία την άλλη (**Εικόνα 7.44A**).

Η αυτοφωσφορυλίωση έχει τρεις σημαντικές επιπτώσεις:

1. Αυξάνεται κατά τρεις τάξεις μεγέθους η συγγένεια της κινάσης για το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, το οποίο διαχωρίζεται με πολύ αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα η ενεργοποιημένη κατάσταση της CaMK-II να διατηρείται για μεγάλη χρονική περίοδο. Ακόμη και όταν το σήμα Ca^{2+} έχει εξασθενήσει και η συγκέντρωση του Ca^{2+} έχει πέσει σε επίπεδα 10^{-7} M, η CaMK-II παραμένει στην ενεργοποιημένη κατάσταση για αρκετά ακόμη δευτερόλεπτα, αφού η καλμοδουλίνη μπορεί να παραμένει συνδεδεμένη στο ένζυμο χωρίς συνδεδεμένο το Ca^{2+} .
2. Η αυτοφωσφορυλίωση στην Thr286 αίρει την αυτοαναστολή και το ένζυμο καθίσταται αυτόνομο, ανεξάρτητο από το σήμα ενεργοποίησης. Όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} πέφτει στα φυσιολογικά κυτταροπλασματικά επίπεδα και το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη διαχωρίζεται, το αυτοφωσφορυλιωμένο ένζυμο έχει ακόμα 20%-80% της δράσης του με συνδεδεμένο το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνης. Αυτό εξασφαλίζει ότι σημαντική δραστηριότητα παραμένει και μετά την εξασθένηση του σήματος Ca^{2+} . Αυτή η αυτόνομη Ca^{2+} /καλμοδουλίνη-ανεξάρτητη κατάσταση της CaMK-II τερματίζεται μόνο όταν φωσφατάσες αποφωσφορυλιώνουν το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο και οδηγούν το ένζυμο πίσω στην ανενεργή του κατάσταση.
3. Η αυτοφωσφορυλίωση εκθέτει μια θέση σύνδεσης για πρωτεΐνες υποστρώματα, όπως ο υποδοχέας NMDA. Η συνδεδεμένη με το υπόστρωμα διαμόρφωση της CaMK-II εμφανίζει μειωμένη απαίτηση για το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη και η κινάση μπορεί να παραμείνει ενεργή ακόμη και χωρίς να αυτοφωσφορυλιωθεί.

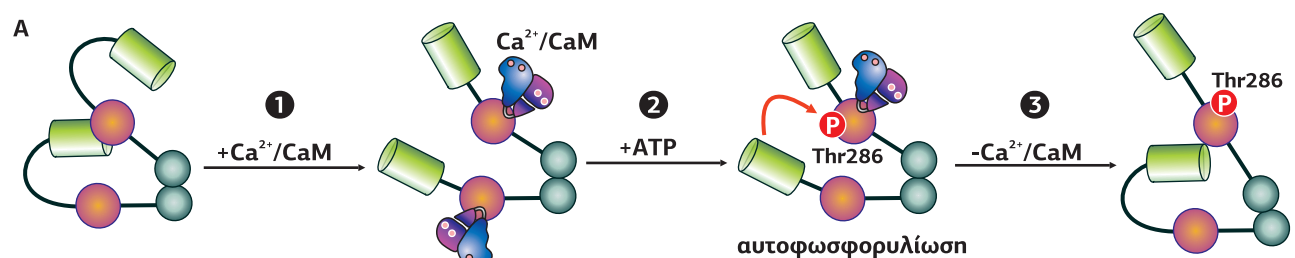
Επειδή η ενεργοποίηση της CaMK-II εξαρτάται από τις μεταβολές στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} , οι αλλαγές στη διάρκεια των καρδιακών δυναμικών δράσης επηρεάζουν τον βαθμό ενεργοποίησης της CaMK-II (**Εικόνα 7.44B**). Η παρατεταμένη διάρκεια των δυναμικών δράσης στην καρδιά, υπεύθυνη για το long QT syndrome (δηλαδή, καρδιακή ανεπάρκεια), οφείλεται στη μεγαλύτερη φάση plateau, λόγω αυξημένης εισόδου Ca^{2+} (κυρίως από τα L-τύπου κανάλια Ca^{2+}) και

Εικόνα 7.43

Η 12μερής δομή της CaM κινάσης τύπου II και οι περιοχές από τις οποίες αποτελείται το κάθε μονομερές.

A. Το κάθε μονομερές της CaM κινάσης II περιέχει μια καταλυτική περιοχή, μια ρυθμιστική περιοχή (με τη θέση σύνδεσης του Ca^{2+} /καλμοδουλίνης και την αλληλουχία αυτοαναστολής) και μια περιοχή αλληλεπίδρασης με τη γειτονική υπομονάδα. B. Η CaMK-II έχει μια 12μερή δομή με δύο εξαμερή δακτυλίδια, καθένα από τα οποία περιέχει έξι αντίγραφα του μονομερούς ενζύμου.

Γ. Κρυσταλλική δομή της CaMK-II. [56] [11]

**Εικόνα 7.44**

Ρύθμιση της CaMK-II από το σύμπλοκο $Ca^{2+}/$ καλμοδουλίνη και από αυτοφωσφορυλίωση.

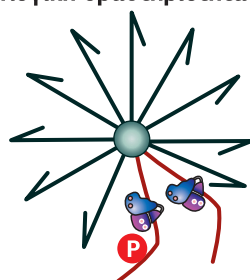
A. Η CaMK-II (εδώ φαίνεται το διμερές της CaMK-II) είναι απενεργοποιημένη στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή και απουσία του Ca^{2+}/CaM . Η σύνδεση του συμπλόκου Ca^{2+}/CaM ενεργοποιεί την trans-αυτοφωσφορυλίωση στο συντηρημένο κατάλοιπο Thr286, που σταθεροποιεί την ενεργοποιημένη διαμόρφωση του ενζύμου. Το ένζυμο παραμένει στην ενεργή κατάσταση ακόμη και μετά την εξασθένηση του σήματος του Ca^{2+} . B. Η CaMK-II είναι ένα μόριο κλειδί στην καρδιακή συσταλτικότητα. Όταν τα καρδιακά δυναμικά δράσης διαρκούν περισσότερο από το φυσιολογικό, όπως στην περίπτωση του συνδρόμου LQT, η είσοδος Ca^{2+} είναι παρατεταμένη και, κατά συνέπεια, περισσότερα μονομερή της 12μερούς κινάσης βρίσκονται συνδεδεμένα με το σύμπλοκο Ca^{2+}/CaM και αυτοφωσφορυλιωμένα, έως ότου τελικά όλο το ένζυμο να βρίσκεται ενεργοποιημένο. Εξαιτίας αυτού του μηχανισμού ενεργοποίησης σε βήματα, η 12μερής CaMK-II λειτουργεί ως ένας ανιχνευτής, ικανός να παρακολουθεί τη διάρκεια, την ένταση και τη συχνότητα ενός σήματος Ca^{2+} και να παραμένει ενεργός ακόμη και μετά τη λήξη του σήματος. [11] [70] [66]

B

Φυσιολογική διάρκεια καρδιακού δυναμικού δράσης



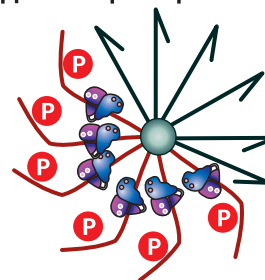
Φυσιολογική δραστηριότητα CaMK-II



Παρατεταμένη διάρκεια καρδιακού δυναμικού δράσης



Υπερβολική δραστηριότητα CaMK-II



LQTS
Καρδιομυπάθεια

μειωμένης εξόδου K^+ . Σε αυτήν την περίπτωση η CaMK-II είναι υπερφωσφορυλιωμένη και υπερενεργοποιημένη, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση και αναστολή της HDAC4, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Mef2, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για καρδιακή υπερτροφία.

CaMK-II ένα μόριο μνήμης?

Το κύριο χαρακτηριστικό της ρύθμισης της CaMK-II είναι η επίδραση μνήμης κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης. Η ενεργοποίηση του ενζύμου ξεκινά από μια παροδική αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Το Ca^{2+} ενεργοποιεί την CaMK-II με τη μορφή του συμπλόκου $Ca^{2+}/$ καλμοδουλίνης, αλλά η κινάση παραμένει ενεργή ακόμη και μετά την εξασθένηση του σήματος του Ca^{2+} , γιατί το ένζυμο οδηγείται σε μια αυτόνομα ενεργοποιημένη διαμόρφωση έπειτα από αυτοφωσφορυλίωση.

Σε αυτήν την ιδιότητα αποδίδεται ειδική σημασία, συγκεκριμένα για την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση των επαναλαμβανόμενων σημάτων Ca^{2+} στα νευρικά κύτταρα. Το μέγεθος της ιδιοσυστατης δραστηριότητας της CaMK-II στην ολιγομερή και αυτοφωσφορυλιωμένη μορφή της εξαρτάται από τη διάρκεια, το εύρος και τη συχνότητα της αύξησης της συγκέντρωσης Ca^{2+} . Για παράδειγμα, το μεσοδιάστημα ανάμεσα στην εμφάνιση των σημάτων Ca^{2+} είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την ένταση της ενεργοποίησης. Αν τα σήματα Ca^{2+} εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα, είναι πιθανή μια μεγάλης διάρκειας και αποτελεσματική ενεργοποίηση, καθώς η κινάση παραμένει στην ενεργοποιημένη της διαμόρφωση μεταξύ των σημάτων Ca^{2+} , εξαιτίας της επίδρασης μνήμης. Λόγω αυτής της ιδιότητας η CaMK-II συμμετέχει ενεργά στη συναπτική πλαστικότητα και στη δημιουργία μνήμης. Η ικανότητα της CaMK-II να αποκωδικοποιεί τη συχνότητα των μεταβολών του Ca^{2+} κατά τη διάρκεια της συναπτικής διέγερσης και να παρέχει μια παρατεταμένη απάντηση πέρα από το αρχικό ερέθισμα, είναι δύο χαρακτηριστικά απαραίτητα σε ένα μόριο που συμμετέχει στη συ-

ναπτική πλαστικότητα και στη δημιουργία μνήμης. Επιπλέον, η ικανότητα μνήμης εμφανίζεται πολύ μειωμένη σε διαγονιδιακά ζώα, τα οποία δεν εκφράζουν την CaMK-II.

Η μακρόχρονη συναπτική ενδυνάμωση (LTP) και ο ρόλος της CaMK-II

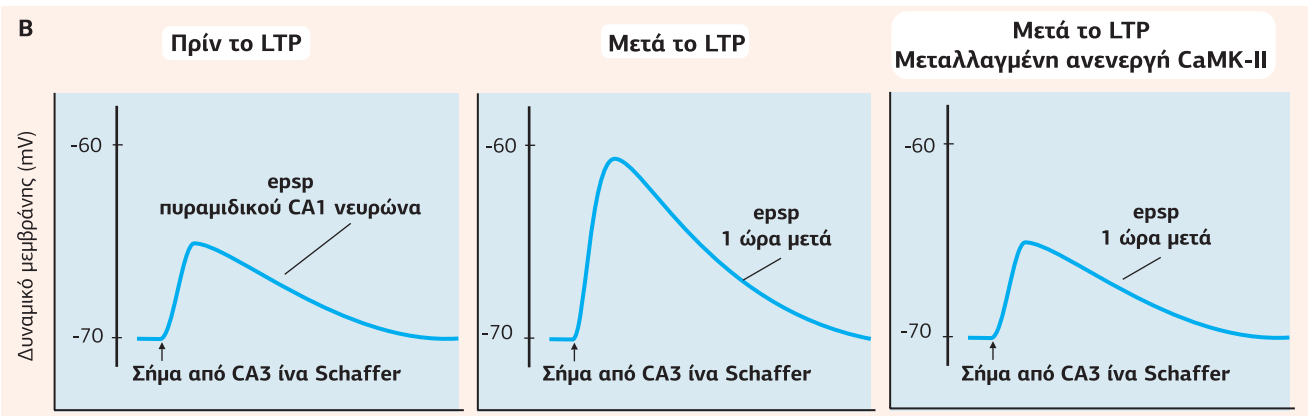
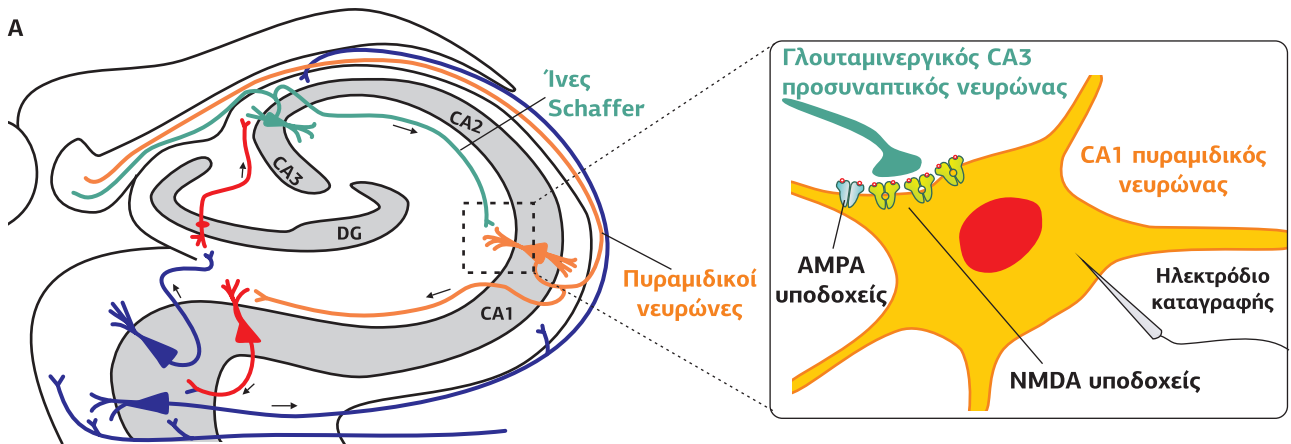
Η μακρόχρονη συναπτική ενδυνάμωση (Long-term potentiation, LTP) είναι μια διαδικασία κατά την οποία σύντομες περίοδοι συναπτικής δραστηριότητας μπορούν να παράγουν μακράς διάρκειας αύξηση της ισχύος μιας σύναψης, όπως φαίνεται από την αύξηση του μεγέθους των διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (epsps, excitatory postsynaptic potentials). Το φαινόμενο αυτό είναι υπεύθυνο για τη **συναπτική πλαστικότητα**, την ικανότητα δηλαδή των συνάψεων να μεταβάλλουν την ισχύ τους, την αγωγιμότητά τους.

Η διαδικασία της LTP λαμβάνει κυρίως χώρα στην περιοχή του ιπποκάμπου. Ξεκινά με σύντομες περιόδους προσυναπτικής διέγερσης υψηλής συχνότητας των ινών Schaffer της περιοχής CA3. Από τους προσυναπτικούς νευρώνες απελευθερώνεται γλουταμινικό, το οποίο ενεργοποιεί τους μετασυναπτικούς AMPA-Rs και NMDA-Rs των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής (**Εικόνα 7.45**). Το άνοιγμα των NMDA-Rs οδηγεί στην είσοδο Ca^{2+} , το οποίο μέσω της καλμοδουλίνης ενεργοποιεί την κινάση CaMK-II. Ως αποτέλεσμα, σε μια αρχική φάση αυξάνεται ο αριθμός και η αγωγιμότητα των AMPA-Rs, και συνεπώς ενισχύεται το μετασυναπτικό ρεύμα, και σε μια ύστερη φάση διευρύνονται οι δενδριτικές άκανθες και δημιουργούνται νέες συνάψεις, επιτρέποντας την αποθήκευση μακρόχρονης μνήμης.

Η LTP, *in vivo*, μπορεί να διαρκέσει έως και έναν μήνα. Οι αλλαγές στη συναπτική ισχύ συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μάθησης. Όταν η LTP αποτρέπεται από loss-

Εικόνα 7.45

Δημιουργία LTP στους πυραμιδικούς νευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου. Γρήγορη και έντονη διέγερση των προσυναπτικών νευρώνων της CA3 περιοχής του ιπποκάμπου (ίνες του Schaffer) επάγει μετασυναπτικά δυναμικά (epsps) στους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής. Η ίδια ένταση διέγερση έπειτα από 1 ώρα οδηγεί σε μεγαλύτερης ισχύος απόκριση των μετασυναπτικών νευρώνων, ένα φαινόμενο που ονομάζεται μακρόχρονη ενδυνάμωση. Μεταλλαγμένα ποντίκια με ανενεργή την κινάση CaMK-II μετά τη δεύτερη διέγερση έχουν την ίδια μετασυναπτική απόκριση.



Εικόνα 7.46

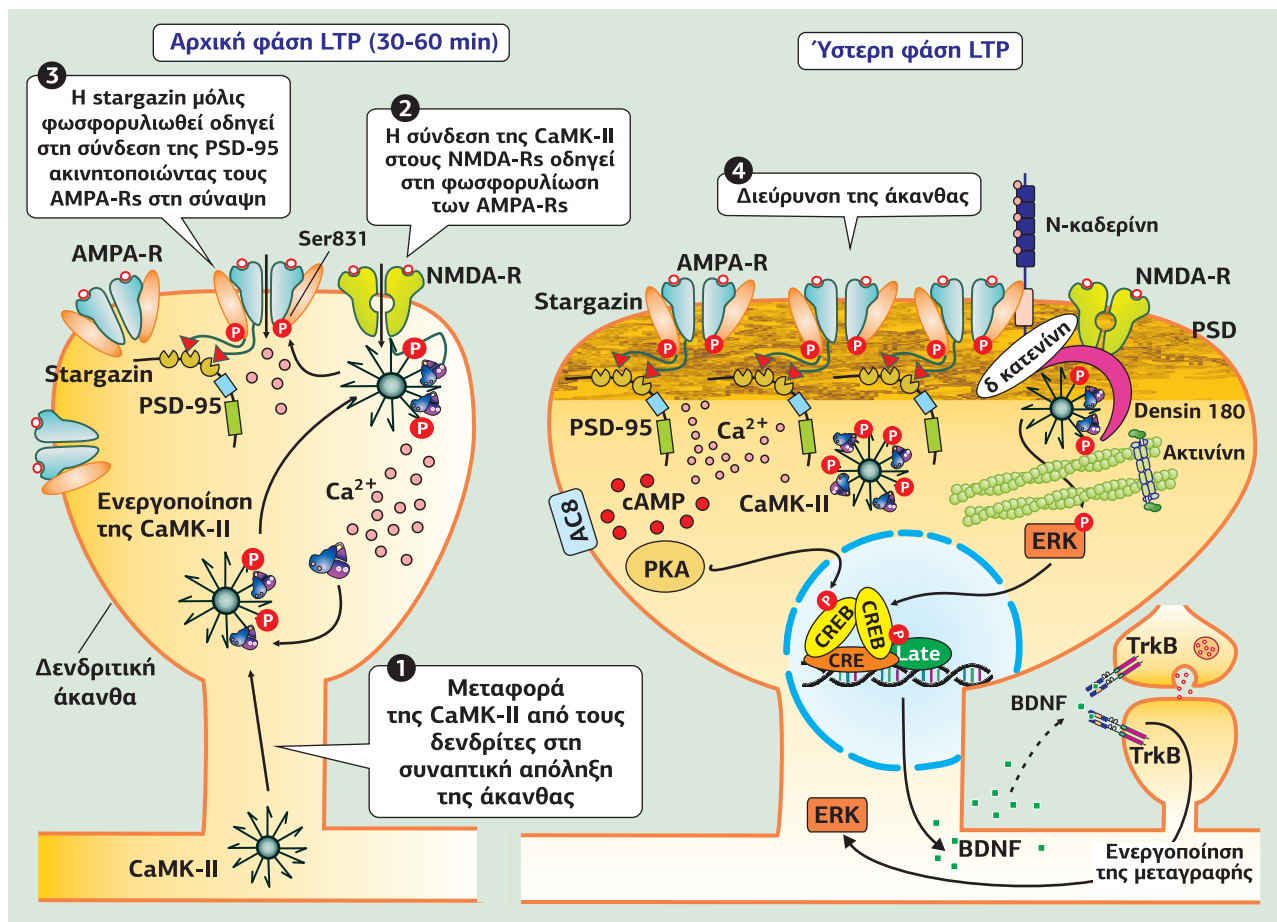
Τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της LTP. Στην αρχική φάση της LTP η ενεργοποίηση της CaMK-II λόγω της εισόδου Ca^{2+} από τον υποδοχέα NMDA οδηγεί στη φωσφορυλίωση των AMPA-Rs και της stargazin. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η αγωγιμότητα και ο αριθμός των AMPA-Rs στη δενδριτική άκανθα. Στην ύστερη φάση LTP η δενδριτική άκανθα διευρύνεται λόγω δημιουργίας της μετασυναπτικής πυκνότητας και ενεργοποιείται ο CREB, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή γονιδίων (π.χ. του BDNF) που οδηγούν στη δημιουργία νέων συνάψεων. [67]

of-function μεταλλάξεις πρωτεϊνών, όπως η CaMK-II, η μνήμη εξασθενεί.

Η **CaMK-II** αντιπροσωπεύει το 2% της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στον ιππόκαμπο και το 10-30% στην περιοχή μετασυναπτικής πυκνότητας (PSD) της σύναψης, συναγωνιζόμενη πρωτεΐνες, όπως η PSD-95, η ακτίνη και η τουμπουλίνη. Από το 1989, όταν ανακαλύφθηκε ότι αναστολείς της CaMK-II εμποδίζουν τη δημιουργία LTP στην CA1, ο κύριος ρόλος της CaMK-II στην έναρξη της LTP επιβεβαιώθηκε πολλές φορές και με πολλές και διαφορετικές προσεγγίσεις. Όπως είδαμε, η CaMK-II συναντάται σε 4 ισομορφές (α, β, γ και δ) και η συνολική 12μερής δομή της μπορεί να προκύψει ως ομο- ή ως ετερο-ολιγομερές συγκροτημένο από διαφορετικές ισομορφές. Σε ποντίκια $\text{CaMK-II}\alpha^{-/-}$ η LTP μειώνεται κατά 50% καθώς η CaMK-IIβ είναι υπεύθυνη για το 65% της δραστηριότητας της CaMK-II στον ιππόκαμπο. Η LTP αναστέλλεται πλήρως όταν η CaMK-II τροποποιείται με τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι αδύνατη η ενεργοποίησή της.

Μόλις ενεργοποιηθεί από το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνης, η CaMK-II μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στη δενδριτική άκανθα (dendritic spine), όπου συνδέεται στο COOH-τελικό άκρο της υπομονάδας NR2B του υποδοχέα NMDA και ενεργοποιεί την αύξηση του αριθμού αλλά και της λειτουργικότητας των υποδοχέων AMPA, αυξάνοντας την απόκριση του μετασυναπτικού νευρώνα. Στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου, όπου έχει κυρίως μελετηθεί η LTP, οι ετερομερείς AMPA-Rs αποτελούνται από τις υπομονάδες GluA1/2. Η GluA1 έχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης: τη Ser831, η οποία φωσφορυλιώνεται από την PKC και την CaMK-II, τη Ser567, η οποία φωσφορυλιώνεται από την CaMK-II, τη Ser845, η οποία φωσφορυλιώνεται από την PKA, και τη Ser818, η οποία φωσφορυλιώνεται από την PKC. Η αύξηση της αγωγιμότητας των AMPA-Rs που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της LTP οφείλεται στη φωσφορυλίωση της Ser831 από την CaMK-II (βλ. **Εικόνα 7.20**).

Εκτός από την υπομονάδα GluA1, η CaMK-II φωσφορυλιώνει και το COOH-



τελικό άκρο της stargazin, της συμπληρωματικής υπομονάδας των AMPA-Rs. Κάτω από μη φωσφορυλιωμένες συνθήκες, το COOH-τελικό άκρο της stargazin είναι συνδεδεμένο στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης από τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αργινίνης. Η φωσφορυλίωση της stargazin από την CaMK-II εξουδετερώνει το φορτίο επιτρέποντας στην PSD-95 να συνδεθεί με το PDZ μοτίβο της stargazin, σταθεροποιώντας τον υποδοχέα AMPA στη σύναψη (**Εικόνα 7.46**).

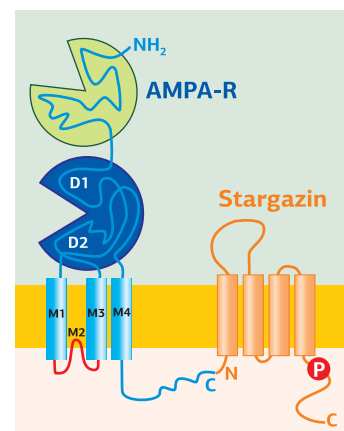
Η φωσφορυλίωση της Ser831 αυξάνει την αγωγιμότητα των AMPA-Rs και η φωσφορυλίωση της stargazin οδηγεί στην αγκυροβόληση περισσότερων AMPA-Rs στη σύναψη. Μαζί αυτές οι δύο διαδικασίες δίνουν μια εξήγηση για την **αρχική φάση της LTP** (για τα πρώτα 30-60 minutes).

Η **ύστερη φάση της LTP** (Late LTP, L-LTP) συνδέεται με την ταχεία και παρατεταμένη διεύρυνση προϋπαρχόντων δενδριτικών ακάνθων, την αναδιαμόρφωση της μετασυναπτικής πυκνότητας (PSD), καθώς και τον *de novo* σχηματισμό συνάψεων. Αυτή η ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση μεγάλης κλίμακας απαιτεί *de novo* σύνθεση συναπτικών πρωτεϊνών, καθώς και μετακίνηση πρωτεϊνών στη σύναψη. Το σύμπλοκο CaMK-II/NMDA-R δρα ως σκαλωσιά αρκετών πρωτεϊνών της μετασυναπτικής πυκνότητας συμπεριλαμβανομένων της α-ακτινίνης, της PSD-95 και της densin-180, μιας πρωτεΐνης συναπτικής προσκόλλησης, στην οποία συνδέονται η δ-κατενίνη και η N-καδερίνη. Επίσης, η ενεργοποίηση της CaMK-II οδηγεί σε φωσφορυλίωση της MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2), η οποία συνδέεται σε μικροσωληνίσκους και παίζει ρόλο στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού. Με αυτόν τον τρόπο η CaMK-II συμβάλλει στις μορφολογικές αλλαγές της σύναψης αυξάνοντας σταδιακά το μέγεθος και την ισχύ των ακάνθων.

Οι αλλαγές που απαιτούνται για την έκφραση των γονιδίων και τη σύνθεση των συναπτικών πρωτεϊνών προκαλούνται από την παρατεταμένη ενεργοποίηση των κινασών, όπως η PKA, η CaMK-II, η PKC και οι MAPKs που ενεργοποιούνται στην αρχική φάση της LTP. Είδαμε ότι η είσοδος Ca^{2+} ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση AC8 οδηγώντας στην παραγωγή cAMP και στην ενεργοποίηση της PKA. Η ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) είναι ο μοριακός σύνδεσμος ανάμεσα στην αρχική και στην ύστερη φάση LTP, καθώς πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια της αρχικής φάσης, στα οποία συμμετέχουν η CaMK-II και η PKC, συγκλίνουν στην ERK (βλ. **Εικόνα 7.20**).

Τόσο η PKA όσο και η ERK μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν τον **CREB**, έναν παράγοντα μεταγραφής που εμπλέκεται στη μακροπρόθεσμη μνήμη. Η φωσφορυλίωση του CREB έχει δείχθει σε νευρώνες CA1 του ιππόκαμπου έπειτα από ερεθίσματα που ενεργοποιούν την LTP. Ποντίκια με loss-of-function μεταλλάξεις του CREB δεν εμφανίζουν την ύστερη φάση της LTP, ούτε δεξιότητες που απαιτούν μακροχρόνια μάθηση, ενώ παρουσιάζουν κανονική βραχυπρόθεσμη μνήμη. Έκφραση ιδιοσύστατα υπερενεργού CREB σε νευρώνες της CA1 χαμηλώνει το κατώφλι επαγωγής L-LTP, έτσι ώστε ένα ερέθισμα που προκαλεί την αρχική φάση της LTP μπορεί να προκαλέσει την ύστερη LTP. Επιπλέον, η εφαρμογή αναστολέων PKA εμποδίζει τον σχηματισμό δενδριτικών ακάνθων, καθώς και τις αποκρίσεις του CREB και της CBP (CREB Binding Protein). Στο σύνολό της η ενεργοποίηση του CREB είναι ένα κρίσιμο βήμα στη σηματοδότηση που επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών και, κατά συνέπεια, οδηγεί μακροπρόθεσμα σε μορφολογικές τροποποιήσεις κατά την L-LTP και τη μακροπρόθεσμη μνήμη.

Συνοψίζοντας, σε σύγκριση με άλλα ένζυμα και πρωτεΐνες προσαρμογής ή σκαλωσιάς, η CaMK-II έχει πολλά χαρακτηριστικά για να αναλάβει τον κυρίαρχο ρόλο στην πρόκληση της συναπτικής πλαστικότητας. Πρώτον, η δωδεκαμερής δομή της CaMK-II της επιτρέπει να αλληλεπιδρά με πολλαπλές πρωτεΐνες και ταυτόχρονα να δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς. Έτσι, η CaMK-II όχι μόνο μπορεί να προσφέρει φυσική σύνδεση μεταξύ πρωτεϊνών, αλλά μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως κομβικό σημείο, όπου πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης συνομιλούν. Δεύτερον, το κάθε μονομερές στο ολοένζυμο CaMK-II είναι ένα ένζυμο που φωσφορυλιώνει τα δικά του υποστρώματα και ενεργοποιεί τη σηματοδότηση. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐ-



Η μεταφορά, η αγωγιμότητα και η λειτουργία των AMPA-Rs ρυθμίζονται από διαμεμβρανικές συμπληρωματικές υπομονάδες, Transmembrane AMPA-R Regulatory Proteins (TRAPs), γνωστότερη από τις οποίες είναι η stargazin.

νες, “μόνο ένζυμο” και “μόνο πρωτεΐνες σκαλωσιάς”, αυτή η μοναδική “όλα-σε-ένα” ιδιότητα της CaMK-II επιτρέπει ταχύτερη και πιο αποτελεσματική τοπική σηματοδότηση. Τρίτον, κάθε διμερές ζεύγος μπορεί να ρυθμιστεί χωριστά, έτσι ώστε κάθε ολοένζυμο μπορεί να έχει πολλαπλές καταστάσεις ενεργοποίησης. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στο ολοένζυμο, καθώς και σε κάθε ζευγάρι διμερούς να πραγματοποιεί διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με τις συνθήκες, διευρύνοντας σημαντικά τον ρόλο της σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών.

Μοριακοί στόχοι της CaMK-II

Η CaMK-II μέσω των ποικίλων στόχων της και χάρη στην ξεχωριστή της ιδιότητα να μπορεί να ρυθμίζει το επίπεδο ενεργοποίησής της από τη συγκέντρωση του Ca^{2+} , παίζει κύριο ρόλο στην αποκωδικοποίηση της μεταβολής της συχνότητας εισόδου του Ca^{2+} .

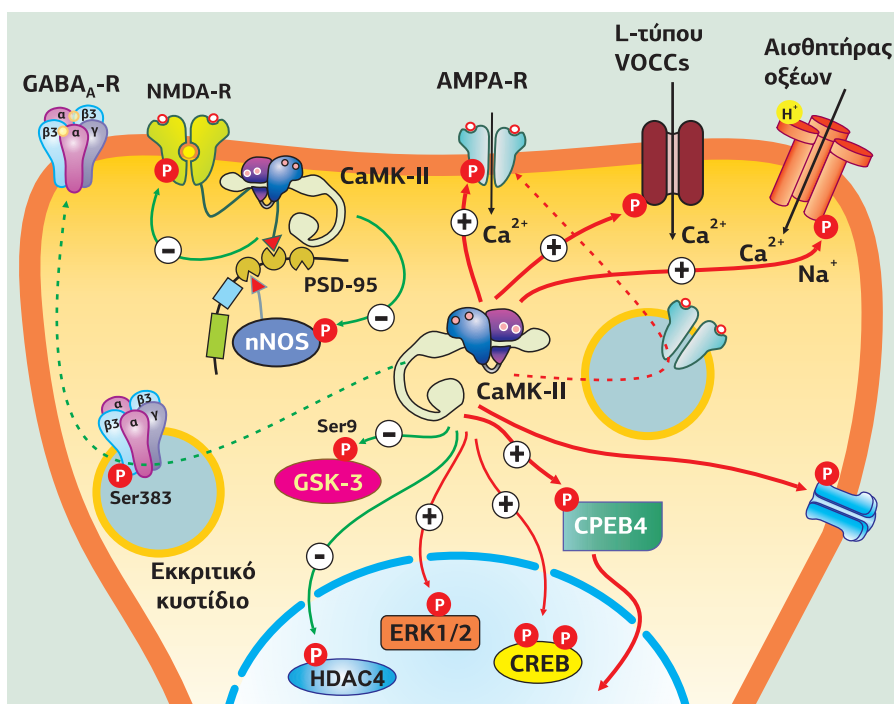
Χαρακτηριστικός είναι ο ρόλος της στην καρδιά, όπου ελέγχει την Ca^{2+} εξαρτώμενη ρύθμιση των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} . Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 4 (σελ. 160), κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης καρδιακής δραστηριότητας η είσοδος Ca^{2+} μπλοκάρει τα L-τύπου κανάλια, καθώς συνδέεται στην καλμοδουλίνη που αποτελεί τμήμα του COOH-τελικού τους άκρου. Κατά τη διάρκεια της άσκησης οι εξαρτώμενες από την αυξημένη συχνότητα δυναμικών δράσης μεταβολές στην είσοδο Ca^{2+} επηρεάζουν τη σχέση ισχύος-συχνότητας της καρδιακής συστολής. Η αύξηση της ισχύος της συστολής, μαζί με τους ταχύτερους ρυθμούς της καρδιάς, οδηγεί στη θετική ινότροπη απόκριση κατά την άσκηση. Η CaMK-II μπορεί να συνδεθεί στο COOH-τελικό άκρο της $\alpha 1$ υπομονάδας των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} και να φωσφορυλιώσει το κανάλι αυξάνοντας την αγωγιμότητά του (βλ. σελ. 159, **Εικόνα 4.33**). Το ολοένζυμο CaMK-II, λόγω της χαρακτηριστικής δομής του, είναι σε προνομιακή θέση για να λειτουργήσει ως ειδικός αποκωδικοποιητής της συχνότητας της τασης-εξαρτώμενης εισόδου Ca^{2+} .

Η CaMK-II εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο νευρικό σύστημα, όπου όπως είδαμε παίζει βασικό ρόλο στην πλαστικότητα των συνάψεων. Επίσης, ανάλογα με την περίπτωση μπορεί να συμβάλει στην επιβίωση των νευρώνων ή στον κυτταρικό τους θάνατο (**Εικόνα 7.47**). Η αυξημένη συγκέντρωση Ca^{2+} μπορεί να υπερενεργοποιήσει την CaMK-II, η οποία φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς AMPA και τα L-τύπου κανάλια Ca^{2+} αυξάνει την αγωγιμότητα των καναλιών αυτών προκαλώντας τον

Εικόνα 7.47

Πιθανοί στόχοι της CaMK-II, οι οποίοι συμμετέχουν στη ρύθμιση της νευρωνικής βιωσιμότητας. Η ενεργοποίηση της CaMK-II προάγει την επιβίωση (πράσινα βέλη) καθώς φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη NOS, μειώνοντας τα επίπεδα NO, φωσφορυλιώνει και απεναιιοθετοποιεί τους NMDA-Rs, μειώνοντας την είσοδο Ca^{2+} , αυξάνει την έκφραση των GABA_A Rs στην πλασματική μεμβράνη (μέσω φωσφορυλίωσης της Tyr365 της γ -υπομονάδας και της Ser383 της $\beta 3$ -υπομονάδας), ενεργοποιεί την MAP κινάση ERK, τον μεταγραφικό παράγοντα CREB, αναστέλλει την κινάση GSK-3 καθώς και την αποακετυλάση των ιστονών, HDAC4.

Η ενεργοποίηση της CaMK-II προάγει τον κυτταρικό θάνατο (κόκκινα βέλη) μέσω φωσφορυλίωσης της Ser831 της GluR1 υπομονάδας του AMPA-R, επάγοντας την αύξηση της αγωγιμότητας του καναλιού και κατά συνέπεια την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , η οποία επιτείνεται από τη φωσφορυλίωση της α - και β -υπομονάδας των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} (VOCCs) και του αισθητήρα οξέων ASICs. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η CaMK-II φωσφορυλιώνει και ανοίγει ημιδιαύλους κοννεξινών. Τέλος, βρέθηκε ότι η CaMK-II είναι απαραίτητη για τη μετακίνηση της CPEB4 στον πυρήνα, σε περίπτωση ισχαιμίας. Η CPEB4 (Cyttoplasmic Polyadenylation Element Binding 4) ρυθμίζει την πολυαδενυλίωση και κατά συνέπεια τη μεταφραστική ικανότητα των νευρώνων. Απομάκρυνση της CPEB4 από το κυτταρόπλασμα οδηγεί στο θάνατο του νευρώνα. [12]



κυτταρικό θάνατο. Επίσης, σε κατάσταση ισχαιμίας, λόγω αύξησης της συγκέντρωσης Ca^{2+} που εισέρχεται από τους NMDA-Rs, η CaMK-II ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει τη Ser478 και τη Ser479 των οξέο-ευαίσθητων καναλιών κατιόντων (ASICs, Acid-Sensing Ion Channels), αυξάνει την αγωγιμότητά τους, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η CaMK-II συνεισφέρει και στην επιβίωση των νευρώνων, καθώς μπορεί να φωσφορυλιώσει και να αναστείλει την nNOS, μειώνοντας τα επίπεδα NO, και την κινάση GSK-3, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της απόπτωσης. Επίσης, η CaMK-II ρυθμίζει αρκετά κανάλια ιόντων με έναν τρόπο που μπορεί να προσδώσει νευροπροστασία από τοξικές προσβολές, όπως στην περίπτωση ισχαιμίας, όπου απευαισθητοποιεί τους υποδοχείς NMDA (μειώνοντας την είσοδο Ca^{2+}) και αυξάνει την επιφανειακή έκφραση των ανασταλτικών GABA_A υποδοχέων.

Στην περιοχή της μετασυναπτικής πυκνότητας (PSD) βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις η **SynGAP**, μια GTPase-activating protein (GAP) υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της δραστηριότητας GTPάσης των Ras και Rap, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της σηματοδοτικής τους δράσης. Στην PSD η SynGAP δημιουργεί σε κατάσταση ηρεμίας (σε χαμηλή συγκέντρωση Ca^{2+}) σύμπλεγμα με την CaMK-II μέσω της PSD-95. Σε αυτήν την κατάσταση φωσφορυλιώνεται και απενεργοποιείται από την CaMK-II, επιτρέποντας τη δράση της Rap-GTP και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης p38 MAPK. Ως αποτέλεσμα, διατηρούνται χαμηλά τα επίπεδα συναπτικής διαβίβασης λόγω της απομάκρυνσης από τη σύναψη των υποδοχέων AMPA, μέσω της Rap/p38 MAPK σηματοδότησης. Η ενεργοποίηση της CaMK-II λόγω της εισόδου Ca^{2+} από τους υποδοχείς NMDA αποσυνδέει την CaMK-II από το σύμπλοκο με την SynGAP οδηγώντας στην αποφωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της SynGAP. Στη συνέχεια, αναστέλλεται η σηματοδότηση Rap/p38 MAPK και η απομάκρυνση των AMPA-Rs από τη μεμβράνη, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται οι AMPA-Rs κατά την LTP. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η CaMK-II φωσφορυλιώνει την SynGAP σε συνθήκες ηρεμίας δεν είναι ακόμη κατανοητός.

Άλλοι στόχοι της CaMK-II είναι η **φωσφοδιεστεράση 1B** (PDE1B), η φωσφορυλίωση της οποίας έχει αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας της στο Ca^{2+} , η **φωσφολαμβάνη**, μέσω της οποίας η CaMK-II ελέγχει την SERCA2a. Η αποφωσφορυλιωμένη PLN αναστέλλει την SERCA2a, ενώ η φωσφορυλίωσή της είτε στη Ser16 από την PKA είτε στη Thr17 από την CaMK-II αντιστρέφει αυτή την αναστολή, οδηγώντας στην είσοδο Ca^{2+} μέσα στο ΕΔ. Στόχος της CaMK-II είναι, επίσης, η **MLCK**, την οποία φωσφορυλιώνει στη Ser992 και αναστέλλει τη δράση της οδηγώντας σε χάλαση (βλ. **Εικόνα 7.40**).

Τέλος, σε ωάρια *Xenopus laevis* η CaMK-II επάγει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση. Η αύξηση του Ca^{2+} και η συνεπακόλουθη ενεργοποίηση της CaMK-II επάγει την είσοδο στην ανάφαση ενεργοποιώντας το σύμπλοκο APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), το οποίο οδηγεί σε αποικοδόμηση της κυκλίνης B επιτρέποντας τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (βλ. Κεφάλαιο Κυτταρικός κύκλος).

6. Πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr

Όπως είδαμε, η έννοια της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών προέκυψε το 1955 από την ανακάλυψη από τους Edmond Fischer και Edwin Krebs της διπλής απαίτησης για ATP και για ένα ένζυμο μετατροπής “converting enzyme” (στη συνέχεια ονομάστηκε κινάση της φωσφορυλάσης) στην *in vitro* μετατροπή της φωσφορυλάσης *b* (ανενεργή) σε φωσφορυλάση *a* (ενεργή). Αυτή η διαδικασία περιελάμβανε τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP στη φωσφορυλάση *b* και η φωσφορυλάση *a* που προέκυπε βρέθηκε να είναι μια φωσφοπρωτεΐνη. Περιέργως, το ένζυμο που μετατρέπει τη φωσφορυλάση *a* σε *b*, που ονομαζόταν “PR enzyme” (φωσφατάση της φωσφορυλάσης) είχε αναφερθεί μία δεκαετία νωρίτερα, το 1943, από τους Carl Ferdinand και Gerty Theresa Cori (Βραβείο Nobel, 1947) και τον

Arda Green. Ωστόσο, η χημική φύση της αντίδρασης παρέμεινε αινιγματική έως ότου ανακαλυφθεί από τους Krebs και Fischer (1956) ότι το ανόργανο φωσφορικό είναι προϊόν της αντίδρασης.

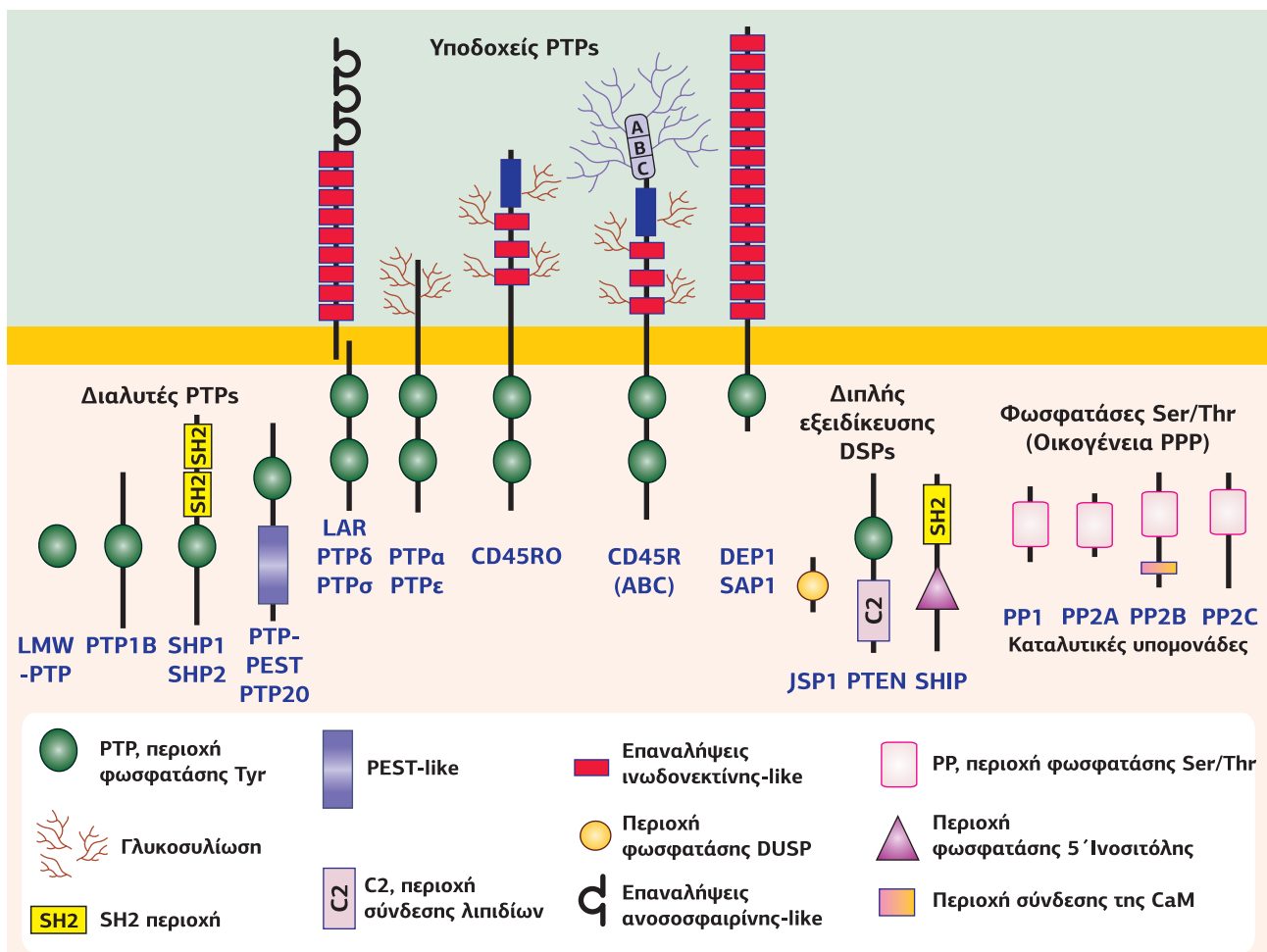
Η φωσφορυλίωση είναι ένας βασικός μηχανισμός σε πολυάριθμες λειτουργίες της φυσιολογίας των ευκαρυωτών (τουλάχιστον το 1/3 των πρωτεϊνών ενός κυτάρου φωσφορυλιώνονται κυρίως σε κατάλοιπα Ser/Thr, αλλά και Tyr) που αντιστρέφεται από τις φωσφατάσες. Η αποφωσφορυλίωση οδηγεί κυρίως στην απενεργοποίηση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, αλλά μπορεί να ενεργοποιήσει και ορισμένες πρωτεΐνες, όπως οι κινάσες GSK-3 β , Src, Lck και οι μεταγραφικοί παράγοντες NFAT και c-Jun. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της κινάσης Tyr Lck απαιτεί την αποφωσφορυλίωση του COOH-τελικού καταλοίπου Tyr καθώς, επίσης, και την αυτοφωσφορυλίωση μιας Tyr στην περιοχή ενεργοποίησης της κινάσης. Επίσης, για να καταστεί πλήρως ενεργός ο NFAT απαιτείται η αποφωσφορυλίωση ενός καταλοίπου Ser κοντά στην περιοχή σύνδεσης με το DNA και η φωσφορυλίωση μιας Ser κοντά στο NH₂-τελικό άκρο (βλ. **Εικόνα 6.34**).

Οι φωσφατάσες ταξινομούνται στις **φωσφατάσες Tyr** και τις **φωσφατάσες Ser/Thr**. Σε αντίθεση με τις κινάσες Ser/Thr και Tyr που μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο, οι φωσφατάσες Ser/Thr και Tyr δεν έχουν εξελικτικά καμιά σχέση μεταξύ τους. Ενώ οι φωσφατάσες Tyr είναι μεγάλα μονομερή ένζυμα με πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές, οι φωσφατάσες Ser/Thr αποτελούνται από καταλυτικές υπομονάδες που συνδέονται με πολλές διαφορετικές ρυθμιστικές υπομονάδες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών διαφορετικών ολοενζύμων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι παρόμοιο, αλλά θα μπορούσε κανείς να αναρωτηθεί γιατί τόσο διαφορετικές στρατηγικές. Τα μονομερή ένζυμα με πολλές περιοχές αλληλεπίδρασης υπόκεινται

Εικόνα 7.48

Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών φωσφατάσων.

Οι φωσφατάσες ανάλογα με τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα που αποφωσφορυλιώνουν χωρίζονται σε **πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr** (PTPs), οι οποίες μπορεί να είναι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, μεμβρανικές με δράση υποδοχέα, ή διπλής εξειδίκευσης (όπως η PTEN), και σε **πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr** (PSPs), οι οποίες είναι μόνο κυτταροπλασματικές (PP1, PP2A, PP2B, PP2C). [45]



σε πιο αυστηρό έλεγχο, ενώ ένας μηχανισμός συνδυασμών οδηγεί σε μεγαλύτερη ευελιξία στις κυτταρικές αποκρίσεις. Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν φωσφατάσες Tyr αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, ενώ ο αριθμός των καταλυτικών υπομονάδων των φωσφατάσων Ser/Thr παρέμεινε σχεδόν σταθερός. Ωστόσο, ο αριθμός των φωσφατάσων Ser/Thr ως ολοένζυμα που δημιουργούνται από τον συνδυασμό καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων υπερέχει κατά πολύ. Ίσως η μεγάλη αύξηση στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών κατά τα αρχικά στάδια εξέλιξης ξεπέρασε τη διαφοροποίηση των περιοχών αλληλεπίδρασης στις φωσφατάσες Ser/Thr και, αντ' αυτού παραδόξως, οδήγησε σε μια κατάσταση κατά την οποία λίγες καταλυτικές υπομονάδες φωσφατάσων οι οποίες αναγνωρίζουν μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, καλύπτουν καλύτερα τις ανάγκες, εφόσον η ρύθμιση και η στόχευσή τους λαμβάνεται υπόψη.

Από το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται περίπου 100 φωσφατάσες Tyr, οι οποίες χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τις εξειδικευμένες στην αποφωσφορυλίωση καταλοίπων Tyr **PTPs** (Protein Tyrosine Phosphatases), και στις διπλής εξειδίκευσης **DSPs** (Dual specificity Ps). Οι PTPs διαχωρίζονται επιπλέον στις διαμεμβρανικές φωσφατάσες-υποδοχείς (Receptors PTPs), οι οποίες έχουν μια εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή και δύο κυτταροπλασματικές καταλυτικές περιοχές, και τις κυτταροπλασματικές φωσφατάσες που αντιπροσωπεύονται από την PTP1B (η πρώτη φωσφατάση Tyr που ανακαλύφθηκε) και την SHP1, που περιέχουν μια καταλυτική περιοχή και διάφορες NH₂- ή COOH-τελικές περιοχές αλληλεπίδρασης, όπως SH2. Οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης περιλαμβάνουν ένζυμα που αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα Tyr, Ser, φωσφοϊνσιτίδια (π.χ. η SHIP, SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase) ή mRNA (**Εικόνα 7.48**). Αν και οι PTPs και οι DSPs έχουν μικρή αμινοξική ομολογία, περιέχουν ένα κοινό μοτίβο στο ενεργό τους κέντρο υπεύθυνο για την καταλυτική τους δραστηριότητα. Στις φωσφατάσες Tyr θα αναφερθούμε στο Κεφάλαιο 9 (σσ. 730-35).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η αλληλούχιση του γονιδιώματος των θηλαστικών αποκάλυψε περίπου 30 γονίδια που κωδικοποιούν για τις καταλυτικές υπομονάδες των φωσφατάσων Ser/Thr (PSPs), οι οποίες ταξινομούνται σε τρεις διαφορετικές οικογένειες, δομικά διακριτές. Η μεγαλύτερη οικογένεια **PPP** περιλαμβάνει τις φωσφατάσες PP1, PP2A (περιλαμβάνει τις PP4 και PP6), PP2B (καλσινευρίνη), PP5 και PP7, η οικογένεια **PPM** (Metal-dependent Protein Phosphatases) περιλαμβάνει Mn²⁺/Mg²⁺-εξαρτώμενες φωσφατάσες που αντιπροσωπεύονται από τις φωσφατάσες PP2C και PDP (Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase), και η οικογένεια **FCP** αναγνωρίστηκε πρόσφατα μέσω του αρχικού της μέλους Fcp1 (ή TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD phosphatase), το οποίο αποφωσφορυλιώνει το COOH-τελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II και περιλαμβάνει και την υποοικογένεια SCPs (SCP1/2 ή CTDSP1/2, SCP3 ή CTDSPL (small C-Terminal Domain phosphatases).

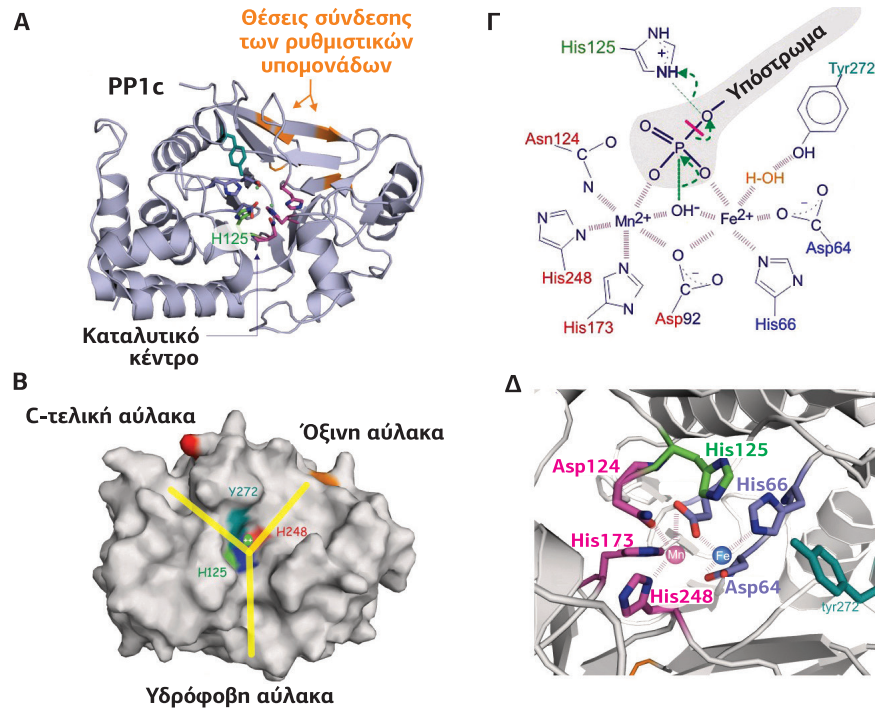
Ωστόσο, σήμερα είναι γνωστό ότι και οι φωσφατάσες της οικογένειας PPP απαιτούν την ύπαρξη δισθενών μεταλλικών ιόντων (Fe²⁺/Mn²⁺) στο ενεργό τους κέντρο. Βλ. Εικόνα 7.49.

6.1 | Δομή και ταξινόμηση των φωσφατάσων Ser/Thr

Όπως είδαμε, οι φωσφατάσες Ser/Thr ταξινομούνται σε τρεις οικογένειες: PPPs, PPMs και FCPs. Στα περισσότερα μέλη των PPPs η καταλυτική υπομονάδα συνδέεται με μια μεγάλη ποικιλία ρυθμιστικών υπομονάδων. Αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας PPP είναι οι PP1, PP2A, PP2B (γνωστή και ως καλσινευρίνη), PP4, PP5, PP6 και PP7. Οι PP1-PP6 εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, σε αντίθεση με την PP7 που βρίσκεται μόνο στον αμφιβληστροειδή και στον εγκέφαλο. Η οικογένεια PPM περιλαμβάνει φωσφατάσες που εξαρτώνται από ιόντα Mn²⁺/Mg²⁺, όπως η PP2C και η φωσφατάση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού. Σε αντίθεση με τις PPPs, τα μέλη της οικογένειας PPM δεν έχουν ρυθμιστικές υπομονάδες αλλά περιέχουν, επιπλέον, περιοχές και καλά συντηρημένα μοτίβα που βοηθούν στον καθορισμό και την εξειδίκευση του υποστρώματος. Και για τις δύο οικογένειες, PPP και PPM, τα μεταλλικά ιόντα παίζουν καταλυτικό και κεντρικό ρόλο στην ενεργοποίηση

Εικόνα 7.49

Τα μέλη της οικογένειας PPP μοιράζονται μια κοινή δομή της καταλυτικής τους περιοχής. Α. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από μια κεντρική περιοχή β-sandwich που περιβάλλεται από τη μία πλευρά από 7 α-έλικες και από την άλλη από μια υποπεριοχή που περιέχει τρεις α-έλικες και τρεις β-κλώνους. Β. Η καταλυτική σχισμή έχει σχήμα Y, με τρεις κλάδους, την υδρόφοβη, την όξινη και την C-τελική αύλακα. Γ. Ο ρόλος των δύο μεταλλικών ιόντων Mn^{2+}/Fe^{2+} στην καταλυτική αντίδραση. Η αποφωσφορυλίωση πραγματοποιείται σε ένα μοναδικό βήμα, χρησιμοποιώντας ένα μεταλλο-ενεργοποιούμενο πυρηνόφιλο μόριο H_2O ή ιόν υδροξειδίου. Δ. Τα αμινοξέα που συντονίζουν τα μεταλλικά ιόντα (ασπαράγινες, ασπαρτικά και ιστιδίνες) είναι καλά συντηρημένα μεταξύ των μελών της οικογένειας PPP. [69] [10] [50]



ενός μορίου H_2O για την αντίδραση αποφωσφορυλίωσης. Αντιθέτως, η οικογένεια FCP χρησιμοποιεί έναν μηχανισμό κατάλυσης βασισμένο σε ένα κατάλοιπο Asp.

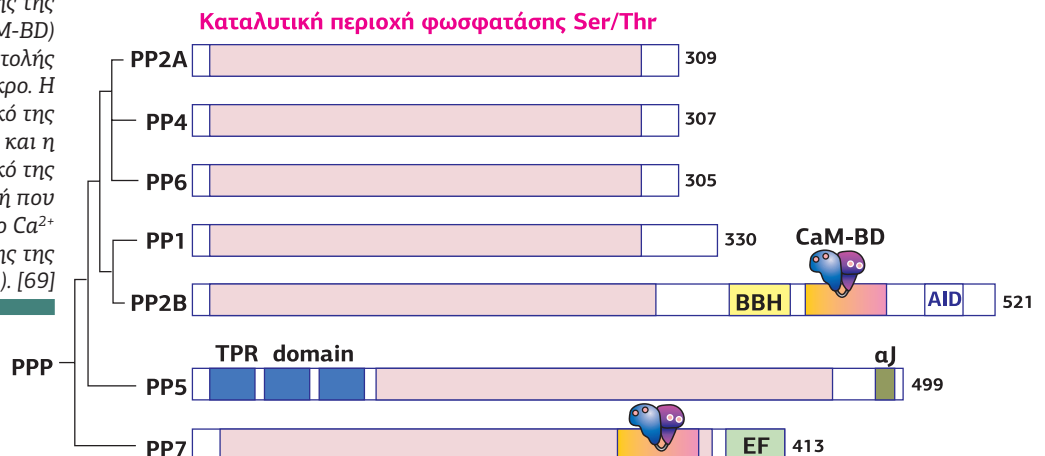
Η λειτουργική πολυπλοκότητα των φωσφατάσων Ser/Thr έγινε εμφανής από την ανακάλυψη εξειδικευμένων αναστολέων, όπως η κυκλοσπορίνη A, εξειδικευμένος αναστολέας της PP2B (καλσινευρίνης) που χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικός παράγοντας έπειτα από μεταμόσχευση οργάνου, και το οκαδικό οξύ, ένας προωθητής όγκων, ισχυρός αναστολέας της PP1 και PP2A.

Δομή της καταλυτικής υπομονάδας των PPPs

Η δομή των καταλυτικών υπομονάδων των PPPs παρουσιάζει μια κοινή αρχιτεκτονική. Οι καταλυτικές υπομονάδες αποτελούνται από μια κεντρική περιοχή β-sandwich που περιβάλλεται από τη μία πλευρά από επτά α-έλικες και από την άλλη από μια υποπεριοχή που περιέχει τρεις α-έλικες και τρεις β-κλώνους. Επίσης, δύο μεταλλικά ιόντα βρίσκονται στο κέντρο της καταλυτικής περιοχής. Τα δύο αυτά μεταλλικά ιόντα (Mn^{2+}/Fe^{2+}) συντονίζουν τρεις His, δύο Asp και μία Asn. Τα κατάλοιπα αυτά είναι καλά συντηρημένα σε όλα τα μέλη της οικογένειας PPP, προτείνοντας έναν κοινό μηχανισμό για την αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης. Τα δύο μεταλλικά ιόντα συνδέονται και

Εικόνα 7.50**Ταξινόμηση και σχηματική αναπαράσταση της δομής των PPPs.**

Εκτός από την κοινή καταλυτική περιοχή που μοιράζονται τα μέλη της οικογένειας PPP, ορισμένες PPPs περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης που τους προσδίδουν ιδιότητες διακριτές της καταλυτικής τους δράσης. Η καταλυτική υπομονάδα της PP2B (καλσινευρίνη A ή CNA) περιέχει μια περιοχή σύνδεσης της CnB (BBH), μια περιοχή σύνδεσης της Ca^{2+} -καλμοδουλίνης (CaM-BD) και μια περιοχή αυτοαναστολής (AID) στο COOH-τελικό άκρο. Η PP5 περιέχει στο NH_2 -τελικό της άκρο τρεις περιοχές TPR και η PP7 έχει στο COOH-τελικό της άκρο μια EF-hand περιοχή που της προσδίδει εναισθησία στο Ca^{2+} και μια περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης (CaM-BD). [69]



ενεργοποιούν ένα μόριο H_2O , το οποίο ξεκινά μια πυρηνόφιλη προσβολή στο άτομο του φωσφόρου. Τρία ρηκά επιφανειακά αυλάκια συγκλίνουν στο καταλυτικό κέντρο σχηματίζοντας ένα χαρακτηριστικό σχήμα Y στην επιφάνεια (**Εικόνα 7.49**).

Παρά την κοινή δομή τους, ορισμένα μέλη της οικογένειας PPP περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης που τους προσδίδουν ιδιότητες διακριτές της καταλυτικής τους δράσης. Για παράδειγμα, η **PP7** έχει στο $COOH$ -τελικό της άκρο μια EF-hand περιοχή που της προσδίδει ευαισθησία στο Ca^{2+} και μια περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης. Η **PP5** περιέχει στο NH_2 -τελικό της άκρο τρεις περιοχές TPR, που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Η καταλυτική υπομονάδα της **PP2B** (καλσινευρίνη A ή CNA) περιέχει μια περιοχή σύνδεσης Ca^{2+} -καλμοδουλίνης που επιτρέπει το ένζυμο να ενεργοποιείται από το Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, καθώς επίσης και μια περιοχή αυτοαναστολής (AID) - ψευδοϋποστρώματος στην άκρη της $COOH$ -τελικής περιοχής (**Εικόνα 7.50**).

6.2 | Οι ρυθμιστικές υπομονάδες των PPPs

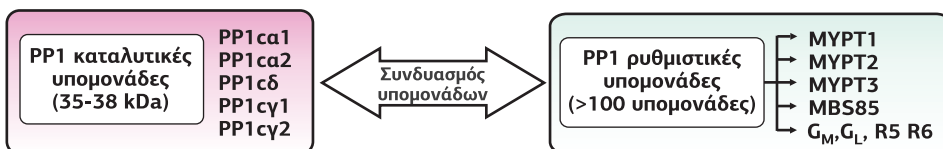
Χαρακτηριστικό ρόλο στη δράση των πρωτεϊνικών φωσφατασών της οικογένειας PPP παίζουν οι συμπληρωματικές υπομονάδες με ρυθμιστικό ρόλο ή/και ρόλο υποκυτταρικού εντοπισμού. Οι ρυθμιστικές υπομονάδες εξειδικεύουν σε μεγάλο βαθμό την επιλεκτικότητα και τον εντοπισμό των φωσφατασών PPPs.

Στα θηλαστικά κωδικοποιούνται 5 ισομορφές της καταλυτικής υπομονάδας της **PP1**, 35-38 kDa, οι οποίες αλληλεπιδρούν με ≥ 100 ρυθμιστικές υπομονάδες. Χαρακτηριστικές ρυθμιστικές υπομονάδες των PP1 είναι οι MYPT1 (Myosin Phosphatase Targeting subunit 1), MYPT2, MYPT3, MBS85 (Myosin Binding Subunit 85 kDa) που στοχοποιούν την PP1cδ στη μυοσίνη, οι G_M , G_L , R5, R6 που στοχοποιούν την PP1 στο γλυκογόνο και πολλές άλλες (βλ. **Πίνακας 8.1**). Τα ολοένζυμα **PP2A** περιλαμβάνουν καταλυτικές υπομονάδες PP2Aα ή PP2Aβ, 36 kDa, οι οποίες δημιουργούν διμερή κυρίως με τις PR65α ή PR65β, 65 kDa. Τριμερή PP2A σχηματίζονται από το σύμπλεγμα PP2Ac-PR65, το οποίο αλληλεπιδρά με μία από τις 21 πρόσθετες ρυθμιστικές υπομονάδες. Η **PP2B** είναι ένα διμερές που σχημα-

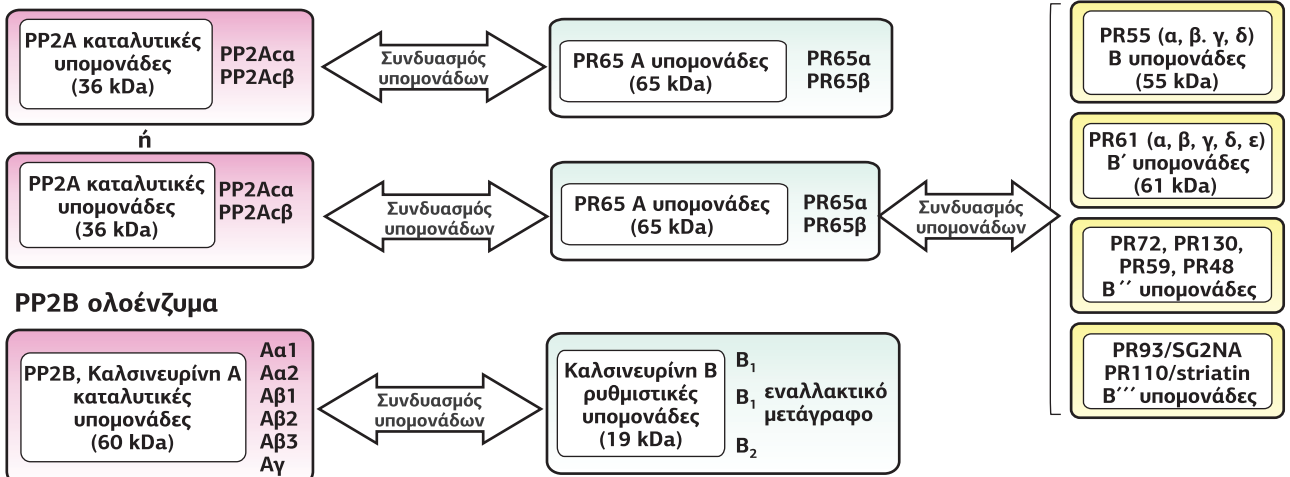
Εικόνα 7.51

Δομή των ολοενζύμων των πρωτεϊνικών φωσφατασών PP1, PP2A και PP2B. Το κάθε ολοένζυμο αποτελείται από μια καταλυτική και περισσότερες από μία ρυθμιστικές υπομονάδες. Η πολυπλοκότητα και η εξειδίκευση δημιουργούνται από τη σύνδεση των ισομορφών της καταλυτικής υπομονάδας σε διαφορετικές ρυθμιστικές υπομονάδες. [6]

PP1 ολοένζυμα



PP2A ολοένζυμα



τίζεται από μία από τις 6 ισομορφές της καταλυτικής υπομονάδας καλσινευρίνης A (CNA), 60 kDa, η οποία συνδέεται με μία από τις 3 ισομορφές της ρυθμιστικής υπομονάδας καλσινευρίνης B, 19 kDa (**Εικόνα 7.51**).

Ο σχηματισμός αυτών των συμπλόκων μετατρέπει τις καταλυτικές υπομονάδες των PPPs σε πολλές διαφορετικές μορφές, οι οποίες έχουν διακριτές ειδικότητες υποστρώματος, περιορισμένη υποκυτταρική τοποθεσία και ποικίλη ρύθμιση. Αυτό επιτρέπει πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες που εξαρτώνται από τις PPPs να ελέγχονται από ανεξάρτητους μηχανισμούς. Για παράδειγμα, σε φυσιολογικές συνθήκες η PP1c συνδέεται με μια G-υπομονάδα (G_M στους μυς), η οποία έχει μεγάλη συγγένεια για το γλυκογόνο. Αυτό εξασφαλίζει ότι η ελεύθερη μορφή της βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Σε περίπτωση σοβαρής μείωσης της συγκέντρωσης του γλυκογόνου ή σε περίπτωση αποσύνδεσης της PP1c λόγω φωσφορυλίωσης της G_M , διαλυτές ανασταλτικές πρωτεΐνες εξασφαλίζουν ότι η συγκέντρωση της PP1c στο κυτταρόπλασμα παραμένει χαμηλή. Με αυτόν τον τρόπο η PP1 εμποδίζεται να δρα αποφωσφορυλιώνοντας ανεξέλεγκτα πρωτεϊνικούς της στόχους. Η σύνδεσή της με συγκεκριμένες πρωτεΐνες τοποθετημένες σε υποκυτταρικές θέσεις περιορίζει τα διαθέσιμα υποστρώματα. Τα υπόλοιπα τρία ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, η κινάση της φωσφορυλάσης, η φωσφορυλάση και η συνθάση του γλυκογόνου, είναι επίσης συνδεδεμένα στο γλυκογόνο και αποτελούν υποστρώματα της φωσφατάσης PP1 (**Εικόνα 7.52**).

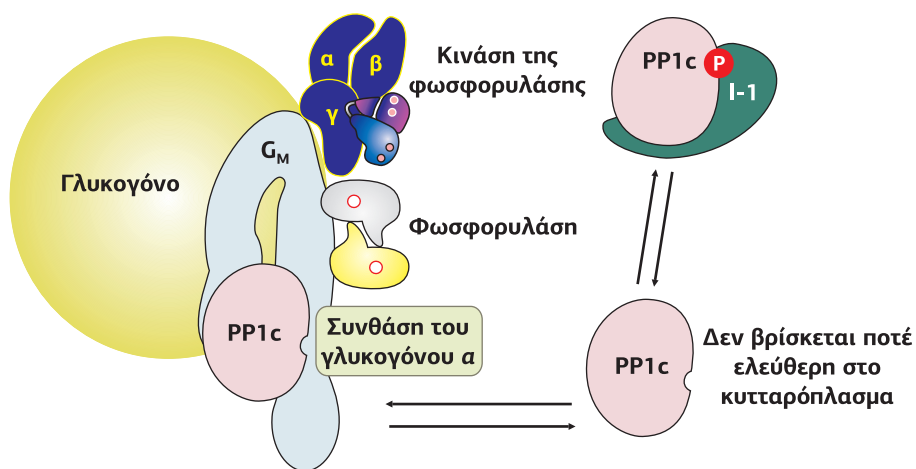
Εικόνα 7.52

Φωσφατάσες Ser/Thr, ρυθμιστικές υπομονάδες που στοχοποιούν το ένζυμο σε συγκεκριμένα υποστρώματα και ανασταλτικές πρωτεΐνες.

Η PP1c που συμμετέχει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου δεν βρίσκεται ποτέ σε διαλυτή μορφή.

Συνδέεται είτε στη ρυθμιστική υπομονάδα G_M (στον μυς), η οποία δημιουργεί το σύμπλεγμα PP1G με το γλυκογόνο, είτε

συνδέεται με την ανασταλτική υπομονάδα I-1 που εμποδίζει την ανεξέλεγκτη αποφωσφορυλίωση άλλων υποστρωμάτων.

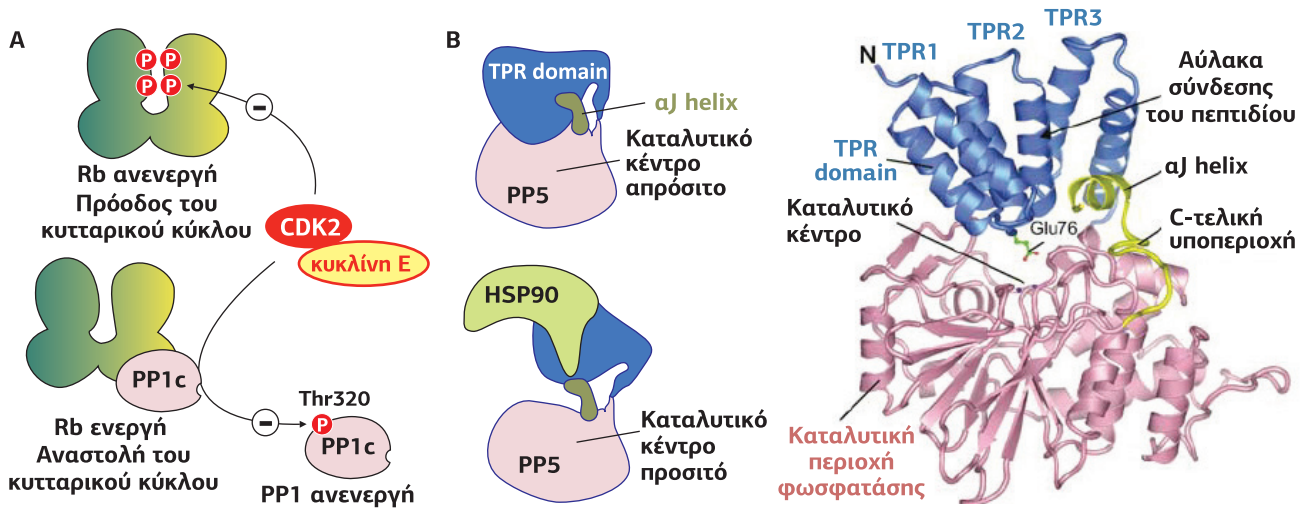


6.3

Ρύθμιση των πρωτεϊνικών φωσφατάσων Ser/Thr

Καθώς οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες είναι ενεργά μέλη της σηματοδοτικής διαδικασίας, η δράση τους ρυθμίζεται από ποικίλους μηχανισμούς:

- 1. Φωσφορυλίωση καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων.** Ως συνέπεια της φωσφορυλίωσης μπορεί να αλλάξει η σύνθεση των υπομονάδων, η καταλυτική δράση και ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φωσφατάσης. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου η PP1c διατηρεί αποφωσφορυλιωμένη την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο. Το σύμπλοκο κυκλίνη E/CDK2 διευκολύνει τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S φωσφορυλιώνοντας αφενός τη Thr320 του COOH-τελικού άκρου της PP1c, απενεργοποιώντας τη φωσφατάση και αφετέρου την πρωτεΐνη Rb, η οποία στη φωσφορυλιωμένη της μορφή καθίσταται ανενεργή (**Εικόνα 7.53A**).
- 2. Υποκυτταρικός εντοπισμός:** Η εξειδίκευση της φωσφατάσης επιτυγχάνεται εν μέρει και με τον εντοπισμό της σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις, όπου βρίσκεται το υπόστρωμα. Με τη βοήθεια της ρυθμιστικής υπομονάδας, η πρωτεϊνική φωσφατάση μπορεί να οδηγηθεί σε ευδιάκριτες



υποκυτταρικές περιοχές στις οποίες εντοπίζονται επίσης και τα υποστρώματα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (βλ. **Εικόνα 7.54**).

- Εξειδικευμένοι πρωτεϊνικοί αναστολείς:** Υπάρχουν εξειδικευμένοι πρωτεϊνικοί αναστολείς, οι οποίοι μπορούν να ελέγξουν τη δράση των φωσφατάσων Ser/Thr. Αυτοί οι αναστολείς υπόκεινται και οι ίδιοι σε ρύθμιση, π.χ. με φωσφορύνση (βλ. **Εικόνα 7.58**).
- Ρύθμιση μέσω ενδομοριακής αλληλεπίδρασης ρυθμιστικών περιοχών.** Η PP5 εκφράζεται ευρέως και συμμετέχει σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από το stress, στα οποία συμμετέχουν οι κινάσες p38 και JNK. Επίσης, συνδέεται στην $G_{12/13}$ και συμμετέχει στις αποκρίσεις των GPCRs. Η δραστηριότητα της PP5 σε κατάσταση πρεμίας είναι εξαιρετικά χαμηλή. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις PP1, PP2A και PP4, οι οποίες υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα ως διμερή ή τριμερή, με την καταλυτική υπομονάδα να συνδέεται σε μια ρυθμιστική, η PP5 είναι μονομερής και η ρύθμισή της οφείλεται στην παρουσία τριών επαναλαμβανόμενων μοτίβων TPR (Tetratricopeptide Repeat) στο NH₂-τελικό της άκρο. Η περιοχή TPR μπλοκάρει την πρόσβαση στην καταλυτική σχισμή και αυτή η ανασταλτική διαμόρφωση σταθεροποιείται από την περιοχή αλφά-έλικας του COOH-τελικού άκρου. Η αυτοαναστολή αίρεται από τις G_{12} υπομονάδες, την HSP90 ή το αραχιδονικό οξύ, τα οποία επαναπροσανατολίζουν την περιοχή των επαναλαμβανόμενων μοτίβων TPR και διακόπτουν την επαφή της με την καταλυτική περιοχή (**Εικόνα 7.53B**).

Εικόνα 7.53
Ρύθμιση φωσφατάσων Ser/Thr μέσω φωσφορύνσης ή ενδομοριακής αλληλεπίδρασης.

A. Η φωσφορύνση από την CDK2 COOH-τελικού καταλοίπουν του Thr320 της PP1c αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή της PP1c εμποδίζει την αποφωσφορύνση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb). Κατά συνέπεια, η Rb παραμένει φωσφορυνωμένη από την CDK2 διευκολύνοντας την προώθηση του κυτταρικού κύκλου. **B.** Δομή και μηχανισμός ρύθμισης της φωσφατάσης PP5. Η δομή της PP5 αποκαλύπτει έναν μηχανισμό αυτοαναστολής. Η COOH-τελική αλφά έλικα (λαδί) της PP5 συνδέεται με την NH₂-τελική περιοχή TPR (μπλε) και ενισχύει σημαντικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών επαναλαμβανόμενων TPR περιοχών και της περιοχής φωσφατάσης (ροζ). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διατηρούν την PP5 σε μια κατάσταση αναστολής. [78] [69] [25]

6.4 | Πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1)

Η PP1 είναι μια κύρια ομάδα ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών φωσφατάσων Ser/Thr που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη μυϊκή σύσπαση, τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, την πρωτεϊνοσύνθεση, τη μεταγραφή και τη νευρική σηματοδότηση. Το γονιδίωμα των ευκαρυωτών περιέχει έως 8 γονίδια που κωδικοποιούν καταλυτικές υπομονάδες PP1c (35-38 kDa), οι οποίες αλληλεπιδρούν με περισσότερες από 100 ρυθμιστικές υπομονάδες. Καθώς οι στόχοι της PP1 είναι πολλαπλοί, οι ρυθμιστικές υπομονάδες εξειδικεύουν τον στόχο και αγκυροβολούν το ένζυμο σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις (**Πίνακας 7.2, Εικόνα 7.54**).

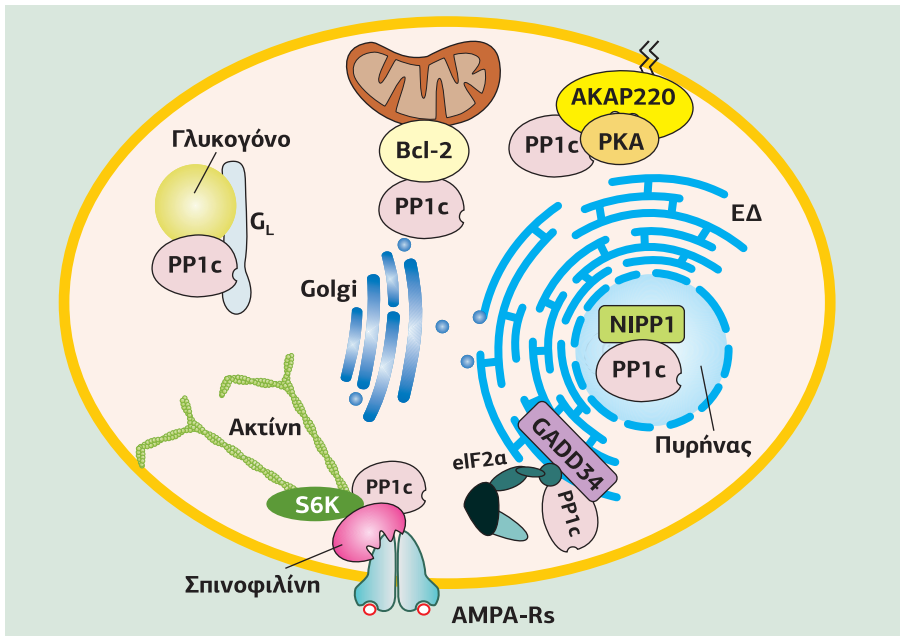
Οι G_M (στοις μύς), G_L (στο ήπαρ), R5 και R6, οι οποίες περιέχουν θέσεις σύνδεσης με το γλυκογόνο, στοχοποιούν την PP1c στο γλυκογόνο, ενώ η M_{110} (επίσης γνωστή και ως MYPT1, MBS και M130) και η MYPT2 συνδέουν την PP1c στην ακτίνη/μυοσίνη.

Πίνακας 7.2

Παραδείγματα ρυθμιστικών υπομονάδων που στοχοποιούν την PP1c σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις ή σε εξειδικευμένα υποστρώματα.

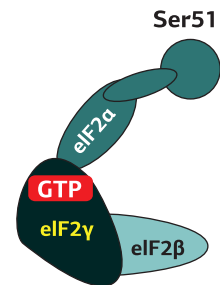
Στόχευση στο γλυκογόνο	G_M , μεταβολισμός γλυκογόνου, μυς G_L , μεταβολισμός γλυκογόνου, ήπαρ R5 , μεταβολισμός γλυκογόνου, ήπαρ/μυς R6 , μεταβολισμός γλυκογόνου, ευρεία κατανομή
Στόχευση σε μυοσίνη/ακτίνη	M₁₁₀ , λείοι μυς, χάλαση MYPT2 , σκελετικοί μυς MBS85 , κυτταροσκελετός ακτίνης, ευρεία κατανομή
Στόχευση σε σωμάτια συναρμογής (spliceosome)/RNA	NIPP1 , μάτισμα pre-mRNA, πυρήνας PSF1 , μάτισμα pre-mRNA, πυρήνας p99 , επεξεργασία του RNA, πυρήνας Hoxl.1 , σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, πυρήνας HCF , μεταγραφή, κυτταρικός κύκλος, πυρήνας
Στόχευση σε πρωτεασώματα	Sds22 , έξοδος από τη μίτωση
Στόχευση στην πυρηνική μεμβράνη	AKAP149 , αποφωσφορυλίωση της tamin type-2
Στόχευση στην πλασματική μεμβράνη και στον κυτταροσκελετό	Neurabin-1 , αύξηση νευριτών Σπινοφιλίνη , γλουταμινεργική σηματοδότηση NF-L , συναπτική διαβίβαση AKAP220 , συντονισμός σηματοδότησης PKA/PP1 Yotiao , γλουταμινεργική σηματοδότηση (NMDA-R) Υποδοχείς ρυανοδίνης , δραστηριότητα καναλιών Ca ²⁺ Συμμεταφορέας NKCC1 , μεταφορά ιόντων Cl ⁻ , επιθήλιο
Στόχευση στο ενδοπλασματικό δίκτυο	RPL5 , ριβοσωμικές πρωτεΐνες, πρωτεϊνοσύνθεση RIPP , ριβοσωμικοί αναστολείς, πρωτεϊνοσύνθεση GADD34 , πρωτεϊνοσύνθεση
Στόχευση σε κεντροσώματα	AKAP350 , λειτουργία κεντροσώματος Nek2 , διαχωρισμός κεντροσωμάτων
Στόχευση σε μικροσωληνίσκους	Tau , σταθερότητα μικροσωληνίσκων, νευρώνες
Στόχευση στα μιτοχόνδρια	Bcl-2 , αποφωσφορυλίωση της Bad
Στόχευση σε ειδικά υποστρώματα	pRb , αναστολή του κυτταρικού κύκλου PRIP , PLC, σηματοδότηση IP ₃ PFK , γλυκόλυση
Ρυθμιστές της δραστηριότητας	I1, I2, I3 , αναστολή της PP1c CPI-17 , αναστολή της PP1c, λείοι μυς

Πολλές AKAPs κρατούν την PKA και την PP1c σε επαφή, τοποθετώντας τις σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις. Για παράδειγμα, η Yotiao συνδέει την PKA και την PP1c με τους υποδοχείς NMDA στη δομή της μετασυναπτικής πυκνότητας (PSD) (βλ. **Εικόνα 7.11**). Η AKAP350 είναι μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς που ομαδοποιεί πολλές πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, συμπεριλαμβανομένης και της PP1c, στο κεντρόσωμα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (βλ. **Εικόνα 7.11**), και στη συσκευή Golgi κατά τη μεσόφαση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως αυτή της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος pRb, η ίδια η ρυθμιστική υπομονάδα είναι το



Εικόνα 7.54

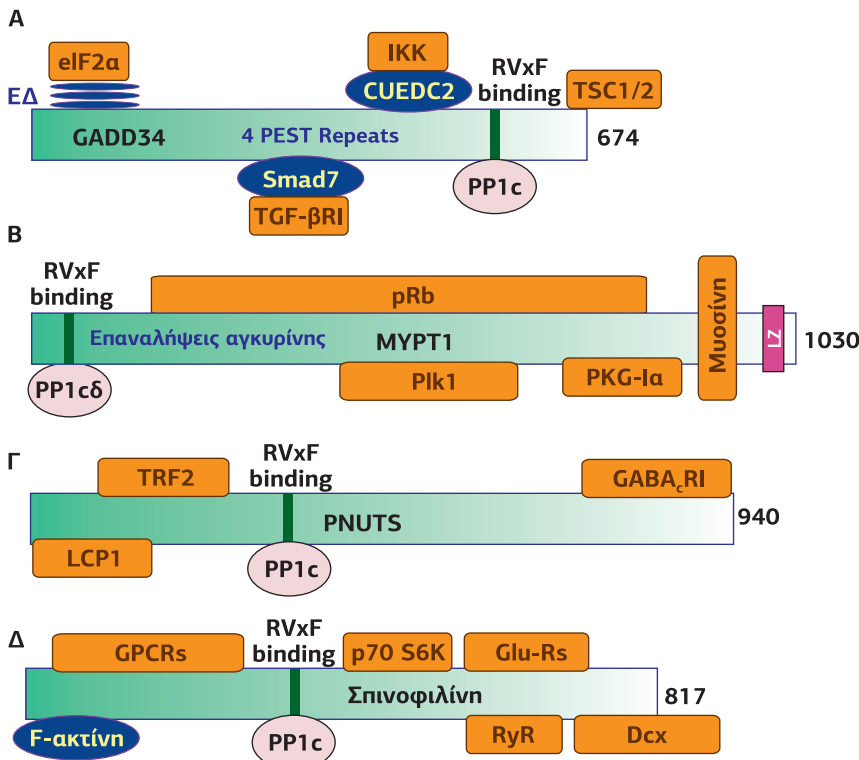
Οι ρυθμιστικές υπομονάδες συνδέουν την PP1c σε εξειδικευμένα υποστρώματα (π.χ. η G_L στο γλυκογόνο) ή τις τοποθετούν σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα (η Bcl2/BclX στα μιτοχόνδρια, η NIPP1 στον πυρήνα και η AKAP220 στην πλασματική μεμβράνη). [25]



Ο **eIF2** (eukaryotic Initiation Factor 2) είναι ένας ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης. Είναι μια GTPάση που μεσολαβεί στη σύνδεση του εναρκτήριου tRNA^{Met} στο ριβόσωμα στη GTP-συνδεδεμένη της μορφή. Ο eIF2 είναι ετεροτριμερής, αποτελούμενος από τις υπομονάδες α- (η ρυθμιστική υπομονάδα που αποτελεί τον κύριο στόχο φωσφορυλίωσης, στη Ser51), β- (υπεύθυνος για την ομαδοποίηση του συμπλόκου και την αλληλεπίδραση με τον eIF2B, έναν παράγοντα GEF) και γ- (θεωρείται η κύρια θέση σύνδεσης του GTP/GDP).

υπόστρωμα της PP1c. Η Rb αποφωσφορυλιώνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου από την PP1c, μια διαδικασία στην οποία οφείλεται η ιδιότητα που εμφανίζει η PP1 στην καταστολή της ανάπτυξης (**Εικόνα 7.53A**).

Η **GADD34** (Growth Arrest and DNA Damage-induced transcript 34, 75,5 kDa) στοχοποιεί την PP1c στο ενδοπλασματικό δίκτυο και προωθεί την PP1-εξαρτώμενη αποφωσφορυλίωση της α-υπομονάδας του eIF2. Η GADD34 μέσω των συνδεδεμένων πρωτεϊνών Smad7 και CUEDC2 (CUE Domain Containing 2) συνδέει την PP1 στα υποστρώματά της, τον υποδοχέα του TGF-β και την I-κΒ κινάση (IKK), αντίστοιχα. Επιπλέον, περιέχει μια κεντρική περιοχή με 4 αλληλουχίες PEST και θέσεις σύνδεσης για τις GAP πρωτεΐνες TSC1 και TSC2, που αποτελούν επίσης υποστρώματα της PP1 (**Εικόνα 7.55A**).

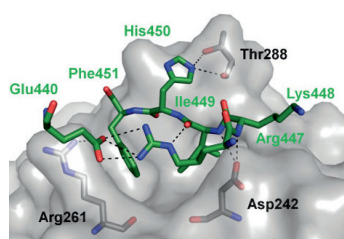
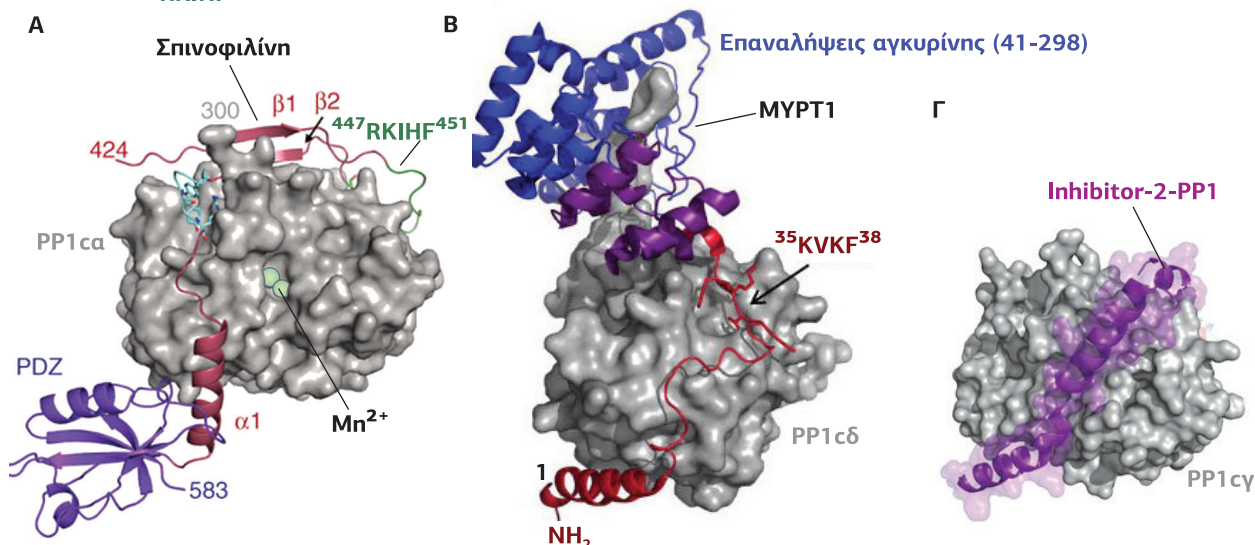


Εικόνα 7.55

Χαρακτηριστικές ρυθμιστικές υπομονάδες της PP1 και η εξειδίκευση των υποστρωμάτων. Οι GADD34, MYPT1, PNUTS και σπινοφιλίνη κατευθύνουν την PP1 σε υποστρώματά της είτε άμεσα (διακρίνονται με πορτοκαλί) είτε έμμεσα μέσω πρωτεϊνών προσαρμογής (διακρίνονται με μπλε σκούρο: CUEDC2, Smad7). [4]

Εικόνα 7.56**Αναπαράσταση της σύνδεσης της σπινοφιλίνης, της MYPT1 και του αναστολέα I-2 με την καταλυτική υπομονάδα PP1c.**

A. Αναπαράσταση της spinophilin424-583, όπου διακρίνεται η περιοχή σύνδεσης με την PP1c, με το μοτίβο ⁴⁴⁷RKIH⁴⁵¹, και η περιοχή PDZ (μωβ). Η PP1c(7-330) αναπαρίσταται ως τριδιάστατη επιφάνεια με γκρι. Τα δύο ιόντα Mn^{2+} (πράσινες σφαίρες) σηματοδοτούν το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα κατάλοιπα της spinophilin που αλληλεπιδρούν με τη θήκη σύνδεσης του μοτίβου RVxFF αναπαριστώνται με πράσινο, ενώ εκείνα που αλληλεπιδρούν με την COOH-τελική αύλακα αναπαριστώνται με γαλάζιο. **B.** Η κρυσταλλική δομή της MYPT1(1-299) συνδεδεμένη με την PP1cδ. **Γ.** Η κρυσταλλική δομή του Inhibitor-2-PP1cγ. [60] [4] [63]

⁴⁴⁷RKIH⁴⁵¹

Ενδογενείς αναστολείς των PP1

Η δραστηριότητα φωσφατάσης της PP1c ρυθμίζεται από έναν αριθμό ενδογενών ανασταλτικών πρωτεϊνών, όπως ο αναστολέας-1 (I-1, inhibitor-1), ο αναστολέας-2 (I-2, inhibitor-2), ο CPI-17 (C-kinase-activated PP1 inhibitor, 17 kDa) και ο DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa). Η εξειδικευμένη αναστολή της PP1c από τον I-1 και τον DARPP-32 απαιτεί φωσφορυλίωση μιας καλά συντηρημένης Thr στο NH₂-τελικό άκρο των αναστολέων, η οποία συνδέεται στο ενεργό κέντρο της PP1c. Παρά την καλά συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία, οι φωσφατάσες PP2A και PP2B δεν αναστέλλονται από τους I-1 και I-2 και αυτό αποτελεί μια βάση για την ταξινόμησή τους σε φωσφατάσες τύπου 1 (PP1) και τύπου 2 (PP2). Κατ' αναλογία με τους αναστολείς της PP1 οι ενδογενείς αναστολείς της PP2A ονομάζονται I-1PP2A και I-2PP2A.

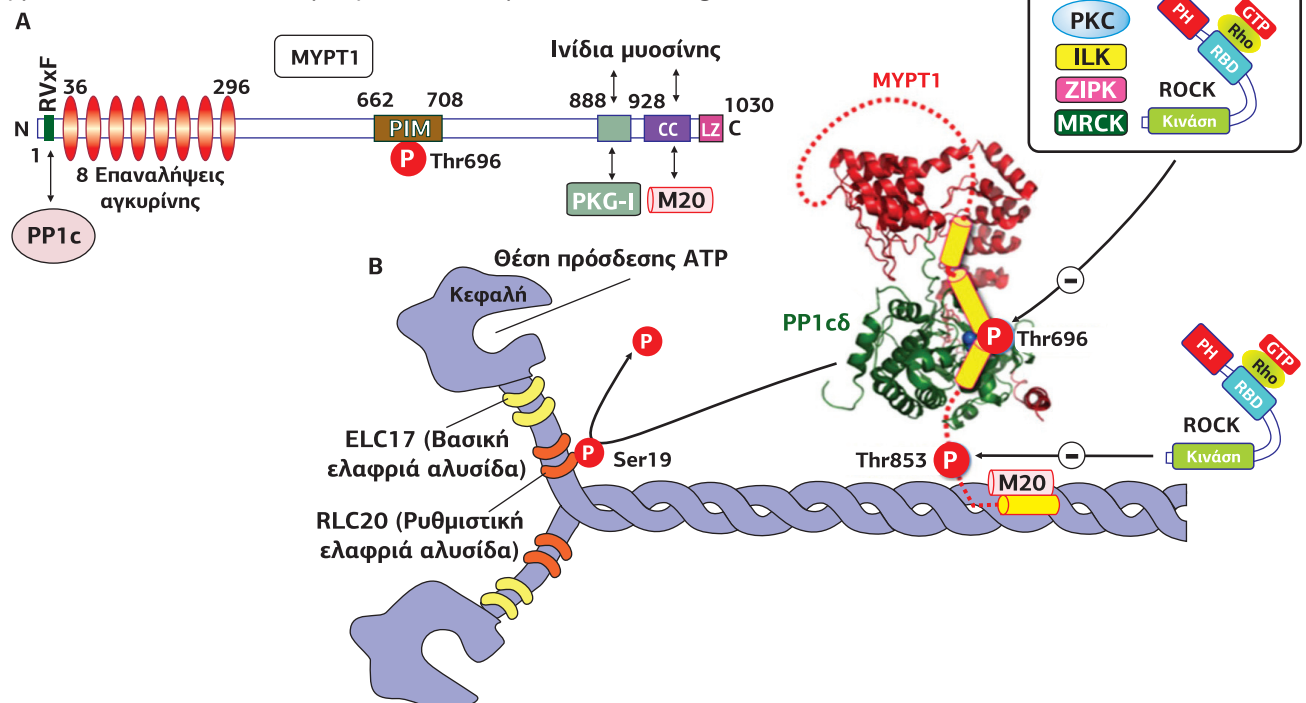
Ο ρόλος της PP1c – MYPT1

Η φωσφορυλίωση των ρυθμιστικών ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης II (MLC20 ή RLC, Myosin II regulatory Light Chains, 20 kDa) από την κινάση MLCK καθορίζει την κινητήρια δραστηριότητα της μυοσίνης, τη συγγένεια για τα ινίδια της ακτίνης και την αυτοσυναρμολόγησή της στα κύτταρα, οδηγώντας στη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων. Το ολοένζυμο φωσφατάση της MLC20 (MLCP, MLC20 Phosphatase) αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα της PP1 (PP1cδ), τη ρυθμιστική υπομονάδα MYPT1 και μια συμπληρωματική υπομονάδα M20. Η MLCP αποφωσφορυλιώνει τη MLC και οδηγεί σε χάλαση.

Τα 300 NH₂-τελικά κατάλοιπα της MYPT1 δημιουργούν, όπως είδαμε, μια πλατφόρμα για την αλλοστερική αλληλεπίδραση με την PP1c. Αυτή η αλληλεπίδραση καθορίζει την εξειδίκευση του υποστρώματος και την ευαισθησία για την ενδογενή ανασταλτική πρωτεΐνη CPI-17. Η MYPT1 περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης που ρυθμίζουν θετικά ή αρνητικά τη δραστηριότητα της MLCP. Η ROCK φωσφορυλιώνει την MYPT1 στη Thr696 και στη Thr853, και αυτή η φωσφορυλίωση καταστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης. Επιπλέον, κινάσες, όπως η ZIPK (Zipper Interacting Protein Kinase), η ILK (Integrin-Linked Kinase) και η MRCK (Myotonic dystrophy kinase Related Cdc42 binding Kinase), μπορούν να φωσφορυλιώσουν την Thr696 και να αναστείλουν τη δραστηριότητα της MLCP. Η Thr696 βρίσκεται στο ανασταλτικό μοτίβο PIM (Phosphatase Inhibiting Motif).

Εικόνα 7.57

Αναπαράσταση της σύνδεσης της PP1c-MYPT1 στη μυοσίνη. Α. Δομή της MYPT1. Β. Η φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης MLCP αποτελείται από τρεις υπομονάδες: την καταλυτική υπομονάδα PP1c και δύο ρυθμιστικές, την MYPT1 και την M20. Η MYPT1 συνδέει το σύμπλοκο στη μυοσίνη οδηγώντας στην αποφωσφορυλίωση της MLC. Η φωσφορυλίωση της MYPT1 στις Thr696 και Thr853 από τις κινάσες ZIPK, ILK, ROCK και MRCK αναστέλλει τη δράση της φωσφατάσης. [38]

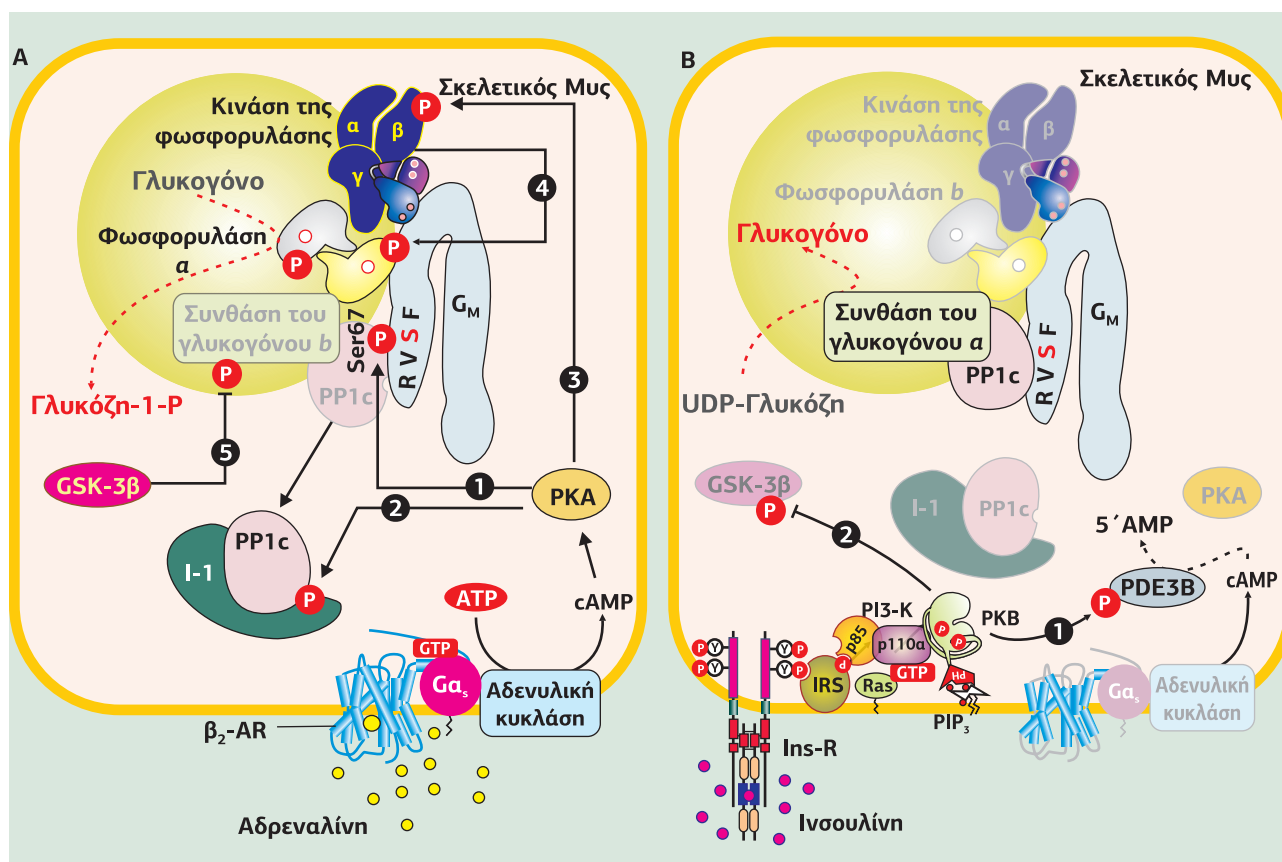


Η ρυθμιστική υπομονάδα G_M έχει δύο θέσεις φωσφορυλίωσης, τη θέση 1 (Ser48), η οποία φωσφορυλιώνεται από την ISPK και ενεργοποιείται η PP1c, και τη θέση 2 (Ser67), η οποία φωσφορυλιώνεται από την PKA και μειώνεται 4 φορές η σύνδεση της PP1c με την G_M .

Πρωτεϊνική φωσφατάση I και ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στους μυς

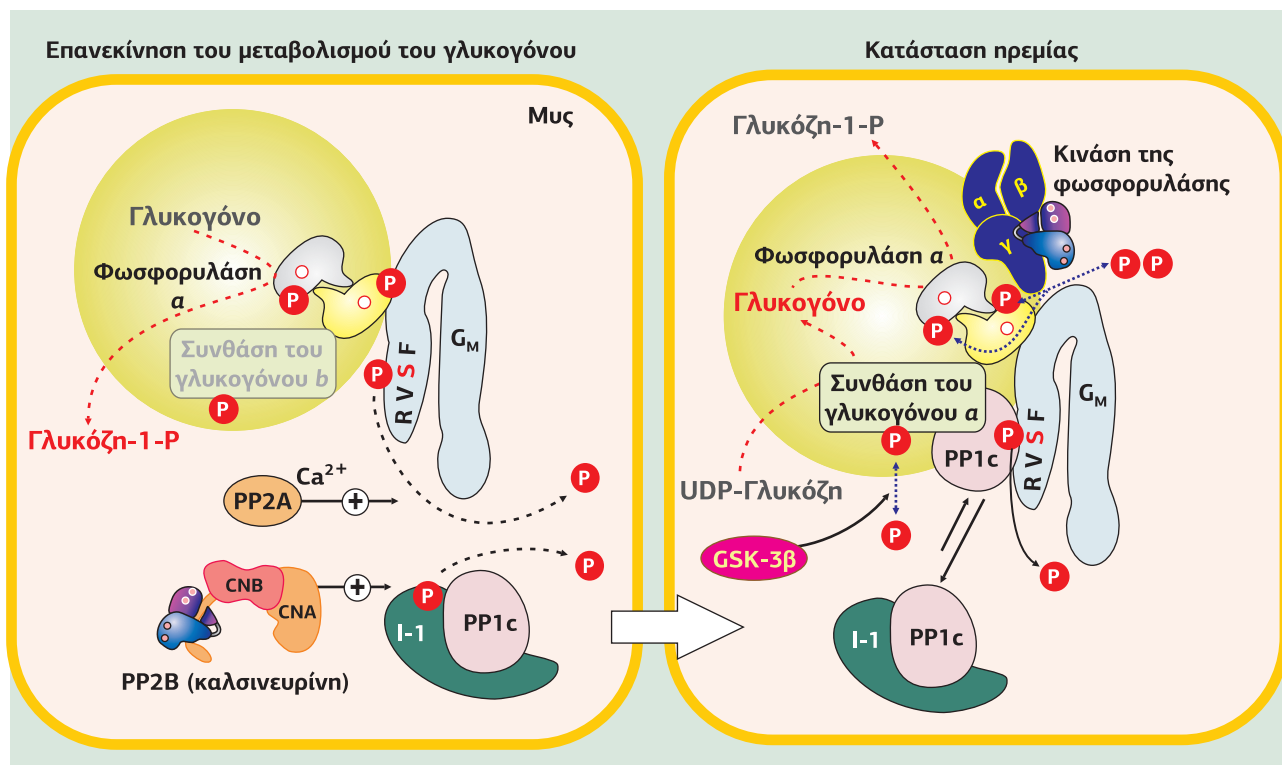
Η PP1c παίζει έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Τα ορμονικά σήματα που οδηγούν σε ταυτόχρονη ενεργοποίηση της PKA και της κινάσης της φωσφορυλάσης ξεκινούν και την απενεργοποίηση της PP1. Η αναστολή που προκύπτει από την αποφωσφορυλίωση και η διέγερση με φωσφορυλίωση του ενζύμου κλειδί στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου διαβεβαιώνουν ότι η γρήγορη κινητοποίηση των αποθεμάτων γλυκογόνου στους μυς μπορεί να ακολουθήσει ένα ορμονικό σήμα.

Στον σκελετικό μυ η γλυκογονόλυση ενεργοποιείται από την αδρεναλίνη. Προκαλεί την παραγωγή cAMP και την ενεργοποίηση της PKA, η οποία οδηγεί σε μια σειρά φωσφορυλίσεων: Πρώτον, φωσφορυλιώνει την G_M οδηγώντας στην αποσύνδεση της PP1c από το σύμπλοκο G_M /



Εικόνα 7.58

Λήψη απόφασης για τη σύνθεση ή τον καταβολισμό του γλυκογόνου: οι αντίθετες δράσεις της αδρεναλίνης και της ινσουλίνης. Α. Η αδρεναλίνη οδηγεί στη γλυκογονόλυση μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού β_2 -AR/ G_s /αδενυλική κυκλάση/παραγωγή cAMP/ενεργοποίηση PKA. Η PKA φωσφορυλιώνει τη G_M στο μοτίβο σύνδεσης της PP1c (RVSF) προκαλώντας την αποσύνδεση της PP1c από το σύμπλοκο (1). Επίσης, φωσφορυλιώνει τον αναστολέα I-1, δημιουργώντας μια θέση ψευδοϋποστρώματος, στρατολογώντας πιο αποτελεσματικά την PP1c (2). Τελικά, η PKA φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (3), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (4). Με τη φωσφορυλίωση και αναστολή της συνθάσης του γλυκογόνου από τη GSK-3 β (5) η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη γλυκογονόλυση με απελευθέρωση 1-P-γλυκόζης. Β. Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου. Αυτό το πετυχαίνει απενεργοποιώντας τις προηγούμενες κινάσες. Η PKB φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη GSK-3 β (1), ενώ ενεργοποιεί την PDE του cAMP (2), μειώνοντας τα επίπεδα του cAMP. Με τις GSK-3 β και PKA ανενεργές, η PP1c κυριαρχεί στη σκηνή: απενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ενώ ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου. Η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη σύνθεση του γλυκογόνου.



PP1c. Δεύτερον, φωσφορυλιώνει τον αναστολέα I-1 δημιουργώντας μια θέση σύνδεσης ψευδοϋποστρώματος. Ως αποτέλεσμα, η PP1c συνδέεται με τον I-1 και είναι ανίκανη να αποφωσφορυλιώσει πρωτεΐνες που σχετίζονται με το γλυκογόνο. Τρίτον, φωσφορυλιώνει και διεγείρει την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Λόγω της απουσίας δραστηριότητας της PP1, η δραστηριότητα της κινάσης κυριαρχεί. Η κινάση της φωσφορυλάσης φωσφορυλιώνει αποτελεσματικά και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ενώ ταυτόχρονα η GSK-3β φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η γλυκογονόλυση, δηλαδή ο καταβολισμός του γλυκογόνου σε πολλά μόρια 1-P-γλυκόζης (**Εικόνα 7.58A**).

Η ινσουλίνη ενεργοποιεί την αντίστροφη αντίδραση. Μέσω του μονοπατιού PI3K/PKB φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση του cAMP PDE3B. Τα επίπεδα του cAMP μειώνονται καθώς και η δραστηριότητα της PKA, με αποτέλεσμα να κυριαρχεί η δράση της φωσφατάσης PP1, η κινάση της φωσφορυλάσης και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου απενεργοποιούνται, ενώ η συνθάση του γλυκογόνου αποφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη σύνθεση του γλυκογόνου (**Εικόνα 7.58B** και βλ. **Εικόνα 7.8**).

Για να γυρίσει ο διακόπτης από τη γλυκογονόλυση προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, η PP1c συνδέεται με τη ρυθμιστική της υπομονάδα G_M , καθώς οι PP2B ή PP2A αποφωσφορυλιώνουν την G_M και τον αναστολέα I-1. Αυτό αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, όπου οι φωσφατάσες γυρνούν πίσω τον διακόπτη (**Εικόνα 7.59**).

Πρωτεϊνική φωσφατάση I και ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ

Ο μηχανισμός που ελέγχει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης PP1 στο ήπαρ και στους μυς είναι διαφορετικός. Στο ήπαρ η δραστηριότητα της υπομονάδας G_L δεν ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Αντιθέτως, η αναστολή της δραστηριότητας της PP1c, που είναι απαραίτητη για την καταστολή της συνθάσης του γλυκογόνου, ασκείται από τη φωσφορυλιωμένη -ενεργή- μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Εικόνα 7.59

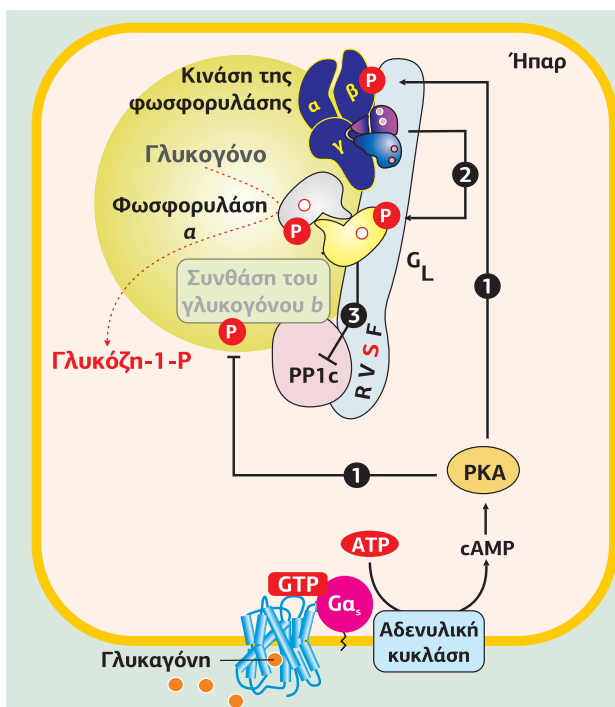
Μετατόπιση της ισορροπίας προς τον καταβολισμό του γλυκογόνου από τις φωσφατάσες PP2A και PP2B. Όταν η αδρεναλίνη απομακρύνεται, γίνεται επανεκκίνηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου μέσω της αποφωσφορυλίωσης της ρυθμιστικής G_M υπομονάδας από τις φωσφατάσες PP2A και PP2B (καλσινευρίνη). Η PP1c επανασυνδέεται στην G_M και ο μεταβολισμός του γλυκογόνου είναι και πάλι ευαίσθητος στην αδρεναλίνη και στην ινσουλίνη. Η PP1c μετακινείται ανάμεσα στην G_M και στον I-1 οδηγώντας σε χαμηλά επίπεδα απελευθέρωσης 1-P-γλυκόζης. [25]

Εικόνα 7.60

Ρύθμιση της γλυκογονόλυσης στο ήπαρ. Αλλοστερική αναστολή της PP1c από την ενεργοποιημένη φωσφορυλάση.

Στο ήπαρ η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και η PP1c συνδέονται στη ρυθμιστική υπομονάδα G_L (διαφορετική από την G_M των μυών). Η PKA φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, καθώς επίσης φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου (1). Στη συνέχεια, η κινάση της φωσφορυλάσης φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (2) η οποία αναστέλλει τη δράση της γειτονικής PP1c (3). Ο καταβολισμός του γλυκογόνου ξεκινά.

Αυτή δρα ως αλλοστερικός αναστολέας της PP1c σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο είναι δυνατή, επειδή η G_L συνδέει και τα δύο ένζυμα, την PP1c και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Εικόνα 7.60).



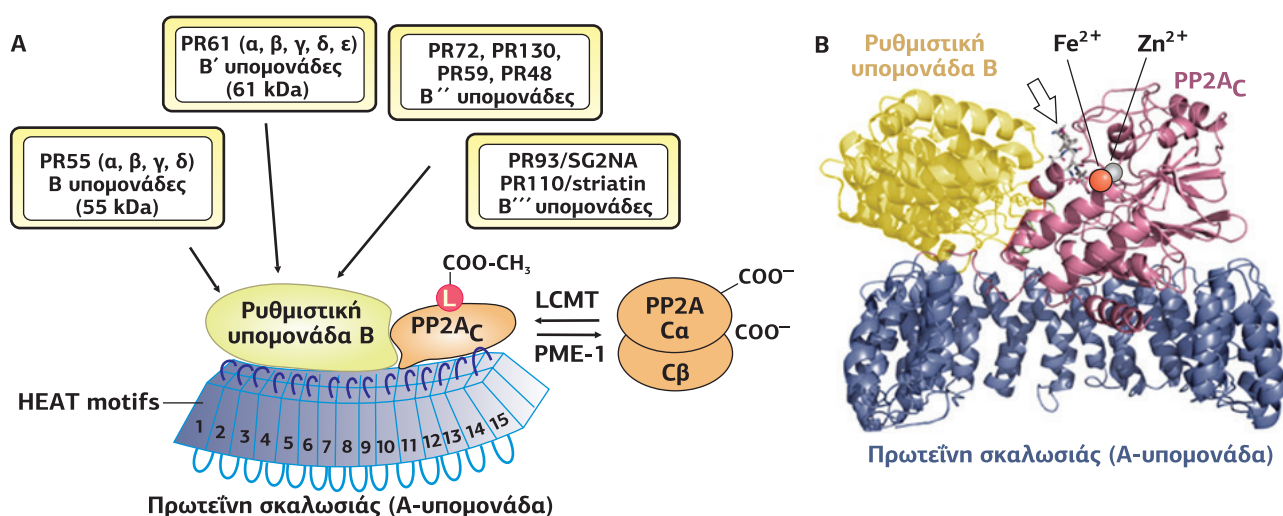
6.5

Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A)

Η PP2A είναι μια ομάδα φωσφατασών Ser/Thr που παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση, στη μεταγραφή και στη μετάφραση. Τα ένζυμα PP2A εμφανίζουν διπλή εξειδίκευση: ισχυρή δραστηριότητα σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Ser/Thr και ασθενέστερη σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr.

Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) ως ολοένζυμο αποτελείται από τρεις υπομονάδες που έχουν διαφορετικές λειτουργίες η καθεμία. Το μοριακό πλαίσιο παρέχεται από την υπομονάδα σκαλωσιάς **A ή PR65** (65 kDa), η οποία αποτελείται από 15 επαναλήψεις πλούσιες σε Leu (HEAT motifs), οι οποίες περιέχουν από 39 έως 41 αμινοξέα και είναι οργανωμένες σε μορφή άγκιστρου. Αυτές οι επαναλήψεις συνδέονται μεταξύ τους με βρόχους. Κάθε επανάληψη αποτελείται από δύο α-έλικες συνδεδεμένες μεταξύ τους επίσης με βρόχους, οι οποίοι παρέχουν μια βάση για να δεσμευθούν οι άλλες υπομονάδες. Οι βρόχοι 1-10 είναι υπεύθυνοι για τη σύνδεση μιας από τις ρυθμιστικές B υπομονάδες, οι οποίες κατατάσσονται σε τέσσερις οικογένειες (B, B', B'', B'''). Η οικογένεια B ή PR55 έχει τέσσερις ισομορφές (α, β, γ, δ), η οικογένεια B' ή RP61 έχει πέντε ισομορφές (α, β, γ, δ, ε), η B'' έχει τέσσερις ισομορφές (PR48, PR59, PR72 και PR130) και, τέλος, η οικογένεια B''' έχει δύο ισομορφές (PR93/SG2NA και PR110/striatin). Οι ρυθμιστικές B υπομονάδες: α. προσανατολίζουν την PP2A στα υποστρώματά της (π.χ. η PR55a την στρατολογεί στους μικροσωληνίσκους), β. καθορίζουν την εξειδίκευση του υποστρώματος (η PR72 συνδέει την PP2A στην κινάση της καζείνης και η PR55 στις CDKs), γ. εκφράζονται εξειδικευμένα σε συγκεκριμένους ιστούς και δ. μπορούν να δράσουν και ως υποδοχείς για δεύτερους διαβιβαστές (π.χ. τα κεραμίδια ενεργοποιούν την PP2A).

Υπάρχουν δύο καταλυτικές υπομονάδες PP2Ac (α και β) 36 kDa και μία από αυτές συνδέεται στους βρόχους 11-15. Η στρατολόγηση της καταλυτικής υπομονάδας στο ολοένζυμο εξαρτάται από την καρβοξυμεθυλίωση της Leu309, από την καρβοξυμεθυλοτρανσφεράση της λευκίνης (LCMT, leucine carboxymethyltransferase)

**Εικόνα 7.61**

Η πρωτεϊνική φωσφατάση PP2A και οι ρυθμιστικές της υπομονάδες.

Α. Το ολοένζυμο PP2A αποτελείται από τρεις υπομονάδες, Α (πρωτεΐνη σκαλωσιάς με 15 HEAT μοτίβα), Β (με ρυθμιστικό ρόλο) και C (καταλυτική υπομονάδα). Η στρατολόγηση της καταλυτικής υπομονάδας στο ολοένζυμο εξαρτάται από την καρβοξυμεθυλίωση της Leu309 από την LCMT, αντίδραση που αντιστρέφεται από την PME-1. Δεδομένου ότι υπάρχουν δύο ισομορφές της Α (α ή β), δύο ισομορφές της C (α ή β) και περίπου 20 διαφορετικές Β, οι συνδυασμοί που μπορεί να προκύψουν είναι πολλοί. [31] Β. Κρυσταλλική δομή του ολοενζύμου PP2A. Διακρίνονται η Α υπομονάδα σκαλωσιάς (με μπλε), η C καταλυτική υπομονάδα (με κόκκινο) και η Β56γ1 (με κίτρινο). Επιπλέον, διακρίνονται τα δύο μεταλλικά ιόντα, Fe^{2+} και Zn^{2+} συνδεδεμένα στην καταλυτική υπομονάδα. Το βέλος δείχνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο οποίο είναι συνδεδεμένη η μικροκυστίνη (ένας PP2A ειδικός αναστολέας). [9]

και αντιστρέφεται από τη μεθυλεστεράση της φωσφατάσης (PME-1, phosphatase methylsterase). Μετά τη συναρμολόγηση το ολοένζυμο μπορεί να αποφωσφορυνώνει ένα ευρύ φάσμα των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων του.

Δεδομένου ότι στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ισομορφές της Α υπομονάδας, δύο ισομορφές της C και περίπου 20 διαφορετικές Β, οι συνδυασμοί που μπορεί να προκύψουν είναι πολλοί, περίπου 50 διαφορετικά τριμερή ολοένζυμα, καθένα με διαφορετική δράση και τρόπο ρύθμισης (**Εικόνα 7.61**).

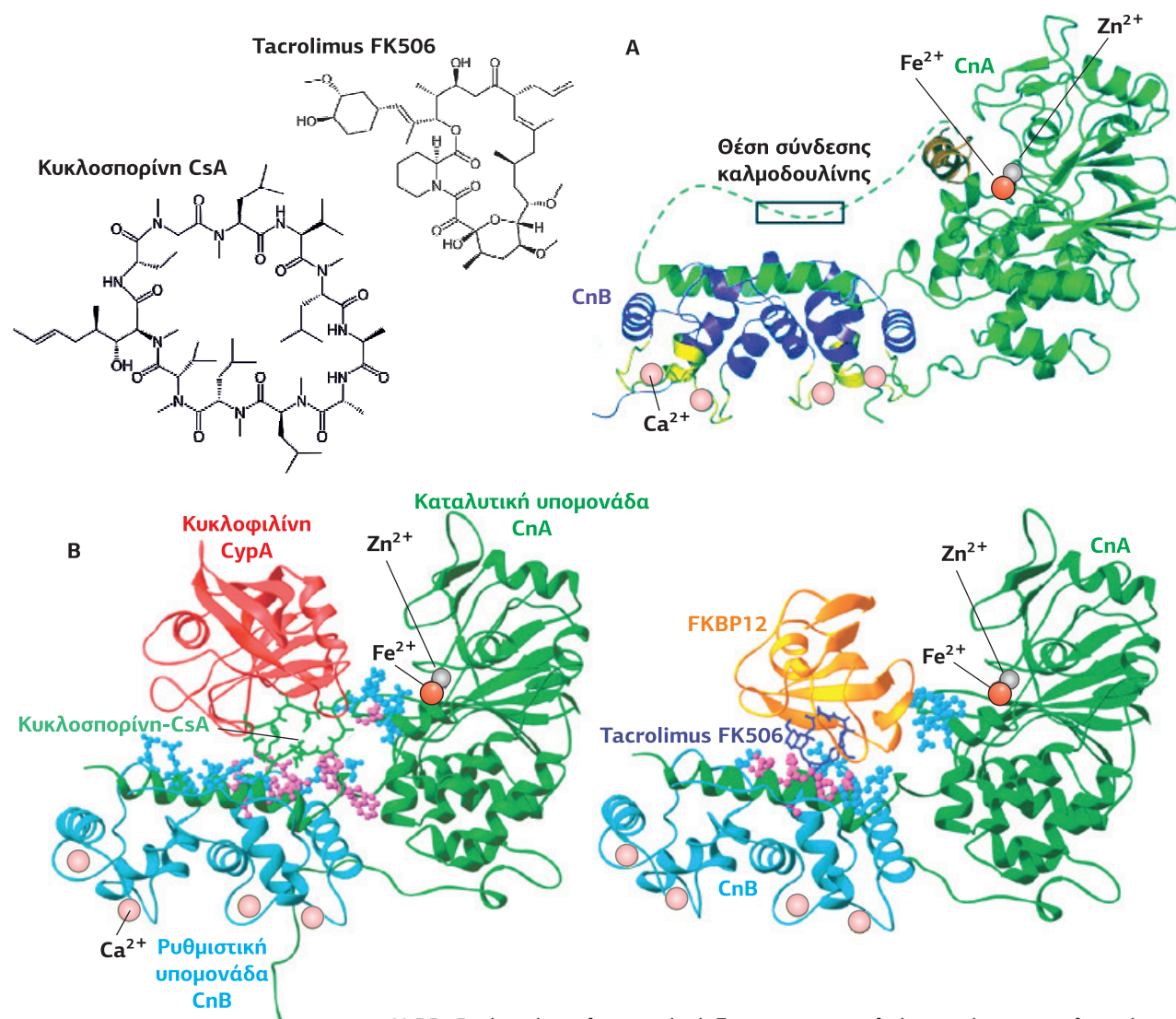
Φυσιολογικοί και παθολογικοί ρόλοι της PP2A

Η PP2A αντιπροσωπεύει το 1% του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών και την κύρια δραστηριότητα των φωσφατάσων Ser/Thr στους περισσότερους ιστούς και κύτταρα. Βιοχημικές και γενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η καταλυτική υπομονάδα των PP2A είναι αξιοσημείωτα συντηρημένη κατά την εξέλιξη. Η σημασία των PP2A στη ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών αναδείχθηκε από μελέτες διαγραφής γονιδίων. Η διαγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα PP2A είναι θανατηφόρα στις ζύμες και στα ποντίκια, αποδεικνύοντας ότι η PP2A είναι απαραίτητη. Η PP2A ελέγχει τις δραστηριότητες αρκετών μεγάλων οικογενειών πρωτεϊνικών κινάσων, ιδίως της PKB, της PKC, της p70 S6K, των CaMKs, των MAPKs (βλ. **Εικόνα 8.110**) και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων. Κατά τη διέγερση των κυττάρων οι περισσότερες κινάσες είναι παροδικά φωσφορυλιωμένες και ενεργοποιημένες. Αρκετές από αυτές τις κινάσες είναι υποστρώματα της PP2A. Η μείωση της δραστηριότητας των ενεργοποιημένων κινάσων από την PP2A παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση.

Ανώμαλη έκφραση, μετάλλαξη ή διαγραφή των υπομονάδων PP2A εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες που οδηγούν σε σχηματισμό όγκου. Η ανακάλυψη μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Α στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου ενισχύει την ιδέα ότι η PP2A εμπλέκεται στην ογκογένεση.

6.6 | Πρωτεϊνική φωσφατάση 2B (PP2B–καλσινευρίνη)

Αν και σήμερα αναγνωρίζουμε την ευρεία κατανομή της PP2B στους ιστούς, διατηρεί ακόμη το όνομα **καλσινευρίνη** με το οποίο ανακαλύφθηκε το 1979 στον νευρικό ιστό ως μία πρωτεΐνη ικανή να δεσμεύει το Ca^{2+} . Λίγο καιρό μετά την ανακάλυψή της, αναγνωρίστηκε η δράση φωσφατάσης της καλσινευρίνης και ότι μία από τις ρυθμιστικές της υπομονάδες είναι η καλμοδουλίνη.



Εικόνα 7.62
Κρυσταλλική δομή της
καλσινευρίνης. Α. Διακρίνονται
 η καταλυτική υπομονάδα CnA,
 η ρυθμιστική υπομονάδα CnB,
 καθώς και μια εκτεταμένη
 α-ελικοειδής περιοχή στην
 καταλυτική υπομονάδα, όπου
 συνδέεται η καλμοδουλίνη.
 Β. Η καλσινευρίνη (CnA –
 CnB) συνδεδεμένη με την
 κυκλοσπορίνη Α (CsA) –
 κυκλοφιλίνη Α (CypA) και με το
 σύμπλοκο FK506–FKBP12 (FKBP).

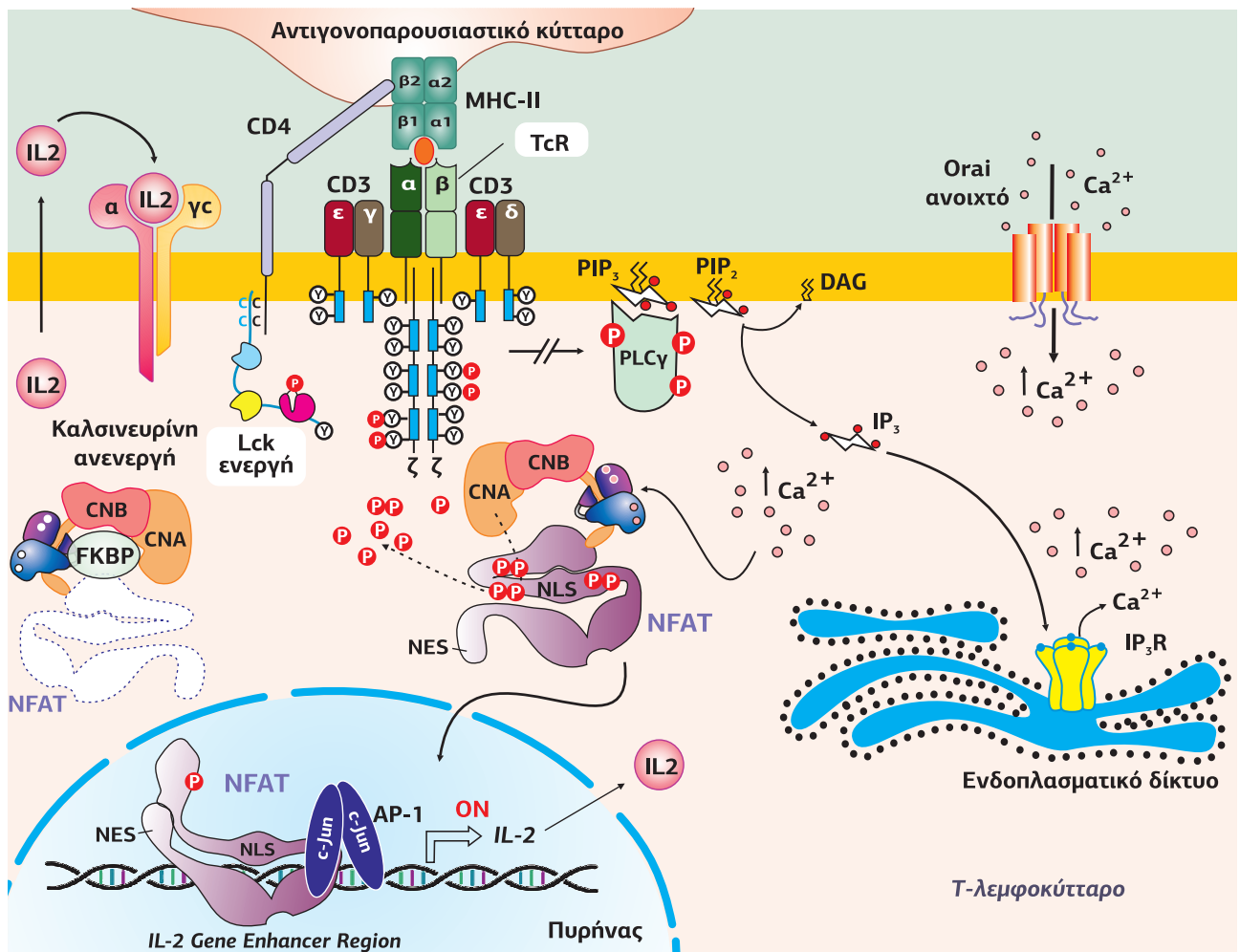
Η PP2B είναι ένα ολιγομερές ένζυμο που αποτελείται από την καταλυτική υπομονάδα καλσινευρίνη Α (CnA), 60 kDa, και τις ρυθμιστικές υπομονάδες καλσινευρίνη Β (CnB), 19 kDa, και καλμοδουλίνη. Η καταλυτική υπομονάδα CnA περιέχει την καταλυτική περιοχή και τρεις ρυθμιστικές περιοχές: τη θέση σύνδεσης για το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, τη θέση σύνδεσης για την καλσινευρίνη Β και μια περιοχή αυτοαναστολής. Στο ενεργό της κέντρο η καλσινευρίνη Α συνδέει μεταλλικά ιόντα Fe^{2+} και Zn^{2+} , τα οποία συμμετέχουν ενεργά στην υδρόλυση του φωσφορικού εστέρα. Η καλσινευρίνη Β εμφανίζει υψηλή ομολογία με την καλμοδουλίνη, καθώς περιέχει τέσσερα EF-χέρια, θέσεις σύνδεσης του Ca^{2+} (Εικόνα 7.62). Απουσία του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, το διμερές καλσινευρίνη Α και Β βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής.

Αποφωσφορλίωση του NFAT

Ο λειτουργικός ρόλος της καλσινευρίνης ήρθε στο φως μέσω της χρήσης φαρμάκων που ονομάζονται **ανοσοφιλίνες**. Το όνομα αυτό αντανάκλα το πλαίσιο της ανακάλυψής τους. Το 1972 η κυκλοσπορίνη, ένα προϊόν του μύκητα *Tolypocladium inflatum*, βρέθηκε να παρουσιάζει εξαιρετικές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες με ελάχιστες παρενέργειες. Εμπόδιζε αποτελεσματικά την απόρριψη μοσχεύματος και κατά συνέπεια η χρήση της αύξησε κατά πολύ το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με μεταμόσχευση νεφρού, καρδιάς και ήπατος. Επίσης, είχε εφαρμογή στη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών και στο άσθμα. Δέκα χρόνια αργότερα η

κυκλοφιλίνη A (CypA) αναγνωρίστηκε ως κυτταροπλασματικός στόχος της κυκλοσπορίνης. Το 1987 ανακαλύφθηκε ένα ακόμη ισχυρό ανοσοκατασταλτικό φάρμακο, το μακρολίδιο tacrolimus ή FK506, το οποίο παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces tsukubaensis* (το tacrolimus προέρχεται από το *Tsukuba macrolide immunosuppressant*). Ο κυτταροπλασματικός στόχος του FK506 είναι η πρωτεΐνη FKBP12. Η CypA και η FKBP12 ονομάστηκαν ανοσοφιλίνες και αποτελούν μέλη μιας μεγάλης οικογένειας πρωτεϊνών. Τα σύμπλοκα του tacrolimus και της κυκλοσπορίνης με τους αντίστοιχους στόχους τους αναστέλλουν την καλσινευρίνη κρύβοντας τη θέση σύνδεσης του υποστρώματός της.

Μια σημαντική συνέπεια της αναστολής της καλσινευρίνης είναι η αποτυχία ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων μετά τη σύνδεση στον TcR ενός αντιγόνου που παρουσιάζεται από το MHC. Στη διαδικασία ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων,



Εικόνα 7.63

Μοντέλο της λειτουργίας της καλσινευρίνης στα T-λεμφοκύτταρα. Αντιγονικά πεπτίδια παρουσιάζονται στα T-λεμφοκύτταρα από ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (APC) με αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου. Η σύνδεση του αντιγόνου ενεργοποιεί τον υποδοχέα των T-κυττάρων που αρχίζει μια αλυσίδα σημάτων οδηγώντας σε αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και ενεργοποίηση της καλσινευρίνης. Η ενεργοποιημένη καλσινευρίνη απομακρύνει ανασταλτικά φωσφορικά κατάλοιπα από τον μεταγραφικό παράγοντα NFAT. Ο NFAT μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου διεγείρει τη μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων. Μεταξύ των γονιδίων που ελέγχονται από τον NFAT είναι το γονίδιο της ιντερλευκίνης 2 (IL-2). Μετά την απελευθέρωση στον εξωκυτταρικό χώρο η IL-2 συνδέεται στους IL-2-υποδοχείς του ίδιου κυττάρου ή κυττάρων του ίδιου τύπου. Το πολλαπλασιαζόμενο σήμα δημιουργείται από τον ενεργοποιημένο IL-2-υποδοχέα, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων. Σύμπλοκα των ανοσοκατασταλτών κυκλοσπορίνη A (CsA) ή FK506 μαζί με τους κυτταροπλασματικούς στόχους τους κυκλοφιλίνη και FKBP12, αντίστοιχα, αναστέλλουν την καλσινευρίνη και διακόπτουν τη μεταβίβαση του σήματος στον NFAT. [41]

η καλσινευρίνη είναι μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται από την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , μετά τη σύνδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα των T-κυττάρων (TcR) και τελικά καταλήγει στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας NFAT (Nuclear Factors of Activated T cells). Τα μέλη της οικογένειας NFAT ελέγχουν την έκφραση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων κυτοκίνες, κανάλια ιόντων, μεμβρανικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόπτωση. Μια υποομάδα των μεταγραφικών παραγόντων NFAT, οι NFATc, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και μεταναστεύουν στον πυρήνα μετά την ενεργοποίηση της καλσινευρίνης, επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Κύριος στόχος είναι το γονίδιο της ιντερλευκίνης 2, η οποία μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων (**Εικόνα 7.63**). Η αύξηση του Ca^{2+} ενεργοποιεί τη δράση της καλσινευρίνης, η οποία αποφωσφορυλιώνει τους κυτταροπλασματικούς μεταγραφικούς παράγοντες NFATc. Οι αποφωσφορυλιωμένοι NFATc εισέρχονται στον πυρήνα και προσδένονται στο DNA σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, π.χ. AP-1. Με τον τρόπο αυτό πολλά γονίδια στόχοι σε διάφορους ιστούς μπορεί να ενεργοποιηθούν.

Μετά την ανακάλυψη του ρόλου της καλσινευρίνης στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, ανακαλύφθηκε ένας μεγάλος αριθμός υποστρωμάτων της καλσινευρίνης, εκτός από τον NFATc. Τα υποστρώματα αυτά περιλαμβάνουν τη NOS, κανάλια ιόντων και την αδενυλική κυκλάση AC9 (βλ. σσ. 269-270 και **Εικόνα 5.45**).

Ρύθμιση της PP2B

Ο πιο σημαντικός ρυθμιστής της δραστηριότητας της PP2B, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι τα ιόντα Ca^{2+} . Η αύξηση στη συγκέντρωση Ca^{2+} οδηγεί στην ενεργοποίηση της CnB και της καλμοδουλίνης και στην αλληλεπίδραση αυτών των αλλοστερικών ρυθμιστών με την καταλυτική υπομονάδα CnA, επάγοντας μια δραματική αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της PP2B. Ωστόσο, και άλλοι ενδογενείς ρυθμιστές της PP2B έχουν εντοπιστεί. Για παράδειγμα, η AKAP79 δρα ως νευρωνική πρωτεΐνη σκαλωσιάς για τον συνεντοπισμό της PKA (μέσω της ρυθμιστικής της υπομονάδας), της PKC και της PP2B στην περιοχή της μετασυναπτικής πυκνότητας (βλ. **Εικόνα 7.11**). Επιπλέον, υπάρχουν τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την καλσινευρίνη, οι MCIPs (Modulatory Calcineurin Interacting Proteins), οι οποίες συνδέονται απευθείας στην CnA. Η MCIP1 είναι μοναδική μεταξύ των γνωστών ενδογενών ρυθμιστών της PP2B, καθώς η μεταγραφή της ενεργοποιείται από την PP2B, καθιερώνοντας έναν πιθανό αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης που διατηρείται σε οργανισμούς τόσο διαφορετικούς όσο τα θηλαστικά και οι ζύμες.

7. Γενικές αρχές της ρύθμισης των ενζύμων με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση

Τα αποτελέσματα της κινάσης της φωσφορυλάσης και της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 εξηγούν κάποιες σημαντικές αρχές της ρύθμισης της δράσης των ενζύμων με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση. Δείχνουν ξεκάθαρα πώς διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να συναντηθούν σε αντιδράσεις κλειδιά του μεταβολισμού, πώς σήματα μπορούν να συνεργαστούν το ένα με το άλλο και πώς κοινά συστατικά ενός ρυθμιστικού δικτύου μπορούν να ενεργοποιηθούν από διαφορετικά σήματα.

Η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετατρέψει τη δράση του ενζύμου σε ενεργή ή μη ενεργή. Το ίδιο ισχύει και για την αποφωσφορυλίωση των ενζύμων. Στο κύτταρο συχνά βρίσκουμε καταρράκτες αντιδράσεων φωσφορυλίωσης, όπου ορισμένες αντιδράσεις φωσφορυλίωσης συνδέονται η μία με την άλλη. Επιπλέον, υπάρχουν δίκτυα φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, τα οποία επιτρέπουν στο κύτταρο να αποκριθεί σε εξωτερικά ερε-

θίσματα με αρμονικό τρόπο.

Μια πρωτεϊνική κινάση ή πρωτεϊνική φωσφατάση μπορεί να ρυθμίζεται από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έτσι, διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα μπορεί να επηρεάσουν τη φωσφορυλιωμένη κατάσταση μιας πρωτεΐνης. Αυτή η διαφορετική διέγερση μπορεί να διαμεσολαβείται από τις υπομονάδες του ενζύμου. Για παράδειγμα, για την κινάση της φωσφορυλάσης απαιτείται ένα σήμα Ca^{2+} , το οποίο ενεργοποιεί την Ca^{2+} /καλμοδουλίνη υπομονάδα, ενώ ένα σήμα cAMP μέσω της ενεργοποιημένης PKA αυξάνει τη φωσφορυλίωση των α και β υπομονάδων. Σε ποια από τα σήματα θα αποκριθεί το κύτταρο εξαρτάται από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται.

Τα διαφορετικά σήματα μπορεί, επίσης, να ρυθμίζονται και να διαφοροποιούνται από διαφορετικές θέσεις φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης. Εξαιτίας της προτίμησης υποστρωμάτων των πρωτεϊνικών κινάσων, οι πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης που υπάρχουν σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα μπορεί να φωσφορυλιωθούν από διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες. Οι ανεξάρτητες θέσεις φωσφορυλίωσης μπορεί να έχουν ξεχωριστές λειτουργίες στη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου, έτσι ώστε μια ειδική ρύθμιση του ενζύμου να είναι πιθανή.

Ένας καταρράκτης αντιδράσεων φωσφορυλίωσης, στον οποίο αρκετές πρωτεϊνικές κινάσες συνδέονται σε σειρά, μπορεί να διαμορφωθούν από ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό. Καλά παραδείγματα για τη σημασία των πολλαπλών θέσεων φωσφορυλίωσης αποτελούν οι πρωτεϊνικές κινάσες, που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της κινάσης ή της φωσφατάσης, επίσης, παίζει κρίσιμο ρόλο στη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης ή φωσφατάσης. Πολλές φυσιολογικές λειτουργίες της πρωτεϊνικής κινάσης και της πρωτεϊνικής φωσφατάσης εξαρτώνται από τη μεταφορά του ενζύμου, με τη βοήθεια εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές δομές κοντά στα υποστρώματά τους.

Βιβλιογραφία

1. Alessi DR, Kulathu Y, Structural biology: Security measures of a master regulator, *Nature* **497**: 193-194 (2013).
2. Barr FA, Silljé HH, Nigg EA, Polo-like kinases and the orchestration of cell division, *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 429-40 (2004).
3. Bastan R, Eskandari N, Sabzghabae AM, Manian M, Serine/Threonine phosphatases: classification, roles and pharmacological regulation, *Int J Immunopathol Pharmacol* **27**: 473-84 (2014).
4. Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M, The extended PP1 toolkit: designed to create specificity, *Trends Biochem Sci* **35**: 450-8 (2010).
5. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA, Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts, *Trends Biochem Sci* **29**: 233-42 (2004).
6. Butler T, Paul J, Europe-Finner N, Smith R, Chan EC, Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility, *Am J Physiol Cell Physiol* **304**: C485-504 (2013).
7. Calejo AI, Taskén K, Targeting protein-protein interactions in complexes organized by A kinase anchoring proteins, *Front Pharmacol* **6**:192 (2015).
8. Carnero A, Paramio JM, The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, *Cancer Mouse Models, Front Oncol* **4**: 252 (2014).
9. Cho US, Xu W, Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme, *Nature* **445**: 53-57 (2007).
10. Cohen P, Protein phosphatase 1-targeted in many directions, *J Cell Sci* **115**: 241-256 (2002).
11. Couchonnal LF, Anderson ME, The role of calmodulin kinase II in myocardial

- physiology and disease, *Physiology (Bethesda)* **23**: 151-9 (2008).
12. Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, Bayer KU, CaMKII in cerebral ischemia, *Acta Pharmacol Sin* **32**: 861-72 (2011).
 13. de Vries PJ, Howe CJ, The tuberous sclerosis complex proteins -a GRIPP on cognition and neurodevelopment, *Trends Mol Med* **13**: 319-26 (2007).
 14. Dekker LV, Parker PJ, Protein kinase C: a question of specificity, *Trends Biochem Sci* **19**: 73-77 (1994).
 15. Dessauer CW, Adenylyl cyclase/A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling, *Mol Pharmacol* **76**: 935-41 (2009).
 16. Diviani D, Dodge-Kafka KL, Li J, Kapiloff MS, A-kinase anchoring proteins: scaffolding proteins in the heart, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**: H1742-53 (2011).
 17. Dworakowska D, Grossman AB, Are neuroendocrine tumours a feature of tuberous sclerosis? A systematic review, *Endocr Relat Cancer* **16**: 45-58 (2009).
 18. Edwards A, Scott J, A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond, *Curr Opin Cell Biol* **12**: 217-222 (2000).
 19. Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E, Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function, *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 157-63 (2006).
 20. Francis SH, Corbin JD, Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases, *Annu Rev Physiol* **56**: 237-72 (1994).
 21. Fu LL, Xie T, Zhang SY, Liu B, Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K): a potential therapeutic target in cancer, *Apoptosis* **19**: 1527-31 (2014).
 22. Gibbs PE, Tudor C, Maines MD, Biliverdin reductase: more than a namesake-the reductase, its Peptide fragments, and biliverdin regulate activity of the three classes of protein kinase C, *Front Pharmacol* **3**: 31 (2012).
 23. Giembycz MA, Newton R, Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways, *Eur Respir J* **27**: 1286-306 (2006).
 24. Goldsmith EJ, Gobb MH, Protein kinases, *Curr Biol* **4**: 833-40 (1994).
 25. Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PER, *Signal Transduction*, 2nd edition, Elsevier/Academic Press, p.576 (2009).
 26. Griner EM, Kazanietz MG, Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer, *Nat Rev Cancer* **7**: 281-94 (2007).
 27. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev* **13**: 1899-911 (1999).
 28. Hoeffer CA, Klann E, mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease, *Trends Neurosci* **33**: 67-75 (2010).
 29. Hong F, Haldeman BD, Jackson D, Carter M, Baker JE, Cremo CR, Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase, *Arch Biochem Biophys* **510**: 135-46 (2011).
 30. Hug H, Sarre TF, Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction, *Biochem J* **291**: 329-43 (1993).
 31. Janssens V, Goris J, Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling, *Biochem J* **353**: 417-39 (2001).
 32. Jezierska J, Goedhart J, Kampinga HH, Reits EA, Verbeek DS, SCA14 mutation V138E leads to partly unfolded PKC γ associated with an exposed C-terminus, altered kinetics, phosphorylation and enhanced insolubilization, *J Neurochem* **128**: 741-51 (2014).
 33. Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ, The eleventh data lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases, *FEBS Lett* **430**: 1-11 (1998).
 34. Johnson LN, Noble ME, Owen DJ, Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, *Cell* **85**: 149-58 (1996).

35. Johnson LN, O'Reilly M, Control by phosphorylation, *Curr Opin Struct Biol* **6**: 762-69 (1996).
36. Jozwiak J, Hamartin and tuberlin: working together for tumour suppression, *Int J Cancer* **118**: 1-5 (2006).
37. Kemp BE, Parker MW, Hu S, Tiganis T, House C, Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity, *Trends Biochem Sci* **19**: 441-48 (1994).
38. Khasnis M, Nakatomi A, Gumper K, Eto M, Reconstituted human myosin light chain phosphatase reveals distinct roles of two inhibitory phosphorylation sites of the regulatory subunit, MYPT1, *Biochemistry* **53**: 2701-9 (2014).
39. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM, Crustal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science* **253**: 407-13 (1991).
40. Kraulis PJ, MOLSKRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J Appl Crystallogr* **24**: 946-950 (1991).
41. Krauss Gerhard, Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Wiley Eds, Chapter 7, (2009).
42. Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH, Factors affecting the activity of muscle phosphorylase kinase, *J Biol Chem* **234**: 2867-2873 (1959).
43. Kumar CC, Madison V, Akt crystal structure and Akt-specific inhibitors, *Oncogene* **24**: 7493-7501 (2005).
44. Langeberg LK, Scott JD, Signalling scaffolds and local organization of cellular behavior, *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 232-44 (2015).
45. Larsen M, Tremblay ML, Yamada KM, Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 700-711 (2003).
46. Leonard TA, Różycki B, Saidi LF, Hummer G, Hurley JH., Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C β II, *Cell* **144**: 55-66 (2011).
47. Liscovitch M, Cantley LC, Lipid second messengers, *Cell* **77**: 329-334 (1994).
48. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC, Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks, *Biochem J* **441**: 1-21 (2012).
49. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC, Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases, *Nat Rev Drug Discov* **13**: 290-314 (2014).
50. Maynes JM, Bateman KS., Cherney MM, Das AK, Luu HA, Holmes CF, James M, Crystal Structure of the Tumor-promoter Okadaic Acid Bound to Protein Phosphatase-1, *J Biol Chem* **276**: 44078-882 (2001).
51. McDonough PM, Maciejewski-Lenoir D, Hartig SM, Hanna RA, Whittaker R, Heisel A, Nicoll JB, Buehrer BM, Christensen K, Mancini MG, Mancini MA, Edwards DP, Price JH, Differential phosphorylation of perilipin 1A at the initiation of lipolysis revealed by novel monoclonal antibodies and high content analysis, *PLoS One* **82**: e55511 (2013).
52. Montminy M, Transcriptional regulation by cAMP, *Annu Rev Biochem* **66**: 807-822 (1997).
53. Mustelin T, A brief introduction to the protein phosphatase families, *Methods Mol Biol* **365**: 9-22 (2007).
54. Newton AC, Regulation of protein kinase C, *Curr Opin Cell Biol* **9**: 161-67 (1997).
55. Oancea E, Meyer T, Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals, *Cell* **95**: 307-18 (1998).
56. Paari Dominic Swaminathan Mark E. Anderson, CaMKII Inhibition: Breaking the Cycle of Electrical Storm? *Circulation* **123**: 2183-86 (2011).
57. Pearson RB, Kemp BE, Protein kinase phosphorylation sit sequences and consensus specificity motifs; tabulations, *Methods Enzymol* **200**: 62-81 (1991).
58. Pereira SF, Goss L, Dworkin J, Eukaryote-like serine/threonine kinases and

- phosphatases in bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 192-212 (2011).
59. Pidoux G, Taskén K, Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins, *J Mol Endocrinol* **44**: 271-84 (2010).
 60. Pinheiro AS, Marsh JA, Forman-Kay JD, Peti W, Structural signature of the MYPT1-PP1 interaction, *J Am Chem Soc* **133**: 73-80 (2011).
 61. Qiu H, Hu C, Hinnebusch AG, Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters, *Mol Cell* **33**: 752-62 (2009).
 62. Rademacher EH, Offringa R, Evolutionary Adaptations of Plant AGC Kinases: From Light Signaling to Cell Polarity Regulation, *Front Plant Sci* **3**: 250 (2012).
 63. Ragusa MJ, Dancheck B, Critton DA, Nairn AC, Page R, Peti W, Spinophilin directs protein phosphatase 1 specificity by blocking substrate binding sites, *Nat Struct Mol Biol* **17**: 459-64 (2010).
 64. Reyland ME, Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* **14**: 2386-99 (2009).
 65. Rigor RR, Shen Q, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY, Myosin light chain kinase signaling in endothelial barrier dysfunction, *Med Res Rev* **33**: 911-33 (2013).
 66. Robison AJ, Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease, *Trends Neurosci* **37**: 653-62 (2014).
 67. Sanhueza M, Lisman J, The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory, *Mol Brain* **6**: 10 (2013).
 68. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG, The structure of a CREB bZIP, somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding, *J Biol Chem* **275**: 35242-7 (2000).
 69. Shi Y, Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure, *Cell* **139**: 468-84 (2009).
 70. Swaminathan PD, Anderson ME, CaMK-II Inhibition: Breaking the Cycle of Electrical Storm? *Circulation* **123**: 2183-86 (2011).
 71. Taha E, Gildish I, Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K, The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity, *Neurobiol Learn Mem* **105**: 100-6 (2013).
 72. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 85-96 (2006).
 73. Tchekina E, Komelkov A, Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways Genetics and Molecular Biology, Protein Phosphorylation in Human Health, book edited by Cai Huang (2012).
 74. Wong W, Scott JD, AKAP signalling complexes: focal points in space and time, *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 959-70 (2004).
 75. Wu-Zhang AX, Newton AC, Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox, *Biochem J* **452**: 195-209 (2013).
 76. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP, mTOR kinase structure, mechanism and regulation, *Nature* **497**: 217-23 (2013).
 77. Yang J, Cron P, Good VM, Thompson V, Hemmings BA, Barford D, Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP, *Nat Struct Biol* **9**: 940-4 (2002).
 78. Yang J, Roe M, Cliff MJ, Williams MA, Ladbury JE, Cohen PT, Barford D, Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5, *EMBO J* **24**: 1-10 (2005).