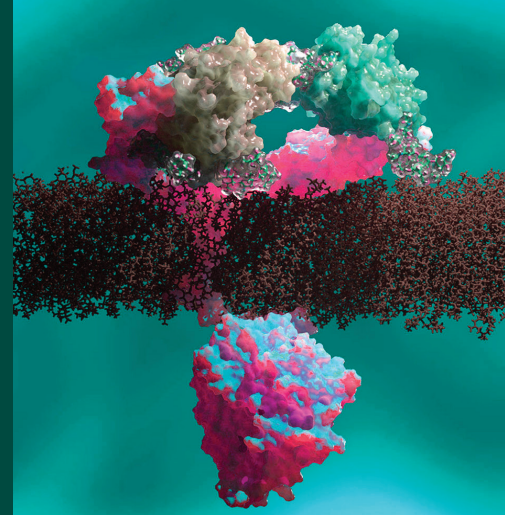


# 8

## Υποδοχείς κινάσες τυροσίνης Δομή και τελεστές: Ras GTPάσες και MAP Κινάσες



### 1. Υποδοχείς κινάσες τυροσίνης: Δομή και ενεργοποίηση

- 1.1 Η ανακάλυψη της φωσφορυλίωσης Tyr
- 1.2 Δύο είδη υποδοχέων συνδέονται με δραστηριότητα κινάσης Tyr
- 1.3 Οι προσδέτες των RTKs
- 1.4 Δομή και ταξινόμηση των RTKs
- 1.5 Μηχανισμοί διμερισμού των RTKs
- 1.6 Ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης Tyr των RTKs
- 1.7 Σύνδεση της ενεργοποίησης των RTKs με την κυτταρική σηματοδότηση
- 1.8 Ρύθμιση των RTKs μέσω ανατροφοδότησης
- 1.9 Εσωτερίκευση και down-regulation των RTKs

### 2. Περιοχές που αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης: η τέχνη της πολύπλοκης διαμόρφωσης

- 2.1 Οι ομόλογες περιοχές της Src
- 2.2 Οι SH2 περιοχές αναγνωρίζουν αλληλουχίες με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης
- 2.3 Οι PTB περιοχές
- 2.4 Οι SH3 περιοχές αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε Pro

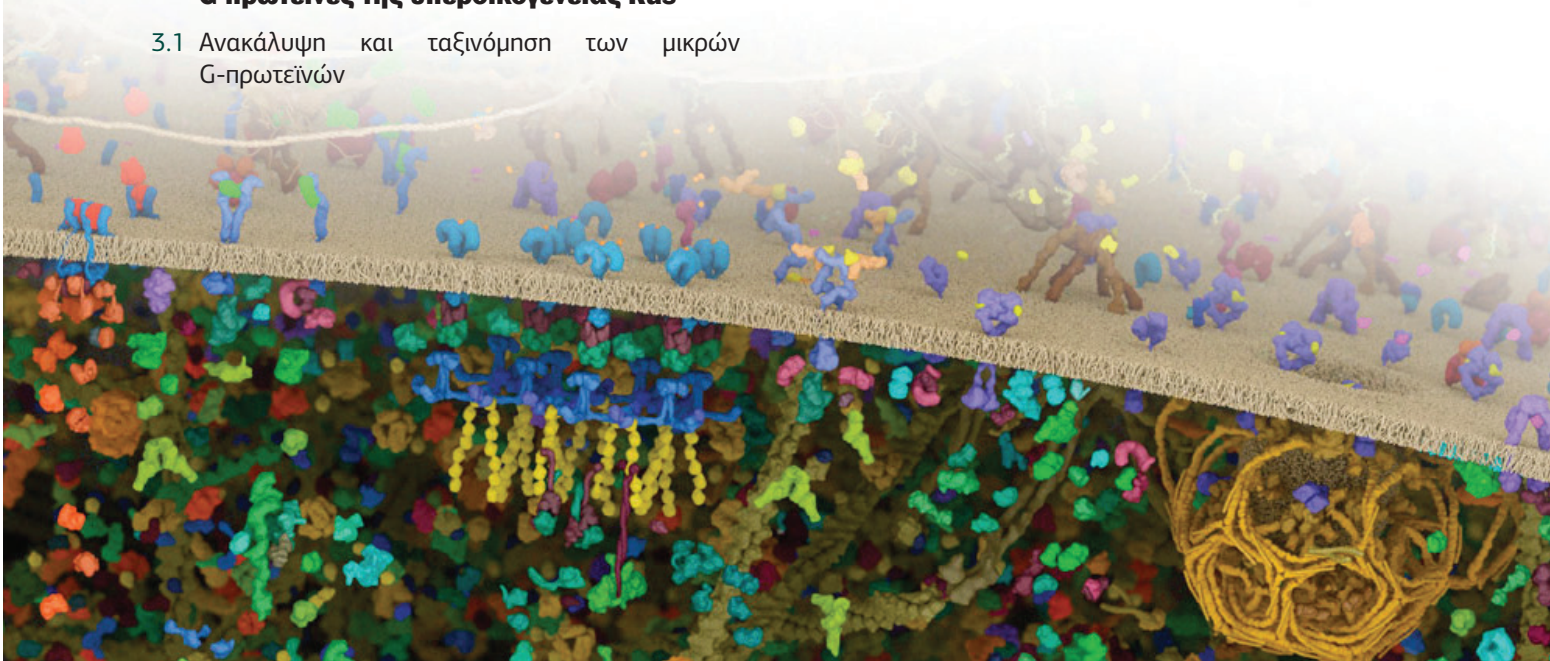
### 3. Τελεστές των RTKs: Μονομερείς G-πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Ras

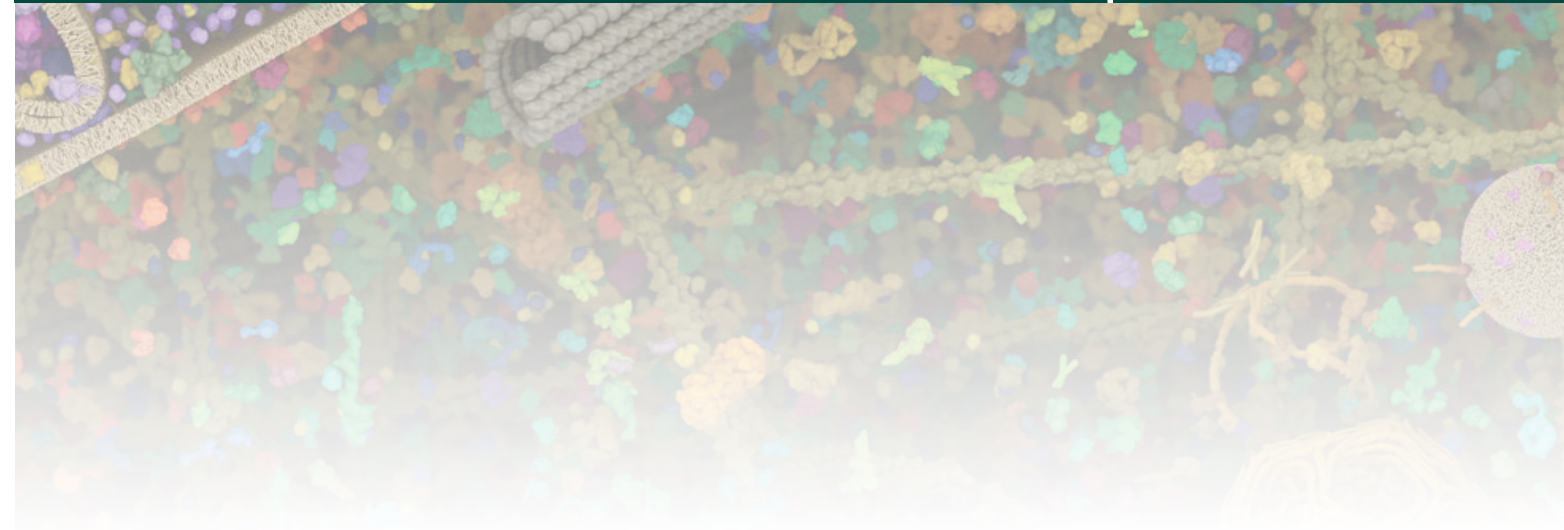
- 3.1 Ανακάλυψη και ταξινόμηση των μικρών G-πρωτεϊνών

- 3.2 Ρύθμιση του κύκλου GDP/GTP στις μικρές G-πρωτεΐνες από τρία διαφορετικά μόρια
- 3.3 Δομή και βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών Ras
- 3.4 Υδρόλυση του GTP: Μηχανισμός και επιτάχυνση από τις GAPs
- 3.5 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Ras στην πλασματική μεμβράνη
- 3.6 Η οικογένεια των πρωτεϊνών Ras: βασικός ρυθμιστής της αύξησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων
- 3.7 Πρωτεΐνες Rho/Rac/Cdc42: Οι κύριοι ρυθμιστές του κυτταροσκελετού της ακτίνης
- 3.8 Πρωτεΐνες Rab: Μεταφορά ενδοκυτταρικών κυστιδίων
- 3.9 Πρωτεΐνες Arf: Εκβλάστηση ενδοκυτταρικών κυστιδίων
- 3.10 Ran και πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά

### 4. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

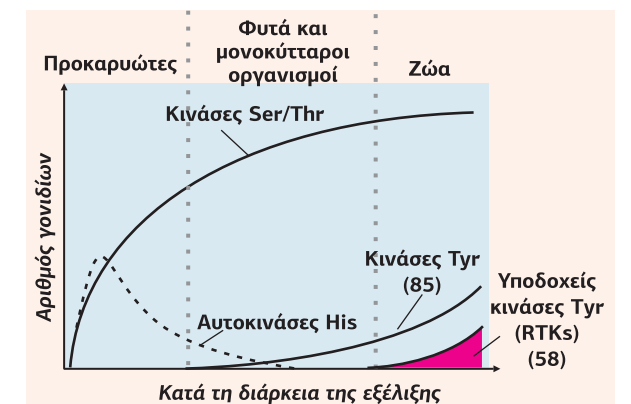
- 4.1 Οργάνωση και συστατικά των μονοπατιών των MAPKs
- 4.2 Η ανακάλυψη των MAPKs στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*
- 4.3 Ενεργοποίηση της ομάδας Raf-MEK-ERK από τους υποδοχείς κινάσες Tyr
- 4.4 Μετάδοση του μηνύματος από την ERK





## 1. Υποδοχείς κινάσες τυροσίνης: Δομή και ενεργοποίηση

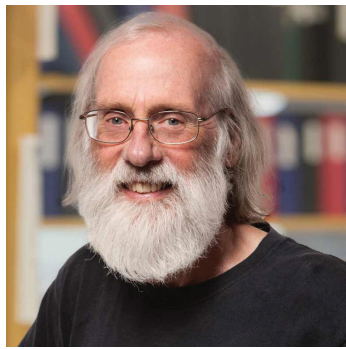
Ενώ οι υποδοχείς κινάσες Ser/Thr αποτελούν εξελικτικά αρχαίους μηχανισμούς διαμεμβρανικής σηματοδότησης, που συναντώνται όχι μόνο στα σπονδυλωτά αλλά και στα ασπόνδυλα και στα φυτά, οι υποδοχείς κινάσες Tyr, αλλά και οι κινάσες Tyr γενικά, είναι πιο σύγχρονοι εξελικτικά μηχανισμοί. Πιο συγκεκριμένα, οι υποδοχείς κινάσες Tyr και οι κινάσες Tyr συναντώνται μόνο στα ζώα, όπου η φωσφορυλίωση Tyr παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση των ιστών, στον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος και στον κακοήγη μετασχηματισμό.



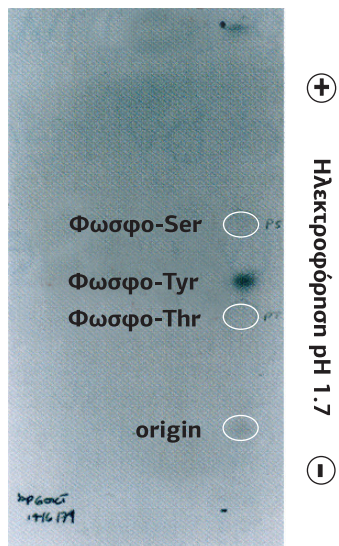
Οι κινάσες Tyr εμφανίζονται μόνο στα ζώα.

### 1.1 Η ανακάλυψη της φωσφορυλίωσης Tyr

Η ανακάλυψη ότι, εκτός από τις σερίνες και τις θρεονίνες των πρωτεϊνών, στόχο φωσφορυλίωσης αποτελούν και οι τυροσίνες οφείλεται τόσο στη σύμπτωση/ τύχη όσο και στην ικανότητα του Tony Hunter και της ομάδας του Salk Institute for Biological Studies του Πανεπιστημίου της California. Ο Tony Hunter το 1979 έφραχνε τον μηχανισμό με τον οποίο τα αντιγόνα του ιού του πολυώματος ήταν ικανά να προκαλέσουν κυτταρικό μετασχηματισμό. Ο polyomavirus ανακαλύφθηκε το 1950



Tony Hunter (1943 - )  
Βρετανός βιολόγος, Καθηγητής  
Βιολογίας στο Salk Institute for  
Biological Studies, University of  
California, San Diego.



**Εικόνα 8.1**  
Διαχωρισμός της φωσφοτυροσίνης  
από τη φωσφοθειονίνη και  
τη φωσφοσερίνη έπειτα από  
ηλεκτροφόρηση σε χαρτί.

από τον Ludwik Gross ως ένας ιός που προκαλούσε λευχαιμία στα τρωκτικά. Στη συνέχεια, τα αντισώματα εναντίον του ιού απομονώθηκαν από το αίμα των τρωκτικών. Το 1978 τα αντισώματα αυτά οδήγησαν στην ανακάλυψη τριών αντιγόνων του polyομανίριου, του μεγάλου, του μεσαίου και του μικρού T-αντιγόνου. Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκε ότι τα τρία αυτά αντιγόνα έχουν διαφορετικές λειτουργίες, καθώς το μεγάλο T-αντιγόνο απαιτείται για τον αναδιπλασιασμό του ιϊκού DNA, ενώ το μεσαίο (middle T-antigen) παίζει ρόλο στον κυτταρικό μετασχηματισμό, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο μηχανισμός.

Η ανακάλυψη το 1979 από τις ομάδες του Raymond Erikson στο Harvard και των Michael Bishop και Harold Varmus στο University of California ότι η πρωτεΐνη v-Src, που κωδικοποιείται από το γονίδιο v-src του ιού του σαρκώματος RSV (Rous Sarcoma Virus), έχει δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης, έθεσε την ερώτηση εάν και άλλα προϊόντα γονιδίων ογκογόνων ιών έχουν την ικανότητα φωσφορυλίωσης, η οποία μπορεί να είναι η βάση του κυτταρικού μετασχηματισμού. Ο Hunter παρατήρησε ότι η μόλυνση με τον polyομανίριου επιφέρει εκτεταμένη φωσφορυλίωση κυτταρικών πρωτεϊνών και ότι οι μετασχηματισμένες πρωτεΐνες, καθώς και το ίδιο το μεσαίο T-αντιγόνο, φωσφορυλιώνονται. Μετά την πρωτεολυτική διάσπαση των σημασμένων με  $^{32}\text{P}$  πρωτεϊνών, τα σημασμένα κατάλοιπα, που θεωρούνταν ότι ήταν φωσφοσερίνες και φωσφοθειονίνες, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση. Αναπάντεχα, όλο το ραδιενεργό σήμα περιορίστηκε σε ένα νέο σημείο, που τώρα είναι γνωστό ότι αντιστοιχεί στη φωσφοτυροσίνη (**Εικόνα 8.1**). Από μια άποψη, αυτή η ανακάλυψη έγινε τυχαία. Είναι κοινή πρακτική όταν εκτελούνται ηλεκτροφορητικές διαδικασίες, να ξαναχρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) σε ανάλογες περιπτώσεις. Ωστόσο, όσο περνάει ο καιρός, το pH μεταβάλλεται, το όξινο ρυθμιστικό διάλυμα γίνεται πιο όξινο και το αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα γίνεται πιο αλκαλικό. Αν το ρυθμιστικό διάλυμα είχε προετοιμαστεί πρόσφατα με pH 1.9, ο αποχωρισμός της φωσφοτυροσίνης δεν θα είχε συμβεί. Όταν το ρυθμιστικό διάλυμα ξαναχρησιμοποιήθηκε, το pH του ήταν πιο όξινο, pH 1.7, η φωσφοτυροσίνη μετακινήθηκε πιο αργά και αποχωρίστηκε από τη φωσφοθειονίνη.

Στη συνέχεια, έπρεπε να αποδειχθεί ότι η φωσφορυλίωση Tyr συμβαίνει *in vivo*. Με ηλεκτροφόρηση, η οποία τώρα εκτελείται σκόπιμα σε pH 1.7, εξετάστηκαν διάφορες άλλες σημασμένες πρωτεΐνες έπειτα από πρωτεολυτική τους διάσπαση και βρέθηκε, απρόσμενα, ότι η v-Src μπορεί να φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσίνης σε μια ποικιλία αρκετά διαφορετικών πρωτεϊνών. Έτσι χαρακτηρίστηκε η **v-Src ως μια πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης**. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης αναπαριστά μια γνήσια φυσιολογική διαδικασία. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την ανακάλυψη ότι ενώ η σήμανση με  $^{32}\text{P}$  στα μη μετασχηματισμένα κύτταρα συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στις σερίνες και θρεονίνες, στα μετασχηματισμένα από τον ιό RSV κύτταρα, φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα θρεονίνης, σερίνης και τυροσίνης, είναι παρόντα σε σχεδόν ίσες ποσότητες.

### Ανακάλυψη των υποδοχέων με δράση κινάσης Tyr (RTKs)

Παρότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης ήταν μια πρωτοφανής διαδικασία, δεν υπήρξε σχεδόν καμία αντίθεση με την ιδέα ότι αυτή είναι μια φυσιολογική διαδικασία και γρήγορα υιοθετήθηκε από την ερευνητική κοινότητα. Το 1978 ο Stanley Cohen (βλ. παρακάτω) στο Vanderbilt ανέφερε ότι ο υποδοχέας του EGF ήταν μια πρωτεϊνική κινάση Thr. Όταν όμως έμαθε ότι η pThr και η pTyr δεν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε pH 1.9, ο ίδιος και ο Hiroshi Ushiro επανεξέτασαν το είδος του αμινοξέος που φωσφορυλιώνεται από την κινάση υποδοχέα του EGF και διαπίστωσαν ότι ήταν φωσφορυλιωμένη τυροσίνη (Ushiro και Cohen, 1980). Η ανακάλυψη αυτή προσέφερε τη σύνδεση μεταξύ του υποδοχέα του EGF και ογκοπρωτεϊνών των ρετροϊών, όπως η v-Src και η v-Abl, και πρότεινε ότι ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός των κυττάρων από ιϊκές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης θα μπορούσε να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών που διεγείρονται από τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.

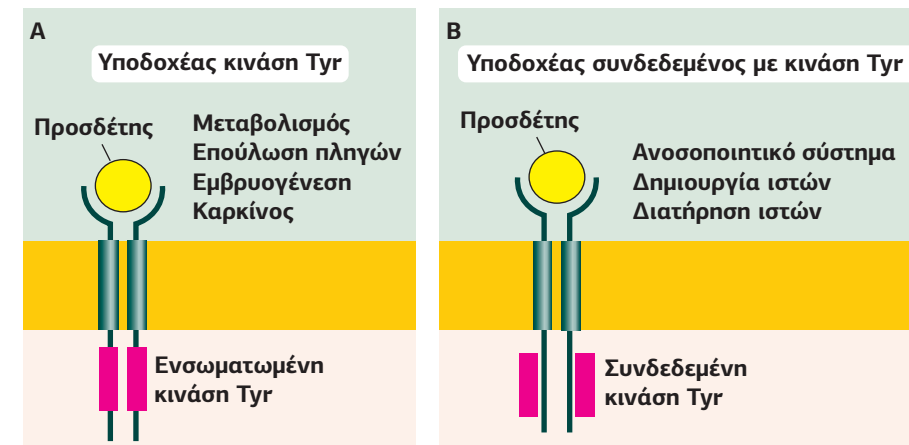
## 1.2

### Δύο είδη υποδοχέων συνδέονται με δραστηριότητα κινάσης Tyr

Η σύζευξη ενός εξωκυτταρικού μηνύματος με τη φωσφορυλίωση τυροσινών στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων:

**Υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης.** Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs, Receptor Tyrosine Kinases) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζουν στην εξωκυτταρική τους επιφάνεια θέσεις πρόσδεσης για εξωκυτταρικούς προσδέτες. Όταν αυτοί συνδέονται στον υποδοχέα, ενεργοποιούν τη δράση κινάσης τυροσίνης, που βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα, αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Αυτά με τη σειρά τους “πυροδοτούν” τη βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Το χαρακτηριστικό αυτού του τύπου υποδοχέα είναι ότι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και η περιοχή της κινάσης τυροσίνης αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης.

**Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συνδεδεμένοι με κινάσες τυροσίνης.** Οι υποδοχείς αυτοί είναι συνδεδεμένοι στην ενδοκυτταρική τους περιοχή με μία ή περισσότερες κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται όταν ένας προσδέτης συνδέεται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα. Η διαφορά είναι ότι η κινάση τυροσίνης και ο υποδοχέας αποτελούν ξεχωριστές πρωτεΐνες. Τους υποδοχείς αυτούς θα τους μελετήσουμε στο Κεφάλαιο 9.



**Εικόνα 8.2**  
Μετάδοση του μηνύματος από υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης και από υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάση τυροσίνης. Α. Οι υποδοχείς κινάσες Tyr εμφανίζουν στην κυτταροπλασματική τους περιοχή μια κινάση τυροσίνης, η οποία ενεργοποιείται με τη σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυτταρική πλευρά του υποδοχέα και παράγει ένα σήμα που ενεργοποιεί άλλες πρωτεΐνες τελεστές. Β. Οι υποδοχείς της κατηγορίας αυτής μεταφέρουν το σήμα σε μια κινάση τυροσίνης, η οποία δεν αποτελεί εσωτερικό τμήμα του υποδοχέα, αλλά είναι παροδικά ή μόνιμα συνδεδεμένη με την κυτταροπλασματική του περιοχή. Απεικονίζονται οι διμερείς ενεργοποιημένες μορφές των υποδοχέων.

## 1.3

### Οι προσδέτες των RTKs

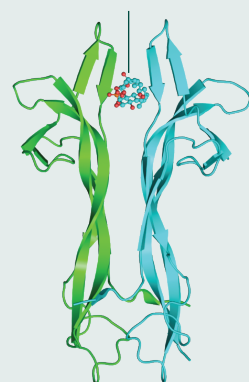
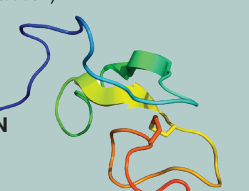
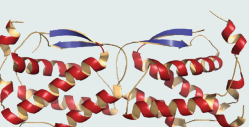
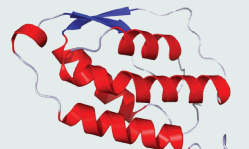
Η οικογένεια των κινασών Tyr στα θηλαστικά αποτελείται από 85 μέλη, 58 από τα οποία είναι υποδοχείς, RTKs (Receptor Tyrosine Kinases). Οι προσδέτες τους είναι ορμόνες, όπως η **ινσουλίνη** και μια μεγάλη και ετερογενής οικογένεια **αυξητικών παραγόντων**. Ανάμεσα στους αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν RTKs είναι ο EGF (Epidermal Growth Factor), ο HB-EGF (Heparin-Binding EGF-like growth factor), ο PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), ο KGF (Keratinocyte Growth Factor), οι CSFs (Colony-Stimulating Factors), ο SCF (Stem Cell Factor), ο VEGF (Vascular Endothelial Growth factor), ο FGF (Fibroblast Growth Factor), ο NGF (Nerve Growth Factor), ο HGF (Hepatocyte Growth Factor), ο Gas6 (Growth arrest-specific 6), οι αγγειοποιητίνες (angiopoietins), οι εφρίνες (ephrins) και ο GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor).

Οι αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη οργάνων και, στον

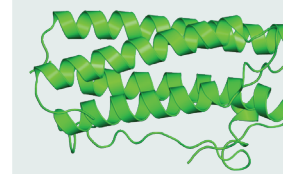
ώριμο οργανισμό, την επιδιόρθωση των πληγών και άλλες πολλαπλασιαστικές διαδικασίες. Αυτή η φυσιολογική λειτουργία αντανάκλαται από δύο κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια: το μιτογόνο μονοπάτι των MAP κινάσων (MAPKs, Mitogen Activated Protein Kinases) και το αντιαποπτωτικό μονοπάτι των κινάσων PI3K - PKB/Akt, που είναι ο βασικός μεσολαβητής της δράσης της ινσουλίνης. Και τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν σε ενεργοποίηση μιας μεγάλης ποικιλίας γονιδίων που ελέγχουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Πίνακας 8.1

Οι αυξητικοί παράγοντες που ενεργοποιούν υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (με τη σειρά με την οποία ανακαλύφθηκαν)

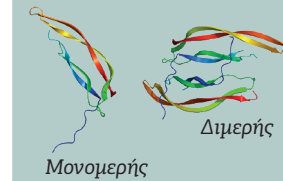
<p><b>NGF</b> (Nerve Growth Factor)</p> <p>Λυσοφωφατιδυλοϊνοσιτόλη</p>  <p>Διμερής NGF β-υπομονάδα</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο NGF είναι ο πρώτος αυξητικός παράγοντας που αναγνωρίστηκε από τη Rita Levi-Montalcini το 1956 ως ο παράγοντας που απελευθερώνεται από τα αναπτυσσόμενα άκρα εμβρύου κοτόπουλου και προκαλεί την αύξηση των αντίστοιχων αισθητηρίων νευρώνων. Το 1971 αποκαλύφθηκε η πρωταρχής δομή του NGF, γεγονός που οδήγησε και στην ανακάλυψη του γονιδίου του. Το 1991 ανακαλύφθηκε η τριτοταγής του δομή.</li> <li>Ο NGF είναι ένα 130 kDa σύμπλοκο 3 πρωτεϊνών, α-NGF, β-NGF και γ-NGF (με αναλογία 2:1:2). Αυτή η μορφή συχνά αναφέρεται ως πρόδρομο NGF (proNGF). Οι α- και γ-υπομονάδες δρουν ως σερίνοπρωτεάσες, οι οποίες αποκόβουν το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της β-υπομονάδας καθιστώντας τον NGF λειτουργικό. Ο όρος NGF αναφέρεται συνήθως στην 26 kDa β-υπομονάδα, το μόνο συστατικό του συμπλόκου του NGF που είναι βιολογικά ενεργό. Η δραστηριότητα του μορφής είναι ομοδιμερής με επίμικτες σχήμα που δημιουργείται από δύο όμοιες αλυσίδες, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από δύο ζευγάρια αντιπαράλληλων β-κλώνων περιεστρεμμένων το ένα γύρω από το άλλο, που σχηματίζουν βρόχους χάρη στους 3 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δύο αλυσίδες είναι head-to-head προσανατολισμένες στο διμερές. [178]</li> <li>Ο NGF είναι το πρότυπο μιας οικογένειας νευροτροφινών που περιλαμβάνουν τον BDNF, την neurotrophin-3 (NT-3) και τις neurotrophin-4/5 (NT-4/5).</li> <li>Όπως δηλώνει το όνομά του, ο NGF παίζει κύριο λόγο στην ανάπτυξη, καθώς και τη συντήρηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων.</li> </ul>
<p><b>EGF</b> (Epidermal Growth Factor)</p>  <p>N C</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Περιγράφηκε το 1960 ως το πεπτίδιο που εκκρίνεται από τους σιελογόνους αδένες ποντικών και βρίσκεται στα ανθρώπινα ούρα, γι' αυτό και αρχικά ονομάστηκε ουρογαστρονίνη.</li> <li>Ο EGF είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 53 αμινοξέων 6 kDa, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη. Έχει έξι κυστεΐνες που δημιουργούν τρεις δισουλφικούς δεσμούς (Cys6-Cys20, Cys14-Cys31, Cys33-Cys42), οι οποίοι σχηματίζουν τρεις βρόχους απαραίτητους για τη σύνδεση του EGF με τον υποδοχέα του. Ο Α-βρόχος (6-19 αα) έχει δομή α-έλικας, ο Β (20-31 αα) αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους β-κλώνους και ο C (33-42 αα) αποτελεί τμήμα του 2ου β-κλώνου. [126]</li> <li>Επάγει τον πολλαπλασιασμό κυρίως των επιδερμικών, αλλά και άλλων κυτταρικών τύπων.</li> </ul>
<p><b>CSF1</b> (Colony-Stimulating Factor 1) ή <b>M-CSF</b> (Macrophage Colony-Stimulating Factor)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο πρώτος CSF ανακαλύφθηκε το 1966 ως ένας παράγοντας που απελευθερώνεται από κύτταρα λευκαϊμίας και είναι ικανός να δημιουργήσει από ένα μόνο αιμοποιητικό κύτταρο του μυελού των οστών αποικίες-κλώνους διαφοροποιημένων λευκοκυττάρων.</li> <li>Ο <b>CSF1</b> ή M-CSF ανακαλύφθηκε το 1970 ως ο παράγοντας που περιέχεται στα ούρα και είναι ικανός να διεγείρει την παραγωγή αποικιών μακροφάγων.</li> <li>Είναι μια εκκρινόμενη ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa, που αποτελείται από δύο υπομονάδες συνδεδεμένες με δισουλφικό δεσμό. [96]</li> <li>Συνδέεται στους υποδοχείς των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα, επίσης, παράγουν τον CSF1, με σκοπό να αντιμετωπίσουν μια ενδοκυτταρική ιϊκή εισβολή.</li> </ul>
<p><b>CSF2</b> ή <b>GM-CSF</b> (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ο <b>CSF2</b> ή GM-CSF ανακαλύφθηκε το 1970 ως ο παράγοντας που απελευθερώνεται από τους πνεύμονες ποντικών μολυσμένων με μια ενδοτοξίνη και είναι ικανός να διεγείρει την παραγωγή αποικιών κοκκιοκυττάρων (ουδετερόφιλα, πωσινόφιλα, βασεόφιλα) και μακροφάγων.</li> <li>Είναι μια μονομερής γλυκοπρωτεΐνη 23 kDa, που αποτελείται από τέσσερις α-έλικες και περιέχει έναν καλά συντηρημένο δισουλφικό δεσμό.</li> <li>Εκκρίνεται από τα μακροφάγα, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά και τους ινοβλάστες και δρα ως κυτοκίνη.</li> </ul>

**CSF3** ή **G-CSF** (Granulocyte Colony Stimulating Factor)



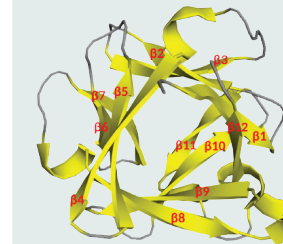
- Ο **CSF3** ή G-CSF ανακαλύφθηκε το 1984 ως ο παράγοντας που είναι ικανός να δημιουργήσει από ένα μόνο αιμοποιητικό κύτταρο του μυελού των οστών αποικίες-κλώνους διαφοροποιημένων ουδετερόφιλων χωρίς να έχει καμία δράση στα μονοκύτταρα, στα πωσινόφιλα και στα βασεόφιλα.
- Είναι μια εκκρινόμενη μονομερής γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη 18,8 kDa, που αποτελείται από 4 α-έλικες, οι οποίες σταθεροποιούνται με δύο δισουλφικούς δεσμούς.
- Δρα ως κυτοκίνη καθώς η παραγωγή της επάγεται κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης και ελέγχει την παραγωγή, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των πρόδρομων ουδετερόφιλων σε ώριμα ουδετερόφιλα, ικανά να εξουδετερώσουν το παθογόνο.

**PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor)



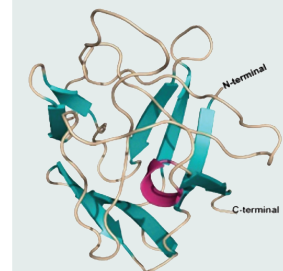
- Ο PDGF ανακαλύφθηκε το 1971 ως ο κύριος αυξητικός παράγοντας που περιέχεται στον ορό του αίματος και απελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια.
- Είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη 28-35 kDa, που αποτελείται από δύο υπομονάδες (AA ή BB ή AB) συνδεδεμένες με δισουλφικό δεσμό.
- Ο PDGF συντίθεται, αποθηκεύεται (στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων), απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και προάγει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων μεσεγχυματικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των λείων μυϊκών και των νευρογλοιακών κυττάρων.

**FGF** (Fibroblast Growth Factor)



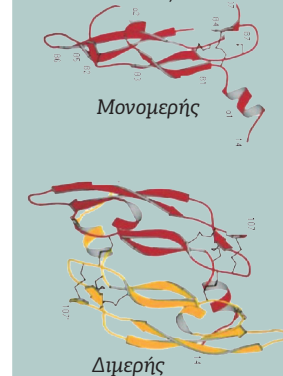
- Ο FGF1 βρέθηκε το 1973 σε εκχυλίσματα υπόφυσης και το 1974 ανακαλύφθηκε ότι προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών.
- Η οικογένεια FGF περιέχει 22 μέλη στα σπονδυλωτά από 17 έως 34 kDa που μοιράζονται μια κοινή δομή. Η δομή τους είναι όμοια με της IL-1 (βλ. **Εικόνα 9.5**). Οι FGFs είναι μονομερή που περιέχουν μια κεντρική περιοχή 150 αμινοξέων που αποτελείται από 12 αντιπαράλληλους β-κλώνους, οργανωμένους σε τρεις ομάδες δημιουργώντας ένα σχήμα τριφυλλίου (beta-trefoil fold). Οι β10 και β11 κλώνοι περιέχουν πολλά βασικά αμινοξέα που δημιουργούν τη θέση σύνδεσης της ηπαρίνης. [141]
- Οι FGFs συμμετέχουν στην αγγειογένεση, την επούλωση πληγών και την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

**KGF** (Keratinocyte Growth Factor) ή **FGF7**



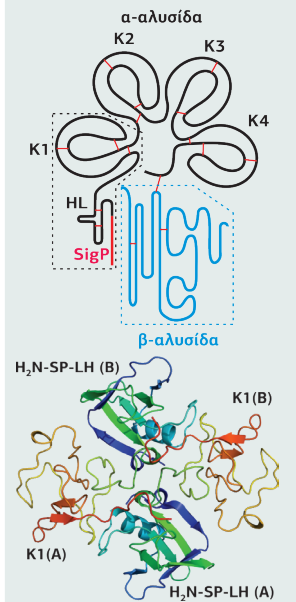
- Ο KGF (FGF7) ανακαλύφθηκε το 1989 ως ο παράγοντας που απελευθερώνεται από ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα και δρα παρακρινώς σε κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης.
- Είναι μια μονομερής 28 kDa γλυκοπρωτεΐνη. Η δραστηριότητα με την οποία συνδέεται στον υποδοχέα του είναι διμερής, με ένα μόριο ηπαρίνης να συνδέει τα δύο μονομερή. [133]
- Απελευθερώνεται κατά τη φάση επιθηλίωσης της επούλωσης του τραύματος, δηλαδή όταν τα κερατινοκύτταρα καλύπτουν την πληγή, σχηματίζοντας το επιθήλιο. Αν και ο FGF7 έχει ικανότητα σύνδεσης της ηπαρίνης παρόμοια με τον FGF1, ασκεί μιτογόνο δραστηριότητα κυρίως σε κερατινοκύτταρα, ενώ δεν είναι αποτελεσματικός σε ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα.

**VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor)



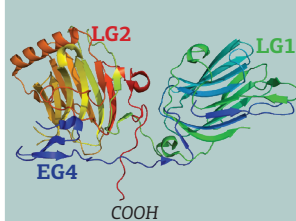
- Ο VEGF-A αναγνωρίστηκε το 1983 ως ένας παράγοντας των όγκων ικανός να διαπερνά τα αγγεία και να προκαλεί συσσώρευση του ασκτικού υγρού. Ο VEGF-B ανακαλύφθηκε το 1995.
- Η οικογένεια VEGF αποτελείται από 7 μέλη (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F και PlGF). Όλα τα μέλη είναι ομοδιμερή 34-42 kDa με έναν κοινό VEGF Homology Domain (VHD). Αυτή η κεντρική περιοχή αποτελείται από ένα **cystine knot motif**, με 6 καλά συντηρημένες Cys, που δημιουργούν 3 ενδομοριακούς δισουλφικούς δεσμούς (όπως στη δομή του PDGF). Τα μονομερή διμερίζονται με αντιπαράλληλο, side-by-side προσανατολισμό, συνδεδεμένα με έναν δισουλφικό δεσμό. [122]
- Διεγείρει την αγγειογένεση με εξειδίκευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Είναι μέρος του συστήματος που αποκαθιστά την παροχή οξυγόνου στους ιστούς όταν η κυκλοφορία του αίματος είναι ανεπαρκής, όπως σε συνθήκες υποξίας. Η συγκέντρωση του VEGF στον ορό είναι υψηλή στο βρογχικό άσθμα και στον σακχαρώδη διαβήτη. Φυσιολογική λειτουργία του VEGF είναι η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, νέων αιμοφόρων αγγείων έπειτα από τραυματισμό, και μυών μετά την άσκηση.

### HGF (Hepatocyte Growth Factor) ή Scatter Factor (SF)



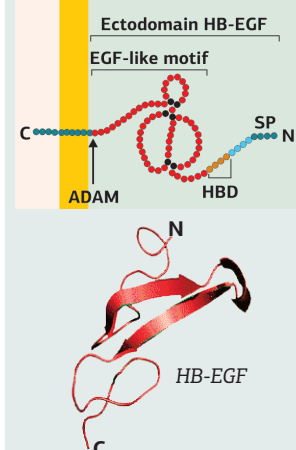
- Ο HGF ανακαλύφθηκε το **1984** ως ένας ηπατοτροφικός παράγοντας στον ορό αρουραίων που είχαν υποστεί 70% ηπατεκτομή, ικανός να επάγει τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων ενήλικων αρουραίων σε πρωτογενείς καλλιέργειες. Ονομάζεται και Scatter factor (Παράγοντας διασποράς), καθώς απελευθερώνεται από τους ινοβλάστες προωθώντας την κινητικότητα και τη διασπορά των επιθηλιακών κυττάρων.
- Εκκρίνεται ως ενιαίο αδρανές πολυπεπτίδιο, το οποίο διασπάται από σερινοπρωτεάσες σε μια α-αλυσίδα 69 kDa και μια β-αλυσίδα 34 kDa. Ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των αλυσίδων άλφα και βήτα παράγει το δραστικό, ετεροδιμερές μόριο. Ο HGF μαζί με το πλασμινογόνο ανήκουν στην υπερικογονεία των Kringle-Ser Proteases (KSPs) των S1 πεπτιδασών, αλλά δεν εμφανίζει ανικνεύσιμη ενεργότητα πρωτεάσης.
- Ο HGF αποτελείται από έξι περιοχές: έναν NH<sub>2</sub>-τελικό βρόχο φουρκέτα (HL, hairpin loop), τέσσερις περιοχές kringle (K1-K4, η καθεμιά ορίζεται από τρεις συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς) και μία περιοχή σερινοπρωτεάσης (SPH, Serine Protease Homology), οι οποίες εξελίχθηκαν από ένα προγονικό γονίδιο που περιέχει μια περιοχή Kringle, μια περιοχή πρωτεάσης και ένα πεπτίδιο ενεργοποίησης που συνδέει τις δύο περιοχές. [123]
- Στην κρυσταλλική δομή διακρίνεται ένα ομοδιμερές που αποτελείται μόνο από τον NH<sub>2</sub>-τελικό βρόχο φουρκέτα (H<sub>2</sub>N-SP-LH) και την πρώτη περιοχή kringle (K1) του κάθε μονομερούς. [123]
- Ο HGF εκκρίνεται από μεσεγχυματικά κύτταρα και δρα παρακρινώς κατά κύριο λόγο στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και στα T-λεμφοκύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι έχει έναν σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση οργάνων, όπως ήπαρ, νεφρά και πνεύμονες.

### Gas6 (Growth arrest-specific 6)



- Η Gas6 είναι μια πρωτεΐνη VKD (Vitamin K-Dependent) που ανακαλύφθηκε το **1988** μέσω της αναζήτησης γονιδίων, των οποίων η έκφραση αυξάνεται σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών που βρίσκονται σε διακοπή αύξησης. Το γονίδιο αλληλουχίστηκε το 1993.
- Η Gas6, όπως και όλα τα μέλη της οικογένειας VKD, χαρακτηρίζονται από την παρουσία καταλοίπων gamma-carboxyglutamic acid (Gla) που συμμετέχουν στην Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενη σύνδεση στα φωσfolιπίδια της μεμβράνης. Η περιοχή Gla ακολουθείται από 4 EGF-like περιοχές και ένα ζευγάρι laminin G-like (LG) περιοχών. [158]
- Οι πρωτεΐνες VDK λειτουργούν στην αιμόσταση και στη θρόμβωση. Σε Gas6 knock-out ποντίκια η χορήγηση Gas6 ενισχύει την απόκριση των αιμοπεταλίων στη θρόμβωση.

### HB-EGF (Heparin-Binding EGF-like growth factor)

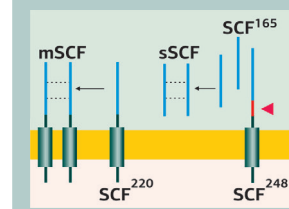


- Ο HB-EGF αναγνωρίστηκε το **1991** ως ένα υψηλά γλυκοσυλιωμένο μέλος της οικογένειας EGF, που εκκρίνεται από τα μακροφάγα, και απομονώθηκε στη βάση της υψηλής συγγένειας του για την ηπαρίνη.
- Ο HB-EGF συντίθεται ως ένα διαμεμβρανικό πρόδρομο μόριο (proHB-EGF), το οποίο υφίσταται μία σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως O-γλυκοσυλίωση της NH<sub>2</sub>-τελικής εξωκυτταρικής περιοχής και φωσφορυλίωση του μικρού κυτταροπλασματικού άκρου. Από το proHB-EGF πρωτεολυτικά αποκόβεται και απελευθερώνεται ο HB-EGF.
- Ο HB-EGF είναι μια πρωτεΐνη 20-22 kDa που αποτελείται από μια περιοχή EGF-like και μια περιοχή HBD (Heparin Binding Domain), πλούσια σε βασικά αμινοξέα, θετικά φορτισμένα σε φυσιολογικό pH, που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης. Η περιοχή αυτή απουσιάζει από τον EGF. Επίσης, στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο υπάρχει το προ-πεπτίδιο και το σηματοδοτικό πεπτίδιο SP (Signal Peptide). [177]
- Παίζει ρόλο στην επούλωση των πληγών, στην καρδιακή υπερτροφία, καθώς και στην ανάπτυξη και λειτουργία της καρδιάς.

### SCF (Stem Cell Factor) ή Kit-ligand



- Ο SCF ανακαλύφθηκε το **1991** ως το προϊόν του γονιδιακού τόπου 12q24.
- Είναι μια κυτοκίνη που συναντάται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε διαμεμβρανική μορφή 31 kDa, αλλά και σε διαλυτή διμερή μορφή 18,5 kDa. Είναι διμερές με την κάθε υπομονάδα να αποτελείται από δεσμίδες α-ελίκων. [101] [105]
- Παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση, στη σπερματογένεση και τη μελανογένεση.

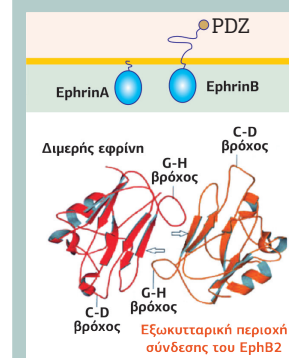


### GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor)



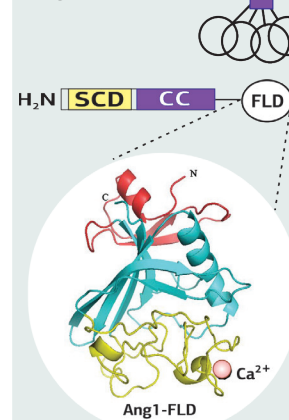
- Ο SCF παράγεται σε δύο διαμεμβρανικές μορφές λόγω του εναλλακτικού ματίσματος του εξονίου 6, SCF<sup>220</sup> και SCF<sup>248</sup>. Στον SCF<sup>248</sup>, το εξόνιο 6 διατηρείται και κωδικοποιεί μία θέση πρωτεολυτικής διάσπασης, δημιουργώντας τον διαλυτό SCF<sup>165</sup>. Ο SCF<sup>220</sup>, χωρίς τη θέση διάσπασης, σχηματίζει μεμβρανικά δεσμευμένα διμερή (mSCF) και ο SCF<sup>248</sup> μετά από πρωτεόλυση δημιουργεί τον SCF<sup>165</sup>, που διμερίζεται σχηματίζοντας τον διαλυτό SCF (sSCF). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν ότι τα διμερή SCF συγκρατούνται με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.
- Ο GDNF ταυτοποιήθηκε το **1993** ως συνέπεια της υπόθεσης ότι η νευρογλοία εκκρίνει παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση συγκεκριμένων κατηγοριών νευρώνων, όπως για παράδειγμα των ντοπαμινεργικών.
- Ο GDNF είναι μια γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη 20 kDa που δρα ως ομοδιμερές 32-42 kDa, το οποίο σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Περιέχει 7 καλά συντηρημένες Cys και ανήκει δομικά στις **cystine knot proteins**. Η δομή του χαρακτηρίζεται από δύο επιμήκη "δάκτυλα", τα οποία δημιουργούνται από ένα ζευγάρι αντιπαράλληλων β-πτυχωτών φύλλων που συνδέονται με βρόχους και μια ελικοειδή περιοχή στο άλλο άκρο του μορίου. Αντίθετα με τον NGF, το ομοδιμερές συνδέεται με έναν προσανατολισμό head-to-tail. Τα πρώτα 37 αμινοξέα του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου του GDNF εμφανίζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης στην ηπαρίνη σχηματίζοντας τον HBD (Heparin-Binding Domain), που αλληλεπιδρά με τις εξωκυτταρικές γλυκοζαμινογλυκάνες θειικής ηπαρίνης. [6]
- Ο GDNF είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση κυρίως ντοπαμινεργικών, καθώς επίσης και αισθητήριων, συμπαθητικών και εντερικών νευρώνων.

### Εφρίνες (ephrins ή ephrin ligands ή Eph family receptor interacting proteins, Eph: Erythropoietin-producing human hepatocellular)



- Μετά την ανακάλυψη του γονιδίου *eph* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα Eph (το 1987) ανακαλύφθηκαν το **1994** οι εφρίνες (ephrins) ως οι φυσικοί προσδέτες των υποδοχέων.
- Οι εφρίνες κατατάσσονται με βάση τη δομή τους και τον τρόπο σύνδεσής τους στη μεμβράνη σε δύο υποκατηγορίες, τις Ephrins-A και τις Ephrins-B. Οι Ephrins-A(1-5) είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη μέσω μιας λιπιδικής άγκυρας GPI (glycosylphosphatidylinositol) και στερούνται κυτταροπλασματικής περιοχής, ενώ οι Ephrins-B(1-3) συνδέονται στη μεμβράνη μέσω μιας διαμεμβρανικής περιοχής και περιέχουν μια μικρή κυτταροπλασματική περιοχή με ένα PDZ-binding motif. Η εξωκυτταρική περιοχή των εφρινών έχει μια δομή β-βαρελιού, που σχηματίζεται από οκτώ αντιπαράλληλους β-κλώνους. Στην περιοχή αυτή δημιουργούνται μεγάλοι και υψηλά συντηρημένοι βρόχοι, όπως ο G-H (υπεύθυνος για τον trans-ετεροδιμερισμό των εφρινών) και ο C-D (ο οποίος δημιουργεί την επιφάνεια ετεροδιμερισμού). [14]
- Οι εφρίνες ρυθμίζουν μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της καθοδήγησης των κώνων ανάπτυξης των νευραξόνων, του σχηματισμού των ορίων των ιστών, της μετανάστευσης των κυττάρων, κ.λπ. Επιπλέον, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο και κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, συμπεριλαμβανομένης της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης, της αγγειογένεσης και της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων.

### Αγγειοποιητίνες (Angiotensins)



- Δεκατρία χρόνια μετά την ανακάλυψη του VEGF-A, το **1996**, αναγνωρίστηκε μια δεύτερη οικογένεια αυξητικών παραγόντων εξειδικευμένων στο αγγειακό ενδοθήλιο, τα μέλη της οποίας ονομάζονται αγγειοποιητίνες. Οι αγγειοποιητίνη 1 (Ang1) αναγνωρίστηκε το 1996 ως ο προσδέτης των υποδοχέων Tie-2.
- Η Ang1 είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που μπορεί να σχηματίσει διμερή, τριμερή, τετραμερή ή και πιο σύνθετες δομές. Η μονομερής Ang1 είναι 70 kDa. Ωστόσο, ο υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιηθεί μόνο με το τετραμερές μόριο. Δομικά, οι αγγειοποιητίνες έχουν μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή υπεύθυνη για τη δημιουργία πολυμερών (SCD, Super Clustering Domain, αμινοξέα από 20 έως 158), μια κεντρική περιελιγμένη περιοχή (CC, Coiled Coil, 159-255aa), μία περιοχή συνδέτη και μια COOH-τελική περιοχή όμοια με το ινωδογόνο (FLD, Fibrinogen-Like Domain, 284-498 aa), υπεύθυνη για τη σύνδεση με τον υποδοχέα. [217]
- Οι αγγειοποιητίνες αποτελούν μέλη της οικογένειας των αγγειακών αυξητικών παραγόντων (VEGF) και παίζουν ρόλο στην εμβρυϊκή και μεταγεννητική αγγειογένεση. Είναι υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση της ενδοθηλιακής επένδυσης των αιμοφόρων αγγείων. Επίσης, εμπλέκονται στον έλεγχο της μικροαγγειακής διαπερατότητας, της αγγειοδιαστολής και της αγγειοσυστολής, μέσω των λείων μυϊκών κυττάρων που περιβάλλουν τα αγγεία.

### Η ανακάλυψη των NGF και EGF και η συναρπαστική ιστορία της Rita Levi-Montalcini

Ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (NGF, Nerve Growth Factor) μπορεί να θεωρηθεί ως ο πρώτος αυξητικός παράγοντας που αναγνωρίστηκε.

Η Rita Levi-Montalcini γεννήθηκε το 1909, ως το τέταρτο παιδί μιας ευκατάστατης οικογένειας Εβραίων του Τορίνο, με πατέρα μηχανολόγο και μητέρα καλλιτέχνη. Πήρε το πτυχίο της Ιατρικής με ειδίκευση στη Νευρολογία και την Ψυχιατρική το 1936 από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου του Τορίνο και, στη συνέχεια, δούλεψε στο εργαστήριο Νευροϊστολογίας του Giuseppe Levi, τον οποίο ως το τέλος αποκαλούσε "the Master". Στο εργαστήριο του Levi ανακάλυψε το πάθος της για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και υπό την καθοδήγησή του τελειοποιήθηκε πάνω στην τεχνική της χρώσης με άργυρο των νευρώνων, που θα μπορούσε κανείς να πει ότι ήταν το κλειδί για την επιτυχία της. Η τεχνική αυτή, που αναπτύχθηκε από τον Camillo Golgi και, στη συνέχεια, βελτιώθηκε από τον Santiago Ramón y Cajal, επέτρεπε σε μεμονωμένους νευρώνες να είναι ορατοί με ακρίβεια κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο.

Όταν η Levi-Montalcini απολύθηκε από την πανεπιστημιακή της θέση λόγω των Φασιστικών διαταγμάτων του Mussolini το 1938, αποφάσισε να συνεχίσει μόνη της την έρευνα. Εμπνευσμένη από την ιστορία του Cajal, ο οποίος εργαζόταν μόνος του σε ένα αυτοσχέδιο εργαστήριο έξω από την Valencia, μετέτρεψε το υπνοδωμάτιο στο σπίτι της οικογένειάς της σε εργαστήριο. Το ερευνητικό της σχέδιο ήταν να ανακαλύψει πώς τα αισθητήρια νεύρα που εκφύονται από τον υπό ανάπτυξη νωτιαίο μυελό του εμβρύου βρίσκουν τον δρόμο τους προς τα άκρα που τελικά θα νευρώσουν.

Είχε διαβάσει πρόσφατα ένα άρθρο που δημοσίευσε ο εμβρυολόγος Viktor Hamburger από το Washington University του St Louis, Missouri. Ο Hamburger ήταν μαθητής του Hans Speman (Βραβείο Nobel, 1935), ο οποίος είχε περιγράψει τον επονομαζόμενο "οργανωτή" που κατευθύνει τη δημιουργία του προσθιοπίσθιου άξονα στο στάδιο του γαστριδίου, κατά την ανάπτυξη του εμβρύου των αμφιβίων. Με αυτήν την ανακάλυψη απέδειξε ότι διαλυτοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα εμβρυϊκά κύτταρα παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης. Με τη σειρά του, ο Hamburger αφαίρεσε τα αναπτυσσόμενα άκρα των εμβρύων όρνιθας και διαπίστωσε ότι μειώθηκε το μέγεθος των γαγγλίων, δηλ. των σωμάτων των αισθητηρίων νευρώνων, οι οποίοι εκφύονται από τον νωτιαίο μυελό και κατευθύνονται προς τα αναπτυσσόμενα άκρα. Θεώρησε ότι η ατροφία αυτή οφειλόταν στην απουσία ενός επαγωγικού παράγοντα που απελευθερώνεται από τον ιστό ο οποίος θα νευρωνόταν και είναι απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε νευρώνες.

Ο Hamburger, όμως, δεν μπορούσε να δει τις νευρικές ίνες με μεγάλη λεπτομέρεια χρησιμοποιώντας το οπτικό μικροσκόπιο. Έτσι, η Levi-Montalcini αποφάσισε να επαναλάβει το πείραμα με τη μέθοδο χρώσης αργύρου. Θεώρησε ότι, όπως και ο Cajal, θα χρειαστεί έναν επωαστήρα και ένα μικροσκόπιο, καθώς και τακτική παροχή γονιμοποιημένων αυγών κότας. Χρησιμοποιώντας μικροσκοπικά νυστέρια και σπάτουλες κατασκευασμένα από βελόνες ραψίματος για να κάνει τις τομές, είδε ότι τα γάγγλια στην πραγματικότητα δεν εκφυλίζονται αμέσως. Οι νευρώνες πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται και αρχίζουν να αναπτύσσονται προς την κατεύθυνση των στόχων τους. Πεθαίνουν ακριβώς πριν τους πλησιάσουν. Κατέληξε δε στο συμπέρασμα ότι το πρόβλημα δεν ήταν η έλλειψη ενός επαγωγικού παράγοντα, αλλά ενός **αυξητικού παράγοντα** που θα έπρεπε κανονικά να απελευθερώνεται από τα αναπτυσσόμενα άκρα.

Προς το τέλος του 1942 μια βομβιστική επίθεση ανάγκασε την οικογένεια Levi-Montalcini να μετακινηθεί στην εξοχή, όπου η Rita συνέχισε την έρευνά της απόκτη, με τακτικές επισκέψεις με ποδήλατο στα γειτονικά αγροκτήματα για να αγοράζει γονιμοποιημένα αυγά. Σταμάτησε μόνο όταν η Ιταλία δήλωσε υποταγή στους Συμμάχους το 1943 και τα στρατεύματα του Χίτλερ κατέλαβαν τη Βόρεια Ιταλία.



Rita Levi-Montalcini (1909-2012)

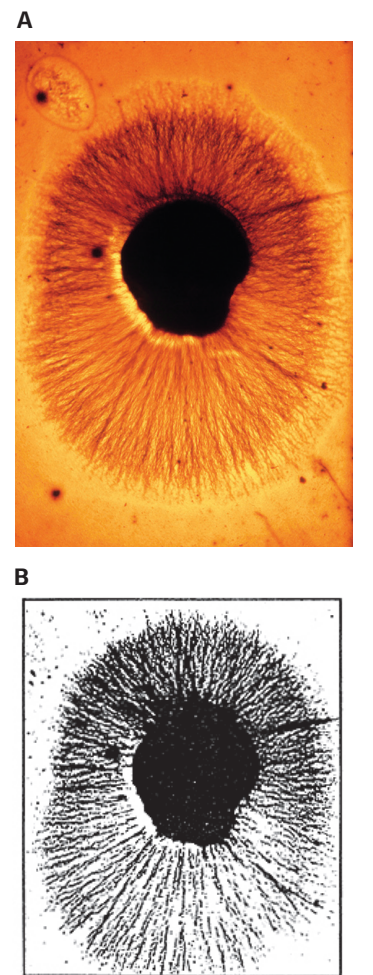
Μετά τον πόλεμο, το 1946, η Levi-Montalcini έπλευσε για τις Η.Π.Α. παρέα με τον Renato Dulbecco (Βραβείο Nobel 1975), έναν φίλο από το εργαστήριο του Levi. Εκείνη είχε προορισμό το St. Louis, εκείνος το Bloomington. Σκοπεύοντας να κάνει μια σύντομη επίσκεψη μερικών εβδομάδων στο εργαστήριο του Viktor Hamburger, παρέμεινε εκεί για 30 χρόνια. Η εργασία που οδήγησε τελικά στην ανακάλυψη του NGF ήρθε από μια παρατήρηση ενός μεταπτυχιακού φοιτητή του Hamburger, του Elmer Bueker. Ο Bueker προσπαθούσε να δει αν κάποιο κομμάτι των ταχέως αναπτυσσόμενων ιστών θα μπορούσε να προσελκύσει νευρικές ίνες με τον ίδιο τρόπο που το κάνουν τα ταχέως αναπτυσσόμενα άκρα. Εμφύτευσε ένα κομμάτι των καρκινικών κυττάρων σαρκώματος ποντικού στην επιδερμίδα ενός εμβρύου κοτόπουλου 3 ημερών και βρήκε ότι οι αισθητήριες νευρικές ίνες μεγάλωναν και εισέβαλλαν στη μάζα του όγκου σε μεγαλύτερη αφθονία από ό,τι στα αναπτυσσόμενα άκρα. Συμπέρανε, όμως, λανθασμένα ότι η μεγαλύτερη επιφάνεια του όγκου επιτρέπει περισσότερα νεύρα να μεγαλώνουν σε αυτόν.

Η Levi-Montalcini, γνωστή για την εξαιρετική της διαίσθηση, ενδιαφέρθηκε αμέσως για το πείραμα του Bueker. Θεώρησε ότι η εισβολή των νευρώνων δεν ήταν φυσιολογική. Ενώ τα νεύρα αναπτύσσονται προς τα εκφυόμενα άκρα με μεθοδευμένο τρόπο, η ανάπτυξή τους μέσα στον όγκο ήταν τεράστια και "άγρια", με τις ίνες να διακλαδώνονται τυχαία. Ήταν πεπεισμένη ότι ο μεταμοσχευμένος καρκινικός ιστός απελευθέρωνε, σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση, τον ίδιο παράγοντα που απελευθερώνουν και τα αναπτυσσόμενα άκρα, έναν παράγοντα που μπορεί να διαχυθεί έως τα γάγγλια και να διεγείρει την ανάπτυξη των νευρικών ινών.

Επανάλαβε το πείραμα, έξυπνα τοποθετώντας τον καρκινικό όγκο έξω από τον σάκο που περιείχε το έμβρυο. Αυτή η περιοχή, αν και φυσικά διαχωρισμένη, μοιράζεται την παροχή αίματος του εμβρύου. Το αποτέλεσμα του πειράματος ήταν εξαιρετικό, καθώς οι "[...] δέσμες των νευρικών ινών περνούσαν ανάμεσα στα κύτταρα του όγκου, όπως ρυακία νερού που ρέουν σταθερά πάνω από ένα στρώμα με πέτρες". Σε καμιά περίπτωση δεν συνδέονται με τα κύτταρα, όπως είναι ο κανόνας όταν οι νευρικές ίνες νευρώνουν φυσιολογικό εμβρυϊκό ή ενήλικο ιστό. Τα νεύρα φέτρωναν και μεγάλωναν άγρια, υποστηρίζοντας τη θεωρία της ότι ο όγκος είχε απελευθερώσει έναν παράγοντα που διαχέεται στο αίμα και ταξιδεύει στο έμβρυο.

Για να αποδείξει όμως πραγματικά τη θεωρία της, η Levi-Montalcini χρειαζόταν ένα σύστημα πιο αξιόπιστο και ευέλικτο από ό,τι το γονιμοποιημένο αυγό, ένα σύστημα που θα της επέτρεπε να ποσοτικοποιήσει τα αποτελέσματά της. Ήθελε, λοιπόν, να μάθει πώς να καλλιεργεί απομονωμένα γάγγλια εμβρύου όρνιθας και γνώριζε μόνο ένα εργαστήριο όπου θα μπορούσε να το κάνει, αυτό της Hertha Meyer, επίσης φοιτήτριας του Levi. Έβαλε δύο ζωντανά λευκά ποντίκια γεμάτα με όγκους στην τσάντα της και επιβίβασκε σε ένα αεροπλάνο για το Rio de Janeiro, όπου η Hertha Meyer είχε δημιουργήσει το πρώτο σύστημα κυτταροκαλλιέργειας. Στο Rio καλλιεργούσε απομονωμένα γάγγλια κοντά σε κομμάτια του σαρκώματος ποντικού. Μετά από 24 ώρες καλλιέργειας, φωτοστέφανα των νευρικών ινών αυξάνονταν γύρω από τα γάγγλια, όπως οι ήλιοι, με την υψηλότερη πυκνότητα να είναι απέναντι στον όγκο. Οι πολλές επιστολές της προς τον Hamburger περιλαμβάνουν όμορφα σχέδια των στεφανιών δείχνοντας την ισχυρή καλλιτεχνική κλίση της Levi-Montalcini (Εικόνα 8.3).

Όταν επέστρεψε από το Rio, ο Stanley Cohen είχε ενταχθεί στην ομάδα του Hamburger. Οι δυο τους εργάστηκαν μαζί για έξι χρόνια προσπαθώντας να εντοπίσουν τον αυξητικό παράγοντα που απελευθερώνεται από τον όγκο. Και οι δύο ήταν αποφασισμένοι να παρέχουν στην επιστημονική κοινότητα, που πάντα αντιδρά με σκεπτικισμό, στέρεα αποτελέσματα που να αποδεικνύουν ότι ο νευροαυξητικός παράγοντας ήταν μια πραγματικότητα. Θεώρησαν, όμως, λανθασμένα ότι ο παράγοντας ήταν νουκλεοπρωτεΐνη. Έπειτα από συμβουλή του Arthur Kornberg (Βραβείο Nobel 1959) χρησιμοποίησαν ένα εκχύλισμα δηλητηρίου φιδιών ως πηγή δραστηκότητας νουκλεάσης, με σκοπό την απομάκρυνση των νουκλεϊνικών οξέων που θεωρούσαν ότι υπήρχαν ως ακαθαρσίες στο υλικό τους. Προς μεγάλη τους έκπληξη, το



**Εικόνα 8.3**  
**Η ανακάλυψη του NGF από την Rita Levi-Montalcini.**  
Α. Όταν απομονωμένα γάγγλια αναπτύσσονταν κοντά σε κομμάτια σαρκώματος ποντικού, έπειτα από 24 ώρες καλλιέργειας, εμφανίζονταν φωτοστέφανα των νευρικών ινών που αυξάνονται γύρω από τα γάγγλια, όπως οι ήλιοι, με την υψηλότερη πυκνότητα να είναι απέναντι στον όγκο. Β. Οι επιστολές της Rita προς τον Hamburger περιλαμβάνουν όμορφα σχέδια των στεφανιών δείχνοντας την ισχυρή καλλιτεχνική της κλίση.

εκκύλιση του δηλητηρίου ενίσχυε ακόμα περισσότερο τη νευρική ανάπτυξη. Συσχετίζοντας το δηλητήριο με το σάλιο, εξέτασαν σιελογόνους αδένες των ποντικών και διαπίστωσαν ότι και αυτό είναι μια άριστη πηγή δραστηριότητας του παράγοντα που έψαχναν. Δυστυχώς, όμως, τα αποτελέσματα αυτά αύξησαν τον σκεπτικισμό της επιστημονικής κοινότητας για την ύπαρξη του αυξητικού τους παράγοντα.

Το 1960 ο Cohen και η Levi-Montalcini χρησιμοποίησαν τους σιελογόνους αδένες, για να απομονώσουν και να καθарίσουν τον αυξητικό παράγοντα των νευρών. Ταυτόχρονα, ο Cohen παρατήρησε ότι το ακατέργαστο εκκύλιση από σιελογόνους αδένες ποντικών, όταν ενέθηκε σε νεογέννητα ποντίκια, είχε μη αναμενόμενα αποτελέσματα: τα βλέφαρα των ποντικών άνοιξαν και τα δόντια τους βγήκαν νωρίτερα από το κανονικό. Αυτό το αποτέλεσμα δεν παρατηρήθηκε με καθαρό NGF και έτσι ο Cohen αποφάσισε να αναζητήσει έναν επιδερμικό αυξητικό παράγοντα σε άλλο κλάσμα του εκκυλίματος των σιελογόνων αδένων. Ο Cohen δημοσίευσε την ανακάλυψη του **EGF** (Epidermal Growth Factor) το 1960. Εκείνη την εποχή δεν ήταν σαφές αν ο EGF ενεργεί άμεσα ή έμμεσα διεγείροντας μια άλλη αναπτυξιακή δράση. Ο όρος “επιδερμικός αυξητικός παράγοντας” δεν χρησιμοποιήθηκε επίσημα παρά μόνο το 1965, όταν *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι ο αυξητικός αυτός παράγοντας δρα απευθείας επί του προσβεβλημένου ιστού.

Το 1964 η Levi-Montalcini ανέπτυξε μαζί με τον Cohen έναν αντιορό στον καθαρό NGF. Ο αντιορός αυτός κατήργησε *in vitro* το φωτοστέφανο και εξαφάνισε το αντίστοιχο τμήμα του νευρικού συστήματος, όταν εγχέεται στο νεογέννητο ποντίκι. Τα τελευταία εναπομείναντα στοιχεία του σκεπτικισμού στην επιστημονική κοινότητα διαλύθηκαν όταν ο Bradshaw, μαζί με την Ruth Hogue Angeletti, τη μόνη υποψήφια διδάκτορα που η Levi-Montalcini είχε ποτέ, καθόρισαν τη δομή της πρωτεΐνης NGF, το 1971, χρησιμοποιώντας ένα από τα πρώτα αυτοματοποιημένα sequencers. “Η Rita δεν έβαλε το όνομά της στο άρθρο, όπως θα περίμενε κάποιος στη θέση της να κάνει”, λέει ο Bradshaw. “Μια τυπική χειρονομία της Rita”.

Αν και η Levi-Montalcini αγαπούσε την επιστημονική ατμόσφαιρα στις Ηνωμένες Πολιτείες, είχε πάντα νοσταλγία για την Ιταλία και την οικογένειά της. Στις αρχές της δεκαετίας του 1960 άρχισε να μοιράζει τον χρόνο της μεταξύ St Louis και Ρώμης, ενώ από το 1961 έως το 1969 διηύθυνε το Research Center of Neurobiology του CNR (στη Ρώμη) και από το 1969 έως το 1978 το Laboratory of Cellular Biology. Το 2002 ίδρυσε το European Brain Research Institute, του οποίου έγινε πρόεδρος. Το στυλ εργασίας της ήταν αμείλικτο, απαιτητικό αλλά και παθιασμένο. Στις δεκαετίες κατά τις οποίες η έρευνά της ήταν πιο έντονη, καλούσε τους συνεργάτες της πριν από τις επτά το πρωί και μετά τις οκτώ το βράδυ, για να συζητήσουν τα πειράματα. Η Angeletti αναφέρεται στο καθεστώς αυτό ως πηγή έμπνευσης: “Even as a highly motivated young American I had never before observed this kind of dedication [...] I realize how lucky I was to work with someone so brilliant, expansive and generous of spirit [...]”. Η Rita Levi-Montalcini τιμήθηκε το 1986 με το Nobel Prize Physiology and Medicine μαζί με τον Stanley Cohen για την ανακάλυψη των αυξητικών παραγόντων. Από το 2001 έως τον θάνατό της το 2012, σε ηλικία 103 χρονών, ήταν Γερουσιαστής στην Ιταλική Γερουσία. Στα εκατοστά της γενέθλια, στην ομιλία της στη Γερουσία είπε: “Πάνω από όλα, μην φοβάστε τις δύσκολες στιγμές. Προκύπτουν τα καλύτερα από αυτές”.

#### Ανακάλυψη του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF)

Το 1912 ο Γάλλος χειρουργός και βιολόγος Alexis Carrel (1873-1944) πραγματοποίησε έναν μεγάλο αριθμό πειραμάτων, με σκοπό να καθορίσει τις συνθήκες κάτω από τις οποίες η ενεργός ζωή ενός ιστού θα μπορούσε να προεκταθεί απεριόριστα έξω από τον οργανισμό.

Όταν ο Carrel προσπάθησε να διατηρήσει τους ιστούς για μερικές μέρες σε ένα απλό ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, τα κύτταρα έχασαν την ικανότητα αύξησης και, στη συνέχεια, τη βιωσιμότητά τους. Ο Carrel υπέθεσε ότι η γήρανση και ο θάνατος της κυτταροκαλλιέργειας οφειλόταν στη συσσώρευση καταβολικών ουσιών και



Stanley Cohen (1922-2020)  
Αμερικανός βιοχημικός που τιμήθηκε, μαζί με τη Rita Levi-Montalcini, με το Nobel Prize Physiology and Medicine το 1986 για την ανακάλυψη των αυξητικών παραγόντων (NGF και EGF).



Η Rita Levi-Montalcini στην ηλικία των 100 ετών.

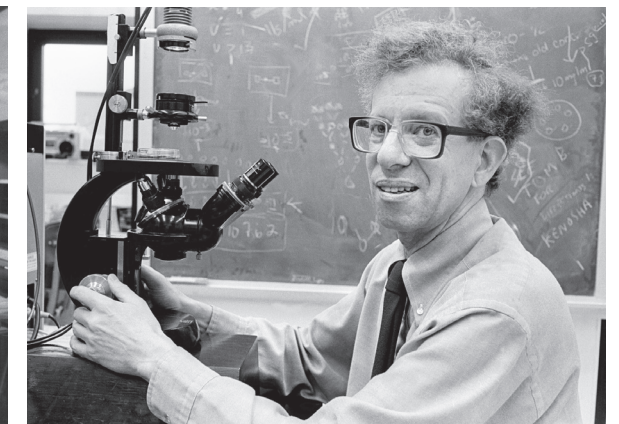
στην εξάντληση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Η παρατεταμένη κυτταρική αύξηση επιτεύχθηκε με τη συμπλήρωση αραιωμένου πλάσματος και, στη συνέχεια, βύθιση του ιστού σε ορό για λίγες ώρες. Είναι ενδιαφέρον ότι ποτέ δεν πέρασε από το μυαλό του Carrel η ιδέα ότι τα κύτταρα μπορεί να απαιτούν ειδικούς παράγοντες που βρίσκονται στον ορό.

Ο Alexis Carrel βραβεύτηκε με το βραβείο Nobel το 1912 “[...] για την αναγνώριση της δουλειάς του πάνω στην αναστόμωση αγγείων και τη μεταμόσχευση αιμοφόρων αγγείων και οργάνων”. Αμαύρωσε τη φήμη του από τη σύνδεσή του με το κίνημα της ευγονικής, που απαιτεί την καθιέρωση ιδρυμάτων εξοπλισμένων με τα “κατάλληλα αέρια”, προκειμένου να εξαφανιστούν οι παράφρονες. Υποστήριξε με ενθουσιασμό την κυβέρνηση του Vichy κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου και μετά την κατοχή της Γαλλίας του ανατέθηκε η συνεργασία με τα κατοκικά στρατεύματα των Nazi. Πέθανε προτού να παραπεμφθεί σε δίκη.

Περίπου 40 χρόνια αργότερα ο Howard Temin και ο Renato Dulbecco, δουλεύοντας ανεξάρτητα, άρχισαν να καθορίζουν τις ακριβείς απαιτήσεις για τις κυτταροκαλλιέργειες σχετικά με τα αμινοξέα, τις βιταμίνες, τα άλατα (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS) και, κυρίως, τους αυξητικούς παράγοντες. Η φιλοδοξία τους να καλλιέργησουν κύτταρα προέκυψε από το ενδιαφέρον τους για τον ρόλο των ιών στον κυτταρικό μετασχηματισμό και στον σχηματισμό όγκων. Κατά συνέπεια, η διαπίστωση ότι η απαίτηση για ορό μειώνεται δραστικά σε κύτταρα που μολύνθηκαν με ογκογόνους ιούς ήταν ένα σημαντικό ορόσημο. Πρότειναν ότι ο μετασχηματισμός θα μπορούσε να συμβεί ως αποτέλεσμα της αυξημένης ικανότητας των κυττάρων του όγκου να ανταποκριθούν στα σήματα πολλαπλασιασμού που υπάρχουν στον ορό.



Renato Dulbecco (1914 - 2012)  
Ιταλός γιατρός και βιολόγος



Howard Martin Temin (1934 - 1994)  
Αμερικανός γενετιστής και ιολόγος

Ένα σημαντικό σημείο καμπής ήταν η ανακάλυψη από τον Samuel Balk το 1971 ότι ο ορός (το διαλυτό συστατικό του θρομβοποιημένου αίματος) στηρίζει την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, ενώ το πλάσμα επιτρέπει μόνο την επιβίωση και για μια περίοδο μόνο δύο ημερών, στη συνέχεια, τα κύτταρα μπαίνουν σε λήθαργο, σταματημένα στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου. Το γεγονός ότι ο ορός περιέχει τα προϊόντα των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων οδήγησε στην υπόθεση ότι αυτά θα μπορούσαν να έχουν έναν ρόλο απαραίτητο στην παροχή αυξητικών παραγόντων. Ο Balk παρατήρησε, επίσης, ότι κύτταρα μετασχηματισμένα από τον ογκογόνο ιό RSV (Rous Sarcoma Virus) πολλαπλασιάζονται εξίσου καλά σε θρεπτικό μέσο που περιέχει είτε πλάσμα είτε ορό.

Το 1973 ο Russell Ross (1929-1999), Καθηγητής Παθολογίας στο University of Washington School of Medicine στο Seattle, πρότεινε ότι η εντοπισμένη καταστροφή στην επένδυση του αρτηριακού τοιχώματος ήταν υπεύθυνη για τη συσ-



Alexis Carrel (1873 - 1944)  
«The cell is immortal. It is merely the fluid in which it floats which degenerates. Renew this fluid at intervals, give the cell something on which to feed and, so far as we know, the pulsation of life may go on forever».

#### Εικόνα 8.4

Στους Renato Dulbecco και Howard Martin Temin απονεμήθηκε το Βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1975 “για τις ανακαλύψεις τους σχετικά με την αλληλεπίδραση των ογκογόνων ιών με το γενετικό υλικό των κυττάρων”. Η διαπίστωσή τους ότι η απαίτηση για ορό μειώνεται δραστικά σε καλλιέργεια κυττάρων που μολύνθηκαν με ογκογόνους ιούς ήταν ένα ορόσημο για την ανακάλυψη του PDGF.

σώρευση λείων μυϊκών κυττάρων μέσα στα τοιχώματα της αρτηρίας, αυξάνοντας τον εσωτερικό χιτώνα και περιορίζοντας τον αυλό της αρτηρίας. Το 1974 ο Ross αναγνώρισε τον αυξητικό παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF, Platelet Derived Growth Factor), ο οποίος διεγείρει την ανώμαλη ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων και τη μετανάστευσή τους στον εσωτερικό χιτώνα στο σημείο της βλάβης του αρτηριακού τοιχώματος.

Το ίδιο έτος, 1974, η Nancy Kohler και ο Allan Lipton έδειξαν ότι ο παράγοντας που απομονώνεται από τα αιμοπετάλια μπορεί να διεγείρει τους 3T3 ινοβλάστες ποντικών, που βρίσκονται σε λήθαργο, αδρανείς, ώστε να εισέλθουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και να διπλασιάσουν το DNA τους. Στη συνέχεια, ο ίδιος αυξητικός παράγοντας ανακαλύφθηκε σε καρκινικά κύτταρα και σε κύτταρα που επουλώνουν τις πληγές.

Με τον καθαρισμό του PDGF από ανθρώπινα αιμοπετάλια, το ερώτημα για το πώς αυτός δρα, απαντήθηκε γρήγορα. Ο PDGF υφίσταται ως διμερές ενωμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς, έτσι ώστε η δέσμευσή του στον υποδοχέα του αυτομάτως να προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα κινάσης Tyr. Αυτό αποτελεί το σήμα για την ενεργοποίηση. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι το ογκογονίδιο του ιού του σαρκώματος των πιθηκοειδών *v-sis* (simian sarcoma virus) είναι ομόλογο με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PDGF. Αυτή ήταν άλλη μια σαφής σχέση μεταξύ ενός αυξητικού παράγοντα και ενός ογκογόνου ιού. Αυτήν τη φορά, ωστόσο, το σήμα για ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό οφείλεται στην υπερβολική παραγωγή αυξητικού παράγοντα και όχι στην έκφραση ενός ιδιόσυστα ενεργοποιημένου υποδοχέα. Επιπλέον, ο *v-sis* προκαλεί κυτταρικό μετασχηματισμό στα πρωτεύοντα.

Ο Howard Temin και ο Renato Dulbecco μοιράστηκαν το βραβείο Nobel το 1975 για τις ανακαλύψεις τους που αφορούν την αλληλεπίδραση των ογκογόνων ιών με το γενετικό υλικό του κυττάρου. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ένα ογκογονίδιο θα μπορούσε να προκαλέσει έναν όγκο γίνονταν σαφέστεροι. Εδώ έχουμε ένα παράδειγμα ενός γονιδίου θηλαστικών, λαθραία δανεισμένο σε έναν ιό, το οποίο στη συνέχεια μεταλλαγμένο ή ακρωτηριασμένο επιστρέφει στον ξενιστή με μόλυνση, προκαλώντας τον κυτταρικό μετασχηματισμό και τον σχηματισμό όγκων.

### Η ανακάλυψη των παραγόντων που διεγείρουν αποικίες, CSFs (Colony Stimulating Factors)

Το 1966 δύο ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν, ταυτόχρονα και ανεξάρτητα μεταξύ τους, τον CSF (Colony-Stimulating Factor), η ομάδα του Donald Metcalf (1929-2014) στο Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research στη Μελβούρνη της Αυστραλίας και η ομάδα του L. Sachs στο Rehobot του Ισραήλ.

Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 ο καθηγητής Don Metcalf θεωρούσε ότι πρέπει να υπάρχει ένας βιολογικός μηχανισμός -μία ή περισσότερες ορμόνες- που να ελέγχει την παραγωγή των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο Metcalf άρχισε μια συνεργασία με τον Ray Bradley στο Πανεπιστήμιο της Μελβούρνης, έχοντας κοινό ενδιαφέρον τη λευχαιμία, έναν καρκίνο των κυττάρων του αίματος που ξεκινά από τον ερυθρό μυελό των οστών. Το ερευνητικό τους project ήταν η ανάπτυξη κυττάρων λευχαιμίας από ποτίνικια, χρησιμοποιώντας τη νέα τεχνική που ο Bradley είχε μάθει στο Denver των ΗΠΑ από έναν από τους πρωτοπόρους της ιστοκαλλιέργειας, τον Theodore Ruck. Προσπάθησαν να καλλιεργήσουν κύτταρα του θύμου ποντικών με λευχαιμία τοποθετώντας τα σε ένα ημιστερεό μέσο που περιείχε άγαρ, πάνω από ένα στρώμα αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών που χρσίσμευαν ως θρεπτικό υλικό. Ωστόσο, παρατήρησαν με έκπληξη ότι ενώ τα κύτταρα του θύμου δεν αυξήθηκαν, δημιουργήθηκαν αποικίες διαφοροποιημένων λευκοκυττάρων από τα κύτταρα του μυελού.

Ο Bradley και ο Metcalf είχαν κατά λάθος ανακαλύψει έναν τρόπο να αναπτύσσονται τα κύτταρα του μυελού των οστών. Ο Metcalf θυμάται την ημέρα που ο Bradley έφερε τα τρυβλία με τα κύτταρα το 1965. "Κανείς στον κόσμο δεν ήταν σε θέση να αναπτύξει κύτταρα του μυελού των οστών ποτέ πριν. Υπήρχαν βιβλία που γράφτηκαν λέγοντας ότι ήταν αδύνατο να γίνει. Αυτό που είχε συμβεί ήταν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα έκαναν κάτι που επέτρεψε στα κύτταρα του μυελού των οστών να κάνουν αποικίες".

Από τα πειράματα του Bradley και Metcalf δύο πράγματα έγιναν αρκετά προφανή. Για πρώτη φορά στην ιστορία οι άνθρωποι θα μπορούσαν να αναπτύξουν και να διαφοροποιήσουν από ένα μόνο αιμοποιητικό κύτταρο αποικίες-κλώνους κατά τη διάρκεια μιας εβδομάδας επώασης. Δεύτερον, η δημιουργία της αποικίας οφειλόταν σε έναν παράγοντα που διαχεόταν από το υπερκείμενο στρώμα που περιείχε τα λεμφοειδή κύτταρα. Χωρίς αυτόν τον παράγοντα στο μέσο της καλλιέργειας δεν δημιουργούνταν οι αποικίες. Ο Metcalf ονόμασε αυτόν τον παράγοντα CSF (Colony Stimulating Factor). Επίσης, ο Metcalf θεώρησε ότι η δραστηριότητα διέγερσης αποικιών που παρέχεται στις καλλιέργειες από τα λεμφοειδή κύτταρα είναι στην πραγματικότητα ένας υποχρεωτικός μηχανισμός ρύθμισης των κοκκιοκυττάρων και των μακροφάγων.



Don Metcalf (1929-2014)

### Εικόνα 8.5

A. Ο Donald Metcalf στο Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research στη Μελβούρνη της Αυστραλίας από το 1965 έως το 1985 αναγνώρισε και απομόνωσε 4 colony-stimulating factors. B. Οι αποικίες που προήλθαν από κύτταρα του μυελού των οστών από το πείραμα του Ray Bradley. Ο Metcalf θυμάται: "Αυτές οι αποικίες είναι τριδιάστατοι πληθυσμοί κυττάρων με θαυμάσια μεταβλητά σχήματα και μεγέθη, μοιάζουν με γαλαξίες, όπως προσεγγίζονται από μια γρήγορη κίνηση διαστημόπλοιου. Η ομορφιά τους συνεχίζει να με συναρπάζει, ακόμα και μετά από 35 χρόνια".

Την ίδια ακριβώς περίοδο, το 1966, στο Ισραήλ ο L. Sachs και η ομάδα του έδειξαν ενδιαφέρον για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης κλώνων αιμοποιητικών κυττάρων. Αρχικά χρησιμοποίησαν ένα υγρό σύστημα καλλιέργειας και, στη συνέχεια, ένα μέσο που περιέχει ημιστερεό άγαρ, το οποίο εμποδίζει στα κύτταρα να μετακινούνται, έτσι ώστε, αν ένα μόνο κύτταρο αρχίζει να πολλαπλασιάζεται, όλα τα κύτταρα που προέρχονται από αυτό θα παραμείνουν συγκεντρωμένα γύρω από το σημείο στη μήτρα, όπου το πρώτο κύτταρο βρισκόταν αρχικά, δημιουργώντας "αποικίες-colonies". Σε αντίθεση με τους Αυστραλούς, ως στρώμα τροφοδότης χρησιμοποίησαν αιμοποιητικά κύτταρα εμβρύου ποντικού. Τα αποτελέσματά τους ήταν πανομοιότυπα με τα αποτελέσματα της ομάδας της Μελβούρνης. Δημιουργήθηκαν αποικίες των εμβρυακών κυττάρων, υπό τη διέγερση ενός παράγοντα που διαχεόταν από το υπερκείμενο στρώμα που περιείχε τα αιμοποιητικά κύτταρα. Στη συνέχεια, βρήκαν ότι καλλιέργειες με άλλους τύπους κυττάρων μπορούσαν να διεγείρουν τον σχηματισμό αιμοποιητικών αποικιών. Ονόμασαν τον παράγοντα "mashran-gm". Αυτό το όνομα προήλθε από μια λέξη στα εβραϊκά που σημαίνει "στέλνω εμπρός" και από τα αρχικά g (κοκκιοκύτταρα, granulocytes) και m (μακροφάγα, macrophages). Πολλά άλλα ονόματα δόθηκαν στους προαγωγείς του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των μυελοειδών κυττάρων, αλλά ο "παράγοντας διέγερσης αποικιών" ήταν το όνομα που επικράτησε.

Σήμερα είμαστε όλοι εξοικειωμένοι με το φαινόμενο της πολλαπλής ανακάλυψης: δύο τελείως διαφορετικά εργαστήρια, από ατύχημα, να "σκοντάψουν" στην ίδια παρατήρηση περίπου την ίδια ώρα. Γιατί συνέβη εκείνη τη στιγμή; Ήταν μια καθαρή σύμπτωση. Αν και οι Ισραηλινοί ήταν πεπεισμένοι ότι ο Metcalf είχε διαβάσει για την τεχνική τους και την είχε αντιγράψει, στην πραγματικότητα αυτό δεν είναι αλήθεια.

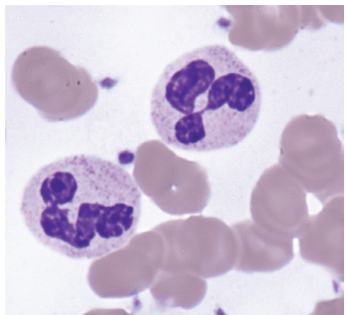
Ας επιστρέψουμε, όμως, στην Αυστραλία. Από τη στιγμή που ανακάλυψαν την ύπαρξη του άγνωστου παράγοντα που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων έως τη στιγμή που έπεισαν την επιστημονική κοινότητα για την *in vivo* ύπαρξη του παράγοντα αυτού, τον οποίον και ταυτοποίησαν ως CSF, ήταν ένα τιτάνιο ταξίδι 35 χρόνων.

Το πρώτο πράγμα που έπρεπε να αποδειχθεί ήταν ότι ο CSF ανιχνεύεται στον ορό και στα ούρα και, στη συνέχεια, και σε άλλους ιστούς, γιατί μόνο τότε θα είχε





Ο Richard Stanley καθώς συλλέγει κλάσματα από ανθρώπινα ούρα για την απομόνωση του CSF, 1969.



Τα **ουδετερόφιλα** είναι ο πιο άφθονος τύπος κοκκιοκυττάρων και ο πλέον άφθονος (60% έως 70%) τύπος λευκών αιμοσφαιρίων στα περισσότερα θηλαστικά. Σχηματίζονται από βλαστοκύτταρα στον ερυθρό μυελό των οστών. Είναι βραχυβία και άκρως κινητικά, καθώς μπορούν να εισέλθουν σε μέρη του ιστού όπου δεν μπορούν άλλα κύτταρα ή μόρια. Τα ουδετερόφιλα είναι ένας τύπος φαγοκυττάρων και συνήθως βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Κατά την έναρξη (οξεία) φάση της φλεγμονής, ιδιαίτερα ως αποτέλεσμα της βακτηριακής λοίμωξης και ορισμένων καρκίνων, τα ουδετερόφιλα στρατολογούνται στο σημείο της βλάβης μέσα σε λίγα λεπτά.

νόημα να είναι ένας ρυθμιστής. Επίσης, σε περίπτωση κάποιας λοίμωξης ο οργανισμός χρειάζεται επιπλέον προστασία με αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων (πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα) οπότε τα επίπεδα του CSF θα πρέπει να ανεβαίνουν, αλλιώς δεν θα ήταν ένας καλός υποψήφιος για ρυθμιστής. Ο Metcalf ξόδεψε περίπου τρία χρόνια μέτρησης των επιπέδων CSF στα ούρα, στον ορό καθώς και σε διαφορετικούς ιστούς ασθενών με λοιμώξεις, ψάχνοντας για να βρει πού υπάρχει η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του CSF.

Ένας “άτυχος” φοιτητής PhD, ο Richard Stanley (σήμερα διακεκριμένος Καθηγητής στη Νέα Υόρκη), ανέλαβε τον καθαρισμό του CSF από ανθρώπινα ούρα, καθώς ήταν μια καλή και φθηνή πρώτη ύλη. Είχαν τοποθετήσει κάδους 50 λίτρων για τη συλλογή των ούρων στο Ινστιτούτο. Χρειάστηκαν εννιά χρόνια για να καθαριστεί ο CSF από τα ανθρώπινα ούρα. Ο Richard δεν κατάφερε να ολοκληρώσει το έργο του καθώς έφυγε στο Τορόντο, για να εργαστεί ως μεταδιδακτορικός.

Όμως ο CSF από τα ούρα διέγειρε μόνο τον σχηματισμό μικρών αποικιών μακροφάγων, όχι των μεγάλων “όμορφων” αποικιών κοκκιοκυττάρων, που είχαν προκύψει με την αρχική τεχνική του Bradley. Έως τα τέλη της δεκαετίας του 1970 έγινε αντιληπτό ότι υπήρχαν αρκετοί CSFs. Όταν ο Metcalf άρχισε να αναλύει τι είδους CSF εκκρινόταν από κάθε ιστό, ανακάλυψε ότι ο πνεύμονας ποντικών μολυσμένων με μια ενδοξίνη παρήγαγε έναν CSF που δεν είχε καμία απολύτως χημική σχέση με τον CSF των ούρων (ο οποίος τώρα ονομάζεται M-CSF, διότι διεγείρει τον σχηματισμό αποικιών μακροφάγων). Ο CSF του πνεύμονα ήταν ένα πολύ μικρότερο μόριο, που διεγείρει τον σχηματισμό αποικιών κοκκιοκυττάρων μακροφάγων και γι’ αυτό ονομάζεται GM-CSF (Granulocyte Macrophage - CSF).

Πήρε αρκετό χρόνο στον Metcalf να ανακαλύψει τον τέταρτο CSF, τον πιο διάσημο από όλους, τον G-CSF. Για δύο χρόνια δεν είχε αντιληφθεί ότι σε ορισμένα τρυβλία είχαν αναπτυχθεί “άθλιες” μικρές αποικίες, καθώς θεωρούσε ότι ήταν απλά νεκρές αποικίες! Ο CSF που προκαλεί τον σχηματισμό αποικιών μικρών κοκκιοκυττάρων - ουδετερόφιλων έγινε γνωστός ως G-CSF και είναι αυτός που έκανε εκατομμύρια πωλήσεις από τις φαρμακευτικές εταιρείες.

Μεταξύ 1984 και 1987 η εφαρμογή μεθόδων της σύγχρονης μοριακής βιολογίας οδήγησε στην κλωνοποίηση του cDNA των CSFs ποντικού και ανθρώπου. Έως τα τέλη της δεκαετίας του 1980 η κλωνοποίηση γονιδίων επέτρεψε τη μαζική παραγωγή των CSFs, που πραγματοποιήθηκε σε κλινικές σε όλο τον κόσμο. Έως σήμερα η ανακάλυψη του καθηγητή Metcalf έχει ωφελήσει περισσότερα από 20 εκατομμύρια ασθενών με καρκίνο. Η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει μυελοκαταστολή και απaráδεκτα χαμηλά επίπεδα ουδετερόφιλων (ουδετεροπενία), κάνοντας τους ασθενείς επιρρεπείς σε μολύνσεις και σήψη. Ο G-CSF διεγείρει την παραγωγή κοκκιοκυττάρων, ενός τύπου λευκών αιμοσφαιρίων. Στην ογκολογία και την αιματολογία, μια ανασυνδυασμένη μορφή του G-CSF χρησιμοποιείται στους ασθενείς με καρκίνο, για να επιταχύνουν την ανάκτηση από ουδετεροπενία έπειτα από χημειοθεραπεία, επιτρέποντας αγωγές θεραπείας υψηλότερης έντασης. Χρησιμοποιείται μέσω υποδόριας ή ενδοφλέβιας οδού.

Οι CSFs έφεραν, επίσης, επανάσταση στις μεταμοσχεύσεις, οδηγώντας σε νέες τεχνικές για την εκτέλεση μεταμόσχευσης μυελού των οστών σε ασθενείς με παθήσεις του αίματος, όπως η λευχαιμία.

### Η ανακάλυψη του ηπατοτροφικού παράγοντα HGF (Hepatocyte Growth Factor)

Το ήπαρ διαδραματίζει ποικίλους ρόλους στον μεταβολισμό του οργανισμού και αναγεννάται ενεργά έπειτα από μερική ηπατεκτομή ή κατά την ηπατίτιδα. Πολλές ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να προσδιορίσουν έναν παράγοντα “φάντασμα” που δρα ως έναυσμα για την αναγέννηση του ήπατος έπειτα από 70% ηπατεκτομή, καθώς πειράματα διασταυρούμενης κυκλοφορίας μεταξύ ενός ζευγαριού παραβιωτικών αρουραίων (δηλαδή, φυσιολογικών αρουραίων και αρουραίων που είχαν υποστεί μερική ηπατεκτομή συνδεδεμένων χειρουργικά μεταξύ τους, ώστε να μοι-

ράζονται ένα κοινό κυκλοφορικό σύστημα) έδειξαν ότι το ήπαρ των φυσιολογικών αρουραίων αναγεννάται από έναν παράγοντα που κυκλοφορεί στο αίμα. Τα πειράματα παραβίωσης ήταν κοινά στα τέλη του 19ου αιώνα, με σκοπό να ελεγχθεί ο ρόλος των παραγόντων που κυκλοφορούν στο αίμα στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού.

Παρόλα αυτά, ένας τέτοιος χυμικός παράγοντας δεν είχε εντοπιστεί τα τελευταία 30 χρόνια, καθώς οι ορμονικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύπλοκες *in vivo* και ένα απλό, ευαίσθητο και αξιόπιστο *in vitro* σύστημα δεν ήταν διαθέσιμο έως τις αρχές του 1980, όταν ο Toshikazu Nakamura στο Πανεπιστήμιο της Osaka έδειξε ότι τα ηπατοκύτταρα ενήλικου αρουραίου σε πρωτογενείς καλλιέργειες διατηρούσαν πολυάριθμες ηπατο-εξειδικευμένες λειτουργίες και αποκρίνονταν σε διάφορες ορμόνες, αλλά δεν μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν.

Το 1983 ο Nakamura απέδειξε ότι όταν στο μέσο προστεθεί ινσουλίνη και EGF, τα ηπατοκύτταρα εισέρχονται στη φάση S και παραμένουν στη φάση G2. Όμως, όταν η κυτταρική πυκνότητα μειώνεται στο μισό ή στο 1/3, ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται μετά την προσθήκη ινσουλίνης και EGF, αναδεικνύοντας ότι ο πολλαπλασιασμός των ώριμων ηπατοκυττάρων ρυθμίζεται από την κυτταρική πυκνότητα. Παρόλα αυτά, δεν βρέθηκε καμία απόδειξη *in vivo* ότι αυτές οι δύο ορμόνες αυξάνονται στον ορό έπειτα από μερική ηπατεκτομή. Αντιθέτως, υπάρχουν πολλές αναφορές ότι τα επίπεδα της ινσουλίνης του αίματος μειώνονται γρήγορα μετά την επέμβαση. Επιπλέον, η συγκέντρωση EGF στο φυσιολογικό αίμα αρουραίου είναι το ένα δέκατο της αποτελεσματικής δόσης για τη σύνθεση του DNA σε καλλιεργούμενα ηπατοκύτταρα. Συνεπώς, ο ορός πρέπει να περιέχει άλλους ενδογενείς αυξητικούς παράγοντες ηπατοκυττάρων εκτός της ινσουλίνης και του EGF.

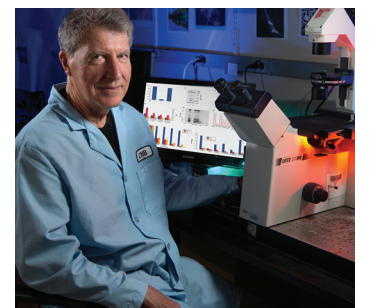
Χρησιμοποιώντας αυτήν τη μέθοδο εντοπίστηκε το 1984 ένας υποθετικός ηπατοτροφικός παράγοντας στον ορό αρουραίων, που είχαν υποστεί 70% ηπατεκτομή, ικανός να επάγει τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό ηπατοκυττάρων ενήλικων αρουραίων σε πρωτογενείς καλλιέργειες. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε “αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων” ή “Hepatotrofin”. Το 1986 ο HGF απομονώθηκε από τα αιμοπετάλια 3.000 αρουραίων, αποδεικνύοντας ότι είναι ένας νέος αυξητικός παράγοντας.

### Η ανακάλυψη νευροτροφικών παραγόντων που εκκρίνονται από νευρογλοιακά κύτταρα

Η ανακάλυψη μορίων με θεραπευτική αξία συχνά συμβαίνει μάλλον από τύχη παρά από σκόπιμο πειραματισμό. Ανάλογη είναι η περίπτωση του GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor), το πρώτο μέλος μιας νέας οικογένειας νευροτροφικών παραγόντων με θεραπευτικό δυναμικό για ντοπαμινεργικούς και άλλους τύπους νευρώνων, με κύριο ρόλο στην ασθένεια του Parkinson.

Μια μελέτη του Dave Schubert, Salk Institute, San Diego, το 1986, που στόχευε στον διαχωρισμό με διδιάστατη ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, που εκφράζονται από μία ποικιλία νευρωνικών και νευρογλοιακών κυτταρικών σειρών, έμελλε να ήταν καθοριστική για την ανακάλυψη του GDNF. Το εκπληκτικό αποτέλεσμα της παραπάνω έρευνας ήταν ότι στο gel το μοτίβο των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από διάφορες κυτταρικές σειρές ήταν εντυπωσιακά διαφορετικό, ενώ το μοτίβο των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών τους ήταν παρόμοιο. Ήταν προφανές ότι το εκκρινόμενο κλάσμα πρωτεϊνών ήταν η πηγή για την αναγνώριση πρωτεϊνών, εξειδικευμένων ανά κυτταρικό τύπο.

Η Martha C. Bohn (Medical School, Chicago) εμπνεύστηκε από την έρευνα του Schubert θεωρώντας ότι με αυτήν την προσέγγιση θα μπορούσε να ανακαλύψει νέα μόρια, τα οποία έχουν τροφικές δράσεις σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, καθώς είχε ήδη προταθεί από τον Alain Prochiantz (Collège de France, Paris) η ύπαρξη παραγόντων σε συγκεκριμένες περιοχές του αναπτυσσόμενου εγκεφάλου με αυξητική δράση στους ντοπαμινεργικούς (DA) νευρώνες. Επίσης, διάφοροι τύποι μοσχευμάτων ιστών αναφέρθηκε ότι διεγείρουν την αναγέννηση ινών χημικά τραυματισμένων ντοπαμινεργικών νευρώνων στον ενήλικο ποντικό, προτείνοντας



Dave Schubert



Martha C. Bohn

την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων που μπορούν να αναζωογονήσουν ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Ωστόσο, η έλλειψη μεθόδων εκείνη την εποχή για τον εντοπισμό πρωτεϊνών σε χαμηλές συγκεντρώσεις με δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση ή για τον προσδιορισμό mRNAs εξειδικευμένων για συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους καθυστέρησε την απομόνωση αυτών των παραγόντων.

Το 1991, ο Jürgen Engle, ένας μεταδιδακτορικός φοιτητής στο εργαστήριο της Bohn, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες εμβρυϊκών ντοπαμινεργικών νευρώνων, σάρωσε τρεις νευρογλοιακές καρκινικές κυτταρικές σειρές και μία νευρωνική κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυτώματος (PC12), αναζητώντας εκκρινόμενους παράγοντες που προωθούν την αύξηση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, τη νευρωνική επιβίωση και την έκφυση νευριτών. Διαπιστώθηκε ότι και οι τρεις νευρογλοιακές κυτταρικές σειρές εκκρίνουν παράγοντα(-ες) με ισχυρή DA δραστικότητα, ενώ, αντιθέτως, καμία δραστηριότητα DA δεν εκκρίθηκε από τη νευρωνική σειρά PC12.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο η Leu-Fen H. Lin (Synergen Inc., Colorado) το 1993 απομόνωσε και καθάρισε, από τη νευρογλοιακή κυτταρική σειρά B49, μια γλυκοπρωτεΐνη με ισχυρή νευροτροφική DA δραστικότητα, την οποία ονόμασε GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor). Ο GDNF στηρίζει την επιβίωση των DA νευρώνων σε καλλιέργεια, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,01-10 ng/ml) και ως εκ τούτου είναι ο πιο ισχυρός ντοπαμινεργικός νευροτροφικός παράγοντας.

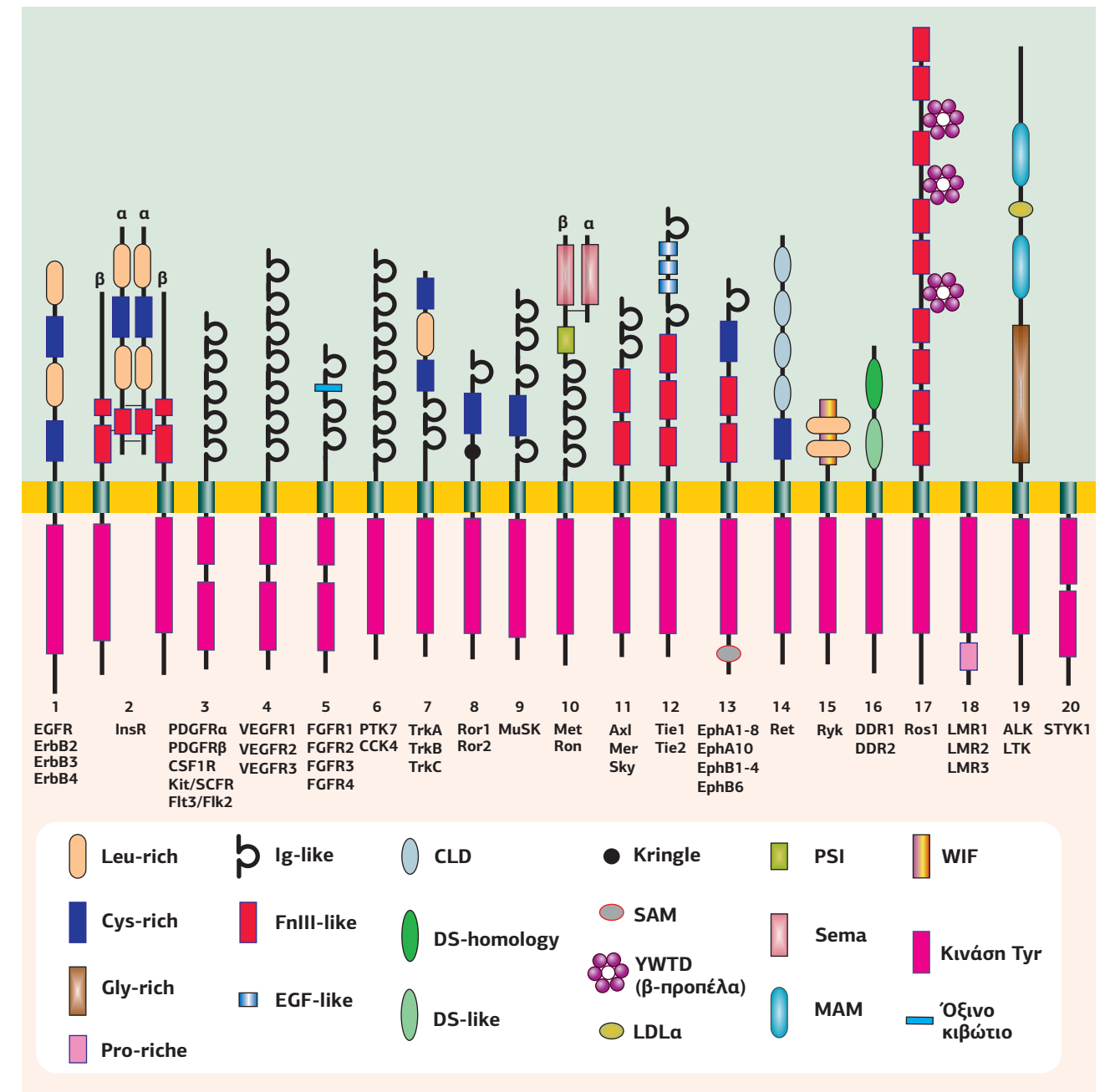
Η ταχύτητα με την οποία προχώρησε η έρευνα πάνω στον GDNF είναι εκπληκτική σε σχέση με εκείνη των άλλων νευροτροφικών παραγόντων. Μέσα σε τρία χρόνια μετά την ανακάλυψή του, όλα τα κλασικά κριτήρια που καθορίζουν έναν νευροτροφικό παράγοντα είχαν εκπληρωθεί. Η κατανομή της έκφρασης του GDNF στο νευρικό σύστημα, καθώς και σε περιφερικούς ιστούς χαρτογραφήθηκε, καθώς επίσης ταυτοποιήθηκαν και οι νευρωνικοί του στόχοι: εκτός από τους DA νευρώνες, είναι οι κινητικοί, νοραδρενεργικοί, χολινεργικοί, σεροτονεργικοί και αισθητήριοι νευρώνες, τα κύτταρα Purkinje και οι νευρώνες του μεντερικού πλέγματος. Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκαν άλλα τρία μέλη της οικογένειας προσδετών GDNF ή GFLs (GDNF Family Ligands): η neurturin (NRTN) το 1996, η artemin (ARTN) και η persephin (PSPN) το 1998, με σειρά βιολογικής δραστικότητας GDNF >> NRTN > ARTN > PSPN.

Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι οι μελέτες που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα του GDNF στη βελτίωση νευροεκφυλισμού σε ζωικά μοντέλα της νόσου του Parkinson και της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis). Απομένει να καθοριστεί αν ο GDNF θα είναι μια αποτελεσματική θεραπεία σε ανθρώπους με αυτές τις ασθένειες.

#### 1.4 Δομή και ταξινόμηση των RTKs

Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν στην εξωκυτταρική NH<sub>2</sub>-τελική τους πλευρά μια περιοχική σύνδεσης του προσδέτη, ενώ στην ενδοκυτταρική COOH-τελική τους πλευρά μια περιοχική κινάσης τυροσίνης (Εικόνα 8.2A). Το διαμεμβρανικό τμήμα των υποδοχέων αυτών διαπερνά τη μεμβράνη με τη μορφή α-έλικας. Το ενδοκυτταρικό τους τμήμα εκτός από τη συντηρημένη περιοχική της κινάσης τυροσίνης περιλαμβάνει και άλλα τμήματα ρυθμιστικών αλληλουχιών, στα οποία λαμβάνουν μέρος αντιδράσεις αυτοφωσφορυλίωσης, φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, αντίστοιχα.

Στα θηλαστικά υπάρχουν 20 οικογένειες υποδοχέων με δράση κινάσης τυροσίνης, οι οποίες ταξινομούνται ανάλογα με τα διαφοροποιημένα τμήματα των αλληλουχιών των εξωκυτταρικών περιοχών τους. Αυτές οι οικογένειες με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε υποοικογένειες ανάλογα με τον προσδέτη από τον οποίο ενεργοποιούνται (Εικόνα 8.6).



Πέρα από την κοινή δομή που εμφανίζουν, οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης έχουν και ορισμένες δομικές ιδιαιτερότητες, οι οποίες τους κατατάσσουν σε 20 διαφορετικές οικογένειες.

1. Η **οικογένεια EGFR/ ErbB2-4**. Δέκα χρόνια μετά την ανακάλυψη του EGF από τον Stanley Cohen, το 1973, ανακαλύφθηκε ο EGFR (ErbB1), και στη συνέχεια διάφορες ισομορφές του, HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) και HER4 (ErbB4). Ο συμβολισμός ErbB προέρχεται από το όνομα ενός ιικού ογκογονιδίου (Erythroblastic leukemia viral oncogene), με το προϊόν του οποίου οι υποδοχείς αυτοί είναι ομόλογοι, με τη διαφορά ότι ο v-Erb είναι ιδιόσυστατα ενεργός. Το εξωκυτταρικό τμήμα των EGFRs περιέχει τέσσερις περιοχές (I-IV). Οι περιοχές I και III, 160 αμινοξέων η καθεμιά, περιέχουν επαναλήψεις πλούσιες σε Leu (LRR-like, Leucine Riche Repeats), οι οποίες συνδέονται με τον προσδέτη. Οι περιοχές II και IV είναι πλούσιες Cys και αποτελούνται από 150 αμινοξέα η καθεμιά. Οι προσδέτες των υποδοχέων αυτής της

**Εικόνα 8.6**  
Ταξινόμηση των υποδοχέων κινάσες τυροσίνης βάσει της οργάνωσης των δομικών τους περιοχών. [72] [100]  
CLD: Cadherin-Like Domain, DS-Homology: Discoidin, SAM: Sterile Alpha Motif, PSI: Plexins, Semaphorins, Integrins, MAM: Meprin, A5, mu, WIF: Wnt Inhibitory Factor.

Ο όρος **TGF** είναι αυθαίρετος, καθώς τα δύο μέλη της οργάνωσης, TGF-α και TGF-β, είναι δομικά και γενετικά άσχετα και δρουν μέσω διαφορετικών υποδοχών. Επιπλέον, δεν προκαλούν πάντα κυτταρικό μετασχηματισμό και δεν είναι οι μόνιμοι αυξητικοί παράγοντες που προκαλούν μετασχηματισμό.

οικογένειας είναι ο EGF (Epidermal Growth Factor), ο TGF-α (Transforming Growth Factor-α), ο HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) και η neuregulin.

2. Η οικογένεια των υποδοχών ινσουλίνης περιλαμβάνει τρία μέλη:

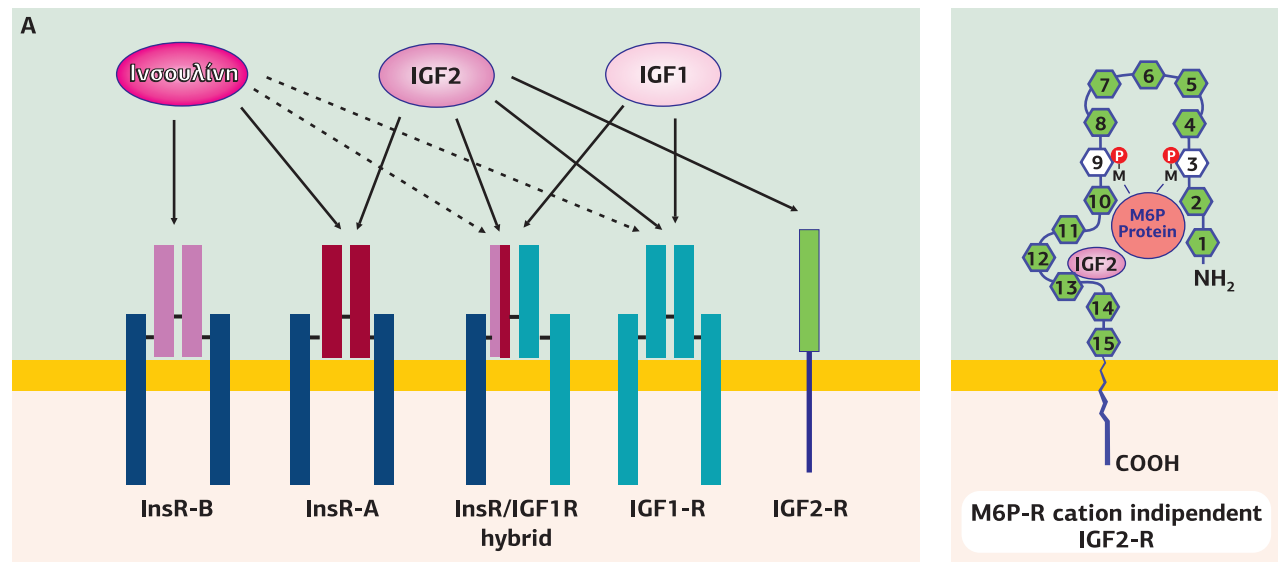
- τον **InsR** με δύο ισομορφές, τον **InsR-A**, ο οποίος έχει υψηλή συγγένεια για τον IGF2 και χαμηλή για την ινσουλίνη, και τον **InsR-B**, ο οποίος ενεργοποιείται μόνο από την ινσουλίνη,
- τον **IGF1-R** (Insulin-like Growth Factor Receptor), ο οποίος έχει υψηλή συγγένεια για τον IGF1 και χαμηλή για τον IGF2, και
- τον ορφανό υποδοχέα **IRR** (IR-Related Receptor), για τον οποίο δεν έχει ταυτοποιηθεί κανένας προσδέτης και μπορεί να ενεργοποιηθεί από αλκαλικό μέσο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε pH >7.9 λειτουργώντας στους νεφρούς ως διαχειριστής της περίσσειας διττανθρακικού.

Η **ινσουλίνη** παράγεται και απελευθερώνεται από τα β-κύτταρα παγκρέατος και κυκλοφορεί στο αίμα ενεργοποιώντας, μέσω του InsR-B, τη σύνθεση του γλυκογόνου, αναστέλλοντας τη γλυκονεογένεση, αυξάνοντας την πρόσληψη της γλυκόζης και την πρωτεϊνοσύνθεση στους ιστούς (βλ. σσ. 429-436).

Ο **IGF1** εκκρίνεται από το ήπαρ και κυκλοφορεί στο αίμα. Ο όρος Insulin-like Growth Factor αντανακλά το γεγονός ότι έχει παρόμοια δράση με την ινσουλίνη σε ορισμένους ιστούς, αν και είναι πολύ λιγότερο ισχυρός από την ινσουλίνη για τη μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα. Ο IGF1 είναι ο κύριος μεσολαβητής της αναβολικής και μιτογόνας δράσης της αυξητικής ορμόνης (GH). Η GH επάγει τη δημιουργία του IGF1 από το ήπαρ, και στη συνέχεια, ο IGF1 απελευθερώνεται στο αίμα παίζοντας, μέσω του IGF1-R, σημαντικό ρόλο στην παιδική ανάπτυξη, ενώ συνεχίζει να έχει αναβολικές επιδράσεις στους ενήλικες.

Ο **IGF2** είναι η δεύτερη ορμόνη με δομική ομοιότητα προς την ινσουλίνη. Η παραγωγή του είναι λιγότερο εξαρτώμενη από την GH σε σχέση με την παραγωγή του IGF1. Ο IGF2 παίζει κύριο ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου, σε αντίθεση με τον IGF1 που είναι ένας σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης στους ενήλικες.

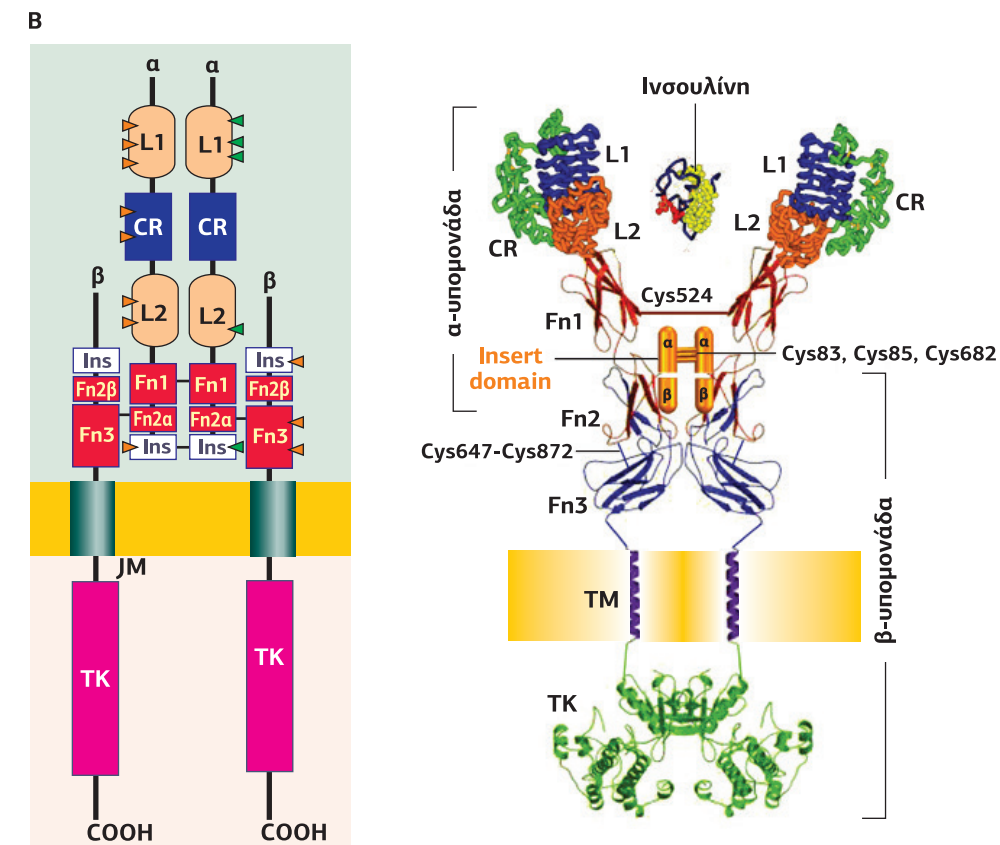
Ο IGF2 συνδέεται στον υποδοχέα IGF1-R, αλλά επίσης και στον υποδοχέα **IGF2-R**, ο οποίος ονομάζεται και υποδοχέας της 6-φωσφορικής μαννόζης (M6P), ανεξάρτητος των κατιόντων (cation-independent mannose 6-phosphate receptor). Ο IGF2-R είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα, που αποτελείται από 15 επαναλήψεις 157 αμινοξέων και μια κοντή κυτταροπλασματική ουρά. Στις περιοχές 3 και 9 συνδέεται η M6P και στην περιοχή 13 ο IGF2 (Εικόνα 8.7A). Ο IGF2-R δεν συνδέει καθόλου την ινσουλίνη και δεν φαίνεται να μεταφέρει



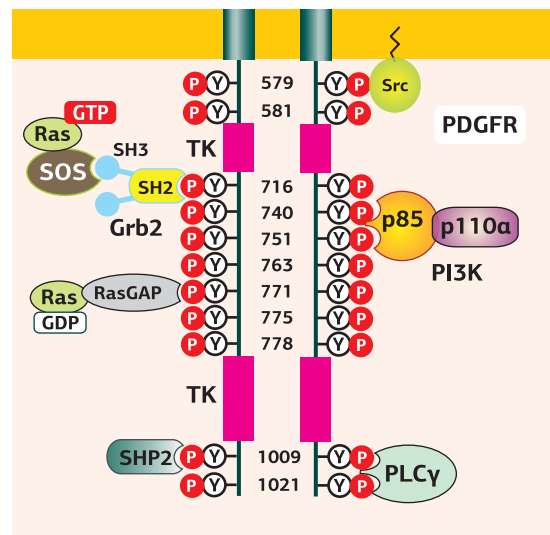
τα σήματα του IGF2 *in vivo*. Αντίθετα, μειώνει τη σηματοδότηση του IGF2 με εσωτερική του IGF2 και προαγωγή της αποικοδόμησής του. Υποστηρίζοντας αυτήν την άποψη, οι ποντικοί από τους οποίους έχει διαγραφεί το γονίδιο του IGF2-R είναι μεγαλύτεροι από τους μάρτυρες και επιπλέον μη λειτουργικές μεταλλάξεις του γονιδίου του IGF2-R έχουν βρεθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου.

**Δομή των υποδοχών ινσουλίνης**

Οι υποδοχείς της οικογένειας InsR αποτελούνται από δύο α- και δύο β-υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς S-S δημιουργώντας ένα τετραμερές α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>. Οι υπομονάδες αυτές προέρχονται από ένα πρόδρομο μονομερές γλυκοσυλιωμένο πολυπεπίτιδιο (precursor), το οποίο μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi, όπου και γλυκοσυλιώνεται εκ νέου, κόβεται από μια furin-like πρωτεάση στις υπομονάδες α και β και κατόπιν μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου και παίρνει την τελική του θέση. Οι α-υπομονάδες βρίσκονται εξ ολοκλήρου στην εξωκυτταρική περιοχή, με το COOH-τελικό άκρο τους προς την πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Περιέχουν 15-20 θέσεις γλυκοσυλίωσης, καθώς και δύο περιοχές πλούσιες σε Leu (L1 και L2, Leucine-rich), μια περιοχή πλούσια σε Cys (CR, Cys-rich domain) και δύο περιοχές όμοιες με την ινωδονεκτίνη III (Fn1 και Fn2a, Fibronectin type III domains). Οι δύο α-υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys524 κάθε περιοχής Fn1, ενώ με τις β-υπομονάδες συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στη Cys647 της περιοχής Fn2 της α-υπομονάδας και στη Cys872 της περιοχής Fn3 της β-υπομονάδας. Στις α-υπομονάδες βρίσκεται η θέση σύνδεσης της ινσουλίνης. Επιπλέον, υπάρχει μια ένθετη περιοχή Ins (Insert domain, αμινοξέα 638-756) μέσα στην Fn2 περιοχή, που περιέχει τη θέση α/β κοπής από την furin-like πρωτεάση. Οι β-υπομονάδες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη έχοντας το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο στην εξωκυτταρική περιοχή, ενώ το COOH-τελικό στο κυτταρόπλασμα. Το εξωκυτταρικό τμήμα των β-υπομονάδων αποτελείται από μια Fn2β και μια Fn3 περιοχή,



**Εικόνα 8.7**  
**A. Υποδοχείς της ινσουλίνης, του IGF-1 και IGF-2.** Οι InsR και IGF-1R αποτελούνται από δύο διμερή αβ, τα οποία συνδυάζονται σε ετερομερή σύμπλοκα. Το διμερές αβ προέρχεται από δύο ξεχωριστά γονίδια και ο InsR έχει παραλλαγές ματίσματος, InsR-B και InsR-A. Κάθε παραλλαγή έχει την ίδια β-υπομονάδα, αλλά διαφέρει στην εξωκυτταρική α-. Ο IGF1-R έχει διαφορετική α-υπομονάδα από αυτές του InsR. Συνδυασμοί των διμερών αβ οδηγούν σε υβριδικούς υποδοχείς, οι οποίοι συνδέουν την ινσουλίνη, τον IGF1 και τον IGF2 με διαφορετική συγγένεια. Ο IGF2 συνδέεται και στον υποδοχέα IGF2-R, ο οποίος είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα, που αποτελείται από 15 επαναλήψεις 157 αμινοξέων και μια κοντή κυτταροπλασματική ουρά. Στις περιοχές 3 και 9 συνδέεται η 6-φωσφορική μαννόζη (M6P) και στην περιοχή 13 ο IGF2. [60] **B. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του υποδοχέα της ινσουλίνης.** Οι εξωκυτταρικές α-υπομονάδες αποτελούνται από δύο περιοχές πλούσιες σε Leu (L1 και L2), μια περιοχή πλούσια σε Cys (CR) και δύο περιοχές όμοιες με την ινωδονεκτίνη III (Fn1 και Fn2a), ενώ το εξωκυτταρικό τμήμα των β-υπομονάδων αποτελείται από μια Fn2β και μια Fn3 περιοχή. Τα πορτοκαλί βέλη συμβολίζουν τις θέσεις γλυκοσυλίωσης, ενώ τα πράσινα βέλη τα κρίσιμα αμινοξέα για τη σύνδεση της ινσουλίνης. Οι δύο α-υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys524 κάθε περιοχής Fn1. Οι α-υπομονάδες συνδέονται με τις β-υπομονάδες με έναν δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στη Cys647 της περιοχής Fn2a της α-υπομονάδας και στην Cys872 της περιοχής Fn3 της β-υπομονάδας. [40]



**Εικόνα 8.8**  
Λεπτομέρεια της  
κυτταροπλασματικής περιοχής  
του υποδοχέα PDGFR.

Διακρίνεται η περιοχή της κινάσης (TK), η οποία διακόπτεται από την παρεμβαλλόμενη περιοχή στην κινάση. Με Y-P συμβολίζονται οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, οι οποίες είναι θέσεις σύνδεσης ειδικών πρωτεϊνών-στόχων, όπως η κινάση Src, η PI3-κινάση, η οποία συνδέεται μέσω της p85 υπομονάδας της, η πρωτεΐνη SOS, η οποία είναι μια πρωτεΐνη ανταλλαγής GDP/GTP (GEF) που συνδέεται μέσω της πρωτεΐνης Grb2, η p120-RasGAP (GTPase Activating Protein), η φωσφολιπάση C-γ (PLCγ) και η φωσφατάση SHP2. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες συνδέονται μέσω των SH2 περιοχών τους στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr. [215]

ενώ στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν την περιοχική κινάσης (Εικόνα 8.7B).

3. Η **οικογένεια PDGFR**. Οι προσδέτες αυτής της οικογένειας είναι ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor), ο οποίος συνδέεται στους υποδοχείς PDGFRα και PDGFRβ, ο CSF1 (Colony Stimulated Factor), γνωστός και ως M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), ο οποίος συνδέεται στον υποδοχέα CSF1R/ M-CSFR/ CD115 (Cluster of Differentiation 115), ο SCF (Stem Cell Factor) ή Kit-ligand, ο οποίος συνδέεται στον υποδοχέα Kit / SCFR / CD117, και η κυτοκίνη Flt3L (Flt3 Ligand), η οποία συνδέεται στον υποδοχέα Flt3 (Fms like tyrosine kinase 3) / Flk2 (Fetal liver kinase-2) / CD135 (Cluster of Differentiation antigen 135). Το χαρακτηριστικό αυτών των υποδοχέων είναι ότι η εξωκυτταρική τους περιοχή αποτελείται από 5 περιοχές όμοιες με των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin-like domains, Ig-like), καθώς και το γεγονός ότι η κινάση της τυροσίνης που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική περιοχή διακόπτεται από μια αλληλουχία αμινοξέων, η οποία ονομάζεται παρεμβαλλόμενη περιοχή στην κινάση (kinase insert region). Τα κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται σε αυτή την περιοχή όταν φωσφορυλιωθούν αποτελούν θέσεις σύνδεσης ορισμένων πρωτεϊνών-στόχων (Εικόνα 8.8).

4. Η **οικογένεια VEGFR1-3**. Οι υποδοχείς της οικογένειας αυτής έχουν ως προσδέτες την οικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors). Η οικογένεια VEGF στα θηλαστικά περιλαμβάνει πέντε μέλη: VEGF-A ή απλώς VEGF (ή PGF, Placenta Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C και VEGF-D. Οι VEGFs ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την ομοιοστάση των αιμοφόρων και λεμφικών αγγείων. Παράγονται, κυρίως, από τα ενδοθηλιακά, αιμοποιητικά και τα κύτταρα του στρώματος (του χαλαρού ινώδους συνδετικού ιστού) ως απάντηση στην υποξία και κάτω από τη διέγερση αυξητικών παραγόντων. Ο υποδοχέας VEGFR1 στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο *Flt1*, ο VEGFR2 από το γονίδιο *KDR* και ο VEGFR3 από το γονίδιο *Flk4*. Οι VEGFRs εξωκυτταρικά αποτελούνται από 7 περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και ενδοκυτταρικά περιέχουν την περιοχική κινάση τυροσίνης που διακόπτεται από μια αλληλουχία αμινοξέων (παρεμβαλλόμενη περιοχή στην κινάση).

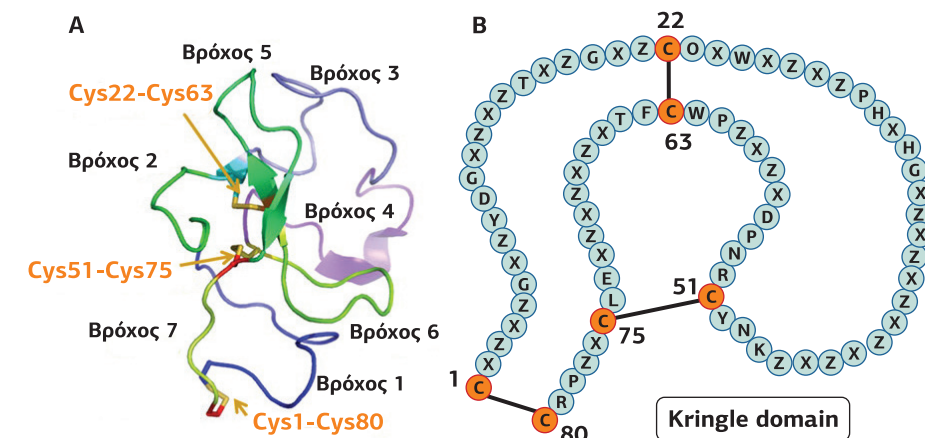
5. Η **οικογένεια FGFR1-4**. Οι υποδοχείς της οικογένειας αυτής έχουν ως προσδέτες τους αυξητικούς παράγοντες των ινοβλαστών, FGFs (Fibroblast Growth Factors). Οι FGFs αποτελούν μια οικογένεια 22 μορίων που κατατάσσονται σε 7 υποοικογένειες με βάση τη δομή τους. Η σύνδεσή τους στους υποδοχείς FGFR1-4 σταθεροποιείται παρουσία ηπαρίνης/θειικής ηπαρίνης (HS, Heparan Sulfate). Το χαρακτηριστικό των υποδοχέων αυτών είναι ότι στο εξωκυτταρικό τους τμήμα περιέχουν 3 περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig-like domains, D1-D3) και ανάμεσα στις D1 και D2 μια περιοχική πλούσια σε όξινα αμινοξέα (οκτώ συνεχή όξινα αμινοξέα). Οι περιοχές D2 και D3 είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση του προσδέτη. Στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν την περιοχική κινάση τυροσίνης, που διακόπτεται από μια αλληλουχία αμινοξέων (περιοχική παρεμβαλλόμενη στην κινάση).

6. Η **οικογένεια PTK7**. Οι υποδοχείς Protein Tyrosine Kinase-like 7 κωδικοποιούνται στον άνθρωπο από το γονίδιο *PTK7*. Στο εξωκυτταρικό τους τμήμα αποτελούνται από 7 Ig-like περιοχές, όπως και οι υποδοχείς VEGFRs, αλλά αντιθέτως, η κυτταροπλασματική περιοχική κινάση δεν διακόπτεται από μια παρεμβαλλόμενη περιοχή. Οι υποδοχείς PTKs λειτουργούν και ως μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Η περιοχική κινάση τους στερείται καταλυτικής δραστηριότητας (ψευδοκινάση καθώς απουσιάζουν κρίσιμα αμινοξέα από το καταλυτικό κέντρο) και οι υποδοχείς αυτοί παίζουν τον ρόλο συνυποδοχέα στο κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt. Το γονίδιο που τους κωδικοποιεί εκφράζεται σε όγκους του παχέος εντέρου και

γι' αυτό και είναι γνωστοί και ως CCK4 (Colon Carcinoma Kinase 4), ενώ δεν εκφράζεται στο φυσιολογικό παχύ έντερο, θεωρώντας ότι μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης για την πορεία αυτού του τύπου καρκίνου.

7. Η **οικογένεια TrkA, TrkB, TrkC**. Οι προσδέτες των υποδοχέων αυτών είναι οι νευροτροφίνες (neurotrophins) και γι' αυτό η οικογένεια των υποδοχέων αυτών ονομάζεται NRF (Neurotrophin Receptors Family). Οι υποδοχείς αυτοί κωδικοποιούνται από το ογκογονίδιο *trk* και συμβολίζονται ως Trk (Tropomyosin receptor kinase). Ο προσδέτης των υποδοχέων TrkA είναι ο αυξητικός παράγοντας των νευρών, NGF (Nerve Growth Factor), ο προσδέτης των TrkB είναι ο BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) και η νευροτροφίνη NT-4, ενώ ο προσδέτης των TrkC είναι η νευροτροφίνη NT-3. Επιπλέον όμως, όλες οι νευροτροφίνες συνδέονται με πολύ χαμηλότερη συγγένεια στον υποδοχέα p75, που αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των υποδοχέων των παραγόντων νέκρωσης όγκων (Tumour Necrosis Factor Receptors superfamily). Δομικό χαρακτηριστικό των υποδοχέων Trks είναι οι δύο περιοχές που είναι όμοιες με τις ανοσοσφαιρίνες (Ig-like domains) και οι δύο περιοχές που είναι πλούσιες σε Cys (CRD1, CRD2), ανάμεσα στις οποίες παρεμβαλλονται τρεις περιοχές πλούσιες σε Leu (LRD1-3).

8. Η **οικογένεια Ror1-2**. Οι υποδοχείς Ror (Receptor tyrosine kinase-like orphan) είναι επίσης γνωστοί και ως NTRKR (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor-related). Το εξωκυτταρικό τμήμα των Ror1-2 αποτελείται από ένα Ig-like μοτίβο, μια περιοχική πλούσια σε Cys και μια περιοχική kringle (KD, Kringle Domain), η οποία πήρε το όνομά της από τα δανέζικα κουλουράκια και αποτελείται από μεγάλους βρόχους που σταθεροποιούνται από 3 δισουλφιδικούς δεσμούς (Εικόνα 8.9). Οι Ror ανήκουν στους ορφανούς υποδοχείς, καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμη ο ενδογενής προσδέτης. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι οι πλούσιες σε Cys περιοχές τους αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς Wnt ενεργοποιώντας το μη κανονικό μονοπάτι των Wnt. Οι Ror εκφράζονται σε φυσιολογικές συνθήκες σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, παίζοντας έναν ρόλο κλειδί στη σκελετική και νευρική οργάνωση. Επίσης, υπερεκφράζονται στα Β-λεμφοκύτταρα στη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία, στο οστεοσάρκωμα και σε καρκινικά νεφρικά κύτταρα.



**Εικόνα 8.9**  
Η δομή της περιοχής  
Kringle (KD). Α. Τριδιάστατη  
αναπαράσταση της δομής kringle,  
η οποία αποτελείται από βρόχους  
(με διαφορετικά χρώματα ο  
καθένας), που σταθεροποιούνται  
με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς.  
Β. Σχηματική αναπαράσταση της  
περιοχής kringle, όπου φαίνονται  
τα αμινοξέα από τα οποία  
αποτελείται και οι δισουλφιδικοί  
δεσμοί ανάμεσα στις Cys22-Cys63,  
Cys51-Cys75 και Cys1-Cys80. [98]



Το πρωτότυπο Kringle

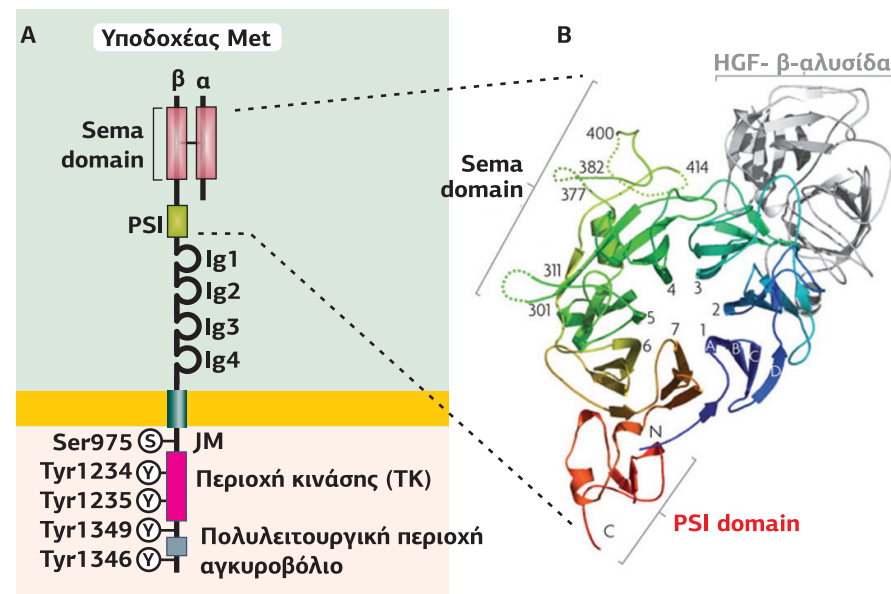
9. Η **οικογένεια MuSK**. Οι MuSKs (Muscle-Specific Kinases) είναι υποδοχείς κινάσες Tyr που απαιτούνται για τη δημιουργία και τη διατήρηση της νευρομυϊκής σύναψης. Ενεργοποιούνται από μια πρωτεογλυκάνη των νευρικών κυττάρων, την agrin (βλ. Εικόνα 8.23). Το εξωκυτταρικό τους τμήμα αποτελείται από τέσσερις Ig-like περιοχές και μια περιοχική πλούσια σε Cys.

10. Η **οικογένεια Met/Ron**. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι υποδοχείς c-Met και Ron. Οι υποδοχείς c-Met ή HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor) έχουν ως προσδέτη τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF). Οι υποδοχείς Ron (Récepteur d' Origine Nantais), ονομασία χάρη στην πόλη της Γαλλίας Nante,

ή MST1R (Macrophage-Stimulating protein Receptor), έχουν ως προσδέτη την πρωτεΐνη HGF-L (Hepatocyte Growth Factor-Like), η οποία αναφέρεται και ως MST1 (Macrophage Stimulating 1) ή MSP (Macrophage-Stimulating Protein). Ο υποδοχέας Met είναι μια ετεροδιμερής πρωτεΐνη που διαπερνάει την πλασματική μεμβράνη μία φορά. Αποτελείται από μια εξωκυτταρική α-υπομονάδα, η οποία συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό με μια διαμεμβρανική β-υπομονάδα, η οποία περιέχει την ενδοκυτταρική καταλυτική δραστηριότητα. Το εξωκυτταρικό τμήμα του Met αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές: μια περιοχή sema (τα πρώτα 500 αμινοξέα), η οποία περιλαμβάνει όλη την α-υπομονάδα και τμήμα της β-, μια περιοχή **PSI** (συναντάται στις Plexins, Semaphorins και Integrins, από όπου προήλθε και η ονομασία) καλύπτει 50 αμινοξέα και περιέχει 4 καλά συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς, και μια περιοχή 400 αμινοξέων που συνδέει την PSI στη διαμεμβρανική α-έλικα και είναι οργανωμένη σε τέσσερις Ig-like περιοχές. Το ενδοκυτταρικό τμήμα αποτελείται από τρεις περιοχές: μια περιοχή κοντά στη μεμβράνη που ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα κινάσης έπειτα από φωσφορυλίωση της Ser975, μια καταλυτική περιοχή κινάσης Tyr και μια COOH-τελική περιοχή με πολυλειτουργικές θέσεις αγκυροβόλια σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες (multifunctional docking domain).

Η **περιοχή sema** είναι μοναδική στους RTKs και συναντάται κυρίως στις semaphorins, μια μεγάλη οικογένεια εκκρινόμενων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, ορισμένες από τις οποίες λειτουργούν ως απωθητικά σήματα κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των νευραξόνων. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από μια ομάδα καλά συντηρημένων Cys, οι οποίες δημιουργούν 4 δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν αυτή τη δομή. Είναι μια παραλλαγή της β-προπέλας, με επτά λεπίδες ακτινοειδώς διατεταγμένες γύρω από έναν κεντρικό άξονα. Κάθε λεπίδα περιλαμβάνει 4 αντιπαράλληλους β-κλώνους. Επίσης, χρησιμοποιεί ένα σύστημα “βρόχου και γάντζου” για να κλείσει τον κύκλο μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας λεπίδας (**Εικόνα 8.10B**).

Όσον αφορά τον υποδοχέα Ron, το εξωκυτταρικό του τμήμα εμφανίζει 25% ομοιότητα με το εξωκυτταρικό τμήμα του Met, ενώ η περιοχή κινάσης τυροσίνης 63% ομοιολογία.



11. Η **οικογένεια Axl**. Ο Axl, από τη λέξη “ανεξέλεγκτος”, ανήκει στην ίδια υποοικογένεια RTKs μαζί με τους υποδοχείς Mer και Sky και αναγνωρίστηκε το 1991 ως ένα γονίδιο μετασχηματισμού στις ανθρώπινες λευχαιμίες. Είναι μια πρωτεΐνη 140 kDa, το εξωκυτταρικό τμήμα της οποίας παρουσιάζει μια ξεχωριστή δομή με

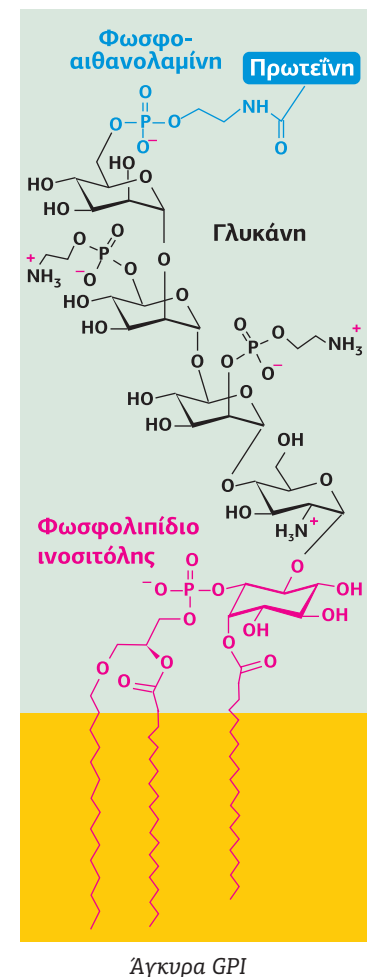
δύο περιοχές Ig-like, που ακολουθούνται από δύο περιοχές όμοιες της ινωδονεκτίνης III (FnIII, Fibronectin-like III). Η περιοχή FnIII είναι μια μοναδική εξωκυτταρική δομή όμοια με τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης των νευρώνων. Ο ενδογενής προσδέτης αυτών των υποδοχέων είναι ο αυξητικός παράγοντας Gas6 (Growth-arrest-specific gene 6), ένα διαλυτό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τη βιταμίνη K. Το γονίδιο *Gas6* ανακαλύφθηκε το 1998 ως ένα γονίδιο που υπερεκφράζεται σε κύτταρα που βρίσκονται σταματημένα στον κυτταρικό κύκλο και δεν αναπτύσσονται, υποθέτοντας έναν ρόλο στην πρόληψη του κυτταρικού stress, όπως η απόπτωση. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι ο Gas6 παίζει ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, στον πολλαπλασιασμό, στην ενεργοποίηση της κυτταρικής μετανάστευσης και στην προσκόλληση των κυττάρων μέσω του υποδοχέα Axl.

12. Η **οικογένεια Tie**. Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων, Tie1 και Tie2 (ή Tek), οι οποίοι έχουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Το εξωκυτταρικό τους τμήμα αποτελείται από δύο περιοχές Ig-like, τρεις περιοχές EGF-like, οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα στις Ig-like, και τρεις περιοχές FnIII-like (Fibronectin III-like), ενώ στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα υπάρχει η περιοχή κινάσης Tyr. Ωστόσο, παρά τη δομική τους ομοιολογία, δεν εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά απέναντι στους ενδογενείς τους προσδέτες, τις αγγειοποιητίνες (angiopoietins), τέσσερις αυξητικούς παράγοντες (Ang1-4) που είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία των αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Είναι κάπως αμφιλεγόμενο ποιο από τα δύο είδη υποδοχέων Tie διαμεσολαβεί λειτουργικά σήματα έπειτα από διέγερση Ang, αλλά είναι σαφές ότι τουλάχιστον ο Tie2 είναι ικανός να ενεργοποιηθεί ως αποτέλεσμα της δέσμευσης των Ang, ενώ ο Tie1 δεν εμφανίζει θέση σύνδεσης για τις Ang. Εκτός από τους προσδέτες του, ο Tie2 αλληλεπιδρά φυσικά με τον Tie1 και οι δύο υποδοχείς υπάρχουν ως προ-σχηματισμένα ετερο-ολιγομερή σύμπλοκα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, το εξωκυτταρικό τμήμα του Tie1 απομακρύνεται με δραστηριότητα μεταλλοπρωτεάσης σε απόκριση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και φλεγμονωδών μεσολαβητών. Η απομάκρυνση του Tie1 από το σύμπλοκο Tie1/Tie2 επιτρέπει τη σύνδεση της Ang στον Tie2.

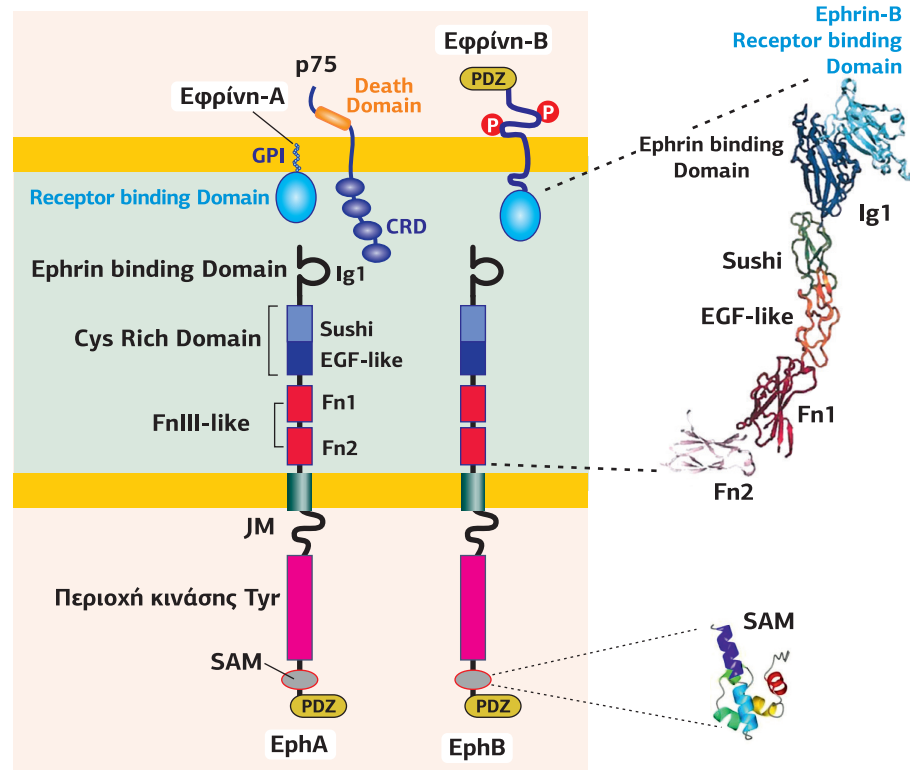
13. Η **οικογένεια Eph**. Οι υποδοχείς Eph ταυτοποιήθηκαν το 1987 έπειτα από μια αναζήτηση για κινάσες τυροσίνης με πιθανούς ρόλους στον καρκίνο, κερδίζοντας το όνομά τους από την καρκινική ηπατοκυτταρική σειρά που παράγει ερυθροποιητίνη (Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell line), από την οποία ελήφθη το cDNA τους. Αυτοί οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς είχαν αρχικά χαρακτηριστεί ως ορφανοί υποδοχείς χωρίς γνωστούς προσδέτες ή λειτουργίες. Όταν έγινε αντιληπτό ότι σχεδόν όλοι οι υποδοχείς Eph εκφράζονται κατά τη διάρκεια διαφόρων σαφώς καθορισμένων σταδίων της ανάπτυξης σε διαφορετικές θέσεις και συγκεντρώσεις, αναδείχθηκε ο ρόλος τους στην ανάπτυξη των οργανισμών. Οι υποδοχείς Eph είναι μια ομάδα υποδοχέων που ενεργοποιούνται από τις εφρίνες (Ephrins, Eph receptor-interacting proteins), οι οποίες είναι επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, και απαιτούν άμεσες αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου για την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Παίζουν ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη συμπεριλαμβανομένης της καθοδήγησης των νευραξόνων, του σχηματισμού των ορίων των ιστών και της κυτταρικής μετανάστευσης. Επιπλέον, παίζουν κρίσιμο ρόλο σε αρκετές διεργασίες κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, συμπεριλαμβανομένων της μακρόχρονης ενδυνάμωσης, της αγγειογένεσης και του καρκίνου. Οι υποδοχείς Ephs διαίρονται σε δύο υποκατηγορίες, τους EphAs και EphBs, με βάση την ομοιότητα αλληλουχίας και τη συγγένεια σύνδεσης για τους προσδέτες, την εφρίνη-A που είναι συνδεδεμένη μέσω της γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊννοσιτόλης (GPI) στη μεμβράνη ή τη διαμεμβρανική εφρίνη-B. Από τους 16 υποδοχείς Ephs που έχουν εντοπιστεί στα σπονδυλωτά, ο άνθρωπος εκφράζει εννέα EphAs (EphA1-8 και EphA10) και πέντε EphBs (EphB1-4 και EphB6). Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων Ephs αποτελείται από μία περιοχή Ig-like, μία περιοχή πλούσια σε Cys (που περιλαμβάνει μια περιοχή sushi-like και μια περιοχή EGF-like) και δύο περιοχές FnIII-like. Το κυτταροπλασματικό τους τμήμα αποτελείται από μια περιοχή κοντά στη μεμβράνη, που

Το **Gas6** περιέχει κατάλοιπα γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος (Gla) που απαιτούν μια καρβοξυλάση, η οποία καρβοξυλιώνει τον γ-άνθρακα ορισμένων γλουταμινικών καταλοίπων της πρωτεΐνης κατά την παραγωγή της στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η καρβοξυλάση αυτή χρησιμοποιεί ως συμπάρονοτα τη βιταμίνη K. Η **περιοχή Gla** βρίσκεται σε περισσότερες από δώδεκα γνωστές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων πήξης του αίματος X, VII, IX και XIV, της εξαρτώμενης από βιταμίνη K πρωτεΐνης S και Z, της προθρομβίνης, της Gas6 κ.λπ. Είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση Ca<sup>2+</sup>, συχνά απαραίτητη για τη σωστή διαμόρφωση και λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών.

**Εικόνα 8.10**  
**Δομή του υποδοχέα Met.** Α. Ο υποδοχέας του HGF, ο Met, είναι μια ετεροδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Αποτελείται από μια εξωκυτταρική α-υπομονάδα, η οποία συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό με μια διαμεμβρανική β-υπομονάδα. Το εξωκυτταρικό τμήμα του Met αποτελείται από μια περιοχή sema (τα πρώτα 500 αμινοξέα), μια περιοχή PSI 50 αμινοξέων που περιέχει 4 καλά συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς και μια περιοχή 400 αμινοξέων που συνδέει την PSI στη διαμεμβρανική α-έλικα και είναι οργανωμένη σε 4 Ig-like περιοχές. Το ενδοκυτταρικό τμήμα αποτελείται από τρεις περιοχές: μια περιοχή κοντά στη μεμβράνη που ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα κινάσης, μια καταλυτική περιοχή κινάσης και μια COOH-τελική περιοχή με πολυλειτουργικές θέσεις αγκυροβόλια σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Β. Κρυσταλλική δομή της περιοχής sema. Διακρίνονται, επίσης, η β-αλυσίδα του HGF και η περιοχή PSI. [187]



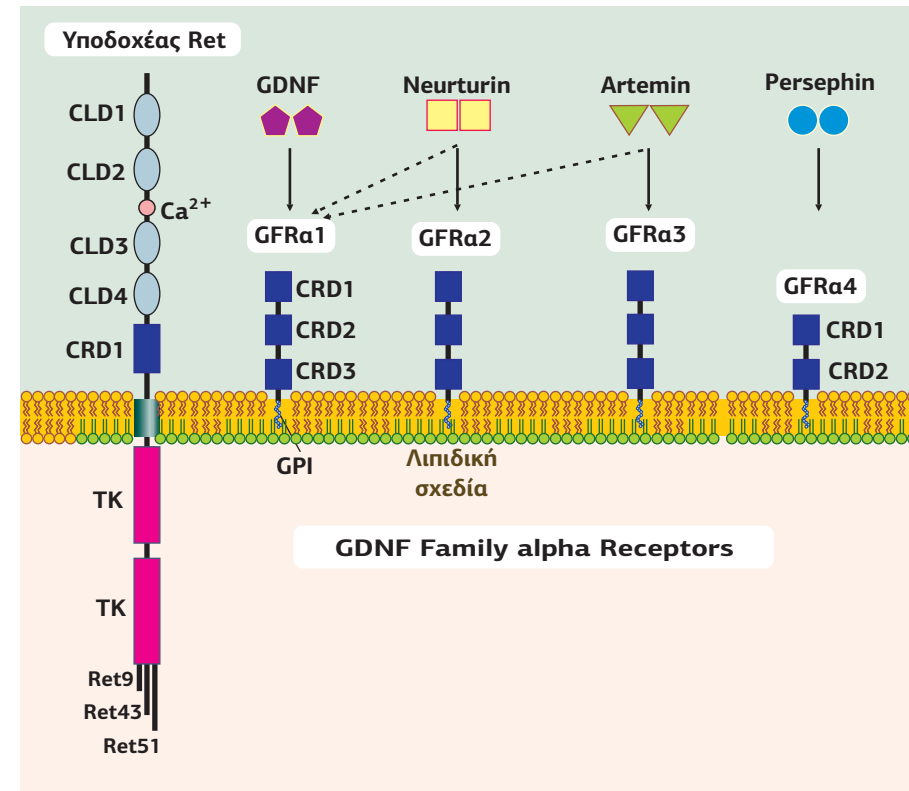
**Εικόνα 8.11**  
**Δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων Eph και των προσδετών τους ephrins.**  
 Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων EphA και EphB αποτελείται από μία περιοχή Ig-like, μια περιοχή πλούσια σε Cys, και δύο περιοχές FnIII, ενώ το κυτταροπλασματικό τους τμήμα αποτελείται από μια περιοχή κοντά στη μεμβράνη, που ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης, μια περιοχή κινάσης, μια σφαιρική περιοχή SAM και μια περιοχή PDZ. Η σύνδεση των ephrins στους υποδοχείς Eph μπορεί να οδηγήσει σε αμφίδρομη σηματοδότηση, δηλαδή όχι μόνο σηματοδότηση στα κύτταρα που εκφράζουν τους υποδοχείς Ephs, αλλά και "αντίστροφη" σηματοδότηση στα κύτταρα που εκφράζουν τον προσδέτη την eφρίνη. Η αντίστροφη σηματοδότηση, στην περίπτωση της eφρίνης-B, επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της ενδοκυτταρικής περιοχής της eφρίνης-B με ενδοκυτταρικές κινάσες και φωσφατάσες. Στην περίπτωση της eφρίνης-A, η οποία δεν περιέχει ενδοκυτταρική περιοχή, συνδέεται με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ικανές να ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας p75. [138] [167] [81]



ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης, μια περιοχή κινάσης, μια περιοχή SAM (Sterile Alpha Motif), η οποία είναι μια σφαιρική περιοχή, που αποτελείται από 6 α-έλικες και συμβάλλει στον διμερισμό των υποδοχέων Eph, αλλά και στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, καθώς και μια περιοχή PDZ (Εικόνα 8.11).

14. Η **οικογένεια Ret**. Η ονομασία Ret προέρχεται από το "Rearranged during transfection", καθώς η αλληλουχία του DNA αυτού του γονιδίου βρέθηκε ανασυνδυασμένη στην κυτταρική σειρά ινοβλαστών 3T3 μετά την επιμόλυνσή τους με DNA από ανθρώπινα κύτταρα λεμφώματος. Οι υποδοχείς Ret έχουν ένα μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα, που περιέχει τέσσερις περιοχές όμοιες των καδερινών (Cadherin-Like Domains, CLD1-4), μια περιοχή σύνδεσης του Ca<sup>2+</sup> ανάμεσα στις περιοχές CLD2 και CLD3 και μια περιοχή πλούσια σε Cys. Στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν την περιοχή κινάσης Tyr και στο COOH-τελικό τους άκρο υπάρχουν τρεις εναλλακτικές αλληλουχίες αμινοξέων που δημιουργούνται από εναλλακτικό μάτισμα (Ret9, Ret43, Ret51). Οι ενδογενείς προσδέτες των υποδοχέων Ret είναι μια οικογένεια διαλυτών νευροτρόφων παραγόντων, GDNFs (Glial cell - Derived Neurotrophic Factors), οι οποίοι περιλαμβάνουν τον GDNF, την neurturin (NTRN), την artemin (ARTN) και την persephin (PSPN). Καθένας από αυτούς τους προσδέτες αλληλεπιδρά με τον Ret μέσω ενός συνυποδοχέα της οικογένειας GFRa (GDNF Family Receptor-α), ο οποίος αποτελείται από 2-3 CRD περιοχές συνδεδεμένες στην πλασματική μεμβράνη με μια άγκυρα GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Εικόνα 8.12). Μεταλλάξεις loss of function του γονιδίου Ret συνδέονται με την ασθένεια του Hirschsprung, ενώ μεταλλάξεις gain of function συνδέονται με την ανάπτυξη διαφόρων ειδών καρκίνου.

15. Η **οικογένεια Ryk**. Το γονίδιο Ryk (Receptor related to tyrosine kinases) αναγνωρίστηκε το 1992. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι το μικρότερο μέλος της οικογένειας των RTKs, καθώς αποτελείται από 250 αμινοξέα, ενώ οι άλλοι RTKs περιέχουν >400 αμινοξέα. Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων Ryk αποτελείται από δύο περιοχές πλούσιες σε Leu, οι οποίες έχουν σημαντική ομολογία με την NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή του WIF (Wnt Inhibitory Factor-1), όπου συνδέεται ο Wnt, ενώ το κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχει την καταλυτική περιοχή κινάσης Tyr. Ο Ryk θεωρείται ένα άτυπο μέλος των RTKs, καθώς δεν

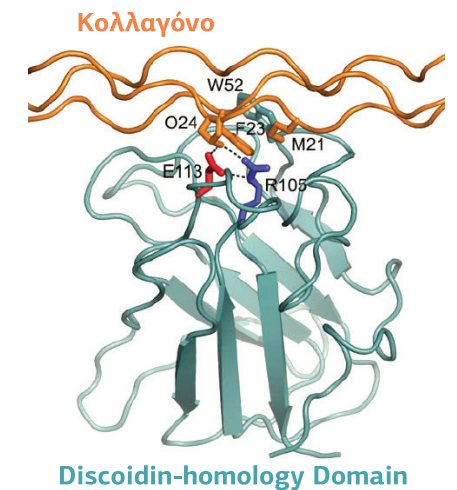


**Εικόνα 8.12**  
**Δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων Ret και των προσδετών τους GDNFs.**  
 Το εξωκυτταρικό τμήμα των Ret αποτελείται από τέσσερις περιοχές όμοιες των καδερινών (CLD1-4), μια περιοχή σύνδεσης του Ca<sup>2+</sup> και μια περιοχή πλούσια σε Cys. Στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν την περιοχή κινάσης Tyr και στο COOH-τελικό τους άκρο υπάρχουν τρεις εναλλακτικές αλληλουχίες αμινοξέων (Ret9, Ret43, Ret51). Οι ενδογενείς προσδέτες (GDNF, NTRN, ARTN και PSPN) αλληλεπιδρούν με τον Ret μέσω ενός συνυποδοχέα της οικογένειας GFRa, ο οποίος αποτελείται από 2-3 CRD περιοχές συνδεδεμένες στην πλασματική μεμβράνη με μια άγκυρα GPI. [6] [120] [208]

φαίνεται να εμφανίζει δραστηριότητα κινάσης και συμμετέχει στην ενεργοποίηση της σηματοδότησης του Wnt, που οδηγεί στην αύξηση των νευραξόνων κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος.

16. Η **οικογένεια DDR**. Οι υποδοχείς DDR1-2 (Discoidin Domain Receptors) εκφράζονται σε φυσιολογικά και καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιούνται από πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο. Περιέχουν στο εξωκυτταρικό τους τμήμα μια περιοχή όμοια με την discoidin I (DS-homology domain), μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από το Dictyostelium discoideum και συμμετέχει στη συσσωμάτωση του πρώτιστου σε αποικίες λειτουργώντας ως λεκτίνη. Η περιοχή συναντάται σε παράγοντες πήξης του αίματος καθώς και σε πρωτεΐνες του γάλακτος, ενώ στους υποδοχείς DDR χρησιμεύει ως θέση σύνδεσης του κολλαγόνου (Εικόνα 8.13). Εκτός από την περιοχή DS-homology, οι υποδοχείς αυτοί περιέχουν μια DS-like περιοχή, η οποία συμβάλλει στην ενεργοποίηση του υποδοχέα που προκαλείται από κολλαγόνο, και μια εξωκυτταρική περιοχή κοντά στη μεμβράνη που περιέχει θέσεις N- και O-γλυκοσυλίωσης και θέσεις διάσπασης από μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας ουσίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι DDRs ελέγχουν την ομοίωση των κυττάρων και των ιστών δρώντας ως αισθητήρες κολλαγόνου, μεταφέροντας σήματα που ρυθμίζουν την κυτταρική πολικότητα, τη μορφογένεση των ιστών και την κυτταρική διαφοροποίηση. Στον καρκίνο οι DDRs διαταράσσουν την κανονική επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και ενεργοποιούν προ-μεταναστευτικά προγράμματα. Επίσης, διάφοροι τύποι καρκίνου εμφανίζουν μεταλλάξεις DDR, οι οποίοι μεταβάλλουν τη λειτουργία του υποδοχέα συμβάλλοντας στην πρόοδο του καρκίνου.

17. Η **οικογένεια Ros1**. Το γονίδιο Ros1 ανακαλύφθηκε το 1986 ως τμήμα του γονιδίου onc του RNA του ιού του σαρκώματος των πουλερικών UR2 (University of Rochester tumor virus 2). Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκε ότι το γονίδιο αυτό κωδικοποιούσε μια πρωτεΐνη 68 kDa με δράση κινάσης τυροσίνης. Το ιικό ογκογονίδιο βρέθηκε στον άνθρωπο και σε πολλούς άλλους οργανισμούς. Ο υποδοχέας Ros1



**Εικόνα 8.13**  
 Τριδιάστατη δομή της περιοχής ομολογίας της Discoidin (DS-homology domain) (με ανοιχτό πράσινο) και η σύνδεσή της με το κολλαγόνο (με πορτοκαλί). [5]

**Η νόσος Hirschsprung**  
 συμβαίνει όταν κάποια από τα νευρικά κύτταρα που φυσιολογικά νευρώνουν το τοίχωμα του εντέρου δεν σχηματίζονται σωστά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Κατά την πέψη το έντερο προωθεί την τροφή με μία σειρά κινήσεων που είναι γνωστές ως περισταλτισμός. Για να συμβούν αυτές οι κινήσεις, απαιτούνται ειδικά νευρικά κύτταρα που ονομάζονται γαγγλιακά. Επειδή τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν από το παχύ έντερο σε παιδιά με νόσο του Hirschsprung, οι φυσιολογικές περισταλτικές κινήσεις δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν. Κατά συνέπεια, τα κόπρανα κατακρατούνται προκαλώντας μερική ή ολική εντερική απόφραξη. Συμβαίνει σε 1 στα 5.000 παιδιά, με αναλογία αρσενικών-θηλυκών 4:1.



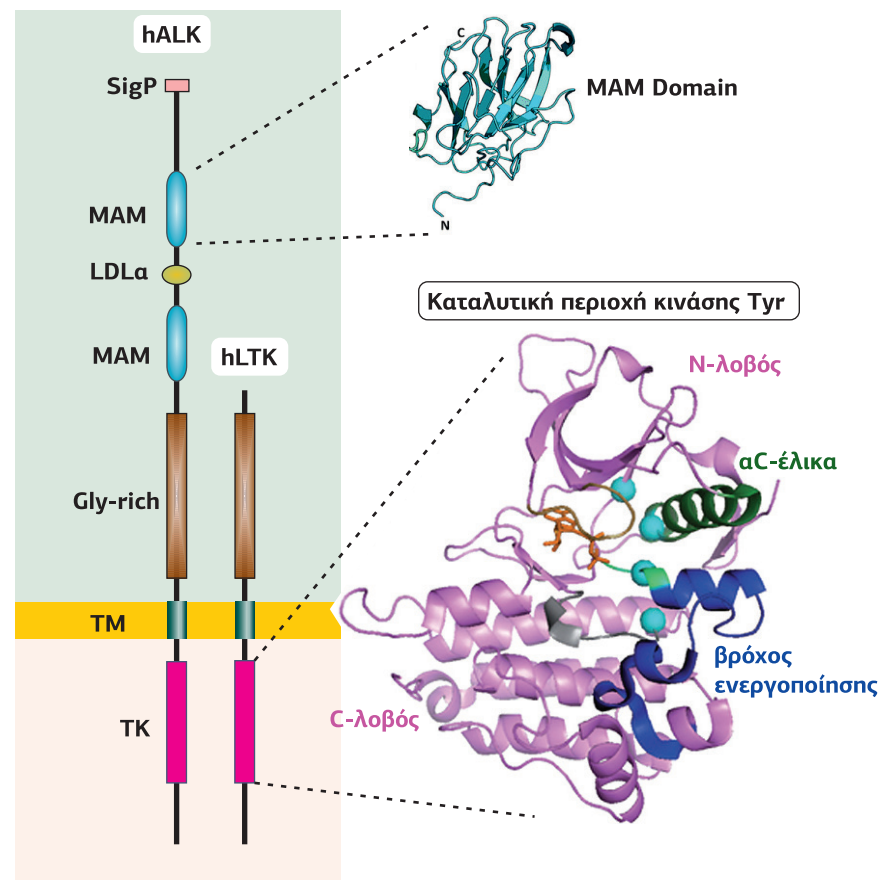
Ο λεμούριος είναι είδος προπιθήκων, ο οποίος εξελίχθηκε ανεξάρτητα και αποτελεί ενδημικό είδος της Μαδαγασκάρης. Η ονομασία του προέρχεται από το λατινικό *lemures*, που σημαίνει “πνεύματα της νύχτας” και αναφέρεται στα έντονα και εκτυφλωτικά μάτια των νυκτόβιων ειδών.

είναι ένας από τους δύο ορφανούς υποδοχείς της οικογένειας RTKs, καθώς ο ενδογενής του προσδέτης δεν έχει ακόμη ανακαλυφθεί. Το εξωκυτταρικό του τμήμα αποτελείται από 9 περιοχές ινωδονεκτίνης (FnIII-like) και τρία μοτίβα YWTD (μία δομή β-προπέλας), τα οποία παρεμβάλλονται ανάμεσα στις FnIII περιοχές. Οι φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου Ros σε διαφορετικούς ιστούς του σώματος δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί έως τώρα. Ωστόσο, η έκτοπη έκφραση, καθώς και η παραγωγή πολυάριθμων μεταλλαγμένων μορφών του υποδοχέα Ros έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη καρκίνων, όπως το γλοιοβλάστωμα και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καταδεικνύοντας έναν ρόλο του Ros στον καρκίνο.

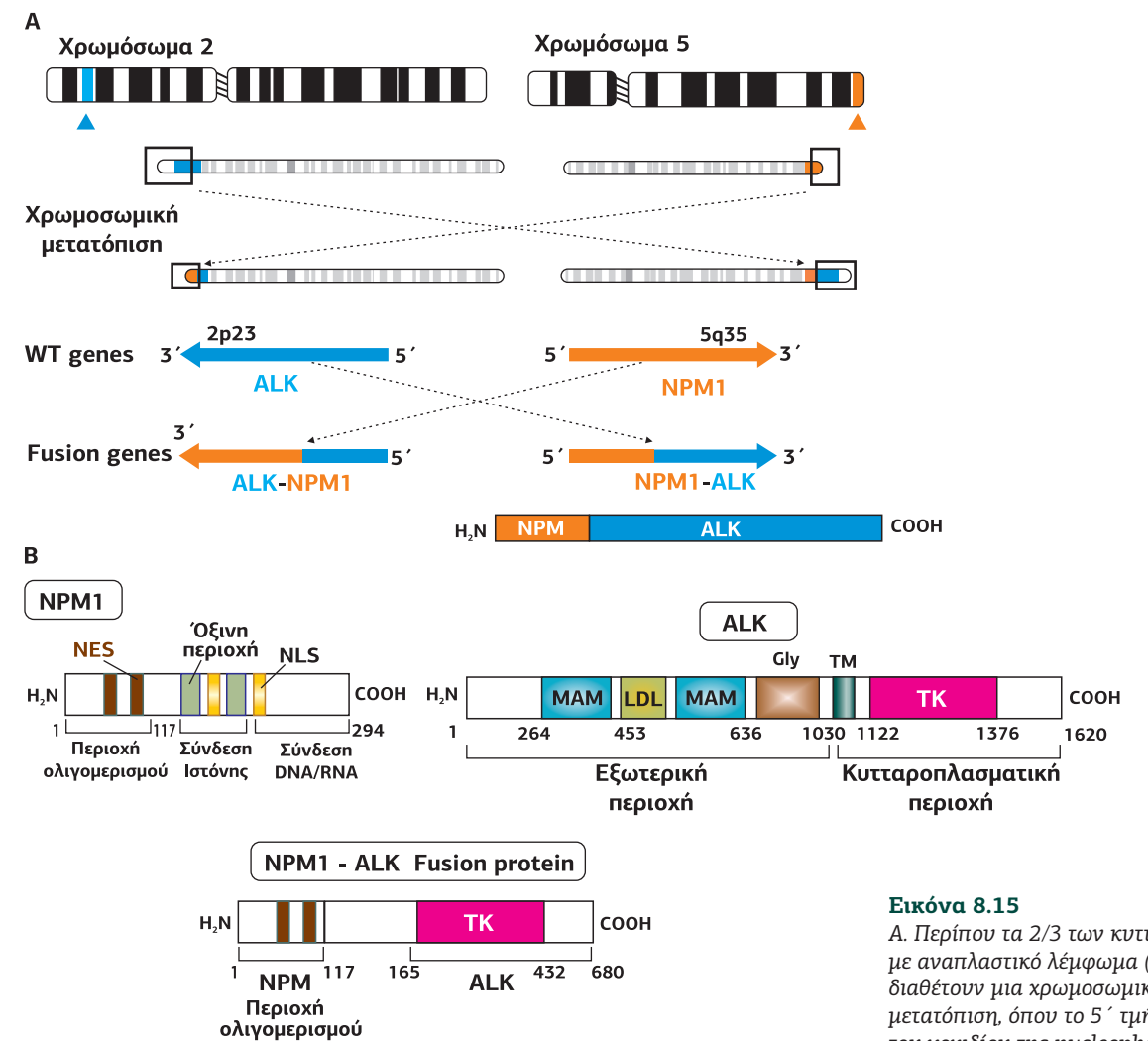
18. Η **οικογένεια LMR1-3**. Οι υποδοχείς LMR1-3 είναι ασυνήθιστοι RTKs, καθώς το εξωκυτταρικό τους τμήμα είναι εξαιρετικά μικρό και δεν περιέχει καμία χαρακτηριστική περιοχή, ενώ το κυτταροπλασματικό τους τμήμα είναι πολύ μεγάλο, γι' αυτό και το όνομά τους προέρχεται από τους λεμούριους “*Lemur*”, λόγω της μακριάς τους ουράς. Η ακριβής λειτουργία των LMRs δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί, αν και ο υποδοχέας LMR1 αναγνωρίστηκε ως μοριακός δείκτης για την απόπτωση, από όπου προέρχεται το όνομα του γονιδίου που κωδικοποιεί τους LMR, AATYK (Αποπτωσης-Associated Tyrosine Kinase). Το κυτταροπλασματικό τμήμα των LMRs αποτελείται από μια περιοχή κινάσης Tyr και μια περιοχή πλούσια σε Pro.

19. Η **οικογένεια ALK**. Ο υποδοχέας ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), επίσης γνωστός και ως CD246 (Cluster of Differentiation 246), παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, καθώς εκφράζεται σε συγκεκριμένους τύπους νευρώνων. Ο ALK εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τον υποδοχέα LTK (Leukocyte Tyrosine Kinase), ο οποίος κατατάσσεται στην ίδια υποοικογένεια. Μεταλλάξεις του γονιδίου ALK έχουν βρεθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως στο αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό Β-λέμφωμα (ALCL, Anaplastic Large - Cell Lymphoma), στο νευροβλάστωμα και στον καρκίνο των πνευμόνων.

Το 1994 ο Stephan W. Morris ανίχνευσε μια άγνωστη κινάση τυροσίνης σε κυτ-



**Εικόνα 8.14**  
Η δομή της κινάσης ALK και της ομολογής της κινάσης LTK. Το εξωκυτταρικό τμήμα της ALK περιέχει δύο περιοχές MAM, μια περιοχή LDLa και μια μεγάλη περιοχή κοντά στη μεμβράνη πλούσια σε γλυκίνη (G-rich). Το κυτταροπλασματικό τμήμα περιέχει την περιοχή κινάσης Tyr. Ο ομόλογος υποδοχέας LTK εξωκυτταρικά περιέχει μόνο την Gly-rich περιοχή. [64] [131]



**Εικόνα 8.15**  
Α. Περίπου τα 2/3 των κυτάρων με αναπλαστικό λέμφωμα (ALCL) διαθέτουν μια χρωμοσωμική μετατόπιση, όπου το 5' τμήμα του γονιδίου της nucleophosmin (NPM1) του χρωμοσώματος 5 συντήκεται με το 3' τμήμα του γονιδίου της ALK του χρωμοσώματος 2. Η πρωτεΐνη που προκύπτει NPM-ALK αποτελείται από το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της NPM (συμπεριλαμβανομένης της περιοχής ομοδιμερισμού της) και την COOH-τελική περιοχή (συμπεριλαμβανομένου ολόκληρου του ενδοκυτταρικού τμήματος με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης) της ALK. Η πρωτεΐνη σύντηξης διμερίζεται και διαθέτει υπερενεργή δραστηριότητα κινάσης Tyr. [174] [51]  
Β. Δομή των πρωτεϊνών NPM1, ALK και της πρωτεΐνης σύντηξης NPM1-ALK.

ταρικές σειρές με αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό μη Hodgkin λέμφωμα (ALCL). Ο όρος αναπλαστικό αναφέρεται σε κύτταρα που έχουν καταστεί αποδιαφοροποιημένα. Περίπου τα 2/3 των κυτάρων με αναπλαστικό λέμφωμα διαθέτουν μια χρωμοσωμική μετατόπιση, όπου το 5' τμήμα του γονιδίου της nucleophosmin (NPM), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5, συντήκεται με το 3' τμήμα του γονιδίου της ALK του χρωμοσώματος 2. Η nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23) είναι μια φωσφοπρωτεΐνη του πυρηνίσκου, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με ριβονουκλεοπρωτεϊνικές δομές και παίζει ρόλο στη βιογένεση των ριβοσωμάτων. Από την χρωμοσωμική μετατόπιση προκύπτει η πρωτεΐνη NPM-ALK, η οποία αποτελείται από το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της NPM και την COOH-τελική περιοχή (συμπεριλαμβανομένου ολόκληρου του ενδοκυτταρικού τμήματος με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης) της ALK (Εικόνα 8.15). Λόγω της ικανότητας ολιγομερισμού της nucleophosmin δημιουργείται ένα διμερές με υπερενεργή τη δραστηριότητα κινάσης, ικανό να προκαλεί λέμφωμα.

Το 1997 η ALK χαρακτηρίστηκε από τον Stephan Morris ως ένας υποδοχέας RTK, ο οποίος εμφανίζει τα κλασικά δομικά χαρακτηριστικά ενός RTK, με μια εξωκυτταρική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, μία διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή κινάσης τυροσίνης (Εικόνα 8.14). Το εξωκυτταρικό τμήμα της ALK περιέχει έναν μοναδικό συνδυασμό περιοχών, με δύο περιοχές **MAM** (ανακαλύφθηκε στην *Mertin*, μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, στο *A5* αντιγόνο και στη *mu*, ένας υποδοχέας φωσφατάση Tyr) (αμινοξέα 264-427 και 480-626), μια περιοχή **LDLa** (Low-Density Lipoprotein class A) (αμινοξέα 453-471) και μια μεγάλη περιοχή κοντά στη μεμβράνη πλούσια σε γλυκίνη (Gly-rich) (αμινοξέα 816-940). Το

κυτταροπλασματικό τμήμα της ALK περιέχει την περιοχική κινάσης Tyr. Οι περιοχές MAM πιστεύεται ότι συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, αλλά η σημασία τους για τη λειτουργία του ALK είναι ασαφής. Η σημασία της περιοχής MAM, ωστόσο, τονίζεται από μελέτες πάνω στη *Drosophila*, στην οποία μια σημαντική μετάλλαξη που τροποποιεί ένα άκρως συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγινικού οξέος στην περιοχή MAM σε αργινίνη καθιστά την dALK (*drosophila* ALK) ανενεργή.

Ως εσωτερικοί προσδέτες που ενεργοποιούν τον υποδοχέα ALK στα θηλαστικά έχουν προταθεί η PTN (pleiotrophin), γνωστή και ως HB-GAM (Heparin-Binding Growth-Associated Molecule), ο OSF-1 (Osteoblast-Specific Factor-1), το HARP (Heparin Affinity Regulatory Peptide), ο HB-NF (Heparin-Binding Neurotrophic Factor), η MK (midkine), γνωστή και ως RI-HB (Retinoic acid - Inducible Heparin-Binding protein). Η MK και η PTN μικροί αυξητικοί παράγοντες που συνδέονται με την ηπαρίνη συμμετέχουν στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, στην κυτταρική μετανάστευση και στην αγγειογένεση.

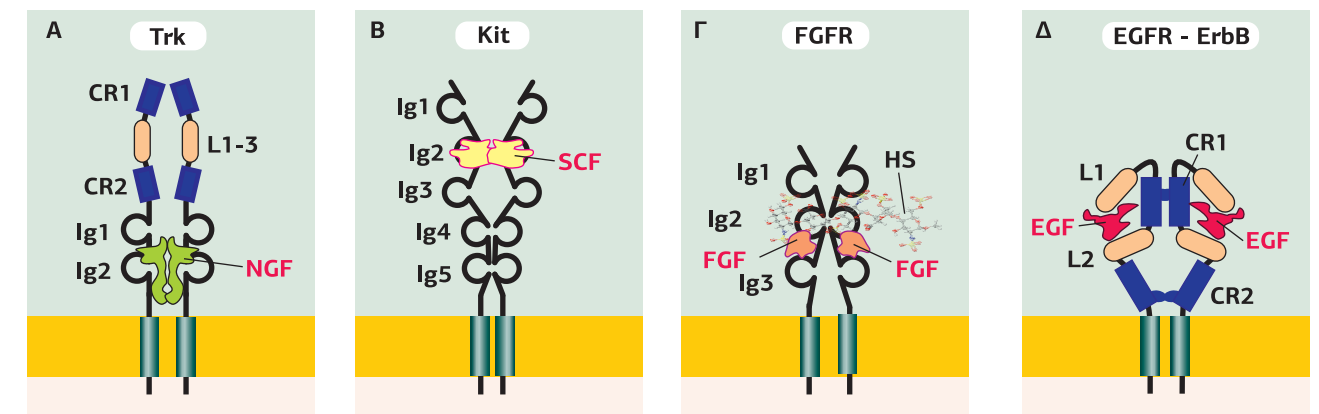
20. Η **οικογένεια STYK1**. Η STYK1 (Serine threonine Tyrosine Kinase 1), επίσης γνωστή και ως NOK (Novel Oncogene with Kinase domain), αναγνωρίστηκε το 2003 ως ένας RTK που εκφράζεται σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς στον άνθρωπο. Στερείται εξωκυτταρικής περιοχής σύνδεσης του προσδέτη, περιέχει μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική με δράση κινάσης τυροσίνης. Ωστόσο, η STYK1 μπορεί να πυροδοτήσει αυτοφωσφορυλίωση και μετάδοση σημάτων χωρίς τη σύνδεση προσδέτη. Η υπερέκφραση της STYK1 μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του προστάτη και κυττάρων λευχαιμίας, καθώς και να επάγει την ογκογένεση και τη μετάσταση σε γυμνούς ποντικούς. Αυτά τα χαρακτηριστικά δείχνουν ότι η STYK1 έχει πολλαπλούς ρόλους στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου.

## 1.5 Μηχανισμοί διμερισμού των RTKs

Σε γενικές γραμμές, ο αυξητικός παράγοντας συνδέεται στον RTK και τον ενεργοποιεί επάγοντας τον διμερισμό του (Ullrich και Schlessinger, 1990). Ωστόσο, ορισμένοι RTKs σχηματίζουν διμερή και απουσία συνδεδεμένου προσδέτη, όπως ο υποδοχέας της ινσουλίνης, ο οποίος εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια ως διμερές αποτελούμενο από δύο αβ-υπομονάδες ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> που ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες S-S. Η σύνδεση της ινσουλίνης προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του διμερούς, που διεγείρουν τη δράση κινάσης τυροσίνης και την κυτταρική σηματοδότηση. Επίσης, χαρακτηριστική περίπτωση αποτελούν οι υποδοχείς του EGF ErbB2, οι οποίοι δεν περιέχουν περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και, συνεπώς, δεν μπορούν να συνδέσουν τον EGF. Ωστόσο, μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων ErbB, σταθεροποιώντας την ενεργή διαμόρφωση του ετεροδιμερούς. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση ορισμένων RTKs, όπως οι Tie2 (υποδοχείς της αγγειοποιητίνης) και οι υποδοχείς Eph απαιτούν τον σχηματισμό μεγαλύτερων ολιγομερών.

Άσχετα εάν η ανενεργός κατάσταση του υποδοχέα είναι μονομερής ή ολιγομερής, η ενεργοποίησή του απαιτεί τη σύνδεση του προσδέτη για τη σταθεροποίηση μιας ειδικής σχέσης μεταξύ των επιμέρους μονομερών του υποδοχέα. Αρχικά, ο συνδεδεμένος προσδέτης προκαλεί την αυτοσυνένωση της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα, η οποία καθοδηγεί τον διμερισμό των κυτταροπλασματικών περιοχών και την επακόλουθη ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης τυροσίνης μέσω μηχανισμών που συζητούνται παρακάτω. Ο υποδοχέας στη διμερή / ολιγομερή του μορφή trans-φωσφορυλιώνει ένα ή περισσότερα κατάλοιπα τυροσίνης του γειτονικού μονομερούς, τα οποία χρησιμεύουν ως θέσεις για τη σύνδεση (και την ενεργοποίηση) των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών σηματοδότησης.

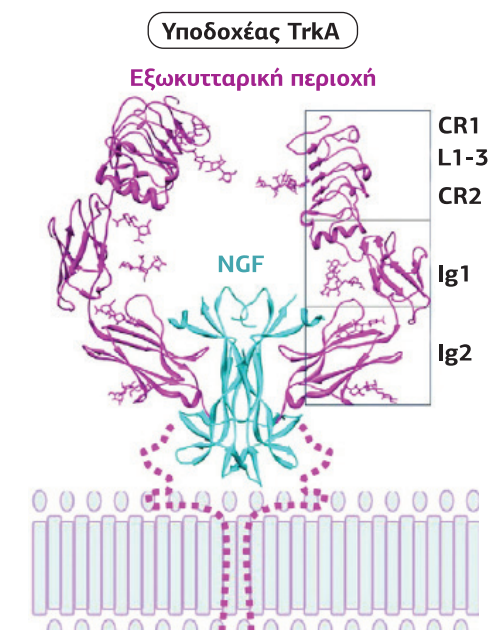
Αρχικές μελέτες πρότειναν έναν απλό μηχανισμό μέσω του οποίου ο διμερής προσδέτης αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με δύο μονομερή του υποδοχέα, τα οποία και



διασυνδέει αποτελεσματικά σε ένα διμερές σύμπλοκο. Αυτός ο "μεσολαβούμενος από τον προσδέτη" τρόπος διμερισμού του υποδοχέα υποστηρίχθηκε περαιτέρω από κρυσταλλικές δομές των εξωκυτταρικών περιοχών των RTKs σε σύνδεση με τους αντίστοιχους προσδέτες τους. Σύμφωνα με πρόσφατες δομές πιο ολοκληρωμένων εξωκυτταρικών περιοχών των RTKs, οι οποίες έχουν προσφέρει επιπλέον πληροφορίες για τη διαλεύκανση των μηχανισμών που χρησιμοποιούνται για τον διμερισμό των υποδοχέων, διακρίνονται τέσσερις διαφορετικοί τρόποι διμερισμού (Εικόνα 8.16). Στην πρώτη περίπτωση, ο διμερισμός του υποδοχέα είναι απολύτως "προσδετο-μεσολαβούμενος" και τα δύο μονομερή του υποδοχέα δεν έχουν καμία άμεση επαφή μεταξύ τους (TrkA). Στο αντίθετο άκρο βρίσκεται η δεύτερη περίπτωση, κατά την οποία ο διμερισμός διαμεσολαβείται αποκλειστικά από τον υποδοχέα και ο προσδέτης δεν έχει καμία άμεση συνεισφορά στη διεπαφή του διμερούς (ErbB). Εναλλακτικά, στην τρίτη και τέταρτη περίπτωση, ο διμερισμός περιλαμβάνει τη μεσολάβηση τόσο του προσδέτη όσο και του υποδοχέα (Kit και FGFR). Ο διμερισμός των περισσότερων RTKs είναι πιθανό να μοιάζει με μία από αυτές τις τέσσερις περιπτώσεις.

### TrkA: προσδετο-μεσολαβούμενος διμερισμός

Η εξωκυτταρική περιοχή του TrkA (υποδοχέα του NGF) αποτελείται από πέντε περιοχές: μια σωληνοειδή περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD1 και CRD2) και λευκίνη (LRD1-3), που ακολουθείται από δύο περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig1 και Ig2). Ο NGF και γενικότερα οι νευροτροφίνες είναι διμερή μόρια που συνδέονται στις περιοχές Ig2 του υποδοχέα. Στο διμερές που δημιουργείται με τη σύνδεση του NGF, οι εξωκυτταρικές περιοχές των δύο μονομερών TrkA δεν έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Έτσι, ο συνδεδεμένος NGF φαίνεται να παρέχει το σύνολο της επιφάνειας διεπαφής του διμερούς TrkA, επισημαίνοντας όμως ότι η παραμεμβρανική περιοχή 30 αμινοξέων λείπει από την πιο πλήρη δομή του TrkA (Εικόνα 8.17).



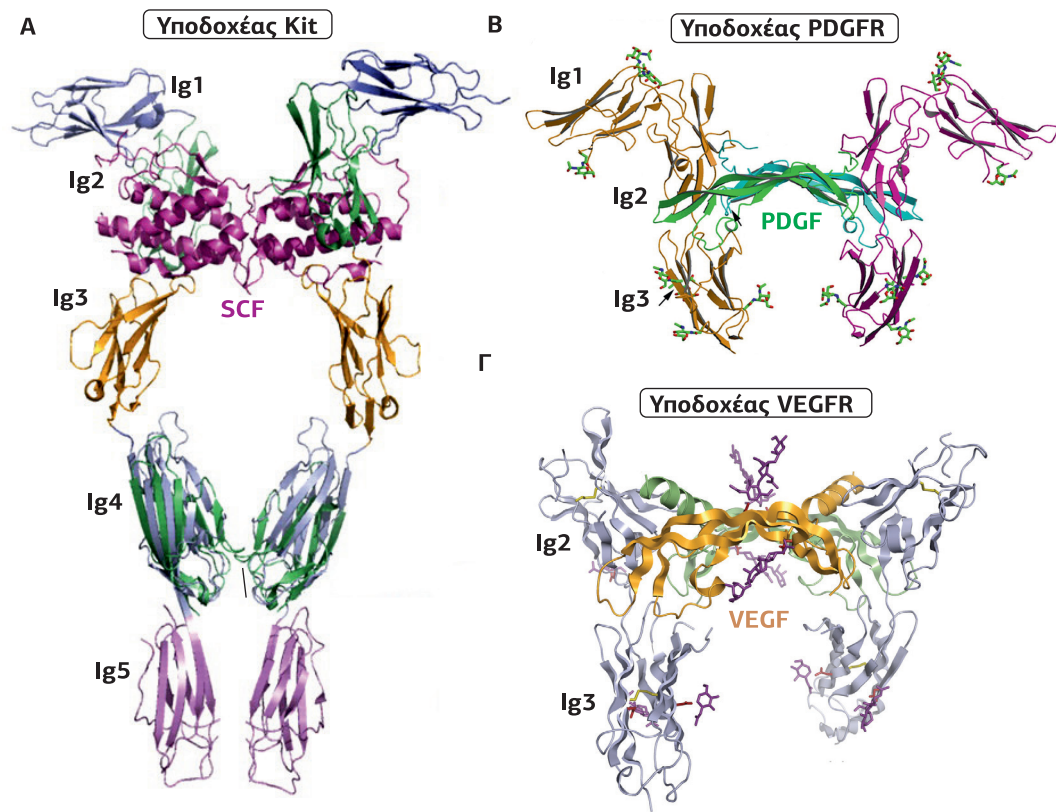
**Εικόνα 8.16**  
**Τρόποι διμερισμού των υποδοχέων RTKs.** Α. Ο διμερισμός του υποδοχέα είναι απολύτως "προσδετο-μεσολαβούμενος" και τα δύο μονομερή δεν έχουν καμία άμεση επαφή μεταξύ τους (TrkA), παρά μόνο συνδέονται μέσω του προσδέτη (NGF). Β. Ο διμερισμός του υποδοχέα είναι "προσδετο-μεσολαβούμενος", αλλά τα δύο μόρια του υποδοχέα έρχονται και σε επαφή μεταξύ τους (Kit). Γ. Ο διμερισμός του υποδοχέα χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό σύνδεσης δύο μορίων μονομερούς προσδέτη (FGF), άμεσης επαφής των δύο μονομερών του υποδοχέα και της συμμετοχής ενός βοηθητικού μορίου ηπαρίνης (FGFR). Δ. Ο διμερισμός είναι απόλυτα "διαμεσολαβούμενος από τον υποδοχέα" και ο προσδέτης (EGF) δεν έχει καμία άμεση συνεισφορά στη διεπαφή του διμερούς (ErbB). [100]

**Εικόνα 8.17**  
**Διμερισμός του υποδοχέα TrkA μετά τη σύνδεση του προσδέτη NGF.** Διακρίνεται η κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του διμερισμένου υποδοχέα μετά τη σύνδεση του NGF στις περιοχές Ig2 των δύο μονομερών του υποδοχέα. [6]

### Kit: ένα προσδετο-μεσολαβούμενο διμερές με τα δύο μόρια του υποδοχέα σε άμεση επαφή

Ο προσδέτης του υποδοχέα Kit είναι ο παράγοντας βλαστικών κυττάρων ή SCF (Stem Cell Factor), ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο δεσμίδες





**Εικόνα 8.18 Προσδετο-μεσολαβούμενος διμερισμός με τα δύο μόρια του υποδοχέα σε άμεση επαφή.** Α. Κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του διμερισμένου Kit μετά τη σύνδεση του SCF. Ο διμερής SCF συνδέεται στις δύο Ig2 περιοχές, μία από κάθε μονομέρες υποδοχέα, οδηγώντας σε μια αλλαγή διαμόρφωσης και αλληλεπίδραση των Ig4-Ig5 περιοχών. [105] [216] Β. Κρυσταλλική δομή των Ig1-Ig3 περιοχών του διμερισμένου υποδοχέα PDGFR μετά τη σύνδεση του προσδέτη PDGF. [169] Γ. Κρυσταλλική δομή των Ig2-Ig3 περιοχών του διμερισμένου υποδοχέα VEGFR μετά τη σύνδεση του προσδέτη VEGF. [78] [102]

τεσσάρων α-ελίκων. Κάθε μόριο SCF συνδέεται με τις πρώτες τρεις περιοχές Ig-like του εξωκυτταρικού τμήματος του Kit (Ig1-3), κυρίως με την Ig2. Η σύνδεση του διμερούς SCF διασυνδέει τα δύο μονομέρη του υποδοχέα χωρίς να προκαλέσει καμιά μεταβολή στη διαμόρφωση των Ig1-Ig3. Ωστόσο, οι δύο περιοχές Ig-like, που βρίσκονται πλησιέστερα στην πλασματική μεμβράνη (Ig4 και Ig5), υφίστανται έναν σημαντικό επαναπροσανατολισμό, με σημαντικές ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις σε όλη την επιφάνεια του διμερούς, οι οποίες προσανατολίζουν σωστά τα δύο μόρια Kit για ενεργοποίηση (**Εικόνα 8.18Α**). Ογκογόνες gain-of-function μεταλλάξεις βρίσκονται στην περιοχή Ig5 του Kit, θεωρώντας ότι σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις ενεργοποίησης.

Με ανάλογο τρόπο συνδέονται στις περιοχές Ig2 των υποδοχέων τους και οι αυξητικοί παράγοντες PDGF και VEGF, οδηγώντας στον διμερισμό των PDGFRs και VEGFRs (**Εικόνα 8.18Β και Γ**).

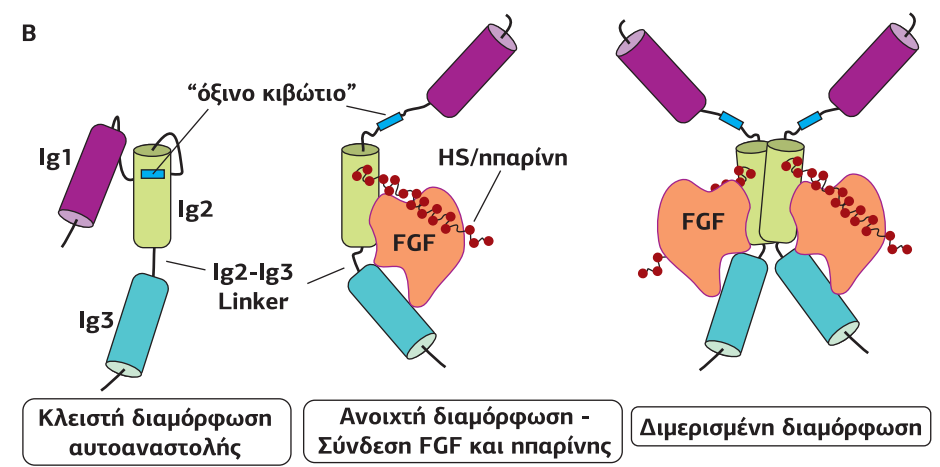
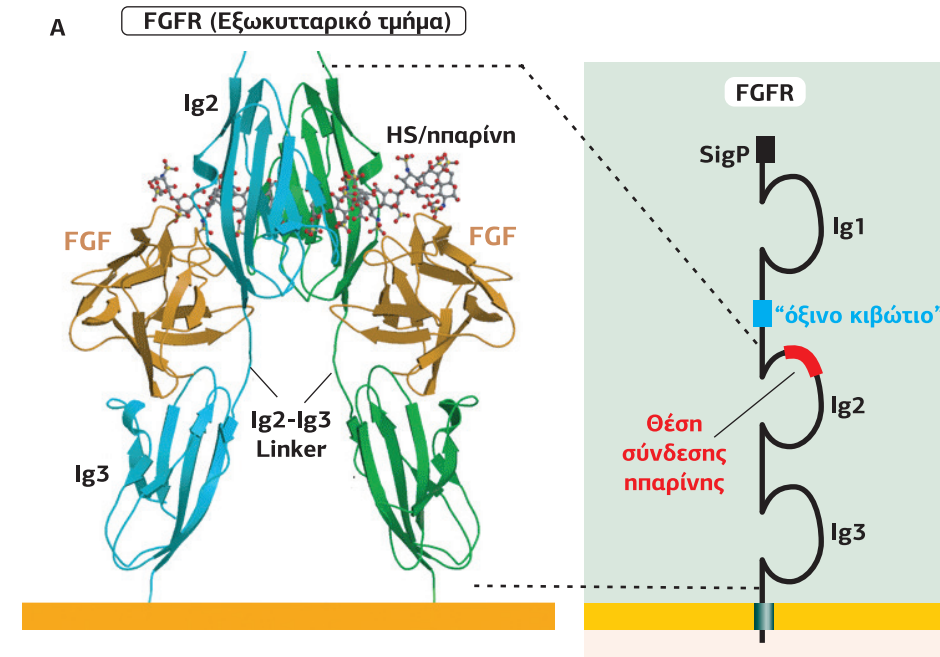
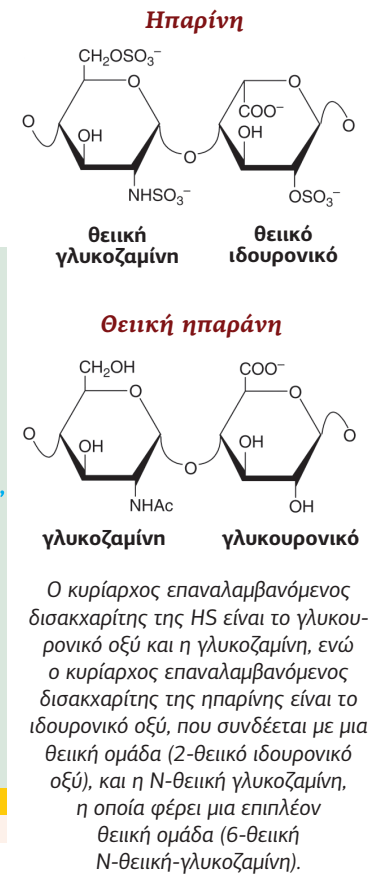
**FGFR: πολλαπλές επαφές υποδοχέα-υποδοχέα, υποδοχέα-FGF και υποδοχέα-ηπαρίνης**

Ο διμερισμός των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF) χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό σύνδεσης δύο μορίων του μονομερούς προσδέτη FGF, άμεσης επαφής υποδοχέα-υποδοχέα, και τη συμμετοχή δύο βοηθητικών μορίων, των πολυσακχαριτών ηπαρίνη/θειική ηπαρίνη (HS). Οι εξωκυτταρικές περιοχές των FGFRs περιέχουν τρεις περιοχές Ig-like (Ig1-Ig3). Οι περιοχές Ig2 και Ig3, μαζί με μια περιοχή που παρεμβάλλεται ανάμεσά τους (linker), είναι ζωτικής σημασίας για την πρόσδεση του FGF, ο οποίος είναι μονομερής (σε αντίθεση με τον NGF και τον SCF). Η κρυσταλλική δομή του εξωκυτταρικού τμήματος του διμερισμένου υποδοχέα FGFR1c, συνδεδεμένου με τον FGF2 και την ηπαρίνη σε αναλογία 2: 2, αποδεικνύει ότι κάθε μόριο υποδοχέα έρχεται ταυτόχρονα σε επαφή τόσο με τον FGF όσο και με την ηπαρίνη. Η ηπαρίνη έρχεται σε επαφή με τα δύο μόρια FGF και με τα δύο μόρια υποδοχέα (μέσω των περιοχών Ig2, όπου συνδέεται). Επιπλέον, οι δύο υποδοχείς αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους μέσω των D2 περιοχών τους. Έτσι, όλες οι αλληλεπιδράσεις, υποδοχέα - προσδέτη,

υποδοχέα - ηπαρίνης/HSPG, προσδέτη - ηπαρίνης και υποδοχέα - υποδοχέα, συνεργάζονται για να σταθεροποιήσουν το διμερές FGFR (**Εικόνα 8.19Α**).

Ο FGFR διαθέτει έναν επιπλέον ενδομοριακό μηχανισμό "αυτοαναστολής", που εμποδίζει τη σύνδεση του προσδέτη. Η συγγένεια των FGFRs για τους FGFs ή τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης, HSPGs (Heparan Sulfate Proteoglycans) αυξάνεται όταν αφαιρεθεί η περιοχή Ig1 είτε ένα "όξινο κιβώτιο" 8-καταλοίπων στην περιοχή μεταξύ των Ig1-Ig2. Μία ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ της Ig1 και της θέσης σύνδεσης του FGF, που σχηματίζεται από την Ig2 και Ig3, συναγωνίζεται τη σύνδεση του FGF στον FGFR. Ταυτόχρονα, το όξινο κιβώτιο συνδέεται σε μια θετικά φορτισμένη "αύλακα" μέσα στον ίδιο υποδοχέα, που διαφορετικά θα φιλοξενούσε την HSPGs/ηπαρίνη. Τα μονομέρη του FGFR υιοθετούν μια "κλειστή" διαμόρφωση αυτοαναστολής όταν η Ig1 και το όξινο κιβώτιο καταλαμβάνουν τις ενδομοριακές θέσεις σύνδεσης. Αυτή η κατάσταση αυτοαναστολής φαίνεται να είναι σε ισορροπία με μια "ανοικτή" διαμόρφωση, στην οποία οι δύο θέσεις πρόσδεσης είναι άδειες και είναι έτοιμες να αλληλεπιδράσουν με FGF και HSPGs, επιτρέποντας την ενεργοποίηση του FGFR (**Εικόνα 8.19Β**).

Η **θειική ηπαρίνη** (HS, Heparan Sulfate) είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που βρίσκεται σε όλους τους ζωικούς ιστούς. Εμφανίζεται ως πρωτεογλυκάνη (HSPG) στην οποία δύο ή τρεις αλυσίδες HS βρίσκονται συνδεδεμένες με την πλασματική μεμβράνη ή με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η θειική ηπαρίνη είναι ένα μέλος της οικογένειας γλυκοζαμινογλυκανών και έχει ανάλογη δομή με την **ηπαρίνη**. Και οι δύο αποτελούνται από μια μεταβλητή επαναλαμβανόμενη μονάδα θειωμένου δισακχαρίτη.



**Εικόνα 8.19 Διμερισμός του υποδοχέα FGFR.** Α. Κρυσταλλική δομή των περιοχών Ig2 και Ig3 του διμερισμένου FGFR με συνδεδεμένο τον προσδέτη και την ηπαρίνη. Διακρίνεται, επίσης, η σχηματική αναπαράσταση όλου του εξωκυτταρικού τμήματος του FGFR. [76] [66] Β. Η διαμόρφωση αυτοαναστολής του FGFR με το όξινο κιβώτιο να καταλαμβάνει τις θέσεις σύνδεσης του προσδέτη και της ηπαρίνης.

**Ο EGFR / οικογένεια ErbB: ο διμερισμός που μεσολαβείται μόνο με τη σύνδεση των δύο μονομερών υποδοχέα**

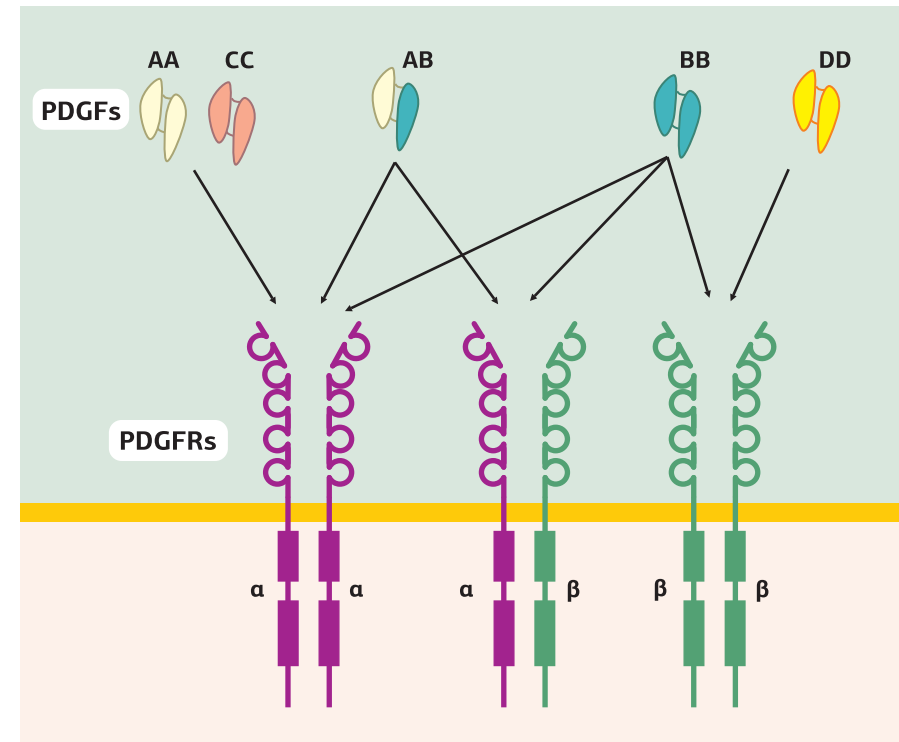
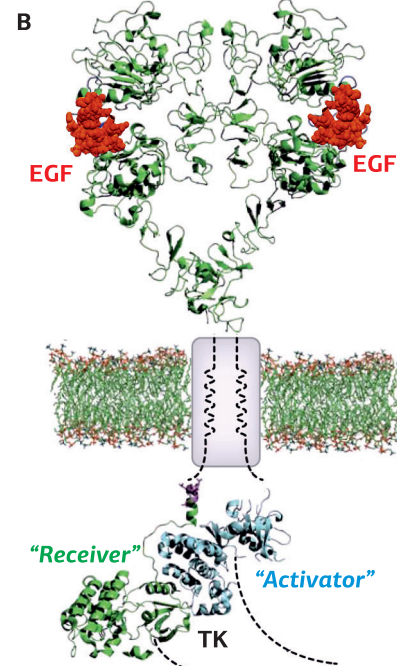
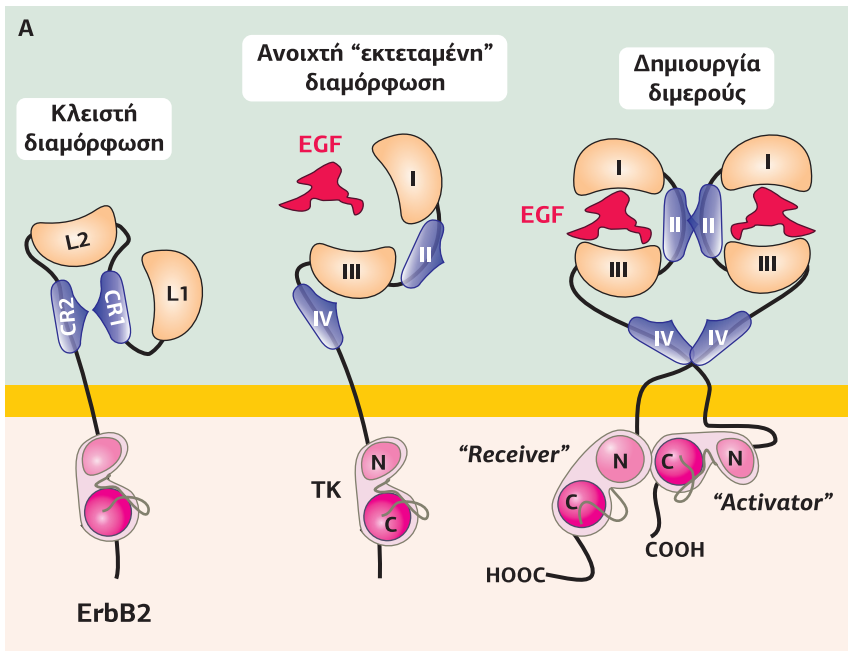
Υποδοχείς της οικογένειας του EGFR ή ErbB αντιπροσωπεύουν το άλλο άκρο των μηχανισμών διμερισμού, όπου ο προσδέτης δεν έχει καμία άμεση συνεισφορά στη διεπιφάνεια διμερισμού. Αυτοί οι υποδοχείς εμφανίζουν, επίσης, έναν μηχανισμό ενδομοριακής αυτοαναστολής. Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων ErbB αποτελείται από τέσσερις περιοχές (I-IV). Οι περιοχές I και III, ~160 αμινοξέων η καθμία, περιλαμβάνουν LRR (Leucine-Rich Repeats) πλούσιες σε λευκίνη α/β σωληνοειδείς δομές beta strand-turn-alpha helix (βλ. **Εικόνα 5.11**, σελ. 238) και έχουν την ικανότητα να συνδέουν, και οι δύο, τους προσδέτες. Οι περιοχές II και IV είναι περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (CRD, Cysteine Rich Domain) που αποτελούνται από ~150 αμινοξέα έκαστη. Η κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του EGFR αποκάλυψε ότι ο διμερισμός οφείλεται μόνο στη σύνδεση των δύο μονομερών του υποδοχέα. Παρά το γεγονός ότι ο προσδέτης είναι δισηθής, όπως αυτοί που συζητήθηκαν παραπάνω, σε αυτήν την περίπτωση ο EGF έρχεται σε επαφή με δύο διακριτές θέσεις (στις περιοχές I και III) στο κάθε μονομερές του υποδοχέα αντί να διασυνδέει τα δύο μονομερή του υποδοχέα, όπως συμβαίνει για τους NGF, SCF ή FGF. Αυτή η σύνδεση του προσδέτη προωθεί σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωση της εξωκυτταρικής περιοχής του EGFR, που ξεσκεπάζουν τον βραχίονα διμερισμού στην περιοχή II. Πριν από τη σύνδεση του προσδέτη, αυτός ο βραχίονας βρίσκεται σε στενή επαφή μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με την περιοχή IV, σταθεροποιώντας μια “κλειστή” διαμόρφωση, στην οποία αυτοαναστέλλεται η σύνδεση του προσδέτη αλλά και ο διμερισμός του υποδοχέα.

Η σύνδεση του προσδέτη στο ένα μονομερές στις περιοχές I και III επάγει άνοιγμα της κλειστής διαμόρφωσης, καθιστώντας τον βραχίονα διμερισμού της περιοχής II διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με την περιοχή II ενός δεύτερου μορίου υποδοχέα, ο οποίος επίσης έχει συνδεδεμένο τον προσδέτη. Όπως και με τον Kit, η περιοχή IV του EGFR που βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη φαίνεται επίσης να εφάπτεται κατά τη δημιουργία του διμερούς. Αυτή η διαμορφωτική μεταβολή συνοδεύεται από μια ασύμμετρη “head to tail” αλληλεπίδραση των δύο περιοχών της κινάσης, που έχει ως αποτέλεσμα την αλλοστερική ενεργοποίηση της κινάσης (**Εικόνα 8.20**).

**Ετεροδιμερισμός ορισμένων RTKs**

Μια άλλη όψη του προσδετο-επαγόμενου διμερισμού των RTKs, που έχει ρυθ-

**Εικόνα 8.20**  
**Διμερισμός του υποδοχέα EGFR.** Α. Το ανενεργό, “κλειστό” διαμόρφωση, μονομερές του EGFR εκτείνεται, ανοίγει, όταν ο EGF συνδέεται στην περιοχή I και III (L1 και L2) προκαλώντας διάσπαση του δεσμού μεταξύ του βραχίονα διμερισμού (CR1) και της περιοχής IV (CR2), καθώς και περιστροφή της γωνίας μεταξύ των περιοχών II και III, για να φέρει κοντά τις περιοχές σύνδεσης του προσδέτη (I και III) επιτρέποντας την ταυτόχρονη σύνδεση του προσδέτη. Η εκτεταμένη διαμόρφωση εκθέτει τον βραχίονα διμερισμού για αλληλεπίδραση με ένα άλλο εκτεταμένο μονομερές. Στον διμερισμό συμμετέχουν και οι περιοχές IV, επάγοντας μια ασύμμετρη “head to tail” αλληλεπίδραση των δύο περιοχών της κινάσης. [93] [8] [11] Β. Κρυσταλλική δομή του διμερισμένου υποδοχέα EGFR. [182] [206]



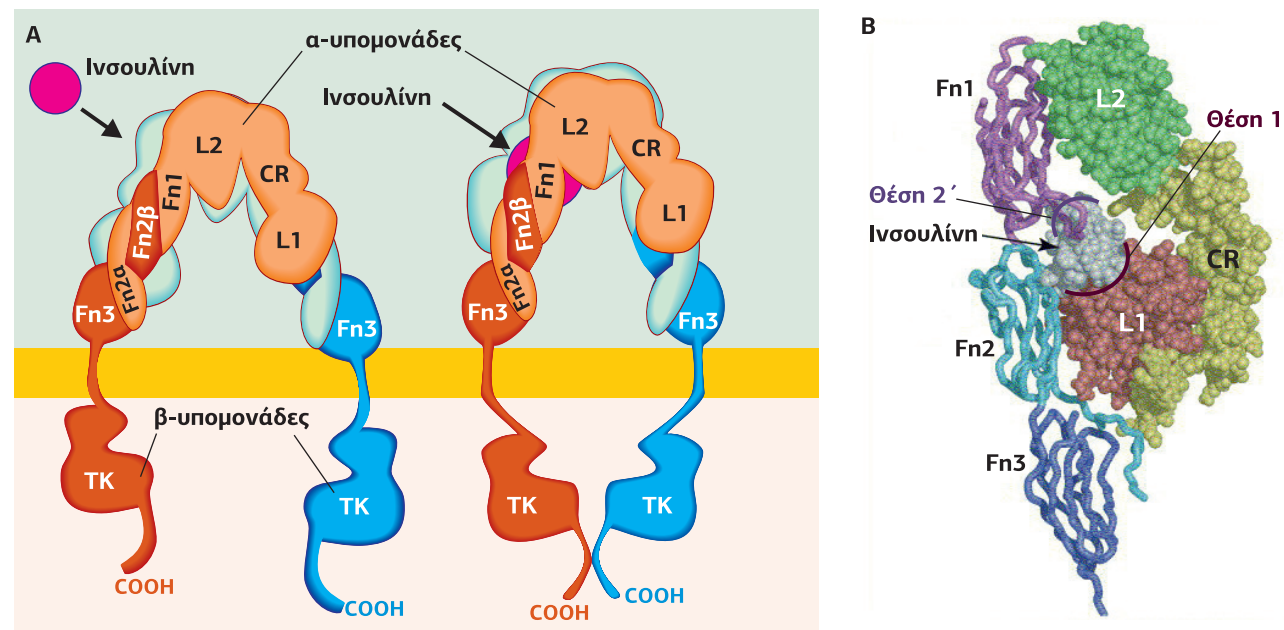
**Εικόνα 8.21**  
**Ομο- και ετερο-διμερή του υποδοχέα PDGFR.** Υπάρχουν δύο υπότυποι του υποδοχέα PDGFR, ο α- και ο β-υπότυπος, και σχηματίζονται τα διμερή αα, αβ και ββ. Ο αυξητικός παράγοντας που παράγεται από τα αιμοπετάλια, ο PDGF, είναι ένας διμερής αυξητικός παράγοντας, ο οποίος συναντάται στις εξής ομοδιμερείς μορφές PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD και σε μια ετεροδιμερή PDGF-AB. Ο PDGF-AA και ο PDGF-CC συνδέονται μόνο στον ομοδιμερή αα-υποδοχέα, ο PDGF-BB σε όλα τα διμερή, αα, αβ, ββ, ο PDGF-AB στα αα και αβ, ενώ ο PDGF-DD συνδέεται μόνο στο ββ-ομοδιμερές. [67] [42]

μιστική σημασία, είναι η δυνατότητα των υποδοχέων να σχηματίζουν ετεροδιμερή. Ο ετερόλογος διμερισμός παρατηρείται ανάμεσα στα διαφορετικά μέλη μιας οικογένειας υποδοχέων. Με αυτόν τον τρόπο ένας αυξητικός παράγοντας μπορεί να δεσμευτεί και να ενεργοποιήσει διαφορετικούς διμερείς συνδυασμούς μελών μιας οικογένειας υποδοχέων. Η **Εικόνα 8.21** δείχνει τις δυνατότητες ετερόλογου διμερισμού των υποδοχέων χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα τον υποδοχέα PDGFR.

Ο ετεροδιμερισμός αποτελεί έναν μηχανισμό, ο οποίος αυξάνει την ποικιλία και τη ρύθμιση των μονοπατιών μετάδοσης του μηνύματος. Από τη στιγμή που διάφορα μέλη μιας οικογένειας υποδοχέων διαφέρουν στην ακριβή δομή των περιοχών αυτοφωσφορυλίωσης και των ρυθμιστικών αλληλουχιών, υποτίθεται ότι η ρύθμιση και η δραστηριότητα είναι διαφορετικές για τους διάφορους συνδυασμούς των υποτύπων ενός υποδοχέα. Οι υπότυποι ενός υποδοχέα που εκφράζονται σε εξειδικευμένους ιστούς ενός οργανισμού του δίνουν τη δυνατότητα να επεξεργάζεται ορμονικά μηνύματα με διαφορετικό τρόπο.

**Υποδοχέας ινσουλίνης: ένας ήδη διμερισμένος υποδοχέας**

Αν και ο ακριβής μηχανισμός σύνδεσης της ινσουλίνης στον υποδοχέα της δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως, έχει προταθεί ένα μοντέλο στο πλαίσιο της παρούσας διαθέσιμης δομής του εξωκυτταρικού τμήματος του InsR. Το μοντέλο αυτό δηλώνει ότι σε κάθε αβ διμερές υπάρχουν δύο θέσεις σύνδεσης. Η κάθε θέση αποτελείται από δύο διακριτές θέσεις σύνδεσης της ινσουλίνης, μια υψηλής και μια χαμηλής συγγένειας: τη **θέση 1**, η οποία συνδέεται με την “κλασική” επιφάνεια σύνδεσης της ινσουλίνης και αποτελείται από την περιοχή L1 της α-υπομονάδας, και τη **θέση 2**, που αποτελείται από βρόχους στη συμβολή των Fn1 και Fn2 περιοχών. Οι θέσεις σύνδεσης της ινσουλίνης ορίζονται ως θέση 1 και 2 στο πρώτο μονομερές, και θέση 1’ και 2’ στο δεύτερο μονομερές του υποδοχέα. Ο κάθε διμερής InsR μπορεί να δεσμεύει ένα μόριο ινσουλίνης (το οποίο έχει δύο δεσμευτικές επιφάνειες). Καθώς η θέση 1 βρίσκεται σε στενή επαφή με τη θέση 2’, και η θέση 1’ με τη θέση 2, μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης προβλέπεται να συμβεί μια “διασταυρούμενη σύνδεση” μέσω της ινσουλίνης ανάμεσα στα δύο μονομερή του υποδοχέα, δηλαδή μονομερές 1 θέση 1 - ινσουλίνη - μονομερές 2 θέση 2’ ή μονομερές 1 θέση



**Εικόνα 8.22**  
**Ενεργοποίηση του υποδοχέα InsR μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης.** Α. Με πορτοκαλί και σιέλ είναι οι α-υπομονάδες, με κόκκινο και μπλε οι β-υπομονάδες. Το κάθε μονομερές υποδοχέα διαθέτει δύο θέσεις σύνδεσης της ινσουλίνης. Τη θέση 1, η οποία συνδέεται με την “κλασική” επιφάνεια σύνδεσης της ινσουλίνης που αποτελείται από την περιοχή L1 της α-υπομονάδας του InsR, και τη θέση 2, που αποτελείται από βρόχους στη συμβολή των Fn1 και Fn2 περιοχών και πάλι της α-υπομονάδας. Καθώς η θέση 1 βρίσκεται σε στενή επαφή με τη θέση 2', μετά τη σύνδεση της ινσουλίνης προκύπτει μια “διασταυρούμενη σύνδεση” ανάμεσα στα δύο μονομερή του υποδοχέα, που φέρνει το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα στην κατάλληλη διαμόρφωση που απαιτείται για την ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης. Β. Τριδιάστατη αναπαράσταση της σύνδεσης της ινσουλίνης στην εξωκυτταρική περιοχή της μιας υπομονάδας του InsR. [87] [39]

2 - ινσουλίνη - μονομερές 2 θέση 1'. Ο σχηματισμός των σταυροσυνδέσεων φέρνει το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα στην κατάλληλη διαμόρφωση που απαιτείται για την ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης (Εικόνα 8.22).

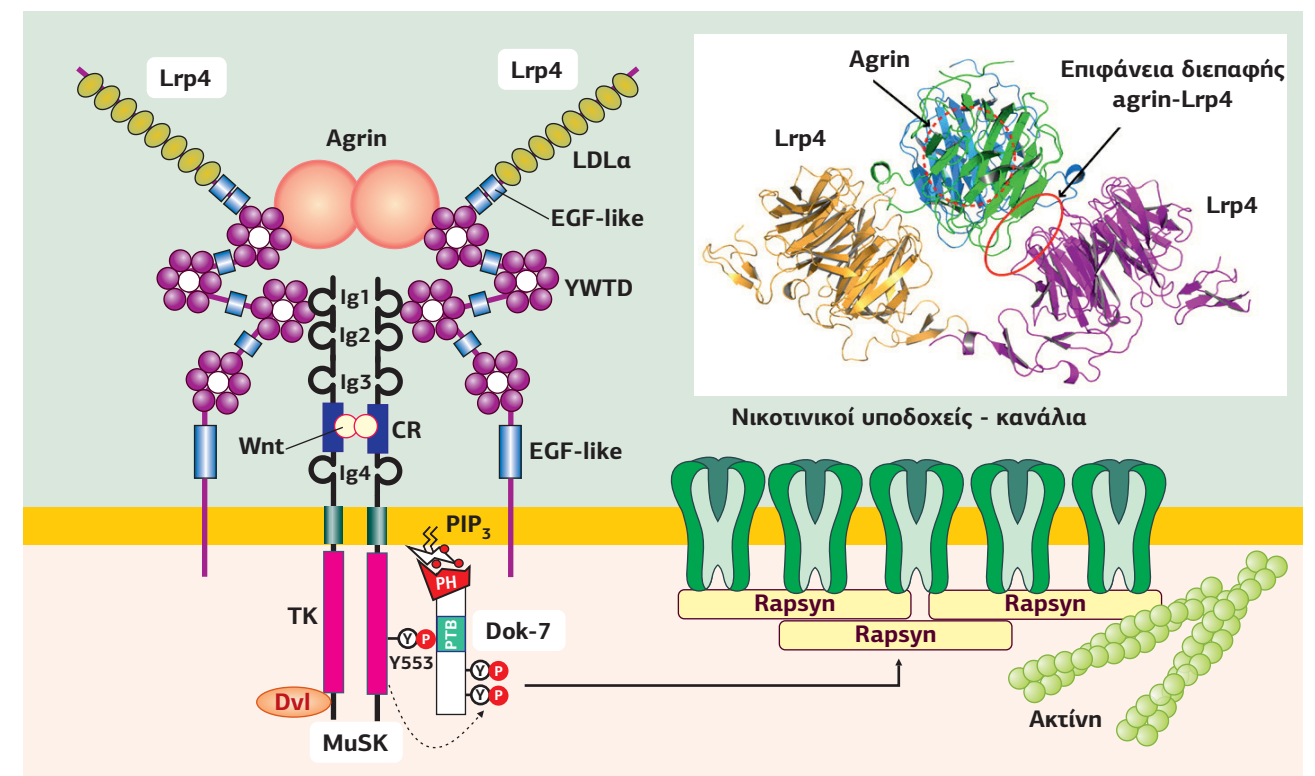
#### Νέοι τρόποι ενεργοποίησης RTKs

Παρά το γεγονός ότι πολλοί από τους 58 RTKs στον άνθρωπο είναι πιθανό να χρησιμοποιήσουν έναν από τους τέσσερις μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω για την ενεργοποίησή τους, περαιτέρω μελέτες προσδιόρισαν νέες παραλλαγές. Για παράδειγμα, οι δύο ανθρώπινοι υποδοχείς DDR1 και DDR2 (Discoidin Domain Receptors) ενεργοποιούνται από ίνες κολλαγόνου και όχι από διαλυτούς αυξητικούς παράγοντες (βλ. Εικόνα 8.13). Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το πώς η σύνδεση κολλαγόνου προάγει τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίησή του. Η κινητική της ενεργοποίησης των DDR1/2 είναι ασυνήθιστα αργή, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να αποκαλύψουν έναν νέο τρόπο για το θέμα της διασταυρούμενης σύνδεσης - διμερισμού των RTKs από πολυδύναμους προσδέτες.

Οι οικογένειες των υποδοχών Ryk (Related to receptor tyrosine kinase), Ror (RTK-like orphan receptor) και MuSK (Muscle-Specific Kinase), οι οποίες έχουν όλες απρόσμενη σύνδεση με τη σηματοδότηση Wnt, πιθανώς να χρησιμοποιούν έναν νέο μοναδικό μηχανισμό ενεργοποίησης. Ο Ryk έχει αναφερθεί ότι λειτουργεί ως ένας υποδοχέας (ή συνυποδοχέας) των Wnts καθώς στο εξωκυτταρικό του τμήμα περιέχει μια περιοχή ομόλογη του WIF-1 (Wnt-Inhibitory Factor-1), όπου συνδέεται ο Wnt. Ωστόσο, οι μηχανιστικές λεπτομέρειες παραμένουν ασαφείς και δεν είναι ξεκάθαρο εάν ο Ryk περιέχει μια δραστική περιοχή κινάσης τυροσίνης.

Οι δύο Ror φαίνεται, επίσης, ότι δεσμεύουν Wnts μέσω μιας περιοχής του εξωκυτταρικού τους τμήματος που εμφανίζει μεγάλη αναλογία με την πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή σύνδεσης της Wnt που βρέθηκε στους υποδοχείς Frizzled. Επιπλέον, οι Ror2 συμμετέχουν σε ορισμένες αποκρίσεις του Wnt5a.

Ο υποδοχέας MuSK διαθέτει, επίσης, μια πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή, ανάλογη με αυτήν των υποδοχών Frizzled, γεγονός που υποδηλώνει σύνδεση με τον Wnt. Ο MuSK ρυθμίζεται από την agrin, μια πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαράνης (HSPG), η οποία εκκρίνεται από τους κινητικούς νευρώνες στη νευρομυϊκή σύναψη, αλλά οι προσπάθειες για τον εντοπισμό άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ agrin και της εξωκυτταρικής περιοχής του MuSK δεν απέδωσαν. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη Lrp4 (LDL receptor-related protein-4) λειτουργεί ως



συνυποδοχέας για τους MuSK, καθώς συνδέεται στην agrin και μεταφέρει τη δραστηριότητα στον MuSK. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της agrin, του συνυποδοχέα Lrp4 και του MuSK ενορχηστρώνει την ομαδοποίηση των nAChRs και τη μετασυναπτική διαφοροποίηση στη νευρομυϊκή σύναψη. Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της εκκρινόμενης agrin (SS-NtA) αλληλεπιδρά με την coiled-coil περιοχή της λαμινίνης σταθεροποιώντας την στη συναπτική εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Ο Lrp4 και ο MuSK δρουν ως πρωτεΐνες σκαλωσιάς δημιουργώντας ένα σύνθετο και δυναμικό δίκτυο αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών, το οποίο απαιτείται για την ομαδοποίηση των nAChRs (Εικόνα 8.23).

Ο υποδοχέας Ret (Rearranged during transfection) ενεργοποιείται, επίσης, έμμεσα και μπορεί να χρησιμοποιεί έναν μηχανισμό αντίστοιχο με αυτόν του MuSK. Ο Ret ανταποκρίνεται σε ομοδιμερείς προσδέτες της οικογένειας GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor), αλλά αυτοί οι προσδέτες πρέπει πρώτα να συνδεθούν στον συνυποδοχέα GFRa (GDNF-family receptor-α) που είναι αγκυροβολημένος στη μεμβράνη μέσω GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol) (βλ. Εικόνα 8.12). Το σύμπλοκο GFRa / GDNF φαίνεται να προωθεί τον διμερισμό του Ret και τα βήματα σε αυτή τη διαδικασία έχουν αναγνωριστεί από ποσοτικές μελέτες σε κυτταρικό επίπεδο. Ο Ret απεικονίζει μια άλλη παραλλαγή διμερισμού που επάγεται από τον προσδέτη και μπορεί, επίσης, να παρέχει ένα μοντέλο για την κατανόηση του πώς το σύμπλοκο agrin/ Lrp4 προωθεί τον διμερισμό του MuSK.

## 1.6 Ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης Tyr των RTKs

Το κρίσιμο ερώτημα πώς ο διμερισμός των εξωκυτταρικών περιοχών των RTKs, που επάγεται με τη σύνδεση του προσδέτη, οδηγεί σε ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης τυροσίνης (TKD, Tyr Kinase Domain) έχει εξεταστεί λεπτομερώς για αρκετούς RTKs, συμπεριλαμβανομένων του Kit, του FGFR, του ErbB και του υποδοχέα της ινσουλίνης. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης είναι εξαιρετικά

**Εικόνα 8.23**  
**Ενεργοποίηση του υποδοχέα MuSK μέσω του συνδεδεμένου με την agrin συνυποδοχέα Lrp4.** Η agrin είναι μια πρωτεογλυκάνη που εκκρίνεται από τον κινητικό νευρώνα στη νευρομυϊκή σύναψη, όπου συνδέεται με τις λαμίνες, αλλά και με την Lrp4. Η Lrp4 έχει ένα μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο που αποτελείται από 8 επαναλήψεις LDLa, δύο επαναλαμβανόμενες περιοχές EGF-like και 4 μοτίβα YWTD που δημιουργούν δομή β-προπέλας, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται περιοχές EGF. Η σύνδεση της agrin στην Lrp4 οδηγεί στον διμερισμό και στην ενεργοποίηση του MuSK. Η MuSk trans-φωσφορυλιώνεται και στις pTyr συνδέεται, μέσω της PTB περιοχής της, η πρωτεΐνη προσαρμογής Dok-7, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη δραστηριότητα του MuSK επάγοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων νικοτινικών υποδοχών συνδεδεμένων μεταξύ τους με μόρια rapsyn (receptor-associated protein of the synapse). Επίσης, ο MuSK αλληλεπιδρά και με την πρωτεΐνη Dvl (Dishevelled) που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πολικότητα. [86] [223]

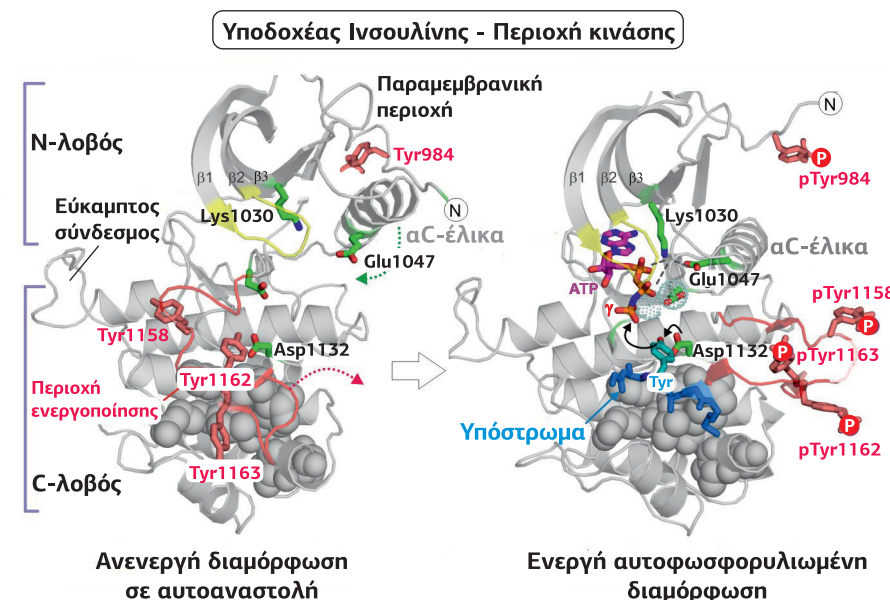
διαφορετικοί. Αν και όλες οι καταλυτικές περιοχές TK έχουν τον χαρακτηριστικό N- και C-λοβό και οι κρυσταλλικές δομές των ενεργοποιημένων μορφών τους είναι όλες παρόμοιες, καθώς τα βασικά ρυθμιστικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων του βρόχου ενεργοποίησης και της αC-έλικας στον N-λοβό, παίρνουν την ίδια διαμόρφωση σε όλες τις ενεργοποιημένες TKDs, οι δομές των ανενεργών TKDs διαφέρουν ουσιαστικά από υποδοχέα σε υποδοχέα και αυτή η μεταβολή αντικατοπτρίζει την ποικιλομορφία των ρυθμιστικών μηχανισμών τους. Κάθε TKD βρίσκεται σε μια μοναδική κατάσταση cis-αυτοαναστολής από ένα σύνολο ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων ειδικών για κάθε υποδοχέα. Η άρση της cis-αυτοαναστολής, η οποία επάγεται με τη σύνδεση του προσδέτη και τον διμερισμό του υποδοχέα, είναι το γεγονός κλειδί που προκαλεί την ενεργοποίηση των RTKs.

#### Αυτοαναστολή της TKD από τον βρόχο ενεργοποίησης: *InsRs* και *FGFRs*

Η κρυσταλλική δομή ενός τμήματος 306 αμινοξέων της β-αλυσίδας του υποδοχέα της ινσουλίνης, που αντιστοιχεί στην κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης, ήταν η πρώτη που έριξε φως στον μηχανισμό αυτοαναστολής των RTKs. Ένα σημαντικό αμινοξύ στον βρόχο ενεργοποίησης, η Tyr1162, προβάλλει προς το ενεργό κέντρο σαν να “περιμένει” να αυτοφωσφορυλιωθεί από τη δική του περιοχική κινάση (δηλαδή, να cis-φωσφορυλιωθεί). Αυτή η αλληλεπίδραση σταθεροποιεί μια ανασταλτική διαμόρφωση του βρόχου ενεργοποίησης που φράζει την ενεργή θέση της κινάσης, εμποδίζοντας την πρόσβαση του ATP και του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Έτσι, η περιοχική κινάση του *InsR* βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής από τον δικό της βρόχο ενεργοποίησης. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η Tyr984 της παραμεμβρανικής περιοχής συνδέεται στη σχισμή ανάμεσα στον β3-κλώνο και την αC-έλικα του N-λοβού, σταθεροποιώντας μια θέση της αC-έλικας, η οποία εμποδίζει τη δημιουργία γέφυρας άλατος μεταξύ της Lys1030 του β3 κλώνου και του Glu1047 της αC-έλικας.

Όταν η ινσουλίνη συνδέεται στον υποδοχέα της, η Tyr1162 (μαζί με την Tyr1158 και την Tyr1163) της μιας TKD trans-φωσφορυλιώνεται από την TDK του απέναντι μονομερούς, διαταράσσοντας την cis-αυτοανασταλτική αλληλεπίδραση του βρόχου ενεργοποίησης. Επιπλέον, η παραμεμβρανική περιοχή διασταυρώνεται για να συνδεθεί στη σχισμή του β3-κλώνου και αC-έλικας της περιοχικής κινάσης του γειτονικού μονομερούς. Ως αποτέλεσμα σταθεροποιείται μια θέση της αC που προωθεί τη δημιουργία της γέφυρας άλατος Lys1030-Glu1047, η οποία με τη σειρά της διευκολύνει τη σύνδεση της Lys1030 στη φωσφορική ομάδα του ATP προωθώντας τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος (Εικόνα 8.24).

**Εικόνα 8.24**  
Δομή της καταλυτικής περιοχής του υποδοχέα της ινσουλίνης σε ανενεργή και ενεργή διαμόρφωση. Η κρυσταλλική δομή της περιοχής της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης έχει τη χαρακτηριστική δομή των δύο λοβών. Ο βρόχος ενεργοποίησης μεσολαβεί στη σύνδεση της φωσφορικής ομάδας του ATP και περιέχει τα απαραίτητα για την κατάλυση κατάλοιπα (π.χ. Asp1132), τα οποία βρέθηκαν σε ισοδύναμες θέσεις ως συντηρημένα κατάλοιπα σε πολλές πρωτεϊνικές κινάσες Tyr και Ser/Thr. Η πρόσβαση στο ενεργό κέντρο μπλοκάρει από τον βρόχο ενεργοποίησης, που περιέχει τρία κατάλοιπα Tyr (Tyr1158, Tyr1162 και Tyr1163). Η trans-φωσφορυλίωση των καταλοίπων αυτών από την κινάση της γειτονικής β-υπομονάδας ενεργοποιεί τον υποδοχέα. [70] [71] [25]

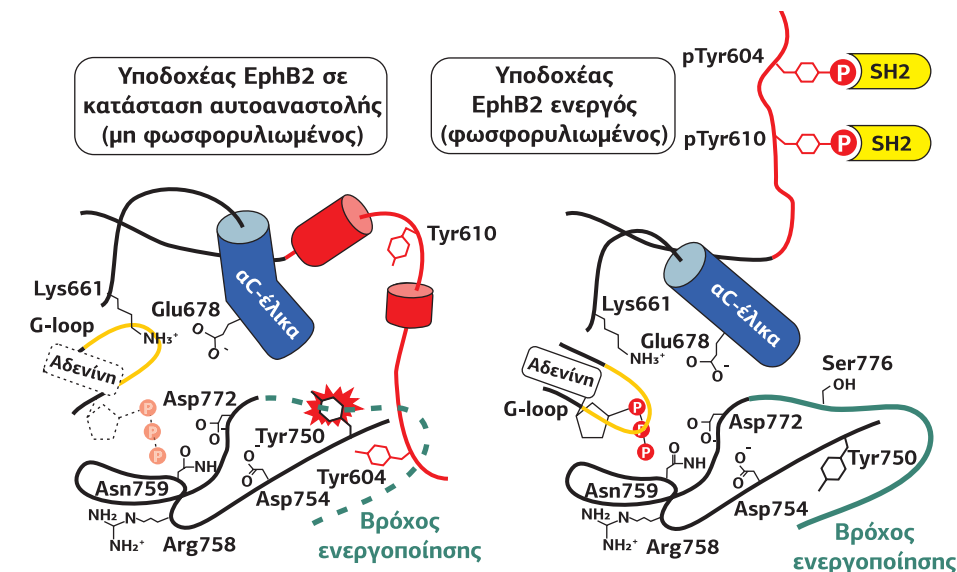


Ο φωσφορυλιωμένος βρόχος ενεργοποίησης της TKD του υποδοχέα ινσουλίνης τότε είναι ελεύθερος να υιοθετήσει την “ενεργή” διαμόρφωση που έχουμε συναντήσει σε όλες τις κινάσες.

Η περιοχική κινάση του *FGFR1* χρησιμοποιεί έναν παρόμοιο μηχανισμό ενεργοποίησης, αν και η αυτοαναστολή της περιλαμβάνει ένα διαφορετικό σύνολο αλληλεπιδράσεων του βρόχου ενεργοποίησης από ό,τι ο υποδοχέας της ινσουλίνης. Οι τυροσίνες στον βρόχο ενεργοποίησης του *FGFR1* δεν αποκλείουν τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος άμεσα. Αντ’ αυτού, συμμετέχουν σε ένα μοναδικό σύνολο ενδομοριακών επαφών που σταθεροποιούν την ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης, οδηγώντας στην cis-αυτοαναστολή της κινάσης φράζοντας τη θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης-υποστρώματος, αλλά όχι τη θέση σύνδεσης του ATP. Όταν ο FGF επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα του, η trans-φωσφορυλίωση τυροσινών στον βρόχο ενεργοποίησης διαταράσσει τη διαμόρφωση cis-αυτοαναστολής, έτσι ώστε τόσο ο βρόχος ενεργοποίησης όσο και η αC-έλικα να μπορούν να υιοθετήσουν τη χαρακτηριστική ενεργή διαμόρφωση.

#### Αυτοαναστολή μέσω της παραμεμβρανικής περιοχής

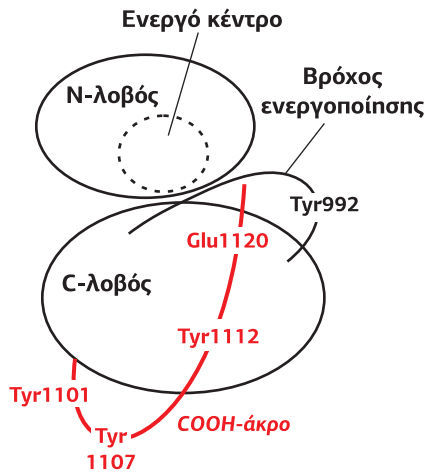
Η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης παίζει έναν κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στις περισσότερες κινάσες. Απαιτείται τόσο για τη σταθεροποίηση της ενεργοποιημένης διαμόρφωσης όσο και για την αποσταθεροποίηση των cis-αυτοανασταλτικών αλληλεπιδράσεων. Όμως, εκτός από αυτόν τον μηχανισμό ρύθμισης, πολλοί RTKs βρίσκονται σε κατάσταση cis-αυτοαναστολής από στοιχεία εκτός της TKD. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η “παραμεμβρανική αυτοαναστολή” που συναντάται στους υποδοχείς *MuSK*, *Flt3*, *Kit* και *ErbB*. Σε κάθε περίπτωση, αλληλουχίες της παραμεμβρανικής περιοχής έρχονται σε επαφή με διάφορα τμήματα της TKD, συμπεριλαμβανομένου του βρόχου ενεργοποίησης, και σταθεροποιούν τη διαμόρφωση αυτοαναστολής (Εικόνα 8.25). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαφέρουν στις λεπτομέρειες μεταξύ των TKDs, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις αφορούν κυρίως τυροσίνες της παραμεμβρανικής περιοχής. Ο διμερισμός του υποδοχέα προωθεί την trans-φωσφορυλίωση αυτών των τυροσινών, η οποία διαταράσσει τις cis-αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις και προωθεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα.



#### Αυτοαναστολή μέσω του COOH-τελικού άκρου

Μια άλλη παραλλαγή μηχανισμού αυτοαναστολής χρησιμοποιεί ο υποδοχέας *Tie2*. Αν και ο βρόχος ενεργοποίησης της TKD του *Tie2* βρίσκεται σε ενεργή διαμόρφωση ακόμη και χωρίς φωσφορυλίωση, ο βρόχος σύνδεσης του ATP υιοθετεί μια ανενεργή διαμόρφωση. Επιπλέον, μια περιοχική του COOH-τελικού άκρου που

**Εικόνα 8.25**  
Δομή της καταλυτικής περιοχής κινάσης του υποδοχέα *ErbB2* σε κατάσταση αυτοαναστολής από την παραμεμβρανική περιοχή και στην ενεργοποιημένη της μορφή. Σχηματική αναπαράσταση της κατάστασης αυτοαναστολής που δημιουργείται όταν αλληλουχίες της παραμεμβρανικής περιοχής έρχονται σε επαφή με διάφορα τμήματα της TKD, συμπεριλαμβανομένου του βρόχου ενεργοποίησης και της αC-έλικας, φράζοντας το ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζοντας το Asp772 να έρθει σε επαφή με τις φωσφορικές ομάδες του ATP. Επίσης, η Tyr750 υιοθετεί μια τέτοια διαμόρφωση ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδρασή της με την Tyr604. Έπειτα από φωσφορυλίωση των τυροσινών Tyr604 και Tyr610, η παραμεμβρανική περιοχή απομακρύνεται και ο υποδοχέας παίρνει την ενεργή του διαμόρφωση. Στην ενεργή διαμόρφωση του υποδοχέα, δημιουργείται μια γέφυρα άλατος μεταξύ της Glu678 (της αC-έλικας) και της Lys661 (του G-βρόχου) συντονίζοντας τη 2η φωσφορική ομάδα του ATP. [214]



**Εικόνα 8.26**  
Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αυτοαναστολής της TKD του υποδοχέα Tie2. Η COOH-τελική ουρά του Tie2 διπλώνει προς το ενεργό κέντρο. Οι δεσμοί υδρογόνου των Tyr1101 και Tyr1112 και οι γέφυρες άλατος του Glu1120 πιστεύεται ότι διατηρούν την COOH-τελική ουρά στην ανασταλτική της διαμόρφωση. Η αυτοφωσφορυλίωση της Tyr992 στον βρόχο ενεργοποίησης μπορεί να παρέχει ένα πρόσθετο επίπεδο ρύθμισης. [124]

περιέχει θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης τυροσίνης φράζει την ενεργό θέση σύνδεσης του υποστρώματος, αντιπροσωπεύοντας μια τρίτη αναστρέψιμη διαμόρφωση cis-αυτοαναστολής (Εικόνα 8.26). Η αυτοφωσφορυλίωση του Tie2 στο COOH-τελικό άκρο διαταράσσει αυτές τις αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις οδηγώντας στην ενεργοποίηση της καταλυτικής περιοχής κινάσης. Μια παρόμοια κατάσταση μπορεί, επίσης, να υφίσταται για τους PDGFRs και Ron, μολονότι δεν έχουν ακόμη περιγραφεί οι δομικές λεπτομέρειες.

#### Αλλοστερική ενεργοποίηση των καταλυτικών περιοχών TKDs

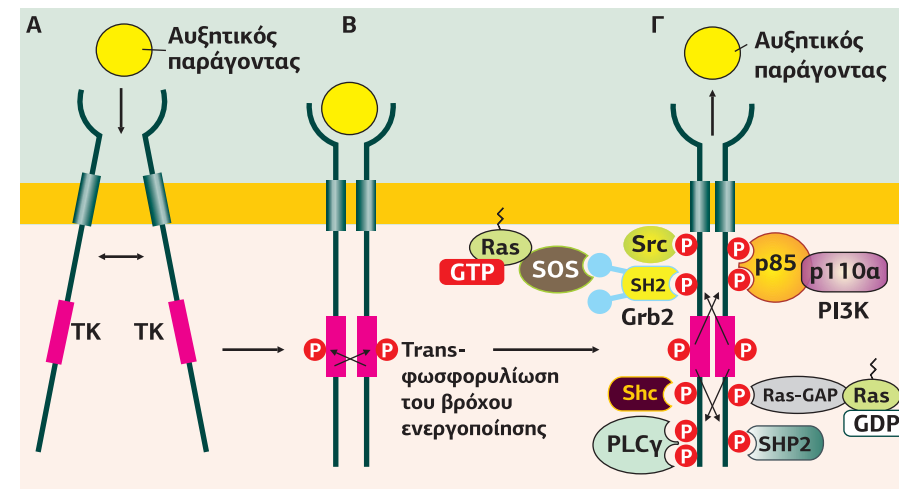
Η ενεργοποίηση όλων των TKDs, όπως συζητήθηκε παραπάνω, απαιτεί trans-φωσφορυλίωση τυροσινών στον βρόχο ενεργοποίησης, στην παραμεμβρανική περιοχή και / ή στο COOH-τελικό άκρο. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις cis-αυτοαναστολής που περιγράφηκαν είναι παροδικά αντιστρεπτές, έτσι ώστε η κάθε TKD να είναι, για ένα μικρό κλάσμα του χρόνου, ικανή να φωσφορυλιώσει τη γειτονική της TKD και ταυτόχρονα ευαίσθητη σε φωσφορυλίωση συγκεκριμένων ρυθμιστικών της θέσεων. Φέρνοντας τις δύο TKDs κοντά και δημιουργώντας ένα σταθερό διμερές αυξάνονται οι αντίστοιχες τοπικές συγκεντρώσεις τους και, κατά συνέπεια, προωθούνται αλλοστερικές δράσεις. Αυτές οι επιδράσεις αυξάνουν δραματικά την πιθανότητα μια παροδικά ενεργή TKD να συναντήσει μια άλλη TKD, να ακολουθήσει η trans-αυτοφωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση των υποδοχέων.

Οι υποδοχείς EGFR / ErbB ξεχωρίζουν ως σαφείς εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα, επειδή δεν απαιτούν trans-φωσφορυλίωση στους βρόχους ενεργοποίησης (ή αλλού) για την ενεργοποίησή τους. Πώς, λοιπόν, ρυθμίζονται οι EGFRs; Κρυσταλλογραφικές μελέτες καθώς και μελέτες μεταλλάξεων έχουν προσδιορίσει έναν αλλοστερικό μηχανισμό που μοιάζει με αυτόν της ενεργοποίησης των εξαρτώμενων από κυκλίνες κινασών (CDKs, Cyclin-dependent kinases). Μετά τη σύνδεση του EGF οι δύο TKDs σχηματίζουν ένα ασύμμετρο διμερές, στο οποίο ο C-λοβός της μιας TKD, που ονομάζεται “activator”, έρχεται σε επαφή με τον N-λοβό της γειτονικής TKD, που ονομάζεται “receiver” (βλ. Εικόνα 8.20A). Αυτές οι επαφές επάγουν διαμορφωτικές αλλαγές στον N-λοβό της κινάσης δέκτη που διαταράσσουν τις cis-αυτοανασταλτικές της αλληλεπιδράσεις. Ως αποτέλεσμα, η κινάση δέκτης υιοθετεί τη χαρακτηριστική ενεργή διαμόρφωση, χωρίς να απαιτείται φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης. Ο EGFR μπορεί να ενεργοποιηθεί χωρίς τη σύνδεση του προσδέτη όταν οι cis-αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις διαταράσσονται λόγω ογκογόνων μεταλλάξεων. Ανάλογες μεταλλάξεις εκφράζονται σε μια υποομάδα ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

## 1.7

### Σύνδεση της ενεργοποίησης των RTKs με την κυτταρική σηματοδότηση

Το αρχικό υπόστρωμα που φωσφορυλιώνουν οι RTKs είναι οι ίδιοι οι υποδοχείς. Οι θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης στην περιοχή της κινάσης διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στους περισσότερους RTKs, με τον EGFR ως εξαίρεση. Για παράδειγμα, η αυτοφωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης της TKD του υποδοχέα ινσουλίνης αυξάνει την καταλυτική της αποτελεσματικότητα από 50 έως 200 φορές. Στη συνέχεια, μετά την ενεργοποίηση της κινάσης trans-φωσφορυλιώνονται πρόσθετες τυροσίνες σε άλλα μέρη της κυτταροπλασματικής περιοχής των περισσότερων RTKs. Οι φωσφοτυροσίνες που προκύπτουν λειτουργούν ως ειδικές θέσεις για τη συναρμολόγηση σηματοδοτικών μορίων σηματοδότησης που στρατολογούνται στον υποδοχέα και ενεργοποιούνται σε απόκριση στη διέγερση του αυξητικού παράγοντα (Εικόνα 8.27).



#### Φάσεις της αυτοφωσφορυλίωσης των RTKs

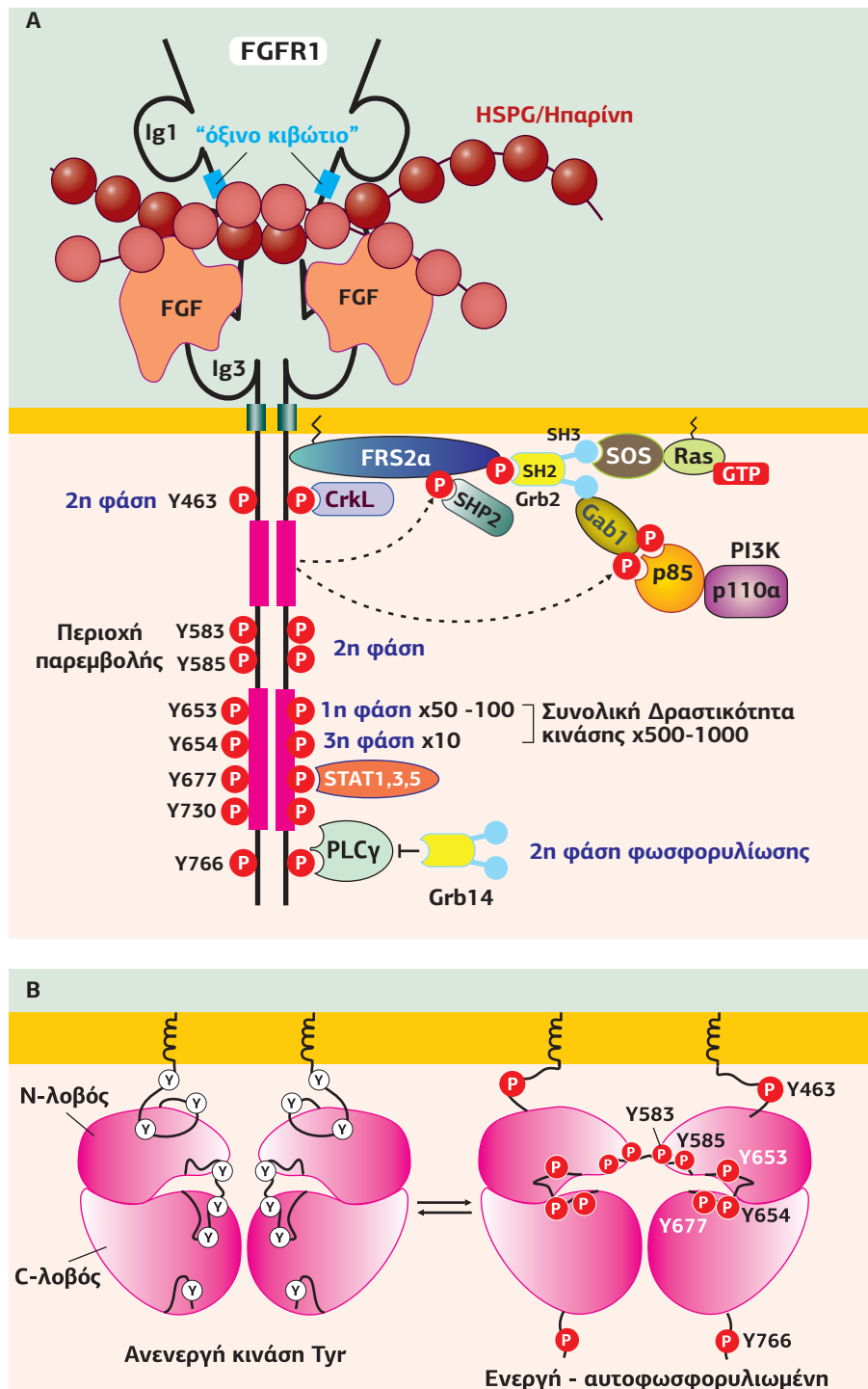
Μελέτες πολλών RTKs *in vitro* έδειξαν ότι οι Tyr της κυτταροπλασματικής πλευράς trans-φωσφορυλιώνονται με μια συγκεκριμένη σειρά. Για παράδειγμα, στους υποδοχείς InsRs και IGF1-Rs οι τρεις θέσεις στον βρόχο ενεργοποίησης φωσφορυλιώνονται με την ίδια σειρά: Tyr1162, Tyr1158 και, στη συνέχεια, Tyr1163 (χρησιμοποιώντας την αρίθμηση του υποδοχέα της ινσουλίνης). Κάθε διαδοχικό γεγονός έχει σημαντική επίδραση στις καταλυτικές ιδιότητες της κινάσης, αποσταθεροποιώντας τις cis-αυτοανασταλτικές αλληλεπιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω. Η πρώτη φωσφορυλίωση προκαλεί τη μεγαλύτερη αύξηση στην  $V_{max}$ , η δεύτερη προκαλεί τη μεγαλύτερη πτώση στην  $K_m$  για τα υποστρώματα και η τρίτη έχει μέτρια επίδραση και στα δύο. Στην περίπτωση του υποδοχέα MuSK, η φωσφορυλίωση της Tyr553 στην παραμεμβρανική αυτοανασταλτική περιοχή και της Tyr754 στον βρόχο ενεργοποίησης προηγούνται δύο επιπλέον φωσφορυλίωσεων στον βρόχο ενεργοποίησης. Αυτά είναι τα γεγονότα αυτοφωσφορυλίωσης “πρώτης φάσης” που χρησιμεύουν κυρίως για την ενίσχυση της καταλυτικής δραστηριότητας της κινάσης, άπαξ και ο υποδοχέας συνδεθεί με τον αυξητικό παράγοντα.

Τα γεγονότα αυτοφωσφορυλίωσης σε μια “δεύτερη φάση” προαπαιτούν την ενεργοποίηση της κινάσης και δημιουργούν τις φωσφοτυροσίνες ως θέσεις σύνδεσης σηματοδοτικών μορίων που περιέχουν SH2 και PTB περιοχές. Για ορισμένους RTKs υπάρχει και “τρίτη φάση”, η οποία περιλαμβάνει γεγονότα trans-αυτοφωσφορυλίωσης, που μεγιστοποιούν την ικανότητα της κινάσης να ενεργοποιεί τους στόχους της.

Μελέτες με τον FGFR1 έδειξαν ότι η αυτοφωσφορυλίωση της Tyr653 στον βρόχο ενεργοποίησης είναι το γεγονός κλειδί της πρώτης φάσης, η οποία αυξάνει τη δράση κινάσης ~50-100 φορές. Τα γεγονότα αυτοφωσφορυλίωσης της δεύτερης φάσης, στη συνέχεια, συμβαίνουν με μια εντυπωσιακά ακριβή σειρά. Η Tyr583, η οποία βρίσκεται στην περιοχή παρεμβολής (insert region) της κινάσης, είναι η πρώτη που trans-αυτοφωσφορυλιώνεται. Ακολουθεί η φωσφορυλίωση της Tyr463 στην παραμεμβρανική περιοχή, της Tyr766 στην COOH-τελική ουρά και της Tyr585, επίσης, στην insert region. Αυτές οι τέσσερις θέσεις της δεύτερης φάσης είναι πιθανό να είναι θέσεις σύνδεσης των περιοχών SH2 / PTB, προάγοντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνών και όχι την αύξηση της δραστηριότητας της κινάσης. Έπειτα από αυτή τη δεύτερη φάση, μια ακόμη αυτοφωσφορυλίωση συμβαίνει στον βρόχο ενεργοποίησης του FGFR1 (της Tyr654), που αυξάνει τη δράση της κινάσης επιπλέον 10 φορές, για να φτάσει 500-1.000 φορές τα βασικά επίπεδα. Αυτή η τροποποίηση της Tyr654 αντιπροσωπεύει την “τρίτη φάση” της αυτοφωσφορυλίωσης, που διεγείρει στο μέγιστο τη δράση κινάσης του FGFR1. Η φωσφορυλίωση δύο επιπλέον θέσεων, της Tyr677 και της Tyr766, απαιτείται για τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 και της φωσφολιπάσης PLCγ, αντίστοιχα (Εικόνα 8.28).

**Εικόνα 8.27**  
Τρία βήματα σηματοδοτικής μετάδοσης από υποδοχέα κινάσης Tyr. Α. Στην κατάσταση ηρεμίας, απουσία προσδέτη, ο υποδοχέας βρίσκεται στη μεμβράνη ως μονομερής. Β. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με έναν αυξητικό παράγοντα οδηγεί σε μια αλλαγή της διαμόρφωσης που προωθεί τον διμερισμό της κυτταροπλασματικής περιοχής κινάσης Tyr, με αποτέλεσμα την trans-φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης της κινάσης. Γ. Trans-φωσφορυλίωση πρόσθετων καταλοίπων Tyr στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα. Σε αυτές τις pTyr, στη συνέχεια, συνδέονται σηματοδοτικές πρωτεΐνες μέσω των SH2 ή PTB περιοχών τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η κυτταροπλασματική κινάση Tyr Src, οι πρωτεΐνες προσαρμογής Grb2 και Shc, η φωσφατάση Tyr SHP2, η κινάση φωσφολιπιδίων ινσουλίνης PI3K, η RasGAP, μια πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη δραστηριότητα GTPάσης της Ras, και η φωσφολιπάση C τύπου γ (PLCγ).

**Εικόνα 8.28**  
**Διαδοχική trans-αυτοφωσφορυλίωση του FGFR1.** Α. Ο διμερισμός της περιοχής κινάσης του FGFR1 επάγει τη διαδοχική φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης, που έχει ως συνέπεια την αύξηση της δραστηριότητας της κινάσης, και οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση των υποστρωμάτων CrkL, STAT, Grb14 και PLCγ. Στην πρώτη φάση της ενεργοποίησης φωσφορυλιώνεται η Tyr653 στον βρόχο ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα μια 50- έως 100-πλάσια αύξηση στη δραστηριότητα της κινάσης. Στη δεύτερη φάση φωσφορυλιώνονται οι Tyr583 (στην περιοχή παρεμβολής της κινάσης), η Tyr463 (στην παραμεμβρανική περιοχή), η Tyr766 (στην COOH-τελική ουρά) και η Tyr585 (επίσης στην περιοχή παρεμβολής). Αυτές οι τέσσερις pTyr αποτελούν θέσεις σύνδεσης των περιοχών SH2 / PTB, προάγοντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Στην τρίτη φάση της ενεργοποίησης η Tyr654 του βρόχου ενεργοποίησης φωσφορυλιώνεται, οδηγώντας σε μια συνολική αύξηση στη δραστηριότητα της κινάσης κατά 500-1.000 φορές. Φωσφορυλίωση της Tyr677 επιτρέπει τη σύνδεση του STAT3 και η φωσφορυλίωση της Tyr766 επιτρέπει τη σύνδεση είτε της Grb14 είτε της PLCγ. Η αρίθμηση των καταλοίπων τυροσίνης αντιστοιχεί στον ανθρώπινο FGFR1. [129]  
 Β. Η περιοχή κινάσης του FGFR1 στην ανενεργή κατάσταση και έπειτα από τη φωσφορυλίωση των κρίσιμων καταλοίπων Tyr. [84]

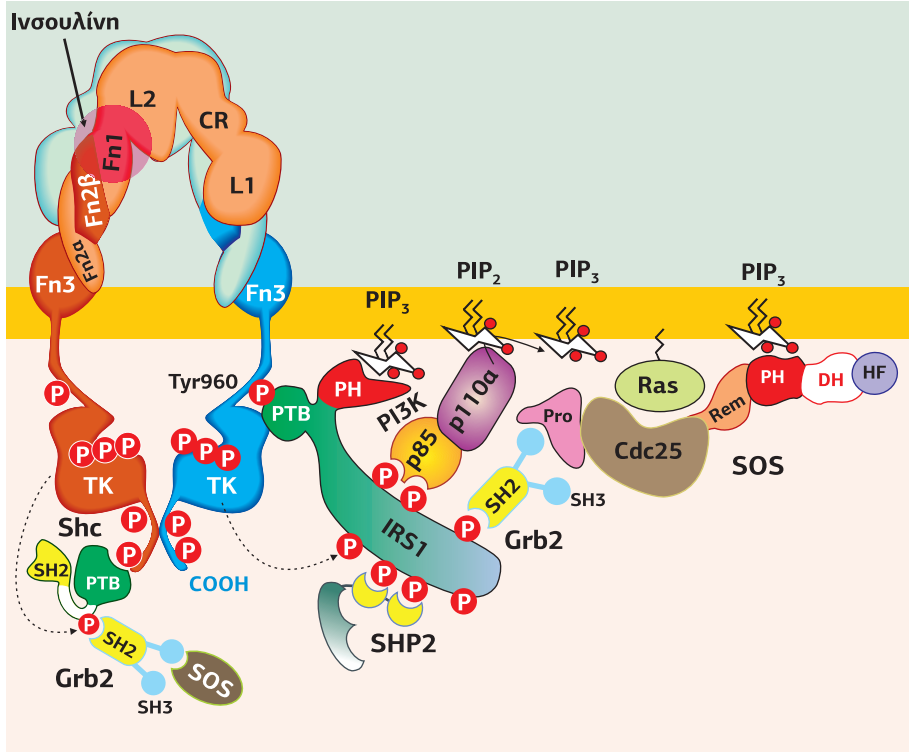


Το κύριο υπόστρωμα του FGFR είναι η πρωτεΐνη προσαρμογής **FRS2α** (FGFR Substrate 2α), η οποία είναι ιδιόσυστατα συνδεδεμένη στην παραμεμβρανική περιοχή και ταυτόχρονα αγκυροβολημένη στη μεμβράνη μέσω μυριστούλωσης. Η FRS2α αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη προσαρμογής **CrkL** [Crk-Like, CT10 (Chicken tumor virus number 10) regulator of kinase-Like), η οποία συνδέεται στην pTyr463 και φωσφορυλιώνεται από την ενεργοποιημένη κινάση του FGFR. Για την ενεργοποίηση της FRS2α απαραίτητη είναι η φωσφορυλίωση της Tyr654 του FGFR. Η FRS2α στρατολογεί τη φωσφατάση SHP2, η οποία έχει θετική δράση στη σηματοδότηση των RTKs, πιθανόν μέσω της αποφωσφορυλίωσης της Sprouty (βλ. σελ. 522). Η FRS2α στρατολογεί επίσης την πρωτεΐνη προσαρμογής **Grb2**, η οποία με τη σειρά

της στρατολογεί τον RasGEF SOS. Ο SOS ενεργοποιεί με τη σειρά του την GTPάση Ras. Η Grb2 μπορεί, επίσης, να στρατολογήσει την πρωτεΐνη προσαρμογής **Gab1** (Grb2-associated-binding protein 1), η οποία φωσφορυλιώνεται από τον FGFR και, στη συνέχεια, στρατολογεί την κινάση PI3K. Ο ενεργοποιημένος FGFR στρατολογεί και ενεργοποιεί την PLCγ, η οποία παράγει IP<sub>3</sub> και DAG. Η Grb14 αναστέλλει την PLCγ. Ο FGFR, επίσης, ενεργοποιεί και τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT1, 3 και 5. Ο STAT3 συνδέεται στην pTyr677 (Εικόνα 8.28).

**Η ενεργοποίηση των RTKs δημιουργεί πρωτεϊνικά σηματοδοτικά συμπλέγματα**

Η πρώτη απάντηση στην αυτοφωσφορυλίωση των RTKs είναι η στρατολόγηση και ενεργοποίηση μιας σειράς σηματοδοτικών μορίων. Αυτά τα μόρια περιέχουν περιοχές SH2 ή PTB, οι οποίες συνδέονται εξειδικευμένα σε φωσφοτυροσίνες. Μπορούν να συνδεθούν στον RTK είτε άμεσα σε φωσφοτυροσίνες της κυτταροπλασματικής του περιοχής είτε έμμεσα μέσω πρωτεϊνών σκαλωσιάς, όπως η FRS2, η IRS1 (Insulin Receptor Substrate - 1) και η Gab1 (Grb2-associated binder). Οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς τυπικά περιέχουν στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο μία θέση σύνδεσης στην πλασματική μεμβράνη, που ακολουθείται από μια σειρά καταλοίπων τυροσίνης, τα οποία φωσφορυλιώνονται από τον RTK και χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών σκαλωσιάς είναι λειτουργικά ισοδύναμη με τη δεύτερη φάση αυτοφωσφορυλίωσης των RTKs. Αν και ορισμένες πρωτεΐνες σκαλωσιάς (όπως η Gab1) συνδέονται μη εξειδικευμένα σε πολλούς RTKs, άλλες περιορίζονται σε συγκεκριμένους μόνο υποδοχείς. Για παράδειγμα, τα δύο μέλη της οικογένειας FRS2 (FRS2α και FRS2β) συμμετέχουν στη σηματοδότηση των υποδοχών του FGF και του NGF. Τα τέσσερα μέλη της οικογένειας IRS (IRS1-4) συμμετέχουν στη σηματοδότηση των υποδοχών InsR και IGF1-R (Εικόνα 8.29). Χάρη στις πολλαπλές φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της κυτταροπλασματικής τους περιοχής και τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών σκαλωσιάς, οι ενεργοποιημένοι RTKs μπορούν να στρατολογήσουν και να επηρεάσουν έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών σηματοδοτικών μορίων. Ως εκ τούτου, ένας ενεργοποιημένος RTK μπορεί να θεωρηθεί ως ένας κόμβος σε ένα πολύπλοκο δίκτυο



**Εικόνα 8.29**  
**Δημιουργία πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος μέσω της IRS.** Η IRS είναι μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς που συνδέεται εξειδικευμένα στον υποδοχέα ινσουλίνης. Περιέχει στο NH<sub>2</sub>-τελικό της άκρο μια περιοχή PH που τη συνδέει στα PIP<sub>2</sub> της μεμβράνης και μια περιοχή PTB, η οποία συνδέεται στην αλληλουχία NPX-pTyr960 του ενεργοποιημένου InsR. Στη συνέχεια, η IRS1 φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα της ινσουλίνης δημιουργώντας πολλαπλές θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες, που φέρουν SH2 περιοχές, όπως η PI3K, το σύμπλοκο Grb2/SOS και η φωσφατάση SHP2. [200]

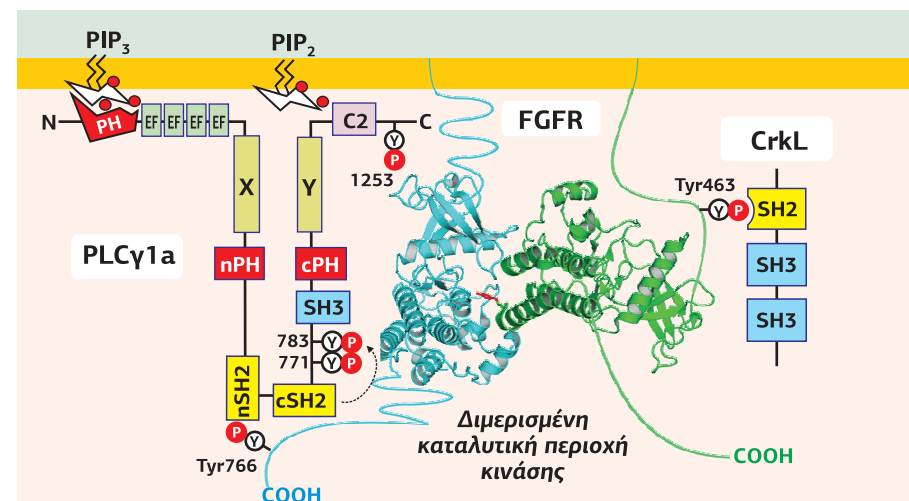
σηματοδότησης, που μεταδίδει πληροφορίες από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου.

**Οι πολλαπλές περιοχές αλληλεπίδρασης εξειδικεύουν τη δημιουργία του σηματοδοτικού συμπλέγματος**

Είναι πλέον κατανοητό ότι μια μεγάλη ποικιλία περιοχών αλληλεπίδρασης είναι υπεύθυνη για την επικοινωνία των σηματοδοτικών μορίων στα μονοπάτια που δημιουργούνται από τους RTKs. Τα σηματοδοτικά μόρια που προσελκύονται στους RTKs συχνά περιέχουν πολλαπλές περιοχές αλληλεπίδρασης, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 8.30** για τη φωσφολιπάση C-γ (PLCγ). Ορισμένες περιοχές, όπως η SH2 και η PTB, συνδέονται άμεσα στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των ενεργοποιημένων RTKs, ενώ άλλες περιοχές εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις που είναι χωρικά και χρονικά πιο απομακρυσμένες. Οι περιοχές SH3, WW και PDZ είναι όλες παραδείγματα περιοχών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, ενώ οι περιοχές PH (Pleckstrin Homology), PX, C1, C2 και FYVE συνδέονται σε φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Επίσης, οι περιοχές αλληλεπίδρασης που αναγνωρίζουν μόρια ουβικουιτίνης συνδέονται άμεσα στους ουβικουιτινωμένους RTKs. Η ουβικουιτινωση των RTKs κατευθύνει τον τερματισμό της σηματοδότησης με την προώθηση της αποικοδόμησης του υποδοχέα, δημιουργώντας έναν σημαντικό μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης.

Παρά το γεγονός ότι αυτές οι περιοχές καθοδηγούν και εξειδικεύουν τη διαμόρφωση των βασικών συμπλεγμάτων σηματοδότησης, λίγες μόνο από αυτές παρουσιάζουν επαρκή εκλεκτικότητα σύνδεσης ή συγγένεια με συγκεκριμένα υποστρώματα, ώστε να μπορεί να ερμηνευθεί η ακριβής εξειδίκευση του σχηματισμού του σηματοδοτικού συμπλέγματος. Η πολυσθενικότητα φαίνεται να είναι μια λύση κλειδί, με διάφορες περιοχές σε μια σηματοδοτική πρωτεΐνη να συνεργάζονται μεταξύ τους, για να οδηγήσουν στον σχηματισμό ενός σηματοδοτικού δικτύου ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Η PLCγ αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα με δύο περιοχές SH2 (nSH2 και cSH2), δύο περιοχές PH (η δεύτερη είναι διαχωρισμένη σε δύο μέρη, nPH και cPH), μια περιοχή C2, και μια περιοχή SH3, οι οποίες συμμετέχουν όλες σε μια πολυδύναμη στόχευση της PLCγ σε θέση δράσης στη μεμβράνη. Η περιοχή nSH2 συνδέεται σε φωσφοτυροσίνες στον RTK (στην περίπτωση του FGFR στην pTyr766) ή σε κάποια πρωτεΐνη σκαλωσιάς, οι περιοχές PH συνδέονται στα φωσφοϊνσιτίδια της πλασματικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων της PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, προϊόντος της κινάσης PI3K, η περιοχή C2 συνδέεται, επίσης, σε συστατικά της μεμβράνης και η περιοχή SH3 συνδέεται με την πλούσια σε προλίνη περιοχή της λιγάσης της ουβικουιτίνης Cbl (Casitas B-lineage lymphoma), που έχει στρατολογηθεί στο σηματοδοτικό σύμπλεγμα. Η PLCγ μετά τη στρατολόγησή της κοντά στον RTK φωσφορυλιώνεται από αυτόν στις Tyr771, Tyr783 και Tyr1253. Στη συνέχεια, η cSH2 συνδέεται στην pTyr783 οδηγώντας στην ενεργοποίηση της

**Εικόνα 8.30**  
Η ύπαρξη πολλαπλών περιοχών αλληλεπίδρασης σε μια πρωτεΐνη εξειδικεύει τη δημιουργία του σηματοδοτικού συμπλέγματος. Οι πολλαπλές περιοχές αλληλεπίδρασης της PLCγ συνεργάζονται για να ενσωματώσουν πολλαπλά σήματα στην πλασματική μεμβράνη. Η nSH2 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στην pTyr766 του ενεργοποιημένου FGFR. Οι περιοχές C2 και PH συνεργάζονται για να στρατολογήσουν την PLCγ στην πλασματική μεμβράνη. Η μία ή και οι δύο PH αναγνωρίζουν εξειδικευμένα προϊόντα της RTK-ενεργοποιημένης PI3K. Η PLCγ μετά τη στρατολόγησή της κοντά στον FGFR φωσφορυλιώνεται από αυτόν στις Tyr771, Tyr783 και Tyr1253. Στη συνέχεια, η cSH2 συνδέεται στην pTyr783 οδηγώντας στην ενεργοποίηση της PLCγ και στην υδρόλυση των PIP<sub>2</sub>. Στην εικόνα διακρίνεται, επίσης, η σύνδεση στην pTyr463 της κυτταροπλασματικής περιοχής του FGFR της πρωτεΐνης προσαρμογής CrkL. [100]



PLCγ και στην υδρόλυση των PIP<sub>2</sub> (**Εικόνα 8.30**). Η PLCγ ενσωματώνει έτσι πολλαπλά σήματα εισόδου μέσω ενός συνδυασμού των περιοχών αλληλεπίδρασης, ο οποίος επιτρέπει την “ανίχνευση κατά σύμπτωση”.

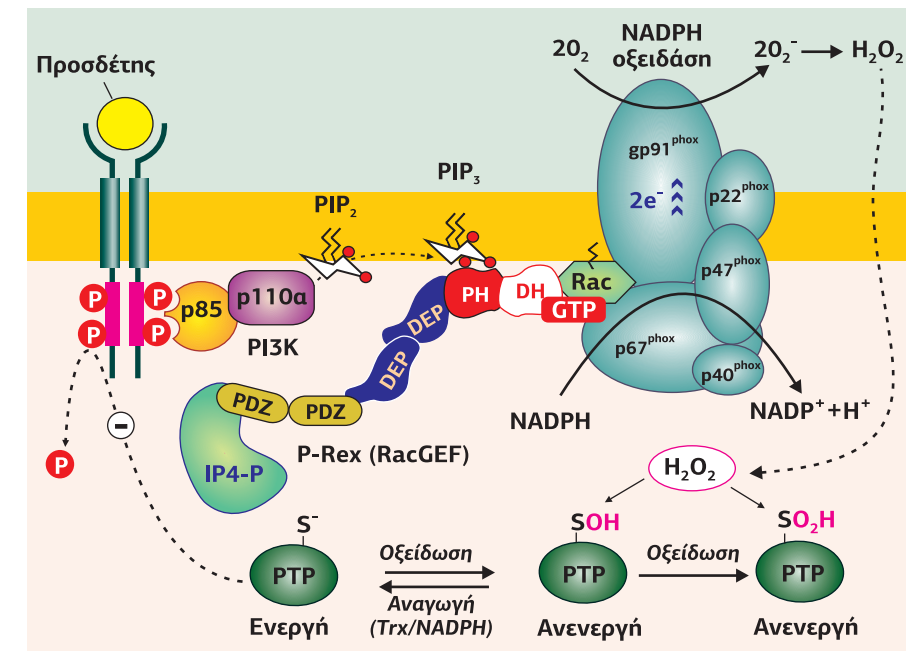
Ένα άλλο παράδειγμα εξειδίκευσης του σηματοδοτικού συμπλέγματος που δημιουργείται γύρω από τους ενεργοποιημένους RTKs αφορά την ύπαρξη δύο περιοχών SH2, η μία σε συνέχεια της άλλης, που συνδέονται στον στόχο τους μόνο εάν αυτός περιέχει δύο κοντινές φωσφοτυροσίνες, ούτως ώστε και οι δύο περιοχές SH2 να μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα. Πράγματι, οι φωσφοτυροσίνες των RTKs, που συνδέονται σε σηματοδοτικά μόρια με δύο περιοχές SH2 (π.χ. PLCγ, ZAP-70, PI3K, και SHP2 φωσφατάση), ήταν οι πιο εύκολες περιοχές για να χαρτογραφηθούν, προϋποθέτοντας μια αυστηρότερη εξειδίκευση από τις πολυδύναμες περιπτώσεις.

**1.8 Ρύθμιση των RTKs μέσω ανατροφοδότησης**

**Μηχανισμοί θετικής ανατροφοδότησης**

Οι κύκλοι φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης αντιπροσωπεύουν ένα γενικό μοτίβο στην κυτταρική σηματοδότηση και η αυτοφωσφορυλίωση των RTKs αντιστρέφεται με μία ποικιλία πρωτεϊνικών φωσφατάσων τυροσίνης (PTPs, Protein Tyrosine Phosphatases). Γενικά, η ενεργοποίηση των RTKs επάγεται από τη σύνδεση του προσδέτη, η οποία προκαλεί διέγερση της δραστηριότητας κινάσης του υποδοχέα και/ή αναστολή μιας συνδεδεμένης με τον υποδοχέα φωσφατάσης. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των RTKs, και ειδικότερα του EGFR, συνοδεύεται από παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και άλλων δραστικών ριζών οξειδίου (ROS), που προκαλείται από την PI3K- και Rac-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της **NADPH οξειδάσης**. Οι ROS αναστέλλουν παροδικά τη δραστηριότητα PTP με οξείδωση ενός κρίσιμου καταλοίπου κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο της φωσφατάσης (**Εικόνα 8.31**). Αυτή η προσωρινή αδρανοποίηση των αρνητικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών αποτελεί έναν θετικό μηχανισμό ανάδρασης και έναν ON-OFF διακόπτη. Έχει προταθεί ότι η EGF-επαγόμενη παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγεί σε μια γενικευμένη ενεργοποίηση των υποδοχέων EGFR στο κύτταρο. Η διάχυση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσα στο κύτταρο αναστέλλει ακόμη και τις απομακρυσμένες PTPs, ενεργοποιώντας μη συνδεδεμένους με προσδέτες EGFRs, με αποτέλεσμα την πλευρική διάδοση της σηματοδότησης. Ωστόσο,

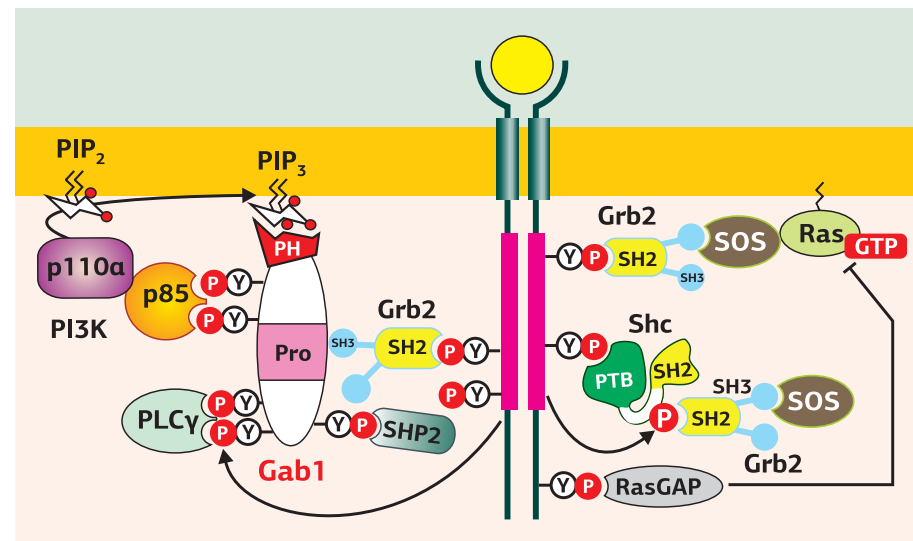
**Εικόνα 8.31**  
Ενίσχυση της μεταγωγής σήματος από έναν υποδοχέα κινάση Tyr, μέσω της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης. Ο RTK με τη σύνδεση ενός αυξητικού παράγοντα διμερίζεται, ενεργοποιείται η δράση κινάσης του και αυτοφωσφορυλιώνεται. Στις φωσφορυλιωμένες Tyr συνδέεται και ενεργοποιείται η PI3K. Η παραγωγή PIP<sub>3</sub> στρατολογεί στην κυτταρική μεμβράνη τον RacGEF P-Rex, ο οποίος ανταλλάσσοντας το GDP με GTP οδηγεί στην ενεργοποιημένη μορφή τη μικρή G-πρωτεΐνη Rac-GTP. Στη συνέχεια, η Rac-GTP διεγείρει τη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης. Οι ROS που παράγονται οξειδώνουν και απενεργοποιούν μια πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης (PTP), δημιουργώντας έναν μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης στη δράση του RTK. Η οξείδωση των φωσφατάσων αντιστρέφεται μέσω της θειορεδοξίνης (Trx) και του NADPH. [125]



σημαντικά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα σχετικά με το εύρος αυτού του φαινομένου. Πράγματι, οι ROS έχουν μια πολύ περιορισμένη διάρκεια ζωής και ως εκ τούτου ενδέχεται να λειτουργήσουν ως “αγγελιαφόροι” μόνο σε πολύ μικρές αποστάσεις εντός του κυττάρου.

Ένας άλλος μηχανισμός θετικής ανατροφοδότησης συμβαίνει στο επίπεδο της πρωτεΐνης σκαλωσιάς **Gab1** (Grb2-associated-binding protein 1). Η Gab1 στρατολογείται στους ενεργοποιημένους RTKs (π.χ. στον EGFR ή στο υπόστρωμα FRS2 του FGFR) μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb2. Στη συνέχεια, η Gab1 φωσφορυλιώνεται από τους RTKs, και στις φωσφοτυροσίνες της συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της, η ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K, παρέχοντας έναν έμμεσο μηχανισμό για την ενεργοποίηση της PI3K. Η Gab1 περιέχει, επίσης, μία NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή PH με σαφή εξειδίκευση στα προϊόντα της PI3K. Η περιοχή PH, ως εκ τούτου, προωθεί την PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-εξαρτώμενη μετατόπιση της Gab1 στη μεμβράνη ως απόκριση στην ενεργοποίηση της PI3K, οδηγώντας στη στρατολόγηση επιπλέον Gab1, οι οποίες ενεργοποιούν επιπλέον PI3Ks. Έτσι, δημιουργείται ένας θετικός βρόχος ανατροφοδότησης που διεγείρει την Akt-εξαρτώμενη αντι-αποπτωτική σηματοδότηση (Εικόνα 8.32).

**Εικόνα 8.32**  
**Θετική ανατροφοδότηση της σηματοδότησης των RTKs μέσω της πρωτεΐνης σκαλωσιάς Gab1.** Η Gab1 συνδέεται μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb2 στους ενεργοποιημένους RTKs και φωσφορυλιώνεται από αυτούς. Στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της Gab1 συνδέεται η υπομονάδα p85 της PI3K ενεργοποιώντας την παραγωγή PIP<sub>3</sub> στη μεμβράνη. Η ενεργοποιημένη Gab1 μέσω της PH περιοχής της συνδέεται στα PIP<sub>3</sub> επάγοντας τη στρατολόγηση επιπλέον Gab1 στον υποδοχέα και ενεργοποιώντας επιπλέον PI3Ks. Στην εικόνα διακρίνεται, επίσης, ο μηχανισμός ρύθμισης της δραστηριότητας της GTPάσης Ras, η οποία ενεργοποιείται από τον RasGEF SOS και αναστέλλεται από τον RasGAP.



**Μηχανισμοί αρνητικής ανατροφοδότησης**

Μηχανισμοί αρνητικής ανατροφοδότησης λειτουργούν σε πολλά σημεία των σηματοδοτικών δικτύων που ελέγχονται από RTKs. Η **άμεση ενεργοποίηση των φωσφατάσων PTPs** (σε αντίθεση με την παροδική ROS-εξαρτώμενη αναστολή των PTPs) αποτελεί τον πιο προφανή αρνητικό μηχανισμό ανάδρασης. Οι φωσφατάσες που περιέχουν περιοχές SH2, όπως οι SHP1 και SHP2, στρατολογούνται στους ενεργοποιημένους RTKs και προωθούν την αποφωσφορυλίωση των pTyr του βρόχου ενεργοποίησης, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα κινάσες των υποδοχέων.

Η δραστηριότητα RTK, επίσης, εξασθενεί από αρνητικούς βρόχους ανάδρασης, που προκύπτουν από την εξαρτώμενη από τον RTK **διέγερση ετερόλογων πρωτεϊνικών κινασών**. Για παράδειγμα, η διέγερση του EGFR προωθεί την ενεργοποίηση της PKC μέσω PLCγ. Με τη σειρά της, η PKC μπορεί να φωσφορυλιώσει την Thr654 στην παραμεμβρανική περιοχή του EGFR. Αυτό μειώνει την υψηλή συγγένεια δέσμευσης του EGF στον EGFR και, ως εκ τούτου, αναστέλλει την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Επίσης, η φωσφορυλίωση του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης SOS από την ERK (μια MAPK) μειώνει τη συγγένειά της για την πρωτεΐνη σκαλωσιάς Grb2 και, κατά συνέπεια, καταστέλλει τη σηματοδότηση μέσω της Ras.

Ένας τρίτος μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης είναι η **απομάκρυνση των RTKs από την πλασματική μεμβράνη** μέσω ενδοκύτωσης σε κυστίδια κα-

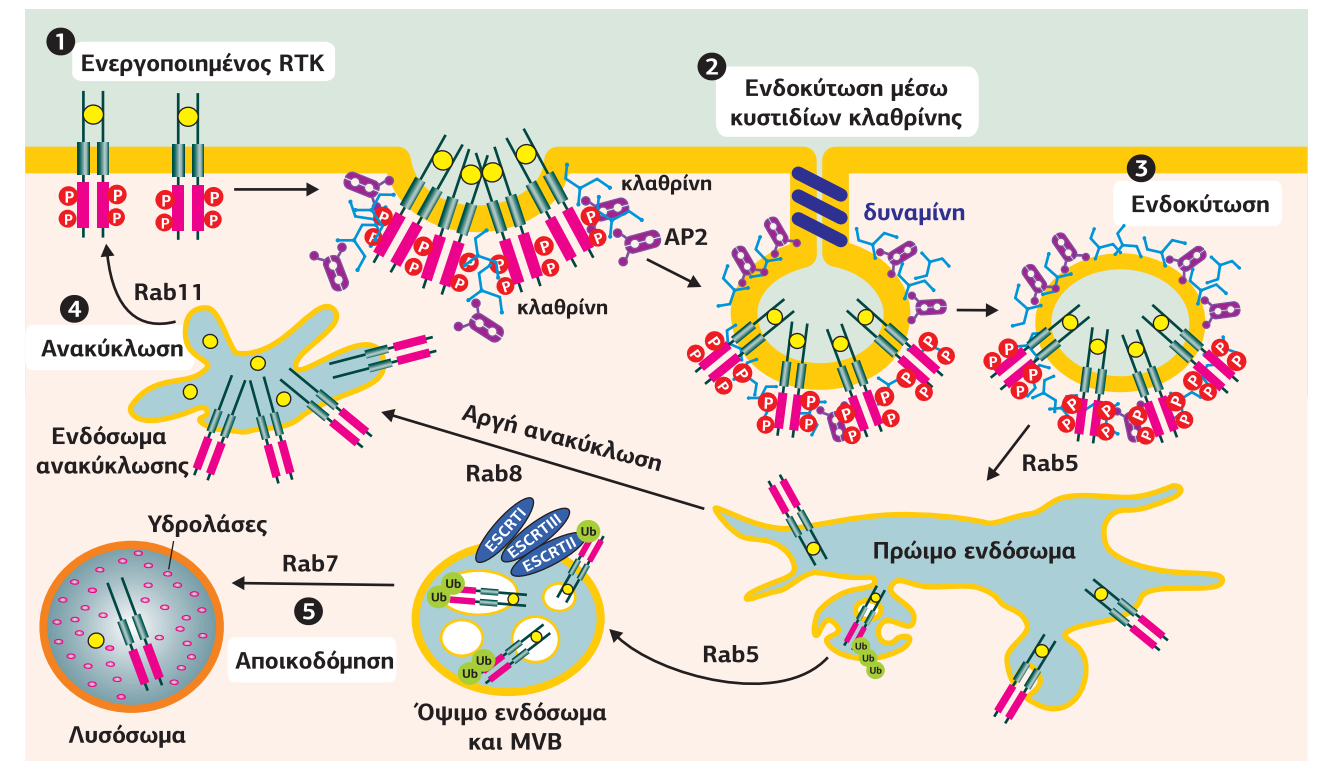
λυμμένα με κλαθρίνη, μετά τη συνάθροισή τους που επάγεται από τη σύνδεση του αυξητικού παράγοντα σε εγκοιλώσεις της μεμβράνης. Επιπλέον, η ανεξάρτητη της κλαθρίνης ενδοκύτωση μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε ιδιαίτερες συνθήκες, όπως όταν το κύτταρο διεγείρεται από υψηλές συγκεντρώσεις προσδέτη.

**1.9 | Εσωτερίκευση και down-regulation των RTKs**

Οι ενεργοποιημένοι και φωσφορυλιωμένοι RTKs απομακρύνονται από τη μεμβράνη μέσω κυστιδίων-ενδοσωμάτων και οδηγούνται είτε στα λυσοσώματα, όπου θα αποικοδομηθούν, είτε ανακυκλώνονται επιστρέφοντας στην πλασματική μεμβράνη.

Αρκετές μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι η ουβικουιλίνωση χρησιμεύει ως ένα σήμα για τη στόχευση των ενεργοποιημένων RTKs σε καλυμμένα με κλαθρίνη εκκοιλώματα της μεμβράνης, με σκοπό την ενδοκύτωση και την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση. Αυτές οι μελέτες έδειξαν, επίσης, ότι η μονο- (αντί για την πολυ-) ουβικουιλίνωση είναι το κύριο σήμα για ενδοκύτωση και αποικοδόμηση των RTKs. Ωστόσο, πιο πρόσφατες αναλύσεις έχουν δείξει ότι η κυτταροπλασματική ουρά του EGFR είναι πολυ-ουβικουιλινωμένη. Επιπλέον, ένας μεταλλαγμένος EGFR -που δεν μπορεί να ουβικουιλινωθεί- ενδοκυτταρώνεται κανονικά μετά τη σύνδεση του EGF, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, αποδεικνύοντας ότι ουβικουιλίνωση δεν είναι απαραίτητη για την εσωτερίκευση του EGFR. Όμως, αυτή η μεταλλαγμένη μορφή του EGFR εμφανίζει μειωμένη ενδοκυτταρική αποικοδόμηση, παρά το γεγονός ότι ενδοκυτταρώνεται αποτελεσματικά. Ομοίως, μεταλλάξεις του EGFR που δεν είναι σε θέση να συνδέσουν τη λιγάση της ουβικουιλίνης Cbl ή Cbl-B -και ως εκ τούτου αδυνατούν να ουβικουιλινωθούν- παρουσιάζουν διαταραχή της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης και down-regulation, αλλά εσωτερικεύονται κανονικά. Έτσι, φαίνεται τώρα ότι ο κύριος ρόλος της ουβικουιλίνωσης είναι η στόχευση του ενεργοποιημένου RTK για αποικοδόμηση αντί για εσωτερίκευση. Η ουβικουιλίνωση ελέγχει έτσι ένα κρίσιμο στοιχείο της αρνητικής ανατροφοδότησης.

**Εικόνα 8.33**  
**Εσωτερίκευση των RTKs σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη.** Οι ενεργοποιημένοι RTKs ενδοκυτταρώνονται μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη. Από τα πρώιμα ενδοσώματα, όσοι ουβικουιλινώνονται, οδηγούνται μέσω των όψιμων ενδοσωμάτων - MVB στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση, ενώ αυτοί που δεν ουβικουιλινώνονται επιστρέφουν μέσω ενδοσωμάτων ανακύκλωσης στην πλασματική μεμβράνη. Διακρίνεται το σύμπλοκο ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), το οποίο παίζει κύριο ρόλο στη βιογένεση των MVB. Για την ενδοκυτταρική μεταφορά των κυστιδίων απαιτούνται οι Rab GTPάσες. [162] [142] [50]





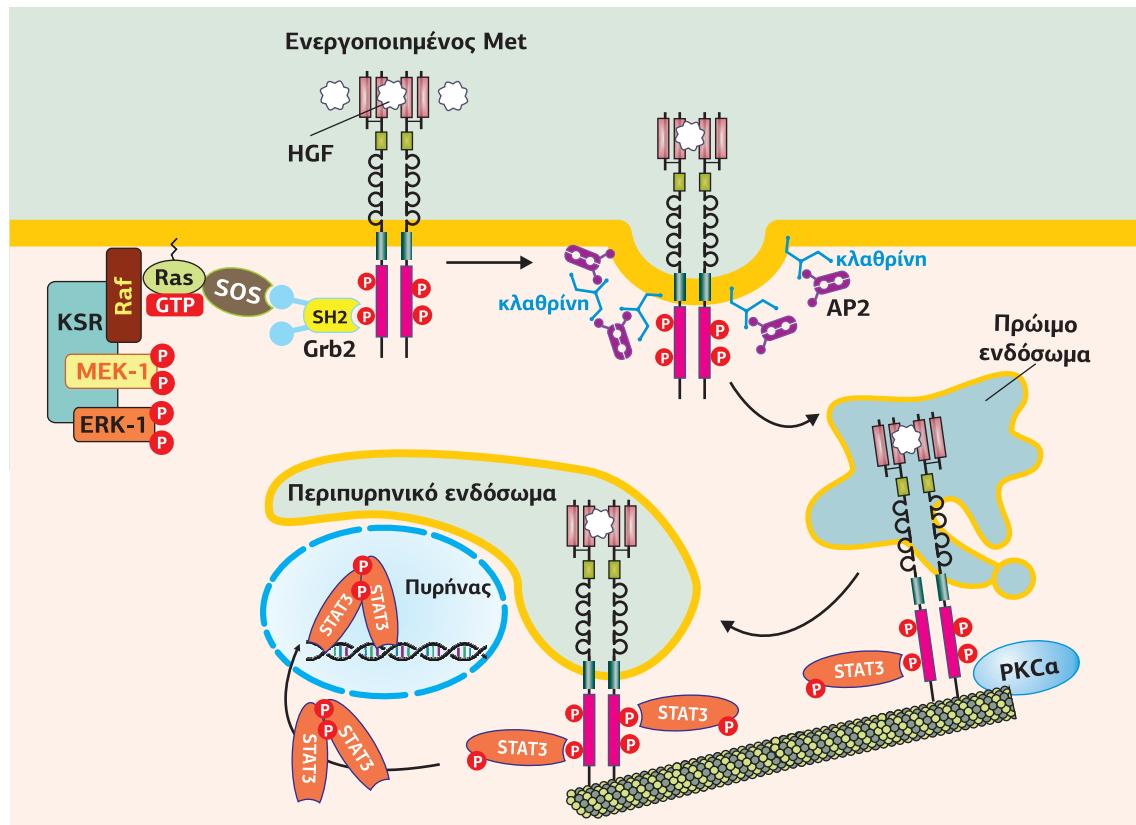
Οι δύο κύριες υποκυτταρικές θέσεις για την αποικοδόμηση των μεμβρανικών υποδοχέων είναι τα πρωτεασώματα και τα λυσοσώματα. Η σύνδεση της ουβικουιτίνης είναι ένα σήμα επιλογής και για τις δύο διαδρομές. Για την αποικοδόμηση στα λυσοσώματα η ουβικουιτίνωση επάγει τη μεταφορά των πρωτεϊνών-στόχων μέσα σε όψιμα ενδοσώματα / πολυκυστιδικά σώματα (MVBs, *M*ulti*v*esicular *B*odies). MVB δημιουργούνται όταν ένα περιορισμένο τμήμα της μεμβράνης ενός ενδοσώματος εγκολληίνεται δημιουργώντας κυστιδία στο εσωτερικό του ενδοσώματος. Αυτά τα ενδο-ενδοσωματικά κυστιδία αποικοδομούνται όταν τα MVBs συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα. Για τη μεταφορά των RTKs στα MVB δεν είναι απαραίτητη η πολυ-ουβικουιτίνωση, ένα μόνο μόριο Ub αρκεί για να κατευθύνει τη στόχευση στα MVB (Εικόνα 8.33).

**Στρατολόγηση σηματοδοτικών μορίων στα ενδοσώματα**

Αν και ο πρωταρχικός ρόλος της ενδοκύτωσης είναι ο τερματισμός της ενεργοποίησης των RTKs, πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι ενεργοποιημένοι RTKs συνεχίζουν να στρατολογούν σηματοδοτικά μόρια και να ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά μονοπάτια από τα ενδοκυτταρικά κυστιδία. Τα σηματοδοτικά μόρια που συνδέονται με έναν ενεργοποιημένο υποδοχέα της πλασματικής μεμβράνης διαφέρουν σημαντικά σε σύγκριση με τα μόρια που συνδέονται στους υποδοχείς των ενδοσωμάτων. Αυτό προσθέτει μια χωρική διάσταση στην κατανόηση των σηματοδοτικών δικτύων.

Η ενδοκύτωση, για παράδειγμα, μέσω κυστιδίων κλαθρίνης απαιτείται για την ενεργοποίηση της Akt και των MAPKs από τον EGFR (στα ενδοσώματα), αλλά όχι για τη φωσφορυλίωση της Shc. Επίσης, η ενδοκύτωση μέσω κυστιδίων κλαθρίνης παρατείνει τη διάρκεια της σηματοδότησης του EGFR, κατευθύνοντας τον υποδοχέα σε μια πορεία ανακύκλωσης και όχι αποικοδόμησης. Όσον αφορά τη σηματοδότηση από τον υποδοχέα Met, η μεταφορά του σε ένα περιπυρηνικό ενδόσωμα είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 και για την είσοδό του στον πυρήνα, αλλά όχι για την ενεργοποίηση της κινάσης ERK (Εικόνα 8.34). Συνεπώς, όλοι οι RTKs μπορεί να μεταδώσουν ενδοκυτταρικά σήματα

**Εικόνα 8.34**  
**Σηματοδότηση των Met έπειτα από εσωτερικέυσή τους στα ενδοσώματα.** Για τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 από τον υποδοχέα Met είναι απαραίτητη η εσωτερικέυση του Met και η μεταφορά του σε ένα όψιμο περιπυρηνικό ενδόσωμα. Κρίσιμο ρόλο στη μεταφορά του περιπυρηνικού ενδοσώματος μέσω μικροσωληνίσκων παίζει η κινάση PKCa. [187]



από τα ενδοσώματα και από άλλα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Ορισμένοι RTKs, κυρίως οι υποδοχείς Erh, απαιτούν εσωτερικέυση για τη λειτουργία της σηματοδότησής τους. Η κατανόηση των χωρικών πτυχών της σηματοδότησης των RTKs σε διαφορετικά τμήματα της μεμβράνης είναι ζωτικής σημασίας για την ποσοτική κατανόηση και τη μοντελοποίηση του πλήρους δικτύου.

**Ουβικουιτίνωση των RTKs: μια πολυδάπανη διαδικασία**

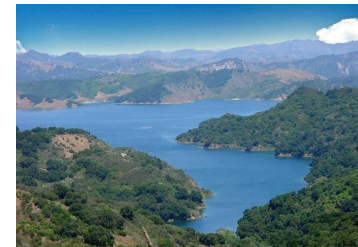
Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών ρυθμίζει την ουβικουιτίνωσή τους και, αντιστρόφως, ότι η ουβικουιτίνωση ρυθμίζει τη λειτουργία μίας ποικιλίας πρωτεϊνικών κινάσων και φωσφατασών. Επιπλέον, οι αλληλοδιασταυρώσεις μεταξύ αυτών των δύο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, ρυθμίζοντας την αποικοδόμηση, την επεξεργασία και τη διακίνηση των πρωτεϊνών.

Η E3 λιγάση της ουβικουιτίνης που καταλύει την ουβικουιτίνωση των κυτταροπλασματικών περιοχών ενός μεγάλου αριθμού RTKs είναι η **Cbl** (το όνομα αναφέρεται στο Casitas B-lineage Lymphoma των ποντικών, όπου η Cbl λόγω μιας μετάλλαξης εκφράζεται ως ογκοπρωτεΐνη). Πρωτεΐνες Cbl-τύπου έχουν βρεθεί στα πολυκύτταρα ζώα, ενώ ο άνθρωπος εκφράζει τρεις ισομορφές (Cbl, Cbl-B, Cbl-C). Η πλήρης απώλεια Cbl σε knockout ποντίκια οδηγεί σε προγεννητικό θάνατο, γεγονός που δείχνει τον βασικό ρόλο αυτών των ενζύμων στην κυτταρική φυσιολογία. Η δομή των Cbl αντικατοπτρίζει τη λειτουργία τους. Αποτελούνται: α. από μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή TKB (Tyrosine Kinase-Binding), η οποία περιέχει μια δεσμίδα 4 α-ελίκων (4H), μια EF-hand περιοχή και μια περιοχή SH2, και χρησιμεύει ως πλατφόρμα που κατευθύνει τη σύνδεση σε συγκεκριμένες pTyr ενεργοποιημένων RTKs, β. μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD), που αποτελεί θέση δέσμευσης για περιοχές SH3, γ. μια περιοχή RING (Really Interesting New Gene) finger (RF), που συνδέεται στο E2 ubiquitin conjugating enzyme και είναι βασική για την ουβικουιτίνωση και δ. μια περιοχή 45 αμινοξέων UBA (Ubiquitin-Associated domain) / leucine zipper στο COOH-τελικό άκρο, που συμμετέχει στη σύνδεση της ουβικουιτίνης και τον διμερισμό (Εικόνα 8.35A).

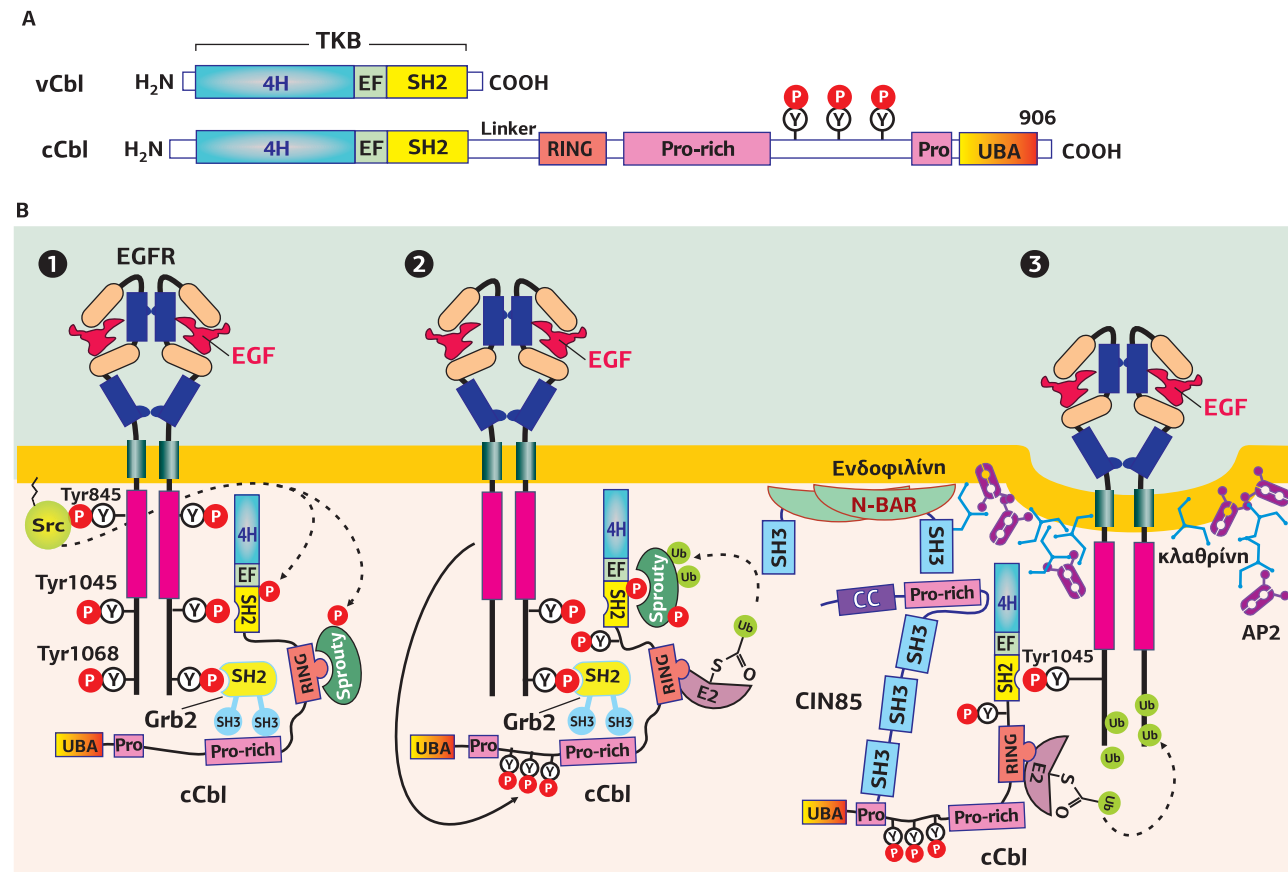
Η προερχόμενη από ιό ογκοπρωτεΐνη vCbl των ποντικών είναι μια κολοβή μορφή που στερείται της περιοχής RING. Μέσω της περιοχής SH2 μπορεί να συνδεθεί στους RTKs, αλλά είναι ανίκανη να συνδέσει το E2 ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά της ουβικουιτίνης και συνεπώς δρα ως κυρίαρχη αρνητική μετάλλαξη. Η ογκογόνος της δράση είναι αποτέλεσμα της συνεχούς ενεργοποίησης των μιτογόνων και των αντι-αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών που διεγείρονται από τους RTKs.

Λόγω της αλληλεπίδρασης με τους RTKs η Cbl φωσφορυλιώνεται σε συγκεκριμένες Tyr παίρνοντας μια ανοιχτή διαμόρφωση που επιτρέπει τη σύνδεση στην περιοχή RING του E2-ενζύμου, το οποίο ουβικουιτίνώνει τον RTK. Τα πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο έλεγχος της δραστηριότητας της Cbl είναι πολύ πιο σύνθετος από τον έως τώρα υποτιθέμενο. Έχουν αναγνωριστεί ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Sts, Sprouty, η μικρή G-πρωτεΐνη Cdc42, και άλλες), οι οποίες στρατολογούνται στο υπόστρωμα της Cbl και αναστέλλουν με συγκεκριμένο τρόπο την ουβικουιτίνωσή του, είτε με τη μετατόπιση και την απομάκρυνση της Cbl είτε με την προώθηση της αποικοδόμησής της. Στην πραγματικότητα, η ενεργοποιημένη Cbl έχει μικρή διάρκεια ζωής, είτε γιατί υποβάλλεται σε αυτοκαταστροφή από αυτόματη ουβικουιτίνωση είτε γιατί αλληλεπιδρά με άλλες λιγάσες ουβικουιτίνης. Η αυτόματη ουβικουιτίνωση σημαίνει ότι ο αριθμός της Cbl και των υποστρωμάτων της μειώνεται με έναν συντονισμένο και αμοιβαίο τρόπο, ένα φαινόμενο αυτοελέγχου που έχει αναφερθεί και για άλλες E3 λιγάσες ουβικουιτίνης. Ένα αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρείται όταν η Cbl ουβικουιτίνώνεται από μία άλλη E3 λιγάση. Λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της E3 λιγάσης για τα υποστρώματά της, μια τέτοια αντίδραση είναι εκλεκτική, που σημαίνει ότι δεν περιλαμβάνει το υπόστρωμα της Cbl, το οποίο προστατεύεται από την ουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση μέσω Cbl (Εικόνα 8.35B).

Η **Cbl** ανακαλύφθηκε ως ογκογονίδιο στον ρετροϊό Cas-Br-M, ο οποίος απομονώθηκε από άγρια ποντίκια της λίμνης Casitas της Καλιφόρνιας. Προκαλεί λεμφώματα B- και T-κυττάρων, και μυελοειδή λευκαίμια.



Casitas lake



Εικόνα 8.35

**Δομή και μηχανισμός δράσης της E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης Cbl.** Α. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της vCbl και cCbl. Η cCbl αποτελείται από μια περιοχή μέσω της οποίας συνδέεται στους RTKs (TKB, Tyrosine Kinase-Binding), η οποία περιέχει 4 δεσμίδες α-ελίκων (4H), μια περιοχή EF hand (EF) και μια περιοχή SH2. Επίσης, αποτελείται από έναν σύνδεσμο (L, linker), μια περιοχή RING finger (RF), μια περιοχή πλούσια σε Pro (PRD) και μια περιοχή που συνδέεται με την ουβικουιτίνη (UBA). Στο COOH-τελικό άκρο της Cbl διακρίνονται και οι Tyr που φωσφορυλιώνονται από τον ενεργοποιημένο RTK. Η vCbl, το προϊόν ενός ογκογονιδίου, είναι μια κολοβή Cbl, η οποία δεν έχει δράση E3 λιγάσης. Β. Εσωτερίκευση, πολυουβικουιτίνωση και αποικοδόμηση των RTKs μέσω της Cbl. 1. Η σύνδεση του αυξητικού παράγοντα (EGF) οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του EGFR και στη στρατολόγηση της Cbl στον υποδοχέα, στον οποίο συνδέεται άμεσα μέσω της περιοχής SH2 (στην pTyr1045) και έμμεσα μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb2, στην οποία συνδέεται μέσω της PRD. Η ενεργοποίηση της Src από τον RTK οδηγεί στη φωσφορυλίωση της Cbl και άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και η Sprouty, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στη RING περιοχή της λιγάσης εμποδίζοντας τη στρατολόγηση του ενζύμου E2 (ubiquitin-conjugating). 2. Η Sprouty μετά τη φωσφορυλίωσή της μετακινείται από την περιοχή RING στην περιοχή TKB. Ως αποτέλεσμα, το ένζυμο E2 συνδέεται στην RING επάγοντας την πολυουβικουιτίνωση και αποικοδόμηση της Sprouty στα πρωτεασώματα. 3. Η TKB της Cbl επανασυνδέεται στον υποδοχέα (στην pTyr1045 του EGFR) και καταλύει τη μεταφορά της ουβικουιτίνης από το συνδεδεμένο στην RING-finger E2 ένζυμο στον RTK. Αυτή η διαδικασία είναι αρκετή για την εσωτερίκευση του υποδοχέα. Συνεχής προσθήκη μορίων ουβικουιτίνης οδηγεί στην πολυ-ουβικουιτίνωση που σηματοδοτεί τον RTK στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Η φωσφορυλίωση της Cbl από τον EGFR, επίσης, αυξάνει τη στρατολόγηση του συμπλόκου CIN85 (Cbl-Interacting protein of 85K) - ενδοφιλίνη. Η ενδοφιλίνη (endorphilin) ανήκει στις πρωτεΐνες BAR (Bin, Amphiphysin Rvs), που αποτελούν ρυθμιστικά συστατικά των κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη. Αυτό το σύμπλοκο προωθεί την εσωτερίκευση μέσω της δημιουργίας εγκοιλώματος της μεμβράνης. Η CIN85 περιέχει τρεις περιοχές SH3, που ακολουθούνται από δύο αλληλουχίες πλούσιες σε Pro (PKKPPPP και PKKPRPP), οι οποίες συνδέονται στην περιοχή SH3 της ενδοφιλίνης, και μια COOH-τελική coiled-coil περιοχή. Η CIN85 συνδέεται στην Cbl μέσω μιας άτυπης αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην SH3 περιοχή της CIN85 και ενός μοτίβου πολυπρωλίνης-αργινίνης που βρέθηκε πρόσφατα στην COOH-τελική περιοχή της Cbl. [184]

Βεβαίως, η down-regulation των πρωτεϊνών αποτελεί μια αρκετά πολυδάπανη διαδικασία, μιας και η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτίνωση και, κυρίως, η επανασύνθεση των αποικοδομημένων πρωτεϊνών απαιτούν ένα μεγάλο απόθεμα ενέργειας-ATP. Προφανώς, η ακριβής ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης δεν είναι κάτι απλό και αξίζει οποιαδήποτε σπατάλη!

## 2. Περιοχές που αλληλεπιδρούν με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης: η τέχνη της πολύπλοκης διαμόρφωσης

Το αν μία πρωτεΐνη συνδεθεί ή όχι σε έναν αυτοφωσφορυλιωμένο RTK εξαρτάται από το αν περιέχει περιοχές αλληλεπίδρασης που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης, δηλαδή περιοχές SH2 και PTB.

### 2.1 Οι ομόλογες περιοχές της Src

Το ακρωνύμιο SH σημαίνει Src Homolog. Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά ως ένα μοτίβο αλληλουχίας που παρουσίαζε ομολογία με μία από τις αλληλουχίες της κινάσης τυροσίνης Src (προφέρεται sarc). Η Src ήταν η πρώτη κινάση τυροσίνης που έγινε γνωστή. Ανακαλύφθηκε στη μεταλλαγμένη ιδιόσυστατα ενεργή μορφή (v-Src) σε ρετροϊούς πτηνών που επάγουν σαρκώματα. Αργότερα, βρέθηκε ότι υπάρχει και στα κύτταρα των θηλαστικών (c-Src), όπου συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης.

Η κινάση Src περιέχει τρεις αλληλουχίες, που βρίσκονται σε ομόλογες μορφές και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες:

SH1, μία περιοχή που μοιάζει με την περιοχή κινάσης της Src.

SH2, μία περιοχή αλληλεπίδρασης που συνδέεται σε κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης.

SH3, μία περιοχή αλληλεπίδρασης που συνδέεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (-Pro-X-X-Pro-).

Οι περιοχές SH3 έχουν ταυτοποιηθεί σε περίπου 300 ανθρώπινες πρωτεΐνες και οι περιοχές SH2 σε 100 (αντιθέτως, ο *Saccharomyces cerevisiae* εκφράζει μόνο μία πρωτεΐνη με μία SH2 περιοχή, αποτυπώνοντας έτσι την σχεδόν πλήρη έλλειψη φωσφορυλίωσης τυροσίνης στους μονοκύτταρους ευκαρυώτες). Οι πρωτεΐνες που περιέχουν SH2 ή SH3 περιοχές μπορεί να είναι ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες ή πρωτεΐνες προσαρμογής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.36.

### 2.2 Οι SH2 περιοχές αναγνωρίζουν αλληλουχίες με κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης

Η περιοχή SH2 είναι ένα μη καταλυτικό μοτίβο ~100 αμινοξέων, που ανακαλύφθηκε το 1986 από τον Tony Pawson (1952-2013), University Toronto, στα προϊόντα των ογκογονιδίων vSrc του Rous Sarcoma Virus και vfps/fes του ιού του σαρκώματος Fujinami, τα οποία εκφράζουν κινάσες Tyr. Έκτοτε, η περιοχή SH2 εντοπίστηκε και σε άλλα ογκογονίδια όπως το vCrk και σε ένζυμα, όπως η PLCγ1 και η RasGAP. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί 121 περιοχές SH2 σε 111 πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Πρωτεΐνες που περιέχουν SH2 περιοχές περιλαμβάνουν κινάσες, πρωτεΐνες προσαρμογής, φωσφατάσες, λιγάσες ουβικουιτίνης, μεταγραφικούς παράγοντες, παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, κ.λπ. Μελέτες σχεδόν δύο δεκαετιών έχουν καταδείξει ότι οι SH2 περιοχές αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr, κυρίως των ενεργοποιημένων RTKs. Επιπλέον, οι SH2 περιοχές στις κινάσες είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της καταλυτικής δραστηκότητας, όπως φαίνεται στην οικογένεια Src, καθώς και στις κινάσες Abl.

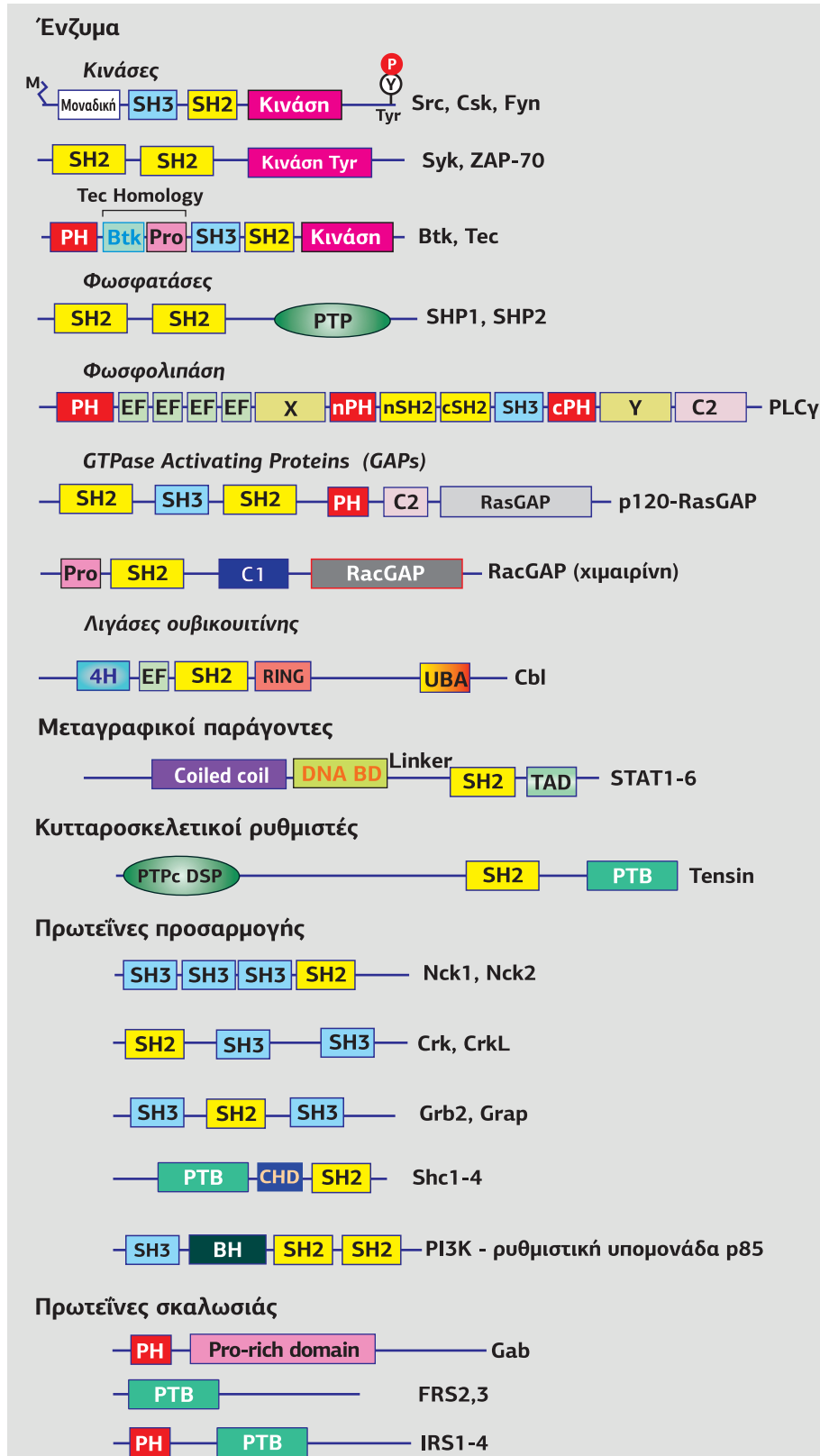
#### Δομή της SH2 περιοχής

Οι περιοχές SH2 συγκροτούνται από περίπου 100 αμινοξέα. Όπως διακρίνεται από την περιοχή SH2 της v-Src, η δομή μιας SH2 περιοχής χαρακτηρίζεται από δύο α-έλικες (αA και αB) που περιβάλλουν ένα β-πτυχωτό φύλλο, το οποίο αποτελείται

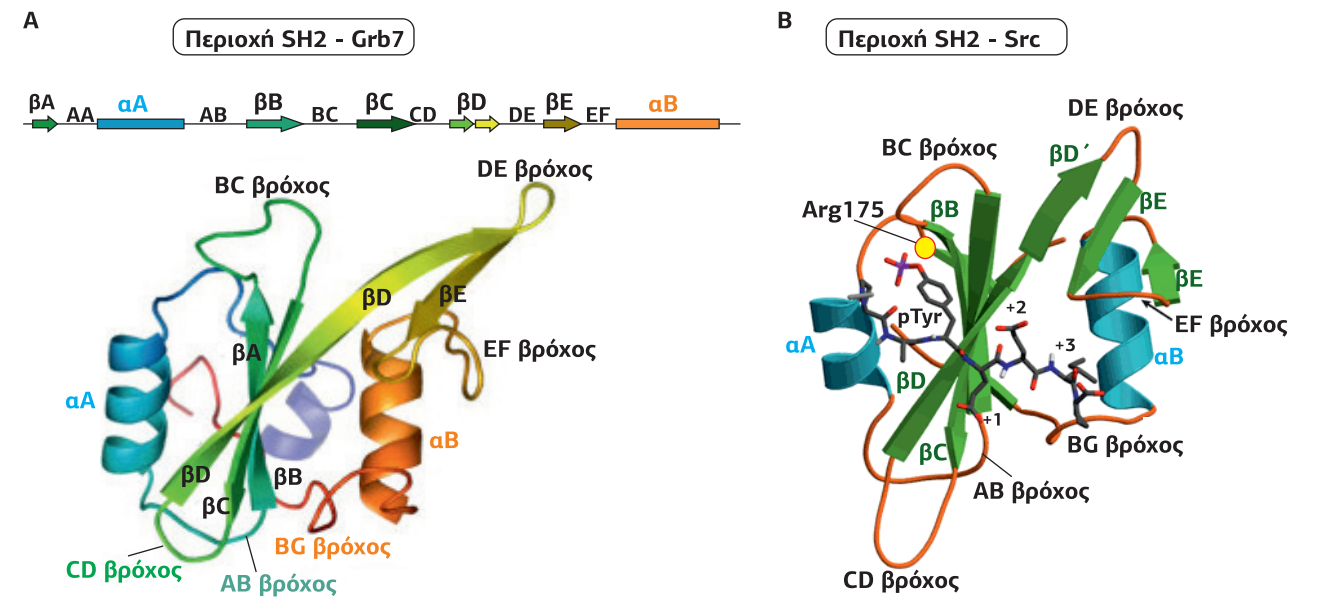


Tony Pawson (1952-2013) Βρετανο-Καναδός επιστήμονας του οποίου η έρευνα (ανακάλυψη της περιοχής SH2) συνετέλεσε στην κατανόηση της μεταγωγής σήματος.

**Εικόνα 8.36**  
**Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες με Src ομόλογες περιοχές.**  
 Ενζυμα, όπως οι κινάσες Tyr Src/Csk/Fyn, Syk/ZAP-70 και Btk/Tec, οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες SHP1/2, οι GTPase Activating Proteins RasGAP και RacGAP, η φωσφολιπάση PLCγ και η λιγάση της ουβικουτίνης Cbl, μεταγραφικοί παράγοντες, όπως οι STAT1-6, κυτταροσκελετικοί ρυθμιστές, όπως η tensin, και πρωτεΐνες προσαρμογής, Crb, Shc, Crk2, Nck, καθώς και πρωτεΐνες σκαλωσιών Gab1, IRS, FRS. Οι πρωτεΐνες δεν παρουσιάζονται σε κλίμακα. CHD: Collagen Homology Domain, PH: Plextrin Homology, TH: Tec Homology, 4H: 4 ελικοειδείς περιοχές, RING: Really Interesting New Gene (μια Zinc finger περιοχή με δράση λιγάσης ουβικουτίνης), UBA: Ubiquitin Associated, TAD: Transcriptional Activator Domain, PTPc-DSP: Phosphatase Tyr (catalytic subunit) - Dual Specificity Phosphatase. [202]



από επτά αντιπαράλληλους κλώνους (βA-βG). Με βάση τις πειραματικά προσδιορισμένες κρυσταλλικές δομές περίπου 70 περιοχών SH2, το NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα της SH2, που παρέχει τον θύλακα δέσμευσης της pTyr, είναι περισσότερο συντηρημένο από το COOH-τελικό, το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη δομική ποικιλομορφία. Επίσης, τα περισσότερα διατηρημένα κατάλοιπα βρίσκονται συγκεντρωμένα στον

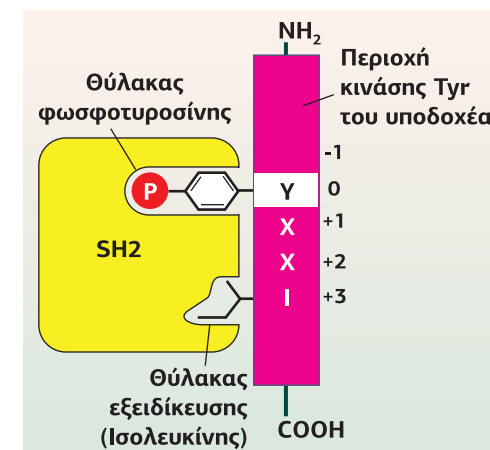


κλώνο βB. Η pTyr δημιουργεί μία εκτεταμένη διαμόρφωση και συνδέεται κάθετα προς τους κεντρικούς β-κλώνους της SH2. Ειδικά κατάλοιπα της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής (αA έως βD) σχηματίζουν έναν θετικά φορτισμένο θύλακα για τη σύνδεση της pTyr. Μια καλά συντηρημένη αργινίνη του κλώνου βB (η Arg175 στην SH2 της v-Src) παίζει τον κεντρικό ρόλο στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τη φωσφορική ομάδα της pTyr. Αντιθέτως, ένας υδρόφοβος θύλακας που δημιουργείται στο δεύτερο μισό αυτής της περιοχής (δηλ. βD έως βG) αναγνωρίζει κατάλοιπα προς το COOH-τελικό άκρο μετά την pTyr, προσδίδοντας εξειδίκευση (Εικόνα 8.37).

Πέρα από την ύπαρξη των φωσφορυλιωμένων τυροσινών κρίσιμο ρόλο παίζουν και οι αλληλουχίες που γειτονεύουν με αυτές. Οι γειτονικές αλληλουχίες των φωσφοτυροσινών καθορίζουν ποιο υπόστρωμα -που περιέχει τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες- θα συνδεθεί με τις περιοχές SH2 και διαφοροποιούν τη συνάφεια σύνδεσης για διαφορετικές περιοχές SH2 (Εικόνα 8.38). Σε αυτή τη βάση, τρεις κύριες οικογένειες των SH2 περιοχών έχουν ταυτοποιηθεί και ονομάζονται από τις πρωτότυπες πρωτεΐνες:

Ο τύπος **Src**, όπου οι SH2 περιοχές αναγνωρίζουν φορτισμένα κατάλοιπα στις θέσεις +1 και +2, όπως επίσης και ένα υδρόφοβο κατάλοιπο στη θέση +3 προς στο COOH-τελικό άκρο της φωσφοτυροσίνης (-x-pY-x-x-I-, Isoleucine Ile).

Ο τύπος **PLCγ**, όπου οι SH2 περιοχές αλληλεπιδρούν με αλειφατικά κατάλοιπα στις θέσεις +1 έως +5 (για παράδειγμα η περιοχή SH2 της p85 της PI3K αναγνωρίζει μια μεθειονίνη στη θέση +3, -x-pY-x-x-M-)



**Εικόνα 8.37**  
**Δομή SH2 περιοχών.**  
 A. Διακρίνεται η περιοχή SH2 της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb7. Αποτελείται από δύο α-έλικες (αA και αB) που περιβάλλουν ένα β-πτυκωτό φύλλο, το οποίο αποτελείται από επτά αντιπαράλληλους β-κλώνους (βA-βG). [143] B. Η περιοχή SH2 της κινάσης Tyr Src. Ειδικά κατάλοιπα της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής (αA έως βD) σχηματίζουν έναν θετικά φορτισμένο θύλακα για τη σύνδεση της pTyr, η οποία δημιουργεί μία εκτεταμένη διαμόρφωση και συνδέεται κάθετα προς τους κεντρικούς β-κλώνους της SH2. Μια καλά συντηρημένη αργινίνη του κλώνου βB (η Arg175 του βB-κλώνου στην SH2 της v-Src) παίζει τον κεντρικό ρόλο στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τη φωσφορική ομάδα της pTyr. Αντιθέτως, ένας υδρόφοβος θύλακας που δημιουργείται στο δεύτερο μισό αυτής της περιοχής (δηλ. από βD έως βG) αναγνωρίζει κατάλοιπα προς το COOH-τελικό άκρο μετά την pTyr, προσδίδοντας εξειδίκευση. [115] [160] [215] [143] [122]

Ο τύπος **Grb2**, στον οποίο οι SH2 περιοχές αναγνωρίζουν ένα κατάλοιπο ασπαργίνης στη θέση +2 (-x-pY-x-N-x, Asparagine Asn).

Η μεγάλη ποικιλία των SH2 περιοχών και των υποστρωμάτων τους τονίζεται από την παρατήρηση ότι πολλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες περιέχουν δύο περιοχές SH2, καθεμιά από τις οποίες έχει διαφορετική συγγένεια σύνδεσης για διάφορα υποστρώματα.

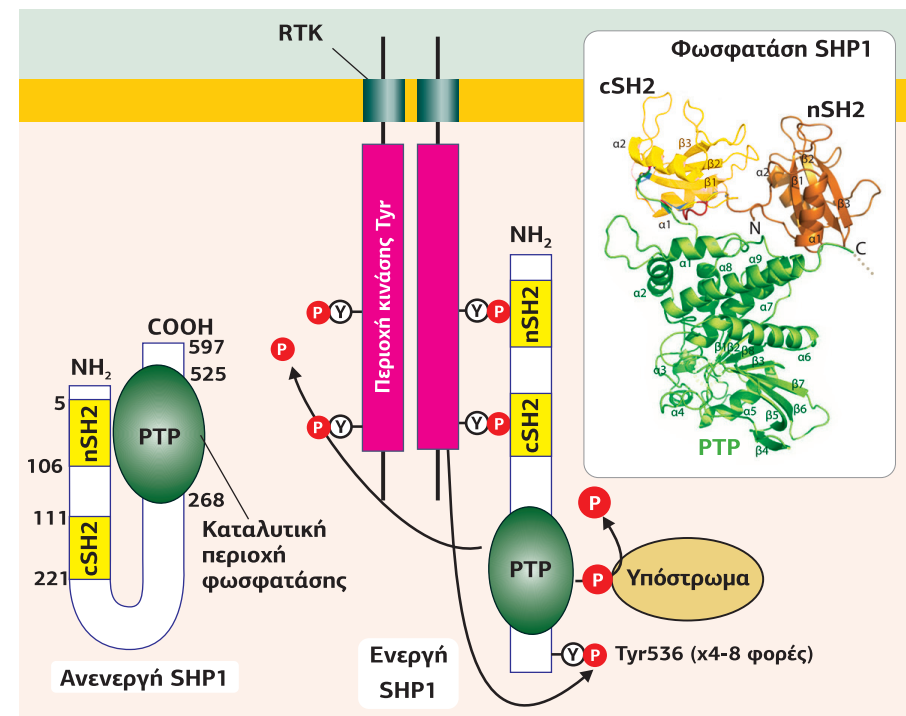
Επιπλέον, υπάρχουν SH2 περιοχές οι οποίες αναγνωρίζουν και μη φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης, όπως η περίπτωση της ενδομοριακής αναστολής που λαμβάνει χώρα στη φωσφατάση SHP1.

**Ο ρόλος των SH2 περιοχών**

Καθώς οι περιοχές SH2 πρωτοανακαλύφθηκαν σε κινάσες Tyr, θεωρήθηκε ότι ο ρόλος τους ήταν να στρατολογήσουν τις κινάσες στα υποστρώματά τους. Με την αυξανόμενη, όμως, πολυπλοκότητα της σηματοδότησης στους πολυκύτταρους οργανισμούς αποδόθηκαν και άλλες ρυθμιστικές λειτουργίες στις SH2.

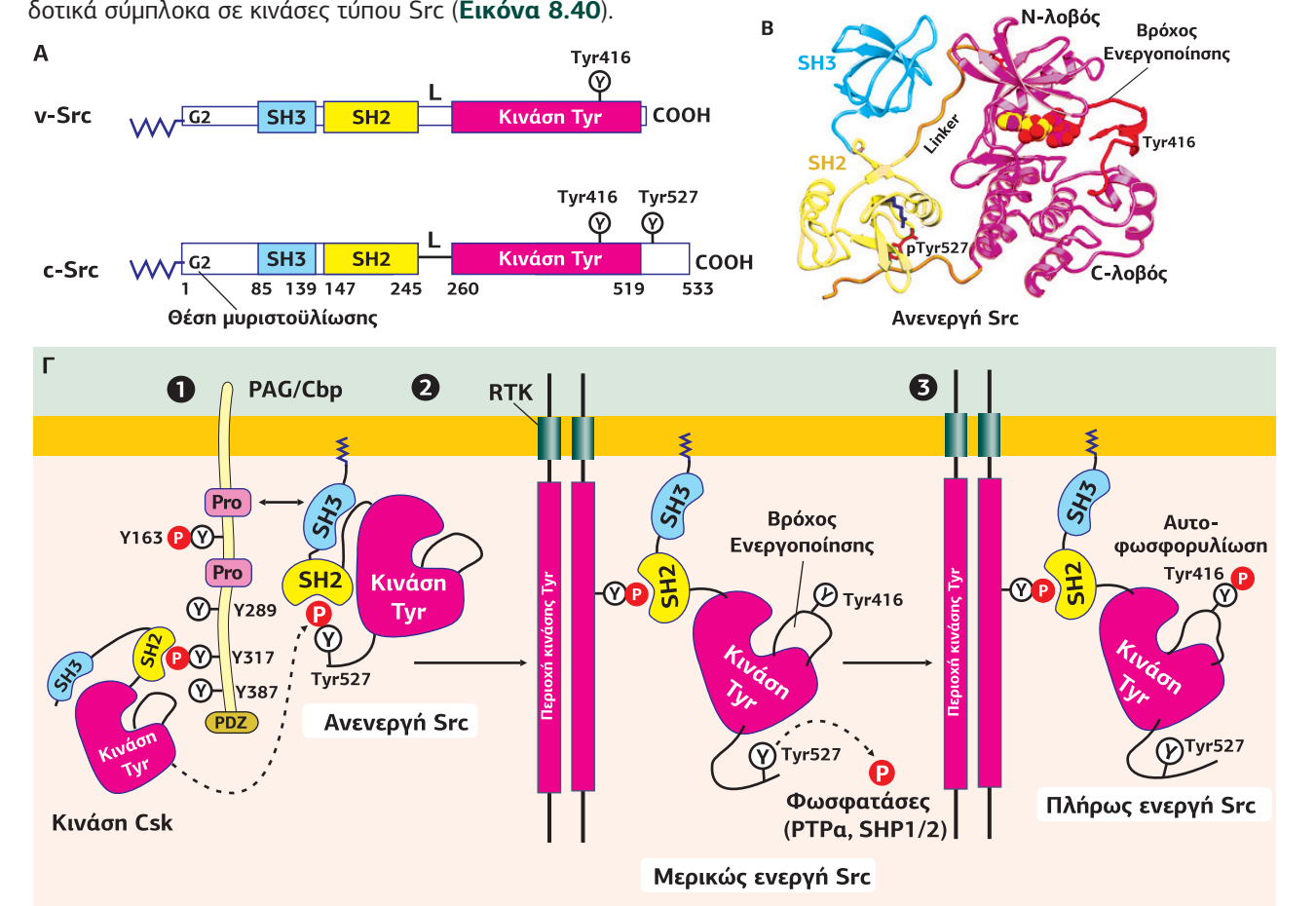
Η βασικότερη λειτουργία των SH2 είναι ότι οργανώνουν τον σχηματισμό σηματοδοτικών συμπλόκων, κυρίως στους αυτοφωσφορυλιωμένους RTKs. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στον ενδομοριακό έλεγχο της δραστηριότητας των σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Συχνά αυτές οι δύο ενέργειες συνδυάζονται. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αφορά τη φωσφατάση Tyr **SHP1** (SH2 containing protein Tyr Phosphatase1, προφέρεται ship). Η SHP1 αποτελείται από μια κεντρική καταλυτική περιοχή, δύο περιοχές SH2 στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο και ένα COOH-τελικό άκρο με Tyr ως πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Στην κατάσταση ηρεμίας η περιοχή nSH2 αλληλεπιδρά ενδομοριακά με την καταλυτική περιοχή φωσφατάσης επάγοντας την αυτοαναστολή του ενζύμου. Οι ενεργοποιημένοι αυτοφωσφορυλιωμένοι RTKs προσελκύουν τη SHP1, ανοίγοντας την κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της SHP1 στην Tyr536 (από τον InsR) αυξάνει τη δραστηριότητά της κατά 4 έως 8 φορές. Μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης η SHP1 αποφωσφορυλιώνει τους αυτοφωσφορυλιωμένους RTKs, οδηγώντας στον τερματισμό του σήματος. Επίσης οι φωσφορυλιωμένες Tyr αποτελούν θέσεις σύνδεσης σηματοδοτικών πρωτεϊνών προσδίδοντας στη φωσφατάση έναν ρόλο πρωτεΐνης προσαρμογής (**Εικόνα 8.39**).

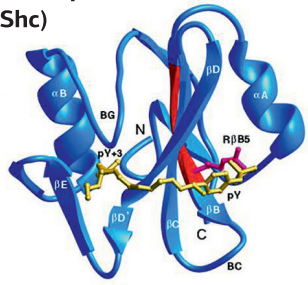
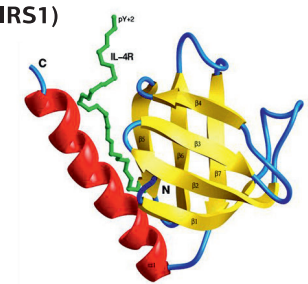
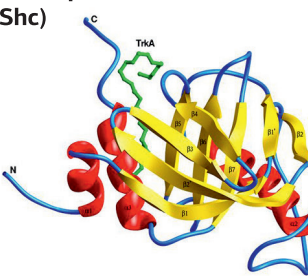
**Εικόνα 8.39**  
Ο ρόλος της SH2 περιοχής στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης SHP1. Στην ανενεργή SHP1, η περιοχή nSH2 αλληλεπιδρά ενδομοριακά με την περιοχή δέσμωσης του υποστρώματος, χωρίς καμία αλληλεπίδραση με pTyr. Αυτή η αυτοαναστολή αίρεται από την αλλαγή στη διαμόρφωση, η οποία προκαλείται από την αλληλεπίδραση των δύο SH2 περιοχών της SHP1 με δύο διαδοχικά κατάλοιπα pTyr των αυτοφωσφορυλιωμένων υποδοχέων. Μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης η SHP1 αποφωσφορυλιώνει τους RTKs, οδηγώντας στον τερματισμό του σήματος. Η φωσφορυλίωση της Tyr536 της SHP1 από τον InsR αυξάνει τη δραστηριότητα PTPάσης 4-8 φορές και, επιπλέον, οι φωσφορυλιωμένες Tyr της SHP1 αποτελούν θέσεις σύνδεσης σηματοδοτικών πρωτεϊνών. [106] [205]



Με έναν παρόμοιο αλλά πιο εξελιγμένο τρόπο ενεργοποιούνται οι κινάσες Tyr **Src**. Η δραστηριότητα της Src ελέγχεται ταυτόχρονα από μια ανασταλτική και μια διεγερτική φωσφορυλίωση Tyr, παρουσιάζοντας ένα ξεκάθαρο παράδειγμα της διφορούμενης σημασίας της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Ενώ ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο τυροσίνης στο COOH-τελικό άκρο διατηρεί το ένζυμο σε ανενεργή διαμόρφωση λόγω αλληλεπίδρασης με την SH2 περιοχή του, η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης στον βρόχο ενεργοποίησης προσδίδει στην κινάση τη μέγιστη δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση της Src γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ της SH2 περιοχής και του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου τυροσίνης που βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο διακόπτεται είτε λόγω συναγωνισμού από μια φωσφορυλιωμένη Tyr μιας άλλης πρωτεΐνης είτε λόγω ενζυμικής αποφωσφορυλίωσης. Σε ένα δεύτερο βήμα λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης μέσω αυτοφωσφορυλίωσης. Το ένζυμο απενεργοποιείται ξανά έπειτα από αποφωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης και φωσφορυλίωση του καταλοίπου τυροσίνης που βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο. Η τελευταία αντίδραση καταλύεται από την κινάση Csk (C-terminal Src Kinase). Η Csk είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο που, για να έρθει σε επαφή με την Src, αλληλεπιδρά με μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη Cbp (Csk-binding single pass transmembrane protein). Αυτή η πρωτεΐνη σκαλωσιάζει συνδέεται, επίσης, και με την SH3 περιοχή της Src και με τη σειρά της φωσφορυλιώνεται από την Src σε διάφορα κατάλοιπα τυροσίνης. Οι φωσφορυλιωμένες Tyr λειτουργούν ως θέσεις δέσμωσης για άλλες πρωτεΐνες με SH2 περιοχές. Έτσι, η πρωτεΐνη που συνδέει την Csk είναι μια πολυλειτουργική σκαλωσιά, η οποία μέσω ειδικών SH2 αλληλεπιδράσεων οργανώνει μεγάλα σηματοδοτικά σύμπλοκα σε κινάσες τύπου Src (**Εικόνα 8.40**).

**Εικόνα 8.40**  
Ο ρόλος των SH2 και SH3 περιοχών στην ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής πρωτεϊνικής κινάσης Src. Α. Η ογκοπρωτεΐνη Src στερείται της Tyr527 και κατά συνέπεια είναι μερικώς ενεργοποιημένη. Β. Διακρίνεται και η κρυσταλλική δομή της cSrc. Γ. Ενεργοποίηση της Src. 1. Απουσία ενός σήματος η Src βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής λόγω αλληλεπίδρασης της SH2 περιοχής και του COOH-τελικού φωσφορυλιωμένου καταλοίπου τυροσίνης (στους ανθρώπους Tyr527). Η φωσφορυλίωση της Tyr527 καταλύεται από την κινάση Csk, η οποία συνδέεται στη μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη σκαλωσιάζει PAG/Cbp, που διαπερνά τη μεμβράνη μόνο μία φορά. 2. Η pTyr527 αποφωσφορυλιώνεται από τις φωσφατάσες PTPα και SHIP1/2 και η Src ξεδιπλώνεται λόγω αλληλεπίδρασης της SH2 περιοχής της με μια φωσφορυλιωμένη Tyr του RTK. 3. Η Src ενεργοποιείται από αυτοφωσφορυλίωση της Tyr416 στον βρόχο ενεργοποίησης. [127] [16]



SH2 περιοχή  
(Shc)PTB περιοχή  
(IRS1)PTB περιοχή  
(Shc)

Εικόνα 8.41

**Η σύγκριση των δομών των SH2 και PTB περιοχών.** Οι δομές των περιοχών SH2 (της Shc) και PTB (της IRS1 και Shc) εμφανίζονται παρουσία συνδεδεμένων πεπτιδίων. Οι β-κλώνοι εμφανίζονται με κίτρινο και οι α-έλικες με κόκκινο. Και οι δύο περιοχές PTB αποτελούνται από δύο β-πτυχωτά φύλλα που πλαισιώνονται από δύο α-έλικες, αλλά ο προσανατολισμός των φύλλων και των ελίκων, καθώς και ο μηχανισμός πρόσδεσης του πεπτιδίου είναι σαφώς διαφορετικοί για τις δύο περιοχές. Η Shc-like PTB περιοχή έχει μια επιπλέον NH<sub>2</sub>-τελική α1 έλικα. [215]

## 2.3

## Οι PTB περιοχές

Η περιοχή PTB (Phosphotyrosine-Binding ή phosphotyrosine-interacting domain) εντοπίστηκε για πρώτη φορά στην πρωτεΐνη προσαρμογής Shc και είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια μοτίβων που συνδέουν pTyr. Περίπου 60 ανθρώπινες πρωτεΐνες περιέχουν μια περιοχή PTB. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχουν εντοπιστεί περιοχές PTB στους σακχαρομύκητες ή στα φυτά, δύο PTB έχουν βρεθεί στο *Dictyostelium discoideum* και 31 στο χοανομαστιγοφόρο *Monosiga brevicollis*. Οι πρωτεΐνες που φέρουν μια περιοχή PTB δρουν αποκλειστικά ως προσαρμογείς ή πρωτεΐνες σκαλωσιάς. Ενώ ένα τρίτο των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με PTB περιοχές περιέχουν ένα μόνο αντίγραφο αυτής της περιοχής, τα υπόλοιπα δύο τρίτα -εκτός από την περιοχή PTB- διαθέτουν και άλλες περιοχές αλληλεπίδρασης, όπως SH2, SH3, PDZ ή SAM.

## Δομή της περιοχής PTB

Η οικογένεια των περιοχών PTB χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες, Shc-like, IRS-like και Dab-like, με βάση τη δομή τους. Παρά το γεγονός ότι οι Shc-like και IRS-like περιοχές PTB αναγνωρίζουν φωσφορυλιωμένες τυροσίνες, η πλειοψηφία των υπολοίπων PTB περιοχών, που ταξινομούνται ως Dab-like, αναγνωρίζουν μη φωσφορυλιωμένες τυροσίνες ή ακόμα και μη τυροσίνες. Δομική ανάλυση έδειξε ότι οι περιοχές PTB έχουν μια πολύ όμοια τοπολογία αναδίπλωσης με τις περιοχές PH (Pleckstrin Homology), αν και εμφανίζουν μικρή ομολογία αλληλουχίας με τις περιοχές PH (Εικόνα 8.41). Όλες οι περιοχές PTB περιέχουν δύο ορθογώνια διατεταγμένα β-πτυχωτά φύλλα, που αποτελούνται από επτά αντιπαράλληλους β-κλώνους. Τα β-πτυχωτά φύλλα περιβάλλονται από δύο α-έλικες, α2 και α3. Οι Shc-like και Dab1-like PTB έχουν μια επιπλέον NH<sub>2</sub>-τελική έλικα (α1 έλικα). Οι περιοχές PTB συνδέουν τα πεπτιδικά υποστρώματα σε μια υδρόφοβη αύλακα σχήματος L που περιβάλλεται από τον β5-κλώνο και την α3-έλικα.

## 2.4

## Οι SH3 περιοχές αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε Pro

Η περιοχή SH3 (Src Homology 3) είναι μια μικρή περιοχή περίπου 60 αμινοξέων. Αρχικά, περιγράφηκε ως μία συντηρημένη αλληλουχία στην ιική πρωτεΐνη προσαρμογής v-Crk. Αυτή η περιοχή είναι, επίσης, παρούσα στην PLCγ και σε κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, όπως η Abl και η Src. Έχει, επιπλέον, εντοπιστεί σε αρκετές άλλες οικογένειες πρωτεϊνών, όπως στην PI3K, στην p120-Ras-GAP, σε RhoGEFs (π.χ. ARHGEF4, Trio) κ.λπ. Οι πρωτεΐνες μέσω των SH3 περιοχών τους αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες προσαρμογής και κινάσες τυροσίνης. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται περίπου 300 πρωτεΐνες με SH3 περιοχές.

## Δομή της περιοχής SH3 και σύνδεση της αλληλουχίας πλούσιας σε Pro

Η περιοχή SH3 έχει μια χαρακτηριστική διαμόρφωση βήτα-βαρελίου, που αποτελείται από πέντε ή έξι β-κλώνους διατεταγμένους ως δύο στενά συσκευασμένα αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. Η αναδίπλωση SH3 τύπου είναι μια αρχαία διαμόρφωση που βρέθηκε σε ευκαρυωτικά όσο και προκαρυωτικά κύτταρα.

Οι περιοχές SH3 συνδέονται σε αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη (X-P-p-X-P). Στις αλληλουχίες αυτές τα δύο κατάλοιπα προλίνης (P) είναι σταθερά, όπου X είναι κάποιο αλειφατικό κατάλοιπο αμινοξέος και p συνήθως είναι κάποιο κατάλοιπο προλίνης. Τα δύο κατάλοιπα προλίνης, που είναι σταθερά, συνδέονται το καθένα σε έναν υδρόφοβο θύλακα της SH3 περιοχής. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες μπορούν να συνδεθούν είτε με κατεύθυνση C→N είτε με κατεύθυνση N→C. Όπως και με τις SH2 περιοχές, έτσι υπάρχουν αρκετές διαφορετικές SH3 περιοχές, υποδηλώνοντας

τη διαφορετική συγγένεια σύνδεσης για τις πλούσιες σε προλίνη περιοχές, εξειδίκευση η οποία καθορίζεται από τις γειτονικές αλληλουχίες των σταθερών καταλοίπων προλίνης.

## Λειτουργίες της SH3 περιοχής

Η σημασία της SH3 περιοχής έγινε φανερή από την παρατήρηση ότι διαγραφή των SH3 περιοχών των κυτταροπλασματικών κινάσων τυροσίνης Abl και Src οδηγεί σε σημαντική αύξηση του δυναμικού δημιουργίας όγκων και από τις δύο κινάσες. Επιπλέον, έχει χαρακτηριστεί ένας σημαντικός αριθμός κυτταρικών διαδικασιών στις οποίες οι SH3 περιοχές μεσολαβούν ανάμεσα σε λειτουργικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Στις SH3 περιοχές μπορούν να αποδοθούν οι ακόλουθες κύριες λειτουργίες:

1. Μεσολάβηση εξειδικευμένης υποκυτταρικής τοποθέτησης. Μια θεμελιώδης λειτουργία των SH3 περιοχών είναι να σχηματίζουν λειτουργικά ολιγομερή σύμπλοκα σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις, συχνά σε συνεργασία με άλλες πρωτεϊνικές περιοχές. Οι SH3 περιοχές εντοπίζονται σε πολλές πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό ή με την πλασματική μεμβράνη. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η α-σπεκτρίνη και η μιοσίνη, που συνδέονται με την ακτίνη.

2. Ρύθμιση της ενζυμικής δράσης. Ένα παράδειγμα ρύθμισης της ενζυμικής δράσης μέσω των SH3 περιοχών είναι η αρνητική ρύθμιση της δράσης της κινάσης Src μέσω SH3 αλληλεπιδράσεων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

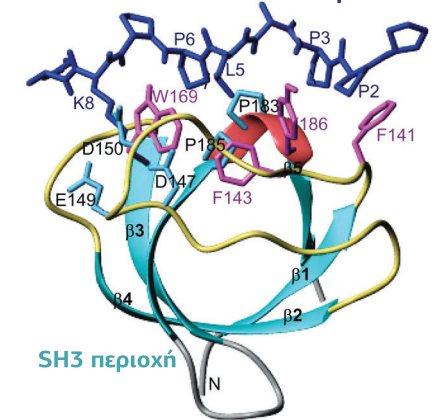
3. Συνεισφορά στην εξειδίκευση υποστρώματων των κινάσων τυροσίνης: Οι κινάσες τυροσίνης έχουν ενδογενώς χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος. Ένας τρόπος αύξησης της εξειδίκευσης και της επιλεκτικότητας της φωσφορυλίωσης τυροσινών φαίνεται να είναι η χρήση των SH3 περιοχών για τη σύνδεση των υποστρώματων στις κινάσες τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες προσαρμογής Crk, Grb2 και Nck φωσφορυλιώνονται εξειδικευμένα από την κινάση Abl σε κατάλοιπα τυροσίνης. Αυτές οι τρεις πρωτεΐνες έχουν SH3 περιοχές, που μπορούν να συνδεθούν σε αλληλουχίες της Abl πλούσιες σε προλίνη. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε μια ισχυρή σύνδεση του υποστρώματος στην κινάση τυροσίνης και προκαλεί μια αποτελεσματική φωσφορυλίωση τυροσινών. Άλλα πιθανά υποστρώματα που δεν έχουν SH3 περιοχές αποκλείονται από τη φωσφορυλίωση, καθώς δεν μπορούν να συνδεθούν ισχυρά με την κινάση τυροσίνης.

Η ειδική λειτουργία των SH3 περιοχών βασίζεται στη χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος που εμφανίζουν οι κινάσες τυροσίνης σε αυτήν την περίπτωση. Στα κλασικά ένζυμα η θέση σύνδεσης του υποστρώματος και το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου βρίσκονται πολύ κοντά και η θέση σύνδεσης του υποστρώματος παρουσιάζει γενικά υψηλή εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Η κατάσταση διαφέρει στις κινάσες τυροσίνης. Εδώ, η περιοχή σύνδεσης κοντά στο καταλυτικό κέντρο παρουσιάζει μέτρια εκλεκτικότητα. Η εξειδίκευση της αντίδρασης αυξάνεται, ωστόσο, με τη μεσολάβηση των SH3 περιοχών. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις περιοχές SH3 και τις πλούσιες σε προλίνη αλληλουχίες συνεισφέρουν στην αναγνώριση του υποστρώματος, προσφέροντας υψηλή εξειδίκευση σε μια μη εξειδικευμένη καταλυτική αντίδραση.

## 3. Τελεστές των RTKs: Μονομερείς G-πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Ras

Ένας μεγάλος αριθμός από μεταγωγικά μονοπάτια διακλαδίζεται κάτω από το σηματοδοτικό σύμπλεγμα των ενεργοποιημένων υποδοχέων RTKs. Έχουμε δει ήδη ότι στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων συνδέονται η φωσφολιπάση

## Αλληλουχία πλούσια σε προλίνη



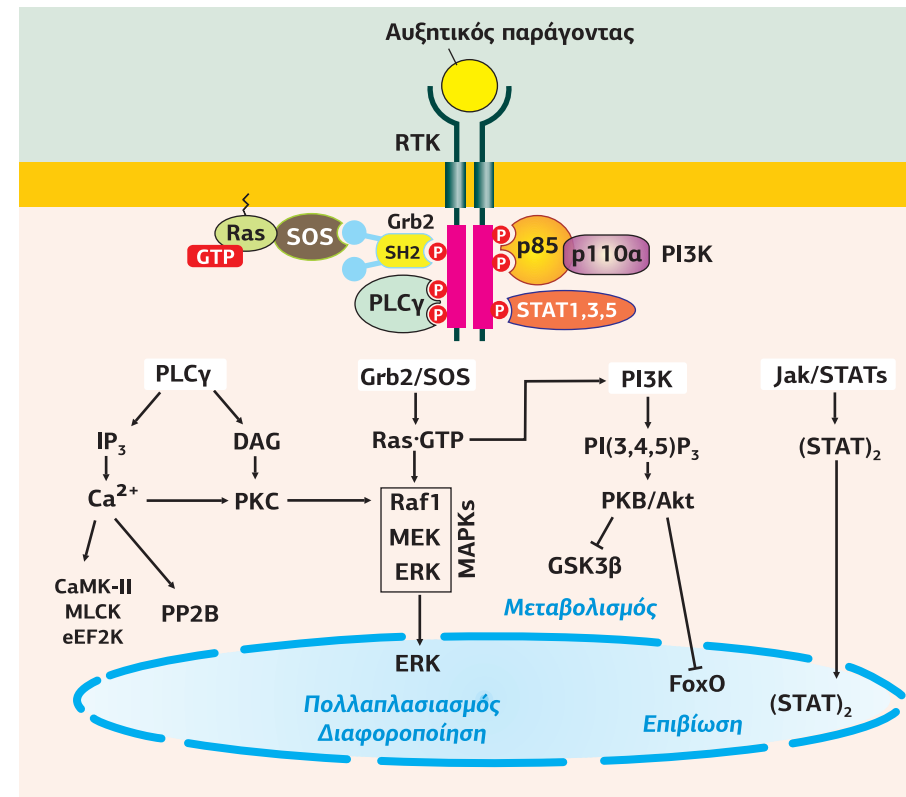
Εικόνα 8.42

**Δομή της περιοχής SH3 και η σύνδεσή της σε μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη.** Η περιοχή SH3 της Crk έχει μια διαμόρφωση χαρακτηριστικού βήτα-βαρελίου, που αποτελείται από τέσσερις β-κλώνους (β1-β4) διατεταγμένους ως δύο στενά συσκευασμένα αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. [103]

Σγ, η κινάση των φωσφολιπιδίων PI3K, οι παράγοντες RasGEFs και οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs (βλ. **Εικόνα 8.27**). Τα αποτελέσματα των δύο πρώτων μονοπατιών έχουν περιγραφεί με λεπτομέρεια σε προηγούμενα κεφάλαια, του PLCγ/ Ca<sup>2+</sup>/ PKC (σσ. 286-299, 416-425) και του PI3K/ Akt (σσ. 302-308, 426-436). Σε αυτήν την ενότητα θα αναλύσουμε εκτεταμένα το μονοπάτι των μικρών GTPασών της υπεροικογένειας Ras, ενώ το μονοπάτι των STATs θα αναλυθεί σε επόμενο Κεφάλαιο.

**Εικόνα 8.43**  
**Τα τέσσερα χαρακτηριστικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς RTKs.** Στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχών αυξητικών παραγόντων (ή RTKs) συνδέονται μέσω των SH2 περιοχών τους η PLCγ, η PI3K, οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs και οι πρωτεΐνες GEFs (έμμεσα μέσω πρωτεϊνών προσαρμογής), οι οποίες ενεργοποιούν τις GTPάσες Ras και κατ' επέκταση το μονοπάτι των MAPK κινάσων. Όλα αυτά τα μονοπάτια καταλήγουν σε ενεργοποίηση γονιδίων που επάγουν την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετακίνηση των κυττάρων.

[26]



Οι πρωτεΐνες Ras, 167 μέλη μιας υπεροικογένειας μικρών GTPασών, αποτελούν έναν ιδιαίτερης σπουδαιότητας σταθμό-διακόπτη, ο οποίος λαμβάνει, διαμορφώνει και διαβιβάζει τα σήματα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική επιβίωση, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, την κυτταρική πολικότητα και την ενδοκυτταρική μεταφορά των ενδοσωμάτων, καθώς και τη μεταφορά πρωτεϊνικών φορτίων μέσα και έξω από τον πυρήνα. Οι Ras επεξεργάζονται τα σήματα που παραλαμβάνουν από υποδοχείς κινάσες τυροσίνης, υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης και από υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες, και τα προωθούν στο εσωτερικό του κυττάρου καταλήγοντας στη μεταγραφή γονιδίων.

### 3.1 Ανακάλυψη και ταξινόμηση των μικρών G-πρωτεϊνών

Το πρώτο γονίδιο μικρής G-πρωτεΐνης που ανακαλύφθηκε ήταν το γονίδιο *ras* (*rat sarcoma*), το οποίο απομονώθηκε το 1978 ως ογκογονίδιο, υπεύθυνο για την καρκινογόνο δράση των ρετροϊών Harvey και Kirsten, οι οποίοι προκαλούν σάρκωμα στα τρωκτικά. Ο Harvey Murine Sarcoma Virus (Ha-MSV) ανακαλύφθηκε το 1964 από την Jennifer Harvey και ο ιός Kirsten (Ki-MSV) από τον Werner Kirsten, το 1967. Το 1973 ο Edward M. Scolnick στο National Institute of Health (NIH) ανακάλυψε ότι οι ιοί αυτοί φέρουν και DNA τρωκτικών. Το 1979 το γονιδίωμα των δύο ιών κλωνοποιήθηκε και βρέθηκε ότι το προϊόν των ιικών ογκογονιδίων *H-ras*

και *K-ras* ήταν μια πρωτεΐνη 21 kDa, η οποία ονομάστηκε p21 Ras. Το 1982 αποδείχθηκε ότι η p21 Ras είχε την ικανότητα να συνδέει τα νουκλεοτίδια γουανίνης GDP / GTP.

Η γενική σημασία των πρωτεϊνών Ras στη ρύθμιση της αύξησης αναγνωρίστηκε στην αρχή της δεκαετίας του '80, όταν δείχθηκε ότι περίπου το 30% όλων των στερεών όγκων στους ανθρώπους παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *ras*. Πιο συγκεκριμένα, το 1982 από τρία διαφορετικά εργαστήρια, στο Harvard (Geoffrey Cooper et al), στο NIH (Mariano Barbacid and Stuart Aaronson) και στο MIT (Robert Weinberg et al) βρέθηκαν σε ανθρώπινους όγκους ογκογονίδια *H(arvey)-ras*, *Ki(rsten)-rasA* και *Ki-rasB*, ανάλογα των ιικών. Η μοριακή κλωνοποίηση των φυσιολογικών και των ογκογόνων ανθρώπινων *H-ras* γονιδίων έδειξε ότι οι λειτουργικές τους διαφορές ήταν αποτέλεσμα μιας μόνο σημειακής μετάλλαξης (Gly12), η οποία καθιστούσε τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Ras ανίκανη να υδρολύσει το GTP και, συνεπώς, βρισκόταν σε μια μόνιμα ενεργή κατάσταση.

Το μικρό τους μέγεθος και η απλή τους λειτουργία έκανε τις πρωτεΐνες Ras ένα ιδανικό αντικείμενο έρευνας για τις σχέσεις δομής - λειτουργίας μιας κεντρικής σηματοδοτικής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη Ras -καθώς τα περισσότερα από τα δομικά και βιοχημικά στοιχεία είναι διαθέσιμα για την πρωτεΐνη H-Ras, θα αναφέρεται στο εξής ως "πρωτεΐνη Ras" για απλούστευση- είναι αυτήν την περίοδο η καλύτερα χαρακτηρισμένη σηματοδοτική πρωτεΐνη.

Το 1983 αναγνωρίστηκε ένα τρίτο ανθρώπινο ογκογονίδιο *ras*, το οποίο ονομάστηκε *N(euroblastoma)-ras*, καθώς απομονώθηκε από όγκους ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Το 1995 δημιουργήθηκε ένα knockout *N-ras<sup>-/-</sup>* ποντίκι, το οποίο ήταν βιώσιμο με μειωμένη ανοσοποιητική απόκριση. Το 1997 δημιουργήθηκε ένα knockout *K-ras<sup>-/-</sup>* ποντίκι, το οποίο δεν ήταν βιώσιμο, πέθανε την 12<sup>η</sup> μέρα της κύησης λόγω δυσλειτουργίας του ήπατος και αναίμιαιας. Το 2000 δημιουργήθηκε ένα knockout *H-ras<sup>-/-</sup>* ποντίκι, το οποίο δεν εμφάνιζε φαινοτυπικά καμιά δυσλειτουργία.

### Ταξινόμηση των GTPασών της υπεροικογένειας Ras

Μετά από την ανακάλυψη της πρωτεΐνης Ras γρήγορα εδραιώθηκε ότι οι πρωτεΐνες Ras αποτελούν μια οικογένεια μέσα σε μια ευρύτερη υπεροικογένεια, γνωστή σήμερα ως υπεροικογένεια των Ras μονομερών GTPασών. Τα περίπου 160 μέλη της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών Ras ταξινομούνται σε 5 οικογένειες:

- **Ras πρωτεΐνες (Ras, Ral, Rap):** έχουν μιτογόνο δράση, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων και εμπλέκονται στη χημειοταξία.
- **Rho πρωτεΐνες (Rho, Rac, Cdc42):** ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και πρόσφατα ορισμένα μέλη της υποοικογένειας Rac βρέθηκε ότι παίζουν ρόλο στην αιμοποίηση.
- **Rab πρωτεΐνες (η μεγαλύτερη ομάδα με περισσότερα από 60 μέλη):** ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική κυκλοφορία κυστιδίων.
- **Arf πρωτεΐνες (Arf1-6, Arl1-7, Sar):** ρυθμίζουν τον σχηματισμό και την ενδομεταφορά των μεταφορικών κυστιδίων στη συσκευή Golgi.
- **Ran πρωτεΐνες:** ρυθμίζουν την πυρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά, καθώς και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων κατά τη μεσόφαση. Έχει βρεθεί μόνο ένα μέλος της οικογένειας αυτής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζει 167 μικρές GTPάσες: 39 Ras, 30 Arf, 22 Rho, 65 Rab, και 1 Ran. Επίσης, υπάρχουν 10 "αταξινόμητες" αλληλουχίες.

### 3.2 Ρύθμιση του κύκλου GDP/GTP στις μικρές G πρωτεΐνες από τρία διαφορετικά μόρια

Τα μέλη της υπεροικογένειας των Ras είναι GTPάσες που μπορούν να υπάρχουν σε μια ανενεργή Ras-GDP και μια ενεργή Ras-GTP διαμόρφωση. Στη GTP-συνδεδεμένη διαμόρφωση οι Ras αλληλεπιδρούν με τους επόμενους στόχους-τε-

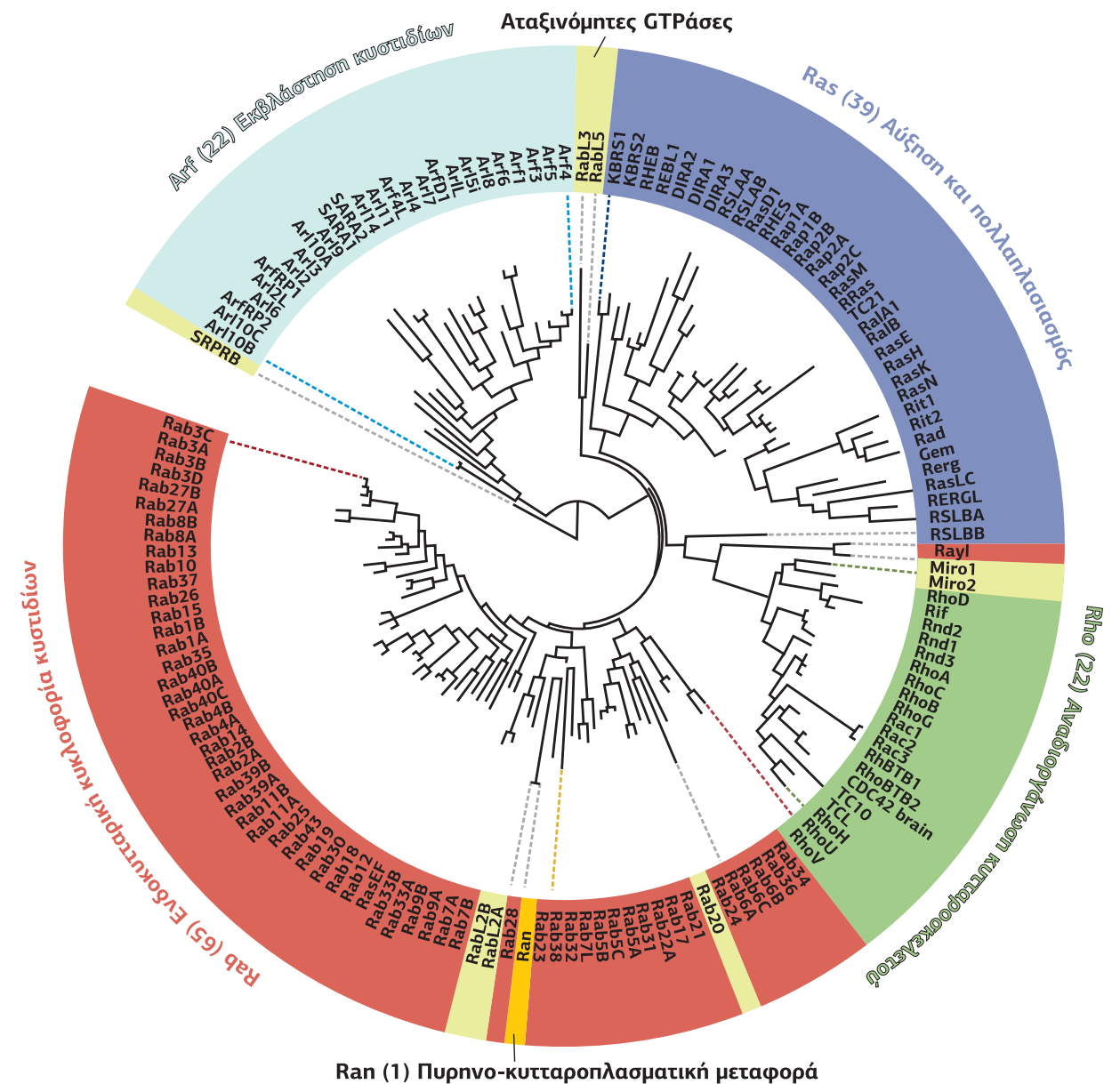
**Πίνακας 8.2**  
Τα μέλη της υπερικογένειας Ras και οι ρυθμιστικές τους πρωτεΐνες

Υπερικογένειες Ras	Μέλη	GEFs	GAPs
<b>Ras (39)</b> Αύξηση και πολλαπλασιασμός	<i>Ras υποοικογένεια:</i> Ha-Ras, N-Ras, R-Ras, Ki-RasA, Ki-RasB, M-Ras, kB-Ras1, kB-Ras2, Rheb	RapGEF2, RasGEF1A, RasGRF2, RasGRP1, RasGRP4, SOS1	p120GAP, NF1, IQGAP1, P1xnB1, RASAL1/2
	<i>Rap υποοικογένεια:</i> Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, RalA, RalB, Rit, Rin, Rad, Kir/Gem TC21	RapGEF1, PLCε1, RalGDS, RGL1, RGL2, RGR	Rap1GAP, SIPA1, TSC2
<b>Rho (22)</b> Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης	<i>Rho:</i> RhoA, RhoB, RhoC	ARHGEF10, ARHGEF4, SPATA13, ARHGEF6/7, DBS, ECT2, ARHGEF2, ARHGEF12, NET1, OBSCN, PREX1/2, ARHGEF11, ARHGEF17, Tiam1, TRIO, VAV1-3, DOCK1-4, DOCK8, DOCK10	ARHGAP5, ARHGAP8, ARHGAP12, ARHGAP22, ARHGAP25, BCR, DLC1, StARD13, StARD8, ARHGAP26, RALBP1
	<i>Rac:</i> Rac1, Rac2, Rac3, RhoG		
	<i>Cdc42-like:</i> Cdc42, TC10, TCL		
	<i>Rnd:</i> Rnd1, Rnd2, Rnd3		
	<i>RhoBTB:</i> RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3 <i>RhoF:</i> RhoD, RhoF		
<b>Rab (65)</b> Ενδοκυτταρική κυκλοφορία κυστιδίων	Rab1A, Rab1B, Rab2, Rab3A, Rab3B, Rab3C, Rab3D, Rab4, Rab5A, Rab5B, Rab5C, Rab6, Rab7, Rab8, Rab10, Rab11A, Rab11B, Rab12, Rab13, Rab14, Rab15, Rab16, Rab17, Rab18, Rab19, Rab20, Rab21, Rab22, Rab23, Rab24, Rab25, Rab26, Rab27A, Rab27B, Rab28, Rab29, Rab30, Rab31, Rab32, Rab33A, Rab33B	MSS4	
<b>Arf (22)</b> Μεταφορά κυστιδίων στο Golgi	Arf1, Arf2, Arf3, Arf4, Arf4L, Arf5, Arf6, Arl1, Arl2, Arl3, Arl4, Arl5, Arl6, Arl7, Arl8, Arl9, Arl10, Arl11, Sar1, Sar2, Ard1	PSD1, FBX8, IQSEC1, GBF1, BIG, ARNO/cytohesins	AGAP2, ASAP1, ASAP3
<b>Ran (1)</b> Πυρνο-κυτταροπλασματική μεταφορά	Ran	RCC1	

λεστές και τους ενεργοποιούν. Στη συνέχεια, οι τελεστές επικοινωνούν με άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες μεταφέροντας το μήνυμα κατά μήκος του σηματοδοτικού μονοπατιού. Η ενεργοποίηση των τελεστών από τις πρωτεΐνες Ras τερματίζεται με την υδρόλυση του GTP σε GDP.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των μικρών GTPασών στα κύτταρα είναι η αλληλεπίδρασή τους με μόρια, τα οποία επηρεάζουν τον κύκλο GDP/GTP. Τα μόρια, τα οποία ρυθμίζουν την κατάσταση ενεργοποίησης/απενεργοποίησης των μικρών G-πρωτεϊνών είναι τριών ειδών, οι GEFs, οι GAPs και οι GDIs.

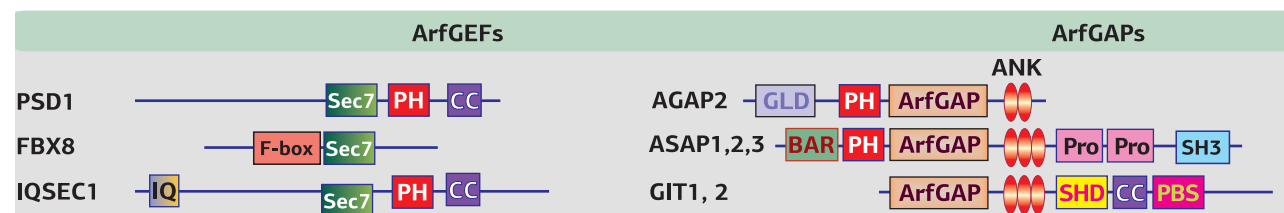
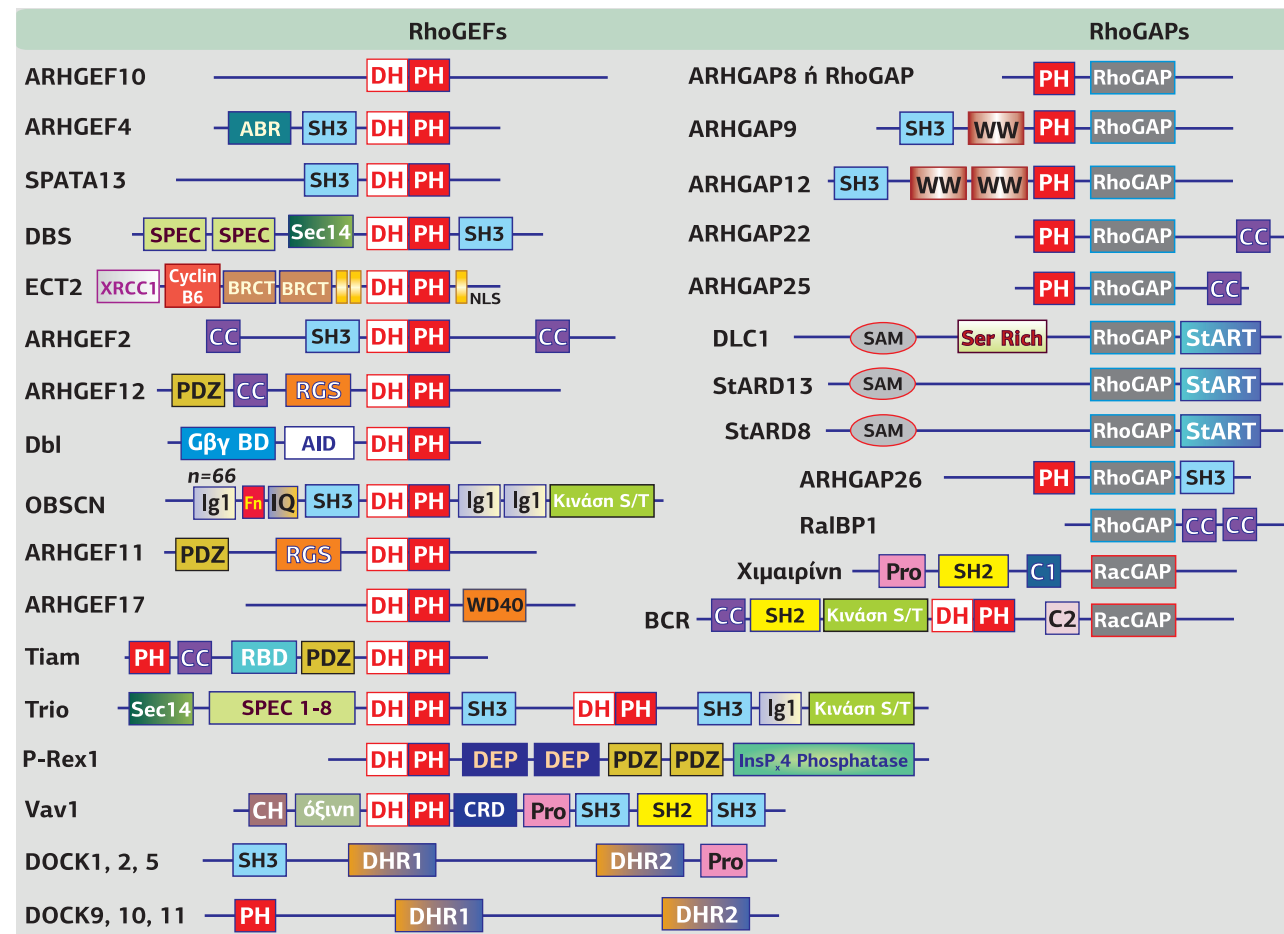
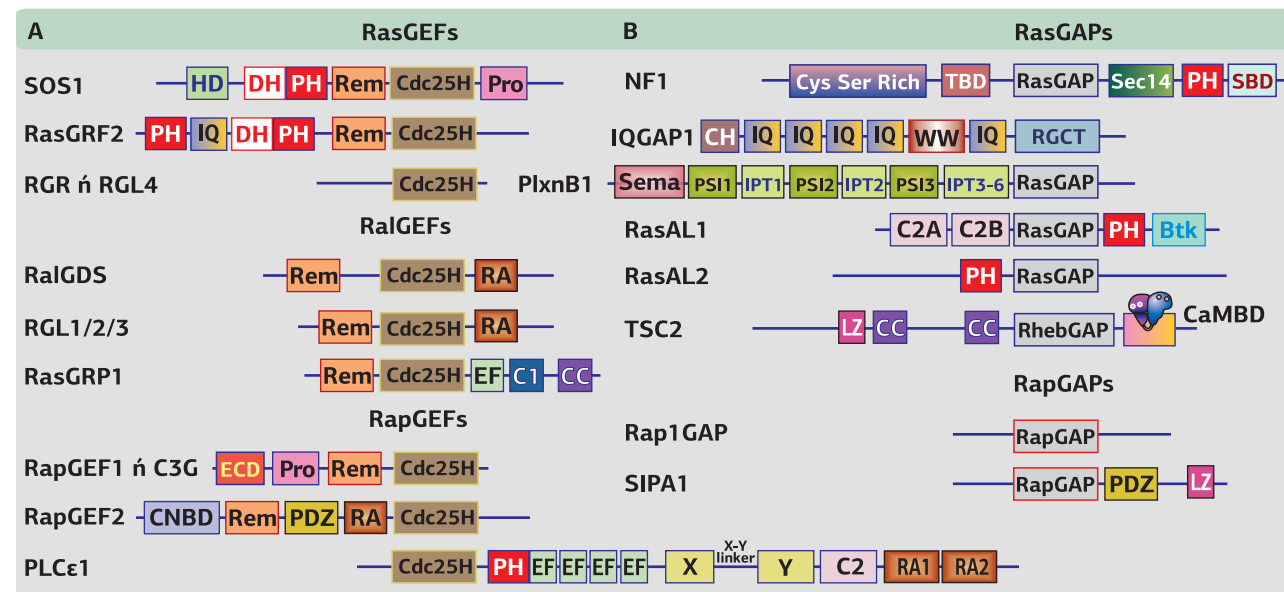
Οι **GEFs** (Guanine nucleotide Exchange Factors) διευκολύνουν την ανταλλαγή του GDP από το GTP, την απομάκρυνση δηλ. του GDP από την G-πρωτεΐνη και τη δέσμευση στη θέση, του GTP. Οι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές των πρωτεϊνών Ras και διαδραματίζουν έναν ουσιαστικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Η απώλεια δραστηριότητάς τους λόγω μετάλλαξης έχει την ίδια επίδραση που έχει η απώλεια ολόκληρου του γονιδίου *ras* στους κατώτερους οργανισμούς.



**Εικόνα 8.44**  
Φυλογενετικό δέντρο της ανθρώπινης υπερικογένειας των GTPασών Ras. Με μωβ διακρίνεται η οικογένεια Ras, με πράσινο η Rho, με κόκκινο η Rab, με σιέλ η Arf και με κίτρινο σκούρο η Ran. Τα μη ταξινομημένα μέλη διακρίνονται με κίτρινο ανοιχτό. [153] [194]

Οι GEFs εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τις μικρές GTPάσες: στο ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζονται 9 GEFs για την οικογένεια Ras, 83 GEFs για τις 22 GTPάσες της οικογένειας Rho, 6 για την οικογένεια Rab, 16 για την οικογένεια Arf και ένας GEF για τη μία Ran. Οι GEFs είναι πρωτεΐνες πολλαπλών περιοχών και η ρύθμιση της δραστηριότητάς τους λαμβάνει χώρα μέσω μιας ποικιλίας στρατηγικών, μεταξύ των οποίων αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, σύνδεση λιπιδίων, αλληλεπιδράσεις με δεύτερους διαβιβαστές (cAMP, DAG, Ca<sup>2+</sup>) και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση.

Οι GEFs που ρυθμίζουν τα μέλη της οικογένειας Ras περιέχουν μια καταλυτική περιοχή ομόλογη του Cdc25 (Cdc25-HD), η οποία συνδυάζεται με ένα μοτίβο Rem (Ras exchange motif). Από τους 83 GEFs, που ρυθμίζουν τα μέλη της οικογένειας Rho, οι 70 περιέχουν μια καταλυτική περιοχή DH (Dbl Homology) που ακολουθείται από την περιοχή PH (Pleckstrin Homology), ενώ εξαίρεση αποτελούν οι 13 DOCKS (Dedicator Of Cytokinesis), οι οποίοι αντί για DH/PH περιέχουν ως καταλυτική περιοχή την DHR2 (DOCK Homology Region 2). Οι GEFs για τα μέλη της οικογένειας Arf περιέχουν μια περιοχή Sec7, η πρωτεΐνη β-προπέλας RCC1 λειτουργεί ως GEF



για τη Rap, ενώ δεν υπάρχουν σαφή μοτίβα που να χαρακτηρίζουν τις πρωτεΐνες RabGEFs. Επιπλέον, ο κάθε μεμονωμένος GEF έχει ένα ορισμένο προφίλ, εξειδικευμένο για μεμονωμένα μέλη μιας οικογένειας. Σε γενικές γραμμές, δεν υπάρχει διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των μελών των διαφόρων GEFs.

Στην **Εικόνα 8.45A** διακρίνονται χαρακτηριστικοί GEFs και η ποικιλία περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχουν. Χαρακτηριστικό είναι, επίσης, τα πολλά διαφορετικά ονόματα που προήλθαν από τις ανεξάρτητες ανακαλύψεις των πρωτεϊνών αυτών.

**RasGEFs:** ο SOS1 (Son Of Sevenless homologue 1), ο οποίος εκτός από την καταλυτική περιοχή Cdc25-H που είναι εξειδικευμένη για τις Ras, περιέχει και την περιοχή DH/PH που εξειδικεύεται στις Rho, ο RasGRF2 (Ras protein-specific Guanine nucleotide-Releasing Factor 2) είναι ένας διπλής εξειδίκευσης Ras/Rac-GEF που εκφράζεται κυρίως στο ΚΝΣ και περιέχει μια περιοχή IQ, μέσω της οποίας ρυθμίζεται από το Ca<sup>2+</sup>, ο RasGRP1 (Ras Guanyl Releasing Protein 1) μέσω μιας περιοχής C1 ενεργοποιείται από την DAG (βλ. **Εικόνα 9.32**), και ο RGR (Ral-GDS-Related protein) είναι ένας διπλής εξειδίκευσης Ras/Ral-GEF.

**RalGEFs:** οι RGL1-3 (Ral Guanine nucleotide dissociation stimulator-Like 1) και ο RalGDS (Ral Guanine nucleotide Dissociation Stimulator) περιέχουν μια περιοχή RA (Ras Association ή RalGDS/AF-6 Association) μέσω της οποίας ενεργοποιούνται από τη Ras-GTP.

**RapGEFs:** ο RapGEF1 ή C3G (Crk SH3 domain binding GEF), ο πρώτος RapGEF που ανακαλύφθηκε, συνδέεται στην SH3 περιοχή της πρωτεΐνης προσαρμογής Crk και έχει εξειδίκευση στην Rap1, ο RapGEF2 ή PDZ-GEF1 εκτός από την περιοχή PDZ περιέχει και μια περιοχή CNBD σύνδεσης κυκλικών νουκλεοτιδίων (cAMP/cGMP), από τα οποία και ενεργοποιείται, ο RapGEF3 και ο RapGEF4 περιέχουν μία ή δύο περιοχές σύνδεσης του cAMP, οι RasGRP1 (Ras Guanyl Releasing Protein 1) και RasGRP2 ή CalDAG-GEF1 (Calcium and DAG regulated) περιέχουν μια περιοχή C1, μέσω της οποίας συνδέονται και ενεργοποιούνται από την DAG (ο GRP2 έχει εξειδίκευση στις Raps, σε αντίθεση με τον RasGRP1 που ενεργοποιεί τις Ras), και η φωσφολιπάση PLCε, είναι ένας άτυπος RapGEF.

**RhoGEFs:** Ο Dbl (Diffuse B-cell lymphoma) εκτός από τη χαρακτηριστική DH/PH περιοχή περιέχει στο NH<sub>2</sub>-τελικό του άκρο μια περιοχή σύνδεσης για τις Gβγ-υπομονάδες και μια περιοχή αυτοαναστολής, η οποία σε κατάσταση ηρεμίας συνδέεται με την PH περιοχή. Ο Trio (Triple functional domain protein) περιέχει δύο περιοχές DH/PH και εμφανίζει δράση κινάσης Ser/Thr, όπως και ο OBSCN (Obscurin). Ο P-Rex (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor) συνδέει στην DH περιοχή του τις Gβγ-υπομονάδες και ενεργοποιείται από GPCRs, καθώς επίσης διαθέτει και δράση φωσφατάσης φωσφοϊνο-

**Εικόνα 8.45**

Ποικιλία GEFs και GAPs, εξειδικευμένων για κάθε οικογένεια μικρών GTPασών. Στην εικόνα αυτή γίνεται εμφανής η πολυπλοκότητα των περιοχών που εμφανίζουν οι GEFs και οι GAPs, καθώς εκτός από τις κοινές καταλυτικές τους περιοχές, περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία περιοχών, χαρακτηριστική για κάθε μεμονωμένη GTPάση με την οποία αλληλεπιδρούν. Αυτή η ποικιλομορφία είναι ιδιαίτερα εμφανής στις RhoGEFs και στις RhoGAPs. Οι περιοχές αυτές συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (περιοχές SH2 και SH3), πρωτεΐνης-λιπιδίων, σύνδεσης δεύτερων διαβιβαστών και αποτελούν θέσεις φωσφορλίωσης. Ορισμένες περιέχουν επιπλέον καταλυτικές περιοχές, όπως για παράδειγμα ορισμένοι RasGEFs περιέχουν έναν συνδυασμό DH/PH περιοχών, που μπορούν να ενεργοποιήσουν τις Rho GTPάσες. Επίσης, οι GEFs και οι GAPs έχουν περιοχές με λειτουργίες ανεξάρτητες των GEFs ή GAP και ρυθμίζονται από μηχανισμούς ανεξάρτητους των GTPασών.

Χαρακτηριστικές περιοχές αλληλεπίδρασης είναι οι: **ABR** (Adenomatous polyposis coli (APC)-Binding Region), **AID** (Auto-Inhibition Domain), **ANK** (επαναλήψεις αγκυρίνης), **BAR** (Bin1/Amphiphysin/Rvs167 domain), **BRCT** (BRCA1 C-Terminus domain), **Btk** (Bruton's tyrosine Kinase motif), **CC** (Coiled-Coil domain), **Cdc25-H** (Cell division cycle 25 Homology domain), **CH** (Calponin Homology domain), **CRD** (Cysteine-Rich Domain), **DEP** (Domain found in Dishevelled, Egl-10 και Pleckstrin), **DHR** (DOCK Homology Region), **DOCK** (Dedicator Of Cytokinesis), **ECD** (Extracellular Cadherin Domain), **HD** (Histone-like Domain), **Ig** (Immunoglobulin domain), **IQ** calmodulin-binding motif (από τα δύο πρώτα αμινοξέα του μοτίβου I: isoleucine, Q: glutamine), **IPT** (Ig-like, Plexins, Transcription factors), **GLD** (GTP-binding protein-Like Domain), **PBS** (Paxillin Binding Domain), **Pro** (Proline-rich domain), **PSI** (Plexins/ Semaphorins/ Integrins), **RA** (Ras Binding Domain), **RBD** (Ras Binding Domain), **Rem** (Ras exchanger motif), **RGCT** (RasGAP C-terminus unique to IQGAPs), **RGS** (Regulator of G protein Signalling domain), **SAM** (Sterile Alpha Motif), **SBD** (Syndecan Binding Domain), **Sema** (structural domain of Semaphorins), **SHD** (Spa-Homology Domain), **SPEC** (Spectrin repeats), **START** (STAR-related lipid Transfer domain), **TBD** (Tubulin-Binding Domain). [107] [198]

Η **IQ** (από I: Isoleucine και Q: Glutamine, τα πρώτα αμινοξέα του μοτίβου) είναι μια χαρακτηριστική περιοχή σύνδεσης της καλμοδουλίνης.



Το **BRCT** (Breast cancer gene 1, Carboxy-Terminal) είναι ένα μοτίβο που ανακαλύφθηκε στην πρωτεΐνη των ζυμομυκήτων Rad4/Cut5, η οποία απαιτείται για την είσοδο στη φάση S και την αναστολή εισόδου στη φάση M, πριν να ολοκληρωθεί ο διπλασιασμός του DNA. Έκτοτε, το μοτίβο αυτό βρέθηκε καλά συντηρημένο σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στον έλεγχο της προώθησης του κυτταρικού κύκλου.

σιτιδίων, ο Tiam1 (T cell lymphoma invasion and metastasis 1) περιέχει μια περιοχή RBD, μέσω της οποίας συνδέεται στις Ras και ενεργοποιείται από αυτές, ο Vav1 (πήρε το όνομά του από το έκτο γράμμα του εβραϊκού αλφαβήτου) περιέχει μια όξινη περιοχή στην οποία βρίσκονται κατάλοιπα Tyr που φωσφορυλιώνονται από τη Src συμβάλλοντας στην ενεργοποίηση του GEF, ο ECT2 (Epithelial Cell Transforming sequence 2) ή ARHGEF3 περιέχει μια περιοχή ομόλογη της XRCC1, που συμβάλλει στην επιδιόρθωση κατεστραμμένου DNA, μια περιοχή ομόλογη με την κυκλίνη B6, η οποία προωθεί τη μετάβαση από την G1 στην S και δύο περιοχές BRCT με ρόλο αυτοαναστολής που δεν έχουν βρεθεί σε κανέναν άλλο GEF. Ο ARHGEF4 ή ASEF (APC-Stimulated GEF) περιέχει μια περιοχή ABR, μέσω της οποίας ενεργοποιείται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη APC (Adenomatous Polyposis Coli), στη συνέχεια, το σύμπλοκο APC-ARHGEF4 συμμετέχει στη μετακίνηση του κυττάρου, καθώς και στην κυτταρική προσκόλληση μέσω E-καδερίνης. Ο ARHGEF8 ή Net1 (Neuroepithelial cell transforming 1), ο ARHGEF12 ή LARG (Leukemia-Associated RhoGEF) και ο ARHGEF11 περιέχουν RGS περιοχές μέσω των οποίων ρυθμίζουν τις ετεροτριμερείς Gαβγ-πρωτεΐνες. Τέλος, οι DOCKs (Dedicator of Cytokinesis) περιέχουν μια καταλυτική περιοχή DHR2 (DOCK Homology Region 2) και μια περιοχή σύνδεσης στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης DHR1. Ο DBS (Dbl's big Sister) περιέχει μια περιοχή Sec14, η οποία στοχοποιεί την πρωτεΐνη σε ενδοσώματα που εκβλαστάνουν από το Golgi, δύο επαναλήψεις σπεκτρίνης (SPEC) που αλληλεπιδρούν με τα PIP<sub>2</sub> της μεμβράνης και, τέλος, μια SH3 περιοχή.

**ArfGEFs:** οι PSD1 (Pleckstrin and Sec7 Domain containing), FBX8 (F-box protein 8) και IQSEC1 (IQ motif and Sec7 domain 1) περιέχουν εκτός της καταλυτικής περιοχής Sec7 και περιοχές αλληλεπίδρασης με φωσφολιπίδια, όπως η PH, αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, όπως η coiled-coil, και F-box, η οποία προσδίδει δράση λιγάσης της ουβικουτίνης.

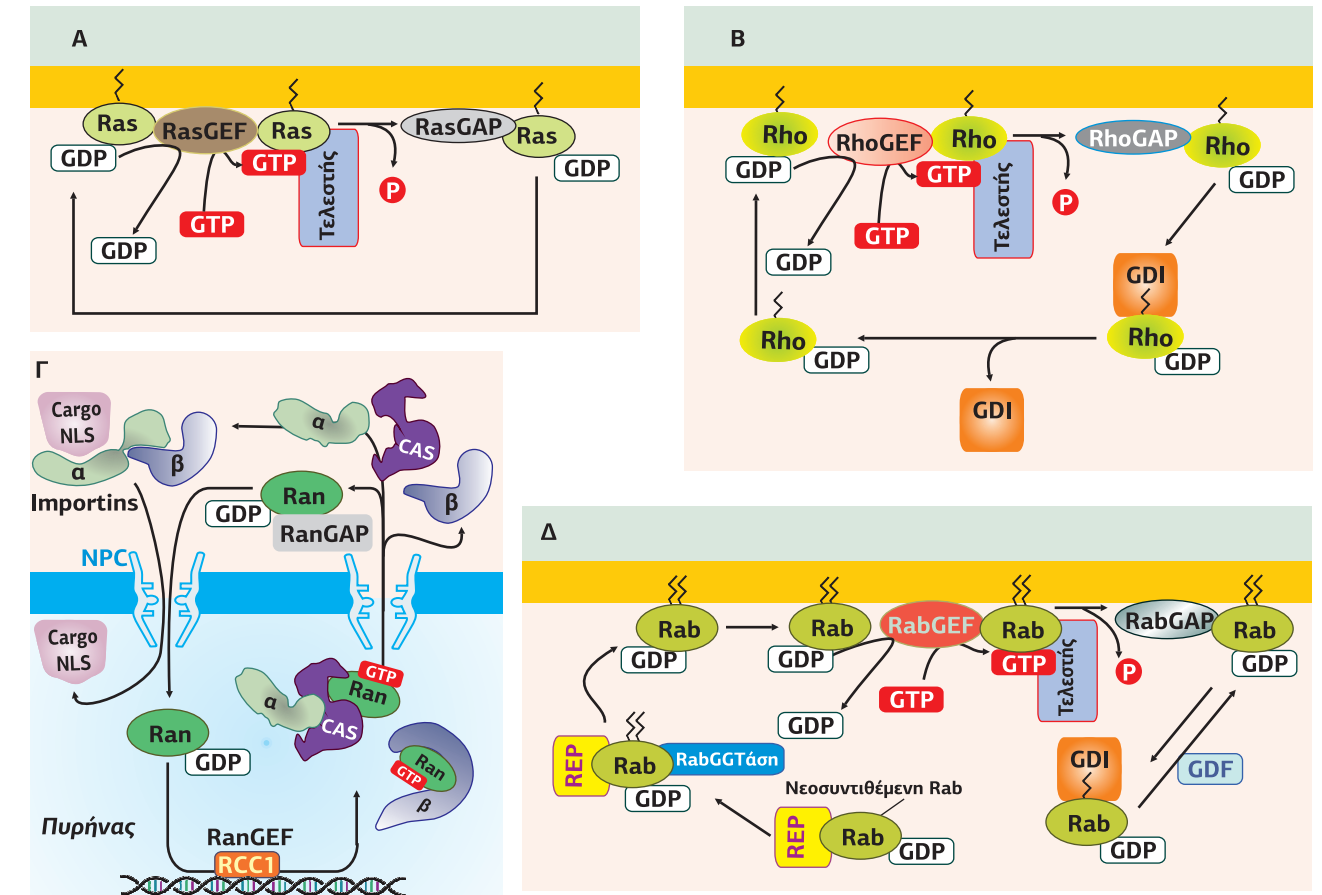
Οι **GAPs** (GTPase-Activating Proteins) αυξάνουν τον ρυθμό υδρόλυσης του GTP, καθώς οι πρωτεΐνες Ras είναι πολύ ανεπαρκή ένζυμα. Εκτός από το γεγονός ότι το σύμπλοκο Ras-GDP είναι πολύ σταθερό και διαχωρίζεται πολύ αργά, οι Ras υδρολύουν το GTP με πολύ χαμηλό ρυθμό. Οι σταθερές ταχύτητας και των δύο διαδικασιών είναι της τάξεως 10<sup>-4</sup> sec<sup>-1</sup>. Κάτω από την επίδραση των GAPs το ποσοστό υδρόλυσης GTP μπορεί να αυξηθεί έως 10<sup>5</sup> φορές. Οι πρωτεΐνες GAPs λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των πρωτεϊνών Ras, καθώς μειώνουν δραστικά τη διάρκεια ζωής της ενεργούς Ras-GTP διαμόρφωσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σηματοδοτική λειτουργία της πρωτεΐνης. Μόνο στην GTP μορφή μπορεί το σήμα να διαβιβαστεί στον τελεστή που ακολουθεί. Ένας χαμηλός ρυθμός υδρόλυσης του GTP και, συνεπώς, μια χρονικά εκτενέστερη ύπαρξη της ενεργούς GTP μορφής συσχετίζεται με μια υψηλή ένταση στη μεταγωγή σήματος. Η μείωση του χρονικού περιθωρίου λόγω της δράσης των GAPs οδηγεί σε αποδυναμωμένη μεταγωγή σιμάτων (βλ. σσ. 23-24).

Υπάρχουν διαφορετικές GAPs για κάθε οικογένεια Ras. Για παράδειγμα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζονται τουλάχιστον 70 διαφορετικές GAPs με εξειδίκευση για την οικογένεια Rho/Rac, 15 για την οικογένεια Ras, 38 για την οικογένεια Rab, 31 για την οικογένεια Arf και μία για τη Ran (Εικόνα 8.45B).

**RasGAPs:** Η NF1 (neurofibromin) περιέχει μια περιοχή Sec14 που την προσανατολίζει σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια. Οι IQGAPs περιέχουν μια μοναδική περιοχή RasGAP, την RGCT (RasGAP C-terminus unique to IQGAPs), με ένα επιπλέον αμινοξύ σε μια θέση κλειδί και δεν εμφανίζουν RasGAP δραστηριότητα, αλλά παρόλα αυτά επηρεάζουν τη σηματοδότηση Ras πιθανώς δρώντας ως πρωτεΐνες σκαλωσιάς. Ωστόσο, παρότι περιέχουν καταλυτική περιοχή όμοια των RasGAP, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Rho και τον κυτταροσκελετό ακτίνης. Επιπλέον, περιέχουν 4 περιοχές σύνδεσης καλμοδουλίνης, IQ. Η P1xnb1 ανήκει στις πλεξίνες (Plexins, plexins), οι οποίες εκτός από ρόλο RasGAP είναι και διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τις semaphorins και χαρακτηρίζονται από μια NH<sub>2</sub>-περιοχή sema, που ακολουθείται από έναν συνδυασμό τριών πλούσιων σε Cys περιοχών PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin) και 6 περιοχών IPT domains (Ig domain shared by plexins and transcription factors). Η RasAL1 (Ras-

GTPase-Activating-Like protein) περιέχει στο NH<sub>2</sub>-άκρο δύο C2 περιοχές (C2A and C2B), που επιτρέπουν τη σύνδεση στη μεμβράνη σε αυξημένες συγκεντρώσεις Ca<sup>2+</sup>, και μια PH που ακολουθείται από ένα μοτίβο Btk (Bruton's tyrosine kinase).

**RhoGAPs:** Η BCR (Breakpoint Cluster Region) είναι μια πολύ χαρακτηριστική GAP, καθώς περιέχει δύο αντίθετες καταλυτικές δραστηριότητες: εκτός από την καταλυτική περιοχή RacGAP, περιέχει και μια καταλυτική περιοχή RhoGEF (DH/PH) και, επιπλέον, μια περιοχή κινάσης Ser/Thr και μια περιοχή ολιγομερισμού. Η DLC1 (Deleted in Liver Cancer 1) περιέχει 4 λειτουργικές περιοχές, μια περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης SAM (Sterile a Motif), μια περιοχή SR (Serine-



Εικόνα 8.46

**Ρύθμιση του κύκλου GDP/GTP στις μικρές GTPάσες από τις πρωτεΐνες GEFs, GAPs και GDIs.** Α. Ο κύκλος της GTPάσης Ras. Η ανεργή Ras βρίσκεται στη μεμβράνη συνδεδεμένη με το GDP. Η ενεργοποίηση της Ras μεσολαβείται από έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίου γουανίνης (RasGEF). Η απομάκρυνση του GDP και η σύνδεση του GTP επιτρέπει την αλληλεπίδραση της Ras-GTP με τους τελεστές. Για να "απενεργοποιηθεί" ο κύκλος, μια πρωτεΐνη ενεργοποίησης της GTPάσης (RasGAP) επιταχύνει την εγγενή δραστηριότητα GTPάσης της Ras, επιτρέποντας στη Ras να επιστρέψει στην ανεργή της κατάσταση. Οι G-πρωτεΐνες Arf έχουν τον ίδιο κύκλο ενεργοποίησης. Β. Ο κύκλος GDP/GTP της GTPάσης Rho είναι παρόμοιος με τον κύκλο των Ras πρωτεϊνών, αλλά περιλαμβάνει έναν νέο ρυθμιστικό μηχανισμό, τον αναστολέα αποσύνδεσης των νουκλεοτιδίων γουανίνης (GDI). Ο GDI συνδέεται εξειδικευμένα με την Rho-GDP, παρατείνοντας την ανεργή διαμόρφωση και την απόσυρση της GTPάσης στο κυτταρόπλασμα. Γ. Η G-πρωτεΐνη Ran είναι ένας ρυθμιστής της εξαγωγής πρωτεϊνικών φορτίων από τον πυρήνα. Η ενεργοποίηση του κύκλου της Ran πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Η πυρηνική Ran διατηρείται στην GTP-δεσμευμένη κατάσταση, καθώς η RanGAP βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ο RanGEF RCC1 στον πυρήνα. Η Ran είναι η μόνη μικρή GTPάση χωρίς μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Δ. Οι πρωτεΐνες Rab περιέχουν στο COOH-τελικό τους άκρο ένα σήμα πρενυλίωσης. Η πρωτεΐνη συνοδός της Rab (REP, Rab Escort Protein) αλληλεπιδρά με τις νεοσυντιθέμενες Rab και επιτρέπει στη γερανυλγερανυλο-μεταφορά της Rab (RabGGT) να προσθέσει δύο ομάδες γερανυλγερανυλο-λιπιδίων στο COOH-τελικό άκρο της Rab. Για τη σύνδεση, όμως, της Rab στη μεμβράνη πρέπει να απομακρυνθεί ο GDI, διαδικασία που διαμεσολαβείται από τον GDF (GDI Dissociation Factor), έναν παράγοντα απομάκρυνσης του GDI. Η ενεργοποίηση της Rab ακολουθεί τον πρωτότυπο κύκλο GDP/GTP των πρωτεϊνών Rho. [107]

Rich), που συνδέεται σε θέσεις εστιακής προσκόλλησης, μια RhoGAP και μια StART (Steroidogenic Acute Regulatory protein related lipid-Transfer), η οποία αλληλεπιδρά με την PLCδ1 και την ενεργοποιεί. Ομοίως με την DLC1, οι StARD13 και 8 (StAR-related lipid transfer Domain containing 13/8), περιέχουν, επίσης, μια SAM και μια StART περιοχή.

Οι **GDI**s (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) είναι αρνητικοί ρυθμιστές, οι οποίοι εμποδίζουν την απομάκρυνση του GDP από την ανενεργή μορφή της G-πρωτεΐνης και, κατά συνέπεια, εμποδίζουν τη σύνδεση του GTP. Οι GDIs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και συνδέονται στην πρενυλιωμένη COOH-τελική περιοχή των πρωτεϊνών Rho και Rab, μέσω της οποίας οι Rho/Rab βρίσκονται συνδεδεμένες στη μεμβράνη. Με τη σύνδεσή τους στο πρενυλιωμένο COOH-τελικό άκρο, οι GDIs είναι σε θέση να απομακρύνουν τις GDP-συνδεδεμένες Rho/Rab από τη μεμβράνη και να τις κρατούν ανενεργές στο κυτταρόπλασμα, προστατεύοντας την υδρόφοβη λιπιδική τους ουρά από το υδατικό περιβάλλον. Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι GDIs μπορούν να αποτρέψουν τον πρόωρο διαχωρισμό του συνδεδεμένου GDP, καθώς και την πρόωρη ανταλλαγή νουκλεοτιδίου κατά τη διάρκεια της ενδοκυτταρικής μεταφοράς των GTPασών.

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rho ελέγχονται από τον **RhoGDI**, ενώ οι πρωτεΐνες Rab από τον **RabGDI**.

### 3.3 Δομή και βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών Ras

Οι πρωτεΐνες Ras είναι μονομερείς GTPάσες περίπου 188 αμινοξέων και 21 kDa. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο τα πρώτα 164 αμινοξέα είναι κοινά για όλες τις Ras και δημιουργούν τη G-περιοχή, ενώ τα αμινοξέα 165-185 στο COOH-τελικό άκρο διαφέρουν μεταξύ των Ras και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως ετερογενής υπερμεταβλητή περιοχή HVD (Hypervariable Domain).

#### Η COOH-τελική υπερμεταβλητή περιοχή (HVD)

Η περιοχή HVD των πρωτεϊνών των οικογενειών **Ras** και **Rho** καταλήγει συνήθως σε ένα μοτίβο -CAAX (C: κυστεΐνη, A: αλειφατικό αμινοξύ, X: οποιοδήποτε αμινοξύ), που σηματοδοτεί για την προσθήκη φαρνεσουλίου ή γερανυλγερανουλίου στο κατάλοιπο κυστεΐνης, για την πρωτεολυτική απομάκρυνση των καταλοίπων AAX και την καρβοξυμεθυλίωση της πρενυλιωμένης κυστεΐνης. Οι πρωτεΐνες **Rab** περιέχουν, επίσης, μια COOH-τελική περιοχή HVD, η οποία όμως τροποποιείται με προσθήκη γερανυλγερανουλίου, με κάποια μοτίβα να υφίστανται καρβοξυμεθυλίωση. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μικρές GTPάσες, οι πρωτεΐνες **Arf** χαρακτηρίζονται από μια NH<sub>2</sub>-τελική επέκταση που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη, με κάποιες να υφίστανται ταυτόχρονη μετα-μεταφραστική τροποποίηση με προσθήκη ενός μυριστικού λιπαρού οξέος. Η **Ran** δεν είναι τροποποιημένη με κάποιο λιπίδιο, αλλά περιέχει μία COOH-τελική επέκταση, που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της (Εικόνα 8.47A).

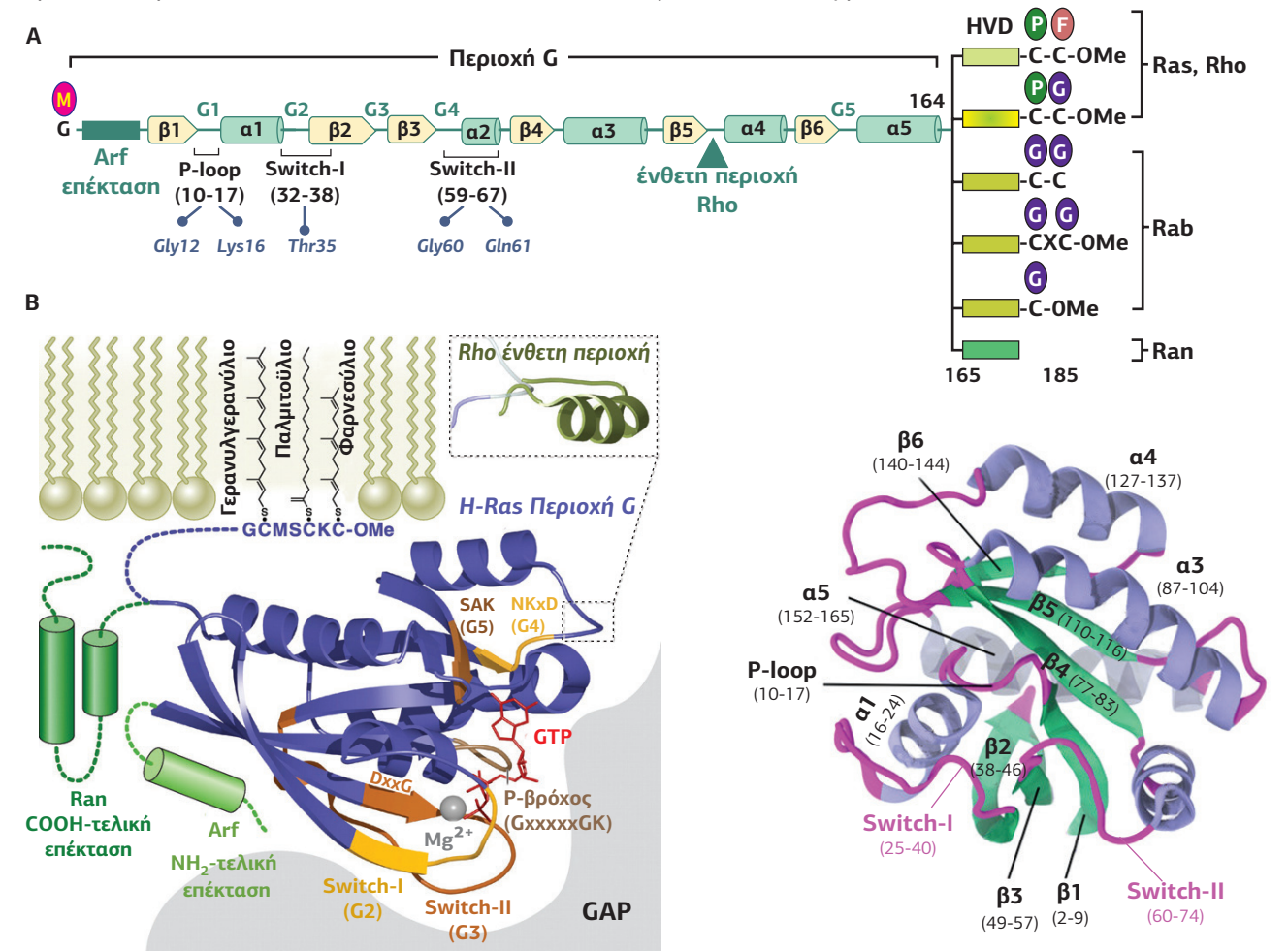
#### Η δομή της NH<sub>2</sub>-τελικής G-περιοχής

Η NH<sub>2</sub>-τελική κοινή περιοχή για όλες τις Ras ονομάζεται **G-περιοχή** (στη Ras τα αμινοξέα 5-166). Συναντάται μόνο στην οικογένεια των G-πρωτεϊνών (μικρών και ετεροτριμερών στη Gα-υπομονάδα) και τις διαχωρίζει από άλλα ένζυμα που υδρολύουν το GTP, όπως η β-σωληνίνη και η καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού. Είναι μία από τις πιο αρχαίες πρωτεϊνικές περιοχές και συναντάται σε όλα τα βασίλεια, ξεκινώντας από τον προκαρυωτικό παράγοντα της μεταγραφής στα ριβοσώματα, τον EF-Tu (Elongation Factor Thermo unstable).

Η G-περιοχή είναι μια σφαιρική περιοχή που αποτελεί το κέντρο της βιοχημικής δραστηριότητας των μικρών GTPασών, καθώς εμπλέκεται στη σύνδεση και στην

υδρόλυση του GTP. Αποτελείται από ένα κεντρικό β-πτυχωτό φύλλο έξι κλώνων (β1-β6) που περιβάλλεται από πέντε α-έλικες (α1-α5). Δομικά, η οικογένεια των πρωτεϊνών Rho διακρίνεται από την οικογένεια Ras λόγω της ύπαρξης μιας επιπλέον περιοχής 10-15 αμινοξέων μεταξύ της α3-έλικας και του β5-κλώνου. Η λειτουργία αυτής της ένθετης περιοχής παραμένει να διευκρινιστεί.

Οι β-κλώνοι και οι α-έλικες συνδέονται μεταξύ τους με βρόχους, πέντε από τους οποίους (G1-G5) περιέχουν καλά συντηρημένα μοτίβα σύνδεσης του GDP/GTP. Ξεκινώντας από το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο διακρίνουμε τους G1: GxGGxGKS/T, G2: xxxTx, G3: DxxGQ/H/T, G4: T/NKxD και G5: C/SAK/L/T. Τα μοτίβα αυτά παρουσιάζονται, επίσης, στους παράγοντες επιμήκυνσης και στις α-υπομονάδες των ετεροτριμερών Gαβγ πρωτεϊνών. Οι πέντε αυτοί βρόχοι συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και στη σύνδεση του νουκλεοτιδίου γουανίνης. Οι G-βρόχοι



Εικόνα 8.47

**Η δομή των πρωτεϊνών της υπεροικογένειας Ras.** Α. Οι πρωτεΐνες Ras αποτελούνται από περίπου 188 αμινοξέα. Η περιοχή των πρώτων 164 αμινοξέων του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου ονομάζεται G-περιοχή, εμπλέκεται στη σύνδεση και στην υδρόλυση του GTP, και είναι καλά διατηρημένη σε όλες τις Ras, ενώ η περιοχή 165-185 στο COOH-τελικό άκρο ποικίλλει μεταξύ των Ras και γι' αυτό και ονομάζεται ετερογενής περιοχή (HVD). Διακρίνονται οι α-έλικες και β-κλώνοι των β-πτυχωτών φύλλων, οι βρόχοι G1-G5 υπεύθυνοι για τη σύνδεση του GTP/GDP, οι περιοχές switch I και switch II, καθώς και η υπερμεταβλητή περιοχή (HVR). Η HVR είναι μεταβλητή λιπιδιωμένη και παρέχει τη λειτουργικά σημαντική άγκυρα στην πλασματική μεμβράνη. [198] Β. Κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης Ras σε σύμπλοκο με το GTP. Η εικόνα παρουσιάζει την κεντρική G-περιοχή με τους βρόχους G1-G5 και τις περιοχές switch που αλλάζουν διαμόρφωση ανάλογα με τη σύνδεση του νουκλεοτιδίου (GDP/GTP). Η θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου γουανίνης της G-περιοχής σχηματίζεται από τις εύκαμπτες περιοχές switch I/II, τον P-βρόχο και το μοτίβο NKxD. Το Mg<sup>2+</sup> αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες του νουκλεοτιδίου και παίρνει την κατάλληλη θέση έπειτα από αλληλεπίδραση με αμινοξέα των περιοχών switch I/II, του P-βρόχου και του μοτίβου DxxG. Η σύνδεση του δακτυλίου γουανίνης ενισχύεται περαιτέρω με άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις με την περιοχή G5. [104] [107]

περιέχουν, επίσης, δύο περιοχές διακόπτες (switch I και II, αμινοξέα 30-38 και 59-76, αντίστοιχα), οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση ανάλογα με την ταυτότητα του δεσμευμένου νουκλεοτιδίου γουανίνης (Εικόνα 8.47B). Πιο αναλυτικά:

Ο βρόχος **G1** (αμινοξέα 10-17), γνωστός και ως **P-βρόχος**, είναι ο βρόχος που ενώνει τον β1-κλώνο με την α1-έλικα και αναδιπλώνεται γύρω από τις φωσφορικές ομάδες του GDP/GTP. Η συναινετική αλληλουχία  $GxG^{12}GxGK^{16}(S/T)^{17}$  περιέχει τα αμινοξέα Gly12, Lys16 και Ser17, τα οποία έρχονται σε επαφή με την α- και β-φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου γουανίνης και με το  $Mg^{2+}$ . Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι πανταχού παρόντα στη βιοχημεία και συχνά εμφανίζονται σε σύμπλοκο με τα νουκλεοτίδια της γουανοσίνης ή της αδενοσίνης. Η **Gly12** αλλοιώνεται συχνά στις ογκογόνες μεταλλάξεις της πρωτεΐνης Ras και γι' αυτό χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη "hot spot". Επίσης, αν η Ser17 αντικατασταθεί για παράδειγμα με μια Asn17, μειώνεται η συγγένεια σύνδεσης του νουκλεοτιδίου και η Ras παραμένει ανενεργή.

Ο βρόχος **G2** (αμινοξέα 32-36) είναι γνωστός και ως **βρόχος τελεστής** "effector region" καθώς συμμετέχει στη σύνδεση των τελεστών, όταν είναι συνδεδεμένο το GTP. Ο G2 ενώνει την α1-έλικα με τον β2-κλώνο. Τμήμα του βρόχου G2 χαρακτηρίζεται ως περιοχή **switch I** (αμινοξέα 32-38), καθώς αλλάζει τη διαμόρφωσή της κατά την ανταλλαγή του GDP με GTP. Κύριο χαρακτηριστικό του G2 βρόχου και της περιοχής switch I είναι το συντηρημένο κατάλοιπο **Thr35**, το οποίο αφενός συνδέεται με το  $Mg^{2+}$  βοηθώντας στη σωστή τοποθέτηση του συμπλόκου  $GTP \cdot Mg^{2+}$  στο ενεργό κέντρο, και αφετέρου δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τη γ-φωσφορική ομάδα του GTP, αλλά και με το  $H_2O$ . Συνεπώς, παίζει κύριο ρόλο στην αλλαγή διαμόρφωσης της switch I μετά την υδρόλυση και την απομάκρυνση της 3ης φωσφορικής ομάδας του GTP, καθώς χάνονται οι δεσμοί ανάμεσα στη Thr35 στο  $Mg^{2+}$  και στην  $P_{\gamma}O_3^-$ .

Ο βρόχος **G3** (αμινοξέα 57-60) περιλαμβάνει το μοτίβο  $^{57}DxxG^{60}$  στο  $NH_2$ -τελικό άκρο της α2-έλικας, καθώς επίσης και την περιοχή "switch II" (αμινοξέα 59-67 σε H-Ras), η οποία εκτείνεται και στην α2-έλικα. Η switch II περιέχει την **Gly60**, συντηρημένη σε όλα τα μέλη της υπεροικογένειας Ras, η οποία -όπως και η Thr35- σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τη γ-φωσφορική ομάδα του GTP. Συνεπώς, είναι υπεύθυνη για την αλλαγή διαμόρφωσης της switch II μετά την υδρόλυση της 3ης φωσφορικής ομάδας του GTP. Η Gly60 συχνά εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τον τελεστή και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή νουκλεοτιδίων από τους GEFs. Περιέχει, επίσης, το ουσιαστικό για την κατάλυση κατάλοιπο **Gln61**, το οποίο επίσης δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τη γ-φωσφορική ομάδα του GTP, αλλά και με το  $H_2O$ .

Ο βρόχος **G4** (αμινοξέα 116-119) περιλαμβάνει το μοτίβο  $^{116}NKxD^{119}$  και ενώνει τον β5-κλώνο και την α4-έλικα. Ο ρόλος του είναι η αναγνώριση του δακτυλίου γουανίνης.

Ο βρόχος **G5** (αμινοξέα 145-147) ενώνει τον β6-κλώνο και την α5-έλικα, και ενισχύει τη θέση αναγνώρισης της γουανίνης.

### 3.4 Υδρόλυση του GTP: Μηχανισμός και επιτάχυνση από τις GAP

Η υδρόλυση του GTP πραγματοποιείται από μια "κατά μέτωπο" επίθεση του πυρηνόφιλου μορίου νερού στη γ-φωσφορική ομάδα. Στην GTP-διαμόρφωση της πρωτεΐνης Ras ένα μόριο  $H_2O$  βρίσκεται συνδεδεμένο, μέσω δύο δεσμών υδρογόνου, με την Thr35 της περιοχής switch I και την Gln61 της περιοχής switch II. Η θέση αυτή είναι πολύ ευνοϊκή θέση για την πυρηνόφιλη "προσβολή" του  $H_2O$  στη γ-φωσφορική ομάδα του GTP.

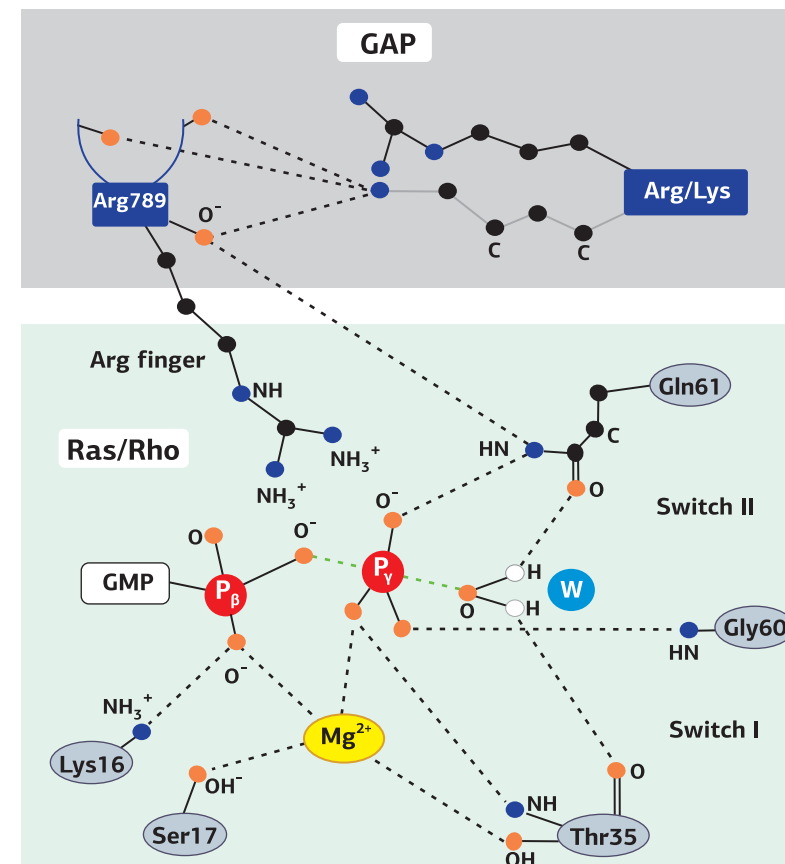
Η Gln61 της περιοχής switch II έχει μια κεντρική λειτουργία στην υδρόλυση του GTP, δεδομένου ότι βρίσκεται σε μια ιδανική θέση για την ακριβή ευθυγράμμιση του μορίου του νερού και για τη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης GTP. Ο βαθμός στον οποίο η Gln61 χρησιμεύει επίσης ως μια βάση, που αφαιρεί ένα πρωτόνιο από το μόριο του  $H_2O$  και το ενεργοποιεί, είναι ακόμη υπό

συζήτηση (Εικόνα 8.48). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός με αυξανόμενη αποδοχή υποθέτει ότι το αρνητικά φορτισμένο άτομο οξυγόνου της γ-φωσφορικής ομάδας εκτελεί τη λειτουργία μιας ενεργοποιημένης βάσης στον μηχανισμό GTPάσης. Το γεγονός ότι η θέση 61, έπειτα από τη θέση 12, είναι η δεύτερη συχνότερη περιοχή των ογκογόνων μεταλλάξεων στους στερεούς όγκους συμφωνεί με την κεντρική σημασία της Gln61 στην υδρόλυση του GTP. Η Gln61 είναι ένα ιδιαίτερα συντηρημένο αμινοξύ μέσα στην υπεροικογένεια των GTPασών. Ένα κατάλοιπο Gln σε μια ισοδύναμη θέση βρίσκεται, επίσης, στις α-υπομονάδες των ετεροτριμερών GTPασών. Εξαιρέσεις αποτελούν ο βακτηριακός παράγοντας επιμήκυνσης (EF-Tu) και η Rap GTPάση που έχουν την His και την Thr/Ile, αντίστοιχα, στην ισοδύναμη θέση με την Gln61.

#### Ο ρόλος των GAPs στην υδρόλυση του GTP

Η υδρόλυση του GTP που καταλύεται από τις Ras είναι  $10^5$  ταχύτερη από ό,τι στο  $H_2O$  (30 min αντί για 200 ημέρες ή 288.000 min). Ωστόσο, για να μεταδώσει τα αυξητικά σήματα, το κύτταρο απαιτεί μια επιπλέον  $10^5$  αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης του GTP (50 msec αντί για 30 min ή 1.800.000 msec). Αυτό γίνεται εφικτό με την ύπαρξη των GAPs. Η μοριακή βάση αυτής της διέγερσης εξηγήθηκε από τον καθορισμό της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου ενός τμήματος της p120-RasGAP και της Ras-GDP- $AlF_3$  τερματίζοντας μια μακροχρόνια συζήτηση σχετικά με τον μηχανισμό της ενεργοποίησης των GTPασών (Εικόνα 8.48).

Τα δομικά στοιχεία δείχνουν ότι η GAP συμμετέχει ενεργά στην κατάλυση συνεισφέροντας μια θετικά φορτισμένη Arg, η οποία σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση της υδρόλυσης του GTP. Η καλά διατηρημένη Arg789, η οποία βρίσκεται στην περιοχή γνωστή ως **finger loop** της πρωτεΐνης GAP, αλληλεπιδρά με το  $AlF_3$ , το οποίο παίρνει τη θέση της γ-φωσφορικής ομάδας του GTP. Η Arg789 εξουδετερώνει το φορτίο της γ-φωσφορικής ομάδας και βοηθά στη σταθεροποίηση του βρόχου G3 της Ras, ο οποίος είναι ένα μέρος της switch II περιοχής.

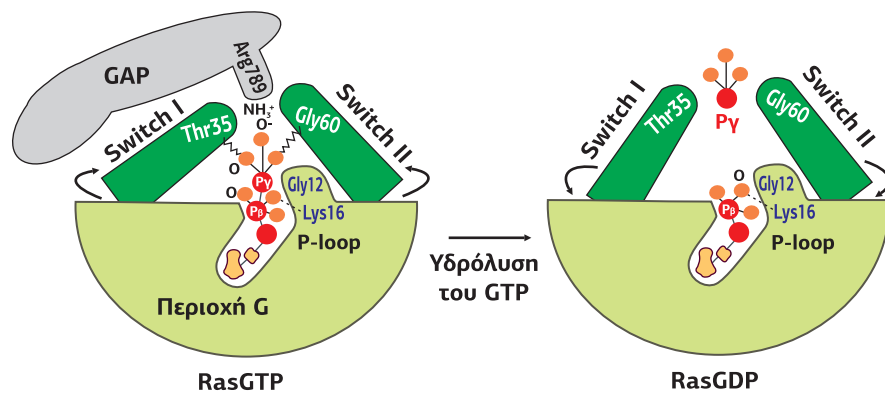


**Εικόνα 8.48**  
**Μηχανισμός υδρόλυσης του GTP από την πρωτεΐνη Ras και ο ρόλος της GAP.** Ένα μόριο  $H_2O$  προσβάλλει πυρηνόφιλα τη  $\gamma-PO_4$  του GTP. Η γ-φωσφορική ομάδα του GTP είναι συνδεδεμένη μέσω δεσμών υδρογόνου στην Thr35 (switch I), στη Gly60 (switch II) και στη Gln61 (switch II) και μέσω συντονισμού με το ιόν  $Mg^{2+}$ . Η GAP συμμετέχει ενεργά στην κατάλυση συνεισφέροντας τη θετικά φορτισμένη Arg789, η οποία βρίσκεται στην περιοχή γνωστή ως **finger loop** της πρωτεΐνης GAP. Η Arg789 αλληλεπιδρά με την  $\gamma-PO_4$  ομάδα του GTP σταθεροποιώντας τη μεταβατική κατάσταση της υδρόλυσης του GTP. [159]

**Ο ρόλος των περιοχών switch I και II**

Σύγκριση της δομής της ενεργούς Ras-GTP με την ανενεργή Ras-GDP δείχνει τις σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση των βρόχων, κυρίως την αλλαγή θέσης των περιοχών switch I και II. Οι δύο περιοχές switch περιέχουν αμινοξέα, όπως η Gly60 και η Thr35, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνδεση των νουκλεοτιδίων, αλλά επίσης και αμινοξέα (Glu62 και Asp57 στην περιοχή switch II) τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση των τελεστών των Ras. Ως συνέπεια της υδρόλυσης του GTP, με τη μεσολάβηση της GAP και την αλληλεπίδραση του δακτύλου Arg789, οι επαφές της Thr35 και Gly60 με τη γ-φωσφορική ομάδα και το Mg<sup>2+</sup> χάνονται και οι switch I και II υποβάλλονται σε έναν δραστικό επαναπροσανατολισμό (Εικόνα 8.49).

**Εικόνα 8.49**  
Σχηματικό διάγραμμα του μηχανισμού-διακόπτη όταν οι περιοχές switch I και II είναι συνδεδεμένες με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP μέσω των NH ομάδων των καταλοίπων Thr και Gly, μέσω ενός "μηχανισμού ελατήριου". Η απελευθέρωση της φωσφορικής ομάδας μετά την υδρόλυση του GTP επιτρέπει στις περιοχές switch να χαλαρώσουν υιοθετώντας μια διαφορετική διαμόρφωση. [18] [171] [28] [207]



**3.5 Εντοπισμός της πρωτεΐνης Ras στην πλασματική μεμβράνη**

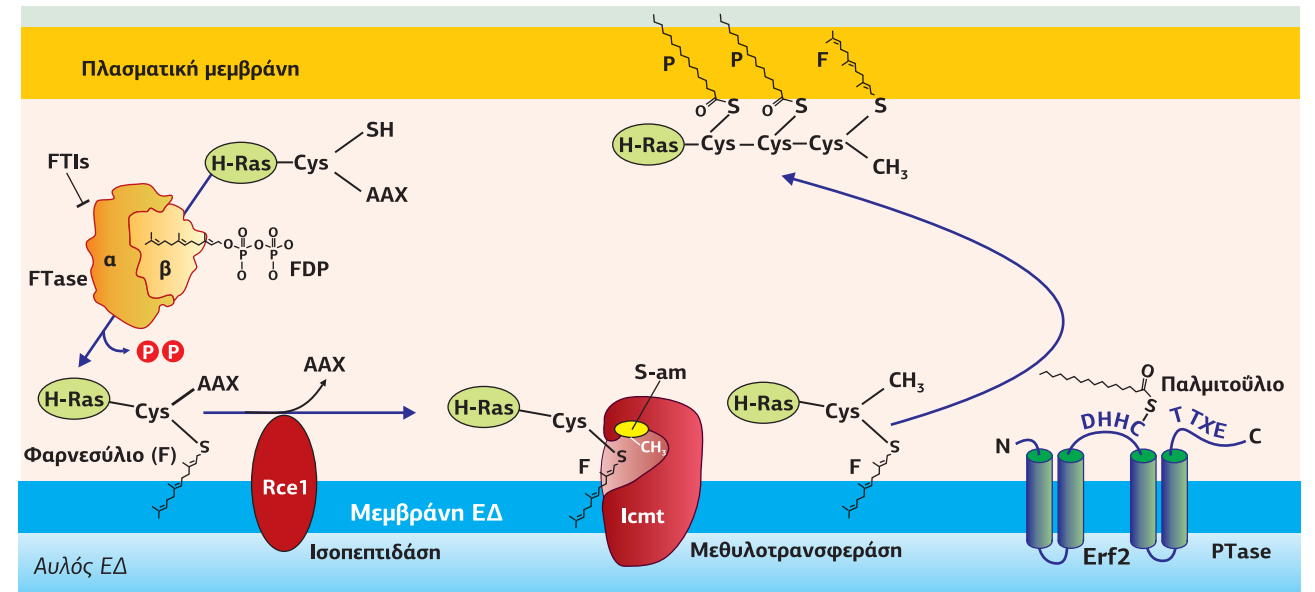
Η λειτουργία της πρωτεΐνης Ras στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος είναι ακώριστα συνδεδεμένη με τη θέση της στην πλασματική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες Ras αγκυροβολούν στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης με τη βοήθεια μιας άγκυρας λιπιδίων.

Αρχικά, στην ακολουθία CAAX του COOH-τελικού άκρου των πρωτεϊνών Ras λαμβάνει χώρα η φαρνεσυλίωση. Η φαρνεσυλομάδα (C15, 3 ισοπρενικές μονάδες) συνδέεται, με τη βοήθεια μιας φαρνεσυλοτρανσφεράσης (FTase), μέσω ενός θειοαιθερικού δεσμού στην Cys της ακολουθίας CAAX. Στη συνέχεια, τα τελευταία τρία αμινοξέα της CAAX αποκόπτονται από την ενδοπεπτιδάση Rce1 (Ras converting CAAX endopeptidase 1), η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ. Η καρβοξυλική ομάδα της φαρνεσυλωμένης Cys υποβάλλεται σε μια μεθυλοστεροποίηση με τη βοήθεια της διαμεμβρανικής μεθυλοτρανσφεράσης Icmt (Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase), η οποία χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα την S-am (S-adenosyl methionine). Και οι δύο αυτές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στη μεμβράνη του ΕΔ. Ένα επιπλέον σήμα είναι, όμως, απαραίτητο για την τοποθέτηση των Ras στην πλασματική μεμβράνη. Στην περίπτωση των N-Ras και H-Ras το σήμα είναι η μονο- (N-Ras) ή δι- (H-Ras) παλμιτοϋλίωση των κυστεϊνών, που βρίσκονται δίπλα στη φαρνεσυλιωμένη κυστεΐνη. Η αντίδραση παλμιτοϋλίωσης λαμβάνει χώρα και αυτή στη μεμβράνη του ΕΔ και καταλύεται από την παλμιτοϋλο-τρανσφεράση Erf2 (Εικόνα 8.50).

Στην περίπτωση της K-Ras το σήμα μετακίνησης προς την πλασματική μεμβράνη είναι μια πολυβασική θετικά φορτισμένη αλληλουχία εξαλουσίνης (KKKKKK), η οποία βρίσκεται δίπλα στη φαρνεσυλιωμένη κυστεΐνη και αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (Εικόνα 8.51).

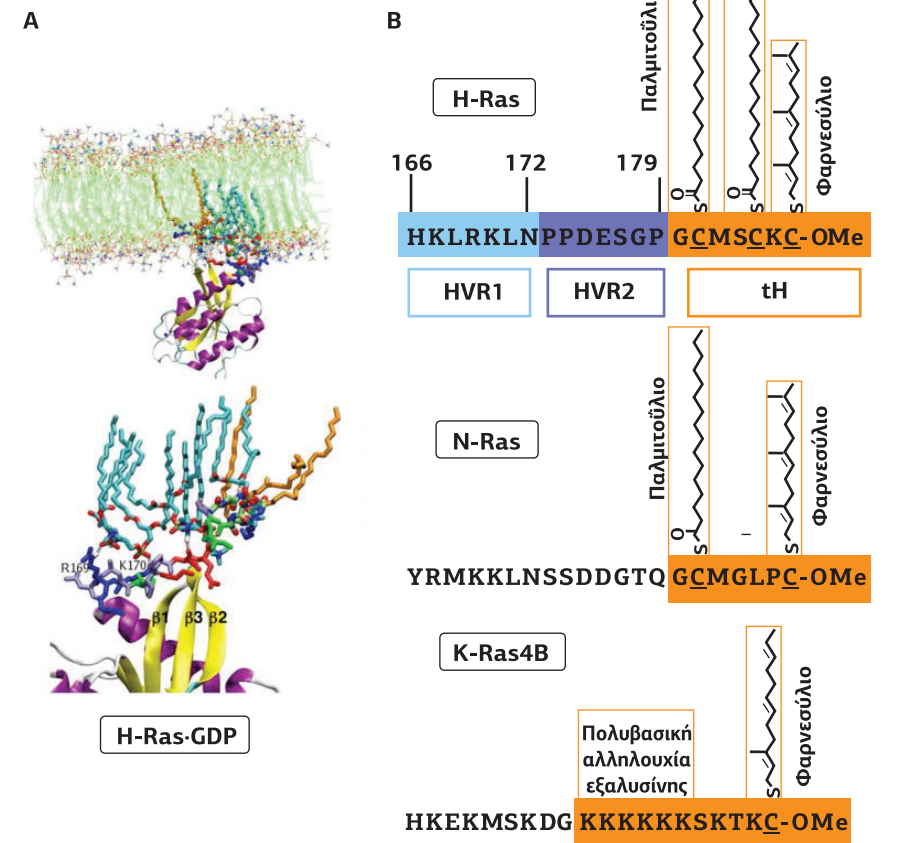
Οι διαφορετικές λιπιδιακές άγκυρες προσανατολίζουν τις διάφορες ισομορφές των Ras σε διακριτές "μικροπεριοχές" της πλασματικής μεμβράνης, γνωστές ως

**Αναστολείς της φαρνεσυλοτρανσφεράσης**, όπως η συμβαστατίνη ή η λοβαστατίνη, χρησιμοποιούνται για να καταστείλουν τη βιοσύνθεση της χοληστερόλης σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης. Αυτά τα φάρμακα αναστέλλουν τη μετατροπή του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο CoA σε μεβαλονικό. Αυτό είναι το βασικό βήμα στο μονοπάτι της δημιουργίας μονάδων ισοπρενίου, οι οποίες στη συνέχεια πολυμερίζονται για να σχηματίσουν το C10 γερανύλιο, το C15 φαρνεσούλιο, το C20 γερανυλγερανύλιο και το C30 σκουαλένιο. Το τελευταίο από αυτά είναι το πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση της χοληστερόλης. Αναστολείς της φαρνεσυλοτρανσφεράσης είναι πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες.



nanoclusters. Η τροποποίηση του COOH-τελικού άκρου είναι απολύτως απαραίτητη για τη λειτουργία των πρωτεϊνών Ras. Οι άγκυρες λιπιδίων, αντιθέτως, δεν έχουν καμία επιρροή στην καταλυτική δραστηριότητα Ras GTPάσης. Τουναντίον, το σημείο της μεμβράνης όπου συνδέεται η Ras έχει ως ρόλο να τη φέρει πολύ κοντά στους τελεστές της. Εξάλειψη της σηματοδοτικής αλληλουχίας CAAX οδηγεί στην απώλεια της σηματοδοτικής λειτουργίας τους. Εξαιτίας αυτού, μεγάλες προσπάθειες καταβάλλονται να αναπτυχθούν αναστολείς της

**Εικόνα 8.50**  
**Μετακίνηση της πρωτεΐνης H-Ras στην πλασματική μεμβράνη.** Μετά τη σύνθεσή της, η Ras φαρνεσυλιώνεται από το ένζυμο FTase [η FTase είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια α- (πορτοκαλί) και μια β- (κίτρινη) υπομονάδα, οι οποίες σχηματίζονται από α-έλικες]. Στη συνέχεια, η ενδοπεπτιδάση Rce1, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ, αποκόβει την αλληλουχία AAX. Η συνδεδεμένη στη μεμβράνη του ΕΔ Ras μεθυλιώνεται από τη διαμεμβρανική Icmt, η οποία χρησιμοποιεί ως συμπαράγοντα την S-am (S-adenosyl methionine). Η μεθυλιωμένη H-Ras παλμιτοϋλιώνεται σε κατάλοιπα Cys του COOH-τελικού της άκρου, στο ΕΔ από μια παλμιτοϋλο-τρανσφεράση Erf2 [η Erf2 βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ, αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές α-έλικες και ένα τετραπεπτιδικό μοτίβο DHHC (Asp-His-His-Cys)] και μεταφέρεται στην πλασματική μεμβράνη. [204]



**Εικόνα 8.51**  
**Λιπιδιακές άγκυρες των πρωτεϊνών Ras.** A. Τριδιάστατο μοντέλο σύνδεσης της H-Ras-GDP στη μεμβράνη. B. Η ετερογενής COOH-τελική περιοχή των Ras (HVD). Διακρίνεται η κοινή για όλες τις Ras φαρνεσυλιωμένη Cys του COOH-τελικού άκρου, οι παλμιτοϋλιωμένες Cys των H- και N-Ras και η θετικά φορτισμένη περιοχή Lys της K-Ras. [1]

φαρνεσουλτοτρανσφεράσης και να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά ως ανασταλτικοί παράγοντες της μεταγωγής σήματος μέσω των πρωτεϊνών Ras στους όγκους.

### 3.6

#### Η οικογένεια των πρωτεϊνών Ras: βασικός ρυθμιστής της αύξησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Ras μεταφέρουν κυρίως σήματα που προωθούν την αύξηση και τη διαφοροποίηση, τα οποία ξεκινούν από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς κινάσες τυροσίνης. Η μεταγωγή σήματος από τους ενεργοποιημένους RTKs στις Ras πραγματοποιείται μέσω των παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, RasGEFs, οι οποίοι μετατρέπουν την ανενεργή Ras-GDP στην ενεργή Ras-GTP διαμόρφωση.

#### Οι RasGEFs και η ανακάλυψη της *Son of Sevenless (SOS)* στη *Drosophila*

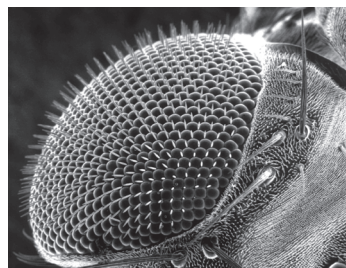
Η σημασία των RasGEFs έγινε γνωστή αρχικά στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, όπου ανακαλύφθηκε το 1986 ότι η πρωτεΐνη **Cdc25** (Cell division cycle 25) λειτουργεί ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, επιταχύνοντας περίπου 1.000-φορές την ανταλλαγή GDP με GTP στη Ras, μια ικανότητα που δείχνει σαφώς ότι η πρωτεΐνη Cdc25 είναι ένας ενεργοποιητής της Ras. Η λειτουργία της πρωτεΐνης Cdc25 είναι, επομένως, συγκρίσιμη με τη λειτουργία των ενεργοποιημένων GPCRs που καταλύουν την ανταλλαγή GDP/GTP στις ετεροτριμερείς Γαβγ-πρωτεΐνες.

Το ερώτημα για το ποια σηματοδοτική πρωτεΐνη προηγείται των Ras στους ανώτερους οργανισμούς ήταν ασαφές για πολύ καιρό. Οι γενετικές έρευνες στην *Drosophila* και τον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* έδειξαν ότι τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες δημιουργούν τον σύνδεσμο μεταξύ των ενεργοποιημένων RTKs και των Ras, οι οποίες στη συνέχεια ανακαλύφθηκαν και στα θηλαστικά: η πρωτεΐνη προσαρμογής **Grb2** (Growth factor receptor binding protein, πρωτεΐνη που δεσμεύεται στον υποδοχέα αυξητικών παραγόντων), και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων **mSOS**, ο οποίος πήρε το όνομά του λόγω της ομολογίας της με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων στην *Drosophila*.

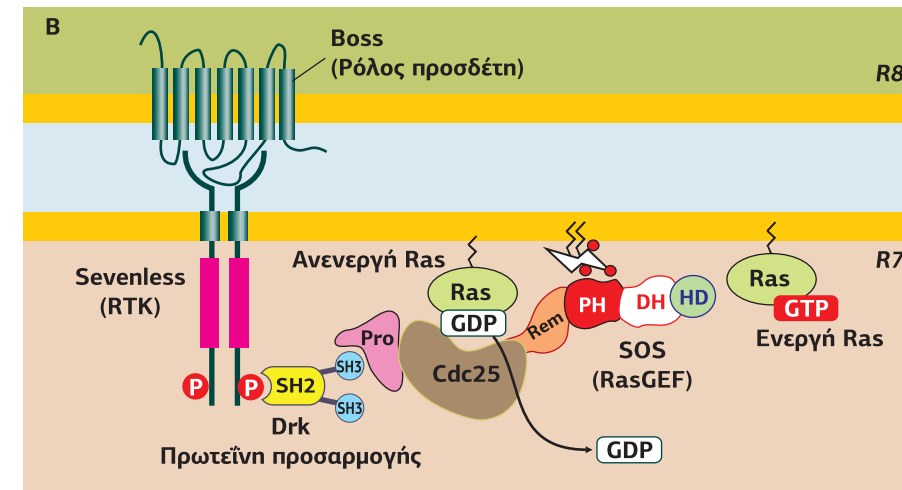
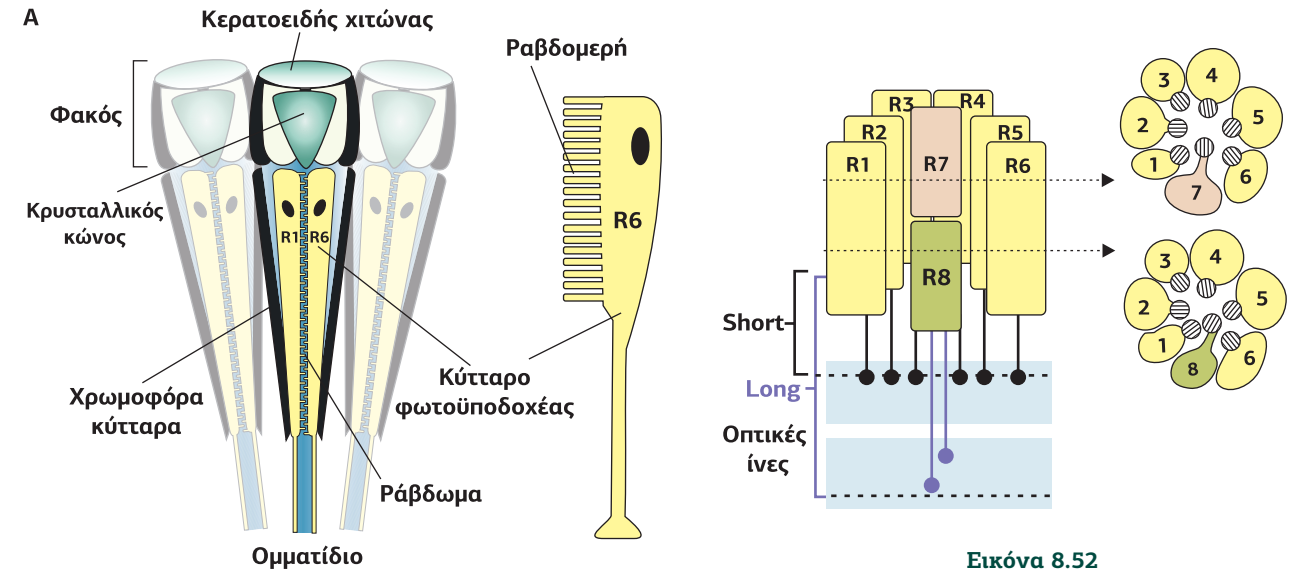
Στην ανακάλυψη της πρωτεΐνης SOS (Son of Sevenless) το 1992 οδήγησε η έρευνα της Laura Bonfili πάνω στην ανάπτυξη του οφθαλμού της *Drosophila*. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της *Drosophila* μια ομάδα οκτώ φωτοευαίσθητων νευρώνων αναπτύσσεται αυτόνομα δημιουργώντας ένα ομματίδιο (ommatidium). Το **ομματίδιο** είναι η λειτουργική μονάδα του σύνθετου οφθαλμού της *Drosophila* και περιέχει 8 κύτταρα φωτοϋποδοχείς (R1-R8), καθένα από τα οποία έχει διαφορετική φασματική ευαισθησία, και 12 βοηθητικά κύτταρα. Τα R1-R6 εκφράζουν την οψίνη Rh1 ευρέος φάσματος (δημιουργία εικόνας και ανίχνευση κίνησης), το R7 εκφράζει τις οψίνες Rh3-Rh4 που απορροφούν το υπεριώδες και το R8 εκφράζει την οψίνη Rh5 που απορροφά το μπλε φως και την οψίνη Rh6 που απορροφά το πράσινο (δημιουργία χρώματος). Η οψίνη (φωτοευαίσθητη χρωστική) βρίσκεται σε αναδιπλώσεις της μεμβράνης (λάχνες) των φωτοϋποδοχέων που ονομάζονται ραβδομερή. Το σύνολο των 8 ραβδομερών καλύπτει το κέντρο του κάθε ομματιδίου και ονομάζεται **ράβδωμα** (Εικόνα 5.82A).

Σε κάθε ομματίδιο το R8 και το R7 βρίσκονται στο κέντρο και περιβάλλονται από τα υπόλοιπα 6 κύτταρα φωτοϋποδοχείς. Το R8 κατευθύνει άμεσα την ανάπτυξη του γειτονικού του πρόδρομου R7 κυττάρου σε ώριμο R7, μέσω της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Boss (Bride of sevenless), που εκφράζεται στην επιφάνεια του R8 και παίζει τον ρόλο του προσδέτη. Περιέργως, η δομή της Boss είναι όμοια με των GPCRs (πρωτεΐνες με 7 διαμεμβρανικές περιοχές), χωρίς όμως να εμφανίζει δράση υποδοχέα συνδεδεμένου με G-πρωτεΐνες. Η Boss συνδέεται στον υποδοχέα κινάση τυροσίνης Sev (Sevenless), που εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη του R7, και τον ενεργοποιεί. Η σύνδεση της Boss στον υποδοχέα Sev διεγείρει μια πολύπλοκη

Ο **Cdc25** ως RasGEF δεν έχει σχέση με τη φωσφοάση Cdc25. Πρόκειται για απλή συνωνυμία.



Σύνθετος οφθαλμός *Drosophila*



σειρά αντιδράσεων, οι οποίες μέσω των Ras και των MAP κινάσων διαφοροποιούν τα πρόδρομα R7 φωτοευαίσθητα κύτταρα σε πλήρως λειτουργικά ικανά να αναγνωρίζουν το υπεριώδες φως. Όταν ο Sev είναι μεταλλαγμένος ή δυσλειτουργικός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα R7 κύτταρα φωτοϋποδοχείς αποτυγχάνουν να σχηματισθούν (σε αυτό οφείλει το όνομά του ο υποδοχέας).

Γενετική μελέτη στη *Drosophila* έδειξε ότι απαιτούνται 7 γονίδια για τη σηματοδότηση του Sev, μεταξύ των οποίων μια πρωτεΐνη Ras, μια πρωτεΐνη ομόλογη της Cdc25, η οποία ονομάστηκε SOS (Son of Sevenless) και καταλύει την ανταλλαγή GDP/GTP στη Ras, και μια πρωτεΐνη προσαρμογής Drk (Downstream of receptor kinases), η οποία είναι ομόλογη της Grb2 και συνδέει τον ενεργοποιημένο Sev με την SOS (Εικόνα 8.52B).

Ομόλογες πρωτεΐνες της SOS ανακαλύφθηκαν και σε άλλα είδη, μεταξύ των οποίων ο νηματώδης, τα τρωκτικά και ο άνθρωπος.

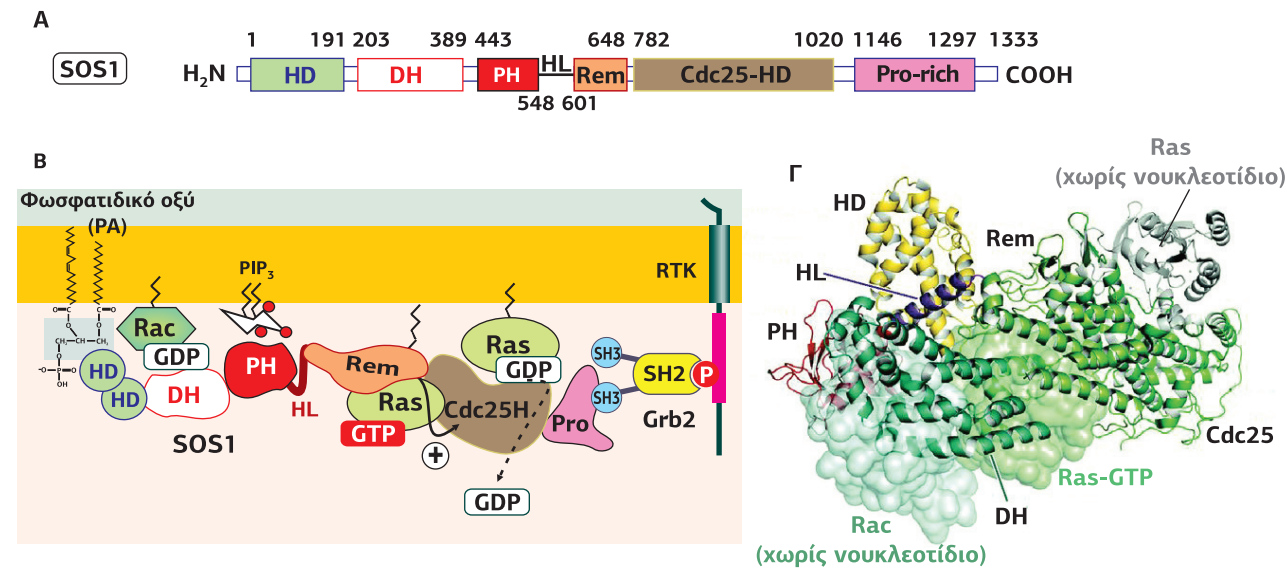
#### Δομή του mSOS (m: mammalian)

Ο SOS είναι ένας GEF διπλής εξειδίκευσης, καθώς εκτός από την καταλυτική περιοχή RasGEF, μια Cdc25-HD που συνδέεται με την Ras-GDP και οδηγεί μέσω της ανταλλαγής GDP/GTP στην ενεργή διαμόρφωση Ras-GTP, περιέχει και μια καταλυτική περιοχή RhoGEF, την περιοχή DH/PH. Πιο αναλυτικά:

Εικόνα 8.52 Το ομματίδιο της *Drosophila* και ο ρόλος της SOS στην ανάπτυξη των φωτοευαίσθητων κυττάρων R7.

A. Ο οφθαλμός της *Drosophila* είναι σύνθετος. Αποτελείται από περίπου 800 ομματίδια. Το κάθε ομματίδιο αποτελείται από 8 φωτοευαίσθητα κύτταρα - φωτοϋποδοχείς (R1-R8), που περιβάλλονται από χρωμοφόρα κύτταρα και καλύπτονται από έναν φακό (κερατοειδής χιτώνας και κρυσταλλικός κώνος). Ο κάθε φωτοϋποδοχέας προβάλλει έναν μεγάλο αριθμό λαχνών (ραβδομερή) που περιέχουν τη χρωστική οψίνη. Τα ραβδομερή και των οκτώ φωτοϋποδοχέων ενός ομματιδίου σχηματίζουν το ράβδωμα. Τα R1-R6 βρίσκονται στην περιφέρεια, ενώ το R7 και το R8 στο κέντρο. [173] [212]

B. Το φωτοευαίσθητο κύτταρο R8 κατευθύνει άμεσα την ανάπτυξη του γειτονικού του πρόδρομου R7, μέσω της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης Boss, η οποία συνδέεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα κινάση τυροσίνης Sevenless, που εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη του R7. Η σύνδεση του Boss στον Sevenless ενεργοποιεί τον SOS μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Drk. Ο SOS, στη συνέχεια, διεγείρει μέσω των Ras μια πολύπλοκη σειρά αντιδράσεων που διαφοροποιούν τα πρόδρομα R7 σε πλήρως λειτουργικά φωτοευαίσθητα κύτταρα ικανά να αναγνωρίζουν το υπεριώδες φως.



Εικόνα 8.53

**Δομικές περιοχές του mSOS και ο ρόλος τους.** Α. Η πρωτεΐνη mSOS των θηλαστικών περιέχει:

α. στο NH<sub>2</sub>-τελικό της άκρο μια περιοχή όμοια με τις ιστόνες, (HD), μια περιοχή DH που ακολουθείται από μια περιοχή PH, β. στο κέντρο μια περιοχή Rem (περιέχει την αλλοστερική θέση σύνδεσης της Ras-GTP) και μια περιοχή Cdc25H (απαραίτητη για την ενζυμική δραστηριότητα ανταλλαγής GDP/GTP στις Ras) και γ. στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή πλούσια σε Pro. [154] [80] Β. Διακρίνεται η σύνδεση της SOS με λιπίδια της μεμβράνης, όπως το φωσφατιδικό οξύ (μέσω της περιοχής HD) και τα PIP<sub>3</sub> (μέσω της περιοχής PH), με τη Ras-GTP (στην αλλοστερική θέση σύνδεσης Rem), με τη Ras-GDP (στην περιοχή Cdc25H) και με τη Rac-GDP (μέσω της DH). Γ. Η κρυσταλλική δομή της SOS σε σύνδεση με την πρωτεΐνη Ras-κενή νουκλεοτιδίων. Θολά διακρίνονται η πρωτεΐνη Rac, η οποία συνδέεται σε διαφορετική θέση από την Ras, και η Ras-GTP, η οποία πρόκειται να απομακρυνθεί από το σύμπλοκο. [29]

Το NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα του mSOS περιέχει μια περιοχή HD όμοια με τις ιστόνες (Histone-like Domain), μια περιοχή DH (Dbl Homology) και μια περιοχή PH. Ο DH/PH είναι ένας συνδυασμός περιοχών χαρακτηριστικών των Rho/Rac-GEFs και έχει δειχθεί ότι η περιοχή αυτή καταλύει την ανταλλαγή GDP/GTP στη Rac1. Η περιοχή HD, η οποία είναι ασυνήθιστη σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αποτελείται από δύο συνεχόμενες αναδιπλώσεις ιστονών, όμοιες δομικά με το διμερές της ιστόνης-2 H2a-H2b. Η περιοχή αυτή διπλώνει και εφάπτεται επάνω σε έναν ελικοειδή συνδετήρα (helical linker), ο οποίος ενώνει την περιοχή DH/PH με την καταλυτική RasGEF περιοχή. Η σύνδεση της HD στην περιοχή DH/PH σταθεροποιεί μια διαμόρφωση αυτοαναστολής της SOS. Επίσης, καθώς η περιοχή HD είναι θετικά φορτισμένη, παρέχει μια δεύτερη πιθανή θέση πρόσδεσης στα φωσφολιπίδια PI(4,5)P<sub>2</sub> ή στο φωσφατιδικό οξύ (PA), εκτός από την περιοχή PH.

Την κεντρική περιοχή της mSOS καταλαμβάνει η περιοχή Rem (Ras exchange motif) που περιέχει την αλλοστερική θέση σύνδεσης της Ras-GTP, η οποία αυξάνει τη δραστηριότητα RasGEF του ενζύμου, και η καταλυτική RasGEF περιοχή Cdc25H (ομόλογη της Cdc25 του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*), που είναι υπεύθυνη για την ανταλλαγή GDP/GTP. Οι δύο αυτές περιοχές καλύπτουν το 40% της πρωτοταγούς αλληλουχίας της SOS. Το γεγονός ότι η SOS έχει τη δυνατότητα να συνδέει δύο οικογένειες μικρών GTPασών, τις Ras (στην περιοχή Cdc25) και τις Rac (στην περιοχή DH), και να τις ενεργοποιεί καταλύοντας την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γουανίνης, καθιστά τη SOS ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο ικανό να ρυθμίζει την ανάπτυξη αλλά και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

Στο COOH-τελικό άκρο υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε Pro, η οποία λειτουργεί ως θέση σύνδεσης στην περιοχή SH3 της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb2 (Εικόνα 8.53).

### Ενεργοποίηση του SOS

Σε κατάσταση ηρεμίας ο SOS βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2. Η δράση RasGEF διατηρείται σε αναστολή κάτω από τον έλεγχο αλληλεπιδράσεων, όπως η COOH-τελική αρνητική ρύθμιση που ασκείται μέσω της σύνδεσης με την Grb2 και η αλλοστερική αυτοαναστολή της δραστηριότητας GEF που διαμεσολαβείται από την NH<sub>2</sub>-τελική HD περιοχή του SOS.

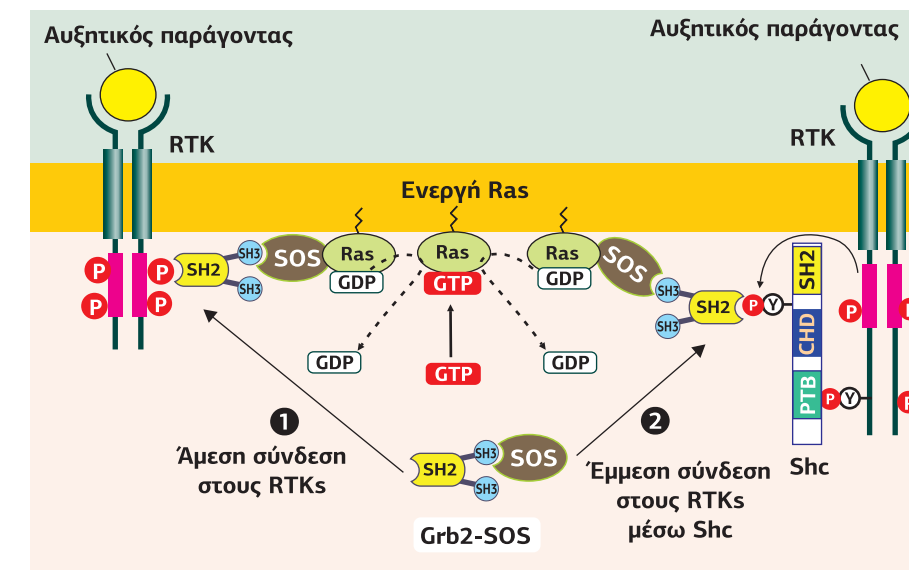
Το απαραίτητο βήμα για την ενεργοποίηση του SOS είναι η στρατολόγηση του συμπλόκου Grb2-mSOS στην πλασματική μεμβράνη και η επακόλουθη απελευθέρωση της αυτοαναστολής, η οποία θα συμβεί μόνο μετά τη διέγερση των υποδοχέων RTKs. Το σύμπλοκο Grb2-mSOS συνδέεται στους RTKs μέσω της SH2, η οποία είτε άμεσα συνδέεται στις φωσφορυλιωμένες Tyr των RTKs, μέσω της SH2

περιοχής της, είτε έμμεσα μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης προσαρμογής, της Shc (Src homology 2 domain containing). Η πρωτεΐνη Shc έχει δύο περιοχές που συνδέονται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες (μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή PTB και μια COOH-τελική SH2), οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη και προλίνη, η οποία μοιάζει με την περιοχή του κολλαγόνου και γι' αυτό ονομάζεται CHD (Collagen Homology Domain). Η Shc συνδέεται στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες συγκεκριμένων υποδοχέων, όπως οι PDGFRs και EGFRs. Μετά τη σύνδεσή της στους RTKs, η Shc φωσφορυλιώνεται και τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης της χρησιμεύουν ως σημεία σύνδεσης για την SH2 περιοχή της Grb2, και κατά συνέπεια για το σύμπλοκο Grb2-SOS (Εικόνα 8.54).

Και στις δύο περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι το ίδιο: το σύμπλοκο Grb2-mSOS, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη. Για την ενεργοποίηση του SOS απαιτείται η σύνδεσή του με τη μεμβράνη μέσω της περιοχής PH, η οποία συνδέεται με τα φωσφολιπίδια της ινσοιτόλης PIP<sub>3</sub> (των οποίων η παραγωγή απαιτεί την ενεργοποίηση της PI3K), και μέσω της περιοχής HD, η οποία συνδέεται με το φωσφατιδικό οξύ (του οποίου η παραγωγή απαιτεί την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης D2). Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη SOS αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Ras, που επίσης βρίσκεται συνδεδεμένη στη μεμβράνη, και επάγει την ανταλλαγή GDP με GTP. Η τοποθέτηση του συμπλόκου Grb2-SOS από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη είναι το αποφασιστικό βήμα που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras και στη μεταγωγή του σήματος του ενεργοποιημένου υποδοχέα.

Ωστόσο, η ρύθμιση των RasGEFs ποικίλλει και δεν περιλαμβάνει μόνο αλληλεπιδράσεις μέσω των πρωτεϊνών προσαρμογής με ενεργοποιημένους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Υπάρχουν άλλοι RasGEFs που ελέγχονται από διαφορετικούς μηχανισμούς, συγκεκριμένα από δεύτερους διαβιβαστές. Ο **RasGRP1/2** (Guanine nucleotide-Releasing Protein) στον εγκέφαλο και ο **RasGRF2** (Guanine nucleotide-Releasing Factor 1/2) βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο της διακυκλογλυκερόλης (μέσω της περιοχής C1) και του Ca<sup>2+</sup> (μέσω της περιοχής IQ), αντίστοιχα (βλ. Εικόνα 8.45A).

Τα σήματα μπορούν, επίσης, να διαβιβαστούν στα μονοπάτια της Ras και από GPCRs. Κατ' αυτόν τον τρόπο η διέγερση των RasGEFs μπορεί να συμβεί άμεσα από τις Gβγ-υπομονάδες. Χαρακτηριστική είναι, επίσης, η περίπτωση ενεργοποίησης της Ras από οξειδοαναγωγικά σήματα, όπως το NO. Υψηλή συγκέντρωση NO (>1 μM), που προέρχεται από την ενεργοποίηση της iNOS, μπορεί άμεσα να προκαλέσει την ανταλλαγή του GDP με GTP και να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη Ras μέσω νιτροσουλίνωσης στο κατάλοιπο Cys118 (βλ. σσ. 356-357).



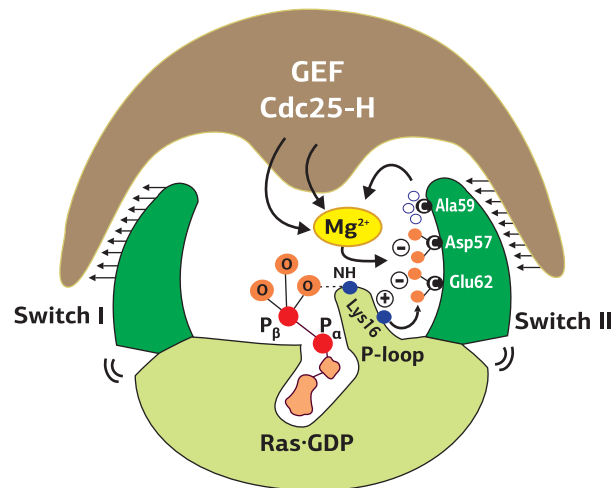
Εικόνα 8.54

**Ενεργοποίηση του mSOS μέσω δύο μονοπατιών.** Σε κατάσταση ηρεμίας ο SOS

βρίσκεται σε σύμπλοκο με την Grb2, στο κυτταρόπλασμα. Με την ενεργοποίηση των RTKs ο SOS, μέσω της Grb2, συνδέεται στους ενεργοποιημένους υποδοχείς. Τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης ενός ενεργοποιημένου αυτοφωσφορυλιωμένου υποδοχέα RTK μπορούν να χρησιμεύσουν ως σημεία σύνδεσης για την περιοχή PTB της Shc (2) ή για την περιοχή SH2 του Grb2-mSOS (1). Στην περίπτωση (2) που η φωσφορυλίωση της Tyr της Shc εκτελείται από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα, το σύμπλοκο Grb2-mSOS δεσμεύεται στα προσφάτως φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα Tyr της Shc και προχωρεί στη μεταγωγή σημάτων. Στην περίπτωση (1) το σύμπλοκο Grb2-SOS δρα άμεσα μεταξύ του υποδοχέα και της πρωτεΐνης Ras. Και στις δύο περιπτώσεις το Grb2-mSOS στρατολογείται στη μεμβράνη και από εκεί μπορεί να καταλύσει την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων στην πρωτεΐνη Ras. [140]

### Μηχανισμός ανταλλαγής GDP/GTP μέσω του SOS

Η Cdc25H περιοχή του SOS (δύο β-φύλλα) αλληλεπιδρά με τις περιοχές switch I και II και τον P-βρόχο της Ras-GDP και δημιουργείται ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο χαμηλής συγγένειας GEF-Ras-GDP-Mg<sup>2+</sup>, το οποίο μετατρέπεται γρήγορα σε υψηλής συγγένειας διμερές GEF-Ras με απομάκρυνση του GDP και του Mg<sup>2+</sup>. Ο μηχανισμός ονομάζεται push-and-pull, καθώς η περιοχή switch I σπρώχνεται/απομακρύνεται (pushed out) από τη θέση σύνδεσης του GDP, ενώ η περιοχή switch II προσελκύεται (pull toward), ώστε η Ras να παραμείνει "γυμνή". Κατά συνέπεια, ο GEF μειώνει τη συγγένεια της Ras για το GDP παραμορφώνοντας τη θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου, ώστε στερεοδομικά και ηλεκτροστατικά αναγκάζεται το GDP σε απομάκρυνση (Εικόνα 8.55).



**Εικόνα 8.55**

**Σχηματική αναπαράσταση της δράσης GEF του SOS, απεικονίζοντας έναν κοινό μηχανισμό για όλους τους GEFs.** Ο GEF αλληλεπιδρά με τη Ras-GDP και το Mg<sup>2+</sup>.

Το GDP αλληλεπιδρά με τον P-βρόχο της Ras και το ιόν Mg<sup>2+</sup>.

Υπό την επίδραση του GEF η θέση αμινοξέων του P-βρόχου διαταράσσεται και η Lys16 επαναπροσανατολίζεται προς τις COO<sup>-</sup> ομάδες των Asp57 και Glu62 της περιοχής switch II. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μηχανισμός push-and-pull, καθώς η περιοχή switch I απομακρύνεται από την περιοχή δέσμευσης των νουκλεοτιδίων, ενώ η switch II προσελκύεται προς την περιοχή αυτή. Επιπλέον, το Mg<sup>2+</sup> ωθείται έξω από τη θέση του λόγω αλληλεπίδρασης με την Ala59 της περιοχής switch II της Ras, ή ακόμη με τα αμινοξέα του GEF. Η δράση του GEF έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του GDP και του Mg<sup>2+</sup> και την απογύμνωση της Ras.

[195]

Η ελεύθερη από νουκλεοτίδια μορφή της πρωτεΐνης Ras μετατρέπεται στην ενεργό Ras-GTP κατάσταση, δεδομένου ότι υπάρχει 300 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση GTP, έναντι του GDP, στο κυτταρόπλασμα. Η κατευθυντήρια δύναμη για την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων είναι, λοιπόν, η υψηλή συγκέντρωση GTP στο κύτταρο. Η σύνδεση με το GTP και το Mg<sup>2+</sup> οδηγεί και πάλι σε ένα ασταθές ετεροτριμερές σύμπλοκο GEF-Ras-GTP-Mg<sup>2+</sup>, που οδηγεί στην αποσύνδεση του GEF.

Επίσης, η περιοχή Rem περιέχει μια αλλοστερική θέση σύνδεσης της Ras-GTP αυξάνοντας την ενεργοποίηση της καταλυτικής Cdc25H περιοχής.

### Δομή και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RasGAPs

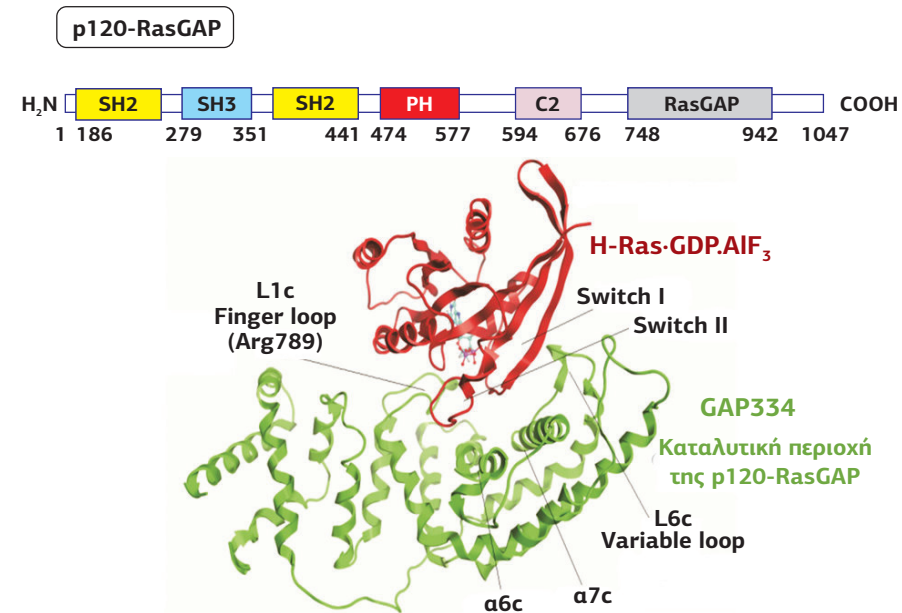
Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 160 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με δραστηριότητα GAP. Οι εξειδικευμένες για την οικογένεια Ras πρωτεΐνες GAPs είναι γνωστές ως πρωτεΐνες RasGAPs. Δεκαπέντε πρωτεΐνες RasGAPs είναι γνωστές στα θηλαστικά, από τις οποίες καλύτερα χαρακτηρισμένες είναι η πρωτεΐνη p120-RasGAP και η neurofibromin (NF1). Υπάρχουν, επίσης, εξειδικευμένες GAPs και για τα άλλα μέλη της υπεροικογένειας Ras, που χαρακτηρίζονται από συντηρημένα στοιχεία της αλληλουχίας τους. Στους ζυμομύκητες η λειτουργία GAP έχει αποδοθεί στις πρωτεΐνες IRA1 (Inhibitory Regulator of the RAS-cAMP pathway) και IRA2.

Η **p120-RasGAP** ανακαλύφθηκε το 1987. Έχει ένα υδροφοβό NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, δύο περιοχές SH2, που περιβάλλουν μια περιοχή SH3, μια περιοχή ομόλογη της πλεξτρίνης (PH) που την συγκρατεί στη μεμβράνη και μια περιοχή C2, ομόλογη με την περιοχή σύνδεσης του Ca<sup>2+</sup> στη φωσφολιπίδαση A<sub>2</sub>. Η καταλυτική περιοχή GAP βρίσκεται σε ένα τμήμα 200 αμινοξέων κοντά στο COOH-τελικό άκρο.

Η παρουσία των SH2 περιοχών στην p120-RasGAP δείχνει έναν ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι που αρχίζει από τους υποδοχείς κινάσες τυροσίνης. Στην πραγματικότητα, η nSH2 περιοχή καθοδηγεί την ειδική δέσμευση της p120-RasGAP στην pTyr771 του υποδοχέα PDGFβ, που επάγει την ενεργοποίησή της (βλ. Εικόνα 8.8, σελ. 494). Στο στάδιο αυτής της αλληλεπίδρασης παρατηρείται, επίσης, φωσφορυλίωση μιας τυροσίνης της p120-RasGAP, της οποίας η φυσιολογική σημασία είναι άγνωστη.

Η πρωτεΐνη **neurofibromin** (NF1) ανακαλύφθηκε το 1990. Η διεγερτική της επίδραση στη δραστηριότητα GTPάσης της πρωτεΐνης Ras είναι συγκρίσιμη με αυτήν της p120-RasGAP. Η neurofibromin εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των νευρικών και των ολιγοδενδροκυττάρων (Schwann cells), που περιβάλλουν τους άξονες των νευρώνων δημιουργώντας το στρώμα μυελίνης.

Η σημασία της στη ρύθμιση της αύξησης υπογραμμίζεται από την παρατήρηση ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της NF1, που οδηγούν σε απώλεια της καταλυτικής της δραστηριότητας, έχουν βρεθεί σε ασθενείς που πάσχουν από **τύπου I νευροϊνωμάτωση** (neurofibromatosis type I) του **Recklinghausen**. Το χαρακτηριστικό της



νόσου είναι τα νευροϊνώματα που κάνουν την εμφάνισή τους συνήθως στην εφηβεία, αν και μπορεί να εμφανιστούν και νωρίτερα. Τα νευροϊνώματα είναι όγκοι του νευρικού συστήματος, συνήθως όχι καρκινικοί, που μπορεί να αναπτυχθούν οπουδήποτε στο σώμα. Τόσο ο αριθμός όσο και το μέγεθός τους ποικίλλει σημαντικά από άτομο σε άτομο, από λίγα έως δεκάδες, από πολύ μικρά έως πολύ μεγάλα. Έχουν την τάση να μεγαλώνουν και να αυξάνονται σε αριθμό με την πάροδο του χρόνου. Το χρώμα τους είναι ίδιο με αυτό του δέρματος στις περισσότερες περιπτώσεις. Έχουν ακανόνιστο σχήμα και μπορεί να είναι τόσο μεγάλα που να παραμορφώνουν το σώμα. Ποσοστό 5% των ασθενών με νευροϊνωμάτωση εμφανίζει επιληψία, ενώ παρατηρούνται μαθησιακές δυσκολίες, με ή χωρίς ελλειμματική προσοχή, στο 45% των παιδιών. Οι ασθενείς συχνά έχουν μακροκεφαλία, ενώ το μήκος σώματος είναι συνήθως κάτω του μέσου όρου. Συχνά οι πάσχοντες έχουν χαμηλό ανάστημα με σκολίωση και άλλες σκελετικές ανωμαλίες.

Η neurofibromin, εκτός από την καταλυτική περιοχή ενεργοποίησης της GTPάσης (RasGAP), περιέχει πολλές περιοχές αλληλεπίδρασης: α. μια περιοχή πλούσια σε Cys-Ser (CSR), β. μια περιοχή TBD (Tubulin-Binding Domain), όπου συνδέεται η τουμπουλίνη, το κύριο συστατικό των μικροσωληνίσκων, και η πρωτεΐνη LRPPRC (Leucine-Rich Pentatricopeptide motif-Containing protein), μεταλλάξεις της οποίας οδηγούν στη νευροεκφυλιστική ασθένεια του Leigh, γ. μια περιοχή Sec14 και μια PH, μέσω των οποίων συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, και τέλος δ. μια COOH-τελική περιοχή σύνδεσης της συνδεκάνης (SBD, Syndecan-Binding Domain). Η συνδεκάνη είναι μια υψηλά γλυκοσυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, το ενδοκυτταρικό COOH-τελικό τμήμα της οποίας αλληλεπιδρά με την PDZ περιοχή της CASK (Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase), ένα μέλος των πρωτεϊνών MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase), και με δύο περιοχές της NF1 (την SBD και την RasGAP). Το σύμπλεγμα των τριών πρωτεϊνών οργανώνει την επαγωγή φιλοποδίων και δενδριτικών ακάνθων.

Η neurofibromin αλληλεπιδρά, επίσης, με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, όπως η APP (Amyloid-β Precursor Protein) και η VCP (Valosin-Containing Protein), μέσω των οποίων συμμετέχει στη διαδικασία της μάθησης, η DDAH1 (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1), μέσω της οποίας συμμετέχει στη σηματοδότηση του NO, η DPYSL2 (Dihydropyrimidinase-like 2), μέσω της οποίας συμμετέχει στην αύξηση και τη διαφοροποίηση των νευρώνων, ο παράγοντας FAF2 (Fas-Associated Factor 2) και η λιγάση της ουβικουτίνης SCF (Skp, Cullin, F-box-containing complex), μέσω των οποίων συμμετέχει στην ουβικουτίνωση, η κινάση FAK (Focal

**Εικόνα 8.56**

**Η πρωτεΐνη ενεργοποίησης της δράσης GTPάσης της Ras, p120-RasGAP.**

Α. Δομικές περιοχές της p120-RasGAP. Η p120-RasGAP είναι μια πρωτεΐνη 120 kDa, η οποία περιέχει στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο δύο περιοχές SH2, που περιβάλλουν μια περιοχή SH3, μια περιοχή PH, μια περιοχή C2 και μια καταλυτική περιοχή GAP 200 αα, κοντά στο COOH-τελικό άκρο. Β. Κρυσταλλική δομή της GAP-334 (η καταλυτική περιοχή της p120-RasGAP) σε σύνδεση με την H-Ras-GDP.AIF<sub>3</sub>.

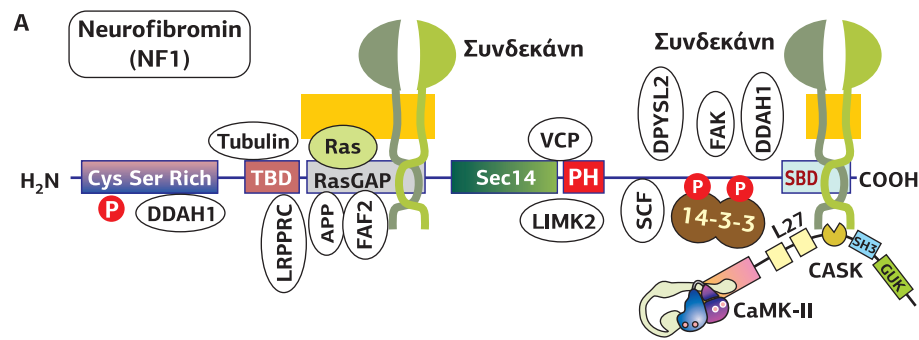
Η καταλυτική περιοχή της p120-RasGAP αποτελείται από 8 α-έλικες (α1c - α8c) που συνδέονται μεταξύ τους με 6 βρόχους (L1c - L6c). Από τις περιοχές αυτές σε επαφή με τη Ras έρχονται οι α6c, α7c, L1c και L6c. Η L1c ονομάζεται "finger loop", γιατί περιέχει αμινοξέα που εισέρχονται στη θέση σύνδεσης του GTP στη Ras, όπως η Arg789, η οποία αλληλεπιδρά με τις Gly12, Gln61, και τα άτομα F της ομάδας AIF<sub>3</sub> (η οποία αντικαθιστά την γ-PO<sub>4</sub>). Η GAP-334 αλληλεπιδρά επιπλέον με τις περιοχές switch I και switch II, τις οποίες και σταθεροποιεί κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του GTP. [55]

Η **CASK** είναι μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς πολλαπλών περιοχών με έναν ρόλο στην αγκυροβόληση συναπτικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και στη μεταφορά καναλιών ιόντων. Αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα TBR1 και συνδέεται με αρκετές πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένης της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς, της νευρεξίνης (βλ. Εικόνα 4.83) και της συνδεκάνης (βλ. Εικόνα 8.57). Μπορεί να διαμεσολαβήσει στη σύνδεση μεταξύ της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας και του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω της αλληλεπίδρασης της με τη συνδεκάνη και με την πρωτεΐνη 4.1, η οποία συνδέεται με την ακτίνη/σπεκτρίνη.



**Εικόνα 8.57**

A. Η *neurofibromin* περιέχει πολλές περιοχές αλληλεπίδρασης. Μια περιοχή πλούσια σε Cys-Ser (CSR), μια περιοχή σύνδεσης της τουμπουλίνης (TBD), μια περιοχή ενεργοποίησης της GTPάσης (RasGAP), μια περιοχή Sec14 και μια PH, μέσω των οποίων συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, και μια COOH-τελική περιοχή σύνδεσης της syndecan (SBD). Στην εικόνα διακρίνονται, επίσης, διάφορες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη NF1. [145] B. Η νευροϊνωμάτωση περιγράφηκε πρώτη φορά το 1821 και ο Κουασιμόδος της Παναγίας των Παρισίων είναι από τους πιο γνωστούς ασθενείς της νόσου. Η σπάνια αυτή ασθένεια ήρθε στο φως της δημοσιότητας, όταν ο Πάπας Φραγκίσκος φίλησε τις πληγές ενός πάσχοντα, ο οποίος τον πλησίασε ζητώντας την ευλογία του. Το χαρακτηριστικό της νόσου είναι τα νευροϊνώματα, όγκοι του νευρικού συστήματος, που μπορεί να αναπτυχθούν οπουδήποτε στο σώμα. Τόσο ο αριθμός όσο και το μέγεθός τους ποικίλλει σημαντικά από άτομο σε άτομο, από λίγα ως δεκάδες, από πολύ μικρά ως πολύ μεγάλα.



Adhesion Kinase), η οποία την τοποθετεί στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης, η κινάση LIMK2 (LIM domain Kinase 2), μέσω της οποίας συμμετέχει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και, τέλος, η SPRED1 (Sprouty-Related, EVH1 Domain-containing protein 1), η οποία αποτελεί συστατικό του Ras/MAPK μονοπατιού χωρίς εξακριβωμένο ακόμη ρόλο.

**Η Raf κινάση, ο κύριος τελεστής των πρωτεϊνών της οικογένειας Ras**

Ποιες σηματοδοτικές πρωτεΐνες είναι οι τελεστές της πρωτεΐνης Ras; Η ανακάλυψη του κεντρικού σημείου για τη λειτουργία της Ras προήλθε το 1984 μέσα από τις έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για τη δομή και τη λειτουργία του ιικού ογκογονιδίου *v-Raf*. Το γονίδιο *v-Raf* κωδικοποιεί την 74 kDa πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr Raf. Το όνομα Raf (*R*apidly *a*ccelerated *f*ibrosarcoma) προήλθε από την επιτάχυνση της δημιουργίας ινοσαρκώματος που προκαλεί ο ιός MSV3611 (Mouse Sarcoma Virus 3611), ο οποίος περιέχει το ογκογονίδιο *v-Raf*. Η διαφορά του ιικού γονιδίου *v-Raf* από το κυτταρικό του αντίστοιχο *c-Raf* οφείλεται στην απουσία 200-300 αμινοξέων στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της ιικής πρωτεΐνης (Εικόνα 8.58A). Αυτή η περιοχή έχει την ικανότητα να αναδιπλώνεται και να δημιουργεί μια κλειστή ανενεργή κατάσταση αυτοαναστολής, ενώ η απουσία της είναι υπεύθυνη για την ιδιόσυστα ενεργή δραστηριότητα κινάσης που προκαλεί μετασχηματισμό.

Οι εκτενείς γενετικές και βιοχημικές έρευνες γρήγορα έδειξαν ότι η κινάση Raf έχει τον ρόλο του άμεσου τελεστή στο μονοπάτι της Ras. Επιπλέον, η Raf αποτελεί τον σύνδεσμο μεταξύ της Ras και των MAP κινάσεων. Μία από τις λειτουργίες αυτού του συνδέσμου είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Εντούτοις, η κινάση Raf δεν είναι ο μόνος τελεστής της πρωτεΐνης Ras. Αντιθέτως, υπάρχουν και άλλα μόρια τελεστές που αλληλεπιδρούν με την GTP μορφή της πρωτεΐνης Ras κατά τρόπο εξειδικευμένο και δημιουργούν συνδέσμους με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως για παράδειγμα η κινάση PI3K, η φωσφολιπάση PLC και ο RafGEF (βλ. Εικόνα 8.61).

**Δομή της Raf κινάσης**

Τα θηλαστικά έχουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά γονίδια για τις Raf κινάσες (A-Raf, B-Raf, C-Raf), από ένα έχουν η *Drosophila* (D-Raf) και ο *Caenorhabditis elegans* (Lin-45), ενώ οι ζυμομύκητες κανένα. Οι Raf κινάσες έχουν τρεις κοινές, καλά συντηρημένες περιοχές CRs (Conserved Regions 1-3) (Εικόνα 8.58A).

Η CR1 περιοχή περιέχει δύο περιοχές: την περιοχή δέσμευσης της Ras-GTP (RBD: Ras Binding Domain), η οποία εμφανίζει μια αναδίπλωση όμοια της ουβικουιτίνης, όπως συμβαίνει και με πολλές άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με μικρές GTPάσες, και συνδέει εξειδικευμένα μόνο την GTP-διαμόρφωση της Ras, καθώς και μια περιοχή δάκτυλο ψευδαργύρου (zinc finger) πλούσια σε κυστεΐνες (CRD: Cys Rich Domain), η οποία σταθεροποιείται με δύο ιόντα Zn<sup>2+</sup>. Η CRD είναι παρόμοια με την περιοχή C1 της PKC, η οποία αποτελεί τη θέση σύνδεσης της διακυλογλυκερόλης, αλλά σε αντίθεση με την PKC δεν δεσμεύει διακυλογλυκερόλη, αλλά αντ' αυτού αλληλεπιδρά με άλλα λιπίδια, όπως κεραμίδια ή φωσφατιδικό οξύ, και

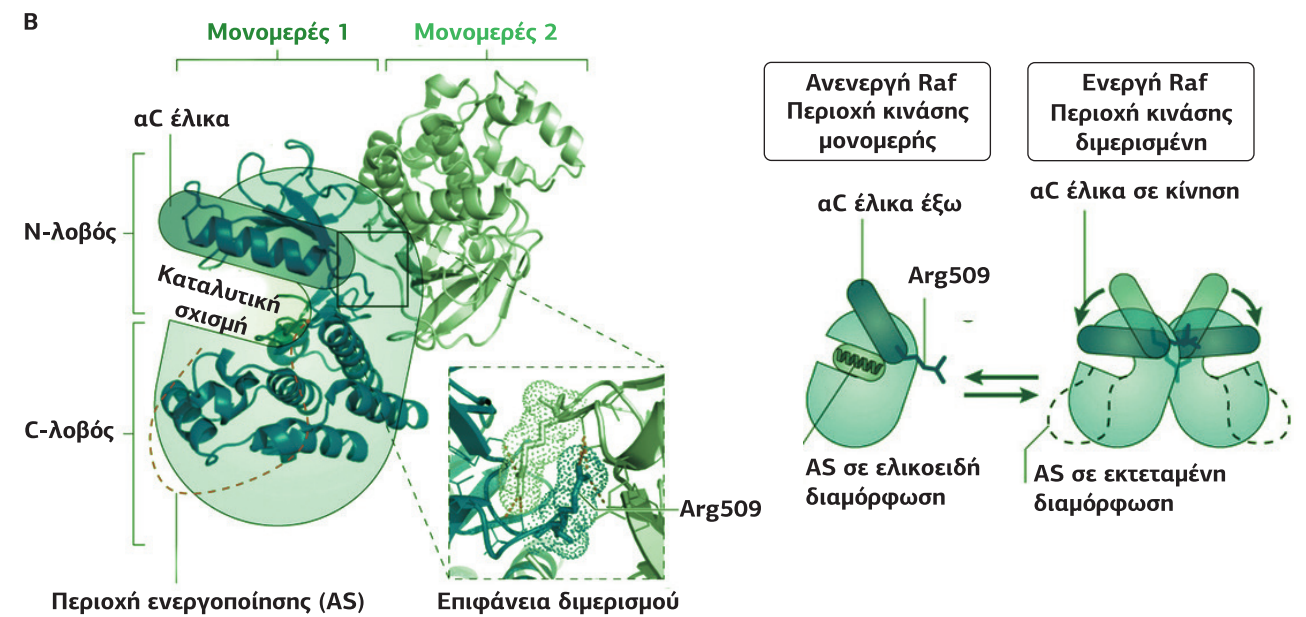
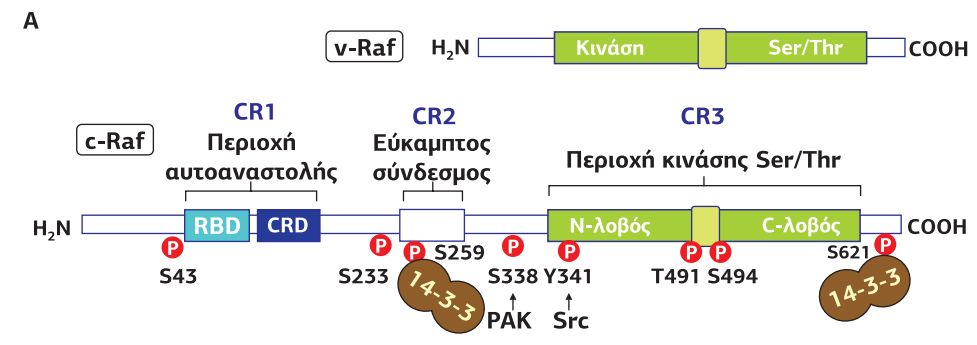
γι' αυτό θεωρείται υπεύθυνη για τη σύνδεση της Raf στη μεμβράνη. Διαγραφή της CR1 περιοχής προκαλεί την ιδιόσυστα ενεργοποίηση της Raf.

Οι περιοχές RBD και CRD ενεργούν ως μία ενιαία μονάδα ρυθμίζοντας αρνητικά τη δραστηριότητα της περιοχής κινάσης της Raf, με άμεση φυσική αλληλεπίδραση. Αυτή η μονάδα αυτοαναστολής χαρακτηρίζεται ως CR1 "συντηρημένη περιοχή 1", η περιοχή άρθρωσης χαρακτηρίζεται ως CR2 και η περιοχή κινάσης CR3.

Η CR2 περιοχή αποτελεί έναν ευέλικτο σύνδεσμο ανάμεσα στη μονάδα αυτοαναστολής και την καταλυτική περιοχή. Δρα ως ένας φυσικός "μεντεσές" μεταξύ των άκαμπτα διπλωμένων περιοχών CR1 (αυτοαναστολής) και CR3 (καταλυτική), επιτρέποντας σύνθετες κινήσεις και βαθιά διαμορφωτικές αναδιατάξεις μέσα στην κινάση. Αυτή η περιοχή άρθρωσης περιέχει ένα μικρό, συντηρημένο μοτίβο υπεύθυνο για την αναγνώριση των πρωτεϊνών 14-3-3, αλλά μόνο όταν μια κρίσιμη σερίνη (Ser259 στο ανθρώπινο *c-Raf*) είναι ιδιόσυστα φωσφορυλιωμένη.

Η CR3 περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δραστηριότητα κινάσης και περιέχει τις θέσεις φωσφορυλίωσης υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της Raf. Επίσης, η CR3 περιέχει ένα ακόμη συντηρημένο, ιδιόσυστα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο, τη Ser621, υπεύθυνο για τη σύνδεση της Raf στις πρωτεΐνες 14-3-3. Η σύνδεση των πρωτεϊνών 14-3-3 στις Raf, μέσω των Ser259 και Ser621, διατηρεί τις Raf στη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Το κλειδί για την άρση της αυτοαναστολής είναι η φωσφατάση PP2A, η οποία ενεργοποιείται από τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και αποφωσφορυλιώνει την Ser259, οδηγώντας την Raf σε μια ανοιχτή διαμόρφωση που επιτρέπει τη σύνδεσή της στη Ras-GTP και στην πλασματική μεμβράνη (Εικόνα 8.60).

**Εικόνα 8.58**  
**Δομικές περιοχές της κινάσης Raf-1 (ή C-Raf).**  
A. Η C-Raf αποτελείται από την περιοχή CR1 (η οποία περιέχει την RBD και την CRD), τον εύκαμπτο σύνδεσμο CR2 και στο COOH-τελικό άκρο την CR3 καταλυτική περιοχή κινάσης. Διακρίνονται οι ιδιόσυστα φωσφορυλιωμένες Ser259 και Ser621, οι οποίες αποτελούν θέσεις σύνδεσης των πρωτεϊνών 14-3-3. Η *v-Raf* αποτελείται μόνο από την καταλυτική περιοχή κινάσης. [99] B. Κρυσταλλική δομή της περιοχής κινάσης της B-Raf. Στην εικόνα διακρίνεται και η επιφάνεια διμερισμού, καθώς στην πλήρως ενεργοποιημένη της κατάσταση η Raf εμφανίζεται ως διμερές. [95]





### Αλληλεπίδραση της Raf κινάσης με την πρωτεΐνη Ras

Η μεταγωγή σήματος από την πρωτεΐνη Ras στην κινάση Raf βασίζεται σε μια συγκεκριμένη αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από την ενεργοποιημένη, GTP-συνδεδεμένη, μορφή της Ras. Η ανεργή Ras-GDP παρουσιάζει σημαντικά πιο αδύναμη σύνδεση στην Raf κινάση. Ο σχηματισμός του συμπλόκου δεν σχετίζεται με τη διέγερση της δραστηριότητας GTPάσης της πρωτεΐνης Ras και έτσι η λήξη της μεταγωγής σηματοδοτείται με τον διαχωρισμό της Raf κινάσης ή την υδρόλυση του συνδεδεμένου GTP.

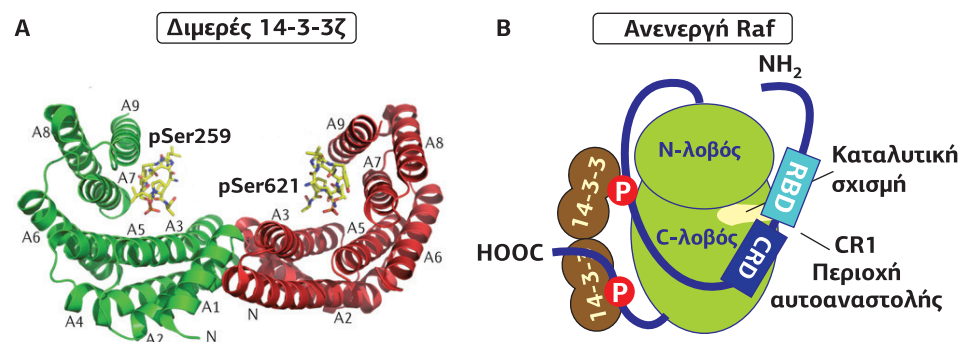
Το δομικό στοιχείο της κινάσης C-Raf που εμπλέκεται στον σχηματισμό του συμπλόκου με τη Ras βρίσκεται στη CR1 περιοχή, ενώ από την πλευρά της Ras στον σχηματισμό του συμπλόκου εμπλέκεται ο βρόχος G2 και η περιοχή switch I, που χαρακτηρίζονται ως περιοχή τελεστής.

### Μηχανισμός ρύθμισης της Raf κινάσης

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της C-Raf είναι πολύπλοκη. Καθώς είναι η αρχική κινάση του μονοπατιού των κινάσεων MAPKs (Raf/MEK/ERK), ελέγχεται από μια μεγάλη ποικιλία ανασταλτικών μηχανισμών και δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί σε ένα μόνο στάδιο. Ο πιο σημαντικός ρυθμιστικός μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση φυσική σύνδεση της **NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής αυτοαναστολής (CR1)** με την περιοχή κινάσης της C-Raf, που έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της καταλυτικής θέσης και την πλήρη διακοπή της δραστηριότητας κινάσης. Αυτή η “κλειστή” διαμόρφωση μπορεί να μεταβληθεί μόνο αν υπάρξει ένα σηματοδοτικό μόριο ικανό να συνδεθεί στην περιοχή αυτοαναστολής (CR1) ανταγωνιζόμενο τη σύνδεσή της με την περιοχή κινάσης, όπως για παράδειγμα η Ras-GTP. Η σύνδεση της ενεργοποιημένης Ras-GTP στην περιοχή RBD της CR1 σπάζει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις της Raf οδηγώντας σε μια αλλαγή διαμόρφωσης, στο “άνοιγμα” δηλαδή της c-Raf, που είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της κινάσης και τη σύνδεση του υποστρώματος.

Οι **πρωτεΐνες 14-3-3**, επίσης, συμμετέχουν στην αυτοαναστολή της Raf-1. Οι 14-3-3 είναι μικρές όξινες πρωτεΐνες που σχηματίζουν ιδιόσυστατα διμερή (**Εικόνα 8.59A**). Το όνομά τους αναφέρεται στον χαρακτηριστικό τρόπο έκλουσης και μετακίνησης αυτών των πρωτεϊνών σε χρωματογραφία DEAE-κυτταρίνης και ηλεκτροφόρηση σε ηλεκτρικό αμύλου. Οι 14-3-3 εκκλύονται στο 14ο κλάσμα του ομογενοποιημένου εγκεφάλου βοοειδών και βρέθηκαν στη θέση 3.3 της επακόλουθης ηλεκτροφόρησης. Καθώς οι πρωτεΐνες 14-3-3 δρουν ως διμερή, οι πρωτεΐνες με τις οποίες δημιουργούν σύμπλοκα έχουν δύο θέσεις σύνδεσης, οι οποίες είναι κατάλοιπα φωσφοσερίνης/φωσφοθρεονίνης ενός συγκεκριμένου αμινοξικού μοτίβου. Όπως είδαμε, οι πρωτεΐνες 14-3-3 δεσμεύονται στα ιδιόσυστατα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα pSer259 και pSer621 της Raf κινάσης. Έτσι, το διμερές 14-3-3 δρα ως “μοριακή χειροπέδη” κλειδώνοντας τη Raf σε μια σταθερή ανεργή διαμόρφωση (**Εικόνα 8.59B**). Αποφωσφορυλίωση της pSer259 από τη φωσφατάση PP2A απομακρύνει το ένα μονομερές 14-3-3 από την NH<sub>2</sub>-τελική θέση σύνδεσής του.

**Εικόνα 8.59**  
A. Δομή του διμερούς 14-3-3. Το κάθε μονομερές (πράσινο και κόκκινο) αποτελείται από 9 α-έλικες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα κανάλι σχήματος U, όπου μπορεί να συνδεθεί ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο (κυρίως pSer ή pThr), το οποίο βρίσκεται σε μια συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία. [146] B. Κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής της κινάσης c-Raf, όπου η περιοχή CR1 (RBD και CRD) βρίσκεται συνδεδεμένη με την καταλυτική περιοχή και, επιπλέον, η διαμόρφωση αυτή κλειδώνει με τη βοήθεια του διμερούς 14-3-3, το οποίο συνδέεται στις pSer259 και pSer621.



Ο **διμερισμός** είναι ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της C-Raf και απαιτείται για τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης της κινάσης. Μετά την άρση της κατάστασης αυτοαναστολής και την υιοθέτηση της ανοιχτής της διαμόρφωσης η Raf διμερίζεται. Κανονικά, μόνο οι “ανοιχτές” περιοχές κινάσης μπορούν να διμεριστούν. Σε αντίθεση με την B-Raf, η οποία σχηματίζει εύκολα ομοδιμερή, η C-Raf προτιμά τη δημιουργία ετεροδιμερών με την B-Raf ή με την πρωτεΐνη σκαλωσιάς KSR. Τα διμερή συγκρατούνται με τις 14-3-3, οι οποίες συνδέονται στην pSer621 του κάθε μονομερούς. Στο στάδιο αυτό η δραστηριότητα των Raf κινάσεων είναι χαμηλή και ασταθής.

Για να επιτευχθεί πλήρης δραστηριότητα και σταθεροποίηση της ενεργούς κατάστασης, πρέπει να **φωσφορυλιωθεί ο βρόχος ενεργοποίησης** της C-Raf. Οι μόνες κινάσες σήμερα γνωστές για την εκτέλεση της φωσφορυλίωσης της Ser338 είναι οι ίδιες οι κινάσες Raf, μέσω trans- και cis-αυτοφωσφορυλίωσης. Κάποιες άλλες κινάσες, όπως η PAK1, η CK2 (Casein Kinase) και οι κινάσες SFKs (Src Family Kinases), μπορούν να φωσφορυλιώσουν άλλα κατάλοιπα κοντά στην περιοχή κινάσης της C-Raf, αλλά ο ακριβής ρόλος αυτών των βοηθητικών κινάσεων είναι άγνωστος. Ο φωσφορυλιωμένος βρόχος ενεργοποίησης αλληλεπιδρά με συντηρημένα κατάλοιπα Arg και Lys της περιοχής κινάσης κλειδώνοντας μόνιμα μια πλήρως ενεργή κατάσταση κινάσης έως ότου αποφωσφορυλιωθεί. Επίσης, καθιστά την κινάση ανεπηρέαστη από την παρουσία της περιοχής αυτοαναστολής. Αυτή τη στιγμή η C-Raf είναι πλήρως ενεργοποιημένη. Τα γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση της Raf οδηγούν κυρίως στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των κινάσεων MAPKs (**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inases), στο οποίο συμμετέχουν οι κινάσες MEK και ERK. Για τις MAPKs και τα αποτελέσματά τους θα μιλήσουμε αναλυτικά στην επόμενη 4η ενότητα.

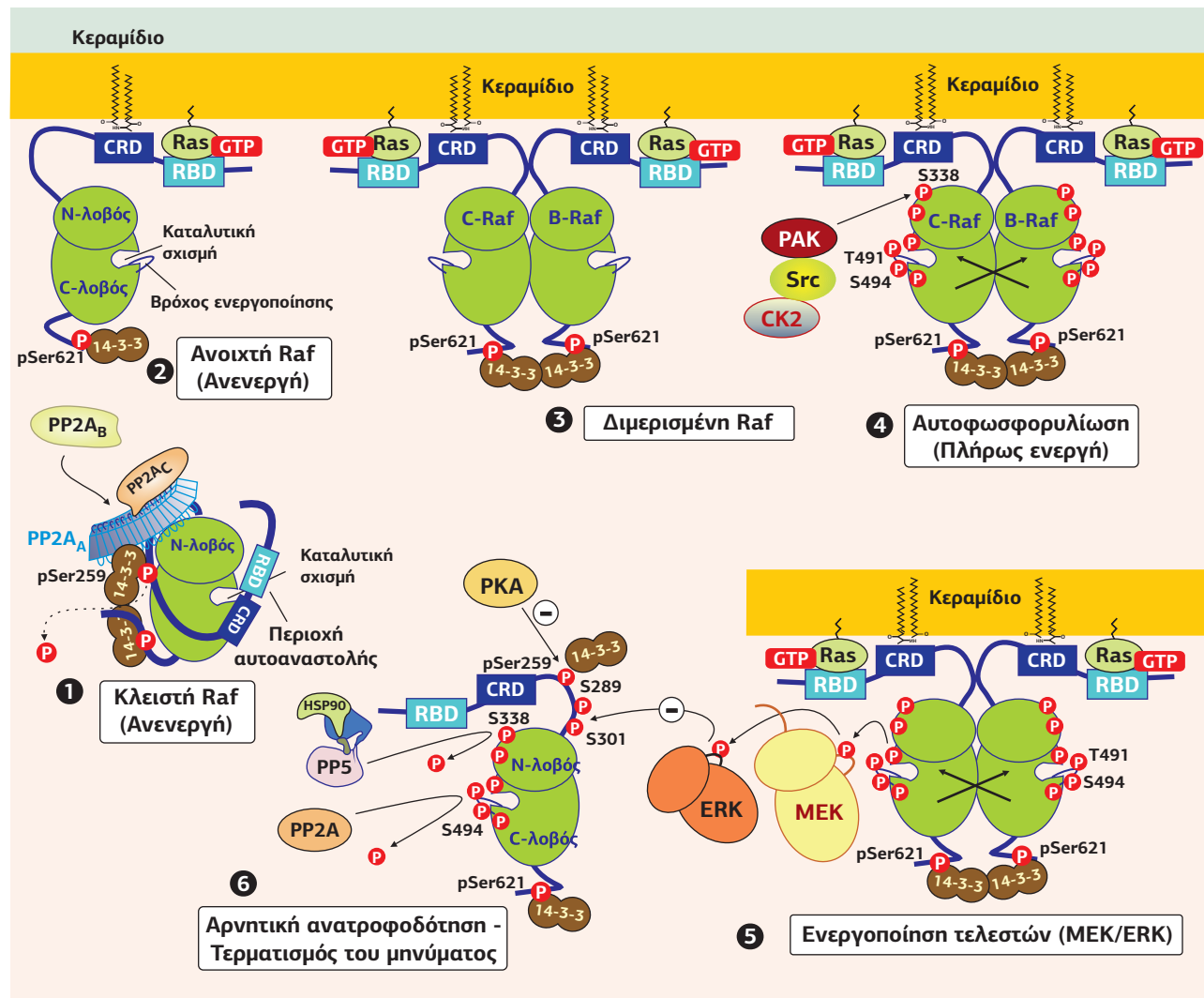
Τέλος, η **φωσφορυλίωση επιπλέον καταλοίπων Ser/Thr και Tyr** ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά τη δραστηριότητα της Raf. Μια αρνητική ρύθμιση της Raf παρατηρείται από φωσφορυλίωση που μεσολαβείται από την PKA. Αντιθέτως, η PKC ενεργοποιεί την Raf μέσω φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, φωσφορυλίωση της Tyr341 από την κινάση Src παρατηρείται κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης του μονοπατιού Ras-Raf. Πώς τα διαφορετικά είδη φωσφορυλίωσης προγραμματίζονται στο γενικό σηματοδοτικό μονοπάτι της Ras/Raf δεν είναι αρκετά κατανοητά.

### Ο κύκλος ενεργοποίησης/ανεργοποίησης της κινάσης Raf

Η Raf σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε μια αναδιπλωμένη μορφή, συνδεδεμένη μέσω των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων pSer259 (στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο) και pSer621 (στο COOH-τελικό άκρο) με το διμερές της 14-3-3. Σε αυτήν τη διαμόρφωση η θέση σύνδεσης της Ras (RBD), αλλά και η θέση σύνδεσης στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης (CRD) βρίσκονται κρυμμένες.

Η διέγερση των υποδοχέων RTKs ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Ras (Ras-GTP) αλλά παράλληλα ενεργοποιεί και τη φωσφατάση PP2A, η οποία αποφωσφορυλιώνει την pSer259 απελευθερώνοντας τη 14-3-3 από τη NH<sub>2</sub>-τελική θέση σύνδεσής της στη Raf-1. Ως αποτέλεσμα, η διαμόρφωση της Raf μεταβάλλεται ξεσκεπάζοντας τις περιοχές RBD και CRD, επιτρέποντας τη σύνδεση στη Ras-GTP και τη στρατολόγηση και σύνδεση στα κεραμίδια της μεμβράνης, μέσω της περιοχής CRD. Η PP2A είναι ένα ετεροτριμερές ένζυμο, το οποίο αποτελείται από μια καταλυτική PP2A<sub>C</sub>, μια δομική PP2A<sub>A</sub> και μια ρυθμιστική PP2A<sub>B</sub> υπομονάδα (βλ. **Εικόνα 7.61**). Σε κατάσταση ηρεμίας οι PP2A<sub>C</sub> και PP2A<sub>A</sub> βρίσκονται συνδεδεμένες με τη Raf, αλλά ανεργές. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων επάγει τη μεταφορά της PP2A<sub>B</sub> στη Raf, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ολοενζύμου PP2A.

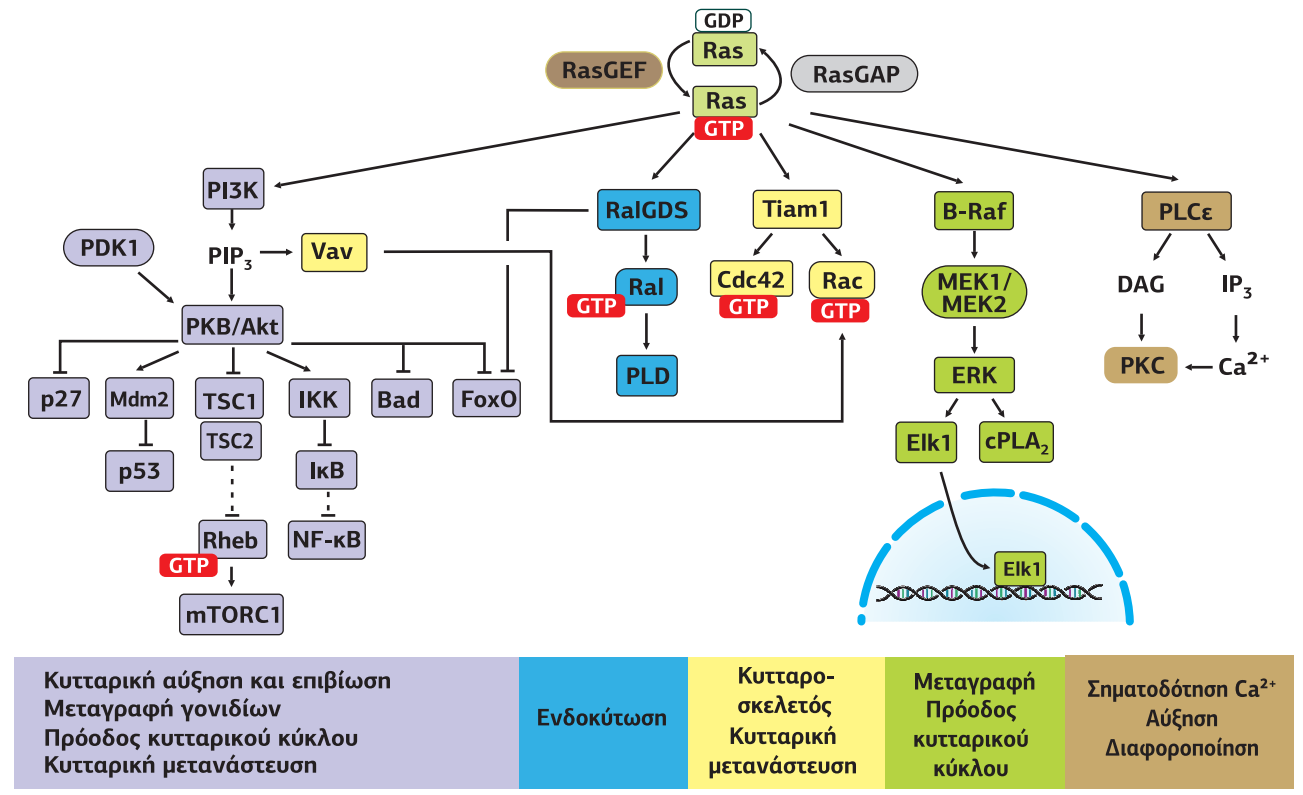
Για την πλήρη ενεργοποίηση της Raf απαιτείται ο διμερισμός της και η trans-αυτοφωσφορυλίωση της Ser494 στον βρόχο ενεργοποίησης της περιοχής κινάσης. Η ανεργοποίηση αρχίζει με τη σύνδεση της φωσφατάσης PP5 στην ενεργοποιημένη Raf-1, η οποία οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση της pSer491, την επαναφωσφορυλίωση της Ser και τελικά την επιστροφή στην ανεργή κατάσταση (**Εικόνα 8.60**).



Εικόνα 8.60

**Ο κύκλος ενεργοποίησης / απενεργοποίησης της κινάσης C-Raf.**

1. Ανενεργή διαμόρφωση: Απουσία σήματος, η C-Raf βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε κατάσταση αυτοαναστολής. Οι δύο θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3 είναι ιδιόσυστα φωσφορυλιωμένες (pSer259 και pSer621) και οι 14-3-3 διατηρούν την κλειστή ανενεργή διαμόρφωση στη C-Raf. Συνδεδεμένες στη Raf, αλλά ανενεργές βρίσκονται, επίσης, οι δύο υπομονάδες της PP2A (PP2A<sub>C</sub> και PP2A<sub>B</sub>). 2. Άρση της αυτοαναστολής: Όταν η ενεργοποιημένη Ras-GTP και τα απαραίτητα φωσφολιπίδια (κεραμίδια) είναι παρόντα, η C-Raf στρατολογείται στη μεμβράνη, καθώς η pSer259 αποφωσφορυλιώνεται από τη φωσφατάση PP2A (η οποία ενεργοποιείται, καθώς συνδέεται και η ρυθμιστική PP2A<sub>B</sub> υπομονάδα) και οι αλληλεπιδράσεις αυτοαναστολής διαταράσσονται, χωρίς ωστόσο η κινάση να γίνει ενεργή. 3. Διμερισμός: Η C-Raf στην ανοικτή της διαμόρφωση δημιουργεί άμεσα ετεροδιμερή (με B-Raf ή με την KSR), ενώ παραμένει συνδεδεμένη στη μεμβράνη. Αυτό οδηγεί τον βρόχο ενεργοποίησης να υιοθετήσει μια μερικώς ενεργή διαμόρφωση μέσω αλλοστερικής αλληλεπίδρασης. 4. Trans-αυτοφωσφορυλίωση: Το διμερές C-Raf/B-Raf trans- και cis-αυτοφωσφορυλιώνεται οδηγώντας σε μια πλήρως ενεργή διαμόρφωση. Άλλες κινάσες, όπως η PAK1 (που ενεργοποιείται από τη Cdc42-GTP), μπορούν να συμμετέχουν σε αυτό το βήμα με επιπλέον φωσφορυλίωση του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου της περιοχής κινάσης. 5. Ενεργοποίηση των MEK-ERK κινασών: Στην πλήρως ενεργή διαμόρφωση η διμερής Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το υπόστρωμά της, την κινάση MEK. Η ενεργή MEK φωσφορυλιώνει στη συνέχεια την ERK. Η ERK απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα φωσφορυλιώνοντας τους στόχους της, που είναι κυρίως μεταγραφικοί παράγοντες. 6. Λήξη του σήματος: Μέσω ενός βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης η ERK μπορεί να φωσφορυλιώσει την περιοχή CR2 της Raf, οδηγώντας στη διάσπαση του διμερούς. Επιπλέον, στη Raf συνδέεται η φωσφατάση PP5, η οποία αποφωσφορυλιώνει την pSer338 του N-λοβού. Τελικά, η PP2A (και ίσως και άλλες άγνωστες φωσφατάσες) αποφωσφορυλιώνει τις υπόλοιπες θέσεις του βρόχου ενεργοποίησης. Η επαναφωσφορυλίωση της Ser259 επιτρέπει την επανασύνδεση των διμερών 14-3-3 και την επιστροφή στην ανενεργή κατάσταση. [112]



**Χαρακτηριστικοί τελεστές της οικογένειας Ras**

Εκτός από την κινάση Raf έχουν προσδιοριστεί διάφορες άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, στις οποίες έχει αποδοθεί μια λειτουργία τελεστή στη μετάδοση σήματος Ras. Αυτοί οι τελεστές αποτελούν μια ετερογενή ομάδα από δομικά και λειτουργικά ευδιάκριτες πρωτεΐνες, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την ενεργή Ras-GTP (Εικόνα 8.61).

**Η κινάση PI3K.** Η ενεργοποιημένη Ras-GTP συνδέεται εξειδικευμένα με την καταλυτική υπομονάδα 110 kDa της PI3-Κινάσης (p110) της τάξης IA (βλ. Εικόνα 5.83, σελ. 307). Η σύνδεση πραγματοποιείται μέσω της περιοχής τελεστή της πρωτεΐνης Ras και της περιοχής RBD (Ras Binding Domain) της p110 PI3K. Η PI3K ενεργοποιείται με μια συνδυαστική δράση των υποδοχών RTKs και της Ras-GTP: ο ενεργοποιημένος RTK συνδέει στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του τις SH2 περιοχές της αυτοανασταλτικής υπομονάδας p85 και ταυτόχρονα στρατολογεί την PI3K στη μεμβράνη, ενώ η Ras-GTP συνδέεται στην RBD της καταλυτικής υπομονάδας p110, οδηγώντας στην ανοικτή διαμόρφωση της κινάσης. Η σύνδεση της p110 στη μεμβράνη σταθεροποιείται με τη σύνδεση της C2 περιοχής με τα PIP<sub>2</sub> (Εικόνα 8.62). Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί στον σχηματισμό PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, που συνδέουν τις περιοχές PH των σηματοδοτικών πρωτεϊνών, οι οποίες στρατολογούνται στη μεμβράνη, όπου και ενεργοποιούνται. Τα φωσφολιπίδια PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> επηρεάζουν πολλές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και η καταστολή της απόπτωσης.

Η ενεργοποίηση της PI3K από τη Ras-GTP συνδέει την πρωτεΐνη Ras με την κινάση PKB/Akt, η οποία μεσολαβεί στα αντιαποπτωτικά σήματα και στην επιβίωση του κυττάρου. Επίσης, συνδέει το σηματοδοτικό μονοπάτι των Ras με τις λειτουργίες των πρωτεϊνών Rho/Cdc42, οι οποίες ελέγχουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Η ακριβής φύση του μονοπατιού που οδηγεί τα σήματα της Ras/PI3K στις πρωτεΐνες Rac είναι άγνωστη. Υπάρχουν στοιχεία ότι το προϊόν της PI3-κινάσης, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, δεσμεύεται στην περιοχή PH της πρωτεΐνης Vav και την ενεργοποιεί. Η πρωτεΐνη Vav λειτουργεί ως παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων για την Rac GTPάση.

Εικόνα 8.61 Πρωτεΐνες στόχοι της ενεργοποιημένης Ras-GTP.

Από την ενεργοποιημένη Ras, τα σήματα περνούν στα διάφορα μέρη τελεστές μεταξύ των οποίων οι κινάσες MAPKs (Raf, MEK, ERK), που προωθούν την πορεία του κυτταρικού κύκλου, η PI3K, η οποία επηρεάζει την αύξηση και την κυτταρική επιβίωση (μέσω της κινάσης PKB/Akt), η PLCε, η οποία οδηγώντας στην αύξηση του Ca<sup>2+</sup> επάγει την κυτταρική αύξηση και τη διαφοροποίηση, ο RalGDS, ένας GEF που ενεργοποιεί την Ral GTPάση, η οποία ενεργοποιεί την PLD επάγοντας την ενδοκύτωση μέσω κυστιδίων, και τέλος ο Tiam1, ένας GEF, ο οποίος ενεργοποιείται από τη Ras-GTP μέσω της RBD και, στη συνέχεια, ενεργοποιεί τη Rac και τη Cdc42 επηρεάζοντας τον κυτταροσκελετό. Καλύτερα κατανοητή είναι η λειτουργία τελεστή της Raf κινάσης, η οποία περνά το σήμα στο επίπεδο μεταγραφής μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών. [27] [38]



μόνο από τον τομέα GTPάσης και κοντά NH<sub>2</sub>- και COOH-τελικά άκρα. Ωστόσο, ορισμένα από τα άτυπα μέλη της οικογένειας περιέχουν επιπλέον περιοχές και μπορεί να φτάνουν έως >700 αμινοξέα. Οι περισσότερες Rho στο COOH-τελικό τους άκρο περιέχουν μια πολυβασική περιοχή [K/R] και το μοτίβο CAAX, το οποίο υφίσταται μεταμεταφραστικές φαρνεσυλο- ή γεραυλγερανυλο-λιπιδιώσεις που επιτρέπουν στις Rho τη σύνδεση στη μεμβράνη. Εξαιρέση αποτελούν οι Chp, RhoBTB και Miro, οι οποίες δεν έχουν λιπιδικές άγκυρες.

Η GTPάση RhoBTB δεν υφίσταται καμιά μεταμεταφραστική λιπιδίωση, ενώ περιέχει δύο περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης BTB (από τους μεταγραφικούς καταστολείς Broad complex, Tramtrack και Bric-a-brac της *Drosophila*, στους οποίους ανακαλύφθηκε) στο COOH-τελικό της άκρο. Οι GTPάσες Miro1/2 ανακαλύφθηκαν το 2003 ψάχνοντας στο ανθρώπινο γονιδίωμα για πρωτεΐνες ομόλογες των Rho. Περιέχουν δύο περιοχές EF-hand (EF) και δύο περιοχές GTPάσης (Εικόνα 8.64A). Ωστόσο, η έλλειψη Rho insert region, καθώς και ο μηδενικός ρόλος τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, πιθανόν κατατάσσει τις Miro στην οικογένεια των Ras.

Όλες οι GTPάσες της οικογένειας Rho συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αλλά ο αντίκτυπος του κάθε μέλους της οικογένειας στον κυτταροσκελετό είναι διαφορετικός. Η ενεργοποίηση της **RhoA** οδηγεί στον σχηματισμό ινιδίων πίεσης (stress fibers) ακτίνης και θέσεων εστιακής προσκόλλησης (focal adhesions). Η ενεργοποίηση της **Rac1** επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου, ώστε να παραχθούν προεξοχές πλούσιες σε ακτίνη, όπως τα ελασματοπόδια (lamellipodia) και πτυχώσεις της μεμβράνης. Η **Cdc42** επάγει τη δημιουργία επιμήκων παράλληλων δεσμίδων νηματίων ακτίνης, οδηγώντας στον σχηματισμό των φιλοποδίων (filopodia). Αυτές οι αναδιαρθρώσεις του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλούνται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Rho έχουν επιπτώσεις στη μορφολογία των κυττάρων, την πολικότητα, την κινητικότητα και την προσκόλλησή τους (βλ. Εικόνα 8.70).

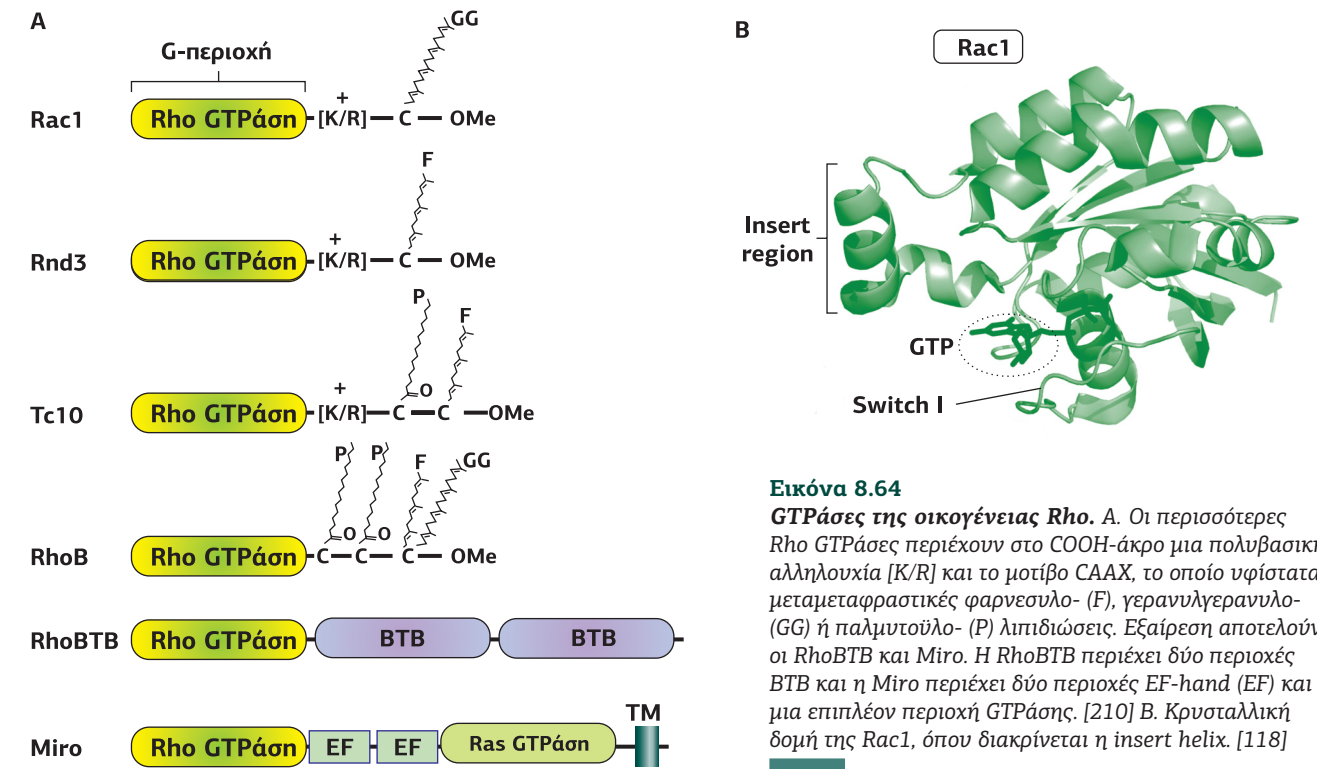
Εκτός από τη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, οι πρωτεΐνες Rho μπορούν να δράσουν και ως ρυθμιστές της ενζυμικής δραστηριότητας. Για παράδειγμα, η Rac1 ελέγχει το ενζυμικό σύμπλοκο που είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό υπεροξειδίου (οξειδάση του NADPH), ενώ η RhoA ρυθμίζει τις Rho-κινάσες (ROCK1 και ROCK2), με αποτέλεσμα τον έλεγχο της συστολής των ινιδίων ακτινομοουσίνης. Τελευταίο αλλά όχι λιγότερο σημαντικό: οι πρωτεΐνες Rho παίζουν ρόλο στη μεταγραφή γονιδίων και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

### Ενεργοποίηση των Rho GTPασών

Οι πρωτεΐνες Rho/Rac/Cdc42 ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά σήματα, τα οποία συνδέονται σε μια ποικιλία μεμβρανικών υποδοχέων, όπως υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs), υποδοχείς συνδεδεμένοι με κινάσες τυροσίνης (όπως οι ιντεγκρίνες), αλλά και GPCRs.

Το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA), συστατικό του ορού, ήταν ο πρώτος αγωνιστής ο οποίος το 1997 βρέθηκε να οδηγεί στην ενεργοποίηση της **RhoA**. Προσθήκη αυτού του λιπιδίου σε ινοβλάστες ενεργοποιεί τη δημιουργία ινιδίων πίεσης ακτίνης και θέσεων εστιακής προσκόλλησης, γεγονός τα οποία στη συνέχεια αναστέλλονται από έναν αναστολέα των Rho, τη C3-ριβουλοτρανσφεράση. Κατόπιν, αναγνωρίστηκαν και άλλα μόρια ικανά να ενεργοποιήσουν τις RhoA, όπως η σφιγγοσίνη, η βομβεσίνη, η θρομβίνη, η ενδοθηλίνη, η ακετυλοχολίνη και το γλουταμινικό. Όλα τα παραπάνω μόρια δρουν μέσω υποδοχέων GPCRs, καθένα από τους οποίους ενεργοποιεί μια διαφορετική Ga. Οι υποδοχείς του LPA, της θρομβίνης και της σφιγγοσίνης ενεργοποιούν την Ga<sub>12/13</sub>, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τον p115-RhoGEF, ενώ ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης και του γλουταμινικού ενεργοποιούν την Ga<sub>q</sub>, η οποία ενεργοποιεί άλλους RhoGEFs.

Αυξητικοί παράγοντες, όπως η ινσουλίνη, ο PDGF και ο EGF, οι οποίοι δρουν μέσω των υποδοχέων RTKs, προκαλούν στους ινοβλάστες αναδιπλώσεις της μεμ-



**Εικόνα 8.64**  
GTPάσες της οικογένειας Rho. Α. Οι περισσότερες Rho GTPάσες περιέχουν στο COOH-άκρο μια πολυβασική αλληλουχία [K/R] και το μοτίβο CAAX, το οποίο υφίσταται μεταμεταφραστικές φαρνεσυλο- (F), γεραυλγερανυλο- (GG) ή παλμντοϋλο- (P) λιπιδιώσεις. Εξαιρέση αποτελούν οι RhoBTB και Miro. Η RhoBTB περιέχει δύο περιοχές BTB και η Miro περιέχει δύο περιοχές EF-hand (EF) και μια επιπλέον περιοχή GTPάσης. [210] Β. Κρυσταλλική δομή της Rac1, όπου διακρίνεται η insert helix. [118]

βράνης (membrane ruffling) **Rac**-εξαρτώμενες. Αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, ένα μόριο κλειδί σε αυτήν την οδό φαίνεται να είναι η PI3K. Χορήγηση στους ινοβλάστες wortmannin (βλ. σελ. 306), ενός αναστολέα της PI3K, αναστέλλει τη Rac-μεσολαβούμενη πτύχωση της μεμβράνης ως απάντηση στον EGF. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι η PI3K είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του Tiam, ενός RacGEF, ο οποίος στρατολογείται στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης μέσω της PH περιοχής του.

Επίσης, και οι υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης και δρουν ως μόρια προσκόλλησης, όπως οι ιντεγκρίνες, είναι ικανοί να ενεργοποιήσουν τις Rac. Συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, όταν προσδεθούν στις ιντεγκρίνες, μεταβάλλουν τη μορφολογία του κυττάρου. Αυτές οι μεταβολές βρέθηκε ότι εξαρτώνται από την ενεργοποίηση των Rac. Όταν η ινωδονεκτίνη δεσμεύεται στις ιντεγκρίνες, το COOH-άκρο του μορίου της ιντεγκρίνης που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί πρωτεΐνες προσκόλλησης των νηματίων ακτίνης (ταλίνη, παξιλίνη, τανσίνη), δημιουργώντας πλάκες εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion plaques) δεσμίδων ινιδίων ακτίνης. Η Rac2 ενεργοποιείται από τον GEF β-Pix, τον οποίο ενεργοποιεί η FAK με φωσφορυλίωση (βλ.σελ. 721 και Εικόνα 9.61).

Πάρα πολύ λίγα είναι γνωστά για τους ενεργοποιητές των **Cdc42**. Η βραδυκίνη, μέσω των GPCRs της, προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό ακτίνης, με σχηματισμό φιλοποδίων Cdc42-εξαρτώμενων, μέσω ενός μηχανισμού που πιθανόν εμπλέκει τις Gβγ. Επίσης, και οι κυτοκίνες προκαλούν αλλαγές στον κυτταροσκελετό ακτίνης Cdc42-εξαρτώμενες.

Ο ακριβής μηχανισμός, μέσω του οποίου το μήνυμα μεταφέρεται από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς στις πρωτεΐνες της οικογένειας Rho, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Οι Rho ρυθμίζονται από τρεις μεγάλες οικογένειες πρωτεϊνών, τους RhoGEFs, τις RhoGAPs και τους RhoGDIs. Λόγω του μεγάλου αριθμού και της δομικής ποικιλομορφίας αυτών των πρωτεϊνών οι μηχανισμοί ενεργοποίησής τους είναι πολλοί και ετερογενείς. Γι' αυτό και η ενεργοποίηση των Rho από τους GEFs δεν συμβαίνει με έναν απομονωμένο γραμμικό τρόπο, αλλά μέσω του αλληπάλληλου σχηματισμού μακρομοριακών συμπλόκων σε συγκεκριμένα σημεία στον χρόνο και τον χώρο. Επιπλέον, η πλήρης κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ενεργοποιούνται

οι πρωτεΐνες Rho από τα εξωκυτταρικά σήματα απαιτεί περισσότερη γνώση του τρόπου ρύθμισης και συντονισμού των RhoGEFs με τους GDIs, τις GAPs, αλλά και με άλλα μόρια σηματοδότησης.

**RhoGDIs**

Η σύνδεση των Rho-GDP, μέσω της άγκυρας λιπιδίου του COOH-τελικού τους άκρου, με τους **RhoGDIs** (GDP-Dissociation Inhibitor) απομακρύνει τις Rho-GDP από τη μεμβράνη και εμποδίζει την ανταλλαγή GDP/GTP, κρατώντας τες, συνεπώς, ανενεργές στο κυτταρόπλασμα (βλ. **Εικόνα 8.46B**). Η οικογένεια RhoGDI αποτελείται από τρία μέλη στα θηλαστικά: τον RhoGDIα, το αρχέτυπο μέλος της οικογένειας που εκφράζεται ευρέως, τον RhoGDIβ, ο οποίος εκφράζεται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα, και κυρίως στα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, και τον RhoGDIγ, ο οποίος βρίσκεται συνδεδεμένος στη μεμβράνη μέσω μιας αμφιπαθούς έλικας και εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, στο πάγκρεας και στους πνεύμονες. Οι RhoGDIs έχουν μια μακριά εξελικτική ιστορία και βρίσκονται στις ζύμες, στον *Caenorhabditis elegans*, στο *Dictyostelium*, στο *Arabidopsis* και στη *Drosophila melanogaster*.

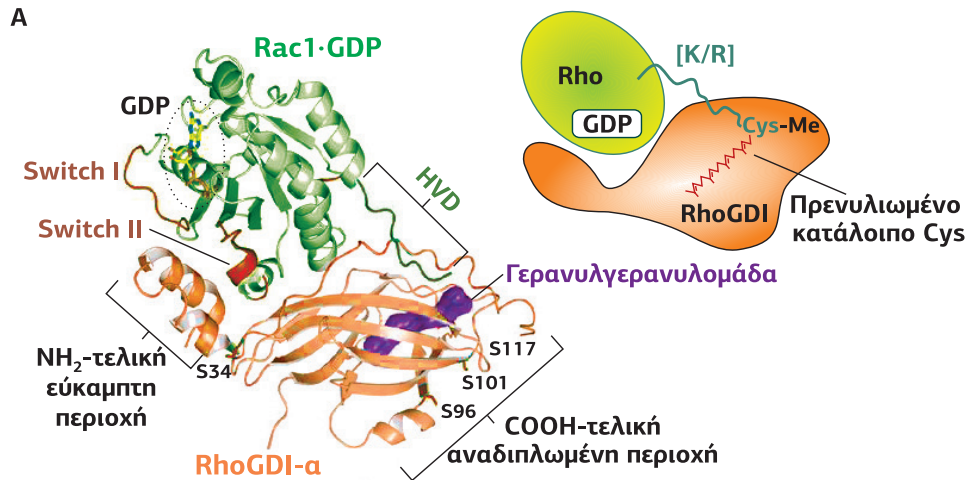
Ο RhoGDIα περιλαμβάνει δύο δομικά διακριτές περιοχές: μια NH<sub>2</sub>-τελική εύκαμπτη περιοχή (κατάλοιπα 1-69) και μια COOH-τελική αναδιπλωμένη περιοχή (κατάλοιπα 70-204). Και οι δύο περιοχές συμβάλλουν σημαντικά στη σύνδεση και, κατά συνέπεια, στις ανασταλτικές δράσεις του GDI μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-λιπιδίων. Έχει προταθεί ένας μηχανισμός δύο σταδίων για τη σύνδεση της Cdc42-GDP στον RhoGDI και την απομάκρυνσή της από τη μεμβράνη. Στο πρώτο στάδιο η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή του RhoGDI συνδέεται στις περιοχές

**Εικόνα 8.65**

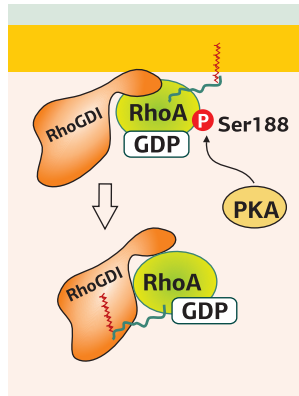
**Οι αναστολείς RhoGDIs των GTPασών της οικογένειας Rho.**

A. Κρυσταλλική δομή της λιπιδιωμένης Rac1-GDP σε σύμπλοκο με τον RhoGDI. Διακρίνονται οι Ser, οι οποίες όταν φωσφορυλιωθούν ρυθμίζουν τη δράση του RhoGDI. [56] [29]

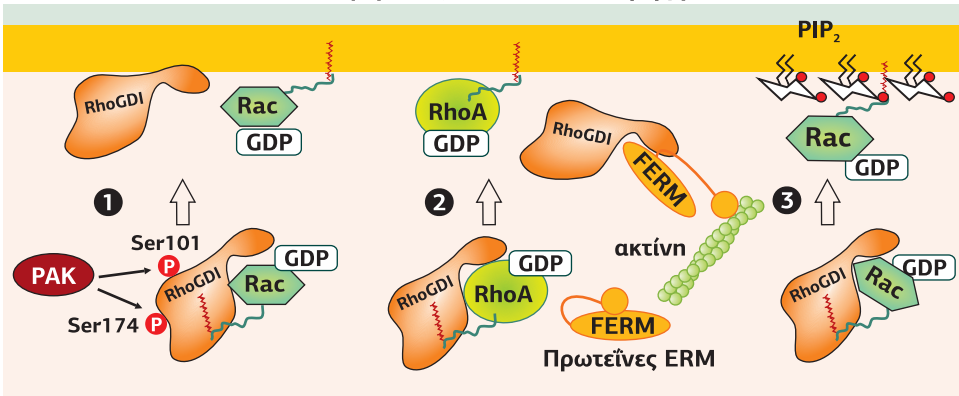
B. Το σύμπλοκο RhoA-GDP / RhoGDI απομακρύνεται από την πλασματική μεμβράνη μετά από φωσφορυλίωση της RhoA στη Ser188, από την κινάση PKA. Γ. Μηχανισμοί αποσύνδεσης του συμπλόκου Rho-RhoGDI: φωσφορυλίωση από κινάσες, όπως η PAK, ύπαρξη στη μεμβράνη αυξημένης συγκέντρωσης συγκεκριμένων φωσφολιπιδίων και σύνδεση του RhoGDI με την περιοχή FERM των πρωτεϊνών ERM. [56]



**B Απομάκρυνση της RhoA-GDP από τη μεμβράνη**



**Γ Αποσύνδεση του συμπλέγματος RhoGDI-RhoA(GDP) και επαναφορά της RhoA(GDP) στη μεμβράνη**



switch I και II της Cdc42. Αυτό οδηγεί στην προσέλκυση της υδρόφοβης περιοχής του GDI στην επιφάνεια της μεμβράνης, επιτρέποντας τη σύνδεση με την υπερμεταβλητή περιοχή της GTPάσης και τη γερανυλγερανυλομάδα που περιέχει. Το δεύτερο στάδιο αντιστοιχεί στην ισομερίωση της γερανυλγερανυλομάδας και στην εισαγωγή της μέσα στον υδρόφοβο θύλακα του GDI, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της Cdc42 από τη μεμβράνη (**Εικόνα 8.65A**).

Οι μηχανισμοί οι οποίοι επάγουν τον σχηματισμό σταθερών κυτταροπλασματικών συμπλόκων Rho-RhoGDI παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, αν και η φωσφορυλίωση φαίνεται να παίζει έναν σημαντικό ρόλο τόσο στην απομάκρυνση από τη μεμβράνη όσο και στη σταθερότητα του κυτταροπλασματικού συμπλόκου. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση από την PKA της RhoA στη Ser188 έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της από τη μεμβράνη των λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας τη σύνδεση με τον RhoGDIα (**Εικόνα 8.65B**). Επίσης, η φωσφορυλίωση από την κινάση Src της Cdc42-GDP στην Tyr64 ενισχύει τη σύνδεση μεταξύ Cdc42 και RhoGDIα.

Ωστόσο, η φωσφορυλίωση είναι και ένας από τους μηχανισμούς που ελέγχουν την αποσύνδεση του συμπλόκου Rho-RhoGDI. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση του RhoGDIα σε δύο θέσεις, Ser101 και Ser174, από την κινάση PAK (p21 Activated Kinase) έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του συμπλόκου Rac1-RhoGDIα. Ένας δεύτερος μηχανισμός για την αποδέσμευση των πρωτεϊνών Rho από το σύμπλοκο Rho-RhoGDI περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η οικογένεια των πρωτεϊνών ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση της ακτίνης, μέσω της περιοχής FERM που περιέχουν, συνδέονται στους RhoGDIα εκποπίζοντάς τους και από τις τρεις GTPάσες, RhoA, Rac1 και Cdc42. Ένας τρίτος μηχανισμός αποσύνδεσης του συμπλόκου Rho-RhoGDI και μετατόπισης των Rho προς τη μεμβράνη μπορεί να προκληθεί και από μια τοπική αύξηση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων φωσφολιπιδίων. Η λειτουργία πολλών Rho απαιτεί φωσφολιπιδικά μικροπεριβάλλοντα, ικανά να συγκεντρώσουν σηματοδοτικά μόρια και να αλλάξουν τις δραστηριότητες και τις λειτουργίες τους. Για παράδειγμα, αυξημένη συγκέντρωση αραχιδονικού οξέος, φωσφατιδικού οξέος και PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> μπορεί να διαχωρίσει το κυτταροπλασματικό σύμπλεγμα Rac1-RhoGDIα, καθώς διευκολύνει τη σύνδεση του συμπλέγματος στις μεμβράνες και επιτρέπει τον ανταγωνισμό με τους GEFs ή με τελεστές που τελικά θα απομακρύνουν τον RhoGDI και θα μεταδώσουν το σήμα (**Εικόνα 8.65Γ**).

**RhoGEFs**

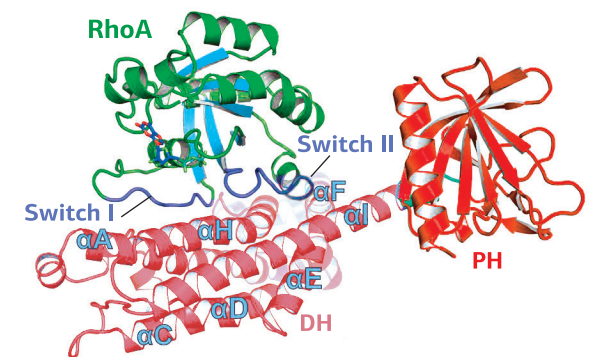
Όπως όλες οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Ras, έτσι και οι Rho ενεργοποιούνται από τους GEFs, οι οποίοι καταλύουν την ανταλλαγή του GDP με GTP, οδηγώντας στην ενεργοποιημένη Ras-GTP διαμόρφωση. Η οικογένεια των RhoGEFs περιλαμβάνει ~60 μέλη, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Dbl (Diffuse B-cell lymphoma) και χαρακτηρίζονται από την καταλυτική περιοχή DH (Dbl Homology) που ακολουθείται από την περιοχή PH (Pleckstrin Homology), η οποία συνδέεται στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης (**Εικόνα 8.66**). Η οικογένεια των RhoGEFs περιλαμβάνει, επίσης, και ~10 μέλη που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και ανήκουν στην οικογένεια των DOCK (Dedicator of Cytokinesis), οι οποίες αντί για DH/PH περιέχουν μια περιοχή DHR2 (DOCK Homology Region 2), η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των Rac σταθεροποιώντας μια ελεύθερη από νουκλεοτίδια διαμόρφωση (βλ. **Εικόνα 8.45A**).

Ορισμένοι RhoGEFs εμφανίζουν εξειδίκευση για μία μόνο Rho, όπως ο p190-RhoGEF, ο οποίος ενεργοποιεί την RhoA, ο Tuba που ενεργοποιεί την Cdc42 και ο Trio ο οποίος ενεργοποιεί τη Rac (και με μικρότερη συγγένεια τη Cdc42). Ο Trio καθώς περιέχει δύο περιοχές DH/PH,

Το προϊόν του ογκογονιδίου *dbl* απομονώθηκε αρχικά από το λέμφωμα διάχυτων Β-κυττάρων (diffuse B-cell lymphoma), μια κακοήθη νεοπλασματική νόσο του λεμφικού συστήματος που προσβάλλει 8/100.000 άτομα τον χρόνο και χαρακτηρίζεται από διογκωμένους λεμφοαδένες. Η ανάλυση των αμινοξέων του έδειξε ότι περιέχει μια κεντρική περιοχή Dbl homology (DH), η οποία εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την περιοχή Cdc24 του ζυμομύκητα.

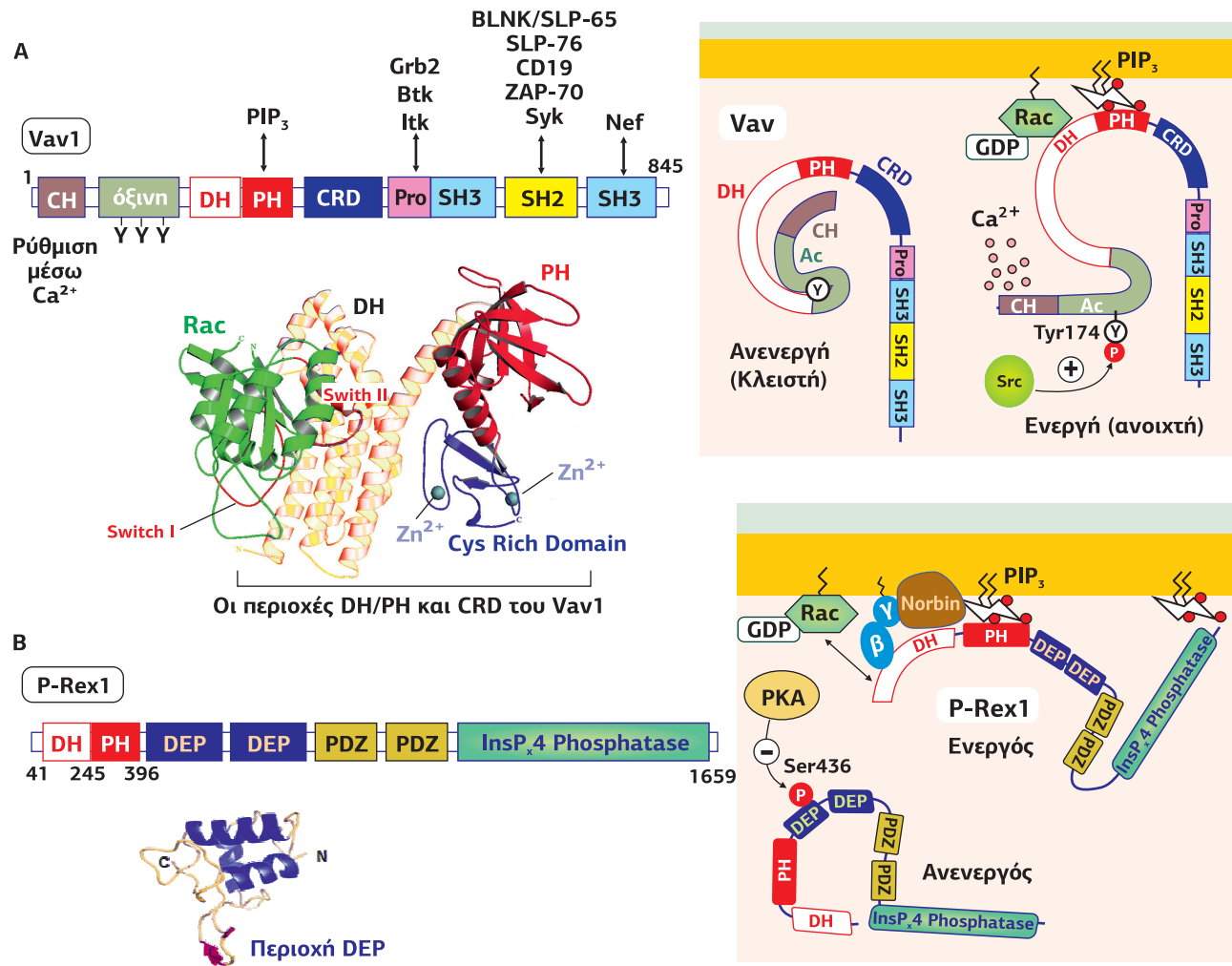
**Εικόνα 8.66**

**Δομή της περιοχής DH/PH της AKAP-Lbc (ή AKAP13), η οποία έχει και ρόλο RhoGEF.** Η RhoGEF περιοχή αποτελείται από μια καταλυτική DH (Dbl-Homology) περιοχή που ακολουθείται από μια PH (Pleckstrin Homology), της οποίας ο ρόλος ποικίλλει. Σε ορισμένους RhoGEFs, η PH προσανατολίζει την πρωτεΐνη στον κατάλληλο υποκυτταρικό χώρο μέσω της σύνδεσης στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης, αλλά σε κάποιους άλλους συμβάλλει στη δραστηριότητα της περιοχής DH. Διακρίνεται επίσης και η συνδεδεμένη RhoA.[2]



ενεργοποιεί εξειδικευμένα τη Rac μέσω της μίας και τη RhoA μέσω της άλλης DH/PH περιοχής. Υπάρχουν και οι GEFs που δεν εμφανίζουν εξειδίκευση, όπως ο Vav που μπορεί να ενεργοποιήσει τις Rac, RhoA και Cdc42, αν και *in vivo* εμφανίζει προτίμηση στη Rac. Τέλος, υπάρχουν και GEFs διπλής εξειδίκευσης, Ras-Rac, όπως ο SOS, ο οποίος διαθέτει μια περιοχή ανταλλαγής νουκλεοτιδίων Cdc25-homology για τις Ras, καθώς και μια περιοχή DH/PH για τις Rac.

Ένας κοινός μηχανισμός για την ενεργοποίηση των RhoGEFs είναι η απομάκρυνση των ενδομοριακών ανασταλτικών τους αλληλεπιδράσεων. Στην ενδομοριακή αυτοαναστολή εμπλέκεται συνήθως η περιοχή PH. Στον Dbl, για παράδειγμα, στο



Εικόνα 8.67

**Ρύθμιση της δραστηριότητας των RhoGEFs.** Α. Ο Vav περιέχει μια περιοχή CH (Calponin-homology), που συναντάται σε πρωτεΐνες που συνδέονται με την ακτίνη, μια όξινη περιοχή Ac (Acidic motif), που περιέχει τρεις καλά συντηρημένες τυροσίνες, η φωσφορυλίωση των οποίων σταθεροποιεί την ενεργή κατάσταση του Vav, την περιοχή DH/PH, μια περιοχή Zinc-finger πλούσια σε κυστεΐνη (CRD), μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD), δύο περιοχές SH3 και μια περιοχή SH2. Ο Vav για να μεταβεί από την κλειστή κατάσταση αυτοαναστολής στην ενεργή ανοικτή του κατάσταση πρέπει η PH περιοχή να συνδεθεί στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης και οι τρεις καλά συντηρημένες Tyr της όξινης περιοχής Ac, και κυρίως η Tyr174, να φωσφορυλιωθούν από τις κινάσες Src ή Syk. Η ανοικτή διαμόρφωση του Vav επιτρέπει την πρόσβαση των Rac-GDP στην περιοχή DH. [188] [32] Β. Ρύθμιση της δραστηριότητας του P-Rex1. Ο P-Rex1 αποτελείται από μια περιοχή DH/PH, δύο περιοχές DEP και δύο περιοχές PDZ, ενώ περιέχει και μια ομόλογη περιοχή φωσφατάσης φωσφοϊνοσιτιδίων. Ως απάντηση στην ενεργοποίηση των υποδοχέων η ανενεργή P-Rex1 από το κυτταρόπλασμα στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέεται άμεσα στα PIP<sub>3</sub>, στη Gβγ-υπομονάδα και σε μια πρωτεΐνη προσαρμογής, την norbin. Η αλληλεπίδραση με τα PIP<sub>3</sub> και την norbin συμβαίνει μέσω της περιοχής PH, ενώ η Gβγ συνδέεται στην DH περιοχή. Η PKA φωσφορυλιώνει τον P-Rex1 στη Ser436 (η οποία βρίσκεται στην πρώτη DEP περιοχή) επάγοντας την κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής. [85]

NH<sub>2</sub>-τελικό του άκρο περιέχει μια περιοχή αυτοαναστολής (AID, Auto-Inhibitory Domain), η οποία συνδέεται στην περιοχή PH, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση της GTPάσης στην περιοχή DH (βλ. **Εικόνα 8.45A**). Φωσφορυλίωση από την ACK1 ή αλληλεπίδραση με τις Gβγ υπομονάδες των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών (στην ειδική περιοχή σύνδεσης για Gβγ) μπορεί να άρει την αναστολή.

Οι ενδομοριακές ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν μια κλειστή διαμόρφωση στον Vav αίρονται έπειτα από σύνδεση στα λιπίδια της μεμβράνης και φωσφορυλίωση. Ο Vav ανακαλύφθηκε το 1989 από την Shulamit Katzav, η οποία αναζητούσε ογκογονίδια παρόντα στο ανθρώπινο καρκινικό DNA και, καθώς το γονίδιο αυτό ήταν το έκτο κατά σειρά που απομονώθηκε από αυτό το εργαστήριο, ονομάστηκε Vav, το όνομα του έκτου γράμματος του εβραϊκού αλφαβήτου. Στον Vav η αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών DH και PH, η οποία καλύπτει τη θέση πρόσδεσης της Rac αίρεται με τη σύνδεση της PH στα PIP<sub>3</sub> (που παράγονται από την PI3K). Η σύνδεση με τη μεμβράνη επάγει τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης της όξινης περιοχής του Vav από κινάσες τυροσίνης Src/Syk, ως απάντηση στη σηματοδότηση του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων. Η όξινη περιοχή απομακρύνεται από την περιοχή DH, επιτρέποντας την πρόσβαση της Rac-GTP (**Εικόνα 8.67A**). Ο Vav στην ενεργή του διαμόρφωση έρχεται σε επαφή με μια μεγάλη ποικιλία σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως οι κινάσες τυροσίνης Btk (Bruton's tyrosine kinase), Itk (Interleukin-2-inducible T-cell kinase), Syk (Spleen tyrosine kinase) και ZAP-70 (Zeta-chain Associated Protein kinase 70), οι πρωτεΐνες προσαρμογής Grb2, BLNK (B-cell Linker) και SLP-76 (SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76 kDa), ο συνηχοδέας αντιγόνων των B-κυττάρων CD19 (Cluster of Differentiation 19), καθώς και ο λοιμογόνος παράγοντας Nef (Negative regulatory Factor).

Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ρύθμισης της δραστηριότητας GEF από έναν συνδυασμό μηχανισμών, όπως συμβαίνει στην ενεργοποίηση του διπλής εξειδίκευσης Rac1/2 και Cdc42 P-Rex1 από PIP<sub>3</sub> και Gβγ υπομονάδες, η οποία αναστέλλεται με τη φωσφορυλίωση της Ser436 από την PKA (**Εικόνα 8.67B**). Ο P-Rex1 περιέχει, επίσης, δύο σφαιρικές περιοχές DEP (Dishevelled, Egl-10 και Pleckstrin) περίπου 80 αμινοξέων, που παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και έχουν βρεθεί σε περισσότερες από 50 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σηματοδότηση μέσω G-πρωτεϊνών.

Καθώς οι RhoGEFs περιέχουν έναν μεγάλο αριθμό περιοχών αλληλεπίδρασης, ένας άλλος μηχανισμός ρύθμισης της δραστηριότητάς τους είναι η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, ορισμένοι RhoGEFs, μεταξύ των οποίων ο Dbl, ο p115-RhoGEF, ο PDZ-RhoGEF και ο LARG (ή ARHGEF12), ενεργοποιούνται άμεσα από την Gα<sub>12/13</sub>, η οποία ενεργοποιείται από τους υποδοχείς του LPA. Ορισμένοι GEFs, όπως ο Dbl, ο DBS και ο RasGRF1/2, δημιουργούν, μέσω της αλληλεπίδρασης των περιοχών DH, ομο- και ετεροδιμερή, τα οποία απαιτούνται για την πλήρη δραστηριότητά τους.

Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου οι GEFs ενεργοποιούν περισσότερες από μία GTPάσες, η δημιουργία ενός συμπλέγματος μπορεί επίσης να κατευθύνει τους GEFs προς συγκεκριμένες GTPάσες. Ο διπλής εξειδίκευσης Ras/Rac-GEF SOS, για παράδειγμα, περιέχει ένα πλούσιο σε προλίνη COOH-τελικό άκρο που μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις περιοχές SH3 είτε της Grb2 είτε της Abi1 / E3b1. Αλληλεπίδραση του SOS με την Grb2 επιτρέπει τη στρατολόγησή του στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και στην ενεργοποίηση της Ras. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση του SOS με την Abi1 (Abelson interactor 1) οδηγεί σε σχηματισμό ενός συμπλόκου με την Eps8 (Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8) και στην ενεργοποίηση της Rac.

### RhoGAPs

Η πρώτη RhoGAP ανακαλύφθηκε το 1989 και έκτοτε περισσότερες από 100 RhoGAPs έχουν βρεθεί σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και τουλάχιστον 60 στον άνθρωπο. Οι RhoGAPs αυξάνουν την καταλυτική δραστηριότητα των Rho, με αποτέλεσμα να απενεργοποιούν τις GTPάσες επιταχύνοντας την υδρόλυση του GTP. Εμφανίζουν εξειδικευμένη κατανομή και δράση, όπως η p73-RhoGAP, η οποία συ-



Shulamit Katzav

Η Nef είναι μια πρωτεΐνη των ιών HIV και SIV υπεύθυνη για τη μολυσματική τους δράση *in vivo*. Έχει ανασταλτική δράση στη μεταγωγή σήματος μέσω των TcRs. Η πρόοδος της ασθένειας του AIDS είναι πολύ πιο αργή όταν απουσιάζει ο Nef.

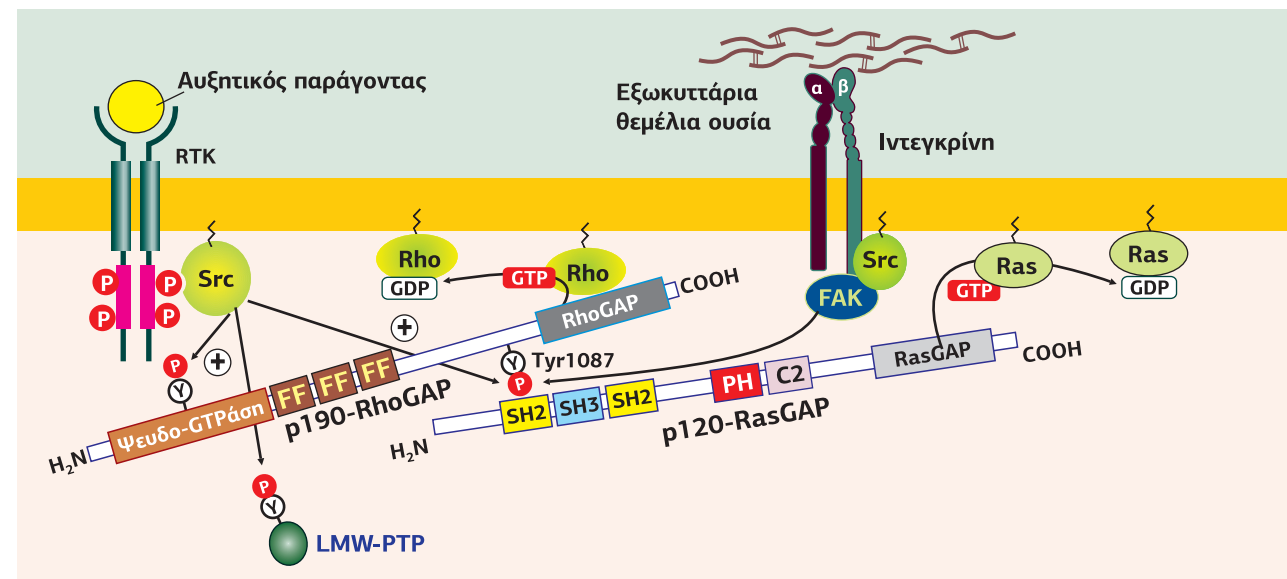
**Εικόνα 8.68****Ρύθμιση της p190-RhoGAP μέσω φωσφορυλίωσης.**

Η p190-RhoGAP μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω φωσφορυλίωσης από τις κινάσες Src και FAK (η οποία βρίσκεται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης και ενεργοποιείται από τις ιντεγκρίνες). Στη φωσφορυλιωμένη Tyr1087 προσελκύεται και συνδέεται η p120-RasGAP, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με την p190-RhoGAP, προωθώντας την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Στη δομή της p190-RhoGAP διακρίνεται η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή ψευδοϋποστρώματος, η οποία ρυθμίζει τη δραστηριότητα αλλά και την ουβικωτίνωση της p190-RhoGAP, και οι περιοχές FF (Phe), υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. [119] [186]

ναντάται μόνο στο ενδοθήλιο των αγγείων και ρυθμίζει τη δραστηριότητα των Rho κατά την αγγειογένεση. Επίσης, η κάθε RhoGAP δρα εξειδικευμένα σε μια συγκεκριμένη Rho, καθώς και σε ένα συγκεκριμένο Rho-σηματοδοτικό μονοπάτι.

Οι RhoGAPs ρυθμίζονται, όπως και οι RhoGEFs, από μια μεγάλη ποικιλία μηχανισμών: φωσφορυλίωση, σύνδεση με τα λιπίδια της μεμβράνης, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Θα αναφέρουμε δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα, της p190-RhoGAP, η οποία ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση, και της β-χιμαιρίνης, η οποία ενεργοποιείται με την πρόσδεσή της σε λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης.

Η p190-RhoGAP έχει βρεθεί ότι μπορεί να φωσφορυλιωθεί από δύο κινάσες τυροσίνης, την Src, η οποία ενεργοποιείται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), και την FAK (Focal Adhesion Kinase), η οποία ενεργοποιείται από υποδοχείς ιντεγκρίνης οδηγώντας στη δημιουργία θέσεων εστιακής προσκόλλησης. Η φωσφορυλίωση της Tyr1087 (ή Tyr1105) της p190-RhoGAP από την Src ή την FAK οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλέγματος p190-RhoGAP / p120-RasGAP. Η p120-RasGAP συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της στην pTyr1087 (ή pTyr1105) της p190-RhoGAP. Το σύμπλεγμα αυτό μετακινείται στη μεμβράνη, όπου αναστέλλει τις Rho-GTP, συμμετέχοντας στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, στον αποπολυμερισμό των ινιδίων πίεσης και, συνεπώς, στην καταστροφή των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, επιτρέποντας τη μετακίνηση του κυττάρου. Η απενεργοποίηση της p190-RhoGAP μπορεί να επιτευχθεί εν μέρει με την αποφωσφορυλίωσή της από τη φωσφατάση τυροσίνης LMW (Low Molecular Weight), η οποία αποτελεί επίσης υπόστρωμα της Src (Εικόνα 8.68). Η σύνδεση p190-RhoGAP και p120-RasGAP δείχνει ότι τα μονοπάτια των Rho και Ras GTPασών μπορούν και αλληλοεπηρεάζονται.

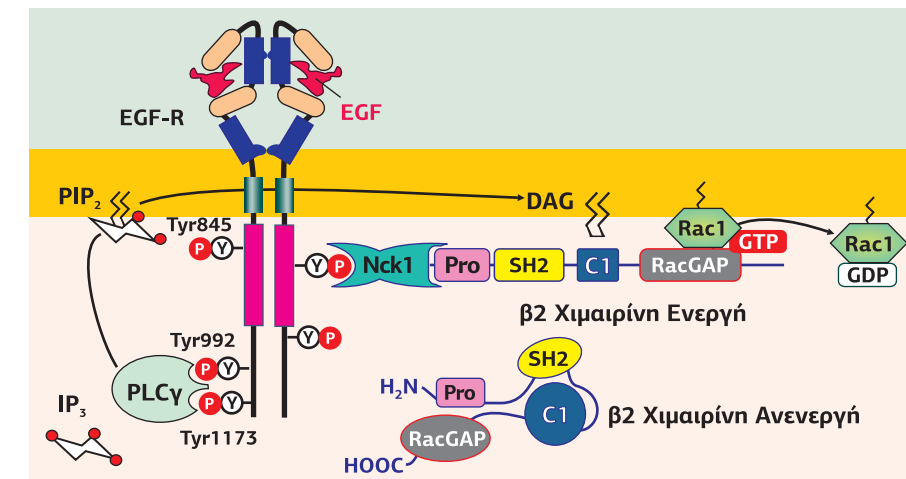


Οι **χιμαιρίνες** (chimaerins) (α1, α2, β1, β2) είναι μια οικογένεια RacGAPs πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη, στην επιμήκυνση των νευριτών, στην κυτταρική μετανάστευση, καθώς και στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Αυτές οι RacGAPs έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να ρυθμίζονται από τον δεύτερο διαβιβαστή διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία δημιουργείται από την PLCγ έπειτα από ενεργοποίηση του υποδοχέα του EGF. Σε δομικό επίπεδο οι χιμαιρίνες αποτελούνται από μια καλά συντηρημένη περιοχή GAP, υπεύθυνη για την επιτάχυνση της υδρόλυσης του GTP από τις Rac, και μια περιοχή C1, ομόλογη με τη θέση σύνδεσης DAG ή των φορβολεστέρων της κινάσης PKC. Η σύνδεση της DAG (ή των φορβολεστέρων) στην περιοχή C1 είναι ένα βασικό βήμα για την αγκυροβόλση των χιμαιρινών στην πλασματική μεμβράνη, όπου θα συνδεθούν με την ενεργή Rac (Rac-GTP), προωθώ-

ντας την απενεργοποίησή της. Κατ' αναλογία με τις PKCs, η σύνδεση της DAG στην περιοχή C1 απαιτεί όξινα φωσφολιπίδια στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, κυρίως φωσφατιδυλοσερίνη (PS).

Οι χιμαιρίνες βρίσκονται σε κατάσταση αυτοαναστολής, μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της C1 και άλλων περιοχών, όπως η περιοχή SH2, η περιοχή GAP και ο σύνδεσμος SH2-C1. Ως αποτέλεσμα η C1 θάβεται μέσα στη δομή και, ως εκ τούτου, η σύνδεση της DAG είναι ανεπαρκής για να προωθήσει τη μετατόπιση της χιμαιρίνης στην πλασματική μεμβράνη. Η μετατόπιση λαμβάνει χώρα σε απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες ικανούς να παράγουν DAG, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), μέσω της ενεργοποίησης της PLCγ. Ωστόσο, η σύνδεση με την περιοχή C1 της DAG δεν είναι επαρκής για την πλήρη μετατόπιση της χιμαιρίνης και απαιτούνται άλλοι μηχανισμοί, οι οποίοι επίσης ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς RTKs. Για παράδειγμα, οι χιμαιρίνες αλληλεπιδρούν δομικά και λειτουργικά με τις πρωτεΐνες προσαρμογής Nck1 και Nck2 (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1), οι οποίες συνδέονται στις φωσφορυλιωμένες Tyr των ενεργοποιημένων RTKs και συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η σύνδεση λαμβάνει χώρα μέσω μιας άτυπης περιοχής προλίνης της χιμαιρίνης στην SH3 περιοχή της Nck. Οι Nck έχουν τρεις περιοχές SH3 και μια COOH-τελική περιοχή SH2. Αφαίρεση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις χιμαιρίνες και τις Nck στα ποντίκια εμφανίζουν τους ίδιους φαινότυπους.

Συνεπώς, η ενεργοποίηση των χιμαιρινών από τον EGF απαιτεί έναν συνδυασμό αλληλεπίδρασης λιπιδίων με την περιοχή C1 και αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με την NH<sub>2</sub>-τελική πλούσια σε προλίνη περιοχή. Η ενεργοποίηση της χιμαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δημιουργίας ελασματοποδίων από την Rac1.

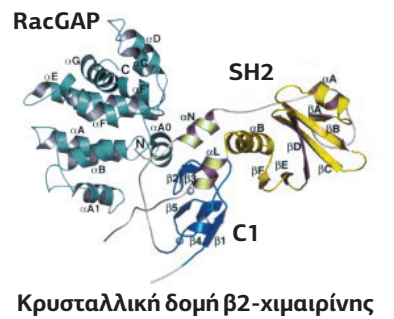
**Οι τελεστές των GTPασών της οικογένειας Rho/Rac/Cdc42**

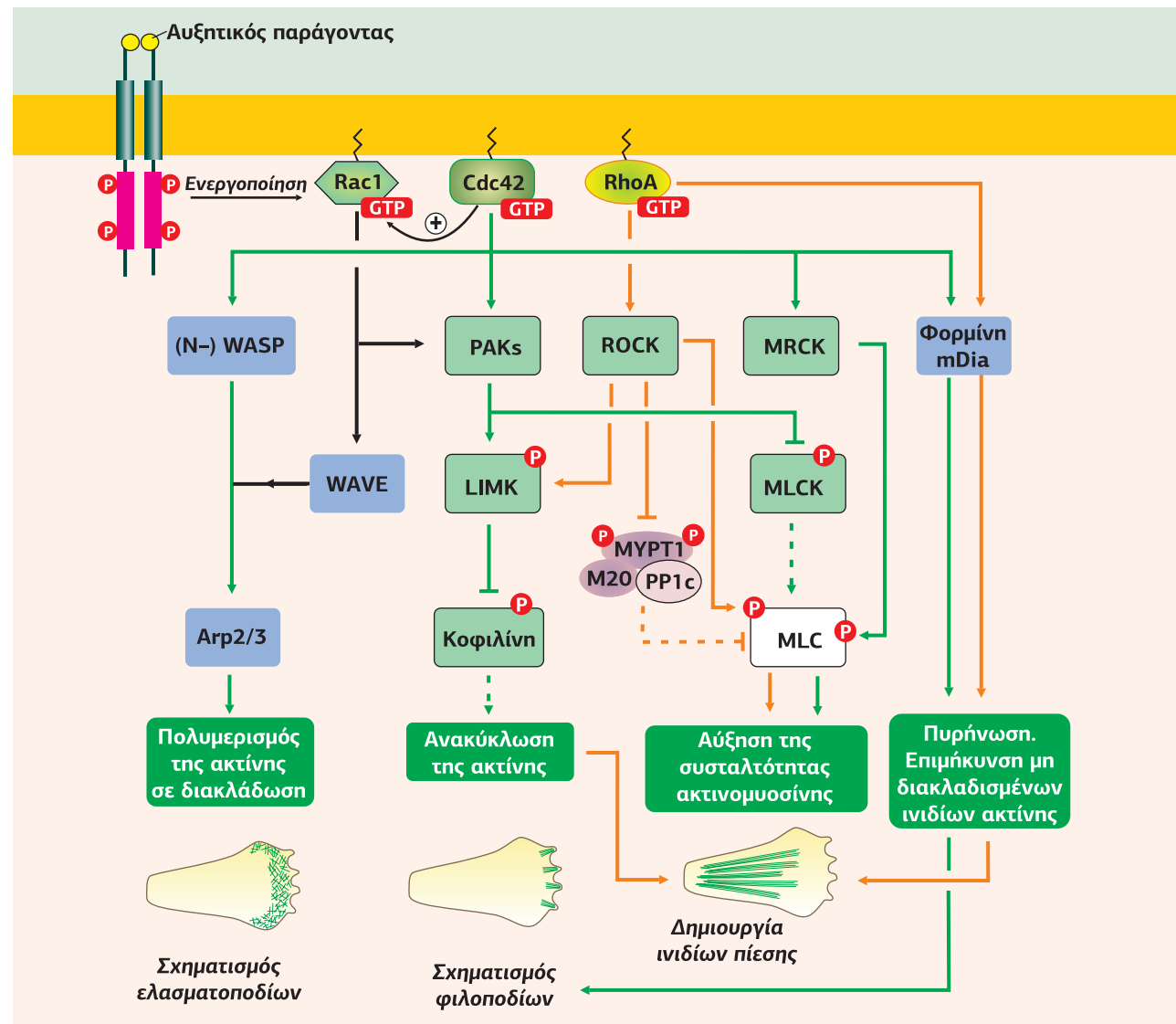
Πάνω από 70 τελεστές ενεργοποιούνται από την οικογένεια των Rho/Rac/Cdc42 GTPασών. Κάθε μέλος της οικογένειας Rho έχει συγγένεια για περισσότερους από έναν τελεστές, καθώς επίσης κάθε τελεστής αναγνωρίζεται από περισσότερες Rho. Το τελικό αποτέλεσμα των σηματοδοτικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι Rho είναι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία επηρεάζει την αρχιτεκτονική και την κινητικότητα των κυττάρων. Στην Εικόνα 8.70 περιγράφονται τα διαφορετικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τις διάφορες υποοικογένειες των Rho, καθώς και το λειτουργικό τους αποτέλεσμα.

Οι δράσεις των Rho έχουν καλά μελετηθεί σε ινοβλάστες που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Κατά την ενεργοποίησή τους αυτά τα κύτταρα υφίστανται χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές που εξαρτώνται από τη συνεργασία των Rho, Rac και Cdc42, με καθεμία GTPάση να συμμετέχει διακριτά στην κυτταρική μετανάστευση, η οποία παίζει έναν ρόλο κλειδί τόσο σε παθολογικές καταστάσεις (καρκίνος) όσο και

**Εικόνα 8.69****Ενεργοποίηση της RacGAP β2-χιμαιρίνης.**

Οι χιμαιρίνες έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να συνδέονται στον δεύτερο διαβιβαστή DAG, ο οποίος παράγεται από την PLCγ, έπειτα από ενεργοποίηση του EGFR. Η σύνδεση της DAG (ή των φορβολεστέρων) στην περιοχή C1 αγκυροβολεί τις χιμαιρίνες στην πλασματική μεμβράνη, όπου θα συνδεθούν με την ενεργή Rac (Rac-GTP), προωθώντας την απενεργοποίησή της. Οι χιμαιρίνες αλληλεπιδρούν, επίσης, με τις πρωτεΐνες προσαρμογής Nck1 και Nck2, οι οποίες συνδέονται στις φωσφορυλιωμένες Tyr των ενεργοποιημένων RTKs. [61]





**Εικόνα 8.70**

**Οι Rho GTPάσες και τα μεταγωγικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούν.** Ο κύριος τελεστής της RhoA είναι η κινάση Ser/Thr ROCK, η οποία συμμετέχει κυρίως στον σχηματισμό ινιδίων πίεσης και θέσεων εστιακής προσκόλλησης. Η ROCK φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης (MLC) που οδηγεί στη σύσπαση της ακτίνης-μυοσίνης, αλλά ταυτόχρονα αναστέλλει την αποφωσφορυλίωση της MLC με αναστολή της φωσφατάσης MLCP. Επίσης, η ROCK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση LIMK, η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη σύνδεση της κοφιλίνης με την ADP-ακτίνη. Ένας δεύτερος τελεστής της RhoA είναι η ομόλογη της diaphanous στα θηλαστικά (mDia), η οποία μεσολαβεί στην πυρήνωση της ακτίνης. Οι τελεστές της Cdc42 και Rac είναι κυρίως πρωτεΐνες σκαλωσιάς που ανήκουν στην οικογένεια WASP/SCAR/WAVE, κύριοι ρυθμιστές του πολυμερισμού της ακτίνης σε διακλάδωση, μέσω των πρωτεϊνών Arp2/3. Οι κινάσες PAKs είναι κοινοί τελεστές τόσο της Rac όσο και της Cdc42. Οι PAKs φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν την MLCK και, κατά συνέπεια, αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση της MLC και τη συσταλτικότητα της ακτινομυοσίνης. Οι PAKs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν, επίσης, την κινάση LIMK που οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κοφιλίνης που αναστέλλει τη λειτουργία της. Με πράσινο πλαίσιο συμβολίζονται οι κινάσες, ενώ με μπλε οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον πολυμερισμό/αποπολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης. [46] [65] [179]

σε φυσιολογικές (κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ή της μετακίνησης κυττάρων του ανοσοποιητικού). Για να μεταναστεύσει ένα κύτταρο, προσλαμβάνει αρχικά μια πολυμένη χαρακτηριστική μορφολογία ως απόκριση σε εξωκυτταρικά μηνύματα. Στο μπροστινό τμήμα των κυττάρων ο πολυμερισμός της ακτίνης οδηγεί στην επέκταση μικρών προεξοχών της μεμβράνης, που ονομάζονται ελασματοπόδια, και στενόμακρων προεξοχών που ονομάζονται φιλοπόδια. Στην αιχμή του ελασματοποδίου το κύτταρο σχηματίζει προσφύσεις που συνδέουν την εξωκυτταρία θεμέλια ουσία

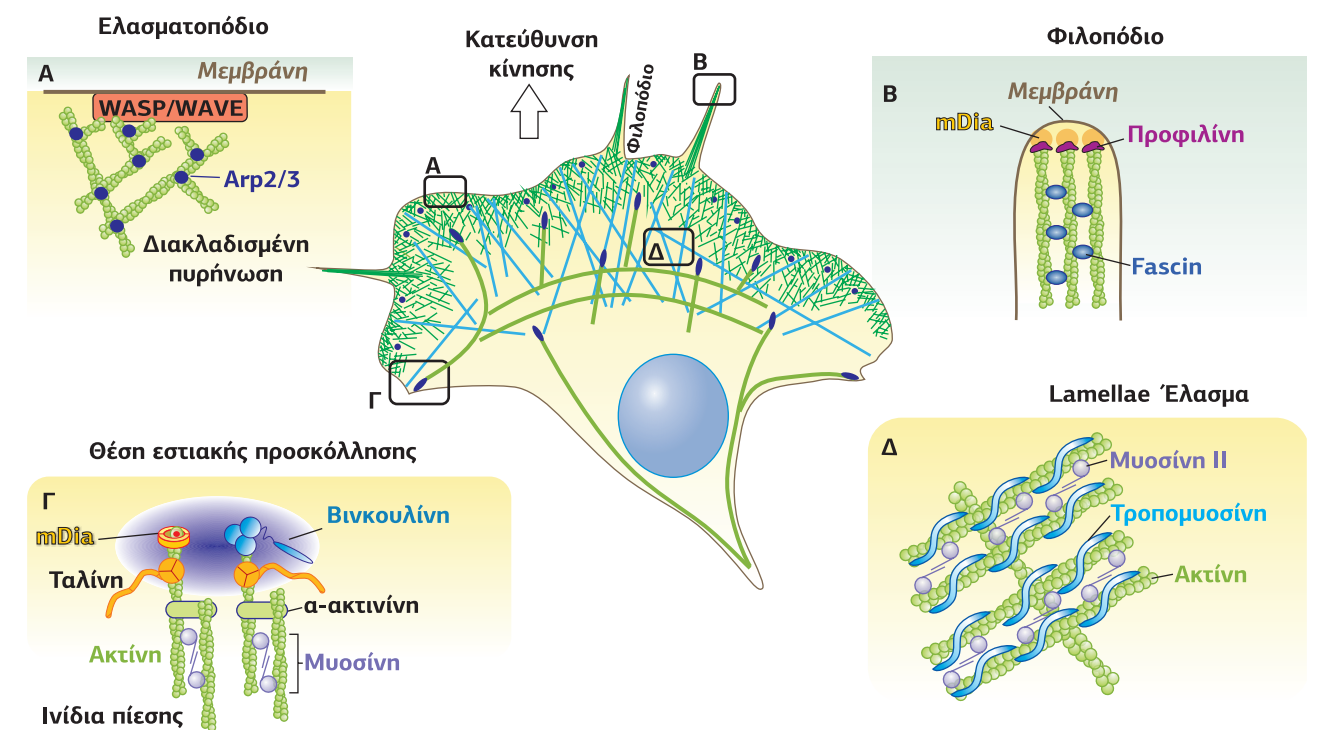
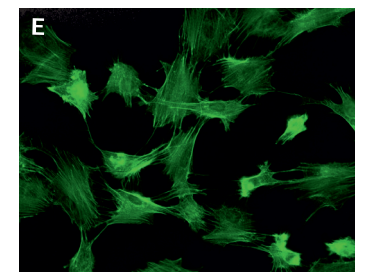
στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, για να “αγκυροβολήσουν” την προεξοχή. Τέλος, για να προχωρήσει το κύτταρο προς τα εμπρός, αποσύρει το οπίσθιο τμήμα του συνδυάζοντας τη συσταλτικότητα της ακτινομυοσίνης και την αποσυναρμολόγηση των οπίσθιων προσφύσεων (**Εικόνα 8.71**).

Όταν ενεργοποιείται η **Cdc42** οι ινοβλάστες αναπτύσσουν **φιλοπόδια** (filopodia), δακτυλοειδείς προεξοχές της μεμβράνης, που χρησιμεύουν ως κεραίες, οι οποίες βοηθούν ένα κύτταρο που μεταναστεύει να αναγνωρίσει το περιβάλλον του. Κάθε φιλοπόδιο περιέχει μια δεσμίδα 10-20 ινιδίων ακτίνης, τα οποία είναι προσανατολισμένα με το (+)άκρο προς τα εμπρός. Στο (+)άκρο κάθε φιλοποδίου φορμίνες (formins), όπως η mDia, καταλύουν την προοδευτική συναρμολόγηση προφιλίνης (profilin) / ATP-ακτίνης στα ινίδια F-ακτίνης, οδηγώντας σε επιμήκυνσή τους. Τα μη διακλαδισμένα ινίδια ακτίνης είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω πρωτεϊνών, όπως η fascin και το σύμπλεγμα IRSp53-EPS8 (**Εικόνα 8.71B**).

Η χαρακτηριστική μορφολογική απάντηση των κυττάρων στην ενεργοποίηση των **Rac** είναι η δημιουργία **ελασματοποδίων** (lamellipodia) και **πυκνώσεων της μεμβράνης** (ruffled membranes). Τα ελασματοπόδια είναι κυτταροσκελετικές προβολές ακτίνης στην περιφέρεια των κυττάρων που βρίσκονται σε κίνηση, στο μπροστινό τους μέρος. Αποτελούνται από ένα σχεδόν διδιάστατο πλέγμα ακτίνης και προωθούν τη μετακίνηση του ινοβλάστη πάνω σε ένα υπόστρωμα. Δημιουργούνται στην πλασματική μεμβράνη από το σύμπλεγμα WASP-Arp2/3, το οποίο αποκρίνεται στα εξωκυτταρικά σήματα, και διατηρούν γρήγορη κίνηση με ανασχηματισμό [treadmilling: η απώλεια μονομερών ADP-ακτίνης από το (-)άκρο εξισορροπείται από την προσθήκη μονομερών ATP-ακτίνης στο (+)άκρο, διατηρώντας σταθερό το μήκος του ινιδίου και ταυτόχρονα δημιουργώντας μια κίνηση προς τα εμπρός] με τη βοήθεια ρυθμιστικών πρωτεϊνών (ADF, καλυπτήριες πρωτεΐνες, προφιλίνη). Όταν τα ινίδια ακτίνης, που ονομάζονται μικροάκανθες (microspikes), εξαπλωθούν πέρα από τα όρια του ελασματοποδίου, δημιουργούν τα φιλοπόδια. Τα ελασματοπόδια και τα φιλοπόδια είναι διερευνητικές κινητικές δομές που σχηματίζονται και αποσύρονται με μεγάλη ταχύτητα (**Εικόνα 8.71A**).

Το κύτταρο αποκρίνεται στην ενεργοποιημένη **RhoA** με τη δημιουργία **ινιδίων πίεσης ακτινομυοσίνης** (actomyosin stress fibers). Είναι δεσμίδες 10-30 μm δι-

**Εικόνα 8.71**  
**Μορφολογικές αλλαγές που υφίστανται οι ινοβλάστες σε απάντηση της ενεργοποίησης των Rho, Rac και Cdc42.** Α-Δ. Σχηματική απεικόνιση ενός ινοβλάστη, όπου διακρίνονται τα φιλοπόδια, τα ελασματοπόδια και οι θέσεις εστιακής προσκόλλησης. [97] Ε. Ινοβλάστες 3T3 ποντικών, διακρίνονται τα ινίδια F-ακτίνης βαμμένα με χρωστική φαλλοϊδίνη (phalloidin).

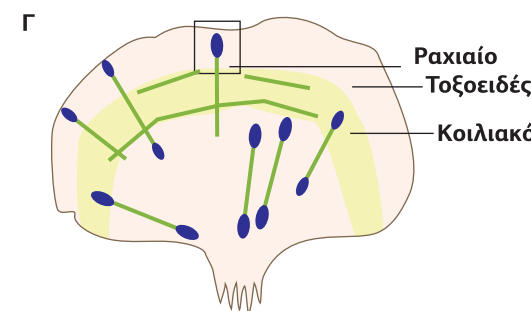
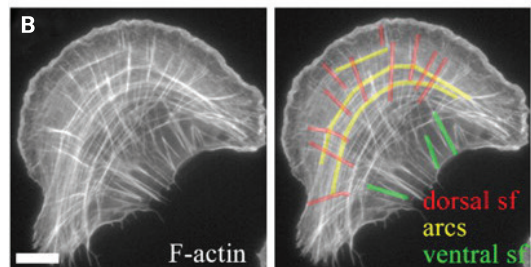
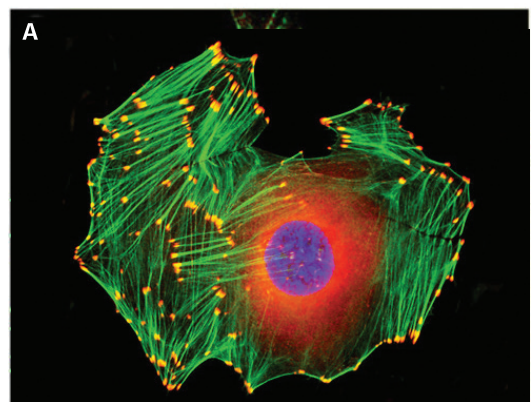




**Εικόνα 8.72**

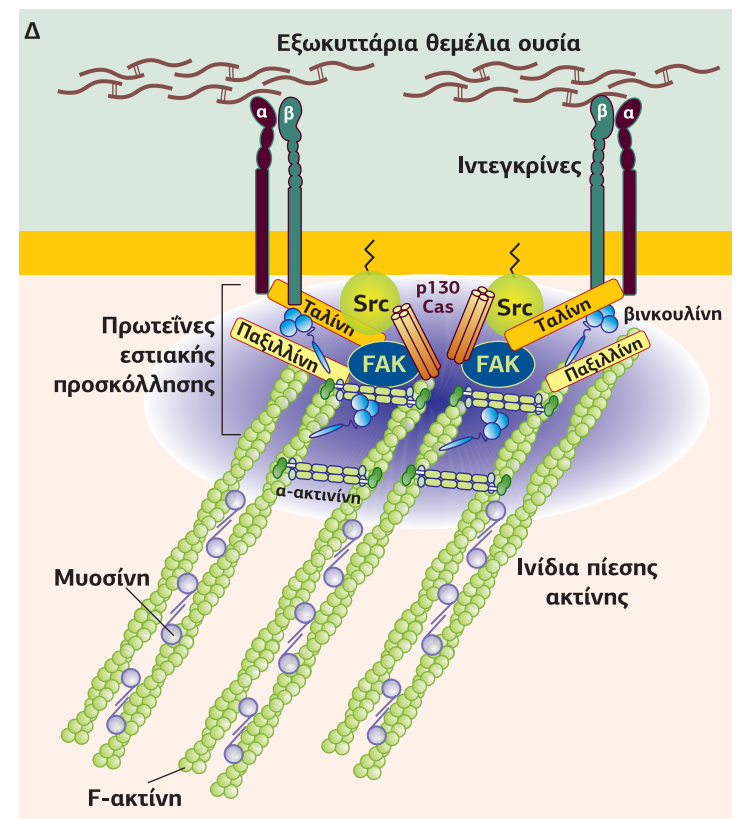
**Δομή των ινιδίων πίεσης της ακτίνης.**

A. Ινοβλάστης με πορτοκαλί χρώση για τη βινκουλλίνη, προκειμένου να αναδειχθούν οι θέσεις εστιακής προσκόλλησης, και πράσινη χρώση για την ακτίνη. B. Σε κύτταρα U2OS οστεοσαρκώματος με χρώση για την F-ακτίνη διακρίνουμε τρεις κατηγορίες ινιδίων πίεσης ακτίνης (ραχιαία: κόκκινο, τοξωτά: κίτρινο, κοιλιακά: πράσινο). Γ. Μοντέλο του σχηματισμού των ινιδίων πίεσης. Τα ραχιαία ινίδια ξεκινούν από θέσεις εστιακής προσκόλλησης της περιφέρειας του κυττάρου και επιμηκύνονται έως ότου συναντήσουν τα εγκάρσια τοξοειδή ινίδια πίεσης στην επιφάνεια του κυττάρου. Δ. Λεπτομέρεια της θέσης εστιακής προσκόλλησης με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό της. [139] [117]



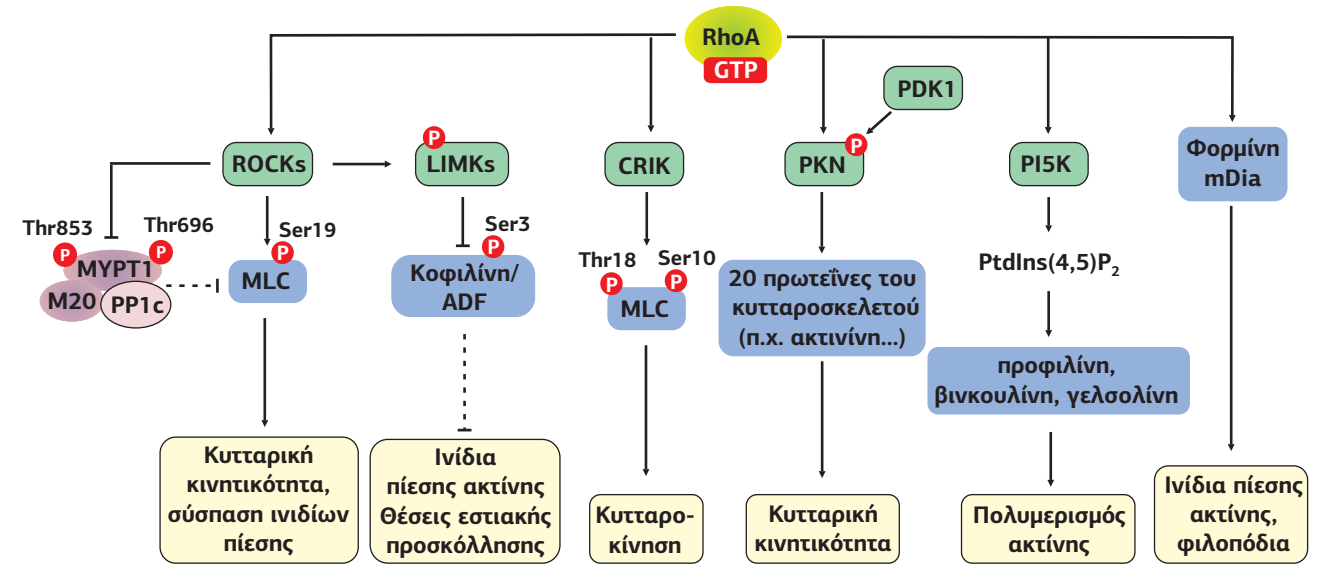
ακλαδισμένων ινιδίων ακτίνης που διασχίζουν όλο το κύτταρο. Ομαδοποιούνται σε δεσμίδες, οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους με την α-ακτινίνη (μια πρωτεΐνη που σταυροσυνδέει τα ινίδια ακτίνης) και συνδέονται με τη μη-μυϊκή μιοσίνη II. Η ενεργοποίηση της RhoA οδηγεί στη σύσπαση αυτών των ινιδίων με την καταπόνηση του ATP, προκαλώντας αλλαγές στο σχήμα του κυττάρου και μεταβολή της κινητικής του κατάστασης. Η δομή και ο τρόπος σύσπασης των ινιδίων πίεσης προσομοιάζει πολύ με την παράλληλη οργάνωση των σαρκομερών των μυϊκών κυττάρων. Σε απόκριση στην ενεργοποιημένη **RhoA-GTP** τα ινίδια πίεσης αγκυροβολούν στις μεμβράνες μέσω ειδικών δομών -που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες σύνδεσης της ακτίνης, καλυπτήριες πρωτεΐνες και πρωτεΐνες πυρήνωσης- δημιουργώντας τις **θέσεις εστιακής προσκόλλησης** (focal adhesion sites). Με έναν αντιστρεπτό τρόπο οι θέσεις εστιακής προσκόλλησης σταθεροποιούν το κύτταρο -κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης- στο υπόστρωμά του, *in vitro* τα δίσκια Petri, *in vivo* δομές του συνδετικού ιστού, προκαλώντας μια αμοιβαδοειδή κίνηση. Στην πραγματικότητα, τα σήματα που ενεργοποιούν την RhoA συχνά προέρχονται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και μεταδίδονται μέσω των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες είναι ένας ειδικός τύπος υποδοχέα που συνδέεται με κινάσες τυροσίνης και βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. (Εικόνα 8.71Γ και 8.72).

Σε ένα κύτταρο που μεταναστεύει οι μορφολογικές αλλαγές που περιγράφει προηγουμένως εναλλάσσονται με μια αυστηρά καθορισμένη σειρά, επισημαίνοντας έναν υψηλό βαθμό διασταυρούμενης επικοινωνίας και αλληλεπικάλυψης στη σηματοδότηση των Cdc42, Rac και Rho. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ακόμη σκοτεινός.



**Οι πρωτεΐνες μέσω των οποίων οι Rho ελέγχουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης**

Οι πρωτεΐνες Rho ελέγχουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ενεργοποιώντας ποικίλες πρωτεΐνες στόχους, μεταξύ των οποίων: οι κινάσες ROCKs, LIMKs, citron (ή CRIK), PRK (ή PKN) και PI5K, και η φορμίνη (formin) mDia (Εικόνα 8.73).



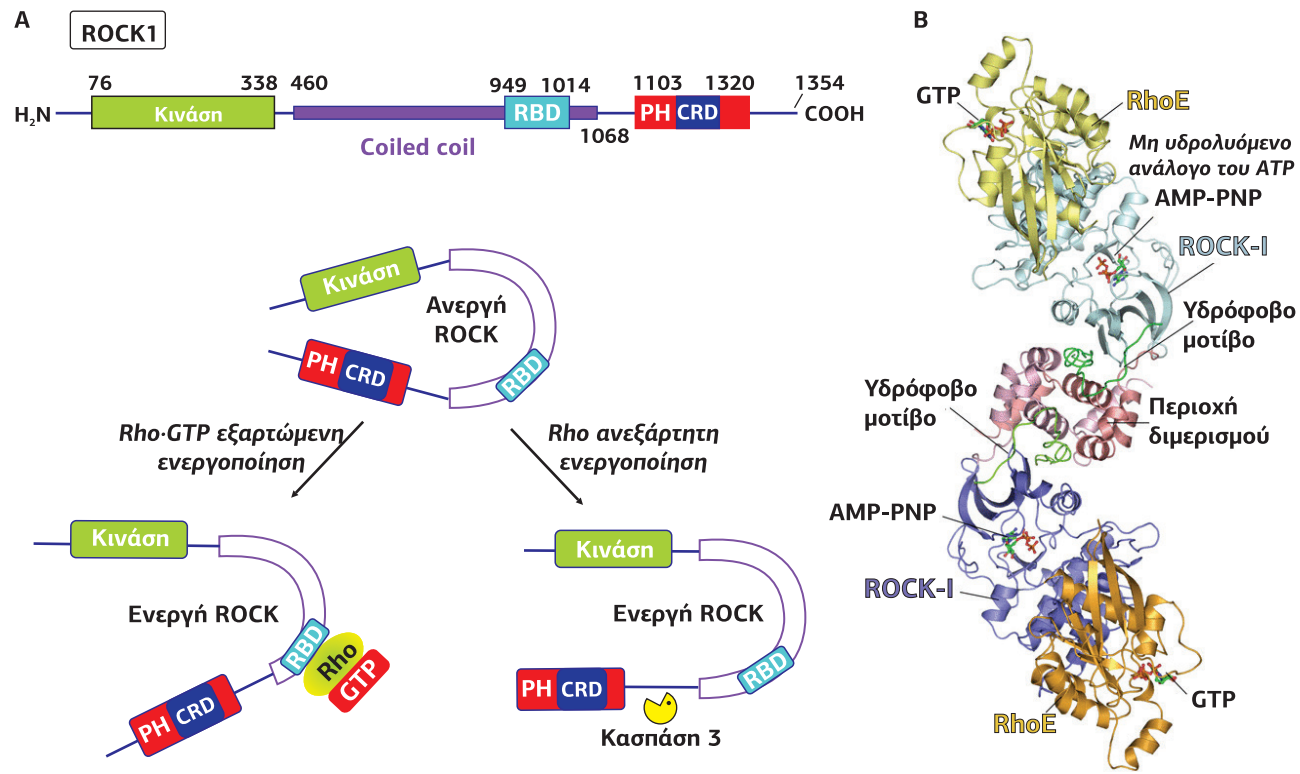
**Εικόνα 8.73**  
**Οι τελεστές των Rho και οι δράσεις τους.** Οι ενεργοποιημένες Rho-GTP έχουν ως στόχους κυρίως κινάσες (ROCKs, LIMKs, citron ή CRIK, PRK ή PKN και PI5K), αλλά και τη φορμίνη (formin) mDia.

Ο κύριος τελεστής των Rho είναι οι κινάσες **ROCKs** (Rho-Controlled Kinases), ROCK1 και ROCK2, οι οποίες λειτουργούν ως ομοδιμερή και ενεργοποιούνται από τις Rho-GTP. Η ROCK ήταν ο πρώτος τελεστής των Rho που ανακαλύφθηκε το 1996 από τον Shuh Narumiya και τους συνεργάτες του στο Department of Pharmacology, Kyoto University, Japan.

Η ROCK1 είναι μια πρωτεΐνη 158 kDa που αποτελείται από α. μια καταλυτική περιοχή κινάσης Ser/Thr (κατάλοιπα 76-338) στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, β. μια περιοχή coiled-coil (κατάλοιπα 425-1100), η οποία περιέχει την περιοχή σύνδεσης της Rho, RBD (Rho-binding domain), και γ. μια περιοχή PH (κατάλοιπα 1118-1317), η οποία περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη CRD (cysteine-rich domain). Η PH χρησιμεύει ως θέση σύνδεσης στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης και είναι υπεύθυνη για τη διαμόρφωση αυτοαναστολής (Εικόνα 8.74A).

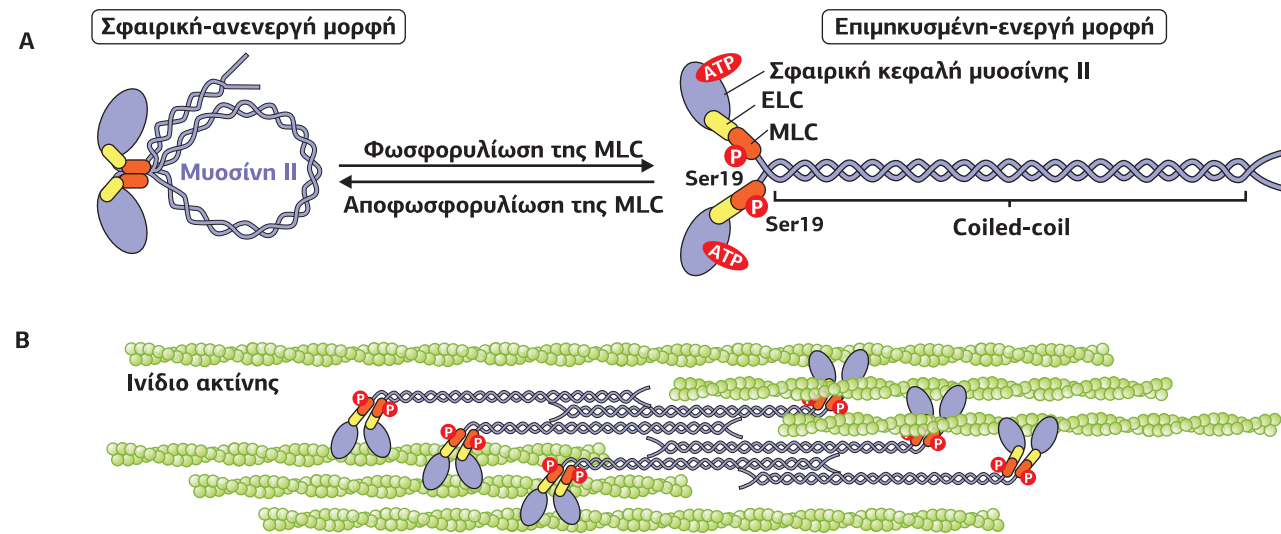
Οι ROCKs ανήκουν στην οικογένεια των κινάσων AGC και η ενεργοποίησή τους ακολουθεί έναν μηχανισμό όμοιο με των PKCs: η κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής που δημιουργείται από τη σύνδεση της COOH-τελικής PH περιοχής στην καταλυτική περιοχή κινάσης ανοίγει έπειτα από τη σύνδεση της ενεργοποιημένης Rho-GTP στην περιοχή RBD. Η σύνδεση της Rho-GTP οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης και του υδρόφοβου μοτίβου που βρίσκεται στο COOH-τελικό της καταλυτικής περιοχής κινάσης. Ως αποτέλεσμα ο θύλακας σύνδεσης του υποστρώματος ανοίγει. Αποκοπή του COOH-τελικού ανασταλτικού άκρου από την κασπάση 3 κατά τη διάρκεια της απόπτωσης μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει την ROCK (Εικόνα 8.74B).

Η σύνδεση της RhoA-GTP μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα της ROCK1 κατά 1,5-2 φορές. Χωρίς τη σύνδεση της RhoA, λιπίδια όπως το αραχιδονικό οξύ ή η φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P) μπορεί να αυξήσουν τη δραστηριότητα της ROCK1 5-6 φορές. Αυτά τα δύο λιπίδια αλληλεπιδρούν με την περιοχή PH, διαταράσσοντας την ικανότητά της να μπλοκάρει την καταλυτική περιοχή. Η RhoE συνδέεται με το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της ROCK1 και αναστέλλει τη δράση της παρεμποδίζοντας τη δέσμευση της RhoA.



Εικόνα 8.74

**Δομή και ενεργοποίηση της κινάσης ROCK από την Rho-GTP.** Α. Οι ROCK1/2 αποτελούνται από μια καταλυτική περιοχή κινάσης Ser/Thr στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, μια περιοχή coiled-coil, η οποία περιέχει την περιοχή σύνδεσης της Rho (RBD), και μια περιοχή PH, η οποία περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD). Η PH χρησιμεύει ως θέση σύνδεσης στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης και είναι υπεύθυνη για τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. [152] Β. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ROCK1/RhoE. Σε κάθε υπομονάδα της διμερούς ROCK1 συνδέεται ένα μόριο RhoE-GTP. [90] [79]



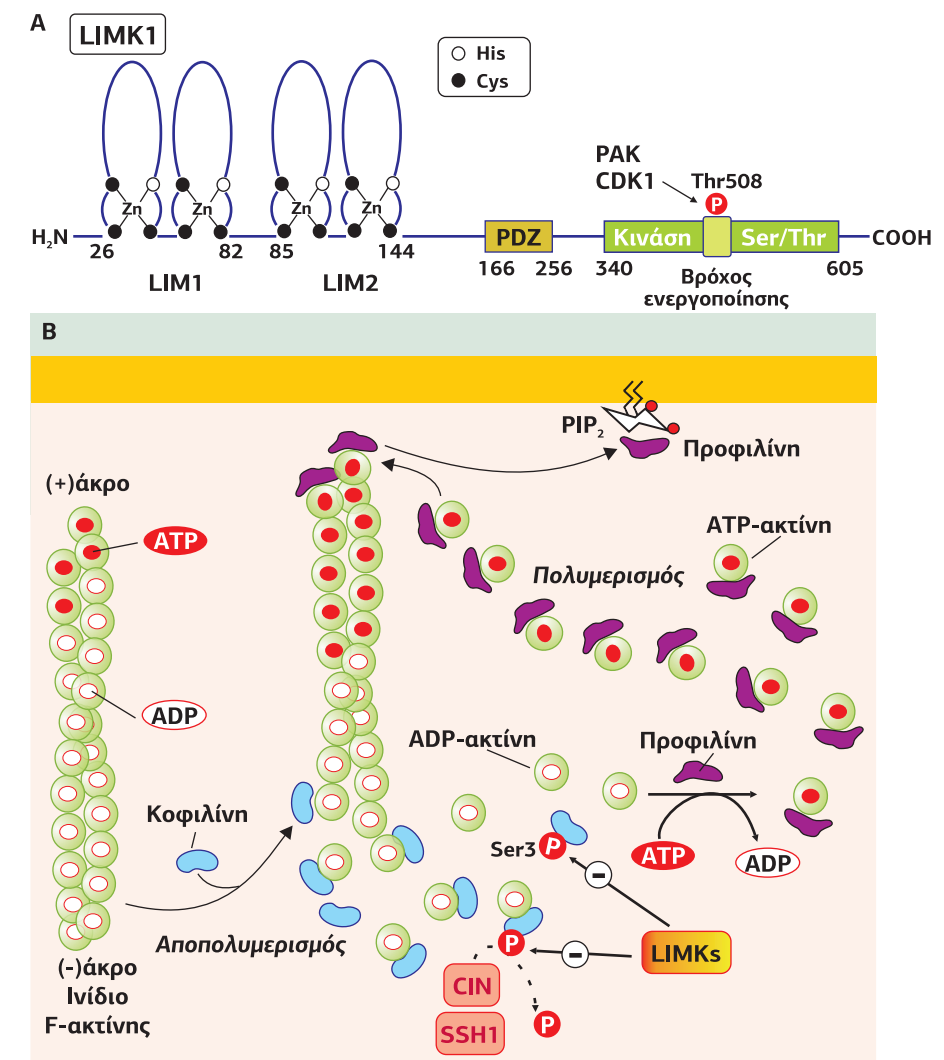
Εικόνα 8.75

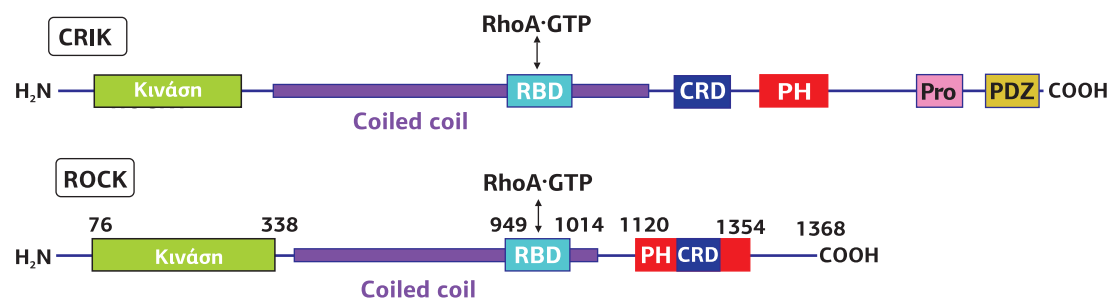
**Φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC) των ινιδίων πίεσης από τη ROCK.** Η φωσφορυλίωση από την ROCK της MLC στη Ser19 και στη Thr18 οδηγεί στην επιμηκυσμένη διαμόρφωση των ινιδίων μυοσίνης, ενεργοποιεί τη δραστηριότητα ATPάσης τους, επιτρέποντας τη σύσπαση των ινιδίων πίεσης ακτινομυοσίνης. Η αποφωσφορυλίωση των δύο καταλοίπων αναστέλλει τη σύσπαση. [12] [196]

Το φυσιολογικό υπόστρωμα της ROCK είναι η **ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης**, MLC (Myosin Light Chain) ή RLC (Regulatory Light Chain), η οποία παίζει ρόλο κλειδί στη σύσπαση των ινιδίων ακτινομυοσίνης, εμποδίζοντας σε κατάσταση ηρεμίας την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, καθώς η μυοσίνη βρίσκεται σε μια σφαιρική, κλειστή διαμόρφωση. Έπειτα από τη φωσφορυλίωση της MLC στη Ser19 και στη Thr18, από τις κινάσες ROCKs ή από κάποια άλλη Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενη MLC κινάση, όπως η MLCK (βλ. σελ. 414), η MLC επάγει μια επιμηκυσμένη ανοικτή διαμόρφωση του ινιδίου μυοσίνης, με αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή του με την ακτίνη (Εικόνα 8.75). Για να αυξήσει επιπλέον το επίπεδο της φωσφορυλιωμένης ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, η ROCK ταυτόχρονα φωσφορυλιώνει στη Thr696 (και στη Thr853) και απενεργοποιεί την υπομονάδα **MYPT1** της **φωσφατάσης της MLC** (βλ. Εικόνα 7.57). Επίσης, η ROCK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον CPI-17, αναστολέα της MLCP. Συνεπώς, η ROCK συνολικά διευκολύνει τη σύσπαση των ινιδίων πίεσης ακτινομυοσίνης.

Επιπλέον, οι κινάσες ROCKs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις **LIM domain kinases** (από τις πρωτεΐνες Lin11 του *Caenorhabditis elegans*, Isl1 των αρουραίων και MEK3 του *Caenorhabditis elegans*, όπου πρωτοανακαλύφθηκε η περιοχή LIM). Η οικογένεια των LIMKs αποτελείται από δύο μέλη, τις LIMK1 και LIMK2, με χαρακτηριστικές δομικές περιοχές, όπως δύο LIM περιοχές στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, μια περιοχή PDZ και μια COOH-τελική περιοχή κινάσης Ser/Thr. Οι περιοχές LIM είναι περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη και συνίστανται από δύο γειτονικά μοτίβα zinc

**Εικόνα 8.76**  
**Δομή και ρόλος των κινάσων LIMKs.** Α. Οι LIMKs περιέχουν δύο περιοχές LIM, μια PDZ και μια περιοχή κινάσης Ser/Thr. Β. Ο ρόλος της προφιλίνης και της κοφιλίνης στη συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση των ινιδίων ακτίνης. Τα μονομερή της G-ακτίνης στο κυτταρόπλασμα είναι συνδεδεμένα με ADP. Η προφιλίνη βοηθά στην ανταλλαγή ADP με ATP και στη σύνδεση της ATP-ακτίνης στο (+)άκρο των ινιδίων F-ακτίνης. Το ATP υδρολύεται σε ADP αμέσως μετά τη συναρμολόγηση των μονομερών ακτίνης στο αυξανόμενο ινίδιο. Τα μονομερή ADP-ακτίνης αποσυνδέονται από το ινίδιο με τη βοήθεια της κοφιλίνης, η οποία συνδέεται στα μονομερή ADP-ακτίνης των ινιδίων και προκαλεί μια μικρή μεταβολή της γωνίας περιστροφής των μονομερών, με αποτέλεσμα είτε την απομάκρυνσή τους από το (-)άκρο των ινιδίων είτε την αποκοπή ολόκληρων τμημάτων των ινιδίων. Η φωσφορυλίωση της Ser3 της κοφιλίνης από τις LIMKs μειώνει δραστηρικά τη συγγένεια της κοφιλίνης για την ADP-ακτίνη και την αποσυνδέει από την ADP-ακτίνη. Ως αποτέλεσμα η προφιλίνη προωθεί την ανταλλαγή ADP / ATP, που διευκολύνει την προσθήκη προφιλίνης-ATP-ακτίνης στο ακιδωτό (+)άκρο. Η απομάκρυνση της προφιλίνης από το (+)άκρο των ινιδίων επάγεται από τη σύνδεσή της στα PIP<sub>2</sub> της μεμβράνης. [43] Γ. Μονομερή G-ακτίνης.





**Εικόνα 8.77**  
**Η δομή της citron kinase ή CRIK.** Αποτελείται από μια καταλυτική περιοχή κινάσης Ser/Thr στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, μια coiled-coil περιοχή, η οποία περιέχει τη θέση σύνδεσης της Rho-GTP (RBD), μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη CRD (Cysteine-Rich Domain), μια περιοχή PH, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη PRD (Proline-Rich Domain) και μια περιοχή PDZ στο COOH-τελικό άκρο.

finger, τα οποία διαχωρίζονται από δύο υδρόφοβα αμινοξέα (Εικόνα 8.76A). Η LIMK1 φωσφορυλιώνεται στη Thr508 από την PAK και την CDK1, ενώ η LIMK2 στη Thr505 από την ROCK. Οι δύο φωσφορυλιώσεις οδηγούν στην ενεργοποίηση των LIMKs.

Οι κινάσες LIMKs έχουν ως μόνο στόχο την **κοφιλίνη (cofilin)**. Η φυσιολογική λειτουργία της κοφιλίνης είναι ο αποπολυμερισμός των ινιδίων ακτίνης (Εικόνα 8.76B). Η φωσφορυλίωση της Ser3 της κοφιλίνης από τις κινάσες LIM μειώνει δραστικά τη συγγένεια της κοφιλίνης για την ADP-ακτίνη. Κατά συνέπεια, η κοφιλίνη α. δεν συνδέεται στην ADP-ακτίνη του (-)άκρου του ινιδίου, με αποτέλεσμα τα ινίδια F-ακτίνης να μην αποπολυμερίζονται, και β. αποσυνδέεται από τα μονομερή ADP-ακτίνης που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η ανταλλαγή ADP με ATP με τη βοήθεια της προφιλίνης. Τα ινίδια πίεσης επιμηκύνονται και δημιουργούνται θέσεις εστιακής προσκόλλησης λόγω του μη αποπολυμερισμού της ακτίνης. Η κοφιλίνη αποφωσφορυλιώνεται από τις εξειδικευμένες φωσφατάσες κοφιλίνης CIN (chronorphin) και SSH1 (slingshot, σφεντόνα).

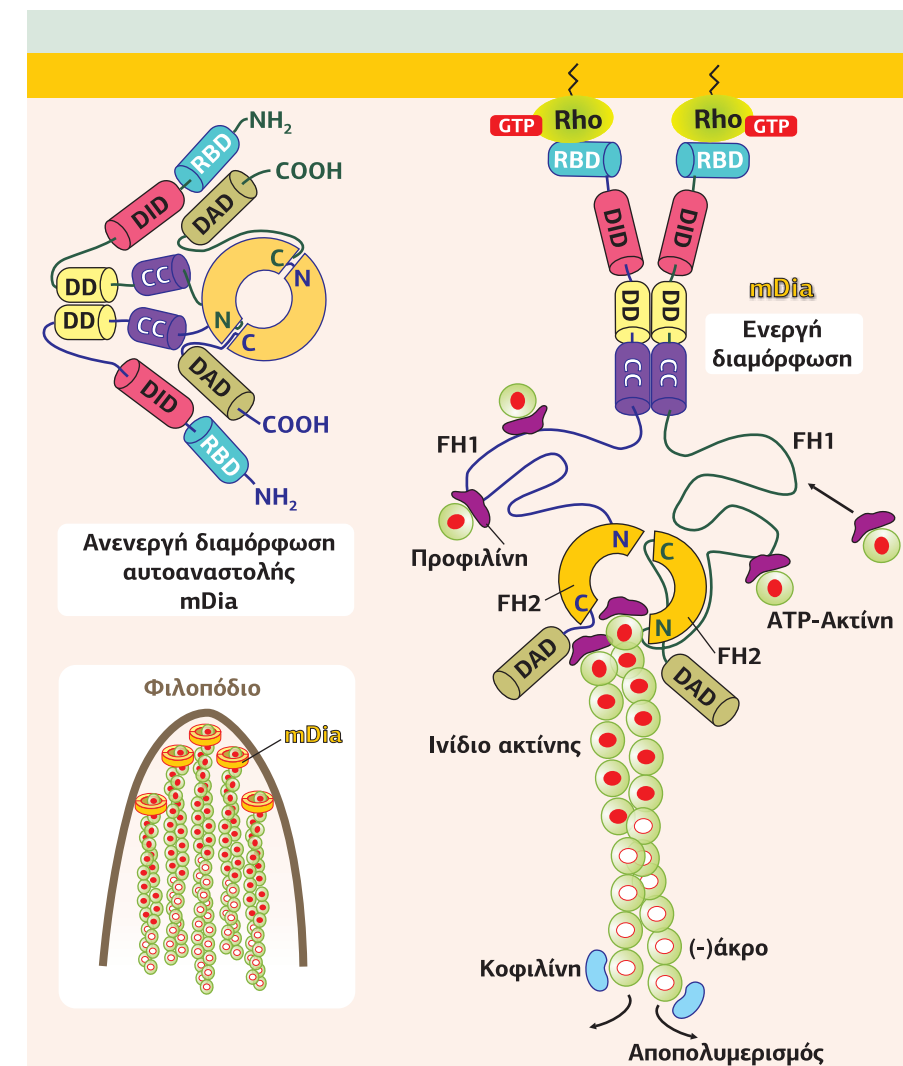
Μια άλλη κινάση, η οποία ενεργοποιείται άμεσα από την RhoA-GTP, είναι η κινάση Ser/Thr **citron kinase ή CRIK** (Citron Rho-Interacting Kinase). Η CRIK εμφανίζει μεγάλη δομική ομοιότητα με τη ROCK, καθώς περιέχει μια NH<sub>2</sub>-τελική καταλυτική περιοχή κινάσης, μια περιοχή coiled-coil, η οποία περιέχει την περιοχή σύνδεσης της Rho-GTP, RBD (Rho-binding domain), μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη CRD (Cysteine-Rich Domain), μια περιοχή PH, μια περιοχή πλούσια σε προλίνη PRD (Proline-Rich Domain), και μια περιοχή PDZ στο COOH-τελικό άκρο (Εικόνα 8.77). Η CRIK φωσφορυλιώνει τις Ser19 και Thr18 της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, αλλά όχι τη φωσφατάση της MLC. Παίζει κύριο ρόλο στην κυτταροκίνηση και τον διαχωρισμό των θυγατρικών κυττάρων στο τέλος της μίτωσης, χωρίς ωστόσο ο μηχανισμός να είναι ακόμη γνωστός. Ποντίκια από τα οποία απουσιάζει το γονίδιο της CRIK εμφανίζουν αταξία και επιληπτικές κρίσεις, και πεθαίνουν σε τρεις εβδομάδες μετά τη γέννησή τους, πιθανόν ως αποτέλεσμα της ανώμαλης κυτταροκίνησης και της μαζικής απόπτωσης πρόδρομων νευρικών κυττάρων.

Ένας άλλος χαρακτηριστικός τελεστής της RhoA, αλλά και της Cdc42 είναι η πρωτεΐνη **mDia** -είναι η ομόλογη της Diaphanous της *Drosophila*-, η οποία ανήκει στην οικογένεια των **φορμινών** (formins), πρωτεϊνών που έχουν FH (Formin Homology) περιοχές. Η mDia περιέχει δύο FH περιοχές: FH1 (αμινοξέα 586-747) και FH2 (αμινοξέα 752-1154). Η FH1 είναι όμοια με σχοινί και περιέχει θέσεις σύνδεσης για το σύμπλοκο προφιλίνης/ATP-ακτίνης, ενώ η γειτονική FH2 συνδέεται με την περιοχή FH2 ενός δεύτερου μορίου mDia1 δημιουργώντας ένα head-to-tail διμερές σχήματος doughnut, που περιβάλλει το ακιδωτό (+)άκρο του ινιδίου ακτίνης. Επίσης, περιέχει στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο τις περιοχές DID (Diaphanous Inhibitory Domain), RBD (Rho Binding Domain), DD (Dimerization Domain) -ικανή να προκαλέσει διμερισμό του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου της mDia1- και μια περιοχή CC (coiled coil) που ακολουθεί την DD, αλλά δεν απαιτείται για τον διμερισμό. Στο COOH-τελικό άκρο υπάρχει η περιοχή DAD (Diaphanous Autoregulated Domain) (Εικόνα 8.78).

Οι φορμίνες σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται ως διμερή σε κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής, καθώς η COOH-τελική περιοχή DAD συνδέεται στη NH<sub>2</sub>-

τελική περιοχή DID. Η σύνδεση της RhoA-GTP ή της Cdc42-GTP στην περιοχή RBD στρατολογεί την mDia στην πλασματική μεμβράνη και οδηγεί σε μια νέα ανοικτή ενεργή διαμόρφωση.

Το διμερές της mDia στην ανοικτή του διαμόρφωση συνδέεται μέσω των δύο FH2 περιοχών στο ακιδωτό (+)άκρο της F-ακτίνης, περιβάλλοντας το ινίδιο, και μέσω της πλούσιας σε προλίνη FH1 περιοχής στρατολογεί μονομερή ATP-ακτίνης μέσω της προφιλίνης (profilin) (Εικόνα 8.78). Η προφιλίνη, όπως είδαμε, παίζει σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό της ακτίνης, καθώς συνδέεται στα μονομερή ADP-ακτίνης, ανταλλάσσει το ADP με ATP και μεταφέρει την ATP-ακτίνη στο (+)άκρο του ινιδίου, όπου και συνδέεται μέσω της FH1 περιοχής της. Συνεπώς, η mDia -και όλες οι φορμίνες- αυξάνει τον πολυμερισμό της ακτίνης -προσθέτει έως και 100 μονομερή ATP-ακτίνης ανά δευτερόλεπτο στο ινίδιο- επιμηκύνοντας μη διακλαδιζόμενα ινίδια F-ακτίνης. Υπερέκφραση της mDia επάγει δημιουργία ινιδίων πίεσης και φιλοποδίων, χωρίς να επηρεάζει τη δημιουργία των θέσεων εστιακής προσκόλλησης.



**Εικόνα 8.78**  
**Δομή και ρόλος της mDia στον πολυμερισμό της ακτίνης.** Η mDia αποτελείται από δύο FH περιοχές: FH1 (όμοια με σχοινί, περιέχει θέσεις σύνδεσης για το σύμπλοκο προφιλίνης/ATP-ακτίνης) και FH2 (συνδέεται με την περιοχή FH2 ενός δεύτερου μορίου mDia1). Επίσης, περιέχει στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο τις περιοχές DID, RBD, DD και μια περιοχή CC. Στο COOH-τελικό άκρο υπάρχει η περιοχή DAD. Σε κατάσταση ηρεμίας η mDia βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής και σε ενεργοποιημένη διαμόρφωση έπειτα από τη σύνδεση με τη Rho-GTP. Στην ενεργοποιημένη μορφή η mDia συνδέεται μέσω της FH2 περιοχής στο (+)άκρο των ινιδίων ακτίνης και μέσω της FH1 περιοχής στην προφιλίνη (συνδεδεμένη με ένα μονομερές ATP-ακτίνης). Μέσω αυτού του μηχανισμού διευκολύνει τον πολυμερισμό της ακτίνης. [30] [144] [130]

Ένας άλλος τελεστής της RhoA-GTP, που επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στον πολυμερισμό της ακτίνης, είναι η **PI5K**, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφατιδυλο(4) φωσφορική ινοσιτόλη σε φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινοσιτόλη, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Η PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> δεν είναι μόνο ο πρόδρομος των δύο δεύτερων διαβιβαστών DAG και IP<sub>3</sub>, αλλά αλληλεπιδρά και με πρωτεΐνες που συνδέονται με την ακτίνη, όπως η προφιλίνη η οποία με αυτόν τον τρόπο απομακρύνεται από την ATP-ακτίνη του

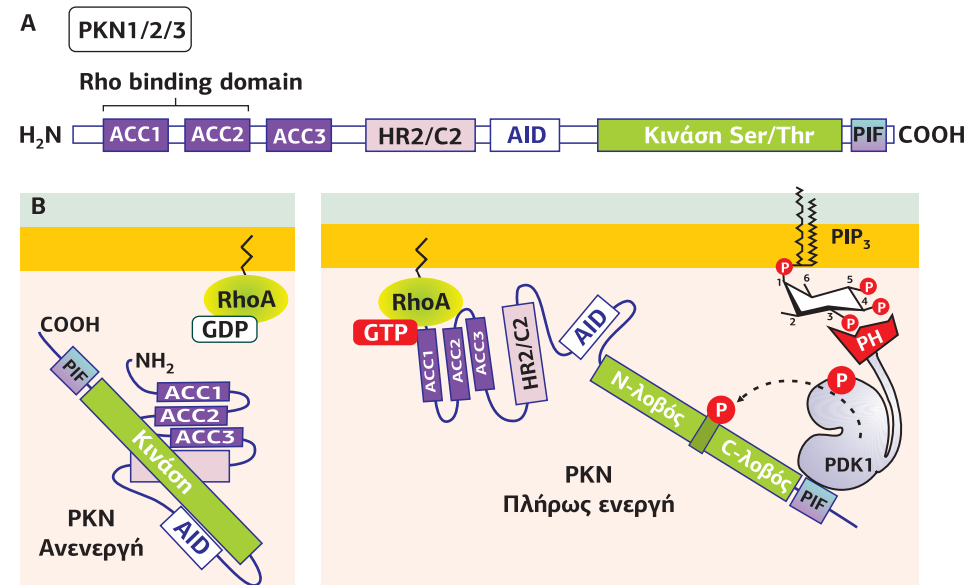
Ο όρος "**formin**" εισήχθη το 1990 για να περιγράψει το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου παραμόρφωσης των άκρων (deformity limbs) σε ποντίκια, το οποίο έπαιξε σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό διαφόρων συστημάτων οργάνων. Τέσσερα χρόνια αργότερα, το προϊόν του γονιδίου Diaphanous της *Drosophila*, το οποίο αποδείχθηκε ότι απαιτείται για την κυτταροκίνηση, βρέθηκε να είναι ομόλογο με την πρωτεΐνη φορμίν. Στις δύο πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν δύο περιοχές ομόλογης αλληλουχίας, οι οποίες οδήγησαν στον ορισμό μιας πλούσιας σε προλίνη περιοχής FH1 που ακολουθείται από μία περιοχή FH2. Η formin και η Diaphanous έγιναν τα ιδρυτικά μέλη της οικογένειας των φορμινών που περιέχει 15 μέλη στον άνθρωπο. Η δράση των φορμινών στον πολυμερισμό ακτίνης αναγνωρίστηκε αρχικά στην ομόλογη Bni1 των ζυμομυκήτων και περίπου στον ίδιο χρόνο οι GTPάσες της οικογένειας Rho ταυτοποιήθηκαν ως ενεργοποιητές των φορμινών.

(+)άκρου του ινιδίου, η βινκουλίνη (vinculin) και η γελσολίνη (gelsolin), προωθώντας τον πολυμερισμό της ακτίνης στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης.

Η οικογένεια των κινάσων **PRK/PKN** (PKC-Related Kinases), η οποία ανακαλύφθηκε το 1994 ως μια υποοικογένεια των κινάσων AGC, αποτελεί έναν ακόμη στόχο των Rho. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί τρεις διαφορετικές ισομορφές: η PKN1 (PKNα/PRK1/PAK1), η PKN2 (PKNγ/PRK2/PAK2) και η PKN3 (PKNβ/PRK3).

Τα τρία μέλη της οικογένειας PKN μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή περιέχει μια καλά συντηρημένη επαναλαμβανόμενη περιοχή, που ονομάζεται HR1a-c (Homology Repeat), γνωστή και ως ACC1-3 (Antiparallel Coiled-Coil). Επίσης, περιέχουν μια περιοχή HR2/C2-like, η οποία είναι ανάλογη με την περιοχή C2 της PKC, δεν συνδέει Ca<sup>2+</sup> όπως αναμενόταν, αλλά δυνάμει εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των PKNs στρατολογώντας τις στην πλασματική μεμβράνη. Τέλος, περιέχει μια περιοχή αυτοαναστολής (AID, Autoinhibition domain) ευαίσθητη στο αραχιδονικό οξύ (το οποίο αυξάνει τη δραστηριότητα των PKNs), και στο COOH-τελικό άκρο την περιοχή κινάσης Ser/Thr στο τέλος της οποίας βρίσκεται η περιοχή PIF (PDK1 Interacting Fragment), όπου συνδέεται η PDK1 (Εικόνα 8.79).

**Εικόνα 8.79**  
**Δομή και ενεργοποίηση της κινάσης PKN.** Α. Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή περιέχει μια καλά συντηρημένη επαναλαμβανόμενη περιοχή που ονομάζεται HR1a-c (Homology Repeat), γνωστή και ως ACC1-3 (Anti-parallel Coiled-Coil). Ακολουθεί η περιοχή HR2/C2-like, η οποία είναι ανάλογη με την περιοχή C2 της PKC. Τέλος, περιέχει μια περιοχή αυτοαναστολής (AID) ευαίσθητη στο αραχιδονικό οξύ, και στο COOH-τελικό άκρο την περιοχή κινάσης στο τέλος της οποίας βρίσκεται η περιοχή PIF (PDK1 Interacting Fragment). [183] Β. Στην κατάσταση ηρεμίας η PKN βρίσκεται σε μία ανενεργή διαμόρφωση, με την περιοχή AID να αλληλεπιδρά με την καταλυτική περιοχή. Με τη σύνδεση της RhoA-GTP στο μοτίβο HR1a/HR1b, η περιοχή κινάσης απελευθερώνεται και μπορεί να εκφράσει καταλυτική δραστηριότητα, αν και σε χαμηλό επίπεδο. Η εκτεθειμένη περιοχή της κινάσης μπορεί να αλληλεπιδράσει με την PDK1 μέσω του μοτίβου PIF που βρίσκεται στο άκρο της. Η PDK1 φωσφορυλιώνει τον βρόχο ενεργοποίησης της PKN ενεργοποιώντας την πλήρως. [13]



Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των PKNs. Η περιοχή HR1 εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τις Rho και Rac. Η Rho-GTP συνδέεται στην PKN και προκαλεί μία διαμορφωτική μεταβολή που επιτρέπει τη σύνδεση με την **PDK1** (3-Phosphoinositide Dependent Kinase 1), μια ιδιοσυστάτα ενεργή κινάση που εξαρτάται από τη σύνδεσή της μέσω της PH περιοχής της σε φωσφοϊνοσιτίδια της μεμβράνης, όπως PI(3,4)P<sub>2</sub> και PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Η PDK1 φωσφορυλιώνει την PKN στον βρόχο ενεργοποίησης και διεγείρει τη δραστηριότητα κινάσης. Ο ρόλος των συνδεδεμένων στη μεμβράνη Rho-GTP είναι να φέρουν σε επαφή την PKN με την PDK1, αλλάζοντας τη διαμόρφωση της PKN, ώστε η PDK1 να έχει πρόσβαση στην περιοχή PIF (PDK1 Interacting Fragment), όπου συνδέεται. Γι' αυτόν τον σκοπό η RhoA-GTP συνδέεται στις περιοχές HR1a και HR1b της PKN αίροντας την αυτοαναστολή και οδηγώντας στην ανοικτή διαμόρφωση. Συνεπώς, ο ρόλος των Rho προσομοιάζει με αυτόν των Ras στην ενεργοποίηση της Raf και της PI3K.

Οι μεμονωμένες ισομορφές της PKN έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένα εξωκυτταρικά σήματα, όπως οι νευροτροφίνες για την ενεργοποίηση της PKN1 (ή PKNα), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGF) για την ενεργοποίηση της PKN2 (ή PKNγ) και η ινσουλίνη για την PKN3 (ή PKNβ). Και στις τρεις περιπτώσεις, οι PKNs συμμετέχουν στη Rho-εξαρτώμενη μετανάστευση των κυττάρων, μέσω της φωσφορυλίωσης περισσότερων από 20 κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (α-ακτινίνη, βιμεντίνη κ.λπ.).

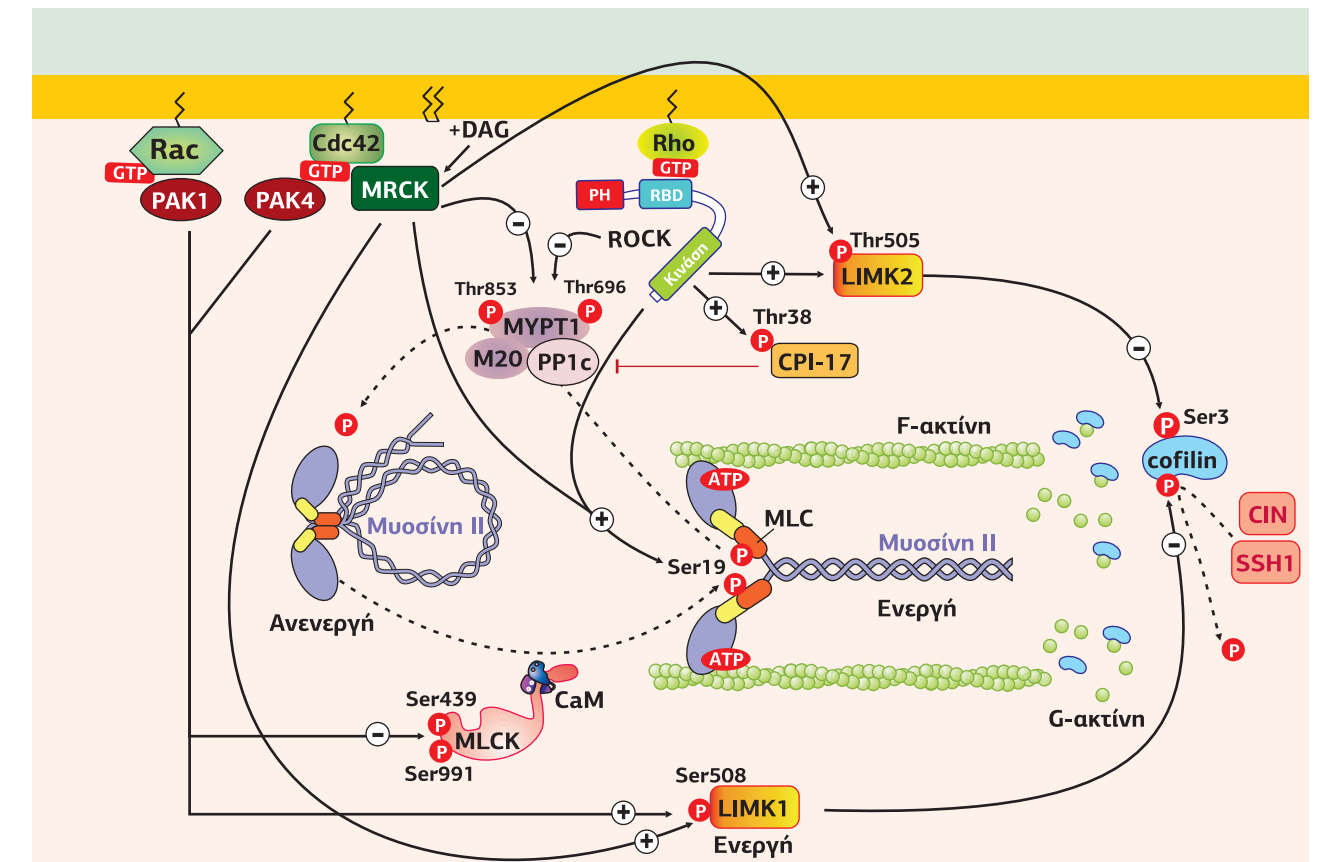
Συνοψίζοντας, η ενεργοποίηση των Rho GTPασών οδηγεί στη δημιουργία ινιδίων πίεσης αλλά και στην αύξηση της σύσπασής τους.

### Οι κινάσες που ενεργοποιούνται από τις Rac/Cdc42 και η ενεργοποίηση της σύσπασης των ινιδίων ακτινομουσίνης

Οι Rac-GTP και οι Cdc42-GTP ενεργοποιούν τρία είδη κινάσων:

- Τις κινάσες **PAKs** (p21-Activated Kinases).
- Τις κινάσες **MRCKs** (Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42 binding Kinases).
- Τις κινάσες **MLKs** (Mixed-Lineage Kinases).

Αυτές οι τρεις κινάσες έχουν πολλά κοινά με τις κινάσες PKNs/PRKs και ROCKs υποδηλώνοντας μια στενή σχέση και έναν υψηλό βαθμό αλληλοεπικάλυψης στη σηματοδότηση των Rho, Rac και Cdc42. Στρατολογούνται από τις συνδεδεμένες με το GTP GTPάσες στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, όπου



**Εικόνα 8.80**

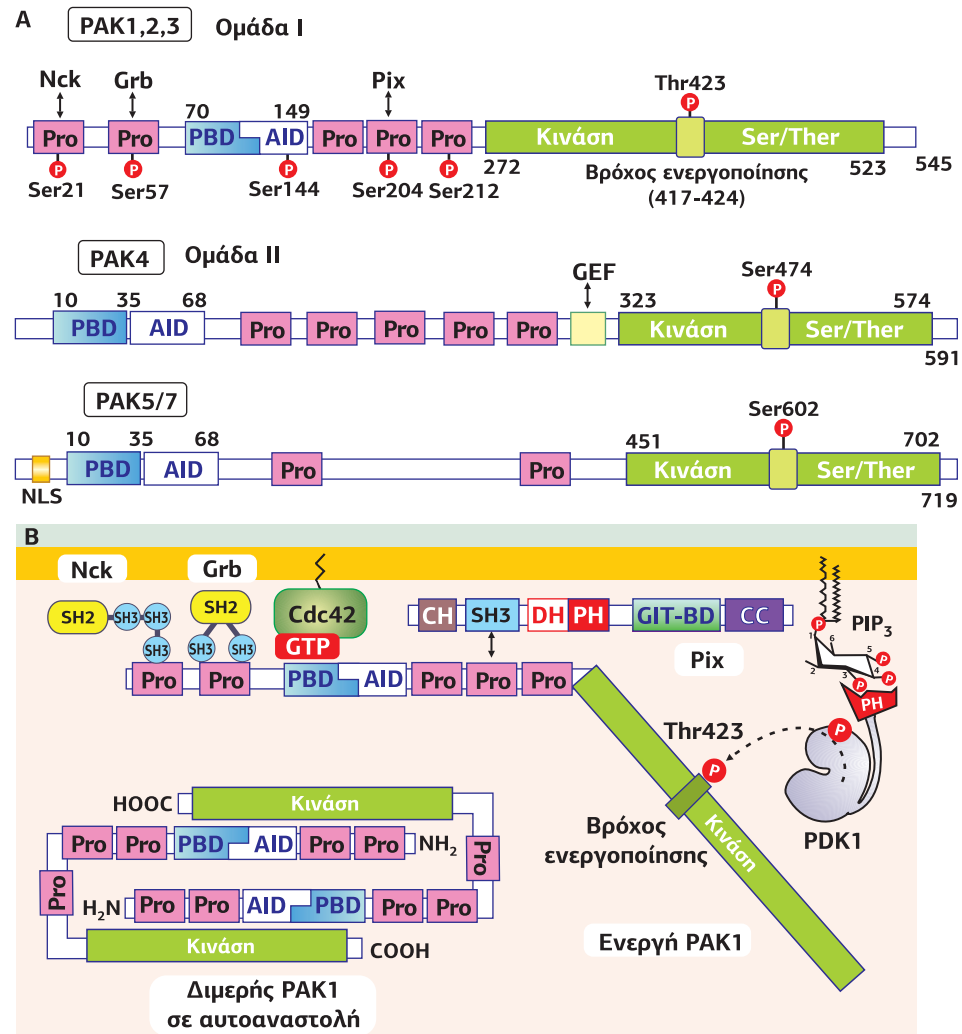
**Συμμετοχή της οικογένειας των Rho GTPασών στον πολυμερισμό και στη σύσπαση των ινιδίων πίεσης ακτινομουσίνης.** Οι RhoA, Rac1 και Cdc42 αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία κινάσων. Η MLCK είναι μια Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, επάγοντας τη σύσπαση, και ρυθμίζεται αρνητικά από τις PAKs. Η ROCK και η MRCK αναστέλλουν τη φωσφοάση PP1 με φωσφορυλίωση της MYPT, με συνέπεια την αύξηση της φωσφορυλιωμένης R-MLC. Η ROCK μπορεί, επίσης, να δράσει μέσω του CPI-17 (protein kinase C-Potentiated Inhibitor of 17 kDa), ενός αναστολέα της MYPT/PP1c, του οποίου η φωσφορυλίωση στη Thr38 ενισχύει την ανασταλτική του δράση. Οι ROCK, MRCK και PAKs συμμετέχουν, επίσης, στη ρύθμιση των LIMKs, οι οποίες απενεργοποιούν την κοφιλίνη με φωσφορυλίωση στη Ser3. Η φωσφορυλιωμένη κοφιλίνη δεν μπορεί πλέον να συνδεθεί αποτελεσματικά στην ADP-ακτινίνη και, συνεπώς, η ικανότητά της να καταλύει τόσο τον αποπολυμερισμό της F-ακτίνης όσο και την αποκοπή τμημάτων της αναστέλλεται. Η PAK1 ρυθμίζει τη λειτουργία της R-MLC κυρίως μέσω αναστολής της δραστηριότητας της MLCK. Η φωσφορυλίωση της MLCK λαμβάνει χώρα στη Ser439 και τη Ser991. Η PAK1 φωσφορυλιώνει τη Ser508 του βρόχου ενεργοποίησης της LIMK1. Συνεπώς, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Rac και Cdc42, δρώντας μέσω των PAKs, λειτουργούν είτε συνεργατικά είτε ανταγωνιστικά με τις Rho-GTP/ROCK. [220] [221]

υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση, ενώ οι PAKs μπορούν να φωσφορυλιωθούν και να ενεργοποιηθούν και από την PDK1.

Επιπλέον, οι PAKs, MRCK και MLKs μοιράζονται αρκετά κοινά υποστρώματα με τις ROCKs και τις PKNs. Όπως και οι ROCKs, η MRCK διεγείρει τη σύσπαση της ακτινομοσίνης απενεργοποιώντας μέσω φωσφορυλίωσης της Thr696 (PIM, Phosphatase Inhibitory Motif) την υπομονάδα MYPT (Myosin Phosphatase Target subunit) της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυσίνης (MLCP), με αποτέλεσμα να παρατείνεται η φωσφορυλιωμένη μορφή της MLC και, συνεπώς, η σύσπαση (βλ. **Εικόνα 7.57**). Όπως και οι ROCKs, η MRCK και οι PAKs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις κινάσες LIMK1/2 προωθώντας τη δημιουργία ινιδίων πίεσης ακτινομοσίνης. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις ROCKs, οι οποίες φωσφορυλιώνουν άμεσα και ενεργοποιούν την MLC, οι PAKs φωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν την  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυσίνης (MLCK), καταστέλλοντας τη φωσφορυλίωση (και ενεργοποίηση) της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας της μυσίνης και, συνεπώς, τη σύσπαση της ακτινομοσίνης (**Εικόνα 8.80**). Χάρη σε αυτήν τη δράση εμποδίζεται η ανάκληση των Rac-επαγόμενων ελασματοποιδίων.

Οι κινάσες PAKs (p21-Activated Kinases) ήταν οι πρώτοι τελεστές των p21Ras-ομόλογων πρωτεϊνών Cdc42 και Rac1 -αλλά όχι των Rho- που ανακαλύφθηκαν στον εγκέφαλο ποντικών το 1994. Στον άνθρωπο οι PAKs κατατάσσονται σε δύο ομάδες: την ομάδα I, στην οποία ανήκουν οι PAK1, PAK2 και PAK3, και την ομάδα II, στην οποία ανήκουν οι PAK4, PAK6 και PAK5/7. Η PAK4, το ιδρυτικό μέλος της ομάδας II, ανακαλύφθηκε το 1998. Οι PAKs έχουν αρχαία προέλευση και

**Εικόνα 8.81**  
**Δομή και ενεργοποίηση της κινάσης PAK.** Α. Οι PAK1-3 αποτελούνται από μια  $NH_2$ -τελική ρυθμιστική περιοχή και μια  $COOH$ -τελική καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή περιέχει δύο περιοχές PRD, μια περιοχή σύνδεσης των p21-ομόλογων GTPασών (PBD), που αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή αυτοαναστολής AID, και μια μη κλασική περιοχή PRD που συνδέεται με τον Pix. Στο  $COOH$ -τελικό άκρο υπάρχει η περιοχή κινάσης. Η PAK4 διαφοροποιείται καθώς αποτελείται από πέντε περιοχές PRD και μια περιοχή αλληλεπίδρασης με GEF, ενώ οι PAK5/7 και PAK6 (δεν φαίνεται στην εικόνα) περιέχουν 2 περιοχές PRD και μια περιοχή που τους στρατολογεί στον πυρήνα NLS. Η περιοχή AID διατηρεί την PAK1 ως διμερές σε μία ανενεργή διαμόρφωση αυτοαναστολής, εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος. Η AID επικαλύπτεται μερικώς με την περιοχή σύνδεσης της GTPάσης. Η σύνδεση των Rac-GTP ή Cdc42-GTP απελευθερώνει την PAK1 από τη διαμόρφωση αυτοαναστολής, επιτρέποντας την αυτόματη φωσφορυλίωσή της (Thr423). Η φωσφορυλίωση στην Thr423 είναι κρίσιμη για τη δραστηριότητα PAK1. [36]



δρουν ως σημαντικοί ρυθμιστές της δυναμικής του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής κινητικότητας. Επιπλέον, εμπλέκονται στη μεταγραφή των γονιδίων μέσω των MAPKs, στην κυτταρική απόπτωση και επιβίωση, καθώς και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Οι PAK1-3 αποτελούνται από μια  $NH_2$ -τελική ρυθμιστική περιοχή και μια  $COOH$ -τελική καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή περιέχει πέντε περιοχές πλούσιες σε προλίνη (PRD), μια περιοχή σύνδεσης της p21 GTPάσης (PBD, p21 GTPase Binding Domain), που αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή αυτοαναστολής AID (Auto-Inhibitory Domain), και μια μη κλασική περιοχή PRD που συνδέεται με τον Pix (PAK-interacting exchange factor). Η PAK4 και οι PAK5/7 διαφοροποιούνται καθώς οι περιοχές PBD και AID διαχωρίζονται. Επίσης, η PAK4 περιέχει και μια περιοχή αλληλεπίδρασης με GEF, ενώ οι PAK5/7 περιέχουν 2 περιοχές PRD και μια περιοχή NLS που τις στρατολογεί στον πυρήνα (**Εικόνα 8.81A**).

Η περιοχή αυτοαναστολής AID της μίας PAK συνδέεται με την περιοχή κινάσης μιας δεύτερης PAK, οδηγώντας στη δημιουργία ενός ομοδιμερούς σε αυτοαναστολή. Η σύνδεση της GTPάσης Cdc42-GTP προκαλεί μια σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση της περιοχής AID που διαταράσσει την αλληλεπίδρασή της με την καταλυτική περιοχή, επιτρέποντας την αυτοφωσφορυλίωση που απαιτείται για την πλήρη δραστηριότητα κινάσης (**Εικόνα 8.81B**). Η αυτοφωσφορυλίωση ενός μόνο καταλοίπου στην καταλυτική περιοχή (Thr423 της PAK1) στον βρόχο ενεργοποίησης είναι σημαντική τόσο για τη διατήρηση της άρσης της αυτοαναστολής όσο και για την πλήρη καταλυτική λειτουργία της κινάσης.

Πρωτεΐνες προσαρμογής, όπως η Grb2 και η Nck, και παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, όπως ο aPix και βPix (βλ. σελ.713, και **Εικόνα 9.61**), αλληλεπιδρούν -μέσω της SH3 περιοχής τους- με τις περιοχές πλούσιες σε προλίνη, στρατολογώντας τα διμερή PAK στη μεμβράνη, αυξάνοντας την αλληλεπίδρασή τους με τις Rac/Cdc42 και με τα λιπίδια. Ωστόσο, οι PAKs μπορούν να ενεργοποιηθούν και ανεξάρτητα από τις Rac και Cdc42. Η στρατολόγησή τους στη μεμβράνη μέσω της Grb2 οδηγεί στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης, η οποία προϋποθέτει τη φωσφορυλίωση της Thr423 από την PDK1.

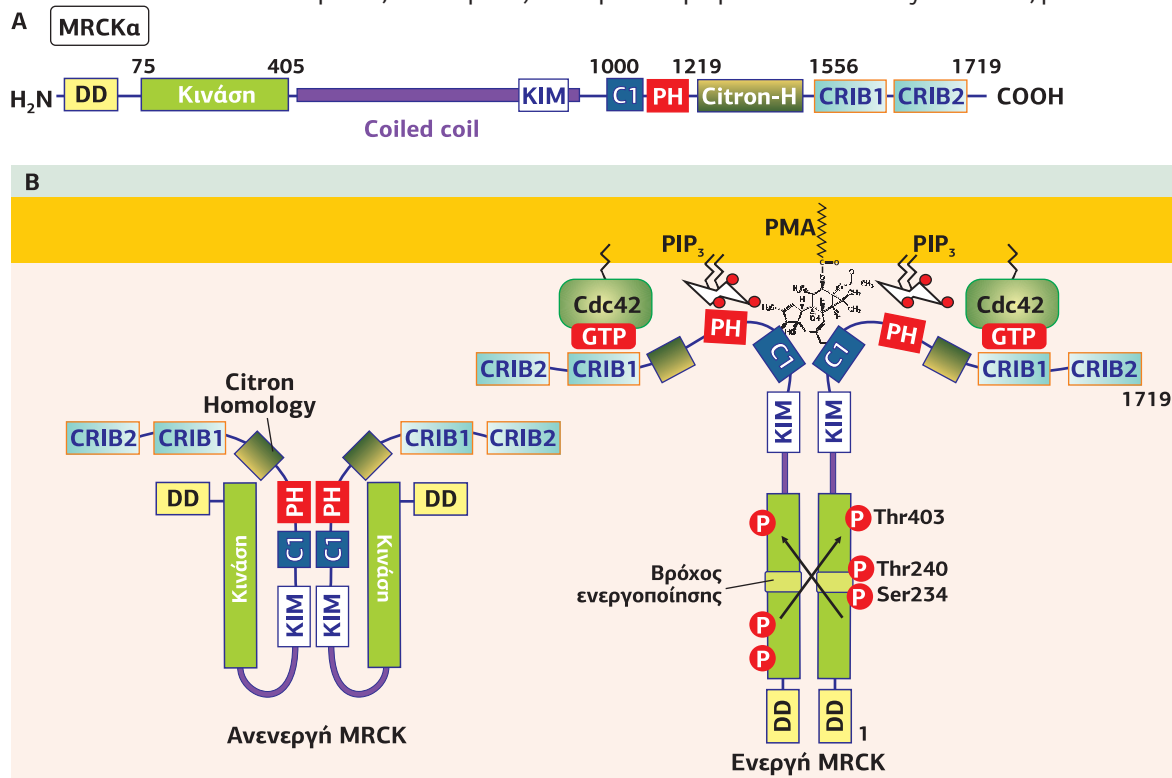
Οι PAKs είναι πολυλειτουργικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Η PAK1 φωσφορυλιώνει υποστρώματα που ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού, όπως η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυσίνης (MLCK) και η κινάση LIM (LIMK), με αποτέλεσμα την ενίσχυση της κυτταρικής κινητικότητας. Επίσης, η αναστολή της Bad και η ενεργοποίηση των Raf1, MEK1, MEK1 με φωσφορυλίωσή τους από την PAK1 προωθεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Οι κινάσες MRCKs (Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42 binding Kinases), MRCKα, β, γ, είναι τελεστές των Cdc42/Rac. Ανήκουν στην οικογένεια των κινάσων DMPKs (Myotonic Dystrophy Protein Kinases), οι οποίες εκφράζονται κυρίως στον σκελετικό μυ και τη νευρομυϊκή σύναψη, και οι μεταλλάξεις τους, όπως η αύξηση των επαναλήψεων CTG στο 3' άκρο, προκαλούν μυοτονική δυστροφία, δηλαδή η χαλάρωση των μυών έπειτα από μια συστολή τους επέρχεται αργά και καθυστερημένα. Για παράδειγμα, στη μυοτονική δυστροφία οι ασθενείς όταν κάνουν χειραψία, το χέρι τους δεν αφήνει το χέρι του άλλου κανονικά, αλλά καθυστερημένα. Οι MRCKs μοιάζουν με τις κινάσες PAKs όσον αφορά την περιοχή σύνδεσης της GTPάσης, αλλά και με τις κινάσες ROCKs όσον αφορά την περιοχή κινάσης. Συνεπώς, δρουν σε όμοια με των ROCKs υποστρώματα, όπως η MYPT1, η οποία αναστέλλεται από την MRCK έπειτα από φωσφορυλίωση της Thr696, ενός κεντρικού συντηρημένου μοτίβου που ονομάζεται PIM (Phosphatase Inhibitory Motif). Οι MRCKs είναι κύριοι ρυθμιστές της σύσπασης της ακτινομοσίνης, μια δραστηριότητα που επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση, την κινητικότητα και την κυτταρική διαίρεση. Έχει δείξει ότι η MRCKα επάγει την Cdc42-εξαρτώμενη ανάπτυξη νευριτών -καθώς στα θηλαστικά η MRCK εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο σε νευρικά κύτταρα- και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, όντας

**Εικόνα 8.82**

**Δομή και ενεργοποίηση των κινάσων MRCKs.**

Α. Όλες οι DMPKs-like κινάσες περιέχουν στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο μια περιοχική διμερισμού (DD) που ακολουθείται από μια περιοχική κινάσης. Το μήκος της περιοχικής coiled coil που βρίσκεται μετά την περιοχική κινάσης είναι μεταβλητό μεταξύ των διαφόρων κινάσων, στην περίπτωση της MRCK η περιοχική αυτή περιέχει το ανασταλτικό μοτίβο KIM. Η περιοχική C1-like αλληλεπιδρά με PMA/DAG και ακολουθείται από τις περιοχές PH και CH. Η περιοχική CRIB, όπου συνδέονται οι Cdc42 και Rac1 βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο. [220] Β. Μοντέλο για τη ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας της MRCK. Η ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ του μοτίβου αυτοαναστολής KIM με την περιοχική κινάσης κρατά την κινάση σε μια κλειστή, ανενεργή, διμερή δομή. Η διάσπαση αυτής της αλληλεπίδρασης (π.χ. μέσω της σύνδεσης του PMA στην C1-like) οδηγεί σε μια ανοικτή δομή που διευκολύνει τον διμερισμό μέσω της NH<sub>2</sub>-τελικής DD περιοχής, την αυτοφωσφορυλίωση και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης. [181]



υπεύθυνη για τη μεταστατική τους ιδιότητα.

Η MRCKα απομονώθηκε μέσω της αλληλεπίδρασής της με την Cdc42-GTP και αργότερα βρέθηκε να περιέχει μία λειτουργική θέση δέσμευσης για τον φορβολεστέρα PMA (ένα ανάλογο της διακυλογλυκερόλης), την C1-like, λόγω της ομοιότητάς της με τις περιοχές C1 (zinc fingers) της PKC και της χιμαιρίνης.

Οι MRCKs αποτελούνται, ξεκινώντας από το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, από μια περιοχική διμερισμού, μια περιοχική κινάσης, μια εκτεταμένη κεντρική περιοχική coiled coil, η οποία περιέχει την αλληλουχία KIM (Kinase Inhibitory Motif) που δρα ως περιοχική αυτοαναστολής, καθώς συνδέεται με την καταλυτική περιοχική και οδηγεί σε μια κλειστή ανενεργή διαμόρφωση, μια περιοχική C1-like (zinc finger), μια περιοχική PH (Pleckstrin Homology), μια περιοχική Citron Homology και δύο περιοχές CRIB (Cdc42/Rac Interaction Binding): την περιοχική CRIB1, η οποία συνδέει κατά προτίμηση τη Cdc42-GTP, και την περιοχική CRIB2, η οποία αυξάνει την αλληλεπίδραση της MRCK με τη Rac-GTP.

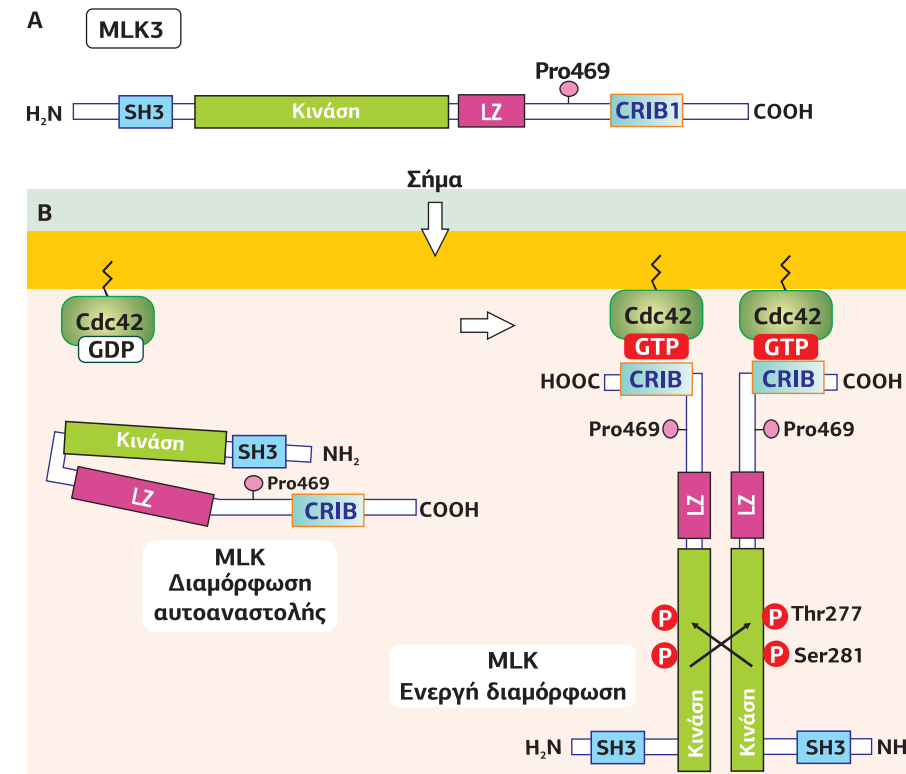
Η MRCKα σχηματίζει head-to-head ολιγομερή και τετραμερή των περίπου 900 kDa μέσω της περιοχικής coiled coil και της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχικής διμερισμού. Σε κατάσταση ηρεμίας η ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ του μοτίβου αυτοαναστολής KIM με την περιοχική κινάσης κρατά τη MRCK σε μια κλειστή, ανενεργή, διμερή δομή. Η ενεργοποίηση της MRCKα απαιτεί τη σύνδεση του φορβολεστέρα PMA και της DAG στην περιοχική C1-like, η οποία αίρει την αυτοαναστολή και επιτρέπει την trans-αυτοφωσφορυλίωση της Ser234 και της Thr240 του βρόχου ενεργοποίησης, καθώς και της Thr403 του "υδρόφοβου μοτίβου". Ωστόσο, για την πλήρη ενεργοποίηση της MRCK απαιτείται και η σύνδεσή της με την Cdc42-GTP, η οποία συνεισφέρει στη στρατολόγησή της στην πλασματική μεμβράνη. Ο ρόλος των PH και citron homology περιοχών δεν είναι γνωστός. Σε αντίθεση με την ROCK, η ρύθμιση της δραστηριότητας της MRCK δεν φαίνεται να εμπλέκει την περιοχική PH.

Η ονομασία της οικογένειας κινάσων **MLK** (Mixed-Lineage Kinase) έχει μια ενδιαφέρουσα ιστορία: από τα 11 συντηρημένα μοτίβα αλληλουχιών, που βρέθηκαν στις πρωτεϊνικές κινάσες (βλ. **Εικόνα 7.1**), οι υποπεριοχές I-VII των MLKs μοιάζουν με τα μοτίβα των κινάσων Ser/Thr και ιδίως με των MEKs και Raf1, ενώ οι υποπεριοχές VIII-XI μοιάζουν περισσότερο με των κινάσων Τυρ και ιδίως με του υποδοχέα

αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR) και της Src. Ως εκ τούτου, ο όρος MLK "μικτής γενεαλογίας κινάση" αναφέρεται στην αβέβαιη καταγωγή τους. Ωστόσο, η αυτοφωσφορυλίωση της MLK3 συμβαίνει αποκλειστικά σε κατάλοιπα Ser/Thr και τα στοιχεία μέχρι στιγμής δείχνουν ότι όλες οι MLKs έχουν δράση κινάσων Ser/Thr. Οι MLKs δρουν ως MAP3Ks, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν ιδιαίτερα το μονοπάτι των JNKs (c-Jun N-terminal Kinases), p38, και ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases), ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη φλεγμονή (βλ. σελ. 424). Επιπλέον, η MLK3 εντοπίζεται στο κεντρόσωμα και η δραστηριότητά της ενισχύεται κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη φάση G2 στη M, όταν η οδός JNK παραμένει ανενεργή, προτείνοντας έναν διαφορετικό ρόλο για τη MLK3 που μένει να αποκαλυφθεί.

Οι MLKs χαρακτηρίζονται από μια NH<sub>2</sub>-τελική SH3 περιοχική, που ακολουθείται από την καταλυτική περιοχική κινάσης, ένα μοτίβο Leucine-zipper, μια καλά συντηρημένη Pro469 και την περιοχική σύνδεσης των Rac/Cdc42 (CRIB, Cdc42- and Rac-Interactive Binding motif). Η SH3 συνδέεται ενδομοριακά στην Pro469 οδηγώντας σε μια κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής. Η Pro469 είναι ένα κρίσιμο αμινοξύ, καλά συντηρημένο σε όλες τις MLKs. Η σύνδεση της Rac/Cdc42-GTP ανοίγει τη διαμόρφωση, επιτρέποντας την αυτοφωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης (στην Thr277 και Ser281) της κινάσης. Η ενεργοποιημένη MLK είναι πλέον ικανή να φωσφορυλιώσει τους στόχους της (την κινάση MEK, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την JNK). Το μοτίβο Leucine zipper οδηγεί στον διμερισμό της κινάσης (ή στον ολιγομερισμό), ο οποίος είναι απαραίτητος για τη σωστή αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα.

Η αντι-αποπτωτική κινάση PKB/Akt μπορεί να φωσφορυλιώσει τη Ser674 και να αναστείλει την MLK3.



**Η ενεργοποίηση των WASPs από τις Rac/Cdc42 και η δημιουργία διακλαδισμένων ινιδίων F-ακτίνης: ελασματοπόδια**

Όπως αναφέραμε προηγουμένως, η ενεργοποίηση των κινάσων LIMKs από το μονοπάτι Rho/ROCKs αναστέλλει τον επαγόμενο από την κοφιλίνη αποπολυμερι-

Η οικογένεια MLK περιέχει τρεις υποοικογένειες.  
 - **MLKs:** MLK1 (ή MAP3K9), MLK2 (ή MAP3K10), MLK3 (ή MAP3K11) και MLK4.  
 - **DLKs** (Dual Leucine zipper bearing Kinases): DLK (ή MAP3K12) και LZK (ή MAP3K13).  
 - **ZAKs** (Zipper sterile α-motif Kinases), οι οποίες περιέχουν μια περιοχική SAM που τις ξεχωρίζει από τις άλλες κινάσες: ZAKα και ZAKβ.

**Εικόνα 8.83**

**Δομή και ενεργοποίηση των κινάσων MLKs.**

Α. Οι MLKs χαρακτηρίζονται από μια NH<sub>2</sub>-τελική SH3 περιοχική, που ακολουθείται από την καταλυτική περιοχική κινάσης, ένα μοτίβο Leucine-zipper (LZ), μια καλά συντηρημένη σε προλίνη (Pro469) και την περιοχική σύνδεσης των Rac/Cdc42 (CRIB). Β. Μοντέλο βάσει του οποίου η SH3 περιοχική στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο των MLKs συνδέεται στην Pro469 που είναι γειτονική προς την καταλυτική περιοχική, οδηγώντας σε αυτοαναστολή της δραστηριότητας κινάσης. Η σύνδεση της Rac-GTP ή Cdc42-GTP στην περιοχική CRIB ανταγωνίζεται την αυτοανασταλτική αλληλεπίδραση, επάγοντας μία διαμορφωτική αλλαγή που επιτρέπει την ενεργοποίηση της MLK. [54]

σμό των ινιδίων ακτίνης προωθώντας ταυτόχρονα τον πολυμερισμό μέσω προφιλίνης και, συνεπώς, επιμηκώνει τα ινίδια ακτίνης επάγοντας τη δημιουργία ινιδίων πίεσης. Επιπλέον, είδαμε ότι οι Rho και Cdc42 προωθούν την ανάπτυξη νέων γραμμικών ινιδίων ακτίνης μέσω της mDia. Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε στον μηχανισμό μέσω του οποίου οι Rac και Cdc42 προωθούν την ανάπτυξη διακλαδισμένων ινιδίων με τη βοήθεια των πρωτεϊνών WASP, WAVE και Arp2/3.

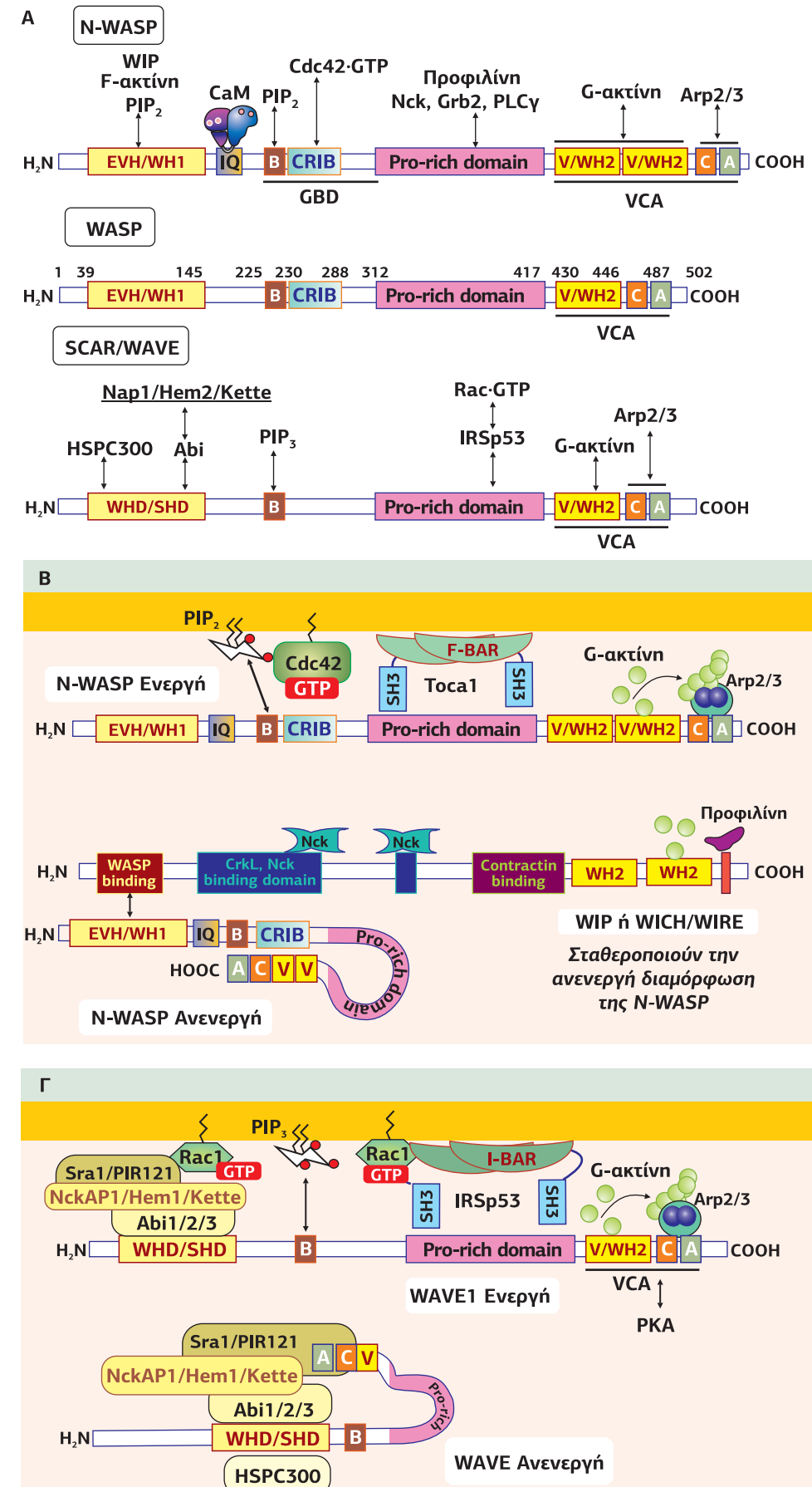
Οι πρωτεΐνες της οικογένειας **WASPs** (Wiskott-Aldrich Syndrome Proteins) είναι ένας χαρακτηριστικός τελεστής των Cdc42. Το ιδρυτικό μέλος της οικογένειας είναι η **WASP**, η οποία ανακαλύφθηκε το 1994. Εκφράζεται μόνο στα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ loss-of-function μεταλλάξεις της βρέθηκαν σε ασθενείς με το σύνδρομο Wiskott-Aldrich, μια σοβαρή αλλά σπάνια κληρονομική ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού. Η απώλεια λειτουργίας της WASP προκαλεί μείωση της κινητικότητας των κυττάρων του ανοσοποιητικού (T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα), καθιστώντας τα ανίκανα να μεταφερθούν στις θέσεις της φλεγμονής. Άλλα μέλη της οικογένειας είναι η **N-WASP**, που βρίσκεται σε όλα τα είδη κυττάρων αλλά είναι πιο πλούσια στον νευρικό ιστό, και η **SCAR** (Suppressor of cAR) / **WAVE** (WASP-family Verprolin homology protein), η οποία έχει μια διπλή ονομασία γιατί ανακαλύφθηκε το 1998 ανεξάρτητα από δύο ομάδες, στο *Dictyostelium* ως SCAR, και στα θηλαστικά ως WAVE (ομόλογο της WASP). Διαφέρει από τις δύο προηγούμενες, καθώς ενεργοποιείται έμμεσα μέσω του IRSp53 (Insulin Receptor Substrate protein of 53 kDa) ή της Sra1/PIR121, από τη GTPάση Rac-GTP, ενώ οι WASPs ενεργοποιούνται άμεσα από την Cdc42-GTP. Οι WASPs ενεργοποιούνται από ένα ευρύ φάσμα εξωκυτταρικών σημάτων -κυρίως αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών-, τα οποία μεταγονται μέσω μεμβρανικών υποδοχών κινάσων Tyr.

Οι WASPs είναι πρωτεΐνες 500 αμινοξέων, με κοινή μοριακή οργάνωση: στο COOH-τελικό τους άκρο περιέχουν μια περιοχή γνωστή ως VCA, που περιλαμβάνει την περιοχή V (Verprolin, η ομόλογη της WASP στον *Saccharomyces cerevisiae*) ή αλλιώς WH2 (WASP-Homology 2), μια κεντρική (C, central) και μια όξινη (A, acidic), όπου συνδέονται το σύμπλοκο Arp2/3 και τα μονομερή G-ακτίνης. Επίσης, κοινό χαρακτηριστικό τους είναι μια βασική περιοχή (B), η οποία δεσμεύει PIP<sub>2</sub> ή PIP<sub>3</sub>, και μια κεντρική περιοχή CRIB (Cdc42/Rac Interaction Binding), η οποία δεσμεύει την Cdc42-GTP. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο υπάρχει μια περιοχή EVH (Ena/VASP Homology) ή WH1 (WASP Homology), στην οποία συνδέεται η πρωτεΐνη WIP (WASP Interacting Protein), τα PIP<sub>2</sub> της μεμβράνης και η F-ακτίνη. Ανάμεσα στην περιοχή CRIB και την περιοχή VCA υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη PRD (Proline-Rich Domain), η οποία συνδέει την προφιλίνη και αρκετές πρωτεΐνες με SH3 περιοχές (Nck, Grb2, κινάσες Tyr, PLCγ1). Το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της N-WASP συνδέει PIP<sub>2</sub>, F-ακτίνη και καλμοδουλίνη μέσω της περιοχής IQ. Το μοτίβο IQ αποτελείται από 23 βασικά αμινοξέα, με μια καλά συντηρημένη συναινετική αλληλουχία A-x(3)-I-Q-x(2)-F-R-x(4)-K-K. (Εικόνα 8.84).

Στην κατάσταση ηρεμίας η WASP βρίσκεται σε μια διαμόρφωση αυτοαναστολής λόγω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής VCA και της περιοχής σύνδεσης της Rac/Cdc42-GTP (CRIB), η οποία αποτρέπει τη σύνδεση του συμπλόκου Arp2/3 και των μονομερών ακτίνης στο COOH-τελικό άκρο. Η σύνδεση της πρωτεΐνης WIP ή της ομόλογης WICH (WIP- and CR16-Homologous protein) / WIRE (WIP-Related protein) με την περιοχή WH1 σταθεροποιεί τη διαμόρφωση αυτοαναστολής, αλλά δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν οι WIP, WICH/WIRE παραμένουν συνδεδεμένες και μετά την ενεργοποίηση της WASP. Η Rac-GTP και η Cdc42-GTP είναι οι κύριοι ενεργοποιητές της WASP, καθώς η σύνδεσή τους στην περιοχή CRIB προκαλεί αλλοστερική απελευθέρωση της VCA από την CRIB, με αποτέλεσμα την αλλαγή της κλειστής διαμόρφωσης αυτοαναστολής σε ενεργή ανοικτή διαμόρφωση, η οποία συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και ταυτόχρονα συνδέει το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Arp2/3 και μονομερή ADP-ακτίνης (Εικόνα 8.84B).

Το **Arp2/3** (Arp: Actin related proteins) είναι ένα σύμπλοκο 7 καλά διατηρημένων πρωτεϊνικών υπομονάδων: Arp2, Arp3, p41/ArpC1, p34/ArpC2, p21/ArpC3,

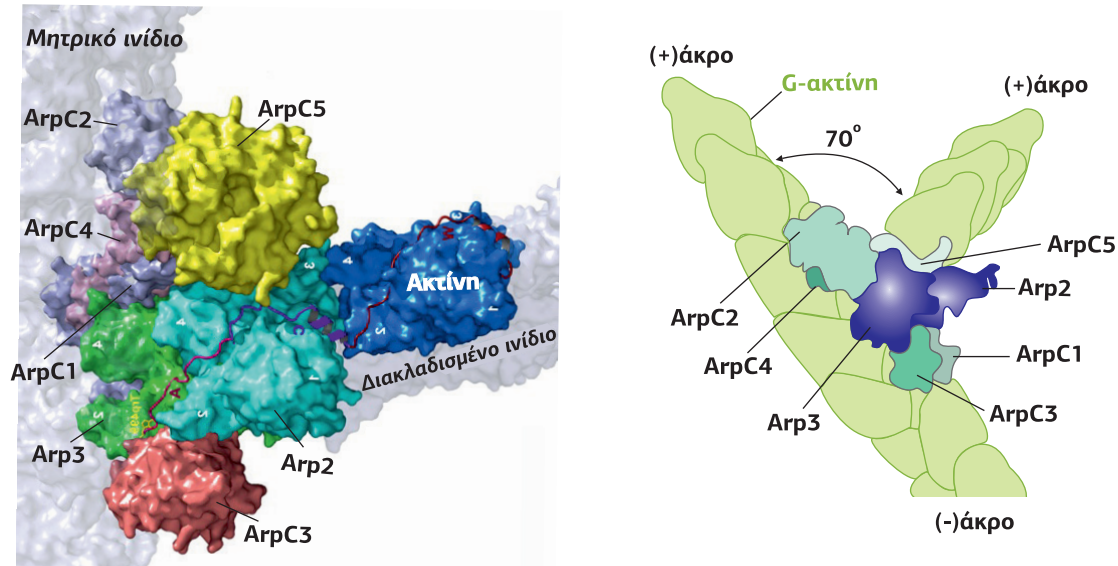
Η **IRSp53** είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει μια περιοχή I-BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs), η οποία δημιουργεί ένα αντιπαράλληλο διμερές, με δομή ελικοειδούς και σχήμα μπανάνας.



**Εικόνα 8.84**  
**Δομή και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών της οικογένειας WASP.** Α. Οι N-WASPs στο COOH-τελικό τους άκρο περιέχουν μια περιοχή γνωστή ως VCA που περιλαμβάνει την περιοχή WH2, μια κεντρική (C) και μια όξινη (A) περιοχή, όπου συνδέονται το σύμπλοκο Arp2/3 και τα μονομερή G-ακτίνης. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο περιέχουν μια περιοχή WH1, μια περιοχή CRIB και μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD), όπου συνδέονται πρωτεΐνες με SH3 περιοχές. Οι πρωτεΐνες WAVE δεν περιέχουν CRIB, αλλά ενεργοποιούνται από τη Rac μέσω της πρωτεΐνης IRSp53. [97] [222] Β. Στην κατάσταση ηρεμίας η N-WASP βρίσκεται σε μια διαμόρφωση αυτοαναστολής λόγω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής VCA και της περιοχής CRIB, η οποία αποτρέπει τη σύνδεση του συμπλόκου Arp2/3 και των μονομερών ακτίνης στο COOH-τελικό άκρο. Η σύνδεση των πρωτεϊνών της οικογένειας WIP (WIP, WICH/WIRE) στην περιοχή WH1 σταθεροποιεί τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Η Cdc42-GTP είναι ο κύριος ενεργοποιητής της WASP, καθώς η σύνδεσή της στην περιοχή CRIB προκαλεί αλλοστερική απελευθέρωση της VCA από την CRIB. [185] Γ. Η πρωτεΐνη WAVE παραμένει ανενεργή στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένη μέσω της WHD/SHD περιοχής της με μια μεγάλη ομάδα ανασταλτικών πρωτεϊνών, όπως οι Sra1/PIR121, NckAP1/Hem1, Abi1/2/3, HSPC300. Στη μεμβράνη στρατολογείται από την ενεργοποιημένη Rac1-GTP, με την οποία συνδέεται έμμεσα μέσω της πρωτεΐνης IRSp53 ή μέσω της Sra1/PIR121. NckAP1 (Nck Associated Protein), Hem1 (Hematopoietic protein 1), HSPC300 (Hematopoietic stem/progenitor cell protein), μια μικρή πρωτεΐνη 8 kDa, Sra1 (Specifically Rac1-Associated protein) / PIR21 (p53-Inducible mRNA).

p20/ArpC4 και p16/ArpC5. Οι υπομονάδες Arp2 και Arp3 μοιάζουν πολύ με τη δομή της μονομερούς ακτίνης και είναι ικανές να δεσμεύσουν μονομερή ακτίνης. Η p41/ArpC1 αλληλεπιδρά με παράγοντες που προωθούν την πυρήνωση, τους NPFs (Nucleation Promoting Factors). Οι p34/ArpC2 και p20/ArpC4 διμερίζονται για να σχηματίσουν έναν δομικό σκελετό που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με το μητρικό ινίδιο, ενώ η p21/ArpC3 αποτελεί μια γέφυρα μεταξύ της Arp3 και του μητρικού ινιδίου, αυξάνοντας την αποδοτικότητα πυρήνωσης. Η p16/ArpC5 προσδένει την Arp2 στο υπόλοιπο του συμπλόκου (Εικόνα 8.85).

Το σύμπλοκο συνδέεται στις πλευρές των υφιστάμενων “μητρικών” ινιδίων και επάγει την ανάπτυξη νέων “θυγατρικών” ινιδίων υπό γωνία 70°. Η ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι σημαντική για τη μετακίνηση των κυττάρων, τη φαγοκυττάρωση και την ενδοκυτταρική κινητικότητα των κυστιδίων.



**Εικόνα 8.85**  
**Η σύσταση του συμπλόκου Arp2/3.** Το Arp2/3 είναι ένα σύμπλοκο 7 πρωτεϊνικών υπομονάδων: Arp2 και Arp3 (δεσμεύουν μονομερή ακτίνης), p41/ArpC1 (αλληλεπιδρά με τους NPFs), p34/ArpC2 και p20/ArpC4 (διμερίζονται για να σχηματίσουν έναν δομικό σκελετό που μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με το μητρικό ινίδιο), p21/ArpC3 (αποτελεί μια γέφυρα μεταξύ της Arp3 και του μητρικού ινιδίου) και p16/ArpC5 (προσδένει την Arp2 στο υπόλοιπο του συμπλόκου). Το ενεργοποιημένο Arp2/3 συνδέεται στην πλευρά ενός προϋπάρχοντος ινιδίου F-ακτίνης και δημιουργεί τις προϋποθέσεις για την πλευρική επιμήκυνση (διακλάδωση) του ινιδίου σε γωνία 70°.

Το σύμπλοκο Arp2/3 ενεργοποιείται από τα μέλη της οικογένειας WASP (WASP, N-WASP, WAVE και πρωτεΐνες WASH). Η περιοχή V της πρωτεΐνης WASP αλληλεπιδρά με τα μονομερή ακτίνης, ενώ η περιοχή CA με το σύμπλοκο Arp2/3, για να δημιουργήσει ένα κέντρο πυρήνωσης. Μετά την ενεργοποίησή του από τη WASP, το σύμπλεγμα Arp2/3 συνδέεται στην πλευρά ενός προϋπάρχοντος ινιδίου F-ακτίνης και δημιουργεί τις προϋποθέσεις για την πλευρική επιμήκυνση (διακλάδωση) του ινιδίου υπό γωνία 70°. Από το σημείο αυτό ξεκινά ο πολυμερισμός της ακτίνης, δημιουργώντας δομές που ονομάζονται ελασματοπόδια (lamellipodia), αλλά και διακλαδισμένες δομές F-ακτίνης, που αποτελούν τον πυρήνα δημιουργίας φιλοποδίων (Εικόνα 8.86).

**Ο ρόλος της Rac στην ενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH**

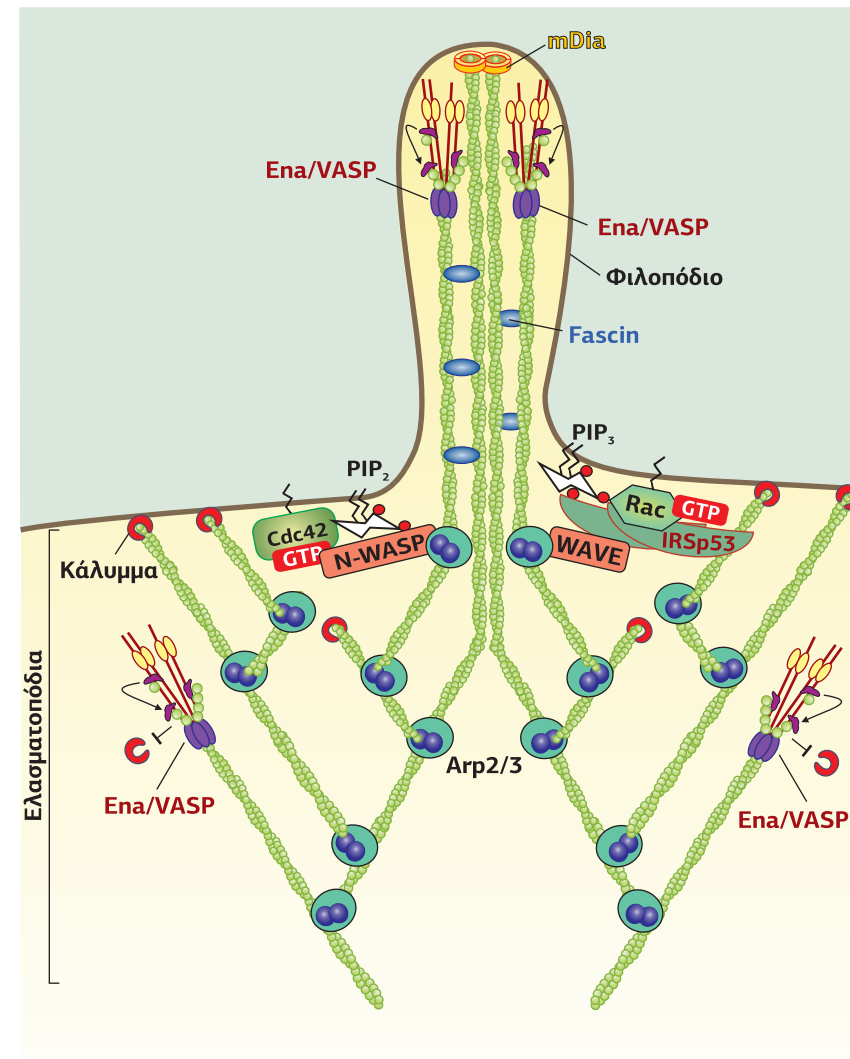
Ενώ σχεδόν όλα τα εργαστήρια ήταν απορροφημένα στη διερεύνηση του ρόλου των Rho/Rac σχετικά με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης, το 1991 μια ομάδα ανακάλυψε μια εντελώς διαφορετική δράση των Rac, την ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH (NOX). Η οξειδάση του NADPH είναι ένα σύμπλοκο ενζύμου που βρίσκεται τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στη μεμβράνη των φαγοσωμάτων των φαγοκυττάρων (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα).

Η NOX των ανθρώπινων ουδετερόφιλων (NOX2) αποτελείται από έξι υπομονάδες: τη GTPάση Rac1 ή Rac2 και πέντε υπομονάδες “Phox” (Phagocytic oxidase). Το κύριο συστατικό του ενζύμου είναι ένα ετεροδιμερές μεμβρανικό σύμπλεγμα, το οποίο αποτελείται από μια μεγάλη gr91<sup>phox</sup> υπομονάδα και από μια μικρή p22<sup>phox</sup> υπομονάδα. Η υπομονάδα gr91<sup>phox</sup> έχει 6 διαμεμβρανικές περιοχές στις οποίες συνδέονται δύο ομάδες αίμης, ο Fe<sup>2+</sup> των οποίων συντονίζεται με κατάλοιπα His της III και IV διαμεμβρανικής περιοχής. Στο COOH-τελικό τμήμα της περιέχει τις περιοχές

σύνδεσης με τη φλαβίνη FAD (Flavin-Adenine Dinucleotide) και το NADPH, που είναι απαραίτητες για τη δραστηριότητά του ενζύμου. Η NOX αποτελείται, επίσης, από τις ρυθμιστικές υπομονάδες p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> και p67<sup>phox</sup>, οι οποίες σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση στο κυτταρόπλασμα.

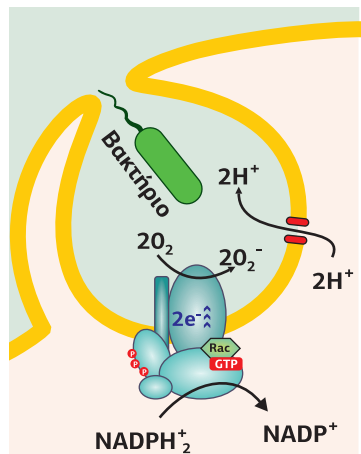
Όταν τα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται από τη δράση φλεγμονωδών παραγόντων κατά την αναπνευστική έκρηξη, ενεργοποιείται και η συναρμολόγηση του συμπλόκου NOX2, η οποία ξεκινάει με τη φωσφορυλίωση της p47<sup>phox</sup> από διάφορες κινάσες, απελευθερώνοντάς την από τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Στη συνέχεια, η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή SH3 της p47<sup>phox</sup> συνδέεται με την πλούσια σε προλίνη περιοχή της p22<sup>phox</sup> και η περιοχή PX της p47<sup>phox</sup> συνδέεται στα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης (προϊόντα της PI3K). Ταυτόχρονα ενεργοποιείται και η Rac2, η οποία στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη μέσω της COOH-τελικής πρενυλομάδας της και της πολυβασικής της περιοχής (βλ. Εικόνα 8.31). Εκεί αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής switch I με την NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή TPR (Tetratricopeptide Repeat) της υπομονάδας p67<sup>phox</sup>. Η p67<sup>phox</sup>, η οποία περιέχει μια περιοχή ενεργοποίησης του cytb588 (gp91 και gp22), είναι η μόνη πρωτεΐνη που επηρεάζει τον ρυθμό μεταφοράς των ηλεκτρονίων στη NOX. Η Rac-GTP δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογής που συνδέεται στην p67<sup>phox</sup> και βοηθά στον σωστό προσανατολισμό της. Η Rac μέσω του insert domain μπορεί επίσης να συνδεθεί στο cyt b, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση βοηθάει μόνο στη σωστή τοποθέτηση της p67<sup>phox</sup> στο cytb588 (Εικόνα 8.87).

Ο σχηματισμός του συμπλόκου επιτρέπει τη ροή ηλεκτρονίων μέσω ενός

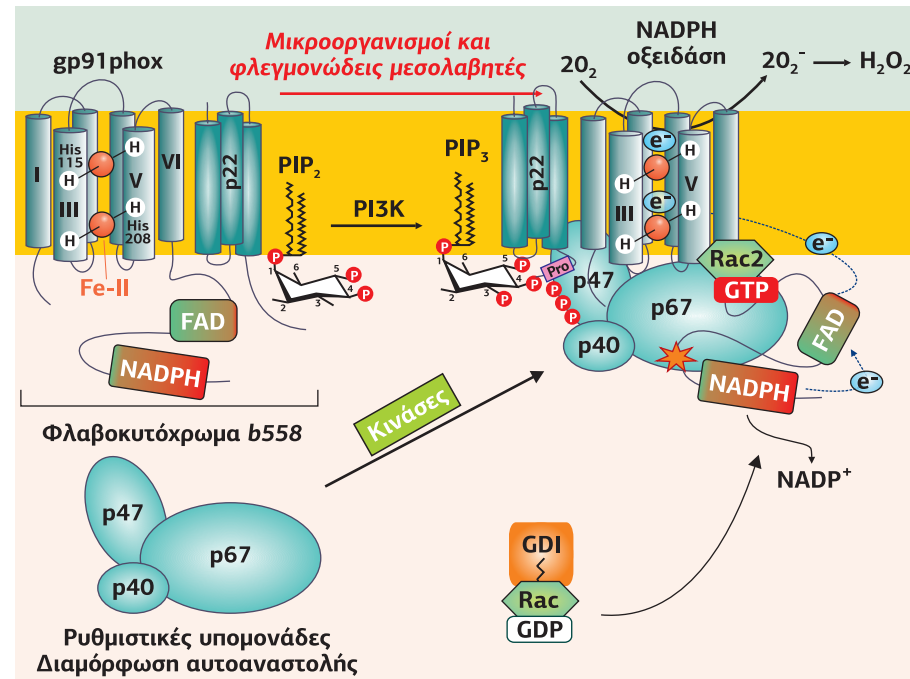


**Εικόνα 8.86**  
**Δημιουργία φιλοποδίων και ελασματοποδίων με τη βοήθεια των N-WASPs και WAVE.** Τα (+)άκρα των ινιδίων ακτίνης (με μονομερή ακτίνης-ATP) βρίσκονται στην άκρη “αναζήτησης” του κυττάρου, ενώ τα (-)άκρα (με μονομερή ακτίνης-ADP) βρίσκονται προς το εσωτερικό του κυττάρου. Τα σύμπλοκα Arp2/3 είναι παρόντα στις διακλαδώσεις των μικροϊνιδίων συμβάλλοντας στη δημιουργία του δικτύου ακτίνης. Το Arp2/3 μπορεί να συνδεθεί μόνο σε προϋπάρχοντα μικροϊνίδια και από τη στιγμή που δεσμευτεί, δημιουργεί μια θέση για την επέκταση των νέων ινιδίων που προκαλεί διακλάδωση. Η ενεργοποιημένη Cdc42-GTP αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη N-WASP, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την Arp2/3. Αυτό διεγείρει τη διακλάδωση των ινιδίων, οδηγώντας στη δημιουργία φιλοποδίων και αυξάνει την κινητικότητα. Η Rac-GTP συνδέεται έμμεσα, μέσω της IRSp53, στη WAVE, η οποία ενεργοποιεί την Arp2/3 προωθώντας τη δημιουργία ελασματοποδίων. Οι πρωτεΐνες Ena (Enabled) / VASP (Vasodilator Phosphoprotein) βρίσκονται στην (+)άκρη των ελασματοποδίων και των φιλοποδίων, όπου προωθούν τον πολυμερισμό της ακτίνης και ταυτόχρονα εμποδίζουν τη δράση των πρωτεϊνών καλύμματος, οι οποίες σταματούν τον πολυμερισμό. Αποτελούνται από μια περιοχή EVH1, μια κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και μια COOH-τελική περιοχή coiled-coil, υπεύθυνη για τον διμερισμό τους. [58]





**Εικόνα 8.87**  
Ο ρόλος της Rac στην ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH (NOX2). Η NOX2 αποτελείται από τη GTPάση Rac1 ή Rac2 και πέντε υπομονάδες "Phox" που περιλαμβάνουν το ετεροδιμερές μεμβρανικό σύμπλεγμα φλαβοπρωτεΐνης-κυτοχρώματος b558 (gp91<sup>phox</sup> και p22<sup>phox</sup>), ικανό να συνδέει την αίμη, και τις ρυθμιστικές υπομονάδες p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> και p67<sup>phox</sup>, οι οποίες σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων οδηγεί στη συναρμολόγηση του συμπλόκου NOX2, η οποία ξεκινάει με τη φωσφορύλιωση της p47<sup>phox</sup> απελευθερώνοντάς την από τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Στη συνέχεια, η p47<sup>phox</sup> συνδέεται με την p22<sup>phox</sup> και τα PIP<sub>3</sub> της μεμβράνης. Ταυτόχρονα στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη η Rac2, η οποία αλληλεπιδρά με την p67<sup>phox</sup>. Σε ένα ενεργοποιημένο ουδετερόφιλο μεταφέρονται από την NADPH οξειδάση 10<sup>8</sup> e<sup>-</sup>/sec. [149] [132]



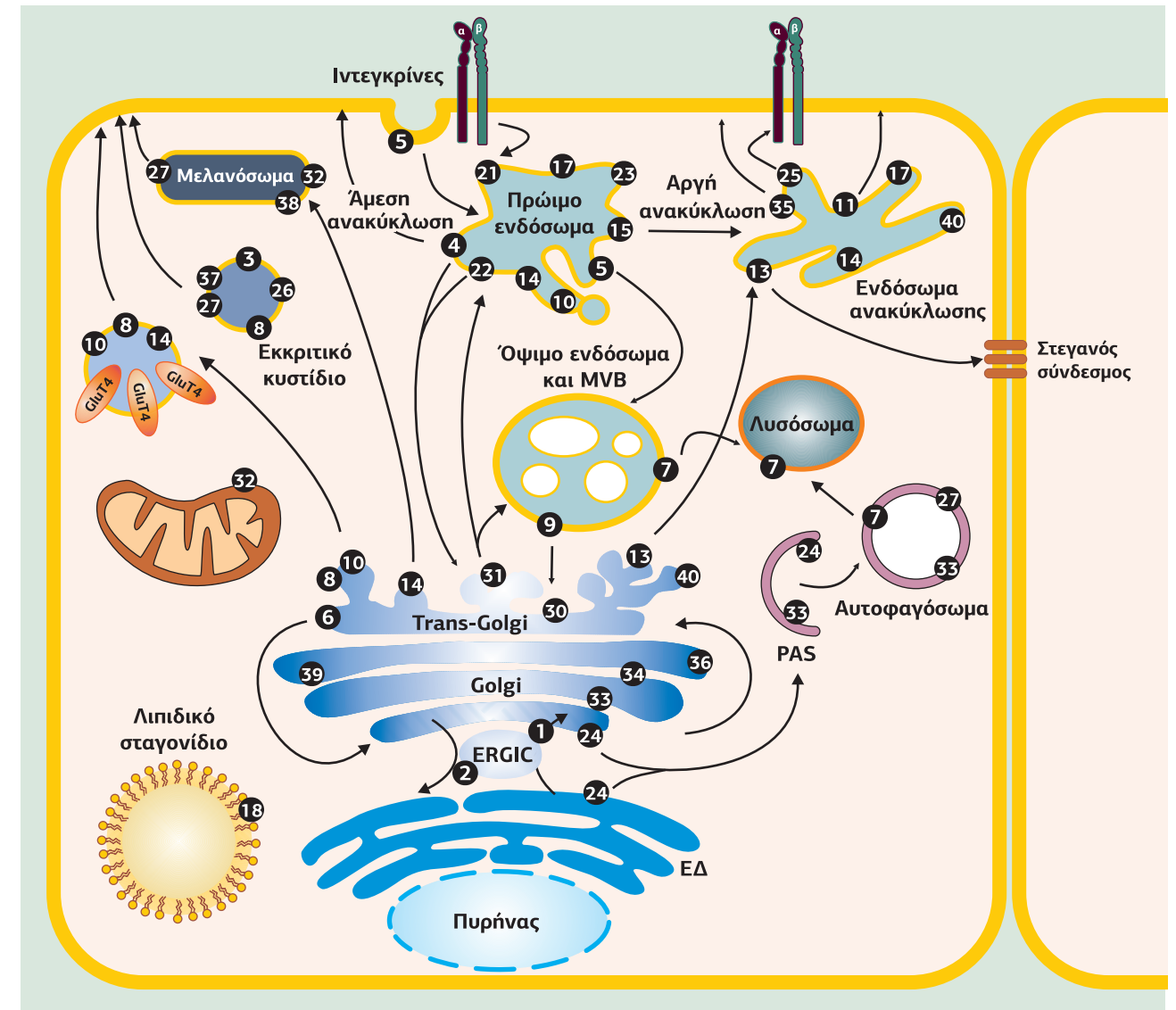
μηχανισμού δύο βημάτων, από το NADPH στο FAD και έπειτα από το FAD στην αίμη του κυτοχρώματος b και τελικά στο μοριακό οξυγόνο, η αναγωγή του οποίου οδηγεί στον σχηματισμό του ανιόντος υπεροξειδίου (O<sup>2-</sup>). Αυτή η δραστική ελεύθερη ρίζα απελευθερώνεται μέσα στα φαγοσώματα, τα οποία εγκλωβίζουν βακτήρια και μύκητες, και επακολουθεί η διάσπαση του φαγοκυτταρωμένου μικροβίου.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια τεράστια πρόοδος όσον αφορά την κατανόηση των οδών επικοινωνίας και των τελεστών που χρησιμοποιούν οι μικρές G-πρωτεΐνες. Αποδείχθηκε δε, ότι οι περισσότερες από αυτές τις οδούς διατηρούνται από τους σακχαρομύκητες έως τα θηλαστικά, γεγονός που σημαίνει ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε μια ποικιλία βασικών λειτουργιών του κυττάρου. Παρόλα αυτά δεν είναι πλήρως κατανοητό, σε μοριακό επίπεδο, πώς τα εξωκυτταρικά μηνύματα ενεργοποιούν τις Rho GTPάσες, καθώς και πώς ρυθμίζονται τα διασταυρωμένα μονοπάτια τους.

### 3.8 Πρωτεΐνες Rab: μεταφορά ενδοκυτταρικών κυστιδίων

Το πρώτο γονίδιο Rab που αναγνωρίστηκε ήταν το YPT1 (Yeast Protein Transport), το οποίο απομόνωσε το 1983 ο Dieter Gallwitz από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Τέσσερα χρόνια μετά ο Antti Salminen και ο Peter Novick στο Yale αναγνώρισαν μια Ras-like GTPάση, τη Sec4 (Secretory pathway), η οποία παίζει κύριο ρόλο στη μεταφορά κυστιδίων. Το 1987 ο Nicolas Touchot στο Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine, Paris, απομόνωσε 4 μέλη ομόλογα του YPT1 από μια cDNA βιβλιοθήκη εγκεφάλου ποντικών και τα ονόμασε Rab από το "Ras gene from rat brain". Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες Rab αναγνωρίστηκαν ως η μεγαλύτερη οικογένεια μικρών GTPασών, με περισσότερα από 60 μέλη στον άνθρωπο. Εντοπίζονται στη μεμβράνη διαφόρων υποκυτταρικών οργανιδίων (Εικόνα 8.88). Τα περισσότερα ενδοκυτταρικά κυστιδία περιέχουν περισσότερους από έναν τύπους πρωτεϊνών Rab.

Οι δομές των Rab-GTP παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δομική ετερογένεια στις περιοχές switch I και II. Αυτές οι δομικές διαφορές θα μπορούσαν να εξηγήσουν πώς διαφορετικές Rab στρατολογούν εξειδικευμένους τελεστές και ρυθμίζουν με



**Εικόνα 8.88**

**Η ενδοκυτταρική τοποθέτηση και ο ρόλος των Rab.** Ένα τυπικό κύτταρο που δείχνει τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των Rab GTPασών και τα αντίστοιχα μονοπάτια μεταφοράς κυστιδίων που ελέγχουν. Η Rab1 ρυθμίζει την κυκλοφορία ΕΡ προς Golgi, ενώ η Rab2 εμπλέκεται στην ανακύκλωση ή ανάδρομη κίνηση από το Golgi και το ERGIC πίσω στο ΕΡ. Η Rab6 ρυθμίζει την κυκλοφορία ενδο-Golgi. Αρκετές Rab συμπεριλαμβανομένων των Rab8, Rab10 και Rab14 ρυθμίζουν τη βιοσυνθετική κυκλοφορία από το δίκτυο trans-Golgi (TGN) προς την πλασματική μεμβράνη. Ο μεταφορέας της γλυκόζης GluT4β βρίσκεται σε κυστιδία που χρησιμοποιούν αυτές τις Rab, για να μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη (βλ. και Εικόνα 7.33). Αρκετά εκκριτικά κυστιδία χρησιμοποιούν τις Rab3a, Rab26, Rab27, Rab37 και να εξωκυτταρώσουν το φορτίο τους. Η Rab5 μεσολαβεί στη σύντηξη των ενδοκυτταρικών κυστιδίων, για να σχηματίσουν το πρώιμο ενδόσωμα. Η κυκλοφορία μπορεί να κατευθύνεται είτε προς το λυσόσωμα για την αποικοδόμηση, κάρη στη δράση της Rab7, είτε σε διάφορα διαμερίσματα ανακύκλωσης, για να επιστρέψει στην πλασματική μεμβράνη κάρη στη δράση της Rab15. Η Rab4 και η Rab11 ρυθμίζουν τη γρήγορη και την αργή ενδοκυτταρική ανακύκλωση, αντίστοιχα. Εξειδικευμένες λειτουργίες Rab περιλαμβάνουν τη ρύθμιση των λιπιδικών σταγονιδίων και την αποθήκευσή τους μέσω της Rab18. Η Rab21 και η Rab25 ρυθμίζουν τη μεταφορά των ιντεγκρινών, ώστε να ελέγχουν την κυτταρική προσκόλληση και την κυτταροκίνηση. Η Rab13 κατευθύνει την κυκλοφορία και ρυθμίζει τον σχηματισμό των στεγανών συνδέσμων στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα. ERGIC: ενδιάμεσος χώρος μεταξύ ΕΡ-Golgi, MVB: multivesicular body, PAS: pre-autophagosomal structure. [75]

ακρίβεια τα αντίστοιχα μονοπάτια τους. Οι πρωτεΐνες Rab συμμετέχουν σε τέσσερις διαφορετικές λειτουργίες:

1. Εκβλάστηση κυστιδίων, διαλογή φορτίου και κάλυψη των κυστιδίων με καλυπτήριες πρωτεΐνες.

2. Μεταφορά των κυστιδίων.
3. Απομάκρυνση καλυπτήριων πρωτεϊνών και ελλιμενισμός των κυστιδίων στη μεμβράνη στόχο, εξασφαλίζοντας την εξειδικευμένη μεταφορά τους σε συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές θέσεις.
4. Σύντηξη των κυστιδίων με τη μεμβράνη στόχο.

### Ο κύκλος των Rab GTPασών - Οι Rab ως μοριακοί διακόπτες

Οι Rab ακολουθούν τον κλασικό κύκλο GDP/GTP, αλλά χρησιμοποιούν μια επιπλέον ρυθμιστική πρωτεΐνη. Οι νεοσυντιθέμενες Rab είναι συνδεδεμένες με το GDP και ανενεργές, με πολύ μικρή συγγένεια για την τρανσφεράση του γερανυλγερανυλίου RabGGT (Geranylgeranyl Transferase). Στη συνέχεια, συνδέονται με την πρωτεΐνη συνοδό REP (Rab Escort Protein), η οποία επάγει την αλληλεπίδρασή τους με την RabGGT και κατά συνέπεια την προσθήκη μίας, ή στις περισσότερες περιπτώσεις, δύο γερανυλγερανυλομάδων, οδηγώντας τις στη μεμβράνη-στόχο. Καθ' όλη αυτή τη διαδικασία οι Rab είναι συνδεδεμένες με το GDP. Στη μεμβράνη ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, ο RabGEF, ανταλλάσσει το GDP με το GTP οδηγώντας τις Rab στην ενεργή Rab·GTP διαμόρφωση. Οι Rab·GTP είναι πλέον ικανές να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες-τελεστές που μεσολαβούν στη μεταφορά κυστιδίων. Στη συνέχεια, μια RabGAP επιταχύνει την υδρόλυση του GTP προς GDP από τις Rab. Οι Rab·GDP απομακρύνονται από τη μεμβράνη έπειτα από σύνδεσή τους με τον GDI, ο οποίος αποσύρει τις Rab στο κυτταρόπλασμα. Η αποσύνδεση των Rab από τον GDI και η μεταφορά τους στη μεμβράνη στόχο διαμεσολαβείται από τον παράγοντα GDF (GDI Dissociation Factor) (βλ. **Εικόνα 8.46Δ**).

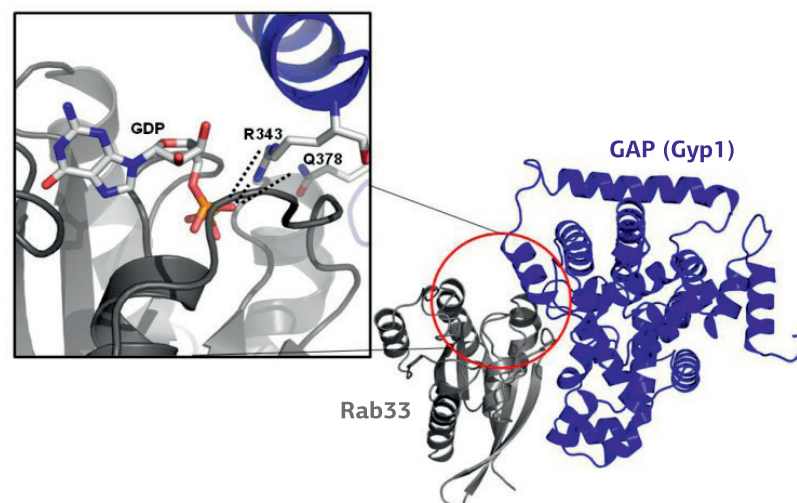
Ο κύκλος των Rab είναι κρίσιμης σημασίας για τη ρύθμιση της κυκλοφορίας από και προς συγκεκριμένα οργανίδια και έτσι βοηθά στον προσδιορισμό της ταυτότητάς τους. Μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο REP1 προκαλούν χοριοειδεργμία (choroideremia), μια ασθένεια που οδηγεί σε ενδεχόμενη τύφλωση λόγω της προοδευτικής ατροφίας του χοριοειδούς, του χρωστικού επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς. Η αιτία της ατροφίας είναι η απώλεια λειτουργίας της Rab27a, η οποία συσσωρεύεται σε μη πρενυλιωμένη μορφή.

### Οι πρωτεΐνες RabGAPs

Όλες οι πρωτεΐνες RabGAPs που έχουν χαρακτηριστεί έως σήμερα περιέχουν μια καλά συντηρημένη περιοχή **TBC** (Tre2/Bub2/Cdc16), που τους προσδίδει τη δραστηριότητα GAP. Η κρυσταλλική δομή της περιοχής TBC της Gyp1 (της GAP της Ypt1) ανέδειξε έναν μηχανισμό αντίστοιχο με των RasGAPs και Cdc42GAPs, που εξαρτάται από τον "δάκτυλο" αργινίνης (arginine finger), ο οποίος εισέρχεται στον θύλακα σύνδεσης του νουκλεοτιδίου, ώστε να διεγείρει την υδρόλυση του GTP.

Η Arg της περιοχής TBC σταθεροποιεί τη β-φωσφορική ομάδα του GTP, έτσι ώστε η γ-φωσφορική ομάδα να υδρολύεται εύκολα και να απομακρύνεται από την Rab.

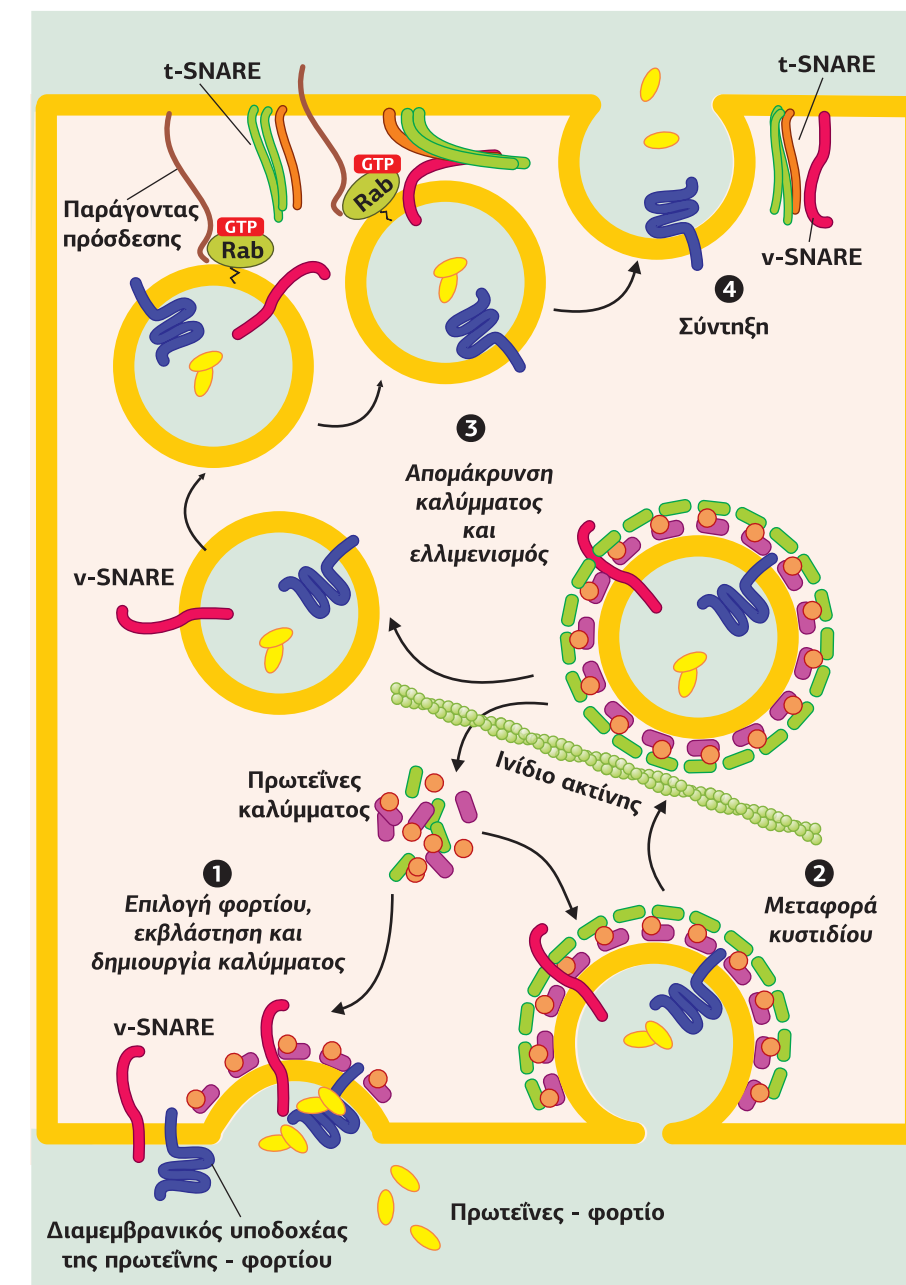
**Εικόνα 8.89**  
Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Rab33/Gyp1. Σε αυτήν τη χαρακτηριστική δομή της RabGAP διακρίνεται σε λεπτομέρεια η συνεισφορά του δακτύλου αργινίνης (R343) αλλά και γλουταμίνης (Q378) στην αλληλεπίδραση της GAP με το GDP, το οποίο είναι συνδεδεμένο στην Rab. Οι δύο γέφυρες αλάτων διακρίνονται με διάστικτη γραμμή. [136]



Ωστόσο, πρόσφατες κρυσταλλικές δομές του Gyp1 με αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες Rab αποκάλυψαν έναν επιπλέον "δάκτυλο", γλουταμίνης, ο οποίος επίσης μεσολαβεί στην υδρόλυση GTP (**Εικόνα 8.89**). Αυτός ο μηχανισμός GAP είναι πιθανό να διατηρείται μεταξύ όλων των συνδυασμών RabGAP.

### Οι πρωτεΐνες RabGEFs

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες RabGAPs, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν σαφή μοτίβα που να χαρακτηρίζουν τις πρωτεΐνες RabGEFs. Ωστόσο, οι δομές αρκετών GEFs αναφέρουν ότι είτε εισέρχονται απευθείας είτε τροποποιούν έμμεσα τη θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου και του  $Mg^{2+}$  στις Rab προκαλώντας την απομάκρυνση του GDP. Οι πρόσφατες κρυσταλλικές δομές του Sec2 (GEF της Sec4) και του TRAPP (GEF της Ypt1) αναδεικνύουν την ποικιλομορφία των μηχανισμών ανταλλαγής νουκλεοτιδίων στις Rab σε σύγκριση με τις δομές άλλων GEFs, όπως ο Rabex5 (ο GEF των Rab5, Rab21 και Rab22) και ο Mss4 (ο GEF της Rab8).



**Εικόνα 8.90**  
Οι τέσσερις δράσεις των Rab GTPασών. 1. Επιλογή φορτίου, εκβλάστηση και δημιουργία καλύμματος στα κυστιδία. 2. Μεταφορά κυστιδίου. 3. Απομάκρυνση των καλυπτήριων πρωτεϊνών και ελλιμενισμός του κυστιδίου. 4. Σύντηξη του κυστιδίου με τη μεμβράνη στόχο. [75]

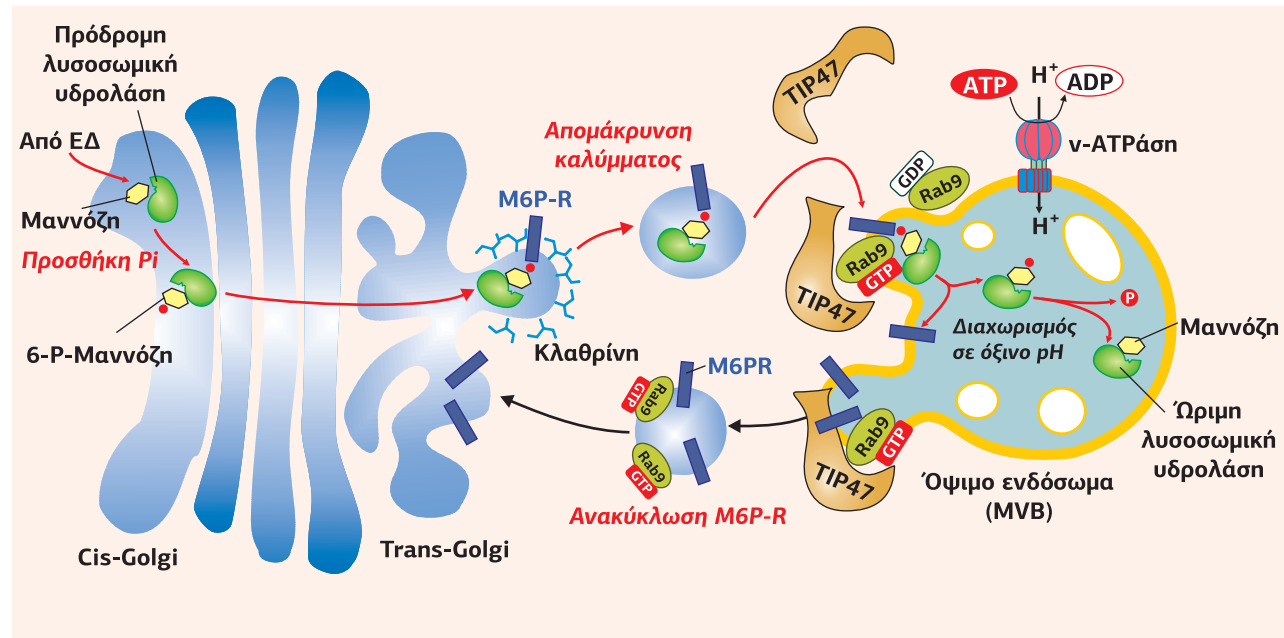
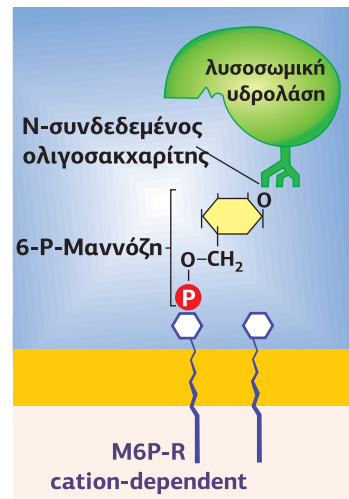
**Οι τελεστές των πρωτεϊνών Rab και οι διακριτοί ρόλοι τους**

Οι πρωτεΐνες Rab αλληλεπιδρούν με διάφορες πρωτεΐνες τελεστές. Οι τελεστές κατά προτίμηση αλληλεπιδρούν με τη Rab-GTP διαμόρφωση, αν και υπάρχουν περιπτώσεις, όπως η protrudin, που αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με την GDP-δεσμευμένη μορφή της Rab11. Διαφορετικοί τελεστές των Rab δρουν κατά τον σχηματισμό κυστιδίων, τη μετακίνηση, τον ελλιμενισμό και τη σύντηξη στη μεμβράνη στόχο, με κάθε μονοπάτι να έχει τη δική του μοναδική ομάδα τελεστών που ελέγχει όχι μόνο τη διαδικασία αυτή καθαυτή, αλλά και τη μετάβαση από το ένα βήμα στο επόμενο.

**1. Επιλογή φορτίου και δημιουργία - εκβλάστηση κυστιδίου**

Τα κυστίδια επιλέγουν το φορτίο τους χάρη στα συστατικά του συμπλόκου καλυπτήριων πρωτεϊνών, οι οποίες αναγνωρίζουν συγκεκριμένα στοιχεία του φορτίου που πρόκειται να μεταφερθεί. Η οικογένεια των GTPασών Sar/Arf, όπως θα δούμε παρακάτω, παίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση των καλυπτήριων πρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και επιπλέον τελεστών που διευκολύνουν τον σχηματισμό των κυστιδίων. Ωστόσο, αρκετές Rab έχει δείξει ότι συμμετέχουν και σε αυτή τη διαδικασία.

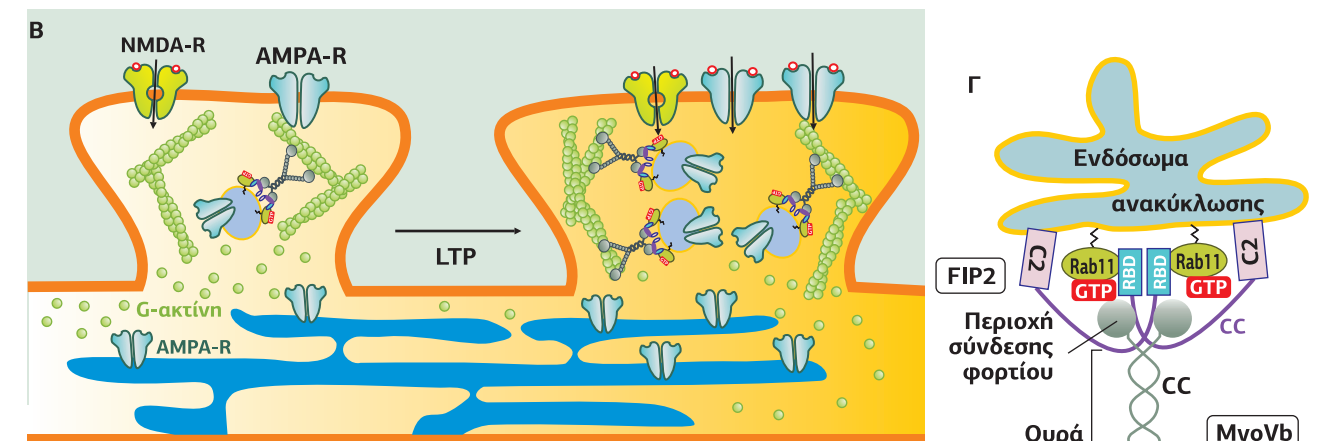
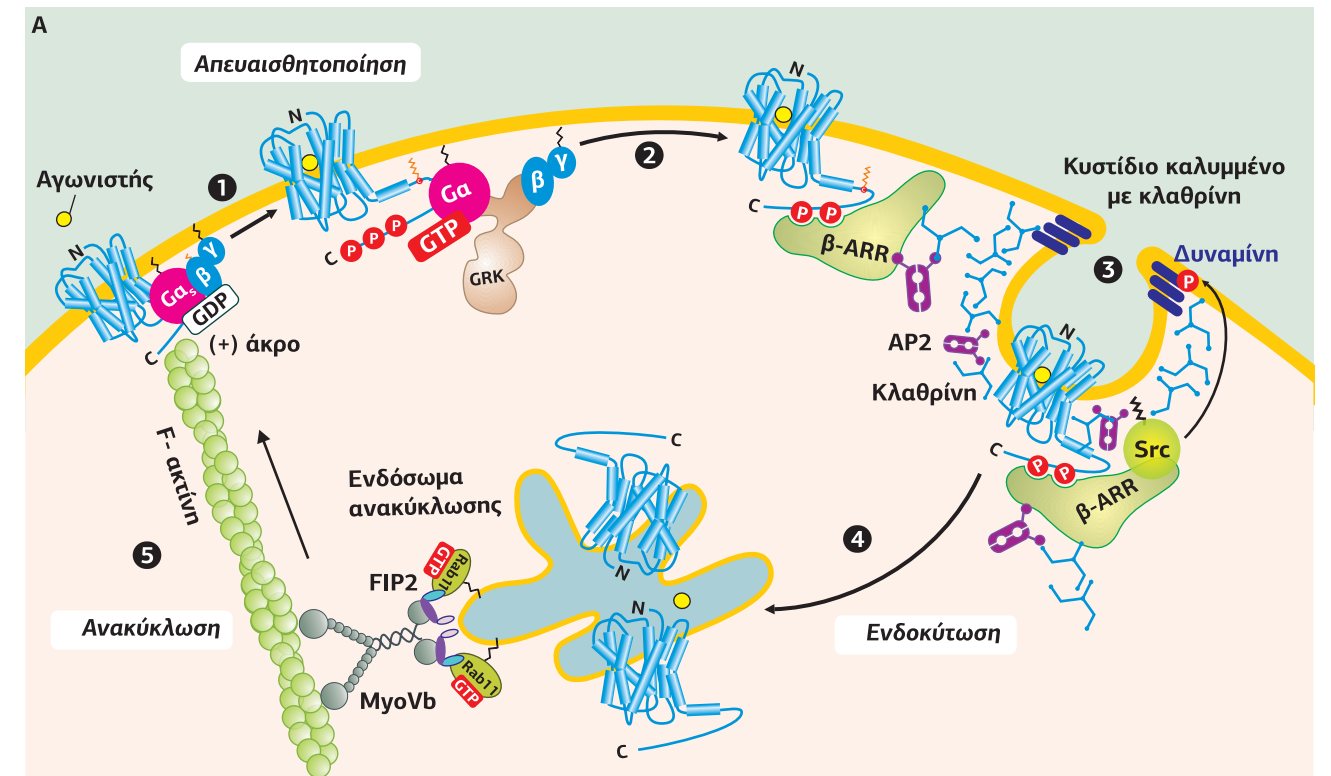
Το καλύτερο παράδειγμα επιλογής φορτίου από τις Rab είναι η **Rab9**, η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά των όψιμων ενδοσωμάτων στο δίκτυο trans-Golgi (TGN). Η Rab9 βρίσκεται συνδεδεμένη στη μεμβράνη των όψιμων ενδοσωμάτων, όπου στρατολογεί την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη TIP47 (Tail-Interacting Protein, 47 kDa), η οποία συνδέεται στη Rab9, αλλά και στην κυτταροπλασματική πλευρά των υποδοχών της 6-φωσφορικής μαννόζης (M6PRs, Mannose-6-Phosphate Receptor, cation dependent). Οι υποδοχείς M6PRs αρχικά βρίσκονται στο Golgi, όπου συνδέουν την 6-φωσφορική μαννόζη, η οποία βρίσκεται σε σύμπλοκο, με λυσοσωμικές υδρολάσες. Στη συνέχεια, μεταφέρονται με κυστίδια καλυμμένα με



**Εικόνα 8.91**

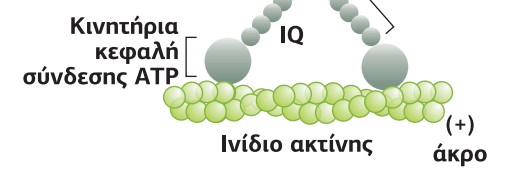
**Ο ρόλος της Rab9 στην επιλογή φορτίου (M6PR) και στη μεταφορά του από τα ενδοσώματα στο trans-Golgi.** Ο M6PR βρίσκεται στη μεμβράνη του Golgi, όπου συνδέει την 6-φωσφορική μαννόζη, η οποία βρίσκεται σε σύμπλοκο με την υδρολάση. Οι M6PRs μεταφέρονται με κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη στα όψιμα ενδοσώματα, απελευθερώνουν τις υδρολάσες και επιστρέφουν στο Golgi. Κατά την επιστροφή τους στο trans-Golgi σημαντικό ρόλο παίζουν οι Rab9, οι οποίες βρίσκονται στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, όπου προσελκύουν την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη TIP47. Η TIP47 συνδέεται με τη Rab9 και την κυτταροπλασματική πλευρά των M6PRs και οδηγεί στη δημιουργία κυστιδίων που θα επαναφέρουν τους M6PRs στο Golgi.

κλαθρίνη στα όψιμα ενδοσώματα, όπου παραδίδουν τις λυσοσωμικές υδρολάσες και επιστρέφουν στο Golgi με τη βοήθεια της Rab-GTP. Ένα βασικό ερώτημα είναι το πώς ένας υποδοχέας αναγνωρίζεται από διαφορετικά συστήματα μεταφοράς ανάλογα με την ενδοκυτταρική του θέση. Μια πιθανότητα είναι ότι ειδικές πρωτεΐνες του οργανιδίου στρατολογούν από κοινού κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συσκευάζουν το φορτίο σε ένα συγκεκριμένο οργανίδιο. Επειδή οι πρωτεΐνες Rab9 βρίσκονται συνδεδεμένες στη μεμβράνη των όψιμων ενδοσωμάτων, στρατολογούν την TIP47 επιλεκτικά στα όψιμα ενδοσώματα (**Εικόνα 8.91**).



**Εικόνα 8.92**

**Μονοπάτια μεταφοράς ενδοσωμάτων που ρυθμίζονται από το σύμπλοκο Rab11-FIP2.** Α. Το σύμπλοκο Rab11-GTP-FIP2-MyoVb οδηγεί τα ενδοσώματα ανακύκλωσης να μετακινηθούν κατά μήκος των ινιδίων ακτίνης προς την πλασματική μεμβράνη, μεταφέροντας κατά κύριο ρόλο υποδοχείς. Β. Η μετακίνηση της Rab11/FIP2/MyoVb πάνω σε ινίδια ακτίνης παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των AMPA-Rs στις δενδριτικές άκανθες. Γ. Η MyoVb, μια κινητήρια πρωτεΐνη, αλληλεπιδρά άμεσα και με την πρωτεΐνη προσαρμογής FIP2 και με την Rab11. [69] [209] [45]



2. Μεταφορά κυστιδίων πάνω σε ινίδια ακτίνης

Εκτός από την επιλογή του φορτίου, οι Rab στρατολογούν τελεστές που είναι κρίσιμοι για τη μετακίνηση των κυστιδίων πάνω σε ινίδια ακτίνης ή σε μικροσωληνίσκους. Υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων τελεστών.

Η **Rab11** στα κύτταρα θηλαστικών αλληλεπιδρά με την κινητήρια πρωτεΐνη μυοσίνη Vb, μέσω της FIP2 (Rab11 Family Interacting Protein 2), για τη ρύθμιση της ενδοκύτωσης των υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης. Η ενδοκύτωση των υποδοχέων είναι μια διαδικασία με την οποία τα ευκαρυωτικά κύτταρα εσωτερικεύουν μεμβρανικούς υποδοχείς που βρίσκονται συνδεδεμένοι με προσδέτες, μέσω κυστιδίων που δημιουργούνται από την πλασματική μεμβράνη. Μετά την εσωτερικεύση αυτών των συνδεδεμένων με προσδέτη υποδοχέων, τα κυστίδια χάνουν το κάλυμμα τους και συντήκονται μεταξύ τους, ώστε να σχηματίσουν ένα ενδόσωμα εξόδου (sorting endosome). Στα ενδοσώματα το χαμηλό pH διαχωρίζει τους προσδέτες από τους υποδοχείς τους. Στη συνέχεια, οι περισσότεροι υποδοχείς επανέρχονται στην πλασματική μεμβράνη είτε άμεσα (fast recycling pathway) είτε μεταφέρονται στο ενδόσωμα ανακύκλωσης (recycling endosome), από όπου εμμέσως επιστρέφουν στην πλασματική μεμβράνη (slow recycling pathway) (Εικόνα 8.92Α). Ωστόσο, πολλοί προσδέτες και οι υποδοχείς τους μεταφέρονται από τα ενδοσώματα εξόδου στα όψιμα ενδοσώματα και από κει στα λυσοσώματα, όπου αποικοδομούνται από υδρολυτικά ένζυμα.

Τα μέλη της υποοικογένειας Rab11 (Rab11a, Rab11b και Rab25) βρίσκονται στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, ρυθμίζοντας τη μεταφορά των ενδοσωμάτων προς την πλασματική μεμβράνη. Για τον λόγο αυτό συνδέονται με τη μυοσίνη Vb (MyoVb), η οποία σε αντίθεση με τη συμβατική μυοσίνη II, που είναι υπεύθυνη για τη σύσπαση των μυών, κινείται πάνω στα ινίδια ακτίνης με ταχύτητα 0,22 μm/sec. Συγκεκριμένα, η Rab11-GTP αλληλεπιδρά άμεσα με τη σφαιρική κεφαλή της ουράς της MyoVb, ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά και με την FIP2. Η FIP2 περιέχει μια καλά συντηρημένη περιοχή RBD (Rab11-Binding Domain), δύο calcium-binding domains (περιοχές C2) και μια περιοχή coiled-coil, και σχηματίζει παράλληλα ομοδιμερή δημιουργώντας δύο συμμετρικές επιφάνειες για τη σύνδεση δύο Rab11-GTP. Η FIP2 έχει την ικανότητα να συνδέεται και στη MyoVb, σταθεροποιώντας τη σύνδεση της Rab11-GTP στη MyoVb και, ταυτόχρονα, στοχοποιώντας το σύμπλοκο Rab11/MyoVb/ FIP2 στη μεμβράνη μέσω της C2 περιοχής της. Καθώς η FIP2 και η MyoVb είναι διμερή, στο τριμερές σύμπλοκο Rab11/MyoVb/FIP2 υπάρχουν δύο συνδεδεμένες Rab11 (Εικόνα 8.92Γ).

Η μετακίνηση του συμπλέγματος Rab11/FIP2/MyoVb πάνω σε ινίδια ακτίνης παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των AMPA-Rs στις δενδριτικές άκανθες (Εικόνα 8.92Β). Καθώς η MyoVb περιέχει και περιοχές αισθητήρες Ca<sup>2+</sup>, όταν η συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> είναι χαμηλή, η MyoVb παραμένει σε κλειστή διαμόρφωση συνδεδεμένη στην ακτίνη, ενώ όταν η συγκέντρωση Ca<sup>2+</sup> αυξηθεί, η διαμόρφωσή της αλλάζει και ευνοείται η σύνδεση με τις πρωτεΐνες των ενδοσωμάτων Rab11 και FIP2. Ως αποτέλεσμα τα ενδοσώματα που περιέχουν τους υποδοχείς AMPA μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου τοποθετούνται οι AMPA-Rs δημιουργώντας την περιοχική μετασυναπτική πυκνότητα.

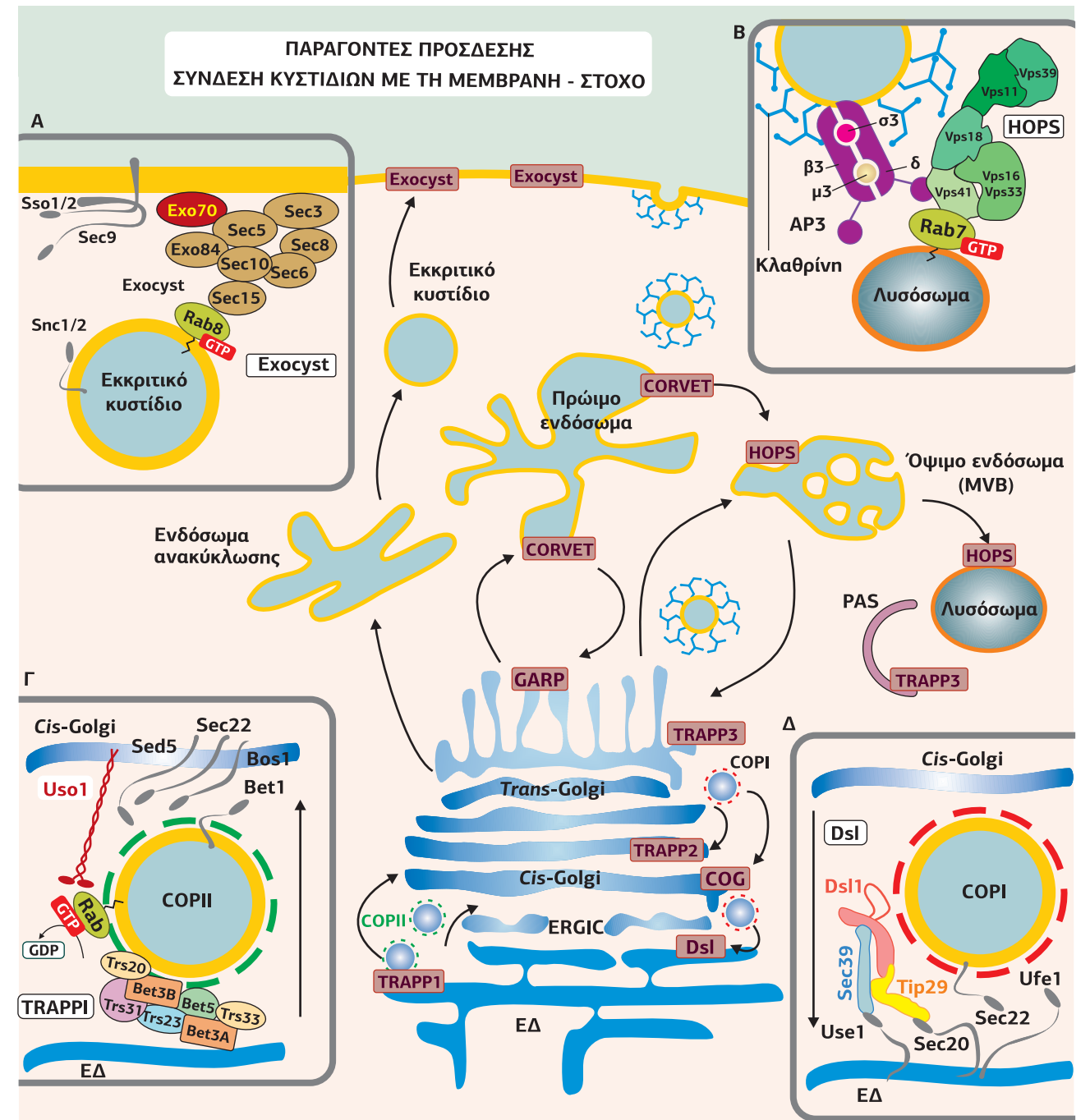
3. Ελλιμενισμός και σύνδεση των κυστιδίων στη μεμβράνη στόχο

Για να εξασφαλιστεί η πιστότητα της μεταφοράς, τα περισσότερα μονοπάτια μεταφοράς κυστιδίων απαιτούν παράγοντες που συνδέουν τα κυστίδια με τη μεμβράνη-στόχο πριν από τη σύντηξη. Αυτοί οι παράγοντες πρόσδεσης (tethering factors) ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: επιμήκεις coiled coil πρωτεΐνες (Uso1) ή πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα. Τα μέλη και των δύο κατηγοριών είναι τελεστές των Rab και μερικά παίζουν, επίσης, και ρόλο GEFs, όπως το σύμπλοκο TRAPP. Η αρχική επαφή μεταξύ κυστιδίων και μεμβράνης στόχου απαιτεί τις Rab και τους παράγοντες πρόσδεσης. Παρά τις διαφορές στη δομή και στην οργάνωση, όλοι αυτοί οι παράγοντες πρόσδεσης σε συνεργασία με τις Rab διασφαλίζουν πιστότητα στη

μεταφορά, δεδομένου ότι ρυθμίζουν και τη, μέσω των SNARE, συγχώνευση των αντίστοιχων κυστιδίων στη μεμβράνη στόχο.

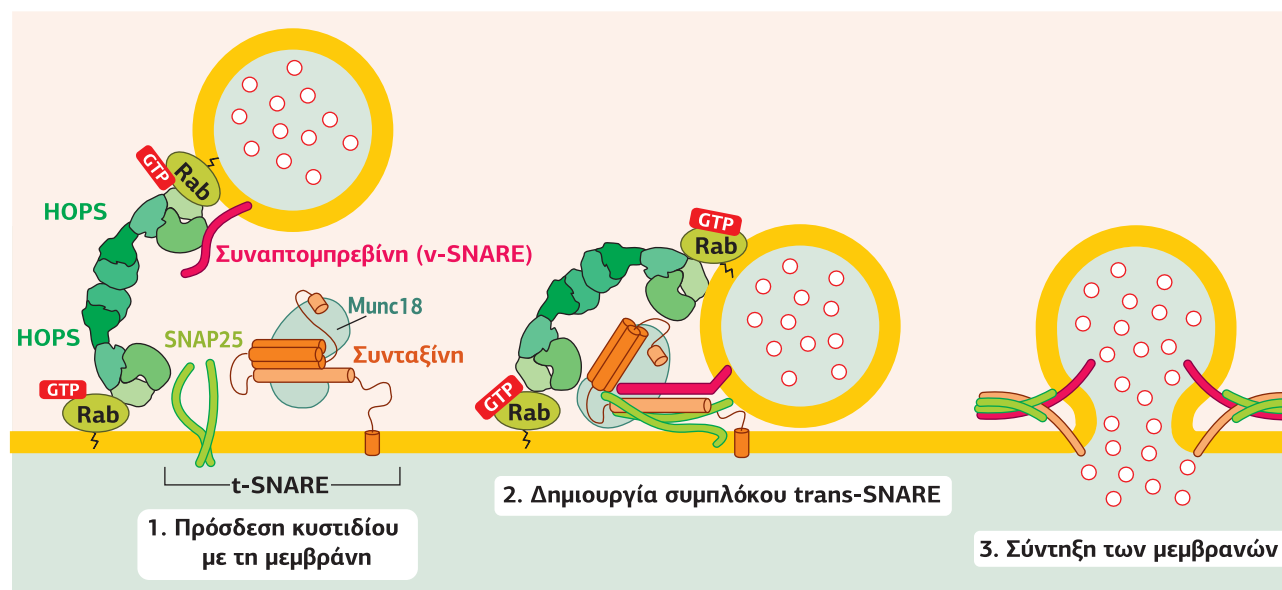
Στις περισσότερες περιπτώσεις η σύνδεση των κυστιδίων στη μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Το **Dsl** (Dependent of Sky1-20) είναι το πιο μικρό σύμπλοκο, αποτελείται από τρεις υπομονάδες (Dsl1, Dsl3/Sec39 και Tip20), βρίσκεται στις μεμβράνες του ΕΔ και αλληλεπιδρά με τις t-SNARE του ΕΔ (Ufe1, Sec20, Sec22) και με τις καλυπτήριες πρωτεΐνες COPI (Coat Proteins I) των κυστιδίων που προέρχονται από το Golgi, με αποτέλεσμα τη σύνδεση των κυστιδίων στο ΕΔ. Η Rab με την οποία αλληλεπιδρά το Dsl1 δεν έχει ακόμη αναγνωριστεί (Εικόνα 8.93Δ). Το σύμπλοκο **COG** (Conserved Oligomeric Golgi) είναι τελεστής της Rab6, αποτελείται από 8 υπομονά-

**Εικόνα 8.93**  
**Ο ρόλος των πρωτεϊνών Rab και των παραγόντων προσκόλλησης των κυστιδίων στις μεμβράνες στόχους τους.**  
Οι παράγοντες προσκόλλησης είναι επιμήκεις coiled coil πρωτεΐνες (Uso1) ή πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα (Dsl, COG, HOPS, CORVET, exocyst και TRAPP-1). Είναι τελεστές των Rab, εκτός από τον TRAPP1 που έχει ρόλο RabGEF, βρίσκονται σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις και εξασφαλίζουν την πιστότητα μεταφοράς των κυστιδίων στις μεμβράνες στόχο. [31] [161] [68] [9]



Η υπομονάδα **Exo70** αλληλεπιδρά με τα PIP<sub>2</sub> της πλασματικής μεμβράνης μέσω μιας πολυβασικής θετικά φορτισμένης περιοχής, και η **Sec3** μέσω της PH περιοχής της. Οι υπόλοιπες υπομονάδες συνδέονται στα κυστιδία (π.χ. η Sec15 με την RabGTP, και η Sec6 με τη v-SNARE Snc2).

**Εικόνα 8.94**  
**Ο ρόλος των πρωτεϊνών Rab, των παραγόντων προσκόλλησης και των πρωτεϊνών SNAREs στη σύντηξη των κυστιδίων στις μεμβράνες στόχους τους.** 1. Το πρώτο βήμα της σύντηξης είναι η πρόσδεση, που μεσολαβείται από την εξειδικευμένη Rab-GTP και τον τελεστή της (π.χ. το σύμπλεγμα πρόσδεσης HOPS). 2. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες SNAREs των δύο συνδεδεμένων μεμβρανών (t-SNARE της μεμβράνης στόχου και v-SNARE του κυστιδίου) σχηματίζουν δύο trans-SNARE σύμπλοκα, αποτελούμενα από 4 ελικοειδείς πρωτεΐνες το καθένα, σε φυσική και λειτουργική σύνδεση με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Sec1/Munc18, οι οποίες επιταχύνουν τη σύντηξη των μεμβρανών. 3. Η σύντηξη ενώνει τις δύο μεμβρανικές διπλοστιβάδες σε μία αναμιγνύοντας το περιεχόμενό τους.



δες, βρίσκεται στις μεμβράνες του Golgi και ρυθμίζει την ενδομεταφορά των κυστιδίων μέσα στο Golgi. Το **HOPS** (Homotypic fusion and vacuole Protein-Sorting) αποτελείται από πέντε υπομονάδες (Vps39, Vps11, Vps18, Vps16/33, Vps41), είναι τελεστής της Rab7, βρίσκεται σε όψιμα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα και ρυθμίζει τον ελλιμενισμό σ' αυτά πρώιμων ενδοσωμάτων καλυμμένων με κλαθρίνη και AP3. Η δ-υπομονάδα της AP3 των ενδοσωμάτων αλληλεπιδρά με την υπομονάδα Vps41 του HOPS (**Εικόνα 8.93B**). Το **CORVET** (Class C core Vacuole/Endosome Tethering) είναι τελεστής της Rab5, βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα και τα βοηθάει να συνδεθούν στο Golgi. Το **exocyst** είναι τελεστής των Rab11 και Rab8, αποτελείται από οκτώ υπομονάδες (Exo70, Exo84, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15) και βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέει τα εκκριτικά κυστιδία (**Εικόνα 8.93A**).

Ένα χαρακτηριστικό σύμπλεγμα, το οποίο όμως δεν αποτελεί τελεστή των Rab αλλά έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (RabGEF), είναι το **TRAPP-I** (Transport Protein Particle) το οποίο ρυθμίζει τη σύνδεση των ενδοσωμάτων που προέρχονται από το ΕΔ σε διαφορετικά τμήματα του Golgi. Το TRAPP-I αποτελείται από 7 υπομονάδες (Bet5 -Blocked early in transport 5-, Bet3, Trs20 -TRAPP subunit-, Trs23, Trs31, Trs33, Trs85). Το TRAPP δεν στρατολογείται από τις Rab, αλλά δρα ως GEF της Rab1, επάγοντας την αλληλεπίδρασή της με τελεστές που συντονίζουν τον ελλιμενισμό των ενδοσωμάτων στο Golgi. Η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ TRAPP και του κυστιδίου που προέρχεται από το ΕΔ διαμεσολαβείται μέσω της αλληλεπίδρασης της υπομονάδας Bet3 του TRAPP και της υπομονάδας Sec23 του COPII. Στη συνέχεια, το TRAPP ενεργοποιεί τη Rab1, η οποία στην GTP-συνδεδεμένη μορφή της αλληλεπιδρά με τον παράγοντα πρόσδεσης Uso1 του Golgi, οδηγώντας τη σύνδεση των ενδοσωμάτων στη μεμβράνη του Golgi (**Εικόνα 8.93Γ**).

Όλοι αυτοί οι παράγοντες πρόσδεσης εκτός από τις Rab αλληλεπιδρούν και με τις πρωτεΐνες SNAREs, σταθεροποιώντας τη δημιουργία του συμπλέγματος SNARE και οργανώνοντας τη σύντηξη των κυστιδίων με τη μεμβράνη στόχο.

4. Σύντηξη των κυστιδίων με τη μεμβράνη στόχο

Οι Rab, εκτός από τη σύνδεσή τους με τους παράγοντες προσκόλλησης, οι οποίοι εξασφαλίζουν τη σωστή στρατολόγηση και ελλιμενισμό των κυστιδίων στις μεμβράνες στόχους, ρυθμίζουν επίσης και τη σύντηξη των κυστιδίων με τις μεμβράνες στόχους μέσω των πρωτεϊνών SNAREs, [SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptors].

Η σύντηξη των κυστιδίων με τη μεμβράνη στόχο είναι ιδιόσυστατη ή μπορεί να ρυθμίζεται από την αύξηση του Ca<sup>2+</sup>, όπως η σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με τη μεμβράνη του προσυναπτικού νευρώνα. Το πρώτο βήμα της σύντηξης είναι

η πρόσδεση, που μεσολαβείται από τις Rab και τους τελεστές τους, δηλαδή τις πρωτεΐνες πρόσδεσης, οι οποίες εξειδικευμένα συνδέονται σε μια Rab-GTP. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες SNAREs των δύο συνδεδεμένων μεμβρανών σχηματίζουν δύο trans-SNARE σύμπλοκα, αποτελούμενα από 4 ελικοειδείς πρωτεΐνες το καθένα, σε φυσική και λειτουργική σύνδεση με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Sec1/Munc18 (Mammalian uncoordinated 18). Η σύντηξη ενώνει τις δύο μεμβρανικές διπλοστιβάδες σε μία, αναμιγνύοντας το περιεχόμενό τους (**Εικόνα 8.94**).

3.9 | Πρωτεΐνες Arf: εκβλάστηση ενδοκυτταρικών κυστιδίων

Η Arf1 πρωτοανακαλύφθηκε το 1980, απομονώθηκε και ορίστηκε λειτουργικά ως ο πρωτεϊνικός συμπαράγοντας που απαιτείται για την ADP ριβοσυλίωση της Gα<sub>s</sub> υπομονάδας που καταλύεται από την τοξίνη της χολέρας, ενώ λίγο αργότερα αποδείχθηκε ότι είναι μια GTPάση. Αν και το ακρωνύμιο Arf προέρχεται από το ADP ribosylation factor, μόνο οι Arf1-6 εμφανίζουν δραστηριότητα συμπαράγοντα για την τοξίνη της χολέρας και, επιπλέον, η ADP ριβοσυλίωση δεν φαίνεται να παίζει ρόλο σε καμία πτυχή των κανονικών κυτταρικών δράσεων οποιουδήποτε μέλους της οικογένειας.

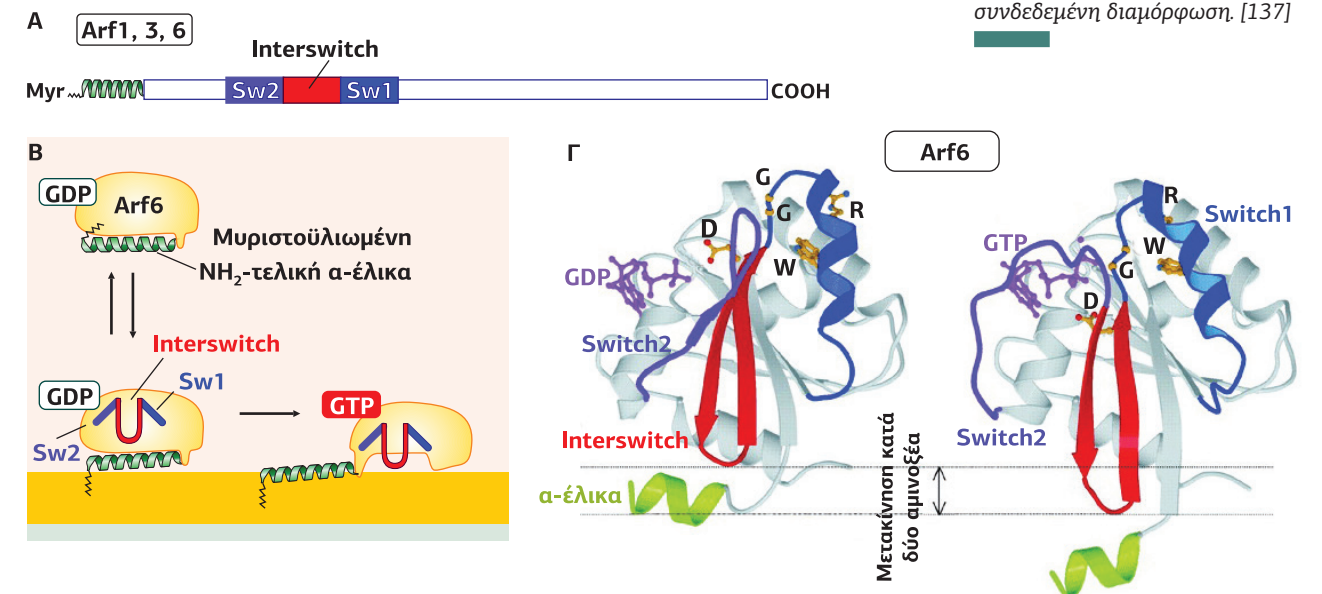
Η οικογένεια Arf περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες **Arf** (ADP-ribosylation factor), **Sar** (Secretion association Ras-like) και **Arl** (Arf-like). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Arf εκφράζονται ευρέως, αλλά βρίσκονται συγκεντρωμένες στη συσκευή Golgi, όπου ρυθμίζουν την εκβλάστηση των καλυμμένων κυστιδίων. Η δημιουργία κυστιδίων ελέγχεται από τις Arf1, Arf2, Arf3, Arf6 και Sar1, οι οποίες στρατολογούν καλυπτήριες πρωτεΐνες στα κυστιδία που εκβλαστάνουν. Οι υπόλοιπες Arfs έχουν διαφορετικές δράσεις, οι οποίες όμως δεν είναι ακόμη ξεκάθαρες. Ορισμένες φαίνεται να συμμετέχουν στη μετακίνηση κυστιδίων.

Δομή

Οι Arfs αν και μοιράζονται τη βασική δομή της περιοχής G με τις άλλες μικρές GTPάσες, διαφέρουν σε τρία δομικά χαρακτηριστικά.

Οι Arfs διαφέρουν από τις υπόλοιπες GTPάσες, καθώς περιέχουν ανάμεσα στις περιοχές switch-I και switch-II έναν βρόχο που περιβάλλεται από 2 β-κλώνους και ονομάζεται **interswitch region**. Επίσης, σε αντίθεση με τις άλλες GTPάσες, οι

**Εικόνα 8.95**  
**Δομή των πρωτεϊνών Arfs.** Α. Οι Arfs περιέχουν μια NH<sub>2</sub>-τελική αμφιπαθή έλικα, μια μυριστοϋλιωμένη Gly και έναν βρόχο που δημιουργείται από δύο β-κλώνους ανάμεσα στις περιοχές switch-I και switch-II, τρία δομικά χαρακτηριστικά που τις ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες GTPάσες. Β. Στη GDP-διαμόρφωση βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, καθώς η NH<sub>2</sub>-τελική αμφιπαθή έλικα βρίσκεται κρυμμένη σε έναν υδρόφοβο θύλακα. Όταν η Arf ενεργοποιηθεί (Arf-GTP), η έλικα απομακρύνεται από τον θύλακα και συνδέεται πλευρικά με τη μεμβράνη, μέσω της υδρόφοβης επιφάνειάς της. Η σύνδεση με τη μεμβράνη σταθεροποιείται με την άγκυρα μυριστοϋλίου. [41] Γ. Κρυσταλλική δομή της Arf6 στην GDP και στην GTP-συνδεδεμένη διαμόρφωση. [137]



οποίες τροποποιούνται μεταμεταγραφικά με την προσθήκη μιας πρενυλομάδας στο COOH-τελικό τους άκρο, με τη βοήθεια της οποίας συνδέονται στη μεμβράνη, οι Arfs συνδέονται στη μεμβράνη μέσω μιας NH<sub>2</sub>-τελικής αμφιπαθούς έλικας (παρουσιάζει μία πλευρά με υδρόφοβα κατάλοιπα και μία πλευρά με φορτισμένα κατάλοιπα) και μιας μυριστοϋλιωμένης Gly (το 2ο αμινοξύ του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου). Οι Sar περιέχουν μόνο την αμφιπαθή έλικα και δεν διαθέτουν λιπιδική άγκυρα.

Οι Arfs στην GDP διαμόρφωσή τους βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, καθώς η NH<sub>2</sub>-τελική έλικα είναι κρυμμένη μέσα σε έναν υδρόφοβο θύλακα. Η μετάβαση στην Arf-GTP διαμόρφωση εκθέτει την έλικα, η οποία μέσω της υδρόφοβης επιφάνειάς της βυθίζεται πλευρικά στη μεμβράνη. Εκεί, η σύνδεση της Arf σταθεροποιείται μέσω της λιπιδικής άγκυρας μυριστοϋλίου (Εικόνα 8.95).

### ArfGEFs και ArfGAPs

Οι GEFs μπορεί να μεταφέρουν το σήμα από μεμβρανικούς υποδοχείς απευθείας στις μικρές GTPάσες και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να δρουν ως τελεστές των GTPάσων ή ως πρωτεΐνες προσαρμογής που διευκολύνουν την ενεργοποίηση άλλων μελών της οικογένειας των μικρών GTPάσων. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει GEFs που είναι εξειδικευμένοι ως προς μια συγκεκριμένη οικογένεια, αλλά και GEFs εξαιρετικά ειδικούς για μία μόνο GTPάση. Η οικογένεια των πρωτεϊνών ArfGEF των θηλαστικών περιλαμβάνει 16 μέλη. Αν και το κάθε μέλος εμφανίζει διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος, όλοι οι ArfGEFs μοιράζονται μια καλά διατηρημένη περιοχή 200 αμινοξέων που ονομάζεται **Sec7** και καταλύει την ανταλλαγή των νουκλεοτιδίων (βλ. Εικόνα 8.45A). Μερικές, αλλά όχι όλες οι περιοχές Sec7 είναι ο στόχος του φαρμάκου Brefeldin A (BFA). Οι ArfGEFs περιέχουν και άλλα μοτίβα, όπως η περιοχή PH, η περιοχή HDS (Homology Downstream of Sec7), η SH2 και η SH3. Οι ArfGEFs κατατάσσονται σε έξι εξελικτικά συντηρημένες οικογένειες ως εξής: GBF1, BIG, PSD, IQSEC, ARNO/cytohesins και FBXO8 (ή FBX8).

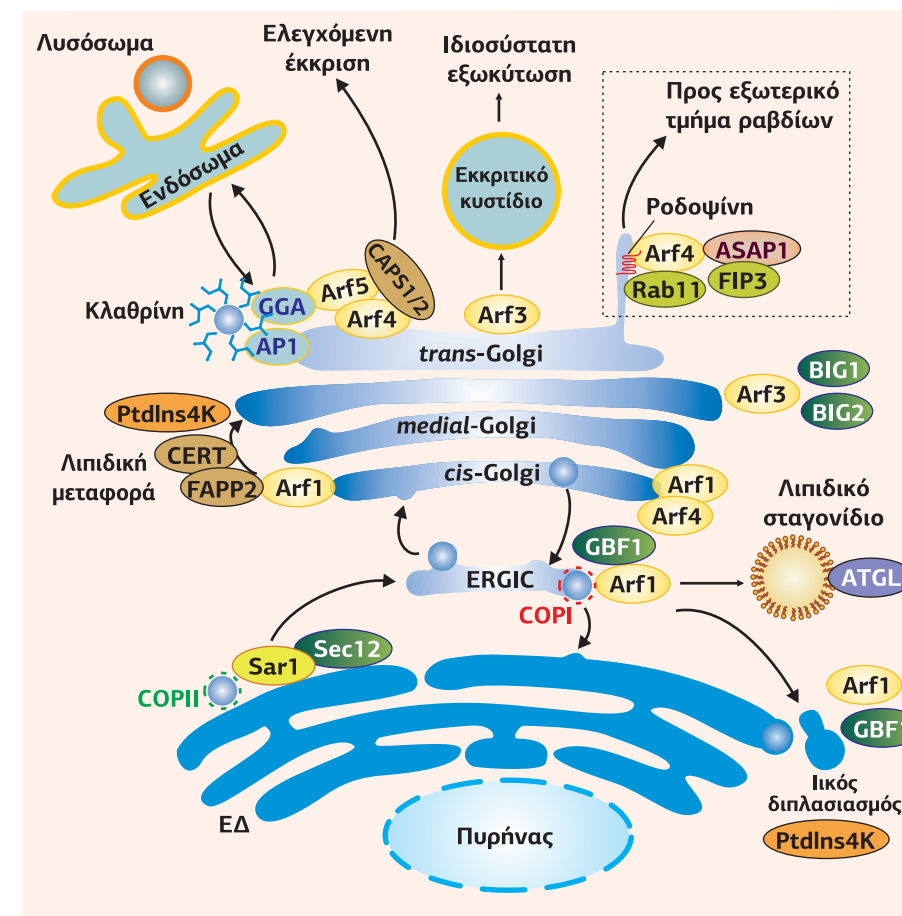
Οι ArfGAPs περιέχουν μια χαρακτηριστική περιοχή περίπου 130 αμινοξέων, η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι η ελάχιστη μονάδα με δραστηριότητα GAP. Η περιοχή GAP έχει μια δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc-finger) που είναι μοναδική για τις ArfGAPs, αλλά και τον καλά συντηρημένο "arginine finger", απαραίτητο για την καταλυτική δράση, που βρίσκεται σε όλες τις GAPs των οικογενειών Ras και Rho. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 31 ArfGAPs. Οι ArfGAPs των θηλαστικών είναι εξειδικευμένες για μία ή περισσότερες Arf, αλλά δεν είναι ενεργές στις Sar1 ή Arl. Ωστόσο, η εξειδίκευση των GAPs εξαρτάται από τον εντοπισμό των ArfGAPs και των Arf στα κύτταρα, καθώς και από τη σύνθεση και το σχήμα των λιπιδικών μεμβρανών. Εκτός από την περιοχή GAP, αυτές οι πρωτεΐνες έχουν μια ποικιλία περιοχών που εμπλέκονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, καθώς και σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-λιπιδίου.

Οι ArfGAPs έχουν ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες ομάδες ανάλογα με τη θέση της καταλυτικής τους περιοχής: α. Η ομάδα ArfGAP1-type με NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή GAP περιλαμβάνει τις ArfGAP, SMAP (Stromal Membrane Associated Protein), ADAP (ArfGAP with Dual PH domain) και GIT (GRK2-Interacting protein, καθώς ανακαλύφθηκε το 1998 ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την κινάση των GPCRs GRK2) β. Η ομάδα AZAP-type, με την περιοχή GAP να βρίσκεται μεταξύ μιας περιοχής PH και ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου αγκυρίνης (ANK), περιλαμβάνει τις ASAP, ACAP, AGAP και ARAP νουκλεοτιδίων (βλ. Εικόνα 8.45B).

### Arfs: Ρόλος και τελεστές

Στο κύτταρο οι πρωτεΐνες της οικογένειας Arf έχουν διαφορετικές θέσεις δράσης. Η Arf1 είναι η καλύτερα μελετημένη στα θηλαστικά και δρα στη στρατολόγηση των πρωτεϊνών καλύμματος προς τις μεμβράνες του Golgi, ενώ η Arf6, η οποία είναι λιγότερο καλά χαρακτηρισμένη, βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και στα ενδοσώματα, όπου ρυθμίζει την ενδοκύτωση και τον κυτταροσκελετό της ακτίνας.

Οι βιολογικές δράσεις των Arfs είναι αποτέλεσμα των εξειδικευμένων αλλη-



λεπιδράσεων τους με ένα μεγάλο αριθμό τελεστών, συμπεριλαμβανομένων των καλυπτήριων πρωτεϊνών των κυστιδίων, όπως COPI, AP1, AP3 και GGA1-3 (Golgi-localized Gamma-Adaptin ear-containing, Arf binding), των μεταφορών κεραμιδίων (CERT, FAPP2), καθώς και των ενζύμων που τροποποιούν λιπίδια (PLD1 και κινάσες των φωσφατιδυλοφωσφολιπιδίων, PtdIns4K).

Η συσκευή Golgi είναι ένα οργανίδιο στο εκκριτικό μονοπάτι που απαιτείται για την προσθήκη πολυσακχαριτών σε πολλές πρωτεΐνες και λιπίδια, καθώς και για τη διαλογή αυτών των πρωτεϊνών και των λιπιδίων για τον σωστό υποκυτταρικό προορισμό τους. Αποτελείται από μια σειρά αναδιπλωμένων μεμβρανών που οργανώνονται σε μια δομή, της οποίας η cis-επιφάνεια λαμβάνει υλικό από το ΕΔ, ενώ η trans-τελική επιφάνεια συσκευάζει το υλικό αυτό σε κυστίδια, τα οποία μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη, ακολουθώντας κάποια άλλη ενδοκυτταρική οδό ή επιστρέφουν στο ΕΔ.

Η κυτταροπλασματική Arf1-GDP προσελκύεται στις μεμβράνες του cis-Golgi μέσω της αλληλεπίδρασης με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς φορτίου του Golgi, p23 και p24 (το φορτίο είναι οι γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες ή λιπίδια), και με την ΕΔ-Golgi SNARE πρωτεΐνη membrin, καθώς και μέσω της μυριστοϋλιωμένης NH<sub>2</sub>-τελικής της περιοχής. Ο ArfGEF GBF1 αμέσως μετά την καταλυτική Sec7 περιοχή περιέχει μια περιοχή HDS1 (Homology Downstream of Sec7), ικανή να συνδέεται στα λιπίδια της μεμβράνης του cis-Golgi, όπου και ενεργοποιεί την Arf, ανταλλάσσοντας το GDP με GTP.

Στην ενεργοποιημένη Arf-GTP διαμόρφωση αυξάνεται η συγγένεια της NH<sub>2</sub>-τελικής αμφιπαθούς έλικας για τις μεμβράνες. Η σταθεροποιημένη στις μεμβράνες ενεργοποιημένη Arf1-GTP στρατολογεί από το κυτταρόπλασμα και συνδέει το επταμερές σύμπλοκο **coatomer**, για να δημιουργήσει ένα καλυμμένο εκβλάστημα. Το coatomer είναι ένα σύμπλοκο καλυπτήριων πρωτεϊνών. Τρεις τύποι είναι γνωστοί: COPI (επιστροφή κυστιδίων από το trans-Golgi στο cis-Golgi και στο ΕΔ).

COPI (επιστροφή κυστιδίων από το trans-Golgi στο cis-Golgi και στο ΕΔ).

**Εικόνα 8.96**  
Οι Arfs βρίσκονται σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις, δρουν κυρίως στο σύστημα ΕΔ-Golgi, και υπεύθυνες για την εκβλάστηση των κυστιδίων. Η Arf1 και η Arf4 βρίσκονται στο cis-Golgi και η Arf3 βρίσκεται στο trans-Golgi. Στο cis-Golgi και στο ενδιάμεσο ERGIC η Arf1 συνδέεται στον ArfGEF GBF1 και στρατολογεί το σύμπλοκο COPI, ρυθμίζει τη μεταφορά λιπιδικών σταγονιδίων και τον αναδιπλασιασμό πολλών ιών. Η Arf1 συνδέεται, επίσης, στους μεταφορείς κεραμιδίων CERT (Ceramide Transfer) και γλυκοκεραμιδίων FAPP2 (Golgi-associated Four-phosphate adaptor protein 2) μεσολαβώντας στη μεταφορά λιπιδίων από το cis-Golgi στο trans-Golgi. Η σύνδεση του FAPP2 απαιτεί την ενεργοποίηση της κινάσης PtdIns4K από την Arf1, καθώς συνδέεται στα λιπίδια PI(4)P της μεμβράνης. Η CAPS1/2 (Calcium-dependent Activator Protein for Secretion), η οποία συμμετέχει στην ελεγχόμενη έκκριση, στρατολογείται στο trans-Golgi από τις Arf4 και Arf5. Οι Arf4 και Arf5 συνδέονται, επίσης, με τις πρωτεΐνες AP1 των κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη, και την GGA, μεσολαβώντας στη μεταφορά των κυστιδίων από το trans-Golgi προς τα ενδοσώματα. Στο ΕΔ η Sar1 ενεργοποιείται από τον SarGEF Sec12 και στρατολογεί COPII οδηγώντας τα κυστίδια προς το cis-Golgi. Στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς η Arf4 συνδέεται εξειδικευμένα στη ροδοψίνη, στη μεμβράνη του trans-Golgi και μαζί με τις πρωτεΐνες Rab11-FIP3 (Rab11-Family Interacting Protein 3), ASAP (ArfGAP containing SH3, Ankyrin repeat and PH domains) και την Rab11 διευκολύνει τη μεταφορά της ροδοψίνης μέσω κυστιδίων από το εσωτερικό στο εξωτερικό τμήμα των ραβδίων. [41]

**GBF** (Golgi-specific Brefeldin-resistance Factor)  
**FBX8** (F-box protein 8)  
**PSD** (Pleckstrin and Sec Domain containing)

**AZAP** (ArfGAP with ANK repeats and PH domains). Το "Z" αντιπροσωπεύει την περιοχή που χαρακτηρίζει την κάθε υποκατηγορία: οι **ASAPs** (ASAP1 και ASAP2) περιέχουν μια περιοχή SH3, οι **ACAPs** περιέχουν μια περιοχή coiled-coil στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο, οι **AGAPs** περιέχουν μια περιοχή GLD (GTP-binding protein-Like Domain) στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο, και οι **ARAPs**, οι μεγαλύτερες από τις ArfGAPs, περιέχουν μια RhoGAP περιοχή.

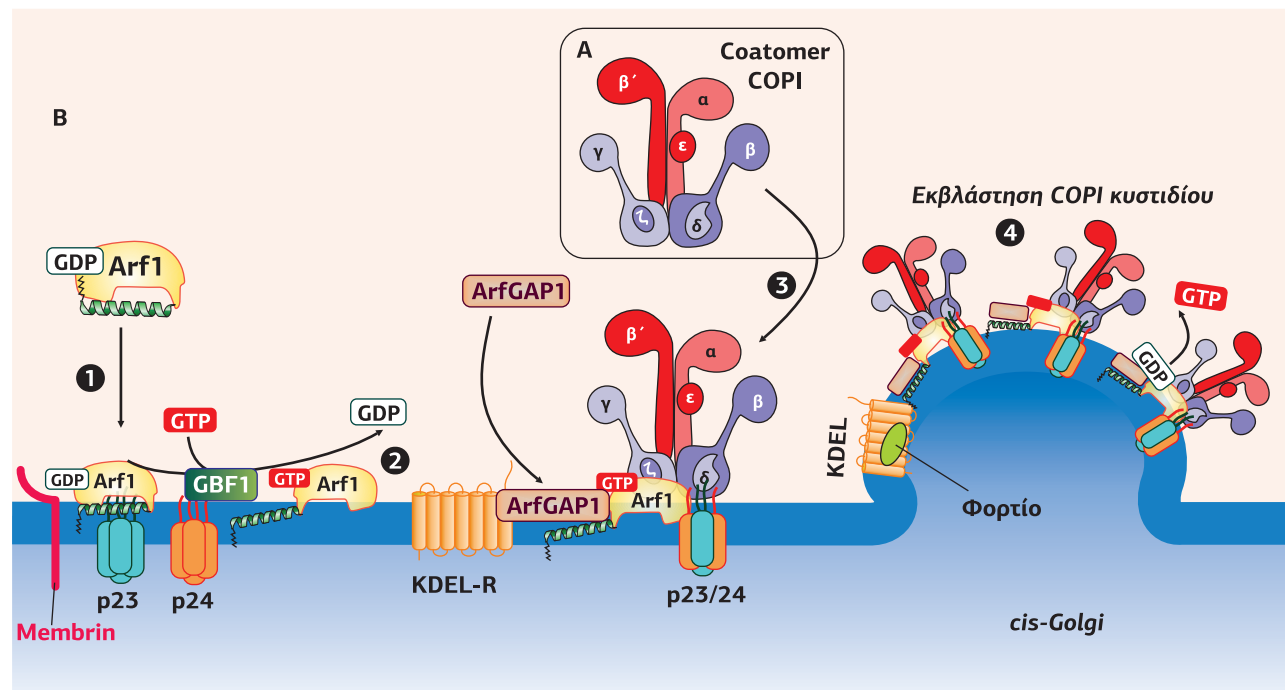
COPII (μεταφορά κυστιδίων από το ΕΔ στο cis-Golgi).

Κλαθρίνη και ανταπίνες (adaptns) AP1-4 (ενδοκύτωση από την πλασματική μεμβράνη και από το trans-Golgi στα λυσοσώματα).

Η Arf1-GTP στρατολογεί στις μεμβράνες του cis-Golgi το σύμπλοκο COPI που αποτελείται από ένα επταμερές (α, β, β', γ, δ, ε, ζ), το οποίο συνίσταται από δύο δευτερεύοντα συμπλέγματα, το τετραμερές γ-δ-ζ-β-COP, που δημιουργεί την εσωτερική στιβάδα, και το τριμερές α-β'-ε-COP που δημιουργεί την εξωτερική στιβάδα του COPI (Εικόνα 8.97A).

Το σύμπλοκο COPI μπορεί να συνδέεται άμεσα ή έμμεσα στις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο Golgi και πρέπει να επιστρέψουν στο ΕΔ. Άμεσα συνδέεται μέσω της γ-υπομονάδας σε ένα σήμα επιστροφής διλυσίνης, που βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο των πρωτεϊνών, και έμμεσα συνδέεται μέσω της ArfGAP στον υποδοχέα KDEL. Η KDEL είναι μια πεπτιδική αλληλουχία (K: Lys, D: Asp, E: Glu γλουταμινικό, L: Leu), η οποία εμποδίζει την έκκριση της πρωτεΐνης από το ΕΔ. Μια πρωτεΐνη με λειτουργική αλληλουχία KDEL επιστρέφει από το Golgi στο ΕΔ. Οι διαλυτές πρωτεΐνες παραμένουν στο ΕΔ έως ότου αποκοπεί αυτή η αλληλουχία.

Ωστόσο, καθώς η εκβλάστηση των κυστιδίων είναι μια δυναμική διαδικασία και υπάρχει μια υψηλή συγκέντρωση διαλυτών πρωτεϊνών στο ΕΔ, οι διαλυτές πρωτεΐνες ακούσια μεταφέρονται στο cis-Golgi μέσω των COPII-καλυμμένων κυστιδίων. Κατά τη σύντηξη με τη cis-Golgi η διαλυτή πρωτεΐνη απελευθερώνεται, όταν ακολουθία σήματος KDEL αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη του Golgi. Ο υποδοχέας και η διαλυτή πρωτεΐνη μεταφέρονται μέσω των COPI-



Εικόνα 8.97

**Εκβλάστηση κυστιδίων από το cis-Golgi με τη βοήθεια της Arf1.** Α. Το καλυπτήριο πρωτεϊνικό σύμπλοκο COPII αποτελείται από ένα επταμερές (α, β, β', γ, δ, ε, ζ), το οποίο ονομάζεται coatomer και δημιουργείται από δύο δευτερεύοντα συμπλέγματα, το τετραμερές γ-COP-δ-COP-ζ-COP-β-COP, που δημιουργεί την εσωτερική στιβάδα, και το τριμερές α-COP-β'-COP-ε-COP, που δημιουργεί την εξωτερική στιβάδα του COPII. Β. Μηχανισμός εκβλάστησης κυστιδίων: 1. Η κυτταροπλασματική Arf1-GDP προσελκύεται στις μεμβράνες του cis-Golgi μέσω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς φορτίου του Golgi, τους p23 και p24, με την πρωτεΐνη membrin, καθώς και μέσω της μυριστοϋλιωμένης NH<sub>2</sub>-τελικής της περιοχής. 2. Ο ArfGEF GBF1 συνδέεται στις μεμβράνες του cis-Golgi και ενεργοποιεί την Arf1-GDP. 3. Η ενεργοποιημένη Arf1-GTP στρατολογεί το σύμπλοκο COPII, το οποίο συνδέεται μέσω της ArfGAP1 στον υποδοχέα KDEL. Οι υπομονάδες α-β'-γ-COP αναγνωρίζουν τα μοτίβα εξόδου των μεμβρανικών φορτίων και τα ενσωματώνουν στα εκβλασάνοντα COPII κυστίδια. 4. Η διέγερση της υδρόλυσης του GTP απομακρύνει τις Arf1-GDP από το σύμπλοκο, οδηγώντας στην αποσύνδεση όλου του συμπλόκου. [44] [20]

κυστιδίων πίσω στο ΕΔ, όπου το περιεχόμενο του κυστιδίου απελευθερώνεται και η διαλυτή πρωτεΐνη διαχωρίζεται από τον υποδοχέα KDEL.

Η ArfGAP1 προωθώντας την υδρόλυση του GTP απενεργοποιεί την Arf1, οδηγώντας στην αποσύνδεση του καλυπτήριου συμπλόκου COPII και της Arf1-GDP από το κυστίδιο. Καθώς η ArfGAP1 περιέχει μια περιοχή ALPS (ArfGAP1 Lipid Packing Sensor), η δραστηριότητά της διεγείρεται από φωσφοϊνοσιτίδια και αναστέλλεται από τη φωσφατιδυλοχολίνη (Εικόνα 8.97B).

### 3.10 | Ran και πυρρνο-κυτταροπλασματική μεταφορά

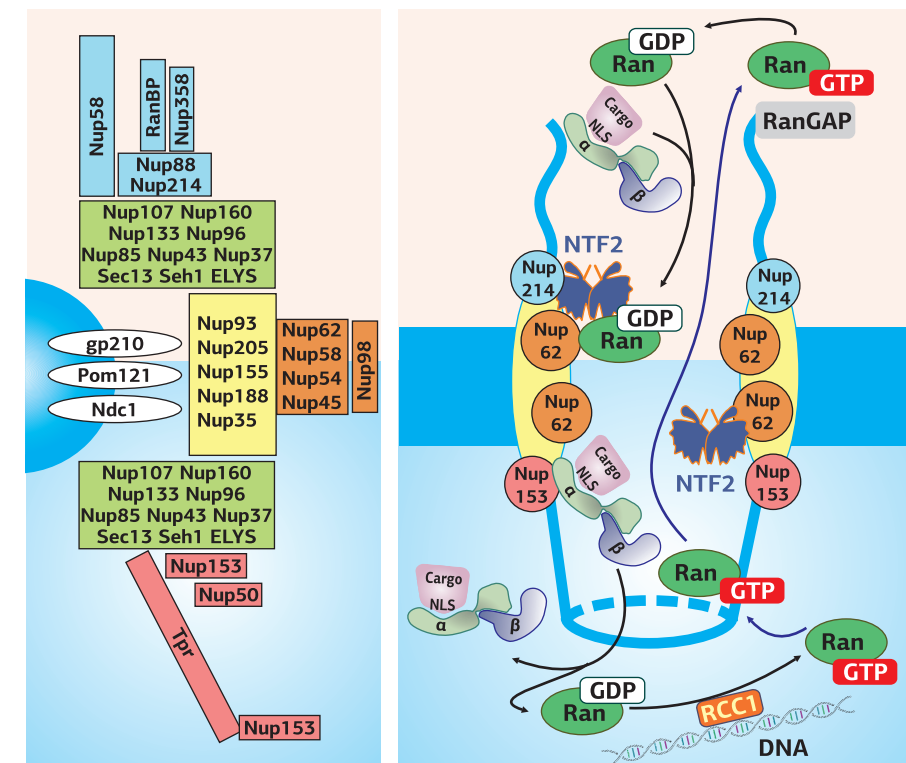
Η Ran (Ras-like nuclear GTPase) ανακαλύφθηκε το 1991 σε σύμπλοκο με τον συνδεδεμένο στη χρωματίνη RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1), ο οποίος αργότερα αποδείχθηκε ότι δρα ως RanGEF. Η Ran είναι η πιο άφθονη ανάμεσα στις GTPάσες της υπεροικογένειας Ras, καλά συντηρημένη από τους ζυμομύκητες ως τα θηλαστικά. Διαφέρει από τις υπόλοιπες οικογένειες σε δύο σημεία:

1. Δεν συνδέεται με τις μεμβράνες.

2. Η κύρια δράση της είναι να οργανώνει τη μεταφορά μακρομορίων (πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων) από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, αντί να συγκεντρώνει πολυπρωτεϊνικά σηματοδοτικά συμπλέγματα στις μεμβράνες. Η υδρόλυση του GTP παρέχει την ενέργεια που καθοδηγεί τη μεταφορά των μακρομορίων προς μια καθορισμένη κατεύθυνση, αντίθετα με τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης.

#### Ο κύκλος GTPάσης της Ran και οι παράγοντες ρύθμισής του

Η Ran στη GDP-συνδεδεμένη διαμόρφωση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Για να εισέλθει στον πυρήνα, δεν απαιτείται κατανάλωση ενέργειας, αλλά η βοηθητική πρωτεΐνη μεταφοράς NTF2 ή NuTF2 (Nuclear Transport Factor 2), η οποία δρα ως ομοδιμερές. Η NTF2 είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το γλυκοπρωτεϊνικό σύμπλοκο Nup62 των πυρρικών πόρων (ο κάθε πυρρικός

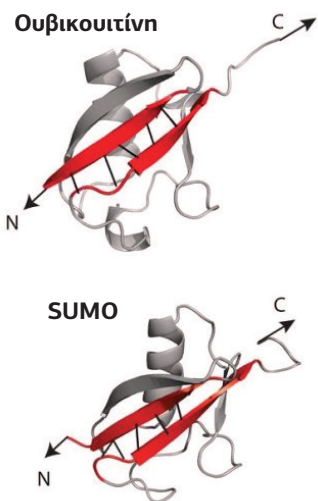
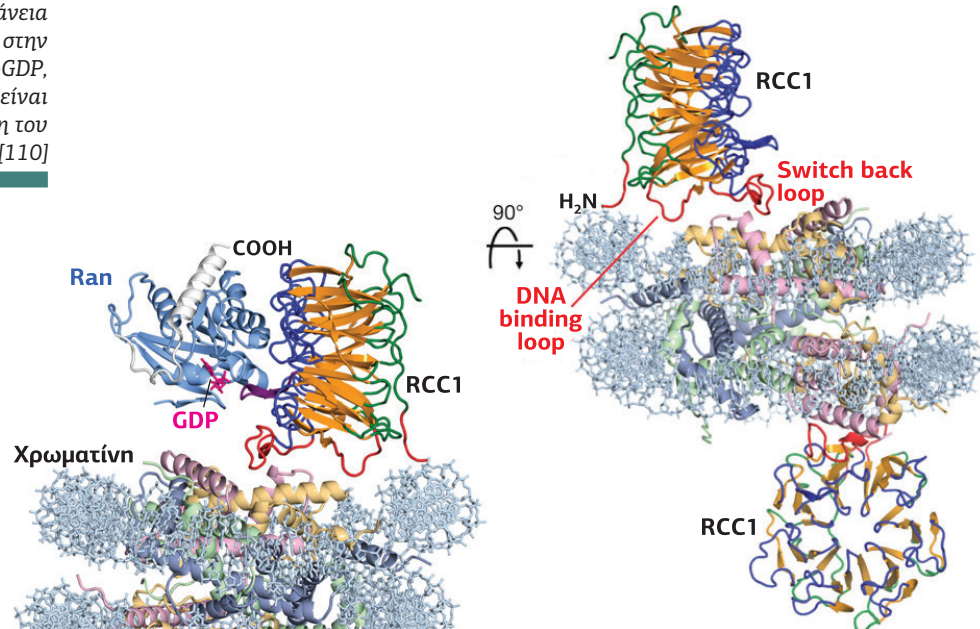


Εικόνα 8.98  
**Δομή του πυρρικού πόρου και ο μηχανισμός εισόδου της Ran-GDP στον πυρήνα.** Α. Ο πυρρικός πόρος αποτελείται από 30-50 πρωτεΐνες που ονομάζονται nucleoporins. Β. Η Ran-GDP, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, εισέρχεται στον πυρήνα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης NTF2, η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του πυρρικού πόρου Nup62. Στο πυρρικόπλασμα η Ran-GDP ενεργοποιείται από τον RCC1 και η Ran-GTP διαμόρφωση εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου από την συνδεδεμένη στον πυρρικό πόρο RanGAP μετατρέπεται σε Ran-GDP. [193]

πόρος, NPC, αποτελείται από 30-50 πρωτεΐνες, τις nucleoporins) και δρα σε ένα σχετικά προχωρημένο στάδιο της εισαγωγής της Ran-GDP, μετά την αρχική σύνδεσή της στον πυρηνικό φάκελο. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι 2.500 ομοδιμερή του NTF2 ανά sec μπορούν να μετακινούνται διαμέσου ενός μόνο NPC (Εικόνα 8.98).

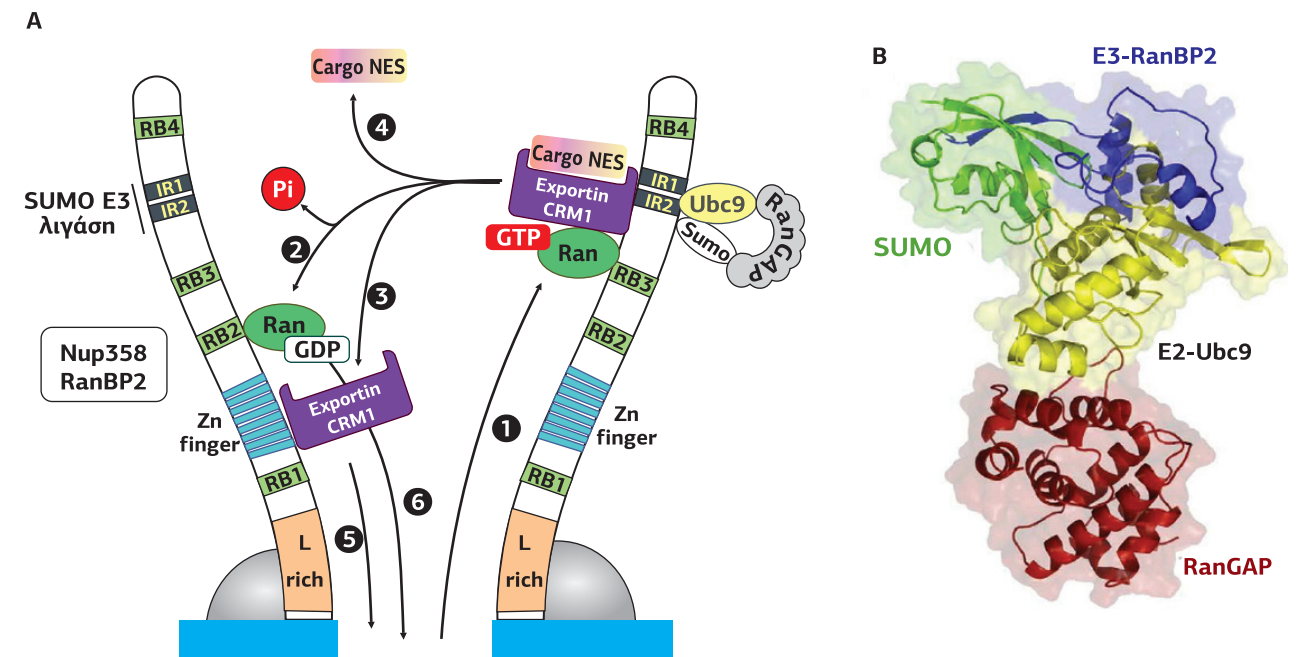
Όταν η Ran-GDP εισέλθει στο πυρηνόπλασμα, ενεργοποιείται από τον RanGEF **RCC1** (Regulator of Chromosome Condensation 1). Ο RCC1 κλωνοποιήθηκε το 1987 από μια κυτταρική σειρά ευαίσθητη στη θερμοκρασία ως ο υπεύθυνος παράγοντας για την πρώιμη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων σε μη επιτρεπές θερμοκρασίες. Η βιοχημική του δραστηριότητα ως RanGEF αναγνωρίστηκε το 1991. Ο RCC1 βρίσκεται στον πυρήνα συνδεδεμένος με τις ιστόνες H2A και H2B και αποτελείται από επτά ομάδες αντιπαράλληλων β-κλώνων, οργανωμένες με έναν κυκλικό τρόπο, όπως οι λάμες μιας προπέλας, μια δομή που προσομοιάζει με τη δομή της Gβ-υπομονάδας (βλ. Εικόνα 5.26). Η μία επιφάνεια της προπέλας συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τη Ran-GDP, ενώ η άλλη επιφάνεια είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του RCC1 με τη χρωματίνη (Εικόνα 8.99). Το πιο σημαντικό στοιχείο του μηχανισμού ανταλλαγής GDP/GTP είναι μια προεξοχή που εμφανίζει ο RCC1 και ονομάζεται β-σφήνα (β-wedge), η οποία πλησιάζει τον P-βρόχο της Ran σπρώχνοντας το GDP από τον θύλακα σύνδεσής του.

**Εικόνα 8.99**  
Δομή του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων **RCC1**. Ο **RCC1** αποτελείται από επτά ομάδες αντιπαράλληλων β-κλώνων, οργανωμένες με έναν κυκλικό τρόπο, όπως οι λάμες μιας προπέλας. Η μία επιφάνεια της προπέλας συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τη Ran-GDP, ενώ η άλλη επιφάνεια είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του **RCC1** με τη χρωματίνη. [110]



Η Ran-GTP εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου συμβαίνει η υδρόλυση του Ran-συνδεδεμένου GTP, η οποία καταλύεται από μια RanGAP. Η RanGAP βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της πυρηνικής μεμβράνης στο στόμιο των πυρηνικών πόρων, συνδεδεμένη με τις **RanBPs** (Ran-Binding Proteins), RanBP1 και RanBP2, οι οποίες ενεργοποιούν τη δράση της.

Η **RanBP2** είναι μια τεράστια πρωτεΐνη 3.224 αμινοξέων, που αποτελεί το κύριο συστατικό των κυτταροπλασματικών ινιδίων των πυρηνικών πόρων (γνωστή και ως nucleoporin 358, Nup358). Η RanBP2 περιέχει μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή, πλούσια σε λευκίνη, που την αγκυροβολεί στο σύμπλεγμα του πυρηνικού πόρου, τέσσερις περιοχές σύνδεσης της Ran (RanBDs), οκτώ μοτίβα zinc-finger και μια COOH-τελική περιοχή (IR1 και IR2) με δράση E3 λιγάσης του SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), η οποία συμμετέχει στη SUMOύλιωση της RanGAP. Η SUMOύλιωση συμβαίνει μέσω μιας ενζυμικής αλληλουχίας που περιλαμβάνει το ένζυμο E1 που ενεργοποιεί τον SUMO με έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο, και το E2 ένζυμο σύζευξης **Ubc9**, που μεταφέρει τον SUMO σε μια λυσίνη της πρωτεΐνης στόχου με τη βοήθεια



της E3 λιγάσης RanBP2. Σε αντίθεση με τη διαδικασία της ουβικουιτίνωσης, η E3 λιγάση του SUMO δεν συνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο ούτε είναι απαραίτητη για τη SUMOύλιωση, απλώς ενισχύει τη δράση του ενζύμου E2, το οποίο παίζει και τον κύριο ρόλο (Εικόνα 8.100). Η RanGAP με τον συνδεδεμένο στο COOH-τελικό της άκρο SUMO αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με SUMO interaction motifs (SIM) άλλων πρωτεϊνών (μεταξύ των οποίων και με την RanBP2), δημιουργώντας σηματοδοτικά σύμπλοκα. Η SUMOύλιωση αντιστρέφεται από εξειδικευμένες ισοπεπτιδάσες που απομακρύνουν τον SUMO από την πρωτεΐνη στόχο.

Υπάρχουν δύο μορφές RanGAP στα σπονδυλωτά: μία μη τροποποιημένη μορφή και μία συνδεδεμένη ομοιοπολικά με SUMO. Και οι δύο μορφές επιταχύνουν την υδρόλυση του Ran-συνδεδεμένου GTP, αλλά μόνο η SUMOύλιωμένη RanGAP βρίσκεται συνδεδεμένη στους πυρηνικούς πόρους, μέσω της αλληλεπίδρασής της με την RanBP2.

Η RanGAP ρυθμίζεται, επίσης, και από τη **RanBP1**, η οποία παίζει τον ρόλο GDF (Guanine nucleotide-Dissociation Factor). Η RanBP1 είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη κυτταροπλασματική μικρή πρωτεΐνη 23 kDa που περιέχει μόνο μια Ran-binding domain (RanBD), η οποία εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη Ran-GTP ( $K_D \approx 1$  nM) και χαμηλή συγγένεια για τη Ran-GDP ( $K_D \approx 10$  nM). Η RanBP1 δρα ως συμπαραγοντας της RanGAP1, αυξάνοντας τον ρυθμό της RanGAP μεσολαβούμενης υδρόλυσης του GTP από τη Ran ~10 φορές.

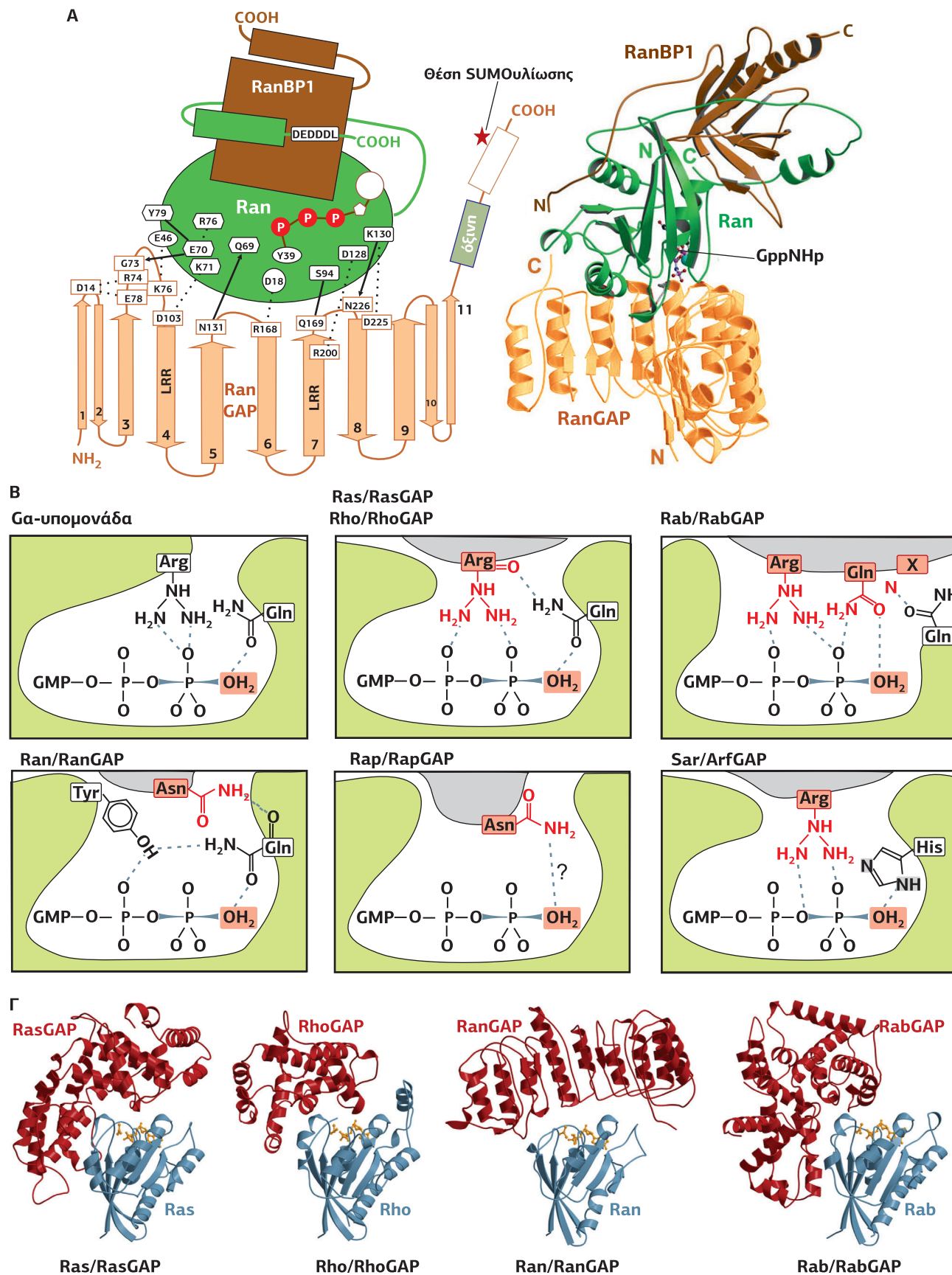
Όλες οι γνωστές **RanGAPs** εμφανίζουν μια αρθρωτή διαμόρφωση, καθώς περιέχουν μια μεγάλη περιοχή 330-350 αμινοξέων με 11 επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη LRR (Leucine-Rich Repeat), οι οποίες υιοθετούν το σφαιρικό σχήμα ημισελήνου. Η LRR περιοχή ακολουθείται από: α. μια όξινη περιοχή 35 έως 50 αμινοξέων και β. από μία περιοχή με μία θέση για SUMOύλιωση, η οποία στοχοποιεί τη RanGAP στην κυτταροπλασματική περιοχή των NPC, μέσω της σύνδεσής της με την Ubc9 και τη RanBP2. Επιπλέον, περιέχουν μία περιοχή NLS και δύο περιοχές NES (Εικόνα 8.101A).

Ενώ η RanGAP ενισχύει τη διέγερση της υδρόλυσης GTP παρόμοια με τις υπόλοιπες GAPs ( $\times 10^5$ ), δεν χρησιμοποιεί τον δάκτυλο αργινίνης (Arg finger) για να σταθεροποιήσει τη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης. Αντ' αυτού, η RanGAP παρέχει μια ασπαργίνη (Asn) για τη σταθεροποίηση του προσανατολισμού του καταλυτικού καταλοίπου γλουταμίνης (Gln) της Ran. Επιπλέον, η RanBP1 συνδιεγείρει τη δραστηριότητα της RanGAP.

**Εικόνα 8.100**  
Στόχευση της **RanGAP** στους πυρηνικούς πόρους και **SUMO**ύλιωση από τα ένζυμα **E2** και **E3**.

A. Η RanBP2 (ή Nup358) είναι μια τεράστια πρωτεΐνη, που αποτελεί το κύριο συστατικό των κυτταροπλασματικών ινιδίων των πυρηνικών πόρων. Περιέχει μία NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή, πλούσια σε λευκίνη, που την αγκυροβολεί στον NPC, τέσσερις περιοχές RanBDs, οκτώ zinc-finger μοτίβα και μία COOH-τελική περιοχή (IR1 και IR2) με δράση E3 λιγάσης του SUMO. [47] [211] B. Κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος RanGAP (το COOH-τελικό άκρο με τη θέση SUMOύλιωσης), E2-ένζυμο (Ubc9) και τμήμα της E3 λιγάσης (RanBP2). [82]





### Ο μηχανισμός της πυρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς και ο ρόλος της Ran

Το RNA και τα ριβοσώματα εξέρχονται από τον πυρήνα, ενώ οι πρωτεΐνες της χρωματίνης και οι μεταγραφικοί παράγοντες εισέρχονται. Τα "φορτία" μετακινούνται διαμέσου εκατοντάδων πυρηνικών πόρων της πυρηνικής μεμβράνης, με ρυθμό πάνω από ένα εκατομμύριο μακρομόρια ανά min. Οι περισσότερες πρωτεΐνες και RNA δεν μπορούν να μετακινηθούν χωρίς συνοδεία μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα και χρειάζεται να συνδεθούν σε πρωτεΐνες μεταφοράς, όπως οι importins και οι exportins (οι οποίες συνολικά χαρακτηρίζονται ως β-karyopherins). Αυτοί οι μεταφορείς αναγνωρίζουν το φορτίο τους μέσω μικρών αμινοξικών αλληλουχιών, όπως η NLS (Nuclear Localization Sequence) και η NES (Nuclear Export Sequence). Οι importins και οι exportins εκφράζονται σε πολλές ισομορφές που εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς το φορτίο τους.

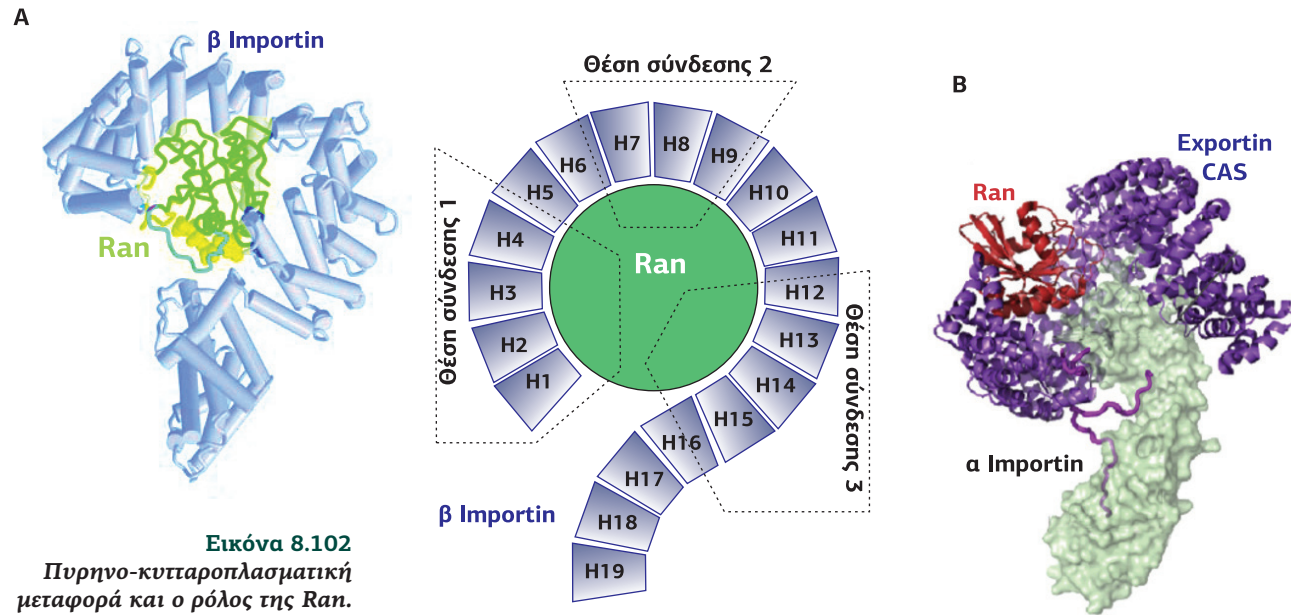
Στο πιο κλασικό μοντέλο εισόδου στον πυρήνα, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο NLS συνδέονται με την α-importin, η οποία αναγνωρίζει το φορτίο, και τη β-importin, η οποία αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του πυρηνικού πόρου (nucleoporins) και κατευθύνει το ετεροτριμερές σύμπλοκο μέσα στον πυρήνα Ran-GTP-ανεξάρτητα. Όταν φτάσει στο πυρηνόπλασμα, το σύμπλοκο (φορτίο/α- και β-importin) συνδέεται με τη Ran-GTP, η οποία απομακρύνει τις importins από το φορτίο τους. Το NLS-πρωτεϊνικό φορτίο είναι πλέον ελεύθερο στο πυρηνόπλασμα.

Το σύμπλοκο α-/β-importin/Ran-GTP διαχωρίζεται σε β-importin/Ran-GTP και α-importin, η οποία συνδέεται σε μια ειδική exportin, την CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility protein), η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με μια Ran-GTP (Εικόνα 8.102A). Η έξοδος των importins -και γενικότερα των NES-πρωτεϊνών- από τον πυρήνα συμβαίνει ενάντια στη διαβάθμιση της συγκέντρωσής τους και γι' αυτό απαιτείται η ενέργεια από την υδρόλυση του Ran-συνδεδεμένου GTP. Η διαδικασία αυτή επιταχύνεται από μια RanGAP, που βρίσκεται συνδεδεμένη στην κυτταροπλασματική πλευρά του πυρηνικού πόρου. Ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης του GTP οι importins απομακρύνονται στο κυτταροπλάσμα και η Ran-GDP επιστρέφει στον πυρήνα με τη βοήθεια της πρωτεΐνης NTF2 (Nuclear Transport Factor 2). Όπως είδαμε, η Ran-GDP ενεργοποιείται στο πυρηνόπλασμα από τον RanGEF RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1), για να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος (Εικόνα 8.102Γ).

#### Εικόνα 8.101

**Ο ρόλος των GAPs στην ενεργοποίηση των μικρών GTPασών.** Α. Οι RanGAPs μοιράζονται μια μεγάλη περιοχή 330-350 αμινοξέων πλούσια σε λευκίνη LRR (Leucine-Rich Repeat), που ακολουθείται από μια όξινη περιοχή 35 έως 50 αμινοξέων. [165] [166] Β. Διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι GAPs επιταχύνουν την υδρόλυση του GTP: σωστός προσανατολισμός και πόλωση του μορίου H<sub>2</sub>O για in-line πυρηνόφιλη επίθεση στη γ-φωσφορική ομάδα του GTP, απομάκρυνση του H<sub>2</sub>O από τη δραστηκή θέση και σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης. Οι RasGAPs σταθεροποιούν τη θέση της Gln61 της Ras, η οποία με τη σειρά της συντονίζει την επίθεση στο H<sub>2</sub>O. Επιπλέον, ο δάκτυλος αργινίνης εισέρχεται μέσα στη θέση πρόσδεσης του φωσφορικού και σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση με εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου της γ-φωσφορικής ομάδας. Ο δάκτυλος αργινίνης λειτουργεί παρόμοια με το κατάλοιπο αργινίνης, που βρίσκεται στην α-ελικοειδή ένθεση της Gα-υπομονάδας των Gαβγ πρωτεϊνών. Ο ίδιος μηχανισμός βρέθηκε για τις RhoGAPs, παρόλο που οι RasGAPs και οι RhoGAPs δεν σχετίζονται με βάση την πρωτοταγή δομή και μόνο μακρινή σχέση έχουν ως προς την τριτοταγή τους δομή. Η καταλυτική γλουταμίνη των Ras και Rho διατηρείται, επίσης, και στις Rab, και ο δάκτυλος αργινίνης παρατηρείται στις RabGAP, αν και ο μηχανισμός είναι κάπως διαφορετικός: η Gln που προσανατολίζει το H<sub>2</sub>O παρέχεται από τη RabGAP, ενώ η Gln της Rab είναι στραμμένη μακριά από την ενεργό περιοχή και εμπλέκεται στην πρόσδεση της GAP. Η RanGAP παρέχει μια ασπαραγίνη (Asn) για τη σταθεροποίηση του προσανατολισμού της Gln της Ran. Αντιθέτως, από την Rap λείπει η αντίστοιχη Gln και οι RapGAPs, δομικά άσχετες με τις RasGAPs, παρέχουν μια ασπαραγίνη (Asn) και όχι ένα υπόλειμμα αργινίνης ως ένα σημαντικό στοιχείο της κατάλυσης. Αυτή η Asn αναλαμβάνει τον ρόλο της Gln στη σωστή τοποθέτηση του H<sub>2</sub>O. Η καταλυτική Gln δεν είναι παρούσα ούτε στις Arf. Στην περίπτωση αυτή οι ArfGAPs παρέχουν μια ιστοιδίνη (His) για να προσανατολίζει σωστά το μόριο του H<sub>2</sub>O. Έτσι, η κύρια συμβολή των διαφόρων GAPs στην κατάλυση είναι η σταθεροποίηση του εγγενώς κινητού καταλυτικού μηχανισμού των G-πρωτεϊνών και, στις περισσότερες περιπτώσεις, η εισαγωγή ενός καταλυτικού αμινοξέος σε trans μορφή. Γ. Οι GAPs δεν εμφανίζουν δομική ομοιομορφία. [19]

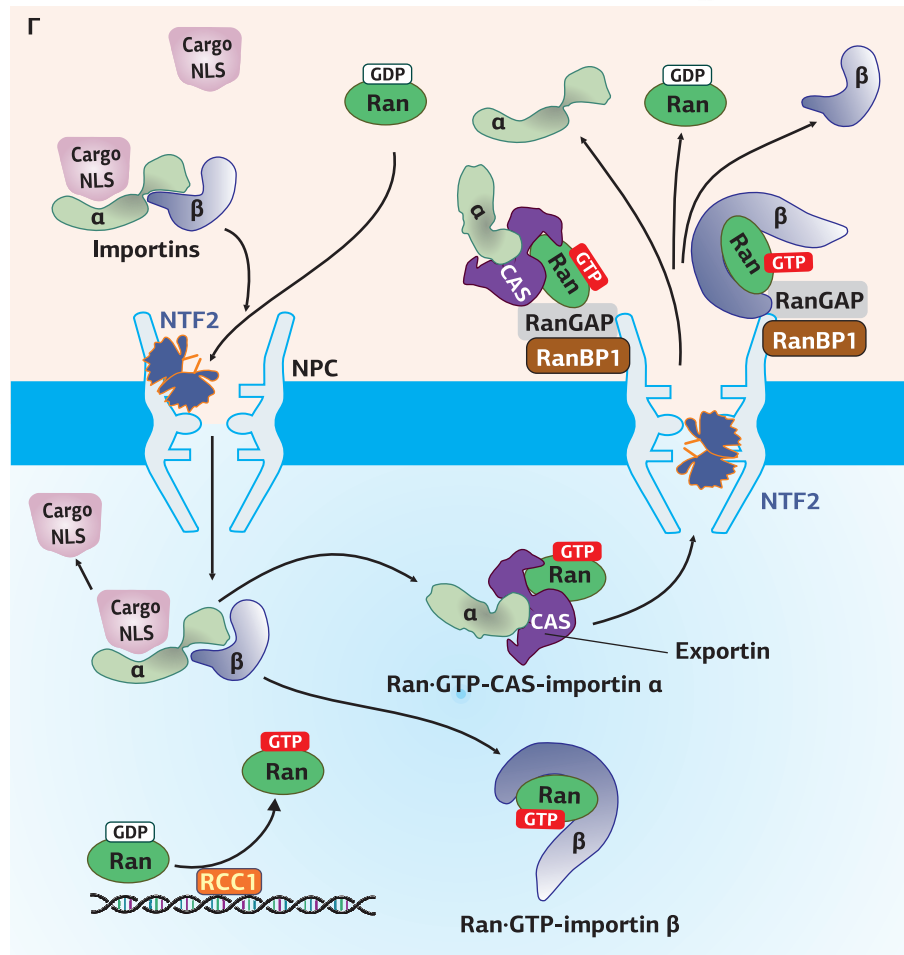
Η α-importin αποτελείται από 10 επαναλήψεις ARM (armadillo), οι οποίες σχηματίζουν μια κυρτή δομή, που διευκολύνει τη σύνδεση με την περιοχή NLS του πρωτεϊνικού φορτίου. Επιπλέον, περιέχει μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή 90 αμινοξέων, IBB (Importin-β Binding domain), υπεύθυνη για σύνδεση με την β-Importin, αλλά επίσης και μια περιοχή αυτοαναστολής που εμπλέκεται στην απελευθέρωση του φορτίου, μόλις η α-importin εισέλθει στον πυρήνα. Η β-Importin περιέχει 18-20 επαναλήψεις του μοτίβου HEAT, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες, που συνδέονται με μια στροφή, και οι οποίες στοιβάζονται για να σχηματίσουν τη συνολική δομή της πρωτεΐνης.



**Εικόνα 8.102**

**Πυρρηνο-κυτταροπλασματική μεταφορά και ο ρόλος της Ran.**

A. Η β-Importin αποτελείται από 19 HEAT μοτίβα οργανωμένα σε μια δεξιόστροφη υπερέλικα. Κάθε μονάδα HEAT αποτελείται από δύο α-έλικες (HEAT-A και HEAT-B), οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία. Στο εσωτερικό της υπερέλικας, στα HEAT 17-18, συνδέεται η Ran-GTP. Η σύνδεσή της απομακρύνει την α-Importin, καθώς συνδέεται στα ίδια μοτίβα. [175] [77] B. Η α-Importin είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές, μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή IBB στην οποία συνδέεται η β-Importin, μια περιοχή ARM που αποτελείται από 10 επαναλήψεις armadillo-οι οποίες αναγνωρίζουν τα NLS μοτίβα των φορτίων- και η CAS binding domain -όπου συνδέεται η exportin CAS. [108] Γ. Εισαγωγή και εξαγωγή φορτίων διαμέσου των NPC, διαμεσολαβούμενες από importins, exportins και Ran. Οι importins συνδέονται με το NLS-φορτίο στο κυτταρόπλασμα και το μεταφέρουν μέσα στον πυρήνα. Εκεί, η Ran-GTP συνδέεται στη β-Importin και επάγει την απελευθέρωση του φορτίου. Το σύμπλοκο α-/β-Importin/Ran-GTP διαχωρίζεται σε β-Importin/Ran-GTP και α-Importin. Η τελευταία συνδέεται στην CAS, που βρίσκεται συνδεδεμένη με μια Ran-GTP. Οι importins μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας την υδρόλυση του GTP. [92] [218]

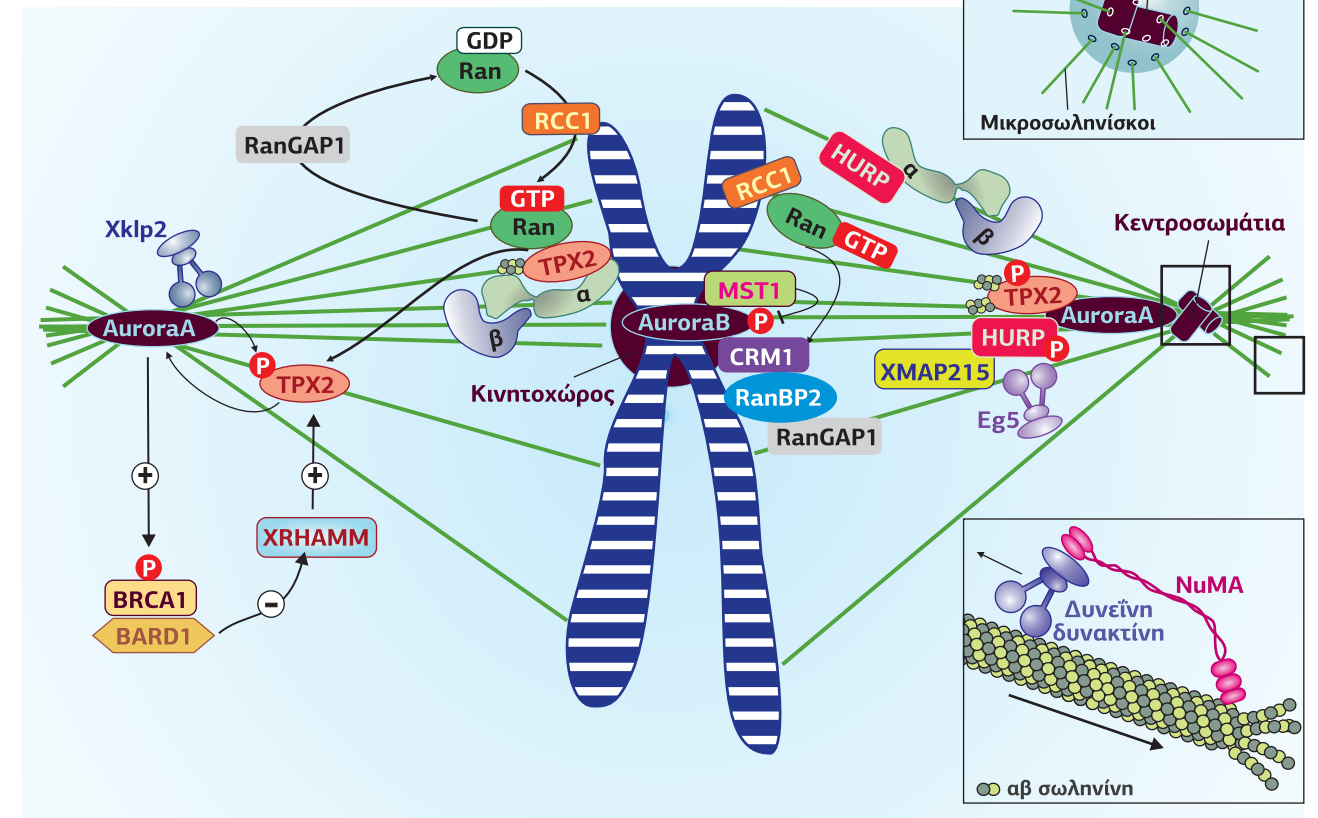
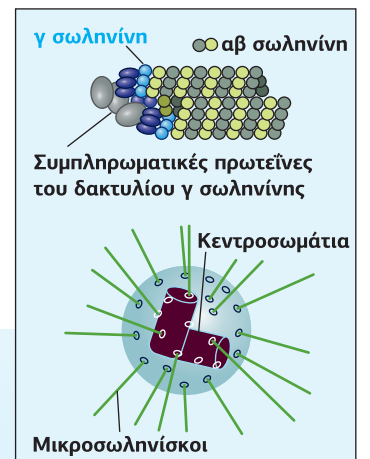


**Ο ρόλος της Ran στον σχηματισμό πυρηνικής ατράκτου κατά τη μίτωση**

Εκτός από τους μηχανισμούς της πυρρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς, η Ran παίζει ρόλο και στα κύτταρα που βρίσκονται σε μίτωση, συμμετέχοντας στον διπλασιασμό του κεντροσώματος, στη δυναμική των μικροσωληνίσκων, στην ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων, στη σύνδεση του κινητοχώρου στους μικροσωληνίσκους και στον σχηματισμό της πυρηνικής ατράκτου.

σκους και στον σχηματισμό της πυρηνικής ατράκτου.

Η κυτταρική διαίρεση χαρακτηρίζεται από τη δραματική αναδιοργάνωση του δικτύου μικροσωληνίσκων σε μία συσκευή σε σχήμα ατράκτου, η οποία διαχωρίζει τα χρωμοσώματα στα δύο θυγατρικά κύτταρα. Η συναρμολόγηση και η λειτουργία της ατράκτου βασίζεται σε δίκτυα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνικών συμπλόκων που ρυθμίζονται λεπτομερώς στον χρόνο και στον χώρο. Στα τέλη του 1990 αρκετές ερευνητικές ομάδες ανακάλυψαν ταυτόχρονα τον ρόλο της Ran στη συναρμολόγηση της ατράκτου. Χωρικά, το σύστημα ορίζεται από την παρουσία του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) κοντά στη χρωματίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αυξημένης συγκέντρωσης Ran-GTP γύρω από τα χρωμοσώματα, εξασφαλίζοντας την πυρήνωση των μικροσωληνίσκων τοπικά κοντά στη χρωματίνη. Η Ran-GTP συμ-



**Εικόνα 8.103**

**Μηχανισμός πυρήνωσης των μικροσωληνίσκων και σχηματισμός της ατράκτου κατά την προμετάφαση από τη Ran-GTP.**

Ο RanGEF RCC1, ο οποίος συνδέεται στη χρωματίνη, δημιουργεί μια διαβάθμιση συγκέντρωσης Ran-GTP γύρω από τα χρωμοσώματα, που επιτρέπει την απελευθέρωση SAFs, όπως η TPX2 από τις importins (η σύνδεση με τις οποίες αναστέλλει τη δράση των SAFs). Η TPX2 μαζί με σύμπλοκα γ-σωληνίνης επάγουν στη συνέχεια την πυρήνωση. Επιπλέον, η TPX2 ενεργοποιεί την Aurora A, η οποία βρίσκεται στα κεντροσώματα και με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την TPX2. Η TPX2 ενεργοποιείται, επίσης, από την XRHAMM (Xenopus Receptor for Hyaluronic-Acid-Mediated Motility), η οποία βοηθάει την πυρήνωση των μικροσωληνίσκων στους πόλους, ενώ το σύμπλοκο λιγάνσης της ουβικουιτίνης BRCA1/BARD1 (Breast cancer type-1 susceptibility protein - Associated RING Domain protein-1) απενεργοποιεί την XRHAMM, δρώντας ως απάντηση στην καταστροφή του DNA, και διεγείρει την επιδιόρθωσή του αναστέλλοντας τον υπερδιπλασιασμό των κεντροσωμάτων λόγω του κατεστραμμένου DNA. Η TPX2 και η Aurora A αλληλεπιδρούν, επίσης, στην άτρακτο με την XMAP215, την κινεσίνη Eg5 και την HURP, η οποία είναι ένας ακόμη SAF που απελευθερώνεται από το ανασταλτικό σύμπλοκο των importins μέσω της Ran-GTP. Η Aurora A φωσφορυλιώνει την HURP ρυθμίζοντας τη σταθερότητά της. Οι χρωμοσωμικοί μικροσωληνίσκοι σταθεροποιούνται γύρω από τους κινητοχώρους με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από το σύμπλοκο CPC (Chromosomal Passenger Complex), το οποίο αποτελείται κυρίως από την πρωτεΐνη Aurora B. Η exportin CRM1 αλληλεπιδρά με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων και την Aurora B στρατολογώντας τις RanGAP1 και RanBP2, που παίζουν κύριο ρόλο στην αλληλεπίδραση των κινητοχώρων με τις δεσμίδες μικροσωληνίσκων. Η MST1 (Mammalian Sterile 20-like kinase 1) προάγει την προσκόλληση των μικροσωληνίσκων στον κινητοχώρο, φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας τη δράση της Aurora B. [116] [33]

μετέχει στην πυρήνωση των μικροσωληνίσκων με έναν μηχανισμό που δεν διαφέρει από τον ρόλο της στην πυρνο-κυτταροπλασματική μεταφορά, ο οποίος βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια της συνδεδεμένης με GDP και GTP διαμόρφωσης της Ran για τις importins. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, η Ran-GTP επάγει την απελευθέρωση των παραγόντων συγκρότησης της ατράκτου **SAFs** (Spindle Assembly Factors) από τις  $\alpha$ - και  $\beta$ -importins, το σύμπλοκο με τις οποίες τους καθιστούσε ανενεργούς.

Ο πρώτος SAF που ρυθμίζεται με αυτόν τον τρόπο ανακαλύφθηκε το 2000 και ήταν η **TPX2** (Targeting Protein for Xklp2). Μόλις απελευθερωθεί από τις  $\alpha$ - και  $\beta$ -importins, η TPX2 ξεκινά τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων γύρω από τη χρωματίνη και τη συναρμολόγηση της ατράκτου. Επίσης, η TPX2 ενεργοποιεί δύο πρωτεΐνες: α. Την **Xklp2** (Xenopus centrosomal kinesin-like protein-2), μια πρωτεΐνη παρόμοια με την κινεσίνη (KLP: Kinesin-Like Protein), η οποία βρίσκεται στα κεντροσώματα και ενεργοποιεί τον διαχωρισμό τους και την απομάκρυνσή τους προς τους πόλους, διαδικασία η οποία σηματοδοτεί την έναρξη της συναρμολόγησης της ατράκτου. β. Την **κινάση Aurora A**, την οποία στρατολογεί κοντά στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου και εμποδίζει την αποικοδόμησή της. Η Aurora A συμμετέχει στην ωρίμανση των κεντροσωμάτων και στον διαχωρισμό τους και, επίσης, στρατολογεί τη  $\gamma$ -σωληνίνη, τη βασική δομή του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων που ξεκινούν από το κεντροσώμα. Χωρίς την Aurora A το κεντροσώμα δεν συσσωρεύει επαρκή ποσότητα  $\gamma$ -σωληνίνης ( $\gamma$ -tubulin) και παρότι ο κυτταρικός κύκλος συνεχίζεται, τα κεντροσώματα δεν ωριμάζουν πλήρως και οι μικροσωληνίσκοι των αστέρων είναι πολύ λιγότεροι. Η TPX2 και η Aurora A αλληλεπιδρούν στην άτρακτο με την XMAP215 (Xenopus Microtubule-associated protein, 215 kDa) μια πρωτεΐνη συγκρότησης των μικροσωληνίσκων (MAP), την κινεσίνη Eg5 και την HURP (Hepatoma Up-Regulated Protein), η οποία είναι ένας ακόμη SAF που απελευθερώνεται από το ανασταλτικό σύμπλοκο των importins μέσω της Ran-GTP. Η Aurora A, επίσης, φωσφορυλιώνει την HURP ρυθμίζοντας τη σταθερότητά της.

Μια άλλη SAF, η οποία επίσης ενεργοποιείται από τη Ran-GTP, είναι η **NuMA** (Nuclear protein of the Mitotic Apparatus), η οποία συμμετέχει στον προσανατολισμό των μικροσωληνίσκων. Σε αντίθεση με την TPX2, η πλειοψηφία των NuMA συνδέεται με το σύμπλοκο δυνεΐνης-δυνακτίνης, ενώ μόνο ένα μικρό υποσύνολο NuMA ρυθμίζεται από το σύστημα Ran μέσω της σύνδεσης με τις importins.

Επιπλέον του ρόλου της να απελευθερώνει SAFs από τα ανασταλτικά τους σύμπλοκα με τις importins, η Ran-GTP δρα μέσω της exportin CRM1 (Chromosome-Region Maintenance protein-1), η οποία αλληλεπιδρά με τους κιντοχώρους των χρωμοσωμάτων και την Aurora B στρατολογώντας τις RanGAP1 και RanBP2. Το σύμπλοκο RanBP2-RanGAP1 παίζει έναν ρόλο στην αλληλεπίδραση των κιντοχώρων με τις δεσμίδες μικροσωληνίσκων που εκτείνονται από τα κεντροσώματα προς τους κιντοχώρους και είναι σημαντικοί στη συσσώρευση των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση (Εικόνα 8.103).

#### 4. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Το 1989 η μελέτη της απόκρισης των ζυμομυκήτων στις φερομόνες ζευγαρώματος οδήγησε στην ανακάλυψη δύο πρωτεϊνικών κινάσων (Kss1p και Fus3p), οι οποίες σταματούν τον κυτταρικό κύκλο και επάγουν τη μορφολογική αναδιαμόρφωση των ζυμομυκήτων, ώστε να οδηγηθούν στη μεταξύ τους σύζευξη.

Ταυτόχρονα, κατά την αναζήτηση υποστρωμάτων κινάσων τυροσίνης ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά μία πρωτεϊνική κινάση Ser/Thr με εντυπωσιακή ομοιότητα με τις δύο πρωτεϊνικές κινάσες Kss1p και Fus3p, των ζυμομυκήτων, ικανή να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων MAP2 (Microtubule-Associated Protein-2). Η κινάση αυτή χαρακτηρίστηκε ως ένα πρώιμο ενδιάμεσο ενός μονοπατιού διαδοχικών φωσφορυλιώσεων, που ενεργοποιείται από μιτογόνα (ινσουλίνη,

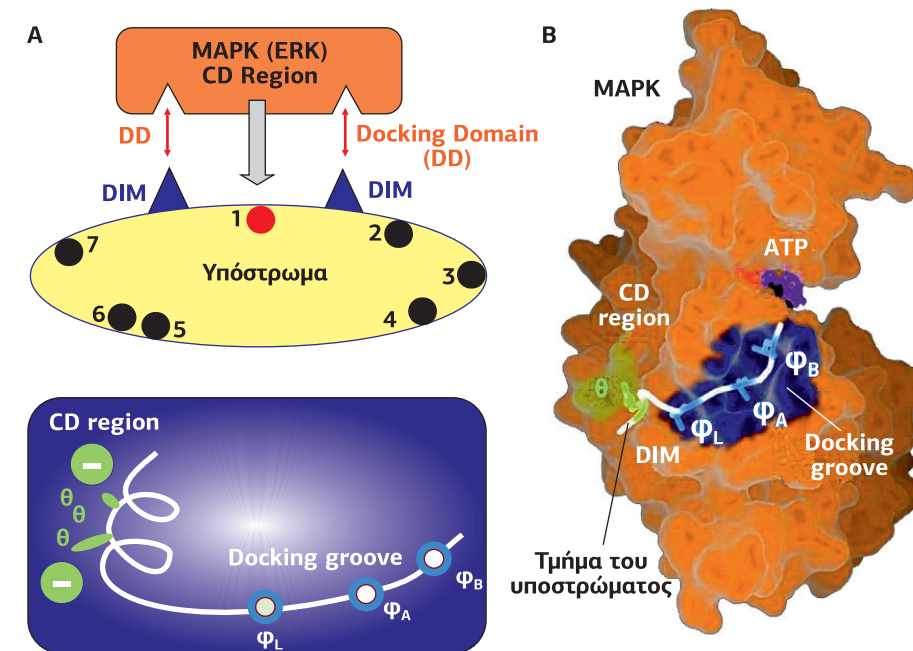
επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, κ.λπ.) αλλά και από μια ποικιλία εξωκυτταρικών σημάτων, και γι' αυτό ονομάστηκε ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1). Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οι κινάσες ERK2 και ERK3, οι οποίες μαζί με τις δύο κινάσες των ζυμομυκήτων αποτέλεσαν τα πρώτα μέλη μιας οικογένειας εξελικτικά συντηρημένων ενζύμων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόκρισης των ευκαρυωτικών κυττάρων σε μιτογόνα σήματα. Στις κινάσες αυτές δόθηκε η γενική ονομασία mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

Ωστόσο, με την ανακάλυψη και άλλων μελών, ακόμη και από μακρινούς εξελικτικά οργανισμούς, όπως τα φυτά, έχει καταστεί σαφές ότι η ονομασία των κινάσων αυτών είναι ψευδεπίγραφη, καθώς δεν αντιστοιχεί στην πραγματικότητα, δεδομένου ότι οι περισσότερες MAPKs συμμετέχουν στην αντιμετώπιση βλαβερών ερεθισμάτων, όπως το αβιοτικό στρες (υπερσωματικότητα, οξειδωτικό στρες, βλάβη στο DNA, υποσωματικότητα, μόλυνση, κ.λπ.). Επειδή τα φυτά δεν μπορούν να "διαφύγουν" από το stress, έχουν τον υψηλότερο αριθμό των γονιδίων MAPK ανά οργανισμό που έχει βρεθεί ποτέ.

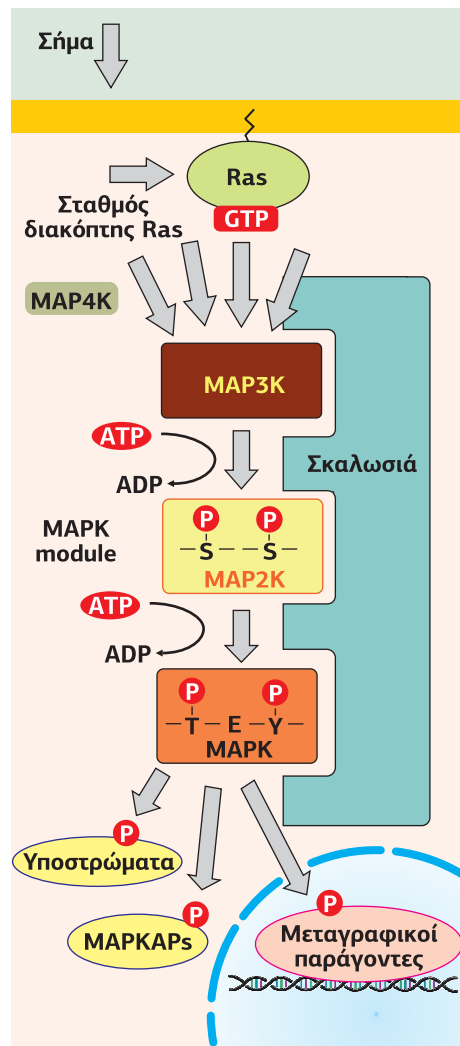
#### 4.1 Οργάνωση και συστατικά των μονοπατιών των MAPKs

Το μονοπάτι των MAPKs περιέχει τρεις πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες φωσφορυλιώνονται διαδοχικά η μία από την άλλη. Οι MAPKKKs ή MAP3Ks (MAPKK kinases) φωσφορυλιώνουν τις MAPKKs ή MAP2Ks (MAPK kinases), οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις MAPKs (MAP kinases). Καθεμία από αυτές τις κινάσες εκφράζεται σε διαφορετικές ισομορφές, οι οποίες συγκροτούν διαφορετικά μονοπάτια. Το κάθε μονοπάτι MAPK είναι οργανωμένο ως μια **ετεροτριμερής ομάδα (module)**, με τη βοήθεια πρωτεϊνών σκαλωσιάς (βλ. Εικόνα 8.105). Η οργάνωση των MAPKs σε μια ομάδα έχει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα: ευνοεί τη γρήγορη μετάδοση του μηνύματος και εγγυάται την εξειδίκευση της μεταγωγής του σήματος, εμποδίζοντας ανεπιθύμητες διασταυρώσεις με άλλα μονοπάτια MAPK. Η οργάνωση αυτή οδήγησε στην εξελικτική επιτυχία του μοντέλου, το οποίο συναντάται σε όλους τους ευκαρυώτες -αλλά όχι στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Τον πυρήνα του μονοπατιού αποτελούν οι MAP2K και MAPK, καθώς αλληλεπι-



**Εικόνα 8.104**  
**Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις MAPKs και τα υποστρώματά τους.** Α. Παρά την αφθονία που εμφανίζει η συναινετική αλληλουχία φωσφορυλιώσης Ser/Thr-Pro, οι MAPKs φωσφορυλιώνουν με εξειδίκευση τα υποστρώματά τους. Αυτή η εξειδίκευση επιτυγχάνεται λόγω της αλληλεπίδρασης των μοτίβων DIM (Docking-Interacting Motifs) των υποστρωμάτων με τις περιοχές αγκυροβόλια (D-domains) των MAPKs. Β. Η περιοχή αγκυροβόλια των MAPKs περιλαμβάνει δύο διακριτές περιοχές: μια κοινή περιοχή αγκυροβόλια (CD, Common Docking) και μια υδρόφοβη περιοχή (μπλε και ανοικτό καφέ, αντίστοιχα). Σε λεπτομέρεια, στο μπλε πλαίσιο διακρίνεται η αύλακα-αγκυροβόλια των MAPKs, όπου συνδέονται τρία υδρόφοβα αμινοξέα σε σειρά ( $\phi_L$ ,  $\phi_A$  και  $\phi_B$ ). Η απόσταση μεταξύ  $\theta$  και  $\phi$  εξαρτάται από το μήκος του συνδέτη και καθορίζει το είδος του υποστρωματος που θα συνδεθεί. [219]



**Εικόνα 8.105**

**Η ετεροτριμερής ομάδα MAPKs.** Το μονοπάτι των MAPKs περιέχει τρεις πρωτεϊνικές κινάσες (MAP3Ks, MAP2Ks και MAPKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν διαδοχικά ή μία την άλλη. Το κάθε μονοπάτι MAPK είναι οργανωμένο ως πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο με τη βοήθεια πρωτεϊνών σκαλωσιάς. Η MAP3K φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα Ser μιας MAP2K, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει σε ένα κατάλοιπο Thr και ένα κατάλοιπο Tyr το τελευταίο μέλος του μονοπατιού, την MAPK. Τέλος, η MAPK ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες ή κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Θα μπορούσαμε να παρομοιάσουμε ότι η ομάδα των MAPK δρα ως ένας "λαιμός μπουκαλιού" που μετατρέπει μια μεγάλη ποικιλία σημάτων εισόδου σε μια μεγάλη ποικιλία σημάτων εξόδου.

δρούν μεταξύ τους με πολύ εξειδικευμένο τρόπο. Αντιθέτως, οι MAP3K και MAP2K εμφανίζουν μεταξύ τους πολύ μικρότερη εξειδίκευση: πολλές πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να δράσουν ως MAP3K μεταφέροντας μια μεγάλη ποικιλία σημάτων εισόδου στο μονοπάτι. Κάτι ανάλογο ισχύει και με τις MAPKs, η καθεμία από τις οποίες αν και ενεργοποιείται εξειδικευμένα μπορεί να φωσφορυλιώσει ένα αρκετά μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Συνεπώς, τα μονοπάτια των MAPKs μπορούμε να τα παρομοιάσουμε ότι δρουν ως ένας "λαιμός μπουκαλιού" που μετατρέπει μια μεγάλη ποικιλία σημάτων εισόδου σε μια μεγάλη ποικιλία σημάτων εξόδου.

Οι MAP3Ks είναι μια μεγάλη και ετερογενής ομάδα πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr, οι οποίες φωσφορυλιώνουν δύο κατάλοιπα Ser ή Thr του βρόχου ενεργοποίησης των κινασών MAP2Ks. Είναι αυτές που δέχονται το σήμα εισόδου της ομάδας των MAPKs. Η αξιοσημείωτη ποικιλία των περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχουν αντανάκλα την ενσωμάτωση των ομάδων MAPKs σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8.106**, οι MAP3Ks ενεργοποιούνται τόσο από μικρές GTPάσες (Ras, Rac/Cdc42) όσο και από MAP4Ks.

Οι MAP2Ks είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών που έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν ταυτόχρονα κατάλοιπα Thr και Tyr, τα οποία αναγνωρίζουν σε μια αλληλουχία -Thr-x-Tyr-. Οι MAP2Ks εξαιτίας αυτής της ιδιότητας ονομάζονται **πρωτεϊνικές κινάσες διπλής εξειδίκευσης** και διαφέρουν σημαντικά από τις άλλες κινάσες που μπορούν να φωσφορυλιώνουν είτε κατάλοιπα Ser/Thr είτε κατάλοιπα Tyr. Οι ενεργοποιημένες MAP2Ks φωσφορυλιώνουν το τελευταίο μέλος του μονοπατιού, τις MAPKs. Ανταγωνιστές των MAP2Ks είναι οι διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσες των MAPKs (DS-MKP: Dual Specific MAP kinase Phosphatases), οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν την αλληλουχία -Thr-x-Tyr-. Η έκφραση και η ενεργοποίησή τους ρυθμίζονται από τις ενεργοποιημένες MAPKs μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης.

Οι MAPKs περιέχουν καλά διατηρημένη την αλληλουχία -Thr-x-Tyr-, η φωσφορυλίωση της οποίας οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Οι ενεργοποιημένες MAPKs φωσφορυλιώνουν κυρίως κατάλοιπα Ser/Thr, τα οποία γειτονεύουν με κατάλοιπα προλίνης, και γι' αυτό και χαρακτηρίζονται και ως **Proline-directed protein kinases**. Αυτή η συναινετική αλληλουχία φωσφορυλίωσης (consensus sequences) Ser/Thr-Pro που αναγνωρίζουν οι MAPKs είναι άφθονη: υπάρχουν πολλά πιθανά υποστρώματα μεταξύ των οποίων κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Ωστόσο, η κάθε ξεχωριστή MAPK αναγνωρίζει μόνο μια μικρή ομάδα υποστρωμάτων. Αυτή η εξειδίκευση οφείλεται σε επιπλέον ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιοχών αγκυροβόλια (Docking Domains) ή DD ή D-domains, που δεν αποτελούν τμήμα του καταλυτικού κέντρου της κινάσης και των περιοχών των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν τις DD, και ονομάζονται DIM (Docking Interacting Motifs). Συνεπώς, για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση του υποστρώματος, χρειάζονται "δύο κλειδιά" (**Εικόνα 8.104**).

Οι MAPKs είτε βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, όπου φωσφορυλιώνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, είτε μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες (**Εικόνα 8.105**). Η ενδοκυτταρική τους θέση εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων μοτίβων στην αμινοξική τους αλληλουχία: όταν πρόκειται να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα, περιέχουν ένα μοτίβο CRS (Cytoplasmic Retention Sequence), ενώ όταν πρόκειται να εισέλθουν στον πυρήνα, περιέχουν ένα μοτίβο NLS (Nuclear Localization Sequence).

**Τα διαφορετικά μονοπάτια των MAPKs**

Το ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζει 14 MAPKs και 8 MAP2Ks, οι οποίες δημιουργούν διακριτά μονοπάτια, καθένα από τα οποία ενεργοποιείται από διαφορετικό είδος σήματος και παίρνει το όνομά του από το όνομα της MAPK:

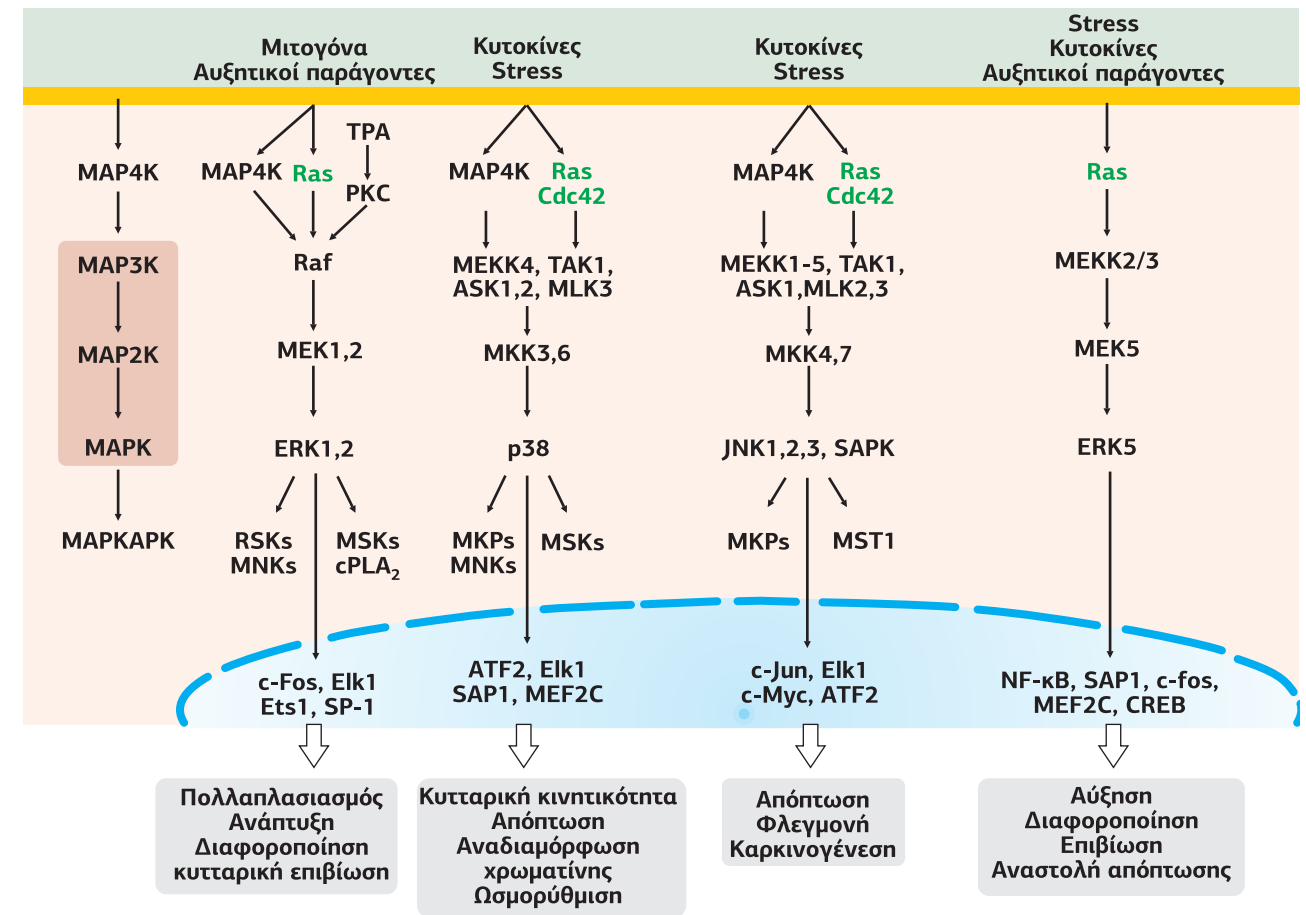
Το μονοπάτι **ERK1-2** (Extracellular signal-Regulated Kinase) ενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα (ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες), τα οποία συνδέονται σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.

Το μονοπάτι **JNK** (Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase) ή **SAPK** (Stress Activated Protein Kinase) ενεργοποιείται από εξωκυτταρικούς στρεσογόνους παράγοντες (TNF-α, UV, προφλεγμονώδεις κυτοκίνες).

Το μονοπάτι **p38/HOG** (High-Osmolarity Glycerol) ενεργοποιείται από εξωκυτταρικούς στρεσογόνους παράγοντες (TNF-α, UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Η HOG εκφράζεται στους σακχαρομύκητες.

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναφερθούμε κυρίως στα μονοπάτια των ERK1/2, τα οποία ενεργοποιούνται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων RTKs. Τα μονοπάτια JNK και p38 θα εξεταστούν σε επόμενο κεφάλαιο, ανάλογα με το είδος των υποδοχών από τους οποίους ενεργοποιούνται.

**Εικόνα 8.106**  
**Τα τρία καλύτερα χαρακτηρισμένα μονοπάτια των MAPKs.** Ο μεγάλος αριθμός MAP3Ks, MAP2Ks και MAPKs δημιουργεί διακριτά οργανωμένες ομάδες, καθεμία από τις οποίες ενεργοποιείται από διαφορετικές MAP4Ks ή από τις μικρές GTPάσες Ras ή Rac/Cdc42 και παίρνει το όνομά της από το όνομα της MAPK. [155]



**Ο ρόλος των πρωτεϊνών σκαλωσιάς: εξειδίκευση και οργάνωση**

Τα διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPKs οργανώνονται σε εξειδικευμένες ομάδες (modules) με τη βοήθεια των πρωτεϊνών σκαλωσιάς. Η κάθε πρωτεΐνη σκαλωσιάς συνδέει μια διαφορετική τριάδα MAP3K/MAP2K/MAPK. Η πρώτη πρωτεΐνη σκαλωσιάς των MAPKs ανακαλύφθηκε στον *Saccharomyces cerevisiae* και ονομάστηκε **Ste5**. Δεν υπάρχει ζωικό ομόλογο του Ste5, αλλά έκτοτε ανακαλύφθηκαν πολλές πρωτεΐνες σκαλωσιάς, όπως η KSR, η JIP1-2, η MP1.

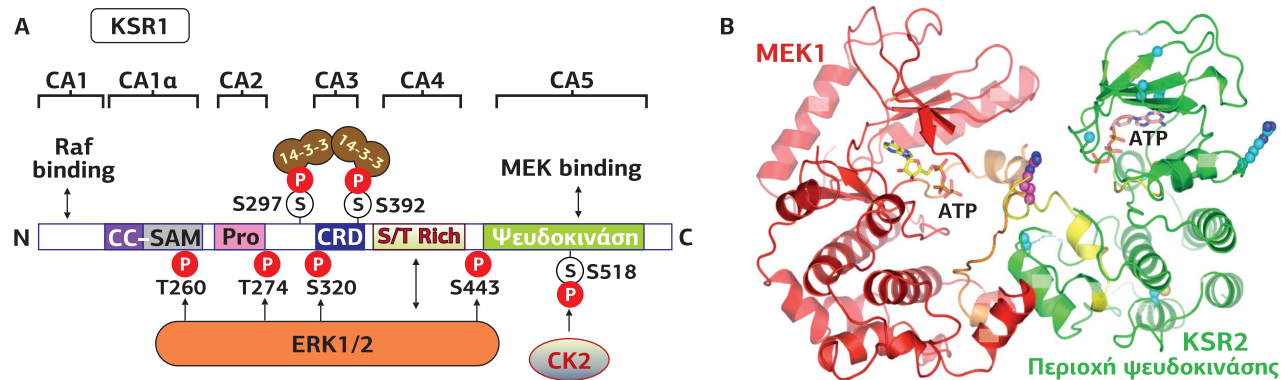
Η ονομασία **Ste** χαρακτηρίζει μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών (υποδοχών φερομονών, κινασών και πρωτεϊνών σκαλωσιών) που οργανώνουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια στους εκβλαστώντες σακχαρομύκητες. Οι Ste2 και Ste3 είναι υποδοχείς των παραγόντων σύζευξης α- και α-, αντίστοιχα. Η Ste7 είναι μια MAP2K, η Ste4 είναι η β υπομονάδα, η Ste18 είναι η γ υπομονάδα, η Ste5 είναι η πρωτεΐνη σκαλωσιών των MAPKs, η Ste11 είναι μια MAP3K, η Ste 20 είναι μια PAK/MEKK κινάση, η Ste20-like είναι μια κινάση τύπου Mst που ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης και την απόπτωση και, τέλος, η Ste12 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ομόλογος του Byr. Αρνητικές μεταλλάξεις όλων των πρωτεϊνών Ste οδηγούν σε άγονους ζυμομύκητες (sterile).

Οι πρωτεΐνες **JIP1-3** (JNK Interacting Proteins) συνδέουν την ομάδα των JNK. Είναι δραστικές μόνο ως διμερή και πιθανόν διευκολύνουν την trans-αυτοφωσφορυλίωση των κινασών των δύο ομάδων.

Η **KSR** (Kinase Suppressor of Ras) έχει ανάλογη δράση, αλλά για την ομάδα ERK1,2. Ανακαλύφθηκε το 1995 ως ρυθμιστής της σηματοδότησης των Ras στη *Drosophila* και στο *Caenorhabditis elegans*. Δύο KSR είναι παρούσες στα θηλαστικά, η KSR1 και η KSR2. Η KSR είναι μια ομόλογη της Raf ψευδοκινάση, από την οποία λείπει η κρίσιμη λυσίνη, η οποία είναι ικανή να συνδέσει το ATP. Αλληλεπιδρά με τη MAP2K (MEK) και ταυτόχρονα αποτελεί το υπόστρωμα της MAP4K C-TAK1 (Cdc25C-Associated Kinase-1). Η Cdc25C είναι μια φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης που παίζει κύριο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Αποφωσφορυλιώνει την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση Cdc2 (CDK1) επάγοντας την είσοδο στη μίτωση.

Οι **ψευδοκινάσες** είναι πρωτεΐνες που περιέχουν μια ατελή και, επομένως, ανεργή περιοχή κινάσης, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 50 ψευδοκινάσες. Όταν είναι πλήρως φωσφορυλιωμένη η KSR, το σύμπλοκο KSR-MEK1 αποσύρεται στο κυτταρόπλασμα από τις πρωτεΐνες 14-3-3 και δεν μπορεί να οργανώσει το ενεργοποιημένο από τη Ras-GTP μονοπάτι της Raf-MEK-ERK -έτσι εξηγείται και το όνομα της KSR. Μόνο έπειτα από μερική αποφωσφορυλίωση η KSR μπορεί να συνδέσει τη Raf και την ERK (Εικόνα 8.107).

Υπάρχουν πολλοί τύποι πρωτεϊνών σκαλωσιών. Άλλες δρουν ως προσαρμογείς, ενώ άλλες έχουν περισσότερες λειτουργίες. Επίσης, στοιχεία του μονοπατιού MAPK μπορούν να παίξουν τον ρόλο σκαλωσιών.



Εικόνα 8.107

**Η πρωτεΐνη σκαλωσιών KSR1.** Α. Η KSR αποτελείται από 5 διακριτές περιοχές καλά συντηρημένες στα διάφορα είδη: η NH<sub>2</sub>-τελική CA1 περιοχή 40 αμινοξέων στην οποία συνδέεται η Raf, μια περιοχή CA1α που αποτελείται από μια coiled-coil περιοχή και ένα μοτίβο SAM, η CA2 (G-protein-binding-like domain) πλούσια σε προλίνη, η CA3, μια άτυπη περιοχή C1 πλούσια σε Cys, η οποία δεσμεύεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, η CA4, μια περιοχή εύκαμπτος σύνδεσμος πλούσια σε Ser/Thr, όπου συνδέεται η ERK, και η περιοχή CA5, μια ψευδοκινάση όμοια με την καταλυτική περιοχή της Raf, όπου συνδέεται η MEK. Διακρίνονται, επίσης, οι θέσεις φωσφορυλίωσης: οι Ser392 και Ser518 είναι ιδιόσυστατα φωσφορυλιωμένες από την C-TAK1 και την CK2, αντίστοιχα, η Ser297 είναι επίσης ιδιόσυστατα φωσφορυλιωμένη από μια άγνωστη κινάση. Η παρατεταμένη ενεργοποίηση των RTKs οδηγεί μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης στη φωσφορυλίωση των Thr260, Thr274, Ser320 και Ser443 από την ERK και στην αποφωσφορυλίωση της Ser392 από την PP2A. Β. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου KSR2/MEK1. [22]

Προσοχή: η **C-TAK1** (Cdc25C-Associated Kinase), η οποία βρίσκεται ιδιόσυστατα συνδεδεμένη με την KSR, είναι διαφορετική από την **TAK1** (TGF-β Associated Kinase), η οποία δρα ως MAP3K στο μονοπάτι JNK.

- Οι πρωτεΐνες σκαλωσιών αυξάνουν την εξειδίκευση και την επιλεκτικότητα της μεταγωγής σήματος, ομαδοποιώντας διακριτές κινάσες σε μια ομάδα MAPK.
- Προσανατολίζουν και ενεργοποιούν αλλοστερικά τις συνδεδεμένες κινάσες και, συνεπώς, αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της σηματοδότησης.
- Εμποδίζουν ανεπιθύμητη διασταυρούμενη επικοινωνία με διαφορετικές ομάδες MAPKs.
- Μεσολαβούν στην ειδική επαφή με ενεργοποιητές του μονοπατιού καθορίζοντας το σήμα εισόδου.

- Επιπλέον, τοποθετούν τα σηματοδοτικά τους σύμπλοκα σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις προστατεύοντάς τα από ανεπιθύμητες επιδράσεις. Αυτό, ωστόσο, είναι εις βάρος της ενίσχυσης του σήματος, η οποία δεν είναι πιθανή σε μια ομάδα της οποίας τα στοιχεία είναι 1:1. Τα μονοπάτια MAPKs υπάρχουν και χωρίς πρωτεΐνες σκαλωσιών, όπου αυξάνεται η ενίσχυση εις βάρος της εξειδίκευσης.
- Οι πρωτεΐνες σκαλωσιών σε ορισμένες περιπτώσεις στρατολογούν και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του μονοπατιού των MAPKs, όπως φωσφατάσες.

Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες σκαλωσιών των θηλαστικών που οργανώνουν σε ομάδες τις MAPKs παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8.3**.

Πίνακας 8.3

Πρωτεΐνες σκαλωσιών που οργανώνουν ομάδες MAPKs στα θηλαστικά

Πρωτεΐνες σκαλωσιών	Χαρακτηριστικά	Μονοπάτι MAPKs
KSR	Raf-related ψευδοκινάση	Raf-MEK1-ERK1
MP1		MEK1-ERK1
JIP1,2	Αλληλεπιδρά με τον p190-RhoGEF	MLK-MKK7-JNK
JSAP1 (JIP3)		MEKK1-MKK4-JNK
MEKK1	Αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό	Raf-MKK2-ERK2
MEKK2		MEKK2-MKK7-JNK1
Φιλαμίνη	Αλληλεπιδρά με ινίδια ακτίνης	TRAF2-MKK4-JNK
β-αρρεστίνη 2	Ενεργοποιείται από την αγγειοτενσίνη II	ASK-MKK4-JNK3

## 4.2

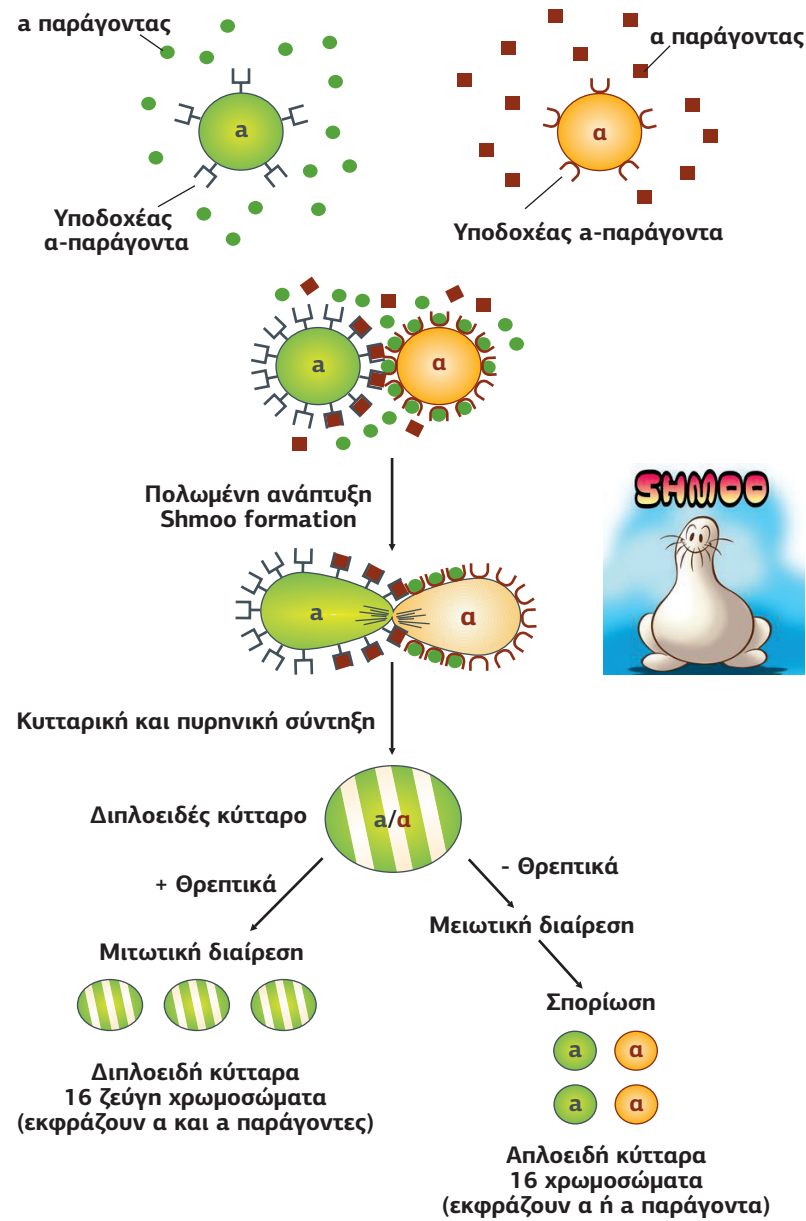
### Η ανακάλυψη των MAPKs στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*

Εκτός από την αγνή αναπαραγωγή με εκβλάστηση, οι σακχαρομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* μπορούν να αναπαράγονται και εγγενώς. Υπάρχουν δύο τύποι απλοειδών κύτταρων, τα α και τα α κύτταρα. Οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων διαφέρουν ως προς το γεγονός ότι εκκρίνουν διαφορετικές φερομόνες (στεροειδή που βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ ατόμων διαφορετικού φύλου): τα α κύτταρα εκκρίνουν α φερομόνες, οι οποίες δεσμεύονται στους υποδοχείς των α κυττάρων, και τα α κύτταρα εκκρίνουν α φερομόνες που προσδέονται στους υποδοχείς των α κυττάρων. Η έκκριση αυτή των χημικών σημάτων ενεργοποιεί τη σύζευξη δύο απλοειδών κυττάρων σε ένα διπλοειδές (Εικόνα 8.108).

Οι α- και α-φερομόνες συνδέονται στους GPCRs Ste3 και Ste2, αντίστοιχα, οι οποίοι ενεργοποιούν την ετεροτριμερή Gβγ πρωτεΐνη. Η ενεργοποιημένη Gα υπομονάδα (Gra1) ανταλλάσσει το GDP με GTP οδηγώντας στην απελευθέρωση του ετεροδιμερούς Gβγ (Ste4 και Ste18), το οποίο θα ενεργοποιήσει τη διαδικασία του ζευγαρώματος. Η Gβγ αλληλεπιδρά άμεσα με 3 τελεστές: την κινάση PAK-like (p21-activated kinase-like) ή Ste20, την πρωτεΐνη σκαλωσιών Ste5 και τον Cdc42-GEF Cdc24. Η ονομασία Ste προέρχεται από το sterile, καθώς αρνητικά μεταλλάγματα καθιστούν άγονους τους ζυμομύκητες.

Η πρωτεΐνη σκαλωσιών Ste5 παίζει έναν κεντρικό ρόλο καθώς συνδέει την Gβγ: α. με τον Cdc24, ο οποίος ενεργοποιείται και στρατολογεί τη GTPάση Cdc42 (ο Cdc24 στην αρχή της G1 βρίσκεται συνδεδεμένος με τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου Far1, μέσα στον πυρήνα όταν ο Far1 φωσφορυλιώνεται από την Fus3, το σύμπλοκο μεταναστεύει στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέεται με την Gβγ), β. με την κινάση PAK Ste20, η οποία παίζει τον ρόλο MAP4K, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί από την Cdc42-GTP και γ. με τις κινάσες MAPKs, προωθώντας την ενεργοποίηση του καταρράκτη των MAPKs: **Ste11** (MAP3K), η οποία οδηγεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της **Ste7** (MAP2K), η οποία τελικά φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί

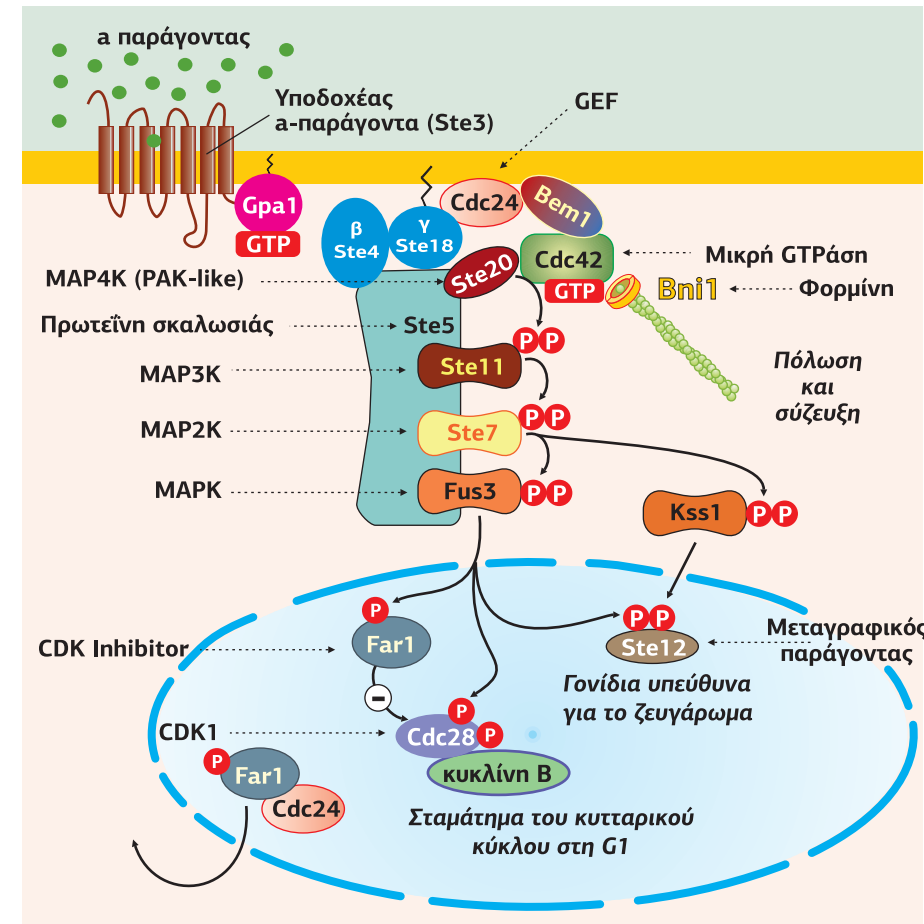
**Εικόνα 8.108**  
**Κύκλος ζωής του *Saccharomyces cerevisiae*.**  
 Εκτός από την αγενή αναπαραγωγή με εκβλάστηση, οι ζυμομύκητες μπορούν να αναπαράγονται και εγγενώς. Υπάρχουν δύο τύποι απλοειδών κυττάρων, τα *a* και τα *α* κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν διαφορετικές φερομόνες: τα *a* κύτταρα εκκρίνουν *a* φερομόνες, οι οποίες δεσμεύονται στους υποδοχείς των *a* κυττάρων, και τα *α* κύτταρα εκκρίνουν *α* φερομόνες που προσδένονται στους υποδοχείς των *a* κυττάρων. Η έκκριση αυτή των χημικών σημάτων οδηγεί στη σύζευξη των απλοειδών κυττάρων σε ένα διπλοειδές. Υπό συνθήκες αστίας, όπως έλλειψη αζώτου, τα διπλοειδή κύτταρα με μείωση οδηγούν στη δημιουργία 4 απλοειδών σπορίων.



δύο MAPKs, την **Fus3** και την **Kss1**. Μόλις ενεργοποιηθεί η Fus3, διαχωρίζεται από τον Ste5 και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Ste12, ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή περισσότερων από 200 γονιδίων. Επίσης, φωσφορυλιώνει τρεις πρόσθετους στόχους: τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου **Far1** και την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση **CDK1** (Cdc28) για το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, καθώς και τη φορμίνη **Bni1** (Bud neck involved), η οποία στρατολογείται κοντά στη Cdc42-GTP και ενεργοποιεί την πυρήνωση των ινιδίων ακτίνης, οδηγώντας στην επαναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, στην πόλωση του κυττάρου και, τελικά, στην κυτταρική σύντηξη (**Εικόνα 8.109**).

**4.3 Ενεργοποίηση της ομάδας Raf-MEK-ERK από τους υποδοχείς κινάσες Tyr**

Οι αυξητικοί παράγοντες, όπως PDGF (Platelet Derived Growth Factor) και EGF (Epidermal Growth Factor), συνδέονται στους μονομερείς υποδοχείς τους (RTKs)

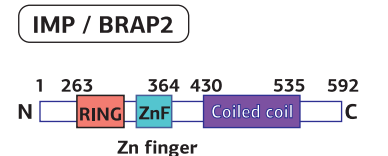


οδηγώντας στον διμερισμό και στην trans-φωσφορυλίωσή τους. Στις φωσφορυλιωμένες Tyr των RTKs συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της η πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2 σε σύμπλοκο με τον SOS, έναν RasGEF, ο οποίος ενεργοποιεί την ανταλλαγή GDP με GTP στη μικρή GTPάση Ras. Η ενεργοποιημένη Ras-GTP στρατολογεί στη μεμβράνη την πρώτη κινάση του μονοπατιού των MAPK, την κινάση Ser/Thr Raf (MAP3K).

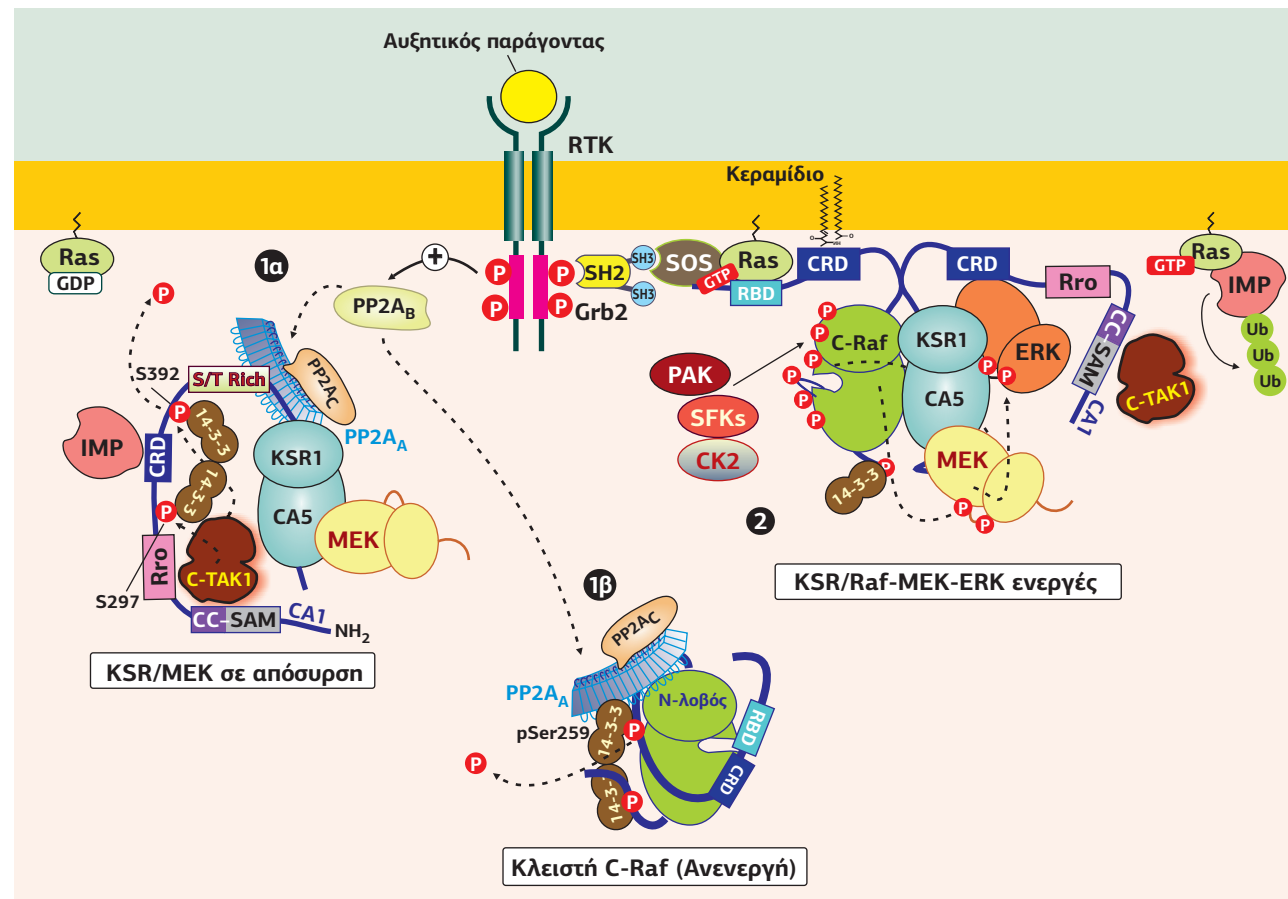
Όπως έχουμε δει (σσ. 553-554) σε κατάσταση ηρεμίας η Raf βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην αναδιπλωμένη μορφή της, συνδεδεμένη μέσω δύο φωσφορυλιωμένων καταλοίπων Ser με τις πρωτεΐνες 14-3-3. Σε αυτήν τη διαμόρφωση οι θέσεις σύνδεσης της Ras, αλλά και οι θέσεις σύνδεσης των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης δεν είναι εκτεθειμένες. Στη Raf βρίσκονται, επίσης, συνδεδεμένες οι δύο κεντρικές υπομονάδες της PP2A (η καταλυτική PP2A<sub>C</sub> και η δομική PP2A<sub>A</sub>), αλλά το ένζυμο παραμένει ανενεργό χωρίς την παρουσία της ρυθμιστικής B υπομονάδας (PP2A<sub>B</sub>). Η διέγερση του αυξητικού παράγοντα ενεργοποιεί την Ras και, ταυτόχρονα, στρατολογεί τη B-υπομονάδα στη φωσφατάση PP2A, η οποία ενεργοποιείται και αποφωσφορυλιώνει τη Raf, οδηγώντας σε μια ανοικτή διαμόρφωση που επιτρέπει τη σύνδεσή της στα λιπίδια της μεμβράνης και στη Ras-GTP.

Στην κατάσταση ηρεμίας η κινάση MEK1/2 (MAP/ERK Kinase), μια MAP2K, είναι ιδιόσυστατα συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη σκαλωσιάς KSR, η οποία λόγω της φωσφορυλιωμένης της κατάστασης βρίσκεται σε απόσυρση στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες 14-3-3 και την IMP (Impedes Mitogenic signal Propagation), μια E3 λιγάση της ουβικουιτίνης, η οποία εμποδίζει τη μετάδοση του μιτογόνου σήματος. Στη διαμόρφωση αυτοαναστολής η άτυπη, πλούσια σε Cys, περιοχή C1, η οποία απαιτείται για τη στρατολόγηση της KSR στη μεμβράνη, παραμένει κρυμμένη. Η KSR1, επίσης, ιδιόσυστατα αλληλεπιδρά με την καταλυτική και τη δομική υπομονάδα της φωσφατάσης PP2A (PP2A<sub>C</sub> και PP2A<sub>A</sub>) και με την κινάση Ser/Thr C-TAK1 (Cdc25C-Associated Kinase 1). Η ενεργοποίηση του RTK

**Εικόνα 8.109**  
**Το μονοπάτι απόκρισης στη φερομόνη (*a* ή *α* mating factor) του *Saccharomyces cerevisiae*.** Η *a* φερομόνη προσδένεται στον GPCR (Ste3) και ενεργοποιείται η Gαβγ πρωτεΐνη. Η υπομονάδα Gβγ (Ste4, Ste18) αποχωρίζεται και ενεργοποιεί τον Cdc24, έναν Cdc42GEF, που ενεργοποιεί τη μικρή μονομερή G πρωτεΐνη Cdc42, υπεύθυνη για τον έλεγχο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού ακτίνης μέσω της φορμίνης Bni1, με αποτέλεσμα την αλλαγή του σχήματος του κυττάρου, ώστε να πολωθεί και να είναι ικανό για σύζευξη. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται ο καταρράκτης των MAPK (Ste11, Ste7, Fus3/Kss1), ο οποίος οδηγεί: *a*. σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 με ενεργοποίηση του Far1, ενός αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης Cdc28, και *β*. στη σύζευξη, με φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα Ste12 και από τις δύο MAPKs. Η Cdc24 σταθεροποιείται στην πλασματική μεμβράνη μέσω της σύνδεσης με την πρωτεΐνη προσαρμογής Bem1 (Bud emergence mediator), η οποία συνδέεται και με την Cdc42-GTP. Στη συνέχεια, η Cdc42-GTP ενεργοποιεί τη φορμίνη Bni1 (Bud neck involved).



Η IMP, γνωστή και ως BRAP2 (BRCA1-Associated Protein 2), αναγνωρίστηκε αρχικά ως η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που αναγνωρίζει το μοτίβο NLS της BRCA1, το καλύπτει και εμποδίζει με αυτόν τον τρόπο την BRCA1 να εισέλθει στον πυρήνα.



**Εικόνα 8.110**

**Ενεργοποίηση της ομάδας Raf-MEK-ERK από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.** 1. Σε κατάσταση ηρεμίας η ανενεργή KSR βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη διαμόρφωση (από την C-TAK1) στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένη με το διμερές 14-3-3, την A και C υπομονάδα της φωσφατάσης PP2A, την κινάση MEK1/2 και τη λιγάση της ουβικουτίνης IMP. Επίσης, η Raf βρίσκεται και αυτή σε διαμόρφωση αυτο-αναστολής στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένη με το διμερές 14-3-3. Η ενεργοποίηση του EGF-R οδηγεί στην ενεργοποιημένη Ras-GTP, η οποία επάγει την αποφωσφορυλίωση της Ser392 της KSR, μέσω της σύνδεσης της ρυθμιστικής B-υπομονάδας της PP2A. Επιπλέον, η Ras-GTP επάγει τη στρατολόγηση στη μεμβράνη και την αυτο-ουβικουτίνωση της IMP. 2. Ως αποτέλεσμα, η KSR στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέεται μέσω της περιοχής CA3 (άντη C1) στα φωσφολιπίδια-κεραμίδια και μέσω της περιοχής CA1 με την Raf και την ERK1/2. 3. Παρατεταμένη έκθεση μιτογόνου σήματος οδηγεί στην απεναιοθητοποίηση μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Η ενεργοποιημένη ERK1/2 είναι ικανή να φωσφορυλιώσει την KSR και την Raf σε διάφορες θέσεις, επάγοντας την αποσύνδεση των συστατικών του συμπλόκου KSR/ Raf-MEK-ERK. [7] [89] [59]

οδηγεί στη μεταφορά της KSR στη μεμβράνη, προωθώντας την έκθεση της περιοχής C1 και απελευθερώνοντας την KSR από την IMP. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των IMP/KSR διακόπτεται από τη Ras-GTP, η οποία συνδέεται άμεσα στην IMP επάγοντας την αυτο-ουβικουτίνωσή της. Η ενεργοποίηση της Ras, επίσης, προκαλεί τη σύνδεση της ρυθμιστικής B-υπομονάδας στις συνδεδεμένες με την KSR PP2A<sub>C</sub> και PP2A<sub>A</sub> συμπληρώνοντας το ολοένζυμο, το οποίο είναι πλέον ικανό να αποφωσφορυλιώσει μία από τις θέσεις σύνδεσης της 14-3-3 στην KSR. Η απομάκρυνση της 14-3-3 οδηγεί στη στρατολόγηση της KSR στην πλασματική μεμβράνη και στη σύνδεση της ERK στην KSR. Στη μεμβράνη η KSR αλληλεπιδρά και με τη Raf, ομαδοποιώντας και τις τρεις κινάσες Raf-MEK-ERK.

Ως αποτέλεσμα, το μονοπάτι των MAPKs ενεργοποιείται: η ενεργοποιημένη Raf φωσφορυλιώνει σε δύο κατάλοιπα Ser τη MEK και, στη συνέχεια, η MEK φωσφορυλιώνει στην Thr183 και στην Tyr185 την ERK. Μετά την ενεργοποίηση το σύμπλεγμα διαχωρίζεται. Η KSR φωσφορυλιώνεται από την κινάση C-TAK1 στη Ser392, σημείο σύνδεσης της 14-3-3, και επανέρχεται στο κυτταρόπλασμα.

**4.4 Μετάδοση του μηνύματος από την ERK**

Η ERK1/2, όπως και όλες οι MAPKs, φωσφορυλιώνει υποστρώματα που περιέχουν τη συναινετική αλληλουχία Ser/Thr-Pro. Επειδή όμως η αλληλουχία αυτή είναι πολύ διαδεδομένη, εξειδικεύει τα υποστρώματά της απαιτώντας επιπλέον αλληλεπιδράσεις μέσω

των περιοχών αγκυροβόλια (Docking domains) που περιέχει. Η κοινή, σε όλες τις MAPKs, περιοχή αγκυροβόλιο (CD, Common Docking Domain) είναι αρνητικά φορτισμένη και αλληλεπιδρά με τις θετικά φορτισμένες DIM περιοχές (D-Interacting Motifs) των υποστρωμάτων.

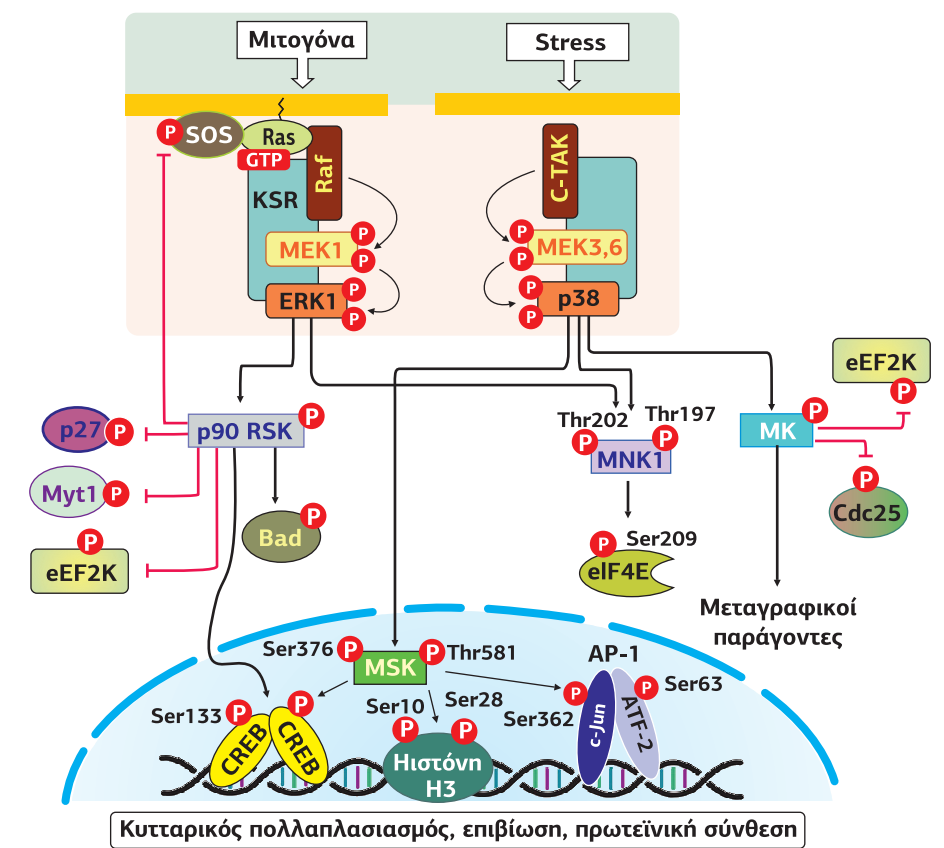
Τα υποστρώματα των ERK1/2 είναι δύο ειδών: κυτταροπλασματικές κινάσες και πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες.

**MAP kinase-activated protein kinases (MAPKAPs)**

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωρισθεί 11 τύποι κινάσων που ενεργοποιούνται από τις MAPKs (ERK και p38), οι οποίες ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 8.111):

- **RSK1-4** (Ribosomal S6 Kinases), επίσης γνωστές και ως p90-RSK ή MAPKAP κινάσες-1, οι οποίες εκφράζονται σε τέσσερις ισομορφές.
- **MSKs** (Mitogen and Stress-activated Kinases), οι οποίες εκφράζονται σε δύο ισομορφές (MSK1, MSK2).
- **MNK1-4** (MAPK-interacting Kinases), οι οποίες εκφράζονται σε τέσσερις ισομορφές.
- **MK2, 3 και 5** (ή MAPKAPK-2, MAPKAPK-3, MAPKAPK-5).

Η κύρια λειτουργία των κινάσων MAPKAP είναι η ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης ως απάντηση σε μιτογόνα (ERK) ή στρεσογόνα (p38) σήματα. Για αυτόν τον σκοπό, οι MAPKAPs φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν επιπλέον πρωτεϊνικές κινάσες ή ακόμη και αλληλουχικές κινάσων, μεταγραφικούς παράγοντες και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Έτσι, τα κύτταρα των θηλαστικών μπορεί να περιλαμβάνουν περισσότερα από 6 βήματα αλληλοδιάδοχων φωσφορυλίσεων. Οι ζυμομύκητες δεν εκφράζουν MAPKAPs φανερώνοντας μια πιο απλή οργάνωση.



**Εικόνα 8.111**

**Δράσεις των κινάσων MAPKAP.** Ως απάντηση σε μιτογόνα και στρεσογόνα σήματα που μεταφέρονται στις ομάδες των MAPKs (ERK και p38), ενεργοποιούνται οι κινάσες MAPKAP οι οποίες μεταφέρουν το μήνυμα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης του κυττάρου. Για αυτόν τον σκοπό διεγείρουν τη μεταγραφή των γονιδίων πρώιμης απόκρισης και επιβίωσης και απενεργοποιούν τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p27<sup>KIP</sup> και Myt1, καθώς επίσης και τη φωσφατάση Cdc25, η οποία ενεργοποιώντας τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ταυτόχρονα προωθούν τη μετάφραση του mRNA απενεργοποιώντας τον αναστολέα της μετάφρασης, την κινάση eEF2K, και ενεργοποιώντας τον παράγοντα της μετάφρασης eIF4E. Η αναστολή του RasGEF mSOS από την κινάση p90 RSK παρέχει έναν έλεγχο αρνητικής ανατροφοδότησης από το μονοπάτι Raf-MEK-ERK.

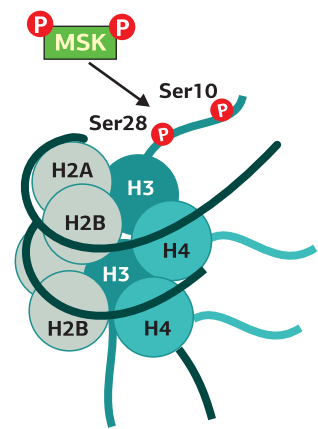
Οι **κινάσες RSK** πήραν λανθασμένα το όνομά τους από την πρωτεΐνη S6 της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, η οποία όπως αποδείχθηκε αργότερα δεν είναι το κύριο υπόστρωμά τους. Οι RSKs ή p90<sup>RSK</sup> διαφέρουν από τις κινάσες S6Ks ή p70<sup>S6K</sup>, οι οποίες έχουν ως κύριο υπόστρωμα τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 και δεν φωσφορυλιώνονται οι ίδιες από τις MAPKs (για λεπτομέρειες σχετικά με τις S6K βλ. σελ. 436). Στον άνθρωπο εκφράζονται 4 ισομορφές (RSK1-4).

Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της οικογένειας RSK είναι η παρουσία δύο λειτουργικών και μη ταυτόσημων καταλυτικών περιοχών κινάσης, μιας PKC- και μιας CaMK-ομόλογης περιοχής. Θεωρείται ότι, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, τα γονίδια για δύο ξεχωριστές πρωτεϊνικές κινάσες συγχωνεύτηκαν, δημιουργώντας μια απλή πρωτεϊνική κινάση, ικανή να δέχεται από τις ERK1/2 ένα σήμα ενεργοποίησης στην περιοχή CTKD του (C-Terminal Kinase Domain) και να το μεταδίδει με ακρίβεια στην περιοχή NTKD (N-Terminal Kinase Domain). Οι δύο περιοχές κινάσης συνδέονται με μια περιοχή συνδέτη περίπου 100 αμινοξέων, που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της NTKD. Δηλαδή, η ενεργοποιημένη CTKD φωσφορυλιώνει την περιοχή συνδέτη, η οποία αλλάζει διαμόρφωση και ενεργοποιεί την NTKD, υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος. Επειδή διαθέτουν δύο ξεχωριστές καταλυτικές περιοχές, οι RSKs αποτελούν μέρος δύο διαφορετικών οικογενειών πρωτεϊνικών κινάσων. Η NTKD ανήκει στην οικογένεια AGC, ενώ η CTKD ανήκει στην οικογένεια CAMK.

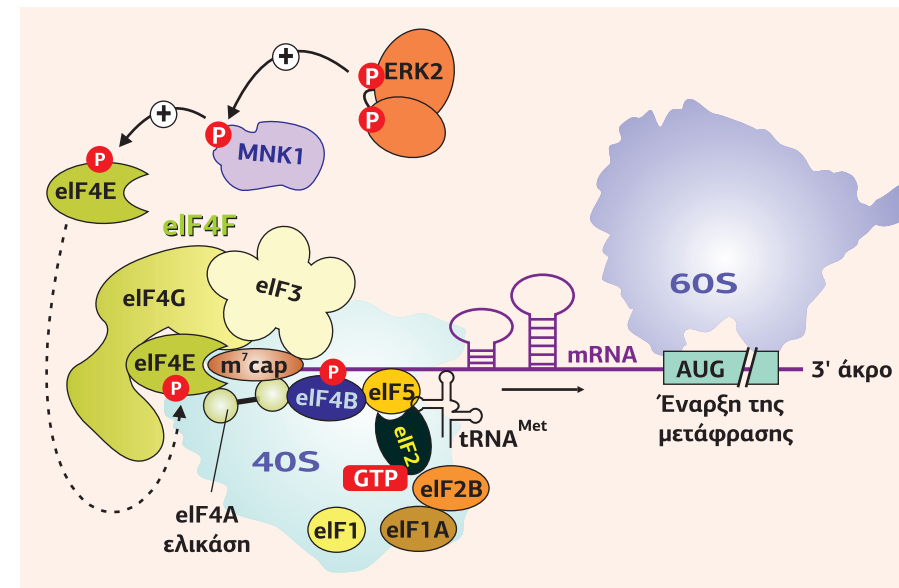
Οι RSKs αλληλεπιδρούν με την ενεργοποιημένη ERK1/2 μέσω του COOH-τελικού τους άκρου (Εικόνα 8.113). Κατά την ενεργοποίησή τους από τις ERK1/2 οι RSKs συσσωρεύονται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν τη μεταγραφή των γονιδίων άμεσης απόκρισης (early response genes) ως μια άμεση αντίδραση στα μιτογόνα σήματα και στους στρεσογόνους παράγοντες. Τα τυπικά υποστρώματα των RSKs είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες SRF (Serum Response Factor), CREB (cAMP Response Element Binding protein), cFos (ρυθμίζει την έκφραση της κυκλίνης D1 κατά τη μετάβαση από την G1 στη S) και cJun, καθώς και παράγοντες που ρυθμίζουν τη βιοσύνθεση του ριβοσωμικού RNA. Επιπλέον, οι RSKs προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση απενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bad, και διεγείροντας τη μεταγραφή αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Τελικά, οι RSKs παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου: απενεργοποιούν τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου p27<sup>KIP</sup> και την κινάση Myt1, μειώνοντας τη διάρκεια της φάσης G1 και προωθώντας τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S.

Οι **κινάσες MSK** εκφράζονται ευρέως και είναι ανάλογες με τις RSKs. Συναντώνται κυρίως στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο CREB, ο NF-κB και ο ATF1 (Activating Transcription Factor 1), καθώς και την ιστόνη H3. Καθώς η φωσφορυλίωση της H3 εξασθενεί την αλληλεπίδραση ιστόνης-DNA στο νουκλεόσωμα, είναι ένα σημαντικό βήμα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων πρώιμης απόκρισης.

Οι **κινάσες MNK** ενεργοποιούνται από τις ERK και p38. Η πιο γνωστή λειτουργία της ισομορφής MNK1 είναι η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα eIF4E. Τα σήματα που ξεκινούν από τους αυξητικούς παράγοντες απαιτούν έναν αυξημένο ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης και μια επιλεκτική μετάφραση ειδικών mRNA. Η ERK συμμετέχει σε αυτή τη διαδικασία ενεργοποιώντας την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Για το άνοιγμα της φουρκέτας στο 5' άκρο του mRNA, ώστε αυτό να μπορέσει να προσδεθεί στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S, απαιτείται η πρόσδεση στο κάλυμμα του mRNA του παράγοντα έναρξης eIF4E. Όταν ο eIF4E συνδεθεί στο σύμπλοκο έναρξης που βρίσκεται ήδη συνδεδεμένο στο κάλυμμα του mRNA, και αποτελείται από τους παράγοντες eIF4G, eIF4A και eIF4B, η φουρκέτα ανοίγει και το mRNA συνδέεται στην 40S ριβοσωμική υπομονάδα. Η MNK1 (MAP kinase integrating kinase-1), όταν φωσφορυλιωθεί από την ERK, φωσφορυλιώνει τον eIF4E, επιτρέποντας την πρόσδεσή του στα υπόλοιπα συστατικά του συμπλόκου έναρξης mRNA (Εικόνα 8.112). Η απομάκρυνση του

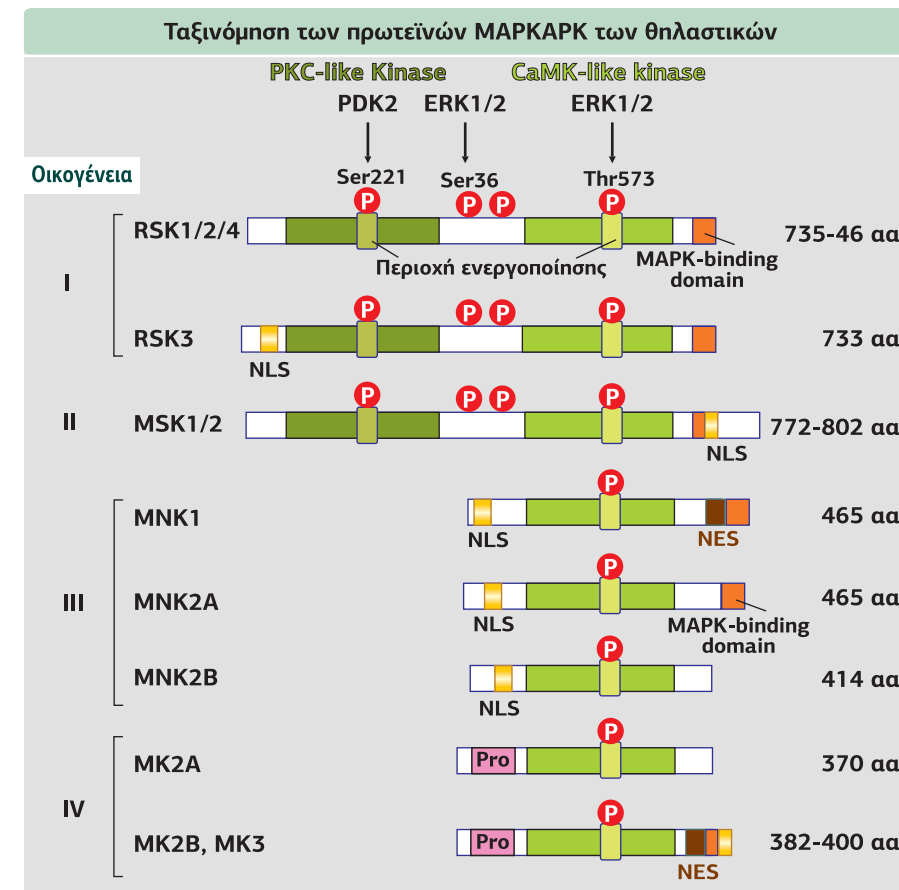


Φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 από την κινάση MSK



eIF4E από την 4E-BP1 συμβαίνει έπειτα από φωσφορυλίωση της 4E-BP1 από το σύμπλοκο TORC1 (βλ. Εικόνα 7.36).

Οι **κινάσες MK** αποτελούν υπόστρωμα μόνο της p38. Έχουν το ίδιο αποτέλεσμα με τις MNKs, φωσφορυλιώνοντας και απενεργοποιώντας την κινάση eEF2K, έναν ισχυρό καταστολέα της μετάφρασης. Επιπλέον, διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο φωσφορυλιώνοντας τη φωσφατάση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων Cdc25, σταθεροποιώντας το mRNA και, όπως και οι RSK και MSK, ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν τα γονίδια πρώιμης απόκρισης.



**Εικόνα 8.112**  
**Ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης από την ERK.** Η ERK προκαλεί τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της κινάσης MNK1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E. Αυτός αλλάζει διαμόρφωση και ενεργοποιεί το σύμπλοκο έναρξης (eIF4G, eIF4A, eIF4B) στην 5' καλύπτρα του mRNA, το οποίο στη συνέχεια ανοίγει την έλικα αναδίπλωσης, επιτρέποντας την πρόσδεση του mRNA στη ριβοσωμική 40S υπομονάδα. [59]

**Εικόνα 8.113**  
**Δομή των κινάσων MAPKAP.** Οι κινάσες MAPKAP ταξινομούνται σε 4 ομάδες, τις RSKs, τις MSKs, τις MNKs και τις MKs. Οι RSKs και MSKs περιέχουν δύο περιοχές κινάσης Ser/Thr, μια PKC- και μια CaMK-ομόλογη περιοχή. Διακρίνονται τα μοτίβα σύνδεσης στις περιοχές αγκυροβόλια (docking domains) των MAPKs, καθώς και οι περιοχές NLS (Nuclear Localization Signals) που τις προσανατολίζουν στον πυρήνα. Οι ERK και p38 φωσφορυλιώνουν μόνον την COOH-τελική περιοχή της CaM-like κινάσης.

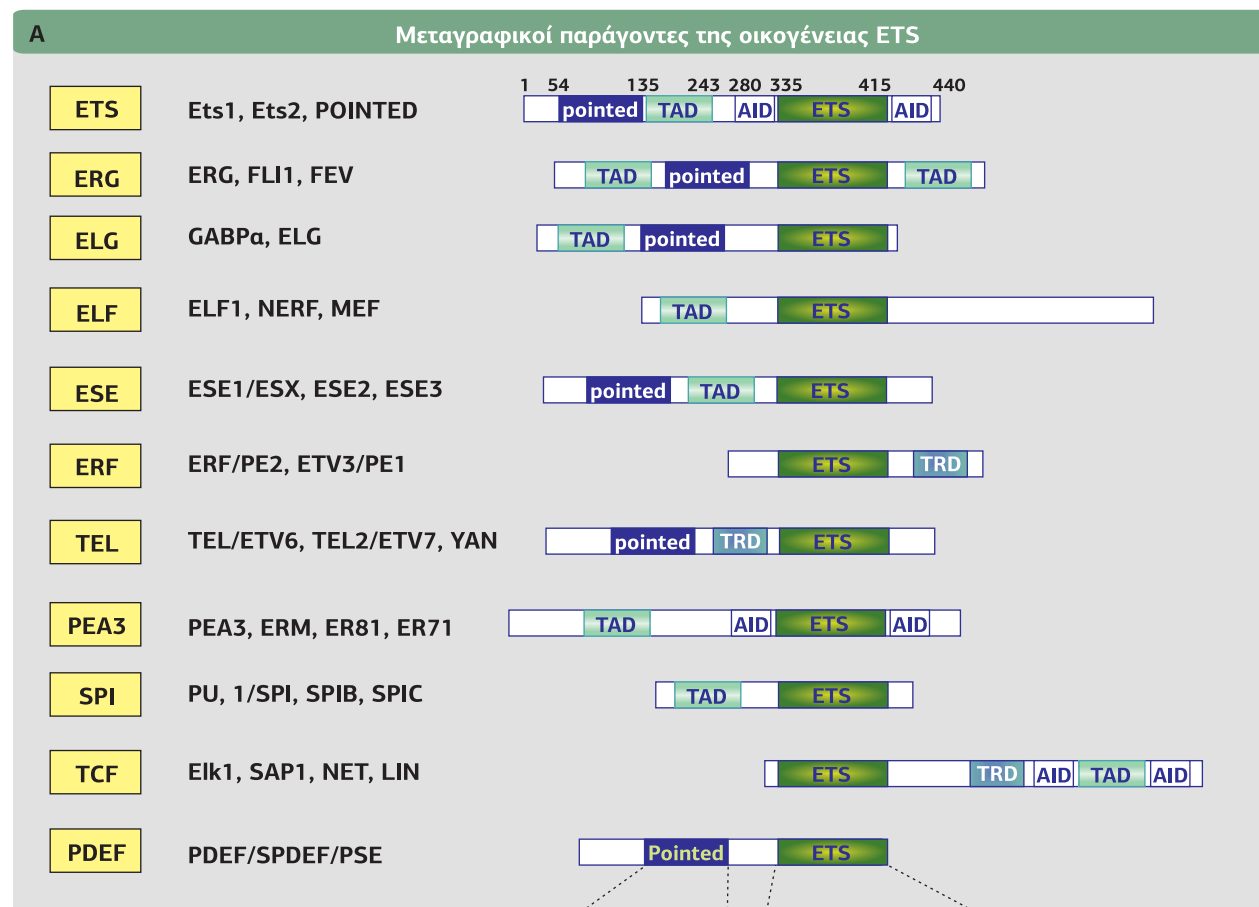


### Μεταγραφικοί παράγοντες - υποστρώματα των MAPKs

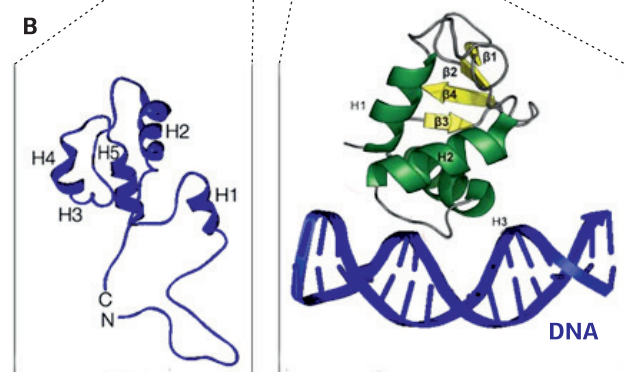
Όλες οι MAPKs, από τους ζυμομύκητες έως τον άνθρωπο, φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω των κινασών MAPKAP και, συνεπώς, ελέγχουν τη μεταγραφική δραστηριότητα ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων.

Οι κύριοι στόχοι είναι τα **γονίδια πρώιμης απόκρισης** (early response genes), όπως *c-fos*, *c-myc* και *c-jun*, τα οποία ενεργοποιούνται σε 20 min από τη διέγερση των υποδοχέων. Η ενεργοποίησή τους είναι παροδική και συμβαίνει πριν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που συνδέονται στους υποκινητές αυτών των γονιδίων περιέχουν εκτός από τη συναινετική αλληλουχία Ser/Thr-Pro, που αναγνωρίζεται από τις MAPKs, και θέσεις σύνδεσης στις περιοχές αγκυροβόλια των MAPKs προσδίδοντας επιπλέον εξειδίκευση. Η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων από τις MAPKs οδηγεί στην ενεργοποίηση ή στην απενεργοποίησή τους, ρυθμίζοντας μία από τις παρακάτω ιδιότητές τους:

TAD: Transcriptional Activation Domain, ETS: DNA binding domain, Pointed: basic helix-loop-helix pointed domain, TRD: Transcriptional Repressor Domain, AID: Autoinhibition Domain.



**Εικόνα 8.114**  
Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας ETS. Α. Ταξινόμηση και δομικές περιοχές των μεταγραφικών παραγόντων ETS. Β. Κρυσταλλική δομή των περιοχών PNT και ETS. Η περιοχή ETS αποτελείται από 85 αμινοξέα που δημιουργούν ένα 4 αντιπαράλληλων κλώνων β-πτυχωτό φύλλο που περιβάλλεται από τρεις α-έλικες (H1, H2, H3) σε μια διαμόρφωση helix-turn-helix. Η περιοχή ETS συνδέεται μέσω της H3 α-έλικας σε ~15 bp dsDNA με εξειδίκευση στις περιοχές του DNA EBSs (Ets-Binding Sites). [168] [34]



- Σύνδεση στο DNA.
- Ικανότητα trans-ενεργοποίησης ή trans-καταστολής.
- Αλληλεπιδράσεις με μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς.
- Είσοδος και έξοδος από τον πυρήνα.
- Αποικοδόμηση μέσω ουβικουιλίνης.

Ποια από αυτές τις δράσεις θα κυριαρχήσει εξαρτάται από το είδος του μεταγραφικού παράγοντα, την ισομορφία της MAPK, καθώς και τον κυτταρικό τύπο.

### Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας ETS

Η οικογένεια των ETS περιορίζεται στα μετάρια και συνεπώς αντιπροσωπεύει μια εξελικτικά πρόσφατη κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων. Το όνομά τους προήλθε από τον ιό E26 της ερυθροβλάστωσης των πτηνών, όπου ένας από αυτούς τους παράγοντες βρέθηκε να εκφράζεται ως ογκογονίδιο *v-ets* (erythroblast transformation-specific ή e twenty-six).

Στα θηλαστικά η οικογένεια ETS περιλαμβάνει περίπου 30 μέλη, τα οποία ταξινομούνται σε 10 υποοικογένειες, ανάλογα με την ομολογία της αλληλουχίας τους και την παρουσία επιπλέον περιοχών, οι οποίες συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή στη μεταγραφική ρύθμιση (**Εικόνα 8.114**).

Οι ETS χαρακτηρίζονται από μια **περιοχή ETS** με δομή helix-loop-helix που χρησιμεύει στη σύνδεση στο DNA, αλλά και στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Πολλές υποοικογένειες ETS (Ets, ERG, ELG, ESE, TEL και PDEF) περιέχουν μια περιοχή **Pointed**, η οποία βρίσκεται στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της περιοχής ETS, είναι όμοια με την περιοχή SAM, αποτελείται από 5 α-έλικες και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Η περιοχή Pointed πήρε το όνομά της από μια ομόλογη περιοχή που πρωτοανακαλύφθηκε στον Ets-like μεταγραφικό παράγοντα Pointed (Pnt) της *Drosophila*. Ορισμένες υποοικογένειες (TEL, ERF and TCF) περιέχουν μια περιοχή καταστολής της μεταγραφής, **TRD** (Transcription Repressor Domain), ενώ η πλειοψηφία των ETS (ETS, ERG, ELG, PEA3, ESE, SPI and TCF) περιέχουν μια περιοχή **TAD** (Trans-Activation Domain), η οποία αλληλεπιδρά με το DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Η περιοχή TRD περιέχει λυσίνες, που αποτελούν στόχο SUMOύλιωσης, μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που ενισχύει την ανασταλτική δράση της περιοχής TRD.

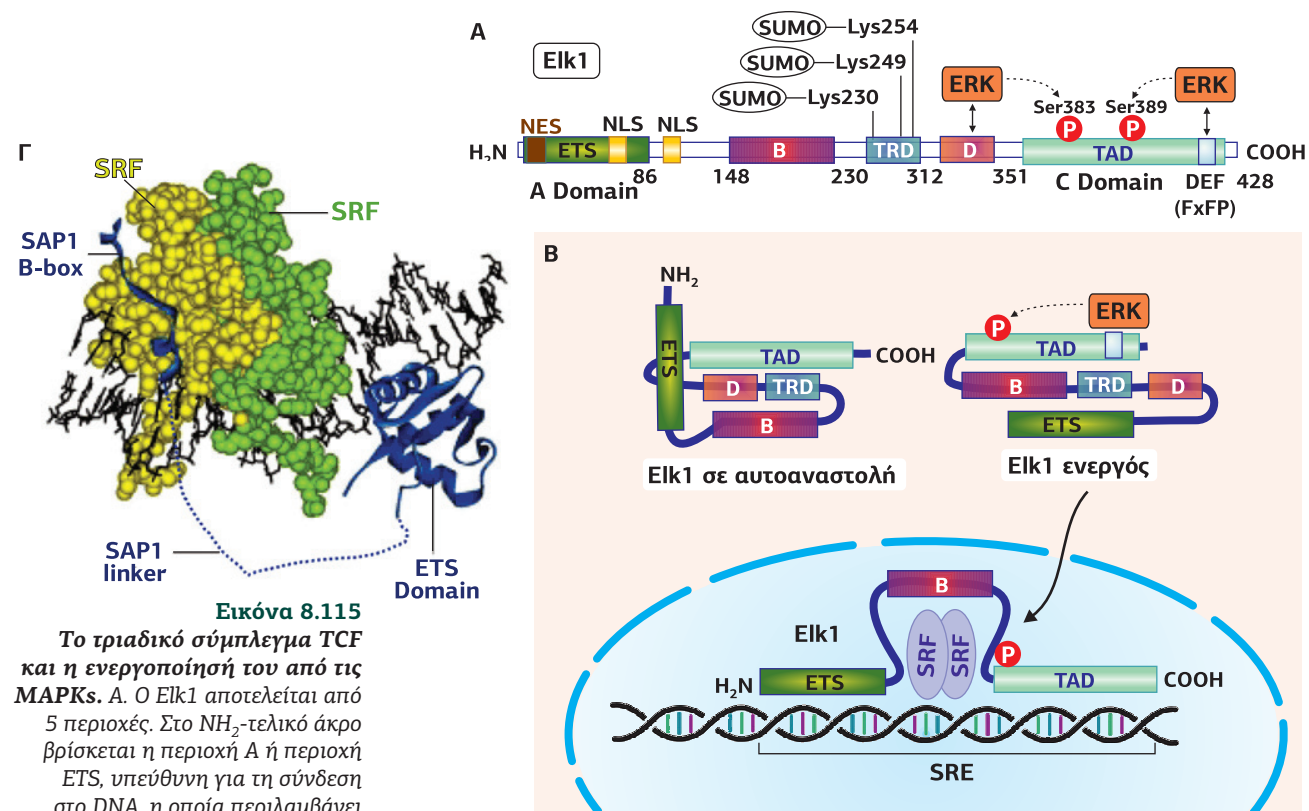
Όλοι οι ETS, με εξαίρεση τον GABPa, συνδέονται στο DNA ως μονομερή και βρίσκονται στην κατάσταση ηρεμίας σε αυτοαναστολή μέσω δύο περιοχών α-έλικας **AIDs** (Autoinhibitory Domains), οι οποίες περιβάλλουν την περιοχή ETS. Οι περιοχές AIDs έπειτα από φωσφορυλίωση ή αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες αίρουν την αναστολή που ασκούν.

Η δραστηριότητα ορισμένων ETS ρυθμίζεται επιπλέον μέσω υποκυτταρικής τοποθέτησης. Για παράδειγμα, ο YAN και ο TEL (μέλη της υποοικογένειας TEL), ο NET (ή SAP2, ένα μέλος της υποοικογένειας TCF), ο Elk και ο ERF περιέχουν επιπλέον μια περιοχή **NES** (Nuclear Export Sequence), η οποία ρυθμίζεται από κινάσες MAPKs.

Όπως οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες, έτσι και οι ETS ενεργοποιούνται από σήματα εισόδου που μεταβάλλουν τη διαμόρφωσή τους από μια ανενεργή σε μια ενεργή κατάσταση. Αυτά τα σήματα εισόδου είναι είτε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης είτε φωσφορυλιώσεις, οι οποίες αποκαλύπτουν την "κρυμμένη" περιοχή ETS. Ανάλογα με την ισομορφία, οι ETS φωσφορυλιώνονται εξειδικευμένα από συγκεκριμένες MAPKs, σε ορισμένες περιπτώσεις ταυτόχρονα από περισσότερες από μία MAP κινάση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση έχει διεγερτικό αποτέλεσμα στη δραστηριότητα των ETS, παρότι υπάρχουν εξαιρέσεις, καθώς ορισμένοι ETS που δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής απενεργοποιούνται από τη φωσφορυλίωση. Όπως και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι ETS είναι ενεργοί μόνο όταν συγκροτήσουν συμπλέγματα όχι μόνο με μεταγραφικούς συν-τροποποιητές, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών CBP/p300, αλλά και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Ένα παράδειγμα που καταδεικνύει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στους ETS

**ELF** (E74-Like Factor),  
**ELG** (Ets Like Gene),  
**ER81** (Ets Related Protein 81),  
**ERF** (Ets Repressor Factor),  
**ERG** (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related),  
**ERM** (Ets Related Molecule),  
**ESE** (Epithelial Specific Ets),  
**Ets** (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog),  
**ETV** (ETS Variant gene),  
**FLI1** (Friend Leukemia virus Integration 1),  
**FEV** (Fifth Ewing Variant),  
**GABPa** (GA repeat Binding Protein-a),  
**LIN** (abnormal cell lineage),  
**MEF** (Myeloid ELF1-like Factor),  
**NERF** (New Ets-Related Factor),  
**PEA3** (Polyomavirus Enhancer Activator-3),  
**PDEF** (Prostate Derived ETS transcription factor),  
**PSE** (Prostate epithelium-Specific ETS),  
**SAP** (Serum response factor Accessory Protein),  
**SPDEF** (SAM Pointed Domain containing Ets transcription factor),  
**SPI** (Spleen factor forming virus Proviral Integration oncogene),  
**TEL** (Translocation Ets Leukemia),  
**TCF** (Ternary Complex Factor).



Εικόνα 8.115

Το τριαδικό σύμπλεγμα TCF και η ενεργοποίησή του από τις MAPKs. Α. Ο Elk1 αποτελείται από 5 περιοχές. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή A ή περιοχή ETS, υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA, η οποία περιλαμβάνει επίσης ένα μοτίβο NLS και ένα μοτίβο NES, υπεύθυνα για την είσοδο και την έξοδο του Elk1 στον πυρήνα. Η περιοχή B (ή B-box) είναι μια περιοχή zinc finger 40 aa, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση στον διμερή μεταγραφικό παράγοντα SRF. Η περιοχή R (ή TRD) καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του Elk1. Αυτή η περιοχή περιέχει τις λυσίνες, πημο αποτελούν στόχο SUMOύλλιωσης, μια μεταμεταφραστική τροποποίηση που ενισχύει την ανασταλτική δράση της περιοχής TRD. Η περιοχή D παίζει έναν ρόλο κλειδί στη σύνδεση της ενεργής MAPK. Στο COOH-τελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή C ή TAD, η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται από τις MAPKs, όπως η Ser383 και Ser389, και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Τέλος, η περιοχή DEF (FxP motif) αποτελεί μια επιπλέον θέση πρόσδεσης της κινάσης ERK. Β. Η δημιουργία του τριαδικού συμπλέγματος Elk1-SRF-SRE, έπειτα από φωσφορυλίωση του Elk1 από την κινάση ERK. Γ. Ο διμερής SRF (κιτρινο και πράσινο), συνδεδεμένος με την B-box περιοχή του παράγοντα SAP1. [197] [168]

και σε άλλους παράγοντες είναι το τριαδικό σύμπλεγμα TCF (Ternary-Complex Factors). Για τη δημιουργία του TCF, ο κύριος παράγοντας είναι ο Elk1 (Ets-like) ή ο SAP1,2 (SRF-Accessory Proteins), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με έναν άλλο μεταγραφικό παράγοντα, τον ομοδιμερή SRF (Serum Response Factor), ο οποίος είναι ιδιόσυστατα συνδεδεμένος στο SRE (Serum Response Element) του υποκινητή (promoter) του *c-fos*.

Ο καλύτερα χαρακτηρισμένος στόχος του Elk1 είναι το πρωτο-ογκογονίδιο *c-fos*, του οποίου ελέγχει τη μεταγραφή μέσω της σύνδεσής του στο SRE του υποκινητή του γονιδίου. Για να συνδεθεί όμως στο SRE, πρέπει πρώτα να αλληλεπιδράσει με τον ομοδιμερή SRF, ο οποίος είναι ιδιόσυστατα συνδεδεμένος στο SRE και είναι ικανός να στρατολογήσει τον Elk1, όταν βρίσκεται στην ενεργή, ανοιχτή του διαμόρφωση, έπειτα από φωσφορυλίωση από τις MAPKs, ERK, JNK και p38 (ο SAP1,2 φωσφορυλιώνεται μόνο από την κινάση p38). Ως αποτέλεσμα, σχηματίζεται το τριαδικό σύμπλοκο TCF, που αποτελείται από τον Elk1, τον SRF και το SRE (Εικόνα 8.115Α).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ETS φωσφορυλιώνονται όχι μόνο από τις MAPKs αλλά και από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και φυσικά αποτελούν υποστρώματα φωσφατασών που σταματούν το σήμα των ETS. Επιπλέον, όπως οι ETS, έτσι και ο SRF φωσφορυλιώνονται και από τη MAPKAP κινάση RSK. Συνεπώς, ο έλεγχος της δραστηριότητας του TCF δείχνει με έναν ξεκάθαρο τρόπο ότι η μεταγραφική ρύθμιση αντιπροσωπεύει μια σύνθετη διαδικασία, όπου το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη διέγερση ενός πρωτεϊνικού δικτύου παρά από ένα απλό σηματοδοτικό μονοπάτι.

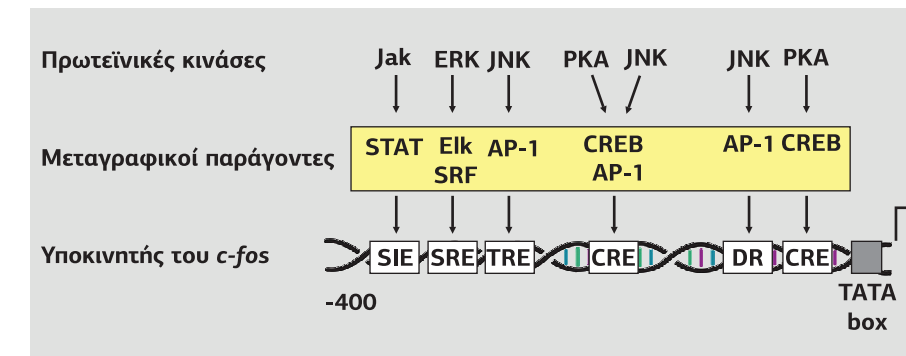
Έως σήμερα δεν είναι πλήρως κατανοητές οι φυσιολογικές λειτουργίες των ETS. Σχετικά γνωστός είναι ο ρόλος τους στις διαδικασίες της ανάπτυξης και της αναγέννησης, όπως η δημιουργία αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση), η αιμοποίηση, καθώς και η νευρωνική διαφοροποίηση.

#### Μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AP-1

Η δεύτερη μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχονται άμεσα από τις MAPKs συνολικά χαρακτηρίζεται ως AP-1 (Activator Protein 1). Κάθε

παράγοντας AP-1 είναι ομο- ή ετερο-διμερές που αποτελείται από πρωτεΐνες που ανήκουν στις υποοικογένειες *c-Jun*, *c-Fos*, ATF2 (Activating Transcription Factor 2) και MAF (Musculo-Aponeurotic Fibrosarcoma factor). Αυτοί οι παράγοντες υπάρχουν σε τουλάχιστον 20 ισομορφές. Ο διμερισμός τους επιτυγχάνεται μέσω των περιοχών Leucine zipper (βλ. Εικόνα 7.26). Ο συνδυασμός τους οδηγεί σε έναν μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, που διαφέρουν ως προς την εξειδίκευση των γονιδίων που ελέγχουν. Οι Jun και Fos ανακαλύφθηκαν αρχικά ως ογκοπρωτεΐνες των ιών του σαρκώματος και του οστεοσαρκώματος (*v-Jun*, *v-Fos*).

Η αποτελεσματικότητα των παραγόντων AP-1 ρυθμίζεται από την *de novo* σύνθεση και τη φωσφορυλίωσή τους. Οι παράγοντες Fos κωδικοποιούνται από τα γονίδια πρώιμης απόκρισης, η μεταγραφή των οποίων κατατάσσεται ανάμεσα στις πιο άμεσες αποκρίσεις των κυττάρων σε σήματα πολλαπλασιασμού και stress που μεταφέρονται από τα μονοπάτια των MAPKs. Όπως όλοι οι υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων, ο υποκινητής του *c-fos* περιέχει πολλά στοιχεία απόκρισης που αλληλεπιδρούν με διαφορετικά σήματα εισόδου. Με άλλα λόγια, η μεταγραφή των γονιδίων *c-fos* ενεργοποιείται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, μεταξύ των οποίων το Ras-Raf-MEK-ERK, τα μονοπάτια που ελέγχονται από το cAMP και το μονοπάτι JAK-STAT (Εικόνα 8.116).



Εικόνα 8.116

Ο υποκινητής του γονιδίου *c-fos*. Ο υποκινητής του *fos* αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας ρυθμιστικής αλληλουχίας γονιδίου που δέχεται διάφορα σήματα εισόδου. Στο σχήμα διακρίνονται διαφορετικά στοιχεία απόκρισης με τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες και τις πρωτεϊνικές κινάσες. SIE: STAT-Inducible Element, SRE: Serum Response Element, TRE: TPA Response Element, CRE: cAMP-Response Element, DR: Direct Repeat.

Σε κατάσταση ηρεμίας ο συνεργάτης του *c-Fos*, ο *c-Jun*, είναι φωσφορυλιωμένος στο COOH-τελικό του άκρο, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον υποκινητή του γονιδίου. Αυτή η φωσφορυλίωση καταλύεται από την κινάση GSK-3β ή την κινάση της καζεΐνης (CK2). Όταν η κινάση GSK-3β απενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα, μέσω του μονοπατιού PI3K-PKB/Akt, ο *c-Jun* αποφωσφορυλιώνεται από τις ενεργοποιημένες φωσφατάσες. Για να ενεργοποιηθεί ο *c-Jun*, όπως και ο ATF2 (οι δύο πιο καλά μελετημένοι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AP-1), πρέπει να φωσφορυλιωθούν σε δύο κατάλοιπα Ser του NH<sub>2</sub>-τελικού τους άκρου. Αυτές οι φωσφορυλιώσεις καταλύονται από τις κινάσες JNK ή p38 (για τον ATF2) και, όπως και στην περίπτωση των ETS, η εξειδίκευσή τους αυξάνεται μέσω της σύνδεσης στις περιοχές αγκυροβόλια των MAPKs.

Τα ομοδιμερή *c-Jun* και τα ετεροδιμερή *c-Jun/c-Fos* συνδέονται κατά προτίμηση στα στοιχεία απόκρισης στον TPA, TRE (TPA Response Elements), στους υποκινητές των γονιδίων - στόχων. Όπως έχουμε δει, ο TPA είναι ένα δηλητήριο που εξάγεται από το *Croton tiglium* και χρησιμοποιείται ως ισχυρός προωθητής όγκων. Μιμείται τη δράση της διακυλογλυκερόλης και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω ενός μηχανισμού που δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Το TRE βρίσκεται, επίσης, στους υποκινητές των γονιδίων *c-fos* και *c-Jun* επιτρέποντας στον *c-Jun* να διεγείρει τη βιοσύνθεσή τους, καθώς και τη βιοσύνθεση του *c-Fos* μέσω θετικής ανατροφοδότησης.

Σε αντίθεση με το διμερές *c-Fos/c-Jun*, το διμερές *c-Jun/ATF* αναγνωρίζει τα γονίδια στόχους του μέσω των CRE (cAMP-Response Elements), τα οποία ανιχνεύει ως θέσεις σύνδεσης των μεταγραφικών παραγόντων CREB.

## Βιβλιογραφία

1. Abankwa D, Gorfe AA, Hancock JF, Ras nanoclusters: molecular structure and assembly, *Semin Cell Dev Biol* **18**: 599-607 (2007).
2. Abdul Azeez KR, Knapp S, Fernandes JM, Klussmann E, Elkins JM, The crystal structure of the RhoA-AKAP-Lbc DH-PH domain complex, *Biochem J* **464**: 231-9 (2014).
3. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW, Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21Rac1, *Nature* **353**: 668-670 (1991).
4. Alberts A, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, *Essential Cell Biology*, Garland Science, 864p (2013).
5. Ali BR, Xu H, Akawi NA, John A, Karuvantevida NS, Langer R, Al-Gazali L, Leitinger B, Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients, *Hum Mol Genet* **19**: 2239-50 (2010).
6. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK, GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration, *Pharmacol Ther* **138**: 155-75 (2013).
7. Anderson D, Role of lipids in the MAPK signalling pathway, *Prog Lipid Res* **45**: 102-119 (2006).
8. Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennisroune A, Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion, *Front Pharmacol* **6**: 283 (2015).
9. Barlowe CK, Miller EA, Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway, *Genetics* **193**: 383-410 (2013).
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, *Βιοχημεία* (Κεφάλαιο 15), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2004).
11. Bertelsen V, Stang E, The mysterious ways of ErbB2/HER2 trafficking, *Membranes (Basel)* **4**: 424-46 (2014).
12. Betapudi V, Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins, *Front Chem* **2**: 45 (2014).
13. Bishop A, Hall A, Rho GTPases and their effector proteins, *Biochem J* **348**: 241-255 (2000).
14. Blits-Huizinga CT, Nelersa CM, Malhotra A, Liebl DJ, Ephrins and their receptors: binding versus biology, *IUBMB Life* **56**: 257-65 (2004).
15. Boettner B, Van Aelst L, The role of Rho GTPases in disease development, *Gene* **286**: 155-174 (2002).
16. Boggon TJ, Eck MJ, Structure and regulation of Src family kinases, *Oncogene* **23**: 7918-27 (2004).
17. Bompard G, Caron E, Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short, *J Cell Biol* **166**: 957-62 (2004).
18. Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J, The structural basis of the activation of Ras by SOS, *Nature* **394**: 337-43 (1998).
19. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins, *Cell* **129**: 865-77 (2007).
20. Brandizzi F, Barlowe C, Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control, *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 382-92 (2013).
21. Breitkreutz A, Tyers M, MAPK signalling specificity: it takes two to tango, *Trends Cell Biol* **12**: 254-57 (2002).
22. Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WC, Burlingame AL, Shokat KM, Barford D, A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK, *Nature* **472**: 366-9 (2011).
23. Buchsbaum RJ, Rho activation at a glance, *J Cell Sci* **120**: 1149-52 (2007).
24. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM, GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo, *Bioessays* **29**: 356-70 (2007).
25. Cabail MZ, Li S, Lemmon E, Bowen ME, Hubbard SR, Miller WT, The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state, *Nat Commun* **6**: 6406 (2015).
26. Casaletto JB, McClatchey AI, Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer, *Nat Rev Cancer* **12**: 387-400 (2012).
27. Castellano E, Downward J, Role of RAS in the regulation of PI3-kinase, *Curr Top Microbiol Immunol* **346**: 143-69 (2010).
28. Chen CC, Er TK, Liu YY, Hwang JK, Barrio MJ, Rodrigo M, Garcia-Toro E, Herreros-Villanueva M, Computational analysis of K-Ras mutations: implications for different effects on the K-Ras p.G12D and p.G13D mutations, *PLoS One* **8**: e55793 (2013).
29. Cherfils J, Zeghouf M, Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs and GDIs, *Physiol Rev* **93**: 269-309 (2013).
30. Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL, Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 62-74 (2010).
31. Chia PZC, Gleeson PA, Membrane tethering, *F1000Prime Reports* **6**: 74 (2014).
32. Chrencik JE, Brooun A, Zhang H, Mathews II, Hura GL, Foster SA, Perry JJ, Streiff M, Ramage P, Widmer H, Bokoch GM, Tainer JA, Weckbecker G, Kuhn P, Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1, *J Mol Biol* **380**: 828-43 (2008).
33. Clarke PR, Zhang C, Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 464-77 (2008).
34. Cooper CD, Newman JA, Gileadi O, Recent advances in the structural molecular biology of Ets transcription factors: interactions, interfaces and inhibition, *Biochem Soc Trans* **42**: 130-8 (2014).
35. Crespo P, Leon J, Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation, *Cell Mol Life Sci* **57**: 1613-36 (2000).
36. Dammann K, Khare V, Gasche C, Tracing PAKs from GI inflammation to cancer, *Gut* **63**: 1173-84 (2014).
37. Dbouk HA, Backer JM, Novel approaches to inhibitor design for the p110 $\beta$  phosphoinositide 3-kinase, *Trends Pharmacol Sci* **34**: 149-53 (2013).
38. de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C, K-Ras mutant NSCLC, a new opportunity for the synthetic lethality therapeutic approach, *Transl Lung Cancer Res* **2**: 142-51 (2013).
39. De Meyts P, The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* **33**: 376-84 (2008).
40. De Meyts P, Whittaker J, Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design, *Nat Rev Drug Discov* **1**: 769-83 (2002).
41. Donaldson JG, Jackson CL, ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 362-75 (2011).
42. Donovan J, Shiwen X, Norman J, Abraham D, Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts, *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**: 10 (2013).
43. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiol Rev* **83**: 433-73 (2003).
44. D'Souza-Schorey C, Chavrier P, Arf proteins: roles in membrane traffic and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 347-58 (2006).
45. Ehlers MD, Dendritic trafficking for neuronal growth and plasticity, *Biochem Soc Trans* **41**: 1365-82 (2013).
46. Ellenbroek SI, Collard JG, Rho GTPases: functions and association with cancer, *Clin Exp Metastasis* **24**: 657-72 (2007).

47. Engelsma D, Bernad R, Calafat J, Fornerod M, Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358, *EMBO J* **23**: 3643-52 (2004).
48. Etienne-Manneville S, Hall A, Rho GTPases in cell biology, *Nature* **420**: 629-35 (2002).
49. Evers EE, Zondag GC, Malliri A, Price LS, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Collard JG, Rho family proteins in cell adhesion and cell migration, *Eur J Cancer* **36**: 1269-1274 (2000).
50. Fader CM, Colombo MI, Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners, *Cell Death Differ* **16**: 70-8 (2009).
51. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Martelli MF, Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias, *Haematologica* **92**: 519-32 (2007).
52. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT, Signalling by receptors tyrosine kinases, *Annu Rev Biochem* **62**: 453-481 (1993).
53. Feig LA, Buchsbaum RJ, Cell Signaling: Life or Death Decisions of Ras proteins, *Curr Biol* **12**: 259-261 (2002).
54. Gallo KA, Johnson GL, Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 663-72 (2002).
55. Gao C, Eriksson LA, Impact of Mutations on K-Ras-p120GAP Interaction, *Comput Mol Biosci* **3**: 32244 (2013).
56. Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K, The "invisible hand": regulation of Rho GTPases by RhoGDIs, *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 493-504 (2011).
57. Garington T, Johnson G, Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways, *Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-18 (1999).
58. Goley ED, Welch MD, The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 713-26 (2006).
59. Gomperts BD, Kramer IM, Tatham PE, Signal transduction, Elsevier (2009).
60. Griffeth RJ, Bianda V, Nef S, The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function, *Basic Clin Androl* **24**: 12 (2014).
61. Gutierrez-Uzquiza A, Colon-Gonzalez F, Leonard TA, Canagarajah BJ, Wang H, Mayer BJ, Hurley JH, Kazanietz MG, Coordinated activation of the RacGAP  $\beta$ 2-chimaerin by an atypical proline-rich domain and diacylglycerol, *Nat Commun* **4**: 1849 (2013).
62. Hall A, Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* **279**: 509-514 (1998).
63. Hall A, Rho GTPases and the control of cell behavior, *Biochem Soc Trans* **33**: 891-5 (2005).
64. Hallberg B, Palmer RH, Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology, *Nat Rev Cancer* **13**: 685-700 (2013).
65. Hanna S, El-Sibai M, Signaling networks of Rho GTPases in cell motility, *Cell Signal* **25**: 1955-61 (2013).
66. Haugsten EM, Wiedlocha A, Olsnes S, Wesche J, Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis, *Mol Cancer Res* **8**: 1439-52 (2010).
67. Hoch RV, Soriano P, Roles of PDGF in animal development, *Development* **130**: 4769-84 (2003).
68. Hong W, Lev S, Tethering the assembly of SNARE complexes, *Trends Cell Biol* **24**: 35-43 (2014).
69. Horgan CP, McCaffrey MW, The dynamic Rab11-FIPs, *Biochem Soc Trans* **37**: 1032-6 (2009).
70. Hubbard SR, The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a008946 (2013).
71. Hubbard SR, Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases, *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 464-71 (2004).
72. Hubbard SR, Hill JH, Protein tyrosine kinase structure and function, *Annu Rev Biochem* **69**: 373-398 (2000).
73. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA, Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, *Nature* **372**: 746-754 (1994).
74. Hunter T, Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting, *Curr Opin Cell Biol* **21**: 140-146 (2009).
75. Hutagalung AH, Novick PJ, Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology, *Physiol Rev* **91**: 119-49 (2011).
76. Ibrahim OA, Yeh BK, Eliseenkova AV, Zhang F, Olsen SK, Igarashi M, Aaronson SA, Linhardt RJ, Mohammadi M, Analysis of mutations in fibroblast growth factor (FGF) and a pathogenic mutation in FGF receptor (FGFR) provides direct evidence for the symmetric two-end model for FGFR dimerization, *Mol Cell Biol* **25**: 671-84 (2005).
77. Jamali T, Jamali Y, Mehrbod M, Mofrad MR, Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease, *Int Rev Cell Mol Biol* **287**: 233-86 (2011).
78. Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA, Stearns GW, Clogston CL, Lu HS, Osslund TD, Syed RS, Langley KE, Hendrickson WA, Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit, *EMBO J* **19**: 3192-203 (2000).
79. Julian L, Olson MF, Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions, *Small GTPases* **5**: e29846 (2014).
80. Jun JE, Rubio I, Roose JP, Regulation of Ras exchange factors and cellular localization of Ras activation by lipid messengers in T cells, *Front Immunol* **4**: 239 (2013).
81. Kania A, Klein R, Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 240-256 (2016).
82. Karaca E, Tozluoğlu M, Nussinov R, Haliloğlu T, Alternative allosteric mechanisms can regulate the substrate and E2 in SUMO conjugation, *J Mol Biol* **406**: 620-30 (2011).
83. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C, Rho GTPase function in tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta* **1796**: 91-8 (2009).
84. Karpov OA, Fearnley GW, Smith GA, Kankanala J, McPherson MJ, Tomlinson DC, Harrison MA, Ponnambala S, Receptor tyrosine kinase structure and function in health and disease, *AIMS Biophysics* **2**: 476-502 (2015).
85. Kazanietz MG, Barrio-Real L, Casado-Medrano V, Baker MJ, Lopez-Haber C, The P-Rex1/Rac signaling pathway as a point of convergence for HER/ ErbB receptor and GPCR responses, *Small GTPases* **2**: 1-7 (2016).
86. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, Hubbard SR, Dustin ML, Burden SJ, Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK, *Cell* **135**: 334-42 (2008).
87. Kiselyov VV, Verstehey S, Gauguin L, De Meyts P, Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation, *Mol Syst Biol* **5**: 243 (2009).
88. Kjäller L, Hall A, Signaling to Rho GTPases, *Exper Cell Res* **253**: 166-179 (1999).
89. Kolch W, Coordinating ERK/MAPK signaling through scaffolds and inhibitors, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 827-38 (2005).
90. Komander D, Garg R, Wan PT, Ridley AJ, Barford D, Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure, *EMBO J* **27**: 3175-85 (2008).
91. Krawss G, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 5th Edition, Wiley Eds, 844p (2013).
92. Kuersten S, Ohno M, Mattaj IW, Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond, *Trends Cell Biol* **11**: 497-503 (2001).

93. Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Brännström A, von Euler A, Jansson M, Peipp M, Schneider-Merck T, Valerius T, van de Winkel JG, Parren PW, The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **105**: 6109-14 (2008).
94. Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A, Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21Ras, *J Biol Chem* **270**: 7017-20 (1995).
95. Lavoie H, Therrien M, Regulation of Raf protein kinases in ERK signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 281-98 (2015).
96. Layton JE, Hall NE, The interaction of G-CSF with its receptor, *Front Biosci* **11**: 3181-9 (2006).
97. Le Clainche C, Carlier MF, Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration, *Physiol Rev* **88**: 489-513 (2008).
98. Lee CH, Park KJ, Sung ES, Kim A, Choi JD, Kim JS, Kim SH, Kwon MH, Kim YS, Engineering of a human kringle domain into agonistic and antagonistic binding proteins functioning in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **107**: 9567-71 (2010).
99. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G, Raf kinases: function, regulation and role in human cancer, *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1196-212 (2007).
100. Lemmon MA, Schlessinger J, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* **141**: 1117-34 (2010).
101. Lennartsson J, Rönstrand L, Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications, *Physiol Rev* **92**: 1619-49 (2012).
102. Leppänen VM, Tvorogov D, Kisko K, Prota AE, Jeltsch M, Anisimov A, Markovic-Mueller S, Stutfeld E, Goldie KN, Ballmer-Hofer K, Alitalo K, Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **110**: 12960-5 (2013).
103. Li SS, Specificity and versatility of SH3 and other Proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction, *Biochem J* **390**: 641-53 (2005).
104. Ligeti E, Welti S, Scheffzek K, Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins, *Physiol Rev* **92**: 237-72 (2012).
105. Liu H, Chen X, Focia PJ, He X, Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases, *EMBO J* **26**: 891-901 (2007).
106. Loh ML, Vattikuti S, Schubert S, Reynolds MG, Carlson E, Lieu KH, Cheng JW, Lee CM, Stokoe D, Bonifas JM, Curtiss NP, Gotlib J, Meshinchi S, Le Beau MM, Emanuel PD, Shannon KM, Mutations in PTPN11 implicate the SHP-2 phosphatase in leukemogenesis, *Blood* **103**: 2325-31 (2004).
107. Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P, Small G proteins in the cardiovascular system: physiological and pathological aspects, *Physiol Rev* **93**: 1659-720 (2013).
108. Lott K, Cingolani G, The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport, *Biochim Biophys Acta* **1813**: 1578-92 (2011).
109. Luo L, Rho GTPases in neuronal morphogenesis, *Nat Rev Neurosci* **1**: 173-180 (2000).
110. Makde RD, England JR, Yennawar HP, Tan S, Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle, *Nature* **467**: 562-6 (2010).
111. Marshall C, How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* **11**: 732-736 (1999).
112. Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W, Raf family kinases: old dogs have learned new tricks, *Genes Cancer* **2**: 232-60 (2011).
113. Matozaki T, Nakanishi H, Takaio Y, Small G-proteins networks. Their crosstalk and signal cascades, *Cell Signal* **12**: 515-524 (2000).
114. Mazzucchelli C, Brambilla R, Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation, *Cell Mol Life Sci* **57**: 604-611 (2000).
115. McNally R, Toms AV, Eck MJ, Crystal Structure of the FERM-SH2 Module of Human Jak2, *PLoS One* **11**: e0156218 (2016).
116. Meunier S, Vernos I, Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci* **125**: 2805-14 (2012).
117. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 56-68 (2005).
118. Miyano K, Koga H, Minakami R, Sumimoto H, The insert region of the Rac GTPases is dispensable for activation of superoxide-producing NADPH oxidases, *Biochem J* **422**: 373-82 (2009).
119. Moon SM, Zheng Y, Rho GTPase-activating proteins in cell regulation, *Trends Cell Biol* **13**: 13-22 (2003).
120. Morandi A, Plaza-Menacho I, Isacke CM, RET in breast cancer: functional and therapeutic implications, *Trends Mol Med* **17**: 149-57 (2011).
121. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM, Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site, *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **94**: 7192-7 (1997).
122. Nachman J, Gish G, Virag C, Pawson T, Pomès R, Pai E, Conformational determinants of phosphotyrosine peptides complexed with the Src SH2 domain, *PLoS One* **5**: e11215 (2010).
123. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K, Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor, *J Gastroenterol Hepatol* **26**: 188-202 (2011).
124. Niu XL, Peters KG, Kontos CD, Deletion of the carboxyl terminus of Tie2 enhances kinase activity, signaling, and function. Evidence for an autoinhibitory mechanism, *J Biol Chem* **277**: 31768-73 (2002).
125. Novo E, Parola M, Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis, *Fibrogenesis Tissue Repair* **1**: 5 (2008).
126. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S, Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, *Cell* **110**: 775-87 (2002).
127. Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Matozaki T, Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior, *Trends Neurosci* **34**: 629-37 (2011).
128. Orban PC, Chapman PF, Brambilla R, Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci* **22**: 38-44 (1999).
129. Ornitz DM, Itoh N, The Fibroblast Growth Factor signaling pathway, *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **4**: 215-66 (2015).
130. Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK, Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1, *Mol Cell* **18**: 273-81 (2005).
131. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B, Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease, *Biochem J* **420**: 345-61 (2009).
132. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S, NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies, *Cell Mol Immunol* **12**: 5-23 (2015).
133. Panwar D, Rawal L, Sehgal N, Ali S, Cross Talk between KGF and KITLG proteins implicated with ovarian folliculogenesis in *Buffalo Bubalus*

- bubalis*, *PLoS One* **10**: e0127993 (2015).
134. Papakonstanti EA, Vardaki EA, Stournaras C, Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation, *Cell Physiol Biochem* **10**: 257-264 (2000).
  135. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ, Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation, *EMBO J* **19**: 496-503 (2000).
  136. Park HH, Structural basis of membrane trafficking by Rab family small G protein, *Int J Mol Sci* **14**: 8912-23 (2013).
  137. Pasqualato S, Renault L, Cherfils J, Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for "front-back" communication. *EMBO Rep* **3**: 1035-41 (2002).
  138. Pasquale EB, Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond, *Nat Rev Cancer* **10**: 165-180 (2010).
  139. Pellegrin S, Mellor H, Actin stress fibers, *J Cell Sci* **20**: 3491-9 (2007).
  140. Pierre S, Bats AS, Coumoul X, Understanding SOS (Son of Sevenless), *Biochem Pharmacol* **82**: 1049-56 (2011).
  141. Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M, Structural basis for FGF receptor dimerization and activation, *Cell* **98**: 641-50 (1999).
  142. Popov-Čeleketić D, van Bergen En Henegouwen PM, Membrane domain formation - a key factor for targeted intracellular drug delivery, *Front Physiol* **5**: 462 (2014).
  143. Porter CJ, Matthews JM, Mackay JP, Pursglove SE, Schmidberger JW, Leedman PJ, Pero SC, Krag DN, Wilce MC, Wilce JA, Grb7 SH2 domain structure and interactions with a cyclic peptide inhibitor of cancer cell migration and proliferation, *BMC Struct Biol* **7**: 58 (2007).
  144. Randall TS, Ehler E, A formin-g role during development and disease, *Eur J Cell Biol* **93**: 205-11 (2014).
  145. Ratner N, Miller SJ, A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor, *Nat Rev Cancer* **15**: 290-301 (2015).
  146. Reinhardt HC, Yaffe MB, Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response, *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 563-80 (2013).
  147. Ren G, Crompton MS, Yap AS, Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions, *Cell Motil Cytoskeleton* **66**: 865-73 (2009).
  148. Reuther GW, Der CJ, The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree, *Curr Opin Cell Biol* **12**: 157-165 (2000).
  149. Ridley A, Rho family proteins: coordinating cell responses, *Trends Cell Biol* **11**: 471-477 (2001).
  150. Ridley A, Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking, *Trends Cell Biol* **16**: 522-9 (2006).
  151. Ridley A, Rho GTPases: integrating integrin signaling, *J Biol Chem* **150**: 107-109 (2000).
  152. Ridley A, Stress fibers take shape, *Nat Cell Biol* **1**: E64 - E66 (1999).
  153. Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A, The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids, *J Cell Biol* **196**: 189-201 (2012).
  154. Rojas JM, Oliva JL, Santos E, Mammalian son of sevenless Guanine nucleotide exchange factors: old concepts and new perspectives, *Genes Cancer* **2**: 298-305 (2011).
  155. Roskoski R Jr, ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**: 105-43 (2012).
  156. Sahai E, Marshall CJ, Rho-GTPases and cancer, *Nat Rev Cancer* **2**: 133-142 (2002).
  157. Saltiel AR, Pessin JE, Insulin signaling pathways in time and space, *Trends Cell Biol* **12**: 65-71 (2002).
  158. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Göhring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E, Structural basis for Gas6-Axl signalling, *EMBO J* **25**: 80-7 (2006).
  159. Scheffzek K, Ahmadian MR, Wittinghofer A, GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site, *Trends Biochem Sci* **23**: 257-62 (1998).
  160. Schlessinger J, Lemmon MA, SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* **2003**: RE12 (2003).
  161. Schroeter S, Beckmann S, Schmitt HD, Coat/Tether Interactions-Exception or Rule? *Front Cell Dev Biol* **4**: 44 (2016).
  162. Scita G, Di Fiore PP, The endocytic matrix, *Nature* **463**: 464-73 (2010).
  163. Scita GP, Tenca P, Frittoli E, Tocchetti A, Innocenti M, Giardina G, Di Fiore PP, Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs, *EMBO J* **11**: 2393-2398 (2000).
  164. Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH, Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling, *Mol Pharmacol* **55**: 949-956 (1999).
  165. Seewald MJ, Körner C, Wittinghofer A, Vetter IR, RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger, *Nature* **415**: 662-6 (2002).
  166. Seewald MJ, Kraemer A, Farkasovsky M, Körner C, Wittinghofer A, Vetter IR, Biochemical characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP system: are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction? *Mol Cell Biol* **3**: 8124-36 (2003).
  167. Seiradake E, Harlos K, Sutton G, Aricescu AR, Jones EY, An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly, *Nat Struct Mol Biol* **17**: 398-402 (2010).
  168. Sharrocks AD, The ETS-domain transcription factor family, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 827-37 (2001).
  169. Shim AH, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC, He X, Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **107**: 11307-12 (2010).
  170. Song C, Hu CD, Masago M, Kariyai K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, Wu D, Satoh T, Kataoka T, Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras, *J Biol Chem* **276**: 2752-7 (2001).
  171. Spiegel J, Cromm PM, Zimmermann G, Grossmann TN, Waldmann H, Small-molecule modulation of Ras signaling, *Nat Chem Biol* **10**: 613-22 (2014).
  172. Stacey D, Kazlauskas A, Regulation of Ras signaling by the cell cycle, *Curr Opin Genet Dev* **12**: 44-46 (2002).
  173. Stavenga DG, Arikawa K, One Rhodopsin per Photoreceptor: Iro-C Genes Break the Rule, *PLoS Biol* **6**: e115 (2008).
  174. Stein H, Foss HD, Dürkop H, MaRafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B, CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features, *Blood* **96**: 3681-95 (2000).
  175. Stewart M, Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle, *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 195-208 (2007).
  176. Stradal TE, Scita G, Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly, *Curr Opin Cell Biol* **18**: 4-10 (2006).
  177. Sudhakar DR, P K, Subbarao N, Docking and molecular dynamics simulation study of EGFR1 with EGF-like peptides to understand molecular interactions, *Mol Biosyst* **12**: 1987-95 (2016).
  178. Sun HL, Jiang T, The structure of Nerve Growth Factor in complex with lysophosphatidylinositol, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **71**: 906-12 (2015).
  179. Swaine T, Dittmar MT, Cdc42 use in viral cell entry processes by RNA

- viruses, *Viruses* **7**: 6526-36 (2015).
180. Takuwa N, Takuwa Y, Regulation of cell cycle molecules by the Ras effector system, *Mol Cell Endocrinol* **177**: 25-33 (2001).
  181. Tan I, Seow KT, Lim L, Leung T, Intermolecular and intramolecular interactions regulate catalytic activity of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha, *Mol Cell Biol* **21**: 2767-78 (2001).
  182. Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG, Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy, *Nat Rev Cancer* **13**: 663-73 (2013).
  183. Thauerer B, zur Nedden S, Baier-Bitterlich G, Protein Kinase C-Related Kinase (PKN/PRK). Potential Key-Role for PKN1 in Protection of Hypoxic Neurons, *Curr Neuropharmacol* **12**: 213-8 (2014).
  184. Thien CB, Langdon WY, c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses, *Biochem J* **391**: 153-66 (2005).
  185. Thrasher AJ, Burns SO, WASP: a key immunological multitasker, *Nat Rev Immunol* **10**: 182-92 (2010).
  186. Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD, A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells, *J Cell Sci* **122**: 1852-62 (2009).
  187. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 834-848 (2010).
  188. Turner M, Billadeau DD, Vav proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors, *Nat Rev Immunol* **2**: 476-86 (2002).
  189. Ullrich A, Schlessinger J, Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell* **61**: 203-212 (1990).
  190. Ushiro H, Cohen S, Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes, *J Biol Chem* **255**: 8363-5 (1980).
  191. van Aelst L, D'Souza-Schorey C, Rho GTPases and signaling networks, *Genes Dev* **11**: 2295-2322 (1997).
  192. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC, Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice, *Trends Biochem Sci* **30**: 194-204 (2005).
  193. Van Impe K, Hubert T, De Corte V, Vanloo B, Boucherie C, Vandekerckhove J, Gettemans J, A new role for nuclear transport factor 2 and Ran: nuclear import of CapG, *Traffic* **9**: 695-707 (2008).
  194. Vargiu P, De Abajo R, Garcia-Ranea JA, Valencia A, Santisteban P, Crespo P, Bernal J, The small GTP-binding protein, Rhes, regulates signal transduction from G protein-coupled receptors, *Oncogene* **23**: 559-68 (2004).
  195. Vetter IR, Wittinghofer A, The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science* **294**: 1299-304 (2001).
  196. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR, Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 778-90 (2009).
  197. Vickers ER, Kasza A, Kurnaz IA, Seifert A, Zeef LA, O'donnell A, Hayes A, Sharrocks AD, Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death, *Mol Cell Biol* **24**: 10340-51 (2004).
  198. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ, Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* **10**: 842-57 (2010).
  199. Virdee S, Macmillan D, Waksman G, Semisynthetic Src SH2 domains demonstrate altered phosphopeptide specificity induced by incorporation of unnatural lysine derivatives, *Chem Biol* **17**: 274-84 (2010).
  200. Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR, Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance, *J Clin Invest* **103**: 931-43 (1999).
  201. von Gise A, Lorenz P, Wellbrock C, Hemmings B, Apoptosis suppression by Raf-1 requires MEK and phosphatidylinositol 3-kinase - dependent signals, *Mol Cell Biol* **21**: 2324-2336 (2001).
  202. Wagner MJ, Stacey MM, Liu BA, Pawson T, Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain - containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a008987 (2013).
  203. Wallar BJ, Alberts AS, The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton, *Trends Cell Biol* **13**: 435-46 (2003).
  204. Wang M, Casey PJ, Protein prenylation: unique fats make their mark on biology, *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 110-22 (2016).
  205. Wang W, Liu L, Song X, Mo Y, Komma C, Bellamy HD, Zhao ZJ, Zhou GW, Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation, *J Cell Biochem* **112**: 2062-71 (2011).
  206. Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM, The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation, *Trends Biochem Sci* **32**: 129-37 (2007).
  207. Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y, The septin family of GTPases: architecture and dynamics, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 478-89 (2008).
  208. Wells SA Jr, Santoro M, Targeting the RET pathway in thyroid cancer, *Clin Cancer Res* **15**: 7119-23 (2009).
  209. Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E, Orchestration of cell surface proteins by Rab11, *Trends Cell Biol* **24**: 407-15 (2014).
  210. Wennerberg K, Der CJ, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it), *J Cell Sci* **117**: 1301-12 (2004).
  211. Werner A, Flotho A, Melchior F, The RanBP2/RanGAP1\*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase, *Mol Cell* **46**: 287-98 (2012).
  212. Wernet MF, Perry MW, Desplan C, The evolutionary diversity of insect retinal mosaics: common design principles and emerging molecular logic, *Trends Genet* **31**: 316-28 (2015).
  213. Wing MR, Bourdon DM, Harden TK. PLC-epsilon: a shared effector protein in Ras-, Rho-, and G alpha beta gamma-mediated signaling, *Mol Interv* **3**: 273-80 (2003).
  214. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, Tong J, Pawson T, Sicheri F, Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region, *Cell* **106**: 745-57 (2001).
  215. Yaffe MB, Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 177-86 (2002).
  216. Yang Y, Xie P, Opatowsky Y, Schlessinger J, Direct contacts between extracellular membrane-proximal domains are required for VEGF receptor activation and cell signaling, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **107**: 1906-11 (2010).
  217. Yu X, Seegar TC, Dalton AC, Tzvetkova-Robev D, Goldgur Y, Rajashankar KR, Nikolov DB, Barton WA, Structural basis for angiopoietin-1-mediated signaling initiation, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **110**: 7205-10 (2013).
  218. Yudin D, Fainzilber M, Ran on tracks-cytoplasmic roles for a nuclear regulator, *J Cell Sci* **122**: 587-93 (2009).
  219. Zeke A, Bastys T, Alexa A, Garai Á, Mészáros B, Kirsch K, Dosztányi Z, Kalinina OV, Reményi A, Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases, *Mol Syst Biol* **11**: 837 (2015).
  220. Zhao Z, Manser E, Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases

- (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1, *Small GTPases* **6**: 81-8 (2015).
- 221.** Zhao ZS, Manser E, PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation, *Biochem J* **386**: 201-14 (2005).
- 222.** Zigmonda SH, How Wasp regulates actin polymerization, *J Cell Biol* **150**: 117-120 (2000).
- 223.** Zong Y, Zhang B, Gu S, Lee K, Zhou J, Yao G, Figueiredo D, Perry K, Mei L, Jin R, Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling, *Genes Dev* **26**: 247-58 (2012).