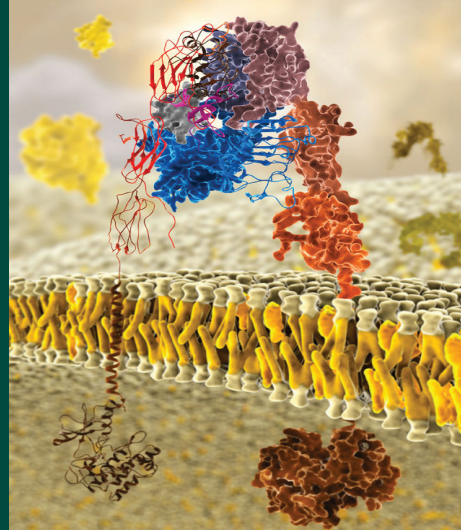


9

Μεμβρανικοί υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης, και Φωσφατάσες τυροσίνης



1. Κυτοκίνες και υποδοχείς κυτοκινών

- 1.1 Κυτοκίνες: Κατηγορίες, δομή και ρόλος
- 1.2 Δομή και ταξινόμηση των υποδοχέων των κυτοκινών
- 1.3 Ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυτοκινών
- 1.4 Ενεργοποίηση της συνδεδεμένης κινάσης τυροσίνης – Η κινάση Jak
- 1.5 Οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs
- 1.6 Ρύθμιση του μονοπατιού Jak-STAT
- 1.7 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον IL-2R και ο ρόλος τους

2. Υποδοχείς αντιγόνων των T- και B-λεμφοκυττάρων

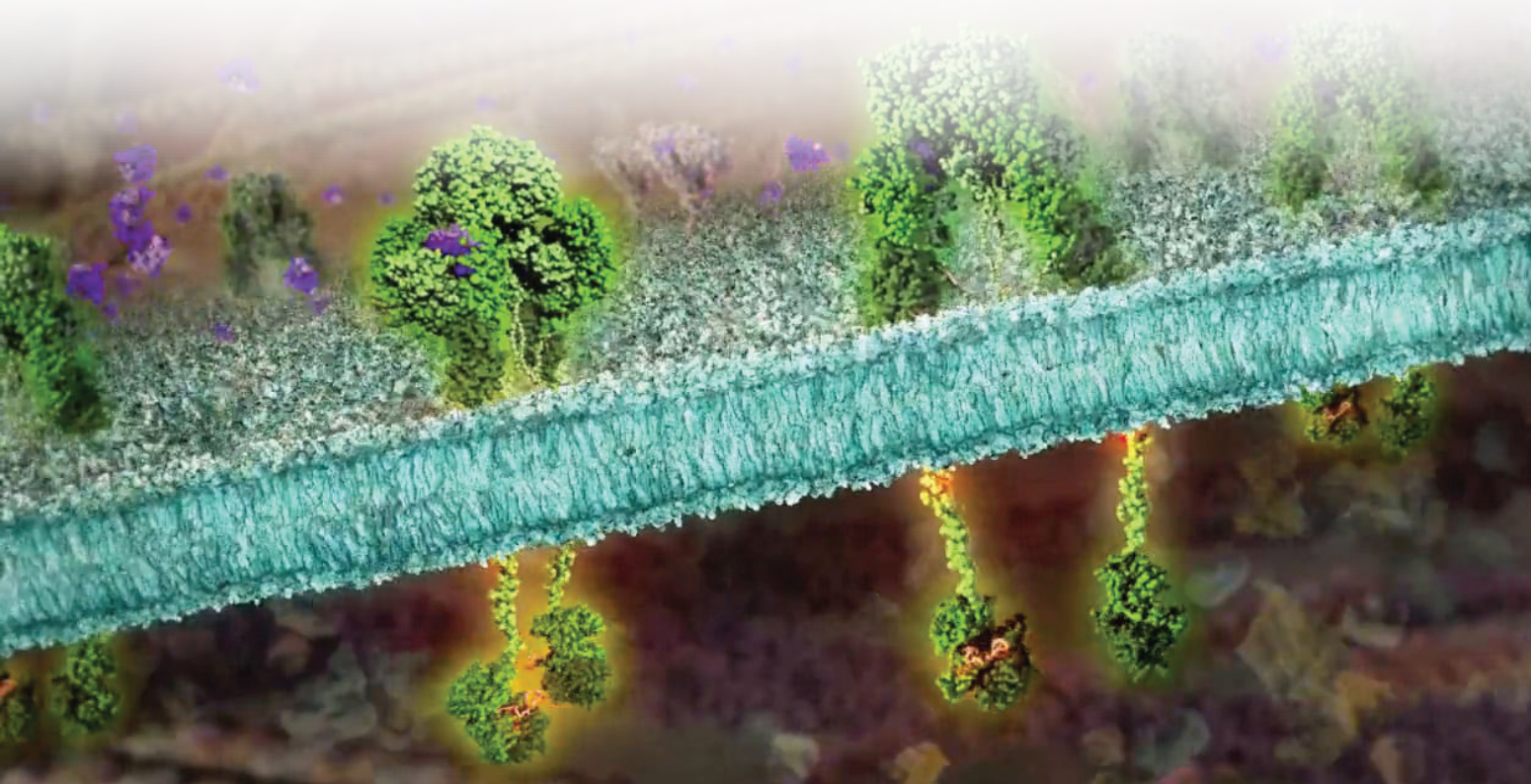
- 2.1 Το σύμπλοκο των TcRs και οι συνυποδοχείς τους
- 2.2 Ενεργοποίηση των TcRs και η μεταγωγή σήματος
- 2.3 Ο υποδοχέας BcR
- 2.4 Ο υποδοχέας Fc

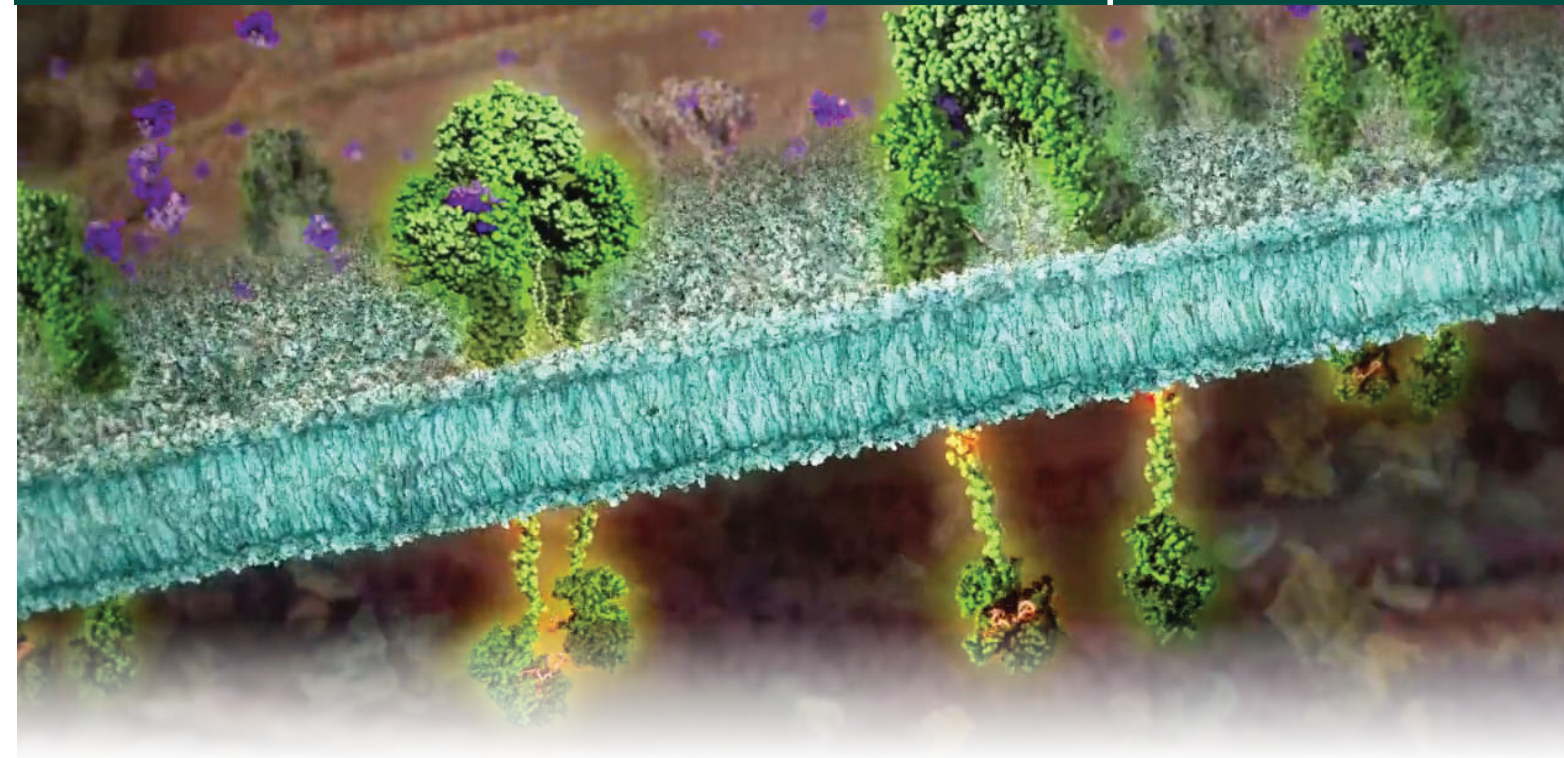
3. Σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών

- 3.1 Ταξινόμηση των ιντεγκρινών
- 3.2 Δομή των ιντεγκρινών
- 3.3 Σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω: Διαμόρφωση υψηλής συγγένειας για τον προσδέτη
- 3.4 Σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα

4. Φωσφατάσες τυροσίνης

- 4.1 Κυτταροπλασματικές και υποδοχείς πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης
- 4.2 Φωσφατάσες Tyr και ο ρόλος τους: μια σύντομη επισκόπηση





Μεμβρανικοί υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης

Η σύνδεση των εξωκυτταρικών σημάτων με τη φωσφορυλίωση τυροσινών στο κυτταρόπλασμα μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς που εμπλέκουν δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, τους υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης Tyr (RTKs) και τους υποδοχείς που συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες Tyr (βλ. **Εικόνα 8.2**). Στο προηγούμενο Κεφάλαιο μελετήσαμε τους RTKs και σε αυτό θα αναλύσουμε τα είδη, τη δομή και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων που συνδέονται με κινάσες Tyr.

Στους υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs: Receptors Tyrosine Kinases) η σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή οδηγεί στον διμερισμό του υποδοχέα και στην trans-αυτοφωσφορυλίωση της καταλυτικής του περιοχής. Η θέση σύνδεσης του προσδέτη και η κινάση τυροσίνης είναι τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης. Αντιθέτως, στους υποδοχείς που βρίσκονται **συνδεδεμένοι με μια κινάση τυροσίνης** (associated tyrosine kinase), η κινάση τυροσίνης και ο υποδοχέας δεν αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης. Η κινάση τυροσίνης είτε μπορεί να είναι μόνιμα συνδεδεμένη με τον υποδοχέα και να ενεργοποιείται έπειτα από τη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα, είτε μπορεί να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε αυτοαναστολή και να συνδέεται στον υποδοχέα, όπου και ενεργοποιείται, μόνο μετά τη σύνδεση του προσδέτη.

Το πλεονέκτημα του διαχωρισμού της περιοχής σύνδεσης του προσδέτη από την περιοχή τελεστή είναι ότι ο ίδιος ενδοκυτταρικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος μπορεί να επεξεργαστεί μεγάλη ποικιλία εισερχόμενων σημάτων. Αυτό, φυσικά, είναι εις βάρος της εξειδικευμένης στόχευσης των σημάτων. Οι υποδοχείς που

συνδέονται με κινάσες τυροσίνης λειτουργούν με τις ίδιες αρχές, όπως οι υποδοχείς με εγγενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η σύνδεση του προσδέτη προκαλεί ομο- ή ετερο-ολιγομερισμό (ή ενεργοποιεί προσχηματισμένα ολιγομερή) με τέτοιο τρόπο, ώστε οι συνδεδεμένες κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης να υφίστανται trans-αυτοφωσφορυλίωση. Η διέγερση της συνδεδεμένης κινάσης τυροσίνης είναι το αναγκαστικό σημείο της μεταγωγής του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ενεργοποιημένη κινάση προωθεί τη σηματοδότηση μέσω φωσφορυλίωσης είτε πρωτεϊνών-τελεστών είτε πολλαπλών καταλοίπων τυροσίνης στην ενδοκυτταρική περιοχή του ίδιου του υποδοχέα, δημιουργώντας, έτσι, σημεία πρόσδεσης για πρωτεΐνες που έχουν SH2 ή PTB περιοχές.

Οι υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης είναι οι υποδοχείς των κυτοκινών, οι υποδοχείς των αντιγόνων, οι οποίοι βρίσκονται στα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, και οι ιντεγκρίνες.

Οι κινάσες τυροσίνης, οι οποίες συνδέονται σε αυτούς τους υποδοχείς, κατατάσσονται σε πολλές υποοικογένειες, μεταξύ των οποίων η μεγαλύτερη είναι η **οικογένεια Src**, η οποία συμμετέχει επίσης και στα σηματοδοτικά μονοπάτια των RTKs. Ανάμεσα στις κινάσες της υποοικογένειας Src συγκαταλέγονται οι Src, Yes [Yamaguchi (Y73 virus), Esh avian sarcoma], Fyn (Egr/Yes novel tyrosine kinase), Fgr (Gardner-Rasheed feline sarcoma), Lyn (Lck/Yes novel tyrosine kinase), Hck (Hematopoietic cell kinase), Lck (Leukocyte C-terminal Src kinase) και Blk (B lymphocyte kinase). Κοινά χαρακτηριστικά αυτών των κινασών είναι η πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη μέσω λιπαρών οξέων, μια χαρακτηριστική διάταξη μιας περιοχής SH2 και μιας περιοχής SH3, καθώς και ένα COOH-τελικό κατάλοιπο φωσφοτυροσίνης. Όπως αναφέρθηκε για τη Src, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των περιοχών διατηρούν τα ένζυμα σε ανενεργή κατάσταση, η οποία καταργείται από εισερχόμενα σήματα (βλ. σελ. 527, **Εικόνα 8.40**). Οι κινάσες Tyr που ενεργοποιούνται άμεσα από τους υποδοχείς κυτοκινών είναι οι **Jak** (Janus kinase) και **Tyk2** (Tyrosine-protein kinase). Οι κινάσες Tyr που ενεργοποιούνται

Εικόνα 9.1

Κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης που συνδέονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς. BD (Binding Domain), FAT ή FABD (Focal Adhesion Targeting domain), CRIB (Cdc42- and Rac-Interactive Binding domain), NLS (Nuclear Localization Signal): αλληλουχία εντοπισμού πυρήνα, PH (Pleckstrin Homology), Pro-rich: μοτίβο πλούσιο σε προλίνη που αλληλεπιδρά με περιοχές SH3, Btk motif: Zn²⁺ finger, FERM [Four-point-one (4.1), Ezrin, Radixin, Moesin], FCH (FER and CIP4 Homology), μια περιοχική ανάλογη με την BAR, υπεύθυνη για την ενδοκύτωση και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης UBA (Ubiquitin-Associated Domain).

| Κινάσες Τυροσίνης | Δομή | Αλληλεπίδραση με υποδοχείς |
|---|------|--|
| Οικογένεια Src A: Src, Yes, Fyn, Fgr B: Lck, Hck, Blk, Lyn C: Frk | | Υποδοχείς αντιγόνων, ιντεγκρίνες, RTKs |
| Brk | | Υποδοχείς αντιγόνων, ιντεγκρίνες, RTKs |
| Csk | | Υποδοχείς αντιγόνων, ιντεγκρίνες, RTKs |
| Fes, Fer | | Υποδοχείς αντιγόνων, ιντεγκρίνες, RTKs |
| ZAP-70, Syk | | Υποδοχείς αντιγόνων |
| Btk, Itk, Etk/Bmx | | Υποδοχείς αντιγόνων |
| FAK | | Ιντεγκρίνες |
| Jak, Tyk2 | | Υποδοχείς κυτοκινών, RTKs |
| ACK1 | | Ιντεγκρίνες |
| Abl | | Ιντεγκρίνες, RTKs |

από τους υποδοχείς των αντιγόνων, εκτός από τις κινάσες Src, είναι οι **ZAP-70** (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70) και **Syk** (Spleen tyrosine kinase), η Brk (**B**reast tumor kinase) και η Btk (**B**ruton's tyrosine kinase). Τέλος, με τις ιντεγκρίνες συνδέεται κυρίως η κινάση **FAK** (Focal Adhesion Kinase), αλλά και οι κινάσες ACK1 (Activated Cdc42 kinase), Abl (Abelson tyrosine kinase), Fes (Feline sarcoma tyrosine kinase) και Brk (**Εικόνα 9.1**)

1. Κυτοκίνες και υποδοχείς κυτοκινών

1.1 | Κυτοκίνες: Κατηγορίες, δομή και ρόλος

Οι κυτοκίνες είναι μικρές πρωτεΐνες (5-20 kDa) ή γλυκοπρωτεΐνες περίπου 150 αμινοξέων. Οι περισσότερες είναι μονομερείς, αλλά συναντώνται και ως ομοδιμερείς (π.χ. IL-5, IL-10, IFN-γ), ομοτριμερείς (TNF-α και TNF-β ή LT-α), ετεροδιμερείς (IL-12 [IL-12A (p35) και IL-12B (p40)], IL-23, IL-27, IL-35) ή ετεροτριμερείς (LT-α₁β₁). Η ονομασία τους προέρχεται από το "κύτταρο" και την "κίνηση", καθώς διεγείρουν τη μετακίνηση των κυττάρων προς τις θέσεις φλεγμονής, λοίμωξης ή τραύματος.

Οι κυτοκίνες εκκρίνονται από τα λευκά αιμοσφαίρια, αλλά και άλλους κυτταρικούς τύπους, ως απάντηση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, κυτοκίνες παράγουν τα Β- και τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά, τα NK (Natural Killer), τα κυτταροτοξικά T_C, τα βοηθητικά T_H, T_H1, T_H2, τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά, τα σιτευτικά, του στρώματος του θύμου, κύτταρα όγκων, καθώς και ινοβλάστες. Η έκκρισή τους διαρκεί από μερικές ώρες έως μερικές μέρες. Ανάλογα με τα κύτταρα που τις παράγουν, οι κυτοκίνες χαρακτηρίζονται ως:

- **Λεμφοκίνες:** παράγονται από τα λεμφοκύτταρα (π.χ. IL-2 από τα Τ-λεμφοκύτταρα).
- **Μονοκίνες:** παράγονται από τα μονοκύτταρα (π.χ. IL-1).

Ωστόσο, αυτή η ονοματολογία δεν είναι πολύ αξιόπιστη, καθώς η κάθε κυτοκίνη μπορεί να παράγεται από περισσότερους από έναν κυτταρικούς τύπους.

Ο ρόλος των κυτοκινών είναι η ρύθμιση της έντασης και της διάρκειας της ανοσολογικής απόκρισης, διεγείροντας ή αναστέλλοντας την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και/ή τη διαφοροποίηση διαφόρων κυττάρων του ανοσοποιητικού, καθώς επίσης και την έκκριση αντισωμάτων ή άλλων κυτοκινών. Λόγω της θεμελιώδους δράσης τους στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, στις αντιδράσεις άμυνας και στις διαδικασίες φλεγμονής, οι κυτοκίνες έχουν μεγάλη θεραπευτική αξία. Έγινε λοιπόν σημαντική προσπάθεια για την κατανόηση της δομής και του μηχανισμού δράσης των κυτοκινών και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, καθώς και των συστατικών των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούνται από τις κυτοκίνες.

Οι κυτοκίνες ανάλογα με τη δράση τους χαρακτηρίζονται ως χημεικίνες, ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, παράγοντες διέγερσης αποικιών και παράγοντες νέκρωσης όγκων. Επειδή όμως ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται, όπως θα δούμε παρακάτω, από σημαντικό πλειοτροπισμό, και αυτή η ταξινόμηση, με εξαιρέσεις βέβαια, είναι ξεπερασμένη.

Χημεικίνες. Οι χημεικίνες λειτουργικά υπάγονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις προφλεγμονώδεις και τις ομοιοστατικές. Οι μολυσμένοι ιστοί διεγείρονται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (π.χ. IL-1 και TNFs) και απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις χημεικίνες, οι οποίες ενορχηστρώνουν τη μετανάστευση κυττάρων του ανοσοποιητικού από το αίμα προς τους ιστούς. Οι ομοιοστατικές χημεικίνες εμπλέκονται στη μετακίνηση των λεμφοκυττάρων προς τους λεμφαδένες κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής επιτήρησης. Συνολικά, υπάρχουν περισσότερα από 30 με-

Τα **μονοκύτταρα** παράγονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών, που ονομάζονται μονοβλάστες, τα οποία προέρχονται από τα αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα για μία έως τρεις περίπου ημέρες και στη συνέχεια μετακινούνται σε ιστούς σε όλο το σώμα, όπου διαφοροποιούνται σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Αποτελούν το 3-8% των λευκοκυττάρων στο αίμα. Περίπου τα μισά από τα μονοκύτταρα του σώματος βρίσκονται αποθηκευμένα στον σπλήνα.



μονωμένα ανθρώπινα γονίδια χημειοκινών. Οι χημειοκίνες σχετίζονται μεταξύ τους δομικά, γιατί είναι πρωτεΐνες 8-10 kDa και έχουν τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης σε διατηρημένες θέσεις, που είναι το κλειδί για τον σχηματισμό της τριδιάστατης τους διαμόρφωσης. Ανάλογα με τη διάταξη των δύο πρώτων κυστεϊνών, χωρίζονται σε τέσσερις υποτύπους: CXC (α), CC (β), C (γ) και CX3C (δ) (βλ. **Εικόνα 9.8**). Παράγονται ως προπεπτίδια και διασπώνται κατά τη διάρκεια της έκκρισής τους, προκειμένου να παραχθεί η δραστική ώριμη πρωτεΐνη.

Ιντερλευκίνες: Ο όρος ιντερλευκίνη χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τους ερευνητές για τις κυτοκίνες, οι οποίες παράγονται από λευκοκύτταρα και στοχεύουν κατά κύριο λόγο σε λευκοκύτταρα. Ωστόσο, αυτή η ονοματολογία είναι προβληματική, γιατί αν και η συντριπτική πλειοψηφία των ιντερλευκινών παράγεται από τα CD4⁺ T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T_H), υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, η IL-1 και η IL-6 παράγονται και από κύτταρα εκτός των λεμφοκυττάρων και ασκούν τη δράση τους σε κυτταρικούς τύπους εκτός του ανοσοποιητικού, ενώ η IL-7 παράγεται από επιθηλιακά κύτταρα. Σήμερα είναι γνωστές 33 ιντερλευκίνες.

Ιντερφερόνες: εμπλέκονται σε αντι-ικές αποκρίσεις.

Παράγοντες διέγερσης αποικιών - CSFs (Colony Stimulating Factors): επάγουν τη διαφοροποίηση βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων σε εξειδικευμένες αποικίες λευκοκυττάρων, κατά την καλλιέργειά τους σε ημιστερεό μέσο (βλ. σσ. 486-488, και **Πίνακας 8.1**). Χαρακτηριστικά παραδείγματα, ο G-CSF, ο GM-CSF, ο M-CSF και η IL-3.

Παράγοντες νέκρωσης όγκων, TNFs (Tumor Necrosis Factors): περισσότερα από 20 μέλη, με κοινή δράση τον κυτταρικό θάνατο.

Ανακάλυψη των κυτοκινών

Η πρώτη κυτοκίνη που αναγνωρίστηκε ήταν η ιντερφερόνη-α (IFN-α), μια ιντερφερόνη τύπου I (βλ. παρακάτω), η οποία ανακαλύφθηκε το 1957 από τον Σκωτσέζο ιολόγο Alick Isaacs (1921-1967) και τον Ελβετό ιολόγο και ανοσολόγο Jean Lindenmann (1924-2015) στο National Institute for Medical Research (NIMR) του Λονδίνου. Η IFN-α αναγνωρίστηκε ως μια πρωτεΐνη που παρεμβαίνει (interfere) στην αναπαραγωγή των ιών. Το 1965 περιγράφηκε η δραστηριότητα της ιντερφερόνης-γ (το μόνο μέλος των ιντερφερονών τύπου II). Ήταν ο πρώτος μεσολαβτής που προέρχεται από τα λεμφοκύτταρα.

Αν και ήδη στα τέλη του 1950, ο MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor) περιγράφηκε ως μια δραστηριότητα των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων, που αναστέλλει την τυχαία μετακίνηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων, το 1966 αναγνωρίστηκε ως μια πρωτεΐνη, ταυτόχρονα από τους John David και Barry Bloom.

Το 1969 ο Dudley Dumonde πρότεινε τον όρο “λεμφοκίνες”, για να περιγράψει πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα λεμφοκύτταρα, και αργότερα τον όρο “μονοκίνες” για τις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα, σε καλλιέργεια. Αργότερα έγινε κατανοητό ότι αυτές οι πρωτεΐνες, μαζί με άλλες, αποτελούν μέλη μια μεγάλης ομάδας που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού και ονομάστηκαν “κυτοκίνες”.

Η ιστορία της ανακάλυψης της πρώτης ιντερλευκίνης, της IL-1, ξεκίνησε το 1948 ερευνώντας τη φύση μιας ενδογενούς πρωτεΐνης που απελευθερωνόταν από τα κύτταρα της περιτοναϊκής κοιλότητας κουνελιών και προκαλούσε πυρετό. Το 1984 η κλωνοποίηση δύο ισομορφών ιντερλευκίνης-1 (IL-1α και IL-1β) απάντησε στο ερώτημα πώς ένα μεμονωμένο πολυπεπτίδιο μπορούσε να προκαλέσει μια τόσο μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων.

Αμφιλεγόμενη διαφορά μεταξύ κυτοκινών, ορμονών και αυξητικών παραγόντων

Παρά τις διαφορές τους, υπάρχουν αρκετά κοινά στοιχεία ανάμεσα στις κυτοκίνες και τις ορμόνες, καθιστώντας τη διάκριση μεταξύ τους θέμα μιας μεγάλης συζήτησης.

Χαρακτηριστική τους διαφορά είναι ότι οι κλασικές ορμόνες κυκλοφορούν στο

αίμα σε συγκεντρώσεις nM (10⁻⁹ M), που συνήθως μπορούν να μεταβληθούν κατά 10 μόνο φορές, ενώ οι κυτοκίνες κυκλοφορούν σε συγκεντρώσεις pM (10⁻¹² M) που μπορούν να αυξηθούν έως και 1.000 φορές κατά τη διάρκεια ενός τραύματος ή μιας μόλυνσης.

Επίσης, οι κλασικές ορμόνες, όπως η ινσουλίνη, εκκρίνονται από διακριτούς αδένες (όπως το πάγκρεας), ενώ η κάθε κυτοκίνη μπορεί να παράγεται από περισσότερους από έναν κυτταρικούς τύπους, που περιλαμβάνουν κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως τα μακροφάγα, τα B- και τα T-λεμφοκύτταρα, τα σιτευτικά, καθώς επίσης και ενδο/επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κ.λπ.

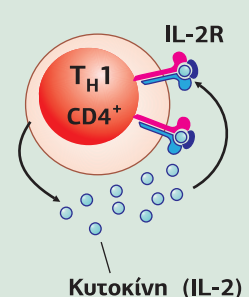
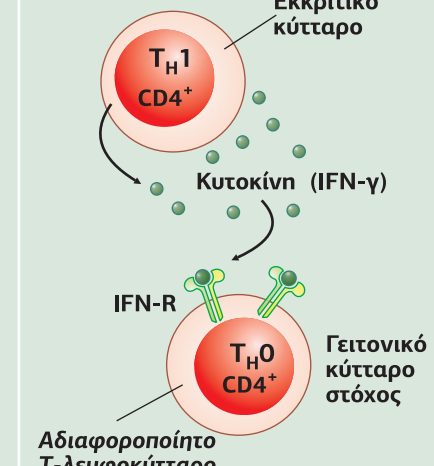
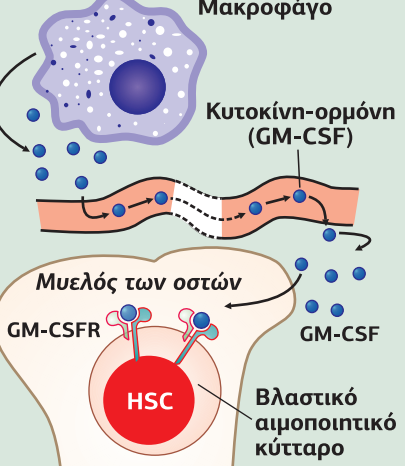
Μέρος της δυσκολίας διάκρισης των κυτοκινών από τις ορμόνες είναι ότι μερικές από τις δράσεις των κυτοκινών είναι συστηματικές παρά τοπικές. Παρότι η πλειοψηφία των κυτοκινών δρουν αυτοκρινώς (δηλ. δρουν στα ίδια κύτταρα τα οποία εκκρίνουν τις συγκεκριμένες κυτοκίνες) ή παρακρινώς (δηλ. δρουν σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε στενή απόσταση από τα κύτταρα που εκκρίνουν την κυτοκίνη), αρκετές κυτοκίνες μεταφέρονται μέσω του αίματος σε ένα ξεχωριστό τμήμα του σώματος (ενδοκρινής δράση). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτοκρινούς επικοινωνίας είναι η IL-2, η οποία απελευθερώνεται από τα T_H1 λεμφοκύτταρα, τα οποία και ενεργοποιεί να παράγουν και να απελευθερώσουν επιπλέον IL-2. Παρακρινή δράση εμφανίζει η INF-γ, η οποία απελευθερώνεται από τα CD4⁺ T_H1-λεμφοκύτταρα και δρα στα αδιαφοροποίητα CD4⁺ T_H0-λεμφοκύτταρα, τα οποία και διαφοροποιεί σε T_H1. Ενδοκρινώς δρα ο GM-CSF, ο οποίος απελευθερώνεται από τα μακροφάγα, στη θέση της φλεγμονής, και μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στον μυελό των οστών, όπου ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων (**Εικόνα 9.2**).

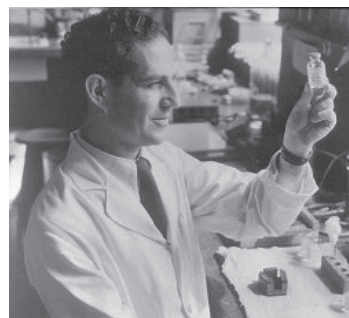
Συνεπώς, κατά κάποιον τρόπο, μπορεί κανείς να θεωρήσει τις κυτοκίνες ως τις “ορμόνες” ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων. Πολλές από αυτές μπορεί, επίσης, να τις θεωρήσει κανείς και ως αυξητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα, τους CSFs, οι οποίοι διεγείρουν τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών σε αποικίες διαφόρων ειδών λευκοκυττάρων, και τις IL-2 και IL-5, οι οποίες διεγείρουν την ανάπτυξη των T_H1 και T_H2-λεμφοκυττάρων, αντίστοιχα. Ωστόσο, ενώ οι αυξητικοί παράγοντες παράγονται σε σταθερή βάση, οι κυτοκίνες και οι ορμόνες παράγονται ως απόκριση σε ορισμένα ερεθίσματα και η

Εικόνα 9.2

Η αυτοκρινής, παρακρινής και ενδοκρινής δράση των κυτοκινών. Α. Αυτοκρινής επικοινωνία: Το ενεργοποιημένο CD4⁺ T_H1 λεμφοκύτταρο παράγει IL-2, η οποία απελευθερώνεται και δρα στους IL-2Rs στο ίδιο T_H1, οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό του και στην επιπλέον παραγωγή και απελευθέρωση IL-2. Β. Παρακρινής επικοινωνία: Το ενεργοποιημένο CD4⁺ T_H1 λεμφοκύτταρο παράγει INF-γ, η οποία απελευθερώνεται και δρα στους INFγ-Rs των γειτονικών CD4⁺ T_H0 λεμφοκυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται σε T_H1. Γ. Ενδοκρινής επικοινωνία: Το ενεργοποιημένο μακροφάγο παράγει GM-CSF, ο οποίος απελευθερώνεται και μεταφέρεται μέσω του αίματος στον μυελό των οστών, όπου διεγείρει τη διαφοροποίηση των βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Οι κυτοκίνες ως μοριακά σήματα

| Αυτοκρινής επικοινωνία | Παρακρινής επικοινωνία | Ενδοκρινής επικοινωνία |
|--|--|--|
| Το ίδιο κύτταρο εκκρίνει και δεσμεύει την κυτοκίνη | Η κυτοκίνη εκκρίνεται από ένα κύτταρο και δρα σε γειτονικά όμοια κύτταρα | Η κυτοκίνη μεταφέρεται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος σε απομακρυσμένα κύτταρα-στόχους |
|  <p>Κυτοκίνη (IL-2)</p> |  <p>Εκκριτικό κύτταρο Κυτοκίνη (IFN-γ) IFN-R Γειτονικό κύτταρο στόχος Αδιαφοροποίητο T-λεμφοκύτταρο</p> |  <p>Μακροφάγο Κυτοκίνη-ορμόνη (GM-CSF) Μυελός των οστών GM-CSFR HSC Βλαστικό αιμοποιητικό κύτταρο</p> |



Alick Isaacs (1921-1967)



Jean Lindenmann (1924-2015)

Τα T_H1 -λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IL-2, IFN- γ και TNF, ενώ τα T_H2 -λεμφοκύτταρα εκκρίνουν τις IL-4, IL-5, IL-6 και IL-13.

έκκρισή τους διαρκεί λίγο, από μερικές ώρες έως λίγες μέρες.

Χρειάζεται, λοιπόν, περισσότερη έρευνα στον τομέα αυτό για τη διάκριση μεταξύ κυτοκινών, ορμονών και αυξητικών παραγόντων.

Χαρακτηριστικές ιδιότητες των κυτοκινών

Οι κυτοκίνες εμφανίζουν τέσσερις αξιοσημείωτες ιδιότητες: πλειοτροπισμό, πλεονασμό, συνέργεια και ανταγωνισμό (Εικόνα 9.3).

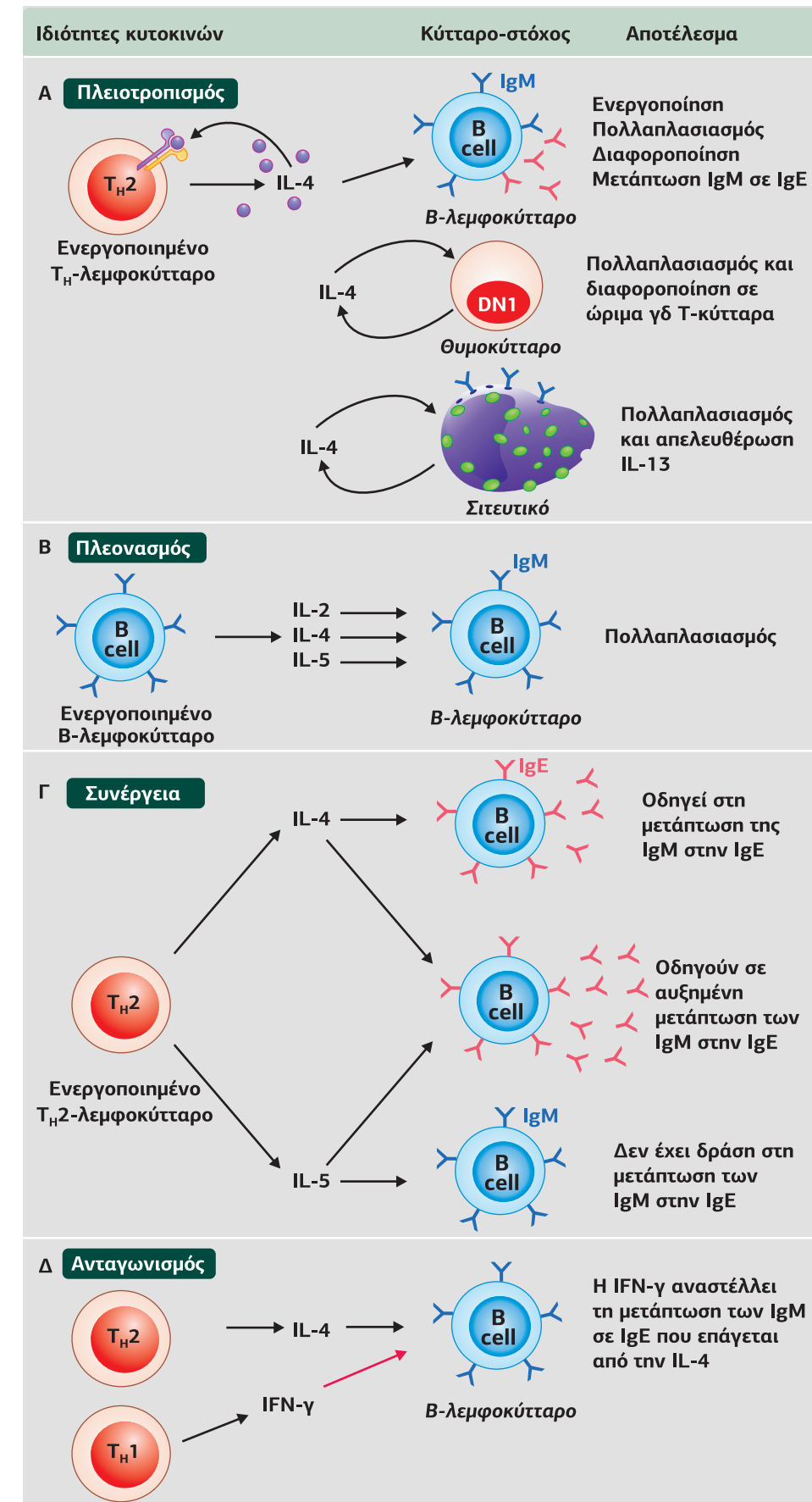
- **Πλειοτροπισμός** (pleiotropy) είναι η ικανότητα που έχει μια κυτοκίνη να προκαλεί ποικίλες αποκρίσεις στα κύτταρα-στόχους, όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση ή τη μετανάστευση. Για παράδειγμα, η IL-4, η οποία εκκρίνεται από τα T_H2 λεμφοκύτταρα, μπορεί να δράσει αυτοκρινώς στα T_H2 , οδηγώντας στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά και παρακρινώς ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων, καθώς και τη μετάπτωση των IgM σε IgE. Η IL-4 απελευθερώνεται από τα διπλά αρνητικά θυμοκύτταρα (DN, CD4⁻/CD8⁻), επάγοντας τη διαφοροποίησή τους σε γδ T-λεμφοκύτταρα, αλλά επίσης και από τα σιτευτικά, όπου δρα αυτοκρινώς, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους και την απελευθέρωση της IL-13 (Εικόνα 9.3A).
- **Πλεονασμός** (redundancy) είναι η ικανότητα διαφορετικών κυτοκινών να προκαλούν την ίδια απόκριση. Για παράδειγμα, οι ιντερφερόνες IFN- α , INF- β και IFN- γ έχουν την ίδια δράση, οι IL-1, TNF- α και IL-6 προκαλούν πυρετό και οι IL-2, IL-4 και IL-5, οι οποίες απελευθερώνονται από τα B-λεμφοκύτταρα, δρουν αυτοκρινώς ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων (Εικόνα 9.3B).
- **Συνέργεια** (synergy) έχουμε όταν η συνδυασμένη δράση δύο ή περισσότερων κυτοκινών έχει ισχυρότερο αποτέλεσμα. Διακρίνουμε δύο ξεχωριστές μορφές συνέργειας, τη "συνέργεια με συνεργασία", όταν δύο κυτοκίνες ενεργοποιούν το ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι αυξάνοντας τη δραστηριότητα του κυττάρου-στόχου, και τη "συνέργεια με ανεξάρτητη δράση", όταν οι δύο κυτοκίνες ενεργοποιούν δύο διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία όμως οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, αυξάνοντας και πάλι τη δραστηριότητα του κυττάρου-στόχου. Στην περίπτωση των IL-4 και IL-5, η IL-4 απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα T_H2 λεμφοκύτταρα και επάγει τη μετάπτωση των IgM στην ισομορφή IgE στα B-λεμφοκύτταρα, ενώ η IL-5, παρότι δεν έχει καμία δράση από μόνη της, είναι ικανή να ενισχύσει τη δράση της IL-4 στα B-λεμφοκύτταρα (Εικόνα 9.3Γ).
- **Ανταγωνισμός** (antagonism) είναι η ικανότητα ορισμένων κυτοκινών να ανταγωνίζονται τη δράση άλλων κυτοκινών. Για παράδειγμα, η IL-4 επάγει τη μετάπτωση των IgM στην ισομορφή IgE στα B-λεμφοκύτταρα, ενώ η IFN- γ αναστέλλει αυτή τη δράση της IL-4 (Εικόνα 9.3Δ).

Κυτοκίνες τύπου I και τύπου II

Οι κυτοκίνες ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση μέσω κυττάρων ή μέσω αντισωμάτων. Με βάση αυτή τη λειτουργία τους ταξινομούνται στις κυτοκίνες **τύπου I** (TNF- α , IFN- γ , κ.λπ.), οι οποίες ρυθμίζουν την ένταση και τη διάρκεια μιας ανοσολογικής απόκρισης διεγείροντας ή αναστέλλοντας την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφόρων κυτταρικών τύπων, και στις κυτοκίνες **τύπου II** (TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13, κ.λπ.), οι οποίες ελέγχουν την έκκριση αντισωμάτων. Το ενδιαφέρον είναι ότι οι κυτοκίνες που ανήκουν στον ένα τύπο τείνουν να αναιρούν τα αποτελέσματα των κυτοκινών του άλλου τύπου.

Ταξινόμηση των κυτοκινών με βάση τη δομή

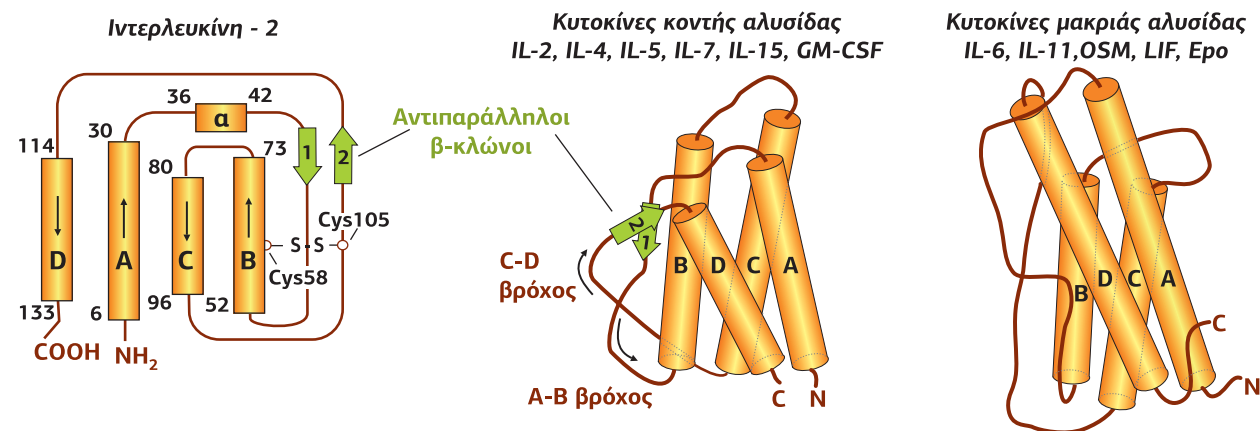
Με βάση τη δομική τους ομοιογένεια οι κυτοκίνες κατατάσσονται σε πέντε τύπους:



Εικόνα 9.3
Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των κυτοκινών.
Α. Πλειοτροπισμός: μια κυτοκίνη μπορεί να προκαλεί ποικίλες αποκρίσεις στα κύτταρα-στόχους.
Β. Πλεονασμός: διαφορετικές κυτοκίνες μπορεί να προκαλούν την ίδια απόκριση.
Γ. Συνέργεια: διαφορετικές κυτοκίνες μπορεί να συνεργάζονται στην επαγωγή ορισμένων κυτταρικών αποκρίσεων.
Δ. Ανταγωνισμός: ορισμένες κυτοκίνες μπορεί να ανταγωνίζονται τη δράση άλλων κυτοκινών.

1. Η **οικογένεια της δέσμης τεσσάρων α-ελίκων**: τα μέλη της αποτελούνται από μια δεσμίδα τεσσάρων αντιπαράλληλων α-ελίκων. Η πρώτη με τη δεύτερη α-έλικα και η τρίτη με την τέταρτη διευθετούνται σχεδόν παράλληλα και συνδέονται με βρόχους. Αυτή η οικογένεια, με τη σειρά της, χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες:

- Την **υποοικογένεια IL-2**. Είναι η μεγαλύτερη υποοικογένεια. Περιλαμβάνει τις κυτοκίνες IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, CSF, GM-CSF, ερυθροποιητίνη (Epo), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), θρομβοποιητίνη (Thpo), oncostatin-M (OSM), την αυξητική ορμόνη GH (Growth Hormone) και άλλες. Μπορεί να διαχωριστεί στις κυτοκίνες μακριών (25 αμινοξέων) και κοντών (15 αμινοξέων) α-αλυσίδων. Οι κυτοκίνες κοντών αλυσίδων περιέχουν επιπλέον και δύο β- αντιπαράλληλους κλώνους στη δομή τους, που λείπουν από τις κυτοκίνες των μακριών αλυσίδων (**Εικόνα 9.4**). Μια υποομάδα συνδεδεμένη με τις κυτοκίνες IL-6 αποτελούν οι IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/EBI3) και IL-35 (p35/EBI3). Πρόκειται για τις νεώτερες ILs που ανακαλύφθηκαν. Είναι ετεροδιμερείς, με μια α-υπομονάδα (p19, p28, p35), όμοια της IL-6, και μια β-υπομονάδα (p40, EBI3). Η πρώτη κρυσταλλική δομή κυτοκίνης που ανακαλύφθηκε ήταν της GH (1987) και η δεύτερη του G-CSF (1992).
- Την **υποοικογένεια ιντερφερόνης (IFN)**, τα μέλη της οποίας αποτελούνται από 5 α-έλικες.
- Την **υποοικογένεια IL-10**. Η IL-10 είναι ομοδιμερής, με την κάθε υπομονάδα να αποτελείται από 178 αμινοξέα που δημιουργούν μια δέσμη έξι α-ελίκων. Περιλαμβάνει, επίσης, τις κυτοκίνες IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 και IL-26, οι οποίες αποτελούνται από έξι ή επτά α-έλικες (A-G). Οι τέσσερις (B, D, E, G) δημιουργούν τη χαρακτηριστική δέσμη τεσσάρων α-ελίκων, ενώ η A και η C είναι πολύ κοντές.



Εικόνα 9.4
Κατάταξη των κυτοκινών της οικογένειας της δομής δεσμίδας 4 α-ελίκων. Αποτελούνται από μια δεσμίδα τεσσάρων α-ελίκων. Αυτές οι κυτοκίνες μπορούν περαιτέρω να διαιρεθούν σε τρεις υποοικογένειες: IL-2 (με 4 α-έλικες, οι οποίες μπορεί να είναι κοντές ή μακριές), IFNs (5 α-έλικες) και IL-10 (6 α-έλικες). Η ιντερλευκίνη IL-5, η IL-10 και η IFN-γ είναι ομοδιμερείς, ενώ οι υπόλοιπες κυτοκίνες δρουν ως μονομερή. Οι κυτοκίνες της υποοικογένειας IL-2 με κοντές α-έλικες περιέχουν επιπλέον και δύο αντιπαράλληλους β-κλώνους, που δεν περιέχουν οι κυτοκίνες μακριών αλυσίδων. [39]

2. Η **οικογένεια IL-1**: Τα μέλη της αποτελούνται από 12 αντιπαράλληλους β-κλώνους που δημιουργούν ένα β-βαρέλι. Η δομή τους χαρακτηρίζεται ως β-τριφύλλι (β-trefoil). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 11 κυτοκίνες, μεταξύ των οποίων οι IL-1α και IL-1β, η IL-18, η IL-36 και η IL-37 (**Εικόνα 9.5**). Η ανακάλυψή τους ξεκίνησε το 1943-48 από μελέτες σχετικά με την παθογένεση του πυρετού.

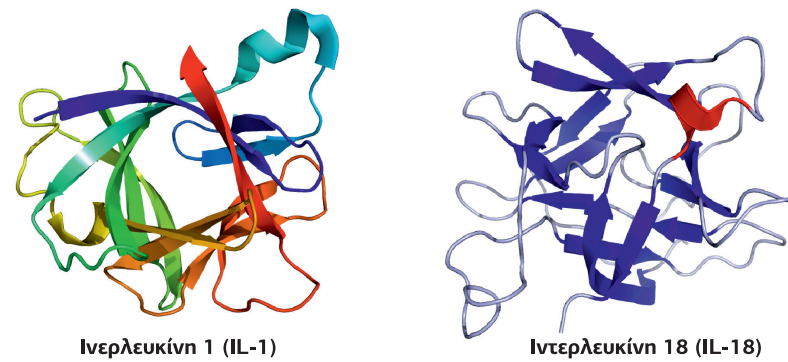
| Οικογένεια κυτοκινών δεσμίδας α-ελίκων | | | |
|--|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Υποοικογένεια IL-2 | | Υποοικογένεια IFN | Υποοικογένεια IL-10 |
| Κοντές αλυσίδες (15 αα) | Μακριές αλυσίδες (25 αα) | IFNs τύπου I | IL-10 (διμερής) |
| IL-2 | IL-6 | IFN-α | |
| IL-4 | IL-11 | IFN-β | IL-19 |
| IL-5 (ομοδιμερής) | Oncostatin (OSM) | IFNs τύπου II | IL-20 |
| IL-7 | LIF | IFN-γ (διμερής) | IL-22 |
| IL-15 | Epo | | IL-24 |
| GM-CSF | IL-12 (p35, p40) | | IL-26 |

Εικόνα 9.5

Κυτοκίνες της οικογένειας IL-1.

Τα μέλη της αποτελούνται από 12 αντιπαράλληλους β-κλώνους που δημιουργούν ένα β-βαρέλι. Η δομή τους χαρακτηρίζεται ως β-τριφύλλι.

[53] [76]



Ιντερλευκίνη 1 (IL-1)

Ιντερλευκίνη 18 (IL-18)

3. Η **οικογένεια IL-17**: Η IL-17 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 155 αμινοξέων. Είναι ομοδιμερής (35 kDa) και χαρακτηρίζεται από τη δομή cystine-knot (η κυστίνη είναι η οξειδωμένη μορφή της κυστεΐνης). Αν και το κλασικό μοτίβο cystine knot περιέχει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες που σχηματίζονται από 3 ζεύγη κυστεϊνών, στο μοτίβο των IL-17 υπάρχουν μόνο δύο ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί, λείπει ο τρίτος, καθώς μια σερίνη έχει αντικαταστήσει την Cys σε εκείνη τη θέση. Η δομή της IL-17 είναι παρόμοια με εκείνη του NGF και των νευροτροφινών, ενώ δεν εμφανίζει δομική ομοιότητα με τις γνωστές κυτοκίνες (Εικόνα 9.6).

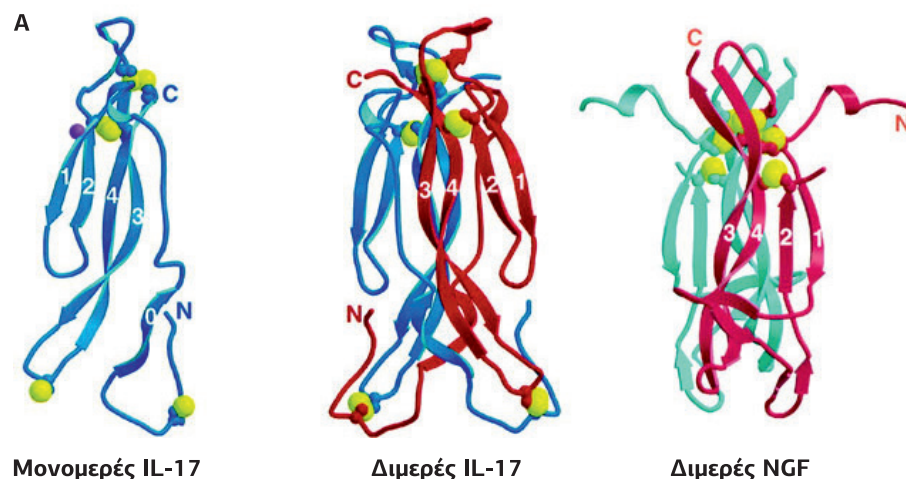
Η οικογένεια αυτή δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί πλήρως. Η IL-17 παράγεται και απελευθερώνεται από τα T_H κύτταρα ως απόκριση κυτταροτοξικών σημάτων και διεγείρει την παραγωγή των G-CSF, IL-6 και IL-8, οι οποίες επάγουν στη συνέχεια τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων.

Εικόνα 9.6

Η οικογένεια της IL-17.

A. Η IL-17 είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη με το χαρακτηριστικό μοτίβο cystine knot, με τη διαφορά ότι σχηματίζονται δύο δισουλφιδικοί δεσμοί, αντί για τρεις. Η δομή προσομοιάζει με τη δομή του NGF και των νευροτροφινών. [87][30]

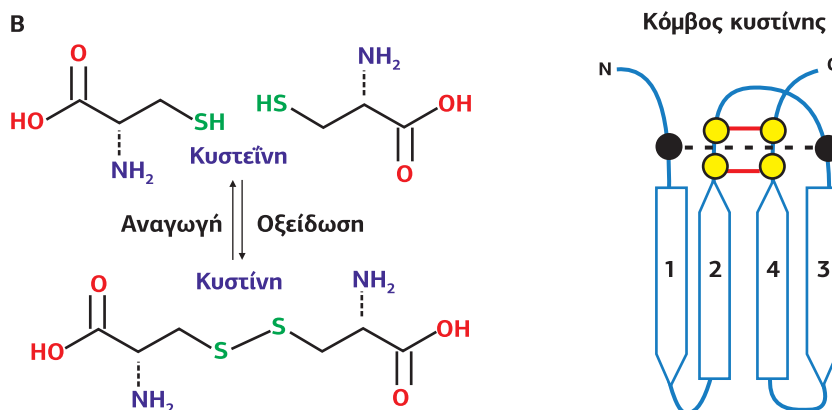
B. Η δημιουργία κυστίνης από την οξείδωση των κυστεϊνών και ο κόμβος κυστίνης. Με κίτρινο συμβολίζονται οι κυστεΐνες, που υπάρχουν στην IL-17, και με μαύρο οι κυστεΐνες που απουσιάζουν.



Μονομερές IL-17

Διμερές IL-17

Διμερές NGF



Κόμβος κυστίνης

4. Η **οικογένεια των κυτοκινών cystine-knot** (κόμβου κυστίνης): η οποία περιλαμβάνει την υπεροικογένεια των TGF-β (Transforming-Growth-Factor-β), TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3.

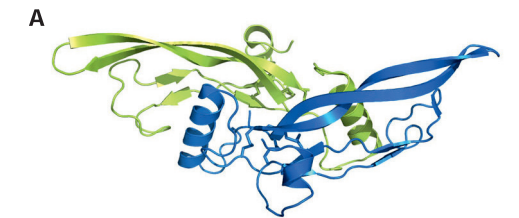
Ο TGF-β1 αποτελείται από 390 αμινοξέα, ενώ οι TGF-β2 και TGF-β3 από 412 αμινοξέα ο καθένας. Όλοι οι TGF-β κωδικοποιούνται ως μεγάλες πρόδρομες πρωτεΐνες, από τις οποίες απελευθερώνεται ο TGF-β έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση. Ο ώριμος TGF-β διμερίζεται για να παραχθεί μια ενεργή πρωτεΐνη 25 kDa με πολλές συντηρημένες περιοχές: για παράδειγμα, επτά κατάλοιπα κυστεΐνης που είναι διατηρημένα μεταξύ της οικογένειας (Εικόνα 9.7A). Οι έξι Cys σχηματίζουν 3 δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στην πρωτεΐνη, για να δημιουργηθεί η χαρακτηριστική δομή cystine knot, και η έβδομη Cys σχηματίζει έναν δισουλφιδικό δεσμό με την έβδομη Cys μιας άλλης πρωτεΐνης TGF-β, για να παραχθεί ένα διμερές.

5. Η **οικογένεια των TNFs** (Tumor Necrosis Factors). Στους TNFs ανήκουν οι TNF-α, CD40L, FasL και TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand). Είναι ομοτριμερείς. Συντίθενται ως προ-ορμόνες που βρίσκονται αρχικά συνδεδεμένες στην πλασματική μεμβράνη, από όπου αποκόπτονται με πρωτεολυτική διάσπαση. Έχουν σχήμα πυραμίδας, αποτελούνται από αντιπαράλληλους β-κλώνους, με β-δομή "jelly roll" (Εικόνα 9.7B).

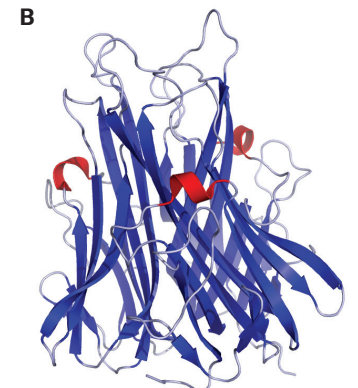
Μια τελείως διαφορετική δομή εμφανίζουν οι **χημειοκίνες**. Όλες είναι μικρές μεταξύ 8 -10 kDa και περίπου 20-50% ταυτόσημες μεταξύ τους. Διαθέτουν διατηρημένα αμινοξέα που είναι σημαντικά για τη δημιουργία της τριτοταγούς δομής τους, όπως για παράδειγμα τέσσερις κυστεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε ζεύγη, για να δημιουργήσουν ένα σχήμα "μαϊνάνδρου" που είναι χαρακτηριστικό των χημειοκινών. Οι ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί τυπικά ενώνουν το πρώτο με το τρίτο και το δεύτερο με το τέταρτο κατάλοιπο κυστεΐνης, αριθμημένα όπως εμφανίζονται στην πρωτεϊνική αλληλουχία της χημειοκίνης. Οι τυπικές χημειοκίνες παράγονται ως προ-πεπτίδια, με ένα πεπτικό σήματος (signal peptide) περίπου 20 αμινοξέων στο NH_2 -τελικό άκρο, το οποίο αποκόπτεται από το ενεργό (ώριμο) τμήμα του μορίου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έκκρισης από το κύτταρο. Οι δύο πρώτες κυστεΐνες, σε μια χημειοκίνη, βρίσκονται κοντά στο NH_2 -τελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης, με την 3η κυστεΐνη να βρίσκεται στο κέντρο του μορίου και την 4η κοντά στο $COOH$ -τελικό άκρο. Ένας βρόχος περίπου δέκα αμινοξέων ακολουθεί τις πρώτες δύο κυστεΐνες και είναι γνωστός ως N-βρόχος. Αυτός ακολουθείται από μια μονόστροφη έλικα, που ονομάζεται 3_{10} -έλικα, τρεις β-κλώνους και μία $COOH$ -τελική α-έλικα. Αυτές οι έλικες και οι κλώνοι συνδέονται με στροφές που ονομάζονται βρόχοι 30s, 40s και 50s. Η 3η και η 4η κυστεΐνη βρίσκονται στον βρόχο των 30s και στην αρχή του βρόχου 50s, αντίστοιχα (Εικόνα 9.8A).

Οι χημειοκίνες κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες με βάση τα πρώτα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στην πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι χημειοκίνες CC περιέχουν δύο γειτονικά κατάλοιπα κυστεΐνης στο NH_2 -τελικό άκρο. Οι χημειοκίνες CX περιέχουν δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στο NH_2 -τελικό άκρο, τα οποία διαχωρίζονται από ένα τυχαίο αμινοξύ. Οι χημειοκίνες C περιέχουν μία κυστεΐνη στο NH_2 -τελικό άκρο και την άλλη κυστεΐνη προς το $COOH$ -τελικό άκρο. Τέλος, οι χημειοκίνες CX3C περιέχουν τρία αμινοξέα μεταξύ των δύο καταλοίπων κυστεΐνης. Δομές των διαφορετικών ομάδων χημειοκινών φαίνονται στην Εικόνα 9.8B.

Χημειοκίνες CC. Οι CC ή β-χημειοκίνες έχουν δύο γειτονικές κυστεΐνες κοντά στο NH_2 -τελικό άκρο τους. Υπάρχουν τουλάχιστον 27 διαφορετικά μέλη αυτής της υποομάδας στα θηλαστικά, που ονομάζονται CCL-1 έως -28 (CC Ligands). Η CCL10 είναι η ίδια με την CCL9. Οι χημειοκίνες αυτής της υποοικογένειας συνήθως περιέχουν τέσσερις κυστεΐνες (C4-CC χημειοκίνες), αλλά ένας μικρός αριθμός CC χημειοκινών διαθέτει έξι κυστεΐνες (C6-CC χημειοκίνες). Οι C6-CC χημειοκίνες περιλαμβάνουν τις CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 και CCL28. Οι CC χημειοκίνες επάγουν τη μετανάστευση μονοκυττάρων και άλλων κυτταρικών τύπων, όπως τα κύτταρα NK και τα δενδριτικά κύτταρα.



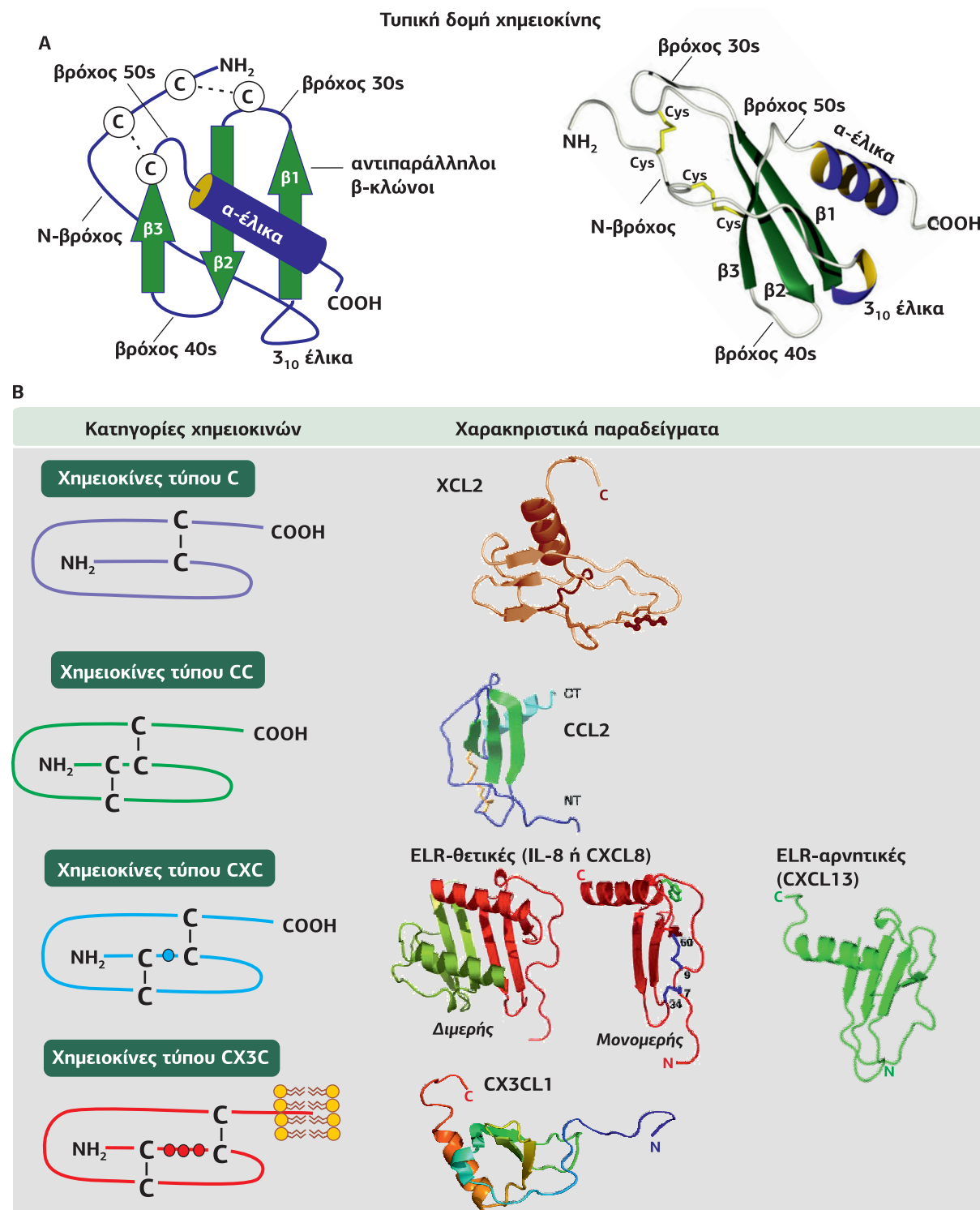
Transforming Growth Factor - β (TGF-β)



Tumor Necrosis Factor - α (TNF-α)

Εικόνα 9.7

A. Η δομή του ώριμου TGF-β. Ένα τυπικό μονομερές TGF-β αποτελείται από το μοτίβο cystine knot με δύο ζεύγη αντιπαράλληλων β-κλώνων που εκτείνονται από μια α-έλικα. Οι β-κλώνοι σχηματίζουν μια κοίλη όσο και μια κυρτή επιφάνεια που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα. [66] [24] B. Η δομή του ομοτριμερούς TNF-α.



Εικόνα 9.8

Ταξινόμηση των χημειοκινών με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Α. Τοπολογία μιας τυπικής χημειοκίνης. Η γενική δομή των χημειοκινών συνίσταται από: α. ένα κοντό NH_2 -τελικό άκρο, β. έναν εκτεταμένο NH_2 -τελικό βρόχο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση του υποδοχέα και περιέχει δύο κυστεΐνες που δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς (με τον βρόχο 30s και τον β3 κλώνο), γ. μια σύντομη στροφή της έλικας 3_{10} που οδηγεί σε ένα τριπλό αντιπαράλληλο β-φύλλο, και δ. μια COOH -τελική α-έλικα, η οποία διπλώνει πάνω από το β-φύλλο και βοηθά στη σταθεροποίηση της συνολικής τριτοταγούς δομής. [58] [33] Β. Οι χημειοκίνες κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες με βάση τα πρώτα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης στην πολυπεπτιδική τους αλυσίδα: χημειοκίνες CC (δύο γειτονικές Cys στο NH_2 -τελικό άκρο), CXC (οι δύο Cys του NH_2 -τελικού άκρου διαχωρίζονται από ένα τυχαίο αμινοξύ), C (περιέχουν μία Cys στο NH_2 -τελικό άκρο και την άλλη Cys προς το COOH -τελικό άκρο), και CX3C (περιέχουν τρία αμινοξέα μεταξύ των δύο Cys).

Χημειοκίνες CXC. Οι δύο NH_2 -τελικές κυστεΐνες των CXC χημειοκινών διαχωρίζονται από ένα τυχαίο αμινοξύ. Υπάρχουν 17 διαφορετικές CXC χημειοκίνες, οι οποίες υποδιαιρούνται σε δύο κατηγορίες: εκείνες που περιέχουν μία ειδική αλληλουχία αμινοξέων Glu-Leu-Arg (ή ELR), πριν από την πρώτη κυστεΐνη του CXC, και εκείνες χωρίς την αλληλουχία ELR. Οι ELR-θετικές CXC (π.χ. IL-8, η οποία συναντάται σε μονομερή και διμερή μορφή, με τη μονομερή να εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα της) προκαλούν εξειδικευμένα τη μετανάστευση ουδετερόφιλων και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς CXCR1 και CXCR2. Οι χημειοκίνες CXC που στερούνται την αλληλουχία ELR, όπως η CXCL13, προκαλούν τη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων και συνδέονται στους υποδοχείς CXCR1-7.

Χημειοκίνες C. Η τρίτη ομάδα χημειοκινών είναι γνωστή ως χημειοκίνες C και διαφέρει από όλες τις άλλες χημειοκίνες, καθώς έχει μόνο δύο κυστεΐνες. Μία NH_2 -τελική κυστεΐνη και μία COOH -τελική κυστεΐνη. Έχουν περιγραφεί δύο χημειοκίνες για αυτή την υποομάδα και ονομάζονται XCL1 και XCL2.

Χημειοκίνες CX3C. Μια τέταρτη ομάδα έχει, επίσης, ανακαλυφθεί, τα μέλη της έχουν τρία αμινοξέα μεταξύ των δύο κυστεΐνών και ονομάζονται CX3C χημειοκίνες. Η μόνη χημειοκίνη CX3C που ανακαλύφθηκε έως σήμερα είναι η CX3CL1. Είναι ταυτόχρονα εκκρινόμενη και συνδεδεμένη στην επιφάνεια του κυττάρου που την εκφράζει, δρώντας τόσο ως χημειοελκυστικό όσο και ως μόριο προσκόλλησης.

1.2 Δομή και ταξινόμηση των υποδοχών των κυτοκινών

Οι κυτοκίνες για να δράσουν συνδέονται στους υποδοχείς τους με μεγάλη συγγένεια (K_D 10^{-10} - 10^{-12} M). Λόγω της τόσο μεγάλης συγγενείας τους μπορούν να ασκούν τη βιολογική τους δράση σε picomoles.

Οι υποδοχείς των κυτοκινών κατατάσσονται σε πέντε οικογένειες, με βάση τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Εκτός από τον υποδοχέα του CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), ο οποίος συνδέεται στη μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας GPI, και των υποδοχών των χημειοκινών που είναι GPCRs και έχουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές, οι υποδοχείς κυτοκινών είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν μία φορά τη μεμβράνη. Έχουν το NH_2 -τελικό τους άκρο στην εξωκυτταρική περιοχή, όπου υπάρχει η θέση σύνδεσης του προσδέτη, και το COOH -τελικό στο κυτταρόπλασμα, χωρίς να παρουσιάζουν ενδογενή ενζυμική δραστηριότητα. Στην ενεργή τους μορφή είναι ομοδιμερείς, ετεροδιμερείς, τριμερείς ή ολιγομερείς. Εκτός από τους υποδοχείς των χημειοκινών, οι οποίοι είναι GPCRs, οι υπόλοιποι υποδοχείς των κυτοκινών συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες Tyr (υποδοχείς τύπου I και II) ή Ser/Thr (υποδοχείς TNF-Rs και IL-1R) ή έχουν ενδογενή δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr (TGF-βRs).

1. Οι **υποδοχείς των κυτοκινών τύπου I**, γνωστοί και ως υπεροικογένεια της ερυθροποϊπτίνης, περιλαμβάνει περίπου 30 μέλη. Η εξωκυτταρική περιοχή τους χαρακτηρίζεται από μια περιοχή 200 αμινοξέων, γνωστή ως **CRH** (Cytokine Receptor Homology), η οποία περιέχει την περιοχή σύνδεσης της κυτοκίνης. Η αλληλουχία CRH συνίσταται από δύο περιοχές όμοιες με την ινωδονεκτίνη (FnIII-like), που συνδέονται με έναν κοντό άκαμπτο σύνδεσμο. Η NH_2 -τελική περιοχή της CRH (άνω FnIII) περιέχει τέσσερις καλά συντηρημένες Cys που δημιουργούν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η COOH -τελική περιοχή της CRH (κάτω FnIII) περιέχει το συντηρημένο μοτίβο WSxWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser), με εξαίρεση τον υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης, που περιέχει την αλληλουχία YGEFS. Το μοτίβο WSxWS δεν είναι απαραίτητο για τη σύνδεση της κυτοκίνης, είναι όμως σημαντικό για την έκφραση και τη σταθερότητα του υποδοχέα και θεωρείται ότι αποτελεί μια θέση σύνδεσης για προσδέτες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας. Το μοτίβο WSxWS και οι συντηρημένες Cys είναι τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν τους υποδοχείς κυτοκινών τύπου I.

Οι υποδοχείς αυτού του τύπου, στην κυτταροπλασματική τους πλευρά, περιέχουν δύο "κιβώτια", το πλούσιο σε Pro Box1, που βρίσκεται κοντά στην πλασματική μεμβράνη και είναι καλά συντηρημένο, και το λιγότερο συντηρημένο Box2 που πε-

ριέχει όξινα, υδρόφοβα και αρωματικά αμινοξέα. Το Box1 είναι απαραίτητο για τη σηματοδότηση μέσω των κινάσων Jak και δρα ως θέση σύνδεσης υψηλής συγγένειας με τις κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης Jak. Το Box2 φαίνεται, επίσης, να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τις Jak.

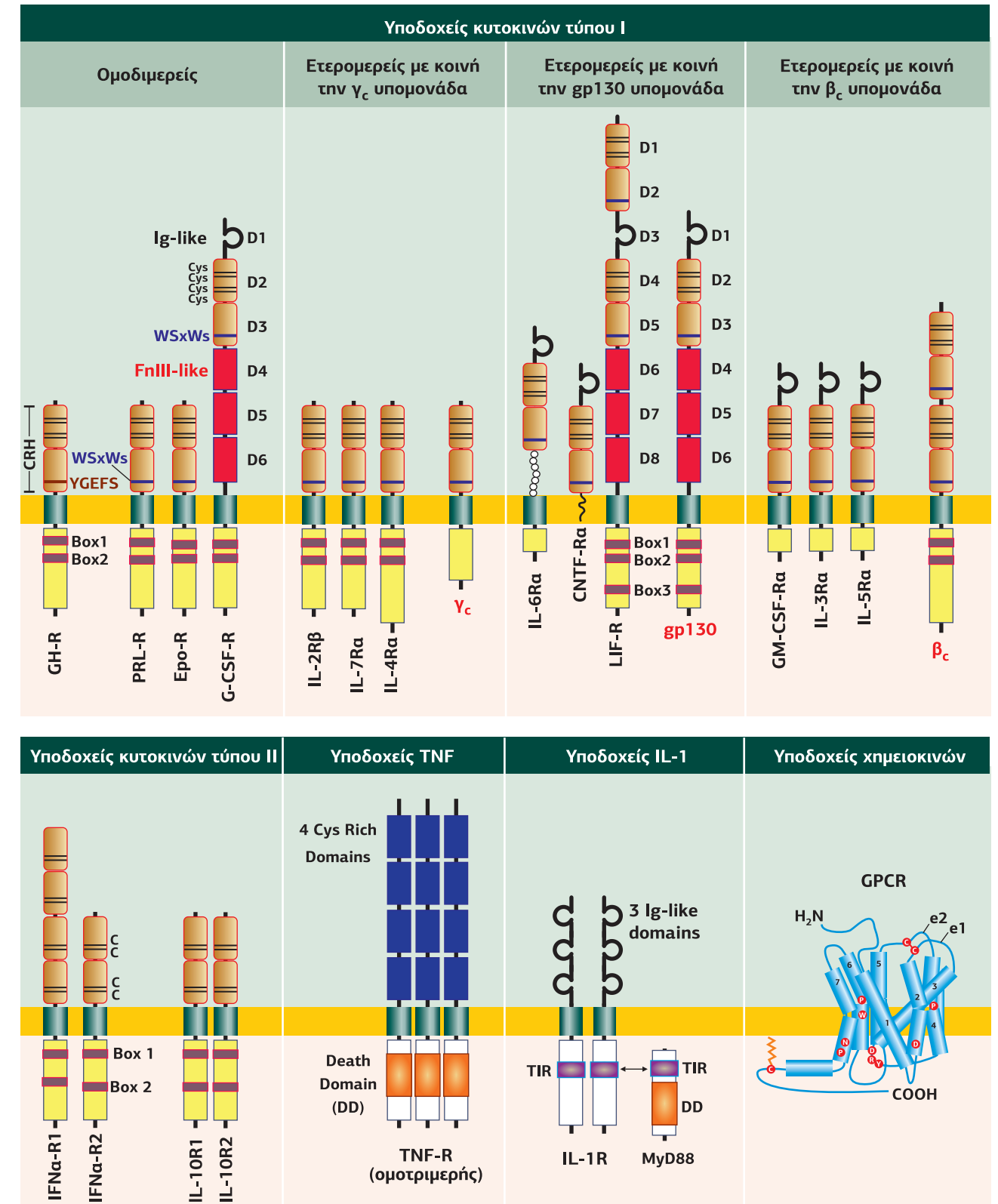
Οι υποδοχείς τύπου I είναι διμερείς ή τριμερείς και διακρίνονται σε τέσσερις υποκατηγορίες (Εικόνα 9.9):

- Υποδοχείς **μονής αλυσίδας**. Είναι ομοδιμερείς. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι EpoR, PRL-R, GH-R και G-CSFR.
 - Υποδοχείς που έχουν μια κοινή gp130 υπομονάδα, η οποία περιέχει επιπλέον μια περιοχή FnIII-like και μια περιοχή Ig-like στο NH₂-τελικό της άκρο. Είναι ετεροδιμερείς ή ετεροτριμερείς. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ο IL-6R, ο IL-11R, ο υποδοχέας του παράγοντα παρεμπόδισης λευχαιμιών LIF (Leukemia Inhibitory Factor), ο υποδοχέας του νευροτροφικού παράγοντα βλεφαριδωτών κυττάρων CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) και ο υποδοχέας της OSM (Oncostatin M). Μια υποομάδα συγκροτούν και οι υποδοχείς IL-12R, IL-23R, IL-27R και IL-35R.
 - Υποδοχείς που έχουν μια κοινή γ_c αλυσίδα. Είναι ετεροδιμερείς ή ετεροτριμερείς. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R και IL-15R.
 - Υποδοχείς που έχουν μια κοινή β_c αλυσίδα. Είναι ετεροδιμερείς. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι IL-3R, IL-5R και GM-CSF-R.
2. Οι **υποδοχείς κυτοκινών τύπου II** (γνωστοί και ως οικογένεια ιντερφερόνης) είναι οι ετεροδιμερείς υποδοχείς της ιντερφερόνης α, β και γ (IFNα-R, IFNβ-R, IFNγ-R), και της IL-10. Μετά την ανακάλυψη νέων κυτοκινών η ομάδα αυτή περιλαμβάνει πλέον ακριβώς δώδεκα μέλη. Έντεκα από αυτά συνδυάζονται ως διαφορετικά ετεροδιμερή για να μεταδώσουν το σήμα από 27 κυτοκίνες που χωρίζονται σε τέσσερις δομικά συγγενείς ομάδες: έξι κυτοκίνες της οικογένειας IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 και IL-29), δεκαεπτά IFN τύπου I, μία IFN τύπου II και τρεις IFN-λ. Οι υποδοχείς κυτοκινών τύπου II έχουν στην εξωκυτταρική περιοχή τα τέσσερα καλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, αλλά δεν περιέχουν το μοτίβο WSxWS. Στην ενδοκυτταρική τους περιοχή περιέχουν τα κιβώτια Box1 και Box2, στα οποία συνδέονται οι κινάσες Jak και Tyk.
3. Οι **υποδοχείς του TNF-α και β**. Περιέχουν τέσσερις εξωκυτταρικές περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης και περιλαμβάνουν, εκτός από τους υποδοχείς του TNF, τους υποδοχείς CD40 του συνδιεγέρτη CD40L (Cluster of differentiation 40), ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και συμμετέχει στην ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, και τους υποδοχείς Fas (ή FasR, CD95) της πρωτεΐνης FasL (υπεύθυνη για την απόπτωση). Οι υποδοχείς αυτοί είναι ομοτριμερείς και συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες Ser/Thr. Θα μελετηθούν στο Κεφάλαιο 10.
4. Οι **υποδοχείς της IL-1**, οι οποίοι στο ενδοκυτταρικό τους τμήμα περιέχουν

Εικόνα 9.9

Οι πέντε κατηγορίες των υποδοχέων των κυτοκινών. Α. Οι υποδοχείς των κυτοκινών τύπου I. Έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό στην εξωκυτταρική περιοχή τέσσερα καλά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης και ένα συντηρημένο μοτίβο WSxWS. Στην κυτταροπλασματική τους πλευρά περιέχουν δύο "κιβώτια" Box1 και Box2, που αποτελούνται από αλληλουχίες συντηρημένων αμινοξέων, μέσω των οποίων οι υποδοχείς κυτοκινών συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης. Οι υποδοχείς αυτοί διακρίνονται σε τέσσερις υποκατηγορίες: υποδοχείς μονής αλυσίδας - ομοδιμερείς (Epo-R, GH-R, G-CSF-R), υποδοχείς που μοιράζονται μια κοινή β_c αλυσίδα - ετεροδιμερείς (IL-3R, IL-5R, GM-CSF-R), υποδοχείς που μοιράζονται μια κοινή γ_c αλυσίδα - ετεροδιμερείς ή ετεροτριμερείς (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R, IL-15R) και υποδοχείς που μοιράζονται μια κοινή gp130 υπομονάδα. Β. Οι υποδοχείς κυτοκινών τύπου II (γνωστοί και ως οικογένεια ιντερφερόνης). Γ. Οι υποδοχείς της IL-1 ή υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών, οι οποίοι στην εξωκυτταρική τους περιοχή περιέχουν περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Διακρίνεται η σύνδεση με την MyD88. Δ. Οι υποδοχείς του TNF-α και -β, του CD40L και της πρωτεΐνης FasL. Ε. Οι υποδοχείς των χημειοκινών, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των GPCRs. Οι υποδοχείς των κυτοκινών I και II μπορεί να είναι ομοδιμερείς, όπως οι Epo-R και G-CSFR, ή ετερο-ολιγομερείς, όπως οι υποδοχείς της IL-6, IL-2, IL-4 και ο υποδοχέας του LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Διακρίνονται οι περιοχές όμοιες με την ινωδονεκτίνη (FnIII-like), όμοιες με ανοσοσφαιρίνες (Ig-like), οι περιοχές πλούσιες σε Cys, το μοτίβο WSxWS, καθώς και τα Box1 και Box2. [81]

περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και στο κυτταροπλασματικό τους περιέχουν μια χαρακτηριστική περιοχή Toll/Interleukin-1R (TIR). Αποτελούν μια ομάδα υποδοχέων καλά συντηρημένη από τα φυτά έως τα θηλαστικά, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή. Υπάρχουν τέσσερις ομάδες πρωτεϊνών που περιέχουν την περιοχή TIR στα ζώα: Toll-like receptors, Interleukin-1 receptor (IL-1R),



κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογής (π.χ. MyD88: Myeloid Differentiation) και οι υποδοχείς Toll των εντόμων και του νηματώδους *Caenorhabditis elegans*. Οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες Ser/Thr, όπως η IRAK (IL-1 Receptor–Associated Kinase), και θα μελετηθούν στο Κεφάλαιο 10.

5. Οι **υποδοχείς των χημειοκινών** είναι GPCRs και έχουν μελετηθεί στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 236). Οι υποδοχείς CCR5 και CXCR4 χρησιμοποιούνται από τον ιό HIV, ο οποίος με αυτόν τον τρόπο αναγνωρίζει και εισέρχεται στα μακροφάγα και στα T-λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα (βλ. **Εικόνα 5.9**).

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε μόνο στους υποδοχείς κυτοκινών τύπου I και II, καθώς είναι οι μόνοι που συνδέονται με κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης.

1.3 | Ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυτοκινών

Οι υποδοχείς κυτοκινών τύπου I και II, στην ενεργή τους μορφή, είναι συνήθως ετεροδιμερείς ή ολιγομερείς. Τέσσερις υπομονάδες είναι γνωστές: οι α , β_c , γ_c και gp130 (γλυκοπρωτεΐνη 130 kDa), οι οποίες εκφράζονται σε διάφορες ισομορφές, που συνδυάζονται για να σχηματίσουν έναν μεγάλο αριθμό υποδοχέων με διαφορετική εξειδίκευση ως προς τον προσδέτη. Απόκλιση από αυτό το πρότυπο αποτελούν οι υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης, της προλακτίνης, της ερυθροποιητίνης, της θρομβοποιητίνης και του αυξητικού παράγοντα των κοκκιοκυττάρων G-CSF, οι οποίοι είναι ομοδιμερείς.

Το ενδιαφέρον σημείο στους ετερο-ολιγομερείς υποδοχείς είναι ότι διαφορετικοί υποδοχείς μπορούν να χρησιμοποιούν την ίδια υπομονάδα. Για παράδειγμα, η **γ_c υπομονάδα** (c: common) του υποδοχέα της IL-2, επίσης, βρίσκεται και στους υποδοχείς των IL-4, IL-7 και IL-9. Άλλες κοινές υπομονάδες είναι η **gp130** και η **β_c υπομονάδα**.

Οι κυτοκίνες στην ελεύθερη κατάσταση υπάρχουν κυρίως ως μονομερείς και σπανιότερα ως διμερείς (IL-5, IL-10, IFN- γ). Στις περισσότερες περιπτώσεις συνδέονται ως μονομερείς στους υποδοχείς τους, οι οποίοι στην ελεύθερή τους κατάσταση υπάρχουν ως ομοδιμερείς (η οικογένεια των Epo-R) ή ετερο-ολιγομερείς (IL-2R, IL-6R κ.λπ.). Μετά τη σύνδεση της κυτοκίνης αλλάζει η διαμόρφωση της κυτταροπλασματικής περιοχής του ολιγομερούς υποδοχέα, ο οποίος μεταπίπτει στην ενεργή του μορφή.

Στους περισσότερους υποδοχείς κυτοκινών τον κύριο ρόλο στη σύνδεση του προσδέτη παίζει η μια υπομονάδα (συνήθως η α), η οποία έχει υψηλή συγγένεια για την κυτοκίνη, αλλά δεν είναι ικανή να μεταφέρει μόνη της το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Για τη μεταφορά του μηνύματος στο εσωτερικό υπεύθυνες είναι οι κοινές υπομονάδες, οι οποίες έχουν μακρύ κυτταροπλασματικό άκρο, στο οποίο περιέχονται τα μοτίβα Box1, Box2 και σε κάποιες περιπτώσεις και Box3. Στα “κιβώτια” αυτά βρίσκονται συνδεδεμένες οι κινάσες τυροσίνης Jak (ο όρος σημαίνει *Janus kinase*, αν και μια άλλη ερμηνεία λέγεται πως είναι “Just another kinase”). Οι Jak συναντώνται σε 4 ισομορφές, Jak 1-3 και Tyk2 (Tyrosine Kinase 2), οι οποίες συνδέονται στα Box1 και Box2 μέσω ειδικών NH₂-τελικών περιοχών αλληλεπίδρασης και ενεργοποιούνται αλλοστερικά με τέτοιο τρόπο, ώστε να trans-αυτοφωσφορυλιώσουν τον βρόχο ενεργοποίησής τους. Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένες κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα (καθιστώντας τον ως σημείο πρόσδεσης για πρωτεΐνες με περιοχές SH2 ή PTB) και άλλων πρωτεϊνών υποστρωμάτων, ανοίγοντας έτσι μια σειρά από σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των MAP κινάσων και του μονοπατιού PI3K-PKB.

Επιπλέον, οι κινάσες Jak είναι η αρχή ενός μονοπατιού που οδηγεί απευθείας από την περιφέρεια του κυττάρου στον πυρήνα του, θυμίζοντας αρκετά την απλή στρατηγική μεταγωγής σήματος στους προκαρυώτες. Αυτό το “σύστημα δύο συστατικών” καλείται **μονοπάτι Jak-STATs**. Οι STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης τυροσίνης. Το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί επτά

ισομορφές (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b και STAT6), οι οποίες περιέχουν SH2 και SH3 περιοχές. Μέσω των SH2 προσδένονται στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα, όπου και φωσφορυλιώνονται από τις συνδεδεμένες Jaks. Οι ενεργοποιημένοι STATs σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή λόγω αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των SH2 περιοχών τους και ομάδες φωσφορυλιωμένων τυροσινών και μεταναστεύουν στον πυρήνα. Τα γονίδια στόχοι τους χαρακτηρίζονται από ένα στοιχείο απόκρισης, που ονομάζεται **αλληλουχία ενεργοποίησης ιντερφερόνης- γ** , αν και δεν αποκρίνεται μόνο στην ιντερφερόνη- γ , αλλά σε μια ευρεία ποικιλία άλλων κυτοκινών.

Εκτός από τις κινάσες Jak, αρκετά μέλη της οικογένειας υποδοχέων τύπου I και τύπου II συνδέονται με και ενεργοποιούν κινάσες της οικογένειας Src (SFKs, Src Family Kinases) και, για μερικούς υποδοχείς, αυτό είναι ανεξάρτητο από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις Jak.

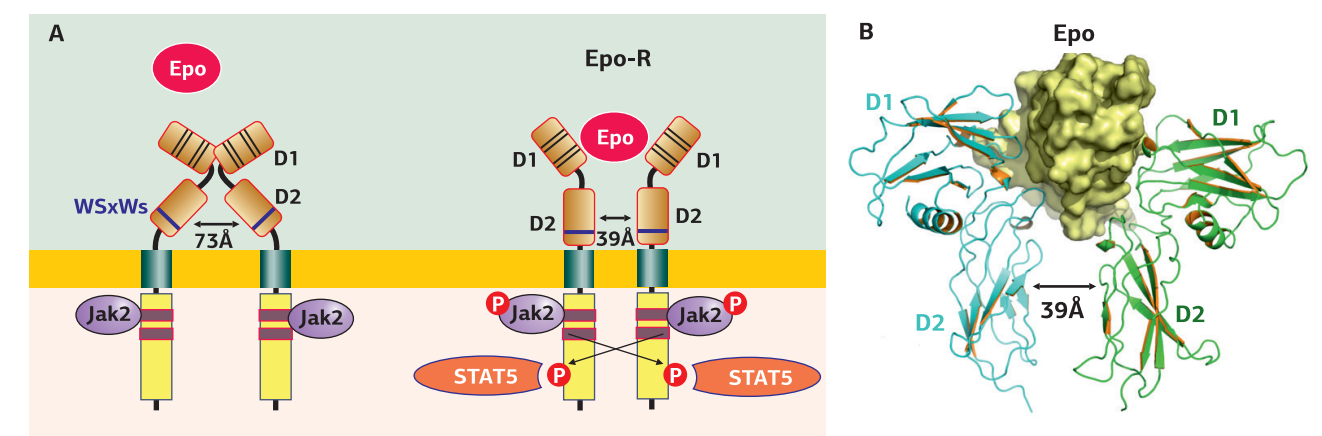
Υποδοχείς της ερυθροποιητίνης Epo-R και της αυξητικής ορμόνης GH-R

Η ερυθροποιητίνη (Epo) είναι μια κυτοκίνη που απαιτείται για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στο ανθρώπινο σώμα η Epo διεγείρει την ημερήσια παραγωγή περίπου 200 δισεκατομμυρίων νέων ερυθρών αιμοσφαιρίων, για να αντισταθμίσει την περιορισμένη διάρκεια ζωής 110-120 ημερών των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η Epo παράγεται κυρίως στους νεφρούς, εκκρίνεται στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρεται στον μυελό των οστών, όπου δρα στα προγονικά βλαστικά κύτταρα, διεγείροντας την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροποίηση). Η Epo δρα αφού συνδεθεί στον ειδικό υποδοχέα της στην επιφάνεια των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, για να διεγείρει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Η απουσία της Epo (Epo^{-/-}) ή του υποδοχέα Epo-R (Epo-R^{-/-}) σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα εμβρυϊκό θάνατο λόγω σοβαρής αναιμίας.

Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης (Epo-R) ανήκει στη μειοψηφία υποδοχέων κυτοκινών, μαζί με τους υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης, της προλακτίνης και του G-CSF, που χρησιμοποιούν μόνον ένα είδος υπομονάδας για σηματοδότηση. Είναι ομοδιμερείς και η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της κυτταροπλασματικής περιοχής, με αποτέλεσμα οι κυτταροπλασματικές περιοχές των δύο υπομονάδων να πλησιάζουν μεταξύ τους και να ενεργοποιούνται οι κινάσες Jak1 και Jak2 που βρίσκονται συνδεδεμένες στα Box1 των δύο υπομονάδων.

Πιο συγκεκριμένα, η εξωκυτταρική περιοχή του Epo-R χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές D1 και D2. Απουσία προσδέτη, η απόσταση μεταξύ των δύο D2 περιοχών είναι 73 Å. Η σύνδεση της Epo στις περιοχές D1 προσελκύει τις D2 μεταξύ τους, μειώνοντας την απόστασή τους σε 39 Å. Ως αποτέλεσμα, πλησιάζουν και οι κυτταροπλασματικές περιοχές των δύο υπομονάδων επιτρέποντας την trans-φωσφορυλίωση από τις κινάσες Jak2, οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες στα Box1. Στις φωσφορυλιωμένες Tyr συνδέεται ο μεταγραφικός παράγοντας STAT5 (**Εικόνα 9.10**).

Εικόνα 9.10
Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης.
Α. Διαμόρφωση ενός διμερούς Epo-R απουσία και παρουσία του προσδέτη (Epo). Η εξωκυτταρική περιοχή του Epo-R χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές D1 και D2, οι οποίες συνιστούν την CRH περιοχή. Απουσία προσδέτη, η απόσταση μεταξύ των δύο D2 περιοχών είναι 73 Å. Η σύνδεση της Epo στην περιοχή D1 προσελκύει τις D2 μειώνοντας την απόσταση μεταξύ τους σε 39 Å. Ως αποτέλεσμα, πλησιάζουν και οι κυτταροπλασματικές περιοχές των δύο υπομονάδων επιτρέποντας την trans-φωσφορυλίωση από τις κινάσες Jak. Β. Κρυσταλλική δομή των εξωκυτταρικών περιοχών D1 και D2 του υποδοχέα Epo-R σε σύνδεση με την Epo. [88]

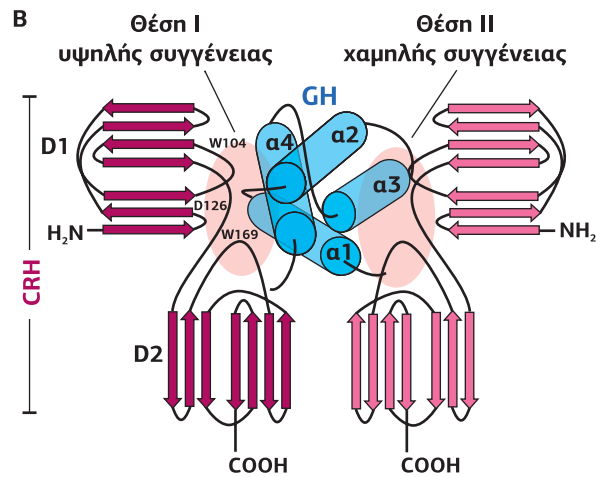


Η **αυξητική ορμόνη GH** (Growth Hormone) συντίθεται και εκκρίνεται από τα σωματοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης (2 mg/μέρα) και διεγείρει την ανάπτυξη ουσιαστικά όλων των ιστών του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των οστών. Η GH είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική σωματική ανάπτυξη, καθώς διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών και αυξάνει τη διάσπαση του λίπους, για να παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για την ανάπτυξη των ιστών. Επίσης, ανταγωνίζεται τη δράση της ινσουλίνης. Η GH μπορεί να δράσει άμεσα στους ιστούς, αλλά μεγάλο μέρος της δράσης της προκαλείται από τη διέγερση του ήπατος και άλλων ιστών για την παραγωγή και απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων που μοιάζουν με την ινσουλίνη, κυρίως του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1).

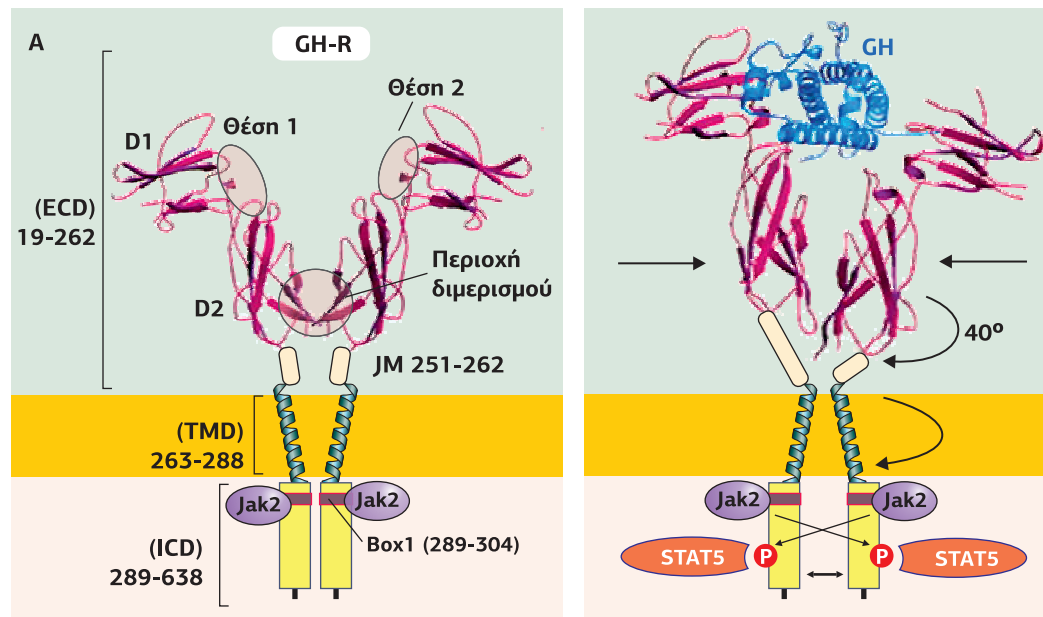
Απουσία προσδέτη, ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης GH-R συναντάται ως ομοδιμερής. Η κάθε υπομονάδα είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 638 αμινοξέων, με μια εξωκυτταρική περιοχή CRH (D1 και D2) και μια μακριά κυτταροπλασματική περιοχή (350 αα). Ο GH-R ήταν ο πρώτος υποδοχέας κυτοκινών τύπου I που κλωνοποιήθηκε και ανακαλύφθηκε η εξωκυτταρική κρυσταλλική του δομή.

Η GH συνδέεται πρώτα με υψηλή συγγένεια στη μία υπομονάδα, σε μια θέση γνωστή ως θέση 1 (site 1) και εν συνεχεία συνδέεται με χαμηλότερη συγγένεια στη δεύτερη υπομονάδα σε μια θέση γνωστή ως θέση 2 (site 2). Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη σύνδεση ορμόνης / υποδοχέα είναι η Trp104 (της περιοχής D1) και η Trp169 (της περιοχής D2), που βρίσκονται στη θέση 1. Στην συνέχεια, η GH συνδέεται στην ασθενέστερη, θέση 2 της δεύτερης υπομονάδας, η οποία περιστρέφεται κατά 40°. Αυτή η επαναδιαμόρφωση διευκολύνει την ισχυρή αλληλεπίδραση των πλησίων της μεμβράνης περιοχών των δύο υπομονάδων, που ονομάζονται περιοχές διμερισμού ή θέση 3, με σημαντική συμβολή στη συνολική σταθερότητα του τριμερούς συμπλόκου. Οι Jak2, που βρίσκονται συνδεδεμένες στα Box1, ενεργοποιούνται οδηγώντας στην τριφωσφορυλίωση Tyr της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα και στην προσέλκυση των STAT5.

Η GH ασκεί μερικά από τα αποτελέσματά της, όπως ο πολλαπλασιασμός των χονδροκυττάρων, μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών, MAPK/ ERK. Μέσω της οδού σηματοδότησης Jak-STAT διεγείρει την παραγωγή IGF-1.

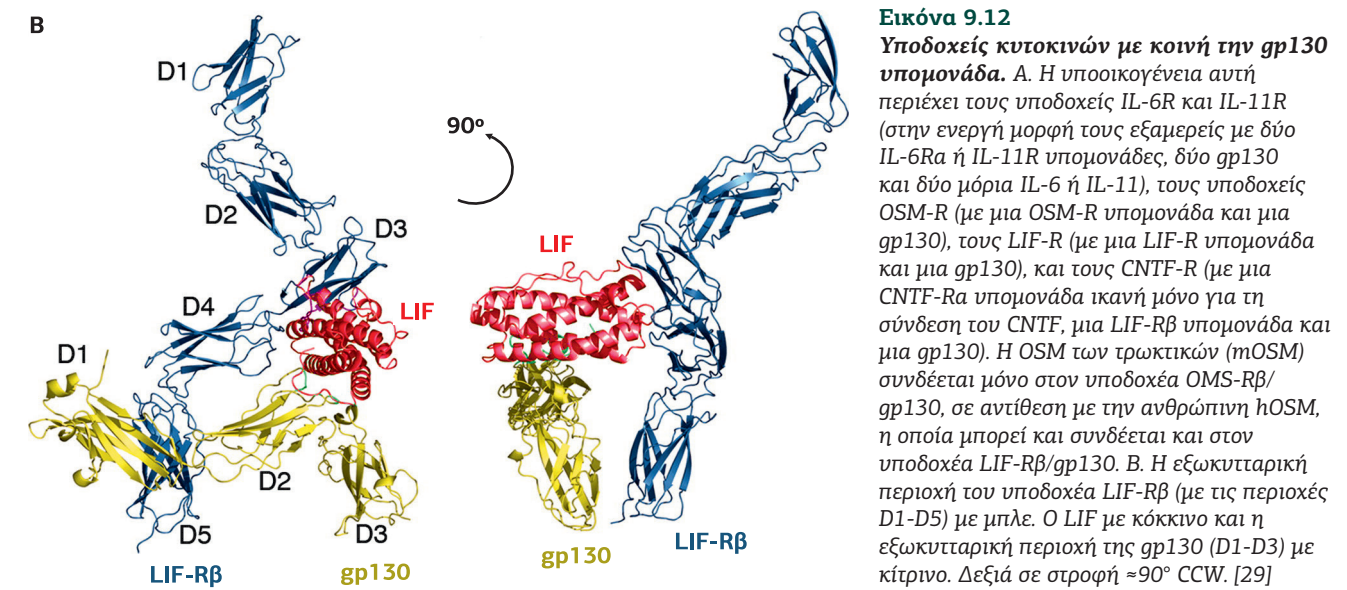
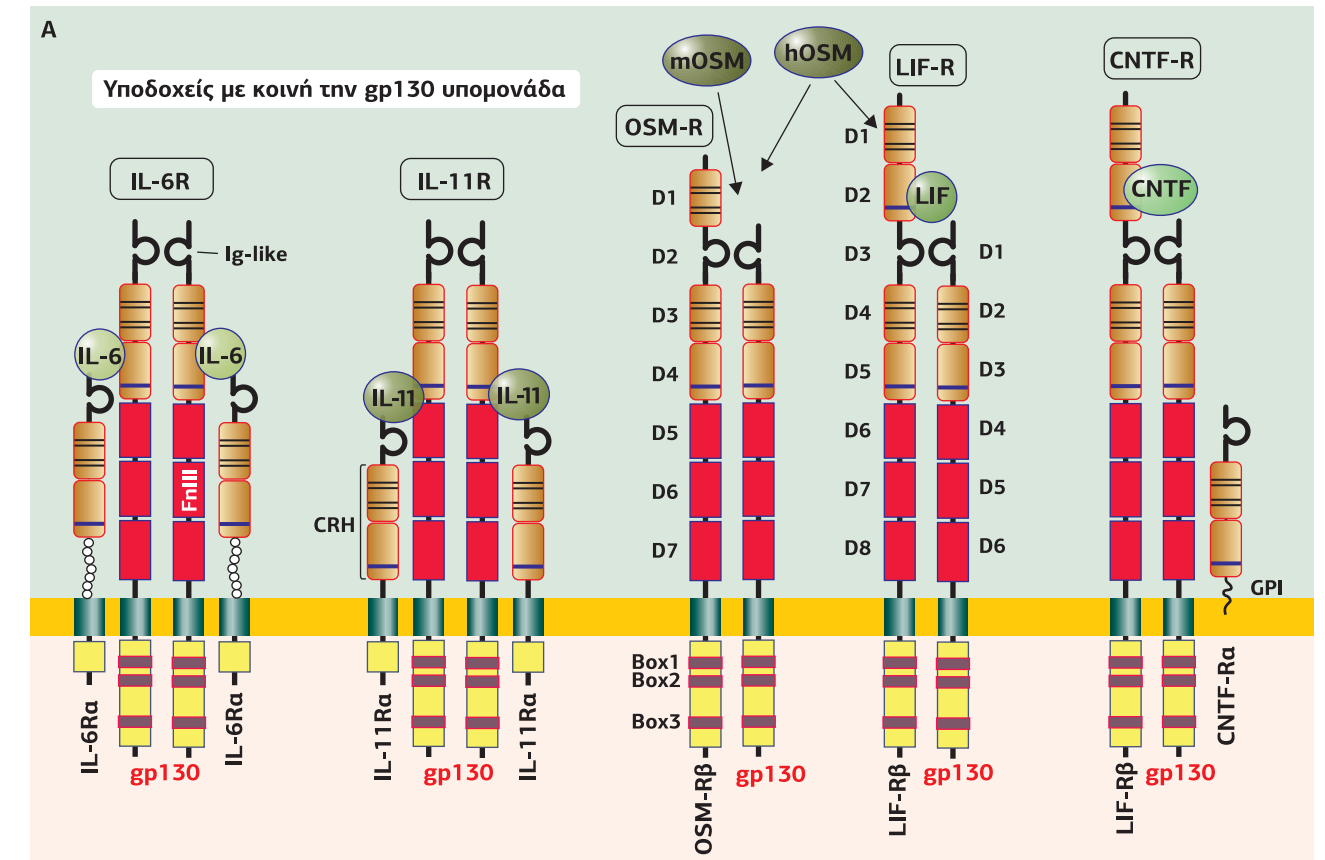


Εικόνα 9.11
Υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης, GH-R. Α. Ο υποδοχέας της GH είναι ομοδιμερής. Το εξωκυτταρικό του άκρο αποτελείται από δύο περιοχές, D1 και D2, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση της GH (περιοχή CRH). Αρχικά η ορμόνη συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στη θέση 1 και στη συνέχεια με χαμηλότερη συγγένεια στη θέση 2. [5] [6] Β. Λεπτομέρεια της εξωκυτταρικής περιοχής σύνδεσης του GH-R, όπου διακρίνονται η θέση I και η θέση II.



Σε ορισμένες περιπτώσεις η εξωκυτταρική περιοχή του GH-R διασπάται με πρωτεόλυση από την πλήρη διαμεμβρανική μορφή του υποδοχέα, δημιουργώντας μια διαλυτή πρωτεΐνη που διατηρεί την ικανότητα σύνδεσης της GH. Αυτή η πρωτεΐνη είναι γνωστή ως πρωτεΐνη σύνδεσης της αυξητικής ορμόνης GHBP (Growth Hormone-Binding Protein) και διαδραματίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο στη ρύθμιση της δράσης της GH.

Υποδοχείς της IL-6: Πρότυπο υποδοχέων που μοιράζονται την gp130

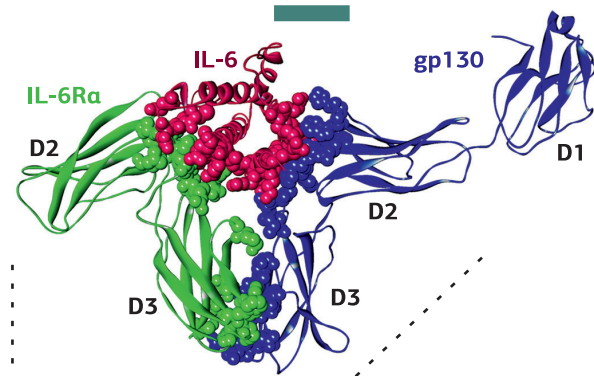


Εικόνα 9.12
Υποδοχείς κυτοκινών με κοινή την gp130 υπομονάδα. Α. Η υποοικογένεια αυτή περιέχει τους υποδοχείς IL-6R και IL-11R (στην ενεργή μορφή τους εξαμερείς με δύο IL-6Rα ή IL-11R υπομονάδες, δύο gp130 και δύο μόρια IL-6 ή IL-11), τους υποδοχείς OSM-R (με μια OSM-R υπομονάδα και μια gp130), τους LIF-R (με μια LIF-R υπομονάδα και μια gp130), και τους CNTF-R (με μια CNTF-Rα υπομονάδα ικανή μόνο για τη σύνδεση του CNTF, μια LIF-Rβ υπομονάδα και μια gp130). Η OSM των τρωκτικών (mOSM) συνδέεται μόνο στον υποδοχέα OSM-Rβ/gp130, σε αντίθεση με την ανθρώπινη hOSM, η οποία μπορεί και συνδέεται και στον υποδοχέα LIF-Rβ/gp130. Β. Η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα LIF-Rβ (με τις περιοχές D1-D5) με μπλε. Ο LIF με κόκκινο και η εξωκυτταρική περιοχή της gp130 (D1-D3) με κίτρινο. Δεξιά σε στροφή =90° CCW. [29]

Εικόνα 9.13

A. Ενεργοποίηση και σχηματισμός ολιγομερούς υποδοχέα IL-6, μετά τη σύνδεση της κυτοκίνης. Αρχικά η IL-6 μέσω της θέσης I συνδέεται στην CRH περιοχή (D2, D3) της IL-6Ra υπομονάδας. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου IL-6/IL-6Ra, αυτό το σύμπλεγμα συνδέεται με την CRH περιοχή της gp130 (D2, D3) μέσω αλληλεπίδρασης με τη θέση II της IL-6, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο τριμερές σύμπλεγμα. Αυτό το σύμπλοκο, στη συνέχεια, διμερίζεται με ένα άλλο τριμερές σύμπλεγμα μέσω αλληλεπίδρασης με τη θέση III και με την περιοχή D1 της gp130, για να σχηματίσει ένα εξαμερές ικανό για σηματοδότηση. [28] [63]

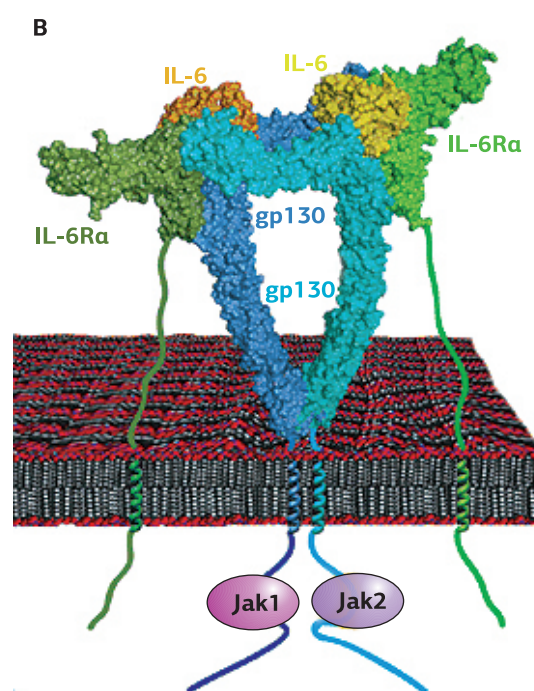
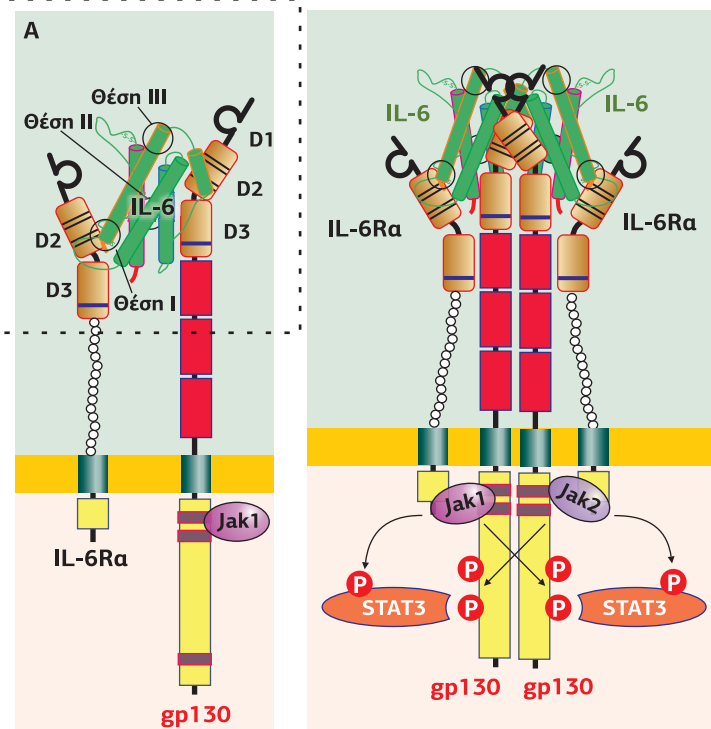
B. Τριδιάστατη αναπαράσταση του εξαμερούς IL-6, IL-6Ra και gp130.



Η gp130 είναι η κοινή υπομονάδα των “ψηλών” υποδοχέων κυτοκινών, που περιέχουν περισσότερες από μία περιοχές CRH, και χρησιμεύει στη σηματοδότηση των IL-6, IL-11, IL-27, LIF (Leukaemia Inhibitory Factor), OSM (Oncostatin-M) και CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor). Όλοι αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από δύο υπομονάδες που έχουν ρόλο μεταφοράς του μηνύματος, οι οποίες είναι είτε δύο gp130 (στην περίπτωση των IL-6R και IL-11R) είτε μία gp130 και μία LIF-Rβ (στην περίπτωση των υποδοχέων που αποκρίνονται στην OSM, στον LIF ή στον CNTF), είτε μία gp130 και μία OSM-Rβ (η OSM είναι η μόνη κυτοκίνη που μπορεί να επάγει συνδυασμούς υποδοχέων gp130/ LIF-R και gp130/ OSM-R). Οι υποδοχείς των IL-6 και IL-11 περιέχουν και δύο α-υπομονάδες, που είναι εξειδικευμένες στη σύνδεση της κυτοκίνης, ενώ ο υποδοχέας του CNTF περιέχει μία CNTF-Ra (Εικόνα 9.12).

Η **ιντερλευκίνη-6 (IL-6)** αναγνωρίστηκε αρχικά ως παράγοντας διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων, αλλά σήμερα είναι γνωστή ως μια πλειοτροπική κυτοκίνη που παρουσιάζει τόσο φλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το κυτταρικό της πλαίσιο. Παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση, την αναγέννηση των ιστών και τον σχηματισμό ογκών.

Ο υποδοχέας της IL-6 είναι το πρωτότυπο των υποδοχέων κυτοκινών που χρησιμοποιεί την κοινή υπομονάδα gp130 και ως α-υπομονάδα την IL-6Ra, η οποία όμως έχει μια κοντή κυτταροπλασματική ουρά και δεν είναι ικανή να μεταφέρει μόνη της το σήμα στο κυτταρόπλασμα. Η υπομονάδα IL-6Ra περιέχει τρεις εξωκυτταρικές περιοχές (D1-D3), από τις οποίες οι D2 και D3 αποτελούν την CRH. Η gp130 περιέχει έξι περιοχές (D1-D6). Αρχικά η IL-6 μέσω της θέσης I συνδέεται στην CRH περιοχή της IL-6Ra υπομονάδας. Μετά τον σχηματισμό του συμπλόκου IL-6/IL-6Ra, αυτό το σύμπλεγμα συνδέεται με την CRH περιοχή της gp130 (που βρίσκεται στις D2-D3) μέσω αλληλεπίδρασης με τη θέση II της IL-6, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο τριμερές σύμπλεγμα, που επίσης δεν είναι ικανό για μετάδοση του μηνύματος. Αυτό το σύμπλοκο, στη συνέχεια, διμερίζεται με ένα άλλο τριμερές σύμπλεγμα μέσω αλληλεπίδρασης με τη θέση III και με την περιοχή D1 της gp130, για να σχηματίσει ένα εξαμερές ικανό για



σηματοδότηση (Εικόνα 9.13).

Η gp130 περιέχει στο κυτταροπλασματικό της τμήμα δύο κιβώτια, Box1 και Box2, μέσω των οποίων βρίσκεται μόνιμα συνδεδεμένη με τις κινάσες Jak1 και Jak2. Στο ολιγομερές σύμπλοκο που δημιουργείται, η κινάση Tyr ενεργοποιείται και το σήμα μεταφέρεται στους μεταγραφικούς παράγοντες STAT3.

Στην οικογένεια των υποδοχέων IL-6Rs ανήκει και η ομάδα των υποδοχέων IL-12Rs. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ετεροδιμερείς: **IL-12R** (IL-12Rβ1, η οποία αποτελείται από 5 FnIII-like εξωκυτταρικές περιοχές, και IL-12Rβ2, η οποία αποτελείται από 5 FnIII-like περιοχές και μια NH₂-τελική Ig-like), **IL-23R** (IL-23R, η οποία αποτελείται από δύο FnIII-like περιοχές και μια NH₂-τελική Ig-like, και IL12Rβ1), **IL-27R** (IL-27Ra ή WSX1 η οποία αποτελείται από 5 FnIII-like περιοχές, και gp130) και **IL-35R** (IL-12Rβ2 και gp130).

Υποδοχείς της IL-2: Πρότυπο υποδοχέων που μοιράζονται την γ_c υπομονάδα

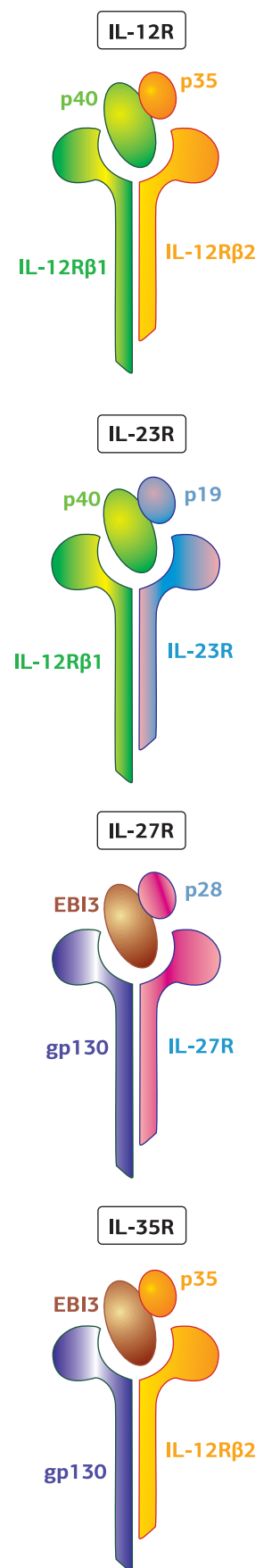
Η υποοικογένεια των υποδοχέων IL-2 περιλαμβάνει τους υποδοχείς των κυτοκινών IL-4, IL-7, IL-9, IL-21 και IL-15, οι οποίοι έχουν κοινή την γ_c υπομονάδα. Οι IL-4R, IL-7R, IL-9R και IL-21R αποτελούνται από 2 υπομονάδες, α και γ_c, ενώ οι IL-2R και IL-15R αποτελούνται από τρεις, α, β και γ_c υπομονάδες.

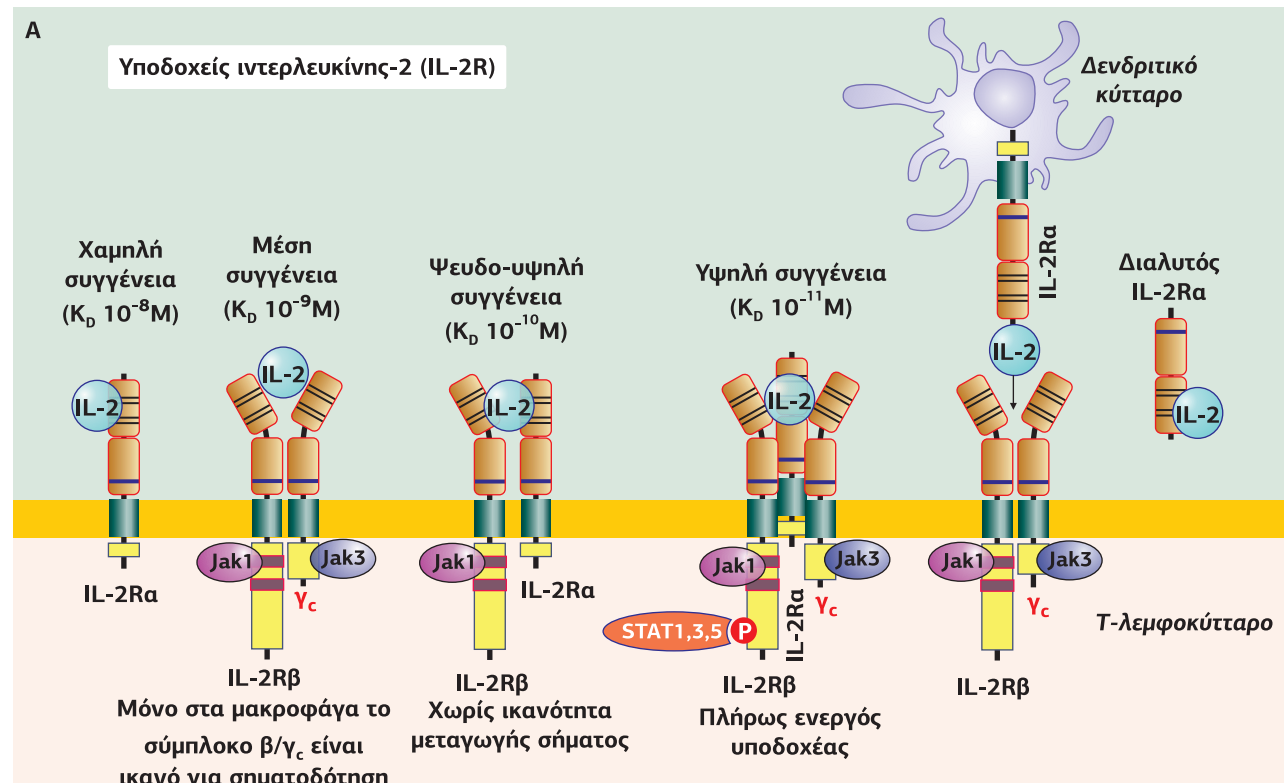
Η ιντερλευκίνη-2 (IL-2) είναι μία κυτοκίνη 15,5 kDa, με δομή δεσμίδας 4 α-ελίκων, που παράγεται κυρίως από CD4⁺ T_H-λεμφοκύτταρα έπειτα από διέγερση κάποιου αντιγόνου, αλλά παράγεται επίσης σε μικρότερο βαθμό από τα CD8⁺ T_C-λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα, τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα σιτευτικά. Η IL-2 έχει μια ειδική λειτουργία στον έλεγχο των T-λεμφοκυττάρων. Όταν τα T_H-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται, απελευθερώνουν την IL-2, η οποία με αυτοκρινή τρόπο ενεργοποιεί τα T_H-λεμφοκύτταρα επάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους. Εκτός από την ισχυρή δράση αυξητικού παράγοντα των T_H-λεμφοκυττάρων, η IL-2 επάγει τον πολλαπλασιασμό των NK κυττάρων και αυξάνει την κυτταρολυτική τους δράση, προάγει την παραγωγή και τον πολλαπλασιασμό αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα και, πρόσφατα, η δράση της έχει επεκταθεί στην προαγωγή της διαφοροποίησης των T_H1 και T_H2.

Η IL-2 ήταν η πρώτη κυτοκίνη που διαπιστώθηκε ότι δρα μέσω μιας θέσης πρόσδεσης της κυτταρικής επιφάνειας που ικανοποιεί όλες τις απαιτήσεις για να χαρακτηριστεί ως κλασικός υποδοχέας ορμονών, όπως αρχικά ορίστηκε από τον John Newport Langley το 1905 (βλ. σελ. 51). Ο υποδοχέας της είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από τρεις ξεχωριστές μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες, την IL-2Ra (ή CD25), την IL-2Rβ (ή CD122) και την γ_c (ή CD132). Η α υπομονάδα δεν συμμετέχει στη σηματοδότηση, ενώ οι β και γ_c αλυσίδες είναι απαραίτητες για τη σηματοδότηση. Οι τρεις υπομονάδες χαρακτηρίζονται από διαφορετικές συγγένειες για την IL-2: η μονομερής IL-2Ra έχει χαμηλή συγγένεια, το διμερές σύμπλοκο IL-2Rβ/γ_c έχει ενδιάμεση συγγένεια και το τριμερές IL-2Ra/β/γ_c διαθέτει υψηλή συγγένεια.

Η IL-2Ra εκφράζεται μόνο από τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και γι' αυτό συχνά αναφέρεται ως αντιγόνο ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων (TAC, T-cell Activation Antigen). Η IL-2Ra υπομονάδα έχει κυρίως δράση ενός ρυθμιστή της συγγένειας και δεν μπορεί από μόνη της να μεταφέρει το μήνυμα στο κυτταρόπλασμα. Στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, όταν συνδέεται στις δύο άλλες υπομονάδες, τους προσδίδει υψηλή συγγένεια για την IL-2, καθώς μόνες τους συνδέουν την IL-2 με χαμηλή συγγένεια. Παρόλο που η γ_c εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα λεμφοκύτταρα, η έκφραση των α και β είναι περιορισμένη και αυξάνεται σημαντικά μετά την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων από κάποιο αντιγόνο. Το φαινόμενο αυτό εξασφαλίζει ότι μόνο τα ενεργοποιημένα CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα θα πολλαπλασιαστούν αποκρινόμενα σε φυσιολογικά επίπεδα IL-2. Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα, οι IL-2Rβ και γ_c είναι επαρκείς για την αποτελεσματική σηματοδότηση.

Οι υπομονάδες IL-2Ra και IL-2Rβ προ-συνδέονται στην κυτταρική επιφάνεια, για να σχηματίσουν μια θέση ψευδο-υψηλής συγγένειας (K_D ~10⁻¹⁰ M), διευκολύνοντας τη σύνδεση της IL-2, χωρίς όμως να είναι ικανές για σηματοδότηση. Η





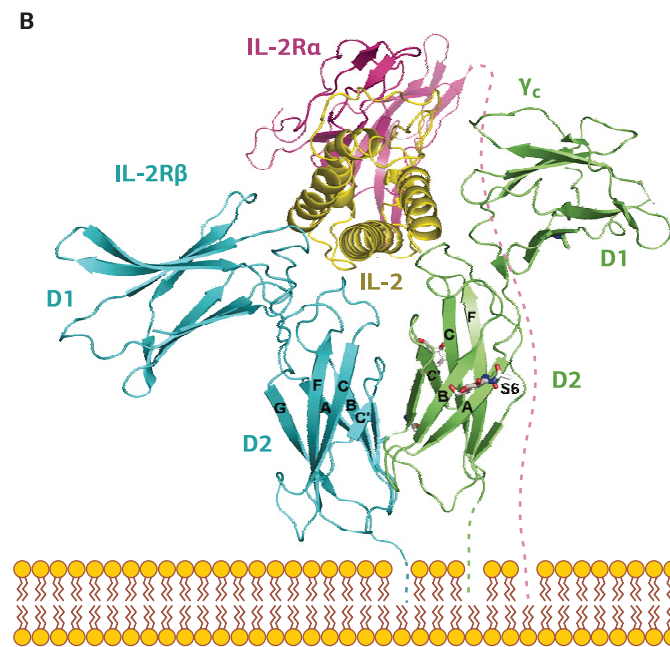
Εικόνα 9.14

Υποδοχέας της IL-2. Ο υποδοχέας IL-2R είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από τρεις ξεχωριστές μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες υπομονάδες, την IL-2Ra (ή CD25), την IL-2Rβ (ή CD122) και την γ_c (ή CD132).

A. Η IL-2Ra απουσιάζει ή εκφράζεται ελάχιστα σε ήρεμα T-λεμφοκύτταρα, αλλά η μεταγραφή της προκαλείται ισχυρά σε ενεργοποιημένα μέσω του TcR T-λεμφοκύτταρα.

Το επίπεδο έκφρασης της IL-2Rβ είναι χαμηλό σε T-κύτταρα, αλλά προκαλείται από ορισμένα ερεθίσματα. Η γ_c εκφράζεται, επίσης, σε αυτά τα κύτταρα, αλλά είναι λιγότερο επαγωγίμη. Η IL-2Ra είναι ο υποδοχέας IL-2 χαμηλής συγγένειας ($K_D \sim 10^{-8} M$). Η IL-2Rβ μόνη της, έχει ασθενή συγγένεια για την IL-2 ($K_D \sim 1 \mu M$), ενώ ο συνδυασμός IL-2Rβ με γ_c σχηματίζει τον υποδοχέα IL-2 ενδιάμεσης συγγένειας ($K_D \sim 10^{-9} M$). Και οι τρεις υπομονάδες μαζί σχηματίζουν τον υποδοχέα IL-2 υψηλής συγγένειας ($K_D \sim 10^{-11} M$). Η IL-2 μπορεί να παρουσιαστεί συνδεδεμένη σε IL-2Ra σε ένα δενδριτικό κύτταρο και να διεγείρει τους υποδοχείς IL-2Rβ και γ_c ενός γειτονικού κυττάρου (trans-ενεργοποίηση). Επιπλέον της διαμεμβρανικής IL-2Ra υπάρχει και η διαλυτή της μορφή (sIL-2Ra), η οποία απελευθερώνεται από την πλασματική μεμβράνη σε μολυσματικές διαταραχές, απόρριψη μοσχεύματος και αυτοάνοσες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Αυξημένη συγκέντρωση sIL-2Ra ανιχνεύεται και σε ορισμένες αιματολογικές κακοήθειες. Σε ορισμένες ασθένειες η συγκέντρωση του sIL-2Ra συσχετίζεται με τη δραστηριότητα της νόσου και την πρόγνωση. [41]

B. Κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του τετραμερούς συμπλόκου IL-2/IL-2Ra/IL-2Rβ/ γ_c [70]



σηματοδότηση λαμβάνει χώρα μόνο μετά τη σύνδεση της γ_c αλυσίδας στο τριμερές σύμπλεγμα IL-2/IL-2Ra/IL-2Rβ. Η γ_c αν και είναι ελάχιστα ικανή να αλληλεπιδρά μεμονωμένα με την IL-2 ($K_D > 700 \mu M$), μειώνει τον ρυθμό αποσύνδεσης της συνδεδεμένης IL-2, ουσιαστικά σχηματίζοντας ένα σταθερό τετραμερές σύμπλοκο συνδέτη / υποδοχέα.

Οι θέσεις της IL-2 που αλληλεπιδρούν με τις τρεις υπομονάδες του IL-2R δεν αλληλεπικαλύπτονται, εκτός από μία μικρή αλλά σημαντική περιοχή. Η δέσμη 4-ελίκων της IL-2 συσφίγγεται μεταξύ των υπομονάδων β και γ_c , οι οποίες συ-

γκλίνουν για να σχηματίσουν ένα σχήμα Y. Αντίθετα, η άλλη πλευρά του μορίου IL-2 συνδέεται στην υπομονάδα α. Επίσης, η υπομονάδα α δεν έρχεται σε επαφή με τις β ή γ_c .

Στην κυτταροπλασματική περιοχή της β υπομονάδας βρίσκεται συνδεδεμένη η κινάση Jak1, ενώ στην γ_c η Jak3. Η γ_c διαθέτει ένα σχετικά βραχύ κυτταροπλασματικό τμήμα (86 αμινοξέων) σε σύγκριση με άλλες υπομονάδες σηματοδότησης των υποδοχέων κυτοκινών τύπου I και, επίσης, στερείται του κλασικού μοτίβου Box1 ή Box2. Ωστόσο, παρά την κοντή κυτταροπλασματική περιοχή και την έλλειψη του κλασικού μοτίβου δέσμευσης Jak, η υπομονάδα γ_c διατηρεί την ικανότητα να συνδέει την Jak3 και είναι ο μόνος υποδοχέας που μεσολαβεί στην εξαρτώμενη από Jak3 σηματοδότηση. Μόνο όταν η σύνδεση της IL-2 φέρνει τις εξωτερικές περιοχές των β και γ_c υπομονάδων σε στενή εγγύτητα, η σηματοδότηση μπορεί να συμβεί με trans φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών περιοχών τους. Στη β υπομονάδα μπορεί, επίσης, να συνδεθεί και η κινάση Lck. Η NH₂-τελική περιοχή του καταλυτικού τμήματος της Lck και μια όξινη περιοχή του κυτταροπλασματικού τμήματος της β υπομονάδας συμμετέχουν στη σύνδεση των δύο πρωτεϊνών.

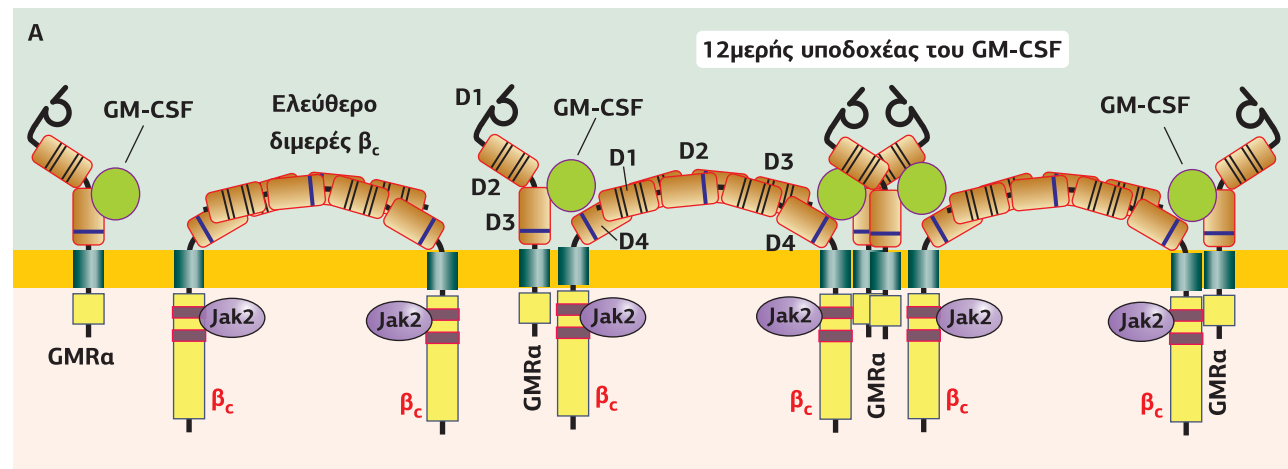
Η οικογένεια υποδοχέων κυτοκινών με κοινή την β_c υπομονάδα

Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων κυτοκινών με κοινή την β_c υπομονάδα περιλαμβάνουν τους υποδοχείς των IL-3, IL-5 και GM-CSF. Οι κυτοκίνες αυτές παράγονται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή, την επιβίωση και την ενεργοποίηση πολλών αιμοποιητικών κυττάρων. Μερικοί άλλοι τύποι κυττάρων, όπως μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα μπορούν να παράγουν GM-CSF. Η IL-3 είναι η πιο πλειοτροπική κυτοκίνη μεταξύ αυτών των μελών της οικογένειας, καθώς διεγείρει την παραγωγή και τη λειτουργία των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, των σιτευτικών και των βασεόφιλων. Σε αντίθεση με την IL-3, η IL-5 είναι η πιο ειδική κυτοκίνη αυτής της οικογένειας, καθώς διεγείρει μόνο την παραγωγή και την ενεργοποίηση των πωσινόφιλων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-3 και ο παράγοντας GM-CSF μπορεί να έχουν δράσεις εκτός του αιμοποιητικού συστήματος, όπως στον καρκίνο.

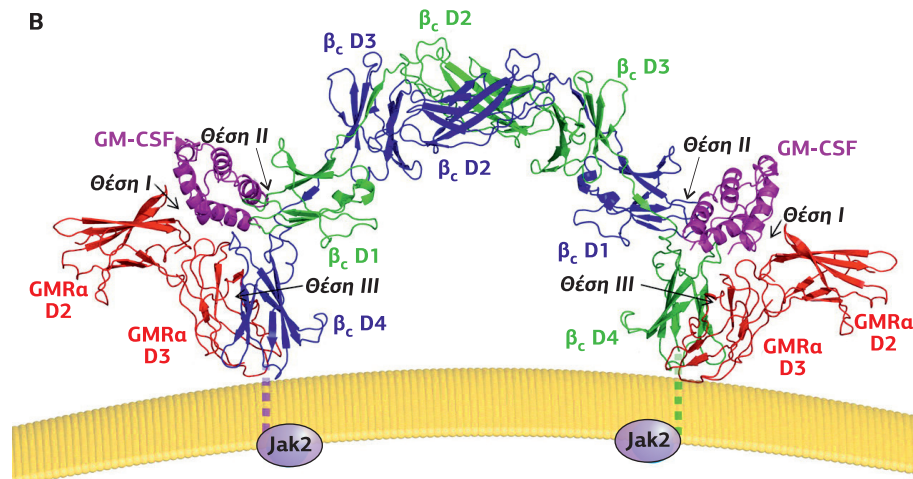
Η β_c είναι η κύρια υπομονάδα σηματοδότησης που μοιράζονται οι κυτοκίνες αυτής της οικογένειας. Ωστόσο, η β_c δεν συνδέεται από μόνη της με τις κυτοκίνες, αλλά παρουσία της ειδικής α-υπομονάδας του υποδοχέα σχηματίζεται ένα σύμπλοκο υψηλής συγγένειας, όπου η συνδεδεμένη κυτοκίνη έρχεται σε στενή επαφή με κατάλοιπα της β_c. Με παρόμοιο τρόπο με την έναρξη της σηματοδότησης της οικογένειας των υποδοχέων gp130, οι κυτοκίνες πρέπει πρώτα να συνδεθούν στην α-υπομονάδα και στη συνέχεια στη β_c, η οποία ολοκληρώνει το σύμπλεγμα σηματοδότησης, που είναι ικανό να ενεργοποιήσει τις συνδεδεμένες Jak2. Η ενεργοποίηση των Jak2 έχει ως αποτέλεσμα την trans-φωσφορυλίωση έξι βασικών καταλοίπων τυροσίνης στην κυτταροπλασματική πλευρά της β_c, που στη συνέχεια οδηγεί σε ενεργοποίηση διαφόρων οδών σηματοδότησης, όπως STATs, MAPK και PI3K.

Η εξωκυτταρική περιοχή της β_c αποτελείται από τέσσερις περιοχές FnIII (D1-D4), που διαιρούνται σε δύο διαδοχικές CRH. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η β_c υπάρχει ως διμερές στην πλασματική μεμβράνη και ότι η κυτοκίνη συνδέεται στην D1 της μιας υπομονάδας και στην D4 της άλλης, σε ένα ομοδιμερές β_c, το οποίο έτσι ενώνεται με αντιπαράλληλο τρόπο.

Από τις τρεις κυτοκίνες που σηματοδοτούν μέσω της υπομονάδας β_c, θα αναπτύξουμε μόνο την περίπτωση του GM-CSF. Ο GM-CSF είναι μια τυπική κυτοκίνη με δομή δεσμίδας 4 α-ελίκων (βλ. σελ. 641) που συνδέεται στην ειδική α-υπομονάδα GMRa. Η GMRa αποτελείται από μία NH₂-τελική περιοχή Ig-like (D1) και δύο περιοχές FnIII (D2 και D3), οι οποίες συνιστούν την CRH. Ο GM-CSF συνδέεται στην GMRa, στην περιοχή αγκώνα μεταξύ D2 και D3, σχηματίζοντας ένα δυαδικό σύμπλεγμα. Η κρυσταλλική δομή του δυαδικού συμπλέγματος έχει πρόσφατα επιλυθεί, προτείνοντας ότι η σύνδεση αυτή επαναπροσανατολίζει τις διαμεμβρανικές περιοχές. Δύο δυαδικά σύμπλοκα συνδέονται σε μια διμερή β_c για να σχηματίσουν



Εικόνα 9.15
Δημιουργία δωδεκαμερούς συμπλόκου του υποδοχέα του GM-CSF. Α. Ο GM-CSF αρχικά συνδέεται στην υπομονάδα GM-Ra, στην περιοχή αγκώνα μεταξύ D2 και D3 περιοχής σχηματίζοντας ένα δυαδικό σύμπλεγμα. Η β_c υπάρχει ως διμερές στην πλασματική μεμβράνη και η κυτοκίνη συνδέεται στην D1 της μιας υπομονάδας β_c και στην D4 της άλλης β_c στο ομοδιμερές β_c , το οποίο έτσι ενώνεται με αντιπαράλληλο τρόπο. Δύο σύμπλοκα GM-CSF/GM-Ra συνδέονται στο διμερές β_c για να σχηματίσουν ένα εξαμερές σύμπλοκο. Στο τριμερές σύμπλεγμα ο υποδοχέας GM-Ra συνδέεται μέσω της περιοχής D3, με την περιοχή D4 της υπομονάδας β_c για να σχηματίσει μια τρίτη θέση αλληλεπίδρασης (θέση III). Β. Κρυσταλλική του εξαμερούς συμπλόκου. [23]



ένα εξαμερές σύμπλοκο. Στο τριμερές σύμπλεγμα, η υπομονάδα GM-Ra μέσω της περιοχής D3 συνδέεται προς την περιοχή D4 της υπομονάδας β_c για να σχηματίσει μια τρίτη θέση αλληλεπίδρασης (θέση III).

Η δομή της β_c καθιστά δυνατή τη συναρμολόγησή της σε ένα μοναδικό σύμπλεγμα σηματοδότησης υψηλότερης τάξης, που δεν έχει παρατηρηθεί σε κανέναν άλλο υποδοχέα κυτοκίνης: ένα απροσδόκητο **δωδεκαμερές σύμπλοκο** που αποτελείται από δύο εξαμερή προσανατολισμένα κατά τρόπο head-to-head. Τρεις θέσεις αλληλεπίδρασης συμμετέχουν στη δημιουργία του δωδεκαμερούς συμπλόκου. Οι θέσεις I και II αφορούν τη σύνδεση του GM-CSF με τις υπομονάδες β_c και GM-Ra, και η θέση III αποτελεί μία μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ της D2 της GM-Ra ενός εξαμερούς και της περιοχής D4 της β_c ενός άλλου εξαμερούς. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του GM-CSF στο κέντρο του δωδεκαμερούς συμπλόκου χαρακτηρίστηκαν ως θέση 5. Ο σχηματισμός του δωδεκαμερούς έχει προταθεί ότι είναι κρίσιμος για τον σχηματισμό ενός κατάλληλου συμπλόκου σηματοδότησης υποδοχέα. Το εάν τέτοιου είδους συμπλέγματα υψηλότερης τάξης είναι δυνατά για άλλους υποδοχείς κυτοκινών δεν είναι σήμερα γνωστό.

Υποδοχείς κυτοκινών τύπου II: ιντερφερονών (IFNs) και IL-10

Οι υποδοχείς κυτοκινών τύπου II διακρίνονται από τους υποδοχείς τύπου I, καθώς περιέχουν διαφορετική διάταξη των διατηρημένων τεσσάρων καταλοίπων κυστεΐνης και έλλειψη του μοτίβου WSxWS στην εξωκυτταρική τους περιοχή. Ως υποδοχείς τύπου II ορίστηκαν αρχικά οι υποδοχείς των ιντερφερονών και της IL-10, αλλά με την ανακάλυψη περισσότερων κυτοκινών της υποοικογένειας IL-10, η

κατηγορία αυτή σήμερα περιέχει 12 μέλη.

Οι **ιντερφερόνες (IFNs)** είναι κυτοκίνες που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις και έχουν κύριο ρόλο στην αντιμετώπιση των ιογενών λοιμώξεων. Η οικογένεια των IFNs περιλαμβάνει 16 μέλη στον άνθρωπο, μεταξύ των οποίων οι IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω και 12 υπότυποι IFN- α . Υπάρχουν τρεις κύριες ομάδες IFNs:

Οι **IFNs τύπου I**, ιντερφερόνη- α (IFN- α) και ιντερφερόνη- β (IFN- β), οι οποίες έχουν σχετικά υψηλή αντι-ιική ισχύ, απελευθερώνονται από ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα σε απόκριση σε λοίμωξη από ιούς και βακτήρια. Η IFN- α και η IFN- β είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες και οι ευρύτερα εκφραζόμενες κυτοκίνες. Αντιθέτως, οι IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ν , IFN- τ και IFN- ω δεν εκφράζονται παντού αλλά εξειδικευμένα σε συγκεκριμένους ιστούς.

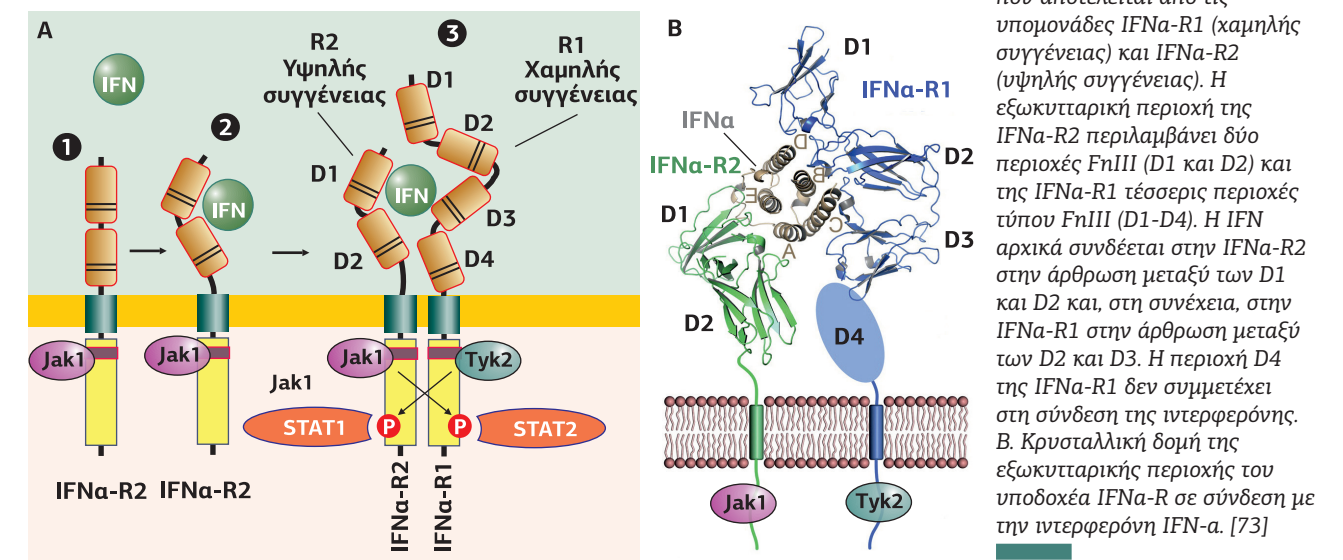
Η **IFN τύπου II**, ιντερφερόνη- γ (IFN- γ), παράγεται από τα T_H -λεμφοκύτταρα και τα NK, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από την IL-2 και την IL-12.

Οι **IFNs τύπου III** περιλαμβάνουν τις IL-28 α (IFN- λ_2), IL-28 β (IFN- λ_3) και IL-29 (IFN- λ_1). Αυτές οι κυτοκίνες έχουν ως πρωταρχικούς τους στόχους τα επιθηλιακά κύτταρα.

Όλες οι IFNs συνδέονται στον ίδιο ετεροδιμερή υποδοχέα που αποτελείται από τις υπομονάδες IFN α -R1 (χαμηλής συγγένειας) και IFN α -R2 (υψηλής συγγένειας). Η εξωκυτταρική περιοχή (ECD) της IFN α -R2 περιλαμβάνει δύο περιοχές FnIII-like (D1 και D2) και της IFN α -R1, τέσσερις περιοχές τύπου FnIII-like (D1-D4), οι οποίες κατά πάσα πιθανότητα προέκυψαν από γονιδιακή επανάληψη.

Η IFN αρχικά συνδέεται στην υπομονάδα υψηλής συγγένειας IFN α -R2 στην άρθρωση μεταξύ των D1 και D2. Στη συνέχεια, ο άξονας της ελικοειδούς δεσμίδας της INF προσανατολίζεται κάθετα στην υπομονάδα IFN α -R1 και συνδέεται στην άρθρωση μεταξύ των D2 και D3. Η περιοχή D4 της IFN α -R1 κοντά στη μεμβράνη δεν συμμετέχει στη σύνδεση της ιντερφερόνης (**Εικόνα 9.16**).

Μετά την τριμερή συναρμολόγηση, ενεργοποιούνται με αμοιβαία trans-φωσφορυλίωση οι κινάσες τυροσίνης Tyk2 και Jak1, οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες στην κυτταροπλασματική περιοχή των IFN α -R1 και IFN α -R2, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνουν διάφορα κατάλοιπα τυροσίνης στις μεμβρανικές απομακρυσμένες ενδοκυτταρικές περιοχές της IFN α -R1 και της IFN α -R2, οι οποίες, με τη σειρά τους, στρατολογούν περαιτέρω πρωτεΐνες τελεστές, που διαδίδουν προς τα κάτω τη σηματοδότηση. Ως αποτέλεσμα ενεργοποιείται η έκφραση περισσότερων των 1.000 γονιδίων που εμπλέκονται σε μια ευρεία ποικιλία δραστηριοτήτων, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη στόχευση διαφορετικών ιών, με κάθε ιό να στοχεύεται από ένα μοναδικό σύνολο δραστηριοτήτων.



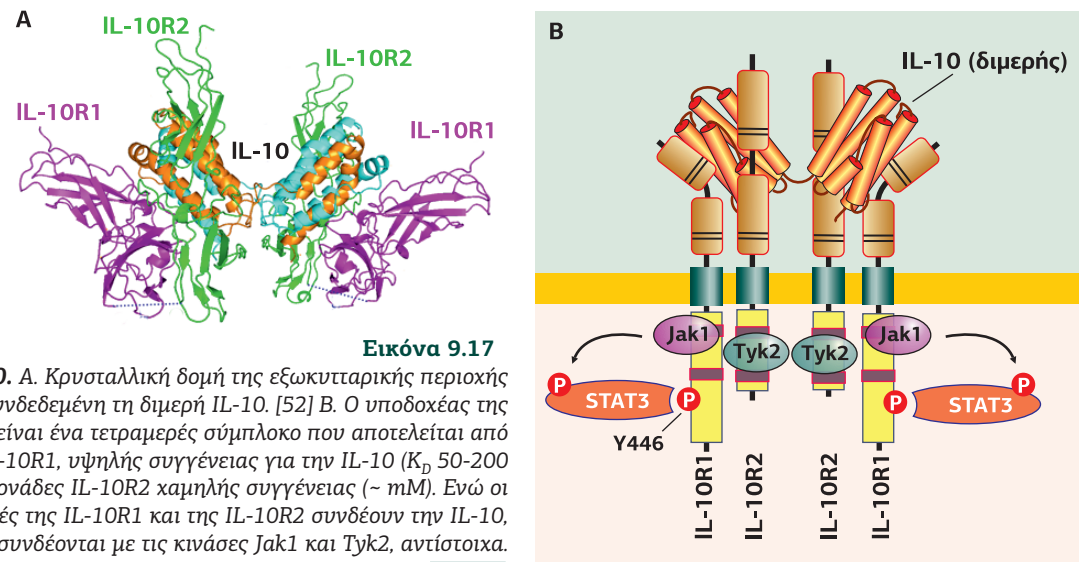
Εικόνα 9.16
Υποδοχείς ιντερφερόνης α (IFN- α). Α. Όλες οι IFNs δεσμεύονται στον ίδιο ετεροδιμερή υποδοχέα, που αποτελείται από τις υπομονάδες IFN α -R1 (χαμηλής συγγένειας) και IFN α -R2 (υψηλής συγγένειας). Η εξωκυτταρική περιοχή της IFN α -R2 περιλαμβάνει δύο περιοχές FnIII (D1 και D2) και της IFN α -R1 τέσσερις περιοχές τύπου FnIII (D1-D4). Η IFN αρχικά συνδέεται στην IFN α -R2 στην άρθρωση μεταξύ των D1 και D2 και, στη συνέχεια, στην IFN α -R1 στην άρθρωση μεταξύ των D2 και D3. Η περιοχή D4 της IFN α -R1 δεν συμμετέχει στη σύνδεση της ιντερφερόνης. Β. Κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα IFN α -R σε σύνδεση με την ιντερφερόνη IFN- α . [73]

Η **ιντερλευκίνη IL-10** είναι μια διμερής αντι-φλεγμονώδης κυτοκίνη που προστατεύει τα κύτταρα από υπερβολική φλεγμονώδη αντίδραση. Μία από τις κύριες λειτουργίες της είναι η μείωση της έκφρασης του συμπλόκου MHC-II και η μείωση της ωρίμανσης των δενδριτικών κυττάρων. Άλλα μέλη αυτής της υποοικογένειας είναι οι IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 και IL-26, οι οποίες λειτουργούν προστατευτικά στα επιθηλιακά κύτταρα έναντι παθογόνων, όπως βακτήρια και ζυμομύκητες. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η IL-20 συμμετέχει στην επούλωση τραυμάτων και διατηρεί την ομοιόσταση και την ακεραιότητα των ιστών τη στιγμή της μόλυνσης.

Ο υποδοχέας της IL-10 (IL-10R) είναι ένα τετραμερές σύμπλοκο που αποτελείται από δύο υπομονάδες IL-10R1, υψηλής συγγένειας για την IL-10 (K_D 50-200 pM), και δύο υπομονάδες IL-10R2 χαμηλής συγγένειας (~ mM) που συμμετέχουν σε σύμπλοκα υποδοχέων και με άλλα μέλη της οικογένειας κυτοκινών της κατηγορίας II.

Η IL-10R1 είναι μια πρωτεΐνη ~ 80 kDa με μια εξωκυτταρική περιοχή 227 αα, μία διαμεμβρανική α-έλικα 21 αα και μία ενδοκυτταρική περιοχή 322 αμινοξέων. Η εξωκυτταρική περιοχή της IL-10R2 έχει περίπου το ίδιο μήκος με την IL-10R1 (201 αα), ενώ η ενδοκυτταρική της περιοχή αποτελείται μόνο από 83 κατάλοιπα.

Ενώ οι εξωκυτταρικές περιοχές της IL-10R1 και της IL-10R2 συνδέουν την IL-10, οι ενδοκυτταρικές συνδέονται με τις κινάσες Jak1 και Tyk2, αντίστοιχα (**Εικόνα 9.17**). Η σύνδεση της IL-10 ενεργοποιεί τις Jak1 και Tyk2, οι οποίες trans-φωσφορυλιώνονται, ενεργοποιούνται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν τις τυροσίνες Tyr446 και Tyr496 της IL-10R1. Οι φωσφοτυροσίνες της IL-10R1 παρέχουν θέσεις πρόσδεσης, που κυρίως συνδέουν και ενεργοποιούν, μέσω επιπρόσθετης φωσφορυλίωσης, τον μεταγραφικό παράγοντα STAT3, αν και ο STAT1 και ο STAT5 μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν.



1.4

Ενεργοποίηση της συνδεδεμένης κινάσης τυροσίνης – Η κινάση Jak

Το αποτέλεσμα της σύνδεσης του προσδέτη στους υποδοχείς κυτοκινών είναι η ενεργοποίηση μιας κινάσης τυροσίνης, η οποία δεν είναι μέρος της πρωτεΐνης του υποδοχέα. Η σύνδεση ανάμεσα στον υποδοχέα και την κινάση τυροσίνης μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους:

- Η σύνδεση του προσδέτη προκαλεί τη σύνδεση της κυτταροπλασματικής κινάσης τυροσίνης στον υποδοχέα. Σε αυτήν την περίπτωση, το εξωκυτταρικό σήμα οδηγεί την κινάση τυροσίνης στη σύνδεσή της με τον υποδοχέα.

- Η κινάση τυροσίνης μπορεί να είναι μόνιμα συνδεδεμένη με τον υποδοχέα, με έναν μη-ομοιοπολικό τρόπο, και να ενεργοποιείται με τη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα.

Και στις δυο περιπτώσεις, η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί σε αναδιαμόρφωση της ενδοκυτταρικής περιοχής του ολιγομερούς υποδοχέα, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται επιφάνειες σύνδεσης για την ενεργή σύνδεση της κινάσης τυροσίνης. Οι κινάσες που συνδέονται στους υποδοχείς κυτοκινών ανήκουν κυρίως στις οικογένειες **Jak** και **Src**.

Το πρώτο σημαντικό βήμα στη μεταγωγή του σήματος είναι η φωσφορυλίωση τυροσινών των ενδοκυτταρικών περιοχών των υποδοχέων των κυτοκινών από την ενεργοποιημένη κινάση. Τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης χρησιμεύουν, στη συνέχεια, ως θέσεις πρόσδεσης για SH2 περιοχές σηματοδοτικών πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν τον σύνδεσμο με κεντρικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Τα ακόλουθα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του προσδέτη στους υποδοχείς των κυτοκινών.

Το **μονοπάτι Jak-STAT**. Είναι το κυριότερο μονοπάτι που ξεκινάει από τους υποδοχείς κυτοκινών και μεταφέρει το μήνυμα απευθείας στον πυρήνα εμπλέκοντας ελάχιστα σηματοδοτικά μόρια. Πολλές κυτοκίνες χρησιμοποιούν αυτό το μονοπάτι για να επιφέρουν γρήγορες αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων.

Το **μονοπάτι της κινάσης PI3K**. Η PI3-Κινάση και η πρωτεΐνη προσαρμογής Shc έχουν αναγνωρισθεί ως σύνδεσμοι, οι οποίοι μεταφέρουν το σήμα προς το μονοπάτι των Ras και MAP κινάσων. Η σύνδεση των υποδοχέων των κυτοκινών με το μονοπάτι των Ras έχει βρεθεί ότι μεσολαβείται από το σύμπλοκο Shc/Grb2/mSos.

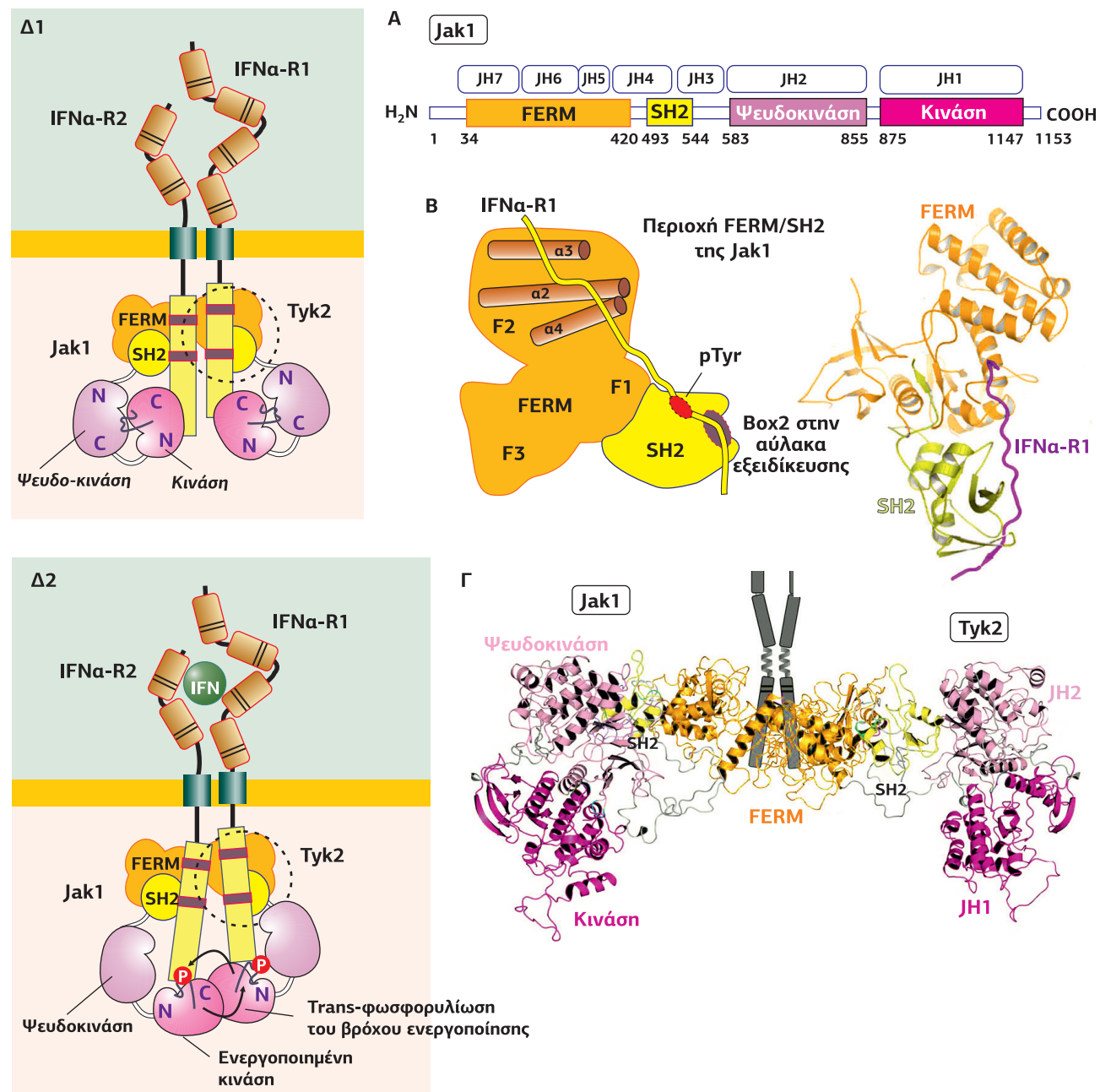
Το **μονοπάτι Ras / MAPKs**.

Η οικογένεια των κινάσων Jak

Η σημαντικότερη οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων που συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος μέσω των κυτοκινών είναι οι κινάσες Janus (Jak). Ο Janus (Ιανός) ήταν ένας Ρωμαίος θεός που είχε δύο πρόσωπα, όπως και οι κινάσες Jak που έχουν δύο θέσεις σύνδεσης, μία με την υπομονάδα του υποδοχέα της κυτοκίνης και μία καταλυτική θέση, η οποία όταν ενεργοποιείται έχει δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης. Μια άλλη ερμηνεία της χρήσης του ονόματος του Ιανού είναι η διπλή παρουσία μιας περιοχής ψευδοκινάσης και μιας περιοχής κινάσης, που χαρακτηρίζει αυτή την οικογένεια. Ορισμένοι όμως βιοχημικοί, κουρασμένοι από τον μεγάλο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνικών κινάσων που ανακαλύφθηκαν, θεωρούν ότι Jak σημαίνει *Just another kinase*.

Τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές κινάσες Jak είναι γνωστές στα θηλαστικά (Jak1, Jak2, Jak3 και Tyk2). Οι κινάσες Jak στο NH_2 -τελικό τους άκρο περιέχουν μια περιοχή 300 αμινοξέων, **FERM**, (F για 4.1 protein, E για ezrin, R για radixin και M για Moesin), που αντιστοιχεί στις περιοχές JH5, JH6, JH7. Η FERM στρατολογεί τις κινάσες στην πλασματική μεμβράνη κοντά στην κυτταροπλασματική περιοχή των υποδοχέων των κυτοκινών και, επίσης, ρυθμίζει θετικά την καταλυτική τους δραστηριότητα. Εμφανίζει μια χαρακτηριστική αρχιτεκτονική τριών λοβών: τον λοβό F1 με μια αναδίπλωση όμοια της ουβικουιλίνης, τον λοβό F2 με μια αναδίπλωση όμοια της ακυλο CoA-binding protein και τον λοβό F3 με μια αναδίπλωση όμοια της πλεξτρίνης. Οι Jak, επίσης, αποτελούνται από μια περιοχή SH2 (JH3, JH4) και δύο περιοχές κινάσης τυροσίνης. Ωστόσο, μόνο η μία έχει δραστηριότητα κινάσης (JH1), ενώ η άλλη (JH2) είναι ψευδοκινάση, καθώς δεν είναι ικανή να φωσφορυλιώνει και ο ρόλος της είναι να μπλοκάρει την κινάση σε κατάσταση ηρεμίας. Η ύπαρξη των δύο περιοχών κινάσης είναι το χαρακτηριστικό της οικογένειας των Jak.

Οι Jak συνδέονται σε μια πλούσια σε προλίνη περιοχή του ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα πλησίον της πλασματικής μεμβράνης που ονομάζεται περιοχή Box1 / Box2. Αφού ο υποδοχέας συνδεθεί με την αντίστοιχη κυτοκίνη του, αλλάζει διαμόρφωση, φέρνοντας τις δύο Jak αρκετά κοντά για να φωσφορυλιώσουν η μία



Εικόνα 9.18

Κινάσες της οικογένειας Jak. Α. Δομή της κινάσης Jak1. Στο NH₂-τελικό της άκρο περιέχει μια περιοχή FERM (JH5 - JH7), στη συνέχεια μια περιοχή SH2 (JH3, JH4) και, τέλος, μια περιοχή ψευδοκινάσης (JH2) και μια περιοχή κινάσης Tyr (JH1) προς το COOH-τελικό άκρο. [85] Β. Οι περιοχές FERM-SH2 της Jak1 και οι αλληλεπιδράσεις της με το κυτταροπλασματικό τμήμα του IFNα-R1. Η περιοχή SH2 παίζει κεντρικό ρόλο: α. συντονίζοντας ένα κατάλοιπο Glu, που βρίσκεται στον θύλακα σύνδεσης φωσφοτυροσίνης (pTyr), τυπικός των περιοχών SH2 (βλ. σελ. 525), και β. συντονίζοντας το μοτίβο Box2 του υποδοχέα στην αύλακα, που προσδίδει εξειδίκευση στην περιοχή SH2. [45] Γ. Οι κινάσες Jak1 και Tyk2 συνδεδεμένες στον υποδοχέα κυτοκινών. [44] Δ. Τρόπος ενεργοποίησης των Jak κινάσων. Αρχικά οι Jak κινάσες, οι οποίες βρίσκονται συνδεδεμένες στις περιοχές Box των ανενεργών υποδοχέων κυτοκινών (εδώ IFNα-R), είναι σε κατάσταση αυτοαναστολής λόγω της επίδρασης της ψευδοκινάσης. Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί, αλλάζει η διαμόρφωση των Jak, οι ψευδοκινάσες απομακρύνονται από τις περιοχές κινάσης, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω trans-φωσφορυλίωσης του βρόχου ενεργοποίησής τους.

την άλλη. Η trans-φωσφορυλίωση των Jak επάγει μια μεταβολή της διαμόρφωσής τους, επιτρέποντας να μεταδώσουν το ενδοκυτταρικό σήμα με περαιτέρω φω-

σφορυλίωση και ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription, or Signal Transduction And Transcription). Οι ενεργοποιημένοι STATs διαχωρίζονται από τον υποδοχέα και σχηματίζουν διμερή πριν μετατοπιστούν στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή επιλεγμένων γονιδίων.

Η κατάσταση περιπλέκεται, γιατί δύο (ή περισσότερες) Jak κινάσες μπορούν να συνδεθούν σε έναν ενεργοποιημένο υποδοχέα. Δύο διαφορετικές κινάσες Jak χρειάζονται για τη μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων της ιντερλευκίνης 6 (Jak1 - Jak2) και της ιντερφερόνης α (Jak1 - Tyk1).

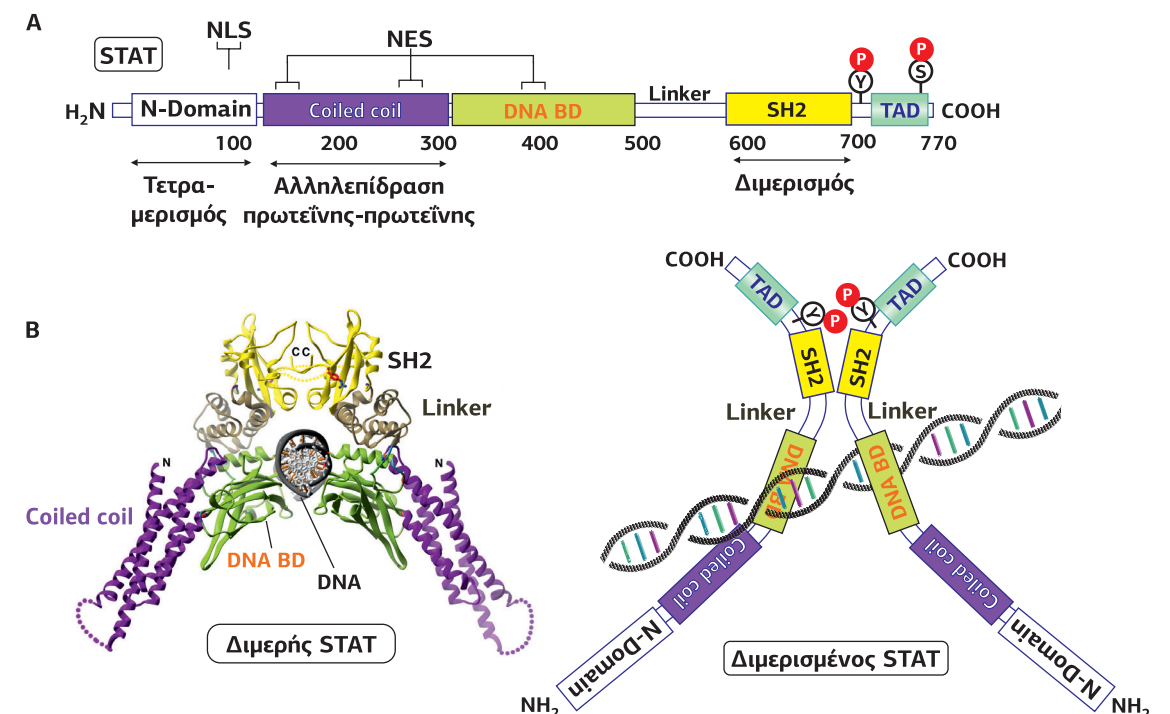
1.5 | Οι μεταγραφικοί παράγοντες STATs

Οι πρωτεΐνες STAT είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, η οποία αποτελείται από επτά μέλη. Έχουν αναγνωριστεί 7 γονίδια *Stat*: *Stat1*, *Stat2*, *Stat3*, *Stat4*, *Stat5a*, *Stat5b* και *Stat6*. Όλοι οι STATs εμφανίζουν την ίδια δομή, ενεργοποιούνται από κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες μεταφέροντας ποικίλα μηνύματα σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους. Σχετίζονται με τον προγραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα βιολογικά γεγονότα, όπως η εμβρυακή ανάπτυξη, ο κυτταρικός θάνατος, η οργανογένεση, η ανοσία, ο έλεγχος της κυτταρικής αύξησης, από απλούς μικροοργανισμούς έως και τον άνθρωπο. Οι περισσότεροι STATs δημιουργούν ομοδιμερή σε απάντηση του ερεθίσματος από τον προσδέτη.

Δομή των πρωτεϊνών STAT: Λειτουργικές και δομικές περιοχές

Οι STATs περιέχουν διάφορες δομικές περιοχές: α. ένα NH₂-τελικό άκρο (N-domain), το οποίο εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ γειτονικών διμερών STAT στο DNA, διευκολύνοντας τον σχηματισμό τετραμερών STAT, και συμμετέχει επίσης στον σχηματισμό διμερών μεταξύ μη φωσφορυλιωμένων μονομερών STAT, β. μια περιοχή *coiled-coil* υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, γ. μια *DNA Binding Domain*, υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA,

Εικόνα 9.19 **Μεταγραφικοί παράγοντες STATs.** Α. Γραμμική αναπαράσταση των δομικών και λειτουργικών περιοχών των STATs. Αποτελούνται από μια N-περιοχή, υπεύθυνη για τον τετραμερισμό των γειτονικών διμερών STATs στο DNA, μια περιοχή *coiled-coil* υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, μια *DNA Binding Domain*, υπεύθυνη για τη σύνδεση στο DNA, δ. μια περιοχή linker με δομή α-έλικας, μια περιοχή SH2 υπεύθυνη για τη σύνδεση στις φωσφορυλιωμένες Tyr του υποδοχέα και, τέλος, στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή TAD. Β. Τριδιάστατη δομή του διμερούς STAT4 συνδεδεμένου στο DNA. Απουσιάζει το NH₂-τελικό άκρο, καθώς και η περιοχή TAD. [42]

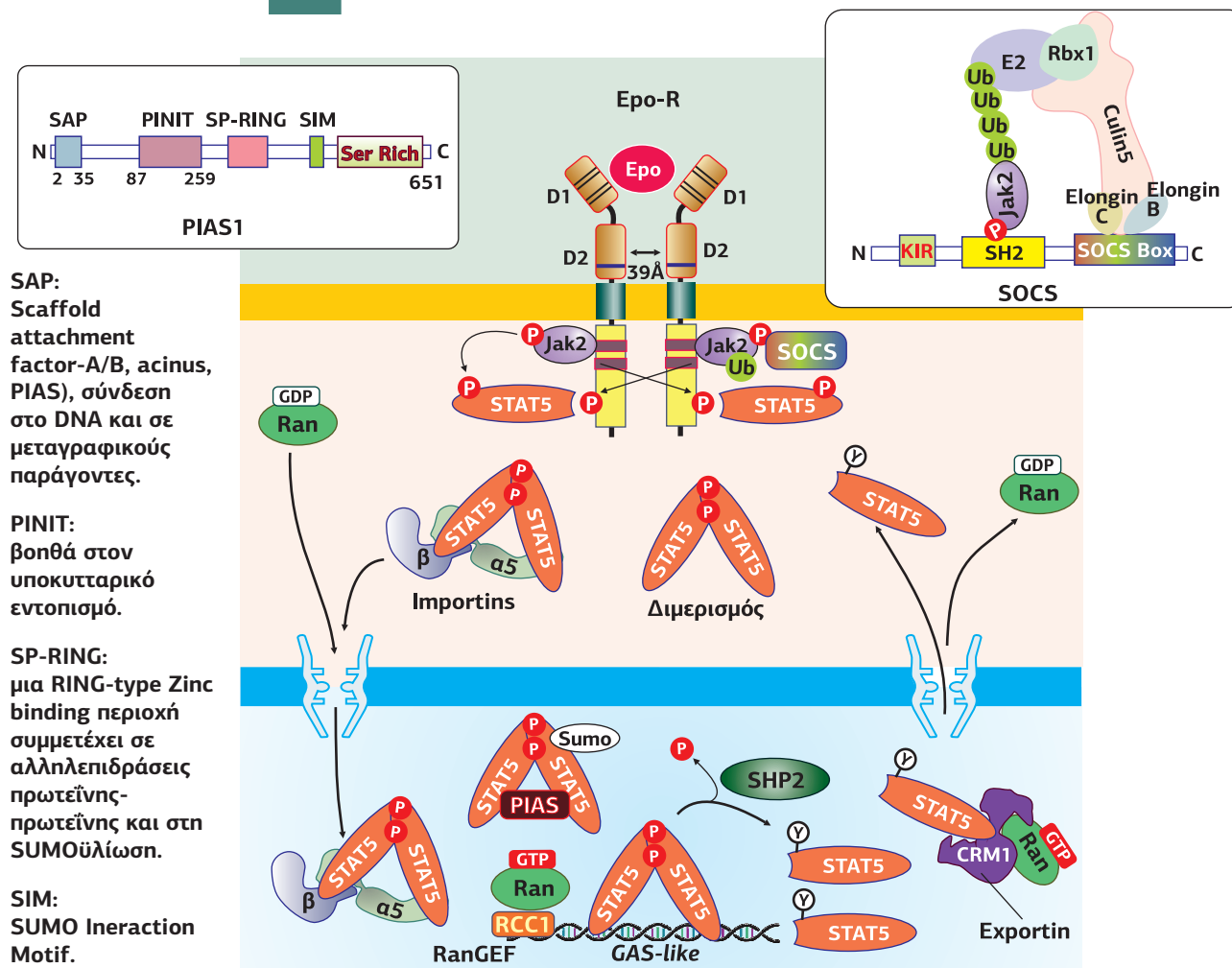


Εικόνα 9.20
Μηχανισμός ενεργοποίησης των STATs, μέσω υποδοχέων που συνδέονται με τις κινάσες Jak. Φωσφορυλιωμένοι από τις Jak κινάσες STATs διμερίζονται και εισέρχονται στον πυρήνα με τη βοήθεια των α - και β -importins. Στη συνέχεια, συνδέονται με τον εξειδικευμένο εκκινητή του γονιδίου επάγοντας τη μεταγραφή του. Οι STATs ενεργοποιούν και τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν τους καταστολείς της σηματοδότησης κυτοκινών SOCS, οι οποίοι μπλοκάρουν την καταλυτική περιοχή των κινασών Jak, ενώ την ίδια στιγμή πυροδοτούν την ουβικουτίνωση και την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του υποδοχέα κυτοκινών και των συνδεδεμένων Jak. Μια άλλη οικογένεια αναστολέων, η PIAS, εμποδίζει την πρόσδεση των STATs στο DNA, καταλύοντας τη SUMOύλιωσή τους [26]

δ. μια περιοχική *linker* με δομή α -έλικας που παίζει ρόλο στη μεταγραφή, ε. μια περιοχική SH2 υπεύθυνη για τη σύνδεση στις φωσφορυλιωμένες Tyr του υποδοχέα και τέλος ζ. στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχική TAD (Transcription Activating Domain), η οποία περιέχει θέσεις σύνδεσης για μεταγραφικούς συνενεργοποιητές (Εικόνα 9.19). Οι STATs εκτός από το διατηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης (pTyr), το οποίο καθίσταται φωσφορυλιωμένο κατά την ενεργοποίηση και εντοπίζεται αμέσως πριν από την περιοχική TAD, περιέχουν και ένα καλά συντηρημένο κατάλοιπο σερίνης (pSer) που βρίσκεται στην περιοχική TAD, φωσφορυλιώνεται μετά τη διέγερση με κυτοκίνες και είναι απαραίτητο για την πλήρη μεταγραφική δραστηριότητα των STATs.

Ανακάλυψη των STATs

Η ανακάλυψη των STATs έγινε μελετώντας τη μεταγωγή του μηνύματος της IFN- α . Οι ιντερφερόνες τύπου 1 (IFN- α και IFN- β) έχουν αντι-ικική δράση, στην οποία συμμετέχουν οι STATs. Με τη βοήθεια της χρωματογραφίας συγγένειας και χρησιμοποιώντας ως δόλωμα τον εκκινητή του γονιδίου, που ενεργοποιεί η IFN- α , ISRE (IFN α -Stimulated gene Response Element), απομονώθηκε από τον πυρήνα ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ονομάστηκε ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3). Επιπλέον, πειράματα χρησιμοποιώντας ως δόλωμα τον εκκινητή του γονιδίου, που ενεργοποιεί η IFN γ , GAS (Gamma interferon Activation Site), οδήγησαν στον χαρακτηρισμό ενός άλλου πρωτεϊνικού συμπλόκου, του GAF (Gamma interferon-Activated Factor). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες που αποτελούν τα συμπλέγματα των ISGF3 και GAF απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν οδηγώντας στην ταυτοποίηση των πρώτων STATs. Το σύμπλοκο ISGF3 αποτελείται από τους STAT1, STAT2



και τον μεταγραφικό παράγοντα IRF9 (IFN-Regulatory Factor 9), γνωστό και ως ISGF3g ή ISGF3 p48 subunit, στη διμερή του μορφή, ενώ ο GAF αποτελείται από μια μόνο πρωτεΐνη, την STAT1.

Ενεργοποίηση των STATs και μεταφορά στον πυρήνα

Οι STATs ενεργοποιούνται αφού συνδεθούν, μέσω της SH2 περιοχής τους, σε φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των υποδοχέων κυτοκινών που φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες Jak. Η ενεργοποίηση των STATs απαιτεί φωσφορυλίωσή τους από τις Jak. Οι μη φωσφορυλιωμένοι STATs υπάρχουν ως μονομερή στο κυτταρόπλασμα. Μετά τη φωσφορυλίωση σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, τα οποία στη συνέχεια κατευθύνονται στον πυρήνα όπου προσδένονται σε εκκινητές γονιδίων στο DNA, οι οποίοι ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 9.20).

Η μεταφορά των STATs στον πυρήνα γίνεται με τη βοήθεια των α 5 β -importins (import: εισαγωγή). Η διμερής μορφή του ενεργοποιημένου STAT συνδέεται στην α -importin μέσω της περιοχής NLS (Nuclear Localization Sequence) και, στη συνέχεια, το σύμπλοκο συνδέεται με την β -importin.

Τα περισσότερα ομο- και ετερο-διμερή των STAT μέσα στον πυρήνα αναγνωρίζουν και συνδέονται στις θέσεις GAS (Gamma interferon Activation Sites) του DNA, οι οποίες έχουν παλινδρομικές ακολουθίες TT-NNNN-AA. Οι θέσεις GAS συχνά συναντώνται σε εκκινητές γονιδίων (gene promoters), π.χ. στο PIE (Prolactin-Inducible Element).

Το ετερο-διμερές STAT1-STAT2, αφού πρώτα δημιουργήσει σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα ISGF3g, συνδέεται στην περιοχική ISRE του DNA. Ορισμένα διμερή των STAT μέσω των NH₂-τελικών άκρων τους αλληλεπιδρούν δημιουργώντας τετραμερή με αυξημένη συγγένεια για τις περιοχές GAS.

Πολλοί STATs, αφού συνδεθούν στο DNA, για να ενεργοποιηθεί ο εκκινητής του γονιδίου, πρέπει να συνδεθούν με μια enhancer binding protein, όπως η SP-1 (Specificity Protein 1), η GR (Glycocorticoid Receptor) κ.ά., η οποία συνεργάζεται με τον STAT για την ενεργοποίηση του γονιδίου.

Μετά τη σύνδεσή τους στο DNA οι STATs μέσω της περιοχής TAD, προσελκύουν και συνδέονται με διάφορους πυρηνικούς παράγοντες και μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές, οι οποίοι βοηθούν στην έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου στόχου (Εικόνα 9.21).

Έξοδος των STAT από τον πυρήνα

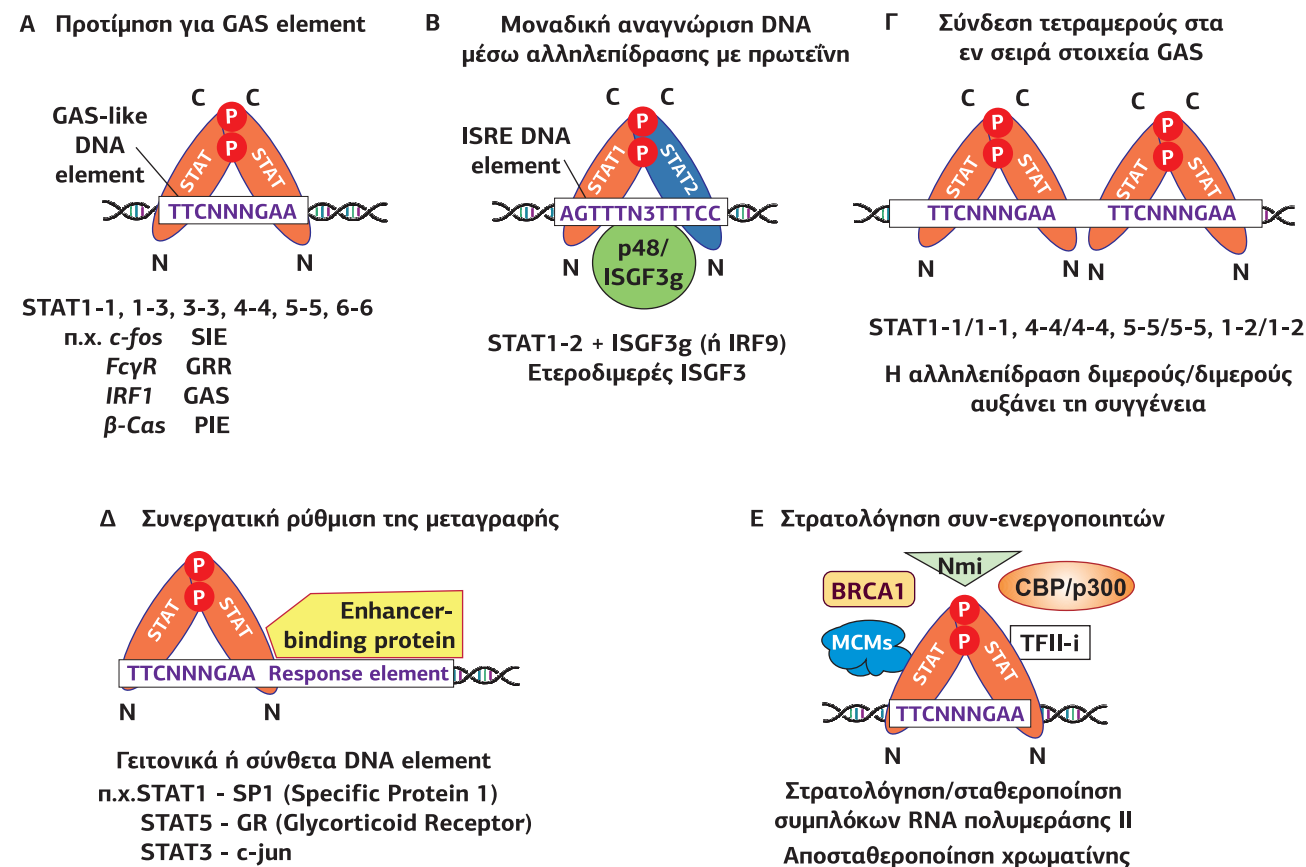
Η έξοδος των STAT από τον πυρήνα εξαρτάται από :

1. Ένα πυρηνικό σήμα NES.
2. Μια φωσφατάση τυροσίνης (SHP2) του πυρήνα, η οποία αποφωσφορυλιώνει τον STAT και τον απελευθερώνει από το DNA ενεργοποιώντας την έξοδό του.

Όταν δεν υπάρχει η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, οι STATs μπαίνουν και βγαίνουν γρήγορα από τον πυρήνα μέσω του NES, αφού πρώτα συνδεθούν στην exportin (export: έξοδος) CRM1, η οποία βγαίνει από τον πυρήνα με τη βοήθεια της Ran-GTP (βλ. Εικόνα 9.20).

1.6 Ρύθμιση του μονοπατιού Jak-STAT

Το σύστημα Jak-STAT ρυθμίζεται από μηχανισμούς τερματισμού της σηματοδότησης. Γενικά, ο βαθμός φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του μονοπατιού τηρείται σε χαμηλά επίπεδα από ειδικές φωσφατάσες τυροσίνης. Επιπλέον, οι STATs ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν **καταστολείς της σηματοδότησης κυτοκινών, SOCS** (Suppressors Of Cytokine Signaling). Αυτές οι πρωτεΐνες μπλοκάρουν την καταλυτική περιοχή των κινασών Jak, ενώ την ίδια στιγμή πυροδοτούν την ουβικουτίνωση και την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του υποδοχέα κυτοκινών και των συνδεδεμένων Jak. Τα ζώα στα οποία έχουν αφαιρεθεί οι SOCS



Εικόνα 9.21

Μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τους STATs για την επίτευξη συγκεκριμένων μεταγραφικών αποκρίσεων.

A. Οι περισσότεροι ομο- και ετερο-διμερείς STATs αναγνωρίζουν τα στοιχεία GAS-like, τα οποία έχουν παλινδρομικές ακολουθίες TT-CNNNG-AA. Ορισμένα στοιχεία αναγνωρίζονται από όλα τα διμερή STATs, αλλά διαφορετικά διμερή μπορούν να συνδεθούν με υψηλή εξειδίκευση σε μεμονωμένα στοιχεία απόκρισης DNA με βάση τις προτιμήσεις τους για συγκεκριμένες βάσεις. Δίνονται παραδείγματα των διμερών STAT και των στοιχείων GAS-like μέσα σε υποκινητές γονιδίων, όπως SIE (c-Sis-Inducible Element), στον εκκινητή του γονιδίου c-fos, GRR (Gamma Response Region), στον εκκινητή του γονιδίου FcγR (κωδικοποιεί για υποδοχείς Fcγ που ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών), GAS (interferon-gamma-activated sequence) στον εκκινητή του γονιδίου IRF1 (κωδικοποιεί τον Interferon Regulatory Factor 1) και PIE (Prolactin-Inducible Element) στο εκκινητή του γονιδίου β-Cas (β-Casein).

B. Στο ετεροτριμερές σύμπλεγμα ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3), τα ετεροδιμερή STAT1-STAT2 συνδέονται με μια τρίτη πρωτεΐνη, την p48 / ISGF3g, η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία ISRE στο DNA. Ο STAT1 απεικονίζεται με πορτοκαλί χρώμα, και ο STAT2 με μπλε χρώμα. Γ. Η N-περιοχή των STATs διαμεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις διμερούς-διμερούς επιτρέποντας τη σύνδεση υψηλής συγγένειας σε διαδοχικά διατεταγμένα στοιχεία GAS, τα οποία μεμονωμένα εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια. Δ. Σε γειτονικά στοιχεία απόκρισης στους εκκινητές των γονιδίων συνδέονται άλλες enhancer-binding proteins που συνεργάζονται με τα διμερή STAT για την επαγωγή ειδικών και συνεργιστικών μεταγραφικών αποκρίσεων. Για παράδειγμα, η SP1 (Specificity Protein 1) και ο GR (Glucocorticoid Receptor). E. Κυρίως οι περιοχές TAD, αλλά και άλλες περιοχές των STATs στρατολογούν και συνδέουν άμεσα σε εκκινητές πυρηνικούς παράγοντες και μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές, που μεσολαβούν στην επαγωγή γονιδίων ή μεταβάλλουν τη δυναμική της χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες Nmi-1 (N-myc-interactor) και CBP / p300 συνδέονται με τις περισσότερες αλληλουχίες TAD των STATs, ενώ η TFII-i (Transcription Factor II-i) αλληλεπιδρά μόνο με τον STAT1 και STAT3, και η MCM (Minichromosome maintenance protein complex) και η BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) αλληλεπιδρούν μόνο μόνο με τον STAT1. [26]

δεν είναι βιώσιμα, δίνοντας έτσι μια ιδέα για το πόσο σημαντικός είναι αυτός ο μηχανισμός ελέγχου αρνητικής ανατροφοδότησης.

Όλες οι SOCS περιέχουν μια κεντρική SH2 περιοχή, η οποία καθορίζει τον στόχο κάθε πρωτεΐνης SOCS, καθώς συνδέεται σε συγκεκριμένα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης του υποστρώματος (κυρίως στις κινάσες Jak), και ένα COOH-τελικό κιβώτιο SOCS (SOCS box), το οποίο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο του μηχανισμού της ουβικουιτίνης, μεταξύ των οποίων είναι οι πρωτεΐνες elongin B (EB), elongin C (EC), cullin5, RING-box-2 (Rbx2) και το E2 ubiquitin-conjugating enzyme. Με τη

μεταφορά του υποστρώματος κοντά στο σύμπλοκο ουβικουιτίνωσης η πρωτεΐνη SOCS διευκολύνει την ουβικουιτίνωση των πρωτεϊνών στόχων, ενεργοποιώντας έτσι την αποικοδόμηση από τα πρωτεασώματα. Ορισμένες πρωτεΐνες SOCS περιέχουν, επίσης, μια NH₂-τελική περιοχή KIR (Kinase Inhibitory Region), η οποία λειτουργεί ως ψευδοϋπόστρωμα ικανό να αναστέλλει τη δραστηριότητα κινάσης πρωτεϊνών που δεσμεύονται από ή σε κοντινή απόσταση από την πρωτεΐνη SOCS (βλ. Εικόνα 9.20).

Πρόσφατα, οι SOCS κέρδισαν αρκετή προσοχή, καθώς φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Εκτεταμένη συσσώρευση σωματικού λίπους αποφεύγεται από λιποκινητικές ορμόνες, όπως η λεπτίνη, μια πρωτεΐνη παρόμοια με κυτοκίνη, που αλληλεπιδρά με έναν υποδοχέα κυτοκινών τύπου 1 και ενεργοποιεί το μονοπάτι Jak-STAT. Χρόνια επαγωγή που οφείλεται σε υπερβολική διατροφή μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στη λεπτίνη, λόγω συσσώρευσης SOCS και αποδόμησης του υποδοχέα. Η συνέπεια αυτού είναι η παχυσαρκία.

Μια άλλη οικογένεια αναστολέων εμποδίζει τη πρόσδεση των STATs στο DNA. Αυτές οι πρωτεΐνες αναστολές των ενεργοποιημένων STATs, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) έχουν λειτουργίες που εκτείνονται πολύ πέρα από τη ρύθμιση της λειτουργίας των STATs. Κάποιες από αυτές ελέγχουν, για παράδειγμα, τη δραστηριότητα καναλιών ιόντων, ενώ άλλες είναι E3 λιγάσες που καταλύουν τη SUMOύλιωση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο c-Jun και ο p53, καταστέλλοντας τους (βλ. Εικόνα 9.20).

1.7

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον IL-2R και ο ρόλος τους

Η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) και ο υποδοχέας της (IL-2R) ήταν η πρώτη κυτοκίνη και ο πρώτος υποδοχέας κυτοκίνης που κλωνοποιήθηκαν (1983). Η πρώτη λειτουργία που αποδόθηκε στην IL-2 ήταν η ισχυρή της ικανότητα να ενισχύει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων και ως εκ τούτου αρχικά ονομάστηκε αυξητικός παράγοντας των T-κυττάρων, TCGF (T-cell Growth Factor). Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι έχει ζωτικό ρόλο *in vivo* στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων που έχουν έρθει αρχικά σε επαφή με αντιγόνα και στη διαφοροποίηση των απλών T-λεμφοκυττάρων σε κύτταρα μνήμης, τα οποία είναι ικανά να υποστούν δευτερογενή επέκταση όταν επανεμφανιστεί ένα αντιγόνο.

Εκτός από τον κύριο ρόλο της στη διαμεσολάβηση για τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων μετά την ειδική αντιγονική τους διέγερση, η IL-2 ρυθμίζει την έκφραση της ιντερφερόνης και των κύριων αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων, αυξάνει τη δραστηριότητα των NK κυττάρων και αναστέλλει τον σχηματισμό αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων.

Κύτταρα που εκκρίνουν IL-2

IL-2 εκκρίνουν, όταν ενεργοποιούνται, τα αβ και γδ T-λεμφοκύτταρα, τα NK, τα δενδριτικά και τα σιτευτικά. Σε κατάσταση ηρεμίας τα CD4⁺ (T_H1) T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα είναι η κύρια πηγή μιας σταθερής, αλλά χαμηλής συγκέντρωσης IL-2. Όταν τα T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται, συμπεριλαμβανομένων και των CD4⁺ και CD8⁺, αρχίζουν να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες IL-2 για δική τους (αυτοκρινή) χρήση, αλλά και για να διεγείρουν με παρακρινή τρόπο τα γειτονικά κύτταρα που εκφράζουν IL-2Rs.

Σηματοδοτικά μονοπάτια

Οι δράσεις της IL-2 μεσολαβούνται από τον υποδοχέα IL-2R. Ο σχηματισμός

του τεταρτοταγούς συμπλέγματος υψηλής συγγένειας IL-2/IL-2Rαβγ οδηγεί σε μεταγωγή σήματος μέσω των κινάσων τυροσίνης Jak1 και Jak3, οι οποίες συνδέονται με τις υπομονάδες IL-2Rβ και γ_c, αντίστοιχα. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν τρία κατάλοιπα τυροσίνης του κυτταροπλασματικού τμήματος της IL-2Rβ, για να προωθήσουν: α. τη σύνδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής Shc (pTyr338 ανθρώπου), οδηγώντας στην ενεργοποίηση των μονοπατιών Grb2/ SOS/ Ras-GTP/ Raf-MEK-ERK και Grb2/ Gab1/ PI3K-PIP₂/ Akt και β. του Stat5 (pTyr392 και pTyr510 ανθρώπου), με αποτέλεσμα την Stat5-εξαρτώμενη ρύθμιση γονιδίων (CD25 ή IL-2Rα, FasL και FoxP3). Το τεταρτοταγές σύμπλοκο IL-2/IL-2R εσωτερικεύεται γρήγορα και η IL-2, η IL-2Rβ και η γ_c αποικοδομούνται αμέσως, ενώ η υπομονάδα IL-2Rα ανακυκλώνεται στην κυτταρική επιφάνεια. Έτσι, οι λειτουργικές δράσεις που απαιτούν παρατεταμένη σηματοδότηση IL-2R χρειάζονται και μία συνεχή πηγή IL-2, για να σχηματίσουν πρόσθετα σύμπλοκα σηματοδότησης IL-2/IL-2R.

Αν και η ενεργοποίηση των MAPKs και PI3K/Akt μέσω της Shc θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση του Stat5, ωστόσο, η σηματοδότηση φαίνεται να είναι πολύ πιο πολύπλοκη και αλληλεξαρτώμενη.

Μέσω του μονοπατιού **PI3K/ Akt** η IL-2 οδηγεί στην κυτταρική επιβίωση και επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την Bad (η οποία προκαλεί απόπτωση), τον FoxO και την GSK-3 (οι οποίοι σταματούν τον κυτταρικό κύκλο), και τέλος ενεργοποιεί το σύμπλοκο mTOR και κατ'επέκταση την κινάση S6K1, η οποία επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση. Η ραπαμυκίνη είναι ένα λιπόφιλο μακρολίδιο αντιβιοτικό, που αναστέλλει τη δραστηριότητα της κινάσης mTOR, αναστέλλει και τον επαγόμενο από την IL-2 πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων στην αρχική φάση G1 (βλ. σσ. 430-435).

Η **Pyk2** (Protein tyrosine kinase) είναι μια κινάση τυροσίνης, μέλος της οικογένειας FAK (Focal Adhesion Kinase). Η IL-2 ενεργοποιεί την Pyk2 μέσω της ενεργοποίησης της Jak3. Loss-of-function μεταλλάγματα της Pyk2 παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγεται με τη μεσολάβηση της IL-2. Εν τούτοις, το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την Pyk2 παραμένει άγνωστο.

Εκτός από τις κινάσες Jak1/3, ο ενεργοποιημένος IL-2R στρατολογεί και ενεργοποιεί και άλλες κινάσες Tyr. Η **Lck** (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) ήταν η πρώτη κινάση τυροσίνης που αναγνωρίστηκε να συνδέεται με τον IL-2R (συγκεκριμένα με την υπομονάδα IL2Rβ) (βλ. σελ. 655). Σε ενεργοποιημένα από την IL-2 T-λεμφοκύτταρα η Lck φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την PLCγ, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKCθ. Η PKCθ φωσφορυλιώνει με τη σειρά της τον RacGEF aPix, ο οποίος ενεργοποιεί την GTPάση Rac1 επάγοντας τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα των Jak.

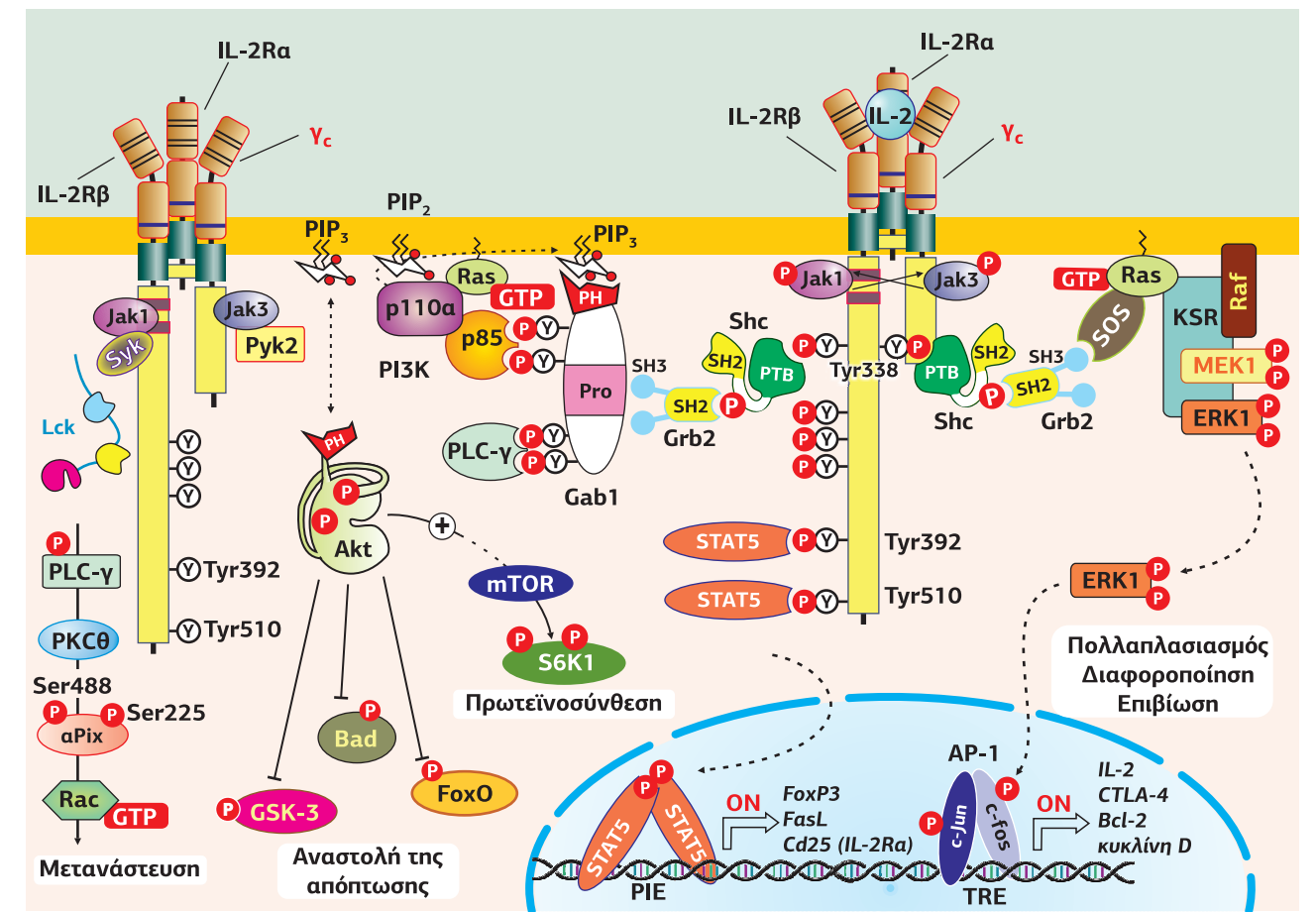
Η **Syk** (Spleen tyrosine kinase) είναι μια κινάση τυροσίνης, μέλος της οικογένειας ZAP-70, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο περιοχών SH2. Γενικά, η Syk και η ZAP-70 έχουν κεντρικούς ρόλους στο μονοπάτι σηματοδότησης των BcRs (B-cell receptors) και TcRs (T-cell Receptors), αντίστοιχα. Η Syk συνδέεται, επίσης, με την IL-2Rβ και ενεργοποιείται έπειτα από διέγερση του υποδοχέα από την IL-2. Η ενεργοποίηση της Syk οδηγεί σε επαγωγή του γονιδίου *c-myc*.

Συνοψίζοντας, η σύνδεση της IL-2 στους IL-2Rs προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης των υποδοχέων που ακολουθείται από την ενεργοποίηση των συνδεδεμένων κινάσων, συμπεριλαμβανομένων των Jak1, Jak3 και άλλων κινάσων τυροσίνης, όπως η Lck, η Pyk2 και η Syk. Αυτές οι κινάσες τυροσίνης ενεργοποιούνται μεταξύ τους ενδοκυτταρικά πολλαπλά μεταγωγικά μονοπάτια, όπως των STATs, Shc, PI3K, οι οποίοι μέσω της SH2 περιοχής τους συνδέονται στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων, ενεργοποιούνται και, στη συνέχεια, μεταδίδουν σήματα στον πυρήνα είτε απευθείας είτε μέσω Ras-ERK1/2 ή Akt (Εικόνα 9.22). Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να καταστεί σαφές πώς συνεργάζονται οι πολλαπλοί ενεργοποιητές μεταξύ τους και ρυθμίζουν την επαγωγή γονιδίων για κυτταρική ανάπτυξη, επιβίωση, διαφοροποίηση ή κυτταρικό θάνατο.

Η οικογένεια γονιδίων Fox (Forkhead-box)

κωδικοποιεί πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες - συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης διαφόρων οργάνων, της ρύθμισης της γήρανσης ή του πολλαπλασιασμού και της μεταβολικής ομοιόστασης. Το πρώτο γονίδιο Fox που ανακαλύφθηκε ήταν το *fkh* (forkhead) της *Drosophila*, το οποίο, όταν μεταλλαχθεί, δίνει στο κεφάλι του εντόμου μια εμφάνιση δικάλας (fork-headed). Ανεξάρτητα, μια άλλη ομάδα αναγνώρισε το FoxA1 στον αρουραίο. Από τότε, η οικογένεια έχει επεκταθεί για να συμπεριλάβει τις υποκατηγορίες FoxA έως FoxS.

Η υποοικογένεια FoxP παίζει ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Συγκεκριμένα, ο ιδιόσυστατα εκφρασμένος FoxP3 θεωρείται κρίσιμος βιοδείκτης για φυσικά κύτταρα Treg προερχόμενα από τον θύμο. Η έκφρασή του απαιτείται για την αυτοανοσία και την ανοσολογική ομοιόσταση.



2. Υποδοχείς αντιγόνων των T- και B-λεμφοκυττάρων

Τα B- και τα T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης και ενεργοποιούνται από αντιγόνα. Οι υποδοχείς αυτοί είναι απαραίτητοι για την ειδική ανοσολογική απόκριση, γιατί ρυθμίζουν εξειδικευμένα τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη λειτουργική αντίδραση ή την απόπτωση των λεμφοκυττάρων.

Οι υποδοχείς των B-λεμφοκυττάρων, οι BcRs (B cell Receptors), αναγνωρίζουν τα αντιγόνα στη μορφή των άγνωστων πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται σε διαλυτή, μοριο-συνδεδεμένη ή κυτταρο-συνδεδεμένη μορφή.

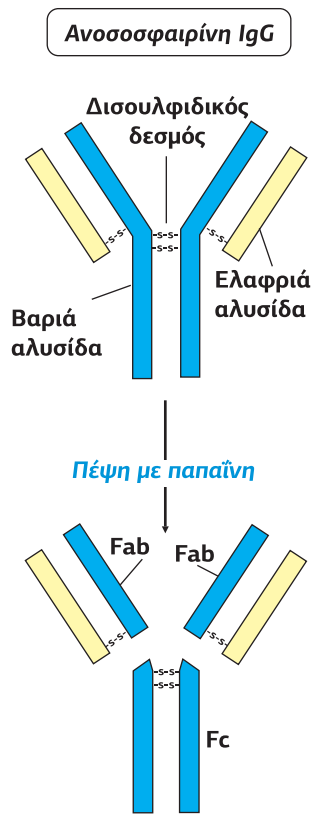
Οι υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων TcRs (T-cell Receptors), αντιθέτως, αναγνωρίζουν αντιγόνα μόνο κατά τη διάρκεια μιας άμεσης αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ένα T-λεμφοκύτταρο και σε ένα αντιγόνο-παρουσιαστικό κύτταρο. Το αντιγόνο-παρουσιαστικό κύτταρο παρουσιάζει την ξένη πρωτεΐνη (την οποία φαγοκυττάρωσε και διέσπασε σε πεπτίδια) ως ένα πεπτίδιο. Αυτό το πεπτίδιο είναι συνδεδεμένο στο μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας MHC (Major Histocompatibility Complex) του αντιγόνο-παρουσιαστικού κυττάρου και αναγνωρίζεται με αυτήν τη μορφή από τον TcR. Οι πρωτεΐνες MHC είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που βρίσκονται ως ετεροδιμερή και έχουν μια θέση σύνδεσης στην εξωκυτταρική τους περιοχή για το πεπτίδιο του αντιγόνου που παρουσιάζουν. Οι BcRs και TcRs συνδέουν το αντιγόνο κάτω από πολύ διαφορετικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, μετά τη σύνδεση ενεργοποιούνται παρόμοια σηματοδοτικά μονοπάτια.

Μια άλλη διαφορά ανάμεσα στους υποδοχείς των T- και B-κυττάρων είναι ότι οι TcRs βρίσκονται στη μεμβράνη και δεν συναντώνται σε διαλυτή μορφή, όπως οι BcRs.

Εικόνα 9.22
Μεταγωγικά μονοπάτια της ιντερλευκίνης 2 (IL-2).
Η IL-2 μετά τη σύνδεση στον υποδοχέα της ενεργοποιεί ποικίλα μονοπάτια. Μέσω των κινάσων Jak1 και Jak3 φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Tyr της υπομονάδας IL-2Rβ, στα οποία συνδέονται η πρωτεΐνη προσαρμογής Shc και οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT5. Μέσω της Shc ενεργοποιούνται τα μονοπάτια Ras/ Raf-MEK-ERK (πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση) και PI3K/ Akt (αναστολή της απόπτωσης και επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης). Εκτός από τις Jak1/3 ενεργοποιούνται και οι κινάσες Lck, Syk και Pyk2. [2] [8]

Οι υποδοχείς αντιγόνων είναι πιο πολύπλοκοι από τους υποδοχείς κυτοκινών στους οποίους αναφερθήκαμε. Είναι ολιγομερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες χωρίς εγγενή ενζυμική δραστηριότητα, αποτελούνται από ένα μεταβλητό τμήμα, όπου συνδέεται το αντιγόνο, και από ένα σταθερό τμήμα, το οποίο συνδέει τον υποδοχέα στη μεμβράνη. Το τμήμα, όπου συνδέεται το αντιγόνο αποτελείται από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Εξαιτίας του μηχανισμού ανασυνδυασμού των γονιδιακών τμημάτων, η μεταβλητότητά του είναι σχεδόν απεριόριστη (ο αριθμός των μεταβλητών φτάνει τα 10^{15}).

Όλα τα αντιγόνα προκαλούν περισσότερο ή λιγότερο ταυτόσημες κυτταρικές αποκρίσεις. Από την αρχή αυτή η κατάσταση αποκλείει οποιαδήποτε σταθερή σύνδεση μεταξύ των περιοχών αισθητήρα και τελεστή των υποδοχέων αντιγόνων. Στην πραγματικότητα, με τη σύνδεση του προσδέτη όλοι οι υποδοχείς αντιγόνων συνδέονται με το ίδιο σηματοδοτικό σύμπλεγμα κυτταροπλασματικών κινασών τυροσίνης και των υποστρωμάτων τους, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο ένα αρκετά πολύπλοκο δίκτυο σηματοδοτικών αντιδράσεων.



Σε ένα κομβικό πείραμα η διάσπαση της IgG με παπαΐνη παράγαγε τρία θραύσματα, δύο από τα οποία ήταν πανομοιότυπα και ένα τρίτο που ήταν πολύ διαφορετικό. Τα δύο πανομοιότυπα ήταν ικανά να δεσμεύσουν το αντιγόνο και ονομάστηκαν **θραύσματα Fab** (Fragment antigen binding). Το άλλο θραύσμα δεν διέθετε αντιγονική εξειδίκευση. Επειδή όμως βρέθηκε ότι κρυσταλλώνεται κατά την αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία, ονομάστηκε **θραύσμα Fc** (Fragment crystallizable).

2.1 Το σύμπλοκο των TcRs και οι συνυποδοχείς τους

Ο υποδοχέας T-κυττάρων ή TcR βρίσκεται στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων και είναι υπεύθυνος για την αναγνώριση τμημάτων του αντιγόνου που συνδέονται στα μόρια του συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC). Η σύνδεση μεταξύ TcR και πεπτιδίων του αντιγόνου είναι σχετικά χαμηλής συγγένειας και είναι εκφυλισμένη: δηλαδή, πολλοί TcRs αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγονικό πεπτίδιο και πολλά αντιγονικά πεπτίδια αναγνωρίζονται από τον ίδιο TcR.

Ο TcR είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές αλυσίδες: στους ανθρώπους στο 95% των T-λεμφοκυττάρων, οι TcRs αποτελούνται από μία α και μία β αλυσίδα, ενώ στο 5% των T-λεμφοκυττάρων οι TcRs αποτελούνται από μία γ και μία δ αλυσίδα. Ο λόγος 95/5 διαφέρει μεταξύ των ειδών και μεταβάλλεται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η λευχαιμία.

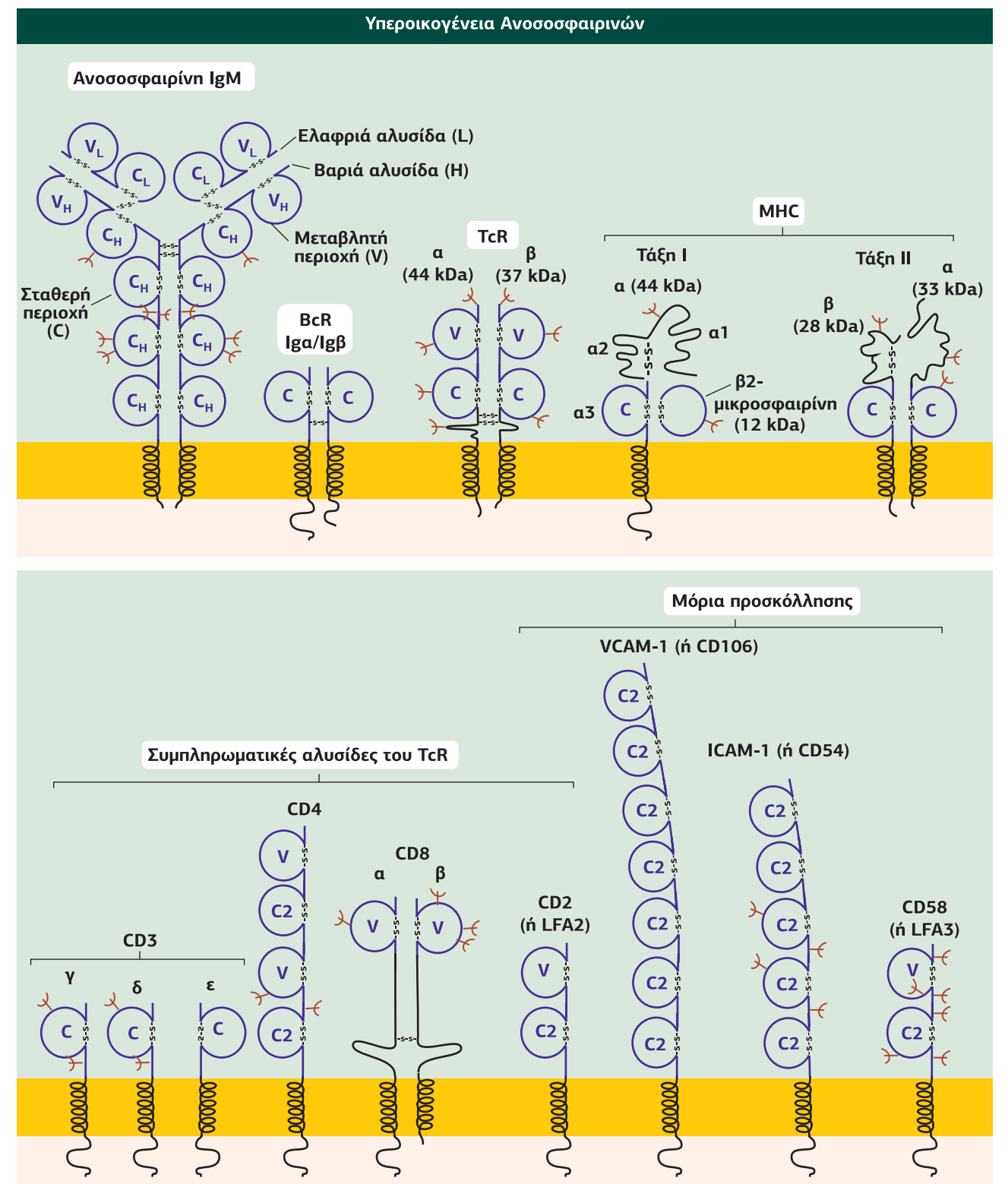
Όταν ο TcR συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγονικό πεπτίδιο / MHC, το T-λεμφοκύτταρο ενεργοποιείται μέσω μιας σειράς βιοχημικών γεγονότων που προκαλούνται από συνδεδεμένα ένζυμα, συνυποδοχείς και εξειδικευμένα μόρια προσαρμογής.

Δομικά χαρακτηριστικά των TcRs

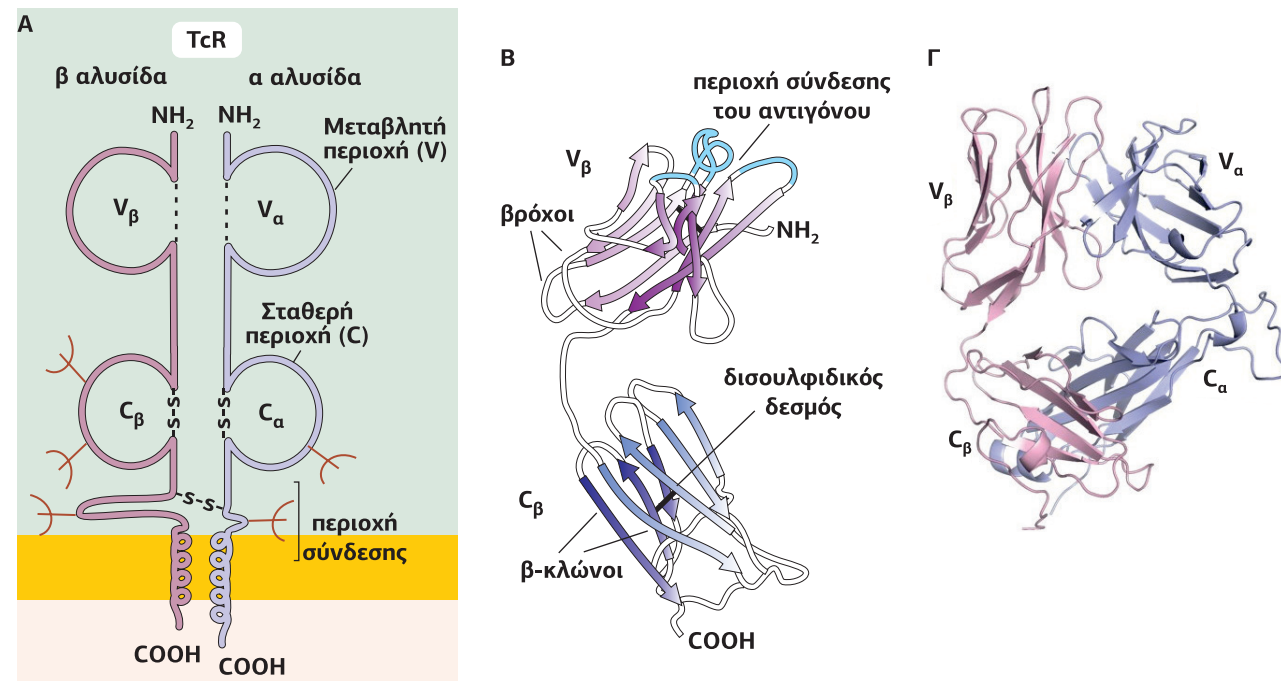
Ο TcR είναι μία ετεροδιμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη αβ ή γδ, οι δύο αλυσίδες της οποίας συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Ο TcR αποτελεί τμήμα ενός συμπλόκου, το οποίο περιλαμβάνει τις ετεροδιμερείς πρωτεΐνες γε και δε (που αποτελούν το μόριο CD3), καθώς και την ομοδιμερή ζζ. Η δομή των εξωκυτταρικών περιοχών όλων των αλυσίδων που απαρτίζουν το σύμπλοκο του TcR είναι όμοια με την αντίστοιχη των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Εικόνα 9.23).

Η **υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών** είναι μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, τα μέλη της οποίας εμπλέκονται στην αναγνώριση, τη σύνδεση και την προσκόλληση των κυττάρων. Η οικογένεια πήρε το όνομά της από τα αντισώματα, που ονομάζονται επίσης ανοσοσφαιρίνες - immunoglobulins. Ο TcR είναι παρόμοιος με το θραύσμα Fab (Fragment antigen binding) μιας ανοσοσφαιρίνης.

Κάθε αλυσίδα (α, β, γ ή δ) ενός μορίου TcR διαθέτει δύο περιοχές Ig-like (η κάθε περιοχή αποτελείται από 110 αμινοξέα, με έναν δισουλφιδικό δεσμό που κλείνει μια θηλιά εκτεινόμενη σε μήκος 65-70 αμινοξέων). Η NH₂-τελική Ig-like περιοχή των αλυσίδων παρουσιάζει αξιοσημείωτη ποικιλία ως προς την αμινοξική της αλληλουχία και ονομάζεται μεταβλητή (V, Variable), σε αντίθεση με την COOH-τελική περιοχή που είναι καλά συντηρημένη και ονομάζεται σταθερή (C, Constant). Οι δύο Ig-like



Εικόνα 9.23 **Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών.** Μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν μία ή περισσότερες περιοχές ομόλογες της περιοχής ανοσοσφαιρίνης (Ig-like). Διακρίνονται: η ανοσοσφαιρίνη (IgM), το ετεροδιμερές Ig-α/Ig-β τμήμα του BcR, ο υποδοχέας T-λεμφοκυττάρων (αβ TcR), το συμπληρωματικό μόριο CD3 και οι συνυποδοχείς CD4 και CD8, τα μόρια MHC τάξης I και II, η β-μικροσφαιρίνη και διάφορα μόρια προσκόλλησης, όπως VCAM, ICAM-1, LFA2 και LFA3. Το LFA2 (ή CD2) χρησιμεύει και ως συμπληρωματικό μόριο στο σύμπλοκο TcR. Με C χαρακτηρίζονται οι σταθερές περιοχές (Constant), ενώ με V οι μεταβλητές (Variable).



Εικόνα 9.24
Δομή του υποδοχέα αντιγόνων αβ TcR. Α. Ένα μόριο TcR αποτελείται από δύο αλυσίδες (η πλειοψηφία των TcR από αβ), συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Η κάθε αλυσίδα διαθέτει δύο περιοχές Ig-like. Η NH₂-τελική εμφανίζει αξιοσημείωτη ποικιλομορφία και ονομάζεται μεταβλητή (V), ενώ η COOH-τελική είναι καλά συντηρημένη και ονομάζεται σταθερή (C). Στη συνέχεια, κάθε αλυσίδα του TcR περιέχει μια μικρή περιοχική σύνδεσης, μια διαμεμβρανική περιοχική 21-22 αμινοξέων (με θετικά φορτισμένα αμινοξέα) και, τέλος, μια μικρή COOH-τελική κυτταροπλασματική ουρά 12 αμινοξέων. Β. Διάγραμμα της μεταβλητής και της σταθερής περιοχής της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Τα δύο β-πτυχωτά φύλλα της κάθε περιοχής συγκρατούνται μεταξύ τους με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και έναν δισουλφιδικό δεσμό. Οι β-κλώνοι του κάθε πτυχωτού φύλλου διακρίνονται με διαφορετικά χρώματα. Οι τρεις βρόχοι της μεταβλητής περιοχής σχηματίζουν τη θέση δέσμευσης του αντιγόνου. [55] Γ. Κρυσταλλική δομή του εξωκυτταρικού τμήματος του TcR. [79]

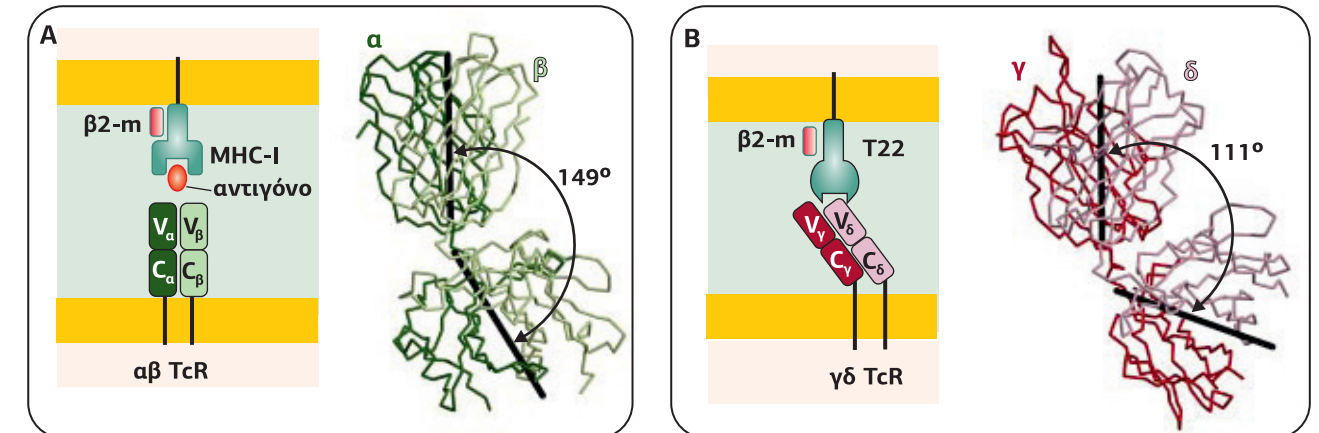
περιοχές είναι δομικά ανάλογες με τις περιοχές V και C των ανοσοσφαιρινών.

Μετά τη σταθερή περιοχική, κάθε αλυσίδα του TcR περιέχει μια μικρή περιοχική σύνδεσης, στην οποία ένα κατάλοιπο Cys σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό με την Cys της άλλης αλυσίδας του ετεροδιμερούς. Στη συνέχεια, υπάρχει μια διαμεμβρανική περιοχική 21-22 αμινοξέων, η οποία αγκυροβολεί την κάθε αλυσίδα στην πλασματική μεμβράνη. Οι διαμεμβρανικές περιοχές παρουσιάζουν το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό να περιέχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα χάρη στα οποία αλληλεπιδρούν με τις αλυσίδες του CD3. Τέλος, κάθε αλυσίδα του TcR περιέχει στο COOH-τελικό της άκρο μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά 12 αμινοξέων (Εικόνα 9.24).

Η πλειοψηφία των T-λεμφοκυττάρων στον άνθρωπο εκφράζει TcRs που κωδικοποιούνται από τα γονίδια αβ. Οι διαφορές στις περιοχές σύνδεσης του αντιγόνου μεταξύ των αβ και γδ ήταν αναμενόμενες, καθώς αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα. Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι ο προσανατολισμός των V και C περιοχών. Η γωνία άρθρωσης που σχηματίζεται κατά τον επιμήκη άξονα των V και C περιοχών του γδ είναι 111° σε αντίθεση με του αβ που είναι 149° (Εικόνα 9.25). Ο αριθμός των κυττάρων γδ στην κυκλοφορία είναι μικρός σε σχέση με τον αντίστοιχο των κυττάρων που διαθέτουν αβ υποδοχείς. Οι γδ TcRs εμφανίζουν περιορισμένη ετερογένεια σε σχέση με τους αβ, με τους οποίους ουδέποτε συγκεντρώνονται στο ίδιο κύτταρο. Τα κύτταρα που εκφράζουν γδ (TcR1) βρίσκονται συγκεντρωμένα σε ορισμένους επιθηλιακούς ιστούς και διαφέρουν από εκείνα που εκφράζουν αβ (TcR2) ως προς τους μηχανισμούς αναγνώρισης του αντιγόνου, τις συνθήκες ενεργοποίησης και τον ρόλο που διαδραματίζουν στην ανοσολογική απόκριση.

Το σύμπλεγμα του TcR

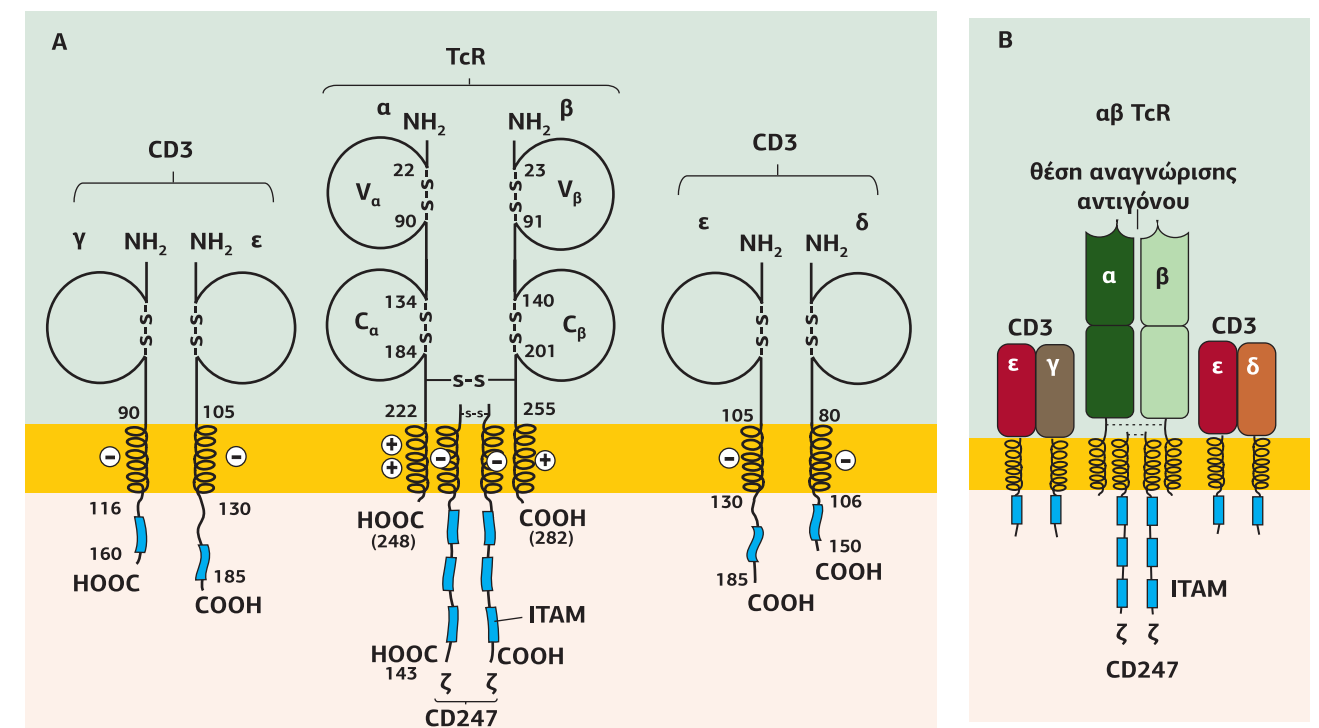
Για την έκφραση του TcR στη μεμβράνη του T-λεμφοκυττάρου είναι απαραίτητη η προηγούμενη μη ομοιοπολική σύνδεσή του με ένα σύμπλεγμα τριών τουλάχιστον διαμεμβρανικών πολυπεπτιδίων, γ, δ και ε, που αποτελούν το μόριο CD3. Οι αλυσίδες του TcR και του CD3 συνδέονται, επίσης, και με το ομοδιμερές CD247 των αλυσίδων ζζ, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων είναι κυτταροπλασματικό. Το σύνολο αποτελεί το οκταμερές **σύμπλεγμα του TcR** (TcR complex). Ιονιζόμενα κατάλοιπα στη διαμεμβρανική περιοχική κάθε υπομονάδας σχηματίζουν ένα πολικό δίκτυο αλληλεπιδράσεων που συγκρατούν το σύμπλοκο μαζί. Δεδομένου ότι η κυτταροπλασματική ουρά του TcR είναι εξαιρετικά σύντομη, καθιστώντας απίθανο



να συμμετέχει στη σηματοδότηση, αυτά τα συμπληρωματικά μόρια σηματοδότησης είναι ζωτικής σημασίας για τη μετάδοση του σήματος από τον ενεργοποιημένο TcR (Εικόνα 9.26).

Το σύμπλεγμα TcR αποτελείται από 4 διμερή: το ετεροδιμερές αβ ή γδ του TcR καθορίζει την εξειδίκευση σύνδεσης των διαφόρων αντιγόνων, ενώ τα ετεροδιμερή του CD3 (γε και δε) και το ομοδιμερές ζζ απαιτούνται για τη μεμβρανική έκφραση του TcR και τη μεταγωγή σήματος. Η κάθε αλυσίδα γ, δ και ε του CD3 (μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών) αποτελούνται από μια περιοχική Ig-like, μια διαμεμβρανική περιοχική και μια κυτταροπλασματική με περισσότερα από 40 αμινοξέα. Η αλυσίδα ζ έχει τελείως διαφορετική δομή: αποτελείται από μια πολύ κοντή εξωκυτταρική περιοχική 9 αμινοξέων, μια διαμεμβρανική περιοχική και μια μεγάλη κυτταροπλασματική ουρά από 113 αμινοξέα. Η διαμεμβρανική περιοχική των αλυσίδων

Εικόνα 9.25
Σύγκριση μεταξύ του γδ TcR και του αβ TcR. Διακρίνεται η διαφορά στη γωνία άρθρωσης 111° / 149°. Η πρωτεΐνη T22 είναι συγγενική, μη κλασική πρωτεΐνη της MHCIIb, η οποία συνδέεται σε ορισμένους γδTcRs. [1]



Εικόνα 9.26

Δομή των διαφορετικών αλυσίδων του συμπλέγματος TcR. Οι α και β αλυσίδες είναι γνωστές ως σύμπλοκο Tiaβ, οι αλυσίδες γε και δε σχηματίζουν μαζί το σύμπλοκο CD3. Διακρίνονται, επίσης, τα μοτίβα αλληλουχίας ITAM στο κυτταροπλασματικό τμήμα των αλυσίδων γ, δ, ε, ζ [20]

γ, δ, ε και ζ περιλαμβάνει ένα αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Asp, που αλληλεπιδρά με ένα ή δύο φορτισμένα αμινοξέα της διαμεμβρανικής περιοχής των αλυσίδων του TcR.

Μέσω παρακείμενης - juxtacrine επικοινωνίας αυτό το ετεροδιμερές αλληλεπιδρά με το συνδεδεμένο στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC, Major Histocompatibility Complex) αντιγόνο που εκτίθεται στην επιφάνεια ενός αντιγόνο-παρουσιαστικού κυττάρου (APC, Antigen Presenting Cell). Οι TcRs έχουν πολύ υψηλό βαθμό εξειδίκευσης για το αντιγόνο, παρά το γεγονός ότι η συγγένεια για το συνδεδεμένο στο MHC πεπτιδικό τμήμα του αντιγόνου είναι ασθενής, της τάξης 10-100 μM . Η ειδική και αποτελεσματική σηματοδότηση μέσω του TcR ρυθμίζεται με δυναμικό ολιγομερισμό των TcRs στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων.

Η σύνδεση του συνδεδεμένου στο MHC αντιγόνου με τον TcR οδηγεί στην αλλαγή διαμόρφωσης των αλυσίδων του συμπλόκου CD3 (γε και δε) και των αλυσίδων ζζ. Ως αποτέλεσμα, αυτές οι αλυσίδες γίνονται προσβάσιμες σε μια συνδεδεμένη κινάση τυροσίνης, που φωσφορυλιώνει τις κυτταροπλασματικές τους περιοχές στις **αλληλουχίες ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs). Οι αλληλουχίες ITAM βρίσκονται στις υπομονάδες CD3γ, CD3δ, CD3ε και ζ, και, επιπλέον, περιλαμβάνουν δύο ζευγάρια καταλοίπων Tyr και Leu μέσα στην αλληλουχία (D/E)XXYXXL(X)₆₋₈YXXL. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των T-κυττάρων, τα κατάλοιπα Tyr των ITAMs φωσφορυλιώνονται, δημιουργώντας θέσεις σύνδεσης για SH2 και PTB περιοχές πρωτεϊνών. Η σύνδεση των πρωτεϊνών αυτών είναι ένα κρίσιμο βήμα στη μετάδοση του μηνύματος.

Συνυποδοχείς CD4 και CD8 και το σύμπλεγμα MHC

Η συνεργασία με άλλους υποδοχείς που βοηθά με συνεργατικό τρόπο τη σηματοδότηση είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα της μεταγωγής σήματος μέσω υποδοχέων αντιγόνων των T-λεμφοκυττάρων. Αυτοί οι άλλοι υποδοχείς είναι γνωστοί ως **συνυποδοχείς**. Οι συνυποδοχείς είναι απαραίτητοι για τη μεταγωγή σήματος των TcRs και εμπλέκονται στη σύνδεση και ενεργοποίηση κινάσων τυροσίνης, όπως η Src. Επιπλέον, έχουν μια ενισχυτική δράση κατά 100 περίπου φορές στην ευαισθησία και εξειδίκευση της σύνδεσης του αντιγόνου. Παραδείγματα συνυποδοχέων είναι οι πρωτεΐνες CD4 και CD8.

Οι συνυποδοχείς CD4 εκφράζονται κυρίως στα βοηθητικά T_H-λεμφοκύτταρα και αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα MHC-II, ενώ οι συνυποδοχείς CD8 εκφράζονται κυρίως στα κυτταροτοξικά T_C-λεμφοκύτταρα και αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα MHC-I.

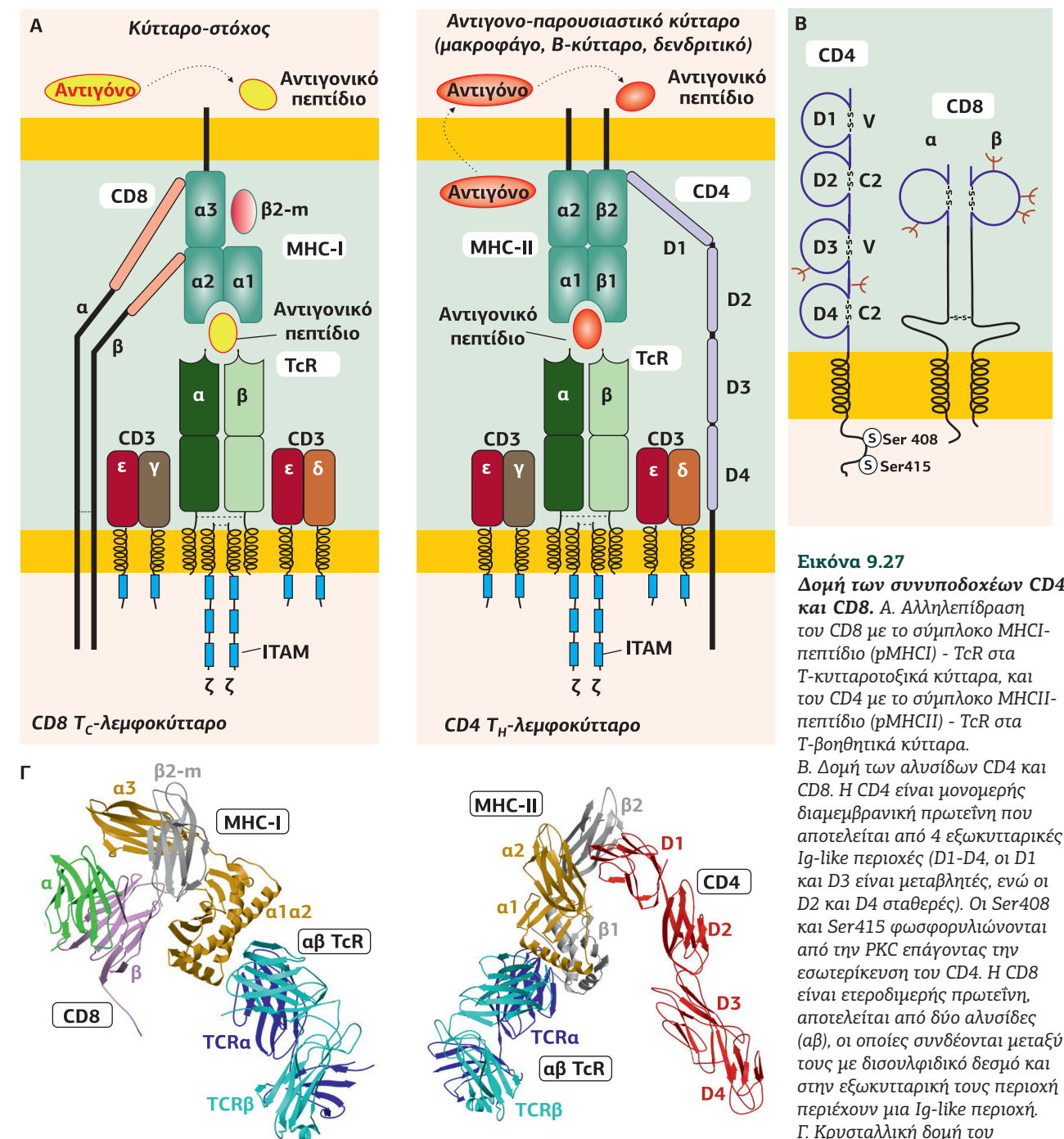
Το **μόριο CD4** είναι μια μονομερής μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 55 kDa που αποτελείται από 4 εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές (D1-D4, οι D1 και D3 είναι μεταβλητές, ενώ οι D2 και D4 σταθερές), μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά, η οποία περιέχει δύο κατάλοιπα Ser που μπορούν να φωσφορυλιωθούν (Ser408 και Ser415). Η φωσφορυλίωση από την PKC της Ser408 επάγει την εσωτερική κίνηση της πρωτεΐνης.

Το **μόριο CD8** είναι ένα ετεροδιμερές αβ που σταθεροποιείται μέσω δισουλφικών δεσμών. Τόσο οι α όσο και οι β αλυσίδες του CD8 είναι μικρές γλυκοπρωτεΐνες 30-38 kDa. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από μία εξωκυτταρική περιοχή Ig-like, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά 25-27 αμινοξέων, αρκετά από τα οποία μπορούν να φωσφορυλιωθούν (Εικόνα 9.27).

Οι εξωκυτταρικές περιοχές των CD4 και CD8 συνδέονται με τις συντηρημένες περιοχές των μορίων MHC των αντιγόνο-παρουσιαστικών κυττάρων. Το διμερές CD8, για παράδειγμα, έρχεται σε επαφή με τις α2 και α3 περιοχές του μορίου MHC-I και σε μικρότερο βαθμό με τη β2-μικροσφαιρίνη, ενώ το CD4 έρχεται σε επαφή με τις α2 και β2 περιοχές του μορίου MHC-II.

Ο κύριος ρόλος των συνυποδοχέων CD4 και CD8 είναι η στρατολόγηση της κινάσης τυροσίνης Lck στο σύμπλοκο TcR - πεπτίδιο/MHCII - CD4 ή TcR - πεπτίδιο/MHCI - CD8.

Ο CD4 δρα, επίσης, ως συνυποδοχέας που αναγνωρίζει τον ιό HIV και βοηθά στην είσοδό του στα T-λεμφοκύτταρα (βλ. Εικόνα 5.9)



Εικόνα 9.27

Δομή των συνυποδοχέων CD4 και CD8

A. Αλληλεπίδραση του CD8 με το σύμπλοκο MHC-I-πεπτίδιο (pMHC I) - TcR στα T-κυτταροτοξικά κύτταρα, και του CD4 με το σύμπλοκο MHC-II-πεπτίδιο (pMHC II) - TcR στα T-βοηθητικά κύτταρα.

B. Δομή των αλυσίδων CD4 και CD8. Η CD4 είναι μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αποτελείται από 4 εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές (D1-D4, οι D1 και D3 είναι μεταβλητές, ενώ οι D2 και D4 σταθερές). Οι Ser408 και Ser415 φωσφορυλιώνονται από την PKC επάγοντας την εσωτερική κίνηση του CD4. Η CD8 είναι ετεροδιμερής πρωτεΐνη, αποτελείται από δύο αλυσίδες (αβ), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφικό δεσμό και στην εξωκυτταρική τους περιοχή περιέχουν μια Ig-like περιοχή.

Γ. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CD4 - MHCII - αβTcR και του CD8 - MHC I - αβTcR. [40]

Το **μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC)** είναι ένα σύνολο διαμεμβρανικών πρωτεϊνών απαραίτητων για την αναγνώριση ξένων μορίων και καθορίζει εν μέρει την απόκριση του ατόμου σε αντιγόνα παθογόνων μικροοργανισμών και, συνεπώς, τη συμβατότητα του δότη για μεταμόσχευση οργάνου, καθώς και την ευαισθησία του ατόμου σε αυτοάνοση ασθένεια. Η κύρια λειτουργία των MHC είναι η σύνδεση των αντιγόνων είτε εαυτών είτε προερχόμενων από παθογόνους παράγοντες και η εμφάνισή τους στην κυτταρική επιφάνεια. Καθώς τα εαυτά αντιγόνα βρίσκονται σε μόνιμη βάση συνδεδεμένα με τα MHC αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση δεν είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τους TcRs. Οι TcRs επιπλέον εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια για τα εαυτά αντιγόνα, καθώς κατά τη διάρκεια της αρνητικής επιλογής στον θύμο, στα θυμοκύτταρα των οποίων ο TcR συνδέεται με μεγάλη συγγένεια

στα εαυτά αντιγόνα-MHC είτε εξαλείφονται (clonal deletion) είτε αδρανοποιούνται (clonal anergy). Η ξαφνική εμφάνιση ενός ξένου παράγοντα (παθογόνου ή μη) σε μεγάλες συγκεντρώσεις οδηγεί σε αυξημένο αριθμό MHC-πεπτιδικών αντιγόνων αυτού του παράγοντα, ικανού να ενεργοποιήσει τους υποδοχείς TcRs. Το ανθρώπινο MHC ονομάζεται, επίσης, HLA (Human Leukocyte Antigen).

Η οικογένεια γονιδίων MHC χωρίζεται σε τρεις υποομάδες: κατηγορία I, II και III. Τα μόρια MHC-I έχουν β2 υπομονάδες και έτσι μπορούν να αναγνωριστούν μόνο από τους συνυποδοχείς CD8. Τα μόρια MHC-II έχουν β1 και β2 υπομονάδες και μπορούν να αναγνωριστούν από τους συνυποδοχείς CD4.

Το **σύμπλοκο MHC-I** εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα, τα οποία δεν χαρακτηρίζονται ως αντιγόνο-παραρσιαστικά αλλά ως κύτταρα-στόχοι. Παρουσιάζει επιτόπους σε T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTLs), τα οποία εκφράζουν συνυποδοχείς CD8, εκτός από τους TcRs. Όταν ο CD8 συνδέεται με ένα μόριο MHC-I, εάν ο TcR του κυτταροτοξικού T-κυττάρου ταιριάζει με τον επίτοπο του συνδεδεμένου στο MHC-I αντιγόνου, το CTL πυροδοτεί το κύτταρο-στόχο, με συνέπεια αυτό να υποβάλλεται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο με απόπτωση. Έτσι, το MHC-I βοηθά στη διαμεσολάβηση της κυτταρικής ανοσίας, πρωταρχικό μέσο για την αντιμετώπιση των ενδοκυτταρικών παθογόνων, όπως οι ιοί και ορισμένα βακτήρια.

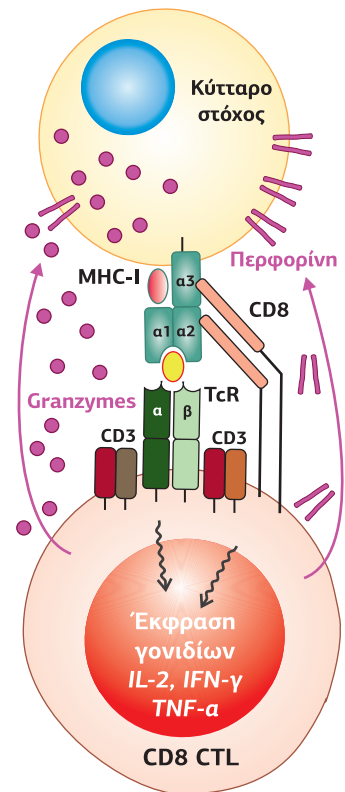
Το σύμπλοκο MHC-I αποτελείται από μια διαμεμβρανική α-αλυσίδα 45 kDa, η οποία περιέχει τρεις εξωκυτταρικές περιοχές 50 περίπου αμινοξέων η καθεμιά (α1, α2, α3) και συνδέεται μη ομοιοπολικά με ένα μόριο β2-μικροσφαιρίνης 12 kDa, το οποίο δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή. Η β2-μικροσφαιρίνη και η α3 περιοχή έχουν καλά διατηρημένη δομή Ig-like (IgC) και γι' αυτό τα μόρια MHC κατατάσσονται στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (βλ. **Εικόνα 9.23**). Οι περιοχές α1 και α2 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας μια βαθιά αύλακα μήκους 8-10 αμινοξέων, όπου συνδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο. Απουσία β2-μικροσφαιρίνης η α αλυσίδα των MHC-I δεν εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη, όπως συμβαίνει στα καρκινικά κύτταρα Daudi, που αδυνατούν να συνθέσουν β2-μικροσφαιρίνη.

Το MHC-I προσδένει πεπτίδια που προέρχονται από ενδογενείς, ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, οι οποίες υφίστανται πέψη στο κυτταρόπλασμα. Αυτά τα ενδογενή αντιγόνα είναι συνήθως προϊόντα ιών ή ορισμένων βακτηρίων που πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα. Τα πεπτίδια, στη συνέχεια, μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα μέσα σε κυστίδια του ΕΔ, όπου και αλληλεπιδρούν με τα μόρια MHC-I. Η παρουσίασή τους από το MHC-I στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του μολυσμένου κυττάρου από τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T_c-λεμφοκύτταρα. Έτσι τα κυτταροτοξικά αποτελούν τον κυριότερο μηχανισμό άμυνας του ξενιστή απέναντι στα ενδοκυτταρικά παθογόνα.

Το **σύμπλοκο MHC-II** εκφράζεται μόνο στα "επαγγελματικά" αντιγόνο-παραρσιαστικά κύτταρα (APCs): μακροφάγα, B-λεμφοκύτταρα και ειδικά δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα οποία είναι τα πιο αποτελεσματικά. Το APC φαγοκυτταρώνει το αντιγόνο, το επεξεργάζεται και επιστρέφει ένα μοριακό κλάσμα του (που ονομάζεται επίτοπος) στην επιφάνειά του, συνδεδεμένο με ένα μόριο MHC-II.

Το σύμπλοκο MHC-II αποτελείται από δύο διαφορετικές διαμεμβρανικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία α αλυσίδα 33 kDa και μια β αλυσίδα 28 kDa που συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Η κάθε αλυσίδα περιέχει δύο εξωκυτταρικές περιοχές (α1, α2 και β1, β2). Οι α1 και β1 δημιουργούν την αύλακα πρόσδεσης του αντιγονικού πεπτιδίου και οι α2 και β2 έχουν δομή Ig-like (βλ. **Εικόνα 9.23**).

Στην επιφάνεια των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων εκτός από τους TcRs εκφράζονται και οι συνυποδοχείς CD4. Όταν ο CD4 συνδεθεί με ένα μόριο MHC-II του APC, ο TcR συνδέεται με τον επίτοπο, συνδεδεμένο στο MHC-II. Αυτό το γεγονός ενεργοποιεί το ανώριμο (naive) T-βοηθητικό κύτταρο (T_H0), το οποίο ανάλογα με το τοπικό περιβάλλον, δηλαδή την ισορροπία των κυτοκινών που εκκρίνονται από τα APCs, διαφοροποιείται είτε σε ένα T_H κύτταρο μνήμης είτε σε ένα κύτταρο T_H τελεστή τύπου T_H1, T_H2 ή ρυθμιστικό/καταστολέα (T_{reg}).



Το CTL απελευθερώνει περφορίνη (perforin), ένα μόριο που δημιουργεί κανάλια στη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, οδηγώντας στη λύση του. Επίσης, απελευθερώνει granzymes (serine esterases) που εισέρχονται διαμέσου των καναλιών και οδηγούν το κύτταρο-στόχο σε απόπτωση. Στη συνέχεια, το CTL απελευθερώνει IFN-γ, TNF-α και IL-2 στρατολογώντας και άλλα κύτταρα στη θέση της φλεγμονής.

Έτσι, το MHC-II μεσολαβεί στην ανοσοποίηση ενάντια σε ένα αντιγόνο (εάν τα APCs οδηγούν στη διαφοροποίηση των T_H0 σε T_{reg} κύτταρα). Η διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς έκθεσης σε ένα αντιγόνο είναι καθοριστική για τον προσδιορισμό χρόνιων ασθενειών, όπως είναι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και το άσθμα, με την απόσβεση της ανοσολογικής απόκρισης όταν τα T_H κύτταρα μνήμης συντονίζονται κατά τη δευτερογενή έκθεση σε παρόμοια αντιγόνα. Τα B-λεμφοκύτταρα δρουν ως APCs και εκφράζουν το MHC-II για να παρουσιάσουν το αντιγόνο στα T_H0. Όταν όμως οι υποδοχείς BcRs συνδέονται με αντίστοιχους προσδέτες τους, τα ενεργοποιημένα B-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν διαλυτές ανοσοσφαιρίνες, μόρια αντισώματος που προκαλούν χυμική ανοσία.

Τα πεπτίδια που προσδένουν τα MHC-II προέρχονται από εξωγενή παθογόνα βακτήρια ή ορισμένα ευκαρυωτικά παράσιτα, που εισέρχονται με φαγοκυττάρωση ή ενδοκύτωση στα αντιγόνο-παραρσιαστικά κύτταρα. Εκεί εισέρχονται μέσα σε όξινα κυστίδια (ενδοσώματα, λυσοσώματα), όπου με τη βοήθεια του πολύ χαμηλού pH (~4) και των πρωτεασών αποικοδομούνται. Τα πεπτίδια που συνδέονται στους MHC-II είναι μεγαλύτερα από αυτά που συνδέονται στους MHC-I (13-18 αμινοξέων αντί για 9).

Συμπληρωματικά μόρια του TcR

Η συγγένεια του TcR για το σύμπλεγμα πεπτίδιο αντιγόνου - MHC είναι χαμηλή έως ενδιάμεση, με τιμές K_D να κυμαίνονται από 10⁻⁴ - 10⁻⁷ M. Η συγγένεια αυτή είναι χαμηλή σε σχέση με τη συγγένεια αντιγόνου-αντισώματος, η K_D της οποίας κυμαίνεται από 10⁻⁶ - 10⁻¹⁰ M. Οι αλληλεπιδράσεις όμως των T-λεμφοκυττάρων με τα APC ή τα κύτταρα-στόχους δεν εξαρτώνται μόνο από τη σύνδεση του TcR με το σύμπλεγμα πεπτίδιο/MHC. Η σύνδεση T-κυττάρου / APC ενισχύεται από μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και αρκετά βοηθητικά μεμβρανικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των CD2 (ή LFA2), LFA1, CD28 και CD45R, που συνδέονται ανεξάρτητα σε άλλους προσδέτες των APCs (**Εικόνα 9.28**). Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης ενός T-λεμφοκυττάρου παρατηρείται μια ξαφνική αύξηση της έκφρασης των μεμβρανικών μορίων κυτταρικής προσκόλλησης προκαλώντας στενότερη επαφή μεταξύ των αλληλεπιδρώντων κυττάρων.

Το **CD2** (Cluster of Differentiation 2) ή LFA2 ή LFA3R (υποδοχέας του LFA3) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 45 kDa, που αποτελείται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα με δύο περιοχές Ig-like, από μία διαμεμβρανική περιοχή και μία μικρή κυτταροπλασματική ουρά. Εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων, όπου δρα ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης. Αλληλεπιδρώντας με άλλα μόρια προσκόλλησης, όπως το **LFA3** (Lymphocyte Function-associated Antigen 3), γνωστό και ως CD58, το οποίο βρίσκεται στα αντιγόνο-παραρσιαστικά κύτταρα προωθεί τη δημιουργία ενός βέλτιστου διαστήματος μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών (~ 140 Å) κατάλληλου για την αναγνώριση του συνδεδεμένου στο MHC πεπτιδίου από τον TcR. Συνεπώς, το CD2 εκτός από μόριο που διευκολύνει την κυτταρική προσκόλληση, ενισχύει και τη διέγερση του TcR.

Το **LFA1** (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) είναι μια ιντεγκρίνη (γνωστή και ως ιντεγκρίνη αLβ2) που βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των T-λεμφοκυττάρων, αλλά επίσης εκφράζεται και στα B-κύτταρα, στα μακροφάγα, στα ουδετερόφιλα και στα NK. Συμμετέχει στη στρατολόγηση των κυττάρων αυτών στη θέση της φλεγμονής. Συνδέεται με το μόριο προσκόλλησης **ICAM-1** (Intercellular Adhesion Molecule 1), γνωστό και ως CD54 (Cluster of Differentiation 54), το οποίο εκφράζεται σε αντιγόνο-παραρσιαστικά κύτταρα. Το LFA1 είναι το πρώτο μόριο που συνδέει τα T-λεμφοκύτταρα με τα APC δημιουργώντας μια ασθενή σύνδεση μεταξύ τους. Η αλληλεπίδραση LFA1 / ICAM-1 έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντική για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των T-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε περαιτέρω διαφοροποίησή τους.

Το LFA1 εμφανίζει τη χαρακτηριστική δομή των ιντεγκρινών: αποτελείται από

μία α-υπομονάδα (αL ή CD11a) 180 kDa και μια β-υπομονάδα (β2 ή CD18) 95 kDa. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια μεγάλη NH₂-τελική εξωκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κοντή κυτταροπλασματική ουρά. Το εξωκυτταρικό τμήμα των α και β υπομονάδων είναι οργανωμένο σε μια σφαιρική κεφαλή που δεσμεύει τον προσδέτη και η οποία στέκεται σε δύο μακρά και εκτεταμένα COOH-τελικά σκέλη που συνδέονται με τις διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές κάθε αντίστοιχης υπομονάδας. Η κεφαλή της αL υπομονάδας αποτελείται από: α. μια **ένθετη περιοχή** ~ 200 αμινοξέων, I-domain (Inserted domain), η οποία περιλαμβάνει από ένα κεντρικό υδρόφοβο β-πτυχωτό φύλλο (σχηματίζεται από 6 β-κλώνους), που περιβάλλεται από επτά αμφιπαθητικές α-έλικες και συνδέει τον προσδέτη ICAM-1, και β. μια **περιοχή β-προπέλας** επτά λεπίδων, παρόμοια με τη β υπομονάδα της Gaβγ πρωτεΐνης. Ο επιμήκης μίσχος της αL αλυσίδας αποτελείται από 4 περιοχές, οι οποίες ονομάστηκαν **thigh** (μηρός), **knee** (γόνατο) και δύο περιοχές **calf** (κνήμη), κατ' αναλογία με τα κάτω άκρα.

Το εξωκυτταρικό τμήμα της β2-αλυσίδας περιέχει και αυτό μια I-περιοχή, η οποία βρίσκεται μέσα σε μια υβριδική περιοχή (hybrid domain), ακολουθείται από μία περιοχή PSI (Plexin/ Semaphorin/ Integrin), και τέσσερις περιοχές EGF-like πλούσιες σε Cys.

Σε αυτά τα ετεροδιμερή ιντεγκρίνης, ο προσδέτης (ICAM-1) δεσμεύεται σε μία ρωγμή στο πεδίο της κεφαλής μεταξύ των διεπιφανειών των υπομονάδων αLβ2.

Ο συνυποδοχέας **CD28** (Cluster of Differentiation 28) είναι μία από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στα T-λεμφοκύτταρα παρέχοντας συνδιεγερτικά σήματα που απαιτούνται για την ενεργοποίηση και επιβίωση των T-λεμφοκυττάρων. Η διέγερση των T-λεμφοκυττάρων μέσω του CD28, επιπλέον του υποδοχέα T-κυττάρων (TcR), παρέχει ένα ισχυρό σήμα για την παραγωγή διαφόρων ιντερλευκινών (ειδικότερα της IL-6). Ο CD28 είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο αλυσίδες συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Το εξωκυτταρικό τμήμα της κάθε αλυσίδας αποτελείται από μια Ig-like περιοχή, ενώ το ενδοκυτταρικό είναι αρκετά μεγάλο με αρκετά κατάλοιπα, που είναι κρίσιμα για την αποτελεσματική σηματοδότηση των T-λεμφοκυττάρων. Το μοτίβο YMNM που αρχίζει στην Tyr170 είναι κρίσιμο για τη σύνδεση πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχές SH2, όπως η PI3K, η Grb2 και η Gad. Αμέσως μετά το μοτίβο YMNM, υπάρχουν δύο περιοχές πλούσιες σε προλίνη (PRD, Pro Riche Domain), οι οποίες είναι ικανές να συνδέουν πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές SH3. Οι κινάσες Itk και Lck συνδέονται στις περιοχές PRD φωσφορυλιώνοντας, στη συνέχεια, κατάλοιπα τυροσίνης του CD28 και επιτρέποντας τη σύνδεση πρωτεϊνών που περιέχουν SH2 περιοχές (βλ. **Εικόνα 9.29**).

Ο CD28 είναι ο υποδοχέας των πρωτεϊνών **CD80** (B7.1) και **CD86** (B7.2), πρωτότυπα μέλη της οικογένειας μορίων συνηματοδότησης B7. Οι CD80 και CD86 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως σε APCs και ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Το εξωκυτταρικό τους τμήμα περιέχει δύο Ig-like περιοχές, μια μεταβλητή (IgV) και μία σταθερή (IgC). Η CD80 υπάρχει κυρίως ως διμερές, ενώ η CD86 υπάρχει μόνο ως μονομερές. Η παρεμπόδιση του CD28 αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, δρώντας ως ένας μηχανισμός που χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα για να ρυθμίσει αρνητικά την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

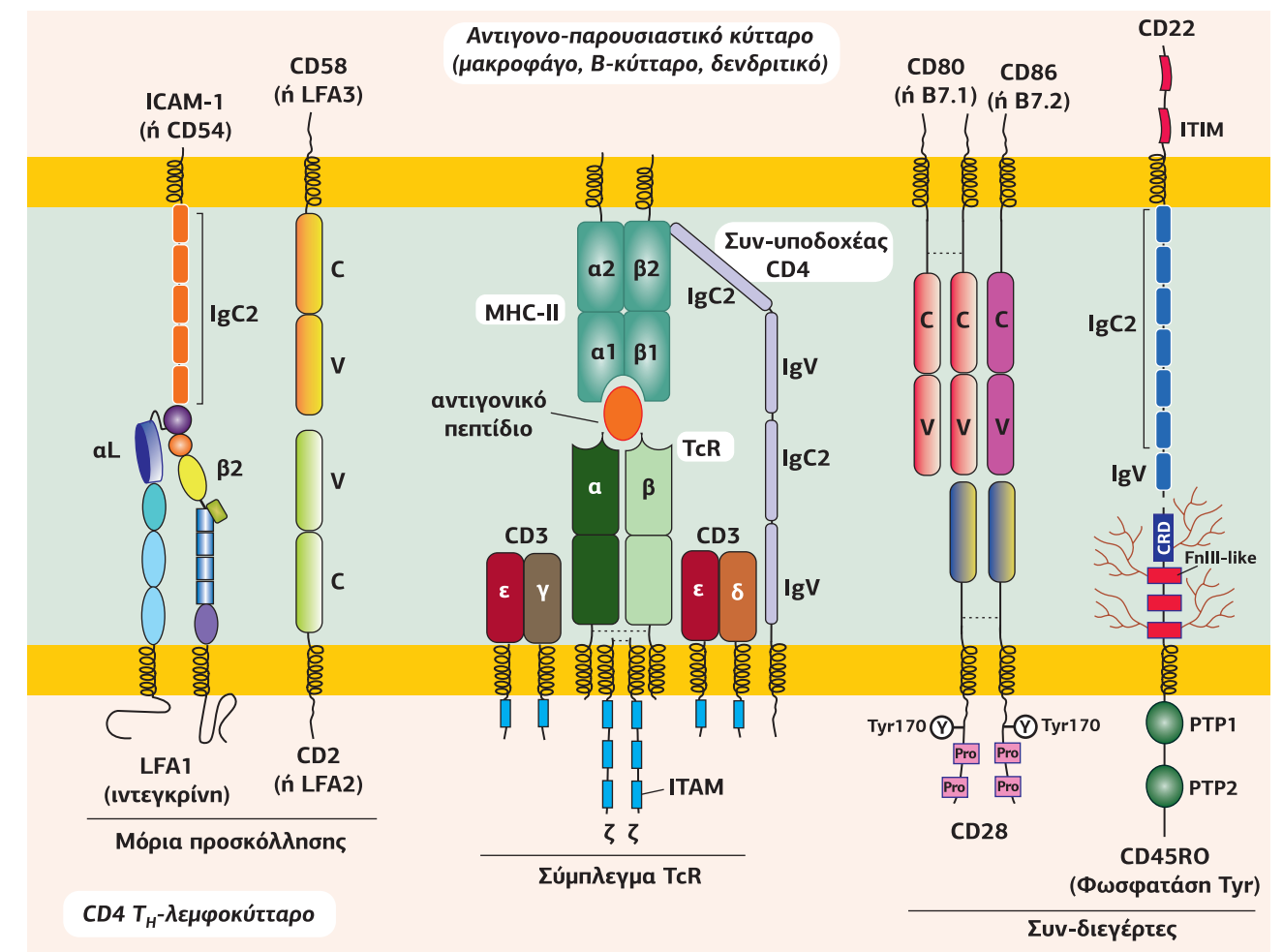
Η **CD45** είναι μια πρωτεϊνική φωσφατάση Tyr, που δρα ως υποδοχέας και γι' αυτό είναι γνωστή και ως **PTPRC** (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor type C). Χάρη στη δραστηριότητα φωσφατάσης η CD45 απομακρύνει μια ανασταλτική φωσφορική ομάδα από την κινάση Lck (στα T-λεμφοκύτταρα) ή από τις κινάσες Lyn/Fyn (στα B-λεμφοκύτταρα) επάγοντας την ενεργοποίησή τους. Είναι ένας βασικός ρυθμιστής της σηματοδότησης των TcRs και BcRs. Αποτελείται από ένα πλούσιο γλυκοσυλιωμένο εξωκυτταρικό τμήμα, που περιέχει τρεις περιοχές FcIII-like, μια περιοχή πλούσια σε Cys, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και δύο διαδοχικές καταλυτικές περιοχές, από τις οποίες μόνο αυτή που είναι κοντά στη μεμβράνη είναι ενεργή. Η

οικογένεια CD45 αποτελείται από πολλά μέλη, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ενός γονιδίου: CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R(ABC). Πολλαπλές θέσεις για N-γλυκοσυλίωση υπάρχουν τόσο στις πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές όσο και στις περιοχές FcIII-like. Η γλυκοσυλίωση οδηγεί σε δραματική αύξηση του μεγέθους και του φορτίου της εξωκυτταρικής περιοχής των ισομορφών υψηλότερου μοριακού βάρους. Το μέγεθος, το φορτίο και η σύνθεση αυτών των γλυκανών εξαρτώνται από τις γλυκοσυλοτρανσφεράσες που εκφράζονται σε ένα κύτταρο, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με την κυτταρική σειρά, την ωρίμανση και την κατάσταση ενεργοποίησης.

Τα ανώριμα (naïve) T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν τις μεγάλες ισομορφές CD45 και είναι συνήθως θετικά για την ισομορφή CD45RA, ενώ τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και τα T-μνήμης εκφράζουν τη συντομότερη ισομορφή CD45RO, η οποία στερείται των περιοχών RA, RB και RC. Αυτή η μικρότερη ισομορφή διευκολύνει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

Η **CD22** είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών με επτά Ig-like περιοχές τύπου C2 στο εξωκυτταρικό της τμήμα. Βρίσκεται στην επιφάνεια των ώριμων B-λεμφοκυττάρων, όπου παίζει έναν διπλό ρόλο: αφενός συνδέεται με τον BcR αναστέλλοντας τη δράση του και, κατά συνέπεια, αποτρέπει την υπερενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, αφετέρου συνδέεται στην κοντή ισομορφή CD45RO των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων δρώντας ως συν-διεγερτικό μόριο του TcR. Επιπλέον, έχει ιδιότητες λεκτίνης, ικανής να συνδέεται στο σιαλικό οξύ. Προτείνεται μάλιστα ότι η CD22 συνδέεται στο γλυκοσυλιωμένο τμήμα της CD45RO, το οποίο περιέχει και σιαλικό οξύ.

Εικόνα 9.28
Ο ρόλος των βοηθητικών μορίων στη δράση των TcRs (T cell Receptors). Τη δράση του TcR διευκολύνουν συνυποδοχείς, όπως ο CD8 και ο CD4 (στην εικόνα διακρίνεται μόνο ο CD4), μόρια προσκόλλησης, όπως LFA1/ICAM1 και CD2/LFA3, που ενδυναμώνουν τη σύνδεση μεταξύ T-λεμφοκυττάρου και αντιγονοπαρουσιαστικού, καθώς και μόρια που δρουν ως συν-διεγέρτες, όπως CD28/CD80-CD86 και CD45RO/CD22. [20]



2.2 Ενεργοποίηση των TcRs και μεταγωγή σήματος

Ούτε οι υποδοχείς αντιγόνων των Τ-λεμφοκυττάρων ούτε οι συμπληρωματικές αλυσίδες που δημιουργούν το σύμπλοκο των TcRs έχουν ενσωματωμένη στο μόριό τους δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η ενεργοποίηση του TcR από το συνδεδεμένο στο MHC αντιγονικό πεπτίδιο οδηγεί στη στρατολόγηση κινάσων τυροσίνης τύπου Src, της **Lck** (Leucocyte specific kinase) ή της **Fyn** (Egr/yes novel kinase), στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέονται με τη βοήθεια των παλμιτουλιωμένων καταλοίπων τους. Σε κατάσταση ηρεμίας οι κινάσες Lck και Fyn βρίσκονται φωσφορυλιωμένες στο κυτταρόπλασμα σε κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής. Μετά την ενεργοποίηση του TcR στρατολογούνται στη μεμβράνη και αποκτούν ανοικτή διαμόρφωση, η οποία τους επιτρέπει να συνδεθούν με τον συνυποδοχέα CD4/8 και ταυτόχρονα να φωσφορυλιώσουν τα κατάλοιπα τυροσίνων των μοτίβων ITAM των ζ-αλυσίδων. Ως πρωταρχικός στόχος των εισερχόμενων σημάτων, η Lck παίζει έναν ρόλο κλειδί στη μεταγωγή του σήματος των αντιγόνων.

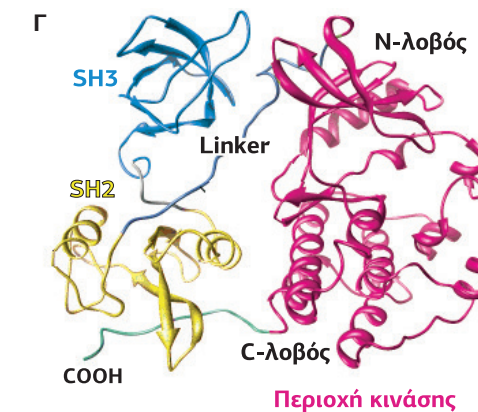
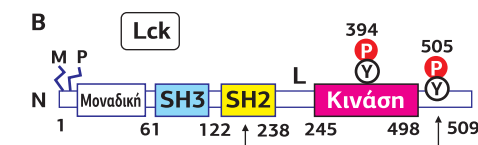
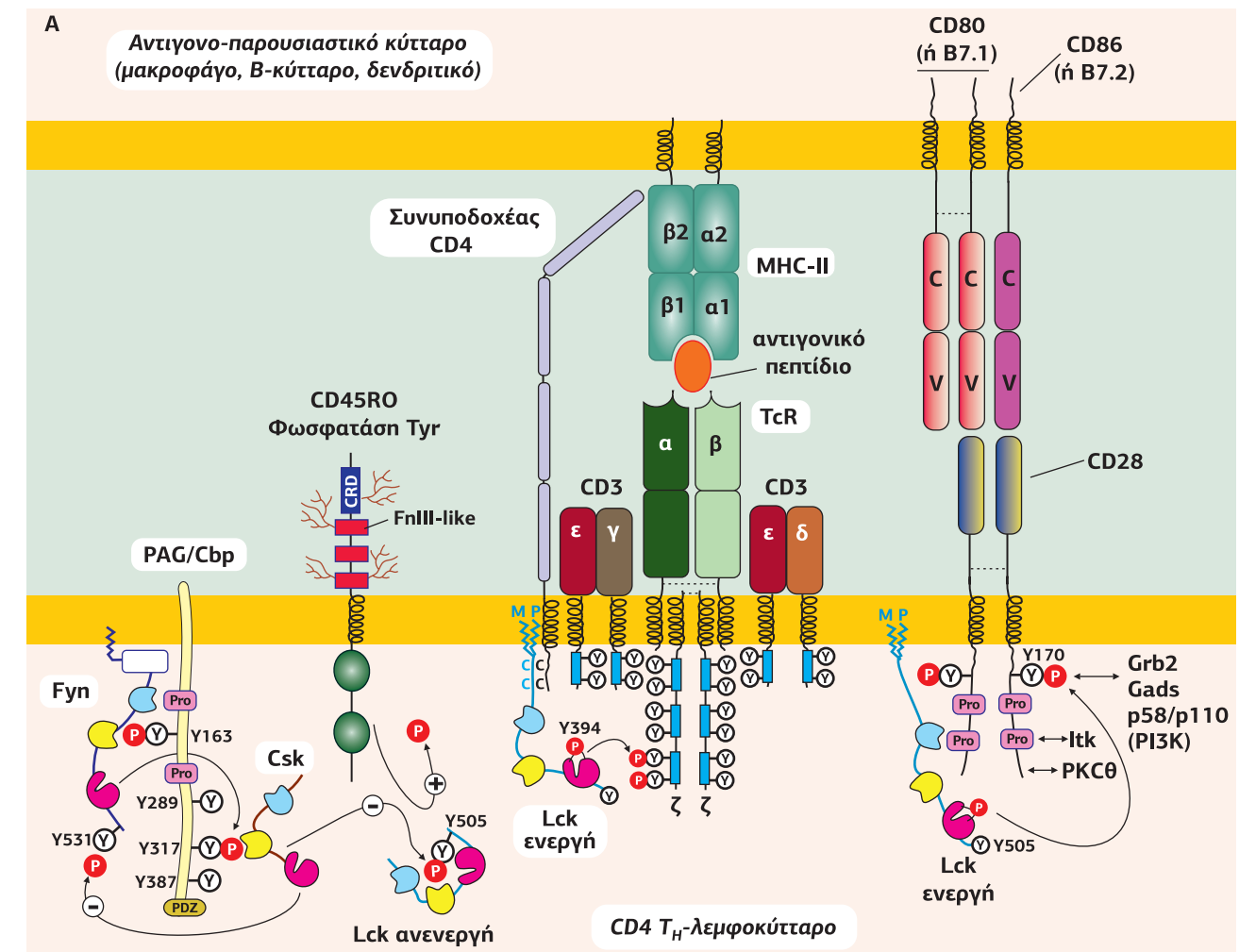
Η κινάση Lck

Η Lck είναι μια πρωτεΐνη 56 kDa που ανήκει στην οικογένεια των κινάσων Src. Το NH₂-τελικό της άκρο, το οποίο είναι μυριστοϋλιωμένο και παλμιτουλιωμένο, προσδένει την πρωτεΐνη στην πλασματική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη περιέχει, επίσης, μία NH₂-τελική μοναδική περιοχή (U, unique), η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη ποικιλία αλληλουχίας μέσα στην οικογένεια Src και εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της Lck με συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Μεσολαβεί, για παράδειγμα, στη μη ομοιοπολική σύνδεση με τους συνυποδοχείς CD4 (στα Τ-βοηθητικά κύτταρα) ή CD8 (στα Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα). Η σύνδεση με τους CD4/CD8 φέρνει την Lck κοντά στο σύμπλοκο του TcR, όπου φωσφορυλιώνει τις τυροσίνες των ITAM των ζ αλυσίδων. Η Lck περιέχει, επίσης, μια περιοχή SH3, η οποία συνδέεται με πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές πλούσιες σε προλίνη, μια περιοχή SH2, που αλληλεπιδρά με pTyr, και στο COOH-τελικό της τμήμα την περιοχή κινάσης τυροσίνης.

Εκτός από τη σύνδεση στη CD4/8, η Lck μέσω της SH3 περιοχής συνδέεται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή της κυτταροπλασματικής ουράς της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης **CD28**. Όπως είδαμε, η CD28 συνδέεται με τις πρωτεΐνες CD80 ή CD86 που εκτίθενται στην επιφάνεια του αντιγονο-παρουσιαστικού κυττάρου, σταθεροποιώντας τη σύνδεση του Τ-λεμφοκυττάρου με το APC. Η Lck καταλύει τη φωσφορυλίωση τυροσίνων του κυτταροπλασματικού τμήματος της CD28, καθιστώντας την ως ένα επιπλέον σημείο πρόσδεσης για πρωτεΐνες με περιοχές SH2 ή PTB. Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται κυρίως κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αποκρίσεων μακράς διάρκειας. Η δραστηριότητα της CD28 αναστέλλεται από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη **CTLA4** (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), γνωστή και ως CD152, η οποία συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στους προσδέτες CD80 και CD86, εμποδίζοντας την πρόσδεση της CD28.

Η Lck, όπως και όλες οι κινάσες της οικογένειας Src, ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης. Οι δύο κύριες θέσεις φωσφορυλίωσης στην Lck είναι οι Tyr394 και Tyr505. Η Tyr394 βρίσκεται στον βρόχο ενεργοποίησης της περιοχής κινάσης και είναι μια θέση αυτοφωσφορυλίωσης που οδηγεί στην πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης. Η Tyr505 βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο της Lck και φωσφορυλιώνεται από την κινάση **Csk** (C-terminal Src kinase). Η φωσφορυλίωση της Tyr505 αναστέλλει την Lck, επειδή οδηγεί στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης μέσω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης pTyr505 / SH2. Στην αρνητική δράση της Csk αντιτίθεται η φωσφατάση CD45. Απουσία Csk, τα περιφερικά Τ-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται αυτόνομα.

Η Csk αποτελεί στόχο ανοσοκατασταλτικών σημάτων. Ένα από αυτά, η προσταγλανδίνη E₂, επάγει την παραγωγή cAMP στα Τ-λεμφοκύτταρα αλληλεπιδρώντας με τον GPCR υποδοχέα της που συνδέεται με μια G_s πρωτεΐνη. Το cAMP ενεργο-



Εικόνα 9.29

Η κινάση Lck. Α. Η σύνδεση του αντιγόνου στον TcR οδηγεί στη στρατολόγηση της κινάσης τυροσίνης Lck, η οποία συνδέεται στον συνυποδοχέα CD4/CD8 (στην εικόνα διακρίνεται ο CD4) και, στη συνέχεια, φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα Tyr των μοτίβων ITAM των ζ-αλυσίδων. Η σύνδεση ανάμεσα στον CD4 και στην Lck μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση των πλούσιων σε Cys περιοχών των δύο μορίων. Η Lck απενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση της Tyr505 από την Csk, ενώ για την πλήρη ενεργοποίησή της απαιτείται η αποφωσφορυλίωση της Tyr394 του βρόχου ενεργοποίησης. Η Lck μπορεί επίσης να φωσφορυλιώσει κατάλοιπα Tyr της CD28, προσελκύοντας πρωτεΐνες με SH2 περιοχές (Grb2, Gads, PI3K). Β. Δομή της Lck. Ξεκινώντας από το NH₂-τελικό της άκρο, η Lck αποτελείται από μια μοναδική περιοχή, μια περιοχή SH3, μια περιοχή SH2 και μια περιοχή κινάσης. Γ. Κρυσταλλική δομή της Lck. [84]

ποιεί την PKA, η οποία με τη σειρά της απενεργοποιεί τη Csk μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων Ser/Thr. Η ενεργοποίηση της Csk διασφαλίζει τον έλεγχο μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης της σηματοδότησης των υποδοχέων των Τ-λεμφοκυττάρων. Επίσης, έπειτα από παρατεταμένη διέγερση, η Lck, όπως και άλλες κινάσες τυρο-

σίνης της οικογένειας Src, αποικοδομείται στα πρωτεασώματα. Όπως και για τους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, αυτή η αρνητική ρύθμιση πυροδοτείται από την πολυουβικουτίνωση, που καταλύεται από την E3 λιγάση της ουβικουτίνης Cbl.

Η διαμεμβρανική φωσφοπρωτεΐνη προσαρμογής **PAG** (Phosphoprotein Associated with Glycosphingolipid-enriched microdomains), γνωστή και ως **Cbp** (Csk-binding protein), είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση στη μεμβράνη της Csk. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της PAG περιέχει δέκα κατάλοιπα τυροσίνης, εννέα από τα οποία μπορούν να φωσφορυλιωθούν από κινάσες της οικογένειας Src. Η φωσφορυλίωση τυροσινών της PAG ρυθμίζεται δυναμικά ως απόκριση στην ενεργοποίηση ανοσοϋποδοχέων, υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και ιντεγκρινών. Στα T-λεμφοκύτταρα η PAG φωσφορυλιώνεται κυρίως από την Fyn. Η φωσφορυλίωση της Tyr317 είναι απαραίτητη για τη σύνδεση της Csk. Με τη σειρά της η Csk φωσφορυλιώνει την Fyn στο COOH-τελικό της κατάλοιπο τυροσίνης Tyr531, επάγοντας τη διαμόρφωση αυτοαναστολής της κινάσης (Εικόνα 9.29).

Άλλος στόχος φωσφορυλίωσης της Lck είναι η **PI3K**, η οποία ενεργοποιείται (με τη βοήθεια και της ενεργοποιημένης Ras-GTP) και παράγει PIP₃. Στα PIP₃ της μεμβράνης συνδέονται σηματοδοτικές πρωτεΐνες μέσω των PH περιοχών τους, μεταξύ των οποίων η κινάση Itk. Η κινάση Itk, όπως θα δούμε στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται από τη Lck, για την πλήρη ενεργοποίησή της. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την PLCγ και τον RhoGEF Vav (βλ. Εικόνα 9.32).

Ο ρόλος της κινάσης τυροσίνης ZAP-70

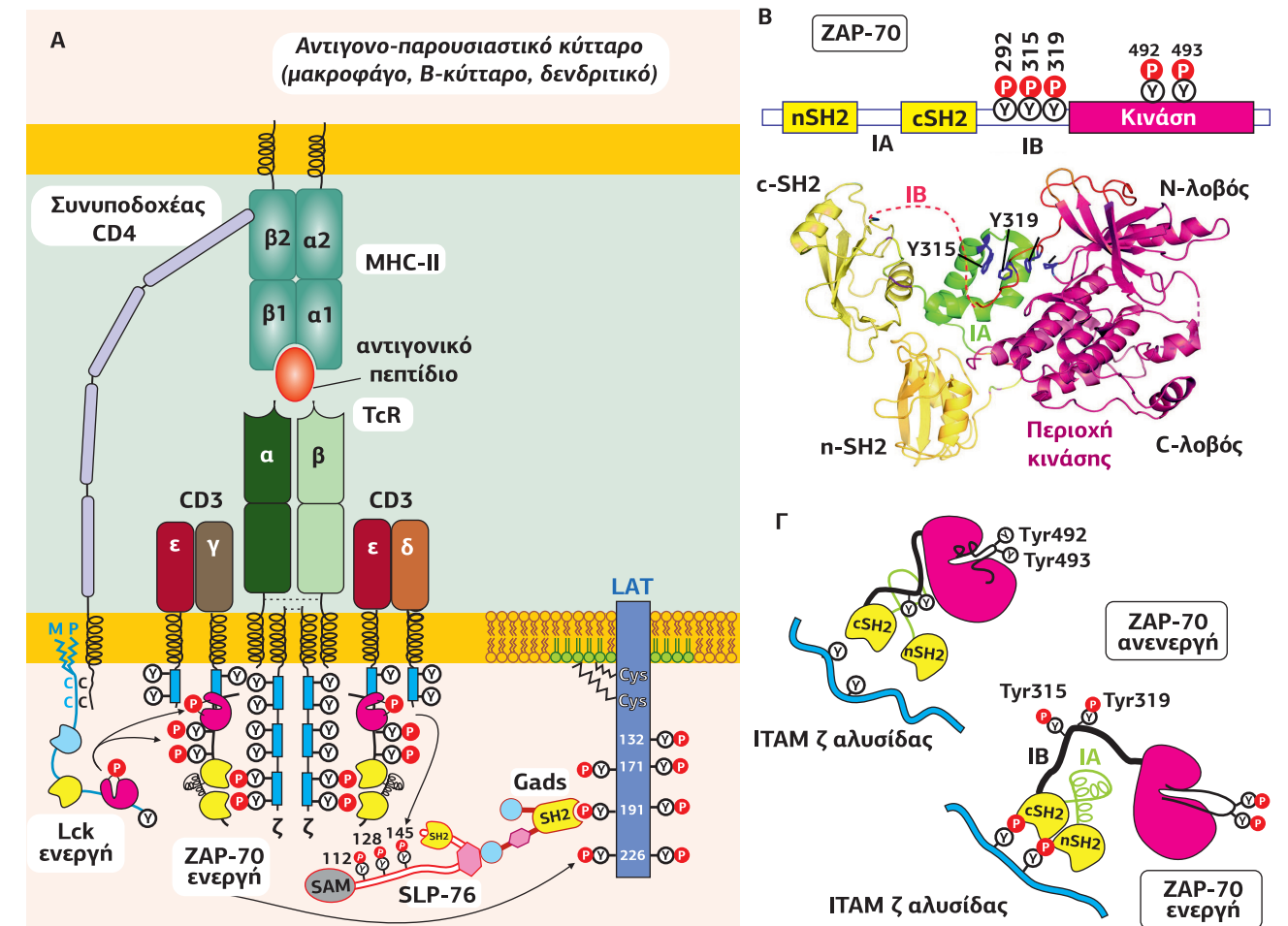
Το σήμα που παράγεται από το μονοπάτι TcR/ Lck (ή Fyn) ενισχύεται και τροποποιείται περαιτέρω από τουλάχιστον δύο ακόμα κινάσες τυροσίνης, την ZAP-70 και την Itk. Οι τυροσίνες, τις οποίες περιέχουν οι αλληλουχίες ITAM των ζ αλυσίδων του συμπλόκου TcR, όταν φωσφορυλιωθούν από την Lck, στρατολογούν πρωτεΐνες με δομικές περιοχές SH2 ή PTB. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η κινάση τυροσίνης **ZAP-70** (Zeta-chain Associated Protein kinase of 70 kDa).

Η ZAP-70 ανακαλύφθηκε το 1991 και η σημασία της αποκαλύφθηκε γρήγορα, καθώς ασθενείς με έλλειψη ZAP-70 δεν έχουν λειτουργικά T-λεμφοκύτταρα και πάσχουν από σοβαρή ανοσοανεπάρκεια SCID (Severe Combined Immune Deficiency).

Η ZAP-70 αποτελείται από δύο περιοχές SH2 και μία COOH-τελική περιοχική κινάσης. Αντίθετα με τις κινάσες της οικογένειας Src που περιέχουν στο NH₂-τελικό τους άκρο μία SH3 και μία SH2 περιοχή, το NH₂-τελικό άκρο της οικογένειας κινάσεων Syk, της οποίας η ZAP-70 είναι ένα μέλος, αποτελείται από δύο διαδοχικές περιοχές SH2 (nSH2, cSH2), που διαχωρίζονται από μία περιοχική linker, η οποία ονομάζεται ενδοπεριοχική A (IA, Interdomain A). Αυτές οι περιοχές SH2 συνδέονται με τις δύο pTyr του μοτίβου ITAM της ζ αλυσίδας. Μία άλλη περιοχική linker, η ενδοπεριοχική B (IB, Interdomain B), συνδέει την περιοχική cSH2 με την περιοχική κινάσης.

Η σύνδεση της ZAP-70 στις ζ αλυσίδες οδηγεί στο άνοιγμα της διαμόρφωσης αυτοαναστολής, εκθέτοντας τις ρυθμιστικές θέσεις για φωσφορυλίωση. Τα κατάλοιπα Tyr315 και Tyr319, για παράδειγμα, στην ενδοπεριοχική B φωσφορυλιώνονται από την Lck. Εκτός από τη σταθεροποίηση της ενεργούς διαμόρφωσης, αυτές είναι θέσεις πρόσδεσης για άλλα μόρια που ελέγχουν τη λειτουργία της ZAP-70. Επιπλέον, για την πλήρη καταλυτική δραστηριότητα της ZAP-70 απαιτείται η φωσφορυλίωση του καταλοίπου Tyr493 στον βρόχο ενεργοποίησης της περιοχικής κινάσης. Η Tyr493 μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την Lck, αλλά μπορεί επίσης και να αυτοφωσφορυλιωθεί από την ίδια την ZAP-70 (Εικόνα 9.30B).

Η ενεργοποιημένη ZAP-70 φωσφορυλιώνει έναν αριθμό σηματοδοτικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των δύο πρωτεϊνών προσαρμογής, **LAT** (Linker for activation of T-cells) και **SLP-76** (SH2-domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa) (Εικόνα 9.30A). Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες LAT και SLP-76 λειτουργούν ως σκαλωσιά για τη σύνδεση πολλών άλλων σηματοδοτικών μορίων, δημιουργώντας επιπλέον σημεία πρόσδεσης για πρωτεΐνες με δομικές περιοχές SH2



Εικόνα 9.30

Η κινάση ZAP-70 και οι στόχοι που φωσφορυλιώνει. Α. Μόλις συνδεθεί με το σύμπλοκο αντιγονικό πεπτίδιο/MHC, ο TcR ενεργοποιείται και στρατολογεί στη μεμβράνη την κινάση Lck. Η Lck συνδέεται με τον συνυποδοχέα CD4/8 και φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Tyr των μοτίβων ITAM των ζ-αλυσίδων. Σε αυτές τις pTyr συνδέεται η κινάση ZAP-70, η οποία έπειτα από μια διπλή φωσφορυλίωση ενεργοποιείται και, με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στις πρωτεΐνες προσαρμογής LAT και SLP-76. Η SLP-76 συνδέεται μέσω της Gads στη φωσφορυλιωμένη LAT, ξεκινώντας τη συγκρότηση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου. [78] Β. Η δομή της ZAP-70. Αποτελείται από δύο SH2 περιοχές και μία περιοχική κινάσης τυροσίνης. Διακρίνεται και η κρυσταλλική δομή της ZAP-70. [3] Γ. Για τη μετάβαση της ZAP-70 από την κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής στην ανοικτή ενεργή διαμόρφωση, τα κατάλοιπα Tyr315 και Tyr319 στην ενδοπεριοχική B φωσφορυλιώνονται από την Lck και η Tyr493 στον βρόχο ενεργοποίησης της περιοχικής κινάσης φωσφορυλιώνεται από τη Lck, αλλά μπορεί επίσης και να αυτοφωσφορυλιωθεί από την ίδια την ZAP-70.

ή PTB. Με άλλα λόγια, η ενεργοποίηση της ZAP-70 προσφέρει έναν ενισχυτικό μηχανισμό που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπλεγμάτων μεταγωγής σήματος γύρω από τον υποδοχέα T-λεμφοκυττάρων, μια απόκριση κρίσιμης σημασίας για την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων.

Οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς LAT και SLP-76 και η δημιουργία του T-cell signalosome

Η **LAT** (Linker of Activated T-cells) ανακαλύφθηκε το 1998 ως μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 36-38 kDa, 262 αμινοξέων, η οποία αποτελεί στα T-λεμφοκύτταρα το κύριο υπόστρωμα της κινάσης ZAP-70, από την οποία φωσφορυλιώνεται άμεσα μετά την ενεργοποίηση των TcRs. Δεν εμφανίζει ενζυμική ή μεταγραφική δραστηριότητα, αλλά με τη βοήθεια των αρκετών καταλοίπων τυροσίνης που έχουν τη δυνατότητα να φωσφορυλιωθούν δρα ως σκαλωσιά, μέσω της οποίας συναρμο-

λογούνται παροδικά σηματοδοτικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα βάσει αλληλεπιδράσεων SH2/pTyr και SH3/PRD (Pro Rich).

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα της LAT περιέχει στην περιοχή κοντά στη μεμβράνη δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (Cys26, Cys29 στον άνθρωπο), τα οποία μπορούν να παλμιτοϋλιωθούν. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση σταθεροποιεί τη σύνδεση της LAT με την πλασματική μεμβράνη και την στοχεύει στις λιπιδικές σχεδίες. Οι **λιπιδικές σχεδίες** (lipid rafts) είναι μικροπεριοχές της μεμβράνης εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια και γλυκερολιπίδια, που περιέχουν κυρίως κορεσμένα κατάλοιπα λιπαρών οξέων. Αυτά τα λιπίδια έχουν την τάση να σχηματίζουν μια συγκεκριμένη “διατεταγμένη” υγρή φάση που διακρίνεται από τη λιγότερο διατεταγμένη υπόλοιπη μεμβράνη, η οποία αποτελείται κυρίως από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο όρος λιπιδική σχεδία χρησιμοποιείται συχνότερα στη βιβλιογραφία, αλλά επειδή για τον σχηματισμό αυτού του τύπου μεμβρανικής μικροδομής απαραίτητα δεν είναι μόνο λιπίδια, αλλά και πρωτεΐνες, ο όρος μεμβρανική σχεδία (membrane raft) ίσως είναι καταλληλότερος. Η συσχέτιση της LAT με λιπιδικές σχεδίες δεν φαίνεται, ωστόσο, απαραίτητη για τη λειτουργία της κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων.

Η LAT περιέχει στην κυτταροπλασματική της περιοχή 9 καλά συντηρημένα κατάλοιπα Tyr, τέσσερα από τα οποία φωσφορυλιώνονται από την ZAP-70. Στα κατάλοιπα στρατολογούνται κινάσες και ένζυμα, που περιέχουν SH2 περιοχές, δημιουργώντας το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο **T-cell signalosome**. Για παράδειγμα, στην pTyr132 συνδέεται η φωσφολιπάση PLCγ1, στην pTyr171 η ρυθμιστική p85 υπομονάδα της PI3K κινάσης ή η Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), στην pTyr191 συνδέεται η πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2 ή η ομόλογή της Gads (Grb-like adaptor downstream of Shc) και στην pTyr226 ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων Vav ή η πρωτεΐνη Grap (Grb2-related adaptor protein) (Εικόνα 9.31A).

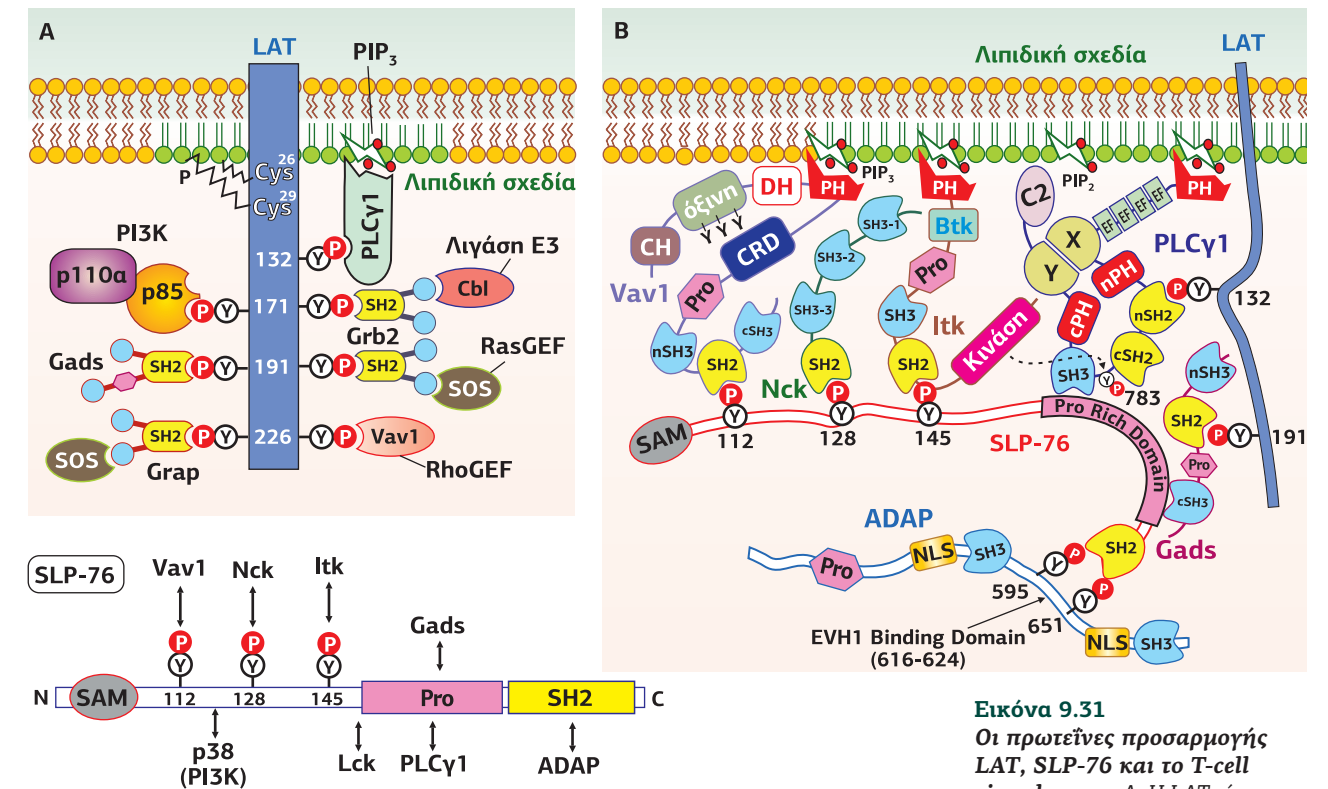
Στην ολοκλήρωση του T-cell signalosome συμμετέχει και η πρωτεΐνη προσαρμογής **SLP-76** (SH2-domain-containing Leukocyte Phosphoprotein of 76 kDa). Η SLP-76 είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 533 αμινοξέων, που περιέχει μία NH₂-τελική περιοχή SAM (Sterile a motif), τρία καλά συντηρημένα κατάλοιπα Tyr (Tyr112, Tyr128, Tyr145) ικανά να φωσφορυλιωθούν, μια κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και μια COOH-τελική περιοχή SH2 (Εικόνα 9.31).

Η περιοχή SAM (1-78 aa) αποτελείται από 5 καλά συντηρημένες α-έλικες. Οι περιοχές αυτές συναντώνται σε πολυάριθμους μεμβρανικούς υποδοχείς, σηματοδοτικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες (βλ. Εικόνα 8.11). Έως σήμερα έχει αναφερθεί ότι το 25% των περιοχών SAM βοηθούν στον σχηματισμό ομο- ή ετερο-διμερών/ολιγομερών.

Οι τρεις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της SLP-76 στρατολογούν πολλαπλά μόρια τελεστές στο signalosome: στην pTyr112 συνδέεται ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (RhoGEF) Vav, στην pTyr128 η πρωτεΐνη προσαρμογής Nck και στην pTyr145 η κινάση Itk. Η πλούσια σε προλίνη περιοχή συνδέει τις περιοχές SH3 σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως η PLCγ1 και η Gads ή η Grb2 (η Gads συνδέεται με 40-50 φορές ισχυρότερη συγγένεια από την Grb2). Η Gads συνδέει την SLP-76 με την LAT μέσω της αλληλεπιδράσεως της περιοχής SH2 της Gads με την pTyr191 της LAT.

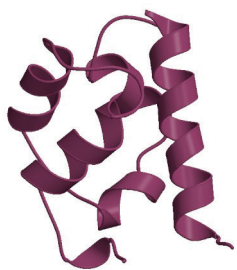
Η COOH-τελική περιοχή SH2 της SLP-76 συνδέεται με δύο φωσφορυλιωμένες τυροσίνες (Tyr595, Tyr651) της πρωτεΐνης **ADAP** (Adhesion- and Degranulation-promoting Adapter Protein). Η ADAP αποτελείται από μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, δύο περιοχές SH3 και δύο περιοχές NLS (Nuclear Localization Sites), δύο μοτίβα Tyr-Asp-Asp-Val (YDDV) στις θέσεις 595-598 και 651-654, οι τυροσίνες των οποίων φωσφορυλιώνονται και συνδέονται με την SH2 COOH-τελική περιοχή της SLP-76. Επιπλέον, η ADAP περιέχει μια περιοχή σύνδεσης του μοτίβου EVH1, (Ena and VASP Homology 1 binding site), όπου συνδέεται η πρωτεΐνη WASP (Εικόνα 9.31B).

Η **PLCγ1** συνδέεται στην pTyr132 της LAT και στην πλούσια σε προλίνη πε-



Εικόνα 9.31
Οι πρωτεΐνες προσαρμογής LAT, SLP-76 και το T-cell signalosome. Α. Η LAT είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη σκαλωσιάς, η οποία όταν φωσφορυλιωθεί σε 4 καλά συντηρημένες Tyr από την ZAP-70, εμφανίζει θέσεις σύνδεσης πρωτεϊνών, όπως η p85 υπομονάδα της PI3K, η E3 λιγάση της ουβικουιτίνης c-Cbl, οι πρωτεΐνες προσαρμογής Grb2, Grap και Cads, η PLCγ και ο RhoGEF Vav1, σχηματίζοντας ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. [27] Β. Στην ολοκλήρωση του T-cell signalosome συμμετέχει και η SLP-76, η οποία συνδέεται με τη LAT μέσω της Gads, στρατολογώντας στις φωσφορυλιωμένες από την ZAP-70 τυροσίνες τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες (Itk, Vav, Nck). Στην SH2 περιοχή της συνδέονται οι pTyr595 και pTyr651 της ADAP. Διακρίνεται, επίσης, η δομή της SLP-76, η οποία περιέχει μία NH₂-τελική περιοχή SAM, τρία καλά συντηρημένα κατάλοιπα Tyr (Tyr112, Tyr128, Tyr145), μία κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και μία COOH-τελική περιοχή SH2. [71]

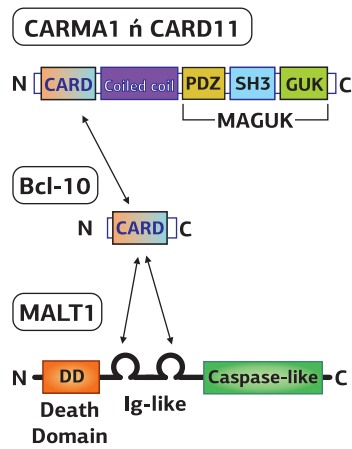
Η **SLP-76** ανακαλύφθηκε το 1995 έπειτα από διαλογή πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται από κινάσες συνδεδεμένες με τους TcRs.



Περιοχή SAM

ριοχή της SLP-76. Είναι ένα ένζυμο πολλαπλών περιοχών αλληλεπιδράσεως, που περιέχει μία NH₂-τελική περιοχή PH, η οποία συνδέεται στα φωσφοϊνοσιτίδια PIP₃ της μεμβράνης, τέσσερα μοτίβα EF hand, μια χωρισμένη καταλυτική περιοχή (X, Y), δύο περιοχές SH2 (nSH2, cSH2), έναν linker που περιέχει ένα κατάλοιπο Tyr ικανό να φωσφορυλιωθεί (Tyr783), μία περιοχή SH3 και, τέλος, μία COOH-τελική περιοχή C2. Στην κατάσταση ηρεμίας η PLCγ1 βρίσκεται σε διαμόρφωση αυτοαναστολής, καθώς ο linker μεταξύ των περιοχών cSH2 και SH3 αλληλεπιδρά ενδομοριακά με την cSH2, θωρακίζοντας την Tyr783. Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων οδηγεί σε φωσφορυλίωση της Tyr145 της SLP-76, δημιουργώντας μια θέση πρόσδεσης για την περιοχή SH2 της Itk. Η PLCγ1 ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση της Tyr783 από την Itk. Η αλληλεπιδράση με την LAT και την SLP-76 αποδείχθηκε ότι απαιτείται τόσο για ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης όσο και για τον εντοπισμό κοντά στο υπόστρωμά της (PIP₂) στην πλασματική μεμβράνη. Μετά την ενεργοποίησή της η PLCγ1 υδrolύει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂) για την παραγωγή 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP₃) και διακυλογλυκερόλης (DAG). Η IP₃ συνδέεται στον υποδοχέα-κάνάλι του ενδοπλασματικού δικτύου, ενεργοποιώντας την απελευθέρωση Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα. Η DAG και το Ca²⁺ ενεργοποιούν την **PKC**. Επίσης, η DAG ρυθμίζει έναν RasGEF, τον **RasGRP1**, είτε άμεσα στρατολογώντας τον στη μεμβράνη είτε έμμεσα έπειτα από φωσφορυλίωση από την PKC.

Εκτός από την PKC, ενεργοποιείται μία ακόμη κινάση, η **PKCθ**, μέλος της καινούριας υποοικογένειας nPKC (novel), η οποία περιλαμβάνει τις PKCδ, ε και η. Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας περιέχουν μία περιοχή C2-like, όμοια στη συνολική της δομή με την περιοχή C2 των cPKCs, με τη διαφορά ότι δεν είναι σε θέση να συνδέσει ιόντα Ca²⁺, αλλά αντιθέτως θεωρείται ότι εμπλέκεται σε ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις σύνδεσης με φωσφολιπίδια ή με άλλες πρωτεΐνες. Γι' αυτό οι nPKCs δεν εξαρτώνται από το Ca²⁺ και ενεργοποιούνται μόνο από την DAG, η οποία συνδέεται στην C1 περιοχή (για τη δομή της PKCθ βλ. Εικόνα 7.23). Η PKCθ εκφράζεται κυρίως στα T-λεμφοκύτταρα και στρατολογείται στο σύμπλοκο του TcR μέσω έμμεσες αλληλεπιδράσεως με τον συνδιεγέρτη CD28. Στη συνέχεια, ενεργοποιεί τη



Το σύμπλοκο CBM.
 Η Bcl-10 περιέχει μια περιοχή CARD, μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με την περιοχή CARD της CARMA1 ή CARD11. Η MALT1 είναι ιδιόσυστατα συνδεδεμένη με την Bcl-10, μέσω των Ig-like περιοχών της.

μεταφορά του NF-κΒ στον πυρήνα. Σε κατάσταση ηρεμίας ο NF-κΒ βρίσκεται σε αναστολή στο κυτταρόπλασμα, καθώς συνδέεται με τον αναστολέα IκΒ (Inhibitor of NF-κΒ), ο οποίος καλύπτει την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού του NF-κΒ. Η διέγερση κυττάρων με διάφορα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της διέγερσης της οδού σηματοδότησης TcR, οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπλόκου της κινάσης IKK (IκΒ Kινάση), η οποία αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες IKKα και IKKβ, καθώς και μία ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ ή NEMO (NF-κΒ Essential Modulator). Η ενεργοποίηση της κινάσης IKK συμβαίνει με τη βοήθεια της PKCθ. Η PKCθ φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη CARMA1 [Caspase-Recruitment Domain (CARD) Membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein 1], γνωστή και ως CARD11, επιτρέποντάς της να συνδεθεί με την Bcl-10 (B-cell CLL/lymphoma 10) και την MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation gene), δημιουργώντας το σύμπλοκο CBM. Το CBM συνεργάζεται με τον TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6) επάγοντας την ουβικουϊνίωση του NEMO. Η PKCθ, επίσης, ενεργοποιεί την κινάση TAK1 (TGFβ-Activated protein Kinase), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κινάση IKKα/β (IκΒ kinase). Ο συνδυασμός φωσφορυλίωσης της IKKα/β και ουβικουϊνίωσης του NEMO ενεργοποιεί το σύμπλοκο IKK, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση του αναστολέα IκΒ, καθώς και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του NF-κΒ. Επομένως, ο NF-κΒ μπορεί να μετατοπιστεί άμεσα στον πυρήνα και να ξεκινήσει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του (βλ. **Εικόνα 9.34**). Ο NF-κΒ είναι απαραίτητος για την πλήρη ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και την αποτελεσματική ανοσοαπόκριση.

Τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών προσαρμογής Grb2, Gads και Grap μπορούν δυναμικά να δεσμεύσουν τρεις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες της LAT, την Tyr171, την Tyr191 και την Tyr226. Η Grb2 (Growth-factor-receptor-bound protein 2) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και περιέχει μία περιοχή SH2 και δύο περιοχές SH3 (nSH3, cSH3). Η Grb2 συμμετέχει σε πολλά συστήματα υποδοχών στην ενεργοποίηση της οδού Ras/ MAPK, κυρίως σε σύνδεση με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (RasGEF) SOS1. Η Gads (Grb2-related adaptor protein downstream of Shc) έχει μια δομή παρόμοια με της Grb2, αλλά περιέχει επίσης μία μοναδική περιοχή πλούσια σε γλουταμίνη και προλίνη μεταξύ της περιοχής SH2 και της COOH-τελικής περιοχής SH3. Εκτός από τη σύνδεση στην pTyr191 της LAT, η Gads συνδέεται και στην πλούσια σε Pro περιοχή της SLP-76. Η Grap (Grb2-related adaptor protein) έχει παρόμοια δομή με την Grb2, αλλά ο ρόλος της στη μεταγωγή σημάτων των T-λεμφοκυττάρων δεν είναι τόσο καλά καθορισμένος και πιθανολογείται ότι αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της μεταγωγής σήματος TcR.

Ο SOS1 (Son of Sevenless homolog) είναι ένας GEF που προάγει την ενεργοποίηση της μικρής G πρωτεΐνης Ras, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι Raf/MEK/ERK. Ο SOS1 συνδέεται ιδιόσυστατα με την Grb2. Μετά την ενεργοποίηση του TcR, η Grb2 στρατολογεί τον SOS1 κοντά στην πλασματική μεμβράνη, όπου θα έρθει σε επαφή και θα ενεργοποιήσει την Ras. Ωστόσο, στα T-λεμφοκύτταρα η Ras ενεργοποιείται δευτερευόντως μέσω του μονοπατιού LAT/Grb2/ SOS (RasGEF), αλλά κυρίως μέσω του μονοπατιού SLP-76/ PLCγ1/ DAG και Ca²⁺ - PKC/ RasGRP1 (**Εικόνα 9.34**).

Το πρωτογονογόνιο c-Cbl κωδικοποιεί μία λιγάση E3 της ουβικουϊνίνης, 120 kDa, η οποία συνδέεται επίσης ιδιόσυστατα με την Grb2, η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση μεταξύ c-Cbl και LAT μετά την ενεργοποίηση του TcR. Η c-Cbl, μετά τη σύνδεσή της στη LAT, φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Παίζει αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στη σηματοδότηση των T-λεμφοκυττάρων, καθώς είναι υπεύθυνη για την ουβικουϊνίωση της αλυσίδας ζ του TcR, της αλυσίδας δ του CD3, καθώς επίσης και των πρωτεϊνών ZAP-70, LAT, PLCγ1, PI3K, Vav και PKCθ.

Η κινάση PI3K αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα 110 kDa (p110) και μια ρυθμιστική υπομονάδα 85 kDa (p85) και καταλύει τη φωσφορυλίωση των PIP₂ για να δημιουργήσει PIP₃. Η συσσώρευση των PIP₃ διευκολύνει τη σύνδεση

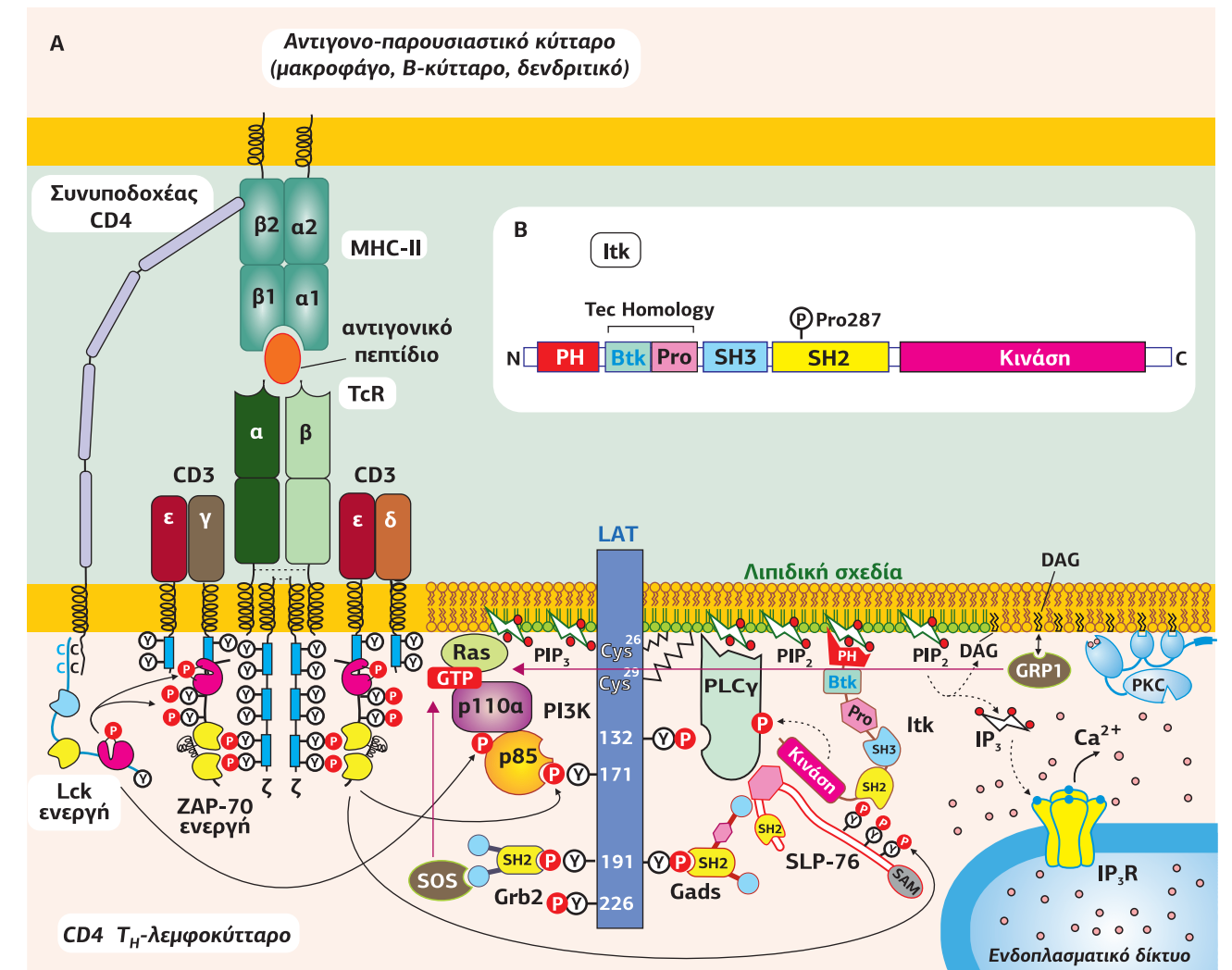
στη μεμβράνη πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχές PH, οι οποίες αναγνωρίζουν τα PIP₃. Η PI3K συνδέεται απευθείας με την pTyr171 της LAT, αλλά η p85 μπορεί να συνδεθεί και με τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη της SLP-76, όπως επίσης και με την pTyr της CD28. Στα T-λεμφοκύτταρα η PI3K ενεργοποιείται από την Lck και ρυθμίζει τη στρατολόγηση πρωτεϊνών, που διευκολύνουν τη μεταγωγή σήματος μέσω TcR, όπως η PLC-γ1, ο SOS1, η Itk και ο Vav. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της εξακολουθεί να είναι ασαφής.

Η Itk (Interleukin-2-inducible T-cell kinase) είναι μια κινάση της οικογένειας Tec, η οποία στρατολογείται στη μεμβράνη και συνδέεται μέσω της PH περιοχής της στα φωσφολιπίδια της ινσοσιτόλης PtdIns(3,4,5)P₃. Η δημιουργία των PtdIns(3,4,5)P₃ προέρχεται από την φωσφορυλίωση των PtdIns(4,5)P₂ από την PI3K. Μετά την ενεργοποίηση του TcR, η Itk στρατολογείται στη μεμβράνη κοντά σε λιπιδικές σχεδίες των PtdIns(3,4,5)P₃ και συνδέεται στο σύμπλεγμα LAT με σύνδεση της SH2 περιοχής της με την pTyr145 της SLP-76, συμμετέχοντας στη δημιουργία του ετερομερούς συμπλόκου SLP-76/ PLCγ1/ Vav/ Itk. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται από την Lck στον βρόχο ενεργοποίησης και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη Itk φωσφορυλιώνει την PLCγ1 σε συγκεκριμένο κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr783), ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τη φωσφολιπάση.

Ο Vav1 είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης, ο οποίος βρίσκεται κυρίως στα T-λεμφοκύτταρα (σε αντίθεση με την έκφραση των Vav2 και Vav3 που είναι πιο γενικευμένη), όπου ενεργοποιεί τις G-πρωτεΐνες της οικογέ-

Εικόνα 9.32

Η κινάση Itk και η δράση της.
 Α. Η Lck έχει αρχικά ως στόχο την κινάση λιπιδίων PI3K, η οποία φωσφορυλιώνει τα PtdIns(4,5)P₂ και τα μετατρέπει σε PtdIns(3,4,5)P₃. Η κινάση τυροσίνης Itk στρατολογείται στη μεμβράνη κοντά σε λιπιδικές σχεδίες των PtdIns(3,4,5)P₃ όπου συνδέεται μέσω της PH περιοχής της. Στη συνέχεια, συνδέεται με την SLP-76, φωσφορυλιώνεται από την Lck, ενεργοποιείται, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την PLCγ1. [18]
 Β. Δομή της κινάσης Itk. Η Itk αποτελείται, ξεκινώντας από το NH₂-τελικό της άκρο, από μια περιοχή PH, μια περιοχή Tec-homology (περιλαμβάνει την περιοχή Btk-homology ή BH που είναι ικανή να συνδέει Zn²⁺ και μια περιοχή πλούσια σε Pro), μια περιοχή SH3, μια περιοχή SH2 και μια περιοχή κινάσης Tyr.

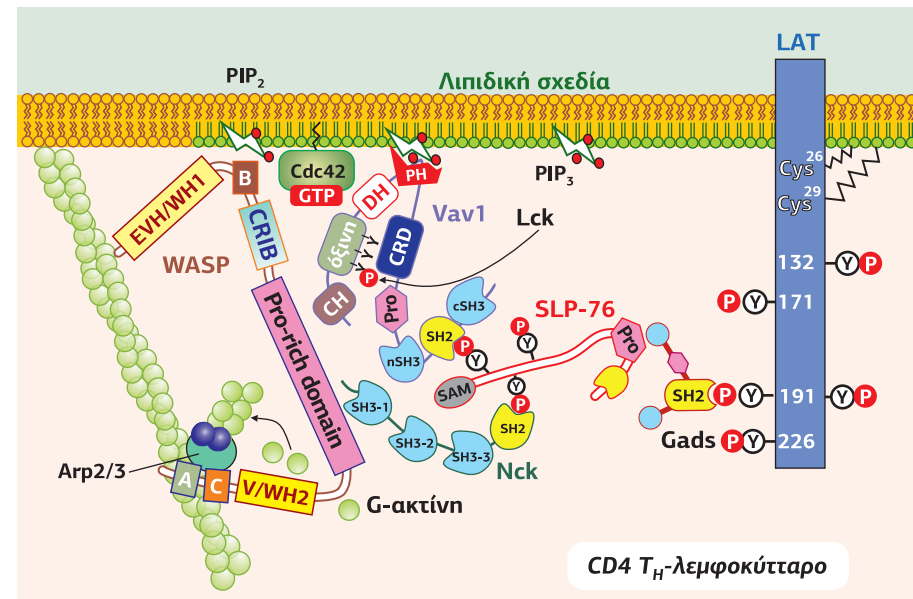


νειας Rho: Rac1, RhoA και Cdc42. Περιέχει μια DH περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των Rho GTPασών, μια όξινη περιοχή (Ac) που περιέχει τρία κατάλοιπα Tyr, θέσεις φωσφορυλίωσης, μια PH περιοχή σύνδεσης σε φωσφολιπίδια της μεμβράνης (ωστόσο η σύνδεση του Vav στη μεμβράνη δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του GEF), δύο SH3 και μια SH2 περιοχή (βλ. **Εικόνα 8.67**). Σε κατάσταση ηρεμίας η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διαμόρφωση αυτοαναστολής. Μετά την ενεργοποίηση του TcR, ο Vav1 φωσφορυλιώνεται από τη Lck στην Tyr174 της όξινης περιοχής του, αλλάζει διαμόρφωση και μέσω της SH2 περιοχής του συνδέεται με την pTyr112 της SLP-76.

Στη συνέχεια, ο ενεργοποιημένος Vav1 ενεργοποιεί τις GTPάσες Rac ή Cdc42, οι οποίες μέσω της πρωτεΐνης **WASP** (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) και του συμπλόκου Arp2/3 οδηγούν στη δημιουργία διακλαδισμένων ινιδίων ακτίνης και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, που θα βοηθήσει τη μετανάστευση του κυττάρου (βλ. Κεφάλαιο 8, σσ. 580-582). Θέση κλειδί στη στρατολόγηση της WASP στο signalosome παίζει η πρωτεΐνη σκαλωσιάς **Nck** (Non-catalytic region of tyrosine kinase), η οποία αποτελείται από μια SH2 και τρεις SH3 περιοχές. Μέσω της SH2 συνδέεται στην pTyr128 της SLP-76 και μέσω της SH3 στην πρωτεΐνη WASP. Μέσω αυτής της διαδικασίας η WASP έρχεται κοντά στην GTPάση Cdc42-GTP, από την οποία και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη WASP αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα Arp2/3, για να ξεκινήσει ο πολυμερισμός ακτίνης και οι κυτταροσκελετικές αλλαγές (**Εικόνα 9.33**).

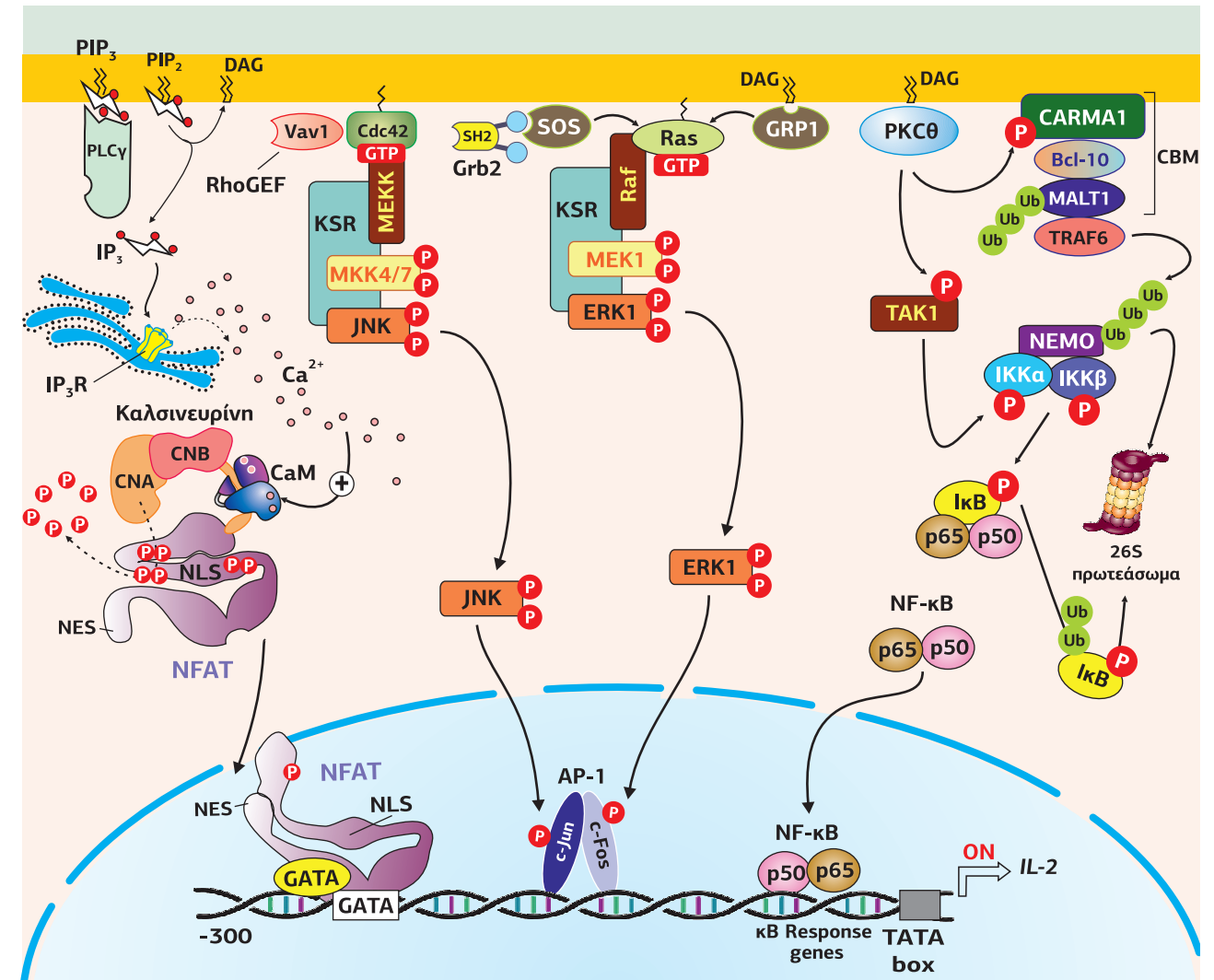
Εκτός από τον καταλυτικό του ρόλο, ο Vav δρα ως σκαλωσιά για τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων PLCγ1 και Itk με την SLP-76. Σε T-λεμφοκύτταρα ανεπαρκή σε Vav1, η αλληλεπίδραση μεταξύ SLP-76 και PLCγ1 είναι αισθητά μειωμένη και η Itk δεν φωσφορυλιώνεται.

Εικόνα 9.33
Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα T-λεμφοκύτταρα. Στη φωσφορυλιωμένη από την κινάση ZAP-70 LAT συνδέεται, μέσω της Gads, η πρωτεΐνη σκαλωσιάς SLP-76, η οποία και φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλά κατάλοιπα Tyr. Στην pTyr112 της SLP-76 συνδέεται, μέσω της SH2 περιοχής του, ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Vav, ο οποίος και φωσφορυλιώνεται από την Lck. Ο ενεργοποιημένος Vav οδηγεί στην ενεργή διαμόρφωση την G-πρωτεΐνη Cdc42-GTP, η οποία μέσω της πρωτεΐνης WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) και του συμπλόκου Arp2/3 επάγει τη δημιουργία διακλαδισμένων ινιδίων ακτίνης και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, που θα βοηθήσει τη μετανάστευση του T_H-λεμφοκυττάρου.



Ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων

Μέσα σε λίγα λεπτά από τη στιγμή της σύνδεσης του TcR με το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC αρχίζει η μεταγραφή ενός πλήθους περισσότερων των 70 γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Πρόκειται για γονίδια αντι-αποπτωτικών παραγόντων (Bcl-2), κυκλινών (κυκλίνη D), κυτοκινών (IL-2, IL-5, IL-10, IL-12 IL-17, IL-22) και των υποδοχέων τους (CD25 ή IL-2Ra, IL-2Rβ). Η περισσότερο μελετημένη από τις μεταγραφικές διαδικασίες που ακολουθούν τη διέγερση του TcR είναι εκείνη της IL-2. Η μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 αρχίζει μία ώρα μετά την ενεργοποίηση του TcR. Ο εκκινητής του γονιδίου της IL-2 είναι μια περιοχή από περίπου 300 ζεύγη βάσεων που περιέχει συγκεκριμέ-



να DNA binding elements, στα οποία συνδέονται μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NF-κB, ο NFAT και ο AP-1 (c-Jun/c-Fos), οι οποίοι ενεργοποιούνται από μονοπάτια εξαρτώμενα από τον TcR.

Ο **NFAT** ενεργοποιείται λόγω αποφωσφορυλίωσης από την καλσινευρίνη, της οποίας ρυθμιστική υπομονάδα είναι η CaM. Η σύνδεση της PLCγ1 στην LAT και η φωσφορυλίωσή της από την Itk οδηγεί στην παραγωγή DAG και IP₃, το οποίο καθώς συνδέεται στον IP₃R του ΕΔ, οδηγεί σε αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ και ενεργοποίηση της CaM.

Το διμερές σύμπλοκο **AP-1** ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση από τις κινάσες JNK και ERK1. Η ενεργοποιημένη από τον Vav Cdc42-GTP ενεργοποιεί το μονοπάτι MEK - MKK4/7 - JNK, ενώ η ενεργοποιημένη από τον SOS ή τον GRP1 Ras-GTP ενεργοποιεί το μονοπάτι Raf - MEK1 - ERK1.

Ο **NF-κB**, όπως είδαμε, ενεργοποιείται μετά την ουβικουιτίνωση του ανασταλτικού παράγοντα IκB, μέσω του μονοπατιού που ξεκινάει από την ενεργοποίηση της PKCθ.

Συνοψίζοντας αυτές τις δράσεις, εύκολα κανείς μπορεί να αναγνωρίσει ότι η ενεργοποίηση του TcR πυροδοτεί έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στο σηματοδοτικό πρωτεϊνικό δίκτυο, ο οποίος οδηγεί σε παρατεταμένη διέγερση. Ως αποτέλεσμα, ο πολλαπλασιασμός των T-λεμφοκυττάρων (κλωνική επέκταση) και η ανταγωνιστικότητα της άμυνας του οργανισμού διεγείρονται δραματικά. Ο τερματισμός της σηματοδότησης βασίζεται σε πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (όπως η SHP1), αλλά και στη λιγάση της ουβικουιτίνης Cbl, οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά τις διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια.

Εικόνα 9.34
Συνοπτική αναπαράσταση της σηματοδότησης έπειτα από ενεργοποίηση του TcR. Διαφορετικά μονοπάτια οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NFAT, ο AP-1 και ο NF-κB, οι οποίοι επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου της IL-2.

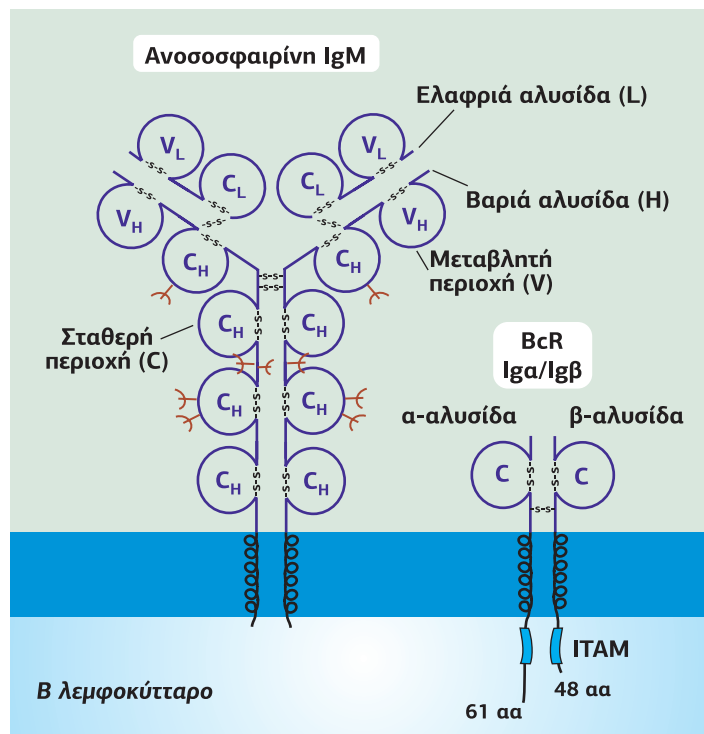
2.3 Ο υποδοχέας BcR

Υποδοχείς τύπου ανοσοσφαιρίνης (Ig) που μοιάζουν μέχρι ενός βαθμού με τους υποδοχείς των Τ-λεμφοκυττάρων είναι οι υποδοχείς των Β-λεμφοκυττάρων (BcRs) και οι υποδοχείς FcRs. Όπως και οι TcRs, είναι διαμεμβρανικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από μία υπομονάδα που συνδέεται με τον προσδέτη (IgM), καθώς και από μία υπομονάδα που μεταδίδει το σήμα (Iga/β). Η τελευταία φέρει κυτταροπλασματικές αλληλουχίες ITAM που φωσφορυλιώνονται από κυτταροπλασματικές κινάσες Tyr, οι οποίες επιστρατεύονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Και πάλι, αυτό πυροδοτεί έναν σηματοδοτικό καταρράκτη, που μοιάζει με αυτόν που περιγράφηκε για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων.

Δομή του BcR

Ο υποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων (BcR) είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την ανοσοσφαιρίνη IgM (ή IgD), υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέτη (αντιγόνου), και τις ετεροδιμερείς αλυσίδες Iga/Igβ, υπεύθυνες για τη μετάδοση του μηνύματος. Η αλυσίδα Iga έχει μακριά κυτταροπλασματική ουρά αποτελούμενη από 61 αμινοξέα, ενώ η ουρά της αλυσίδας Igβ έχει 48 αμινοξέα. Οι ουρές και των δύο αλυσίδων περιέχουν αλληλουχίες ITAM (Εικόνα 9.35).

Από τη στιγμή που το Β-λεμφοκύτταρο θα εκφράσει τον πλήρη BcR, μεταναστεύει ως ώριμο Β-λεμφοκύτταρο (mature B cell) από τον μυελό των οστών προς το αίμα και τους λεμφικούς ιστούς, όπου συνεχίζει να ωριμάζει, ακόμη και χωρίς την παρουσία αντιγονικού ερεθίσματος. Τα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα, εκτός από τον BcR, εκφράζουν μια σειρά βοηθητικών μορίων στα οποία περιλαμβάνονται οι υποδοχείς του συμπληρώματος CR1, CR2 (Complement Receptors), τα μόρια προσκόλλησης (LFA1, ICAM-1, L-σελεκτίνη), το σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας MHC-II και ο υποδοχέας CD40, απαραίτητος για τη σύνδεση των Β-λεμφοκυττάρων με τα T_H-λεμφοκύτταρα. Τα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα που δεν θα συναντηθούν με το αντιγόνο πεθαίνουν μέσα σε διάστημα λίγων ημερών ή λίγων εβδομάδων.



Εικόνα 9.35
Δομή του υποδοχέα Β-κυττάρων BcR. Ο BcR είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από την ανοσοσφαιρίνη IgM (ή IgD), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του αντιγόνου, και τις ετεροδιμερείς αλυσίδες Iga/Igβ, υπεύθυνες για τη μετάδοση του μηνύματος, μέσω της περιοχής ITAM που περιέχουν.

Συνυποδοχείς του BcR

Η διέγερση μέσω BcR τροποποιείται σημαντικά υπό την επίδραση μηνυμάτων που μεταδίδονται μέσω συνυποδοχέων. Αναφέρθηκε ήδη ότι ο συνυποδοχέας του TcR, ο CD28, είναι απαραίτητος για την αποτελεσματική ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, ενώ η σηματοδότηση μέσω του CTLA-4 αναστέλλει την απόκριση των Τ-λεμφοκυττάρων. Ο συνυποδοχέας του BcR είναι ένα σύμπλεγμα τριών πρωτεϊνών: CD19, CD21 (CR2) και CD81 (TAPA-1).

Το **CD19** (Cluster of Differentiation) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 95 kDa, μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Διαθέτει δύο εξωκυτταρικές C2-type Ig-like περιοχές, που χωρίζονται από μια μικρότερη non-Ig-like περιοχή και μια μεγάλη κυτταροπλασματική ουρά, η οποία περιέχει 9 κατάλοιπα Tyr και αποτελεί ένα σημαντικό υπόστρωμα των κινάσων τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση του CD19 διευκολύνει τη σύνδεση σηματοδοτικών μορίων, όπως οι κινάσες Lyn και PI3K, ο RhoGEF Vav και η φωσφολιπάση PLCγ.

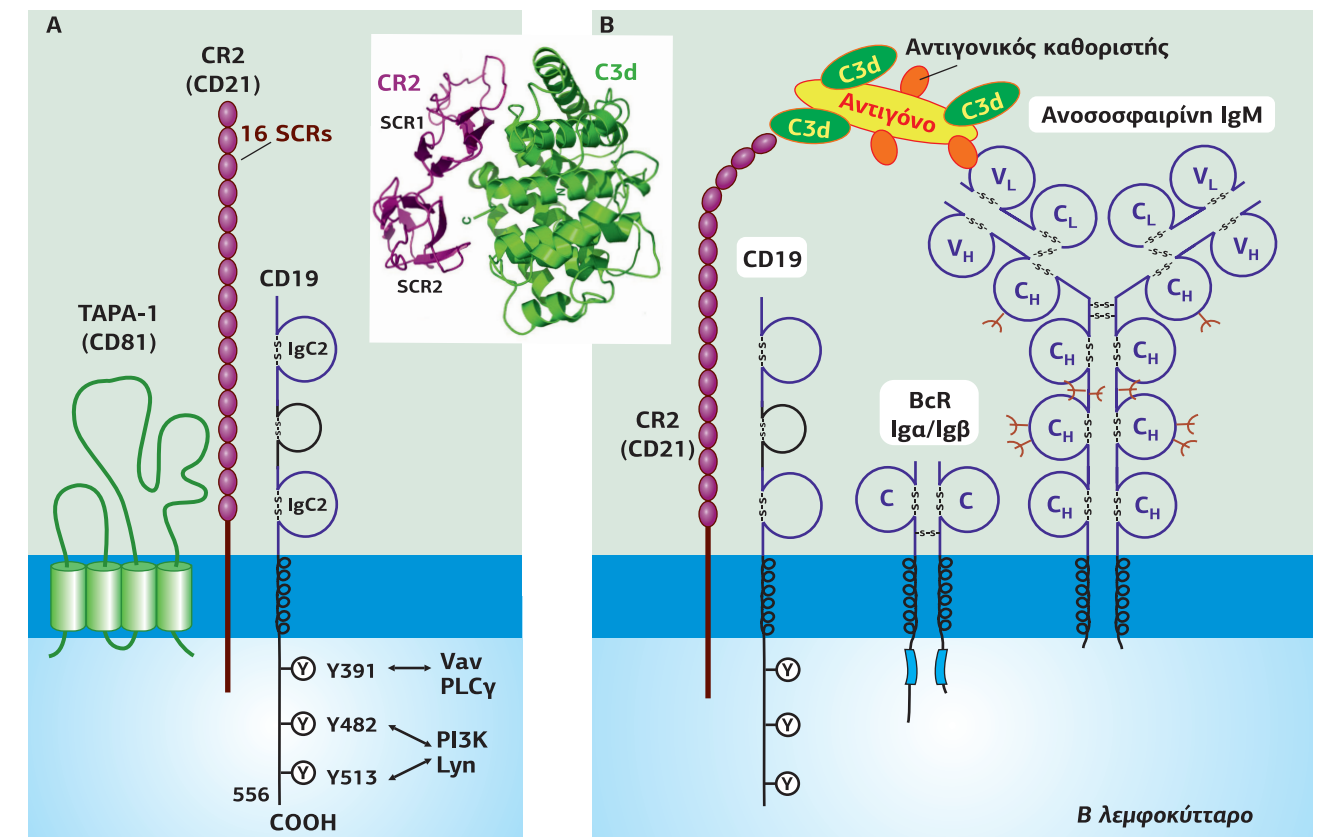
Το **CD21** ή CR2 (Complement Receptor type 2) είναι υποδοχέας του C3d (Complement component 3d), το οποίο αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης του συμπληρώματος. Το CD21 αποτελείται από 16 περιοχές SCRs (Short Consensus Repeats). Το CD21 συνδέεται στο καλυμμένο με συμπλήρωμα αντιγόνο, που έχει συνδεθεί στον BcR μέσω των αντιγονικών καθοριστών. Το γεγονός αυτό φέρνει κοντά τον συνυποδοχέα με τον BcR και επιτρέπει στο CD19 να αλληλεπιδράσει με τις αλυσίδες Iga/Igβ. Η συμμετοχή του C3d στη δράση του συνυποδοχέα αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση διαφορετικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος, της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης σε παθογόνους παράγοντες και ξένα αντιγόνα, που προκαλείται από το συμπλήρωμα με την προσαρμοστική (adaptive) ανοσοαπόκριση. Το ανθρώπινο CD21 αποτελεί, επίσης, τον υποδοχέα του ιού Epstein-Barr (EBV), ενός καρκινογόνου ιού.

Το **CD81** ή TAPA-1 (Target of the Antiproliferative Antibody 1) ή Tetraspanin-28 (Tspan-28) ανήκει στην οικογένεια τετρασπανίνης (tetraspanin family). Είναι μια πρωτεΐνη με 4 διαμεμβρανικές περιοχές που εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση.

Εικόνα 9.36

Ο ρόλος του συμπλέγματος συνυποδοχέων του BcR.

Ο συνυποδοχέας του BcR είναι ένα σύμπλεγμα τριών διαμεμβρανικών μορίων, του CD81, του CD21 και του CD19. Η σύνδεση του CD21 στο C3d, που προέρχεται από το συμπλήρωμα και καλύπτει το αντιγόνο που έχει συνδεθεί με την IgM, έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του CD19. Η κινάση τυροσίνης Lyn συνδέεται στο φωσφορυλιωμένο CD19. Η επακόλουθη ενεργοποίηση των Lyn και Fyn πυροδοτεί τη σηματοδότηση.



Στην περίπτωση που το σύμπλεγμα των συνυποδοχέων δεν συμμετέχει στη σηματοδότηση, απαιτούνται 10^4 μόρια BcR να καταληφθούν από αντιγόνο, ώστε να συμβεί η ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων. Όταν όμως οι συνυποδοχείς [CD19, CD21 (CR2) και CD81 (TAPA-1)] συνεργάζονται με τον BcR, απαιτείται η κατάληψη μόνο 10^2 μορίων BcR, ώστε να συμβεί η ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων.

Τα B-λεμφοκύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά

Το αντιγόνο, μετά τη σύνδεσή του στο μόριο IgM του BcR, εισέρχεται στο B-λεμφοκύτταρο μέσω ενδοκύτωσης, η οποία ρυθμίζεται από τους υποδοχείς, και τέλος αποικοδομείται σε πεπτίδια μέσω της ενδοκυτταρικής οδού. Η σύνδεση του αντιγόνου προκαλεί, επίσης, την έναρξη της σηματοδότησης μέσω του BcR, η οποία επάγει την αύξηση της έκφρασης διαφόρων μεμβρανικών μορίων του B-λεμφοκυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των μορίων MHC-II και του συνδεδεμένου προσδέτη B7. Η αύξηση της έκφρασης των δύο αυτών μεμβρανικών πρωτεϊνών ενισχύει την ικανότητα του B-λεμφοκυττάρου να δρα ως αντιγονοπαρουσιαστικό, κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης των T_H -λεμφοκυττάρων. Τα αντιγονικά πεπτίδια συνδέονται με μόρια MHC-II και παρουσιάζονται στη μεμβράνη του B-λεμφοκυττάρου, ώστε να είναι ορατά στα T_H λεμφοκύτταρα επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργοποίηση των τελευταίων. Η διαδικασία που ακολουθεί την ενδοκυττάρωση του αντιγόνου και περιλαμβάνει την επεξεργασία και την επακόλουθη παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων μέσω των MHC-II στην επιφάνεια του B-λεμφοκυττάρου διαρκεί 30-60 min.

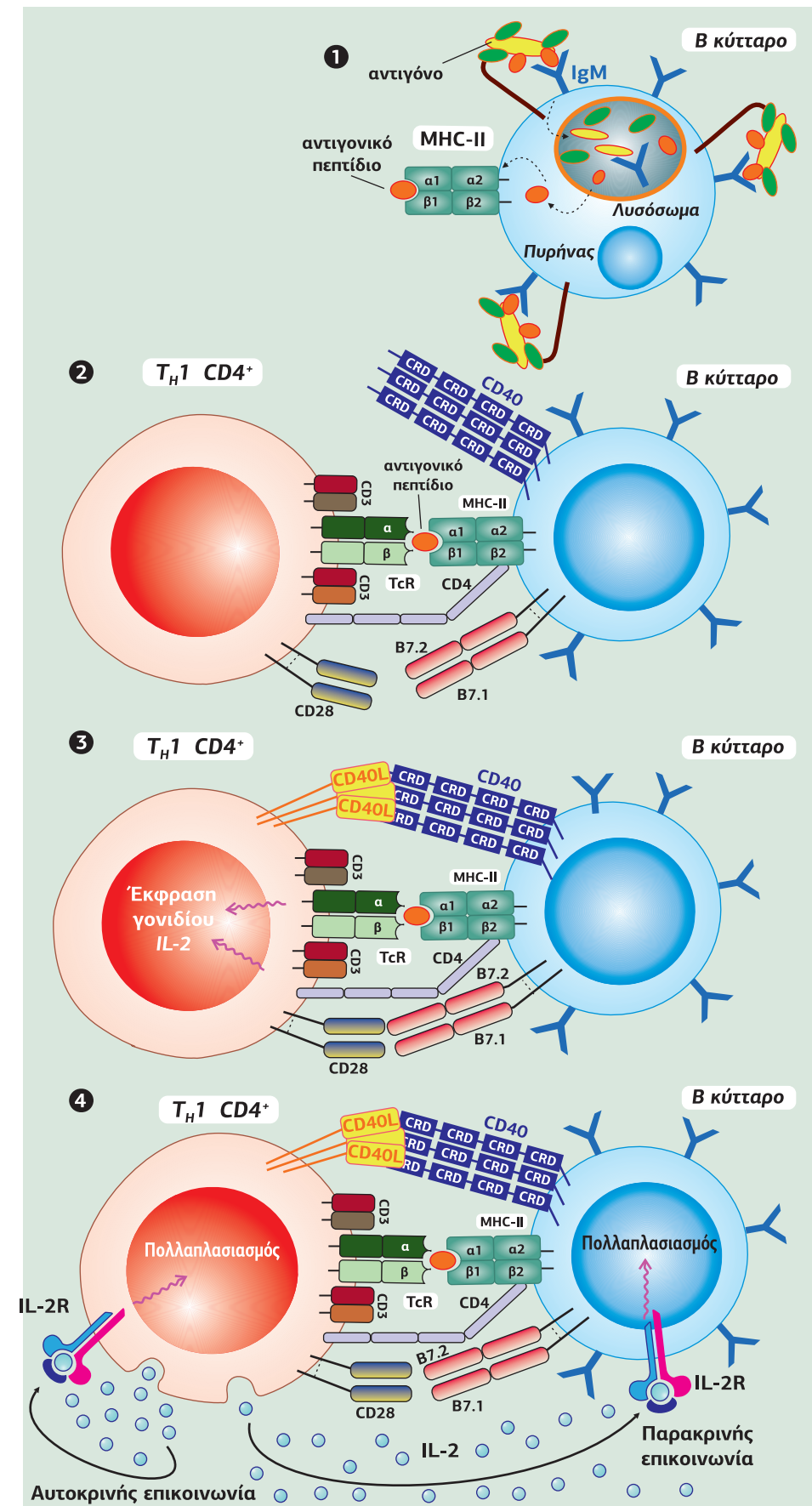
Το γεγονός ότι ένα B-λεμφοκύτταρο αναγνωρίζει τα αντιγόνα εξειδικευμένα, μέσω των μεμβρανικών μορίων IgM που διαθέτει, και στη συνέχεια τα ενδοκυττάρωνει, το καθιστά ικανό να παρουσιάζει αντιγόνα στα T_H -λεμφοκύτταρα σε συγκεντρώσεις 100 έως και 10.000 φορές χαμηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την παρουσίαση από τα μακροφάγα ή τα δενδριτικά. Όταν οι συγκεντρώσεις του αντιγόνου κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά δρουν αποτελεσματικά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Καθώς όμως τα επίπεδα του αντιγόνου ελαττώνονται, τα B-λεμφοκύτταρα αναλαμβάνουν τον κυρίαρχο ρόλο ως αντιγονοπαρουσιαστικά.

Από τη στιγμή που ο TcR του T_H -λεμφοκυττάρου συνδεθεί με το επεξεργασμένο αντιγονικό πεπτίδιο, που είναι συνδεδεμένο στο MHC-II, ξεκινά η αλληλεπίδραση των δύο κυττάρων, ώστε να σχηματισθεί η ανοσολογική σύναψη μεταξύ T- και B-λεμφοκυττάρου. Η σύνδεση μεταξύ T- και B-λεμφοκυττάρου δεν οδηγεί μόνο στην απελευθέρωση κυτοκινών, όπως η IL-2, αλλά και στην αύξηση της έκφρασης του μορίου CD40L (CD154) στα T-λεμφοκύτταρα, το οποίο αλληλεπιδρά με το CD40 των B-λεμφοκυττάρων. Το B-λεμφοκύτταρο αρχίζει να εκφράζει υποδοχείς για την IL-2, οι οποίοι ενεργοποιούνται και οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων (Εικόνα 9.37).

Σηματοδότηση μέσω του BcR. Ο ρόλος της Lyn

Ο μηχανισμός σηματοδότησης μέσω του BcR προσομοιάζει με αυτόν του TcR. Τον ρόλο που παίζει στα T-λεμφοκύτταρα η κινάση τυροσίνης Lck, τον αναλαμβάνει η στενά συγγενική κινάση τυροσίνης Lyn (Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase). Η Lyn είναι ένα μέλος της οικογένειας Src. Όπως κάθε μέλος της οικογένειας, αποτελείται από μία μοναδική NH_2 -τελική περιοχή, που περιέχει μια θέση μυριστοϋλίωσης και μία παλμιτουλίωσης, η οποία ακολουθείται από μια περιοχή SH3, μια περιοχή SH2 και μια περιοχή κινάσης τυροσίνης (βλ. Εικόνα 9.1).

Στην ανενεργή της διαμόρφωση η Lyn φωσφορυλιώνεται στην Tyr508 του COOH-τελικού άκρου της από την Csk (η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στην PAG), δημιουργώντας μια θέση πρόσδεσης για τη δική της περιοχή SH2. Η περιοχή SH3 συνδέεται σε ένα ενδομοριακό μοτίβο προλίνης, που βρίσκεται μεταξύ των περιοχών SH2 και κινάσης (περιοχή άρθρωσης), βοηθώντας να σταθεροποιηθεί η διαμόρφωση αυτοαναστολής. Η ενεργοποίηση της Lyn περιλαμβάνει α. την αποφωσφορυλίωση



Εικόνα 9.37
Ακολουθία των γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων από ένα αντιγόνο.

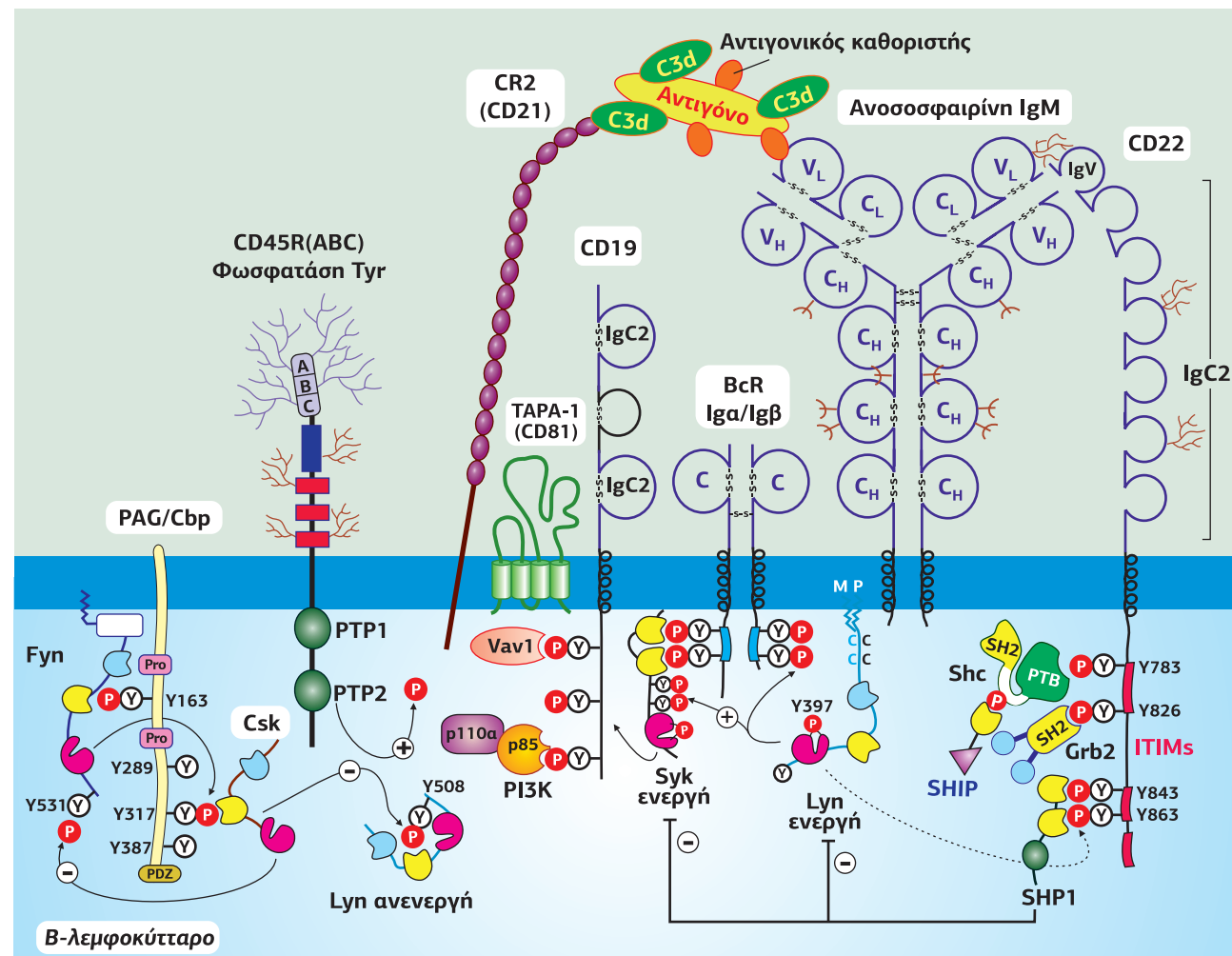
1. Το αντιγόνο συνδέεται στην IgM οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των μορίων MHC-II και B7.1/B7.2. Στη συνέχεια, το αντιγόνο ενδοκυττάρωνεται και αποικοδομείται σε πεπτίδια, μερικά από τα οποία συνδέονται στα μόρια MHC-II και παρουσιάζονται στη μεμβράνη ως συμπλέγματα αντιγονικού πεπτιδίου/MHC-II. 2. Ο TcR του T_H λεμφοκυττάρου συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγονικό πεπτίδιο/MHC-II του B-λεμφοκυττάρου, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του T_H -λεμφοκυττάρου. 3. Το T_H λεμφοκύτταρο αρχίζει να εκφράζει μόρια CD40L. Το CD40L αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα CD40 του B-λεμφοκυττάρου, ενισχύοντας το μήνυμα του T_H λεμφοκυττάρου. Επιπλέον, το CD28 του T_H αλληλεπιδρά με το B7.1/B7.2 του B-λεμφοκυττάρου, ενισχύοντας επιπλέον το μήνυμα του T_H . Το T_H αρχίζει να παράγει και να απελευθερώνει IL-2, η οποία δρα είτε ενδοκρινώς στα T_H λεμφοκύτταρα είτε παρακρινώς στα B-λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν αρχίσει να παράγουν υποδοχείς IL-2. Η σύνδεση της IL-2 στους υποδοχείς της οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των B- και T_H -λεμφοκυττάρων.

της COOH-τελικής pTyr508 από τη φωσφατάση CD45 -στα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζεται η μεγάλη ισομορφή της CD45R(ABC)-, και β. αλληλεπιδράσεις με pTyr του υποδοχέα και/ή με SH3 περιοχές, οι οποίες ανταγωνίζονται τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις απελευθερώνοντας τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Για την πλήρη ενεργοποίησή της, η Lyn αυτοφωσφορυλιώνεται στον βρόχο ενεργοποίησης (Tyr397) παράγοντας ένα έντονα δραστικό ένζυμο.

Η ενεργοποιημένη Lyn φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα Tyr των μοτίβων ITAM των αλυσίδων Igα/Igβ. Στις pTyr των ITAMs συνδέονται και ενεργοποιούνται η κινάση Syk, η φωσφολιπάση PLCγ2 και η PI3K. Η Lyn, εκτός από τον διεγερτικό της ρόλο, παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στη μετάδοση ανασταλτικών σημάτων μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης, που βρίσκονται στα ανασταλτικά μοτίβα ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως η CD22.

Η CD22 (Cluster of Differentiation-22) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 140 kDa, η οποία ανακαλύφθηκε το 1987 ως λεκτίνη που ανήκει στην οικογένεια Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) γι' αυτό είναι γνωστή και ως Siglec-2. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι πρωτεΐνες, οι οποίες συνδέουν γλυκάνες που περιέχουν σιαλικό οξύ. Η αλληλεπίδραση αυτή (υποδοχέα-σιαλικού οξέος) παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση. Η CD22 εκφράζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα ανώριμα Β-λεμφοκύτταρα και σε μέγιστες συγκεντρώσεις στα ώριμα. Για την αλληλεπίδραση με το σιαλικό οξύ είναι υπεύθυνη η NH₂-τελική περιοχή Ig-like (τύπου V). Μέσω αυτής της περιοχής η CD22 συνδέεται στην φωσφατάση CD45 (βλ. σελ. 677, **Εικόνα 9.28**), η οποία βρίσκεται στα Τ-λεμφοκύτταρα, αλλά και στην IgM του BcR. Το ενδοκυτταρικό τμήμα της CD22

Εικόνα 9.38
Ρύθμιση θετικών και αρνητικών σηματοδοτικών οδών από την Lyn. Η Lyn ενεργοποιείται έπειτα από αποφωσφορυλίωση της COOH-τελικής pTyr508 (από την CD45) και αυτοφωσφορυλίωση της Tyr397 του βρόχου ενεργοποίησης. Η ενεργοποιημένη Lyn ρυθμίζει πολλαπλές οδούς σηματοδότησης αλληλεπιδρώντας και/ή φωσφορυλιώνοντας διαφορετικά μόρια που μεσολαβούν τόσο στην ενεργοποίηση / ενίσχυση [ITAM του BcR (Igα/Igβ) και Syk] όσο και στην αναστολή / τερματισμό των σηματοδοτικών δικτύων (ITIM της CD22).



περιέχει έξι κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία βρίσκονται σε 3 μοτίβα ITIM (Tyr783, Tyr826, Tyr843 και Tyr863) και φωσφορυλιώνονται, όπως είδαμε από την Lyn. Στις pTyr αυτές προσελκύονται οι φωσφατάσες SHIP –έμμεσα μέσω των Shc και Grb2, οι οποίες συνδέονται στις pTyr783 και pTyr826, αντίστοιχα, και SHP1 –άμεσα στις pTyr843 και pTyr863. Οι φωσφατάσες αυτές μειώνουν την ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, καθώς αποφωσφορυλιώνουν τις pTyr του βρόχου ενεργοποίησης της Lyn και της Syk. Στα Β-λεμφοκύτταρα η Lyn ορίζει το κατώφλι της κυτταρικής σηματοδότησης και διατηρεί την ισορροπία μεταξύ ενεργοποίησης και αναστολής, λειτουργεί ως ρεοστάτης που ρυθμίζει τη σηματοδότηση και όχι ως δυαδικός διακόπτης on-off. Η δε CD22 δρα ως ρυθμιστικό μόριο που αποτρέπει την υπερδραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος και την ανάπτυξη αυτοάνοσων παθήσεων (**Εικόνα 9.38**).

Σηματοδότηση μέσω του BcR. Ο ρόλος της Syk

Όπως τον ρόλο της Lck των Τ-λεμφοκυττάρων τον παίζει η Lyn στα Β-λεμφοκύτταρα, έτσι και η ZAP-70 αντικαθίσταται από την κινάση Syk (Spleen tyrosine kinase). Πήρε το όνομά της από τη σπλήνα χοίρων, από την οποία απομονώθηκε η καταλυτική της περιοχή. Είναι μια πρωτεΐνη 72 kDa, η οποία εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα Β-λεμφοκύτταρα και εμφανίζει τη χαρακτηριστική δομή της ZAP-70 με δύο περιοχές SH2 (nSH2, cSH2), που διαχωρίζονται από μια ενδοπεριοχή A (interdomain A) και μια COOH-τελική περιοχή κινάσης, η οποία διαχωρίζεται από την cSH2 μέσω της ενδοπεριοχής B (interdomain B).

Σε κατάσταση ηρεμίας η Syk βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε διαμόρφωση αυτοαναστολής. Στα Β-λεμφοκύτταρα η φωσφορυλίωση των δύο τυροσινών των ITAMs της κυτταροπλασματικής περιοχής του BcR (Igα/Igβ) οδηγεί στη φυσική στρατολόγηση της Syk στον BcR, μέσω μιας αλληλεπίδρασης που διαμεσολαβείται από τις δύο γειτονικές SH2. Λίγο μετά την ενεργοποίηση του BcR, η Syk που έχει στρατολογηθεί στον υποδοχέα φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλές τυροσίνες, τόσο μέσω αυτοφωσφορυλίωσης όσο και από την Lyn.

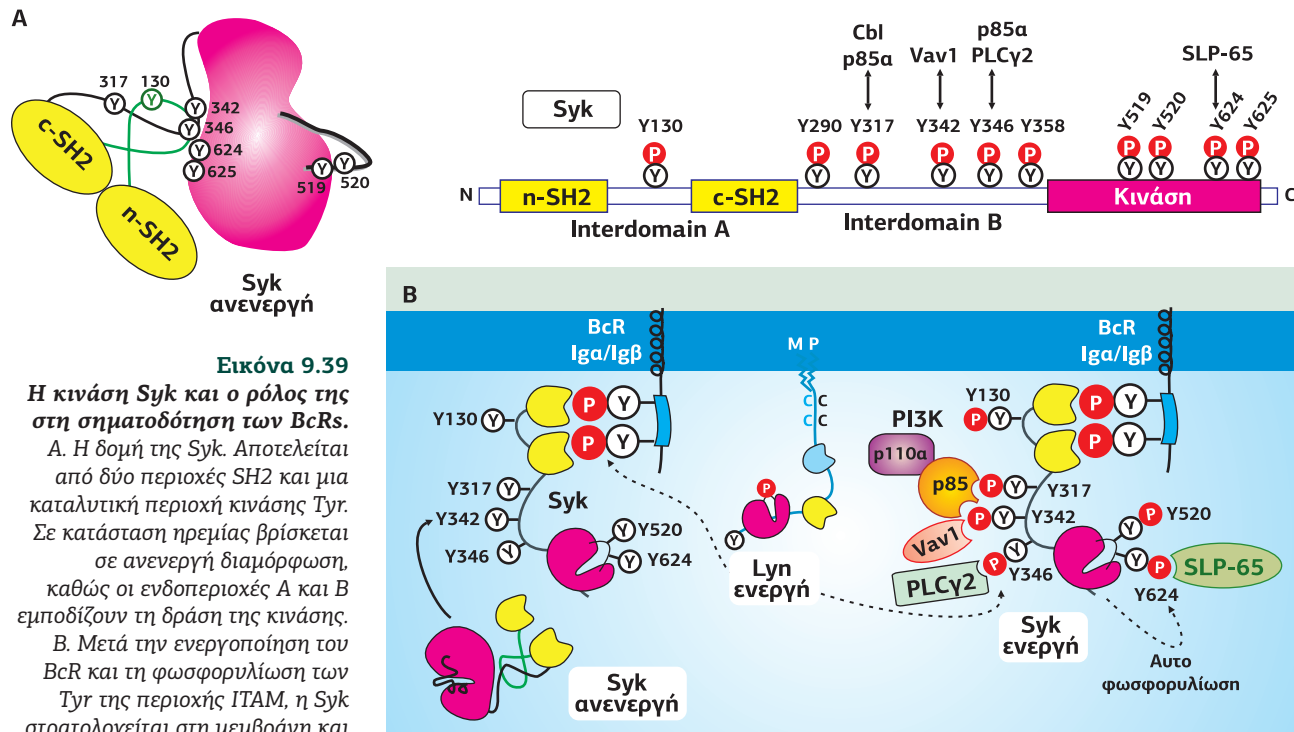
Υπάρχουν δέκα τυροσίνες στην Syk που είναι θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης, οι περισσότερες από τις οποίες έχουν αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος. Η pTyr317 είναι μια θέση πρόσδεσης για την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης Cbl, η οποία συμμετέχει στην ουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση της Syk. Η pTyr317 συνδέεται, επίσης, με την cSH2 της ρυθμιστικής υπομονάδας p85α της PI3K, ενώ η nSH2 της p85α συνδέεται με την pTyr346. Η pTyr342 συνδέεται στην περιοχή SH2 του Vav1 και αμφότερες οι φωσφορυλιωμένες Tyr342 και Tyr346 συνδέονται στην cSH2 της PLCγ2. Όταν φωσφορυλιωθεί η Tyr624 του βρόχου ενεργοποίησης, δεσμεύει την περιοχή SH2 της πρωτεΐνης προσαρμογής SLP-65.

Οι θέσεις φωσφορυλίωσης περιλαμβάνουν επίσης τις Tyr348 και Tyr352 στην ενδοπεριοχή IA, τις Tyr525 και Tyr526 στον βρόχο ενεργοποίησης της περιοχής κινάσης και την Tyr630 στην COOH-τελική περιοχή της Syk.

Η σύνδεση της Syk στο διπλά φωσφορυλιωμένο ITAM και η φωσφορυλίωσή της από την Lyn και/ή η αυτοφωσφορυλίωση στις Tyr342 και Tyr346 στην ενδοπεριοχή IB (και ίσως στις Tyr519 και Tyr520 στον βρόχο ενεργοποίησης) ενεργοποιεί πλήρως την κινάση. Ανάλογα με τις θέσεις που φωσφορυλιώνονται και τη στοιχειομετρία της φωσφορυλίωσής τους, οι φωσφοτυροσίνες της ενδοπεριοχής IB χρησιμεύουν ως θέσεις αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που βοηθούν στην ενίσχυση των ασθενών σημάτων. Επιπλέον, η Syk καταλύει τη φωσφορυλίωση πολλαπλών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση των ενζύμων PLCγ2, Btk και Vav1 οδηγεί στην ενεργοποίησή τους, ενώ η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης σκαλωσιάς BLNK/SLP-65 δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης των Btk και PLCγ2 για τη δημιουργία ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών, που ρυθμίζει την κινητοποίηση του Ca²⁺ (**Εικόνα 9.39**).

Η ενεργοποιημένη Syk μπορεί, επίσης, να αποσυνδεθεί από τον υποδοχέα και να εμφανιστεί σε μια ενεργή μορφή σε θέσεις μέσα στο κύτταρο εκτός από την

Η SHP1 (ή PTPN6) εκφράζεται κυρίως σε αιμοποιητικά κύτταρα, όλων των τύπων, και σε όλα τα στάδια ωρίμανσης, ενώ εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντιθέτως, η δομικά ομόλογη SHP2 (ή PTPN11) εκφράζεται ευρέως σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων που εκφράζουν την SHP1. Ενώ η SHP1 είναι ευρέως αποδεκτό ότι δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης στα Β-λεμφοκύτταρα, η SHP2 θεωρείται ότι προάγει θετικά τη σηματοδότηση, κυρίως των RTKs, ενεργοποιώντας την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση. Gain-of-function μεταλλάξεις της SHP2 οδηγούν σε διάφορους τύπους καρκίνου.



Εικόνα 9.39
Η κινάση Syk και ο ρόλος της στη σηματοδότηση των BcRs.

A. Η δομή της Syk. Αποτελείται από δύο περιοχές SH2 και μια καταλυτική περιοχή κινάσης Tyr. Σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται σε ανενεργή διαμόρφωση, καθώς οι ενδοπεριοχές A και B εμποδίζουν τη δράση της κινάσης. B. Μετά την ενεργοποίηση του BcR και τη φωσφορυλίωση των Tyr της περιοχής ITAM, η Syk στρατολογείται στη μεμβράνη και συνδέεται μέσω των περιοχών SH2 στις pTyr του BcR. Στη συνέχεια, αυτοφωσφορυλιώνεται προσελκύνοντας ποικίλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως η PLCγ2, ο Vav1, η PI3K και η SLP-65.

πλασματική μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένου και του πυρήνα. Η φωσφορυλίωση της Tyr130 παρέχει έναν μηχανισμό για αυτή την αποσύνδεση. Η σηματοδότηση τερματίζεται μέσω της down-regulation των μεμβρανικών υποδοχέων και μέσω της αποφωσφορυλίωσης της Syk και των υποστρωμάτων της από μία ή περισσότερες από αρκετές υποψήφιες φωσφατάσες. Έτσι, πολλαπλοί παράγοντες δρουν συνεργιστικά, για να επηρεάσουν τη δραστηριότητα της Syk, προκειμένου να ρυθμίσουν την ποιότητα και την ποσότητα του σήματος που μεταφέρεται από τον BcR, το οποίο τελικά καθορίζει το φυσιολογικό αποτέλεσμα της εμπλοκής του υποδοχέα.

Ενώ η πρωτεΐνη σκαλωσιάς LAT είναι ένα σημαντικό συστατικό της σηματοδότησης TcR, δεν είναι προς το παρόν σαφές εάν οποιαδήποτε μόρια που σχετίζονται με την LAT παίζουν παρόμοιους ρόλους στα B-λεμφοκύτταρα.

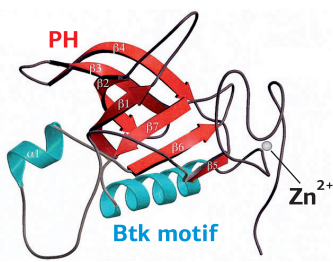
Ο ρόλος της Btk

Η Itk, η οποία συμμετέχει στη σηματοδότηση των TcRs, στα B-λεμφοκύτταρα αντικαθίσταται από την κινάση Btk και ο συνδιεγέρτης CD28 από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη CD19 (ο μηχανισμός ενεργοποίησης της οποίας παραμένει άγνωστος).

Η Btk (Bruton's tyrosine kinase) είναι μέλος της οικογένειας κινάσων τυροσίνης Tec, εκφράζεται αποκλειστικά στα B-λεμφοκύτταρα, όπου διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της ωρίμανσης. Μη λειτουργική Btk σχετίζεται με απώλεια λειτουργίας και μειωμένο αριθμό ώριμων B-λεμφοκυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα την X-φυλοσύνδετη α-γ-σφαιραιναιμία (XLA, X-linked agammaglobulinemia), που χαρακτηρίζεται από σοβαρές υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις σε αγόρια έως 2 ετών.

Η οικογένεια Tec περιλαμβάνει την Btk, την Tec, την Itk και την Bmx/Etk. Το χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι η ύπαρξη της περιοχής PH στο NH₂-τελικό τους άκρο. Εκτός από την περιοχή PH, περιέχουν μια περιοχή SH3 και μία SH2. Η περιοχή Tec-homology (TH) αποτελείται από 80 αμινοξέα και περιέχει ένα καλά διατηρημένο μοτίβο Btk, το Btk-type zinc finger ή Btk motif (BM), το οποίο αποτελείται από 27 αμινοξέα, με 3 διατηρημένες κυστεΐνες και μια ιστιδίνη που δημιουργούν ένα zinc finger, καθώς και μία ή δύο πλούσιες σε προλίνη αλληλουχίες (PxPPxP), οι οποίες επιτρέπουν την αλληλεπίδραση με

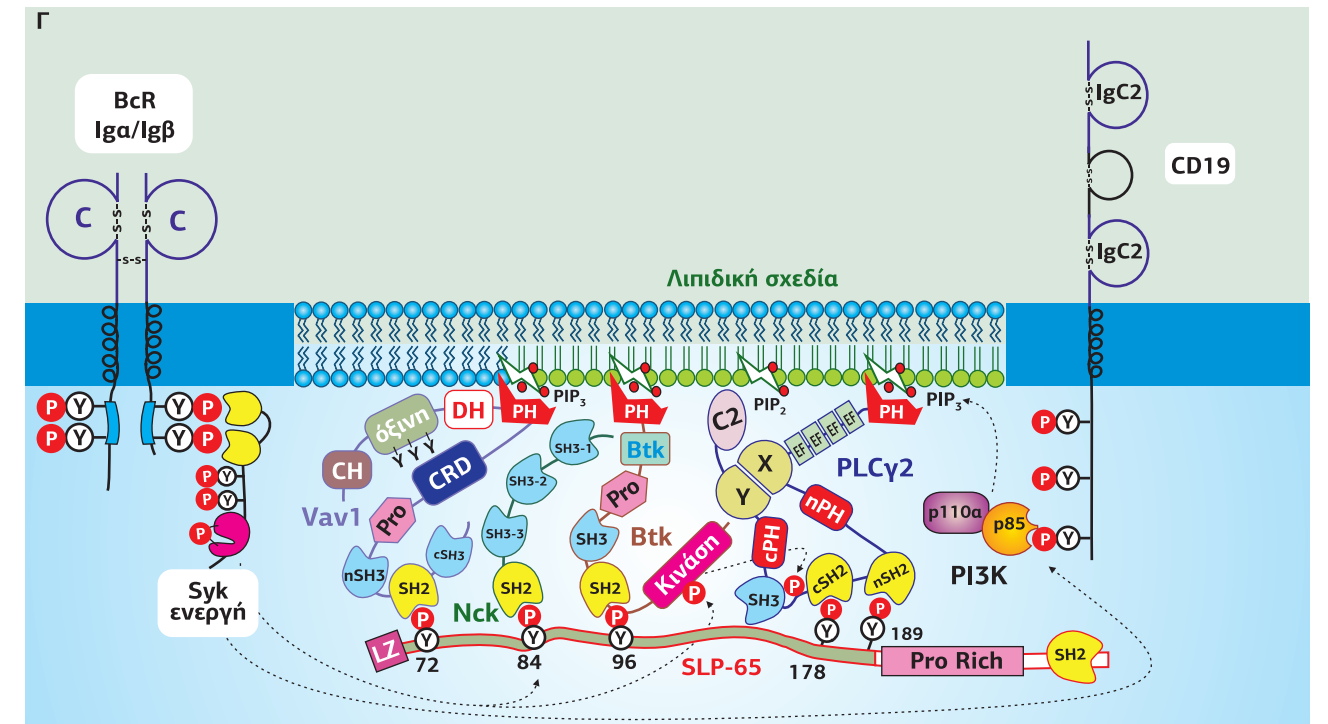
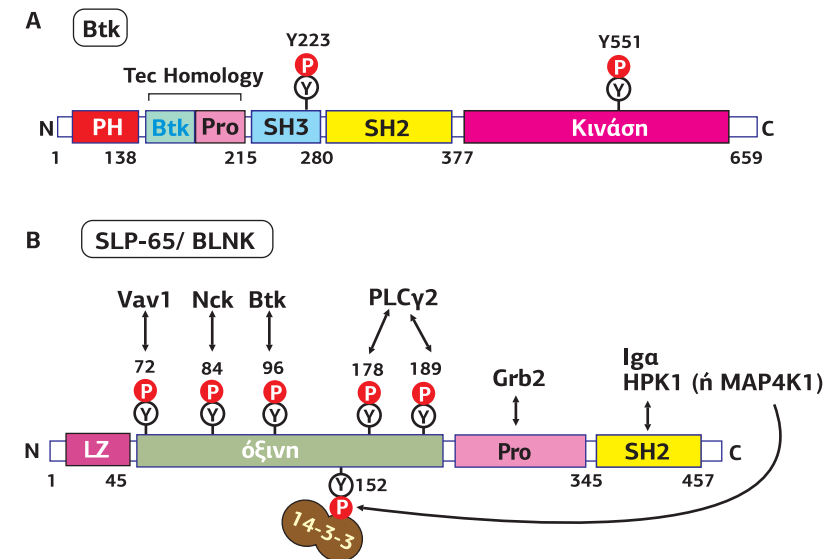
Η Btk ανακαλύφθηκε το 1993 και πήρε το όνομά της από τον παιδίατρο Ogden Bruton, ο οποίος πρώτος περιέγραψε την XLA, το 1953



πρωτεΐνες που περιέχουν SH3 περιοχές (Εικόνα 9.40A). Επιπλέον, η παρουσία του μοτίβου PxxP και της περιοχής SH3 μέσα στην ίδια πρωτεΐνη επιτρέπει μια ενδομοριακή αλληλεπίδραση, που αναδιπλώνει την κινάση Btk σε κλειστή διαμόρφωση και υποβάλλει την κινάση σε ρύθμιση από ερεθίσματα, τα οποία ενεργοποιούν μόρια που διαταράσσουν αυτή την αλληλεπίδραση. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς οι κινάσες της οικογένειας Tec - Btk, αντίθετα με τις κινάσες της οικογένειας Src, δεν έχουν COOH-τελικό κατάλοιπο τυροσίνης, του οποίου η φωσφορυλίωση και η αλληλεπίδραση με την εσωτερική περιοχή SH2 ελέγχουν τη δραστηριότητα κινάσης των κινάσων Src.

Μετά την ενεργοποίηση του BcR, η Btk συνδέεται στα PIP₃ της πλασματικής μεμβράνης μέσω της περιοχής PH. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται από την κινάση Syk στην Tyr551 στον βρόχο ενεργοποίησης και αυτοφωσφορυλιώνει την Tyr223 στην περιοχή SH3. Είναι ενδιαφέρον ότι η φωσφορυλίωση της Tyr223 μεταβάλλει την εξειδίκευση δέσμευσης για τους πρωτεϊνικούς εταίρους.

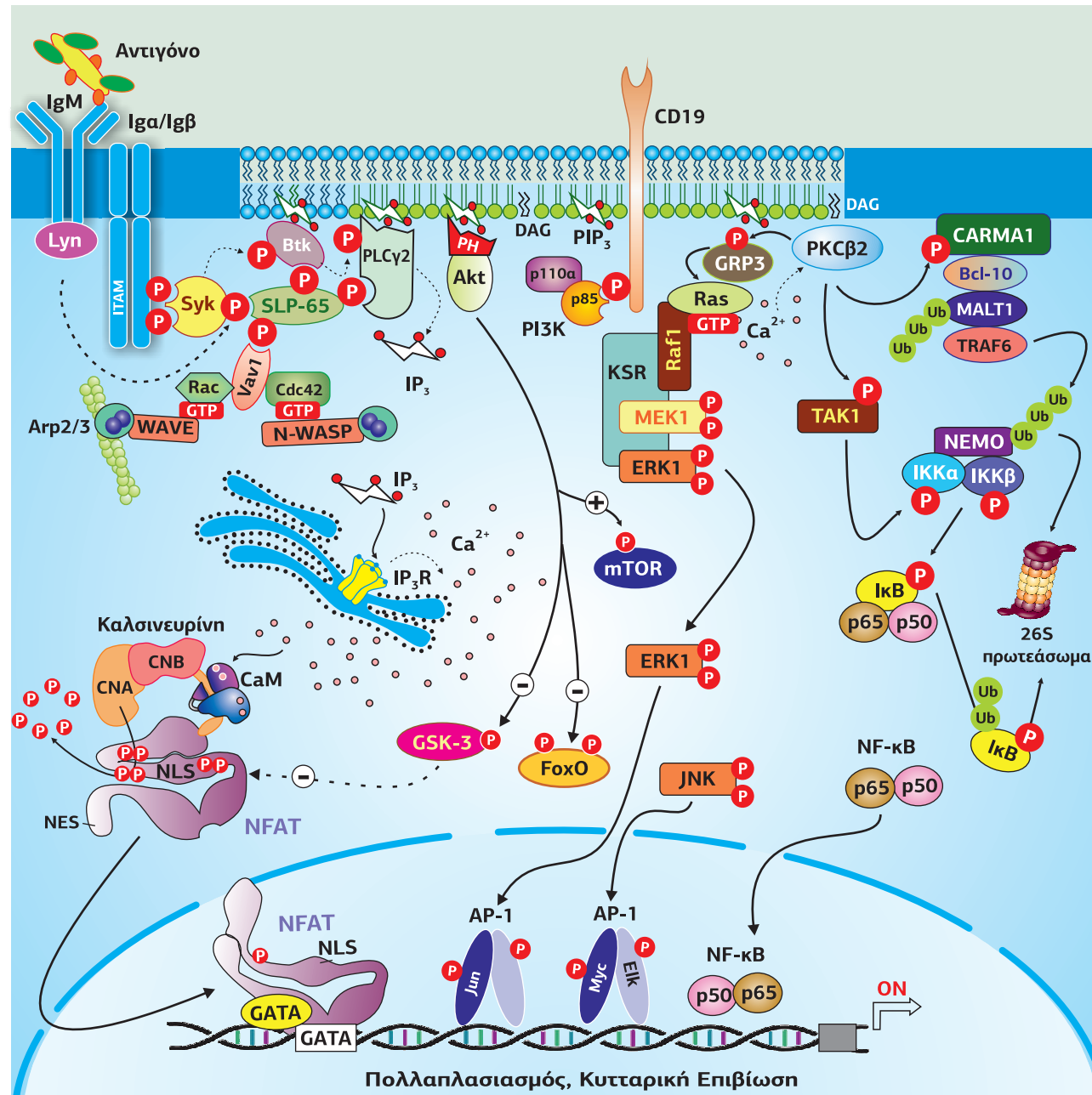
Η ενεργοποιημένη Btk συνδέεται, μέσω της SH2 περιοχής, στη φωσφορυλιωμένη από την Syk πρωτεΐνη προσαρμογής SLP-65 (SH2 domain-containing Leukocyte



Εικόνα 9.40
Η κινάση Btk και η πρωτεΐνη σκαλωσιάς SLP-65.

A. Το χαρακτηριστικό της Btk είναι η ύπαρξη της περιοχής PH στο NH₂-τελικό της άκρο, καθώς επίσης και η περιοχή Tec-homology, η οποία περιέχει ένα καλά διατηρημένο μοτίβο Btk με 3 διατηρημένες κυστεΐνες και μια ιστιδίνη που δημιουργούν ένα zinc finger, και μία ή δύο πλούσιες σε προλίνη αλληλουχίες. Η Btk αποτελείται επίσης από μια περιοχή SH3, μία περιοχή SH2 και μια περιοχή κινάσης Tyr στο COOH-τελικό άκρο. B. Η SLP-65 ή BLNK αποτελείται από ένα NH₂-τελικό μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (LZ) ακολουθούμενο από μία "όξινη" περιοχή, μία πλούσια σε προλίνη περιοχή και μία COOH-τελική περιοχή SH2, η οποία αλληλεπιδρά με την κινάση HPK1 (Hematopoietic Progenitor Kinase 1). Γ. Η όξινη περιοχή της SLP-65 περιέχει τουλάχιστον 5 κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία φωσφορυλιώνονται από την ενεργοποιημένη Syk και μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ SLP-65 και PLCγ2, Btk, Vav1 και Nck.

Protein) ή **BLNK** (B-cell Linker protein). Η SLP-65 είναι το κύριο υπόστρωμα της Syk. Στις φωσφορυλιωμένες Tyr της BLNK στρατολογείται και η PLCγ2, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή της από την Btk. Η SLP-65/BLNK αποτελείται από ένα NH₂-τελικό μοτίβο φερμουάρ λευκίνης (LZ) ακολουθούμενο από



Εικόνα 9.41

Ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μέσω ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν από τους BcRs. Μετά την ενεργοποίηση του BcR από το αντιγόνο, οι κινάσες Lyn και Syk ξεκινούν έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που έχει ως αποτέλεσμα: α. την ενεργοποίηση της Rac-GTP που οδηγεί στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, β. την ενεργοποίηση της PLCγ2, η οποία μέσω της παραγωγής IP₃ και DAG οδηγεί στην αύξηση του Ca²⁺ και την ενεργοποίηση του NFAT, και στην ενεργοποίηση της κινάσης PKCβ2. Η PKCβ2 φωσφορυλιώνει τον RasGEF GRP3 (ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι Ras-GTP / Raf-MEK-ERK που επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1) και τις πρωτεΐνες CARMA1 και TAK (που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ). γ. Η PI3K ενεργοποιείται μέσω της πρόσδεσής της στη φωσφορυλιωμένη από τη Syk CD19 και παράγει PIP₃, στα οποία συνδέεται η κινάση Akt/PKB. Η Akt, αναστέλλοντας την κινάση GSK-3, επιτρέπει την ενεργοποίηση του NFAT, ενώ ενεργοποιώντας το σύμπλοκο mTOR, οδηγεί στην αναστολή της απόπτωσης και στην επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων. [56] [72] [22]

μία "όξινη" περιοχή, μία πλούσια σε προλίνη περιοχή και μία COOH-τελική περιοχή SH2. Το μοτίβο φερμουάρ λευκίνης επιτρέπει στην SLP-65 να εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη αλληλεπιδρώντας με μεμβρανικές πρωτεΐνες. Αυτό το μοτίβο LZ διακρίνει την SLP-65 από την ομόλογή της SLP-76 (η οποία εκφράζεται στα Τ-λεμφοκύτταρα), η οποία δεν περιέχει αυτό το μοτίβο. Η όξινη περιοχή της SLP-65 περιέχει τουλάχιστον πέντε κατάλοιπα τυροσίνης, ικανά να φωσφορυλιωθούν, τα οποία μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ SLP-65 και PLCγ2, Btk, Vav και Nck. Πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες περιέχουν, επίσης, περιοχές PH και σταθεροποιούνται σε αυτό το σύμπλοκο με αλληλεπίδραση με τα PIP₃. Επίσης, μέσω της SH2 περιοχής η SLP-65 αλληλεπιδρά με την Iga και την κινάση MAP4K1 ή HPK1 (Hematopoietic Progenitor Kinase 1) (Εικόνα 9.40B και 9.40Γ)

Η Btk διευκολύνει τον μεταβολισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων μέσω της αλληλεπίδρασής της με την κινάση PIP5K. Επίσης, η Btk φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση PKCβ2, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την Btk και μειώνει τη δραστηριότητά της. Αυτός ο βρόχος αρνητικής ανάδρασης εμπλέκεται στη διατήρηση της δυναμικής ομοιόστασης της δραστηριότητας της Btk.

Ο ρόλος της PKCβ2 στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων

Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ που επάγεται μετά την ενεργοποίηση του BcR προκαλείται από την ενεργοποιημένη PLCγ2, η οποία μετατρέπει τα PIP₂ σε IP₃ και DAG. Η IP₃ προωθεί την απελευθέρωση Ca²⁺ από το ΕΔ, γεγονός που με τη σειρά του προκαλεί εισροή Ca²⁺ μέσω του ανοίγματος καναλιών CRAC (βλ. σελ. 204 και Εικόνα 4.87). Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ επάγει, μέσω της φωσφατάσης καλσινευρίνης, την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT και τη μετακίνησή του στον πυρήνα. Η αύξηση του Ca²⁺ σε συνδυασμό με την παραγωγή DAG ενεργοποιούν την κινάση PKCβ2, η οποία φωσφορυλιώνει τον RasGEF GRP3 (ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι Ras-GTP / Raf1-MEK1-ERK1, που επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP-1) και τις πρωτεΐνες CARMA1 και TAK1 (ο οποίος οδηγούν στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κβ) (Εικόνα 9.41).

Ο ρόλος της PKB/Akt στην ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων

Η PI3K ενεργοποιείται μέσω της πρόσδεσής της στις φωσφορυλιωμένες, από τις κινάσες Lyn και Syk, τυροσίνες της CD19. Ως αποτέλεσμα φωσφορυλιώνονται τα PIP₂ σε PIP₃. Μία από τις χαρακτηριστικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες, που συνδέονται στα PIP₃, μέσω της PH περιοχής τους, είναι η κινάση PKB/Akt. Η Akt αναστέλλοντας την κινάση GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) επιτρέπει την ενεργοποίηση του NFAT, ενώ ενεργοποιώντας το σύμπλοκο mTOR, οδηγεί στην αναστολή της απόπτωσης και στην επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων.

Ως αποτέλεσμα όλων αυτών των γεγονότων, 12 περίπου ώρες μετά τη σύνδεση του αντιγόνου, τα Β-λεμφοκύτταρα εμφανίζονται μεγαλύτερα και με αυξημένη ποσότητα RNA, γεγονός ενδεικτικό της εισόδου τους από τη φάση G0 στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Στην κατάσταση αυτή τα Β-λεμφοκύτταρα εκφράζουν αυξημένο αριθμό μορίων MHC-II, μεμβρανικών υποδοχέων για τις κυτοκίνες που παράγονται από τα T_H λεμφοκύτταρα και διαφόρων άλλων συνδιεγερτικών μορίων.

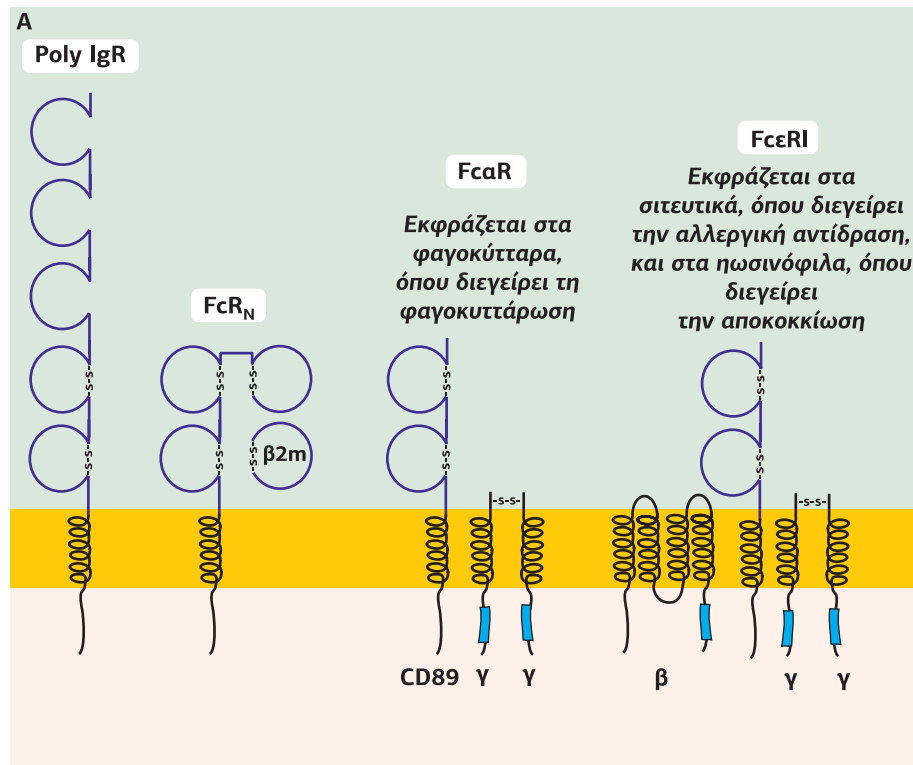
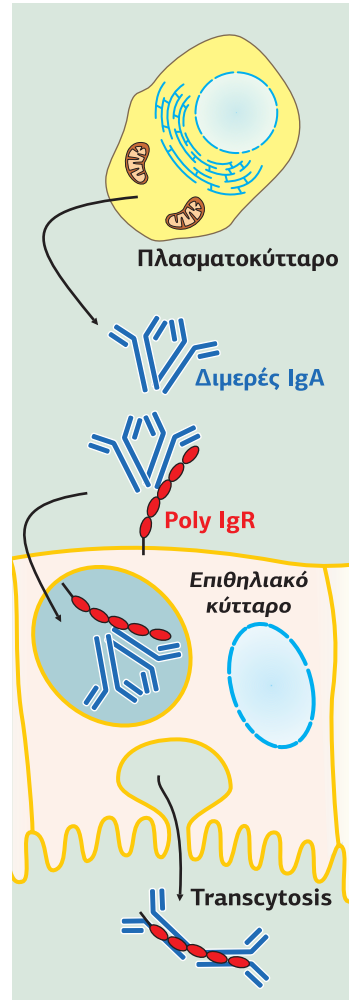
Η **HPK1** (Hematopoietic Progenitor Kinase 1) φωσφορυλιώνει την Thr152 της ενεργοποιημένης SLP-65 οδηγώντας είτε στην απόσυρσή της, μέσω της σύνδεσής με τις πρωτεΐνες 14-3-3, είτε στην ουβικουτίνωση και πρωτεόλυσή της. Κατά συνέπεια, η HPK1 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του BcR. Επίσης, η κινάση HPK1 ή **MAP4K1** ανήκει στην οικογένεια των MAP4Ks, η οποία περιέχει ακόμη 5 μέλη (MAP4K2/GCK, MAP4K3/GLK, MAP4K4/HGK, MAP4K5/GCKR, MAP4K6/MINK). Η HPK1 ενεργοποιεί το μονοπάτι της JNK μέσω των MAP3Ks (MEKK1, TAK1, MLK3) και των MAP2Ks (MKK4, MKK7).

2.4 | Οι υποδοχείς FcRs

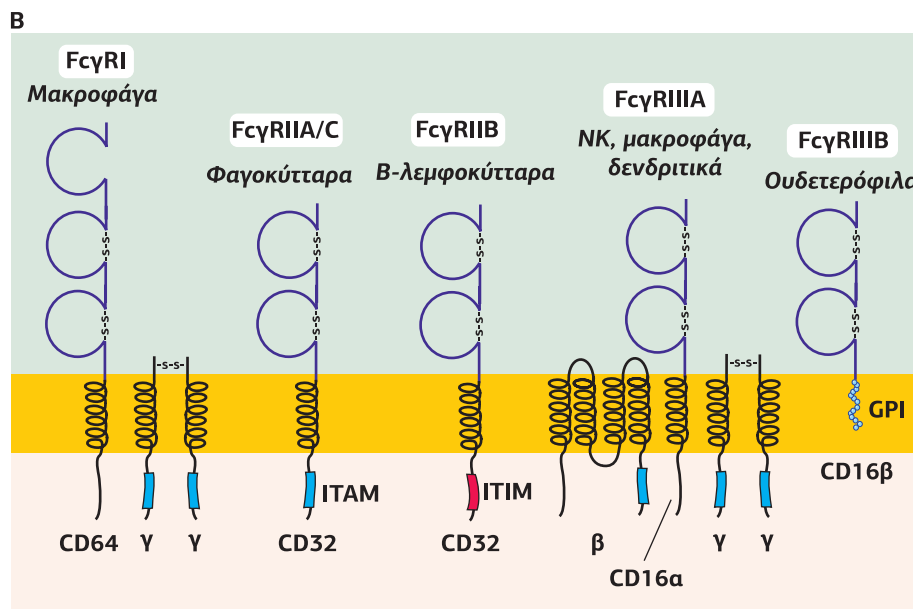
Τα αντισώματα αποτελούν σημαντική γέφυρα μεταξύ της εξειδίκευσης του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος (επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία) και των εξαιρετικά καταστρεπτικών μηχανισμών των κυττάρων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αντισώματα, μέσω της NH₂-τελικής περιοχής Fab, συνδέονται με μικροοργανισμούς και μέσω της COOH-τελικής περιοχής Fc με τους υποδοχείς FcRs που βρίσκονται στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Οι υποδοχείς

FcRs εκφράζονται κυρίως στα κύτταρα NK (Natural Killer cells), στα κοκκιόκυτταρα, στα μακροφάγα και στα σιτευτικά. Η σύνδεση των FcRs με τα αντισώματα διεγείρει την κυτταροκτόνο δράση αυτών των κυττάρων. Κατά συνέπεια, το συνδεδεμένο με το αντίσωμα παθογόνο δεσμεύεται μέσω της Fc περιοχής του αντισώματος στην επιφάνεια του κυττάρου, το οποίο εν τέλει καταστρέφει τον εισβολέα.

Οι υποδοχείς **FcγRs**, που είναι οι πλέον άφθονοι, αναγνωρίζουν αντισώματα τύπου IgG, οι υποδοχείς **FcaRs** εξειδικεύονται στα IgA και οι **FceRs** αλληλεπιδρούν με τα IgE. Οι υποδοχείς FcaRs και FcγRs εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων, όπου διεγείρουν τη φαγοκυττάρωση και την απελευθέρωση αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως ROS. Αντιθέτως, οι υποδοχείς FceRs περιορίζονται στα σιτευτικά καθώς και στα βασεόφιλα και ηωσινόφιλα κοκκιόκυτταρα.



Εικόνα 9.42
Οικογένεια των υποδοχέων FcRs. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί FcRs. Ο poly-Ig υποδοχέας είναι απαραίτητος για τη μεταφορά των πολυμερών ανοσοσφαιρινών διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων (transcytosis). Στον άνθρωπο ο FcR νεογνών (FcR_N) μεταφέρει τις IgG από τη μητέρα στο έμβryo κατά τη διάρκεια της κύησης. Οι FcRs έχουν περιγραφεί για όλες τις τάξεις των ανοσοσφαιρινών: οι FceRs συνδέουν τις IgE, οι FcaRs συνδέουν τις IgA, οι FcμRs συνδέουν τις IgM και η μεγαλύτερη υποοικογένεια, οι FcγRs (FcγRI, FcγR-II), συνδέουν τις IgG.



Οι υποδοχείς των σιτευτικών αποκρίνονται σε συμπλέγματα αντισωμάτων IgE με αλλεργιογόνα. Επιστρατεύοντας κι ενεργοποιώντας κινάσες τυροσίνης, όπως οι Lyn και Syk, διεγείρουν την αποκοκκίωση των εξωκυτταρικών κυστιδίων, τα οποία απελευθερώνουν ισταμίνη και άλλους παράγοντες, προκαλώντας έτσι αλλεργική αντίδραση. Οι υποδοχείς των ηωσινόφιλων κοκκιόκυττάρων αναγνωρίζουν μεγάλα παράσιτα, όπως οι σκώληκες, καλυμμένα με αντισώματα IgE, και πυροδοτούν την απελευθέρωση ενζύμων όπως οι υπεροξειδάσες και άλλους παράγοντες, τοξικούς για τον εισβολέα. Από τη στιγμή που και η φαγοκυττάρωση και η αποκοκκίωση των κυστιδίων απαιτούν μια αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, το μονοπάτι της φωσφολιπίσης Cγ, IP₃, Ca²⁺ που ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης, καταλαμβάνει κεντρική θέση στη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων FcRs.

Δομή των FcγRs

Οι υποδοχείς FcγRs είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών, μέρος της υπεροικογένειας IgG. Αποτελούνται από μια α-υπομονάδα σύνδεσης της IgG, η οποία συνήθως δημιουργεί σύμπλοκα με γ βοηθητικές αλυσίδες, οι οποίες είναι σημαντικές για τη σηματοδότηση. Κάθε γ αλυσίδα (επίσης ονομαζόμενη αλυσίδα Fcγ) περιέχει κατάλοιπα τυροσίνης που φωσφορυλιώνονται κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα και γίνονται θέσεις πρόσδεσης για άλλα μόρια σηματοδότησης. Αυτά τα κατάλοιπα τυροσίνης βρίσκονται μέσα σε μοτίβα ITAM.

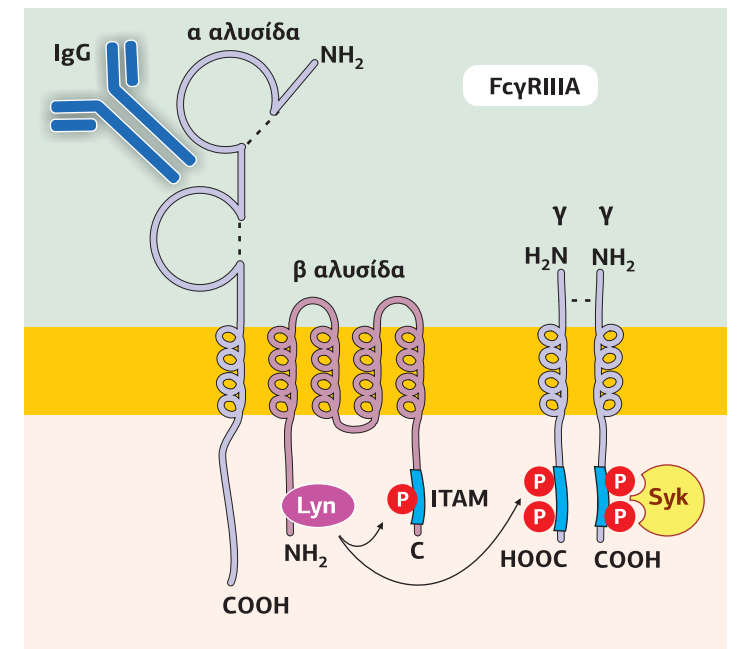
Οι FcγRs κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και διαφέρουν στη συγγένεια για την IgG, στη μοριακή δομή και στην κυτταρική κατανομή. Στον άνθρωπο ταυτοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες FcγRs: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) και FcγRIII (CD16).

Ο **FcγRI** αποτελείται από μια α-υπομονάδα, με τρεις εξωκυτταρικές περιοχές Ig-like, η οποία δεσμεύει μονομερή IgG, και από δύο γ-υπομονάδες, υπεύθυνες για τη μεταφορά του μηνύματος. Ο FcγRI εκφράζεται σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και διεγείρομενα από ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) ουδετερόφιλα.

Οι **FcγRII** αποτελούνται μόνο από μια α-υπομονάδα, με δύο εξωκυτταρικές περιοχές Ig-like, η οποία συνδέει πολυμερή ανοσοσυμπλέγματα. Δεν περιέχουν συμπληρωματικές αλυσίδες Fcγ. Υπάρχουν αρκετές ισομορφές του FcγRII, οι οποίες κατανέμονται διαφορετικά στα αιμοποιητικά κύτταρα. Οι ισομορφές FcγRIIA και FcγRIIC βρίσκονται κυρίως σε φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) και περιέχουν ένα μοτίβο ITAM στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα, ενώ η ισομορφή FcγRIIB εκφράζεται κυρίως σε Β-λεμφοκύτταρα και περιέχει ένα μοτίβο ITIM που εμπλέκεται σε αρνητική σηματοδότηση. Η έκφραση της FcγRIIB επάγεται στα φαγοκύτταρα, για την αρνητική ρύθμιση της φαγοκυττάρωσης.

Οι **FcγRIII** συναντώνται σε δύο ισομορφές. Η ισομορφή **FcγRIIIA**, η οποία εκφράζεται σε μακροφάγα, κύτταρα NK και δενδριτικά. Αποτελείται από μια α-υπομονάδα που περιέχει μια εξωκυτταρική περιοχή με δύο Ig-like περιοχές, στην οποία συνδέεται το αντιγόνο IgG, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική ουρά. Η α-υπομονάδα συνδέεται με μια β-αλυσίδα με 4 διαμεμβρανικές περιοχές, με το NH₂-τελικό και COOH-τελικό άκρο στο κυτταρόπλασμα, και με δύο γ-διαμεμβρανικές αλυσίδες με μοτίβα ITAM στην κυτταροπλασματική τους περιοχή (**Εικόνα 9.43**). Η ισομορφή **FcγRIIIB** εκφράζεται αποκλειστικά σε ουδετερόφιλα και είναι ένας υποδοχέας

Εικόνα 9.43
Δομή του υποδοχέα FcγRIIIA. Ο FcγRIIIA αποτελείται από μια α-υπομονάδα που περιέχει μια εξωκυτταρική περιοχή με δύο Ig-like περιοχές, όπου συνδέεται το αντιγόνο IgG, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική ουρά. Η α-υπομονάδα συνδέεται με ένα διμερές γ αλυσίδων και μια επιπλέον β υπομονάδα. Οι β και γ αλυσίδες περιέχουν μοτίβα ITAM στην COOH-τελική κυτταροπλασματική τους περιοχή.



Εικόνα 9.44

Σηματοδότηση μέσω FcγRs.
 Ο FcγRIIIA συνδέεται μέσω της ανοσοσφαιρίνης IgG στο αντιγόνο και επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης Lyn στις λιπιδικές σχεδίες. Η Lyn φωσφορυλιώνει τις Tyr των ITAM. Στη συνέχεια, η κινάση Syk συνδέεται στις pTyr, ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει ένζυμο όπως η PI3K, η PLCγ και τα μόρια προσαρμογής SLP-76 και LAT. Η PI3K παράγει PIP₃, τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση της Akt και της ERK. Η PLCγ παράγει IP₃ και DAG. Αυτοί οι δεύτεροι αγγελιοφόροι προκαλούν αφενός απελευθέρωση Ca²⁺ από το ενδοπλασματικό δίκτυο και αφετέρου την ενεργοποίηση της PKC. Η PKC οδηγεί στην ενεργοποίηση της ERK. Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Van ενεργοποιεί τις GTPάσες της οικογένειας Rho και Rac, οι οποίες εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Άλλα ένζυμα, όπως η κινάση Btk ενεργοποιούν επίσης την GTPάση Rac-GTP.

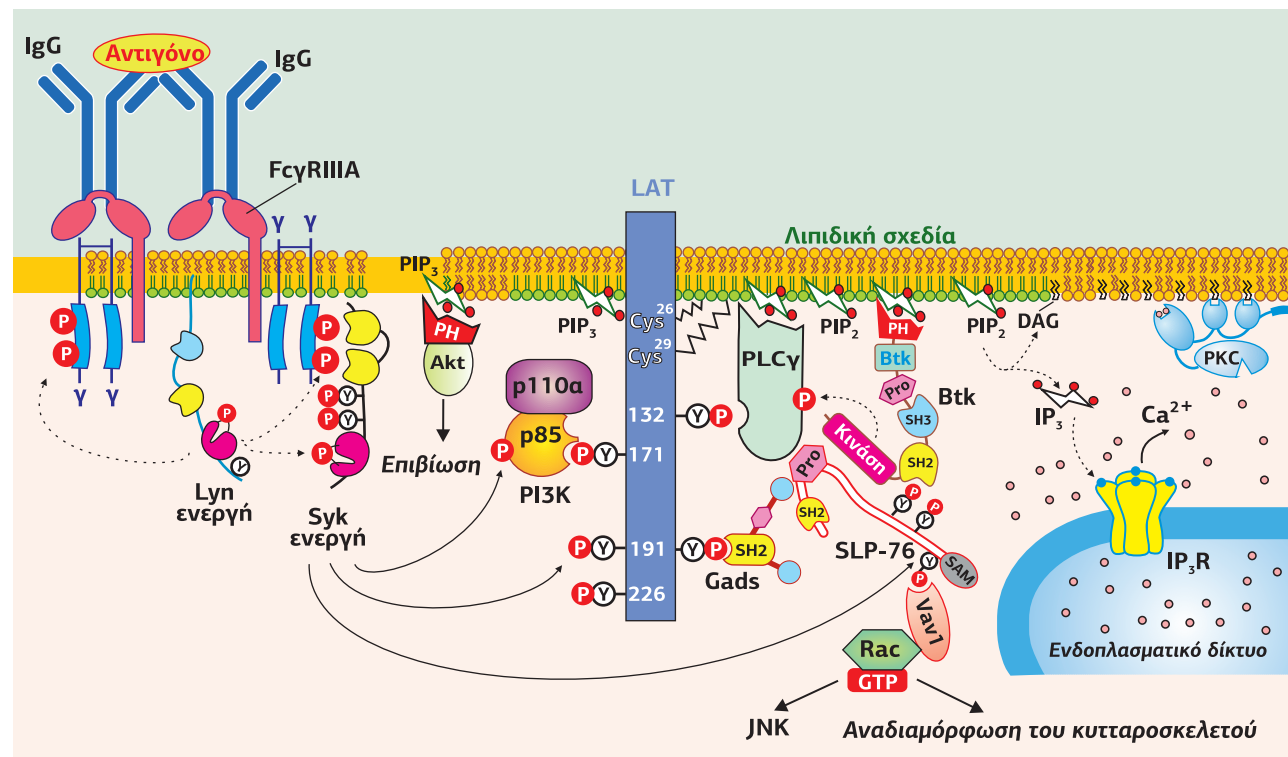
με μια εξωκυτταρική περιοχή που συνδέεται στη μεμβράνη με μια άγκυρα GPI, και ο οποίος στερείται κυτταροπλασματικής ουράς. Δεν είναι γνωστό αν άλλες υπομονάδες συσχετίζονται με αυτόν και ο μηχανισμός σηματοδότησης παραμένει άγνωστος. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι οι FcγRIIA και FcγRIIIB συναντώνται αποκλειστικά στον άνθρωπο και δεν απαντώνται σε άλλα είδη.

Σηματοδότηση των υποδοχών FcγRs

Η σύνδεση των υποδοχών FcγRs με τους προσδέτες τους, τα αντισώματα IgG, ενεργοποιεί διάφορες λειτουργίες σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όλοι οι υποδοχείς περιέχουν μοτίβα ITAM που εμπλέκονται στη σηματοδότηση. Ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης δεν είναι εντελώς σαφής, αλλά στα αρχικά γεγονότα συμμετέχει η ενεργοποίηση κινασών της οικογένειας Src (κυρίως της Lyn) που ακολουθείται από την ενεργοποίηση κινασών της οικογένειας Syk. Το μοντέλο για τα αρχικά στάδια ενεργοποίησης της σηματοδότησης των FcγRs έχει ως ακολούθως:

Κατά τη σύνδεση με τον προσδέτη ο υποδοχέας συναντάται στις λιπιδικές σχεδίες. Οι λιπιδικές σχεδίες είναι μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Εκεί, ο υποδοχέας συν-εντοπίζεται με κινάσες τύπου Src, κυρίως την Lyn, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τυροσίνες των ITAM. Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες γίνονται τότε θέσεις σύνδεσης για την κινάση **Syk**, η οποία φωσφορυλιώνει πολλαπλά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων των PI3K, PLCγ, SLP-76 και LAT. Στη συνέχεια, αυτά τα μόρια οργανώνουν και ενεργοποιούν διάφορες οδούς σηματοδότησης, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, οδηγώντας σε συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις και σε μεταγραφικές μεταβολές (**Εικόνα 9.44**).

Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη προσαρμογής SLP-76 είναι σημαντική για τη σηματοδότηση FcγRs στα ουδετερόφιλα, ενώ δεν φαίνεται να είναι απαραίτητη σε μακροφάγα και NK κύτταρα. Η LAT είναι μια άλλη πρωτεΐνη προσαρμογής που είναι σημαντική για την αποτελεσματική φαγοκυττάρωση σε μακροφάγα. Είναι σαφές ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την αναγνώριση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης προσαρμογής που χρησιμοποιείται από κάθε τύπο FcR στα διάφορα λευκοκύτταρα και για τη σύνδεση αυτού με μια μοναδική κυτταρική απόκριση.

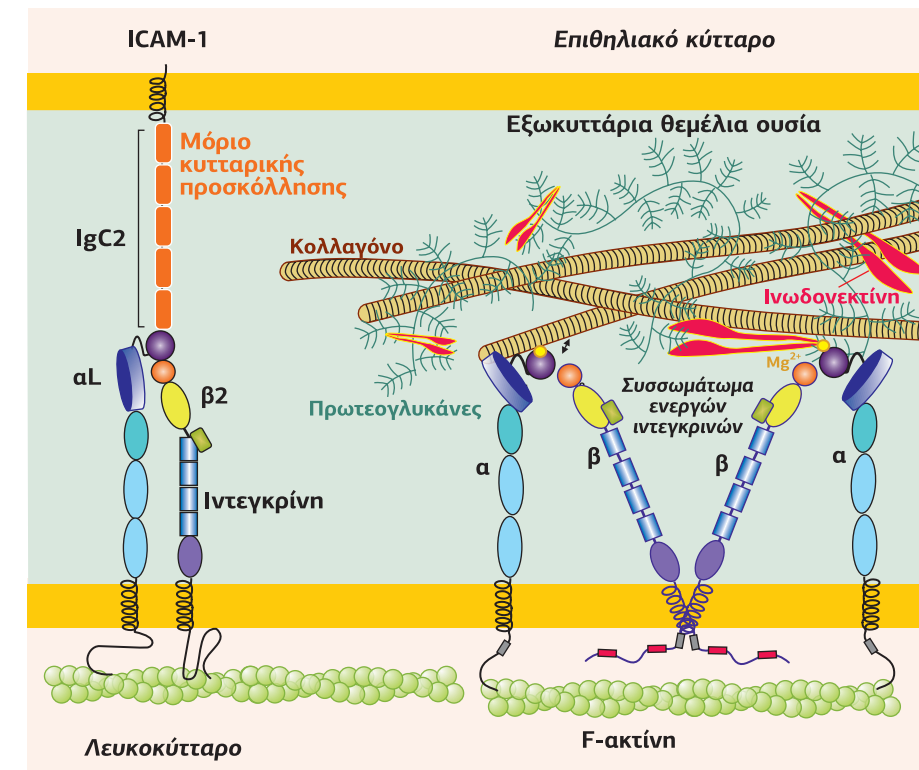


Ο ανασταλτικός FcγRIIIB είναι ο αρνητικός υποδοχέας που περιέχει ένα μοτίβο ITIM στην κυτταροπλασματική ουρά του αντί για μια ακολουθία ITAM. Περιγράφηκε πρώτα στα Β-λεμφοκύτταρα, όπου ρυθμίζει τα σήματα ενεργοποίησης από τον υποδοχέα BcR για την αναστολή της παραγωγής αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς ενεργοποίησης που εμπλέκουν αρκετές κινάσες, αυτός ο ανασταλτικός υποδοχέας σηματοδοτείται με ενεργοποίηση των φωσφατάσων. Η SHIP1 είναι το κύριο ένζυμο που ενεργοποιείται κατά τη διασταύρωση των μονοπατιών FcγRIIIB και BcR. Αυτή η φωσφατάση δεσμεύεται μέσω της SH2 περιοχής της, στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες εντός της αλληλουχίας ITIM του FcγRIIIB. Η SHIP1 μετατρέπει τα PIP₃, το κύριο προϊόν της PI3K, σε PIP₂ εμποδίζοντας έτσι τη διέγερση των βασικών ενζύμων ενεργοποίησης, όπως η Akt, η Btk και η PLCγ.

3. Σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών

Η δομή και η λειτουργία των ιστών στους ανώτερους οργανισμούς εξαρτώνται από την προσκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (ECM, extracellular matrix). Οι αλληλεπιδράσεις προσκόλλησης δεν χρησιμεύουν απλώς για να κρατούν συνδεδεμένα τα κύτταρα σε έναν σχηματισμό, αλλά έχουν και μια ρυθμιστική επίδραση στη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και την ομοιοστάση των ιστών.

Οι **ιντεγκρίνες** είναι υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης που μπορούν να συνδέονται εξειδικευμένα με τα γειτονικά κύτταρα ή με την εξωκυτταρική ουσία, δημιουργώντας μια διαμεμβρανική γέφυρα ανάμεσα σε εξωκυτταρικές δομές και τον ενδοκυτταρικό κυτταροσκελετό (**Εικόνα 9.45**). Οι ιντεγκρίνες (integrins) πήραν το όνομά τους από τον λειτουργικό τους ρόλο να ενσωματώνουν (integrate) τα μηνύματα των επαφών κυττάρου - κυττάρου και κυττάρου - εξωκυτταρικής ουσίας και να τα μετατρέπουν σε ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μηνύματα (Hynes, 1987). Εκφράζονται σε κύτταρα που είναι στατικά, όπως οι ινοβλάστες, αλλά και σε κύτταρα



Εικόνα 9.45
 Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανοειδείς υποδοχείς που λειτουργούν ως μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Αποτελούνται από δύο υπομονάδες, την α και την β αλυσίδα, και έχουν ικανότητα σύνδεσης με πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής ουσίας (ινοδονεκτίνη, κολλαγόνο), με μόρια προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (ICAMs), αλλά και με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (ακτίνη).

ρα που βρίσκονται στην κυκλοφορία, όπως τα λευκοκύτταρα.

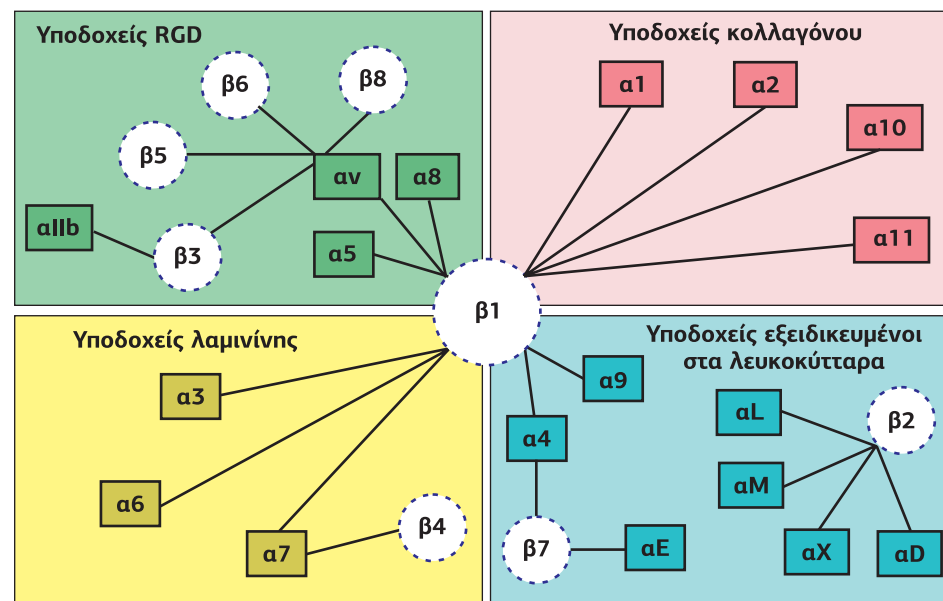
Οι ιντεγκρίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια διαμεμβρανικών ετεροδιμερών γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων που λειτουργούν ως κύρια μόρια κυτταρικής προσκόλλησης μόνο στα μετάρια (κοράλλια, νηματώδεις, εχινόδερμα, έως τα θηλαστικά), τα οποία εμφανίστηκαν πριν από 600 εκατομμύρια χρόνια. Στα πιο αρχαία μετάρια, όπως τα σφουγγάρια, δεν έχουν ανιχνευτεί καδερίνες και η συσσώματωση των κυττάρων του σπόγγου μεσολαβείται από μια εξωκυτταρική θεμέλια ουσία πρωτεογλυκανών. Ο υποδοχέας που δεσμεύεται σε αυτή την ουσία περιέχει το τυπικό μοτίβο RGD, το οποίο δεσμεύουν οι ιντεγκρίνες (βλ. παρακάτω). Κάποια πρώιμα μετάρια ανέπτυξαν ιντεγκρίνες που δεσμεύουν τη λαμινίνη και ιντεγκρίνες που δεσμεύουν το μοτίβο RGD. Στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* εκφράζεται μία υπομονάδα $\beta\text{rat}3$ και δύο υπομονάδες $\alpha\text{ina}1$ και $\alpha\text{pat}2$, οι συνδυασμοί των οποίων σχηματίζουν δύο ιντεγκρίνες. Στη *Drosophila melanogaster* σχηματίζονται πέντε ιντεγκρίνες μέσω συνδυασμού μίας υπομονάδας βPS με πέντε α υπομονάδες (ονομαζόμενες $\alpha\text{PS}1-5$). Με την εξέλιξη των σπονδυλωτών η οικογένεια των ιντεγκρινών έχει επεκταθεί σημαντικά.

Καθώς οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με κινάσες τυροσίνης, οι μονοκύτταροι ευκαρυώτες, μύκητες και φυτά, οι οποίοι δεν εκφράζουν κινάσες τυροσίνης, χρησιμοποιούν άλλους μηχανισμούς κυτταρικής προσκόλλησης.

3.1 Ταξινόμηση των ιντεγκρινών

Οι ιντεγκρίνες συναντώνται ως δύο μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες α και β υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν ετεροδιμερή. Υπάρχουν 18 α - και 8 β -υπομονάδες, οι οποίες συνδυάζονται, για να σχηματίσουν τουλάχιστον 24 διαφορετικά ετεροδιμερή ιντεγκρινών, με διαφορετική εξειδίκευση ως προς τους προσδέτες. Οι ιντεγκρίνες συνδέονται σε γλυκοπρωτεϊνικές εξωκυτταρικές θεμέλιας ουσίας (ECM), που περιλαμβάνουν το κολλαγόνο, την ινωδονεκτίνη, τη λαμινίνη, και σε μόρια προσκόλλησης, όπως το VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) και το ICAM (Intercellular Adhesion Molecule).

Η εξειδίκευση της σύνδεσης των ιντεγκρινών με τα συστατικά της ECM, όπως η λαμινίνη, το κολλαγόνο και η ινωδονεκτίνη, εξαρτάται από τις ισομορφές των α - και β -υπομονάδων. Οι ιντεγκρίνες $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ και $\alpha11\beta1$ αντιπροσωπεύουν τους κύριους υποδοχείς κολλαγόνου, οι ιντεγκρίνες $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ και $\alpha6\beta4$ είναι οι κύριοι υποδοχείς λαμινίνης και οι ιντεγκρίνες $\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$, $\alpha11\beta3$ είναι οι



Εικόνα 9.46
Ταξινόμηση των ιντεγκρινών με βάση την ικανότητα σύνδεσης στους προσδέτες τους.
Οι ιντεγκρίνες εμφανίζουν εξειδίκευση για το κολλαγόνο, τη λαμινίνη, για πρωτεΐνες που περιέχουν το μοτίβο RGD (Arg-Gly-Asp), καθώς επίσης υπάρχουν και ιντεγκρίνες που εκφράζονται αποκλειστικά στα λευκοκύτταρα. Η εξειδίκευση σύνδεσης εξαρτάται από την ισομορφία των α και β υπομονάδων. Διαφορετικές ιντεγκρίνες μπορούν να προσδέσουν τον ίδιο εξωκυτταρικό προσδέτη και η ίδια ιντεγκρίνη μπορεί να συνδέσει διαφορετικούς προσδέτες. Η $\beta1$ -υπομονάδα δημιουργεί διμερή με έντεκα διαφορετικά είδη α -υπομονάδων. Οι α -υπομονάδες μπορούν να συνδυαστούν με ένα μόνο είδος β -υπομονάδας, εκτός από την $\alpha4$, η οποία μπορεί να συνδεθεί με την $\beta1$ ή την $\beta7$, την $\alpha7$ που συνδέεται με την $\beta1$ ή την $\beta4$, και την αv η οποία συνδέεται με τις $\beta3$, $\beta5$, $\beta6$ ή $\beta8$. [21]

κύριοι υποδοχείς ινωδονεκτίνης (**Εικόνα 9.46**). Υπάρχει πλεονασμός σε σχέση με ορισμένες αλληλεπιδράσεις ιντεγκρινών - ECM, καθώς ορισμένες ιντεγκρίνες συνδέουν τους ίδιους εξωκυτταρικούς προσδέτες, αν και με διαφορετική συγγένεια και, αντιστρόφως, μερικοί προσδέτες αναγνωρίζονται από διαφορετικές ιντεγκρίνες. Τα περισσότερα ετεροδιμερή ιντεγκρινών εκφράζονται ευρέως σε πολλούς ιστούς. Ωστόσο, ορισμένες ιντεγκρίνες είναι πιο περιορισμένες στην έκφρασή τους. Για παράδειγμα, η $\alpha11\beta3$ βρίσκεται μόνο στα αιμοπετάλια, η $\alpha6\beta4$ σε κερατινοκύτταρα και οι οικογένειες $\beta2$ ιντεγκρινών περιορίζονται σε λευκοκύτταρα.

3.2 Δομή των ιντεγκρινών

Κάθε υπομονάδα της ετεροδιμερούς $\alpha\beta$ ιντεγκρινών περιέχει μια διαμεμβρανική περιοχή, μια μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή πολλών εκατοντάδων αμινοξέων (που αποτελείται από πολλές δομικές περιοχές) και μια μικρή ενδοκυτταρική περιοχή 20-70 αμινοξέων (με εξαίρεση την $\beta4$).

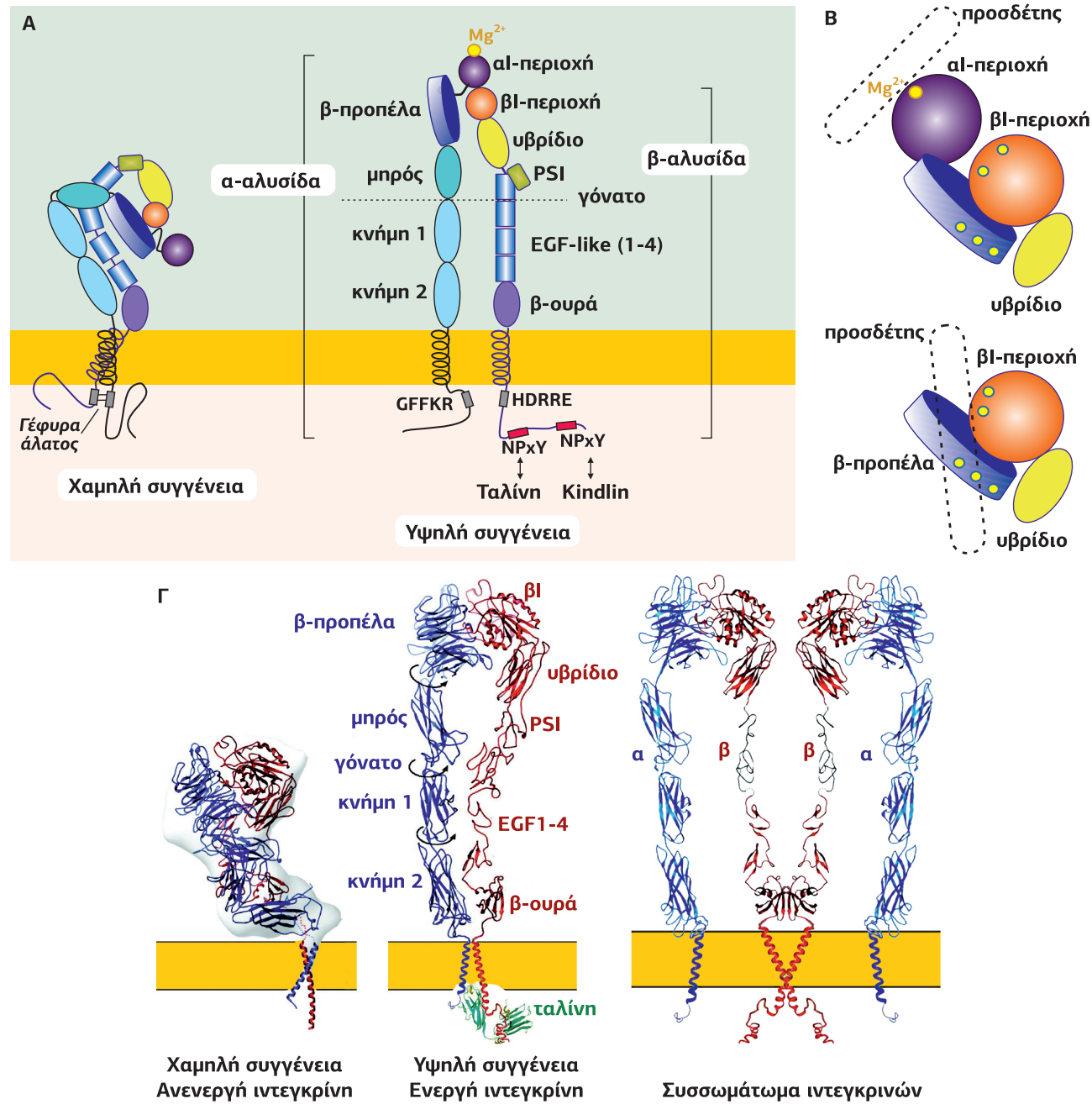
Το μεγάλο **εξωκυτταρικό τμήμα**, 80-150 kDa, είναι οργανωμένο σε μια σφαιρική NH_2 -τελική κεφαλή, που στέκεται σε δύο μακρά και εκτεταμένα COOH -τελικά σκέλη τα οποία συνδέονται με τις διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές κάθε αντίστοιχης υπομονάδας. Η κεφαλή της α υπομονάδας αποτελείται από μια περιοχή β -προπέλας με αναδιπλωμένες επτά λεπίδες και στηρίζεται σε μία περιοχή μπρού (thigh domain) και δύο περιοχές κνήμης (calf domain). Οι εννέα από τις α υπομονάδες περιέχουν μια πρόσθετη I-περιοχή ~ 200 αμινοξέων που εισάγεται εντός της περιοχής β -προπέλας. Όταν υπάρχει, η αI -περιοχή αντιπροσωπεύει την αποκλειστική εξωκυτταρική θέση σύνδεσης για τους προσδέτες. Η I-περιοχή περιέχει μια διατηρημένη εξαρτώμενη από μέταλλα θέση MIDAS (Metal-Ion-Dependent Adhesive Site), η οποία συνδέει δισθενή μεταλλικά κατιόντα (Mg^{2+}), και παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του πρωτεϊνικού προσδέτη. Η σύνδεση του προσδέτη μεταβάλλει τη συνάρτηση του μεταλλικού ιόντος και μετατοπίζει την I-περιοχή από μια κλειστή κατάσταση ηρεμίας σε μια ανοικτή, ενεργή διαμόρφωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη συγγένεια για τον προσδέτη και προάγει την επακόλουθη ενεργοποίηση ιντεγκρινών. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης είναι ανάλογος με τις μικρές G-πρωτεΐνες, οπότε η υδρόλυση GTP μεταβάλλει τον συντονισμό ενός ιόντος Mg^{2+} και με επακόλουθη αλλαγή διαμόρφωσης.

Η β υπομονάδα αποτελείται από μια I-like περιοχή, η οποία είναι δομικά όμοια με την I-περιοχή της α υπομονάδας, μία περιοχή PSI (Plexin/Semaphorin/Integrin), μία υβριδική περιοχή, τέσσερις επαναλήψεις EGF-like και μία β ουρά κοντά στη μεμβράνη (βTD). Η β υπομονάδα παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του προσδέτη, όταν η α υπομονάδα στερείται της I-περιοχής. Σε αυτήν την περίπτωση, ο προσδέτης συνδέεται σε μία αύλακα στην περιοχή κεφαλής μεταξύ των διεπιφανειών των $\alpha\beta$ υπομονάδων (**Εικόνα 9.47B**).

Οι προσδέτες των ιντεγκρινών είναι συνήθως συστατικά της εξωκυτταρικής ουσίας, όπως η ινωδονεκτίνη και το κολλαγόνο. Είναι γενικά πολυσθενείς ακινητοποιημένοι σε ιώδεις δομές και η σύνδεσή τους οδηγεί σε σταυροσύνδεση και συμπλεγματοποίηση - συσσώματωση (clustering) των ιντεγκρινών. Δηλαδή, η διαμεμβρανική περιοχή της κάθε υπομονάδας (α ή β αλυσίδας) αλληλεπιδρά με την ομοιά της (η α με την α και η β με τη β) σχηματίζοντας ομοτυπικά ολιγομερή. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην ενεργοποίηση των υποδοχέων. Εξωκυτταρικοί προσδέτες μπορεί, ωστόσο, να είναι διαλυτές πρωτεΐνες ή επιφανειακές πρωτεΐνες των γειτονικών κυττάρων.

Οι **κυτταροπλασματικές περιοχές** των ιντεγκρινών είναι γενικά μικρές, χωρίς περιοχές αλληλεπίδρασης, και αποτελούνται από 10-70 κατάλοιπα αμινοξέων, με εξαίρεση την υπομονάδα $\beta4$ που περιέχει >1.000 αμινοξέα. Οι συντηρημένες αλληλουχίες GFFKR και HDR(R/K)E που βρίσκονται κοντά στη μεμβράνη των α και β υπομονάδων, αντίστοιχα, σχηματίζουν μία γέφυρα άλατος μεταξύ της αργινίνης (R)

από την α-υπομονάδα και του ασπαρτικού οξέος (D) από την β-υπομονάδα. Η γέφυρα άλατος αντιπροσωπεύει μια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των κυτταροπλασματικών ουρών, που διατηρεί τις ιντεγκρίνες στην ανενεργή κατάσταση χαμηλής συγγένειας (Εικόνα 9.47).

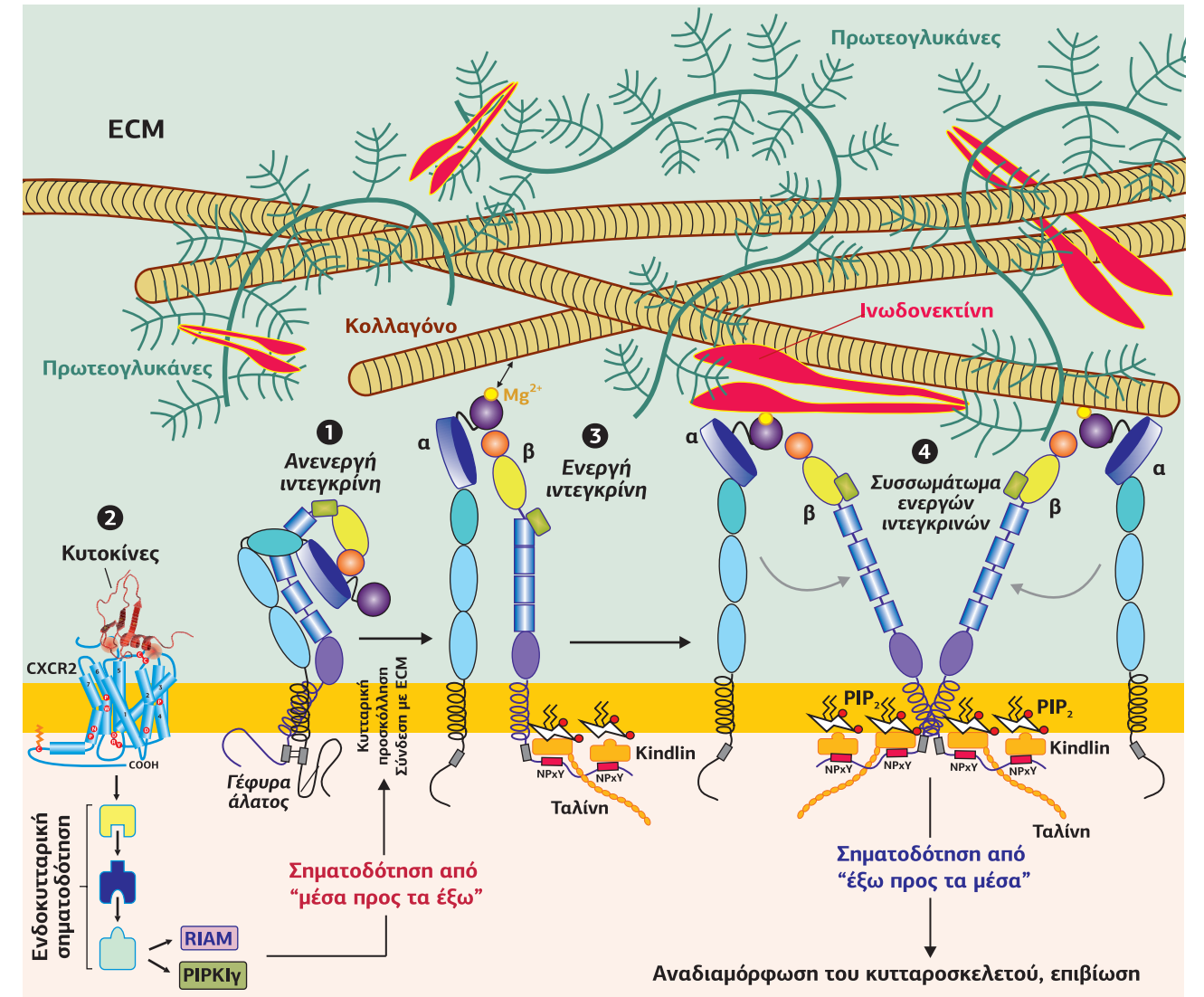


Εικόνα 9.47

Δομή των ιντεγκρινών. Α. Οι ιντεγκρίνες αποτελούνται από δύο αλυσίδες, α και β, οι οποίες περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία περιοχών. Σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται σε κλειστή - ανενεργή διαμόρφωση, χαμηλής συγγένειας για τον εξωκυττάριο προσδέτη, ενώ μετά τη σύνδεση με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η ταλίνη, αποκτούν μια εκτεταμένη διαμόρφωση, υψηλής συγγένειας για τον εξωκυτταρικό τους προσδέτη. Στην εικόνα οι α και β-αλυσίδες περιέχουν I-περιοχές. Β. Διακρίνεται η κεφαλή μιας αβ ιντεγκρίνης και η θέση σύνδεσης του προσδέτη. Όταν υπάρχει η αI-περιοχή, τότε αποτελεί την αποκλειστική εξωκυτταρική θέση σύνδεσης για τους προσδέτες, καθώς περιέχει μια διατηρημένη εξαρτώμενη από μέταλλα θέση MIDAS. Απουσία της αI-περιοχής, ο προσδέτης συνδέεται σε μία αύλακα στην περιοχή κεφαλής μεταξύ των διεπιφανειών των αβ υπομονάδων. Γ. Κρυσταλλική δομή της ανενεργής και της ενεργής διαμόρφωσης της ιντεγκρίνης, καθώς και του συσσωματώματος ιντεγκρινών, που δημιουργείται μετά τη σύνδεση του προσδέτη (πρωτεΐνη της εξωκυττάριας ουσίας). Στην τρίτη περίπτωση, οι ιντεγκρίνες σταυροσυνδέονται και δημιουργούν συμπλέγματα, στα οποία οι α αλυσίδες αλληλεπιδρούν με τις γειτονικές α και οι β με τις β. [57]

3.3 Σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω: Διαμόρφωση υψηλής συγγένειας για τον προσδέτη

Οι ιντεγκρίνες είναι υποδοχείς. Επομένως, ο όρος “υποδοχείς ιντεγκρινών” είναι παραπλανητικός, γιατί υπαινίσσεται ότι οι ιντεγκρίνες είναι προσδέτες αυτών των υποδοχέων. Στην πραγματικότητα, οι προσδέτες των ιντεγκρινών είναι πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως το κολλαγόνο, η ινωδονεκτίνη, η βιτρο-



Εικόνα 9.48

Μοντέλο ενεργοποίησης των ιντεγκρινών. Σηματοδότηση από “μέσα προς τα έξω” και από “έξω προς τα μέσα”.

1. Η ιντεγκρίνη στην ανενεργή κατάσταση είναι σε κάμψη, καθώς οι διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές περιοχές της α- και β-αλυσίδας συνδέονται στενά μεταξύ τους. Η ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ενδοκυτταρικών περιοχών εμποδίζει τη σύνδεση του προσδέτη. 2. Εξωκυττάρια σήματα, όπως οι κυτοκίνες, μέσω των GPCRs υποδοχέων τους, ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών, όπως η ταλίνη και η kindlin, οι οποίες στρατολογούνται στη μεμβράνη κοντά στις ιντεγκρίνες και επάγουν την κυτταρική προσκόλληση ή τη σύνδεση με την ECM. 3. Η σύνδεση της ταλίνης και της kindlin στη β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης οδηγεί στην απομάκρυνση των κυτταροπλασματικών και διαμεμβρανικών περιοχών των αβ υπομονάδων και στην εκτεταμένη διαμόρφωση των εξωκυτταρικών τους περιοχών. Η σύνδεση του εξωκυτταρικού προσδέτη μπορεί να συμβεί σε αυτή τη διαμόρφωση. 4. Όταν οι ενεργοποιημένες ιντεγκρίνες συνδέονται με τον εξωκυττάριο προσδέτη, συσσωρεύονται στην πλασματική μεμβράνη. Η συσσωμάτωση είναι απαραίτητη για την αποστολή ενδοκυτταρικών σημάτων, ώστε να σχηματιστούν στενές θέσεις εστιακής προσκόλλησης, σημαντικές για την κυτταροσκελετική συσσώρευση ακτίνης και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών (σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα).

νεκτίνη και η λαμινίνη, πρωτεΐνες του καταράκτη της πήξης του αίματος, όπως το ινωδογόνο και ο παράγοντας von-Willebrand, καθώς και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs, Cell Adhesion Molecules) των οικογενειών Ig-CAM και ADAM, που εκτίθενται από γειτονικά κύτταρα (κυρίως επιθηλιακά) και αλληλεπιδρούν με τις ιντεγκρίνες με παρακρινή τρόπο.

Οι περισσότερες ιντεγκρίνες συνδέονται με τους προσδέτες τους μόνο όταν παραστεί ανάγκη, παραμένοντας σε κατάσταση ηρεμίας μέχρι να δεχθούν ένα εισερχόμενο σήμα. Στην κατάσταση ηρεμίας η εξωκυτταρική περιοχή της ιντεγκρίνης δεν μπορεί να συνδεθεί με τους προσδέτες, καθώς βρίσκεται σε κάμψη εμφανίζοντας χαμηλή συγγένεια. Τα σήματα ενεργοποίησης προέρχονται αρχικά από το εσωτερικό του κυττάρου και γι' αυτό η σηματοδότηση αυτού του είδους ονομάζεται **“σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω”** (inside-out). Η σύνδεση της κυτταροπλασματικής περιοχής της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού προκαλεί το ίσιωμα της εξωκυτταρικής περιοχής και σταθεροποιεί την εκτεταμένη, ενεργή διαμόρφωση. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης εκθέτει την εξωτερική θέση σύνδεσης, στην οποία συνδέονται οι προσδέτες, επιτρέποντας τη μετάδοση του σήματος από το εξωτερικό προς το εσωτερικό, δηλαδή τη **“σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα”** (outside-in).

Το κλειδί για την κατανόηση της εκ των έσω ενεργοποίησης των ιντεγκρινών είναι η δομή της κυτταροπλασματικής περιοχής της α-υπομονάδας. Η ισχυρή αλληλεπίδραση της α- με τη β-υπομονάδα διατηρεί την ιντεγκρίνη σε μια ανενεργή διαμόρφωση, η οποία χαρακτηρίζεται από την κάμψη των εξωκυτταρικών περιοχών των δύο αλυσίδων, εμποδίζοντας την πρόσβαση του εξωκυτταρικού προσδέτη. Η αναστολή αυτή υπερνικάται από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την κυτταροπλασματική περιοχή κυρίως της β-υπομονάδας. Αυτές οι πρωτεΐνες-ενεργοποιητές των ιντεγκρινών είναι στόχοι ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, γίνονται δηλαδή ενεργές έπειτα από μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορύλιωση (ή η αποφωσφορύλιωση), η μερική πρωτεόλυση, ή με τη σύνδεση δεύτερων διαβιβαστών, όπως τα φωσφοϊνοσιτίδια. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτές οι σηματοδοτικές αντιδράσεις έχουν ως αποτέλεσμα την έκθεση μιας περιοχής PTB μέσω της οποίας η ρυθμιστική πρωτεΐνη προσδέεται στη β-υπομονάδα της ιντεγκρίνης, εκτοπίζοντας την ανασταλτική α-υπομονάδα.

Περίπου 40 κυτταροσκελετικές και σηματοδοτικές πρωτεΐνες συνδέονται με τις κυτταροπλασματικές ουρές των ιντεγκρινών, αλλά έχει αποδειχθεί ότι μόνο δύο πρωτεΐνες, η ταλίνη (talin) και η kindlin, οι οποίες συνδέονται με την κυτταροπλασματική ουρά της β-υπομονάδας, είναι σημαντικές για τον διαχωρισμό των κυτταροπλασματικών ουρών και την επακόλουθη ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Το μοτίβο NPXY, που βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη, απαιτείται για τη σύνδεση της ταλίνης και το απομακρυσμένο από τη μεμβράνη μοτίβο NPXY απαιτείται για τη σύνδεση της kindlin.

Η ταλίνη

Η **ταλίνη** (talin) ανακαλύφθηκε το 1983 ως μια πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Υπάρχουν δύο ισομορφές της ταλίνης στα θηλαστικά: η ταλίνη-1, η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, και η ταλίνη-2, η οποία εκφράζεται στην καρδιά. Οι ταλίνες είναι μεγάλες πρωτεΐνες 270 kDa, 2.541 αμινοξέων, που αποτελούνται από μία NH₂-τελική περιοχή κεφαλής (1-433 αα, 50 kDa) και από μία μεγάλη περιοχή ράβδου-ουράς (482-2.541 αα, 220 kDa).

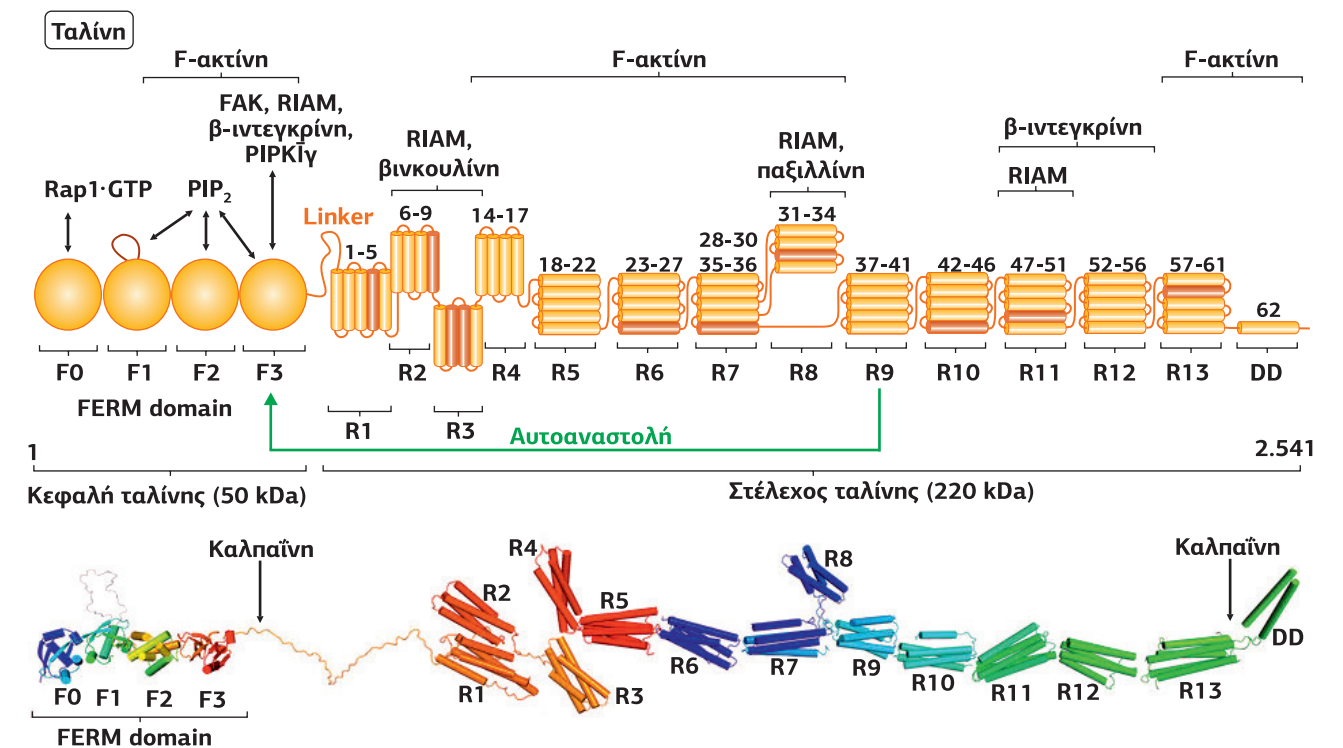
Η **περιοχή κεφαλής** αποτελείται από μια άτυπη περιοχή FERM (Four-point-one-protein - 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin), που περιέχει εκτός από τις τρεις χαρακτηριστικές υποπεριοχές (F1, F2, F3) -οι οποίες συνδέονται με την κυτταροπλασματική περιοχή των ιντεγκρινών καθώς και με φωσφολιπίδια της μεμβράνης- και μία τέταρτη περιοχή FO, η οποία συνδέεται με την GTPάση Rap1-GTP. Η υποπεριοχή F3 της ταλίνης (μια περιοχή sandwich με δύο ορθογώνια αντιπαράλληλα β-φύλλα,

που ακολουθούνται από μια α-έλικα), μοιάζει με την περιοχή PTB και συνδέεται στο μοτίβο NPXY, που βρίσκεται κοντά στη μεμβράνη της κυτταροπλασματικής περιοχής της β ιντεγκρίνης, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση της γέφυρας άλατος. Το καθαρό αποτέλεσμα είναι ο επαναπροσανατολισμός των ουρών της ιντεγκρίνης. Αυτά τα γεγονότα έχουν ως αποτέλεσμα την επαναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής περιοχής, οδηγώντας σε αυξημένη συγγένεια προς τον προσδέτη και ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης. Η F3 συνδέεται, επίσης, με τις κινάσες PIPK1γ και FAK και αποτελεί πρόσθετη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης RIAM.

Η **περιοχή ουράς** αποτελείται από 62 αμφιπαθείς α-έλικες, που είναι οργανωμένες σε 13 δεσμίδες 4 α-ελίκων ή 5 α-ελίκων (R1-R13). Η τελευταία μεμονωμένη έλικα του COOH-τελικού άκρου της ουράς χαρακτηρίζεται ως περιοχή THATCH (Talin/HIP1R Actin Tethering C-terminal Homology) ή μοτίβο I/LWEQ, χρησιμεύει ως περιοχή διμερισμού DD (Dimerization Domain) και συμμετέχει στην άμεση σύνδεση με την F-ακτίνη. Η ουρά περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τη βινκουλίνη (vinculin), καθώς και μία πρόσθετη θέση πρόσδεσης για την β ιντεγκρίνη (Εικόνα 9.49).

Εικόνα 9.49

Η δομή της ταλίνης. Η NH₂-τελική κεφαλή της ταλίνης περιλαμβάνει μια άτυπη περιοχή FERM, που περιέχει τις περιοχές F0, F1, F2 και F3, και συνδέεται μέσω ενός μη δομημένου linker 80 καταλοίπων στην εύκαμπτη ράβδο. Η ράβδος αποτελείται από 62 α-έλικες (αριθμημένοι κύλινδροι), οι οποίες είναι οργανωμένες σε δεκατρείς δέσμες 4 ή 5 α-ελίκων η καθεμία (R1-R13) και μια μονή ελικοειδή περιοχή διμερισμού (DD) στο COOH-τελικό άκρο. [10] [32]



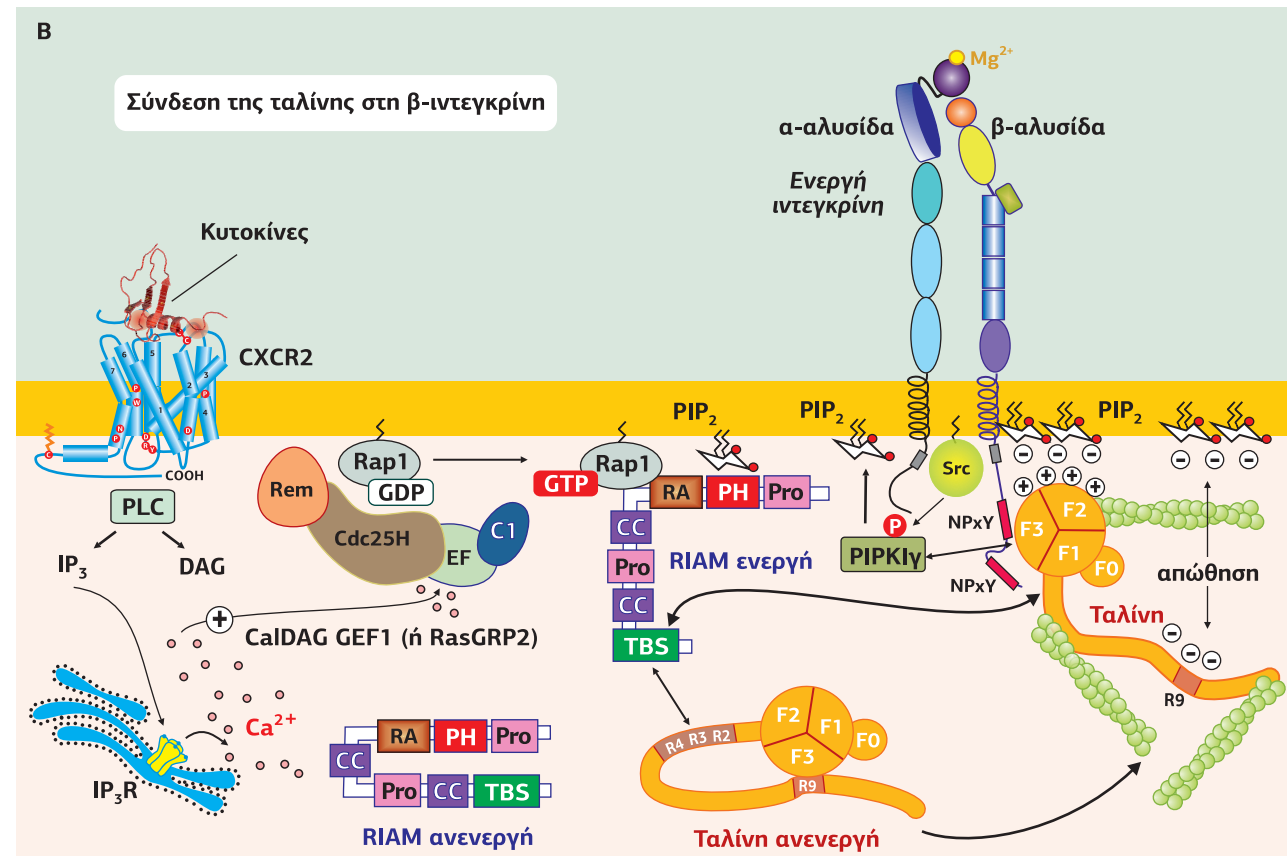
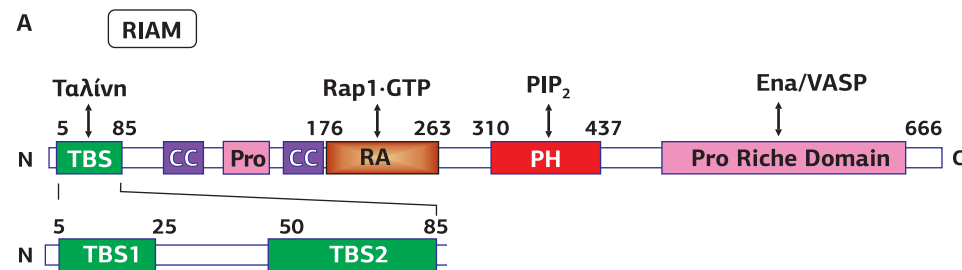
Σε συνθήκες ηρεμίας η ταλίνη βρίσκεται σε κατάσταση αυτοαναστολής στο κυτταρόπλασμα, μη ικανή να συνδέεται με ιντεγκρίνες. Ένα τμήμα του COOH-τελικού άκρου της (R9) βρίσκεται σε ενδομοριακή αλληλεπίδραση με την περιοχή F3, μπλοκάροντας τη θέση σύνδεσης της β-ιντεγκρίνης. Επιπλέον, οι ταλίνες ομοδιμερίζονται και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις καλύπτουν με τη σειρά τους τις θέσεις σύνδεσης ιντεγκρίνης. Μετά τη διέγερση του κυττάρου από έναν αγωνιστή (π.χ. κυτοκίνες ή θρομβίνη) η ταλίνη γρήγορα στρατολογείται στην πλασματική μεμβράνη. Αν και οι μηχανισμοί ενεργοποίησης της ταλίνης είναι ασαφείς, περιλαμβάνουν τους λιπιδικούς δεύτερους διαβιβαστές, όπως η PIP₂. Η ταλίνη συνδέει και ενεργοποιεί την PIPK1γ [PtdIns(4)P 5-Kinase type 1γ], η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή PI(4,5)P₂. Τα PIP₂ αλληλεπιδρούν με την περιοχή F2/F3 της ταλίνης, αίροντας την αυτοαναστολή μέσω ενός ηλεκτροστατικού μηχανισμού “απόθλιψης έλξης”. Η αλληλεπίδραση ταλίνης-ιντεγκρίνης ρυθμίζεται από την Src, καθώς η φωσφορύλιωση της Tyr649 της PIPK1γ αυξάνει τη στρατολόγησή της κοντά στις ιντε-

Εικόνα 9.50
Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της ταλίνης.
Α. Δομή της πρωτεΐνης RIAM. Η RIAM συνδέεται στην ενεργοποιημένη Rap1-GTP, στην ταλίνη, στα PIP₂, καθώς και στην Ena/VASP. Β. Η διέγερση του κυττάρου από μια κυτοκίνη ή τη θρομβίνη ενεργοποιεί υποδοχείς GPCRs. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται το μονοπάτι PLC, IP₃-DAG, αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ και PKC. Η αύξηση του Ca²⁺ ενεργοποιεί τον CalDAG-GEF1, ο οποίος προσελκύεται στη μεμβράνη και συνδέεται μέσω της περιοχής Cdc25H στην GTPάση Rap1-GDP, οδηγώντας στην ανταλλαγή του GDP με GTP. Η Rap1-GTP ενεργοποιεί την πρωτεΐνη RIAM, η οποία συμμετέχει στη μετακίνηση της ταλίνης προς τη μεμβράνη και στη σύνδεσή της με τη β-ιντεγκρίνη. Στη σύνδεση της ταλίνης στη μεμβράνη παίζουν ρόλο και τα φωσφολιπίδια PIP₂, τα οποία παράγονται από την κινάση PIPKIγ. [80] [11] [4] [86]

γκρίνες, και η φωσφορυλίωση της τυροσίνης του μοτίβου NPxY της β-ιντεγκρίνης διευκολύνει την πρόσδεση.

Σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της ταλίνης φαίνεται να παίζουν η GTPάση **Rap1A** και ο τελεστής της, η πρωτεΐνη προσαρμογής **RIAM** (Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule). Η RIAM περιέχει μία περιοχή RA (RalGDS/Arf6 Ras-Association), μία περιοχή PH, δύο μοτίβα coiled-coil (CC), έξι αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Ena/VASP, και δύο θέσεις σύνδεσης της ταλίνης, TBS1 και TBS2 (Talin-Binding Sites). Από τις TBS μόνο η TBS1 είναι ικανή να συνδεθεί με τις περιοχές R2-4 και R8 της ταλίνης και να στρατολογήσει την κυτταροπλασματική ανενεργή ταλίνη στην πλασματική μεμβράνη (**Εικόνα 9.50A**).

Η Rap1 ενεργοποιείται από τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης **CalDAG-GEF1** (ή RasGRP2). Η δραστηριότητα GEF των RasGRPs οφείλεται σε δύο NH₂-τελικές περιοχές, την περιοχή Rem (Ras exchange motif) και την περιοχή Cdc25H. Το COOH-τελικό ρυθμιστικό τμήμα τους περιέχει δύο EF-hand ικανά να δεσμεύουν τα Ca²⁺ και μια περιοχή C1. Στην κατάσταση ηρεμίας ο CalDAG-GEF1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μεταναστεύει στην πλασματική μεμβράνη έπειτα από κυτταρική διέγερση. Ενεργοποιεί εξειδικευμένα την Rap1 και την Rap2, χωρίς να έχει δραστηριότητα στις Ras. Η περιοχή C1 είναι άτυπη και εμφανίζει πολύ χαμηλή συγγένεια για την DAG, ενώ αντίθετα φαίνεται να ενεργοποιείται από το Ca²⁺.



Μετά την ενεργοποίηση της Rap1, η RIAM μετατοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, αλληλεπιδρώντας μέσω της RA περιοχής της με την Rap1-GTP και μέσω της PH περιοχής με τα PI(4,5)P₂ της μεμβράνης. Η RIAM, στη συνέχεια, συνδέεται με την ταλίνη μέσω της περιοχής TBS1 και αίρει τη διαμόρφωση αυτοαναστολής. Η ενεργοποιημένη πλέον ταλίνη συνδέεται στη β-ιντεγκρίνη, επάγοντας τη μετάβασή της από τη διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας για τους εξωκυττάριους προσδέτες σε διαμόρφωση υψηλής συγγένειας (**Εικόνα 9.50B**).

Σε μύγες που έχουν έλλειψη ταλίνης οι ιντεγκρίνες είναι ικανές να συνδεθούν με την εξωκυττάρια ουσία, αλλά δεν είναι σε θέση να συνδεθούν με τον κυτταροσκελετό, με αποτέλεσμα την αποσύνδεση των μυών.

Μετά τη σύνδεση της ταλίνης στις ιντεγκρίνες, πρωτεΐνες, όπως η **βινκουλίνη**, στρατολογούνται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Η βινκουλίνη (vinculin) δεν συνδέεται άμεσα με τις ιντεγκρίνες, αλλά συνδέεται στις περιοχές R2-R4 στην περιοχή ράβδου της ταλίνης και στην ακτίνη, και θεωρείται ότι δρα ως παράγοντας σταυρωτής σύνδεσης που σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση ταλίνης - ακτίνης (βλ. **Εικόνα 9.56**). Οι ινοβλάστες που δεν εκφράζουν βινκουλίνη δημιουργούν λιγότερες και μικρότερες θέσεις εστιακής προσκόλλησης που δεν μπορούν να ωριμάσουν, παρέχοντας στοιχεία ότι η βινκουλίνη απαιτείται για να ενισχυθεί η σύνδεση μεταξύ των ιντεγκρινών και του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

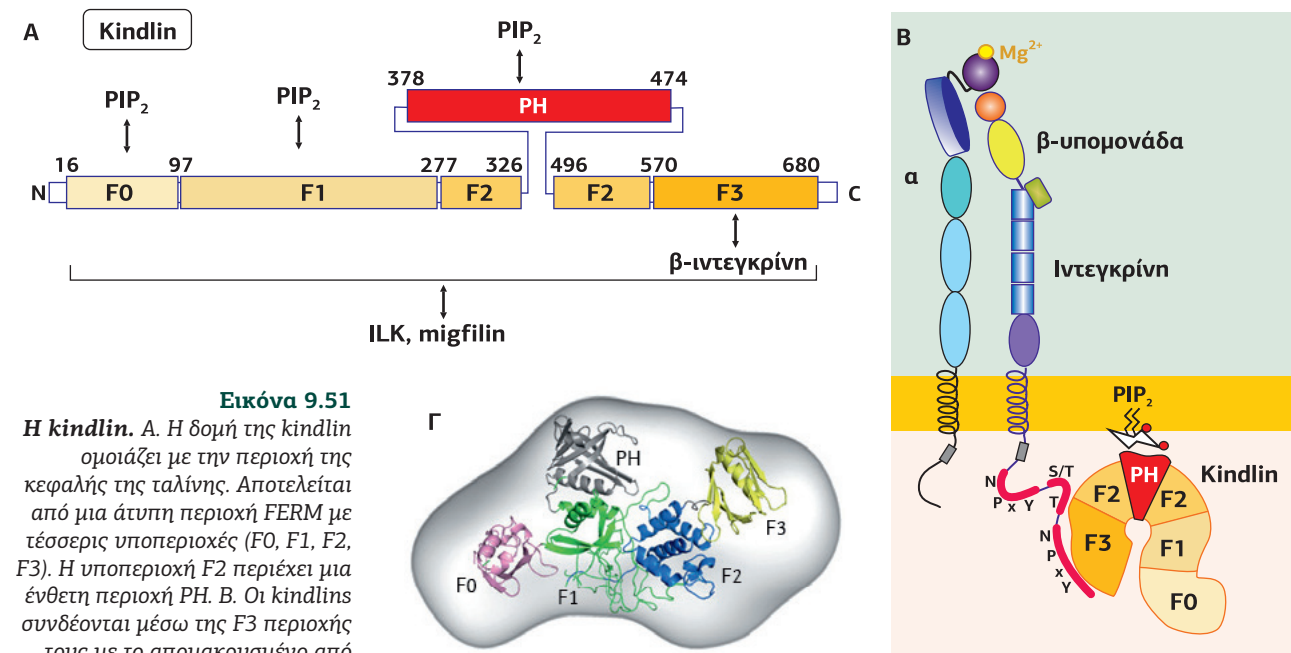
Οι kindlins και η δημιουργία του συμπλόκου kindlin-migflin-φιλαιμίνη-ILK-παξιλλίνη-parvins

Για χρόνια, η ταλίνη θεωρήθηκε ως ο μοναδικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών, αλλά τώρα μοιράζεται αυτό το έργο με τις kindlins. Οι **kindlins** είναι μια νέα οικογένεια εξελικτικά διατηρημένων πρωτεϊνών προσαρμογής. Η πρώτη kindlin ανακαλύφθηκε το 1994 ως ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G0/1 στη φάση S και αρχικά ονομάστηκε mitogen-induced gene (MIG-2). Στη συνέχεια, μετονομάστηκε ως kindlin-1, από το μεταλλαγμένο γονίδιο που προκαλεί το σύνδρομο Kindler σε ανθρώπους (περιγράφηκε το 1954 από την Βρετανο-Αυστριακή δερματολόγο Theresa Kindler), μια σπάνια ασθένεια που προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *kindlin-1* και χαρακτηρίζεται από φουσκάλες του δέρματος.

Υπάρχουν τρία μέλη της οικογένειας kindlins στα θηλαστικά: kindlin-1, kindlin-2 και kindlin-3. Η **kindlin-1**, η οποία εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα, βρίσκεται σε ιστούς όπως το δέρμα, το έντερο και τα νεφρά, η **kindlin-2** (ή Mig-2) εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, με υψηλά επίπεδα σε κύτταρα σκελετικών και λείων μυών, με εξαίρεση τα αιμοποιητικά κύτταρα, και η **kindlin-3** βρίσκεται σε σπλήνα, θύμο, λεμφαδένες, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, T- και B-λεμφοκύτταρα, αλλά όχι στην καρδιά, τον εγκέφαλο, το ήπαρ, τους σκελετικούς μυς, τους νεφρούς ή τους όρχεις. Και οι τρεις πρωτεΐνες εντοπίζονται σε εξαρτώμενες από τις ιντεγκρίνες θέσεις εστιακής προσκόλλησης.

Η ενεργοποίηση ιντεγκρίνης με τη μεσολάβση της kindlin απαιτεί άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της kindlin και της β-ιντεγκρίνης. Οι kindlins ομοιάζουν δομικά με την κεφαλή της ταλίνης. Περιέχουν μια παρόμοια περιοχή με την άτυπη περιοχή FERM με τέσσερις υποπεριοχές (F0, F1, F2, F3). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις ταλίνες, η υποπεριοχή F2 περιέχει μια ένθετη περιοχή PH (**Εικόνα 9.51**). Οι kindlins συνδέονται με το απομακρυσμένο από τη μεμβράνη μοτίβο NPxY των β-ιντεγκρινών και συνεργάζονται με την ταλίνη, για να αυξήσουν τη συγγένεια των ιντεγκρινών για τους προσδέτες τους και να προωθήσουν την ενεργοποίησή τους.

Η ποσότητα της ταλίνης που εκφράζεται στα κύτταρα καθορίζει την αποτελεσματικότητα των kindlins στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, καθώς η υπερέκφραση της kindlin-2 στο κύτταρο με σχετικά μικρή έκφραση ταλίνης έχει μικρή ή καθόλου επίδραση στη μεταβολή της συγγένειας της ιντεγκρίνης για τους προσδέτες της. Αντίθετα, η ταλίνη εξαρτάται από τις kindlins για να ενεργοποιήσει τις ιντεγκρίνες, καθώς η υπερέκφραση της ταλίνης αποτυγχάνει να αυξήσει τη συγγένεια



Εικόνα 9.51
Η kindlin. Α. Η δομή της kindlin ομοιάζει με την περιοχή της κεφαλής της ταλίνης. Αποτελείται από μια άτυπη περιοχή FERM με τέσσερις υποπεριοχές (F0, F1, F2, F3). Η υποπεριοχή F2 περιέχει μια ένθετη περιοχή PH. Β. Οι kindlins συνδέονται μέσω της F3 περιοχής τους με το απομακρυσμένο από τη μεμβράνη μοτίβο NPxY των β-ιντεγκρινών. Γ. Κρυσταλλική δομή της άτυπης περιοχής FERM. [46] [17] [59]

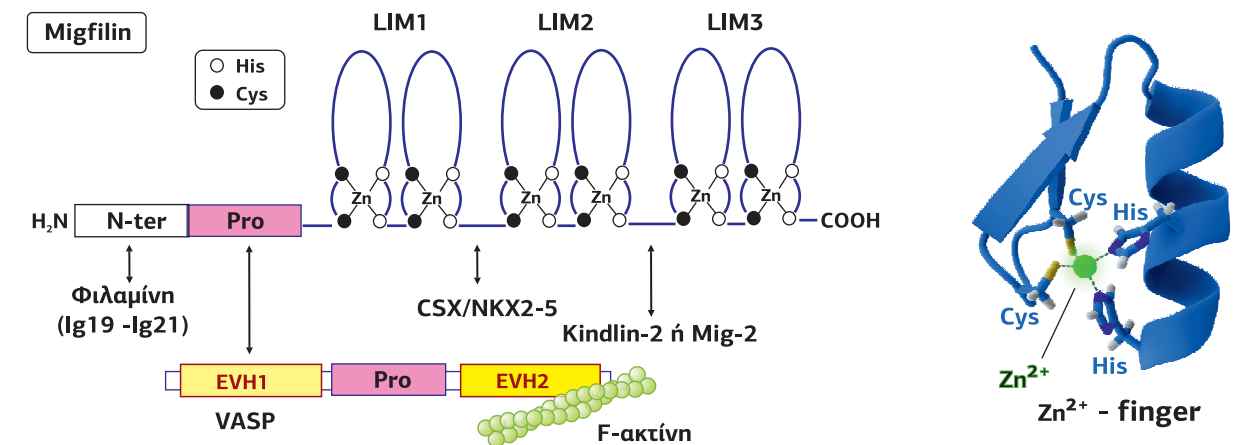
της ιντεγκρίνης για τους προσδέτες στα επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκών CHO (Chinese Hamster Ovary), στα οποία η έκφραση της kindlin είναι μειωμένη. Επομένως, οι kindlins απαιτούν την ταλίν και η ταλίν δεν επαρκεί μόνη της για να αυξήσει τη συγγένεια της ιντεγκρίνης. Ωστόσο, δεν έχει ανιχνευθεί άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της kindlin και της ταλίνης, αλλά δεν μπορούν να αποκλειστούν οι αλληλεπιδράσεις χαμηλής συγγένειας. Μόνο η ταλίν μεσολαβεί στο τελικό βήμα για την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης, αλλά ίσως και η kindlin διαμεσολαβεί στην πρόσδεση της ταλίνης στην ιντεγκρίνη.

Αν και η δραστηριότητα της kindlin, όπως και της ταλίνης, είναι έντονα ρυθμισμένη, οι ακριβείς μηχανισμοί αυτού του ελέγχου είναι άγνωστοι. Η kindlin και η ταλίν μπορούν να απαντήσουν στα ίδια ή σε διαφορετικά σήματα ενεργοποίησης. Καθώς αμφότερες περιέχουν περιοχές σύνδεσης φωσφολιπιδίων, μπορούν και ελέγχονται από σήματα φωσφοϊνοσιτιδίων, τα οποία συνδέονται στην περιοχή PH των kindlins. Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης μπορεί να είναι, επίσης, η φωσφορυλίωση.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι kindlins έχουν και άλλες λειτουργίες εκτός από την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, μέσω σηματοδότησης “από μέσα προς τα έξω”. Οι kindlins λειτουργούν και ως μόρια που συνδέονται στον κυτταροσκελετό έπειτα από σηματοδότηση “από έξω προς τα μέσα”. Οι kindlin-1 και -2 μέσω της F3 περιοχής τους συνδέονται με την κινάση ILK (Integrin-Linked Kinase) και με την πρωτεΐνη migfilin. Η ILK και η migfilin συνδέουν έμμεσα τις kindlins στην ακτίν του κυτταροσκελετού. Αμφότερες οι πρωτεΐνες εντοπίζονται στις θέσεις προσκόλλησης των κυττάρων με την εξωκυττάρια ουσία, με τρόπο που εξαρτάται από τις kindlins, αποδεικνύοντας ότι οι kindlins είναι κεντρικές πρωτεΐνες που μεσολαβούν στη συναρμολόγηση των συμπλοκών εστιακής προσκόλλησης που εξαρτώνται από ιντεγκρίνες (βλ. **Εικόνα 9.56**).

Η migfilin, η οποία ονομάζεται και FBLIM-1 (Filamin-Binding LIM protein-1), εντοπίζεται τόσο στις θέσεις επαφής κυττάρου - ECM όσο και στις θέσεις επαφής κυττάρου - κυττάρου, όπου θεωρείται ότι παρέχει μια σύνδεση μεταξύ του κυτταροσκελετού ακτίνης και των συνδεδεμένων με πρωτεΐνες της ECM ιντεγκρινών. Είναι μια πρωτεΐνη περίπου 50 kDa, που χαρακτηρίζεται από τις περιοχές LIM που περιέχει (βλ. σσ. 571-572 και **Εικόνα 8.76A**). Η migfilin αποτελείται από τρεις περιοχές LIM στο COOH-τελικό άκρο, μία κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και μία NH₂-τελική περιοχή, η οποία στερείται οποιουδήποτε αναγνωρίσιμου μοτίβου. Οι περιοχές LIM μεσολαβούν στη σύνδεση με την kindlin-2 ή Mig-2 (Mitogen

inducible gene-2) και απαιτούνται για τον εντοπισμό στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης (**Εικόνα 9.52**). Η migfilin αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 2003 ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την kindlin-2 στον σακχαρομύκητα, με το σύστημα διαλογής δύο υβριδίων (two-hybrid screens), και ακολούθως βρέθηκε ότι συνδέεται με τη φιλαμίνη (filamin), μια μεγάλη πρωτεΐνη που σταυροσυνδέει την ακτίν. Συνεπώς, η migfilin αποτελεί τμήμα του συμπλόκου ιντεγκρίνη-kindlin-migfilin-φιλαμίνη-ακτίν. Οι περιοχές Ig-like 19 και Ig-like 21 της φιλαμίνης συνδέονται στα πρώτα 15 αμινοξέα του NH₂-τελικού άκρου της migfilin. Απώλεια της migfilin οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική μετανάστευση. Η migfilin συναντάται, επίσης, και στον πυρήνα επηρεάζοντας τη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων μετά τη σύνδεσή της με τον μεταγραφικό παράγοντα CSX (Cardiac-Specific homeobox) / NKX2-5 (NK2 homeobox 5).

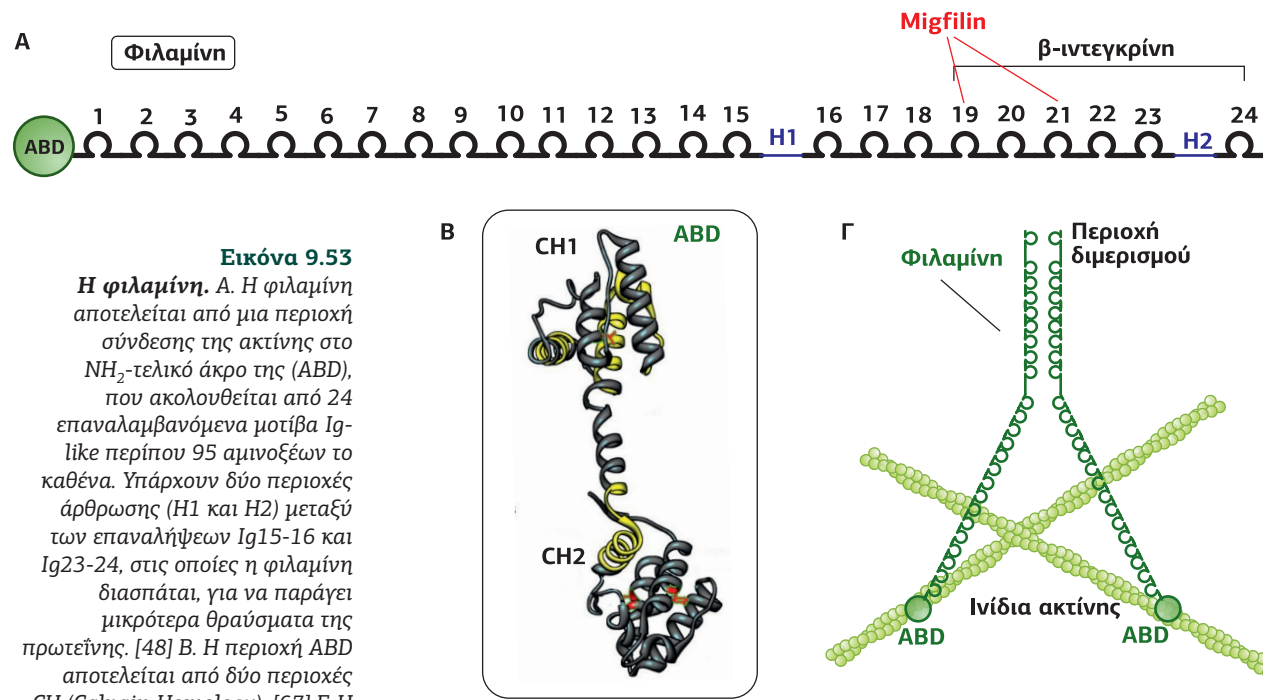


Η φιλαμίνη (filamin, FLN) είναι μια πρωτεΐνη 280 kDa που βοηθά στην οργάνωση της ακτίνης σε ένα δίκτυο ινιδίων πίεσης. Πήρε το όνομά της (filamin) λόγω της συμμετοχής της σε ενδοκυτταρικές νηματοειδείς (filamentous) δομές. Αποτελείται από μια περιοχή σύνδεσης της ακτίνης, την ABD (α-actinin-like conserved F-actin binding domain), στο NH₂-τελικό άκρο της, που ακολουθείται από 24 επαναλαμβανόμενες περιοχές Ig-like, περίπου 95 αμινοξέων η καθεμιά. Η περιοχή ABD αποτελείται από δύο περιοχές CH (Calponin Homology): CH1 και CH2. Η περιοχή CH αποτελείται από 110 αμινοξέα, που δημιουργούν τέσσερις κύριες α-έλικες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μακρείς βρόχους, και δύο ή τρεις μικρότερες, λιγότερο κανονικές α-έλικες (**Εικόνα 9.53B**). Η περιοχή CH ανακαλύφθηκε στην καλπονίνη (calponin), ενώ αποτελεί τμήμα και άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως ο Van και η IQGAP (βλ. σελ. 534 **Εικόνα 8.45**).

Οι περιοχές Ig-like της φιλαμίνης αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών πρωτεϊνών, π.χ. στις Ig-like 19 και Ig-like 21 συνδέεται η NH₂-τελική περιοχή της migfilin, ενώ στις Ig-like 19 με 24 συνδέεται η β-ιντεγκρίνη. Υπάρχουν, επίσης, δύο περιοχές άρθρωσης (hinge-1, hinge-2) μεταξύ των επαναλήψεων Ig-like 15 και 16, καθώς και Ig-like 23 και 24. Η φιλαμίνη διασπάται σε αυτές τις περιοχές άρθρωσης, για να παράγει μικρότερα θραύσματα της πρωτεΐνης (**Εικόνα 9.53**).

Η κινάση Ser/Thr ILK (Integrin-Linked Kinase) αναγνωρίστηκε το 1996 στον σακχαρομύκητα, επίσης με διαλογή δύο υβριδίων, ως μια πρωτεΐνη 59 kDa που συνδέεται με την β1-υπομονάδα των ιντεγκρινών. Η ILK εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και αποτελείται από τρεις περιοχές: μία NH₂-τελική περιοχή που περιέχει 4 επαναλήψεις αγκυρίνης, μία κεντρική περιοχή PH και μία COOH-τελική περιοχή κινάσης Ser/Thr. Η NH₂-τελική περιοχή αγκυρίνης συνδέεται με το δεύτερο zinc finger της περιοχής LIM1 της πρωτεΐνης προσαρμογής PINCH (Particularly Interesting New Cysteine Histidine-rich protein) και με τη φωσφατάση Ser/Thr της οικογένειας PP2C, ILKAP (ILK-Associated Phosphatase), η οποία ρυθμίζει αρ-

Εικόνα 9.52
Η migfilin. Η migfilin αποτελείται από τρεις περιοχές LIM στο COOH-τελικό άκρο, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την kindlin-2 (mig-2) και με τον μεταγραφικό παράγοντα CSX/NKX2-5 (ο οποίος παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς). Επίσης, περιέχει μία κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή EVH1 της πρωτεΐνης VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) και η οποία επάγει την επιμήκυνση ινιδίων ακτίνης. Τέλος, στο NH₂-τελικό της άκρο περιέχει μια περιοχή, η οποία στερείται οποιουδήποτε αναγνωρίσιμου μοτίβου και αλληλεπιδρά με τη φιλαμίνη [γ' αυτό ονομάζεται και FBLIM-1 (Filamin-Binding LIM protein-1)]. [83]

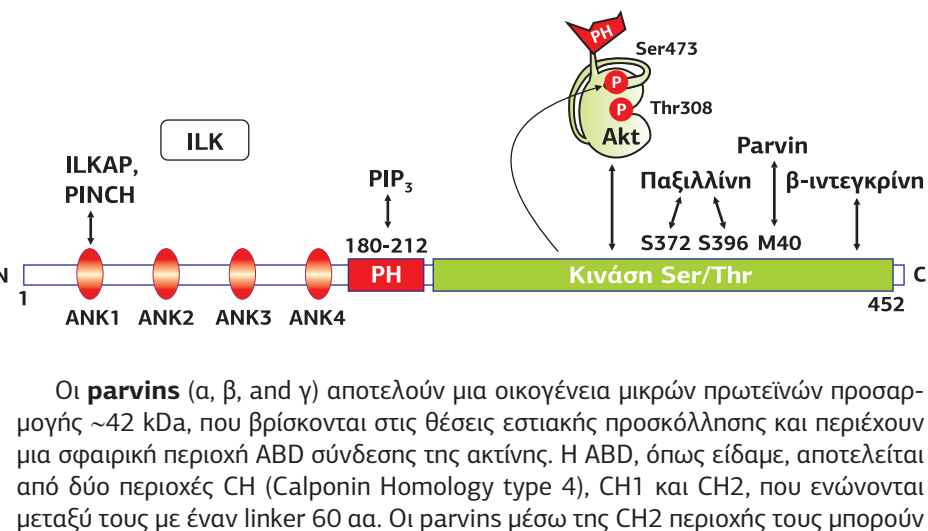


Εικόνα 9.53
Η φιλαμίνη. Α. Η φιλαμίνη αποτελείται από μια περιοχή σύνδεσης της ακτίνης στο NH₂-τελικό άκρο της (ABD), που ακολουθείται από 24 επαναλαμβανόμενα μοτίβα Ig-like περίπου 95 αμινοξέων το καθένα. Υπάρχουν δύο περιοχές άρθρωσης (H1 και H2) μεταξύ των επαναλήψεων Ig15-16 και Ig23-24, στις οποίες η φιλαμίνη διασπάται, για να παράγει μικρότερα θραύσματα της πρωτεΐνης. [48] Β. Η περιοχή ABD αποτελείται από δύο περιοχές CH (Calpain Homology). [67] Γ. Η φιλαμίνη συναντάται σε διμερή μορφή και συγκρατεί δύο ινίδια ακτίνης υπό γωνία. [75]

νπτικά τη σηματοδότηση της ILK. Οι γειτονικές επαναλήψεις αγκυρίνης καθώς και η περιοχή PH συνδέονται στα PI(3,4,5)P₃ της πλασματικής μεμβράνης. Η COOH-τελική περιοχή κινάσης αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες, την parvin και την παξιλλίνη (Εικόνα 9.54). Η ILK, η PINCH1 και η parvin δημιουργούν το τριμερές σύμπλοκο IPP που συναντάται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης και συνδέει τις ιντεγκρίνες με τον κυτταροσκελετό (Εικόνα 9.56). Η περιοχή κινάσης συνδέεται, επίσης, και με την κινάση PKB/Akt, την οποία φωσφορυλιώνει στην Ser473 και την ενεργοποιεί, δρώντας ως PDK2. Μέσω της Akt, η ILK ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση (αναστέλλοντας την απόπτωση).

Τα κύτταρα με έλλειψη ILK εμφανίζουν σοβαρή καθυστέρηση στον σχηματισμό θέσεων εστιακής προσκόλλησης, με αποτέλεσμα την ελαττωματική μετακίνηση των κυττάρων. Η διαγραφή της ILK από τον σκελετικό μυ έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της βασικής μεμβράνης και τη συσσώρευση εξωκυττάριας ουσίας, παρέχοντας περαιτέρω στοιχεία για τον κρίσιμο ρόλο που διαδραματίζει η ILK στη σταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης ιντεγκρίνης-ακτίνης.

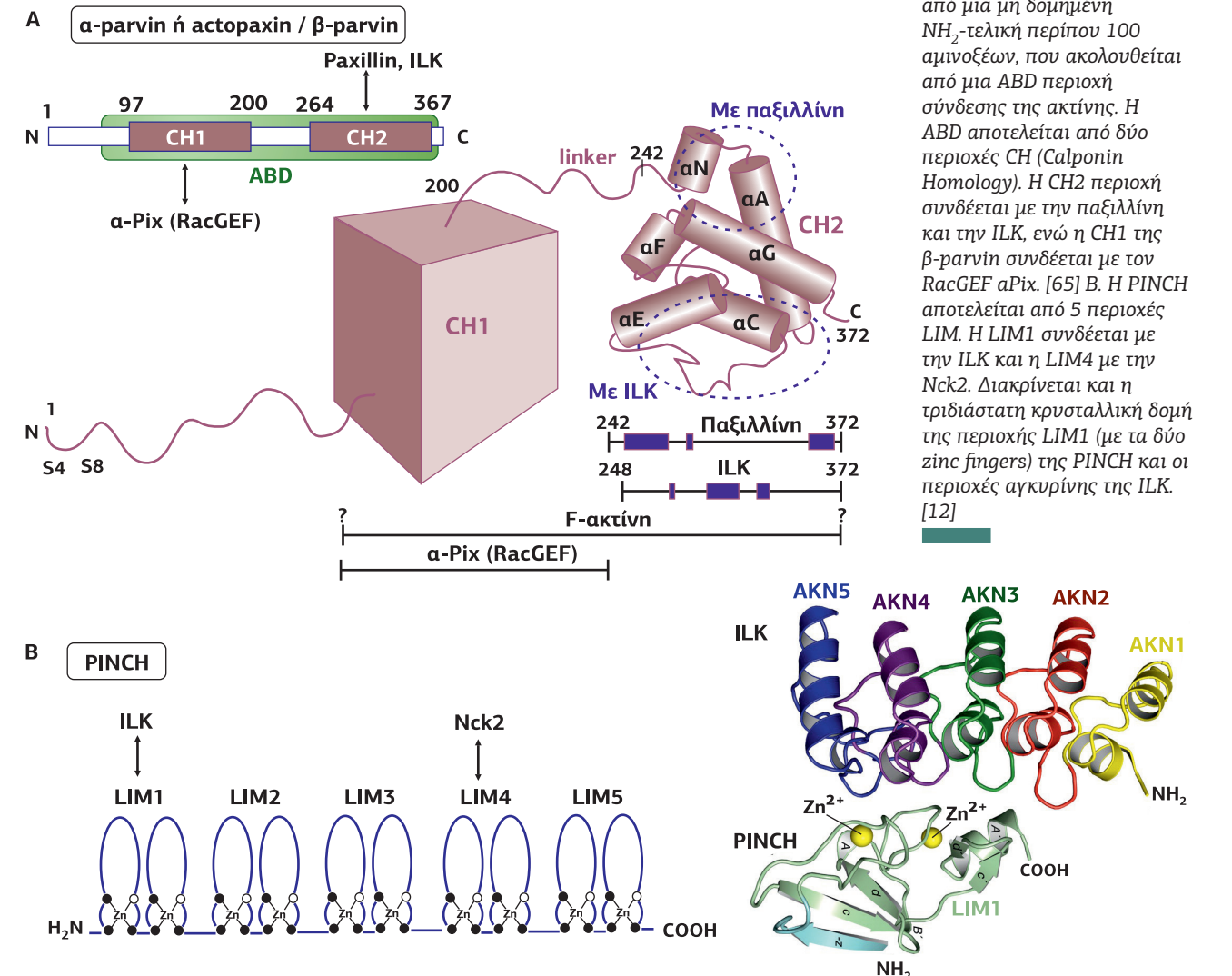
Εικόνα 9.54
Η δομή της κινάσης ILK. Η ILK αποτελείται από μία NH₂-τελική περιοχή που περιέχει 4 επαναλήψεις αγκυρίνης, οι οποίες συνδέονται με την πρωτεΐνη προσαρμογής PINCH και με τη φωσφατάση ILKAP, μία κεντρική περιοχή PH, η οποία συνδέεται στα PI(3,4,5)P₃ της πλασματικής μεμβράνης, και μία COOH-τελική περιοχή κινάσης Ser/Thr, η οποία αλληλεπιδρά με τη β-ιντεγκρίνη, την parvin και την παξιλλίνη. Επίσης, συνδέεται με την κινάση PKB/Akt, την οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί. [35]



Οι parvins (α, β, and γ) αποτελούν μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών προσαρμογής ~42 kDa, που βρίσκονται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης και περιέχουν μια σφαιρική περιοχή ABD σύνδεσης της ακτίνης. Η ABD, όπως είδαμε, αποτελείται από δύο περιοχές CH (Calponin Homology type 4), CH1 και CH2, που ενώνονται μεταξύ τους με έναν linker 60 aa. Οι parvins μέσω της CH2 περιοχής τους μπορούν

άμεσα να συνδεθούν με την περιοχή κινάσης της ILK και με την παξιλλίνη (Εικόνα 9.55A). Η α-parvin ανακαλύφθηκε το 2001 ως μια πρωτεΐνη που συνδέεται με την ακτίνη και την παξιλλίνη και γι' αυτό ονομάστηκε actopaxin. Η β-parvin ανακαλύφθηκε το 2001 ως affixin και έχει διαφορετικό ρόλο από την α-parvin, καθώς συνδέεται μέσω της CH1 περιοχής με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (RacGEF) αPix (γνωστός και ως ARHGEF6 ή Cool-2), ο οποίος ενεργοποιεί την GTPάση Rac και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

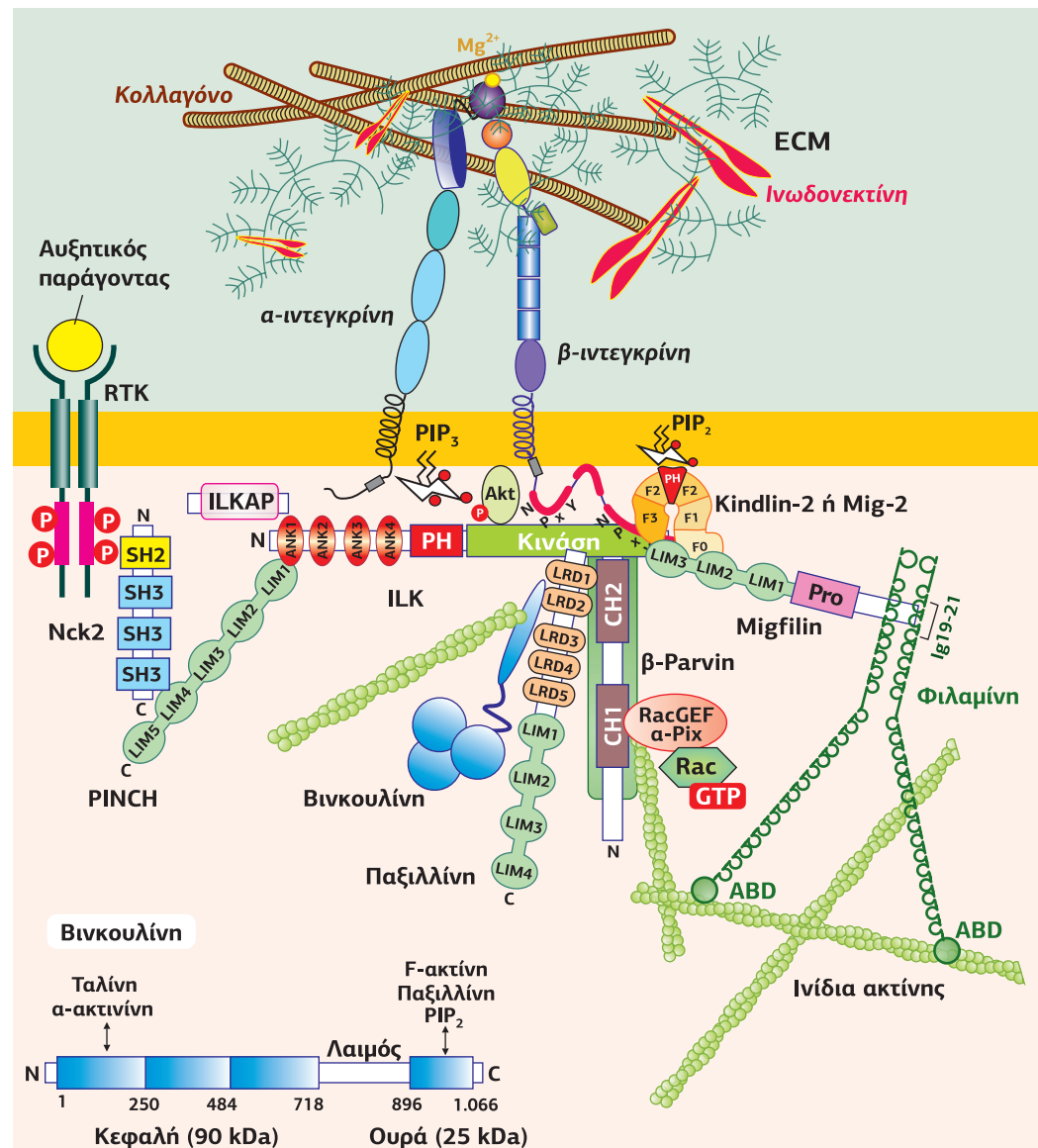
Η PINCH (Particularly Interesting New Cysteine-Histidine-rich protein) ανακαλύφθηκε το 1994 από την Ann Rearden, στο University of California, από τη διαλογή σε μια ανθρώπινη βιβλιοθήκη cDNA με αυτοαντισώματα από γηρασμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, ως μια πρωτεΐνη 35.8 kDa, η οποία περιέχει έναν αυτοεπίτοπο του "senescent cell antigen". Είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής που περιέχει μόνο περιοχές LIM (LIM-domain-only adaptor protein). Συμμετέχει στη στρατολόγηση πρωτεϊνών, την επακόλουθη συναρμολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και τον υποκυτταρικό εντοπισμό αυτών των συμπλόκων. Μέσω του 2ου zinc-finger της περιοχής LIM1 αλληλεπιδρά με την NH₂-τελική περιοχή αγκυρίνης (ANK1) της ILK (Εικόνα 9.55B). Αν και η PINCH δεν έχει καταλυτικές ικανότητες, το σύμπλεγμα IPP (ILK-PINCH-Parvin) χρησιμεύει ως σύνδεσμος μεταξύ ιντεγκρινών και συστατικών των οδών σηματοδότησης. Επιπλέον, η PINCH μέσω της LIM4 συνδέεται στην NH₂-τελική SH3 περιοχή της πρωτεΐνης προσαρμογής Nck2, η οποία συνδέει την PINCH με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (βλ. Εικόνα 9.56).



Στα θηλαστικά, εκφράζονται δύο πρωτεΐνες Pix, α-Pix (ή ARHGEF6) and β-Pix (ή ARHGEF7). Είναι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης των G-πρωτεϊνών της οικογένειας Rho. Είναι γνωστές και ως cool-2 και cool-1, αντίστοιχα, καθώς κλωνοποιήθηκαν το 1998 έπειτα από διαλογή σε μια βιβλιοθήκη (cloned out of library-2 and -1). Επίσης, όπως έχουμε δει στη σελ. 577, στρατολογούν τις κινάσες PAKs κοντά στις μικρές GTPάσες Cdc42. Για τη δομή τους βλ. σελ. 721, και Εικόνα 9.61.

Εικόνα 9.55
Η δομή των πρωτεϊνών προσαρμογής α- και β-parvin και PINCH. Α. Οι parvins αποτελούνται από μια μη δομημένη NH₂-τελική περίπου 100 αμινοξέων, που ακολουθείται από μια ABD περιοχή σύνδεσης της ακτίνης. Η ABD αποτελείται από δύο περιοχές CH (Calponin Homology). Η CH2 περιοχή συνδέεται με την παξιλλίνη και την ILK, ενώ η CH1 της β-parvin συνδέεται με τον RacGEF αPix. [65] Β. Η PINCH αποτελείται από 5 περιοχές LIM. Η LIM1 συνδέεται με την ILK και η LIM4 με την Nck2. Διακρίνεται και η τριδιάστατη κρυσταλλική δομή της περιοχής LIM1 (με τα δύο zinc fingers) της PINCH και οι περιοχές αγκυρίνης της ILK. [12]

Πριν από είκοσι και πλέον χρόνια, η ανακάλυψη από διαφορετικά εργαστήρια ενός κοινού μοτίβου αμινοξέων, που είναι πλούσιο σε κυστεΐνη οδήγησε στην αναγνώριση μιας νέας κατηγορίας πρωτεϊνών: **των πρωτεϊνών που περιέχουν περιοχές LIM**. Η ονομασία LIM προέκυψε από τα ονόματα των γονιδίων, των οποίων η έκφραση οδήγησε στην ανακάλυψη αυτής της περιοχής: LIN-11 (cell lineage), Isl-1 (Islet-1, Insulin gene enhancer binding protein) και MEC-3 (Mechanosensory-3). Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες LIM περιέχουν από μία έως πέντε περιοχές LIM, οι οποίες μπορεί να βρίσκονται στο NH₂-τελικό ή στο COOH-τελικό άκρο. Ταξινομούνται σε 4 ομάδες: α. πυρηνικές πρωτεΐνες, β. πρωτεΐνες που περιέχουν μόνο περιοχές LIM (όπως η PINCH), γ. πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη (όπως η παξιλλίνη) και δ. πρωτεΐνες που περιέχουν και καταλυτική περιοχή (LIMKs, βλ. σελ. 571).



Εικόνα 9.56

Πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα που δημιουργείται γύρω από τις ιντεγκρίνες και την κινάση ILK στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της συνδεδεμένης στη β-ιντεγκρίνη kindlin-2 και της ILK συμβάλλει στη συσσωμάτωση των ιντεγκρινών και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η kindlin-2 (ή Mig-2), εκτός από την ILK, συνδέεται και με την πρωτεΐνη migfilin, η οποία μέσω του NH₂-τελικού της άκρου συνδέεται με τη φιλαμίνη. Η διμερής φιλαμίνη σταυροσυνδέει τα ινίδια ακτίνης. Στην ILK συνδέονται οι πρωτεΐνες PINCH, α- και β-parvinin, η παξιλλίνη και η φωσφατάση ILKAP. Στην παξιλλίνη συνδέεται μέσω της COOH-τελικής της ουράς η βινκουλίνη, η οποία στη συνέχεια μέσω της ίδιας περιοχής συνδέεται και με τα ινίδια ακτίνης. Η PINCH μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής Nck2 αλληλεπιδρά με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. [49] [37] [83]

Η σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω εμποδίζει την κατά λάθος ενεργοποίηση των ιντεγκρινών

Τα αιμοπετάλια προσφέρουν ένα παράδειγμα αυστηρού ελέγχου της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών και της σημασίας της σηματοδότησης από μέσα προς τα έξω. Εκφράζουν την ιντεγκρίνη αIIbβ3, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με πρωτεΐνες του καταρράκτη πήξης του αίματος, διεγείροντας τη συσώρευση αιμοπεταλίων στο σημείο της πήξης. Ανεξέλεγκτη δράση των ιντεγκρινών θα είχε θανατηφόρες συνέπειες, όπως η θρόμβωση. Επομένως, δεν μπορεί να επιτραπεί στις ιντεγκρίνες των αιμοπεταλίων να συνδέονται με τους προσδέτες τους, εκτός κι αν ενεργοποιηθούν από θρομβογενετικά ερεθίσματα, όπως η θρομβίνη, η αδρεναλίνη ή το κολλαγόνο, που απελευθερώνονται σε επαρκείς ποσότητες ή έρχονται σε επαφή με τα αιμοπετάλια μόνο σε περίπτωση τραυματισμού. Η αδρεναλίνη και η θρομβίνη αλληλεπιδρούν με GPCRs και ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες μέσω ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών από μέσα προς τα έξω, ενώ το κολλαγόνο αλληλεπιδρά με τον γλυκοπρωτεϊνικό υποδοχέα του GP6 (Glycoprotein VI), οδηγώντας στην ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης αIIbβ3. Αν και τα μονοπάτια αυτά δεν είναι πλήρως κατανοητά, φαίνεται ότι συμμετέχουν η Gα_q, η PLC, το Ca²⁺, η PKC και η Rap1, οι οποίες οδηγούν στη στρατολόγηση της ταλίνης και της kindlin στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης, όπου συσσωρεύονται οι ιντεγκρίνες.

3.4 | Σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα

Οι ιντεγκρίνες δεν έχουν εγγενή καταλυτική δραστηριότητα. Η σύνδεση του προσδέτη στο εξωκυτταρικό τμήμα τους έχει ως αποτέλεσμα τη μετάδοση σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου στην κλασική κατεύθυνση από τον εξωκυτταρικό χώρο στο κυτταρόπλασμα. Τα σήματα αυτά επηρεάζουν την κυτταρική μετανάστευση, μέσω αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αλλά και την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και απόπτωση. Η σηματοδότηση των ιντεγκρινών είναι πολύπλοκη και επηρεάζεται σημαντικά από τη διασταυρούμενη επικοινωνία με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων.

Οι ιντεγκρίνες παίζουν κύριο ρόλο στη δημιουργία θέσεων εστιακής προσκόλλησης

Το άμεσο αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών είναι η δημιουργία γεφυρών ανάμεσα στην εξωκυτταρική ουσία και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αυτή η σύνδεση λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες δομές, γνωστές ως **θέσεις εστιακής προσκόλλησης** (FA, focal adhesion sites), οι οποίες δημιουργούνται μετά τη σύνδεση του εξωκυτταρικού προσδέτη στις ιντεγκρίνες. Στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης προάγεται η συναρμολόγηση ινιδίων ακτίνης, τα οποία αναδιοργανώνονται σε μεγαλύτερες δεσμίδες που ονομάζονται **ινίδια πίεσης** (stress fibers) και οδηγούν σε περαιτέρω συσσωμάτωση ιντεγκρινών και ενισχυμένη σύνδεση με την εξωκυτταρική ουσία. Με αυτόν τον τρόπο η σύνδεση των ιντεγκρινών με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης επιτρέπει τη ρύθμιση της δημιουργίας θέσεων εστιακής προσκόλλησης, καθώς και τη ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος μέσω του χωροχρονικού ελέγχου της δημιουργίας προεκβολών και της απόσυρσής τους (protrusion and retraction) κατά τη μετανάστευση των κυττάρων.

Οι θέσεις εστιακής προσκόλλησης είναι δυναμικά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα (συμμετέχουν έως και 150 διαφορετικές πρωτεΐνες), στα οποία σχηματίζονται ειδικές επαφές στην κυτταροπλασματική πλευρά ανάμεσα στις ιντεγκρίνες, σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και σε ινίδια ακτίνης. Στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε σταθερή ροή, συνδέοντας συνεχώς και αποσυνδέοντας η μία την άλλη. Αυτές περιλαμβάνουν:

- Πρωτεΐνες συνδεδεμένες στις ιντεγκρίνες, οι οποίες μπορούν απευθείας να

συνδεθούν και με την ακτίνη, όπως η ταλίνη και η α-ακτινίνη.

- Πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην ιντεγκρίνη, οι οποίες συνδέονται έμμεσα με την ακτίνη, όπως οι kindlins, η κινάση ILK (Integrin Linked Kinase), η παξιλλίνη (paxillin) και η κινάση FAK.
- Πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην ακτίνη, οι οποίες συνδέονται έμμεσα με τις ιντεγκρίνες, όπως η βινκουλίνη (vinculin) και η φιλαμίνη.
- Μόρια προσαρμογής και σηματοδότησης, που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών από τις προαναφερθείσες ομάδες.

Ο κεντρικός ρόλος της κινάσης FAK στη σηματοδότηση των ιντεγκρινών

Η κινάση **FAK** (Focal Adhesion Kinase) ήταν ένα από τα πρώτα μόρια που ταυτοποιήθηκαν ότι συμμετέχουν στη σηματοδότηση των ιντεγκρινών. Ανακαλύφθηκε το 1992 από δύο συγκλίνοντα ερευνητικά μονοπάτια. Στην πρώτη σειρά μελετών ο Jun-Lin Guan στο Massachusetts Institute of Technology και ο Steve Hanks στο Vanderbilt University ταυτοποίησαν μια πρωτεΐνη περίπου 120 kDa, η οποία εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε θέσεις εστιακής προσκόλλησης και φωσφορυλιώνεται σε τυροσίνες μετά την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών. Σε μία άλλη σειρά μελετών ο Michael Schaller στο University of Virginia, αναζητώντας διάφορα πιθανά υποστρώματα των v-Src με βάση την υψηλή φωσφορυλίωση τυροσινών σε μετασχηματισμένα κύτταρα με το ογκογονίδιο v-Src, ανακάλυψε μια κινάση τυροσίνης, η οποία ήταν ταυτοσημ με την πρωτεΐνη των 120 kDa και φωσφορυλιώνεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών. Αυτή η πρωτεΐνη ονομάστηκε FAK με βάση την εξέχουσα θέση της στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesions).

Δύο ισομορφές είναι γνωστές: η FAK1 που εκφράζεται παντού και η FAK2 που εκφράζεται ιστο-ειδικά. Και οι δύο μοιράζονται την ίδια δομή. Αποτελούνται από μια NH₂-τελική περιοχή FERM, μία κεντρική περιοχή κινάσης, τρεις περιοχές πλούσιες σε προλίνη και μία COOH-τελική περιοχή FAT (Focal-Adhesion-Targeting) ή FABD (Focal-Adhesion-Binding Domain) (Εικόνα 9.57).

Η περιοχή **FERM** συναντάται σε πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η ταλίνη και οι kindlins, καθώς επίσης και σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως οι κινάσες τυροσίνης Jak και αρκετές φωσφατάσες τυροσίνης. Η FAK μέσω της περιοχής FERM συνδέεται με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων EGFR και PDGFR, την κινάση τυροσίνης Etk (ή Bmx), την πρωτεΐνη προσαρμογής Ezrin (η οποία επίσης περιέχει μια περιοχή FERM, η οποία αλληλεπιδρά με την περιοχή FERM της FAK), ενώ μπορεί να τροποποιηθεί με SUMOύλιωση στη Lys152 (η SUMOύλιωμένη FAK βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στον πυρήνα).

Οι **πλούσιες σε προλίνη** περιοχές αποτελούν θέσεις σύνδεσης σε πρωτεΐνες με SH3 περιοχές, όπως ο Trio (RhoGEF), η p130Cas (p130 Crk-associated substrate), η Graf (GTPase regulator associated with FAK), η ASAP (ArfGAP containing SH3, Ankyrin repeat and PH domains), ορισμένες από τις οποίες (π.χ. p130Cas) στρατολογούν επιπλέον πρωτεΐνες. Η **περιοχή κινάσης** αποτελεί θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης FIP200 (FAK-family Interacting Protein of 200 kDa), η οποία αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της FAK.

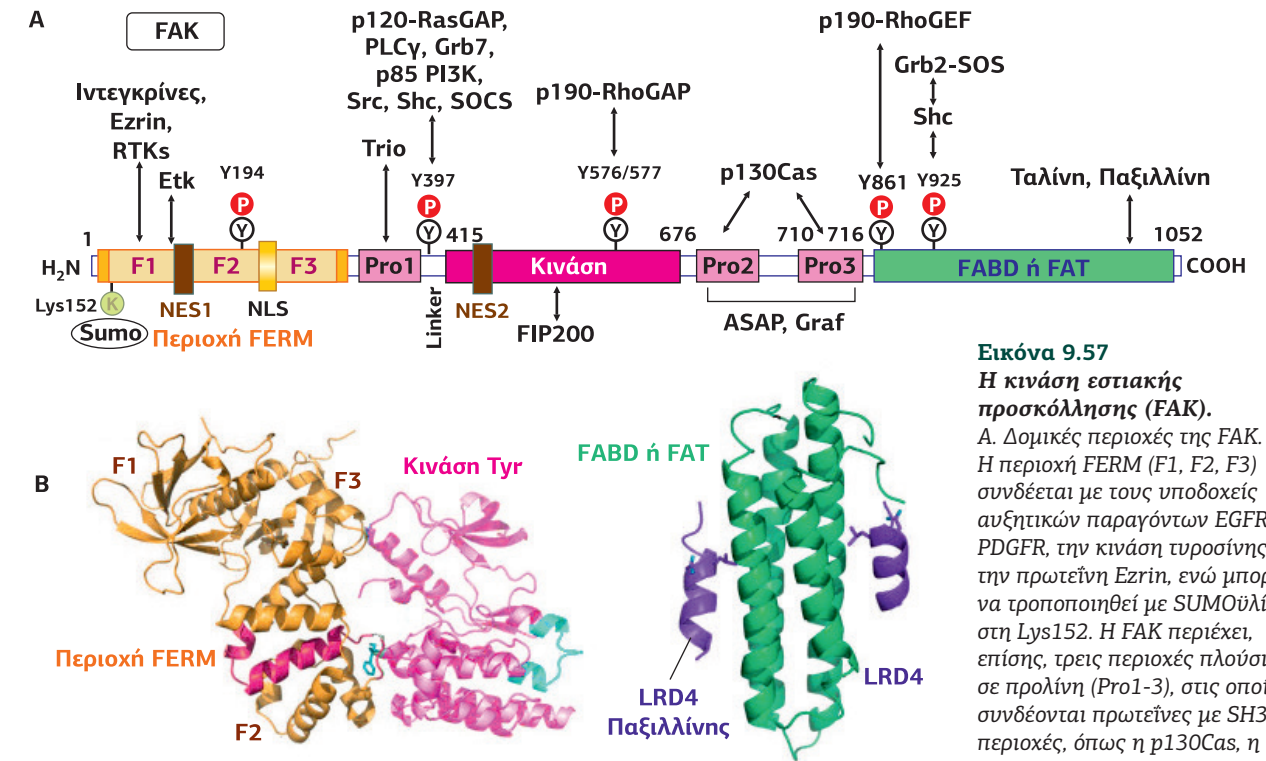
Η περιοχή **FAT** (Focal Adhesion Targeting) ή **FABD** (Focal-Adhesion-Binding Domain), 159 αμινοξέων, είναι υπεύθυνη για τη στόχευση της FAK σε θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Η περιοχή αυτή αποτελείται από τέσσερις α-έλικες που δημιουργούν μια δεομίδα. Η NH₂-τελική α-έλικα περιέχει μία τυροσίνη ικανή να φωσφορυλιωθεί (Tyr925), η οποία εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος, ενώ οι περιοχές μεταξύ της 1ης και 4ης α-έλικας και 2ης και 3ης συνδέονται με την παξιλλίνη (paxillin) και την ταλίνη. Η pTyr861 της περιοχής FAT συνδέεται, επίσης, άμεσα στον ενεργοποιητή της οικογένειας Rho p190-RhoGEF και η φωσφορυλίωση του p190-RhoGEF από την FAK αποτελεί μια άμεση σύνδεση με την ενεργοποίηση της RhoA.

Η ομόλογη της FAK Pyk2 μοιράζεται πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά, αλλά οι Pyk2 και FAK έχουν μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες δεν αλληλεπικαλύπτονται.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν αποδεικτικά στοιχεία για τον πυρηνικό εντοπισμό

Η **Etk** (Epithelial and endothelial tyrosine kinase) ή Bmx (Bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X) είναι ένα μέλος της οικογένειας Tec/Btk, που ανακαλύφθηκε το 1998.

Ο **RhoGEF Trio** ανακαλύφθηκε το 1996 ως μια μεγάλη πρωτεΐνη 350 kDa, που βρίσκεται συνδεδεμένη στη φωσφατάση LAR. Όπως δείχνει το όνομά του περιέχει τρεις περιοχές με ενζυμική δραστηριότητα, δύο περιοχές GEF, DH-PH, (η NH₂-τελική με εξειδίκευση στις Rac1 και RhoG, ενώ η COOH-τελική με εξειδίκευση στην RhoA) και μια περιοχή με δράση κινάσης Ser/Thr (βλ. σελ. 534, 535). Η σύνδεση του Trio με την FAK επάγει τη φωσφορυλίωσή του, που έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή του με τον κυτταροσκελετό ακτίνης, παρά την αύξηση της δραστηριότητάς του ως GEF.



Εικόνα 9.57
Η κινάση εστιακής προσκόλλησης (FAK).
 Α. Δομικές περιοχές της FAK. Η περιοχή FERM (F1, F2, F3) συνδέεται με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων EGFR και PDGFR, την κινάση τυροσίνης Etk, την πρωτεΐνη Ezrin, ενώ μπορεί να τροποποιηθεί με SUMOύλιωση στη Lys152. Η FAK περιέχει, επίσης, τρεις περιοχές πλούσιες σε προλίνη (Pro1-3), στις οποίες συνδέονται πρωτεΐνες με SH3 περιοχές, όπως η p130Cas, η Graf (GTPase regulator associated with FAK) και η ASAP1 (Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeats and PH domain-containing protein). Η FAK φωσφορυλιώνεται σε πολλαπλά κατάλοιπα Tyr, π.χ. Tyr397, Tyr 407, Tyr 576, Tyr 577, Tyr 861 και Tyr 925. Η φωσφορυλίωση της Tyr397 αποτελεί μια θέση σύνδεσης για τη SH2 περιοχή της Src, της PLCγ, της SOCS (Suppressor Of Cytokine Signalling), της Grb7 (Growth-factor-receptor-bound protein 7), της πρωτεΐνης προσαρμογής Shc, της p120 RasGAP και της p85 υπομονάδας της PI3K. Η φωσφορυλίωση της Tyr576 και της Tyr577 μέσα στην περιοχή κινάσης απαιτείται για τη μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα της κινάσης, ενώ η σύνδεση της περιοχής κινάσης με την FIP200 (FAK-family interacting protein of 200 kDa) αναστέλλει την καταλυτική δραστηριότητα της FAK. Στην pTyr925 συνδέεται η Grb2. [60] [64] [36] [47]
 Β. Κρυσταλλική δομή της FAK. [77]

της FAK, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη μιας αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στην περιοχή F2 της FERM και δύο αλληλουχιών εξαγωγής από τον πυρήνα (NES1 και NES2), μία στην περιοχή FERM και μία στην καταλυτική περιοχή κινάσης. Η πυρηνική FAK προωθεί την αποικοδόμηση των p53 και GATA4 μέσω της ουβικουιτίνης, με αποτέλεσμα τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση. Η FAK μπορεί, επίσης, να χρησιμεύσει ως ένας συν-μεταγραφικός ρυθμιστής, που μεταβάλλει τη γονιδιακή μεταγραφική δραστηριότητα. Σε συνθήκες ηρεμίας μπορεί να παρατηρηθεί μόνο μια μικρή ποσότητα πυρηνικής FAK. Διάφορα ερεθίσματα, όπως τα σήματα στρες και η κατάσταση αποσυναρμολόγησης των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον πυρηνικό εντοπισμό της FAK, για να επιτρέψουν σε αυτή την πρωτεΐνη να ξεκινήσει νέες θέσεις εργασίας στον πυρήνα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός που ελέγχει τον πυρηνικό εντοπισμό της FAK δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί.

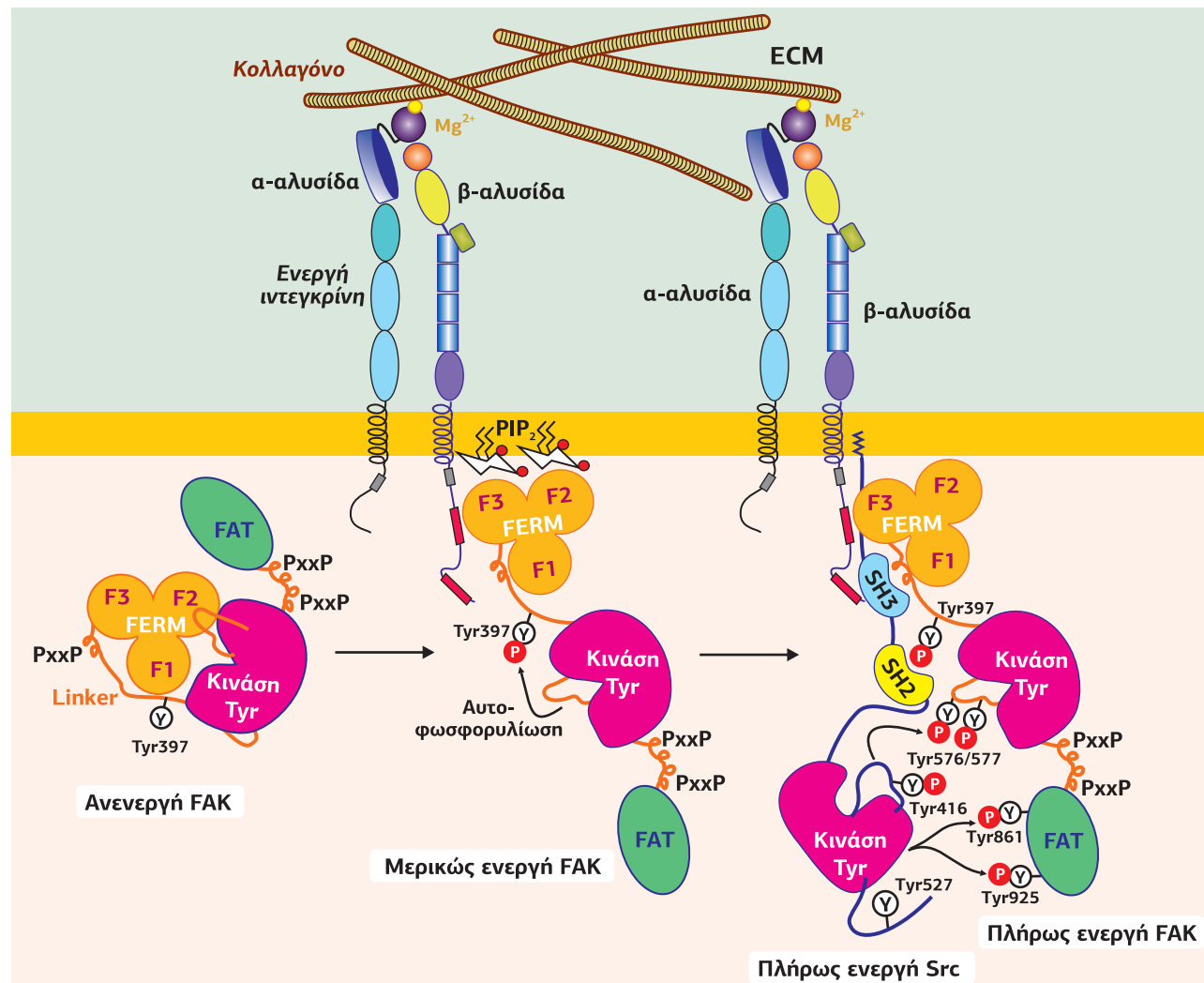
Στην κατάσταση ηρεμίας η FAK βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση αυτοαναστολής με την περιοχή FERM (κυρίως η F2) να συνδέεται με την περιοχή κινάσης. Μετά την πρόσδεση της ιντεγκρίνης στις πρωτεΐνες της ECM, η FAK, μέσω της περιοχής FAT, προσκολλάται στην ταλίνη και την παξιλλίνη, οι οποίες είναι συνδεδεμένες άμεσα (η ταλίνη) ή έμμεσα (η παξιλλίνη) με τη β αλυσίδα των ιντεγκρινών. Ως αποτέλεσμα, η περιοχή FERM εκτοπίζεται από την περιοχή κινάσης προκαλώντας μια μεταβολή της διαμόρφωσης, ώστε να επιτραπεί η αυτοφωσφορυλίωση της FAK στην Tyr397, στην οποία θα συνδεθεί στη συνέχεια η κινάση Src.

Η **Src** βρίσκεται ιδιόσυστατα συνδεδεμένη μέσω της SH3 περιοχής της με την κυτταροπλασματική ουρά των β3 ιντεγκρινών. Η Src, όπως και όλα τα μέλη της οικογένειάς της σε κατάσταση ηρεμίας, βρίσκεται σε αυτοαναστολή λόγω της σύνδεσης της φωσφορυλιωμένης COOH-τελικής τυροσίνης τους με την SH2 περιοχή τους. Η σύνδεση της Tyr397 με την περιοχή SH2 της Src εκτοπίζει την ενδομοριακή της αλληλεπίδραση με την Tyr527 του COOH-τελικού άκρου, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της Src. Η ενεργοποιημένη Src φωσφορυλιώνει επιπλέον κατάλοιπα Tyr στον βρόχο ενεργοποίησης της FAK (pTyr576 και pTyr577), οδηγώντας στη μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα της κινάσης. Η pTyr397 αποτελεί, επίσης, θέση σύνδεσης για την SH2 περιοχή της PLCγ, της SOCS (Suppressor Of Cytokine

Εικόνα 9.58
Ενεργοποίηση της FAK από την κινάση Src. Στην κατάσταση ηρεμίας η FAK βρίσκεται σε διαμόρφωση αυτοαναστολής στο κυτταρόπλασμα. Μετά τη σύνδεση των ιντεγκρινών σε πρωτεΐνες της ECM η FAK, μέσω της περιοχής FERM, συνδέεται στην κυτταροπλασματική ουρά της β-ιντεγκρίνης και αυτοφωσφορυλιώνεται. Στην pTyr397 συνδέεται η Src μέσω της SH2 περιοχής της και φωσφορυλιώνει την FAK, σε πολλαπλά κατάλοιπα, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δραστηριότητα. [38] [61]

Signalling), της Grb7 (Growth-factor-receptor-bound protein 7), της πρωτεΐνης προσαρμογής Shc, της p120-RasGAP και της p85 ρυθμιστικής υπομονάδας της PI3K. Δεν είναι γνωστό αν αυτές οι διαφορετικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες συνδέονται στην pTyr397 σε απόκριση συγκεκριμένων κυτταρικών ερεθισμάτων ή εάν ταυτόχρονα υπάρχουν διαφορετικά σύμπλοκα με ένα μεγαλύτερο σύνολο ενεργοποιημένων FAK. Η Src φωσφορυλιώνει τη FAK και σε επιπλέον κατάλοιπα, όπως την Tyr925, η οποία λειτουργεί ως θέση σύνδεσης για την πρωτεΐνη προσαρμογής Shc, η οποία συνδέει την Grb2/Sos και ενεργοποιεί το μονοπάτι της Ras/ERK, απαραίτητο για την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο. Επίσης, φωσφορυλιώνει την Tyr861, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη σύνδεση της p130Cas, η οποία αρχικά συνδέεται στις COOH-τελικές πλούσιες σε προλίνη περιοχές της FAK, Pro2 και Pro3 (Εικόνα 9.58). Η Src φωσφορυλιώνει εκτός από κατάλοιπα Tyr της FAK και τυροσίνες των πρωτεϊνών p130Cas και παξιλλίνη.

Η FAK παίζει, επιπλέον, ρόλο στην ενεργοποίηση μικρών GTPασών της οικογένειας Rho με άμεση σύνδεση και φωσφορυλίωση των παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων τους. Αυτό είναι σημαντικό επειδή οι GTPάσες Rho διαμορφώνουν τον σχηματισμό των θέσεων εστιακής προσκόλλησης. Η FAK συνδέεται με τον p190-RhoGEF κατευθείαν μέσω της pTyr861 εντός της περιοχής FAT και η συν-έκφραση των δύο μορίων έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της φωσφορυλίωσής τους, καθώς επίσης και την ανταλλαγή του GDP με GTP στις Rho. Εκτός από τον p190-RhoGEF, ένας άλλος RhoGEF, ο Trio, συνδέεται μέσω της SH3 περιοχής του στην πλούσια σε προλίνη (Pro1) περιοχή της FAK. Ο ακριβής ρόλος αυτής της αλ-



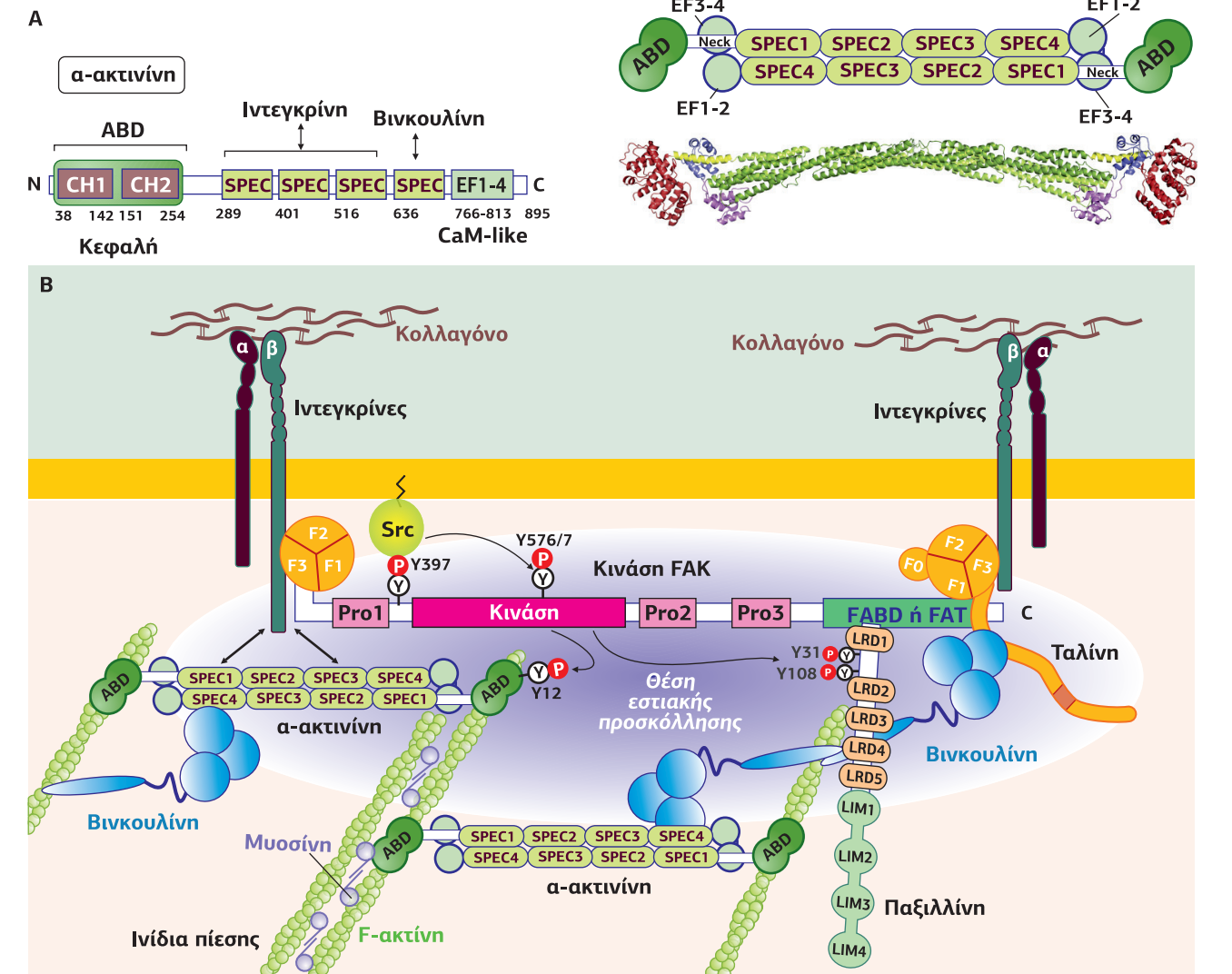
ληπίδρασης παραμένει ασαφής, αν και φαίνεται να ενισχύει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της FAK.

Η ενεργοποιημένη FAK αφενός δημιουργεί ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα δρώντας ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς, που οργανώνει τη δημιουργία των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, και αφετέρου μέσω πολλαπλών φωσφορυλίωσεων σε συνεργασία με την Src παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού. Πριν περιγράψουμε τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο FAK/Src, θα αναφερθούμε στην περίπτωση της α-ακτινίνης, η φωσφορυλίωση της οποίας από την FAK μειώνει τη συγγενεία της για την ακτίνη και εμποδίζει τον εντοπισμό της στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης.

Η α-ακτινίνη είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού που συνδέεται στην ακτίνη και αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας της σπεκτρίνης. Δημιουργεί ένα αντιπαράλληλο επίμηκες διμερές, με μορφή ράβδου, με μία περιοχή σύνδεσης της ακτίνης σε κάθε άκρο της ράβδου. Στα μη-μυϊκά κύτταρα η α-ακτινίνη βρίσκεται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης κατά μήκος των ινιδίων ακτίνης, όπου συνδέεται και με άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η βινκουλίνη, και σταθεροποιεί το δίκτυο των ινιδίων της ακτίνης.

Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας της σπεκτρίνης έχουν στο NH₂-τελικό άκρο τους μια χαρακτηριστική περιοχή σύνδεσης της ακτίνης, την

Εικόνα 9.59
Η α-ακτινίνη και ο ρόλος της.
Α. Η α-ακτινίνη περιέχει μια περιοχή ABD, η οποία συνδέεται μέσω μιας εύκαμπτης περιοχής λαιμού με 4 επαναλήψεις σπεκτρίνης (SPEC1-4), που σχηματίζουν την κεντρική ράβδο και ακολουθούνται από μια COOH-τελική περιοχή CaM-like, η οποία αποτελείται από 4 EF-hand. Η α-ακτινίνη απαντάται ως αντιπαράλληλο διμερές. [68]
Β. Μόλις αλληλεπιδράσει με ιντεγκρίνες, η FAK αυτοφωσφορυλιώνεται, δημιουργώντας σημείο πρόσδεσης για την Src. Η περιοχή FAT προσδένει την παξιλλίνη και την ταλίνη, συνδέοντας έτσι την FAK στις θέσεις FA όπου βρίσκεται η α-ακτινίνη. Η φωσφορυλίωση της Tyr12 της α-ακτινίνης από την FAK αποσταθεροποιεί τη σύνδεσή της με την ακτίνη διευκολύνοντας την κυτταρική μετανάστευση. Στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης βρίσκεται επίσης και η βινκουλίνη, η οποία συνδέεται με την α-ακτινίνη (στην περιοχή SPEC4), με την παξιλλίνη (στις LRD1 και LRD4) και με την ταλίνη (στις περιοχές R2-R3). [62] [47] [89]



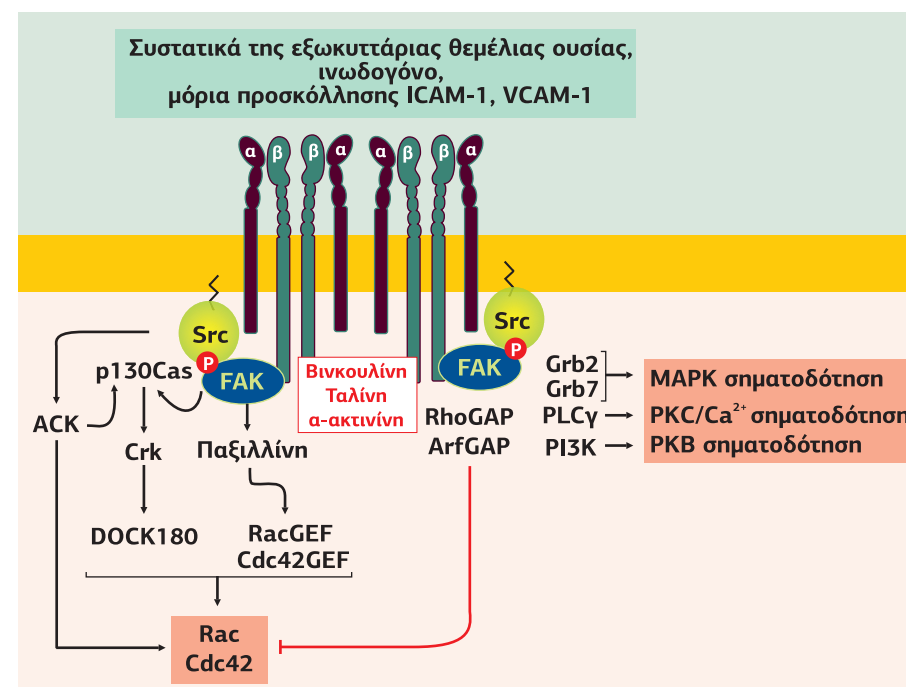
ABD (Actin-Binding Domain), που αποτελείται από δύο διαδοχικές περιοχές CH (Calponin Homology). Η ABD συνδέεται, μέσω μιας εύκαμπτης περιοχής λαιμού, σε μια περιοχική ουράς, που περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις σπεκτρίνης (SPEC, spectrin repeats), ο αριθμός των οποίων καθορίζει το μήκος και την ευελιξία της πρωτεΐνης, που συνδέεται με την ακτίνη και, συνεπώς, τη φύση των σταυρο-συνδέσεων των ινιδίων ακτίνης. Η α-ακτινίνη περιέχει τέσσερις επαναλήψεις σπεκτρίνης που σχηματίζουν την κεντρική ράβδο και ακολουθούνται από μια COOH-τελική περιοχική CaM-like, η οποία μοιάζει με την καλμοδουλίνη και αποτελείται από τέσσερα μοτίβα EF-hand. Αυτή η μοριακή αρχιτεκτονική έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός μορίου μορφής ράβδου με λειτουργικές περιοχές (ABD και CaM) και στα δύο άκρα, επιτρέποντας τη σταυροσύνδεση των ινιδίων ακτίνης σε δεσμίδες. Η α-ακτινίνη μέσω των περιοχών SPEC1-3 συνδέεται στη β-ιντεγκρίνη, ενώ μέσω της SPEC4 συνδέεται με την κεφαλή της βινκουλίνης. Η βινκουλίνη με τη σειρά της συνδέεται μέσω της COOH-τελικής περιοχής ουράς με την F-ακτίνη (Εικόνα 9.59A). Η σύνδεση του Ca²⁺ στα EF-hands μειώνει τη συγγένεια της α-ακτινίνης για την ακτίνη.

Η ενεργοποιημένη FAK φωσφορυλιώνει την Tyr12 της α-ακτινίνης. Η φωσφορυλίωση αυτή μειώνει τη συγγένεια της α-ακτινίνης για την ακτίνη. Επιπλέον, η αυξημένη φωσφορυλίωση της Tyr12, που προκαλείται από την υπερνευροποιημένη FAK, εξασθενεί τη δύναμη των συνδέσεων, που δημιουργούνται ανάμεσα στις ιντεγκρίνες και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, και μεταβάλλει τη δυναμική των θέσεων εστιακής προσκόλλησης. Συνεπώς, η φωσφορυλίωση της α-ακτινίνης χρησιμεύει για τη ρύθμιση της σύνδεσης / αποσύνδεσης των ιντεγκρινών στον κυτταροσκελετό, προωθώντας την κυτταρική μετανάστευση.

Το αμοιβαία ενεργοποιημένο σύμπλεγμα FAK/Src πυροδοτεί μια χιονοστιβάδα φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στο δίκτυο σηματοδοτικών πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας έναν μεγάλο αριθμό μονοπατιών σηματοδότησης. Δύο από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες στόχους του συμπλέγματος FAK/Src είναι η **p130Cas** και η **παξιλλίνη**. Οι οδοί που ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο FAK/Src είναι:

1. Παξιλλίνη - RacGEF, Cdc42GEF - Rac-GTP, Cdc42-GTP
2. p130Cas - Crk - DOCK180
3. Grb2, Grb7 - MAPK σηματοδότηση
4. PLCγ - PKC - Ca²⁺
5. PI3K - PIP₃ - PKB/Akt

Εικόνα 9.60
Στόχοι των FAK/Src. Τα εισερχόμενα σήματα προκαλούν τη συσσώρευση ιντεγκρινών στα σημεία εστιακής προσκόλλησης. Τα συσσωματώματα των ενεργοποιημένων ιντεγκρινών συναρμολογούν στην κυτταροπλασματική πλευρά μεγάλα σύμπλοκα κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών (ταλίνη, βινκουλίνη, α-ακτινίνη), καθώς και την κινάση τυροσίνης FAK. Μόλις αυτοφωσφορυλιωθεί, η FAK λειτουργεί ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς για την κινάση Src, η οποία συνδέεται στην pTyr397 μέσω της SH2 περιοχής της. Το σύμπλοκο των κινάσεων FAK/Src οδηγεί: α. στην ενεργοποίηση των GTPασών Rac και Cdc42 μέσω τριών μονοπατιών: ACK, p130Cas-Crk-DOCK180 και παξιλλίνης-RacGEF/Cdc42GEF, β. στην αναστολή των Rac και Cdc42, μέσω ενεργοποίησης των RhoGAP και ArfGAP, και γ. στην ενεργοποίηση των MAPK (μέσω Grb2/7), της σηματοδότησης PKC/Ca²⁺ (μέσω της PLCγ) και της κινάσης PKB/Akt (μέσω της κινάσης PI3K και των PIP₃).



Το μονοπάτι Παξιλλίνη - RacGEF, Cdc42GEF - Rac-GTP, Cdc42-GTP

Η **παξιλλίνη** (paxillin) είναι μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού και ταυτόχρονα μια πρωτεΐνη σκαλωσιάς, που συνδέει τις ιντεγκρίνες με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η βινκουλίνη, αλλά και με σηματοδοτικά μόρια, όπως οι κινάσες FAK και ILK, η φωσφατάση PTP-PEST, η πρωτεΐνη ArfGAP PKL και ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων βPix. Η ονομασία της προέρχεται από το λατινικό paxillus, δηλαδή πάσσαλος. Ανακαλύφθηκε το 1989 ως μια πρωτεΐνη 68 kDa, που φωσφορυλιώνεται από τις κινάσες Src και FAK. Περιέχει στο NH₂-τελικό της άκρο πέντε μοτίβα πλούσια σε λευκίνη LRD (Leucine-Rich Domains), τα οποία αλληλεπιδρούν με τις κινάσες FAK και ILK, τις πρωτεΐνες προσαρμογής α-parvin (ή actopaxin) και β-parvin, την πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού βινκουλίνη και την ArfGAP PKL (Paxillin kinase linker) γνωστή και ως GIT2. Στο COOH-τελικό της άκρο η παξιλλίνη περιέχει τέσσερις περιοχές LIM, πλούσιες σε Cys που δημιουργούν δύο zinc fingers η καθεμία. Μέσω των περιοχών LIM η παξιλλίνη συνδέεται στην πλασματική μεμβράνη και αλληλεπιδρά με τη φωσφατάση PTP-PEST (Εικόνα 9.61A).

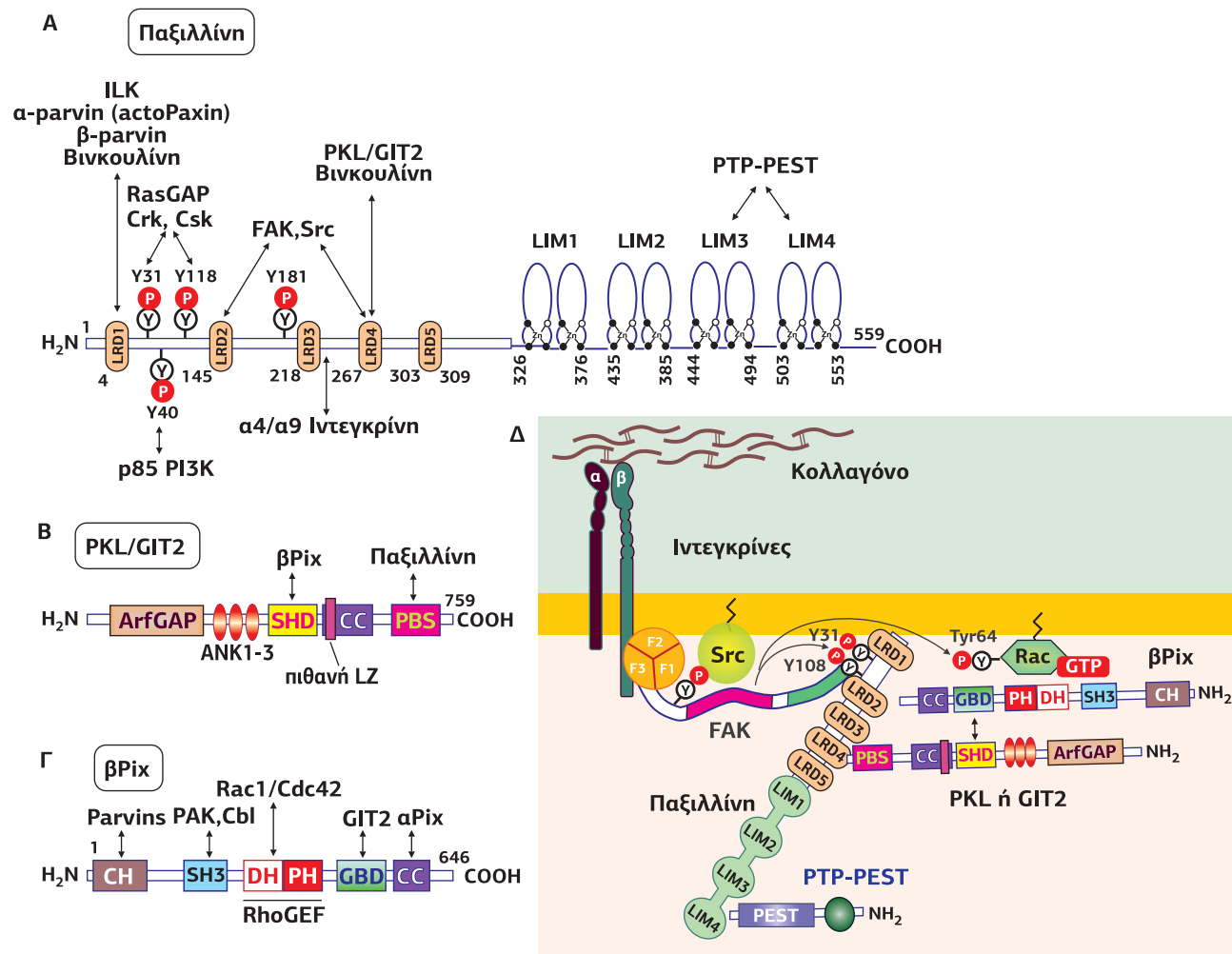
Η παξιλλίνη στρατολογείται στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης, όπου συνδέεται άμεσα με τις β1 και α4 ιντεγκρίνες. Η παξιλλίνη, μετά τη σύνδεσή της στις ενεργοποιημένες από πρωτεΐνες της ECM ιντεγκρίνες, συνδέεται μέσω της LRD2 και LRD4 με την περιοχική FAT της FAK. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται από την FAK σε κατάλοιπα τυροσίνης, τα οποία αποτελούν θέσεις σύνδεσης πρωτεϊνών με SH2 περιοχές. Για παράδειγμα, στις pTyr31 και pTyr118 συνδέονται οι πρωτεΐνες προσαρμογής Crk και Csk, καθώς και η RasGAP, ενώ στην pTyr40 η υπομονάδα p85 της κινάσης PI3K.

Το κύριο μονοπάτι που ενεργοποιεί η παξιλλίνη οδηγεί στην ενεργοποίηση των μικρών GTPασών Rac/Cdc42. Η παξιλλίνη μέσω του μοτίβου LRD4 αλληλεπιδρά με την ArfGAP PKL (Paxillin Kinase Linker), γνωστή και ως **GIT2**.

Οι πρωτεΐνες GIT αλληλεπιδρούν με G protein-coupled receptor kinases και έχουν δραστηριότητα ArfGAP. Μοιράζονται μια κοινή αρχιτεκτονική: αποτελούνται από μια NH₂-τελική περιοχική ArfGAP, τρεις επαναλήψεις αγκυρίνης (ANK), που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, και μια περιοχική SHD (Sra2-Homology Domain). Η **περιοχή SHD** είναι μια διαδοχική επανάληψη, που υπάρχει μόνο στις πρωτεΐνες GIT1 και GIT2, καθώς και στις πρωτεΐνες Sra2 και Sph1 των ζυμομυκήτων, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων και απαιτείται για μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος. Ένα πολύπλοκο σύνολο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων λαμβάνει χώρα στην περιοχική SHD, για να σχηματιστεί ένα μεγάλο ολιγομερές σύμπλεγμα. Η κύρια πρωτεΐνη που συνδέεται στην SHD είναι ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Rac1/Cdc42-GEF βPix (PAK interacting exchange factor), ο οποίος φωσφορυλιώνεται επίσης από το σύμπλοκο FAK/Src. Οι πρωτεΐνες Pix (α-Pix και β-Pix) περιέχουν τη διπλή περιοχική DH/PH (Dbl-Homology and Pleckstrin-Homology), χαρακτηριστική για τους GEFs της οικογένειας Rho. Δρουν ως GEFs για τις GTPάσες Rac2 και Cdc42, οι οποίες είναι οι κύριοι ρυθμιστές της δυναμικής της ακτίνης και της εστιακής προσκόλλησης. Οι GIT περιέχουν, επίσης, μια περιοχική coiled-coil, και τέλος, στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχική PBS (Paxillin Binding Subdomain), όπου συνδέεται η παξιλλίνη (Εικόνα 9.61B, Γ). Οι πρωτεΐνες PKL/GIT2 και βPix μετά τη σύνδεσή τους στην παξιλλίνη φωσφορυλιώνονται από την FAK και ενεργοποιούνται, επάγοντας την ενεργοποίηση των Rac/Cdc42, την κυτταρική πολικότητα και τη σταθερότητα των ελασματοποδίων.

Η FAK, εκτός από την ενεργοποίηση των Rac/Cdc42-GEFs, ενεργοποιεί και πρωτεΐνες GAPs, εξασθενώντας τη δραστηριότητα των Rac-GTP και Cdc42-GTP μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Με αυτόν τον τρόπο το σύμπλεγμα FAK-παξιλλίνης είναι ένας ενεργοποιητής των Rac και Cdc42 με έναν ενσωματωμένο μηχανισμό αυτοελέγχου.

Η κατάσταση φωσφορυλίωσης των συστατικών των θέσεων εστιακής προσκόλλησης αντισταθμίζεται από τη δράση διαφόρων πρωτεϊνικών φωσφατάσων τυροσίνης. Για παράδειγμα, η PTP-PEST (ή PTPN12) ρυθμίζει αρνητικά τη φωσφορυλίωση της FAK, της p130Cas και της παξιλλίνης.



Εικόνα 9.61

Η δομή της παξιλλίνης και οι θέσεις αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες των θέσεων εστιακής προσκόλλησης. Α. Η παξιλλίνη περιέχει στο NH₂-τελικό της άκρο πέντε μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (LRD), τα οποία αλληλεπιδρούν με τις κινάσες FAK/Src και ILK, την α-parvinin (ή actopaxin) και β-parvinin, τη βινκουλίνη και την ArfGAP PKL (ή GIT2). Στο COOH-τελικό της άκρο η παξιλλίνη περιέχει 4 περιοχές LIM, πλούσιες σε Cys που δημιουργούν δύο zinc fingers η καθεμία. Β. Η PKL/GIT2 είναι μια ArfGAP που περιέχει τρεις περιοχές αγκυρίνης (ANK), μία περιοχή SHD, μία περιοχή coiled-coil και, τέλος, μία περιοχή σύνδεσης με την παξιλλίνη (PBS, Paxillin Binding Sequence). Γ. Ο βPix είναι ένας RhoGEF που περιέχει την κλασική περιοχή DH/PH, μία περιοχή CH, μία περιοχή SH3 και μία περιοχή σύνδεσης της GIT2, η οποία συνδέεται στην SHD περιοχή των GIT. [7] [50] [25] Δ. Ο ρόλος της παξιλλίνης στην ενεργοποίηση των Rac/Cdc42, μέσω του συμπλόκου παξιλλίνη - PKL/GIT2 - βPix - Rac-GTP. Η FAK συνδέεται μέσω της FAT περιοχής στην παξιλλίνη και την φωσφορυλιώνει, καθώς και στις πρωτεΐνες PKL/GIT2, βPix επάγοντας την ενεργοποίηση της Rac-GTP, την οποία επιπλέον φωσφορυλιώνει στην Tyr64, ενισχύοντας τη δραστηριότητά της.

Ο ρόλος της κινάσης ACK1 στην ενεργοποίηση των Rac/Cdc42

Εκτός από την παξιλλίνη, τελεστές του συμπλόκου FAK/Src είναι η κινάση ACK και η πρωτεΐνη p130Cas, οι οποίες επίσης οδηγούν στην ενεργοποίηση των GTPασών Rac και Cdc42.

Η **ACK1** (Activated Cdc42-associated Kinase) ή TNK2 (Tyrosine kinase, non-receptor, 2) είναι μια κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης, 120 kDa, που περιέχει πολλές λειτουργικές περιοχές, όπως μια περιοχή SAM (Sterile α-Motif), μια περιοχή κινάσης τυροσίνης, μια περιοχή SH3 (Src Homology 3), που συνεισφέρει στον εντοπισμό της ACK1 καθώς και στην ουβικουιτίνωσή της, μια περιοχή CRIB (Cdc42/Rac-Interacting Binding Domain), η οποία συνδέεται με την Cdc42-GTP, μια περιοχή όπου συνδέεται η πρωτεΐνη SNX9 (Sorting Nexin 9), μια περιοχή CBD (Clathrin-Binding Domain), όπου συνδέεται η κλαθρίνη, μια περιοχή WWBD (WW-Binding

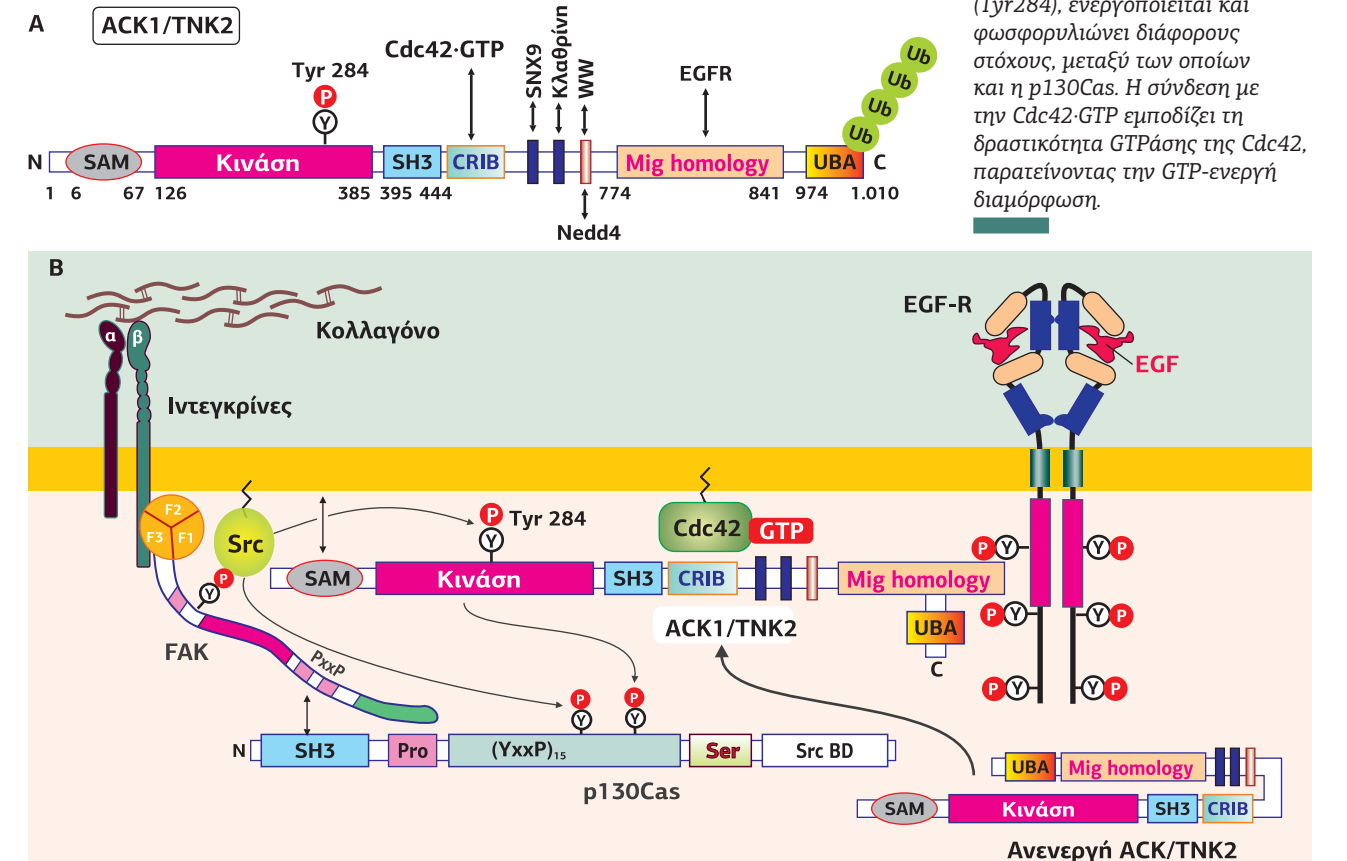
Η **ACK1** συναγωνίζεται τη β-αρρεστίνη για τη σύνδεση στην NH₂-τελική περιοχή της κλαθρίνης. Η σύνδεση της ACK1 με τα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2 δείχνει ότι συμμετέχει στην εσωτερική κίνηση των υποδοχέων.

domain), που συνδέεται σε πρωτεΐνες με WW περιοχές (όπως η E3 λιγάση Nedd4), μια περιοχή EBD (EGFR-Binding Domain), γνωστή και ως περιοχή με μεγάλη ομολογία με την Mig6 (Mitogen inducible gene-6) και, τέλος, η περιοχή Uba (Ubiquitin association), όπου συνδέεται η ουβικουιτίνη (**Εικόνα 9.62**).

Η ACK1 αρχικά ανακαλύφθηκε ως ένας τελεστής της GTPάσης Cdc42. Συνδέεται μέσω μιας περιοχής CRIB (Cdc42/Rac-Interactive Binding) στην GTP μορφή της Cdc42, αναστέλλοντας τόσο την ενδογενή δραστηριότητα GTPάσης της Cdc42 όσο και την ενεργοποιούμενη από την GAP δραστηριότητα GTPάσης, εμποδίζοντας έτσι τον τερματισμό του σήματος. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της Cdc42-GTP στη μεταγωγή σήματος. Ταυτόχρονα, η σύνδεση με τη Cdc42-GTP αίρει την αυτοαναστολή της ACK. Η ACK φωσφορυλιώνεται κι ενεργοποιείται από την Src. Η ενεργοποιημένη ACK φωσφορυλιώνει, στη συνέχεια, την p130Cas προωθώντας τη δημιουργία του συμπλόκου p130Cas - Crk - DOCK180, που δρα ως RacGEF και συμμετέχει στη μετανάστευση, προσκόλληση και διασπορά των κυττάρων.

Το μονοπάτι p130Cas - DOCK180 - Rac, Cdc42

Το τρίτο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα FAK/Src και συμμετέχει στην προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης είναι το μονοπάτι της **p130Cas**. Η Cas (Crk-associated kinase substrate) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1990 ως μια υπερφωσφορυλιωμένη σε τυροσίνες πρωτεΐνη σε κύτταρα που μετασχηματίστηκαν από τα ογκογονίδια *v-crk* και *v-src*. Δεν έχει ενζυμική δραστηριότητα, αλλά είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη σκαλωσιάς, η οποία αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μέσω των διαφόρων περιοχών και μοτιβών της.



Εικόνα 9.62

Η δομή της κινάσης ACK1 και ο ρόλος της. Α. Περιέχει, ξεκινώντας από το NH₂-τελικό άκρο, μια περιοχή SAM, μια περιοχή κινάσης τυροσίνης, μια περιοχή SH3, μια περιοχή CRIB, η οποία συνδέεται με τη Cdc42-GTP, μια περιοχή όπου συνδέεται η πρωτεΐνη SNX9, μια περιοχή CBD, όπου συνδέεται η κλαθρίνη, μια περιοχή WWBD (WW-Binding Domain), μια περιοχή EBD, όπου συνδέονται οι υποδοχείς EGFRs, γνωστή και ως περιοχή με μεγάλη ομολογία με τη Mig6, και τέλος η περιοχή Uba, όπου συνδέεται η ουβικουιτίνη. [43] [54] Β. Στην κατάσταση ηρεμίας η ACK1 βρίσκεται σε αυτοαναστολή στο κυτταρόπλασμα. Όταν συνδεθεί στην ενεργοποιημένη Cdc42-GTP, αίρεται η αυτοαναστολή, φωσφορυλιώνεται στον βρόχο ενεργοποίησης από την Src (Tyr284), ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει διάφορους στόχους, μεταξύ των οποίων και η p130Cas. Η σύνδεση με την Cdc42-GTP εμποδίζει τη δραστηριότητα GTPάσης της Cdc42, παρατείνοντας την GTP-ενεργή διαμόρφωση.

Η p130Cas περιέχει μια περιοχή SH3, η οποία συνδέεται στις πλούσιες σε προλίνη περιοχές της αυτοφωσφορυλιωμένης FAK, που βρίσκεται συνδεδεμένη με την Src. Όταν η p130Cas φωσφορυλιώνεται από την Src στην Tyr12 (μέρος της περιοχής SH3), η SH3 αλληλεπιδρά με την περιοχή πολυπρολίνης PPKP της βιν-

κουλίνης. Η περιοχή SH3 ακολουθείται από μία περιοχή πλούσια σε προλίνη, μία περιοχική υποστρώματος, που αποτελείται από 15 μοτίβα YxxP, μία περιοχική πλούσια σε σερίνη (SRD, Serine Rich Domain) και μία COOH-τελική περιοχική που περιέχει το μοτίβο YDYVHL, όπου δεσμεύεται η Src. Η φωσφορυλίωση της περιοχικής υποστρώματος αποδίδεται κυρίως στη Src, ενώ η FAK μπορεί να φωσφορυλιώσει το μοτίβο YDYVHL. Μόλις φωσφορυλιωθούν, τα μοτίβα YxxP γίνονται θέσεις πρόσδεσης για αρκετά μόρια που περιέχουν περιοχές SH2, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών προσαρμογής Crk, Nck1 και της φωσφατάσης PTP-PEST (Εικόνα 9.63A). Ο σχηματισμός του συμπλόκου p130Cas/Crk παίζει έναν βασικό ρόλο στη ρύθμιση των αναδιπλώσεων της μεμβράνης (membrane ruffling) και στην κυτταρική μετανάστευση μέσω της DOCK180 και της Rac-GTP.

Η p130Cas είναι γνωστή και ως **BCAR1** (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 1) καθώς, εκτός από τον ρόλο της στη σηματοδότηση στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης, παίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

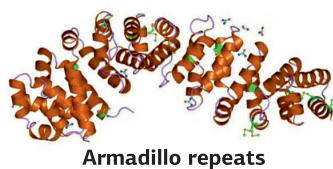
Η **Crk** ανακαλύφθηκε το 1988 ως μια ιική ογκοπρωτεΐνη και εσφαλμένα θεωρήθηκε πως είναι κινάση (κι επομένως ονομάστηκε "*Chicken tumor virus regulator kinase*"). Η Crk αντιπροσωπεύει μια οικογένεια ευρέως διαδεδομένων πρωτεϊνών προσαρμογής, με μία περιοχική SH2, δύο περιοχές SH3, συνδεδεμένες με ευέλικτους linkers. Μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε περίπου 15 κατάλοιπα τυροσίνης, που λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης για πρωτεΐνες με περιοχές SH2 ή PTB, συμπεριλαμβανομένων των PI3K, Gab1 και Grb2. Με αυτόν τον τρόπο η Crk μπορεί να ενεργοποιήσει τα μονοπάτια PI3K/ PKB και Gab/ Grb2-Ras-MAP κινάσης, που αποτελούν το "πρόγραμμα επιβίωσης" του κυττάρου. Έτσι εξηγείται γιατί οι μεταλλάξεις της Crk είναι δυνητικά ογκογόνες.

Η CrkII αλληλεπιδρά με τη φωσφορυλιωμένη p130Cas μέσω της SH2 περιοχικής της και μέσω της nSH3 περιοχικής με την πλούσια σε προλίνη περιοχική της DOCK180. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές παίζουν κρίσιμο ρόλο στη δράση της p130Cas. Η φωσφορυλίωση της Tyr221 της CrkII (από την κινάση Abl) προκαλεί ενδομοριακή σύνδεση της περιοχικής linker με την περιοχική SH2, κρύβοντας τις περιοχές SH2 και nSH3 και παρεμποδίζοντας τη σύνδεση πρωτεϊνών-στόχων.

Το σύμπλοκο p130Cas/CrkII ενεργοποιεί τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης **DOCK180** (Dedicator of Cytokinesis) ή DOCK1. Ο DOCK180 δεν είναι ένας κλασικός RhoGEF, καθώς δεν έχει τη χαρακτηριστική περιοχική DH/PH (Dbl-Homology / Pleckstrin-Homology), που συναντάται σε όλους τους RhoGEFs. Αντίθετα, ο DOCK180 περιέχει μία καταλυτική περιοχική 450-550 αμινοξέων DHR2 (DOCK Homology Region), γνωστή και ως CZH2 ή Docker2, μία περιοχική 200-250 αμινοξέων DHR1 (CDM-zizimin homology 1), μέσω της οποίας συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, και στο COOH-τελικό άκρο μία περιοχική πλούσια σε προλίνη. Η DHR2 δεν εμφανίζει καμία ομοιότητα με την περιοχική DH των RhoGEFs, όπως ο Vav, ο P-Rex και ο Trio.

Ο DOCK180 αποκτά τη δραστηριότητά του συνδέοντας τις πρωτεΐνες σκαλωσιάς CrkII και **ELMO** (Engulfment and Cell Motility) και μόνο όταν συναρμολογείται σε αυτό το σύμπλεγμα ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση Rac. Η ELMO είναι μια πρωτεΐνη ~82 kDa που περιέχει στο NH₂-τελικό άκρο μια ομάδα επαναλήψεων **armadillo** που καλύπτουν τα 2/3 της πρωτεΐνης, στο κέντρο μια άτυπη περιοχική PH (aPH) και στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχική πλούσια σε προλίνη. Μια επανάληψη armadillo είναι μια χαρακτηριστική, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 40 αμινοξέων που βρίσκεται σε πολλές πρωτεΐνες. Κάθε επανάληψη armadillo αποτελείται από ένα ζευγάρι από α-έλικες, που σχηματίζουν μια δομή φουρκέτας. Πολλαπλά αντίγραφα της δημιουργούν μια δομή άλφα σωληνοειδούς. Ο όρος armadillo προέρχεται από την ιστορική ονομασία του γονιδίου β-κατενίνης στην *Drosophila*, όπου ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά οι επαναλήψεις armadillo. Παραδείγματα πρωτεϊνών που περιέχουν επαναλήψεις armadillo περιλαμβάνουν την β-κατενίνη, την α-importin, την APC (Adenomatous Polyposis Coli) κ.λπ.

Η **zizimin1** είναι ένας Cdc42GEF, ο οποίος όπως και ο RacGEF DOCK180 ανήκουν στους 11 RhoGEFs της υποοικογένειας CZH, τα μέλη της οποίας περιέχουν δύο καλά συντηρημένες περιοχές DHR1 και DHR2. Υπάρχουν 69 RhoGEFs που περιέχουν περιοχική DH/PH.

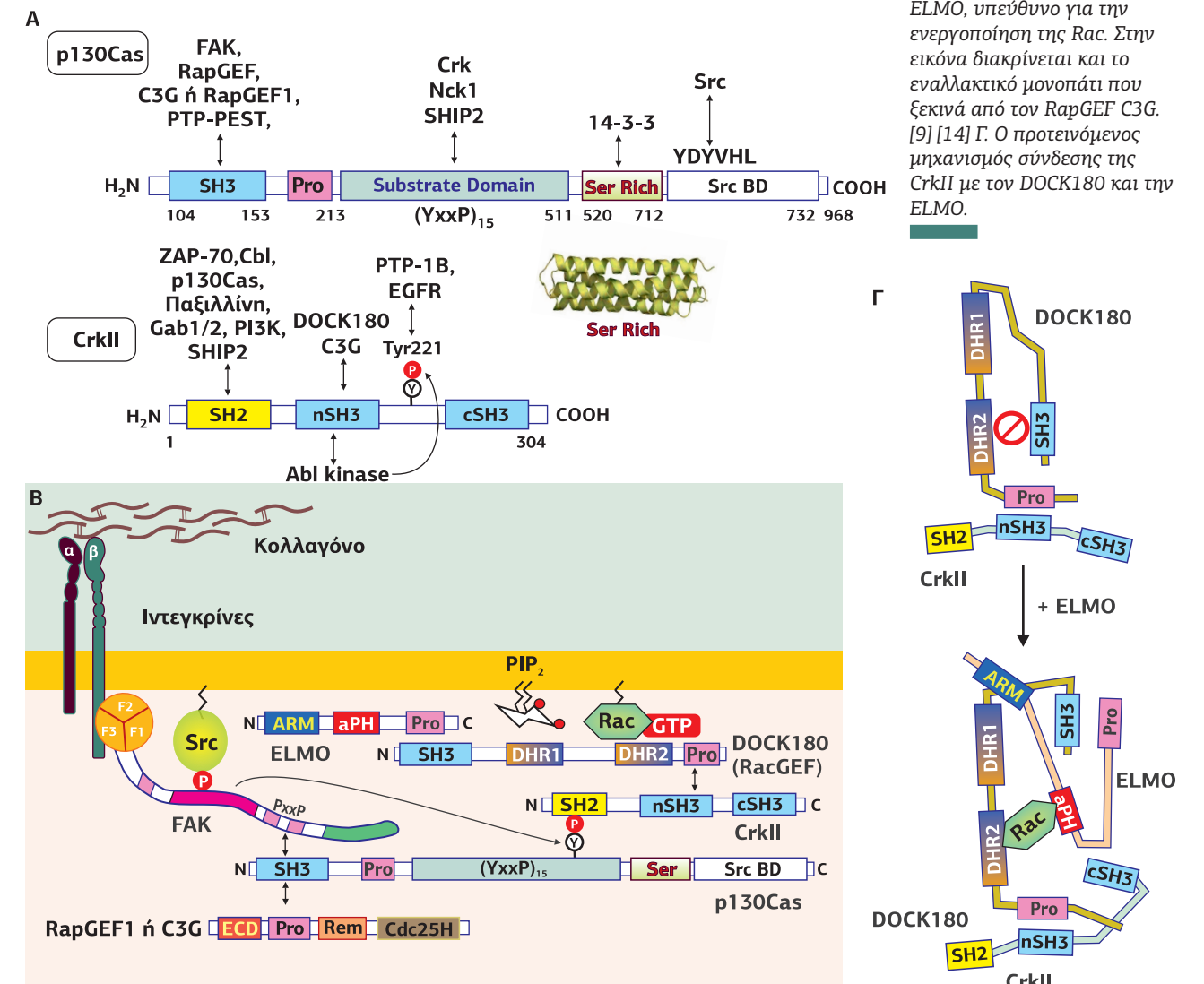


Armadillo repeats

Η αλληλεπίδραση DOCK180/ELMO απαιτεί την περιοχική PH της ELMO, ενώ συμμετέχει επίσης και η πλούσια σε προλίνη περιοχική της ELMO, η οποία αλληλεπιδρά με την SH3 του DOCK180. Ο τρόπος με τον οποίο η ELMO ρυθμίζει τη σηματοδότηση μέσω του DOCK180 RacGEF δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Έχει προταθεί ένας μηχανισμός διακόπτη, σύμφωνα με τον οποίο ο DOCK βρίσκεται σε αναστολή, καθώς η SH3 περιοχική του συνδέεται με την DHR2. Η ELMO αίρει αυτή την αυτοαναστολή, καθώς μέσω της PRD συνδέεται με την SH3 του DOCK180 (Εικόνα 9.63Γ). Το σύμπλεγμα DOCK180/ELMO1 συνδέεται με την χωρίς νουκλεοτίδια Rac1 μέσω της περιοχικής Docker της DOCK180, επάγοντας τη φόρτωση του GTP. Η δραστηριότητα του RacGEF βρίσκεται εντός της πρωτεΐνης DOCK180, αν και σταθεροποιείται ή αυξάνεται με τη δέσμευσή της στην ELMO. Η ενεργοποίηση της Rac, μέσω αυτού του μηχανισμού ενισχύει περαιτέρω τη φωσφορυλίωση της p130Cas, καθώς και τη σύνδεση p130Cas/CrkII, υποδεικνύοντας έναν μηχανισμό θετικής ανάδρασης που προωθεί την αυξημένη μετανάστευση κυττάρων.

Οι p130Cas και Crk συνεισφέρουν, επίσης, στην ενεργοποίηση των GTPασών της οικογένειας Ras, δημιουργώντας σύμπλοκο με έναν πιο συμβατικό παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων, τον C3G. Ο C3G συνδέεται μέσω των πλούσιων σε προλίνη μοτίβων στις περιοχές SH3 των p130Cas και Crk, οι οποίες στρατολογούν τον GEF στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Ο C3G ενεργοποιεί τις Rap1 και R-Ras, οι οποίες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών από μέσα προς τα έξω.

Ο τρόπος με τον οποίον τα κύτταρα ρυθμίζουν εάν το σύμπλεγμα p130Cas/Crk



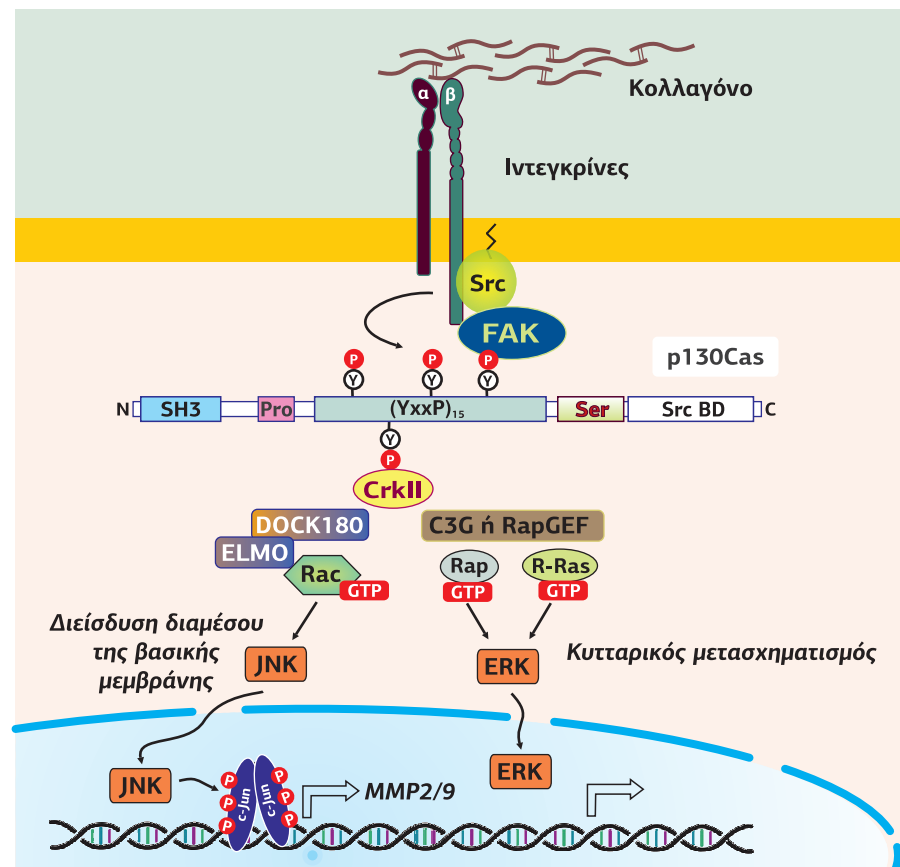
Εικόνα 9.63
Το σύμπλεγμα p130Cas - CrkII - DOCK180 - ELMO στην ενεργοποίηση της Rac. Α. Η δομή των πρωτεϊνών προσαρμογής p130Cas και CrkII. Β. Το μονοπάτι μέσω του οποίου η φωσφορυλίωση της p130Cas από την FAK οδηγεί στη δημιουργία του συμπλόκου p130Cas - CrkII - DOCK180/ELMO, υπεύθυνου για την ενεργοποίηση της Rac. Στην εικόνα διακρίνεται και το εναλλακτικό μονοπάτι που ξεκινά από τον RapGEF C3G. [9] [14] Γ. Ο προτεινόμενος μηχανισμός σύνδεσης της CrkII με τον DOCK180 και την ELMO.

θα αλληλεπιδράσει με το σύμπλοκο DOCK180/ELMO ή με τον C3G, ρυθμίζοντας με αυτρήν τον τρόπο χωρικά ή χρονικά τη σηματοδότηση, δεν είναι ακόμα γνωστός. Αυτά τα ερωτήματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς το λειτουργικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του DOCK180/ELMO, που οδηγεί στη μετακίνηση των κυττάρων με τη μεσολάβηση των Rac, διαφέρει από τη λειτουργική έκβαση του C3G, που οδηγεί σε αυξημένη προσκόλληση κυττάρων (Εικόνα 9.64). Με αυτόν τον τρόπο, είναι σαφές ότι τα διάφορα σύμπλοκα σηματοδότησης συναρμολογημένα σε εστιακές συμφύσεις είναι σημαντικοί ρυθμιστές της συμπεριφοράς των κυττάρων.

Διείσδυση των κυττάρων διαμέσου της βασικής μεμβράνης

Οι ιντεγκρίνες μπορούν να επηρεάσουν την προσκόλληση των κυττάρων, αλλά και την αποκόλλησή τους σε περίπτωση που αυτά πρέπει να μεταναστεύσουν. Η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας και των φραγμών των ιστών απαιτεί αυξημένη κυτταρική κινητικότητα και ρυθμίζεται από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Η έκφραση της FAK είναι αυξημένη σε διεισδυτικούς καρκίνους, υποδηλώνοντας την εμπλοκή των ιντεγκρινών στη διεισδυτικότητα των κυττάρων.

Επίσης, η μεταλλαγμένη v-Src οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση της FAK, γεγονός που συνδέεται με αύξηση της διεισδυτικότητας των κυττάρων. Ο διεισδυτικός φαινότυπος συνδέεται με την αύξηση των σηματοδοτικών συμπλόκων v-Src-FAK στα διεισδυτοπόδια (invadopodia), κυτταρικές προεκτάσεις πλούσιες σε ιντεγκρίνες και μεταλλοπρωτεάσες (MMP), οι οποίες χρησιμεύουν στην καταστροφή του φράγματος της βασικής μεμβράνης διευκολύνοντας τη διείσδυση των κυττάρων. Η αυτοφωσφορυλίωση της Tyr397 της FAK οδηγεί στη στρατολόγηση της Src στα διεισδυτοπόδια. Εκεί, η σηματοδότηση FAK-Src επάγει την ενεργοποίηση της JNK είτε μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης σκαλωσιάς της JNK, της JSAP1, είτε μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού p130Cas - CrkII - DOCK180/ELMO - Rac-GTP.



Εικόνα 9.64
Η φωσφορυλίωση της p130Cas από τις κινάσες FAK/Src οδηγεί στη σύνδεση και ενεργοποίηση της CrkII. Στη συνέχεια, η CrkII είναι ικανή να ενεργοποιήσει δύο μονοπάτια: είτε το μονοπάτι DOCK180/ELMO, υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της Rac και τη διείσδυση των κυττάρων διαμέσου της βασικής μεμβράνης, είτε το εναλλακτικό μονοπάτι που ξεκινά από τον RapGEF C3G, και οδηγεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η JNK είναι ένας από τους στόχους της Rac-GTP και είτε φωσφορυλιώνει την παξιλίνη στη Ser178, οδηγώντας σε αλλαγές του κυτταροσκελετού, είτε μέσω του c-Jun επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών MMP2, MMP9 (Εικόνα 9.64). Αποτέλεσμα είναι ο διεισδυτικός φαινότυπος του κυττάρου.

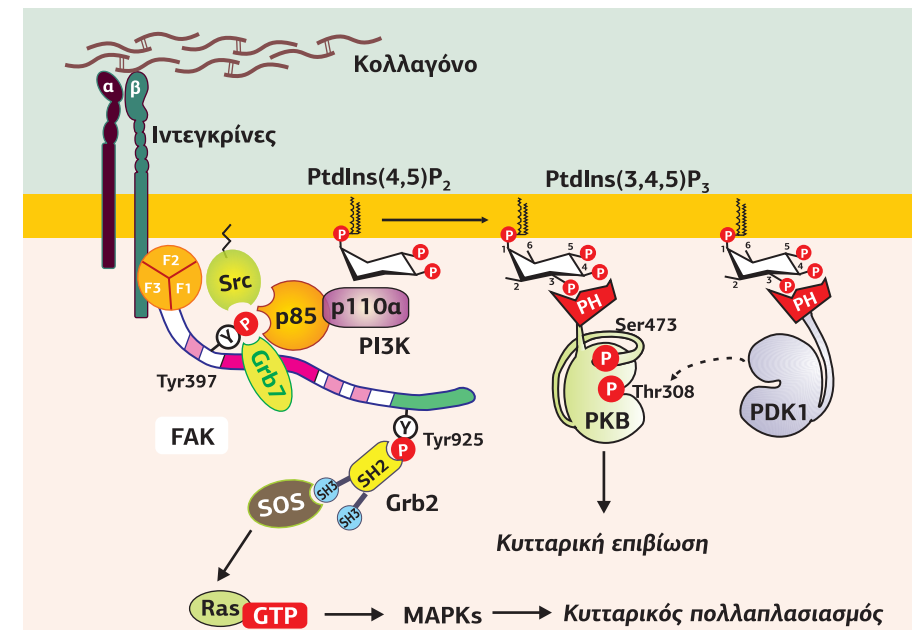
Το μονοπάτι PI3K: Μετανάστευση και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Ένα τρίτο μονοπάτι που μεσολαβεί στην προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ενεργοποιημένης FAK, μέσω της pTyr397, με την περιοχή SH2 τόσο της κινάσης PI3K όσο και της πρωτεΐνης προσαρμογής Grb7. Η FAK συνδέεται στις PI3K και Grb7 ανεξάρτητα, ωστόσο ο ρόλος των μονοπατιών FAK - PI3K και FAK - Grb7 στην κυτταρική μετανάστευση είναι συνεργατικός. Η ενεργοποιημένη PI3K διεγείρει τον RacGEF Vav1, ο οποίος συνδέεται μέσω της περιοχής PH στα PIP₃ της μεμβράνης και ενεργοποιεί τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της Rac-GTP (η οποία βρίσκεται σε αυξημένη συγκέντρωση στα ελασματόποδια). Επιπλέον, τα PIP₃ διευκολύνουν τη σύνδεση της Grb7 στην πλασματική μεμβράνη μέσω της PH, οδηγώντας σε αυξημένη φωσφορυλίωση της Grb7 από τη FAK.

Επίσης, η PI3K προάγει και την κυτταρική επιβίωση, καθώς οδηγεί στην παραγωγή των PIP₃, τα οποία παρέχουν θέσεις πρόσδεσης για την PH περιοχή της κινάσης PKB/Akt. Η PKB φωσφορυλιώνεται επιπλέον σε δύο κατάλοιπα Ser/Thr και ενεργοποιείται πλήρως. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνει (και απενεργοποιεί) πρωτεΐνες που θα οδηγούσαν το κύτταρο σε απόπτωση, όπως η Bad, η κασπάση-9, κ.λπ. (Εικόνα 9.65). Για τον ρόλο της PKB/Akt στην αναστολή της απόπτωσης και στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου βλέπε σσ. 427-429. Συνεπώς, η προσκόλληση των κυττάρων των ιστών (επιθηλιακά, ενδοθηλιακά) στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία τα προστατεύει ενάντια στην απόπτωση, ενώ όταν βρίσκονται σε εनावώρημα είναι επιρρεπή στην αυτοκαταστροφή.

Το μονοπάτι FAK - Grb2/SOS - Ras -MAPK

Μία σημαντική οδός που ενεργοποιείται από το σύμπλοκο FAK/Src είναι η οδός Ras-MEK-ERK, η οποία ενεργοποιείται από σήματα από ιντεγκρίνες και αυξητικούς παράγοντες. Η φωσφορυλίωση της κινάσης ERK2 ρυθμίζει τη δυναμική των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, καθώς και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική επιβίωση. Η σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών μπορεί να επηρεάσει την ενεργοποίηση των MAPKs σε πολλαπλά επί-



Εικόνα 9.65
Οι ιντεγκρίνες επάγουν την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στην pTyr397 της ενεργοποιημένης FAK συνδέονται η κινάση Src, η κινάση PI3K (μέσω της ρυθμιστικής p85 υπομονάδας της) και η πρωτεΐνη σκαλωσιάς Grb7. Η παραγωγή PIP₃ από την PI3K οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της PKB/Akt, που προωθεί την κυτταρική επιβίωση. Στην pTyr925 της FAK (η οποία φωσφορυλιώνεται από την Src) συνδέεται μέσω της SH2 περιοχής της η πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2, η οποία μέσω του μονοπατιού Sos - Ras-GTP - MAPKs προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η Grb7 είναι μέλος μιας αναδυόμενης οικογένειας σηματοδοτικών πρωτεϊνών, που περιλαμβάνουν τις Grb7, Grb10 και Grb14. Τα μέλη της οικογένειας έχουν μια εξαιρετικά διατηρημένη δομή: μια NH₂-τελική περιοχή πλούσια σε προλίνη, μια κεντρική περιοχή PH και μια COOH-τελική περιοχή SH2. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Grb7 αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία άλλων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες Grb7 περιέχουν μια περιοχή > 300 αμινοξέων, που παρουσιάζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο του *Caenorhabditis elegans*, mig-10. Η πρωτεΐνη Mig-10 συμμετέχει στη μετανάστευση των νευρικών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, υποδηλώνοντας έναν ρόλο για την Grb7 στη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων θηλαστικών. Υπερέκφραση της Grb7 ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση προς την ινωδοκτεΐνη.

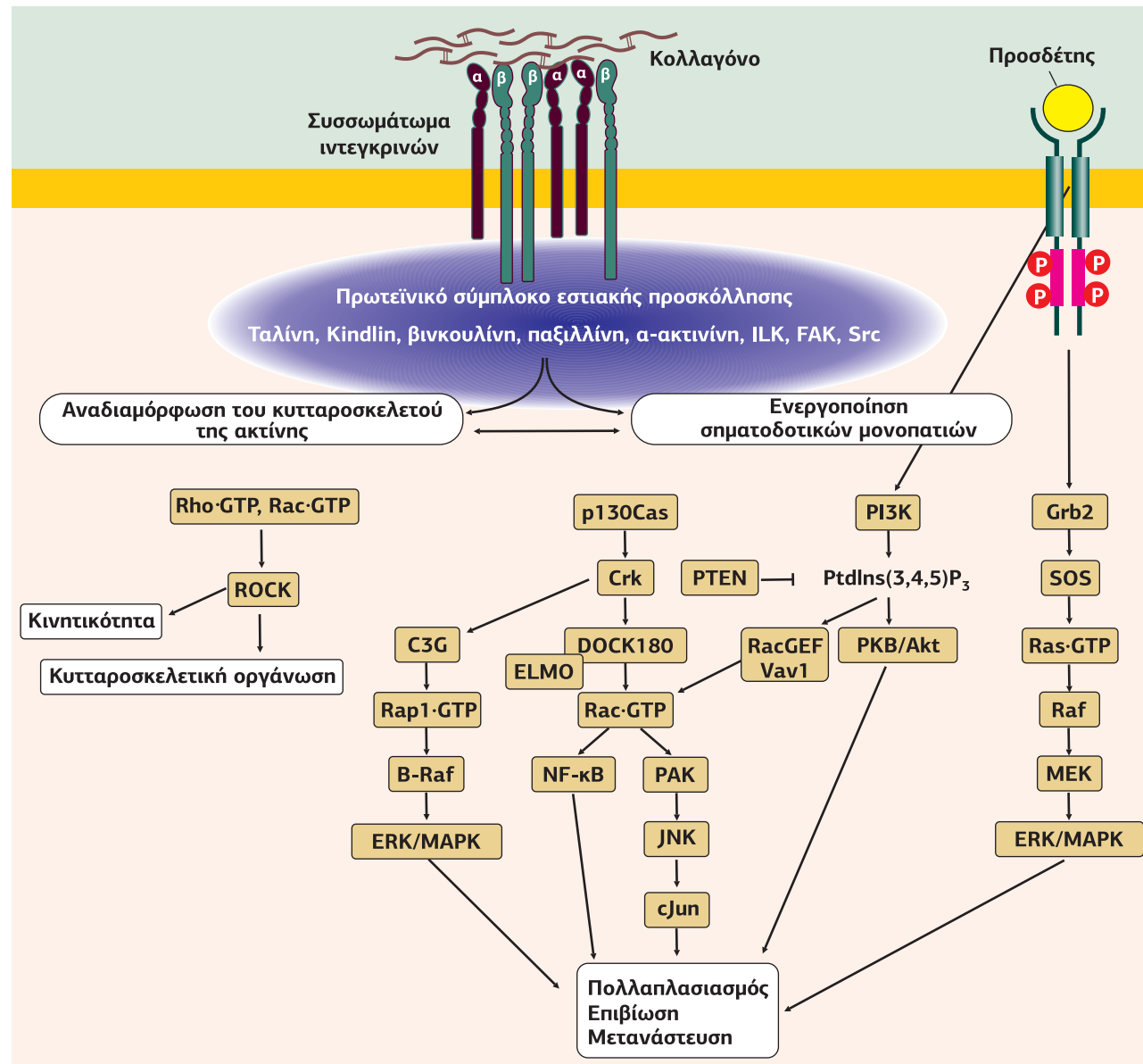
Εικόνα 9.66

Τα συσσωμάτωμα ιντεγκρινών παίζουν ρόλο στον σχηματισμό του συμπλόκου των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, που επάγει τη συναρμολόγηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα μονοπάτια αυτά οδηγούν στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στον πολλαπλασιασμό, επιβίωση και μετανάστευση των κυττάρων. Υπάρχει διασταυρούμενη επικοινωνία στο επίπεδο των ιντεγκρινών και των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. [61] [69]

πεδα. Το σύμπλοκο FAK/Src μπορεί να ενεργοποιήσει την PAK1, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την MEK1. Η MEK1 οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAPKs και επομένως χρησιμεύει ως κρίσιμο σημείο σύγκλισης μεταξύ των αυξητικών παραγόντων και της σηματοδότησης των ιντεγκρινών. Ένα άλλο σημείο διασταύρωσης αυτών των δύο οδών λαμβάνει χώρα στο επίπεδο της Raf1. Έτσι υπάρχουν πολλαπλοί τρόποι με τους οποίους το σύμπλοκο FAK/Src ρυθμίζει την ERK και αυτή η ρύθμιση είναι εξειδικευμένη ανά κυτταρικό τύπο, αφού η διαγραφή της FAK οδηγεί σε ελαττωματικό πολλαπλασιασμό σε επιθηλιακά κύτταρα και καρδιομυοκύτταρα αλλά όχι σε κερατινοκύτταρα ή ενδοθηλιακά κύτταρα.

Διασταύρωση (cross talk) με τα σηματοδοτικά μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων

Επίσης, υπάρχει διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ ιντεγκρινών και υποδοχέων κινάσων τυροσίνης (RTKs), επειδή οι RTKs ενεργοποιούνται από ιντεγκρίνες ακόμα και απουσία αυξητικών παραγόντων. Σε αυτήν την περίπτωση, η Src παίρνει το ρόλο της κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τον βρόχο ενεργοποίησης των RTKs. Αντιστρόφως, οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων μπορούν να ενεργοποιήσουν



σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχονται από ιντεγκρίνες.

Επιπλέον, οι ιντεγκρίνες είναι σε θέση να διασταυρωθούν με τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και οι ιντεγκρίνες στην πραγματικότητα απαιτούνται για να λειτουργήσουν πολλοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η διέγερση μέσω αυξητικών παραγόντων και η προσκόλληση με τη μεσολάβηση ιντεγκρινών συνεργικά αυξάνουν την ένταση και τη διάρκεια της ενεργοποίησης της ERK. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R) είναι πολύ πιο έντονη όταν ενεργοποιείται μέσω της κυτταρικής προσκόλλησης παρά όταν ενεργοποιείται μόνο από τον EGF. Αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών επάγει συσσωμάτωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων EGF-Rs, PDGF-Rs και FGF-Rs. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, που ενεργοποιούνται από τις ιντεγκρίνες, είναι εξαιρετικά περίπλοκα και διαφέρουν ανάλογα με τους κυτταρικούς τύπους και τις φυσιολογικές συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, ορισμένα βασικά μόρια αναγνωρίζονται ότι είναι σημαντικά στον σχηματισμό συμπλεγμάτων σηματοδότησης, τα οποία ξεκινούν την εξαρτώμενη από ιντεγκρίνες σηματοδότηση.

Σύνοψη των υποδοχέων που συνδέονται με κινάσες τυροσίνης

Οι περισσότερες κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης διαθέτουν μοτίβα, τα οποία τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με διαμεμβρανικούς υποδοχείς, από τους οποίους λείπει η εγγενής δομική περιοχή κινάσης τυροσίνης. Τα συμπλέγματα υποδοχέων - κινάσων μεταδίδουν σήματα με παρόμοιο τρόπο με τους υποδοχείς που έχουν δράση κινάσης τυροσίνης.

Οι **οικογένειες I και II των υποδοχέων κυτοκινών** διαθέτουν μια μεγάλη οικογένεια ομο- και ετεροδιμερών ή ολιγομερών, που συναθροίζονται σαν μια κατασκευαστική μονάδα. Για τη μεταγωγή σήματος συνεργάζονται με τις κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Jak. Μόλις αυτοφωσφορυλιωθούν, αυτά τα συμπλέγματα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια με τους υποδοχείς κινάσες τυροσίνης. Τα κύρια υποστρώματα των Jak, που διαβιβάζουν σήματα κυτοκινών στον πυρήνα, είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας STAT, που προσδέονται στα γονίδια μέσω αλληλουχιών ενεργοποίησης ιντερφερόνης-γ. Η σηματοδότηση μέσω STATs αναστέλλεται από καταστολείς της σηματοδότησης κυτοκινών (SOCS) καθώς και από πρωτεϊνικούς αναστολείς ενεργοποιημένων STATs (PIAS).

Οι **υποδοχείς αντιγόνων των λεμφοκυττάρων** συνεργάζονται για τη μεταγωγή σήματος με κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, οι οποίες δημιουργούν σημεία αλληλεπίδρασης για πρωτεΐνες με δομικές περιοχές SH2. Το σήμα ενισχύεται και μεταφέρεται από κινάσες τυροσίνης. Επίσης, η ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων απαιτεί τη διέγερση συνυποδοχέων από πρωτεΐνες, που εκτίθενται στην επιφάνεια των αντιγόνο-παραρυσιαστικών κυττάρων. Δομικά συγγενείς υποδοχείς είναι οι υποδοχείς Fc των φαγοκυττάρων, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με αντισώματα συνδεδεμένα με παθογόνα ή αλλεργιογόνα. Η μεταγωγή σήματος από όλους αυτούς τους τύπους ανοσολογικών υποδοχέων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φωσφορυλίωση των αλληλουχιών ITAM, που καταλύεται από κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης.

Οι **ιντεγκρίνες** είναι ετεροδιμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες δημιουργούν σύνδεση με άλλα κύτταρα, αλλά κυρίως με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Παλινδρομούν μεταξύ της ανενεργούς και της ενεργούς διαμόρφωσης. Η ενεργοποίησή τους διεγείρεται από εξωκυτταρικά σήματα παράλληλα με σηματοδοτικά μονοπάτια, που εξαρτώνται από υποδοχείς (γνωστή και ως σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω). Οι ιντεγκρίνες συνδυάζουν τις ιδιότητες μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs) με αυτές των μεταγωγών σήματος. Μόλις ενεργοποιηθούν από τους προσδέτες τους, συναθροίζονται (σε ειδικά σημεία εστιακής προσκόλλησης) και επιστρατεύουν κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών.

4. Φωσφατάσες τυροσίνης

Σε ένα κύτταρο θηλαστικών περισσότερο από το ένα τρίτο του συνόλου των πρωτεϊνών ενδέχεται να φωσφορυλιωθούν, αναστρέψιμα. Αυτό το διαρκώς κυμαινόμενο επίπεδο φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών μοιάζει με ένα είδος βραχυπρόθεσμης μνήμης. Βιοχημικά, αντιπροσωπεύει μια σταθερή κατάσταση που προκύπτει από τις ανταγωνιστικές επιδράσεις των πρωτεϊνικών κινάσων και πρωτεϊνικών φωσφατάσων. Επιπλέον, οι φωσφατάσες ενεργοποιούνται συχνά από τις κινάσες, ενώ οι τελευταίες διεγείρουν τις δικές τους δραστηριότητες με αυτοφωσφορυλίωση. Με άλλα λόγια, μια θετική ανατροφοδότηση μικρής εμβέλειας συζεύγνυται με μια αρνητική ανάδραση μεγάλης εμβέλειας. Αντίστοιχα, το σύστημα μπορεί είτε να ταλαντώνεται είτε να αυτο-οργανώνεται σε ένα καθορισμένο πρότυπο.

Σε γενικές γραμμές, υπό φυσιολογικές συνθήκες το επίπεδο φωσφορυλίωσης των καταλοίπων Ser/Thr είναι πολύ υψηλότερο από εκείνο της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων Tyr. Ο λόγος είναι ο μεγάλος αριθμός των κινάσων Ser/Thr, που περιλαμβάνει 428 τύπους στον άνθρωπο, σε σύγκριση με 85 μόνον κινάσες Tyr, καθώς και το ότι η φωσφορυλίωση καταλοίπων Tyr ελέγχεται από τις φωσφατάσες Tyr με έναν ιδιαίτερα αυστηρό τρόπο.

4.1 | Κυτταροπλασματικές και υποδοχείς φωσφατάσες τυροσίνης

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 107 γονίδια και ορισμένα ανενεργά ψευδογονίδια με ακολουθίες χαρακτηριστικές για φωσφατάσες Tyr. Ωστόσο, μόνο 81 από αυτά κωδικοποιούν αυθεντικές φωσφατάσες Tyr πρωτεϊνών, ενώ τα υπόλοιπα είναι γονίδια φωσφατάσων φωσφολιπιδίων και RNA, καθώς και ορισμένων ενζυμικά ανενεργών πρωτεϊνών. Έτσι, ο αριθμός των γνήσιων πρωτεϊνικών φωσφατάσων Tyr αντιστοιχεί σε ικανοποιητικό βαθμό με τον αριθμό των κινάσων Tyr (85). Στην πραγματικότητα, όμως, ο αριθμός των ισομορφών κινάσων και φωσφατάσων είναι πολύ υψηλότερος από τον αριθμό των γονιδίων, γεγονός που οφείλεται σε εναλλακτικό μάτισμα του pro-mRNA, των εναλλακτικών υποκινητών γονιδίων και άλλων μηχανισμών διαφοροποίησης. Έτσι, και οι δύο οικογένειες ενζύμων παρουσιάζουν υψηλό βαθμό μεταβλητότητας, με τα μεμονωμένα μέλη τους να εμφανίζουν ειδικές και συχνά περιορισμένες σε συγκεκριμένους ιστούς λειτουργίες, οι οποίες στην πραγματικότητα δεν συμπίπτουν.

Πίνακας 9.1
Πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (PTPs)

| Ένζυμο | Αριθμός γονιδίων στον άνθρωπο | Εξειδίκευση |
|---|-------------------------------|-----------------|
| 1. Κλασικές PTPs (38) | | |
| Υποδοχείς PTPs | 21 | pTyr |
| Κυτταροπλασματικές PTPs | 17 | pTyr |
| 2. Διπλής εξειδίκευσης PTPs (61) | | |
| Φωσφατάσες των MAP κινάσων | 11 | pTyr, pThr |
| Άτυπες διπλής εξειδίκευσης PTPs | 19 | pTyr, pThr, RNA |
| PRLs | 3 | pTyr |
| Cdc14 | 4 | pSer, pThr |
| PTEN | 21 | PI3-P |
| 3. Cdc25 | | |
| | 3 | pTyr, pThr |
| 4. LMWP | | |
| | 1 | pTyr |

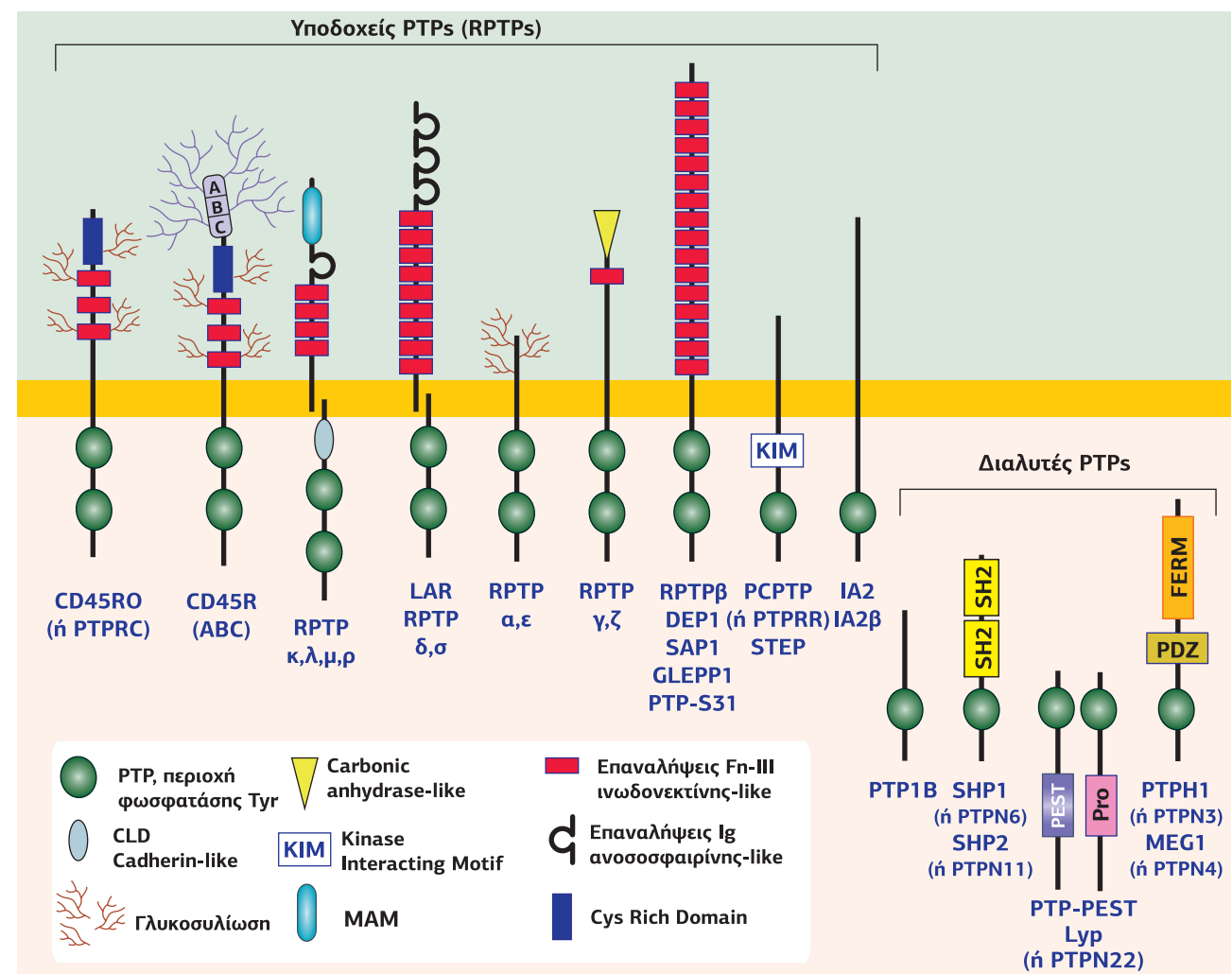
Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr ρυθμίζονται διαφορετικά από τις εξειδικευμένες φωσφατάσες Ser/Thr. Οι τελευταίες είναι κυρίως μικρές πρωτεΐνες που αποτελούνται μόνον από μια καταλυτική περιοχή και, όπως είδαμε στις σσ. 451–468, αποκτούν ειδικότητα συνδυαζόμενες *ad libitum* (ελεύθερα, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα) με διάφορες ρυθμιστικές υπομονάδες. Αντιθέτως, στις περισσότερες φωσφατάσες Tyr οι καταλυτικές και οι ρυθμιστικές περιοχές ανήκουν σε μια ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Ομοίως με τις κινάσες Tyr, οι ρυθμιστικές περιοχές των φωσφατάσων Tyr φαίνεται να έχουν μια διπλή λειτουργία: από τη μια πλευρά, ελέγχουν την ενζυμική δραστηριότητα και, από την άλλη πλευρά, ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα και τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της φωσφατάσης Tyr. Για παράδειγμα, η ρύθμιση της φωσφατάσης Tyr SHP1 έχει συζητηθεί στη σελ. 526 (βλ. **Εικόνα 8.39**).

Με βάση την ακολουθία των αμινοξέων των καταλυτικών τους περιοχών οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr (PTPs) ταξινομούνται σε 4 οικογένειες, οι οποίες συνοψίζονται στον **Πίνακα 9.1**. α. Οι λεγόμενες **κλασικές PTPs**, οι οποίες είναι αυστηρά εξειδικευμένες στις Tyr, β. οι **διπλής εξειδίκευσης PTPs**, οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν και τα κατάλοιπα Thr/Ser, καθώς και το RNA και τα φωσφολιπίδια, γ. οι **φωσφατάσες LMW** (Low-Molecular-Weight) ή όζινες φωσφατάσες και δ. οι **φωσφατάσες Cdc25** (αποφωσφορυλιώνουν Tyr και/ή Thr).

Κλασικές πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr

Οι κλασικές πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr υποδιαιρούνται σε κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές. Οι κυτταροπλασματικές φωσφατάσες Tyr είναι υπεύθυ-

Εικόνα 9.67
Κλασικές πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr. Εμφανίζονται οι υποδοχείς φωσφατάσες Tyr (RPTPs) καθώς και μια επιλογή κυτταροπλασματικών PTPs. Η φωσφατάση Lyp έχει στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή πλούσια σε Pro, ενώ η PTP-PEST περιέχει μια περιοχή PTEN, όπου P (Pro), E (Glutamic acid), S (Ser) και T (Thr). [74]

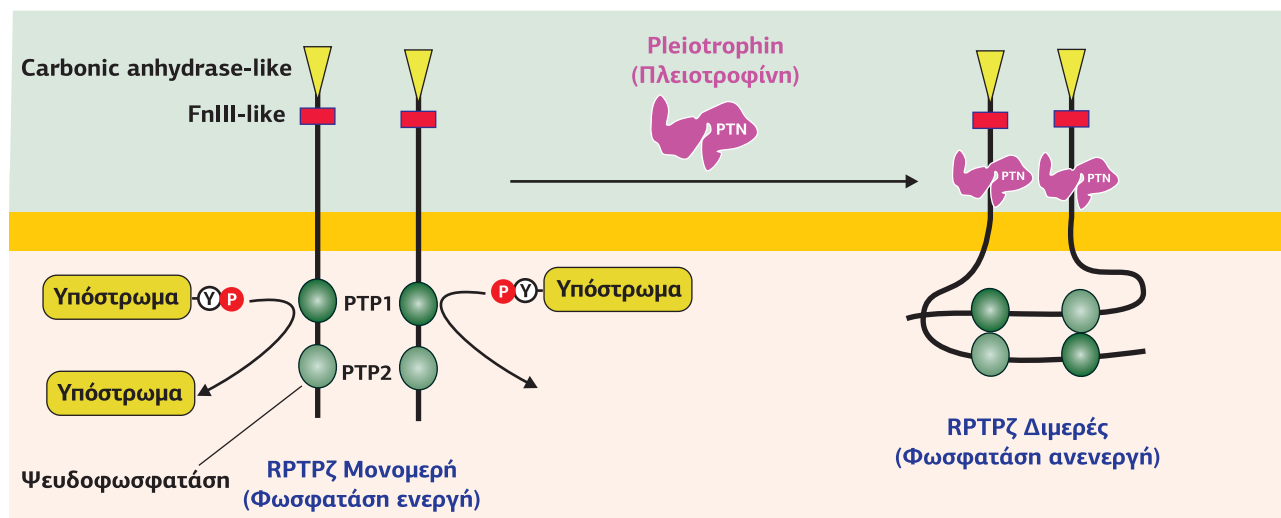


νες για την αποφωσφορυλίωση Tyr στο κύτταρο. Η αποτελεσματικότητά τους είναι τόσο έντονη, ώστε συχνά πρέπει να αδρανοποιούνται παροδικά, ώστε να εξασφαλιστεί η μεταγωγή σήματος από υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάσες Tyr στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Η αδρανοποίηση προκαλείται από αντιστρεπτή οξείδωση από το οξειδοαναγωγικό σήμα H_2O_2 , τουλάχιστον όσον αφορά τις PTP-1B και SHP (βλ. σελ. 517, **Εικόνα 8.31**).

Με καθεμία να παρουσιάζει μια ενιαία διαμεμβρανική περιοχή και μία ή δύο καταλυτικές περιοχές στο κυτταροπλασματικό τμήμα, τα 21 συνδεδεμένα στη μεμβράνη μέλη της οικογένειας των φωσφατασών Tyr έχουν μια τοπογραφία, που μοιάζει με εκείνη των υποδοχών κινάσων Tyr. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι προσδέτες δεν είναι γνωστοί και οι διαμεμβρανικές φωσφατάσες της Tyr αναφέρονται, επομένως, ως παρόμοιες με υποδοχείς (**Receptor-like**). Σε πολλές από αυτές, το εξωκυτταρικό τους τμήμα περιέχει χαρακτηριστικά στοιχεία, τυπικά των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης CAMs, όπως περιοχές Ig-like και FnIII-like (**Εικόνα 9.67**), υποστηρίζοντας την άποψη ότι, όπως ορισμένοι υποδοχείς κινάσων Tyr, αυτές οι φωσφατάσες συμμετέχουν στην κυτταρική προσκόλληση και στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Στην πραγματικότητα, πολλές παρόμοιες με υποδοχείς φωσφατάσες Tyr παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τυπικά συστατικά του εξωκυττάρου χώρου, όπως οι πρωτεογλυκάνες και το κολλαγόνο, τα οποία είναι γνωστό ότι παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη των ιστών.

Ένα χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο πολλών υποδοχών φωσφατασών Tyr είναι μια διπλασιασμένη καταλυτική περιοχή. Ωστόσο, μόνο η καταλυτική περιοχή που βρίσκεται κοντά στην πλασματική μεμβράνη παρουσιάζει δραστηριότητα φωσφατάσης, ενώ η άλλη καλείται περιοχή ψευδοφωσφατάσης. Διαθέτει μια αυτοανασταλτική λειτουργία ελέγχου, που παρεμποδίζει την ενζυμικά ενεργή περιοχή. Αυτό είναι δυνατό μόνο σε ένα διμερές μόριο, με trans-αλληλεπίδραση. Διατυπώνεται, συνεπώς, η υπόθεση ότι σήματα ενεργοποίησης πυροδοτούν τον διαχωρισμό του ανενεργού διμερούς σε δύο δραστηρικά μονομερή, ενώ ανασταλτικά σήματα σταθεροποιούν τη διμερή μορφή (**Εικόνα 9.68**). Για παράδειγμα, η πλειοτροπίνη, μια κυτοκίνη που δρα και ως αυξητικός παράγοντας, αλληλεπιδρά με τη φωσφατάση RPTPζ και εμποδίζει τη δράση της. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τους υποδοχείς κινάσων Tyr, οι οποίοι πρέπει να διμεριστούν, για να ενεργοποιηθούν από την trans-αυτοφωσφορυλίωση.

Εικόνα 9.68
Μοντέλο του μηχανισμού ενεργοποίησης των υποδοχών φωσφατασών Tyr. Όταν οι φωσφατάσες βρίσκονται στη μεμβράνη ως μονομερή, οι ενζυμικά δραστηρές περιοχές τους είναι εκτεθειμένες και μπορούν να αποφωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους. Παρουσία ενός ανασταλτικού προσδέτη, όπως η πλειοτροπίνη (pleiotrophin), οι φωσφατάσες παίρνουν τη διμερή μορφή τους και μια trans-αλληλεπίδραση μεταξύ των ρυθμιστικών (σφαίρες χρώματος ανοικτού πράσινου) και των καταλυτικών δραστηρών (σφαίρες χρώματος σκούρου πράσινου) περιοχών φωσφατάσης, παρεμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στα καταλυτικά κέντρα. [19]



4.2 Φωσφατάσες Tyr και ο ρόλος τους: μια σύντομη επισκόπηση

Αν και οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr είναι εξαιρετικά σημαντικές για την επεξεργασία σήματος, η γνώση μας για τις φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες

τους μοιάζει περισσότερο με ένα μωσαϊκό περισσότερο, παρά με μια σαφή εικόνα. Πράγματι, μέχρι στιγμής, λίγα μόνον ένζυμα μπορούν αναμφίβολα να συσχετιστούν με φυσιολογικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική προσκόλληση, η ανοσολογική απάντηση και η δράση της ινσουλίνης, οι οποίες στο σύνολό τους υπόκεινται στον έλεγχο των κινάσων της Tyr.

Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Στο Κεφάλαιο της Ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου θα εξετάσουμε τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης της υποοικογένειας **Cdc25**, ως βασικούς ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Καταλύουν την αποφωσφορυλίωση ενός ζεύγους Thr-Tyr σε κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, οι οποίες με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούνται και προωθούν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Αντιθέτως, οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης **Cdc14** απενεργοποιούν κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, αποφωσφορυλιώνοντας τους βρόχους ενεργοποίησης. Αυτή η αντίδραση είναι σημαντική για τον τερματισμό του κυτταρικού κύκλου.

Ανοσολογική απάντηση

Μια φωσφατάση με χαρακτηριστικό φυσιολογικό ρόλο είναι η φωσφατάση υποδοχέας **CD45**, της οποίας η έκφραση περιορίζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Η CD45 ενεργοποιεί την κινάση Tyr Lck, καθώς αποφωσφορυλιώνει την Tyr505 (βλ. **Εικόνα 9.29A**) και αποτελεί έναν κύριο διακόπτη στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Κατά συνέπεια, η διαγραφή του ενζύμου οδηγεί σε σοβαρές διαταραχές της ανοσολογικής επιτήρησης.

Ενώ η CD45 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, άλλες φωσφατάσες Tyr, που εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα, εμφανίζουν ανασταλτικές επιδράσεις. Για παράδειγμα, η φωσφατάση **PTP-PEST**, η οποία αδρανοποιεί την Csk (C-terminal Src kinase), αποφωσφορυλιώνοντας τους βρόχους ενεργοποίησης. Ένας άλλος αναστολέας της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων είναι η κλασική φωσφατάση Tyr **SHP1**, η οποία αδρανοποιεί τις κινάσες Tyr ZAP-70 (στα T-λεμφοκύτταρα) και Syk και Lyn (στα B-λεμφοκύτταρα) με αποφωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ποντικοί από τους οποίους απουσιάζει η SHP1, πάσχουν από ανοσολογική ανεπάρκεια, αλλά και από άλλες διαταραχές, όπως η ανάπτυξη του θύλακα της τρίχας (λόγω της όψης του τριχώματός τους, που διακόπτεται από πολλά κενά, ονομάζονται σκωροφαγωμένοι).

Μια άλλη κυτταροπλασματική φωσφατάση Tyr, που αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων καταλύοντας την αποφωσφορυλίωση της ZAP-70, του υποδοχέα TcR, καθώς και της κινάσης Lck, είναι η **Lyp** (Lymphoid tyrosine phosphatase). Το ένζυμο αυτό έχει τραβήξει την προσοχή, επειδή μια μετάλλαξη αλλαγής λειτουργίας είναι παράγοντας κινδύνου για αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου 1 και η νόσος Graves-Basedow, η οποία είναι η πιο συχνή αιτία υπερθυρεοειδισμού.

Μιτογόνος σηματοδότηση

Σε αντίθεση με την SHP1, η ισομορφή **SHP2** δεν αναστέλλει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, δεν φαίνεται να ανταγωνίζεται τις επιδράσεις άλλων κινάσων Tyr. Αντί γι' αυτό, διεγείρει τη σηματοδότηση Ras-GTP - Raf - ERK από ένα μηχανισμό του οποίου η λειτουργία δεν είναι ακόμη γνωστή και ο οποίος, ενδεχομένως, περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση της Sprouty. Η SHP2 μπορεί ακόμη και να μεταλλαχθεί σε μια ογκοπρωτεΐνη, προκαλώντας το λεγόμενο σύνδρομο Noonan. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από έντονες αναπτυξιακές ατέλειες και έχει συνδεθεί με νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Καθώς τα ζώα με εξουδετερωμένη SHP2 δεν είναι βιώσιμα, το ένζυμο διαδραματίζει με βεβαιότητα σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση.

Η σηματοδότηση από ινσουλίνη

Το κυτταροπλασματικό ένζυμο **PTP-1B** είναι το πρότυπο των κλασικών φωσφατάσων Tyr των πρωτεϊνών. Μία από τις σημαντικότερες κυτταρικές λειτουργίες του είναι αυτή του ανταγωνιστή του υποδοχέα της ινσουλίνης, ο οποίος μαζί με την πρωτεΐνη IRS αποφωσφορυλιώνεται, τερματίζοντας τη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Σε μυϊκά κύτταρα παχύσαρκων και τύπου 2 διαβητικών ασθενών, η PTP-1B βρέθηκε να υπερεκφράζεται και να παρουσιάζει ιδιόσυστατη υπερδραστηριότητα. Αντιθέτως, ποντικοί με μη λειτουργική PTP-1B είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ινσουλίνη, ακόμη και σε υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων και λιπών. Αυτό υποδεικνύει ότι, σε αυτά τα ζώα, ο υποδοχέας της ινσουλίνης δεν απευαισθητοποιείται από περίσσεια ινσουλίνης.

Κυτταρική προσκόλληση, καρκίνος και άλλες σφαίρες επιρροής των φωσφατάσων τυροσίνης των πρωτεϊνών

Η όμοια με υποδοχέα φωσφατάση **RPTPμ** θεωρείται ότι σταθεροποιεί συνδέσεις καδερίνης. Στην πραγματικότητα, η φωσφατάση ανταγωνίζεται τη φωσφορυλίωση Tyr των συμπλόκων καδερίνης-κατενίνης, η οποία καταλύεται από κινάσες Tyr τύπου Src και αποσταθεροποιεί τους συνδέσμους κυτταρικής προσκόλλησης. Τέτοια αποσταθεροποίηση μεσοκυττάρων θέσεων επαφής έχει παρατηρηθεί σε όγκους που παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα κινάσης Tyr, η οποία ενδέχεται να συμβάλλει σε μετάσταση.

Δεδομένου ότι πολλές κινάσες Tyr έχει βρεθεί ότι μεταλλάσσονται σε ογκοπρωτεΐνες, θα περίμενε κανείς ότι οι αντίπαλοί τους, οι φωσφατάσες Tyr, αποτελούν καταστολείς όγκων. Στην πραγματικότητα, αρκετές κλασικές φωσφατάσες Tyr είναι υποψήφιες για να χαρακτηριστούν ως καταστολείς όγκων και θεωρείται ότι ενέχονται σε ποικίλες κακοήθειες. Ωστόσο, ο ρόλος αυτός έχει αποδειχθεί χωρίς αμφιβολία για μία μόνον από αυτές τις φωσφατάσες, ειδικά για τη φωσφατάση υποδοχέα **DEP1**, η οποία απαλείφεται σε καρκίνους του παχέος εντέρου και ορισμένους άλλους όγκους. Η DEP1 θεωρείται ότι ανταγωνίζεται τον υποδοχέα κινάσης Tyr, Met, που είναι υπερενεργός σε πολλές νεοπλασματικές ασθένειες του ανθρώπου.

Κατεξοκνή ογκοκατασταλτική είναι η φωσφατάση των φωσφολιπιδίων **PTEN** (Phosphatase- and TENsin-homologous enzyme, ένζυμο ομόλογο της φωσφατάσης και τενσίνης. Η τενσίνη είναι μια καταλυτικά ανενεργή φωσφατάση της Tyr). Το ένζυμο αυτό αφαιρεί ειδικά φωσφορικές ομάδες από την 3-υδροξυλομάδα καταλοίπων ινσοιτόλης, με αποτέλεσμα την αδρανιστική των PIP₂ και PIP₃. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλεται η αντι-αποπτωτική οδός PKB/Akt. Αυτό εξηγεί γιατί οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της PTEN προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση. Ως αποτέλεσμα, τα μεταλλαγμένα κύτταρα αποκτούν ένα πλεονέκτημα έναντι των κανονικών γειτονικών τους.

Φωσφατάσες Tyr με άγνωστες ακόμη λειτουργίες είναι οι οι PRL, η LMW-PTP και EyA. Η LMW-PTP, η χαμηλού μοριακού βάρους φωσφατάση της τυροσίνης των πρωτεϊνών (the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase), είναι εκπρόσωπος μιας αρχαίας οικογένειας πρωτεϊνών με στενή συγγένεια ως προς τις αναγωγάσες αρσενικού των προκαρυωτικών.

Ορισμένα βακτήρια παράγουν πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr, ως εξαιρετικά ισχυρούς παράγοντες που προσδίδουν λοιμογόνο δράση. Οι καταστροφικές επιδράσεις ενζύμων όπως αυτά, για παράδειγμα στις μεγάλες επιδημίες πανώλης του Μεσαίωνα, καταδεικνύουν με εντυπωσιακό τρόπο τον ουσιαστικό ρόλο που παίζει η φωσφορυλίωση της τυροσίνης στην υγεία του ανθρώπου και την επιβίωση.

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες Tyr, οι αντίπαλοι των κινάσων Tyr, αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια αρκετά διαφορετικών κυτταροπλασματικών και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων τόσο ειδικών της Tyr όσο και διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσων, αλλά και φωσφατάσων του RNA και φωσφατάσων των

φωσφολιπιδίων. Πρόκειται για πρωτεΐνες με πολλαπλές περιοχές, καταλυτικές και ρυθμιστικές που συνδυάζονται σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι διαμεμβρανικές φωσφατάσες μοιάζουν δομικά με υποδοχείς και CAMs, αν και πολύ λίγοι μόνο προσδέτες είναι γνωστοί. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες της Tyr συμμετέχουν με κρίσιμο τρόπο σε όλες τις διαδικασίες σηματοδότησης, που μεσολαβούνται από φωσφορυλίωση καταλοίπων Tyr. Οι διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσες Cdc25 είναι, επιπλέον, ρυθμιστές-κλειδιά του κυτταρικού κύκλου. Η απορρύθμιση της αποφωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης (και των φωσφολιπιδίων), που οφείλεται σε γονιδιακή μετάλλαξη, βακτηριακή λοίμωξη ή άλλους λόγους, έχει συνδεθεί με πολυάριθμες ασθένειες.

Βιβλιογραφία

- Allison TJ, Winter CC, Fournié JJ, Bonneville M, Garboczi DN, Structure of a human gamma delta T-cell antigen receptor, *Nature* **411**: 820-4 (2001).
- Asao H, Mechanism of interleukin 2 - induced signal transduction, *Yamagata Med J* **21**: 141-154 (2003).
- Au-Yeung BB, Deindl S, Hsu LY, Palacios EH, Levin SE, Kuriyan J, Weiss A, The structure, regulation, and function of ZAP-70, *Immunol Rev* **228**: 41-57 (2009).
- Bouaouina M, Harburger DS, Calderwood DA, Talin and signaling through integrins, *Methods Mol Biol* **757**: 325-47 (2012).
- Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D4, Chhabra Y, Pelekanos RA, Gardon O, Tunny KA, Blucher KM, Morton CJ, Parker MW, Sieracki E, Gambin Y, Gomez GA, Alexandrov K, Wilson IA, Doxastakis M, Mark AE, Waters MJ, Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor, *Science* **344**: 1249783 (2014).
- Brooks AJ, Waters MJ, The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications, *Nat Rev Endocrinol* **6**: 515-25 (2010).
- Brown MC, Turner CE, Paxillin: adapting to change, *Physiol Rev* **84**: 1315-39 (2004).
- Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA, Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis, *Immunol Lett* **114**: 1-8 (2007).
- Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P, Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story, *Nat Rev Cancer* **10**: 858-70 (2010).
- Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR, Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion, *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 503-17 (2013).
- Calderwood DA, Talin controls integrin activation, *Biochem Soc Trans* **32** (Pt3): 434-37 (2004).
- Chiswell BP, Zhang R, Murphy JW, Boggan TJ, Calderwood DA, The structural basis of integrin-linked kinase-PINCH interactions, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **105**: 20677-82 (2008).
- Darnall JE, Kerr IM and Stark GR, Jak-Stat pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling pathways, *Science* **264**: 1415-20 (1994).
- Defilippi P, Di Stefano P, Cabodi S, p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks, *Trends Cell Biol* **16**: 257-63 (2006).
- DeMali K, Wenerberg K, Burridge K, Integrin signaling to the actin cytoskeleton, *Curr Opin Cell Biol* **15**: 572-582 (2003).
- Fagerholm S, HIL-den T, Gahmberg C, P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions, *Trends Biochem Sci* **29**: 504-512 (2004).

Ο παράγοντας Yop51 του βακτηρίου *Yersinia pestis* είναι μια φωσφατάση Tyr.

17. Fässler R, Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR, Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion, *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 503-17 (2013).
18. Finkelstein LD, Schwartzberg PL, Tec kinases: shaping T-cell activation through actin, *Trends Cell Biol* **14**: 443-51 (2004).
19. Fujikawa A, Noda M, Role of pleiotrophin-protein tyrosine phosphatase receptor type Z signaling in myelination, *Neural Regen Res* **11**: 549-551 (2016).
20. Goldsby R, Kindt T, Kuby J, Immunology, Freeman editions, 5th edition (2003).
21. Goswami S, Importance of integrin receptors in the field of pharmaceutical and medical science, *Adv Biol Chem* **3**: 30809 (2013).
22. Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP, Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies, *Nat Rev Cancer* **14**: 219-32 (2014).
23. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, Lopez AF, The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease, *Blood* **114**: 1289-98 (2009).
24. Hinck AP, Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily, *FEBS Lett* **586**: 1860-70 (2012).
25. Hoefen RJ, Berk BC, The multifunctional GIT family of proteins, *J Cell Sci* **119** (Pt 8): 1469-75 (2006).
26. Horvath C.M, Stat proteins and transcriptional responses to extracellular signals, *Trends Biochem Sci* **25**: 496-502 (2000).
27. Houtman JC, Barda-Saad M, Samelson LE, Examining multiprotein signaling complexes from all angles, *FEBS J* **272**: 5426-35 (2005).
28. Hunter CA, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions, *Nat Rev Immunol* **5**: 521-531 (2005).
29. Huyton T, Zhang JG, Luo CS, Lou MZ, Hilton DJ, Nicola NA, Garrett TP, An unusual cytokine: Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **104**: 12737-42 (2007).
30. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA, IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding, *EMBO J* **20**: 5332-41 (2001).
31. Hynes RO, Integrins: A family of cell surface receptors, *Cell* **48**: 549-550 (1987).
32. Klapholz B, Brown NH, Talin - the master of integrin adhesions, *J Cell Sci* **130**: 2435-2446 (2017).
33. Koenen RR, Weber C, Therapeutic targeting of chemokine interactions in atherosclerosis, *Nat Rev Drug Discov* **9**: 141-53 (2010).
34. Krauss G, Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Wiley-VCH editions (2001).
35. Lal H, Guleria RS, Foster DM, Lu G, Watson LE, Sanghi S, Smith M, Dostal DE, Integrins: novel therapeutic targets for cardiovascular diseases, *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **5**: 109-32 (2007).
36. Lal H, Verma SK, Foster DM, Golden HB, Reneau JC, Watson LE, Singh H, Dostal DE, Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease, *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 2307-34 (2009).
37. Larjava H, Plow EF, Wu C, Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion, *EMBO Rep* **9**: 1203-8 (2008).
38. Lawson C, Schlaepfer DD, pHocal adhesion kinase regulation is on a FERM foundation, *J Cell Biol* **202**: 833-6 (2013).
39. Leonard WJ, Cytokines and immunodeficiency diseases, *Nat Rev Immunol* **1**: 200-8 (2001).
40. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA, Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation, *Front Immunol* **4**: 206 (2013).
41. Liao W, Lin JX, Leonard WJ, Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy, *Immunity* **38**: 13-25 (2013).
42. Lim CP, Cao X, Structure, function, and regulation of STAT proteins, *Mol Biosyst* **2**: 536-50 (2006).
43. Mahajan K, Mahajan NP, ACK1/TNK2 tyrosine kinase: molecular signaling and evolving role in cancers, *Oncogene* **34**: 4162-7 (2015).
44. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, Leroy E, Harutyunyan AS, Abgrall JF, Favier R, Toussaint A, Solary E, Kralovics R, Constantinescu SN, Najman A, Vainchenker W, Plo I, Bellanné-Chantelot C, Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors, *Blood* **123**: 1372-83 (2014).
45. McNally R, Eck MJ, JAK-cytokine receptor recognition, unboxed, *Nat Struct Mol Biol* **2**: 431-3 (2014).
46. Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins, *Trends Cell Biol* **19**: 504-13 (2009).
47. 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).
48. Modarres HP, Mofradt MR, Filamin: a structural and functional biomolecule with important roles in cell biology, signaling and mechanics, *Mol Cell Biomech* **11**: 39-65 (2014).
49. Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R, The tail of integrins, talin, and kindlins, *Science* **324**: 895-9 (2009).
50. Panetti TS, Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130Cas: effects on cell spreading and migration, *Front Biosci* **7**: d143-50 (2002).
51. Parsons JT, Focal adhesion kinase: the first ten years, *J Cell Sci* **116**: 1409-1416 (2003).
52. Pletnev S, Magracheva E, Wlodawer A, Zdanov A, A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors, *BMC Struct Biol* **5**: 10 (2005).
53. Priestle JP, Schär HP, Grütter MG, Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta, *EMBO J* **7**: 339-43 (1988).
54. Prieto-Echagüe V, Miller WT, Regulation of ack-family nonreceptor tyrosine kinases. *J Signal Transduct* **2011**: 742372 (2011).
55. Punt J, Owen J, Stranford S, Kuby Immunology, 7th Edition (2013).
56. Puri KD, Di Paolo JA, Gold MR, B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies, *Int Rev Immunol* **32**: 397-427 (2013).
57. Quin J, Vinogradova O, Plow E, Integrin bidirectional signaling: a molecular view, *PLoS Biol* **2**: 726-729 (2004).
58. Rajagopalan L, Rajarathnam K, Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity, *Biosci Rep* **26**: 325-39 (2006).
59. Rognoni E, Ruppert R, Fässler R, The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease, *J Cell Sci* **129**: 17-27 (2016).
60. Schaller MD, Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions, *J Cell Sci* **123**: 1007-13 (2010).
61. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D, Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase, *Biochim Biophys Acta* **1692**: 77-102 (2004).
62. Schlaepfer DD, Mitra SK, Multiple connections link FAK to cell motility and invasion, *Curr Opin Genet Dev* **14**: 92-101 (2004).
63. Schwache D, Müller-Newen G, Receptor fusion proteins for the inhibition of

- cytokines. *Eur J Cell Biol* **91**: 428-34 (2012).
64. Schwartz MA, Integrin signalling revisited, *Trends Cell Biol* **11**: 466-470 (2001).
 65. Sepulveda JL, Wu C, The parvins, *Cell Mol Life Sci* **63**: 25-35 (2006).
 66. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA, Latent TGF- β structure and activation, *Nature* **474**: 343-9 (2011).
 67. Singh SM, Kongari N, Cabello-Villegas J, Mallela KM, Missense mutations in dystrophin that trigger muscular dystrophy decrease protein stability and lead to cross-beta aggregates, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **107**: 15069-74 (2010).
 68. Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K, Alpha-actinin structure and regulation, *Cell Mol Life Sci* **65**: 2688-701 (2008).
 69. Srichai MB, Zent R, Integrin Structure and Function in Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer, Chapter 2 (eds R. Zent and A. Pozzi) Springer (2010).
 70. Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA, Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **103**: 2788-93 (2006).
 71. Sylvain NR, Nguyen K, Bunnell SC, Vav1-mediated scaffolding interactions stabilize SLP-76 microclusters and contribute to antigen-dependent T cell responses, *Sci Signal* **4**: 163 (2011).
 72. ten Hacken E, Burger JA, Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia - focus on the B-cell receptor, *Clin Cancer Res* **20**: 548-56 (2014).
 73. Thomas C, Moraga I, Levin D, Krutzik PO, Podoplelova Y, Trejo A, Lee C, Yarden G, Vleck SE, Glenn JS, Nolan GP, Piehler J, Schreiber G, Garcia KC, Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons, *Cell* **146**: 621-32 (2011).
 74. Tonks NK, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 833-46 (2006).
 75. Truong T, Shams H, Mofrad MR, Mechanisms of integrin and filamin binding and their interplay with talin during early focal adhesion formation, *Integr Biol (Camb)* **7**: 1285-96 (2015).
 76. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z, The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18, *Nat Commun* **5**: 5340 (2014).
 77. Walkiewicz KW, Girault JA, Arold ST, How to awaken your nanomachines: Site-specific activation of focal adhesion kinases through ligand interactions, *Prog Biophys Mol Biol* **119**: 60-71 (2015).
 78. Wang H, Kadlecsek TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS, Weiss A, ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a002279 (2010).
 79. Wang J, Lim K, Smolyar A, Teng M, Liu J, Tse AG, Liu J, Hussey RE, Chishti Y, Thomson CT, Sweet RM, Nathenson SG, Chang HC, Sacchettini JC, Reinherz EL, Atomic structure of an alphabeta T cell receptor (TCR) heterodimer in complex with an anti-TCR fab fragment derived from a mitogenic antibody, *EMBO J* **17**: 10-26 (1998).
 80. Wang JH, Pull and push: talin activation for integrin signaling, *Cell Res* **22**: 1512-4 (2012).
 81. Waters MJ, Brooks AJ, JAK2 activation by growth hormone and other cytokines, *Biochem J* **466**: 1-11 (2015).
 82. Wozniak M, Modzelewska K, Kwong L, Keely P, Focal adhesion regulation of cell behaviour, *Biochim Biophys Acta* **1692**: 103-119 (2004).
 83. Wu C, Migfilin and its binding partners: from cell biology to human diseases, *J Cell Sci* **118**: 659-64 (2005).
 84. Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC, Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Mol Cell* **3**: 629-38 (1999).
 85. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ, The Janus kinases (Jaks), *Genome Biol* **5**: 253 (2004).
 86. Zhang H, Chang YC, Brennan ML, Wu J, The structure of Rap1 in complex with RIAM reveals specificity determinants and recruitment mechanism, *J Mol Cell Biol* **6**: 128-39 (2014).
 87. Zhang X, Angkasekwina P, Dong C, Tang H, Structure and function of interleukin-17 family cytokines, *Protein Cell* **2**: 26-40 (2011).
 88. Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, Teng R, Noguchi CT, Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism, *Int J Mol Sci* **15**: 10296-333 (2014).
 89. Zhang Z, Lin SY, Neel BG, Haimovich B, Phosphorylated alpha-actinin and protein-tyrosine phosphatase 1B coregulate the disassembly of the focal adhesion kinase x Src complex and promote cell migration, *J Biol Chem* **281**: 1746-54 (2006).

