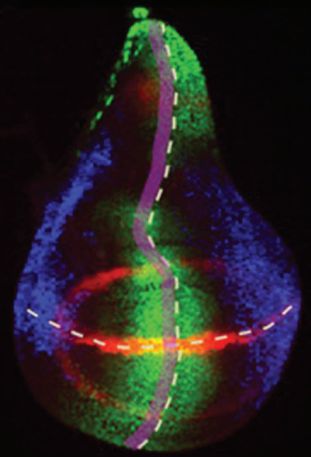


# 10 Υποδοχείς με εσωτερική δραστικότητα κινάσης Ser/Thr



## 1. Υποδοχείς πρωτεϊνικές κινάσες: η αρχή του διμερισμού για την προώθηση της μεταγωγής σήματος. Μια επανάληψη

1.1 Ο κοινός μηχανισμός δράσης όλων των υποδοχέων κινασών

## 2. Η οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF-β)

2.1 Η ανακάλυψη του TGF-β

2.2 Τα μέλη της οικογένειας TGF-β

## 3. Ωρίμανση και ενεργοποίηση των TGF-β

3.1 Μηχανισμός ωρίμανσης των TGF-β1/3

3.2 Έκκριση του LLC από τα κύτταρα και αγκυροβόληση σε πρωτεΐνες της ECM

3.3 Μηχανισμοί ενεργοποίησης του TGF-β

## 4. Υποδοχείς των TGF-β: τύπου I και τύπου II

4.1 Δομή των TβRI και TβRII και ο ρόλος της περιοχής GS

4.2 Ενεργοποίηση των υποδοχέων RI και RII από τους TGF-β

4.3 Τα διαφορετικά σύμπλοκα των υποδοχέων και οι διαφορετικοί προσδέτες

4.4 Οικογένεια των συμπληρωματικών υποδοχέων TGF-β, τύπου III

## 5. Σηματοδότηση των TβRs μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smads

5.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads

5.2 Η ρύθμιση του μονοπατιού TGF-β / Smads

## 6. Μη-Smad σηματοδότηση των TβRs

6.1 Ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση των MAPKs

6.2 Ο TGF-β ρυθμίζει τη δράση των GTPασών της οικογένειας Rho

6.3 Ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt

## 7. TGF-β, ένα παράδειγμα πλειοτροπικού παράγοντα

7.1 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

7.2 Έλεγχος της κυτταρικής διαφοροποίησης

7.3 Έλεγχος της επούλωσης των πληγών

7.4 Καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος

7.5 Αυξημένη σηματοδότηση του TGF-β οδηγεί σε ίνωση

7.6 Ο διαφορετικός ρόλος του TGF-β στα διάφορα στάδια του καρκίνου

## 8. Το μονοπάτι των BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

8.1 Ωρίμανση των BMPs και σηματοδότηση

8.2 Οι ανταγωνιστές των BMPs και ο ρόλος τους στην εμβρυογένεση

8.3 Οι BMPs και η ομόλογη Dpp της Drosophila ως μορφογενετικοί παράγοντες



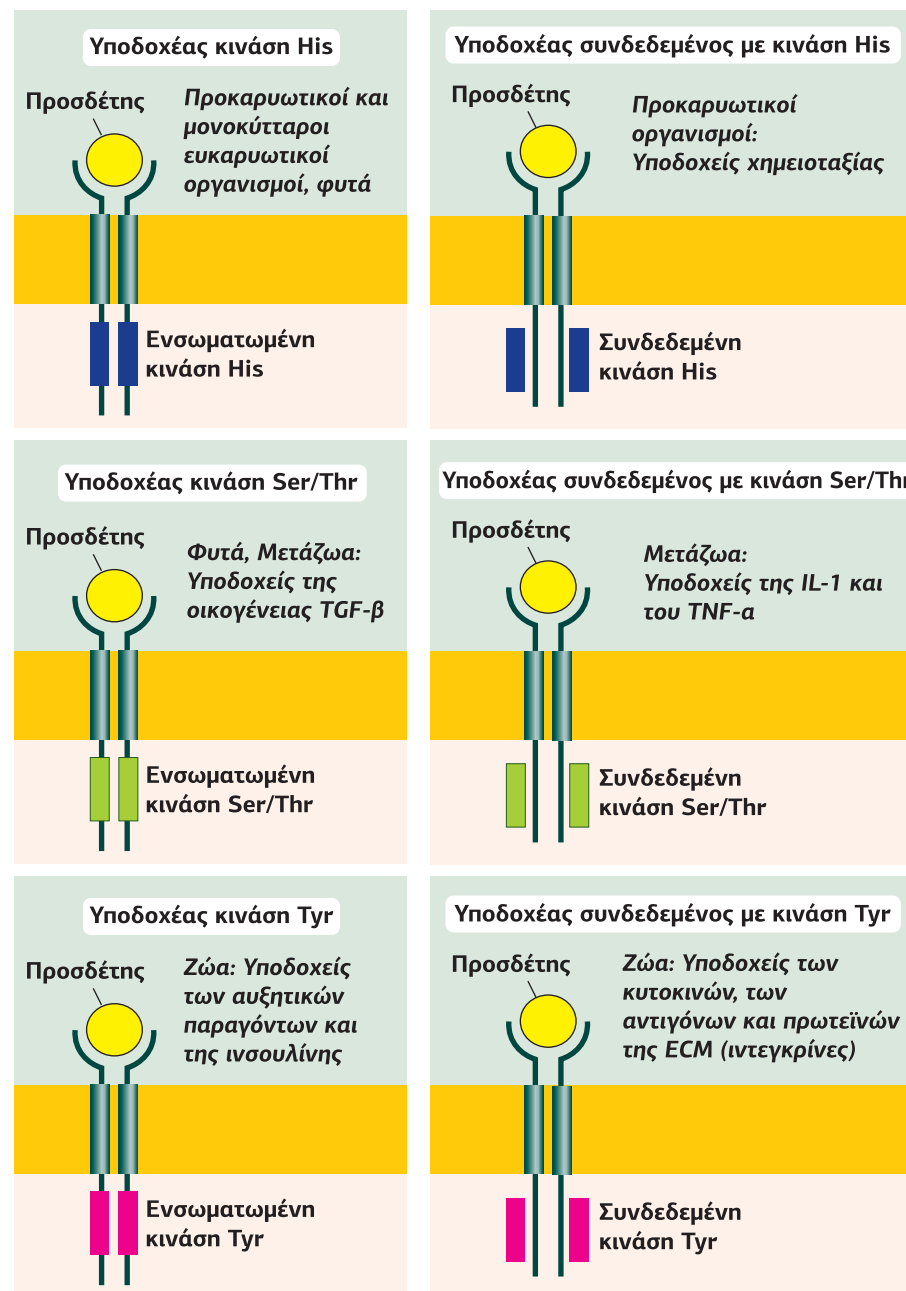


Σε πλήρη αντίθεση με τους GPCRs, οι οποίοι συνδέονται με ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες και αποτελούν ένα επιτυχημένο εξελικτικά μοντέλο, το οποίο όμως περιορίζεται μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, και συγκεκριμένα στα ζώα (εξαιρουμένης της ειδικής περίπτωσης της ροδοψίνης των αρχαιοβακτηρίων), οι υποδοχείς που έχουν δράση κινάσης ή συνδέονται με πρωτεϊνικές κινάσες, έχουν βρεθεί σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και απαρτίζουν μία μεγάλη και ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών που κατέχει την πρώτη θέση στους προκαρυώτες και στα φυτά και τη δεύτερη θέση στα ζώα. Στην πραγματικότητα, οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν τους αρχαιότερους μηχανισμούς διαμεμβρανικής σηματοδότησης.

### **1. Υποδοχείς πρωτεϊνικές κινάσες: η αρχή του διμερισμού για την προώθηση της μεταγωγής σήματος. Μια επανάληψη**

Στο πρώτο Κεφάλαιο έχουμε αναφερθεί στους αρχέγονους υποδοχείς αυτοκινάσες ιστιδίνης (His), που αποτελούν τα πρωτότυπα υποδοχέων πρωτεϊνικών κινάσων στους προκαρυώτες. Στο μεγαλύτερο ποσοστό τους αυτοί οι υποδοχείς έχουν εγγενή δραστηριότητα κινάσης, η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική περιοχή του διαμεμβρανικού υποδοχέα, ενώ μερικοί μόνο υποδοχείς (ιδιαίτερα οι υποδοχείς κημειοταξίας) συνδέονται μη ομοιοπολικά με ξεχωριστές κινάσες His. Αυτοί οι δύο μηχανισμοί, η ενδογενής και η συνδεδεμένη δράση πρωτεϊνικής κινάσης, έχουν διατηρηθεί κατά την εξέλιξη, παρόλο που κατά την ανάπτυξη των ευκαρυωτών οι ειδικές κινάσες His αντικαταστάθηκαν με ειδικές δραστηριότητες κινάσων σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr) και τυροσίνης (Tyr) (**Εικόνα 10.1**).

**Εικόνα 10.1**  
**Υποδοχείς με ενδογενή ή συνδεδεμένη δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης: μία επισκόπηση.** Υποδοχείς με ενδογενή δραστικότητα κινάσης His συναντώνται σε προκαρυωτικούς, σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σε φυτά. Υποδοχείς με ενδογενή δραστικότητα κινάσης Ser/Thr συναντώνται σε φυτά, αλλά και σε ζώα (οι υποδοχείς της οικογένειας TGF- $\beta$ ), ενώ οι υποδοχείς με ενδογενή ή συνδεδεμένη δραστικότητα κινάσης Tyr είναι μεταγενέστεροι και συναντώνται μόνο στα μετόζωα. Οι υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες His είναι οι υποδοχείς χημειοταξίας των προκαρυωτών, ενώ αυτοί που συνδέονται με κινάσες Ser/Thr ή Tyr συναντώνται σε ζώα, αλλά όχι σε φυτά.



### 1.1 Ο κοινός μηχανισμός δράσης όλων των υποδοχέων κινάσων

Όλοι οι υποδοχείς κινάσες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μία διαμεμβρανική περιοχή -ή, όπως στην περίπτωση των υποδοχέων κινάσων His, περισσότερες από μία. Οι υποδοχείς αυτοί μοιράζονται έναν κοινό μηχανισμό ενεργοποίησης. Απουσία προσδέτη βρίσκονται στην ανενεργή διαμόρφωση. Για να μεταφέρουν το σήμα θα πρέπει να διμεριστούν ή να δημιουργήσουν και μεγαλύτερα ολιγομερή. Ανάλογα με τον τύπο του υποδοχέα, ο προσδέτης επάγει μία αλλαγή στη διαμόρφωση που προάγει τον διμερισμό ή τη σταθεροποίηση διμερών συμπλεγμάτων υποδοχέων που έχουν ήδη σχηματιστεί. Ως αποτέλεσμα οι ενδογενείς ή οι συνδεδεμένες περιοχές κινάσων πλησιάζουν μεταξύ τους, ώστε να ενεργοποιήσουν η μία την άλλη. Στις περισσότερες περιπτώσεις -αλλά όχι πάντα- αυτή η ενεργοποίηση

απαιτεί φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης που επιτυγχάνεται μέσω trans-φωσφορυλίωσης. Ανάλογα με τον τύπο του υποδοχέα, αυτό συμβαίνει σύμφωνα με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: είτε τα μονομερή φωσφορυλιώνουν το ένα το άλλο είτε, περισσότερο ως εξαίρεση, το ένα μονομερές φωσφορυλιώνει το άλλο, το οποίο διαβιβάζει το σήμα.

Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένες κινάσες μέσω της φωσφορυλίωσης των τελεστών ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, συνδέοντας την περιφέρεια με τον μεταβολισμό και το γονιδίωμα. Συχνά, η κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα κινάσης φωσφορυλιώνεται και σε άλλα κατάλοιπα, επιπλέον του βρόχου ενεργοποίησης. Αυτό δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, ένα αποτέλεσμα το οποίο είναι ιδιαίτερα έντονο για τους υποδοχείς κινάσες Tyr. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση μπορεί να παρατείνει τη μεταγωγή του σήματος, ακόμα και αφού ο προσδέτης έχει απομακρυνθεί, καθώς ο υποδοχέας ή η συνδεδεμένη πρωτεϊνική κινάση παραμένουν ενεργοί έως ότου αποφωσφορυλιωθούν από μία συγγενή πρωτεϊνική φωσφατάση ή αλλιώς έως ότου ρυθμιστούν αρνητικά (down-modulated). Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τους προκαρυωτικούς υποδοχείς κινάσες His, όπου η φωσφορυλιωμένη μορφή είναι μία μεταβατική κατάσταση μικρής διάρκειας μιας αντίδρασης μεταφοράς φωσφορικών ομάδων μεταξύ του υποδοχέα και της πρωτεΐνης υποστρώματος, η οποία είναι ο ρυθμιστής της απόκρισης (βλ. σσ. 31-36). Οι εξελικτικά αρχαιότεροι υποδοχείς κινάσες Ser/Thr θα αναλυθούν στη συνέχεια, ενώ τα πιο σύγχρονα είδη υποδοχέων, που έχουν ενδογενή δραστικότητα κινάσης Tyr ή συνδέονται με κινάσες Tyr, έχουν περιγραφεί στα Κεφάλαια 8 και 9, αντίστοιχα.

## 2. Η οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGF- $\beta$ )

Οι υποδοχείς που έχουν ενδογενή δράση κινάσης Ser/Thr είναι με μεγάλη διαφορά η μεγαλύτερη κατηγορία υποδοχέων στα φυτά, ενώ στα ζώα οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αποτελούν μια μικρή ομάδα υποδοχέων που συνδέει μόνο τα μέλη της οικογένειας του TGF- $\beta$ .

### 2.1 Η ανακάλυψη του TGF- $\beta$

Οι έρευνες για την ανακάλυψη παραγόντων μετασχηματισμού ξεκινούν το 1972, όταν οι George Todaro και Robert Huebner, στο National Cancer Institute of Health, Bethesda, Maryland, μελετώντας την ικανότητα κυτταρικού μετασχηματισμού που έχουν οι RNA ιοί τύπου C, πρότειναν την υπόθεση ύπαρξης ιικών ογκογονιδίων στα σπονδυλωτά. Πρότειναν, δηλαδή, ότι τα ενδογενή ογκογονίδια έχουν τη γενετική πληροφορία για την παραγωγή ενός καρκινικού RNA ιού τύπου C, η έκφρασή τους όμως ανακόπτεται από καταστολείς στα "φυσιολογικά" κύτταρα, ενώ διάφοροι εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ακτινοβολιών και των χημικών καρκινογόνων θα μπορούσαν να τα ενεργοποιήσουν απενεργοποιώντας τον καταστολέα. Το 1976 οι Michael Bishop και Harold Varmus (Nobel 1989) στο University of California Medical Center, San Francisco, μελετώντας επίσης τις επιδράσεις των καρκινογόνων RNA ιών έδειξαν ότι υπεύθυνο για τον καρκινικό μετασχηματισμό ενός κυττάρου από τον ιό του σαρκώματος των πτηνών είναι το ικό γονίδιο *v-src*, το προϊόν του οποίου είναι μια ιδιόσυστα ενεργή κινάση τυροσίνης. Το 1983 η ίδια ομάδα έδειξε ότι το ικό *v-src* προέκυψε από το κυτταρικό γονίδιο *c-src*.

Περίπου την ίδια εποχή, το 1976, με βάση τα αποτελέσματα από μια συνεργασία με τον βραβευμένο με Nobel Stanley Cohen (ανακάλυψε τον EGF), ο George

Todaro πρότεινε ότι οι ογκογόνοι ιοί των τρωκτικών μετασχηματίζουν τα κύτταρα επάγοντας την έκκριση ενός μορίου, λειτουργικά ανάλογου του EGF, το οποίο δρα στα ίδια κύτταρα από τα οποία απελευθερώνεται, μέσω μιας διαδικασίας που αργότερα ονομάστηκε αυτοκρινής έκκριση. Κινούμενος στο ίδιο πλαίσιο, ο Robert Holley (Nobel 1968), στο Salk Institute for Biological Studies, San Diego, California, πρότεινε ότι ένας μηχανισμός μετασχηματισμού επάγει την αύξηση της διαθεσιμότητας συγκεκριμένων υποδοχέων ορμονών (ή αυξητικών παραγόντων).

Οι αυξητικοί παράγοντες μετασχηματισμού (TGFs), που περιγράφθηκαν από τους De Larco και Todaro το 1978, μοιράζονται κοινές ιδιότητες με το γονίδιο *v-src*, καθώς ήταν σε θέση να οδηγήσουν φυσιολογικούς ινοβλάστες να σχηματίσουν προοδευτικά αναπτυσσόμενες αποικίες σε μαλακό άγαρ, ιδιότητα που συνδέεται στενά με τον μετασχηματισμένο φαινότυπο *in vitro*. Όμως, σε αντίθεση με τα *v-src* και άλλα ογκογονίδια, ο μετασχηματισμός δεν προήλθε από ενδογενείς, γενετικές αλλαγές των κυττάρων, αλλά από εκκρινόμενους παράγοντες που δεν επηρέασαν τον γενότυπο. Ο όρος TGF επιλέχθηκε για αυτή τη δραστηριότητα λόγω της επαγωγής ενός μετασχηματισμένου φαινοτύπου σε καλλιέργειες μη μετασχηματισμένων κυττάρων και λόγω της παραδοχής, που αποδείχθηκε αργότερα ότι είναι εσφαλμένη, ότι ο παράγοντας αυτός εκφραζόταν μόνο στα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα. Εξαιτίας της αναστρέψιμης συμπεριφοράς κατά την απομάκρυνση της πηγής των TGFs και λαμβάνοντας υπόψη την ιδιαίτερα ορατή ανακάλυψη των ογκογονιδίων ως γενετικής βάσης κακοήθους μετασχηματισμού εκείνη την εποχή, η έννοια του αναστρέψιμου μετασχηματισμού με εκκρινόμενους παράγοντες αντιμετωπίστηκε με σκεπτικισμό.

#### Από τον SCF στους TGF- $\alpha$ και TGF- $\beta$

Η ανακάλυψη του TGF- $\beta$  ξεκίνησε το 1978, όταν οι De Larco και Todaro περιέγραψαν τον μερικό καθαρισμό ενός αυξητικού παράγοντα, ο οποίος εκκρίνεται από ινοβλάστες μετασχηματισμένους από τον RNA ιό σαρκώματος Moloney (MSV), και τον ονόμασαν αυξητικό παράγοντα σαρκώματος, SGF (Sarcoma Growth Factor).

Το 1981, ωστόσο, έγινε εμφανές στο εργαστήριο του Harold Moses, Mayo Clinic, και στη συνέχεια στο εργαστήριο των Michael Sporn και Anita Roberts, στο National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, ότι ο SGF, καθώς και οι δραστηριότητες σχηματισμού αποικιών με παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες που απομονώθηκαν από μια ποικιλία μη καρκινικών ιστών ποντικού, βοδιού και ανθρώπου, αποτελούσαν στην πραγματικότητα δύο συνεργικές δραστηριότητες. Η μία από αυτές απαιτούσε σύνδεση στον υποδοχέα EGFR και στη συνέχεια αποδόθηκε στον TGF- $\alpha$  ένα μέλος της οικογένειας αυξητικών παραγόντων EGF, ενώ η δεύτερη αποδόθηκε στον TGF- $\beta$ , ο οποίος δεν συνδέεται σε EGFRs αλλά μπορεί να προκαλέσει καρκινικό μετασχηματισμό, σε συνδυασμό με τον EGF. Ένα ενδιαφέρον ανέκδοτο είναι ότι η αντιστοίχιση των "α" και "β" σε αυτούς τους δύο TGF βασίστηκε στην επιμονή του Todaro ότι ο TGF- $\alpha$ , ο οποίος θεωρούσε ότι υπήρχε μόνο στα καρκινικά κύτταρα, αντιπροσώπευε την κυρίαρχη μετασχηματιστική δραστηριότητα και ότι ο TGF- $\beta$ , τότε γνωστό ότι εκφράζεται σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, χρησίμευσε απλά για να ρυθμίσει τη διαδικασία.

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι η επαγωγή του καρκινικού φαινοτύπου δεν είναι σε καμία περίπτωση η κύρια λειτουργία του TGF- $\beta$ , ο οποίος είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη με πολλούς φυσιολογικούς ρόλους, από την εμβρυογένεση έως την επούλωση τραυμάτων.

Σε πειράματα που έγιναν με knockout γονίδια αναδείχθηκε ο ουσιαστικός ρόλος του TGF- $\beta$  και των ισομορφών του, σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Για παράδειγμα, οι ποντικοί με διαγραφή του γονιδίου *tgf- $\beta$ 1* παρουσιάζουν προγεννητική θνησιμότητα ή πεθαίνουν λίγο μετά τον τοκετό από μια αυτοάνοση φλεγμονώδη νόσο, εμπλέκοντας έντονα αυτήν την ισομορφή στην ανοσολογική ρύθμιση. Ωστόσο, η προγεννητική θνησιμότητα σε αυτά τα ποντίκια οφείλεται σε ελαττωματική ανάπτυξη της αγγείωσης του λεκιθικού σάκου, υπογραμμίζοντας τον

σημαντικό ρόλο του TGF- $\beta$ 1 στην αγγειακή ανάπτυξη. Τα ποντίκια με διαγραφή των γονιδίων *tgf- $\beta$ 2* ή *tgf- $\beta$ 3* παρουσιάζουν πολλαπλά αναπτυξιακά ελαττώματα του σκελετού, της καρδιάς και του ουρογεννητικού συστήματος ή των πνευμόνων, αντίστοιχα.

## 2.2 Τα μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$

Η οικογένεια TGF- $\beta$  περιέχει 42 μέλη στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 7 στην *Drosophila*, και 4 στον *Caenorhabditis elegans*. Στα θηλαστικά εκφράζονται οι υποοικογένειες TGF- $\beta$ , BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), GDFs (Growth Differentiation Factors), **activin/inhibin**, **Nodal**, **μυοστατίνη** (myostatin) και **AMH** (anti-Müllerian hormone) (Εικόνα 10.2). Οι περισσότεροι από αυτούς τους παράγοντες εκφράζονται ευρέως (όπως ο TGF- $\beta$ ), ενώ ορισμένοι έχουν εξειδικευμένη έκφραση (όπως η μυοστατίνη στους μύς). Μπορεί να είναι ενεργοί από τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μέχρι και την εφηβεία (όπως οι BMPs) ή μόνο για πολύ περιορισμένες περιόδους (όπως η AMH).

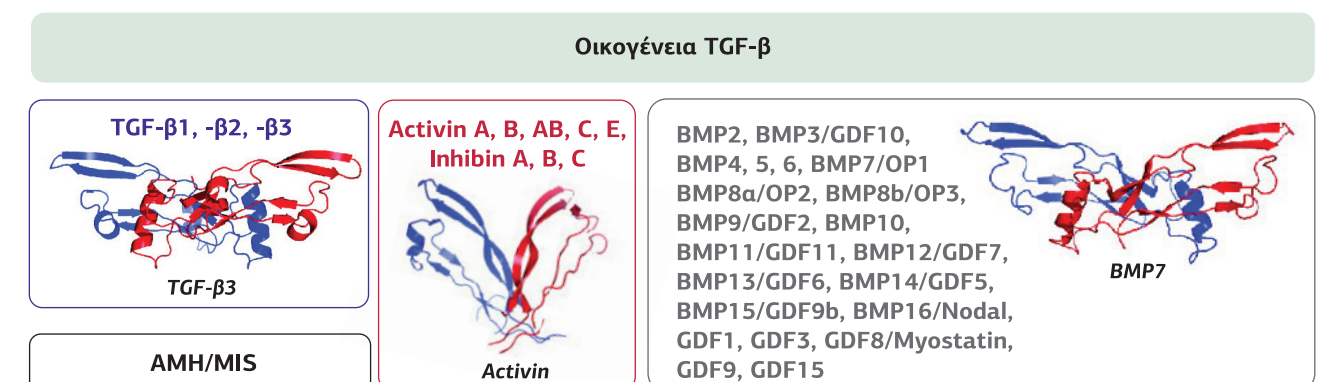
Τα μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$  ενορχηστρώνουν την αρχιτεκτονική των ιστών σε όλο το σώμα, παίζοντας κύριο ρόλο στη διαμόρφωση του σχεδίου του σώματος κατά την ανάπτυξη των μεταζώων. Οι Nodal, activin, inhibin, BMPs και GDFs καθορίζουν τον εμπρόσθιο/οπίσθιο και ραχιαίο/κοιλιακό άξονα, το ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα, καθώς και τη δεξιά/αριστερή ασυμμετρία, ενώ οι TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 και - $\beta$ 3 είναι κρίσιμοι αναστολείς της ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων, της ανοσολογικής και της αιμοποιητικής λειτουργίας, και προωθούν την ανάπτυξη του συνδετικού ιστού. Επίσης, οι BMPs/GDFs ρυθμίζουν την ανάπτυξη του σκελετού και των χόνδρων, οι activins και inhibins την απελευθέρωση των ορμονών της υπόφυσης και η AMH τον καθορισμό του φύλου κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

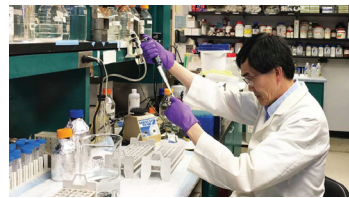
#### Η κοινή δομή των μελών της οικογένειας TGF- $\beta$

Όλα τα μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$ , στην ώριμη ενεργή μορφή τους, βρίσκονται ως ομο- ή ετερο-διμερή. Η γενική δομή του κάθε μονομερούς περιλαμβάνει δύο ζεύγη αντιπαράλληλων  $\beta$ -κλώνων που σχηματίζουν μία πεπλατυσμένη επιφάνεια, η οποία προεξέχει από μια μακριά  $\alpha$ -έλικα. Στο διμερές που σχηματίζεται, η  $\alpha$ -έλικα του ενός μονομερούς βρίσκεται απέναντι από την κοίλη επιφάνεια που σχηματίζεται από τους  $\beta$ -κλώνους του άλλου μονομερούς (Εικόνα 10.2). Το κάθε μονομερές δημιουργεί τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς που σχηματίζουν το μοτίβο κόμβου κυστίνης "cystine knot" (βλ. Εικόνα 9.6 και 9.7A). Με εξαίρεση τους GDF3 και GDF9, όλα τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$  περιέχουν μια καλά συντηρημένη έβδομη κυστεΐνη, η οποία σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των δύο μονομερών, διατηρώντας ομοιοπολικά συνδεδεμένους τους διμερείς TGF- $\beta$ .

**Εικόνα 10.2**  
Τα μέλη της οικογένειας του TGF- $\beta$  και η κρυσταλλική δομή τους. Η οικογένεια TGF- $\beta$  περιλαμβάνει τέσσερις υποοικογένειες: α. TGF- $\beta$ , β. BMPs (Bone Morphogenetic proteins)/GDFs (Growth Differentiation Factors)/Nodal/myostatin (μυοστατίνη), γ. activin/inhibin και δ. AMH (anti-Müllerian hormone). Τα ώριμα διμερή της οικογένειας TGF- $\beta$  (στην εικόνα διακρίνονται οι activin, BMP7, TGF- $\beta$ 3) μοιράζονται την ίδια δομή, στην οποία η κεντρική  $\alpha$ -έλικα του ενός μονομερούς (με μπλε) βρίσκεται απέναντι στην κοίλη επιφάνεια που σχηματίζεται από τους  $\beta$ -κλώνους του άλλου μονομερούς (με κόκκινο). [41]

Moses HL, Roberts AB, Derynck R, The Discovery and Early Days of TGF- $\beta$ : A Historical Perspective, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8: pii a021865 (2016)



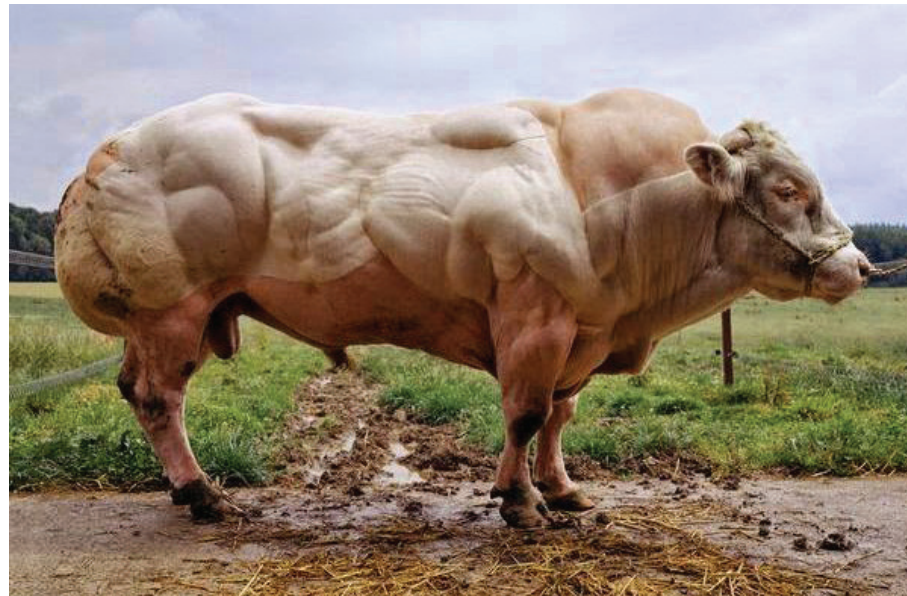


Se-Jin Lee, Καθηγητής Γενετικής και Γονιδιωματικής στο Harvard College, Johns Hopkins University School of Medicine

### Μυοστατίνη, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα

Η μυοστατίνη (ή GDF8) είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των μυών. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη μυοστατίνη ανακαλύφθηκε το 1997 από τους γενετιστές Se-Jin Lee και Alexandra McPherron, οι οποίοι δημιούργησαν στο Johns Hopkins University ένα knockout στέλεχος ποντικών, το οποίο στερούνταν το γονίδιο και ως αποτέλεσμα τα ποντίκια είχαν περίπου διπλάσια μυϊκή μάζα από τα κανονικά. Αυτοί οι ποντικοί, στη συνέχεια, ονομάστηκαν “mighty mice”.

Φυσικές ελλείψεις μυοστατίνης, διαφόρων ειδών, έχουν ταυτοποιηθεί σε μερικές φυλές βοοειδών και προβάτων και σε ανθρώπους. Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα είναι μια δραματική αύξηση της μυϊκής μάζας. Μια έλλειψη 11bp στο COOH-τελικό άκρο της κωδικής περιοχής του γονιδίου της μυοστατίνης (*Mstn*) στη βελγική ράτσα βοοειδών Belgian Blue και μία μετάλλαξη στη ράτσα Piedmontese είναι υπεύθυνες για τον φαινότυπο των διπλών μυών “double-muscled” (Εικόνα 10.3). Τα ζώα γεννιούνται φαινομενικά με φυσιολογικό φαινότυπο και ο αποκαλούμενος διπλομυϊκός φαινότυπος εμφανίζεται μόνο έπειτα από 4-6 βδομάδες. Δεν είναι ασυνήθιστο για τους ταύρους να φτάσουν σε βάρος που ξεπερνά τα 1.300 κιλά. Τα ζώα είναι υπάκουα και το βοδινό λέγεται ότι είναι πεντανόστιμο.



Εικόνα 10.3 Belgian Blue. Μια έλλειψη 11bp στο COOH-τελικό άκρο της κωδικής περιοχής του γονιδίου της μυοστατίνης (*Mstn*) στη βελγική ράτσα βοοειδών Belgian Blue είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο των διπλών μυών (double-muscled).

Μια κληρονομήσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο της μυοστατίνης, που διεγείρει την ανάπτυξη των μυών και μειώνει το λίπος, εμφανίζεται και στους ανθρώπους. Το 2004, ένα αγόρι στη Γερμανία διαγνώστηκε με μια μετάλλαξη και στα δύο αντίγραφα του γονιδίου της μυοστατίνης, η οποία τον καθιστούσε αρκετά ισχυρότερο από τους συνομηλικούς του. Η μητέρα του έχει μια μετάλλαξη σε ένα αντίγραφο του γονιδίου. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός πως προϊόντα που ρυθμίζουν τα επίπεδα μυοστατίνης χρησιμοποιούνται ήδη από πολλούς αθλητές και body builders.

### 3. Ωρίμανση και ενεργοποίηση των TGF-β

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας TGF-β (BMPs, activin/inhibin, Nodal κ.λπ.) συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα μόρια, τα οποία αποτελούνται από το πεπτιδίο σήματος (signal peptide) που στρατολογεί το μόριο στο ΕΔ, την πρόδρομη περιοχή (pro-region) και το μονομερές μέλος της οικογένειας TGF-β. Η prepro-περιοχή αποκόπτεται από πρωτεάσες και οι BMPs, activin/inhibin, Nodal κ.λπ. απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα, όπου διμερίζονται. Τα ώριμα ενεργά διμερή εκκρίνονται

στον εξωκυτταρικό χώρο, όπου η δραστικότητά τους ρυθμίζεται από διάφορες οικογένειες διαχεόμενων πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέοντας τον προσδέτη τύπου TGF-β παρεμποδίζουν την πρόσδεση στους υποδοχείς του. Μερικοί από τους χαρακτηριστικότερους ανταγωνιστές είναι η Noggin, η Chordin, και η οικογένεια των πρωτεϊνών DAN/Cerberus (και οι τρεις δρουν ως ανταγωνιστές των BMPs), η Follistatin (ανταγωνιστής της activin και των BMPs) και η Sclerostin. Αυτές οι πρωτεΐνες συνεισφέρουν στον σχηματισμό διαβάθμισης της συγκέντρωσης του μορφογόνου κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης (βλ. σσ. 801-805), ωστόσο, η δομική πολυμορφία και η πολυπλοκότητά τους αυξάνει την πιθανότητα ότι μπορεί να έχουν και άλλους ρόλους, όπως για παράδειγμα να δρουν ως δεξαμενές αυξητικών παραγόντων για τη συντονισμένη παροχή διαφόρων αυξητικών παραγόντων ταυτόχρονα.

### 3.1 Μηχανισμός ωρίμανσης των TGF-β1/3

Όσον αφορά τους TGF-β1/β3 καθώς και ορισμένα μέλη της υποοικογένειας των BMPs συντίθενται και αυτοί ως ανενεργά πρόδρομα μόρια, τα οποία μετά την αποκοπή του πεπτιδίου σήματος από πρωτεάσες, το υπόλοιπο μόριο διμερίζεται. Ωστόσο, στο διμερές η πρόδρομη περιοχή και το ώριμο TGF-β παραμένουν μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα, παρεμποδίζοντας τη σύνδεση στους αντίστοιχους υποδοχείς. Για τον λόγο αυτό δεν χρησιμοποιούν ανταγωνιστές.

Συγκεκριμένα, ο TGF-β συντίθεται ως πρόδρομη ανενεργή προ-πρωτεΐνη, pre-pro-TGF-β, 55 kDa, 390 αμινοξέων, η οποία αποτελείται από μια NH<sub>2</sub>-τελική προ-προ-περιοχή 29 αμινοξέων (pre-region) **Pre**, με ρόλο πεπτιδίου σήματος που οδηγεί την πρόδρομη πρωτεΐνη στο ΕΔ, μια προ-περιοχή (pro-domain) **LAP** (Latency Associated Peptide) 249 αμινοξέων, και ένα COOH-τελικό τμήμα 112 αμινοξέων, που θα αποτελέσει το μονομερές του ενεργού, ώριμου **TGF-β**.

Η διαδικασία ωρίμανσης ξεκινά στο ΕΔ, όπου αποκόβεται το σηματοδοτικό προ-προ-πεπτιδίο. Το υπόλοιπο τμήμα διμερίζεται και ονομάζεται μικρό λανθάνον σύμπλοκο, **SLC** (Small Latent Complex). Το διμερές SLC συγκρατείται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς, ο σχηματισμός των οποίων καταλύεται από το ένζυμο δισουλφιδική ισομεράση (PDI, Protein Disulfide Isomerase), μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης Cys223, Cys225 και Cys356. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το ομοδιμερές προ-TGF-β 110 kDa που αποτελείται από δύο αλυσίδες LAP και δύο αλυσίδες ώριμου TGF-β. Το SLC οδηγείται στο trans-Golgi, όπου οι δύο συνδεδεμένες αλυσίδες LAP διαχωρίζονται από τις δύο συνδεδεμένες αλυσίδες TGF-β, με κόψιμο του δεσμού μεταξύ των αμινοξέων 278 και 279, της αλληλουχίας RxxR, που αναγνωρίζει μια furin-like Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενη ενδοπρωτεάση Ser, η οποία βρίσκεται στη μεμβράνη του Golgi. Ωστόσο, ο ομοδιμερής TGF-β (25 kDa) παραμένει συνδεδεμένος μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων στις δύο αλυσίδες LAP, οι οποίες σχηματίζουν έναν ειδικό τύπο προστασίας (δραστικότητα chaperone-like) διατηρώντας τον TGF-β στην ανενεργή του μορφή και παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα.

Τέλος, η LAP, μέσω της Cys33, συνδέεται με δισουλφιδικό δεσμό με την 2n CRD περιοχή (8-Cys) της γλυκοπρωτεΐνης LTBP (Latent TGF-β - Binding Protein), δημιουργώντας το μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο **LLC** (Large Latent Complex): LTBP/LAP/ TGF-β (Εικόνα 10.4). Η σύνδεση με την LTBP δεν απαιτείται για τη διατήρηση της λανθάνουσας μορφής του TGF-β, αλλά διευκολύνει την έκκριση, αποθήκευση και ενεργοποίηση του συμπλόκου TGF-β/ LAP.

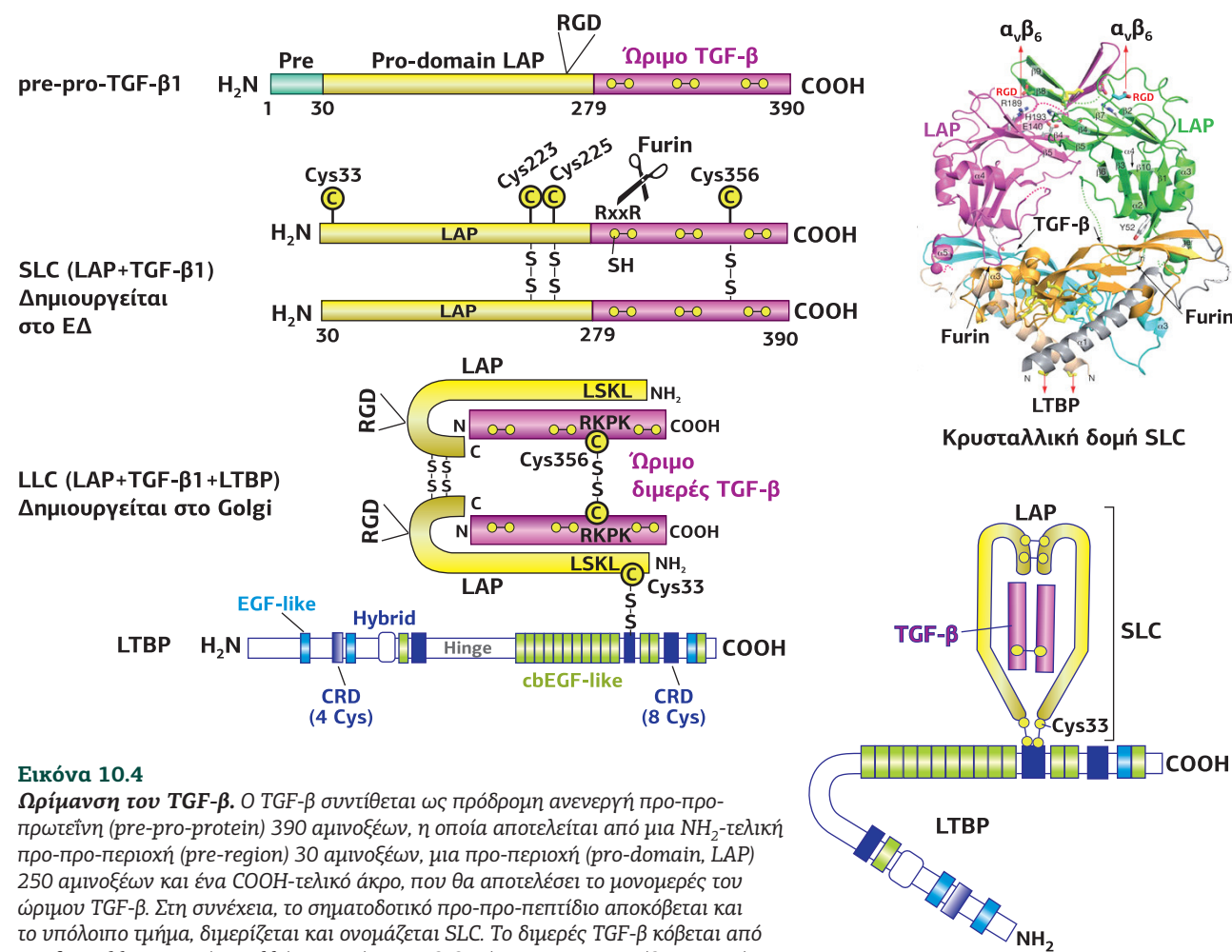
#### Οι πρωτεΐνες LTBP

Οι **LTBPs** (LTBP1-4) είναι μια ομάδα τεσσάρων πρωτεϊνών 120-240 kDa, οι οποίες ανακαλύφθηκαν το 1990 και ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας fibrillins. Περιέχουν 18 επαναλήψεις EGF-like ικανές να συνδέουν Ca<sup>2+</sup>, cbEGF (calcium-binding Epidermal Growth Factor-like),

τρεις περιοχές πλούσιες σε Cys (CRD), οι οποίες περιέχουν 8 Cys η καθεμία και είναι γνωστές και ως **TB** (TGF-β Binding protein-like domains), καθώς έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν τον TGF-β και μια περιοχή CRD με 4 Cys. Επίσης, στο NH<sub>2</sub>-τελικό τους άκρο περιέχουν περιοχές υβρίδια (hyb), των οποίων η δομή ομοιάζει με τις περιοχές CRD - 8Cys και cbEGF, χωρίς όμως να μπορούν να συνδέσουν ούτε τον TGF-β ούτε το Ca<sup>2+</sup>. Μέσω του COOH-τελικού τους άκρου οι LTBP's συνδέονται με τη fibrillin (FBN).

Από τις LTBP's, η LTBP1 και η LTBP3 συνδέονται αποτελεσματικά και στις τρεις TGF-β LAP ισομορφές, ενώ η LTBP4 συνδέεται με χαμηλή συγγένεια μόνο στην TGF-β1 LAP και η LTBP2 δεν συνδέεται σε καμία LAP.

Το LLC και η ελεύθερη μορφή της LTBP εκκρίνονται άμεσα από τα κύτταρα. Αντιθέτως, το SLC εκκρίνεται πολύ αργά και η πλειονότητά του παραμένει στην cis πλευρά της συσκευής Golgi. Συνεπώς, η σύνδεση της LTBP με το SLC είναι σημαντική για τη σωστή συναρμολόγηση και έκκριση των αδρανών συμπλόκων του TGF-β. Η σημασία αυτής της σύνδεσης υπογραμμίζεται όταν η Cys33 του LAP, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση LAP - LTBP, αντικαθίσταται με Ser σε ποντικούς και τα ζώα παρουσιάζουν φλεγμονώδεις και ογκογόνους φαινοτύπους παρόμοιους με εκείνους που παρατηρούνται στα TGF-β1 null ποντίκια (Εικόνα 10.4).



**Εικόνα 10.4**

**Ωρίμανση του TGF-β.** Ο TGF-β συντίθεται ως πρόδρομη ανενεργή προ-προ-πρωτεΐνη (*pre-pro-protein*) 390 αμινοξέων, η οποία αποτελείται από μια NH<sub>2</sub>-τελική προ-προ-περιοχή (*pre-region*) 30 αμινοξέων, μια προ-περιοχή (*pro-domain*, LAP) 250 αμινοξέων και ένα COOH-τελικό άκρο, που θα αποτελέσει το μονομερές του ώριμου TGF-β. Στη συνέχεια, το σηματοδοτικό προ-προ-πεπτιδίο αποκόβεται και το υπόλοιπο τμήμα, διμερίζεται και ονομάζεται SLC. Το διμερές TGF-β κόβεται από μια furin-like πρωτεάση, αλλά παραμένει συνδεδεμένο στο προ-πεπτιδίο LAP μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Στην περιοχή LAP του διμερούς πρόδρομου μορίου συνδέεται και η γλυκοπρωτεΐνη LTBP (*Latent TGFβ - Binding Protein*), και το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ονομάζεται LLC. [20] [38] [62] [63] Σε πλαίσιο διακρίνεται η κρυσταλλική δομή του ομοδιμερούς SLC (LAP+TGF-β1). [24] [69].

### 3.2

#### Έκκριση του LLC από τα κύτταρα και αγκυροβόληση σε πρωτεΐνες της ECM

Μετά την έκκριση του LLC, η LTBP διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη στρατολόγηση του συμπλόκου στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM). Η COOH-τελική περιοχή της LTBP συνδέεται στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της fibrillin, ενώ η NH<sub>2</sub>-τελική της περιοχή συνδέεται με την ινωδονεκτίνη (fibronectin). Αυτή η ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ της LTBP και των πρωτεϊνών της ECM επιτυγχάνεται μέσω σταυροσυνδέσεων που δημιουργούνται με τη βοήθεια της τρανσγλουταμίνησης (Εικόνα 10.5). Η τρανσγλουταμίνηση (TG) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη δημιουργία ενός ισοπεπτιδικού δεσμού ανάμεσα σε μια ελεύθερη NH<sub>2</sub>-ομάδα (π.χ. μιας λυσίνης) και σε μια R-C=O ομάδα (π.χ. μιας γλουταμίνης).

#### Οι fibrillins

Οι **fibrillins** (fibrillin 1-3) είναι μεγάλες γλυκοπρωτεΐνες 350 kDa, οι οποίες εκκρίνονται από τους ινοβλάστες στην εξωκυττάρια ουσία. Είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό των ελαστικών μικροϊνιδίων (διαμέτρου 10 έως 12 nm) του συνδετικού ιστού, η ακριβής μοριακή δομή των οποίων καθώς και η ρύθμιση της ελαστικότητάς τους δεν είναι πλήρως κατανοητές. Στην καρδιά του προβλήματος της κατανόησης της οργάνωσης αυτών των μικροϊνιδίων βρίσκεται το ερώτημα πώς ένα μόριο το οποίο είναι συσκευασμένο σε ινίδια με ένα μέσο αλλά μεταβλητό μήκος από σφαιρική περιοχή σε σφαιρική περιοχή 55 nm, όταν εκτείνεται πλήρως αποκτά μήκος 150 nm. Οι ιδιότητες της ελαστικότητας και της εκτατότητας είναι ζωτικής σημασίας στους συνδετικούς ιστούς, όπως τα αιμοφόρα αγγεία και οι πνεύμονες. Στους ανθρώπους, αρνητικές μεταλλάξεις στα γονίδια *fibrillin-1* και *fibrillin-2* έχουν συνδεθεί με ασθένειες που επηρεάζουν το καρδιαγγειακό, το σκελετικό και το οπτικό σύστημα.

Και οι τρεις fibrillins χαρακτηρίζονται από μια κοινή δομή και αποτελούνται από (Εικόνα 10.5A):

**46 EGF-like περιοχές**, από τις οποίες οι 42 συνδέουν το Ca<sup>2+</sup> (cbEGF, calcium binding EGF). Οι περιοχές EGF και cbEGF εμφανίζονται σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και της κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με ελαστικές ίνες, καθώς και πρωτεϊνών με μη σχετικές λειτουργίες, όπως ο υποδοχέας Notch (βλ. Εικόνα 3.2), ο υποδοχέας της LDL (Low-Density Lipoprotein) και διάφοροι παράγοντες πήξης. Οι περιοχές cbEGF αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των fibrillins. Η σύνδεση του Ca<sup>2+</sup> στις περιοχές αυτές παίζει έναν δομικό ρόλο περιορίζοντας την κινητικότητα των ενδοπεριοχών των fibrillins και προστατεύοντας το μόριο από την πρωτεόλυση. Παίζει, επίσης, ρόλο στις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των fibrillins, σταθεροποιώντας τη διαμόρφωση που απαιτείται για την αναγνώριση από άλλες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, αλλά και για ομοτυπικές και ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της fibrillin-1 και της fibrillin-2.

**7 περιοχές πλούσιες σε Cys (CRD)**, οι οποίες περιέχουν 8 Cys η καθεμία και ονομάζονται περιοχές TGF-β - Binding (TB1-TB7), όμοιες με τις περιοχές των LTBP's. Οι LTBP1-4 ανήκουν στην οικογένεια των fibrillins. Οι 8 Cys της TB1 σχηματίζουν τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς σε διάταξη 1-3, 2-6, 4-7 και 5-8, δημιουργώντας μία NH<sub>2</sub>-τελική σφαιρική περιοχή σταθεροποιημένη από ένα καλά διατηρημένο αρωματικό αμινοξύ. Ωστόσο, καμία από τις CRD - TB περιοχές δεν είναι ικανή να συνδέσει τον TGF-β, όπως η CRD2 περιοχή της LTBP. Η CRD4 περιοχή της fibrillin-1 περιέχει ένα μοτίβο RGD, το οποίο απαιτείται για τη σύνδεση με τις ιντεγκρίνες ανβ3, ανβ6 και α5β1.

Επιπλέον, οι fibrillins περιέχουν μια **περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD)** και **δύο περιοχές υβρίδια (hybrid)** με δομική ομοιότητα με τις περιοχές cbEGF και TB.

Τα μικροϊνίδια fibrillins παίζουν ζωτικό ρόλο στην εξωκυτταρική ρύθμιση των

TGF- $\beta$  και των BMPs καθώς ρυθμίζουν την αποθήκευση, την απελευθέρωση και την ενεργοποίησή τους σε απόκριση στα διάφορα ερεθίσματα. Όπως είδαμε, το LLC (LTBP/ LAP/ TGF- $\beta$ ) αποτελεί μια μορφή χωρίς βιολογική δραστηριότητα και η σύνδεσή του μέσω της LTBP στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο των fibrillins είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή του.

### Η ινωδονεκτίνη

Η **ινωδονεκτίνη** (FN, fibronectin) είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η οποία συνδέεται κυρίως στις ιντεγκρίνες, αλλά και σε άλλα συστατικά της ECM, όπως κολλαγόνο, ινώδες (fibrin), πρωτεογλυκάνες της θειικής ηπαράνης, όπως οι συνδεκάνες (syndecans), αλλά και με την LTBP1, δρώντας ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς που διατηρεί και κατευθύνει την οργάνωση των ιστών και τη σύνθεση της ECM. Η ινωδονεκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και είναι σημαντική για διαδικασίες, όπως η επούλωση πληγών και η εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Η ινωδονεκτίνη υπάρχει ως διμερές που αποτελείται από δύο σχεδόν πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες με ένα ζευγάρι COOH-τελικών δισουλφιδικών δεσμών. Κάθε υπομονάδα ινωδονεκτίνης είναι 230-250 kDa και περιέχει τρεις τύπους περιοχών (ονομαζόμενες επαναλήψεις Fn): Fn-τύπου I, II και III. Και οι τρεις τύποι αποτελούνται από δύο αντιπαράλληλα  $\beta$ -φύλλα που δημιουργούν ένα  $\beta$ -sandwich (Εικόνα 10.5B).

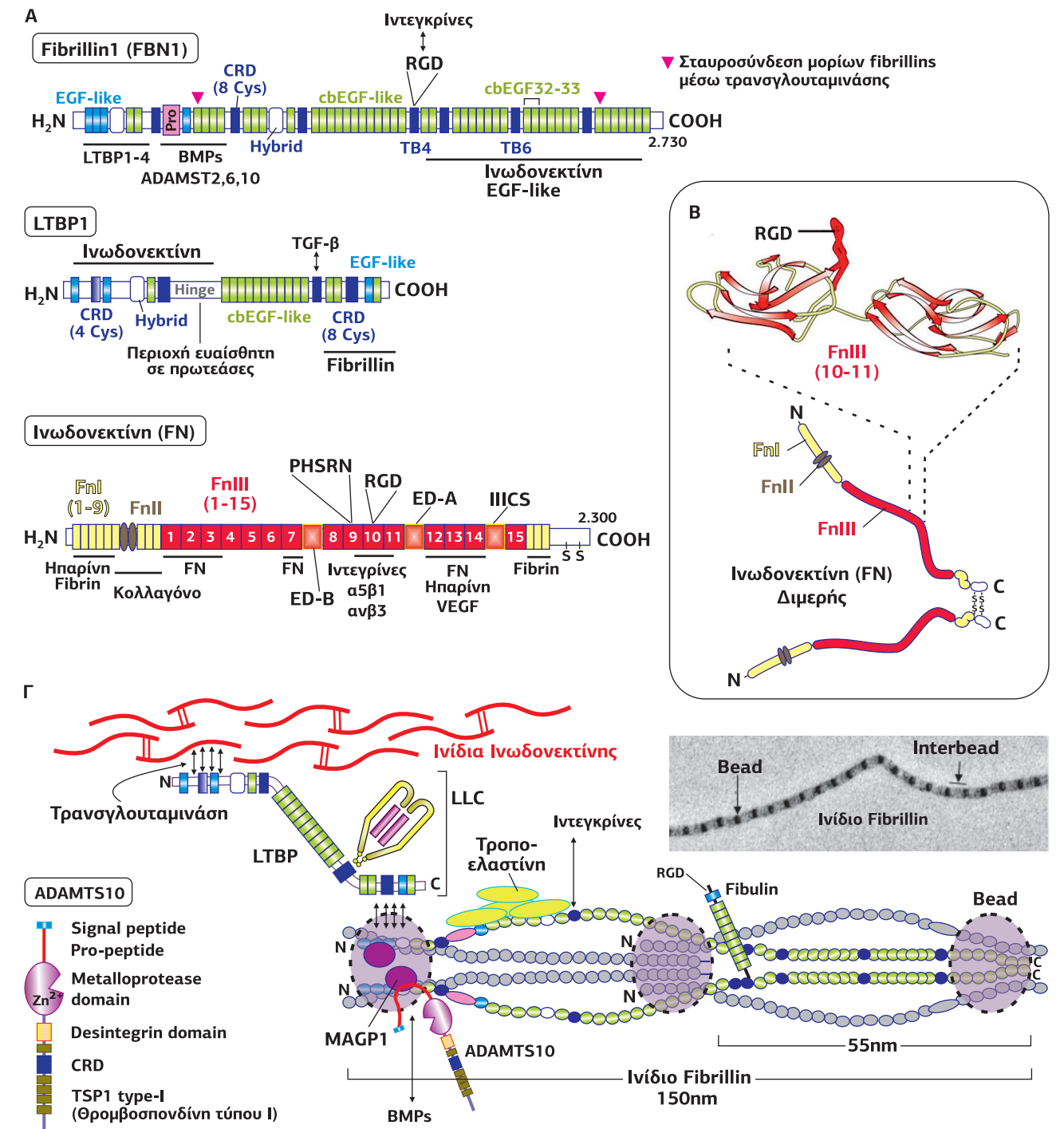
Η ινωδονεκτίνη περιέχει 12 επαναλήψεις FnI, δύο επαναλήψεις FnII και 15 επαναλήψεις FnIII, οι οποίες μαζί αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% της αλληλουχίας. Οι επαναλήψεις FnI αποτελούνται από 40 κατάλοιπα και περιέχουν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, οι FnII από 60 κατάλοιπα με επίσης δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, και οι FnIII από 90 κατάλοιπα χωρίς κανένα δισουλφιδικό δεσμό. Οι περιοχές FnI και FnII σταθεροποιούνται με τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ οι FnIII καθώς δεν περιέχουν κανένα δισουλφιδικό δεσμό, επιτρέπουν το ξεδίπλωμα της περιοχής υπό εφαρμοζόμενη δύναμη.

Η ινωδονεκτίνη συνδέεται με τις ιντεγκρίνες  $\alpha 5 \beta 1$  και  $\alpha \nu \beta 3$  μέσω της αλληλουχίας **RGD** (Arg-Gly-Asp), που βρίσκεται στην περιοχή FnIII10, και της αλληλουχίας **PHSRN** γνωστής και ως "θέση συνέργειας" (synergy site), που βρίσκεται στην FnIII9 (Εικόνα 10.5B). Η ινωδονεκτίνη περιέχει, επίσης, θέσεις για σύνδεση με τη fibrin (FnI1-5, FnI10-12), το κολλαγόνο (FnI6-9), τη fibulin-1 (FnIII13-14), την ηπαρίνη και τη συνδεκάνη (FnIII12-14).

### Εικόνα 10.5

**Πρωτεΐνες σύνδεσης της LTBP.** Α. Δομή της fibrillin1, της ινωδονεκτίνης και της LTBP1. Η fibrillin αποτελείται από 46 EGF-like περιοχές (42 από τις οποίες δεσμεύουν το Ca<sup>2+</sup>, cbEGF) και 7 CRD περιοχές με 8 Cys η καθεμιά ή αλλιώς περιοχές TGF- $\beta$ -Binding (TB1-TB7). Η TB4 περιοχή περιέχει ένα μοτίβο RGD, το οποίο απαιτείται για τη σύνδεση με τις ιντεγκρίνες. Επιπλέον, οι fibrillins περιέχουν μια περιοχή πλούσια σε προλίνη (PRD) και δύο περιοχές υβρίδια (hybrid) με δομική ομοιότητα με τις περιοχές cbEGF και TB. [31] Η LTBP1 περιέχει 18 επαναλήψεις cbEGF, τρεις περιοχές CRD, με 8 Cys η καθεμιά, γνωστές και ως TB (TGF- $\beta$  Binding), και μια περιοχή CRD με 4 Cys. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει μια περιοχή υβρίδιο (hyb). [66] Η κάθε υπομονάδα της ινωδονεκτίνης περιέχει 12 επαναλήψεις FnI, δύο επαναλήψεις FnII και 15 επαναλήψεις FnIII, οι οποίες μαζί αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% της αλληλουχίας της. Η περιοχή FnIII10 περιέχει την αλληλουχία RGD, η οποία είναι η θέση σύνδεσης στις ιντεγκρίνες. Η "θέση συνέργειας" (synergy site) βρίσκεται στην FnIII9 και συμμετέχει στη ρύθμιση της σύνδεσης της ινωδονεκτίνης με τις ιντεγκρίνες. Διακρίνονται, επίσης, και οι περιοχές ED-A και ED-B, υπεύθυνες για τη σύνδεση της ινωδονεκτίνης στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. [54] [79] Β. Η ινωδονεκτίνη (FN) υπάρχει ως διμερές που αποτελείται από δύο σχεδόν πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες με ένα ζευγάρι COOH-τελικών δισουλφιδικών δεσμών. Διακρίνονται οι περιοχές FnIII (10-11), οι οποίες αποτελούνται από δύο αντιπαράλληλα  $\beta$ -φύλλα που δημιουργούν ένα  $\beta$ -sandwich. Γ. Σύνδεση του LLC, μέσω της LTBP1, στα μικροϊνίδια fibrillin και ινωδονεκτίνης. Αν και η μοριακή οργάνωση των ινιδίων fibrillins εξακολουθεί να είναι ασαφής, τα μικροϊνίδια είναι γνωστό ότι περιέχουν θέσεις σύνδεσης α. για αρκετές πρωτεΐνες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως οι fibulins, η τροποελαστίνη, οι γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται με μικροϊνίδια MAGPs (Microfibril-Associated Glycoproteins), β. για μέλη των μεταλλοπρωτεασών ADAMTS, γ. για τις ιντεγκρίνες, και δ. για την LTBP-TGF- $\beta$  και τις BMPs. Η MAGP-1 συνδέεται στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της fibrillin-1 και έχει εντοπιστεί στις σφαιρικές δομές των μικροϊνιδίων. Οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσης των άλλων μορίων στα μικροϊνίδια είναι ασαφείς και επομένως αντιπροσωπεύονται μόνο σχηματικά. [32] [61] [65]

Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, τέσσερις περιοχές Fn-III υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα για να παράγουν έως και 20 διαφορετικές ισομορφές ινωδονεκτίνης. Το εναλλακτικό μάτισμα των περιοχών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία ή την απουσία τους. Οι δύο περιοχές εναλλακτικού μάτισματος, η **ED-A** και η **ED-B** (Extra Domains), είναι απαραίτητες για τη σύνδεση της ινωδονεκτίνης στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης. Όπως θα δούμε στην **Εικόνα 10.7**, σύνδεση της ινωδονεκτίνης στις θέσεις εστιακής προσκόλλησης συμβάλλει στη μετατροπή των ινοβλαστών σε μυσιοβλάστες, ένα φαινόμενο που ελέγχεται από τον TGF- $\beta$ . Η παρουσία της ED-A FN είναι χαρακτηριστική για την επιδιόρθωση / επούλωση των ιστών και την ίνωση, ενώ η ED-B FN συνδέεται συχνότερα με την ανάπτυξη όγκων και την



αγγειογένεση. Η τρίτη περιοχική εναλλακτικού ματίσματος, η IIICS (επίσης γνωστή ως μεταβλητή περιοχική), ρυθμίζει την αλληλεπίδραση με τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης και χρησιμεύει για τον έλεγχο των βιολογικών δραστηριοτήτων της ινωδοεκτίνης.

Η ινωδοεκτίνη συνδέεται στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχική της LTBP1 και αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη για την ανβ6-εξαρτώμενη ενεργοποίηση του TGF-β. Αδυναμία σύνδεσης της ινωδοεκτίνης - LTBP1 ελαττώνει τα επίπεδα του ενεργού TGF-β1.

### 3.3 Μηχανισμοί ενεργοποίησης του TGF-β

Η τοπική ενεργοποίηση των ανενεργών συμπλεγμάτων TGF-β και η καλά και σφικτά ενορρηστωμένη ρύθμιση της λανθάνουσας μορφής τους, επιτρέπει την άμεση και άκρως εντοπισμένη απόκριση στον τραυματισμό των ιστών χωρίς *de novo* σύνθεση.

Η πρωτεολυτική διάσπαση φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός κυτταρικός μηχανισμός της ενεργοποίησης των ανενεργών συμπλεγμάτων TGF-β1. Η πρωτεολυτική διάσπαση του LLC και η απελευθέρωση του ενεργού TGF-β1 διεξάγεται: α. από μια ποικιλία μεταλλοπρωτεασών της ECM (MMPs), συμπεριλαμβανομένων των MMPs μεμβρανικού τύπου 1 (MT1-MMP ή MMP14), και των διαλυτών MMP2, MMP3, MMP9 και MMP13, β. από την πλασμίνη και από ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, και τέλος γ. από τη θρομβίνη και την καθεψίνη (cathepsin).

Την ενεργοποίηση των ανενεργών συμπλεγμάτων TGF-β1 προάγει, επίσης, ανεξάρτητα από την πρωτεολυτική διάσπαση, η αλληλεπίδραση μεταξύ του LAP/TGF-β1, της θρομβοσπονδίνης 1 (TSP1) και του υποδοχέα 6-φωσφορικής μαννόζης. Ένας τρίτος μηχανισμός ενεργοποίησης απαιτεί τη σύνδεση του LLC με τις ιντεγκρίνες.

Η επικρατούσα ιδέα είναι ότι υπάρχει μια εξωκυτταρική αποθήκη προσδετών, έτοιμη να ενεργοποιηθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

#### Ενεργοποίηση από πρωτεάσες

Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεασών, μεταξύ των οποίων η πλασμίνη, η θρομβίνη, η ελαστάση, οι μεταλλοπρωτεάσες MMP2 και MMP9 (Matrix Metalloproteinases) και η ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with TSP1 motifs) μπορούν να ενεργοποιήσουν τον TGF-β, *in vitro*. Ωστόσο, η βιολογική ενεργοποίηση του TGF-β είναι μια σύνθετη, σφικτά ρυθμιζόμενη διαδικασία και μελέτες *in vivo* δεν έχουν ακόμη καθορίσει τη βιολογική σημασία της πρωτεόλυσης του λανθάνοντος TGF-β. Πολλές σερίνοπρωτεάσες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του TGF-β βρίσκονται συνδεδεμένες με μεμβρανικούς υποδοχείς, σε θέσεις όπου υποθετικά θα ενεργοποιήσουν τον TGF-β.

Στην NH<sub>2</sub>-περιοχική της LTBP υπάρχει μια περιοχική ευαίσθητη σε πρωτεάσες, που ονομάζεται περιοχική άρθρωσης (hinge). Η δράση των πρωτεασών σε αυτήν την περιοχική οδηγεί στην απελευθέρωση του LLC από τις πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής ουσίας (βλ. **Εικόνα 10.5A**).

Η **πλασμίνη** είναι μια πρωτεάση που αποτελείται από 5 περιοχές kringle και μια περιοχική πρωτεάσης. Η πλασμίνη διασπά έναν μεγάλο αριθμό συστατικών της ECM και είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση και τη διάσπαση των θρόμβων αίματος (fibrinolysis) κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος. Η πλασμίνη μπορεί, επίσης, να ενεργοποιήσει μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (MMPs), όπως MMP2, MMP3, MMP9, MMP12 και MMP13. Επιπλέον, η πλασμίνη και οι MMPs μπορούν να απελευθερώνουν αυξητικούς παράγοντες συνδεδεμένους με συστατικά της ECM, όπως ο TGF-β. Η ενεργοποίηση του TGF-β από την πλασμίνη είναι μια πολύπλοκη διεργασία που απαιτεί είτε τη σύνδεση καταλοίπων 6-φωσφορικής μαννόζης της LAP στους υποδοχείς της 6-P-μαννόζης (cation-independent mannose 6-phosphate receptors), στη μεμβράνη των κυττάρων, είτε τη σύνδεση

του πλασμινογόνου (το πρόδρομο μόριο της πλασμίνης) στη θρομβοσπονδίνη, η οποία, όπως θα δούμε παρακάτω, δρώντας ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς αφενός διευκολύνει τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη και αφετέρου φέρνει κοντά την πλασμίνη και τον TGF-β. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι ο CI-MMPR συνδέεται και με το πλασμινογόνο διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση πλασμίνης - SLC (βλ. **Εικόνα 10.8**). Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμη απόδειξη της δράσης της πλασμίνης *in vivo*. Ποντίκια χωρίς πλασμινογόνο έχουν φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη, επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση, είναι γόνιμα και δεν εμφανίζουν κανένα από τα παθολογικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται σε ποντικούς χωρίς TGF-β. Επίσης, η παρουσία ενεργού TGF-β σε ποντίκια που στερούνται πλασμινογόνου υποστηρίζει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που είναι λειτουργικοί *in vivo*.

Μια ομάδα 6 μεταλλοπρωτεασών της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας MMPs (Matrix Metalloproteinase) είναι διαμεμβρανικές **MT-MMPs** (Membrane-Type Matrix Metalloproteinases). Οι MT-MMPs μοιράζονται μια κοινή δομή που αποτελείται από ένα πεπτιδίο σήματος (signal peptide), μια προ-περιοχική, μια καταλυτική περιοχική, έναν εύκαμπο σύνδεσμο (linker 1), μια περιοχική όμοια με την αιμοπεξίνη (Hrx, hemopexin) και μια περιοχική μίσχου (linker-2). Χαρακτηριστική MT-MMP είναι η MT1-MMP ή MMP14. Η **MMP14** συμμετέχει στην ιντεγκρινο-μεσολαβούμενη (ανβ8) ενεργοποίηση του TGF-β, καθώς αποκόβει πρωτεολυτικά το LAP και απελευθερώνει τον TGF-β (βλ. **Εικόνα 10.8**).

#### Ενεργοποίηση από τη θρομβοσπονδίνη 1

Η θρομβοσπονδίνη 1 (TSP1, Thrombospondin-1) είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, η οποία συναντάται και σε εκκρινόμενη μορφή και ως αδιάλυτο στοιχείο της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ των κυττάρων και της ECM. Αποτελεί το κύριο συστατικό των α-κοκκίων των αιμοπεταλίων. Εκφράζεται άμεσα (early response gene) ως απόκριση στην καταστροφή του ιστού ή στο stress και εκκρίνεται ως αποτέλεσμα της αποκοκκίωσης των αιμοπεταλίων. Η εκκρινόμενη διαλυτή μορφή της συνδέεται σε τουλάχιστον 12 υποδοχείς κυτταρικής προσκόλλησης, όπως ο CD36, ο CD47, η συνδεκάνη και οι ιντεγκρίνες, προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης με αναδιάρθρωση των θέσεων εστιακής προσκόλλησης, αναστολή της αγγειογένεσης, καθώς επίσης του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των επιθηλιακών κυττάρων.

Η θρομβοσπονδίνη είναι ο πρώτος ισχυρός ενεργοποιητής του TGF-β. Η ενεργοποίηση του TGF-β από την TSP1 μπορεί να είναι υπεύθυνη για ορισμένες πτυχές των λειτουργιών της, καθώς ο TGF-β διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές διαδικασίες απαραίτητες για την επούλωση πληγών: στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων, αναστολή αγγειογένεσης κ.λπ.

Όπως και άλλες πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής ουσίας, η TSP1 έχει σύνθετη δομή. Είναι ένα ομοτριμερές 540 kDa συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς που αποτελείται από: α. μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχική HBD (Heparin Binding Domain), η οποία συνδέεται με τη συνδεκάνη, τη βηταγλυκάνη, τις ιντεγκρίνες και την καλρετικουλίνη, και παίζει κύριο ρόλο στην προσκόλληση της θρομβοσπονδίνης με τα κύτταρα, β. μια περιοχική που περιέχει τις Cys που δημιουργούν τους ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, γ. μια περιοχική που μοιάζει με το κολλαγόνο PC (von Willebrand factor type C pro-collagen homology domain). Στη συνέχεια, περιέχει τρεις τύπους επαναλήψεων θρομβοσπονδίνης: TSP-type I [τρεις επαναλήψεις προπερδίνης, πλούσιες σε Cys, με ικανότητα εξειδικευμένης σύνδεσης σε CD36 και πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (HSPG)], TSP-type II (τρεις επαναλήψεις EGF-like) και TSP-type III [13 επαναλήψεις EGF-like ευαίσθητες στο Ca<sup>2+</sup> (cbEGF-like)], οι οποίες συνδέονται με τις ιντεγκρίνες και με μια ποικιλία πρωτεασών, όπως η πλασμίνη, η θρομβίνη, η ελαστάση κ.λπ.. Τέλος περιέχει μια σφαιρική COOH-τελική κεφαλή, η οποία συνδέεται με τον υποδοχέα CD47 (**Εικόνα 10.6A**).

Η αλληλουχία (K)RFK(K), η οποία συνδέεται στην LAP, βρίσκεται μεταξύ της 1<sup>ης</sup>

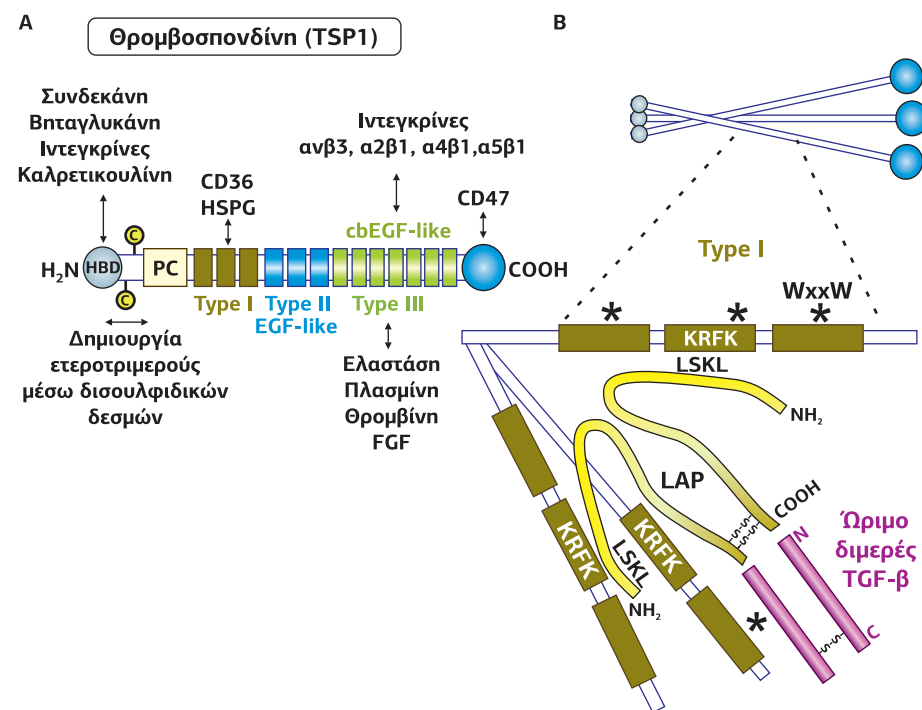
Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων M6P, ο CD-M6PR (cation-dependent) και ο CI-M6PR (cation-independent), ανάλογα αν η σύνδεση του προσδέτη εξαρτάται ή όχι από την παρουσία δισθενών κατιόντων. Ο **CD-M6PR** είναι μια μονομερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη 46 kDa, με μια εξωκυτταρική περιοχική που περιέχει 5 Asn, θέσεις πιθανής γλυκοσυλίωσης, και μεσολαβεί στη μεταφορά λυσοσωμικών ενζύμων από το *trans*-Golgi στα ενδοσώματα (βλ. σελ. 588 και **Εικόνα 8.91**). Ο **CI-M6PR** είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 300 kDa που περιέχει στην εξωκυτταρική του περιοχική 15 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (134-167 αμινοξέων), όπου συνδέεται η M6P και ο IGF-I (βλ. σελ. 492 και **Εικόνα 8.7**). Επιπλέον του συμβατικού του ρόλου ως μεταφορική πρωτεΐνη λυσοσωμικών ενζύμων, ο CI-M6PR παίζει ρόλο και στην ενεργοποίηση του TGF-β. Ο αναστολέας του CI-M6PR PXS-25 δρα νεφροπροστατευτικά σε καταστάσεις νεφρικής ίνωσης, οι οποίες προκαλούνται από υπερενεργοποίηση του TGF-β, καθώς αναστέλλει την απελευθέρωση του TGF-β από το LAP.



και 2<sup>η</sup> επανάληψη τύπου I (Εικόνα 10.6B). Η σύνδεση της θρομβοσπονδίνης στην LAP οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση καθιστώντας ικανό τον ώριμο TGF-β να απελευθερωθεί και να συνδεθεί στους υποδοχείς του. Ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα η ενεργοποίηση του TGF-β από τη θρομβοσπονδίνη είναι ανεξάρτητη των πρωτεασών, στα μακροφάγα στην ενεργοποίηση συμμετέχει και η πρωτεάση πλασμίνη. Η θρομβοσπονδίνη συνδέεται στο πλασμινογόνο και διευκολύνει τη μετατροπή του σε πλασμίνη, υποθέτοντας ότι η πλασμίνη χρησιμοποιεί την TSP1 ως σκαλωσιά για να ενεργοποιήσει τον TGF-β, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Ποντίκια χωρίς θρομβοσπονδίνη εμφανίζουν έναν φλεγμονώδη φαινότυπο, όμοιο με αυτόν των ποντικών χωρίς TGF-β.

**Εικόνα 10.6**  
**Δομή και ρόλος της θρομβοσπονδίνης 1.** Α. Δομή της TSP1 και οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Β. Οι τρεις επαναλήψεις τύπου I της TSP1 μεγεθύνθηκαν για να δείξουν το μοτίβο KRFK και τα τρία μοτίβα WxxW (συμβολίζονται με αστεράκι), τα οποία συνδέουν τον ώριμο TGF-β μέσω μιας απροσδιόριστης θέσης και διευκολύνουν τη σύνδεση KRFK με την αλληλουχία LSKL της LAP. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταβάλλουν την αναδίπλωση της LAP σε σχέση με τον ώριμο TGF-β και αποκαλύπτουν τις θέσεις σύνδεσης του υποδοχέα. Ποιο από τα τρία μοτίβα WxxW δεσμεύει τον ώριμο TGF-β και πόσα από τα μονομερή της τριμερούς TSP1 εμπλέκονται σε αυτή την αλληλεπίδραση είναι άγνωστο.

[51] [52]



### Ενεργοποίηση από τις ιντεγκρίνες

Εκτός από την παροχή φυσικής υποστήριξης στα κύτταρα και στους ιστούς, η ECM χρησιμεύει ως μια δομή πλούσια σε πληροφορίες που ερμηνεύονται από τα κύτταρα μέσω πολλαπλών μηχανισμών, μεταξύ των οποίων η σηματοδότηση μέσω ιντεγκρινών και μέσω αυξητικών παραγόντων. Η ECM, οι ιντεγκρίνες και οι αυξητικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους: για παράδειγμα, πολλοί αυξητικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων και ο TGF-β, αποθηκεύονται στην ECM, από όπου μπορούν να απελευθερωθούν με τη βοήθεια των ιντεγκρινών.

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερή αβ που συναρμολογούνται από 18 διαφορετικές α και 8 διαφορετικές β υπομονάδες και συνδυάζονται στα θηλαστικά σε 24 μεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι συνδέονται με πρωτεΐνες της ECM, με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, διαλυτές πρωτεάσες, παθογόνα και με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Είναι προφανές ότι είναι κάτι περισσότερο από απλές άγκυρες των κυττάρων στην ECM. Δρουν ως αμφίδρομοι κυτταρικοί υποδοχείς που λαμβάνουν και μεταδίδουν σήματα και από τις δύο πλευρές της πλασματικής μεμβράνης, δηλαδή, και από τον ενδοκυτταρικό κυτταροσκελετό και από την εξωκυττάρια ουσία, μια ιδιότητα γνωστή ως σηματοδότηση από μέσα προς τα έξω και από έξω προς τα μέσα (βλ. σσ. 701-729).

Οι ιντεγκρίνες συσσωρεύονται σε θέσεις εστιακής προσκόλλησης, στις οποίες αναπτύσσονται στη συνέχεια συσταλά κυτταροπλασματικά ινίδια πίεσης με ταυ-

τόχρονη διεύρυνση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων σε αυτές τις θέσεις, ως απάντηση σε μηχανικές πιέσεις που δέχονται τα κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα ενισχύουν τις συνδέσεις μεταξύ τους, αλλά και με την εξωκυττάρια ουσία. Η ενεργοποίηση των ιντεγκρινών ως απάντηση σε πιέσεις που ασκούνται στα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην άμεση απελευθέρωση / ενεργοποίηση του LLC (TGF-β), που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της ECM. Από τις 24 ιντεγκρίνες, μόνο οι έξι συνδέονται στο λανθάνον σύμπλοκο του TGF-β μέσω του μοτίβου RGD που είναι παρόν στην περιοχή LAP του LLC. Αυτές περιλαμβάνουν όλες τις ιντεγκρίνες αν (ανβ1, ανβ3, ανβ5, ανβ6 και ανβ8), καθώς και την αβ1. Ωστόσο, μόνο οι ανβ3, ανβ5, ανβ6 και ανβ8 μπορούν να απελευθερώσουν *in vivo* τον ώριμο TGF-β.

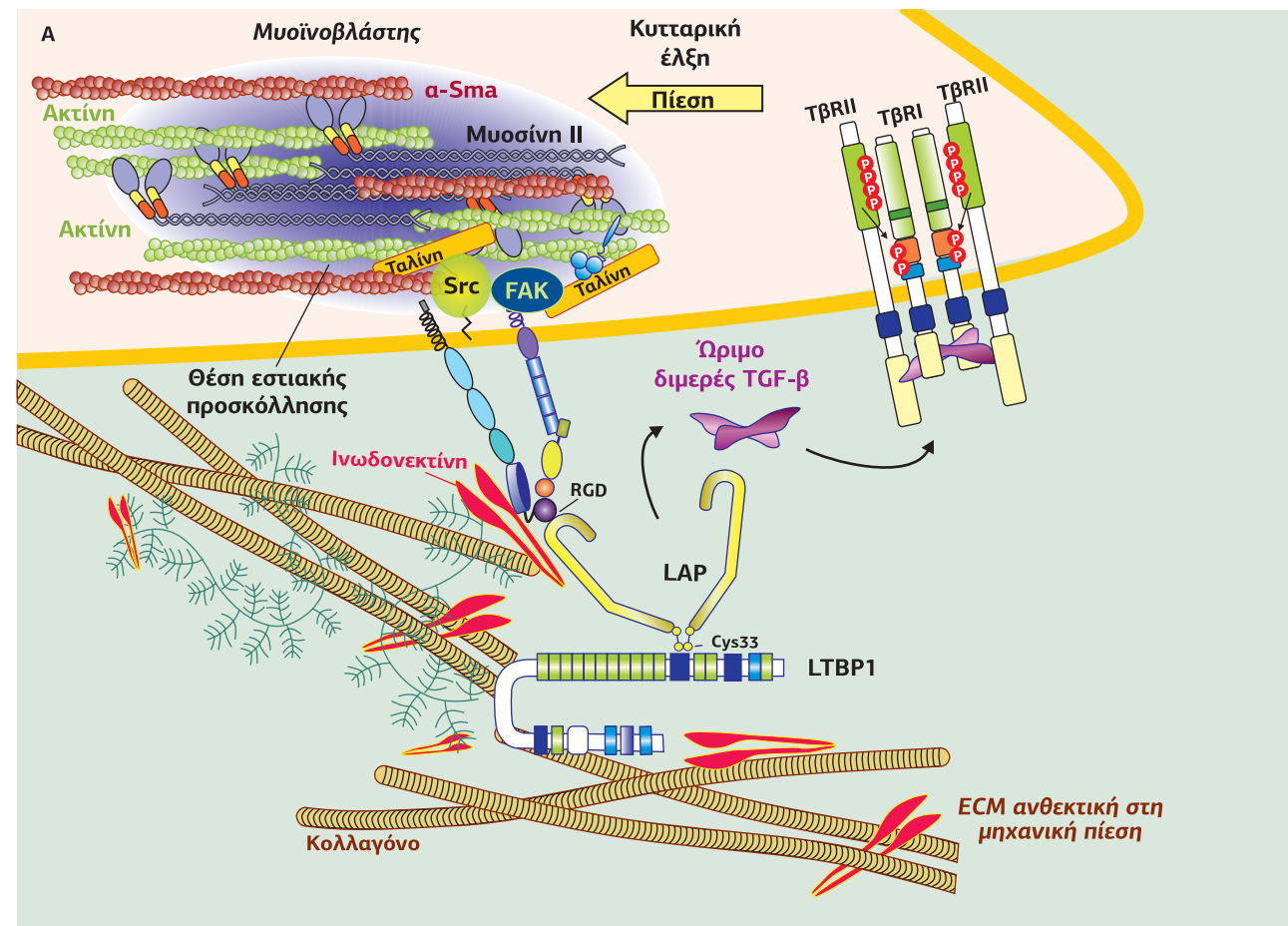
Οι ιντεγκρίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τον TGF-β με δύο μηχανισμούς:

**α. Ο ένας μηχανισμός εξαρτάται από πρωτεάσες:** οι ιντεγκρίνες συνδέουν ταυτόχρονα το LLC και συγκεκριμένες πρωτεάσες. Για παράδειγμα, τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, οι εμβρυακοί ινοβλάστες, τα δενδριτικά κύτταρα και τα νευρικά εκφράζουν την ιντεγκρίνη ανβ8, η οποία συνδέεται με υψηλή συγγένεια με την LAP/TGF-β1 και μεσολαβεί στην ενεργοποίηση του TGF-β1 σε συνδυασμό με τη δράση της MT-1 MMP. Επιπλέον, η ιντεγκρίνη ανβ3 συνδέεται με την MMP9 σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του μαστού και με την MMP2 σε κύτταρα μελανώματος, διευκολύνοντας την ενζυμική διάσπαση του LLC και την ενεργοποίηση του ώριμου TGF-β1.

**β. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ανεξάρτητος από την πρωτεόλυση.** Σε αυτήν την περίπτωση, οι ιντεγκρίνες αλληλεπιδρούν άμεσα με το μοτίβο RGD του COOH-τελικού άκρου της LAP, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωση του ανεργού συμπλόκου LLC και απελευθέρωση του ενεργού TGF-β. Ωστόσο, μόνο ο TGF-β απελευθερώνεται από το LLC μετά την αλληλεπίδραση με την ιντεγκρίνη, ενώ ο LAP παραμένει συνδεδεμένος. Για την ενεργοποίηση του TGF-β απαιτείται η σύνδεση της κυτταροπλασματικής περιοχής της υπομονάδας β6 της ιντεγκρίνης με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ώστε η δύναμη που δημιουργείται από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης να μπορεί να μεταδοθεί στο LLC. Επίσης, το LLC (μέσω της LTBP1) πρέπει να είναι ακινητοποιημένο σε μηχανικά ανθεκτική ECM, η οποία αντιστέκεται μηχανικά στις κυτταρικές δυνάμεις έλξης που ασκούνται στο LLC.

Ποια είναι όμως η φυσιολογική σημασία της ενεργοποίησης του λανθάνοντος συμπλόκου του TGF-β1 από τις ιντεγκρίνες και ποιες είναι οι συνέπειες όταν αποτυγχάνει αυτός ο μηχανισμός ενεργοποίησης;

Οι ιντεγκρίνες **ανβ3 και ανβ5** εκφράζονται σε πολλούς και διαφορετικούς τύπους. Ωστόσο, στα περισσότερα κύτταρα δεν είναι προφανής η βιολογική σημασία της ενεργοποίησης του TGF-β από τις ιντεγκρίνες. Ποντίκια που στερούνται ανβ3 ή ανβ5 δεν εμφανίζουν καμία παθολογική κατάσταση, η οποία να συνδέεται με μείωση της ενεργοποίησης του TGF-β. Στους ινοβλάστες της φυσιολογικής επιδερμίδας τα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών ανβ5 και ανβ3 είναι χαμηλά, ενώ είναι σημαντικά αυξημένα στη σκληροδερμία, μια αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από συστηματική ινώδη σκλήρυνση (SSc, fibrotic Systemic Sclerosis). Η αυξημένη έκφραση αυτών των ιντεγκρινών προκαλεί, μέσω της ενεργοποίησης του TGF-β, τη μετάπτωση των επιδερμικών ινοβλαστών σε ινώδεις μυοϊνοβλάστες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από *de novo* έκφραση α-SMA (α-Smooth Muscle Actin). Η ενσωμάτωση των ινιδίων α-SMA στα προϋπάρχοντα ινίδια πίεσης αυξάνει σημαντικά τη συσταλτικότητα των μυοϊνοβλαστών. Επιπλέον, η επαγόμενη από ανβ5 ενεργοποίηση του TGF-β μπορεί να οδηγήσει στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών του πνεύμονα σε μυοϊνοβλάστες, προτείνοντας ότι αυτή η οδός μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της πνευμονικής ίνωσης. Χορήγηση της cilengitide, ενός ανταγωνιστή των ανβ3 και ανβ5, αναστέλλει τα αποτελέσματα της ινώδους συστηματικής σκληροδερμίας, καθώς μειώνει τη σηματοδότηση TGF-β, την έκφραση α-SMA και την αυξημένη εναπόθεση ινώδους κολλαγόνου.

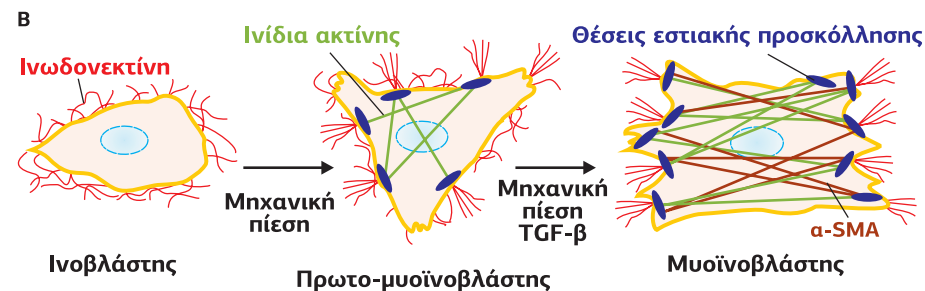


Εικόνα 10.7

Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην ενεργοποίηση του TGF-β. Α. Οι ινοβλάστες εκκρίνουν το λανθάνον σύμπλοκο LAP/ TGF-β1, το οποίο ενσωματώνεται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία μέσω της LTBP1.

Όταν οι ιντεγκρίνες ανβ5 και ανβ6 δεχτούν κυτταρική μηχανική πίεση, μπορούν να συνδέσουν το σύμπλοκο LAP/ TGF-β1 μέσω του μοτίβου RGD του LAP. Καθώς το LAP είναι συνδεδεμένο μέσω της LTBP1 σε ECM ανθεκτική στις μηχανικές πιέσεις, η εφαρμογή δύναμης προκαλεί μια μεταβολή της διαμόρφωσής του, προκαλώντας την απελευθέρωση του TGF-β1. Στη συνέχεια, ο ενεργός TGF-β1 συνδέεται στον υποδοχέα του, συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες.

Β. Οι μυοϊνοβλάστες προκαλούν ίνωση με την έκκριση υπερβολικών ποσοτήτων κολλαγόνου και με τη de novo παραγωγή ινιδίων ακτίνης α-SMA (α-Smooth Muscle Actin), τα οποία συσσωρεύονται στα ινίδια πίεσης προκαλώντας υψηλή ικανότητα σύσπασης. [25] [26] [64] [80]



Η έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ6 περιορίζεται σε επιθηλιακά κύτταρα, όπου σε φυσιολογικές καταστάσεις είναι χαμηλή, ενώ αυξάνεται σημαντικά σε τραυματισμένα και φλεγμονώδη επιθήλια. Τα ανβ6 knockout ποντίκια προστατεύονται εν μέρει ή πλήρως από την πνευμονική ίνωση που προκαλείται από ακτινοβολία, ενώ σε ποντίκια άγριου τύπου, η ίνωση μπορεί να αναστέλλεται εξίσου με θεραπεία με ανταγωνιστές σηματοδότησης TGF-β ή με χρήση αντισώματος κατά της ανβ6. Συνεπώς, η αναστολή των ιντεγκρινών, υπεύθυνων για την ενεργοποίηση του LLC (TGF-β1), παρέχει ένα σημαντικό θεραπευτικό εργαλείο που αντισταθμίζει εξειδικευμένα την επιβλαβή δραστικότητα του ενεργού TGF-β1, χωρίς να αναστέλλει τα ευεργετικά του αποτελέσματα σε άλλους κυτταρικούς τύπους.

Η ενεργοποίηση του TGF-β από την ιντεγκρίνη ανβ8 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοκατασταλτική του δράση σε κυτταρικούς όγκους. Αυξημένη έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ8 σε κύτταρα όγκου παρατηρείται στο 20% -80% διαφόρων καρκίνων. Ο ρόλος του TGF-β ως ισχυρή ανοσοκατασταλτική κυτοκίνη, που αναστέλλει τόσο τη διαφοροποίηση όσο και τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, είναι

γνωστός. Η σύνδεση του LLC (TGF-β) στην ιντεγκρίνη ανβ8 καταλήγει στην ενεργοποίηση του TGF-β. Αντισώματα ενάντια στην ανβ8 εμποδίζουν την ανάπτυξη όγκων, ενισχύοντας την κυτταροτοξική δράση των T-λεμφοκυττάρων και την προσάρτηση των ανοσοκυττάρων στα κέντρα των όγκων. Η υπομονάδα β8 εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων σε υψηλά επίπεδα και όχι στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενώ το αντίστροφο ισχύει για το LLC (TGF-β), υποδηλώνοντας ότι η ιντεγκρίνη ανβ8 των καρκινικών κυττάρων χρησιμεύει ως πλατφόρμα ενεργοποίησης του LLC (TGF-β), που παρουσιάζεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, πιθανώς τα μακροφάγα. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ιντεγκρίνη ανβ8 των καρκινικών κυττάρων είναι ένας ενδιαφέρον ανοσοθεραπευτικός στόχος.

Συνοψίζοντας, ο TGF-β συντίθεται ως πρόδρομο διμερές μόριο στο ΕΔ, μεταφέρεται στο σύστημα Golgi, όπου δημιουργείται το διμερές λανθάνον TGF-β συνδεδεμένο στο προ-πεπτιδίο LAP μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Στην περιοχή LAP του διμερούς πρόδρομου μορίου συνδέεται, επίσης, και η γλυκοπρωτεΐνη LTBP (Latent TGFβ - Binding Protein). Οι LTBP μοιράζονται την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και τη δομή της περιοχής των μελών της οικογένειας των fibrillins. Ωστόσο, είναι σημαντικά μικρότερες, με 125-160 kDa σε σύγκριση με τις fibrillins (~ 350 kDa). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί δημιουργούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μεταξύ της τρίτης περιοχής 8-C του LTBP και του ζεύγους Cys33 στο διμερές LAP. Ο TGF-β1 συνδέεται και σχηματίζει μεγάλα λανθάνοντα σύμπλοκα με τις ισομορφές LTBP1, 3 και LTBP4. Το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ονομάζεται LLC και είναι αυτό που απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου συνδέεται με πρωτεΐνες της ECM (Εικόνα 10.8).

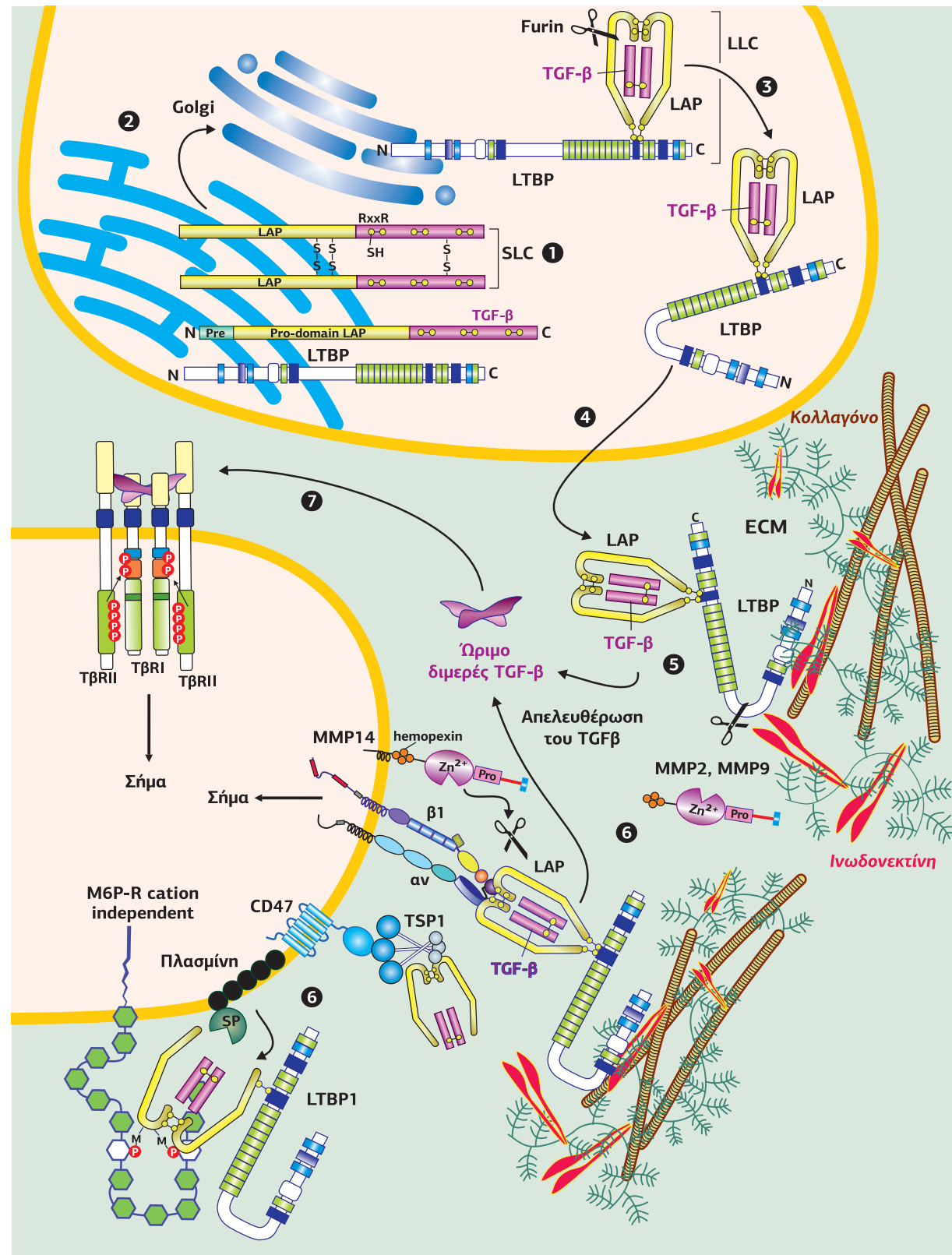
Όντας κάτι παραπάνω από μια απλή σκαλωσιά, η ECM παρέχει έναν χώρο αποθήκευσης για μια ποικιλία αυξητικών παραγόντων και εξωκυτταρικών πρωτεϊνών με ρυθμιστικές λειτουργίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η ινωδοκτεΐνη, η οποία συνδέει πληθώρα αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι έχουν κεντρικό ρόλο στην αποκατάσταση των ιστών και στην ίνωση, συμπεριλαμβανομένων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP1), του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF), του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (PDGF) και του λανθάνοντα TGF-β (LLC). Ο TGF-β1 είναι ξεχωριστός μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που συνδέονται στην ECM, καθώς χρησιμοποιεί ως προσωπικό συνοδό το προστατευτικό προ-πεπτιδίο LAP και απαιτεί την απελευθέρωσή του από αυτό για την προώθηση της κυτταρικής σηματοδότησης. Επίσης, οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι δημιουργούν μια ακόμη μεγαλύτερη λανθάνουσα συσκευασία, συνδέοντας ομοιοπολικά την LTBP με την περιοχή LAP του λανθάνοντος TGF-β1.

Η παραγωγή μίας πρωτεΐνης φορέα ~ 150 kDa που απλά βοηθά στην αναδίπλωση και την έκκριση ενός 25 kDa αυξητικού παράγοντα φαίνεται ότι είναι μια δαπανηρή λύση για τα κύτταρα. Ωστόσο, δεδομένης της πλειοτροπικής φύσης του TGF-β1 και του κεντρικού ρόλου του στον συντονισμό σχεδόν κάθε πτυχής της φυσιολογικής αποκατάστασης ιστών και της ομοιόστασης, ειδικά μέτρα ασφαλείας έχουν εξελιχθεί για να μας προστατεύσουν από τις καταστροφικές συνέπειες της μη ρυθμισμένης σηματοδότησης του TGF-β1.

#### 4. Υποδοχείς των TGF-β: τύπου I και τύπου II

Όπως είδαμε, ο TGF-β1 εντοπίστηκε το 1980 σε μια έρευνα για αυξητικούς παράγοντες, που προκαλούν μετασχηματισμό, και αρχικά θεωρήθηκε ότι ο υποδοχέας του θα μπορούσε να είναι συνδεδεμένος άμεσα ή έμμεσα με τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης. Όταν αργότερα ανακαλύφθηκε ότι καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, το ενδιαφέρον στράφηκε στην πιθανότητα να εμποδίζει τη σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων. Καμία, όμως, από αυτές τις θεωρίες δεν αποδείχτηκε σωστή. Ο TGF-β1 δεν επάγει τη φωσφορυλίωση

τυροσινών, ούτε επιδρά στα αρχικά γεγονότα μεταγωγής σήματος μέσω των υποδοχών EGFR και PDGFR (τουλάχιστον όταν μετρήθηκε σε κλίμακα χρόνου της τάξης των min). Αυτή η άποψη παρέμεινε μέχρι το 1990, όταν κλωνοποιήθηκε ο υποδοχέας της activin και βρέθηκε να περιέχει μια περιοχή αντίστοιχη της διαμε-



βρανικής πρωτεϊνικής κινάσης Ser/Thr. Παρόμοιες περιοχές βρέθηκαν αργότερα σε δύο από τους υποδοχείς του TGF-β1.

#### 4.1 | Δομή των TβRI και TβRII και ο ρόλος της περιοχής GS

Με βάση τις δομικές και λειτουργικές τους ιδιότητες, οι υποδοχείς της οικογένειας προσδετών TGF-β χωρίζονται σε δύο υποοικογένειες: τύπου I και II (TβRI και TβRII), οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα. Και οι δύο υποδοχείς είναι γλυκοπρωτεΐνες, που περιέχουν α. μία N-γλυκοσυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή, στην οποία βρίσκεται η θέση σύνδεσης του προσδέτη και μια μικρή περιοχή πλούσια σε Cys (CRD), β. μία διαμεμβρανική περιοχή και γ. μία ενδοκυτταρική περιοχή με δράση κινάσης Ser/Thr στο COOH-τελικό τους άκρο. Ωστόσο, **μόνο η κινάση των υποδοχών τύπου II είναι ιδιόσυστατα ενεργή**. Οι εξωκυτταρικές περιοχές (ECDs, extracellular domains) των TβRI και TβRII είναι μικρές (101 και 136 αμινοξέα, αντίστοιχα), με πέντε και έξι δισουλφιδικούς δεσμούς, αντίστοιχα, υιοθετώντας την αναδίπλωση που εμφανίζουν οι μικρές τοξίνες τριών δακτύλων (οι περιοχές F1, F2 και F3 υποδηλώνουν τα τρία δάκτυλα της αναδίπλωσης του υποδοχέα τοξινών τριών δακτύλων) (Εικόνα 10.9).

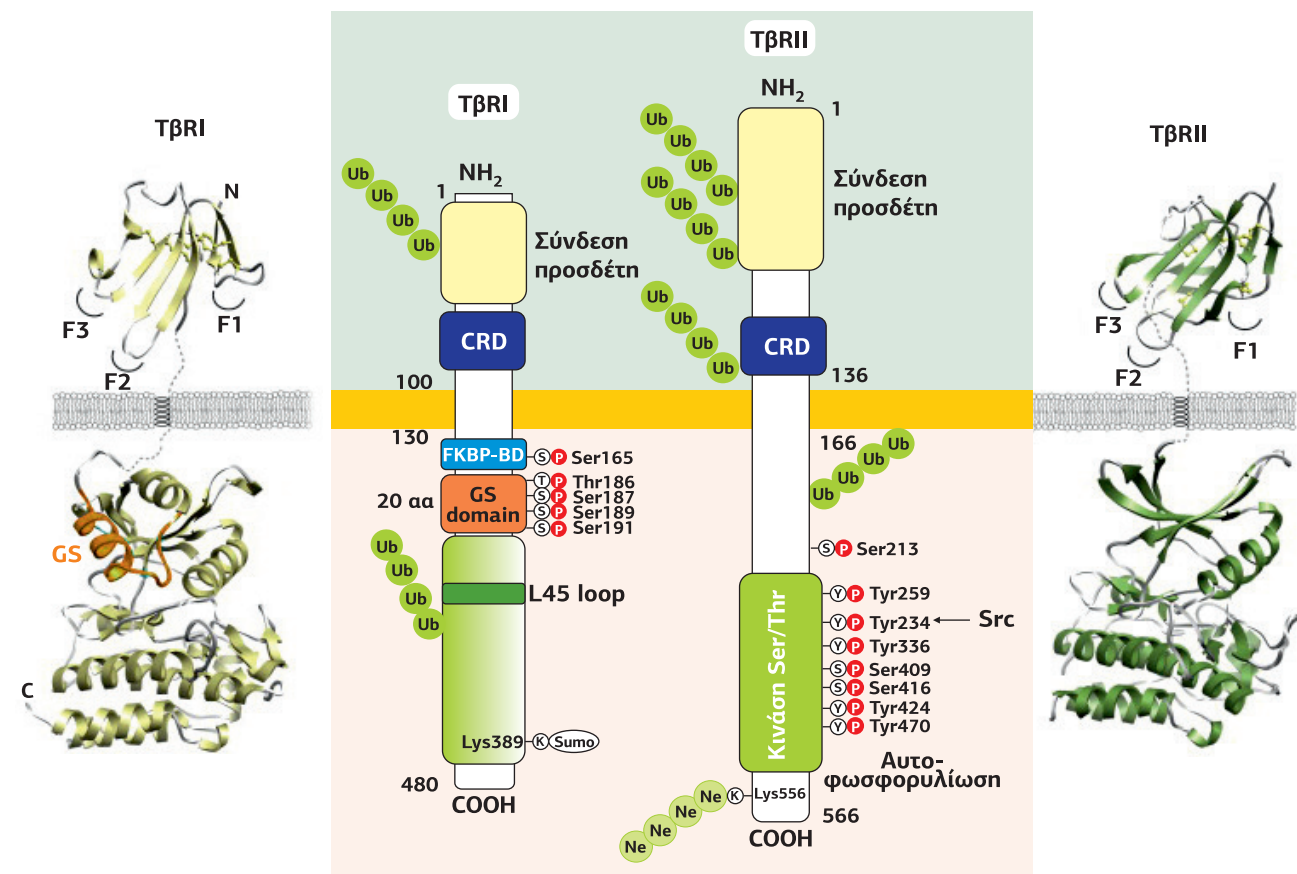
Αυτό που διαφοροποιεί τους υποδοχείς τύπου I είναι μια υψηλά συντηρημένη περιοχή 30 καταλοίπων, η **GS περιοχή** (πλούσια σε Gly και Ser) ή **GS box**, η οποία βρίσκεται κυτταροπλασματικά ακριβώς πριν από την καταλυτική περιοχή της κινάσης και ρυθμίζει την ενεργότητα της TβRI κινάσης. Η περιοχή GS συνδέεται στην περιοχή της κινάσης αλλά είναι ιδιαίτερα εύκαμπτη και μπορεί να μεταπίπτει μεταξύ συνδεδεμένης και μη συνδεδεμένης κατάστασης, κάτι που επιτρέπει στον υποδοχέα TβRI να αλλάζει μεταξύ ανενεργής και ενεργής διαμόρφωσης. Η μετάβαση στην ενεργή διαμόρφωση εμποδίζεται από την ανασταλτική πρωτεΐνη ανοσοφιλίνη FKBP12 (immunophilin FKBP12), η οποία συνδέεται στην περιοχή GS και την σταθεροποιεί στη θέση της. Φωσφορυλίωση της περιοχής GS από τον υποδοχέα τύπου II, τον TβRII, αίρει την κατάσταση αναστολής και ενεργοποιεί τον TβRI. Καθώς ο υποδοχέας τύπου II δεν διαθέτει περιοχή GS, διαφεύγει του ανασταλτικού ελέγχου και άρα είναι ιδιόσυστατα ενεργός και συνεχώς σε αναμονή για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I.

#### 4.2 | Ενεργοποίηση των υποδοχών RI και RII από τους TGF-β

Μετά την απελευθέρωση του διμερούς ενεργού μορίου TGF-β στον εξωκυτταρικό χώρο, ακολουθεί η πρόσδεση στον υποδοχέα του. Ο υποδοχέας του TGF-β, στην ενεργοποιημένη του μορφή είναι ένα ετεροτετραμερές, που περιέχει δύο υπομονάδες TβRI και δύο υπομονάδες TβRII. Οι υπομονάδες TβRII είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση του προσδέτη, ενώ οι υπομονάδες TβRI καθορίζουν την εξειδίκευση

#### Εικόνα 10.8

**Σύνοψη των γεγονότων που οδηγούν στην απελευθέρωση του ώριμου TGF-β.** 1. Ο TGF-β συντίθεται στο ΕΔ ως pre-pro-protein (pre-region + pro-domain LAP + ώριμο TGF-β). Στη συνέχεια, το σηματοδοτικό προ-προ-πεπτιδίο αποκόβεται και το υπόλοιπο τμήμα διμερίζεται και ονομάζεται Small Latent Complex (SLC). 2. Το διμερές πρόδρομο μόριο κόβεται στο Golgi από μια furin-like πρωτεάση, αλλά παραμένει συνδεδεμένο στο πεπτιδίο LAP μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. 3. Το διμερές LAP/TGF-β συνδέεται στη γλυκοπρωτεΐνη LTBP (Latent TGF-β Binding Protein) και το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα ονομάζεται LLC. 4. Το LLC απελευθερώνεται στον εξωκυτταρικό χώρο και μέσω της LTBP συνδέεται σε πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας, παραμένοντας ανενεργό. 5. Η ενεργοποίηση του TGF-β αρχίζει με την αποσύνδεση του LLC από την εξωκυτταρική θεμέλια ουσία με τη βοήθεια διαλυτών πρωτεασών, όπως η MMP2 και η MMP9. 6. Επίσης, το LLC μπορεί να συνδεθεί στον υποδοχέα της M6P (cation-independent 6-P-Mannose Receptor, CI-M6PR), και ο TGF-β να αποκοπεί με τη βοήθεια της πρωτεάσης πλασμίνης, είτε να συνδεθεί στις ιντεγκρίνες και να αποκοπεί με τη βοήθεια της μεταλλοπρωτεάσης MMP14. Στη συνέχεια, ο ενεργοποιημένος TGF-β συνδέεται στους υποδοχείς του μεταφέροντας το μήνυμα. [16] [30] [62]



Εικόνα 10.9

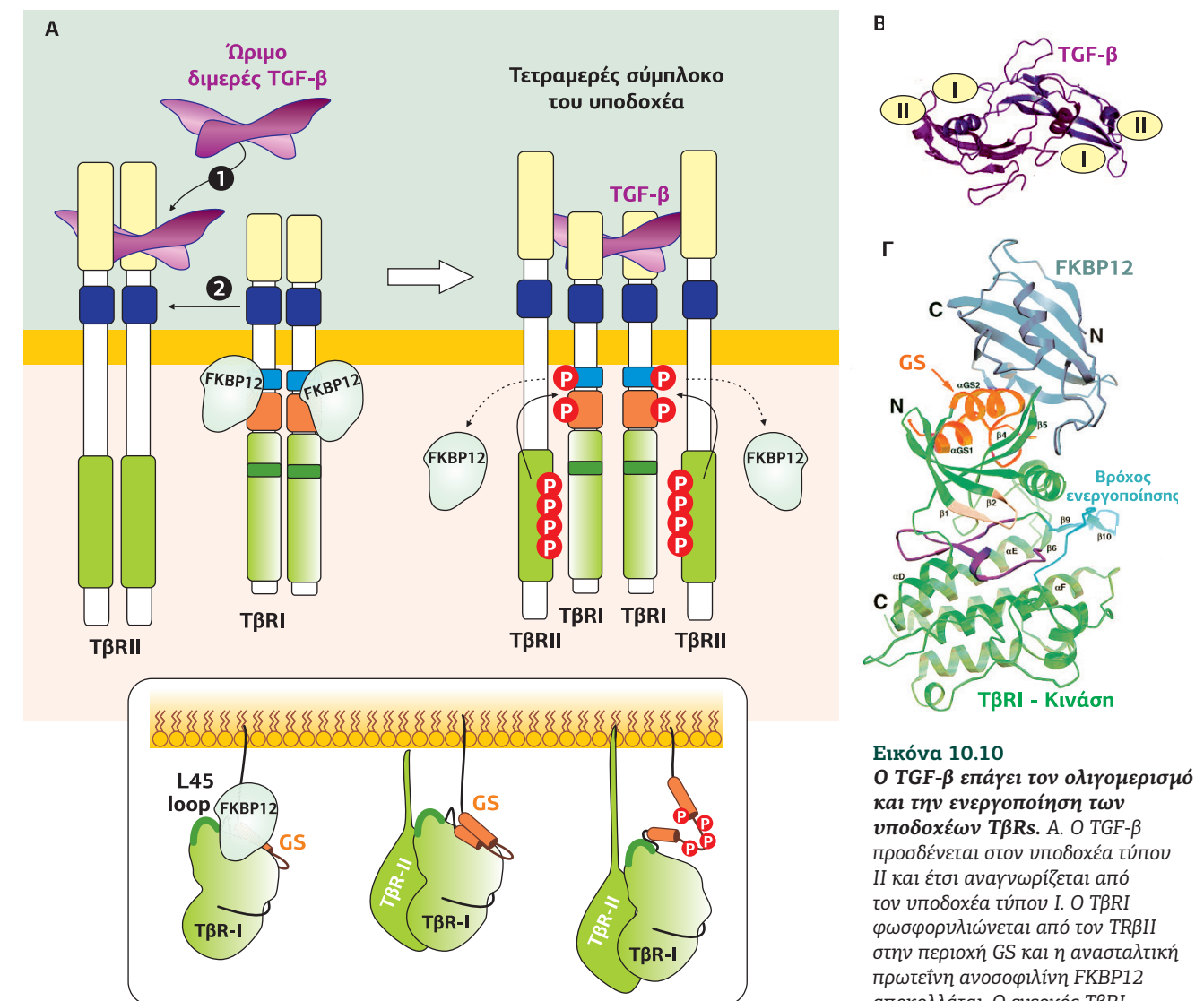
### Δομικές περιοχές των υποδοχών TβRI και TβRII.

Οι εξωκυτταρικές περιοχές (ECDs) των TβRI και TβRII είναι μικρές (101 και 136 αμινοξέα, αντίστοιχα), με πέντε και έξι δισουλφιδικούς δεσμούς, αντίστοιχα, υιοθετώντας την αναδίπλωση που εμφανίζουν οι μικρές τοξίνες τριών δακτύλων (F1, F2 και F3 υποδηλώνουν τα τρία δάκτυλα της αναδίπλωσης του υποδοχέα τοξινών τριών δακτύλων). Οι TβRI και TβRII περιέχουν, επίσης, μια διαμεμβρανική (TMD) και μια κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης Ser/Thr (S/TKD). Ο υποδοχέας τύπου I έχει επιπλέον μια ρυθμιστική περιοχή ~ 20 αμινοξέων, κοντά στη μεμβράνη, την περιοχή GS box. Στον υποδοχέα TβRI διακρίνονται στην GS περιοχή οι Ser/Thr που φωσφορυλιώνονται από τον TβRII, και στον υποδοχέα TβRII οι Ser και Tyr, που αποτελούν θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης. Επίσης, διακρίνονται οι θέσεις ουβικουτίνωσης (Ub) και Nedδύλιωσης (Ne). [22] [23]

για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος. Ο ρόλος του διμερούς TGF-β είναι να φέρει κοντά τους δύο τύπους υποδοχών, επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση του TβRI από τον TβRII. Για τον σκοπό αυτό και οι δύο τύποι υποδοχών έχουν περιοχές σύνδεσης του προσδέτη. Ένα διμερές μόριο TGF-β συνδέει δύο μόρια TβRI και δύο TβRII δημιουργώντας ένα συμμετρικό σύμπλοκο 2:2:2. Ομο-ολιγομερή ανεξάρτητα προσδετών μπορεί να υπάρχουν, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα μεταγωγής σήματος. Ο TGF-β1 μπορεί να προσδεθεί στον TβRII απουσία του TβRI, αλλά όχι το αντίστροφο. Ωστόσο, ο TGF-β1 δεν μπορεί να μεταδώσει το σήμα στο κύτταρο απουσία του TβRI.

Ο TGF-β1 και ο TGF-β3 έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τον TβRII από ό,τι για τον TβRI. Συνεπώς, συνδέονται πρώτα στον TβRII και ο TβRI στρατολογείται στο σύμπλοκο αναγνωρίζοντας μια μοναδική επιφάνεια που δημιουργήθηκε από το σύμπλοκο TGF-β/TβRII. Σε αντίθεση, ο TGF-β2 εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τον TβRII και, κατά συνέπεια, προσχηματισμένα ετερομερή σύμπλοκα TβRII - TβRI ή συνυποδοχείς, όπως η βηταγλυκάνη (βλ. σσ. 766-767 και Εικόνα 10.12), βοηθούν τον TGF-β2 να δημιουργήσει σταθερά σύμπλοκα υποδοχών.

Οι υποδοχείς των BMPs συνδέουν τους προσδέτες τους σε παρόμοια συμμετρικά σύμπλοκα 2:2:2, αλλά σε αυτά τα σύμπλοκα, οι υποδοχείς τύπου I έχουν υψηλότερη συγγένεια για τον προσδέτη από ό,τι οι υποδοχείς τύπου II. Οι BMPs συνδέονται στο σύμπλεγμα των υποδοχών με σχετικά χαμηλότερη συγγένεια από την αντίστοιχη συγγένεια του TGF-β1 για τους υποδοχείς του, επιτρέποντας στις BMPs να σηματοδοτούν με μεγαλύτερη ευελιξία, χρησιμοποιώντας μια μεγαλύτερη ποικιλία μεμβρανικών υποδοχών. Όπως στην περίπτωση του TGF-β2, τα προσχηματισμένα ετεροτετραμερή σύμπλοκα υποδοχών των BMPs σταθεροποιούνται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυτταροπλασματικών περιοχών των υποδοχών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις στους υποδοχείς των BMPs και TGF-β2 υποστηρίζουν



Εικόνα 10.10

### Ο TGF-β επάγει τον ολιγομερισμό και την ενεργοποίηση των υποδοχών TβRs.

Ο TGF-β προσδέεται στον υποδοχέα τύπου II και έτσι αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα τύπου I. Ο TβRI φωσφορυλιώνεται από τον TβRII στην περιοχή GS και η ανασταλτική πρωτεΐνη ανοσοφιλίνη FKBP12 αποκολλάται. Ο ενεργός TβRI μεταβιβάζει το σήμα μέσα στο κύτταρο. Επειδή ο TGF-β είναι από τη φύση του διμερής, σχηματίζεται γύρω του ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο υποδοχών. Στο πλαίσιο διακρίνεται με λεπτομέρεια η ενεργοποίηση του TβRI. Στην ανενεργή διαμόρφωση, η GS περιοχή σφηνώνεται μέσα στον N-λοβό της κινάσης του TβRI, εμποδίζοντας τη σωστή τοποθέτηση του ATP στη σχισμή. Για να επιτευχθεί καταλυτική δραστηριότητα, η GS περιοχή μετά από φωσφορυλίωση που υφίσταται από τον TβRII αποκολλάται δίνοντας τη δυνατότητα στο ATP να τοποθετηθεί σωστά. [14] Β. Κάτοψη του TGF-β, συνδεδεμένου με τον ετεροτετραμερή υποδοχέα του. [5] Γ. Κρυσταλλική δομή της κυτταροπλασματικής περιοχής του TβRI, όπου διακρίνεται η περιοχή GS και η συνδεδεμένη FKBP12. [19]

επίσης το μοντέλο των προσχηματισμένων ετεροτετραμερών υποδοχών που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια πριν από τη σύνδεση του προσδέτη.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης είναι ο ακόλουθος: Ο διμερής προσδέτης TGF-β αρχικά προσδέεται στο ομοδιμερές σύμπλοκο υποδοχών τύπου II, TβRII, μεταβάλλοντας έτσι τη διαμόρφωσή του, ώστε να μπορεί να αναγνωριστεί από τους TβRI. Το ομοδιμερές σύμπλοκο υποδοχών τύπου I, TβRI, συνδέεται στο σύμπλοκο TGFβ/TβRII, απομακρύνεται η ανασταλτική πρωτεΐνη FKBP12 και δημιουργείται ένα ετερο-τετραμερές, όπου οι TβRII έχοντας ιδιόσυστα ενεργή δράση κινάσης Ser/Thr φωσφορυλιώνουν, σε απόκλιση από τον κανόνα, όχι τον βρόχο ενεργοποίησης αλλά τις Ser/Thr στην ακολουθία TTSGSGSGL (τις Thr186, Ser187, Ser189 και Ser191) της περιοχής GS των υποδοχών TβRI, απομακρύνοντας τον κατασταλτικό περιορισμό που ασκεί αυτή η περιοχή (καθώς είναι σφηνωμένη στον N-λοβό), και επιπλέον αποτρέποντας την επανασύνδεση του αναστολέα FKBP12. Ως αποτέλεσμα, το ενεργό κέντρο της κινάσης του TβRI καθίσταται προσβάσιμο στο ATP και στα πρωτεϊνικά του υποστρώματα. Συνεπώς, η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση της κινάσης του υποδοχέα τύπου I, η οποία είναι ο πραγματικός μεταγωγέας του σήματος (Εικόνα 10.10).

Η φωσφορυλίωση της περιοχής GS, επιπλέον, ενισχύει την αλληλεπίδραση του TβRI με τους μεταγραφικούς παράγοντες R-Smads, η οποία προάγει τη φωσφορυλίωσή τους από τον TβRI (βλ. Εικόνα 10.15).

**Εικόνα 10.11**  
**Η υπεροικογένεια των υποδοχών της οικογένειας TGF-β και οι διαφορετικοί προσδέτες.** Α. Οι υποδοχείς τύπου I και τύπου II και οι διαφορετικοί συνδυασμοί ανάλογα με τον προσδέτη. Οι υποδοχείς των TGF-β1, β2 και β3 αποτελούνται από τις υπομονάδες TβRI (ALK5) και TβRII. Οι υποδοχείς των BMP9/10 αποτελούνται από τις υπομονάδες BMPRII ή ActRIIA και ALK1. [22] Β. Προσδέτες της οικογένειας TGF-β, οι αναστολείς τους (LAP, Decorin, Cerberus, Follistatin, Chordin, Noggin), οι υποδοχείς στους οποίους συνδέονται, καθώς και οι συμπληρωματικοί υποδοχείς τους (βηταγλυκάνη, ενδογλίνη, Cripto). Διακρίνονται, επίσης, οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads, οι συννεργοποιητές τους και ορισμένα από τα γονίδια-στόχους. [45]

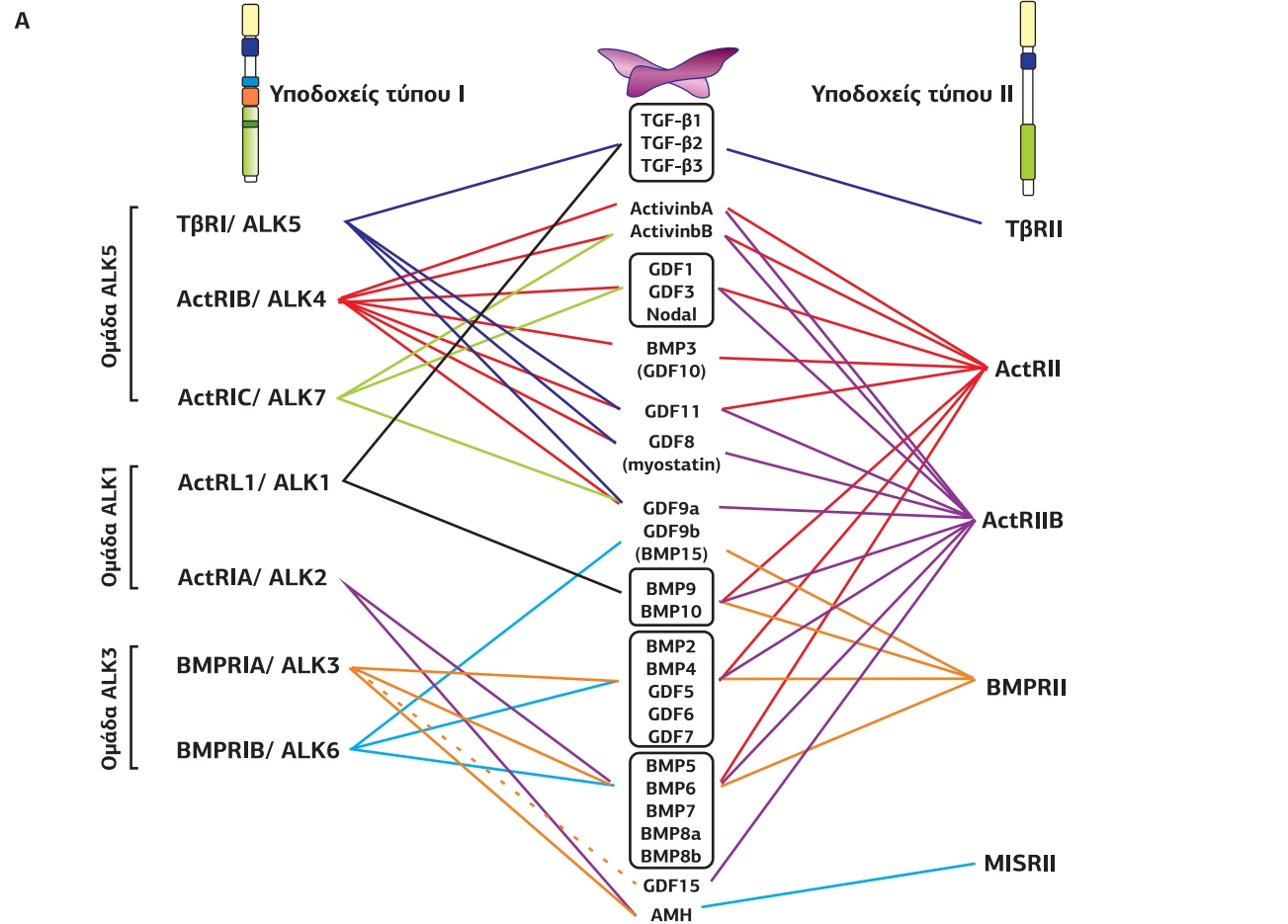
**Ρύθμιση του TβRII μέσω φωσφορυλίωσης**

Η δραστικότητα κινάσης του TβRII ρυθμίζεται θετικά με αυτοφωσφορυλίωση της Ser213 και Ser409 και αρνητικά με αυτοφωσφορυλίωση της Ser416. Επιπλέον, ο TβRII μπορεί να αυτοφωσφορυλιωθεί σε κατάλοιπα τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένων των Tyr259, Tyr336 και Tyr424, ή να φωσφορυλιωθεί από την Src στην Tyr284. Η Tyr470 φωσφορυλιώνεται είτε από την Src είτε με αυτοφωσφορυλίωση (βλ. **Εικόνα 10.9**). Το γεγονός ότι ο TβRII μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε τυροσίνες επιτρέπει στον υποδοχέα να δεσμεύσει σηματοδοτικά μόρια με SH2 ή PTB περιοχές (όπως η Shc και Grb2).

**4.3**

**Τα διαφορετικά σύμπλοκα των υποδοχών και οι διαφορετικοί προσδέτες**

Όπως είδαμε, η οικογένεια των προσδετών TGF-β περιλαμβάνει διάφορες υποοικογένειες: την υποοικογένεια των TGF-β (β1, β2, β3), την υποοικογένεια activins/inhibins, την υποοικογένεια των BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) / GDFs (Growth and Differentiation Factors) και την υποοικογένεια της AMH (anti-Müllerian hormone). Αυτοί οι προσδέτες ενεργοποιούν μια οικογένεια υποδοχών με ενδογενή δράση κινάσης Ser/Thr. Η οικογένεια αυτή στον άνθρωπο περιλαμβάνει 12 μέλη (7 υποδοχείς τύπου I και 5 υποδοχείς τύπου II) και είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με την οικογένεια των υποδοχών με δράση κινάσης Tyr που αποτελείται από 58 μέλη.



**Οικογένεια των υποδοχών TGF-β τύπου I και τύπου II**

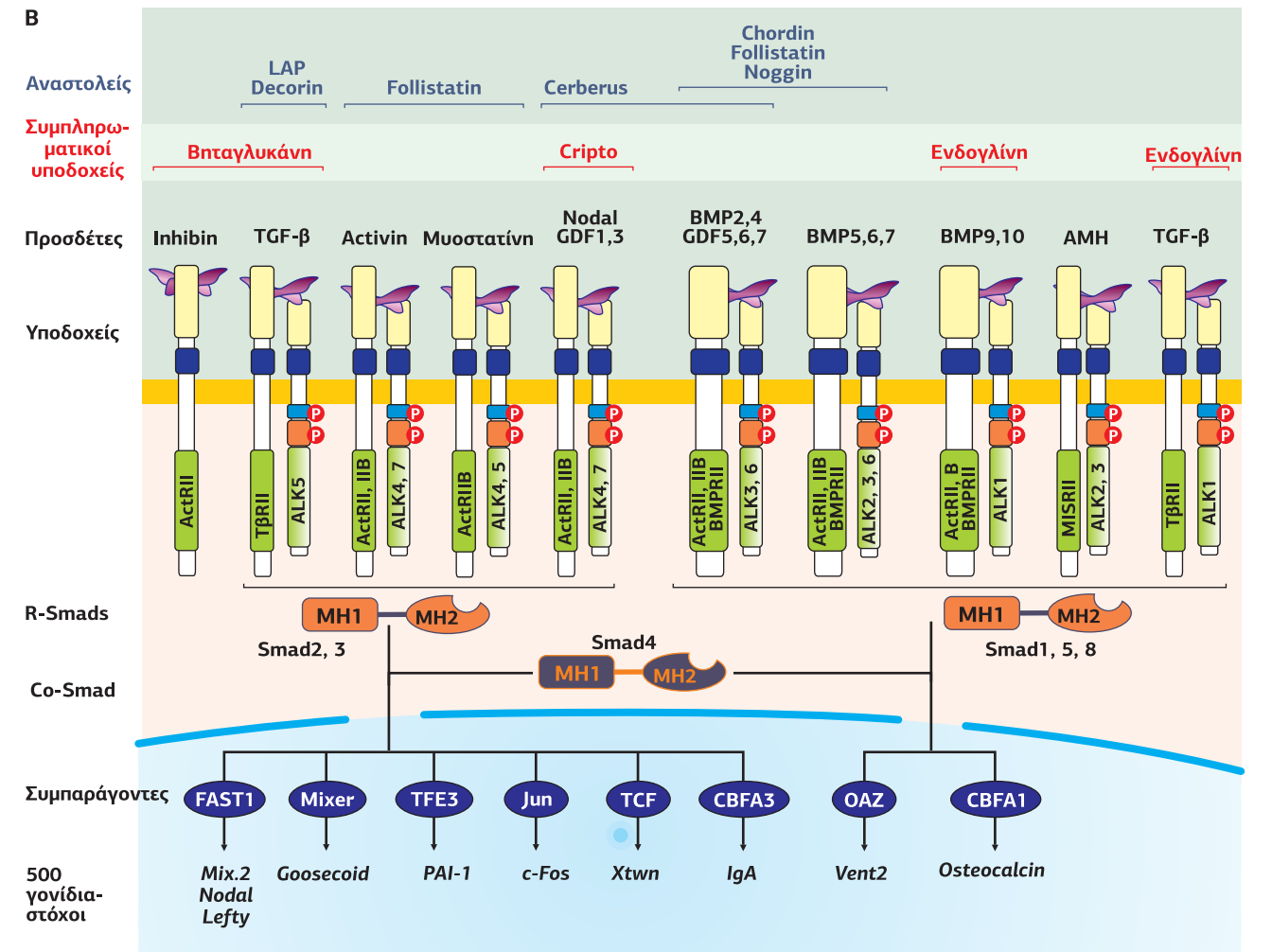
Η ονοματολογία για τους υποδοχείς του TGF-β τύπου I και II είναι κάπως συγκεχυμένη. Για λόγους απλότητας αναφερόμαστε στους υποδοχείς τύπου I με μια κοινή ονοματολογία “κινάσες με δράση ακτιβίνης” (activin-like kinases, ALK1-6) και στους υποδοχείς τύπου II σύμφωνα με τον κυρίαρχο προσδέτη τους.

Οι επτά υποδοχείς τύπου I ταξινομούνται σύμφωνα με ομοιότητες αλληλουχίας σε τρεις κύριες ομάδες (**Εικόνα 10.11**):

- Την ομάδα ALK5, η οποία περιλαμβάνει τον υποδοχέα τύπου I του TGF-β ALK5, τον υποδοχέα της activin ALK4 και τον υποδοχέα του Nodal ALK7.
- Την ομάδα ALK3, η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς τύπου I των BMPs ALK3 και ALK6.
- Την ομάδα ALK1, η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς ALK1 και ALK2, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με διαφορετικούς προσδέτες της οικογένειας BMP/GDF και TGF-β/Activin. Οι υποδοχείς ALK1 εκφράζονται εξειδικευμένα σε ορισμένους μόνο τύπους κυττάρων (π.χ. ενδοθηλιακά).

Οι πέντε υποδοχείς τύπου II περιλαμβάνουν:

- Τον υποδοχέα τύπου II του TGF-β, TβRII.
- Τους υποδοχείς τύπου II των activin και BMP/GDF, ActRII και ActRIIB.
- Τον υποδοχέα τύπου II των BMP/GDF, BMPRII.
- Τον υποδοχέα τύπου II της AMH, MISRII.



Ενώ όλοι οι προσδέτες της οικογένειας των TGF- $\beta$  έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς τύπου II, όπου και συνδέονται αρχικά, οι BMP2/4 εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια για τους υποδοχείς τύπου I, ALK3 και ALK6, όπου και συνδέονται κατά προτίμηση, και στη συνέχεια στρατολογούν τους υποδοχείς τύπου II σε ετερομερή σύμπλοκα σηματοδότησης.

Τα σύμπλοκα των υποδοχέων που μπορεί να δημιουργηθούν είναι αρκετά, ώστε να εξαρτάται από αυτά το είδος της απόκρισης του κυττάρου. Δηλαδή, ανάλογα με τον προσδέτη ενεργοποιείται ένα διαφορετικό σύμπλοκο υποδοχέων, το οποίο στη συνέχεια θα φωσφορυλιώσει και τις αντίστοιχες πρωτεΐνες R-Smads, οι οποίες με τη σειρά τους θα μεταδώσουν το σήμα ώστε να υπάρξει η κατάλληλη απόκριση του κυττάρου.

#### 4.4 Οικογένεια των συμπληρωματικών υποδοχέων του TGF- $\beta$ , τύπου III

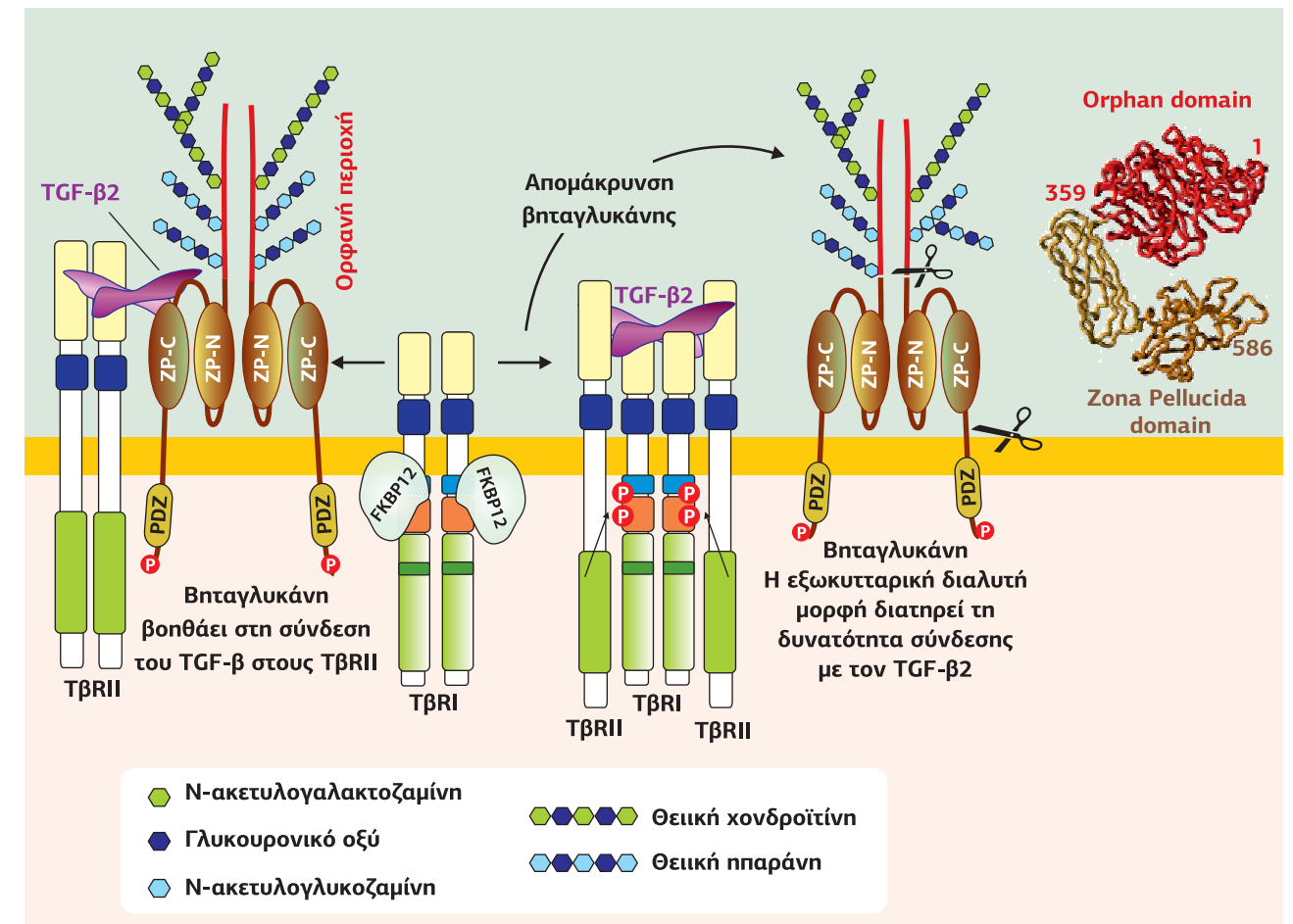
Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και τρίτο είδος υποδοχέων, οι υποδοχείς **T $\beta$ RIII**. Αυτοί οι υποδοχείς διαφέρουν από τους T $\beta$ RI και T $\beta$ RII, καθώς οι ενδοκυτταρικές περιοχές τους στερούνται οποιουδήποτε μοτίβου που θα μπορούσε να συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος.

##### Η βηταγλυκάνη

Όπως είδαμε, σε αντίθεση με τους TGF- $\beta$ 1 και TGF- $\beta$ 3, ο TGF- $\beta$ 2 εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για τον T $\beta$ RII, και κατά συνέπεια απαιτείται η ύπαρξη ενός συνοποδοχέα, όπως η βηταγλυκάνη, η οποία διευκολύνει την πρόσδεση του TGF- $\beta$ 2 στον υποδοχέα T $\beta$ RII. Μετά τη δημιουργία του συμπλόκου TGF- $\beta$ 2/ T $\beta$ RII/ βηταγλυκάνη, ο T $\beta$ RI συνδέεται στο σύμπλοκο εκτοπίζοντας τη βηταγλυκάνη (Εικόνα 10.12).

Η **βηταγλυκάνη** είναι ο πιο άφθονος και ο πιο μεγάλος (250-350 kDa) από τους υποδοχείς τύπου III. Είναι μια διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη με αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης και θειικής ηπαράνης. Η εξωκυτταρική της περιοχή αποτελείται από μια περιοχή ZP (Zona Pellucida Domain), 260 αμινοξέων με 8 καλά συντηρημένες Cys, η οποία έχει δύο λοβούς (ZP-N και ZP-C) που διαχωρίζονται από έναν linker. Ο κάθε λοβός συνεισφέρει χωριστά στη σύνδεση του προσδέτη και μαζί σχηματίζουν μία θέση σύνδεσης υψηλής συγγένειας. Οι αλυσίδες πολυσακχαριτών δεν είναι απαραίτητες για τη σύνδεση του TGF- $\beta$ 2, αλλά οι μεγάλες αλυσίδες μπορεί να διαταράξουν την αλληλεπίδραση του T $\beta$ RI - T $\beta$ RII και έτσι να αναστείλουν τη σηματοδότηση του TGF- $\beta$ 2. Επίσης, στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο βρίσκεται μια ορφανή περιοχή, χωρίς καμιά δομική ομοιότητα με άλλες πρωτεΐνες. Η ορφανή περιοχή μπορεί να απελευθερωθεί με πρωτεολυτική διάσπαση και επειδή η διαλυτή αυτή μορφή διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης του TGF- $\beta$ 2, δρα ως σκαλωσιά που αναστέλλει τη σηματοδότηση του TGF- $\beta$ 2. Το κυτταροπλασματικό άκρο της βηταγλυκάνης περιέχει μια περιοχή PDZ και μια θέση φωσφορυλίωσης από κινάσες Ser/Thr, μεταξύ των οποίων και οι υποδοχείς T $\beta$ RII. Η βηταγλυκάνη βρίσκεται στη μεμβράνη ως ομοδιμερές, με τις δύο υπομονάδες του να συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.

Εκτός από διεγερτικός, ο ρόλος της βηταγλυκάνης μπορεί να είναι και ανασταλτικός ανάλογα με τις συνθήκες και τον κυτταρικό τύπο. Η βηταγλυκάνη διευκολύνει τη σύνδεση της inhibin στον υποδοχέα ActRII, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο inhibin/ βηταγλυκάνη/ ActRII, με αποτέλεσμα την εξάντληση των ελεύθερων ActRII. Η inhibin δεν έχει τη δυνατότητα να μεταδώσει περαιτέρω το σήμα, καθώς δεν συνδέεται στη συνέχεια με υποδοχείς τύπου I. Αντιθέτως, η σύνδεση της activin στον ActRII οδηγεί στη στρατολόγηση του υποδοχέα ActRIB (ALK4), ενεργοποιώντας την έκκριση της FSH από τους γοναδοτρόπους αδένες. Η δημιουργία σταθερού συμπλόκου inhibin/ βηταγλυκάνη/ ActRII εμποδίζει τη σηματοδότηση της activin.



*In vivo*, ο λειτουργικός ρόλος της βηταγλυκάνης είναι ζωτικός. Ποντίκια στα οποία λείπει η βηταγλυκάνη πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση λόγω καρδιακής και ηπατικής δυσλειτουργίας. Στους ενήλικες η έλλειψη βηταγλυκάνης σχετίζεται με τον σχηματισμό όγκων.

##### Η ενδογλίνη

Ένας άλλος συμπληρωματικός υποδοχέας είναι η **ενδογλίνη** (ή CD105), μια ομοδιμερής διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 633 αμινοξέων και 180 kDa (η κάθε υπομονάδα), που εκφράζεται σε ορισμένους μόνο κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, σε απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα και επάγει την αγγειογένεση. Η έκφραση της ενδογλίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε πρέμια σε φυσιολογικούς ιστούς είναι μικρή και αυξάνεται σε θέσεις έντονης αγγειογένεσης, όπως κατά την εμβρυογένεση, σε φλεγμονώδεις ιστούς και μέσα ή γύρω από όγκους.

Η ενδογλίνη έχει παρόμοια δομή με τη βηταγλυκάνη, αλλά στερείται αλυσίδων θειικής ηπαράνης. Στο εξωκυτταρικό της τμήμα περιέχει μια ορφανή περιοχή και μια περιοχή ZPD (Zona Pellucida Domain), η οποία περιλαμβάνει την Cys582, υπεύθυνη για τον διμερισμό της ενδογλίνης και ένα μοτίβο RGD (γνωστό για τη σύνδεση με ιντεγκρίνες και άλλες πρωτεΐνες της ECM). Το κοντό κυτταροπλασματικό της τμήμα αποτελείται από μια περιοχή PDZ, υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως ο RhoGEF και η eNOS.

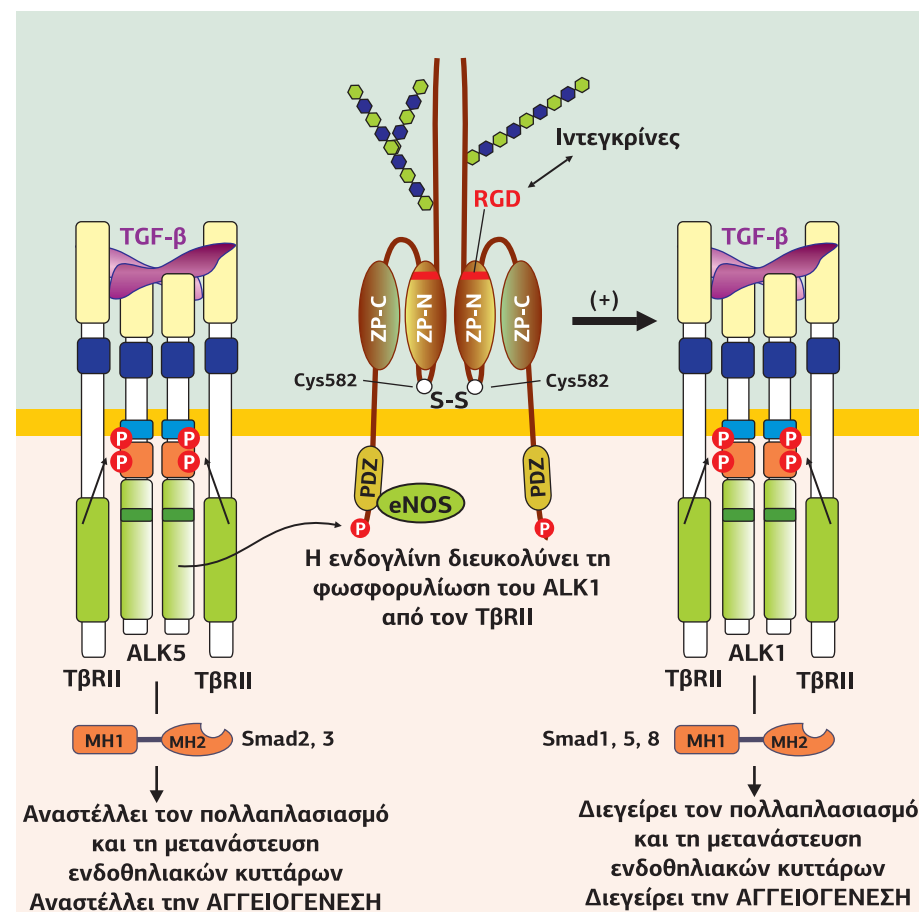
Ο τρόπος με τον οποίο δρα η ενδογλίνη είναι ακόμη αμφιλεγόμενος, αλλά είναι σίγουρο ότι εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το είδος των υποδοχέων TGF- $\beta$  που εκφράζει.

**Εικόνα 10.12**  
**Η βηταγλυκάνη και ο ρόλος της στη σηματοδότηση του TGF- $\beta$ 2.** Η βηταγλυκάνη συνδέει τον TGF- $\beta$ 2 και διευκολύνει την πρόσβασή του στον T $\beta$ RII. Μόλις σχηματισθεί το σύμπλοκο με τον T $\beta$ RI, η βηταγλυκάνη αποκολλάται. Διακρίνεται η δομή της βηταγλυκάνης: μια διμερής διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη με αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης και θειικής ηπαράνης. Η εξωκυτταρική της περιοχή αποτελείται από μια περιοχή ZP, η οποία έχει δύο λοβούς που διαχωρίζονται από έναν linker. Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο βρίσκεται μια ορφανή περιοχή, ενώ στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή PDZ και μια θέση φωσφορυλίωσης από κινάσες Ser/Thr. [2] [14] [28]

Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ο TGF-β συνδέεται στο σύμπλοκο των υποδοχών TβRII και ALK5. Αυτό το μονοπάτι είναι γνωστό ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μεσολαβεί στην παραγωγή ινιδονεκτίνης και κολλαγόνου και επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου PAI-1. Ο PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου-1 και κατ' επέκταση της πρωτεάσης πλασμίνης (η οποία αποικοδομεί πρωτεΐνες της ECM), αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση. Αυτή η οδός σηματοδότησης ενισχύεται από την ενδογλίνη μόνο σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, όπως οι καρδιακοί ινοβλάστες.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο TGF-β συνδέεται κατά κύριο λόγο στο σύμπλοκο των υποδοχών TβRII και ALK1, το οποίο διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την κυτταρική μετανάστευση, καθώς και την αγγειογένεση. Η ενδογλίνη διευκολύνει τη δημιουργία του συμπλόκου TGF-β/ TβRII/ ALK1. Συνδέεται μέσω της εξωκυτταρικής περιοχής της (437-558 αα) στον TβRII, στην ανενεργή ή στην ενεργή του μορφή, ενώ με τον υποδοχέα τύπου I συνδέεται μέσω της κυτταροπλασματικής της περιοχής, μόνο όταν είναι ανενεργός, ενώ μόλις ενεργοποιείται διαχωρίζεται άμεσα από την ενδογλίνη. Το κυτταροπλασματικό COOH-τελικό άκρο της ενδογλίνης είναι ιδιόσυστατα φωσφορυλιωμένο, πιθανώς λόγω του ιδιόσυστατα ενεργού TβRII. Η ενδογλίνη θεωρείται ότι ρυθμίζει τη σηματοδότηση του TGF-β στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ των δύο ανταγωνιστικών μονοπατιών που αποκρίνονται στον TGF-β, της οδού ALK5 - Smad2/3 και της οδού ALK1 - Smad1/5/8, χωρίς ωστόσο να έχει καθοριστεί ο ακριβής μηχανισμός. Έχει προταθεί ότι η φωσφορυλίωση στις Ser646 και Ser649 της κυτταροπλασματικής περιοχής της ενδογλίνης από τον ALK5 παίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση του ALK1 (Εικόνα 10.13).

Η κληρονομική απουσία λειτουργικής ενδογλίνης σχετίζεται με την "αιμορραγική



**Εικόνα 10.13**  
Ρόλος της ενδογλίνης στη σηματοδότηση του TGF-β. Ο TGF-β μπορεί να σηματοδοτεί μέσω δύο ξεχωριστών μονοπατιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Όταν τα επίπεδα ενδογλίνης είναι αυξημένα (π.χ. σε περιπτώσεις φλεγμονής ή ύπαρξης όγκου) ενεργοποιείται το μονοπάτι ALK1 - Smad1,5,8 (ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της αγγειογένεσης), ενώ όταν τα επίπεδα ενδογλίνης είναι μειωμένα (π.χ. σε φυσιολογικές συνθήκες) ενεργοποιείται το μονοπάτι ALK5 - Smad2/3 (αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της αγγειογένεσης). [7] [15] [53] [75]

τελαγγειεκτασία τύπου I" (Telangiectasia, hereditary hemorrhagic, type 1) ή σύνδρομο Osler-Weber-Rendu, που χαρακτηρίζεται από αρτηριοφλεβικές δυσπλασίες και σοβαρά και συχνά αιμορραγικά επεισόδια. Όταν η έκφραση της ενδογλίνης μειώνεται, η σηματοδότηση μέσω του ALK1 εξασθενεί, ενώ αυξάνεται η δραστικότητα του ALK5, προάγοντας έτσι τη διακοπή του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού και την αναστολή της αγγειογένεσης. Τα συμπτώματα της ασθένειας οφείλονται, επίσης, στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την αδυναμία σύνδεσης της ενδογλίνης (η οποία απουσιάζει) με την eNOS, οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα NO, αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίων και εξασθενημένη αγγειοκινητική λειτουργία.

### Ο Cripto και η σηματοδότηση του Nodal

Ο Cripto, επίσης γνωστός και ως Cripto-1, Cryptic και TDGF-1 (Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1) είναι μια μικρή γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται με μια άγκυρα GPI (glycosylphosphatidylinositol) σε σχεδίες λιπιδίων της μεμβράνης. Όταν αρχικά κλωνοποιήθηκε το 1989 ως τυχαίο μετάγραφο σύντηξης, σε μια βιβλιοθήκη cDNA, ονομάστηκε Cripto για τη μυστηριώδη έλλειψη σχέσης με γνωστές πρωτεΐνες και μονοπάτια σηματοδότησης. Εξωκυτταρικά, αποτελείται από μια περιοχή EGF-like και μια περιοχή CFC (Cripto, Frl-1, Cryptic domain), η οποία βρέθηκε στο COOH-τελικό άκρο πρωτεϊνών, όπως η Cripto και η Jagged 1 και 2. Η περιοχή CFC αποτελείται από 40 αμινοξέα, συγκρατείται με τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και συνδέει τον υποδοχέα ALK4 με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

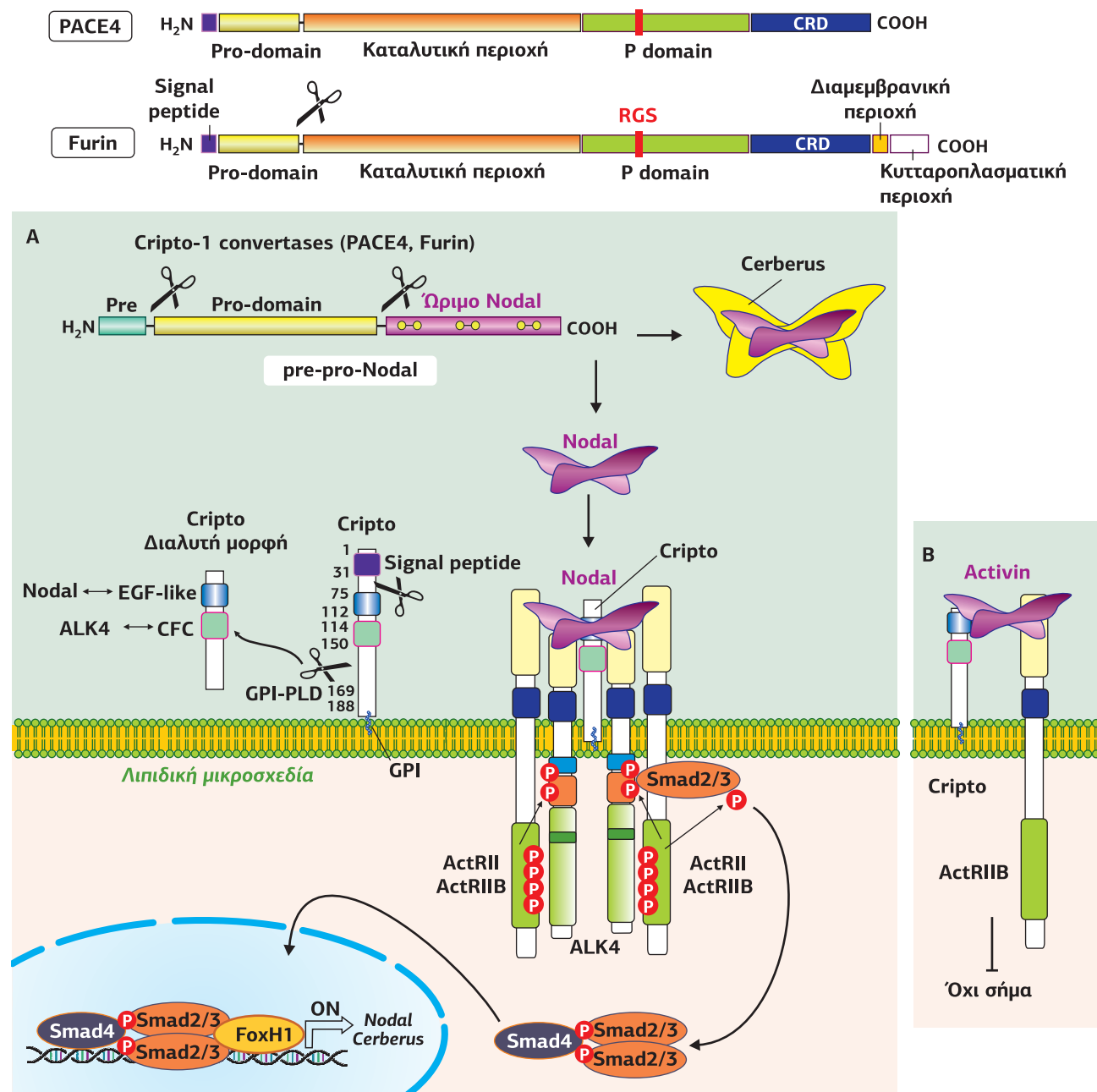
Ο Cripto δρα ως συνυποδοχέας του Nodal, ένα μέλος της υπερικογενείας TGF-β. Ο Cripto δρα είτε cis (αυτοκρινώς, παραμένοντας συνδεδεμένος στη μεμβράνη) είτε trans (παρακρινώς, καθώς έχει την ικανότητα να αποκόπεται από τη μεμβράνη με τη δράση της GPI-PLD (Glycosylphosphatidylinositol phospholipase D). Συγκεκριμένα, ο Cripto συνδέεται, μέσω του EGF-like μοτίβου του και χάρη σε μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση με O-φουκοσυλίωση της εξωκυτταρικής του περιοχής, με τον Nodal. Ταυτόχρονα αλληλεπιδρά μέσω του CFC μοτίβου του με τον ALK4, επιτρέποντας στον Nodal να συνδεθεί στο σύμπλοκο ALK4 και ActRII ή ActRIIB. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα και τη δημιουργία του ετεροτετραμερούς, φωσφορυλιώνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad2/3 και μεταφέρονται μαζί με τον Smad4 στον πυρήνα, όπου θα αλληλοεπιδράσουν με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο FoxH1, ο p53, κ.λπ. Αυτό θα οδηγήσει στην επαγωγή γονιδίων στόχων, όπως ο ίδιος ο Nodal και οι ανταγωνιστές του, Lefty και Cerberus (Εικόνα 10.14A). Είναι ενδιαφέρον ότι ελλείψει Cripto ο Nodal στερείται σηματοδοτικής δραστηριότητας μέσω των υποδοχών ALK4.

Οι πρωτεΐνες Lefty, αποκλίνοντα μέλη της υπερικογενείας των πρωτεϊνών TGF-β, δρουν ως εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές της σηματοδότησης του Nodal. Η υπερέκφραση του Lefty οδηγεί σε έναν φαινότυπο παρόμοιο των Nodal knockout, ενώ η υπερέκφραση των υποδοχών ALK4 και ActRII ή ActRIIB μπορεί να επαναφέρει τον φαινότυπο. Καθώς η έκφραση του Lefty εξαρτάται από την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του Nodal, ο Lefty ενεργεί ως κλασικός αναστολέας ανατροφοδότησης. Σε αντίθεση με τον Lefty, ο οποίος ανταγωνίζεται τη σύνδεση του Nodal με τους υποδοχείς ALK4 και ActRII ή ActRIIB, ο αναστολέας Cerberus συνδέεται άμεσα στον εξωκυτταρικό Nodal και εμποδίζει τη σηματοδότηση.

Ο Cripto και ο Nodal κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης παίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και τη διαφοροποίηση της μορφής των εμβρύων των ραχιαίου-κοιλιακού άξονα, τη δεξιά-αριστερή ασυμμετρία και τη διαμόρφωση του νευρικού συστήματος. Τα Cripto-null ποντίκια πεθαίνουν την 7<sup>η</sup> ημέρα της κύησης λόγω αδυναμίας γαστρίδωσης.

Ο Cripto, ενώ ενεργοποιεί τον Nodal, αναστέλλει τη δράση της activin. Ο Cripto μπορεί να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα με την activin και τον υποδοχέα ActRII ή IIB. Το σύμπλοκο αυτό δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ALK4, αποκλείοντας τη σηματοδότηση της activin (Εικόνα 10.14B).

Η furin είναι ένα μέλος της οικογένειας subtilisin/kexin-like proprotein convertases (PCs), που κόβουν τις πρωτεΐνες σε βασικά αμινοξέα. Παράγεται ως ζυμογόνο (zymogen), δηλαδή ως προένζυμο 104 kDa που μετατρέπεται, κατά τη μεταφορά του από το ΕΔ στο trans-Golgi, σε ώριμο ένζυμο 98 kDa μετά από αυτοκαταλυτική αποκοπή σε δύο θέσεις. Είναι μια διαμεμβρανική Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενη ενδοπρωτεάση που συναντάται στην πλασματική μεμβράνη και στη μεμβράνη του trans-Golgi. Το όνομά της προέρχεται από το γεγονός ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη Furin βρίσκεται στο χρωμόσωμα πάνω από το ογκογονίδιο FES, και ονομάζεται FUR (FES Upstream Region), και κατά συνέπεια η πρωτεΐνη ονομάζεται Furin. Πολλές πρωτεΐνες συντίθενται σε ανενεργή μορφή, ως πρόδρομα μόρια από τα οποία πρέπει να αποκοπεί μια πρόδρομη αλληλουχία για να γίνουν ενεργά. Η furin συμμετέχει στην ενεργοποίηση πολλών πρόδρομων πρωτεϊνών κόβοντας σε ένα ζευγάρι βασικών αμινοξέων. Τα υποστρώματά της περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες (όπως οι pro-TGFβ, pro-IGF2, pro-PDGF, InsR, IGF1-R, Notch), νευροτροφίνες (pro-NGF, pro-BDNF), προ-ορμόνες, ιντεγκρίνες (α3, α6, αν, α5 και α4) και ποικίλες μεταλλοενδοπρωτεάσες (ADAM, ADAMTS, MT1-MMP). Η καταλυτική περιοχή της Furin εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με τις άλλες PCs, π.χ. 70% ομοιότητα με την κυτταροπλασματική PACE4 (Paired basic Amino-acid-Cleaving Enzyme).



Εικόνα 10.14

Ο συνυποδοχέας Cripto διευκολύνει τη σύνδεση Nodal, ALK4 και ActRII ή ActRIIB. Α. Ο Nodal συντίθεται ως πρόδρομο μόριο pre-pro-Nodal (~55 kDa), το οποίο κόβεται από τις convertases PACE4 και Furin, δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο pro-Nodal (~37 kDa) και τελικά τον ενεργό Nodal (~18 kDa). Ο Cripto παίζει έναν ρόλο στην ωρίμανση του Nodal στρατολογώντας τις PACE-4/Furin και τον Nodal κοντά στους υποδοχείς ALK4 και ActRII ή ActRIIB, στην πλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας τόσο την αποδοτικότητα της επεξεργασίας του Nodal όσο και τη διαθεσιμότητα της τελικής ενεργού μορφής του. Για τα περισσότερα μέλη της οικογένειας TGF-β, η αποκοπή των πρόδρομων πεπτιδίων συμβαίνει ενδοκυτταρικά, αλλά για τον Nodal υπάρχουν ενδείξεις ότι συμβαίνει εξωκυτταρικά. Ο Cripto είναι μια μικρή γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στη μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας GPI, αλλά έχει και την ικανότητα να αποκόπεται από τη μεμβράνη με τη δράση της GPI-PLD. Αλληλεπιδρά με τον ALK4 και τον Nodal επιτρέποντας τη δημιουργία του ενεργού συμπλόκου Nodal/ ActRII ή ActRIIB/ ALK4. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα και τη δημιουργία του ετεροτετραμερούς, φωσφορυλιώνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad2/3 και μεταφέρονται μαζί με τον Smad4 στον πυρήνα, όπου θα αλληλοεπιδράσουν με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο FoxH1, ο p53 κ.λπ. Αυτό θα οδηγήσει στην επαγωγή γονιδίων στόχων, όπως ο ίδιος ο Nodal και οι ανταγωνιστές του Lefty και Cerberus, οι οποίοι δρουν μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Β. Ο Cripto μπορεί να σχηματίσει ένα σύμπλεγμα με την activin και τον υποδοχέα ActRII ή IIB. Το σύμπλεγμα αυτό δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ALK4, αποκλείοντας τη σηματοδότηση της activin. [46] [68] [72] [73]

## 5. Σηματοδότηση των TβR μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smads

Με τη φωσφορυλίωση της περιοχής GS του TβRI δημιουργείται ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο pSer-x-pSer, το οποίο χρησιμεύει ως θέση πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες R-Smads. Η εξειδίκευση των υποδοχέων TβRI για τους R-Smads καθορίζεται από τον βρόχο L45 της περιοχής κίνησης των TβRI και, αντίστοιχα, από τον βρόχο L3 και τον βασικό θύλακα της MH2 περιοχής των R-Smads. Οι υποδοχείς τύπου I, ALK4, ALK5 και ALK7 των TGF-β, activin και Nodal συνδέουν τους Smad2/3, ενώ οι ALK1, ALK2, ALK3 και ALK6 των BMPs αναγνωρίζουν τους Smads1/5/8.

Μετά τη σύνδεση του ενεργοποιημένου TβRI με τον R-Smad, η περιοχή κίνησης του TβRI φωσφορυλιώνει τον R-Smad σε δύο κατάλοιπα Ser στην COOH-τελική αλληλουχία Ser-Val-Ser (Ser-Met-Ser στον Smad2). Το pSer-x-pSer είναι το χαρακτηριστικό μοτίβο ενεργοποίησης του μονοπατιού TGF-β / Smad, το οποίο εμφανίζεται τόσο στην περιοχή GS των υποδοχέων τύπου I κατά τη φωσφορυλίωση από τους υποδοχείς τύπου II, όσο και στο COOH-τελικό άκρο των R-Smads κατά τη φωσφορυλίωσή τους από τους υποδοχείς τύπου I. Αυτή η μονάδα δι-pSer αποτελεί την όξινη ουρά, που συνδέεται στον βασικό θύλακα και στον L3 βρόχο στην περιοχή MH2 των R-Smads ή του Co-Smad.

Μετά τη φωσφορυλίωσή τους οι R-Smads σχηματίζουν τριμερή σύμπλοκα με τον κοινό διαμεσολαβητή Smad4, καθώς το COOH-τελικό φωσφορυλιωμένο μοτίβο pSer-x-pSer συνδέεται με τον L3 βρόχο της Co-Smad, και μεταφέρονται στον πυρήνα. Οι Smads είτε αλληλεπιδρούν μέσω του μοτίβου NLS, με την β-importin, η οποία συνδέεται με την α-importin, και μέσω αλληλεπίδρασης των importins με τις nucleoporins των πυρηνικών πόρων εισέρχονται στον πυρήνα, είτε, καθώς οι R-Smads έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν άμεσα με τις nucleoporins Nup214 και Nup153, εισέρχονται χωρίς τη μεσολάβηση των importins, μεμονωμένα. Η θέση σύνδεσης για αυτές τις nucleoporins βρίσκεται στον υδρόφοβο διάδρομο της περιοχής MH2 των Smad2/3 και επικαλύπτεται με τη θέση πρόσδεσης για την περιοχή SBD (Smad Binding Domain) της SARA, όπως θα δούμε παρακάτω.

Μπαίνοντας οι Smads στον πυρήνα, ο TGF-β μεταδίδει το σήμα, αλλά δεν παρέχει τις ακριβείς οδηγίες. Εκτός από το ίδιο το σύμπλοκο των Smads, ποια γονίδια θα αναγνωριστούν από αυτό το σύμπλεγμα, καθώς και το αποτέλεσμα αυτής της επιλογής καθορίζεται από τη γενετική σύσταση του κυττάρου και από αποκρίσεις και σε άλλα μηνύματα. Αυτό το κυτταρικό πλαίσιο αποτελείται από τουλάχιστον δύο κατηγορίες μορίων που αλληλεπιδρούν με τους Smads: συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA και μεταγραφικοί συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς.

Γιατί χρειάζονται οι συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA, εφόσον οι Smads μπορούν να συνδέονται στο DNA από μόνοι τους; Η συγγένεια των Smads για τη συγγενή αλληλουχία τους είναι πολύ χαμηλή για να επιτευχθεί μη ενισχυμένη σύνδεση στο DNA. Η συνεργασία μεταξύ των R-Smads και του Smad4 επαρκεί για τη σύνδεση σε ορισμένα μόνο γονίδια που έχουν δύο ή περισσότερες αλληλουχίες CACAG σε κατάλληλη απόσταση. Οι συμπαράγοντες συνεργάζονται με τους ενεργοποιημένους Smads για τη σύνδεση μόνο με εκείνους τους εκκινητές που πληρούν τις συνδυασμένες απαιτήσεις ειδικότητας αλληλουχίας ενός δεδομένου συνδυασμού Smad-συμπαράγοντα. Πολλοί από αυτούς τους καθοριστικούς παράγοντες είναι ειδικοί για μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, ένα στάδιο διαφοροποίησης ή μεταβολικές συνθήκες του κυττάρου. Κάτω από την επίδρασή τους, το μεταγωγικό μονοπάτι TGF-β / Smad λειτουργεί ως εξαρτώμενη από το περιβάλλον πολυεπιλογική συσκευή σηματοδότησης για τη ρύθμιση των κυττάρων καθόλη τη διάρκεια ζωής του οργανισμού.

Επιπλέον, κάθε υποομάδα R-Smad είναι ικανή να συσχετίζεται με ένα διαφορετικό υποσύνολο συμπαραγόντων σύνδεσης στο DNA, επιτυγχάνοντας έτσι την εξειδίκευση της οδού του κυτταρικού αποτελέσματος (Πίνακας 10.1). Κάποιοι συμπα-



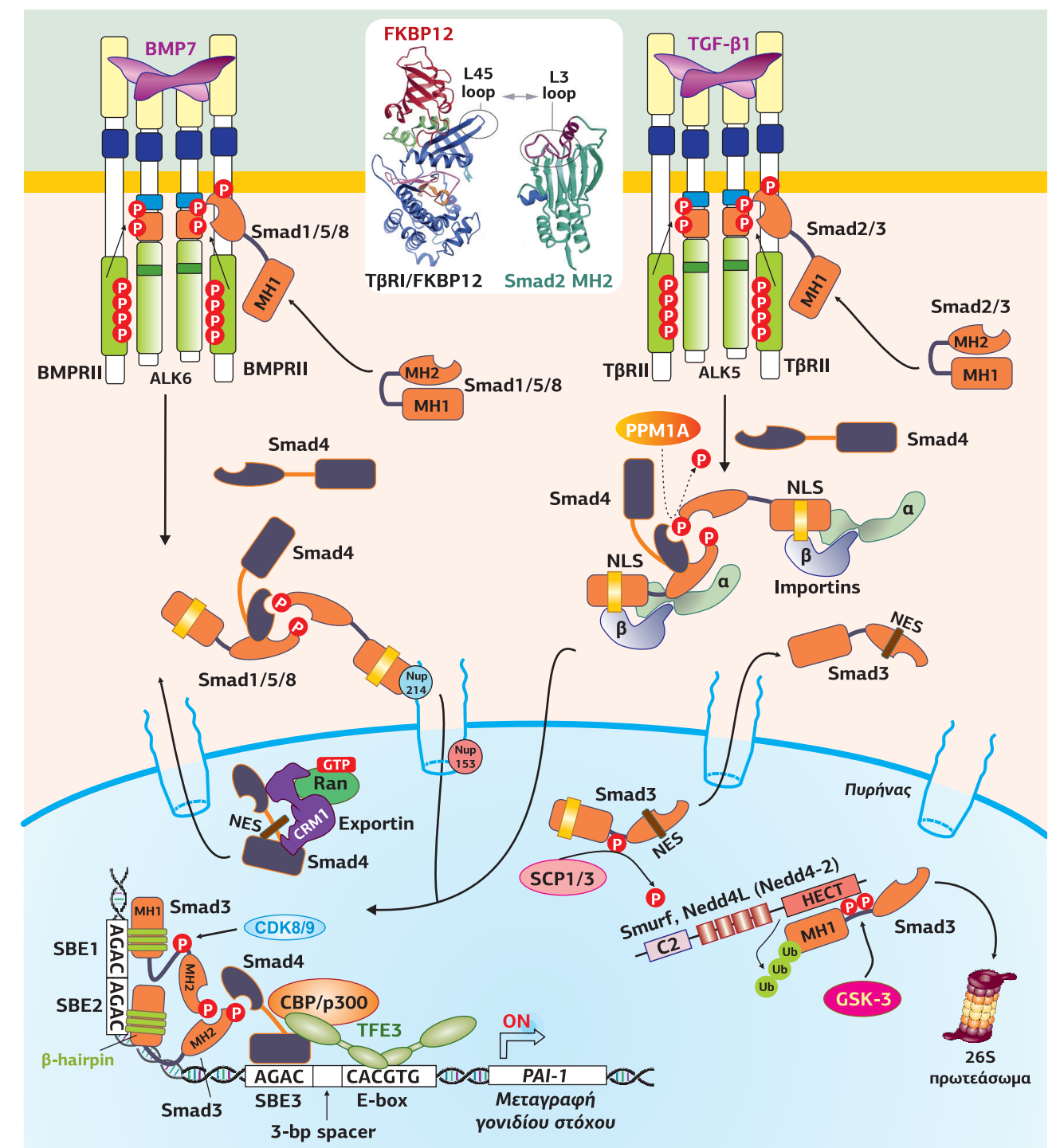
ράγοντες, όπως ο FAST (μέλος της οικογένειας winged-helix/Forkhead), ο Mixer (homeodomain protein) και οι 30 πρωτεΐνες zinc finger OAZ, δεν έχουν ανιχνεύσιμη μεταγραφική δραστηριότητα από μόνοι τους, ενώ άλλοι, συμπεριλαμβανομένων των c-Jun, TFE3, και LEF1/TCF, έχουν και αυτόνομη μεταγραφική δραστηριότητα και ανταποκρίνονται στο δικό τους σύνολο εξωκυτταρικών σημάτων. Για παράδειγμα, ο c-Jun ανταποκρίνεται σε ποικίλες κυτοκίνες και κυτταρικό στρες και ο LEF1/TCF ανταποκρίνεται στα σήματα Wnt/β-κατενίνης.

**Πίνακας 10.1**  
Μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με ετεροτριμερή σύμπλοκα των Smads

Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων	Μέλη	Αλληλεπίδραση με Smads	Γονίδιο και Λειτουργία
Οικογένεια Forkhead (Winged helix proteins)	FoxH1 (ή FAST1) FoxO1, FoxO2, FoxO3	Smad 2 Smad 4	Ενεργοποίηση έκφρασης του <i>Mix.2</i> που οδηγεί στην επαγωγή του μεσοδέρματος στον Χεπορυσ ως απόκριση στην activin και στο Nodal
RUNX	Runx1,-3 (ή CBFA)	Smad 2 ή 3 Smad 4	Επαγωγή έκφρασης της σταθερής περιοχής της <i>IgA</i> στα Β-λεμφοκύτταρα
Mix Homeodomain	Mixer, Milk (Mix-like)	Smad 3 Smad 4	Επαγωγή της έκφρασης του <i>Goosecoid</i> μόνο στη ραχιαία ακραία ζώνη του πρώιμου γαστρίδιου του Χεπορυσ
Zinc finger	OAZ	Smad 1 Smad 4	Επαγωγή έκφρασης του <i>vent2</i> , ενός γονιδίου που ενορχηστρώνει την επαγωγή του κοιλιακού μεσοδέρματος στον Χεπορυσ σε απόκριση στην BMP
AP-1 (Activation protein-1)	c-Jun, c-Fos	Smad 3 Smad 4	Επαγωγή έκφρασης του Jun-B, c-Jun, κολλαγενάσης-1 (MMP1), ιντερλευκίνης-11 και του PAI-1
E2F-DP (Dimerization Partner)	E2F4, E2F5	Smad 3 Smad 4	Καταστολή της έκφρασης του <i>c-myc</i> από τον TGF-β στα επιθηλιακά κύτταρα, που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου (μέσω απελευθέρωσης από τη μεσολαβούμενη από τον c-Myc καταστολή των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου)
ATF/CREB	ATF3	Smad 3 Smad 4	Καταστολή της έκφρασης του <i>Id1</i> , που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου των επιθηλιακών κυττάρων

Η οικογένεια **ATF/CREB** είναι μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που συνίσταται από διαφορετικούς ATFs (Activating transcription factors), CREB (cAMP response element binding protein), CREM (cAMP response element modulator) και συναφείς πρωτεΐνες. Μεταξύ των μελών της ομάδας, άλλοι εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα στους CREB, ενώ άλλοι στους AP-1 (c-Jun ή c-Fos).

Μέσα στον πυρήνα οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK8/9, γεγονός που μεγιστοποιεί τη μεταγραφική τους δραστηριότητα, ευνοώντας τις αλληλεπιδράσεις με τους συνενεργοποιητές τους και επιπλέον προετοιμάζει τις R-Smads για φωσφορυλίωση από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK-3). Η GSK-3 μετατρέπει την περιοχή linker από μια θέση πρόσ-



**Εικόνα 10.15**  
**Το βασικό μονοπάτι των TGF-β μέσω των Smads.** Ο TGF-β1 προσδέεται στον υποδοχέα TβRII, ο οποίος φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα ALK5 στην GS περιοχή του, και δημιουργείται ένα τετραμερές ενεργό σύμπλοκο. Στη φωσφορυλιωμένη GS συνδέεται ο Smad2/3, ο οποίος φωσφορυλιώνεται από τον ALK5. Ο φωσφορυλιωμένος Smad2/3 απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, διμερίζεται και συνδέεται στη συνέχεια με τον Smad4. Το σύμπλοκο, με ή χωρίς τη βοήθεια των importins, εισέρχεται στον πυρήνα, όπου οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από την CDK8/9, γεγονός που διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις με τους συνενεργοποιητές τους (π.χ. TFE3) μεγιστοποιώντας τη μεταγραφική τους δραστηριότητα (π.χ. τη μεταγραφή του γονιδίου στόχου PAI1). Οι R-Smads επιπλέον φωσφορυλιώνονται από την GSK-3, επιτρέποντας την πρόσδεση για την περιοχή HECT της E3 λιγάσης ουβικουιτίνης Nedd4-2 (ή Nedd4L), που σημαίνει τους R-Smads για αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα. Η φωσφορυλίωση από τις CDK8/9 αντιστρέφεται από τις φωσφατάσες SCP1-3. [42] [47] [86]

δεσης για συνενεργοποιήτες σε μια θέση πρόσδεσης για την περιοχική HECT των E3 λιγασών ουβικουιτίνης, που σημαίνουν τις R-Smads για αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα. Η φωσφορυλίωση από τις CDK8/9 αντιστρέφεται από τις πυρηνικές φωσφατάσες SCP1-3 (Small CTD Phosphatases 1-3), επίσης γνωστές ως CTDSPL1/2 (CTD Small Phosphatases) και CTDSPL (CTD Small Phosphatase-Like protein), οι οποίες παρατείνουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των Smads (Εικόνα 10.15).

Ένα σταθερό επίπεδο φωσφορυλίωσης των Smad2/3 επιτυγχάνεται μέσα σε 15-30 min από την έκθεση στον TGF-β και μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες. Τελικά, η μείωση των επιπέδων του TGF-β στον εξωκυτταρικό χώρο, η απενεργοποίηση του υποδοχέα με εσωτερική και αποικοδόμηση ή η δράση μηχανισμών αρνητικής ανάδρασης οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση των Smads. Η αποφωσφορυλίωση των R-Smads λαμβάνει χώρα στον πυρήνα και συνοδεύεται από διάσπαση του συμπλόκου R-Smads / Smad4 και έξοδο των συστατικών του στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, οι R-Smads υφίστανται επαναλαμβανόμενους κύκλους φωσφορυλίωσης και επανεισόδου στον πυρήνα, εφόσον οι υποδοχείς του TGF-β παραμένουν ενεργοί. Η δραστηριότητα σηματοδότησης των Smads συνδέεται έτσι με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση των R-Smads με τη μεσολάβηση του υποδοχέα μπορεί να αντιστραφεί μέσω της PPM1A (Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent, 1A) ή από άλλες πρωτεϊνικές φωσφατάσες που περιορίζουν τη σηματοδότηση TGF-β και BMP.

## 5.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads

Η πρωτεΐνη Mad (Mothers against decapentaplegic) αναγνωρίστηκε το 1999 στη *Drosophila*, είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας Smads, ομόλογη των Smad1/5 των θηλαστικών. Αργότερα αναγνωρίστηκαν, επίσης στη *Drosophila*, οι dSmad2, Medea, και Dad, ομόλογες των Smad2/3, Smad4 και Smad6/7, αντίστοιχα. Η οικογένεια Smad του *Caenorhabditis elegans* περιλαμβάνει τους Sma1, Sma2 και Sma3 (Small), λόγω του μικρού μεγέθους σώματος της Dauer λάβρας του *Caenorhabditis elegans*, το οποίο επάγεται από τη σηματοδότηση μέσω TGF-β υποδοχέων που έχουν ενεργοποιηθεί από στρες. Το όνομα Smad προήλθε από την ομολογία της ανθρώπινης Smad1 με τις πρωτεΐνες Sma και Mad.

### Πίνακας 10.2

Τα ομόλογα μονοπάτια των TGF-β στη *Drosophila* και στον *Caenorhabditis elegans*.



### Ταξινόμηση των Smads

Οι Smads είναι πρωτεΐνες που κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

**R-Smads** (Receptor activated Smads) που ενεργοποιούνται από υποδοχείς των TGF-β (Smad2, Smad3) και των BMPs (Smad1, Smad5 και Smad8)

**Co-Smad** (Common mediator Smad) κοινός μεσολαβητής, είναι ο Smad4 και είναι εκείνος που συνοδεύει τους R-Smads στον πυρήνα. Δεν συνδέεται με τους υποδοχείς TβRs παρά μόνο με τους R-Smads και στερείται του COOH-τελικού μοτίβου Ser-x-Ser. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο μέσα στον πυρήνα, καθώς αλληλεπιδρά με τους συμπαράγοντες αλλά και με την ακετυλοτρανσφεράση CBP/p300.

**I-Smads** (Inhibitory Smads) είναι οι ανασταλτικοί Smads, Smad6 και Smad7, οι οποίοι ανταγωνίζονται τους R-Smads και σταματούν τη μεταγωγή του σήματος. Λειτουργούν με διάφορους τρόπους. Αρχικά βρέθηκε ότι ανταγωνίζονται με τους R-Smads για τη σύνδεση στους ενεργοποιημένους υποδοχείς τύπου I, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση των R-Smads. Ακολούθως, βρέθηκε ότι στρατολογούν τις E3 λιγασές ουβικουιτίνης, Smurf1 και Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factor), στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I, με αποτέλεσμα την ουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση του υποδοχέα, καθώς και τη λήξη της σηματοδότησης. Πολύ πρόσφατα, ο Smad7 έχει αποδειχθεί ότι στρατολογεί το σύμπλεγμα της ρυθμιστικής (GADD34) και της καταλυτικής υπομονάδας της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I προς αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση. Περαιτέρω, οι I-Smads θα μπορούσαν να έχουν πυρηνικό ρόλο, επειδή ο Smad6 έχει αποδειχθεί ότι στρατολογεί τον συνκαταστολέα CtBP (C-terminal-Binding Protein 1) για την καταστολή της BMP-επαγόμενης μεταγραφής των γονιδίων.

### Δομή των Smads

Οι Smads είναι πρωτεΐνες 500 αμινοξέων χωρίς ενζυμική δράση, που περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, με το DNA και με μεταγραφικούς παράγοντες. Αποτελούνται από δύο σφαιρικές περιοχές: MH1 (N-Mad Homology 1) και MH2 (C-Mad Homology 2), οι οποίες συνδέονται με έναν linker. Η περιοχή MH1 είναι καλά συντηρημένη σε όλους τους R-Smads και Smad4, αλλά όχι στους I-Smads, η MH2 είναι συντηρημένη σε όλους τους Smads, ενώ η συνδετική περιοχή δεν είναι συντηρημένη.

### Ο ρόλος της περιοχής MH1

1. Αυτοαναστολή: Η περιοχή MH1 αλληλεπιδρά με την περιοχή MH2 συμβάλλοντας στην αυτοαναστολή των Smads σε κατάσταση ηρεμίας. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η δράση των Smads απουσία προσδέτη (TGF-β).
2. Εισαγωγή στον πυρήνα: Οι Smads περιέχουν στην περιοχή MH1 ένα NLS μοτίβο (Nuclear Localization Signal), το οποίο αναγνωρίζεται από τις importins, συμβάλλοντας στην εισαγωγή των Smads στον πυρήνα.
3. Αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες.
4. Ικανότητα δέσμευσης με το DNA: Η περιοχή MH1 αποτελείται από 4 α-έλικες και 3 ομάδες αντιπαράλληλων β-hairpins, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των R-Smads στη μεγάλη αύλακα του DNA. Οι δύο από τις β-hairpins σταθεροποιούνται από ένα στενά συνδεδεμένο άτομο Zn<sup>2+</sup>. Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CAGAC-3' στο δίκλωνο DNA, η οποία είναι γνωστή ως SBE (Smad Binding Element). Ο Smad2 περιέχει μια ένθετη περιοχή, η οποία εμποδίζει τη σύνδεση στο DNA.

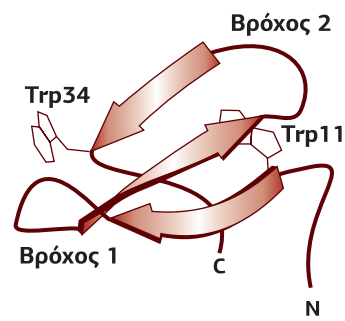
### Η συνδετική περιοχή - linker

Η συνδετική περιοχή (linker), η οποία συνδέει τις περιοχές MH1 και MH2, είναι λιγότερο συντηρημένη, ωστόσο, οι θέσεις φωσφορυλίωσης και το μοτίβο PY (-PPXY-) που περιέχει είναι εξαιρετικά συντηρημένα στους R-Smads στα μετάρια. Σε αυτές τις θέσεις συνδέονται πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές WW.

Στο μονοπάτι BMP, οι CDK8/9 φωσφορυλιώνουν τις Ser206 και Ser214 του Smad1 δημιουργώντας θέσεις σύνδεσης που αναγνωρίζονται από τις περιοχές WW του μεταγραφικού συμπαράγοντα YAP (Yes-Associated Protein 1). Αυτές οι φωσφορυλιώσεις διευκολύνουν τη μετέπειτα φωσφορυλίωση των Thr202 και Ser210 από



Η περιοχή **β-hairpin** (φουρκέτα) είναι ένα απλό πρωτεϊνικό δομικό μοτίβο που περιλαμβάνει δύο β-κλώνους που μοιάζουν με φουρκέτα. Οι δύο β-κλώνοι είναι προσανατολισμένοι σε αντιπαράλληλη κατεύθυνση (το N-τελικό άκρο του ενός φύλλου είναι δίπλα στο C-τελικό άκρο του επόμενου) και συνδέονται με έναν βραχύ βρόχο δύο έως πέντε αμινοξέων. Οι περιοχές β-hairpin μπορούν να εμφανιστούν μεμονωμένα ή ως μέρος μιας σειράς κλώνων, που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δημιουργούν ένα β-πτυχωτό φύλλο.



Η περιοχή WW είναι μια από τις μικρότερες περιοχές αλληλεπίδρασης, αποτελείται από 38-40 αμινοξέα και έχει διαμόρφωση αντιπαράλληλου τριπλά πτυχωμένου β-φύλλου. Συνδέεται κατά προτίμηση σε πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη, με ειδικά μοτίβα προλίνης, -PP-x-Y-, ενώ μερικές περιοχές WW συνδέονται με μοτίβα που περιέχουν pSer/pThr. Πήρε το όνομά της από την παρουσία δύο διατηρημένων Trp (W), οι οποίες απέχουν 20-22 αμινοξέα μεταξύ τους.

την GSK-3, αλλάζοντας την προτίμηση σύνδεσης του Smad1 από τον YAP στην περιοχή HECT της E3 λιγάσης ουβικουιτίνης Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1). Οι YAP και Smurf1 συνδέονται με τον Smad1 χάρη στην ικανότητα του ζεύγους τους WW να συνδέεται συνεργικά στο μοτίβο PY και στο φωσφορυλιωμένο μοτίβο του linker. Συγκεκριμένα, ο YAP συνδέεται με την pSer206 μέσω της WW1 του και με το μοτίβο PY μέσω της WW2. Μετά την επιπλέον φωσφορυλίωση του Smad1 από την GSK-3, η λιγάση Smurf1 γίνεται η προτιμώμενη πρωτεΐνη σύνδεσης, επειδή αναγνωρίζει το ζεύγος των φωσφορυλιωμένων pSer210 και pSer214 συν το μοτίβο PY.

Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του linker του Co-Smad βρίσκεται μια περιοχή NES (Nuclear Export Sequence), που συμβάλλει στην έξοδο του από τον πυρήνα καθώς αλληλεπιδρά με την exportin CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1), και στο COOH-τελικό του άκρο μια περιοχή SAD (Smad Activation Domain), που συμβάλλει στην αλληλεπίδραση του Smad4 με τους R-Smads.

#### Ρόλος της περιοχής MH2

Ο ρόλος της περιοχής MH2 είναι η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, με υποδοχείς (στην περίπτωση των R-Smads), με άλλους Smads και με μεταγραφικούς συμπαράγοντες. Η περιοχή MH2 καθορίζεται από δύο ομάδες αντιπαράλληλων πέντε και έξι β-κλώνων, αντίστοιχα, διευθετημένων ως β-sandwich, που περιβάλλεται από μια τριπλή δεσμίδα από α-έλικες από τη μια πλευρά και από μια ομάδα ενός μεγάλου βρόχου και μιας α-έλικας από την άλλη. Η περιοχή MH2 περιέχει έναν L3 βρόχο και έναν γειτονικό **θετικά φορτισμένο θύλακα** που καλύπτεται με βασικά αμινοξέα, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με το μοτίβο των δι-pSer. Στην περίπτωση των R-Smads αλληλεπιδρούν με τον L45 βρόχο της περιοχής κίνησης των TβRI υποδοχέων, ενώ στην περίπτωση του Co-Smad με τους φωσφορυλιωμένους R-Smads. Αν και η αλληλεπίδραση μεταξύ των βρόχων L45 και L3 καθορίζει την εξειδίκευση, η φωσφορυλίωση της περιοχής GS δρα ως σήμα On/Off, παρόμοιο με τη σύνδεση των pTyr στις περιοχές SH2 ή PTB.

Μια ομάδα από υδρόφοβα μοτίβα της MH2 περιοχής δημιουργούν έναν **υδρόφοβο διάδρομο** (hydrophobic corridor) που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως η SARA, με πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων (Nup214) και με μεταγραφικούς συμπαράγοντες.

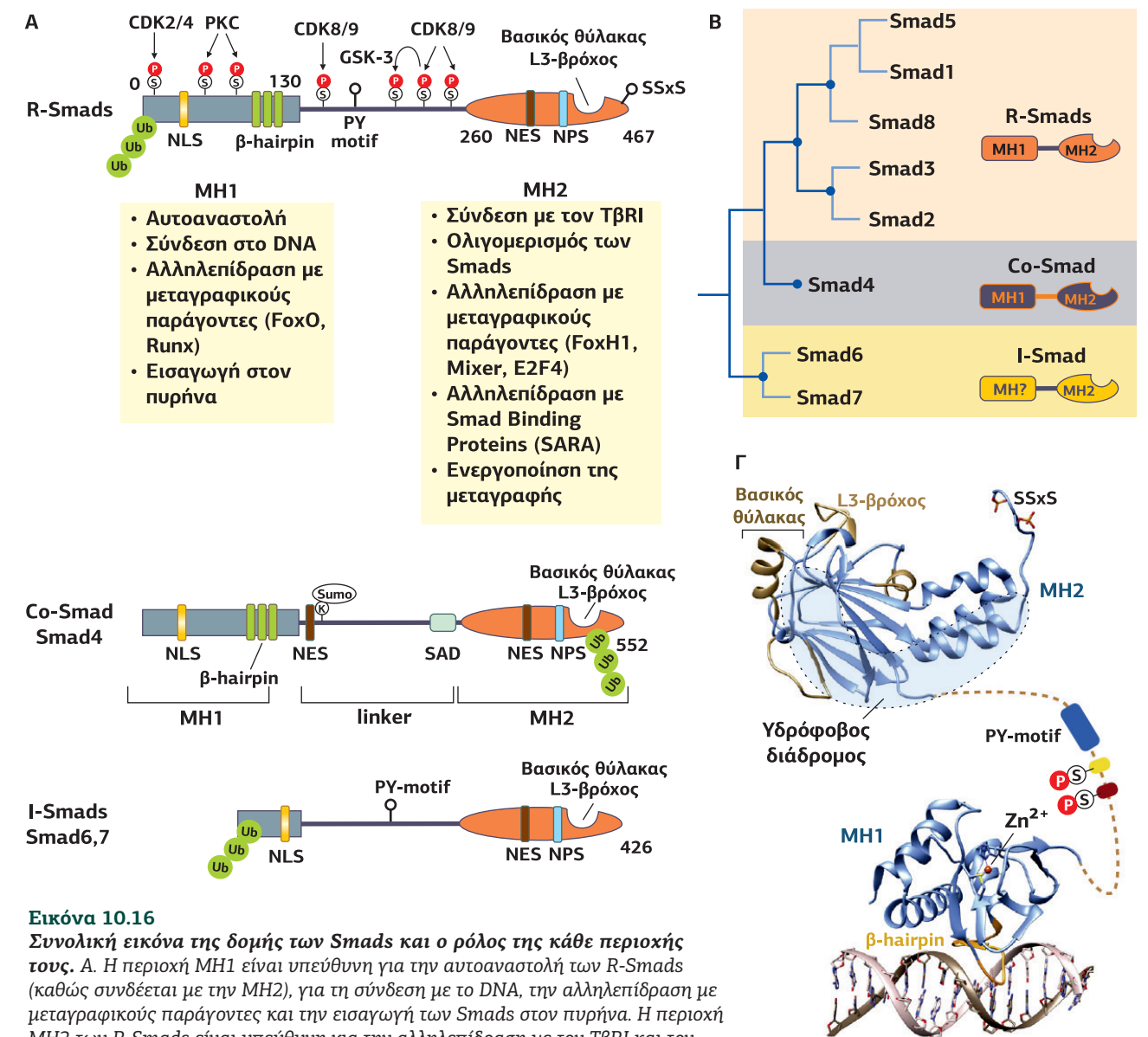
Η περιοχή MH2 εμφανίζει δομική ομολογία με την περιοχή FHA (Forkhead-Associated), αλλά όχι με τις 14-3-3, οι οποίες επίσης αναγνωρίζουν pSer/pThr.

Σε κατάσταση ηρεμίας οι περιοχές MH1 και MH2 των R-Smads και Smad4 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και αναστέλλουν η μια τις λειτουργίες της άλλης. Επιπλέον, η σύνδεση με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, π.χ. Disabled2, Axin, SARA (συνδέει τους Smad2/3), TRAP1 (Smad4), επιβάλλει την παραμονή των Smads στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας τη μεταφορά τους στον πυρήνα. Η επαγόμενη από τον TβRI φωσφορυλίωση του μοτίβου S-x-S των R-Smads αίρει την αναστολή αυτή, επάγοντας μια νέα διαμόρφωση, η οποία εμφανίζει μειωμένη συγγένεια για τις πρωτεΐνες που κρατούν τους Smads στο κυτταρόπλασμα, και αυξημένη συγγένεια για τις nucleoporins, επιτρέποντας στους Smads να σχηματίζουν σύμπλοκα και να μεταφερθούν στον πυρήνα.

Επειδή οι Smads συνδέονται στο DNA είτε με χαμηλή συγγένεια είτε καθόλου, απαιτούν συνεργασία με άλλους παράγοντες αλληλεπίδρασης ειδικής αλληλουχίας, για να δεσμεύονται αποτελεσματικά με τους εκκινητές των γονιδίων στόχων.

## 5.2 Η ρύθμιση του μονοπατιού TGF-β / Smads

Η κυτταρική απόκριση στους προσδέτες της οικογένειας των TGF-β ποικίλλει. Τι είναι αυτό που καθορίζει ποια θα είναι η κυτταρική απάντηση και ποιο το μέγε-



**Εικόνα 10.16**

**Συνολική εικόνα της δομής των Smads και ο ρόλος της κάθε περιοχής τους.** Α. Η περιοχή MH1 είναι υπεύθυνη για την αυτοαναστολή των R-Smads (καθώς συνδέεται με την MH2), για τη σύνδεση με το DNA, την αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες και την εισαγωγή των Smads στον πυρήνα. Η περιοχή MH2 των R-Smads είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον TβRI και τον Smad4 και με συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA. Τέλος, στην περιοχή linker των R-Smads υπάρχουν θέσεις φωσφορυλίωσης, το PY μοτίβο το οποίο αλληλεπιδρά με E3 λιγάσες (Smurf1 και Smurf2) και οδηγεί στην ουβικουιτίνωση, ενώ στον linker του Co-Smad υπάρχουν οι περιοχές NES και SAD για εξαγωγή από τον πυρήνα και αλληλεπίδραση με τους R-Smads, αντίστοιχα. [21] [43] [45] [47] Β. Ταξινόμηση των Smads. Γ. Κρυσταλλική δομή του Smad3. [44]

θός της; Ο σηματοδοτικός μηχανισμός του TGF-β είναι τόσο απλός και όμως τόσο ισχυρός, γιατί ένα περίπλοκο δίκτυο ρυθμιστών διατηρεί τον έλεγχο των εισερχόμενων μηνυμάτων, της δραστηριότητας και των αποτελεσμάτων του συστήματος. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ένα πλήθος ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν την πρόσβαση των μελών της οικογένειας TGF-β στους υποδοχείς τους, τη δραστικότητα των υποδοχέων τους και των υποστρωμάτων τους, καθώς και την πυρηνική λειτουργία των μεταγραφικών συμπλοκών που παράγονται από αυτή την οδό. Η ρύθμιση του μονοπατιού συνεπώς λαμβάνει χώρα είτε στο επίπεδο των προσδετών (θα μελετηθεί σε παρακάτω ενότητα) είτε σε επίπεδο υποδοχέων. Η σηματοδότηση των υποδοχέων ρυθμίζεται:

- Μέσω της ανακύκλωσης των υποδοχέων.
- Μέσω πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς ή εμπλέκονται στο μονοπάτι.

### Η ανακύκλωση των υποδοχέων

Η ενδοκύτωση του υποδοχέα λαμβάνει χώρα ιδιόσυστατα ή ενεργοποιείται με τη σύνδεση του προσδέτη. Στη δεύτερη περίπτωση συνήθως απαιτείται φωσφορυλίωση του υποδοχέα ή ουβικουιλίνωση. Τόσο οι υποδοχείς TGF- $\beta$  τύπου I όσο και τύπου II φαίνεται να υφίστανται διαρκώς εσωτερίκευση.

Απουσία προσδέτη μόλις ενσωματωθούν στα πρώιμα ενδοσώματα οι TBRs, επιστρέφουν πίσω στην πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της GTPάσης Rab11 και των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Καθώς οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς είναι πιο πιθανό να υποβληθούν σε αποικοδόμηση, είναι εκπληκτικό ότι η παρουσία προσδετών δεν έχει επίδραση στους ρυθμούς εσωτερίκευσης και ανακύκλωσης των υποδοχέων TBRs.

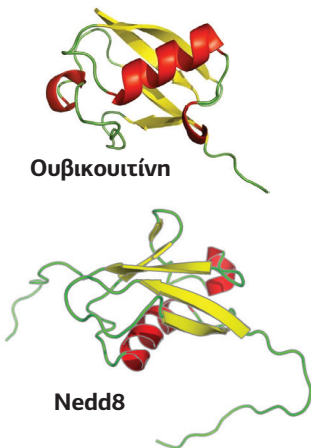
Ένα θέμα που απασχόλησε τους επιστήμονες ήταν το τι ακριβώς συμβαίνει μετά τη σύνδεση του προσδέτη (TGF- $\beta$ ) με τον υποδοχέα. Αν ο προσδέτης παρέμενε μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα στην περιοχή της πλασματικής μεμβράνης, δηλαδή ήταν σε θέση να ενεργοποιήσει πολλές φορές τον ίδιο ή και άλλους υποδοχείς, αυτό θα οδηγούσε σε μια ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού. Γι' αυτόν τον λόγο, με την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον προσδέτη ξεκινάει η ενεργοποίηση του μονοπατιού, αλλά και η εσωτερίκευση του υποδοχέα μαζί με τον προσδέτη. Διακρίνονται δύο οδοί εσωτερίκευσης των υποδοχέων TGF- $\beta$ : Η εξαρτώμενη από κλαθρίνη εσωτερίκευση σε πρώιμα ενδοσώματα που περιέχουν τη SARA, η οποία προάγει τη σηματοδότηση των Smads, και η εσωτερίκευση των υποδοχέων που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδίες της μεμβράνης (lipid raft - caveolar compartments) όπου συνδέονται μέσω του I-Smad Smad7 με τη λιγάση της ουβικουιλίνης Smurf2, η οποία οδηγεί τους TBRs σε αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα μέσω πολυ-ουβικουιλίνωσης.

### Η ενδοκύτωση των TBRs μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη

Η ενδοκύτωση μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη χρησιμοποιείται, όπως είδαμε σε προηγούμενα Κεφάλαια, από πολλούς μεμβρανικούς υποδοχείς, όπως οι GPCRs και οι RTKs (EGFR, PDGFR, InsR, κ.λπ.), και είναι η καλύτερα χαρακτηρισμένη οδός. Οι υποδοχείς αρχικά συγκεντρώνονται σε εγκολπώσεις της μεμβράνης, καλυμμένες με κλαθρίνη, AP2 και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες, όπως Eps15, συναπτοταγγίνη και amphiphysin. Στη συνέχεια, οι κοιλότητες διογκώνονται και αποκόπτονται από την πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της GTPάσης δυναμίνης. Μετά την απομάκρυνση του καλύμματος της κλαθρίνης, τα κυστίδια τελικά συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα, όπου μεταφέρονται και οι υποδοχείς. Στα πρώιμα ενδοσώματα (EEA1-θετικά, Early Endosome Antigen 1) βρίσκεται η πρωτεΐνη SARA, η οποία ενισχύει τη σηματοδότηση TGF- $\beta$  / Smad, όπως θα δούμε παρακάτω. Οι υποδοχείς TBRs από τα πρώιμα ενδοσώματα είτε επιστρέφουν, μέσω ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, στην πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της GTPάσης Rab11, είτε οδηγούνται, μέσω των όψιμων ενδοσωμάτων, στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση με τη βοήθεια της GTPάσης Rab7 (**Εικόνα 10.17**).

Η c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) εκτός από τον κλασικό της ρόλο ως E3 λιγάση της ουβικουιλίνης, η οποία ουβικουιλινώνει και οδηγεί στην αποικοδόμηση τους υποδοχείς RTKs (βλ. σσ. 521-522, **Εικόνα 8.35**), αλληλεπιδρά με τον TBRII και διευκολύνει τη σύνδεση της Nedd8 (Neural precursor cell - expressed, developmentally down-regulated 8), μιας ubiquitin-like πρωτεΐνης, στις Lys556 και Lys567 στον υποδοχέα. Η Nedd8 ρυθμίζει τη δραστικότητα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης στόχου. Στην περίπτωση του TBRII στοχοποιεί τον υποδοχέα στα πρώιμα ενδοσώματα, εμποδίζοντας την ενδοκύτωσή του μέσω μικροδιαμερισμάτων καβεολίνης, με τη συνεπαγόμενη ουβικουιλίνωση και την αποικοδόμηση του.

Το **EEA1** (Early Endosome Antigen 1) είναι μια πρωτεΐνη 1.400 αμινοξέων που εντοπίζεται αποκλειστικά σε πρώιμα ενδοσώματα και έχει σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση των ενδοσωμάτων. Συνδέεται απευθείας στα PI(3)P μέσω της περιοχής FYVE και σχηματίζει ένα ομοδιμερές μέσω της περιοχής coiled coil. Είναι ένας τελεστής των Rab5 (συνδέεται στην Rab5-GTP μέσω της περιοχής RBD -Rab Binding Domain) και δρα ως μόριο πρόσδεσης (tethering molecule) που συνδέει τα πρώιμα ενδοσώματα με τις SNAREs, οδηγώντας στη σύντηξη των κυστιδίων στη μεμβράνη στόχο και την παράδοση του φορτίου.



Η ενδοκύτωση των TBRs που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδίες πλούσιες σε καβεολίνη

Στην πλασματική μεμβράνη υπάρχουν λιπιδικές σχεδίες εμπλουτισμένες με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Αυτά τα εξειδικευμένα μικροδιαμερίσματα χαμηλής πυκνότητας, αδιάλυτα σε απορρυπαντικά, ονομάζονται caveolae, όταν περιέχουν και τη δομική πρωτεΐνη καβεολίνη (caveolin). Οι λιπιδικές σχεδίες μπορούν να χρησιμοποιούν ως κέντρα σηματοδότησης για το NO, το Ca<sup>2+</sup>, τους GPCRs ή για την είσοδο ιόντων. Μεσολαβούν επίσης στην εσωτερίκευση διαφόρων πρωτεϊνών, όπως της τοξίνης της χολέρας (βλ. σελ. 263-264, **Εικόνα 5.40**), των πρωτεϊνών με άγκυρες γλυκοσυλο-φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (GPI), κ.λπ. Η ενδοκύτωση, που προκαλείται από σχεδίες λιπιδίων με καβεολίνη, προάγει την ουβικουιλίνωση και την αποικοδόμηση των υποδοχέων TBRs και, συνεπώς, τη λήξη της σηματοδότησης.

Η σύνδεση των **E3 λιγασών τύπου WW-HECT (Homologous to the E6-accessory protein C-Terminus)**, Smurf1/2 (Smad ubiquitin regulatory factors), Nedd4-2 (ή Nedd4L) και WWP1, στους TBRs είναι απαραίτητη για την ουβικουιλίνωση των υποδοχέων, ενώ ο Smad7 λειτουργεί ως κρίσιμος προσαρμογέας. Ο Smad7 μέσω του μοτίβου PY της περιοχής linker συνδέεται με τις περιοχές WW2 / WW3 των E3 λιγασών και μέσω της περιοχής MH2 (L3 βρόχος και βασικός θύλακας) με τη φωσφορυλιωμένη περιοχή GS του TBRs, επάγοντας τη συναρμολόγηση του συμπλόκου TBRs-Smad7-E3 λιγάση, στο οποίο αμφότεροι οι TBRs και Smad7 ουβικουιλινώνονται και αποικοδομούνται (**Εικόνα 10.17**).

Η έκφραση του Smad7 ρυθμίζεται τόσο από τον TGF- $\beta$  όσο και από την BMP, που αυξάνουν τα επίπεδα του Smad7, ιδιαίτερα στον πυρήνα, όπου εντοπίζεται κατά προτίμηση. Η Smurf2 βρίσκεται και αυτή στον πυρήνα στην κατάσταση ηρεμίας και έτσι η αύξηση των επιπέδων του Smad7 έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του Smad7 με την Smurf2. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Smad7/ Smurf2 εξέρχεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου στρατολογείται στο σύμπλεγμα των ενεργοποιημένων υποδοχέων TBRs στα caveosomes. Μόλις ο Smad7 συνδεθεί στον TBRs, η Smurf2 ουβικουιλινώνει τον Smad7 και τους TBRs, οδηγώντας τους στα πρωτεασώματα για αποικοδόμηση. Ο TSC-22 (TGF- $\beta$ -Stimulated Clone 22), ένας Leucine-zipper μεταγραφικός παράγοντας, η μεταγραφή του οποίου επάγεται από τον TGF- $\beta$ , μπορεί να διαταράξει τη σύνδεση των Smad7/ Smurf2 με τον TBRs και, συνεπώς, να μειώσει την ουβικουιλίνωση και την αποικοδόμηση του υποδοχέα, οδηγώντας σε αυξημένη σηματοδότηση TGF- $\beta$ , μέσω θετικής ανατροφοδότησης.

Η **πρωτεΐνη προσαρμογής PICK1** (Protein that Interacts with C Kinase 1) αποτελείται από μια περιοχή PDZ και μια περιοχή BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), και οφείλει την ονομασία της στην ικανότητα σύνδεσής της με την PKCa, μέσω της PDZ περιοχής της. Αντίθετα με την c-Cbl, προωθεί τον εντοπισμό των TBRs στις λιπιδικές σχεδίες πλούσιες σε καβεολίνη και την ενδοκύτωσή τους. Αλληλεπιδρά άμεσα με το COOH-τελικό άκρο των TBRs, μέσω της PDZ περιοχής της και δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς προωθώντας την αλληλεπίδραση TBRs και caveolin-1 (**Εικόνα 10.17**). Ο εντοπισμός των υποδοχέων TBRs στις λιπιδικές σχεδίες είναι, επίσης, κρίσιμος για την ενεργοποίηση των κινάσων MAPKs με τη μεσολάβηση του TGF- $\beta$ .

Η **Dapper2** εντοπίζεται στα όψιμα ενδοσώματα και επιταχύνει τη μεταφορά των ενδοκυτταρωμένων υποδοχέων από τα όψιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα, επιταχύνοντας την λυσοσωμική αποικοδόμηση των TBRs. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Η ανασταλτική επίδραση της Dapper2 στη σηματοδότηση Nodal δείχθηκε στην αναστολή της επαγωγής του μεσοδέρματος στο zebrafish και η λειτουργία του βρέθηκε στη συνέχεια να διατηρείται σε κύτταρα θηλαστικών.

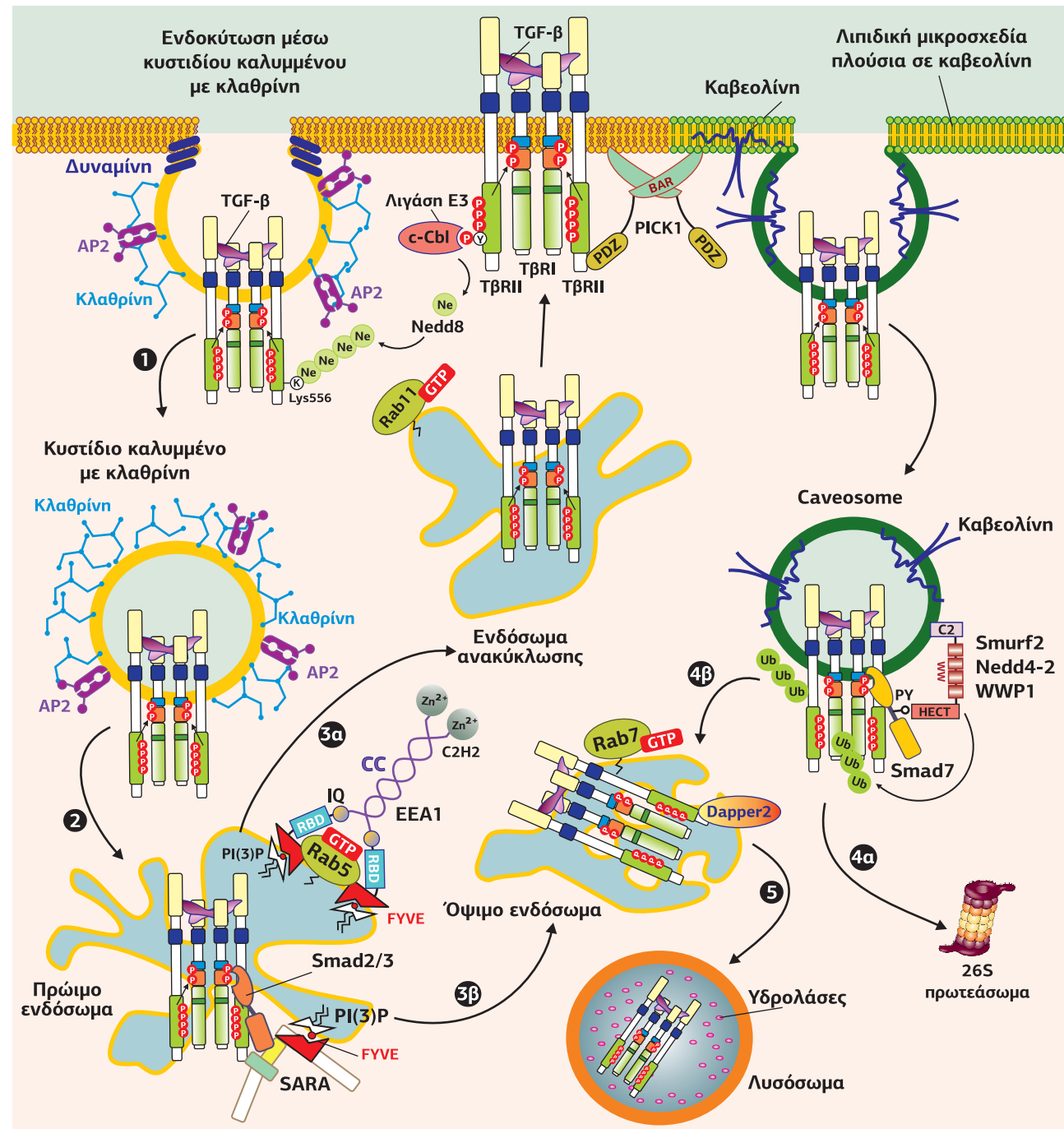
### Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων TBRs με άλλες πρωτεΐνες

Διάφορες αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών - TBRs έχουν βρεθεί να λειτουργούν ως θετικοί ή αρνητικοί ρυθμιστές του μονοπατιού που ενεργοποιείται από τον TGF- $\beta$ .

Οι E3 λιγάσες της ουβικουιλίνης τύπου WW-HECT, Smurf1/2, Nedd4-2 και WWP1, αποτελούνται από μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή C2 που τις συνδέει στα λιπίδια της μεμβράνης, τρεις περιοχές WW, που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες, και μια COOH-τελική περιοχή HECT, με δράση λιγάσης ουβικουιλίνης.

Θετική ρύθμιση

Η **SARA** (Smad Anchor Receptor Activation) ανακαλύφθηκε το 1998 ως μια πρωτεΐνη που συγκρατεί τους Smad2/3 στην πλασματική μεμβράνη, διευκολύνοντας την αλληλεπίδρασή τους με τον ενεργοποιημένο TβRI. Όταν οι Smad2/3



**Εικόνα 10.17**

**Ανακύκλωση των υποδοχέων.** Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον προσδέτη ξεκινάει η ενεργοποίηση του μονοπατιού, αλλά και η εσωτερίκευση του υποδοχέα μαζί με τον προσδέτη. Διακρίνονται δύο οδοί εσωτερίκευσης των υποδοχέων TGF-β. Η εξαρτώμενη από κλαθρίνη εσωτερίκευση σε πρώιμα ενδοσώματα που περιέχουν την SARA, η οποία προάγει τη σηματοδότηση των Smads, και η εσωτερίκευση των υποδοχέων που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδιές της μεμβράνης, πλούσιες σε καβεολίνη, όπου συνδέονται μέσω του I-Smad Smad7 με τη λιγάση της ουβικουτίνης Smurf2, η οποία οδηγεί τους TβRs σε αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα μέσω πολυ-ουβικουτίνωσης. [11] [13] [29] [33] [43] [74] [85]

φωσφορυλιωθούν από τον TβRI στο μοτίβο SxS, διαχωρίζονται από τη SARA και δημιουργούν σύμπλοκο με τον Smad4. Ταυτόχρονα επάγεται και μια διαμόρφωση αυξημένης συγγένειας για τις nucleoporins επιτρέποντας την είσοδό τους στον πυρήνα.

Η SARA αποτελείται από μια περιοχική FYVE, που την στρατολογεί στα φωσφολιπίδια PI(3)P της μεμβράνης, μια περιοχική SBD (Smad Binding Domain), η οποία συνδέεται με τον υδρόφοβο διάδρομο της MH2 περιοχής των Smad2/3, και μια COOH-τελική περιοχική, η οποία συνδέεται με το σύμπλοκο TβRs.

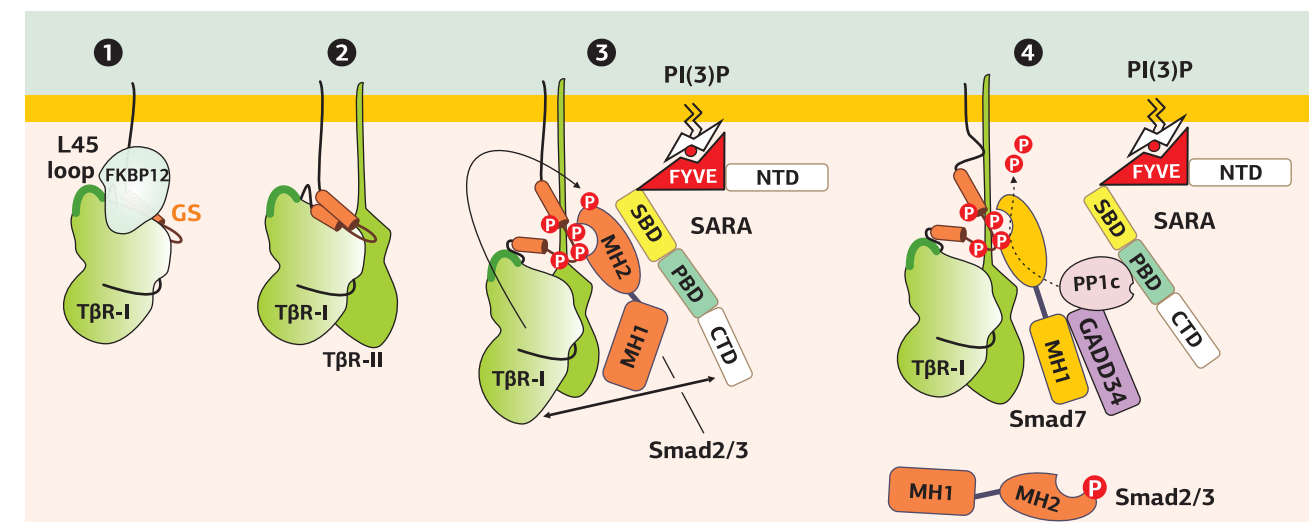
Αν και η SARA βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς TβRs, απαντάται συσσωρευμένη κυρίως στη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων μέσω σύνδεσης της περιοχής FYVE με τα PI(3)P, που είναι άφθονα στα πρώιμα ενδοσώματα (βλ. **Εικόνα 10.17**). Ο κυρίαρχος εντοπισμός της SARA στα πρώιμα ενδοσώματα εγείρει το ερώτημα εάν η φωσφορυλίωση των Smad2/3 συμβαίνει στην πλασματική μεμβράνη ή εάν η ενδοκύτωση των πρώιμων ενδοσωμάτων είναι απαραίτητη προϋπόθεση. Η τρέχουσα άποψη, όπως είδαμε και προηγουμένως, είναι ότι η εσωτερίκευση των TβRs, μέσω του μονοπατιού κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη και ενδοσωμάτων EEA1- και SARA-θετικών, προωθεί τη σηματοδότηση. Αντιθέτως, η εσωτερίκευση σε λιπιδικές σχεδιές καβεολίνης, όπου εντοπίζονται οι Smad7 και Smurf2, προάγει την αποικοδόμηση των υποδοχέων που εξαρτάται από την ουβικουτίνη. Έτσι, η διαίρεση μεταξύ αυτών των δύο οδών εσωτερίκευσης φαίνεται να είναι μια δυναμική και ισορροπημένη διαδικασία που επηρεάζει την έκβαση σηματοδότησης των ενεργοποιημένων υποδοχέων της οικογένειας TGF-β.

Η SARA όχι μόνο παρουσιάζει τους Smads στο σύμπλεγμα των ενεργοποιημένων TβRs για φωσφορυλίωση, αλλά συνδέεται και με την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) στο COOH-τελικό της άκρο μεσολαβώντας στην αποφωσφορυλίωση των TβRs. Ο Smad7 δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογής, καθώς αλληλεπιδρά με την GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage Protein), μία ρυθμιστική υπομονάδα του ολεονζύμου της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1), η οποία στη συνέχεια στρατολογεί την καταλυτική υπομονάδα PP1c, οδηγώντας προς αποφωσφορυλίωση του TβRI. Η SARA ενισχύει τη στρατολόγηση της PP1c στο σύμπλοκο Smad7/ GADD34 ελέγχοντας τον συγκεκριμένο υποκυτταρικό εντοπισμό της PP1c (**Εικόνα 10.18**).

Η **Dab2** (Disable-2) ανακαλύφθηκε το 1994 ως ένα γονίδιο που εκφράζεται σε καρκινικούς όγκους των ωοθηκών και ονομάστηκε DOC (Differentially expressed gene in human Ovarian Carcinoma). Το 1995 ανακαλύφθηκε σε μια κυτταρική σειρά μακροφάγων των τρωκτικών, ως μια πρωτεΐνη 96 kDa (p96) που φωσφορυλιώνεται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες (π.χ. CSF1). Ονομάστηκε Disable-2 (Dab2) λόγω της δομικής της ομολογίας με την πρωτεΐνη disabled της *Drosophila*.

**Εικόνα 10.18**  
**Ο ρόλος της SARA στη σηματοδότηση των TβRs.**

1. Ο TβRI στην κατάσταση ηρεμίας είναι ανενεργός καθώς έχει την περιοχική GS σφηνωμένη στον N-λοβό της κινάσης (βοηθούμενη να παραμείνει στη θέση της από την FKBP12). 2. Μετά τη σύνδεση του προσδέτη, ο TβRI αλληλεπιδρά με τον TβRII, αλλάζει διαμόρφωση η περιοχική GS και ο TβRI βρίσκεται σε μια ενδιάμεση κατάσταση, κατά την οποία επιτρέπεται η ταλάντωση μεταξύ της προσκολλημένης και εν μέρει της αποκολλημένης θέσης της GS. 3. Ο TβRI ενεργοποιείται μετά τη φωσφορυλίωση της περιοχής GS από τον TβRII. Η φωσφορυλιωμένη περιοχική GS, μαζί με τον βρόχο L45, σχηματίζει τη θέση πρόσδεσης των R-Smads, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται σε δύο Ser στο COOH-τελικό άκρο τους. Η SARA διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των R-Smads και του TβRI. 4. Μόλις φωσφορυλιωθεί, η R-Smad απομακρύνεται από τον υποδοχέα και στη θέση της συνδέεται η I-Smad (Smad7), η οποία στρατολογεί την GADD34, τη ρυθμιστική υπομονάδα της PP1. Ταυτόχρονα, η SARA, μέσω της PBD (Phosphatase BD) περιοχής της, συνδέεται με την καταλυτική υπομονάδα της φωσφατάσης PP1c. Η PP1c αποφωσφορυλιώνει τους TβRs και το σήμα σταματά. [67] [70]



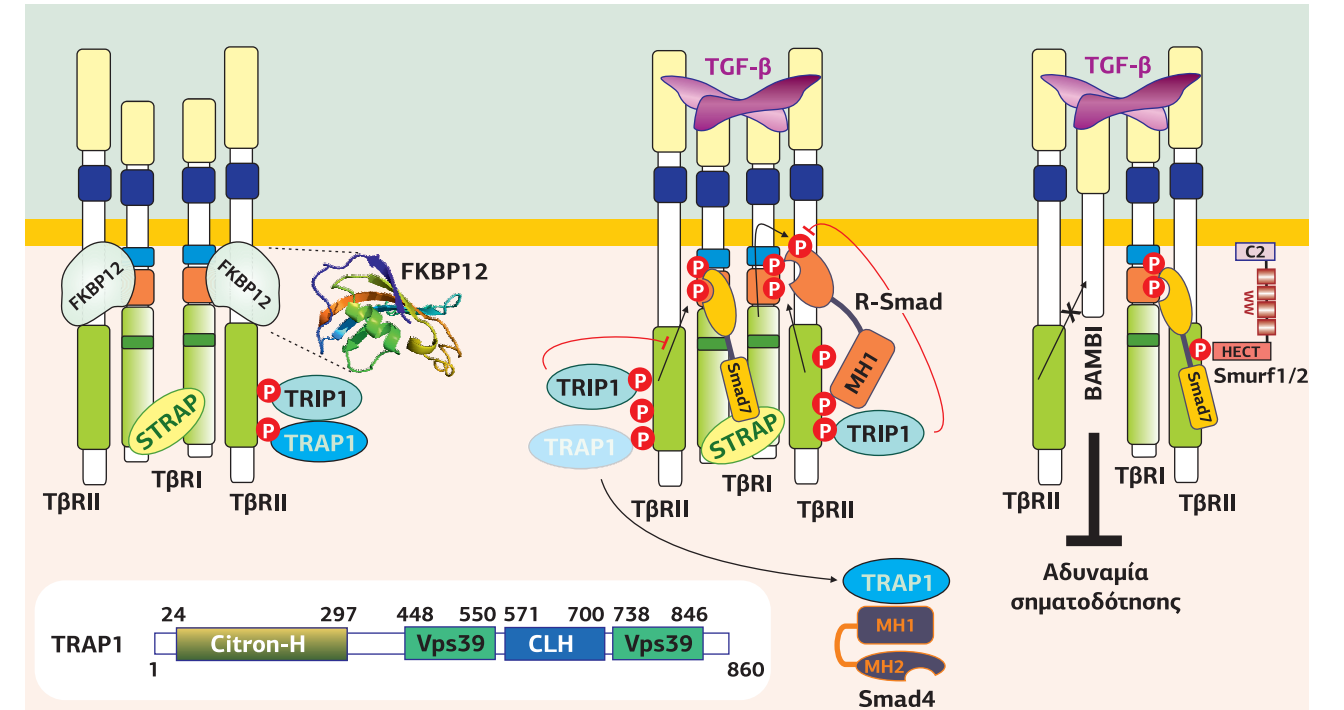
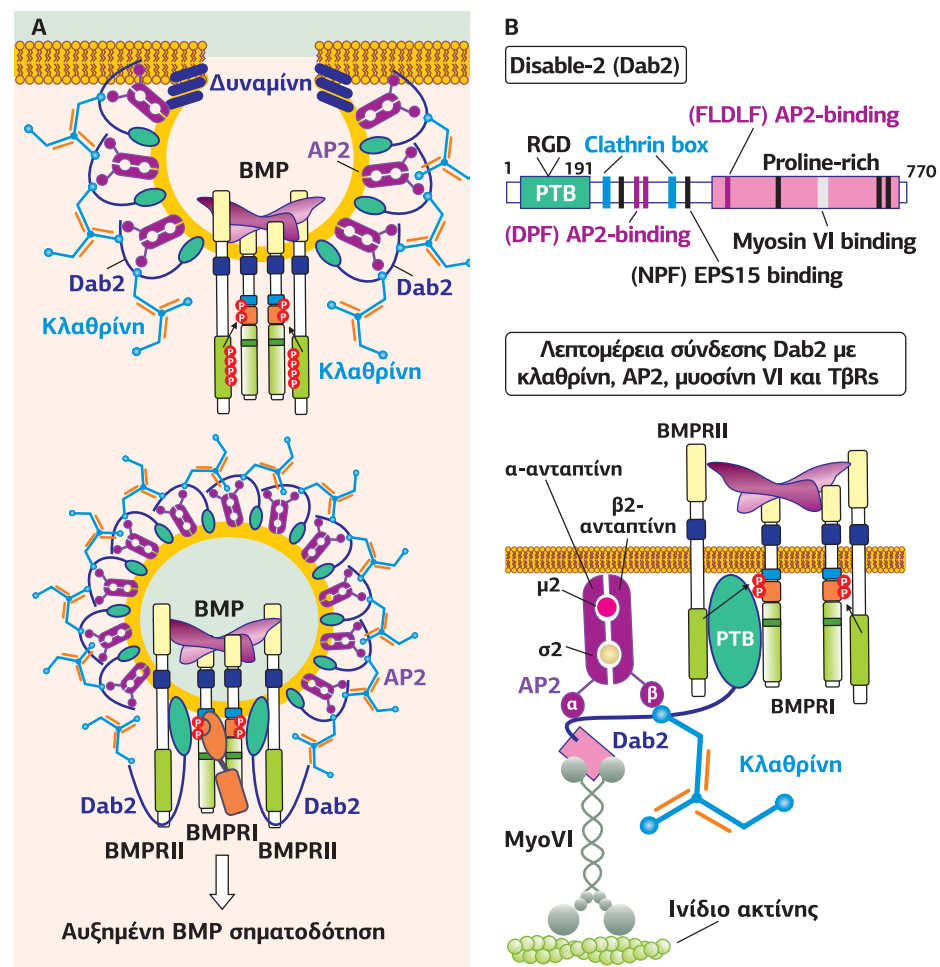
Το προϊόν του γονιδίου *dab* πρωτοανακαλύφθηκε να αλληλεπιδρά με την κινάση Tyr Abelson συμμετέχοντας στη δημιουργία αξονικών συνδέσεων στο εμβρυϊκό ΚΝΣ της *Drosophila*.

Τα μέλη της οικογένειας Dab μοιράζονται μια κοινή δομή: στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο τους περιέχουν μια περιοχή PTB και στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή πλούσια σε προλίνη.

Η Dab2 είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η οποία συσσωρεύεται στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2. Ο ρόλος της στη συγκρότηση των μορίων κλαθρίνης γύρω από τη μεμβράνη των κυστιδίων διευκολύνεται από την παρουσία α. πέντε μοτίβων NPF (Asn-Pro-Phe), που μεσολαβούν στη σύνδεση των πρωτεϊνών που περιέχουν EH-περιοχές (EPS15 Homology), π.χ. της EPS15 και της intersectin, β. δύο μοτίβων DPF (Asp-Pro-Phe) και ενός μοτίβου FLDLF, ικανών να συνδέουν την AP2 και τέλος γ. δύο κιβωτίων κλαθρίνης (clathrin box), που περιβάλλουν τις DPF περιοχές και συνδέουν τη βαριά αλυσίδα της κλαθρίνης. Η σταθερότητα του συμπλόκου ενισχύεται περαιτέρω με τη σύνδεση της COOH-τελικής πλούσιας σε προλίνη περιοχής με τη μυοσίνη VI, η οποία επίσης δεσμεύει τα PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> με τρόπο Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενο. Η Dab2 διευκολύνει την εσωτερίκευση διαμεμβρανικών υποδοχέων, καθώς το NH<sub>2</sub>-τελικό της άκρο περιλαμβάνει μια περιοχή σύνδεσης pTyr, **PTB**, ικανή να δεσμεύει μοτίβα [FY]xNPx[YF], τα οποία είναι κοινά σε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες - φορτία, και σε φωσφοϊνοσιτίδια PI(4,5)P<sub>2</sub> της μεμβράνης (Εικόνα 10.19).

Η Dab2 στα καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2 κυστίδια αλληλεπιδρά και με το σύμπλοκο των υποδοχέων TβRs, απουσία και παρουσία του TGF-β. Έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνει τη σηματοδότηση των BMPs δρώντας ως γέφυρα ανάμεσα στον BMPRI και τον BMPRII και βοηθώντας στην αλληλεπίδραση των R-Smads με τον BMPRI. Αν και η απουσία της Dab2 δεν επηρεάζει την εσωτερίκευση των BMPRs, έχει δραματική επίδραση στην ανακύκλωσή τους και στον εντοπισμό τους στα εν-

**Εικόνα 10.19**  
Ο ρόλος της Dab2 στην εσωτερίκευση των BMPRs και στη σηματοδότηση μέσω ενδοσωμάτων. Α. Η Dab2 είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η οποία συσσωρεύεται στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2. Διευκολύνει τη σηματοδότηση των BMPRs δρώντας ως γέφυρα ανάμεσα στον BMPRI και τον BMPRII, καθώς επίσης βοηθά στην αλληλεπίδραση BMPRI/R-Smads. Β. Το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της Dab2 περιλαμβάνει μια περιοχή PTB, δύο μοτίβα DPF (Asp-Pro-Phe) και πέντε μοτίβα NPF (Asn-Pro-Phe), τα οποία είναι ικανά να συνδέουν την AP2, την κλαθρίνη και την EPS15. Στο COOH-τελικό άκρο της Dab2 υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, που συνδέεται με τη μυοσίνη VI. [12] [59]



δοσώματα. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα Dab2 knockdown η ανακύκλωση των BMPRII διακόπτεται, ενώ ο εντοπισμός των BMPRII στα πρώιμα ενδοσώματα παρατείνεται.

Η **TRAP1** ή **TGFβRAP1** (TGF-β Receptor Associated Protein 1) αναγνωρίστηκε το 1998 στο σύστημα διαλογής δύο υβριδίων στον σακχαρομύκητα (yeast two-hybrid screen) ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με τον TβRI. Είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 96 kDa που περιέχει μια κεντρική περιοχή επαναλήψεων ομόλογων της κλαθρίνης CLH (Clathrin Homology) και μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή Citron Homology. Συνδέεται αποκλειστικά στους ανενεργούς υποδοχείς του TGF-β και της actinin και απελευθερώνεται αμέσως μετά την ενεργοποίησή τους. Επίσης, συνδέεται και με τον κοινό μεσολαβητή Smad4. Οι ενεργοποιημένοι R-Smads ανταγωνίζονται με την TRAP1 για τη σύνδεσή τους στον Smad4, υποδηλώνοντας μία παροδική σύνδεση μεταξύ TRAP1 και Smad4, υποθέτοντας ότι η TRAP1 παίζει τον ρόλο πρωτεΐνης συνοδού (chaperone) της Smad4. Συγκεκριμένα, μεταφέρει τον Smad4 στην περιοχή του συμπλόκου των TβRs, διευκολύνοντας τη μεταφορά του κοντά στους R-Smads (Εικόνα 10.20).

Η TRAP1 αποτελεί, επίσης, ένα συστατικό του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου σύνδεσης (tethering protein complex) CORVET, το οποίο συμμετέχει στη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων.

**Αρνητική ρύθμιση**

Αρνητική ρύθμιση στο μονοπάτι του TGF-β επιτυγχάνεται από πρωτεΐνες, όπως η FKBP12, ο ανασταλτικός μεταγραφικός παράγοντας Smad7, η STRAP (Serine/Threonine kinase Receptor-Associated Protein) ή από τις E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης Smurf1, Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factors).

Ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της δραστικότητας των υποδοχέων TβRI είναι η ανοσοφιλίνη **FKBP12** (FK506 binding protein 12 kDa). Η FKBP12 είναι μια 12 kDa, η οποία ανακαλύφθηκε το 1991 ως υποδοχέας για το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο FK506 - tacrolimus, το οποίο προκαλεί τα αποτελέσματά του αναστέλλοντας τη φωσφατάση καλσινευρίνη (βλ. σσ. 465-468). Παρόλο που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα T-λεμφοκύτταρα, η FKBP12 εμφανίζεται σε όλους τους ιστούς, με ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στον εγκέφαλο και έχει ποικίλες λειτουργίες, οι οποίες έχουν μόνο μερικώς χαρακτηριστεί. Η FKBP12 είναι μια υπομονάδα δύο

**Εικόνα 10.20**  
Αλληλεπίδραση των υποδοχέων του TGF-β με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Ένας αριθμός πρωτεϊνών, που έχουν είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στο σήμα που επάγεται από τον TGF-β, αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική περιοχή των υποδοχέων του TGF-β. Θετική επίδραση στη σηματοδότηση έχει η TRAP1, η οποία συνδέεται στο ανενεργό σύμπλοκο των TβRs. Μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων η TRAP1 απομακρύνεται και συνδέεται με τον Smad4. Αρνητική δράση έχουν οι πρωτεΐνες FKBP12, ο ανασταλτικός μεταγραφικός παράγοντας Smad7, η STRAP (Serine/Threonine kinase Receptor-Associated Protein) και οι E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης Smurf1, Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factors). Διακρίνεται επίσης η δομή της TRAP1, η οποία αποτελείται από μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή Citron Homology, μια κεντρική περιοχή επαναλήψεων ομόλογων της κλαθρίνης CLH (Clathrin Homology) και δύο περιοχές Vps39, χαρακτηριστικές των πρωτεϊνών που αποτελούν μέρος του συμπλόκου CORVET. [43]

ενδοκυτταρικών καναλιών  $Ca^{2+}$ , των υποδοχέων της  $IP_3$  και των υποδοχέων ρυανοδίνης (βλ. **Εικόνα 4.39** και **4.41**), ενώ αποτελεί επίσης τμήμα του ανενεργού υποδοχέα TβRI. Η FKBP12 αναστέλλει τη βασική σηματοδότηση αυτών των τριών υποδοχέων και είναι κρίσιμη για την επιβίωση, καθώς ποντίκια knockdown FKBP12 πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, εκδηλώνοντας πολλαπλές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής υπερτροφίας και της αυξημένης απελευθέρωσης  $Ca^{2+}$  μέσω του υποδοχέα της ρυανοδίνης. Η FKBP12 εμφανίζεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα κύτταρα και θεωρείται ότι ρυθμίζει θεμελιώδεις πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας.

Όπως είδαμε προηγουμένως, απουσία του προσδέτη, η FKBP12 είναι ισχυρά συνδεδεμένη με τον υποδοχέα TβRI και τον σταθεροποιεί σε μια διαμόρφωση, στην οποία είναι ανίκανος να φωσφορυλιωθεί από τον υποδοχέα TβRII. Όταν όμως ο TGF-β προσδεθεί στον TβRII, και ο TβRII φωσφορυλιώσει με τη σειρά του τον TβRI στην περιοχή GS, η FKBP12 απομακρύνεται και επομένως ο TβRI ενεργοποιείται (**Εικόνα 10.20** και βλ. **Εικόνα 10.10**).

Ο **Smad7** ανήκει στην οικογένεια των ανασταλτικών I-Smads, οι οποίοι διαφέρουν από τους άλλους Smads στην MH1 περιοχή, ενώ περιέχουν όμοια περιοχή MH2. Έτσι ο Smad7 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα TβRI στη θέση των R-Smads, αλλά δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί και να μεταδώσει το σήμα. Σε συνδυασμό με τον Smad7, η πρωτεΐνη **STRAP** (Serine-Threonine kinase Receptor-Associated Protein) αναστέλλει το σήμα αλληλεπιδρώντας με τους υποδοχείς TβRI, βοηθώντας τους να προσεγκύσουν τον Smad7 και, επιπλέον, σταθεροποιώντας τη διαμόρφωση υποδοχέων - Smad7 (**Εικόνα 10.20**). Τέλος, οι E3 λιγάσες **Smurf1** και **Smurf2** βρίσκονται συνδεδεμένες στον Smad7 και βοηθούν στην ουβικουίτινωση, ώστε να οδηγηθεί όλο το σύμπλοκο των ενεργοποιημένων υποδοχέων για αποικοδόμηση (βλ. **Εικόνα 10.17**).

Μία άλλη πρωτεΐνη, η οποία περιέχει WD επαναλήψεις και παίζει επίσης αρνητικό ρόλο στο μονοπάτι του TGF-β, αλλά το πώς ακριβώς δρα δεν είναι ακόμη γνωστό, είναι η **TRIP1** (TGF-β Receptor Interacting Protein). Η TRIP1 ανακαλύφθηκε το 1995 ως μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνεται από τους υποδοχείς TβRII σε κατάλοιπα Ser/Thr, υποστηρίζοντας ότι παίζει έναν ρόλο και στη σηματοδότηση του TGF-β. Το 1998 ανακαλύφθηκε ότι η TRIP1 εμποδίζει τη μεταγραφή του γονιδίου *PAI-1* (Plasminogen Activator Inhibitor-1), μέσω επίδρασης που ασκεί είτε στη δυνατότητα να ενεργοποιηθούν οι Smads είτε στη δυνατότητα να ενεργοποιηθεί ο υποδοχέας TβRI (**Εικόνα 10.20**).

Ο **BAMBI** (BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor) είναι ένας γενικός ανταγωνιστής της οικογένειας των TGF-β. Είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία δρα ως ψευδοϋποδοχέας καθώς απουσιάζει η ενδοκυτταρική περιοχή κίνησης και παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση μεταξύ υποδοχέων τύπου I και τύπου II της οικογένειας TGF-β. Επιπλέον του αποκλεισμού του σχηματισμού ετεροσυμπλόκων TβRs, ο BAMBI συνεργάζεται με τον Smad7, για να αναστέλλει τη σηματοδότηση του TGF-β. Σχηματίζοντας ένα τριμερές σύμπλεγμα με Smad7 και TβRI, αναστέλλει την αλληλεπίδραση μεταξύ TβRI και Smad2/3, παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των Smad2/3 (**Εικόνα 10.20**).

Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς άμεσα ή έμμεσα είναι οι TAB1, η SNX6 (Sorting Nexin 6) και η DAXX, οι οποίες όμως, όπως θα δούμε παρακάτω, συνδέονται με μη Smad μονοπάτια.

## 6. Μη-Smad σηματοδότηση του TGF-β

Εκτός από την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, στα οποία συμμετέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads, οι ενεργοποιημένοι TβRs σηματοδοτούν και μέσω άλλων τελεστών, για παράδειγμα, μέσω των κινασών MAPKs, συμπερι-

λαμβανομένων των ERK1/2, JNK και p38, της κίνησης IKK (IκB Kinase), της κίνησης των φωσφοϊνοσιτιδίων PI3K και κατά συνέπεια της Akt, και της οικογένειας των GTPασών Rho. Όλα αυτά τα μονοπάτια, στο πλαίσιο της σηματοδότησης της οικογένειας TGF-β, είναι γνωστά ως μη-Smad, μη κανονικά (non-canonical) μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία δρουν είτε ανεξάρτητα είτε σε συνδυασμό με Smads είτε συγκλίνουν σε Smads, με σκοπό να ενισχύσουν, να εξασθενίσουν ή να τροποποιήσουν τις κυτταρικές αποκρίσεις του TGF-β.

Τα μη-Smads σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιεί ο TGF-β είναι:

- Τα μονοπάτια των **MAP κινασών**: μέσω της GTPάσης Ras ενεργοποιεί το μονοπάτι των ERK1/2 και μέσω της TAK1 (MAPKK) ενεργοποιεί τα μονοπάτια JNK και p38 MAPK.
- Το μονοπάτι της κίνησης **ROCK**: μέσω της GTPάσης Rho ενεργοποιεί την ROCK, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κίνηση LIMK2. Η LIMK2 αναστέλλει την κοφιλίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη και οδηγεί στον αποπολυμερισμό της. Συνεπώς, ο TGF-β ευνοεί τον πολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού.
- Το μονοπάτι της **κίνησης PI3K** και μέσω της παραγωγής  $PIP_3$  το μονοπάτι της κίνησης Akt.

Μέσω της ενεργοποίησης της φωσφατάσης PP2A αναστέλλει την **κίνηση p70<sup>S6K</sup>**, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο.

### 6.1 | Ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση των MAPKs

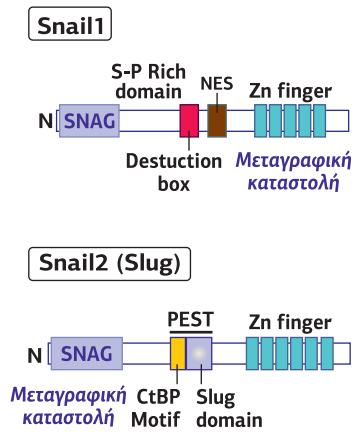
Ο TGF-β μέσω της GTPάσης Ras-GTP ενεργοποιεί το μονοπάτι της ERK1/2, μέσω της GTPάσης Rho-GTP ενεργοποιεί το μονοπάτι JNK, ενώ μέσω της κίνησης TAK1 (MAPKK) ενεργοποιεί το μονοπάτι p38.

#### Ενεργοποίηση της ERK1/2

Η αρχική ένδειξη ότι ο TGF-β μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της κίνησης ERK1/2 προήλθε από παρατηρήσεις που δείχνουν μια ταχεία ενεργοποίηση της Ras από τον TGF-β σε επιθηλιακά κύτταρα πνευμόνων αρουραίων. Η γρήγορη ανταλλαγή του GDP με GTP στη Ras σε απόκριση στον TGF-β οδηγεί στη στρατολόγηση στην πλασματική μεμβράνη και στην ενεργοποίηση της κίνησης Raf (μιας MAP3K) και, στη συνέχεια, των κινασών MEK1 και ERK1/2. Η κινητική της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 που επάγεται από τον TGF-β ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Σε ορισμένες κυτταρικές σειρές η απόκριση της ERK1/2 στον TGF-β είναι καθυστερημένη (συμβαίνει ώρες μετά τη χορήγηση του TGF-β), υποδεικνύοντας μια έμμεση απόκριση που απαιτεί μετάφραση πρωτεϊνών. Αντιθέτως, σε άλλους κυτταρικούς τύπους η ενεργοποίηση μπορεί να λάβει χώρα εντός 5-10 min μετά τη χορήγηση του TGF-β, χρονικό διάστημα συγκρίσιμο με αυτό της ενεργοποίησης της ERK από αυξητικούς παράγοντες, όπως ο EGF.

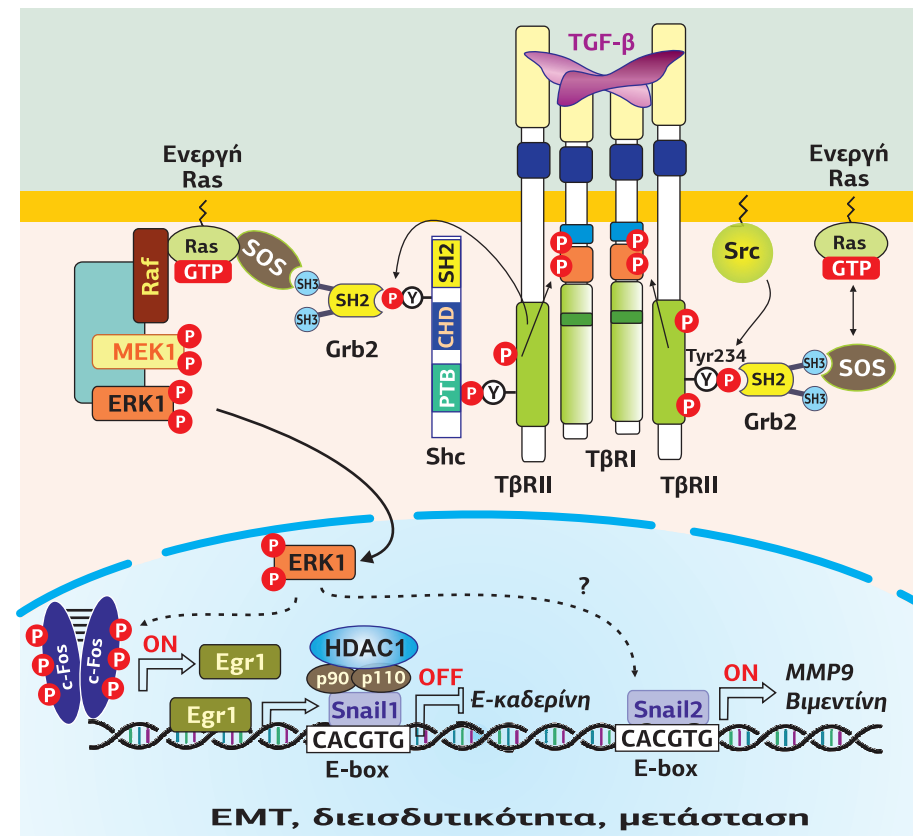
Αν και το Smad-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να οδηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, στην καθυστερημένη ενεργοποίηση της ERK1/2 από τον TGF-β, δεν εξηγεί τη γρήγορη ενεργοποίησή της. Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 8, στο μονοπάτι RTK/ Ras-GTP/ ERK1/2, η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στους RTKs επάγει τον διμερισμό και την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυτο- και trans-φωσφορυλίωση πολλαπλών καταλοίπων Tyr στην κυτταροπλασματική περιοχή του RTK. Μόλις φωσφορυλιωθούν, αυτές οι Tyr χρησιμεύουν ως θέσεις σύνδεσης για σηματοδοτικά μόρια με περιοχές SH2 ή PTB, όπως η Src και η Grb2. Η Grb2 είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής, η οποία σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται συνδεδεμένη με τον RasGEF SOS στο κυτταρόπλασμα. Μετά την ενεργοποίηση του RTK, το σύμπλεγμα Grb2/ SOS συνδέεται στον RTK, γεγονός

**Εικόνα 10.21**  
**Το non-Smad σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β που ενεργοποιεί την ERK.** Κατά τη σύνδεση του TGF-β στο σύμπλεγμα υποδοχών του, οι ιδιόσυστα ενεργοί TβRII φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς τύπου I σε κατάλοιπα Ser/Thr και, επιπλέον, προκαλούν φωσφορυλίωση καταλοίπων Tyr τόσο στους υποδοχείς τύπου I όσο και στον τύπο II και / ή στην πρωτεΐνη προσαρμογής Shc. Οι pTyr είναι ικανές να στρατολογήσουν το σύμπλοκο Grb2-SOS ή Shc/Grb2-SOS για να ενεργοποιήσουν την ERK1/2 μέσω Ras-GTP, Raf, και MEK. Η ERK1, στη συνέχεια, ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων (Snail1, Slug), επάγοντας την αναστολή της μεταγραφής της E-καδερίνης και την έκφραση των γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών MPPs. Πιο συγκεκριμένα, η ERK1 φωσφορυλιώνει τον c-fos, ο οποίος επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου Egr1. Στη συνέχεια, ο Egr1 επάγει τη μεταγραφή του Snail1, ενός μεταγραφικού καταστολέα, ο οποίος στρατολογεί συν-καταστολείς, όπως ο CUX1 (p90/p110), και την αποακετυλάση των ισονών HDAC1, καταστέλλοντας τη μεταγραφή του γονιδίου της E-καδερίνης. Με άγνωστο μηχανισμό η ERK1 ενεργοποιεί τον Snail2 (Slug), ο οποίος επάγει τη μεταγραφή των MMP9 και βιμεντίνης. Δεξιά διακρίνεται η δομή των Snail1 και Snail2. [18] [76] [83] [84]



που μεταφέρει τον SOS στην πλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιεί τη Ras διευκολύνοντας την ανταλλαγή του GDP για το GTP. Η Ras-GTP συνδέει τη Raf και ενεργοποιεί έναν καταρράκτη MAPKs, που περιλαμβάνει τις MEK1 και ERK1/2. Το σύμπλοκο Grb2/ SOS συνδέεται σε pTyr του RTK μέσω της περιοχής SH2 της Grb2 ή μέσω μιας άλλης πρωτεΐνης προσαρμογής, της Shc. Η Shc συνδέεται στον RTK και χρησιμεύει ως υπόστρωμά του. Στην pTyr της Shc συνδέεται το σύμπλοκο Grb2/ SOS, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/ Raf-MEK1-ERK1/2 (βλ. **Εικόνα 8.54**).

Αν και οι υποδοχείς TβRI και TβRII είναι καλά χαρακτηρισμένες κινάσες Ser/Thr, ο TβRII υφίσταται αυτοφωσφορυλίωση σε τρία κατάλοιπα τυροσίνης, την Tyr259, την Tyr336 και την Tyr424, αν και σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο από την αυτοφωσφορυλίωση σε κατάλοιπα Ser/Thr. Ο TβRII μπορεί, επίσης, να φωσφορυλιωθεί από την κινάση Src στην Tyr234, η οποία μπορεί να χρησιμεύσει ως θέση σύνδεσης των Grb2 και Shc, γεφυρώνοντας έτσι την ενεργοποίηση του TβRII με τις κινάσες MAPKs. Επιπλέον, και ο TβRI μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε Tyr έπειτα από διέγερση με TGF-β, είτε μέσω αυτοφωσφορυλίωσης είτε μέσω trans-φωσφορυλίωσης από τον TβRII, στρατολογώντας και αυτός το σύμπλοκο Shc/Grb2-SOS. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο Shc/Grb2-SOS είναι στη συνέχεια ικανό να ενεργοποιήσει τη Ras οδηγώντας σε διαδοχική ενεργοποίηση των c-Raf, MEK και ERK1/2 (**Εικόνα 10.21**). Οι δραστηριότητες κινάσης και των δύο τύπων υποδοχών, I και II, απαιτούνται για τη φωσφορυλίωση της Shc.



Ο ρόλος του μονοπατιού TGF-β / ERK στη μετάπτωση επιθηλίου σε μεσέγχυμα

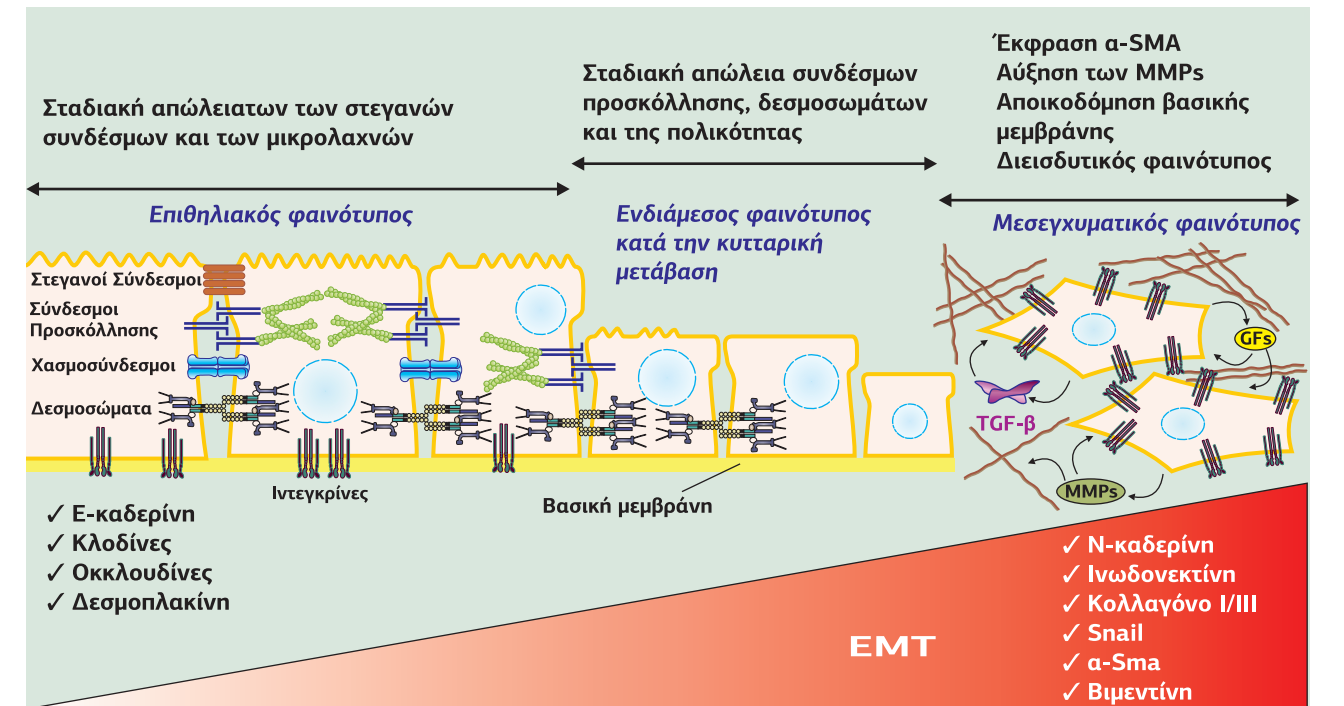
Η ενεργοποίηση της ERK1/2 είναι σημαντική για τη **μετάπτωση επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά** (EMT, Epithelial to Mesenchymal Transition), η οποία είναι μία από τις κύριες βιολογικές λειτουργίες του TGF-β.

Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν πολικότητα στα άκρα και διατηρούν στενές

διακυτταρικές συνδέσεις με τα γειτονικά τους κύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης CAMs (Cell Adhesion Molecules), ο σημαντικότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι η E-καδερίνη. Η ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων επιτελείται μέσω χασμοσυνδέσμων (gap junctions). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν διακλαδώσεις με αποφυάδες και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να διαπερνούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται από διακυτταρική επαφή, η οποία προκαλεί έκκριση ειδικών ενζύμων, που διασπούν τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εμφανίζουν χαλαρή οργάνωση μέσα στην τριδιάστατη εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τόσο τα επιθηλιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να αλλάζουν φαινότυπο και να μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά (EMT), όσο και τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε επιθηλιακά (MET).

Μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και σε καταστάσεις φλεγμονής και επούλωσης των ιστών. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από απώλεια των στεγανών συνδέσμων και των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης, καθώς και της κυτταρικής πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και από απόκτηση μεταναστευτικών και διεισδυτικών ιδιοτήτων. Παράλληλα, συμβαίνει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αλλαγή φαινότυπου, ο οποίος μοιάζει με αυτόν των ινοβλαστών και των μυοϊνοβλαστών (έκφραση α-SMA) (**Εικόνα 10.22**). Η EMT συμβάλλει στην αποκατάσταση και επούλωση της ιστικής βλάβης, αλλά μπορεί να οδηγήσει και σε υπερβολική συσσώρευση συνδετικού ιστού (ίνωση) ή σε καρκινική ανάπτυξη, ευνοώντας την πρόοδο του όγκου και τη μετάσταση.

**Εικόνα 10.22**  
 Τα γεγονότα τα οποία συμβαίνουν κατά τη μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα, η οποία είναι μία από τις κύριες βιολογικές λειτουργίες του TGF-β. Ο επιθηλιακός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη E-καδερίνης, κλοδίνης, σκκλουδίνης και δεσμοπλακίνης, ενώ ο μεσεγχυματικός από την N-καδερίνη, ινωδονεκτίνη, κολλαγόνο I/III, Snail, α-Sma και βιμεντίνη. [55]



Η ενεργοποίηση της ERK1 είναι απαραίτητη για την EMT που επάγεται από τον TGF-β. Η ERK1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα c-Fos, ο οποίος ενεργοποιεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Egr1 (Early growth response 1). Ο Egr1 επάγει στη συνέχεια τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον zinc-finger μεταγραφικό καταστολέα Snail1. Ο Snail1 (Snail1) με τη σειρά του καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της E-καδερίνης (η πρωτεΐνη των συνδέσμων κυτταρικής προσκόλλησης). Έχει, επίσης, δείξει ότι η ERK1 ενεργοποιεί με άγνωστο ακόμη μηχανισμό τον μεταγραφικό παράγοντα



Snail2 (παλαιότερη ονομασία Slug), ο οποίος εκτός από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της E-καδερίνης, ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών και της βιμεντίνης (**Εικόνα 10.21**). Επιπλέον, η ERK1 μπορεί να φωσφορυλιώσει τους Smad1/2/3, αναστέλλοντας τη δράση τους.

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων **Snail** αποτελείται από τον Snail1 (Snail), τον Snail2 (Slug) και τον Snail3 (Smuc), οι οποίοι μοιράζονται έναν εξελικτικά συντηρημένο ρόλο στον σχηματισμό του μεσοδέρματος στα σπονδυλωτά, καθώς επίσης και στη διαδικασία της μετάπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT). Ονομάστηκαν Snail επειδή τα πρώιμα έμβρυα της *Drosophila*, που φέρουν μια αρνητική θανατηφόρα μετάλλαξη του γονιδίου, μοιάζουν με σαλιγκάρια. Αποτελούνται από μια εξαιρετικά συντηρημένη COOH-τελική περιοχή, που περιέχει 4-6 Zn fingers (τύπου C2H2), τα οποία συνδέονται στο E2-box (CAGGTG) των εκκινητών διαφόρων γονιδίων με διαφορετική συγγένεια (Snail1>Snail2). Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή όλων των μελών της οικογένειας στα σπονδυλωτά περιέχουν την εξελικτικά διατηρημένη περιοχή SNAG (Snail/Gfi), η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική καταστολή. Οι Snail στρατολογούν απευθείας συμπλέγματα συνκαταστολέων, για παράδειγμα, αλληλεπιδρούν με το συν-κατασταλτικό σύμπλοκο CUX1 (p90/p110) και τις αποακετυλάσες ιστονών HDAC1 και HDAC2, για να καταστείλουν την έκφραση της E-καδερίνης. Το κεντρικό τμήμα των πρωτεϊνών Snail χαρακτηρίζεται από μια περιοχή πλούσια σε Ser/Pro, η οποία περιέχει θέσεις για φωσφορυλίωση και είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και την υποκυτταρική της θέση. Ο Snail2 περιέχει επιπλέον τη λεγόμενη περιοχή Slug, η λειτουργία της οποίας παραμένει ασαφής, και ένα CtBP binding motif, όπου συνδέεται ο συν-καταστολέας CtBP. Ο Snail1 περιέχει μια περιοχή NES και μια περιοχή DB (Destruction Box), που καθορίζει την ευαισθησία της πρωτεΐνης στην ουβικουιλίνωση και στην επακόλουθη πρωτεόλυση.

Οι Snail έχουν επιπλέον κυτταρικές λειτουργίες, οι οποίες μερικές φορές συμβαίνουν ανεξάρτητα από την επαγωγή του EMT. Προστατεύουν τα κύτταρα από τον θάνατο που προκαλείται είτε από την απώλεια παραγόντων επιβίωσης είτε από τα άμεσα αποπτωτικά ερεθίσματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ιδιότητες επιβίωσης εμφανίζονται ταυτόχρονα με την επαγωγή του EMT, ενώ σε άλλες απαιτείται αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο και η επιμονή του επιθηλιακού φαινοτύπου.

### Η ενεργοποίηση των JNK και p38

Ίσως το καλύτερα χαρακτηρισμένο μη-Smad μονοπάτι είναι αυτό των κινασών JNK και p38 MAPK. Ο TGF-β μπορεί να ενεργοποιήσει γρήγορα την JNK και την p38, σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ανεξάρτητα από τους Smads, καθώς απουσία Smad3 ή Smad4 από τα κύτταρα δεν αναστέλλει την ενεργοποίηση. Επίσης, ένας μεταλλαγμένος υποδοχέας TβRI με τροποποιημένο βρόχο L45, ανίκανος να συνδέσει και να ενεργοποιήσει τους R-Smads, αλλά με άθικτη τη δραστικότητα κινάσης, είναι ακόμα ικανός να μεσολαβεί στην επαγόμενη από TGF-β ενεργοποίηση των JNK και p38 MAPK.

Οι κινάσες JNK και p38 είναι οι τελευταίες στο μονοπάτι των MAPKs. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει:

- ως MAP3K κυρίως την κινάση TAK1, ενώ έχουν προταθεί και δύο άλλες MAP3Ks, η MEKK1 και η MLK3,
- ως MAP2Ks την MKK4 (που ενεργοποιεί την JNK) και την MKK3/6 (που ενεργοποιεί την p38).

### Η κινάση TAK1 και ο τρόπος ενεργοποίησής της

Η κινάση **TAK1** (TGF-β - Activated Kinase 1) ή MKKK7 ή MAP3K7 ταυτοποιήθηκε το 1995 από τον Kunihiko Matsumoto (Department of Molecular Biology, Nagoya University, Japan) με βάση την ικανότητα ενός cDNA ποντικού να μπορεί υποκαταστήσει μια ανενεργή MAP3K του *Saccharomyces cerevisiae* σε απόκριση φερομονών. Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε ως μια MAP3K, η οποία

ενεργοποιείται από τον TGF-β και την BMP. Μια δεκαετία αργότερα η TAK1 έγινε ευρέως γνωστή ως ένας βασικός παράγοντας στη σηματοδότηση προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως η IL-1, ο TNF-α, οι προσδέτες των υποδοχέων Toll-like (TLR) και τα αντιγόνα που δεσμεύονται σε TcRs και BcRs.

Η TAK1 συνδέεται έμμεσα στους υποδοχείς TβRI, μέσω μιας πρωτεΐνης προσαρμογής, γνωστής ως παράγοντας **TRAF6** (TNF Receptor-Associated Factor 6). Ο TRAF6 αποτελείται από μια εξαιρετικά συντηρημένη COOH-τελική περιοχή TRAF και μια μεταβλητή NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή, η οποία περιέχει μια περιοχή E3 λιγάσης, RING, και πέντε Zn<sup>2+</sup> fingers. Ο TRAF6 συνδέεται με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς TβRI μέσω της περιοχής TRAF, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της E3 λιγάσης του και της επακόλουθης Lys63-πολυουβικουιλίνωσής του. Αντίθετα με την Lys48-πολυουβικουιλίνωση, η οποία φυσιολογικά στοχεύει τον TRAF6 για αποικοδόμηση, η Lys63-πολυουβικουιλίνωση καθιστά τον TRAF6 ικανό να δράσει ως σκαλωσιά, για να συναρμολογήσει πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεσολαβώντας στην ενεργοποίησή τους. Αν και η δραστικότητα κινάσης του TβRI δεν απαιτείται για αλληλεπίδραση με τον TRAF6, απαιτείται για την πολυουβικουιλίνωση του TRAF6 και την επαγόμενη αλληλεπίδραση με την κινάση TAK1.

Η TAK1, αφού συνδεθεί με τον TRAF6, Lys63-πολυουβικουιλινώνεται στη Lys158 και/ή στη Lys209. Η πολυουβικουιλινωμένη TAK1 συνδέεται με ειδικές πρωτεΐνες γνωστές ως **TABs** (TAK1-Binding Proteins 1, 2, και 3). Η TAK1 συνδέεται ιδιόσυστατα μέσω του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου της στην COOH-τελική περιοχή TAK-BD (TAK1 Binding Domain) της TAB1 και μέσω του COOH-τελικού άκρου της, έπειτα από εξωκυττάριο μήνυμα, με τις TAB2/3. Η περιοχή TAK-BD περιέχει α-έλικες που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση με την TAK1, παρά τη χαμηλή ομολογία αλληλουχίας. Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της TAK1 θεωρείται περιοχή αυτοαναστολής, καθώς η αποκοπή της οδηγεί σε ιδιόσυστατα ενεργή κινάση.

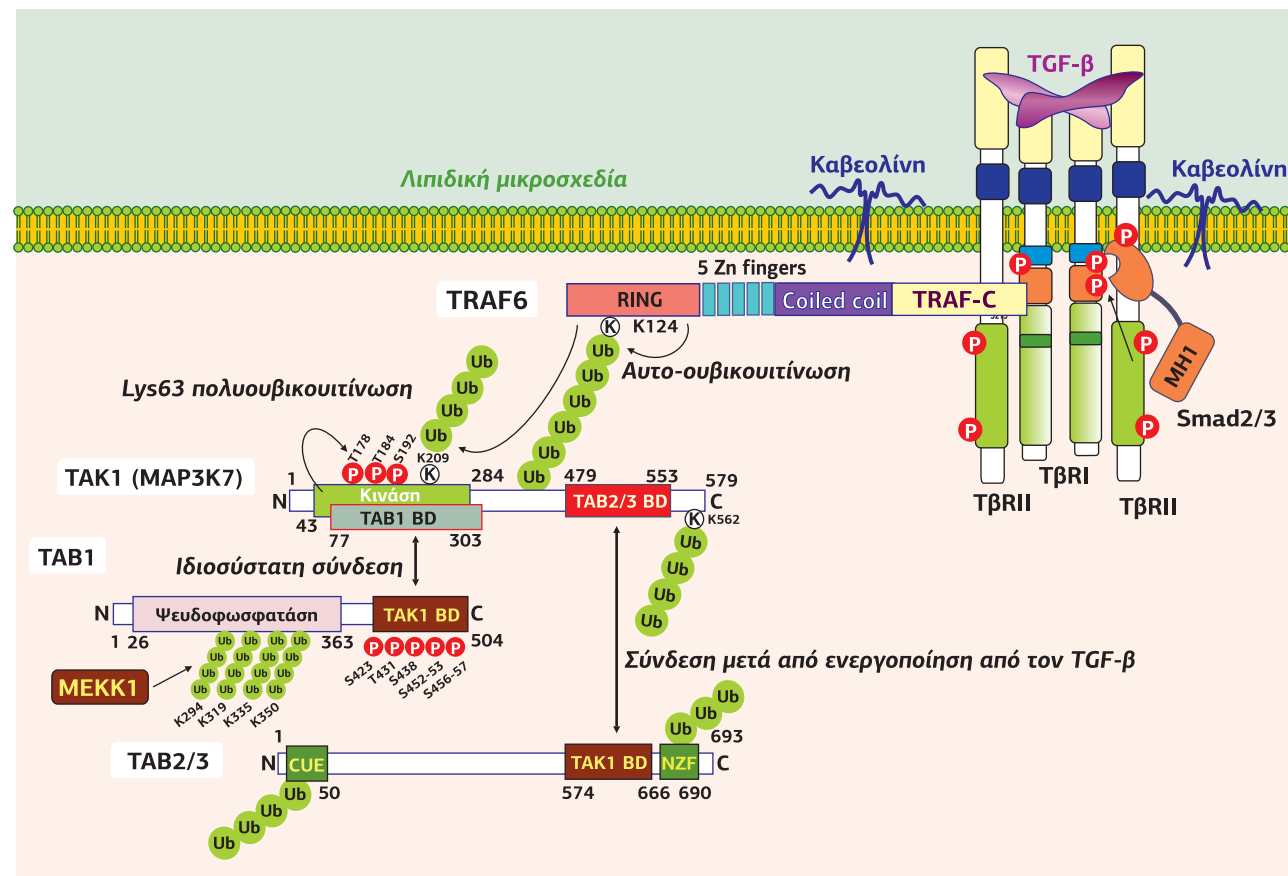
Οι TABs δεν αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς TβRs, αλλά είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της TAK1. Μετά τη δημιουργία του συμπλόκου TAK1-TAB1-TAB2 ή TAK1-TAB1-TAB3, η TAK1 αυτοφωσφορυλιώνεται στις Thr178, Thr184, Thr187 και Ser192 του βρόχου ενεργοποίησης. Η TAK1 αρχικά αυτοφωσφορυλιώνει την Ser192 και ακολουθεί η φωσφορυλίωση των Thr178, Thr187 και τελικά της Thr184. Ως αποτέλεσμα, ενεργοποιείται η δραστικότητα κινάσης της. Η αποφωσφορυλίωση της Thr187 μεσολαβείται από τη φωσφατάση PP2A κατά τη σηματοδότηση του TGF-β.

Οι TABs ρυθμίζονται και αυτές μέσω φωσφορυλίωσης. Στην περίπτωση της TAB1 φωσφορυλιώνονται οι Ser423, Thr431, Ser438, Ser452, Ser453, Ser456 και Ser457, αν και ο λειτουργικός ρόλος αυτών των φωσφορυλίωσεων στην ενεργοποίηση της TAK1 δεν έχει αποδειχθεί. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι η κινάση p38, μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης, απενεργοποιεί την TAK1 φωσφορυλιώνοντας τις Ser423 και Thr431 της TAB1. Η TAB1 περιέχει εκτός από την περιοχή TAK-BD και μια περιοχή ψευδοφωσφατάσης, δομικά ομόλογης με τη φωσφατάση 2C (PP2C), με τη διαφορά ότι απουσιάζει η δραστικότητα φωσφατάσης. Οι TAB2/3 περιέχουν δύο περιοχές σύνδεσης της ουβικουιλίνης: στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο μια περιοχή CUE (Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation), και στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή NZF (Npl4 Zinc Finger).

Η TAB1 Lys63-πολυουβικουιλινώνεται από την κινάση MEKK1, η οποία έχει και δραστηριότητα E3 λιγάσης της ουβικουιλίνης, που μεσολαβείται από την περιοχή PHD (Plant Homeodomain) της. Ο TGF-β επάγει την MEKK1 PHD-μεσολαβούμενη πολυουβικουιλίνωση της TAB1 σε 4 κατάλοιπα, Lys294, Lys319, Lys335 και Lys350. Κύτταρα με μεταλλαγμένη TAB1, ανίκανη να πολυουβικουιλινωθεί, αδυνατούν να ενεργοποιήσουν την TAK1 και τις MAPKs JNK και p38, ως απόκριση στον TGF-β.

Η TAB1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά και με την E3 λιγάση της ουβικουιλίνης **XIAP** (X-linked Inhibitor of Apoptosis), η οποία μπορεί να συνδέσει την TAK1 με υποδοχείς των TGF-β / BMPs μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με τους TβRs

Οι πρωτεΐνες όταν σημανθούν με μια πολυουβικουιλινική αλυσίδα, στην οποία οι ουβικουιλίνες συνδέονται μεταξύ τους μέσω της Lys48-Gly76, μεταφέρονται στο 26S πρωτεάσωμα, ενώ όταν σημανθούν με μια πολυουβικουιλινική αλυσίδα, στην οποία οι ουβικουιλίνες συνδέονται μεταξύ τους μέσω Lys63-Gly76, ακολουθούν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (βλ. σελ. 43 και **Εικόνα 1.42**)



**Εικόνα 10.23**

**Η δομή και ο τρόπος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών TRAF6, TAK1 και TABs.** Η TRAF6 είναι μια E3 λιγάση της ουβικουτίνης που αποτελείται από μια συντηρημένη COOH-τελική περιοχή TRAF, η οποία συνδέεται με τους TβRI, και μια μεταβλητή NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή, η οποία περιέχει μια περιοχή E3 λιγάσης RING finger και πέντε Zn<sup>2+</sup> fingers. [35] Η TAK1 εκτός από την περιοχή κινάσης, περιέχει δύο περιοχές σύνδεσης των TABs (TAB1- και TAB2/3-Binding Domains). Οι TABs περιέχουν στο COOH-τελικό τους άκρο μια περιοχή σύνδεσης της TAK1 (TAK1-Binding Domain). Η TAB1 περιέχει επιπλέον μια περιοχή ψευδοφωσφατάσης, ενώ οι TAB2/3 περιέχουν δύο περιοχές σύνδεσης της ουβικουτίνης: στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο μια περιοχή CUE και στο COOH-τελικό μια περιοχή NZF. [27]

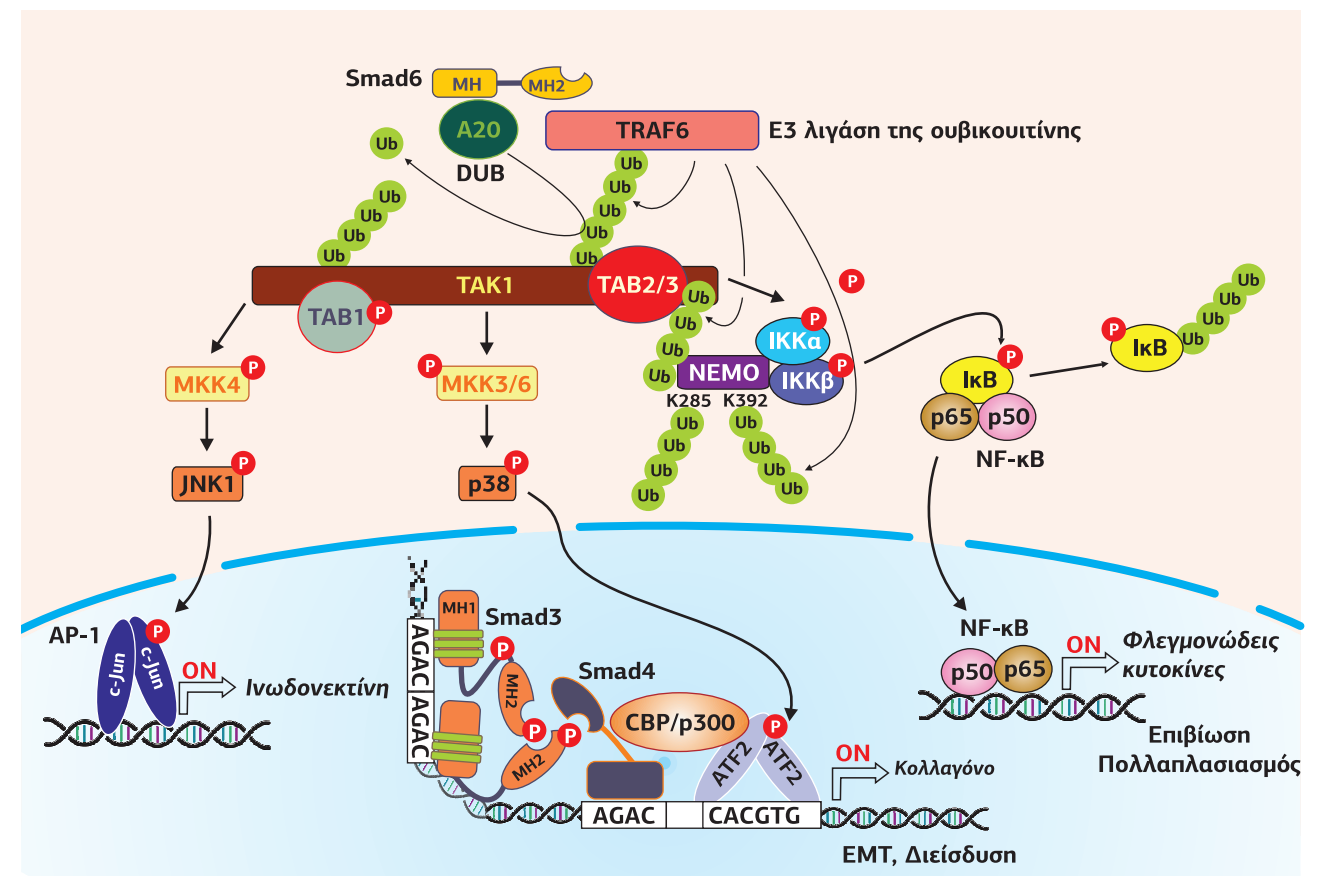
και με την TAB1. Η XIAP είναι απαραίτητη στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB. Αναστολή των υποδοχών της BMP και του TGF-β μειώνει την έκφραση της XIAP και της TAK1, οδηγώντας σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

**Τα μονοπάτια που ενεργοποιεί η TAK1**

Η TAK1 ενεργοποιεί τρία μονοπάτια: το μονοπάτι IKK (IκB kinase) / NF-κB (Nuclear Factor-κB) και τα μονοπάτια των MAPKs MKK4 - JNK1 και MKK3/6 - p38. Επίσης, ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία των Smads. Αλληλεπιδρά με την περιοχή MH2 των Smads, παρεμβαίνοντας δραματικά στην ενεργοποίηση των R-Smad και στην υποκυτταρική κατανομή τους. Επιπλέον, η TAK1 είναι ικανή να αναστείλει την ενεργοποίηση των R-Smads, αυξάνοντας την έκφραση της ανασταλτικής Smad7.

Τα μονοπάτια TRAF6, TAK1/TABs και JNK/ p38 μεσολαβούν στην κυτταρική επιβίωση, στη μετάπτωση επιθηλίου σε μεσέγχυμα (EMT) και στην επαγωγή του μεσοδέρματος που προκαλούνται από τον TGF-β/BMP.

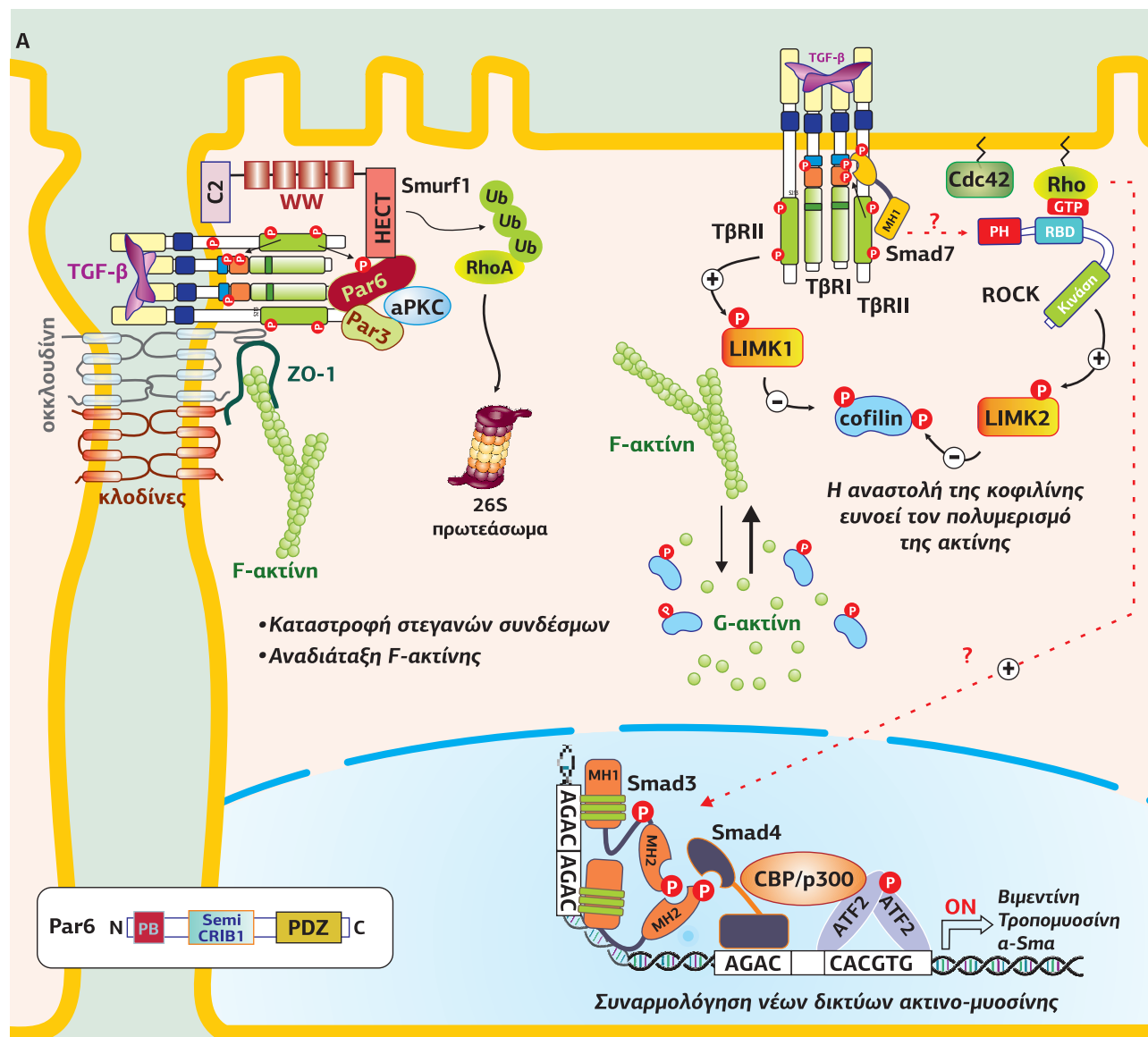
1. Ο TGF-β1 είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες. Η μείωση της έκφρασης της TAK1 ή η αναστολή της ενεργοποίησής της αυξάνει την κυτταρική απόπτωση που επάγεται από τον TGF-β1, επισημαίνοντας τον ρόλο της **TAK1 ως παράγοντα επιβίωσης κυττάρων**.
2. Αδυναμία έκφρασης του TRAF6 αναστέλλει την **EMT**. Επιπλέον, το μονοπάτι MKK3/6 - p38 MAPK ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα ATF2 και επάγει την έκφραση του κολλαγόνου τύπου I και IV, που συμμετέχει στην EMT. Παράλληλα, το μονοπάτι MKK4 - JNK1 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 και επάγει την έκφραση της ινωδονεκτίνης. Η παρεμπόδιση της δραστικότητας της p38 MAPK, χρησιμοποιώντας έναν αναστολέα



**Εικόνα 10.24**

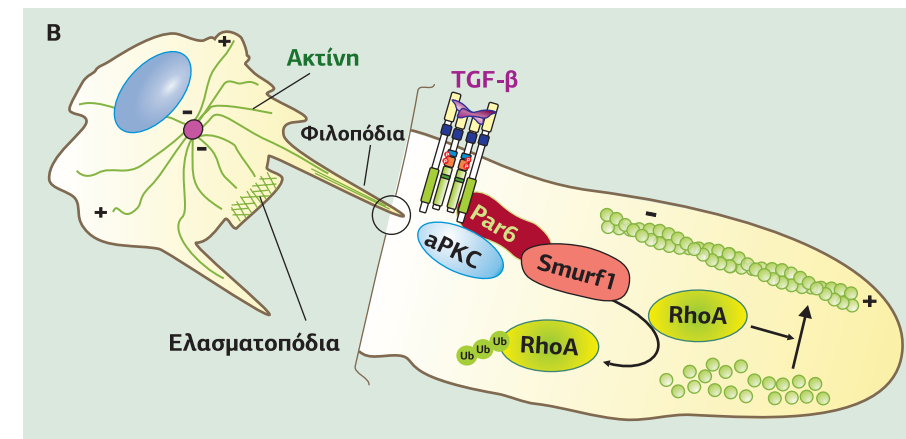
**Το non-Smad σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β που ενεργοποιεί την JNK και p38 MAPK.** Η ενεργοποιημένη TAK1 φωσφορυλιώνει τις κινάσες JNK1, p38 MAPK και IKK. Οι ενεργοποιημένες JNK1 και p38 MAPK στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν τους AP-1 και ATF2, ενώ η IKK φωσφορυλιώνει και απομακρύνει στα πρωτεασώματα τον αναστολέα του NF-κB, IκB. Ο NF-κB εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι AP-1 και ATF2 συνεργάζονται με ενεργοποιημένους Smads για την ενεργοποίηση της απόπτωσης και της EMT. Ο Smad6 αναστέλλει την επαγόμενη από TGF-β ενεργοποίηση των JNK1 και p38 MAPK με τη στρατολόγηση της αποουβικουτίνωσης A20 για την αποουβικουτίνωση της TRAF6. [10] [27] [34] [76] [83]

3. Η υπερβολική δραστικότητα του TGF-β1 οδηγεί σε καταστάσεις ίνωσης, αλλά, δεδομένης της πολυπλοκότητας και των πλειοτροπικών δράσεων του TGF-β1, οι θεραπείες που στοχεύουν σε αδιάκριτο αποκλεισμό των αποτελεσμάτων του TGF-β1 δεν είναι ιδανικές. Η στόχευση του μονοπατιού σηματοδότησης TAK1 είναι μια ελκυστική στρατηγική που στοχεύει τις κύριες προφλεγμονώδεις, προαποπτωτικές και προϊνώδεις οδούς, όπως η MKK3 - p38 MAPK και MKK4 - JNK, στη θεραπεία της νεφρικής ίνωσης. Αποτελέσματα της πρώτης κλινικής μελέτης φάσης I για τη θεραπεία της νεφροπάθειας με τη χρήση fresolimumab, ενός αντι-TGF-β μονοκλωνικού αντισώματος που εξουδετερώνει και τις τρεις ισομορφές του TGF-β, δείχνουν ότι το fresolimumab είναι σχετικά ασφαλές και καλά ανεκτό σε ασθενείς.
4. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Xenopus*, η TAK1 μεσολαβεί στην **επαγωγή του μεσοδέρματος** από την BMP. Τα έμβρυα με έλλειψη TAK1 εμφανίζουν ελαττώματα στο αγγειακό τους σύστημα, φαινότυπο με εντυπωσιακές ομοιότητες με εκείνες που παρουσιάζονται από loss-of-function μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα ALK1 ή την ενδογλίνη (υποδοχέα τύπου III).



Εικόνα 10.25

**Ο διπλός ρόλος των TGF-β και BMPs στη σηματοδότηση των GTPασών RhoA και Cdc42.** Οι υποδοχείς TβRs ενεργοποιούν μικρές GTPάσες όπως η Cdc42 και η RhoA ή RhoB με ακόμη άγνωστους μηχανισμούς (διακεκομμένο βέλος και ερωτηματικό), που περιλαμβάνουν τον Smad7, την Src και τον RhoGEF Van2. Στη συνέχεια, η RhoA-GTP ενεργοποιεί την κινάση ROCK1, η οποία ενεργοποιεί την LIMK2. Η LIMK2 δρα με παρόμοιο τρόπο όπως η LIMK1 (η οποία συνδέεται και ενεργοποιείται από τον υποδοχέα BMP-RII) στη ρύθμιση της δυναμικής της ακτίνης μέσω της κοφιλίνης: οι LIMKs φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν την κοφιλίνη, ευνοώντας τον πολυμερισμό της ακτίνης. Αφετέρου ο TGF-β έχει και έναν ρόλο, εστιασμένο στις θέσεις όπου βρίσκονται οι στεγανοί σύνδεσμοι των επιθηλιακών κυττάρων και τα φιλοπόδια, όπου βρίσκεται ο TβRII συνδεδεμένος με την οκκλουδίνη και την Par6. Η Par6 αποτελείται α. από μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή PB1 (Phox and Bem1 domain), η οποία αλληλεπιδρά με τον TβRI (απουσία προσδέτη) και την aPKC, β. από ένα semi-CRIB (Cdc42 and Rac interaction binding) μοτίβο, όπου συνδέονται οι Rho, και γ. μια COOH-τελική PDZ περιοχή, η οποία συνδέεται με την PDZ περιοχή της Par3. Η σύνδεση του TGF-β στον TβRI στρατολογεί τον υποδοχέα TβRII δημιουργώντας το ενεργοποιημένο σύμπλοκο TβRI/TβRII. Ο TβRII φωσφορυλιώνει την Par6, η οποία στρατολογεί τη λιγάση της ουβικουιτίνης Smurf. Η Smurf οδηγεί σε ουβικουιτινο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση της RhoA. Οι GTPάσες Rho διαδραματίζουν, επίσης, θετικό ρόλο στην προώθηση της σηματοδότησης Smads, η οποία ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Η σύνθεση της βιμεντίνης οδηγεί σε ένα νέο ενδιάμεσο ινώδη κυτταροσκελετό, η σύνθεση της α-SMA (α-smooth muscle actin) και της τροπομοσίνης συμβάλλει στη συναρμολόγηση των νέων δικτύων ακτινομυοσίνης που προάγουν την κυτταρική κινητικότητα. Η σύνθεση της μυοσίνης X συμβάλλει σε νέα δίκτυα ακτινομυοσίνης στα φιλοπόδια των κυττάρων που μεταναστεύουν. [40] [48] [49] [83]



## 6.2

## Ο TGF-β ρυθμίζει τη δράση των GTPασών της οικογένειας Rho

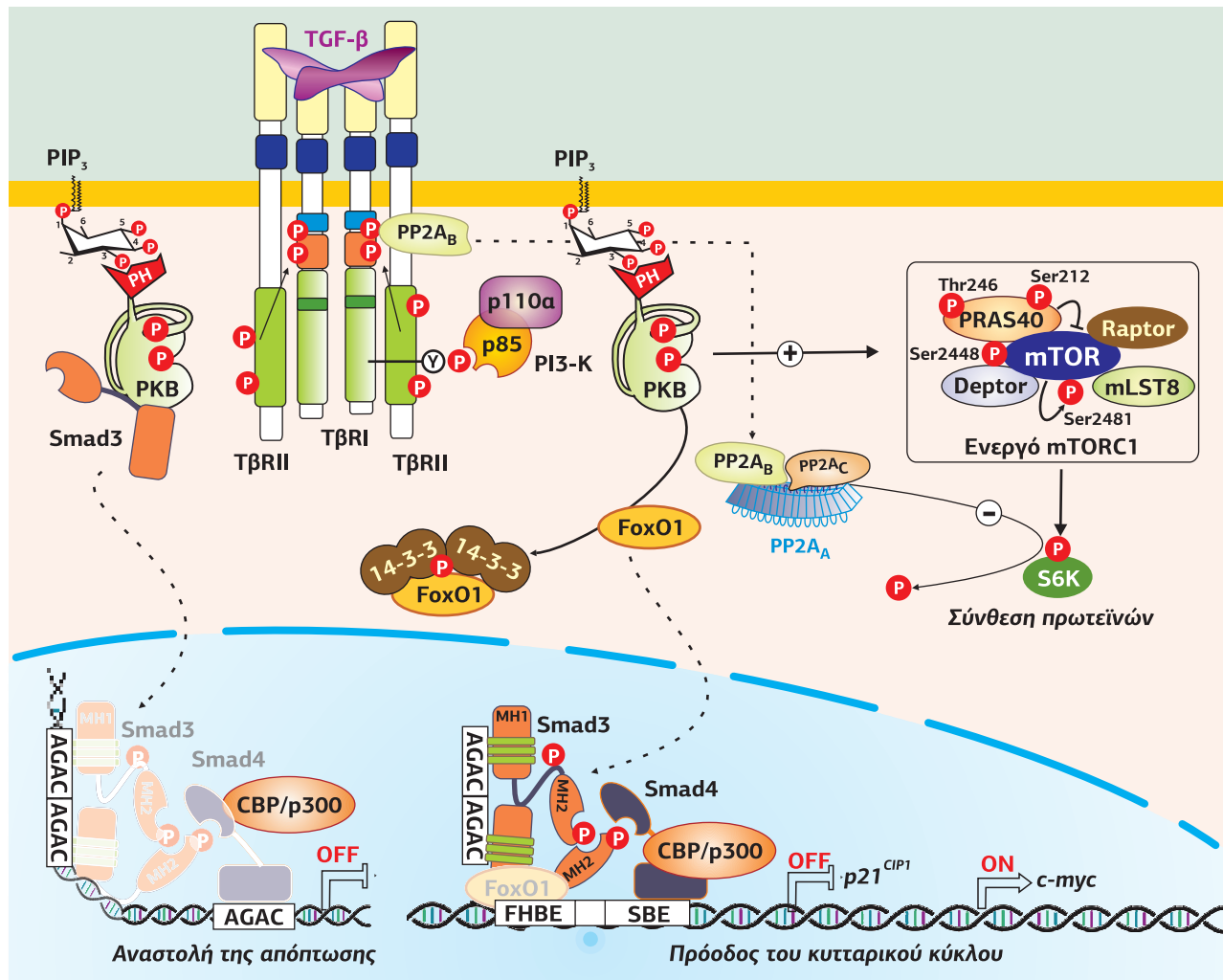
Οι GTPάσες Rho-like, συμπεριλαμβανομένων των RhoA, Rac και Cdc42, παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της οργάνωσης του κυτταροσκελετού, της κυτταρικής κινητικότητας και της γονιδιακής έκφρασης μέσω μιας ποικιλίας τελεστών. Όπως τα μονοπάτια των Smads και των MAPKs, και το μονοπάτι της RhoA συμμετέχει στην EMT που επάγεται από τον TGF-β. Ο TGF-β ενεργοποιεί γρήγορα τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την RhoA και επάγουν τον σχηματισμό ινιδίων πίεσης και των μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών στα επιθηλιακά κύτταρα. Η ταχεία ενεργοποίηση της RhoA είναι ανεξάρτητη από τους Smad2/3, όπως διαφαίνεται από το γεγονός ότι η απουσία Smad3 δεν αναστέλλει την ενεργοποίηση RhoA στα επιθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, σε ορισμένα κύτταρα παρατηρήθηκε μια καθυστερημένη ενεργοποίηση της RhoA, εξαρτώμενη από τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και ο RhoGEF Net1 (ARHGEF8), η μεταγραφή του οποίου συμβαίνει με τη μεσολάβηση των Smads.

Ο TGF-β ανάλογα με τη θέση των TβRs ενεργοποιεί ή αναστέλλει τις GTPάσες της οικογένειας Rho. Με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο των Smads, αλλά ακόμη όχι πλήρως κατανοητό, ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση της RhoA, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι της κινάσης **ROCK**. Η ROCK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση LIMK2. Η LIMK2 φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την κοφιλίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη και οδηγεί στον αποπολυμερισμό της. Η αναστολή της κοφιλίνης ευνοεί τον πολυμερισμό της ακτίνης.

Οι υποδοχείς TβRI εντοπίζονται στους στεγανούς συνδέσμους στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα, και σε κυτταρικές προεξοχές τύπου ελασματοπόδια και φιλοπόδια. Εκεί βρίσκονται συνδεδεμένοι με την οκκλουδίνη (occludin) και την Par6, μια πρωτεΐνη σκαλωσιά, μέλος του συμπλόκου κυτταρικής πολικότητας (cell polarity complex) που αποτελείται από την Par3 και την άτυπη aPKC και συμμετέχει στη συγκρότηση των στεγανών συνδέσμων. Η παρουσία του TGF-β στρατολογεί τον TβRII δημιουργώντας το ενεργοποιημένο σύμπλοκο TβRI/TβRII. Ο TβRII φωσφορυλιώνει τη Ser345 της Par6, η οποία στρατολογεί στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο υποδοχών την E3 λιγάση **Smurf1**. Η Smurf1, με τη σειρά της, ουβικουιτινώνει την RhoA στοχεύοντάς την για αποικοδόμηση. Μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης RhoA, ο TGF-β προάγει α. την καταστροφή των στεγανών συνδέσμων, προϋπόθεση για την EMT, και β. την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα φιλοπόδια προωθώντας τη μετανάστευση.

### 6.3 Ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt

Ο TGF-β μπορεί να ενεργοποιήσει γρήγορα την κινάση PI3K, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των Smad2/3. Ο υποδοχέας TβRII μπορεί να συνδεθεί ιδιόσυστατα με την p85, τη ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, ενώ η σύνδεση του υποδοχέα TβRI με την p85 απαιτεί τη διέγερση από τον TGF-β, όπως επίσης και η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/ Akt. Αναστολή της δραστηριότητας του TβRI εμποδίζει την ενεργοποίηση της Akt από την PI3K.



Εικόνα 10.26

**Η TGF-β επαγόμενη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/ Akt.** Ο TGF-β επάγει την ενεργοποίηση των κινασών PI3K και Akt μέσω αλληλεπίδρασης της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 του PI3K με τους υποδοχείς TβRs. Η ενεργοποιημένη Akt στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μετάφραση πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας την κινάση mTOR1, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση S6K. Ο TGF-β επάγει, επίσης, την ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC2, το οποίο συμβάλλει στην ενισχυμένη ενεργοποίηση της Akt και σχηματίζει έναν ενισχυτικό βρόχο ανατροφοδότησης στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/ Akt. Αυτές οι non-Smad μεσολαβούμενες μεταφραστικές αποκρίσεις συνεργάζονται με τις Smad μεταγραφικές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της EMT, αλλά μπορούν και να ανταγωνίζονται τις Smad μεσολαβούμενες μεταφραστικές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της διακοπής της ανάπτυξης ή της απόπτωσης. Η Akt μπορεί να ρυθμίζει τη δραστηριότητα του Smad3 είτε αποσύροντάς τον στο κυτταρόπλασμα είτε αναστέλλοντας την GSK3β-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση και αποικοδόμησή του. Η Akt μπορεί, επιπλέον, να ρυθμίζει την απόπτωση ή την EMT με απευθείας φωσφορυλίωση και αναστολή του FoxO ή της GSK3β (η οποία ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Snail). Τέλος, ο TGF-β μπορεί, επίσης, να αναστείλει την ανάπτυξη, ενεργοποιώντας τη φωσφατάση PP2A, η οποία αποφωσφορυλιώνει την ενεργοποιημένη S6K, εμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. [48] [83]

Το μονοπάτι PI3K/ Akt παίζει ρόλο στην TGF-β μεσολαβούμενη EMT και στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, διευκολύνοντας την κυτταρική μετανάστευση. Η Akt ενεργοποιεί την κινάση mTOR (mammalian Target of Rapamycin), η οποία είναι βασικός ρυθμιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης S6K και της πρωτεΐνης 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E - Binding Protein). Αν και η ραπαμικίνη (αναστολέας της mTOR) δεν επηρεάζει τις μορφολογικές μεταβολές που προκαλούνται από τον TGF-β, αναστέλλει την ενισχυμένη μετανάστευση που επάγεται από τον TGF-β.

Ένας δεύτερος ρόλος του μονοπατιού PI3K/ Akt είναι η αναστολή της TGF-β επαγόμενης απόπτωσης, μέσω των Smads. Αυτή η κυτταρική προστασία έχει προταθεί ότι προκύπτει από μια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της Akt και του Smad3. Η Akt μπορεί να συνδεθεί άμεσα με τον Smad3 αποτρέποντας τη φωσφορυλίωση και τον πυρηνικό εντοπισμό του τελευταίου, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεσολαβούμενης από τον Smad3 μεταγραφής των γονιδίων στόχων του.

Ένας τρίτος ρόλος του μονοπατιού PI3K/ Akt είναι η καταστολή της TGF-β επαγόμενης αναστολής της ανάπτυξης. Ο TGF-β είναι ένας πολύ γνωστός καταστολέας της ανάπτυξης, καθώς μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smad3, Smad4 και FoxO καταστέλλει την μεταγραφή του πρωτο-ογκογονιδίου *c-myc* και διεγείρει τη μεταγραφή των αναστολέων των CDKs της φάσης G1, *p15<sup>Ink4b</sup>* και/ή *p21<sup>Cip1</sup>*. Ο FoxO είναι στόχος της Akt, η οποία μέσω φωσφορυλίωσης αναστέλλει τον πυρηνικό εντοπισμό του. Κατά συνέπεια, το μονοπάτι PI3K/ Akt εμποδίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του FoxO εμποδίζει την TGF-β επαγόμενη αναστολή της ανάπτυξης.

Ωστόσο, έχει προταθεί και ένας δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο ο TGF-β αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Ενεργοποιεί την άμεση αλληλεπίδραση των υποδοχέων του με την υπομονάδα Ba της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A, με αποτέλεσμα τη συγκρότηση του ολεονζύμου PP2A (αποτελείται από 3 υπομονάδες: Ba, Aβ και Ca). Η φωσφατάση PP2A αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση *p70<sup>Rsk</sup>*. Η *p70<sup>Rsk</sup>* είναι μια κινάση Ser/Thr που επάγει τη μετάφραση των mRNAs και είναι απαραίτητη για την παραγωγή πρωτεϊνών (βλ. Εικόνα 7.63). Η αναστολή σταματά την κυτταρική ανάπτυξη.

Ο TGF-β αποδείχθηκε ότι ρυθμίζει και αρνητικά τη σηματοδότηση PI3K/ Akt, μέσω της Smad-εξαρτώμενης έκφρασης της λιπιδικής φωσφατάσης SHIP, η οποία ευθύνεται για την παροδική φύση της ενεργοποίησης της Akt από τον TGF-β.

Όλα τα συστατικά του κάθε non-Smad μονοπατιού δεν είναι ακόμη γνωστά, καθώς επίσης και η σημασία τους.

## 7. TGF-β, ένα παράδειγμα πλειοτροπικού παράγοντα

Η σηματοδότηση του TGF-β ελέγχει την ανάπτυξη των ιστών και τη μορφογένεση κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όπως η αγγειογένεση. Στους ώριμους ιστούς η σηματοδότηση του TGF-β εξασφαλίζει την ομοιοστασία των ιστών ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων, ανοσοκυττάρων και ινοβλαστών. Αυτή η προσεκτική ισορροπία διαταράσσεται σε μια ποικιλία ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η ίνωση, οι αυτοάνοσες ασθένειες και οι αγγειακές παθήσεις. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου, η τροποποιημένη σηματοδότηση του TGF-β ασκεί προ-αγγειογόνα αποτελέσματα και επάγει μετάπτωση των επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, ορισμένα καρκινικά κύτταρα αποδείχθηκε ότι έχασαν την ανταπόκρισή τους στην ανασταλτική δράση ανάπτυξης του TGF-β. Η βιολογική δράση του TGF-β μελετήθηκε καλύτερα κατά τη διάρκεια των διαδικασιών επούλωσης των ιστών και ανάπτυξης ασθενειών ίνωσης. Πράγματι, ο TGF-β1 θεωρείται η κεντρική προ-ινώδης κυτοκίνη, που μεσολαβεί στη φλεγμονώδη απόκριση, προκαλεί υπερβολική παραγωγή και αναδιοργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, αυξάνει τη σύνθεση αναστολέων των

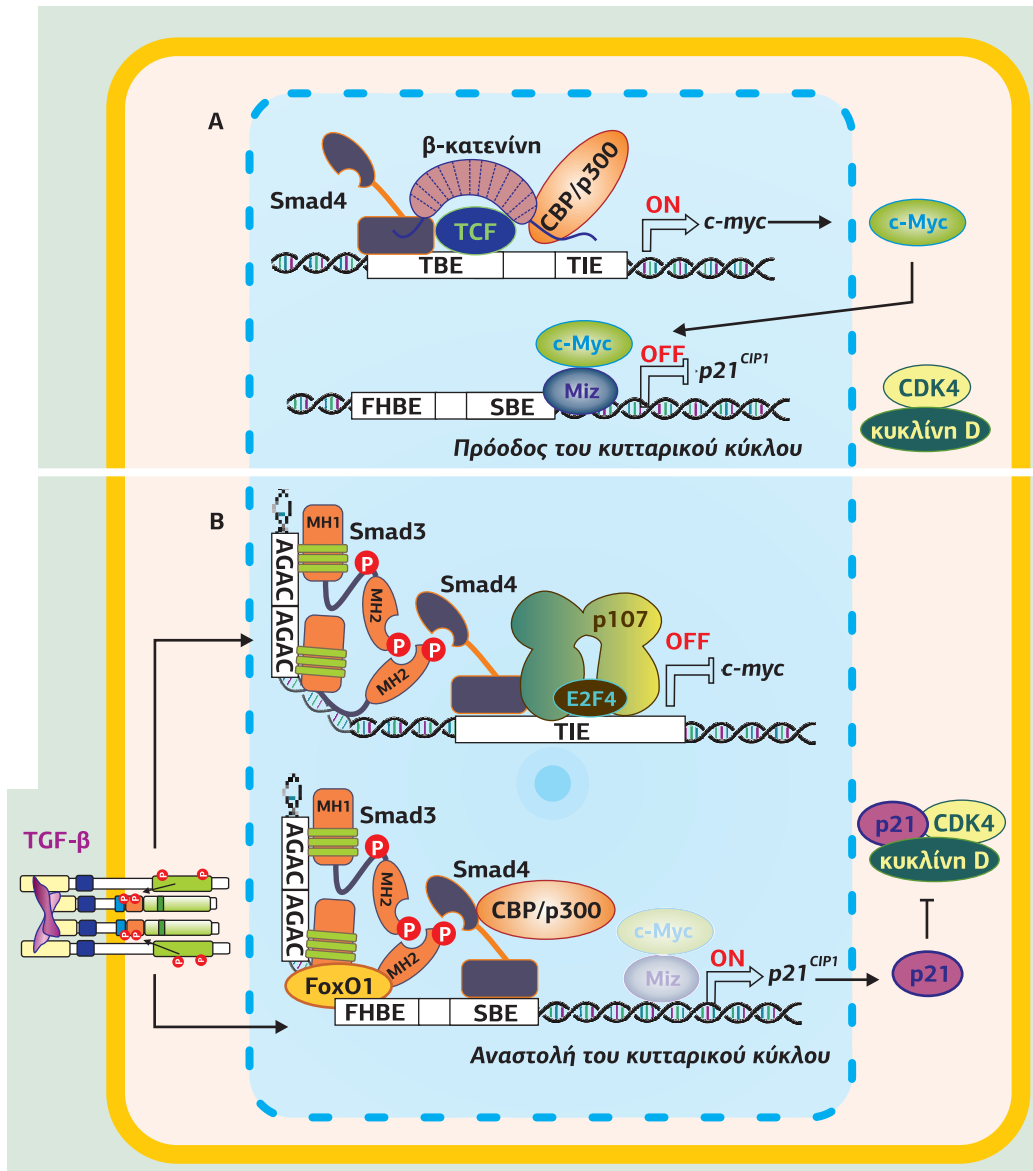
μεταλλοπρωτεϊνών, μειώνει τη σύνθεση πρωτεϊνών και προκαλεί τη μετάπτωση των ινοβλαστών σε συσταλτούς μυοϊνοβλάστες.

### 7.1 Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο TGF-β αναστέλλει την ανάπτυξη στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους (επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, αιμοποιητικά και γλοιακά κύτταρα) και αυτή η αναστολή είναι αναστρέψιμη μετά την απομάκρυνση του προσδέτη. Η ένταση της αντιπολλαπλασιαστικής απόκρισης στον TGF-β ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η αντιπολλαπλασιαστική δράση του TGF-β διαμεσολαβείται κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: αναστολή της έκφρασης μεσολαβητών που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό κυττάρων, όπως *c-myc* και *Cdc25*, και επαγωγή της έκφρασης των καταστολέων των CDKs (*p15<sup>Ink4b</sup>*, *p21<sup>Cip1</sup>/Waf1* και *p27<sup>Kip1</sup>*) (Εικόνα 10.27).

Ο υποκινητής του *c-Myc* περιέχει δύο TCF-Binding Elements (TBE), τα οποία συνδέουν τον μεταγραφικό παράγοντα TCF/LEF, την β-κατενίνη και τον *Smad4* ενεργοποιώντας τη γονιδιακή έκφραση. Ο υποκινητής του *c-myc* περιέχει, επίσης,

**Εικόνα 10.27**  
**Αναστολή του κυτταρικού κύκλου από τον TGF-β.**  
 Α. Η έκφραση του καταστολέα των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών *p21<sup>Cip1</sup>* αναστέλλεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες *c-Myc* και *Miz*, των οποίων η έκφραση επάγεται από το σύμπλοκο TCF, β-κατενίνης και *Smad4*.  
 Β. Ο TGF-β αναστρέφει την κατάσταση. Οι *Smad3/Smad4* συνδέονται στο TGFβ-ανασταλτικό στοιχείο στον υποκινητή του *c-myc*. Με τους *E2F4* (ή *F5*) και *p107* εμποδίζουν την έκφραση του *c-myc*. Η μεσολαβούμενη από *c-Myc/Miz* αναστολή παρακάμπτεται και ένα νέο μεταγραφικό σύμπλοκο, αποτελούμενο από τους *Smad3/Smad4*, *FoxO* και *p300*, οδηγεί στην έκφραση του *p21<sup>Cip1</sup>*. Μετά τη μετάφραση ο καταστολέας δεσμεύεται στην *CDK4*-κυκλίνη *D* και σταματά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.



μία εκφυλισμένη αλληλουχία πρόσδεσης Smads, το στοιχείο TIE (TGFβ-Inhibitory Element). Ως απόκριση στον TGF-β, το TIE συνδέει τους *Smad3* και *Smad4* σε συνδυασμό με τον *E2F4* (ή τον *E2F5*). Αυτό το σύμπλοκο στρατολογεί στη συνέχεια τον καταστολέα *p107*, ο οποίος οδηγεί σε δραστική αποσιώπηση του *c-myc*.

Ο υποκινητής των δύο καταστολέων του κυτταρικού κύκλου, *p21<sup>Cip1</sup>* και *p15<sup>Ink4b</sup>*, περιέχει ένα στοιχείο δέσμευσης του *c-Myc/Miz*, το οποίο καταστέλλει τη μεταγραφή τους. Συνεπώς, η αναστολή της έκφρασης του *c-myc*, ως απόκριση στον TGF-β, καταργεί αυτόν τον αρνητικό έλεγχο και αφήνει τον δρόμο ανοικτό στην ενεργοποίηση της μεταγραφής των δύο καταστολέων, μέσω των Smads. Αυτή η ενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω δύο στοιχείων του υποκινητή, του SBE, που δεσμεύει τους *Smad3* και *Smad4*, και του FHBE, που δεσμεύει τον μεταγραφικό παράγοντα *FoxO* (forkhead transcription factor). Οι Smads και ο *FoxO* στρατολογούν την αποακετυλάση των ιστονών *p300*, η οποία ανοίγει το δρόμο για την RNA πολυμεράση. Τα αυξημένα επίπεδα των *p21<sup>Cip1</sup>* και *p15<sup>Ink4b</sup>* στη συνέχεια εμποδίζουν τον κυτταρικό κύκλο μέσω σύνδεσης και αναστολής του συμπλόκου κυκλίνης *D* και κίνησης *CDK4*, το οποίο διευκολύνει την πρόοδο της φάσης *G1*.

Ωστόσο, όπως είδαμε και προηγουμένως υπάρχει και ένας τρίτος μηχανισμός με τον οποίο ο TGF-β αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη. Ενεργοποιεί την άμεση αλληλεπίδραση των υποδοχέων του με την υπομονάδα *Ba* της πρωτεϊνικής φωσφατάσης *2A*, με αποτέλεσμα τη συγκρότηση του ολοενζύμου *PP2A* (αποτελείται από 3 υπομονάδες, *Ba*, *Aβ* και *Ca*). Η φωσφατάση *PP2A* αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση *p70<sup>S6K</sup>*, της οποίας ο ρόλος είναι η επαγωγή της μετάφρασης των mRNAs και, συνεπώς, η παραγωγή πρωτεϊνών.

Σε αντίθεση με την αναστολή ανάπτυξης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ο TGF-β μπορεί να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων σε άλλους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των χονδροκυττάρων, των οστεοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων υπό ορισμένες συνθήκες. Τα αποτελέσματα συχνά εξαρτώνται από το περιβάλλον, καθώς ο TGF-β μπορεί να επάγει τόσο την ανάπτυξη όσο και την αναστολή της ανάπτυξης στα ίδια κύτταρα, ανάλογα με τις συνθήκες της κυτταροκαλλιέργειας. Έτσι, όχι μόνο διαφορετικοί τύποι κυττάρων αποκρίνονται διαφορετικά στον TGF-β, αλλά επίσης ο ίδιος τύπος κυττάρου μπορεί να εμφανίζει αντίθετες αποκρίσεις υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση πολλαπλασιασμού είναι λιγότερο καθορισμένοι από εκείνους που οδηγούν στην αναστολή του πολλαπλασιασμού.

### 7.2 Έλεγχος της κυτταρικής διαφοροποίησης

Ο TGF-β ελέγχει την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία διαφόρων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, των κυττάρων του αίματος και των νευρικών κυττάρων. Τα ποντίκια με έλλειψη TGF-β2 εμφανίζουν ελαττώματα στην καρδιά, στους πνεύμονες, στον νωτιαίο μυελό, στο μάτι και στο εσωτερικό αυτί, ενώ τα ποντίκια με έλλειψη TGF-β1 παρουσιάζουν ελαττωματικό φαινότυπο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, τα ποντίκια που έχουν έλλειψη στην έκφραση TGF-β2 και -β3 εμφανίζουν ελαττώματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

### 7.3 Έλεγχος της επούλωσης των πληγών

Η φυσιολογική επούλωση τραυμάτων είναι μια περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει μετανάστευση κυττάρων και φλεγμονή, πολλαπλασιασμό ινοβλαστών με εναπόθεση ECM και αναδιαμόρφωση του τραυματισμένου ιστού. Οι TGF-βs ρυθμί-

ζουν αυτά τα διαφορετικά στάδια επιδρώντας σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων και προάγοντας τη διαδικασία επούλωσης τραύματος *in vivo*.

Ο TGF-β1 εκφράζεται και ενεργοποιείται άμεσα σε απόκριση σε τραυματισμό. Τα αιμοπετάλια, τα οποία αμέσως μετά τον τραυματισμό διευκολύνουν την επούλωση της πληγής, αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες TGF-β1, που στη συνέχεια απελευθερώνεται στη θέση της πληγής. Στη συνέχεια, η TGF-β1 δρα ως ισχυρό χημειοπροσελκυστικό για μονοκύτταρα και ινοβλάστες, προσελκύοντας και τους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς στη θέση φλεγμονής και αποκατάστασης. Ο TGF-β1 είναι επίσης ένας ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης των κύριων πρωτεϊνών της ECM, όπως είναι η ινωδονεκτίνη και το κολλαγόνο, προάγοντας έτσι την απόθεση ECM στο σημείο της επούλωσης του τραύματος. Περαιτέρω, ο TGF-β1 αναστέλλει την αποικοδόμηση της ECM, καθώς καταστέλλει την έκφραση μεταλλοπρωτεασών και επάγει την έκφραση ενός αναστολέα της σύνθεσης των μεταλλοπρωτεασών.

Η καταστολή του επιθηλιακού φαινοτύπου σε απόκριση του TGF-β και η ταυτόχρονη επαγωγή μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών με αυξημένη κυτταρική κινητικότητα συμβάλλουν, επίσης, στην επούλωση των επιθηλιακών πληγών. Στη θέση της βλάβης, τα επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται μερική ή πλήρη EMT ως αποτέλεσμα της αυξημένης σηματοδότησης του TGF-β, προωθώντας επομένως την επιθηλιακή επανεμφάνιση και στη συνέχεια επαναποκτούν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο. Ο TGF-β συμβάλλει στην παραγωγή μυοϊνοβλαστών, επάγοντας την έκφραση της α-Sma ακτίνης, δείκτη των μυοϊνοβλαστών.

#### 7.4 Καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος

Ο TGF-β δρα ως ισχυρή ανοσοκατασταλτική κυτοκίνη, επιδρώντας τόσο στη διαφοροποίηση όσο και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για παράδειγμα, ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων και των θυμοκυττάρων και ο TGF-β2 απομονώθηκε ως παράγοντας καταστολής των T-λεμφοκυττάρων, προερχόμενος από γλοιοβλάστωμα (το γλοιοβλάστωμα συνοδεύεται από ανοσοκαταστολή). Ποντίκια με έλλειψη TGF-β1 ή ποντίκια με ένα κυρίαρχο αρνητικά μεταλλαγμένο υποδοχέα TβKII ή TβRI/ALK5 πεθαίνουν από νεογνική θανατηφόρο φλεγμονώδη νόσο.

#### 7.5 Αυξημένη σηματοδότηση του TGF-β οδηγεί σε ίνωση

Ο κεντρικός ρόλος του TGF-β στη δημιουργία ίνωσης αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1986, όταν υποδόρια έγχυση TGF-β1 φάνηκε να προκαλεί ινώδεις αλλοιώσεις στη θέση της ένεσης. Επιπλέον, αναστολείς ή ανταγωνιστές του μονοπατιού TGF-β/Smad προλαμβάνουν την ίνωση του ήπατος και των πνευμόνων σε ποντίκια. Οι προ-ινώδεις επιδράσεις του TGF-β περιλαμβάνουν έναν συνδυασμό μηχανισμών και κυτταρικών τύπων, όπως η ενισχυμένη διήθηση ή/και ο πολλαπλασιασμός προϋπαρχόντων ινοβλαστών, η δημιουργία μυοϊνοβλαστών, η αυξημένη σύνθεση ECM και η αναστολή κολλαγόλυσης, συνθήκες που είναι επίσης εμφανείς στην επούλωση πληγών.

#### 7.6 Ο διαφορετικός ρόλος του TGF-β στα διάφορα στάδια του καρκίνου

Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μια σειρά μεταλλάξεων σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία αποκρίνονται στον TGF-β. Μελέτες σε ένα σύνολο

ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυτταρικών σειρών έδειξαν ότι ο TGF-β λειτουργεί ως καταστολέας όγκων νωρίς στην καρκινογόνο διαδικασία, αλλά αλλάζει σε έναν προ-ογκογόνο παράγοντα στα μεταγενέστερα στάδια. Συγκεκριμένα, στην πιο επιθετική καρκινική γραμμή, η απώλεια της απόκρισης στον TGF-β δεν επηρεάζει την πρωτογενή ογκογένεση, αλλά καταστέλλει τη μετάσταση.

Ο TGF-β επάγει μια αντιπολλαπλασιαστική απόκριση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων τόσο των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων όσο και των καρκινικών κυττάρων, στα αρχικά στάδια του όγκου. Αρνητικές μεταλλάξεις και διαγραφές στο γονίδιο TβRII και Smad4 βρέθηκαν σε καρκίνους και πιστεύεται ότι οδηγούν στην ογκογένεση.

Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση TGF-β, συνήθως TGF-β1, όταν συγκρίνονται με τον φυσιολογικό περιβάλλοντα ιστό και εκκρίνουν TGF-β. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση TGF-β συσχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου, υποδεικνύοντας έναν ρόλο για τον TGF-β στα τελευταία στάδια. Η αυξημένη έκφραση TGF-β από κύτταρα όγκου προάγει την εξέλιξη του όγκου ενισχύοντας τη μετανάστευση, την εισβολή και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων κατά τη διάρκεια των μεταγενέστερων σταδίων ογκογένεσης, μέσω της διέγερσης της εναπόθεσης ECM και της ίνωσης του ιστού, της διατάραξης της ανοσολογικής και φλεγμονώδους λειτουργίας, διεγείροντας την αγγειογένεση και προωθώντας την EMT που οδηγεί σε αυξημένη μετανάστευση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Τα αιμοπετάλια που προσκολλώνται στα καρκινικά κύτταρα στην κυκλοφορία παρέχουν μια πρόσθετη πηγή TGF-β που ενισχύει τη μετάσταση *in vivo*.

Όπως απεικονίζεται με αυτές τις παρατηρήσεις, η σηματοδότηση του TGF-β ελέγχει τόσο την αρχική ανάπτυξη όγκων όσο και την πρόοδο του καρκίνου μιας μεγάλης ποικιλίας τύπων όγκου.

## 8. Το μονοπάτι των BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

Ο ρόλος των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs) παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1960 όταν ανακαλύφθηκε ότι μπορούσαν να προκαλέσουν έκτοπο σχηματισμό οστών. Ο Marshall R. Urist (1914-2001), χημικός και γιατρός ορθοπαιδικός, έδειξε για πρώτη φορά ότι απομεταλλωμένη θεμέλια ουσία των οστών (DBM, Demineralized Bone Matrix) όταν εμφυτεύεται εκτοπικά μέσα σε μυ ή κάτω από το δέρμα κουνελιών επάγει τη δημιουργία οστού, λόγω της ύπαρξης πρωτεϊνών, τις οποίες ονόμασε Bone Morphogenetic Proteins. Αυτή η ανακάλυψη δημοσιεύτηκε το 1965 στο περιοδικό *Science*. Ο Urist χρειάστηκε 30 χρόνια στην School of Medicine, University of California, Los Angeles, για να απομονώσει και να καθαρήσει τις BMPs, οι οποίες και κλωνοποιήθηκαν από τον John Wozney στις αρχές του 1990, αποδεικνύοντας ότι αποτελούν μέλη της οικογένειας του TGF-β. Έκτοτε, πολλές μελέτες απέδειξαν την ικανότητα των BMPs να επάγουν τη διαφοροποίηση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε οστά, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο τους στον σχηματισμό οστών και χόνδρων.

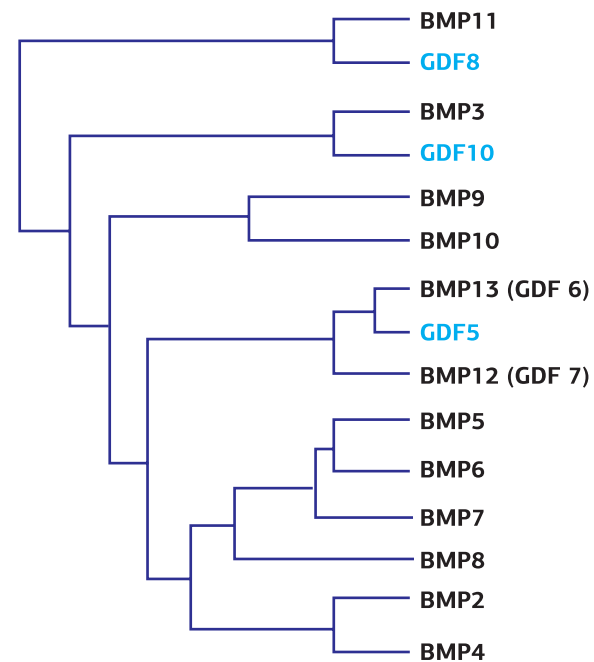
Αρχικά ανακαλύφθηκαν επτά BMPs, από τις οποίες οι έξι (BMP2 έως BMP7) ανήκουν στην οικογένεια TGF-β, ενώ η BMP1 είναι μια μεταλλοπρωτεάση. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί 13 επιπλέον BMPs, ανεβάζοντας τον συνολικό τους αριθμό σε 20 (Εικόνα 10.28).

Εκτός από τη δημιουργία οστών και χόνδρων, η σηματοδότηση των BMPs συμμετέχει:

- Στη δημιουργία μιας ποικιλίας εμβρυονικών δομών στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, όπως για παράδειγμα στην αρχική ανάπτυξη του Mullerian αγωγού, η οποία θα οδηγήσει στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα.
- Στον καθορισμό της εμπρόσθιας - οπίσθιας πολικότητας του εμβρύου (BMP10).

**Εικόνα 10.28**

**Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs) και ο ρόλος τους.** Η BMP1 είναι μια μεταλλοπρωτεάση που δρα στο προκολλαγόνο I, II, III και συμμετέχει στην ανάπτυξη των χόνδρων. Η BMP2 δρα ως ομοδιμερές και συμμετέχει στην ανάπτυξη των οστών και των χόνδρων, καθώς και στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η BMP3 επάγει τη δημιουργία των οστών. Η BMP4 ρυθμίζει τον σχηματισμό των δοντιών, των άκρων και των οστών από το μεσόδερμα, παίζει ρόλο στην αποκατάσταση κατάγματος, στον σχηματισμό της επιδερμίδας και του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα. Η BMP5 συμμετέχει στην ανάπτυξη των χόνδρων. Η BMP6 παίζει ρόλο στην ακεραιότητα των συνδέσμων στους ενήλικες. Η BMP7 συμμετέχει στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Η BMP8a συμμετέχει στην ανάπτυξη των οστών και των χόνδρων, ενώ η BMP8b εκφράζεται μόνο στον ιππόκαμπο. Η BMP10 παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση του ενδοκαρδίου. Η BMP11 ελέγχει την πρόσθια-οπίσθια πολικότητα του εμβρύου. Η BMP15 παίζει ρόλο στην ανάπτυξη ωοκυττάρων και ωοθυλακίων.

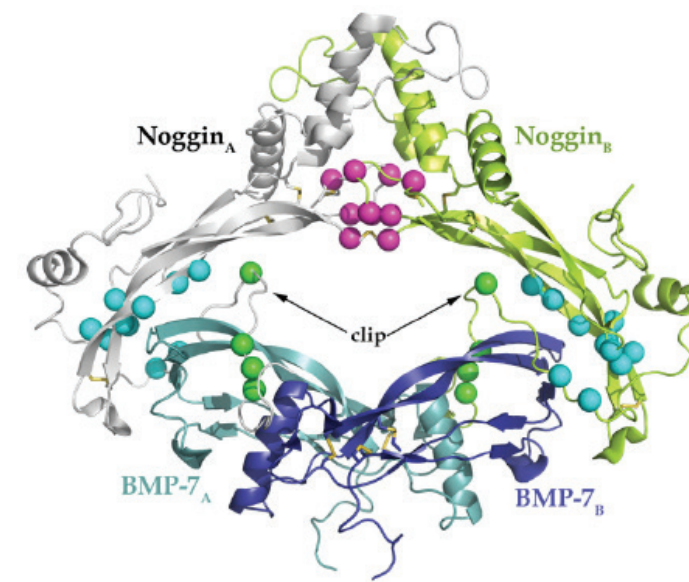


- Στη νευριδίωση και στην ανάπτυξη της νευρικής πλάκας: η BMP4 επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων του εξωδέρματος σε κύτταρα επιδερμίδας, ενώ η έκκριση των αναστολέων Noggin και Chordin από το υποκείμενο μεσόδερμα εμποδίζει τη δράση της BMP4, επιτρέποντας το εξώδερμα να συνεχίσει τη φυσιολογική του ανάπτυξη σε νευρικό ιστό.
- Συμμετέχει στον καθορισμό της εμπρόσθιας - οπίσθιας πολικότητας του πεπτικού σωλήνα και στη διαμόρφωση των εντερικών λαχνών, συμβάλλοντας στην αποτελεσματική απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών.
- Παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση του ενδοκαρδίου (BMP10).

## 8.1 Ωρίμανση των BMPs και σηματοδότηση

Οι BMPs συντίθενται από τους οστεοβλάστες ως ένα πρόδρομο μόριο 400-500 αμινοξέων, το οποίο στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει ένα πεπτίδιο σήματος και στο COOH-τελικό άκρο ένα μη συντηρημένο προπεπτίδιο. Η COOH-τελική ενεργή περιοχή του προπεπτιδίου αποκόβεται από μια furin-like convertase στη διβασική αλληλουχία Arg-x-x-Arg, απελευθερώνοντας το ώριμο μόριο, το οποίο διμερίζεται δημιουργώντας την ενεργή BMP. Η BMP έχει θέσεις για N- και O-γλυκοσυλίωση, η οποία αυξάνει τη σταθερότητα και τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης και επιπλέον καθορίζει την εξειδίκευση σύνδεσης στον υποδοχέα. Το ώριμο μόριο περιέχει 7 συντηρημένες Cys στο COOH-τελικό άκρο, από τις οποίες οι 6 συμμετέχουν στη δημιουργία του χαρακτηριστικού μοτίβου cystine knot.

Τα ώριμα ενεργά διμερή εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο. Σε αντίθεση με τον TGF-β, ο οποίος συνδέεται σε πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η δραστικότητα των BMPs ρυθμίζεται από διάφορες οικογένειες διαχεόμενων εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται με τις BMPs και παρεμποδίζουν την πρόσδεση στους υποδοχείς τους. Μερικοί από τους χαρακτηριστικότερους ανταγωνιστές είναι η Noggin, η Chordin, η οικογένεια των πρωτεϊνών DAN/Cerberus (και οι τρεις δρουν ως ανταγωνιστές των BMPs), και η Follistatin (ανταγωνιστής της activin και των BMPs). Παρόμοια με τους στόχους τους, όλοι οι ανταγωνιστές BMP έχουν ένα πεπτίδιο σήματος και θέσεις N-γλυκοσυλίωσης. Η συγκέντρωση

**Εικόνα 10.29**

**Αναστολή της BMP7 από την Noggin.** Τριδιάστατη αναπαράσταση του συμπλέγματος BMP7-Noggin. Η διμερής Noggin (γκρίζο και ανοιχτό πράσινο) αποτελείται από τρεις περιοχές: την περιοχή συνδέτη (clip domain) που βρίσκεται στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, τον COOH-τελικό δάκτυλο (finger domain) ή περιοχή β-πτυχτών φύλλων και μια περιοχή διμερισμού. Η Noggin συνδέεται με την BMP μέσω της περιοχής συνδέτη και της περιοχής δακτύλου και αποτρέπει αποτελεσματικά τη σύνδεση των υποδοχέων τύπου I και τύπου II, ανταγωνιζόμενη έτσι τη σηματοδότηση της BMP. Οι μεταλλάξεις της Noggin που εντοπίζονται σε ασθένειες σκελετικής δυσπλασίας εμφανίζονται ως σφαίρες. [17] [78]

και ο χρόνος τόσο της έκφρασης των BMPs όσο και των ανταγωνιστών τους είναι κρίσιμοι παράγοντες για τις φυσιολογικές αναπτυξιακές διεργασίες.

Το μονοπάτι των BMPs είναι παρόμοιο με το μονοπάτι των TGF-β, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί διαφορετικούς υπότυπους R-Smads. Στο μονοπάτι των BMPs οι R-Smads που ενεργοποιούνται είναι οι Smad1, Smad5, Smad8. Ο βρόχος L45 στην περιοχή κινάσης του TβRI καθορίζει την αλληλεπίδραση του TβRI με τους R-Smads: μέσα σε αυτόν τον βρόχο βρίσκονται αμινοξέα τα οποία διαφέρουν στους υποδοχείς των TGF-β και BMPs, με αποτέλεσμα να προσδίδουν εξειδίκευση σε ορισμένες ισομορφές των Smads και έτσι να διαχωρίζεται το μονοπάτι των BMPs και TGF-β.

Οι BMPs εκτός από το μονοπάτι των Smads ενεργοποιούν και non-Smad μονοπάτια των MAPK κινάσων: TAB/TAK1/ p38 και το μονοπάτι των ERK.

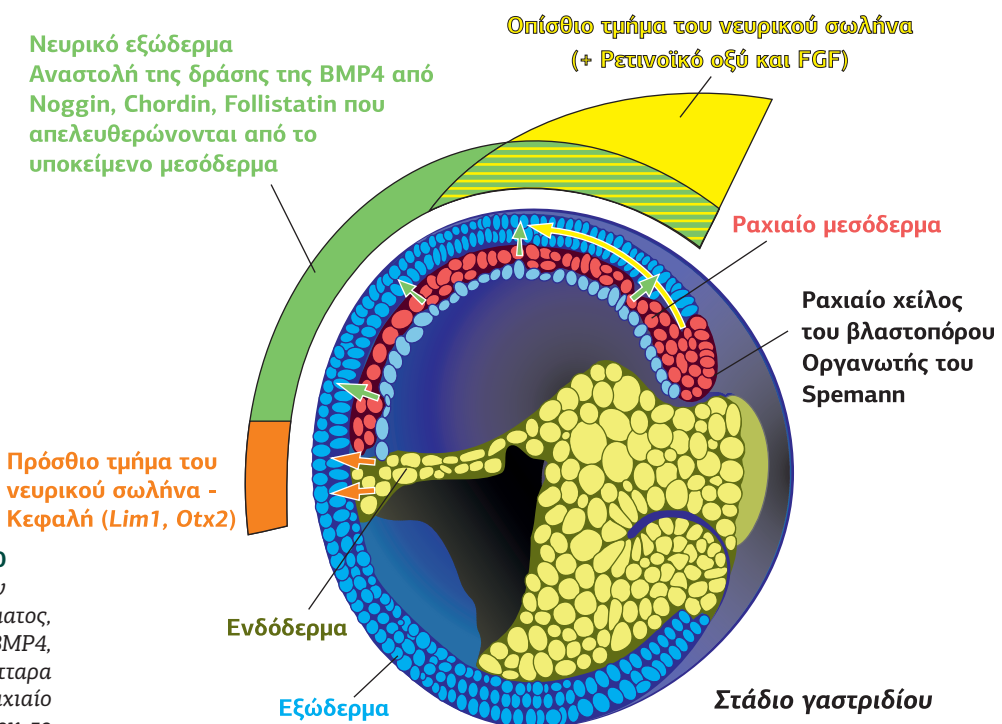
## 8.2 Οι ανταγωνιστές των BMPs και ο ρόλος τους στην εμβρυογένεση

Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης στα σπονδυλωτά, τα κύτταρα του εξωδέρματος έχουν να επιλέξουν ανάμεσα σε δύο μοίρες: να διαφοροποιηθούν σε νευρικό ιστό ή σε επιδερμίδα. Χωρίς καμία επίδραση από το υποκείμενο μεσόδερμα, τα κύτταρα του εξωδέρματος εκφράζουν και απελευθερώνουν την BMP4, η οποία συνδέεται στους υποδοχείς των γειτονικών εξωδερμικών κυττάρων επάγοντας τη διαφοροποίησή τους σε επιδερμικά. Το τμήμα του εξωδέρματος που θα διαφοροποιηθεί σε νευρικό ιστό δέχεται αναστολές της σηματοδότησης BMP, από το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου, το οποίο στο στάδιο του γαστριδίου ονομάζεται **οργανωτής του Spemann**. Ο οργανωτής προάγει τον σχηματισμό ραχιαίων ιστών από το μεσόδερμα και τη δημιουργία νευρικού ιστού από το υπερκείμενο εξώδερμα, το οποίο διαφορετικά θα γινόταν επιδερμίδα.

Ο οργανωτής εκφράζει και εκκρίνει δύο αναστολές της σηματοδότησης της BMP4, τη **Chordin** και τη **Noggin**. Η Noggin είναι μια μικρή γλυκοπρωτεΐνη 32 kDa που παράγεται ως ομοδιμερές, ενώ η Chordin είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη 941 αμινοξέων, 120 kDa. Η Noggin περιέχει μια COOH-τελική περιοχή πλούσια σε Cys, ενώ η Chordin περιέχει επαναλήψεις πλούσιες σε Cys, όμοιες με τις επαναλήψεις τύπου I της θρομβοσπονδίνης (βλ. **Εικόνα 10.6A**), του προκολλαγόνου I και III και του παράγοντα von Willebrand. Αν και δεν είναι δομικά όμοιες, η Chordin και η

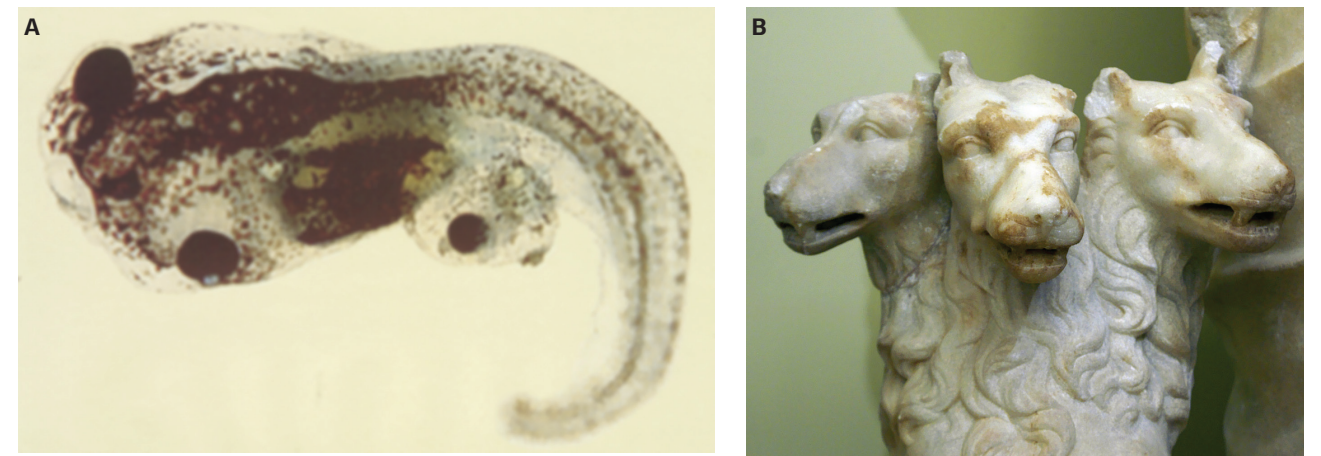
Noggin συνδέονται εξειδικευμένα στις BMPs, αλλά όχι στην activin ή στον TGF-β, εμποδίζουν τη σύνδεση της BMP4 στους υποδοχείς της και, κατ' επέκταση, εμποδίζουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εξωδέρματος σε επιδερμίδα, οδηγώντας στη δημιουργία νευρικού ιστού (Εικόνα 10.30). Γι' αυτό το όνομα Noggin προέρχεται από την αγγλική λέξη αργκό για το "κεφάλι", καθώς υπερέκφραση της Noggin οδηγεί σε έμβρυα με μεγάλα κεφάλια. Αλλά και σε αργότερα στάδια ανάπτυξης, η Noggin απελευθερώνεται από τη νωτοχορδή και απαιτείται για τη σωστή δημιουργία του νευρικού σωλήνα και των σωματιών. Ο ανταγωνισμός της δραστηριότητας της BMP4 από τη Noggin παίζει κρίσιμο ρόλο και για την ανάπτυξη του σκελετού: Noggin-null ποντίκια έχουν υπερβολική ποσότητα χόνδρων, ενώ αποτυγχάνουν να σχηματίσουν αρθρώσεις.

Όπως θα δούμε παρακάτω, στη *Drosophila* η Sog είναι ένα δομικό και λειτουργικό ανάλογο της Chordin, το οποίο δημιουργεί ένα ανασταλτικό σύμπλοκο με την Dpp (ανάλογη της BMP) ή με την Screw εμποδίζοντας τη σύνδεση με τους υποδοχείς τους.



**Εικόνα 10.30**  
Στο στάδιο του γαστριδίου τα κύτταρα του εξωδέρματος, υπό την επίδραση της BMP4, διαφοροποιούνται σε κύτταρα επιδερμίδας. Ωστόσο, το ραχιαίο χείλος του βλαστοπόρου, το οποίο ονομάζεται οργανωτής του Spemann, απελευθερώνει ανταγωνιστές της σηματοδότησης BMP, τη Chordin και Noggin, επιτρέποντας το υπερκείμενο εξώδερμα να διαφοροποιηθεί σε νευρικό ιστό.

Μια άλλη οικογένεια ανταγωνιστών της σηματοδότησης BMPs είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών **DAN** και **Cerberus**. Ο Cerberus είναι μια πρωτεΐνη 270 αμινοξέων που εκφράζεται στο μπροστινό τμήμα του ενδοδέρματος, στο στάδιο του γαστριδίου. Περιέχει και αυτή μια περιοχή 90 αμινοξέων, πλούσια σε κυστεΐνες, οι οποίες δημιουργούν τον χαρακτηριστικό κόμβο κυστίνης "cystine knot", παρόντα σε όλα τα μέλη της οικογένειας TGF-β. Όπως και οι Noggin και Chordin, αυτή η οικογένεια των ανταγωνιστών των BMPs συνδέει τις BMPs εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς. Ωστόσο, ο Cerberus συνδέει και τον παράγοντα επαγωγής του μεσοδέρματος Xnr1 και τον επαγωγέα του δευτερεύοντος άξονα, τον Xwnt8. Αυτοί οι παράγοντες φαίνεται να δεσμεύονται σε ξεχωριστές θέσεις στον Cerberus: Xnr1 και BMP4 συνδέονται στην περιοχή του κόμβου κυστίνης, ενώ ο Xwnt8 συνδέεται στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή του Cerberus. Ο Cerberus απομονώθηκε σε μια έρευνα για μετάγραφα, που είναι συγκεντρωμένα στον οργανωτή του πρώιμου εμβρύου Xenopus. Η μικροέγχυση του mRNA του Cerberus σε έμβρυα Xenopus έχει την εξαιρετική ικανότητα να προκαλεί εκτοπικές κεφαλές, να επάγει τη δημιουργία νευρικού ιστού από το εξώδερμα και να διπλασιάζει την καρδιά και το ήπαρ.



### 8.3

#### Οι BMPs και η ομόλογη Dpp της *Drosophila* ως μορφογενετικοί παράγοντες

Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs) ανήκουν σε μία από τις καλύτερα μελετημένες οικογένειες μορφογόνων. Στη *Drosophila* υπάρχουν τρεις προσδέτες τύπου BMP, οι Decapentaplegic (Dpp), Screw (Scw) και Glass bottom boat (Gbb). Η Dpp είναι η ομόλογη των BMP2/4, η Gbb είναι η ομόλογη των BMP5-8, επισημαίνοντας την εξελικτική παλαιότητα της οικογένειας των παραγόντων TGF-β, και η Scw είναι ένας μακρινός συγγενής των BMP5-8, χωρίς σαφή ομόλογο στα σπονδυλωτά. Οι προσδέτες αυτοί δρουν ως ομο- ή ετεροδιμερή και συνδέονται σε υποδοχείς τύπου I, Thickveins (Tkv) και Saxophone (Sax). Η Dpp ως ομοδιμερές ή ετεροδιμερές Dpp/Scw συνδέεται κατά προτίμηση με τον υποδοχέα Tkv, ενώ η Gbb κατά προτίμηση σηματοδοτεί μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα Sax. Μετά τη σύνδεση της Dpp, ο ιδιόσυστατος ενεργός υποδοχέας τύπου II Punt αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιεί τον Tkv, ο οποίος στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον ομόλογο των Smads Mothers against dpp (Mad). Ο Mad μετατοπίζεται στον πυρήνα μαζί με τον ομόλογο του Smad4 Medea. Το σύμπλοκο pMad/Medea συνδέονται με πλούσια σε GC μοτίβα στους εκκινητές πολλών γονιδίων και, σε συνεργασία με συμπαραγόντες μεταγραφής, ρυθμίζουν τη την έκφραση πολλών γονιδίων στόχων.

Ο γονιδιακός τόπος *decapentaplegic* ανακαλύφθηκε το 1982 από τον William M. Gelbart, στο Harvard, ως ρυθμιστής της ανάπτυξης των **δίσκων των ενηλικών** (imaginal discs) της προνύμφης της *Drosophila*, ενώ μεταλλάξεις του *dpp* οδηγούσαν σε ανωμαλίες (απώλειες ή διπλασιασμούς) δομών, που προέρχονται από έναν ή περισσότερους από τους 15 δίσκους.

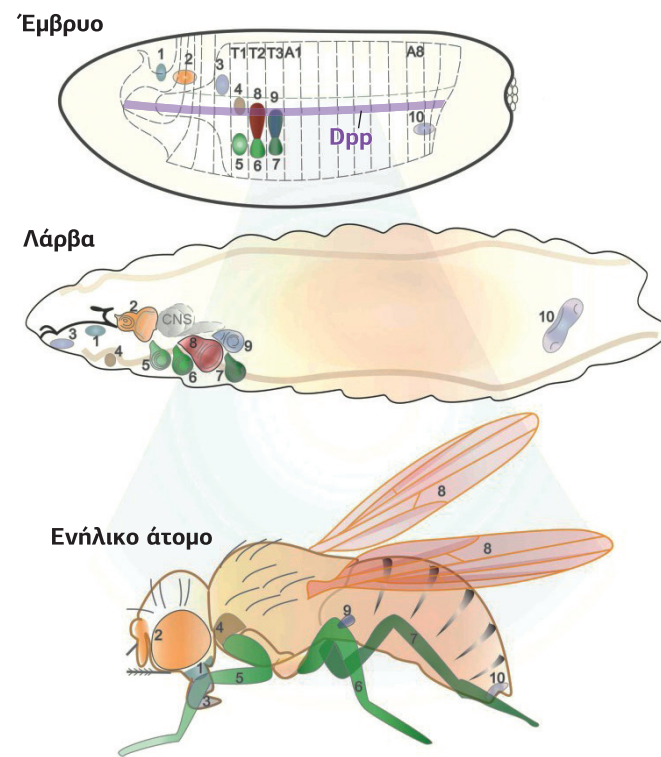
Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οι περισσότεροι οργανισμοί αναπτύσσουν αρχικά μικροσκοπικές εκδοχές των δομών των ενηλικών σωμάτων τους, οι οποίες τελικά αυξάνονται σε μέγεθος. Έντομα που υφίστανται μεταμόρφωση, όπως η *Drosophila*, υφίστανται σημαντικές μορφολογικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, σχηματίζοντας πρόδρομες δομές κατά τη διάρκεια προηγούμενων σταδίων ανάπτυξης που δεν αυξάνονται απλώς, αλλά μετασχηματίζονται ουσιαστικά κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης. Οι ενήλικες δροσόφιλες έχουν καλά αναπτυγμένα εξαρτήματα (μάτια, φτερά, πόδια και γεννητικά όργανα), ενώ οι προνύμφες απαιτούν λιγότερο σύνθετες δομές για απλές συμπεριφορές, όπως η σίτιση. Οι δομές που θα δημιουργήσουν εξωτερικά εξαρτήματα στο ενήλικο έντομο παραμένουν προστατευμένες εντός της προνύμφης. Αυτές οι πρόδρομες δομές αναφέρονται ως "imaginal discs" ή δίσκοι ενηλικών, καθώς θα δημιουργήσουν τις δομές του σώματος του τελικού και τελειότερου σταδίου των ενηλικών εντόμων που είναι γνωστό ως "imago". Μόλις η προνύμφη (larva) μετατραπεί σε pupa, σχεδόν όλοι οι ιστοί της προνύμφης εκφυλίζονται και οι δίσκοι μετατρέπονται σε εξω-

**Εικόνα 10.31**

A. Υπερέκφραση του Cerberus, οδηγεί σε εκτοπικές κεφαλές. [4] B. Κέρβερος, το μυθικό τέρας με τα τρία κεφάλια που φύλαγε την πύλη του Άδη. Λεπτομέρεια αγάλματος από το Αρχαιολογικό Μουσείο Ηρακλείου.



**Εικόνα 10.32**  
Οι δίσκοι ενηλικίου (*imaginal discs*) είναι επιθηλιακές δομές που βρίσκονται μέσα στην προνύμφη των εντόμων και υφίστανται μεταμόρφωση. Μόλις η προνύμφη (*larva*) μετατραπεί σε ρυπα, σχεδόν όλοι οι ιστοί της προνύμφης εκφυλίζονται και οι δίσκοι μετατρέπονται σε εξωτερικές δομές του κεφαλιού, του θώρακα, των άκρων και των γεννητικών οργάνων. Η πρωτεΐνη Dpp εκφράζεται και στους 15 δίσκους ενηλικίων. [1]



τερικές δομές του κεφαλιού, του θώρακα, των άκρων και των γεννητικών οργάνων. Έκτοτε ανακαλύφθηκε ένας πολλαπλός ρόλος της Dpp στην ανάπτυξη της *Drosophila*. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, η Dpp είναι υπεύθυνη για τη ραχιαία-κοιλιακή πολικότητα του εμβρύου, ενώ μετέπειτα, με την εμφάνιση των μεταμερών, είναι υπεύθυνη για τον προσδιορισμό της εμπρόσθιας-οπίσθιας πολικότητας και την αύξηση του δίσκου ενηλικίων που οδηγεί στη δημιουργία φτερών. Επίσης, παίζει ρόλο στον σχηματισμό του μεσοδέρματος.

#### Η Dpp ως μορφογόνο στο πρώιμο έμβρυο της *Drosophila*

Τα μορφογόνα είναι εκκρινόμενα μόρια που προκαλούν διαφορετικές κυτταρικές τύχες ως συνάρτηση της συγκέντρωσής τους, οργανώνοντας έτσι μια σειρά κυτταρικών τύπων σε μια καθορισμένη χωρική συστοιχία. Από την περιοχή παραγωγής τους (η πηγή), τα μορφογόνα δημιουργούν βαθμίδες συγκέντρωσης στον παρακείμενο ιστό στόχο. Έτσι, τα κύτταρα μακριά από την πηγή του μορφογόνου θα έρθουν σε επαφή με χαμηλά επίπεδα μορφογόνου και θα εκφράσουν μόνο συγκεκριμένα γονίδια “χαμηλής απόκρισης”. Αντίθετα, τα κύτταρα κοντά στην πηγή του μορφογόνου θα ενεργοποιηθούν από υψηλά επίπεδα μορφογόνου και θα εκφράσουν γονίδια τόσο χαμηλής όσο και “υψηλής απόκρισης”. Διακριτοί τύποι κυττάρων αναδύονται ως συνέπεια του διαφορετικού συνδυασμού έκφρασης γονιδίων στόχων. Με αυτόν τον τρόπο, το πεδίο των κυττάρων υποδιαιρείται σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με την πηγή του μορφογόνου.

**Στο στάδιο του πρώιμου βλαστοδέρματος** προσδέτες τύπου BMP, όπως η Decapentaplegic (Dpp) και η Screw (Scw), δρουν ως μορφογόνα, για να καταστείλουν τη νευρική μοίρα και να διαφοροποιήσουν τη ραχιαία πλευρά του εμβρύου σε *amnioserosa* (ραχιαία εξωεμβρυϊκή μεμβράνη) και ραχιαίο εξώδερμα. Η *amnioserosa* προέρχεται από τα 8-10 κύτταρα που βρίσκονται γύρω από τη ραχιαία μεσαία γραμμή, ενώ το ραχιαίο εξώδερμα προέρχεται από περισσότερα πλευρικά κύτταρα (Εικόνα 10.33A). Στα αρνητικά μεταλλάγματα *dpp* όλα τα ραχιαία κύτταρα αποκτούν μια κοιλιακή νευρογενή μοίρα, ενώ έγχυση υψηλών επιπέδων mRNA *dpp* μετατρέπει όλα τα ραχιαία κύτταρα σε *amnioserosa*, ενώ τα χαμηλά επίπεδα

mRNA *dpp* καθορίζουν το ραχιαίο εξώδερμα. Συνεπώς, η Dpp δρα ως εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση μορφογόνο για τον προσδιορισμό και των δύο ιστών.

Παρότι το γονίδιο *dpp* μεταγράφεται ομοιόμορφα σε όλα τα ραχιαία κύτταρα στο πρώιμο έμβρυο, η δραστικότητα Dpp είναι υψηλότερη στη ραχιαία μεσαία γραμμή και χαμηλότερη στο πλευρικό τμήμα. Συνεπώς, η άνιση δραστικότητα της Dpp μέσα σε μια περιοχή ομοιόμορφης έκφρασης *dpp* θα πρέπει να οφείλεται σε εξωκυτταρικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, για τη δημιουργία της διαβαθμισμένης δραστηριότητας της Dpp σημαντικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες **Sog** (Short gastrulation) και **Tsg** (Twisted gastrulation), οι οποίες περιέχουν πλούσιες σε Cys περιοχές (CRD), μέσω των οποίων συνδέονται με την Dpp και εμποδίζουν τη σύνδεσή της στον υποδοχέα τύπου II, Punt. Το ετεροτιμερές σύμπλοκο (Sog, Dpp, Tsg) απελευθερώνει στη συνέχεια την Dpp, μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη διάσπαση της Sog από τη μεταλλοπρωτεάση Tolloid (Tld).

Ενώ τα ομοδιμερή και ετεροδιμερή Dpp και Scw παράγονται σε όλη τη ραχιαία πλευρά, η Sog παράγεται και εκκρίνεται στην κοιλιακή πλευρική περιοχή και διαχέεται προς τη ραχιαία. Τα **ομοδιμερή Dpp και Scw** συνδέονται με χαμηλή συγγένεια στις Sog/Tsg, με αποτέλεσμα να είναι ελεύθερα να συνδέονται στους υποδοχείς τους, παράγοντας όμως μόνο σήματα χαμηλής έντασης. Αντίθετα, τα **ετεροδιμερή Dpp/Scw** συνδέονται με υψηλή συγγένεια στις Sog/Tsg. Η ροή του συμπλόκου προς τη ραχιαία μέση γραμμή οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του ετεροδιμερούς στη μέση γραμμή. Η μεταλλοπρωτεάση Tolloid αποκόπτει την Sog στη μεσαία γραμμή για να απελευθερώσει τον προσδέτη, ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται στους υποδοχείς Sax και Tkv. Αυτό το σύμπλεγμα παράγει ένα συνεργιστικό υψηλό σήμα που ενεργοποιεί τα γονίδια στόχους.

Οι Sog και Tsg αναστέλλουν τη σηματοδότηση στα ραχιαίοπλευρικά κύτταρα, ενώ την προάγουν στα ραχιαία κύτταρα της μέσης γραμμής. Η κοιλιακή-πλευρική έκφραση της Sog θεωρείται ότι είναι το κλειδί για τα δύο αυτά γεγονότα. Σε πλευρικές περιοχές το σύμπλοκο των Sog, Tsg και Dpp εμποδίζει τη σύνδεση της Dpp στους υποδοχείς της, αναστέλλοντας τοπικά τη σηματοδότηση. Ωστόσο, επειδή το σύμπλοκο αποτρέπει την αλληλεπίδραση της Dpp με τον υποδοχέα της, διευκολύνει τη διάχυση της Dpp σε μεγάλα εμβέλεια. Καθώς η καθαρή ροή της Sog είναι μακριά από τη θέση σύνθεσής της, την κοιλιακή-πλευρική περιοχή, με κατεύθυνση προς τη ραχιαία μέση γραμμή, η ροή διευκολύνει τη μεταφορά της Dpp από πλευρικές περιοχές προς τη μέση γραμμή. Το γεγονός αυτό προάγει τη σηματοδότηση Dpp αυξάνοντας τη συγκέντρωση Dpp στη ραχιαία μέση γραμμή. Σε αυτή τη διαδικασία ένα συστατικό κλειδί που βοηθά στη δημιουργία ροής της Sog είναι η επεξεργασία της Sog από τη μεταλλοπρωτεάση Tld. Αυτή η ραχιαία εκφραζόμενη πρωτεάση δρα τοπικά για να διασπάσει το σύμπλοκο Sog/Dpp και να απελευθερώσει τη Dpp. Η Dpp που απελευθερώνεται έχει δύο πιθανές μοίρες: είτε συνδέεται στον υποδοχέα της προάγοντας τη σηματοδότηση είτε συνδέεται σε ένα άλλο σύμπλεγμα Sog/Tsg. Όταν τα επίπεδα Sog είναι υψηλά, όπως στις πλευρικές περιοχές, η πιθανότητα επανασύνδεσης είναι υψηλή, ενώ στη μέση γραμμή, όπου τα επίπεδα Sog είναι χαμηλά, η Dpp που απελευθερώνεται είναι πιθανότερο να συνδεθεί στους υποδοχείς της.

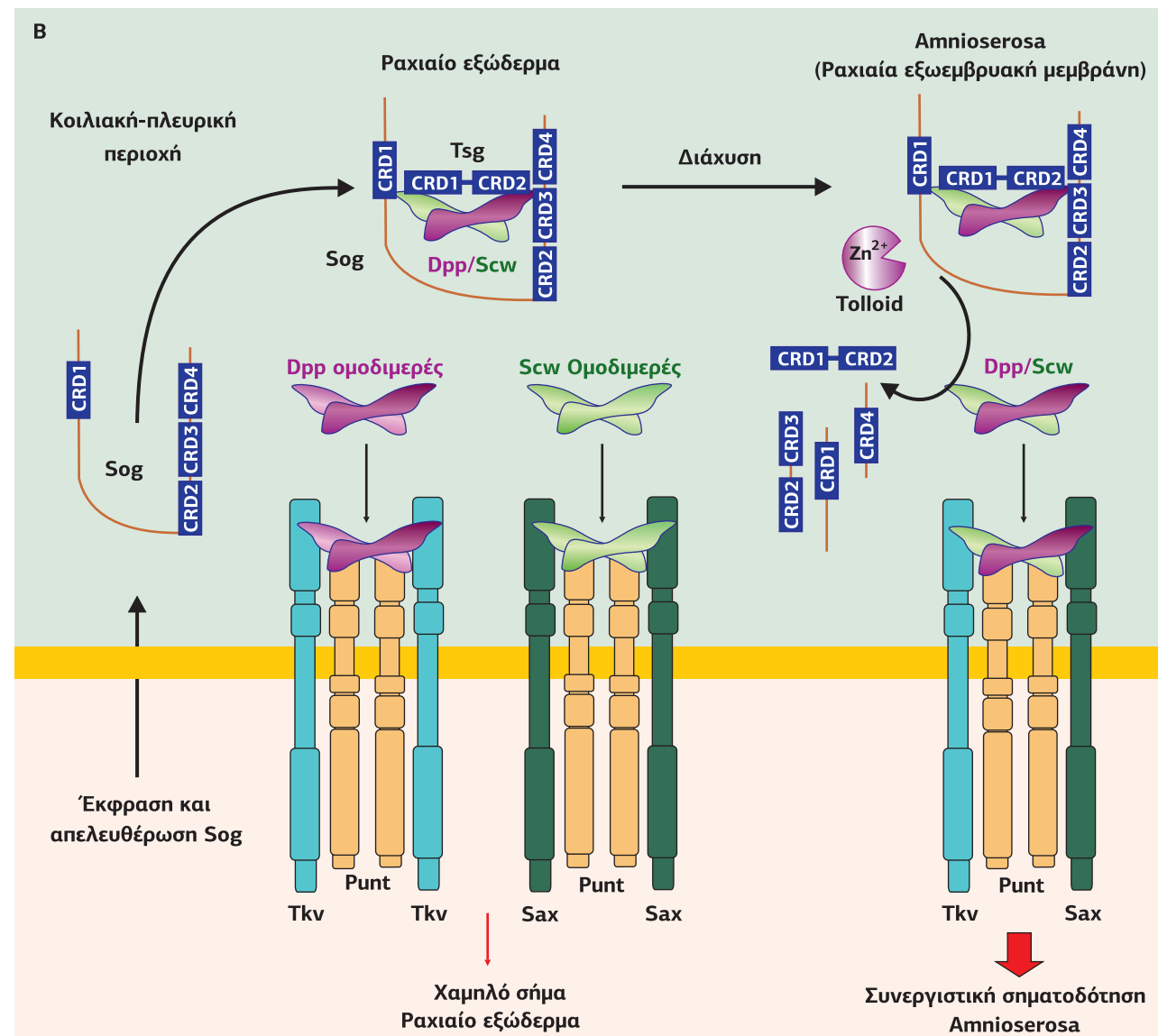
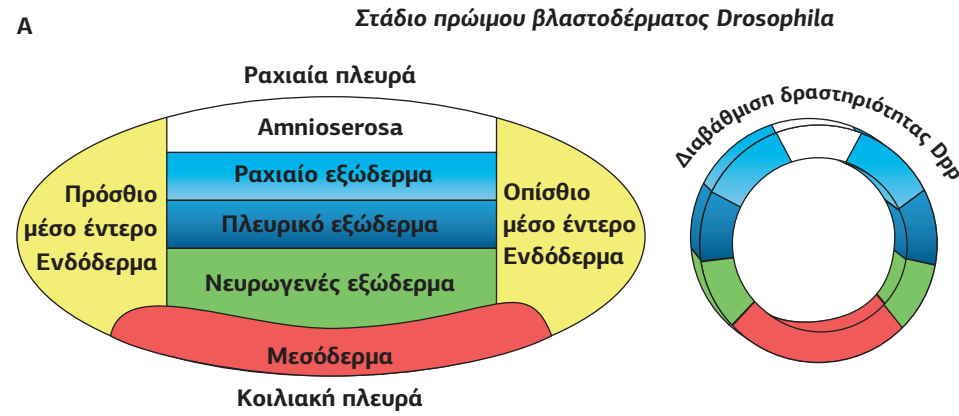
Εκτός από την Dpp, η διαφοροποίηση της *amnioserosa* (ραχιαία εξωεμβρυϊκή μεμβράνη) απαιτεί και την Scw, έναν δεύτερο προσδέτη τύπου BMP. Σε αντίθεση με την Dpp, η Scw εκφράζεται ομοιόμορφα και μόνο στο στάδιο βλαστοδέρματος. Οι μεταλλάξεις *scw* οδηγούν σε λιγότερο σοβαρούς φαινότυπους από ό,τι οι μεταλλάξεις *dpp*. Η *amnioserosa* χάνεται και στις δύο περιπτώσεις, αλλά σε μεταλλάγματα *scw* εξακολουθεί να σχηματίζεται κάποιο ραχιαίο εξώδερμα.

Η Dpp και η Scw σχηματίζουν ετεροδιμερή και επιπλέον το ετεροδιμερές παράγει δέκα φορές περισσότερο σήμα (φωσφορυλίωση pMad) από ένα ισομοριακό μίγμα ομοδιμερών Dpp και Scw. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ομοδιμερή Scw παρουσιάζουν πολύ μικρή ικανότητα σηματοδότησης.

Η αυξημένη ικανότητα σηματοδότησης του ετεροδιμερούς Dpp/Scw οφείλεται στη συνεργεία μεταξύ των δύο υποδοχέων τύπου I, Tkv και Sax. Η Scw σηματοδο-

τεί μέσω του Sax, ενώ η Dpp κυρίως σηματοδοτεί μέσω του Tkv. Και οι δύο προσδέτες ενεργοποιούν συνεργικά τους δύο υποδοχείς.

**Εικόνα 10.33**  
 Διαφοροποίηση της ραχιαίας πλευράς του εμβρύου *Drosophila* σε *amnioserosa* και ραχιαίο εξώδερμα από *Dpp* και *Scw*, τα οποία δρουν ως μορφογόνα. Α. Στάδιο του πρώιμου βλαστοδέρματος. Β. Δημιουργία διαβαθμισμένης εξωκυτταρικής συγκέντρωσης των *Dpp* και *Scw*, και ο ρόλος τους. [57] [71]



### Βιβλιογραφία

1. Beira JV, Paro R, The legacy of *Drosophila* imaginal discs, *Chromosoma* 125: 573-92 (2016).
2. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M, The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer, *Biochim Biophys Acta* 1792: 954-73 (2009).
3. Birkey RS, Wurthner GU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS, X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling, *J Biol Chem* 276: 26542-9 (2001).
4. Bouwmeester T, Kim S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM, Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of *Spemann's* organizer, *Nature* 382: 595-601 (1996).
5. Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, Bernard DJ, Thompson TB, The structure of myostatin: follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding, *EMBO J* 28: 2662-76 (2009).
6. Choy L, Derynck R, The type II transforming growth factor (TGF-β) receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-β response, *J Biol Chem* 273: 31455-62 (1998).
7. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP, Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques, *Atherosclerosis* 153: 323-35 (2000).
8. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A5, Stromal Modulators of TGF-β in Cancer, *J Clin Med* 6: piiE7 (2017).
9. DaCosta S, Roberts A, Lateral signaling enhances TGF-β response complexity, *Trends in Cell Biol* 14: 107-111 (2004).
10. Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY, Signaling pathway cooperation in TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition, *Curr Opin Cell Biol* 31: 56-66 (2014).
11. Dijke P, Hill C, New insights into TGF-β-Smad signaling, *Trends Biochem Sci* 29: 265-273 (2004).
12. Finkielstein CV, Capelluto DG, Disabled-2: A modular scaffold protein with multifaceted functions in signaling, *Bioessays* 38: S45-55 (2016).
13. Finsson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A, Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring, *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2: 195-214 (2013).
14. Gomperts B, Kramer I, Tatham P, Signal Transduction, 2nd edition, Academic Press pp. 576 (2009).
15. Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M, Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta, *Placenta* 35Suppl: S93-9 (2014).
16. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM, Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options, *Comp Hepatol* 6:7 (2007)
17. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Izpisua Belmonte JC, Choe S, Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin, *Nature* 420: 636-42 (2002).
18. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Muragaki Y, The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-β-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition, *J Signal Transduct* 2012: 289243 (2012).
19. Han S, Crystal structure of activin receptor type IIB kinase domain, *Vitam Horm* 85: 29-38 (2011).
20. Hayashi H, Sakai T, Biological Significance of Local TGF-β Activation in Liver Diseases, *Front Physiol* 3: e-collection 12 (2012).

21. Heldin CH, Moustakas A, Role of Smads in TGF $\beta$  signaling, *Cell Tissue Res* 347: 21-36 (2012).
22. Heldin CH, Moustakas A, Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8: pii022053 (2016).
23. Hinck AP, Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily, *FEBS Lett* 586: 1860-70 (2012).
24. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA, Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8: pii: a022103 (2016).
25. Hinz B, It has to be the av: myofibroblast integrins activate latent TGF- $\beta$ 1, *Nat Med* 19: 1567-8 (2013).
26. Hinz B, The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship, *Matrix Biol* 47: 54-65 (2015).
27. Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T, Matsuzawa A, Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex, *Int J Mol Sci* 18: pii E205 (2017).
28. Iozzo RV, Schaefer L, Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biol* 42:11-55 (2015).
29. Izzi L, Attisano L, Regulation of the TGF- $\beta$  signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation, *Oncogene* 23: 2071-8 (2004).
30. Jenkins G, The role of proteases in transforming growth factor-beta activation, *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1068-78 (2008).
31. Jensen SA, Handford PA, New insights into the structure, assembly and biological roles of 10-12 nm connective tissue microfibrils from fibrillin-1 studies, *Biochem J* 473: 827-38 (2016).
32. Kaartinen V, Warburton D, Fibrillin controls TGF-beta activation, *Nat Genet* 33: 331-32 (2003).
33. Kang JS, Liu C, Derynck R, New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function, *Trends Cell Biol* 19: 385-94 (2009).
34. Kim SI, Choi ME, TGF- $\beta$ -activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF- $\beta$  signaling and kidney disease, *Kidney Res Clin Pract* 31: 94-105 (2012).
35. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, Inoue J, Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis, *EMBO J* 20: 1271-80 (2001).
36. Krauss G, *Biochemistry of signal Transduction and Regulation*, Wiley-VCH Verlag (2001).
37. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S, Transforming growth factor  $\beta$  1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90: 77-774 (1993).
38. Lafyatis R, Transforming growth factor  $\beta$  - at the center of systemic sclerosis, *Nat Rev Rheumatol* 10: 706-19 (2014).
39. Levy L, Hill C, Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathways in human cancer, *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 41-58 (2006).
40. Lim J, Thiery JP, Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development, *Development* 139: 3471-86 (2012).
41. Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardetzky TS, Woodruff TK, The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding, *Reproduction* 132: 179-90 (2006).
42. Lodish H, *Molecular Cell Biology* (2007).
43. Lutz M, Knays P, Integration of the TGF- $\beta$  pathway into the cellular signaling network, *Cell Signal* 14: 977-988 (2002).
44. Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J, Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem Sci* 40: 296-308 (2015).
45. Massagué J, Blain SW, Lo RS, TGF-beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders, *Cell* 103: 295-309 (2000).
46. Massagué J, Chen YG, Controlling TGF-beta signaling, *Genes Dev* 14: 627-44 (2000).
47. Massagué J, Seoane J, Wotton D, Smad transcription factors, *Genes Dev* 19: 2783-810 (2005).
48. Moustakas A, Heldin C, Non-Smad TGF-beta signals, *J Cell Sci* 118: 3573-3584 (2005).
49. Moustakas A, Heldin C, Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton, *FEBS Lett* 582: 2051-65 (2008).
50. Munger JS, Sheppard D, Cross talk among TGF- $\beta$  signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005017 (2011).
51. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M, Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology, *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 59-69 (2000).
52. Murphy-Ullrich JE, Suto MJ, Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- $\beta$  activation: A therapeutic target for fibrotic disease, *Matrix Biol* 68-69: 28-43 (2018).
53. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd RV, Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy, *Anticancer Res* 31: 2283-90 (2011).
54. Nishida T, Inui M, Nomizu M, Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions, *Prog Retin Eye Res* 47: 38-63 (2015).
55. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC, Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: pii a011908 (2012).
56. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen N, Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors, *Cell Signal* 16: 291-299 (2004).
57. O'Connor MB, Umulis D, Othmer HG, Blair SS, Shaping BMP morphogen gradients in the Drosophila embryo and pupal wing, *Development* 133: 183-93 (2006).
58. Parks WT, Frank DB, Huff C, Renfrew Haft C, Martin J, Meng X, de Caestecker MP, McNally JG, Reddi A, Taylor SI, Roberts AB, Wang T, Lechleider RJ, Sorting nexin 6, a novel SNX, interacts with the transforming growth factor-beta family of receptor serine-threonine kinases, *J Biol Chem* 276: 19332-9 (2001).
59. Penheiter SG, Singh RD, Repellin CE, Wilkes MC, Edens M, Howe PH, Pagano RE, Leof EB, Type II transforming growth factor-beta receptor recycling is dependent upon the clathrin adaptor protein Dab2, *Mol Biol Cell* 21: 4009-19 (2010).
60. Perlman R, Shiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA, TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation, *Nat Cell Biol* 3: 708-14 (2001).
61. Robertson I, Jensen S, Handford P, TB domain proteins: evolutionary insights into the multifaceted roles of fibrillins and LTBP, *Biochem J* 433: 263-76 (2011).
62. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB, Latent TGF- $\beta$ -binding proteins, *Matrix Biol* 47: 44-53 (2015).
63. Saharinen J, Hyytiäinen M, Taipale J, Keski-Oja J, Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs) - structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action, *Cytokine Growth Factor Rev* 10:

- 99-117 (1999).
64. Sarrazy V, Koehler A, Chow ML, Zimina E, Li CX, Kato H, Caldarone CA, Hinz B, Integrins  $\alpha\beta 5$  and  $\alpha\beta 3$  promote latent TGF- $\beta 1$  activation by human cardiac fibroblast contraction, *Cardiovasc Res* 102: 407-17 (2014).
  65. Sengle G, Tsutsui K, Keene DR, Tufa SF, Carlson EJ, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Wirtz MK, Samples JR, Fessler LI, Fessler JH, Sekiguchi K, Hayflick SJ, Sakai LY, Microenvironmental regulation by fibrillin-1, *PLoS Genet* 8: e1002425 (2012).
  66. Serralheiro P, Soares A, Costa Almeida CM, Verde I, TGF- $\beta 1$  in Vascular Wall Pathology: Unraveling Chronic Venous Insufficiency Pathophysiology, *Int J Mol Sci* 18: piiE2534 (2017).
  67. Sflomos G, Kostaras E, Panopoulou E, Pappas N, Kyrkou A, Politou AS, Fotsis T, Murphy C, ERBIN is a new SARA-interacting protein: competition between SARA and SMAD2 and SMAD3 for binding to ERBIN, *J Cell Sci* 124(Pt 19): 3209-22 (2011).
  68. Shen MM, Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis, *J Clin Invest* 112: 500-2 (2003).
  69. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA, Latent TGF- $\beta$  structure and activation, *Nature* 474: 343-9 (2011).
  70. Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X, GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF-beta type I receptor. *J Cell Biol* 164: 291-300 (2004).
  71. Shimmi O, Umulis D, Othmer H, O'Connor MB, Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the Drosophila blastoderm embryo, *Cell* 120: 873-86 (2005).
  72. Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Abbott DE, Seftor RE, Salomon DS, Hendrix MJ, Emerging roles of nodal and Cripto-1: from embryogenesis to breast cancer progression. *Breast Dis* 29: 91-103 (2008).
  73. Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, Lipavsky A, Gadiot J, Blank C, Seftor RE, Seftor EA, Hendrix MJ, Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention, *Expert Rev Dermatol* 4: 67-78 (2009).
  74. ten Dijke P, Hill CS, New insights into TGF-beta-Smad signalling, *Trends Biochem Sci* 29: 265-73 (2004).
  75. Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ, Transforming Growth Factor- $\beta$  and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing, *Front Physiol* 2: 89 (2011).
  76. Wakefield L, Roberts A, TGF- $\beta$  signaling: positive and negative effects on tumorigenesis, *Curr Opin Genet Dev* 12: 22-29 (2002).
  77. Wakefield LM, Yang YA, Dukhanina O, Transforming growth factor- $\beta$  and breast cancer: Lessons learned from genetically altered mouse models, *Breast Cancer Res* 2: 100-106 (2000).
  78. Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F, Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots, *Trends Cell Biol* 20: 244-56 (2010).
  79. Wierzbicka-Patynowski I, Schwarzbauer JE, The ins and outs of fibronectin matrix assembly, *J Cell Sci* 116(Pt 16): 3269-76 (2003).
  80. Wipff PJ, Hinz B, Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship, *Eur J Cell Biol* 87: 601-15 (2008).
  81. Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, et al. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway, *EMBO J* 1999, 18, 179-87
  82. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D, Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis, *Cell* 89: 1067-76 (1997).
  83. Zhang YE, Non-Smad pathways in TGF-beta signaling, *Cell Res* 19: 128-39 (2009).
  84. Zhang YE, Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 9 (2017).
  85. Zhao B, Chen YG, Regulation of TGF- $\beta$  Signal Transduction, *Scientifica (Cairo)* 2014: 874065 (2014).
  86. Zi Z, Chapnick DA, Liu X, Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling, *FEBS Lett* 586: 1921-8 (2012).

