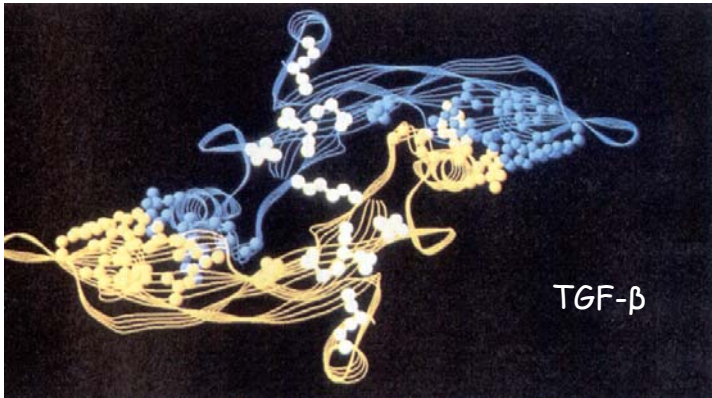


**13<sup>o</sup>**



**Μεμβρανικοί  
υποδοχείς  
με εσωτερική δραστικότητα  
κινάσης Ser/Thr**

---

**1. Σηματοδότηση μέσω TGFβ**

Ωρίμανση του μορίου TGFβ

Ενεργοποίηση των υποδοχέων TGFβ

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads

Η ρύθμιση του μονοπατιού

Στη σηματοδότηση του TGFβ δεν συμμετέχουν μόνο οι Smads

Εκτός από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενδογενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, τα κύτταρα περιέχουν επίσης διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενδογενή δραστηριότητα κινάσης Ser/Thr. Ένα παράδειγμα αυτού του τύπου υποδοχέων είναι οι υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF-β (transforming growth factor β). Ο TGFβ ανήκει σε μια κατηγορία εξωκυτταρικών σηματοδοτικών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και οι κυτοκίνες. Ο TGFβ αναστέλλει την κυτταρική αύξηση και τη μορφογένεση διαφόρων κυτταρικών τύπων. Με τη σύνδεση του TGFβ στον υποδοχέα του, ενεργοποιείται μια σηματοδοτική αλυσίδα που οδηγεί στη ρύθμιση της μεταγραφής επηρεάζοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ενεργοποίηση του υποδοχέα TGFβ δημιουργεί αντιμιτογόνα σήματα (πχ αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης), τα οποία εκδηλώνονται με την αύξηση της παραγωγής ειδικών πρωτεϊνικών κινασών, αναστολέων του κυτταρικού κύκλου.

## 1. Σηματοδότηση μέσω TGF-β

Ο TGF-β είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που αρχικά αναγνωρίστηκε ως παράγοντας μετασχηματισμού των μεσεγχοματικών κυττάρων (transforming growth factor), ενώ σήμερα είναι γνωστό ότι έχει σαν κύριο αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η υπερικιογένεια των TGF-β πρωτεϊνών περιλαμβάνει περισσότερα από 30 μέλη, από τα οποία τα κυριότερα είναι ο TGF-β, η BMP (Bone Morphogenetic Protein: μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών) και η ακτιβίνη. Ο TGF-β υπάρχει σε τρεις ισομορφές TGFβ-1, TGFβ-2 και TGFβ-3. Ανάλογα με την ισομορφή που συμμετέχει στο μονοπάτι καθορίζεται και ο τύπος του μηνύματος.

Όλες οι ισομορφές TGF-β προσδέονται σε υποδοχείς που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με ενσωματωμένη δράση κινάσης σερίνης-θρεονίνης (Ser/Thr). Οι υποδοχείς δηλαδή έχουν μία περιοχή που έχει την ικανότητα να μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα από το ATP σε κατάλοιπα Ser/Thr. Η δράση κινάσης βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα.

Οι υποδοχείς των TGF-β ονομάζονται TβR και οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι ο TβRI και ο TβRII. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς είναι διμερισμένοι, δηλαδή αποτελούνται από δύο ίδιες υπομονάδες.

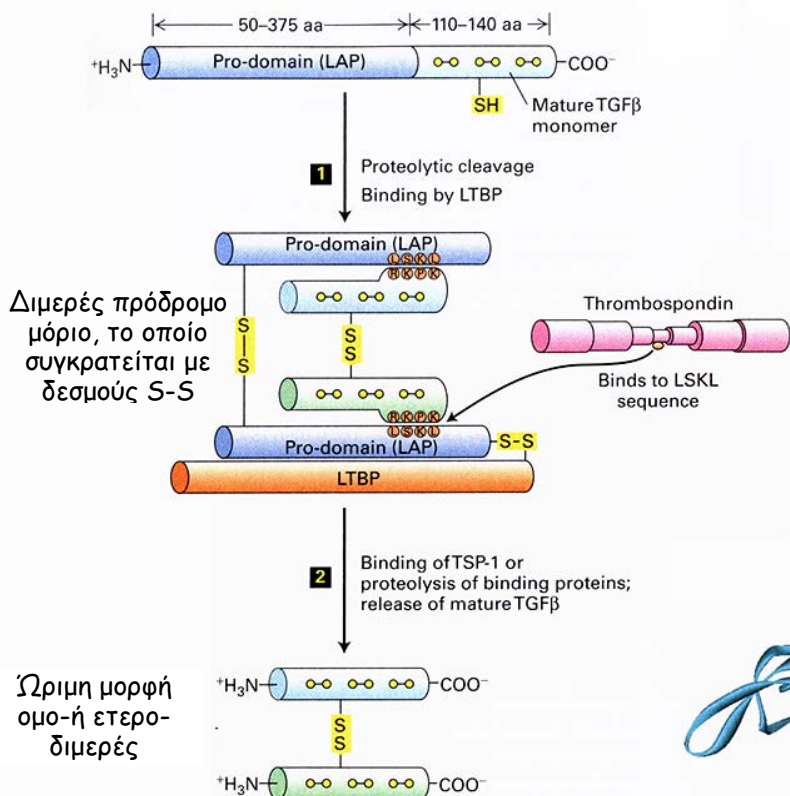
### ■ Ωρίμανση του μορίου TGF-β

Ο TGF-β συντίθεται ως πρόδρομη ανενεργή διμερής προ-πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Η πρόδρομη αυτή πρωτεΐνη αποτελείται από μια NH<sub>2</sub>-τελική προ-περιοχή (pro-domain, LAP) 50-375 αμινοξέων, και ένα COO-τελικό τμήμα που θα αποτελέσει το ενεργό, ώριμο TGF-β.

Μέσα στο κυτταρόπλασμα, το διμερές πρόδρομο μόριο συγκρατείται με δεσμούς S-S. Μετά την απελευθέρωση, οι δεσμοί σπάζουν, αλλά το ώριμο TGFβ-LAP παραμένουν συνδεδεμένα, μέσω ειδικών αλληλουχιών LSKL και RKPK, στην προ-περιοχή LAP του διμερούς πρόδρομου μορίου, στο οποίο συνδέεται επίσης και η πρωτεΐνη LTBP (Latent TGFβ-binding protein). Το σύμπλοκο αυτό παραμένει ανενεργό στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η σύνδεση της πρωτεΐνης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας θρομβοσπονδίνης στην προ-περιοχή LAP, στην αλληλουχία LSKL, οδηγεί στην απελευθέρωση του ώριμου ομο- ή ετερο-διμερούς TGFβ (Εικόνα 13.1).

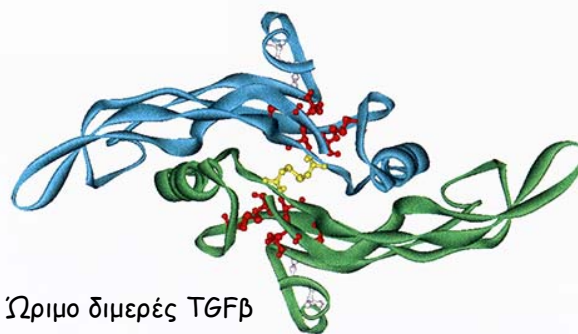
Η μονομερής μορφή του TGFβ περιέχει τρεις καλά συντηρημένες ενδομοριακές περιοχές δισουλφιδικών δεσμών. Μία επιπλέον κυστεΐνη στο κέντρο του κάθε μονομερούς TGFβ συνδέει τα δυο μονομερή σε λειτουργικά ομο- ή ετερο-διμερή.

Μονομέρες πρόδρομο μόριο, όπως απελευθερώνεται



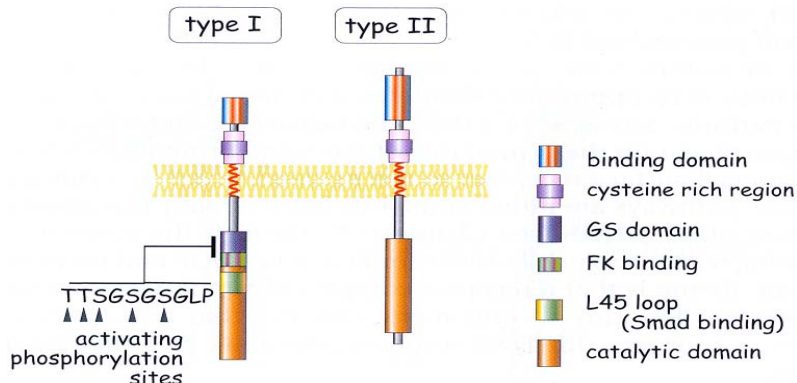
**Εικόνα 13.2** Ωρίμανση του TGF-β

Το πρόδρομο μόριο TGF-β σχηματίζεται μέσα στο κύτταρο ως διμερές, αλλά απελευθερώνεται ως μονομέρες. [1] Μέσα στο κυτταρόπλασμα, το διμερές πρόδρομο μόριο, το οποίο συγκρατείται με δεσμούς S-S, διασπάται πρωτεολυτικά. Το τμήμα TGFβ που απελευθερώνεται συνεχίζει να παραμένει συνδεδεμένο μέσω ειδικών αλληλουχιών LSKL και RKPΚ, στην προ-περιοχή LAT του διμερούς πρόδρομου μορίου, στο οποίο επίσης συνδέεται και η πρωτεΐνη LTBP. [2] Το ώριμο ομο- ή ετερο-διμερές TGFβ απελευθερώνεται από το σύμπλοκο, αφού συνδεθεί στην πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας θρομβοσπονδίνη. Από: Harvey Lodish, *Molecular Cell Biology*, 2007.



■ Ενεργοποίηση των υποδοχών των TGF-β

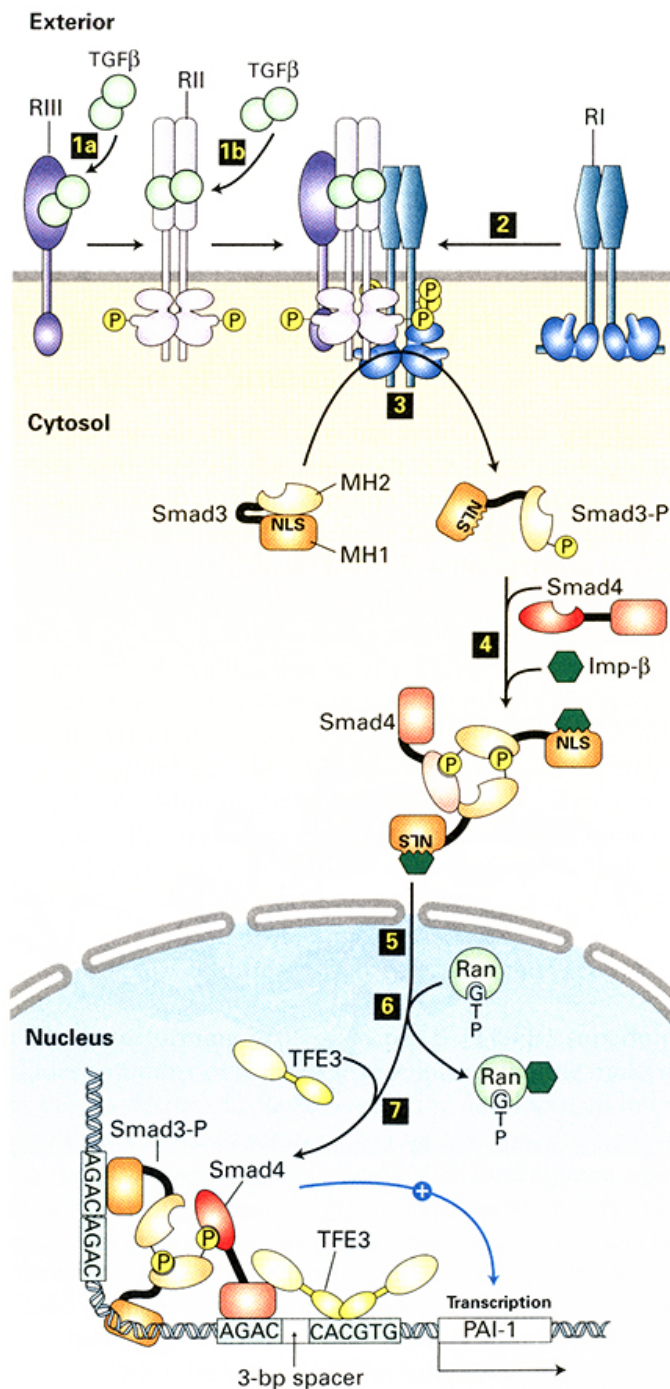
Μετά από την εμφάνιση ενός διμερούς μορίου TGF-β στον εξωκυττάριο χώρο, ακολουθεί η πρόσδεσή του στον υποδοχέα του. Ο υποδοχέας TGFβ είναι ένα ετερο-τετραμερές στην ενεργοποιημένη του μορφή, περιέχει δυο αντίγραφα δυο διαφορετικών υπομονάδων, γνωστών ως TβRI και TβRII. Και οι δυο υπομονάδες έχουν στο ενδοκυτταρικό τους τμήμα μια κινάση Ser/Thr, και η δραστηριότητα του TβRI ελέγχεται από τον προσδέτη. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης είναι ο ακόλουθος: Ο διμερής προσδέτης TGFβ αρχικά προσδένεται στον υποδοχέα TβRII, και σε αυτή τη μορφή αναγνωρίζεται από τον TβRI. Ο



**Εικόνα 13.3** Δομικές περιοχές των υποδοχών TβRI και TβRII. Ο TβRI διαθέτει μια GSπεριοχή, η οποία φωσφορυλιώνεται ύστερα από την πρόσδεση του TGFβ.

TβRI συνδέεται στο σύμπλοκο TGFβ-TβRII, δημιουργώντας ένα ετερο-ολιγομέρες, όπου ο TβRII έχοντας δράση κινάσης Ser/Thr φωσφορυλιώνει τον TβRI. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TβRI γίνεται σε μία περιοχή που βρίσκεται λίγο κάτω από την πλασματική μεμβράνη και είναι πλούσια σε γλυκίνη και σερίνη (Gly/Ser), γνωστή ως **GS-box**. Η φωσφορυλίωση του

υποδοχέα ΤβRI δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για σηματοδοτικά μόρια τελεστές.



Αυτός ο τύπος υποδοχέα λοιπόν χρησιμοποιεί δυο υπομονάδες για τη μεταγωγή σήματος: την υπομονάδα ΤβRII, υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέτη, και την υπομονάδα ΤβRI, η οποία καθορίζει την εξειδίκευση για την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος.

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ΤGFβ συνοδεύεται από πολλαπλές φωσφορυλιώσεις στις κυτταροπλασματικές περιοχές του υποδοχέα, φωσφορυλιώσεις όχι μόνο σε κατάλοιπα Ser/Thr αλλά και σε Tyr. Πρόκειται για trans-αυτοφωσφορυλιώσεις ανάμεσα στις υπομονάδες του υποδοχέα. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας στη συνέχεια μεταφέρει το μήνυμα στον πυρήνα μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smads (Smad2, Smad3), πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν τα υποστρώματα των υποδοχέων ΤβRI (Εικόνα 13.4).

#### Εικόνα 13.4 Βασικό μονοπάτι των ΤGFβ.

Ο ΤGF-β προσδένεται στο διμερισμένο υποδοχέα ΤβRII, ο οποίος φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα ΤβRI, στην GS περιοχή του, και αυτός με την σειρά του θα φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη Smad 2/3, αυτή θα συνδεθεί με τη Smad4 και θα εισέλθουν στον πυρήνα όπου θα προάγουν την μεταγραφή ενός γονιδίου στόχου. Από Harvey Lodish, *Molecular Cell Biology*, 2007.

#### ■ Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smads

Οι Smads είναι πρωτεΐνες που κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες :

1. **R- Smads** (receptor activated Smad) που ενεργοποιούνται από υποδοχείς:
  - των ΤGF-β (Smad2, Smad3)
  - των BMP (Smad1, Smad5 και Smad8)

2. **Co-Smads** (common mediator Smad) κοινός μεσολαβητής: είναι ο Smad4 και είναι εκείνος που συνοδεύει τους R-Smads στον πυρήνα.
3. **I-Smads** (inhibitory Smads): είναι οι ανασταλτικοί Smad, σταματούν την περαιτέρω μεταγωγή του σήματος και είναι οι Smad6 και Smad7.

Οι Smads που αντιστοιχούν στους υποδοχείς του TGF- $\beta$  είναι οι Smad2 και Smad3. Όπως αναφέρθηκε με την φωσφορυλίωση του T $\beta$ RI δημιουργείται μια θέση πρόσδεσης για τους Smads. Με την πρόσδεση των Smad2,3 στον υποδοχέα, προκαλείται φωσφορυλίωσή τους. Η φωσφορυλίωση των Smad2,3 προκαλεί την απομάκρυνσή τους από τον υποδοχέα και τη δημιουργία συμπλόκου με τον Smad4 (Co-Smad). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Smad2/3-Smad4 εισέρχεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, που είναι συνδεδεμένοι με το DNA, και μεταγράφεται το γονίδιο στόχος.

### Δομή των Smads

Οι Smads είναι πρωτεΐνες χωρίς ενζυμική δράση που περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, με το DNA και με μεταγραφικούς παράγοντες. Αποτελούνται από τρεις περιοχές:

- MH1 N-Mad homology1
- Linker, συνδετική περιοχή
- MH2 C-Mad homology2



Οι περιοχές MH1 και MH2 περιέχουν πολλές διατηρημένες περιοχές, ενώ η συνδετική περιοχή δεν είναι τόσο συντηρημένη.

Ο ρόλος της περιοχής MH1 είναι:

1. Αυτοαναστολή: Η περιοχή MH1 συμβάλλει στην αυτοαναστολή αλληλεπιδρώντας φυσιολογικά με την περιοχή MH2. Με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η δράση των Smad απουσία προσδέτη (TGF- $\beta$ ).

2. Ικανότητα δέσμευσης με το DNA: Η περιοχή MH1 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το DNA για να ξεκινήσει η μεταγραφή. Οι R-Smads διαφέρουν ως προς την ικανότητα αυτή γιατί ο Smad3 περιέχει μια περιοχή που ονομάζεται βρόγχος  $\beta$ -hairpin, που είναι υπεύθυνος για την πρόσδεσή του στην μεγάλη αύλακα του DNA, ενώ ο Smad2 δεν περιέχει την περιοχή αυτή.

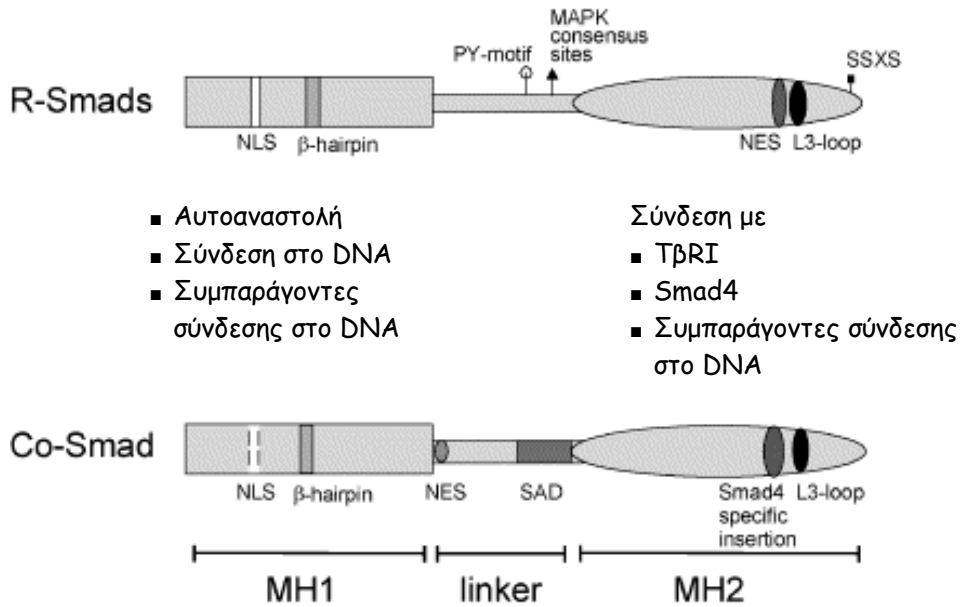
3. Αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες.

4. Εισαγωγή στον πυρήνα: Οι Smads περιέχουν μια αλληλουχία στην περιοχή MH1 που ορίζεται ως NLS μοτίβο (nuclear localization signal) και συμβάλλει στην εισαγωγή των Smads στον πυρήνα.

Η συνδετική περιοχή (linker) η οποία συνδέει τις περιοχές MH1 και MH2, είναι λιγότερο συντηρημένη, περιέχει σημαντικά ρυθμιστικά μοτίβα πλούσια σε προλίνη Περιλαμβάνει:

- Θέσεις φωσφορυλίωσης για MAPKKK.
- PY μοτίβο, υπάρχει μόνο στα R-Smads το οποίο αλληλεπιδρά με E3 λιγάσες (Smurf1 και Smurf2) και οδηγεί στην ουβικουιτινίωση και πέψη του συμπλόκου.
- NES στο N-άκρο, βρίσκεται μόνο στον Co-Smad και συμβάλλει στην εισαγωγή του στον πυρήνα.
- SAD (Smad activation domain), είναι η περιοχή του Co-Smad που συμβάλλει στην αλληλεπίδρασή του με τους R-Smads.

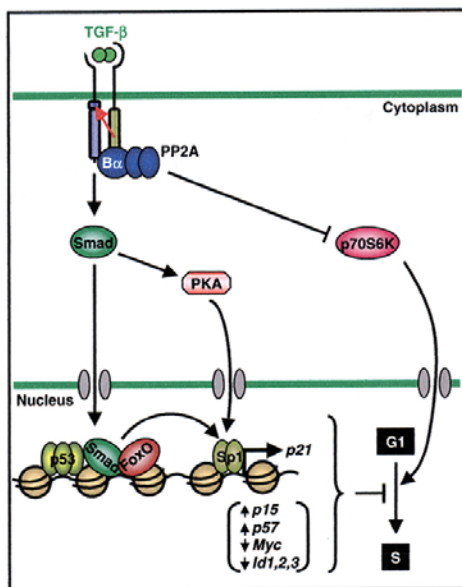
Ο ρόλος της περιοχής MH2 είναι: Αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, με υποδοχείς (στην περίπτωση των R-Smads), με άλλους Smads και με μεταγραφικούς παράγοντες.



**Εικόνα 13.5** Συνολική εικόνα δομής των Smad και ρόλος της κάθε περιοχής τους.

Στην περιοχή **MH1** υπάρχουν τμήματα για αυτοαναστολή των R-Smads, σύνδεση με το DNA, αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες και εισαγωγή στον πυρήνα. Στην περιοχή **MH2** βρίσκονται τμήματα για αλληλεπίδραση με τον TβRI, και την Smad4 και με συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA. Τέλος στην συνδετική περιοχή των R-Smads υπάρχουν θέσεις φωσφορυλίωσης από MAPKKK, το PY μοτίβο το οποίο αλληλεπιδρά με E3 λιγάσες (Smurf1 και Smurf2) και οδηγεί στην ουβικουιτινίωση, ενώ στη συνδετική περιοχή του Co-Smad υπάρχουν οι περιοχές NES και SAD για εισαγωγή στον πυρήνα και αλληλεπίδραση με τους R-Smads αντίστοιχα.

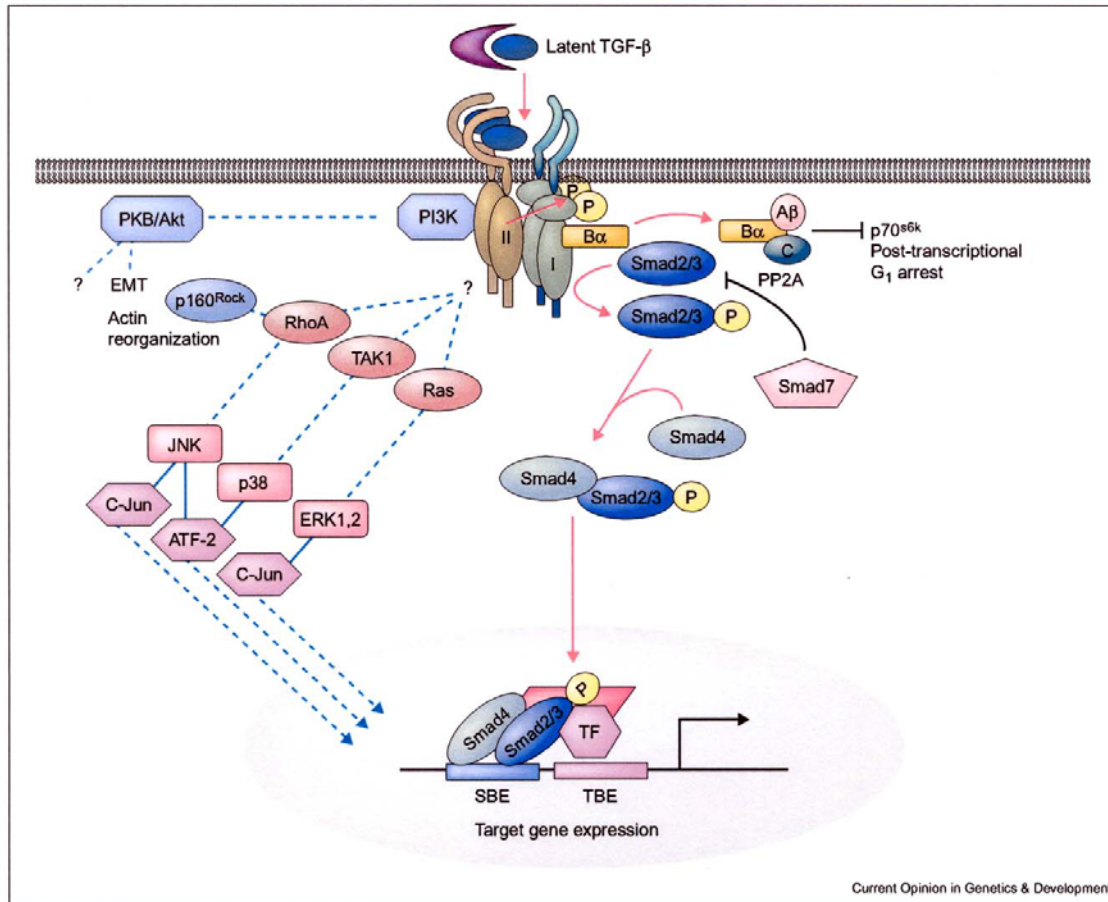
Από M Lutz, P Knays, *Integration of the TGF-β pathway into the cellular signaling network, Cellular Signaling 14 (2002) 977-988.*



**Εικόνα 13.10** Ο TGFβ σταματά τον κυτταρικό κύκλο (εμποδίζει το πέρασμα από την G1 στην S) μέσω δύο μονοπατιών, Smad και non-Smad.

α/ Μέσω της ενεργοποίησης των Smad επηρεάζει, είτε άμεσα είτε μέσω της PKA, γονίδια που αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο. Η σημαντικότερη δράση είναι η αναστολή του γονιδίου myc.

β/ Μέσω της ενεργοποίησης της PP2A αναστέλλει την p70S6K, μια κινάση η οποία εισέρχεται στον πυρήνα και προωθεί τον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G1 στην S. Η αναστολή της p70S5K σταματά τον κυτταρικό κύκλο στην φάση G1. Από Moustakas A., Heldin C., *J. Cell Sci. 2005, 118, 3573-3584.*



### Εικόνα 13.11 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGFβ.

**Το Smad μονοπάτι:** Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας TGFβR φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad2/3, οι οποίοι διμερίζονται, συνδέονται με τον Smad4, εισέρχονται στον πυρήνα, όπου συνδέονται στο DNA, στις περιοχές SBE (Smad binding element) μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (TF, transcription factors), οι οποίοι συνδέονται στις περιοχές TBE (Transcription factor Binding element).

**Τα non-Smad μονοπάτια:** Επίσης ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορα μονοπάτια MAPK κινασών (Rho/JNK/cJun, TAK/p38/ATF2, Ras/ERK/cJun), την κινάση PI3-K και την φωσφατάση PP2A, η οποία αναστέλλει την κινάση p70S6K (η οποία προωθεί τον κυτταρικό κύκλο).

Από Wakefield L, Roberts A., *TGF-β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*, *Current Opinion in Genetics and Development*, 2002, 12, 22-29.