

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Molekulární mechanismy přenosu extracelulárních signálů  
dráhou ERK.**

(Molecular mechanisms of signal transduction by the ERK signaling  
cascade.)

Vojtěch Bráborec

Školitel: Ing. Tomáš Vomastek, Ph.D.

Praha 2010

Děkuji svému školiteli Ing. Tomášovi Vomastkovi, Ph.D. a ostatním členům laboratoře za potřebnou dávku trpělivosti a cenné rady poskytnuté v průběhu psaní této bakalářské práce. Mnohá díky patří i mé přítelkyni Marii Hořkové za vydatnou morální podporu zejména v závěrečných fázích příprav.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval sám z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

## Obsah

<b>1. Seznam zkratek</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Abstrakt</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>5. Signální dráha proteinkinázy ERK</b> .....	<b>8</b>
5.1 Princip a charakteristika MAPK kaskád.....	8
5.2 Aktivace kaskády ERK.....	9
5.3 Ras .....	10
5.4 Raf .....	11
5.5 MEK (MAPK/ERK kinase).....	13
5.6 ERK .....	13
<b>6. Regulace specificity buněčné odpovědi dráhou ERK</b> .....	<b>15</b>
6.1 Docking interakce.....	16
6.2 Subcelulární lokalizace proteinů .....	16
6.3 Síla a doba trvání signálu.....	17
6.4 Komunikace s ostatními signálními drahami .....	18
6.5 Modulační proteiny.....	18
6.5.1 Scaffold proteiny .....	19
6.5.1.1 KSR (kinase suppressor of Ras) .....	19
6.5.1.2 MP1 (MEK partner-1) a jeho interakční partneři .....	20
6.5.1.3 Ostatní scaffold proteiny .....	21
6.5.2 Proteinové inhibitory.....	21
6.5.2.1 RKIP (Raf kinase inhibitor protein) .....	22
6.5.2.2 Sef (Similar expression of fgf genes) .....	22
6.5.2.3 Sprouty.....	23
6.5.2.4 SPRED (Sprouty related proteins with EVH1 domain) .....	23
6.5.3 Proteinové kotvy .....	23
6.5.3.1 PEA-15 (15kDa phosphoprotein enriched in astrocytes) .....	23
6.5.3.2 Sef.....	24
6.5.3.3 Paxillin.....	24
6.5.3.4 Proteinové kotvy s enzymatickou funkcí.....	25
<b>7. Scaffold proteiny a modulátory v kontextu fyziologických dějů</b> .....	<b>25</b>
7.1 Integrace signálů vedoucích od extracelulární matrix.....	25
7.2 EGF/NGF signalizace v PC12 buňkách .....	27
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	<b>30</b>

## 1. Seznam zkratek

CamKII	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	MEK	MAPK/ERK kinase
CD	common docking	MKP	MAPK phosphatase
CNK	connector enhancer of KSR	MLCK	myosin light-chain kinase
CR1-3	conserved region 1-3	MNK	MAPK-interacting kinase
CRD	cysteine rich domain	MORG1	MAPK-organizer 1
DED	death effector domain	MP1	MEK partner 1
DEF	docking site for ERK	NES	nuclear export signal
DUSP	dual specificity phosphatase	NF1	neurofibromin 1
ECM	extracellular matrix	NGF	nerve growth factor
EGF	epidermal growth factor	NLS	nuclear localization signal
EGFR	epidermal growth factor receptor	PAK	p21 Rac-activated kinase
ERF	ETS2 repressor factor	PEA-15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
ERK	extracellular signal-regulated kinase	PI3K	phosphatidylinositol-3-kinases
FADD	Fas-activated death domain protein	PKA	proteinkinase A
FAK	focal adhesion kinase	PKC	proteinkinase C
FGF	fibroblast growth factor	PP2A	protein phosphatase 2A
GAP	GTPase activating protein	PRS	proline-rich sequence
GEF	guanine nucleotide exchange factor	RACK1	receptor for activated C-kinase 1
GPCR	G protein-coupled receptor	RBD	Ras binding domain
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	RKIP	Raf kinase inhibitor protein
GRK	G protein-coupled receptor kinase	RSK	ribosomal protein S6 kinase
GDP	guanosine diphosphate	RTK	receptor tyrosine kinase
GTP	guanosine triphosphate	Sef	similar expression of fgf genes
IEG	immediate early gene	SH2	Src homology 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase	SOS	son of sevenless
KSR	kinase suppressor of Ras	SPRED	Sprouty related protein with EVH1 domain
MAPK	mitogen-activated protein kinase	SRF	serum response factor
		TCF	ternary complex factor

## 2. Abstrakt

Signální MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskáda představuje evolučně konzervovaný mechanismus, který buňkám umožňuje vnímat extracelulární signály a vhodným způsobem na tyto signály reagovat. Nejlépe prostudovaným členem MAPK rodiny je proteinkináza ERK (extracellular signal-regulated kinase), která spolu s proteiny Raf a MEK (MAPK/ERK kinase) tvoří prototypickou signální dráhu regulující široké spektrum biologických dějů jako je například proliferace, diferenciace, buněčný pohyb, adheze či apoptóza. Aby mohla jedna signální dráha regulovat množství různých odpovědí, vyvinuly si buňky modulační mechanismy, mezi které patří odlišná síla a doba trvání signálu, různá lokalizace proteinů, komunikace s ostatními signálními drahami, rozdíly ve výběru substrátů i to, jakým způsobem si signalizační molekuly dané spektrum interakčních partnerů vybírají. Uvedené mechanismy jsou ve velké míře ovlivňovány proteiny s neenzymatickými funkcemi, jako jsou tzv. scaffold proteiny, proteinové inhibitory a proteinové kotvy. Tyto proteiny usměrňují signály vedoucí k dosažení konkrétní buněčné odpovědi a jsou tedy klíčovými články signální transdukce. I přes rostoucí význam proteinových modulátorů v buněčné signalizaci, není jejich fyziologická role často známá. Částečnou výjimku představují dva fyziologické děje - integrace signálů vedoucích od ECM (extracellular matrix) a diferenciace PC12 buněk. Na těchto dějích lze názorně demonstrovat funkční význam proteinových modulátorů ERK dráhy.

### **Klíčová slova:**

MAPK; ERK; signální transdukce; signální kaskáda; buněčná specificita; scaffold proteiny

### **3. Abstract**

The MAPK (mitogen-activated protein kinase) cascade represents an evolutionary conserved mechanism by which cells sense extracellular signals and convert them into variety of context-dependent responses. The best studied member of the MAPK protein family is protein kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase). Together with protein kinases Raf and MEK (MAPK/ERK kinase) comprise a prototypical signaling pathway which regulates broad-spectrum of biological processes such as cellular proliferation, differentiation, cellular migration, adhesion or apoptosis. To modulate such a multitude of distinct responses by a single pathway, cells utilize mechanisms such as signal strength and duration, distinct protein localization, communication with other signaling pathways, differential substrate selection and the selection of interactive partners. All presented means of regulation are influenced by proteins with non-enzymatic functions - scaffold proteins, protein inhibitors and anchoring proteins. These protein modulators channel the signals leading to particular cellular response, and thus represent the key element of signal transduction. Despite increasing importance of protein modulators in cellular signaling, their biological roles remain mostly unknown. The physiological importance of protein modulators is best understood during the process of PC12 cells differentiation and integration of signals leading from proteins of extracellular matrix (ECM).

#### **Keywords:**

MAPK; ERK; signal transduction; signal cascade; cellular specificity; scaffold proteins

## 4. Úvod

Každá buňka se vyskytuje v prostředí, které je proměnlivé a nestálé. Je tedy potřeba registrovat jeho změny a adekvátním způsobem na ně reagovat pro zachování stálého vnitřního prostředí, což je z hlediska přežití kritický parametr. Situace je poněkud odlišná u organismů jednobuněčných a mnohobuněčných. Zatímco u jednobuněčných je každá buňka samostatnou funkční jednotkou reagující sama za sebe, u mnohobuněčných organismů fungují buňky v určitém kontextu, a to v rámci dané tkáně či orgánu. Aby byly buňky schopné vnímat své okolí a následně odpovídat na jeho případné změny, vyvinuly si velice účinný mechanismus v podobě signálních kaskád, které jim umožňují účinně přenášet vnější podněty přes membránu směrem do intracelulárního prostředí.

Mezi nejdůležitější signální dráhy patří rodina tzv. MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskád, která je vysoce konzervovaná od kvasinek až po vyšší eukaryota. Do této skupiny patří i proteinkináza ERK (extracellular signal-regulated kinase), která byla první popsanou kinázou řadící se do MAPK rodiny. Je hlavní součástí kaskády, která je tvořena dalšími dvěma složkami - proteinkinázami Raf a MEK (MAPK/ERK kinase). Signální dráha ERK je aktivována celou řadou vnějších stimulů, které následně převádí v rozmanité buněčné odpovědi, jako je například regulace proliferace, diferenciace, regulace buněčného cyklu, imunitní odpovědi, migrace či programované buněčné smrti. Funkční ERK kaskáda je nezbytným předpokladem správného embryonálního vývoje, což dokazuje celá řada závažných defektů způsobených nefunkčností některé ze složek uplatňujících se v rámci přenosu signálu. Příkladem vývoj nervového systému, ale i morfogeneze srdce, lebky či obličejové části jsou spojeny se signalizací dráhou ERK a jakékoliv narušení se může projevit poruchou dané tkáně. Z biomedicínského hlediska je ovšem role kaskády ERK ve vývoji postembryonálním ještě významnější. Somatické mutace, které způsobují konstitutivní aktivaci dráhy ERK, se totiž s vysokou frekvencí objevují u mnoha typů lidských nádorových onemocnění.

I když máme velké množství informací o biochemické podstatě jednotlivých kroků zahrnutých v přenosu signálu dráhou ERK, výrazně méně víme o tom, jakým způsobem jsou tyto signály realizovány v rámci specifické buněčné odpovědi. Tato práce si proto klade za cíl popsat základní biochemické charakteristiky signální transdukce dráhou ERK a na základě současných poznatků zdůraznit klíčové mechanismy, které směřují signál k dané biologické odpovědi, a které jsou tedy zásadní pro bezchybnou činnost buněk, tkání a potažmo celého organismu. Detailní pohled je věnován zejména neustále se rozrůstající skupině proteinů

s neenzymatickými funkcemi, které mohou tyto zásadní mechanismy regulovat, a tím dále modulovat průběh signálu. Jejich zapojení v rámci konkrétního buněčného programu je ukázáno na příkladu dvou fyziologických procesů – diferenciaci PC12 buněk a integrace signálů vedoucích od ECM (extracellular matrix).

## 5. Signální dráha proteinkinázy ERK

### 5.1 Princip a charakteristika MAPK kaskád

Dráha ERK a obecně MAPK kaskády se vyznačují rozčleněním cesty signálu do několika vzájemně komunikujících úrovní. Typicky se jedná o úrovně tři a to MAP3K (MAP kinase kinase kinase), MAP2K (MAP kinase kinase) a MAPK (MAP kinase), přičemž vlastní přenos signálu z jedné úrovně na následující je realizován ve formě následných fosforylací. Hlavní aktivátor MAPK kaskády, MAP3K, fosforyluje proteinkinázu MAP2K, která je tímto krokem aktivována. Aktivní MAP2K následně fosforyluje a aktivuje MAPK. Proteinkináza MAPK je klíčovým regulátorem vnitrobuněčné odpovědi, protože fosforyluje a tím přímo ovlivňuje funkci celé řady proteinů, což má za následek specifickou odpověď buňky. Hovoříme-li konkrétně o dráze ERK, hlavní aktivátory MAP3K představují proteinkinázy Raf, na úrovni MAP2K operují isoformy MEK proteinů a centrální MAPK složku reprezentují proteinkinázy ERK (Rubinfeld and Seger, 2005).

Rozdělení do tří úrovní je významné z hlediska možnosti zesilování signálu, kdy malé množství aktivního proteinu může vést k ovlivnění mnohonásobně větší frakce proteinů uvnitř buňky. Další výhodou existence signálních kaskád je možnost jejich přesné regulace a tím dosažení specifické biologické odpovědi. K dramaticky odlišnému efektu stačí totiž zásah do jedné z úrovní například pomocí specifického inhibitoru či pomocí proteinové fosfatázy.

Jak bylo naznačeno již v úvodu, signální dráha proteinkinázy ERK je jedním ze členů MAPK rodiny. V současné době jsou, kromě dráhy ERK, detailně popsány další dvě kaskády z této skupiny. Jsou jimi dráha JNK (c-Jun N-terminal kinase) a p38. Tyto dráhy mají podobnou architekturu a aktivační mechanismy. V případě proteinkináz na úrovni MAPK, tzn. ERK, JNK a p38, mají všechny tyto proteiny obdobný aminokyselinový motiv Thr-Xxx-Tyr, který se nalézá v kinázové doméně proteinů, konkrétně v oblasti nazývané se aktivační smyčka. Do aktivního stavu jsou uváděny fosforylací threoninu a tyrosinu. Tyto proteinkinázy také vykazují obdobnou substrátovou specifitu, jelikož fosforylují serinové nebo threoninové zbytky v kontextu sekvence Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro. Ačkoli všechny tyto kaskády

vykazují řadu podobností, navzájem se odlišují v regulaci různých biologických dějů a liší se taktéž podněty, které je stimulují (Raman et al., 2007).

JNK kaskáda je aktivována zejména při buněčném stresu, jakým je kupříkladu teplotní šok, ionizující záření, oxidační stres či poškození DNA. Dále je dráha stimulována prozánětlivými cytokiny, inhibicí syntézy DNA a mimo jiné i růstovými faktory. JNK proteiny se tak uplatňují při zánětlivých reakcích, programované či stresem navozené buněčné smrti, při reorganizaci aktinu, buněčné transformaci a při metabolických pochodech. Typickým aktivačním motivem v případě JNK je sekvence Thr-Pro-Tyr. Do dnešní doby byly popsány tři různé geny (JNK1, JNK2, JNK3), které jsou si podobné z více než 80 % a minimálně deset rozdílných sestřihových forem (Raman et al., 2007).

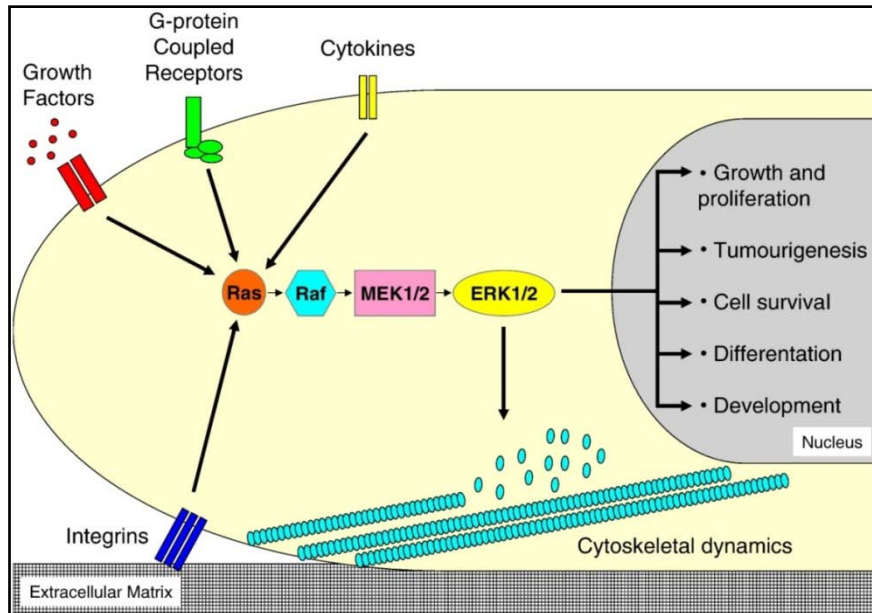
Do rodiny p38 proteinkináz patří čtyři isoformy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), jejichž vzájemná podobnost je pouze kolem 60 %. Dráha je spouštěna v reakci na širokou škálu stresových podnětů, mezi které patří mimo jiné UV záření, osmotický šok, hypoxie nebo prozánětlivé cytokiny. Méně často je stimulována růstovými faktory. Signální kaskáda p38 je zapojená do regulace zánětlivých reakcí, apoptosy či buněčné diferenciaci. Charakteristickým motivem nalézajícím se v aktivační smyčce je sekvence Thr-Gly-Tyr (Raman et al., 2007).

## 5.2 Aktivace kaskády ERK

Aktivace kaskády vedoucí ke stimulaci proteinu ERK začíná na cytoplasmatické membráně, kde se na receptorové molekuly váží extracelulární ligandy (Obr. 1). Mezi nejdůležitější receptory podílející se na přenosu signálu z vnějšího prostředí do buňky patří tři funkčně se lišící typy proteinů - receptory ze skupiny GPCR (G protein-coupled receptor), receptory s vnitřní tyrosin kinázovou aktivitou (neboli RTK; receptor tyrosine kinase) a integriny, což jsou povrchové receptory bez vlastní kinázové aktivity interagující s proteiny ECM (Brown and Sacks, 2009).

Nejlépe prostudovanou je signalizace prostřednictvím EGF (epidermal growth factor), který se váže na EGFR (EGF receptor). EGFR je receptor typu RTK, který se bez navázaného ligandu vyskytuje ve formě monomerů. Vazba EGF vede k dimerizaci monomerních EGFR a posléze indukuje tyrosin kinázovou aktivitu receptoru. Tímto způsobem dochází k vzájemné fosforylaci cytoplasmatických domén EGFR. Fosforylovaná cytoplasmatická doména EGFR je rozeznávána SH2 (Src homology 2) doménami adaptorových proteinů. V případě ERK kaskády je do této skupiny proteinů řazen Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2). Před aktivací se Grb2 nachází v cytoplasmě v komplexu se SOS (son of sevenless). SOS je tzv. GEF (guanine nucleotide exchange factor), který stimuluje výměnu GDP za GTP v malé

GTPáze Ras. Po stimulaci ligandem následuje mobilizace celého komplexu Grb2-SOS na cytoplasmatickou membránu, kde SOS katalyzuje výměnu GDP za GTP a tím aktivaci Ras (Seger and Krebs, 1995).



Obr. 1 - Dráha ERK je stimulována vazbou extracelulárních ligandů na příslušné receptory – GPCR, RTK či integrinové proteiny. Signál je poté přenášen přes malou GTPázu Ras a vlastní dráhu ERK tvořenou proteinkinázami Raf, MEK1/2 a ERK1/2 až k substrátům proteinů ERK. Jejich fosforylací proteinkináza ERK ovlivňuje řadu fyziologických procesů jako je např. růst a proliferace, diferenciacie a další. Převzato z (Brown and Sacks, 2009).

### 5.3 Ras

Aktivace Ras je klíčovým dějem v přenosu signálu, neboť aktivní protein Ras dále stimuluje celou řadu signálních drah, včetně kaskády ERK, a představuje tak jakýsi signalizační uzel.

Proteiny Ras patří do rodiny tzv. malých GTPáz. Obecně mezi malé GTPázy patří proteiny v rozmezí velikostí od 20 do 29kDa, které mezi sebou sdílí sekvenční homologii, společné motivy a mají téměř identickou terciární strukturu. Malé GTPázy, neboli malé G proteiny, nabývají dvou odlišných konformačních stavů – s navázaným GDP nebo s navázaným GTP. Vazba GTP, kterou zajišťují GEF proteiny, jako je například výše uvedený SOS, vede ke strukturní přestavbě, která bílkovinu aktivuje. Opačný proces, tedy rozštěpení GTP způsobující inaktivaci Ras, katalyzují GAP (GTPase activating proteins) (Rajalingam et al., 2007).

Strukturní přestavba spojená s vazbou GTP je klíčovým dějem při aktivaci dráhy ERK. Ras s navázaným GTP asociuje s N-koncovou regulační oblastí Raf proteinu, ve které se nachází RBD (Ras-binding domain) a CRD (cysteine-rich domain) domény (Wellbrock et al., 2004). Díky zakotvení Ras proteinu, kterého je dosaženo posttranslační modifikací lipidy (Brunsveld et al., 2009), je proteinkináza Raf rekrutována na cytoplasmatickou membránu a v tomto kompartmentu je i aktivována.

Doposud byly popsány tři isoformy Ras sdílející více než 90% sekvenční homologii – K-Ras, N-Ras a H-Ras. Dlouho byly považovány za funkčně redundantní, ale ukázalo se, že jsou tkáňově specifické a v organismu hrají rozdílné role. Aktivační somatické mutace způsobující konstitutivní signalizaci Ras proteiny byly nalezeny v téměř 30% případech lidských nádorových onemocnění. Výskyt jednotlivých isoform je u jednotlivých typů malignit odlišný. Mutace, konkrétně substituce, vedou k trvalé stimulaci tím, že brání rozštěpení GTP katalyzované GAP (Rajalingam et al., 2007).

#### 5.4 Raf

Proteinkináza Raf, aktivovaná na cytoplasmatické membráně G proteinem Ras, zajišťuje signální transdukcí fosforylací serinových aminokyselin kinázy MEK, čímž indukuje její kinázovou činnost. MEK je jediným známým substrátem Raf.

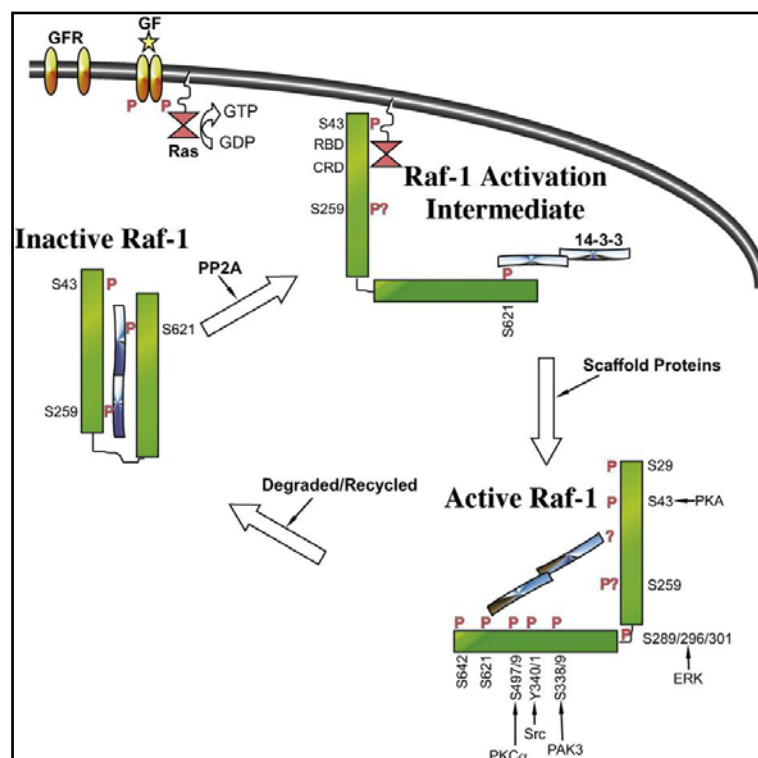
Identifikovány byly celkem tři isoformy – A-Raf, B-Raf a c-Raf, který je někdy označován jako Raf-1. Jednotlivé isoformy se v některých funkcích překrývají, ale zároveň se v určitých aspektech regulace odlišují. Proteiny Raf jsou exprimovány prakticky ve všech tkáních, liší se ovšem úrovně exprese jednotlivých isoform (Wellbrock et al., 2004).

Nejdéle studovanou a tedy i nejlépe popsanou isoformou je c-Raf. Skládá se ze tří konzervovaných úseků CR1, CR2 a CR3 (conserved region 1-3). Na CR1 doméně se nachází RBD, úsek zodpovědný za vazbu c-Raf na Ras, a CRD oblast stabilizující asociaci s Ras. Doména CR2 zahrnuje Ser259, který slouží jako vazebné místo pro 14-3-3 proteiny. CR3 je katalytická doména s konzervovaným zbytkem Ser621, který je druhým vazebným místem 14-3-3 proteinů.

V neaktivním stavu je katalytická doména proteinkinázy c-Raf blokována svou N-terminální částí a inaktivní konformace je stabilizována prostřednictvím dimeru 14-3-3 proteinů a fosforylací Ser43, který je cílem PKA (proteinkinase A). Aktivace proteinkinázy c-Raf je poměrně komplikovaný proces (Obr. 2). Při stimulaci signální kaskády vede vazba Ras-GTP do oblasti RBD a CRD k vytlačení 14-3-3 ze Ser259, čímž se c-Raf protein rozbálí a katalytická doména se stává volně přístupnou pro další fosforylace. Klíčovými ději se jeví

fosforylace Ser338/339 a Tyr340/341 zprostředkovaná proteinkinázou PAK (p21 Rac-activated kinase), respektive Src. Fosforylace těchto aminokyselinových zbytků uvolňuje inhibiční efekt N-terminální části c-Raf a stabilizuje aktivní konformaci proteinu.

Byla popsána i řada dalších fosforylačních míst, jejichž úloha v regulaci Raf proteinů ale zůstává dosud neobjasněná (Leicht et al., 2007). Mozaika fosforylačních dějů, v rámci které každý aminokyselinový zbytek přispívá rozdílnou měrou a protichůdnými efekty k usměrňování činnosti Raf proteinů, není specifickým pouze c-Raf, ale i ostatních isoform Raf. Je ovšem nutné dodat, že poloha a množství fosforylačních míst se u jednotlivých isoform liší.



Obr. 2 – Fosforylace řady threoninových, serinových a tyrosinových zbytků je důležitým regulačním elementem ovlivňujícím kinetiku Raf proteinů. Převzato z (Leicht et al., 2007).

Ačkoli studium c-Raf poskytlo nejvíce informací o komplexitě regulačních procesů, co do významnosti, minimálně medicínského, dominuje B-Raf. Je totiž jedinou isoformou, u které byly popsány přirozeně se vyskytující aktivační mutace. Mutovaný B-Raf byl nalezen až u 60 % melanomů, 50 % rakovin štítné žlázy či 30 % nádorů postihující vaječníky (Wellbrock et al., 2004). Aktivační mutace vedou ke konstitutivní aktivaci Raf. Typickou

substituční mutací a to zhruba v 90 % všech případů je výměna valinu na pozici 600 za glutamovou kyselinu (Wan et al., 2004).

## 5.5 MEK (MAPK/ERK kinase)

Do plně stimulovaného stavu je MEK protein uváděn proteinkinázou Raf, která fosforyluje dvě serinové aminokyseliny Ser218 a Ser222 (Rubinfeld and Seger, 2005). Mimo typického aktivátoru MAP2K, kterým je proteinkináza Raf, může být MEK pravděpodobně za specifických podmínek fosforylován i dalšími proteiny, jakými jsou kupříkladu TPL2, Mos či MEKK1 (Yoon and Seger, 2006). Jediným známým substrátem proteinkinázy MEK je ERK, která která musí zaujímat nativní konformaci, aby byla úspěšně rozpoznána.

MEK je proteinkináza s duální specificitou, což znamená, že fosforyluje nejen threoninové, ale i tyrosinové zbytky. Identifikovány byly tři isoformy MEK proteinu - MEK1, MEK2 a MEK1b, která je enzymaticky neaktivní. Jednotlivé isoformy sdílí asi 85 % sekvenční homologie.

Mimo Ser218 a Ser222 obsahuje MEK řadu dalších míst, která podléhají fosforylaci a která regulují činnost proteinkinázy. Pro fungování MEK proteinů má zcela zásadní význam tzv. PRS (proline-rich sequence) oblast, ve které se nalézá Ser298 a Thr292. Fosforylace Ser298 proteinem PAK1 je vyžadována pro účinnou aktivaci MEK1 proteinkinázou Raf (Frost et al., 1997) a také pro tvorbu komplexu MEK1-ERK při buněčné adhezi. Fosforylace Thr292 naopak tuto interakci potlačuje, protože brání PAK1 v rozeznání Ser298 (Eblen et al., 2004). Existuje řada dalších fosforylovaných oblastí MEK, jejichž funkce ale zatím není objasněná.

MEK také obsahuje NES (nuclear export signal) sekvenci, která proteinu zajišťuje cytoplasmatickou lokalizaci. Jelikož MEK interaguje s neaktivní proteinkinázou ERK, hraje roli také tzv. proteinové kotvy neboli „anchoring“ proteinu, který zabezpečuje cytoplasmatickou lokalizaci i neaktivní proteinkinázy ERK (Rubinfeld and Seger, 2005).

## 5.6 ERK

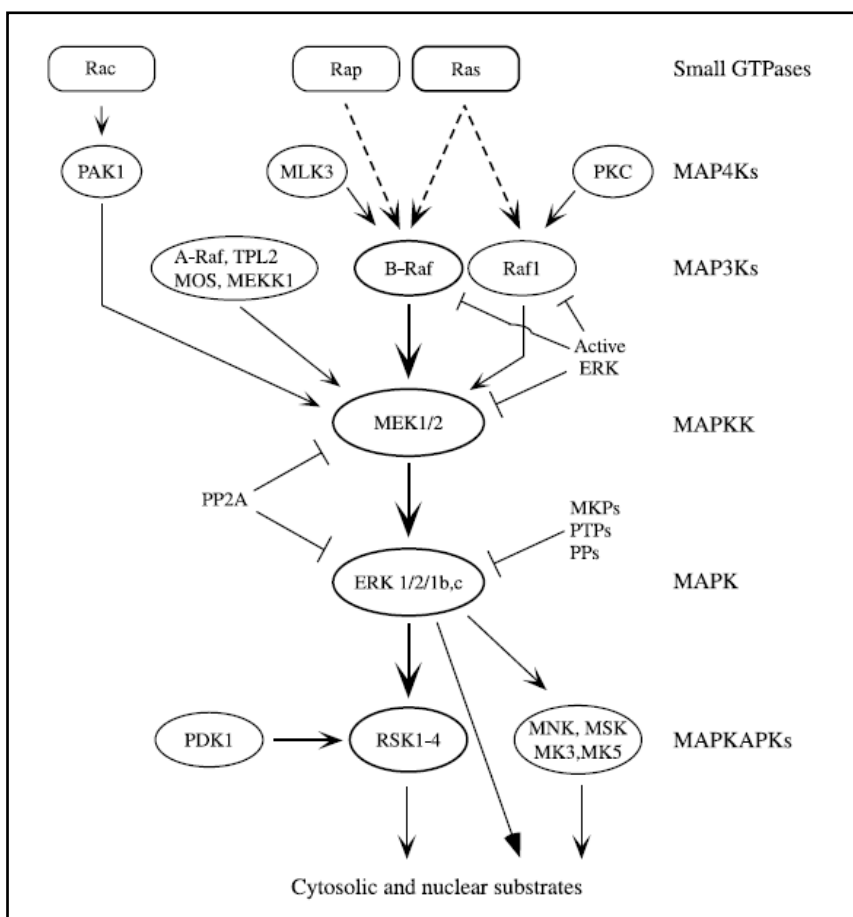
Proteinkináza ERK je stimulována fosforylací threoninu a tyrosinu v charakteristické sekvenci Thr-Glu-Tyr (Thr202-Glu203-Tyr204 v případě ERK1 a Thr183-Glu184-Tyr185 v případě ERK2), která se nalézá v aktivační smyčce (Yoon and Seger, 2006). U obratlovců jsou za signální transdukcii zodpovědné dvě isoformy – ERK1 a ERK2. Navíc se protein ERK1 vyskytuje v několika sestřihových formách, mimo nejrozšířenější varianty ERK1

existuje i ERK1b a ERK1c. ERK1 a ERK2 se vyznačují zhruba 84% sekvenční identitou na aminokyselinové úrovni (Lefloch et al., 2008). Dlouhou dobu se spekulovalo, proč existují dvě formy, které se funkčně překrývají a prakticky se v žádném aspektu regulace neliší. Knockout pokusy ale odhalily, že zatímco myši postrádající ERK1 jsou životaschopné a jejich vývoj probíhá normálně až na malé defekty při vývoji lymfocytů (Pages et al., 1999), myši bez ERK2 umírají již v raném embryonálním vývoji (Yao et al., 2003). Lefloch (et al., 2008) tento fenomén interpretoval tak, že klíčový vliv ERK2 je dán obecně vyšší úrovní exprese této isoformy. Pokud ERK1 v organismu chybí nebo je koncentrace proteinu snížena, proteinkináza ERK2 může tento nedostatek kompenzovat.

Dvojitou fosforylací aktivovaná proteinkináza ERK fosforyluje celou řadou jaderných a cytoplasmatických substrátů. Rozeznává při tom konsenzus sekvenci Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro a fosforyluje aminokyseliny serin či threonin, přičemž přítomnost prvního z prolinů není vždy nutná (Seger and Krebs, 1995). Zkrácený motiv Ser/Thr-Pro lze nalézt až v 80 % všech buněčných proteinů, z čehož se dá usuzovat, že ERK ovlivňuje obrovské množství molekul. Do dnešní doby bylo v souvislosti s proteinkinázou ERK nalezeno více než 150 interakčních partnerů (Yoon and Seger, 2006). Skutečné množství bude ovšem pravděpodobně ještě mnohem vyšší.

Nejlépe pochopeným mechanismem, jakým ERK moduluje funkci proteinů a následnou buněčnou odpověď, je regulace na úrovni transkripce. Aktivovaná ERK po translokaci do jádra fosforyluje transkripční faktor Elk1, který je členem skupiny tzv. TCF (ternary complex factors) faktorů patřících do rodiny ETS transkripčních faktorů. Fosforylovaný Elk1 heterodimerizuje se SRF (serum response factor) a indukuje expresi bezprostředně časných genů (IEG; immediate early genes) (Yoon and Seger, 2006). Mezi produkty těchto genů patří transkripční faktory jako například c-Fos či c-Jun. c-Fos vytváří s c-Jun komplex nazývaný se AP1, který funguje jako transkripční faktor regulující expresi cyklinu D1 a následný vstup do buněčného cyklu. c-Fos je nestabilní protein a jeho stabilita je pozitivně regulována fosforylací ERK. ERK tedy plní dvě hlavní úlohy – indukuje expresi transkripčních faktorů a následně je stabilizuje (Murphy et al., 2002).

ERK fosforyluje i velké množství cytoplasmatických proteinů, které se podílí na cytoplasmatické či jaderné signalizaci (Obr. 3). Z nich stojí za zmínku například RSK (ribosomal protein S6 kinase), MNK (MAPK-interacting protein) nebo MKP3 (MAPK phosphatase 3) (Yoon and Seger, 2006).



Obr. 3 – Dráha ERK a proteiny modulující její signalizaci. Převzato z (Yoon and Seger, 2006).

## 6. Regulace specifity buněčné odpovědi dráhou ERK

Jak vyplývá z předchozí kapitoly, biochemické charakteristiky jednotlivých komponent dráhy ERK a jejich vzájemných interakcí jsou již velmi dobře zmapovány. O poznání méně však víme o tom, jak je signál směřován na cestě ke konkrétní biologické odpovědi, což je pro správnou regulaci a funkčnost dráhy v rámci celého organismu klíčová otázka. Jako důležité mechanismy, které modulují směr signálu uvnitř kaskády ERK tak, aby specificky odpovídal na aktuální požadavky vnějšího či vnitřního prostředí, se jeví odlišná síla a doba trvání signálu, různá lokalizace proteinů, komunikace s ostatními signálními drahami, rozdíly ve výběru substrátů i to, jakým způsobem si signalizační molekuly dané spektrum interakčních partnerů vybírají. Nedávné práce ukazují, že všechny tyto mechanismy mohou být regulovány proteiny, které nevykazují enzymatickou aktivitu, a které lze pro jejich činnost souhrnně označit jako modulační.

## 6.1 Docking interakce

Za vzájemné specifické rozpoznání a následnou fosforylaci substrátu proteinkinázou ERK jsou zodpovědné tzv. docking interakce. Docking interakcemi se rozumí jev, kdy jeden člen kaskády interaguje se svým partnerem prostřednictvím elektrostatických a/nebo hydrofobních interakcí, ke kterým dochází mimo aktivní místo proteinkinázy. Tzv. docking místa jsou konzervována u celé řady molekul interagujících s ERK jako jsou proteinfosfatázy, cytoplasmatické či jaderné substráty nebo proteiny MEK (Tanoue and Nishida, 2003).

DEF doména (docking site for ERK; či FXFP motiv) je právě takovým evolučně konzervovaným vazebným místem zprostředkovávajícím vysokoafinitní interakce mezi ERK a substráty a nachází se u mnoha proteinů interagujících s ERK (Jacobs et al., 1999). FXFP motiv přítomný v DEF doméně specificky interaguje s aktivní proteinkinázou ERK přes aminokyselinové zbytky Met197, Leu198, Tyr231 a Leu23 přítomné na povrchu ERK2 (Lee et al., 2004).

Druhou popsanou docking doménou je tzv. D doména, která se nachází v proteinkináze MEK a celé řadě fosforylačních cílů proteinu ERK. Pro D doménu je charakteristický krátký úsek bazických aminokyselinových zbytků. Kladně nabitá D doména interaguje s negativně nabitými aspartátovými zbytky Asp316 a Asp319, které jsou přítomné v proteinech ERK (Lee et al., 2004). Tato samotná oblast ovšem pro stanovení vazebné specifity nestačí, protože vysokoafinitní interakce vyžadují též přítomnost tzv. ED místa, které zřejmě s Asp316 a Asp319 vytváří „aktivační žlábek“, do kterého „zapadají“ interagující proteiny (Tanoue et al., 2001). Některé proteiny obsahují D doménu, jiné jen DEF doménu a některé mají obě vazebné oblasti jako například transkripční faktor Elk1.

## 6.2 Subcelulární lokalizace proteinů

Aby kaskáda ERK mohla uplatňovat svůj vliv na širokou škálu biologických dějů, nesmí se signály z vnějšího prostředí zastavit na cytoplasmatické membráně, ale musí být přeneseny do místa svého konečného zpracování.

V nestimulovaných buňkách se komponenty ERK kaskády nacházejí převážně v cytoplasmě. Situace se však dramaticky mění po působení růstovými faktory či jinými extracelulárními ligandy, které aktivují ERK. Aktivní proteinkináza ERK je lokalizována do různých intracelulárních kompartmentů, jako je kupříkladu jádro, cytoplasmatická membrána (Yoon and Seger), endosomální váčky (Teis et al., 2002) nebo fokální adheze (Vomastek et al., 2007). V jednotlivých buněčných kompartmentech může ERK fosforylovat

a tak aktivovat odlišné spektrum substrátů, které vykonávají specifické funkce vedoucí k naplnění buněčné odpovědi.

Jak bylo zmíněno, proteinkináza ERK svou činností reguluje průběh širokého spektra biologických dějů jako je například proliferace, diferenciace, migrace apod. Je zřejmé, že to se může odehrávat pouze cestou ovlivnění exprese za dané děje zodpovídajících genů a že je tedy vyžadována lokalizace proteinkinázy ERK do jádra. Zhruba dvě třetiny cytoplasmatické zásobárny proteinu se skutečně dostává do jaderného kompartmentu, kde fosforyluje a stabilizuje transkripční faktory. Zahájením genové transkripce může ERK zprostředkovaně ovlivnit například vstup do buněčného cyklu nebo iniciaci diferenciačního programu (Zehorai et al., 2010).

I přes znalosti lokalizace proteinů dráhy ERK, jejich role v rozdílných oblastech buňky zůstává často neobjasněná. Je však zřejmé, že signalizace z různých buněčných organel je nezbytná a zaslouží si řadu dalších studií.

### **6.3 Síla a doba trvání signálu**

Intenzita a celková doba ERK signalizace jsou parametry, které značně ovlivňují biologickou odpověď buňky. Proto je důležitá jejich přísná regulace, která se ovšem liší v závislosti na tom, zda má být signál udržován pouze po krátkou dobu, či má dojít k signalizaci dlouhodobější. Intenzita a doba trvání signálu jsou regulovány na celé řadě úrovní, jako je množství receptorů na cytoplasmatické membráně a rychlost jejich internalizace a inaktivace, regulace aktivity proteinkinázy Raf fosforylací proteinkinázami z jiných signálních drah, regulace scaffold proteiny a proteinovými inhibitory apod. Jedním z nejdůležitějších a nejúčinnějších mechanismů je ale zpětnovazebná regulace, ať pozitivní či negativní.

Rychlého útlumu aktivity ERK je dosaženo několika různými způsoby. Jedním z nich je fosforylace SOS proteinu přímo prostřednictvím proteinkinázy ERK či jejího substrátu RSK. Tato modifikace má inhibiční vliv na interakci mezi SOS a Grb2, takže nemohou vytvářet komplex a přesouvat se na cytoplasmatickou membránu (Douville and Downward, 1997). Druhou regulační možností je proteinkinázou ERK řízená hyperfosforylace Raf proteinů, která vede k jejich desenzitizaci, takže i přes přítomnost růstových faktorů nedochází k aktivaci MEK. Hyperfosforylace však nevede k degradaci Raf, a proto opačný proces, defosforylace zprostředkovaná PP2A (protein phosphatase 2A), může obnovit signalizaci (Dougherty et al., 2005). V neposlední řadě lze zkrácené signalizace docílit i ovlivněním činnosti inaktivátorů dráhy ERK, jakými jsou například proteinové fosfatázy.

ERK2 fosforyluje MKP-1 na Ser359 a Ser364 a stabilizuje aktivní konformaci fosfatázy, čímž prodlužuje její poločas života, a zároveň tak tlumí ERK signalizaci (Brondello et al., 1999).

Naopak dlouhodobějšího trvání signálu dosáhne buňka mj. destabilizací proteinových fosfatáz. Například fosforylace MKP-3 na Ser159 a Ser197, na rozdíl od MKP-1, vede k jeho cílení do degradační dráhy (Marchetti et al., 2005). Další variantou je hyperfosforylace Raf proteinů. Ačkoli bylo v předchozím odstavci ukázáno, že fosforylace řady míst může vést k inaktivaci Raf proteinkináz, některé aminokyselinové zbytky mají na aktivitu proteinu opačný efekt (Balan et al., 2006). Je zajímavé, že některá fosforylační místa se uplatňují jak v negativní tak i v pozitivní zpětnovazebné regulaci.

#### **6.4 Komunikace s ostatními signálními drahami**

Bylo by chybné domnívat se, že kaskáda ERK funguje nezávisle na ostatních signálních drahách. Koneckonců už proteiny Raf (King et al., 1998) a MEK (Slack-Davis et al., 2003) vyžadují pro svou aktivaci, respektive pro efektivní signální transdukcii, fosforylaci proteinkinázou PAK, což je efektor malých G proteinů Rac a Cdc42. Je pravděpodobné, že vzájemná komunikace jednotlivých signálních drah probíhá na mnoha úrovních kaskády. Kupříkladu k propojení různých drah může dojít prostřednictvím centrálního aktivátoru ERK kaskády, G proteinu Ras. Ten komunikuje mj. s PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases) dráhou, která reguluje například růst, diferenciaci či přežití buněk (Rajalingam et al., 2007). Vytvoření interakční sítě, která by reflektovala veškeré vzájemné vazby různých signálních drah, je spolu s popisem fyziologických dopadů těchto propojení cílem mnoha současných studií.

#### **6.5 Modulační proteiny**

Jak bylo naznačeno výše, modulační proteiny mají schopnost regulovat mechanismy ovlivňující specifitu a z tohoto důvodu jsou klíčové pro plnění různých buněčných programů. Funkčně je lze rozdělit na scaffold či adaptorové proteiny, inhibitory nebo proteinové kotvy. Nicméně tato specifikace je poměrně nejasně definována a v některých případech jsou rozdíly mezi těmito skupinami minimální, pokud vůbec nějaké. Následující text si klade za cíl popsat základní mechanismy, kterými tyto neenzymatické komponenty dráhy ERK regulují přenos signálu.

### 6.5.1 Scaffold proteiny

Název scaffold lze do češtiny přeložit jako lešení či konstrukce, což do značné míry odráží roli, jakou proteiny nesoucí toto označení v buňce, potažmo v regulaci ERK kaskády hrají. Svým způsobem se skutečně jedná o jakási polypeptidová lešení, která obklopují a váží dvě nebo více komponent dráhy, jelikož typický scaffold protein MAPK kaskády asociuje s centrálními proteinkinázami MAP3K, MAP2K a MAPK. Vazba na scaffold protein způsobuje vzájemné přiblížení navázaných proteinů a tím zprostředkovává a usnadňuje jejich interakci a aktivaci (Ramos, 2008).

Scaffold proteiny a ostatní modulátory představují jeden z důležitých mechanismů, kterým buňky převádí extracelulární signály ve specifickou buněčnou odpověď. Scaffold proteiny dosahují specifity odpovědi v několika základních směrech – často interagují s membránovými receptory, čímž umožňují úzké spojení vnějšího signálu s MAPK dráhou, ovlivňují interakce mezi jednotlivými členy kaskády, účastní se výběru substrátů a zajišťují rozdílnou intracelulární lokalizaci signálních komponent.

Se scaffold proteiny se setkáváme již u kvasinek, kde byly též poprvé identifikovány a popsány. Navzdory značné konzervovanosti základních mechanismů přenosu signálu dráhou ERK a jejích členů, savčí scaffold proteiny je nutno vnímat poněkud odlišným pohledem. Zatímco u kvasinek scaffold proteiny obvykle váží většinu, ne-li všechny složky signální kaskády, u savců může docházet k interakci s menším počtem komponent a často je funkce scaffoldu rozdělena mezi více proteinů.

#### 6.5.1.1 KSR (kinase suppressor of Ras)

Nejlépe prostudovaným a popsaným scaffold proteinem je KSR. KSR je prakticky jediný protein ERK dráhy, který se podobá klasickým scaffold proteinům, tak jak byly definovány u kvasinek. Vytváří vysokomolekulární komplexy s proteiny Raf, MEK1 a MEK2 a ERK1 a ERK2, čímž je vzájemně přibližuje, a zvyšuje tak účinnost přenosu signálu (Morrison, 2001). Stejně jako Raf proteiny má i KSR kinázovou doménu označovanou CA5, která je ovšem v řadě klíčových aminokyselinových zbytků mutovaná. Na rozdíl od Raf tak zřejmě postrádá kinázovou aktivitu (Therrien et al., 1995). V klidových buňkách se KSR nachází v cytoplasmě, zatímco v buňkách stimulovaných dochází ke změně intracelulární lokalizace a přesunu proteinu na cytoplasmatickou membránu. Tím se KSR liší od ostatních scaffold proteinů dráhy ERK (McKay et al., 2009).

KSR je jedním z mála proteinů, u nichž byla prokázána jak jeho buněčná tak fyziologická úloha při regulaci ERK kaskády. V souladu s předpokládanou funkcí scaffold

proteinu dochází při ztrátě KSR k narušení aktivace MEK a stimulace ERK je taktéž defektní (Nguyen et al., 2002). Na základě knockout experimentů s myšími modely byla identifikována fyziologická role proteinu KSR1, jedné ze dvou savčích isoform. Narušená stimulace dráhy ERK za nedostatku KSR1 vedla k defektům v proliferaci T-buněk (Nguyen et al., 2002) a fibroblastů (Lozano et al., 2003). Podobně bylo v experimentálním modelu nádoru kůže prokázáno, že KSR1 pozitivně reguluje aktivaci ERK dráhy a následně vznik nádorů vyvolaných expresí konstitutivně aktivní GTPázy Ras (Lozano et al., 2003).

#### **6.5.1.2 MP1 (MEK partner-1) a jeho interakční partneři**

Dalším scaffold proteinem, o němž máme poměrně obsáhlé informace, je MP1 (MEK partner 1), který zajišťuje aktivaci ERK kaskády interakcí s MEK a ERK proteiny (Schaeffer et al., 1998). MP1 konstitutivně asociuje s proteinem p14, a vytváří tak komplex, který je nezbytný pro ERK signalizaci z pozdních endosomů, neboť absence jednoho z vazebných partnerů v této buněčné oblasti vede k výraznému útlumu aktivity proteinkinázy ERK. p14 je 14kDa adaptorový protein, který je přímo zodpovědný za endosomální lokalizaci komplexu MP1-p14 (Teis et al., 2002).

MP1 je i s trvale asociovaným p14, příliš malý na to, aby vykonával funkci scaffold proteinu nezávisle na dalších partnerech. Interaguje s ním tedy scaffold protein MORG1 (MAPK-organizer 1), člen tzv. WD-40 proteinové rodiny, který mimo MP1 váže i ERK, MEK, c-Raf a B-Raf a selektivně podporuje aktivaci ERK1 a ERK2 v odpověď na různé extracelulární signály, mezi které ale nepatří EGF. Ačkoli není známá přesná intracelulární lokalizace MORG1, předpokládá se, že je spolu s MP1 lokalizován do endosomálních váčků (Vomastek et al., 2004).

Dalším vazebným partnerem MP1 je scaffold protein RACK1 (receptor for activated C-kinase 1), který asociuje s proteinkinázami ERK, Raf a MEK (Vomastek et al., 2007). RACK1 je nezbytný pro efektivní aktivaci ERK kaskády při adhezi, nikoli však při stimulaci růstovými faktory. Za lokální aktivaci ERK jsou zodpovědné proteiny Src a FAK (focal adhesion kinase). Podle získaných dat se zdá, že RACK1 směřuje ERK do fokálních adhezí, a spojuje tak „upstream“ integrinovou signalizaci s „downstream“ cíly ve fokálních adhezích. Předpokládá se, že mezi cíle aktivní proteinkinázy ERK ve fokálních adhezích patří mj. MLCK (Myosin light-chain kinase) či proteáza Calpain, které jsou zodpovědné za rozpad fokálních adhezí a následkem toho i za regulaci buněčného pohybu (Vomastek et al., 2007).

### 6.5.1.3 Ostatní scaffold proteiny

Mezi další proteiny s funkcí scaffoldu patří paxillin, CNK, IQGAP a  $\beta$ -arrestiny. Přestože molekulární interakce těchto scaffold proteinů byly taktéž poměrně dobře definovány, funkční důsledky zůstávají u většiny neodhaleny. Řada z nich zajišťuje signalizaci z rozdílných buněčných organel.

Scaffold protein paxillin podporuje signální transdukcí vytvářením komplexů Raf-MEK-ERK. Přitom neaktivní forma ERK je vázána s vyšší afinitou než forma aktivovaná. Účinnější vazba neaktivní ERK spolu se schopností nahradit aktivovanou proteinkinázu formou ještě nefosforylovanou a tedy nestimulovanou vede k tomu, že je neaktivní ERK díky paxillinu cílena do fokálních adhezí, kde je poté aktivována (Ishibe et al., 2003).

CNK (connector enhancer of KSR) byl identifikován a popsán nejprve u *Drosophila melanogaster* a později u *Caenorhabditis elegans*. Fyzicky interaguje s proteinem Raf a umožňuje jeho aktivaci prostřednictvím GTPázy Ras (Therrien et al., 1998). Doposud byly identifikovány tři savčí isoformy CNK, které se liší výskytem a částečně i mechanismem působení. Fyziologická role scaffold proteinu CNK nebyla doposud určena.

Dalším ze scaffold proteinů je IQGAP1, který váže ERK2 a MEK proteiny. V klidových buňkách IQGAP1 váže preferenčně MEK2. Markantní změna nastává po stimulaci EGF. Vazba MEK1 je výrazně zvýšena, zatímco MEK2 potlačena. Tímto mechanismem může EGF podporovat signalizaci z MEK1 na ERK, zatímco současně dochází k útlumu přenosu signálu z MEK2 na ERK. Podobně jako u CNK ale platí, že i k IQGAP1 zatím nebyla přiřazena žádná konkrétní biologická funkce (Roy et al., 2005).

Původně byla  $\beta$ -arrestinům připisována role pouze v desenzitizaci receptorů GPCR, které byly obsazené příslušným ligandem a po uvolnění podjednotky fosforylovány proteinkinázami ze skupiny GRK (G protein-coupled receptor kinase).  $\beta$ -arrestiny ovšem mohou fungovat i jako scaffold proteiny zprostředkovávající tvorbu Raf-1, MEK1 a ERK2 komplexů. Navíc se uplatňují i v regulaci intracelulární lokalizace tím, že tyto komplexy směřují do endosomálních váčků. I fyziologická role  $\beta$ -arrestinů jakožto scaffoldu je prozatím neznámá (Luttrell et al., 2001).

### 6.5.2 Proteinové inhibitory

Proteinové inhibitory dráhy ERK mají přesně opačný účinek než scaffold proteiny. Interagují s jednou nebo s více komponentami ERK kaskády a zabraňují jejich aktivaci nebo dalšímu přenosu signálu. Většina proteinových inhibitorů dráhy ERK vykazuje dvojúrovňovou regulaci aktivity. Ke stimulaci inhibičního efektu u nich dochází na úrovni

transkripce. Snížená exprese některých inhibitorů koreluje s výskytem různých patofyziologických jevů. Důležitým mechanismem na buněčné úrovni je ale především fosforylace serinových, threoninových a tyrosinových aminokyselinových zbytků, které převádí inhibitory do aktivního stavu a defosforylace naopak slouží k inaktivaci. Tento mechanismus poskytuje rychlý a efektivní způsob, jak regulovat trvání ERK signalizace.

#### **6.5.2.1 RKIP (Raf kinase inhibitor protein)**

RKIP je proteinový inhibitor, který specificky blokuje aktivaci MEK prostřednictvím Raf-1. Součástí utvářeného komplexu je i proteinkináza ERK (Yeung et al., 1999). Inhibice MEK se odehrává cestou fyzického rozrušení kontaktu mezi MEK a Raf-1 a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. RKIP se chová jako kompetitivní inhibitor MEK fosforylace, který snižuje afinitu Raf-1 a MEK vůči sobě (Yeung et al., 2000).

Za určitých okolností ale RKIP mění substrátovou specificitu a stává se fyziologickým inhibitorem GRK-2, proteinkinázy zodpovědné za desenzitizaci GPCR. Po stimulaci GPCR receptorů se RKIP odpoutává od Raf-1 a asociuje s GRK-2, a tak blokuje jeho aktivitu. Vlivem změny substrátu přestává RKIP inhibovat ERK signalizaci. Tímto způsobem RKIP přímo propojuje ERK dráhu s GPCR signalizací. Změny substrátové specificity proteinu je dosaženo fosforylací Ser153, za kterou zodpovídá PKC (proteinkinase C). Inhibice GRK-2 vede kromě prodloužené doby ERK signalizace i ke snížení množství internalizovaných receptorů. Přepínání specificity má své fyziologické důsledky. RKIP tímto způsobem totiž zvyšuje citlivost  $\beta$ -adrenergních receptorů kardiomyocytů, čímž posiluje kontraktilitu buněk (Lorenz et al., 2003).

#### **6.5.2.2 Sef (similar expression of fgf genes)**

Sef byl identifikován jako inhibitor FGF (fibroblast growth factor) signalizace. Inhibiční efekt Sef na FGF signalizaci je způsoben interakcí s FGFR (FGF receptory), která brání fosforylaci receptorů. V důsledku toho dochází i ke snížení fosforylace proteinkináz Raf, MEK a ERK (Kovalenko et al., 2003). Navíc je Sef zodpovědný za regulaci intracelulární lokalizace ERK, o čemž je pojednáno v podkapitole „6.5.3 Proteinové kotvy“. Na rozdíl od inhibičního účinku na FGF signalizaci, Sef podporuje EGF stimulovanou ERK signalizaci (Ren et al., 2007). Vzájemná interakce Sef a EGFR totiž zvyšuje počet recyklovaných receptorů EGF, které by jinak byly degradovány.

### **6.5.2.3 Sprouty**

Sprouty blokuje signální transdukcí na více úrovních proteinové kaskády. Jednak Sprouty váže adaptorový protein Grb2, čímž brání následnému přesunu komplexu Grb2-SOS na receptor růstových faktorů jako je například FGFR, a tím znemožňuje aktivaci GTPázy Ras (Hanafusa et al., 2002). Navíc protein Sprouty inhibuje i signalizaci na úrovni proteinkinázy c-Raf (Sasaki et al., 2003), respektive B-Raf (Brady et al., 2009).

Ačkoli proteinový inhibitor Sprouty vždy negativně reguluje FGF-indukovanou ERK signalizaci, byly popsány případy, kdy protein Sprouty naopak podporoval ERK signalizaci indukovanou EGF (Fong et al., 2003). Na molekulární úrovni zřejmě spočívá odlišný efekt Sprouty v interakci s proteiny c-Cbl, které endocytózou regulují množství receptorů růstových faktorů (Wong et al., 2001).

V savčích buňkách nacházíme čtyři isoformy, které mají rozdílnou úroveň účinku v rámci dráhy ERK a jsou regulovány specifickou kombinací faktorů. Nejlépe popsané jsou proteiny Sprouty1 a Sprouty2. Jejich inhibiční aktivita je modulována fosforylací aminokyselinových zbytků, v tomto konkrétním případě modifikací tyrosinu, a je indukovaná signalizací přes RTK (Hanafusa et al., 2002).

### **6.5.2.4 SPRED (Sprouty related proteins with EVH1 domain)**

Proteiny SPRED inhibují ERK signalizaci indukovanou růstovými faktory. Podstatou této inhibice je tvorba komplexů s Ras a Raf proteiny, které jsou nedostupné pro MEK1 a MEK2 a tím pádem nemohou být aktivovány proteinkinázou Raf (Wakioka et al., 2001).

## **6.5.3 Proteinové kotvy**

Do skupiny tzv. proteinových kotev se řadí proteiny, jejichž vliv na signalizaci dráhou ERK spočívá v modulaci intracelulární lokalizace komponent této signální kaskády. Proteinové kotvy lze rozdělit na proteiny bez enzymatických funkcí a na proteiny, které naopak enzymatické funkce mají. Do první skupiny patří například PEA-15, Sef či paxillin. Mezi proteinové kotvy s enzymatickými funkcemi se naopak řadí proteinkináza MEK či některé proteinfosfatázy.

### **6.5.3.1 PEA-15 (15kDa phosphoprotein enriched in astrocytes)**

PEA-15 je typickou proteinovou kotvou, což znamená, že vymezuje oblast výskytu svých interakčních partnerů, konkrétně proteinkináz ERK. PEA-15 je cytoplasmatický protein a vazbou ERK brání transportu proteinkináz do jádra. ERK se tak hromadí v cytoplasmě a

zároveň klesá úroveň fosforylace jejich jaderných substrátů, tím i exprese jaderných genů a snižuje se míra buněčné proliferace, nebo je proliferace zcela zastavena. Funkce cytoplasmatických substrátů zůstává beze změny (Whitehurst et al., 2004). Cytoplasmatickou lokalizaci proteinu PEA-15 zajišťuje sekvence NES. Dalším mechanismem, který umožňuje PEA-15 hromadit ERK v cytoplasmě, je právě na NES závislý export proteinkináz z buněčného jádra. Pokud se PEA-15 dostane do jádra, může zde interagovat s proteiny ERK a pomocí NES sekvence je transportovat do cytoplasmy (Formstecher et al., 2001).

Jiným charakteristickým znakem PEA-15 je tzv. DED (death effector domain) doména, kterou lze typicky nalézt u proteinů uplatňujících se v regulaci apoptózy. Mimo proliferace totiž PEA-15 reguluje i ochranu buněk proti programované buněčné smrti. Vazbou k proteinu FADD (Fas-activated death domain protein) blokuje mobilizaci tzv. kaspáz, efektorových proteáz, které jsou hlavními vykonavateli apoptotických procesů. Princip střídání cílové molekuly je stejný jako například u proteinu RKIP – fosforylace aminokyselinových zbytků Ser104 a Ser116 funguje jako molekulární přepínač substrátové specificity. Ser104 je fosforylován prostřednictvím PKC, která tak blokuje vazbu k ERK, a tím pádem se ERK může hromadit v jádře. Proteinkinázy CamKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) a Akt fosforylují Ser116 a tím podporují vazbu k FADD. Pouze dvojitě fosforylovaný PEA-15 má protiapoptotický účinek (Renganathan et al., 2005).

Rozdílnou úrovní exprese proteinu PEA-15, jeho fosforylací a „zakotvením“ proteinkinázy ERK v cytoplasmě tedy buňka ovlivňuje intracelulární distribuci ERK a následně i biologickou odpověď.

### **6.5.3.2 Sef**

Protein Sef je nejen inhibítozem, ale působí i jako proteinová kotva, protože se specificky váže na aktivovaný MEK, inhibuje disociaci MEK-ERK komplexu, a tím blokuje translokaci aktivní proteinkinázy ERK do jádra. Kvůli tomu nemůže dojít k fosforylaci jaderných substrátů jako je například Elk1 a potažmo k ovlivnění exprese jaderných genů, například c-Fos. Na funkci aktivní cytoplasmatické proteinkinázy ERK nemá Sef vliv (Torii et al., 2004).

### **6.5.3.3 Paxillin**

I protein paxillin se podílí na regulaci intracelulární lokalizace ERK. Paxillin cílí neaktivní ERK do fokálních adhezí, kde je následně aktivována. Hraje tak zřejmě důležitou roli v pohybu buněk, není ale vyžadován pro buněčnou adhezi (Ishibe et al., 2003).

#### **6.5.3.4 Proteinové kotvy s enzymatickou funkcí**

Kromě proteinových kotev bez známé enzymatické aktivity mohou intracelulární lokalizaci proteinkinázy ERK regulovat i kotvy s enzymatickou aktivitou. Typickými zástupci těchto kotev je proteinkináza MEK a některé proteinfosfatázy.

Jak bylo zmíněno v kapitole 5.5, proteinkináza MEK je cytoplasmatický protein, jehož lokalizace je zajištěna přítomností sekvence NES v N-terminální části. Jelikož MEK interaguje s neaktivním proteinem ERK, zajišťuje cytoplasmatickou lokalizaci i neaktivní ERK. Proteinkináza MEK má tedy dvě důležité úlohy - kromě funkce aktivační se uplatňuje i při udržování cytoplasmatické lokalizace ERK (Rubinfeld and Seger, 2005).

DUSPs (dual specificity phosphatases) neboli fosfatázy s duální specificitou mohou ukotvit protein ERK a to buď v jaderném, nebo v cytoplasmatickém kompartmentu. Kupříkladu DUSP6 (jinak též MKP-3) obsahuje sekvenci NES, díky níž exportuje z jádra neaktivní formu ERK2, a pomáhá tak zachovávat jeho cytoplasmatickou lokalizaci. Jiné fosfatázy, jako například DUSP 2,4 či 5, zadržují ERK v jádře, přičemž k dosažení jaderné lokalizace využívají NLS (nuclear localization signal), jaderný lokalizační signál, a pro interakci s ERK CD či D-doménu (Ramos, 2008).

## **7. Scaffold proteiny a modulátory v kontextu fyziologických dějů**

V předchozí kapitole byly popsány molekulární charakteristiky scaffold a ostatních modulačních proteinů. Ty ovšem nevypovídají nic o tom, jak jsou tyto proteiny zapojeny do realizace konkrétního buněčného programu. Biologická role většiny modulačních proteinů zůstává neznámá. Zřejmě nejpokročilejší úroveň znalostí bylo dosaženo u dvou fyziologických dějů - diferenciaci PC12 buněk a integrace signálů vedoucích od extracelulární matrix. Zatímco první jmenovaný model je typickým příkladem toho, jak je dráha ERK modulována proteinovými inhibitory a kotvami, model buněčné adheze reprezentuje funkci scaffold proteinů.

### **7.1 Integrace signálů vedoucích od extracelulární matrix**

Klíčovým mechanismem předávajícím buňkám informace o stavu adheze je signalizace prostřednictvím proteinů z integrinové rodiny. Při kontaktu integrinů s proteiny ECM dochází k asociaci integrinů s adaptorovými proteiny a k aktivaci celé řady

signálních kaskád. Mezi asociované proteinkinázy aktivované integriny patří mimo jiné FAK (focal adhesion kinase) či Src. Bylo zjištěno, že Src fosforyluje kinázu FAK a tím vytváří vazebné místo pro Grb2-SOS komplex, což v důsledku vede k aktivaci ERK dráhy (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Zvláště důležitá je aktivace Rac1-PAK dráhy, která předává signál o buněčné adhezi a umožňuje účinnou aktivaci dráhy ERK.

PAK1 (p21 Rac-activated kinase 1) je efektorovou molekulou GTPáz Cdc42 a Rac1, které patří do rodiny Rho proteinů. Adheze k ECM, konkrétně k fibronektinu, prostřednictvím integrinů vede k aktivaci Rac1, který následně aktivuje PAK1. Aktivní proteinkináza PAK1 fosforyluje Ser298 nacházející se v PRS MEK1, ne však MEK2, a tím podporuje fyzickou asociaci mezi MEK1 a ERK (Frost et al., 1997). Ačkoli fosforylace Ser298 nemá přímý vliv na aktivitu MEK1, umožňuje jeho účinnou aktivaci proteinkinázou Raf, a je proto klíčová pro úspěšnou aktivaci dráhy ERK (Eblen et al. 2002; Slack-Davis et al., 2003). MEK1 tedy představuje senzor pro adhezivní signály, které umožňují vznik signálního komplexu Raf-MEK-ERK a jeho účinnou aktivaci růstovými faktory. Jestliže jsou integrinové receptory neaktivní, například pokud jsou buňky v suspenzi, je i dráha Rac1-PAK1 neaktivní a Ser298 není fosforylován. Ačkoli je tedy protein Raf stimulací růstovými faktory aktivován, není schopen fosforylovat MEK1 (Renshaw et al., 1997), protože došlo k rozpadu signálního komplexu Raf-MEK-ERK.

Fosforylace Ser298 proteinkinázou PAK1 je regulována scaffold proteinem MP1, který tvoří komplex s proteinem p14 a interaguje taktéž s proteinkinázami MEK1 a ERK. Pullikuth (et al., 2005) prokázal, že dimer MP1/p14 během buněčné adheze kooperuje s PAK1. MP1/p14 preferenčně asociuje s aktivní kinázou PAK1 a zprostředkovává její přímou interakci s MEK1, čímž dochází k propojení aktivace MEK1-ERK s adhezivními signály. Experimentální snížení hladiny MP1/p14 inhibuje fosforylaci MEK1 na Ser298, což vede k následnému snížení fosforylace MEK proteinu na Ser218 a Ser222, kroku nezbytnému ke stimulaci kinázové činnosti. Komplex MP1/p14 tímto způsobem reguluje integraci signálů vedoucích od Rac/Cdc42-PAK dráhy.

MP1 funkčně kooperuje také se svým dalším interakčním partnerem RACK1. Scaffold protein RACK1 asociuje kromě MP1 i s triádou proteinkináz Raf/MEK/ERK a je nezbytný pro integriny indukovanou efektivní aktivaci a lokalizaci kinázy ERK při buněčné adhezi. Mechanismus působení RACK1 je odlišný od funkce MP1/p14. RACK1 reguluje aktivitu proteinkinázy MEK modifikací jeho aktivátoru, proteinu Raf, na Ser338 (Vomastek et al., 2007). Jak se ukázalo, fosforylace Ser338 je nezbytná pro stimulaci kinázy Raf růstovými

faktory a zprostředkovávají ji proteiny PAK (King et al., 1998). Zdá se tedy, že scaffold protein RACK1 reguluje aktivaci Raf a následně i MEK.

Na základě dostupných údajů se lze domnívat, že proteiny MP1/p14 v komplexu s RACK1 při buněčné adhezi integrují signály na dvou různých úrovních – na úrovni tzv. „permissivní“ a „aktivační“. Komplex MP1/p14 umožňuje prostřednictvím PAK proteinu fosforylaci Ser298 na kináze MEK, a poskytuje tak informaci o buněčné adhezi. Ačkoli tato fosforylace samotná není pro spuštění signální transdukce dostačující, vytváří nezbytný předpoklad pro stimulaci kaskády ERK růstovými faktory a lze o ní proto hovořit jako o „permissivní“. Pro úspěšnou aktivaci dráhy ERK je nutná fosforylace MEK proteinu na aminokyselinových zbytcích Ser218, a Ser222, což zajišťuje kináza Raf. Ta je díky scaffoldové funkci RACK1 stimulována PAK proteiny aktivační fosforylací Ser338. Tuto úroveň tedy lze nazvat „aktivační“. Při adhezi tak zřejmě dochází k „nachystání“ kinázy MEK scaffold proteiny MP1/p14 a následné aktivaci ERK signalizace prostřednictvím RACK1. Vzhledem k tomu, že RACK1 a MP1/p14 spolu interagují, lze předpokládat existenci velkých signalizačních komplexů, které zajišťují efektivní integraci různých signálů.

Kromě proteinu RACK1 interaguje MP1 také s dalším scaffold proteinem, MORG1 (Vomastek et al., 2004). MORG1 i RACK1 patří do tzv. WD-40 proteinové rodiny a oba mají podobné uspořádání domén. MORG1, podobně jako RACK1, asociuje s triádou proteinkináz Raf/MEK/ERK, nicméně spektrum signálů regulované MORG1 je odlišné od RACK1. Zatímco RACK1 se zdá být specifickým regulátorem integrinové signalizace, MORG1 moduluje signály pocházející od heterotrimerických proteinů. Je tedy možné spekulovat, jaký je funkční význam interakcí MP1/p14 s celou řadou scaffold proteinů. MP1/p14 může reprezentovat universální mechanismus, kterým je předávána informace o adhezi. Aktivace ERK dráhy specifickými extracelulárními signály je patrně zprostředkována spektrem scaffold proteinů, jako je RACK1 a MORG1, které umožňují aktivaci specifickým „upstream“ aktivátorem. Interakce RACK1 (či MORG1) s MP1/p14 zajišťuje, že veškeré signální komponenty jsou v těsné blízkosti, a umožňuje tak účinný přenos signálu.

## **7.2 EGF/NGF signalizace v PC12 buňkách**

Buněčná linie PC12 se používá jako model neuronální diferenciaci a je odvozena od feochromocytomu dřeně nadledvin potkana. Výhodou PC12 buněk je jejich schopnost rozdílně reagovat na různé růstové faktory. Například při kultivaci s NGF (nerve growth factor) přestávají buňky růst a v řádu dní se diferencují v sympatiku podobné neurony.

Naproti tomu pokud jsou kultivovány v přítomnosti EGF, dochází k růstu a nikoliv k diferenciaci (Marshall, 1995).

Diametrálně odlišné biologické odpovědi je dosaženo rozdílnou dobou trvání signalizace a různou lokalizací proteinkinázy ERK. V případě NGF je signál udržován až po dobu několika hodin, zatímco EGF zprostředkovává pouze krátkodobou aktivaci, maximálně v řádu minut. Při dlouhodobější aktivaci dráhy prostřednictvím NGF dochází k translokaci většího množství ERK proteinkinázy do jádra, což vede k ovlivnění exprese genů podílejících se na diferenciaci. EGF vyvolává příliš krátkodobou aktivaci na to, aby byla exprese diferenciačních genů významně ovlivněna (Marshall, 1995).

Jak ale buňka rozliší mezi krátkodobou a dlouhodobou stimulací, aby mohla spustit rozdílné programy? Triáda Raf-MEK-ERK tvoří stabilní kontakty, v rámci nichž probíhá signální transdukce v prakticky neměnné podobě. Signalizaci kaskádou ERK směrem k diferenciaci či proliferaci kontrolují modulační proteiny, mezi které patří RKIP, NF1 (neurofibromin 1), PEA-15, ERF (ETS2 repressor factor) či Sprouty.

V předešlé kapitole byl protein RKIP popsán jako inhibitor Raf-1 (Yeung et al., 1999), který po fosforylaci PKC mění substrátovou specifitu a přestává fungovat jako inhibitor dráhy ERK (Lorenz et al., 2003). Tento jev má své fyziologické důsledky i v buňkách PC12. Experimentální snížení koncentrace RKIP totiž vedlo k prodloužené ERK signalizaci i při stimulaci EGF. Vlivem této změny se obrátila orientace dráhy ERK směrem k jinému buněčnému programu – k diferenciaci. Fosforylace RKIP tedy představuje pozitivní zpětnovazebný mechanismus, jakým NGF signalizace moduluje délku signálu a umožňuje diferenciaci. Při stimulaci EGF vykazuje dráha ERK naopak negativní zpětnovazebnou regulaci. Negativní zpětná vazba je založená na fosforylaci SOS, což vede k narušení schopnosti komplexu SOS-Grb2 vázat, a tím aktivovat Ras. To vysvětluje, proč je takováto aktivace dráhy pouze krátkodobá (Santos et al., 2007).

Dalším příkladem modulace buněčné odpovědi pomocí specifického regulátoru je fungování proteinu NF1. NF1 se řadí do skupiny GAP proteinů, a tedy zkracuje dobu signalizace Ras proteinů. Pro inaktivaci NF1 je podstatná vazba a fosforylace proteinkinázou ERK. Růstový faktor NGF způsobuje oproti EGF dlouhodobější aktivaci ERK a tím pádem i trvalejší disociaci komplexu ERK-NF1, čímž prodlužuje celkovou dobu Ras-Raf-MEK-ERK signalizace a umožňuje diferenciaci PC12 buněk. NF1 je často mutovaný u pacientů s neurofibromatosou (von Kriegsheim et al., 2009).

Dynamiku ERK ovlivňuje i proteinová kotva PEA-15. Princip funkce PEA-15 spočívá v asociaci s proteinkinázou ERK a v blokování jejího jaderného importu (Formstecher et al.,

2001). Při signalizaci NGF je navozena trvalejší disociace komplexu PEA-15/ERK, a proteinkináza ERK se tak může hromadit v jádře ve větším množství ve srovnání s krátkodobější disociací při působení EGF. Rozrušení komplexu je tedy součástí diferenciálního programu a je regulováno komunikací s proteinem Akt a zpětnovazebnou fosforylací ERK (von Kriegsheim et al., 2009). PEA-15 interaguje s ERK1 i s ERK2 prostřednictvím své C-terminální části a DED (Formstecher et al., 2001).

ERF (ETS2 repressor factor) je jedním z popsaných jaderných interakčních partnerů proteinkinázy ERK, který potlačuje transkripci zprostředkovanou transkripčním faktorem Ets2. Inhibiční efekt ERF je vyrušen asociací s ERK, protože vzájemná interakce vede k fosforylaci supresoru a posléze k jeho vyloučení z jádra. Jak při působení NGF, tak EGF dochází k fosforylaci a tedy i k exportu ERF z jádra, ale jen při vazbě NGF na receptor se vytváří stabilní vazba ERF-ERK, takže většina supresoru může být přesunuta. Pouze při působení NGF je tedy dosaženo diferenciace (von Kriegsheim et al., 2009).

Proteiny Sprouty byly identifikovány jako inhibitory FGF signalizace, mohou ale modulovat biologickou odpověď i u PC12 buněk. Vzhledem k jejich inhibiční funkci, představují Sprouty proteiny negativní zpětnovazebný mechanismus, který je ale ovlivnitelný modifikací aminokyselinových zbytků. Dojde-li totiž k defosforylaci Sprouty, dojde k vyrušení inhibičního efektu proteinu a k následnému prodloužení FGF signalizace, což se projeví navozením diferenciace buněk (Hanafusa et al., 2002).

Výše uvedené příklady demonstrují představu, že kinetika signální kaskády není regulována pouze v jednom hlavním bodě, ale že k modulacím dochází na každé její úrovni. Za ovlivnění dynamiky signalizace jsou zodpovědné modulační či scaffold proteiny, které přistupují k interakcím s různými složkami kaskády. Lze předpokládat, že tyto regulační komponenty nepůsobí odděleně, ale že mezi sebou komunikují a že na výsledném biologickém efektu se podílí vzájemnou kooperací. Při narušení této spolupráce je možné změnit výsledný program. To dokazuje například knockdown experiment, při kterém snížení množství PEA-15 a NF1 pomocí siRNA vyvolalo diferenciaci a to jak při působení NGF, tak i EGF (von Kriegsheim et al., 2009).

## 8. Seznam použité literatury

- Balan, V., D.T. Leicht, J. Zhu, K. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, J. Qin, H. Ruan, M.J. Comb, and G. Tzivion. 2006. Identification of novel in vivo Raf-1 phosphorylation sites mediating positive feedback Raf-1 regulation by extracellular signal-regulated kinase. *Molecular Biology of the Cell*. 17:1141-1153.
- Brady, S.C., M.L. Coleman, J. Munro, S.M. Feller, N.A. Morrice, and M.F. Olson. 2009. Sprouty2 Association with B-Raf Is Regulated by Phosphorylation and Kinase Conformation. *Cancer Research*. 69:6773-6781.
- Brondello, J.M., J. Pouyssegur, and F.R. McKenzie. 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44(MAPK)-dependent phosphorylation. *Science*. 286:2514-2517.
- Brown, M.D., and D.B. Sacks. 2009. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling*. 21:462-469.
- Brunsveld, L., H. Waldmann, and D. Huster. 2009. Membrane binding of lipidated Ras peptides and proteins - The structural point of view. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1788:273-288.
- Dougherty, M.K., J. Muller, D.A. Ritt, M. Zhou, X.Z. Zhou, T.D. Copeland, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, K.P. Lu, and D.K. Morrison. 2005. Regulation of raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular Cell*. 17:215-224.
- Douville, E., and J. Downward. 1997. EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*. 15:373-383.
- Eblen, S.T., J.K. Slack, M.J. Weber, and A.D. Catling. 2002. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal- regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Molecular and Cellular Biology*. 22:6023-6033.
- Eblen, S.T., J.K. Slack-Davis, A. Tarcsafalvi, J.T. Parsons, M.J. Weber, and A.D. Catling. 2004. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. *Molecular and Cellular Biology*. 24:2308-2317.
- Fong, C.W., H.F. Leong, E.S.M. Wong, J. Lim, P. Yusoff, and G.R. Guy. 2003. Tyrosine phosphorylation of Sprouty2 enhances its interaction with c-Cbl and is crucial for its function. *Journal of Biological Chemistry*. 278:33456-33464.
- Formstecher, E., J.W. Ramos, M. Fauquet, D.A. Calderwood, J.C. Hsieh, B. Canton, X.T. Nguyen, J.V. Barnier, J. Camonis, M.H. Ginsberg, and H. Chneiweiss. 2001. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Developmental Cell*. 1:239-250.
- Frost, J.A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P.E. Shaw, and M.H. Cobb. 1997. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo Journal*. 16:6426-6438.

- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Transduction - Integrin signaling. *Science*. 285:1028-1032.
- Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga, and E. Nishida. 2002. Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nature Cell Biology*. 4:850-858.
- Ishibe, S., D. Joly, X.L. Zhu, and L.G. Cantley. 2003. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Molecular Cell*. 12:1275-1285.
- Jacobs, D., D. Glossip, H.M. Xing, A.J. Muslin, and K. Kornfeld. 1999. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development*. 13:163-175.
- King, A.J., H.Y. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W.Y. Miao, S. Bagrodia, and M.S. Marshall. 1998. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*. 396:180-183.
- Kovalenko, D., X.H. Yang, R.J. Nadeau, L.K. Harkins, and R. Friesel. 2003. Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*. 278:14087-14091.
- Lee, T., A.N. Hoofnagle, Y. Kabuyama, J. Stroud, X.S. Min, E.J. Goldsmith, L. Chen, K.A. Resing, and N.G. Ahn. 2004. Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Molecular Cell*. 14:43-55.
- Lefloch, R., J. Pouyssegur, and P. Lenormand. 2008. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and Cellular Biology*. 28:511-527.
- Leicht, D.T., V. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, L. Kaplun, M. Dobson, and G. Tzivion. 2007. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1773:1196-1212.
- Lorenz, K., M.J. Lohse, and U. Quidde. 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*. 426:574-579.
- Lozano, J., R. Xing, Z.Z. Cai, H.L. Jensen, C. Trempus, W. Mark, R. Cannon, and R. Kolesnick. 2003. Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic Ras signaling in mice. *Cancer Research*. 63:4232-4238.
- Luttrell, L.M., F.L. Roudabush, E.W. Choy, W.E. Miller, M.E. Field, K.L. Pierce, and R.J. Lefkowitz. 2001. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:2449-2454.
- Marchetti, S., C. Gimond, J.C. Chambard, T. Touboul, D. Roux, J. Pouyssegur, and G. Pages. 2005. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein

- kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and Cellular Biology*. 25:854-864.
- Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling - transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80:179-185.
- McKay, M.M., D.A. Ritt, and D.K. Morrison. 2009. Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:11022-11027.
- Morrison, D.K. 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science*. 114:1609-1612.
- Murphy, L.O., S. Smith, R.H. Chen, D.C. Fingar, and J. Blenis. 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology*. 4:556-564.
- Nguyen, A., W.R. Burack, J.L. Stock, R. Kortum, O.V. Chaika, M. Afkarian, W.J. Muller, K.M. Murphy, D.K. Morrison, R.E. Lewis, J. McNeish, and A.S. Shaw. 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 22:3035-3045.
- Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F.D. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. Pouyssegur. 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*. 286:1374-1377.
- Pullikuth, A., E. McKinnon, H.J. Schaeffer, and A.D. Catling. 2005. The MEK1 scaffolding protein MP1 regulates cell spreading by integrating PAK1 and Rho signals. *Molecular and Cellular Biology*. 25:5119-5133.
- Rajalingam, K., R. Schreck, U.R. Rapp, and S. Albert. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1773:1177-1195.
- Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 26:3100-3112.
- Ramos, J.W. 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40:2707-2719.
- Ren, Y.M., Z.Y. Li, Z.L. Rong, L. Cheng, Y.H. Li, Z. Wang, and Z.J. Chang. 2007. Tyrosine 330 in hSef is critical for the localization and the inhibitory effect on FGF signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354:741-746.
- Renganathan, H., H. Vaidyanathan, A. Knapinska, and J.W. Ramos. 2005. Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochemical Journal*. 390:729-735.

- Renshaw, M.W., X.D. Ren, and M.A. Schwartz. 1997. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *Embo Journal*. 16:5592-5599.
- Roy, M., Z.G. Li, and D.B. Sacks. 2005. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Molecular and Cellular Biology*. 25:7940-7952.
- Rubinfeld, H., and R. Seger. 2005. The ERK cascade - A prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*. 31:151-174.
- Santos, S.D.M., P.J. Verveer, and P.I.H. Bastiaens. 2007. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nature Cell Biology*. 9:324-U139.
- Sasaki, A., T. Taketomi, R. Kato, K. Saeki, A. Nonami, M. Sasaki, M. Kuriyama, N. Saito, M. Shibuya, and A. Yoshimura. 2003. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature Cell Biology*. 5:427-432.
- Schaeffer, H.J., A.D. Catling, S.T. Eblen, L.S. Collier, A. Krauss, and M.J. Weber. 1998. MP1: A MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*. 281:1668-1671.
- Seger, R., and E.G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *Faseb Journal*. 9:726-735.
- Slack-Davis, J.K., S.T. Eblen, M. Zecevic, S.A. Boerner, A. Tarcsafalvi, H.B. Diaz, M.S. Marshall, M.J. Weber, J.T. Parsons, and A.D. Catling. 2003. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *Journal of Cell Biology*. 162:281-291.
- Tanoue, T., R. Maeda, M. Adachi, and E. Nishida. 2001. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo Journal*. 20:466-479.
- Tanoue, T.J., and E. Nishida. 2003. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular Signalling*. 15:455-462.
- Teis, D., W. Wunderlich, and L.A. Huber. 2002. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental Cell*. 3:803-814.
- Therrien, M., H.C. Chang, N.M. Solomon, F.D. Karim, D.A. Wasserman, and G.M. Rubin. 1995. KSR, a novel protein-kinase required for Ras signal-transduction. *Cell*. 83:879-888.
- Therrien, M., A.M. Wong, and G.M. Rubin. 1998. CNK, a RAF-binding multidomain protein required for RAS signaling. *Cell*. 95:343-353.
- Torii, S., M. Kusakabe, T. Yamamoto, M. Maekawa, and E. Nishida. 2004. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Developmental Cell*. 7:33-44.

- Vomastek, T., M.P. Iwanicki, H.J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, J.T. Parsons, and M.J. Weber. 2007. RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility. *Molecular and Cellular Biology*. 27:8296-8305.
- Vomastek, T., H.J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, M.E. Smolkin, E.A. Bissonette, and M.J. Weber. 2004. Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:6981-6986.
- von Kriegsheim, A., D. Baiocchi, M. Birtwistle, D. Sumpton, W. Bienvenut, N. Morrice, K. Yamada, A. Lamond, G. Kalna, R. Orton, D. Gilbert, and W. Kolch. 2009. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nature Cell Biology*. 11:1458-U1172.
- Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron, and A. Yoshimura. 2001. Sprad is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*. 412:647-651.
- Wan, P.T.C., M.J. Garnett, S.M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V.M. Good, C.M. Jones, C.J. Marshall, C.J. Springer, D. Barford, R. Marais, and P. Cancer Genome. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 116:855-867.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5:875-885.
- Whitehurst, A.W., F.L. Robinson, M.S. Moore, and M.H. Cobb. 2004. The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 279:12840-12847.
- Wong, E.S.M., J. Lim, B.C. Low, Q.P. Chen, and G.R. Guy. 2001. Evidence for direct interaction between sprouty and Cbl. *Journal of Biological Chemistry*. 276:5866-5875.
- Yao, Y., W. Li, J.W. Wu, U.A. Germann, M.S.S. Su, K. Kuida, and D.M. Boucher. 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:12759-12764.
- Yeung, K., P. Janosch, B. McFerran, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy, and W. Kolch. 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the Raf kinase inhibitor protein. *Molecular and Cellular Biology*. 20:3079-3085.
- Yeung, K., T. Seitz, S.F. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K.D. Katsanakis, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy, and W. Kolch. 1999. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature*. 401:173-177.

- Yoon, S., and R. Seger. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 24:21-44.
- Zehorai, E., Z. Yao, A. Plotnikov, and R. Seger. 2010. The subcellular localization of MEK and ERK-A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 314:213-220.