

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Speciální chemicko-biologické obory
Študijný odbor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristína Galvánková

Úloha proteínkináz ERK1 a ERK2 v prenosu signálu dráhou MAPK/ERK
The role of ERK1 and ERK2 protein kinases in the MAPK/ERK signalling

Bakalárska práca

Školiteľ: Ing. Tomáš Vomastek, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Zuzana Klímová

Praha, 2021

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu školiteľovi Ing. Tomášovi Vomastkovi, Ph.D. a konzultantke Mgr. Zuzane Klímovej za neoceniteľné rady, trpezlivý prístup a pomoc počas písania tejto bakalárskej práce. Ďalej chcem poďakovať svojmu priateľovi Jakubovi, rodine a blízkym kamarátom za podporu a povzbudzovanie v priebehu štúdia.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu vypracovala samostatne a uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 6.5.2021

Podpis:

Abstrakt

MAPK/ERK je naprieč organizmami vysoko konzervovaná signálna dráha, zabezpečujúca procesy nevyhnutné pre život, akými sú proliferácia, diferenciácia, apoptóza alebo migrácia buniek. Všetky tieto procesy sú výsledkom spracovania celej rady extracelulárnych signálov prenášaných od receptorov cez kaskádu proteínkináz Raf, MEK a ERK pomocou následných fosforylácií. Raf fosforyluje MEK a MEK fosforyluje a aktivuje proteínkinázu ERK, ktorá následne fosforyluje a tým reguluje široké spektrum substrátov na rôznych miestach v bunke. Keďže ostatné dve proteínkinázy majú obmedzený počet substrátov, práve ERK fosforyláciou stoviek popísaných substrátov v daný moment zásadne vplyva na konečnú odpoveď bunky. Ovplynené substráty potom určujú výslednú bunkovú odpoveď na extracelulárny signál. Celá signálna dráha je v jednotlivých krokoch prísne regulovaná za pomoci interakčných partnerov a ďalších adaptorových proteínov. Nesprávna regulácia dráhy, ako aj mutácie jednotlivých proteínkináz vedú k závažným patologickým prejavom.

Na úrovni proteínkinázy ERK sa vyskytujú dve izoformy, ERK1 a ERK2, ktoré sú z viac než 80 % identické. Ich veľká sekvenčná aj funkčná podobnosť vyvoláva otázky o ich evolučnej konzervovanosti a taktiež o tom, či majú tieto izoformy rozdielne funkcie, alebo sú funkčne zameniteľné. Cieľom práce je zhrnúť doterajšie poznatky týkajúce sa rozdielov v štruktúre a funkcii izoform ERK1 a ERK2 v MAPK/ERK signálnej dráhe.

Kľúčové slová: signálna dráha, proteínkináza, fosforylácia, Raf, MEK, ERK1, ERK2, génová expresia, bunková proliferácia, bunková migrácia, invazivita

Abstract

The MAPK/ERK cascade is highly conserved signalling pathway regulating cellular processes which are necessary for cell life, such as proliferation, differentiation, apoptosis or cell migration. All these cellular responses are the result of the processing of extracellular signals through three-tier ERK cascade consisting of protein kinases Raf, MEK and ERK. The signal is transmitted by sequential phosphorylation where RAF phosphorylates MEK and MEK phosphorylates and activates ERK. Protein kinase ERK then phosphorylates and regulates a wide range of substrates at different locations in the cell. This affects the cellular response to the extracellular signal. Regulation of this pathway on every level is very important and is modulated by interaction partners and adaptor proteins. Deregulation of the pathway as well as mutations of individual protein kinases can lead to severe pathological consequences.

At the level of ERK, there are two isoforms, ERK1 and ERK2, which are more than 80 % identical at the amino acid level. Their high sequence similarity has triggered the interest of many authors for more detailed examination of both isoforms in respect of their evolutionary conservation and whether they are functionally redundant or whether they have specific functions. The aim of this work is to summarize the knowledge about differences in the structure and function of ERK1 and ERK2 isoforms in the MAPK/ERK signalling pathway.

Key words: signal transduction, protein kinase, phosphorylation, Raf, MEK, ERK1, ERK2, gene expression, cell proliferation, cell migration, cell invasion

Zoznam skratiek

Abi1	Abelson interactor 1	Abelsonov interaktor 1
AKAP9	A kinase anchoring protein 9	proteín 9 kotviaci A proteínkinázu
Arp	actin-related protein	aktínu príbuzný proteín
ATP	adenosine triphosphate	adenozíntrifosfát
CD	common docking domain	spoločná dokovacia doména
Cdc42	cell division control protein 42 homolog	kontrolný proteín bunkového delenia, homolog 42
CDC25B	M-phase inducer phosphatase 2	M-fázová induktorová fosfatáza 2
CDK	cyclin-dependent kinase	cyklín-dependentná proteínkináza
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma oncogene cellular homolog	
c-Jun	V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	
CK2	casein kinase 2	kazeín proteínkináza 2
c-Myc	myelocytomatosis oncogene cellular homolog	
CR	conserved region	konzervovaný región
CRD	cystein-rich domain	doména bohatá na cysteín
DAPK	death-associated protein kinase	proteínkináza asociovaná so smrťou
DED	death effector domain	efektorová doména smrti
DEF	docking site for ERK and FXFP	dokovacie miesto pre ERK a FXFP
DEJL	docking site for ERK/JNK, LXL	dokovacie miesto pre ERK/JNK, LXL
DUSP	dual specificity phosphatase	duálne špecifická proteínfosfatáza
EGF	epidermal growth factor	epidermálny rastový faktor
EGFR	EGF receptor	receptor pre EGF
Elk	ETS-like protein	proteín podobný ETS
EMT	epithelial to mesenchymal transition	epiteliálno-mezenchymálna tranzícia
ERK	extracellular signal-regulated kinase	proteínkináza regulovaná extracelulárnym signálom
ETS	E-twenty six / E26 transformation-specific	
FAK	focal adhesion kinase	proteínkináza fokálnych adhézii
FOXO	forkhead box protein O	
FRS	F-site recruitment site	rekrutujúce miesto pre DEF motív
GDP	guanosine diphosphate	guanozindifosfát
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2	proteín 2 viazaný na receptor rastového faktoru
GTP	guanosine triphosphate	guanozíntrifosfát

IEG	immediate early genes	gény skorej odpovede
IGF	insulin-like growth factor	inzulínu podobný rastový faktor
IL3	interleukin 3	interleukín 3
Imp7	importin 7	importín 7
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	GTPázu aktivujúci proteín 1 obsahujúci IQ motív
IRS	insulin receptor substrate	substrát inzulínového receptoru
JNK	cJun NH ₂ -terminal kinase	cJun N-terminálna proteínkináza
kDa	kilodalton	kilodalton
KID	kinase insert domain	doména vložená do proteínkinázy
KSR	kinase suppressor of Ras	kinázový supresor Ras GTPázy
LPA	lysophosphatidic acid	lysofosfatidová kyselina
MAPK	mitogen-activated protein kinase	proteínkináza aktivovaná mitogénom
MAPKAPK	MAPK-activated protein kinase	proteínkináza aktivovaná prostredníctvom MAPK
MAPKK	MAPK kinase	proteínkináza fosforylujúca MAPK
MAPKKK	MAPKK kinase	proteínkináza fosforylujúca MAPKK
MEF	myocyte enhancer factor 2	myocyt zosilňujúci faktor 2
MEK	MAPK/ERK kinase	MAPK/ERK proteínkináza
MKP	MAPK phosphatase	MAPK proteínfosfatáza
MLC	myosin light-chain	ľahký reťazec myozínu
MLCK	MLC kinase	proteínkináza fosforylujúca MLC
MNK	MAP-kinase-interacting kinase	proteínkináza interagujúca s MAPK
MORG1	mitogen-activated protein kinase organizer 1	MAPK organizér 1
MP1	MEK partner 1	MEK partner 1
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
MSK	mitogen and stress activated protein kinase	proteínkináza aktivovaná mitogénom a stresom
NES	nuclear export signal	jadrový exportný signál
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells	jadrový faktor aktivovaných T-buniek
NLS	nuclear location signal	jadrový lokalizačný signál
NTS	nuclear translocation signal	jadrový translokačný signál
Nup	nucleoporin	nukleoporín
PAK	p21-activated kinase	proteínkináza aktivovaná p21
PEA-15	15 kDa phosphoprotein enriched in astrocytes	15 kDa fosfoproteín obohatený v astrocytoch
Pin1	peptidylprolyl cys/trans isomerase	peptidylprolyl cys/trans izomeráza
PP2A	protein phosphatase 2A	proteínfosfatáza 2A
PRS	proline-rich sequence	sekvencia bohatá na prolín

Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	substrát 1 C3 botulinum toxínu príbuzný Ras
RACK	receptor for activated C kinase	receptor pre aktivovanú proteínkinázu C
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma	
Ran	Ras-related nuclear protein	jadrový proteín príbuzný Ras
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog	
RBD	Ras binding domain	Ras väzobná doména
RNAi	RNA interference	RNA interferencia
RSK	90 kDa ribosomal S6 kinase	90 kDa ribozomálna S6 proteínkináza
RTK	receptor tyrosine kinase	receptor s tyrozínkinázovou aktivitou
SAP	SRF accessory protein	SRF doplnkový proteín
SAPK	stress-activated protein kinase	proteínkináza aktivovaná stresom
SDF-1	stromal cell-derived factor 1	faktor 1 odvodený zo stromálnych buniek
SH2	Src homology 2	Src homológia 2
SH3	Src homology 3	Src homológia 3
Shc	SH2 domain-containing transforming protein	transformujúci proteín obsahujúci SH2
shRNA	short hairpin RNA	krátka vlásenková RNA
siRNA	small interfering RNA	malá interferujúca RNA
Sos	son of sevenless	väzobný proteín RTK
Src	proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC	proto-onkogénna tyrozín-proteínkináza Src
SRF	serum response factor	faktor odpovede na sérum
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	prevodník signálu a aktivátor transkripcie 3
TCF	ternary complex factor	faktor ternárneho komplexu
Tob1	transducer of erbB-2 1	prevodník erbB-2 1
TOR	mammalian target of rapamycin	cicavčí cieľ rapamycínu
TSC2	tuberous sclerosis complex 2	komplex tuberóznej sklerózy 2
UBF	upstream binding factor	„upstream“ väzobný faktor
UTR	untranslated region	neprekladaná oblasť
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein	proteín Wiskott-Aldrich syndrómu
WAVE	WASP-family veprolin-homologous protein	veprolín-homológny proteín rodiny WASP
WD-40	tryptophane-aspartate repeat	tryptofán-aspartátové sekvenčné opakovanie
WRC	WAVE regulatory complex	WAVE regulačný komplex

Obsah

1. Úvod	1
2. Signalizácia dráhou MAPK/ERK	2
2.1 Základná charakteristika signálnej dráhy MAPK/ERK.....	2
2.2 Mechanizmus prenosu signálu a aktivácia dráhy MAPK/ERK.....	3
2.2.1 Ďalšie spôsoby aktivácie dráhy MAPK/ERK.....	6
2.2.2 Inhibícia ERK signalizácie	7
2.3 Proteínové adaptory.....	8
2.4 Fyziologická signalizácia	9
2.4.1 ERK a proliferácia.....	9
2.4.2 ERK a migrácia	10
2.4.3 ERK a apoptóza.....	11
2.5 Patologická signalizácia	11
3. Rozdiely medzi izoformami Raf a MEK	13
3.1 Rozdiely A-Raf, B-Raf, C-Raf	13
3.2 Rozdiely MEK1 a MEK2	13
4. Aktivácia ERK	14
4.1 Štruktúra ERK	14
4.2 Mechanizmus aktivácie ERK	15
4.2.1 Ďalšie fosforylácie.....	16
4.2.2 Interakcia ERK so substrátmi pomocou dokovacích domén a nezávisle na dokovacích doménach.....	16
4.3 Dimerizácia	18
4.4 Lokalizácia	19
4.4.1 Mechanizmus translokácie do jadra	19
4.4.2 Lokalizácia do ďalších bunkových kompartmentov.....	19
5. Rozdiely medzi izoformami ERK1 a ERK2	20
5.1 Rozdiely na sekvenčnej úrovni.....	21
5.2 Rozdiely v aktivácii.....	22
5.3 Rozdiely vo fosforylácii substrátu.....	23
5.4 Rozdiely v expresii ERK1 a ERK2	24
5.5 Funkčné rozdiely	25
6. Záver	28
7. Použitá literatúra	29

1. Úvod

Komunikácia medzi bunkami navzájom, ako aj medzi bunkami a prostredím, je zaistovaná pomocou bunkovej signalizácie. Príjem, prenos a spracovanie signálu vedie ku konkrétnej bunkovej odpovedi, pričom výsledkom správnej reakcie na prenášaný signál je zabezpečenie dôležitých procesov v daný čas a na danom mieste.

Jednou skupinou signálnych dráh je rodina mitogénmi aktivovaných proteínkináz (MAPK), ktorých úloha spočíva v spracovaní extracelulárnych signálov stimulujúcich bunku ku konkrétnej bunkovej odpovedi. Signál je prijatý pomocou receptorov zachycujúcich jednotlivé signálne molekuly a prenášaný prostredníctvom kaskády intracelulárne lokalizovaných proteínkináz. Najlepšie preštudovaným členom tejto rodiny MAPK signálnych dráh je dráha MAPK/ERK. Rovnako ako u ostatných MAPK kaskád je aj u MAPK/ERK podstatou prenosu séria následných fosforylácií. Tieto fosforylácie sú zabezpečované tromi proteínkinázami, Raf, MEK a ERK. ERK je proteínkináza, ktorá sa líši od zvyšných dvoch členov kaskády svojou schopnosťou fosforylovať veľké množstvo substrátov, napríklad transkripčných faktorov. Dôležité však nie sú iba samotné proteínkinázy, ale aj ďalšie faktory podieľajúce sa na správnej regulácii prenosu signálu a zabraňujúce nekontrolovateľným patologickým procesom v bunke.

Všetky tri proteínkinázy MAPK/ERK kaskády sa vyskytujú v minimálne dvoch izoformách. Zatiaľ čo izoformy Raf vykazujú istú mieru odlišností, u izoform MEK a ERK je situácia komplikovanejšia. ERK1 a ERK2 sa na úrovni sekvencie aminokyselinového reťazca zhodujú z viac než 80 %. Napriek tomu sú obe izoformy v evolúcii konzervované, čo viedlo viacerých autorov k myšlienke, že by mohli byť funkčne špecializované aj napriek vysokej sekvenčnej zhode. Táto bakalárska práca si kladie za cieľ zhrnúť súčasné poznatky o štruktúrnych a funkčných rozdieloch medzi ERK1 a ERK2 izoformami v MAPK/ERK signálnej dráhe.

2. Signalizácia dráhou MAPK/ERK

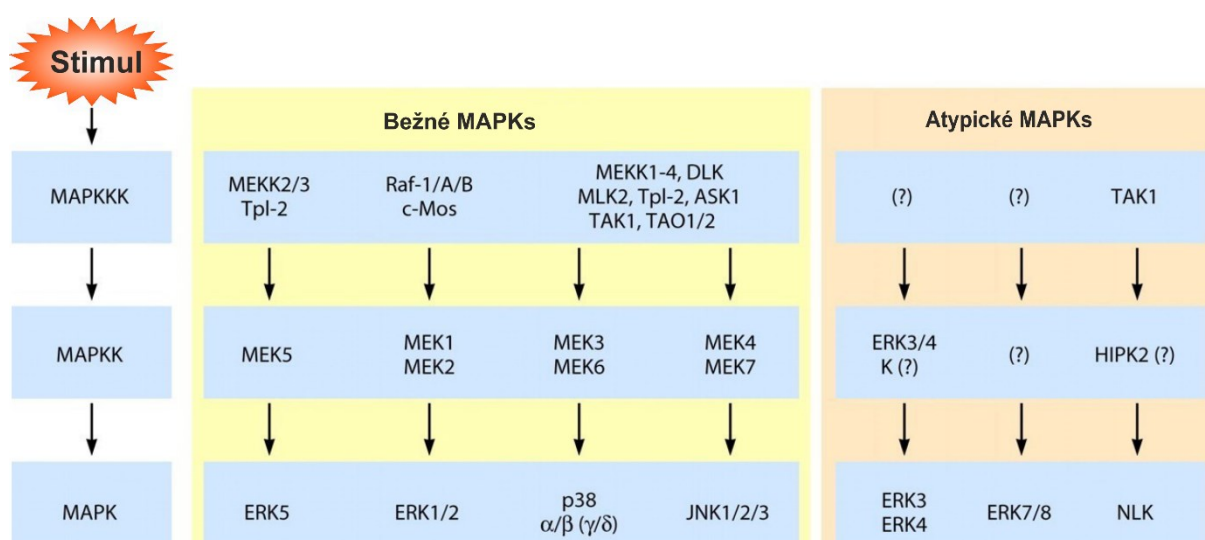
2.1 Základná charakteristika signálnej dráhy MAPK/ERK

Signálna dráha ERK (extracellular signal-regulated kinase) je súčasťou rodiny evolučne konzervovaných signálnych dráh súhrnne označovaných ako MAPK (mitogen-activated protein kinase) signálne dráhy. MAPK/ERK dráha je asociovaná s množstvom bunkových dejov, akými sú napríklad proliferácia, diferenciácia, migrácia buniek, adhézia, senescencia či apoptóza (Sun *et al.*, 2015). MAPK dráhy patria k najdôležitejším mechanizmom, pomocou ktorých bunka spracováva rozmanité extracelulárne signály a na základe toho vyvoláva určitú vnútrobunkovú odpoveď (Saba-El-Leil *et al.*, 2016). K zachyteniu signálnych molekúl slúžia receptory lokalizované na plazmatickej membráne a v prípade intracelulárnej signalizácie sa jedná o tyrozín kinázové receptory, cytokínové receptory, receptory spriahnuté s G proteínmi alebo adhézne receptory (Eblen, 2018). Rozmanité signálne molekuly sa viažu na tieto receptory, ktoré následne aktivujú MAPK dráhu, čoho výsledkom je relevantná odpoveď bunky na prenášaný signál.

Rodina MAP kináz je evolučne konzervovaná a vyskytuje sa u rastlín, húb aj živočíchov (Li *et al.*, 2011). Kľúčové komponenty MAPK kaskád predstavujú tri proteínkinázy – MAPKKK (MAPK kinase kinase), MAPKK (MAPK kinase) a MAPK (MAP kinase) (Johnson & Lapadat, 2002). Princípom prenosu signálu cez MAPK dráhy je séria následných fosforylácií jednotlivých komponent dráhy (Obr. 1). MAPKKK fosforyluje MAPKK a tá aktivuje MAPK dvojistou fosforyláciou hydroxylových skupín na serín/treonínových a tyrozínových zvyškoch. Tento systém postupných fosforylácií a jednotlivé intermediáty dráhy zabezpečujú možnosť zosilnenia alebo potlačenia signalizácie, pričom sú využívané rozličné mechanizmy na rozpoznanie signálnych molekúl aj z iných signálnych dráh v bunke. Ďalšou výhodou tohto systému je možnosť amplifikácie, pokiaľ sú po sebe nasledujúce proteíny vo väčšom zastúpení ako ich regulátory (Pearson *et al.*, 2001). Aktivácia jednotlivých proteínkináz kaskády vedie k mnohým fyziologickým procesom, ale v istých prípadoch môže dochádzať aj k signalizácii spôsobujúcej patologickú odpoveď.

MAPK dráhy nie sú u všetkých organizmov rovnaké. Bezstavovce majú menej MAP kináz než stavovce a na základe fylogenetického analýzy MAPK génov sa predpokladá, že MAP kinázy stavovcov vznikli z 3 prekursorov a vďaka génovým duplikáciám expandovali už počas skorej evolúcie stavovcov (Li *et al.*, 2011). Cicavce využívajú 7 rôznych MAPK dráh, ktoré sú kódované 14 génmi pre MAP kinázy. Najlepšie preskúmané sú tri podrodiny signálnych dráh, a to ERKs (proteínkinázy regulované extracelulárnym signálom), JNKs (Jun amino-terminálne proteínkinázy) a p38/SAPK (stresom aktivované proteínkinázy). Do podrodiny ERK patrí 6 členov, a to ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, pričom ERK7/8 reprezentuje jednu proteínkinázu v potkanoch označovanú ako ERK7 a u ľudí pôvodne ERK8. ERK1/2 a ERK5 sa označujú ako typické MAP kinázy, zatiaľ čo ERK3/4 a ERK7/8 ako atypické (Cargnello & Roux, 2011).

V prípade ERK dráhy zabezpečujú prenos signálu proteínkinázy Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) a ERK (MAPK) (Obr. 1). Raf a MEK sa vyskytujú v cytoplazme a fosforylujú len obmedzený počet substrátov – Raf fosforyluje hlavne MEK a MEK fosforyluje iba ERK. ERK, na rozdiel od týchto dvoch proteínkináz, fosforyluje veľké množstvo substrátov vo všetkých kompartmentoch bunky vrátane jadra. Vďaka úzkej substrátovej špecificke proteínkináz Raf a MEK je prenos signálu v rámci kaskády lineárny. Na úrovni ERK sa následne signál vetví do mnohých smerov. Zaujímavé je, že každý stupeň kaskády obsahuje viacero izoformiem. V prípade Raf a MEK sa izoformy líšia vo funkcii či tkanivovo-špecifickej expresii, aj keď ich rozdielne funkcie sú pomerne málo popísané (Buscà *et al.*, 2016). To sa týka aj izoformiem ERK1 a ERK2, ktorým bude venovaná osobitná kapitola.



Obr. 1 – Rozličné stimuly vedú k aktivácii viacerých MAP kinázových dráh a následnými fosforyláciami jednotlivých členov kaskád sa aktivuje veľké množstvo substrátov. Mitogény, stresové faktory a cytokíny aktivujú rôzne MAPK dráhy. Upravené, prevzaté z (Cargnello & Roux, 2011).

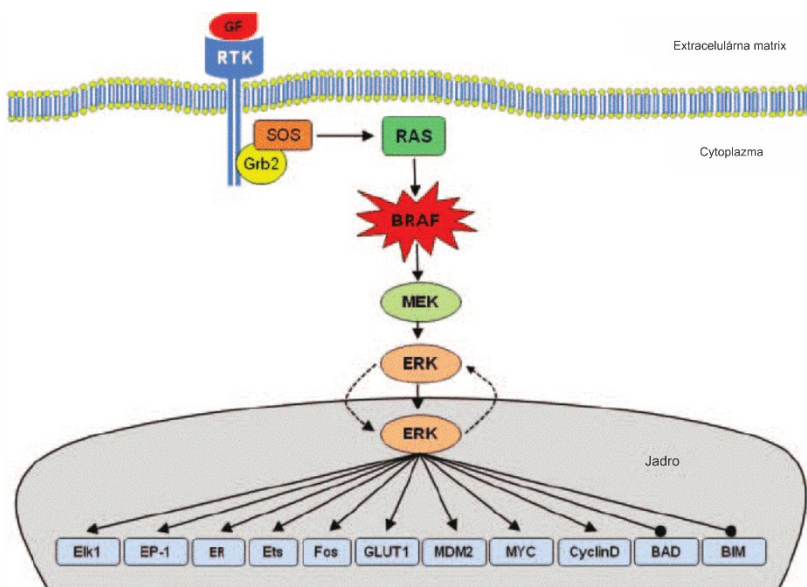
2.2 Mechanizmus prenosu signálu a aktivácia dráhy MAPK/ERK

MAPK/ERK kaskáda je aktivovaná celou radou extracelulárnych podnetov a signálnych molekúl, akými sú napríklad rôzne rastové faktory, cytokíny a aktivátory receptorov spriahnutých s G-proteínmi. Aktivácia dráhy ERK pomocou EGF (epidermal growth factor) slúži ako modelový príklad aktivácie dráhy ERK extracelulárnymi signálmi (Brown & Sacks, 2009).

EGF sa viaže na receptor typu RTKs (receptor tyrosine kinases), konkrétne EGF receptor (EGFR) na cytoplazmatickej membráne (Obr. 2). Po naviazaní ligandu na receptor dochádza k dimerizácii pôvodných monomérov a je spustená tyrozínkinázová aktivita receptoru, nastáva trans-autofosforylácia na tyrozínových zvyškoch intracelulárnej domény receptoru. Na fosforylované

tyrozínové zvyšky sa viažu proteíny s SH2 doménou. Príkladom takého proteínu je Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), ktorý sa viaže na Ras-GEF (guanine nucleotide exchange factor) Sos (son of sevenless) v cytoplazme. To spôsobí presun Grb2/Sos komplexu na cytoplazmatickú membránu, kde je aktivovaný a spúšťa činnosť malej GTPázy Ras tým, že uvoľní GDP a umožní nadviazanie GTP (Brown & Sacks, 2009).

Do Ras rodiny malých GTPáz sa mimo iné radia H-Ras, K-Ras a N-Ras, ktoré sú zodpovedné za aktiváciu ERK kaskády „downstream“ od RTKs. Väzba GTP na Ras indukuje konformačné zmeny väzobných domén, čo následne umožňuje nadviazanie ďalších efektorových proteínov. V prípade ERK signalizácie dochádza k väzbe proteínkinázy z rodiny Raf, ktorá je rekrutovaná na plazmatickú membránu (Eblen, 2018).



Obr. 2 – Prenos signálu dráhou MAPK/ERK aktivovanou pôsobením rastových faktorov (GF) na receptor s tyrozínkinázovou aktivitou (RTK). Upravené, prevzaté z (Govender & Chetty, 2012).

Pre translokáciu Raf na membránu je nutná membránová lokalizácia Ras proteínov. Ras sa v bunke nachádza v membránových mikrodoménach bohatých na kaveolín, proteíny s glykozylfosfatidylinozitolovou kotvou a molekuly signálnej transdukcie (Mineo *et al.*, 1997). Ras proteíny prechádzajú viacerými post-translačnými modifikáciami, vďaka čomu sa zvyšuje ich hydrofóbný charakter a možnosť väzby na cytoplazmatickú membránu. Najdôležitejšou modifikáciou je farnezylácia motívu CAAX (C je cystein, A sú alifatické aminokyseliny a X predstavuje ľubovoľnú aminokyselinu) na C-konci Ras proteínov (Nan *et al.*, 2015). Lipidový zvyšok na motíve CAAX zabezpečuje ukotvenie Ras GTPáz na plazmatickú membránu. Podstatným krokom v interakcii Ras

s Raf je dimerizácia Ras, prípadne tvorba nano-klastrov (Degirmenci *et al.*, 2020). Hlavnou úlohou Ras GTPáz je translokovať Raf na cytoplazmatickú membránu, avšak presný popis ich vzájomnej interakcie stále nie je známy.

Z rodiny proteínov Raf je najlepšie preštudovaná proteínkináza Raf1 (C-Raf) (Mineo *et al.*, 1997). Ďalšími sú A-Raf a B-Raf, všetky patria medzi serín/treonínové proteínkinázy a zabezpečujú fosforyláciu proteínkináz MEK1 a MEK2 (Eblen, 2018). Aktívny Ras translokuje Raf na plazmatickú membránu naviazaním na N-koncovú regulačnú doménu Raf (Stokoe *et al.*, 1994) a indukuje Raf heterodimerizáciu (Weber *et al.*, 2001). Niektoré štúdie však ukazujú, že tieto dve proteínkinázy majú medzi sebou komplexnejšiu reguláciu. Asociácia Raf s plazmatickou membránou je v aktivácii kľúčová a vyžaduje viacero aktivačných procesov sprostredkovaných proteínkinázami, adaptorovými proteínmi a lipidovými kofaktormi (Mineo *et al.*, 1997). U C-Raf je pre kinázovú aktivitu nevyhnutná fosforylácia Ser338 proteínkinázou PAK3 a Tyr341 proteínkinázami Src (Mason *et al.*, 1999). Autoinhibícia aktivity Raf regulačnou doménou je prekonaná práve fosforyláciou Tyr341 (Tran & Frost, 2003). Samotná aktivácia Raf je na Ras nezávislá. Vo väčšine prípadov Ras neslúži ako proteínová kotva, ktorá by držala Raf ukotvený v membráne. Raf teda nie je po celú dobu svojej aktivity naviazaný na plazmatickú membránu, ale využíva väzby s proteínmi cytoskeletu (Stokoe *et al.*, 1994).

Akonáhle je Raf aktivovaný, nasleduje fosforylácia proteínkináz MEK1 a MEK2, súhrnne označovaných ako MEK1/2. MEK1 a MEK2 sa nachádzajú v cytoplazme vďaka jadrovému exportnému signálu (NES) na N-konci (Fukuda *et al.*, 1996) a interakciám s ďalšími proteínovými kotvami (Zehorai *et al.*, 2010). Sú substrátom Raf a ich aktivácia nastáva po fosforylácii Ser218/Ser222 (MEK1), respektíve Ser222/Ser226 (MEK2), lokalizovaných v aktivačnej slučke (sekvencie ľudských proteínov) (Zaballos *et al.*, 2019). V prípade izoformy MEK1 prispieva k aktivácii proteínkinázou Raf i fosforylácia Ser298, pretože zvyšuje asociáciu MEK-Raf (Eblen *et al.*, 2004). Obe MEK izoformy sú kinázy s duálnou špecifitou, čo znamená, že fosforylujú tak serín/treonínové, ako aj tyrozínové zvyšky. Pôsobia ako aktivátory ERK, poprípade ako cytoplazmatické kotvy, ktoré majú regulačnú funkciu (Fukuda *et al.* 1997).

MEK aktivuje ERK fosforyláciou motívu Thr-Glu-Tyr (takzvaný TEY motív), fosforylovanými aminokyselinami sú u potkanieho ERK2 Thr183 a Tyr185 a u ERK1 Thr203 a Tyr205 (Roskoski, 2012). Rozpoznanie ERK proteínkinázou MEK je závislé na takzvaných „docking“ (dokovacích) interakciách prostredníctvom krátkeho motívu neďaleko N-konca MEK (Fukuda *et al.*, 1997) (MAPK-docking site, D doména), ktorý obsahuje bázické a hydrofóbne aminokyseliny (Xu *et al.*, 2001). V štruktúre MEK sa však nachádzajú viaceré oblasti dôležité pre interakciu MEK-ERK, napríklad oblasť bohatá na prolín (PRS), ktorej prítomnosť pozitívne vplyva na aktiváciu ERK (Dang *et al.*, 1998). U ERK2 sú pre interakciu dôležité dva kyslé zvyšky (Asp316, Asp319) v blízkosti C-konca ERK2, tvoriace takzvanú CD doménu. Medzi kyslými zvyškami CD domény ERK2 a bázickými zvyškami D domény MEK

dochádza k elektrostatickým interakciám (Tanoue *et al.*, 2000). Dva hydrofóbne zvyšky (Tyr314, Tyr315) ležiace vedľa kyslých aminokyselín CD domény taktiež napomáhajú k väzbe MEK-ERK prostredníctvom hydrofóbných interakcií s aminokyselinami D domény (Xu *et al.*, 2001). Okrem C-koncových oblastí sa na asociácii s MEK podieľa aj úsek na N-konci ERK2, a to aminokyseliny na pozícii 19-25 (Eblen *et al.*, 2001). Vďaka týmto väzbám môže byť regulovaná aktivácia ERK, lokalizácia a fosforylácia ďalších substrátov v MAPK/ERK signálnej dráhe.

2.2.1 Ďalšie spôsoby aktivácie dráhy MAPK/ERK

Okrem vyššie spomínaného EGFR existujú aj iné možnosti aktivácie dráhy ERK. Nasledujúci text stručne popisuje niektoré z nich.

Inzulínová signalizácia sprostredkovaná IGF funguje na podobnom princípe ako signalizácia prostredníctvom EGFR. Stimulácia IGF receptoru vedie k autofosforylácii a sú rekrutované a aktivované signálne proteíny s SH2 doménou. Na rozdiel od EGFR však autofosforylované IGF receptory nerekrutujú priamo signálne proteíny Grb2 a Sos, ale fosforylujú adaptorové proteíny IRS a Shc, ktoré prepájajú signalizáciu od IGF k MAPK/ERK dráhe (Skolnik *et al.*, 1993).

S Grb2 a Sos komplexom interagujú aj proteínkinázy FAK a PAK, ktoré majú význam v integrínovej signalizácii a adhézii buniek, a tým sa podieľajú na migrácii buniek. FAK sprostredkovaná aktivácia MAPK/ERK dráhy počas integrínmi indukovanej adhémie buniek k fibronektínu spočíva vo vytvorení komplexu FAK-c-Src, fosforylácii FAK a väzbe s SH2 doménou proteínu Grb2. Grb2 ďalej interaguje so Sos a aktivuje sa Ras/MAPK signálna dráha (Schlaepfer *et al.*, 1994).

K aktivácii MAPK/ERK dráhy prispievajú aj IL3 (receptor bez tyrozínkinázovej aktivity) a SDF-1 (heterotrimerický proteín). Takýto spôsob aktivácie sa uplatňuje v krvotvorných bunkách. IL3 a SDF-1 aktivujú GTPázy Ras a Rac. Pre aktiváciu Ras prostredníctvom IL3 je nevyhnutná GTPáza Rac a adaptorový proteín Grb2, rovnako ako pri aktivácii dráhy pomocou Sos. Malá GTPáza Ras a proteínkináza Raf sú silno aktivované práve prostredníctvom IL3, SDF-1 aktivuje GTPázu Rac a indukuje fosforyláciu Raf1 na Ser338. Táto fosforylácia je kľúčová pre správnu aktiváciu Raf1 a zabezpečuje ju proteínkináza PAK. SDF-1 výrazne zosilňuje aktiváciu Raf1, a taktiež zosilňuje fosforyláciu MEK indukovanú prostredníctvom IL3 (Arai *et al.*, 2005).

Proteínkináza PAK je efektorovým proteínom dvoch GTPáz, Rac a Cdc42. Tieto GTPázy interagujú s proteínkinázou Raf, čím sa podieľajú na aktivácii ERK „downstream“ od Ras. PAK1 fosforyluje MEK1 a tým napomáha interakcii MEK1-Raf1 (Frost *et al.*, 1997). Fosforylácia MEK1 prostredníctvom PAK vyžaduje bunkovú adhéziiu a v adherentných bunkách je proteínkináza PAK nevyhnutná pre asociáciu MEK1-ERK a aktiváciu ERK (Eblen *et al.*, 2002).

2.2.2 Inhibícia ERK signalizácie

Inaktivácia či terminácia signalizácie dráhy ERK je dôležitým krokom pre fyziologickú funkciu tejto dráhy. Na terminácii signalizácie sa podieľa niekoľko mechanizmov – internalizácia a inaktivácia „upstream“ aktivátorov (predovšetkým receptorov), inhibícia „upstream“ väzobných komponent spätnými väzbami a fosforyláciou pomocou aktívnej ERK proteínkinázy a defosforylácia pomocou duálne špecifických MAPK fosfatáz.

Internalizácia EGFR je proces, v ktorom sa za využitia väčkov a receptorom sprostredkovanej endocytózy transportuje komplex receptor-ligand do lyzozómu na degradáciu, prípadne dochádza k recyklácii späť na bunkový povrch. Degradácia alebo recyklácia receptora závisí na druhu ligandu. Zníženie expresie klatrínu v HeLa bunkách narušuje proces transportu EGFR do endozómu. Negatívna regulácia tohto procesu vedie k inhibícii signalizácie (Henriksen *et al.*, 2013). V bunkách, ktoré majú narušený proces endocytózy EGFR, bolo pozorované potlačenie MAPK/ERK signalizácie (Vieira *et al.*, 1996).

Inaktivácia dráhy prostredníctvom negatívnej spätnej väzby zahŕňa fosforyláciu Raf1 na viacerých miestach bohatých na prolin. ERK2 *in vitro* fosforyluje Raf1 na piatich serínových zvyškoch (SP motívy), čo vedie k hyperfosforylácii, narušeniu schopnosti Raf1 interagovať s Ras GTPázou a zabráneniu translokácie na plazmatickú membránu. Hyperfosforylovaná Raf1 však nie je degradovaná, ale recyklovaná za pomoci ďalších dvoch molekúl (PP2A, Pin1) do stavu, v ktorom je znova schopná aktivácie a interakcie s Ras (Dougherty *et al.*, 2005). Inhibičná fosforylácia Sos sprostredkovaná ERK proteínkinázou je taktiež zodpovedná za inaktiváciu dráhy, pretože vedie k narušeniu tvorby komplexu Grb2/Sos. ERK fosforyluje Sos na troch serínových zvyškoch na C-konci proteínu v oblasti bohatej na prolin, kde sa nachádzajú väzobné miesta pre SH3 domény (Corbalan-Garcia *et al.*, 1996). Na inhibičnej fosforylácii sa okrem ERK podieľa aj RSK2 proteínkináza, ktorá je sama substrátom ERK (Douville & Downward, 1997).

Ďalším spôsobom je deaktivácia proteínkinázy ERK za pomoci duálne špecifických MAPK fosfatáz, ktoré defosforylujú fosfotreonín aj fosfotyrozín v aktivačnej slučke. Tieto duálne špecifické proteínfosfatázy (DUSP) majú v bunke rôznu lokalizáciu, v jadre sa nachádzajú napríklad MKP-1, MKP-2, DUSP-2 a DUSP-5. V cytoplazme sú to MKP-3, MKP-4 a MKP-X. Niektoré z nich dokážu defosforylovať len ERK1/2, príkladom takejto proteínfosfatázy je MKP-3, iné defosforylujú spolu s ERK aj JNK a P38 (Owens & Keyse, 2007). Špecifickú väzbu MKP-3 na ERK zabezpečuje nekatalytická N-koncová doména. Väzbou na substrát sa spúšťa katalytická aktivita proteínfosfatáz (Camps *et al.*, 1998). Okrem DUSP existujú aj ďalšie proteíny, ktoré regulujú MAPK/ERK signalizáciu. Patria sem rôzne adaptorové proteíny a kotviace proteíny, ktoré zabezpečujú cytoplazmatickú lokalizáciu ERK a zabraňujú presunu ERK do jadra, poprípade zabezpečujú interakcie s aktívnym cytoskeletom (Olea-Flores *et al.*, 2019).

2.3 Proteínové adaptory

Prenos signálu MAPK/ERK dráhou je regulovaný množstvom proteínov, ktoré síce nemajú enzymatickú aktivitu, ale majú v regulácii veľký význam. Patria sem 3 skupiny proteínov – takzvané „scaffold“ proteíny, proteínové kotvy a inhibítory. Jednotlivé modulárne proteíny však nemožno priamo rozdeliť do jednotlivých skupín, často môže jeden proteín plniť viac funkcií zároveň. Regulácia pomocou inhibítorov, ktorej príkladom je regulácia prostredníctvom DUSP, už bola popísaná v predošlej kapitole. Preto sa táto časť textu bude zameriavať na reguláciu pomocou „scaffold“ proteínov, ktoré môžu fungovať „upstream“ i „downstream“ od ERK (Ramos, 2008) a vytvárajú „lešenie“ pre ostatné proteíny podieľajúce sa na signalizácii.

„Scaffold“ proteíny (adaptorové proteíny) sú dôležitou súčasťou signálnych dráh, pretože dokážu priblížiť jednotlivé členy dráhy do takej blízkosti, aby mohli spolu interagovať a podporujú tak fosforyláciu efektorových molekúl. Vplývajú na dĺžku trvania signálu a intenzitu signálu (Dhanasekaran *et al.*, 2007). Okrem toho je pre funkciu celej dráhy dôležitá aj lokalizácia jednotlivých enzýmových komplexov v bunke, ktorá je takisto výsledkom činnosti „scaffold“ proteínov (Ramos, 2008). Na základe rôznej lokalizácie komplexov je zabezpečená regulácia aktivácie jednotlivých členov dráhy a zároveň presnejšia regulácia fosforylácie substrátov v jednotlivých kompartmentoch bunky.

Jedným z najvýznamnejších adaptorových proteínov regulujúcich MAPK/ERK signálnu dráhu je KSR (kinase suppressor of Ras). Ide o proteín interagujúci s Raf, MEK aj ERK, ktorý obsahuje kinázovú doménu, avšak jeho kinázová aktivita nie je preukázaná (Morrison, 2001; Therrien *et al.*, 1995). U cicavcov sa vyskytujú 2 izoformy, KSR1 a KSR2. KSR1 sa podieľa na aktivácii ERK na úrovni medzi Ras a Raf (Therrien *et al.*, 1995). V bunkách, v ktorých práve neprebíha signálna transdukcia, je KSR lokalizovaný v cytoplazme a po aktivácii Ras sa translokuje na plazmatickú membránu a napomáha aktivácii Raf1 (Michaud *et al.*, 1997). Následne je na membránu lokalizovaný aj MEK a KSR moduluje tvorbu multiproteínového komplexu zloženého z Raf, MEK1/2, ERK1/2 a ďalších proteínov regulujúcich aktivitu a lokalizáciu KSR. Sú to napríklad γ podjednotky G proteínov, 14-3-3 proteín a chaperony (Morrison, 2001). To, akým spôsobom KSR ovplyvňuje prenos signálu od Ras k ERK, závisí aj na koncentrácii KSR v bunke. Pokiaľ je KSR exprimovaný v optimálnej hladine, pozitívne ovplyvňuje ERK aktiváciu. Pokiaľ však presiahne určitú mieru expície, výsledkom je inhibícia ERK signalizácie (Cacace *et al.*, 1999).

Ďalším dobre preštudovaným „scaffold“ proteínom je MP1 (MEK partner 1), ktorý interaguje s MEK1 a ERK1, ale *in vivo* neinteraguje s Raf, MEK2 ani ERK2. Pokiaľ je MP1 v bunke exprimovaný, podporuje interakciu MEK1-ERK1 a ich aktiváciu (Schaeffer *et al.*, 1998). MP1 tvorí komplex s vysoko konzervovaným proteínom p14 a tento komplex je nevyhnutný pre signalizáciu na neskorých endozómoch (Wunderlich *et al.*, 2001). P14 je tiež zodpovedný za lokalizáciu MP1 na neskorý endozóm a reguluje ERK1/2 signalizáciu na endozómoch vyvolanú EGF (Teis *et al.*, 2002).

Významným interakčným partnerom MP1 pozitívne ovplyvňujúcim aktiváciu ERK je proteín z rodiny WD-40, MORG1. Na rozdiel od p14 sa nezúčastňuje na aktivácii ERK spustenej prostredníctvom EGF, ale podporuje ERK aktiváciu spustenú inými signálnymi molekulami, napríklad LPA. MORG1 interaguje okrem MP1 aj s C-Raf, B-Raf, MEK a ERK1/2 a podieľa sa na formovaní multiproteínového komplexu. I v tomto prípade však treba dodať, že pri príliš vysokých koncentráciách MORG1 môže byť aktivácia ERK inhibovaná (Vomastek *et al.*, 2004).

Okrem vyššie spomenutých príkladov existuje množstvo ďalších proteínových adaptorov – PEA-15, β -arrestin, IQGAP1, paxilín a ďalšie, ktoré výrazne napomáhajú k usmerneniu signalizácie (Ramos, 2008).

2.4 Fyziologická signalizácia

Ako bolo spomenuté vyššie, ERK1/2 má veľké množstvo ako cytosolických, tak jadrových substrátov. Príkladmi cytoplazmatických substrátov sú DAPK, TSC2, RSK alebo MNK, v jadre sú to potom transkripčné faktory Elk1, c-Fos, c-Myc, NF-AT, MEF2, STAT3 a iné (Cargnello & Roux, 2011). Vzhľadom k tejto skutočnosti je zrejmé, že MAPK/ERK signálna dráha pomocou aktivácie rôznej sady substrátov vyvoláva rozličné fyziologické deje v bunkách. Príkladmi týchto dejov sú proliferácia, normálny embryonálny vývoj, diferenciácia buniek, senescencia, apoptóza, migrácia buniek, adhézia, modulácia cytoskeletárnych štruktúr, regulácia bunkového cyklu, regulácia transkripcie či remodelácia chromatinu (Olea-Flores *et al.*, 2019).

To, akým spôsobom bunka reaguje na signály dráhy závisí na lokalizácii aktivovanej proteínkinázy ERK v bunke a na aktivácii jednotlivých substrátov (kapitola 3.2 Mechanizmus aktivácie ERK).

2.4.1 ERK a proliferácia

Príkladom jednej z najlepšie preštudovaných funkcií signálnej dráhy ERK je jej vplyv na bunkovú proliferáciu a vplyv na vstup bunky do bunkového cyklu. Aktivácia a presun ERK1/2 do jadra je počas G1 fázy bunkového cyklu dôležitou podmienkou prechodu do S fázy cyklu. V jadre ERK fosforyluje primárne transkripčné faktory. Jednými z najdôležitejších substrátov sú transkripčné faktory z rodiny Ternary complex factors (TCFs), napríklad Elk1. Po fosforylácii Elk1 heterodimerizuje s faktorom SRF, ovplyvňuje expresiu IEGs (immediate early genes), rôznorodú skupinu génov zabezpečujúcich vstup do bunkového cyklu. V rámci skorej odpovede sú indukované transkripčné faktory, ktoré sú súčasťou komplexu AP-1 (activating protein 1, kam patria c-Fos a c-Jun) alebo c-Myc (Eblen, 2018). Tieto transkripčné faktory indukujú transkripciu génov zúčastňujúcich sa na regulácii bunkového cyklu, napríklad cyklínov.

Aktivácia ERK môže byť krátkodobá alebo dlhodobá. To ovplyvňuje syntézu i stabilitu proteínov dôležitých v G1 fáze. Počas tejto fázy je predĺžená signalizácia ERK významným faktorom potlačujúcim proti-proliferáciu gény. Rovnako tak fosforylácia niektorých proti-proliferatívnych proteínov (FOXO3a, Tob1) prostredníctvom ERK spôsobuje inhibíciu, prípadne degradáciu daných proteínov (Eblen, 2018).

Predtým, ako dôjde k rozdeleniu bunky, je potrebné skontrolovať, či vôbec bude bunka schopná vykonať všetky energeticky náročné procesy spojené so syntézami. ERK1/2 ovplyvňuje reguláciu produkcie metabolitov potrebných pre syntézu (Chambard *et al.*, 2007), fosforyluje karbamoyl fosfát syntetázu zodpovednú za katalýzu syntézy pyrimidinových nukleotidov (Graves *et al.*, 2000), prostredníctvom fosforylácie MSK1 a MSK2 reguluje remodeláciu chromatinu, vplyva na syntézu ribozómov fosforyláciou transkripčných faktorov UBF a cez MNK1 a TOR tiež na transláciu proteínov. Čo sa týka samotnej G1 fázy bunkového cyklu a prechodu do S fázy, dôležitú úlohu zohrávajú cyklín dependentné proteínkinázy a tvorba komplexu s cyklínom D. ERK1/2 podporuje ich expresiu a zároveň sa zúčastňuje na regulácii inhibítorov týchto proteínkináz. ERK taktiež významne reguluje proteíny zodpovedné za zablokovanie bunkového cyklu pred začatím S fázy. Aktivita ERK bola preukázaná aj počas prechodu z G2 fázy do M fázy (Chambard *et al.*, 2007).

2.4.2 ERK a migrácia

Na migrácii buniek sa podieľa množstvo proteínov a proteínových komplexov a dochádza k prepájaniu viacerých signálnych dráh. Je to komplexný dej, pri ktorom bunka vytvorí vedúci a retrahujúci okraj, kde dochádza k tvorbe a rozpadu fokálnych adhézii a prestavbe aktínového cytoskeletu, a tým k protrúzii a retrakcii buniek a ich následnej migrácii. Aktivácia ERK dráhy vedie mimo iné ku zvýšenej expresii, napríklad proteínov extracelulárnej matrix, niektorých integrínov a matrixových metaloproteáz, ktoré pozitívne ovplyvňujú bunkovú migráciu.

Jednou z významných molekúl zabezpečujúcich migráciu je proteínkináza MLCK, ktorá fosforyluje MLC (myosin light-chain), čím je stimulovaná aktivita myozínu II. Práve táto proteínkináza je fosforylovaná proteínkinázou ERK a touto cestou ERK indukuje bunkovú migráciu (Klemke *et al.*, 1997). Dôležitú úlohu plnia aj nukleačné faktory WAVE tvoriace regulačný komplex WRC, ktorý interaguje s Arp2/3 a aktínom. ERK fosforyluje WAVE2 a Abi1 (súčasť WRC komplexu), čím podporuje polymerizáciu aktínu (Mendoza *et al.*, 2011). Substrátom ERK je tiež kortaktín, ktorý interaguje s nukleačnými faktormi WASP a N-WASP, ako aj s Arp2/3, čo taktiež ovplyvňuje polymerizáciu a nukleáciu aktínu (Martinez-Quiles *et al.*, 2004). ERK ďalej fosforyluje paxilín a FAK, pričom je regulovaná interakcia týchto dvoch proteínov a adhézia buniek, a tým aj migrácia (Hunger-Glaser *et al.*, 2003; Ishibe *et al.*, 2004). Ďalšie pre migráciu potrebné proteíny, ako napríklad kalpain 2, vinexin β

a Rac1 sú substrátmi ERK a mnohé ďalšie sú fosforylované proteínkinázou RSK, ktorá je taktiež substrátom ERK (Tanimura & Takeda, 2017).

ERK spolu s RSK priamou fosforyláciou mnohých molekúl zodpovedných za bunkovú migráciu ovplyvňujú polymerizáciu aktínu, sieťovanie F-aktínu, dynamiku fokálnej adhézie, aktivitu myozínu II, aktiváciu a inhibíciu Rho GTPáz či inaktiváciu Rac/Cdc42 GTPáz (Tanimura & Takeda, 2017).

Špeciálnym prípadom ovplyvňovania bunkovej migrácie dráhou MAPK/ERK je epiteliálno-mezenchymálna tranzícia (EMT). Počas EMT polarizované nepohyblivé epiteliálne bunky strácajú epitelové charakteristiky a transformujú sa na samostatné mezenchymálne bunky. Tie sú pohyblivé a schopné individuálnej migrácie. Tento proces zaisťujú EMT-indukujúce transkripčné faktory, ktorých expresia je modulovaná prostredníctvom ERK a tým je podporená expresia génov zvyšujúcich bunkovú migráciu (Tanimura & Takeda, 2017).

2.4.3 ERK a apoptóza

ERK1/2 proteínkinázy sa prevažne zúčastňujú na procesoch, ktoré zabraňujú apoptóze. Či už sa jedná o kontrolu proliferácie a diferenciácie buniek, alebo reguláciou proteínov na úrovni ich transkripcie a posttranslačných úprav v prospech anti-apoptotických proteínov. MAPK/ERK signálna dráha sa však môže zúčastňovať i opačných, a teda pre-apoptotických procesov (Yue & López, 2020). V prípade uzamknutia bunkového cyklu v G2 fáze je za apoptózu zodpovedná destabilizácia dôležitej regulačnej fosfatázy CDC25B prostredníctvom MEK1 (Astuti *et al.*, 2009). U nervových buniek, ktoré sú po mitóze v G0 kontrolnom uzle bunkového cyklu zablokované nastáva apoptóza pri opätovnom vstupe do bunkového cyklu, ktorý je vyvolaný stresovými faktormi. MEK/ERK dráha pôsobí napríklad na zvýšenie hladiny cyklínu D1 a neurón vstúpi do S-fázy bunkového cyklu, čo vedie k bunkovej smrti (Modi *et al.*, 2012). Ďalším príkladom je apoptóza spôsobená poškodenou DNA, kde ERK signalizácia indukuje zvýšenú reguláciu tumor supresorového proteínu p53 (Brown & Benchimol, 2006).

2.5 Patologická signalizácia

Pokiaľ dôjde k mutáciám v génoch kódujúcich jednotlivé členy dráhy alebo regulátory tejto dráhy, môže dochádzať k vzniku ochorení, akými sú rasopatie a mnoho typov rakoviny. Častou príčinou vzniku nádorového tkaniva je mutačná aktivácia na úrovni Ras, Raf, a MEK. Bodové mutácie v génoch pre Ras proteín, konkrétne K-Ras, spôsobujú rakovinu pankreasu (duktálny karcinóm) v 95 % prípadov. 66 % melanómov a histiocytóza z Langerhansových buniek je výsledkom mutačnej aktivity na úrovni B-Raf, v 50 % ostatných prípadov histiocytózy sa však jedná o mutačnú aktiváciu MEK1. Mutácie Ras a Raf sú častou príčinou viacerých druhov rakoviny a genetických porúch (Buscà *et al.*, 2016).

Mutačná aktivácia na úrovni Ras sa vyskytuje u K-Ras izoformy častejšie než u N-Ras a H-Ras. Jedná sa o bodové mutácie v kodóne 12 génu pre K-Ras, zodpovedné za vznik adenokarcinómov pankreasu (Santarpia *et al.*, 2012). Ďalšími častými mutáciami sú tie v kodónoch 13 a 61. Záměna glycínu na pozícii 12 a 13 a glutamínu na pozícii 61 zabraňuje schopnosti Ras hydrolyzovať GTP, čím je ovplyvnená inaktivácia Ras (Simanshu *et al.*, 2017). Problém nastáva aj pri častej disociácii GDP z Ras, ku ktorej dochádza napríklad v prípade záměny Ala146 (Edkins *et al.*, 2006), kedy sa nadmerne viaže GTP a aktivita Ras nie je regulovaná „upstream“ komponentami (Simanshu *et al.*, 2017).

Mutačná aktivita Raf proteínkinázy sa prejavuje najmä u izoformy B-Raf, pretože C-Raf a A-Raf majú menšiu bazálnu kinázovú aktivitu. Najčastejšie sa mutácie objavujú v glycín-bohatej slučke a aktivačnom segmente. Jednou z najvýznamnejších mutácií je substitúcia valínu na pozícii 600 za glutamát v kinázovej doméne, ktorej výsledkom je znížená schopnosť interakcie aktivačného segmentu s glycín-bohatou slučkou, čo spôsobuje nadmernú aktiváciu Raf (Emuss *et al.*, 2005). Častým následkom tejto mutácie je vznik melanómov a rakoviny štítnej žľazy (Santarpia *et al.*, 2012). V prípade rakoviny vaječníkov skupina Estep *et al.* identifikovala 4 mutácie v géne pre B-Raf v exónoch 4, 11, 12 a 15 génu *B-RAF* (Estep *et al.*, 2007). Špecifická je mutačná aktivita B-Raf, spôsobujúca papilárnu rakovinu štítnej žľazy, kedy nedochádza iba k mutáciám bodovým, ale aj k fúzii N-koncovej regulačnej domény s *AKAP9* génom. Dôjde tak k skráteniu regulačnej domény a tým k zvýšeniu bazálnej aktivity B-Raf (Ciampi *et al.*, 2005).

Na úrovni MEK bola preukázaná významná úloha dvoch regulačných zvyškov Ser218 a Ser222, ktoré po substitúcii kyselinou glutámovou alebo asparágovou *in vitro* spôsobujú zvýšenú bazálnu aktivitu MEK1. Ďalšou mutáciou, ktorá *in vitro* zvyšuje bazálnu aktivitu MEK je delécia aminokyselín na N-konci proteínu na pozíciách 32-51, pričom tieto aminokyseliny sú v nemutovanom stave zodpovedné za stabilitu inaktivovaného MEK (Mansour *et al.*, 1994). Substitúcia kyseliny asparágovej na pozícii 67 za asparagín bola identifikovaná u MEK1 v prípade rakoviny vaječníkov. Táto mutácia má vplyv na zvýšenú kinázovú aktivitu a tým zvýšenú mieru fosforylácie ERK (Estep *et al.*, 2007).

Okrem vyššie spomenutých mutácií v génoch pre Ras, Raf a MEK existujú i ďalšie, ktorých výsledkom je abnormálna aktivácia ERK proteínkináz a vznik rakoviny rôzneho typu. Liečba nádorových ochorení je teda cielená práve na signálnu dráhu ERK, a to inhibíciou jednotlivých členov dráhy, najmä „upstream“ od ERK proteínkináz. V prípade B-Raf (mutácia B-Raf^{V600E} a B-Raf^{V600K}) a MEK sa využíva kombinovaná liečba inhibítormi dabrafenib (B-Raf inhibítor) a trametinib (MEK inhibítor), avšak u pacientov vo väčšine prípadov dochádza k opätovnému zhoršeniu stavu. Ďalším problémom sú vznikajúce rezistencie na rôzne typy inhibítorov, preto sa liečba začala orientovať na inhibíciu na úrovni samotného ERK proteínu (Buscà *et al.*, 2016). V súvislosti s liečbou MEK a B-Raf inhibítormi sa objavili mutácie MEK2^{Q60P} a MEK1^{Q56P}, ktoré vedú k alosterickej zmene vo väzobnom mieste pre ATP a k zvýšenej kinázovej aktivite. Tieto mutácie do značnej miery znižujú citlivosť buniek

na kombinovanú liečbu MEK a B-Raf inhibítormi v B-Raf^{V600E} melanómoch (Villanueva *et al.*, 2013). MEK1^{V211D} je ďalšia mutácia vznikajúca počas liečby, ktorá spôsobuje rezistenciu nádorových buniek k alosterickým MEK inhibítormi. Nádejnými sú v tomto prípade ATP-konkurenčné MEK inhibítory, ktoré by mohli byť účinné v liečbe nádorov, ktoré už neodpovedajú na liečbu alosterickými MEK inhibítormi (Gao *et al.*, 2019).

3. Rozdiely medzi izoformami Raf a MEK

3.1 Rozdiely A-Raf, B-Raf, C-Raf

Izoformy A-Raf, B-Raf a C-Raf sú evolučne konzervované proteínkinázy stavovcov a každá izoforma má pre bunku funkčný význam. Všetky tri izoformy obsahujú konzervované oblasti CR1, CR2 a CR3, vrátane motívov RBD (Ras-binding domain) a CRD (cysteine-rich domain). B-Raf je pravdepodobne najpôvodnejšia z týchto troch izoform, pretože má najbližšie k Raf homológom, ktoré sa vyskytujú u bezstavovcov. Taktiež pre B-Raf platí, že je najviac efektívny v aktivácii proteínkináz MEK1/2, pričom A-Raf je v tomto smere najmenej efektívny (Desideri *et al.*, 2015). Gény pre izoformy ležia na rozdielnych chromozómoch a sú exprimované v rôznych tkanivách v rozličnej miere (Hagemann & Rapp, 1999). B-Raf je jedinou izoformou schopnou alostericky aktivovať ostatné signálne proteíny, medzi ktoré patrí aj C-Raf (Hu *et al.*, 2013). B-Raf ovplyvňuje procesy spojené s vývojom placenty, vývojom buniek v nervovej sústave a jeho mutácie sa objavujú vo viacerých prípadoch rakoviny. C-Raf sa podieľa na apoptóze, bunkovej migrácii, formovaní prepojení medzi bunkami a ďalších procesoch prostredníctvom iných dráh než MAPK/ERK. A-Raf sa rovnako ako C-Raf zúčastňuje na procesoch apoptózy (Desideri *et al.*, 2015).

3.2 Rozdiely MEK1 a MEK2

MEK1 a MEK2 vykazujú viac než 80 % zhodu v aminokyselinovej sekvencii. Veľká zhoda sa vyskytuje aj v rámci ich kinázových domén, čo značí, že MEK1 a MEK2 sú obe v rovnakej miere schopné fosforylovať ERK1/2 (Shaul & Seger, 2007). Táto podobnosť je výrazne nižšia na N-konci proteínkináz a v inzercii bohatej na prolín, ktoré sú u MEK1 a MEK2 zhodné len zo 40 % (Ussar & Voss, 2004). Obe izoformy sú schopné autofosforylácie na serínových a treonínových zvyškoch, ale MEK2 autofosforylácia je efektívnejšia než MEK1 autofosforylácia. MEK1 navyše obsahuje autofosforylovateľný tyrozín, ktorý sa u MEK2 nevyskytuje (Zheng & Guan, 1993). Ďalším rozdielom medzi izoformami je schopnosť MEK1 tvoriť komplexy s C-Raf, čo u MEK2 nebolo pozorované. Na tvorbe tohto komplexu sa podieľajú niektoré fosforylovateľné aminokyselinové zvyšky v inzercii bohatej na prolín, ktoré sa vyskytujú u MEK1, ale nie sú prítomné na zodpovedajúcich pozíciách

u MEK2 (Frost *et al.*, 1996; Jelinek *et al.*, 1994). Proteínkinázy MEK1 a MEK2 sa teda odlišujú napríklad v spôsobe, akým sú regulované.

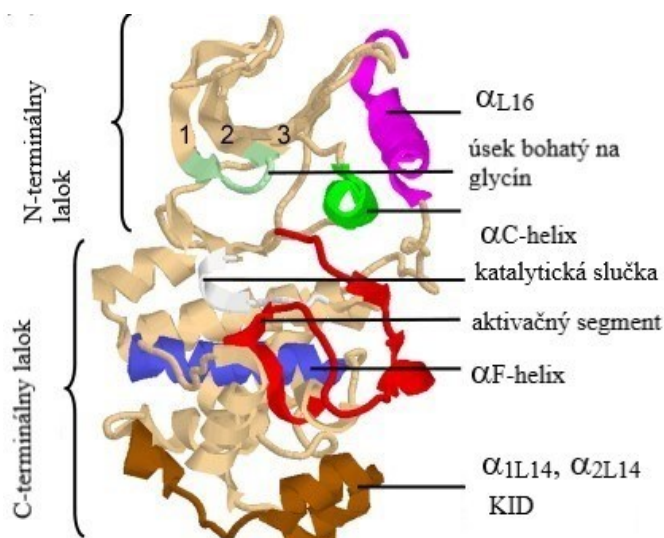
4. Aktivácia ERK

4.1 Štruktúra ERK

Primárna štruktúra ERK pozostáva z 11 konzervovaných domén. Dôležitými časťami terciárnej štruktúry ERK1/2 proteínkináz sú malý amino-terminálny lalok a veľký karboxy-terminálny lalok (Obr. 3) (Roskoski, 2012).

Amino-terminálny lalok obsahuje 5 reťazcov antiparalelných β -listov a konzervovaný motív α C-helix. Ďalšou súčasťou tohto laloku je konzervovaný úsek bohatý na glycín, takzvaná P-slučka (ATP-fosfát-väzobná slučka), ktorá spája prvý a druhý β -list. V jej blízkosti je lokalizovaný Val56/39 (ERK1/2) dôležitý pre hydrofóbnú väzbu s adenínom ATP. Tretí β -list obsahuje motív AXK (Ala-Xxx-Lys) a lyzíny Lys71/54, ktoré sprostredkovávajú väzbu α C-helixu s fosfátmi ATP. V okolí α C-helixu sa nachádza konzervovaná kyselina glutámová, Glu88/71. Medzi Glu88/71 a tretím β -listom sa nachádzajú soľné mostíky vplývajúce na zmenu inaktívnej konformácie proteínkinázy na aktívnu (Roskoski, 2012).

Veľký karboxy-terminálny lalok je tvorený prevažne α -helixami (α D - α I), ale vyskytujú sa tam aj 4 konzervované β -listy (β 6 - β 9) obsahujúce katalytické aminokyselinové zvyšky, umiestnené medzi α E a α F helixami. Katalytické jadro ERK1/2 je tvorené dvanástimi subdoménami obsahujúcimi sekvencie aminokyselín, z ktorých hlavnú úlohu v katalýze zohráva motív lyzín/kyselina asparágová/kyselina asparágová (Lys71/54, Asp166/149, Asp186/189 u človeka). Asp166/149 predstavuje súčasť motívu HRD a Asp186/189 je počiatočnou aminokyselinou aktivačného segmentu a viaže ióny horčíka. Aktivačný segment začína motívom DFG (Asp-Phe-Gly) a končí motívom APE (Ala-Pro-Glu). Strednú časť tvorí aktivačná slučka (nazývaná aktivačný pysk u ERK1/2) obsahujúca fosforylovateľný tyrozín a o dve aminokyseliny „upstream“ od tyrozínu fosforylovateľný treonín. Súčasťou aktivačného pysku je aj P+1 oblasť špecificky rozpoznávajúca substrát (Roskoski, 2012). P+1 špecifická oblasť je dôležitou súčasťou MAP kináz a tvorí ju osem aminokyselinových zvyškov, konkrétne sa jedná o motív YVATRWYR (Tyr-Val-Ala-Thr-Arg-Trp-Tyr-Arg) (Canagarajah *et al.*, 1997). V jeho blízkosti sa nachádza horčík-väzobná slučka, N-koniec α C-helixu a HRD (His-Arg-Asp) motív (Roskoski, 2012). V štruktúre ERK sa tiež nachádza MAP kinázová inzercia a C-koncové predĺženie (L16) zakončené helixom α L16 (Canagarajah *et al.*, 1997).



Obr. 3 – Štruktúra ľudskej nefosforylovanej proteínkinázy ERK2 znázorňujúca N-terminálny a C-terminálny lalok a niektoré dôležité domény a motívy. Čísla 1, 2, 3 označujú 3 z piatich β -listov. α L16 helix na obrázku zdanlivo pôsobí ako súčasť N-terminálneho laloku, ale v skutočnosti je súčasťou C-terminálneho laloku. Upravené, prevzaté z (Roskoski, 2012).

4.2 Mechanizmus aktivácie ERK

Proteínkinázy ERK1/2 sú aktivované fosforyláciou tyrozínových a treonínových zvyškov v aktivačnom pysku prostredníctvom proteínkináz MEK1/2, pričom aktivácia je sprevádzaná veľkými konformačnými zmenami (Wortzel & Seger, 2011). Jedná sa teda o duálnu fosforyláciu a konkrétnymi fosforylovanými aminokyselinami sú u ľudských ERK2 Thr185 a Tyr187 a u ERK1 Thr202 a Tyr204, takzvaný Thr-Glu-Tyr (TEY) motív (Roskoski, 2012). Takto aktivované ERK1/2 sú schopné viazať substrát a fosforylovať ho, pričom najčastejšie cielia na substráty, ktoré majú vo svojej štruktúre motív Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro alebo minimálny motív Ser/Thr-Pro, kde je dôležitý prolín na pozícii P+1 (Canagarajah *et al.*, 1997).

V neaktívnej forme ERK2 nie sú katalytické zvyšky v jednej rovine a P+1 špecifická oblasť je pravdepodobne blokováná, takže nemôže viazať substrát (Canagarajah *et al.*, 1997). V aktívnej forme tvorí fosforylovaný Thr183 (ERK2 potkana) iónové väzby s N-koncovou doménou, interaguje s arginínmi v α C-helixe, katalytickej slučke a aktivačnom pysku. Okrem toho sa účastní vodíkových a iónových väzieb, ktoré prepájajú aktivačný pysk s α C-helixom a C-koncovým predĺžením L16, čím priamo vplýva na vzájomnú orientáciu C-koncovovej a N-koncovovej domény proteínkinázy. Vzájomné natočenie domén voči sebe umožňuje formovanie katalytických zvyškov v aktívnom mieste. Fosforylovaný Tyr185 mení natočenie postranného reťazca tak, že sa stáva súčasťou P+1 špecifickej oblasti na povrchu proteínkinázy spolu s ďalšími aminokyselinovými zvyškami (Val186-Arg192, ERK2 potkana). P+1 oblasť je odblokovaná a tvorí na povrchu proteínkinázy trochu hlbšiu priehlbínu než je tomu v nefosforylovanom stave. Tvoria sa interakcie s arginínmi, ktoré v neaktívnom stave predstavujú aniónové väzobné miesto. Významná je tiež tvorba 3/10 helixu v L16, čo vytvára tesnejšie prepojenie oboch domén (Canagarajah *et al.*, 1997).

Proces aktivácie zabezpečuje odpojenie od proteínov, ktoré kotvia ERK1/2 v cytoplazme (Plotnikov *et al.*, 2019). Následne sa indukuje tvorba diméru (Tomasovic *et al.*, 2020), ktorá bude popísaná v samostatnej podkapitole. Aktivovaná proteínkináza ďalej fosforyluje substráty v jednotlivých kompartmentoch bunky.

4.2.1 Ďalšie fosforylácie

Fosforylácie mimo TEY (Thr-Glu-Tyr) motív majú regulačnú funkciu. U proteínkinázy ERK2 bola preukázaná fosforylácia serínu, konkrétne Ser244 a Ser246 v KID (kinase insert domain) doméne zabezpečujúca väzbu na importín7 a tým transport do jadra. Nemenej dôležitý vplyv na lokalizáciu ERK2 v rámci bunky má autofosforylácia treonínu Thr188, ktorý sa nachádza v aktivačnej slučke (Wortzel & Seger, 2011). Táto autofosforylácia Thr188 nastáva po tvorbe diméru ERK1/2 a zohráva dôležitú úlohu pri vzniku patologických srdečných hypertrofií, čo bolo preukázané na myších proteínkinázach ERK2 (u myších ERK1 je ekvivalentný Thr208). MAPK/ERK dráha však okrem nežiadúcich remodelácií plní v srdci i dôležitú úlohu v ochrane proti stresovými faktormi spúšťanej bunkovej smrti, preto nie je možné túto dráhu úplne blokovať. Fosforylácia Thr188 má okrem spomínaných účinkov podstatný vplyv na signalizáciu ERK1/2 v jadre (Tomasovic *et al.*, 2020).

4.2.2 Interakcia ERK so substrátmi pomocou dokovacích domén a nezávisle na dokovacích doménach

Pre účinnú fosforyláciu a aktiváciu substrátov je potrebné vytvoriť komplex enzým-substrát. Tvorba signalizačného komplexu je často sprostredkovaná pomocou takzvaných dokovacích domén a dokovacích väzobných interakcií. Tieto domény sú prítomné v štruktúre substrátov proteínkináz ERK a slúžia k tomu, aby mohol byť substrát účinne fosforylovaný a bunka mohla efektívne reagovať na extracelulárne podnety (Baryte-Lovejoy *et al.*, 2002). V proteínkinázach ERK boli identifikované dve dokovacie miesta: CD doména (common docking) a FRS (F-site recruitment site) doména (Lee *et al.*, 2004). Úlohou dokovacích domén je zvýšiť špecifickosť proteínkináz a ich účinnosť (Baryte-Lovejoy *et al.*, 2002).

D domény (taktiež nazývané DEJL, docking site for ERK and JNK, LXL), prítomné v mnohých substrátoch, proteínkinázach, proteínfosfatázach a „scaffold“ proteínoch, sú evolučne konzervované domény obsahujúce skupinu bázičných zvyškov, ktoré sú nasledované LXL (Leu-Xxx-Leu) motívom a hydrofóbnymi aminokyselinami. Nachádzajú sa v blízkosti fosforylačného miesta, a to „upstream“ alebo „downstream“ od neho na N-konci proteínu (Baryte-Lovejoy *et al.*, 2002; Raman *et al.*, 2007). Proteíny obsahujúce D domény, napríklad Elk-1 z rodiny ETS, však nie sú fosforylované výlučne proteínkinázami ERK, sú taktiež substrátmi ďalšej MAPK dráhy – JNK (Jacobs *et al.*, 1999).

CD domény (common docking) sú súčasťou ERK a interagujú s D doménami na substrátoch (Tanoue *et al.*, 2000). CD domény, na rozdiel od D domén, obsahujú negatívne nabité a teda kyslé zvyšky. Taktiež sa v nich vyskytujú hydrofóbne aminokyseliny. Väzba so substrátom je sprostredkovaná pomocou elektrostatických interakcií s pozitívne nabitými zvyškami D domény (Tanoue *et al.*, 2000). Sú lokalizované na C-konci proteínu oproti aktívnemu miestu a obsahujú TT (Thr156, Thr157, ERK2 potkana) motív, ktorý zvyšuje špecifickosť „docking“ interakcií s MAPKAPKs (Tanoue *et al.*, 2001).

DEF domény (docking site for ERK, FXF), obsahujúce motív FXFP (Phe-Xxx-Phe-Pro) sú taktiež konzervovanými dokovacími doménami, zohrávajú dôležitú úlohu v rámci MAPK/ERK signálnej kaskády a sú pre túto kaskádu špecifické. ERK rozpoznáva DEF aj D doménu, zatiaľ čo napríklad JNK pre DEF väzobné miesto neobsahuje. Motív FXFP sa vyskytuje v blízkosti fosforylačného miesta smerom k C-koncu proteínu, to znamená neďaleko sekvencie Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro. Príkladom substrátov obsahujúcich FXFP (Phe-Xxx-Phe-Pro) je rodina proteínov ETS, medzi ktoré patrí u ľudí transkripčný faktor Elk-1 alebo SAP-1 a rodina proteínov KSR (Jacobs *et al.*, 1999).

FRS doména (F-site recruitment site) je súčasťou proteínkinázy ERK a interaguje s DEF doménami na substrátoch. FRS doména obsahuje aminokyselinové zvyšky Leu198, Tyr231, Leu232, Leu235 a Tyr261(ERK2). FRS doména vytvára hydrofóbnu oblasť blízko aktívneho miesta ERK a pomocou hydrofóbných interakcií viaže proteíny obsahujúce DEF doménu (Lee *et al.*, 2004).

Domény D a DEF sa však v niektorých substrátoch ERK nevyskytujú. Príkladom takéhoto proteínu je PEA-15, ktorý reguluje aktivitu ERK2 a zabraňuje translokácii ERK2 do jadra. Neobsahuje FXFP motív ani klasickú D doménu. Jeho väzba s ERK2 je sprostredkovaná DED doménou a krátkym C-koncovým segmentom. PEA-15 využíva k väzbe s ERK2 väzobné miesta pre D aj DEF motívy, avšak tieto väzby vedú k zmene konformácie aktivačného pysku, ktorý aj napriek duálnej fosforylácii zostáva v neaktívnej konformácii. V komplexe PEA-15-ERK2 DED doména obsadzuje D-väzobné miesto a C-koncový segment obsadzuje DEF-väzobné miesto (Mace *et al.*, 2013). Ďalším príkladom je transkripčný faktor Ets-1, ktorý taktiež neobsahuje typické dokovacie domény, ale k väzbe s ERK využíva dve atypické dokovacie domény, jednu na N-konci Ets-1 a jednu na C-konci, obsahujúcom takzvanú PNT (pointed domain) doménu. Takto je zvýšená efektívnosť fosforylácie Ets-1 (Piserchio *et al.*, 2017). To naznačuje, že interakcie s niektorými proteínmi môžu byť na klasických dokovacích doménach nezávislé. Tento názor bol potvrdený proteomickou analýzou substrátov ERK, pri ktorej sa ukázalo, že dokovacie domény sprostredkovávajú interakciu iba s obmedzeným počtom substrátov (Courcelles *et al.*, 2013).

4.3 Dimerizácia

O dimerizácii ERK1/2 proteínkináz a mechanizme, akým sa presúvajú do jadra, bolo vypracovaných niekoľko štúdií. Niektoré potvrdili hypotézu, že tvorba dimérov je dôležitým a kľúčovým krokom k aktívnemu transportu ERK do jadra (Khokhlatchev *et al.*, 1998), iné naopak preukázali, že transport do jadra je na dimerizácii ERK nezávislý (Burack & Shaw, 2005).

Skupina Khokhlatchev *et al.* vo svojej práci (Khokhlatchev *et al.*, 1998) považuje za kľúčový krok k translokácii proteínkináz ERK1/2 fosforyláciu a následnú disociáciu z MEK-ERK komplexu. ERK1/2 potom podliehajú dimerizácii a putujú do jadra. Monoméry ERK1/2 spolu interagujú prostredníctvom dvoch domén. C-terminálne predĺženia oboch molekúl (od Pro309 po Arg358), takzvané L16, sa dostávajú do vzájomnej blízkosti a dochádza k väzbám medzi hydrofóbnymi zvyškami Leu333, Leu336, Leu341 a Leu344 (potkania ERK2). Okrem Leu zvyškov sa na tvorbe diméru podieľa motív PE/DHD (u potkanej ERK2 Pro174, Asp175, His176 a Asp177), kyselina glutámová sa vyskytuje u ERK1 izoformy (Buscà *et al.*, 2016; Khokhlatchev *et al.*, 1998).

Aktívne miesta oboch ERK molekúl sú aj po dimerizácii prístupné pre naviazanie substrátu (Canagarajah *et al.*, 1997). Vďaka tomu môže ERK fosforylovať dva substráty naraz, pričom niektoré transkripčné faktory taktiež dimerizujú, a tak sa viažu na ERK dimér. Tvorba sa predovšetkým homodiméry ERK, pretože heterodimér ERK1-ERK2 ľahko disociuje. Z molekúl tvoriacich dimér nemusia byť fosforylované obe ERK proteínkinázy, pretože fosforylovaná forma ERK dokáže interagovať s nefosforylovanou a vzniká takzvaný hemiaktívny dimér. Tvorba takýchto hemiaktívnych dimérov by vysvetľovala skutočnosť, že sa v jadre nachádzali aj ERK molekuly s mutáciou v mieste fosforylácie (Khokhlatchev *et al.*, 1998).

Khokhlatchev *et al.* ďalej vo svojej štúdií naznačili, že pre translokáciu do jadra je fosforyláciou vyvolaná tvorba diméru nevyhnutným krokom, ale kinázová aktivita enzýmu podmienkou translokácie nie je (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Toto tvrdenie neskôr spochybnilo viacero štúdií, napríklad Burack a Shaw poukázali na to, že dimerizácia nie je k transportu ERK do jadra potrebná, avšak nevylúčili úlohu diméru pri väzbe s jadrovými substrátmi (Burack & Shaw, 2005). Skupina Adachi *et al.* popísala aj ďalší spôsob translokácie ERK do jadra, ktorý je uskutočnený pasívnou difúziou cez jadrové póry vo forme monomérov (Adachi *et al.*, 1999). Závety týchto dvoch štúdií podporila aj skupina Casar *et al.*, ktorá skúmala, akú úlohu zohráva dimerizácia vo fosforylácii cytosolických a jadrových substrátov. Z tejto práce (Casar *et al.*, 2008) vyplýva, že sa ERK do jadra presúva najmä vo forme monoméru a transkripčné faktory interagujú taktiež s monomérmi ERK, čo spochybňuje hypotézu o väzbe dimérnych transkripčných faktorov na dimér ERK. Ten bol síce v jadre taktiež zaznamenaný, ale jeho úloha v jadre nebola v danej práci objasnená. Naopak bola preukázaná úloha ERK dimérov pri fosforylácii substrátov v cytoplazme v spolupráci so „scaffold“ proteínmi (Philipova & Whitaker, 2005).

Tvorba dimérov ERK1 môže *in vivo* v závislosti na počte fosforylovaných ERK1 molekúl v rámci homodiméru ovplyvňovať kinázovú aktivitu ERK1. Bazálnu kinázovú aktivitu udržuje hemiaktívny dimér (monofosfodimér), v prípade výrazne zvýšenej kinázovej aktivity ERK1 je v bunke vyšší podiel bisfosfodimérov, to znamená dimérov obsahujúcich obe molekuly ERK1 vo fosforylovej forme (Philipova & Whitaker, 2005).

4.4 Lokalizácia

4.4.1 Mechanizmus translokácie do jadra

Za podmienok, kedy bunka nie je stimulovaná a MAPK/ERK kaskáda nie je aktivovaná, ERK1/2 sú lokalizované primárne v cytoplazme bunky, čomu napomáhajú proteínové kotvy. Za proteínovú kotvu sa dá považovať aj MEK, ktorá obsahuje NES (nuclear export signal) a je primárne lokalizovaná v cytoplazme (Wainstein & Seger, 2016). Po aktivácii ERK nastáva presun do jadra, a to viacerými spôsobmi. ERK pre transport do jadra nevyužíva NLS (nuclear location signal) a teda väzbu na importín α a β . Môže však byť realizovaný voľne difúziou alebo pomocou tvorby dimérov (kapitola 4.3 Dimerizácia). Difúzia je sprostredkovaná interakciami s nukleoporínnymi Nup153 a Nup214 (Matsubayashi *et al.*, 2001; Whitehurst *et al.*, 2002).

Ďalším spôsobom je transport do jadra fosforyláciou už spomínaných Ser244 a Ser246, ktoré tvoria motív Ser-Pro-Ser v KID a sú súčasťou jadrového translokačného signálu (NTS), vďaka čomu je umožnená interakcia s importínom7 (Imp7) a prechod cez jadrový pór. Interakcia ERK s Imp7 je možná len pokiaľ sú seríny v NTS fosforylované. V štúdií Plotnikov *et al.* výskumný tím preukázal významnú úlohu CK2 (casein kinase 2) v regulácii translokácie ERK do jadra fosforyláciou oboch serínových zvyškov, pričom je ale dôležitým faktorom odpojenie ERK od proteínových kotiev, ktoré držia proteínkinázy za neaktívneho stavu v cytoplazme. Fosforylovaný Ser246 umožňuje translokáciu do jadra a fosforylovaný Ser244 ju urýchľuje, ale nie je sám o sebe schopný ju sprostredkovať. Ser244 môže byť fosforylovaný nielen CK2 ale aj autofosforylovaný aktívnou proteínkinázou ERK (Plotnikov *et al.*, 2019). Akonáhle ERK vstúpi do jadra, Imp7 je za pomoci malej GTPázy Ran oddelený z komplexu ERK-Imp7 za hydrolýzy GTP a putuje do cytoplazmy spolu s Ran-GDP (Maik-Rachline *et al.*, 2019).

4.4.2 Lokalizácia do ďalších bunkových kompartmentov

V nestimulovanej bunke sa ERK proteínkinázy vyskytujú v cytoplazme. Po stimulácii bunky dochádza nielen k translokácii ERK do jadra (popísané vyššie), ale taktiež k translokácii do mitochondrií, endozómu, lyzozómu alebo dochádza k interakciám s Golgiho aparátom a štruktúrami cytoskeletu (Wainstein & Seger, 2016).

Mechanizmus, akým sa ERK translokuje do mitochondrie nie je úplne objasnený, pravdepodobne v tomto procese zohráva úlohu asociácia s mitochondriálnymi proteínmi a proteínovými adaptormi. Proteínkinázy ERK1/2 regulujú expresiu mitochondriálnych génov, mitofágiu a mitochondriálne procesy spojené s apoptózou a metabolizmom (Wainstein & Seger, 2016). ERK1/2 detekované v mitochondriách v mozgu potkana sa nachádzajú v medzimembránovom priestore a na vonkajšej mitochondriálnej membráne, pričom sa podieľajú na vývojových procesoch (Alonso *et al.*, 2004). ERK1/2 bolo tiež nájdené v mitochondriách srdcových buniek myši (Baines *et al.*, 2002) a niektorých nádorových bunkových línii (Galli *et al.*, 2008).

ERK signalizácia zohráva úlohu aj v regulácii dejov prebiehajúcich v Golgiho aparáte, konkrétne indukuje fragmentáciu tejto organely počas mitózy. V tomto prípade sa však nejedná o klasické ERK1/2 proteínkinázy. V Golgiho aparáte je lokalizovaná izoforma ERK1, ktorá vzniká alternatívnym zostrihom a bola označená ako ERK1c (Aebersold *et al.*, 2004). Translokáciu počas mitózy zabezpečuje CDK1, ktorá fosforyluje ERK1c a následne sa tvorí komplex s ďalšími dvoma proteínmi, vďaka čomu sa ERK1c dostáva do Golgiho aparátu (Wortzel *et al.*, 2015). Je však nutné podotknúť, že počas interfázy sa ERK2 podieľa na remodelácii Golgiho aparátu počas bunkovej polarizácie (Bisel *et al.*, 2008).

Aktivované ERK1/2 proteínkinázy sú lokalizované aj na miesta fokálnych adhézii, na čom sa podieľa rada ďalších proteínov. Integrínmi sprostredkovaná adhézia buniek k substrátu, napríklad k fibronektínu, vedie k aktivácii ERK signalizácie (Chen *et al.*, 1994) a samotný presun ERK1/2 na miesta novovznikajúcich fokálnych adhézii je na účasti integrínov závislý. Okrem integrínov sa na rekrutovaní ERK k fokálnym adhéziam podieľa aj proteínkináza Src, ktorej aktivácia takisto vedie k ich formovaniu (Fincham *et al.*, 2000). Súčasťou týchto dejov sú proteínové adaptory. Napríklad RACK1 je významným „scaffold“ proteínom pri adhézii aktivovanej ERK signalizácii sprostredkovanej integrínmi a FAK proteínkinázou. Pri jeho umlčaní bol pozorovaný obmedzený presun proteínkináz ERK do oblastí fokálnych adhézii (Vomastek *et al.*, 2007).

5. Rozdiely medzi izoformami ERK1 a ERK2

Prvá štúdia popisujúca izoformy ERK v bunkách cicavcov je z roku 1991 (Boulton *et al.*, 1991). ERK1 a ERK2 sú hojne rozšírené a vysoko konzervované naprieč stavovcami, i keď v niektorých prípadoch sa exprimuje buď jedna, alebo druhá izoforma. Z fylogenetických analýz vyplýva, že obe izoformy sa objavili už pred 400 miliónmi rokov a vznikli z jednej duplikačnej udalosti. Pomocou metódy Western blot bolo zistené, že ERK1 sa nevyskytuje u vtákov a niektorých obojživelníkov, ako aj u drsnokožcov. Rovnako tak sa u nich nevyskytuje ani gén *ERK1*, čo poukazuje na stratu tohto génu v evolúcii. Opačná situácia bola pozorovaná u plazov, kde niektoré druhy, napríklad hady, exprimujú ERK1 v oveľa väčšej miere než ERK2 (Buscà *et al.*, 2015).

Jednou z najdôležitejších otázok, ktoré ostávajú nevyjasnené, je funkčná podobnosť alebo odlišnosť ERK izoformiem. Pokiaľ by však obe izoformy boli funkčne zhodné, bola by na mieste otázka, prečo sa v evolúcii obe tieto izoformy zachovali.

5.1 Rozdiely na sekvenčnej úrovni

Z hľadiska evolúcie boli porovnané rozdiely medzi ERK1 a ERK2 sekvenciami na úrovni nukleových kyselín aj na úrovni aminokyselín. Dĺžkou vetiev fylogenetického stromu z hľadiska sekvencie nukleových kyselín sa izoformy príliš neodlišujú, čo sa však nedá povedať o dĺžke vetiev z hľadiska aminokyselinových reťazcov, kde je vetva proteínu ERK1 výrazne dlhšia než je tomu u ERK2. Tieto údaje naznačujú rozdiely v evolučnej rýchlosti medzi proteínmi ERK1 a ERK2, pričom samotné gény týchto proteínkináz majú evolučnú rýchlosť podobnú. ERK1 proteín má väčšiu evolučnú, a teda aj mutačnú rýchlosť (v zmysle nesynonymických mutácií), ktorá u ERK1 dosahuje hodnotu 0,083 a u ERK2 len 0,033. Pomer mutačnej rýchlosti vyvolanej synonymickými/nesynonymickými substitúciami je u ERK1 4,45-krát vyšší než u ERK2, čo len podčiarkuje veľmi nízku evolučnú rýchlosť ERK2 izoformy. Odchýlky v aminokyselinovej sekvencii ERK1 sa nachádzajú mimo katalytické jadro a väzobné miesta substrátov, z čoho by sa dalo usudzovať, že nemajú vplyv na funkciu proteínkináz (Buscà *et al.*, 2015).

Gén *ERK1* je u cicavcov priemerne 15-krát menší než gén *ERK2* (Buscà *et al.*, 2015). Na úrovni aminokyselín izoformy cicavcov zdieľajú približne 84 % (Obr. 4). Veľkosť ľudských proteínkináz je 43,1 kDa (ERK1) a 41,4 kDa (ERK2) (Roskoski, 2012). Rozdiel medzi veľkosťou ERK1 a ERK2 tvorí predĺženie o 17 aminokyselín na N-konci proteínu a 2 aminokyseliny na C-konci u ERK1 (Buscà *et al.*, 2016), ktorá obsahuje 379 aminokyselinových zvyškov, ERK2 je teda tvorená 360 aminokyselinovými zvyškami. Počet aminokyselín v reťazci proteínu sa u rôznych organizmov môže líšiť (Roskoski, 2012).



Obr. 4 – Porovnanie štruktúry ERK1 a ERK2. Modrá farba predstavuje oblasti identické pre obe izoformy, červená farba aminokyselinové zvyšky lišiace sa medzi izoformami a oranžová farba predstavuje N-koncovú inzerciu ERK1, ktorá sa u ERK2 nevyskytuje. Obrázok vytvoril Mgr. Jan Rásl z laboratória bunkovej signalizácie Mikrobiologického ústavu AV ČR, upravené.

V sekvencii ERK1 sa nachádzajú aminokyseliny, ktoré by mohli byť príčinou funkčnej špecifickosti izoformiem v súvislosti so striedavým prechodom medzi jadrom a cytoplazmou. Marchi *et al.* preukázali, že sa jedná o N-koncový úsek aminokyselín na pozícii 8-39, ktorý spôsobuje, že striedavý prechod medzi jadrom a cytoplazmou je u ERK1 výrazne pomalší než u ERK2. Keď bol tento úsek z ERK1 odstránený, rýchlosť presunu ERK1 sa vyrovnala rýchlosti ERK2. Pokiaľ bol N-koncový úsek z ERK1 fúzovaný s ERK2, spomalil sa presun ERK2 na úroveň ERK1 (Marchi *et al.*, 2008). Keďže veľká časť signalizácie je smerovaná k jadrovým substrátom, je potrebný prísun fosforylovaných proteínkináz z cytoplazmy do jadra. Význam tohto N-koncového úseku špecifického pre izoformu ERK1 by na základe výsledkov tejto štúdie mohol spočívať v orientovaní ERK1 izoformy prednostne k cytoplazmatickým substrátom, zatiaľ čo ERK2 aktivita je cielená k cytoplazmatickým aj k jadrovým substrátom (Marchi *et al.*, 2008). Žiadna ďalšia štúdia však túto hypotézu nepodporila.

Ďalší sekvenčný rozdiel medzi ERK izoformami súvisí s interakciou so substrátmi, kde v 23-aminokyselinovom úseku je len jediná aminokyselina v izoformách odlišná. Ide o konzervatívnu substitúciu, u ERK2 sa vyskytuje leucín (Leu 155) a u ERK1 izoleucín (Ile175) (Buscà *et al.*, 2015). Na väzbách s interakčnými partnermi sa podieľajú aj domény zabezpečujúce dimerizáciu ERK. Motív PE/DHD sa vyskytuje u všetkých cicavcov a substitúcia kyseliny asparágovej (Asp) (ERK2) za glutámovú (Glu) (ERK1) by mohla byť zodpovedná za rozdiely vo väzbách s interakčnými partnermi, aj keď len nepatrné. Glu má dlhší postranný reťazec než Asp a je preto objemnejší, čím je u ERK1 skomplikovaná interakcia s väzobnými partnermi. V tejto oblasti je však potrebný ďalší výskum (Buscà *et al.*, 2016).

5.2 Rozdiely v aktivácii

Obidve izoformy ERK sú aktivované rovnakými extracelulárnymi podnetmi a pre aktiváciu oboch ERK je kľúčová duálna fosforylácia na motíve TEY prostredníctvom proteínkinázy MEK. Samotný proces aktivácie je u izoformiem ERK1 a ERK2 rovnaký a výsledkom sú konformačné zmeny v aktivačnom segmente (kapitola 4.2 Mechanizmus aktivácie ERK).

Okrem vyššie spomínaných konformačných zmien je však aktivácia sprevádzaná zmenami konformačnej mobility. Skupina Ring *et al.* vo svojich experimentoch porovnávala konformačné zmeny v kľúčových oblastiach ERK1 izoformy metódou vodík-deutériovej výmeny (Ring *et al.*, 2011) so zmenami pozorovanými pomocou rovnakej metódy v štruktúre ERK2 izoformy (Lee *et al.*, 2005). Po vodíkovej výmene bol rozsah zmien medzi oboma nefosforylovanými izoformami podobný, ale v niektorých oblastiach boli pozorované odlišnosti. Konkrétne sa jedná o oblasti periférnych β 1LO a β 2LO listov a β 1 v N-terminálnom laloku, kde ERK1 vykazovala nižší rozsah vodíkovej výmeny než ERK2. V oblasti C-terminálneho laloku bol vyšší rozsah vodíkovej výmeny v okolí MAP kinázovej inzercie u ERK1, ale v oblasti β 7- β 8 slučky, α L16 helixu a v okolí aktivačného pysku bol rozsah opäť

nižší u ERK1 v porovnaní s ERK2. Tieto výsledky poukazujú na nižšiu flexibilitu v rámci domén ERK1 izoformy. Po aktivácii ERK1 duálnou fosforyláciou bola pozorovaná znížená miera vodíkovej výmeny vo viacerých oblastiach C-terminálneho laloku, pričom niektoré z nich (α L16, α F- α G a P+1) vykazovali zníženú mieru vodíkovej výmeny aj u aktivovanej ERK2 izoformy. Zaznamenané boli rozdiely medzi izoformami v oblasti MAP kinázovej inzercie a slučky bohatej na glycín. U fosforylovanej ERK2 dochádza v týchto oblastiach k zvýšenej miere vodíkovej výmeny, čo nebolo pozorované u fosforylovanej ERK1 izoformy. Dôležité je aj to, že u aktivovanej ERK1 neboli zaznamenané žiadne zmeny vo vodíkovej výmene v oblasti kľúčovej pre pohyb dvoch lalokov voči sebe, čo nie je prípad ERK2 izoformy. Táto skutočnosť poukazuje na rozdielnu reguláciu flexibility ERK1 a ERK2 izoformami po aktivácii, respektíve ERK1 na rozdiel od ERK2 nemá aktiváciou regulovaný pohyb domén voči sebe. Výsledky týchto experimentov potvrdzujú rozdielnu konformačnú mobilitu ERK izoformami po ich aktivácii duálnou fosforyláciou (Ring *et al.*, 2011).

Skupina Vantaggiato *et al.* sa vo svojej štúdií pokúsila preukázať platnosť modelu, ktorý hovorí, že v aktivovaných bunkách sa v MEK-ERK komplexe preferenčne viaže izoforma ERK2, a že obe izoformy si v bunke konkurujú pri väzbe s MEK. ERK1 a ERK2 tým pádom rozlične interagujú s ich „upstream“ aktivátorom MEK, čo vedie k rozdielnej miere bunkovej odpovede na prenášaný signál. Experimenty boli vykonávané na myších NIH 3T3 bunkách, kde bola hladina ERK1 a ERK2 umlčaná pomocou siRNA. Umlčaním jednej alebo druhej izoformy bolo zistené, že úroveň interakcií ERK2 s MEK bola v neprítomnosti ERK1 o 70 % vyššia než v kontrolných bunkách. V bunkách so zoslabenou expresiou ERK2 však nebola pozorovaná taká veľká zmena (20 %) v úrovni interakcií ERK1-MEK (Vantaggiato *et al.*, 2006).

Podľa Lefloch *et al.* však nie je aktivácia ERK prostredníctvom MEK špecializovaná podľa izoform ERK. Pokiaľ dôjde k poklesu množstva niektorej z izoform ERK, MEK aktivuje dostupné ERK proteínkinázy bez ohľadu na izoformu. Pomer aktivovaných ERK izoformami koreluje s pomerom ich vzájomnej expzie. Obe izoformy kompetujú o väzbu s MEK rovnocenne. Zároveň bolo pozorované, že v niektorých prípadoch dokáže ERK1 izoforma kompenzovať nedostatok ERK2 pri jej umlčaní a naopak (Lefloch *et al.*, 2008).

5.3 Rozdiely vo fosforylácii substrátu

Medzi substrátmi ERK neboli doposiaľ nájdené také, ktoré by sa viazali špecificky iba na jednu alebo druhú izoformu. Vyššie spomínaná substitúcia leucínu (ERK2) za izoleucín (ERK1) v úseku interagujúcom so substrátmi pravdepodobne nemá vplyv na rozdiely medzi izoformami ERK vo väzbe substrátu (Lefloch *et al.*, 2008). Z 284 proteínov, ktoré boli identifikované skupinou von Kriegsheim *et al.* ako interakční partneri ERK, sa žiadny neviazal špecificky iba na jednu z izoform ERK (von Kriegsheim *et al.*, 2009).

V niektorých štúdiách však boli prezentované prípady preferenčnej asociácie molekúl s jednou alebo druhou izoformou ERK. Jednou z týchto molekúl je adaptorový proteín MP1, u ktorého bola preukázaná preferenčná interakcia s ERK1 izoformou *in vivo*. V prítomnosti MP1 bola pozorovaná zvýšená aktivácia ERK1, ale u ERK2 k posilneniu aktivácie nedošlo (Schaeffer *et al.*, 1998). Ďalším adaptorovým proteínom vykazujúcim preferenčnú interakciu s ERK1 proteínkinázou je MORG1, ktorý v optimálnych množstvách posilňuje aktiváciu ERK1 (Vomastek *et al.*, 2004). Opačná situácia bola pozorovaná v prípade proteínkinázy RSK1, ktorá sa prednostne viaže s ERK2 izoformou. V tomto prípade sa však jedná o vtáčiu RSK1, pričom ľudská RSK1 nevykazovala prednostnú väzbu s ERK2 (Roux *et al.*, 2003).

5.4 Rozdiely v expresii ERK1 a ERK2

Úroveň expzie sa u izoforiem ERK líši, pričom expresia ERK2 značne prevyšuje expresiu ERK1 vo väčšine cicavčích tkanív. Jedným z dôvodov je väčšia sila proximálneho promotora ERK2 (Buscà *et al.*, 2015). Okrem toho by k rozdielnej miere expzie týchto dvoch izoforiem mohli prispievať aj to, že u myši obsahuje *erk1* RNA len krátku 3'-UTR oblasť (632 párov báz), ale ERK2 má túto oblasť RNA dlhšiu (3777 párov báz) a možnosť alternatívnej polyadenylácie. Na celkový dopad miery expzie jednotlivých ERK izoforiem je potrebné nahliadať v kontexte celkovej aktivity ERK v bunkách (Buscà *et al.* 2016).

Nie všetky tkanivá majú rovnaký pomer medzi expresiou ERK1 a ERK2. Pokusy s transgennou exprimáciou ERK1 na myších modeloch preukázali, že pri vyradení ERK2 je transgenna ERK1 exprimovaná vo zvýšenej miere až natoľko, že v niektorých tkanivách, napríklad srdca, prevyšuje expresiu ERK2 v štandardných bunkách (wild type). Celková úroveň ERK1/2 ostala ale v oboch prípadoch približne rovnaká, čo poukazuje na vysokú plasticitu v rámci signalizácie pri kolísaní hladín expzie (Frémin *et al.*, 2015).

Skupina Lefloch *et al.* skúmala vplyv zníženej expzie ERK izoforiem na proliferáciu a na expresiu IEGs za použitia RNA interferencie. V experimentoch s inhibítormi MEK (U0126, PD184352) na exponenciálne rastúcich NIH 3T3 bunkách bola pozorovaná znížená miera aktivácie ERK1 aj ERK2. Pomer oboch fosforylovaných izoforiem bol aj pri vyšších koncentráciách inhibítorov naklonený v prospech izoformy ERK2. So zníženou mierou aktivácie oboch ERK izoforiem sa znižovala aj rýchlosť proliferácie NIH 3T3 buniek. Umlčaním samotnej ERK1 izoformy však nedošlo k žiadnej zmene rýchlosti proliferácie. Úplne odlišná situácia nastala pri zredukovaní fosforylovanej ERK2 izoformy, kedy bola rýchlosť proliferácie výrazne znížená. Pri umlčaní oboch izoforiem zároveň sa výsledný efekt na proliferáciu nelíšil od efektu vyvolaného umlčaním samotnej ERK2 izoformy. Súčasné umlčanie oboch izoforiem ERK prinieslo aj ďalšie zaujímavé výsledky v pomere fosforylovaných izoforiem. Napriek tomu, že sa znížila expresia oboch izoforiem, miera aktivácie ERK1

a ERK2 nebola až tak výrazne oslabená. Miera fosforylácie ERK1 izoformy bola porovnateľná s kontrolnými bunkami a miera fosforylácie ERK2 bola síce znížená oproti kontrole, ale oveľa vyššia než pri umlčaní samotnej ERK2. Z toho vyplýva, že miera fosforylácie ERK2 je rozdielna v bunkách s umlčaním ERK2 a v bunkách so súčasným umlčaním ERK1 a ERK2, a že miera aktivácie izoformy ERK2 vo výsledku nemá na rýchlosť proliferácie vplyv. Tento výsledok potvrdil aj experiment, v ktorom napriek takmer rovnakej miere aktivovaného ERK2 bola rýchlosť proliferácie odlišná. Jedným zo záverov tejto práce je, že *in vitro* sa obe ERK izoformy podieľajú na celkovej sile signálu a podiel na výslednej signalizácii je úmerný úrovni expresie týchto izoform. Obe izoformy sú pozitívnymi regulátormi transkripcie IEGs a v tomto prípade ERK1 dokáže funkčne zastúpiť ERK2 (Lefloch *et al.*, 2008).

5.5 Funkčné rozdiely

Na základe rozdielnej miery expresie izoform ERK sa mnoho štúdií pokúsilo objasniť ich funkčné rozdiely. Využívané pri tom boli metódy umlčania génovej expresie pomocou morfolino metódy (modified antisense oligo-nucleotides), pomocou metódy zablokovania a zníženia expresie s využitím siRNA/shRNA (Buscà *et al.*, 2016).

Morfolino metóda bola použitá pri výskume vplyvu ERK1 a ERK2 na embryonálny vývoj modelového organizmu *Danio rerio*. Krens *et al.* skúmali, aké skupiny génov boli ovplyvnené pri znížení expresie ERK1 a ERK2 v bunkách počas embryogenézy. Expresia niektorých génov bola regulovaná oboma izoformami, avšak časť z nich mala pri zoslabenej expresii ERK1 zvýšenú reguláciu a pri zoslabenej expresii ERK2 zníženú. Analýza ale potvrdila, že ERK1 a ERK2 majú vo vývoji špecifické úlohy, pretože zoslabenie expresie jednej či druhej izoformy pôsobí aj na expresiu rozdielnych sád génov. V bunkách so zníženou expresiou ERK1 boli zasiahnuté gény podieľajúce sa na dorzo-ventrálnej diferenciacii a migrácii embryonálnych buniek. Nízka expresia ERK2 pôsobila na gény pre formovanie a diferenciaciu mezodermu a endodermu (Krens *et al.*, 2008a). V ďalšej štúdií z rovnakého laboratória boli prezentované výsledky podporujúce rozdielnu úlohu ERK1 a ERK2 počas gastrulačnej bunkovej migrácie v embryogenéze *Danio rerio*. Tieto výsledky preukázali, že poškodenia v embryách s nízkou expresiou ERK2 v procese gastrulácie boli vážnejšie než pri zníženej expresii ERK1 a vykazovali vyššiu mieru letality. Pozorované boli tiež zmeny v konvergentnej extenzii buniek, kedy znížená expresia ERK1 narušila konvergenciu buniek a znížená expresia ERK2 anteriórne-posteriórnu extenziu buniek. V bunkách so zoslabenou expresiou pomocou morfolino metódy došlo v prípade oboch ERK izoform k zmene fenotypu embrya. Pri experimente s použitím syntetickej ERK1 a ERK2 mRNA s cieľom zmierniť dopad zoslabenej expresie izoform bolo preukázané, že ERK2 mRNA dokáže zvrátiť účinok slabšej expresie ERK1, ale ERK1 mRNA nedokáže zvrátiť účinok zoslabenej expresie ERK2 (Krens *et al.*, 2008b).

Na základe pokusov so zablokovanou expresiou ERK1 a ERK2 bolo možné porovnať vplyv izoformiem na fenotyp myši. Myši so zablokovanou expresiou ERK1 boli schopné prežiť a plodiť potomkov, avšak bol preukázaný negatívny vplyv na maturáciu tymocytov (Pagès *et al.*, 1999). Neskôr však vyšla štúdia, ktorá tento výsledok nepotvrdila (Nekrasova *et al.*, 2005). Deficit ERK1 vplýval priaznivo na synaptickú plasticitu v striate a formovanie dlhodobej pamäte u myši (Mazzucchelli *et al.*, 2002). Zablokovanie ERK2 viedlo k poruchám vývoja placenty a k úmrtiu v skorej fáze embryonálneho vývoja. Hlavným dôvodom takto skorých úmrtí je nedostatočný prísun kyslíka a živín k embryu v dôsledku chybného vývoja krvného riečiska placenty. Embryá, ktoré boli zbavené ERK2 izoformy, ale zároveň mali funkčnú placentu, boli životaschopné (Hatano *et al.*, 2003).

V prípade proliferácie myších embryonálnych fibroblastov (MEF bunky) geneticky ochudobnených o ERK1 alebo ERK2 bolo pozorované, že neprítomnosť ERK1 nespôsobila zvýšenú expresiu ERK2. Po vyradení ERK1 došlo k miernej redukcii proliferácie MEF buniek, čo naznačuje, že ERK1 pozitívne reguluje proliferáciu (Voisin *et al.*, 2010). To je v kontraste so štúdiou skupiny Vantaggiato *et al.*, ktorej výsledky preukázali, že ERK1 negatívne reguluje proliferáciu a zabraňuje rastu bunkových kolónií v prítomnosti onkogénneho Ras. Neprítomnosť ERK1 viedla k zvýšenej proliferácii a bol pozorovaný nárast bunkových kolónií v prítomnosti onkogénneho Ras (Vantaggiato *et al.*, 2006). Táto štúdia nebola podporená ani v prípade výskumu skupiny Frémin *et al.*, ktorý preukázal, že myši s vysokou mierou expresie ERK1 sú schopné žiť a reprodukovať sa aj v prípade, že u nich nie je exprimovaná ERK2 (Frémin *et al.*, 2015). Oslabenie expresie jednej či druhej ERK izoformy za využitia RNAi viedlo k záveru, že obe izoformy redukujú rýchlosť proliferácie fibroblastov a vykazujú funkčnú redundanciu. Kombinované vyradenie oboch ERK izoformiem spôsobilo zablokovanie bunkového cyklu (Voisin *et al.*, 2010).

Skupina Frémin *et al.* sa zaoberala problematikou rozdielnych funkcií ERK1 a ERK2 v rámci embryonálneho vývoja myši, pričom bol kladený dôraz na príspevok jednotlivých izoformiem k celkovej miere aktivácie ERK v bunkách. V embryách s deficitom ERK2 boli pozorované početné morfológické defekty v oblastiach, v ktorých je za normálnych podmienok vysoká miera aktivity ERK1/2. ERK2 zaisťuje prevažnú časť celkovej aktivity ERK1/2 v placente a deficit tejto izoformy negatívne ovplyvňuje celkovú mieru aktivity ERK1/2. Génová dávka *ERK1/2* je výrazne znížená stratou len jednej alely *erk2* a spôsobuje poruchy vo vývoji placenty, pričom súčasné narušenie alely *erk1* tieto problémy ešte zväčšuje. Pri pozorovaní morfológických zmien na embryách sa zistilo, že embryá obsahujúce len jednu alelu *erk1* a ani jednu alelu *erk2* nedokončili svoj vývoj, zatiaľ čo embryá obsahujúce jednu alelu *erk2* a žiadnu alelu *erk1* sa síce narodili, no do pár hodín po narodení zomreli. Táto štúdia ďalej preukázala, že transgénnou zvýšenou expresiou ERK1 je schopná funkčne zastúpiť ERK2 v myších embryách, ktoré neobsahovali ani jednu alelu *erk2*. Morfológické defekty neboli pod vplyvom transgénnou exprimovanej ERK1 zaznamenané a embryá spolu s placentou mali obnovenú celkovú aktivitu ERK1/2 (Frémin *et al.*, 2015).

Frémin a jeho spolupracovníci podali presvedčivé dôkazy funkčnej redundancie izoforiem ERK1 a ERK2 a zvýraznili dôležitosť celkovej ERK1/2 aktivity v embryonálnom vývoji. Je však potrebné vziať do úvahy, že hladina ERK1 v týchto experimentoch bola mnohonásobne vyššia, než hladina ERK2 v štandardnom type myši (wild type) (Frémin *et al.*, 2015).

V oblasti patológií vyvolaných nesprávnou reguláciou dráhy MAPK/ERK sa taktiež skúmala funkcia izoforiem ERK1 a ERK2. Shin *et al.* preukázali, že pri epiteliálno-mezenchymálnej tranzícii (EMT) je nutnou podmienkou interakcia ERK2 izoformy s proteínmi obsahujúcimi DEF motív. ERK2 indukuje a špecificky reguluje EMT „downstream“ od Ras-V12 v niektorých epiteliálnych bunkách, zatiaľ čo ERK1 nemá na EMT vplyv. V procese EMT buniek bola podľa tejto štúdie preukázaná rozdielna úloha ERK izoforiem (Shin *et al.*, 2010). Ďalšie zaujímavé výsledky priniesol výskum skupiny von Thun *et al.* v oblasti invazivity nádorových bunkových línií, za ktorú je v prevažnej miere zodpovedná ERK2 izoforma. V MDA-MB-231 nádorových bunkách bola za využitia siRNA prechodne zoslabovaná expresia ERK1 a ERK2 izoformy, čím sa zistilo, že znížená expresia ERK2 výrazne spomaľuje invazívnu migráciu, ale znížená expresia ERK1 ju významne neovplyvňuje. Rozdiely v zasiahnutí invazivity oslabením jednej alebo druhej izoformy mohli byť zapríčinené rozdielnou mierou expresie ERK1 a ERK2 v MDA-MB-231 bunkách, keďže miera expresie ERK2 v týchto bunkách je vyššia než miera expresie ERK1. Táto možnosť však bola zamietnutá, pretože expresia rekombinovanej ERK1 nedokázala zvrátiť účinok zoslabenej expresie ERK2 na invazivitu, ale ektopická expresia ERK2 obnovila invazívnu migráciu buniek. Rozdielna úloha oboch ERK izoforiem sa prejavila aj na úrovni expresie génov podieľajúcich sa na invazivite. Niektoré z týchto génov vykazovali zvýšenú mieru expresie počas umlčania ERK2. Obnovenie expresie ERK2 upravilo expresiu týchto génov na pôvodnú hladinu, čo znova nebolo možné dosiahnuť pomocou ERK1 izoformy (von Thun *et al.*, 2012).

6. Záver

Táto bakalárska práca popisuje jednu z najdôležitejších dráh zabezpečujúcich signálnu transdukciu v bunkách, MAPK/ERK dráhu. Pre zaistenie procesov nevyhnutných pre život buniek je príjem a následné spracovanie extracelulárnych signálov cez túto dráhu kľúčové. Dráha MAPK/ERK je jednou z najviac študovaných MAPK dráh a poruchy regulácie vyúsťujú v široké spektrum patologických prejavov. Preto je dôležité skúmať túto signálnu dráhu nielen ako celok, ale na úrovni jednotlivých členov kaskády a ich interakčných partnerov. Hlbšie porozumenie funkciám týchto členov umožňuje vývoj prostriedkov k liečbe patológií, akými sú napríklad rôzne druhy rakovín.

ERK1 a ERK2 proteínkinázy sú efektorovými proteínkinázami MAPK/ERK kaskády a fosforylujú obrovské množstvo substrátov, čoho výsledkom je bunková odpoveď na prenášaný signál. V tejto práci boli popísané základné mechanizmy aktivácie ERK1/2 proteínkináz, ako aj ich subcelulárna lokalizácia a mechanizmus interakcie so substrátmi. Ďalej je práca zameraná na popis rozdielov medzi izoformami ERK1 a ERK2, ktoré sú si štruktúrne veľmi podobné. Mnoho autorov sa pokúšalo na základe skúmania génovej expresie a genetických analýz preukázať ich funkčnú špecifickosť. Väčšina z nich však došla k záveru, že sa tieto dve izoformy funkčne dopĺňajú a prispievajú tak k celkovej miere aktivácie ERK, ktorá je podstatou správnej funkcie buniek a tkanív. Napriek tomu však funkcia ERK izoformami zostáva všeobecne nepochopená. Dôležitú úlohu zohráva celková miera expresie ERK1 a ERK2 v rôznych typoch buniek a tkanív. Tam, kde jedna izoforma výrazne prevyšuje expresiu druhej izoformy, je po vyradení alebo oslabení expresie prevažujúcej izoformy výsledný dopad na fenotyp vážnejší. Preto je nutné pri experimentoch hladiny expresie oboch izoformami vyrovnať a následne skúmať ich dopad na fenotyp. Pomer aktivovaných izoformami ERK je do značnej miery ovplyvnený úrovňou ich expresie. Štúdie v prospech funkčnej redundancie dokázali na základe obnovenia expresie oslabených ERK1 alebo ERK2 preukázať, že sa môžu v konkrétnych prípadoch navzájom zastupovať. V prospech funkčnej špecifickosti naopak hovoria štúdie, ktoré zasadili úlohu ERK izoformami do kontextu zložitých dejov, napríklad embryonálneho vývoja či invazivity nádorových buniek. Aj v tomto prípade je však potrebné zohľadniť celkovú mieru aktivácie ERK a typ buniek.

Táto práca súhrnne popisuje výsledky štúdií, ktoré sa snažili preukázať ako funkčnú redundanciu, tak aj špecifickosť izoformami ERK1 a ERK2. Stále však v tejto oblasti ostáva mnoho nejasností, pre ktorých vysvetlenie je potrebný ďalší výskum.

7. Použitá literatura

- Adachi, M., Fukuda, M., & Nishida, E. (1999).** Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *The EMBO Journal*, *18*(19), 5347–5358. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5347>
- Aebbersold, D. M., Shaul, Y. D., Yung, Y., Yarom, N., Yao, Z., Hanoch, T., & Seger, R. (2004).** Extracellular Signal-Regulated Kinase 1c (ERK1c), a Novel 42-Kilodalton ERK, Demonstrates Unique Modes of Regulation, Localization, and Function. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(22), 10000–10015. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.22.10000-10015.2004>
- Alonso, M., Melani, M., Converso, D., Jaitovich, A., Paz, C., Carreras, M. C., Medina, J. H., & Poderoso, J. J. (2004).** Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *Journal of Neurochemistry*, *89*(1), 248–256. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02323.x>
- Arai, A., Jin, A., Yan, W., Mizuchi, D., Yamamoto, K., Nanki, T., & Miura, O. (2005).** SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cellular Signalling*, *17*(4), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.09.007>
- Astuti, P., Pike, T., Widberg, C., Payne, E., Harding, A., Hancock, J., & Gabrielli, B. (2009).** MAPK Pathway Activation Delays G2/M Progression by Destabilizing Cdc25B. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(49), 33781–33788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027516>
- Baines, C. P., Zhang, J., Wang, G.-W., Zheng, Y.-T., Xiu, J. X., Cardwell, E. M., Bolli, R., & Ping, P. (2002).** Mitochondrial PKC ϵ and MAPK Form Signaling Modules in the Murine Heart. *Circulation Research*, *90*(4), 390–397. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000012702.90501.8D>
- Barsyte-Lovejoy, D., Galanis, A., & Sharrocks, A. D. (2002).** Specificity Determinants in MAPK Signaling to Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(12), 9896–9903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108145200>
- Bisel, B., Wang, Y., Wei, J.-H., Xiang, Y., Tang, D., Miron-Mendoza, M., Yoshimura, S., Nakamura, N., & Seemann, J. (2008).** ERK regulates Golgi and centrosome orientation towards the leading edge through GRASP65. *Journal of Cell Biology*, *182*(5), 837–843. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805045>
- Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., & Yancopoulos, G. D. (1991).** ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, *65*(4), 663–675. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90098-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90098-J)
- Brown, L., & Benchimol, S. (2006).** The Involvement of MAPK Signaling Pathways in Determining the Cellular Response to p53 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 3832–3840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507951200>
- Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009).** Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling*, *21*(4), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.11.013> *
- Burack, W. R., & Shaw, A. S. (2005).** Live Cell Imaging of ERK and MEK. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(5), 3832–3837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410031200>
- Buscà, R., Christen, R., Lovorn, M., Clifford, A. M., Yue, J.-X., Goss, G. G., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2015).** ERK1 and ERK2 present functional redundancy in tetrapods despite higher evolution rate of ERK1. *BMC Evolutionary Biology*, *15*(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0450-x>

- Buscà, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2016).** ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 53. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053> *
- Cacace, A. M., Michaud, N. R., Therrien, M., Mathes, K., Copeland, T., Rubin, G. M., & Morrison, D. K. (1999).** Identification of Constitutive and Ras-Inducible Phosphorylation Sites of KSR: Implications for 14-3-3 Binding, Mitogen-Activated Protein Kinase Binding, and KSR Overexpression. *Molecular and Cellular Biology*, 19(1), 229–240. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.229>
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., & Arkinstall, S. (1998).** Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science*, 280(5367), 1262–1265. <https://doi.org/10.1126/science.280.5367.1262>
- Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H., & Goldsmith, E. J. (1997).** Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell*, 90(5), 859–869. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80351-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80351-7)
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011).** Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10> *
- Casar, B., Pinto, A., & Crespo, P. (2008).** Essential Role of ERK Dimers in the Activation of Cytoplasmic but Not Nuclear Substrates by ERK-Scaffold Complexes. *Molecular Cell*, 31(5), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.024>
- Chambard, J.-C., Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2007).** ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1299–1310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.010> *
- Chen, Q., Kinch, M. S., Lin, T. H., Burridge, K., & Juliano, R. L. (1994).** Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26602–26605. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47058-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47058-5)
- Ciampi, R., Knauf, J. A., Kerler, R., Gandhi, M., Zhu, Z., Nikiforova, M. N., Rabes, H. M., Fagin, J. A., & Nikiforov, Y. E. (2005).** Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 94–101. <https://doi.org/10.1172/JCI200523237>
- Corbalan-Garcia, S., Yang, S. S., Degenhardt, K. R., & Bar-Sagi, D. (1996).** Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5674–5682. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5674>
- Courcelles, M., Frémin, C., Voisin, L., Lemieux, S., Meloche, S., & Thibault, P. (2013).** Phosphoproteome dynamics reveal novel ERK1/2 MAP kinase substrates with broad spectrum of functions. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 669. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.25>
- Dang, A., Frost, J. A., & Cobb, M. H. (1998).** The MEK1 proline-rich insert is required for efficient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 and ERK2 in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19909–19913. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19909>
- Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020).** Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9(1), 198. <https://doi.org/10.3390/cells9010198> *
- Desideri, E., Cavallo, A. L., & Baccarini, M. (2015).** Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. *Cell*, 161(5), 967–970. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.045> *

- Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H., & Reddy, E. P. (2007).** Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, *26*(22), 3185–3202. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210411> *
- Dougherty, M. K., Müller, J., Ritt, D. A., Zhou, M., Zhou, X. Z., Copeland, T. D., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Lu, K. P., & Morrison, D. K. (2005).** Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation. *Molecular Cell*, *17*(2), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.055>
- Douville, E., & Downward, J. (1997).** EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene*, *15*(4), 373–383. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201214>
- Eblen, S. T., Catling, A. D., Assanah, M. C., & Weber, M. J. (2001).** Biochemical and Biological Functions of the N-Terminal, Noncatalytic Domain of Extracellular Signal-Regulated Kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(1), 249–259. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.249-259.2001>
- Eblen, S. T., Slack, J. K., Weber, M. J., & Catling, A. D. (2002).** Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(17), 6023–6033. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.17.6023-6033.2002>
- Eblen, S. T., Slack-Davis, J. K., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., Weber, M. J., & Catling, A. D. (2004).** Mitogen-Activated Protein Kinase Feedback Phosphorylation Regulates MEK1 Complex Formation and Activation during Cellular Adhesion. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(6), 2308–2317. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.6.2308-2317.2004>
- Eblen, S. T. (2018).** Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. In *Advances in Cancer Research*, *138*, 99–142. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.004> *
- Edkins, S., O’Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalglish, G., Forbes, S., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Goldstraw, P., Nicholson, A., Tsun, L. C., Velculescu, V. E., Siu, T. Y., Suet, Y. L., ... Futreal, P. A. (2006).** Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy*, *5*(8), 928–932. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.8.3251>
- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C., & Marais, R. (2005).** Mutations of C-RAF Are Rare in Human Cancer because C-RAF Has a Low Basal Kinase Activity Compared with B-RAF. *Cancer Research*, *65*(21), 9719–9726. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1683>
- Estep, A. L., Palmer, C., McCormick, F., & Rauen, K. A. (2007).** Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer cell lines: Implications for therapy. *PLoS ONE*, *2*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001279>
- Fincham, V. J., James, M., Frame, M. C., & Winder, S. J. (2000).** Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *The EMBO Journal*, *19*(12), 2911–2923. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2911>
- Frémin, C., Saba-EI-Leil, M. K., Lévesque, K., Ang, S.-L., & Meloche, S. (2015).** Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Reports*, *12*(6), 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.011>
- Frost, J A, Xu, S., Hutchison, M. R., Marcus, S., & Cobb, M. H. (1996).** Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(7), 3707–3713. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3707>
- Frost, Jeffrey A., Steen, H., Shapiro, P., Lewis, T., Ahn, N., Shaw, P. E., & Cobb, M. H. (1997).** Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO Journal*, *16*(21), 6426–6438. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6426>

- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y., & Nishida, E. (1996).** Cytoplasmic Localization of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Directed by Its NH₂-terminal, Leucine-rich Short Amino Acid Sequence, Which Acts as a Nuclear Export Signal. *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), 20024–20028. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.20024>
- Fukuda, M., Gotoh, Y., & Nishida, E. (1997).** Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal*, 16(8), 1901–1908. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1901>
- Galli, S., Antico Arciuch, V. G., Poderoso, C., Converso, D. P., Zhou, Q., de Kier Joffé, E. B., Cadenas, E., Boczkowski, J., Carreras, M. C., & Poderoso, J. J. (2008).** Tumor Cell Phenotype Is Sustained by Selective MAPK Oxidation in Mitochondria. *PLoS ONE*, 3(6), e2379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002379>
- Gao, Y., Maria, A., Na, N., da Cruz Paula, A., Gorelick, A. N., Hechtman, J. F., Carson, J., Lefkowitz, R. A., Weigelt, B., Taylor, B. S., Zhao, H., Reis-Filho, J. S., de Stanchina, E., Rosen, N., Yao, Z., & Yaeger, R. (2019).** V211D Mutation in MEK1 Causes Resistance to MEK Inhibitors in Colon Cancer. *Cancer Discovery*, 9(9), 1182–1191. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0356>
- Govender, D., & Chetty, R. (2012).** Gene of the month: BRAF. *Journal of Clinical Pathology*, 65(11), 986–988. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-200960> *
- Graves, L. M., Guy, H. I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., Collins, M. A., Dahlstrand, E. N., Earp, H. S., & Evans, D. R. (2000).** Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature*, 403(6767), 328–332. <https://doi.org/10.1038/35002111>
- Hagemann, C., & Rapp, U. R. (1999).** Isotype-Specific Functions of Raf Kinases. *Experimental Cell Research*, 253(1), 34–46. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4689> *
- Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., & Ogata, M. (2003).** Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to Cells*, 8(11), 847–856. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00680.x>
- Henriksen, L., Grandal, M. V., Knudsen, S. L. J., van Deurs, B., & Grøvdal, L. M. (2013).** Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PLoS One*, 8(3), e58148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058148>
- Hu, J., Stites, E. C., Yu, H., Germino, E. A., Meharena, H. S., Stork, P. J. S., Kornev, A. P., Taylor, S. S., & Shaw, A. S. (2013).** Allosteric Activation of Functionally Asymmetric RAF Kinase Dimers. *Cell*, 154(5), 1036–1046. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.046>
- Hunger-Glaser, I., Salazar, E. P., Sinnott-Smith, J., & Rozengurt, E. (2003).** Bombesin, Lysophosphatidic Acid, and Epidermal Growth Factor Rapidly Stimulate Focal Adhesion Kinase Phosphorylation at Ser-910. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22631–22643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210876200>
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.-X., & Cantley, L. G. (2004).** Paxillin Serves as an ERK-Regulated Scaffold for Coordinating FAK and Rac Activation in Epithelial Morphogenesis. *Molecular Cell*, 16(2), 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.006>
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A. J., & Kornfeld, K. (1999).** Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development*, 13(2), 163–175. <https://doi.org/10.1101/gad.13.2.163>
- Jelinek, T., Catling, A. D., Reuter, C. W., Moodie, S. A., Wolfman, A., & Weber, M. J. (1994).** RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 8212–8218. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.12.8212>

- Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002).** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682> *
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., & Cobb, M. H. (1998).** Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerization and Nuclear Translocation. *Cell*, 93(4), 605–615. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81189-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81189-7)
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., Lanerolle, P. de, & Cheresh, D. A. (1997).** Regulation of Cell Motility by Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Cell Biology*, 137(2), 481–492. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.2.481>
- Krens, S. G., Corredor-Adámez, M., He, S., Snaar-Jagalska, B. E., & Spaink, H. P. (2008)a.** ERK1 and ERK2 MAPK are key regulators of distinct gene sets in zebrafish embryogenesis. *BMC Genomics*, 9(1), 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-196>
- Krens, S. F. G., He, S., Lamers, G. E. M., Meijer, A. H., Bakkers, J., Schmidt, T., Spaink, H. P., & Snaar-Jagalska, B. E. (2008)b.** Distinct functions for ERK1 and ERK2 in cell migration processes during zebrafish gastrulation. *Developmental Biology*, 319(2), 370–383. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.032>
- Lee, T., Hoofnagle, A. N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E. J., Chen, L., Resing, K. A., & Ahn, N. G. (2004).** Docking Motif Interactions in MAP Kinases Revealed by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Molecular Cell*, 14(1), 43–55. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00161-3)
- Lee, T., Hoofnagle, A. N., Resing, K. A., & Ahn, N. G. (2005).** Hydrogen Exchange Solvent Protection by an ATP Analogue Reveals Conformational Changes in ERK2 upon Activation. *Journal of Molecular Biology*, 353(3), 600–612. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.029>
- Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (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(1), 511–527. <https://doi.org/10.1128/MCB.00800-07>
- Li, M., Liu, J., & Zhang, C. (2011).** Evolutionary History of the Vertebrate Mitogen Activated Protein Kinases Family. *PLoS ONE*, 6(10), e26999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026999>
- Mace, P. D., Wallez, Y., Egger, M. F., Dobaczewska, M. K., Robinson, H., Pasquale, E. B., & Riedl, S. J. (2013).** Structure of ERK2 bound to PEA-15 reveals a mechanism for rapid release of activated MAPK. *Nature Communications*, 4(1), 1681. <https://doi.org/10.1038/ncomms2687>
- Maik-Rachline, G., Hacoheh-Lev-Ran, A., & Seger, R. (2019).** Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1194. <https://doi.org/10.3390/ijms20051194> *
- Mansour, S., Matten, W., Hermann, A., Candia, J., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G., & Ahn, N. (1994).** Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, 265(5174), 966–970. <https://doi.org/10.1126/science.8052857>
- Marchi, M., D'Antoni, A., Formentini, I., Parra, R., Brambilla, R., Ratto, G. M., & Costa, M. (2008).** The N-Terminal Domain of ERK1 Accounts for the Functional Differences with ERK2. *PLoS ONE*, 3(12), e3873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003873>
- Martinez-Quiles, N., Ho, H.-Y. H., Kirschner, M. W., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2004).** Erk/Src Phosphorylation of Cortactin Acts as a Switch On-Switch Off Mechanism That Controls Its Ability To Activate N-WASP. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5269–5280. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5269-5280.2004>

- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., & Marais, R. (1999).** Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO Journal*, 18(8), 2137–2148. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2137>
- Matsubayashi, Y., Fukuda, M., & Nishida, E. (2001).** Evidence for Existence of a Nuclear Pore Complex-mediated, Cytosol-independent Pathway of Nuclear Translocation of ERK MAP Kinase in Permeabilized Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41755–41760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106012200>
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., Welzl, H., Wolfer, D. P., Pagès, G., Valverde, O., Marowsky, A., Porrazzo, A., Orban, P. C., Maldonado, R., Ehrengruber, M. U., Cestari, V., Lipp, H.-P., Chapman, P. F., Pouyssegur, J., & Brambilla, R. (2002).** Knockout of ERK1 MAP Kinase Enhances Synaptic Plasticity in the Striatum and Facilitates Striatum-Mediated Learning and Memory. *Neuron*, 34(5), 807–820. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00716-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00716-X)
- Mendoza, M. C., Er, E. E., Zhang, W., Ballif, B. A., Elliott, H. L., Danuser, G., & Blenis, J. (2011).** ERK-MAPK Drives Lamellipodia Protrusion by Activating the WAVE2 Regulatory Complex. *Molecular Cell*, 41(6), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.031>
- Michaud, N. R., Therrien, M., Cacace, A., Edsall, L. C., Spiegel, S., Rubin, G. M., & Morrison, D. K. (1997).** KSR stimulates Raf-1 activity in a kinase-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(24), 12792–12796. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12792>
- Mineo, C., Anderson, R. W., & White, M. A. (1997).** Physical Association with Ras Enhances Activation of Membrane-bound Raf (RafCAAX). *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10345–10348. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10345>
- Modi, P. K., Komaravelli, N., Singh, N., & Sharma, P. (2012).** Interplay between MEK-ERK signaling, cyclin D1, and cyclin-dependent kinase 5 regulates cell cycle reentry and apoptosis of neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 23(18), 3722–3730. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-02-0125>
- Morrison, D. K. (2001).** KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science*, 114(Pt 9), 1609–1612. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.9.1609>
- Nan, X., Tamgüney, T. M., Collisson, E. A., Lin, L.-J., Pitt, C., Galeas, J., Lewis, S., Gray, J. W., McCormick, F., & Chu, S. (2015).** Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(26), 7996–8001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509123112>
- Nekrasova, T., Shive, C., Gao, Y., Kawamura, K., Guardia, R., Landreth, G., & Forsthuber, T. G. (2005).** ERK1-Deficient Mice Show Normal T Cell Effector Function and Are Highly Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 175(4), 2374–2380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2374>
- Olea-Flores, M., Zuñiga-Eulogio, M. D., Mendoza-Catalán, M. A., Rodríguez-Ruiz, H. A., Castañeda-Saucedo, E., Ortuño-Pineda, C., Padilla-Benavides, T., & Navarro-Tito, N. (2019).** Extracellular-signal regulated kinase: A central molecule driving epithelial–mesenchymal transition in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2885. <https://doi.org/10.3390/ijms20122885> *
- Owens, D. M., & Keyse, S. M. (2007).** Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22), 3203–3213. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210412> *

- Pagès, G., Guérin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P., & Pouyssegur, J. (1999).** Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, 286(5443), 1374–1377. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1374>
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001).** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428> *
- Philipova, R., & Whitaker, M. (2005).** Active ERK1 is dimerized in vivo: bisphosphodimers generate peak kinase activity and monophosphodimers maintain basal ERK1 activity. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5767–5776. <https://doi.org/10.1242/jcs.02683>
- Piserchio, A., Warthaka, M., Kaoud, T. S., Callaway, K., Dalby, K. N., & Ghose, R. (2017).** Local destabilization, rigid body, and fuzzy docking facilitate the phosphorylation of the transcription factor Ets-1 by the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114(31), E6287–E6296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702973114>
- Plotnikov, A., Chuderland, D., Karaman, Y., Livnah, O., & Seger, R. (2019).** Nuclear ERK translocation is mediated by protein kinase CK2 and accelerated by autophosphorylation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 53(2), 366–387. <https://doi.org/10.33594/000000144>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007).** Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100–3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392> *
- Ramos, J. W. (2008).** The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(12), 2707–2719. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.04.009> *
- Ring, A. Y., Sours, K. M., Lee, T., & Ahn, N. G. (2011).** Distinct patterns of activation-dependent changes in conformational mobility between ERK1 and ERK2. *International Journal of Mass Spectrometry*, 302(1–3), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.08.020>
- Roskoski, R. (2012).** ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005> *
- Roux, P. P., Richards, S. A., & Blenis, J. (2003).** Phosphorylation of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase Docking and RSK Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 4796–4804. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.14.4796-4804.2003>
- Saba-El-Leil, M. K., Frémin, C., & Meloche, S. (2016).** Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 67. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00067> *
- Santarpia, L., Lippman, S. M., & El-Naggar, A. K. (2012).** Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(1), 103–119. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805> *
- Schaeffer, H. J., Catling, A. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., & Weber, M. J. (1998).** MP1: A MEK Binding Partner That Enhances Enzymatic Activation of the MAP Kinase Cascade. *Science*, 281(5383), 1668–1671. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1668>
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., & Geer, P. van der. (1994).** Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372(6508), 786–791. <https://doi.org/10.1038/372786a0>
- Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007).** The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005> *

- Shin, S., Dimitri, C. A., Yoon, S. O., Dowdle, W., & Blenis, J. (2010).** ERK2 but Not ERK1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transformation via DEF Motif-Dependent Signaling Events. *Molecular Cell*, 38(1), 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.020>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017).** RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009> *
- Skolnik, E., Batzer, A., Li, N., Lee, C., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., & Schlessinger, J. (1993).** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*, 260(5116), 1953–1955. <https://doi.org/10.1126/science.8316835>
- Stokoe, D., Macdonald, S., Cadwallader, K., Symons, M., & Hancock, J. (1994).** Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264(5164), 1463–1467. <https://doi.org/10.1126/science.7811320>
- Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., & Zhou, H. F. (2015).** Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. In *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 600–604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412> *
- Tanimura, S., & Takeda, K. (2017).** ERK signalling as a regulator of cell motility. *The Journal of Biochemistry*, 162(3), 145–154. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx048> *
- Tanoue, T., Maeda R., Adachi M., & Nishida E. (2001).** Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *The EMBO Journal*, 20(3), 466–479. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.466>
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., & Nishida, E. (2000).** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology*, 2(2), 110–116. <https://doi.org/10.1038/35000065>
- Teis, D., Wunderlich, W., & Huber, L. A. (2002).** Localization of the MP1-MAPK Scaffold Complex to Endosomes Is Mediated by p14 and Required for Signal Transduction. *Developmental Cell*, 3(6), 803–814. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00364-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00364-7)
- Therrien, M., Chang, H. C., Solomon, N. M., Karim, F. D., Wassarman, D. A., & Rubin, G. M. (1995).** KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*, 83(6), 879–888. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90204-x)
- Tomasovic, A., Brand, T., Schanbacher, C., Kramer, S., Hümmert, M. W., Godoy, P., Schmidt-Heck, W., Nordbeck, P., Ludwig, J., Homann, S., Wiegner, A., Shaykhutdinov, T., Kratz, C., Knüchel, R., Müller-Hermelink, H.-K., Rosenwald, A., Frey, N., Eichler, J., Dobrev, D., Lorenz, K. *et al.* (2020).** Interference with ERK-dimerization at the nucleocytoplasmic interface targets pathological ERK1/2 signaling without cardiotoxic side-effects. *Nature Communications*, 11(1), 1733. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15505-4>
- Tran, N. H., & Frost, J. A. (2003).** Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated Kinase 1 and Src Regulates Raf-1 Autoinhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11221–11226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210318200>
- Ussar, S., & Voss, T. (2004).** MEK1 and MEK2, Different Regulators of the G1/S Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43861–43869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406240200>
- Vantaggiato, C., Formentini, I., Bondanza, A., Bonini, C., Naldini, L., & Brambilla, R. (2006).** ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *Journal of Biology*, 5(5), 14. <https://doi.org/10.1186/jbiol38>

- Vieira, A. V., Lamaze, C., & Schmid, S. L. (1996).** Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 274(5295), 2086–2089. <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2086>
- Villanueva, J., Infante, J. R., Krepler, C., Reyes-Uribe, P., Samanta, M., Chen, H.-Y., Li, B., Swoboda, R. K., Wilson, M., Vultur, A., Fukunaba-Kalabis, M., Wubbenhorst, B., Chen, T. Y., Liu, Q., Sproesser, K., DeMarini, D. J., Gilmer, T. M., Martin, A.-M., Marmorstein, R., Nathanson, K. L. *et al.* (2013).** Concurrent MEK2 Mutation and BRAF Amplification Confer Resistance to BRAF and MEK Inhibitors in Melanoma. *Cell Reports*, 4(6), 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.023>
- Voisin, L., Saba-El-Leil, M. K., Julien, C., Frémin, C., & Meloche, S. (2010).** Genetic Demonstration of a Redundant Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinases in Promoting Fibroblast Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(12), 2918–2932. <https://doi.org/10.1128/MCB.00131-10>
- Vomastek, T., Schaeffer, H.-J., Tarcsafalvi, A., Smolkin, M. E., Bissonette, E. A., & Weber, M. J. (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 USA*, 101(18), 6981–6986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305894101>
- Vomastek, T., Iwanicki, M. P., Schaeffer, H. J., Tarcsafalvi, A., Parsons, J. T., & Weber, M. J. (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(23), 8296–8305. <https://doi.org/10.1128/MCB.00598-07>
- von Kriegsheim, A., Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., Yamada, K., Lamond, A., Kalna, G., Orton, R., Gilbert, D., & Kolch, W. (2009).** Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1458–1464. <https://doi.org/10.1038/ncb1994>
- von Thun, A., Birtwistle, M., Kalna, G., Grindlay, J., Strachan, D., Kolch, W., von Kriegsheim, A., & Norman, J. C. (2012).** ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin-β2. *Journal of Cell Science*, 125(6), 1465–1477. <https://doi.org/10.1242/jcs.092916>
- Wainstein, E., & Seger, R. (2016).** The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles. *Current Opinion in Cell Biology*, 39, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.007> *
- Weber, C. K., Slupsky, J. R., Kalmes, H. A., & Rapp, U. R. (2001).** Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf. *Cancer Research*, 61(9), 3595–3598. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325826>
- Whitehurst, A. W., Wilsbacher, J. L., You, Y., Luby-Phelps, K., Moore, M. S., & Cobb, M. H. (2002).** ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7496–7501. <https://doi.org/10.1073/pnas.112495999>
- Wortzel, I., Hanoch, T., Porat, Z., Hausser, A., & Seger, R. (2015).** Mitotic Golgi translocation of ERK1c is mediated by a PI4KIIIβ–14-3-3γ shuttling complex. *Journal of Cell Science*, 128(22), 4083–4095. <https://doi.org/10.1242/jcs.170910>
- Wortzel, I., & Seger, R. (2011).** The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, 2(3), 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328> *

- Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R. G., Lottspeich, F., & Huber, L. A. (2001).** A Novel 14-Kilodalton Protein Interacts with the Mitogen-Activated Protein Kinase Scaffold Mp1 on a Late Endosomal/Lysosomal Compartment. *Journal of Cell Biology*, 152(4), 765–776. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.765>
- Xu, B., Stippec, S., Robinson, F. L., & Cobb, M. H. (2001).** Hydrophobic as Well as Charged Residues in Both MEK1 and ERK2 Are Important for Their Proper Docking. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 26509–26515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102769200>
- Yue, J., & López, J. M. (2020).** Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2346. <https://doi.org/10.3390/ijms21072346> *
- Zaballos, M. A., Acuña-Ruiz, A., Morante, M., Crespo, P., & Santisteban, P. (2019).** Regulators of the RAS-ERK pathway as therapeutic targets in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 26(6), R319–R344. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0098> *
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., & Seger, R. (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(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.008>*
- Zheng, C. F., & Guan, K. L. (1993).** Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 23933–23939. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80474-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80474-8)

* Review