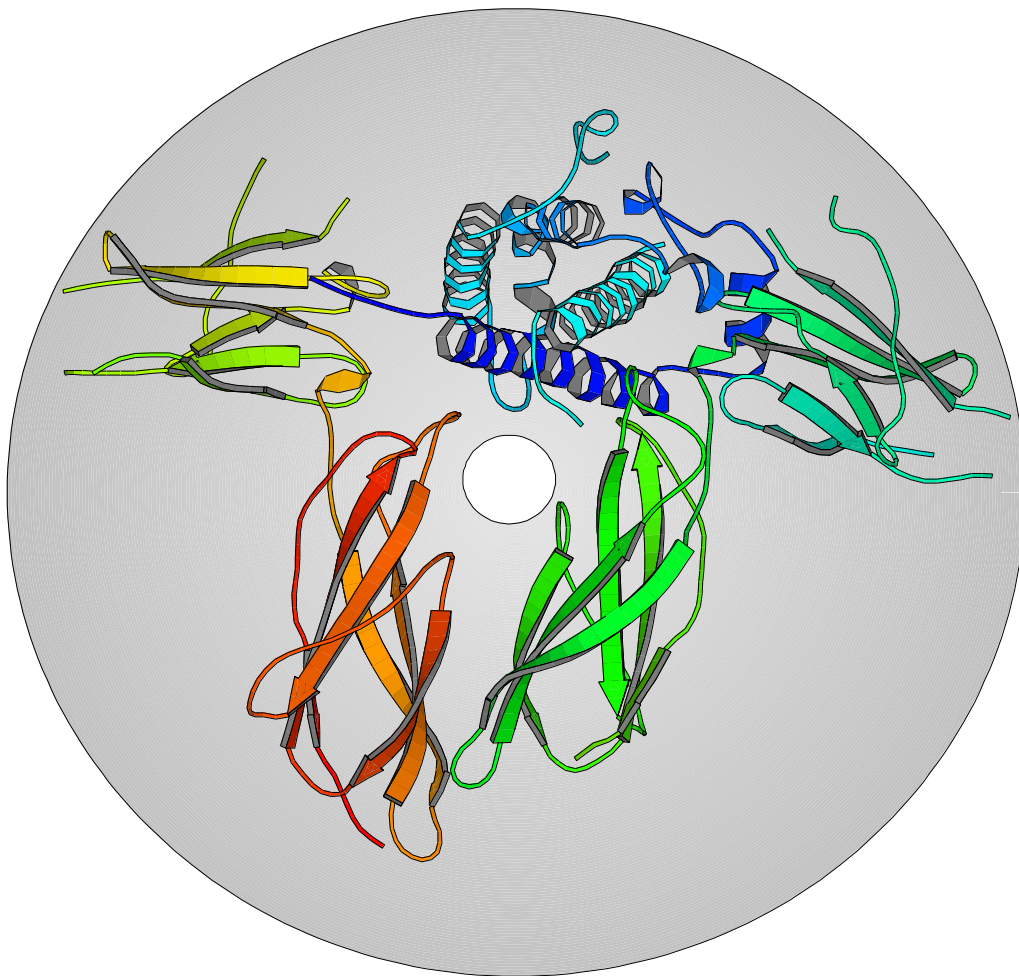


# MECHANISMEN VAN CEL - CEL COMMUNICATIE

Prof. Dr. Jan Tavernier

Prof. Dr. Sarah Gerlo



Communicatie tussen cellen is een fundamentele eigenschap van alle organismen, die bepalend is voor hun ontwikkeling en functie. Systemen die communicatie tussen cellen toelaten zijn evolutief zeer oud en komen zelfs voor bij eenvoudige eencellige organismen. Een mooi voorbeeld zijn gisten (vb. *Saccharomyces cerevisiae*) waar sexuele interactie voorafgegaan wordt door herkenning van zogenaamde *feromonen* (*Mating Factors*). In multicellulaire organismen functioneren de cellen niet autonoom, maar op gecoördineerde wijze. De ontwikkeling en werking van deze cellen wordt daarbij perfect op elkaar afgestemd: de juiste cel dient de juiste activiteit uit te voeren op het juiste moment. Dit geldt zowel tijdens de ontwikkeling van het organisme, waarbij cellen bijvoorbeeld signalen ontvangen om een welbepaald deel te vormen van een orgaan, of in een adult organisme om bijvoorbeeld een juiste metabole balans in stand te houden of om op gepaste wijze te reageren op pathogenen.

Een cruciale rol bij communicatie tussen cellen wordt gespeeld door *liganden* (hormonen, interferonen, cytokines, neurotransmitters...) en hun *receptoren*. Vergelijkbare receptorsystemen zijn eveneens betrokken bij detectie van licht, geur of smaak. Ligand-receptor interacties leiden in de doelwitcel tot activering van *signaaltransductoren* met zowel cytosolische als nucleaire effecten als gevolg. Gezien de complexiteit van de communicatiepatronen tussen de verschillende celtypen is het niet verrassend dat in de loop van de evolutie een sterke toename van ligand/receptor systemen en van signaaltransductiemechanismen is gebeurd. Desalniettemin zijn vele van de basiscomponenten van de simpele signaaloverdracht bij eencelligen geconserveerd in complexere organismen.

De essentiële functies die cellen kunnen uitvoeren zijn groei, proliferatie, differentiatie, apoptose of behoud van een gecontroleerde rusttoestand. Foute regulatie hiervan ligt aan de basis van veel gezondheidsproblemen: tumorvorming, fibrose, reumatoïde artritis en de ziekte van Alzheimer zijn maar enkele voorbeelden.

In dit deel van de cursus belichten we deze signaalmechanismen eerst in algemene zin, daarna aan de hand van specifieke, prototype ligand/receptor systemen. Er wordt ook aandacht geschonken aan experimentele methoden om signaaloverdracht te bestuderen.

De figuur op de vorige pagina toont groeihormoon, volledig opgebouwd uit  $\alpha$ -helices, in complex met zijn homodimere receptor, die uitsluitend  $\beta$ -sheet structuren bevat.

## Table of Contents

MECHANISMEN VAN CEL - CEL COMMUNICATIE .....	1-1
1 ALGEMEEN OVERZICHT VAN SIGNAALOVERDRACHT .....	1-4
1.1 Types van cel-cel communicatie .....	1-4
1.2 Endocrien/Paracrien/Synaptisch/Autocrien/Direct .....	1-7
1.3 Bindings- en effector-specificiteit.....	1-8
1.4 Algemene eigenschappen van ligand/receptor systemen .....	1-10
1.5 Algemene eigenschappen van signaaltransductoren .....	1-19
1.6 Regulatiemechanismen .....	1-23
2 BESPREKING VAN SIGNAALSYSTEMEN .....	2-24
2.1 Directe werking van NO.....	2-24
2.2 Nucleaire receptoren.....	2-26
2.3 G-eiwit gekoppelde receptoren.....	2-29
2.4 Receptoren met enzymatische werking .....	2-47
2.5 Cytokinereceptoren en signaaltransductie via STAT factoren. ....	2-63
2.6 Inhibitie van signalering via RTKs en cytokinereceptoren .....	2-66
2.7 Toll-like receptoren.....	2-68
2.8 De rol van ubiquitine in signaaltransductie.....	2-72
3 Experimentele methoden voor studie van signaaltransductieprocessen .....	3-75
3.1 Detectie van eiwit-eiwit interacties .....	3-75
3.2 Clonering van receptor genen. ....	3-79
3.3 Meten van kinase activiteit .....	3-81
3.4 Meten van GTPase activiteit door middel van "pull-down assays".....	3-83
3.5 Studie van subcellulaire localisatie van eiwitten.....	3-85

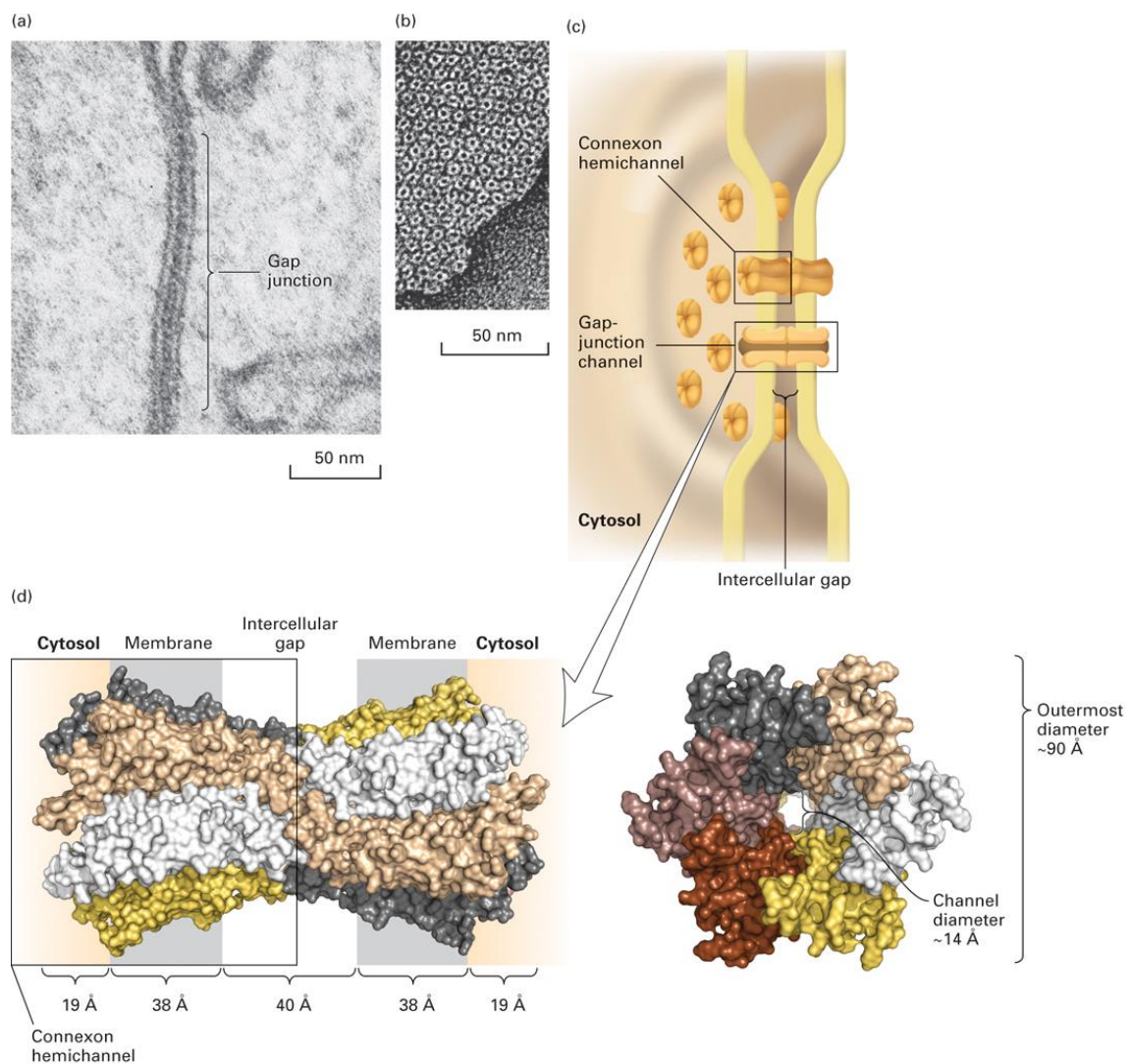
# 1 ALGEMEEN OVERZICHT VAN SIGNAALOVERDRACHT

## 1.1 Types van cel-cel communicatie

Bij dierlijke cellen komen essentieel twee types van communicatie voor:

### 1.1.1 Via gespecialiseerde, directe verbindingen tussen cellen

Electronen-microscopische opnamen toonden aan dat op welbepaalde plaatsen, membranen van twee aaneenpalende cellen zich op een vaste afstand van elkaar bevonden: een welbepaalde "gap". Ter hoogte van een dergelijke zone komen relatief homogene aggregaten van eiwitten voor.



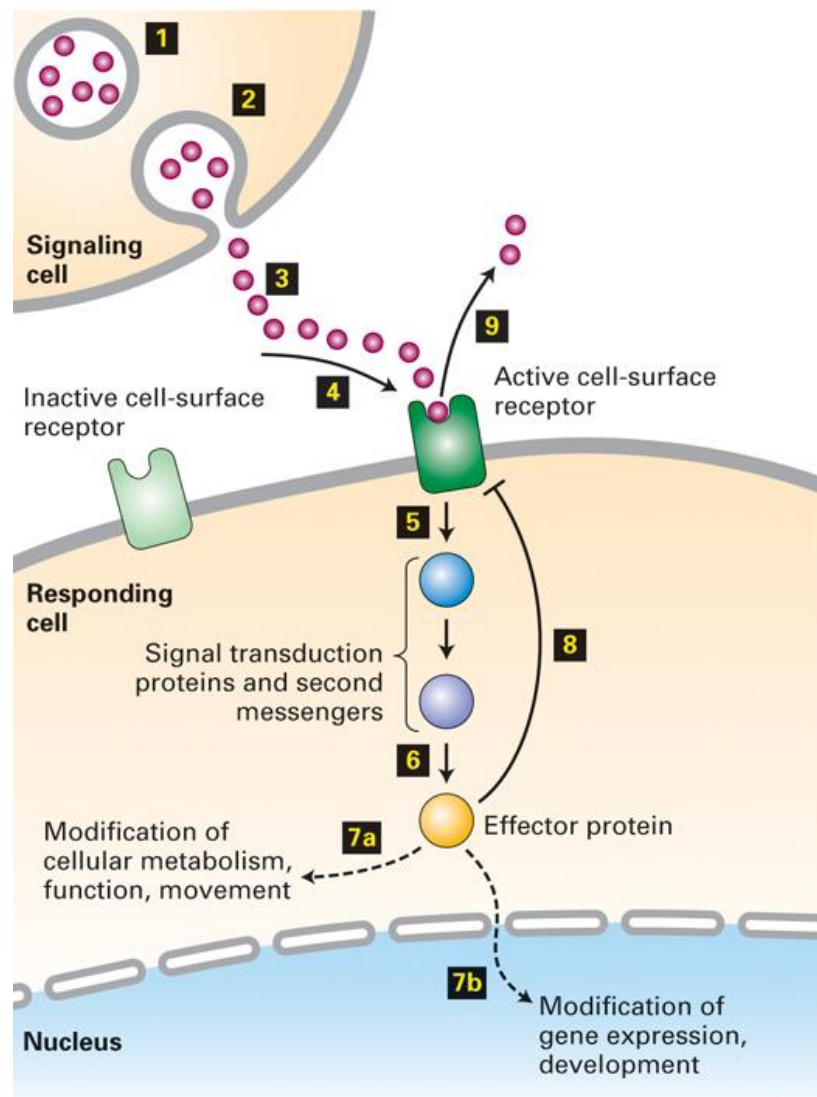
Dergelijke "gap-junctions" zijn opgebouwd uit tientallen tot duizenden kanaaltjes in de plasmamembranen van cellen, die een directe verbinding tussen de cytoplasma's toelaten. Gap-junctions bestaan uit buisvormige eiwitverbindingen (*connexons*),

opgebouwd uit integrale membraaneiwitten: de *connexines*. De connexons laten snelle uitwisseling toe van kleine signaalmoleculen, zoals  $\text{Ca}^{2+}$  en cyclisch AMP, of glucose en wateroplosbare vitamines, zodat functionele en metabole koppeling ontstaat. Dit laat toe dat celgroepen *synchroon en snel* reageren op een stimulus.

Voor een meer gedetailleerde bespreking van de structuur en functie van deze connexons verwijzen we naar de lessen van Prof. Luc Leybaert.

### 1.1.2 Via extracellulaire signaalmoleculen

Deze worden gesynthetiseerd en gesecreteerd door de signaliserende cel, en worden herkend door specifieke membraanreceptoren op de doelwitcellen. Dergelijke signaalmoleculen en receptoren zijn zeer variabel. Eveneens is het type respons zeer verschillend van cel tot cel, en wordt bepaald door intracellulaire componenten: *de signaaltransductoren*.



De signaaltransductoren beïnvloeden op hun beurt doelwit-eiwitten, wat uiteindelijk leidt tot gewijzigde functies in het cytosol, zoals gewijzigd metabolisme of gewijzigde celmotiliteit, of in de nucleus, door controle op gereguleerde genexpressie via de werking van ondermeer transcriptiefactoren.

Zoals weergegeven in bovenstaande figuur, kan communicatie via extracellulaire signalen essentieel onderverdeeld worden in volgende stappen:

1. synthese van de signaalmolecule
2. secretie van de signaalmolecule
3. transport naar de doelwitcel
4. binding op een specifieke receptor, en activatie van deze receptor
5. activatie/synthese van signaaltransductie-eiwitten en kleine moleculen
6. activatie van effector-eiwitten
- 7a: korte termijn effect (wijziging cellulaire functie, metabolisme, motiliteit)
- 7b: lange termijn effect (wijziging genexpressie, ontwikkeling)
8. uitdoven van het signaal door negatieve feedback
9. uitdoven van het signaal door verwijdering van het ligand

In de loop van de evolutie zijn bijzonder veel variaties op dit basisthema ontstaan, waarvan we er verder in de cursus een aantal in meer detail zullen bespreken.

## 1.2 Endocrien/Paracrien/Synaptisch/Autocrien/Direct

Onderverdeling van cel-cel communicatie via gesecreteerde signaalmoleculen bij dierlijke organismen (bij planten komen dergelijke systemen veel minder voor) kan gebeuren op basis van de afstand waarover het signaal opereert.

### Endocrien.

Dergelijke signaalmoleculen worden "*hormonen*" genoemd en worden meestal geproduceerd door gespecialiseerde cellen in endocriene organen. Transport naar de verafgelegen doelwitcellen gebeurt via de bloedbaan.

### Paracrien.

Signalisatie blijft hier beperkt tot cellen in de onmiddellijke omgeving. Dit wordt veroorzaakt door een snelle opname, afbraak of immobilisatie. Een voorbeeld hiervan is de werking van interferonen bij antivirale bescherming.

Een gespecialiseerde vorm hiervan is de **synaptische communicatie**. Hierbij worden *neurotransmitters* gesecreteerd in de synaptische spleet (50-100 nm), die instaan voor de overdracht van elektrische impulsen tussen zenuwcellen. Deze vorm van cel-cel communicatie is uiterst snel en gericht.

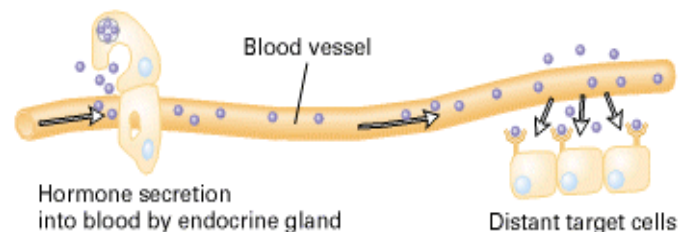
### Autocrien.

Dit type groeistimulatie komt vaak voor bij cellen in weefselkweek. Meerdere *groefactoren* werken op deze wijze. Aberrante autocriene stimulatie kan bijdragen tot celtransformatie.

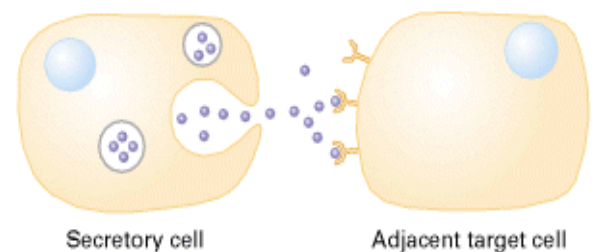
### Direct.

Bij direct contact blijft de signaalmolecule membraangebonden. Bijvoorbeeld bij de haematopoiese gebeurt groeistimulatie van stamcellen en vroege progenitoren op deze wijze, via direct contact met zogenaamde stromale cellen. Deze vorm van cel-cel communicatie speelt eveneens een voorname rol tijdens de ontwikkeling van een organisme.

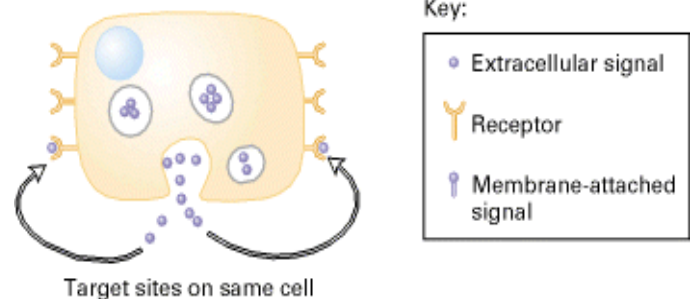
(a) Endocrine signaling



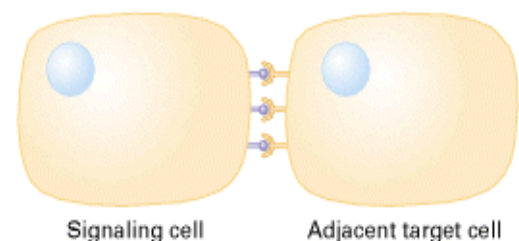
(b) Paracrine signaling



(c) Autocrine signaling



(d) Signaling by plasma membrane-attached proteins



Een dergelijke indeling is niet absoluut: dezelfde signaalmoleculen kunnen soms betrokken zijn bij meerdere types signaaloverdracht.

Steeds gebeurt de werking via binding op specifieke receptoren.

### 1.3 Bindings- en effector-specificiteit

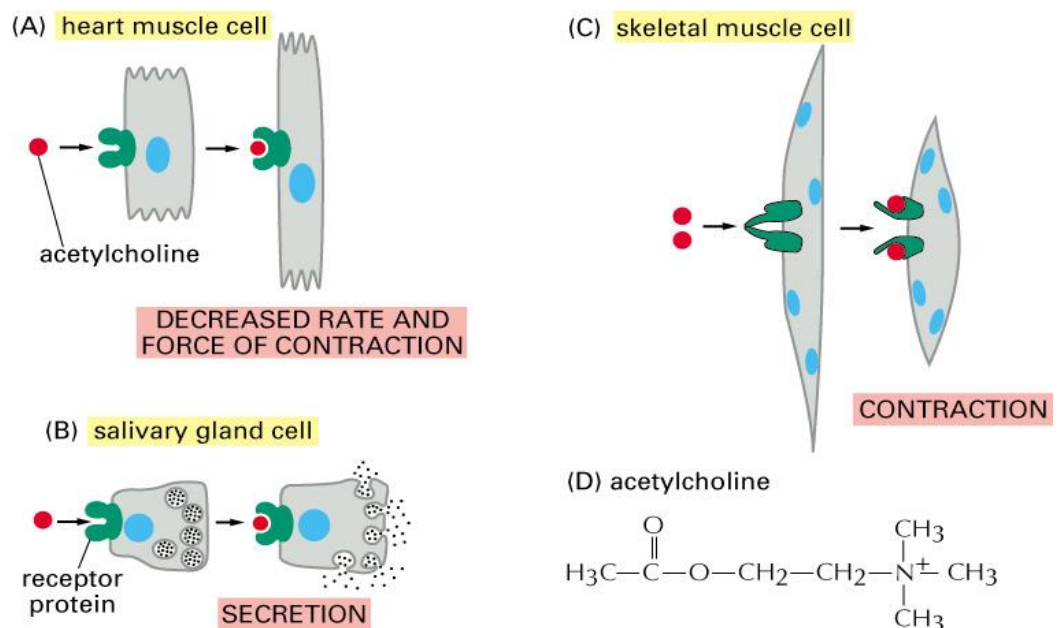
Receptoren vertonen zowel bindings- als effector-specificiteit.

Liganden binden op unieke, specifieke receptoren: er bestaat dus uitgesproken **bindings-specificiteit** tussen receptor en ligand: insuline bindt uitsluitend op de insuline-receptor, glucagon bindt uitsluitend op de glucagon-receptor; erythropoietine uitsluitend op de Epo-receptor, etc... Toch is dit niet absoluut. Sommige liganden kunnen meerdere verschillende receptoren hebben zoals acetylcholine dat aparte receptoren herkent op hartspier- en dwarsgestreepte spiercellen, of serotonine, waarvoor nu reeds een 15-tal verschillende G-eiwit gekoppelde receptoren gevonden zijn. Ook kunnen sommige receptoren soms verschillende liganden binden, of zijn ze opgebouwd uit verschillende subeenheden die gemeenschappelijk kunnen gebruikt worden.

Ligand/receptor interactie leidt tot een welbepaalde respons in de receptor-dragende cellen. Dergelijke respons kan wel verschillen van cel tot cel voor eenzelfde ligand/receptor interactie: er bestaat dus **effector-specificiteit**, die bepaald wordt door het type receptor, en door de cel-specifieke intracellulaire signaalmoleculen.

Twee belangrijke begrippen hierbij zijn *pleiotropie* en *redundantie*.

Eenzijds kunnen meerdere, verschillende ligand/receptor interacties op eenzelfde cel leiden tot dezelfde cellulaire respons (=redundantie). Dit kan verklaard worden door het gebruik van dezelfde signaaltransductoren in deze cellen door beide receptor-systemen.

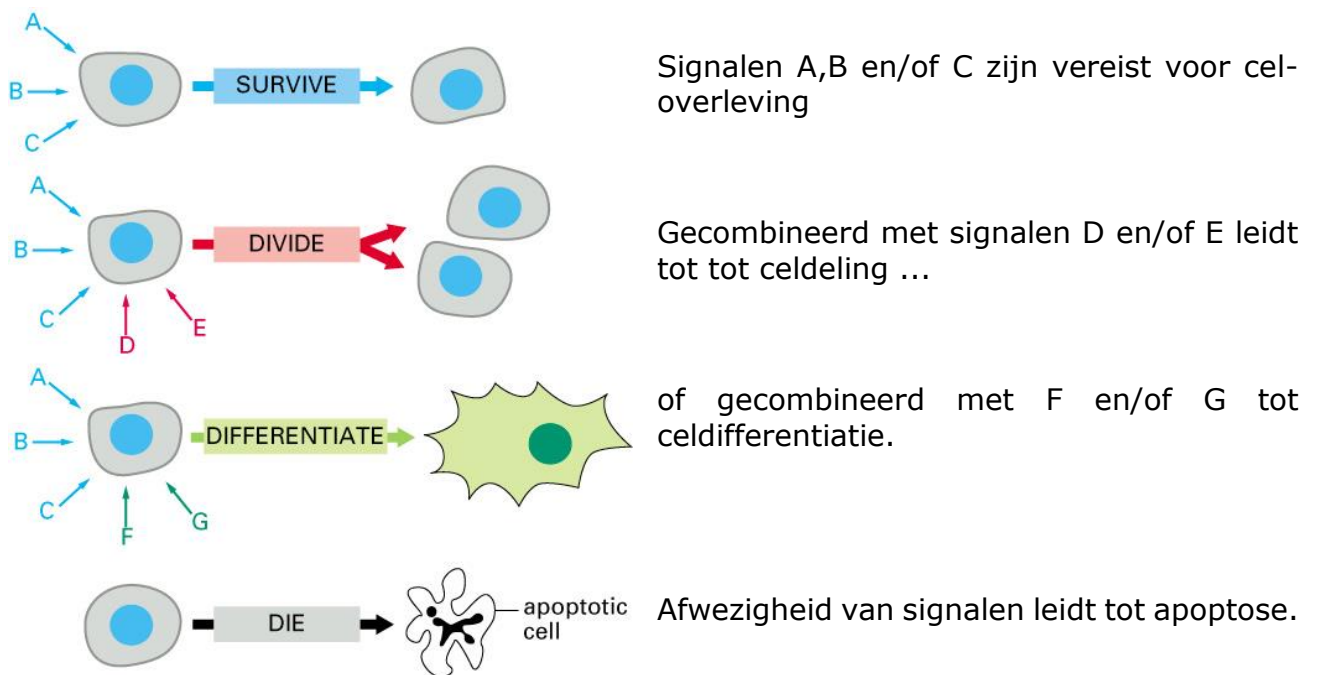


Anderzijds kan eenzelfde ligand-receptor interactie op verschillende cellen leiden tot verschillende responsen (=pleiotropie).

Deze fenomenen laten optimale reactie van een organisme toe op één signaal (zie verder: de "fight-or-flight" reactie bij adrenaline vrijstelling), en laten ook een hoge mate van flexibiliteit toe.



Bovendien staat het cellulair gedrag meestal onder controle van meerdere signalen tegelijkertijd. Het gecombineerd activeren van sets van receptoren bepaalt de finale uitkomst, wat uiteraard een enorm gamma aan mogelijke celcontrole toelaat.



Alles wijst erop dat liganden, behalve binding en activatie van hun receptoren, geen enkele verdere functie hebben. Ze worden na internalisatie niet afgebroken tot functionele metabolieten, of hebben geen enzymatische activiteit. Ligand-afbraak draagt bij tot beëindiging van het signalisatieproces.

## 1.4 Algemene eigenschappen van ligand/receptor systemen

### 1.4.1 Classificatie van liganden

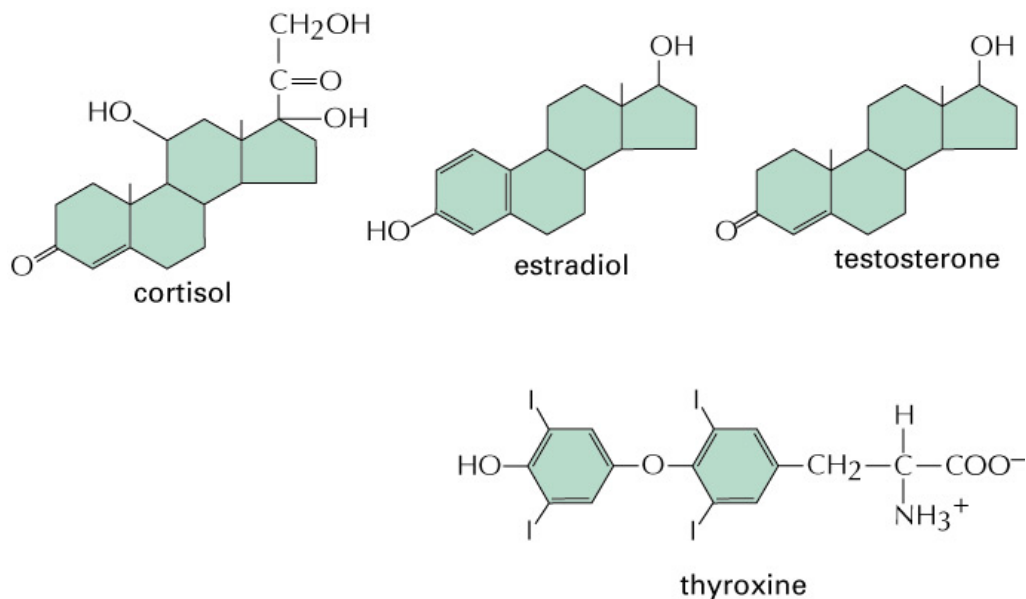
Liganden kunnen ingedeeld worden op basis van hun oplosbaarheid en receptor-localisatie:

- Lipofiele hormonen met intracellulaire receptoren
- Lipofiele hormonen met celmembraan-gebonden receptoren
- Wateroplosbare hormonen met celmembraan-gebonden receptoren

#### 1.4.1.1 Lipofiele hormonen met intracellulaire receptoren

Veel kleine, lipofiele hormonen kunnen vrij doorheen het plasmamembraan en nucleair membraan diffunderen, en interageren in de cel met cytosolische of nucleaire receptoren. Deze ligand-receptor complexen kunnen rechtstreeks binden op transcriptie-controle CIS-elementen en zo op directe wijze transcriptiepatronen reguleren.

Voorbeelden hiervan zijn *steroiden (cortisol, oestradiol, testosteron...), thyroxine en retinoïne-zuur*.



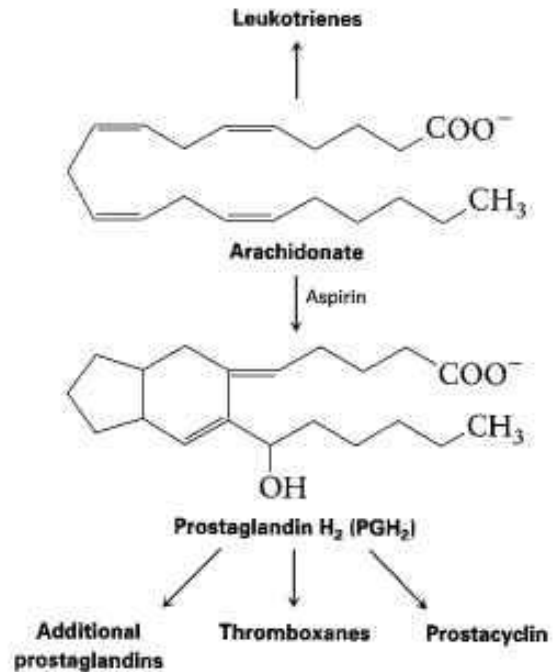
De werking van deze hormonen en hun receptoren wordt besproken in sectie 2.2.

### 1.4.1.2 Lipofiele hormonen met celmembraan-gebonden receptoren

Type-voorbeelden van deze hormoonklasse zijn de *prostaglandines*. Ze behoren tot de groep van 20-C bevattende eicosanoïd hormonen, die alle afgeleid zijn van arachidonzuur, een onverzadigd vetzuur dat voorkomt in de plasmamembraan.

Zestien verschillende types prostaglandines zijn reeds beschreven. De functie van de prostaglandines is zeer variabel. Vele zijn pro-inflammatoir of zijn betrokken bij aggregatie van bloedplaatjes en adhesie aan de bloedvaatwanden. *Aspirine* inhibeert de prostaglandine-synthese.

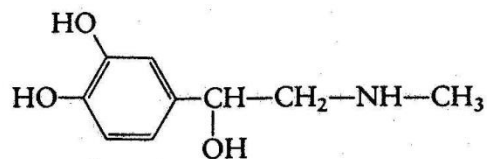
Deze hormonen kunnen niet doorheen de plasmamembraan diffunderen en binden op specifieke membraan-gebonden receptoren.



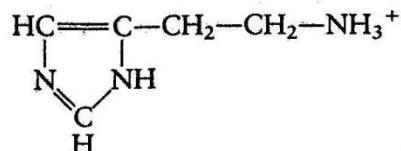
### 1.4.1.3 Wateroplosbare hormonen met celmembraan-gebonden receptoren

Deze zeer uitgebreide groep omvat *kleine, geladen molecules*, waaronder adrenaline en histamine (beide aminozuur-derivaten) en *peptide- en polypeptide hormonen* zoals glucagon, insuline, groeifactoren, cytokines. Liganden van deze zeer uitgebreide groep kunnen variëren in lengte van minder dan tien tot meerdere honderden aminozuren.

Epinephrine



Histamine



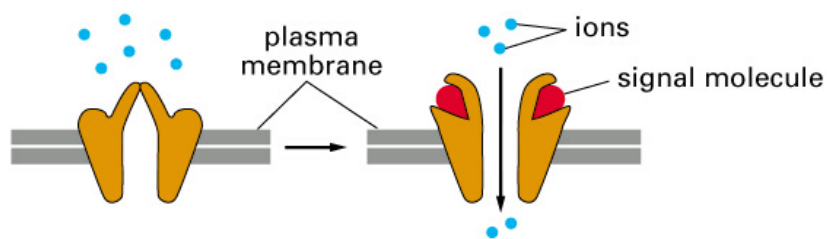
## 1.4.2 Classificatie van receptoren

### 1.4.2.1 Membraan-verankerde receptoren

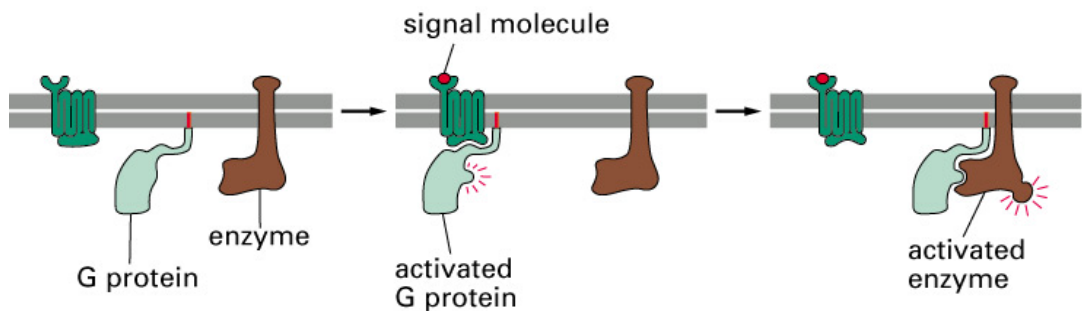
Membraan-receptoren kunnen ingedeeld worden in 3 groepen:

- Ion-kanaal gekoppelde receptoren
- G-eiwit gekoppelde receptoren
- Enzym-gekoppelde receptoren

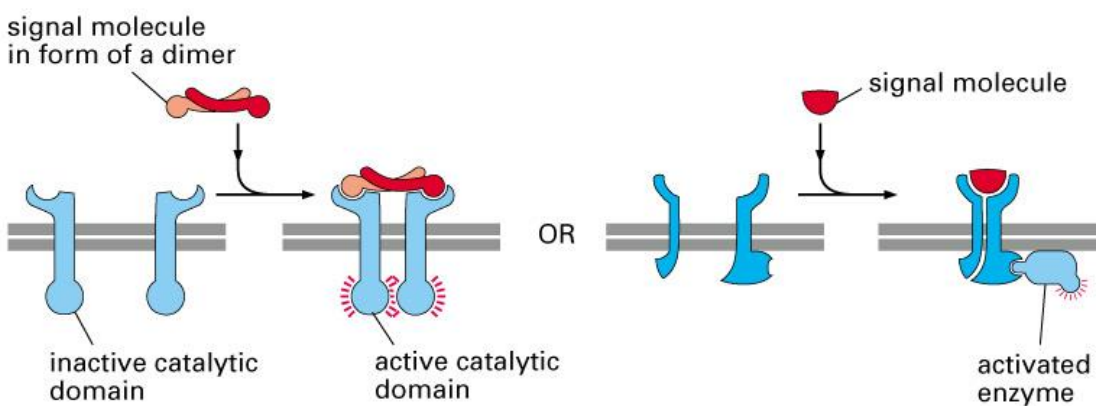
#### (A) ION-CHANNEL-LINKED RECEPTORS



#### (B) G-PROTEIN-LINKED RECEPTORS



#### (C) ENZYME-LINKED RECEPTORS



#### 1.4.2.1.1 Ion-kanaal gekoppelde receptoren

Ligand-binding leidt tot openen of sluiten van membraanporiën waardoor specifieke ionen doorheen de membraan migreren, zodat de membraanpotentiaal gewijzigd wordt. Dit zeer snelle effect komt veel voor bij neurotransmitters.

Activatie gebeurt door een structuurwijziging in de receptor. Een type-voorbeeld is de *acetylcholine*-receptor. Voor een gedetailleerde bespreking van deze groep verwijzen we naar de cursus fysiologie.

#### 1.4.2.1.2 G-eiwit gekoppelde receptoren

Ligand-binding op deze receptoren leidt tot activatie van G-eiwitten, welke op hun beurt (1) enzymes aan- of afschakelen die specifieke signalen sturen, en/of (2) ion-kanalen aan- of afschakelen, wat leidt tot een wijziging van de membraanpotentiaal.

De liganden voor deze receptoren zijn meestal klein. Activatie van deze receptoren gebeurt door de inductie van een structuurwijziging.

Een type-voorbeeld zijn de receptoren voor *adrenaline*. Deze receptoren bespreken we in meer detail in sectie 2.3.

#### 1.4.2.1.3 Receptoren met enzymatische werking

Naast een extracellulair gelegen receptorsegment dat instaat voor ligand-binding, bevatten deze receptoren een intracellulair deel met enzymatische activiteit. Op basis van de gekatalyzeerde reactie kunnen we meerdere subtypes onderscheiden:

**Tyrosine-kinase receptoren.** Ligand-binding bij deze groep receptoren leidt tot activatie van een tyrosine-specifiek eiwitkinase domein in de receptor. Dit leidt tot fosforylatie van tyrosine-zijketens op de receptor en op doelwitewitten. Liganden voor deze receptoren zijn polypeptiden, bijvoorbeeld *insuline* en meerdere groeifactoren zoals *EGF*, *Epidermale Groei Factor*. Ze activeren de receptor door inductie van gewijzigde receptor-complexvorming (bijvoorbeeld dimerisatie). Zeer verwant hieraan zijn de **cytokine-receptoren**. Deze groep receptoren heeft geen intrinsieke enzymatische activiteit, maar wordt gekenmerkt door het voorkomen van receptor-geassocieerde tyrosine kinasen. Het signaaltransductieproces verloopt essentieel volgens dezelfde principes als de receptoren met intrinsieke tyrosine-kinase activiteit. De liganden zijn steeds polypeptiden, bijvoorbeeld *interferons* en *interleukines*. Ze activeren de receptoren eveneens door de inductie van gewijzigde receptorclustering. Deze receptoren worden in meer detail besproken in secties 2.4 - 2.6.

**Serine/Threonine kinase receptoren** omvatten de receptoren voor een groep polypeptide-groeifactoren waaronder TGF- $\beta$ , Transformerende Groei Factor  $\beta$ . Activatie gebeurt door het samenbrengen van verschillende receptorketens. Het werkingsmechanisme van deze groep receptoren verloopt zeer analoog aan de voorgaande groepen.

Andere receptoren hebben intrinsieke **fosfatase activiteit**, of **guanylaat-cyclase activiteit**. Activatie van deze laatste groep receptoren leidt tot de onmiddellijke aanmaak van de secundaire boodschapper cGMP.

#### 1.4.2.1.4 Receptoren die "signaalplatformen" vormen

Tenslotte zijn er membraanreceptoren die geen intrinsieke enzymatische activiteit bezitten, en ook niet rechtstreeks met kinasen interageren, doch waarbij zogenaamde **adaptor-eiwitten** een brug vormen tussen receptor en kinasen. Deze receptoren vormen oligomere clusters in de celmembraan die als platform dienen voor het aanmeren van verschillende adaptoren, die de verbinding met andere signaleiwitten mediëren. Voorbeelden van deze klasse van receptoren zijn de receptoren voor pro-inflammatoire mediators, zoals TNF- $\alpha$  en IL1 $\beta$ , en de Toll-like receptoren (TLRs) die pathogeen-geassocieerde moleculen herkennen. Voorbeelden van deze receptorklasse worden besproken in secties 2.7 en 2.8.

#### **1.4.2.2 Cytoplasmatische/nucleaire receptoren**

Lipofiele hormonen kunnen doorheen de plasma- en nucleaire membraan migreren en rechtstreeks binden op intracellulaire receptoren. Het voorkomen van dergelijke receptoren in het dierenrijk is zeer variabel: bij de mens komen minder dan 50 dergelijke receptoren voor, bij *C. elegans* daarentegen coderen 1-2% van alle genen voor nucleaire receptoren! Deze receptoren bespreken we in meer detail in sectie 2.2.

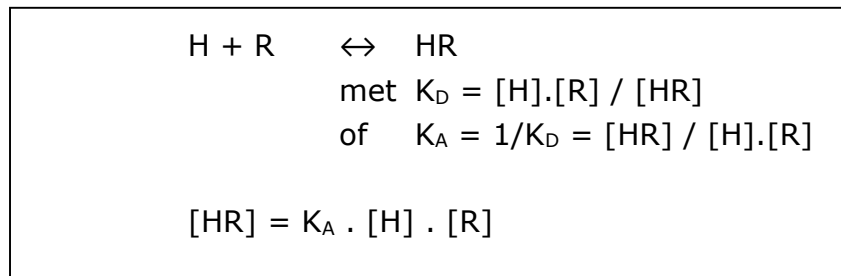
### 1.4.3 Karakterisatie van ligand/receptor binding

Receptoren binden hun liganden op zeer specifieke wijze. Dit gebeurt op basis van meerdere zwakke interacties (ionische – en Van der Waals – bindingen, en hydrofobe interacties), waarbij de ruimtelijke posities van de zijketens van de aminozuren een essentiële rol vervullen.

#### Bepalen van de bindingsaffiniteit

Na secretie komen de liganden vrij in de bloedstroom of het interstitieel vocht. Vooraleer ze de doelwitcellen bereiken worden ze bijgevolg sterk verdund. Om toch een voldoende groot aantal receptoren te bezetten, moet de *bindingsaffiniteit* tussen ligand en receptor zeer hoog zijn (meestal van de orde  $10^8$  tot  $10^{10}$  M).

Een ligand/receptor interactie is reversibel en kan voorgesteld worden door de volgende eenvoudige evenwichtsvergelijking:



Waarbij : [H] = hormoon-concentratie  
[R] = receptor-concentratie  
[HR] = concentratie van hormoon/receptor complex  
 $K_A$  = associatieconstante  
 $K_D$  = dissociatieconstante

Associatie- of dissociatieconstanten zijn karakteristiek voor elke ligand/receptor interactie en zijn een maat voor de bindingsaffiniteit tussen beide. De  $K_D$  waarde is equivalent aan de ligandconcentratie waarbij de helft van de receptoren het gebonden ligand bevatten. Bij een endocrien hormoon benadert deze waarde meestal de fysiologische concentratie van het ligand in het bloed. Bijvoorbeeld voor insuline :  $K_D = 2 \cdot 10^{-8}$  M, vergelijkbaar met een insulinespiegel van ongeveer 100 ng/ml.

Indien de  $K_A = 10^9$  M is, dan is de fractionele receptor-bezetting  $[HR] / [HR] + [R]$  bij een hormoonconcentratie  $[H] = 10^{-8}$  M :

$$\frac{10^9 \cdot 10^{-8} \cdot [R]}{10^9 \cdot 10^{-8} \cdot [R] + [R]} = \frac{10}{11} = 0.91$$

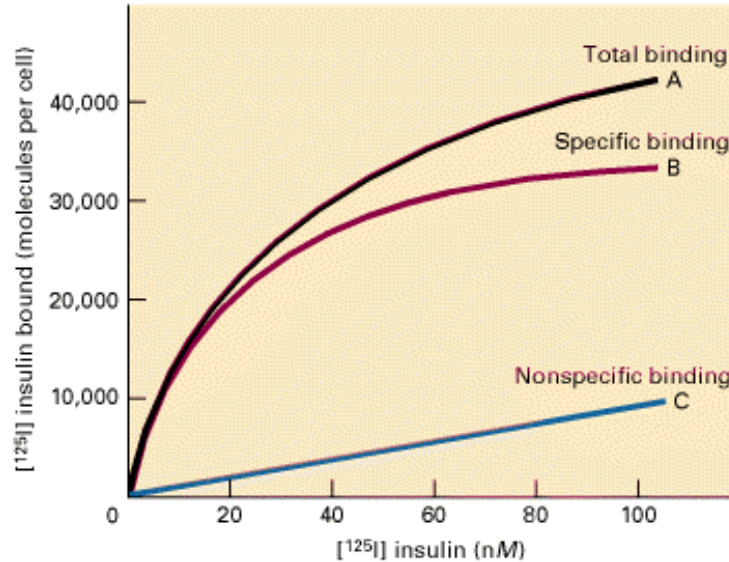
Met andere woorden : 90% van de receptormoleculen zullen bezet zijn met ligand.

Ter vergelijking, bij een  $K_A = 10^4 \text{ M}$ , zou bij eenzelfde ligand-concentratie de fractionele receptorbezetting slechts 0.0001 zijn:

$$\frac{10^4 \cdot 10^{-8}}{10^4 \cdot 10^{-8} + 1} = \frac{0.0001}{1.0001}$$

Bij paracriene processen, en in het bijzonder bij synaptische signalisatie, is de situatie zeer verschillend. Aangezien neurotransmitters in een synaptische spleet gesecreteerd worden zullen deze liganden aan hoge concentraties voorkomen. De acetylcholine-concentratie bijvoorbeeld in de synaptische spleet is van de orde grootte van  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Belangrijk is dat de passende neurotransmitterreceptoren een lage affiniteit hebben voor hun ligand:  $K_A = 10^4 \text{ M}$ , waarbij, door de hoge ligandconcentratie, toch een voldoende receptorbezetting kan voorkomen. Dit heeft het grote voordeel dat neurotransmitters die uit de synaptische spleet zouden wegdiffunderen sterk verdund worden, waardoor ze de receptoren van de verder afgelegen cellen onvoldoende zullen bezetten en dus niet kunnen activeren. Gezien de synaptische contacten zeer precies tussen welbepaalde cellen voorkomen, zullen deze signalen dan ook ook zeer precies gestuurd worden.

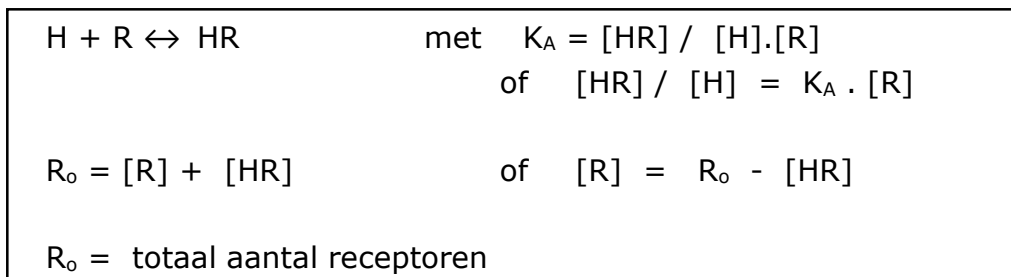
Receptoren komen op cellen voor in kleine aantallen. Detectie gebeurt bij middel van radioactief gemerkte liganden. Door stijgende concentraties van het ligand toe te voegen aan cellen zullen we een saturatie bindingscurve bekomen:



Daarbij moeten we een onderscheid maken tussen specifieke, hoog-affiene binding en een niet-specifieke achtergrond. Door een overmaat niet-gemerkt ligand toe te voegen tijdens het bindingsexperiment, detecteren we alleen deze laatste vorm.



Een **Scatchard plot** laat toe om vanuit een saturatiecurve, zowel het aantal receptoren als de bindingsaffiniteit af te leiden. Deze berekening is op volgende vergelijkingen gesteund:

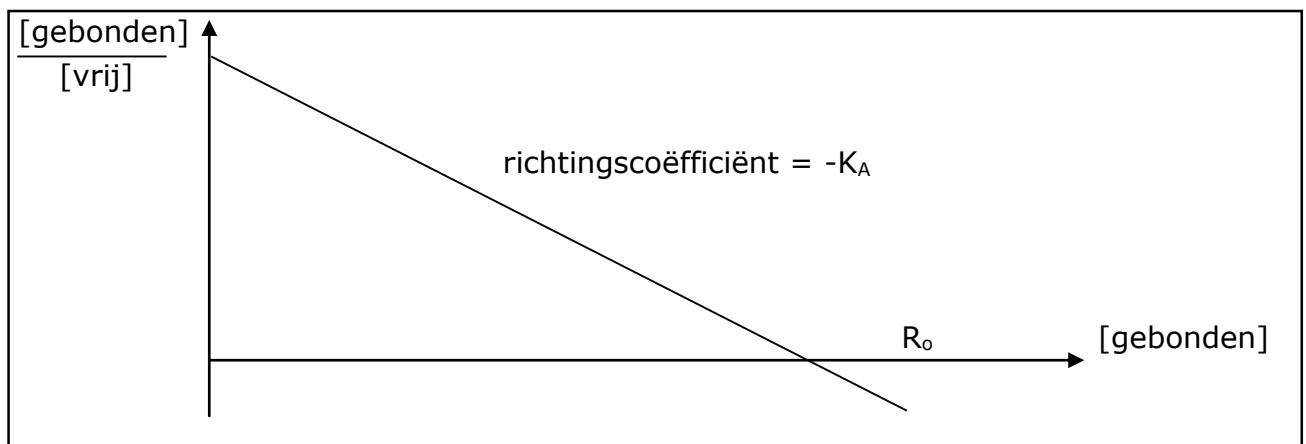


Dus :

$[HR] / [H] = K_A \cdot R_o - K_A \cdot [HR]$
---

Als we  $[HR] / [H]$  uitzetten ten opzichte van  $[HR]$ , bekomen we een rechte, waarbij:

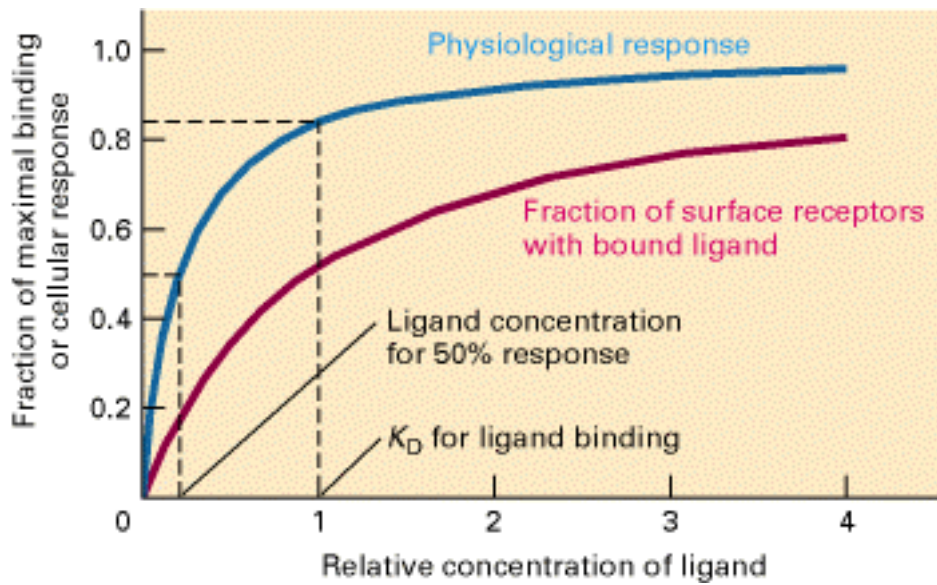
- *de helling (richtingscoëfficiënt) overeenkomt met  $-K_A$*
- *het snijpunt met de X-as (de as waar we  $[HR]$  uitzetten) overeenkomt met het totaal aantal receptoren  $R_o$ .*



Typische waarden voor hormonen of cytokines zijn:

- *honderden tot tienduizenden receptoren per cel*
- *met een  $K_A$  waarde tussen  $10^8$  en  $10^{10}$  M. De  $K_D$  waarde benadert meestal de concentratie waarbij de liganden in circulatie voorkomen.*

Voor veel hormonen wordt reeds een sterke fysiologische respons in de cel opgewekt bij lage fractionele receptor bezetting.



## 1.5 Algemene eigenschappen van signaaltransductoren

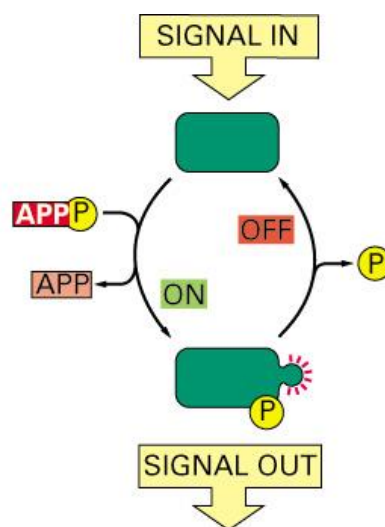
Het signaaltransductie proces initieert ter hoogte van het cytoplasmatische deel van de receptoren. Dit is een geïntegreerd proces waarbij zowel kleine metabolieten en ionen als complexe eiwitsystemen deelnemen.

### 1.5.1 Rol van signaaleiwitten

Een voorname rol bij signaaloverdracht is weggelegd voor een aantal eiwitfamilies met evolutief zeer geconserveerde functies:

#### Eiwitkinasen

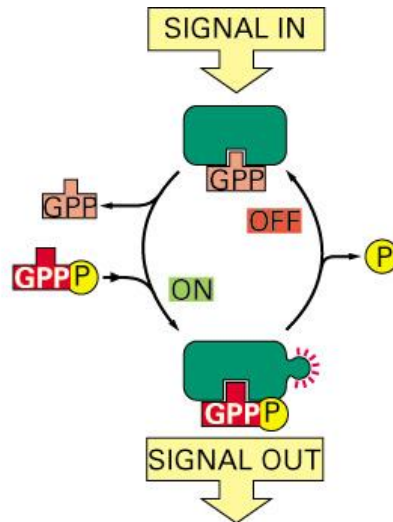
Activatie van alle membraanverankerde receptoren leidt tot wijziging van het fosforylatie-patroon van cytosolische eiwitten. Er wordt geschat dat 1/3 van alle cellulaire eiwitten op elk gegeven tijdstip gefosforyleerd zijn! De kinase-activiteit kan zowel door de receptoren zelf als door cytosolische kinasen uitgeoefend worden. Ongeveer 1.5% van het humane genoom codeert voor kinasen: samen vormen ongeveer 520 kinasen het "kinoom". Ook hier komen 2 types voor op basis van hun substraat-specificiteit: tyr of ser/thr residu's. De katalytische plaatsen voor beide groepen kinasen zijn zeer vergelijkbaar; sommige kinasen hebben een duale activiteit. Overdracht van fosfaat vervult hierbij een *schakelfunctie*: het al dan niet aanwezig zijn van de fosfaatgroep bepaalt de werking van het substraateiwit. Gezien hun belangrijke rol in veel cellulaire processen vormen kinasen een interessante enzymgroep voor farmacologische interventie; een voorbeeld hiervan is het recent ontwikkelde *Gleevec*, voor de behandeling van sommige vormen van leukemie (CML, chronische myeloïde leukemie). Gleevec is een kleine molecule die activatie van het Abl tyrosine kinase inhibeert. Een ander voorbeeld is *Herceptin*, een monoclonaal antilichaam dat bindt op de ErbB2 tyrosine kinase receptor en activatie ervan verhindert. Verhoogde expressieniveaus van ErbB2 zijn karakteristiek voor bepaalde vormen van borsttumoren.



(A) SIGNALING BY PHOSPHORYLATION

## GTP-bindende eiwitten

Deze eiwitten komen voor in associatie met GTP of GDP. Signalen leiden tot uitwisseling van het GDP nucleotide voor GTP, wat zorgt voor activatie van het eiwit. Uitschakeling gebeurt door GTPase activiteit die zowel intrinsiek kan zijn (vb. G-eiwitten bij G-eiwit gekoppelde receptoren, sectie 2.3) of uitgeoefend kan worden door accessorische eiwitten (vb. bij Ras-eiwitten, zie sectie 2.4.2). Ook hier zorgt het al dan niet aanwezig zijn van een fosfaatgroep voor de *schakelfunctie*.



(B) SIGNALING BY GTP-BINDING PROTEIN

## Adaptor eiwitten

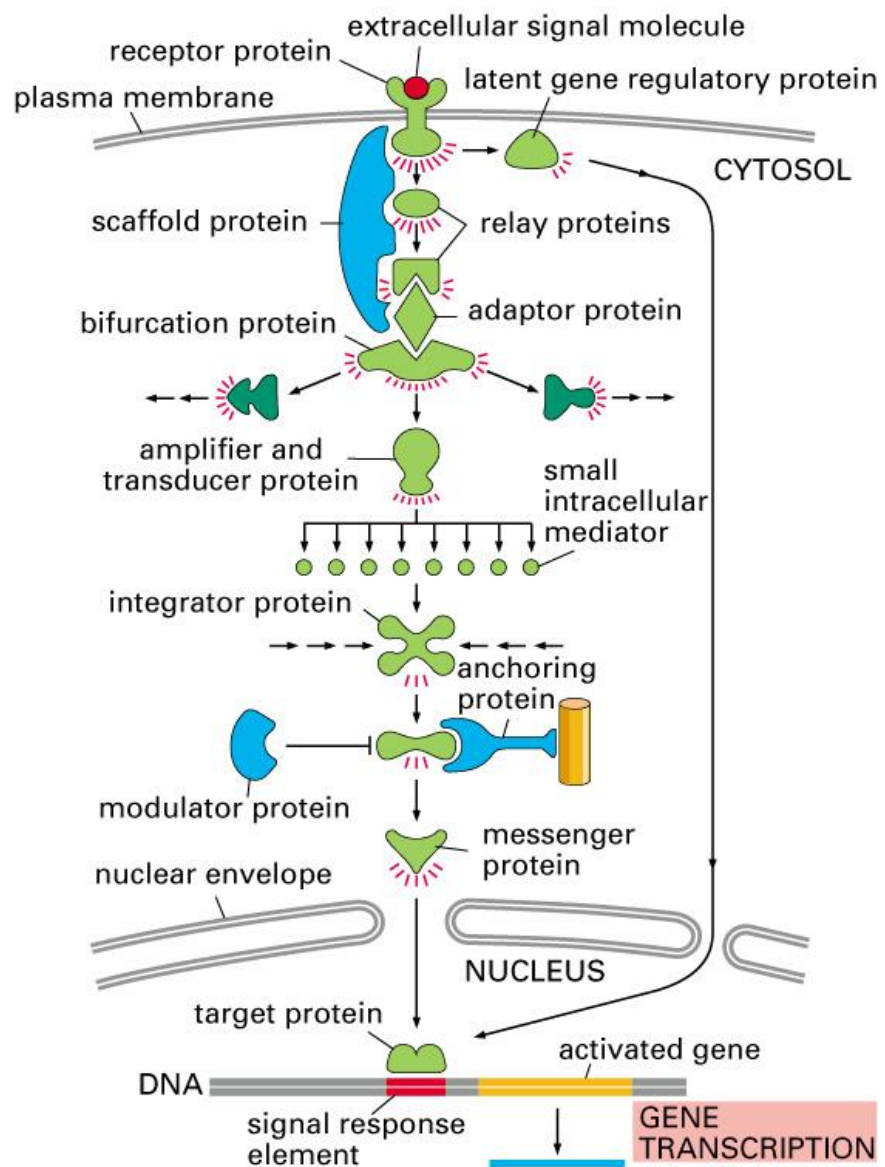
zorgen voor koppeling van signaalcomponenten. Ze bezitten zelf geen katalytische activiteit maar vervullen een *brugfunctie* tussen verschillende signaal-eiwitten. Karakteristiek voor deze groep eiwitten is het voorkomen van geconserveerde eiwitmodules zoals SH2-, SH3-, PH-, ... domeinen die instaan voor de intermoleculaire interacties.

## "Scaffold" eiwitten of skeleteiwitten

brenge groepen eiwitten op een geordende manier samen zodat ze hun specifieke functie meer efficiënt kunnen uitvoeren.

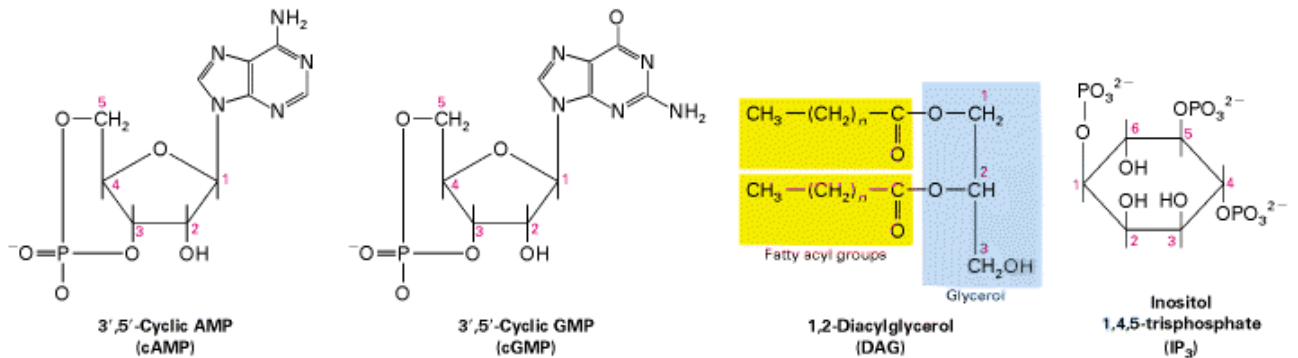
Zoals schematisch weergegeven op onderstaande figuur, kan signaaloverdracht gebeuren via een complexe cascade van gebeurtenissen, waarbij zowel directe eiwit-eiwit interacties als secundaire boodschappers betrokken zijn. Deze opbouw van een signaalbaan met veel stappen laat amplificatie, signaaldiversificatie en interferentie met andere signaalbanen mogelijk.

Anderzijds bestaan ook zeer directe effecten. Een voorbeeld hiervan is de activatie van Interferon-responsieve genen via de JAK/STAT signaalbaan (zie sectie 2.6). Cellen dienen immers zeer snel te reageren om een virale infectie te kunnen onderdrukken.



## 1.5.2 Rol van secundaire boodschappers

Naast de signaleiwitten spelen ook kleine, zogenaamde "secundaire boodschappers", een belangrijke rol bij signaaltransductie. Receptoractivatie leidt tot wijziging in de intracellulaire concentratie van deze tweede boodschappers wat op zijn beurt leidt tot de snelle modulatie van de activiteit van cytosolische eiwitten, dikwijls met enzymatische werking. Deze kleine signaalmoleculen hebben steeds een korte levensduur. Belangrijke secundaire boodschappers zijn cAMP, cGMP, DAG, IP<sub>3</sub> en Ca<sup>2+</sup>. De term "primaire boodschappers" verwijst naar de liganden.



## 1.6 Regulatiemechanismen

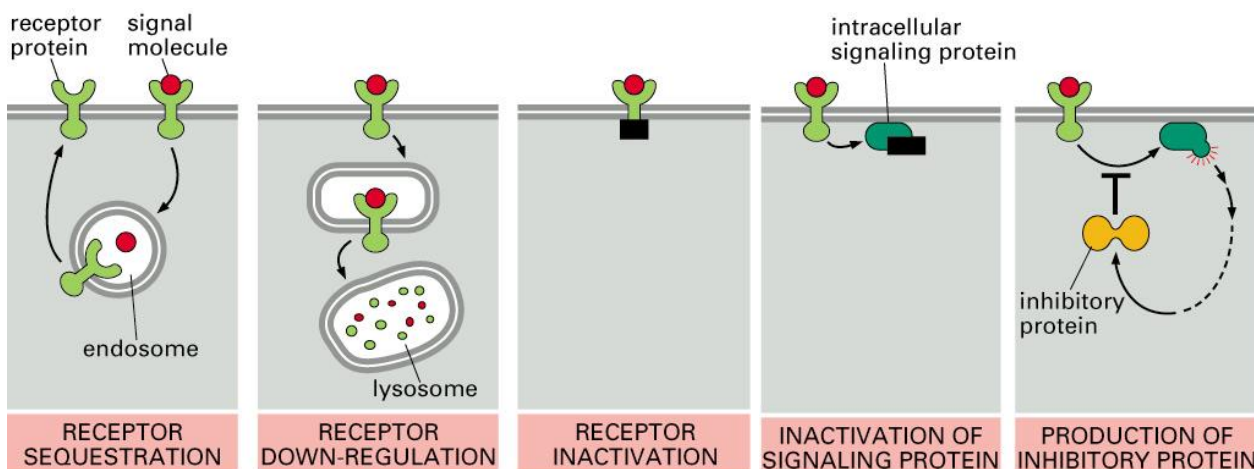
Aangezien een organisme zich voortdurend moet aanpassen aan zijn wijzigende omgeving zijn veel signalen van korte duur en worden ze strikt gereguleerd. Dit wordt gerealiseerd op verschillende niveau's.

### Ter hoogte van het ligand:

- *Synthese* van het ligand staat dikwijls onder strikte transcriptionele controle. Promoter-sequenties worden slechts kortstondig geactiveerd zodat mRNA's slechts enkele uren aangemaakt worden. Het coderende mRNA bevat dikwijls ook destabiliserende sequenties in het 3'-onvertaald gebied (zie Moleculaire Biologie I).
- Daarnaast gebeurt dikwijls ook kortstondige *vrijstelling* vanuit granules (peptide hormonen, neurotransmitters).
- De productie van veel hormonen (vb. oestrogeen en progesteron) staat bovendien onder controle van *feedback* regulatie. Deze kan zowel positief als negatief zijn.
- Veel liganden hebben een *korte halfwaardetijd* na vrijstelling. Deze kan variëren van seconden (catecholamines), over minuten (peptide- en polypeptide-hormonen) tot uren (steroïden) of dagen (thyroxine). De langere halfwaardetijd voor steroïden en thyroxine is te verklaren doordat ze in circulatie niet vrij voorkomen, maar gebonden op drager ("carrier")-eiwitten. Zeer kortlevende liganden worden enzymatisch afgebroken.

### Ter hoogte van de receptor-activatie:

- Veel receptoren worden na ligand-binding *geïnternaliseerd*. In de meeste gevallen worden ze, samen met het ligand *snel afgebroken* in de lysosomen.
- Anderzijds bestaan mechanismen waarbij receptoren na activatie snel *teruggeschakeld* worden naar een inactieve vorm. Dit kan gebeuren ter hoogte van de receptoren of van de signaaltransductoren door bijvoorbeeld fosfatasen, maar kan ook intrinsiek zijn aan het activatiemechanisme van de signaaltransductoren.

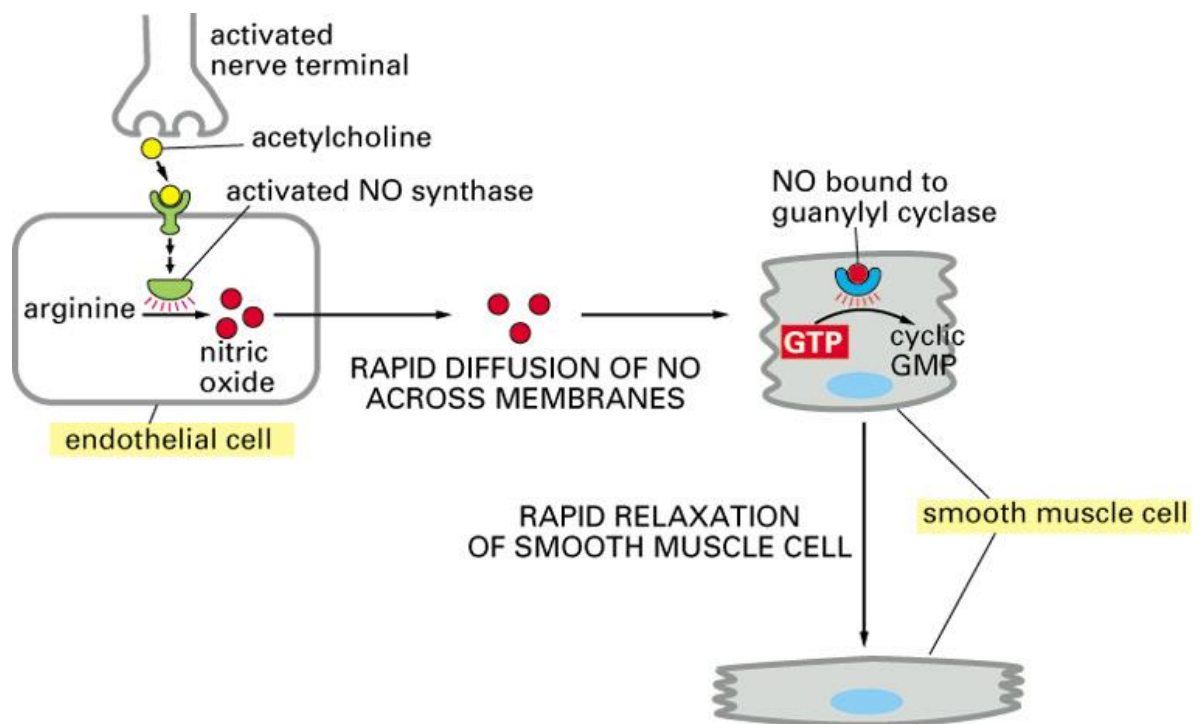


## 2 BESPREKING VAN SIGNAALSYSTEMEN

Veruit de meeste signaalsystemen werken via membraan-verankerde receptoren. De liganden zijn dan ook meestal hydrofiel, en kunnen de celmembraan niet doorkruisen. Uitzondering hierop vormen NO, en een groep van kleine hydrofobe liganden, die werken via intracellulaire receptoren.

### 2.1 Directe werking van NO

NO werkt als signaalmolecule bij zowel planten als dieren. In zoogdieren speelt het een belangrijke rol bij de contractie van gladde spiercellen.



Acetylcholine wordt vrijgesteld door *zenuwcellen* van het autonome zenuwstelsel ter hoogte van de bloedvatwanden. Op de *endotheelcellen* die het bloedvat omlijnen bindt het op zijn receptor, wat leidt tot een  $\text{Ca}^{2+}$  influx, gevolgd door activatie van het *endotheliale NO synthase (eNOS)*. NO wordt geproduceerd door omzetting van arginine tot citrulline, en kan passief wegdifunderen uit de endotheelcellen. Na verdere diffusie tot in de gladde spiercellen activeert het een cytosolisch enzyme: het *guanylaat cyclase*, wat leidt tot aanmaak van de secundaire boodschapper *cGMP*, en uiteindelijk tot wijziging van de spiertonus.

Het cytosolisch guanylaat cyclase is een heterodimeer eiwit met een haemgroep gekoppeld tussen beide subeenheden. NO bindt op deze haemgroep, en veroorzaakt een conformatiewijziging zodat de katalytische activiteit van het enzym gestimuleerd wordt.



NO heeft een zeer korte halfwaardetijd (seconden) vooraleer het omgezet wordt tot nitraten en nitrieten, en werkt bijgevolg zeer lokaal. Bovendien wordt cGMP in een cel zeer snel omgezet tot GMP door fosfodiesterasen, zodat het effect zeer tijdelijk is, en bepaald wordt door de cGMP synthese/afbraak balans.

Bij een erectie gebeurt een analoog mechanisme: autonome zenuwcellen stellen NO vrij wat leidt tot lokale bloedvat dilatatie en verhoogde bloedtoevoer. Viagra en analoge middelen werken door inhibitie van het cGMP fosfodiesterase en verlengen bijgevolg het NO effect.

Vroeger werd angina pectoralis (borstpijn, veroorzaakt door inadequate bloedtoevoer naar de hartspier) behandeld met nitroglycerine. In het lichaam wordt nitroglycerine afgebroken met vrijstelling van NO, zodat bloedvatverwijding kon optreden, waardoor zuurstoftoevoer naar de hartspier vergemakkelijkt.

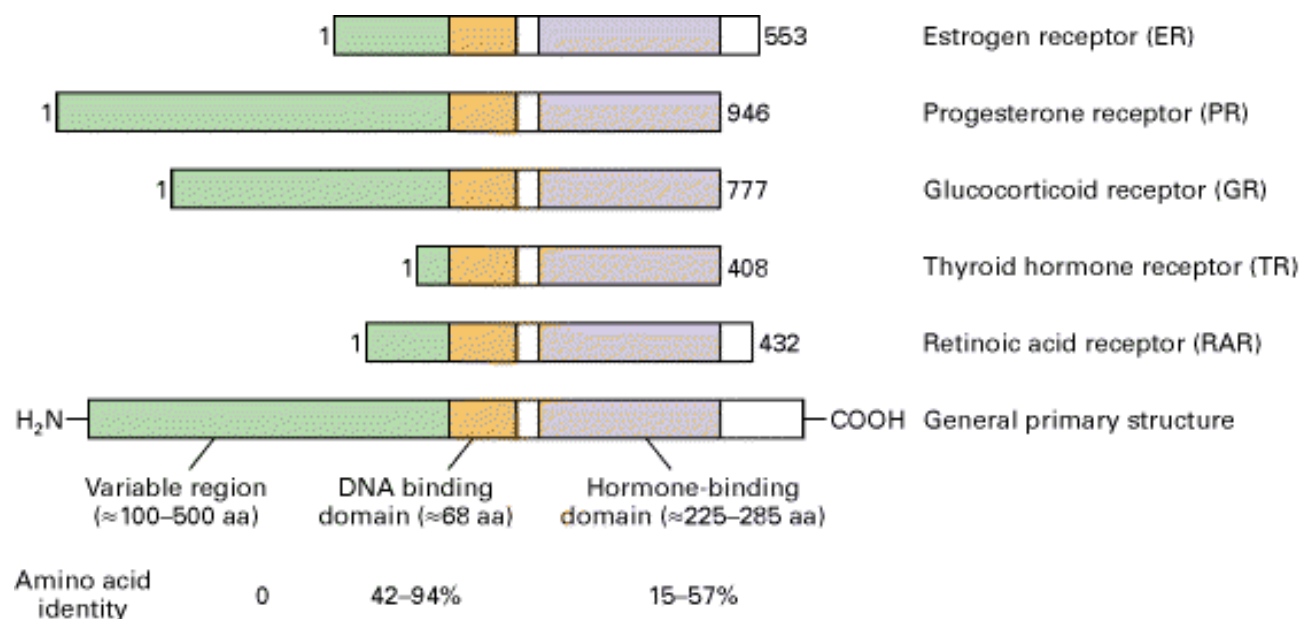
NO speelt eveneens een rol bij immuunafweer en wordt geproduceerd door een *induceerbaar NO-synthase (iNOS)* in geactiveerde macrofagen en neutrofielen. Cytokines zoals Tumor Necrosis Factor (TNF), Interleukine-1 (IL-1) of Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) stimuleren de transcriptie van het iNOS gen. Locale hoge NO-concentraties vrijgesteld door macrofagen en neutrofielen zijn toxisch voor veel cellen, waaronder bacteriën.

## 2.2 Nucleaire receptoren

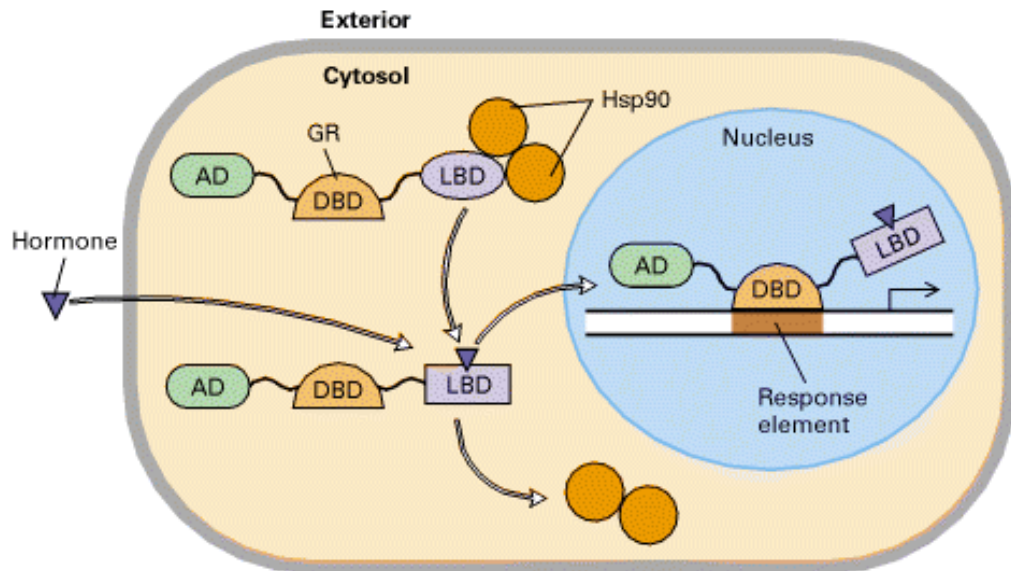
Zoals reeds eerder vermeld, kunnen lipofiele hormonen doorheen de plasmamembraan migreren en rechtstreeks binden op intracellulaire receptoren. Voorbeelden zijn de cholesterol-afgeleide *steroiden* (*progesteron, oestradiol, testosteron, cortisol, vitamine D3...*), *thyroxine* en *retinoïne-zuur*.

Deze liganden hebben een hoge halfwaardetijd (uren tot dagen) en spelen ondermeer een belangrijke rol in weefselgroei en –differentiatieprocessen, zoals bijvoorbeeld bij de vrouwelijke vruchtbaarheidscyclus. Retinoïnezuur en de afgeleide retinoiden spelen een zeer voorname rol ondermeer tijdens vroege embryonale ontwikkelingsprocessen. Het *α-ecdysone*, eveneens een cholesterolderivaat, zorgt bij insecten en kreeftachtigen voor differentiatie en uitgroei van de larvale stadia.

De receptoren voor deze liganden vertonen opvallende structurele en functionele gelijkenissen, en worden samen de *nucleaire receptorfamilie* genoemd. De geconserveerde gebieden in deze receptoren tonen aan dat deze receptoren zelf als transcriptiefactor kunnen functioneren. Alle nucleaire receptoren zijn opgebouwd uit een N-terminaal variabel gebied (100-500 aa) dat functioneert als *transactiverend domein (AD)*, gevolgd door een *DNA-bindend domein (DBD)* met een C<sub>4</sub>-zinkvinger motief (~68 aa), en een C-terminaal *ligand-bindend domein (LBD)* (225-285 aa).

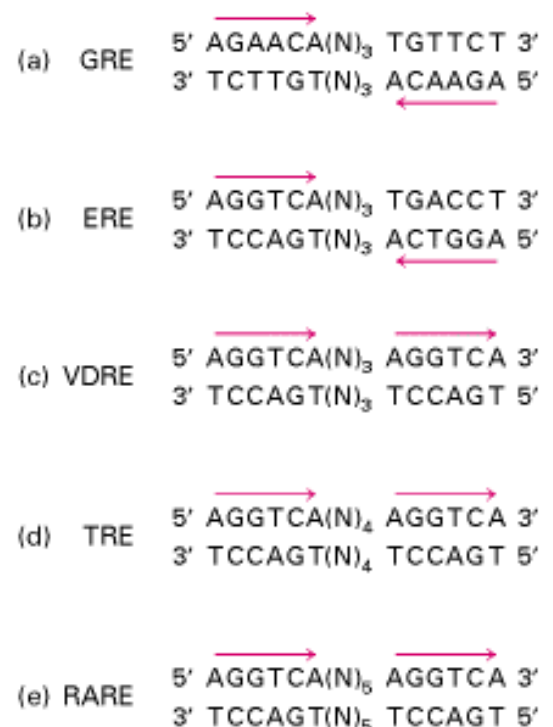


In afwezigheid van ligand bevinden veel van deze receptoren zich in het cytosol, met Hsp90 eiwitten gebonden op het LBD. Ligandbinding op het LBD veroorzaakt een structuurwijziging waardoor het complex met Hsp90 verbroken wordt; daarna kunnen deze receptoren naar de nucleus transloceren.



Eens in de nucleus binden Receptor/Ligand complexen als homo- of hetero-dimeren op specifieke, maar zeer verwante DNA promotor-sequenties: de *Response Element* (*RE's*). Deze sequenties kunnen, afhankelijk van de structuur van het complex, directe of omgekeerd herhaalde motieven zijn. Omgekeerd herhaalde sequenties vinden we bij de Glucocorticoïd Receptor en de Estrogen Receptor.

Bij heterodimere complexen is dikwijls een gemeenschappelijke receptor aanwezig, zoals bij de receptoren voor Vit D3, retinoïnezuur en het thyroïd hormoon, die alle de RXR receptor als tweede component hebben. Het RE is steeds identiek aan dit van de Estrogen Receptor, maar specificiteit hangt hier af van het aantal basen (3, 4 of 5 !) dat de twee motieven scheidt.



Door ondermeer de werking van het transactiverend domein wordt transcriptie van specifieke genen aangedreven. De totale transcriptionele respons gebeurt dikwijls in twee (of meerdere) fasen: een snelle, primaire respons die binnen het uur optreedt, en een secundaire golf van genactivatie of -inactivatie die aangestuurd wordt door genproducten (die dikwijls zelf transcriptie-regulatoren zijn) van de primaire fase. Op deze wijze kan één stimulus een zeer complex effect op het totale gentranscriptie patroon in een cel hebben.

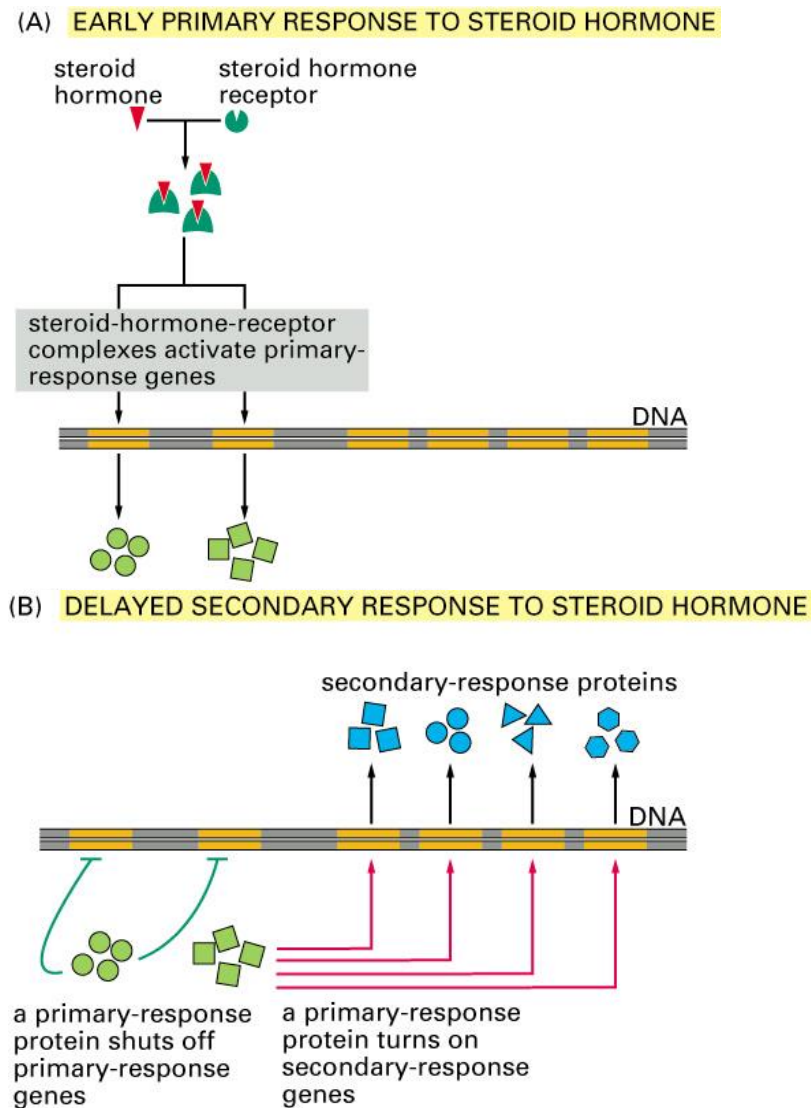


Figure 15-14 part 2 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

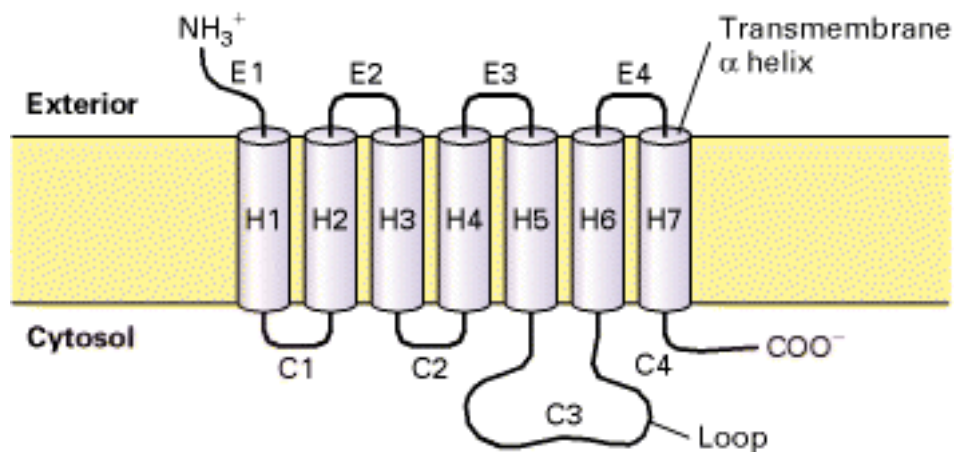
In tegenstelling tot de liganden die binden op intracellulaire receptoren, leiden liganden die binden op membraan-verankerde receptoren niet tot directe regulatie van genregulatie, maar is de werking van specifieke signaaltransductoren vereist. Deze worden geactiveerd via het cytosolische domein van deze receptoren.

## 2.3 G-eiwit gekoppelde receptoren

### 2.3.1 Algemene kenmerken

*G-eiwit gekoppelde receptoren (G Protein Coupled Receptors, GPCR's)* vormen de grootste receptorgroep: ze komen in grote aantallen voor bij alle eukaryoten: bij de mens zijn er minstens 800 GPCRs beschreven, terwijl er bij de muis ongeveer 1000 GPCRs betrokken zijn bij het reukvermogen alleen al. Liganden voor deze receptorklasse zijn meestal klein, maar extreem divers : (poly)peptiden, aminozuur(derivaten), vetzuren, allerlei kleine organische moleculen, licht, enz.

Ondanks deze extreme heterogeniteit van de liganden, is de basisstructuur van GPCR's bijzonder geconserveerd: alle bevatten 7  $\alpha$ -helicale transmembranaire regio's en hebben de N- en C- terminus respectievelijk extracellulair en cytosolisch. Ze worden daarom ook "serpentine" receptoren genoemd.

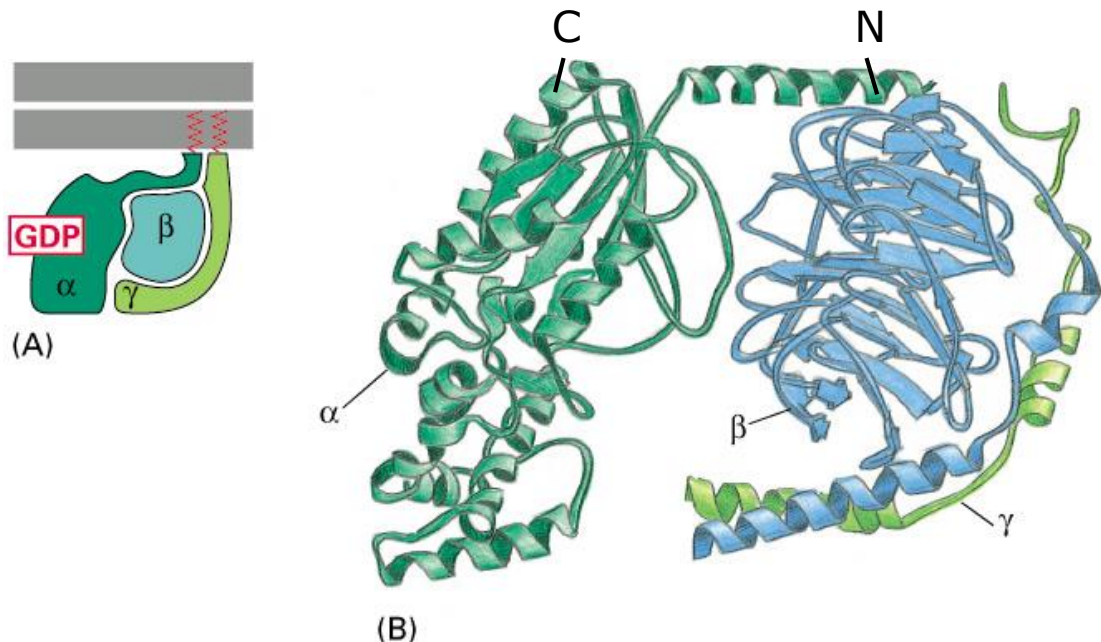


GPCR's zijn van uitzonderlijk belangrijk voor therapeutische interventie: 45 tot 50% van de geneesmiddelen die momenteel op de markt zijn moduleren de werking van GPCR's, en in 2000 waren 26 van de 100 best verkopende farmaceutische producten gericht tegen GPCR's, met een totale verkoopwaarde van ongeveer 25 miljard Euro! Dit komt overeen met bijna 10% van de totale farmaceutische drug-markt.

### 2.3.2 De G-eiwit Cyclus

G-eiwitten zijn *heterotrimere GTP-bindende proteïnen* samengesteld uit 3 verschillende subeenheden :  $G\alpha$ ,  $G\beta$  en  $G\gamma$ .

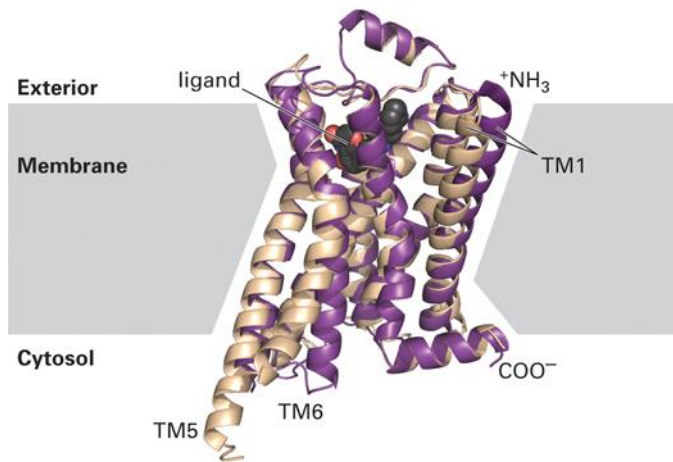
$G\alpha$  en  $G\gamma$  zijn verankerd in de membraan met covalent veresterde vetzuren. In de niet-gestimuleerde, inactieve vorm, bindt  $G\alpha$  GDP.



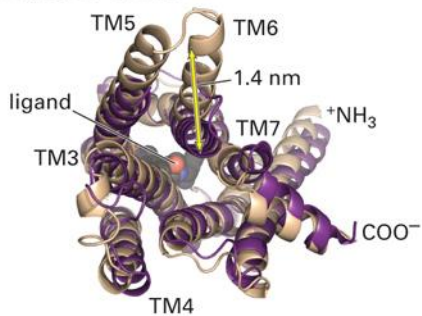
Ligand-binding leidt tot een *structuurwijziging* in de G-eiwit gekoppelde receptor, waarbij de relatieve posities van de transmembranaire  $\alpha$ -helices ten opzichte van elkaar wijzigen. Dit positioneert de cytosolische domeinen zo dat binding van de G-eiwitten mogelijk wordt. Deze binding gebeurt ter hoogte van de C- en N-terminus van de  $G\alpha$  subeenheid. In rusttoestand kan soms ook reeds pre-associatie tussen receptor en G-eiwit optreden.

Deze interactie tussen GPCR en G-eiwit leidt op zijn beurt tot een *structuurwijziging* in de  $G\alpha$  subeenheid van het G-eiwit. Daarna zorgen de G-eiwitten voor activatie van membraan-verankerde enzymen of ion-kanalen. Er komen verschillende types G-eiwitten voor, met specificiteit voor zowel de receptoren als voor de doelwitenzymen of -ionkanalen. Deze geassocieerde G-eiwitten functioneren als aan/af schakelaars, afhankelijk van binding van een GTP of GDP.

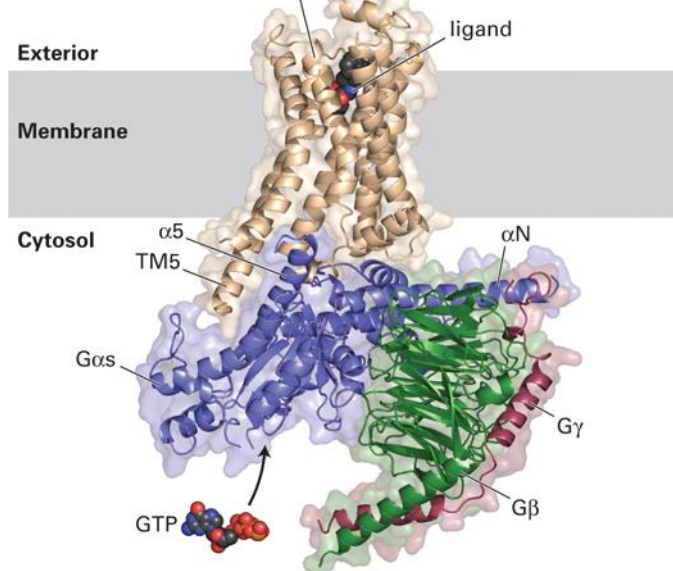
(a) Side view  $\beta$ -adrenergic receptor



(b) View from cytosolic surface



(c)  $\beta$ -adrenergic receptor

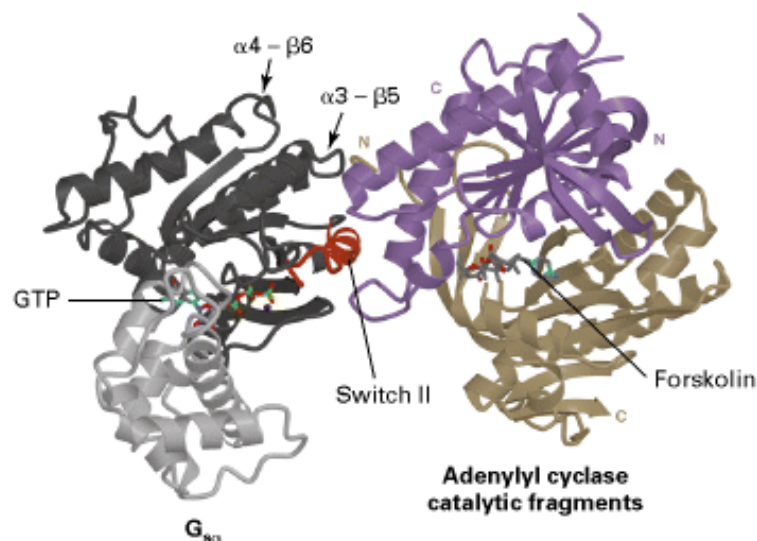


Recent werden de structuren bepaald van de actieve (in complex met agonist) en inactieve (in complex met antagonist)  $\beta$ -adrenerge receptor, een prototypische GPCR (zie verder). Vergelijking van de 3D-structuren toont aan dat er belangrijke wijzigingen zijn in de conformatie van de intracellulaire domeinen van transmembranaire helices 5 (TM5) en 6 (TM6) en in de structuur van de C3 lus, wat een bindingsoppervlak voor de  $\text{G}\alpha$  subeenheid creëert.

G-eiwit activering leidt tot uitwisseling in de  $G\alpha$  subeenheid van GDP met GTP (de cytosolische concentratie van GTP is veel hoger dan deze van GDP) waardoor de structuur van  $G\alpha$  sterk wijzigt, met dissociatie van het heterotrimere complex naar een vrije  $G\alpha$  subeenheid en een  $G\beta\gamma$  dimeer tot gevolg.

Twee domeinen van  $G\alpha$  zijn betrokken bij binding van  $G\beta$  van het  $G\beta\gamma$  dimeer: de N-terminus, dicht bij de membraan, en twee aanpalende gebieden: switch I en switch II. GTP binding leidt tot sterke structuurwijzigingen in de switch-gebieden, met verlies van  $G\beta$  binding tot gevolg.

Na dissociatie blijven zowel de  $G\alpha$  subeenheid als het  $G\beta\gamma$  dimeer in de membraan verankerd, en kunnen vrij diffunderen. Zolang ligand gebonden blijft op de receptor kunnen bijkomende G-eiwitten geactiveerd worden, wat leidt tot *amplificatie* van het signaal. De structuurwijziging in  $G\alpha$  laat nu interactie toe met het doelwitenzyme. Op zijn beurt induceert  $G\alpha$  een structuurwijziging in het doelwitenzyme, met activatie van dat laatste tot gevolg. Binding van een doelwitenzym, het adenylaatcyclase, gebeurt ondermeer ter hoogte van de gewijzigde switch II structuur.

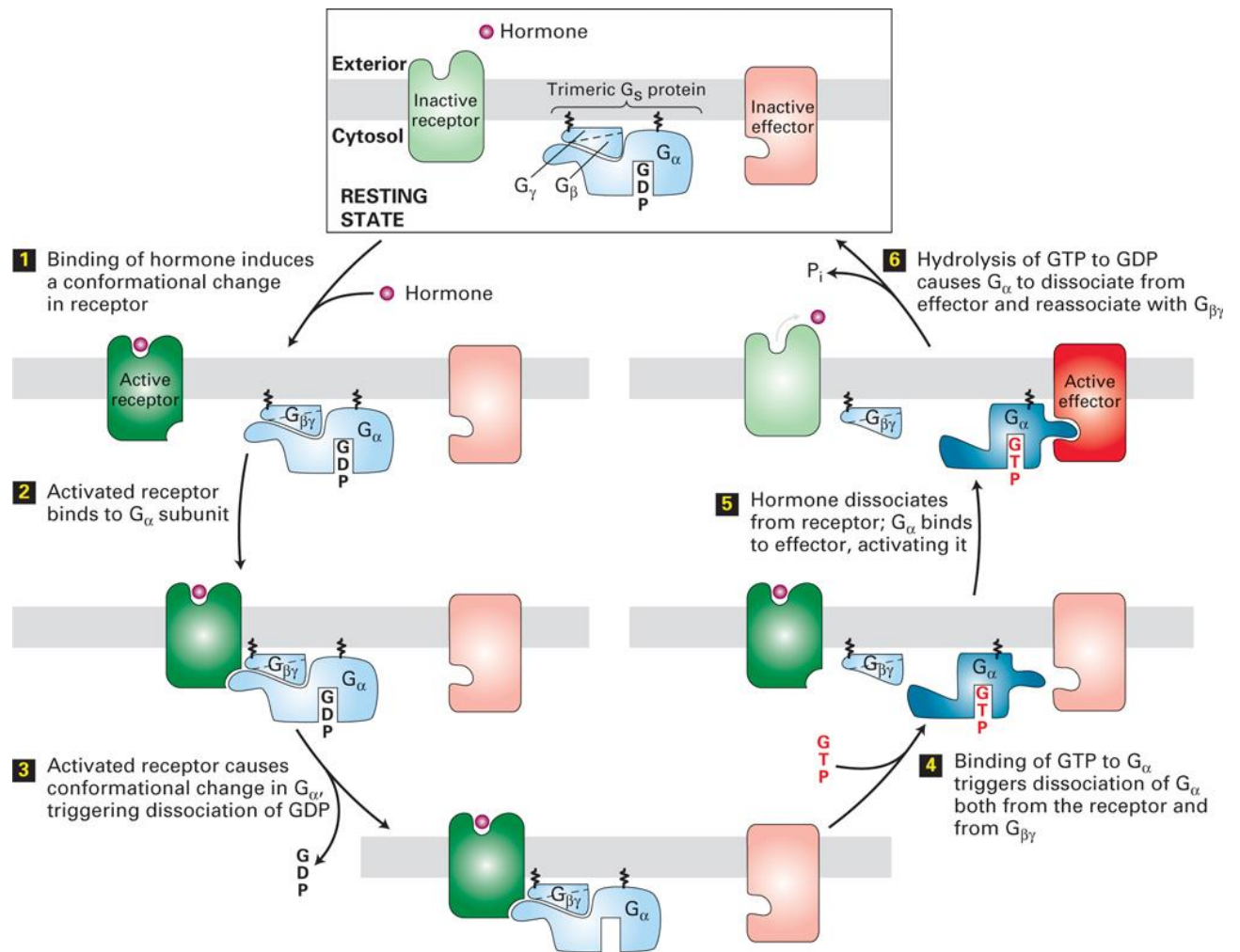


Bij het  $G\beta\gamma$  complex treden geen belangrijke structuurwijzigingen op, maar het vrijgekomen oppervlak kan nu eveneens associatie aangaan met doelwitewitten.

Zeer karakteristiek voor de G-eiwit cyclus is dat de  $G\alpha$  subeenheden zelf GTPase activiteit bezitten, en zichzelf dus opnieuw uitschakelen door de hydrolyse van GTP tot GDP. Dit leidt tot omkering van het volledige gebeuren :  $G\alpha$  dissocieert weer van het enzyme, en bindt opnieuw op  $G\beta\gamma$  met vorming van het inactieve G-eiwit trimeer.



De volledige G-eiwit cyclus is schematisch voorgesteld in onderstaande figuur.



### 2.3.3 De $G\alpha$ subeenheid bepaalt de associatie met effector-eiwitten

Alle effector eiwitten in GPCR signaal cascades zijn hetzij membraangebonden ionenkanalen, hetzij membraangebonden enzymen die de vorming van tweede boodschapper moleculen catalyzeren. De G-eiwitten zelf vormen een uitgebreide familie. Bij de mens coderen 16 genen voor tenminste 21 verschillende  $G\alpha$  subeenheden. Er zijn tevens verschillende  $G\beta$  en  $G\gamma$  subeenheden beschreven, maar voor zover men weet zijn deze grotendeels uitwisselbaar wat functionaliteit betreft. Het zijn dus de verschillende  $G\alpha$  subeenheden die zorgen voor de specificiteit van de verschillende heterotrimere G-eiwitten. Het volledige heterotrimere G-eiwit wordt bijgevolg genoemd naar zijn  $\alpha$  subeenheid. In onderstaande tabel worden de functies van de voornaamste klassen van G-eiwitten samengevat.

$G\alpha$ Class	Associated Effector	2nd Messenger	Receptor Examples
$G_{\alpha s}$	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	$\beta$ -Adrenergic (epinephrine) receptor; receptors for glucagon, serotonin, vasopressin
$G_{\alpha i}$	Adenylyl cyclase $K^+$ channel ( $G_{\beta\gamma}$ activates effector)	cAMP (decreased) Change in membrane potential	$\alpha_2$ -Adrenergic receptor Muscarinic acetylcholine receptor
$G_{\alpha olf}$	Adenylyl cyclase	cAMP (increased)	Odorant receptors in nose
$G_{\alpha q}$	Phospholipase C	$IP_3$ , DAG (increased)	$\alpha_1$ -Adrenergic receptor
$G_{\alpha o}$	Phospholipase C	$IP_3$ , DAG (increased)	Acetylcholine receptor in endothelial cells
$G_{\alpha t}$	cGMP phosphodiesterase	cGMP (decreased)	Rhodopsin (light receptor) in rod cells

\*A given  $G\alpha$  subclass may be associated with more than one effector protein. To date, only one major  $G_{\alpha s}$  has been identified, but multiple  $G_{\alpha q}$  and  $G_{\alpha i}$  proteins have been described. Effector proteins commonly are regulated by  $G\alpha$  but in some cases by  $G_{\beta\gamma}$  or the combined action of  $G\alpha$  and  $G_{\beta\gamma}$ .  $IP_3$  = inositol 1,4,5-trisphosphate; DAG = 1,2-diacylglycerol.

SOURCES: See L. Birnbaumer, 1992, *Cell* 71:1069; Z. Farfel et al., 1999, *New Eng. J. Med.* 340:1012; and K. Pierce et al., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.

### 2.3.4 Kenmerken van een G-eiwit gekoppeld systeem

- **Het signaal gebeurt in tijdsquanta.** Zolang de  $G\alpha$  subeenheid een GTP molecule bevat blijft ze in de actieve conformatie bestaan, dus onafhankelijk van de aanwezigheid van het ligand op de receptor. Aangezien ze zelf GTP hydrolyseert bepaalt de kinetiek van deze hydrolyse de duur van activatie, en is dus een intrinsieke eigenschap van het G-eiwit. Dit is hier in de orde van seconden, zodat een korte puls gegenereerd wordt. (Bij Ras-eiwitten is dit beduidend langer: ongeveer een minuut, zie verder sectie 2.4.3). De GTPase activiteit van  $G\alpha$  werkt dus als een timer, die de duur bepaalt van de interactie tussen  $G\alpha$  en het doelwit-enzyme, en dus van de activatie van deze laatste.
- **Het signaal is zelf-uitdovend.** Van zodra dissociatie gebeurt van het hormoon van de receptor zal, als gevolg van de intrinsieke GTP-ase activiteit van  $G\alpha$  het signaal uitdoven. Een langdurig signaal vereist dus continue aanwezigheid van het ligand op de receptor. Het is belangrijk hierbij te vermelden dat de volgende stap in de signaalbaan ook kortlevend is. Zo wordt bijvoorbeeld cAMP snel gehydrolyseerd tot AMP door cAMP fosfodiësterasen. Dergelijke enzymen staan zelf onder controle van andere stimuli, een voorbeeld van de kruiswerking tussen verschillende signaalbanen.
- **Het signaal wordt geamplificeerd.** Dit is noodzakelijk omdat de cellulaire effecten tot miljoenen cAMP moleculen per cel vereisen, terwijl slechts enkele duizenden receptoren voorkomen. Dit wordt op twee manieren gerealiseerd. Enerzijds doordat receptoren en G-eiwitten vrij kunnen diffunderen in de membraan. Daardoor kan één enkel hormoon/receptor complex een honderdtal G-eiwitten activeren. Anderzijds doordat koppeling gebeurt naar de katalytische activiteit van een doelwit-enzyme. Het enzym adenylaatcyclase zal bijvoorbeeld instaan voor de productie van zeer veel cAMP moleculen.

## 2.3.5 Adrenerge Receptoren als model

In deze sectie zullen we de *adrenerge receptoren* als voorbeeld voor de GPCR receptorklasse in meer detail bespreken.

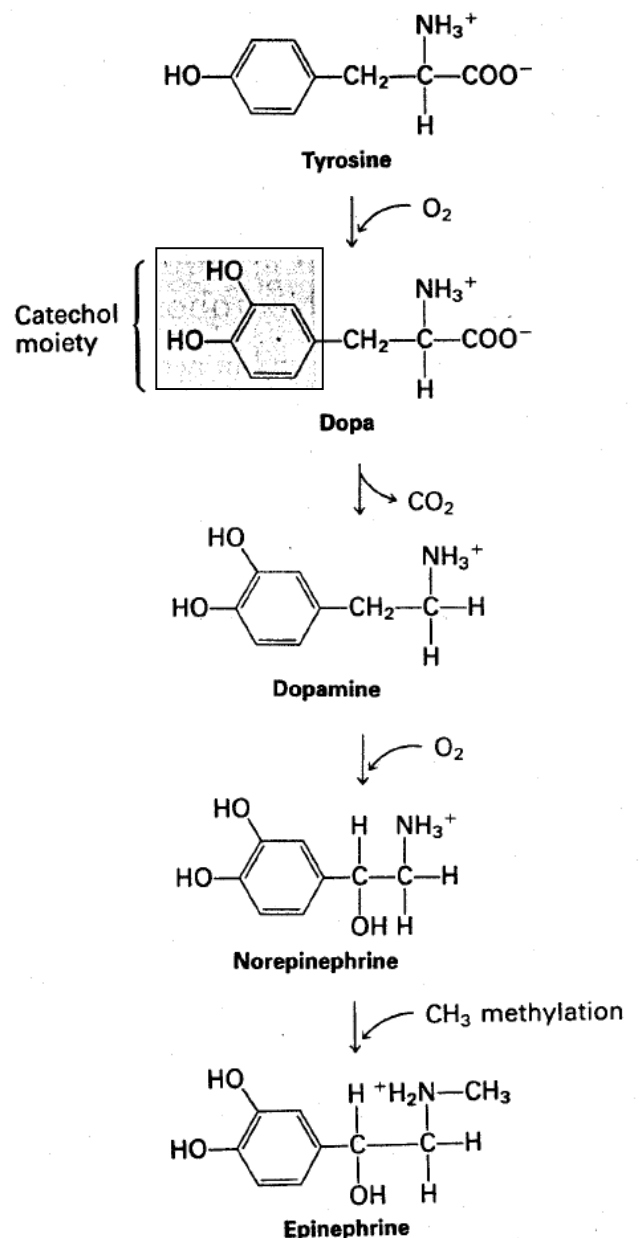
### 2.3.5.1 De catecholamines

*Catecholamines* (dopa, dopamine, noradrenaline en adrenaline) worden gesynthetiseerd vanuit tyrosine. Adrenaline en noradrenaline kunnen zowel als hormoon of als neurotransmitter functioneren.

*Noradrenaline* is de neurotransmitter ter hoogte van synaptische verbindingen met gladde spiercellen (sympatisch autonome motorische neuronen), alsook ter hoogte van synapsen in het centraal zenuwstelsel.

*Adrenaline* wordt aangemaakt door cellen in de medulla of merg van de bijnier (deze cellen zijn embryologisch verwant aan neuronale cellen) en wordt vrijgesteld in het bloed. De halfwaardetijd is seconden zodat een zeer kortstondig signaal gegeven wordt.

Deze hormonen zijn gekenmerkt door aanwezigheid van een *catechol-groep*.



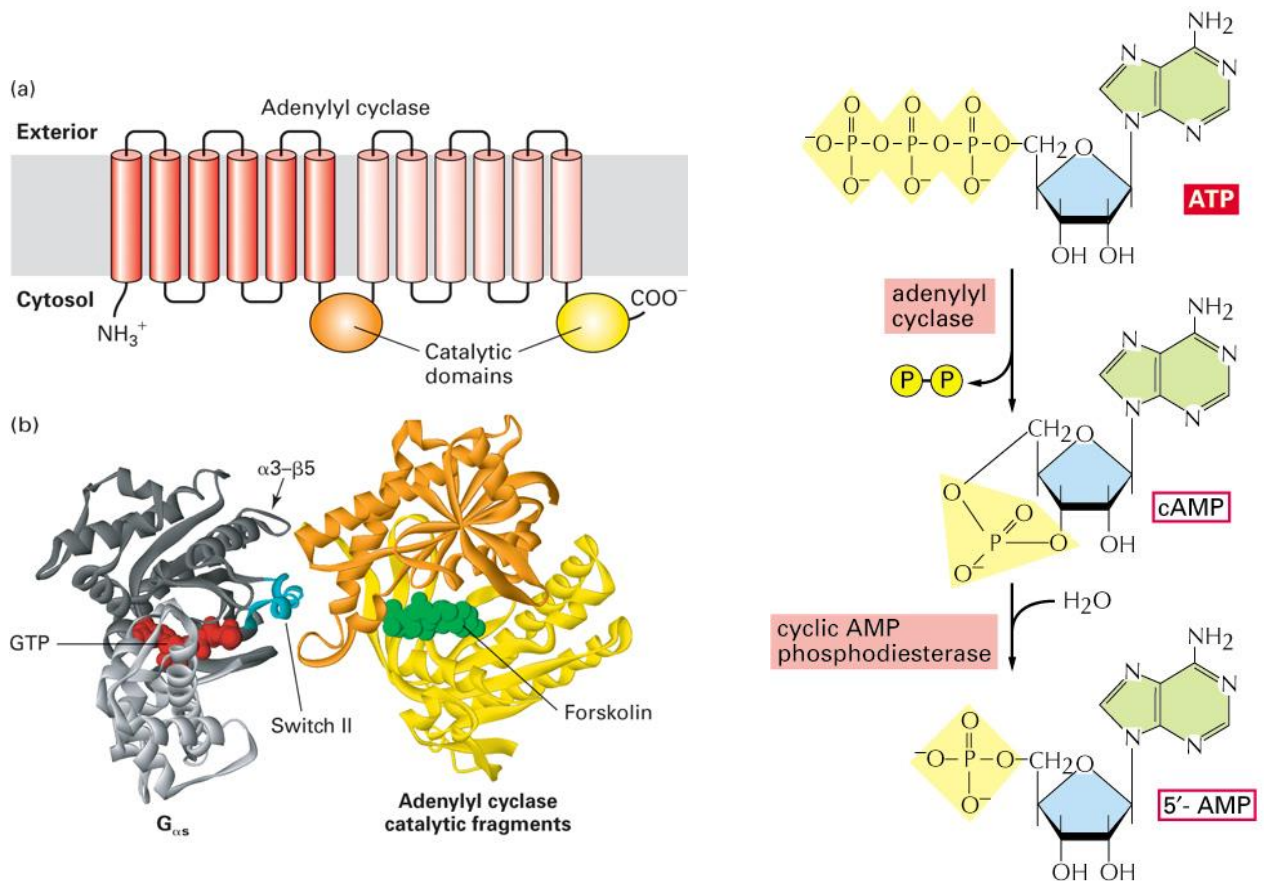
Adrenaline kan binden op 2 types GPCR's: de  $\alpha$ - en  $\beta$ -adrenerge receptoren, die verschillende subtypes receptoren ( $\alpha1A, \alpha1B, \alpha1D, \alpha2A, \alpha2B, \alpha2C, \beta1, \beta2$  en  $\beta3$ ) omvatten. In totaal zijn dus 9 verschillende GPCR's gekend waarop adrenaline kan binden.

Adrenaline speelt een belangrijke rol bij stress-reacties, waarbij het organisme nood heeft aan extra energie (zware inspanning of de "fight-or-flight" reactie). Deze kan snel (in seconden) bekomen worden door vrijstelling van *glucose* door glycogeenafbraak in de lever, en door afbraak van triacylglycerolen tot *vetzuren* in de vetgranules van adipocyten.

Bij zoogdieren worden beide metabolische processen geïnduceerd door binding van (nor-)adrenaline op de zogenaamde  $\beta$ -adrenerge receptoren op levercellen en adipocyten. Hetzelfde type receptor komt ook voor op hartspiercellen en activatie leidt hier tot verhoogd contractie-ritme, zodat een snellere bloedvoorziening naar de spieren gerealiseerd wordt. Tenslotte leidt stimulatie van opnieuw dit receptortype op gladde spiercellen van het darmkanaal tot relaxatie.

Een ander type receptor, de  $\alpha2$ -adrenerge receptor komt voor op gladde spiercellen langs de bloedvaten rondom het darmkanaal, huid en nieren. Stimulatie leidt tot vasoconstrictie zodat de bloedtoevoer hier verlaagd wordt. Het gezamenlijk netto-effect van de werking van adrenaline op verschillende celtypes (pleiotropie) is dus optimale energietoever naar de bewegingsspiers.

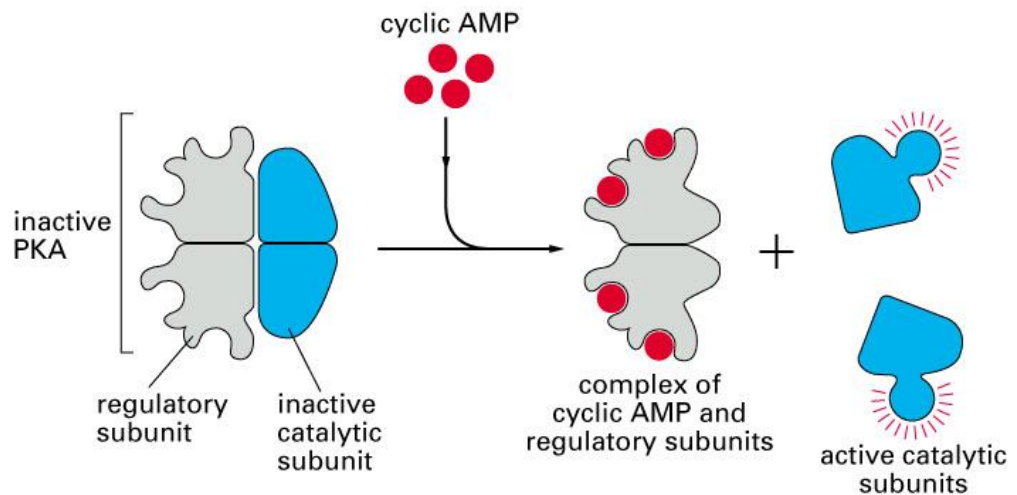
Veel van de zeer uiteenlopende effecten veroorzaakt door activering van de  $\beta$ -adrenerge receptoren worden veroorzaakt door koppeling naar het *adenylaat-cyclase*. Dit enzyme staat in voor de synthese van cAMP uit ATP. De normale cytosolische cAMP concentratie is ongeveer  $10^{-7}$  M, en kan na een stimulus binnen enkel seconden 20-voudig stijgen. cAMP wordt omgezet tot AMP door een cAMP-fosfodiesterase, waardoor het signaal zal uitdoven.



### 2.3.5.2 De rol van cAMP

Het effect van een verhoogde cAMP concentratie verschilt sterk van cel tot cel. Deze verscheidenheid wordt verklaard door de aanwezigheid van verschillende *cAMP-afhankelijke eiwit-kinasen (PKA's)*, die bovendien de signaaltransductie verder overdragen op cel-specifieke substraten: enzymen en transcriptiefactoren. Bij de inductie van specifieke genen speelt ondermeer ook de specifieke condensatietoestand van het DNA een belangrijke rol.

PKA's zijn tetrameren, opgebouwd uit 2 regulatorische en 2 katalytische subeenheden. Ze zijn inactief in de tetramere vorm, maar binding van cAMP leidt tot dissociatie van de katalytische eiwitten. Binding van cAMP door de regulatorische segmenten gebeurt coöperatief: eens een eerste cAMP molecule gebonden is, verlaagt dit de bindings  $K_D$  voor cAMP op de tweede regulatorische module. Bijgevolg kunnen relatief geringe concentratiestijgingen van cAMP leiden tot volledige activatie van PKA.

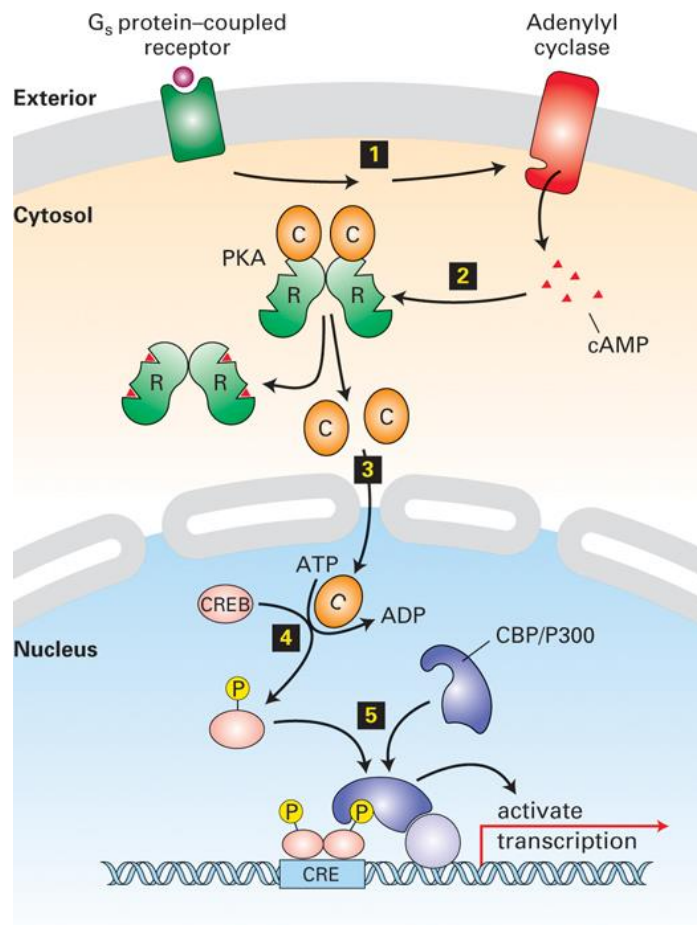


Het cellulair effect van PKA-activatie via  $\beta$ -adrenerge receptoren is substraat-afhankelijk. Meerdere verschillende enzymen in de doelwitcellen kunnen simultaan gereguleerd worden met een optimale respons tot gevolg. Een voorbeeld hiervan vinden we in de spier- en levercellen, waar stimulus leidt tot de vrijstelling van glucose uit glycogeen. Dit wordt verklaard door:

- enerzijds inactivatie van het glycogeen-synthase
- anderzijds activatie van glycogeen fosforylase kinase (dat op zijn beurt glycogeen fosforylase activeert dat het glycogeen afbreekt tot glucose-1-fosfaat).

In zowel spier- als levercellen wordt glucose-1-fosfaat omgezet tot glucose-6-fosfaat. In spiercellen wordt deze metabooliet in de glycolyse baan verder omgezet met vrijstelling van ATP; in de levercellen wordt glucose-6-fosfaat gedefosforyleerd tot glucose en vrijgesteld in het bloed, en kan als dusdanig ook door spiercellen opgenomen worden.

Behalve cytoplasmatische enzymen kan PKA ook de activiteit van transcriptiefactoren moduleren en zo genexpressiepatronen beïnvloeden. De meest bekende transcriptiefactor die door PKA wordt gereguleerd is het "cAMP-responsief-element-bindend eiwit" of CREB. Na dissociatie van de regulatorische subeenheden kunnen de PKA catalytische subeenheden migreren naar de nucleus waar ze CREB fosforyleren op een welbepaald serine residu. Dit leidt tot de binding van CREB op responsieve elementen (CREs) in de promotoren van doelwitgenen en tot de recuterings van transcriptionele co-activatoren waarvoor de door PKA aangebrachte fosfaatgroep op CREB een herkenningsplaats is.

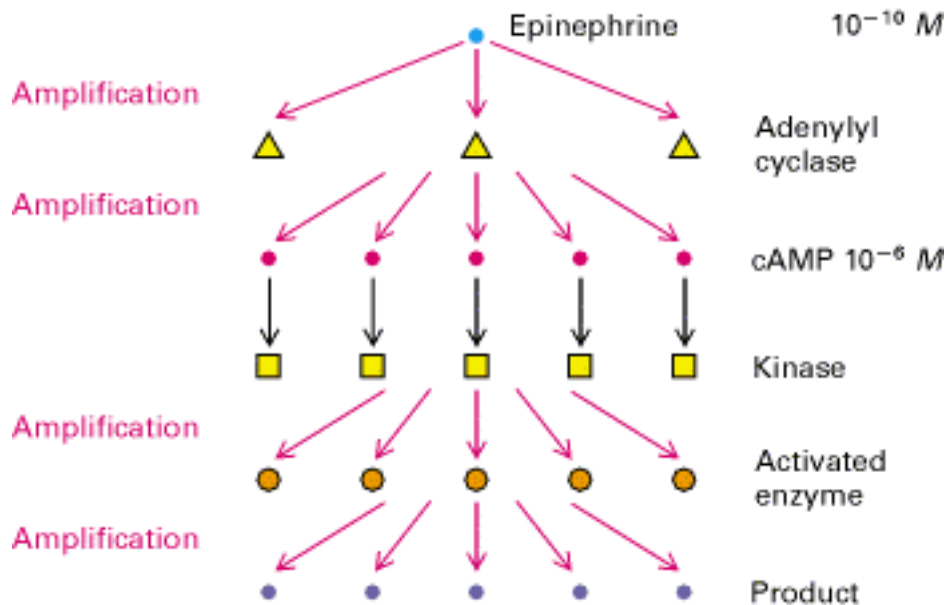


Eiwit-fosforylatie cascades, zoals deze door (nor)adrenaline geïnitieerd, komen veel voor bij signaaltransductie (zie volgend hoofdstuk). Ze dragen bij tot *signaaldiversificatie* en *-amplificatie*.

*Diversificatie* van het signaal binnenin een cel is dikwijls vereist om een maximale respons te bekomen: tegelijkertijd wordt de glycogeensynthese geïnhibeed, en wordt de glycogeenafbraak gestimuleerd. Samen met het pleiotrope gedrag van adrenaline op verschillende celtypes in het lichaam zorgt dit voor een optimale orchestratie van de adrenaline werking.



*Amplificatie* is noodzakelijk opdat het initieel beperkte signaal toch fysiologische effecten zou hebben. Een  $10^{-10}$  M adrenaline-concentratie in het bloed kan op deze wijze leiden tot een verhoging van de glucose bloedspiegel tot 50%, via stimulatie van slechts een duizendtal receptoren per doelwitcel!



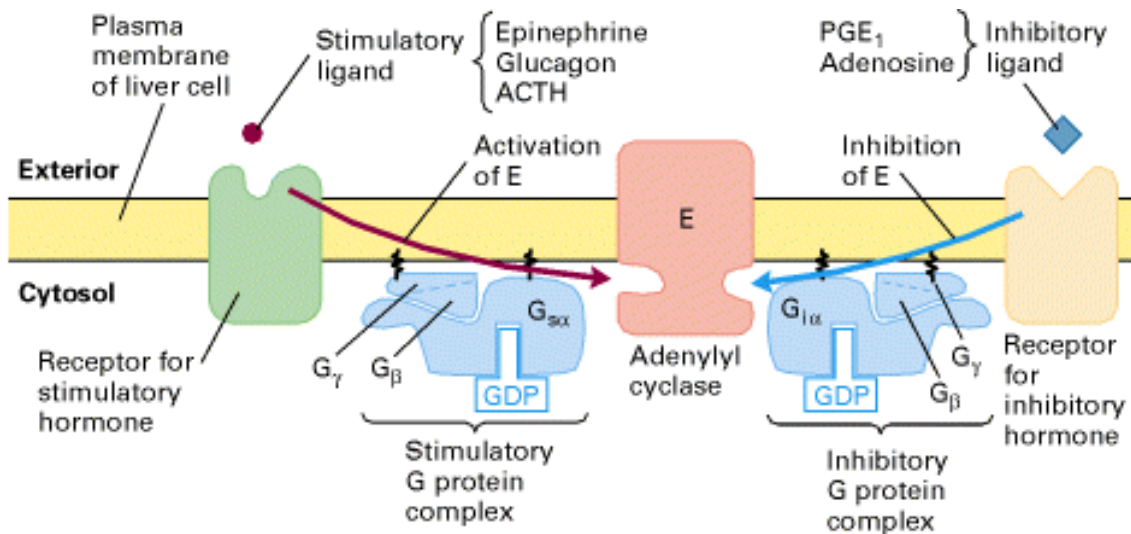
Zoals vermeld zijn de effecten ook erg celtype-specifiek. In adipocyten beïnvloedt activatie van  $\beta$ -adrenerge receptoren het metabolisme van triacyl-glycerolen. Hier is een lipase aanwezig dat na fosforylatie door het PKA aanwezig in deze vetcellen geactiveerd wordt, en vetzuren vrijstelt.

Binnenin één enkele cel kan het effect van cAMP ook variëren. Zo dient de werking van cAMP op het cytoskelet in migrerende cellen beperkt te blijven tot het bewegend uiteinde. Dit wordt gerealiseerd door verankering van inactieve PKA's via de regulerende subeenheden door de AKAP's (*cAMP Kinase Anchor Proteins*).

We hebben reeds vermeld dat adenylaatcyclase en cAMP een cruciale rol spelen bij verschillende hormoon/receptorsystemen. Ook kan een cel, afhankelijk van zijn receptor-set, onder invloed staan van meerdere verschillende stimuli.

Op levercellen binden glucagon, adrenaline en ACTH op verschillende serpentine receptoren, maar receptor-activatie leidt in deze gevallen op analoge wijze tot activatie van adenylaatcyclase. Beide hormonen versterken dus elkaars effect.

Het prostaglandine  $PGE_1$  en adenosine werken daarentegen inhiberend. Dit is te verklaren doordat hun receptoren met een ander G-eiwit associëren, dat opgebouwd is uit dezelfde  $\beta\gamma$ -subeenheden, maar een andere  $\alpha$ -component:  $G_{i\alpha}$ . De koppeling met het adenylaatcyclase gebeurt op zeer analoge wijze, maar het enzyme wordt *geïnhibeerd* door binding van het  $G_{i\alpha}$ .

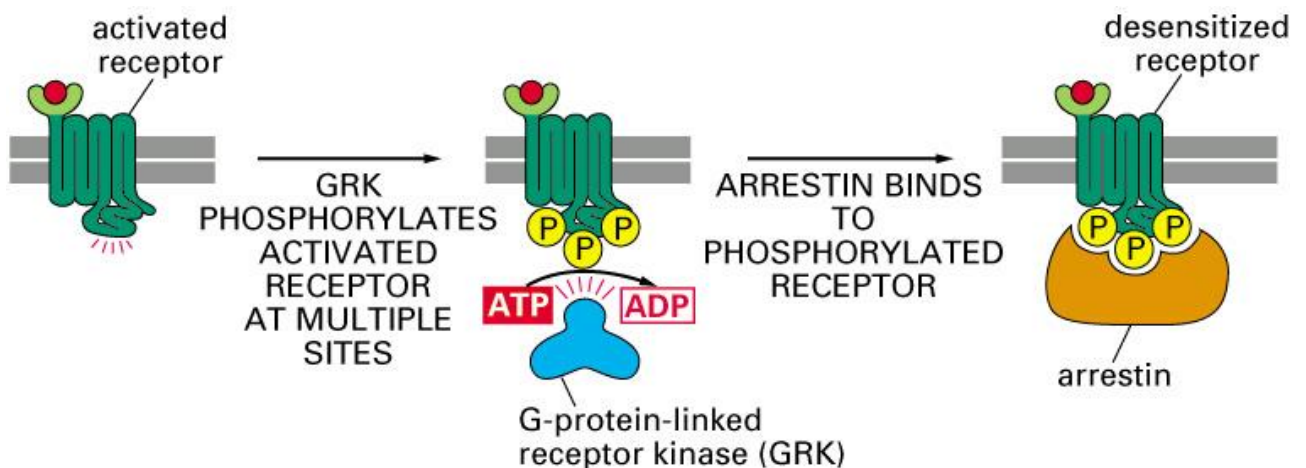


### 2.3.5.3 Terugkoppelingsmechanismen

Terugkoppeling van het signaal in de doelwit-cel wordt gerealiseerd op verschillende niveau's:

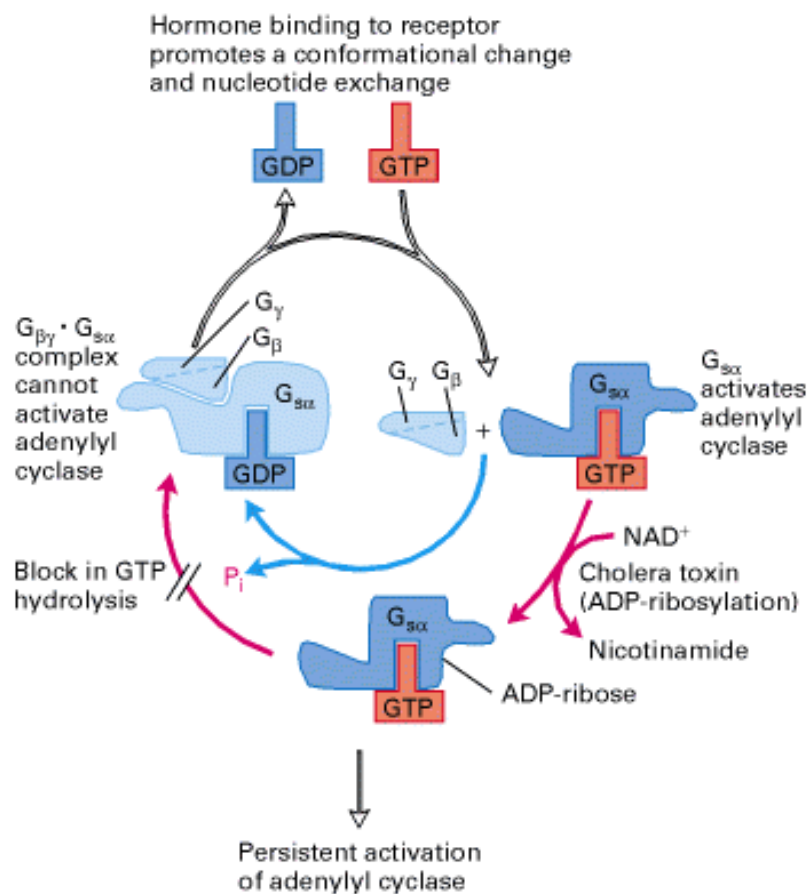
- inactivering van de  $G\alpha$  subeenheden van de G-eiwitten door hun intrinsieke GTPase activiteit
- terugkoppeling van de werking van de doelwit-enzymen glycogeensynthase, glycogeen fosforylase kinase en glycogeen fosforylase door fosfatasen die de P-serine of P-threonine residu's defosforyleren
- omzetting van cAMP naar AMP door een specifiek cAMP-fosfodiësterase
- werking van *GPCR-kinasen* (GRK's) en *arrestines*:

Geactiveerde receptoren worden door deze GRK's gefosforyleerd op Ser/Thr residu's, wat binding toelaat van een arrestine. Dit leidt tot ont koppeling van de receptor omdat G-eiwitten niet meer kunnen binden, maar bovendien fungeren arrestines als adaptor eiwitten die de receptor in clathrin-coated pits positioneren en induceren endocytose. Hierna kan de receptor worden afgebroken.



#### 2.3.5.4 Werking van cholera toxine en pertussis toxine.

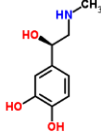
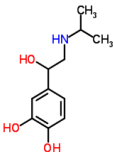
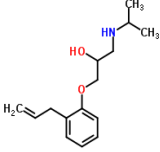
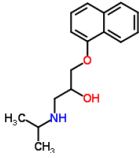
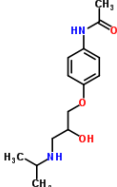
*Vibrio cholerae*, de ziekteverwekker van cholera, produceert een toxine dat massieve diarree met zeer hoog waterverlies veroorzaakt. Dit toxine is een heterodimeer eiwit: een B-eenheid die bindt op specifieke receptoren op intestinale epitheelcellen, en daardoor de A-eenheid, een ADP-ribosyl-transferase, doorheen de celmembranbarrière loodst. Eens in het cytosol katalyseert het de transfer van de ADP-ribose groep van NAD<sup>+</sup> op de arginine-174 zijketen van de G<sub>sα</sub>-subeenheid. Daardoor wordt de GTP-ase activiteit geblokkeerd, zodat G<sub>sα</sub> permanent geactiveerd blijft. Deze continuë verhoging van cAMP verstoort de normale werking van de epitheelcellen van het darmkanaal, wat leidt tot sterk verhoogde secretie van Na<sup>+</sup>-ionen en water in het lumen van het darmkanaal.



Pertussis-toxine wordt gesecreteerd door *Bordetella pertussis*, de verwekker van kinkhoest. Het werkt op zeer analoge wijze door ADP-ribose transfer op G-eiwitten. Eén daarvan is G<sub>iα</sub>, zodat de associatie met de receptor verstoord is. Dit leidt dus tot afwezigheid van een negatieve stimulus.

### 2.3.5.5 Ligand-analogen als geneesmiddel

Chemisch gesynthetiseerde analogen (van adrenaline) vallen uiteen in twee klassen: enerzijds *agonisten*, die de werking van het natuurlijke ligand nabootsen, en anderzijds *antagonisten*, die de werking inhiberen. Deze laatste groep bindt wel op de receptor, en als dusdanig kunnen ze adrenaline van zijn receptor verdringen, maar activeren zelf de receptor niet. Het gedrag van dergelijke analogen kan veel leren over de manier waarop het ligand met zijn receptor associeert en deze activeert.

<u>Structure</u>	<u>Compound</u>	<u>K<sub>D</sub> for binding to frog erythrocyte receptor</u>
	Epinephrine	5 X 10 <sup>-6</sup> M
	Isoproterenol	0.4 X 10 <sup>-6</sup> M
	Alprenolol	0.0034 X 10 <sup>-6</sup> M
	Propranolol	0.0046 X 10 <sup>-6</sup> M
	Practolol	21 X 10 <sup>-6</sup> M

Vergelijking van de moleculaire structuur en de activiteit van dergelijke analogen toont aan dat:

- de catechol-groep absoluut vereist is voor receptor-activatie
- de zijketen met de amino-groep bepalend is voor de bindings-affiniteit. Dergelijke analogen kunnen een beduidend hogere affiniteit voor de receptor hebben dan het natuurlijke ligand.

Bij mensen zijn drie types  $\beta$ -adrenerge receptoren goed gekarakteriseerd. Onderscheid tussen deze verschillende types kan gemaakt worden op basis van de celspecifieke expressie, en van de bindingsaffiniteiten voor de diverse natuurlijke liganden en synthetische analogen.

Type	expressie	affiniteit
$\beta_1$	hartspiercellen	Isoproterenol > noradrenaline > adrenaline
$\beta_2$	gladde spiercellen bronchiën	isoproterenol >> adrenaline > noradrenaline
$\beta_3$	adipocyten	Isoproterenol = noradrenaline > adrenaline.

Een belangrijke toepassing voor analogen ligt in de mogelijkheid tot selectieve binding en activatie of inactivatie van één van beide receptoren:

*beta-blokkers (practolol)* zijn selectief voor de  $\beta_1$ -adrenerge receptor, en worden ondermeer gebruikt om hartritme-stoornissen te corrigeren;

*terbutaline* bindt daarentegen selectief op  $\beta_2$ -adrenerge receptoren en vindt een toepassing in asthma.

Volledigheidshalve vermelden we dat sommige types  $\alpha$ -adrenerge receptoren eveneens goed gekarakteriseerd zijn:

*$\alpha_1$ -adrenerge receptoren*, voornamelijk voorkomend op de postsynaptische membraan van gladde spieren en kliercellen.

*$\alpha_2$ -adrenerge receptoren*, voornamelijk ter hoogte van zenuwuiteinden en postsynaptische cellen.

De bindingsaffiniteitsvolgorde voor beide is :

adrenaline = noradrenaline, ongevoelig voor isoproterenol.

## 2.4 Receptoren met enzymatische werking

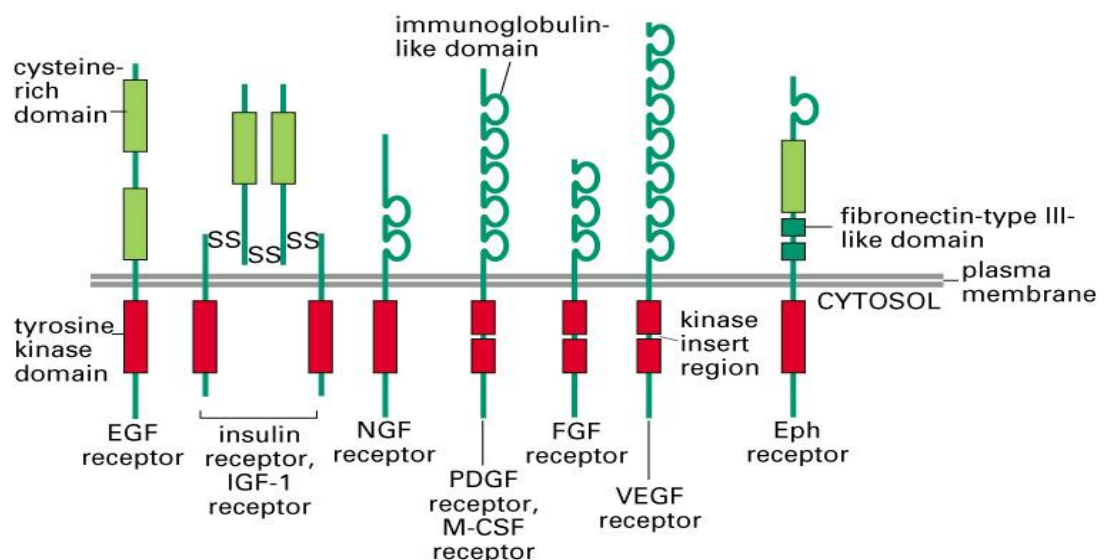
### 2.4.1 Algemene kenmerken

Receptoren met intrinsieke enzymatische activiteit vormen een tweede grote familie van membraan-geassocieerde receptoren. De voornaamste groep hierbinnen zijn de tyrosine-kinase receptoren (*Receptor Tyrosine Kinases, RTK's*). Liganden voor deze receptoren zijn polypeptiden, die zowel gesecreteerd als membraan-verankerd kunnen voorkomen. Voorbeelden zijn eiwit-hormonen zoals insuline of groeifactoren zoals Epidermale Groei Factor (EGF).

Signalisatie via deze receptoren beïnvloedt zeer verscheiden processen in de doelwit-cel : bevordering van cel-overleving, stimulatie van de celcyclus, inductie van differentiatie... Mutaties in dergelijke receptoren kunnen bijgevolg leiden tot ondermeer celtransformatie en ontwikkelingsstoornissen.

cAMP wordt als secundaire boodschapper niet gebruikt door de receptoren met tyrosine-kinase activiteit.

De structuur van het extracellulair domein van deze receptoren is zeer verscheiden, en dikwijls gekenmerkt door het voorkomen van geconserveerde "modules" zoals immunoglobuline- en fibronectine-achtige domeinen. Bij het ontstaan van deze uitgebreide waaier aan receptor-types heeft exon-shuffling wellicht een zeer belangrijke rol gespeeld. Enkele voorbeelden zijn hieronder weergegeven:



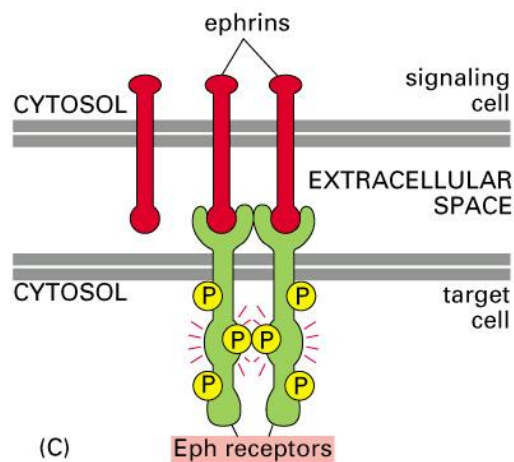
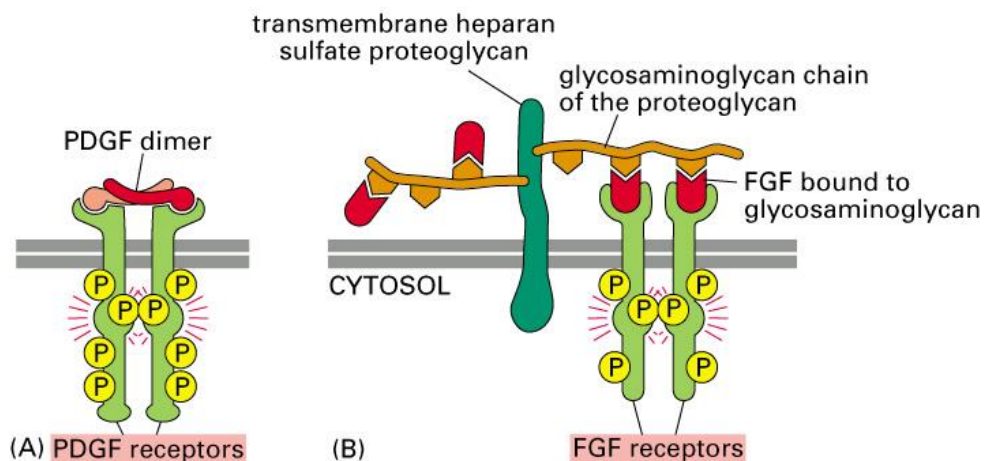
Deze receptoren zijn steeds opgebouwd uit één ligand-bindend extracellulair domein (met de NH<sub>2</sub>-terminus extracellulair), één transmembraan gebied, gevolgd door het cytoplasmatisch domein met de katalytische tyrosine-kinase functie.

Ligand-geïnduceerde dimerisatie (of reorganisatie van een voorgevormd receptor complex) brengt de cytoplasmatische domeinen bijeen, waardoor het tyrosine-kinase domein de partner receptor kan fosforyleren op tyrosine-residus: *receptor autofosforylatie*.

Dit proces gebeurt in twee stappen. Eerst gebeurt fosforylatie op de *activatielus* gelegen bij de actieve plaats van de partner receptor. Dit wordt mogelijk doordat de ligand-geïnduceerde receptor dimerisatie of reorganisatie de kinase domeinen optimaal ten opzichte van elkaar positioneert. Fosforylatie van de activatielus leidt tot een lokale structuurwijziging, met een sterke verhoging van de katalytische activiteit van het kinase tot gevolg. Dit kan verklaard worden door betere binding van ATP (zoals bij de insuline receptor) of door betere binding van de substraten (veel groeifactor receptoren). Daarna gebeurt fosforylatie van tyrosine residus op de cytosolische domeinen van de receptoren.

Ligand-geïnduceerde receptor activatie kan op verschillende wijzen gebeuren.

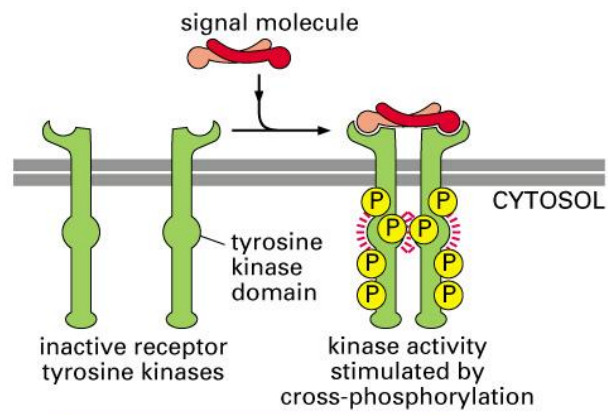
- (A) het ligand is een (covalent) dimeer
- (B) monomere liganden komen gebonden voor op proteoglycanen
- (C) membraanverankerde liganden komen in aggregaten voor. In dit geval zijn de gesecreteerde liganden inactief.



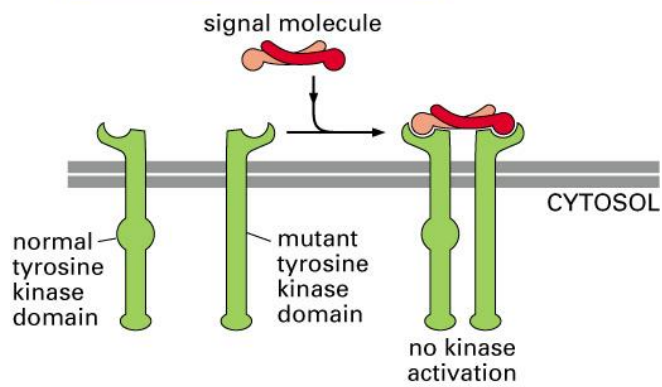


Een gevolg van dit activatiemechanisme is dat *dominant-negatieve* receptor-mutanten kunnen voorkomen.

Een voorbeeld hiervan zijn receptoren met een geïnactiveerd kinase-domein.



(A) NORMAL RECEPTOR ACTIVATION



(B) DOMINANT-NEGATIVE INHIBITION BY MUTANT RECEPTOR

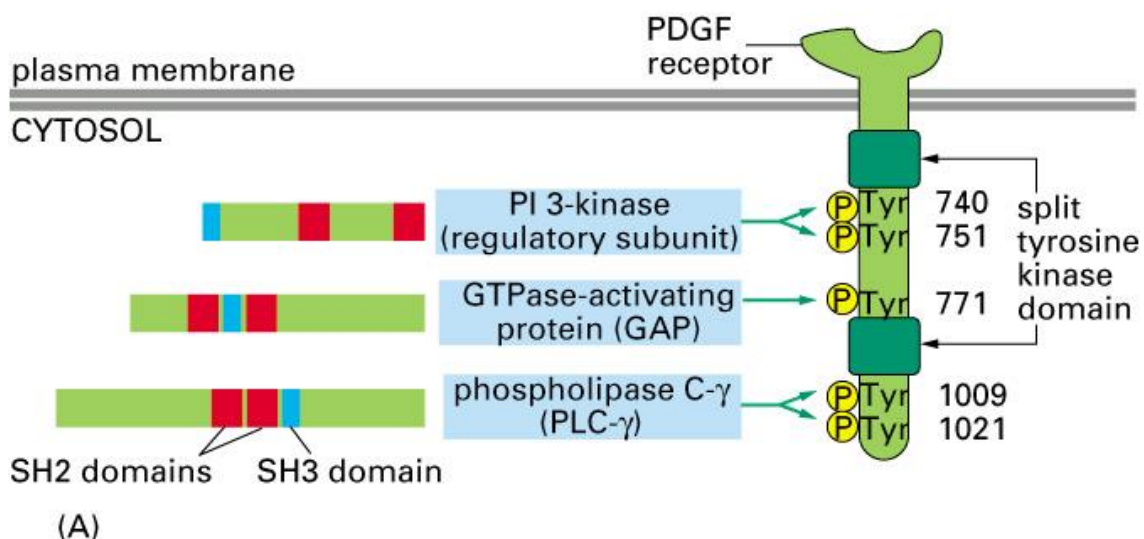
## 2.4.2 Interactie van fosfo-tyrosine met signaal-eiwitten

Gefosforyleerde tyrosines vormen de directe interactieplaatsen met de signaal-transductoren. Twee eiwitmodules die binden op pY zijn het SH2 domein (Src-Homology) en, in mindere mate, het PTB domein (Phospo-Tyrosine Binding).

Talrijke eiwitten bevatten dergelijke pY bindingsdomeinen, en associëren met geactiveerde receptoren:

- Enzymes* - eiwitkinasen (Src-kinase)
- fosfatidyl-inositol-3-kinase (PI<sub>3</sub>K)
  - fosfolipase C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>)
  - GTP-ase activerend proteïne (GAP)
  - eiwitfosfatasen (SHP)

*Adaptors.* Dit zijn koppel-eiwitten die door interacties een fysische brug leggen tussen de receptor en andere signaaltransductoren. Zelf bezitten ze geen enzymatische werking. Adaptors kunnen multifunctioneel zijn, en koppeling naar meerdere signaalbanen toelaten: een voorbeeld hiervan zijn de IRS (*insulin receptor substrate*) eiwitten bij signaaloverdracht via de insuline receptor. Sommige adaptors spelen een rol bij negatieve terugkoppelen, zoals *c-Cbl* dat koppelt naar ubiquitine ligasen en het proteasoom.



Veel informatie over aankoppeling van signaal-eiwitten werd bekomen door mutagenese studies: vervangen van tyrosines 740 en 751 door fenylalanine residu's (PDGFR Y740F / Y751F) leidt bijvoorbeeld tot verlies van aankoppeling van PI<sub>3</sub>K, maar heeft geen effect op GAP of PLC- $\gamma$  binding.

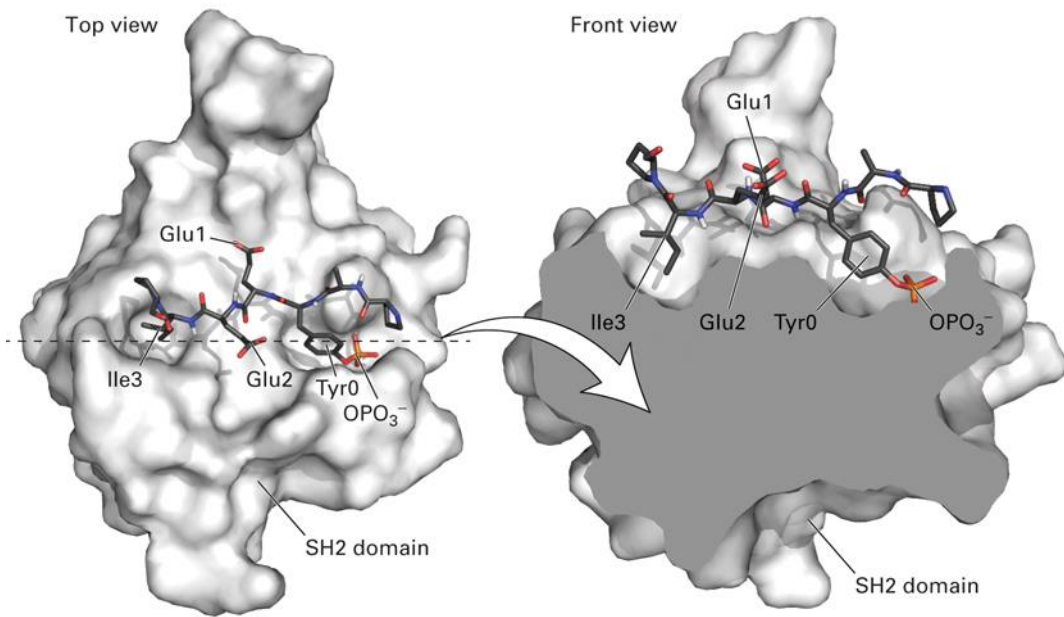
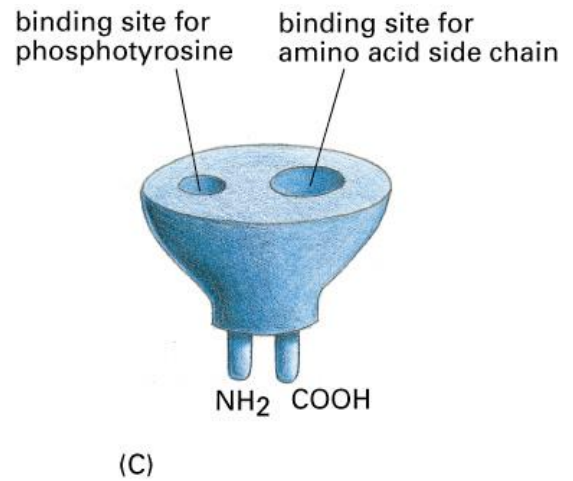
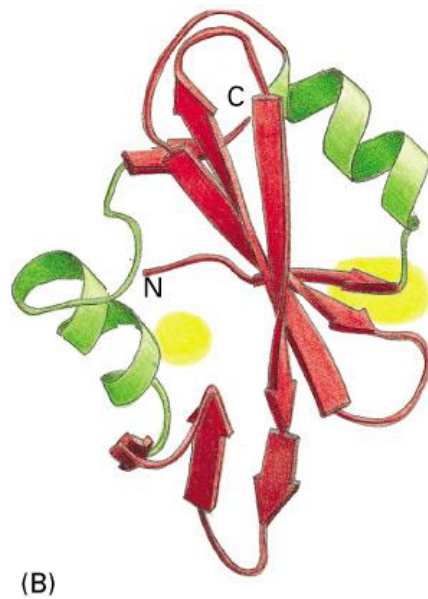
De terminologie SH2-domeinen is afgeleid van een prototype cytosolisch tyrosine-kinase: *src*.

SH1 = src homologie 1 domein = het katalytisch kinase-domein

SH2 = src homologie 2 domein = bindingsmodule voor fosfo-tyrosine

SH3 = src homologie 3 domein = bindingsmodule voor proline-rijke sequenties, aanwezig in andere cytosolische eiwitten.

SH2-domeinen herkennen een pY samen met één of meer omringende aminozuren. Op deze wijze wordt een zekere bindings-specificiteit bekomen.



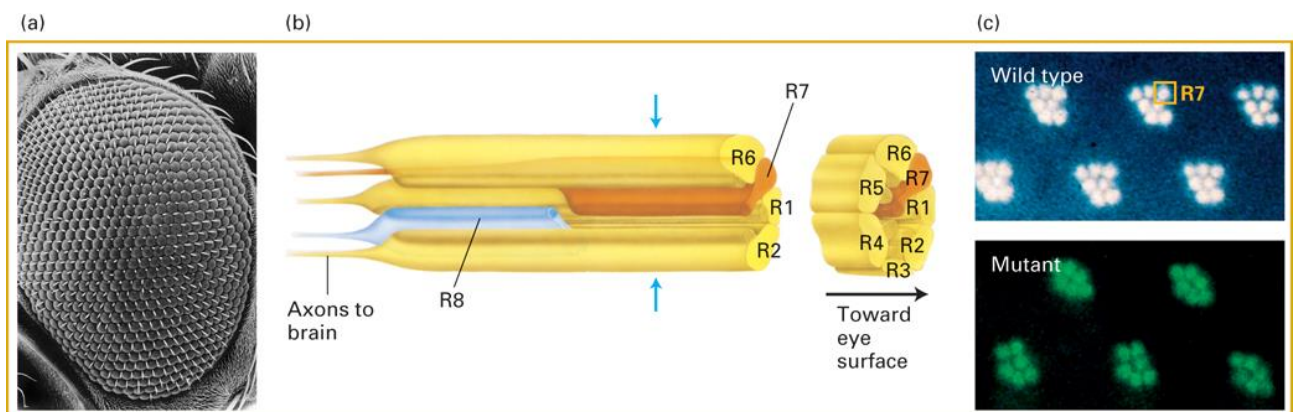
SH2 domeinen, en andere dergelijke domeinen zijn zeer compact, en kunnen op veel plaatsen in eiwitten voorkomen. De meeste signaaltransductoren zijn dus gekenmerkt door een modulaire opbouw.

### 2.4.3 Koppeling aan de Ras signaaltransductieweg

Een belangrijke signaalbaan via veel tyrosine-kinase receptoren maakt gebruik van het *Ras* eiwit.

*Ras* eiwitten behoren tot de GTPase superfamilie. Net zoals de andere leden van deze familie cycleert *Ras* tussen een actieve GTP-gebonden vorm, en een inactieve GDP-gebonden vorm. *Ras* eiwitten vervullen een belangrijke rol bij ondermeer *de controle van celdeling en celdifferentiatie*. Mutante *Ras* eiwitten die GTP niet meer kunnen hydrolyseren zijn permanent aangeschakeld en zijn daarom *onco-proteïnen*. De *Ras* eiwitten zijn via een vetzuurketen (farnesyl) verankerd aan de binnenzijde van het celmembraan. Mutaties die deze vetzuur-verestering verhinderen leiden tot inactivatie van *Ras*.

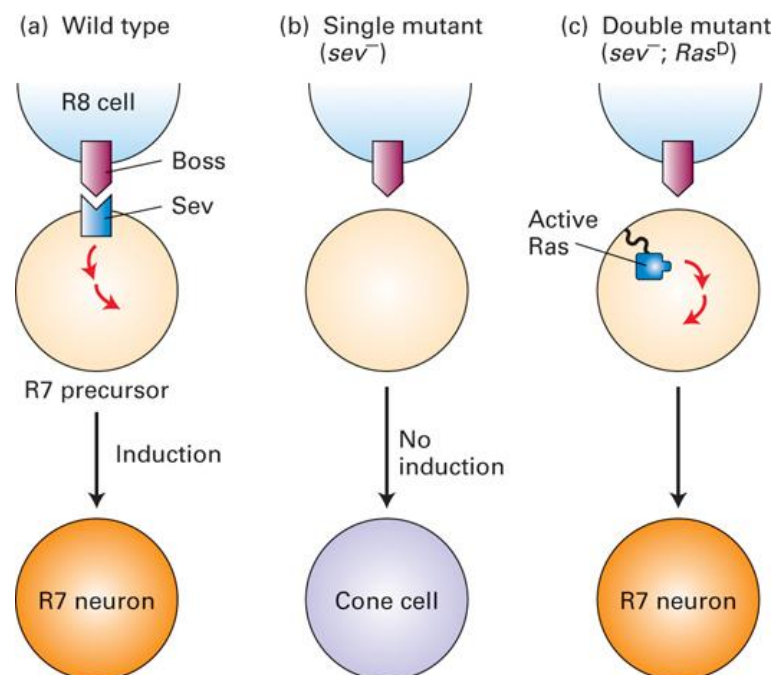
Veel inzicht in de werking van tyrosine-kinase receptoren en de *Ras* signaalbaan werd bekomen door genetische studies in *C. elegans* of *D. melanogaster*. Als voorbeeld bespreken we de ontwikkeling van het facet oog bij de fruitvlieg. Eén facet oog is opgebouwd uit ongeveer 800 *ommatidia*, met elk exact 22 cellen, waarvan 8 fotosensorische neuronen zijn. Deze vormen samen de *retinula*, en worden R-cellen genoemd: R1 - R8. De ontwikkeling van de cel R7 wordt tijdens de ontwikkeling geregeld door een RTK : *Sevenless (Sev)* genoemd, aangezien loss-of-function mutaties in het coderend gen leiden tot afwezigheid van deze cel. Deze R7 fotoreceptor cel is voor een fruitvlieg noodzakelijk voor zicht in UV-licht: op deze wijze kunnen mutanten in deze receptor, of in noodzakelijke componenten van de signaalbaan die door deze receptor geactiveerd wordt, geïsoleerd worden. Het ligand voor *Sev* bevindt zich op de membraan van de R8 cel: *Bride of Sevenless, Boss*. In afwezigheid van *Boss* gebeurt dus geen receptor activatie, waardoor deze vliegen geen R7 cel kunnen ontwikkelen.



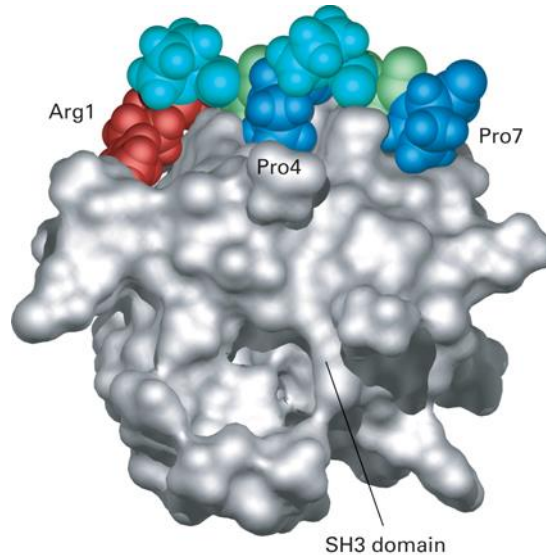
Om componenten in de signaalbaan van *Sev* te identificeren werd gebruik gemaakt van *temperatuur-sensitieve Sev* mutanten: indien opgegroeid bij de lagere 'permissieve' temperatuur gebeurde R7 ontwikkeling normaal, bij de hogere 'restrictieve' temperatuur bleven R7 cellen afwezig. Bij een intermediaire temperatuur, waren er net genoeg functionele *Sev* RTK's functioneren om nog R7 ontwikkeling toe te laten. Een dergelijke strategie was noodzakelijk om mutanten te isoleren die slechts in één allel gemuteerd zijn; daardoor valt de expressie van functioneel eiwit tot de helft terug (recessieve mutatie) wat bij de permissieve temperatuur vaak niet tot duidelijke fenotypes leidt. Echter, bij de intermediaire temperatuur, waar er maar net voldoende R7 ontwikkeling is, leidt een extra mono-allelische mutatie in een component van de *Sev* signaalbaan meestal wel tot een duidelijk waarneembaar defect.

Door middel van deze *Drosophila* experimenten werden 3 nieuwe eiwitten betrokken bij *Sev* signaaloverdracht geïdentificeerd:

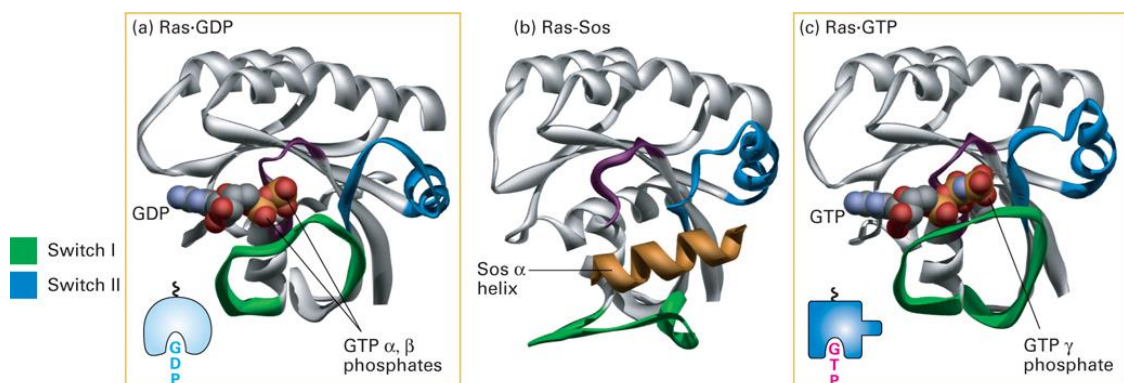
- *Grb2* (64% homologoos aan humaan Grb2)
- *Sos*, *Son of Sevenless* (een GEF, Guanylaat Exchange Factor)
- *Ras* (80% homologoos aan humaan Ras).



*Grb2* bindt rechtstreeks aan de geactiveerde receptor met zijn SH2 domein. Daarnaast heeft deze adapter twee SH3 domeinen, die *Sos* binden. Deze binding gebeurt via proline residues, samen met flankerende aminozuren die ook hier voor de specificiteit zorgen.



Op deze wijze wordt het anders vrij in de cytosol diffunderend *Sos* submembranair gepositioneerd. Dit brengt deze GEF in de nabijheid van zijn substraat: *Ras*. Bovendien wordt door de *Grb2* – *Sos* interactie de positie van de C-terminus van *Sos* gewijzigd zodat guanylaat uitwisselings activiteit kan gebeuren, die anders door deze C-terminus verhinderd wordt. Binding van *Sos* op *Ras* induceert in deze laatste een wijziging in de Switch I en Switch II regio's, waardoor het gebonden GDP kan wegdiffranderen, en vervangen worden door GTP, waarvan de cytosolische concentratie  $\sim 10$  maal hoger is. Deze GTP binding activeert *Ras* opnieuw door structurele wijzigingen in de Switch regio's waardoor interactie met substraten mogelijk wordt.



De activatie van *Ras* in cellen behandeld met EGF verloopt dus als volgt:

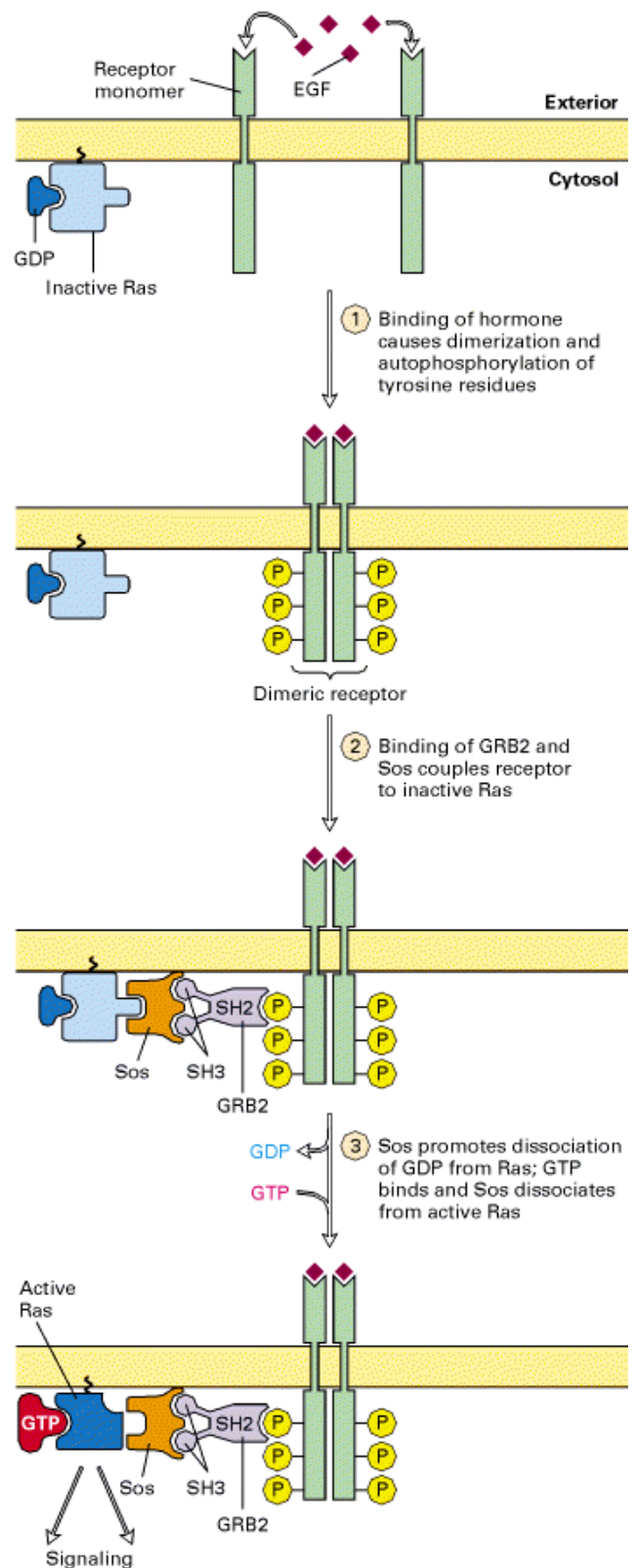
Ligandbinding leidt tot de auto-fosforylatie van tyrosine-residus op het cytosolisch deel van de receptor.

Een adaptor-eiwit, *Grb2*, bindt op een fosfotyrosine-residu via zijn SH2 domein, en brengt via zijn SH3-domeinen, die prolinerijke regio's herkennen, het *Sos*-eiwit mee. Door deze interactie wordt *Sos* uit het cytosol gerecruteerd en in de nabijheid van zijn substraat, *Ras*, gebracht. Het belang van deze *Sos-Ras* co-localisatie wordt onderstreept door inactivatie van *Ras* bij verlies van membraanverankering.

Op zijn beurt bindt, en activeert *Sos* het *Ras*-eiwit. Dit gebeurt door uitwisseling van GDP voor GTP.

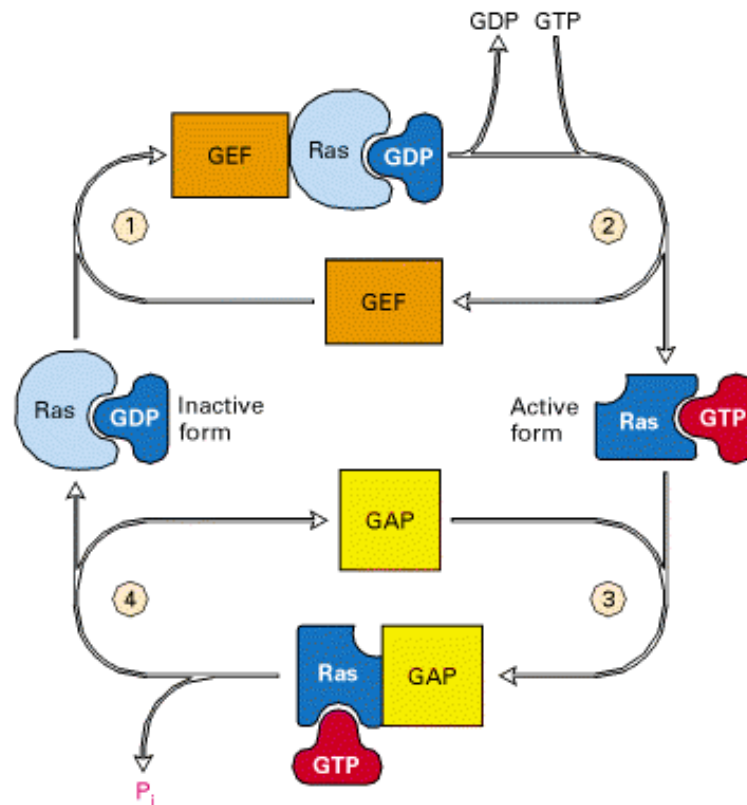
*Ras* eiwitten functioneren analoog aan de  $G\alpha$ -subeenheden van G-eiwitten, maar vereisen bijkomende eiwitten bij hun omschakeling tussen actieve en inactieve vorm.

Binding van *Sos* aan het inactieve *Ras*-GDP complex verdringt het GDP zodat een "leeg" *Ras*-eiwit overblijft. GTP, dat in veel hogere concentratie aanwezig is in het cytosol dan GDP, bindt nu op *Ras*, waardoor *Sos* weer vrijgesteld wordt.



Sos veroorzaakt dus de uitwisseling van GDP door GTP en wordt daarom ook "guanine nucleotide exchange factor, GEF" genoemd.

Omgekeerd is koppeling van een GAP of *GTP-ase activerend proteïne* nodig voor efficiënte hydrolyse van het GTP tot GDP. Net zoals bij  $G\alpha$  eiwitten vertonen Ras eiwitten dus een activatiecyclus.

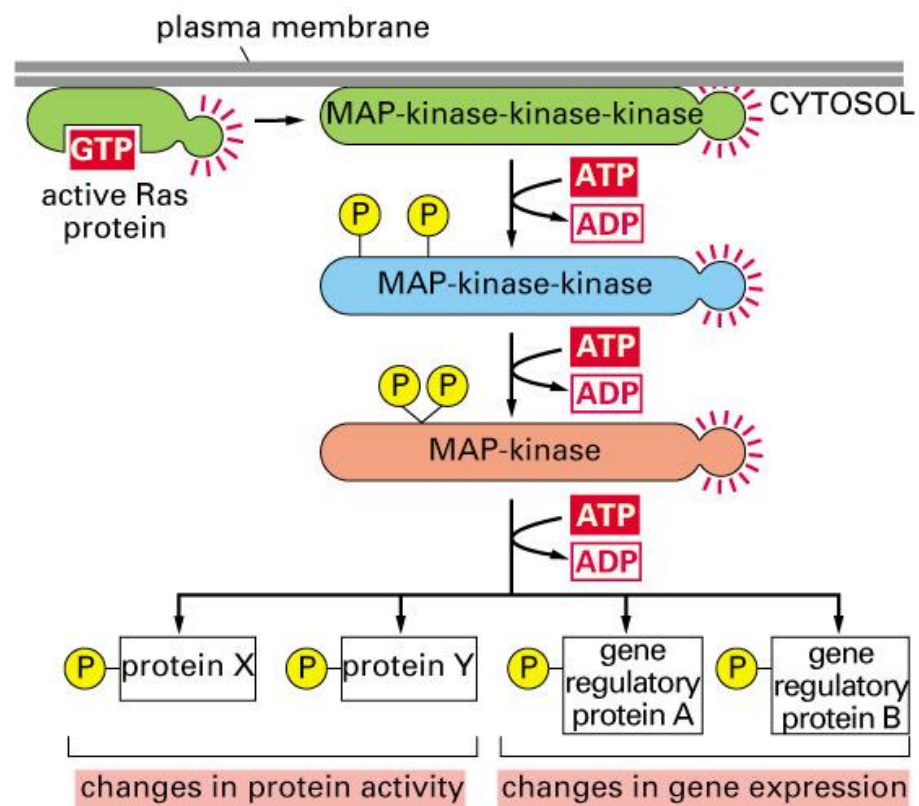




## 2.4.4 De MAP Kinasen

Verder stroomafwaarts in de *Ras* signaalbaan bevindt zich een uitgebreide, evolutief zeer geconserveerde *cascade* van cytosolische serine/threonine kinasen: het laatste kinase in de reeks is het *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK, een mitogen is een molecule die celdeling stimuleert). Bijzonder aan dit kinase is dat fosforylering van zowel een threonine als een tyrosine, gescheiden door één enkel aminozuur, noodzakelijk is voor optimale activatie. Dit kan enkel gebeuren door het zeer specifieke MEK enzyme een "dual" MAPKK, wat wellicht een veiligheid tegen toevallige activering inhoudt.

Achtereenvolgens worden: Raf (MAPKKK)  
MEK (MAPKK)  
MAPK geactiveerd.



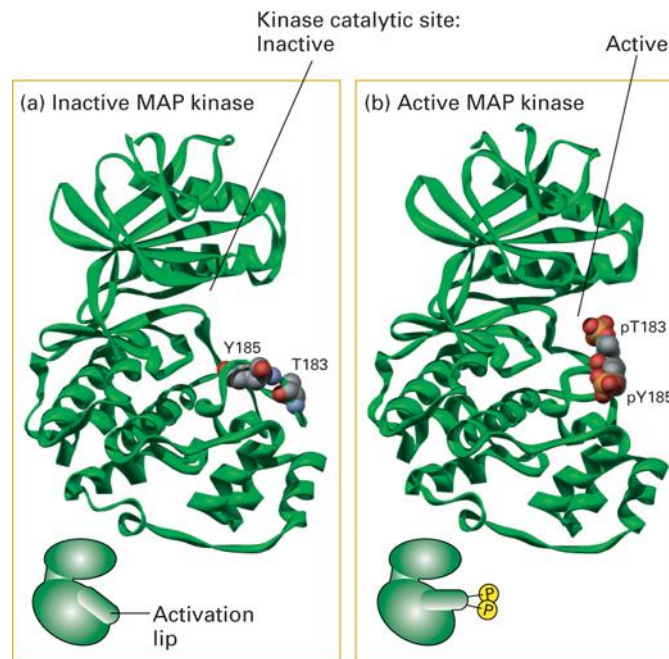
»n.

Onder de substraten van het MAPK bevinden zich transcriptiefactoren, die na activatie op specifieke promoter-elementen binden. Op deze wijze leidt dus de extracellulaire interactie van een hormoon met zijn receptor opnieuw tot de transcriptionele activatie van welbepaalde genen.

Onder deze genen bevinden zich ondermeer de *G<sub>1</sub> cyclines*, die een cruciale rol spelen bij de regulatie van de celcyclus (vandaar de naam MAPK). Aangezien deze signaaltransductie-cascade een cruciale rol speelt bij de controle van celdeling (en celdifferentiatie), kunnen mutaties op elk niveau leiden tot *onco-proteïnen*.

Activatie van MAPK is erg analoog aan de kruis-fosforylatie van de RTK-kinase domeinen. In het onderstaande voorbeeld (MEK) leidt fosforylatie op T183 en Y185 tot

het wegklappen van de activatielus met verhoogde katalytische werking en substraatherkenning tot gevolg.

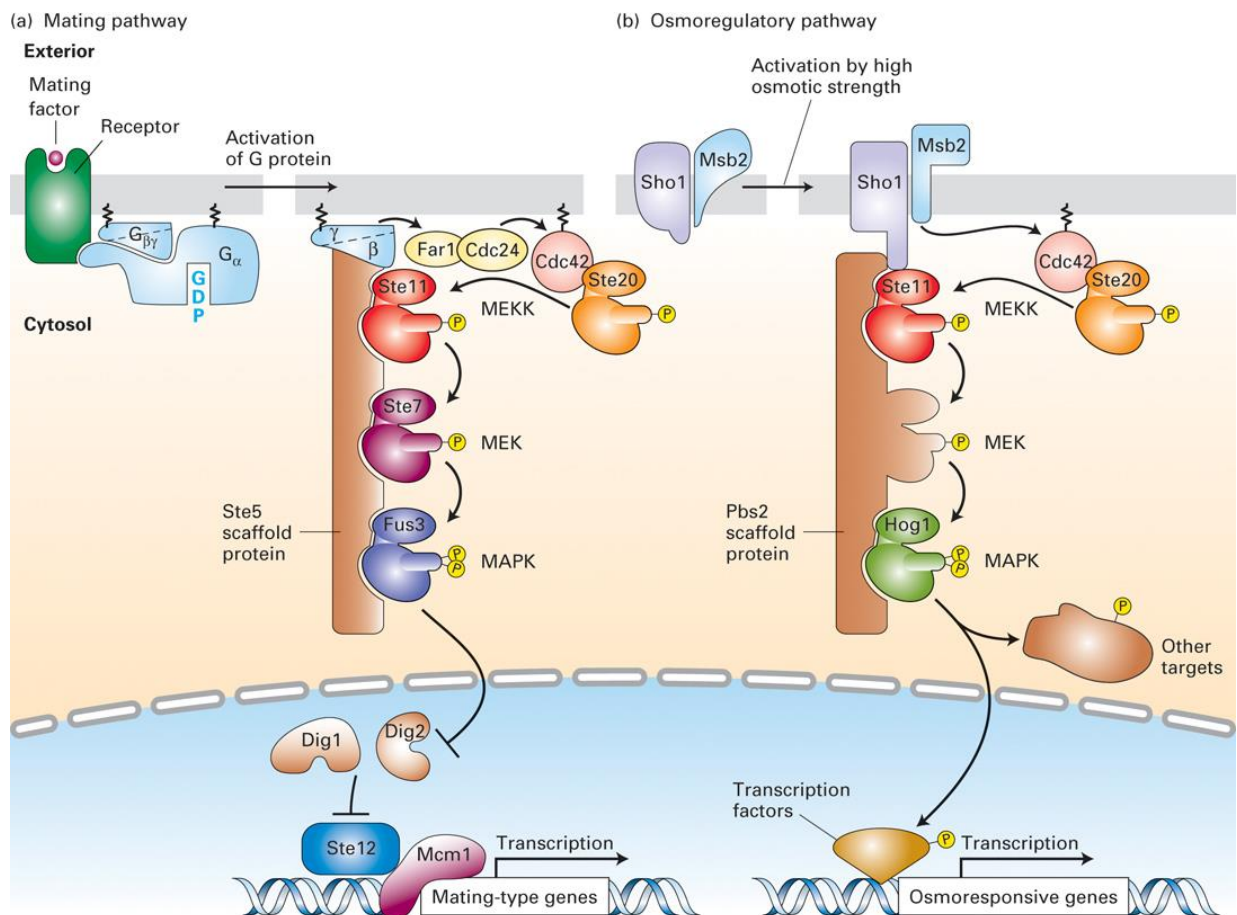


Interessant is dat de *duur van activatie* van deze MAPK de uiteindelijke cellulaire respons bepaalt. Op de neuronale precursor PC12 cellijn veroorzaakt EGF kortstondige MAPK activering (minuten), met celdeling tot gevolg. Behandeling van dezelfde cellen met NGF (Neuronale Groei Factor, die eveneens via een TRK werkt) leidt tot langdurige MAPK fosforylering (uren), waardoor de cellen differentiëren tot neuronen.

Terugkoppeling gebeurt door de werking van specifieke fosfatasen.

De MAPK cascade is evolutief bijzonder sterk geconserveerd en is niet alleen betrokken bij regulatie van de celcyclus. Bij de mens vinden we ze bijvoorbeeld ook terug bij signaaltransductie via de insulinerceptor en bij de celrespons op verschillende stressstimuli zoals UV-licht, osmotische druk, verhoogde temperatuur of inflammatoire cytokines. De MAPK cascade is ook aanwezig in gistcellen en speelt daar oa een belangrijke rol bij feromooncommunicatie.

Interessant hierbij is dat de stimulus via een geactiveerd  $G\beta\gamma$  complex loopt (gisten hebben geen RTK's).

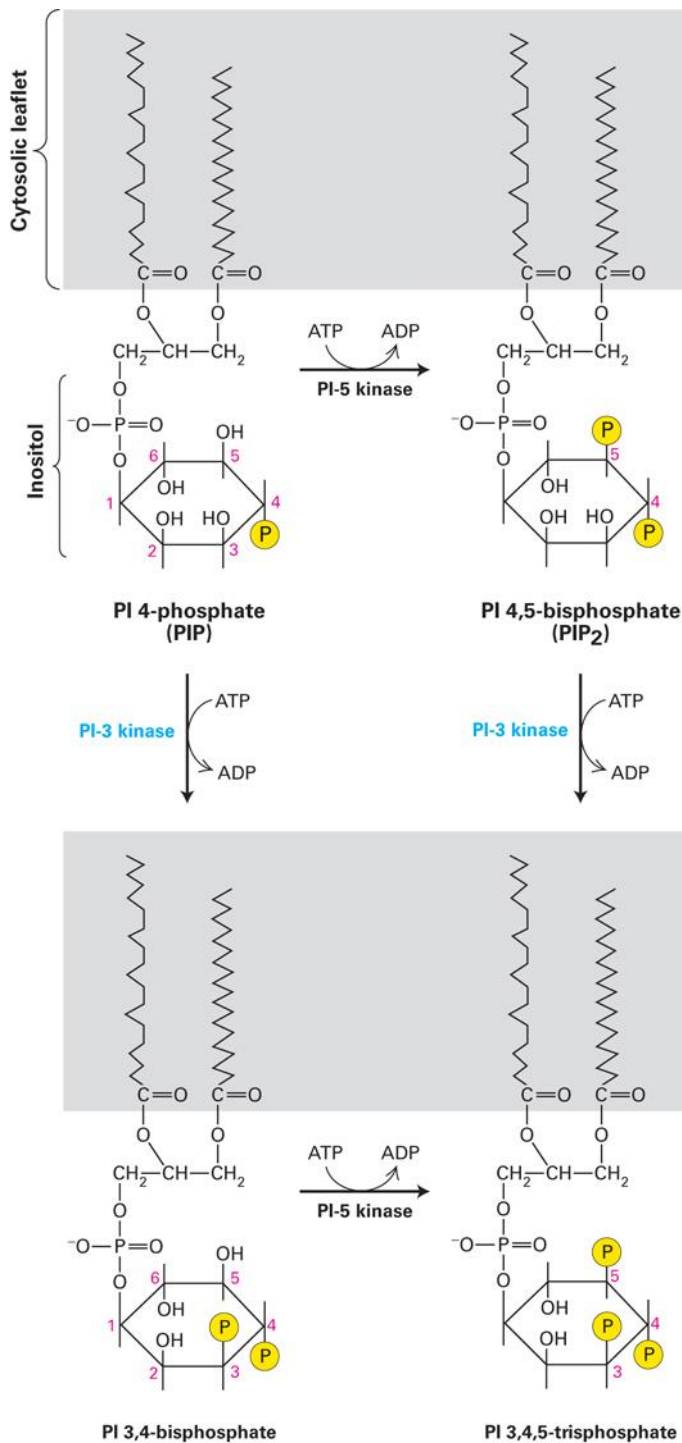


Bij gisten komen 5 parallelle MAPK signaalbanen voor. De eindpunten, de signaal-registrerende receptoren, en de effector-eiwit activerende MAPK's zijn steeds uniek.

Merkwaardig hierbij is wel dat de verschillende stimuli via gemeenschappelijk gebruik van één of zelfs meerdere intermediaire kinasen lopen, en toch een specifiek effect kunnen bewerkstelligen. Hoe kunnen cellen dan "cross-talk" tussen deze verschillende stimuli vermijden? De sleutel hiervoor ligt ondermeer bij de aanwezigheid van verschillende "skeletal"-eiwitten ("scaffold" proteins), die de verschillende kinase-componenten van één signaalbaan samenbrengen en verschillende signaalbanen gescheiden houden (ie feromoon-respons en de reactie op osmotische druk). Ook bij de mens komen minstens 5 parallelle MAPK signaalbanen voor. De verschillende "scaffold" eiwitten die bij de mens de MAPK cascades "in goede banen leiden" zijn echter nog niet goed gekend.

### 2.4.5 Signaaloverdracht via PI<sub>3</sub>K

Activatie van één van de Ras-MAPK signaalbanen in zoogdiercellen resulteert uiteindelijk in activatie van de celcyclus en *celdeling* (mitose). Cellen kunnen evenwel niet voortdurend delen aangezien dit zou leiden tot een graduele vermindering van de celgrootte. Er zijn bijgevolg signalen nodig die zorgen voor *celgroei*. Alhoewel deze scheiding zeker niet absoluut is kunnen we bij signalen die celdeling stimuleren spreken van *mitogenen*, en bij celgroei van *groefactoren*. Eén van de voornaamste signaalbanen die leiden tot celgroei loopt via *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*, *PI<sub>3</sub>K*. Een ander effect is *inhibitie van apoptose*, wat dus leidt tot *verlengde cel-overleving*. In zoogdiercellen komen meerdere PI<sub>3</sub>K isovormen voor.

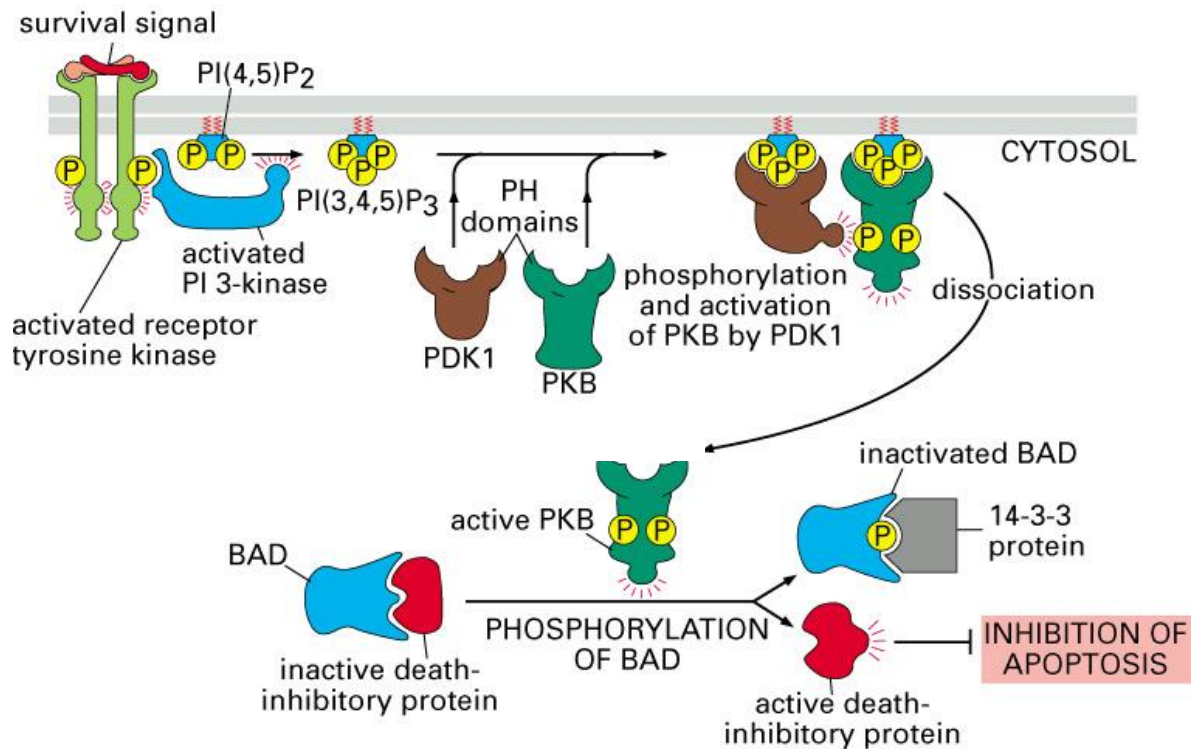


Het inositol-fosfolipide (of fosfatidyl-inositol, PI; PI's vormen ongeveer 10% van de dierlijke fosfolipide-fractie) wordt door specifieke, membraan-verankerde kinasen gefosforyleerd op de inositol ring. Deze ring bevindt zich submembranair. Daarbij worden achtereenvolgens de hydroxyl-groepen op de 4 en 5 plaats vervangen door fosfaatgroepen met vorming van respectievelijk fosfatidyl-inositol 4-fosfaat [PI(4)P] en fosfatidyl-inositol 4,5-bisfosfaat [PI(4,5)P<sub>2</sub>]. In groeifactor-gestimuleerde cellen wordt een bijkomende fosfaatgroep op de 3-positie van de inositol ring gehecht door het PI<sub>3</sub>K.

Deze gefosforyleerde inositol fosfolipiden spelen een belangrijke *duale rol*: Enerzijds vormen PI(3,4)P<sub>2</sub> en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> bindingsplaatsen voor een reeks signaalmoleculen, die hiervoor uitgerust zijn met een geconserveerde bindingsmodule: het *Pleckstrin Homologie (PH) domein*. Anderzijds kan PI(4,5)P<sub>2</sub> gesplitst worden tussen het lipide en de fosfaatgroep met vorming van het membraanverankerde 1,2-diacylglycerol (DAG), en het nu vrij diffundeerbare IP<sub>3</sub>. Dit laatste speelt een cruciale rol bij de vrijstelling van Ca<sup>2+</sup> ionen in de cel (zie lessen Prof. Luc Leybaert).

Eén signaalbaan die via PI3K geactiveerd wordt en een rol speelt bij celoverleving en – groei loopt via *Proteïne Kinase B* (PKB, ook *Akt* genoemd).

Receptoractivering leidt tot recrutering en activering van PI<sub>3</sub>K via zijn SH2-domein. Na vorming van PI(3,4)P<sub>2</sub> en PI(3,4,5)P<sub>3</sub> worden twee kinasen via hun PH domein vanuit het cytosol gerecruteerd en submembranair gebonden: PDK1 en PKB. Net zoals bij de Ras signaalbaan speelt deze diffusie-restrictie een zeer belangrijke rol. Eens geactiveerd door fosforylering wijzigt de PH structuur in PKB, waardoor dit nu geactiveerd kinase weer vrij kan diffunderen. Substraat is ondermeer *BAD*, een eiwit dat actief betrokken is bij de regulatie van gereguleerde celdood of apoptose.



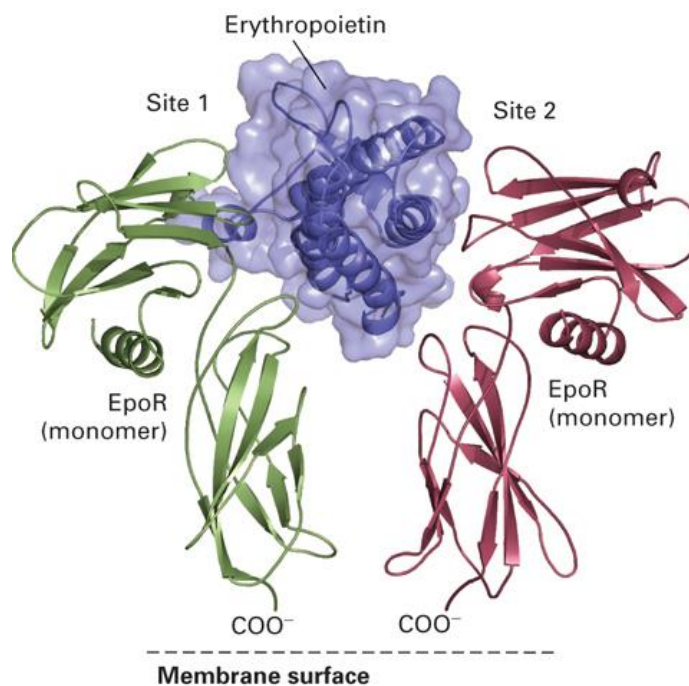
Terugkoppeling van dergelijke PI<sub>3</sub>K-afhankelijke signaalbanen gebeurt door *inositol fosfolipide fosfatasen*, die de 3-P groep verwijderen. Inactiverende mutaties in een dergelijk fosfatase (*PTEN*) zijn beschreven en leiden tot een verlengde duur van het PI<sub>3</sub>K effect. Aangezien dit ondermeer de levensduur van een cel verlengt, werken dergelijke mutaties celtransformatie in de hand. *PTEN* is dan ook een voorbeeld van een "tumor suppressor" gen. Deze mutaties worden frequent gevonden in humane kankers.

## 2.5 Cytokinereceptoren en signaaltransductie via STAT factoren.

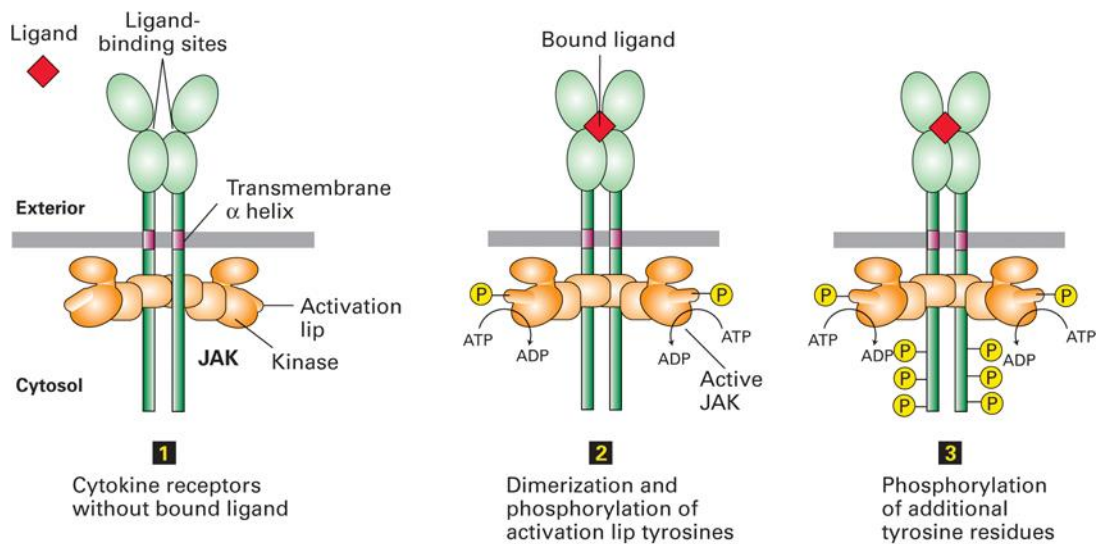
*Cytokines* zijn kleine gesecreëerde signaaleiwitten die de groei en differentiatie van verschillende celtypen controleren. Het cytokine prolactine wordt bijvoorbeeld gesecreëerd door de hypofyse en stimuleert de differentiatie van borstklierepitheelcellen tot melk-secreterende acinaire cellen. Andere cytokines, de *interleukines*, spelen een belangrijke rol bij de proliferatie van verschillende types immuuncellen. Tenslotte zijn er nog de *interferonen* die worden aangemaakt door virus-geïnficeerde cellen en de antivirale respons regelen. Cytokines kunnen zowel auto-, paracrien als endocrien werken.

Vele cytokines stimuleren de vorming van belangrijke groepen bloedcellen. Eén van de bekendste voorbeelden daarvan is het *erythropoietine* of kortweg Epo, dat de vorming van rode bloedcellen uit progenitorcellen in het beenmerg stimuleert.

Alle cytokines hebben een gemeenschappelijk voorouder-eiwit en hebben een gelijkaardige tertiaire structuur, bestaande uit vier  $\alpha$ -helices. Ook de cytokinereceptoren hebben verwante structuren: een extracellulair gedeelte, dat bestaat uit twee subdomeinen, die elk zijn opgebouwd uit  $\beta$  strands, een transmembrane  $\alpha$  helix en een cytoplasmatisch gedeelte.

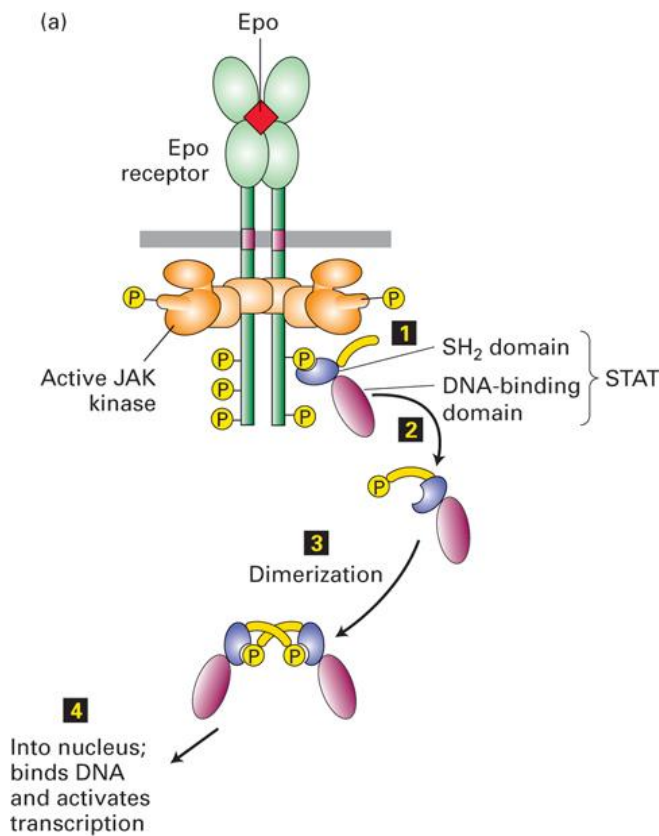


Zoals reeds eerder vermeld behoren de cytokinereceptoren tot de familie van enzymgekoppelde receptoren. Cytokinereceptoren bezitten echter geen intrinsieke kinase-activiteit doch zijn geassocieerd met kinasen van de JAK ("Just Another Kinase") familie. Net als bij de RTKs, worden de JAKs door receptordimerisatie zodanig gepositioneerd dat ze mekaar kunnen fosforyleren op een tyrosine in de activatielus. De daaropvolgende stappen in het receptoractivatieproces zijn identiek aan deze beschreven voor de RTKs.

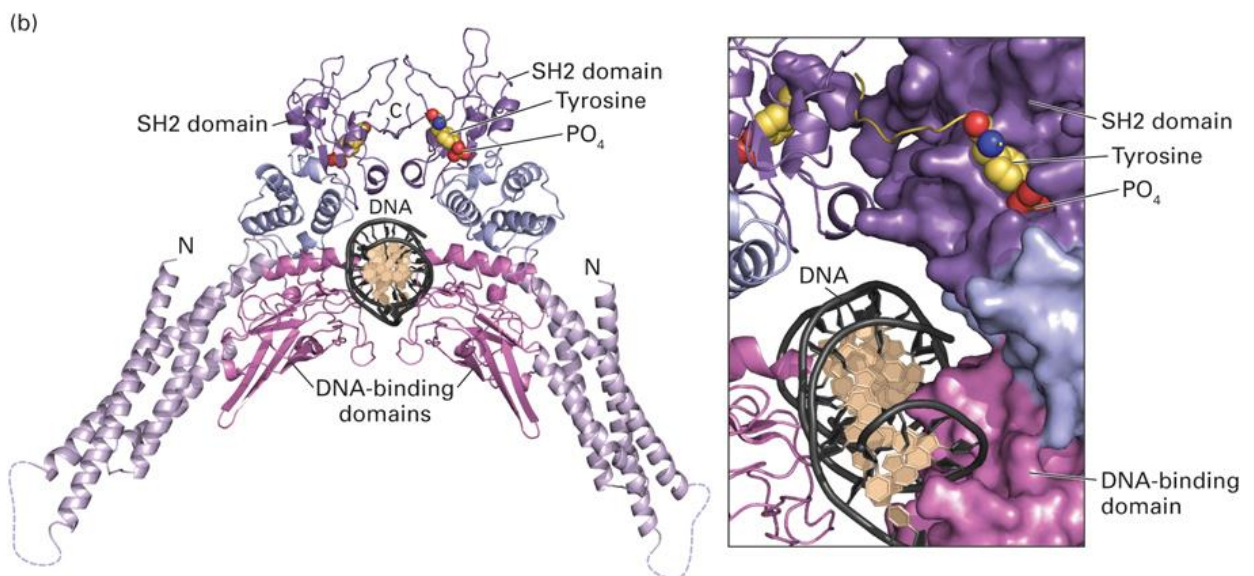


Naar analogie met de RTKs zijn er ook *dominant-negatieve* JAK mutaties. Zo is bijv. een JAK2 mutant beschreven, waarin het kritische tyrosine naar fenylalanine is gemuteerd. Dit mutante JAK2 bindt de Epo receptor, doch kan niet meer worden gefosforyleerd en is dus katalytisch defect. Wanneer deze JAK2 mutant tot overexpressie wordt gebracht in erythroïde cellen, dan wordt de werking van Epo belemmerd omdat de meerderheid van de Epo receptoren bezet is door het mutante, inactieve, JAK2.





De cytokinereceptoren kunnen koppelen aan dezelfde signaal cascades die werden beschreven voor de RTKs (Ras, PI3K,...). Daarnaast initiëren cytokines ook een zeer directe signaalbaan, die verloopt via de STAT (signal transducer and activator of transcription) transcriptiefactoren. STAT factoren zijn opgebouwd uit een N-terminaal DNA-bindend domein, een SH2 domein (voor binding aan fosfotyrosines in de cytokine receptor) en een C-terminaal domein met een kritisch tyrosine. Wanneer monomeer STAT via zijn SH2 domein een gefosforyleerd tyrosine op de receptor bindt, wordt het C-terminale STAT tyrosine gefosforyleerd door receptor-geassocieerd JAK. Gefosforyleerd STAT dissocieert van de receptor en twee C-terminale tyrosine gefosforyleerde STATs vormen een dimeer, door interactie via hun SH2 domeinen. STAT dimerisatie leidt bovendien tot een conformationele verandering waardoor een nucleair localisatie-sigitaal (NLS) wordt blootgelegd en het STAT dimeer naar de nucleus kan migreren.



## 2.6 Inhibitie van signalering via RTKs en cytokinereceptoren

### Receptor-gemedieerde endocytose

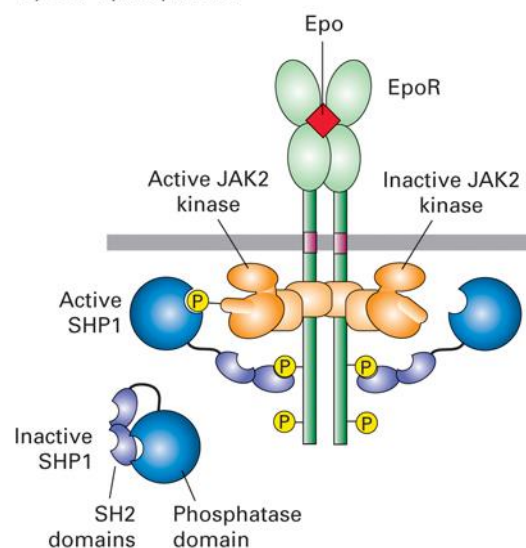
Net zoals we eerder beschreven voor de GPCRs, kan ook desensitisatie, door internalisatie van receptoren via "clathrin-coated pits", optreden wanneer cellen gedurende lange tijd worden blootgesteld aan bepaalde groeifactoren of cytokines. Het exacte mechanisme voor de versnelde endocytose die soms wordt waargenomen na ligandbinding is echter nog niet opgehelderd. Een interessante waarneming is dat geen desensitisatie optreedt voor een HER1 mutant (receptor voor EGF) met defecte kinase functie, wat suggereert dat de kinase-activiteit noodzakelijk is voor het blootstellen van een sorteermotief in het cytoplasmatisch deel van de receptor.

Na endocytose kunnen receptoren hetzij gerecycled worden, hetzij gedegradeerd worden in de lysosomen. Verschillende processen, die hier niet verder worden besproken, zullen het lot van een geïnternaliseerde receptor bepalen.

### Fosfotyrosine fosfatasen

Deze defosforylerende enzymen hydrolyseren specifiek fosfotyrosine verbindingen op bepaalde doelwit-eiwitten. Eén van de bekendste fosfotyrosine fosfatasen is SHP1, dat signalering van verschillende cytokinereceptoren inhibeert. Muizen die geen SHP1 hebben sterven door excessieve productie van (rode) bloedcellen, door ongeremde signalering van Epo en andere cytokines. SHP1 remt cytokine signalering door binding aan JAK. SHP1 heeft, naast zijn katalytisch fosfatase domein, twee SH2 domeinen. In ongestimuleerde cellen bindt en inactiveert één van deze SH2 domeinen het fosfatase domein. In cytokine-behandelde cellen, zal dit SH2 domein echter binden aan een fosfotyrosine in de geactiveerde receptor. Dit induceert een conformationele wijziging in SHP1, waardoor het fosfatase actief wordt en JAK defosforyleert en inactiveert. Het SHP1 fosfatase is latent aanwezig in de cel en kan dus snel cytokinereceptoren inactiveren.

(a) Short-term regulation: JAK2 deactivation by SHP1 phosphatase



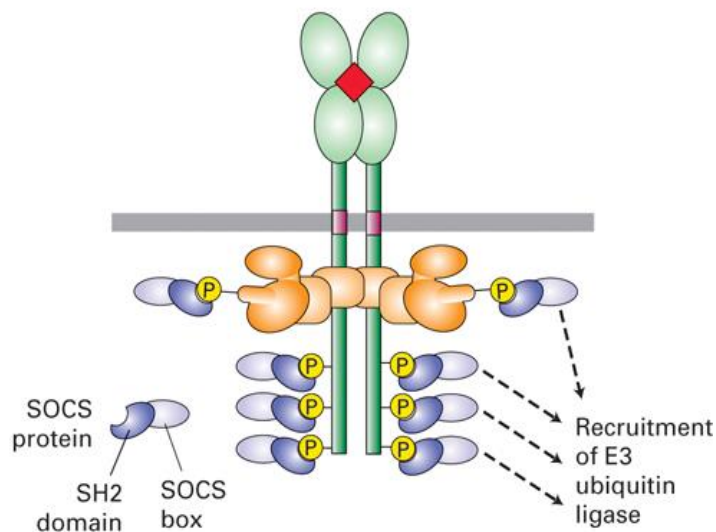
## SOCS eiwitten

De *SOCS* eiwitten of "*Suppressors of Cytokine Signalling*" zijn transcriptionele doelwitten van STAT factoren. SOCS eiwitten zijn dus een klassiek voorbeeld van negatieve feedback. De SOCS eiwitten hebben verschillende werkingsmechanismen. Enerzijds bezitten zij een SH2 domein, waarmee ze fosfotyrosines in geactiveerde receptorketens kunnen binden, zodat deze bindingsplaatsen niet meer beschikbaar zijn voor andere signaleiwitten. Dit is een vorm van inhibitie door *competitie*.

Anderszijds zijn er SOCS eiwitten die JAK inhiberen door binding aan het kritische fosfotyrosine in de activatielus en remming van de katalytische activiteit van het JAK.

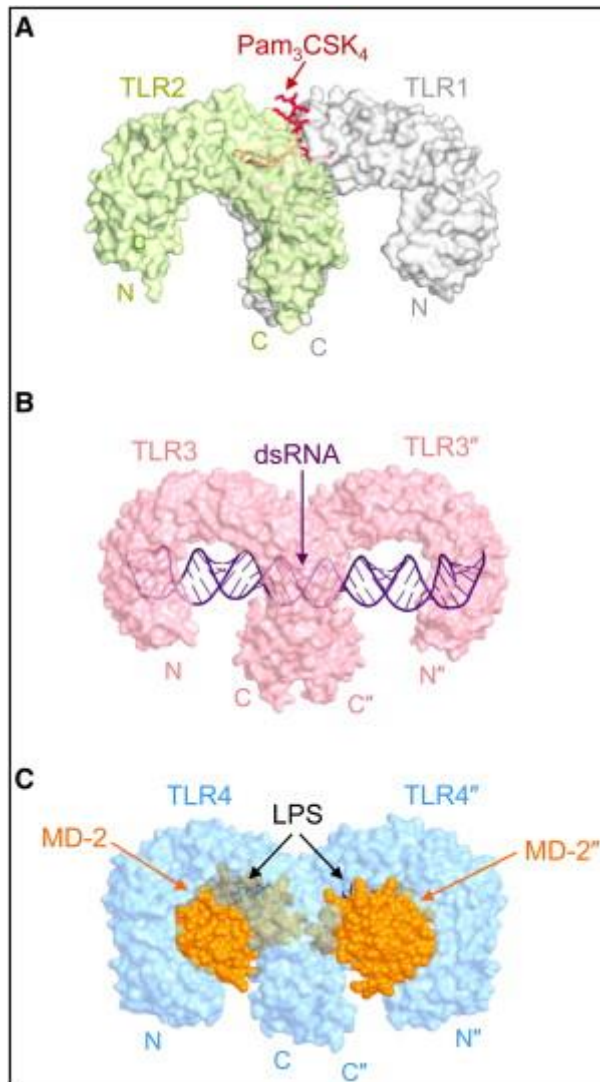
Tenslotte bevatten alle SOCS eiwitten een zogenaamde SOCS box, een domein dat componenten van E3 ubiquitine ligasen recruteert. Binding aan SOCS eiwitten kan bijgevolg leiden tot polyubiquitinatie (covalent koppelen van een ubiquitine polymeer op lysine zijketens) van de cytokinereceptor of geassocieerde JAKs. De geubiquitineerde receptoren/JAKs zullen vervolgens worden afgebroken via het proteasoom. Het belang van deze SOCS eiwitten wordt duidelijk in muizen die bepaalde SOCS factoren missen. Zo vertonen SOCS-2-deficiënte muizen een vorm van reuzegroei, die het gevolg is van ontbreken van remming op groeihormoon signalering (groeihormoon is ook een cytokine).

(b) Long-term regulation: signal blocking and protein degradation by SOCS proteins



## 2.7 Toll-like receptoren

Zoogdieren bezitten immuuncellen die zijn uitgerust met receptoren die de detectie van binnendringende micro-organismen kunnen detecteren. Deze "sentinel" cellen verblijven in verschillende epithelen (luchtwegen, gastro-intestinaal systeem, genitaal systeem, huid) waar ze het meeste kans hebben pathogenen tegen te komen. Veel van deze pathogeen-herkende receptoren behoren tot de familie van de "Toll-like" receptoren of kortweg TLRs. De TLRs zijn genoemd naar het *Drosophila* eiwit Toll, dat ook bij insecten een belangrijke rol in de immunrespons speelt.

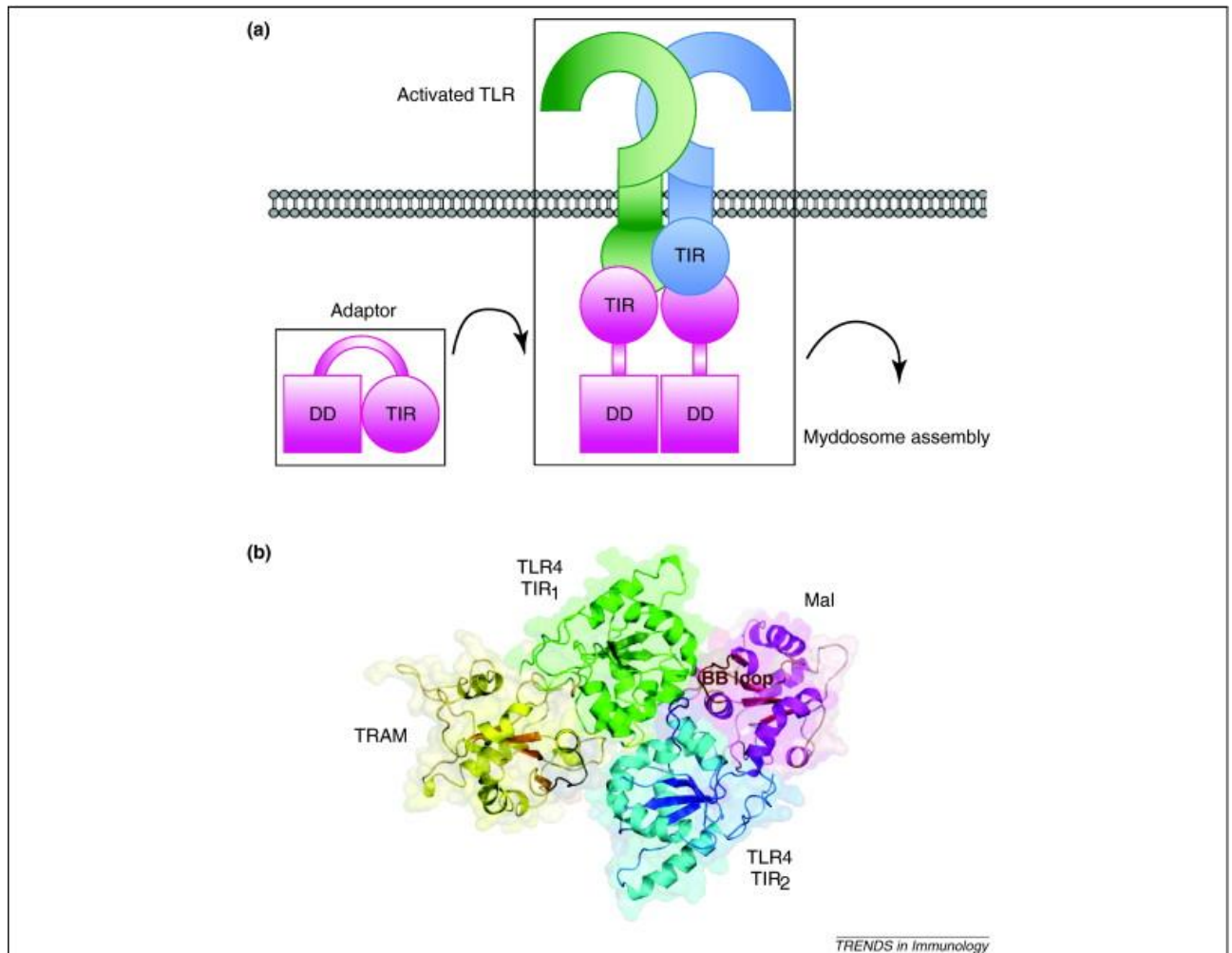


from Min and Lee (*Immunity* 2008)

De TLRs bezitten een ectodomein dat is opgebouwd uit *leucine-rijke herhalingen*, die een sikkelvormige structuur vormen en instaan voor de ligand-herkenning. Verschillende TLRs herkennen verschillende componenten van pathogenen: zo herkennen TLR4, TLR2 en TLR3 respectievelijk lipopolysaccharide (LPS) uit de celwand van gram-negatieve bacteriën, lipoteïchoic acid (LTA) uit de celwand van Gram-positieve bacteriën en dsRNA dat wordt geproduceerd bij virusreproductie. Kristallografische studies suggereren dat ligand-binding dimerisatie van de TLR ectodomeinen stimuleert, waardoor domeinen in het cytoplasmatische deel van de receptor met mekaar kunnen interageren.

De TLRs bezitten geen intrinsieke kinase activiteit en zijn ook niet direct geassocieerd met kinasen (zoals de JAKs bij de cytokine receptoren). Signaaltransductie door TLRs wordt geïnitieerd door de vorming van een multi-eiwit complex aan de celmembranen, waarbij verschillende adaptoren een rol spelen en de TLRs verbinden met verschillende signaaltransductie cascades. Het signaaldomein dat cruciaal is voor de vorming van dit TLR-afhankelijk signaalplatform is het "Toll-IL1 receptor resistance" of TIR domein.

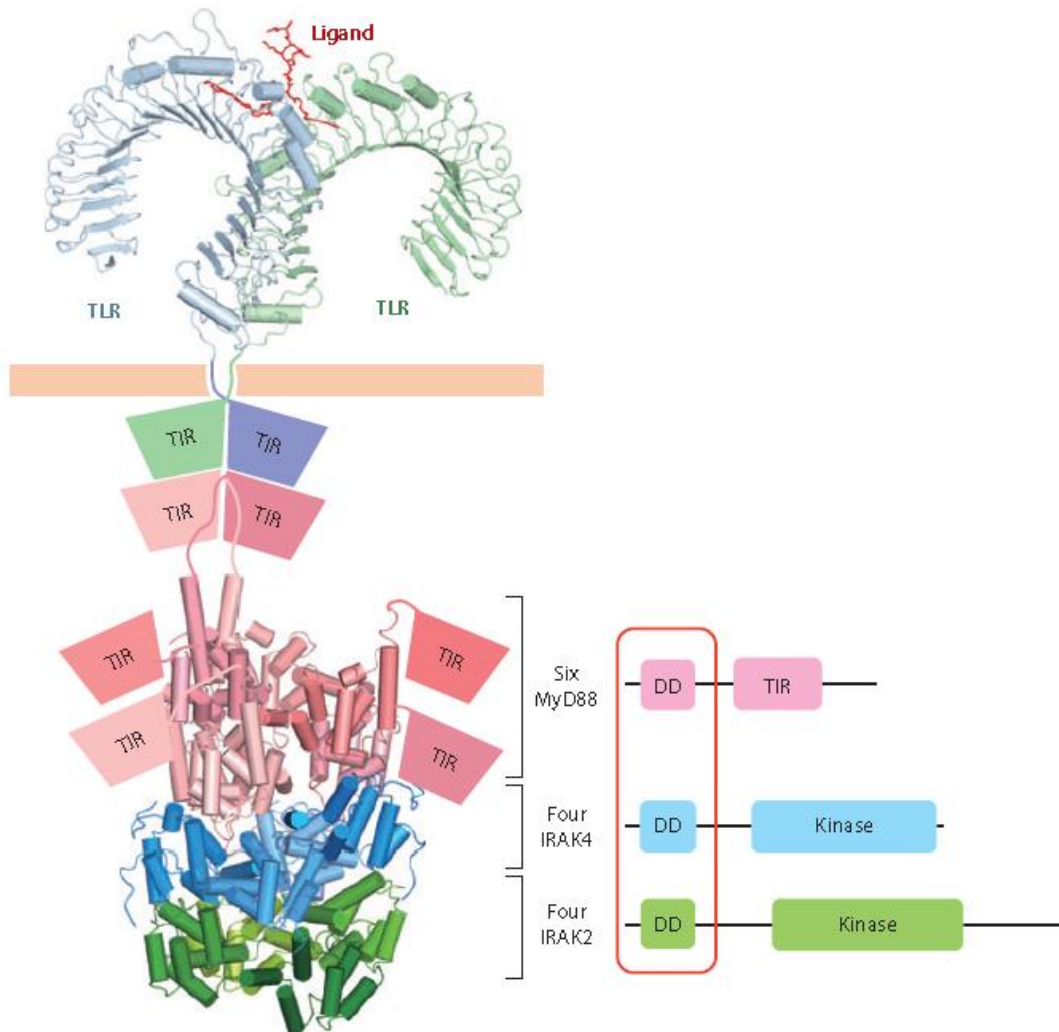
Ook veel van de adaptor-eiwitten (MAL, TRAM, MyD88 en TRIF) die met de TLRs interageren bezitten TIR domeinen en homo- en heterotypische TIR-TIR interacties, zijn cruciaal voor de vorming van het signaalplatform aan de receptor. Het is tot op heden nog niet gelukt om de structuur te bepalen van een TLR in complex met zijn adaptoreiwitten. Waarschijnlijk is de vorming van dit complex co-operatief en wordt een transient signaalcomplex opgebouwd door synergie van meerdere zwakke interacties. *In vivo* wordt de stabiliteit van de TIR complexen bovendien bevorderd doordat de receptor in de celmembraan is verankerd en verschillende van de adaptoren ook met de celmembraan associëren (door PIP2 binding of via N-myristoylatie).



from Gay and O'Neill 2011

Eén van de adaptoreiwitten die met TLRs interageren is MyD88. MyD88 bezit naast een TIR domein ook een "death" domein (DD), dat door interactie van MyD88 met de TLR wordt geactiveerd. Het actieve DD interageert vervolgens met een kinase (IRAK-4), dat op zijn beurt met een ander kinase (IRAK2) interageert. Net als de TIR domeinen, kunnen de DDs homo- en heterotypisch interageren. De DD interactie is echter veel sterker dan de TIR-TIR interactie en recent werd de structuur van het zogenaamde "Myddosome" opgehelderd. Dit complex bestaat uit zes MyD88, vier IRAK-4 en vier IRAK-2 moleculen, die in een helicale structuur zijn georganiseerd. Hoe de sequentiële opbouw van dit complex wordt bewerkstelligd is tot op heden niet duidelijk.

Hoewel het moeilijk is aan te tonen dat deze *in vitro* structuren ook werkelijk in levende cellen voorkomen, zijn er verschillende single nucleotide polymorfismen (SNPs) beschreven in het MyD88 DD waarvan men verwacht dat ze de Myddosome vorming zouden verhinderen en die inderdaad geassocieerd zijn met defecten in TLR signaaltransductie. Ook SNPs in andere TLR adaptoren zijn gelinkt met verschillen in vatbaarheid voor infecties.

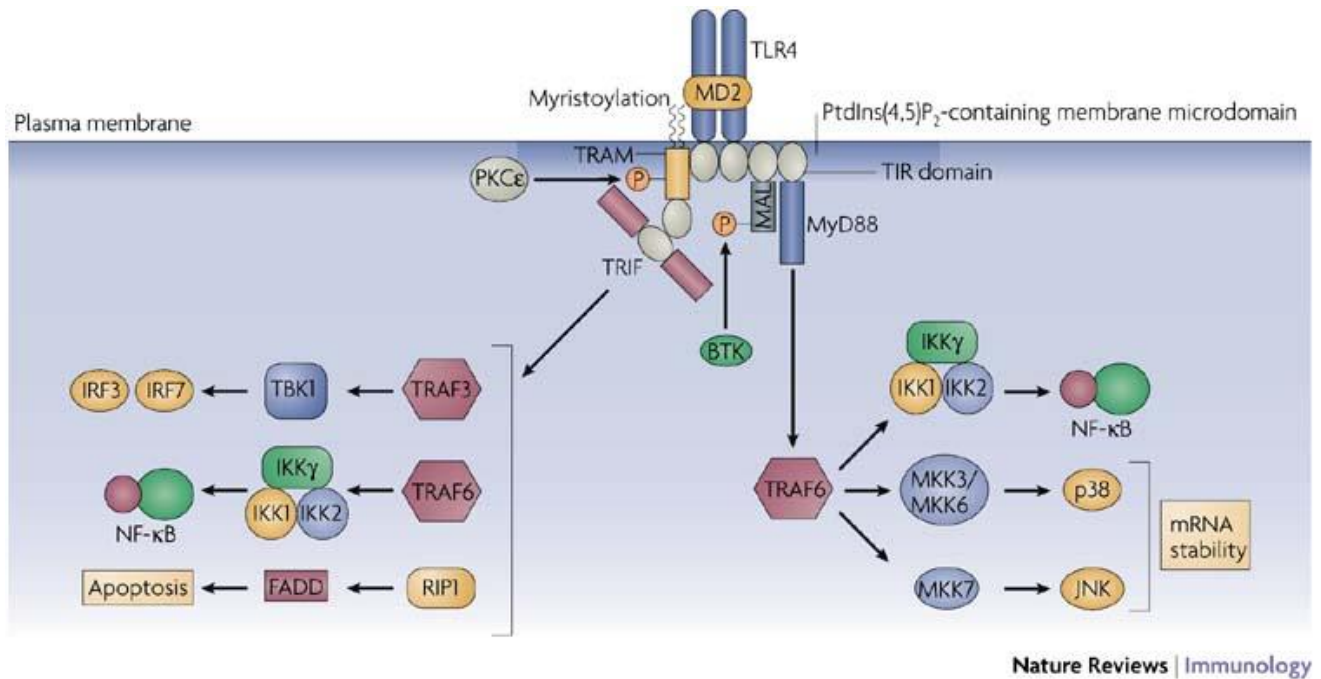


from Min and Lee (*Immunity* 2008)

Omdat het "Myddosome" complex 6 MyD88 moleculen bevat, vermoedt men dat "higher-order" oligomere TLR clusters worden gevormd, waarbij verschillende geactiveerde receptorparen in een netwerk worden verbonden. Dergelijke netwerken kunnen verschillende types van TLRs samenbrengen en synergistische responsen op microbiële stimuli veroorzaken.

De vorming van oligomere signaalplatformen in gespecialiseerde vetrijke microdomeinen ("lipid rafts") op de celmembraan is waarschijnlijk een concept dat ook door andere receptorsystemen wordt gebruikt.

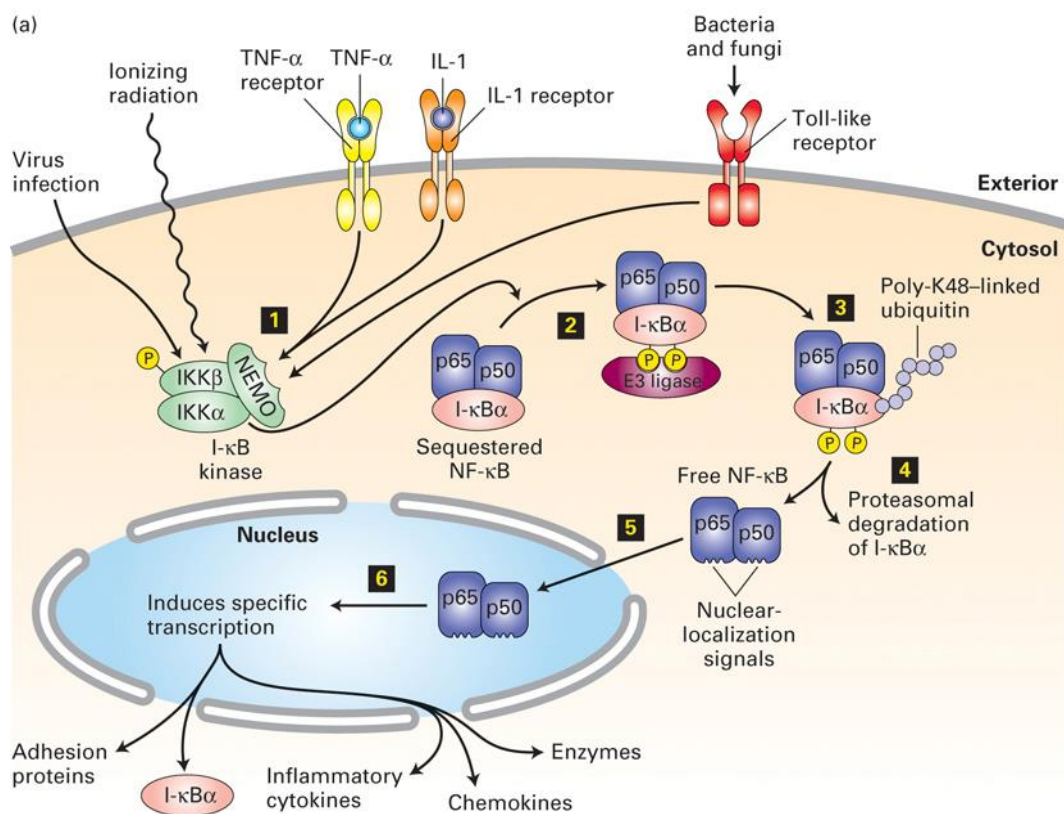
In onderstaande figuur wordt de signaaltransductiecascade die wordt geïnitieerd door TLR4 activatie (vereenvoudigd) weergegeven. Vier TIR-domein-adaptoren zijn betrokken bij TLR4 signalering: TRAM, MAL, MyD88 en TRIF. De MyD88-afhankelijke cascade leidt tot activatie van MAPKs (p38 en JNK; zie 2.4.4) en NF-κB (zie 2.8). Activatie van de TRIF-afhankelijke pathway resulteert in de activatie van zowel IRF als NF-κB transcriptiefactoren en kan tevens apoptose induceren. Al deze cascades coördineren de respons op pathogenen.



from O'Neill and Bowie, Nature Reviews 2007.

## 2.8 De rol van ubiquitine in signaaltransductie

Alle signaalbanen die we tot nu toe hebben besproken beruften op fosforylatie van signaleiwitten. In deze sectie zullen we bespreken hoe een andere posttranslationele modificatie, *ubiquitylatie*, signaaltransductieprocessen reguleert. Ubiquitine is een klein eiwit (76 AA) dat aan andere eiwitten kan gekoppeld worden door E3 ubiquitine ligasen. Ubiquitylatie speelt o.a. een belangrijke rol in signaalbanen die leiden tot activatie van de transcriptiefactor "*Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*" of kortweg *NF-κB*. *NF-κB* wordt beschouwd als een cruciale regulator van immuun- en ontstekingsresponsen. *NF-κB* homologen, die de primitieve immuunrespons via productie van antimicrobiële peptiden regelen, worden ook teruggevonden in *Drosophila*, wat aangeeft dat deze signaaltransductiebaan sterk geconserveerd is doorheen de evolutie. De *NF-κB* signaalbaan wordt geactiveerd door veel verschillende extracellulaire signalen, waaronder componenten van bacteriën en fungi (via TLRs), pro-inflammatoire mediators zoals *Tumor Necrosis Factor α* (*TNFα*) of *Interleukine 1* (*IL1*) en andere cellulaire stressoren (ioniserende straling, ...). *NF-κB* is een heterodimeer (van p65 en p50), dat zich in niet-gestimuleerde cellen in inactieve vorm in het cytoplasma bevindt, in complex met zijn inhibitor-eiwit I-κB. Het I-κB eiwit maskeert het NLS van *NF-κB*.

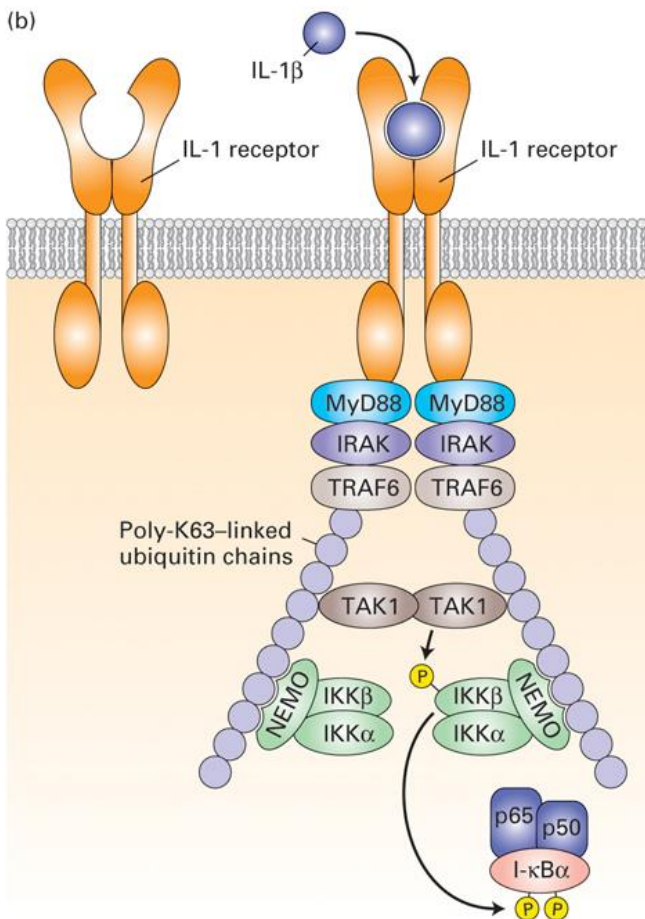


Wanneer cellen echter worden blootgesteld aan infectieuze stimuli of andere stressoren, zal dit leiden tot de vorming van een multi-eiwit complex ter hoogte van de betrokken membraanreceptoren (zie 2.7) en de activatie van het IKK kinase complex, dat bestaat uit de regulerende NEMO subeenheid en twee katalytische subeenheden (IKK $\alpha$  en IKK $\beta$ ). De IKK $\beta$  subeenheid zal daaropvolgens het I- $\kappa$ B eiwit fosforyleren op twee specifieke serine residus, die als herkenningsplaats voor een E3 ligase fungeren. Dit E3 ligase



poly-ubiquitineert vervolgens I- $\kappa$ B, waardoor dit via proteasomale degradatie wordt afgebroken. Door degradatie van I- $\kappa$ B worden de NLSen van de NF- $\kappa$ B subeenheden blootgesteld, waardoor het dimeer naar de nucleus kan migreren om daar transcriptie van zijn doelwitgenen aan te zwingelen. Omdat I- $\kappa$ B zelf een doelwitgen is van NF- $\kappa$ B is deze cascade onderhevig aan negatieve feedback regulatie.

Het receptor-geassocieerd multi-eiwit complex in het submembranaire cytosol dat ontstaat na blootstelling van cellen aan TLR agonisten (zie 2.7) of pro-inflammatoire mediators zoals TNF $\alpha$  of IL1, bevat onder andere E3 ubiquitine ligasen (zoals TRAF6) die polyubiquitine ketens aanmaken.



In tegenstelling tot de polyubiquitine ketens die proteasomale degradatie veroorzaken, synthetiseert TRAF6 echter polyubiquitine ketens die fungeren als "scaffolds" voor signaleiwitten. De polyubiquitineketens die fungeren als "scaffold" verschillen van deze die eiwitten voor degradatie markeren en ontstaan door verschillende ubiquitine ligatie reacties. Zo koppelt TRAF6 de COOH-terminus van één ubiquitine molecule aan lysine 63 (K63) van een ander, terwijl de poly-ubiquitinylatie, die geassocieerd is met proteasomale degradatie, op lysine 48 (K48) gebeurt.

Verschillende signaleiwitten hebben domeinen die poly-K63 ubiquitineketens herkennen. Zo binden het TAK1 kinase en de NEMO regulatorische subeenheid van het IKK kinase complex de poly-K63 ubiquitineketens op TRAF6. Interactie van beide eiwitten met de polyubiquitine "scaffold" is vereist om IKK $\beta$  fosforylatie door TAK1 toe te laten.

## SAMENVATTING VAN ENKELE ESSENTIËLE KENMERKEN VAN HET SIGNAALTRANSDUCTIE PROCES

1. Signaaltransductie kan verlopen via **directe interacties** tussen eiwitten
  - \* een ligand op zijn receptor
  - \* het cytosolisch deel van de receptor met signaaltransductoren: G-eiwitten, adaptor-eiwitten of rechtstreeks met enzymes en via **secundaire boodschappers**.
  
2. In beide gevallen leidt dit tot eiwitactivatie en signaaloverdracht door
  - \* inductie van **structuurwijzigingen**, en/of
  - \* activatie van enzymes door **colocalisatie met hun substraat** ter hoogte van de plasmamembraan, en/of
  - \* **aan/af schakeling** door aanhechting van fosfaatgroepen of binding van GTP/GDP
  
3. Tijdens de signaaltransductie treden noodzakelijkerwijs zeer belangrijke **amplificatiesystemen** in werking:
  - \* in mindere mate ter hoogte van directe eiwitinteracties;
  - \* in veel sterkere mate ter hoogte van secundaire boodschappers. Deze worden zelf aangemaakt door enzymes, en zijn in staat enzymes te activeren;
  - \* door het gebruik van cascades. Zeer dikwijls zijn dit fosforylatie-cascades door kinasen.
  
4. Volgens het principe van **bindings- en effectorspecificiteit** zullen de cellulaire netto-effecten variëren (of parallel lopen) van ligand tot ligand en van cel tot cel. Dergelijke effecten kunnen zowel cytosolische enzymes als nucleaire transcriptiefactoren betreffen.
  
5. Het cellulaire netto-resultaat wordt bovendien mede bepaald door een **complex netwerk** van kruiskoppelingen tussen verschillende signaaloverdracht banen.
  
6. **Negatieve terugkoppeling** is noodzakelijk voor tijdelijke en snelle cellulaire responsen.

### 3 Experimentele methoden voor studie van signaaltransductieprocessen

---

#### 3.1 Detectie van eiwit-eiwit interacties

---

Essentieel kunnen eiwit-eiwit interacties op twee wijzen bestudeerd worden : biochemisch of genetisch.

##### 3.1.1 Biochemische methoden

Een veel gebruikte biochemische methode berust op affiniteits-chromatografie. Daarbij wordt een celextract over een drager (vb. sepharose-parels) gestuurd waarop het (zuiver) tester-eiwit waarvoor we interactiepartners zoeken, gekoppeld is. Bindende eiwitten worden weerhouden en daarna geëlueerd met bijvoorbeeld hoog zout. Koppeling van het eiwit aan de vaste drager gebeurt dikwijls indirect als een chimeer fusie-eiwit: aan het eiwit wordt via recombinant DNA technieken een (poly)peptide gekoppeld dat eenvoudige koppeling aan een gemerkte drager toelaat:

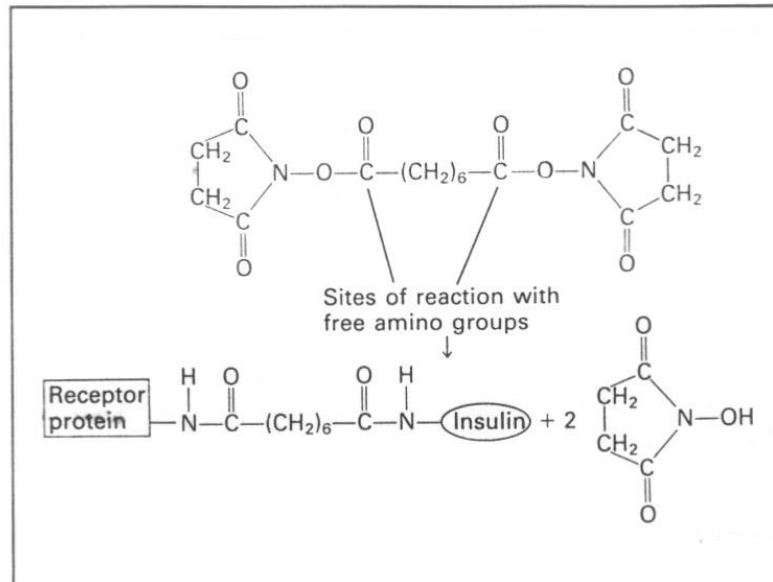
<b>fusie(poly)peptide</b>	<b>gemerkte drager</b>
oligohistidine	nikkel
FLAG-epitoom	FLAG antilichaam
Maltose-bindend eiwit	amylose
Glutathion S-transferase (GST)	glutathion

Daarnaast wordt ook co-immunoprecipitatie frequent toegepast. Aan de dragers wordt het Proteïne A of Proteïne G covalent gekoppeld. Deze eiwitten vertonen een hoge affiniteit voor de Fc gebieden van antilichamen. Indien antilichamen tegen het tester-eiwit voorhanden zijn kunnen we dit eiwit, en mogelijk andere eiwitten die ermee gecomplexeerd zijn, opzuiveren uit een cel extract. Het gebruik van bifunctionele cross-linkers kan helpen de eiwit-complexen te stabiliseren.

Identificatie kan gebeuren na gelectroforese, gekoppeld aan Edman degradatie of massa-spectrometrische analyse. We verwijzen hiervoor naar de lessenspakketten biochemie. Indien men een specifieke eiwit-eiwit interactie wenst te onderzoeken, kan ook gebruik gemaakt worden van Western blotting met specifieke antilichamen.

Een onvermijdelijk nadeel verbonden aan alle biochemische methoden is de vereiste cellen te lyseren en extracten te bereiden. Dit laat enerzijds valse interacties toe tussen eiwitten die in een cel bijvoorbeeld in verschillende compartimenten gelocaliseerd zijn; anderzijds kunnen dynamische en zwakke interacties moeilijk gedetecteerd worden.

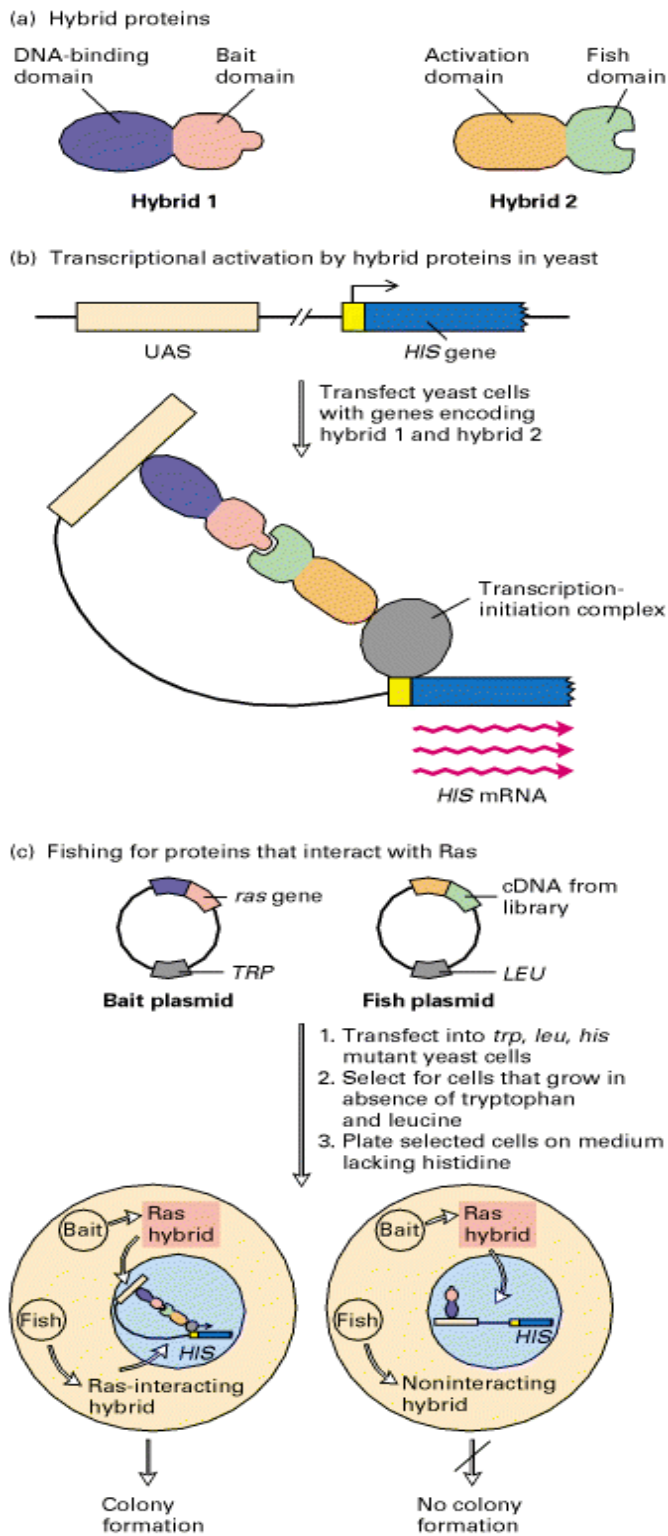
Om deze interacties beter te kunnen detecteren wordt soms gebruik gemaakt van *chemische crosslinking*. Bij deze techniek worden interagerende eiwitten covalent verbonden bij middel van een zogenaamde *cross-linker*. De meeste dergelijke cross-linkers bevatten twee reactieve groepen die reageren met vrije aminogroepen (bv. zijketens van Lys, Arg).



Daarna worden de cellen gelyseerd door detergent toe te voegen, zodat de celmembranestructuur vernietigd wordt. Deze techniek wordt vaak gebruikt om ligand-receptor interacties te bestuderen. Daarbij worden cellen geïncubeerd met een radioactief ligand en vervolgens behandeld met crosslinker. Wanneer lysaten of membraanpreparaten van deze cellen op een polyacrylamidegel worden gescheiden door electroforese, zullen we na autoradiografie een band waarnemen die migreert ter hoogte van de som van het ligand en de receptor. Deze techniek laat dus toe de receptoren te visualiseren: zowel het aantal receptoren in een receptorcomplex als hun grootte kan bepaald worden.

## 3.1.2 Genetische methoden

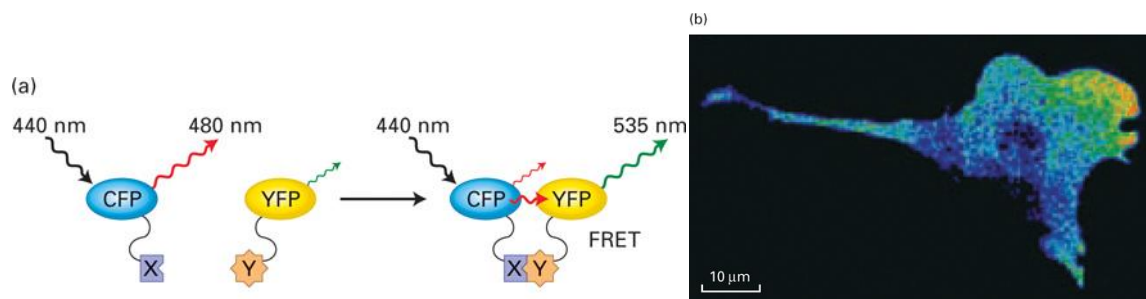
### 3.1.2.1 Gist twee-hybride



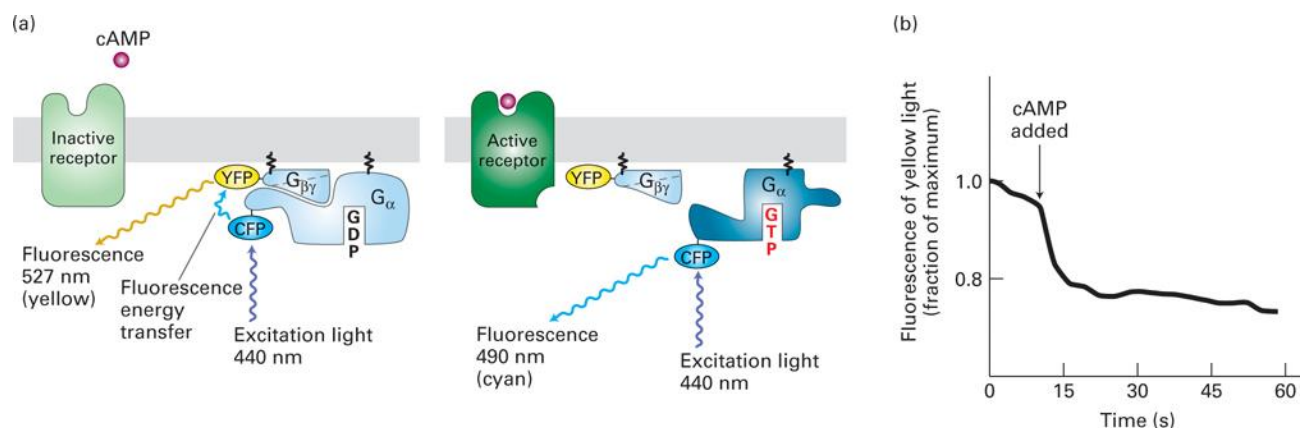
De meest gebruikte genetische methode is het gist twee-hybride systeem (yeast two-hybrid). Essentieel bij deze methode is dat genactivatie afhankelijk gemaakt is van de interactie tussen twee eiwitten. Het is een zeer ingenieuze methode geënt op de eigenschap van veel transcriptiefactoren dat ze opgebouwd zijn uit twee onafhankelijk opererende functionele domeinen: het DNA-bindend en het transactiverend domein.

### 3.1.2.2 Förster Resonance Energy Transfer (FRET)

Interactie van eiwitten kan in levende cellen worden gemeten en gevisualiseerd via FRET, een techniek waarin het fenomeen van "fluorescentie-energie transfer" wordt uitgebuit. Een molecule is fluorescent wanneer ze licht met een bepaalde golflengte absorbeert (excitatiegolflengte) en daaropvolgend licht met een specifieke (langere) golflengte uitzendt (emissiegolflengte). Bij FRET worden twee fluorescente eiwitten gebruikt, waarbij de emissie-golflengte van het eerste eiwit gelijk is aan de excitatie-golflengte van het tweede eiwit. Wanneer bijv. cyaan fluorescent eiwit (CFP) wordt geëxciteerd met 440-nm golflente licht, zal het fluoresceren en op zijn beurt licht met een golflengte van 480 nm uitzenden. Indien op dat moment yellow fluorescent eiwit (YFP) in de nabijheid is, zal dit het 480-nm licht absorberen en licht met een golflengte van 535 nm uitzenden. De efficiëntie van deze energietransfer is in verhouding met de nabijheid van de fluoroforen en is in de praktijk niet meer te detecteren wanneer de afstand tussen de interagerende fluoroforen meer dan 10 nm bedraagt. Het licht dat wordt uitgezonden kan worden gemeten door gebruik te maken van een fluorimeter of gevisualiseerd worden door middel van fluorescentiemicroscopie (zie ook 3.5).



In onderstaande figuur werd FRET gebruikt om aan te tonen dat dissociatie van de  $G_{\alpha}$  eenheid van de  $G_{\beta\gamma}$  eenheid optreedt binnen een paar seconden na ligand activatie. (opgelet, in dit experiment werden amoëbe (*Dictyostelium discoideum*) cellen gebruikt en in deze fungeert cAMP ook als extracellulaire signaalmolecule, en bindt het op een GPCR).



## 3.2 Cloning van receptor genen.

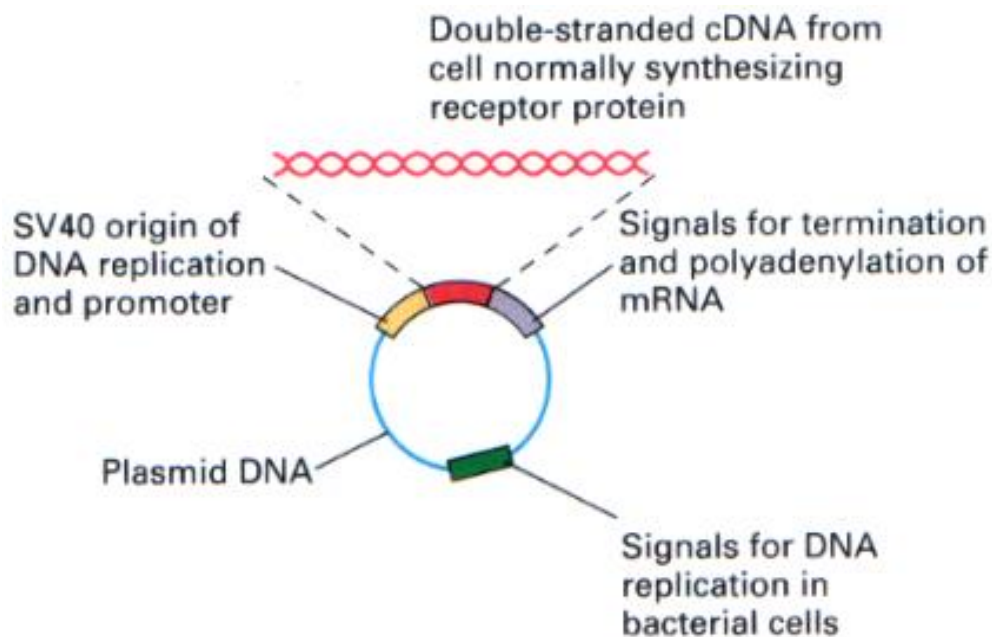
### 3.2.1 Affiniteitspurificatie

Een eerste benadering die veelvuldig aangewend wordt om receptorgen te clonen is via zuivering. Vele receptoren behouden hun bindingskarakteristieken voor het ligand na oplossen van de celmembraan met detergenten. Dit laat *affiniteits-chromatografie* toe, waarbij het ligand (of een antilichaam gericht tegen de receptor) covalent gekoppeld wordt aan een vaste drager. Door de zeer hoge bindings-specificiteit enerzijds en de hoge affiniteit anderzijds kan op deze wijze in één enkele zuiveringsstap de receptor vrij homogeen bekomen worden. Na eiwit-sequentie-analyse kan dan via oligonucleotiden gezocht worden naar het receptor gen.

### 3.2.2 Expressiecloning

Dikwijls is het receptoraantal per cel (honderden of duizenden) veel te laag om via zuivering de minimale hoeveelheid receptor-eiwit te bekomen vereist voor sequentie-analyse. Zeer veel receptor genen werden daarom geïsoleerd via zogenaamde *expressie-cloning*. Deze procedure verloopt als volgt:

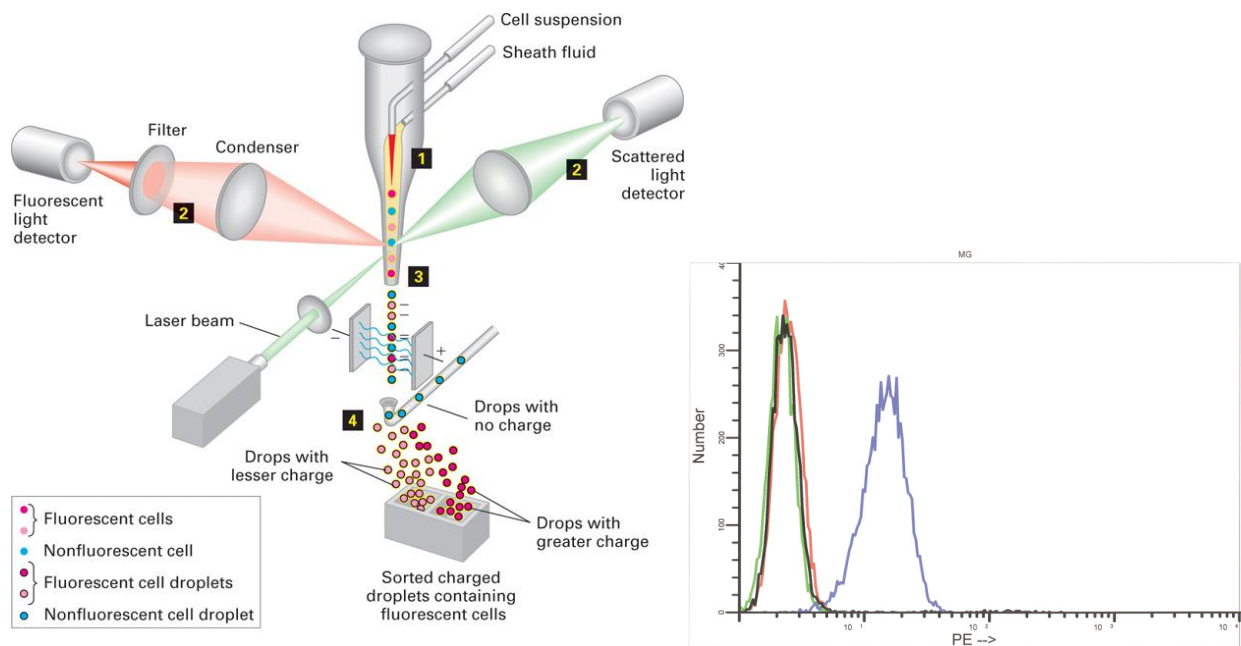
1. een cDNA bibliotheek wordt aangemaakt vanaf mRNA afkomstig uit een celtype dat de receptor bevat. De cDNAs worden hierbij gekloneerd in een plasmide-vector die expressie toelaat in eukaryote cellen: een "shuttle" vector.



2. groepen van dergelijke plasmiden met cDNAs worden opgezuiverd uit de bacteriële kolonies, en via transfectie ingebracht in eukaryote cellen die een hoge expressie toelaten.

3. "screening" kan gebeuren door middel van "flow cytometrische cell sorting". Een flow cytometer is een toestel dat cellen door een laserstraal stuurt en toelaat de fluorescentie

van individuele cellen, opgewekt door de laserexcitatie, te bepalen. Wanneer cellen gelabeld worden met een fluorescent ligand (of indirect: met een ongemarkt ligand en een gemerkt antilichaam dat het ligand herkent) kan dus de fluorescentie-intensiteit van individuele cellen bepaald worden. Een "fluorescence-activated cell sorter" of kortweg FACS is een flow cytometer die een extra module bevat die toelaat cellen te sorteren op basis van hun fluorescentie-eigenschappen. Met de FACS kunnen cellen die het fluorescent gemerkte ligand binden dus geïsoleerd worden uit de pool van getransfecteerde cellen. Enkel cellen die de receptor uitdrukken zullen dit gemerkte ligand binden en door middel van flow cytometrie kunnen deze cellen dan uit de pool van getransfecteerde cellen worden geïsoleerd.



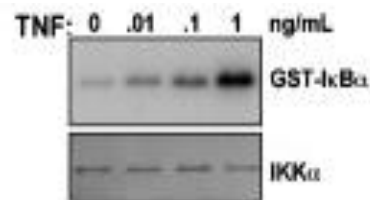
4. Door middel van PCR op genomisch DNA van FACS-gesorteerde cellen kan tenslotte de identiteit van het receptorgen dat een voorheen "orphan" ligand herkent worden bepaald.



### 3.3 Meten van kinase activiteit

#### 3.3.1 In vitro-kinase assay

Immunoprecipitatie-assays worden vaak gebruikt om de activiteit van een bepaald kinase in een celextract te bepalen. In één versie van deze techniek wordt een specifiek antilichaam voor het kinase gekoppeld aan proteïne-A parels. Deze parels worden dan gemengd met een celextract dat het kinase van interesse bevat. De antilichaam-gekoppelde proteïne A parels binden het kinase en het complex van parels-antilichaam-kinase kan vervolgens door centrifugatie worden geïsoleerd. Om de activiteit van het kinase in het celextract te bepalen worden de complexen geïncubeerd met een gekend substraat van het kinase en radioactief gemerkt ATP (g-[<sup>32</sup>P]). De hoeveelheid fosfaat die door het kinase wordt overgebracht op zijn substraat kan worden bepaald door de reactiemengsels te laden op een polyacrylamide gel en het radioactief gemerkt (bijgevolg gefosforyleerd) substraat te detecteren door middel van autoradiografie.

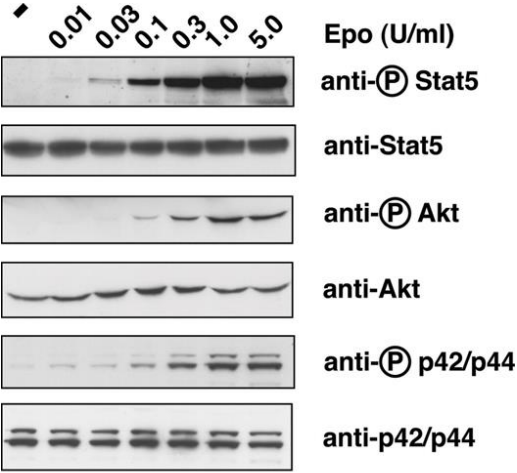


(from O'Dea et al, Mol Cell 2008)

#### 3.3.2 Gebruik van fosfo-specifieke antilichamen om kinase-activiteit te bepalen

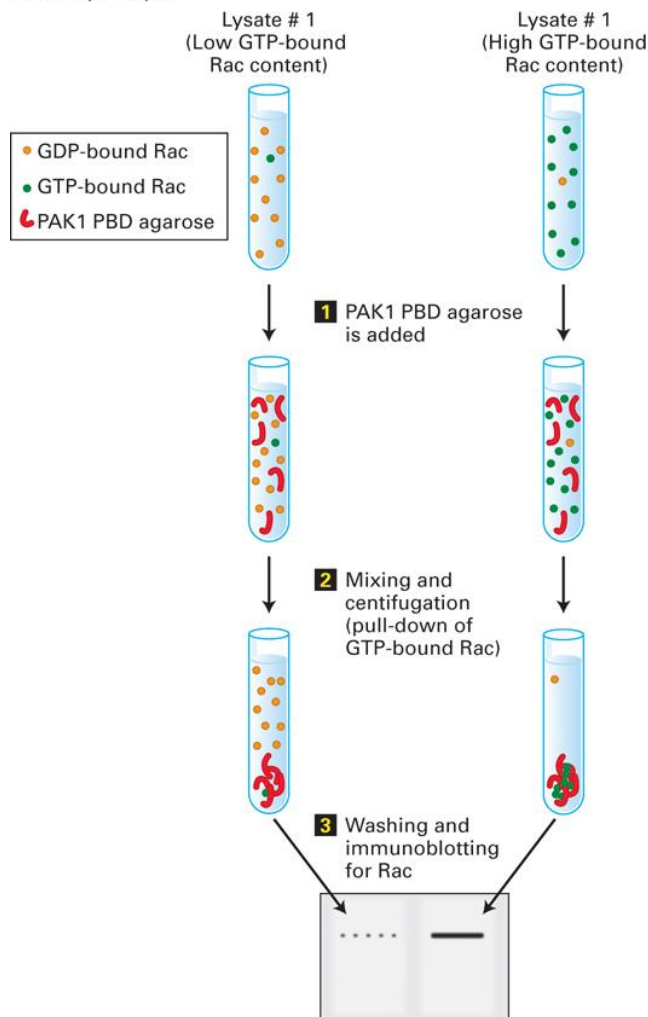
Vele eiwitten kunnen worden gefosforyleerd door verschillende kinasen, vaak op verschillende serine, threonine of tyrosine residus. Om na te gaan welke aminozuren precies worden gefosforyleerd in een eiwit kan men gebruik maken van antilichamen die een specifiek gefosforyleerd aminozuur in een eiwit herkennen. Om deze antilichamen te genereren, gebruikt men synthetische peptiden, die ongeveer 15 aminozuren lang zijn en bestaan uit het aminozuur van interesse, dat chemisch werd gefosforyleerd, en de omringende aminozuren. Dit peptide wordt vervolgens gebruikt om door immunisatie antilichamen te genereren. De antilichamen die op deze manier worden opgewekt worden geselecteerd voor minimale kruisreactie met het niet-gefosforyleerd peptide. Specifieke herkenning van slechts één bepaald eiwit door deze antilichamen is mogelijk omdat het antilichaam niet enkel het gefosforyleerd residu, maar ook de omringende aminozuren zal herkennen.

In onderstaande figuur werden fosfo-specifieke antilichamen gebruikt om fosforylatie van STAT5, Akt en p42/p44 in rode bloedcellen behandeld met erythropoietine na te gaan.



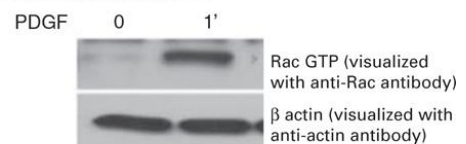
### 3.4 Meten van GTPase activiteit door middel van "pull-down assays".

(a) Assay Principle



Om de activiteit van GTP-bindende eiwitten na te gaan, wordt vaak gebruik gemaakt van de eigenschap dat de meeste van deze eiwitten binden aan één of meer doelwiteiwitten, maar dit enkel in GTP-gebonden toestand (dus in de "aan" stand). Pull-down assays lijken op de eerder beschreven immunoprecipitatie-techniek, doch in plaats van een antilichaam dat het kinase herkent, wordt hier gebruik gemaakt van het bindingsdomein van een gekend doelwit van een bepaald GTP-bindend eiwit.

(b) Western blot of hematopoietic stem cells before and after treatment with PDGF



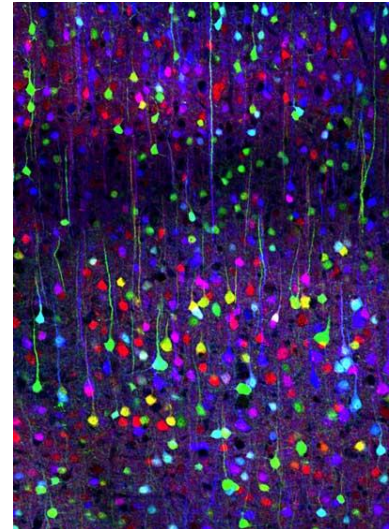
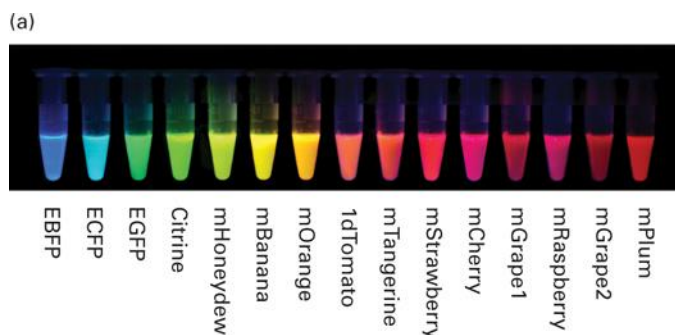
Het doelwiteiwit wordt recombinant aangemaakt met een epitoom die koppeling aan parels toelaat. Door centrifugatie kunnen dan de complexen van parels-doelwiteiwit-GTP-bindend eiwit worden geïsoleerd. Deze complexen worden geladen op een acrylamidegel en de hoeveelheid GTP-bindend eiwit kan worden gekwantificeerd door middel van Western blot detectie met een antilichaam dat het GTP-bindend eiwit herkent. In onderstaande figuur werd deze methode gebruikt om na te gaan of PDGF het GTP-bindend eiwit Rac activeert. Als Rac doelwit werd het PAK1 p21-bindend domein (PBD) gebruikt. Uit dit experiment blijkt dat PDGF inderdaad Rac activeert



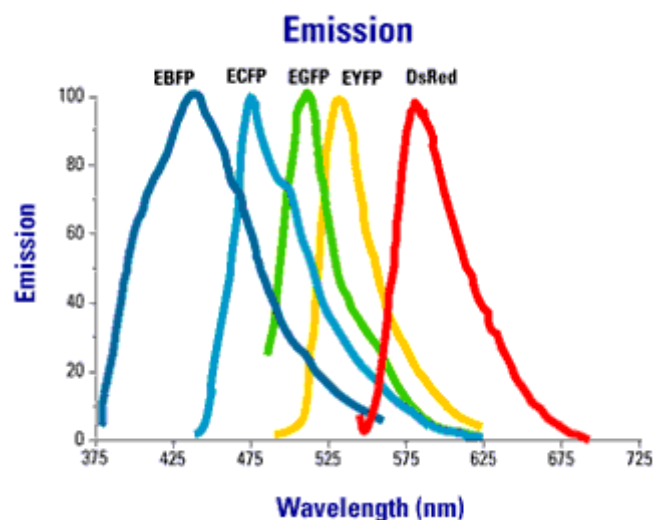
## 3.5 Studie van subcellulaire localisatie van eiwitten.

### 3.5.1 Fluorescentie-microscopie.

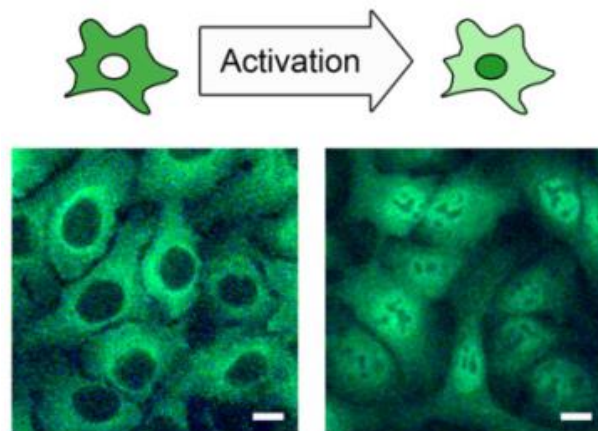
Verschillende signaaleiwitten verplaatsen zich tijdens het signaaltransductieproces in de cel. Deze verplaatsingen kunnen gevolgd worden door gebruik te maken van fluorescentiemicroscopie. Daarbij wordt, net zoals bij FRET en flow cytometrie, gebruik gemaakt van fluoroforen. Bij fluorescentiemicroscopie worden deze fluoroforen geëxciteerd met een kwikdamplamp of laser (confocale microscopie) en wordt, door het gebruiken van filters tussen de objectieflens en het oog (of de camera), enkel het emissielicht afkomstig van de fluoroforen doorgelaten voor de beeldvorming.



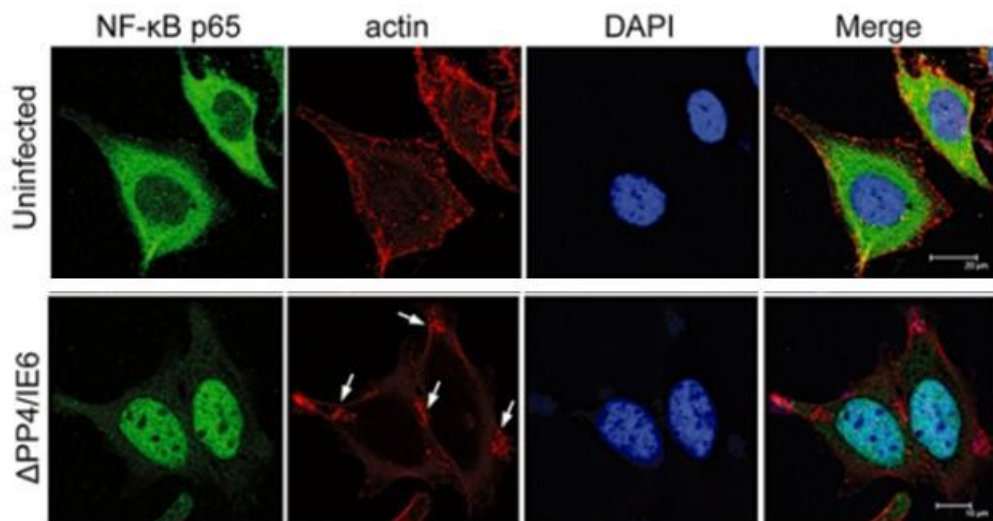
Vaak wordt voor translocatiestudies gebruik gemaakt van chimere fusie-eiwitten, waarbij het eiwit van interesse aan een eiwit met fluorescente eigenschappen wordt gekoppeld. DNA coderend voor een dergelijk chimeer eiwit wordt in een expressievector gecloneerd en getransfecteerd in dierlijke cellen. Het meest bekende fluorescente eiwit is "green fluorescent protein" of GFP. GFP komt in de natuur voor in luminescente kwallen (*Aequorea victoria*) en werd begin jaren '90 gecloneerd. Sindsdien zijn er op basis van de GFP sequentie veel verschillende GFP mutanten, met verschillende excitatie-emissie eigenschappen, gemaakt.



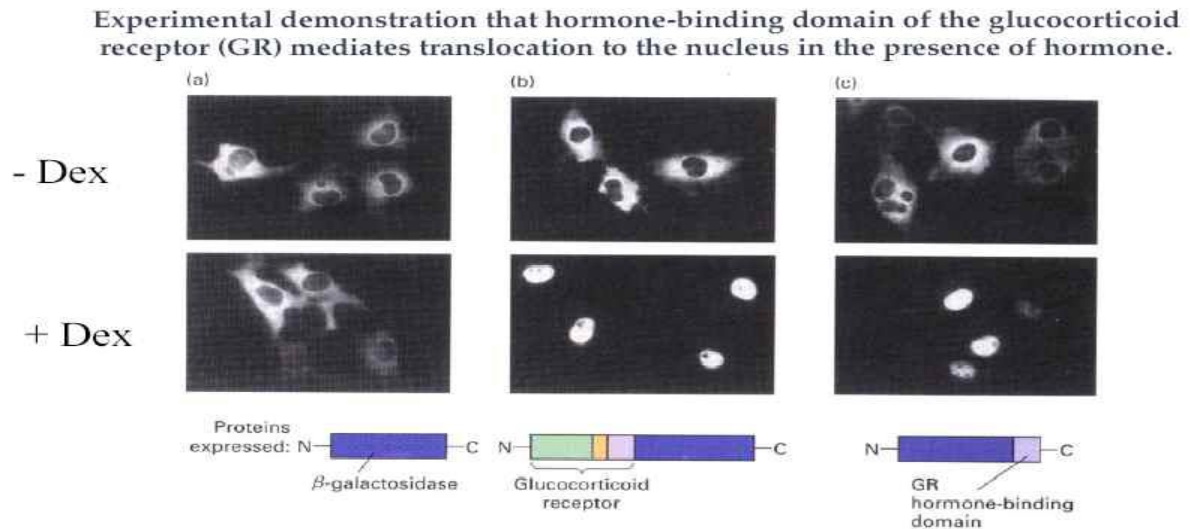
In onderstaande figuur werden cellen getransfecteerd met p65-GFP (p65 is een subeenheid van de dimere NF- $\kappa$ B, zie 2.8) transcriptiefactor. Na behandeling van de cellen met LPS transloceert het chimere p65-GFP eiwit vanuit het cytoplasma naar de kern.



Fluorescentie-microscopie kan ook gebruikt worden om de localisatie van endogene eiwitten te bestuderen. In dit geval wordt gebruik gemaakt antilichamen die covalent gelinkt worden aan een fluorochroom. Omdat de antilichamen in de cel moeten geraken om hun doelwit te binden, vereist deze techniek (in tegenstelling tot de GFP methode, die op levende cellen kan gebeuren) fixatie en permeabilisatie van de cellen. Er is een zeer uitgebreid gamma aan fluorochromen, met verschillende excitatie-emissie spectra beschikbaar, wat toelaat verschillende doelwit-eiwitten tegelijkertijd te onderzoeken.



Het gebruik van *eiwit-chimeren* en fluorofoon-gekoppelde antilichamen wordt ook vaak gecombineerd. Zo werd de rol van het LBD van de glucocorticoid receptor (GR, zie 2.2) voor translocatie van GR naar de kern aangetoond door chimere GR eiwitten, opgebouwd uit een enzyme ( $\beta$ -galactosidase), gekoppeld aan de volledige GR, of enkel aan het LBD ervan te cloneren en transfacteren in dierlijke cellen. Visualisatie gebeurde met een fluorofoon-gemerkt antilichaam gericht tegen  $\beta$ -galactosidase. Toevoegen van het ligand (dexamethasone, Dex) leidde tot nucleaire translocatie van het chimeer dat enkel het GR-LBD bevat. Merk op dat deze studie stamt uit het pre-GFP tijdperk. Vandaag worden dergelijke experimenten meestal met fluorescente chimere eiwitten gedaan.



Cultured animal cells were transfected with expression vectors encoding the proteins diagrammed at the bottom. Immunofluorescence with a labeled antibody specific for  $\beta$ -galactosidase was used to detect the expressed proteins in transfected cells. [From D. Picard and K. R. Yamamoto, 1987, *EMBO J.* 6:3333; courtesy of the authors.]