

BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Marija Ger

NCK ADAPTORINIO BALTYMO IR P120 RAS GTPAZĘ
AKTYVINANČIO BALTYMO SAŲVEIKOS MECHANIZMAS BEI
VAIDMUO RAS AKTYVUMO REGULIAVIME

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2003-2009 metais Biochemijos Institute
Disertacija ginama eksternu

Mokslinis konsultantas:

dr. Mindaugas Valius (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija –
04P)

Turinys

| | |
|--|----|
| Santrumpų sąrašas..... | 5 |
| Įvadas..... | 6 |
| Darbo uždaviniai..... | 8 |
| Mokslinis naujumas..... | 8 |
| Ginamieji teiginiai..... | 10 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 11 |
| 1.1. GTPazių Ras šeima..... | 11 |
| 1.1.1. Tradicinės GTPazės Ras | 14 |
| 1.1.2. Kiti Ras šeimos baltymai..... | 17 |
| 1.2 Ras reguliavimas..... | 22 |
| 1.2.1 Ras guanino nukleotido mainų faktoriai | 23 |
| 1.2.2 Ras GTPazę aktyvinantys baltymai..... | 25 |
| 1.2.2.1 p120 Ras GTPazę aktyvinantis baltymas..... | 26 |
| 1.2.2.2 Kiti Ras GTPazę aktyvinantys baltymai..... | 33 |
| 1.3 Signalo nuo Ras perdavimas..... | 34 |
| 1.3.1 Raf-MEK-Erk signalo perdavimo kelias..... | 35 |
| 1.3.2 Ral šeimos baltymų vaidmuo..... | 38 |
| 1.3.3 Nuo PI3K priklausomi keliai..... | 38 |
| 1.3.4 Nuo RASSF priklausomi keliai..... | 40 |
| 1.3.5 Kiti nuo Ras priklausomi signalo perdavimo keliai..... | 42 |
| 1.4 Adaptoriniai baltymai ir jų vaidmuo signalo perdavime..... | 43 |
| 1.4.1 SH2 domenai..... | 44 |
| 1.4.2 SH3 domenai..... | 45 |
| 1.5. Adaptorinių baltymų Nck šeima..... | 47 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI..... | 55 |
| 2.1. Ląstelių linijos..... | 55 |
| 2.2. Ląstelių lizatų paruošimas..... | 55 |
| 2.3. Ekspresijos konstruktai, antikūnai, kiti reagentai..... | 56 |
| 2.4. Imunonusodinimas ir imunoblota..... | 58 |
| 2.5. Su GST sulietų baltymų gryninimas ir nusodinimo su rekombinantinis baltymais metodas..... | 58 |
| 2.6. Laikinoji transfekcija..... | 59 |
| 2.7. Netiesioginis imunoblota..... | 59 |
| 2.8. Imunofluorescencija ir konfokalinė mikroskopija..... | 59 |
| 2.9. RasGAP aktyvumo matavimas..... | 60 |
| 2.10. Laikiniai ekspresuoto HA epitopu pažymėto H-Ras (HA-H-Ras) aktyvumo ląstelėje matavimas..... | 61 |
| 2.11. Statistinė duomenų analizė..... | 61 |
| 3. REZULTATAI..... | 62 |
| 3.1. Adaptorinių baltymų Nck sąveika su p120 Ras GTPazę aktyvinančiu baltymu (RasGAP)..... | 62 |
| 3.2. Nck1 ir RasGAP kolokalizacija ląstelėje..... | 65 |

| | |
|---|-----|
| 3.3. Nck1 ir RasGAP domenų, atsakingų už adaptorinio baltymo Nck1 komplekso su RasGAP susidarymą, nustatymas..... | 67 |
| 3.4. Nck1 ir RasGAP sąveikos potencialių tarpininkų paieška..... | 73 |
| 3.5. Baltymų Nck1 ir RasGAP sąveikos priklausomybė nuo poveikio PDGF-BB augimo faktoriumi arba ląstelės citoskeletą suardančiais slopikliais..... | 75 |
| 3.6. Nck1 ir RasGAP kolokalizacijos su aktino citoskeletu tyrimas... | 77 |
| 3.7. Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja po adhezinių ląstelių sąveikos su substratu suardymo..... | 79 |
| 3.8. Nck1 sąveikos su RasGAP įtaka GTPazės Ras aktyvumui..... | 84 |
| 4. REZULTATŲ APTARIMAS..... | 91 |
| IŠVADOS..... | 100 |
| Literatūros sąrašas..... | 101 |
| Publikacijų sąrašas..... | 115 |

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

| | |
|-------|---|
| C2 | Ca ²⁺ reguliuojamas sąveikos su membrana [domenas]-2 |
| cAMP | Ciklinis adenozinomonofosfatas |
| GAP | GTPazę aktyvinantis baltymas |
| GEF | Guanino nukleotido mainų faktorius |
| GST | Gliutatio S-transferazė |
| DAG | diaciloglicerolis |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindolis |
| DME | Dulbecco modifikuota Eagle terpė |
| H-N | HepG2 ląstelės su įvestu pLXSN vektoriumi |
| H-WT | HepG2 ląstelės, ekspresuojančios laukinio tipo PDGF receptorių |
| HA | Hemoagliutinas |
| MAPK | Mitogenų aktyvinama baltymų kinazė |
| PBS | Fiziologinis tirpalas fosfatiniame buferyje |
| PDGF | Trombocitų kilmės augimo faktorius |
| PDGFR | Trombocitų kilmės augimo faktoriaus receptoriai |
| PGR | Polimerazės grandininė reakcija |
| PH | Plekstrino homologijos [domenas] |
| PI3K | Fosfatidilinozitolio-3 kinazė |
| PVDF | Polivinildifluoridas |
| RBD | Ras prijungiantis domenas |
| RTK | Receptoriai-tirozino kinazės |
| SH | Src homologijos [domenas] |
| WT | Laukinis tipas |

IVADAS

Kiekvienai gyvai sistemai, nuo viruso iki ekosistemos, yra būdingi vystymasis bei homeostazės palaikymas. Galima net teigti, jog tai yra esminiai gyvosios gamtos bruožai. Daugialąsčiame organizme harmoningą vystymąsi bei homeostazę užtikrina ryšiai tarp ląstelių. Nei viena ląstelė nesidalija, nesidiferencijuoja arba nepereina į apoptozę be atitinkamo procesą reguliuojančio signalo. Reguliacijos defektai pasireiškia įvairiausiais sutrikimais, ligomis ar sindromais, pažeidžiančiais atskirus organus arba visą organizmą. Ryškiausias tokių ligų pavyzdys yra vėžys, pasireiškiantis nekontroliuojamu ląstelių dalijimusi, bei įvairūs imuninę sistemą pažeidžiantys sindromai, organizmo vystymosi sutrikimai.

Ląstelės ciklą ir diferenciaciją reguliuojantys signalai dažniausiai yra specifiniai augimo faktoriai, paskleisti skystoje terpėje tarp ląstelių ir įtakojantys tik tam tikras ląstelių grupes, turinčias receptorius, giminingus duotajam faktoriui. Receptorius, dažniausia esantis ląstelės membranoje, reaguoja su faktoriumi ir sukelia ląstelės viduje biocheminių reakcijų grandinę, nulemiančią tolesnį ląstelės likimą. Pagrindiniai šių reakcijų dalyviai yra baltymai. Ląstelės baltymų sudėtis nulemia, ar ląstelė reaguoja į išorės signalą ir kaip ji į tą signalą reaguoja. Vienas kertinių ląstelės likimą nulemiančių baltymų yra GTPazė Ras. Tiksliau, šiuo vardu yra vadinamos trys Ras GTPazės: N-, H- ir K-Ras. Jų aminorūgščių sekos ir funkcijos yra beveik vienodos. Į Ras baltymus sueina įvairūs reguliavimo keliai, priklausomai nuo efektorių balanso aktyvus Ras įjungia skirtingus procesus: dalijimąsi, diferenciaciją, išgyvenimą, endo- arba egzocitozę, citoskeleto persitvarkymus, judėjimą (Bos 1989). Ras baltymai yra būtini ląstelės funkcionavimui. GTPazių N-, H- ir K-Ras funkcijos didžiąja dalimi persikloja ir pavienių N-, H- ir K-Ras genų išjungimas įtakos beveik neturi, tačiau visų Ras baltymų ekspresijos išjungimas yra mirtinas (Potenza, Vecchione et al. 2005). Ras baltymų mutacijos yra aptinkamos beveik visų vėžio formų atvejais, jos būdingos nuo 10 % (šlapimo pūslės vėžys) iki 90 % (kasos vėžys) navikų ląstelių (Pamonsinlapatham, Hadj-Slimane et al. 2009).

Baltymai Ras gali egzistuoti dvejose būsenose: neaktyvioje su GDP sujungtoje (Ras-GDP) arba aktyvioje su GTP sujungtoje (Ras-GTP). Su GTP sujungtas Ras gali sąveikauti su reguliuojamaisiais baltymais ir veikti ląstelės funkcijas. Su GDP sujungtas Ras yra neaktyvus. Itin svarbi yra Ras aktyvumo dinamika, tai yra, įjungimas ir išjungimas, griežtas valdymas laike ir erdvėje. Ras mutacijos, sąlygojančios pastovų nereguliuojamą Ras aktyvumą, skatina nevaldomą ląstelių dalijimąsi bei migraciją ir taip paverčia sveikas ląsteles vėžinėmis. Už Ras aktyvumą, tai yra nukleotido GDP pakeitimą nukleotidu GTP yra atsakingi GEF vadinamų baltymų grupė – guanino nukleotido mainų faktoriai. Aktyvus Ras dėl nuosavo GTPazinio aktyvumo pamažu pats hidrolizuoja GTP iki GDP ir pereina į neaktyvią formą, tačiau natūralus Ras GTPazinis aktyvumas yra labai silpnas ir jo nepakanka, kad Ras būtų valdomas griežtai ir efektyviai. Todėl egzistuoja už Ras išjungimą atsakingi baltymai RasGAP. Sąveikaudami su Ras jie padidina Ras nuosavą katalizinį aktyvumą iki 10^5 kartų ir užtikrina staigų Ras išjungimą (Pamonsinlatham, Hadj-Slimane et al. 2009).

Taigi, GEF ir GAP baltymai betarpiškai reguliuoja Ras įjungimą ir išjungimą. Tačiau kas valdo reguliatorius, kaip yra užtikrinamas reguliatorių atsiradimas ir aktyvumas duotuoju momentu duotame ląstelės kompartimente? Ir GEF, ir GAP baltymų yra kelios šeimos, kiekviena jų yra reguliuojama skirtingai: erdviškai, fiziškai priartinant baltymą prie Ras, cheminėmis modifikacijomis, kofaktoriais, sąveika su pagalbinais baltymais (Bos, Rehmann et al. 2007).

Pagrindinis Ras išjungiantis baltymas arba neigiamas reguliatorius yra p120 RasGAP. Nors tai yra anksčiausiai atrastas RasGAP baltymas, apie jo reguliaciją žinoma nedaug. Yra parodyta, jog atskirais atvejais p120 RasGAP aktyvumas Ras atžvilgiu yra užtikrinamas priartinant RasGAP prie membranos, kur yra lokalizuotas Ras. Kai kurie su p120 RasGAP sąveikaujantys baltymai slopina RasGAP katalizinį aktyvumą (Bos, Rehmann et al. 2007).

Mes tyrėme naujai atrastą p120 RasGAP sąveiką su baltymu Nck. Nck yra adaptorinių baltymų šeima. Tokie baltymai nepasižymi jokių katalizinių aktyvumu, tačiau turi daugybinius domenus, užtikrinančius sąveikas tarp kitų baltymų. Šitai adaptoriniai baltymai gali keisti savo partnerių lokalizaciją ląstelėje arba, priartinant baltymą-fermentą prie baltymo-substrato, didinti arba slopinti su adaptoriumi sąveikaujančio baltymo aktyvumą. Atskirais atvejais adaptoriniai baltymai sąveikaudami su partneriu gali keisti jo konformaciją ir tokiu būdu – jo aktyvumą arba gebėjimą sąveikauti su reguliatoriais arba efektoriais.

Pagrindinis darbo tikslas buvo nustatyti adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP sąveikos mechanizmą bei ištirti šių baltymų komplekso įtaką mažosios GTPazės Ras aktyvumui.

Ras aktyvumui

Darbo uždaviniai:

- Ištirti baltymų Nck ir RasGAP sąveiką skirtingose ląstelių linijose bei sąveikos specifiškumą Nck šeimos baltymams Nck1 ir Nck2.
- Ištirti baltymų Nck1 ir RasGAP lokalizaciją ląstelėje.
- Nustatyti už RasGAP ir Nck1 sąveiką atsakingus domenus.
- Įvertinti ląstelių prilipimo prie substrato įtaką Nck1 ir RasGAP kompleksui.
- Nustatyti Nck1 asocijavimo su RasGAP įtaką kataliziniam RasGAP aktyvumui.

Mokslinis naujumas

Darbo metu mes tyrėme kompleksą tarp adaptorinio baltymo Nck1 ir Ras pagrindinio neigiamo reguliatoriaus RasGAP bei šio komplekso vaidmenį ląstelėje. Sąveika tarp šių dviejų baltymų buvo atrasta mūsų laboratorijoje tiriant Nck1 sąveiką su plokštelių kilmės augimo faktoriaus (PDGF) receptoriumi (Ger, Tunaitis et al. 2003). Nors Nck1 ir RasGAP buvo atrasti beveik prieš 20 metų ir parodyta, jog jie kartu dalyvauja įvairių viduląstelių

procesų reguliavime, niekas dar nebuvo paskelbęs tiesioginės sąveikos tarp šių dviejų baltymų. Mes parodėme kompleksą tarp Nck1 ir RasGAP egzistavimą biocheminiais bei konfokalinės mikroskopijos metodais, ištyrėme sąveikos priklausomybę nuo poveikio PDGF augimo faktoriumi bei eile slopiklių. Naudojant RasGAP ir Nck1 delecinius bei taškinius mutantus buvo nustatyti už sąveiką tarp šių baltymų atsakingi domenai: Nck1 pirmasis ir trečiasis SH3 domenai bei RasGAP N-galinė prolino turtinga seka.

Naujausi proteomikos metodai šiuo metu suteikia gausybę informacijos apie sąveikas tarp baltymų ir leidžia modeliuoti tarpbaltyminių sąveikų tinklus iš tūkstančių dalyvių. Todėl sąveikos tarp dviejų baltymų konstatavimas savaime nėra žymus atradimas. Tačiau yra kur kas sudėtingesnė ir kruopštaus darbo reikalaujanti užduotis: biologinių procesų, kuriuose dalyvauja duotasis baltymų kompleksas, nustatymas. Buvo parodyta, jog adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja po adhezinių ląstelių suspendavimo. Už šią disociaciją yra atsakinga nežinoma RasGAP baltymo modifikacija arba nenustatytas su RasGAP sąveikaujantis baltymas. Nors pagrindinė RasGAP funkcija yra mažosios GTPazės Ras aktyvumo reguliavimas, parodyta, jog nekatalizinė RasGAP baltymo dalis yra susijusi su ląstelių prilipimo prie substrato reguliavimu (McGlade, Brunkhorst et al. 1993). Toks RasGAP poveikis yra siejamas su p190 RhoGAP baltymo, sąveikaujančio su RasGAP, aktyvumo ir vietos ląstelėje pokyčiais. Mūsų duomenys leidžia daryti prielaidą, jog Nck1 baltymas, žinomas kaip svarbus citoskeleto persitvarkymą kontroliuojantis baltymas (Buday, Wunderlich et al. 2002), potencialiai dalyvauja ląstelių sąveikos su substratu reguliavime.

RasGAP yra pagrindinis mažosios GTPazės Ras išjungiantis baltymas. Apie paties RasGAP katalizinio aktyvumo reguliavimą žinoma nedaug. Šiame darbe mes pirmą kartą sistemoje *in vitro* bei ląstelėje parodome, jog RasGAP aktyvumą gali padidinti sąveika su kitu baltymu – adaptoriniu baltymu Nck1. Rezultatai rodo RasGAP aktyvumo padidėjimą ir, atitinkamai, Ras aktyvumo sumažėjimą, esant Nck1 pertekliui, bei RasGAP aktyvumo sumažėjimą ir Ras aktyvumo padidėjimą suspenduotose ląstelėse, kur Nck1 ir RasGAP

kompleksas yra disocijavęs. Toks RasGAP ir Ras aktyvumo reguliavimo kelias yra visiškai naujas.

Turint omenyje, jog Ras reguliuojantys baltymai yra potencialūs terapeutiniai taikiniai daugeliui ligų, susijusių su GTPazių Ras defektais, šiame darbe gauti duomenis gali būti naudingi ne tik teoriniu moksliniu, bet ir praktiniu aspektu.

Ginamieji teiginiai

1. Nck šeimos baltymai Nck1 ir Nck2 sąveikauja su Ras GTPazę aktyvinančiu baltymu (RasGAP). Ši sąveika yra būdinga skirtingiems ląstelių tipams.
2. Baltymai Nck1 ir RasGAP kolokalizuoja ląstelėje.
3. Už komplekso tarp adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP susidarymą yra atsakingi pirmasis ir trečiasis adaptorinio baltymo Nck1 SH3 domenai bei RasGAP N-galinė prolino turtinga sritis.
4. Adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP sąveika priklauso nuo ląstelių prilipimo prie substrato.
5. Adaptorinio baltymo Nck1 sąveika su RasGAP skatina RasGAP katalizinį aktyvumą GTPazės Ras atžvilgiu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. GTPazių Ras šeima

GTPazių Ras šeima dalyvauja ląstelės dalijimosi, diferenciacijos, išgyvenimo, endo- arba egzocitozės, citoskeleto persitvarkymų, judėjimo reguliavime (Bos 1989). Ras šeima yra taip pat Ras vadinamo GTPazių arba mažųjų G baltymų Ras antšeimio dalis. Į Ras antšeimį įeina Arf, Rab, Ran, Rap, Ras, Rho ir Sar GTPazių šeimos. Arf ir Rab šeimos, talpinančios apie 100 baltymų, valdo visą viduląstelinį transportą, o mažiausia šeima – Ran – reguliuoja nukleocitoplazminį transportą. Ras ir Rho kontroliuoja signalo perdavimą. Ras ir Rho šeimoms priskiriami maždaug trečdalis Ras antšeimio baltymų, o reguliuoja juos iki 60 % (100 genų) GAP baltymų. Tai rodo GTPazių Ras ir Rho svarbą (Malumbres and Pellicer 1998).

Ras antšeimio nariai yra nedideli (20-25 kDa) monomeriniai su GTP sąveikaujantys baltymai, pasižymintys sugebėjimu pereiti iš aktyvios, su GTP sujungtos, į neaktyvią, su GDP sujungtą, formą ir atvirkščiai. Maždaug 2 % žmogaus genų koduoja Ras antšeimio baltymus (apie 160) bei jų reguliatorius. Su GTP sujungtoje formoje Ras antšeimio nariai gali sąveikauti su efektoriniais baltymais ir, tiesiogiai ar netiesiogiai juos keisdami, atlikti savo biologinę funkciją. Paprastai GDP keitimą į GTP skatina guanino nukleotidų mainų faktoriai (*guanin nucleotide exchange factors*, GEF), o Ras GTPazinį aktyvumą ir, tuo pačiu, perėjimą į su GDP sujungtą formą skatina GTPazę aktyvinantys baltymai (*GTPase-activating proteins*, GAP). GEF formuoja kompleksą su GTPaze, esančia su GDP sujungtoje formoje ir palengvina GDP disociaciją iš komplekso. Dėl GTP pertekliaus ląstelėje išsilaisvinusį nukleotidą nedelsiant pakeičia GTP, tuo sukeldamas GEF disociaciją. Kai kuriuos antšeimio narius (Rab, Rho, Ran) reguliuoja guanino nukleotidų mainų slopikliai (GDI), kurie stabilizuoja Rab, Ran ir Rho GTPazes su GDP sujungtoje formoje. GEF ir GAP baltymų aktyvumas priklauso nuo jų lokalizacijos ląstelėje, sąveikos su kitais baltymais, potransliacinių modifikacijų, antrinių signalo pernešėjų. GEF slopikliai ir GAP aktyvintojai yra potencialūs terapeutiniai agentai (Bos, Rehmann et al. 2007).

Ras antšeimio baltymai reguliuoja viduląstelinius procesus laike, veikdami ne tik kaip „jungtukai“, bet ir kaip „taimeriai“, tikslingai įjungdami ir išjungdami procesą bei erdvėje – specifiniuose ląstelės kompartmentuose. Aktyvią vietą neretai apsprendžia GEF baltymai: pavyzdžiui, GTPazė Sar1 yra aktyvinama tik ten, kur yra Sec12 GEF baltymas (prie krovinio receptorių), GTPazė Ran yra aktyvinama RCC1 tik branduolyje (RCC1 sąveikauja su chromatinu). Rab ir Rho atveju, priešingai, lokalizaciją bei aktyvumą neretai apsprendžia su aktyvatoriais sąveikaujantys efektoriai (Takai, Sasaki et al. 2001).

Pagal GTP ir GDP reikšmę funkcionalumui G-baltymai yra skirstomi į dvi grupes:

1. G-baltymai, kurie veikia visą laiką prijungę GTP. Ras baltymai, Rho šeima tam tikrais atvejais (pvz., aktyvinant nuo jų priklausomas kinazes).

2. G-baltymai, kurių aktyvumui būtina GTP ir GDP formų kaita. Tai Rho šeima citoskeleto pertvarkymo atveju, Rab, Sar1/Arf, Ran.

Taškiniai pastoviai aktyvūs onkogeniniai mutantai būdingi tik pirmajai grupei. Iš antrosios grupės onkogenais dažniau būna GEF baltymai (Takai, Sasaki et al. 2001).

Visiems Ras antšeimio baltymams yra būdinga panaši struktūra. Visi jie turi konservatyvų domeną, sąveikaujantį su guanino nukleotidu, GTPazės domeną, sąveikos su efektoriais domeną. Arf, Ras, Rho ir Rab šeimų baltymai C-gale turi hipervariabilias sekas, kurios yra modifikuojamos lipidais ir proteolizuojamos. C-galinės sekos yra skirstomos į keturias grupes:

1. Cys-A-A-X (CAAX). N-Ras, H-Ras ir K-Ras yra farnezilinami cisteino likutyje, A-A-X seka yra nukerpama proteazėmis, o atviras cisteinas yra karboksimetilinamas. N-Ras ir H-Ras po to yra palmitoilinami prieš CAAX esančiame cisteino radikale. K-Ras papildomo cisteino vietoje turi polibazinę seką.

2. Cys-A-A-Leu/Phe. Rap1 cisteinas yra geranilgeranilinamas ir toliau procesuojamas kaip H- ir N-Ras.

3. Cys-X-Cys. Rab3A abu cisteinai yra geranilgeranilinami, o C-galinis cisteinas dar ir karboksimetilinamas.

4. Cys-Cys. Abu Rab1 cisteinai yra geranilgeranilinami.

Lipidų grupės, kuriomis modifikuojami Ras baltymai, yra prijungiamos nuo tarpinių lipidų ir angliavandenių metabolizmo produktų. Lipidinės modifikacijos dažniausiai nulemia mažųjų GTPazių lokalizaciją specifinėse membranose (Takai, Sasaki et al. 2001).

G-baltymai kitiems G-baltymams gali būti efektoriais, dėl ko susidaro ištisos G-baltymų kaskados. Kaskadų viršuje paprastai būna vidinio ar išorinio stimulo aktyvinti Ras, toliau – labiau specializuoti reguliatoriai Rho, ir dar toliau – pvz., Rab. Panašios kaskados gali egzistuoti ir šeimų viduje, pvz., GTPazė Cdc42 aktyvina GTPazę Rac, kuri, savo ruožtu, aktyvina GTPazę Rho. Aktyvinimas paprastai nėra tiesioginis, o per atitinkamų GEF aktyvinimą. Skirtinguose ląstelių tipuose bei skirtingų procesų metu gali susidaryti skirtingos kaskados (Takai, Sasaki et al. 2001).

Skirtingų G-baltymų signalo perdavimo keliai gali persikryžiuoti arba reguliuoti vienodas funkcijas. Pvz., Rho GTPazės reikalingos Ras transformacijai. Rho šeima kartu su Rab reguliuoja ląstelių adheziją ir migravimą: Rho GTPazė skatina įtempimo skaidulų susirinkimą, o Rab5 – disociaciją (Malumbres and Pellicer 1998).

Geriausia ištirti Ras šeimos nariai yra trys taip vadinamos tradicinės GTPazės Ras: H-, N- ir K-Ras. Jos pasižymi tarpusavyje itin aukštu homologijos laipsniu (žymiai skiriasi tik ~20 C-galinių aminorūgščių). Be šių trijų GTPazių, Ras šeimai dar yra priskiriami R-ras1, R-ras2/TC21, R-ras3/M-ras, RalA, RalB, penki Rap baltymai: Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B ir Rap2C ir kai kurie kiti signalo perdavime potencialiai dalyvaujantys baltymai: Rheb1, Rheb2, RasD2/Rhes, AGS1, Rin1-3, Rit, Rad, Noey2, DiRas1/Rig, DiRas2, ERas, DexRas/RasD1, Ges, Gem, κ B-Ras1 ir κ B-Ras2 (sąveikauja su I κ B β stabdydamas jo degradavimą; tai, matomai, yra viena iš lėtesnio I κ B β degradavimo nei I κ B α priežasčių) (Rodriguez-Viciana, Sabatier et al. 2004).

Geriausia tradiciniai Ras yra žinomi kaip proliferacijos reguliatoriai ir išgyvenimo signalo iniciatoriai, tačiau pastaruoju metu nustatyta, jog priklausomai nuo efektorių balanso Ras gali sukelti ir proapoptotinių, ir antiapoptotinių atsakus.

Galvojama, jog normaliose ląstelėse per didelis Ras aktyvumas sukelia apsauginį proapoptotinį signalą, kaip atsvarą į padidintą proliferaciją. Transformuotose ląstelėse onkogeninis Ras, atvirkščiai, skatina išgyvenimą, o ne mirtį (Cox and Der 2003). Be to, Ras baltymai dalyvauja transkripcijos, translacijos, citoskeleto organizacijos, Goldžio aparato ir endo- bei egzocitozės pūslelių susidarymo, tarpląstelių jungčių reguliavime. M-ras, nors pagal sekų homologiją priskirtina prie Ras šeimos, dalyvauja aktino citoskeleto persitvarkyme, kaip ir Rho šeima (Matsumoto, Asano et al. 1997).

Dauguma Ras šeimos GTPazių yra sintetamos ant laisvų polisomų citozolyje. Beveik visi Ras turi CAAX seką, kuri citozolyje yra prenalinama. Prenilintas baltymas yra transportuojamas į endoplazminį tinklą, kur yra veikiamas RCE1 proteaze ir prenilcisteiną atpažįstančia karboksimetiltransferaze (*prenylcysteine-directed carboxymethyltransferase*). Šitaip subrandintas baltymas yra modifikuojamas hipervariabilios srities sekoje, matomai Goldžio aparate, ir transportuojamas į specifines plazminės membranos sritis (Bivona and Philips 2003).

1.1.1. Tradicinės GTPazės Ras

Tradicinėmis GTPazės Ras yra vadinamos GTPazės H-, N- ir K-Ras (tiksliau, alternatyvaus splaisingo produktai K-Ras2A ir K-Ras2B). Onkogenai H-Ras ir K-Ras buvo pirmą kartą identifikuoti 1982 m. (Chang, Gonda et al. 1982). Ras pavadinimas yra kilęs nuo *rat sarcoma* (žiurkių sarkoma), iš kurios dar šešiasdešimtaisiais metais J. Harvey (Harvey 1964) ir W. Kirsten (Kirsten, Schauf et al. 1970) buvo išskyre ląsteles transformuojančius virusus (šių mokslininkų garbei ir atsirado pavadinimai atitinkamai H- ir K-Ras). N-Ras buvo identifikuotas vėliau neuroblastomos ląstelėse (Taparowsky, Shimizu et al. 1983). Tradiciniai Ras pasižymi aukštu homologijos laipsniu, jų funkcijos ląstelėje didžiąja dalimi dubliuojasi: N-Ras (Umanoff, Edelmann et al. 1995) ir H-Ras (Ise, Nakamura et al. 2000) genai nėra būtini normaliam pelių vystymuisi. Nors K-Ras mutantai žusta embriono stadijoje (Johnson, Greenbaum et al. 1997), esmė yra ne

išskirtinėse K-Ras funkcijose, o specifiniame ekspresijos rašte (Potenza, Vecchione et al. 2005). Tačiau tarp N-, H- ir K-ras egzistuoja tam tikri skirtumai.

Genetiniai ir struktūriniai skirtumai. Kaip minėta, *ras* genas ekspresuojasi įvairiai skirtinguose ląstelių tipuose ir priklausomai nuo ląstelių diferenciacijos bei organizmo vystymosi stadijos. Ypač skiriasi K-rasA ekspresija embriono ir suaugusio organizmo audiniuose (Pells, Divjak et al. 1997). Tačiau nėra duomenų, kad kuriame nors ląstelių tipų visai nebūtų ekspresuojamas kuris nors iš H-, N- ar K-Ras baltymų.

Tradicinių Ras baltymų seką sudaro 189 aminorūgštys. Pirmosios 85 aminorūgštys yra identiškos, vidurinėje 80-ties aminorūgščių sekoje yra 85% homologija tarp bet kurių dviejų tradicinių Ras baltymų. Likusios 24 C-galinės aminorūgštys yra unikalios kiekvienam baltymui, jos nulemia eilę struktūrinių bei funkcinių skirtumų. Skirtumai C-galinėse sekose nulemia skirtingą Ras baltymų potransliacinį modifikavimą ir mikrolokalizaciją membranoje. Daugelio Ras antšeimio narių skirtingas prenilinimas nulemia reguliavimo skirtumus. Tradicinių Ras sąveika su plazmine membrana yra reliatyviai silpna ir gali būti moduluojama įvairių efektorių bei modifikacijų (Bivona, Quatela et al. 2006). K-ras2B, bet ne kiti Ras, yra geranilgeranilinamas. H- ir N-ras endoplazminiame tinkle yra palmitoilinami ir per Goldžio aparatą patenka į citoplazminę membraną, tuo tarpu K-ras nėra palmitoilinamas ir į membraną patenka nežinomu keliu (Augsten, Pusch et al. 2006). Depalmitoilintas Ras gali grįžti į Goldžį (Bivona, Quatela et al. 2006). H-Ras funkcionalumas kritiškai priklauso nuo farnezilo baltymų transferazės (*farnesyl protein transferase*) slopiklių, o N- ir K-Ras modifikacijos – nekritiškai (Whyte, Kirschmeier et al. 1997).

Farnezilintas K-Ras lokalizuojasi plazminėje membranoje, tačiau jo sąveika su membrana yra reliatyviai silpna. Aktyvinta baltymų kinazė C fosforilina K-Ras seriną-181, ir pastarasis migruoja į vidines ląstelės membranas. 80% K-Ras translokuojama į mitochondrijas, kur sąveikauja su Bcl-xL ir indukuoja apoptozę. Bcl-2 slopiną šią indukciją (Bivona, Quatela et al. 2006).

Funkciniai skirtumai. Struktūriniai skirtumai tarp tradicinių Ras baltymų vienaip ar kitaip nulemia funkcinius skirtumus. N-, H- ir K-Ras skirtingai

sąveikauja su kai kuriais reguliatoriais. Guanino nukleotidų mainų faktorius RasGRF aktyvina tik H-ras, SmgGDS aktyvina tik K-ras (Malumbres and Pellicer 1998). GTPazę aktyvinantis baltymas NF1 H pasižymi keturis kartų didesniu giminingumu H-Ras, nei N-ras (Bollag and McCormick 1991).

Skirtingai Ras GTPazės sąveikauja ir su kai kurias efektoriais. N- ir K-Ras aktyvina Erk kinazes per Raf1, o Erk aktyvinimas H-ras GTPaze nuo Raf1 nepriklauso (Hamilton and Wolfman 1998).

Biologinės funkcijos sveikoje ląstelėje. Yra duomenų, jog K-Ras ir H-Ras slopina skydliaukės ląstelių diferenciaciją skirtingais būdais. K-Ras sumažina TTF-1 (*thyroid transcription factor-1*) ekspresiją, o H-Ras veikia netiesiogiai, slopindamas TTF-1 genų-taikinių veiklą (Francis-Lang, Zannini et al. 1992).

H-Ras ir N-Ras, bet ne K-Ras yra aptinkami Goldžio aparate. Goldžio aparate H-Ras yra aktyvinamas vėliau ir ilgiau lieka aktyvus, nei citoplazminėje membranoje. Yra duomenų, jog augančių ląstelių Goldžio aparate Ras yra pastoviai aktyvus (nors šie duomenys yra kontraversiški) (Chiu, Bivona et al. 2002; Augsten, Pusch et al. 2006; Mor, Campi et al. 2007).

T ir B limfocitų linijose augimo faktoriai (CSF, EGF, IL-3) stipriau aktyvina K-ras4B (ir M-ras). Tokį pasirinkimą nulemia bazinis C-galas, kuris sąlygoja GTPazės K-ras4B lokalizaciją specifinėse, nepriskiriamose lipidų plaustams (*lipid rafts*), membranos srityse, kur taip pat lokalizuojasi šių augimo faktorių receptoriai ir Shc, Grb2 bei mSos baltymai (Ehrhardt, David et al. 2004).

Visiems trims: N-, H- ir K-Ras būdinga lokalizacija mitochondrijose, tačiau T-limfocituose ji yra priklausoma nuo IL-2. N-Ras lokalizuojasi mitochondrijose IL-2 stimuliuotuose limfocituose, o be IL-2 N-Ras kiekis mitochondrijose palaipsniui mažėja. K-Ras lokalizuojasi tik IL-2 stimuliuotų ląstelių mitochondrijose, o H-Ras yra aptinkamas mitochondrijose tik tam tikram laikotarpiui nutraukus stimuliavimą IL-2. Skirtingai nuo N- ir K-Ras, pastaroji translokacija nepriklauso nuo H-Ras modifikacijos, o sąveika su Bcl-2 – priklauso. (Rebollo, Perez-Sala et al. 1999)

Aktyvintas H-Ras relokizuojasi membranoje iš lipidinių plaustų į neplaustines membranos sritis. K-Ras nepriklausomai nuo aktyvumo lokalizuojasi neplaustinėse srityse (Takai, Sasaki et al. 2001).

Biologinės funkcijos navikų ląstelėse. Skirtinguose navikuose yra aktyvinami skirtingi ras. K-Ras yra dažniau aktyvinamas storosios žarnos ir kasos karcinomose, H-Ras – šlapimo pūslės ir inkstų karcinomose, N-Ras – mieloidinių ir limfoidinių sutrikimų metu (Rodenhuis 1992).

Skirtinguose ląstelių tipuose įvairios GTPazės Ras pasižymi skirtingu transformacijos potencialu. Onkogeninė H-Ras 10 kartų efektyviau už N-Ras transformuoja rat-2 ir NIH3T3 fibroblastus, o N-Ras stipriau veikia hemapoetines TF-1 ir FDC-P1 ląsteles. Skirtumus nulemia GTPazių C-galinės sritys ir H-Ras aminorūgštys 84-143 (Rodriguez-Viciana, Sabatier et al. 2004).

1.1.2. Kiti Ras baltymai

R-Ras1 seka daugiau nei 50% panaši į tradicinės GTPazės Ras, N-gale turi papildomas 26 aminorūgštis. R-Ras1 padidinta ekspresija transformuoja ląsteles, bet žymiai silpniau nei Ras ar TC21 (Bos 1997). *In vitro* R-Ras1 sąveikauja su Raf ir RalGDS, bet nėra duomenų, kad aktyvintų jas ląstelėje (Urano, Emkey et al. 1996). R-Ras1 aktyvina fosfatidilinozitolio-3 kinazę (PI3K), bet kitas PI3K frakcijas nei tradiciniai Ras baltymai. R-Ras1 per PI3K aktyvina tik PKB/Akt kelią, bet ne Erk, be to, nesukelia membranos raukšlių susidarymo (Marte, Rodriguez-Viciana et al. 1997). GTPazė R-Ras1 skatina integrinų aktyvumą fibroblastuose ir šitaip – ląstelių sąveiką su substratu (H-Ras veikia priešingai). Šiam poveikiui yra svarbi R-Ras C-galinė variabili sritis, kuri sąlygoja R-Ras lokalizaciją lipidų plaustuose (Takai, Sasaki et al. 2001). R-Ras sąveikauja su Bcl-2 (Rebollo, Perez-Sala et al. 1999), turi prolino turtingą seką, kuri sąveikauja su adaptorinio baltymo Nck antruoju SH3 domenu. Prolino turtingo motyvo mutacija mažina nuo R-Ras priklausomą ląstelių prilipimą prie substrato (Wang, Zou et al. 2000).

R-ras priskiriamos dvi funkcijos:

1. Dalyvauja apoptozės reguliavime (priklausomai nuo efektorių slopina arba aktyvina), mielių dvihibridinėje sistemoje sąveikauja su Bcl-2.

2. Kontroliuoja integrinų aktyvinimą. Dominantinis negatyvus R-ras slopina nuo integrinų priklausomą ląstelių prilipimą.

R-Ras2/TC21 seka 55% panaši į tradicinių GTPazių Ras seką. Panašumas su *R-Ras1* yra 70%. Vienintelė iš netradicinių RasGTPazių, kurios mutacijos aptinkamos navikuose (mutacija L72, analogiška Ras L61, sukelia pastovų GTPazės aktyvumą). GTPazės *R-Ras2* padidinta ekspresija transformuoja ląsteles. *R-Ras2* nesąveikauja su Raf, bet *in vitro* sąveikauja su RalGDS. Gali aktyvinti PI3K ir PKB kelią. Blokuoja, kaip ir tradicinės GTPazės Ras, mioblastų diferenciaciją (Rodriguez-Viciano, Sabatier et al. 2004). Analogiškai kaip ir *R-Ras1*, skatina integrinų aktyvumą fibroblastuose ir šitaip – ląstelių sąveiką su substratu (*H-Ras* veikia priešingai) (Takai, Sasaki et al. 2001).

R-Ras3/M-Ras yra aktyvinamas NGF, FGF, CSF, EGF, IL-3 augimo faktoriais, bet ne TCR ir BCR limfocitų receptorių sąveika su IgG. *M-Ras* padidinta ekspresija transformuoja NIH ląsteles. Taip pat *M-Ras* indukuoja neuritų augimą (Rodriguez-Viciano, Sabatier et al. 2004). *M-Ras* gali apsaugoti nuo apoptozės (Cox and Der 2003). Parodyta, jog *M-Ras* gali sąveikauti su eile Ras efektorių, bet šių sąveikų funkcinė prasmė nėra žinoma. *M-ras* efektorius yra RA-GEF2, GTPazės Rap1 GEF, kuris aktyvina Rap plazminėje membranoje (Rebhun, Castro et al. 2000). Nors *M-Ras* yra reguliuojama tų pačių GEF ir GAP baltymų kaip ir kitos GTPazės Ras, yra iškelta hipotezė apie *M-Ras* nepriklausomą nuo kitų Ras baltymų kilmę (Keduka, Kaiho et al. 2009). Ši hipotezė derinasi su filogenetine *M-Ras* geno analize bei skirtingu nuo kitų Ras šeimos baltymų vaidmeniu aktino citoskeleto reguliavime (Matsumoto, Asano et al. 1997).

Rap1a ir *Rap1b* izoformos skiriasi tik keliomis aminorūgštimis C-gale, funkcinių skirtumų neaptikta. 61-oje pozicijoje vietoje glutamino GTPazės Rap1 turi treoniną, dėl šios priežasties jų GTPazinis aktyvumas yra apie dešimt kartų mažesnis, nei tradicinių Ras baltymų. Rap1 (ankstesnis jų pavadinimas K-rev1)(Sakoda, Kaibuchi et al. 1992) gali supresuoti transformaciją. Rap1 sąveikauja su Raf1 ir RalGEF baltymais, bet *in vivo* šie kompleksai yra neaktyvūs

(Urano, Emkey et al. 1996). Rap1-GTP sąveika su RafB bei PKC kinazėmis *in vitro* aktyvina jas (Labadia, Bokoch et al. 1993; Ohtsuka, Shimizu et al. 1996). Rap1 baltymai yra siejami su ilgalaikiu (skirtingai nuo Ras, kurie skatina trumpalaiki) Erk aktyvinimu cikliniu AMP (cAMP) per B-Raf ir PKA kinazes. PC12 ląstelėse GTPazės Rap1 veikia panašiai kaip Ras. Tačiau daugumoje ląstelių linijų Rap1 veikia su Ras antagonistiskai, galbūt prijungdama Raf1. Kas nulemia jautrumą Rap1-B-Raf keliui, neaišku, spėjama, kad 95kDa B-raf izoformos ekspresija arba Rap1 lokalizacija ląstelėje (Bos 1997).

Rap1 yra aktyvinamas EGF perinuklearinėje membranoje (manoma, jog EGF endocitozė aktyvina C3G) (Mochizuki, Yamashita et al. 2001). Taip pat Rap1 yra aptinkami viduląstelinėse pūslelėse ir plazminėje membranoje (Bivona and Philips 2003). Ypač daug Rap1 yra trombocituose, kur jis dalyvauja nuo PLC priklausomame vidinės membranų sistemos atidaryme ir kalcio jonų koncentracijos pakitimuose. Procesų indukcijoje dalyvauja trombocitų integrinas α IIb β 3. Po trombocitų stimuliacijos Rap1 sąveikauja su citoskeletu, tačiau su Rap1 kataliziniu aktyvumu ši sąveika yra nesusijusi (Franke, Akkerman et al. 1997).

Rap2a, *Rap2b* ir *Rap2c* GTPazės nuo Rap1 GTPazių skiriasi viena aminorūgštimi efektoriniame regione bei keliomis už jo ribų. Rap2 nesupresuoja transformacijos ir netransformuoja ląstelių. Apie Rap2 aktyvinimą ir funkcijas žinoma nedaug. Trombocituose Rap2 baltymai aptinkami komplekse su integrinu α IIb β 3 (Bos 1997).

RalA ir *RalB* yra plačiai ekspresuojami labai panašūs baltymai. Ląstelėje GTPazės Ral lokalizuojasi endocitozės ir egzocitozės pūslelėse. GTPazės Ral visų pirma yra siejamos su navikų atsiradimo ir pūslelių transporto reguliavimu (van Dam and Robinson 2006). Ral baltymai reguliuoja kai kurių su heterotrimeriniais G-baltymais susijusių receptorių endocitozę (Bhattacharya, Babwah et al. 2004). GTPazių Ral aktyvintojai RalGEF baltymai: RalGDS, Rgl, Rgl2 ir Rlf – yra tradicinių Ras baltymų efektoriai, bet nuo RalGEF priklausomi efektai skiriasi nuo aktyvių GTPazių Ral efektų. Tai leidžia daryti prielaidą, jog minėtų baltymų funkcijos nėra tik Ral aktyvinimas. Tradiciniai Ras transformuoja kai kurias

ląsteles, aktyvindami RalGEF, o aktyvūs Ral – netransformuoja. Taip pat RalGEF veikia sinergistiškai su Raf1, o Ral su Raf aktyvinimu yra beveik nesusiję. Yra hipotezė, jog GTPazės Ral supresuoja tradicinius Ras baltymus, prijungdamos RalGEF baltymus. Gali būti, jog RalGEF turi ir kitus efektorius (Bos 1997). Kita vertus, GTPazės Ral gali būti aktyvinamos ir nepriklausomai nuo Ras (van Dam and Robinson 2006).

GTPazių Ral funkcijos:

1. Tarpininkavimas tarp Ras ir Rho šeimų GTPazių reguliuojamų kelių: RalBP yra GTPazės Ral efektorius ir GTPazės Cdc42 neigiamas reguliatorius. Taip pat RalBP yra susijęs su AP-2 priklausoma receptorių aktyvinama endocitoze. Kitas su Ral sąveikaujantis baltymas, filaminas, skatina nuo GTPazės Cdc42 priklausomų filopodijų formavimąsi (Takai, Sasaki et al. 2001).

2. Ral N-galas yra susijęs su fosfolipazės D (PLD) aktyvumu, kuris yra aktyvinamas Src kinaze ir tradicinėmis GTPazėmis Ras. Tiesioginė asocijacija su RalA PLD aktyvumo nekeičia, tam turi susiformuoti trigubas PLD-RalA-Arf kompleksas su aktyvia GTPaze Arf. Rgr – RalGDS šeimos narys, neturintis Ras prijungiančio domeno, gali būti atsakingu už nuo Ras nepriklausomą Ral ir PLD aktyvinimą (Bernards 2003).

Sąveikaudama su PLD GTPazė RalA teigiamai reguliuoja kalcio sukeltą egzocitozę ir sąveikauja su egzocistės kompleksu (van Dam and Robinson 2006).

3. Per ciklino D ir p27 lygį gali kontroliuoti ląstelės ciklą (Rodriguez-Viciana, Sabatier et al. 2004).

4. Sąveikaudama su PLCδ1 dalyvauja signalo nuo su G baltymais susijusių receptorių perdavime (Takai, Sasaki et al. 2001).

Rheb GTPazių efektorinis domenas yra labai panašus į tradicinių Ras, tik konservatyvių Ras glicino-12 ir glicino-13 vietoje Rheb turi arginina-15 ir serina-16. Tradicinėse Ras tokios mutacijos būtų išaktyvinančios, tačiau Rheb yra būdingas į Ras panašus katalizinis aktyvumas (Yamagata, Sanders et al. 1994). Nuo Ras Rheb GTPazė skiriasi atsaku į cAMP: Ras yra slopinami cAMP ir baltymų kinaze A, kuri fosforilina Raf1, o Rheb ir Raf1 sąveika dėl Raf1 fosforilinimo sustiprėja (Yee and Worley 1997). Pagrindinis aktyvios Rheb

efektorius yra TOR – serino ir treonino kinazė, kuri dalyvauja ląstelių augimo, dalijimosi, išgyvenimo, baltymų sintezės reguliavime priklausomai nuo įvairių augimo faktorių, tarp jų – insulino (Saucedo, Gao et al. 2003). Taip pat Rheb sąveikauja su B-Raf kinaze, tačiau, skirtingai nuo tradicinių Ras, jos neaktyvina, o slopina (Im, von Lintig et al. 2002). Rheb baltymas yra išaktyvinamas GAP baltymų tuberino ir hamartino kompleksu (*tuberous sclerosis complex*). Akt kinazė fosforilina tuberiną ir sąlygoja jo disocijaciją nuo hamartino (ir/arba slopina jo GAP aktyvumą), aktyvindama RheB, kuri savo ruožtu aktyvina TOR. Fosforilintas tuberinas yra degraduojamas (Potter, Pedraza et al. 2002).

Rin1, *Rin2*, *Rin3* yra Ras šeimos GTPazės. Rin baltymai neturi Ras būdingos CAAX sekos, bet turi kitą bazinę membraninės lokalizacijos seką. GTPazės Rin yra tradicinių Ras efektoriai ir GTPazių Rab5 reguliatoriai GEF (Tall, Barbieri et al. 2001). Tačiau ląstelėse būna ekspresuojama ir deletuota Rin1 forma, neturinti katalizinio GEF domeno (Han, Wong et al. 1997).

GTPazė Rin1 sąveikauja su tradicinėmis Ras beveik tokiu pat stiprumu, kaip ir Ras efektorius kinazė Raf, ir gali su Raf konkuruoti, mažindama aktyvaus Ras transformacinį potencialą. Sąveiką su Ras blokuoja 14-3-3 baltymų sąveika su Rin1. Ši sąveika priklauso nuo fosforilinimo baltymų kinaze D (Wang, Waldron et al. 2002). Aktyvūs Ras savo ruožtu didina Rin1 katalizinį GEF aktyvumą, stimuliuodami nuo Rab5 priklausomą membranų receptorių endocitozę. Tokia stimuliacija gali turėti bent dvi funkcines prasmes: pirma, aktyvaus receptoriaus kiekio mažinimas ir Ras neigiamas reguliavimas, ir antra, viduląstelių signalinių kelių, kuriuos reguliuoja endocituotas receptorius, stimuliavimas (Hoshino, Yoshimori et al. 2005).

GTPazė Rin1 sąveikauja su kinaze c-Abl ir yra jos fosforilinama (Tall, Barbieri et al. 2001). Rin baltymai sąveikauja su tradiciniais Ras, Rap1, Rap2 (apart Rin3), visais trimis R-Ras (Rodriguez-Viciana, Sabatier et al. 2004).

Rit (senesniuose straipsniuose klaidingai vadinama Rin2) yra Ras šeimos GTPazė. Rit yra plačiai ekspresuojama. Ši GTPazė, kaip ir Rin GTPazės, neturi Ras būdingos CAAX sekos, bet turi kitą bazinę membraninės lokalizacijos seką. Rit gali transformuoti NIH fibroblastus, blokuoja apoptozę, indukuoja neuritų

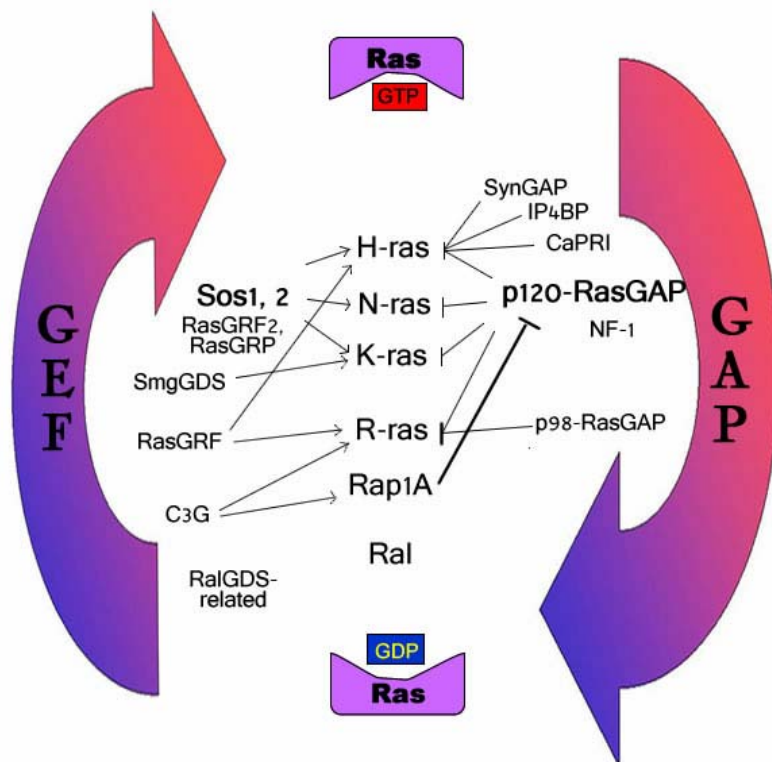
augimą nervų ląstelėse (Hoshino, Yoshimori et al. 2005). Rit gali sąveikauti su Raf1, kai kuriose ląstelėse aktyvina Erk fosforilinimą. Rit turi aukštą bazinį aktyvumą, beveik prilygstantį įvestos pastoviai aktyvios formos aktyvumui – tai yra, ląstelėje Rit beveik visada yra aktyvioje konformacijoje (Rodriguez-Viciana, Sabatier et al. 2004).

1.2. Ras reguliavimas

Baltymai Ras yra daugybės signalinių kelių nuo skirtingų receptorių (RTK, citokinų, B- ir T-ląstelių, heterotrimerinių su G-baltymais susijusių receptorių ir t.t.) konvergencijos taškas. Ramybės būsenoje esančioje ląstelėje Ras baltymai paprastai egzistuoja neaktyvioje su GDP sujungtoje formoje. Ras giminingumas GDP nukleotidui yra didesnis, nei GTP nukleotidui, todėl tam, kad GDP būtų pakeistas į GTP reikia papildomų baltymų, vadinamų GEF, – guanino nukleotido mainų faktorių. Sąveikaudami su Ras, GEF baltymai skatina GDP disociaciją. Kadangi citoplazmoje paprastai GTP yra apie 1000 kartų daugiau nei GDP, prie atitinkamos Ras baltymo srities prisijungia GTP, Ras pereina į aktyvia, su GTP sujungta forma, o GEF baltymai disocijuoja (Malumbres and Pellicer 1998).

Aktyvus Ras dėl nuosavo GTPazinio aktyvumo pamažu pats hidrolizuoja GTP iki GDP ir pereina į neaktyvią su GDP sujungtą formą, tačiau natūralus Ras GTPazinis aktyvumas yra labai silpnas ir jo nepakanka, kad Ras būtų valdomas griežtai ir efektyviai. Todėl egzistuoja už Ras išjungimą atsakingi baltymai RasGAP. Sąveikaudami su Ras jie padidina Ras nuosavą katalizinį aktyvumą iki 10^5 kartų ir užtikrina staigų Ras išjungimą (Pamonsinlapatham, Hadj-Slimane et al. 2009).

GEF ir GAP baltymų įvairovė užtikrina efektyvų GTPazių Ras reguliavimą priklausomai nuo konkretaus Ras baltymo, ląstelių tipo, aktyvintojų ir efektorių sudėties ir signalo stiprumo (1.1 pav).



1.1 pav. GTPazių Ras reguliavimas įvairiais GEF ir GAP baltymais. Rodyklės smailiais galais rodo aktyvinimą, bukais – slopinimą.

1.2.1. Ras guanino nukleotidų mainų faktoriai (RasGEF)

GTPazių Ras šeimai yra identifikuoti keletas GEF: Sos1, Sos2, RasGRF, RasGRF2, C3G, RasGRP, RalGDS giminingi baltymai, Vav, SmgGDS.

Žmogaus bei pelės audiniuose yra plačiai ekspresuojami *Sos1* ir *Sos2* baltymai, giminingi *Drosophila son-of-sevenless* geno produktui. Sos baltymams yra būdingas alternatyvus splaisingas. Pelės mSos1 baltymo vidurinis rajonas, apie 200 aminorūgščių, yra giminingas mielių *Sacharomyces* RasGEF aktyvumu pasižyminčių baltymų Cdc25, Sdc25 ir Ste6 analogiškiems rajonams ir yra vadinamas Cdc25 domenu (Bowtell, Fu et al. 1992). Šis domenas katalizuoja guanino nukleotido mainus H-, N-, K- ir M-ras baltymuose. C-galinis prolino turtingomis sekomis gausus rajonas asocijuoja su Grb2 adaptorinio baltymo SH3 domenais, ir Grb2 per savo SH2 domeną sąveikauja su fosforilintais tirozinuose receptoriais ir šitaip pritraukia Sos baltymus prie membranos, kur jie gali sąveikauti su GTPazėmis Ras (Egan, Giddings et al. 1993). Adaptorinis baltymas

Nck irgi sąveikauja su Sos (parodyta Sos1 atveju), tačiau šios sąveikos prasmė nėra iki galo aiški (Hu, Milfay et al. 1995).

Be Cdc25 domeno ir prolino turtingų sekų, Sos baltymai turi N-gale tandemiškai išsidėsčiusius Dbl homologijos (DH) ir plekstrino homologijos (PH) domenus. DH domenai yra kataliziniai domenai, skatinantys guanino nukleotido mainus Rho šeimos GTPazėse. Sos DH domenai pasižymi GEF aktyvumu Rho šeimos GTPazės Rac atžvilgiu. Rac ir Ras guanino nukleotido mainų aktyvumai abu yra slopinami fosfatidilinozitolio-4,5-difosfatu, PI3K substrato, sąveikos su PH domenu. Sos katalizinis aktyvumas yra atstatomas, kai Ras aktyvina PI3K. Yra parodyta, jog Sos specifiškumą GTPazių Ras arba Rac atžvilgiu apsprendžia su Sos asocijuojantys baltymai: Grb2 arba E3b1 (Abi1). Pastaruoju atveju adaptorinis baltymas E3b1 pritraukia prie Sos RTK substratą Eps8, ir šis trigubas kompleksas aktyvina Rac GTPazę (Innocenti, Tenca et al. 2002).

RasGRF, taip pat vadinamas Cdc25Mm, šalia Cdc25 domeno papildomai turi DH ir PH domenus, yra specifiškai ekspresuojamas smegenų ląstelėse. RasGRF baltymui yra būdingas alternatyvus splaisingas, baltymų heterogeniškumas gali sąlygoti Ras aktyvinimo ypatybes skirtinguose audiniuose ar vystymosi stadijose. Yra parodyta, jog *in vivo* RasGRF aktyvina H-ras, tačiau ne N- ar K-rasB baltymus (Jones and Jackson 1998).

RasGRF2 yra daugiadomeninis baltymas, skatinantis tradicinių Ras, tačiau ne kitų GTPazių guanino nukleotido mainus. C-gale RasGRF2 turi Cdc25 giminingą domeną. N-gale yra keletas skirtingiems signaliniams baltymams homologinių domenų: DH, du PH domenai, IQ motyvas. Kalcio jonų koncentracijos padidėjimas sukelia RasGRF2 persikraustymą į ląstelės periferiją, kur jis stimuliuoja GTP prijungimą Ras baltymais ir šitaip įgalina Erk aktyvinimą kalcio jonoforais. RasGRF2 yra specifiškai ekspresuojamas smegenų ląstelėse (Fam, Fan et al. 1997).

RasGRP turi netipiškų EF-hand domenų porą ir diacilglicerolį (DAG) prijungiantį domeną. RasGRP aktyvina Ras ir Erk kelią priklausomai nuo DAG. RasGRP yra ekspresuojamas nervų sistemoje, manoma, kad veikia kaip tarpininkas tarp DAG ir kalcio koncentracijų pokyčio bei Ras aktyvavimo (Ebinu,

Bottorff et al. 1998). Duomenys, jog RasGRP aktyvina Ras Goldžio aparate yra gauti Ras perteklių ekspresuojančioje sistemoje FRET metodu ir nėra patvirtinti tyrimais su endogeniniu Ras (M. Augsten et al, EMBO rep, 2005).

Baltymas *Vav* turi domenų, panašius į Dbl šeimos domenų, pagal seką yra labiau specifinis GTPazių Ras, nei Rho šeimai. Tačiau *in vivo* veikia kaip Rho šeimos GTPazių Rac1 (nuo PI3K substratų ir produktų priklausomoje Rac aktyvacijoje) ir Cdc42 mainų faktorius. Ekspresuojamas tik hemapoetinėse ląstelėse (Malumbres and Pellicer 1998).

C3G turi Cdc25 homologijos domeną ir yra Rap1 baltymui specifinis RasGEF (Malumbres and Pellicer 1998).

SmgGDS katalizuoja K-Ras4B ir kitų Ras giminingų GTPazių guanino nukleotido mainus, išskyrus H-ras (Malumbres and Pellicer 1998).

1.2.2 Ras GTPazę aktyvinantys baltymai

Baltymų Ras GTPazinis aktyvumas pasireiškia lėta su Ras sujungto GTP hidrolize (disociacijos greitis yra apie 10^{-5} molių į sekundę vienam moliui Ras-GTP komplekso). Be to, viduląstelinė GTP koncentracija yra žymiai didesnė, nei GDP, todėl tampa akivaizdu, jog baltymų Ras GTPazinis aktyvumas reikalauja papildomų reguliacinių baltymų.

GAP baltymų genų yra priskaičiuojama apie 170, jau yra iširta apie 80 baltymų, iš kurių tik keli nepasižymėjo GAP kataliziniu aktyvumu. Ras ir Rho GAP baltymų įvairovė gali būti paaiškinama tuo, jog skirtingi GAP yra:

1. Ekspresuojami skirtinguose ląstelių tipuose;
2. Veikia specifines GTPazes;
3. Reguliuoja GTPazių aktyvumą priklausomai nuo skirtingų signalo perdavimo kelių.

Dabar yra aptikta trylika skirtingų žmogaus ir penki vaisinės muselės RasGAP baltymų. Šie baltymai sąveikauja su su GTP sujungtu ras ir neigiamai jį reguliuoja, stimuliuodami Ras baltymo GTPazinį aktyvumą. Tačiau RasGAP baltymai negali sąveikauti su kai kuriais onkogeniniais Ras mutantais, pavyzdžiui, tradicinių Ras glicino-12 ir glicino-13 (guanino nukleotido prijungimo domeno) ar

gliutamino-61 (efektorinio domeno) mutantais. Būtent nesugebėjimu sąveikauti ir būti aktyvinamiems RasGAP baltymais ir yra paaiškinamas šių mutantų onkogeniškumas.

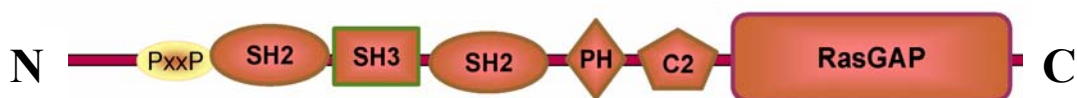
RasGAP katalizinis domenas yra sudarytas iš α -spiralių ir turi taip vadinamą arginino pirštų struktūrą. Argininas (p120RasGAP atveju – R789) dalyvauja su Ras sujungto GTP hidrolizėje, stabilizuodamas Ras GTPaziniame domene pereinamojoje fazėje susidarantį neigiamą krūvį (Scheffzek, Ahmadian et al. 1997).

Be GTPazę aktyvinančios funkcijos, baltymai p120-RasGAP ir NF1 gali būti ir Ras efektoriais.

S. cerevisiae RasGAP homologai yra Ira1 ir Ira2 (Tanaka, Nakafuku et al. 1990).

1.2.2.1. p120 Ras GTPazę aktyvinantis baltymas

p120RasGAP (p120 Ras GT Pase-activating protein, čia vadinamas tiesiog RasGAP) yra plačiai ekspresuojamas 120 kDa baltymas, kurio pagrindinė funkcija yra mažosios GTPazės Ras katalizinio aktyvumo stimuliavimas. Hidrolizuodama GTP iki GDP GTPazė Ras pereina iš aktyvios būsenos į neaktyvią (Trahey, Wong et al. 1988).



1.2 pav. **Baltymo RasGAP struktūros schematinis vaizdas.**

Kaip ir visi kiti GAP baltymai, RasGAP turi katalizinį GAP domeną (aminorūgštys 700-1044) su arginino pirštų struktūra aktyviame centre (Bernards 2003). Be to, Ras GAP turi du SH2 (N- ir C-galinį), SH3 (esanti tarp dviejų SH2; pagrindinis už sąveiką atsakingas triptofanas yra W317), PH ir C2 (Ca^{2+} reguliuojamas sąveikos su membrana domenas-2) domenus, atsakingus už sąveiką su kitais baltymais (Pamonsinlapatham, Hadj-Slimane et al. 2009)

(1.2 pav.). N-gale RasGAP baltymas turi prolino turtingą seką (aminorūgštys 135-145), potencialiai galinčią sąveikauti su SH3 domenais (analizuota naudojant Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) programą), tačiau kol kas literatūroje nėra duomenų apie su šia seka sąveikaujančius baltymus.

Kristalų struktūros analizė parodė, jog RasGAP SH3 domenai gali dimerizuotis. Dimerizacijos sritis neapima hidrofobinės už sąveiką su ligandu atsakingos SH3 domeno sritys. Penkios iš dimerą sudarančių liekanų įeina į apoptogeninio N2 peptido seką (žr. žemiau). RasGAP SH3 domeno struktūra yra nestandartinė, jis gali sąveikauti su netradicinėmis sekomis (ne prolino turtingomis) (Ross, Kristensen et al. 2007).

RasGAP yra vienas iš klasikinių citoplazmos markerių (nors mūsų tyrimai rodo RasGAP buvimą ir branduolyje, žr. Rezultatai).

Paprastai RasGAP ekspresija ląstelėje vyksta pastoviai, bet yra duomenų, jog augimo faktorius EGF gali stimuliuoti RasGAP ekspresiją (Soler, Felipe et al. 1994). Kai kurie virusai didina Ras aktyvumą ląstelėje degraduodami (*coxsackievirus*) ar slopindami (*herpes simplex*, fosforilina RasGAP) RasGAP (Bernards and Settleman 2004).

Normalioje ląstelėje dauguma RasGAP molekulių yra monomerinėje būsenoje, o transformuotoje, pvz., v-src – beveik visos sudaro kompleksus su fosforilintais tirozinuose baltymais (Moran, Polakis et al. 1991).

RasGAP per savo katalizinį GAP domeną sąveikauja su GTPazės Ras aminorūgštimis glicinu-12 ir glicinu-13, efektoriniu domenu (aminorūgštis 32-40) ir *switchII* sritys aminorūgštimis 60-65. RasGAP arginino-789 radikalas neutralizuoja neigiamą krūvį, trukdantį Ras baltymui hidrolizuoti GTP. Dėl sąveikos su RasGAP poveikio Ras gliutaminas-61 gali dalyvauti katalizėje. Ras glicinas-12 sąveikauja su gliutaminu-61 ir RasGAP argininu-789, dėl šios sąveikos Ras molekulė priima reikiamą konformaciją (Scheffzek, Ahmadian et al. 1997).

RasGAP sąveikauja su visais keturiais tradiciniais Ras bei Rap1 ir yra specifinis Ras baltymų šeimai; tyrimai *in vitro* taip pat yra parodę, jog p120 RasGAP gali veikti kaip Rab šeimos baltymo Rab5 GAP (Liu and Li 1998).

RasGAP molekulėje yra fosforilinami tirozinai, serinai. Pagrindinis fosforilinamas tirozinas yra Y460, taip pat yra keli potencialūs tirozinai C-gale, kataliziniame domene. Parodyta, jog RasGAP fosforilinimas Src kinaze (fosforilina daugiausia Y460) slopina RasGAP katalizinį aktyvumą, o fosforilinimas Src šeimos kinaze Lck (fosforilina Y460 bei C-galinius tirozinius) RasGAP aktyvumo nekeičia (Giglione, Gonfloni et al. 2001). Kompleksuose su membranos baltymais esantis RasGAP yra fosforilintas stipriau. Bcr/Abl kinazė nefosforilina RasGAP, nors fosforilina du pagrindinius jo partnerius, p190 RhoGAP ir p62 DOK (Skorski, Kanakaraj et al. 1994).

RasGAP pagrindinė žinoma funkcija yra GTPazės Ras aktyvumo reguliavimas. Tyrimai su RasGap $-/-$ ląstelėmis parodė, jog RasGAP reguliuoja PDGF (Kulkarni, Gish et al. 2000) ir EGF indukuotą, bet ne pastovų Ras aktyvumą; Ras-GTP lygis RasGAP $-/-$ ląstelėse būna net žemesnis lyginant su normaliomis. RasGAP geno, *rasal*, išmušimas nedidino MAP kinazių aktyvumo, tačiau sąlygojo ilgesnį MAP kinazių aktyvumo laiką (van der Geer, Henkemeyer et al. 1997). Taip pat RasGAP dalyvauja ląstelių proliferacijos reguliavime per savo PH ir C2 domenus (Koehler and Moran 2001). Ras aktyvumo reguliavimui pakanka RasGAP katalizinio domeno, lokalizuoto plazminėje membranoje (Huang, Marshall et al. 1993).

Tačiau Ras aktyvumo reguliavimas nėra vienintelė RasGAP funkcija. RasGAP gali veikti ne tik Ras reguliatorius, bet ir kaip efektorius. Ras-RasGAP kompleksas slopina kalio jonų kanalų sąveiką su muskarininiu cholinerginiu (*muscarinic cholinergic*) receptoriumi ir šitaip blokuoja receptoriaus kanalo atidarymą. Šitas efektas priklauso nuo RasGAP SH2-SH3 srities (Martin, Yatani et al. 1992). RasGAP SH3 domenas yra būtinas nuo Ras priklausomam *Xenopus* ovocito brendimui (*germinal vesicle breakdown*) ir *cdc2* kinazės aktyvinimui, nors jo slopinimas nekeičia RasGAP katalizinio aktyvumo. RasGAP aktyvina *cdc2*, indukuodama Mos sintezę, nepriklausomai nuo MAPK, kurios irgi prisideda prie MOS sintezės (Duchesne, Schweighoffer et al. 1993; Pomerance, Thang et al. 1996; Leblanc, Tocque et al. 1998). Membranoje esantys RasGAP be Ras sujungančios srities gali slopinti

onkogeninio, bet ne normalaus Ras aktyvumą (Clark, Quilliam et al. 1993). Dominantinis neigiamas Ras slopina RasGAP ir su RasGAP asocijuojančio G3BP baltymo sąveiką (Parker, Maurier et al. 1996).

RasGAP baltymo, turinčio tik SH2-SH3-SH2 domenų sritį, ekspresija sąlygoja Src aktyvumo sumažėjimą. Sąveikaudamas su RasGAP Src nebegali fosforilinti PLC γ , ir PLC γ signalas yra neigiamai reguliuojamas (Cailliau, Browaeys-Poly et al. 2001). Sąveikaudamas su PDGF receptoriumi RasGAP mažina nuo PLC γ priklausomą proliferaciją nekeičiant Ras aktyvumo (Valius, Secrist et al. 1995).

RasGAP PH domenai gali dalyvauti nuo Ras (bet ne nuo Raf) priklausomame JNK reguliavime, jo padidinta ekspresija blokuoja nuo Ras priklausomą transformaciją, bet ne proliferaciją. Taip pat yra parodyta, jog PH domenai gali sąveikauti su RasGAP kataliziniu domenu ir jį slopinti. Inozitolio trifosfatas ir inozitolio-4,5-bifosfatas gali sąveikauti su PH domenu, mažindami jo gebą sąveikauti su kataliziniu domenu (Drugan, Rogers-Graham et al. 2000).

RasGAP dalyvauja apoptozės reguliavime. Kai kaspazių 3 ir 9 aktyvumas yra žemas, RasGAP yra skeliamas į N-galinį fragmentą ties asparaginu-455, kuris veikia antiapoptotiškai aktyvindamas Ras-PI3K-Akt kelią, ir C-galinį fragmentą, kuris potencialiai gali veikti proapoptotiškai, tačiau N-galinio fragmento antiapoptotinis poveikis yra stipresnis. Tačiau jeigu kaspazių aktyvumas padidėja, jos skaldo N-galinį fragmentą į du mažesnius (N1 ir N2) ties asparaginu-157, kurie apoptozę aktyvina. RasGAP D455A mutacija didina ląstelių jautrumą proapoptotiniams agentams, o D157A mutacija mažina ląstelių jautrumą didesnėms proapoptotinių agentų koncentracijoms, kas koreliuoja su antiapoptotine N-fragmento ir proapoptotine N2 fragmento funkcijomis (Yang, Walicki et al. 2005). Kol kas RasGAP yra unikalus žinomas reguliatorius, kurio pro- arba antiapoptotinis poveikis priklauso nuo kaspazių aktyvumo lygio (Yang and Widmann 2001). N2 fragmentas yra 36 kDa baltymas (seka 158-455 aminorūgštys, beveik atitinka SH2-SH3-SH2 domenų sritį), apoptogeninė seka – aminorūgštys 317-326. N2 padaro

transformuotas ląsteles jautresnėmis cisplatinos ir kitų genotoksinų indukuotai apoptozei, bet ne per įprastus NFκB aktyvumo moduliavimą ar JNK ir p38 kelius (Cailliau, Browaeys-Poly et al. 2001; Yang and Widmann 2002). N2 peptidas konkuruoja su SH3 domenu dėl jo sąveikos partnerių (Ross, Kristensen et al. 2007). Iš N2 išskirta seka RasGAP₃₁₇₋₃₂₆, sulieta su virusiniu pro membraną praeinančiu TAT₄₈₋₅₇ peptidu (TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆), specifiskai jautrina navikų ląstelių atsaką į genotoksinius priklausomai nuo p53 efektoriaus PUMA (Michod and Widmann 2007).

Rasal geno mutacijos yra aptinkamos pas kapiliarų defektu – genetinė liga, pasireiškiančia kraujo kapiliarų išsivystymu viršutiniame epidermio sluoksnyje – būtent pas CM-AVM šios ligos porūšiu sergančius pacientus (Eerola, Boon et al. 2003). Pelių embrionuose, homozigotinėse pagal RasGAP nulinę mutaciją, yra sutrikusi angiogenezė, intersomatinių arterijų išsidėstymas. Tokio fenotipo priežastimi gali būti ląstelių kryptingos migracijos sutrikimas (Eerola, Boon et al. 2003). Ląstelėse, neekspresuojančiose RasGAP, yra sutrikusi poliarizacija ir jos negali kryptingai judėti. Mikrovamzdeliai jose yra normalūs. Poliarizacija sutrinka dėl Goldžio aparato fragmentacijos (RasGAP yra potencialus Rab5, dalyvaujančio Goldžio aparato veiklos reguliavime, GAP) ir nepoliarizuoto pūslelių transporto į membraną (PDGF poveikis dalinai fragmentaciją ištaiso, bet poveikis mažėja, jei yra nuslopintos Rho kinazės). Tokios ląstelės nesugeba reorganizuoti įtempimo skaidulų ir fokolinių adhezijų, po PDGF poveikio pasitaiso įtempimo skaidulų, bet ne fokolinių adhezijų reorganizavimas (iš dalies– dėl nesąveikavimo su p190RhoGAP ir padidėjusio Rho aktyvumo). Ląstelės be RasGAP blogiau suformuoja tarpląstelinius kontaktus. Iš dalies toks RasGAP poveikis yra aiškinamas RasGAP-p190RhoGAP komplekso nebuvimu (Kulkarni, Gish et al. 2000).

P190 RhoGAP (vėliau buvo atrasta, jog egzistuoja du panašūs baltymai P190 RhoGAP-A ir p190 RhoGAP-B) yra vienas pirmųjų atrastų su p120 RasGAP sąveikaujančių baltymų (Hall 1992). P190 RhoGAP yra Rho GTPazių GAP, ląstelėje p190 RhoGAP yra pastoviai fosforilintas ir sąveikauja su p120

RasGAP SH2 domenais. Tirozino kinazėmis transformuotose ląstelėse beveik visas RasGAP yra komplekse su p190, ir šitas kompleksas yra aptinkamas tik citoplazmoje. Kompleksų su augimo faktoriais aktyvintais receptoriais arba p62 baltymu būna žymiai mažiau. RasGAP SH2 domenai sąveikauja su Y1087 ir Y1105 p190 fosforilintais tirozinais (p190A; p190B turi analogiškus Y1090 ir Y1108, atstumas tas pats - 17 aminorūgščių). Šiuos p190 tirozinius fosforilina Src šeimos kinazės, Blk, Abl (Druker, Okuda et al. 1992). Pavienių p190 fosforilintų tirozinų užtenka silpnai sąveikai su RasGAP. Dėl sąveikos su dviem (būtinai abiem!) fosforilintais tirozinais pasikeičia RasGAP konformacija: atsidengia RasGAP SH3 domeno ligandą prijungiantis paviršius (giminingumas specifiniam monokloniniam antikūnui B4F8 padidėja ~100 kartų) (Hu and Settleman 1997). Kita vertus, yra duomenų, jog už p120 RasGAP sąveiką su p190 RhoGAP yra atsakingas tik Y1105, o Y1087 net nėra fosforilinamas (Roof, Haskell et al. 1998).

Galima šių dviejų baltymų sąveikos funkcija yra signalo perdavimo kelių per Ras ir Rho koordinavimas. Sąveikaudamas su RasGAP p190 RhoGAP slopina RasGAP katalizinį aktyvumą *in vitro* ~4 kartus (Moran, Polakis et al. 1991). Gali būti, kad viena iš p190 sąveikos su RasGAP funkcijų yra RasGAP sąveikos su papildomais baltymais per SH3 domeną užtikrinimas (Hu and Settleman 1997). Savo ruožtu RasGAP dalyvauja p190RhoGAP fosforilinimo reguliavime (van der Geer, Henkemeyer et al. 1997). RasGAP N-galinės dalies padidinta ekspresija sukelia aktino įtempimo skaidulų suirimą ir sumažina ląstelių adheziją su substratu. Panašiai veikia ir p190 pavienio katalizinio domeno ekspresija, todėl įmanoma, jog RasGAP reguliuoja p190RhoGAP aktyvumą (McGlade, Brunkhorst et al. 1993).

RasGAP pilno arba dalies be GAP domeno padidinta ekspresija skatina mRNR ir baltymų sintezę, Cdk7 ir RNR polimerazės II ekspresiją (Abdellatif, Packer et al. 1998). Nusodinimu su GST-baltymais parodyta, jog RasGAP gali sąveikauti su eEF1A2 (Panasyuk, Nemazanyy et al. 2008).

RasGAP sukelia embrioninių kamieninių (ES) ląstelių diferenciaciją, kuri gali būti slopinama SC1 (taip pat vadinamu *pluripotin*), 3,4-

dihidropirimido[4,5-d]pirimidino pagrindu susintetinta medžiaga, kuri leidžia kultyvuoti ES ląsteles (Chen, Do et al. 2006).

RasGAP sąveikauja su serino ir treonino kinazėmis Aurora A ir Aurora B, dalyvaujančiomis mitozės reguliavime (Gigoux, L'Hoste et al. 2002). Aurora A lokalizuojasi centrosomose ir mitotinės verpstės susirinkimo centruose. Ji yra būtina centrosomų brendimui ir atsiskyrimui. Taip pat Aurora A kinazė reikalinga Mos mRNR translacijai (o RasGAP dalyvauja *mos* geno ekspresijos reguliavime). Aurora B išsidėsto centrosomose, o po anafazės persilokalizuoja į mitotinę verpstę. Ji yra būtina histono H3 serino-10 fosforilinimui ir chromosomų kondensavimui. Aurora B reguliuoja kinetochoro funkcijas (Keen and Taylor 2004). Peptidas-aptameras, specifiskai slopinantis SH3 domeną, ląsteles veikia citotoksiškai. Galima toksiškumo priežastis: SH3 sąveikos su AuroraB kinaze suardymas (Pamonsinlapatham, Hadj-Slimane et al. 2008).

RasGAP sąveikauja su p62 Dok1 Y362 ir Y398 (Y296 ir Y315 *in vitro*) fosforilintais tiroziniais. p62 Dok1 fosforilinimą paprastai stimuliuoja augimo faktoriai (Kashige, Carpino et al. 2000). RasGAP sudaro kompleksą su p62 (DOK1) citoplazmoje ir membranoje. v-src transformuotų ląstelių membranose yra aptinkama apie 8% ląstelės RasGAP (p62, receptoriai) (Moran, Koch et al. 1990). Komplekse su RasGAP yra apie 10% p62. *In vitro* sąveika su p62 mažina RasGAP aktyvumą, o *in vivo* už šią sąveiką yra atsakingi kiti fosforilinti tirozinai. p62 yra žinomas kaip neigiamas Ras ir nuo Ras priklausomo Akt kelio (duomenys apie Erk yra prieštaringi) reguliatorius.

Į p62 Dok1 panašus p56 (DOK-R) taip pat sąveikauja su RasGAP. DOK-R aktyvina kinazę Abl ir stimuliuoja membranos išsikišimų atsiradimą. DOK-R nuo RasGAP ir Nck priklausomai neigiamai reguliuoja T-ląstelių diferenciaciją (Gugasyan, Quilici et al. 2002). Kitas Dok šeimos baltymas, Dok4 irgi sąveikauja su RasGAP, o DOK-L (Dok3) ir Dok5 su RasGAP nesąveikauja (Cai, Dhe-Paganon et al. 2003).

Rack1, pastolinis baltymas, kuris sąveikauja su PKCε (kartu su RasGAP), βIIPKC, PLCγ, sinaptotagminu, dinaminu-1, sudaro kompleksą ir su RasGAP (Koehler and Moran 2001). Rack1 yra Src kinazių sąveikos partneris,

substratas ir slopiklius: slopindamas Src aktyvumą, Rack1 mažina Sam68 bei p190 RhoGAP fosforilinimą. Rack1 ir Src sąveikos suardymas konkuruojančiais peptidais sukelia aktino skaidulų disociaciją (Miller, Lee et al. 2004).

1.2.2.2 Kiti Ras GTPazę aktyvinantys baltymai

Neurofibrominas (genas *nfl*) yra baltymas, kurio geno mutacijos yra atsakingos už pirmojo tipo neurofibromatozės atsiradimą (Xu, Lin et al. 1990). Neurofibrominas yra tradicinių Ras RasGAP. *Nfl* geno mutacijos taip pat yra siejamos su jaunatvine mielomonocitine leukemija (Side, Emanuel et al. 1998) ir Watson sindromu (Tassabehji, Strachan et al. 1993).

Drozofilos Gap1 homologai: baltymai Gap1m (genas *rasa2*), GAP1ip4bp (genas *rasa3*), RASAL1 (genas *rasal1*) ir CAPRI (genas *rasa4*). Šiems baltymams yra būdinga panaši struktūra, jie turi porą C2 domenų, po kurių eina RasGAP katalizinis ir PH domenai. Nepaisant bendros struktūros, šios grupės RasGAP baltymams būdingas skirtingas reguliavimas ir poveikis. Gap1m ir GAP1ip4bp C2 domenai neturi aminorūgščių, atsakingų už koordinavimą kalcio jonais, o CAPRI C2 domenas pasižymi aukštu giminingumu kalcio jonų atžvilgiu, ir jo translokacijai į plazminę membraną yra būtinas Ca^{2+} išlaisvinimas. Kiti Gap1 šeimos nariai sąveikauja su membrana PH domeno sąveikos su fosfolipidais dėka: GAP1ip4bp PH domenas sąveikauja su fosfatidilinozitolio-2-fosfatu, o Gap1m – su fosfatidilinozitolio-3-fosfatu, ir jo translokacija link membranos priklauso nuo PI3K kinazės aktyvumo. Gap1m per PH domeną taip pat sąveikauja su G baltymų subvienetu $G\alpha_{12}$, ir $G\alpha_{12}$ stimuliuoja jo GTPazinį aktyvumą. Skiriasi ir šių baltymų kataliziniai GAP domenai. CAPRI GAP domenas, skirtingai nuo Gap1m ir GAP1ip4bp, sulieto baltymo pavidale *in vitro* nepasižymi GAP aktyvumu, jei terpėje nėra Ca^{2+} jonų, kitaip tariant, yra aktyvinamas kalcio jonų. RASAL1 baltymo GAP aktyvumas *in vitro* tikrintas nebuvo (Bernards 2003).

SynGAP yra RasGAP, selektyviai ekspresuojamas smegenų sužadinančiose sinapsėse. Yra žinomi bent keturi žiurkės ir žmogaus genai, ekspresuojantys *SynGAP* homologus: *syngap1*, *rasal2*, *af9q34* ir *flj21438*, bet pagrindiniai tyrimai

buvo atlikti su baltymu SynGAP1 (Bernards 2003). SynGAP kalcio jonai aktyvina netiesiogiai: jį fosforilina nuo kalmodulino priklausoma kinazė II (CAMKII) padidindama jo aktyvumą 70-95% (Oh, Manzerra et al. 2004). SynGAP reguliuoja tradicinių GTPazių Ras, o taip pat GTPazių Rap1 aktyvumą (Pena, Hothorn et al. 2008). *SynGAP1* geno mutacijos neretai aptinkamos pas autosominiu dominantiniu nesindrominiu protiniu atsilikimu sergančius ligonius (Hamdan, Gauthier et al. 2009).

IQGAP šeimai yra priskiriami trys baltymai: IQGAP1, IQGAP2, IQGAP3, bet IQGAP3 nėra ištirtas ir priskiriamas IQGAP baltymams tik pagal homologiją. IQGAP baltymų N-gale yra kalponinui homologiškas F-aktiną prijungiantis domenai, po to seka WW domenai, keturi IQ motyvai ir C-gale yra RasGAP giminingas segmentas. Pastarasis neturi RasGAP domenui būdingų arginino pirštų ir veikia slopindamas Rho šeimos GTPazių Cdc42 ir Rac1 aktyvumą. IQGAP1, galbūt, veikia kaip tarpininkas tarp kalmodulino bei Cdc42 ir Rac1, nes IQGAP sąveika su šiomis Rho GTPazėmis yra reguliuojama Ca^{2+} ir kalmodulinu. Vienose ląstelėse IQGAP lokalizuojasi Goldžio aparate, kitose – ties adhezinėmis jungtimis, kur sąveikauja su E-kadherinu ir β -kateninu. IQGAP1 ir IQGAP2 genai nekompensuoja vienas kito, nes turi nepersidengiančius ekspresijos raštus (Bernards 2003).

1.3. Signalas nuo Ras perdavimas

Signalas nuo GTPazių Ras yra perduodamas per aktyvių Ras (Ras-GTP) sąveikas su baltymais-taikiniais. Žinoma vis daugiau tokių baltymų. Tradicinių Ras atveju efektorinių baltymų prijungime dalyvauja Ras efektorinė kilpa (aminorūgštys 32-40) ir kai kurie aplinkui esantys radikalai bei taip vadinama *switch II* sritis (aminorūgštys 60-72). Ras baltymo sąveika su GTP vietoj GDP kritiškai pakeičia šių sričių konformaciją, ir įgalina jo sąveiką su efektoriais. Be to, kai kurios (26, 31, 41, 45, 46, 48, 49 ir 53) aminorūgštys, nors jų konformacija dėl guanino nukleotido mainų ir nesikeičia, yra kritiškos Ras signalo perdavimui. Tai buvo nustatyta, tiriant Ras mutantus. Šitos aminorūgštys bendrai yra

vadinamos aktyvinančia sritimi (*activator region*) arba pastovia efektorine sritimi (*constitutive effector region*).

Baltymai Ras efektoriams yra priskiriami pagal du pagrindinius požymius:

1. Kai baltymo sąveika vyksta tik su aktyvia Ras forma arba sąveika su aktyviu Ras vyksta žymiai geriau, nei su neaktyviu;

2. Kai baltymas sąveikauja su efektorinėmis Ras sritimis, ir specifinės šių sričių mutacijos smarkiai sumažina ar panaikina sąveiką (Malumbres and Pellicer 1998).

Pagrindiniai tradicinių Ras efektoriai yra Raf baltymai, RalGDS šeima, PI3K kinazė, MEKK1 kinazė, GTPazės Rin-1, Rin-2, Rin-3; AF-6, PKC-z, Nore-1, RasGAP, Tiam1 ir kiti.

Ras efektoriai sąveikauja su Ras per savo RBD (Ras prijungiantį) domeną. RBD būna trijų tipų: Raf tipo, PI3K tipo ir RA (RalGDS/AF6) tipo. RA tipo RBD turinčių efektorių yra žinoma daugiausia.

Ras sąveika su efektoriumi sąlygoja efektoriaus aktyvumo padidėjimą arba biocheminį poveikį efektoriaus taikiniams. Efektoriaus geno išmušimas pakenkia daliai nuo Ras perduodamo signalo. Skirtingi efektoriai sąveikauja su skirtingomis Ras molekulės sritimis – tai padeda išskirti signalo perdavimo kelius.

1.3.1 Raf-MEK-Erk signalo perdavimo kelias

Raf šeimos kinazės yra pirmieji nustatyti ir geriausia ištirti Ras efektoriai (Vojtek, Hollenberg et al. 1993; Zhang, Settleman et al. 1993).

Raf aktyvinimo mechanizmai gali būti sudėtingi, integruojantys konformacijos pakitimą, translokaciją į membraną (Stokoe, Macdonald et al. 1994), fosforilinimą (Carroll and May 1994), Ras farnezilinimą (Kikuchi and Williams 1994). Raf-1 turi du su Ras sąveikaujančius domenus: pagrindinį, RBD, ir papildomą, CRD (*cysteine-rich domain*), kuris sąveikauja su Ras po RBD ir moduliuoja sąveiką. Tačiau vien sąveikos su Ras nepakanka Raf aktyvinimui. Raf kinazių aktyvinime gali dalyvauti papildomi baltymai. Pavyzdžiui, 14-3-3 baltymai (žinomos 7 izoformos) sąveikauja su Raf-1, ši sąveika netrukdo Raf sąveikai su Ras. 14-3-3 šeimos adaptoriniai baltymai sąveikauja su fosforilintu arba autofosforilintu Raf-1 ir yra kritiniai Raf-1 aktyvinimo kofaktoriai (Freed, Symons et al. 1994; Dhillon,

Yip et al. 2009). Raf-1 yra aktyvinama ir PKC kinazių, kai kuriais atvejais net nepriklausomai nuo Ras būsenos (Zou, Komuro et al. 1996).

Aktyvi Raf kinazė fosforilina ir aktyvina labai specifines tirozino ir treonino MEK kinazes (*MAP kinase extracellular signal-regulated kinase*), kurios, savo ruožtu, fosforilina ir aktyvina p42 (Erk2) ir p44 (Erk1) MAPK/Erk serino ir treonino kinazes (Macdonald, Crews et al. 1993). Erk kinazės, turi labai daug taikinių citoplazmoje bei branduolyje, kur jos migruoja po aktyvinimo.

Žindoliai turi tris Raf genus, koduojančius Raf-1 (C-Raf), A-Raf ir B-Raf; B-Raf turi daug alternatyvaus splaisingo izoformų. B-Raf neturi dviejų fosforilinamų tirozinų, kas galbūt nulemia aktyvinimo skirtumą: Raf-1 ir A-Raf yra stipriai aktyvinami onkogeninės Src kinazės, B-Raf aktyvinime esminį vaidmenį atlieka Ras baltymas, greičiausia, tiesiogiai sukeldamas konformacijos pokytį (H-Ras atveju). Kita vertus, yra nustatyta, kad H-Ras aktyvina Raf-1 žymiai silpniau už N-Ras, bet abu šios GTPazės Ras aktyvina MAPK/Erk kelią (Malumbres and Pellicer 1998).

Kinazė Raf-1 yra aktyvinama tradicinėmis GTPazėmis Ras, TC21, M-ras, Rit; A-Raf yra aktyvinama tradicinėmis Ras ir M-ras; B-Raf – tik tradicinėmis Ras. Kinazių Erk fosforilinimą sukelia tradicinės GTPazės Ras ir, žymiai silpniau, TC21, M-ras, Rit (Rodriguez-Viciano, Sabatier et al. 2004). Erk fosforilinimas skatina Erk molekulių homodimerizaciją ir translokaciją į branduolį, kur Erk kinazės aktyvina transkripcijos faktorius, tiesiogiai juos fosforilindamos (Khokhlatchev, Canagarajah et al. 1998).

Su Raf-MEK-Erk kelio aktyvinimu yra susijusi dar eilė kitų baltymų:

1. Raf šeimai gimininga serino ir treonino kinazė Tpl2/Cot, kuri fosforilina ir aktyvina MEK-Erk ir JNKK-JNK/SAPK kelius priklausomai nuo Ras (Hagemann, Troppmair et al. 1999).
2. Raf-1 ląstelėje egzistuoja komplekse su Hsp90 šaperonu, kuris, kaip manoma, užtikrina Raf-1 stabilumą ir vietą ląstelėje (Schulte, Blagosklonny et al. 1995). Hsp90 slopikliai yra potencialūs priešvėžiniai preparatai (Neckers 2009).

3. Pastolinis baltymas Ksr1 (*kinase supressor of Ras*) po stimuliavimo augimo faktoriais sudaro trigubą kompleksą su B-Raf ir MEK, kuris stiprina MEK aktyvinimą. Kai komplekse atsiranda aktyvi Erk kinazė, ji fosforilina Ksr1 ir B-Raf, skatindama komplekso tarp jų disociavimą ir tokiu būdu neigiamai reguliuoja savo aktyvinimą (McKay, Ritt et al. 2009).

Pagrindiniai Erk taikiniai yra p90 ribosominė kinazė S6, citozolinė fosfolipazė A-2, eukariotų transliacijos inicijacijos faktorių 4E prijungiantis baltymas-1, transkripcijos faktorius Myc, kurį stabilizuoja fosforilinimas Erk kinazėmis; tarp taikinių taip pat yra transkripcijos faktoriai p62TCF/Elk-1 ir Ets-2, kurie formuoja trigubą kompleksą ties SRE (*serum response element*) elementais ir reguliuoja proliferaciją inicijuojančių staigaus ankstyvojo atsako genų (*c-fos*, *HB-EGF*) ekspresiją; p90RSK kinazė, kuri fosforilina transkripcijos faktorių CREB ir aktyvina jo transaktivacinį potencialą, taip pat p90RSK kinazė fosforilina ir slopina Bad, vieną esminių apoptozės induktorių (Malumbres and Pellicer 1998; Cox and Der 2003).

Raf ir MEK kinazės nepriklausomai nuo Erk aktyvumo reguliuoja Mdm2/Hdm2 baltymo, degraduojančio p53 mRNR transportą ir taip prisidedančio prie Ras sukeliama išgyvenimo signalo (Phelps, Phillips et al. 2005); Par-4, proapoptotinį transkripcijos faktorių; Bcl-2 šeimos baltymus: K-Ras skatina Bcl-2 ekspresiją, Bcl-xL ekspresija irgi priklauso nuo GTPazių Ras. Raf-1 gali sąveikauti su Bcl-2 tiesiogiai citoplazmoje. Mitochondrijose esanti Raf-1 prijungia Bad ir slopina apoptozę (Cox and Der 2003).

Ras gali aktyvinti Erk ir receptoriaus endocitozės metu po signalo, perduodamo nuo klatrinu padengtų endocitozės pūslelių (*clatrin-coated vesicles*). Pavyzdžiui, po aktyvaus EGF receptoriaus endocitozės į citoplazmą yra perduodamas išgyvenimo signalas; po NGF stimuliuto TrkA receptoriaus endocitozės yra aktyvinamas transkripcijos faktorius Elk (Bivona and Philips 2003).

Erk kinazių signalo specifiškumas iš dalies priklauso nuo Erk erdvinės lokalizacijos ir skirtingos baltymų kompleksų sudėties. Pavyzdžiui, pastolinis baltymas Ksr1 lokalizuoja Raf-MEK-Erk kompleksą prie plazminės membranos (McKay, Ritt et al. 2009), o kitas Erk signalą stiprinantis pastolinis baltymas MP1

per adaptorinį baltymą p14 – prie vėlyvųjų endosomų (Wunderlich, Fialka et al. 2001).

Raf-MEK-Erk kelias yra svarbus proliferacijos, išgyvenimo, apoptozės bei genų transkripcijos reguliavimui.

1.3.2. RalGDS šeima

RalGDS (*Ral GDP dissociation stimulator*) yra Ras šeimos GTPazių Ral guanino nukleotido mainų faktoriai. Su aktyviu Ras sąveikauja ir keletas kitų RalGDS giminingų baltymų, irgi Ral GTPazių guanino nukleotido mainų faktorių: Rgl, Rgl2, Rlf. Visi jie turi katalizinį domeną ir RA domeną, atsakingą už sąveiką su Ras: C-gale, apie 80-100 aminorūgščių ilgio. Kinazių Raf ir RalGDS sąveikos su Ras mechanizmai skiriasi, galbūt šitie skirtumai sąlygoja reguliavimo specifiškumą; šį specifiškumą taip pat galėtų įtakoti baltymų kinazė A (Malumbres and Pellicer 1998).

RalGDS yra aktyvinamas tradicinėmis GTPazėmis Ras, R-Ras1, R-Ras2, R-Ras3, Rit, Rap1. Rgl ir Rgl2 yra aktyvinami tradicinėmis Ras, R-Ras1, R-Ras2, R-Ras3, Rit (Rodriguez-Viciano, Sabatier et al. 2004).

GTPazė Ras aktyvintas RalGDS skatina Ral guanino nukleotido mainus; šį procesą stimuliuoja daugelis augimo faktorių. Šiai aktyvacijai yra būtina Ras ir Ral kolokalizacija (Kishida, Koyama et al. 1997).

RalGDS veikia į Goldžio aparato judėjimą, pūslelių formavimąsi (per GTPazę Arf ir fosfolipazę D), citoskeletą (per GTPazes Cdc42 ir Rac), genų ekspresiją (*fos*, veikia sinergetiškai su Ras). RalGDS, Rgl ir Rlf dalyvauja nuo Ras priklausomoje TFF faktoriumi indukuotoje DNR sintezėje (van Dam and Robinson 2006).

1.3.3. Fosfatidilinozitolio-3-kinazės (PI3K)

Fosfatidilinozitolio-3-kinazės (PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase) katalizuoja fosfatidilinozitolio-4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂) fosforilinimą iki fosfatidilinozitolio-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Kitas jų produktas yra fosfatidilinozitolio-3,4-bifosfatas (PI(3,4)P₂). PI3K yra heterodimerai, sudaryti iš dviejų subvienetų: p110 ir p85

baltymų. p110 yra katalizinis PI3K subvienetas, egzistuoja α , β , γ ar δ p110 baltymai. p85 subvienetai yra eilė skirtingų adaptorinių molekulių, kurios turi SH2 domeną ir per jį pritraukia PI3K heterodimerus prie fosforilintų tirozinuose augimo faktorių receptorių ar pastolinių baltymų. Skirtingi p85 subvienetai veikia nulemia skirtingų heterodimerų reguliavimo ypatumus. Su p85 subvienetais nesąveikauja tik PI3K γ , ji yra reguliuojama heterotrimerinių G baltymų (Leevers, Vanhaesebroeck et al. 1999).

GTPazės Ras sąveikauja su PI3K p110 subvienetais ir aktyvina juos. Taip Ras kontroliuoja PI3K, dalyvaujančios nuo Ras priklausomoje tumorigenezėje, aktyvumą (Der and Van Dyke 2007). Pelių *pi3kca* geno mutacijos parodė, jog PI3K p110 sąveika su Ras yra svarbi nuo Ras priklausomiems vystymosi procesams bei tumorigenezei (Gupta, Ramjaun et al. 2007).

Skirtingi p110 subvienetai su Ras sąveikauja skirtingai. p110 α ir p110 γ sąveikauja su tradiciniais Ras, R-Ras1, R-Ras2, R-Ras3, Rit; p110 α labai silpnai sąveikauja su Rap1. Sąveika su p110 α koreliuoja su Akt kinazės aktyvinimu. p110 δ sąveikauja su R-Ras1 ir R-Ras2 (TC21). p110 β su Ras nesąveikauja (Rodriguez-Viciano, Sabatier et al. 2004).

PI3K aktyvinimo Ras GTPazėmis mechanizmas nėra aiškus, bet parodyta, kad užtenka p110 translokacijos prie membranos. Gali būti, kad PI3K aktyvinimui reikia ir papildomų veiksnių, pvz., tirozinų fosforilinimas (Leevers, Vanhaesebroeck et al. 1999). PI3K poveikis yra neigiamai reguliojamas PIP3 fosfatazės PTEN (Maehama and Dixon 1998).

Labiausia ištirta PI3K kinazės funkcija yra baltymų kinazės B (PKB), taip pat žinomos kaip Akt kinazės, aktyvinimas (aktyvinime dalyvauja I klasės PI3K). Akt priklauso baltymų serino ir treonino kinazių A/G/C (AGC) šeimai, yra žinomos trys Akt izoformos (Akt1, 2, Akt3 arba Akt α , Akt β , Akt γ). PIP3 sąveikauja su Akt PH domenu ir sąlygoja jos translokaciją prie membranos, kur ji yra fosforilinama ir aktyvinama įvairių kinazių, dažniausia PDK1 (kuri yra pritraukiama prie membranos irgi sąveikos su PIP3). PDK1 fosforilina Akt treoniną-308. Kitas Akt aktyvinimo kelias yra nuo RTK per mTOR kompleksą 2, tikslus mechanizmas

nežinomas, fosforilinas Akt serinas-473. Akt kinazės veikia savo aktyvinimo kelius teigiamais ir neigiamais grįžtamaisiais ryšiais (Manning and Cantley 2007).

Akt kinazės veikia ir citoplazmoje, ir branduolyje. Jų fosforilinimo įtaka gali pasireikšti per efektorių funkcijų stimuliavimą arba slopinimą. Pagrindinės Akt funkcijos: ląstelės išgyvenimas – per BAD, FOXO, Cas9; ląstelės augimas (masės didėjimas) priklausomais ir nepriklausomais nuo mTor komplekso1 keliais; dalijimasis – per p27Kip1, p27Cip/Waf, mTorC1, migracijos slopinimas – per NFAT degradavimą ir Erk kelio slopinimą. Akt fosforilina IKK, kuris fosforilina ir išaktyvina IκB, NF-κB slopiklių. NF-κB indukuoja išgyvenimo signalą. Akt kinazės įtakoja Erk (fosforilina Raf-1 ir mažina jo kinazinį aktyvumą (Cox and Der 2003)), JNK/p38 signalo perdavimo kelius (Manning and Cantley 2007).

Bcl-2 šeimos baltymai reguliuoja mitochondrijų membranos pralaidumą ir nuo mitochondrijų priklausomą apoptozę. Bcl-2 ir Bcl-xL baltymai mitochondrijų membranoje slopina citochromo c išėjimą į citoplazmą. Kitas šeimos narys, Bad, prijungia Bcl-2 ir Bcl-xL ir veikia proapoptotiškai. Akt fosforilina Bad, dėl ko su Bad sąveikauja 14-3-3 šeimos baltymai, kurie prijungia Bad citoplazmoje ir užtikrina ląstelės išgyvenimą (Cox and Der 2003).

PI3K taip pat dalyvauja nuo Ras priklausomame Rho šeimos kinazių aktyvinime, nuo Rab5 priklausomos endocitozės reguliavime (Christoforidis, Miaczynska et al. 1999).

PI3K ir jos lipidiniai produktai dalyvauja proliferacijos, išgyvenimo, migracijos ir metabolizmo pokyčių (insulinu reguliuojamas gliukozės metabolizmas) reguliavime, taip pat uždegiminiame ir imuniniame atsakuose.

1.3.4 Nuo RASSF priklausomi keliai

RASSF yra Ras efektorių, navikų supresorių (*tumour suppressor*) šeima. Į šią šeimą įeina šeši homologiniai baltymai, nuo RASSF1 iki RASSF6.

Bendros RASSF baltymų savybės:

1. C-gale turi sąveikos su Ras (RBD) RA tipo domenų ir SARAH baltymų sąveikos domenų.

2. Būdingi daugybiniai transkriptai (alternatyvinis splaisingas, skirtingi promotoriai).

3. Promotorių sričiai būdingos CpG salelės, transkripcija reguliuojama metiliniu.

4. Funkcionuoja kaip navikų supresoriai.

5. Veikia kaip adaptoriniai baltymai.

RASSF1 turi septynias izoformas, žymimas nuo RASSF1A iki RASSF1G, kai kurios jų turi C1 domeną, ATM kinazės fosforilavimo motyvą. RASSF1 funkcijos yra navikų supresavimas, taip pat šie baltymai yra susiję su mikrovamzdelių reguliacija, dalyvauja ląstelės cikle.

RASSF1 kolokalizuoja su mikrovamzdeliais, mitozės metu keičia lokalizaciją. Skatina α -tubulino acetilinimą, ir tokiu būdu – mikrovamzdelių stabilumą, apsaugo nuo mikrovamzdelių susirinkimo slopikliaus nokodazolo poveikio. RASSF1 sąveikauja su keletu baltymų, susijusių su mikrovamzdelių susirinkimo reguliavimu.

RASSF1A ir RASSF1C sąveikauja su kitu RASSF baltymu – RASSF5/NORE1, su proapoptotine kinaze MST1, kuri gali indukuoti nuo Ras priklausomą apoptozę (priešingai PI3K ir Tiam1 išgyvenimo keliams). Mst1 yra kaspazės-3 efektorius ir stiprintuvas. Vaisinės muselės Mst homologas indukuoja nuo CNR1 ir Mst priklausomą apoptozę.

RASSF1 vaidmuo ląstelės cikle pasireiškia prometafazėje Cdc20 titravimu. RASSF1 neleidžia Cdc20 sąveikauti su APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) kompleksu, kuris turėtų katalizuoti ciklinų A ir B degradavimą. Padidinta RASSF1 ekspresija taip pat mažina ciklinų D1 ir D3 lygį.

Kai kurių navikų ląstelėse RASSF1 geno promotorius yra slopinamas metiliniu, pavyzdžiui, NSCLC, krūties karcinomos ląstelėse. Reikia pažymėti, jog ši reguliacija būdinga RASSF1A ir kai kurioms kitoms izoformoms, tačiau šis metilinimas nekeičia RASSF1C ekspresijos. RASSF1 somatinės mutacijos aptinkamos retai. Taip pat yra duomenų apie RASSF2, RASSF3, RASSF4, RASSF5 įvairių izoformų promotorių metilinimą navikų ląstelėse. RASSF1 ekspresijos pažeidimai siejami su onkogeninėmis 3p21.3 srities delecijomis.

Rassf1 sąveikauja su tradiciniais Ras (geriausia – su K-Ras) ir M-Ras.

RASSF2 dalyvauja apoptozės, pereinimo iš G0 į G1 reguliavime. Gali lokalizuotis branduolyje, bet ne branduolėliuose. RASSF2 sąveikauja su tradiciniais ir, silpnai, su trimis R-Ras.

RASSF4/AD037 dalyvauja apoptozės reguliavime, sąveikauja su tradiciniais ir trimis R-Ras.

RASSF5/NORE1 dalyvauja ląstelės ciklo sustabdyme ir apoptozės indukavime, skirtinguose ląstelių tipuose veikia skirtingai. Gali lokalizuotis branduolyje ir branduolėliuose. RASSF5 sąveikauja su tradiciniais Ras, Rap2 ir R-Ras. RASSF5 yra homologiškas RASSF1 baltymams, turi hipotetinį C1 domeną.

Apie RASSF3 ir RASSF6 funkcijas duomenų kol kas nėra (Agathangelou, Cooper et al. 2005).

1.3.5 Kiti nuo Ras priklausomi signalo perdavimo keliai

MEKK1 nors vadinasi MEK kinazė, MEK aktyvina tik nežymiai. Pagrindinė MEKK1 funkcija yra JNK ir p38 MAP kinazių kelių aktyvinimas. GTPazės Ras per MEKK1 aktyvina NF- κ B signalą. MEKK1 aktyvina I κ B kinazę, kuri fosforilina I κ B baltymą, sukeldama jo degradavimą ir NF- κ B translokaciją į branduolį (Russell, Lange-Carter et al. 1995).

Tiam1 yra Rho šeimos GTPazių Rac GEF baltymas (Lambert, Lambert et al. 2002). Tiam1 gali aktyvintis tiesioginė sąveika su Ras, taip pat Ras aktyvina Tiam1 per PI3K. Baltymas Tiam1 turi Raf tipo RBD domeną (Michiels, Habets et al. 1995).

Atipinės, nuo DAG ir kalčio jonų nepriklausomos, baltymų kinazės C (PKC) *PKC λ* ir *PKC ζ* sąveikauja su tradicinėmis GTPazėmis Ras. Aktyvintos Ras perneša *PKC λ* ir *PKC ζ* prie plazminės membranos ir aktyvina jas. Per atipines PKC Ras blokuoja miogeninių satelitinių ląstelių diferenciaciją (Fedorov, Jones et al. 2002).

Kita su Ras sąveikaujanti baltymų kinazė C yra *PLC ϵ* , turinti du RA tipo RBD domenus, antras yra žemesnio giminingumo. Ji sąveikauja su tradiciniais Ras ir M-Ras, kurie pritraukia ją prie membranos ir aktyvina (Song, Hu et al. 2001).

Bcl-2 sąveikauja su aktyviomis tradicinėmis GTPazėmis Ras mitochondrijose per savo BH4 (*Bcl-2* *homology-4*) domeną ir blokuoja nuo Ras priklausomą apoptozę (Denis, Yu et al. 2003), tačiau šis procesas būdingas ne visoms ląstelių linijoms. Taip pat Bcl-2 citozolyje sąveikauja su kinaze Raf-1, pernešdama Raf-1 į mitochondrijas, kur Raf-1 kartu su Bcl-2 slopina nuo Ras priklausomą apoptozę (Rebollo, Perez-Sala et al. 1999).

1.4. Adaptoriniai baltymai

Adaptoriniais (*adaptor* arba *adapter*) yra vadinami baltymai, nepasižymintys kataliziniu aktyvumu, kurie užtikrina sąveikas tarp baltymų ar tarp baltymų ir lipidų. Kai kurie fermentai irgi gali būti vadinami adaptoriais, jeigu nagrinėjamo proceso metu jie funkcionuoja kaip adaptoriai, o ne fermentai. Adaptoriams taip pat priskiriami dokiniai (*docking*) baltymai ir pastoliniai (*scaffold*) baltymai. Dokiniai baltymai veikia kaip tarpininkai tarp vieno ar kelių baltymų ir ląstelės struktūrų. Pastoliniai baltymai veikia kaip tarpininkai, susidarant kompleksams iš kelių baltymų, kurie šio komplekso susidarymo dėka gali sąveikauti tarpusavyje (Csiszar 2006).

Adaptoriniai baltymai yra sudaryti iš domenų, užtikrinančių sąveikas tarp baltymų arba tarp baltymų ir lipidų. Tokių domenų yra žinoma apie 80. Geriausiai ištirti yra fosforilintą tiroziną prijungiantys domenai SH2 ir PTB, fosforilintą seriną prijungiantis 14-3-3 baltymo domenas, prolino turtingus motyvus prijungiantis domenas SH3, fosfoinozitolio darinius ir hidrofobinius aminorūgščių motyvus prijungiantis domenas PH (Pawson 1995).

Ląstelėje adaptoriniai baltymai atlieka įvairias funkcijas. Jie dalyvauja viduląstelių signalų ir signalų nuo membranos receptorių perdavime per kompleksų tarp baltymų suformavimą, sąveikaudami su baltymais, dalyvaujančiais skirtinguose procesuose, adaptoriniai baltymai veikia kaip savotiškos signalinių kelių sankryžos. Adaptoriniai baltymai gali reguliuoti signalo amplitudę bei poveikio laiką per sąveikų stiprumą bei giminingumą. Neretai adaptoriniai baltymai apsprendžia kitų baltymų vieta ląstelėje. Atskirais atvejais adaptorinio baltymo sąveika su partneriu gali keisti baltymo-partnerio

erdvinę konformaciją ir dėl to jo aktyvumą arba sugebėjimą sąveikauti su kitais baltymais (Csiszar 2006).

Iš adaptorinių baltymų pažymėtina 14-3-3 baltymų šeima, kurios potencialūs sąveikos partneriai sudaro apie 0,6% genomo (Jin, Smith et al. 2004), Grb2 ir į Grb2 panašių baltymų šeimos Graf ir Gab, dalyvaujančios signalo nuo įvairių augimo faktorių perdavimo reguliavime, Nck adatoriniai baltymai, kurių vaidmuo bus aptartas žemiau.

1.4.1. SH2 domenai

SH2 (*Src homology 2* [domain]) domenai pirmą kartą buvo identifikuoti kai kurių tirozino kinazių reguliatorinėse dalyse (DeClue, Sadowski et al. 1987). Vėliau jie buvo atrasti dar keliuose negimininguose baltymuose, pvz., PLC γ , RasGAP ir PI3K reguliatoriniame subvienete p85 (Anderson, Koch et al. 1990). Tyrimai parodė, jog SH2 domenai gali užtikrinti sąveiką tarp baltymų. Pirmiausia buvo parodyta, jog v-Crk onkobaltymas, sudarytas vien iš SH2 ir SH3 domenų, v-Crk transformuotose ląstelėse aktyvina onkogeninę tirozino kinazę ir asocijuoja su eile baltymų su fosforilintais tiroziniais (Mayer and Hanafusa 1990). Mutaciniai tyrimai patvirtino prielaidą, jog SH2 domenai iš tiesų yra atsakingi už sąveiką su fosforilintais tiroziniais. Be to, SH2 domenų turinčių signalinių molekulių (PLC γ ir GAP) sąveika su fosforilintu EGF receptoriumi parodė SH2 domenų svarbą signalo perdavimui nuo RTK (Moran, Koch et al. 1990).

SH2 domenai užtikrina sąveiką su fosforilintą tiroziną turinčiais aminorūgščių motyvais. Fosforilintas tirozinas suteikia sąveikai pagrindinę energiją – be fosforilinimo sąveika visai nevyksta. Sąveikos specifiškumą užtikrina C-gale nuo fosforilinamo tirozino esančios 3-6 aminorūgštys. Kiekvienas SH2 domenas specifiškai atpažįsta unikalią aminorūgščių seką. SH2 domenas yra maždaug 100 aminorūgščių ilgio, kurios sudaro centrinę antiparalelinę β -klostę, apsuptą dviejų α -spiralių. Fosforilintą tiroziną atpažįsta konservatyvi hidrofobinė kišenė, fosfato deguonies atomus nukreipia invariantinis argininas, kuris yra esminis prijungiant fosforilintą peptidą. C-gale nuo fosforilinto tirozino esančias aminorūgštis

specifiškai atpažįsta kintamoji SH2 domeno dalis. SH2 domeno specifinio ligando disociavimo konstanta yra ~50-500 nM (Waksman, Kominos et al. 1992).

SH2 domenai yra būdingi daugialąsčiams organizmams, pradedant gleivūnais (Eichinger, Pachebat et al. 2005). Žmogaus ir pelės organizmuose juos turi virš 110 baltymų, dalyvaujančių išorės bei viduląstelių signalų perdavime, citoskeleto, transkripcijos, baltymų degradavimo reguliavime ir kituose procesuose (<http://sh2.uchicago.edu/>).

1.4.2. SH3 domenai

SH3 (Src homology 3) domenai yra atrasti daugelyje baltymų, dalyvaujančių signalo perdavime, citoskeleto organizavime ir fermentų kompleksuose, pvz., fagocitų NADPH oksidazė, Src, Abl kinazės, p120RasGAP. Kaip ir SH2, SH3 domenai užtikrina tarpbaltymines sąveikas. Bandant identifikuoti su SH3 domenais sąveikaujančius motyvus buvo klonuoti du su Abl kinazės SH3 domenais sąveikaujantys baltymai. Už sąveiką pasirodė esą atsakingi trumpi, apie 10 aminorūgščių ilgio, prolino turtingi motyvai (Ren, Mayer et al. 1993).

SH3 domenas yra ~60 aminorūgščių ilgio, jo struktūrinį pagrindą sudaro 5-6 antiparalelinės β -sekos, suformuojančios dvi β -klostes. β -sekas jungia keturios kilpos. Ligandą prijungiantis rajonas susidaro iš hidrofobinio paviršiaus, kuriame yra trys negilios aromatinių aminorūgščių suformuotos kišenės; Ši paviršių supa dvi įkrautos variabilios kilpos, prisidedančios užtikrinant sąveikos specifiškumą (Nguyen, Turck et al. 1998). Struktūrinė ir mutacinė SH3 domenų kompleksų su ligandais analizė rodo, kad su SH3 domenais asocijuojantys peptidai turi kairiojo sukimo II tipo poliprolino spiralę su trimis aminorūgštimis vijoje. Peptidas-ligandas turi tris vijas, iš kurių dvi sąveikauja su SH3 domenu, o trečioji stabilizuoja spiralę, ir jam yra būdingas aminorūgščių motyvas X-P-p-X-P. Du konservatyvūs prolinai yra būtini sąveikai, viena iš aminorūgščių tarp jų dažniausia irgi yra prolina, o X linkę būti alifatinėmis aminorūgštimis. Kiekviena XP pora sąveikauja su viena SH3 domeno hidrofobine kišene, suteikdamos sąveikai pagrindinę energiją. SH3 domeno sąveikos su ligandu disociavimo konstanta yra 0,1-10 μ M eiles (Mayer 2001).

Su SH3 domenais sąveikaujantys peptidai yra pseudosimetriški ir potencialiai gali sąveikauti abiem kryptimis, tai yra, iš C-galo į N-galą (klasė I) arba iš N-galo į C-galą (II klasė). Kryptį nulemia su trečią ("specifiškumo") viją sąveikaujantis SH3 domeno argininas (arba lizinas). SH3 domenų sugebėjimas sąveikauti su ligandu abiem kryptimis padidindamas potencialių partnerių skaičių gali turėti ir netikėtų pasekmių. Pavyzdžiui, ligando orientacija nulemia komplekso erdvinę organizaciją, kuri gali būti lemtinga tolesniam signalo perdavimui. Įdomu, jog, kaip rodo tyrimai, adaptorinių baltymų SH3 domenai teikia pirmenybę išimtinai II klasės ligandams (Pawson 1995).

Kai kuriuose baltymuose SH3 domenai prisijungia netradicines sekas, ne PXXP (Pix sąveika su Pak, Eps8 ir Hbp SH3 domenais). Rūgštines liekanas RT kilpoje turintys SH3 domenai gali atpažinti netradicines sekas, turinčias daug bazinių aminorūgščių: R/KXXR/K, KKPP, HXXK ir kt. (Jia, Nie et al. 2005).

Naudojant trumpų peptidų bibliotekas bei eksponavimą fago paviršiuje nustatyta, kad kiekvienas SH3 domenas sąveikauja su specifiniu motyvu. Specifiškumą akivaizdžiai nulemia sąveika tarp ligando neprolininių aminorūgščių, esančių už pagrindinės sąveikos vietos (PXXP) ribų, taip pat variabilios SH3 domeno kilpos, kurios supa pagrindinį hidrofobinį sąveikos paviršių (Pawson 1995). Vis dėl to, SH3 domenų giminingumas savo ligandų atžvilgiu paprastai yra gana žemas, tačiau esant aukštai žemo giminingumo ligando lokalinei koncentracijai, sąveiką gali vykdyti (pvz., Src SH3 domeno sąveika su tos pačios molekulės prolino turtinga sritimi (Sicheri and Kuriyan 1997)).

Daugumos SH3 domenų specifiškumas yra žemas, ir tai nesiderina su jų svarbia biologine funkcija. Šis paradoksas turi du paaiškinimus:

1. Selektyvumas *in vivo* gali didėti:
 - a) potencialių partnerių suartinimo dėka, pavyzdžiui, SH2 domenų pagalba;
 - b) dėl daugybinės sąveikos per keletą SH3 domenų, pavyzdžiui, Grb2, Nck adaptorinių baltymų atvejais;
2. Galbūt, ląstelėje SH3 domenų sąveikos selektyvumas nėra lemiamas. Atvirkščiai, sąveikaudamas su daugybe partnerių, SH3 domeną turintis baltymas sujungia signalo perdavimo grandines į vientisą tinklą (Mayer 2001).

Baltymai su SH3 domenais paprastai sąveikauja pastoviai, nepriklausomai nuo ląstelės būsenos. SH3 domenų sąveikai su ligandu nereikia papildomų modifikacijų (priešingai kaip, pavyzdžiui, SH2 domenų sąveikai reikia tirozinių fosforilinimo). Pažymėtina, kad su panašiais, prolino turtingais ir spirale sudarančiais ligandais sąveikauja ir kiti baltymų sąveikos domenai: WW domenai (Wintjens, Wieruszeski et al. 2001), profilino domenai (Mahoney, Rozwarski et al. 1999).

SH3 domenai yra būdingi beveik visų eukariotų, pradedant mielėmis, baltymams. Žmogaus genome yra užkoduota apie 300 SH3 domenų, tačiau dar neaišku, kiek yra SH3 domenų turinčių baltymų: kai kurie baltymai turi po kelis SH3 domenų (<http://www.expasy.org/prosite/>).

1.5. Adaptoriai baltymai Nck

Nck yra adaptorinių baltymų, turinčių tris SH3 ir vieną SH2 domenų (1.1 pav.), šeima, į kurią įeina du baltymai: Nck1 (Nck α) ir Nck2 (Nck β /Grb4). Nck baltymai pasižymi aukšta tarpusavio homologija: 68%, domenų srityse – nuo 72 iki 94% (Coutinho, Jahn et al. 2000). Didžiąja dalimi Nck1 ir Nck2 baltymų funkcijos dubliuojasi, nes pelės su nokautuotais vienu iš šių baltymų nepasižymi išskirtiniu fenotipu, o dvigubi Nck mutantai žūsta embriono stadijoje (Bladt, Aippersbach et al. 2003). Tačiau pavieniai tyrimai leidžia manyti, jog Nck baltymų vaidmenys signalo perdavime tam tikrais atvejais gali žymiai skirtis, kaip, pavyzdžiui, aktino citoskeleto persitvarkymo reguliavimas priklausomai nuo PDGF (Chen, She et al. 2000). Nck2, bet ne Nck1 stabilizuoja aktiną reguliuojantį baltymą paksiliną neuritogenezės metu (Guan, Chen et al. 2007).

Nck yra konservatyvūs baltymai, jų genų homologai yra klonuoti pelėse (abiejų formų, α ir β), *Xenopus* (vienas genas), *C. elegans* (vienas genas) bei *Drosophila* (genas *dreadlocks*: *dork* arba *dock*).

Nck1 genas yra trečiosios chromosomos q21 srityje; aberacijos šiame regione yra siejamos su įvairiomis karcinomomis bei piktybiniais hemopoezės sutrikimais. Nck2 genas yra antrosios chromosomos q12 srityje (Chen, She et al. 1998).



1.3 pav. Nck šeimos baltymų struktūros schematinis vaizdas.

Kaip paminėta aukščiau, Nck baltymai pasižymi aukštu homologijos laipsniu. Antikūnai prieš Nck, išskyrus specialiai pagamintus monokloninius arba giminingumo chromatografija išgrynintus polikloninius antikūnus, atpažįsta abu Nck baltymus. Todėl daugelyje Nck baltymų tyrimų nebuvo deramai atsižvelgta į tai, kuriam Nck baltymui būdinga tiriamoji sąveika arba kuris iš Nck specifiskai sukelia tiriamąjį efektą. Specifiškumo klausimas reikalauja išsamių ir sisteminių tyrimų (Lettau, Pieper et al. 2009).

Nck yra adaptoriniai baltymai ir nepasižymi kataliziniu aktyvumu. Pagrindiniai Nck tyrimai yra susiję su baltymų, sąveikaujančių su Nck, paieška. Paradigminis adaptorinių baltymų vaidmuo signalo perdavime yra sąveikų tarp kitų baltymų užtikrinimas (Csiszar 2006). Nck baltymai, per savo SH3 domenus, stabiliai sąveikauja su viduląsteliniais baltymais, ir po augimo faktoriaus ar kitokio poveikio pritraukia juos per savo SH2 domenus prie tirozinuose fosforilintų baltymų. Tačiau yra duomenų, demonstruojančių, jog Nck baltymai gali tiesiogiai veikti baltymų-partnerių aktyvumą. Geriausia ištirtas tokio poveikio pavyzdys yra Nck sąveika su T-ląstelių receptoriumi (TCR) (Gil, Schamel et al. 2002).

Nck yra vienintelė adaptorinių baltymų šeima, kurios nariai turi net tris SH3 domenus. Potencialiai Nck gali vienu metu sąveikauti su keletu partnerių, arba kai kurioms sąveikoms yra būtinas daugiau nei vienas domenas. Iš tikrųjų, abi prielaidos yra teisingos. Nck partnerių tarpe yra tokių, kurie sąveikauja tik su vienu SH3 domenu, bet yra ir tokių, sąveikai su kuriais yra būtini du ar daugiau domenų arba jie gali sąveikauti ir su vienu domenu, bet kitų domenų buvimas sustiprina šią sąveiką (Mayer 2001).

Adaptoriniai baltymai Nck dalyvauja signalo perdavime nuo RTK. Per savo SH2 domeną Nck sugeba asocijuoti su daugybe baltymų, fosforilintų

tirozinuose. Visų pirma, tai yra pačios autofosforilintos RTK. Nck baltymai sąveikauja su EGF (Li, Hu et al. 1992) ir PDGF receptoriais. PDGF receptoriuje buvo nustatytos dvi sąveikos su Nck vietos: Nck1 sąveikauja tiesiogiai su Y751 saitų, konkuruodamas su PI3K, ir su Y1009, o Nck2, matomai, tiesiogiai sąveikauja su Y1009 (Chen, She et al. 2000). Taip pat Nck baltymai gali sąveikauti su PDGFR netiesiogiai per pastolinį baltymą p130^{Cas} (Rivera, Antoku et al. 2006). Su Flt-1 (VEGFR-2) (Lamallice, Houle et al. 2006) ir EphB1 receptoriais Nck sąveikauja tiesiogiai (Stein, Huynh-Do et al. 1998), o su EphB2 (Nuk) receptoriais – netiesiogiai: EphB2 fosforilina baltymo DOK (arba p62^{DOK}) tirozinas, jis sudaro kompleksą su Nck ir RasGAP, o RasGAP per vieną savo SH2 domenų sąveikauja su fosforilintu tirozinuose receptoriais (Holland, Gale et al. 1997). Abu Nck sąveikauja su IRS-1, kuris yra pagrindinis insulino receptoriaus substratas (Tu, Li et al. 1998). Sąveikaudami su receptoriais, baltymai Nck dalyvauja perduodant išorės signalą į ląstelę, pavyzdžiui, skatinant citoskeleto persitvarkymus.

Nck baltymai yra glaudžiai susiję su citoskeleto organizacija bei signalo perdavimu nuo RTK į citoskeletą. Vaisinės muselės geno *dock* mutacijos sukelia fotoreceptorių aksonų krypties vystymosi sutrikimus (Song, Wu et al. 2003); panašias funkcijas Nck atlieka ir vystantis stuburinių nervų sistemai (Li, Meriane et al. 2002; Fawcett, Georgiou et al. 2007; Guan, Chen et al. 2007).

Adaptoriniai baltymai Nck sąveikauja su baltymais WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) ir N-WASP – centriniams aktino citoskeleto struktūros reguliatoriais. WASP ir N-WASP aktyvina Arp2/3 kompleksą, kuris katalizuoja aktino filamentų šakojimąsi ir aktino skaidulų tinklų susiformavimą (Suetsugu, Miki et al. 2002). WASP ir N-WASP funkcijos yra identiškos, tik WASP yra ekspresuojamas hemopoetinėse ląstelėse, o N-WASP – kituose audiniuose (Fukuoka, Miki et al. 1997). WASP geno mutacijos sukelia Wiskott-Aldrich sindromą – su X-chromosoma susijusio imunodeficito sindromą. WASP šeimos baltymams yra būdingas autoslopinimas. Aktyvinami jie per sąveiką su Cdc42 Rho šeimos GTPaze (Kim, Kakalis et al. 2000). Nck sąveikauja su WASP per SH3-III domeną (Rivero-Lezcano, Marcilla et al. 1995) ir po TCR ar PDGFRβ

(Nck β) aktyvavimo savo SH2 domeno pagalba pritraukia WASP į tirozinuose fosforilintų baltymų kompleksus, pavyzdžiui, į vieną kompleksą su Vav, Rho GTPazių GEF baltymu ir aktyvia Cdc42 GTPaze (Aspenstrom, Lindberg et al. 1996). Tačiau baltymai Nck gali aktyvinti WASP ir kitais būdais. Eksperimentai su mielėmis leidžia manyti, kad nekonvenciniai SH3 domenus turintys miozinai, būtini aktino citoskeleto susirinkimui, yra potencialūs WASP partneriai. Mielėse jie sąveikauja su mielių WASP analogu Bee1p ir pritraukia jį prie Arp2/3 komplekso. Šių miozinų funkcionavimui yra svarbus fosforilinimas Pak šeimos kinazėmis (Ste20p). Nck ir mielių, ir žinduolių ląstelėse sąveikauja su Pak šeimos kinazėmis. Gali būti, kad Nck yra svarbus nekonvencinių miozinų fosforilinimo reguliavimui (Tomasevic, Jia et al. 2007). Taip pat su WASP baltymų EVH1 domenu sąveikauja WIP (WASP-interacting protein) (Ramesh, Anton et al. 1997), WIP sąveikauja ir su Nck SH3-II domenu, stabilizuodamas jo gana silpną sąveiką su WASP arba N-WASP (Anton, Lu et al. 1998). WIP turi prolino turtingą sritį, kuri irgi gali sąveikauti su SH3 domenus turinčiais miozinais. Šitaip WASP-WIP kompleksas turi daugiau sąveikos su miozinais vietų. Be to WIP gali dalyvauti aktino pluoštų susirinkime iš pavienių skaidulų (Anton, Lu et al. 1998). Nck gali aktyvinti WASP prijungdamas kitą savo partnerį NAP (Kitamura, Kitamura et al. 1996). Galų gale, domenai gali aktyvinti WASP-Arp2/3 kompleksus tiesiogiai, Nck atveju optimaliam aktyvinimui reikia keleto SH3 domenų. Gali būti, kad sąveika su dviem ar net trim SH3 domenais užfiksuoja N-WASP atviroje, aktyvioje konformacijoje, atidengdama VCA sritį, susijusią su aktino polimerinimosi reguliavimu. Aukšta lokalinė Nck koncentracija gali aktyvinti N-WASP nepriklausomai nuo aktyvaus Cdc42-GTP buvimo (Tomasevic, Jia et al. 2007). Nck SH3 domenų sankaupos skatina aktino polimerinimąsi (Rivera, Briceno et al. 2004). Vienas iš receptorių, sudarančių tokias sankaupas, yra nefrino receptorių-1 (taip pat žinomas kaip DCC). Nefrinai yra sekretuojami baltymai, kurie suteikia kryptį ląstelių judėjimui ir aksonų augimui. Nck sąveikauja su nefrino receptoriaus fosforilintą tiroziną turinčiais motyvais per savo SH2 domeną ir tarpininkauja aktyvinant GTPazę Rac1 (Li, Meriane et al.

2002). Daugybiniiai nefrino receptoriaus fosforilintą tiroziną turintys motyvai ir Nck SH3 domenai leidžia moduluoti aktino polimerinimąsi nefrino receptoriaus ir Nck sankaupose kiekybiškai (Blasutig, New et al. 2008).

Vieni svarbiausių Nck partnerių yra serino/treonino kinazės *PAK* (*p21 activated kinase*) (Galisteo, Chernoff et al. 1996). Pak yra serino ir treonino kinazių šeima, kurios yra aktyvinamos Rac ir CDC42 mažų GTPazių, mielių Ste20 kinazės homologai. Jos dalyvauja perduodant proliferacijos, diferenciacijos, išgyvenimo signalus, reguliuoja citoskeleto persitvarkymus. Pak kinazės yra susijusios su JNK ir p38MAP kinazių kaskadų aktyvacija, o taip pat su citoskeleto organizacija. Yra šešios Pak kinazės. Pagal sekos panašumą jos yra skirstomos į dvi grupes:

1. Pak1(α), Pak2(\square) ir Pak3(β)
2. Pak4, Pak5, Pak6 (Zhou, Zhuo et al. 2003).

Nck asocijuoja su Pak1 ir Pak2 per savo SH3-II domeną (Bokoch, Wang et al. 1996). Pak1 ekspresija skatina membranos raukšlėjimąsi, slopina įtempimo skaidulų formavimąsi. Pak1 gali aktyvinti JNK kinazių kaskadą, bet nėra kritinė. Erk kinazių atžvilgiu, priešingai, Pak1 yra būtina, bet jos vienos aktyvumo Erk aktyvinimui nepakanka. Pak1, Pak2 ir Pak4 kartu su Akt kinaze fosforilina ir aktyvina po Ras aktyvinimo išgyvenimo faktorių Bad (Tang, Zhou et al. 2000).

Nck pritraukia Pak1 prie aktyvintų augimo faktorių receptorių ir sąlygoja nuo G-baltymų nepriklausomą Pak1 aktyvinimą. Sąveiką su Nck sąlygojanti prolino turtinga seka yra šalia serino 21. Šitas Pak serinas yra autofosforilinamas arba fosforilinamas Akt, PDK-1, PKG (Fryer, Wang et al. 2006) kinazių, dėl ko Pak aktyvumas nežymiai padidėja, o sąveika su Nck yra slopinama. Manoma, jog taip yra reguliuojami Pak kinazės lokalizacija ir aktyvumas. Pak1 relokalizacija į citoplazmą sumažina ląstelės prilipimą prie substrato; fosforilindama citoplazmoje miozino lengvąją grandinę Pak1 galbūt papildomai mažina prilipimą (Zhou, Zhuo et al. 2003). Dar Pak yra autofosforilinama ar fosforilinama PDK-1 kinazės ties treoninu 423 ir aktyvinama.

Pak sąveikauja (prolino turtinga seka ties S199, sąveika irgi yra reguliuojama fosforilinant S199) su PIX: Rac ir CDC42 GEF.

Su Nck SH3-II domenu sąveikaujanti serino/treonino kinazė PRK2 yra homologinė lipidų reguliuojamai baltymų kinazei N (PKN). PRK2 specifiskai asocijuoja su GTP turinčia RhoA GTPaze, ir ši sąveika sąlygoja nuo RhoA priklausomų genų transkripcijos aktyvinimą (Quilliam, Lambert et al. 1996).

Dar viena su Nck asocijuojanti serino/treonino kinazė – NIK taip pat yra susijusi su JNK MAP kinazių kaskados aktyvinimu. Tyrimai su vaisine musele parodė, kad Nck ir NIK homologinių genų – *dock* ir *msn* (*misshapen*) – produktų asociacija yra būtina normalios fotoreceptorių aksonų krypties vystymuisi (Becker, Huynh-Do et al. 2000), tačiau NIK aktyvacija, skirtingai nuo PAK, nepriklauso nuo asocijavimo su GTPazėmis Rho. Gali būti, kad NIK yra aktyvinama tiesioginės sąveikos su MEKK dėka. Taigi, Nck vaidmuo signalo perdavime pasireiškia kaip nuo Rho priklausomoje, taip ir nepriklausomoje JNK MAP kinazių kaskados aktyvacijoje (McCarty 1998).

Ras šeimos GTPazė R-Ras turi prolino turtingą seką, kuri sąveikauja su adaptorinio baltymo Nck antruoju SH3 domenu. Prolino turtingo motyvo mutacija mažina nuo R-Ras priklausomą ląstelių prilipimą (Wang, Zou et al. 2000).

Duomenys apie Nck įtaką Ras ir šitaip Erk kinazių kaskados aktyvinimui yra prieštaringi. Nck sugeba asocijuoti su Ras guanino nukleotido mainų faktoriumi Sos (Hu, Milfay et al. 1995), ir yra parodyta, jog nuo šitos sąveikos priklauso kai kurių nuo Ras priklausomų genų transkripcijos aktyvinimas. Tačiau kiti tyrimai parodė, kad Nck atskirų domenų mutacijos neturi įtakos nuo EGF arba PDGF priklausomam Erk aktyvinimui, o padidinta Nck ekspresija PC12 ląstelėse netgi slopino NGF ir FGF sukeltą nuo Ras priklausomą diferenciaciją ir skatino jų tolimesnę proliferaciją, taip patvirtindama kritinį Nck vaidmenį proliferacijoje (Rockow, Tang et al. 1996).

Adaptoriniai baltymai Nck dalyvauja taip vadinamame nesulankstytų baltymų atsake (*unfolded protein response*). Tai yra endoplazminio tinklo indukuojamas atsakas, kai endoplazminiame tinkle susikaupia galutinės tretinės

struktūros nepasiekę baltymai. Nesulankstytų baltymų atsako metu yra laikinai slopinama baltymų transliacija ir gaminami leucino užtrauktuko tipo transkripcijos faktoriai, kurie įjungia su baltymų struktūros susidarymu susijusių genų ekspresiją. Iš endoplazminio tinklo ertmės į citozolį ir branduolį atsaką perduoda trys transmembraniniai pernešėjai: IRE1, ATF6 ir PERK. Baltymų Nck sąveika su eIF2 β transliacijos iniciacijos komplekso komponentu stimuliuoja transliaciją, todėl nesulankstytų baltymų atsako metu ši sąveika yra suardoma (Kebache, Zuo et al. 2002). Taip pat Nck yra eIF2 α Ser51 fosfatazės komplekso dalis, skatindamas eIF2 α defosforilinimą, Nck perteklius ląstelėje irgi skatina transliaciją, sustabdytą atsako į nesulankstytus baltymus metu (Kebache, Cardin et al. 2004). Žinduolių ląstelėse su baltymų sintezės sustabdymu susijusius stresus specifiskai aktyvina keturios kinazės: PERK, PKR, HRI ir GCN2. Nck moduliuoja stresus sukeltus PERK (Kebache, Cardin et al. 2004), PKR (Cardin and Larose 2008) ir HRI, bet ne GCN2 (aminorūgščių trūkumo sukeltas atsakas) (Cardin, Latreille et al. 2007).

Kai kurie faktai apie Nck dar laukia paaiškinimo. Pavyzdžiui, įvairių augimo faktorių bei metabolitų analogų aktyvintose ląstelėse specifiniai Nck serinai bei tirozinai yra gausiai fosforilinami, bet šio fosforilinimo funkcinė reikšmė yra nėra aiški (Park and Rhee 1992). Nck tirozinai yra fosforilinami kepenų ląstelėse išemijos ir reperfuzijos procesų metu kepenų persodinimo eigoje, taip pat keičiasi Nck ekspresija bei lokalizacija ląstelėje (Emadali, Metrakos et al. 2007). Dalis ląstelinio Nck yra lokalizuota branduolyje, kur jis asocijuoja su RNR prijungiančiu baltymu SAM68, tačiau vėl gi, funkcinė šios sąveikos prasmė dar nežinoma (Lawe, Hahn et al. 1997).

Septinai (Sept) yra neaiškios funkcijos su GTP sąveikaujantys citoplazmos baltymai. Septinai per Socs7 adaptorinį baltymą sąveikauja su Nck baltymais ir sulaiko juos citoplazmoje. Nesant septinų 2, 6 arba 7, Nck perlokalizuojamas į branduolį ir dėl to suyra įtempimo skaidulos. Iš kitos pusės, Nck patekimas į branduolį yra būtinas atsako į DNR pažeidimą indukavimui, konkrečiai – nuo Atm/Atr priklausomam Chk2 ir p53 aktyvinimui, nors vien Nck perlokalizacijos tam neužtenka (Kremer, Adang et al. 2007).

Apibendrinant, adaptoriniai baltymai Nck yra svarbūs įvairių viduląstelinių procesų, tokių kaip išorės signalo perdavimas, citoskeleto persitvarkymas, baltymų sintezė reguliatoriai. Nepaisant gausios informacijos, Nck baltymų vaidmuo ląstelėje dar kelia daug klausimų.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Ląstelių linijos

Daugiausia tyrimams buvo naudojama HepG2 žmogaus hepatomos ląstelių linija, neturinti endogeninio PDGF receptoriaus β . Laukinio tipo PDGF receptoriaus β (PDGFR- β) genas buvo įvestas į HepG2 ląsteles pLXSN vektoriaus pagalba. HepG2 ląstelės su įvestu tuščiu pLXSN vektoriumi buvo pavadintos H-N, o ekspresuojančios laukinio tipo PDGFR- β – H-WT (Van Lint, Ni et al. 1998). Taip pat buvo panaudota NIH3T3 pelės embriono fibroblastų linija, HeLa linija iš žmogaus gimdos kaklelio karcinomos ir Myo26, triušio miogeninių ląstelių linija. Ląstelės buvo kultivuojamos Dulbecco modifikuotoje Eagle (DME, Biochrom) terpėje su 10% jaučio embriono serumo (Sigma) ir antibiotikais (100 μ g/ml penicilino ir 100 μ g/ml streptomicino, Biochrom). Ląstelės buvo persėjamos, naudojant standartinę audinių kultūrų priežiūros techniką.

2.2. Ląstelių lizatų paruošimas

Ląstelės buvo auginamos iki 70-80% tankio ir sinchronizuojamos DME terpėje per naktį. PDGF poveikiui buvo naudota PDGF-BB (Amgene) 50 ng/ml koncentracija 37°C temperatūroje. 2,5 μ M latrunkulinu B (Sigma) ląstelės buvo veikiamos 0,5 val. 37°C temperatūroje. 10 μ g/ml nokodazolu (Sigma) ląstelės buvo veikiamos 0,5 val. 37°C temperatūroje. Ląstelių suspendavimui buvo naudojamas 2 mg/ml tripsino proteazės (Amresco) tirpalas fiziologiniame tirpale fosfatiniame buferyje (PBS) su 1 mM EDTA, ląstelės buvo veikiamos tripsinu 5 min kambario temperatūroje. Pakartotinam užsėjimui po suspendavimo buvo naudoti 25 cm² audinių kultūrų indeliai, kurių dugnas buvo padengtas 0,1 μ g/ml fibronektinu (Sigma).

Po poveikių ląstelės buvo tris kartus plaunamos PBS ir lizuojamos lizės buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 20 nM aprotininas, 2 mM NaVO₄). Lizatai

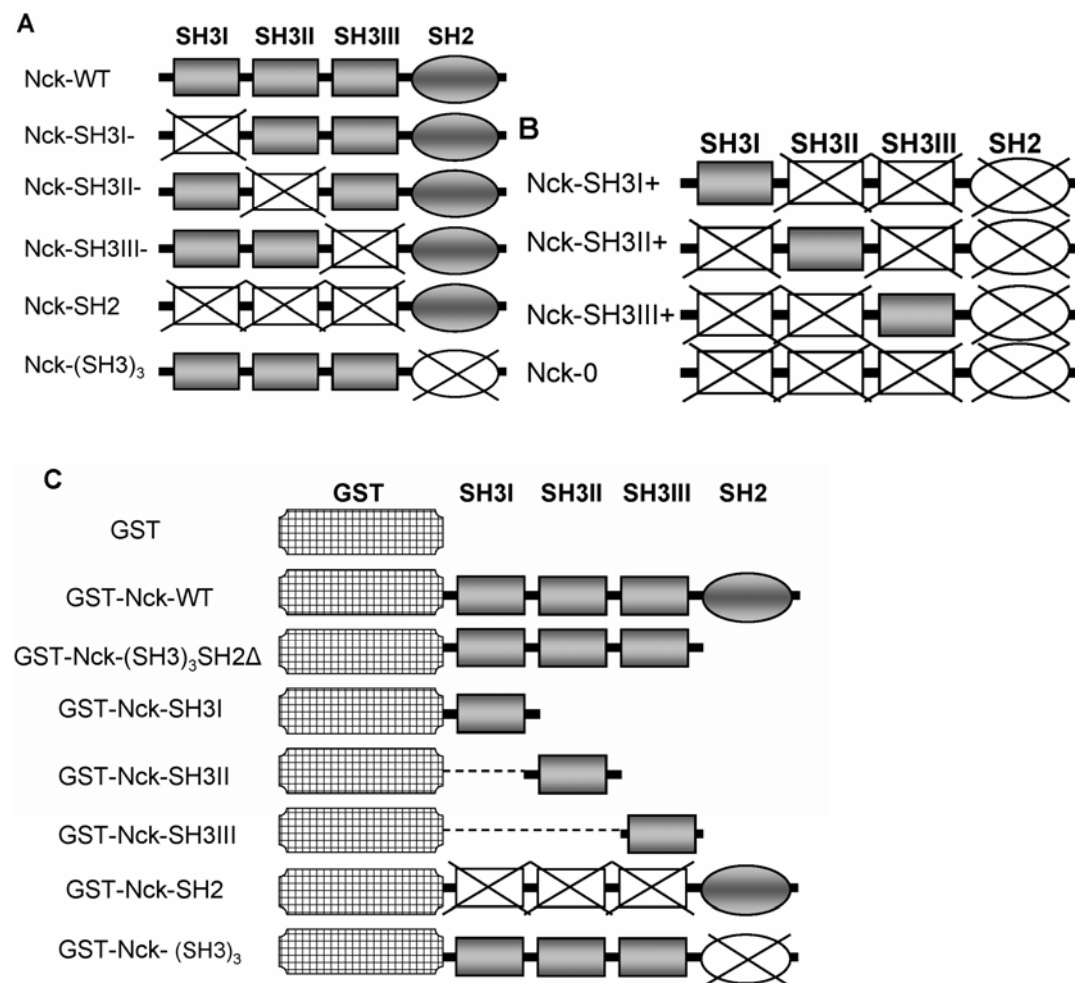
buvo atskiriami nuo neištirpusių nuosėdų centrifuguojant (20000 g, 15 min, 0°C temperatūroje).

2.3. Ekspresijos konstruktai, antikūnai, kiti reagentai

pRK5-HA-Nck1 vektoriai ekspresuojantys laukinio tipo hemoagliutinino (HA) epitopu pažymėtą Nck1 (HA-Nck1), arba Nck1 su išaktyvinančiomis taškinėmis mutacijomis pavieniuose domenuose: SH3 pirmajame (K38), antrajame (K143), trečiajame (K229) ar SH2 domene (K308), arba HA-Nck1 su visais trimis išaktyvintais SH3 domenais (K38, 143, 229) (2.1 A pav.) buvo gauti iš dr. W. Li (Chen, She et al. 2000).

Kiti pRK5-HA-Nck1 konstruktai: Nck-SH3I+ (K143, 229, 308; tik SH3-I domenas funkcionalus), Nck-SH3II+ (K38, 229, 308; tik SH3-II domenas funkcionalus), Nck-SH3III+ (K38, 143, 308; tik SH3-III domenas funkcionalus), Nck-0 (K38, 143, 229, 308; visi SH3 ir SH2 domenai su išaktyvinančiomis taškinėmis mutacijomis) buvo sukurti mūsų laboratorijoje įstatant restrikcijos fragmentus iš vienu mutantų į kitus (2.1B pav.). pGex2T-Nck1-WT vektorius, ekspresuojantis su gliutationo S-transferaze (GST) sulietą laukinio tipo Nck1 baltymą (GST-Nck1-WT) ir antikūnas specifinis Nck2 baltymui taip pat buvo gauti iš dr. W. Li. pGex2T-Nck-(SH3)₃ SH2Δ vektorius ir pavienius su GST sulietus Nck1 SH3 domenus ekspresuojantys vektoriai buvo sukonstruoti, klonuojant PGR padaugintas SH3 domenų sekas į pGex2T vektorių į *EcoRI/BamH1* restriktazių kirpimo vietą (2.1C pav.). kDNR fragmentas, koduojantis RasGAP N-galinę prolino turtingą seką (aminorūgštys 68-168), buvo padaugintas PGR pagalba ir įstatytas į pEGFP-C2 vektorių per tarpinį pcDNA3 vektorių į *EcoRI/Bsp1201* restriktazių kirpimo vietas; c-myc epitopas buvo įterptas naudojant adaptorinius oligonukleotidus su lipniais galais. pGex2T-Nck-(SH3)₃ ir pGex2T-Nck-SH2 vektoriai buvo sukonstruoti klonuojant fragmentus iš pRK5 vektorių su atitinkamais mutantais į pGex2T-Nck1-WT plazmidę (2.1C pav.). pGex2T-RBD ir pGex-Nck2 plazmidės buvo gautos iš dr. L.A. Quilliam. pcDNA3-HA-H-Ras plazmidę padovanojo dr. K.-L. Guan. Nck, GST ir RasGAP triušio polikloninis antiserumas buvo gautas

imunizuojant triušius atitinkamais rekombinantiniais su GST sulietais baltymais. Molekulinės biologijos reagentai buvo pirkti iš Fermentas. Nck1, c-myc ir HA pelės monokloniniai antikūnai buvo pirkti iš Santa Cruz Biotechnology. Nck, p190 RhoGAP ir Ras pelės monokloniniai antikūnai buvo pirkti iš BD Transduction Laboratories. RasGAP pelės monokloninis antikūnas buvo pirktas iš Millipore. FITC žymėtas faloidinas ir R250 kumasio mėlio dažai buvo pirkti iš Sigma.



2.1 pav. **Nck1 taškinių mutantų schemas ir nomenklaturā.** A. Iš W. Li gauti Nck1 mutantai, įstatyti į pRK5-HA vektorių. B. Mūsų laboratorijoje restrikcijos fragmentų pakeitimo pagalba sukonstruoti Nck1 mutantai, įstatyti į pRK5-HA vektorių. C. Deleciniai ir taškiniai Nck1 mutantai, įstatyti į pGex2T vektorių.

2.4. Imunonusodinimas ir imunoblotas

Imunonusodinimo eksperimentams naudotų antikūnų titrai buvo: Nck1 – 1:50, HA – 1:250, RasGAP antiserumas – 1:100, c-myc – 1:100. Ląstelių lizatai buvo inkubuoti su nurodytu antikūnu 2 val. 4°C temperatūroje. Imuniniai kompleksai buvo surinkti su ProtA sefarozę (GE Healthcare), jei buvo naudojami triušio antikūnai, arba ProtG sefarozę (GE Healthcare), jeigu buvo naudojami pelės antikūnai, inkubuojant 1 val. 4°C temperatūroje pastoviai vartant. Sefarozė su sujungtais baltymų kompleksais buvo 6 kartus plaunama lizės buferiu ir iškaitinta 50 µl vienkartinio elektroforezės pavyzdžio (SB) buferio (2% SDS, 10% glicerolio, 5% 2-mercaptoetanolio, 0,004% bromfenolio mėlio, 0,125 M Tris HCl, pH 6,8). Baltymai buvo išskirstomi SDS-PAG elektroforezės gelyje, pernešami elektroforezės būdu ant polivinildifluorido (PVDF) membranos (Bio-Rad). Membrana buvo blokuojama BLOTTO buferyje (0,9% NaCl, 8mM Tris HCl, 2mM Tris, 1% lieso pieno, 0,025% Tween-20, 0,05% NaN₃) bei analizuojama imunobloto metodu, naudojant antikūnus, specifiskai atpažįstančius analizuojamus baltymus. Inkubavimo laikas su pirminiais antikūnais standartiškai buvo 2 val., su antriniais, konjuguotais su šarmine fosfataze (Sigma), – 0,5 val. Imunoblotas buvo ryškinamas naudojant nitro-blue tetrazolio ir 5-bromo-4-chloro-3-indolilfosfato tolidžio druskos dažus (Roth). Membranos skenavimui naudotas Image Scanner skeneris (GE Healthcare).

2.5. Su GST sulietų baltymų gryninimas ir nusodinimo su rekombinantinius baltymais metodas

Su GST sulieti baltymai buvo ekspresuoti BL21 kamieno bakterijose ir išgryninti giminingumo chromatografija, naudojant gliutinationo sefarozę (GE Healthcare), vadovaujantis gamintojo instrukcija. RasGAP aktyvumo matavimo eksperimentams nuo GST-Nck1 su trombino proteaze (GE Healthcare) buvo nuskeltas GST ir pašalintas gliutinationo sefaroze. Nusodinimo su GST-Nck baltymais eksperimentams buvo naudojama po 10 µg GST-Nck

baltymo arba GST kiekvienam mėginiui. Baltymas buvo imobilizuojamas ant gliutinationo sefarozės ir inkubuojamas su ląstelių lizatu 1 val. 4°C pastoviai vartant. Sefarozė su susidariusiais baltymų kompleksais buvo plaunama 5 kartus lizės buferiu ir iškaitinta su 50 µl SB buferio. Su GST ar GST-Nck baltymais asocijavę baltymai buvo frakcionuojami SDS-PAGE gelyje ir analizuojami imunoblotu. Membranos skenavimui naudotas Image Scanner skeneris (GE Healthcare).

2.6. Laikinoji transfekcija

H-WT ląstelės 25 cm² indeliuose buvo transfekuojamos su 10 µg išgrynintos su MaxiPrep kolonėle (Qiagen) plazmidės, naudojant standartinę nusodinimo su kalcio fosfatu metodiką. 24 val. po transfekcijos ląstelės buvo sinchronizuojamos terpėje be serumo per naktį ir naudojamos tolesniems eksperimentams.

2.7. Netiesioginis imunoblotas

RasGAP buvo imunonusodintas iš H-WT ląstelių lizatų, baltymų kompleksas buvo išskirstytas SDS-PAGE ir perneštas ant PVDF membranos. Membrana buvo blokuojama BLOTTO buferyje ir 3 val. inkubuojama netiesioginio imunobloto buferyje (22 mM HEPES pH7,7, 75 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 2,5 mM MgCl, 1% jaučio serumo albumino, 0,05% NP-40, 1 mM DTT) su 10 mg/ml tiriamojo rekombinantinio baltymo. Su GST sulieti baltymai, specifiskai asocijavę su sąveikos partneriais ant membranos, buvo analizuoti antikūnais prieš GST, inkubuojant membraną antikūno prieš GST tirpale 1,5 val ir antrinio antikūno tirpale – 0,5 val. Netiesioginis imunoblotas buvo ryškinamas naudojant nitro-blue tetrazolio ir 5-bromo-4-chloro-3-indolilfosfato tolidžio druskos dažus (Roth).

2.8. Imunofluorescencija ir konfokalinė mikroskopija

H-WT ląstelės buvo užauginamos ant dengiamųjų stiklelių, užfiksuojamos 4% paraformaldehidu, permeabilizuojamos 0,2% Triton X-100

PBS buferyje ir blokuojamos Image-iT FX signalo stiprikyje (Invitrogen). Nck ir RasGAP kolokalizacijos eksperimentams adaptorinis baltymas Nck buvo nudažytas monokloniniu antikūnu, atpažįstančiu Nck1 ir Nck2 baltymus (Transduction Labs); RasGAP baltymas buvo nudažytas monokloniniu antikūnu, atpažįstančiu epitopą RasGAP SH3 domene (Millipore). Abu antikūnai buvo tiesiogiai pažymėti Alexa fluorescuojančiais dažais, naudojant Apex antikūnų žymėjimo rinkinį (Invitrogen). Branduoliai buvo nudažyti DNR dažu 4,6-diamidino-2-fenilindoliu (DAPI) (Invitrogen). Nck, RasGAP ir aktino citoskeleto kolokalizacijos eksperimentams adaptorinis baltymas Nck buvo nudažytas monokloniniu antikūnu, atpažįstančiu Nck1 ir Nck2 baltymus ir antriniu antikūnu prieš pelės IgG konjuguotu su fluorochromu. RasGAP buvo nudažytas antiserumu tiesiogiai pažymėtu Alexa 488 fluorochromu (antikūno žymėjimui naudotas baltymų žymėjimo rinkinys iš Invitrogen). Aktino citoskeletas buvo nudažytas su FITC konjuguotu faloidinu. Fluorescencijos vaizdai buvo gauti Nikon C1 invertuotu lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu, naudojant 60.1.4NA imersinį objektyvą. Signalo apdorojimui bei kolokalizacijos įvertinimui buvo naudota Imaris 5.0 (Bitplane) programinė įranga.

2.9. RasGAP aktyvumo matavimas

RasGAP buvo imunonusodintas iš H-WT ląstelių lizatų. Sefarozė su baltymu buvo plauta lizės buferiu ir inkubuojama su rekombinantiniu Nck1 baltymu arba tuščiu buferiu 1 val. 4°C pastoviai vartant. Rekombinantinis baltymas H-Ras (Sigma), po 5 µg kiekvienam mėginiui, buvo pakrautas 0,1 mM GTP Ras pakrovimo buferyje (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 1mM DTT, 50µg/ml jaučio serumo albumino, 100 mM NaCl) ir inkubuotas su imunoisodintu RasGAP arba tuščia ProtA sefaroze. Aktyvus H-Ras, likęs po inkubavimo su RasGAP ar be jo, buvo nusodintas su 20 µg Raf1 baltymo Ras prijungiančio domeno (RBD) sulieto su GST (GST-RBD). RBD specifiškai sąveikauja tik su aktyviu H-Ras. Nusodinimo su GST-RBD metodika buvo analogiška nusodinimui su GST-Nck baltymais (žr. 2.5). Aktyvaus H-Ras

kiekis buvo įvertintas išskirsčius susidariusius kompleksus SDS-PAGE ir analizuojant imunoblotu su antikūnais prieš H-Ras. Imunobloto dėmių optinio tankio įvertinimui buvo naudota Image J programinė įranga.

2.10. Laikinai ekspresuoto HA epitopu pažymėto H-Ras (HA-H-Ras) aktyvumo ląstelėje matavimas

H-WT ląstelės buvo transfekuotos tuščiu pcDNA3 vektoriumi arba pcDNA vektoriumi, ekspresuojančiu HA-H-Ras. Ląstelės buvo sinchronizuotos terpėje be serumo per naktį. Praėjus 48 val. po transfekcijos ląstelės buvo paveiktos PDGF-BB arba suspenduotos tripsinu, priklausomai nuo konkretaus eksperimento, ir lizuotos. Aktyvus HA-H-Ras iš lizatų buvo nusodintas su 20 μ g GST-RBD. Aktyvaus HA-H-Ras kiekis buvo įvertintas išskirsčius susidariusius kompleksus SDS-PAGE ir analizuojant imunoblotu su antikūnais prieš HA epitopą. Imunobloto dėmių optinio tankio įvertinimui buvo naudota Image J programinė įranga.

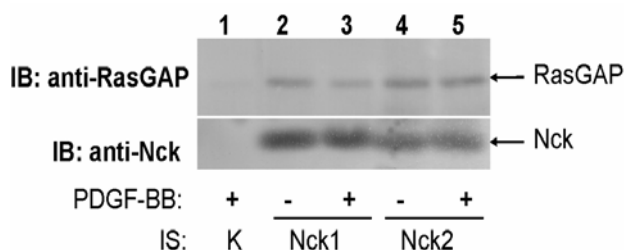
2.11. Statistinė duomenų analizė

Visi šiame darbe aprašyti eksperimentai buvo pakartoti tris kartus su panašiais rezultatais. Kiekybiniai duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida. Duomenų kitimo patikimumas įvertintas lyginant nesuporuotų dviejų nuokrypių Stjudento testą. Duomenys laikomi patikimais kai P yra mažesnis nei 0,1.

3. REZULTATAI

3.1. Adaptorinių baltymų Nck sąveika su p120 Ras GTPazę aktyvinančiu baltymu (RasGAP)

Tirdami Nck šeimos baltymų vaidmenį PDGF- β receptoriaus signalo perdavime, mes aptikome, jog Nck1 (Ger, Tunaitis et al. 2003) baltymas sąveikauja su RasGAP. Pirmasis uždavinys iškeltas šiai sąveikai ištirti buvo nustatyti, ar ląstelėje egzistuoja kompleksas tarp adaptorinių Nck šeimos baltymų: Nck1 ir Nck2 – ir RasGAP. Šiam uždaviniui išspręsti Nck1 ir Nck2 baltymai buvo imunonusodinti su antikūnais, specifiniais Nck1 arba Nck2 baltymui, iš plokštelių kilmės augimo faktoriumi BB (PDGF-BB) paveiktų (PDGF-BB koncentracija – 50 nM, poveikio laikas – 5 min., temperatūra 37°C) arba nepaveiktų HepG2 ląstelių, pastoviai ekspresuojančių dirbtinai įvestą laukinio tipo PDGF receptorių β (H-WT ląstelės). Baltymai, esantys komplekse su Nck1 ir Nck2 ir nusodinti kartu su jais, buvo išskirstyti SDS-PAGE, ir imunoblotu buvo patikrinta, ar šiuose kompleksuose yra RasGAP.

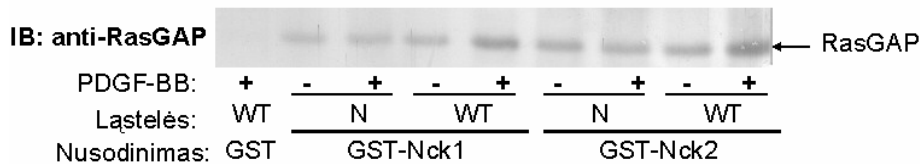


3.1 pav. **Adaptoriniai baltymai Nck1 ir Nck2 sąveikauja su RasGAP ląstelėje.** H-WT ląstelės buvo paveiktos arba nepaveiktos PDGF-BB ir lizuotos. Iš lizatų su specifiniais antikūnais buvo nusodinti (IS) Nck1 (takeliai 2-3) arba Nck2 (takeliai 4-5) ir su jais sąveikaujantys baltymai. RasGAP buvimas imuninėse kompleksuose patikrintas imunoblotu (IB) su antikūnų prieš RasGAP (viršutinė juostelė). Nck baltymų kiekis parodytas, naudojant antiserumą, atpažįstantį abu Nck baltymus (apatinė juostelė). Imunonusodinimo kontrolėje be Nck antikūnų nei Nck, nei RasGAP nėra (takelis 1).

Gauti duomenys parodė, jog RasGAP sąveikauja su Nck1 (3.1 pav., takeliai 2-3, viršutinė juosta) ir Nck2 (3.1 pav., takeliai 4-5, viršutinė juosta) PDGF paveiktose ir nepaveiktose ląstelėse. Baltymų Nck1 (3.1 pav., takeliai 2-3, apatinė juosta) ir Nck2 (3.1 pav., takeliai 4-5, apatinė juosta) buvo vienodas kiekis, kas yra parodyta imunoblotu su antikūnu, atpažįstančiu abu Nck

baltymus. Imunonusodinimo kontrolėje be Nck antikūnų nei Nck, nei RasGAP nėra (3.1 pav., takelis 1). RasGAP su abiem Nck baltymais sąveikauja vienodu stiprumu, ir ši sąveika nepriklauso nuo trumpalaikio poveikio PDGF-BB.

Alternatyviai Nck baltymų ir RasGAP sąveika buvo patikrinta naudojant rekombinantinius su gliutatio-S-transferaze (GST) sulietus Nck1 (GST-Nck1) ir Nck2 (GST-Nck2) baltymus. Rekombinantiniai baltymai buvo imobilizuoti ant gliutatio sefrozės granulių ir inkubuoti PDGF paveiktų ar nepaveiktų H-WT ląstelių lizatuose. Lygiagrečiai buvo panaudotos HepG2 ląstelės be PDGF receptoriaus β , transfekuotos tuščiu vektoriumi (H-N ląstelės), nes PDGF receptorius potencialiai gali sudaryti kompleksą su Nck

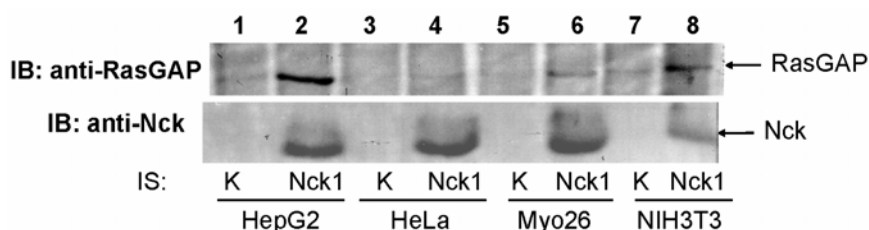


3.2 pav. **Rekombinantiniai GST-Nck1 ir GST-Nck2 sąveikauja su RasGAP.**

Transfekuotos tuščiu vektoriumi (N, takeliai 2-3 ir 6-7) arba vektoriumi su PDGFR- β genu (WT, takeliai 4-5 ir 8-9) HepG2 ląstelės buvo paveiktos arba ne PDGF-BB, lizuotos ir iš lizatų su 10 μ g GST-Nck1 (takeliai 2-5) arba GST-Nck2 (takeliai 6-9) buvo precipituotas RasGAP baltymas. RasGAP buvimas komplekse su rekombinantiniais baltymais patikrintas imunoblotu (IB) su antikūnų prieš RasGAP. Nusodinimo kontrolėje su GST RasGAP nėra (takelis 1).

baltymais bei su RasGAP ir taip veikti kaip tarpininkas. Baltymų kompleksai, analogiškai kaip ir prieš tai analizuoti imuniniai kompleksai, buvo išskirstyti SDS-PAGE ir imunoblotu patikrinta, ar juose yra RasGAP. Rezultatai rodo, jog Nck1 (3.2 pav., takeliai 2-5) ir Nck2 (3.2 pav., takeliai 6-9) sąveikauja su RasGAP nepriklausomai nuo trumpalaikio PDGF poveikio ir nuo PDGF receptoriaus ekspresijos. Grynas GST baltymas su RasGAP nesąveikauja (3.2 pav., takelis 1). Šis eksperimentas patvirtina duomenis, jog RasGAP su abiem Nck sąveikauja vienodu stiprumu, ir ši sąveika nepriklauso nuo trumpalaikio poveikio PDGF-BB.

Nustatę, jog Nck1 ir Nck2 sąveikauja su RasGAP vienodai, tolesniuose eksperimentuose mes dirbome tik su Nck1.



3.3 pav. **Adaptorinis baltymas Nck1 sąveikauja su RasGAP skirtingose ląstelių linijose.** Iš H-WT (takeliai 1-2), HeLa (takeliai 3-4), Myo26 (takeliai 5-6) arba NIH3T3 (takeliai 7-8) lizatų su specifiniais antikūnais buvo nusodintas Nck1 arba paruoštas kontrolinis mėginys su tuščia sefaroze. RasGAP buvimas imuniniuose kompleksuose patikrintas imunoblotu (IB) su antikūnu prieš RasGAP (viršutinė juostelė). Nck baltymų kiekis parodytas, naudojant antiserumą, atpažįstantį abu Nck baltymus (apatinė juostelė).

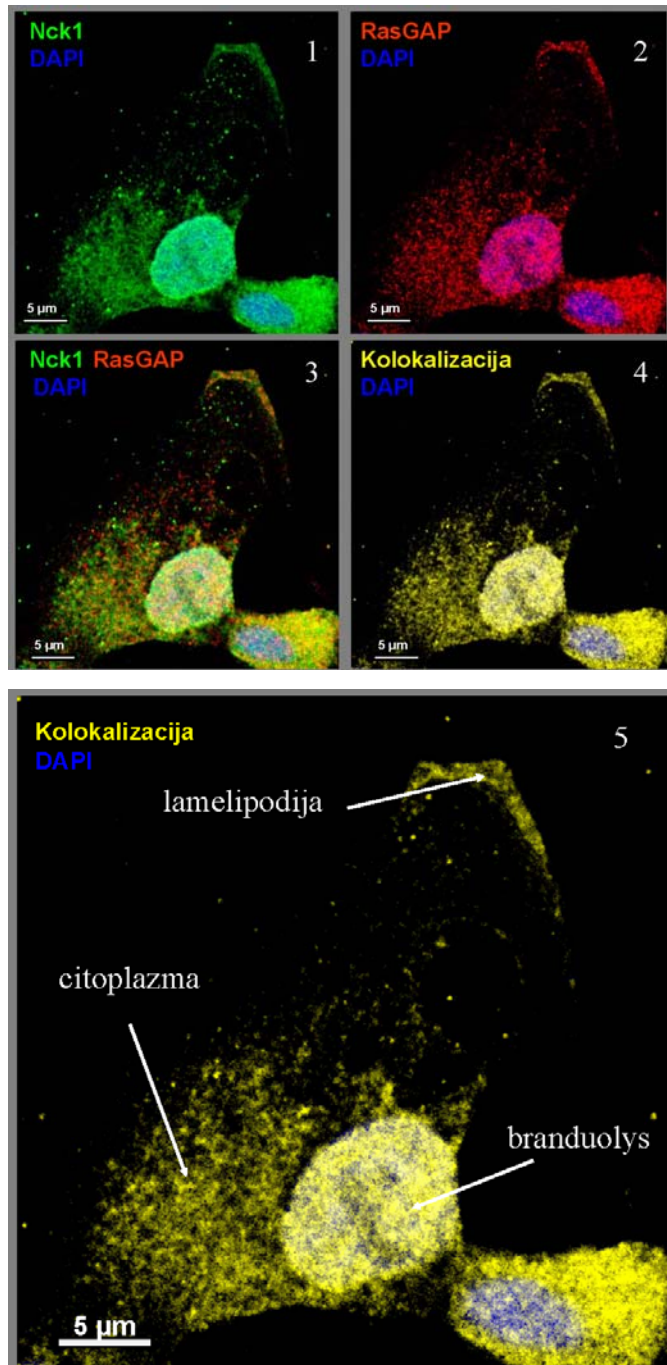
Siekiant patikrinti, ar Nck baltymų ir RasGAP sąveika yra būdinga skirtingiems ląstelių tipams, Nck1 ir RasGAP sąveika buvo patikrinta keliose ląstelių linijose. Buvo panaudotos žmogaus gimdos kaklelio vėžio karcinomos ląstelių linija HeLa, triušio mioblastų pirminė linija Myo26 ir pelės embriono ląstelių linija NIH3T3. Iš šių ląstelių lizatų su antikūnu prieš Nck1 buvo imunonusodintas Nck1. Lygiagrečiai buvo padaryta kontrolė be Nck1 antikūnų. Nusodintuose imuniniuose kompleksuose esantys baltymai buvo išskirstyti SDS-PAGE ir imunoblotu patikrinta, ar juose yra RasGAP. Visose naudotose ląstelių linijose: HeLa (3.3 pav., takeliai 3-4, viršutinė juosta), Myo26 (3.3 pav., takeliai 5-6, viršutinė juosta), NIH3T3 (3.3 pav., takeliai 7-8, viršutinė juosta) – buvo stebima specifinė Nck1 sąveika su RasGAP. Skirtingas RasGAP kiekis imuniniuose kompleksuose galimas dėl skirtingo Nck1 kiekio ląstelėse ir imuninėse kompleksuose (3.3 pav., apatinė juosta) ir skirtingo RasGAP kiekio lizatuose (duomenys nepateikti). H-WT (3.3 pav., takeliai 1-2) ląstelės buvo naudotos kaip teigiama kontrolė sąveikai stebėti. Šie duomenys rodo, jog sąveika tarp Nck1 ir RasGAP nėra reiškinys, būdingas tik vienam ląstelių tipui, ir yra vertas tolesnių tyrimų.

3.2. Nck1 ir RasGAP kolokalizacija ląstelėje

Ląstelėje du baltymai potencialiai gali sąveikauti tik tuo atveju, jeigu jie lokalizuojasi viename ląstelės kompartimente. Siekiant nustatyti, ar baltymų Nck1 ir RasGAP sąveika, aptikta biocheminiais metodais, kai ląstelės struktūros yra suardomos, gali vykti intaktinėje ląstelėje, mes patikrinome, ar Nck1 ir RasGAP kolokalizuoja ląstelėje. Tam tikslui H-WT ląstelės buvo užfiksuotos, Nck1 ir RasGAP baltymai ląstelėje buvo aptinkami aukšto specifškumo monokloniniais antikūnais. Nck1 antikūnas buvo pažymėtas Alexa 488 žaliai fluorescuojančiais dažais, o RasGAP antikūnas – Alexa 594 raudonai fluorescuojančiais dažais. Be to, ląstelių branduoliai buvo nudažyti DNR specifiniu mėlynai fluorescuojančiu dažu 4,6-diamidino-2-fenilindolu (DAPI). Šitai paruošti pavyzdžiai buvo tiriami lazeriniu skenuojančiu mikroskopu Nikon C1 bei apdorojami atitinkamos programinės įrangos pagalba.

Duomenys rodo, jog abu baltymai, Nck1 (3.4 pav., nuotrauka 1, matomas žalia spalva) ir RasGAP (3.4 pav., nuotrauka 2, matomas raudona spalva), yra pasiskirstę kaip citoplazmoje, taip ir branduolyje. Bendras Nck1 ir RasGAP vaizdas ląstelėje parodytas nuotraukoje 3. Nuotraukoje 4 yra pateiktas Nck ir RasGAP kolokalizacijos vaizdas, tai yra raštas, rodantis, kur Nck1 ir RasGAP baltymai ląstelėje yra kartu. Kolokalizacijos raštas yra sugeneruotas apdorojus vaizdą mikroskopijos vaizdų analizės programa Imaris 5.0.1.

Kaip matosi nuotraukoje 5, Nck1 ir RasGAP kolokalizuoja ląstelės branduolyje, citoplazmoje (konkrečių ląstelės struktūrų tyrimų metų nustatyti nepavyko) ir judančių ląstelių lamelipodijose.



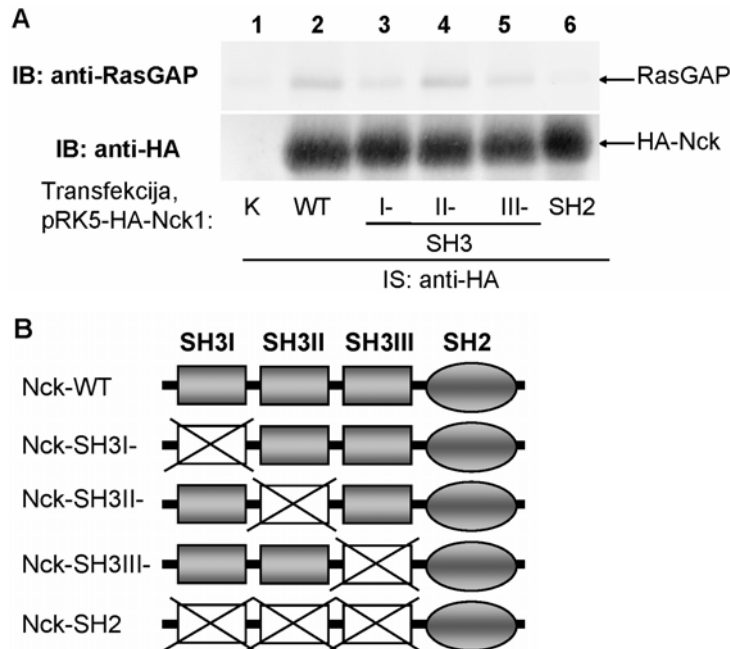
3.4 pav. **Nck1 ir RasGAP kolokalizuojasi ląstelėje.** Augančios H-WT ląstelės buvo užfiksuotos ir nudažytos specifiniais antikūnais, atpažįstančiais Nck1 (nuotrauka 1, žalia spalva) ir RasGAP (nuotrauka 2, raudona spalva) baltymus, o taip pat DNR dažų DAPI (mėlyna spalva). Pavyzdžiai buvo nuskenuoti lazeriniu konfokaliu mikroskopu Nikon C1. Nuotraukoje 3 pateiktas bendras Nck1 ir RasGAP baltymų vaizdas ląstelėje. Vaizdo analizės programos Imaris 5.0 pagalba sugeneruotas Nck1 ir RasGAP kolokalizacijos raštas parodytas nuotraukoje 4. Nck1 ir RasGAP lokalizuojasi kartu ląstelės citoplazmoje, branduolyje bei lamelipodijoje (nuotrauka 5). Pridėtos palyginamosios liniuotės dydis – 5 μm .

3.3. Nck1 ir RasGAP domenų, atsakingų už adaptorinio baltymo Nck1 kompleksu su RasGAP susidarymą, nustatymas

Nck1 asocijavimas su kitais baltymais beveik visada vyksta per vieną ar kelis Nck1 domenus, sąveikaujančius su specifinėmis sekomis (domenų ligandais) baltyme-partneryje, todėl Nck1 ir RasGAP sąveikos mechanizmo nagrinėjimą mes pradėjome nuo Nck1 domenų, atsakingų už sąveiką, nustatymo. Adaptorinis baltymas Nck1 yra sudarytas iš keturių domenų, atsakingų už tarpbaltymines sąveikas: trijų SH3 domenų ir vieno SH2 domeno. Už sąveiką su RasGAP atsakingų domenų nustatymui mes naudojome Nck1 taškinius mutantus su įvairiomis mutacijų, išaktyvinančių pavienius domenus, kombinacijomis. Laukinio tipo arba mutantiniai Nck1 genai, sulieti su hemoagliutinino (HA) epitopu (HA-Nck1) ir įstatyti į pRK5 vektorių, buvo ekspresuojami H-WT ląstelių kultūroje 48 valandas. Po to ląstelės buvo lizuojamos ir įvestas HA-Nck1 baltymas buvo imunonusodinamas su antikūnu prieš HA epitopą. Kaip ir kitų imunonusodinimo eksperimentų atveju, imunonusodintuose kompleksuose esantys baltymai buvo išskirstyti SDS-PAGE ir imunoblotu buvo patikrinta, ar juose yra RasGAP.

Iš pradžių mes naudojome pavienių Nck1 SH3 domenų mutantus (naudotų mutantinių baltymų schema –3.5B pav.). Taškiniai pavienių SH3 domenų mutantai buvo įvesti į H-WT ląsteles, ekspresuotas HA-Nck1 imunonusodintas antikūnu prieš HA epitopą ir imunoblotu parodytas RasGAP kiekis imunonusodintuose kompleksuose. Palyginimui lygiagrečiai buvo naudotas laukinio tipo HA-Nck1 ir HA-Nck1 su visais išaktyvintais SH3 domenais. HA-Nck1 su išaktyvinančia mutacija pirmajame SH3 domene (SH3I-) (3.5A pav., takelis 3, viršutinė juosta) ir HA-Nck1 su išaktyvinančia mutacija trečiajame SH3 (SH3III-)(3.5A pav., takelis 5, viršutinė juosta) domene sąveikavo su RasGAP silpniau, nei laukinio tipo HA-Nck1 (3.5A pav., takelis 2, viršutinė juosta). Išaktyvinanti mutacija antrame SH3 domene (SH3II-) (3.5A pav., takelis 4, viršutinė juosta) Nck1 sąveikos su RasGAP neįtakojo. Nck1 su visais išaktyvintais SH3 domenais su RasGAP nesąveikavo (3.5A pav., takelis 6, viršutinė juosta). Įvestų HA-Nck1 baltymų ekspresija

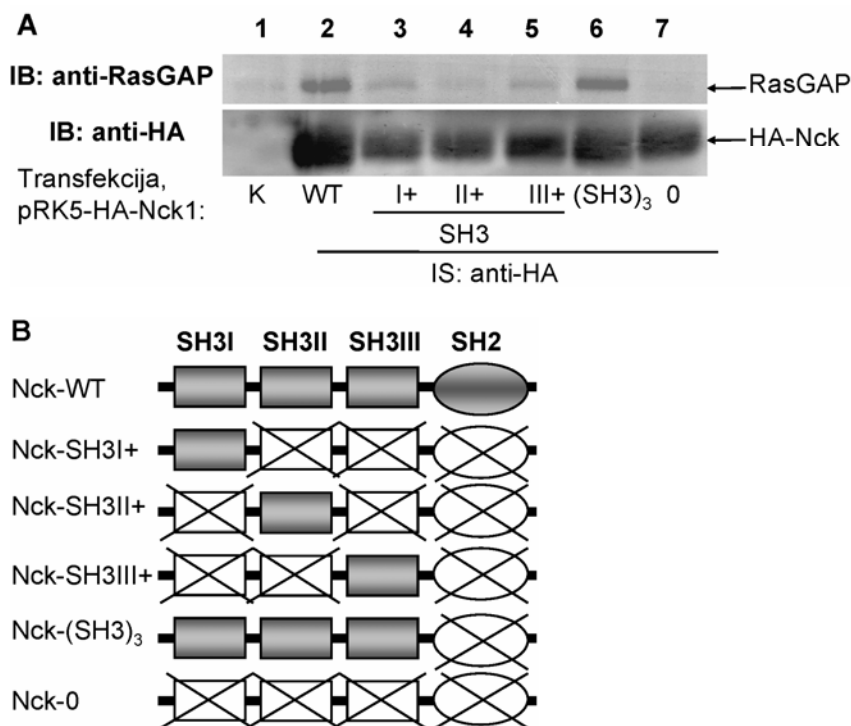
buvo daugmaž vienoda (3.5A pav., apatinė juosta). Kontrolėje be įvestos HA-Nck1 nei HA-Nck1, nei RasGAP nesimato (3.5A pav., takelis 1).



3.5 pav. **Nck1 pirmojo ir trečiojo SH3 domenu mutacijos silpnina Nck1 asocijavimą su RasGAP.** A. Su HA epitopu sulietas laukinio tipo Nck1 arba Nck1 su taškinėmis mutacijomis buvo ekspresuoti H-WT ląstelėse, iš ląstelių lizatų buvo imunonusodintas HA-Nck1, ir imunoblotu (IB) patikrintas RasGAP (viršutinė juostelė) arba HA-Nck1 (apatinė juostelė) kiekis surinktuose imuniniuose kompleksuose. Takelis 1 – imunonusodinimo kontrolė be įvestos HA-Nck1; 2 – laukinio tipo HA-Nck1; 3-5 – HA-Nck1 su taškine mutacija pirmajame (I-), antrajame (II-) arba trečiajame (III-) domenuose; 6 – HA-Nck1 su taškinėmis mutacijomis visuose trijuose SH3 domenuose. B. Eksperimente naudotų HA-Nck1 konstrukto schemos.

Taigi, šis eksperimentas rodo, jog už adaptorinio baltymo Nck1 sąveiką su RasGAP yra atsakingi Nck1 pirmasis bei trečiasis SH3 domenai.

Siekiant įvertinti pavienių baltymo Nck1 SH3 domenu vaidmenį sąveikoje su RasGAP, mes sukonstravome vektorius, ekspresuojančius HA-Nck1 su pavieniais funkcionaliais SH3 domenais ir SH2 domeno mutacija (naudotų mutantinių baltymų schema –3.6B pav.).



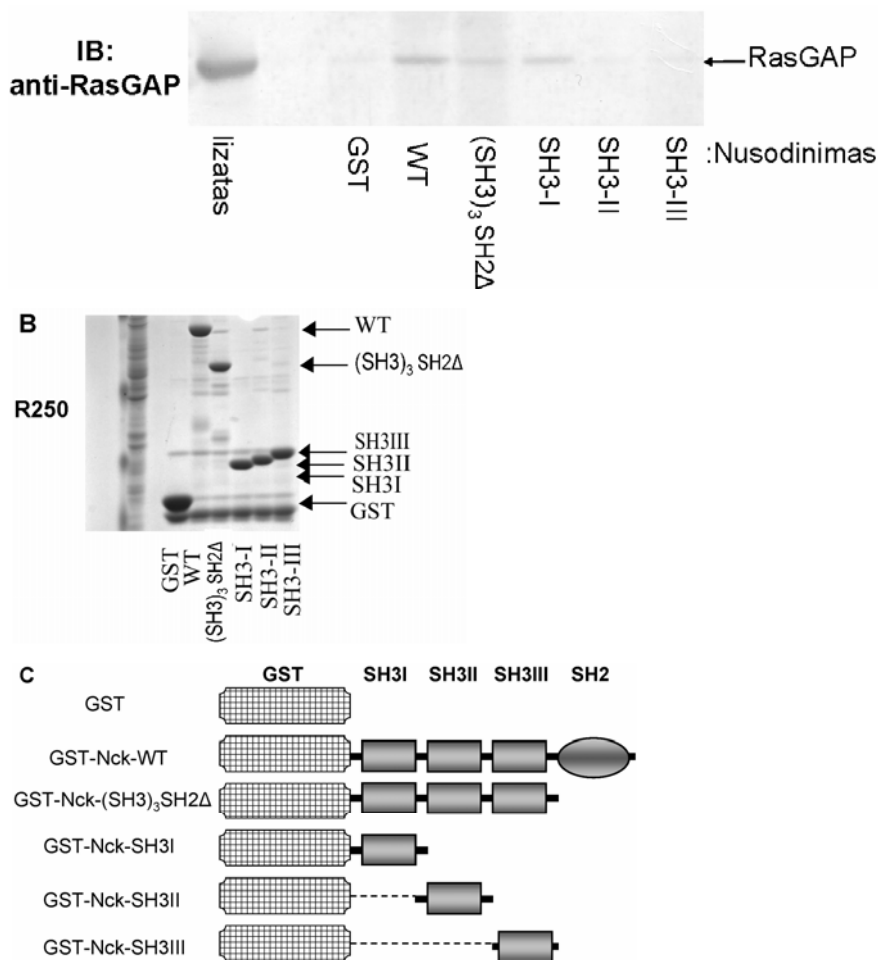
3.6 pav. **Nck1 pirmasis ir trečiasis SH3 domenai sąveikauja su RasGAP.** A. Su HA epitopų sulietas laukinio tipo Nck1 arba Nck1 su taškinėmis mutacijomis buvo ekspresuoti H-WT ląstelėse, iš ląstelių lizatų buvo imunonusodintas HA-Nck1, ir imunoblotu (IB) patikrintas RasGAP (viršutinė juostelė) arba HA-Nck1 (apatinė juostelė) kiekis surinktuose imuniniuose kompleksuose. Takelis 1 – imunonusodinimo kontrolė be įvestos HA-Nck1; 2 – laukinio tipo HA-Nck1; 3-5 – HA-Nck1 su taškinėmis mutacijomis visuose domenuose, išskyrus pirmą (I-), antrą (II-) arba trečią (III-) SH3 domeną; 6 – HA-Nck1 su išaktyvinančia taškine mutacija SH2 domene ir funkcionaliais visais SH3 domenais; 7 – HA-Nck1 su išaktyvinančiomis mutacijomis visuose SH3 ir SH2 domenuose. B. Eksperimente naudotų HA-Nck1 konstrukčių schemas.

Įvedę šiuos vektorius į H-WT ląsteles ir imunonusodinę ekspresuotus HA-Nck1 baltymus, mes parodėme, jog su RasGAP sąveikauja HA-Nck1, turintys funkcionalų pirmąjį SH3 domeną (3.6A pav., takelis 3, viršutinė juosta) arba funkcionalų trečiąjį SH3 domeną (3.6A pav., takelis 5, viršutinė juosta). Abu šie baltymai sąveikavo su RasGAP silpniau, nei HA-Nck1 su visais trimis funkcionaliais SH3 domenais (3.6A pav., takelis 6, viršutinė juosta), kurio sąveika su RasGAP buvo tokio pat stiprumo, kaip ir laukinio tipo HA-Nck1 baltymo (3.6A pav., takelis 2, viršutinė juosta). Funkcionalų antrąjį SH3 domeną turintis HA-Nck1 (3.6A pav., takelis 4, viršutinė juosta), kaip ir HA-Nck1 su visų keturių domenų mutacijomis (3.6A pav., takelis 7), su RasGAP nesąveikavo. Įvestų HA-Nck1 baltymų ekspresija buvo daugmaž vienoda

(3.6A, apatinė juosta). Kontrolėje be įvestos HA-Nck1 nei HA-Nck1, nei RasGAP nesimato (3.6A pav., takelis 1). Taigi, pirmasis bei trečiasis Nck1 domenai sąveikauja su Nck1 panašiu stiprumu, ir vieno domeno nepakanka, kad susidarytų pilnavertė sąveika, lyginant su laukinio tipo Nck1.

Norėdami alternatyviu būdu įvertinti Nck1 SH3 domenų vaidmenį komplekso tarp Nck1 ir RasGAP susidaryme, mes sukonstravome rekombinantinius su GST sulietus pavienius Nck1 SH3 domenus: pirmąjį (SH3I), antrąjį (SH3II) arba trečiąjį (SH3III), o taip pat su GST sulietą Nck1 su visais trimis SH3 domenais ir be SH2 domeno (SH3)₃SH2Δ (su GST sulietų baltymų schemos pateiktos pav. 3.7C). Šiuos rekombinantinius baltymus mes imobilizavome ant gliutaciono sefarozės ir inkubavome su H-WT ląstelių kultūrų lizatais. Sefarozė su imobilizuotais rekombinantiniais baltymais ir baltymais iš lizatų, kurie su jais asocijavę, buvo nusodinta centrifugavimu. Susidariusiuose kompleksuose esantys baltymai buvo išskirstyti SDS-PAGE, ir imunoblotu buvo patikrinta, ar juose yra RasGAP. Rezultatai parodė, jog su RasGAP sąveikavo visus tris SH3 domenus turintis GST-Nck1 (3.7A pav., takelis 4) ir pavienis pirmasis Nck1 SH3 domenas, sulietas su GST (3.7A pav., takelis 5). Abu šie konstruktai sąveikavo su RasGAP silpniau, nei laukinio tipo Nck1, sulietas su GST (WT) (3.7A pav., takelis 3). GST baltymas (3.7A pav., takelis 2), o taip pat su GST sulieti antrasis (3.7A pav., takelis 6) arba trečiasis (3.7A pav., takelis 7) Nck1 SH3 domenai su RasGAP nesąveikavo. 3.7A pav. takelyje 1 parodytas RasGAP baltymo lygis H-WT ląstelių lizate. Vienodas bandymams naudotų su GST sulietų baltymų kiekis parodytas kumasio mėlio dažais nudažytame SDS-PAGE gelyje (3.7B pav.).

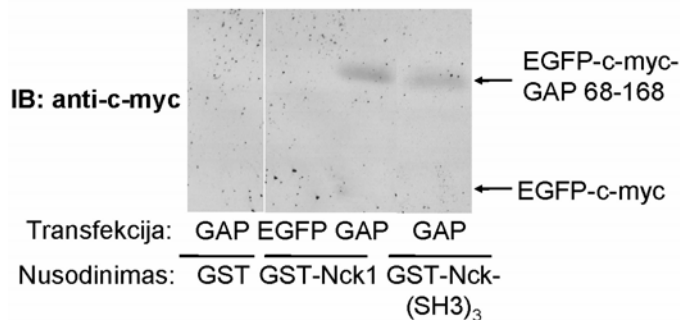
Taigi, šis eksperimentas patvirtina Nck1 pirmojo SH3 domeno svarbą sąveikos su RasGAP susidarymui. Silpnesnė visus tris Nck1 SH3 domenus turinčio konstrukto sąveika su RasGAP bei RasGAP sąveikos su pavieniu trečiuoju SH3 domenu nebuvimas gali būti aiškintini trečiojo SH3 domeno konformacijos pažeidimu po SH2 domeno delecijos.



3.7 pav. **Rekombinantinis Nck1 pirmasis SH3 domenas sąveikauja su RasGAP.** A. Su GST sulieti laukinio tipo Nck1 arba atskiri Nck1 domenai, imobilizuoti ant sefarozės, buvo inkubuoti su H-WT ląstelių lizatais. RasGAP kiekis susidariusiuose kompleksuose buvo patikrintas imunoblotu (IB) su antiserumu prieš RasGAP. Takelyje 1 parodytas RasGAP lizate, takelis 2 – nusodinimas su GST, 3 – su GST-Nck1, 4 – su GST-Nck(SH3)₃SH2Δ, 5-7 – su GST sulietais pavieniai Nck1 pirmasis (takelis 5), antrasis (takelis 6) arba trečiasis (takelis 7) domenais. B. Eksperimente naudoti baltymai, išskirstyti SDS-PAGE, nudažyti kumasio mėlio R250 dažais. C. Eksperimente naudotų GST-Nck1 konstrukto schemas.

SH3 domenai paprastai sąveikauja su specifiniais prolino turtingais motyvais. Baltymo RasGAP seka buvo išanalizuota naudojant Scansite programą (<http://scansite.mit.edu/>), kuri parodė RasGAP sekos N-gale sritį tarp aminorūgščių 135 ir 145, turinčią keletą aminorūgščių motyvų PXX/PP, kurie teoriškai gali sąveikauti su SH3 domenais. Mes klonavome RasGAP DNR sekos fragmentą, atitinkantį aminorūgštis 68-168, įstatėme šį fragmentą į pEGFP-C2 eukariotinį ekspresijos vektorių ir pridėjome c-myc epitopą, kad

galėtume registruoti baltymo ekspresiją su antikūnais prieš c-myc baltymą. Gauta plazmidė, ekspresuojanti EGFP-c-myc-RasGAP 68-168 baltymą, arba kontrolinė plazmidė, ekspresuojanti EGFP su c-myc epitopu, buvo įvestos į



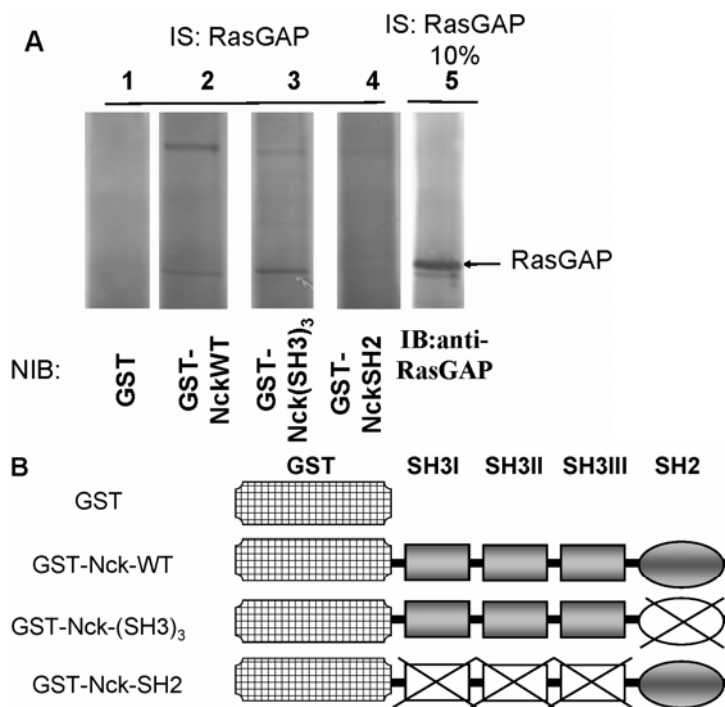
3.8 pav. RasGAP N-galinė prolino turtinga seka sąveikauja su Nck1 SH3 domenais. Su EGFP-c-myc sulieta RasGAP 68-168 seka arba vien tik EGFP-c-myc buvo ekspresuoti H-WT ląstelėse. Ląstelės buvo lizuotos ir lizatai buvo panaudoti nusodinimui su GST, laukinio GST-Nck1 arba GST-Nck-(SH3)₃ rekombinantiniais baltymais. EGFP-c-myc arba EGFP-c-myc-RasGAP 68-168 kiekis susidariusiuose kompleksuose buvo patikrintas imunoblotu (IB) su antikūnu prieš c-myc seką. Takelis 1 – nusodinimas su GST, takeliai 2-3 – nusodinimas su GST-Nck1 laukinio tipo, 4 – nusodinimas su GST-Nck-(SH3)₃. EGFP – nusodinimas iš ląstelių, ekspresuojančių EGFP-c-myc; GAP – iš ląstelių, ekspresuojančių EGFP-c-myc-RasGAP 68-168.

H-WT ląstelės. Po 48 val. nuo transfekcijos ląstelės buvo lizuotos, lizatai buvo panaudoti nusodinimui su GST, GST-Nck1 arba GST-Nck-(SH3)₃ (Nck1 su išaktyvinančia taškine mutacija SH2 domene ir funkcionaliais SH3 domenais) baltymais. C-myc epitopu pažymėti baltymai iš lizatų, asocijavę su rekombinantiniais, buvo išanalizuoti imunoblotu su antikūnais prieš c-myc seką. Abu Nck1: laukinio tipo (3.8 pav., takelis 3) ir Nck1, turintis funkcionalius tik SH3 domenais (3.8 pav., takelis 4) – sąveikavo su EGFP-c-myc-RasGAP 68-168. EGFP-c-myc baltymas su laukinio tipo Nck1 nesąveikavo (3.8 pav., takelis 2). GST rekombinantinis baltymas EGFP-c-myc-RasGAP 68-168 iš lizato netraukė (3.8 pav., takelis 1). EGFP-c-myc ir EGFP-c-myc-RasGAP 68-168 ekspresija buvo vienoda (duomenys nepateikti). Šitaip mes nustatėme, jog RasGAP N-galinė prolino turtinga sritis sąveikauja su Nck1 baltymo SH3 domenais.

Taigi, už baltymų Nck1 ir RasGAP sąveiką yra atsakingi Nck1 pirmasis bei trečiasis SH3 domenai bei RasGAP N-galinė prolino turtinga sritis.

3.4. Nck1 ir RasGAP sąveikos potencialių tarpininkų paieška

Imunonusodinimo metodas leidžia aptikti į vieną kompleksą, kuris yra atsparus ląstelių lizės sąlygoms, įeinančius baltymus, bet neįrodo, jog tiriamieji baltymai sąveikauja tiesiogiai. Iš literatūros yra žinomi baltymai, kurie sąveikauja ir su Nck1, ir su RasGAP, ir potencialiai gali veikti kaip tarpininkai sąveikoje tarp šių dviejų baltymų (Kazlauskas, Kashishian et al. 1992; Nishimura, Li et al. 1993). Tam, kad patikrintume, ar Nck1 ir RasGAP gali sąveikauti tiesiogiai ir kokie Nck1 domenai yra atsakingi už tiesioginę Nck1 ir RasGAP sąveiką, mes pasinaudojome netiesioginio imunobloto metodu.

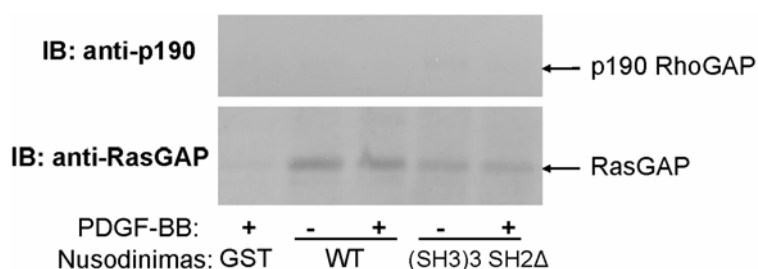


3.9 pav. **Adaptorinio baltymo Nck1 SH3 domenai gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai.** A. H-WT ląstelės, sinchronizuotos parą, buvo lizuotos, ir iš lizatų imunonusodintas (IS) su specifiniu antikūnu RasGAP baltymas. Imuniniai kompleksai buvo išskirstyti SDS-PAGE, pernešti ant PVDF membranos ir panaudoti netiesioginiam imunobloutui su rekombinantiniais GST (takelis 1), GST-Nck1 laukinio tipo (takelis 2) arba su išaktyvinančiomis taškinėmis mutacijomis SH2 (takelis 3) arba SH3 (takelis 4) domenuose. RasGAP baltymo lygis imuniniame komplekse (naudojant 10% imuninių kompleksų) buvo parodytas imunobloutu (IB) su antikūnais, atpažįstančiais RasGAP (takelis 5). B. Eksperimente naudotų GST-Nck1 konstrukčių schemas.

Iš H-WT ląstelių, sinchronizuotų parą be augimo faktorių, buvo imunonusodintas RasGAP. Imuniniai kompleksai buvo išskirstyti SDS-PAGE gelyje, pernešti ant PVDF membranos ir netiesioginio imunobloto metodu su rekombinantiniu su GST sulietu laukinio tipo Nck1 (GST-NckWT), Nck1 su funkcionaliais SH3 domenais ir išaktyvintu SH2 domenu (GST-Nck(SH3)₃) arba Nck1 su išaktyvintais SH3 domenais ir funkcionalių SH2 domenu (GST-NckSH2) buvo patikrinta, ar šie rekombinantiniai baltymai gali sąveikauti su RasGAP. Rezultatai rodo, jog GST-NckWT (3.9A pav., takelis 2) ir GST-Nck(SH3)₃ (3.9A, takelis 3 pav.) gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai, o GST-NckSH2 (3.9A pav., takelis 4) su RasGAP tiesiogiai nesąveikauja. Kontrolėje, inkubuotoje su GST, RasGAP nesimato (3.9A pav., takelis 1). Takelyje 5 imunoblote su antiserumu prieš RasGAP yra parodytas imunonusodinto RasGAP lygis, taip pat tai yra baltymo masės kontrolė, rodanti, kurios netiesioginiame imunoblote matomos juostelės pagal masę tiksliai atitinka RasGAP. Šis bandymas rodo, jog adaptorinis baltymas Nck1 gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai per savo SH3 domenus.

RasGAP imuniniame komplekse, inkubuotame su laukinio tipo Nck1 (3.9A pav., takelis 2), buvo aptiktas apie 190 kDa masės baltymas, sąveikaujantis su RasGAP ir Nck1. Buvo iškelta hipotezė, jog šis baltymas yra p190 RhoGAP, nes p190 RhoGAP sąveikauja su RasGAP (Moran, Polakis et al. 1991) ir aptiktas baltymas tiksliai atitiko p190 RhoGAP pagal masę tikrinant jo buvimą imunoblote (duomenys nepateikti). Siekiant nustatyti, ar p190RhoGAP sąveikauja su Nck1, mes ištyrėme RasGAP ir p190 RhoGAP sąveiką su rekombinantiniu GST-NckWT ir GST-Nck(SH3)₃SH2Δ (GST-Nck1 su SH2 domeno delecija) H-WT ląstelėse, parą sinchronizuotose be augimo faktorių ir paveiktose arba nepaveiktose PDGF-BB. Susidarę kompleksai buvo išanalizuoti antikūnais, atpažįstančiais p190RhoGAP-B, tačiau p190RhoGAP buvimą nustatyti nepavyko nei mėginiuose su GST-NckWT (3.10 pav., takeliai 3-4, viršutinė juosta), nei mėginiuose su GST-Nck(SH3)₃SH2Δ (3.10 pav., takeliai 5-6, viršutinė juosta). Abu

rekombinantiniai baltymai sąveikavo su RasGAP (3.10 pav., apatinė juosta). GST nesąveikavo nei su RasGAP, nei su p190RhoGAP-B (3.10 pav., takeliai 1-2). Taigi, kitais metodais, ne netiesioginiu imunoblotu, Nck1 sąveikos su p190 RhoGAP mes neaptinkame.



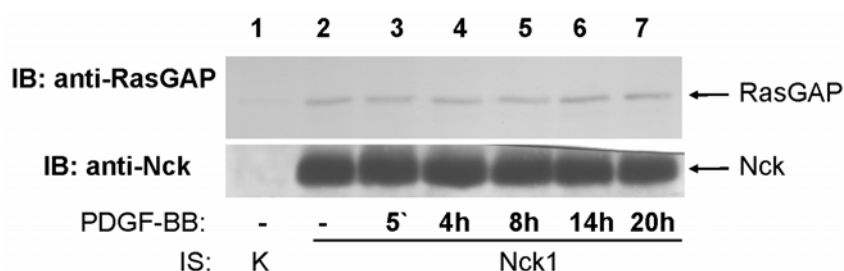
3.10 pav. **Adaptorinis baltymas Nck1 nesąveikauja su p190 RhoGAP.** H-WT ląstelės, sinchronizuotos paraž, buvo paveiktos arba nepaveiktos PDGF-BB, lizuotos, ir lizatai panaudoti nusodinimui su rekombinantiniais baltymais GST-Nck1 laukinio tipo (takeliai 3-4) arba GST-Nck1 su išaktyvinančiomis taškinėmis mutacijomis SH2 domene (takeliai 5-6) baltymais. Lygiagrečiai buvo padaryta kontrolė su GST baltymu (takeliai 1-2). p190 RhoGAP ir RasGAP baltymų lygis susidariusiuose kompleksuose vizualizuotas imunoblotu (IB) su atitinkamais antikūnais.

3.5. Baltymų Nck1 ir RasGAP sąveikos priklausomybė nuo poveikio PDGF-BB augimo faktoriumi arba ląstelės citoskeletą suardančiais slopikliais

Turimi literatūros duomenys apie Nck baltymų ir RasGAP funkcijas ląstelėje leidžia daryti prielaidą, jog šių dviejų baltymų kompleksas gali dalyvauti signalo nuo augimo faktorių receptorių perdavime arba citoskeleto persitvarkymo reguliavime (Kulkarni, Gish et al. 2000; Rivera, Briceno et al. 2004). Todėl mes patikrinome, kaip Nck1 ir RasGAP kompleksų kiekis keičiasi, veikiant ląsteles augimo faktoriumi PDGF-BB arba citoskeleto struktūrų susirinkimo slopikliais.

Tiriant PDGF-BB poveikį Nck1 ir RasGAP kompleksui, H-WT ląstelės buvo neveiktos PDGF-BB (3.11 pav., takelis 2) arba paveiktos 50 ng/ml PDGF-BB skirtingą laiko tarpą: 5 min. (3.11 pav., takelis 3), 4 val. (3.11 pav., takelis 4), 8 val. (3.11 pav., takelis 5), 14 val. (3.11 pav., takelis 6) arba 20 val. (3.11 pav., takelis 7). Nck1 baltymas buvo imunonusodintas specifiniu

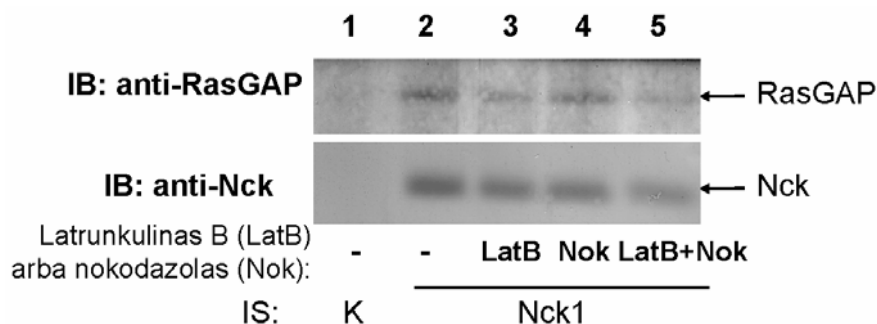
antikūnu iš nepaveiktų ir paveiktų ląstelių, imunonusodinti baltymai išskirstyti SDS-PAGE ir imunobloto metodu nustatytas RasGAP lygis imuniniuose kompleksuose. Veikiant PDGF-BB su Nck1 sąveikaujančio RasGAP kiekis laike nesikeitė (3.11 pav., viršutinė juosta). Imunonusodinto Nck1 kiekis visuose pavyzdžiuose buvo vienodas (3.11 pav., apatinė juosta). Imunonusodinimo kontrolėje be Nck1 antikūnų nei Nck1, nei RasGAP nėra (3.11 pav., takelis 1). Duomenys rodo, jog PDGF-BB augimo faktorius neįtakoja baltymų Nck1 ir RasGAP sąveikos.



3.11 pav. **Nck1 ir RasGAP kompleksų kiekis nepriklauso nuo PDGF-BB poveikio.** H-WT ląstelės buvo neveiktos (takeliai 1-2) arba veiktos PDGF-BB 5 min (takelis 3), 4 val. (takelis 4), 8 val. (takelis 5), 14 val. (takelis 6) arba 20 val. (takelis 7), lizuotos, ir iš lizatų imunonusodintas Nck1 (IS). RasGAP ir Nck1 kiekis imuniniuose kompleksuose buvo nustatytas imunoblotu (IB) su atitinkamais antikūnais. Takelyje 1 yra imunonusodinimo kontrolė be Nck1 antikūno.

Ląstelės citoskeleto pagrindą sudaro aktino citoskeletas, sudarytas iš F-aktino baltymo skaidulų, ir mikrovamzdeliai – iš baltymų α -tubulino ir β -tubulino heteromero sudarytos skaidulos. Aktino citoskeletas ir mikrovamzdeliai yra dinaminės struktūros, todėl paveikus ląsteles slopikliais, kurie blokuoja citoskeleto baltymų polimerinimąsi, citoskeletas greitai suyra. Mes paveikėme H-WT ląstelės aktino citoskeleto slopikliu latrunkulinu B (3.12 pav., takelis 3), arba mikrovamzdelių slopikliu nokodazolu (3.12 pav., takelis 4), arba abiem šiais slopikliais tuo pačiu metu (3.12 pav., takelis 5). Kontrolinės ląstelės nebuvo veiktos slopikliais (3.12 pav., takelis 2). Analogiškai, kaip ir aukščiau aprašytame bandyme, ląstelės buvo lizuotos, iš lizatų imunonusodintas Nck1 ir imunoblotu nustatytas RasGAP lygis imuninėse kompleksuose. Su Nck1 sąveikaujančio RasGAP kiekis dėl

poveikio latrunkulinu B, nokodazolu ar abiem slopikliais nesikeitė (3.12 pav., viršutinė juosta). Imunonusodinto Nck1 kiekis visuose pavyzdžiuose buvo vienodas (3.12 pav., apatinė juosta). Imunonusodinimo kontrolėje be Nck1 antikūnų nei Nck1, nei RasGAP nėra (3.12 pav., takelis 1). Taigi, citoskeleto susirinkimo slopikliai neįtakoja sąveikos tarp Nck1 ir RasGAP.

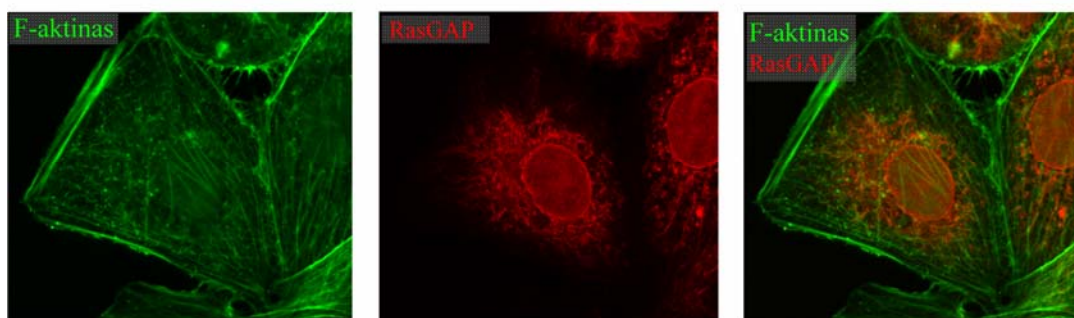


3.12 pav. **Citoskeleto susirinkimo slopikliai neįtakoja sąveikos tarp baltymų Nck1 ir RasGAP.** H-WT ląstelės buvo neveiktos (takeliai 1-2) arba paveiktos latrunkulinu B (LatB; takelis 3), nokodazolu (Nok; takelis 4) arba latrunkulinu B ir nokodazolu kartu (LatB+Nok; takelis 5), lizuotos, ir iš lizatų imunonusodintas Nck1 (IS). RasGAP ir Nck1 kiekis imuniniuose kompleksuose buvo nustatytas imunoblotu (IB) su atitinkamais antikūnais. Takelyje 1 yra imunonusodinimo kontrolė be Nck1 antikūno.

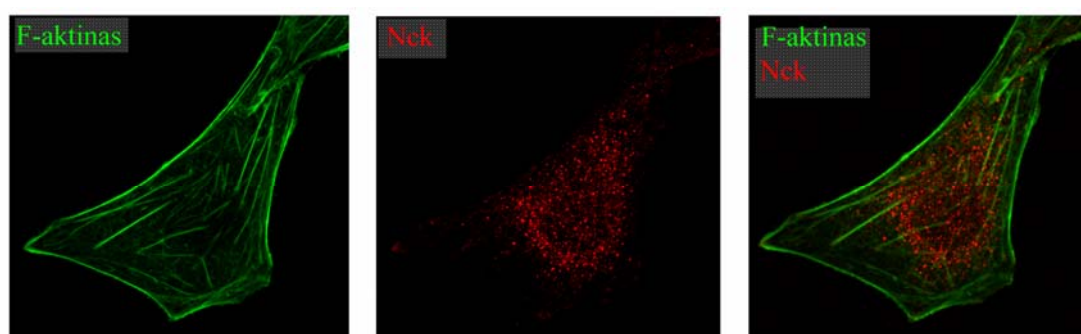
3.6. Nck1 ir RasGAP kolokalizacijos su aktino citoskeletu tyrimas.

Nck1 ir RasGAP baltymus tyrusių autorių duomenys leidžia daryti prielaidą, jog Nck1 (Buday, Wunderlich et al. 2002) ir RasGAP (Kulkarni, Gish et al. 2000) yra susiję su aktino citoskeleto persitvarkymo reguliavimu, todėl mes patikrinome Nck1 ir RasGAP baltymų kolokalizaciją su F-aktinu augančiose H-WT ląstelėse. Ląstelės buvo užfiksuotos paraformaldehidu, ir jose buvo nudažytas RasGAP arba Nck1 kartu su F-aktinu. Aktino skaidulos buvo nudažytos FITC žymėtu faloidinu. RasGAP buvo nudažytas specifiniu antikūnu, konjuguotu su *Alexa Fluor 594* fluorochromu, o Nck1 buvo nudažytas specifiniu antikūnu ir antriniu antikūnu, konjuguotu su *Alexa Fluor 594* fluorochromu. Ląstelių pavyzdžiai buvo skenuojami lazeriniu skenuojančiu mikroskopu Nikon C1 bei apdorojami atitinkamos programinės įrangos pagalba. Kaip parodyta 3.13 pav., F-aktino dažymosi raštas (3.13 pav.,

nuotrauka 1) skiriasi nuo RasGAP (3.13A pav., nuotrauka 2) ir neaptikta jų kolokalizacijos (3.13 pav., nuotrauka 3), ką patvirtina ir skaitmeninė vaizdo analizė. Nck1 dažymosi raštas (3.14 pav., nuotrauka 2) irgi beveik nesutampa su F-aktinu (3.14 pav., nuotrauka 1) ir patikimos kolokalizacijos su vaizdų analizės programa Imaris 5.0.1 tarp F-aktino ir Nck1 neaptikta (3.14 pav., nuotrauka 3). Rezultatai rodo, jog RasGAP ir Nck1 neišsidėsto ant F-aktino skaidulų.



3.13 pav. **RasGAP nesikolocalizuoja su aktino citoskeletu.** Augančios H-WT ląstelės buvo užfiksuotos ir nudažytos su FITC konjuguotu faloidinu, sąveikaujančiu su F-aktinu (nuotrauka 1, žalia spalva) ir specifiniu antikūnu, atpažįstančiu RasGAP (nuotrauka 2, raudona spalva). Nuotraukoje 3 yra parodytas bendras F-aktino ir RasGAP dažymo raštas ląstelėje.

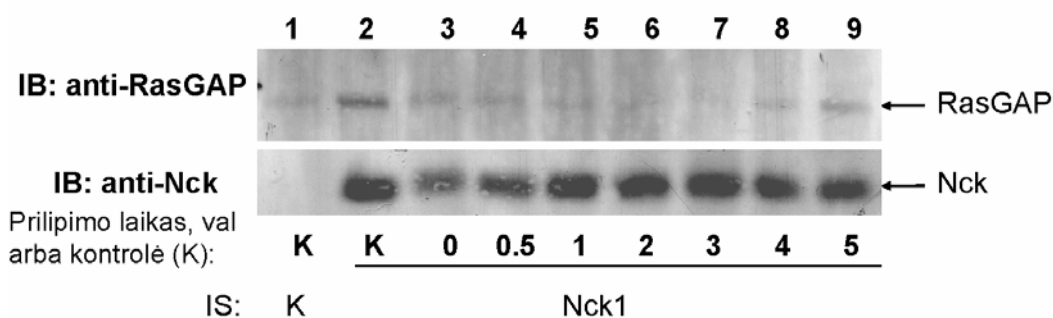


3.14 pav. **Nck1 nesikolocalizuoja su aktino citoskeletu.** Augančios H-WT ląstelės buvo užfiksuotos ir nudažytos su FITC konjuguotu faloidinu, sąveikaujančiu su F-aktinu (nuotrauka 1, žalia spalva) ir specifiniu antikūnu, atpažįstančiu Nck1 baltymą (nuotrauka 2, raudona spalva). Nuotraukoje 3 yra parodytas bendras F-aktino ir Nck1 dažymo raštas ląstelėje.

3.7. Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja po adhezinių ląstelių sąveikos su substratu suardymo

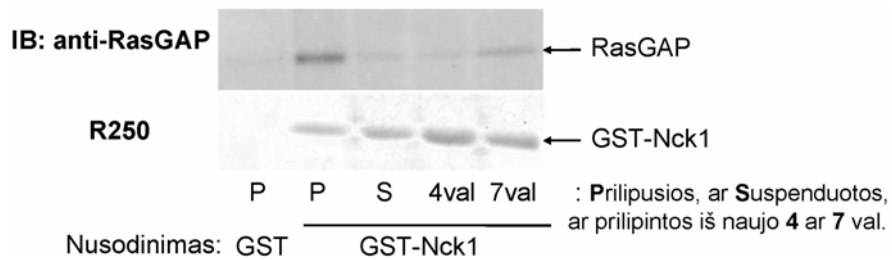
Siekiant nustatyti biologinį procesą, su kuriuo yra susijęs Nck1 ir RasGAP kompleksas ląstelėje, mes patikrinome, kaip Nck1 ir RasGAP kompleksų kiekis keičiasi, suardžius prilipusių (adhezinių) ląstelių sąveiką su substratu ir leidus joms prilipti iš naujo. Tuo tikslu H-WT ląstelės, sinchronizuotos parą be augimo faktorių, buvo suspenduotos proteazę tripsinu, užsėtos ant fibronektinu padengto paviršiaus ir po suspendavimo augintos iki 5 val. Ląstelės buvo lizuotos, iš lizatų imunonusodintas Nck1 ir imunoblotu su antikūnais prieš RasGAP parodytas RasGAP kiekis imuninėse kompleksuose su Nck1. Pasirodė, jog iškart po suspendavimo su Nck1 sąveikaujančio RasGAP kiekis, lyginant su nesuspenduotomis prilipusiomis ląstelėmis (3.15 pav., takelis 2, viršutinė juosta), stipriai sumažėja (3.15 pav., takelis 3, viršutinė juosta). Po ląstelių užsėjimo ant substrato RasGAP ir Nck1 kompleksų kiekis neatsistato po 0,5 val. (3.15 pav., takelis 4, viršutinė juosta), 1 val. (3.15A pav., takelis 5, viršutinė juosta), 2 val. (3.15 pav., takelis 6, viršutinė juosta), 3 val. (3.15 pav., takelis 7, viršutinė juosta), 4 val. (3.15 pav., takelis 8, viršutinė juosta). Nck1 ir RasGAP sąveika atsistato tik iš dalies praėjus 5 val. (3.15 pav., takelis 9, viršutinė juosta) po ląstelių užsėjimo ant substrato. Imunonusodinto Nck1 kiekis visuose pavyzdžiuose buvo vienodas (3.15 pav., apatinė juosta). Imunonusodinimo kontrolėje be Nck1 antikūnų nei Nck1, nei RasGAP nėra (3.15 pav., takelis 1). Taigi, baltymų Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja po ląstelių suspendavimo ir pradeda atsistatyti tik praėjus penkioms valandoms po prilipimo atstatymo.

Nck1 ir RasGAP kompleksas gali būti suardomas dėl vieno iš šių baltymų kokios nors modifikacijos arba sąveikos su konkuruojančiu baltymu, todėl kitas uždavinys buvo nustatyti, kuris iš šių baltymų – Nck1 arba RasGAP yra atsakingas už Nck1 ir RasGAP komplekso disociavimą. Tam tikslui buvo patikrintas Nck1 arba RasGAP iš suspenduotų ląstelių sugebėjimas sąveikauti su nemodifikuotu RasGAP arba Nck1 atitinkamai.



3.15 pav. **Adaptorinio baltymo Nck1 sąveikos su RasGAP priklausomybė nuo ląstelių prilipimo.** H-WT ląstelės, sinchronizuotos paraž, buvo suspenduotos naudojant tripsino proteazę ir lizuotos (takelis 3) arba užsėtos ant fibronektino ir kultivuotos nuo 0,5 iki 5 (takeliai 4-9) valandų, paskui lizuotos. Iš lizatų buvo imunonusodintas (IS) su specifiniu antikūnu Nck1 baltymas. Lygiagrečiai padaryta imunonusodinimo kontrolė be antikūnų (takelis 1) arba imunonusodinimas iš normalių nesuspenduotų H-WT ląstelių lizatų (takelis 2). Nck ir RasGAP baltymų lygis imunininėse kompleksuose vizualizuotas imunoblotu (IB) su atitinkamais antikūnais.

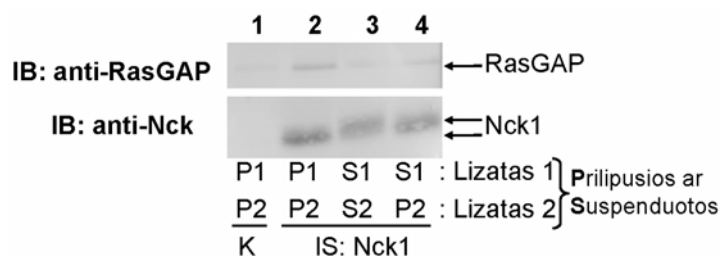
RasGAP iš suspenduotų ląstelių galimai sąveikai su Nck1 patikrinti mes nusodinome RasGAP su rekombinantiniu GST-Nck1 baltymu iš prilipusių arba suspenduotų H-WT ląstelių lizatų. RasGAP lygis susidariusiuose kompleksuose buvo patikrintas imunoblotu su antiserumu prieš RasGAP. Suspenduotose ląstelėse RasGAP su rekombinantiniu GST-Nck1 baltymu sąveikavo žymiai silpniau (3.16 pav., takelis 3, viršutinė juosta), nei RasGAP iš prilipusių ląstelių (3.16 pav., takelis 2, viršutinė juosta). Analogiškai imunonusodinimo eksperimentams, RasGAP beveik nesąveikavo su Nck1 po 4 val (3.16 pav., takelis 4, viršutinė juosta) po ląstelių užsėjimo ant fibronektino, bet sąveika iš dalies atsistatė po 7 val. (3.16 pav., takelis 5, viršutinė juosta). Grynas GST baltymas su RasGAP nesąveikauja (3.16 pav., takelis 1, viršutinė juosta). Eksperimentams buvo naudojamas vienodas GST-Nck1 kiekis (3.16 pav., apatinė juosta). Šie duomenys rodo, jog būtent RasGAP baltymas po ląstelių suspendavimo netenka galimybės sąveikauti su Nck1.



3.16 pav. **RasGAP po ląstelių suspendavimo nebesąveikauja su Nck1.** H-WT ląstelės buvo paliktos prilipusios (takeliai 1-2), arba suspenduotos (takelis 3), arba suspenduotos ir užšėtos ant fibronektino iš naujo 4 (takelis 4) arba 7 (takelis 5) valandoms ir lizuotos. Iš lizatų buvo nusodinti baltymai, sąveikaujantys su GST (takelis 1) arba GST-Nck1 (takeliai 2-5) ir imunoblotu (IB) patikrintas RasGAP kiekis susidarusiuose kompleksuose. Nusodinimui naudotas GST1-Nck1 nudažytas kumasio mėlio R250 dažais.

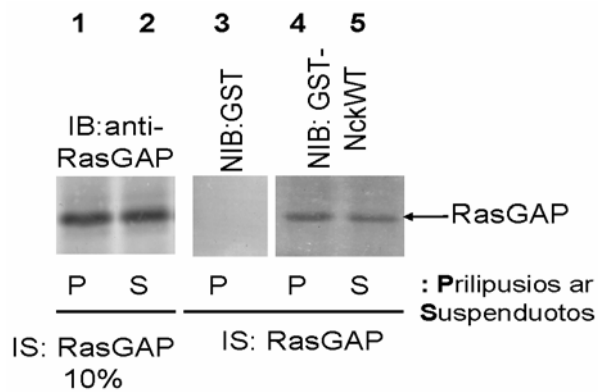
Nck1 baltymo gebėjimui sąveikauti su RasGAP nustatyti mes patikrinome, ar Nck1 iš suspenduotų ląstelių gali sąveikauti su RasGAP iš prilipusių ląstelių. H-WT ląstelės, sinchronizuotos parą, buvo suspenduotos, ir iš jų buvo imunonusodintas Nck1. Nck1 iš suspenduotų ląstelių buvo inkubuotas su sinchronizuotų nesususpenduotų H-WT ląstelių lizatu. Su Nck1 sąveikaujančio RasGAP lygis imuniniuose kompleksuose buvo patikrintas imunoblotu su RasGAP atpažįstančiais antikūnais. Duomenys rodo, jog iš suspenduotų ląstelių imunonusodintas Nck1 (3.17 pav., takelis 4, viršutinė juosta) gali sąveikauti su RasGAP. Suspenduotose ląstelėse Nck1 baltymo masė padidėja, greičiausiai dėl fosforilavimo, ir imunoblote matosi, jog Nck1 masė pasunkėja. Pagal masės poslinkį mes sprendžiame, jog imuniniuose kompleksuose yra Nck1 būtent iš suspenduotų ląstelių, ir RasGAP į kompleksą ateina būtent dėl to, jog Nck1 iš suspenduotų ląstelių sąveikauja su RasGAP, o ne dėl to, jog Nck1 antikūnas papildomai prisijungia Nck1 iš prilipusių ląstelių lizato. Lygiagrečiai paruoštas Nck1 iš kontrolinių prilipusių ląstelių (3.17 pav., takelis 2, viršutinė juosta) sąveikauja su RasGAP stipriau, tačiau sąveikos sustiprėjimas gali būti paaiškintas tuo, jog iš prilipusių ląstelių mes ištraukiame Nck1, kuri jau yra komplekse su RasGAP, ir inkubuojame ją pakartotinai su lizatu, kur šitas Nck1 baltymas sąveikauja su RasGAP papildomai. Suspenduotų ląstelių lizate Nck1 sąveikauja su RasGAP žymiai silpniau (3.17 pav., takelis 3, viršutinė juosta). Imunonusodinto Nck1 kiekis visuose

pavyzdžiuose buvo vienodas (3.17 pav., apatinė juosta). Imunonusodinimo kontrolėje be Nck1 antikūnų nei Nck1, nei RasGAP nėra (3.17 pav., takelis 1). Nck1 suspenduotose ląstelėse potencialiai gali sąveikauti su RasGAP.



3.17 pav. **Nck1 po ląstelių suspendavimo gali sąveikauti su RasGAP.** H-WT ląstelės buvo paliktos prilipusios (P1; takeliai 1-2) arba suspenduotos (S1; takeliai 3-4), lizuotos, ir iš lizatų imunonusodintas (IS) Nck1 baltymas. Nck1 baltymas iš prilipusių ląstelių buvo pakartotinai inkubuotas su prilipusių ląstelių lizatu (P2; takelis 2), o Nck1 baltymas iš suspenduotų ląstelių – su suspenduotų (S2; takelis 3) arba prilipusių (P2; takelis 4) ląstelių lizatais. Imunonusodinimo kontrolė (tuščia sefarozė) abu kartus buvo inkubuota su prilipusių ląstelių lizatais (takelis 1). RasGAP ir Nck1 kiekis imuniniuose kompleksuose buvo parodytas imunoblotu (IB) su atitinkamais antikūnais.

Nck1 ir RasGAP komplekso disociavimo priežastis gali būti RasGAP baltymo modifikacija arba nežinomas baltymas, kuris pradeda sąveikauti su RasGAP po ląstelių suspendavimo. Tai gali būti potransliacinė RasGAP sąveikos su Nck1 vietos modifikacija, alosterinė potransliacinė modifikacija, dėl kurios įvyksta RasGAP baltymo konformacijos pokytis ir Nck1 nebegali sąveikauti su RasGAP; arba kažkoks baltymas, kuris po suspendavimo pradeda sąveikauti su RasGAP ir konkuruoja su Nck1. Kad nustatytume, ar tai yra kovalentinė sąveikos su Nck1 motyvu RasGAP baltyme modifikacija, mes patikrinome RasGAP baltymo sugebėjimą sąveikauti su Nck1 netiesioginiu imunoblotu. Iš prilipusių arba suspenduotų H-WT ląstelių buvo imunonusodintas RasGAP, imuniniai kompleksai išskirstyti SDS-PAGE ir analizuoti netiesioginiu imunoblotu su GST-Nck1 baltymu.



3.18 pav. **RasGAP iš suspenduotų ląstelių gali sąveikauti su Nck1 po denatūravimo.** Sinchronizuotos parą H-WT ląstelės buvo paliktos prilipusios arba suspenduotos ir lizuotos, iš lizatų imunonusodintas (IS) su specifiniu antikūnu RasGAP baltymas. Imuniniai kompleksai buvo išskirstyti SDS-PAGE, pernešti ant PVDF membranos ir panaudoti netiesioginiam imunoblotui su rekombinantiniais GST (takelis 3) arba GST-Nck1WT (takelis 4 – RasGAP iš prilipusių ląstelių, takelis 5 – RasGAP iš suspenduotų) baltymais. RasGAP baltymo lygis imuniniame komplekse buvo patikrintas, paleidus 10% imuninių kompleksu tame pačiame gelyje ir dažant imunoblotu (IB) su antikūnais, atpažįstančiais RasGAP (takelis 1 – RasGAP iš prilipusių ląstelių, takelis 2 – RasGAP iš suspenduotų).

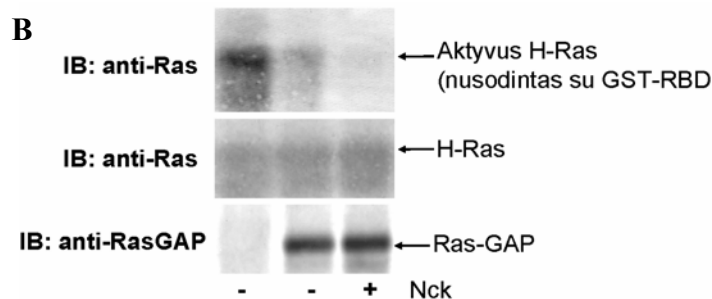
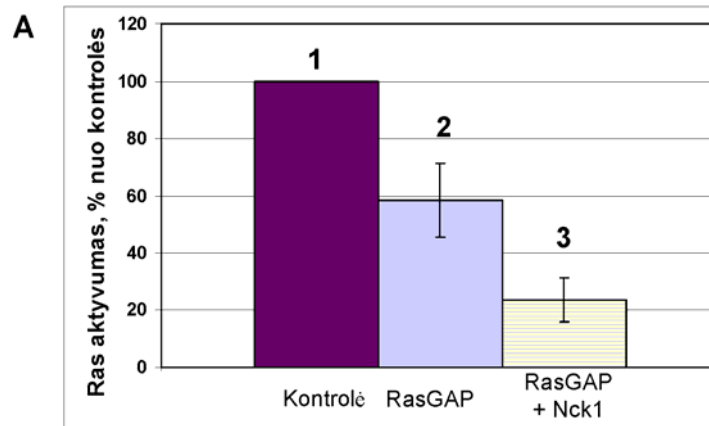
Analizė parodė, jog RasGAP iš suspenduotų ląstelių (3.18 pav., takelis 5) netiesioginiame imunoblote gali sąveikauti su Nck1 tokiu pat stiprumu, kaip ir RasGAP iš nesuspenduotų adhezinių ląstelių (3.18 pav., takelis 4). GST baltymas su RasGAP nesąveikauja (3.18 pav., takelis 3). RasGAP lygis imuninėse kompleksuose iš prilipusių (3.18 pav., takelis 1) ir suspenduotų (3.18 pav., takelis 2) ląstelių buvo vienodas.

Ruošiant mėginius SDS-PAG elektroforezei, baltymai yra denatūruojami. Jeigu RasGAP nesugebėjimo sąveikauti su Nck1 priežastis būtų kovalentinė N-galinės prolino turtingos srities modifikacija, ši modifikacija išliktų ir Nck1 negalėtų sąveikauti su RasGAP netiesioginiame imunoblote. Tačiau Nck1 gali sąveikauti su denatūruotu RasGAP iš suspenduotų ląstelių, reiškia, sąveikos disociavimo priežastis yra RasGAP konformacijos pokytis (kuris išnyksta, denatūravus baltymą) arba su Nck1 konkuruojantis baltymas (kompleksas su kuriuo yra išardomas, paruošiant mėginius SDS-PAG elektroforezei).

3.8. Nck1 sąveikos su RasGAP įtaka GTPazės Ras aktyvumui

GTPazė Ras egzistuoja ląstelėje dvejose formose: aktyvioje su GTP sujungtoje ir neaktyvioje su GDP sujungtoje. Pagrindinė RasGAP baltymo funkcija ląstelėje yra GTPazės Ras GTPazinio aktyvumo padidinimas ir šitaip Ras perėjimo į neaktyvią su GDP sujungtą būseną katalizavimas. Todėl mes patikrinome, kaip sąveika su Nck1 įtakoja RasGAP katalizinį aktyvumą *in vitro* ir ląstelėje.

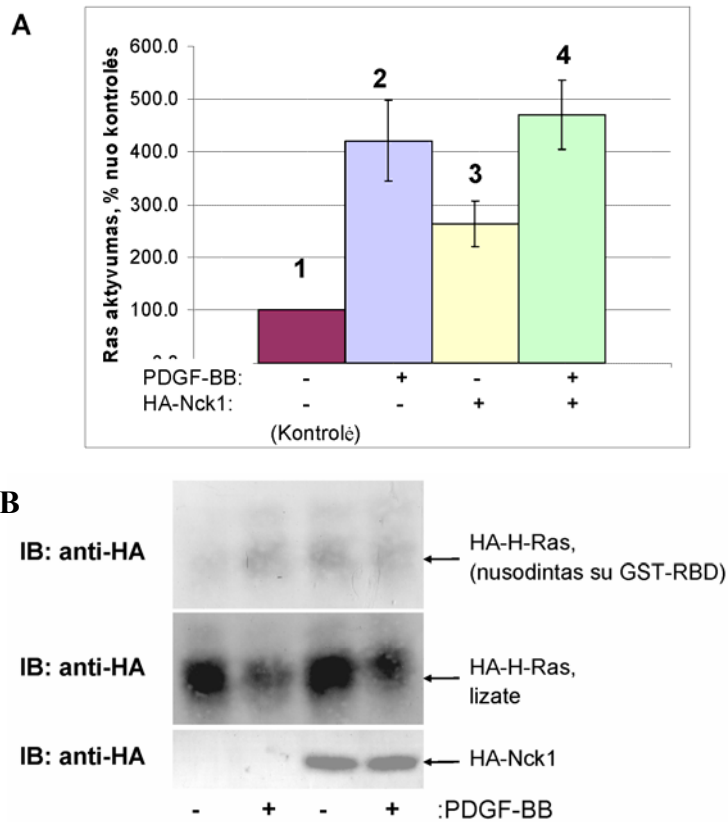
Eksperimentuose *in vitro* buvo tikrinamas imunonusodinto RasGAP sugebėjimas sumažinti aktyvaus rekombinantinio Ras kiekį. Tuo tikslu iš H-WT ląstelių, sinchronizuotų parą be augimo faktorių, buvo imunonusodinamas RasGAP, imuniniai kompleksai inkubuojami su rekombinantiniu Nck1 arba be Nck1. Šitaip RasGAP, komplekse su Nck1 baltymu arba tuščias, buvo inkubuotas su rekombinantiniu H-Ras baltymu, pakrautu GTP. Aktyvus, tai yra komplekse su GTP esantis, H-Ras po inkubavimo su RasGAP buvo nusodinamas su rekombinantiniu Raf baltymo Ras prijungiančiu domenu sulietu su GST (GST-RBD), kuris specifiškai atpažįsta tik aktyvų Ras. Nusodinto aktyvaus H-Ras lygis buvo ryškinamas imunoblotu su antikūnais prieš H-Ras ir matuojamas Image J vaizdų analizės programa (3.19A pav.). Rezultatai parodė, jog komplekse su Nck1 baltymu esantis RasGAP išaktyvindavo H-Ras efektyviau (3.19B pav., takelis 3, viršutinė juosta) už RasGAP, neinkubuotą su Nck1 (3.19B pav., takelis 2, viršutinė juosta). H-Ras išaktyvinimas buvo nustatytas, lyginant su pavyzdžiu, inkubuotu be RasGAP (3.19B pav., takelis 1, viršutinė juosta). Bendras H-Ras lygis visuose pavyzdžiuose buvo vienodas (3.19B pav., vidurinė juosta). Imunonusodinto RasGAP lygis mėginiuose be ir su Nck1 buvo vienodas (3.19B pav., takeliai 2-3, apatinė juosta). *In vitro* eksperimentai leidžia daryti prielaidą, jog sąveika su Nck1 padidina RasGAP katalizinį aktyvumą.



3.19 pav. **Sąveika su Nck1 padidina RasGAP katalizinį aktyvumą.** RasGAP buvo imunonusodintas iš H-WT ląstelių lizato, užkrautas arba ne Nck1 ir inkubuotas su H-Ras-GTP. Po inkubavimo be RasGAP (1), arba vien su RasGAP (2), arba su RasGAP užkrautu Nck1 (3) likęs aktyvus Ras buvo nusodintas su GST-RBD ir išanalizuotas imunoblotu. A. Aktyvaus H-Ras baltymo kiekis mėginiuose, pamatuotas su Image J programa, išreikštas procentais nuo aktyvaus H-Ras, likusio po inkubavimo be RasGAP. B. Viršutinė juostelė – aktyvus Ras kiekis, vidurinė juostelė – bendras Ras kiekis prieš inkubavimą, apatinė juostelė – RasGAP kiekis imuniniuose kompleksuose, nudažyti imunoblotu (IB) su antikūnais, atpažįstančias Ras arba RasGAP.

Eksperimentų su rekombinantiniais baltymais duomenų patvirtinimui, Nck1 įtaka RasGAP aktyvumui buvo įvertinama ląstelėje, transfekuojuojant į H-WT ląsteles pRK5 vektorių, ekspresuojantį laukinio tipo HA-Nck1, ir pCDNA3 vektorių, ekspresuojantį laukinio tipo HA-H-Ras (endogeninio Ras aktyvumo mums pamatuoti nepavyko dėl žemo Ras ekspresijos lygio). Sinchronizuotos parą be augimo faktorių ląstelės buvo nepaveiktos arba paveiktos 2 min. 50 ng/ml PDGF-BB, lizuotos, ir iš lizatų su GST-RBD nusodintas aktyvus HA-H-Ras. HA-H-Ras lygis komplekse su GST-RBD buvo

nustatytas imunoblotu su antikūnais prieš HA epitopą Ras ir matuojamas Image J vaizdų analizės programa (3.20A pav.).

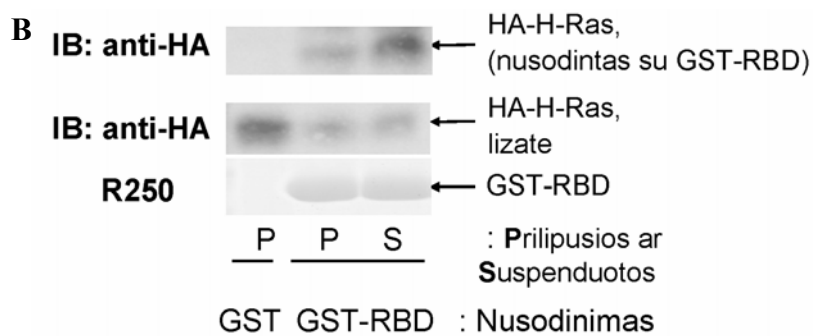
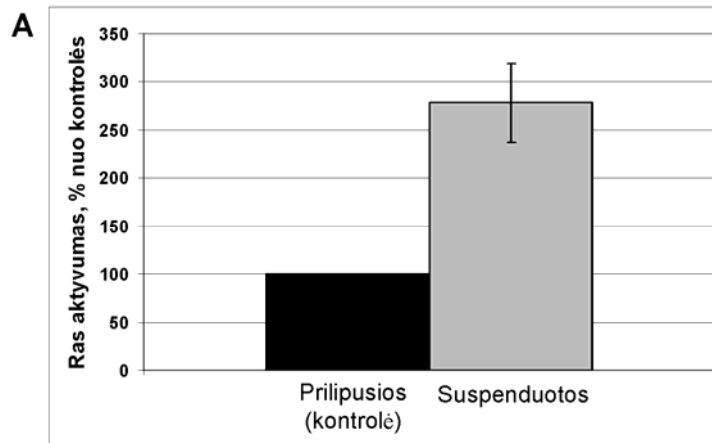


3.20 pav. **Nck1 padidinta ekspresija įtakoja Ras aktyvumą ląstelėje.** H-WT ląstelės buvo transfekuotos pcDNA3-HA-H-Ras vektoriumi ir papildomai transfekuotos (takeliai 3-4) arba ne (takeliai 1-2) pRK5-HA-Nck1 plazmide. 48 val. po transfekcijos sinchronizuotos ląstelės buvo paveiktos (takeliai 2, 4) arba ne (takeliai 1, 3) PDGF-BB ir lizuotos. Aktyvus HA-H-Ras iš lizatų buvo nusodintas su GST-RBD baltymu ir detektuotas imunoblotu (IB) su antikūnu, atpažįstančiu HA epitopą. A. Aktyvaus HA-H-Ras baltymo kiekis mėginiuose, pamatuotas Image J programa, išreikštas procentais nuo aktyvaus HA-H-Ras kiekio PDGF-BB nepaveiktose HA-Nck1 neekspresuojančiose ląstelėse. B. Viršutinė juostelė – aktyvaus HA-H-Ras kiekis, vidurinė juostelė – bendras HA-H-Ras lygis lizatuose, apatinė juostelė – HA-Nck1 ekspresijos lygis; nustatyta imunoblotu su antikūnu, atpažįstančiu HA epitopą.

Duomenys rodo, jog PDGF-BB paveiktuose pavyzdžiuose be transfekuoto HA-Nck1 (3.20B pav., takelis 2, viršutinė juosta) arba su HA-Nck1 (3.20B pav., takelis 4, viršutinė juosta) HA-Ras lygis yra beveik vienodas ir didesnis, nei atitinkamuose PDGF-BB nepaveiktuose

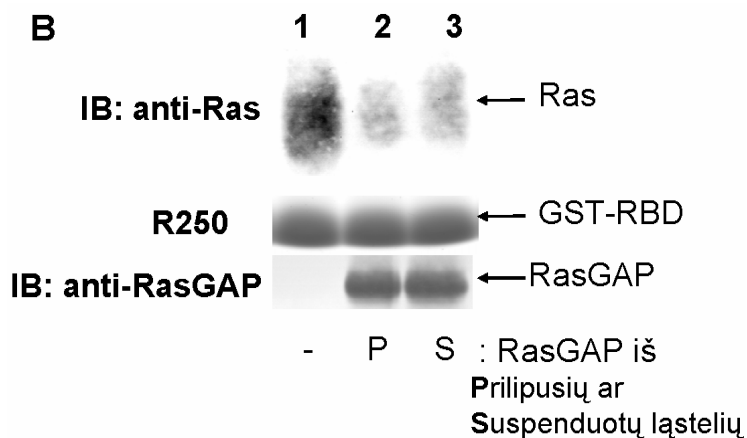
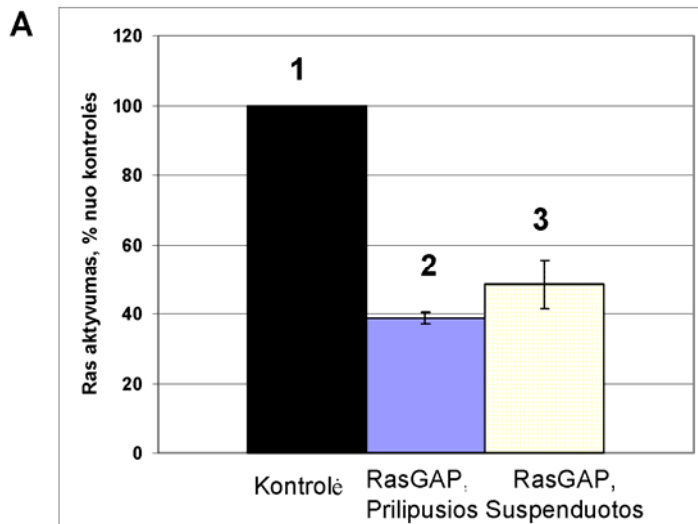
pavyzdžiuose, kas atitinka literatūros duomenis, jog PDGF-BB padidina H-Ras aktyvumą ląstelėje. PDGF-BB nepaveiktuose pavyzdžiuose ląstelėse su transfekuotų HA-Nck1 (3.20B pav., takelis 3, viršutinė juosta) H-Ras lygis yra aukštesnis, nei ląstelėse be transfekuotos HA-Nck1 (3.20B pav., takelis 1, viršutinė juosta). HA-H-Ras lygis, bendrai paėmus, nėra vienodas, tačiau yra vienodas, lyginant tarpusavy tik PDGF-BB paveiktus arba tik nepaveiktus pavyzdžius (3.20B pav., vidurinė juosta). HA-Nck lygis pavyzdžiuose, transfekuotuose su pRK5-Nck1, yra vienodas (3.20B pav., apatinė juosta). Duomenys rodo, jog Nck1 padidinta ekspresija ląstelėje padidina bazinį aktyvaus Ras lygį, o paveikus PDGF-BB aktyvaus Ras lygis ląstelėje susilygina. Tas rodo, jog Nck1 ekspresija mažina PDGF-BB indukuoto aktyvaus Ras lygį, tai yra, skirtumą tarp bazinio Ras lygio be poveikio PDGF-BB ir bendro Ras lygio po poveikio PDGF-BB. Augimo faktoriumi indukuoto Ras lygio sumažėjimas koreliuoja su *in vitro* parodytu RasGAP aktyvumo padidėjimu.

Kaip mes buvome nustatę, ląstelėms praradus sąveiką su substratu baltymų Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja. Mes patikrinome kaip tokioje sistemoje, kur išyra tiriamasis kompleksas, kinta Ras aktyvumas. H-WT ląstelės buvo transfekuotos pcDNA3 vektoriumi, ekspresuojančiu HA-H-Ras 48 val., sinchronizuotos per naktį, paliktos prilipusios arba suspenduotos ir lizuotos. Iš lizatų su imobilizuotu GST-RBD arba GST baltymu, kaip kontrole (3.21B pav., takelis 1), buvo nusodintas aktyvus HA-H-Ras, jo kiekis parodytas imunoblotu su antikūnais prieš HA epitopą (3.21B pav., viršutinė juosta) ir pamatuotas Image J vaizdų analizės programa (3.21A pav.). HA-H-Ras ekspresija visose mėginiuose buvo beveik vienoda (3.21B pav., vidurinė juosta). Nusodinimui naudotas GST-RBD kiekis buvo parodytas, nudažius gelį kumasio mėlio dažais (3.21B pav., apatinė juosta). Duomenys rodo, jog po ląstelių suspendavimo (3.21B pav., takelis 3) Ras aktyvumas ląstelėje, lyginant su prilipusiomis ląstelėmis (3.21B pav., takelis 2) padidėja, kas koreliuoja su Nck1 ir RasGAP kompleksų disociavimu. GST baltymas su Ras nesąveikauja (3.21B pav., takelis 1).



3.21 pav. **Ras aktyvumo priklausomybė nuo ląstelių suspendavimo.** H-WT ląstelės buvo transfekuotos su pcDNA3-HA-H-Ras vektoriumi. 48 val. po transfekcijos ląstelės buvo paliktos prilipusios arba suspenduotos ir lizuotos. Aktyvus HA-H-Ras iš lizatų buvo nusodintas su GST-RBD baltymu ir detektuotas imunoblotu (IB) su antikūnu, atpažįstančiu HA epitopą. A. Aktyvaus HA-H-Ras baltymo kiekis mėginiuose, pamatuotas su Image J programa, išreikštas procentais nuo aktyvaus HA-H-Ras kiekio prilipusiose ląstelėse. B. Takelis 1 – nusodinimas su GST-baltymu, takelis 2 – Ras aktyvumo matavimas prilipusiose ląstelėse, takelis 3 – Ras aktyvumo matavimas suspenduotose ląstelėse. Viršutinė juostelė – aktyvaus HA-H-Ras kiekis, vidurinė juostelė – bendras HA-H-Ras lygis lizatuose; nustatyta imunoblotu su antikūnu, atpažįstančiu HA epitopą. Apatinė juostelė – GST-RBD kiekis mėginiuose, nudažytas kumasio mėlio R250 dažais.

Nustatę, jog suspenduotose ląstelėse H-Ras aktyvumas padidėja, mes patikrinome, kaip jose kinta RasGAP aktyvumas. Iš prilipusių arba suspenduotų H-WT ląstelių buvo imunonusodintas RasGAP baltymas ir inkubuotas su rekombinantiniu GTP pakrautu H-Ras baltymu. Aktyvus H-Ras, likęs po inkubavimo su arba be RasGAP, buvo nusodintas su GST-RBD ir parodytas imunoblotu su antikūnais prieš Ras (3.22B pav., viršutinė juosta). Aktyvaus Ras kiekis imunoblote buvo pamatuotas Image J vaizdų analizės



3.22 pav. **RasGAP aktyvumo priklausomybė nuo suspendavimo.** RasGAP buvo imunonusodintas iš prilipusių arba suspenduotų H-WT ląstelių lizato ir inkubuotas su H-Ras-GTP. Po inkubavimo be RasGAP (1), arba su RasGAP iš prilipusių ląstelių (2), arba su RasGAP iš suspenduotų (3) likęs aktyvus Ras buvo nusodintas su GST-RBD ir išanalizuotas imunoblotu (IB) su antikūnais prieš Ras. A. Aktyvaus H-Ras baltymo kiekis mėginiuose, pamatuotas su Image J programa, išreikštas procentais nuo aktyvaus H-Ras, likusio po inkubavimo be RasGAP. B. Viršutinė juostelė – aktyvaus Ras kiekis. Vidurinė juostelė – GST-RBD kiekis mėginiuose, nudažytas su kumasio mėlio R250 dažais. Apatinė juostelė – RasGAP kiekis imuniniuose kompleksuose, nudažytas imunoblotu su antikūnais, atpažįstančias RasGAP.

programa (3.22A pav.). Nusodinimui naudotas GST-RBD gelyje buvo nudažytas kumasio mėlio R250 dažais Ras (3.22B pav., vidurinė juosta). Imunonusodinto RasGAP kiekis nudažytas imunoblotu su antiserumu prieš RasGAP Ras (3.22B pav., apatinė juosta). Lyginant su H-Ras, inkubuotu be RasGAP (3.22B pav., takelis 1), inkubavimas su RasGAP kaip iš prilipusių

(3.22B pav., takelis 2), taip ir iš suspenduotų ląstelių (3.22B pav., takelis 3) mažina aktyvaus H-Ras kiekį mėginiuose. RasGAP iš suspenduotų ląstelių pasižymi žemesniu kataliziniu aktyvumu, nei RasGAP iš prilipusių ląstelių, kas koreliuoja su Nck1 ir RasGAP sąveikos suardymu po ląstelių suspendavimo.

Taigi, Nck1 sąveika su RasGAP padidina RasGAP katalizinį aktyvumą ir mažina aktyvaus Ras kiekį ląstelėje. Nck1 ir RasGAP sąveikos disociavimas po ląstelių suspendavimo veikia priešingai: RasGAP katalizinis aktyvumas po suspendavimo sumažėja, o aktyvaus Ras kiekis ląstelėje padidėja.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Ras šeimos GTPazės yra labai svarbūs ląstelėje vykstančių procesų, tokių kaip dalijimasis, diferenciacija, apoptozė, egzocitozės ir endocitozės ciklai, citoskeleto persitvarkymas reguliatoriai (Ehrhardt, Ehrhardt et al. 2002). Su Ras baltymų aktyvumo anomalijomis, kurių priežastimi gali būtų pačių Ras arba Ras reguliuojančių baltymų mutacijos, yra susijusi eilė ląstelės bei organizmo veiklos sutrikimų, todėl yra būtina gerai suprasti Ras reguliavimo mechanizmus. Pagrindinis Ras baltymų neigiamas reguliatorius ląstelėje yra p120 Ras GTPazę aktyvinantis baltymas (RasGAP). Šiame darbe buvo nagrinėjama RasGAP sąveika su adaptoriniu baltymu Nck1. Buvo išsamiai ištirtas RasGAP ir Nck1 sąveikos mechanizmas, nustatyta, jog RasGAP ir Nck1 komplekso stabilumas priklauso nuo ląstelės sąveikos su substratu bei parodyta Nck1 asocijavimo su RasGAP įtaka H-Ras baltymo aktyvumui.

Adaptorinių baltymų Nck šeimą sudaro du baltymai: Nck1 ir Nck2. Nors šie du baltymai pasižymi gana aukšta homologija, jų funkcijos ląstelėje gali skirtis (Chen, She et al. 2000; Guan, Chen et al. 2007). Nck baltymai dalyvauja citoskeleto persitvarkymo, ląstelės ciklo, baltymų transliacijos reguliavime (Cardin, Latreille et al. 2007; Lettau, Pieper et al. 2009).

Tirdami Nck šeimos baltymų vaidmenį PDGF- β receptoriaus signalo perdavime, mes aptikome, jog Nck1 (Ger, Tunaitis et al. 2003) ir Nck2 baltymai sąveikauja su RasGAP. Kiti Nck ir RasGAP tyrė autoriai duomenų apie tokią sąveiką nebuvo paskelbę, tai yra naujai atrastas reiškinys. Teoriškai yra baltymų, kurie sąveikauja kaip su Nck baltymais, taip ir su RasGAP ir galėtų būti tarpininkais komplekso tarp šių baltymų susidaryme, pavyzdžiui, PDGFR- β sąveikauja ir su Nck (Nishimura, Li et al. 1993), ir su RasGAP (Kazlauskas, Kashishian et al. 1992). Yra parodyta, jog Nck1 gali sąveikauti su RasGAP NG108 ląstelėse (neuroblastomos ir gliomos ląstelių hibridas) (Holland, Gale et al. 1997), bet pastarajame darbe teigiama, jog (1) šis kompleksas susiformuoja tik paveikus ląsteles efrinu-B1, (2) už komplekso susiformavimą yra atsakingi Nck1 ir RasGAP SH2 domenai, (3) Nck1 ir

RasGAP kompleksas susidaro per tarpininką – adaptorinį baltymą p62DOK1. Mūsų atveju, Nck baltymų ir RasGAP kompleksas ląstelėje egzistavo nepriklausomai nuo trumpalaikio poveikio PDGF-BB, kas buvo parodyta dviem nepriklausomais imunonusodinimo su specifiniais antikūnais ir nusodinimo su rekombinantiniais su GST sulietais baltymais metodais. Šie eksperimentai paneigia prielaidą, jog kompleksas yra indukuojamas augimo faktoriumi. Nck1 ir RasGAP kompleksas buvo aptiktas keliose skirtingų tipų ir biologinių rūšių ląstelėse. Mes netikrinome Holland S. su bendraautoriais (1997) darbe naudotų NG108 ląstelių, bet gali būti, jog šiose ląstelėse Nck1 ir RasGAP kompleksas nesusidaro arba jo yra labai mažai, todėl jis neaptinkamas.

Abu Nck1 šeimos baltymai sąveikavo su RasGAP vienodu stiprumu, todėl mes nenagrinėjome potencialių skirtumų tarp Nck baltymų ir tolesniuose tyrimuose naudojome vien Nck1.

Pagrindiniai biologiniai procesai, su kuriais yra susiję abu tiriamieji baltymai: Nck1 ir RasGAP – yra signalo nuo augimo faktoriumi aktyvinto receptoriaus perdavimas bei citoskeleto persitvarkymo reguliavimas. Todėl mes patikrinome, kaip Nck1 ir RasGAP sąveika priklauso nuo poveikio augimo faktoriumi (PDGF) bei ląstelės citoskeletą suardančių slopiklių: latrunkulino B (blokuoja susidarymą ir šitaip suardo aktino citoskeletą) bei nokodazolo (suardo tubulino mikrovamzdelius). Nei poveikis PDGF iki 20 valandų, nei poveikiai citoskeletą suardančiais slopikliais (pavieniais ir abiem kartu) nedarė įtakos Nck1 bei RasGAP kompleksų kiekiui ląstelėje. Vienintelis kompleksą įtakojantis veiksnys buvo žemiau aprašytas ląstelių sąveikos su substratu suardymas.

Ląstelėje Nck1 ir RasGAP potencialiai gali sąveikauti tik tuo atveju, jeigu jiems yra būdingas buvimas tuose pačiuose ląstelės kompartmentuose, tai yra, jeigu jie *kolokalizuoja*si. Fiksuotuose ląstelių kultūrų preparatuose Nck1 ir RasGAP baltymai buvo pažymėti specifiniais antikūnais, preparatai buvo skenuoti lazeriniu skenuojančiu konfokaliniu mikroskopu, gauti vaizdai buvo apdoroti mikroskopijos vaizdų analizės programa Imaris 5.0.1. Mes parodėme,

jog Nck1 ir RasGAP lokalizuojasi kartu tose pačiose ląstelės struktūrose: ląstelės branduolyje, lamelipodijose ir neidentifikuotose citoplazmos struktūrose. Tai yra svarus argumentas, jog imunonusodinimo ir nusodinimo su rekombinantiniais baltymais metodais parodyta sąveika vyksta ląstelėje.

Kadangi kolokalizacija su tam tikromis ląstelės struktūromis gali padėti atskleisti baltymo komplekso biologinį vaidmenį, buvo patikrinta Nck1 ir RasGAP kolokalizacija su įvairiomis ląstelės struktūromis: aktino citoskeletu, Goldžio aparatu (duomenis nepateikti), mitochondrijomis (duomenis nepateikti), endocitotinėmis pūslelėmis (duomenis nepateikti), branduoliu. Nck1 ir RasGAP kartu yra aptikti judančių ląstelių lamelipodijose, kas atitinka literatūros duomenis: Nck (Buday, Wunderlich et al. 2002) ir RasGAP (Ligeti, Dagher et al. 2004; Shang, Moon et al. 2007) yra susiję su mažųjų Rac GTPazių, atsakingų už lamelipodijų susidarymą, reguliavimu. Taip pat Nck1 ir RasGAP yra aptinkami kartu citoplazmoje (srityse, nesutampančiose nei su viena analizuotų viduląstelinių struktūrų) bei branduolyje. Nck1 buvimas branduolyje yra žinomas faktas (Kremer, Adang et al. 2007), o RasGAP visada buvo laikomas specifiniu citoplazmos markeriu (Zhang, Zhang et al. 1993), tačiau mes aptinkame RasGAP branduolyje, naudojant skirtingus RasGAP specifinius antikūnus bet dažymo technikas. Mes kol kas negalime vienareikšmiškai teigti, ar RasGAP buvimas branduolyje yra mikroskopijos artefaktas, ar RasGAP yra ekstrahuojamas iš branduolio nustatant baltymo lokalizaciją biocheminiais metodais.

Patvirtinus baltymų Nck1 ir RasGAP sąveiką įvairiais metodais, toliau siekėme nustatyti už sąveikos susidarymą atsakingus domenus. Adaptorinis baltymas Nck1 turi keturis žinomus funkcinis domenus: tris SH3 domenus, kurie yra numeruojami nuo N-galo: pirmasis, antrasis, trečiasis, ir vieną SH2 domeną (Lehmann, Riethmuller et al. 1990). SH2 domenai užtikrina baltymo sąveiką su specifiniais motyvais turinčiais fosforilintą tiroziną, ir tokią sąveiką paprastai indukuoja augimo faktoriai ar kiti veiksniai, kai yra aktyvinamos tirozino kinazės. SH3 domenai sąveikauja su prolino turtingais specifiniais motyvais, sąveika per SH3 domeną paprastai būna pastovi, neindukuojama.

Minėtame Holland S. ir bendraautorių (1997) darbe yra tvirtinama, jog už komplekso tarp Nck1 ir RasGAP susidarymą yra atsakingi abiejų baltymų SH2 domenai, kas atitinka stebimą indukuojamą Nck1 ir RasGAP sąveikos prigimtį. Tačiau mūsų duomenys rodo, jog Nck1 ir RasGAP sąveika nėra indukuojama. Imunonusodinimo su taškiniais Nck1 domenų mutantais eksperimentuose mes parodėme, jog komplekso susidarymui reikalingi Nck1 SH3 domenai, konkrečiai – pirmasis ir trečiasis Nck1 SH3 domenai. Nck1 konstruktai su mutuotais pirmuoju ar trečiuoju SH3 domenais sąveikauja su RasGAP silpniau, nei laukinio tipo Nck1. Antrojo SH3 domeno ar SH2 domeno mutacijos sąveikos stiprumui neturi įtakos. Taškinių mutacijų pagalba „išjungus“ visus, apart pavienių, SH3 domenus su RasGAP sąveikauja pirmąjį ar trečiąjį, bet ne antrąjį SH3 domeną turintys baltymai. Pavieniai SH3 domenai sąveikauja su RasGAP silpniau, nei visus tris SH3 domenus turintis baltymas. Kitu, nusodinimo su rekombinantiniais su GST sulietais baltymais, metodu mes parodėme, jog su RasGAP sąveikauja pirmasis, bet ne trečiasis SH3 domenas, tačiau RasGAP sąveikos su trečiuoju Nck1 SH3 domenu nebuvimas gali būti paaiškintas šio domeno konformacijos pažeidimu, kai pavienis domenas buvo ekspresuotas kaip atskiras baltymas.

SH3 domenų ligandai yra specifinės prolino turtingos sekos. RasGAP baltymo seka buvo išanalizuota Scansite programa (<http://scansite.mit.edu/>). RasGAP N-galinėje dalyje buvo identifikuota sritis (aminorūgštys 135-145), turinti daug potencialiai su SH3 domenais sąveikaujančių prolinų. Ši seka su aplinkinėmis amino rūgštimis (nuo 68 iki 168) buvo klonuota PGR metodu ir ekspresuota su EGFP sulieto baltymo pavidalu. Nusodinimo su laukinio tipo GST-Nck1 arba su GST-Nck1 su mutuotu SH2 domenu būdu buvo parodyta, jog ši seka gali sąveikauti su Nck1 SH3 domenais.

Taigi, mes nustatėme, jog RasGAP ir Nck1 baltymų sąveiką sąlygoja du Nck1 SH3 domenai, kurie sąveikauja su RasGAP N-galine prolino turtinga sritimi. Siekiant nustatyti, ar ši sąveika gali vykti tiesiogiai, ar jai reikia tarpininko, mes pasinaudojome netiesioginio imunobloto metodu, kurio esmė yra tokia: vienas tiriamųjų baltymų (mūsų atveju – RasGAP), sukoncentruotas

imunonusodinimo pagalba, yra denatūruojamas, atskiriamas nuo kitų su juo sąveikaujančių baltymų SDS-PAG elektroforeze ir pernešamas ant membranos. Kitas tiriamasis baltymas yra susintetinamas bakterijose kaip su GST sulietas rekombinantinis baltymas (mūsų atveju – Nck1), ir membrana su pirmu baltymu yra inkubuojama rekombinantinio antro baltymo tirpale. Sąveika, jeigu tokia yra, parodoma antikūnais prieš antrą baltymą. Žinoma, jog SH2 ir SH3 domenai, išskyrus retus atvejus, sugeba atpažinti denatūruotas sąveikos determinantes, nes SH2 ir SH3 domenu sąveiką su determinantėmis nulemia pirminė determinančių struktūra (Pawson 1995). Lygiagrečiai su laukinio tipo rekombinantiniu Nck1 mes naudojome su GST sulietą Nck1 su funkcionaliais SH3 domenais ir mutuotu SH2 domenu (GST-Nck(SH3)₃) arba Nck1 su mutuotais SH3 domenais ir funkcionalių SH2 domenu (GST-NckSH2). Duomenys rodo, jog laukinio tipo GST-Nck1 arba GST-Nck(SH3)₃ gali sąveikauti su RasGAP tiesiogiai, tačiau GST-NckSH2 su RasGAP tiesiogiai nesąveikauja. Šitie duomenys galėtų paaiškinti mūsų prieštaravimus su Holland S. ir bendradarbių (1997) darbu, kuriame yra teigiama, jog Nck1 ir RasGAP sąveikai reikia p62DOK1 baltymo, nes minėti autoriai registravo tik nuo Nck1 SH2 domeno priklausomą Nck1 ir RasGAP sąveiką.

Tiriant netiesioginio imunobloto metodu Nck1 sąveiką su RasGAP, tarp baltymų, imunonusodintų su RasGAP, mes aptikome apie 190 kDa masės baltymą, kuris sąveikavo tik su laukinio tipo GST-Nck1. Buvo iškelta hipotezė, jog tai galėtų būti p190 RhoGAP baltymas, nes jis (1) stipriai sąveikauja su RasGAP (Ellis, Moran et al. 1990) ir (2) tiksliai atitinka aptiktą baltymą pagal masę. Nck1 sąveika su p190 buvo patikrinta nusodinimo su rekombinantiniais GST-Nck1 ir GST-Nck(SH3)₃ būdu, tačiau šiuo metodu sąveikos su p190 nustatyti nepavyko. Todėl, jeigu šis potencialiai su Nck1 sąveikaujantis baltymas iš tikrųjų yra p190RhoGAP, Nck1 ir p190RhoGAP sąveika yra labai silpna, arba netiesioginiu imunoblotu užregistruota sąveika yra tiesiog šio metodo artefaktas.

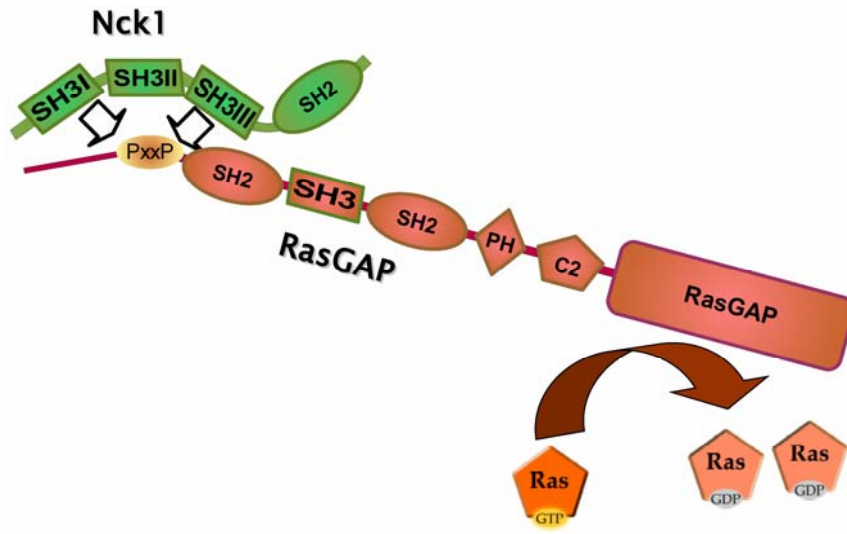
Mes patikrinome, kaip sąveika tarp baltymų Nck1 ir RasGAP priklauso nuo ląstelių prilipimo ir nustatėme, jog suardžius ląstelių baltymines jungtis su

substratu tripsino proteaze ir taip suspendavus prilipusias ląsteles, Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja. Sąveika pradeda atsistatyti tik praėjus penkioms valandoms po ląstelių užsėjimo ant fibronektino. Toliau mes patikrinome, kuris iš šių dviejų baltymų praranda sugebėjimą sąveikauti su kitu. Nck1 iš suspenduotų ląstelių galėjo sąveikauti su RasGAP iš adhezinių ląstelių, tačiau RasGAP suspenduotose arba augintose tik keturias valandas ant substrato ląstelėse nesąveikavo su rekombinantine Nck1, skirtingai nei RasGAP iš adhezinių ląstelių ar ląstelių, augintų ant substrato septynias valandas. Reiškia, būtent RasGAP baltymas praranda sugebėjimą sąveikauti su Nck1 ląstelių suspendavimo metu. To priežastimi gali būti (1) potransliacinė sąveikos su Nck1 vietos modifikacija, (2) potransliacinė modifikacija, keičianti RasGAP baltymo konformaciją, dėl kurios Nck1 nebegali sąveikauti su RasGAP, arba (3) kažkoks baltymas, kuris po suspendavimo pradeda sąveikauti su RasGAP ir konkuruoja su Nck1. Sąveikos tarp RasGAP ir Nck1 analizė netiesioginiu imunoblotu parodė, jog denatūruotas RasGAP iš suspenduotų ląstelių gali sąveikauti su Nck1 lygiai taip pat efektyviai, kaip ir RasGAP iš prilipusių ląstelių. Šis eksperimentas leido mums atmesti hipotezę, jog kompleksas suyra dėl tiesioginės sąveikos vietos su Nck1 modifikacijos. Tolesni tyrimai bus nukreipti į alosteriškai veikiančios modifikacijos arba po suspendavimo su RasGAP sąveikaujančio baltymo paiešką.

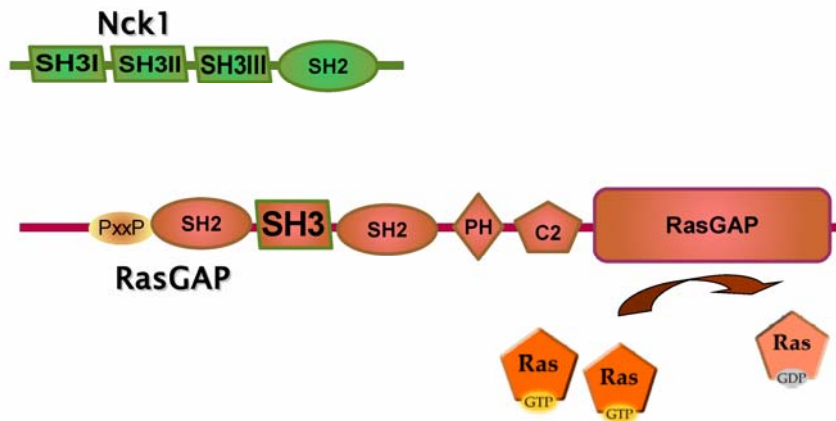
Sąveikos tarp baltymų priklausomybė nuo prilipimo prie substrato yra žinomas reiškinys. RasGAP sąveikauja su baltymų kinaze FAK tik suspenduotoje, bet ne prilipusioje vėžinių astrocitomos ląstelių U-251MG kultūroje, tačiau šiuo atveju komplekso susidarymo priežastimi negalima įvardinti tik suspendavimą, nes šių ląstelių suspendavimas modeliuoja migravimą ir invaziją (Hecker, Ding et al. 2004). Adaptorinis baltymas Nck1 suspendavimo metu disocijuoja nuo baltymų kinazės Pak (Howe 2001), tačiau Nck1 ir Pak kompleksas atsistato iškart po ląstelių gražinimo ant substrato, o mūsų tiriamasis Nck1 ir RasGAP kompleksas pradeda atsistatyti praėjus tik penkioms valandoms. Reiškia, Nck1 ir RasGAP sąveika yra reguliuojama ne

šiaip kontaktu su substratu, o dar ir po prilipimo vykstančiais procesais, kurių nustatymas būtų viena iš tolesnių darbo užduočių.

RasGAP baltymų aktyvumas gali būti reguliuojamas baltymo translokacija, antriniais signalo pernešėjais, potransliacinėmis modifikacijomis arba sąveika su reguliuojančiais baltymais (Bos, Rehmann et al. 2007). Apie mūsų nagrinėjamo RasGAP, p120 RasGAP, baltymo reguliaciją nėra daug žinoma. Jis turi domenus, kurie paprastai yra atsakingi už sąveiką su antriniais pernešėjais: PH domeno viena iš funkcijų yra specifinė sąveika su fosfatidilinozitoliniais lipidais (Ferguson, Lemmon et al. 1995), o C2 domenu su kalcio jonais (Sutton and Sprang 1998). PH domenas gali sąveikauti su RasGAP kataliziniu domenu ir jį slopinti. Inozitolio trifosfatas ir inozitolio-4,5-bifosfatas gali sąveikauti su PH domenu, mažindami jo gebą sąveikauti su kataliziniu domenu (Drugan, Rogers-Graham et al. 2000). Parodyta, jog RasGAP fosforilimas Src kinaze (fosforilina daugiausia Y460) slopina RasGAP katalizinį aktyvumą (Giglione, Gonfloni et al. 2001). Ir vis dėlto dominuojanti RasGAP aktyvumo reguliavimo teorija yra translokacijos į membraną, kurioje yra Ras, teorija. Toks Ras aktyvumo reguliavimo modelis yra įrodytas sistemoje, kur RasGAP yra translokuojamas į membraną per kompleksą su aneksinu VI (Grewal, Evans et al. 2005). Taip pat yra žinomi atvejai, kai RasGAP slopina sąveika su kitais baltymais, p190 RhoGAP (Moran, Polakis et al. 1991) arba p62 DOK (Kashige, Carpino et al. 2000). Niekas iki šiol nebuvo pademonstravęs RasGAP katalizinį aktyvumą didinančios sąveikos. Mes konstatavome, jog užkrovus imunonusodintą RasGAP Nck1 baltymu RasGAP katalizinis aktyvumas Ras atžvilgiu padidėja, ir aktyvaus Ras kiekis sistemoje, atitinkamai, sumažėja. Ekspresavus ląstelėje Nck1 perteklių ir HA epitopu pažymėtą H-ras (HA-H-Ras), mes registravome bazinio HA-H-Ras aktyvumo lygio padidėjimą ir PDGF indukuoto HA-H-Ras aktyvumo lygio sumažėjimą. Tikslios priežasties, kodėl Nck1 padidina bazinį Ras aktyvumą ląstelėje, nebuvo nustatyta. Nck1 sąveikauja su keliais baltymais, dalyvaujančiais Ras aktyvumo reguliavime: Ras guanino nukleotido mainų faktoriumi Sos1 (Hu, Milfay et al. 1995), p62 DOK baltymu



LAŠTELIŲ SUSPENDAVIMAS



4.1 pav. Adaptorinio baltymo Nck1 disocijavimas nuo RasGAP po ląstelių suspendavimo mažina RasGAP katalizinę aktyvumą GTPazės Ras atžvilgiu.

(Tang, Feng et al. 1997), kuris veikia į Ras aktyvumą neigiamai (Kashige, Carpino et al. 2000), Abi1 adaptoriniu baltymu (Yamamoto, Suzuki et al. 2001), kuris įeina į kompleksą, keičiantį Ras aktyvatoriaus Sos1 specifiškumą (Innocenti, Tenca et al. 2002). Ras bazinis lygis ląstelėje galėjo padidėti dėl bet kurios iš šių sąveikų pusiausvyros pokyčio, sukkelto Nck1 pertekliumi. Bet tirdami Nck1 įtaką RasGAP aktyvumui mes labiau kreipėme dėmesį į PDGF indukuoto Ras lygio pokytį, nes nuo

p120 RasGAP priklauso ne bazinis, o būtent PDGF indukuoto Ras aktyvumo lygis (Kulkarni, Gish et al. 2000). Mūsų duomenys parodė, jog esant ląstelėje Nck1 padidintai ekspresijai PDGF indukuoto Ras lygis sumažėja, kas atitinka sistemoje *in vitro* gautus duomenis, jog Nck1 sąveikaudama su RasGAP didina jo katalizinį aktyvumą.

Kaip buvo parodyta aukščiau, ląstelėms praradus kontaktą su substratu, kompleksas tarp Nck1 ir RasGAP suyra. Mes patikrinome, kaip tokiose ląstelėse kinta RasGAP ir Ras aktyvumas. RasGAP iš suspenduotų ląstelių sistemoje *in vitro* slopino Ras aktyvumą ne taip efektyviai, kaip RasGAP iš prilipusių ląstelių. Ras lygis suspenduotose ląstelėse buvo padidėjęs lyginant su prilipusiomis ląstelėmis, kas atitinka literatūros duomenis (Hecker, Ding et al. 2004). Taigi, mūsų gauti rezultatai rodo, jog egzistuoja koreliacija tarp Nck1 ir RasGAP komplekso disociavimo, RasGAP katalizinio aktyvumo sumažėjimo bei aktyvaus Ras lygio užkilimo (4.1 pav). Tolesniais tyrimais planuojama parodyti, ar tarp šių reiškinių yra priežastinis ryšys.

IŠVADOS

1. Nck šeimos baltymai Nck1 ir Nck2 sąveikauja su Ras GTPazę aktyvinančiu baltymu (RasGAP). Ši sąveika vyksta skirtingo tipo ląstelėse.
2. Baltymai Nck1 ir RasGAP kolokalizuoja ląstelės branduolyje, lamelipodijose ir neidentifikuotose citoplazmos struktūrose.
3. Už komplekso tarp adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP susidarymą yra atsakingi pirmasis ir trečiasis adaptorinio baltymo Nck1 SH3 domenai bei RasGAP N-galinė prolino turtinga sritimi. Nck1 ir RasGAP sąveika gali vykti tiesiogiai.
4. Adaptorinio baltymo Nck1 ir RasGAP kompleksas disocijuoja suardžius ląstelių sąveiką su substratu.
5. Adaptorinio baltymo Nck1 sąveika su RasGAP skatina RasGAP katalizinį aktyvumą GTPazės Ras atžvilgiu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abdellatif, M., S. E. Packer, et al. (1998). "A Ras-dependent pathway regulates RNA polymerase II phosphorylation in cardiac myocytes: implications for cardiac hypertrophy." *Mol Cell Biol* **18**(11): 6729-36.
- Agathangelou, A., W. N. Cooper, et al. (2005). "Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers." *Cancer Res* **65**(9): 3497-508.
- Anderson, D., C. A. Koch, et al. (1990). "Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors." *Science* **250**(4983): 979-82.
- Anton, I. M., W. Lu, et al. (1998). "The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck." *J Biol Chem* **273**(33): 20992-5.
- Aspenstrom, P., U. Lindberg, et al. (1996). "Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome." *Curr Biol* **6**(1): 70-5.
- Augsten, M., R. Pusch, et al. (2006). "Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane." *EMBO Rep* **7**(1): 46-51.
- Becker, E., U. Huynh-Do, et al. (2000). "Nck-interacting Ste20 kinase couples Eph receptors to c-Jun N-terminal kinase and integrin activation." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1537-45.
- Bernards, A. (2003). "GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila." *Biochim Biophys Acta* **1603**(2): 47-82.
- Bernards, A. and J. Settleman (2004). "GAP control: regulating the regulators of small GTPases." *Trends Cell Biol* **14**(7): 377-85.
- Bhattacharya, M., A. V. Babwah, et al. (2004). "Small GTP-binding protein-coupled receptors." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6): 1040-4.
- Bivona, T. G. and M. R. Philips (2003). "Ras pathway signaling on endomembranes." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 136-42.
- Bivona, T. G., S. E. Quatela, et al. (2006). "PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis." *Mol Cell* **21**(4): 481-93.
- Bladt, F., E. Aippersbach, et al. (2003). "The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network." *Mol Cell Biol* **23**(13): 4586-97.
- Blasutig, I. M., L. A. New, et al. (2008). "Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization." *Mol Cell Biol* **28**(6): 2035-46.
- Bokoch, G. M., Y. Wang, et al. (1996). "Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1)." *J Biol Chem* **271**(42): 25746-9.

- Bollag, G. and F. McCormick (1991). "Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities." Nature **351**(6327): 576-9.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-9.
- Bos, J. L. (1997). "Ras-like GTPases." Biochim Biophys Acta **1333**(2): M19-31.
- Bos, J. L., H. Rehmann, et al. (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-77.
- Bowtell, D., P. Fu, et al. (1992). "Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6511-5.
- Buday, L., L. Wunderlich, et al. (2002). "The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton." Cell Signal **14**(9): 723-31.
- Cai, D., S. Dhe-Paganon, et al. (2003). "Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5." J Biol Chem **278**(28): 25323-30.
- Cailliau, K., E. Browaeys-Poly, et al. (2001). "RasGAP is involved in signal transduction triggered by FGF1 in Xenopus oocytes expressing FGFR1." FEBS Lett **496**(2-3): 161-5.
- Cardin, E. and L. Larose (2008). "Nck-1 interacts with PKR and modulates its activation by dsRNA." Biochem Biophys Res Commun **377**(1): 231-5.
- Cardin, E., M. Latreille, et al. (2007). "Nck-1 selectively modulates eIF2alphaSer51 phosphorylation by a subset of eIF2alpha-kinases." FEBS J **274**(22): 5865-75.
- Carroll, M. P. and W. S. May (1994). "Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells." J Biol Chem **269**(2): 1249-56.
- Chang, E. H., M. A. Gonda, et al. (1982). "Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(16): 4848-52.
- Chen, M., H. She, et al. (1998). "Identification of Nck family genes, chromosomal localization, expression, and signaling specificity." J Biol Chem **273**(39): 25171-8.
- Chen, M., H. She, et al. (2000). "Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb." Mol Cell Biol **20**(21): 7867-80.
- Chen, S., J. T. Do, et al. (2006). "Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17266-71.
- Chiu, V. K., T. Bivona, et al. (2002). "Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi." Nat Cell Biol **4**(5): 343-50.
- Christoforidis, S., M. Miaczynska, et al. (1999). "Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors." Nat Cell Biol **1**(4): 249-52.
- Clark, G. J., L. A. Quilliam, et al. (1993). "Differential antagonism of Ras biological activity by catalytic and Src homology domains of Ras GTPase activation protein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 4887-91.

- Coutinho, S., T. Jahn, et al. (2000). "Characterization of Grb4, an adapter protein interacting with Bcr-Abl." Blood **96**(2): 618-24.
- Cox, A. D. and C. J. Der (2003). "The dark side of Ras: regulation of apoptosis." Oncogene **22**(56): 8999-9006.
- Csiszar, A. (2006). "Structural and functional diversity of adaptor proteins involved in tyrosine kinase signalling." Bioessays **28**(5): 465-79.
- DeClue, J. E., I. Sadowski, et al. (1987). "A conserved domain regulates interactions of the v-fps protein-tyrosine kinase with the host cell." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9064-8.
- Denis, G. V., Q. Yu, et al. (2003). "Bcl-2, via its BH4 domain, blocks apoptotic signaling mediated by mitochondrial Ras." J Biol Chem **278**(8): 5775-85.
- Der, C. J. and T. Van Dyke (2007). "Stopping ras in its tracks." Cell **129**(5): 855-7.
- Dhillon, A. S., Y. Y. Yip, et al. (2009). "The C-terminus of Raf-1 acts as a 14-3-3-dependent activation switch." Cell Signal **21**(11): 1645-51.
- Drugan, J. K., K. Rogers-Graham, et al. (2000). "The Ras/p120 GTPase-activating protein (GAP) interaction is regulated by the p120 GAP pleckstrin homology domain." J Biol Chem **275**(45): 35021-7.
- Druker, B., K. Okuda, et al. (1992). "Tyrosine phosphorylation of rasGAP and associated proteins in chronic myelogenous leukemia cell lines." Blood **79**(9): 2215-20.
- Duchesne, M., F. Schweighoffer, et al. (1993). "Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP-mediated signaling." Science **259**(5094): 525-8.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, et al. (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." Science **280**(5366): 1082-6.
- Eerola, I., L. M. Boon, et al. (2003). "Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations." Am J Hum Genet **73**(6): 1240-9.
- Egan, S. E., B. W. Giddings, et al. (1993). "Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation." Nature **363**(6424): 45-51.
- Ehrhardt, A., M. D. David, et al. (2004). "Distinct mechanisms determine the patterns of differential activation of H-Ras, N-Ras, K-Ras 4B, and M-Ras by receptors for growth factors or antigen." Mol Cell Biol **24**(14): 6311-23.
- Ehrhardt, A., G. R. Ehrhardt, et al. (2002). "Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together." Exp Hematol **30**(10): 1089-106.
- Eichinger, L., J. A. Pachebat, et al. (2005). "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." Nature **435**(7038): 43-57.
- Ellis, C., M. Moran, et al. (1990). "Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases." Nature **343**(6256): 377-81.

- Emadali, A., P. P. Metrakos, et al. (2007). "Proteomic analysis of tyrosine phosphorylation during human liver transplantation." Proteome Sci **5**: 1.
- Fam, N. P., W. T. Fan, et al. (1997). "Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for Ras." Mol Cell Biol **17**(3): 1396-406.
- Fawcett, J. P., J. Georgiou, et al. (2007). "Nck adaptor proteins control the organization of neuronal circuits important for walking." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20973-8.
- Fedorov, Y. V., N. C. Jones, et al. (2002). "Atypical protein kinase Cs are the Ras effectors that mediate repression of myogenic satellite cell differentiation." Mol Cell Biol **22**(4): 1140-9.
- Ferguson, K. M., M. A. Lemmon, et al. (1995). "Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain." Cell **83**(6): 1037-46.
- Francis-Lang, H., M. Zannini, et al. (1992). "Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells." Mol Cell Biol **12**(12): 5793-800.
- Franke, B., J. W. Akkerman, et al. (1997). "Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets." EMBO J **16**(2): 252-9.
- Freed, E., M. Symons, et al. (1994). "Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation." Science **265**(5179): 1713-6.
- Fryer, B. H., C. Wang, et al. (2006). "cGMP-dependent protein kinase phosphorylates p21-activated kinase (Pak) 1, inhibiting Pak/Nck binding and stimulating Pak/vasodilator-stimulated phosphoprotein association." J Biol Chem **281**(17): 11487-95.
- Fukuoka, M., H. Miki, et al. (1997). "Identification of N-WASP homologs in human and rat brain." Gene **196**(1-2): 43-8.
- Galisteo, M. L., J. Chernoff, et al. (1996). "The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1." J Biol Chem **271**(35): 20997-1000.
- Ger, M., V. Tunaitis, et al. (2003). "Elucidation of the Complex Formation between Nck- α , RasGTPase Activating Protein and Platelet-derived Growth Factor Receptor- β ." Biologija **3**: 7-9.
- Giglione, C., S. Gonfloni, et al. (2001). "Differential actions of p60c-Src and Lck kinases on the Ras regulators p120-GAP and GDP/GTP exchange factor CDC25Mm." Eur J Biochem **268**(11): 3275-83.
- Gigoux, V., S. L'Hoste, et al. (2002). "Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins." J Biol Chem **277**(26): 23742-6.
- Gil, D., W. W. Schamel, et al. (2002). "Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation." Cell **109**(7): 901-12.
- Grewal, T., R. Evans, et al. (2005). "Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity." Oncogene **24**(38): 5809-20.

- Guan, S., M. Chen, et al. (2007). "Nckbeta adapter controls neuritogenesis by maintaining the cellular paxillin level." Mol Cell Biol **27**(17): 6001-11.
- Gugasyan, R., C. Quilici, et al. (2002). "Dok-related protein negatively regulates T cell development via its RasGTPase-activating protein and Nck docking sites." J Cell Biol **158**(1): 115-25.
- Gupta, S., A. R. Ramjaun, et al. (2007). "Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice." Cell **129**(5): 957-68.
- Hagemann, D., J. Troppmair, et al. (1999). "Cot protooncogene protein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells." Oncogene **18**(7): 1391-400.
- Hall, A. (1992). "Signal transduction through small GTPases--a tale of two GAPs." Cell **69**(3): 389-91.
- Hamdan, F. F., J. Gauthier, et al. (2009). "Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation." N Engl J Med **360**(6): 599-605.
- Hamilton, M. and A. Wolfman (1998). "Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo." Oncogene **16**(11): 1417-28.
- Han, L., D. Wong, et al. (1997). "Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4954-9.
- Harvey, J. J. (1964). "An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice." Nature **204**: 1104-5.
- Hecker, T. P., Q. Ding, et al. (2004). "Overexpression of FAK promotes Ras activity through the formation of a FAK/p120RasGAP complex in malignant astrocytoma cells." Oncogene **23**(22): 3962-71.
- Holland, S. J., N. W. Gale, et al. (1997). "Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells." EMBO J **16**(13): 3877-88.
- Hoshino, M., T. Yoshimori, et al. (2005). "Small GTPase proteins Rin and Rit Bind to PAR6 GTP-dependently and regulate cell transformation." J Biol Chem **280**(24): 22868-74.
- Howe, A. K. (2001). "Cell adhesion regulates the interaction between Nck and p21-activated kinase." J Biol Chem **276**(18): 14541-4.
- Hu, K. Q. and J. Settleman (1997). "Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation." EMBO J **16**(3): 473-83.
- Hu, Q., D. Milfay, et al. (1995). "Binding of NCK to SOS and activation of ras-dependent gene expression." Mol Cell Biol **15**(3): 1169-74.
- Huang, D. C., C. J. Marshall, et al. (1993). "Plasma membrane-targeted ras GTPase-activating protein is a potent suppressor of p21ras function." Mol Cell Biol **13**(4): 2420-31.
- Im, E., F. C. von Lintig, et al. (2002). "Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells." Oncogene **21**(41): 6356-65.
- Innocenti, M., P. Tenca, et al. (2002). "Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac." J Cell Biol **156**(1): 125-36.

- Ise, K., K. Nakamura, et al. (2000). "Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis." Oncogene **19**(26): 2951-6.
- Jia, C. Y., J. Nie, et al. (2005). "Novel Src homology 3 domain-binding motifs identified from proteomic screen of a Pro-rich region." Mol Cell Proteomics **4**(8): 1155-66.
- Jin, J., F. D. Smith, et al. (2004). "Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization." Curr Biol **14**(16): 1436-50.
- Johnson, L., D. Greenbaum, et al. (1997). "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." Genes Dev **11**(19): 2468-81.
- Jones, M. K. and J. H. Jackson (1998). "Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo." J Biol Chem **273**(3): 1782-7.
- Kashige, N., N. Carpino, et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2093-8.
- Kazlauskas, A., A. Kashishian, et al. (1992). "GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase bind to distinct regions of the platelet-derived growth factor receptor beta subunit." Mol Cell Biol **12**(6): 2534-44.
- Kebache, S., E. Cardin, et al. (2004). "Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation." J Biol Chem **279**(10): 9662-71.
- Kebache, S., D. Zuo, et al. (2002). "Modulation of protein translation by Nck-1." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5406-11.
- Keduka, E., A. Kaiho, et al. (2009). "M-Ras evolved independently of R-Ras and its neural function is conserved between mammalian and ascidian, which lacks classical Ras." Gene **429**(1-2): 49-58.
- Keen, N. and S. Taylor (2004). "Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents." Nat Rev Cancer **4**(12): 927-36.
- Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, et al. (1998). "Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation." Cell **93**(4): 605-15.
- Kikuchi, A. and L. T. Williams (1994). "The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation." J Biol Chem **269**(31): 20054-9.
- Kim, A. S., L. T. Kakalis, et al. (2000). "Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein." Nature **404**(6774): 151-8.
- Kirsten, W. H., V. Schauf, et al. (1970). "Properties of a murine sarcoma virus." Bibl Haematol(36): 246-9.
- Kishida, S., S. Koyama, et al. (1997). "Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator." Oncogene **15**(24): 2899-907.

- Kitamura, T., Y. Kitamura, et al. (1996). "Molecular cloning of p125Nck1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck." Biochem Biophys Res Commun **219**(2): 509-14.
- Koehler, J. A. and M. F. Moran (2001). "RACK1, a protein kinase C scaffolding protein, interacts with the PH domain of p120GAP." Biochem Biophys Res Commun **283**(4): 888-95.
- Koehler, J. A. and M. F. Moran (2001). "Regulation of extracellular signal-regulated kinase activity by p120 RasGAP does not involve its pleckstrin homology or calcium-dependent lipid binding domains but does require these domains to regulate cell proliferation." Cell Growth Differ **12**(11): 551-61.
- Kremer, B. E., L. A. Adang, et al. (2007). "Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7." Cell **130**(5): 837-50.
- Kulkarni, S. V., G. Gish, et al. (2000). "Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement." J Cell Biol **149**(2): 457-70.
- Labadia, M. E., G. M. Bokoch, et al. (1993). "The Rap1A protein enhances protein kinase C activity in vitro." Biochem Biophys Res Commun **195**(3): 1321-8.
- Lamallice, L., F. Houle, et al. (2006). "Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF." J Biol Chem **281**(45): 34009-20.
- Lambert, J. M., Q. T. Lambert, et al. (2002). "Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism." Nat Cell Biol **4**(8): 621-5.
- Lawe, D. C., C. Hahn, et al. (1997). "The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68." Oncogene **14**(2): 223-31.
- Leblanc, V., B. Tocque, et al. (1998). "Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain." Mol Cell Biol **18**(9): 5567-78.
- Leevers, S. J., B. Vanhaesebroeck, et al. (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 219-25.
- Lehmann, J. M., G. Riethmuller, et al. (1990). "Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3." Nucleic Acids Res **18**(4): 1048.
- Lettau, M., J. Pieper, et al. (2009). "Nck adapter proteins: functional versatility in T cells." Cell Commun Signal **7**: 1.
- Li, W., P. Hu, et al. (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing Nck protein is oncogenic and a common target for phosphorylation by different surface receptors." Mol Cell Biol **12**(12): 5824-33.
- Li, X., M. Meriane, et al. (2002). "The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism." J Biol Chem **277**(40): 37788-97.

- Ligeti, E., M. C. Dagher, et al. (2004). "Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein." J Biol Chem **279**(7): 5055-8.
- Liu, K. and G. Li (1998). "Catalytic domain of the p120 Ras GAP binds to RAb5 and stimulates its GTPase activity." J Biol Chem **273**(17): 10087-90.
- Macdonald, S. G., C. M. Crews, et al. (1993). "Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro." Mol Cell Biol **13**(11): 6615-20.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem **273**(22): 13375-8.
- Mahoney, N. M., D. A. Rozwarski, et al. (1999). "Profilin binds proline-rich ligands in two distinct amide backbone orientations." Nat Struct Biol **6**(7): 666-71.
- Malumbres, M. and A. Pellicer (1998). "RAS pathways to cell cycle control and cell transformation." Front Biosci **3**: d887-912.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-74.
- Marte, B. M., P. Rodriguez-Viciana, et al. (1997). "R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways." Curr Biol **7**(1): 63-70.
- Martin, G. A., A. Yatani, et al. (1992). "GAP domains responsible for ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents." Science **255**(5041): 192-4.
- Matsumoto, K., T. Asano, et al. (1997). "Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton." Oncogene **15**(20): 2409-17.
- Mayer, B. J. (2001). "SH3 domains: complexity in moderation." J Cell Sci **114**(Pt 7): 1253-63.
- Mayer, B. J. and H. Hanafusa (1990). "Mutagenic analysis of the v-crk oncogene: requirement for SH2 and SH3 domains and correlation between increased cellular phosphotyrosine and transformation." J Virol **64**(8): 3581-9.
- McCarty, J. H. (1998). "The Nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events." Bioessays **20**(11): 913-21.
- McGlade, J., B. Brunkhorst, et al. (1993). "The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion." EMBO J **12**(8): 3073-81.
- McKay, M. M., D. A. Ritt, et al. (2009). "Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(27): 11022-7.
- Michiels, F., G. G. Habets, et al. (1995). "A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion." Nature **375**(6529): 338-40.

- Michod, D. and C. Widmann (2007). "TAT-RasGAP317-326 requires p53 and PUMA to sensitize tumor cells to genotoxins." Mol Cancer Res **5**(5): 497-507.
- Miller, L. D., K. C. Lee, et al. (2004). "RACK1 regulates Src-mediated Sam68 and p190RhoGAP signaling." Oncogene **23**(33): 5682-6.
- Mochizuki, N., S. Yamashita, et al. (2001). "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1." Nature **411**(6841): 1065-8.
- Mor, A., G. Campi, et al. (2007). "The lymphocyte function-associated antigen-1 receptor costimulates plasma membrane Ras via phospholipase D2." Nat Cell Biol **9**(6): 713-9.
- Moran, M. F., C. A. Koch, et al. (1990). "Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8622-6.
- Moran, M. F., P. Polakis, et al. (1991). "Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein." Mol Cell Biol **11**(4): 1804-12.
- Neckers, L. (2009). "Heat Shock Protein 90 Is a Rational Molecular Target in Breast Cancer." Breast Dis **15**: 53-60.
- Nguyen, J. T., C. W. Turck, et al. (1998). "Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors." Science **282**(5396): 2088-92.
- Nishimura, R., W. Li, et al. (1993). "Two signaling molecules share a phosphotyrosine-containing binding site in the platelet-derived growth factor receptor." Mol Cell Biol **13**(11): 6889-96.
- Oh, J. S., P. Manzerra, et al. (2004). "Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **279**(17): 17980-8.
- Ohtsuka, T., K. Shimizu, et al. (1996). "Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP-binding protein." J Biol Chem **271**(3): 1258-61.
- Pamonsinlapatham, P., R. Hadj-Slimane, et al. (2009). "P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling." Biochimie **91**(3): 320-8.
- Pamonsinlapatham, P., R. Hadj-Slimane, et al. (2008). "A RasGAP SH3 peptide aptamer inhibits RasGAP-Aurora interaction and induces caspase-independent tumor cell death." PLoS One **3**(8): e2902.
- Panasyuk, G., I. Nemazanyy, et al. (2008). "A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 63-71.
- Park, D. and S. G. Rhee (1992). "Phosphorylation of Nck in response to a variety of receptors, phorbol myristate acetate, and cyclic AMP." Mol Cell Biol **12**(12): 5816-23.

- Parker, F., F. Maurier, et al. (1996). "A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2561-9.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." *Nature* **373**(6515): 573-80.
- Pells, S., M. Divjak, et al. (1997). "Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms." *Oncogene* **15**(15): 1781-6.
- Pena, V., M. Hothorn, et al. (2008). "The C2 domain of SynGAP is essential for stimulation of the Rap GTPase reaction." *EMBO Rep* **9**(4): 350-5.
- Phelps, M., A. Phillips, et al. (2005). "MEK-ERK signaling controls Hdm2 oncoprotein expression by regulating hdm2 mRNA export to the cytoplasm." *J Biol Chem* **280**(17): 16651-8.
- Pomerance, M., M. N. Thang, et al. (1996). "The Ras-GTPase-activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and mos induction by oncogenic Ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen-activated protein kinase activation." *Mol Cell Biol* **16**(6): 3179-86.
- Potenza, N., C. Vecchione, et al. (2005). "Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice." *EMBO Rep* **6**(5): 432-7.
- Potter, C. J., L. G. Pedraza, et al. (2002). "Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2." *Nat Cell Biol* **4**(9): 658-65.
- Quilliam, L. A., Q. T. Lambert, et al. (1996). "Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling." *J Biol Chem* **271**(46): 28772-6.
- Ramesh, N., I. M. Anton, et al. (1997). "WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14671-6.
- Rebhun, J. F., A. F. Castro, et al. (2000). "Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction." *J Biol Chem* **275**(45): 34901-8.
- Rebollo, A., D. Perez-Sala, et al. (1999). "Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis." *Oncogene* **18**(35): 4930-9.
- Ren, R., B. J. Mayer, et al. (1993). "Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site." *Science* **259**(5098): 1157-61.
- Rivera, G. M., S. Antoku, et al. (2006). "Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(25): 9536-41.
- Rivera, G. M., C. A. Briceno, et al. (2004). "Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization." *Curr Biol* **14**(1): 11-22.
- Rivero-Lezcano, O. M., A. Marcilla, et al. (1995). "Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains." *Mol Cell Biol* **15**(10): 5725-31.

- Rockow, S., J. Tang, et al. (1996). "Nck inhibits NGF and basic FGF induced PC12 cell differentiation via mitogen-activated protein kinase-independent pathway." *Oncogene* **12**(11): 2351-9.
- Rodenhuis, S. (1992). "ras and human tumors." *Semin Cancer Biol* **3**(4): 241-7.
- Rodriguez-Viciana, P., C. Sabatier, et al. (2004). "Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate." *Mol Cell Biol* **24**(11): 4943-54.
- Roof, R. W., M. D. Haskell, et al. (1998). "Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7052-63.
- Ross, B., O. Kristensen, et al. (2007). "High resolution crystal structures of the p120 RasGAP SH3 domain." *Biochem Biophys Res Commun* **353**(2): 463-8.
- Russell, M., C. A. Lange-Carter, et al. (1995). "Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1)." *J Biol Chem* **270**(20): 11757-60.
- Sakoda, T., K. Kaibuchi, et al. (1992). "smg/rap1/Krev-1 p21s inhibit the signal pathway to the c-fos promoter/enhancer from c-Ki-ras p21 but not from c-raf-1 kinase in NIH3T3 cells." *Oncogene* **7**(9): 1705-11.
- Saucedo, L. J., X. Gao, et al. (2003). "Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network." *Nat Cell Biol* **5**(6): 566-71.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, et al. (1997). "The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants." *Science* **277**(5324): 333-8.
- Schulte, T. W., M. V. Blagosklonny, et al. (1995). "Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association." *J Biol Chem* **270**(41): 24585-8.
- Shang, X., S. Y. Moon, et al. (2007). "p200 RhoGAP promotes cell proliferation by mediating cross-talk between Ras and Rho signaling pathways." *J Biol Chem* **282**(12): 8801-11.
- Sicheri, F. and J. Kuriyan (1997). "Structures of Src-family tyrosine kinases." *Curr Opin Struct Biol* **7**(6): 777-85.
- Side, L. E., P. D. Emanuel, et al. (1998). "Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1." *Blood* **92**(1): 267-72.
- Skorski, T., P. Kanakaraj, et al. (1994). "Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth." *J Exp Med* **179**(6): 1855-65.
- Soler, C., A. Felipe, et al. (1994). "Epidermal growth factor increases protein and messenger RNA expression levels of Ras GTPase activating protein." *Cell Growth Differ* **5**(5): 519-26.

- Song, C., C. D. Hu, et al. (2001). "Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras." J Biol Chem **276**(4): 2752-7.
- Song, J., L. Wu, et al. (2003). "Axons guided by insulin receptor in Drosophila visual system." Science **300**(5618): 502-5.
- Stein, E., U. Huynh-Do, et al. (1998). "Nck recruitment to Eph receptor, EphB1/ELK, couples ligand activation to c-Jun kinase." J Biol Chem **273**(3): 1303-8.
- Stokoe, D., S. G. Macdonald, et al. (1994). "Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane." Science **264**(5164): 1463-7.
- Suetsugu, S., H. Miki, et al. (2002). "Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins." Cell Motil Cytoskeleton **51**(3): 113-22.
- Sutton, R. B. and S. R. Sprang (1998). "Structure of the protein kinase Cbeta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺." Structure **6**(11): 1395-405.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Tall, G. G., M. A. Barbieri, et al. (2001). "Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1." Dev Cell **1**(1): 73-82.
- Tanaka, K., M. Nakafuku, et al. (1990). "S. cerevisiae genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein." Cell **60**(5): 803-7.
- Tang, J., G. S. Feng, et al. (1997). "Induced direct binding of the adapter protein Nck to the GTPase-activating protein-associated protein p62 by epidermal growth factor." Oncogene **15**(15): 1823-32.
- Tang, Y., H. Zhou, et al. (2000). "The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals." J Biol Chem **275**(13): 9106-9.
- Taparowsky, E., K. Shimizu, et al. (1983). "Structure and activation of the human N-ras gene." Cell **34**(2): 581-6.
- Tassabehji, M., T. Strachan, et al. (1993). "Tandem duplication within a neurofibromatosis type 1 (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome." Am J Hum Genet **53**(1): 90-5.
- Tomasevic, N., Z. Jia, et al. (2007). "Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2." Biochemistry **46**(11): 3494-502.
- Trahey, M., G. Wong, et al. (1988). "Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta." Science **242**(4886): 1697-700.
- Tu, Y., F. Li, et al. (1998). "Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways." Mol Biol Cell **9**(12): 3367-82.

- Umanoff, H., W. Edelmann, et al. (1995). "The murine N-ras gene is not essential for growth and development." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1709-13.
- Urano, T., R. Emkey, et al. (1996). "Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation." EMBO J **15**(4): 810-6.
- Valius, M., J. P. Secrist, et al. (1995). "The GTPase-activating protein of Ras suppresses platelet-derived growth factor beta receptor signaling by silencing phospholipase C-gamma 1." Mol Cell Biol **15**(6): 3058-71.
- van Dam, E. M. and P. J. Robinson (2006). "Ral: mediator of membrane trafficking." Int J Biochem Cell Biol **38**(11): 1841-7.
- van der Geer, P., M. Henkemeyer, et al. (1997). "Aberrant Ras regulation and reduced p190 tyrosine phosphorylation in cells lacking p120-Gap." Mol Cell Biol **17**(4): 1840-7.
- Van Lint, J., Y. Ni, et al. (1998). "Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase Cgamma and protein kinase C." J Biol Chem **273**(12): 7038-43.
- Vojtek, A. B., S. M. Hollenberg, et al. (1993). "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf." Cell **74**(1): 205-14.
- Waksman, G., D. Kominos, et al. (1992). "Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides." Nature **358**(6388): 646-53.
- Wang, B., J. X. Zou, et al. (2000). "R-Ras contains a proline-rich site that binds to SH3 domains and is required for integrin activation by R-Ras." J Biol Chem **275**(7): 5222-7.
- Wang, Y., R. T. Waldron, et al. (2002). "The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins." Mol Cell Biol **22**(3): 916-26.
- Whyte, D. B., P. Kirschmeier, et al. (1997). "K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors." J Biol Chem **272**(22): 14459-64.
- Wintjens, R., J. M. Wieruszkeski, et al. (2001). "1H NMR study on the binding of Pin1 Trp-Trp domain with phosphothreonine peptides." J Biol Chem **276**(27): 25150-6.
- Wunderlich, W., I. Fialka, et al. (2001). "A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment." J Cell Biol **152**(4): 765-76.
- Xu, G. F., B. Lin, et al. (1990). "The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*." Cell **63**(4): 835-41.
- Yamagata, K., L. K. Sanders, et al. (1994). "rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein." J Biol Chem **269**(23): 16333-9.
- Yamamoto, A., T. Suzuki, et al. (2001). "Isolation of hNap1BP which interacts with human Nap1 (NCKAP1) whose expression is down-regulated in Alzheimer's disease." Gene **271**(2): 159-69.

- Yang, J. Y., J. Walicki, et al. (2005). "Impaired Akt activity down-modulation, caspase-3 activation, and apoptosis in cells expressing a caspase-resistant mutant of RasGAP at position 157." Mol Biol Cell **16**(8): 3511-20.
- Yang, J. Y. and C. Widmann (2001). "Antiapoptotic signaling generated by caspase-induced cleavage of RasGAP." Mol Cell Biol **21**(16): 5346-58.
- Yang, J. Y. and C. Widmann (2002). "A subset of caspase substrates functions as the Jekyll and Hyde of apoptosis." Eur Cytokine Netw **13**(4): 404-6.
- Yee, W. M. and P. F. Worley (1997). "Rheb interacts with Raf-1 kinase and may function to integrate growth factor- and protein kinase A-dependent signals." Mol Cell Biol **17**(2): 921-33.
- Zhang, X. F., J. Settleman, et al. (1993). "Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1." Nature **364**(6435): 308-13.
- Zhang, Y., G. Zhang, et al. (1993). "Purification, characterization, and cellular localization of the 100-kDa human placental GTPase-activating protein." J Biol Chem **268**(25): 18875-81.
- Zhou, G. L., Y. Zhuo, et al. (2003). "Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration." Mol Cell Biol **23**(22): 8058-69.
- Zou, Y., I. Komuro, et al. (1996). "Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes." J Biol Chem **271**(52): 33592-7.

Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. **Ger M**, Tunaitis V, Valius M. 2003. *Elucidation of the Complex Formation between Nck- α , RasGTPase Activating Protein and Platelet-derived Growth Factor Receptor- β* . Biologija Nr.3: 7-9
2. **Ger M**, Tunaitis V, Stoskus M, Valius M. 2005. *Identification of Ras GTPase-activating protein-binding sites in adaptor protein Nck- α* . Biologija Nr.1: 35-7
3. **Ger M**, Magnusson KE, Valius M. 2006. *Proteomics Analysis of Proteins Associating with Nck- α* . Biologija Nr.4: 1-4.
4. Gurskiene V, **Ger M**, Valius M. 2006. *Differential association of Nck family proteins with PDGF receptor- β and Ras GTPase activating protein*. Biologija Nr.3: 106-8.

Pristatymai konferencijose

1. **Ger M**, Tunaitis V, Stoskus M, Valius M. „Su Ras GTPazę aktyvinančiu baltymu sąveikaujančių domenų nustatymas adaptoriniame baltyme Nck- α “. Lietuvos biochemilų draugijos VIII suvaziavimas-konferencija. 2004.
2. **Ger M**, Magnusson KE, Valius M. „Proteomine su Nck- α saveikaujanciu baltymu analize“. Lietuvos biochemilų draugijos IX suvaziavimas-konferencija. 2006.
3. **Ger M**, Valius M. “Interaction between Nck-1 and p120RasGAP: the Mechanism, the Subcellular Localization and the Role of Cell Adhesion”. Tarptautinė mokslinė konferencija „Šiuolaikinės biochemijos iššūkiai ir galimybės“. 2007.

Padėka

Norėčiau padėkoti visiems, kurie padėdavo ir paremdavo mane mokslo darbuose bei disertacijos rašymo metu, ypač:

- ❖ Darbo vadovui, o vėliau – konsultantui dr. Mindaugui Valiui už pagrindinę temą, neišsenkančias idėjas bei mokslinį auklėjimą.
- ❖ Biochemijos instituto mokslinei sekretorei dr. Virginijai Bukelskienei bei dr. Daivai Baltriukienei už neįkainojamą informacinę bei moralinę paramą ruošiant disertacinį darbą.
- ❖ Dr. Audronei Kalvelytei, dr. Jūratei Savickienei ir hab. dr. Jūratei Darginavičienei už vertingas pastabas.
- ❖ Kolegoms Zigmui Žitkui – už aštrų kritinį mąstymą bei vertingas diskusijas; dr. Algirdui Kaupiniui, Daliui Kučiauskui ir Lidijai Dubakienei – už kūrybingą bei produktyvų bendradarbiavimą.
- ❖ Buvusioms bendradarbėms Alinai Marandykinai ir Vaidai Gurskienei – už didžiulę pagalbą eksperimentuose.
- ❖ Dr. Rolandui Meškiui bei dr. Renatai Gasparavičiutei – už paskatinimą disertacijai ruošti.
- ❖ Kuo nuoširdžiausia padėka mamai ir kitiems šeimos nariams bei ištikimiems draugams – už tai, jog palaikė bei tikėjo manimi nuo mokyklos suolo, o taip pat kartais laiku atitraukdavo nuo darbų.

Finansinė parama

- ❖ LVMSF kompleksinis mokslinio tyrimo darbas „Imunokompetentinių ląstelių funkcijas kontroliuojančių viduląstelinų signalinių sistemų lokalizacija“, reg. Nr. 26040, 2001-2003.
- ❖ LVMSF mokslininkų grupės projektas „Protoonkogeno Ras aktyvumo bei įtakos viduląsteliniam transportui tyrimas konfokalinės mikroskopijos metodais“, reg. Nr. T-07352, 2007.
- ❖ LVMSF stipendija 2005-2007.