

3 - Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo

Avtorji: Martin Stanonik, Peter Gričar Vintar, Marko Kovačič, David Valte, Lev Jošt

Uvod

Receptorske tirozin kinaze

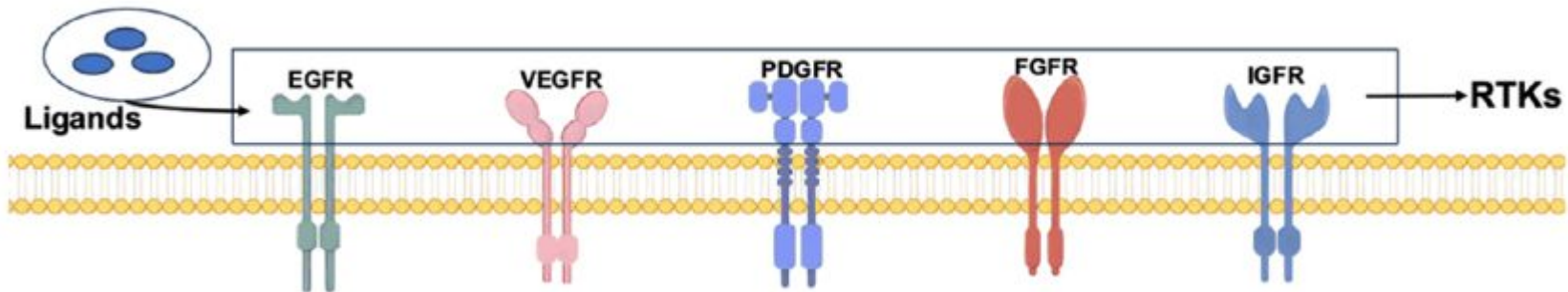
Receptorske serin/treonin kinaze

Gvanilat ciklaze

Receptorske tirozin fosfataze

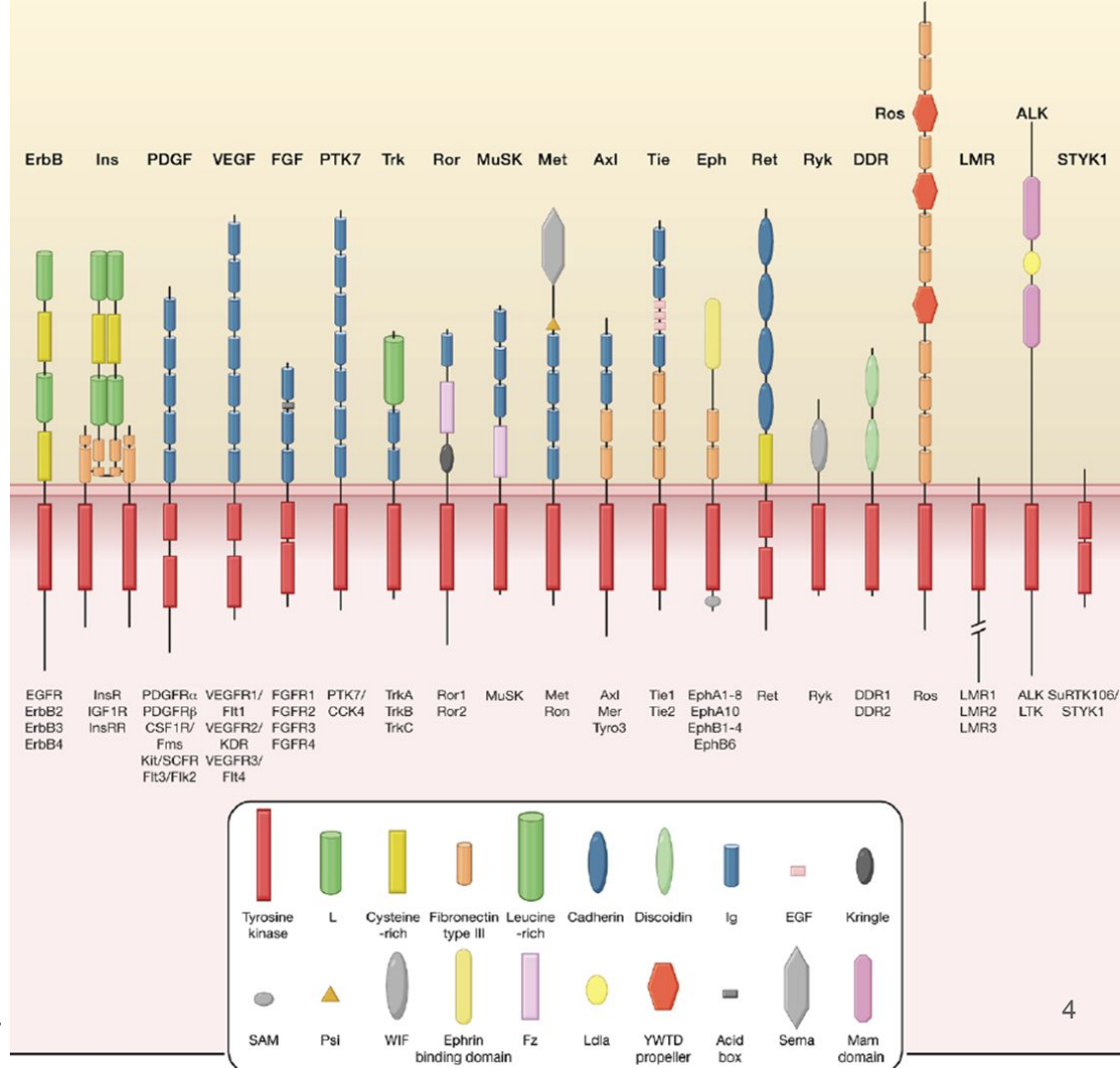
RECEPTORSKE TIROZIN KINAZE

- Tirozin kinazni receptorji so transmembranski proteini
- Vloga pri metabolizmu, proliferaciji, diferenciaciji celic, ohranitvi homeostaze
- Vežejo se z raznovrstnimi ligandi

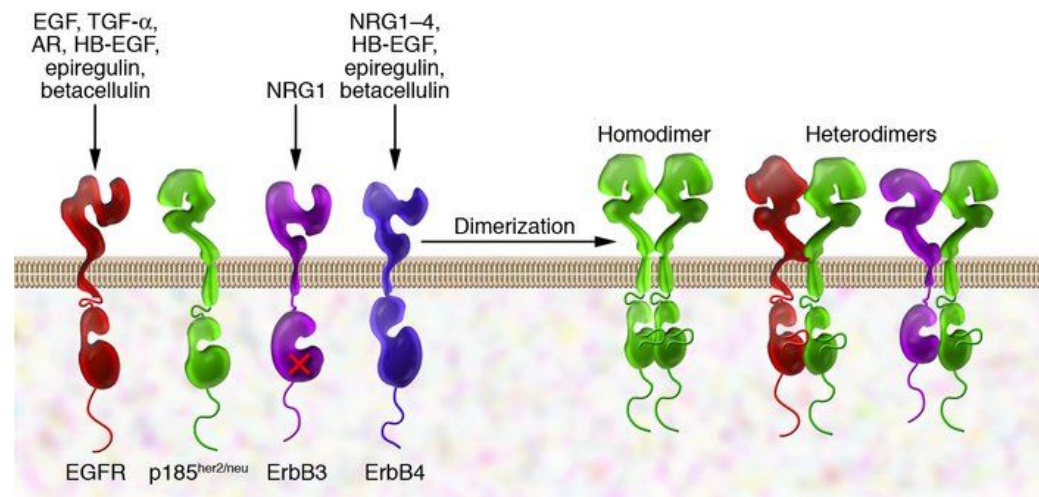


DELITEV

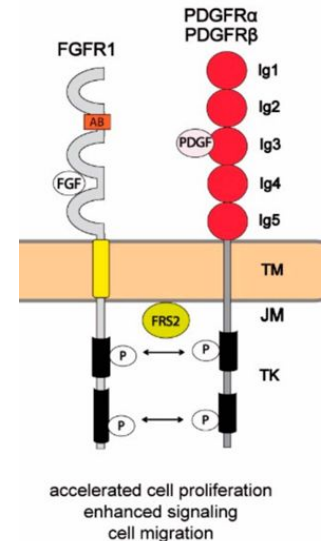
- V genomu zapis za 518 kinaz
- 1,7% celotnega genoma
- 58 receptorjev v 20 poddružinah
- ErbB, FGFR, PDGFR



- ErbB → tvorijo homo- ali heterodimere
- EGF, TGF α , NRG1
- ErbB2 se pogosteje veže z drugimi receptorji
- ErbB3 nima kinazne aktivnosti
- FGFR → visoko in nizko afinitetni razredi
- PDGFR → kodirata PDGFR- α in PDGFR- β gena
- Konfiguracije $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$



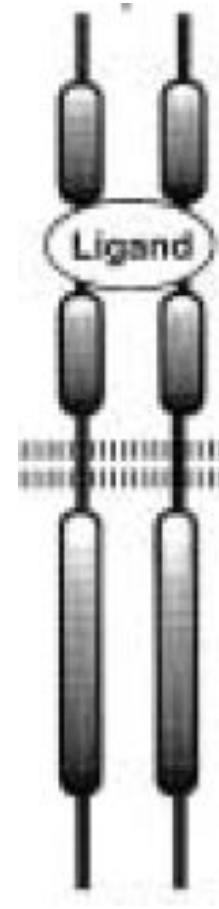
Vir slike: <https://www.jci.org/articles/view/32278/figure/1> (pridobljeno 11.5.2025).



Vir slike: M. Latko, A. Czyrek, N. Porebska, M. Kucińska, J. Otlewski, M. Zakrzewska, Ł. Opaliński: Cross-Talk between Fibroblast Growth Factor Receptors and Other Cell Surface Proteins. *Cells*. 2019, 8, 455.

STRUKTURA

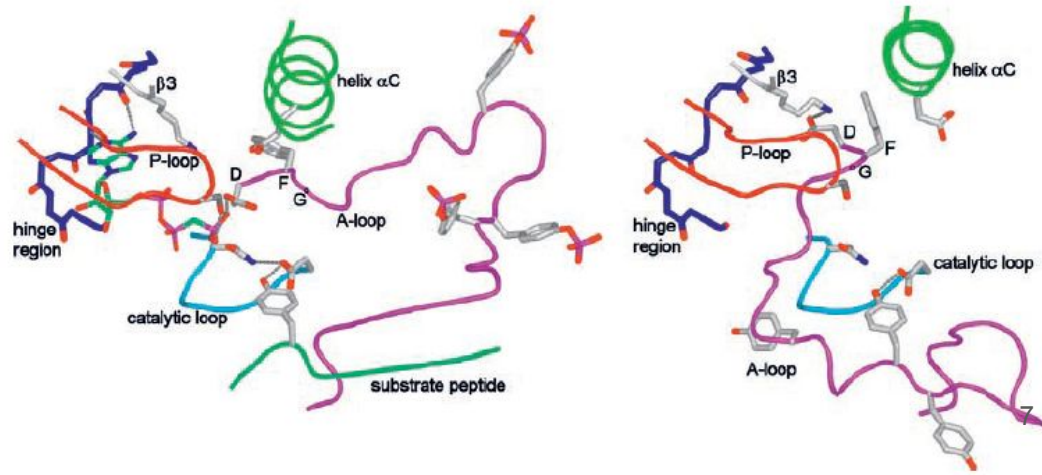
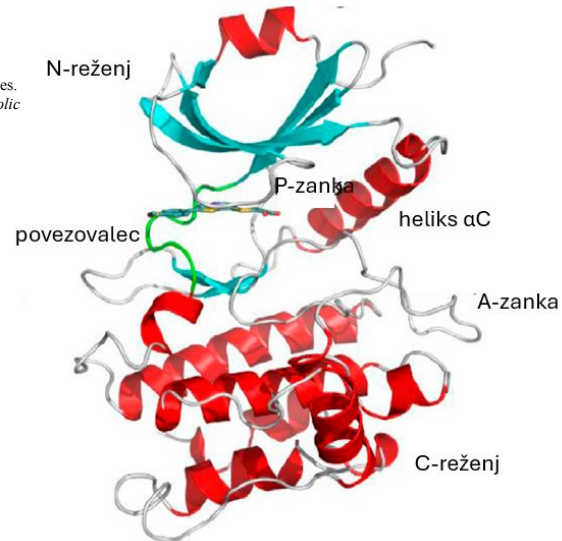
- Receptorji imajo ekstracelularni N-konec, intracelularni C-konec ter transmembranski povezovalec
- N-konec se med receptorji razlikuje → vezava različnih ligandov
- Znotraj celice se nahaja tirozin kinazna domena
- Tirozin kinazna domena zelo ohranjena med receptorji



Kinazna domena

- Vsebuje tirozine ki se fosforilizirajo in sprožijo signalne kaskade
- Sestavljena iz N- in C- režnja
- Ključni elementi so β -ploskev, α heliks (α C) in P-zanka v N-režnju in A-zanka ter katalitična zanka v C-režnju
- DFG (Asp-Phe-Gly) in HRD (His-Arg-Asp) motiva nujna za vezavo s substratom

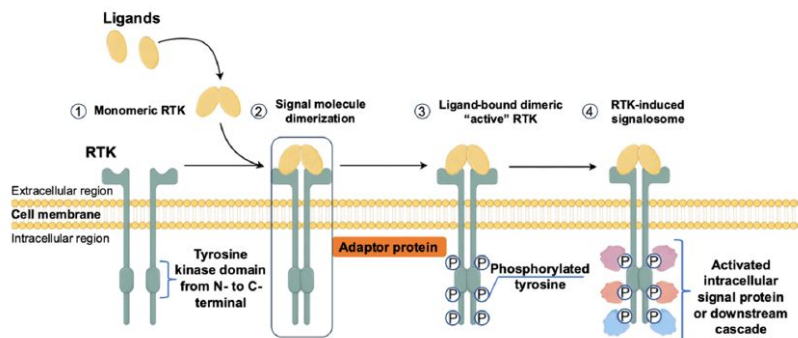
Vir slike: L. E. Kilpatrick, S. J. Hill:
Transactivation of G protein-coupled
receptors (GPCRs) and receptor tyrosine
kinases (RTKs): Recent insights using
luminescence and fluorescence technologies.
*Current Opinion in Endocrine and Metabolic
Research*. 2021, 16, str. 102–112.



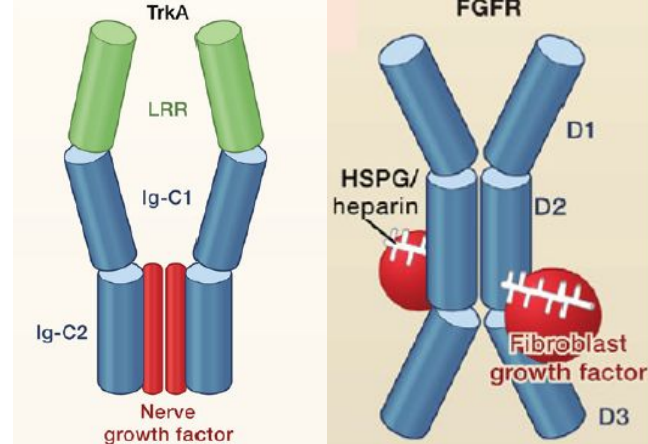
Vir slike: S. W. Cowan-Jacob: Structural biology of protein
tyrosine kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006,

SIGNALIZACIJA

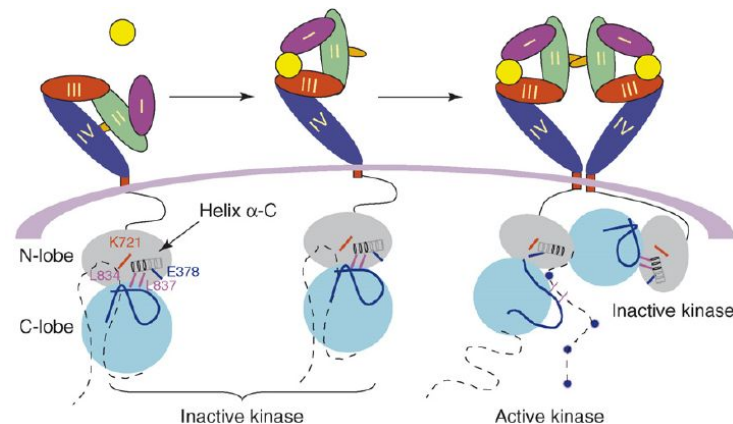
- Večina receptorjev v monomerni obliki → dimerizacija ob prisotnosti liganda
- Ligand ima pri določenih receptorjih strukturno povezovalno vlogo
- Pride do fosforilacije tirozinov v kinazni domeni
- Povezava s signalnimi molekulami



Vir slike: Y. Qi: Receptor tyrosine kinases in breast cancer treatment: unraveling the potential. *American Journal of Cancer Research*. 2024, 14(9), str. 4172–4196.



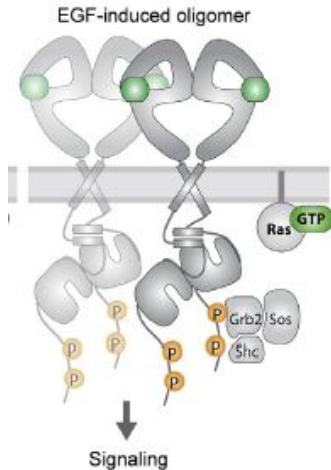
Vir slike: M. A. Lemmon, J. Schlessinger: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010, 141(7), str. 1117–1134.



Vir slike: E. M. Bublil, Y. Yarden: The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007, 19, str. 124–134.

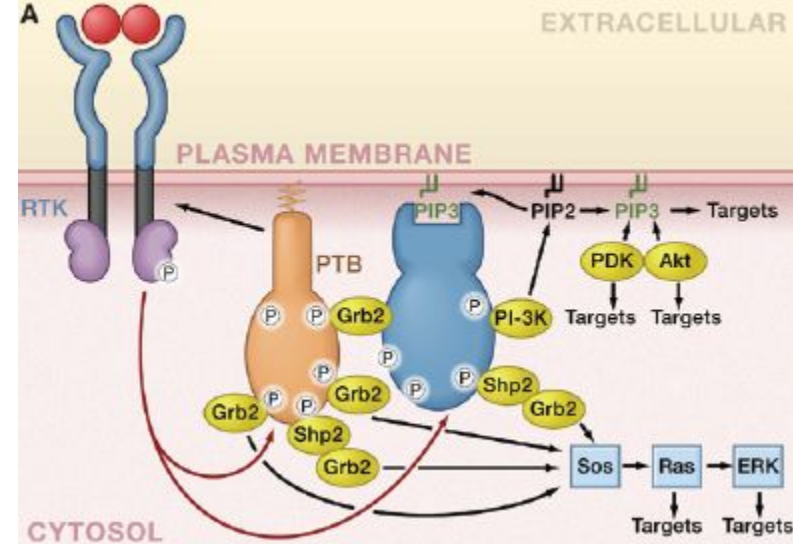
Signalne poti

- Vezava receptorjev in substratnih proteinov z tirozin kinaznimi domenami
- SH2 in PTB domene na proteinih
- PI3K/AKT/mTOR kaskada
- Ras/Raf/MEK/ERK kaskada

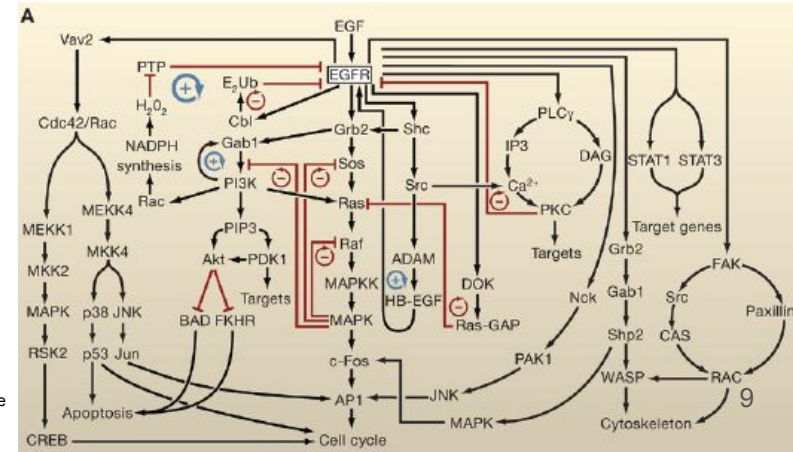


Vir slike: R. Trenker, N. Jura: Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Current Opinion in Cell Biology*. 2020, 63, str. 174–185.

Vir slike: M. A. Lemmon, J. Schlessinger: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010, 141(7), str. 1117–1134.

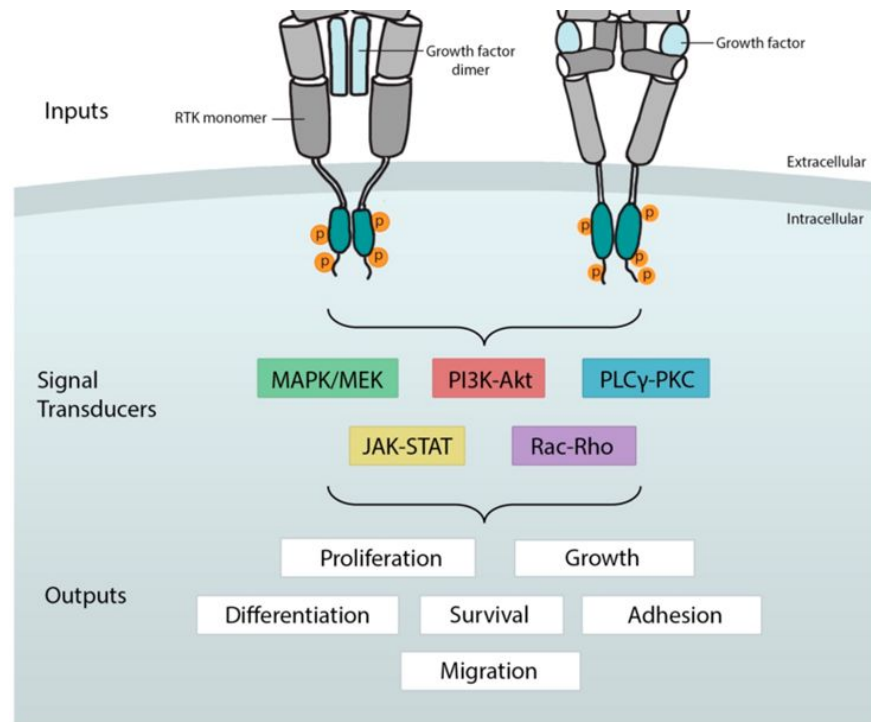


Vir slike: M. A. Lemmon, J. Schlessinger: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010, 141(7), str. 1117–1134.



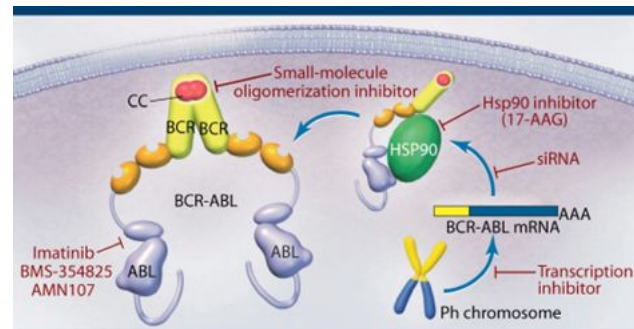
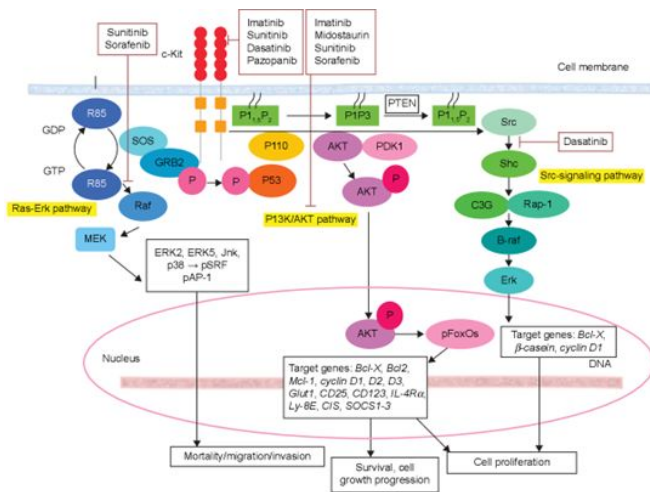
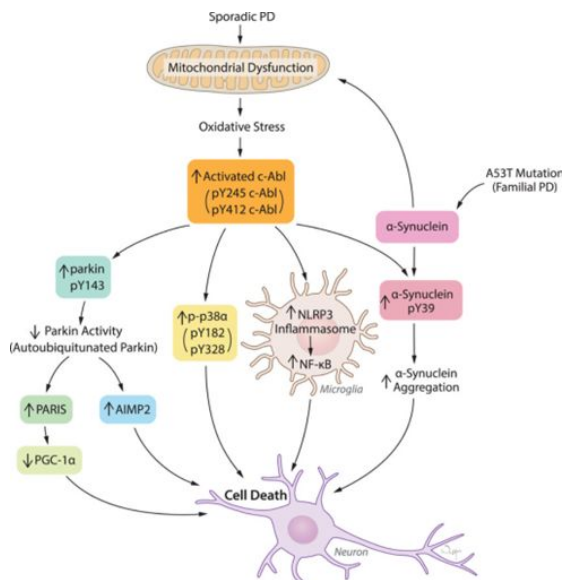
Fiziološka vloga tirozin kinaz

- Ključni prenašalci signalov za rast, diferenciacijo, presnovo, imunski odziv in razvoj tkiv.
- Aktivacija prek receptorjev: EGFR, FGFR, PDGFR, IGF-1R.
- V imunskem sistemu omogočajo aktivacijo T- in B-limfocitov.
- V živčevju omogočajo nevroplastičnost prek Trk receptorjev in Src kinaz.
- Prisotni tudi v žilnem in mišičnem razvoju.



Patološka vloga tirozin kinaz

- Nenadzorovana aktivacija zaradi mutacij, fuzij genov, amplifikacij.
- Povezane z rakom: EGFR, BCR-ABL, HER2.
- Prisotne tudi pri srčno-žilnih, presnovnih, nevrodegenerativnih in avtoimunskih boleznih.
- Vključena JAK-STAT signalna pot.

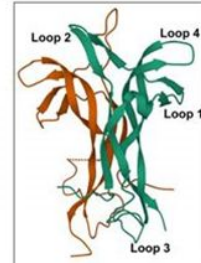
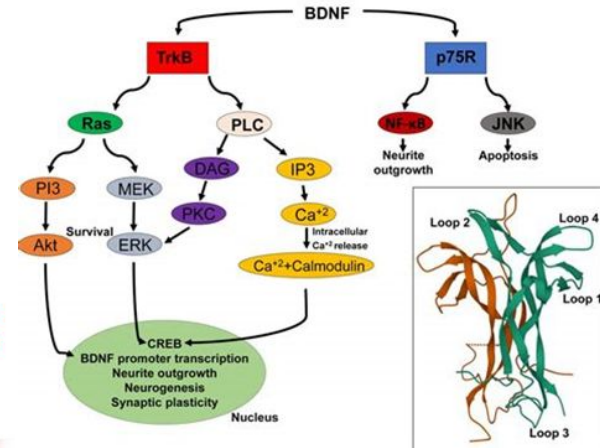
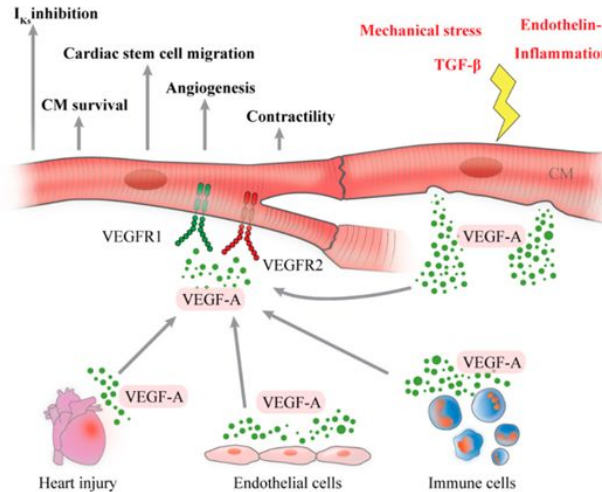
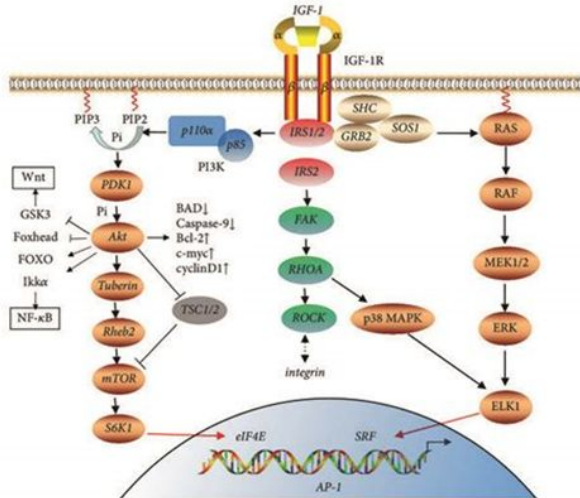


Therapeutic Targeting of Activated Fusion TK Proteins

Krause DS, Van Etten RA. *New Engl J Med* 2005;353(2):172-187. © 2005 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

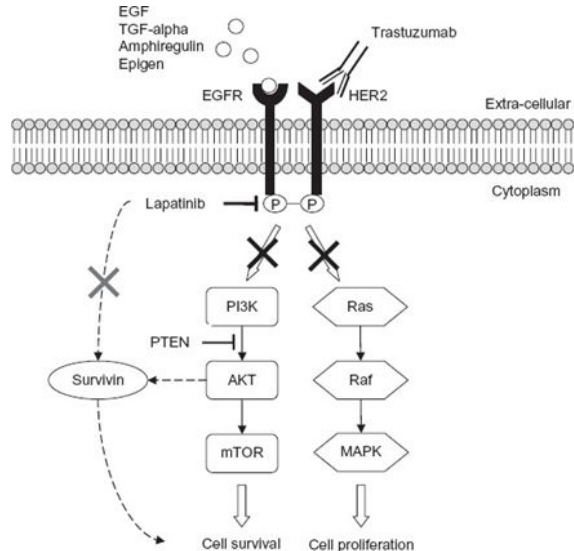
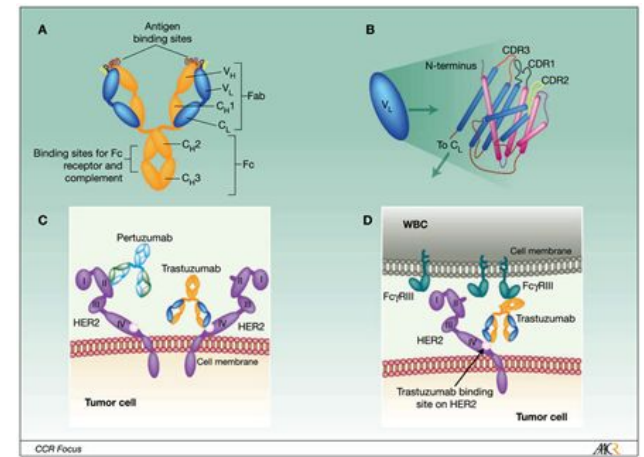
Koristne in zaščitne vloge tirozin kinaz pri obolenjih

- Pospešujejo regeneracijo po poškodbah – VEGFR, FGFR, Trk.
- TrkB/C receptorji varujejo nevrone, izboljšujejo spomin.
- JAK1–STAT3 pot ima tudi protivnetne učinke.
- IR in IGF-1R podpirata homeostazo in zaščito srca.

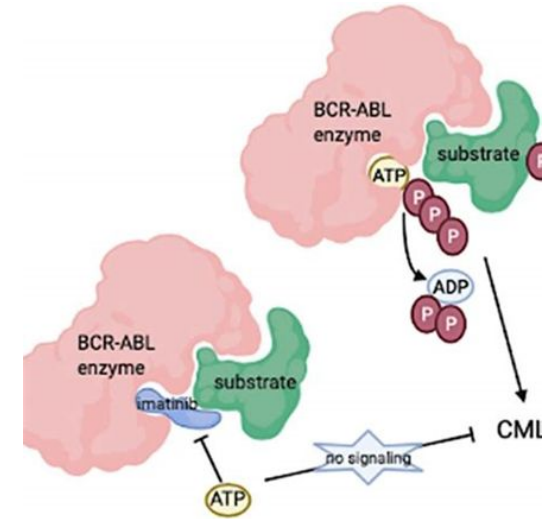
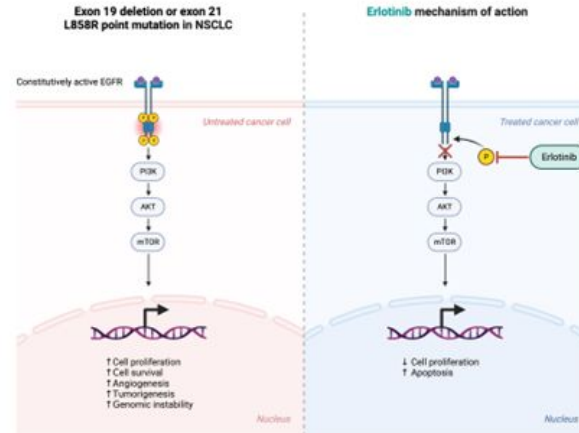


Terapevtski zaviralci tirozin kinaz

- Primeri: Imatinib, Erlotinib, Trastuzumab, Lapatinib.
- Specifično zavirajo signalne poti rakavih celic.
- Neželeni učinki zaradi vpliva na zdrava tkiva.
- Uporabljajo se reverzibilni, nepovratni zaviralci in protitelesa.

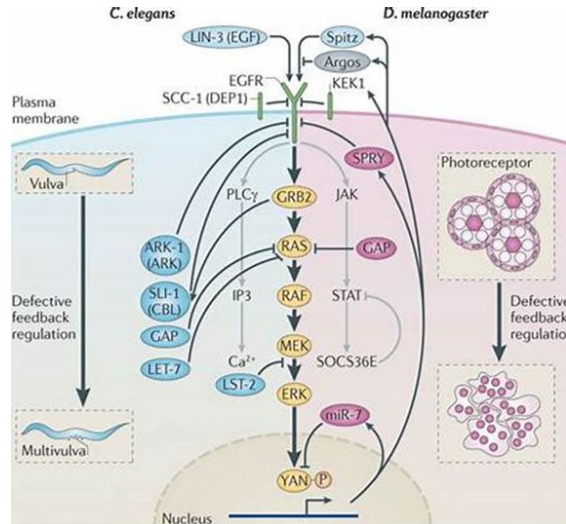


Erlotinib Mechanism of Action in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)

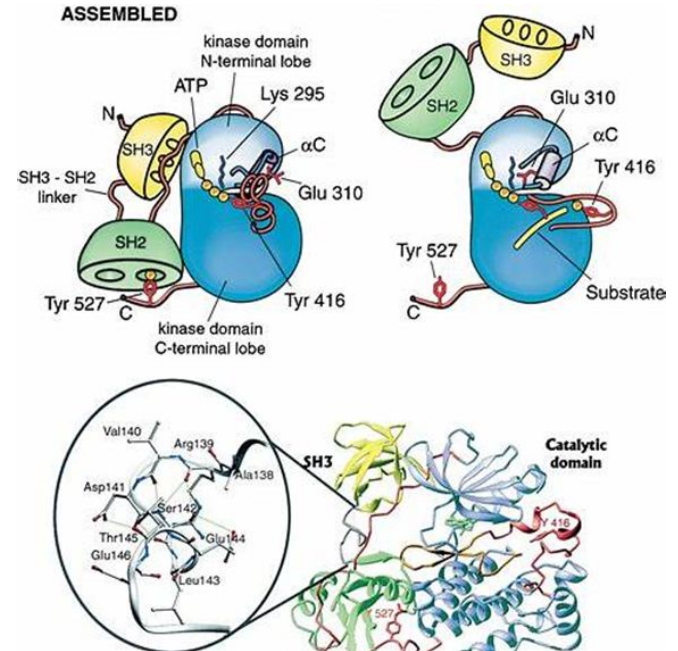


Evolucijski vidik tirozin kinaz

- TK prisotne le pri živalih, ne pri kvasovkah.
- Ohranjene strukturne domene (ATP-vezeče, SH2/SH3).
- Signalne poti podobne med vrstami (Ras/MAPK, PI3K).
- Modelni organizmi (miši, *Drosophila*) ključni za raziskave.

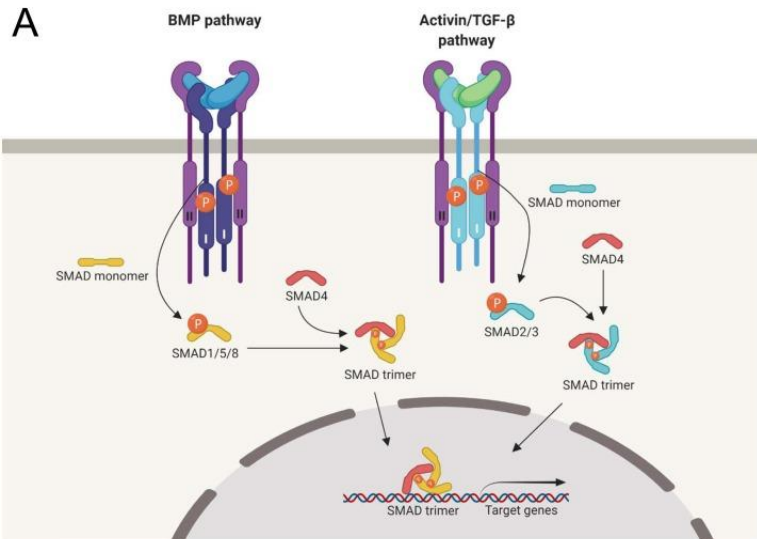


Nature Reviews | Molecular Cell Biol



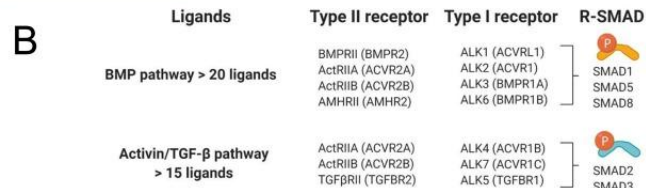
Receptorske serin/treonin kinaze (številka EC: 2.7.11.30)

- Signaliziranje z ligandi iz družine TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP, aktivini)
- V nadaljevanju podrobnejši opis signaliziranja, fiziologije in patologije: T β RII, T β RI, 3 izooblike TGF- β



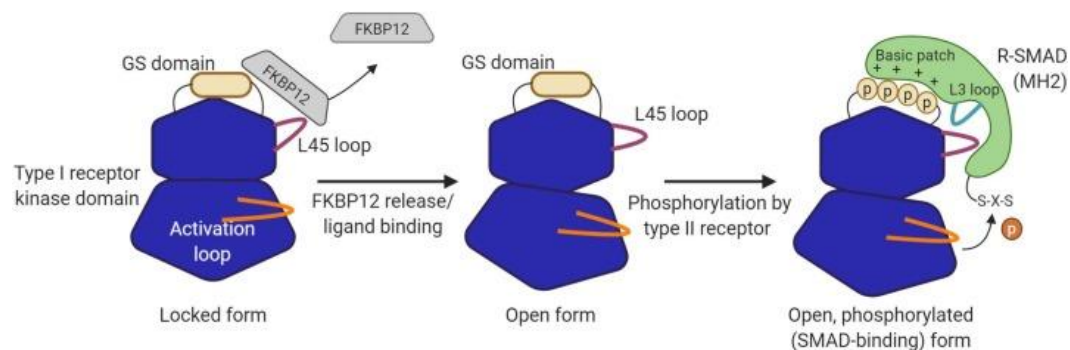
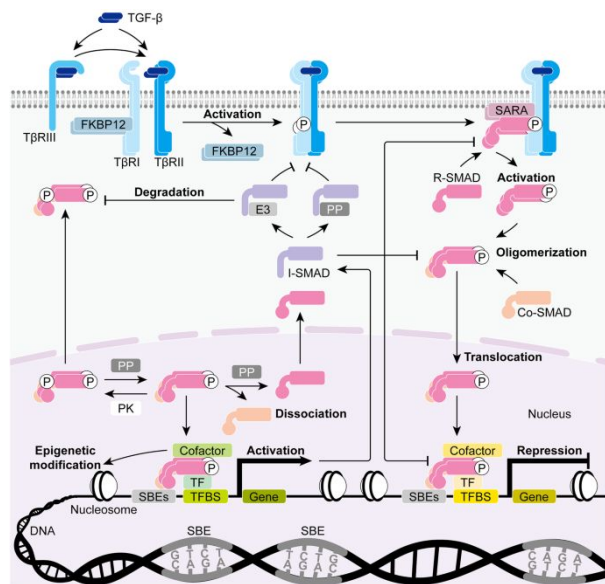
A: Splošna shema signaliziranja z ligandi iz družine TGF- β .

B: Delitev receptorjev tipa II, receptorjev tipa I in signalnih efektorjev.



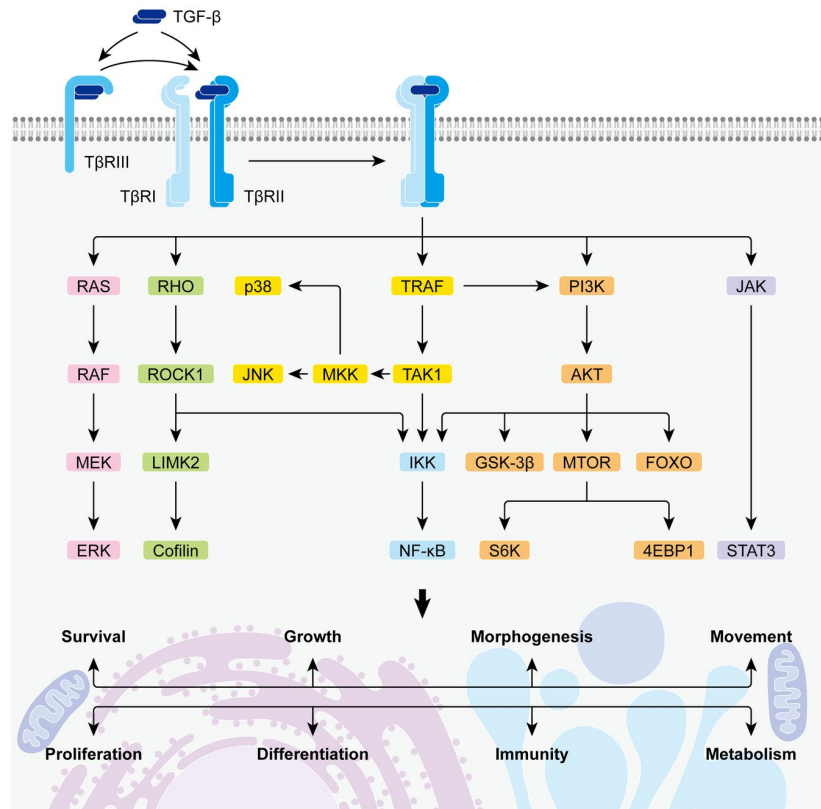
Signaliziranje s TGF- β na biokemijskem in strukturnem nivoju

- Kompleks 3 receptorjev: T β RII, T β RI (ALK5), T β RIII
- T β RII in T β RI sta receptorja z lastno encimsko aktivnostjo (serin/treonin kinazi; T β RII fosforilira več Ser in Thr na domeni GS v T β RI; T β RI fosforilira 2 Ser na domeni MH2 na C-končnem motivu SXS v SMAD2/3)
- T β RIII je koreceptor
- Kanonična in nekanonična pot signaliziranja



Aktivacija receptorja T β RI in R-SMAD (SMAD2/3).

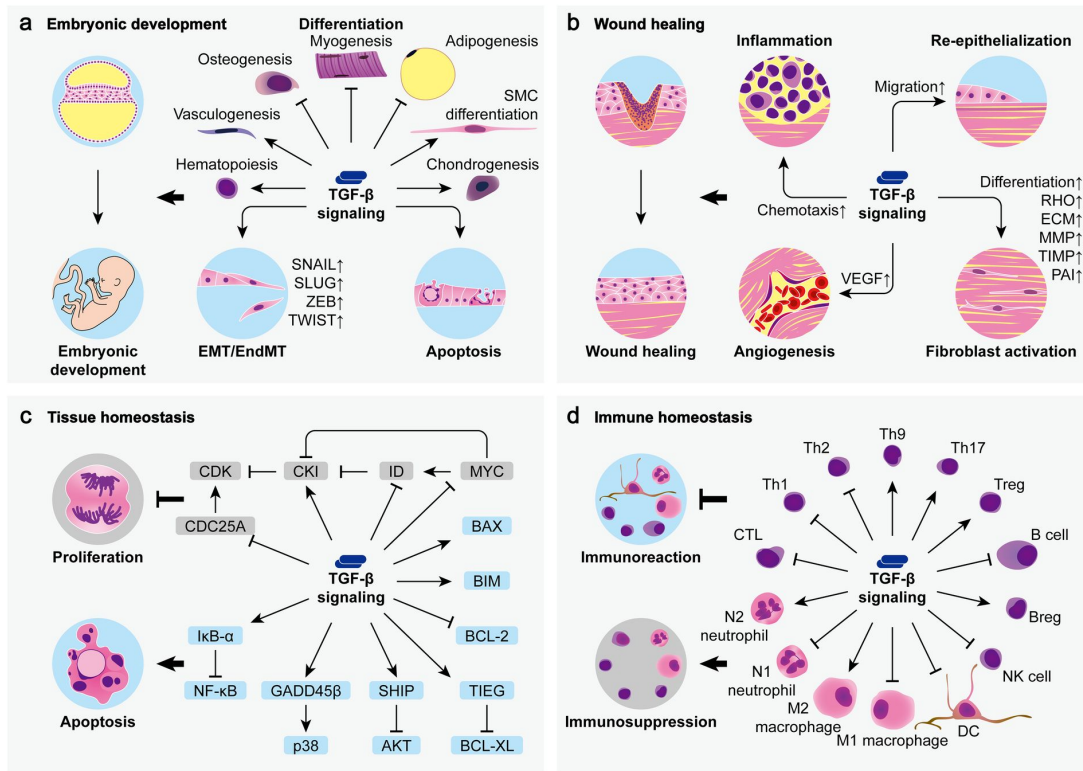
Kanonična pot signaliziranja s TGF β in regulacija signaliziranja.



Nekanonična pot signaliziranja s TGF- β .

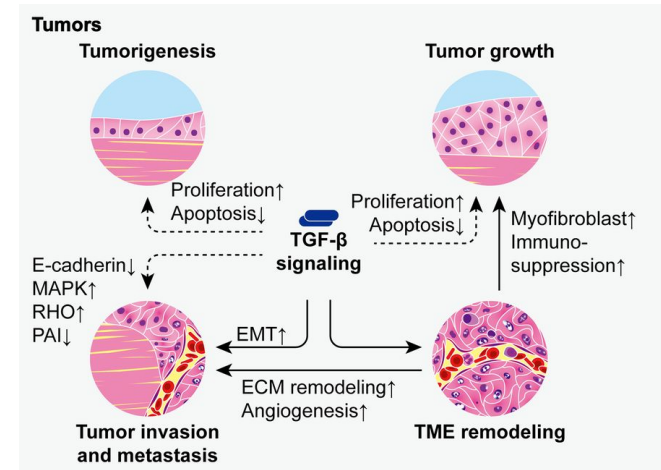
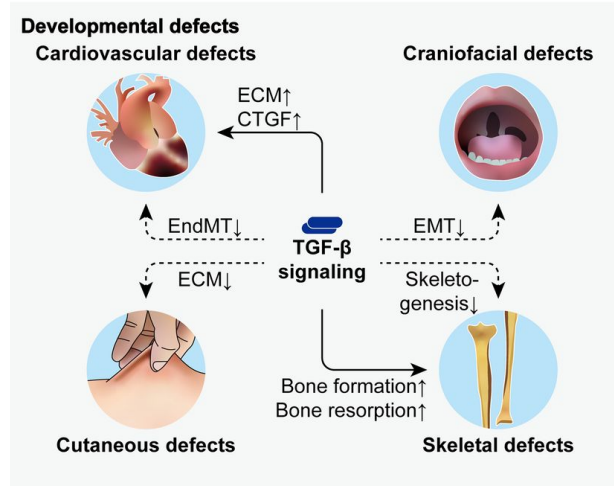
Fiziološki pomen signaliziranja s TGF- β

- Vloga pri številnih celičnih procesih, ključna vloga pri embrionalnem razvoju, celjenju ran, tkivni homeostazi, imunski homeostazi



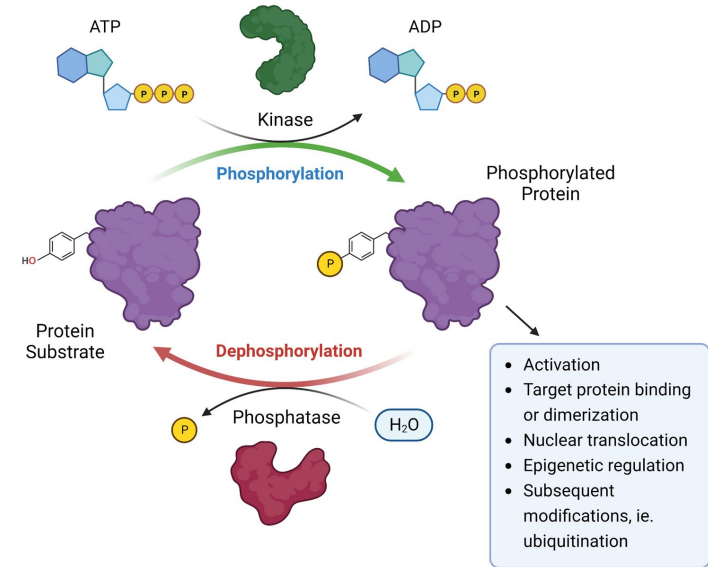
Patološki pomen signaliziranja s TGF- β

- Moteno signaliziranje $\Rightarrow$ patološki procesi (razvojne motnje, napake v celjenju ran, vnetne bolezni, infekcije, tumorji)
- Loeys-Dietzov sindrom $\Rightarrow$ prizadeti kardiovaskularni sistem, kraniofacialne strukture, skelet, koža
- Camurati-Engelmannova bolezen $\Rightarrow$ progresivna kostna displazija, hiperostoza in skleroza dolgih kosti
- Tumor supresor v zgodnjih fazah razvoja tumorja, v kasnejših fazah spodbuja širjenje tumorjev



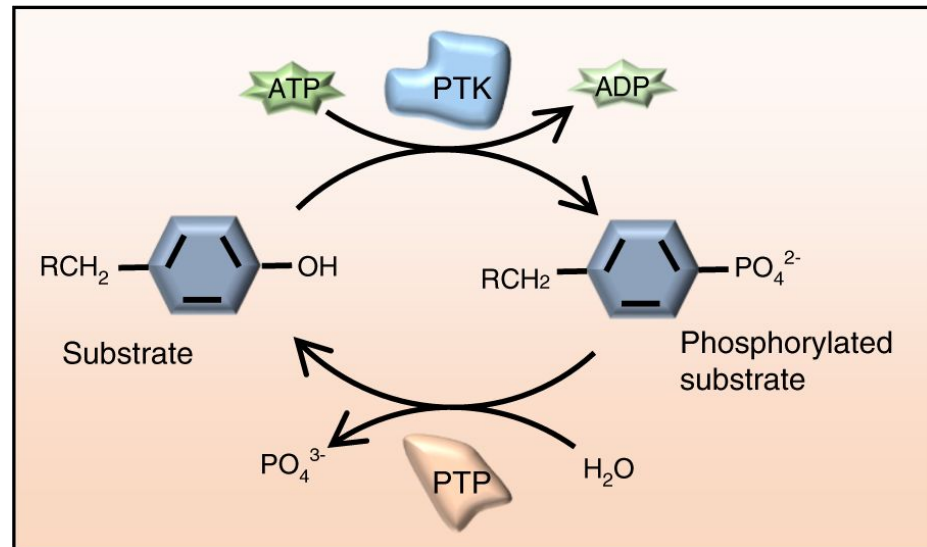
Receptorske tirozin fosfataze

- So skupina transmembranskih encimov, ki igrajo ključno vlogo pri uravnavanju celične signalizacije preko specifične odstranitve fosfatnih skupin na tarčnih proteinih
- Najbolj poznane so:
 1. CD45 (Cluster of Differentiation 45), oziroma PTPRC (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type C)
 2. PTPRA (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type A)
 3. PTPRM (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type M)
 4. DEP-1 (Density-Enhanced Phosphatase 1), znan tudi kot PTPRJ (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type J)



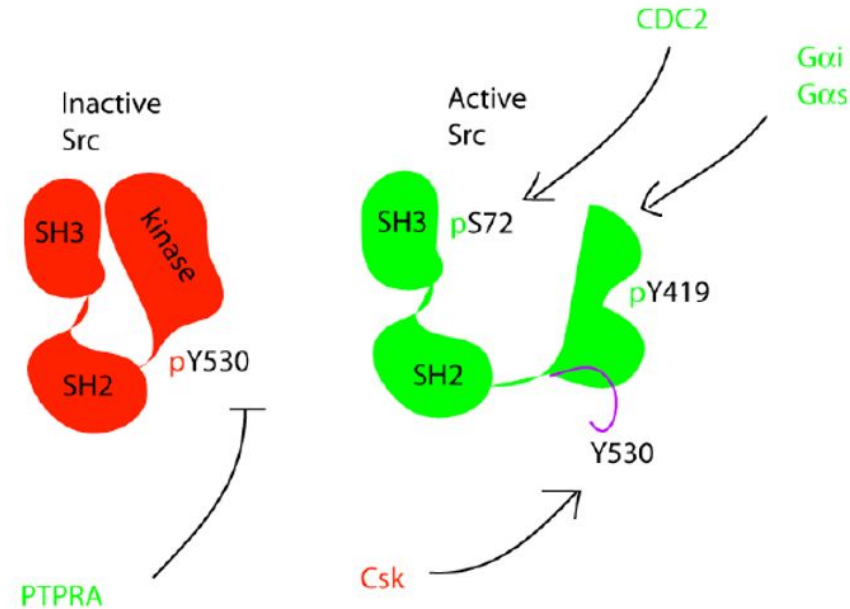
Biokemijski mehanizem delovanja

- Skupaj z receptorskimi tirozin-kinazami vzdržujejo ravnovesje med fosforilacijo in defosforilacijo in katalizirajo reakcijo odstranjevanja fosfatne skupine iz fosforiliranih tirozinskih ostankov
- Reakcija poteka v aktivnem mestu fosfatazne domene, kjer je cistein ključen za katalizo, ker mehanizem poteka vključuje nukleofilni napad cisteinskega ostanka, natančneje tiolatnega iona v aktivnem mestu na fosforjev atom fosfo-tirozina
- Tvori se začasni intermediat, ko se fosfat veže na cisteinski ostanek in pride do hidrolize le-tega in molekula vode sprosti fosfatni ion in obnovi aktivno mesto encima
- Dimerizacija, ki jo povzroči vezava liganda lahko pogosto inhibira katalitično aktivnost, obratno kot pri receptorskih tirozin kinazah

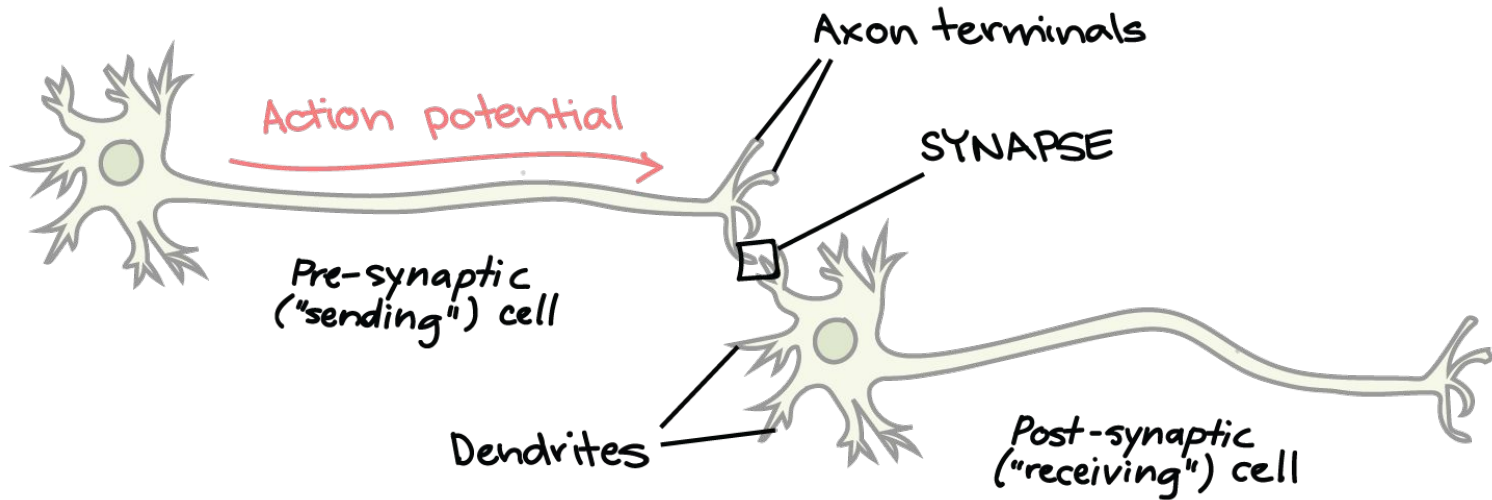


Fiziološke vloge pri razvoju, signalizaciji in uravnavanju imunskega odziva

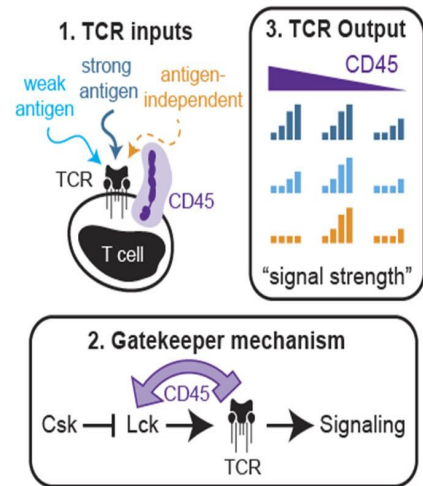
- Glavne fiziološke vloge receptorskih tirozin fosfataz so regulacija celične rasti in proliferacije
- Poleg omenjenega DEP-1 je npr. PTPRA s svojo aktivacijo kinaz družine Src pomemben za pravilen razvoj in delovanje živčnih celic
- Regulira nevrite (izrastke)
- Src-kinaze so tudi pomembne pri preoblikovanju citoskeleta in adheziji na ekstracelularni matriks, s čimer tudi vpliva na stabilnost tkiv
- RTP so ključne pri embrionalnem razvoju in tkivni diferenciaciji s kontrolo signalnih poti, povezanih z razvojnimi procesi



- PTPRM vpliva na nevrolški razvoj, še posebej na oblikovanje sinaps in rast aksonov, s svojim uravnavanjem stabilnosti interakcij med kadherini
- omogoča začetno vzpostavitev stika med presinaptično in postsinaptično membrano
- S fosfatazno aktivnostjo prav tako regulira fosforilacijsko stanje proteinov, kar neposredno vpliva na strukturno stabilnost sinaps
- S prilagajanjem fosforilacije proteinov, kot so aktin-vezavni in regulacijski proteini citoskeleta tudi uravnava spremembe le-tega, potrebne za razvejanost aksonov

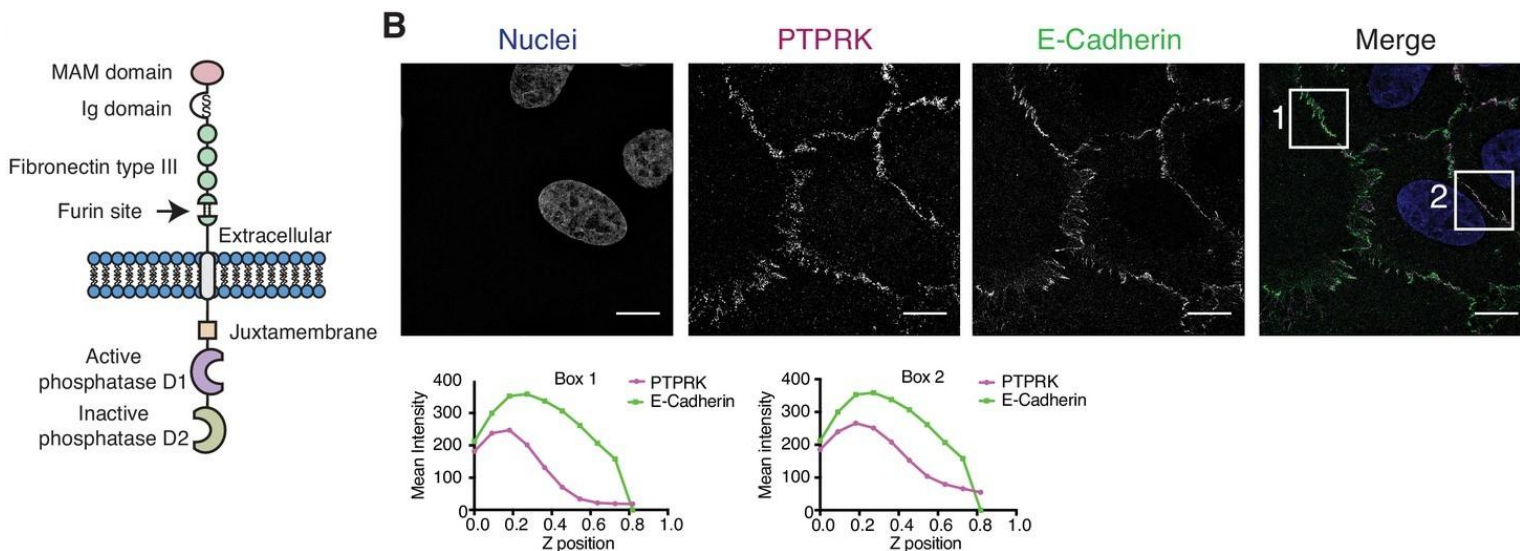


- so regulatorji imunskih celic, predvsem limfocitov, kjer usmerjajo odziv na antigene in aktivacijo
- CD45 je ena najpomembnejših fosfataz v imunskem sistemu, ki je izražena izključno na površini levkocitov
- Ob vezavi antigena na TCR odstrani fosfat z inhibitornih mest, kar omogoči aktivacijo Lck
- Aktivirana Lck fosforilira ITAM motive CD3 kompleksa in posledično aktivira kinazo ZAP-70 in nadaljnjo signalno kaskado
- Podobno omogoči aktivacijo in sprožitev signalne kaskade v B-celicah z defosforilacijo inhibitornih mest na Src kinazah, kot je Lyn
- Regulira tudi druge imunske celice, pri NK celicah sodeluje v regulaciji citotoksičnosti, v makrofagih in dendritičnih celicah pa vpliva na signalne poti, ki so vključene v fagocitozo

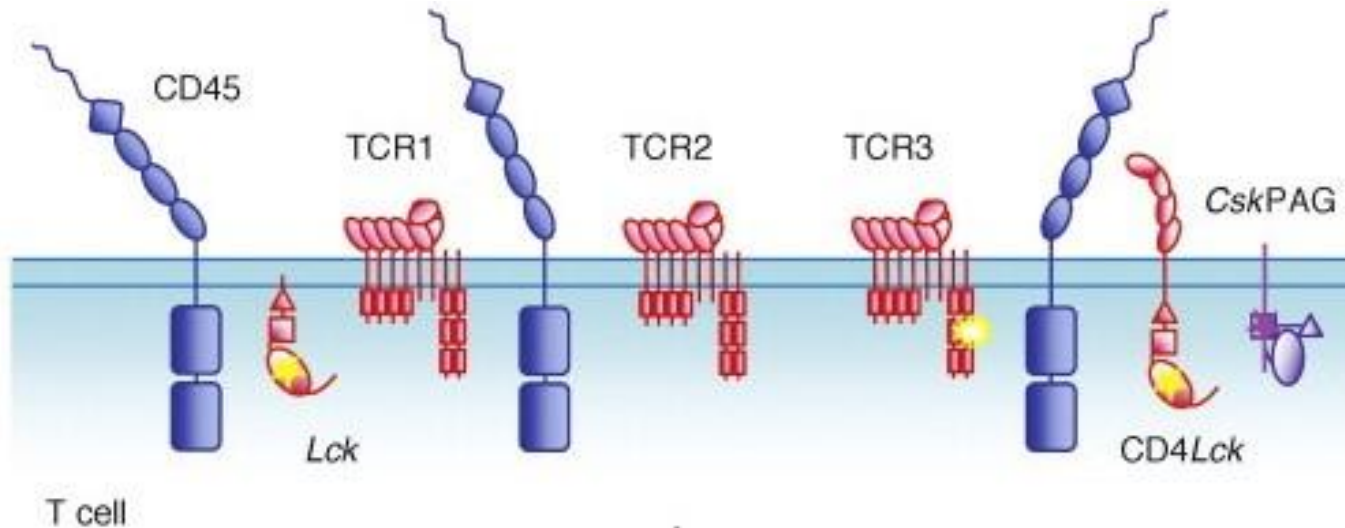


Patološke posledice nepravilnega delovanja

- Receptorske tirozin fosfataze imajo pogosto vlogo tumorsupresorskih proteinov. Izguba njihove aktivnosti (z mutacijami, delecijami ali epigenetskim utišanjem) vodi v prekomerno aktivnost receptorskih tirozin kinaz
- EGFR, PDGFR, ki ostanejo fosforilirane in signalizirajo neomejeno rast
- PTPRM, PTPRK sodelujejo pri celični adheziji, stabilizaciji adhezijskih kompleksov in izguba njihove funkcije oslabi stike in posledično celice lažje invadirajo okoliško tkivo



- imajo ključno vlogo pri pravilnem uravnavanju imunskega odziva
- Zmanjšanje njihove aktivnosti vodi v nepravilno aktivacijo imunskih celic in povzroči razvoj avtoimunih bolezni
- Če Lck ostane fosforiliran na zaviralnih mestih nadaljna signalizacija ne steče, in lahko se pojavi imunska anergija
- prekomerna aktivnost CD45 tudi sproži avtoimune bolezni, ker pretirana defosforilacija sproži hiperaktivacijo Src-kinaz in izrazito aktivacijo T- in B-celic
- celice napadajo lastne antigene in lahko se pojavi multipla skleroza ali sladkorna bolezen



Strukturna organizacija receptorskih tirozin fosfataz in njen pomen za signalno regulacijo

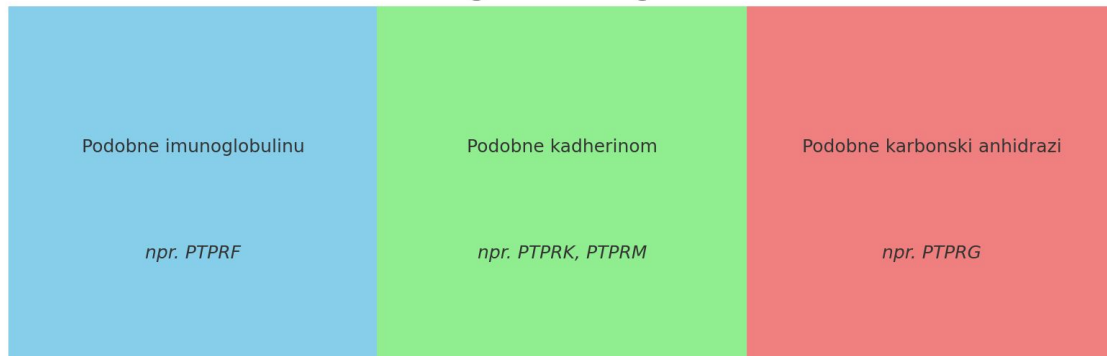
So integralni membranski proteini iz več funkcionalnih domen, ki določajo substratno specifičnost in interakcije z drugimi molekulami v celici

Zunajcelična domena je odgovorna za vezavo ligandov, interakcije med celicami in zunajceličnim matriksom in regulacijo aktivnosti v notranjosti celice

Dimerizacija zunajceličnih domen lahko povzroči inhibicijo fosfatazne aktivnosti s sterično oviranostjo aktivnih mest in nekatere (npr. CD45) so regulirane s konformacijskimi spremembami te domene

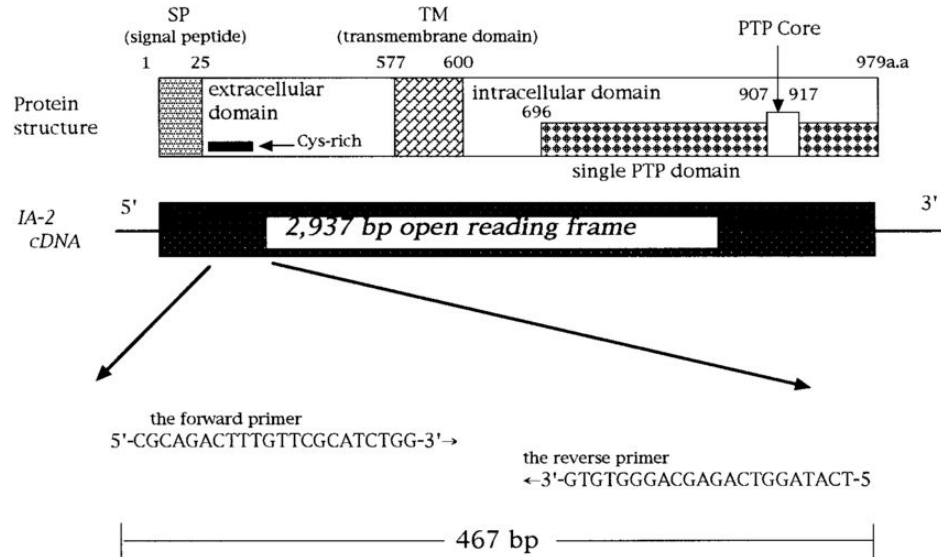
Struktura domene določa delitev RTP v različne podrazrede

Razvrstitev RTP glede na zgradbo ektodomen



Zunajcelična domena (ektodomena) in transmembranska domena

- Vloga domen je prepoznavanje specifičnih ligandov in regulacija encimske aktivnosti preko oligomerizacije in interakcij z ligandi
- domena je velikokrat tudi močno glikozilirana, saj glikani stabilizirajo strukturo, povečajo topnost in sodelujejo pri prepoznavanju specifičnih ligandov in receptorjev
- Transmembranska domena omogoča prenos signala iz zunajcelične v znotrajcelično regijo
- Gre za hidrofobno alfa-vijačnico, dolgo 15 do 25 aminokislin, bogato z nepolarnimi levcini, izolevcini, valini in alanini
- Vključuje specifične motive za dimerizacijo in omogoča vpetost v membrano in prenos signala iz zunajcelične v znotrajcelično regijo



Znotrajcelična (citoplazemska) katalitična domena

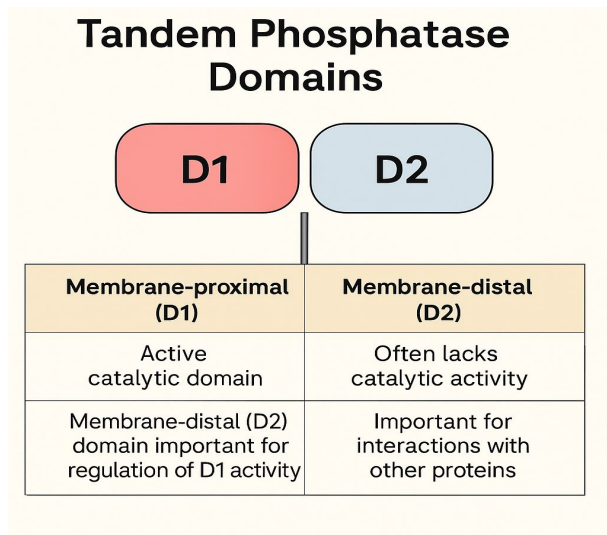
izvaja fosforilacijo tirozinskih ostankov na tarčnih proteinih ali na samem receptorju (avtofosforilacija)

Ta domena je odgovorna za prenos fosfatne skupine z ATP na hidroksilno skupino tirozina in opravlja ključno encimsko funkcijo odstranjevanja fosfatnih skupin

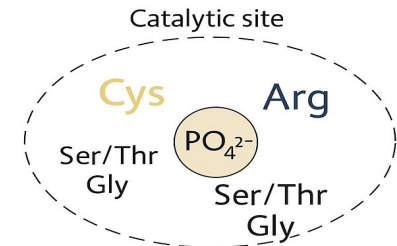
Citoplazemska regija vsebuje proteinsko tirozin fosfatazno (PTP) domeno, ki katalizira hidrolizo fosfoesterske vezi na fosfotirozinu

Aktivno mesto vsebuje cisteinski ostanek, argininski ostanek in ostanke, ki stabilizirajo prehodno stanje (serin, treonin, glicin)

Večina RTP ima dve katalitični domeni (tandemski fosfatazni domeni)

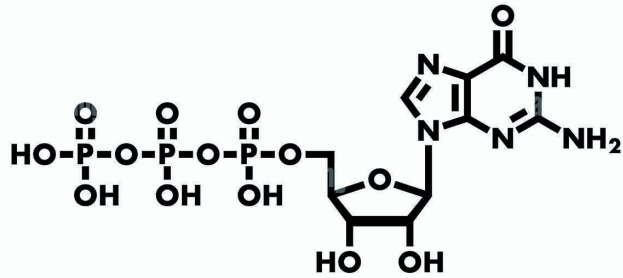


nino acid residue	Functional role
 Cysteine	Nucleophilie for catalysis
 Arginine	Binding phosphate group
Serine, threonine, glycine	Stabilizing transition state



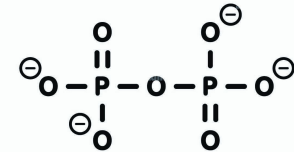
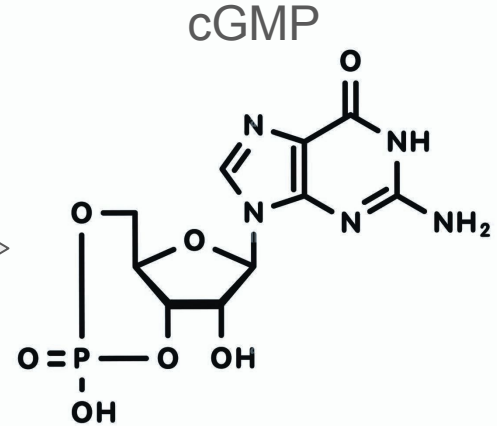
Gvanilil ciklaze

EC 4.6.1.2 - GTP difosfat liaze



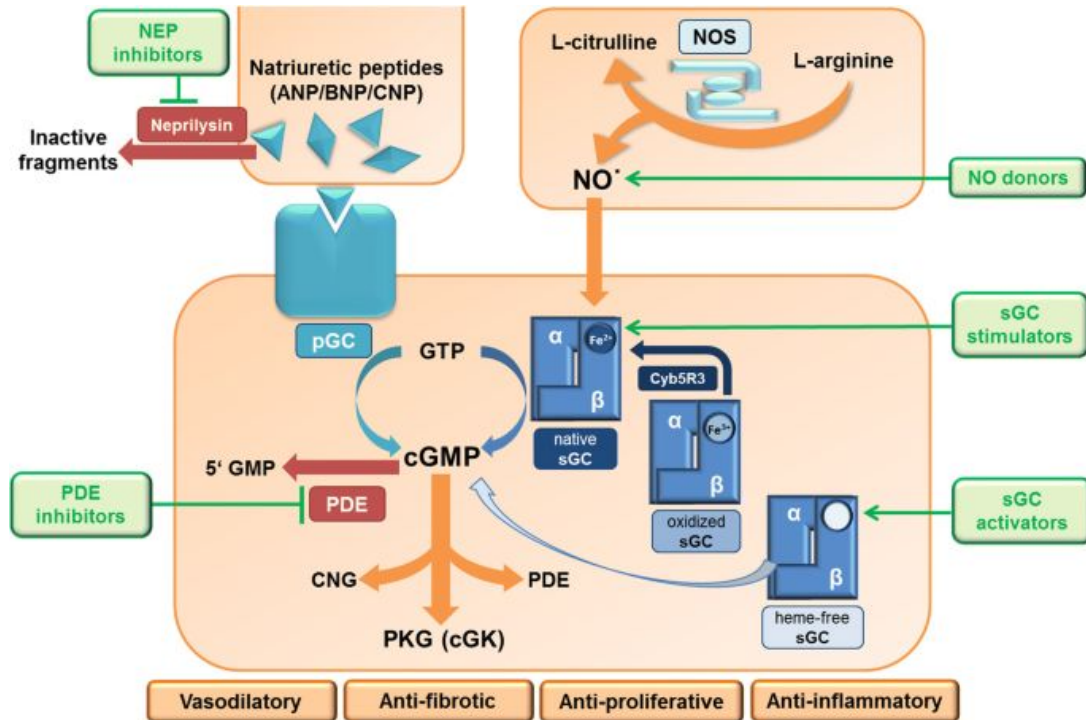
GTP

EC 4.6.1.2



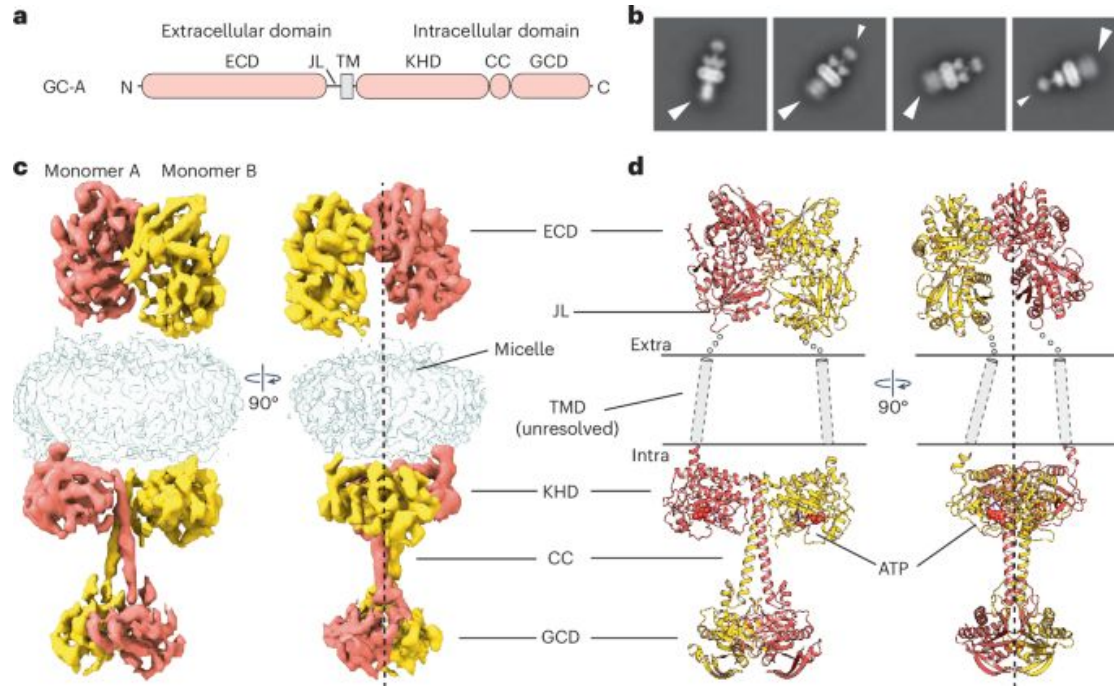
PPi

cGMP služi kot sekundarni prenašalec



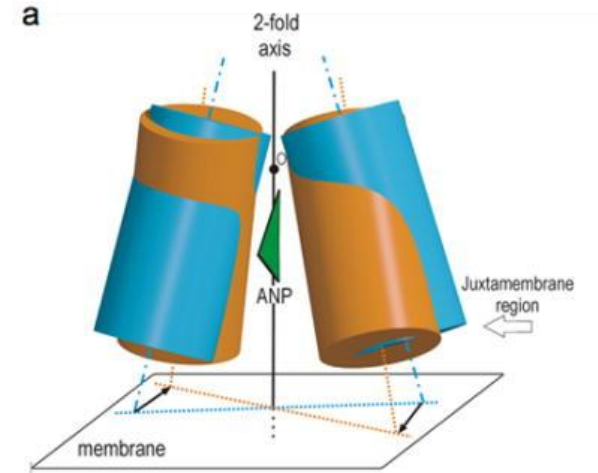
- cGMP znižuje krvni tlak,
- zavira proliferacijo in
- deluje protiinflamatorno

Struktura GC



S. Liu, A. M. Payne, J. Wang, L. Zhu, N. Paknejad, E. T. Eng, W. Liu, Y. Miao, R. K. Hite, X. Y. Huang: Architecture and activation of single-pass transmembrane receptor guanylyl cyclase. *Nature Structural & Molecular Biology* 2024 32:3 2024, 32, 469–478.

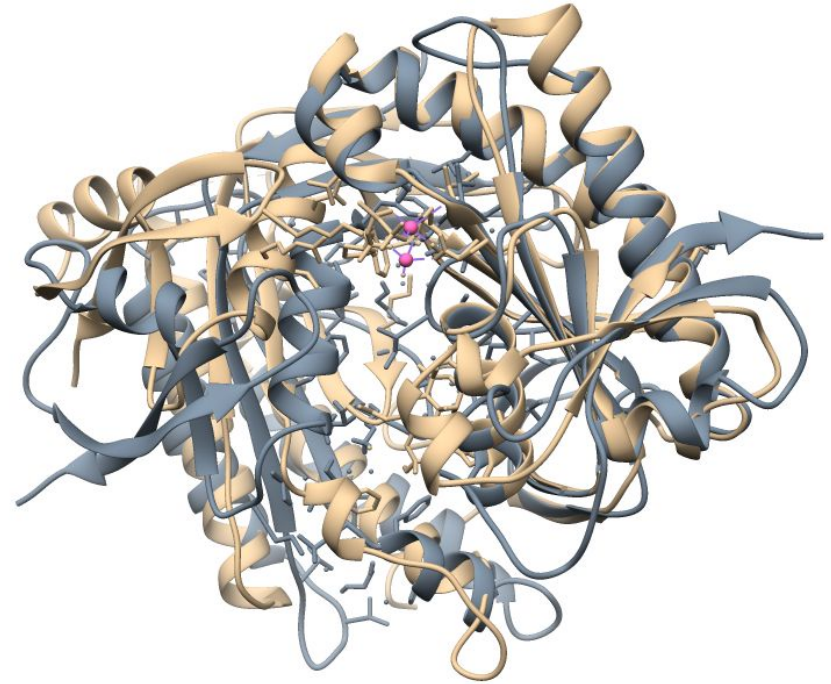
Vezava povzroči konformacijsko spremembo, ki se prevede preko linkerske regije.



K. S. Misono, J. S. Philo, T. Arakawa, C. M. Ogata, Y. Qiu, H. Ogawa, H. S. Young: Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J* 2011, 278, 1818–1829.

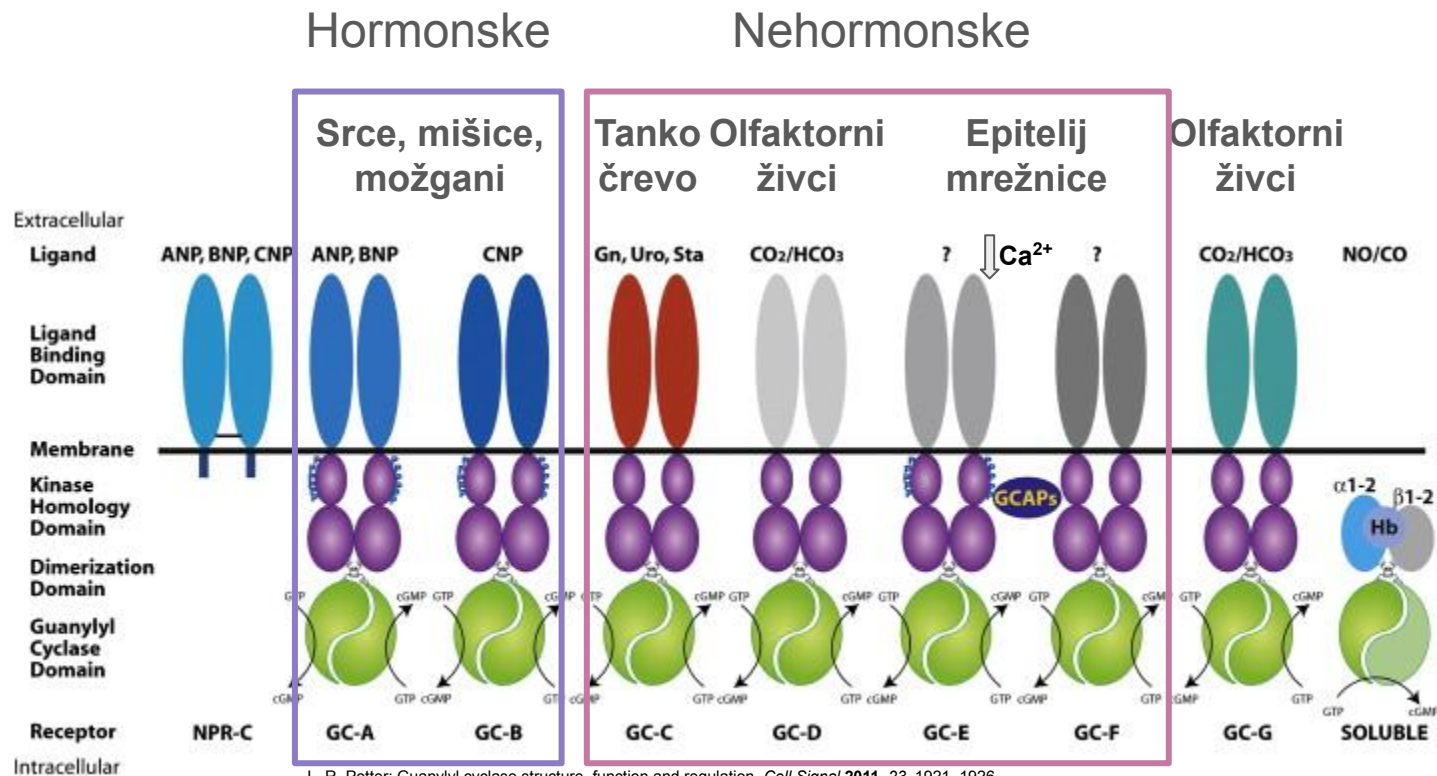
Evolucija GC

- Adenilat ciklaze in gvanilat ciklaze so si podobne.
- Spremembe opazimo predvsem v aktivnem mestu (drug ligand)
- Poznamo organizme, ki uporabljajo le cAMP in ne cGMP



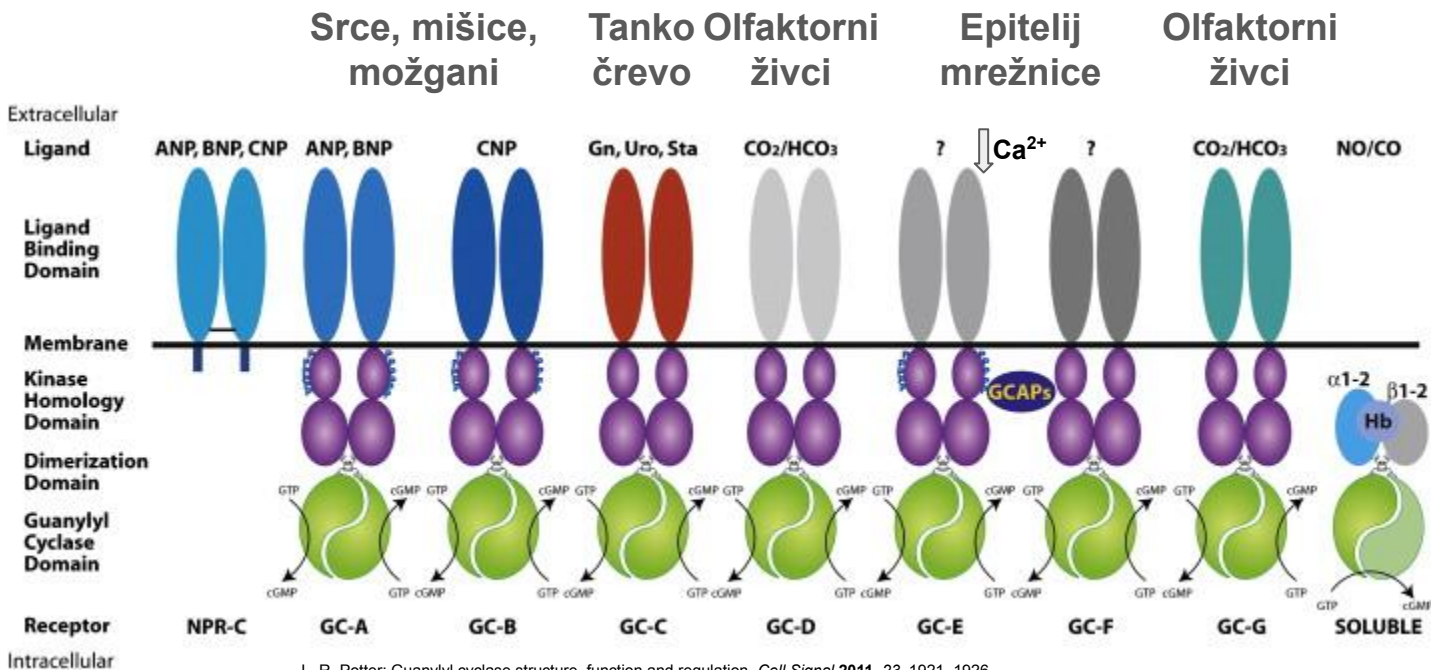
Gvanilat ciklaza (pdb: 4NI2) (sivo)
Adenilat ciklaza (pdb: 1CJU) (svetlo)
Mg²⁺ (roza)

Gvanilil ciklaze se izražajo tkivno specifično ter imajo izoformam specifične ligande



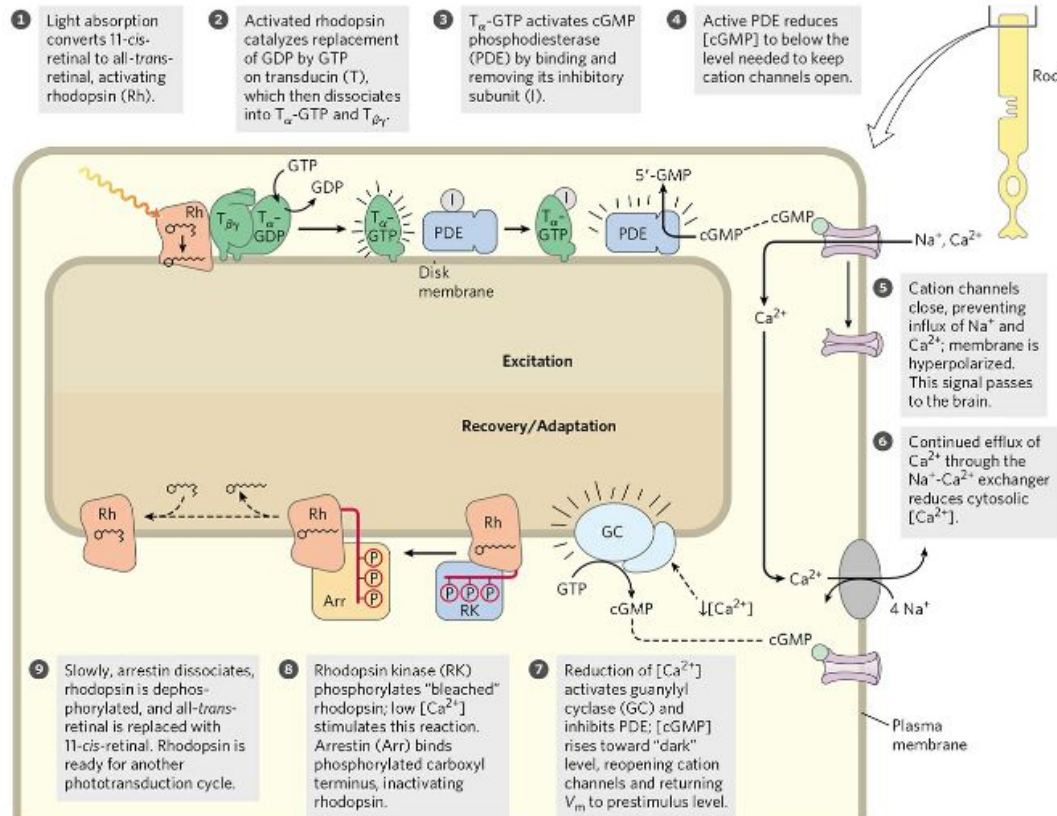
L. R. Potter: Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 2011, 23, 1921–1926.

Gvanilil ciklaze se izražajo tkivno specifično ter imajo izoformam specifične ligande



L. R. Potter: Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 2011, 23, 1921–1926.

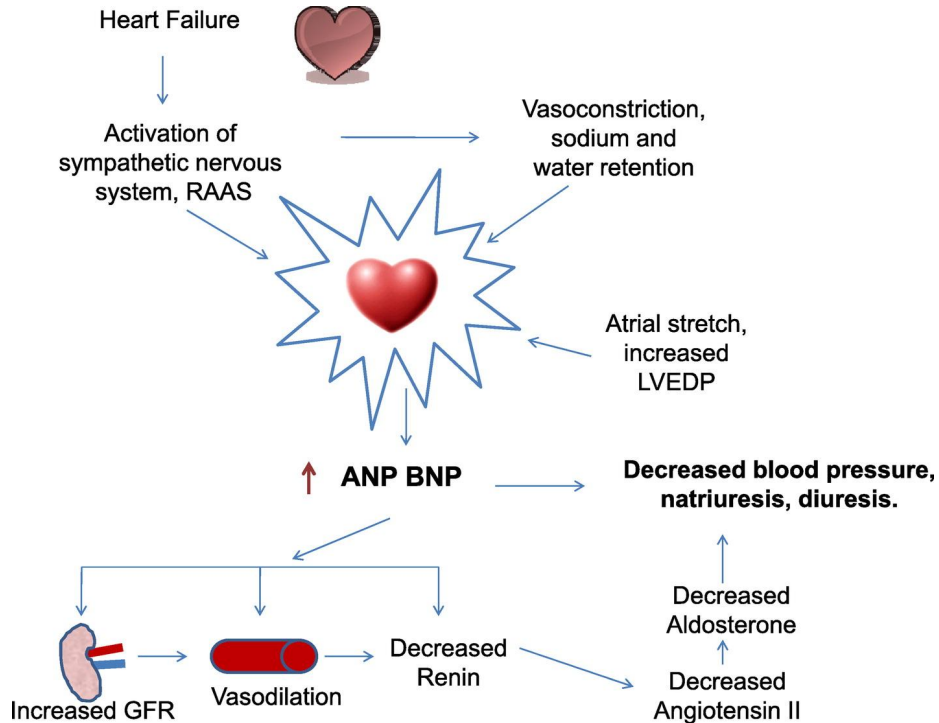
Fotodetekcija - vloga gvanilat ciklaz



GC-E deluje od Ca²⁺ odvisno

Znižana koncentracija Ca²⁺ jo aktivira, začne se produkcija cGMP, Na⁺-K⁺ se odprejo, celica se ponovno polarizira

Detekcija pešanja srca - ANP/BNP



Triage BNP Test (CLIA waived)
<https://www.cliawaived.com/triage-bnp-test-clia-waived.html> (accessed May 12, 2025).

Hvala za vašo pozornost!