

Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo

Seminar pri predmetu Biološke membrane

Študijsko leto 2024/2025

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

UVOD

Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo so katalitično aktivni receptorji. Predstavili bomo 4 skupine teh receptorjev, in sicer tirozin kinazne receptorje, receptorske serin/treonin kinaze, membranske gvanilat ciklaze in receptorske tirozin fosfataze.

Martin-TIROZIN KINAZNI RECEPTORJI (DELITEV, STRUKTURA, SIGNALIZACIJA)

UVOD

Tirozin kinazni receptorji (TKR) so transmembranski proteini ki se nahajajo na raznih tipih celic. Ob vezavi liganda se v receptorjih pojavijo strukturne spremembe preko katerih se lahko sprožijo signalne kaskade [1]. Več različnih ligandov lahko interagira z istim receptorjem a sprožijo različne signalne poti znotraj celice [2]. Receptorji sodelujejo pri spremembah metabolizma, ohranitvi homeostaze, proliferaciji in diferenciaciji celic,... Zaradi svoje vloge komunikacije med celicami ter med celicami in okoljem so ključnega pomena pri pojavu določenih obolenj (pr. rak) in so pomembna tarča terapevtikov [1]–[4].

DELITEV

Človeški genom vsebuje zapis za 518 kinaz kar predstavlja 1,7% celotnega genoma. Največji delež jih spada med tirozin kinaze ki se delijo na kinazne receptorje in nereceptorje [5]. Med TKR spada 58 receptorjev ki so porazdeljeni med 20 poddružin. Med te skupine receptorjev spadajo EGFR, FGFR, IGFR, VEGFR, HGFR, PDGFR, RET,...[1],[5],[6].

ErbB

ErbB je družina tirozin kinaz med katere spadajo EGFR/ErbB1 HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 in HER4/ErbB4. Vsi lahko tvorijo homo- ali heterodimere. Med njihove ligande spadajo EGF (epidermalni rastni faktor), TGF α (transformirajoč rastni faktor α), betacelulin in mnogi drugi. Med pomembnejše spada NRG1 (neuregilin 1) ki se veže na receptorje ErbB2 in ErbB3. Receptorji sprožijo signale ki spodbudijo proliferacijo celic, diferenciacijo in angiogenezo. Če signalizacija pr. NRG1 preneha potekati to privede do cel. smrti motoričnih in senzoričnih nevronov. Receptorji so ključnega pomena pri tumorigenezi [6].

Ko se ligand veže z ErbB1 in ErbB4 receptorjema se ta dimerizirata in sprožita signalne kaskade. Sta avtonomna. ErbB2 in ErbB3 pa nista. ErbB2/HER2 se veže z drugimi receptorji te skupine v heterodimere. ErbB3 sam po sebi nima kinazne aktivnosti in se tudi veže s ostalimi ErbB receptorji. Pogosto je prisoten ErbB3/ErbB2 dimer [7].

FGFR – RECEPTORJI FIBROBLASTNIH RASTNIH FAKTORJEV

Ti receptorji se delijo na dva razreda: visoko afinitetne in nizko afinitetne. Med visoko afinitetne spadajo FGFR1, FGFR2, FGFR3 in FGFR4. Ob prisotnosti FGF (fibroblastni rastni faktor) liganda dimerizirajo a je polna aktivacija dosežena samo ob vezavi heparina. Nizkoafinitetni razred predstavljajo HSPG vezavna mesta (heparan sulfat proteoglikanske molekule) za FGF ligande na celični površini. Ti pomagajo pri odzivu

celice na ta signal. Receptorji imajo na ekstracelularni strani tri imunoglobulinu podobne domene: D1, D2 in D3 [6].

FGF ligandi delujejo parakrino, avtokrino in endokrino. Tisti ki delujejo parakrino in avtokrino imajo visoko afiniteto do heparan sulfata, endokrini pa imajo manjšo. Zato lahko endokrini FGF-ji potujejo skozi krvni obtok [2].

PDGFR – RECEPTORJI TROMBOCITNIH RASTNIH FAKTORJEV

V PDGFR družino spadajo receptorji PDGFR-A, -B, -C in -D. Lahko tvorijo homo- ali heterodimere. Samo slednji konstrukti so aktivni. Receptorji imajo na ekstracelularni strani pet imunoglobulinu podobnih domen in na intercelularni tirozin kinazno domeno ki jo deli 100 aminokislin. PDGFR receptor kodirata 2 gena: PDGFR- α in PDGFR- β . Pri dimerizaciji so tako možne tri konfiguracije: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$. Vsi so aktivirani s dimernim ligandom (PDGF-A in/ali PDGF-B) [6].

Koekspresija PDGFR in njegovih ligandov je pogosta pri astrocitnih možganskih tumorjih in glioblastomah. V to družino spada tudi receptor Kit. Je izražen v kostnem mozgu in melanocitih [6].

STRUKTURA

Kljub velikem številu TKR ter raznolikosti v njihovih vlogah imajo receptorji podobno glavno strukturo. Njihov N-konec je ekstracelularna domena ki se lahko zelo razlikuje med receptorji saj se nanjo vežejo razni ligandi. Tu so prisotni raznovrstni motivi ki so ključni pri vezavi z ligandom kot levcinsko bogate domene, cisteinsko bogate domene, imunoglobulinu podobne domene ter tip III fibronektinske domene [1],[2].

C-konec receptorjev je intracelularna domena in je z ekstracelularno domeno povezana preko transmembrnaske domene. Se rahlo razlikuje med družinami receptorjev kar dodatno prispeva k specifičnosti celičnega signaliziranja. Znotraj celice se nahaja kinazna domena katere DNA sekvenca je med TKR receptorji zelo ohranjena [2],[4],[5]. Ta vsebuje tirozinske ostanke ki so ključni za nadaljnjo signalizacijo [1],[2],[5].

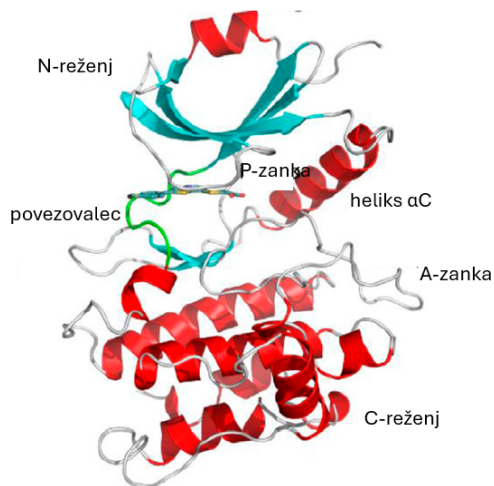
KINAZNA DOMENA IN FOSFORILACIJA

Kinazno domeno sestavlja več strukturnih elementov katerih skupna dolžina je okoli 300 aminokislinskih ostankov. Mednje spada petveržna β -ploskev in α heliks (α C) ki sta del N-režnja. Tu se nahaja glicinsko bogata zanka (P-zanka) ki stabilizira fosfatne skupine ATP ter Lys72 ki se veže z α in β fosfatnima skupinama ATP. α C heliks je ključen za tvorbo solnega mostička preko katerega se poveže v lizinom na β 3-verigi. To dodatno koordinira ATP ter sodeluje pri katalitični aktivnosti. N-reženj je povezan s večjim C-režnjem, ki ga sestavljajo heliksi, preko fleksibilnega povezovalca ki se poveže z ATP preko vodikovih vezi. ATP se poveže v konformaciji da sta γ -fosfat in hidroksilna skupina tirozina zelo blizu. Konformacijo omogoča aktivacijska zanka (A-zanka) [5],[8],[9].

A-zanka je del C-režnja. Regulira aktivnost domene glede na konformacijo. V nefosforilirani obliki interagira s ostanki katalitične zanke in blokira aktivno mesto. Tirozini se s vodikovo vezjo povežejo s katalitično zanko. Ob trans-avtofosforilaciji tirozina/tirozinov ko se receptorja dimerizirata pa se A-zanka odmakne od aktivnega mesta. Konformacijo dodatno stabilizirata še dva arginina, eden v A-zanki, drugi v

katalitični zanki. S tem omogoči vezavo substratov in prenos fosfatne skupine [5],[8],[9].

V C-reženj pride do vezave receptorja s substratnim proteinom, ki se veže preko Src homologne 2 domene (SH2) in fosfotirozin vezavne domene (PTB). Za prenos fosfatne skupine iz ATP na substrat sta ključna DFG (Asp-Phe-Gly) in HRD (His-Arg-Asp) motiva. Prvi se nahaja na A-zanki in sodeluje pri koordinaciji Mg^{2+} ionov ki dodatno koordinirajo ATP. Drugi pa je na katalitični zanki kjer asparagin (Asp) katalizira prenos fosfatne skupine iz ATP na substrat. Ob fosforilizaciji substrata se sprožijo Ras/MAPK, Raf/MEK/ERK in druge signalne kaskade [5],[8],[9].



Slika 1: Sekundarne strukture kinazne domene receptorja [9].

SIGNALIZACIJA

Pred vezavo liganda se TKR večinoma nahajajo na celični membrani v monomerni obliki. Nekateri so lahko tudi v oligomerni obliki kot inzulinski receptor in IGF-1 ($(\alpha\beta)_2$ oblika). Ob vezavi liganda pride do dimerizacije receptorja. Pojavi se kinazna aktivnost, ki fosforilizira intracelularni del receptorja, specifično tirozinske ostanke. Nanje se nato lahko vežejo adapterski proteini ki naprej sprožijo signalno pot v celici [1],[4],[10].

DIMERIZACIJA

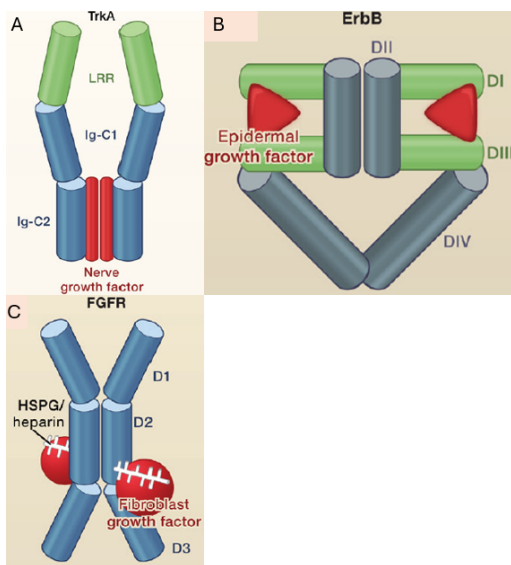
Mehanizem dimerizacije se aktivira na več načinov. Če se pojavi bivalentni ligand lahko ta interagira z dvema receptorskima molekulama in tvori dimer. Tu receptorski molekuli ne integrirata neposredno med seboj. Obstajajo pa tudi primeri kjer ligand ni potreben za dimerizacijo. Takrat se receptorski molekuli povežeta neposredno in se nato na novonastali kompleks lahko veže ligand. Večina TKR je sposobna obeh mehanizmov [10].

TrkA receptor je eden izmed receptorjev ki se lahko dimerizira preko liganda. Na zunajcelični strani se na vsakem receptorju nahajata dve imunoglobulinu podobni domeni, Ig-C1 in Ig-C2, ter levcinsko bogata domena a se te neposredno ne povežejo. Ig-C2 domeni se povežeta preko liganda [10].

EGFR ima zunajcelično domeno ki je sestavljena iz štirih domen. I in III sta v obliki β heliksa (iz 160 aminokislin), II in IV pa sta cisteinsko bogati (iz 150 aminokislin). Ob

prisotnosti liganda se pojavi dimerizacija. V domeni II konformacijske spremembe odkrijejo vezavno mesto preko katerega se receptorja povežeta. To je bilo pred pojavom liganda prekrito z domeno IV. Ob dimerizaciji ligand nima strukturne vloge pri povezavi [10].

Obstajajo tudi receptorji kjer je za dimerizacijo poleg liganda in receptorskih interakcij potrebna še dodatna molekula. Pri dimerizaciji FGFR je prisoten bivalenten ligand. Poveže se s FGFR molekulama kjer je povezava s enim receptorjem močnejša od druge. Zunajcelični domeni D2 in D3 ter njuna povezava sta potrebni za povezavo z ligandom. Poleg se mora ligand povezati s heparinom. Receptorja se povežeta preko D2 domene, ter vsak receptor je še povezan s heparinom. Oba ligand sta tudi povezana s heparinom [10].



Slika 2: (A) TrkA receptor se dimerizira preko liganda. Imunoglobulinu podobni domeni C2 se povežeta preko liganda. (B) EGFR receptor se dimerizira samodejno, nato se poveže s ligandom. (C) Dimerizacija FGFR preko imunoglobulinu podobne domene D2. Potreben je tudi kontakt s heparinom. FGF se poveže s heparinom in domenama D2 in D3 [10].

AKTIVACIJA KINAZNIH DOMEN

Dimerizacija receptorjev vodi v trans-fosforilacijo intercelularnih domen. Ta avtofosforilacija tirozinskih ostankov se zgodi v določenem zaporedju. Mehanizem tega procesa se razlikuje med receptorji, a tirozin kinazne domene so si med receptorji v aktivni obliki podobne, v neaktivni pa zelo različne [1],[4],[10].

TKR so se sposobni avtoinhibirati preko A-zanke ali juktamembranske domene. Pri A-zanki se tirozini lahko pomaknejo v aktivno mesto kjer se ponavadi fosforilirajo a tokrat samo stabilizirajo zanko v cis konformaciji ki blokira vezavo ATP in proteinskih substratov. Juktamembranska regija pa s svojimi tirozini interagira z drugimi predeli TKR (tudi A-zanko) ter stabilizira inhibitorno stanje. Vendar tudi ko je receptor inhibiran je prisotne dovolj kinazne aktivnosti da TKR lahko trans-fosforilizira drugi receptor v dimeru [10].

Aktivacija TKR poteka v večih fazah. Za iniciacijo aktivacije tirozin kinaznih domen je potrebna avtofosforilacija tirozinskih ostankov A-zanke in C konca ob dimerizaciji. To stabilizira aktivno stanje in destabilizira cis-avtoinhibicijske interakcije. Fosfatno

skupino zagotovi ATP. Primer je pri IGF-1 in inzulinskem receptorju kjer se fosforilizirajo trije tirozini na A-zanki: Y1162, Y1158 in Y1163, v tem vrstnem redu. To zniža K_m ter poveča V_{max} katalitične aktivnosti ob vezavi liganda. Katalitične domene tako lahko fosforilirajo dodatne tirozinske ostanke določenem vrstnem redu [10].

Na te novo fosforilizirane tirozinske ostanke se nato lahko vežejo signalne molekule znotraj celic preko SH2 in PTB domen. Vezava poteka neposredno ali preko vmesnih (sidrnih) proteinov ki se fosforilirajo. Mednje spadajo IRS1 (*angl.* insulin receptor substrate-1) in Gab-1 (*angl.* growth factor receptor-bound protein 2 (Grb-2) – associated binder) [1].

ZNOTRAJCELIČNE SIGNALNE POTI

Aktivirani receptorji lahko povzročijo začetek večih znotrajceličnih signalnih kaskad. Mednje spadajo PI3K/AKT/mTOR kaskada, PLC- γ /protein kinaza C kaskada in JAK/STAT signalna pot.

Pri FGFR se ob vezavi FGF na kompleks veže FGF receptorski substrat-2 (FRS2 α) preko PTB domene. FRS2 α je vmesni protein kateri tirozinski ostanki se fosforilizirajo kar privabi Grb2 kar posledično omogoča kompleksu kontakt s Gab-1 [10]. Ta rekrutira fosfoinozitud 3-kinazo (PI3K) ki fosforilizira fosfatidilinositol (4,5) bifosfat (PIP-2) v fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PIP-3) na membrani celice. Naprej se posledično aktivira od fosfoinozitida odvisna kinaza-1 (PDK1) ter nadaljnjo ta fosforilizira treonin kinaze AKT/PKB. Ta se popolnoma aktivira ob dodatni fosforilaciji specifičnega serina preko mTOR (tarča rapamicina pri sesalcih) kompleksa 2 (mTORC2). Kinaza naprej vpliva na celične tarče ki regulirajo proliferacijo, preživetje celic, diferenciacijo,...[3].

Druge poznane signalne kaskade ki jo TKR povzročijo je fosforilacija Ras-GDP v Ras-GTP. Aktivira kinazo RAF (serin/treonin kinaza) kar povzroči posledično fosforilacijo MEK1 in MEK2 kinazi ki enako vnaprej aktivirata ERK1 in ERK2 kinazi. Na koncu se enako fosforilizirajo jedrne in citoplazemske tarče ki regulirajo celične procese kot proliferacijo in diferenciacijo [4].

POVRATNA ZANKA

Pri TKR so prisotni mehanizmi ki omogočajo pospeševanje ali zaviranje delovanja lastnih receptorjev. Med molekule ki vplivajo na delovanje receptorjev (kot EGFR) so reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Njihova tvorba je odvisna od PI-3 kinaz in NADPH oksidaz. Omogočijo pospešeno delovanje TKR s inhibicijo protein tirozin fosfataz (PTP). Tem oksidirajo cisteine ki so ključni za prekinitev avtofosforilacije. Receptorji so tudi sposobni aktivirati PTP ki posledično zmanjšajo aktivacijo TKR. Rekrutirajo se SH2 domene ki vsebujejo Shp1 in Shp2. Aktivirajo receptorje in promovirajo njihovo defosforilacijo [10].

Povratne zanke ki so prisotne pri teh receptorjih so tudi eden izmed razlogov da lahko TKR sprožijo različne signalne kaskade glede na to kateri ligand se veže na isti receptor. NGF in EGF ob vezavi na receptor sprožita intracelične signale preko enakih oz. podobnih intermediatov a končen odziv se razlikuje. To je zato ker NGF ob aktivaciji sproži pozitivno povratno zanko od MAPK do Raf. Aktivira Rap1 kar vodi v vzdržno B-Raf aktivacijo. Pri EGF kaskadi je prisotna negativna povratna zanka [10].

Peter-TIROZIN KINAZE (FIZIOLOŠKA VLOGA, PATOLOŠKA VLOGA, TERAPEVTSKI ZAVIRALCI, EVOLUCIJSKI VIDIK)

Fiziološka vloga

Tirozin kinaze opravljajo ključne fiziološke vloge v različnih organskih sistemih, kjer omogočajo regulacijo celične rasti, diferenciacije, presnove, imunskega odziva in razvoja tkiv. Njihova aktivacija je natančno usklajena s specifičnimi signalnimi potmi, ki so značilne za posamezne celične tipe in tkiva. [11]

Pri rasti in razvoju tkiv receptorji kot so FGFR, EGFR, PDGFR in IGF-1R posredujejo signale za proliferacijo in diferenciacijo celic. Na primer, FGFR3 sodeluje pri razvoju skeleta, EGFR in ErbB2 pri oblikovanju srca in živčnega sistema, IGF-1R pa spodbuja splošno telesno rast. [11] V okviru presnove in homeostaze ima pomembno vlogo inzulinski receptor (IR), ki ob aktivaciji sproži signalizacijo prek IRS (insulin receptor substrate) proteinov in PI3K–Akt poti ter tako omogoča vnos glukoze v jetra, mišice in maščobno tkivo ter spodbuja sintezo glikogena. IGF-1R dodatno pospešuje anabolične procese, pomembne za rast mišic in kosti. [16] V imunskem sistemu tirozin kinaze sodelujejo tako v razvoju kot v aktivaciji imunskih celic. V T-limfocitih Lck in ZAP-70 omogočata signalizacijo T-celičnega receptorja (TCR) in s tem diferenciacijo T-celic. [15] V B-celicah kinazi Syk in Btk prenašata signal ob vezavi antigena. JAK-STAT signalna pot, aktivirana prek JAK kinaz (JAK1–3, Tyk2), omogoča odziv na citokine in spodbuja nastanek različnih imunskih podtipov, kot sta Th1 in Th17. [11] V živčnem sistemu receptorji Trk (TrkA, TrkB, TrkC), ki se aktivirajo z nevrotrofini kot so NGF in BDNF, posredujejo signale za preživetje, rast, diferenciacijo in sinaptično plastičnost nevronov. [12] Src-družina kinaz, zlasti c-Src in Fyn, uravnava delovanje NMDA receptorjev, kar je bistveno za sinaptično krepitev (LTP) in spomin. [13] Družina Eph receptorjev pa sodeluje v sinaptičnem preoblikovanju z dvosmerno signalizacijo med nevroni. [14] V kardiovaskularnem sistemu tirozin kinaze omogočajo razvoj in vzdrževanje žilnega sistema. VEGF receptorji (VEGFR1–3) in Tie2 posredujejo signale, ki usmerjajo tvorbo krvnih in limfnih žil, medtem ko PDGFR β uravnava razvoj gladkih mišičnih celic in pericitov, s čimer prispeva k stabilnosti žilne stene in prilagoditvam po poškodbah. [17] V skeletno-mišičnem sistemu IGF-1R spodbuja rast in diferenciacijo mišičnih celic. Pomembno vlogo ima tudi receptor MuSK, ki vodi oblikovanje nevromišične sinapse (NMJ), njegovo pomanjkanje pa lahko vodi do mišične oslabelosti, kot pri miasteniji gravis. [18]

Patološka vloga tirozin kinaz pri obolenjih

Tirozin kinaze (TK) predstavljajo ključne regulatorje številnih fizioloških procesov, a njihova disregulacija lahko vodi v širok spekter bolezni. Najpogostejše je patološka aktivacija TK posledica genetskih sprememb, ki povzročijo njihovo trajno delovanje neodvisno od zunanjih signalov. To se lahko zgodi prek točkovnih mutacij, fuzij genov, genomske amplifikacije ali izgube negativne regulacije. [19]

Točkovne mutacije, zlasti v kinaznih domenah, lahko receptorjem omogočijo neprekinjeno aktivnost brez potrebe po ligandu. Klasični primeri vključujejo mutacije EGFR v nedrobnoceličnem pljučnem raku (NSCLC), KIT v gastrointestinalnih stromalnih tumorjih (GIST) in FGFR3 pri ahondroplaziji. Fuzijski onkoproteini, kot je

BCR-ABL v kronični mieloični levkemiji ali NPM-ALK pri anaplastičnem T-celičnem limfomu, nastanejo zaradi kromosomskih translokacij in vodijo v konstitutivno aktivno kinazno signalizacijo. Pri genomski amplifikaciji, kot je npr. povečano število kopij gena HER2/ERBB2 v raku dojk, pride do prekomerne izraženosti receptorja in posledično do pretirane celične proliferacije. Četrty mehanizem vključuje avtokrino signalizacijo in izgubo negativne regulacije, pri čemer tumorji sami izločajo rastne faktorje ali pa izgubijo zaviralce signalizacije, kot sta PTEN ali PTP, kar vodi v neomejeno aktivacijo TK poti. [19]

Poleg raka imajo TK pomembno patološko vlogo tudi pri številnih neonkoloških boleznih. V kardiovaskularnem sistemu njihova prekomerna aktivacija, zlasti prek EGFR in PDGFR, spodbuja miokardno hipertrofijo ter zadebelitev žilne stene. TK prav tako sodelujejo pri aterosklerozi, kjer prispevajo k vnetju in kalcifikaciji žil. Medtem ko so se nekateri EGFR-inhibitorji (npr. erlotinib) izkazali kot koristni v predkliničnih modelih, imajo drugi TK-inhibitorji (imatinib, sunitinib, sorafenib) lahko negativne kardiovaskularne učinke, saj zavirajo tudi fiziološke signalne poti. [20]

V presnovnih boleznih, kot je sladkorna bolezen tipa 2, motnje v delovanju inzulinskega receptorja (IR) povzročajo inzulinsko rezistenco. Slaba fosforilacija IRS proteinov, pogosto poslabšana z vnetjem in aktivacijo JAK–STAT poti, vodi v zmanjšan celični odziv na inzulin. Nekateri TK-inhibitorji lahko v teh primerih ugodno vplivajo na presnovo z zmanjšanjem vnetne signalizacije v jetrih in maščobnem tkivu. [21]

V živčnem sistemu ima kinaza c-Abl pomembno vlogo pri nevrodegenerativnih boleznih, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. Njena prekomerna aktivnost spodbuja fosforilacijo patogenih proteinov (npr. alfasinuklein, parkin), kar vodi do tvorbe toksičnih agregatov. Predklinične študije so pokazale, da inhibitorji c-Abl (npr. nilotinib) zmanjšajo te procese in imajo nevroprotektivne učinke. Tudi Src-kinaza Fyn sodeluje pri degenerativnih spremembah v Alzheimerjevi bolezni, saj vpliva na sinaptično signalizacijo in amiloidne poti. [20] [28]

V okviru avtoimunskih in vnetnih bolezni imajo JAK kinaze osrednjo vlogo pri prenosu citokinskih signalov. Njihova pretirana aktivacija vodi v prekomerno diferenciacijo T-celic (npr. Th1, Th17) in s tem v boleznih, kot sta revmatoidni artritis in psoriza. Uporaba JAK-inhibitorjev (npr. tofacitinib, baricitinib) omogoča nadzor nad vnetjem in je klinično potrjena. Poleg tega kinazi Syk in Btk prispevata k avtoimunske aktivaciji B-celic, kar ima ključno vlogo pri sistemskem lupusu (SLE) in multipli sklerozi. [22]

TK sodelujejo tudi pri dednih boleznih. Mutacije v FGFR3 povzročijo akondroplazijo, v RET vodijo do Hirschsprungove bolezni, okvare v KIT vplivajo na pigmentacijo (piebaldizem) in hemopoezo, mutacije inzulinskega receptorja pa povzročajo redke oblike sladkorne bolezni (npr. Donohuejev sindrom). [19]

Skupno gledano so tirozin kinaze osrednji posredniki številnih signalnih poti, katerih delovanje je nujno za fiziološko ravnovesje. Njihova patološka aktivacija pa lahko vodi tako v raka kot tudi v številne druge bolezni, kot so degenerativna, presnovna, avtoimunska in žilna obolenja. Zdravila, ki ciljajo na TK (npr. JAK-inhibitorji, BTK-inhibitorji, TKI za PDGF/EGFR), so tako vse pomembnejši del sodobne terapije, kar potrjuje njihov širok patofiziološki in terapevtski pomen. [19]

Koristne in zaščitne vloge tirozin kinaz pri obolenjih

Čeprav so TK pogosto povezane s patogenezo, imajo v določenih kontekstih tudi pozitivne, zaščitne ali regenerativne funkcije pri obolenjih. Njihovo uravnoteženo delovanje je zelo pomembno za zmanjšanje škode, pospešitev regeneracije in vzdrževanje homeostaze v prizadetih tkivih.

Po poškodbah ali ishemiji, receptorji, kot so FGFR, VEGFR in PDGFR, pospešujejo proliferacijo, migracijo in angiogenezo, kar omogoča učinkovito celjenje. Na primer, VEGF signalizacija pospešuje obnovo žilja po infarktu, medtem ko FGF signalizacija sodeluje pri obnovi epitelija in kože. [17] Receptorji TrkB in TrkC, ki jih aktivirata nevrotrofina BDNF in NT-3, omogočajo preživetje in regeneracijo nevronov po poškodbi. Pri nevrodegenerativnih boleznih ohranjena Trk signalizacija blaži kognitivni upad, spodbuja sinaptično plastičnost in zavira apoptotske poti. [16] Čeprav JAK–STAT signalizacija pogosto prispeva k vnetju, lahko v določenih primerih deluje tudi protivnetno. Aktivacija IL-10R z vključitvijo JAK1–STAT3 poti zavira sproščanje proinflammatory citokinov, kot je TNF- α , in omejuje tkivno škodo pri kroničnih vnetjih. [21] Pri pravilno delujočem inzulinskem receptorju (IR) TK signalizacija ohranja glukozno homeostazo, zavira lipolizo in spodbuja anabolične procese. IGF-1R pa poleg anabolizma deluje tudi kardioprotektivno v nekaterih primerih zmanjšuje ishemično poškodbo srčne mišice. [12] Src kinaza je bistvena za normalno delovanje osteoklastov in s tem za kostno preoblikovanje. Ravnovesje med aktivacijo in inhibicijo TK poti v kostnem tkivu ohranja fiziološko gostoto kosti in preprečuje tako osteoporozo kot osteopetrozo. [23]

Terapevtski zaviralci tirozin kinaz

Zaradi klinične pomembnosti TK so razviti številni ciljani zaviralci (TKI) in monoklonska protitelesa, usmerjena v specifične TK. Med glavnimi so:

Imatinib (Gleevec) – majhna molekula, ki zavira ATP-vežeče mesto na BCR-ABL kinazi ter dodatno inhibitorno deluje na c-Kit in PDGFRA. V kronični mieloični levkemiji popolnoma onemogoči konstitutivno aktivnost BCR-ABL in povzroči dolgotrajno remisijo. V gastrointestinalnih stromalnih tumorjih (GIST) z gain-of-function mutacijami v c-KIT pa omenjajo več kot 50 % objektivnih remisij ob terapiji z 400 mg/dan. Imatinib je standard za CML in neoperabilni GIST. V praksi ga dopolnjujejo drugi TKI (npr. sunitinib, regorafenib) pri rezistenci. [24]

Erlotinib (Tarceva) – majhna molekula prve generacije, ki reverzibilno zavira kinase receptorja za epidermalni rastni faktor (EGFR, ErbB1). Uporablja se predvsem pri metastatskem ne-ploščatem karcinomu pljuč (NSCLC) z aktivirajočo mutacijo EGFR (delecija eksona 19 ali L858R mutacija eksona 21). Z blokado EGFR signalizacije erlotinib zavira proliferacijo tumorskih celic in inducira apoptotične poti. Manjše koristi ima tudi pri določenih primerih rakov trebušne slinavke. Terapija je povezana z značilnimi neželenimi učinki (izpuščaji, driska) kot posledica blokade EGFR v zdravih tkivih. [25]

Trastuzumab (Herceptin) – humanizirano monoklonsko protitelo proti HER2 (ErbB2) zunanjemu delu. Zaveže se HER2 na celicni membrani tumorja, prepreči tvorbo aktivnih homodimerov in posredno povzroči ADCC (Citotoksičnost odvisno od protiteles) s strani imunskih celic. Trastuzumab je odobrila FDA za zdravljenje HER2+ raka dojke in želodca. V kliničnih preskušanjih je pomembno izboljšal preživetje bolnic s

HER2-pozitivnim rakom dojk (zaradi blokade HER2 signalizacije). Priporoča se v kombinaciji s kemoterapijo (npr. paklitaksel). Najpomembnejši stranski učinek je kardiotsičnost, zato je potrebno spremljanje srčne funkcije. [26]

Lapatinib (Tykerb) – dvojni TKI, ki znotrajcelično tekmuje z ATP na povezovalnih mestih za ErbB1 (EGFR) in ErbB2 (HER2). Uporablja se pri metastatskem HER2-pozitivnem raku dojk (pogosto v kombinaciji s kemoterapijo ali hormonsko terapijo). Za razliko od trastuzumaba, ki veže zunajcelični del HER2, lapatinib signalizira preprečevanje fosforilacije obeh receptorjev. Klinično podaljša preživetje bolnic s HER2+ tumorji, čeprav ni primera za vse bolnice (učinkovitost je omejena pri nekaterih primarnih rezistencah). [27]

Evolucijski vidik

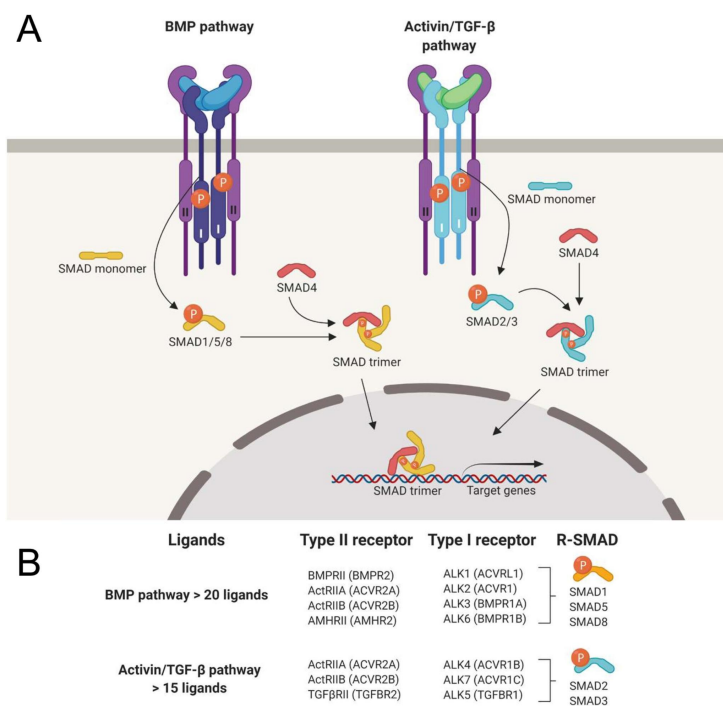
Tirozin kinaze so se razvile v metazojih in so močno konzervirane med vrstami. Človeški genom vsebuje približno 90 genov, ki kodirajo TK (vključno s 58 receptorskimi TK). Mišji kinom je zelo podoben človekovemu, tako da je model miši pogosto uporaben za študij TK. *Drosophila melanogaster* ima sicer manj TK genov, vendar več kot 20 receptorskih TK. Muhin EGFR homolog (DER) obdeluje vezava proteina Spitz, a ga za signalizacijo potrebujejo isti glavni prenašalci (Ras/MAPK) kot v sesalcih. *Drosophila* ima tudi FGFR homologa (Hrthles/Breathless), insulin receptor (*InR*) ter naključne Src/Abl kinaze, ki so genetsko in strukturno sorodne človeškim. Zanimivo je, da veliko "nižjih" organizmov (celičnjaki) sploh nima TK (npr. kvasovke) medtem ko so pri živalih in človeku raznolike podskupine TK zelo ohranjene. [29]

Primerjalno gledano so strukturne domene kinaz (ATP-vezeče mesto, SH2/SH3 itd.) zelo ohranjene. Številni TK iz živalskih linij se razvrščajo v iste družine kot človeški (npr. src-like kinase, inzulinski receptor-like, VEGF receptorji, Eph receptorji). Tudi signalne poti so podobne, kot je ugotovljeno pri muhi, različni RTK aktivirajo iste posrednike (SH2-proteine, Ras, PI3K). To pojasnjuje, zakaj so študije v modelnih organizmih (miši, mušice, celo *Caenorhabditis elegans*) dale ključen vpogled v delovanje TK. Kljub temu obstajajo primerjalne razlike. Sesalci imajo več genov (npr. več različic FGFR, KDR/VEGFR), medtem ko imajo muhe nekatere svoje specifične receptorje (npr. Torso za zarodni razvoj). Na splošno pa očitno osnovna hierarhija signalizacije ostaja ohranjenja. Tirozin kinaze prenašajo signale na jedro celice na zelo podoben način pri človeških celicah kot pri mišjih in celo žuželjskih celicah. [29]

Marko-RECEPTORSKE SERIN/TREONIN KINAZE

Receptorji z lastno encimsko serin/treonin kinazno aktivnostjo katalizirajo prenos fosfatne skupine iz ATP na hidroksilno skupino določenega serinskega ali treoninskega aminokislinskega preostanka na tarčnem proteinu. Njihova številka EC je 2.7.11.30 [30]. Primer signaliziranja receptorjev s serin/treonin kinazno encimsko aktivnostjo je signaliziranje z ligandi iz družine TGF- β (transforming growth factor beta). Ligandi iz družine TGF- β so večfunkcionalni citokini, mednje spadajo tudi 3 izooblike TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 in TGF- β 3), BMP (bone morphogenetic proteins) in aktivini. Splošna shema signaliziranja ligandov iz družine TGF- β je prikazana na sliki 3A. V splošnem ligandi iz družine TGF- β signalizirajo preko receptorskega kompleksa, sestavljenega iz dveh molekul receptorja tipa II in dveh molekul receptorja tipa I (receptorji so iz družine receptorjev TGF- β). Vezava dveh molekul liganda povzroči tvorbo kompleksa med dimerom receptorja tipa II in dimerom receptorja tipa I. Receptor tipa II fosforilira

receptor tipa I na domeni GS (domena bogata z glicini in serini) in ga tako aktivira. Aktivirani receptorji tipa I fosforilirajo R-SMAD (receptor-activated SMAD transcription factors), ti heterooligomerizirajo s SMAD4, nato pa v celičnem jedru regulirajo izražanje genov. Obstajata dve skupini R-SMADs, in sicer skupina SMAD1/5/8 (signalna pot BMP) ter skupina SMAD2/3 (signalna pot aktivin/TGF- β). Na sliki 3B so prikazane različne kombinacije receptorjev tipa II in I ter R-SMADs (signalnih efektorjev). V nadaljevanju bomo podrobneje opisovali kombinacijo receptorjev T β RII in T β RI ter signaliziranje z ligandi TGF- β (izooblike TGF- β 1, TGF- β 2 in TGF- β 3) [31].



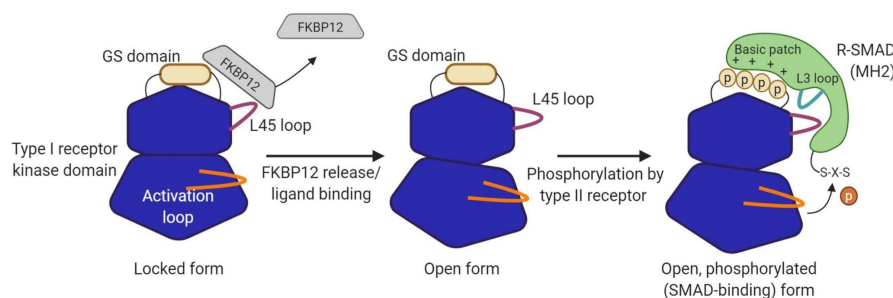
Slika 3: A. Splošna shema signaliziranja ligandov iz družine TGF- β . B. Kombinacije receptorjev tipa II in I ter R-SMADs pri signaliziranju z ligandi iz družine TGF- β . Slika je prevzeta iz članka [31].

Signaliziranje s TGF- β na biokemijskem in strukturnem nivoju

Pri signaliziranju s TGF- β je udeležen kompleks treh receptorjev za TGF- β , ki ga tvorijo receptor I (T β RI; znan tudi kot ALK5 = activin receptor-like kinase 5), receptor II (T β RII) ter receptor III (T β RIII). T β RI in T β RII sta vsak v receptorskem kompleksu v obliki dimera, oba imata serin/treonin kinazno aktivnost (sta receptorja z lastno encimsko aktivnostjo). TGF- β 1 in TGF- β 3 se vežeta na T β RII, saj imata višjo afiniteto zanj kot za T β RI. TGF- β 2 se slabo veže tako na T β RI kot tudi na T β RII. T β RIII lahko veže TGF- β (predvsem TGF- β 2) z visoko afiniteto in deluje kot koreceptor, ki izboljša signaliziranje s predstavitvijo ligandov T β RII. V celicah sta prisotna kanonična in nekanonična pot signaliziranja. Pri kanoničnem signaliziranju se TGF- β veže na monomer T β RII, kar povzroči homodimerizacijo T β RII. 2 molekuli liganda TGF- β se lahko vežeta tudi že na obstoječ dimer T β RII. Nato pride do rekrutacije dimera T β RI in tvorbe kompleksa dimer TGF- β -dimer T β RII-dimer T β RI. To povzroči konformacijske spremembe, ki vodijo do disociacije inhibitorja FKBP12 (FK506-binding protein 1A) iz domene GS na T β RI. Domena GS vsebuje okrog 30 aminokislinskih preostankov, je zelo ohranjena in se nahaja N-končno od kinazne domene na citoplazemski strani receptorja T β RI. Kadar je na domeno GS vezan FKBP12, je preprečena fosforilacija

domene GS s T β RII, hkrati pa je kinazna domena T β RI katalitično neaktivna. FKBP12 mora oddisociirati z domene GS, kar domeno GS naredi dovzetno za fosforilacijo s T β RII. V kompleksu T β RII (ki je sicer konstitutivno aktivna kinaza) fosforilira T β RI na več serinskih in treoninskih aminokislinskih preostankih v domeni GS. Fosforilacija T β RI povzroči aktivacijo kinazne aktivnosti T β RI in višjo afiniteto za signalne efektorje, ki so v tem primeru R-SMADs. R-SMADs, med katere spadata tudi SMAD2 in SMAD3, vsebujejo globularno domeno MH1 (Mad homology 1) na N-končnem delu in globularno domeno MH2 na C-končnem delu. Protein SARA (SMAD anchor for receptor activation) dostavi R-SMADs v bližino T β RI. Nato kinazna domena T β RI fosforilira domeno MH2 na R-SMAD na dveh serinskih aminokislinskih preostankih, ki se nahajata na C-končnem motivu SXS (serin, katerakoli aminokislina, serin). Specifičnost uravnavajo interakcije med zanko L45 na T β RI ter med zanko L3 na R-SMAD. Aktivacija receptorja T β RI in fosforilacija R-SMAD sta prikazani na sliki 4. Aktivirani fosforilirani R-SMADs homooligomerizirajo ali heterooligomerizirajo preko domen MH2, lahko pa oligomerizirajo s SMAD4, ki spada med co-SMAD (common-partner SMAD). Najstabilnejši kompleks je heterotrimer, ki vsebuje dva R-SMADs in eno molekulo SMAD4. Različni oligomeri SMAD imajo lahko različne funkcije, vendar pa vsi regulirajo transkripcijo tarčnih genov z vezavo na DNA po translokaciji v celično jedro. Domene MH1 na SMAD4, SMAD3 in SMAD2 prepoznajo nukleotidno zaporedje GTCT (ali reverzni komplement AGAC), ki so SBEs (canonical SMAD-binding elements). Ker je vezava na eno zaporedje SBE zelo šibka, se morajo oligomeri SMAD vezati na več SBEs hkrati, potrebujejo pa tudi vezavo drugih transkripcijskih faktorjev na specifična zaporedja DNA [31]–[33].

Nekanonično signaliziranje s TGF- β je od proteinov SMAD neodvisno signaliziranje, lahko pa privede do aktivacije številnih signalnih poti (ERK, Rho, p38, JNK, NF- κ B, PI3K/AKT, JAK/STAT). Te signalne poti so udeležene pri številnih celičnih procesih, kar še dodatno kaže, kako kompleksno vlogo ima signaliziranje s TGF- β tako pri zdravju kot boleznih [32].



Slika 4: Aktivacija T β RI in R-SMAD. Slika je prevzeta iz članka [31].

Fiziološki pomen signaliziranja s TGF- β

Signaliziranje s TGF- β je pomembno pri številnih bioloških in fizioloških procesih ter povzroči različne celične odzive v različnih celičnih tipih. Dokazana je bila vloga TGF- β pri številnih celičnih procesih, kot so proliferacija in rast celic, diferenciacija, metabolizem, adhezija, migracija in celična smrt. TGF- β ima ključno vlogo predvsem pri embrionalnem razvoju, celjenju ran, tkivni homeostazi in imunski homeostazi [32].

TGF- β je izražen v skoraj vseh embrionalnih tkivih in ima pomembno vlogo pri procesih celične diferenciacije. Inducira tvorbo mezoderma, hematopoezo ter

vaskulogenezo. Inhibira osteogenezo, miogenezo in adipogenezo, stimulira pa diferenciacijo mezenhimske matične celice v gladke mišične celice in hondrogenezo. TGF- β (predvsem TGF- β 3) inducira epiteljsko-mezenhimski prehod (EMT), kar se je izkazalo za pomembno pri procesu palatogeneze (oblikovanje neba pri embriju). Tudi endoteljske celice so lahko podvržene podobnemu procesu (endoteljsko-mezenhimski prehod), kar je ključno za razvoj kardiovaskularnega sistema. Pri ljudeh je TGF- β 2 najmočnejši aktivator endoteljsko-mezenhimskega prehoda [32].

Po poškodbi na koži med procesom hemostaze trombociti zagotavljajo takojšnjo zalogo TGF- β , ki prispeva k celjenju rane s spodbujanjem prenosa vnetnih celic in fibroblastov do mesta poškodbe. Številne vrste celic, ki jih rekrutira TGF- β , so prav tako aktivne pri izločanju TGF- β , kar vodi do še višjih koncentracij TGF- β v ranah. TGF- β sodeluje pri ponovni epitelizaciji v ranah, pri angiogenezi in aktivaciji fibroblastov. Pokazano je bilo, da TGF- β sodeluje pri procesih popravljanja in regeneracije številnih tkiv (jetra, trebušna slinavka, miokard, hrustanec, živčni sistem) [32].

Tkivna homeostaza pomeni ravnovesje med celično proliferacijo in celično smrtjo. V večini celic TGF- β inhibira proliferacijo, saj povzroči zaustavitev celičnega cikla v fazi G1. V številnih celicah TGF- β aktivira transkripcijo genov za inhibitorje od ciklina odvisnih kinaz (CDK), recimo transkripcijo genov za proteina p15 in p21. V določenih celičnih tipih (gladke mišične celice, fibroblasti, hondrociti) lahko TGF- β stimulira proliferacijo, najverjetneje preko indukcije sinteze rastnih faktorjev. TGF- β lahko sproži apoptozo preko povišanja izražanja proapoptotskih članov družine BCL-2 (BAX, BIM) in znižanja izražanja antiapoptotskih članov družine BCL-2 (BCL-2, BCL-XL). Kompleksno signaliziranje s TGF- β se kaže npr. v podocitih, kjer lahko sproži tako propapotosko signaliziranje kot tudi antiapoptotsko signaliziranje [32].

TGF- β je imunosupresivni citokin, s čimer bistveno prispeva k vzdrževanju imunske homeostaze in imunske tolerance. Moteno signaliziranje s TGF- β lahko vodi do pretiranih imunskih odzivov, kar privede do številnih vnetnih in avtoimunskih bolezni. TGF- β prepreči diferenciacijo naivnih celic T v efektorske celice T preko številnih mehanizmov. V CD8⁺ celicah T TGF- β zavre izražanje citolitičnih faktorjev, kot so perforin, grancim A, grancim B, ligand Fas in IFN- γ . TGF- β zmanjša izločanje imunoglobulinov iz celic B, zavre sintezo izotipov IgM in IgG, sproži pa sintezo izotipa IgA (s TGF- β inducirani IgA imajo manjšo specifičnost, kar pomeni slabši imunski odziv). TGF- β lahko vpliva na pretvorbo celic B v regulatorne celice B, ki pa sintetizirajo številne imunosupresivne molekule (TGF- β , IL-10, IL-35, PD-L1,...). TGF- β zavre diferenciacijo in delovanje naravnih celic ubijalk, vpliva pa tudi na delovanje pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (zmoti prezentacijo antigenov v dendritičnih celicah, makrofagih in nevtrofilcih). Vpliva tudi na polarizacijo makrofagov iz tipa M1 v tip M2, ki ima številne imunosupresivne lastnosti [32].

Patološki pomen signaliziranja s TGF- β

Moteno signaliziranje s TGF- β lahko privede do številnih patoloških procesov, kot so razvojne motnje, moteno celjenje ran, vnetne bolezni, infekcije in tumorji. Miši, ki imajo mutacije v genih za T β RI in T β RII, ki vodijo do izgube njihovih funkcij, umrejo med embrionalnim razvojem zaradi motenj v hematopoezi in vaskulogenezi. Pomanjkanje različnih izooblik TGF- β pri miših vodi do različnih fenotipov, kar je skladno z izoformno specifičnimi vlogami TGF- β pri embrionalnem razvoju. Tako recimo miši brez TGF- β 2 kažejo perinatalno umrljivost in širok spekter razvojnih napak

v srcu, pljučih, kosteh, očeh, notranjih ušesih, kraniofacialnih strukturah, urogenitalnih organih in lasnih mešičkih. Miši brez TGF- β 3 prav tako hitro po rojstvu umrejo, kažejo pa nenormalnosti v palatogenezi in v razvoju pljuč. Pri ljudeh lahko mutacije z izgubo funkcije pri eni sami signalni komponenti signaliziranja s TGF- β (TGF- β 2, TGF- β 3, T β RI, T β RII, SMAD2, SMAD3) vodijo do Loeys-Dietzovega sindroma, avtosomalne dominantne bolezni vezivnega tkiva, ki prizadene kardiovaskularni sistem, skelet, kraniofacialne strukture in kožo. Tudi pretirano signaliziranje s TGF- β lahko privede do razvojnih motenj. Pri ljudeh se Camurati-Engelmannova bolezen, progresivna kostna displazija, ki se deduje avtosomalno dominantno, pripisuje mutacijam v genu za TGF- β 1, kar privede do pretiranega signaliziranja s TGF- β . Za to bolezen sta značilni hiperostoza in skleroza dolgih kosti in lobanje [32].

TGF- β deluje kot tumor supresor v zgodnjih fazah razvoja tumorjev, v kasnejših fazah pa spodbuja širjenje tumorjev. Tumor supresorska vloga TGF- β v zgodnjih fazah razvoja tumorjev se pripisuje vplivu na zgodnjo apoptozo diferencirajočih se celic in prezgodnjemu staranju matičnih celic (zmanjšana reprodukativna sposobnost in pogostost fiksiranja rakavih mutacij v celični populaciji). Izguba funkcionalnega signaliziranja s TGF- β je torej eden izmed zgodnjih dogodkov v procesu razvoja tumorjev. TGF- β inhibira rast tumorjev s sprožitvijo citostaze in apoptoze, zmanjšano signaliziranje s TGF- β torej spodbuja rast tumorjev. Pri številnih tumorjih je bilo opaženo zmanjšano signaliziranje s TGF- β zaradi zmanjšanega izražanja T β R in SMAD. Zanimivo pa je, da TGF- β spodbuja procesa invazije in metastaziranja tumorjev, najverjetneje preko induciranja epitelijsko-mezenhimskega prehoda. TGF- β vpliva tudi na remodeliranje tumorskega mikrookolja, saj stimulira pretvorbo fibroblastov v njihovo prokancerogeno obliko (CAF = cancer-associated fibroblasts). TGF- β spodbuja tudi angiogenezo endotelijskih celic, saj inducira sintezo VEGF v rakavih celicah in fibroblastih. Hkrati poveča vaskularno prepustnost endotelijskih celic (zmoti medendotelijske stike), kar vodi do povečane rasti tumorjev in hitrejšega metastaziranja [32].

LEV - RECEPTORSKE TIROZIN FOSFATAZE (RTP)

Receptorske tirozin fosfataze (RTP) so skupina transmembranskih encimov, ki igrajo ključno vlogo pri uravnavanju celične signalizacije preko specifične odstranitve fosfatnih skupin na tarčnih proteinih.

Najbolj poznane so CD45 (Cluster of Differentiation 45) oziroma PTPRC (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type C), ki ga najdemo na površini praktično vseh celic imunskega sistema in je pomemben pri aktivaciji T- in B-limfocitov in regulaciji T-celičnega receptorja (TCR). PTPRA (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type A) katalizira odstranitev fosfatnih skupin z določenih tirozinskih ostankov na substratih in z aktivacijo Src-družine kinaz sproži številne signalne poti, ki vplivajo na proliferacijo. PTPRM (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type M) sodeluje pri celični adheziji preko homofilnih interakcij med ekstracelularnimi domenami na sosednjih celicah. DEP-1 (Density-Enhanced Phosphatase 1), znan tudi kot PTPRJ (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type J), z regulacijo VEGFR vpliva na rast in stabilnost žilnega mrežja. Njegovo izražanje se poveča, ko celice dosežejo visoko gostoto in prične zavirati signalne poti, s čimer prepreči prekomerno rast celic. Prav tako velja za tumor supresorski protein, saj zavira signale, ki jih sprožijo receptorji rastnih faktorjev, kot so EGFR, PDGFR, VEGFR, s čimer prepreči nenadzorovano rast celic [34].

Biokemijski mehanizem delovanja

Skupaj z receptorskimi tirozin-kinazami vzdržujejo ravnovesje med fosforilacijo in defosforilacijo in katalizirajo reakcijo odstranjevanja fosfatne skupine iz fosforiliranih tirozinskih ostankov. Omenjena reakcija poteka v aktivnem mestu fosfatazne domene, kjer je cistein ključen za katalizo. Mehanizem poteka vključuje nukleofilni napad cisteinskega ostanka, natančneje tiolatnega iona v aktivnem mestu na fosforjev atom fosfo-tirozina in tvori se začasni intermediat, ko se fosfat veže na cisteinski ostanek. Nato 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 [34].

Fiziološke vloge RTP pri razvoju, signalizaciji in uravnavanju imunskega odziva

Glavne fiziološke vloge receptorskih tirozin fosfataz so regulacija celične rasti in proliferacije. Poleg omenjenega DEP-1, ki zmanjšuje invazivne lastnosti rakavih celic z inhibicijo poti, povezanih z invazivnostjo, je npr. PTPRA s svojo aktivacijo kinaz družine Src pomemben za pravilen razvoj in delovanje živčnih celic, kjer regulira nevrite (izrastke). Prav tako so Src-kinaze pomembne pri preoblikovanju citoskeleta in adheziji na ekstracelularni matriks, s čimer tudi vpliva na stabilnost tkiv. Receptorske tirozin fosfataze 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, ki omogočajo 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.

RTP 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, CD45 odstrani fosfat z inhibitornih mest, kar omogoči aktivacijo Lck. Aktivirana Lck dalje fosforilira ITAM motive CD3 kompleksa in posledično aktivira kinazo ZAP-70 in nadaljnjo signalno kaskado. Podobno v B-celicah z defosforilacijo inhibitornih mest na Src kinazah, kot sta Lyn in Fyn, omogoči njihovo aktivacijo in sprožitev signalne kaskade. 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 [34], [35].

Patološke posledice nepravilnega delovanja RTP

Nepravilnosti v aktivnosti ali izražanju RTP lahko vodijo do številnih patoloških stanj [35]. Receptorske tirozin fosfataze imajo pogosto vlogo tumorsupresorskih proteinov. Izguba njihove aktivnosti (z mutacijami, delecijami ali epigenetskim utišanjem) vodi v prekomerno aktivnost receptorskih tirozin kinaz (npr. EGFR, PDGFR), ki ostanejo fosforilirane in signalizirajo neomejeno rast. Prav tako nekatere RTP (npr. PTPRM, PTPRK) sodelujejo pri celični adheziji in stabilizaciji adhezijskih kompleksov. Izguba

njihove funkcije oslabi stike in posledično celice lažje invadirajo okoliško tkivo. RTP imajo ključno vlogo pri pravilnem uravnavanju imunskega odziva. Zmanjšanje njihove aktivnosti vodi v nepravilno aktivacijo imunskih celic in povzroči razvoj avtoimunih bolezni. Če npr. omenjen Lck ostane fosforiliran na zaviralnih mestih nadaljna signalizacija ne steče, in lahko se pojavi imunska anergija (celice obstajajo, a se ne odzivajo na antigene). Tudi prekomerna aktivnost CD45 sproži avtoimunske bolezni, ker pretirana defosforilacija sproži hiperaktivacijo Src-kinaz in izrazito aktivacijo T- in B-celic. Posledično celice napadajo lastne antigene in lahko se pojavi multipla skleroza ali sladkorna bolezen (tipa 1) [34].

Strukturna organizacija receptorskih tirozin fosfataz in njen pomen za signalno regulacijo

Poznavanje strukturnih značilnosti RTP omogoča boljše razumevanje njihove fiziologije in patologije. So integralni membranski proteini iz več funkcionalnih domen, ki določajo substratno specifičnost in interakcije z drugimi molekulami v celici. Zunajcelična domena (ektodomena) 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 nekateri RTP (npr. CD45) so regulirani s konformacijskimi spremembami te domene, ki alosterično vplivajo na encimsko domeno. Struktura domene določa delitev RTP v različne podrazrede: podobne imunoglobulinu (npr. PTPRF), podobne kadherinom (npr. PTPRK, PTPRM) in podobne karbonski anhidrazi (npr. PTPRG). Vloga domen je prepoznavanje specifičnih ligandov in regulacija encimske aktivnosti preko ligandne interakcije in oligomerizacije. Ta domena je velikokrat tudi močno glikozilirana, saj glikani stabilizirajo strukturo, povečajo topnost in sodelujejo pri prepoznavanju specifičnih ligandov in receptorjev [36].

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 RTP v membrano in prenos signala iz zunajcelične v znotrajcelično regijo. Mutacije v njej lahko privedejo do od liganda neodvisne aktivacije receptorja [36].

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. Gre za 240–280 aminokislin veliko alfa/beta strukturo s katalitičnim motivom z aktivnim mestom, ki vsebuje cisteinski ostanek, ki je nukleofilno mesto za

katalizo, argininski ostanek, ki je pomemben za vezavo negativno nabitih fosfatnih skupin in ostanke, ki stabilizirajo prehodno stanje (serin, treonin, glicin). Večina RTP ima dve katalitični domeni (tandemski fosfatazni domeni). Membransko-proksimalna (D1) je aktivna katalitična domena, medtem ko Membransko-distalna (D2) pogosto nima katalitične aktivnosti oziroma je ta zmanjšana, vendar je pomembna za regulacijo aktivnosti D1 in za interakcije z drugimi proteini [36].

David-MEMBRANSKE GVANILAT CIKLAZE

Membranske gvanilat (tudi gvanil- ali gvanilil-) ciklaze (GC) so encimi, ki v prisotnosti dvovalentnih kovinskih kofaktorjev (Mg^{2+} ali Mn^{2+}) in ob vezavi specifičnih ligandov katalizirajo pretvorbo gvanozin-5'-trifosfata (GTP) v ciklični 3',5'-gvanozin monofosfat (cGMP) in pirofosfat. Ciklični monofosfat v živalskih celicah služi kot sekundarni sporočevalec, ki prek od-cGMP-odvisnih kinaz, fosfodiesteraz in ionskih kanalov modulira prenos živčnih signalov, fototransdukcijo, črevesno peristaltiko, krvni tlak, rast dolgih kosti in druge procese [37],[38].

Pri sesalcih je trenutno znanih 7 transmembranskih in 4 citosolne GC. Izoforme membranskih GC se izražajo tkivno specifično in so v nasprotju s topnimi GC, ki jih aktivirajo majhne molekule (npr. NO in CO), lahko aktivirane s številnimi raznovrstnimi molekulami in dražljaji, od majhnih peptidnih ligandov, kot sta na primer atrijski natriuretični peptid (ANP) ali možganski natriuretični peptid (BNP), do večjih gvanilat ciklazo-aktivirajočih proteinov (GCAP) ter celo sprememb v koncentraciji CO_2 /bikarbonata ali Ca^{2+} in celo temperaturi, odvisno od izoforme [38],[39].

Membranske GC so tkivno specifične

GC-A se v večji meri nahaja v ledvicah, srcu, mišicah, možganih in drugih organih ter vpliva na žejo, vazodilatacijo in vazopresijo. Skupaj z GC-B, ki je prisotna v srcu in v centralnem živčevju, zavira hipertrofijo srca. GC-B ima vlogo tudi pri razvoju centralnega živčevja tekom embrionalnega razvoja. Skupaj uravnavata ravnotežje telesnih tekočin in delovanje kardiovaskularnega sistema [39].

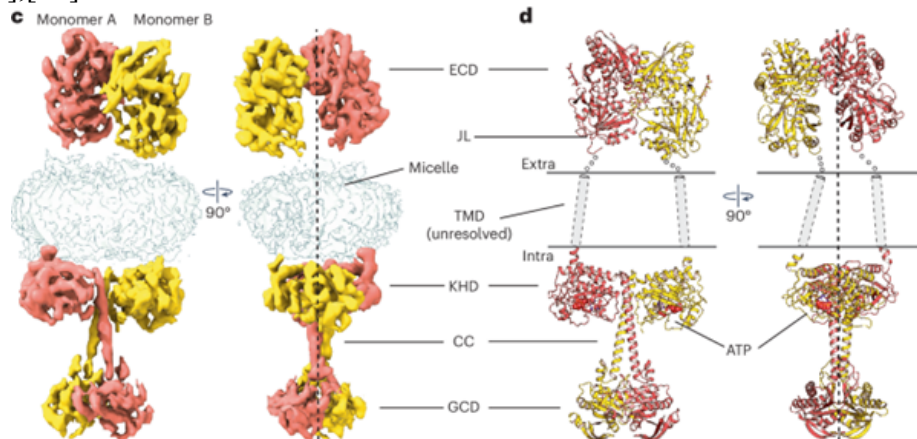
GC-C se nahaja v vilih črevesnih resic tankega črevesa. Sodeluje pri proliferaciji, diferenciaciji in migraciji ter apoptozi celic na poti iz kript v vile. Ob bakterijski okužbi se ob vezavi bakterijskega enterotoksina na receptor začnejo sproščati kloridni anioni v črevesni lumen, kar vodi v diarejo [38],[39].

GC-D in GC-G se lokalizirata v olfaktornih živcih ter nosnemu epiteliju ter sodelujeta v procesih kemorepcije v vodotopnih molekul ter volatilnih in plinastih substanc, GC-G sodeluje tudi pri termorepciji. Pri vrstah z bolj razvito olfaktorno sposobnostjo GC-G omogoča detekcijo feromonov za preplah in sodeluje pri uravnavanju izločanja kortikosteroidov [39]–[41]. GC-E in GC-F se nahajata na epiteliju mrežnice in sta vključena v modulacijo signalne transdukcije fotoreceptorja rodopsina [39].

Struktura in evolucija membranskih GC

Membranski receptorji z GC aktivnostjo imajo homologno zgradbo. Za njihovo zvitje, transportacijo in lokalizacijo so ključnega pomena ustrezni vzorci N-glikozilacije. Na

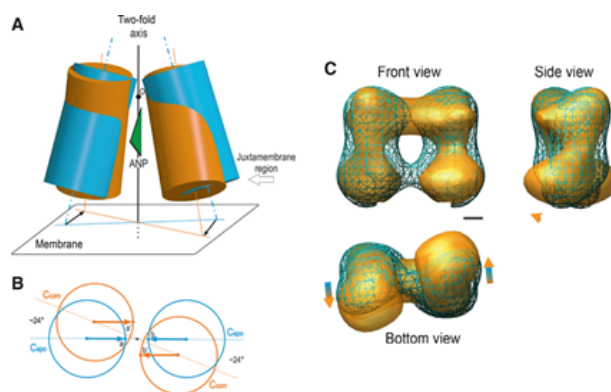
samo funkcionalnost glikozilacija ekstracelularne domene (ECD) nima vpliva. Funkcionalen receptor je homodimer (prikazan na sliki 5), katerega monomeri so sestavljeni iz N-terminalne ECD, odgovorne za prepoznavo in vezavo ligandov, ki je z obmembranskim linkerjem (JL) povezana s transmembranskim α -heliksom, ki se v citosolu zaključi z intracelularno domeno s protein-kinazno funkcijo (kinase homology domain, KHD). Neaktivna KHD prehaja v amfipatičen α -heliks oz. obrito vijačnico, ki omogoča asociacijo monomerov in se zaključi s C-terminalno GC domeno (GCD) [37],[38],[42].



Slika 5: Cryo-EM struktura GC-A (levo) ter cartoon prikaz GC-A (desno). Slika iz [42]

Ekstracelularna domena ob prisotnosti ionov (Cl^- v primeru ANP), ki so reverzibilno vezani na protein, omogoča prepoznavo/vezavo liganda. Nizka koncentracija ionov v primeru ANP in GC-A onemogoča vezavo ANP ter tako zavira natriurezo (tj. postopek izločanja odvečnih soli). Povišanje koncentracije soli omogoča vezavo ANP. Ob vezavi liganda se konformacija ECD spremeni. Sprememba v konformaciji se prenese na obmembranski linker, ki je ključen za prenos signala skozi protein v citosol (prikazano na sliki 6). Signal preide membrano, kjer je lahko moduliran s strani neaktivnih KHD. Nanje se lahko veže ATP, ki regulira stimulacijo receptorja s strani liganda. KHD omogočajo modulacijo signala tudi s svojo fosforiliranostjo. Defosforilacija KHD domene namreč vodi v desenzitacijo receptorja. Aktiven encim pretvarja GTP v cGMP v prisotnosti Mg^{2+} ali Mn^{2+} , saj ta pomagata senčiti naboj treh fosfatnih skupin molekule GTP [38],[42].

Evolucijsko izredno ohranjen JL je zaslužen za »konformacijski prenos signala« skozi protein. Točkovne mutacije v tem predelu vodijo v neodzivnost receptorjev na prisotnost liganda. Prav tako je izredno ohranjena tudi katalitična domena GC. Ta je podobna katalitični domeni adenilat ciklaze (AC) z minimalnimi spremembami v primarni strukturi, ki omogočajo substratno specifičnost za GTP namesto ATP. Preprostejši evkarionti imajo za razliko od višjih evkariontov GC iz 12 transmembranskih domen in dve katalitični domeni. Membranske GC so se verjetno razvile iz AC na kar kažeta dejstvi, da so AC primitivnih evkariontov podobne GC in da poznamo organizme, ki uporabljajo le cAMP in ne cGMP. Med samimi transmembranskimi GC se je GC-G prva evolucijsko oddaljila od ostalih, kasneje so se GC delile v dve skupini glede na tipe ligandov in sicer: hormonske (GC-A ter GC-B) in nehormonske GC (GC-C, GC-D, GC-E, GC-F) [39],[42].



Slika 6: Konformacijska sprememba ECD in obmembranskega linkerja pred (modro) in po (oranžno) vezavi ANP na GC-A. Slika iz [37]

Fotodetekcija

Fotodetekcija je postopek, ki poteka v živalskih fotoreceptorskih celicah – v paličicah in čepkih. Proteini zaslužni za proces fotodetekcije, med katere spadata tudi GC-E in GC-F, so med vrstami živali izredno ohranjeni. Ko 11-cis-retinal absorbira svetlobo se pretvori v trans-retinal. Takšna oblika molekule se lahko specifično veže na GPCR (G-protein coupled receptor) rodopsin ter ga tako aktivira. Aktiviran rodopsin katalizira izmenjavo GDP za GTP na proteinu transducinu (T), ki se loči na dve podenoti: $T\alpha$ -GTP ter $T\beta\gamma$. Alfa podenota je sposobna interakcije s cGMP fosfodiesterazo (PDE). Povzroči odstranitev inhibitorne podenote PDE, aktiviran protein je nato sposoben pretvorbe cGMP v 5'-GMP. Znižanje koncentracije cGMP privede do zaprtja od cGMP odvisnih Na^+ - K^+ kanalčkov, ki omogočajo vstop ionov v celico. Zaprtje kanalčkov čez čas privede do hiperpolarizacije celice, ki vodi v sprožitev signala, ki potuje v možgane. V času ko so kanalčki zaprti še vedno deluje drug membranski protein, ki »izvažaja« Ca^{2+} in sprejema Na^+ v celico. Ko koncentracija Ca^{2+} ionov pade, pride do aktivacije GC in deaktivacije PDE. Ciklaza ponovno proizvaja cGMP, zato se odprejo od cGMP-odvisni Na^+ - K^+ kanalčki. V vmesnem času se regenerira cis-retinal in receptorska celica je zmožna ponovne detekcije [42],[43].

Detekcija pešanja srca

BNP je peptidni hormon, ki je s svojim stranskim produktom procesiranja iz propeptida (NT-proBNP) pogosto uporabljen kot marker za zaznavo pešanja srca. Izločajo ga atrialni in ventrikularni miociti, pričakovana vrednost koncentracije peptida je za zdrave osebe okoli pikomolarna [37].

Za razliko od ANP, katerega sekrecija je direktno kontrolirana s krčenjem atrijev, kar povzroči večje fluktuacije (na raven ANP vpliva že sprememba drže ali koncentracije soli), je izločanje BNP kontrolirano transkripcijsko. Nihanja zato opazimo z v roku parih ur. Vezava BNP na GC-A povzroči vazodilatacijo ter zavira hipertrofijo srca. Za izločanje pa je potreben dolgotrajen stimulus, ki vpliva na intenzivnejše krčenje srčnih sten. Bolniki s pešajočim srcem imajo kronično povišane ravni peptida BNP in njegovega stranskega produkta, ki se sproščata v kri in ju zato standardno detektiramo za dokazovanje ali določanje ravni pešanja srca [37],[44].

Literatura:

- [1] Y. Qi: Receptor tyrosine kinases in breast cancer treatment: unraveling the potential. *American Journal of Cancer Research*. **2024**, *14*(9), str. 4172–4196.
- [2] R. Trenker, N. Jura: Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Current Opinion in Cell Biology*. **2020**, *63*, str. 174–185.
- [3] W. R. Montor, A. R. O. S. E. Salas, F. H. M. de Melo: Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: The current arsenal of inhibitors. *Molecular Cancer*. *BioMed Central*. **2018**, *17*(55).
- [4] 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.
- [5] S. W. Cowan-Jacob: Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2006**, *63*, str. 2608–2625.
- [6] E. Zwick, J. Bange, A. Ullrich: Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*. **2001**, *8*, str. 161–173.
- [7] 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.
- [8] X. Lin, S. Lee, G. Sun: Functions of the activation loop in Csk protein-tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, *278*, str. 24072–24077.
- [9] C. Liu, Z. Li, Z. Liu, S. Yang, Q. Wang, Z. Chai: Understanding the P-Loop Conformation in the Determination of Inhibitor Selectivity Toward the Hepatocellular Carcinoma-Associated Dark Kinase STK17B. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **2022**, *9*(901603).
- [10] M. A. Lemmon, J. Schlessinger: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **2010**, *141*(7), str. 1117–1134.
- [11] Wintheiser GA, Silberstein P. Physiology, Tyrosine Kinase Receptors. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538532/>
- [12] De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Updated 2016 Apr 27]. In: Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
- [13] Wang, H., Kadlecsek, T. A., Au-Yeung, B. B., Goodfellow, H. E., Hsu, L. Y., Freedman, T. S., & Weiss, A. (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a002279. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002279>
- [14] Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, *72*, 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>

- [15] Salter M. W. (1998). Src, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity. *Biochemical pharmacology*, 56(7), 789–798. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00124-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00124-5)
- [16] Lai, K. O., & Ip, N. Y. (2009). Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Current opinion in neurobiology*, 19(3), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.04.009>
- [17] Jeltsch, M., Leppänen, V. M., Saharinen, P., & Alitalo, K. (2013). Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a009183. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009183>
- [18] Burden, S. J., Yumoto, N., & Zhang, W. (2013). The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a009167. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009167>
- [19] Du, Z., Lovly, C.M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer* 17, 58 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>
- [20] Siveen, K.S., Prabhu, K.S., Achkar, I.W. *et al.* Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products. *Mol Cancer* 17, 31 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0788-y>
- [21] Hu, X., li, J., Fu, M. *et al.* The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Sig Transduct Target Ther* 6, 402 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>
- [22] Szilveszter, K. P., Németh, T., & Mócsai, A. (2019). Tyrosine kinases in autoimmune and inflammatory skin diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01862>
- [23] Matsubara, T., Yasuda, K., Mizuta, K., Kawaue, H., & Kokabu, S. (2022). Tyrosine Kinase Src Is a Regulatory Factor of Bone Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5508. <https://doi.org/10.3390/ijms23105508>
- [24] Siehl, J., & Thiel, E. (2007). C-kit, GIST, and imatinib. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 176, 145–151. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46091-6_12
- [25] Carter J, Tadi P. Erlotinib. [Updated 2024 Oct 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554484/>
- [26] Greenblatt K, Khaddour K. Trastuzumab. [Updated 2024 Jun 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532246/>
- [27] Wang H. (2014). Lapatinib for the treatment of breast cancer in the People's Republic of China. *OncoTargets and therapy*, 7, 1367–1373. <https://doi.org/10.2147/OTT.S60586>
- [28] Motaln, H., & Rogelj, B. (2023). The Role of c-Abl Tyrosine Kinase in Brain and Its Pathologies. *Cells*, 12(16), 2041. <https://doi.org/10.3390/cells12162041>

- [29] Sopko, R., & Perrimon, N. (2013). Receptor tyrosine kinases in *Drosophila* development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a009050. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009050>
- [30] <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.11.30>.
- [31] E. Martinez-Hackert, A. Sundan, T. Holien: Receptor binding competition: A paradigm for regulating TGF- β family action. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd February 1, 2021, pp 39–54.
- [32] Z. Deng, T. Fan, C. Xiao, H. Tian, Y. Zheng, C. Li, J. He: TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature December 1, 2024.
- [33] M. Huse, Y.-G. Chen, J. Massagué, J. Kuriyan: *Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF Receptor in Complex with FKBP12*. 1999; Cell, Vol. 96.
- [34] J. Sevillano, M. G. Sánchez-Alonso, J. Pizarro-Delgado, M. del P. Ramos-Álvarez: Role of Receptor Protein Tyrosine Phosphatases (RPTPs) in Insulin Signaling and Secretion. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 5812.
- [35] N. M.-N. Dubé: *Protein tyrosine phosphatase 1B regulates metabolic, oncogenic, and hematopoietic function* <https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/8w32r6116> (pridobljeno 10. maj 2025).
- [36] J. N. Andersen, O. H. Mortensen, G. H. Peters, P. G. Drake, L. F. Iversen, O. H. Olsen, P. G. Jansen, H. S. Andersen, N. K. Tonks, N. P. H. Møller: Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, 21, 7117–7136
- [37] 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.
- [38] L. R. Potter: Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 2011, 23, 1921–1926.
- [39] Y. Takei: Evolution of the membrane/particulate guanylyl cyclase: From physicochemical sensors to hormone receptors. *Gen Comp Endocrinol* 2022, 315, 113797.
- [40] Y. C. Chao, C. J. Cheng, H. T. Hsieh, C. C. Lin, C. C. Chen, R. B. Yang: Guanylate cyclase-G, expressed in the Grueneberg ganglion olfactory subsystem, is activated by bicarbonate. *Biochemical Journal* 2010, 432, 267–273.
- [41] T. Leinders-Zufall, R. E. Cockerham, S. Michalakis, M. Biel, D. L. Garbers, R. R. Reed, F. Zufall, S. D. Munger: Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 14507–14512.
- [42] 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.

- [43] D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger: *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed.; W.H. Freeman: New York, 2005.
- [44] Z. Cao, Y. Jia, B. Zhu: BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine. *Int J Mol Sci* 2019, 20, 1820.