

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Δομή, λειτουργία των Rho GTPασών και ο ρόλος τους στον καρκίνο του πνεύμονα

Οι Rho κινάσες είναι μια οικογένεια μικρών σηματοδοτικών GTPασών, που ανήκουν στην υπεροικογένεια των Ras πρωτεϊνών. Η κύρια λειτουργία τους είναι η ρύθμιση του κυτταροσκελετού προκειμένου να πραγματοποιούνται σωστά καίριες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η μορφογένεση, η αύξηση των νευρώνων, η κυτταρική διαίρεση, η κυτταρική προσκόλληση και η κυτταρική μετανάστευση. Η απορρύθμισή τους έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου. Σε λίγους τύπους καρκίνου έχουν βρεθεί μεταλλάξεις των ίδιων των Rho κινασών. Στους περισσότερους όμως τύπους καρκίνου οι πρωτεΐνες (GEFs, GAPs και GDIs) που συμμετέχουν στη ρύθμιση των Rho κινασών είναι απορρυθμισμένες, οδηγώντας είτε στην υπερέκφρασή τους είτε στη μειωμένη έκφρασή τους. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον καρκίνο, οι Rho έχει δειχθεί ότι δρουν τόσο ως ογκογονίδια, όσο και ως ογκοκατασταλτικά μόρια, τα οποία επάγουν και αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου, αντίστοιχα. Στην πλειονότητα των καρκινικών ιστών παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση των Rho GTPασών σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς. Στο παρόν άρθρο ανασκόπησης δίνεται έμφαση στον τρόπο έκφρασής τους στους διάφορους τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πλέον συνήθη μορφή καρκίνου και χωρίζεται σε δύο κύριους τύπους, το μικροκυτταρικό (SCLC) και το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα (NSCLC). Περίπου το 12,5% των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων στον κόσμο είναι καρκίνοι του πνεύμονα. Γι' αυτόν το λόγο, καθώς επίσης και επειδή ο βρογχογενής καρκίνος του πνεύμονα (lung cancer subscale, LCS) έχει πολύ ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, στην παρούσα ανασκόπηση επιθυμία μας ήταν η επισήμανση της συσχέτισης μεταξύ της δράσης των Rho κινασών (η οποία περιλαμβάνει τον πιθανό ογκογόνο ή ογκοκατασταλτικό ρόλο τους) τόσο με την ανάπτυξη, όσο και με τη μετάσταση αυτών των καρκινωμάτων.

1. ΔΟΜΗ ΤΩΝ RHO GTPΑΣΩΝ

Οι Rho GTPάσες είναι μια οικογένεια μικρών σηματοδοτικών G-πρωτεϊνών, οι οποίες ανήκουν στην υπεροικογένεια των Ras πρωτεϊνών. Στον άνθρωπο κωδικοποιούνται από 20 περίπου γονίδια και κατηγοριοποιούνται με βάση την αμινοξική τους ομοιότητα σε οκτώ υποοικογένειες.¹

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, οι υποοικογένειες είναι οι εξής: Rho, Rac, Cdc42, RhoF-D, RhoV-U, RhoBTB, RND και RhoH. Οι τέσσερις πρώτες υποοικογένειες ανήκουν στις κλασικές Rho GTPάσες, δηλαδή σε αυτές τις Rho όπου η λειτουργία τους ελέγχεται από την εναλλαγή του GDP σε GTP από τους GEFs (guanine nucleotide exchange factors) και αντίστροφα από τις GAPs (GTPase activating proteins). Αντίθετα, οι υπόλοιπες ονομάζονται άτυπες Rho GTPάσες

καθώς είναι κατά κύριο λόγο συνδεδεμένες με το GTP, είτε λόγω κάποιας αμινοξικής αντικατάστασης σε κατάλοιπα ζωτικής σημασίας για την GTP ενεργότητα των πρωτεϊνών, είτε λόγω της αυξημένης νουκλεοσιδικής αλλαγής. Γι' αυτόν το λόγο, η ενεργότητά τους ελέγχεται από τη γονιδιακή έκφραση, τη σταθερότητα των πρωτεϊνών και τη φωσφορυλίωσή τους.

Οι Rho GTPάσες μοιράζονται μια κοινή G-επικράτεια, η οποία αποτελείται από έξι κλώνους β-πτυχωτού πεδίου που περιβάλλεται από α-έλικες.² Οι διαφορές μεταξύ των GDP και GTP-δεσμευμένων δομικών μορφών των Rho περιορίζονται κυρίως σε δύο τμήματα των μορίων τους, που αναφέρονται ως διακόπτης I και διακόπτης II. Οι διαμορφώσεις των διακοπών I και II στην GTP-δεσμευμένη μορφή των Rho σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014, 31(2):150-164
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2014, 31(2):150-164

Μ.Ε. Ξυπολιτά,
Ε. Σκούρτη,
Α. Κρητικός,
Σ. Βλαχόπουλος,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής
Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό
Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

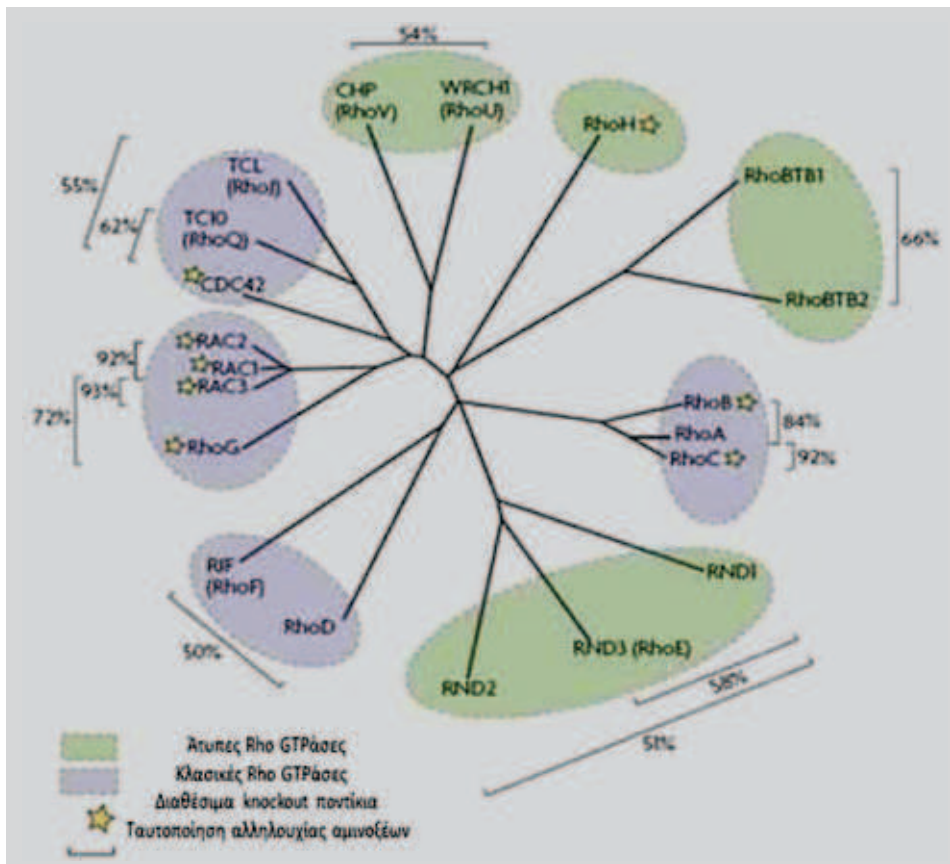
The structure and function of Rho
GTPases and their role in lung
cancer

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Καρκίνος του πνεύμονα
Rho GTPάσες

Υποβλήθηκε 17.7.2013
Εγκρίθηκε 25.7.2013



Εικόνα 1. Η οικογένεια των Rho GTPασών. Ένα φυλογενετικό δένδρο που βασίζεται σε μια μέθοδο σύγκρισης των αλληλουχιών των αμινοξέων από τις 20 Rho πρωτεΐνες GTPάσης. Το δένδρο αποδεικνύει τη σχέση μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας. Οι Rho GTPάσες σχηματίζουν οκτώ υποοικογένειες. Η πρώτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις RAC1, RAC2, RAC3 και RhoG, η δεύτερη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις CDC42, TC10 (επίσης γνωστή ως RhoQ) και TC10-like πρωτεΐνη (TCL, επίσης γνωστή ως RhoJ). Η τρίτη περιλαμβάνει τις CHP (επίσης γνωστή ως RhoV) και WNT1-ανταποκρινόμενο ομόλογο-1 της CDC42 (WRCH1, επίσης γνωστή ως RhoU), η τέταρτη περιλαμβάνει την RhoH, η πέμπτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις RhoBTB1 και RhoBTB2, η έκτη περιλαμβάνει τις RhoA, RhoB και RhoC, η έβδομη περιλαμβάνει τις RND1, RND2 και RND3 (επίσης γνωστή ως RhoE) και η όγδοη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις Rap1-αλληλεπιδρώντα παράγοντα-1 (RIF, επίσης γνωστή ως RhoF) και RhoD.

μεταξύ της γ-φωσφορικής ομάδας και της κύριας αλυσίδας αμινομάδας της αμετάβλητης Thr 37 (στο διακόπτη I) και της Gly 62 (στο διακόπτη II). Αντίθετα, η GDP μορφή των Rho GTPασών στερείται αυτών των αλληλεπιδράσεων και δείχνει μια μεγάλη διακύμανση στις διαμορφώσεις των διακοπών.

Επίσης, οι περισσότερες Rho GTPάσες έχουν ένα C-τελικό CAAX μοτίβο. Αυτό μπορεί να έχει τροποποιηθεί μετα-μεταφραστικά με την προσθήκη μιας υδρόφοβης πρενυλικής ουράς σε κατάλοιπο κυστεΐνης.

Τα ιόντα Mg^{2+} είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα της GTPάσης. Είναι ενδιαφέρον ότι η εξάλειψη των Mg^{2+} επάγει μεγάλες διαμορφωτικές μεταβολές στο διακόπτη I, οι οποίες οδηγούν σε άνοιγμα της θέσης πρόσδεσης της γουανίνης.

2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ RHO GTPΑΣΩΝ

Η ενεργότητα των Rho πρωτεϊνών κατά κύριο λόγο βασίζεται στην ανακύκλωση του GDP (ανενεργή κατάσταση) σε GTP (ενεργή κατάσταση) και το αντίστροφο.³ Η ανακύκλωση μεταξύ αυτών των δύο καταστάσεων ελέγχεται από τρεις ομάδες πρωτεϊνών· τους παράγοντες ανταλλα-

γής του νουκλεοτιδίου γουανίνη (GEFs), τις πρωτεΐνες της ενεργοποιημένης GTPάσης (GAPs) και τους αναστολείς αποδέσμευσης της γουανίνης (GDIs).

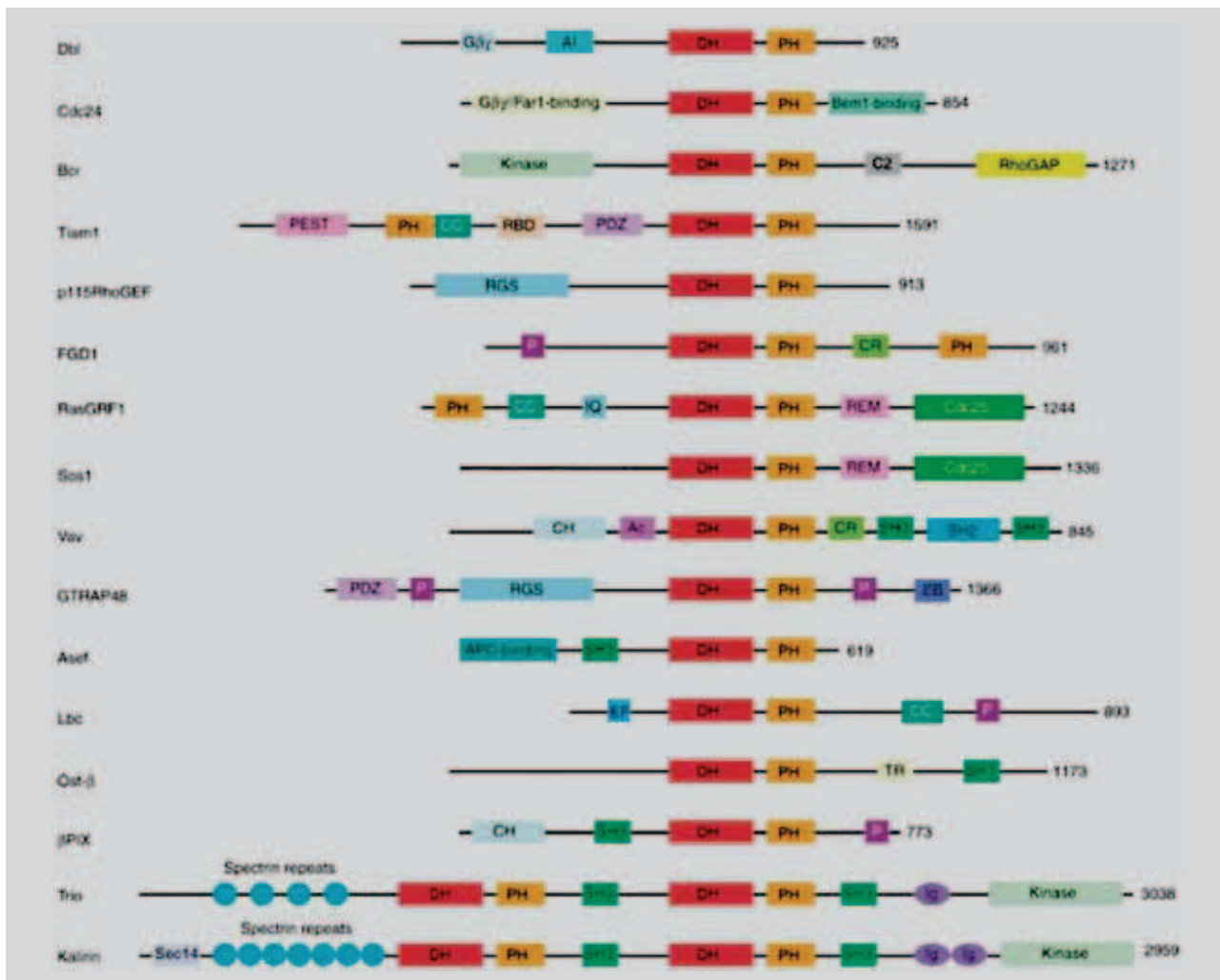
Οι GEFs έχουν αναγνωριστεί ως ενδοκυτταρικοί τελεστές των υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, περιλαμβανομένων των υποδοχέων των κινασών τυροσίνης, των G-συζευγμένων πρωτεϊνικών υποδοχέων και των υποδοχέων προσκόλλησης. Πιο συγκεκριμένα, οι GEFs είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την αναδρομική σηματοδότηση των Rho. Μέχρι στιγμής, δύο οικογένειες των Rho-GEFs έχουν βρεθεί: Η Dbl (diffuse B-cell lymphoma) οικογένεια και η DOCK (dicator of cytokinesis) οικογένεια.

Η οικογένεια Dbl έλαβε το όνομά της από την πρωτεΐνη Dbl, που ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1985 λόγω της ογκογόνου δράσης σε NIH 3T3 μετασχηματισμένα κύτταρα με γενετικό υλικό προερχόμενο από λέμφωμα των B-κυττάρων του ανθρώπου.⁴ Μέχρι σήμερα, στον άνθρωπο έχουν ανακαλυφθεί 69 Dbl πρωτεΐνες. Η δομή μερικών από αυτές παρουσιάζεται στην εικόνα 2. Όλες περιέχουν τη συντηρημένη επικράτεια DH/PH (Db1 homology/Pleckstrin homology), που είναι απαραίτητη για τις βιοχημικές και τις λειτουργικές ενεργότητες των GEFs στο κύτταρο. Συγκεκριμένα, μέσω της σύνδεσης

της DH των GEFs με τις Rho επάγεται η απομάκρυνση του GDP και ακολούθως η πρόσδεση του κυτταροπλασματικού GTP σχηματίζοντας την ενεργή μορφή της GTPάσης, η οποία θα μεταδώσει σήματα σε μεταγενέστερα μόρια-τελεστές, ενώ η PH ελέγχει την ενεργότητα του DH τομέα και μέσω της αλληλεπίδρασής της με φωσφοϊνοσιτίδια μεταφέρει το σύμπλοκο στη μεμβράνη. Σε όσες GEFs των Rho απουσιάζει η PH περιοχή, όπως στην Tuba, υπάρχει μια BAR επικράτεια που αγκυροβολεί στη μεμβράνη και αντισταθμίζει αυτή την έλλειψη. Επί πλέον, χαρακτηρίζονται από ποικίλους τομείς που είναι υπεύθυνοι για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, όπως οι SH3, CR, CH, C2, AI κ.ά., δεικνύοντας

ένα χωροχρονικό μηχανισμό ρύθμισης των Rho GEFs, μέσω της σύζευξής τους με πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Πολλά μέλη της οικογένειας Dbl φαίνεται να υπάρχουν σε μια ανενεργή ή μερικώς ενεργή κατάσταση πριν από τη διέγερσή τους. Η τρέχουσα βιβλιογραφία δείχνει ότι η βασική τους κατάσταση μπορεί να διατηρηθεί με μία ή περισσότερες μορφές τεσσάρων πιθανών ρυθμιστικών μοντέλων, περιλαμβανομένων των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.⁵ Το πρώτο μοντέλο είναι μέσω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των DH και PH επικρατειών. Το δεύτερο δυνατό μοντέλο ρύθμισης είναι μέσω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης ενός



Εικόνα 2. Η δομή των επικρατειών των πλέον αντιπροσωπευτικών μελών της Dbl οικογένειας. Ac: Μοτίβο πλούσιο σε όξινα αμινοξέα, AI: Τομέας αυτοκαταστολής, C2: Εξαρτώμενη από το ασβέστιο σύνδεση λιπιδίων, CC: Περιελιγμένη έλικα, Cdc25: Μοτίβο RasGEF, CH: Ομολογία με καλπονίνη, CR: Μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου πλούσιο σε κυστεΐνη, DH: Dbl ομολογία, EB: Δέσμευση της EAAT4, EF: EF πλευρικό ασβέστιο δεσμευόμενο μοτίβο, Gβγ: Gβγ δεσμευτική περιοχή, Ig: Μοτίβο παρόμοιο με ανοσοσφαιρίνη, IQ: Μοτίβο πρόσδεσης καλμοδοουλίνης, μοτίβο κίνησης: Σερίνης/θρεονίνης κίνησης, P: Τομέας πλούσιος σε προλίνη, SH3: Μοτίβο ομολογίας με Src 3, PDZ: Επικράτεια μετασυναπτικής πυκνότητας, DHR ή GLGF τομέας, PEST: Πλούσιο στα αμινοξέα P, E, S και T, μοτίβο αποικοδόμησης, PH: Επικράτεια ομολογίας με πλεκστρίνη, RBD: Τομέας Ras-σύνδεσης, REM: Ras εναλλακτικό μοτίβο, RGS: Μοτίβο του ρυθμιστή της σηματοδοτικής G-πρωτεΐνης, RhoGAP: Μοτίβο της Rho GTPάσης ενεργοποιημένης πρωτεΐνης, Sec14: Τομέας παρόμοιος με sec14, SH2: Μοτίβο ομολογίας με Src 2, TR: Συσχέτιση με Tat/RAG8.

ρυθμιστικού τομέα με τον τομέα DH ή τον PH της GEF πρωτεΐνης. Οι εν λόγω αλληλεπιδράσεις θεωρείται ότι περιορίζουν την κανονική λειτουργία των DH ή και των PH τομέων, καλύπτοντας την πρόσβαση του υποστρώματος των Rho GTPασών ή και τροποποιώντας την ενδοκυτταρική στόχευση μεσολαβούμενη από την περιοχή PH. Το τρίτο πιθανό μοντέλο περιλαμβάνει ολιγομερισμό μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των DH τομέων. Τέλος, υπάρχουν πολλοί άλλοι κυτταρικοί παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία συγκεκριμένων μελών των DbI μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών, συνδράμοντας έτσι στη διατήρηση της βασικής κατάστασης των GEFs.

Η οικογένεια των DOCK πρωτεϊνών έχει διαφορετική δομή από την DbI οικογένεια και στερείται της DH (DbI ομολογία) επικράτειας. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η εν λόγω οικογένεια περιέχει μόνο GEFs για τις υποοικογένειες Rac και Cdc42 και είναι συντηρημένη στα φυτά και τα ζώα, αλλά όχι στους ζυμομύκητες.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε ήταν η DOCK 180, μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 180 kDa που αλληλεπιδρά με το πρωτογονιδιο *c-crk* και εμπλέκεται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Σήμερα, περισσότερες από 12 πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί ως ομόλογες στην DOCK 180 και ονομάζονται DOCK/Zizimin/CZH οικογένεια πρωτεϊνών.⁶ Αυτές οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από δύο συντηρημένους τομείς: τον DHR1/CZH1 και τον DHR2/CZH2/Docker, οι οποίοι είναι περιοχές με ομολογία με την DOCK.

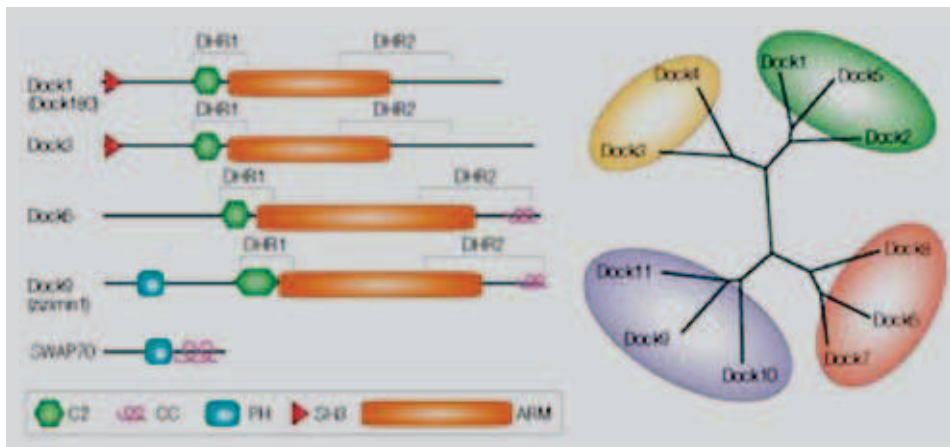
Οι DOCK GEFs εμφανίζουν ομολογία σε τρεις περιοχές, στο αμινοτελικό τους άκρο φέρουν την επικράτεια PH και την DHR1 και στο καρβοξυτελικό την DHR2 (εικ. 3). Ενδεχομένως, η λειτουργία του PH τομέα να σχετίζεται με τη στόχευση πρωτεϊνών, την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών

και πιθανόν με την αγκυροβόληση των πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη ή με το διμερισμό τους. Ο τομέας DHR1 φαίνεται ότι πάντοτε προηγείται του DHR2. Ο πρώτος τομέας καλύπτεται και από τη C2, μια περιοχή πρόσδεσης λιπιδίων που εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις ασβεστίου του κυττάρου, υποδηλώνοντας μια μεσολαβούμενη από το ασβέστιο σηματοδότηση για τις DOCK GEFs. Η ίδια περιοχή μεσολαβεί στη σηματοδότηση μέσω της PIP3 και διαδραματίζει ρόλο στην κυτταρική επιμήκυνση και μετάναστευση μέσω της αλληλεπίδρασης της DOCK 180 με τη Rac. Η λειτουργία του τομέα DHR2 αφορά στην κατάλυση της ανταλλαγής του GDP σε GTP πάνω στις Rho πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, ο συγκεκριμένος τομέας δεν φέρει κάποια ομοιότητα με τον DH των DbI GEFs και μεσολαβεί στην πρόσδεση των GDP-Rho.

Μια ιδιαιτερότητα που εμφανίζει ένα μέλος της DOCK οικογένειας, η DOCK 11, που έχει σχεδόν ίδια δομή με την DOCK 9, είναι ότι εκτός από το γεγονός πως αποτελεί έναν εξειδικευμένο ενεργοποιητή της Cdc42, επί πλέον είναι μια άτυπη GEF καθώς μπορεί να προσδεθεί και στην ενεργοποιημένη μορφή της Cdc42 μέσω του αμινοτελικού ενεργοποιημένου Cdc42 τομέα σύνδεσης του GTP.⁴ Επίσης, ο τομέας SH3 στις DOCK 180 και 3 έχει αυτοανασταλτική δράση, καθώς έχει τη δυνατότητα να προσδέεται και να αναστέλλει τις ενεργότητες της DHR2 περιοχής.

Μέχρι στιγμής, δεν έχει διευκρινιστεί με ποιο διαφορετικό μηχανισμό υφίσταται η ανταλλαγή του GDP σε GTP από τις διαφορετικές οικογένειες των GEFs. Ο λόγος για την ύπαρξη δύο λειτουργικά πλεοναστικών οικογενειών στα ζωικά κύτταρα δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Σε αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί ότι μόνες τους οι Rho πρωτεΐνες δεν μπορούν να ξεχωρίσουν τους ποικίλους τελεστές τους, καθώς εμφανίζουν τα ίδια μοτίβα αλληλεπίδρασης με παρόμοια συγγένεια



Εικόνα 3. Απεικόνιση της δομής των επικρατειών των μελών της DOCK οικογένειας. C2: Εξαρτώμενη από το ασβέστιο σύνδεση λιπιδίων CC περιελιγμένη έλικα, PH: Επικράτεια ομολογίας με πλεκστρίνη, DHR1 και DHR2: Dock ομόλογες περιοχές 1 και 2, SH3: Μοτίβο ομολογίας με Src 3, ARM: Armadillo συστοιχία.

για την ενεργοποίηση των Rho. Γι' αυτόν το λόγο και βασιζόμενοι στο ότι οι GAPs και οι GDIs καταστέλλουν τη λειτουργία των Rho πρωτεϊνών, κατά πάσα πιθανότητα οι GEFs είναι τα μόρια που επιλέγουν τους εξειδικευμένους μεταγενέστερους τελεστές. Αυτό το επιτυγχάνουν είτε με την άμεση στρατολόγηση των μεταγενέστερων τελεστών στο σύμπλοκο GEF-Rho, είτε με τη μετακίνηση των Rho σε ένα διαμέρισμα στο οποίο εντοπίζεται ο τελεστής. Οι GEFs, χάρη στις πολλές περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών που περιέχουν, μπορούν και αντιλαμβάνονται αναδρομικά σήματα και δέχονται επί πλέον πληροφορίες μέσω της διασταύρωσής τους με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Οι GAPs είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ενισχύουν την εγγενή ικανότητα των μικρών GTPασών να υδρολύουν το δεσμευόμενο GTP σε GDP. Αρχικά, θεωρήθηκαν ως πρωτεΐνες τερματιστές με ένα δευτερεύοντα ρόλο σε σύγκριση με τις GEF πρωτεΐνες, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιούν τις Rho GTPάσες ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες και άλλα εξωκυτταρικά σήματα.⁷ Ωστόσο, αυτή η παρανόηση θα εκλείψει σύντομα, καθώς αυξανόμενες ενδείξεις πρότειναν ότι οι GAPs ρυθμίζονται και από εξωτερικά ερεθίσματα και διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε μια σειρά από Rho-μεσολαβούμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Οι δομές των GAP τομέων για τις διάφορες μικρές υποοικογένειες των Rho GTPασών είναι διαφορετικές, ενώ όλες οι GAP επικράτειες είναι διπλωμένες ως α-ελικοειδείς δομές. Κατά συνέπεια, στη μεταβατική κατάσταση, αλλά όχι στη θεμελιώδη κατάσταση, οι GAPs δρουν εισάγοντας μια άκρως συντηρημένη αργινίνη, που αναφέρεται ως «δακτύλιος αργινίνης», στην ενεργή θέση της GTPάσης. Αυτή αλληλεπιδρά άμεσα με τη γλουταμίνη 61 της GTPάσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σωστή τοποθέτηση του υδρολυτικού μορίου του νερού για τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Η σταθεροποίηση της συγκεκριμένης γλουταμίνης περιορίζει την ελευθερία του μορίου του νερού και μπορεί να μειώσει το ενεργειακό εμπόδιο για την υδρόλυση του GTP. Η ασπαργίνη 194, η οποία διατηρείται σε όλους τους RhoGAP τομείς, αλληλεπιδρά μέσω της κύριας αλυσίδας της και πιστεύεται ότι σταθεροποιεί τη θηλιά του τελεστή.

Το τρίτο ζευγάρι ρυθμιστικών πρωτεϊνών είναι οι GDIs, από τις οποίες τρία μέλη έχουν εντοπιστεί στα θηλαστικά. Είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με την ανενεργή μορφή των Rho GTPασών. Η σύνδεσή τους με τις Rho γίνεται μέσω ενός ισοπρενυλικού λιπιδίου (ή γερανυλγερανυλικής αλυσίδας) τους που είναι συνδεδεμένο στη C-τελική περιοχή τους. Οι GDIs έχουν μια δευτεροταγή δομή όμοια με αυτήν της ανοσοσφαιρίνης, που περιλαμβάνει εννέα β-κλώνους και περιέχει μια μικρή

έλικα, η οποία ακολουθείται από ένα μοτίβο έλικας-θηλιάς-έλικας στη N-τελική περιοχή.⁸ Η γερανυλγερανυλική αλυσίδα εισέρχεται σε μια υδρόφοβη θηλιά/τσέπη του β-πυρροσόμενου τομέα. Η τσέπη είναι επενδυμένη με συντηρημένα υδρόφοβα κατάλοιπα που συμβάλλουν σε ευνοϊκότερες van der Waals αλληλεπιδράσεις. Οι GDIs εφάπτονται κυρίως με το διακόπτη II και το C-τελικό τμήμα του διακόπτη I. Η πλευρική αλυσίδα του συντηρημένου ασπαρτικού από την περιοχή έλικας-θηλιάς-έλικας του GDI συνδέεται με υδρογονο-δεσμούς με τη θρεονίνη του διακόπτη I των Rho. Η εν λόγω αλληλεπίδραση σταθεροποιεί το σύντομο των ιόντων Mg²⁺ μέσω της κύριας αλυσίδας του καρβονυλίου της θρεονίνης και κατά συνέπεια ενισχύει τη συγγένεια για το νουκλεοσίδιο. Οι GDIs κάνουν εκτεταμένες επαφές με την περιοχή του διακόπτη II και, ταυτόχρονα με τη σταθεροποίηση του διακόπτη I, οδηγούν τόσο στην αναστολή του GDP όσο και στην υδρόλυση του GTP από τις Rho GTPάσες.

Μέχρι στιγμής, τρεις GDIs έχουν αναγνωρισθεί στα θηλαστικά: η RhoGDIα, η LyGDI ή RhoGDIβ και η RhoGDIγ. Αυτές λειτουργούν ως housekeeping γονίδια και η κύρια λειτουργία τους είναι να δρουν ως τσαπερόνες και να παρέχουν στο κύτταρο μια δεξαμενή από ανενεργές Rho, οι οποίες μπορούν να κατανεμηθούν σε οποιαδήποτε μεμβράνη με λίγη ή καθόλου εξειδίκευση. Πάνω σε αυτές τις πρωτεΐνες δρουν κάποιοι παράγοντες μετακίνησης, όπως είναι η εζρίνη, η ραντιζίνη και η μοεσίνη (ERM). Η αμινοτελική τους περιοχή αλληλεπιδρά με τις RhoGDIs, επιτρέποντας την ενεργοποίηση των Rho. Αυτοί οι παράγοντες φωσφορυλιώνονται από κινάσες που είναι μεταγενέστεροι τελεστές των Rho, συμβάλλοντας έτσι στην επανενεργοποίησή τους, εμφανίζοντας ένα μηχανισμό θετικής ανάδρασης για τις Rho GTPάσες.

Σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι GTPάσες τροποποιούνται στο CAAX μοτίβο και από το είδος αυτής της τροποποίησης εξαρτάται ο τελικός προορισμός της κάθε GTPάσης. Επίσης, τον ίδιο ρόλο εξυπηρετούν και άλλες επικουρικές αλληλεπιδράσεις στις οποίες εκτίθεται κατά βάση το C-άκρο της GTPάσης, κυρίως μεταξύ πρωτεϊνών.

Όπως είναι αντιληπτό και από τα παραπάνω δεδομένα, ενώ οι γνώσεις μας για τη μετα-μεταγραφική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση των Rho GTPασών είναι εκτεταμένη, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη μεταγραφική ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών. Μόνο για λίγες Rho GTPάσες (Rac1, Rac2, RhoG και RhoB) έχει χαρακτηριστεί η περιοχή του υποκινητή.⁹⁻¹¹ Ο υποκινητής της Rac1 έχει χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των housekeeping γονιδίων: Ένα μικρού μεγέθους TATA/CCAAT πιο μακριά από την περιοχή του υποκινητή, με υψηλή περιεκτικότητα σε GC και με ένα μι-

κρό αριθμό αλληλουχιών αναγνώρισης για μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι c-Jun/c-Fos (AP1, AP2, AP4), Ίκαρος, E2P-2, Sp1 και MZF1. Παρόμοια δομή και μέγεθος με το Rac1 υποκινητή εμφανίζει ο υποκινητής του RhoG, με έλλειψη όμως των περιοχών TATA και CCAAT και με λιγότερες θέσεις σύνδεσης για τους παρακάτω μεταγραφικούς παράγοντες Sp1, AP2 (κυρίως) και AP1, NF1 και PE-A2 (σε μικρότερο βαθμό). Από την άλλη πλευρά, ο υποκινητής της RhoB περιέχει δύο πιθανές περιοχές TATA και ένα μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR), ακολουθούμενο από μια επαναλαμβανόμενη μονάδα 34-bp, η οποία πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου.

3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Οι λειτουργίες των Rho πηγάζουν από την ικανότητά τους να ελέγχουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, την ομαδοποίηση των μικροϊνιδίων ακτίνης και γενικά την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού. Τα τελευταία χρόνια, χάρη στη διαθέσιμότητα knock-out ποντικών για πολλά μέλη της οικογένειας των Rho, συγκεντρώθηκαν νέες πληροφορίες σχετικά με το σηματοδοτικό τους ρόλο στον κυτταροσκελετό και στην ανάπτυξη. Παρακάτω αναφέρονται μερικές από τις κύριες λειτουργίες της κάθε υποοικογένειας των Rho.

3.1. Cdc42 υποοικογένεια

Αρχικά, μια από τις λειτουργίες της Cdc42 βρέθηκε στο σακχαρομύκητα με τη συμμετοχή της στη διαδικασία της σύζευξης και αργότερα ανακαλύφθηκε ο κρίσιμος ρόλος της στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης τόσο στην *Drosophila melanogaster* και στον *Caenorhabditis*, όσο και στα θηλαστικά. Βασικός ρόλος της Cdc42 υποοικογένειας είναι ο σχηματισμός ελασματοποδίων, παράλληλων δεσμών νηματοειδούς F-ακτίνης και λεπτών κυτταροπλασματικών προεξοχών που εκτείνονται στο πρόσθιο άκρο των ελασματοποδίων,¹² μέσω της πρόσδεσης της ενεργοποιημένης Cdc42 σε πρωτεΐνες όπως η WASP, η οποία εμπλέκεται στο σύνδρομο Wiskott-Aldrich, ή ο υποδοχέας της ινσουλίνης του υποστρώματος της p53 (IRSp53), που με τη σειρά τους ενεργοποιούν το σύμπλοκο της ακτινο-σχετιζόμενης πρωτεΐνης-2/3 (ARP2/3).¹³ Επίσης, ένα μέλος της οικογένειας των φορμινών, η θηλαστική διάφανη πρωτεΐνη 2 (mDia2), μεσολαβεί στη διέγερση του πολυμερισμού των μη διακλαδωμένων νηματιών ακτίνης.¹⁴

Επίσης, η Cdc42 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των νευρώνων και την επιμήκυνση του νευράξονα. Οι νευρώνες οι οποίοι παρουσιάζουν έλλειψη της Cdc42 σχηματίζουν λίγα ή καθόλου ελασματοπόδια και αυξημένη φωσφορυλίωση της κοφιλίνης.¹⁵ Η κοφιλίνη καθορίζει τη δυναμική της

ακτίνης ρυθμίζοντας τον αποπολυμερισμό της και μέσω της φωσφορυλίωσής της απενεργοποιείται. Ομοίως, απουσία της Cdc42 τα έλυτρα των νευραξόνων είναι λεπτότερα λόγω αδυναμίας μετακίνησης του κυτταροπλάσματος, καθώς οι πλασματικές μεμβράνες των ολιγοδενδριτικών κυττάρων περιελλίσσονται γύρω από τους νευράξονες.

Ένας πολύ σημαντικός ρόλος της Cdc42 είναι και η ρύθμιση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων μέσω του PAR συμπλόκου (PAR6-PAR3-aPKC). Μέσω της κυτταρικής πολικότητας το κύτταρο ανταποκρίνεται σε εξωκυτταρικά σήματα, αναδιοργανώνοντας και διατηρώντας τις πρωτεΐνες και τα οργανίδια σε μια ασύμμετρη διάταξη. Ακόμη, μέσω του ελέγχου της πολικότητας μπορεί να επιτευχθεί και κυτταρικός καθορισμός πολλών διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Γι' αυτόν το λόγο, η πολικότητα των κυττάρων έχει θεμελιώδη σημασία για μια σειρά κυτταρικών διαδικασιών, περιλαμβανομένης της μετάστασης, της διαφοροποίησης και της μορφογένεσης. Η Cdc42 αλληλεπιδρά απ' ευθείας με την πρωτεΐνη PAR-6 και την PAR-3 και με την άτυπη πρωτεϊνική κινάση C (aPKC) για να επάγει την πολικότητα σε πολλούς οργανισμούς. Χάρη σε αυτή την αλληλεπίδραση οι ανωτέρω παράγοντες σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους έμπροσθεν του κυττάρου και προσανατολίζουν το όργανο του Golgi και το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC) κατά τη διάρκεια εγκαθίδρυσης της μεταναστευτικής πολικότητας.¹⁶

Επί πλέον, η Cdc42 συμμετέχει στη χημειοταξία και την κατευθυνόμενη μετανάστευση πολλών κυτταρικών τύπων (μακροφάγων, T-λεμφοκυττάρων, ινοβλαστών κ.ά.). Ο έλεγχος της χημειοταξίας πραγματοποιείται μέσω της μείωσης του εντοπισμού της Rac και της ενεργοποίησής της στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου. Αντίθετα, μια αύξηση της Cdc42 μπορεί να ενισχύσει τη μεταναστευτική ταχύτητα των κυττάρων, καθώς διεγείρεται η Rac εξαρτημένη προέκταση νηματοποδίων.

3.2. Rac υποοικογένεια

Όσον αφορά στη Rac υποοικογένεια, αυτή αποτελείται από τη Rac1, τη Rac2, τη Rac3 και τη RhoG. Η Rac1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η Rac2 περιορίζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα και η Rac3 στον εγκέφαλο. Η RhoG είναι ευρέως εκφραζόμενη, αλλά τα επίπεδα έκφρασής της ποικίλλουν ανάλογα με τον ιστό. Τα μέλη της οικογένειας είναι υπεύθυνα για την έκταση των ελασματοποδίων και τον έλεγχο του σκελετού ακτίνης.¹⁷ Απουσία της Rac1 δεν πραγματοποιείται σχηματισμός ελασματοποδίων και δεν γίνονται οι προσεκβολές της μεμβράνης.

Επίσης, η Rac1 απαιτείται για τη διαμόρφωση της κα-

τάλληλης πολικότητας και της χημειόταξης. Η Rac2 είναι απαραίτητη τόσο για το σχηματισμό των ελασματοποδίων, όσο και τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων, ενώ η RhoG χρειάζεται για τη μετανάστευση των μακροφάγων, δεν έχει όμως κανένα χημειοτακτικό ρόλο. Έχει παρατηρηθεί ότι σε ερυθροκύτταρα στα οποία είναι ελαττωματικές ή απουσιάζουν οι Rac1,2 εμφανίζονται προβλήματα αναιμίας.

Επιπρόσθετα, τα μέλη της Rac υποοικογένειας συμβάλλουν στην ανάπτυξη του νευράξονα, στην καθοδήγησή του και στην επαγωγή της NADPH οξειδάσης και στο βακτηριακό θάνατο μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης.^{18,19} Έχει δειχθεί ότι σε απουσία των Rac1,2 ελαττώνεται η FcR και η CR3 μεσολαβούμενη φαγοκυττάρωση, παρ' όλο που για την πραγματοποίηση της ίδιας της φαγοκυττάρωσης απαραίτητες είναι η Cdc42 και τα μέλη της Rho οικογένειας.

3.3. Rho υποοικογένεια

Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στις Rho ισομορφές, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η επαγωγή του σχηματισμού ινών-stress σε περίπτωση υπερέκφρασης σε ινοβλάστες. Επίσης, ελέγχουν τη διακίνηση των ενδοσωμάτων.²⁰ Συγκεκριμένα, η RhoB είναι αυτή που εντοπίζεται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια και ρυθμίζει τη διακίνηση των κυστιδίων.²¹ Ένα παράδειγμα τέτοιας διακίνησης είναι αυτή του παράγοντα EGF από τη βασική στην κορυφαία πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων. Μέσα από πειράματα έχει δειχθεί ότι σε καταστολή της RhoB τα κύτταρα του ενδοθηλιακού σωλήνα οδηγούνται σε απόπτωση κατά τη δημιουργία του ενδοθηλιακού σωλήνα. Ακόμη, η ίδια ισομορφή επηρεάζει την πυρηνική διακίνηση της πρωτεϊνικής κινάσης B στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ένας μηχανισμός που πιθανολογείται ότι ρυθμίζει την ενδοθηλιακή επιβίωση. Ο ίδιος μηχανισμός μπορεί να σχετίζεται και με αλλαγές στη διακίνηση του VEGF υποδοχέα.

Η Rho οικογένεια σχετίζεται και με τις μεταστάσεις. Η RhoC ενεργοποιείται μέσω του miR-10b και μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της ROCK υφίσταται απώλεια των κυτταρικών συνδέσεων και κατ' επέκταση εισβολή των κυττάρων. Η RhoB πιστεύεται ότι λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, καθώς η έκφρασή του είναι μειωμένη σε πολλούς τύπους καρκίνου ενώ η υπερέκφρασή του καταστέλλει την κυτταρική αύξηση, την επιβίωση, την εισβολή και τη μετάσταση. Σε σχετικά πειράματα, ινοβλάστες οι οποίοι είναι RhoB^{-/-} εμφανίζουν ελαττώματα στην προσκόλληση και στη μετάσταση και είναι περισσότερο ευαίσθητοι σε αλλαγές του κυτταροσκελετού και του πολλαπλασιασμού επαγόμενες από τον παράγοντα TGF-β. Αυτό συνάδει και με την απόδειξη ότι η RhoB ελέγχει την έκφραση του υποδοχέα TGF-β.^{22,23}

3.4. RhoH υποοικογένεια

Μια GTPάση που πρόσφατα ανακαλύφθηκε και έχει εντοπιστεί μόνο στα σπονδυλωτά είναι η RhoH. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι αναστέλλει τη σηματοδότηση των υπόλοιπων Rho GTPασών, καθώς η υπερέκφρασή της ανέστειλε τη Rac1 και RhoA μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα NFκB και της p38 MAPK σηματοδότησης σε αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές.²⁴ Εκφράζεται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα και η έκφρασή της ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου της και της 5' εναλλακτικής συρραφής του mRNA της RhoH. Ανάλυση σε knock out για τη RhoH ποντίκια εμφάνισε μια άγνωστη λειτουργία της RhoH στη σηματοδότηση των T-κυττάρων.²⁵ Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της συγκρότησης του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR) πραγματοποιείται ενεργοποίηση μιας τυροσινικής κινάσης της LCK. Η κινάση αυτή με τη σειρά της θα φωσφορυλιώνει τις ζαλυσίδες του συμπλόκου TCR έτσι ώστε να εμφανιστεί μια θέση σύνδεσης για μια άλλη πρωτεϊνική κινάση, τη ZAP70. Η ενεργοποιημένη ZAP70 θα φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη προσαρμοστή LAT (linker for activation of T-cells) και τη φωσφολιπάση Cγ1 (PLCγ1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια ποικιλία αποκρίσεων, όπως η εισροή ασβεστίου, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και οι μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση. Η RhoH αλληλεπιδρά απ' ευθείας με τη ZAP70 και αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται να μεσολαβείται από την LCK επαγόμενη φωσφορυλίωση της RhoH.

Σε πολλές περιπτώσεις, οι Rho GTPάσες έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν την είσοδο του κυττάρου στον κυτταρικό κύκλο καθώς και την πρόοδό του.^{26,27} Αυτό το επιτυγχάνουν ρυθμίζοντας την έκφραση ενός αριθμού γονιδίων (p21, κυκλίνης D1 κ.ά.) που εμπλέκονται στη μετάβαση από την G1 στη φάση S. Το ίδιο σημαντικό είναι και ο ρόλος τους στη μίτωση. Συγκεκριμένα, στην έναρξη της μίτωσης αυξάνεται η ενεργότητα της RhoA, που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός τελεστή της, της ROCK (Rho-associated kinase). Αυτή μεσολαβεί στην αναδιάταξη του πυρηνικού φλοιού και μέσω του μονοπατιού της Ect2 (GEF)/Cdc42/mDia3 γίνεται συγκρότηση της ατράκτου και συγκέντρωση των μικροσωληνίσκων στους κινητοχώρους. Αργότερα, στη μίτωση, εμπλέκονται άμεσα στην κυτοκίνηση ελέγχοντας το συστατικό δακτύλιο ακτίνης/μυοσίνης που είναι υπεύθυνος για τον τελικό σχηματισμό της διαχωριστικής αύλακας των θυγατρικών κυττάρων.

Η κυκλίνη D1 και οι CDK αναστολείς p21, p27, p57 φαίνεται να σχετίζονται με την οδό RhoA/ROCK. Η κυκλίνη D1 προσδέεται απ' ευθείας στην p27 και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της RhoA, αναστέλλοντας τη σύνδεσή της με τον GEF της. Ομοίως, η p21 φαίνεται να προσδέεται και να αναστέλλει τη ROCK1, ενώ η p57 απομονώνει τη LIMK

(LIM domain kinase), ένα μεταγενέστερο τελεστή του μονοπατιού που θα απενεργοποιήσει την κοφιλίνη. Η κυκλίνη A2 προσδένεται απ' ευθείας στη RhoA και συμβάλλει στην ενεργοποίησή της, διευκολύνοντας τη σύνδεσή της με GEFs.

Σε ένα από τα μονοπάτια ρύθμισης των Rho συμμετέχει η Ect2 και η MgcRacGAP (μια GAP εξειδικευμένη για τις Cdc42, Rac και λιγότερο για τη RhoA). Και τα δύο αυτά μόρια εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου και σχετίζονται με την άτρακτο στη μετάφαση και την ανάφαση. Η MgcRacGAP αλληλεπιδρά με την MKLP1, μια πρωτεΐνη ομοιάζουσα με την κινεσίνη και μαζί ελέγχουν τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Επίσης, η ενεργότητα αυτής της GAP απαιτείται για να μειώσει τα επίπεδα των Rac και Cdc42 στη μετάφαση, ενώ κατά την κυτοκίνηση δρα προσελκύνοντας την Ect2 και ευνοώντας την ενεργοποίηση της RhoA. Υπάρχουν και άλλα μόρια που έχουν παρόμοια ρύθμιση, όπως τα MyoGEF, GEF H1/Ifc και p190RhoGAP. Θα πρέπει να διασαφηνιστεί όμως ότι κάθε κυτταρικός τύπος έχει τις δικές του απαιτήσεις και κατ' επέκταση εκφράζει διαφορετικό συνδυασμό πρωτεϊνών στα διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου.

Υπάρχουν επίσης αρκετές συνδέσεις πολλών κυτταρικών διαδικασιών που μεσολαβούνται από τις Rho GTPάσες με μεταγραφική ρύθμιση.²⁸ Οι Rho GTPάσες τροποποιούν τη δράση των SRF, NFκB, c/EBP, Stat3, Stat5, FHL-2, Pax6, GATA-4, E2F, υποδοχέα οιστρογόνων α/h, CREB και μεταγραφικών παραγόντων που εξαρτώνται με την JNK και το p38 μονοπάτι των MAP κινασών, τα υποστρώματα για τις κινάσες αυτές, περιλαμβανομένων των c-Jun, ELK, PEA3, ATP2, MEF2A, Max και CHOP/2GADD153.

4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Περίπου το 12,5% των νεοδιαγνωσθέντων καρκίνων στον κόσμο είναι καρκίνοι του πνεύμονα. Οι βρογχογενείς καρκίνοι του πνεύμονα (LCS) έχουν πολύ ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης.²⁹ Η εν λόγω βασική πτυχή του καρκίνου του πνεύμονα τον καθιστά βιολογικά ευπαθή σε χημειοθεραπεία και σε θεραπείες βασισμένες στην ακτινοβολία για μια προσωρινή ανακουφιστική θεραπεία. Αυτοί οι θεραπευμένοι όγκοι του πνεύμονα τελικά θα υποτροπιάσουν, επειδή ένας αριθμός των καρκινικών κλώνων ή των αρχικών καρκινικών κυττάρων έχουν διαφύγει από την αρχική θεραπεία. Αυτά τα κύτταρα επιλέγονται και θα επιστρέψουν με αυξημένη αντοχή στις θεραπευτικές μεθόδους.

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα στο δυτικό κόσμο αυξήθηκε απότομα κατά τη διάρκεια του 20ού αιώνα, λόγω του αυξημένου ποσοστού του καπνίσματος. Οι συγκεκριμένοι καρκίνοι του πνεύμονα

που επάγονται από το κάπνισμα κατά κύριο λόγο προκαλούνται από μεταλλάξεις του γονιδίου *K-ras*. Όταν οι καρκινογόνες ουσίες εισέλθουν σε υγιή κύτταρα επάγουν γενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε ογκογόνο μετασχηματισμό. Τέλος, υπάρχουν άτομα που μπορούν να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα αυθόρμητα χωρίς καμιά έκθεση σε κάποιο γνωστό καρκινογόνο.³⁰ Οι Ασιάτισσες, συνήθως ιαπωνικής καταγωγής, εμφανίζουν μεταλλάξεις του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα της επιδερμίδας EGFR, ενώ μερικοί νεότεροι άνδρες παρουσιάζουν μια μετατόπιση (EML4-ALK) μεταξύ της εχινοδερμικής πρωτεΐνης 4 που συνδέεται στους μικροσωληνίσκους (EML4) και της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK), η οποία προκαλεί τον καρκίνο τους.

Στην Ελλάδα, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί το συχνότερο τύπο καρκίνου στους άνδρες και το δεύτερο σε συχνότητα στις γυναίκες. Κάθε χρόνο >3.000 άτομα προσβάλλονται από τη νόσο. Η συχνότητά του αυξάνεται με ραγδαίο ρυθμό λόγω της αύξησης των καπνιστών τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στην Ελλάδα.

Ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο κύριους τύπους: Το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), ο οποίος περιλαμβάνει το πλακώδες καρκίνωμα, το καρκίνωμα των μεγάλων κυττάρων και το αδενοκαρκίνωμα. Αν και το πλακώδες καρκίνωμα είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου, ιδιαίτερα σε καπνιστές, το αδενοκαρκίνωμα έχει καταστεί η πλέον κοινή μορφή σε πολλές περιοχές του κόσμου και η συχνότητά του ολοένα και αυξάνεται. Αρκετοί υπότυποι του αδενοκαρκινώματος έχουν περιγραφεί, αν και η μεγάλη πλειοψηφία των αδενοκαρκινωμάτων περιέχει στοιχεία πολλαπλών υποτύπων.

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα προκύπτει από νευροενδοκρινή κύτταρα, τα κύτταρα Kulchitsky των πνευμόνων.³¹ Αυτός ο καρκίνος αντιπροσωπεύει μόνο το 10–15% των περιστατικών αλλά είναι πολύ επιθετικός, αναπτύσσεται ταχέως και εξαπλώνεται εξ ίσου γρήγορα σε άλλα όργανα. Τα κύτταρα Kulchitsky παράγουν πολυπεπτιδικές ορμόνες και χαρακτηρίζονται από πυκνούς πυρήνες με νευροεκκριτικά κοκκία. Οι συγκεκριμένοι μικροκυτταρικού τύπου καρκίνοι του οργάνου είναι διαφορετικοί από τους μη μικροκυτταρικούς τύπους καρκίνους του πνεύμονα. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο NSCLC περιλαμβάνει τα αδενοκαρκινώματα, το πλακώδες καρκίνωμα και το καρκίνωμα των μεγαλοκυττάρων, που συνήθως προκύπτουν από κυψελιδικά κύτταρα. Τα αδενοκαρκινώματα προέρχονται από τα βασικά βρογχικά κύτταρα και τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, που εδράζονται στην περιφέρεια του πνεύμονα, ενώ οι καρκίνοι του πνεύμονα πλακώδους μορφολογίας προέρχονται από τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα, τα

οποία εντοπίζονται πιο κεντρικά. Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα πλακώδους μορφολογίας έχει μειωθεί και έχει πλέον ξεπεραστεί από τα αδενοκαρκινώματα.

Όσον αφορά στα διάφορα στάδια του καρκίνου του πνεύμονα, η αξιολόγησή τους βασίζεται στο βαθμό εξάπλωσής του σε σχέση με την αρχική του προέλευση. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση κλινικών εργαλείων όπως είναι η αξονική τομογραφία και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, καθώς και μέσω βιοψίας. Επί πλέον, εφαρμόζεται και η χειρουργική επέμβαση προκειμένου να εξακριβωθεί η σταδιοποίηση του καρκίνου μέσω της δειγματοληψίας θωρακικών λεμφαδένων.

5. ΟΙ Rho GTPΑΣΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

5.1. Μεταλλάξεις των γονιδίων των Rho GTPασών στον καρκίνο

Λόγω της γνώσης ότι οι πρωτεΐνες Ras είναι μεταλλαγμένες στο 30% των καρκίνων του ανθρώπου διαφορετικών προελεύσεων, προτάθηκε ότι το ίδιο θα μπορούσε να ισχύει και για την οικογένεια των μικρών Rho GTPασών.³² Όμως, δεν έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις ενεργοποίησης εντός της κωδικής αλληλουχίας των Rho πρωτεϊνών σε όγκους του ανθρώπου. Επί πλέον, οι Rho πρωτεΐνες είναι σε θέση να συντονίζουν διαφορετικές και μερικές φορές αντίθετες λειτουργίες των κυττάρων (δηλαδή τον πολλαπλασιασμό έναντι της απόπτωσης, την κινητικότητα έναντι της προσκόλλησης) στον όγκο, μια επιπρόσθετη επιπλοκή που παρεμποδίζει την κατανόηση του ρόλου τους στην καρκινογένεση.

Φυσικά, υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως η σύντηξη του γονιδίου *RhoH* με το *bcl6* που ανιχνεύτηκε σε ορισμένες περιπτώσεις μη Hodgkin λεμφώματος και η εναλλακτική συρραφή της *Rac1b* που έχει ανιχνευτεί τόσο σε καρκινώματα του παχέος εντέρου όσο και του μαστού. *In vitro* μελέτες με ινοβλάστες ποντικού δείχνουν ότι η επίδραση της *Rac1b* σηματοδότησης μπορεί να περιλαμβάνει αυξημένη διέγερση της σηματοδότησης της επιβίωσης μέσω του παράγοντα NFκB.³³ Είναι ενδιαφέρον ότι σε μια μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα από καρκίνο μαστού ποντικού τα επίπεδα έκφρασης τόσο της *Rac1b* όσο και της MMP-3 μεταβάλλονταν. Η μεταλλοπρωτεάση MMP-3 επάγει την EMT, καθώς και την αύξηση των ROS στο κύτταρο, προκαλώντας βλάβες στο DNA. Σε αντίθεση με την έλλειψη της *Rac1*, η οποία οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα, η έλλειψη της *Rac3* δεν επηρεάζει την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Τα ποντίκια που δεν εκφράζουν τη *RAC3* βρέθηκαν να προστατεύονται από την επαγόμενη από τη σύντηξη του ογκογονιδίου *bcr-abl* λεμφοβλαστική λευχαιμία.³⁴ Αυτό υποδηλώνει ότι η παρέμβαση της *Rac3* μπορεί να παρέχει μια στρατηγική για τη θεραπευτική παρέμβαση στα λεμφώματα των Β-λεμφοκυττάρων. Σε ιδιαίτερα επιθετικές μορφές καρκίνου και ιστούς όγκων βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα υπερενεργής *Rac3*.

Μια επισκόπηση των επιπέδων έκφρασης των μικρών Rho GTPασών στους καρκίνους του ανθρώπου παρατίθεται στον πίνακα 1.³⁵ Η απορρυθμισμένη έκφρασή τους μπορεί να λάβει χώρα σε επίπεδο mRNA ή σε επίπεδο πρωτεΐνης και αυτό έχει συνδεθεί με την πρόγνωση και την πορεία των ασθενειών.

Πίνακας 1. Συσχέτιση των Rho GTPασών με τον καρκίνο.

Rho GTPάσες		
<i>RhoA</i>	Υπερέκφραση	Καρκίνος μαστού, εντέρου, πνεύμονα, στομάχου, HNSCC, κύστης, όρχεων
<i>RhoB</i>	Υπερέκφραση ή μειωμένη έκφραση	Καρκίνος μαστού (υπερέκφραση), πνεύμονα, HNSCC (down-regulation)
<i>RhoC</i>	Υπερέκφραση	(Φλεγμονώδης) καρκίνος μαστού και μεταστατικός καρκίνος στομάχου, αδενοκαρκίνωμα παγκρεατικού πόρου, καρκίνος ουροδόχου κύστης, NSCLC, HNSCC
<i>Rac1</i>	Υπερέκφραση	Καρκίνος μαστού, κύστης, όρχεων, OSCCC
<i>Rac1b</i>	Εναλλακτικό μάτισμα (19 aa εισδοχή)	Καρκίνος μαστού, παχέος εντέρου
<i>Rac2</i>	Υπερέκφραση	HNSCC
<i>Rac3</i>	Υπερενεργοποιημένη ή υπερέκφραση	Καρκίνος μαστού
<i>RhoG</i>	Υπερέκφραση	Καρκίνος μαστού
<i>Cdc42</i>	Υπερέκφραση	Καρκίνος μαστού, όρχεων
<i>RhoH/TF</i>	Αναδιοργάνωση ή μετάλλαξη (5' UTR)	Λέμφωμα μη Hodgkin, πολλαπλό μυέλωμα (αναδιάταξη), διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (μετάλλαξη)
<i>Rnd3/RhoE</i>	Υπερέκφραση ή μειωμένη έκφραση	NSCLC (υπερέκφραση), καρκίνος προστάτη (μειωμένη έκφραση)

HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma (πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής και του τραχήλου), NSCLC: Non-small cell lung cancer (μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα), OSCCC: Oral squamous cell carcinoma (πλακώδες καρκίνωμα του στόματος)

Με βάση τα παραπάνω, πολύ συχνά παρατηρείται υπερέκφραση των Rho GTPασών στους όγκους του ανθρώπου, οδηγώντας σε μια ποσοτική και ποιοτική αύξηση της σηματοδότησης των Rho. Οι Rho GTPάσες δεν μπορούν να θεωρηθούν ως ογκογονίδια με τον τρόπο που έχει γίνει ευρέως αποδεκτός ο σχετικός ορισμός (δηλαδή, ως γενετικά τροποποιημένο γονίδιο με συνεχή ενεργότητα).

5.2. Μεταλλάξεις των ρυθμιστών των Rho GTPασών στον καρκίνο

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι απαιτείται η παρουσία των Rho GEFs για την ανάπτυξη καρκίνου. Όπως φαίνεται στον πίνακα 2, οι GEFs υπερεκφράζονται ή ενεργοποιούνται σε ένα μεγάλο αριθμό όγκων του ανθρώπου.³⁶

Πίνακας 2. Συμμετοχή Rho GEFs στον καρκίνο.

Rho GEF	Rho GTPάση ειδικότητα	Καρκινικός τύπος	Τύπος τροποποίησης της GEF	Λειτουργία
Vav1	RhoA, RhoG, Rac	Νευροβλάστωμα Καρκίνος παγκρέατος Καρκίνος πνεύμονα Μεταστατικό μελάνωμα B-κυττάρων χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία	Υπερέκφραση	Άγνωστη Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και επιβίωση Έκκριση αυτοκρινών συνδετών κρίσιμη για την καρκινογένεση MT-MMP1 και MT-MMP2 εξαρτώμενη διήθηση κυττάρων μελανώματος Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, επιβίωση ή μετανάστευση
Vav2	RhoA, RhoG, Rac	Μεταστατικό μελάνωμα Καρκίνος μαστού	Υπερέκφραση	MT-MMP1 και MT-MMP2 εξαρτώμενη διήθηση κυττάρων μελανώματος Ειδική μετάσταση πνευμόνων
Vav3	RhoA, RhoG, Rac	Καρκίνος μαστού Καρκίνος προστάτη Γλοιοβλάστωμα	Υπερέκφραση	Ειδική μετάσταση πνευμόνων Ενίσχυση της δραστηριότητας του υποδοχέα οιστρογόνων Διήθηση και μετανάστευση
P-Rex1	Rac	Καρκίνος μαστού Μελάνωμα Καρκίνος προστάτη	Υπερέκφραση	Rac1-εξαρτώμενη διήθηση και μετανάστευση από τους υποδοχείς ErbB, GPCRs Μετανάστευση των μελανοβλαστών Rac1-εξαρτώμενη διήθηση και μετανάστευση
P-Rex2a	Rac	Μελάνωμα	Σημειακές μεταλλάξεις	Επιτάχυνση του σχηματισμού όγκου
Tiam1	Rac	Καρκίνωμα του εντέρου Καρκίνος προστάτη	Υπερέκφραση	Διήθηση και μετάσταση
Ect2	RhoA	Καρκίνος πνεύμονα Καρκίνος οισοφάγου Πλακώδες καρκίνωμα του στόματος	Γονιδιακός πολλαπλασιασμός Υπερέκφραση	Πολλαπλασιασμός κυττάρων
LARG	RhoA	Οξεία μυελογενής λευχαιμία	Ένωση με το γονίδιο MLL	Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της RhoA
BCR	Cdc42, Rac, Rho	Οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία Χρόνια μυελογενής λευχαιμία Χρόνια ουδετερόφιλη λευχαιμία	Ένωση με το γονίδιο ABL	Ογκογονική μεταμόρφωση
TRIO	RhoA, RhoG, Rac1	Καρκίνος ουροδόχου κύστης Γλοιοβλάστωμα	Υπερέκφραση Γονιδιακός πολλαπλασιασμός	Μετάσταση από δυσπλασία σε καρκίνωμα Διήθηση καρκίνου
Intersectin-1	Cdc42	Νευροβλάστωμα	Υπερέκφραση	Ογκογονική μεταμόρφωση
Net-1	RhoA	Γαστρικός καρκίνος	Υπερέκφραση	Λυσοφωσφατιδικό οξύ προκαλεί κυτταρική μετανάστευση και διήθηση
Fdg1	Cdc42	Καρκίνος προστάτη Καρκίνος μαστού	Υπερέκφραση	Σχηματισμός διηθητικών ποδιών (invalidopodia) και μετάσταση
C9orf100	–	Ηπατικό καρκίνωμα	Υπερέκφραση	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και μετάσταση

Επίσης, έχουν αναφερθεί μεταβολές στην έκφραση των GDIs που προωθούν τα αναπτυξιακά στάδια του καρκίνου. Ο RhoGDIa, ο οποίος είναι ικανός να δεσμεύει τις RhoA, RhoB, Rac1, Rac2 και Cdc42, υπερεκφράζεται σε μεταστατικούς καρκίνους των ωοθηκών.³⁷ Οι RhoGDIs μπορούν επίσης να επηρεάσουν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω της ενίσχυσης των επιπέδων μεταγραφής των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER) α και β.³⁸ Ο RhoGDI2 (ή RhoGDIb) εκφράζεται σε μια ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού και τα επίπεδα έκφρασής του συσχετίζονται με τη διηθητική ικανότητα των κυττάρων αυτών.³⁹ Ο RhoGDI2 δεν εκφράζεται σε καλοήθεις καρκίνους του μαστού. Σε αντίθεση, μειωμένη έκφραση του RhoGDI2 βρέθηκε να ενισχύει την ανάπτυξη του μεταστατικού όγκου της ουροδόχου κύστης.⁴⁰

Τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών GAPs επίσης συνδέονται με την ογκογένεση, περιλαμβανομένων της DLC-1 και της DLC-2. Η έλλειψη του γονιδίου της DLC-1 παρατηρήθηκε σε πρωτογενείς όγκους του μαστού, ενώ η DLC-2 βρέθηκε σε υποέκφραση στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.^{41,42} Η έλλειψη ή η μειωμένη έκφρασή της οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα της GTP-δεσμευμένης RhoA κι έτσι ενισχύεται η δραστηριότητα της GTPάσης και η μεταγενέστερη σηματοδότηση, η οποία θα μπορούσε να συμβάλλει στην ογκογένεση. Μια άλλη Rho GAP, η ARHGAP8, έχει βρεθεί να ρυθμίζεται θετικά στην πλειονότητα των όγκων του παχέος εντέρου.⁴³

Για τις περισσότερες παρατηρήσεις σχετικά με τους διάφορους ρυθμιστές (GEFS, GAPs και GDIs) των Rho GTPασών στον καρκίνο δεν είναι σαφής ποια είναι η πιθανή τους επίδραση επί της δραστηριότητας των Rho GTPασών στους όγκους. Επί πλέον, η εξειδίκευση των περισσότερων ρυθμιστών των Rho πρωτεϊνών είναι ακόμη άγνωστη, γεγονός το οποίο καθιστά τέτοιες μελέτες δυσχερείς. Ενδεχομένως, η απορρύθμιση της Rho σηματοδότησης να είναι επαρκής για τη συμμετοχή τους στην ογκογένεση. Ωστόσο, όλα τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι τα μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών συμβάλλουν στα διάφορα στάδια της ογκογένεσης και πιθανόν δρουν με διαφορετικό τρόπο κατά την έναρξη και κατά την εξέλιξη του όγκου.

5.3. Οι Rho πρωτεΐνες στη διήθηση και στη μετάσταση

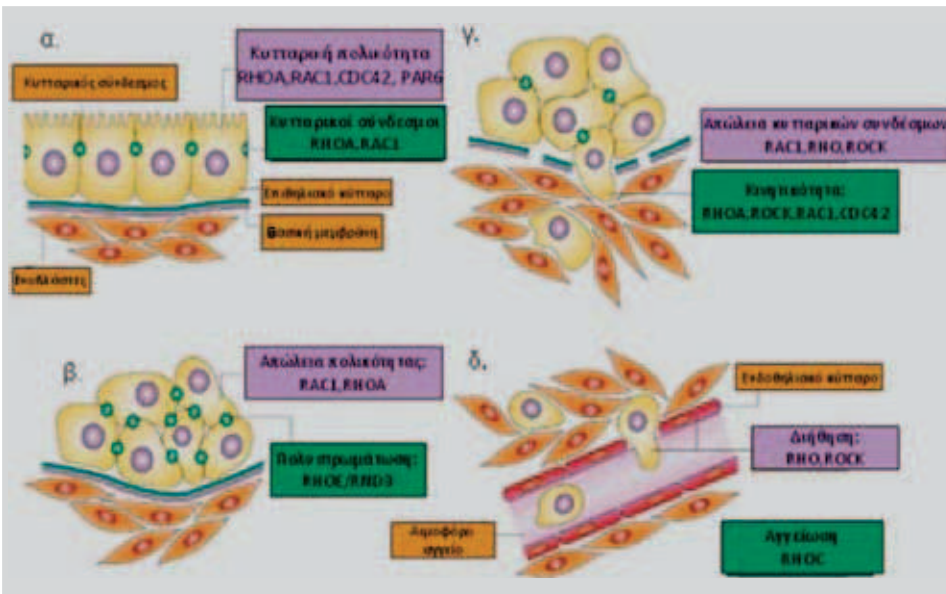
Όπως είναι γνωστό, τα κύτταρα του όγκου έχουν αλλάξει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους στην περίπτωση της μετάστασης και έχουν αποκτήσει τη δυνατότητα να διασχίζουν τα όρια ενός ιστού. Είναι σαφές ότι οι Rho συμμετέχουν στον έλεγχο της κυτταρικής μορφολογίας και της κινητικότητας στα φυσιολογικά κύτταρα. Επίσης, θεωρείται

ότι είναι σημαντικές στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση που παρατηρείται στους πλέον επιθετικούς όγκους.⁴⁴

Οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν τόσο την αποσυναρμολόγηση όσο και τη σταθεροποίηση μιας οργανωμένης σειράς εξειδικευμένων κυτταρικών συνδέσεων (συνδέσεων προσκόλλησης, στενοσυνδέσμων) μεταξύ των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων (εικ. 4α). Αυξημένα επίπεδα των Rnd3/RhoE, οι οποίες ανταγωνίζονται τη λειτουργία της RhoA, μπορεί να ενισχύσουν την απώλεια της πολικότητας και τις πολλές στιβάδες των επιθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα, η αναστολή της Rac1 οδηγεί σε απώλεια της πολικότητας εξ αιτίας της αποτυχίας να διαμοιραστεί η λαμινίνη ασύμμετρα (εικ. 4β).

Τα καρκινικά κύτταρα απαιτούν τη μεταβολή της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) προκειμένου να είναι σε θέση να διασχίζουν τα όρια των ιστών και να εξαπλώνονται σε περιφερικά σημεία του σώματος (εικ. 4γ). Η RhoA και η Rac1 μπορούν να ελέγχουν τα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών της μήτρας (MMPs), οι οποίες αποικοδομούν την εξωκυττάρια ουσία (ECM). Εκτός από τη ρύθμιση των επιπέδων των MMPs, οι Rho GTPάσες μπορούν να επηρεάσουν την αναδιαμόρφωση της ECM, ρυθμίζοντας αναστολείς του ιστού των μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP). Οι ίδιες μπορούν να ρυθμίζουν και τη λειτουργία της εζρίνης, της μοεσίνης και της ραδιξίνης: Αυτές οι συγγενείς πρωτεΐνες ενισχύουν την κινητικότητα των κυττάρων, συνδέοντας τον κυτταροσκελετό της ακτίνης με την πλασματική μεμβράνη μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα CD44. Συγκεκριμένα, η RhoA μπορεί να προωθήσει τη φωσφορυλίωση της εζρίνης από τη ROCK, προκαλώντας αυξημένη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό, ενώ η Rac1 προάγει τη φωσφορυλίωση και την αναστολή της πρωτεΐνης NF2 (της νευροϊνωμάτωσης τύπου 2) που λειτουργεί ως ανταγωνιστής της εζρίνης. Έτσι δικαιολογείται και ο αυξημένος εντοπισμός της εζρίνης και του CD44 σε πολλά καρκινικά κύτταρα με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων του NF2, η έλλειψη του οποίου οδηγεί σε εξαιρετικά μεταστατικούς καρκίνους.

Άλλη μια ικανότητα που πρέπει να αποκτήσουν τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένες περιοχές είναι η εισβολή τους στην κυκλοφορία ή στη λέμφο (εικ. 4δ). Οι RhoA και ROCK απαιτούνται τόσο στα ενδοθηλιακά όσο και στα μεταναστευτικά κύτταρα για να διασχίσουν τα τελευταία το αγγειακό ενδοθήλιο. Η υπερέκφραση της RhoC οδηγεί σε αυξημένη έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων, που συμβάλλουν στην αυξημένη αγγείωση του όγκου και στη μεγάλη πιθανότητα τα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος. Η υπερέκφραση της RhoC προάγει επίσης τη δυνατότητα των κυττάρων του μελανώματος να εξέλθουν από το αίμα και να αποικίσουν τους πνεύμονες.



Εικόνα 4. Συμμετοχή των Rho πρωτεϊνών στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης του όγκου. (α) Διατήρηση της φυσιολογικής επιθηλιακής πολικότητας. Οι RhoA, RAC1, CDC42 και PAR6 απαιτούνται για την κυτταρική πολικότητα και είναι σημαντικές για το σχηματισμό κυτταρικών συνδέσμων. (β) Καλοήθεις όγκοι: Απώλεια της πολικότητας και της πολυστρωμάτωσης. Η αναστολή της RAC1 οδηγεί σε αδυναμία ασύμμετρης κατανομής της λαμινίνης και στην επακόλουθη απώλεια της πολικότητας. Η ενεργοποίηση της RhoA οδηγεί επίσης σε απώλεια της πολικότητας, αλλά ανταγωνισμό της λειτουργίας της από τη RHOE/RND3, υπερέκφραση της οποίας προκαλεί πολυστρωμάτωση των επιθηλιακών κυττάρων. (γ) Τοπικά μεταστατευτικοί όγκοι: Απώλεια των ορίων του ιστού και αύξηση της κινητικότητας. Η τροποποίηση της

RAC1 και RHO/ROCK ενεργοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια των διακυτταρικών συνδέσεων. Η αυξημένη δραστηριότητα των RhoA, ROCK, RAC1 και CDC42 μπορεί να προκαλέσει αυξημένη κινητικότητα. Οι RhoA και RAC1 ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεασών που διευκολύνουν την κινητικότητα από την υποβαθμισμένη βασική μεμβράνη και άλλων εξωκυττάρων ενώσεων του στρώματος. (δ) Μετάσταση σε μια μακρινή περιοχή: Ενδοαγγείωση και εξαγγείωση. Οι RHO και ROCK απαιτούνται προκειμένου τα κύτταρα του όγκου να διασχίσουν τις στιβάδες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η RHOc προάγει την έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων, οδηγώντας σε μια αύξηση στην αγγείωση του όγκου.

Η βιβλιογραφία σχετικά με τις Rho πρωτεΐνες και την εξέλιξη του όγκου δημιουργεί σύγχυση, καθώς διαφορετικές μελέτες έχουν δείξει αντιφατικούς ρόλους για τις Rho πρωτεΐνες. Οι εν λόγω ρόλοι θα μπορούσαν να συνυπάρχουν, αν οι Rho πρωτεΐνες εμφάνιζαν διαφορετικές λειτουργίες σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης του όγκου.

5.4. Οι Rho GTPάσες στον καρκίνο του πνεύμονα

Λίγα δεδομένα υπάρχουν αναφορικά με τη συσχέτιση των πρωτεϊνών Rho με τον καρκίνο του πνεύμονα. Ωστόσο, έχει μελετηθεί η υπερέκφραση της RhoA σε όγκους του πνεύμονα.⁴⁵ Από τις δύο κύριες μορφές του καρκίνου του πνεύμονα, του μικροκυτταρικού και του μη μικροκυτταρικού, ο πρώτος έχει ένα μεγαλύτερο μεταστατικό δυναμικό. Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση και η ενεργοποίηση της RhoA είναι μεγαλύτερη σε SCLC απ' ό,τι σε κυτταρικές σειρές του NSCLC.⁴⁶ Οι Delarue et al έδειξαν ότι τόσο η RhoA όσο και η H-Ras καταστέλλουν την έκφραση της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου-2 (NOS-2) στην καρκινική σειρά του πνεύμονα A549.⁴⁷ Η δραστηριότητα του NOS-2 σχετίζεται με την καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Έτσι, η RhoA μέσω της καταστολής της έκφρασης της συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου-2 ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επί πλέον, η αναστολή της RhoA από τα ένζυμα C3 ή μέσω ADP ριβοζυλίωσης οδηγεί σε αύξηση της προσκόλλησης που

βασίζεται στην καδερίνη και σε απώλεια της κινητικότητας των κυττάρων του SCLC.

Επίσης, έχει δείχθει ότι η υψηλότερη έκφραση της RhoC σχετίζεται με την επιθετικότητα των κυττάρων του NSCLC και η υπερέκφραση της RhoC θα μπορούσε να είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της επιθετικότητας της νόσου.⁴⁸ Επί πλέον, σε ένα ορθοτοπικό μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα φάνηκε ότι η RhoC δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του όγκου, αλλά ενισχύει τη μεταστατική φύση της διεγείροντας την κινητικότητα των κυττάρων και των μεταλλοπρωτεϊνών.⁴⁹ Σε παρόμοια αποτελέσματα οδηγήθηκαν και οι Stallings-Mann et al, για την έκφραση της Rac1b.⁵⁰ Ως εκ τούτου, η εξασθένιση της ενεργότητας της RhoC μπορεί να αποτελέσει ένα δυνητικό στόχο για την ανάπτυξη μιας νέας στρατηγικής αναφορικά με τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Σε πειράματα ανοσοφθορισμού σε ιστούς πνεύμονα του ανθρώπου όπου μελετήθηκε η έκφραση της RhoB δείχθηκε ότι, ενώ η πρωτεΐνη RhoB εκφράζεται στο φυσιολογικό πνεύμονα, τα επίπεδά της είναι μηδαμινά σε όλη την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα.⁵¹ Ακόμη, έχει περιγραφεί ότι η αποακετυλάση της ιστόνης 1 καταστέλλει την έκφραση της RhoB στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και ότι ο EGFR και το ογκογονίδιο *erbB2* καταστέλλουν τη μεταγραφική ικανότητα του υποκινητή της RhoB τόσο στα NIH3T3 κύτταρα όσο και σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του πνεύμονα του ανθρώπου.⁵²

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αν και τα πειραματικά αποτελέσματα που συσχετίζουν τις Rho πρωτεΐνες με τον καρκίνο του πνεύμονα είναι λίγα, θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κυρίως στη σταδιακή μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων της απορρύθμισής τους στους καρκίνους του ανθρώπου μέσω μεταλλάξεων, αυξημένης ενεργοποίησης ή μειωμένης έκφρασης δείχνουν ότι ίσως δρουν ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια. Φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές διαδικασίες που απορρυθμίζονται στον καρκίνο, όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και η κυτταρική διαίρεση. Επιπρόσθετα,

ρυθμίζουν μονοπάτια που εμπλέκονται στον κακοήγη μετασχηματισμό και αυτό αποτελεί βάση για την κατανόηση των συνδετικών μηχανισμών μεταξύ της απορρύθμισης των Rho GTPασών και συγκεκριμένων μοριακών μονοπατιών.

Επί πλέον, περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την αναγνώριση και την ταυτοποίηση νέων λειτουργιών των Rho, καθώς και για τη διεκρίνιση των σχέσεών τους με τα μοριακά μονοπάτια του καρκίνου, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών για τον περιορισμό των μεταστάσεων της νόσου. Τελικά, η αξιολόγηση των Rho πρωτεϊνών ως διαγνωστικών δεικτών και ως θεραπευτικών μορίων ή στόχων δεν είναι ακόμη σαφής, λόγω της εμπλοκής τους σε πολλά διαφορετικά μονοπάτια του κυττάρου και της ιστοεξειδίκευσής τους.

ABSTRACT

The structure and function of Rho GTPases and their role in lung cancer

M.E. XIPOLITA, E. SKOURTI, A. KRITIKOS, S. VLAHOPOULOS, V. ZOUMBOURLIS

*Unit of Biomedical Applications, Institute of Biology, Medical Chemistry and Biotechnology,
National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece*

Archives of Hellenic Medicine 2014, 31(2):150–164

The Rho kinases are a family of small signaling GTPases, belonging to the superfamily of Ras proteins. Their main function is in the regulation of the cytoskeleton in such a way that critical cellular processes, such as morphogenesis, growth of neurons, cell division, cell adhesion and cellular migration take place correctly. Their deregulation has been associated with several types of cancer. In a few types of cancers mutations of these proteins have been identified, but in most types the regulatory proteins (GEFs, GAPs and GDIs) are deregulated, resulting in either overexpression or reduced expression. In addition, Rho have been shown to act as both oncogenes and tumor suppressor molecules, which induce and inhibit tumor growth, respectively. In the majority of cancer tissues increased activation of Rho GTPases has been observed compared with the corresponding normal tissue. This paper emphasizes the expression of Rho GTPases in different types of lung cancer. Lung cancer is the most common type of cancer, accounting for approximately 12.5% of newly diagnosed cancers worldwide, and it is divided into two main subtypes, the small cell carcinoma (SCLC) and the non-small cell carcinoma (NSCLC). For this reason, and because a specific type, lung cancer subscale (LCS) presents a very rapid progression, this review highlights the correlation between the activity of Rho kinases (which includes their possible oncogenic or oncosuppressor roles) with both progression and metastasis of these tumors.

Key words: Lung cancer, Rho GTPases

Βιβλιογραφία

1. HEASMAN SJ, RIDLEY AJ. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9:690–701
2. HAKOSHIMA T, SHIMIZU T, MAESAKI R. Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem* 2003, 134:327–331
3. BUSTELO XR, SAUZEAU V, BERENJENO IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions *in vivo*. *Bioessays* 2007, 29:356–370
4. SINHA S, YANG W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal* 2008, 20:1927–1934
5. ZHENG Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* 2001, 26:724–732
6. YANG J, ZHANG Z, ROE SM, MARSHALL CJ, BARFORD D. Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. *Science* 2009, 325:1398–1402
7. CSÉPÁNYI-KÖMI R, SÁFÁR D, GRÓSZ V, TARJÁN ZL, LIGETI E. In sil-

- ico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins. *Small GTPases* 2013, 4:90–101
8. DRANSART E, OLOFSSON B, CHERFILS J. RhoGDIs revisited: Novel roles in Rho regulation. *Traffic* 2005, 6:957–966
 9. LE GALLIC L, FORT P. Structure of the human ARHG locus encoding the Rho/Rac-like RhoG GTPase. *Genomics* 1997, 42:157–160
 10. MATOS P, SKAUG J, MARQUES B, BECK S, VERÍSSIMO F, GESPACH C ET AL. Small GTPase Rac1: Structure, localization, and expression of the human gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 277:741–751
 11. TOVAR D, FAYE JC, FAVRE G. Cloning of the human RHOB gene promoter: Characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* 2003, 81:525–530
 12. GUPTON SL, GERTLER FB. Filopodia: The fingers that do the walking. *Sci STKE* 2007, 2007:re5
 13. SNAPPER SB, TAKESHIMA F, ANTÓN I, LIU CH, THOMAS SM, NGUYEN D ET AL. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* 2001, 3:897–904
 14. PENG J, WALLAR BJ, FLANDERS A, SWIATEK PJ, ALBERTS AS. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* 2003, 13:534–545
 15. CHEN TJ, GEHLER S, SHAW AE, BAMBURG JR, LETOURNEAU PC. Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. *J Neurobiol* 2006, 66:103–114
 16. GOMES ER, JANI S, GUNDERSEN GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 2005, 121:451–463
 17. JAFFE AB, HALL A. Rho GTPases: Biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21:247–269
 18. WHEELER AP, WELLS CM, SMITH SD, VEGA FM, HENDERSON RB, TYBULEWICZ VL ET AL. Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *J Cell Sci* 2006, 119:2749–2757
 19. CONDLIFFE AM, WEBB LM, FERGUSON GJ, DAVIDSON K, TURNER M, VIGORITO E ET AL. RhoG regulates the neutrophil NADPH oxidase. *J Immunol* 2006, 176:5314–5320
 20. WHEELER AP, RIDLEY AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* 2004, 301:43–49
 21. RIDLEY AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 2006, 16:522–529
 22. VEGA FM, RIDLEY AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 2008, 582:2093–2101
 23. ADNANE AM, SEIJO E, CHEN Z, BIZOUARN F, LEAL M, SEBTI SMJ ET AL. RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem* 2002, 277:8500–8507
 24. LI X, BU X, LU B, AVRAHAM H, FLAVELL RA, LIM B. The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function. *Mol Cell Biol* 2002, 22:1158–1171
 25. DORN T, KUHN U, BUNGARTZ G, STILLER S, BAUER M, ELLWART J ET AL. RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling. *Blood* 2007, 109:2346–2355
 26. DAVID M, PETIT D, BERTOGLIO J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways. *Cell Cycle* 2012, 11:3003–3010
 27. BENDRIS N, ARSIC N, LEMMERS B, BLANCHARD JM. Cyclin A2, Rho GTPases and EMT. *Small GTPases* 2012, 3:225–228
 28. BENITAH SA, VALERÓN PF, VAN AELST L, MARSHALL CJ, LACAL JC. Rho GTPases in human cancer: An unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1705:121–132
 29. JADUS MR, NATIVIDAD J, MAI A, OUYANG Y, LAMBRECHT N, SZABO S ET AL. Lung cancer: A classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention. *Clin Dev Immunol* 2012, 2012:160724
 30. GAZDAR AF, BRAMBILLA E. Preneoplasia of lung cancer. *Cancer Biomark* 2010, 9:385–396
 31. SALGIA R, SKARIN AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16:1207–1217
 32. SCHUBBERT S, SHANNON K, BOLLAG G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:295–308
 33. SCHNELZER A, PRECHTEL D, KNAUS U, DEHNE K, GERHARD M, GRAEFF H ET AL. Rac1 in human breast cancer: Overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 2000, 19:3013–3020
 34. CHO YJ, ZHANG B, KAARTINEN V, HAATAJA L, DE CURTIS I, GROFFEN J ET AL. Generation of rac3 null mutant mice: Role of Rac3 in Bcr/Abl-caused lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Biol* 2005, 25:5777–5785
 35. ELLENBROEK SI, COLLARD JG. Rho GTPases: Functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007, 24:657–672
 36. GÓMEZ DEL PULGAR T, BENITAH SA, VALERÓN PF, ESPINA C, LACAL JC. Rho GTPase expression in tumorigenesis: Evidence for a significant link. *Bioessays* 2005, 27:602–613
 37. JONES MB, KRUTZSCH H, SHU H, ZHAO Y, LIOTTA LA, KOHN EC ET AL. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002, 2:76–84
 38. SU LF, KNOBLAUCH R, GARABEDIAN MJ. Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response. *J Biol Chem* 2003, 276:3231–3237
 39. ZHANG Y, ZHANG B. D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res* 2006, 66:5592–5598
 40. THEODORESCU D, SAPINOSO LM, CONAWAY MR, OXFORD G, HAMP-TON GM, FRIERSON HF Jr. Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:3800–3806
 41. YUAN BZ, ZHOU X, DURKIN ME, ZIMONJIC DB, GUMUNSDOTTIR K, EYFJORD JE ET AL. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and *in vivo* tumorigenicity. *Oncogene* 2003, 22:445–450
 42. CHING YP, WONG CM, CHAN SF, LEUNG TH, NG DC, JIN DY ET AL. Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2003, 278:10824–10830
 43. JOHNSTONE CN, CASTELLVÍ-BEL S, CHANG LM, BESSA X, NAKAGAWA H, HARADA H ET AL. ARHGAP8 is a novel member of the RHO GAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP:

- Mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers. *Gene* 2004, 336:59–71
44. SAHAI E, MARSHALL CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:133–142
45. FRITZ G, JUST I, KAINA B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999, 81:682–687
46. VARKER KA, PHELPS SH, KING MM, WILLIAMS CL. The small GTPase RhoA has greater expression in small cell lung carcinoma than in non-small cell lung carcinoma and contributes to their unique morphologies. *Int J Oncol* 2003, 22:671–681
47. DELARUE FL, TAYLOR BS, SEBTI SM. Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells. *Oncogene* 2001, 20:6531–6537
48. SHIKADA Y, YOSHINO I, OKAMOTO T, FUKUYAMA S, KAMEYAMA T, MAEHARA Y. Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003, 9:5282–5286
49. IKOMA T, TAKAHASHI T, NAGANO S, LI YM, OHNO Y, ANDO K ET AL. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice. *Clin Cancer Res* 2004, 10:1192–1200
50. STALLINGS-MANN ML, WALDMANN J, ZHANG Y, MILLER E, GAUTHIER ML, VISSCHER DW ET AL. Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression. *Sci Transl Med* 2012, 4:142ra95
51. MAZIERES J, ANTONIA T, DASTE G, MURO-CACHO C, BERCHERY D, TILLEMENT V ET AL. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004, 10:2742–2750
52. JIANG K, DELARUE FL, SEBTI SM. EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 2004, 23:1136–1145

Corresponding author:

V. Zoumpourlis, Institute of Biology, Medical Chemistry and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., GR-116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@eie.gr

.....