

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Ιστορική αναδρομή της έρευνας των γονιδίων *Ras*

Η ικανότητα μιας ομάδας ρετροϊών να προκαλεί όγκους σε ζώα μετά τη μόλυνσή τους αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ύπαρξης γενετικών στοιχείων με ογκογόνες ιδιότητες. Διεξοδικές μελέτες που εκπονήθηκαν ταυτοποίησαν τα πρώτα ογκογονίδια *Ras* σε αυτούς τους ρετροϊούς, ενώ αργότερα αποδείχθηκε ότι πρόκειται για γονίδια που εντοπίζονται στο γονιδίωμα του αρουραίου. Η αφορμή για περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων γονιδίων δόθηκε με τον εντοπισμό μεταλλαγμένων γονιδίων *Ras* σε καρκίνους του ανθρώπου. Έτσι, τα επόμενα χρόνια διεξήχθη μια σειρά βιοχημικών και δομικών μελετών, *in vivo* και *in vitro*, που προσέφερε πληροφορίες θεμελιώδους σημασίας για την κυτταρική βιολογία, αλλά και τη βιολογία του καρκίνου. Αποδείχθηκε ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες αποτελούν ένα πολύ μικρό τμήμα μιας υπεροικογένειας *Ras*-σχετιζόμενων μικρών GTPασών, οι οποίες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση των περισσότερων βασικών κυτταρικών λειτουργιών. Η μελέτη των συγκεκριμένων μορίων συνέβαλε σημαντικά στη βαθύτερη κατανόηση τόσο του μοριακού μηχανισμού επαγωγής της καρκινογένεσης, όσο και του πολύπλοκου μηχανισμού μετάδοσης σήματος γενικότερα. Παράλληλα, η ερευνητική δραστηριότητα αυτής της περιόδου ανέδειξε τη σημασία των μικρών GTPασών για τη βιολογία, καθώς και τη συμβολή των εξωκυττάριων σημάτων στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών διαδικασιών. Παρ' όλο που η πλήρης κατανόηση της λειτουργίας των *Ras* βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, τα τελευταία χρόνια, η γνώση που έχει συσσωρευτεί μετά από πολλά έτη μελετών έχει επικεντρωθεί στην εύρεση αποτελεσματικών αντικαρκινικών θεραπειών. Στο συγκεκριμένο άρθρο ανασκόπησης πραγματοποιείται μια αναδρομική ανάλυση της ιστορίας της έρευνας των γονιδίων *Ras* και, συγκεκριμένα, γίνεται μια ανάλυση των σταδιακών ανακαλύψεων που συνέβησαν και αφορούν στη βιοχημεία, στη δομή και στον μηχανισμό δράσης των *Ras*, αλλά και στη συσχέτισή τους με τον καρκίνο.

1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *RAS* ΣΕ ΡΕΤΡΟΪΟΥΣ

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη των γονιδίων *Ras* προέκυψαν με την ταυτοποίηση της ύπαρξης ογκογόνων γενετικών στοιχείων σε ρετροϊούς, το 1964 και το 1967.^{1,2}

Το 1973 αποδείχθηκε ότι οι ιδιότητες μετασχηματισμού των συγκεκριμένων ιών σαρκώματος ήταν αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης φυσιολογικών αλληλουχιών του αρουραίου στο γονιδίωμα του ιού.³ Αρχικά, τα γονίδια αυτά θεωρήθηκαν εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου *src*, ενώ σήμερα, χάρη στην ικανότητά τους να προκαλούν σαρκώματα σε αρουραίους και βάσει των ερευνητών που τα ανακάλυψαν, ονομάζονται *H-Ras* και *K-Ras* (Harvey και Kirsten-rat sarcomas, αντίστοιχα). Τέσσερα έτη αργότερα, το 1977, επιτεύχθηκε ο μοριακός χαρακτηρισμός των αλ-

ληλουχιών των συγκεκριμένων γονιδίων, όταν άρθηκαν οι περιορισμοί στη μοριακή κλωνοποίηση και έγινε εφικτή η κλωνοποίηση των γονιδιωμάτων των στελεχών Ha-MSV και Ki-MSV σε βακτήρια. Παράλληλα, ογκογονίδια από διάφορα άλλα στελέχη ρετροϊών, τα οποία προκαλούσαν έντονα μετασχηματισμό, βρέθηκαν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες αργότερα ταυτοποιήθηκε ότι αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στη σηματοδότηση των *Ras*. Τέτοια μόρια είναι τα Raf, Akt, EGFR, PI3-K, που θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω. Αργότερα, το 1979, βρέθηκε ότι τα γονίδια *H-ras* και *K-ras* κωδικοποιούν πρωτεΐνες 21 kDa, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν GDP και GTP και οι οποίες προσδένονται στην πλασματική μεμβράνη.⁴ Αντίστοιχα γονίδια βρέθηκαν και στα σπονδυλωτά, και καταδείχθηκε ότι η υπερέκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών *Ras* οδηγεί σε

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2017, 34(4):439-447
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2017, 34(4):439-447

Γ. Χαλδαιοπούλου,
Μ. Γουλιελμάκη,
Ν. Χουρί,
Β. Ζουμπουρλής

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

Flashback in the history
of *Ras* research

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Μεταγωγή σήματος μέσω *Ras*
Μικρές GTPάσες
Ras
Ras στοχευμένη θεραπεία
του καρκίνου

Υποβλήθηκε 7.8.2016
Εγκρίθηκε 19.8.2016

μετασχηματισμό των κυττάρων, ενώ αποδείχθηκε ακόμη ότι η προτίμηση για δέσμευση GTP αποτελεί το κλειδί του μετασχηματισμού.⁵

2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ RAS ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Βασικό εργαλείο για την ταυτοποίηση της συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων *Ras* και του καρκίνου του ανθρώπου αποτέλεσε η μεταφορά βιολογικά ενεργού ευκαρυωτικού DNA σε κύτταρα θηλαστικών, οι πρώτες προσπάθειες της οποίας χρονολογούνται ήδη από το 1970. Το 1981, παρατηρήθηκε ότι DNA απομονωμένο από κυτταρικές σειρές EJ καρκινώματος της ουροδόχου κύστης του ανθρώπου (T24 κύτταρα), αλλά και DNA από κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων, λευχαιμιών και σαρκωμάτων, μπορεί να προκαλέσει μορφολογικό μετασχηματισμό σε NIH/3T3 ινοβλάστες ποντικού.⁶

Ο προσδιορισμός των ογκογονιδίων του ανθρώπου τα οποία προκαλούσαν τον μετασχηματισμό των NIH/3T3 κυττάρων δεν καθυστέρησε πολύ και το 1982 πραγματοποιήθηκε ταύτιση μεταξύ των γονιδίων που μετασχημάτιζαν τα κύτταρα NIH/3T3, των γονιδίων τα οποία είχαν απομονωθεί από τους ρετροϊούς και των γονιδίων που βρέθηκαν μεταλλαγμένα σε καρκίνους του ανθρώπου και παρατηρήθηκε ότι τα υπεύθυνα γονίδια για τον μετασχηματισμό ήταν τα *H-Ras* και *K-Ras*. Παράλληλα, αποδείχθηκε ότι η μοριακή βάση της ενεργοποίησης του γονιδίου *H-Ras* στην κυτταρική σειρά καρκινώματος ουροδόχου κύστης EJ, του *K-Ras* σε κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, καθώς και των ιικών ογκογονιδίων *H-Ras* και *K-Ras*, ήταν μια μεταλλαγή αλλαγής νοήματος (missense mutation) στο κωδικόνιο 12. Έτσι, αποδείχθηκε ότι μια σημειακή μεταλλαγή μπορεί να τροποποιήσει τη βιοχημική και τη βιολογική λειτουργία των σχετικών πρωτεϊνών και συμμετέχει σε μια μη φυσιολογική διαδικασία επαγωγής καρκινογένεσης.⁷

Ένα έτος αργότερα, το 1983, με περαιτέρω μελέτες, ταυτοποιήθηκαν πολλά ενεργοποιημένα γονίδια *Ras* σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών σειρών καρκίνων του ανθρώπου, ενώ αξιοσημείωτη ήταν και η μεγάλη συχνότητα μεταλλαγμένων γονιδίων *Ras* που βρέθηκαν στον καρκίνο του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του παγκρέατος, και, εκτός από τη μεταλλαγή του κωδικονίου 12, που προαναφέρθηκε, ταυτοποιήθηκαν επίσης μεταλλαγές στα κωδικόνια 13 και 61. Οι παραπάνω τρεις μεταλλαγές εντοπίζονταν στο 97–99% των γονιδίων *Ras* των καρκινικών κυττάρων, παρ' όλη την ύπαρξη πολλών άλλων μεταλλαγών σε διάφορα σημεία των γονιδίων *Ras*.⁷

Το ίδιο έτος ταυτοποιήθηκε ακόμη ένα μέλος της οικογένειας των γονιδίων *Ras*, το *N-Ras*, το οποίο δεν είχε ταυτοποιηθεί σε κανένα ρετροϊό και απομονώθηκε από DNA κυττάρων νευροβλαστώματος.⁸ Παρατηρήθηκε ότι οι τρεις ισομορφές των γονιδίων *Ras* διέφεραν ως προς τις θέσεις των μεταλλαγών και εμφανίζονταν μεταλλαγμένες με διαφορετική συχνότητα στους διάφορους καρκίνους, με το *K-Ras* να εμφανίζεται με την υψηλότερη συχνότητα (21%). Αξιοσημείωτη είναι, τέλος, η παρατήρηση ότι υπάρχει μια προτίμηση εμφάνισης των διαφόρων μεταλλαγμένων ισομορφών των γονιδίων *Ras* σε κάθε είδος καρκίνου, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι συγκεκριμένες ισομορφές των γονιδίων *Ras* ενδεχομένως είναι απαραίτητες ώστε να αρχίσει η ογκογένεση σε συγκεκριμένο τύπο ιστού. Ωστόσο, η εν λόγω υπόθεση απαιτεί επί πλέον μελέτες.^{7,9}

Περαιτέρω μελέτες αλληλουχίας, αλλά και πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα απέδειξαν ότι η έναρξη της καρκινογένεσης είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού μεταλλαγών, υπόθεση που βρίσκεται, επίσης, σε συμφωνία με τις συσσωρευμένες γενετικές μεταλλαγές οι οποίες παρατηρήθηκαν σε κύτταρα από καρκίνο παχέος εντέρου και παγκρέατος στον άνθρωπο, ενώ επίσης συμφωνεί με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου με την πάροδο της ηλικίας.⁷ Ωστόσο, παρά τον μεγάλο αριθμό των μεταλλαγών που ανιχνεύονται σε καρκινικά κύτταρα, βρέθηκε ότι μόνο 15–20 μεταλλάξεις συμβάλλουν δυναμικά στην εξέλιξη του καρκίνου, ως μεταλλάξεις-οδηγοί, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία δεν εξυπηρετεί κάποιο ρόλο στην καρκινογένεση.

3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RAS

Η διερεύνηση της βιολογίας της οικογένειας των πρωτεϊνών *Ras* άρχισε όταν, με αρχικές μελέτες σε διάφορους ασπόνδυλους οργανισμούς, ταυτοποιήθηκαν συντηρημένα γονίδια *Ras*. Αυτά φάνηκε να σχετίζονται με διαδικασίες, όπως η βιωσιμότητα των σπορίων στην εκκολαπτόμενη ζύμη *S. cerevisiae* (*Ras1* και *Ras2*) και η ρύθμιση της ανάπτυξης των ματιών στην *Drosophila* (*DRas1*).^{10,11} Οι έρευνες συνεχίστηκαν ακόμη και σε άλλους οργανισμούς, περιλαμβανομένου του *Dictyostelium* και του zebrafish, ενώ σε γονιδιώματα φυτών δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί ομόλογα γονίδια.

Τα γονίδια *Ras* αποτελούν επίσης βασικά μέλη μιας υπεριοικογένειας γονιδίων που σχετίζονται με τα *Ras*, η ύπαρξη των οποίων ταυτοποιήθηκε τόσο σε ασπόνδυλα όσο και σε σπονδυλωτά ζώα. Η συγκεκριμένη υπεριοικογένεια των πρωτεϊνών *Ras* στον άνθρωπο διαιρείται σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικές ομάδες (*Ras*, *Rho*, *Rab*, *Arf* και *Ran*), βάσει των ομοιοτήτων στην αλληλουχία και των λειτουργ-

γικών σχέσεων που εμφανίζουν μεταξύ τους. Η εύρεση των ορθόλογων γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών πραγματοποιήθηκε, αρχικά, με τη χρήση ταυτοποιημένων γονιδίων ενός οργανισμού ως ανιχνευτή (π.χ. μέσω του γονιδίου *Rho* της *Aplysia*, που ανακαλύφθηκε το 1985, ταυτοποιήθηκαν οι *RhoA*, *RhoB* και *RhoC* του ανθρώπου), ενώ αργότερα χρησιμοποιήθηκαν ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, που στόχευαν το μοτίβο πρόσδεσης του GTP (57-DTAGQEE/D-63). Το 1986, με παρόμοιες μελέτες, ο παράγοντας *Arf* χαρακτηρίστηκε ως μια πρωτεΐνη που προσδένει GTP και το 1987 ταυτοποιήθηκαν στα θηλαστικά οι *Rab1-4*, ορθόλογες πρωτεΐνες της *Ypt1* της ζύμης.^{7,12}

Πιο πρόσφατα, ολοκληρώθηκε το πλήρες ρεπερτόριο γονιδίων που κωδικοποιούν τις *Ras* σχετιζόμενες μικρές GTPάσες. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν 56 μέλη στον σκώληκα *C. elegans* και 90 στην *Drosophila* και αποδείχθηκε ότι ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών της υπεροικογένειας *Ras*, παρ'όλο που δεν ήταν μεταλλαγμένες σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου.^{13,14} Παράλληλα, ικανός αριθμός των πρωτεϊνών της οικογένειας *Rho*, καθώς και ρυθμιστές αυτών, φαίνεται να εμπλέκονται στον καρκίνο, καθώς και σε άλλες παθήσεις του ανθρώπου.¹⁵ Τέλος, να σημειωθεί ότι, εκτός από κάποιες μόνο εξαιρέσεις, στην πλειοψηφία τους οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των *Ras* πρωτεϊνών λειτουργούν ως μετατροπείς GDP σε GTP και δρουν ως μεταγωγείς σήματος, προάγοντας πληροφορίες μέσω σηματοδοτικών καταρρακτών.^{7,12}

4. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ RAS

4.1. Ρύθμιση του κύκλου GDP/GTP των πρωτεϊνών *Ras* από GAPs και GEFs

Καθώς καταβάλλονταν προσπάθειες να διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης των πρωτεϊνών *Ras*, παρατηρήθηκε ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες έχουν μειωμένη ικανότητα υδρόλυσης GTP, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι σε καρκινικά κύτταρα θα υπάρχει αυξημένη προτίμηση δέσμευσης των εν λόγω πρωτεϊνών σε GTP.⁵ Ωστόσο, η μειωμένη ενεργότητα GTPάσης των πρωτεϊνών *Ras* δεν επαρκούσε από μόνη της να εξηγήσει τη μετασχηματιστική ικανότητα των πρωτεϊνών *Ras in vivo*. Το 1987 έλαβε χώρα μια ανακάλυψη θεμελιώδους σημασίας, με την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών GAPs (GTPase activating proteins), οι οποίες αποδείχθηκε ότι επιταχύνουν κατά 300 φορές την υδρόλυση του GTP που βρίσκεται συνδεδεμένο με τις φυσιολογικές πρωτεΐνες *RAS*, γεγονός το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών.^{7,12,16}

Το ίδιο έτος, γενετική μελέτη στη ζύμη οδήγησε στην

ταυτοποίηση της πρωτεΐνης CDC25 ως ακόμη ενός ενεργοποιητή των πρωτεϊνών *Ras*, η οποία αργότερα έγινε γνωστό ότι δρα ως παράγοντας εξαγωγής γουανίνης (GEF) και προωθεί την απομάκρυνση του GDP από τις πρωτεΐνες *Ras*, επιτρέποντας έτσι μόρια GTP να προστεθούν στην κατάλληλη θέση.¹⁷ Αντίστοιχες μελέτες στην *Drosophila* ταυτοποίησαν την πρωτεΐνη *SOS*, πρωτεΐνη με ομολογίες με την πρωτεΐνη CDC25 της ζύμης.¹⁸

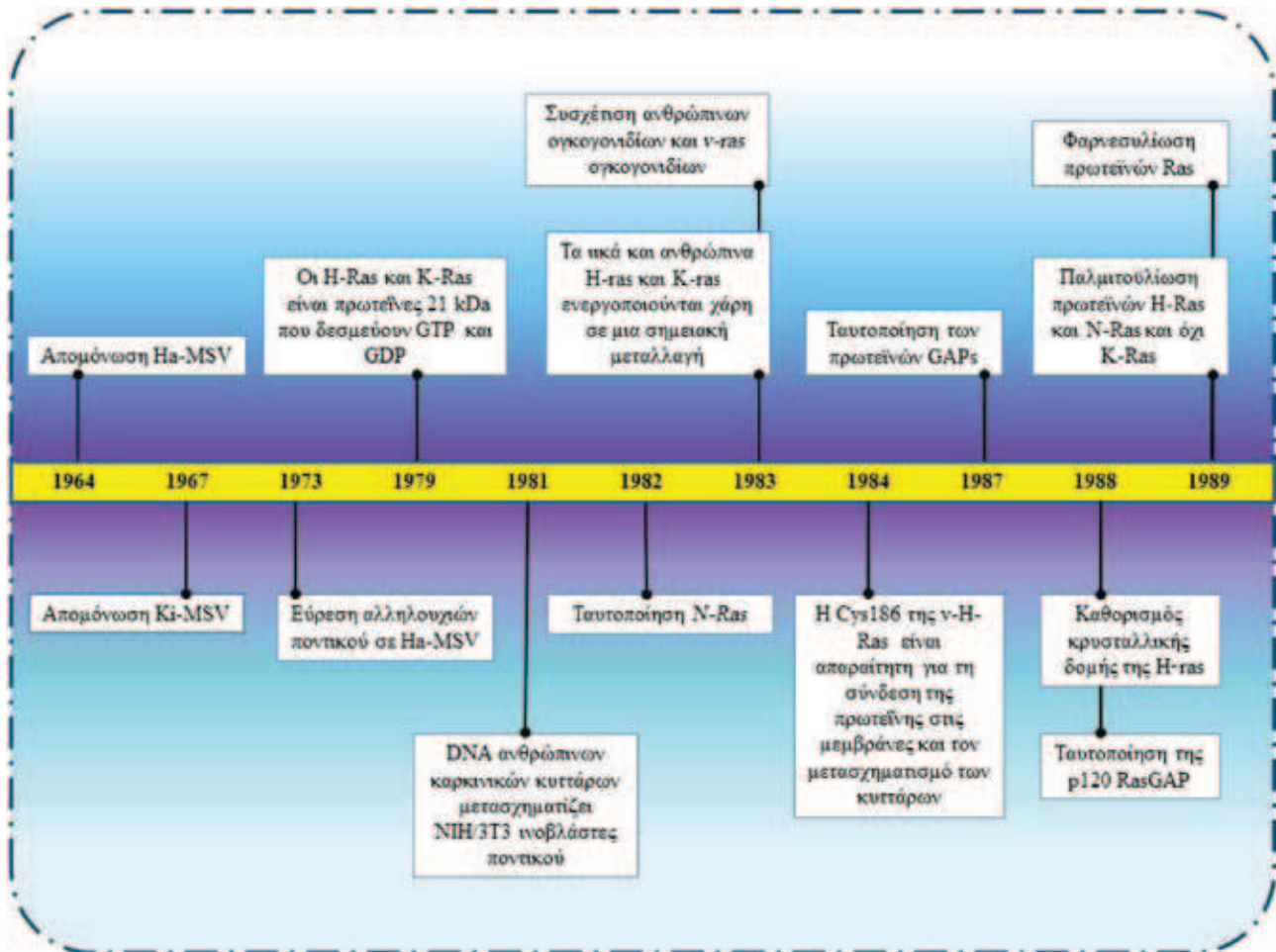
Η πρώτη πρωτεΐνη *RasGAP* (p120 *RasGAP*) ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε το επόμενο έτος, 1988, ενώ λίγο αργότερα άρχισαν να ταυτοποιούνται και άλλες πρωτεΐνες *RasGAPs*. Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με το εύρημα ότι η GTP δεσμευμένη μορφή της *Ras* αποτελεί την ενεργοποιημένη κατάσταση της πρωτεΐνης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο κύριος παράγοντας της βιοχημικής δυσλειτουργίας των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών *Ras* είναι η έλλειψη απόκρισης των πρωτεϊνών *GAP* που οδηγεί σε μειωμένη υδρόλυση GTP, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ενεργούς GTP δεσμευμένης πρωτεΐνης.¹⁶

Τα επόμενα έτη, πειράματα κρυστάλλωσης πρόσφεραν σημαντικές πληροφορίες για τη λειτουργία των πρωτεϊνών *Ras* ως διακόπτες μετατροπής GTP/GDP. Συγκεκριμένα, το 1988 καθορίστηκε η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης *H-Ras*, ενώ με τον προσδιορισμό της δομής του συμπλόκου των πρωτεϊνών *Ras* με τις πρωτεΐνες *GAP* και *GEF* αποκαλύφθηκαν αλληλουχίες της *Ras*, μείζονος σημασίας για την ενεργότητά της. Αργότερα, η μελέτη της δομής του συμπλόκου της *H-Ras* με την καταλυτική υπομονάδα της πρωτεΐνης p120*RasGAP* αποκάλυψε τη μοριακή βάση της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων και ερμήνευσε τις συνέπειες που φέρουν οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις υποκατάστασης στα κατάλοιπα G12 και Q61: παραμονή σε ενεργό κατάσταση με δεσμευμένο GTP και έλλειψη απόκρισης των πρωτεϊνών *GAP*.¹⁹ Όλες οι σημαντικές ανακαλύψεις σχετικά με τα γονίδια *Ras* που πραγματοποιήθηκαν έως το 1989 συνοψίζονται στην εικόνα 1.

Να σημειωθεί επίσης ότι το 1992 απομονώθηκαν για πρώτη φορά τα γονίδια *RASGEF* των θηλαστικών (κυρίως τα *SOS1*, *SOS2* και *RASGRF*) και, τέλος, μέλη μιας τρίτης οικογένειας πρωτεϊνών *RasGEFs*, των *RasGRPs*, ταυτοποιήθηκαν σε πειράματα εντοπισμού ενεργοποιημένων ογκογονιδίων.²⁰

4.2. Ενεργοποίηση των *Ras* από ποικίλα εξωκυττάρια σήματα

Το 1993 ήταν ένα πολύ σημαντικό έτος, καθώς οριοθετήθηκε το κλασικό σηματοδοτικό μονοπάτι των *Ras* και δείχθηκε ότι οι υποδοχείς κίνησης τυροσίνης του EGF (EGFR) ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες *Ras*, οι οποίες με τη σειρά τους



Εικόνα 1. Χρονοδιάγραμμα σημαντικών ανακαλύψεων στην έρευνα των γονιδίων Ras. Πρώτο μέρος (1964–1989).

ενεργοποιούν τον καταρράκτη των MAP κινασών (MAPK).²¹

Γενετικές μελέτες στον σκώληκα *C. elegans* και στην *Drosophila* αποκάλυψαν ότι ο συνδέτης μεταξύ των πρωτεϊνών Ras και του EGFR είναι η πρωτεΐνη-προσαρμογέας Grb2. Η Grb2 αποτελείται από ένα κεντρικό κατάλοιπο -SH2 (Src homologous 2), που συνδέεται με αλληλουχίες φωσφορυλιωμένων τυροσινών. Το εν λόγω τμήμα της πρωτεΐνης πλαισιώνεται από δύο κατάλοιπα -SH3, που αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνες, και το οποίο φάνηκε να στερείται καταλυτικής λειτουργίας. Η Grb2 λειτουργεί αποκλειστικά ως πρωτεΐνη-προσαρμογέας, η οποία διευκολύνει τον σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων. Λίγο αργότερα αποδείχθηκε ότι, μέσω του καταλοίπου SH3, η Grb2 αλληλεπιδρά με τη Sos1, δημιουργώντας σύμπλοκο Grb2-Sos1, το οποίο συνδέεται με τον ενεργοποιημένο EGFR, προωθώντας στη συνέχεια την πρόσδεση της Ras σε αυτόν. Επόμενες μελέτες διεύρυναν το μονοπάτι σηματοδότησης Grb2-Sos-Ras, καταδεικνύοντας και διαφορετικές πρωτεΐνες-προσαρμοστές (όπως οι Shc, IRS και Gab2), οι

οποίες δημιουργούν συνδέσεις με διαφορετικούς υποδοχείς κίνησης τυροσίνης, αυξάνοντας έτσι την ποικιλία των ανοδικών σημάτων που ενεργοποιούν το μονοπάτι των Ras.²²

Παράλληλα, άλλες μελέτες ενίσχυσαν την υπόθεση της συγκλίνουσας σηματοδότησης για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras, καθώς ταυτοποιήθηκαν οι τάξεις των πρωτεϊνών RasGEFs που ενεργοποιούνται από διακριτούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι RasGRPs διαθέτουν το κατάλοιπο C1 το οποίο δεσμεύει τη διακυλογλυκερόλη (DAG), ενώ διαφορετικές ισομορφές της PLC ρυθμίζουν καθοδικά διακριτές τάξεις σηματοδοτικών ρυθμιστών, όπως είναι οι υποδοχείς κίνησης τυροσίνης (PLCγ), οι υποδοχείς οι δεσμευμένοι με G πρωτεΐνες (PLCβ) ή οι Ras/Rho μικρές GTPάσες (PLCε), παρέχοντας έτσι ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία εξοκυττάρων ερεθισμάτων που συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Ras.¹⁶ Με τις παραπάνω ανακαλύψεις έγινε γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των Ras μπορεί να ενεργοποιείται από ποικίλα ανοδικά σήματα, παρέχοντας έτσι πληροφορίες

θεμελιώδους σημασίας για την κατανόηση της βιοχημικής ρύθμισης των μικρών GTPασών.¹²

4.3. Τελεστές των γονιδίων *Ras*: καθοδική σηματοδότηση

Η πληθώρα των τελεστών των πρωτεϊνών *Ras* που ταυτοποιήθηκαν αντικατοπτρίζει την ποικιλία των βιολογικών απαντήσεων τις οποίες έχει ως αποτέλεσμα η ενεργοποίηση των συγκεκριμένων μορίων. Από νωρίς κατά τη διάρκεια των μελετών, τόσο οι *Ras* όσο και οι τελεστές τους φάνηκαν να σχετίζονται με διαδικασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ρύθμιση της ανάπτυξης, η γήρανση, η διαφοροποίηση, η απόπτωση και η επιβίωση.²³

Το 1993 ταυτοποιήθηκε ο πρώτος τελεστής των πρωτεϊνών *Ras*, στα θηλαστικά, η κινάση σερίνης/θρεονίνης *Raf* (πρωτεΐνη που εμφανίζει προτίμηση πρόσδεσης σε ενεργοποιημένο σύμπλοκο *Ras*-GTP), ενώ ένα έτος αργότερα, το 1994, ταυτοποιήθηκε η p110 καταλυτική υπομονάδα της τάξης I PI3-K ως μια δεύτερη τάξη τελεστών των *Ras*. Τα μόρια αυτά αρχικά είχαν ταυτοποιηθεί ως ικκά ογκογονίδια και αργότερα βρέθηκαν μεταλλαγμένα σε καρκίνους του ανθρώπου.²³ Οι παραπάνω πληροφορίες, σε συνδυασμό με την παρατήρηση της εξαρτώμενης από τη *Ras* και *Raf* ενεργοποίησης των ERK1 και ERK2 MAPKs, καθώς και το γεγονός ότι η *Raf* κινάση είναι ικανή να ενεργοποιεί τις MEK1 και MEK2 κινάσες, οδήγησαν στον προσδιορισμό του καθοδικού καταρράκτη κινασών *Raf*-MEK-ERK των πρωτεϊνών *Ras* που είναι γνωστές σήμερα.^{21,23,24}

Παράλληλα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα του ανθρώπου υπέδειξαν έναν ενδεχομένως σημαντικό ρόλο της σηματοδότησης *Ral*GEFs-*Ral* στην ογκογένεση και επισημάνθηκε η συμβολή των *Ral* GTPασών στον καρκίνο του παγκρέατος, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης και σε άλλους καρκίνους του ανθρώπου. Το μονοπάτι *Ral*GEF-*Ral* περιλαμβάνει τον τελεστή *Ral*GEF και μολονότι δεν έχουν καταγραφεί μεταλλαγές στα μόρια που συμμετέχουν σε αυτό σε καρκίνους του ανθρώπου, η συγκεκριμένη σηματοδότηση αποτελεί, ενδεχομένως, την τρίτη αποδοτικότερη οδό μέσω της οποίας προάγεται η ογκογονικότητα των *Ras*.^{25,26}

Αργότερα, προσδιορίστηκαν ακόμη δύο τάξεις τελεστών των πρωτεϊνών *Ras*, που χαρακτηρίστηκαν ως θετικοί ρυθμιστές της από τη *Ras* επαγόμενης ογκογένεσης. Αρχικά, το 2002 ταυτοποιήθηκε η *Tiam1*, μια *Rac*GEF, ομόλογη με την πρωτεΐνη *Raf*-RBD και στη συνέχεια, το 2004, η πρωτεΐνη PLCε, ένας τελεστής για την *H-Ras* του ανθρώπου, που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του DAG και την απελευθέρωση ασβεστίου. Το γεγονός ότι έλλειψη των εν λόγω πρωτεϊνών επηρεάζει την εξέλιξη της *H-RAS*-

επαγόμενης καρκινογένεσης του δέρματος του ποντικού καταδεικνύει τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην καρκινογένεση.²⁷

5. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ

Από το 1990 και μετά επικράτησε η άποψη ότι οι πρωτεΐνες *Ras* συντίθενται ως διαλυτές πρόδρομες ουσίες, οι οποίες υφίστανται ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αναγκαίες για τη μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιούνται από GEFs, απενεργοποιούνται από GAPs και αλληλεπιδρούν με τελεστές προκειμένου να μεταφέρουν το σήμα καθοδικά. Μικρά βήματα και παρατηρήσεις, καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας της ανακάλυψης των πρωτεϊνών *Ras*, ήταν καίριας σημασίας για τον προσδιορισμό των τροποποιήσεων που υφίστανται τα συγκεκριμένα μόρια, ώστε να ενεργοποιηθούν και να καταστούν λειτουργικά.²⁸

Το 1979 έγινε γνωστό ότι ιικές πρωτεΐνες *Ras* εντοπίζονταν στο κυτταρόπλασμα αμέσως μετά τη σύνθεσή τους, αλλά δεν παρέμεναν εκεί. Ένα έτος αργότερα, το 1980, με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας πραγματοποιήθηκε απεικόνιση της πρωτεΐνης *Ras* στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, μια παραδοχή που επικράτησε για πολλά χρόνια, ενώ το 1982 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα της *v-H-Ras* να ενσωματώσει 3H-παλμιτικό οξύ. Το 1984 έγινε μια προσπάθεια χαρακτηρισμού της διαδικασίας με την οποία οι πρωτεΐνες *Ras* συνδέονται στη μεμβράνη και βρέθηκε ότι το κατάλοιπο Cys186 στο καρβοξυτελικό άκρο της *v-H-Ras* είναι απαραίτητο ώστε η πρωτεΐνη *Ras* να δεσμεύσει λιπίδια, να συνδεθεί με τις μεμβράνες και να επιτελέσει τη δράση της. Λίγο αργότερα, το 1987, δείχθηκε ότι η ακυλίωση δεν αποτελεί το πρώτο βήμα της επεξεργασίας των *Ras*, όπως είχε θεωρηθεί παλαιότερα, και μέσα στα επόμενα έτη ταυτοποιήθηκε μια σειρά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που βρέθηκαν να επηρεάζουν την ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης *Ras* και των διαφόρων τελεστών της.^{4,29-31} (εικ. 1).

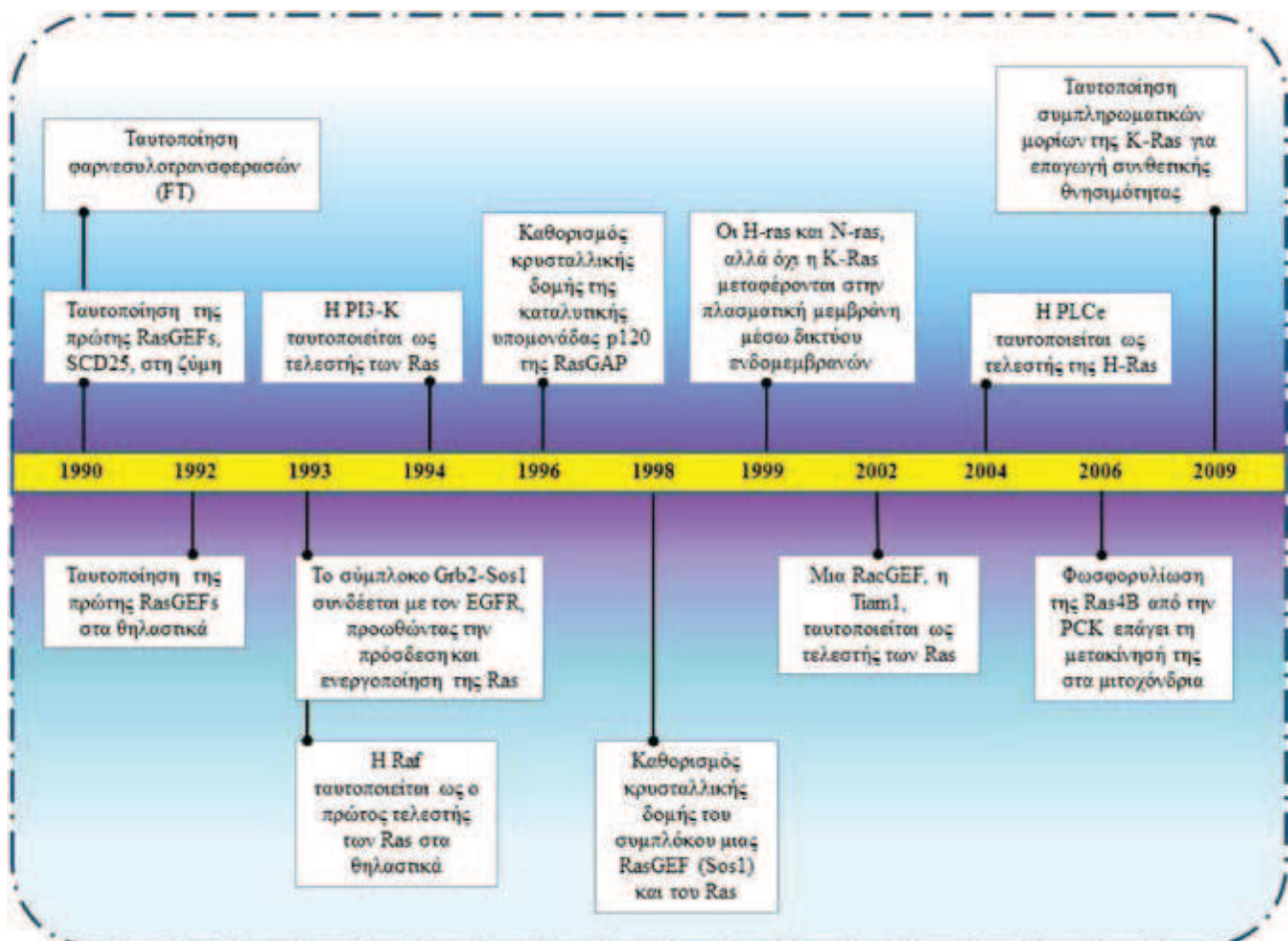
Το 1989 ταυτοποιήθηκε ότι το μοτίβο CAAX (C=Cysteine, A=Aliphatic amino acid, X=Terminal amino acid) του καρβοξυτελικού άκρου των πρωτεϊνών *Ras* ήταν παρόμοιο με εκείνο του α-παράγοντα της ζύμης, ο οποίος είναι γνωστό ότι υφίσταται φαρνεσυλίωση.³² Το ίδιο έτος αποδείχθηκε ότι η *H-Ras* και η *N-Ras*, αλλά όχι η *K-Ras*, ήταν τροποποιημένες και οι δύο με φαρνεσυλίωση της κυστεΐνης 186 και με παλμιτοϋλίωση σε ένα (στην περίπτωση της *N-Ras*) ή σε δύο (στην περίπτωση της *H-Ras*) κυστεϊνικά κατάλοιπα, τα οποία βρίσκονταν ανοδικά ακριβώς πριν από τη φαρνεσυλιωμένη κυστεΐνη 186.³³ Η φαρνεσυλίωση φάνηκε να είναι

το πρώτο και απαραίτητο βήμα ώστε να πραγματοποιηθεί παλμιτοϋλίωση σε κυστεΐνες ανοδικά της κυστεΐνης 186 και διαπιστώθηκε ότι η παλμιτοϋλίωση ενισχύει τη σύνδεση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και τη βιολογική δραστηριότητά τους, ενώ πρωτεΐνες που δεν είναι φαρνεσυλιωμένες γίνονται κυτταροπλασματικές^{12,34} (εικ. 1).

Το 1999 βρέθηκε ότι η μεταφορά των H-Ras και N-Ras, οι οποίες υφίστανται παλμιτοϋλίωση, όχι όμως της K-Ras, μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της πλασματικής μεμβράνης περιλαμβάνει επίσης τη διακίνηση μέσα από το σύμπλεγμα Golgi.³⁵ Επί πλέον, η παλμιτοϋλίωση παγιδεύει τις πρωτεΐνες Ras στη μεμβράνη, καθιστώντας εφικτή τη μεταφορά τους μέσω κυστιδίων, ενώ η αποπαλμιτοϋλίωση επιτρέπει την απελευθέρωσή τους για ανακύκλωση, στοιχεία τα οποία συνέβαλαν στην κατανόηση του μηχανισμού μετακίνησης των πρωτεϊνών Ras μέσα στο κύτταρο.^{12,36} Όλες οι σημαντικές ανακαλύψεις σχετικά με τα γονίδια Ras που πραγματοποιήθηκαν μετά το 1990 συνοψίζονται στην εικόνα 2.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η παλμιτοϋλίωση φάνηκε να συνεισφέρει σημαντικά στη διαφορετική σηματοδότηση των H-Ras και N-Ras σε σχέση με το K-Ras, κατευθύνοντας τις εν λόγω πρωτεΐνες σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί ότι κάθε ισομορφή Ras χαρακτηρίζεται από ειδική αλληλεπίδραση με διαφορετικές πρωτεΐνες συνοδούς. Τα στοιχεία αυτά επισημαίνουν ότι οι συγκεκριμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις υποστηρίζουν την υπόθεση διαφορετικής λειτουργίας των διαφόρων ισομορφών των Ras, που είχε προταθεί προηγουμένως.³⁶

Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών Ras που ταυτοποιήθηκαν είναι η ουβικιτινίωση και η φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η τροποποίηση της H-Ras με μονο- ή δι-ουβικιτινίωση σταθεροποιεί τη σύνδεσή της με τα ενδοσώματα και ρυθμίζει την ικανότητά της να ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του μονοπατιού ERK MAPK, ενώ η φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου φάνηκε να συμμετέχει στον καθορισμό της τοποθεσίας και της λειτουργίας της πρωτεΐνης.^{37,38}



Εικόνα 2. Χρονολογικό διάγραμμα σημαντικών ανακαλύψεων στην έρευνα των γονιδίων Ras. Δεύτερο μέρος (1990–2009).

6. RAS ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Λόγω της αποκάλυψης στοιχείων που υποστηρίζουν την κρίσιμη συμβολή των πρωτεϊνών Ras στη διαδικασία της καρκινογένεσης, τα τελευταία έτη η μελέτη στο συγκεκριμένο πεδίο έχει επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση και στη στόχευση κατάλληλων μορίων ως μέσο της αντικαρκινικής θεραπείας.^{21,39} Αρχικά, μια από τις πλέον ελκυστικές ιδέες φάνηκε να είναι η στόχευση και η αναστολή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων λιπιδίωσης που υφίστανται οι πρωτεΐνες Ras.³⁹ Περίπου το 1990 καταδείχθηκε ότι η καταλυτική δράση της φαρνεσυλοτρανσφεράσης (FT) μπορεί να ανασταλεί αποτελεσματικά από μικρά τετραπεπτίδια που μιμούνταν τις καρβοξυτελικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών Ras, ενώ 5 έτη αργότερα, το 1995, πεπτιδομιμητικοί αναστολείς του FT (FTI) προκάλεσαν υποχώρηση του όγκου, *in vivo*, σε MMTV-ras ποντίκια και ανέστειλαν την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων καρκινικών κυττάρων του ανθρώπου σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια.^{34,39} Ωστόσο, η χρήση των FTI δεν στέφθηκε με την ίδια επιτυχία και σε κλινικές δοκιμές λόγω της εναλλακτικής πρενυλίωσης που υφίστανται οι πρωτεΐνες K-Ras4B και N-Ras παρουσία FTI, γεγονός που οδηγεί σε αντοχή έναντι της συγκεκριμένης θεραπείας. Το γεγονός ότι οι εν λόγω πρωτεΐνες είναι οι πλέον συχνά μεταλλαγμένες σε πολλούς όγκους στον άνθρωπο δικαιολογεί την αποτυχία των κλινικών δοκιμών.

Παράλληλα, έχουν γίνει προσπάθειες στόχευσης τελεστών που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των Ras. Η εύρεση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών BRAF και PIK3CA σε πολλούς καρκίνους οδήγησε τους ερευνητές να εστιάσουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια Raf-MEK-ERK και PI3K-AKT-mTOR και δοκιμάστηκαν αναστολείς διαφόρων μορίων, όπως οι κινάσες MEK και Raf. Ειδικά στην περίπτωση της Raf, η ανακάλυψη του ειδικού αναστολέα PLX4032, που στοχεύει στη μεταλλαγμένη κινάση BRAFV600E, αποτέλεσε σημαντικό

σταθμό στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου.⁴⁰ Το 2012, το PLX4032 (βεμουραφενίμπη [vemurafenib], Zelboraf®) έλαβε έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία ασθενών με BRAF^{V600E} μεταστατικό μελάνωμα. Παρά τα εντυπωσιακά αποτελέσματα που επέδειξε ο συγκεκριμένος αναστολέας στους ασθενείς με την παραπάνω μετάλλαξη, μελέτες τόσο σε κυτταρικό όσο και σε κλινικό επίπεδο έδειξαν ότι, παρουσία μετάλλαξης στα γονίδια *Ras*, ο συγκεκριμένος αναστολέας οδηγεί σε ενεργοποίηση της RAF, μέσω αναστολής του ενδογενούς μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, που φυσιολογικά παρεμποδίζει τη σηματοδότηση.⁴¹ Φαίνεται ότι για την εξαγωγή ελπιδοφόρων αποτελεσμάτων από τη συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση απαιτείται περαιτέρω μελέτη.^{39,42}

Επί πλέον, μια πιο σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η επαγωγή συνθετικής θνησιμότητας, κατά την οποία επέρχεται θάνατος του κυττάρου όταν δύο συγκεκριμένα γονίδια βρεθούν ταυτόχρονα μεταλλαγμένα⁴³ (εικ. 2). Λόγω του σημαντικού ρόλου της πρωτεΐνης K-Ras στην καρκινογένεση, έγινε αναζήτηση ενός συμπληρωματικού μορίου αυτής. Οι μελέτες που εκπονήθηκαν έφεραν στο φως μόρια, όπως η STK33 κινάση σερίνης/θρεονίνης, η Polo-like κινάση 1 (Plk1), μια κινάση σερίνης/θρεονίνης με ρόλο στη μίτωση, καθώς η TANK-binding κινάση 1 (TBK1), μόριο που προωθεί την κυτταρική επιβίωση. Αναστολείς των παραπάνω μορίων φάνηκε ότι ήταν ικανοί να αναστείλουν την καρκινογένεση σε κύτταρα με μεταλλαγμένη Ras, και ως εκ τούτου να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα κατά την αντικαρκινική θεραπεία. Περαιτέρω μελέτη στον συγκεκριμένο τομέα θα μπορούσε να ρίξει φως στη βιολογία των Ras και να συμβάλει στην παραγωγή αποτελεσματικών φαρμάκων, τα οποία ενδέχεται να έχουν σημαντική επίδραση στη θεραπεία του καρκίνου.^{39,42}

ABSTRACT

Flashback in the history of Ras research

G. CHALDAIOPOULOU, M. GOULIELMAKI, N. KHOURY, V. ZOUMPOURLIS

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

Archives of Hellenic Medicine 2017, 34(4):439–447

The ability of a group of retroviruses to produce tumors in infected animals was the first indication of the existence of genetic elements with oncogenic properties. After comprehensive studies on these retroviruses, the first *Ras* genes were identified, which were later found to be present in the rat genome. The trigger for further studies was given by the discovery of mutated *Ras* genes in human cancer cells. In the following years, a series of biochemical and structural, *in vivo* and *in vitro*, studies were conducted that contributed fundamental information to the field of cell and

cancer biology. Ras proteins constitute a very small part of a superfamily of Ras-related small GTPases, which appear to be the main regulators of the majority of crucial cell functions. The study of these proteins has contributed to the comprehension of the molecular mechanisms involved in cancer incidence and progression, and the complex mechanisms of signal transduction in general. Through these years of in-depth investigation, the vital role of the small GTPases in biology was revealed and it became clear that extracellular signals are capable of modifying the regulation of intracellular procedures. Taking advantage of the knowledge that has been accumulated, research is now focused on finding new, effective anticancer treatments, although further investigation of the *Ras* genes continues to be mandatory for substantial understanding of their dynamic. This review provides a chronological flashback in the history of *Ras* research. A thorough analysis of the key discoveries related to the structure, biochemistry and mechanism of function of the Ras superfamily of proteins is presented, and their correlation with human cancer is highlighted.

Key words: *Ras*, *Ras* targeted cancer therapy, *Ras* transmission signals, Small GTPases

Βιβλιογραφία

- HARVEY JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 1964, 204:1104–1105
- KIRSTEN WH, MAYER LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1967, 39:311–335
- SCOLNICK EM, PARKS WP. Harvey sarcoma virus: A second murine type C sarcoma virus with rat genetic information. *J Virol* 1974, 13:1211–1219
- WILLINGHAM MC, PASTANI I, SHIHTY, SCOLNICK EM. Localization of the *src* gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 1980, 19:1005–1014
- GIBBS JB, SIGAL IS, POE M, SCOLNICK EM. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:5704–5708
- SHIH C, SHILO BZ, GOLDFARB MP, DANNENBERG A, WEINBERG RA. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76:5714–5718
- FERNANDEZ-MEDARDE A, SANTOS E. *Ras* in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011, 2:344–358
- HALL A, MARSHALL CJ, SPURR NK, WEISS RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the *ras* gene family located on chromosome 1. *Nature* 1983, 303:396–400
- COLICELLI J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* 2004, 2004:RE13
- DHAR R, NIETO A, KOLLER R, DeFEO-JONES D, SCOLNICK EM. Nucleotide sequence of two *rasH* related-genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1984, 12:3611–3618
- NEUMAN-SILBERBERG FS, SCHEJTER E, HOFFMANN FM, SHILO BZ. The *Drosophila ras* oncogenes: Structure and nucleotide sequence. *Cell* 1984, 37:1027–1033
- WENNERBERG K, ROSSMAN KL, DER CJ. The *Ras* superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005, 118:843–846
- LUNDQUIST EA. *Small GTPases*. WormBook, 2006:1–18
- JIANG SY, RAMACHANDRAN S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. *Physiol Genomics* 2006, 24:235–251
- SURMA M, WEIL, SHI J. Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Future Cardiol* 2011, 7:657–671
- BOS JL, REHMANN H, WITTINGHOFFER A. GEFs and GAPs: Critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 2007, 129:865–877
- CRÉCHET JB, POULLET P, MISTOU MY, PARMEGIANNI A, CAMONIS J, BOY-MARCOTTE E ET AL. Enhancement of the GDP-GTP exchange of RAS proteins by the carboxyl-terminal domain of SCD25. *Science* 1990, 248:866–868
- BOWTELL D, FU P, SIMON M, SENIOR P. Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: Potential activators of *ras*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:6511–6515
- SCHEFFZEK K, LAUTWEIN A, KABSCH W, AHMADIAN MR, WITTINGHOFFER A. Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with *Ras*. *Nature* 1996, 384:591–596
- EBINU JO, BOTTORFF DA, CHAN EY, STANG SL, DUNN RJ, STONE JC. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 1998, 280:1082–1086
- CHAPPELL WH, STEELMAN LS, LONG JM, KEMPF RC, ABRAMS SL, FRANKLIN RA ET AL. *Ras/Raf/MEK/ERK* and *PI3K/PTEN/Akt/mTOR* inhibitors: Rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011, 2:135–164
- PRUETT W, YUAN Y, ROSE E, BATZER AG, HARADA N, SKOLNIK EY. Association between GRB2/Sos and insulin receptor substrate 1 is not sufficient for activation of extracellular signal-regulated kinases by interleukin-4: Implications for *Ras* activation by insulin. *Mol Cell Biol* 1995, 15:1778–1785
- KYRIAKIS JM. Thinking outside the box about *Ras*. *J Biol Chem* 2009, 284:10993–10994
- HOWE LR, LEEVERS SJ, GÓMEZ N, NAKIELNY S, COHEN P, MARSHALL CJ. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 1992, 71:335–342
- WOLTHUIS RM, ZWARTKRUIS F, MOEN TC, BOS JL. *Ras*-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr Biol* 1998, 8:471–474
- BODEMANN BO, WHITE MA. Ral GTPases and cancer: Linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer* 2008, 8:133–140

27. MALLIRI A, VAN DER KAMMEN RA, CLARK K, VAN DER VALK M, MICHIELS F, COLLARD JG. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to *Ras*-induced skin tumours. *Nature* 2002, 417:867–871
28. COX AD, DER CJ. *Ras* history: The saga continues. *Small GTPases* 2010, 1:2–27
29. AHEARN IM, HAIGIS K, BAR-SAGI D, PHILIPS MR. Regulating the regulator: Post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, 13:39–51
30. WILLUMSEN BM, CHRISTENSEN A, HUBBERT NL, PAPAGEORGE AG, LOWY DR. The p21 *ras* C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 1984, 310:583–586
31. SEFTON BM, TROWBRIDGE IS, COOPER JA, SCOLNICK EM. The transforming proteins of Rous sarcoma virus, Harvey sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid. *Cell* 1982, 31:465–474
32. CASEY PJ, SOLSKI PA, DER CJ, BUSS JE. p21*ras* is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:8323–8327
33. HANCOCK JF, MAGEE AI, CHILDS JE, MARSHALL CJ. All *ras* proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 1989, 57:1167–1177
34. RUBIO I, WITTIG U, MEYER C, HEINZE R, KADEREIT D, WALDMANN H ET AL. Farnesylation of *Ras* is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur J Biochem* 1999, 266:70–82
35. CHOY E, CHIU VK, SILLETTI J, FEOKTISTOV M, MORIMOTOT, MICHAELSON D ET AL. Endomembrane trafficking of *ras*: The CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 1999, 98:69–80
36. EISENBERG S, LAUDE AJ, BECKETT AJ, MAGEEAN CJ, ARAN V, HERNANDEZ-VALLADARES M ET AL. The role of palmitoylation in regulating *Ras* localization and function. *Biochem Soc Trans* 2013, 41:79–83
37. PARKS, JOVER. Tyrosine phosphorylation of *Ras* GTPase-activating protein stabilizes its association with p62 at membranes of v-*Src* transformed cells. *J Biol Chem* 1993, 268:25728–25734
38. SASAKI AT, CARRACEDO A, LOCASALE JW, ANASTASIOU D, TAKEUCHI K, KAHOUDE ER ET AL. Ubiquitination of *K-Ras* enhances activation and facilitates binding to select downstream effectors. *Sci Signal* 2011, 4:ra13
39. BAINES AT, XU D, DER CJ. Inhibition of *Ras* for cancer treatment: The search continues. *Future Med Chem* 2011, 3:1787–1808
40. TSAI J, LEE JT, WANG W, ZHANG J, CHO H, MAMO S ET AL. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:3041–3046
41. POULIKAKOS PI, ZHANG C, BOLLAG G, SHOKAT KM, ROSEN N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signaling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010, 464:427–430
42. GYSIN S, SALT M, YOUNG A, McCORMICK F. Therapeutic strategies for targeting *ras* proteins. *Genes Cancer* 2011, 2:359–372
43. KAELIN WG Jr. Synthetic lethality: A framework for the development of wiser cancer therapeutics. *Genome Med* 2009, 1:99

Corresponding author:

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

.....