

5^o

Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες

**Δομή και αλληλεπιδράσεις με άλλα συστήματα.
Ταχύτητα και εξειδίκευση στη μεταγωγή σήματος**

1. Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες - GPCRs

Δομή των GPCRs

Σύνδεση GPCRs με G πρωτεΐνες και ενεργοποίηση του τελεστή

Απευεσθητοποίηση και ανακύκλωση των GPCRs: Λήξη του μηνύματος

Διμερισμός των GPCRs

GPCRs γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών

GPCRs οι οποίοι ενεργοποιούνται από πρωτεάσες

2. Πρωτεΐνες G

Δομή των πρωτεϊνών G

Η μετάδοση του μηνύματος μέσω πρωτεϊνών G περιλαμβάνει πολύπλοκες διεργασίες

Ο ρόλος των βγ-υπομονάδων

Ποικιλομορφία των α-υπομονάδων των πρωτεϊνών G

Τοξίνη του κοκίτη – τοξίνη της χολέρας και η ADP ριβοσυλίωση των G-πρωτεϊνών

Εξειδίκευση των πρωτεϊνών G

Ρυθμιστές των G-πρωτεϊνών: Φωσδυσίνη και πρωτεΐνες RGS

3. Αδενυλοκυκλάση και cAMP

Η δομή της αδενυλοκυκλάσης

Οι διάφοροι τύποι της αδενυλοκυκλάσης

Ο ρόλος της φορσκολίνης στη δράση της αδενυλοκυκλάσης

Το cAMP ως δεύτερος διαβιβαστής

Το cAMP έχει πολυάριθμα αποτελέσματα

4. Φωσφολιπάση C και IP₃/διακυλογλυκερόλη

Οι κατηγορίες φωσφολιπασών

Τα πολυ-φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης

Διακυλογλυκερόλη

Τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃ ή Ins(1,4,5)P₃)

Πρωτεϊνική κινάση C: δομή και ενεργοποίηση από DAG και Ca²⁺

Φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης και η κινάση PI3-K

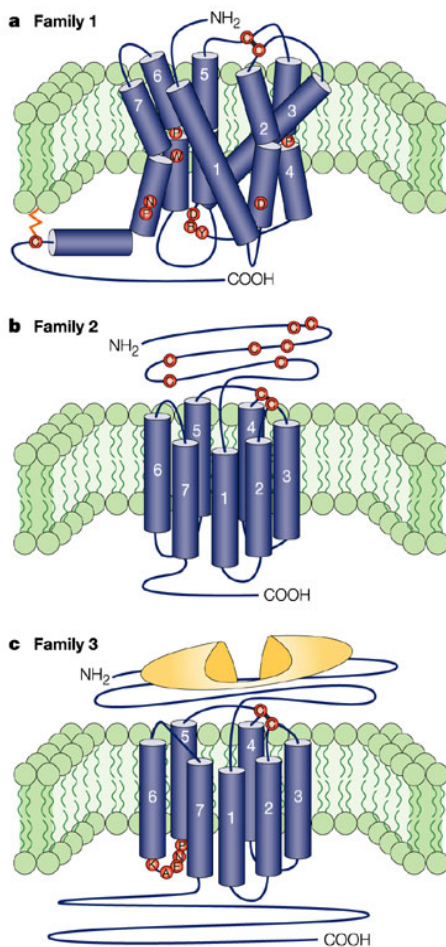
Άλλα φωσφολιπίδια της μεμβράνης που συμμετέχουν στη σηματοδότηση

Το Ca²⁺ ως δεύτερος διαβιβαστής

1. Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors: GPCRs)

Οι GPCRs ανήκουν σε μια υπεροικογένεια υποδοχέων που αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών στη φύση. 2000 αλληλουχίες GPCR-like έχουν αναγνωριστεί και αποτελούν το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Από τις αλληλουχίες αυτές, οι περισσότερες (>1.000) ανήκουν σε αισθητήριους υποδοχείς, γεύσης, όρασης και κυρίως όσφρησης καθώς η ανακάλυψη του Richard Axel (βραβείο Nobel 2004) ότι ο κάθε όσφρητικός νευρώνας εκφράζει το δικό του όσφρητικό υποδοχέα ανέβασε τον αριθμό των GPCRs. Προσδέτες έχουν αναγνωριστεί για τους 210 από τους μη-αισθητήριους GPCRs του ανθρώπινου γονιδιώματος. Οι υπόλοιποι 150 χαρακτηρίζονται ως «ορφανοί», που σημαίνει ότι δεν έχει αναγνωριστεί ακόμη ο ενδογενής τους προσδέτης.

Οι GPCRs είναι η μεγαλύτερη κατηγορία υποδοχέων, η οποία υποδιαιρείται σε 3 υποοικογένειες ανάλογα με την ομολογία των αλληλουχιών τους (Εικόνα 5.1 και 5.2).

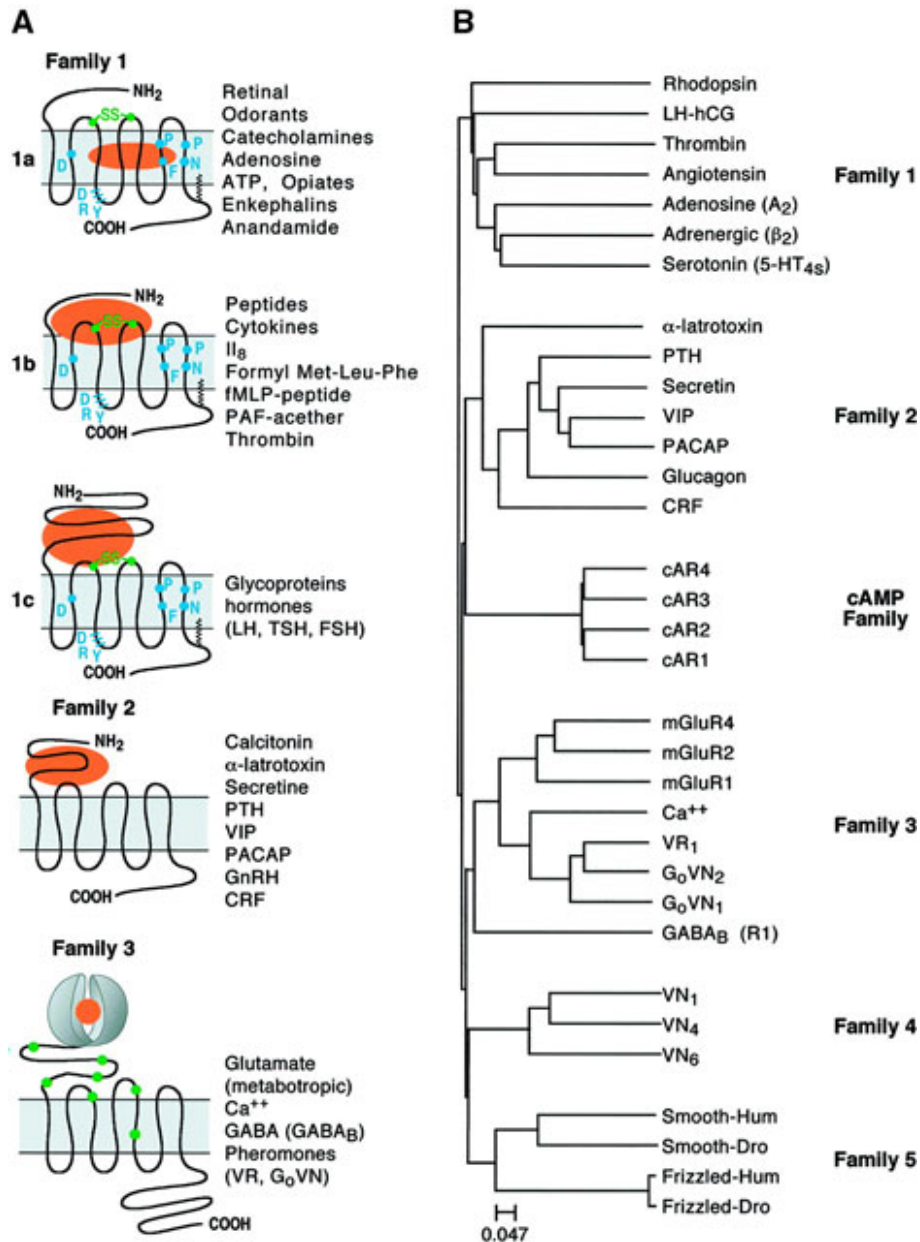


Εικόνα 5.1. Οι τρεις οικογένειες στις οποίες ταξινομούνται σύμφωνα με την ομολογία της αλληλουχίας τους, οι υποδοχείς GPCRs. Από *Strosberg and Nahmias, G-protein coupled receptor signaling through protein networks, Biochemical Society Transactions, 2007, 35, 23-28.*

Η **οικογένεια A**, η οποία έχει δομή όμοια με τον υποδοχέα ροδοψίνη, περιλαμβάνει τα περισσότερα μέλη, μεταξύ των οποίων οι GPCRs των νευροδιαβιβαστών (μικρά μόρια όπως η αδρεναλίνη, ντοπαμίνη, σεροτονίνη, ακετυλοχολίνη), οι GPCRs των μικρών νευροπεπτιδίων (fMLP-peptide, PAF, εγκεφαλίνες), των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών (LH, TSH, FSH) και οι όσφρητικοί GPCRs. Οι υποδοχείς της οικογένειας A χαρακτηρίζονται από πολλά καλά συντηρημένα αμινοξέα (στην Εικόνα 1 φαίνονται με κόκκινο), ένα δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει την 1^η και 2^η εξωκυτταρική θηλειά, και μια παλμιτουλιωμένη κυστεΐνη στο καρβοξυ τελικό άκρο.

Η **οικογένεια B**, χαρακτηρίζεται από ένα σχετικά μεγάλο NH₂ άκρο, το οποίο περιέχει πολλές κυστεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ένα δίκτυο δισουλφιδικών δεσμών. Η μορφολογία τους είναι όμοια με αυτή της οικογένειας A, με τη διαφορά ότι λείπει η θέση παλμιτουλίωσης, και έχουν διαφορετικά συντηρημένα αμινοξέα ή μοτίβα. Οι προσδέτες της οικογένειας B είναι μεγάλες πεπτιδικές ορμόνες, όπως η γλυκαγόνη, η σεκρετίνη, το VIP και η παραθυροειδής ορμόνη.

Η **οικογένεια C**, περιλαμβάνει τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού, των φερομονών, τους αισθητήρες Ca²⁺ και τους υποδοχείς GABA_B. Αυτοί οι υποδοχείς εμφανίζονται σε διμερή μορφή και χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο NH₂-άκρο και μια μεγάλη COOH-ουρά. Η θήκη σύνδεσης του προσδέτη τους βρίσκεται στο NH₂ άκρο, μοιάζει με σαρκοφάγο φυτό εντομοπαγίδα της Αφροδίτης και περικλείει τον προσδέτη. Εκτός από το δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει την 1^η και 2^η εξωκυτταρική τους θηλειά, τα χαρακτηριστικά των υποδοχέων αυτών δεν έχουν κοινά με την οικογένεια A.



Εικόνα 5.2: Ταξινόμηση και διαφοροποίηση των GPCRs.

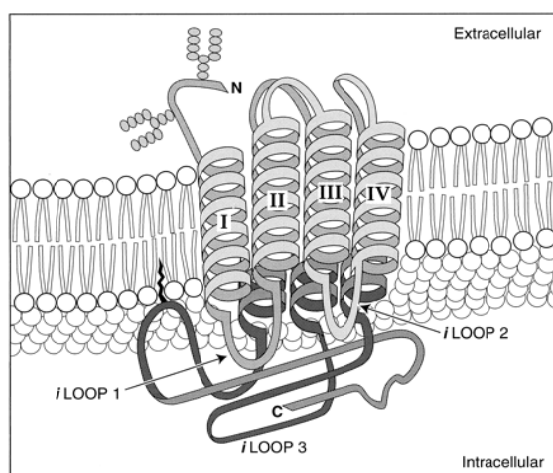
A. Οι τρεις κύριες οικογένειες (1, 2, 3) μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν με σύγκριση των αμινοξικών τους αλληλουχιών. Η οικογένεια 1 περιλαμβάνει τους ορρητικούς υποδοχείς. Στην ομάδα των 1a ανήκουν υποδοχείς για μικρούς προσδέτες, με πρότυπους υποδοχείς τη ροδοψίνη και τον β -αδρενεργικό. Η θέση σύνδεσης του προσδέτη βρίσκεται μέσα στη μεμβράνη, ανάμεσα στις διαμεμβρανικές α -έλικες. Στην ομάδα των 1b ανήκουν υποδοχείς για μικρά πεπτίδια, τα οποία συνδέονται στο NH_2 -άκρο, στις εξωκυτταρικές θηλιές και στην έξω πλευρά των διαμεμβρανικών περιοχών. Στην ομάδα 1c ανήκουν υποδοχείς των γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο NH_2 -άκρο, όπου συνδέονται οι προσδέτες. Η οικογένεια 2 έχει όμοια μορφολογία με την ομάδα 1c, χωρίς όμως ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία. Οι προσδέτες είναι μεγάλου MB ορμόνες, όπως η γλυκαγόνη, η σεκρετίνη, το VIP και η α -λατροτοξίνη. Η οικογένεια 3 περιλαμβάνει τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς του γλουταμικού (mGluRs), υποδοχείς αισθητήρες Ca^{2+} , τους GABA_B και ορισμένους υποδοχείς φερομονών που συνδέονται με G_0 .

B. Η οικογένεια 4 περιλαμβάνει υποδοχείς φερομονών που συνδέονται με G_i (VNs). Η οικογένεια 5 περιλαμβάνει τους υποδοχείς frizzled και smoothed (Smo), οι οποίοι εμπλέκονται στην εμβρυογένεση. Τέλος, οι υποδοχείς του cAMP (cARs) έχουν βρεθεί μόνο στο *D. discoideum*.

Από Bockaert and Pin, *Molecular tinkering of GPCRs: an evolutionary success*, *The EMBO J.* 1999, 18, 1723-1729.

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο μεταγωγής σήματος μέσω GPCRs, ο υποδοχέας ενεργοποιεί μια ετεροτριμερή G πρωτεΐνη (α , $\beta\gamma$ υπομονάδες), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τελεστές (effectors) και αυτοί δεύτερους αγγελιοφόρους, ικανούς να προκαλέσουν διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Έχει ακόμα βρεθεί πως η δράση των GPCRs ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων υποδοχέων και συντελεί έτσι σε πιο πολύπλοκα και πολλές φορές μη προβλεπόμενα αποτελέσματα.

■ Δομή των GPCRs Νευροδιαβιβαστών της Οικογένειας A - Ομάδα 1a



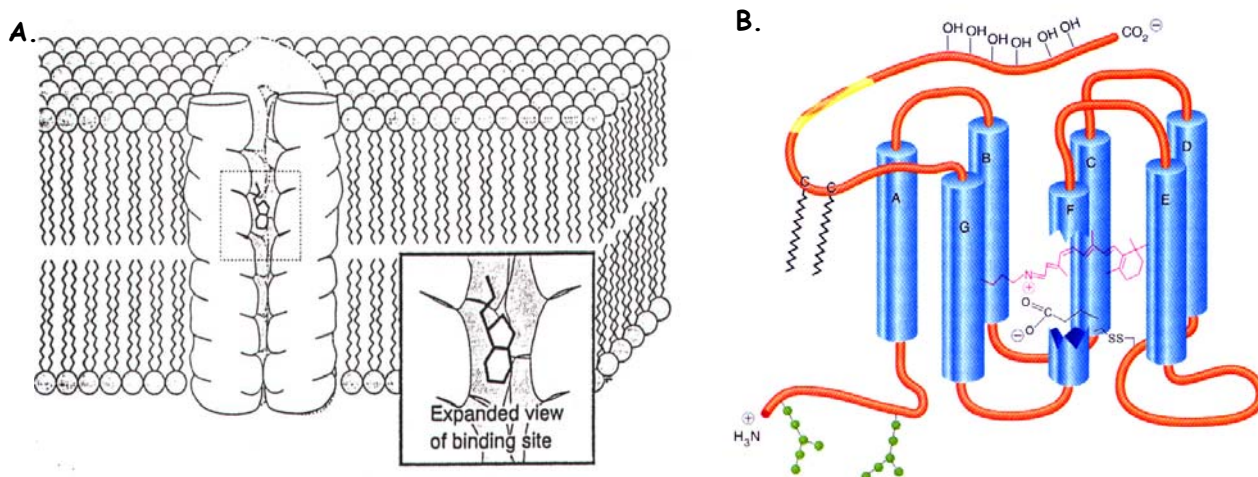
Εικόνα 5.3 Δομή υποδοχέα GPCR. Από *Morris and Malbon, Physiological Rev. 1999.*

Οι υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με μια πρωτεΐνη G και ανήκουν στην οικογένεια A – ομάδα 1a μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Είναι γλυκοπρωτεΐνες 400 έως 600 αμινοξέων που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη 7 φορές. Ενδομεμβρανικά σχηματίζονται 7 α -έλικες, οι οποίες καθώς αναδιπλώνονται σχηματίζουν 3 θηλιές-βρόχους (loops) εξωκυτταρικά και 3 θηλιές ενδοκυτταρικά. Το εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα εμφανίζει θέσεις γλυκοσυλίωσης ενώ το ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό του άκρο είναι μια μακριά αλυσίδα, η οποία συνδέεται στη μεμβράνη μέσω μιας παλμιτοϋλιωμένης κυστεΐνης. Οι ενδοκυττάριοι βρόχοι και η καρβοξυτελική

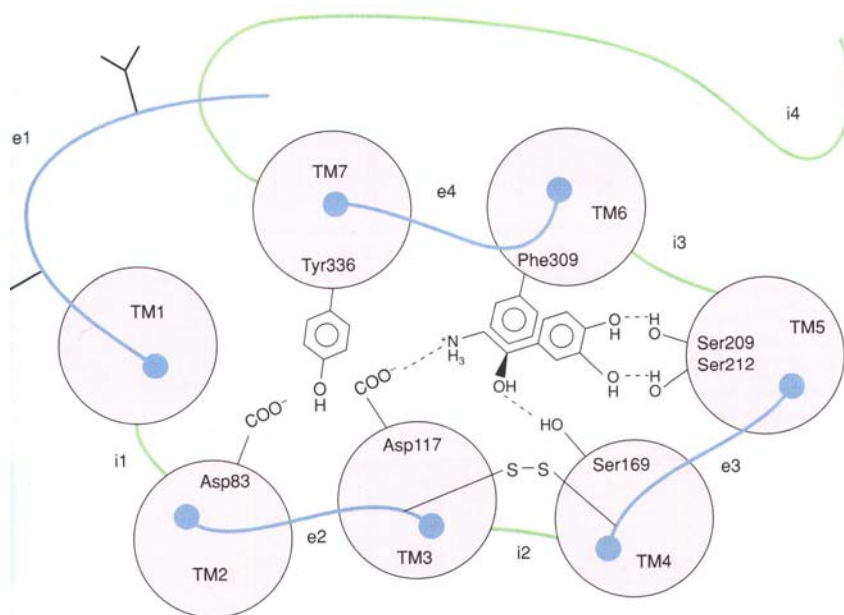
ουρά μεταφέρουν το σήμα στη G πρωτεΐνη και δρουν ως υποστρώματα για φωσφορυλιώσεις από πρωτεϊνικές κινάσες.

• **7-ΕΝΔΟΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ.** Η κάθε μία περιοχή αποτελείται από 20-25 αμινοξέα, τα οποία είναι διατεταγμένα σε α -έλικα, δημιουργώντας ένα είδος κυλίνδρου. Οι περιοχές αυτές περιέχουν τα περισσότερα συντηρημένα αμινοξέα ή μοτίβα, ανάμεσα στους υποδοχείς αυτής της κατηγορίας (βλπ [Εικόνα 5.1](#) και [5.2](#)).

Η τρίτη ενδομεμβρανική περιοχή περιέχει τη θέση σύνδεσης του νευροδιαβιβαστή (binding site). Μελέτες μεταλλαγμένης που έγιναν αρχικά στο β_2 -αδρενεργικό υποδοχέα, και επιβεβαιώθηκαν αργότερα και για άλλους υποδοχείς (σεροτονεργικούς, μουσκαρινικούς, α -αδρενεργικούς, ντοπαμινεργικούς) έδειξαν ότι βασικό ρόλο στη σύνδεση μονοαμίνης-υποδοχέα παίζει το ασπαρτικό οξύ (το Asp 113: το 113^ο αμινοξύ του β_2 -αδρενεργικού υποδοχέα). Η αντικατάσταση του Asp113 από κάποιο άλλο αμινοξύ (πχ. βαλίνη ή γλυκίνη) εμποδίζει τη σύνδεση αγωνιστών και ανταγωνιστών στο β_2 AR. Το ασπαρτικό οξύ διατηρείται στην 3^η ενδομεμβρανική περιοχή όλων των υποδοχέων των μονοαμινών (είναι Asp117 στον αδρενεργικό β_3 υποδοχέα, Asp105 στο μουσκαρινικό m_1 , Asp104 στο μουσκαρινικό m_4 , κλπ), ενώ απουσιάζει πχ. από τους υποδοχείς της αγγειοτανσίνης ή της γοναδοτροπίνης. Η καρβοξυλική ομάδα (COO^-) του ασπαρτικού οξέος χρησιμεύει σαν αντίθετο ιόν (counter-ion) στη σύνδεση της αμινομάδας (NH_2^+) των μονοαμινών. Το ασπαρτικό οξύ, αν και παίζει κυρίαρχο ρόλο, δεν είναι το μόνο που απαιτείται για τη σύνδεση της αμίνης. Στους υποδοχείς των κατεχολαμινών, και ειδικότερα στον αδρενεργικό β_3 , οι σερίνες Ser209 και Ser212 στην V περιοχή χρησιμεύουν στη δημιουργία δεσμού υδρογόνου ($\text{H}\dots\text{OH}$) προσφέροντας το H^+ , ενώ οι κατεχολαμίνες προσφέρουν το OH^- . **Τα υπεύθυνα λοιπόν αμινοξέα για τη σύνδεση δημιουργούν μια ΘΗΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ (binding pocket).**



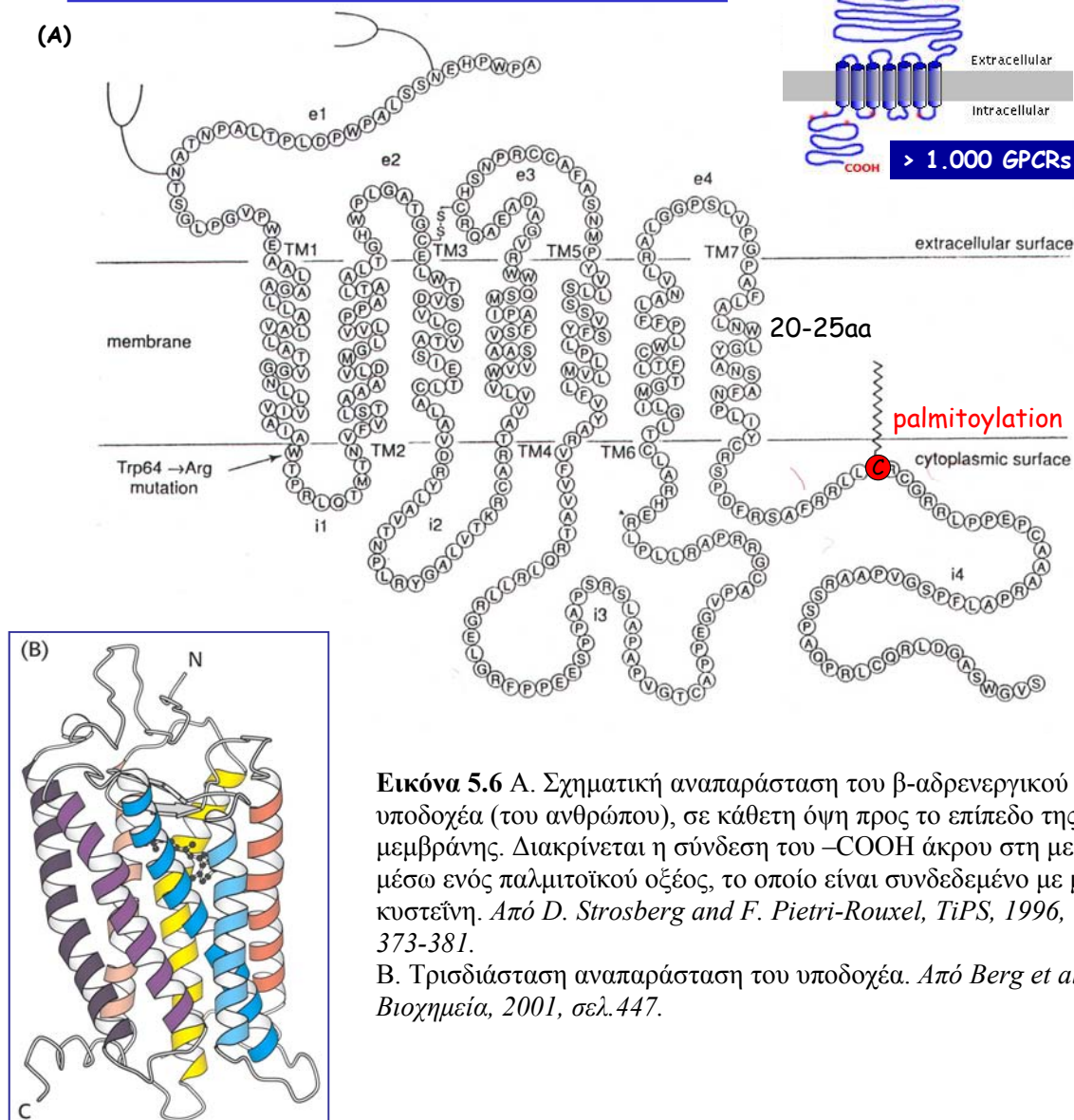
Εικόνα 5.4 Α. Σχηματική αναπαράσταση της θήκης σύνδεσης μορίου-υποδοχέα (binding pocket). Από C.D. Strader et al, *Faseb J.*, 1989, 3, 1825-32. Β. Αναπαράσταση του υποδοχέα ροδοψίνης, όπου διακρίνεται η θήκη σύνδεσης της ρετινάλης, Από Zubay G, *Biochemistry* 1998.



Εικόνα 5.5 Μοντέλο για τη θήκη σύνδεσης του β₃-αδρενοϋποδοχέα, σε κάτοψη. Διακρίνονται το Asp117 της 3^{ης} ενδομεμβρανικής περιοχής, οι δύο σερίνες (Ser209 και Ser212) της 5^{ης} περιοχής και η Phe309 της 6^{ης} περιοχής. Το μόριο στο κέντρο είναι η ισοπρεναλίνη (αγωνιστής του υποδοχέα). **e1-e4**: είναι οι 4 εξωκυτταρικές περιοχές, και **i1-i3**: είναι οι 4 ενδοκυτταρικές περιοχές. Από D. Strosberg and F. Pietri-Rouxel, *TiPS*, 1996, 373-381.

Όλοι οι υποδοχείς που δρουν μέσω πρωτεϊνών G έχουν στην πρώτη και στη δεύτερη εξωκυτταρική θηλιά **δύο κυστεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη δημιουργία ενός δεσμού S-S**, που παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της φυσιολογικής δομής της πρωτεΐνης. Για παράδειγμα, στον υποδοχέα της ροδοψίνης οι υπεύθυνες κυστεΐνες για το δεσμό S-S είναι η Cys110 και η Cys187. Σε άτομα που έχουν αχρωματοψία στο κόκκινο/πράσινο, ο υποδοχέας της ροδοψίνης αντί για Cys187 έχει Arg187, που σημαίνει ότι η απώλεια του δεσμού S-S οδήγησε στη μη φυσιολογική λειτουργία του υποδοχέα.

Δομή υποδοχών που συνδέονται με G-πρωτεΐνες



Εικόνα 5.6 Α. Σχηματική αναπαράσταση του β-αδρενεργικού υποδοχέα (του ανθρώπου), σε κάθετη όψη προς το επίπεδο της μεμβράνης. Διακρίνεται η σύνδεση του –COOH άκρου στη μεμβράνη μέσω ενός παλμιτοϊκού οξέος, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια κυστεΐνη. Από *D. Strosberg and F. Pietri-Rouxel, TiPS, 1996, 17, 373-381.*

Β. Τρισδιάστατη αναπαράσταση του υποδοχέα. Από *Berg et al, Βιοχημεία, 2001, σελ.447.*

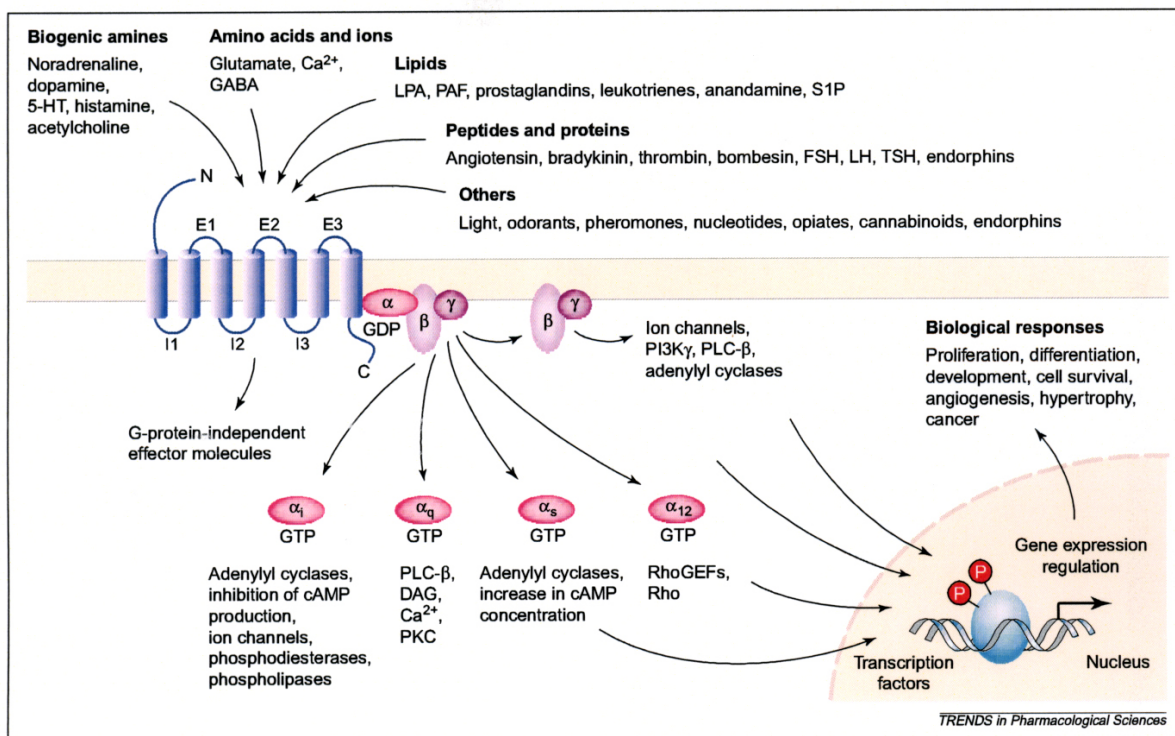
Η 3^η ενδοκυτταρική θηλιά, η οποία είναι και η μεγαλύτερη, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς συμμετέχει στη **σύνδεση του υποδοχέα με την πρωτεΐνη G** και καθορίζει το είδος της πρωτεΐνης G με την οποία θα συνδεθεί ο υποδοχέας.

- **ΑΜΙΝΟΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ (NH₂-TERMINAL).** Είναι μια εξωκυτταρική περιοχή, η οποία περιέχει θέσεις γλυκοσυλίωσης (γι' αυτό οι υποδοχείς είναι γλυκοπρωτεΐνες), ο ρόλος των οποίων είναι ακόμη άγνωστος.

- **ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΟ ΑΚΡΟ (COOH-TERMINAL).** Είναι μια ενδοκυτταρική περιοχή, η οποία περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης από κινάσες πρωτεϊνών (PKA, PKC και GRK), υπεύθυνες για την απενεργοποίηση του υποδοχέα. Η περιοχή αυτή παίζει επίσης ρόλο και στη σύνδεση της πρωτεΐνης G.

■ Σύνδεση GPCRs με τις πρωτεΐνες G και ενεργοποίηση του τελεστή

Ο υποδοχέας GPCR με τη βοήθεια της πρωτεΐνης G ενεργοποιεί τον **τελεστή (effector)**, ο οποίος μπορεί να είναι ένα ένζυμο -αδενυλοκυκλάση, φωσφολιπάση C και A₂, φωσφοδιεστεράση- ή ένα κανάλι ιόντων. Ο τελεστής στη συνέχεια συνθέτει το **δεύτερο διαβιβαστή (second messenger)** προκαλώντας μια σημαντική ενίσχυση του μηνύματος: παράγει 100.000 δεύτερους διαβιβαστές για κάθε μόριο νευροδιαβιβαστή. Οι δεύτεροι διαβιβαστές διαχέονται εν συνεχεία στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιούν άμεσα ή έμμεσα πρωτεϊνικές κινάσες (PKA, PKC) ικανές να φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες-στόχους. Στις περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες αυτές είναι ένζυμα, προκαλείται μια δεύτερη ενίσχυση του αρχικού μηνύματος.



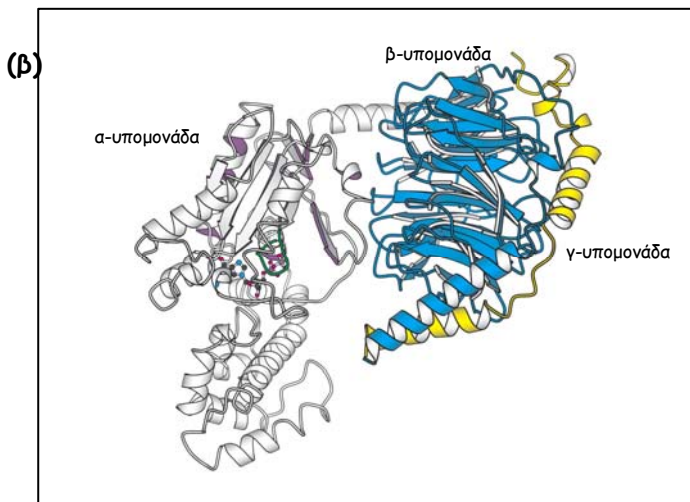
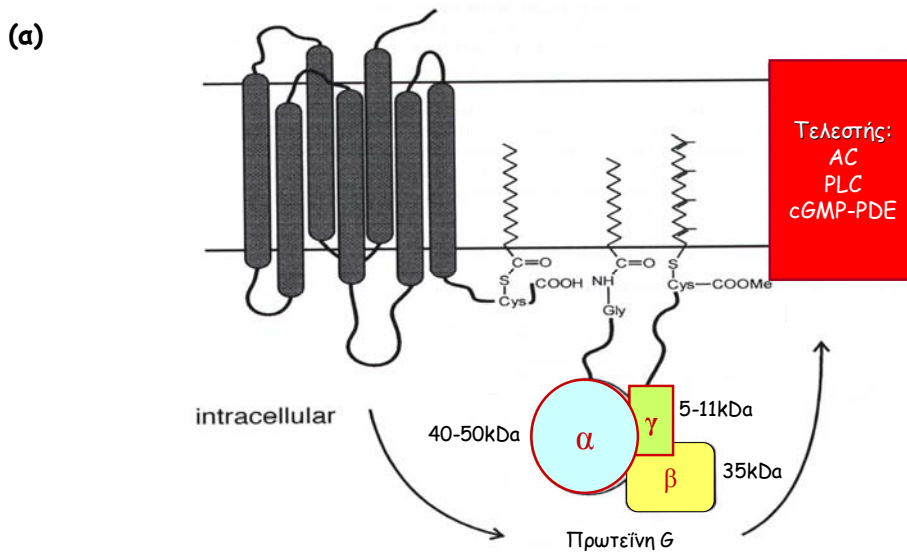
Εικόνα 5.12 Ο GPCR ενώνεται με την α-υπομονάδα της πρωτεΐνης Gαβγ, η οποία στη συνέχεια ανάλογα με το είδος της (α_s, α_q, α₁₂) ενεργοποιεί διάφορους τελεστές (αδενυλική κυκλάση, PLC..). Επιπλέον, οι Gβγ υπομονάδες μπορούν να ενεργοποιήσουν και αυτές συγκεκριμένους τελεστές. Από Marinissen M., Gutkind S., *G-protein coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms, Trends in Pharmacol. Sci.*, 2001, 22, 368-376.

2. Πρωτεΐνες G

Οι πρωτεΐνες G αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στη μεγάλη κατηγορία υποδοχέων "G protein-coupled receptors" και τον τελεστή. Είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν το GTP γι' αυτό και ονομάζονται **πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια της γουανίνης** (guanine nucleotide-binding proteins).

■ Δομή των πρωτεϊνών G

Οι πρωτεΐνες G είναι ετερο-τριμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από τις υπομονάδες α , β και γ . Οι α και β υπομονάδες είναι υδρόφιλες, ενώ η γ είναι ιδιαίτερος υδρόφοβη και συνεπώς είναι αυτή που συγκρατεί την πρωτεΐνη G $\beta\gamma$ στην κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 5.18 (α) Ετεροτριμερής G $\beta\gamma$ πρωτεΐνη και ο τρόπος σύνδεσής της στην κυτταρική μεμβράνη. Η G α υπομονάδα συνδέεται με τη μεμβράνη, μέσω ενός μυριστοϊκού οξέος που βρίσκεται συνδεδεμένο σε μια γλυκίνη (Gly) του -NH₂ άκρου της α υπομονάδας, ενώ η G γ υπομονάδα χρησιμοποιεί μια πρενυλ-ομάδα, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη σε μια κυστεΐνη (Cys) του -COOH άκρου της. Επίσης διακρίνεται η σύνδεση του -COOH άκρου του GPCR στη μεμβράνη, μέσω ενός παλμιτοϊκού οξέος που βρίσκεται συνδεδεμένο σε μια κυστεΐνη (Cys). (β) Τρισδιάστατη δομή μιας ετεροτριμερούς πρωτεΐνης G. Με γκρι είναι η

α -υπομονάδα, με μπλε η β - και με κίτρινο η γ -υπομονάδα.

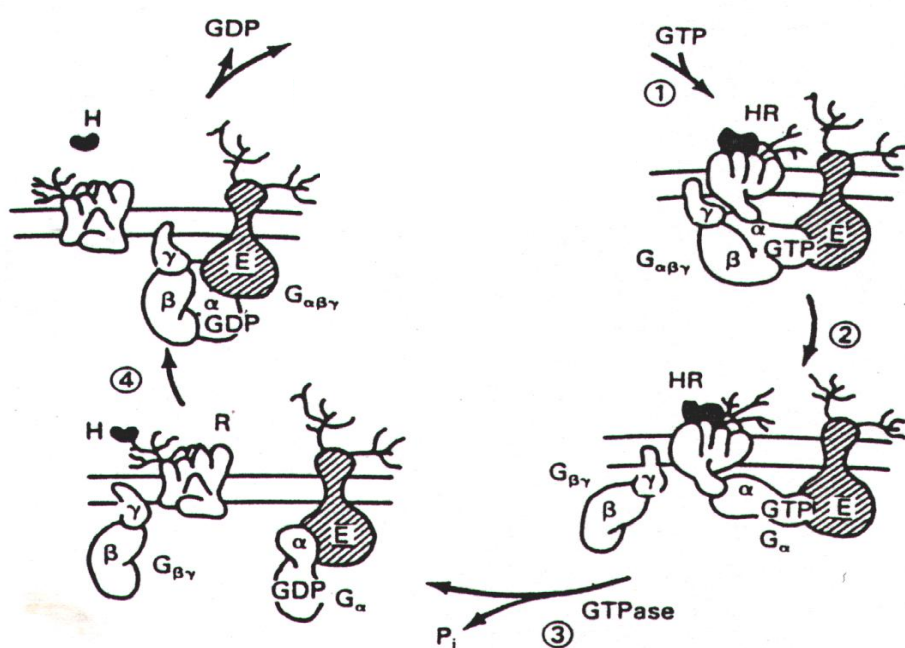
Η **α -υπομονάδα** είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 40-50 kDa. Ο κύριος ρόλος της είναι η δέσμευση του GTP (γουανοσινιο τριφωσφορικό οξύ) και η υδρόλυσή του σε GDP και P_i. Η α -υπομονάδα εκτελεί χρέη GTPάσης.

Η **β -υπομονάδα** είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 35-36 kDa. Έχει μια δομή, η οποία αντίθετα με αυτή της α -υπομονάδας είναι πολύ καλά διατηρημένη από είδος σε είδος και από ιστό σε ιστό.

Η **γ-υπομονάδα**, η πιο πρόσφατα απομονωμένη, έχει μοριακό βάρος 5-11 kDa και σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τη β-υπομονάδα.

■ Η μετάδοση του μηνύματος μέσω των πρωτεϊνών G περιλαμβάνει μια σειρά πολύπλοκων διεργασιών

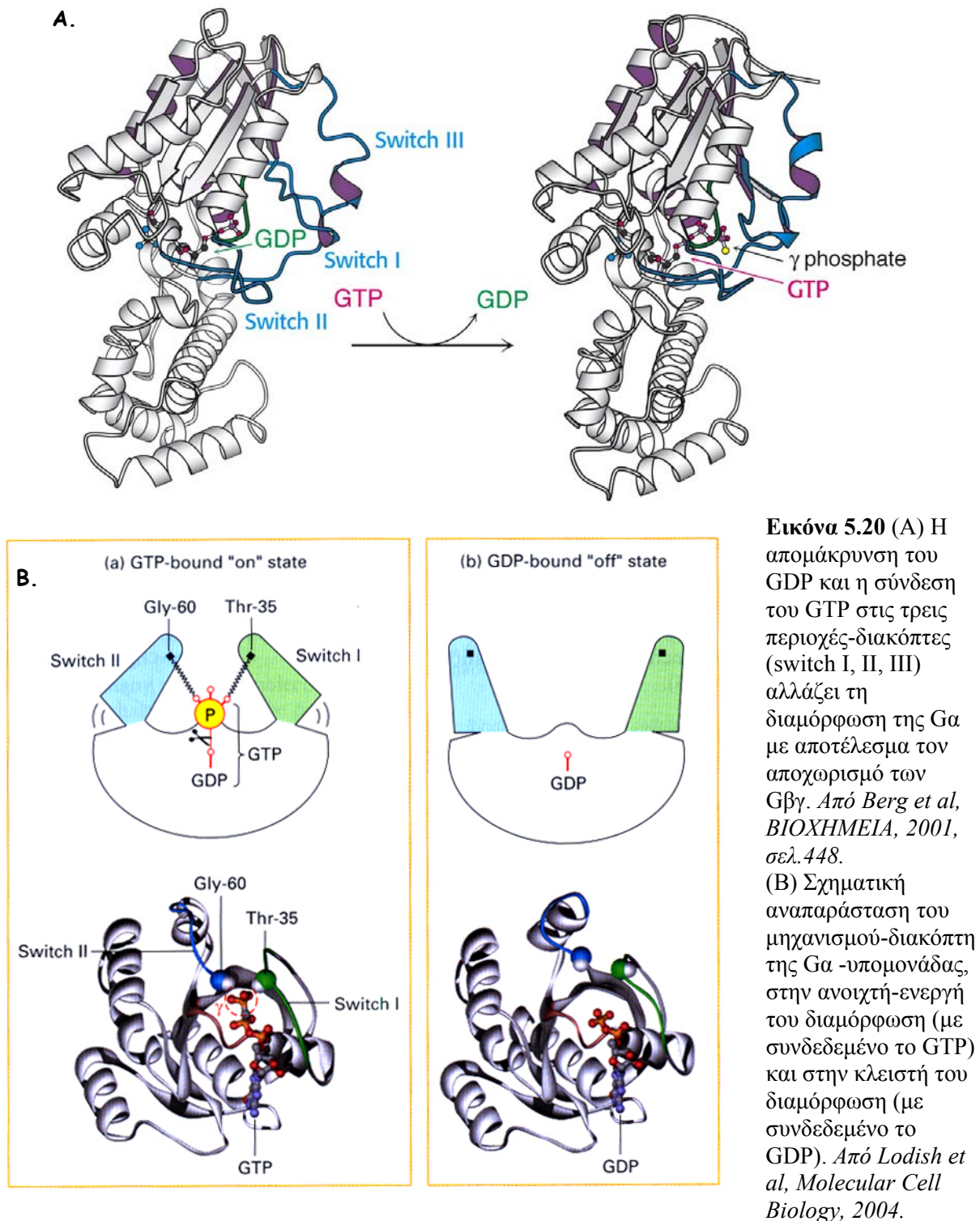
1. Η ένωση του υποδοχέα (R) με την ορμόνη (H) αλλάζει τη διαμόρφωση του, μετατρέποντάς την σε διαμόρφωση υψηλής συγγένειας. Ο υποδοχέας με τη νέα του διαμόρφωση συνδέεται με την πρωτεΐνη $G_{\alpha}(GDP)\beta\gamma$, ενεργοποιώντας την απομάκρυνση του GDP και την ανταλλαγή του με το GTP. Ένας ενεργοποιημένος υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει την ανταλλαγή πολλών μορίων GDP με GTP.
2. Το σύμπλοκο ορμόνη / υποδοχέας / ($\alpha GTP\beta\gamma$) διαχωρίζεται σε $RH/\alpha GTP + \beta\gamma$, και η υπομονάδα αGTP ενεργοποιεί τον τελεστή.
3. Η α -υπομονάδα εκτελεί χρέη GTPάσης υδρολύοντας το GTP σε GDP (που παραμένει δεσμευμένο στην α -υπομονάδα) και ανόργανο φώσφορο (P_i). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο $RH/\alpha GDP/E$ διασπάται, ο τελεστής παραμένει ενωμένος με την α -υπομονάδα, αλλά ανενεργός, και η ορμόνη διαχωρίζεται από τον υποδοχέα, ο οποίος ξαναβρίσκει την παλιά του διαμόρφωση (διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας).
4. Οι τρεις υπομονάδες της πρωτεΐνης G ενώνονται μεταξύ τους ($\alpha GDP + \beta\gamma = GDP\alpha\beta\gamma$).



Εικόνα 5.19 Ο ρόλος της πρωτεΐνης G στη μετάδοση του μηνύματος της ορμόνης (H), από τον υποδοχέα (R) στον τελεστή-effector (E). Ο υποδοχέας και ο τελεστής παρουσιάζονται σαν γλυκοσυλιωμένα διαμεμβρανικά μόρια. Ο υποδοχέας εμφανίζεται σε δύο διαμορφώσεις, μια υψηλής συγγένειας (με δεσμευμένη την ορμόνη) και μια χαμηλής συγγένειας (χωρίς ορμόνη). Από *L. Birnbaumer et al, Kidney Inter., 1987, 32, S14-S37*.

Ο ρόλος του ενεργοποιημένου από την ορμόνη υποδοχέα είναι να ενεργοποιεί την ανταλλαγή του GDP ώστε η G_{α} να δεσμεύσει το GTP. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με την G_{α} , και ανοίγει τη θέση δέσμησης του νουκλεοτιδίου ώστε το GDP να αποδεσμευτεί και να συνδεθεί το GTP. Η G_{α} -υπομονάδα αποτελείται από τρία πολυπεπτιδικά τμήματα-κλειδιά: το διακόπτη I, διακόπτη II και διακόπτη III, τα οποία αλληλεπιδρούν είτε

άμεσα είτε έμμεσα με τη γ -φωσφορική ομάδα του GTP αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους. Οι δομικές αυτές αλλαγές μειώνουν τη συγγένεια της $G\alpha$ προς το διμερές $G\beta\gamma$. Ο διαχωρισμός της ετεροτριμερούς πρωτεΐνης G σε $G\alpha$ και $G\beta\gamma$, μεταδίδει το μήνυμα στον τελεστή.



Εικόνα 5.20 (A) Η απομάκρυνση του GDP και η σύνδεση του GTP στις τρεις περιοχές-διακόπτες (switch I, II, III) αλλάζει τη διαμόρφωση της $G\alpha$ με αποτέλεσμα τον αποχωρισμό των $G\beta\gamma$. Από Berg *et al*, *BIOΧΗΜΕΙΑ*, 2001, σελ. 448.

(B) Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού-διακόπτη της $G\alpha$ -υπομονάδας, στην ανοιχτή-ενεργή του διαμόρφωση (με συνδεδεμένο το GTP) και στην κλειστή του διαμόρφωση (με συνδεδεμένο το GDP). Από Lodish *et al*, *Molecular Cell Biology*, 2004.

■ Ποικιλομορφία των α -υπομονάδων των πρωτεϊνών G

Οι α -υπομονάδες κατατάσσονται σε 4 μεγάλες κατηγορίες:

1/ **Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ G_s (G STIMULATORY)**. Περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες G_{α_s} που συναντώνται σε όλους τους ιστούς, και $G_{\alpha_{olf}}$ που βρίσκονται μόνο σε νευρικούς ιστούς και ιδιαίτερα στους νευρώνες του οσφρητικού επιθηλίου (olfactory epithelium).

Οι πρωτεΐνες G_s ενεργοποιούν την αδενυλοκυκλάση, και συνεπώς αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP.

Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι είναι στόχος μιας τοξικής ουσίας που προέρχεται από το βακτήριο *Vibrio cholerae*, της **τοξίνης της χολέρας** (CTX: cholera toxine), η οποία δρα στην G_{α_s} και εμποδίζει την υδρόλυση του GTP σε GDP+P_i εμποδίζοντας τη διάσπαση του συμπλόκου RH/asGTP/Αδενυλοκυκλάση. Σαν αποτέλεσμα παρατείνεται η δραστηριότητα της αδενυλοκυκλάσης.

2/ **Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ G_i (G INHIBITORY)**. Ορισμένα μέλη της κατηγορίας αυτής (G_{α_1} , G_{α_2} , G_{α_3}) αναστέλλουν τη δράση της αδενυλοκυκλάσης, ορισμένα (G_{α_o}) ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C, άλλα (G_{α_1} , G_{α_2} , G_{α_3} , G_{α_o}) ρυθμίζουν τη λειτουργία καναλιών ιόντων και τέλος η G_{α_t} (transducin) ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση του cGMP.

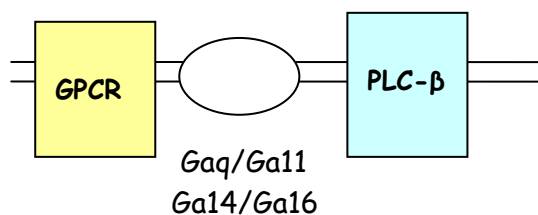
Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν το χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι είναι στόχος μιας τοξίνης που παράγεται από το βακτήριο *Bordetella pertussis*, της **τοξίνης του κοκκύτη** (PTX: pertussis toxine), η οποία εμποδίζει τη σύνδεση της πρωτεΐνης G_{α_i} με τον υποδοχέα, εμποδίζοντας τη μετάδοση του μηνύματος.

3/ **ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ G_{12} ΚΑΙ G_q** έχουν ανακαλυφθεί τελευταία. Δεν αποτελούν στόχο για τη PTX (PTX-resistants). Οι G_{α_q} ενεργοποιούν μια φωσφολιπάση C-β, ενώ ο ρόλος των πρωτεϊνών $G_{\alpha_{12}}$ δεν είναι ακόμη γνωστός.

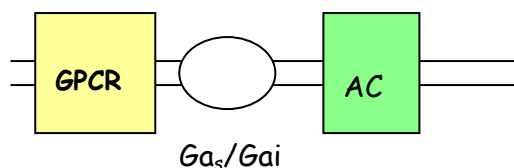
■ Εξειδίκευση των G πρωτεϊνών

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 27 G_{α} , 5 G_{β} και 14 G_{γ} υπομονάδες που μας δίνουν θεωρητικά 1890 συνδυασμούς ετεροτριμερών $G_{\alpha\beta\gamma}$. Αν και ορισμένοι συνδυασμοί δε δημιουργούνται *in vitro*, αυτό αντιπροσωπεύει μία μεγάλη ποικιλομορφία.

Έχουν περιγραφεί πολλά επίπεδα εξειδίκευσης G πρωτεΐνης. **Το πρώτο επίπεδο εξειδίκευσης υπαγορεύεται από την G_{α} υπομονάδα, η οποία καθορίζει την εξειδίκευση G πρωτεΐνης-τελεστή.** Για παράδειγμα η οικογένεια $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}/G_{\alpha_{14}}/G_{\alpha_{16}}$ ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C β (PLC-β).



Οι G_{α_s} και G_{α_i} αναγνωρίζουν την αδενυλική κυκλάση (AC), αλλά συνδέονται σε διαφορετικές θέσεις σύνδεσης και την ενεργοποιούν (as) ή την απενεργοποιούν (ai).

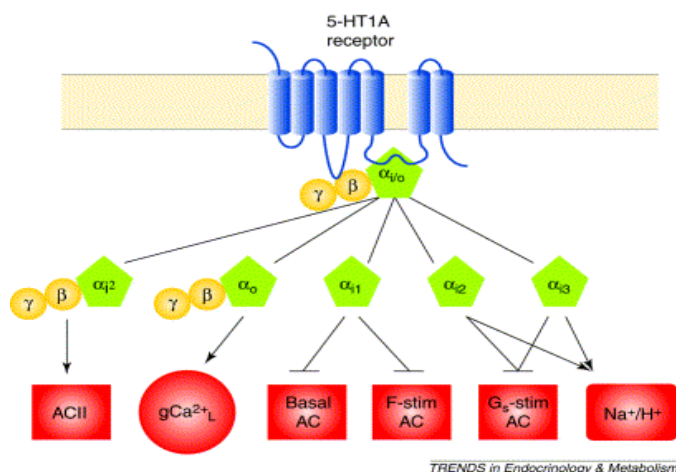


Γενικά οι G_{aq} , G_{as} και G_{ai} αναγνωρίζουν διαφορετικές οικογένειες υποδοχέων και κάθε υποδοχέας είναι δυνατόν να συνδέεται με περισσότερες από μία από αυτές τις πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας της θυρεοτροπίνης μπορεί να ενεργοποιήσει και τις τρεις οικογένειες των πρωτεϊνών με διαφορετική αποτελεσματικότητα, ενώ κάποιοι άλλοι υποδοχείς, όπως ο α_2 -αδρενεργικός, συνδέονται τόσο στη G_{as} όσο και στη G_{ai} .

Η εξειδίκευση υποδοχέα-G πρωτεΐνης φαίνεται να υποδεικνύεται από τη δομή του υποδοχέα έτσι ώστε ομόλογοι υποδοχείς να φανερώνουν παρόμοια σύνδεση. Πχ. η οικογένεια του 5-HT₁ υποδοχέα αποτελείται από 5 μέλη που όλοι συνδέονται αρχικά με τις πρωτεΐνες G_i/G_o και αναστέλλουν την AC. Η οικογένεια του 5-HT₂ υποδοχέα συνδέεται με την G_q και διεγείρει την PLC. Αυτό δείχνει ότι η δομή του υποδοχέα και κυρίως οι ενδοκυτταρικές του περιοχές, που αναγνωρίζουν τις G πρωτεΐνες, καθορίζουν εν μέρει, την επιλογή των υπομονάδων των G πρωτεϊνών από διαφορετικούς τύπους υποδοχέα.

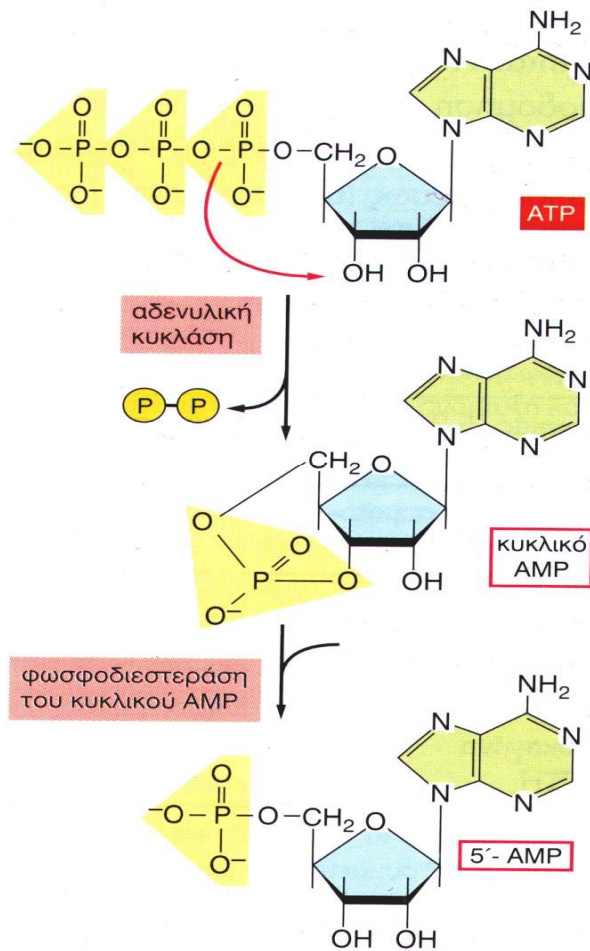
Όμως, πειράματα που έγιναν για μία σειρά υποδοχέων, όπως ο 5HT_{1A}, ο α_2 -αδρενεργικός και ο GABA_B, οι οποίοι συνδέονται με μία συγκεκριμένη G πρωτεΐνη, διαπίστωσαν την έλλειψη μίας κοινής αλληλουχίας αμινοξέων στην περιοχή δέσμευσης της πρωτεΐνης G στον υποδοχέα. **Επομένως ο τύπος του κυττάρου και η αφθονία των G πρωτεϊνών σε διαφορετικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση της G πρωτεΐνης για έναν συγκεκριμένο τύπο υποδοχέα.**

Επίσης, η ακριβής εξειδίκευση των G πρωτεΐνης-τελεστή είναι δύσκολο να οριστεί λόγω της ύπαρξης πολλαπλών τύπων του κάθε τελεστή. Συγκεκριμένα, διαφορετικοί τύποι AC μπορεί να φανερώνουν διαφορετικές προτιμήσεις για τις G πρωτεΐνες και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στην εξειδίκευση υποδοχέα-G πρωτεΐνης-AC. Βρέθηκε λοιπόν ότι ο ντοπαμινεργικός D₂, ο οποίος στα GH₄ κύτταρα χρησιμοποιεί την G_{i2} για να αναστείλει την αδενυλοκυκλάση, στα NS_{20Y} κύτταρα του νευροβλαστώματος αναστέλλει την αδενυλοκυκλάση μέσω της G_o . **Τέτοιες διαφορές στην εξειδίκευση των G πρωτεϊνών σε πολλούς κυτταρικούς τύπους είναι δυνατόν να φανερώνουν έκφραση διαφορετικών τύπων αδενυλικής κυκλάσης που αναγνωρίζονται από διαφορετικές G πρωτεΐνες.**



Εικόνα 5.23 Η σύνδεση των υποδοχέων με διαφορετική κάθε φορά πρωτεΐνη και τα αποτελέσματά που προκαλούνται ενδοκυτταρικά μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Η σύνδεση του 5-HT_{1A} με την πρωτεΐνη G_{i2} ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση-II (ACII), με την G_{α_o} ανοίγει κανάλια Ca^{2+} τύπου L, με την $G_{\alpha_{i1}}$ απενεργοποιεί την ήδη ενεργοποιημένη από τη φορσκολίνη AC αλλά και τη φυσιολογική, με την $G_{\alpha_{i2}}$ ή την $G_{\alpha_{i3}}$ απενεργοποιεί την GTP-ενεργοποιημένη AC ή ενεργοποιεί τον ιοντοανταλλάκτη ιόντων νατρίου και πρωτονίων. Ο 5-HT_{1A} έχει βέβαια μεγαλύτερη συγγένεια για ορισμένες πρωτεΐνες G και συνεπώς την τάση να συνδέεται με κάποιες περισσότερο: $G_{i2} > G_{i3} \gg G_{i1} = G_o$. Από Albert PR., Tiberi M, *Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors*, Trends in Endocrinology and Metabolism, 2001, 12, 453-460.

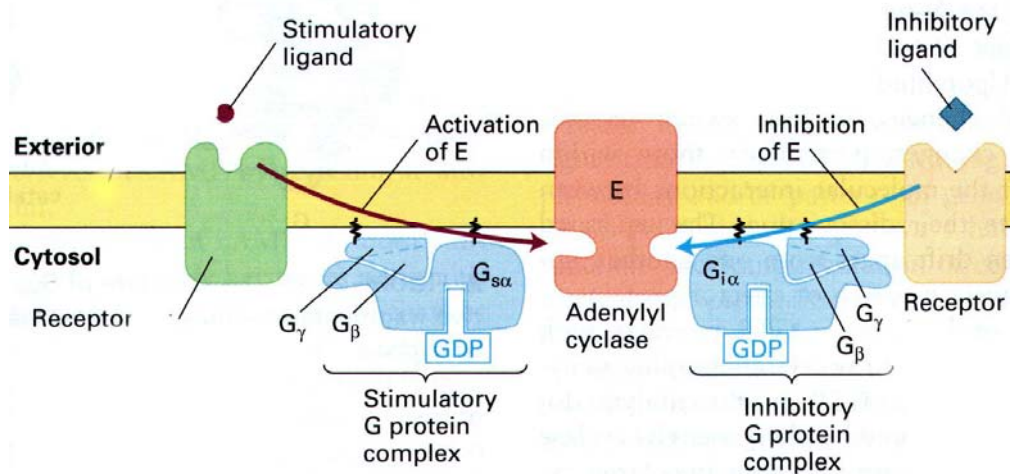
4. Αδενυλοκυκλάση και cAMP



Η αδενυλοκυκλάση είναι ένα ένζυμο παρόν σε όλους τους ιστούς όπου έχει ένα κοινό ρόλο: τη μετατροπή του ATP σε κυκλικό AMP (cAMP), το οποίο δρα στη συνέχεια ως δεύτερος διαβιβαστής. Το cAMP που παραμένει αδέσμευτο, ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα καταστρέφεται γρήγορα από τις φωσφοδιεστεράσες του cAMP, ένζυμα που υδρολύουν το cAMP (κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη) σε 5'AMP (5' μονοφωσφορική αδενοσίνη). Οι φωσφοδιεστεράσες ρυθμίζονται είτε από το Ca^{2+} /καλμοντουλίνη είτε μετά από φωσφορυλίωση. Πάνω από 10 διαφορετικές ισομορφές φωσφοδιεστερασών είναι γνωστές, οι οποίες διαφέρουν ως προς την εξειδίκευσή τους για τα κυκλικά νουκλεοτίδια και ως προς τον τρόπο ρύθμισής τους.

Εικόνα 5.26 Η αδενυλική κυκλάση μετατρέπει το ATP σε cAMP, το οποίο γρήγορα υδρολύεται από τις φωσφοδιεστεράσες σε 5'AMP.

Ορισμένοι νευροδιαβιβαστές είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν την αδενυλοκυκλάση μέσω μιας πρωτεΐνης $G_{\alpha s}$ ευαίσθητης στη τοξίνη της χολέρας, ενώ άλλοι αναστέλλουν τη δράση της μέσω μιας πρωτεΐνης $G_{\alpha i}$ ευαίσθητης στην τοξίνη του κοκίτη.



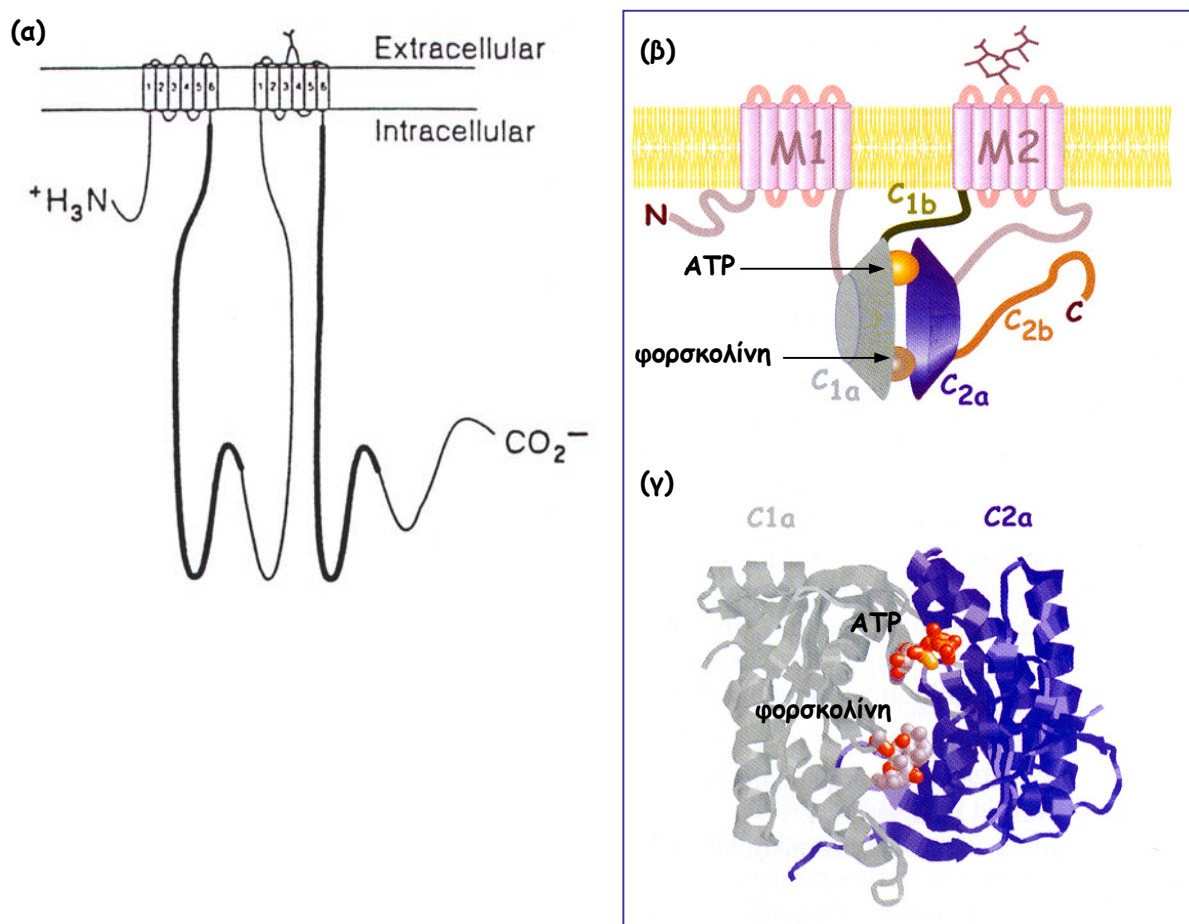
Εικόνα 5.27 Η σύνδεση GPCR με $G_{\alpha s}$ ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση, ενώ η σύνδεση με $G_{\alpha i}$ αναστέλλει τη δράση της.

■ Η δομή της αδενυλοκυκλάσης

Η αδενυλοκυκλάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 120 kDa. Αποτελείται από 12 ενδομεμβρανικές περιοχές (δύο σειρές των 6), οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με ενδο- και εξωκυτταρικές θηλιές. Η 3^η ενδοκυτταρική θηλιά, η οποία είναι πολύ μεγάλη ενώνει τις δύο σειρές των 6 ενδομεμβρανικών περιοχών και αποτελεί τη θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης Ga και του ATP. Το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα.

Στην 5^η εξωκυτταρική θηλιά υπάρχει μια θέση γλυκοσυλίωσης. Στην 3^η ενδοκυτταρική θηλιά υπάρχει μια θέση φωσφορυλίωσης από την πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από το cAMP (PKA) που είναι υπεύθυνη για την απενεργοποίηση του ενζύμου, αλλά και από την πρωτεϊνική κινάση PKC, η οποία την ενεργοποιεί.

Η δομή της αδενυλοκυκλάσης παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη δομή των μεταφορέων (transporters) και των καναλιών ιόντων. Η σημασία της ομοιότητας αυτής δεν έχει ακόμη εξηγηθεί.



Εικόνα 5.28 (α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής της αδενυλοκυκλάσης. Διακρίνεται η τρίτη μεγάλη ενδοκυτταρική θηλιά που συνδέει τις δύο σειρές των 6 ενδομεμβρανικών περιοχών. Με Y συμβολίζεται η θέση γλυκοσυλίωσης (glycosylation site) στην 5^η εξωκυτταρική θηλιά. Από *J. Krupinski, Mol. & Cell. Pharmacology, 1991, 104, 73-79.* (β) Αναπαράσταση της δομής της αδενυλοκυκλάσης, όπου διακρίνονται οι θέσεις σύνδεσης του ATP και της φορσκολίνης στην 3^η ενδοκυτταρική θηλιά. (γ) Τρισδιάστατη αναπαράσταση της 3^{ης} θηλιάς με δεσμευμένα το ATP και τη φορσκολίνη. Από *Gomberts et al, Signal transduction, 2001.*

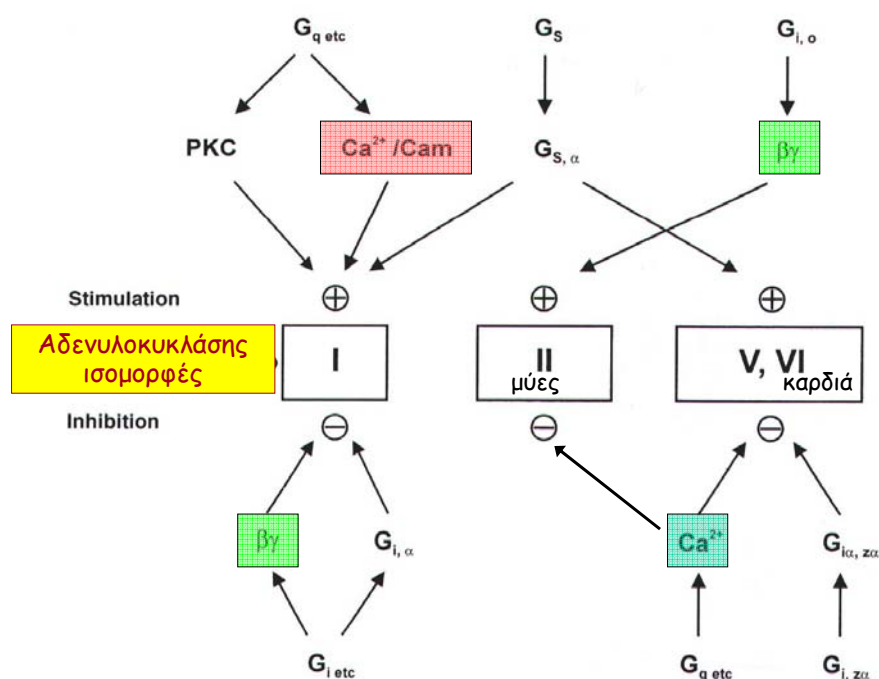
■ Οι διάφοροι τύποι της αδενυλοκυκλάσης

Έχουν βρεθεί διάφορες μορφές αδενυλοκυκλάσης (AC-I έως AC-VIII), και υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη πολλών περισσότερων.

Οι διάφορες αυτές ισομορφές (isoformes) παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στη δομή τους και εμφανίζουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς, πχ. η αδενυλοκυκλάση AC-VII βρίσκεται κυρίως στην καρδιά, ενώ η AC-II στους μύς.

Στις μικρές διαφορές που υπάρχουν στην αλληλουχία των αμινοξέων τους οφείλεται η διαφορετική ευαισθησία που εμφανίζουν στην καλμοδουλίνη, η οποία ενεργοποιεί την AC-I, ενώ δεν επηρεάζει την AC-II, και στο ασβέστιο, το οποίο απενεργοποιεί μόνο τις AC-II, AC-V, AC-VII.

Διαφορετικός είναι ακόμη και ο ρόλος των βγ-υπομονάδων των G-πρωτεϊνών στους διαφορετικούς τύπους αδενυλοκυκλάσης. Οι βγ-υπομονάδες, παρουσία της α-υπομονάδας, ενεργοποιούν την AC-II, αναστέλλουν την AC-I, ενώ δεν επηρεάζουν τις AC-V και AC-VI.



Εικόνα 5.29 Η αδενυλοκυκλάση, ανάλογα με τον τύπο της μπορεί να ενεργοποιηθεί ή να απενεργοποιηθεί από ξεχωριστούς τύπους Gα-υπομονάδων, από τις υπομονάδες βγ ή ακόμη από κινάσες (PKC, Ca²⁺/Calmoduline kinase). Από *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, G. Krauss, 2001.

■ Ο ρόλος της φορσκολίνης στη δράση της αδενυλοκυκλάσης

Η αδενυλοκυκλάση είναι στόχος ενός πολύ σημαντικού παράγοντα από φαρμακολογική άποψη, της φορσκολίνης (forskolin). Η φορσκολίνη είναι ένα διτερπένιο που εξάγεται από τις ρίζες ενός ινδικού φυτού του *coleus forskohlii*, ευρέως διαδεδομένο στην Ινδία για τη θεραπεία καρδιακών και αναπνευστικών παθήσεων, καθώς και για την αϋπνία και τους σπασμούς.

Η φορσκολίνη υπερ-ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση, αυξάνοντας την παραγωγή του cAMP μέχρι και 10 φορές πάνω από τη φυσιολογική συγκέντρωση του στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, ένας νευροδιαβιβαστής ενεργοποιώντας την αδενυλοκυκλάση μέσω του

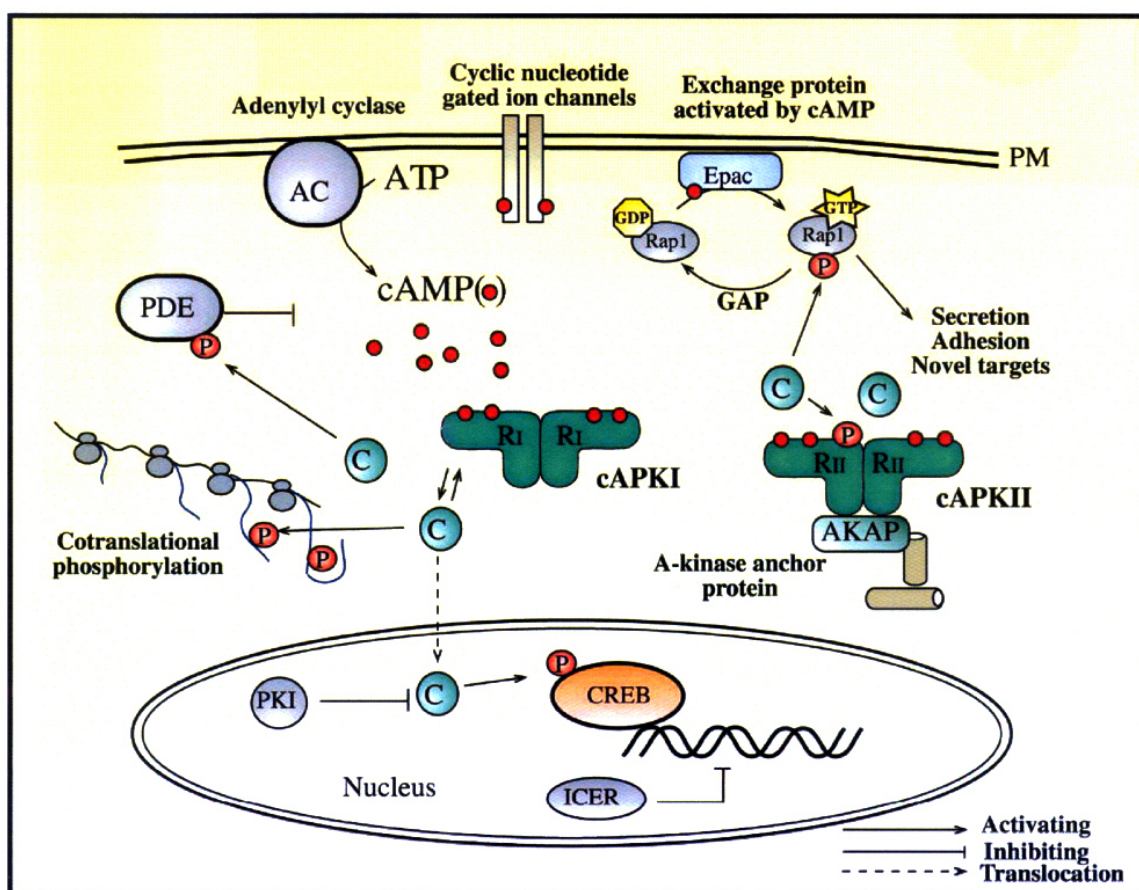
υποδοχέα του και της πρωτεΐνης Gs, μπορεί να αυξήσει την παραγωγή του cAMP μέχρι δύο φορές maximum.

Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι οι νευροδιαβιβαστές, οι οποίοι αναστέλλουν *in vitro* τη δράση της αδενυλοκυκλάσης μέσω της πρωτεΐνης Gi, αναστέλλουν τη δράση ενός ενζύμου ήδη υπερ-ενεργοποιημένου από τη φορσκολίνη, ενώ δεν έχουν κανένα ή ελάχιστο αποτέλεσμα στα φυσιολογικά επίπεδα ενεργοποίησης της αδενυλοκυκλάσης.

■ Το cAMP ως δεύτερος διαβιβαστής

Όταν το κυκλικό AMP βρεθεί στο κυτταρόπλασμα παίζει το ρόλο του δεύτερου διαβιβαστή ενεργοποιώντας ποικίλους στόχους:

- Ο κύριος στόχος του cAMP είναι ειδικές πρωτεϊνικές κινάσες PKA (protein kinase cAMP-dependent).
- Σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως το οσφρητικό επιθήλιο, το cAMP μπορεί να δεσμευτεί σε κανάλια ιόντων cAMP-εξαρτώμενα προκαλώντας το άνοιγμά τους (βλπ σελ.97-99).
- Πρόσφατα έχει βρεθεί ένας νέος στόχος του cAMP, ο Epac (exchange protein directly activated by cAMP), μια πρωτεΐνη που εξειδικευμένα καταλύει την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γουανίνης στη μικρή GTPάση Rap1, ενεργοποιεί δηλ. την Rap1.

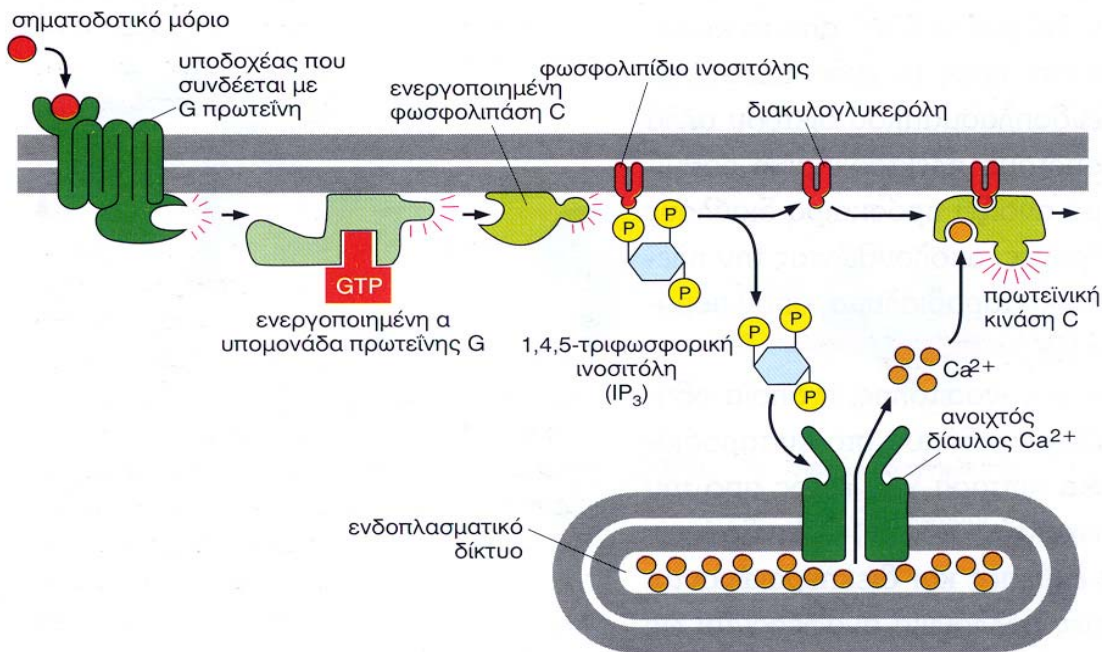


Εικόνα 5.30 Οι τρεις στόχοι του cAMP. Το cAMP παράγεται από την αδενυλοκυκλάση (AC) και στη συνέχεια μπορεί να συνδεθεί 1) στις ρυθμιστικές υπομονάδες (R1 ή R2) της κινάσης PKA απελευθερώνοντας τις καταλυτικές υπομονάδες (C), οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν διάφορους στόχους, 2) σε ένα κανάλι ιόντων κυκλικών νουκλεοτιδίων προκαλώντας το άνοιγμά του και 3) στον Epac, μια πρωτεΐνη που καταλύει την ανταλλαγή του GDP με GTP στη μικρή GTPάση Rap1. Από *Kopperud R., Krakstad C., Selheim F., Doskeland S., cAMP effector mechanisms. Novel twists for an "old" signaling system, FEBS Letters, 2003, 546, 121-126.*

5. Φωσφολιπάση C και IP_3 /διακυλογλυκερόλη

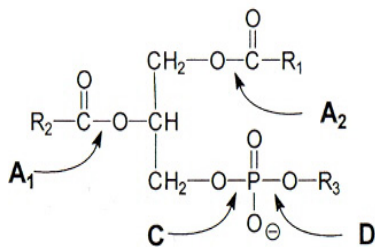
Η φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLC) αποτελεί ένα σημαντικό τελεστή γιατί παράγει παράλληλα δύο δευτέρους διαβιβαστές: την τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol-1,4,5-triphosphate, IP_3) και τη διακυλογλυκερόλη (diacyl glycerol, DAG).

Η φωσφολιπάση C είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και εκτελεί χρέη φωσφοδιεστεράσης: υδρολύει δηλ. τη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, και σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), η οποία ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 5.37 Ο GPCR μέσω της $G_{\alpha q}$ ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C (PLC), η οποία υδρολύει τη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, και σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), η οποία ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και επάγει την απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ΕΔ.

■ Οι κατηγορίες φωσφολιπασών



Εικόνα 5.38 Οι θέσεις στόχευσης στο φωσφολιπίδιο, των PLA₁, A₂, C και D.

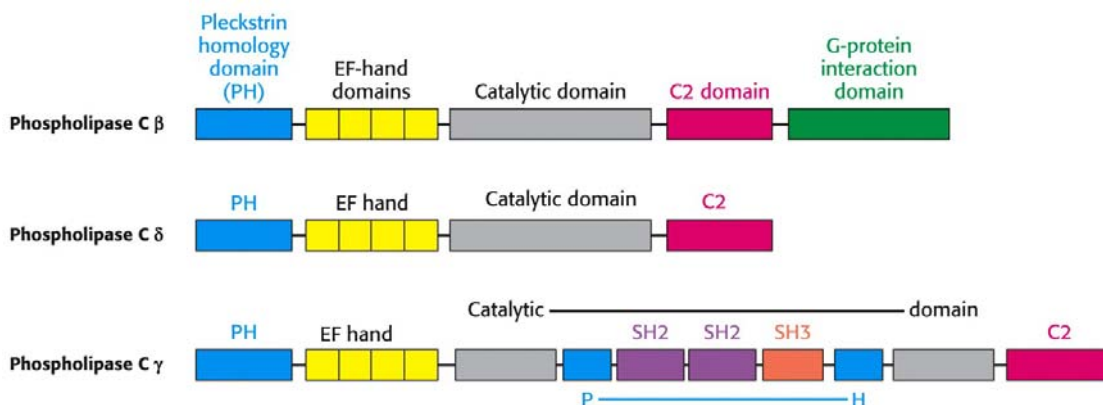
Οι φωσφολιπάσες είναι ένζυμα, τα οποία διασπών φωσφολιπίδια. Οι φωσφολιπάσες τύπου A₁, A₂, C και D διαφοροποιούνται ανάλογα με τη θέση στόχευσής τους στο φωσφολιπίδιο. Οι δεσμοί που σπάζουν αυτές οι φωσφολιπάσες διακρίνονται στην Εικόνα 5.44.

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ C

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί τρεις κατηγορίες φωσφολιπάσης C (PLCβ, PLCγ, PLCδ) με πολλές υποκατηγορίες η καθεμιά (πχ. PLCβ₁, PLCβ₂, PLCβ₃).

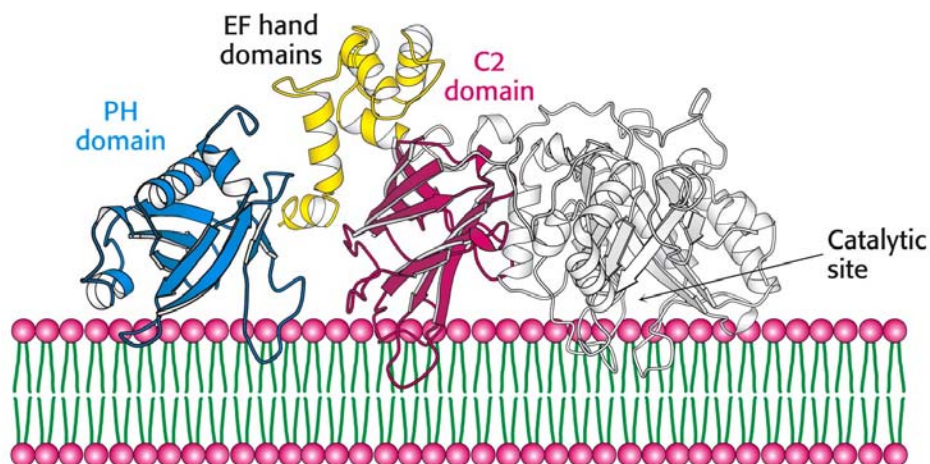
Κοινό όλων των PLC είναι η περιοχή πλεξτρίνης (PH, pleckstrin homology domain), μέσω της οποίας δεσμεύονται στη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP_2).

Οι διάφορες υποκατηγορίες φωσφολιπασών C αντανακλούν τη διαφορετική κατανομή τους (πχ. η PLCβ₁ βρίσκεται μόνο στον εγκέφαλο, ενώ η PLCβ₂ στα ηπατικά κύτταρα), αλλά και το διαφορετικό τρόπο ρύθμισής τους: πχ. οι PLCβ ενεργοποιούνται από τις α-υπομονάδες των πρωτεϊνών G_q, ενώ οι PLCγ ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωσή τους από την κινάση των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων (βλπ και Κεφάλαιο 9).



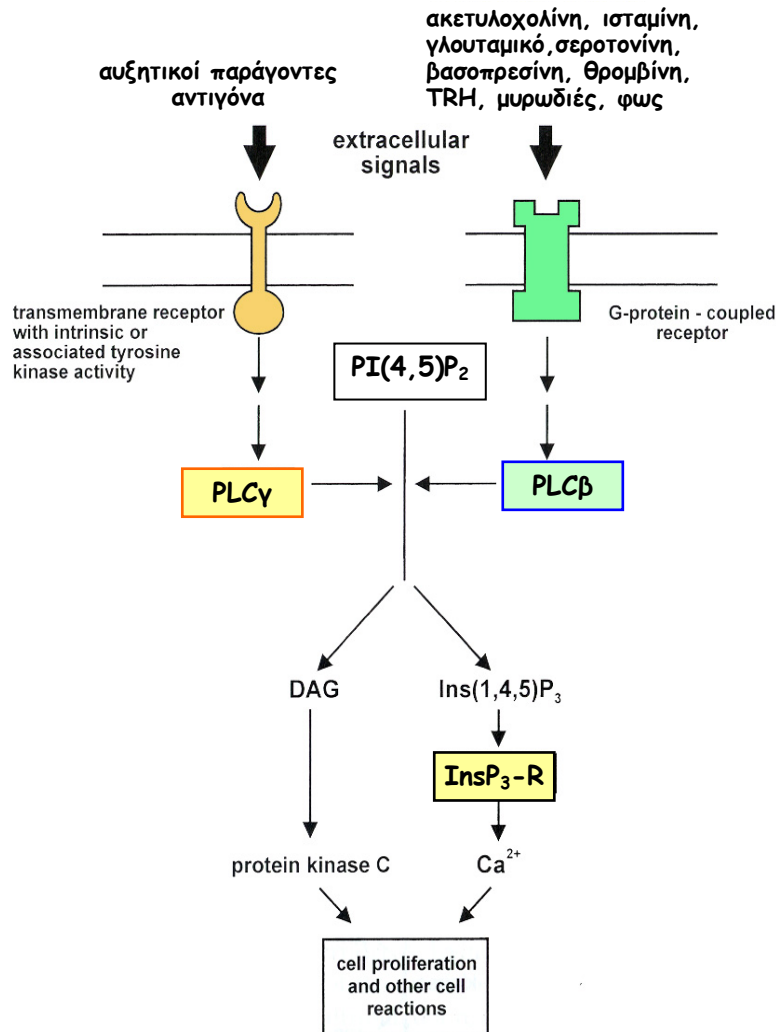
Εικόνα 5.39 Οι τρεις κατηγορίες φωσφολιπάσης C (PLCβ, PLCγ, PLCδ). Κοινό όλων των PLC είναι η περιοχή πλεξτρίνης (PH, pleckstrin homology domain), μέσω της οποίας δεσμεύονται στη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP₂) της μεμβράνης, η περιοχή EF-χειριού που δεσμεύει το Ca²⁺ και η καταλυτική περιοχή. Διακρίνεται στην PLCβ, η περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της Gα-υπομονάδας, και στην PLCβγ οι SH2, SH3 περιοχές που συνδέονται στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων RTK. Από Berg et al, *BIOCHEMISTRY*, 2004.

Οι δ-μορφές της PLC είναι πιθανόν προγονικές όλων των ισοενζύμων των ζωικών φωσφολιπασών C. Έχουν το μικρότερο μοριακό βάρος και δεν περιέχουν περιοχές που να είναι μοναδικές μόνο σ' αυτές (κάτι το οποίο λείπει από τις δύο άλλες τάξεις). Μόνο οι δ-μορφές υπάρχουν σε οργανισμούς όπως οι ζύμες, το *Dictyostelium* και τα ανθοφόρα φυτά. Υπάρχει μία σκέψη ότι η PLCδ αρχικά ήταν μία Ca²⁺-εξαρτώμενη γεννήτρια της DAG, ο ενεργοποιητής της PKC. Σε αυτήν την περίπτωση, το υδατοδιαλυτό δευτερεύον προϊόν, η IP₃ δεν θα είχε κανένα ρόλο να παίξει στη σηματοδότηση. Αργότερα κατά την εξέλιξη, όταν έγινε δεύτερος διαβιβαστής, ρυθμίζοντας το Ca²⁺, εμφανίστηκαν οι πιο σύνθετες δομές της PLC (η β και η γ) που ρυθμίζονταν από τους υποδοχείς.



Εικόνα 5.40 Η τρισδιάστατη δομή της φωσφολιπάσης Cδ (PLCδ). Διακρίνεται η περιοχή πλεξτρίνης (PH, pleckstrin homology domain), μέσω της οποίας δεσμεύεται στη φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP₂) της μεμβράνης, η περιοχή EF-χειριού που δεσμεύει το Ca²⁺ και η καταλυτική περιοχή. Από Berg et al, *BIOCHEMISTRY*, 2004.

Η σημασία των περιοχών που είναι κοινές σε όλες τις γνωστές ισομορφές δεν είναι ξεκάθαρη. Αν και τα μοτίβα EF-χεριού μπορούν να συνδέουν το Ca^{2+} , η N-τελική περιοχή των PLCs που περιέχει το EF-χέρι δεν φαίνεται να είναι η θέση, μέσω της οποίας το ένζυμο ρυθμίζεται από το Ca^{2+} . Ωστόσο, η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο, πιθανόν δομικό, αφού όταν εξαλείφεται η μισή περιοχή, καταργείται η δράση του ενζύμου.



Εικόνα 5.41 Παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG) και τριφωσφορικής ινοσιτόλης $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ από δύο τύπους φωσφολιπάσης (PLCβ και PLCγ).

Η παραγωγή DAG και IP_3 ρυθμίζεται από δυο σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία αρχικά ξεκινούν είτε από ενεργοποιημένους GPCRs (G-protein coupled receptors) είτε RTKs (υποδοχείς κινάσες τυροσίνης).

Στη συνέχεια, η DAG ενεργοποιεί την PKC, ενώ η IP_3 τον υποδοχέα IP_3 που βρίσκεται στο ΕΔ και αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} .

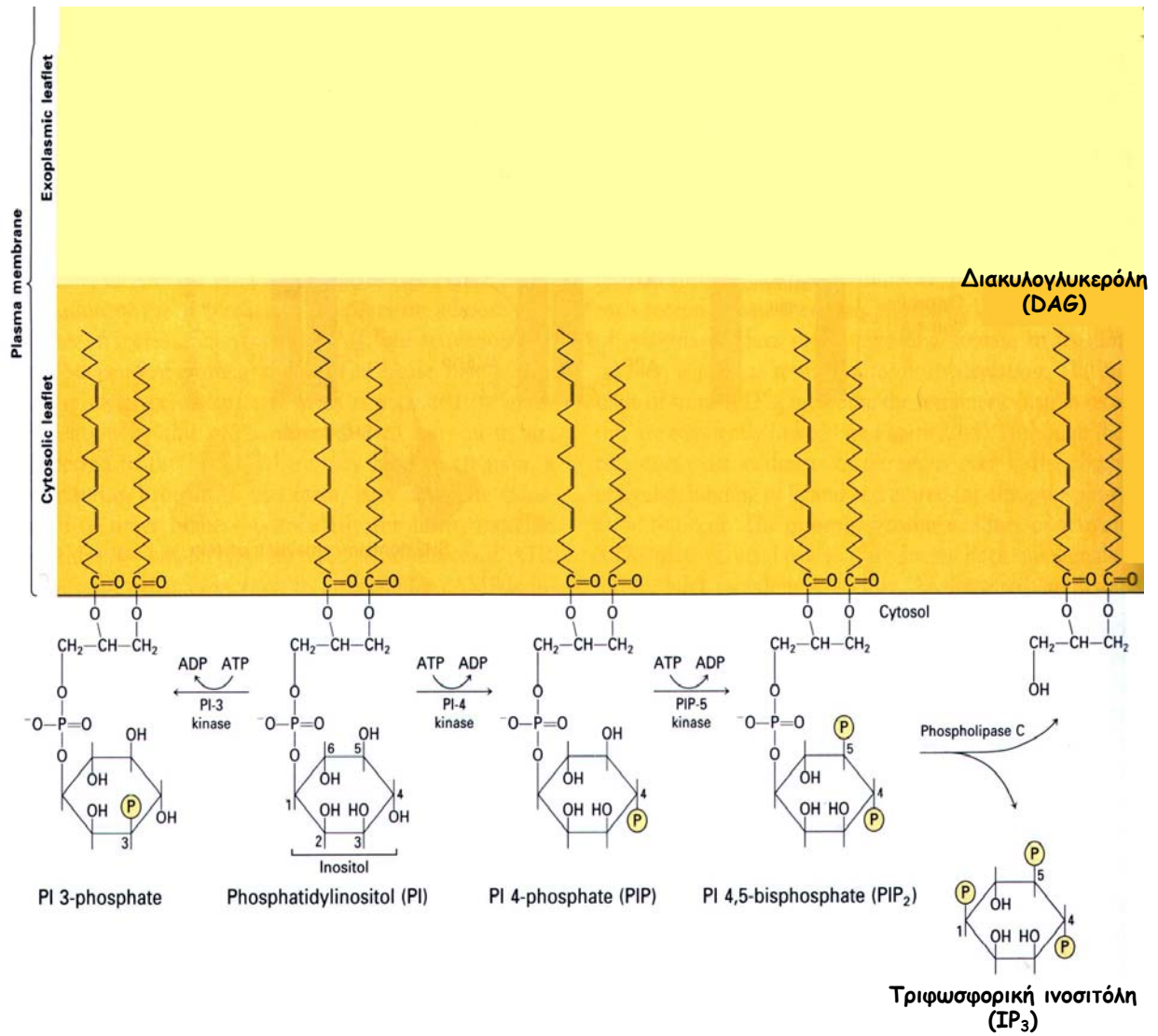
Από *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, G. Krauss, 2001.

■ Τα πολυφωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης

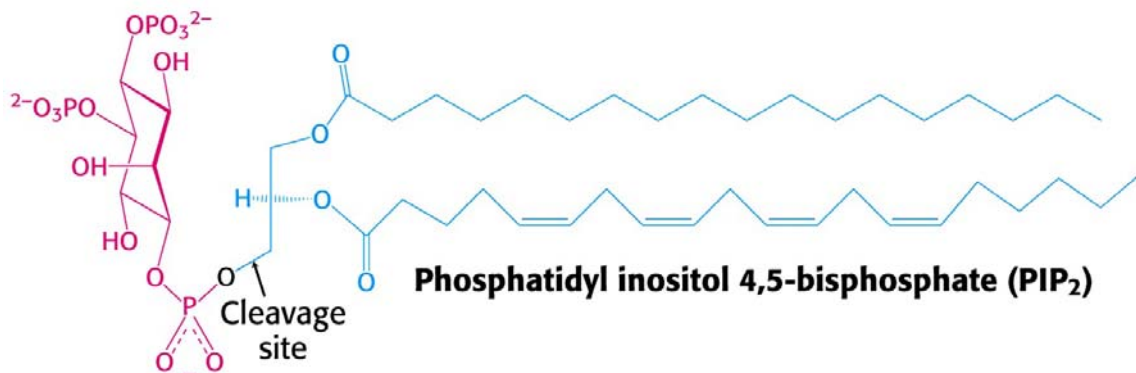
Η PIP_2 είναι το μόριο που υδρολύει η φωσφολιπάση C σε IP_3 και DAG. Είναι ένα ασυνήθιστο γλυκερο-φωσφολιπίδιο της μεμβράνης, γιατί περιέχει τρεις φωσφορικές ομάδες αντί μια που έχουν όλα τα άλλα λιπίδια της μεμβράνης. Ονομάζεται φωσφατιδυλ-4,5-διφωσφορική ινοσιτόλη γιατί παράγεται από τη **φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PI)**, η οποία προσλαμβάνει αρχικά ένα άτομο φωσφόρου στο 4^ο άτομο άνθρακα του κύκλου της ινοσιτόλης της, παράγοντας τη **φωσφατιδυλ-μονοφωσφορική ινοσιτόλη (PIP)**. Στη συνέχεια η PIP προσλαμβάνει ακόμη ένα άτομο φωσφόρου στο 5^ο άτομο άνθρακα και μετατρέπεται σε **φωσφατιδυλ-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP_2)**.



Τα φωσφολιπίδια αυτά ονομάζονται πολυφωφο-ινοσιτίδια (PPI) και αποτελούν μόλις το 1% των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης ενός ευκαριωτικού κυττάρου.

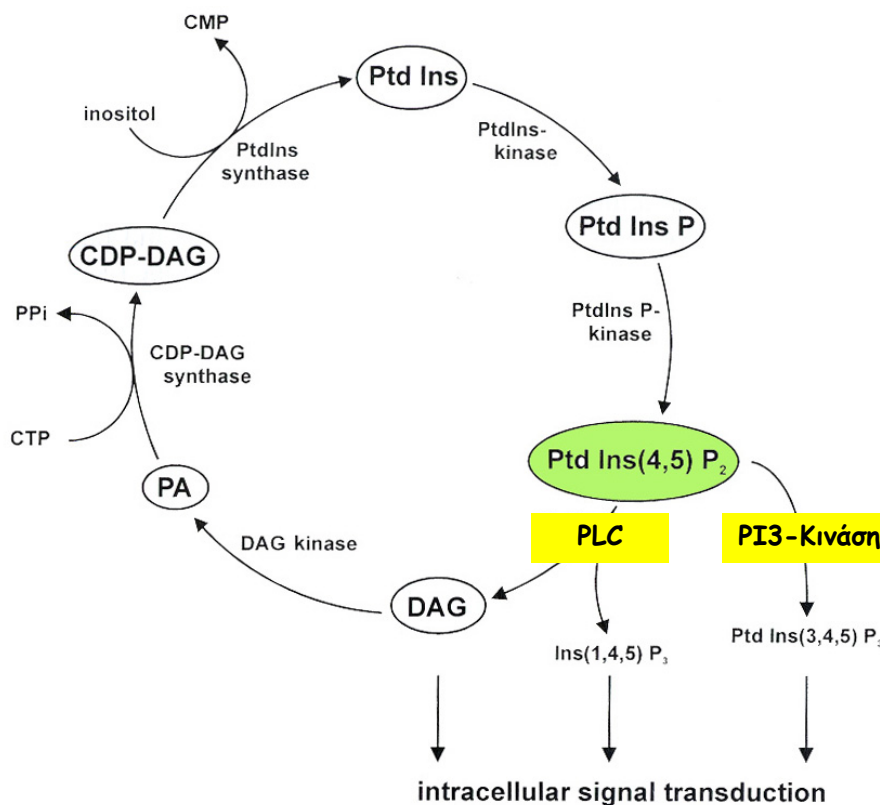


Εικόνα 5.42 Μετατροπή των πολυφωσφο-ινοσιτιδίων (PPI) της μεμβράνης σε IP₃ και DAG. Η PI μέσω της PI4-Κινάσης μετατρέπεται σε PIP, η οποία μέσω της PIP5-Κινάσης μετατρέπεται σε PIP₂. Η PIP₂ μέσω της Φωσφολιπάσης C (PLC) μετατρέπεται σε IP₃ και DAG.



Εικόνα 5.43 Η διφωσφορική 4,5-φωσφατιδυλο ινοσιτόλη (PIP₂) και η θέση όπου κόβεται από την φωσφολιπάση C. Η PIP₂ μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) μετατρέπεται σε IP₃ και DAG.

Τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης βρίσκονται σε ένα μεταβολικό κύκλο, όπου καταβολίζονται και αναγεννώνται συνεχώς. Η φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη (PtdIns) αναγεννάται από τη διακυλογλυκερόλη, η οποία μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ, από το οποίο στη συνέχεια δημιουργείται η CDP-γλυκερόλη. Από τη CDP-γλυκερόλη με την προσθήκη ινοσιτόλης και με τη βοήθεια της συνθάσης της PtdIns, δημιουργείται η PtdIns της μεμβράνης.



Εικόνα 5.44 Ο μεταβολικός κύκλος και η αναγέννηση των φωσφοϊνοσιτιδίων (PtdIns).

Η PtdIns(4,5)P₂ ή PIP₂ μέσω της φωσφολπάσης C (PLC) μετατρέπεται σε Ins(1,4,5)P₃ και DAG. Η DAG φωσφορυλιώνεται από την DAG κινάση και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA), από το οποίο μέσω της CDP-DAG-συνθάσης δημιουργείται η CDP-γλυκερόλη. Από τη CDP-γλυκερόλη με την προσθήκη ινοσιτόλης και με τη βοήθεια της συνθάσης της PtdIns, δημιουργείται η PtdIns της μεμβράνης. Η PtdIns(4,5)P₂ μέσω της **PI3-K** μετατρέπεται σε Ptd Ins(3,4,5)P₃.

■ Διακυλογλυκερόλη

Η διακυλογλυκερόλη είναι ο μόνος δεύτερος διαβιβαστής που παράγεται μέσα στην κυτταρική μεμβράνη και δεν την εγκαταλείπει. Αρχικά φαινόταν παράδοξο ότι μόρια τόσο κοινά όπως οι διακυλογλυκερόλες μπορούσαν να παίζουν το ρόλο δεύτερου διαβιβαστή. Και χρησιμοποιούμε πληθυντικό γιατί υπάρχουν τόσες διακυλογλυκερόλες όσες οι ποικιλίες των λιπαρών οξέων R₁COOH και R₂COOH ικανών να εστεροποιήσουν τη γλυκερόλη.

Ενώ το R₁COOH διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (πχ. στα αιμοπετάλια είναι το στεατικό οξύ), το R₂COOH είναι πάντοτε το **αραχιδονικό οξύ**, γεγονός που δεν είναι τυχαίο αφού το λιπαρό αυτό οξύ είναι ο πρόδρομος των εικοσανοειδών ορμονών: προσταγλανδινών (που παίζουν σημαντικό ρόλο στο φυσιολογικό μηχανισμό της φλεγμονής), λευκοτριενίων και θρομβοξανών.

Η DAG, χωρίς να εγκαταλείψει την κυτταρική μεμβράνη, μεταδίδει το μήνυμα ενεργοποιώντας την κινάση πρωτεϊνών C (PKC: protein kinase-calcium dependent). Για την ενεργοποίηση της κινάσης αυτής χρειάζονται τρεις ενεργοποιητές: το ασβέστιο (Ca^{2+}), η φωσφατιδυλ-σερίνη (PS) και η διακυλο-γλυκερόλη. Επειδή οι δύο πρώτοι παράγοντες βρίσκονται σε αφθονία στις μεμβράνες δεν αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες και μόνη η DAG ρυθμίζει τη δραστηριότητα της PKC. Η κινάση αυτή ενεργοποιεί με τη σειρά της (φωσφορυλιώνοντας) άλλες πρωτεΐνες.

Η διακυλογλυκερόλη καταβολίζεται είτε από τη **DAG λιπάση**, σε γλυκερόλη, αραχιδονικό οξύ και λιπαρό οξύ R_1COOH , είτε φωσφορυλιώνεται από την **DAG κινάση** και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA), το οποίο όπως είδαμε είναι η πηγή αναγέννησης των φωσφολιπιδίων (Εικ. 5.50).

Οι **φορβολεστέρες** (εστέρες της φορβόλης) είναι μια κατηγορία φυτικών ουσιών που εξάγονται από τους σπόρους ενός δένδρου της ΝΑ Ασίας, την ευφόρβιο (ο Euphorbus ήταν ο γιατρός ενός βασιλιά της Μαυριτανίας!). Έχουν ανάλογη δομή με τη διακυλογλυκερόλη και ενεργοποιούν απευθείας την PKC. Οι ουσίες αυτές χορηγούμενες προκαλούν καρκινογένεση και ονομάζονται **προωθητές όγκων**. Η δράση τους αυτή εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης C, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) που παίζει μεγάλο ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη αλλά και στον καρκίνο.

■ Η τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3 ή $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$)

Η τριφωσφορική ινοσιτόλη παράγεται, όπως είδαμε, από τη φωσφατιδυλ-4,5-διφωσφορική ινοσιτόλη (PIP_2) με τη βοήθεια της φωσφολιπάσης C, και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Η IP_3 είναι ένας σημαντικός δευτερος διαβιβαστής ο οποίος **αυξάνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα**. Η αύξηση επιτυγχάνεται με τον παρακάτω μηχανισμό:

Η IP_3 δεσμεύεται σ' έναν ειδικό υποδοχέα-κανάλι Ca^{2+} που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (βλπ Κεφάλαιο 3: Κανάλια και Μεταγωγή Σήματος). Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα IP_3 ανοίγει το κανάλι και το Ca^{2+} απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Η συγκέντρωση του ασβεστίου είναι 15.000 φορές μεγαλύτερη στο εξωτερικό από ότι στο εσωτερικό, γιατί το Ca^{2+} είναι αποθηκευμένο στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια, όπου βρίσκεται συνδεδεμένο με ειδικές πρωτεΐνες, όπως η καλρετικουλίνη, η οποία επειδή έχει χαμηλή συγγένεια για το Ca^{2+} έχει ικανότητα σύνδεσης μεγάλης ποσότητας Ca^{2+} .

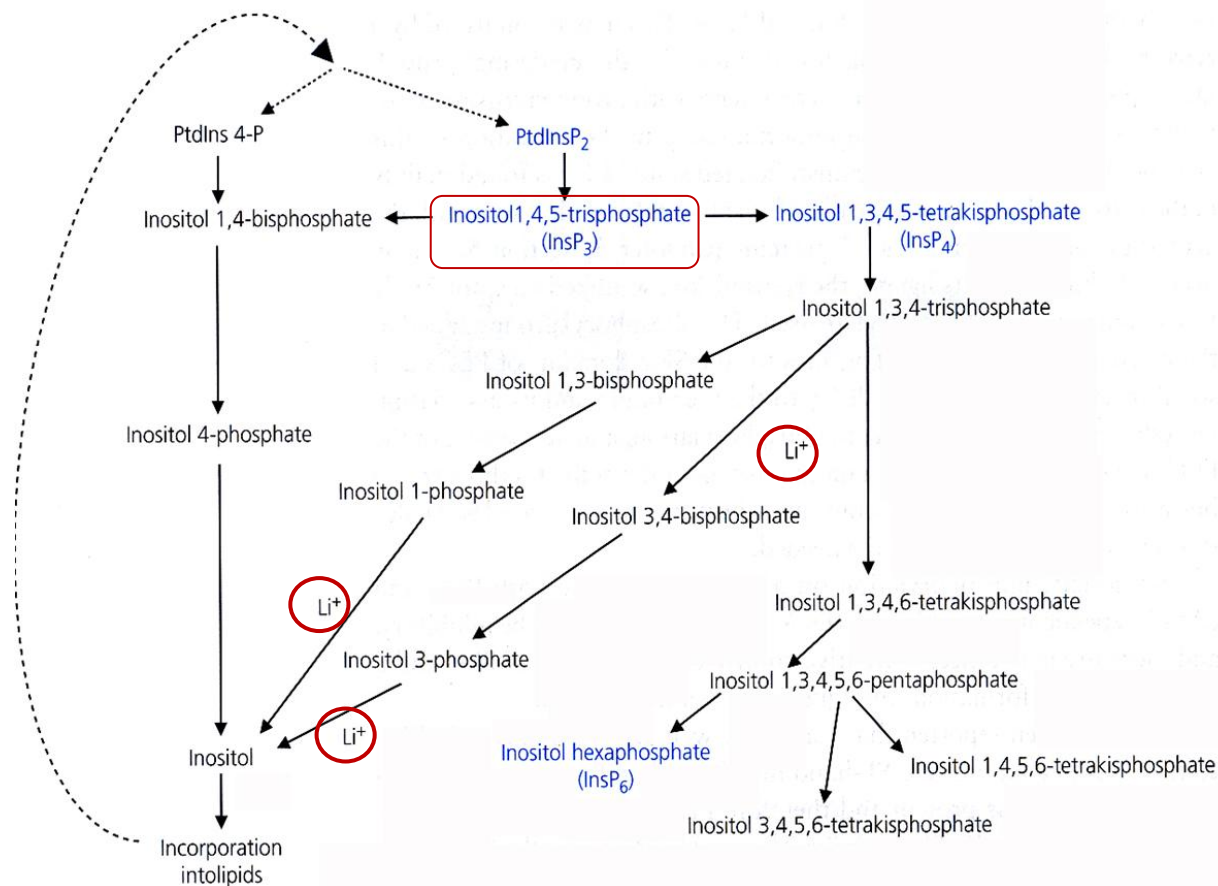
Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} είναι ένα επιπλέον στάδιο ενίσχυσης του αρχικού μηνύματος. Κάθε μόριο IP_3 αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου κατά 20 ιόντα Ca^{2+} . Το ασβέστιο δεσμεύεται στη συνέχεια από πρωτεΐνες όπως η καλμοδουλίνη (CAM: calmodulin), οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση και ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες-στόχους, όπως οι Ca^{2+} /καλμοδουλίνη-κινάσες (CAM-kinases).

Ο ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$: Η τριφωσφορική ινοσιτόλη που δεν δεσμεύεται από τους ειδικούς υποδοχείς της, καταβολίζεται μετά από υδρόλυση των φωσφορικών της ομάδων, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη βιολογική της δραστηριότητα. Οι αντιδράσεις αυτές είναι πολύ γρήγορες εμποδίζοντας τη συσσώρευση του δεύτερου διαβιβαστή. Ο χρόνος ημιζώης της IP_3 στα περισσότερα κύτταρα είναι μικρότερος από λίγα δευτερόλεπτα.

Η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη διασπάται σε ινοσιτόλη. Μια 5-φωσφομονοεστεράση υδρολύει την $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ δημιουργώντας την $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, η οποία υδρολύεται από την 4-φωσφομονοεστεράση και μετατρέπεται σε $\text{Ins}(4)\text{P}$, η οποία τελικά αποφωσφορυλιώνεται σε

ινοσιτόλη. Η $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ φωσφορυλιώνεται επίσης σε $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_3$ (IP_4), η οποία ακολουθεί διαφορετικά καταβολικά μονοπάτια με συνεχείς αποφωσφορυλιώσεις.

Ένα σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό της IP_3 παίζει το λίθιο (Li^+). Το λίθιο αναστέλλει τη δημιουργία ινοσιτόλης από $\text{Ins}(1)\text{P}$ προκαλώντας συσσώρευση των $\text{Ins}(1)\text{P}$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ και $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Στη δράση αυτή του λιθίου έχει αποδοθεί ο θεραπευτικός του ρόλος στην μανιο-κατάθλιψη.



Εικόνα 5.45 Μερικά από τα σημαντικότερα μονοπάτια του καταβολισμού της IP_3 (Inositol 1,4,5-trisphosphate, InsP_3), περιλαμβανομένων αυτών όπου επιδρά το λίθιο.

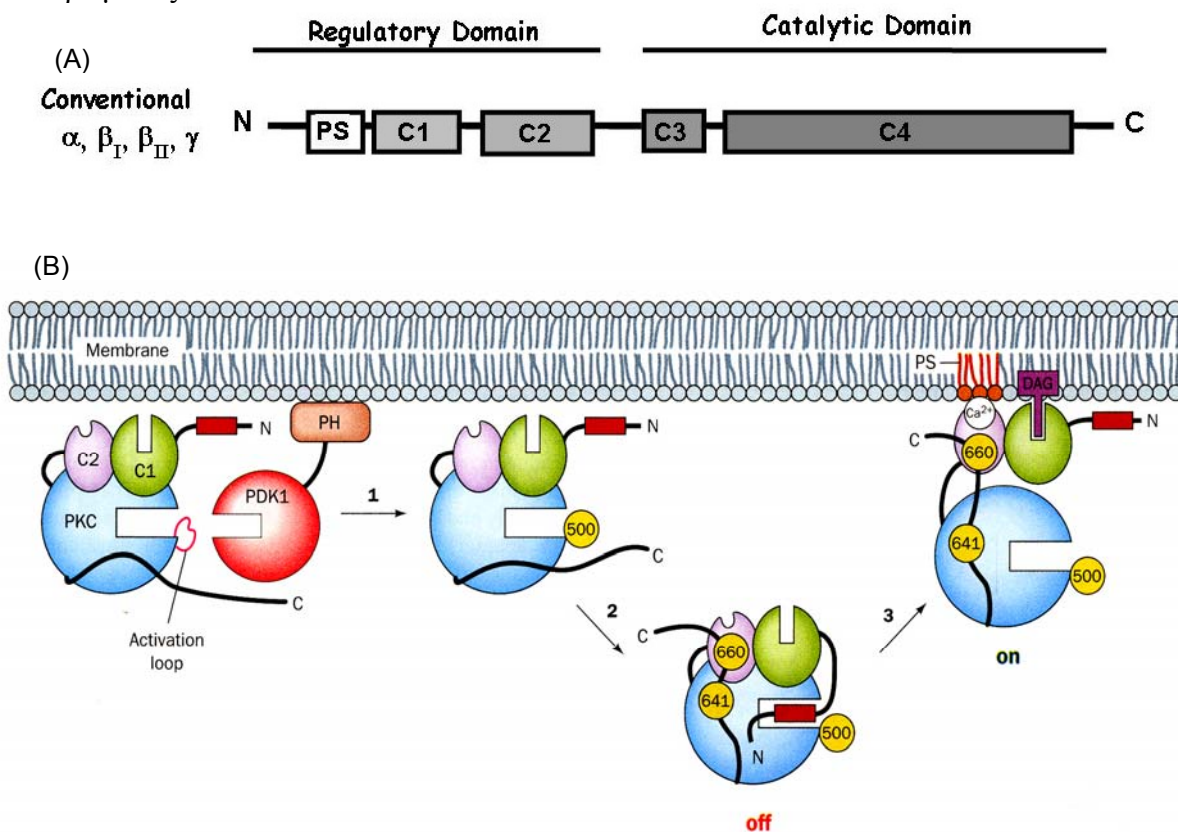
Η ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΤΗΣ ΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ: Η ινοσιτόλη γρήγορα εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου και χρησιμοποιείται ως πρώτο συνθετικό για τη δημιουργία της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (PI). Το δεύτερο συνθετικό είναι η CDP-διακυλογλυκερόλη, η οποία παράγεται ως εξής: η διακυλο-γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται από την DAG κινάση και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA), το οποίο με τη σειρά του αντιδρά με την τριφωσφορική κυτοσίνη (CTP) και δίνει την CDP-διακυλογλυκερόλη.

■ Πρωτεϊνική κινάση C: δομή και ενεργοποίησή της από DAG και Ca^{2+}

Ο κύριος στόχος, τον οποίο ενεργοποιεί η DAG είναι η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), μια πρωτεϊνική κινάση που φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Ser/Thr σε πολλές πρωτεΐνες-στόχους. Έχουν αναγνωριστεί 12 διαφορετικές ισομορφές PKC, από τις οποίες οι περισσότερες ρυθμίζονται από Ca^{2+} /DAG.

Οι PKCs αποτελούνται από μια καταλυτική και μια ρυθμιστική περιοχή, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο. Στο καρβοξυ-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής βρίσκεται η περιοχή κινάσης (C4), όμοια με της PKA. Στη ρυθμιστική

περιοχή υπάρχει η περιοχή C2, χάρη στην οποία η PKC προσδένεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, και η περιοχή C, που αποτελείται από δύο μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες, καθένα από τα οποία οργανώνεται γύρω από δυο δεσμευμένα ιόντα Zn^{2+} . Η C2 περιοχή δεσμεύει τη διακυλογλυκερόλη. Τέλος στο N-τελικό άκρο υπάρχει μια αλληλουχία της μορφής -A-R-K-G-A-L-R-Q-K-, η οποία μοιάζει με την αλληλουχία των υποστρωμάτων που φωσφορυλιώνονται από τις PKC, χωρίς όμως να περιέχει κατάλοιπα Ser/Thr για φωσφορυλίωση. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται *αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος* γιατί συνδέεται και φράζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του υποστρώματος.



Εικόνα 5.46 (Α) Σχηματική αναπαράσταση τη δομής των ισομορφών cPKCs, της κλασικής υποοικογένειας. Διακρίνονται οι δομικές περιοχές τους. (Β) Τρισδιάστατη δομή της PKC. Διακρίνεται η καταλυτική περιοχή της, η περιοχή C2, μέσω της οποίας συνδέεται στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, η περιοχή C1 που συνδέεται στη διακυλογλυκερόλη, και η περιοχή του ψευδοϋποστρώματος η οποία φράζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του υποστρώματος. Η ενεργοποίηση της PKC απαιτεί τη φωσφορυλίωση της Thr500 από την PKD1 και δύο αυτο-φωσφορυλιώσεις στα κατάλοιπα 660, 641.

Πριν την ενεργοποίησή της, η PKC βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα. Με την υδρόλυση της PIP_2 από τη φωσφολιπάση C, η δομική περιοχή C1 δεσμεύεται στη DAG της μεμβράνης. Η δέσμευση αυτή και η αλληλεπίδραση της περιοχής C2 με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης προσδένουν το ένζυμο στη μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση της C2 με τα φωσφολιπίδια και ιδιαίτερα με τη φωσφατιδυλοχολίνη, χρειάζεται την παρουσία Ca^{2+} . Η δέσμευση της DAG στην περιοχή C1 απομακρύνει το ψευδοϋπόστρωμα έξω από το ενεργό κέντρο, με αποτέλεσμα τη δέσμευση της PKC στην ενεργό μορφή της, έτοιμη για φωσφορυλίωση καταλοίπων Ser/Thr σε κατάλληλες αλληλουχίες υποστρωμάτων, με περιοχές της μεμβράνης πλούσιες σε DAG (για περισσότερες λεπτομέρειες βλπ Κεφάλαιο 8: Πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες Ser/Thr).