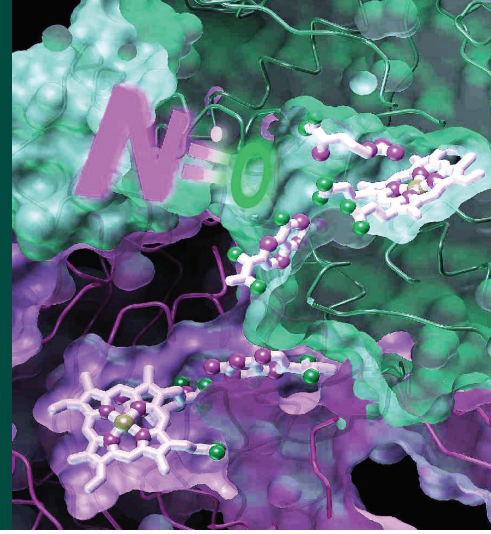


6

Γουανυλικές κυκλάσες και σηματοδότηση μέσω του κυκλικού GMP



1. Το cGMP και η Σύνθεσή του από τις Γουανυλικές Κυκλάσες

- 1.1 Η ανακάλυψη του cGMP και των γουανυλικών κυκλασών
- 1.2 Γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με γουανυλικές κυκλάσες

2. Διαμεμβρανικές Γουανυλικές Κυκλάσες (pGCs): Δομή και Ενεργοποίηση

- 2.1 Προσδέτες των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών και ο ρόλος τους
- 2.2 Δομή των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών
- 2.3 Ενεργοποίηση και ρύθμιση των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών

3. Διαλυτές Γουανυλικές κυκλάσες (sGCs): Δομή και Ενεργοποίηση

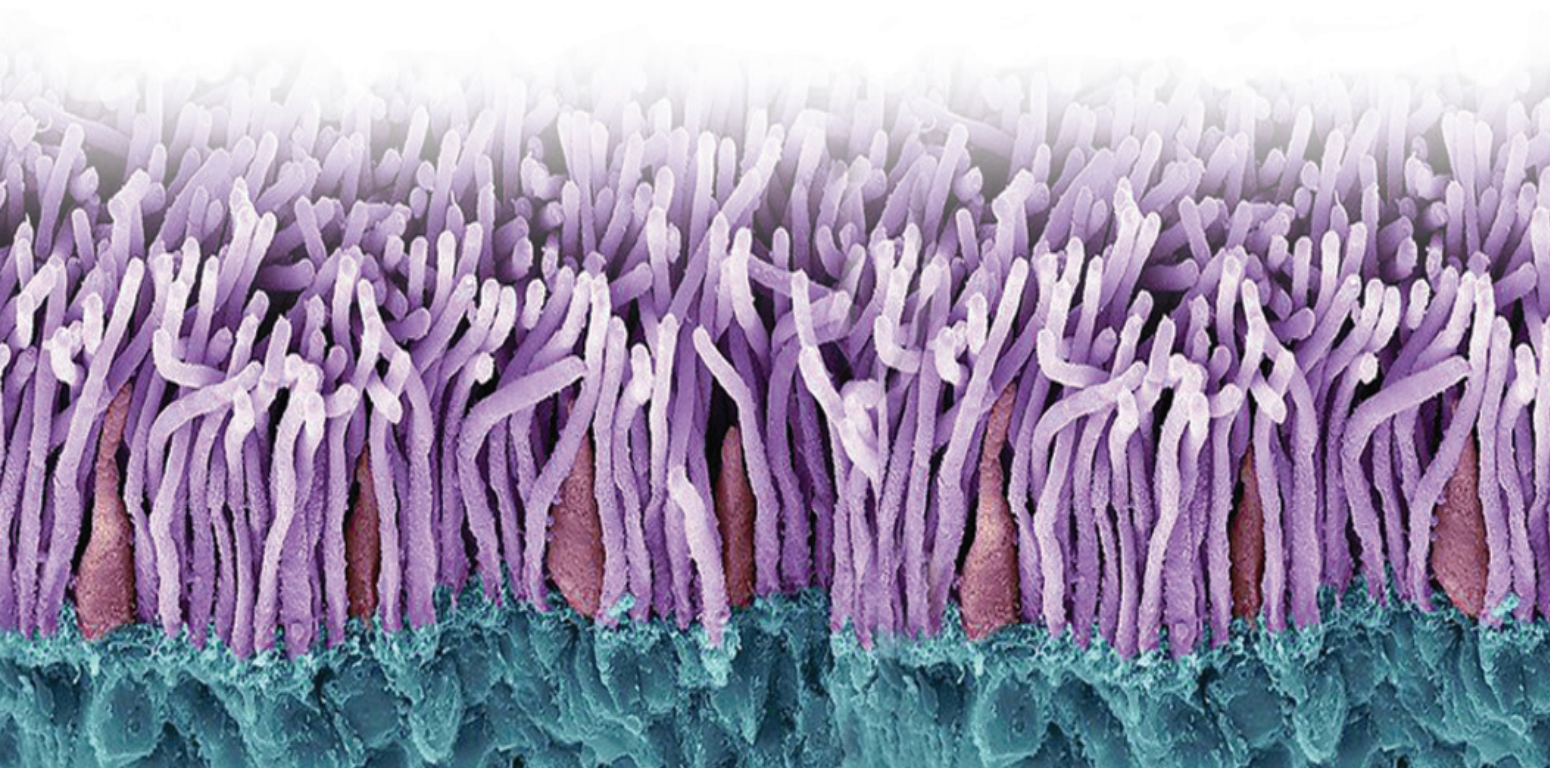
- 3.1 NO, ο κύριος ενδογενής προσδέτης των sGCs
- 3.2 Αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης NO, ανεξαρτήτως της sGC
- 3.3 Δομή και ισομορφές των sGCs
- 3.4 Ενεργοποίηση και ρύθμιση των sGCs

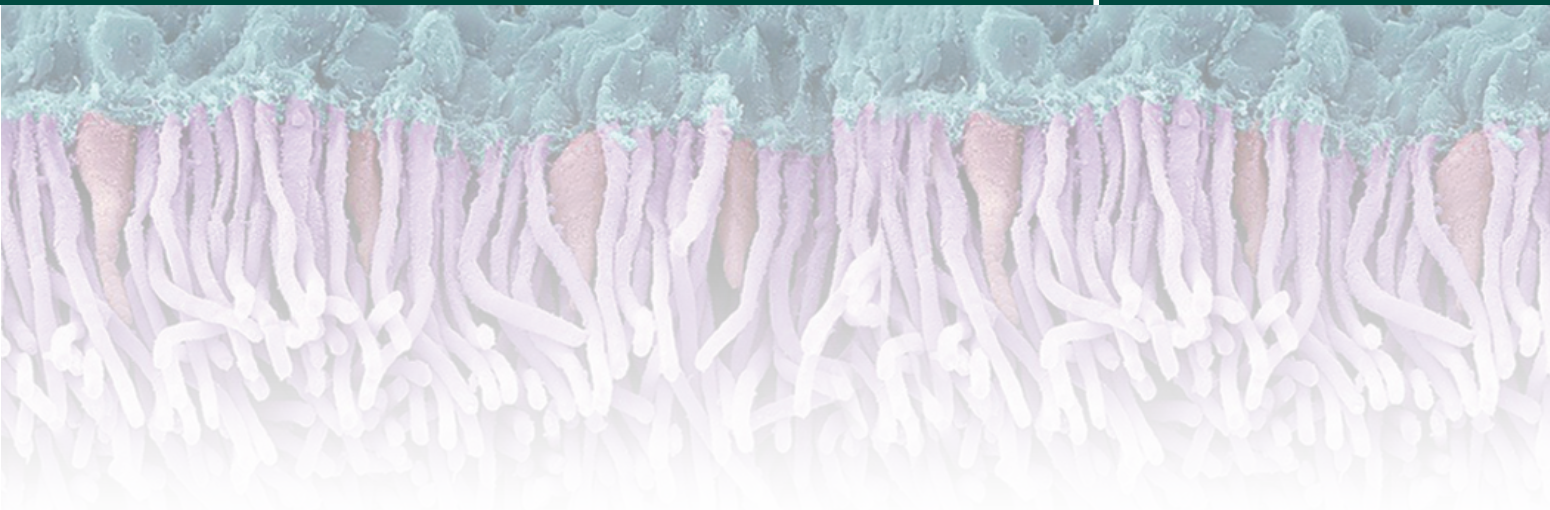
4. Οι Τελεστές του cGMP

- 4.1 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cGMP (PKG)
- 4.2 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cAMP (PKA)
- 4.3 cGMP-εξαρτώμενες φωσφοδιεστεράσες (PDE)
- 4.4 Κανάλια που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια

5. Το cGMP και η Φυσιολογία του Κυττάρου

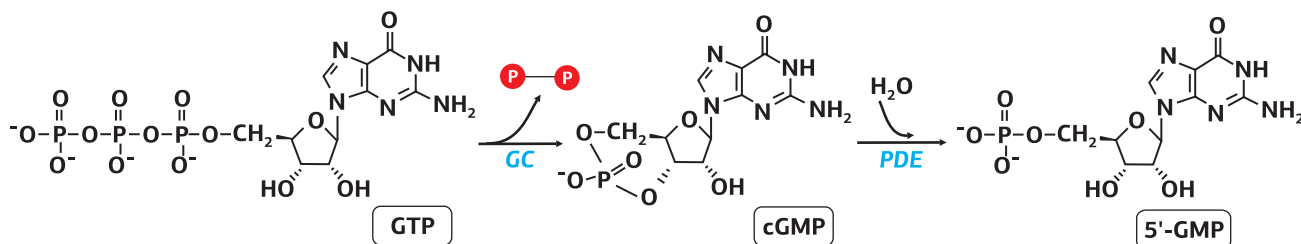
- 5.1 GC-A και ο φυσιολογικός της ρόλος
- 5.2 GC-B και ο ρόλος της στην ανάπτυξη των οστών
- 5.3 GC-C και ο ρόλος της στην έκκριση υγρών από το εντερικό επιθήλιο
- 5.4 GC-E και GC-F και ο ρόλος τους στη φωτοδιαβίβαση





1. Το cGMP και η Σύνθεσή του από τις Γουανυλικές Κυκλάσες

Οι γουανυλικές κυκλάσες (GCs, Guanylate ή guanylyl cyclases) είναι μια οικογένεια ενζύμων που εκφράζονται σε όλα σχεδόν τα είδη κυττάρων και καταλύουν τη μετατροπή του GTP σε cGMP. Στη συνέχεια, το cGMP υδρολύεται γρήγορα από τις φωσφοδιεστεράσες σε 5' GMP (**Εικόνα 6.1**).



Οι γουανυλικές κυκλάσες διακρίνονται στις διαμεμβρανικές (particulate GCs, pGCs ή transmembrane GCs, tmGCs) και στις διαλυτές, κυτταροπλασματικές (soluble GCs, sGCs). Και τα δύο είδη δρουν ως υποδοχείς, καθώς ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά μηνύματα. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί στην αύξηση του κυτταροπλασματικού cGMP, το οποίο έχοντας ως στόχους cGMP-εξαρτώμενες κινάσες, φωσφοδιεστεράσες και κανάλια ιόντων ρυθμίζει πολύπλοκα μονοπάτια σηματοδότησης. Αυτά τα μονοπάτια συμμετέχουν σε ποικίλες (παθο)φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η χάλαση των λείων μυών των αγγείων, η ομοιόσταση ηλεκτρολυτών και νερού στον εντερικό σωλήνα, η λιπόλυση, η φωτοδιαβίβαση στον αμφιβληστροειδή κ.λπ.

Εικόνα 6.1

Η παραγωγή του cGMP από το GTP καταλύεται από τις γουανυλικές κυκλάσες, ενώ η υδρόλυσή του σε 5' GMP καταλύεται από τις φωσφοδιεστεράσες.

Η δομή και η λειτουργία της οικογένειας των γουανυλικών κυκλασών, οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δραστηριότητά τους, τα μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από την αύξηση του cGMP, καθώς και οι λειτουργίες που ελέγχουν θα είναι τα θέματα που θα αναλυθούν σ' αυτό το Κεφάλαιο.

1.1

Η ανακάλυψη του cGMP και των γουανυλικών κυκλασών

Από την ανακάλυψη του cAMP το 1958 από τον Earl Sutherland, είχε καταστεί προφανές ότι υπάρχουν και άλλα 3', 5' κυκλικά νουκλεοτίδια και ότι αυτές οι ενώσεις μπορεί να είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της κυτταρικής φυσιολογίας. Το 1960 το cGMP συντέθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο και δείχθηκε ότι αυτή η συνθετική ένωση αποικοδομείται με ενζυμική υδρόλυση παρόμοια με του cAMP. Το 1963 ο Donald Ashman επιβεβαίωσε την ύπαρξη ενδογενούς cGMP σε ούρα κουνελιών και έξι χρόνια αργότερα το cGMP, καθώς και το μεμβρανικό ένζυμο γουανυλική κυκλάση (guanylyl ή guanylate cyclase, GC) που καταλύει τη σύνθεσή του, ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ζωικούς ιστούς.

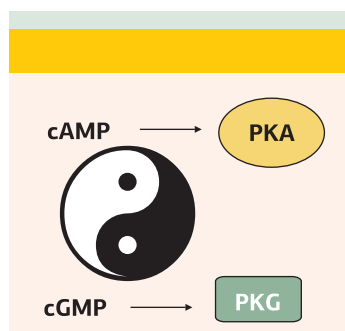
Μια πρωτοποριακή "yin yang hypothesis" προτάθηκε από τον Nelson Goldberg το 1975. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή το cAMP και το cGMP δρουν ως δεύτεροι διαβιβαστές με αλληλένδετες και αντίθετες βιολογικές δραστηριότητες, και ένα ορμονικό σήμα, που προκαλεί αύξηση του cGMP, ταυτόχρονα οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του cAMP, και το αντίστροφο (Εικόνα 6.2). Η πρόταση αυτή δεν άντεξε στον χρόνο καθώς οι υποστηρικτές της την εποχή εκείνη απέτυχαν να αποδείξουν την εξάρτηση της γουανυλικής κυκλάσης από κάποια ορμόνη. Ωστόσο, σήμερα γνωρίζουμε ότι σε συγκεκριμένους ιστούς το cAMP και το cGMP εμφανίζουν παρόμοια δράση, όπως για παράδειγμα και τα δύο προκαλούν χάλαση των λείων μυών.

Ταυτόχρονα, ανακαλύφθηκε ότι εκτός από τις διαμεμβρανικές γουανυλικές κυκλάσες υπάρχουν και διαλυτές γουανυλικές κυκλάσες. Όμως, η κατάσταση ήταν εντελώς διαφορετική από ό,τι στις αδενυλικές κυκλάσες. Ορμόνες και μεσολαβητές ικανοί να ενεργοποιήσουν άμεσα ή έμμεσα τις αδενυλικές κυκλάσες δεν είχαν καμιά επίδραση στις γουανυλικές κυκλάσες, των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος παρέμενε ένα μυστήριο. Ο Earl Sutherland έγραφε στη διάλεξη του Νόμπελ το 1971 συγκρίνοντας το cAMP και το cGMP: «Τότε είχαμε μια λειτουργία και βρήκαμε ένα νουκλεοτίδιο (υπονοώντας το cAMP), ενώ τώρα έχουμε ένα νουκλεοτίδιο (υπονοώντας το cGMP) και προσπαθούμε να ανακαλύψουμε τη λειτουργία του». Έτσι, οι γουανυλικές κυκλάσες θεωρήθηκαν αρχικά μη ειδικά ένζυμα, που ρυθμίζονταν μέσω του δυναμικού οξειδοαναγωγής των βιοχημικών αντιδράσεων, ενώ έως το τέλος της δεκαετίας του 1970 ο μόνος γνωστός στόχος του cGMP ήταν μια μη εξειδικευμένη cGMP-εξαρτώμενη κίνηση και ο ρόλος του ως δεύτερου διαβιβαστή δεν είχε αποδειχθεί.

Η ανακάλυψη των μεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών

Το 1978 ο James Hughes ανέφερε για πρώτη φορά ότι η μεμβρανική γουανυλική κυκλάση στον εντερικό ιστό ενεργοποιείται εξειδικευμένα από θερμοανθεκτικές τοξίνες της *Escherichia coli*. Δεκατέσσερα χρόνια αργότερα, το 1992, απομονώθηκαν τα ενδογενή πεπτίδια γουανυλίνη και ουρογουανυλίνη, που ενεργοποιούν τη μεμβρανική γουανυλική κυκλάση τύπου C, **GC-C**, όπως ονομάστηκε.

Όσον αφορά τις άλλες ισομορφές των μεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών, η μεγάλη πρόοδος οφείλεται στις μελέτες με σπέρμα του θαλάσσιου αχινού, μία από τις πλουσιότερες πηγές pGCs. Το 1981 βρέθηκε ότι πεπτίδια που απελευθερώνονται από τα ωάρια του θαλάσσιου αχινού ενεργοποιούσαν απευθείας τη μεμβρανική GC των σπερματοζωαρίων, γεγονός που δείχνει ότι οι pGCs μπορούν να λειτουργήσουν ως υποδοχείς για πεπτιδικούς προσδέτες. Την ίδια περίοδο (1981) από εκχυλίσματα των κόλπων της καρδιάς αναγνωρίστηκαν πεπτίδια όμοιας δομής που δρουν ως νατριουρητικοί παράγοντες. Αυτά τα πεπτίδια ήταν ικανά να ενεργ-



Εικόνα 6.2

Το 1975 ο Nelson Goldberg πρότεινε μια πρωτοποριακή υπόθεση "yin yang", σύμφωνα με την οποία το cAMP και το cGMP δρουν ως δεύτεροι διαβιβαστές με αλληλένδετες και αντίθετες βιολογικές δραστηριότητες και ένα ορμονικό σήμα που προκαλεί αύξηση του cGMP, ταυτόχρονα οδηγεί στη μείωση των επιπέδων του cAMP, και το αντίστροφο. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί.

γοποιήσουν τη μεμβρανική γουανυλική κυκλάση σε διάφορους ιστούς. Το 1988 κλωνοποιήθηκε από το σπέρμα αχινού η **GC-A**, η οποία στον άνθρωπο εκφράζεται κυρίως στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα και στα νεφρά, όπου παίζει τον ρόλο του υποδοχέα του νατριουρητικού πεπτιδίου των κόλπων, ANP (Atrial Natriuretic Peptide). Η νέα οικογένεια των ορμονικών διαβιβαστών συμπληρώθηκε από την ανακάλυψη δύο άλλων πεπτιδίων, του νατριουρητικού πεπτιδίου του εγκεφάλου (BNP, Brain Natriuretic Peptide), που επίσης ενεργοποιεί την GC-A, και του νατριουρητικού πεπτιδίου C-τύπου (CNP, C-Natriuretic Peptide), που ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση B, **GC-B**.

Στον αμφιβληστροειδή η cGMP-ειδική φωσφοδιεστεράση και η γουανυλική κυκλάση περιγράφηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '70, αλλά ο ρόλος του cGMP στη ρύθμιση της φωτομεταγωγής ήταν αμφιλεγόμενος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η γουανυλική κυκλάση του αμφιβληστροειδούς, **GC-E**, δεν φαινόταν να ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά μηνύματα, σε αντίθεση με τις άλλες γνωστές μεμβρανικές γουανυλικές κυκλάσεις, αλλά από ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές και πρωτεΐνες. Ορισμένοι ερευνητές υποστήριζαν ότι τα ιόντα Ca^{2+} παίζουν τον κρίσιμο ρόλο στη φωτομεταγωγή, ενώ άλλοι επέμεναν ότι το cGMP είναι πιο σημαντικό. Τελικά, το 1985 αποδείχθηκε ότι τα κανάλια ιόντων των ραβδίων ρυθμίζονται από το cGMP, ενώ τα επίπεδα Ca^{2+} ρυθμίζουν τη δράση της γουανυλικής κυκλάσης. Το 1988 σε ένα άρθρο στο *Nature*, οι Karl-Wilhelm Koch και Lubert Stryer απέδειξαν ότι στον αμφιβληστροειδή η Ca^{2+} -εξαρτώμενη γουανυλική κυκλάση και η φωτο-εξαρτώμενη cGMP-ειδική φωσφοδιεστεράση είναι στενά συνδεδεμένες κατά τη διαδικασία της φωτομεταγωγής.

Το 1998 αναγνωρίστηκε ένας επιπλέον υποδοχέας νατριουρητικών πεπτιδίων, γνωστός ως υποδοχέας εκκαθάρισης (clearance receptor, **NRP-C**). Η εξωκυτταρική περιοχή του είναι όμοια με αυτή των γουανυλικών κυκλασών A και B, ενώ στο κυτταροπλασματικό του άκρο απουσιάζει η καταλυτική περιοχή κυκλάσης. Ο υποδοχέας αυτός δεν συνδέεται με παραγωγή cGMP, αλλά μετά τη σύνδεση των νατριουρητικών πεπτιδίων επάγεται η εσωτερική και αποικοδόμησή τους.

Η αναζήτηση για τους ενεργοποιητές των μεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών είναι σε εξέλιξη, δεδομένου ότι υπάρχουν δύο λεγόμενοι "ορφανοί υποδοχείς", **GC-D**, **GC-G**, για τους οποίους αγνοούμε τους εξωκυτταρικούς τους προσδέτες.

Τέλος, να αναφέρουμε ότι η οικογένεια των GCs στα θηλαστικά είναι σχετικά μικρή, καθώς έχουν έως σήμερα αναγνωριστεί επτά rGCs, ενώ στον *Caenorhabditis elegans* έχουν βρεθεί τριάντα γονίδια που κωδικοποιούν γουανυλικές κυκλάσεις και τα cGMP-εξαρτώμενα μονοπάτια είναι ποικίλα.

Η ανακάλυψη των διαλυτών γουανυλικών κυκλασών και του ρόλου του NO

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 έγινε γνωστό ότι η ακετυλοχολίνη αυξάνει έμμεσα τη συγκέντρωση του cGMP στην καρδιά αρουραίων και ότι το Ca^{2+} παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη ρύθμιση. Ένα άλλο κομμάτι του puzzle συμπλήρωσε η ανακάλυψη το 1975 ότι το NO μπορεί να ενεργοποιήσει τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση. Αυτές οι δύο ανακαλύψεις παρέμειναν ασύνδετες για τα επόμενα 10 χρόνια. Το 1980 ανακαλύφθηκε ότι η ακετυλοχολίνη προκαλεί διαστολή των αγγείων, η οποία εξαρτάται από έναν αδιευκρίνιστο παράγοντα EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor) που απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και στοχεύει στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Το 1989 ο Furgchott και ο Ignaro, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, ταυτοποίησαν τον παράγοντα αυτόν με το NO (βλ. σελ. 35). Ταυτόχρονα, ανακαλύφθηκε ότι η L-αργινίνη προκαλεί την ενεργοποίηση της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης μόνο σε κυτταρικό κλάσμα, χωρίς να επηρεάζει το καθαρό ένζυμο, και βρέθηκε ότι η ενδογενής παραγωγή του NO καταλύεται από τη συνθάση του NO με πρώτη ύλη την L-αργινίνη.

Έκτοτε, χρειάστηκαν 15 χρόνια για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός με τον οποίο η ακετυλοχολίνη και το Ca^{2+} αυξάνουν τη συγκέντρωση του cGMP. Περιληπτικά, η ακετυλοχολίνη συνδέεται στους μουσκαρινικούς M3 υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων και αυξάνει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , τα οποία οδηγούν



Lubert Stryer (1938-2024)
Το 2007 έλαβε το Εθνικό Μετάλλιο Επιστημών από τον Πρόεδρο Μπους σε τελετή στον Λευκό Οίκο για την αποσαφήνιση της βιοχημικής βάσης της ενίσχυσης σήματος στην όραση, για την πρωτοποριακή ανάπτυξη μικροσυστοιχιών υψηλής πυκνότητας για γενετική ανάλυση, την ανάπτυξη της μικροσκοπίας φθορισμού Förster resonance energy transfer (FRET), καθώς και για τη συγγραφή του τυπικού προπτυχιακού βιβλίου βιοχημείας, *Biochemistry*.

Η ακετυλοχολίνη δρα στην καρδιά μέσω των μουσκαρινικών M2 υποδοχέων προκαλώντας μείωση του καρδιακού ρυθμού (βλ. **Εικόνα 4.53**). Ο ρόλος του μονοπατιού NO-cGMP στη χολινεργική ρύθμιση του φλεβόκομβου, βηματοδότη της καρδιάς, είναι ακόμη αμφιλεγόμενος.

γούν στην παραγωγή NO μέσω της καλμοδουλινο-εξαρτώμενης ενεργοποίησης της συνθάσης του NO. Το NO, στη συνέχεια, διαχέεται έξω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και εισέρχεται μέσα στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, όπου ενεργοποιεί τη διαλυτή γουανυλική κυκλάση. Ως αποτέλεσμα, αυξάνονται τα επίπεδα cGMP, το οποίο ενεργοποιεί την PKG-I, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCP) προκαλώντας χάλαση (βλ. σσ. 301-302).

Άλλες σημαντικές ανακαλύψεις ήταν η απομόνωση το 1986 της καθαρής διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης από πνεύμονες αρουραίων, η ταυτοποίηση της διμερούς μορφής της και η ύπαρξη μιας ομάδας αίμης, απαραίτητης για την ενεργοποίηση του ενζύμου από το NO. Η κλωνοποίηση των υπομονάδων α- και β- της sGC πραγματοποιήθηκε το 1988 από την Doris Koesling.

1.2

Γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με τις γουανυλικές κυκλάσες

Εικόνα 6.3

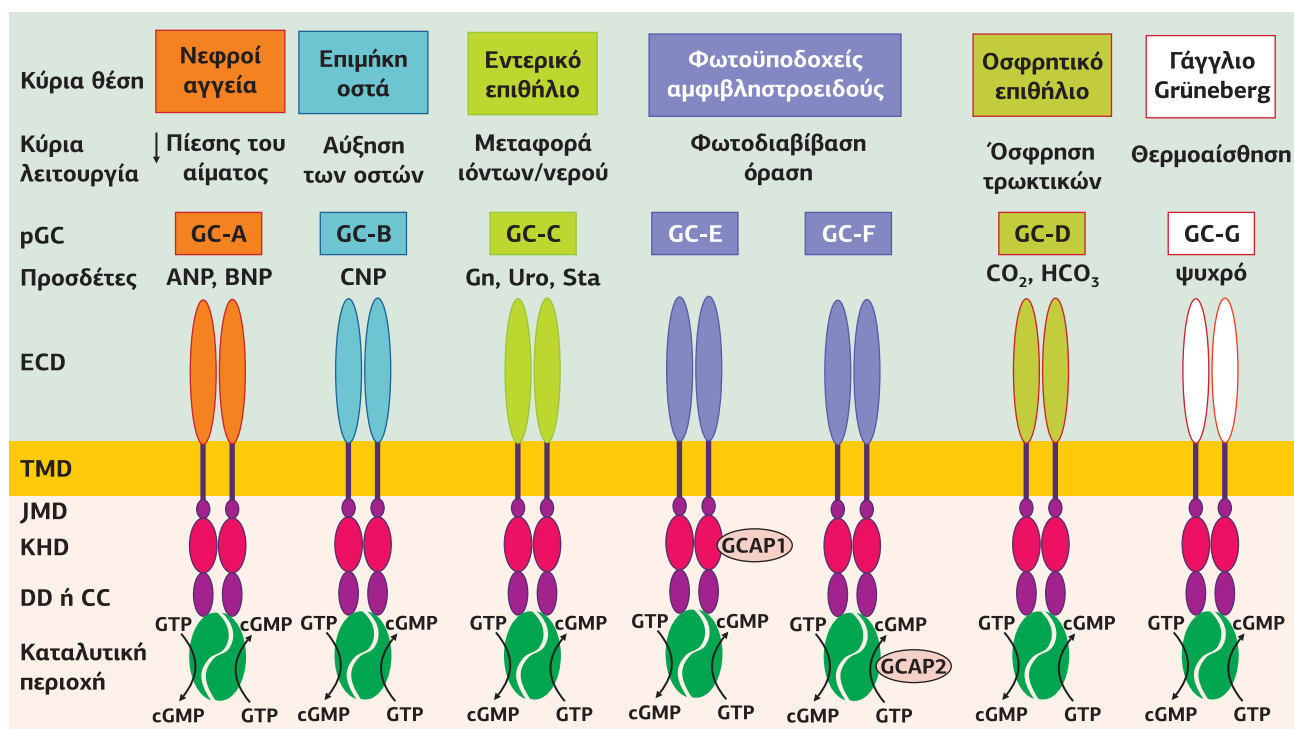
**Ταξινόμηση των μεμβρανικών
γουνανυλικών κυκλασών με
βάση τους προσδέτες τους.**

Διακρίνεται η γενική δομή τους, η κύρια έκφρασή τους στους ιστούς, καθώς και οι σημαντικότερες δράσεις τους. Όσον αφορά τη δομή των pGCs διακρίνονται οι περιοχές: ECD (Extracellular Domain), TM (Transmembrane Domain), JMD (Juxtamembrane Domain), KHD (Kinase Homology Domain), DD (Dimerization Domain) ή CC (Coiled coil) και η καταλυτική περιοχή. [18] [34]

Η μόνη ανθρώπινη ασθένεια που σχετίζεται με τις γουανυλικές κυκλάσες αφορά τη δυστροφία του αμφιβληστροειδούς, η οποία οφείλεται σε loss-of-function μεταλλάξεις του γονιδίου της **GC-E**. Αν αφαιρέσουμε το γονίδιο της GC-E από ποντίκια (GC-E null mice), τότε τα κωνία εξαφανίζονται σε ηλικία 5 εβδομάδων, ενώ ο αριθμός και η μορφολογία των ραβδίων δεν υφίσταται καμιά μεταβολή.

Μεταλλάξεις σε άλλα μέλη της οικογένειας των GCs δεν σχετίζονται με κανέναν φαινότυπο ασθένειας στους ανθρώπους. Ποντίκια **GC-A** null εμφανίζουν υπέρταση ανθεκτική στα άλατα και δεν αντιδρούν καθόλου στο ANP ή σε ερεθίσματα που προκαλούν διούρηση. Επιπλέον, ανέπτυξαν καρδιακή υπερτροφία, τα δε αρσενικά GC-A null ποντίκια πέθαναν σε ηλικία 6 μηνών από ανακοπή καρδιάς. Καθώς τα συμπτώματα αυτά παρουσιάζουν πολλά κοινά στοιχεία με την ανθρώπινη υπέρταση, ίσως αποδειχθούν ένα σημαντικό μοντέλο για τη μελέτη και τη θεραπεία αυτής της ασθένειας.

Η δημιουργία **GC-C** null ποντικών οδήγησε σε βιώσιμα και υγιή ποντίκια, τα οποία όμως δεν εμφανίζουν διάρροια έπειτα από μόλυνση με το βακτήριο της χολέρας.



2. Διαμεμβρανικές Γουανυλικές κυκλάσες (pGCs): Δομή και Ενεργοποίηση

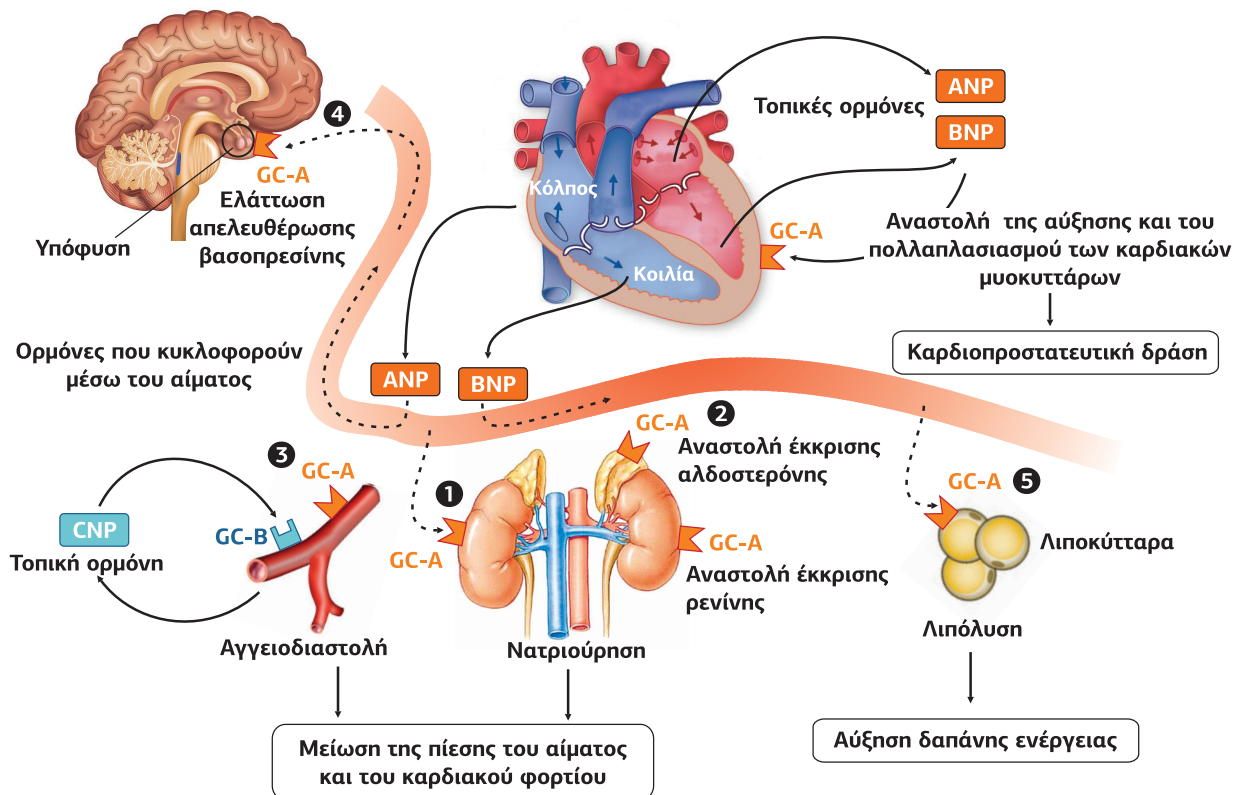
Επτά ισομορφές διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλάσων έχουν αναγνωρισθεί στα θηλαστικά (GC-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G), οι οποίες με βάση το είδος του προσδέτη ταξινομούνται στις παρακάτω πέντε ομάδες (**Εικόνα 6.3**):

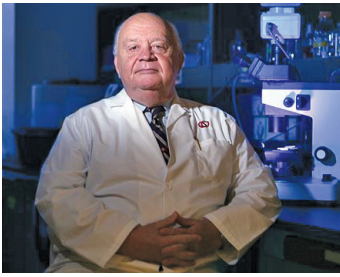
1. Η GC-A δρα ως υποδοχέας των νατριουρητικών πεπτιδίων ANP και BNP. Εκφράζεται κυρίως στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό. Σε χαμηλότερα επίπεδα εκφράζεται στην καρδιά. Ο κύριος ρόλος της είναι η μείωση της πίεσης του αίματος.
2. Η GC-B δρα ως υποδοχέας του νατριουρητικού πεπτιδίου CNP. Εκφράζεται κυρίως στα επιμήκη οστά και ο ρόλος της είναι η αύξηση των οστών.
3. Η GC-C αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως υποδοχέας των θερμοανθεκτικών τοξινών των βακτηρίων, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί και από τα ενδογενή νατριουρητικά πεπτίδια των θηλαστικών, γουανυλίνη, ουρογουανυλίνη και λεμφογουανυλίνη. Εκφράζεται, κυρίως, στα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού σωλήνα, όπου αναστέλλει την απορρόφηση Na^+ από τον αυλό του εντέρου, έπειτα από ένα γεύμα πλούσιο σε άλας.
4. Οι GC-E και GC-F ενεργοποιούνται από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες GCAPs που δρουν ως αισθητήρες Ca^{2+} . Εκφράζονται μόνο στους φωτοϋποδοχείς (ραβδία, κωνία) του αμφιβληστροειδούς και παίζουν κύριο ρόλο στη φωτοδιαβίβαση.
5. Οι GC-D και GC-G είναι ορφανοί υποδοχείς για τους οποίους δεν ξέρουμε τους προσδέτες τους. Η GC-D εκφράζεται στο σφρηκτικό επιθήλιο των τρωκτικών και φαίνεται να μεσολαβεί στην ανίχνευση του CO_2 , ενώ μπορεί να ενεργοποιείται και από το νατριουρητικό πεπτίδιο ουρογουανυλίνη. Η GC-G εκφράζεται στο γάγγλιο του Grönberg, που βρίσκεται στα ρουθούνια των τρωκτικών και αποκρίνεται σε ψυχρές θερμοκρασίες.

Εικόνα 6.4

Παρακρινής και ενδοκρινής δράση των νατριουρητικών πεπτιδίων.

Τα νατριουρητικά πεπτίδια ANP και BNP απελευθερώνονται από τους κόλπους και τις κοιλίες της καρδιάς, αντίστοιχα, ως απάντηση στη διάταση των καρδιομυοκυττάρων. Δρουν παρακρινώς στα καρδιακά μυοκύτταρα, αναστέλλοντας την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους και ενδοκρινώς: 1. στους νεφρούς, όπου αναστέλλοντας την έκκριση ρενίνης και κλείνοντας τα κανάλια ENaC προκαλούν διούρηση και νατριούρηση, 2. στα επινεφρίδια, όπου αναστέλλουν την απελευθέρωση της αλδοστερόνης, 3. στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων προκαλώντας χάλαση και αγγειοδιαστολή, 4. στον εγκέφαλο –στην υπόφυση– όπου ελαττώνουν την απελευθέρωση της βασοπρεσίνης και 5. στα λιποκύτταρα προκαλώντας λιπόλυση. Το CNP απελευθερώνεται από τα αγγεία και δρα παρακρινώς. [10]





Adolfo de Bold (1942 - 2021)
Αργεντινο-Καναδός κλινικός
βιοχημικός που ανακάλυψε το ANP.

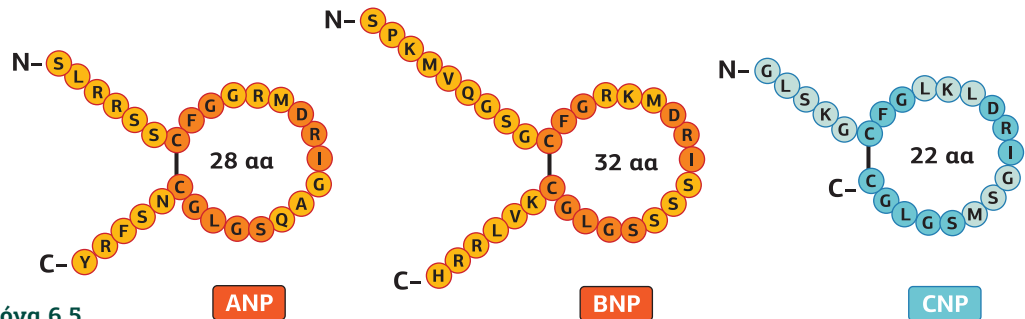
2.1

Προσδέτες των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών και ο ρόλος τους

Το **ANP** (Atrial Natriuretic Peptide) απομονώθηκε το 1981 από τον Adolfo de Bold, ως ένας ισχυρός διουρητικός και νατριουρητικός παράγοντας, ο οποίος απελευθερώνεται από τους κόλπους της καρδιάς (atria), αποδεικνύοντας για πρώτη φορά τη σύνδεση ανάμεσα στην καρδιά και στους νεφρούς. Το ANP απελευθερώνεται από την καρδιά, κυρίως από τους κόλπους (η συγκέντρωσή του στους κόλπους είναι 100 φορές μεγαλύτερη από ό,τι στις κοιλίες), ως απάντηση στην αυξημένη πίεση του αίματος και, κατά συνέπεια, στην αυξημένη διάταση των μυϊκών καρδιακών κυττάρων. Η δράση του είναι διπλή: παρακρινής, καθώς δρα στα καρδιακά μυοκύτταρα αναστέλλοντας την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους, και ενδοκρινής, καθώς μεταφέρεται μέσω του αίματος 1. στους νεφρούς, όπου ελαττώνει την έκκριση ρενίνης και την επαναρρόφηση Na^+ , 2. στον φλοιό των επινεφριδίων, όπου αναστέλλει την έκκριση αλδοστερόνης, 3. στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, όπου προκαλεί χάλαση και συνεπώς αγγειοδιαστολή, 4. στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου αναστέλλει την έκκριση βασοπρεσίνης (αντιδιουρητικής ορμόνης), και τέλος 5. στα λιποκύτταρα προκαλώντας λιπόλυση (**Εικόνα 6.4**).

Το ANP συντίθεται αρχικά ως ένα όξινο prepro-ANP πολυπεπτιδίο 152 αμινοξέων, το οποίο στο COOH-τελικό του άκρο περιέχει την αλληλουχία 28 αμινοξέων (αμινοξέα 124-152) του ενεργού πεπτιδίου. Η δραστική μορφή του ANP έχει έναν βρόχο που κλείνει μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού, ο οποίος φαίνεται να είναι απαραίτητος για τη βιολογική του δραστηριότητα (**Εικόνα 6.5**).

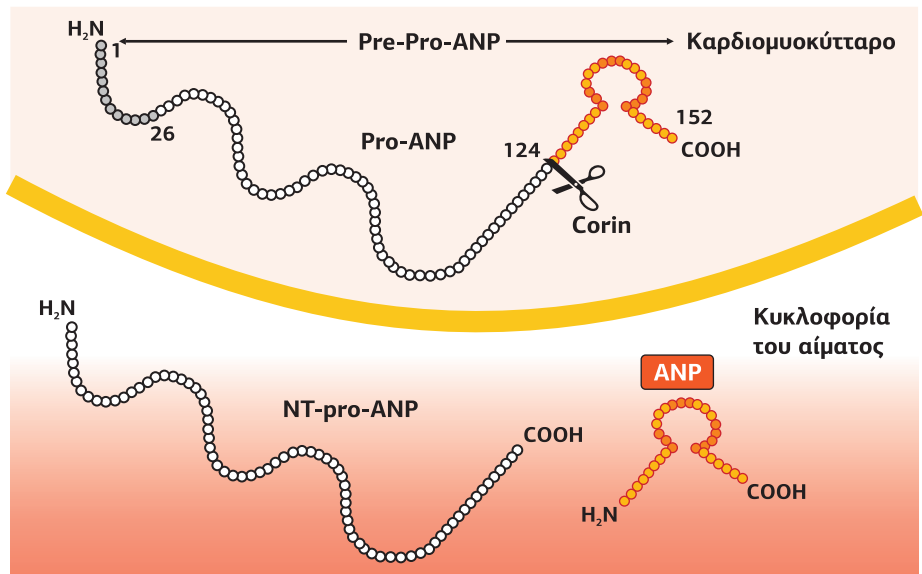
Το **BNP** (Brain Natriuretic Peptide) είναι ένα πεπτιδίο 32 αμινοξέων που αρχικά απομονώθηκε το 1988 από τον εγκέφαλο γουρουνιών. Συντίθεται και εκκρίνεται



Εικόνα 6.5

Δομή και διαδικασία σύνθεσης των νατριουρητικών πεπτιδίων.

Α. Τα νατριουρητικά πεπτιδία ANP, BNP και CNP αποτελούνται από 28, 32 και 22 αμινοξέα, αντίστοιχα. Η δραστική μορφή τους έχει έναν βρόχο που κλείνει μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού, ο οποίος φαίνεται να είναι απαραίτητος για τη βιολογική τους δραστηριότητα. Τα συντηρημένα αμινοξέα συμβολίζονται με πιο σκούρο πορτοκαλί ή μπλε. [42] Β. Τα νατριουρητικά πεπτιδία προέρχονται από μια πρόδρομη πρωτεΐνη που κόβεται από την πρωτεάση corin. Διακρίνεται το ANP, το οποίο μετά την πρωτεόλυση του pro-BNP απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος.

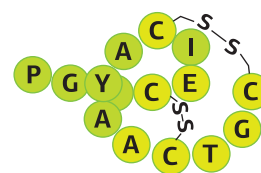


κυρίως από τις κοιλίες της καρδιάς παίζοντας όμοιο ρόλο με το ANP, με το οποίο έχει σχεδόν παρόμοια δομή και συνδέεται στον ίδιο υποδοχέα, τη γουανυλική κυκλάση GC-A ασκώντας παρόμοια δράση. Το BNP αποθηκεύεται μαζί με το ANP σε κοκκία στα μυοκύτταρα των κόλπων, ενώ στις κοιλίες βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα.

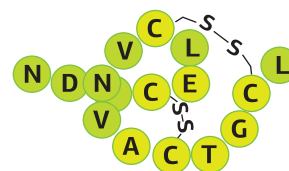
Το 1990 ανακαλύφθηκε το **CNP** (C-type Natriuretic Peptide), ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων, το οποίο και αυτό απομονώθηκε από τον εγκέφαλο γουρουνιών. Το CNP δεν είναι μια καρδιακή ορμόνη και η δράση της είναι παρακρινής, καθώς η συγκέντρωσή της είναι εξαιρετικά χαμηλή στο αίμα. Εκφράζεται, κυρίως, στο ΚΝΣ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Ο υποδοχέας του είναι η GC-B. Το CNP διαφέρει από τα άλλα νατριουρητικά πεπτίδια, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των χόνδρων και των οστών.

Το 1992, αναζητώντας ενδογενείς ενεργοποιητές των μεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών, απομονώθηκε από εκχύλισμα του λεπτού εντέρου αρουραίων η **γουανυλίνη** (guanyline), ένα μικρού MB όξινο σταθερό πεπτίδιο. Τον επόμενο χρόνο, από τα ούρα του μαρσιποφόρου οροσsum απομονώθηκε η **ουρογουανυλίνη** (uroguanylin), με δέκα φορές υψηλότερη δραστικότητα από τη γουανυλίνη. Γουανυλίνη και ουρογουανυλίνη αποδείχθηκαν οι κύριοι μεσολαβητές στη διατήρηση της ομοιόστασης του εντερικού υγρού. Η γουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 15 αμινοξέων, που εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, ενώ η ουρογουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 16 αμινοξέων, που εκκρίνεται από τα κύτταρα του εντέρου και των νεφρών. Η βιολογικά δραστική μορφή τους εμφανίζει εντυπωσιακές ομοιότητες, καθώς περιέχουν τέσσερις καλά συντηρημένες κυστεΐνες, που δημιουργούν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, απαραίτητους για τη δραστικότητα των πεπτιδίων (**Εικόνα 6.6**).

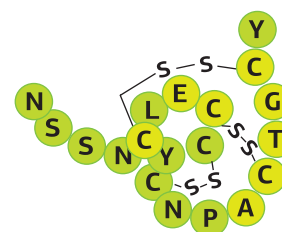
Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν άλλα δύο μέλη της οικογένειας γουανυλικών πεπτιδίων, η λεμφογουανυλίνη (lymphoguanlylin), η οποία απομονώθηκε από λεμφαδένες του οροσsum και η ρενογουανυλίνη (renoguanlylin), η οποία βρέθηκε στα χέλια. Ισομορφή της ρενογουανυλίνης στα θηλαστικά δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα. Επίσης, μένει να ανακαλυφθούν οι φυσιολογικές λειτουργίες των δύο αυτών πεπτιδίων.



Γουανυλίνη



Ουρογουανυλίνη



Θερμοανθεκτική τοξίνη της *E. coli*

Εικόνα 6.6

Ενεργοποιητές της GC-C.

Η γουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 15 αμινοξέων, ενώ η ουρογουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 16 αμινοξέων. Η βιολογικά δραστική μορφή τους εμφανίζει εντυπωσιακές ομοιότητες, καθώς περιέχουν τέσσερις καλά συντηρημένες κυστεΐνες, που δημιουργούν δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, απαραίτητους για τη δραστικότητά τους. Παρόμοιας δομής είναι και η θερμοανθεκτική εντεροτοξίνη που παράγει η *Escherichia coli*, ένα πεπτίδιο 19 αμινοξέων, το οποίο περιέχει 6 καλά συντηρημένες κυστεΐνες, που δημιουργούν 3 δισουλφιδικούς δεσμούς. Με ανοιχτό πράσινο διακρίνονται τα συντηρημένα αμινοξέα. [40]

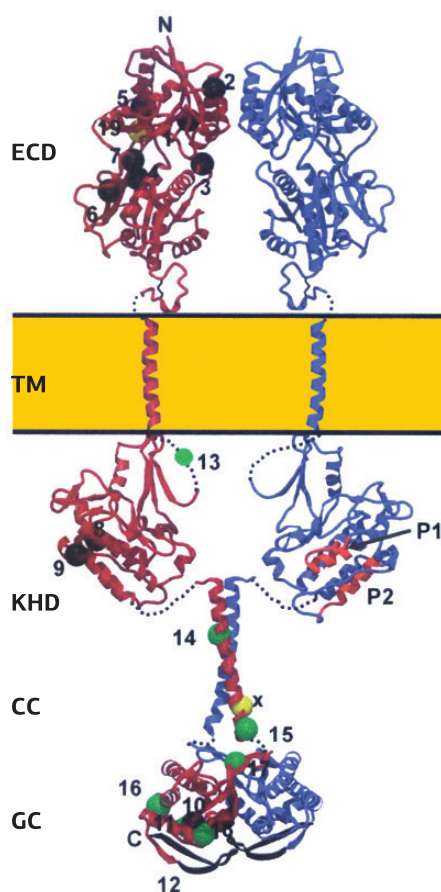
2.2 | Δομή των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλασών

Οι pGCs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαπερνούν τη μεμβράνη μόνο μία φορά. Αποτελούνται από υψηλά διατηρημένες περιοχές (**Εικόνα 6.7**):

- Μια εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης του προσδέτη, στο NH₂-τελικό άκρο.
- Μια διαμεμβρανική περιοχή, με τη μορφή α-έλικας.
- Μια κυτταροπλασματική περιοχή κοντά στη μεμβράνη, JMD (Juxtamembrane Domain).
- Μια περιοχή που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με τις κινάσες, KHD (Kinase Homology Domain).
- Μια περιοχή συσπειρωμένης σπείρας (CC, Coiled Coil) ή περιοχή διμερισμού (DD, Dimerization Domain).
- Μια καταλυτική περιοχή με δράση γουανυλικής κυκλάσης.
- Μια COOH-τελική ουρά, που έχουν μόνο οι γουανυλικές κυκλάσες που εκφράζονται στα κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου (GC-C) και στα αισθητήρια όργανα (GC-D, -E και -F).

1. Εξωκυττάρια περιοχή. Η εξωκυττάρια περιοχή των pGCs παρουσιάζει τεράστια ποικιλομορφία που πιθανώς αντανάκλα τη λειτουργική εξειδίκευση της σύνδεσης με διαφορετικούς προσδέτες.

Όλες οι pGCs των θηλαστικών, εκτός της GC-F, περιέχουν τουλάχιστον μία N-γλυκοσυλιωμένη περιοχή στο εξωκυττάριο τμήμα τους. Αυτή ποικίλλει σε μέγεθος, γεγονός που οδηγεί σε ετερογένεια στο μέγεθος των GCs και φαίνεται να παίζει ρόλο στη σύνδεση του προσδέτη ως εξής: ενώ η πλήρως γλυκοσυλιωμένη GC-A δεσμεύει το ANP, αν απομακρύνουμε τα γλυκοσυλιωμένα κατάλοιπα από την



Εικόνα 6.7
Κρυσταλλική δομή της
γουανυλικής κυκλάσης
GC-B. Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται σε διμερή μορφή. Διακρίνεται η εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης του προσδέτη στο NH₂-τελικό άκρο (ECD, Extracellular Domain), μια διαμεμβρανική περιοχή με μορφή α-έλικας (TM, TransMembrane), μια περιοχή ομόλογη με τις κινάσες (KHD, Kinase Homology Domain), μια περιοχή σπασμένης σπείρας (CC, Coiled-Coil), γνωστή και ως περιοχή διμερισμού (DD), και μια COOH-τελική, καταλυτική περιοχή με δράση γουανυλικής κυκλάσης (GC). [28]

GC-A, εμποδίζεται η σύνδεση του ANP στον υποδοχέα. Αν και η γλυκοσυλίωση είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του προσδέτη, δεν απαιτείται για την κατανομή των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια.

Όλες οι rGCs των θηλαστικών έχουν τρεις διατηρημένες κυστεΐνες στην NH₂-τελική εξωκυττάρια περιοχή τους. Οι κυστεΐνες αυτές σχηματίζουν δι-σουλφιδικούς δεσμούς, που σταθεροποιούν την τριτοταγή δομή του υποδοχέα (Εικόνα 6.8). Με πειράματα βρέθηκε ότι απουσία των προσδετών, οι rGCs αυθόρμητα σχηματίζουν σύμπλοκα, τα οποία σταθεροποιούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς στην εξωκυττάρια περιοχή.

2. Διαμεμβρανική περιοχή (TM, Transmembrane Domain). Όλες οι rGCs έχουν μία μοναδική διαμεμβρανική περιοχή, υπό μορφή α-έλικας, παρόμοια με αυτές των άλλων μελών της υπερικογενείας των υποδοχέων αυξητικών ορμονών. Η α-έλικα δημιουργεί μία υδρόφοβη περιοχή, που επιτρέπει την είσοδο στην υδρόφοβη λιπιδική διπλοστιβάδα. Αφαίρεση των υδρόφοβων αμινοξέων από αυτήν την περιοχή επηρεάζει την τοποθέτηση στη μεμβράνη, αλλά όχι τη σηματοδότηση. Επιπλέον, ίσως διευκολύνει τον ολιγομερισμό του υποδοχέα μέσω δεσμών α-έλικας/α-έλικας.

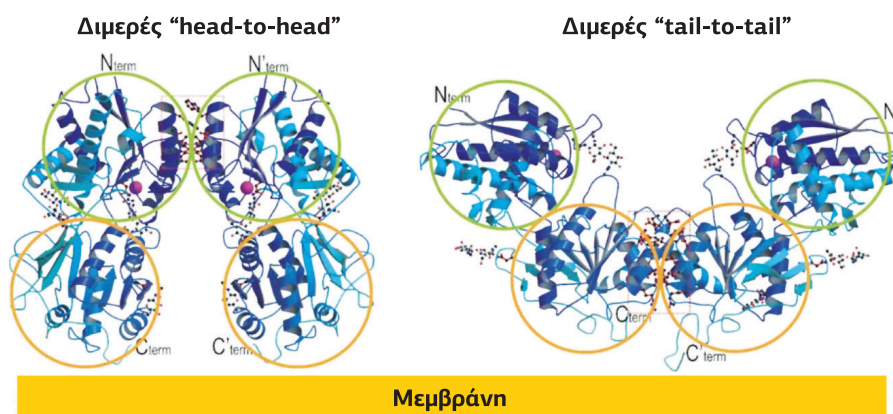
3. Κυτταροπλασματική περιοχή κοντά στη μεμβράνη (JMD, Juxtamembrane Domain). Είναι μια μικρή περιοχή 25 αμινοξέων στο κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης κοντά στη μεμβράνη. Αν και η ακριβής λειτουργία της δεν είναι γνωστή, πιθανόν να μεσολαβεί σε εναλλακτικούς μηχανισμούς μετάδοσης του μηνύματος από τις rGCs. Αυτή η περιοχή περιέχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων, η οποία συναντάται και σε μονομερείς διαμεμβρανικούς υποδοχείς επιτρέποντας τη σύνδεση με τις ετεροτρίμερες G-πρωτεΐνες. Γι' αυτό έχει προταθεί ότι ο υποδοχέας εκκαθάρισης NRP-C, ο οποίος δεν περιέχει καταλυτική περιοχή γουανυλικής κυκλάσης, πιθανόν μέσω της JMD περιοχής του να συνδέεται με G-πρωτεΐνες για να μεταδώσει το μήνυμα.

4. Περιοχή ομόλογη της κινάσης (KHD, Kinase Homology Domain). Όλες οι rGCs έχουν μία περιοχή 250 αμινοξέων, η οποία είναι 30% ομόλογη με μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνικών κινάσων. Στις πρωτεϊνικές κινάσες υπάρχει μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη που συμμετέχει στη σύνδεση του ATP. Η ίδια περιοχή υπάρχει και στις GC-A, -B αλλά όχι στην GC-C, δείχνοντας ότι αυτές οι δομικές διαφορές ίσως αποδεικνύουν μερικές από τις λειτουργικές διαφορές στη ρύθμιση αυτών των υποδοχέων από το ATP.

Η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι οι rGCs δεν διαθέτουν δράση κινάσης, λόγω αντικατάστασης ενός "κρίσιμου" καταλοίπου Asp που υπάρχει στις πρωτεϊνικές κινάσες και προσδίδει τη χαρακτηριστική τους ιδιότητα. Ωστόσο, οι rGCs του αμφιβλοπρωτεϊνικού διαθέτουν φυσική ενεργότητα κινάσης. Έτσι, το ATP ενώνεται στη γουανυλική κυκλάση του αμφιβλοπρωτεϊνικού σε μια απομακρυσμένη περιοχή πρόσδεσης από την καταλυτική περιοχή πρόσδεσης του GTP ως υπόστρωμα. Η δράση κινάσης των GCs του αμφιβλοπρωτεϊνικού δεν έχει τις ίδιες ιδιότητες με τις άλλες κινάσες Ser/Thr που βρίσκονται στα εξωτερικά τμήματα των ραβδίων.

5. Περιοχή σπασμένης σπείρας CC (Coiled Coil) ή περιοχή διμερισμού DD (Dimerization Domain). Είναι μια περιοχή 43 αμινοξέων ανάμεσα στην περιοχή κινάσης και την καταλυτική περιοχή, η οποία ρυθμίζει τον διμερισμό των δύο υπομονάδων και κυρίως των καταλυτικών περιοχών. Ο διμερισμός των καταλυτικών περιοχών απαιτείται για την έκφραση της ενζυμικής δράσης, τόσο των sGCs και rGCs όσο και των αδενυλικών κυκλασών.

6. Καταλυτική περιοχή (CD, Catalytic Domain). Από πειράματα προκύπτει ότι δύο καταλυτικές περιοχές απαιτούνται για την έκφραση της δράσης των νουκλεοτιδικών κυκλασών και, επίσης, ότι οι καταλυτικές περιοχές των αδενυλικών και γουανυλικών κυκλασών είναι δομικά και λειτουργικά ομόλογες.

**Εικόνα 6.8**

Οι pGCs προϋπάρχουν ως διμερή στη μεμβράνη, τα οποία σταθεροποιούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε καλά συντηρημένες κυστεΐνες των εξωκυτταρικών τους περιοχών. [24]

Τρία καλά συντηρημένα κατάλοιπα που υπάρχουν στο ενεργό κέντρο των αδενυλικών κυκλάσεων (που δημιουργείται όπως είδαμε από τις υποπεριοχές C1a και C2a, οι οποίες δημιουργούν ένα “ενδομοριακό” ψευδοδιμερές, βλ. σσ. 267-268) συνδέονται με τον δακτύλιο πουρίνης του ATP και καθορίζουν την εξειδίκευση του υποστρώματος (ATP αντί GTP). Μεταλλάξεις των αδενυλικών και γουανυλικών κυκλάσεων, στις οποίες τα τρία κατάλοιπα έχουν αντικατασταθεί, οδηγούν στην αλλαγή της εξειδίκευσης του νουκλεοτιδικού υποστρώματος: η μεταλλαγμένη GC χρησιμοποιεί ATP ως υπόστρωμα, ενώ η μεταλλαγμένη αδενυλική κυκλάση μετατρέπεται σε μία μη εκλεκτική κυκλάση για πουρινικά νουκλεοτίδια.

Η δομή της καταλυτικής περιοχής διατηρείται σε μέγιστο βαθμό τόσο στις pGCs όσο και τις sGCs. Οι ετεροδιμερείς κυκλάσες, όπως οι sGCs, έχουν ένα απλό ενεργό κέντρο που σχηματίζεται από δύο καταλυτικές υπομονάδες και μπορεί να συνδέσει ένα μόριο GTP ανά διμερές. Οι ομοδιμερείς κυκλάσες, όπως οι pGCs, έχουν δύο καταλυτικά κέντρα μέσα σε μία απλή σχισμή και μπορούν να συνδέσουν δύο μόρια GTP ανά διμερές. Τρία κατάλοιπα απαιτούνται για να σχηματίσουν ένα καταλυτικό κέντρο, ένα Asp από τη μία καταλυτική περιοχή και ένα ζευγάρι Asn/Arg από την άλλη. Στις ετεροδιμερείς κυκλάσες, όπου δημιουργείται ένα ενεργό κέντρο, το ένα Asp το προσφέρει η μία καταλυτική περιοχή και το ζευγάρι Asn/Arg η άλλη. Στις ομοδιμερείς κυκλάσες, όπου δημιουργούνται δύο ενεργά κέντρα, η κάθε καταλυτική περιοχή συνεισφέρει το Asp όσο και το ζευγάρι Asn/Arg.

7. Καρβοξυτελική ουρά. Οι GC-C, -D, -E, -F περιέχουν μία COOH-τελική ουρά έπειτα από την καταλυτική περιοχή. Ο ακριβής ρόλος της παραμένει αδιευκρίνιστος. Υπάρχουν υποψίες ότι ίσως η COOH-τελική ουρά να συνδέει τις GCs με τον κυτταροσκελετό. Επιπλέον, ίσως μεσολαβεί στην ενδοκυττάρωση των GC-υποδοχέων, γιατί οι υποδοχείς που υφίστανται προσδετο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση περιέχουν μια κυτταροπλασματική περιοχή με ομόλογες αλληλουχίες.

2.3

Ενεργοποίηση και ρύθμιση των διαμεμβρανικών γουανυλικών κυκλάσεων

Διμερισμός των υποδοχέων

Οι μεμβρανικές γουανυλικές κυκλάσες εμφανίζουν μια γενική δομή όμοια με τους υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs), καθώς και στους δύο τύπους υποδοχέων ο διμερισμός είναι απαραίτητος για την ενεργοποίησή τους. Όμως, ενώ η ενεργοποίηση των RTKs απαιτεί τον διμερισμό του υποδοχέα, ο οποίος λαμβάνει χώρα μετά τη σύνδεση του προσδέτη, ο μηχανισμός για τις pGCs διαφέρει. Οι pGCs προϋπάρχουν ως διμερή, πριν από τη σύνδεση του προσδέτη. Μελέτες που αφορούν τον διμερισμό των GCs έδειξαν ότι GCs από τις οποίες έχει αφαιρεθεί η περιοχή

KHD και η καταλυτική περιοχή, προϋπάρχουν μόνο ως μονομερή, συμπεραίνοντας ότι οι περιοχές αυτές είναι απαραίτητες για τον ολιγομερισμό τους. Παρόλο, όμως, που οι pGCs σχηματίζουν διμερή με έναν τρόπο ανεξάρτητο από τον προσδέτη, η παρουσία του προσδέτη σταθεροποιεί τη διμερισμένη μορφή τους προκαλώντας τη δημιουργία δισουλφιδικών σταθεροποιητικών δεσμών.

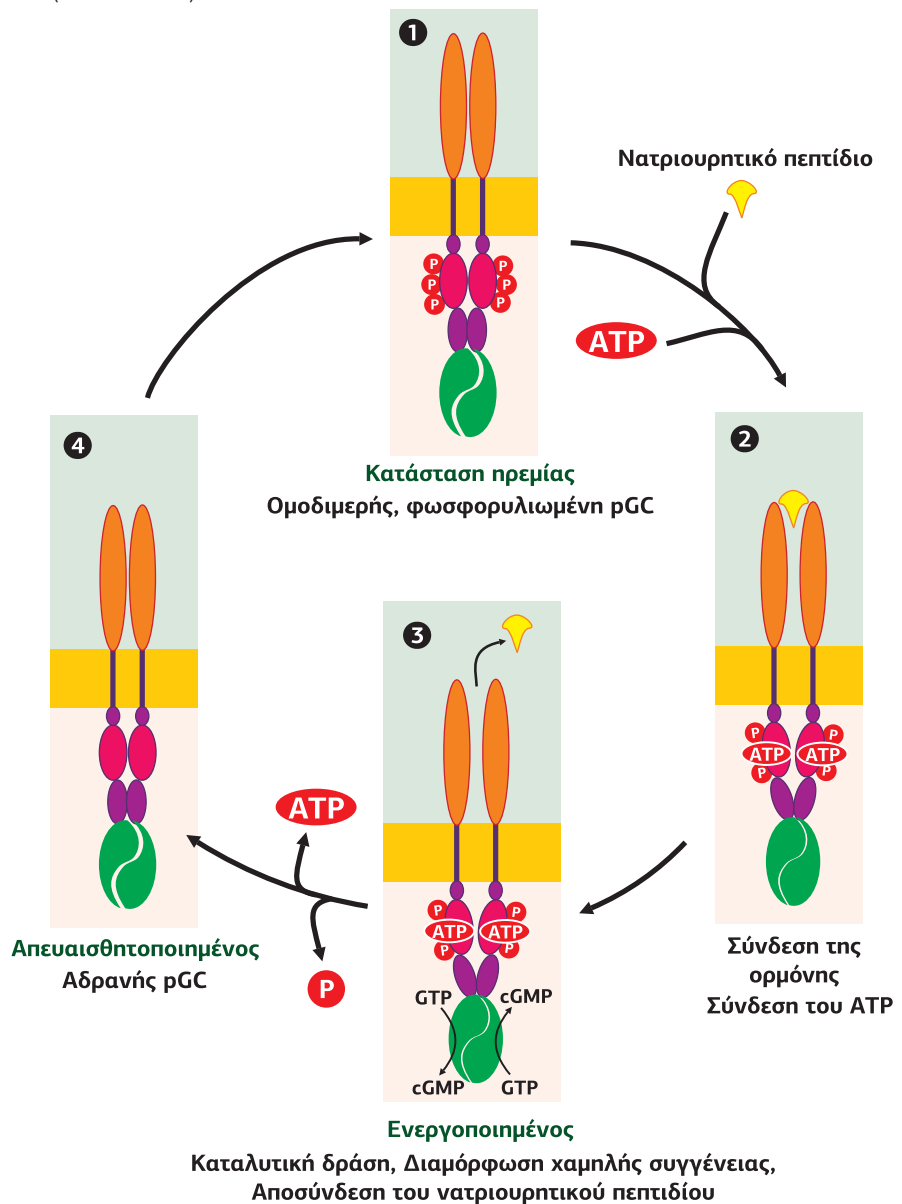
Σύνδεση του προσδέτη

Οι μεμβρανικές γουανυλικές κυκλάσες μετά τη σύνδεση του προσδέτη αλλάζουν διαμόρφωση και περνούν από τη διαμόρφωση υψηλής συγγένειας (K_D 0,1 nM) σε διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας (K_D 1 nM). Η προσδετο-προκαλούμενη μεταβολή της συγγένειας του υποδοχέα είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της καταλυτικής δραστηριότητας της GC. Κύριο ρόλο φαίνεται να παίζει η περιοχή KHD (Kinase Homology Domain), καθώς η απομάκρυνσή της μπλοκάρει τον υποδοχέα στη διαμόρφωση υψηλής συγγένειας και, συνεπώς, εμποδίζει την ενεργοποίησή του. Η σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή των pGCs προκαλεί μια περιστροφή των περιοχών που βρίσκονται κοντά στη μεμβράνη (juxtamembrane domains), η οποία μεταφέρεται στην περιοχή KHD, επιτρέποντας τη σύνδεση του ATP, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της καταλυτικής περιοχής του υποδοχέα (Εικόνα 6.9).

Εικόνα 6.9

Ενεργοποίηση της pGC από τον φυσικό της προσδέτη.

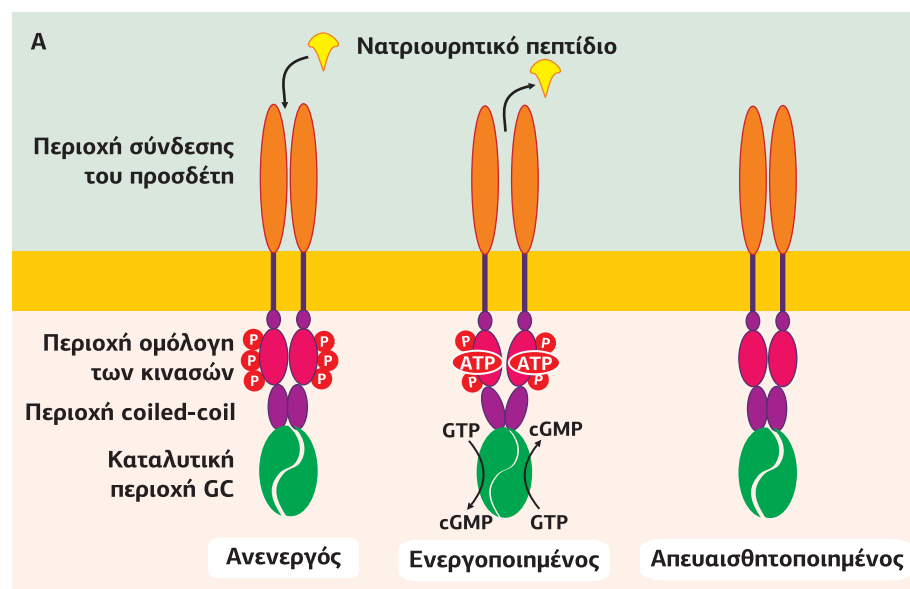
Στην ανενεργή μορφή τους, οι pGCs προϋπάρχουν ως ομοδιμερή σύμπλοκα. Το κάθε μονομερές φωσφορυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο Ser ή Thr στην περιοχή KHD, κάτι που καθιστά τον υποδοχέα ικανό να ενεργοποιηθεί. Η σύνδεση του προσδέτη (π.χ. ANP) στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση του ATP στην περιοχή KHD, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης και ταυτόχρονα στη μείωση της συγγένειας του υποδοχέα (διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας) και στην αποφωσφορυλίωση της KHD. Η αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα σημαίνει αποσύνδεση του ATP και του προσδέτη από τον υποδοχέα, δηλαδή απενεργοποίησή του. Τελικά μένει ο υποδοχέας στην αδρανή μορφή του, μια κατάσταση που ξεπερνιέται με την εκ νέου φωσφορυλίωσή του. [22]



Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στην ενεργοποίηση και απευαισθητοποίηση των pGCs

Γενικά, η φωσφορυλίωση είναι ένας πολύ σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης των pGCs, καθώς οι pGCs πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένες για να είναι δυνατή η ενεργοποίησή τους από τον προσδέτη. Τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνονται βρίσκονται στην περιοχή KHD, αν και οι υπεύθυνες κινάσες δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί. Η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τον υποδοχέα οδηγεί στην πρόσδεση του ATP στην περιοχή KHD και στη μείωση της συγγένειας του υποδοχέα (διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας). Στη συνέχεια, ενεργοποιείται η καταλυτική δράση της γουανυλικής κυκλάσης και, ταυτόχρονα, αποφωσφορυλιώνεται η περιοχή KHD, με αποτέλεσμα την ομόλογη απευαισθητοποίηση της GC (Εικόνα 6.10). Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι αυτός ο μηχανισμός της ομόλογης απευαισθητοποίησης είναι αντίστροφος με τον μηχανισμό ο οποίος απευαισθητοποιεί τους GPCRs, οι οποίοι δεν είναι φωσφορυλιωμένοι στην κατάσταση ηρεμίας, ενώ η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί σε φωσφορυλίωση και απευαισθητοποίησή τους.

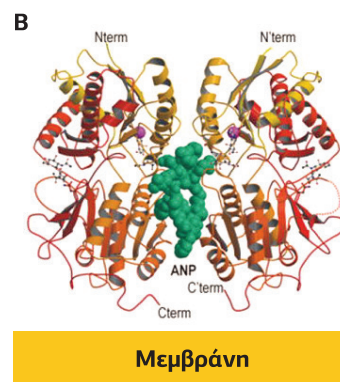
Οι pGCs υπόκεινται και σε ετερόλογη απευαισθητοποίηση, η οποία προκαλείται από την οξική μυριστική φορβόλη (PMA, Phorbol Myristate Acetate), την ενδοθηλίνη, τη βασοπρεσίνη και την αγγειοτενσίνη. Οι προσδέτες αυτοί, μέσω των υποδοχέων τους, συνδέονται με αύξηση του Ca^{2+} και ενεργοποίηση της PKC. Ο παραπάνω μηχανισμός είναι ανεξάρτητος από την αποφωσφορυλίωση που προκαλείται από τη σύνδεση του ANP.



Ρύθμιση των pGC-E και GC-F του αμφιβληστροειδούς μέσω GCAPs

Οι pGCs του αμφιβληστροειδούς (RtGCs, Retinal GCs), GC-E και GC-F, ρυθμίζονται από μια οικογένεια Ca^{2+} -εξαρτώμενων πρωτεϊνών που ονομάζονται **GCAPs** (Guanylyl Cyclase Activating Proteins: πρωτεΐνες που ενεργοποιούν γουανυλικές κυκλάσες). Οι pGC-E και GC-F βρίσκονται στη μεμβράνη των δίσκων των ραβδίων και των κωνίων του αμφιβληστροειδούς και παίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της φωτοδιαβίβασης. Το φως ενεργοποιεί τη ροδοψίνη, η οποία μέσω της cGMP-εξαρτώμενης φωσφοδιεστεράσης PDE6 και της υδρόλυσης του cGMP οδηγεί στο κλείσιμο cGMP-εξαρτώμενων καναλιών $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Η ελάττωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} ενεργοποιεί τις GCAPs που διεγείρουν τις GC-E και GC-F, οι οποίες παράγουν cGMP. Η αύξηση του cGMP ανοίγει τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια Ca^{2+} (σκοτεινό ρεύμα Ca^{2+}), επανασταθεροποιώντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου.

Γενικά, οι GCAPs ενεργοποιούν τις γουανυλικές κυκλάσες GC-E και GC-F όταν



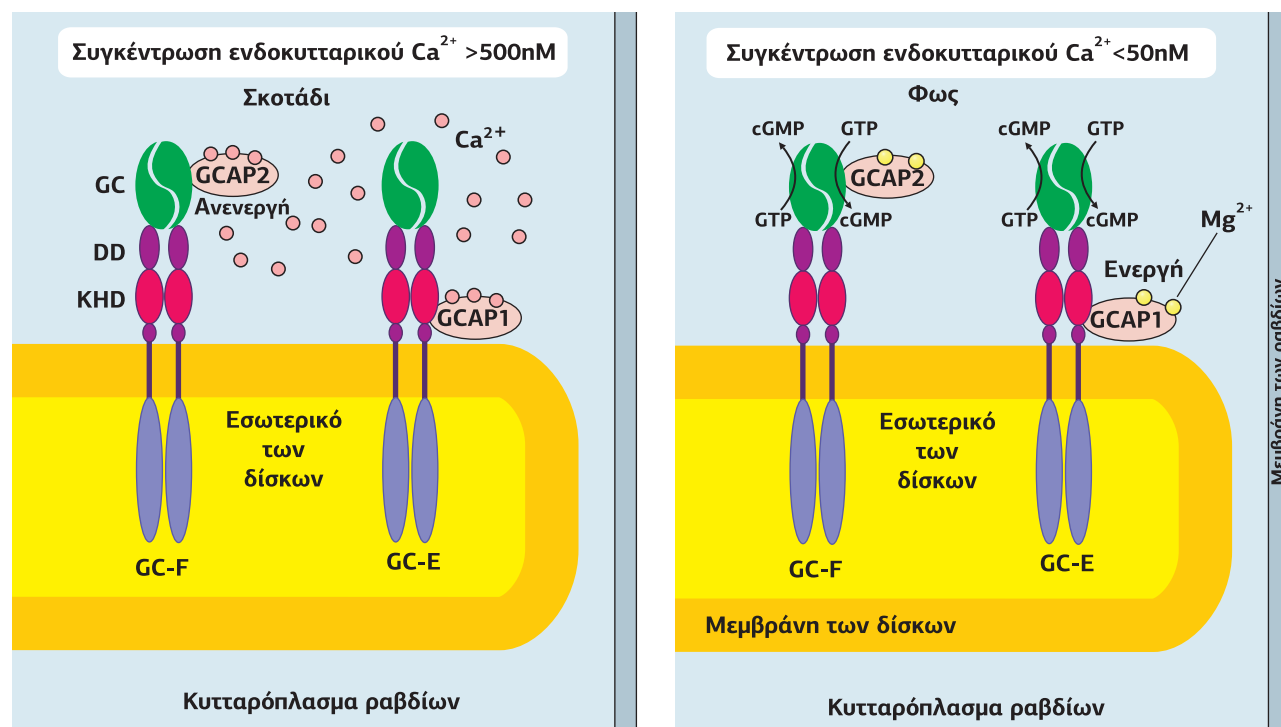
Εικόνα 6.10

Η φωσφορυλίωση είναι σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης των pGCs.

A. Οι pGCs πρέπει να είναι φωσφορυλιωμένες, για να είναι δυνατή η ενεργοποίησή τους. Η αλληλεπίδραση του προσδέτη με τον υποδοχέα ξεκινά μια σειρά διαδοχικών διεργασιών που οδηγούν στην πρόσδεση του ATP στην περιοχή KHD, στην ενεργοποίηση της καταλυτικής δραστηριότητας της γουανυλικής κυκλάσης και, τέλος, στην αποφωσφορυλίωση και απευαισθητοποίησή της. [19] B. Κρυσταλλική δομή της εξωκυτταρικής περιοχής (ECD) της μεμβρανικής γουανυλικής κυκλάσης με συνδεδεμένο το νατριουρητικό πεπτίδιο ANP. [25]

η συγκέντρωση Ca^{2+} είναι ≤ 50 nM και αναστέλλουν τη δράση τους όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} είναι μεγαλύτερη των 500 nM (**Εικόνα 6.11**). Η ενεργοποίηση πραγματοποιείται μέσω δύο μηχανισμών: 1. αύξηση της συχνότητας διμερισμού των καταλυτικών υπομονάδων των γουανυλικών κυκλάσεων και 2. σταθεροποίηση του δεσμού του GTP στην καταλυτική περιοχή των GCs.

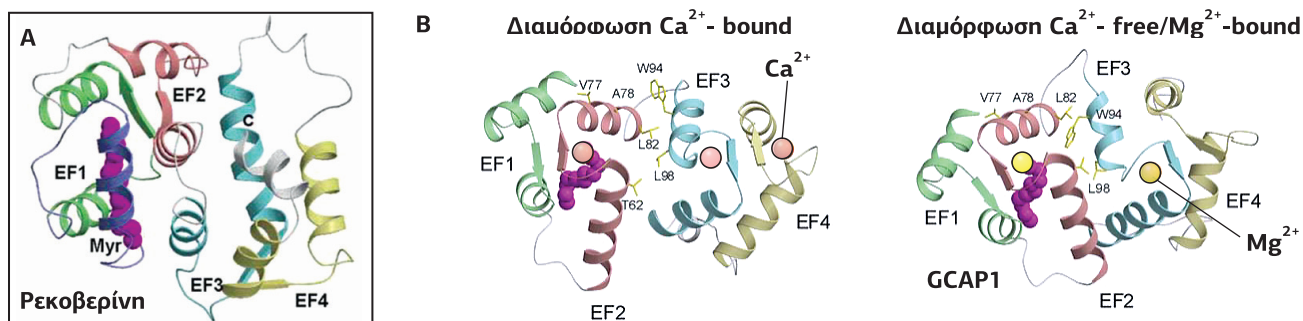
Οι παραπάνω παρατηρήσεις έγιναν μόνο για τις γουανυλικές κυκλάσες του αμφιβληστροειδούς. Για τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας δεν είναι γνωστή η δράση συμπληρωματικών πρωτεϊνών στη ρύθμισή τους.



Εικόνα 6.11
Ρύθμιση των γουανυλικών κυκλάσεων E και F από τις GCAPs. Η GCAP1 συνδέεται στην περιοχή KHD της GC-E, ενώ η GCAP2 συνδέεται στην καταλυτική περιοχή της GC-F. Ενεργοποιούν τις γουανυλικές κυκλάσες όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} είναι κάτω από 50 nM και αναστέλλουν τη δράση τους όταν η συγκέντρωση Ca^{2+} είναι μεγαλύτερη των 500 nM. [33] [14]

Οι πρωτεΐνες GCAPs ανήκουν σε μια ομάδα 16 πρωτεϊνών της υπερικογένειας της καλμοδουλίνης, που εκφράζονται στον εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή και ονομάζονται **νευρωνικοί αισθητήρες Ca^{2+}** (Neuronal Calcium Sensors, NCS). Ενώ η αλληλουχία των αμινοξέων τους είναι υψηλά συντηρημένη (35-60%), οι φυσιολογικές τους λειτουργίες είναι αρκετά διαφορετικές. Η **ρεκοβερίνη** (recoverin) του αμφιβληστροειδούς ελέγχει την Ca^{2+} -εξαρτώμενη απενεργοποίηση της διεγερμένης από το φως ροδοψίνης, ενώ οι **πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη γουανυλική κυκλάση** (Guanylyl Cyclase Activating Proteins, GCAP1 και GCAP2) ελέγχουν την Ca^{2+} -εξαρτώμενη απενεργοποίηση των γουανυλικών κυκλάσεων του αμφιβληστροειδούς. Όλες οι πρωτεΐνες NCS έχουν δύο κοινά δομικά χαρακτηριστικά: α. τέσσερα μοτίβα EF-hands, από τα οποία το πρώτο EF-hand δεν συνδέει Ca^{2+} , και β. μια αλληλουχία στο NH_2 -τελικό άκρο που μυριστοϋλιώνεται. Το 4ο EF-hand (EF4) ποικίλλει, καθώς στις GCAPs μπορεί να συνδέει Ca^{2+} , ενώ στη ρεκοβερίνη όχι (**Εικόνα 6.12**). Η σύνδεση ή όχι του Ca^{2+} στο EF4 της GCAP1 ρυθμίζει αν η GCAP1 θα αναστείλει ή θα ενεργοποιήσει τη γουανυλική κυκλάση, με έναν μηχανισμό που θα περιγράψουμε παρακάτω.

Η **ρεκοβερίνη**, η πρώτη NCS που ανακαλύφθηκε (το 1991), ενεργοποιείται από υψηλά επίπεδα Ca^{2+} έχοντας ως στόχο την κίνηση της ροδοψίνης (GRK1), την οποία απενεργοποιεί. Η ελάττωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , που προκαλείται από το φως, αναστέλλει τη ρεκοβερίνη, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η δράση της GRK1, η οποία φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη ροδοψίνη. Κατά συνέπεια, η ρεκοβερίνη σε χαμηλά επίπεδα Ca^{2+} μειώνει τη διάρκεια ζωής της ροδοψίνης, επιταχύνοντας την προσαρμογή των φωτοϋποδοχέων στο βασικό επίπεδο του φωτός. Η σύνδεση του Ca^{2+} στη ρεκοβερίνη (όταν τα επίπεδα Ca^{2+} είναι υψηλά) οδηγεί στην έκθεση του λιπαρού οξέος στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, στρατολογώντας τη ρεκοβερίνη



στη μεμβράνη των δίσκων των ραβδίων, όπου συναντά και συνδέεται στον στόχο της, την GRK1.

Οι **GCAP1 και 2** ανακαλύφθηκαν το 1994 στα κωνία και τα ραβδία των τρωκτικών και, στη συνέχεια, του ανθρώπου, ενώ η GCAP3 ανακαλύφθηκε το 1999 και εκφράζεται αποκλειστικά στα κωνία του ανθρώπου. Είναι μικρές πρωτεΐνες 24 kDa που περιέχουν 4 EF-hands με διακριτές ιδιότητες σύνδεσης δισθενών κατιόντων Mg^{2+} και Ca^{2+} . Το πρώτο EF-hand (EF1) δεν συνδέει ούτε Ca^{2+} ούτε Mg^{2+} , καθώς απουσιάζει ένα κρίσιμο αμινοξύ στη θέση σύνδεσης του Ca^{2+} , ενώ παρέχει την επιφάνεια διεπαφής με τις RtGCs. Τα άλλα τρία EF-hands (EF2, EF3 και EF4) συνδέουν και τα δύο ιόντα, με διαφορετική συγγένεια. Έχουν μεγάλη συγγένεια για το Ca^{2+} (η K_D είναι της τάξης των nM), ενώ η συγγένεια για το Mg^{2+} είναι ~1.000-φορές χαμηλότερη (K_D της τάξης μ M). Κατά συνέπεια, σε ραβδία προσαρμοσμένα στο σκοτάδι, στα οποία η συγκέντρωση κυτταροπλασματικού Ca^{2+} είναι σχετικά υψηλή [Ca^{2+}]_{free} = 250-500 nM και του [Mg^{2+}] ~1 mM, τρία Ca^{2+} συνδέονται σε ένα mole GCAP1 (στα EF2, EF3 και EF4). Καθώς η ενεργοποίηση των ραβδίων από το φως προκαλεί μια δραματική μείωση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} [Ca^{2+}]_{free} = 5-50 nM, ενώ τα επίπεδα Mg^{2+} παραμένουν σταθερά [Mg^{2+}]_{free} ~1 mM, οι GCAPs αντί για Ca^{2+} συνδέουν τουλάχιστον δύο Mg^{2+} . Η διαμόρφωση Ca^{2+} -free/ Mg^{2+} -bound των GCAPs ενεργοποιεί την RetGC, ενώ η Ca^{2+} -bound διαμόρφωση αναστέλλει την RetGC.

Τα 4 EF-hands της GCAP1 ομαδοποιούνται σε δύο σφαιρικούς τομείς: ο N-τομέας περιλαμβάνει τα EF1 και EF2 (αμινοξέα 18-83) και ο C-τομέας περιέχει τα EF3 και EF4 (αμινοξέα 88-161). Ένα ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό είναι ότι η N-τελική α -έλικα (αμινοξέα 5-15) πριν από το EF1 και η C-τελική έλικα (αμινοξέα 175-183) μετά το EF4 βρίσκονται σε στενή επαφή και σε αλληλεπίδραση με τη μυριστοϋλική αλυσίδα. Η μυριστοϋλική αλυσίδα των GCAPs παραμένει "θαμμένη" στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και δεν συμμετέχει στην Ca^{2+} -εξαρτώμενη αγκυροβόληση στη μεμβράνη, όπως είδαμε στη ρεκοβερίνη. Αντ' αυτού, χρησιμεύει ως γέφυρα ανάμεσα στο NH_2 - και $COOH$ -τελικό άκρο, εξηγώντας πώς η Ca^{2+} -επαγόμενη αλλαγή της διαμόρφωσης του C-τομέα (λόγω της σύνδεσης του Ca^{2+} στο EF4) μπορεί να μεταφερθεί στον N-τομέα και κυρίως στο EF1, επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση του με τη γουανυλική κυκλάση (Εικόνα 6.13).

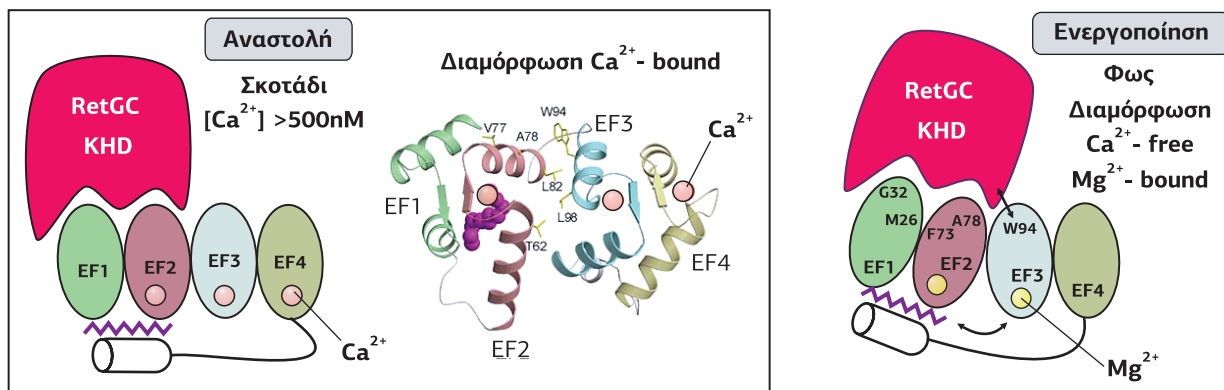
Εικόνα 6.12

Νευρωνικοί αισθητήρες ασβεστίου (NCS). Α. Η Κρυσταλλική δομή της ρεκοβερίνης. Β. Η Κρυσταλλική δομή της GCAP1 στη διαμόρφωση που είναι ικανή να ενεργοποιήσει τη RtGC (με συνδεδεμένα δύο Mg^{2+}) και στην ανασταλτική διαμόρφωση (με συνδεδεμένα τρία Ca^{2+}). Διακρίνεται η μυριστοϋλική ομάδα (με μωβ) και τα τέσσερα EF-hands. [21]

Εικόνα 6.13

Μηχανισμός ενεργοποίησης των RtGCs από τις GCAPs.

Η Ca^{2+} -free κατάσταση της EF4 δημιουργεί μια χαλαρή και δυναμική δομή επιτρέποντας την έκθεση αμινοξέων των EF1, EF2 και EF3, που μεταβάλλουν την επιφάνεια σύνδεσης με τη γουανυλική κυκλάση, οδηγώντας την σε μια ενεργή διαμόρφωση. Αντίθετα, όταν το Ca^{2+} είναι συνδεδεμένο στα τρία EF-hands της GCAP1, η επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τη GC τροποποιείται οδηγώντας στην αναστολή της δραστηριότητας της GC. [21]



3. Διαλυτές γουανυλικές κυκλάσεις (sGCs): Δομή και Ενεργοποίηση

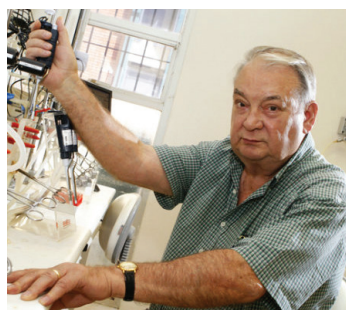
Οι sGCs είναι ετεροδιμερή ένζυμα που αποτελούνται από μία α - και μία β -υπομονάδα και περιέχουν έναν δακτύλιο αίμης. Κάθε υπομονάδα έχει μία NH_2 -τελική ρυθμιστική περιοχή και μία COOH -τελική καταλυτική περιοχή, που παρουσιάζουν ομολογία με τις ανάλογες περιοχές των rGCs. Οι διαλυτές γουανυλικές κυκλάσεις εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα σχεδόν όλων των κυττάρων των θηλαστικών και έχουν ως ενδογενή ενεργοποιητή το NO, του οποίου η βιολογική δράση εξαρτάται από τους ιστούς στους οποίους εκφράζεται. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων απελευθερώνουν NO, το οποίο διαχέεται και εισέρχεται στα γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα, προκαλώντας χάλαση και, κατά συνέπεια, αγγειοδιαστολή. Τα μακροφάγα των σπονδυλωτών παράγουν NO ως μέρος της ανοσολογικής απόκρισης στην εισβολή των βακτηρίων και άλλων παθογόνων. Το NO δρα, επίσης, και ως νευροδιαβιβαστής που χρησιμοποιείται από τους νευρώνες για την ενίσχυση της νευροδιαβίβασης και την ενδυνάμωση της μνήμης.



Robert Francis Furchgott
(1916 – 2009)



Louis J. Ignarro
(1941 -)



Ferid Murad
(1936 - 2023)

3.1 NO, ο κύριος ενδογενής προσδέτης των sGCs

Αν και αποτελεί ένα τοξικό αέριο στην ατμόσφαιρα που απελευθερώνεται από πυρηνικά εργοστάσια και μηχανές αυτοκινήτων, το οξείδιο του αζώτου (NO) είναι ταυτόχρονα ένα αέριο σηματοδοτικό μόριο που συναντάται σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών. Τα τελευταία 30 χρόνια ανακαλύφθηκε ο σπουδαίος ρόλος που διαδραματίζει το NO στη διακυτταρική επικοινωνία και τη μεταγωγή σήματος. Το 1992 το NO ανακηρύχθηκε ως “Το μόριο της Χρονιάς” από το επιστημονικό περιοδικό *Science*, και το 1998 τρεις Αμερικάνοι επιστήμονες, ο Robert Furchgott, ο Louis Ignarro και ο Ferid Murad, μοιράστηκαν το Βραβείο Nobel Ιατρικής για την ανακάλυψη ότι το NO διαστέλλει τα αγγεία του σώματος ρυθμίζοντας έτσι την πίεση του αίματος.

Το NO παράγεται ενδογενώς από την L-αργινίνη, παρουσία NADPH και O_2 , σε μια αντίδραση η οποία καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων, που ονομάζονται **συνθάσες του οξειδίου του αζώτου** (NOS, Nitric Oxide Synthases).

Από τη στιγμή που παράγεται, το NO προκαλεί ποικίλα βιολογικά αποτελέσματα, τα οποία εξαρτώνται εκτός από το μοριακό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και από τη συγκέντρωσή του. Όταν η συγκέντρωση του NO είναι μικρότερη του $1\mu\text{M}$, τότε έχουμε τα **αποτελέσματα χαμηλής συγκέντρωσης**. Το κύριο αποτέλεσμα χαμηλής συγκέντρωσης του NO είναι η επίδρασή του στη διαλυτή γουανυλική κυκλάση (sGC), η οποία μετά τη σύνδεση του NO καταλύει τον σχηματισμό του cGMP από GTP. Όταν η συγκέντρωση του NO είναι μεγαλύτερη από $1\mu\text{M}$, τότε προκύπτουν τα **αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης** και συγκεκριμένα η νιτροσυλίωση, η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης διαφόρων πρωτεϊνών και η απαμίνωση του DNA. Κατά τη διαδικασία της νιτροσυλίωσης, το ιόν νιτροζονίου (nitrosonium ion, NO^+) αντιδρά με τις κυστεΐνες (Cys) διαφόρων πρωτεϊνών και σχηματίζονται νιτροζοθειόλες κυστεΐνης (Cys-NO). Στη νίτρωση της τυροσίνης το υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrite, ONOO^-) αντιδρά με τη φαινολική ομάδα της τυροσίνης, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό νιτροτυροσίνης (Tyr-NO_2). Τέλος, η κυτοσίνη μετατρέπεται σε ουρακίλη με τη διαδικασία της απαμίνωσης του DNA, μέσω του N_2O_3 .

Συνθάσες του NO, NOS

Όπως προαναφέρθηκε, το NO παράγεται από το ένζυμο συνθάση του οξειδίου του αζώτου (NOS). Υπάρχουν 3 γενετικά διακριτές ισομορφές της NOS: NOS-I (nNOS), NOS-II (iNOS) και NOS-III (eNOS). Όλες μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά και δρουν ως ομοδιμερή χρησιμοποιώντας ως βασικό υπόστρωμα την L-αργινίνη και, μέσω δύο διαδοχικών οξειδώσεων, καταλύουν τον σχηματισμό

σμό L-κιτρουλλίνης και NO. Για τη διεξαγωγή της παραπάνω αντίδρασης, συμμετέχουν ως **συνυποστρώματα** το O_2 και το ανηγμένο NADPH (Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide Phosphate) και ως **συμπαράγοντες** το FMN (Flavin Mononucleotide), το FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) και η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4 , 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin). Όλες οι NOS περιέχουν αίμη και συνδέουν την καλμοδουλίνη και ιόντα Zn^{2+} .

Οι NOS αποτελούνται από δύο περιοχές, μια περιοχή οξυγενάσης στο NH_2 -τελικό άκρο και μια περιοχή αναγωγάσης στο $COOH$ -τελικό άκρο, οι οποίες χωρίζονται από ένα κεντρικό μοτίβο, όπου συνδέεται η καλμοδουλίνη. Η περιοχή οξυγενάσης περιέχει την ενεργή θέση σύνδεσης της αίμης και τη θέση σύνδεσης της BH_4 , και η περιοχή αναγωγάσης περιέχει την περιοχή μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπου συνδέονται μονονουκλεοτίδια φλαβίνης FMN και FAD (**Εικόνα 6.14**). Η δραστηριότητα της NOS απαιτεί τη σύνδεση της καλμοδουλίνης, η οποία συνδέεται όταν αυξηθεί η συγκέντρωση Ca^{2+} , τη σύνδεση της BH_4 και τη δημιουργία ενός ομοδιμερούς. Οι nNOS και eNOS περιέχουν μια περιοχή 40-50 αμινοξέων στο μέσον της περιοχής σύνδεσης της FMN, που λειτουργεί ως βρόχος αυτοαναστολής, εμποδίζοντας τη σύνδεση της καλμοδουλίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} , με συνέπεια την αναστολή μεταφοράς ηλεκτρονίων από την FMN στην αίμη. Αυτή η περιοχή απουσιάζει από τη δομή της iNOS, γι' αυτό στην iNOS η καλμοδουλίνη συνδέεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις κυτταροπλασματικού Ca^{2+} (κάτω από 40 nM).

Στις nNOS και eNOS η σύνδεση της καλμοδουλίνης επάγεται από την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} (πάνω από 200-400 nM). Όταν η συγγένεια της καλμοδουλίνης για την NOS αυξάνεται, διευκολύνεται η ροή των ηλεκτρονίων από το NADPH της περιοχής αναγωγάσης στην αίμη της περιοχής οξυγενάσης. Όλες οι NOS περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης Zn^{2+} , μία σε κάθε μονομερές. Ο Zn^{2+} θεωρείται ότι περισσότερο έχει δομικό παρά καταλυτικό ρόλο.

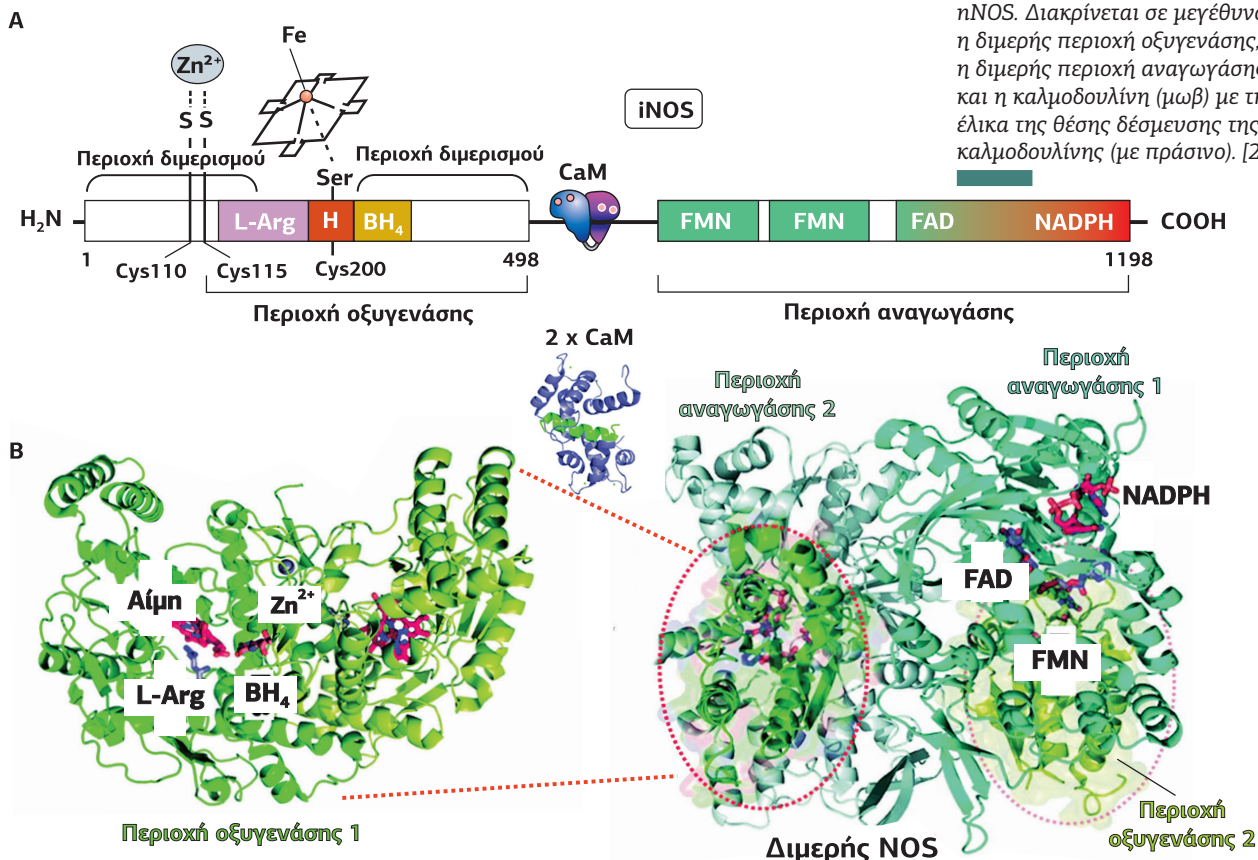
Μια λειτουργική NOS είναι διμερής και μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH

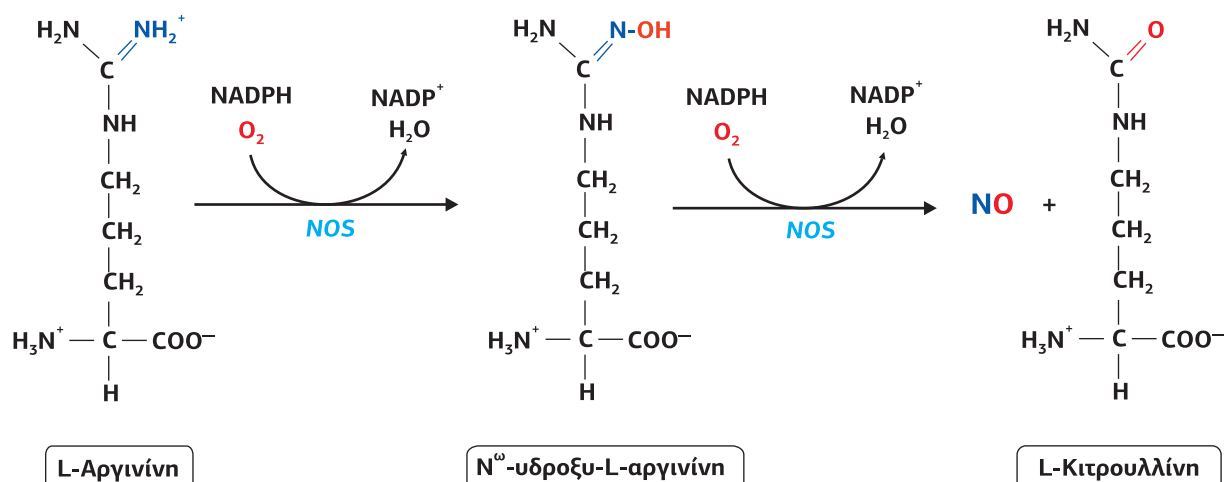
Η τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4) ή σαπροπτερίνη είναι ένας απαραίτητος φυσικός συμπαράγοντας τριών ενζύμων-υδροξυλασών αρωματικών αμινοξέων, που συμμετέχουν στον καταβολισμό της φαινυλαλανίνης και στη βιοσύνθεση των νευροδιαβιβαστών σεροτονίνη, μελατονίνη, ντοπαμίνη, νοραδρεναλίνη, αλλά δρα και ως συμπαράγοντας στην παραγωγή NO από τις συνθάσες του NO.

Εικόνα 6.14

Δομή της iNOS.

A. Διακρίνονται στην NH_2 -τελική περιοχή οξυγενάσης οι θέσεις σύνδεσης για το βασικό υπόστρωμα του ενζύμου L-αργινίνη (Arg), για την αίμη (H) και την τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4). Στην $COOH$ -τελική περιοχή αναγωγάσης διακρίνονται οι θέσεις σύνδεσης του NADPH, του FMN και του FAD, καθώς και η ενδιάμεση περιοχή όπου συνδέεται η καλμοδουλίνη (CaM). [15] B. Κρυσταλλική δομή της nNOS. Διακρίνεται σε μεγέθυνση η διμερής περιοχή οξυγενάσης, η διμερής περιοχή αναγωγάσης και η καλμοδουλίνη (μωβ) με την έλικα της θέσης δέσμευσης της καλμοδουλίνης (με πράσινο). [27]





Εικόνα 6.15
Βιοσύνθεση του NO με τη βοήθεια της NOS σε δύο στάδια. Σε ένα 1ο στάδιο η NOS υδροξυλιώνει την L-αργινίνη σε N^ω-υδροξυ-L-αργινίνη (η οποία παραμένει συνδεδεμένη στο ένζυμο). Σε ένα 2ο στάδιο η NOS οξειδώνει την N^ω-υδροξυ-L-αργινίνη σε L-κιτρουλίνη και NO.

μέσω των φλαβινών FAD και FMN, που συνδέονται στην COOH-τελική περιοχή αναγωγάσης της μίας υπομονάδας, στην αίμη της NH₂-τελικής περιοχής οξυγενάσης της άλλης υπομονάδας. Η περιοχή οξυγενάσης συνδέει, επίσης, τον απαραίτητο συμπαραγόνα BH₄, το μοριακό οξυγόνο O₂ και το υπόστρωμα L-αργινίνη. Στην αίμη τα ηλεκτρόνια χρησιμοποιούνται στην αναγωγή και, συνεπώς, στην ενεργοποίηση του O₂ και στην οξείδωση της L-αργινίνης σε L-κιτρουλίνη και NO. Η σύνθεση του NO από τις NOS γίνεται σε δύο στάδια. Σε ένα 1ο στάδιο η NOS υδροξυλιώνει την L-αργινίνη σε N^ω-υδροξυ-L-αργινίνη (η οποία παραμένει συνδεδεμένη στο ένζυμο). Σε ένα 2ο στάδιο η NOS οξειδώνει την N^ω-υδροξυ-L-αργινίνη σε L-κιτρουλίνη και NO (Εικόνα 6.15).

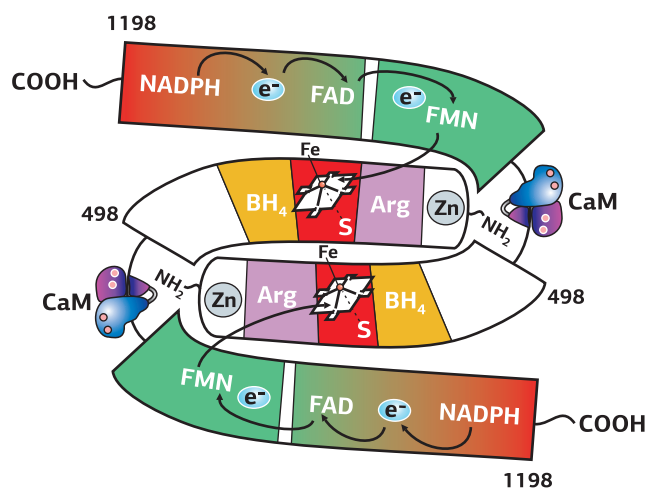
Η NOS στη μονομερή της μορφή είναι ικανή να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στις φλαβίνες FAD και FMN, αλλά έχει μειωμένη ικανότητα να ανάγει το O₂ σε υπεροξείδιο (O₂^{•-}). Επιπλέον, μπορεί να συνδέσει την καλμοδουλίνη (CaM), η οποία αυξάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην περιοχή αναγωγάσης. Ωστόσο, δεν είναι ικανή να συνδέσει τον συμπαραγόνα BH₄ ούτε την L-αργινίνη και, συνεπώς, δεν μπορεί να καταλύσει την παραγωγή NO. Επίσης, δεν μπορεί να μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από τις φλαβίνες στην αίμη, καθώς η αίμη της μιας υπομονάδας προσλαμβάνει τα ηλεκτρόνια από τις φλαβίνες της άλλης υπομονάδας. Όταν το υπόστρωμα L-αργινίνη και ο συμπαραγόνας BH₄ είναι παρόντα, οι διμερείς NOS συνδέουν την αναγωγή της αίμης και του O₂ με τη σύνθεση του NO. Η L-κιτρουλίνη δημιουργείται ως παραπροϊόν (Εικόνα 6.16).

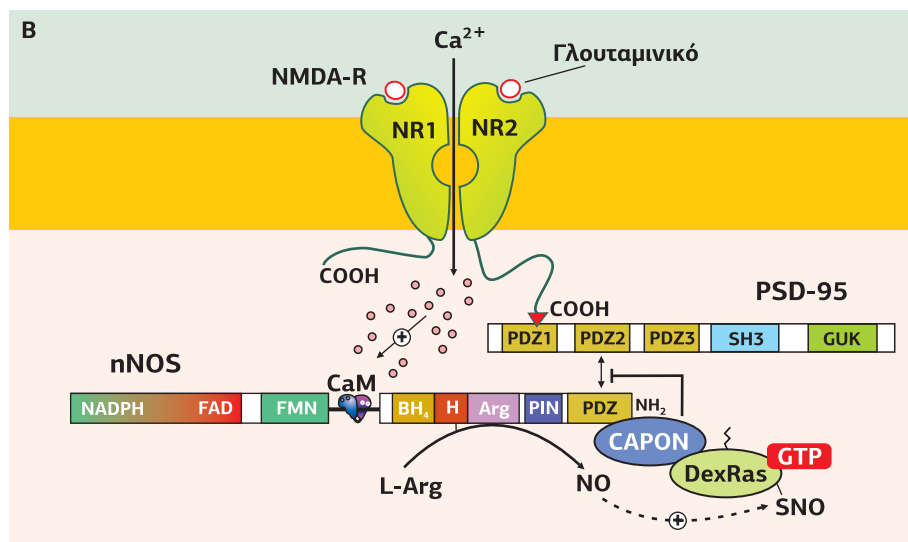
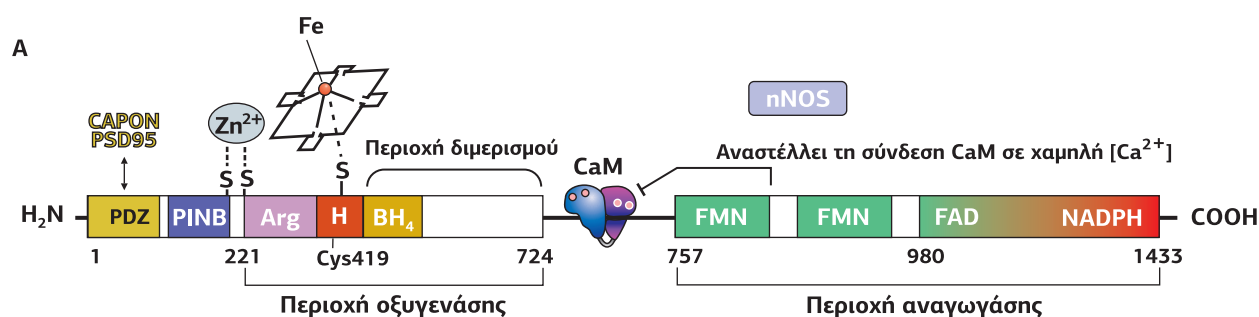
Υπάρχουν 3 γενετικά διακριτές ισομορφές της NOS: NOS-I, NOS-II και NOS-III.

Η **NOS-I ή νευρωνική NOS** (nNOS, neuronal NOS) εκφράζεται ιδιосύστατα στους νευρώνες του εγκεφάλου και ενεργοποιείται από την αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺, μέσω της καλμοδουλίνης. Η nNOS συμμετέχει στη ρύθμιση φυσιολογικών λειτουργιών, όπως μνήμη, μάθηση και νευρογένεση, μεσολαβώντας στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση της συναπτικής διαβίβασης (long-term potentiation, long-term inhibition), ενώ δεν φαίνεται να εμπλέκεται στην άμεση νευροδιαβίβαση.

Η NH₂-τελική περιοχή της nNOS περιέχει μια περιοχή αλληλεπίδρασης PDZ, η οποία συμμετέχει στη δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις. Η περιοχή PDZ βρίσκεται μόνο στις nNOS και δεν συναντάται σε καμία άλλη ισομορφή. Μέσω της PDZ περιοχής, η nNOS συνδέεται με την πρωτεΐνη NOS1AP (Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein) ή CAPON, η οποία είναι άφθονη στον εγκέφαλο και συναγωνίζεται με την πρωτεΐνη

Εικόνα 6.16
Η διμερής μορφή της NOS.
 Διακρίνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADPH και τις φλαβίνες του ενός μονομερούς στην αίμη του άλλου μονομερούς. [41]





Εικόνα 6.17

Δομή και ρόλος της νευρωνικής NOS (nNOS).

A. Δομή της nNOS. Εκτός από την περιοχή αναγωγής και οξυγενάσης διακρίνεται στο NH₂-τελικό άκρο μια περιοχή PDZ, η οποία αλληλεπιδρά με την CAPON και την PSD-95, και μια περιοχή PINB (PIN Binding Domain), όπου συνδέεται η ανασταλτική πρωτεΐνη PIN (Protein Inhibitor of nNOS). Η σύνδεση της PIN αποσταθεροποιεί τη διμερή μορφή της nNOS.

B. Δημιουργία συμπλόκου της nNOS με την πρωτεΐνη σκαλωσίας PSD-95 και τους υποδοχείς NMDA, μέσω PDZ-PDZ αλληλεπιδράσεων. Το τριμερές σύμπλοκο NMDA/ PSD-95/ nNOS συνδέει αποτελεσματικά την είσοδο Ca²⁺ από το κανάλι-υποδοχέα NMDA με την ενεργοποίηση της nNOS. Η nNOS μέσω της PDZ περιοχής της μπορεί, επίσης, να συνδεθεί με την πρωτεΐνη προσαρμογής CAPON. Η GTPάση της υπεροικογένειας Ras DexRas 1 συνδέεται στην CAPON, δημιουργώντας σύμπλοκο DexRas/ CAPON/ nNOS. Η PSD95 αποτελείται από τρεις PDZ περιοχές, μια περιοχή SH3 και μια ανενεργή περιοχή γουανυλικής κινάσης GUK. [41]

σκαλωσίας PSD-95 (Postsynaptic Density 95) για τη σύνδεσή της στην nNOS (βλ. **Εικόνα 4.83**). Υπερέκφραση της CAPON έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του συμπλέγματος PSD-95/nNOS, διαταράσσοντας την προσέλκυση της nNOS στους υποδοχείς NMDA και επηρεάζοντας την Ca²⁺-μεσολαβούμενη παραγωγή NO (**Εικόνα 6.17**). Η DexRas 1 (Dexamethasone-induced Ras protein 1) είναι μια GTPάση της υπεροικογένειας Ras, η οποία εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και συνδέεται στην CAPON, δημιουργώντας σύμπλοκο DexRas/ CAPON/ nNOS. Όπως και οι υπόλοιπες Ras, περιέχει καλά συντηρημένες Cys, που αποτελούν στόχο νιτροσυλίνωσης, η οποία αυξάνει τη δραστηριότητά τους. Η αυξημένη συγκέντρωση NO, η οποία παρατηρείται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οδηγεί στη νιτροσυλίνωση και ενεργοποίηση της DexRas, η οποία συμμετέχει στον κυτταρικό θάνατο και στην απομυελίνωση των νευρώνων.

Η nNOS εκφράζεται, επίσης, στους νευρώνες που απελευθερώνουν NO στους λείους μυς του σπραγγώδους σώματος (corpus cavernosum) του πέους. Στα σπραγγώδη σώματα το NO προκαλεί χάλαση των λείων μυών, η οποία είναι υπεύθυνη για τη στύση του πέους. Τα nNOS knockout ποντίκια είναι σεξουαλικά επιθετικά (μόνο τα αρσενικά).

Η **NOS-II** εκφράζεται στα μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα και, σε αντίθεση με τις ιδιοσυστάτες NOS-I και NOS-III, χαρακτηρίζεται ως **επαγώγιμη** NOS (iNOS, inducible NOS), καθώς η δράση της επάγεται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες και ενδοτοξίνες, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) του τοιχώματος των βακτηρίων, μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα TLR4. Η δράση της είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του Ca²⁺. Ο κύριος ρόλος της iNOS είναι η καταστροφή των εισβαλλόντων μικροοργανισμών, παράγοντας υψηλά επίπεδα NO με ισχυρή κυτταροτοξική δράση. Το NO λόγω της συγγένειάς του για πρωτεΐνες που συνδέουν Fe²⁺, μπορεί να αναστείλει ένζυμα που περιέχουν Fe²⁺ στο ενεργό τους κέντρο, όπως το complex I και II της αναπνευστικής αλυσίδας, η cis-ακονιτάση κ.λπ. Επιπλέον, υψη-

Λότερες συγκεντρώσεις NO, που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, μπορούν να συνδεθούν άμεσα στο DNA των κυττάρων στόχων προκαλώντας τον τεμαχισμό του. Συνεπώς, η ανοσολογική δράση του NO είναι ανεξάρτητη από τις γουανυλικές κυκλάσες. Τα iNOS κνοκκουτ ποντίκια βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή και είναι ευαίσθητα στις βακτηριακές μολύνσεις.

Η **NOS-III ή ενδοθηλιακή NOS** (eNOS, endothelial NOS) εκφράζεται ιδιόσυστατα στα κύτταρα του ενδοθηλίου και ενεργοποιείται από το Ca^{2+} . Το NO που παράγεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε μεταφέρεται στο αίμα, όπου αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, είτε στα γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, των οποίων διεγείρει τη χάλαση προκαλώντας αγγειοδιαστολή. Η αρτηριακή πίεση των eNOS knockout ποντικών είναι 20 mmHg υψηλότερη από των αγρίου τύπου. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν την ύπαρξη των ισομορφών της eNOS και σε άλλους ιστούς, εκτός των προαναφερθέντων.

3.2

Αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης NO, ανεξαρτήτως της sGC

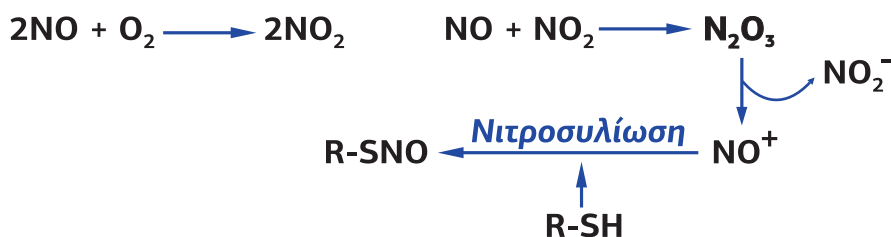
Όταν η συγκέντρωση του NO είναι μεγαλύτερη από 1 μM, τότε προκύπτουν τα αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα η νιτροσουλίωση, η νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης και η απαμίνωση του DNA.

Νιτροσυλίωση

Η νιτροσουλώση (nitrosylation) είναι ένας επιλεκτικός μηχανισμός μετα-μεταγραφικής τροποποίησης που στοχεύει σε συγκεκριμένες κυστεΐνες πρωτεϊνών στόχων και απαιτεί συγκέντρωση NO σε μM . Αρχίζει με αυτοοξειδωση του NO σε NO₂. Η αναλογία σχηματισμού του NO₂ εξαρτάται από τη σύγκρουση δύο μορίων NO. Ο χρόνος ημιζωής του NO είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσής του στο διάλυμα, γιατί όταν η συγκέντρωση του NO είναι μικρή, οι πιθανότητες δύο μορίων να συγκρουσθούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν NO₂ είναι πολύ λίγες και άρα ο χρόνος που παραμένει ως NO στο διάλυμα είναι μεγάλος. Όταν, για παράδειγμα, έχουμε φυσιολογική συγκέντρωση NO, δηλαδή σε επίπεδο nM, ο χρόνος ημιζωής του είναι 70 ώρες, ενώ όταν η συγκέντρωση NO είναι μM , π.χ. κατά τη διάρκεια ισχαιμίας, ο χρόνος ημιζωής του NO είναι της τάξης των 15 min.

Όταν η ποσότητα του NO₂ που παράγεται είναι επαρκής, το NO₂ οξειδώνει το NO σχηματίζοντας N₂O₃ (dinitrogen trioxide). Το N₂O₃, στη συνέχεια, γρήγορα διασπάται σε NO⁺ (nitrosonium ion) και NO₂⁻ (nitrite ion). Το NO⁺ είναι υπεύθυνο για τη νιτροσυλίσωση ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων, όπως οι φαινόλες, οι δευτεροταγείς αμίνες και οι θειόλες (Εικόνα 6.18).

Παρόλα αυτά, η οξείδωση του NO από το NO₂ δεν είναι ο μόνος τρόπος παραγωγής του NO⁺, καθώς η οξείδωση του NO από ενώσεις με σιδηρούχο αίμη, όπως η καταλάση, μπορεί επίσης να παράγει NO⁺.



Εικόνα 6.18

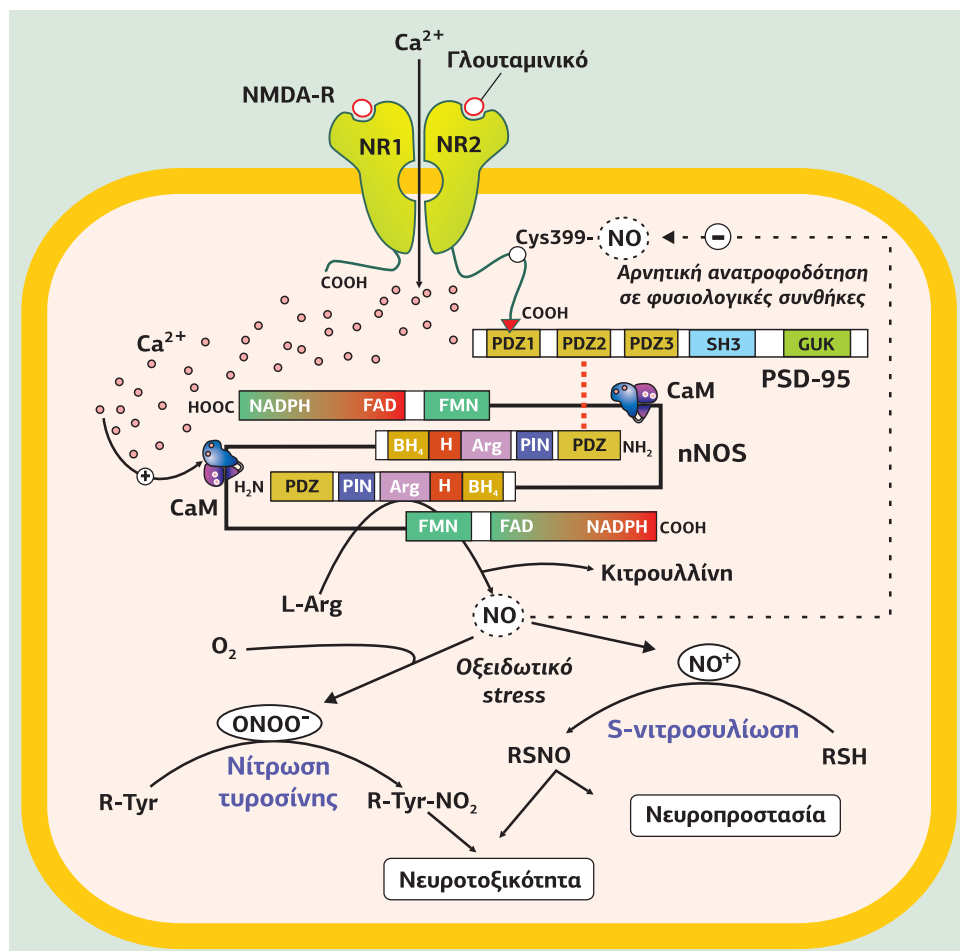
S-Νιτροσουλώση. Αρχίζει με αυτοοξειδωση του NO σε NO₂. Όταν η ποσότητα του NO₂ που παράγεται είναι επαρκής, το NO οξειδώνεται από το NO₂ και σχηματίζεται N₂O₃. Το N₂O₃, στη συνέχεια, διασπάται γρήγορα σε NO⁺ και NO₂⁻. Το NO⁺ είναι υπεύθυνο για την S-νιτροσουλώση ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων (R-SH).

α. Νιτροσουλώση της Ras. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα που αποδεικνύει την επιλεκτικότητα της νιτροσουλώσης είναι η νιτροσουλώση της μονομερούς GTPάσης p21 Ras. Η Ras, όπως έχουμε δει, απαντάται σε δύο μορφές, την ανενεργή (με συνδεδεμένο το GDP) και την ενεργή (με συνδεδεμένο το GTP). Έχει 5 κατάλοιπα

κυστεΐνης και από αυτά μόνο η κυστεΐνη 118, η οποία βρίσκεται στη θέση σύνδεσης των νουκλεοτιδίων γουανίνης, είναι σταθερά νιτροσυλιωμένη. Η S-νιτροσυλίωση της Ras από την iNOS επάγει την ανταλλαγή GDP με GTP και ενεργοποιεί την Ras συνεπιφέροντας την περαιτέρω ενεργοποίηση τελεστών, όπως το μονοπάτι των MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) και το μονοπάτι της PI3-K (Phosphatidylinositol-3 Kinase), με έναν μηχανισμό NO-εξαρτώμενο και cGMP-ανεξάρτητο. Ο ρόλος της iNOS σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπου υπερεκφράζεται, μπορεί να συνδέεται με την S-νιτροσυλίωση των Ras.

β. Νιτροσυλίωση της κασπάσης 3. Ένα άλλο παράδειγμα νιτροσυλίωσης ως σύστημα μεταγωγής αποτελεί η κασπάση 3 (caspase 3), μια πρωτεάση που συμμετέχει στη διαδικασία της απόπτωσης. Το NO ασκεί την αντιαποπτωτική του δράση νιτροσυλιώνοντας επιλεκτικά μία κυστεΐνη στο καταλυτικό κέντρο της κασπάσης 3, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας. Η διέγερση των κυττάρων από τον αποπτωτικό παράγοντα Fas, οδηγεί στην απονιτροσυλίωση και, συνεπώς, στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Ως εκ τούτου, η S-νιτροσυλίωση/απονιτροσυλίωση λειτουργεί ως διακόπτης ON/OFF της δραστηριότητας της κασπάσης 3 κατά την απόπτωση.

γ. Νιτροσυλίωση προσδετο-εξαρτώμενων καναλιών ιόντων. Το γλουταμινικό είναι ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ και οι ιοντοτροπικοί NMDA υποδοχείς συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η νευρωνική ανάπτυξη, η πλαστικότητα και η μακρόχρονη ενδυνάμωση (long-term potentiation). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA οδηγεί σε είσοδο Ca^{2+} και ενεργοποίηση της nNOS, με την οποία συνδέονται οι NMDA-Rs μέσω της PSD-95. Η αυξημένη συγκέντρωση NO μειώνει τη δραστηριότητα των υποδοχέων NMDA



Εικόνα 6.19

Η υπέρμετρη ενεργοποίηση των γλουταμινικών ιοντοτροπικών υποδοχέων NMDA, που συναντάται σε παθολογικές καταστάσεις, π.χ. στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις ενδοκυτταρικού Ca^{2+} . Αυτό προκαλεί υπερενεργοποίηση της nNOS και υπερβολικά αυξημένα ποσά NO. Το NO μέσω της S-νιτροσυλίωσης ή της νίτρωσης καταλοίπων τυροσίνης συμμετέχει στην καταστροφή των νευρώνων. [2]

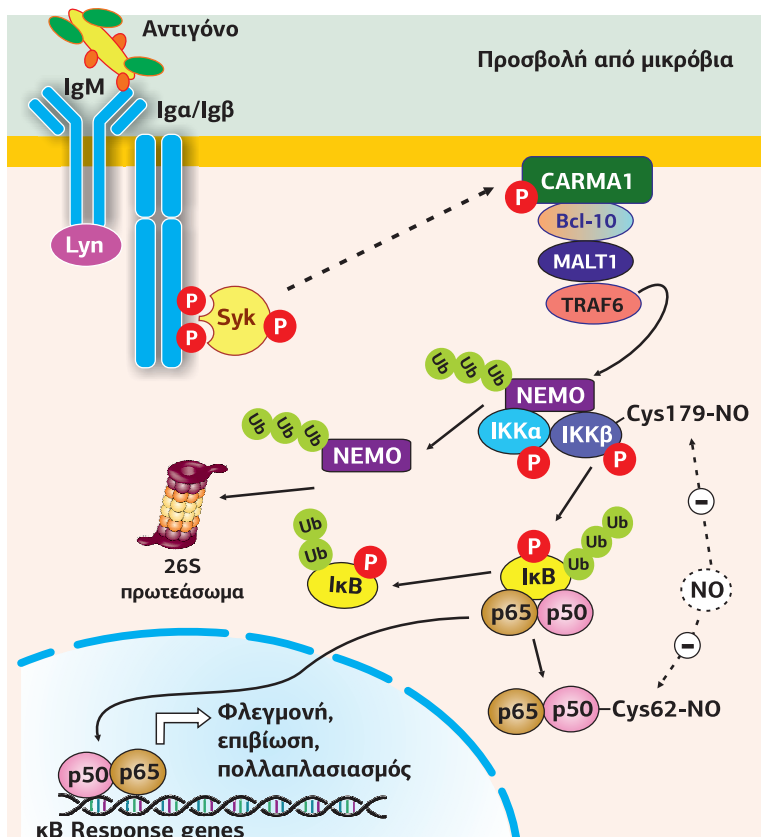
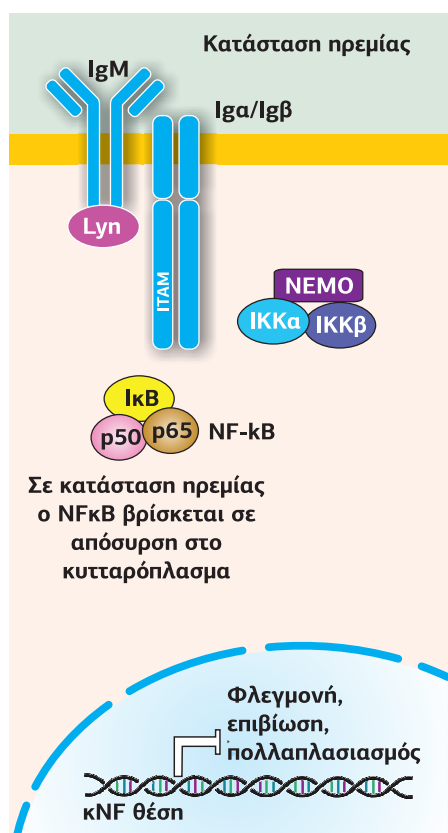
μέσω S-νιτροσυλίσωσης της κυστεΐνης 399 της NR2A υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση λειτουργεί ως feed-back negative μηχανισμός, που οδηγεί σε μείωση της αγωγιμότητας Ca^{2+} και βοηθά στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του Ca^{2+} . Ωστόσο, η υπερενεργοποίηση των NMDA-Rs, που συμβαίνει για παράδειγμα στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οδηγεί σε υπέρμετρη είσοδο Ca^{2+} , δημιουργία ελεύθερων ριζών RNS και ανώμαλη ενζυμική δραστηριότητα, συμμετέχοντας στον θάνατο των νευρώνων. Σε περίπτωση παθολογικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} , έχουμε υπερενεργοποίηση της nNOS, υπέρμετρη αύξηση του NO, το οποίο μέσω της νίτρωσης, που θα δούμε στη συνέχεια, συμμετέχει στον θάνατο των νευρώνων (Εικόνα 6.19).

Ο υποδοχέας ρυανοδίνης είναι ένα κανάλι Ca^{2+} που ρυθμίζει την απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στους μυς. Ο υποδοχέας ρυανοδίνης RyR2 που εκφράζεται στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα έχει 84 κατάλοιπα κυστεΐνης, 12 από τα οποία μπορούν να νιτροσυλιωθούν. Έχει βρεθεί ότι η αυξημένη δραστηριότητα της NOS των καρδιακών κυττάρων οδηγεί στην S-νιτροσυλίωση των RyR2 (βλ. Εικόνα 1.18), με αποτέλεσμα την προοδευτική αύξηση της αγωγιμότητας Ca^{2+} επηρεάζοντας τη συσταλτικότητα της καρδιάς.

δ. Νιτροσυλίωση μεταγραφικών παραγόντων. Ο NF-κΒ (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από μία p50 και μία p65 υπομονάδα και εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μεταφράζουν τοξικά ή φλεγμονώδη ερεθίσματα σε μια συντονισμένη ενεργοποίηση γονιδίων, που κωδικοποιούν για κυτοκίνες, υποδοχείς κυτοκινών, μόρια προσκόλλησης και αντιαποπτωτικούς παράγοντες. Ο NF-κΒ είναι ένας παράγοντας κλειδί στην ανοσολογική και αντιφλεγμονώδη απόκριση, καθώς και στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ανώμαλη ρύθμισή του συνδέεται με τον καρκίνο, αυτοάνοσες ασθένειες, σπητικό shock και ανώμαλη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος.

Εικόνα 6.20

Η S-νιτροσυλίωση της υπομονάδας p50 του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αναστέλλει τη σύνδεσή του στο DNA. Επιπλέον, η S-νιτροσυλίωση της καταλυτικής υπομονάδας IKKβ αναστέλλει την κινάση IKK, εμποδίζοντας την ουβικουτίνωση και, συνεπώς, την πρωτεόλυση του αναστολέα IκΒ. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι το ίδιο: αναστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για την αντιμετώπιση της φλεγμονής.



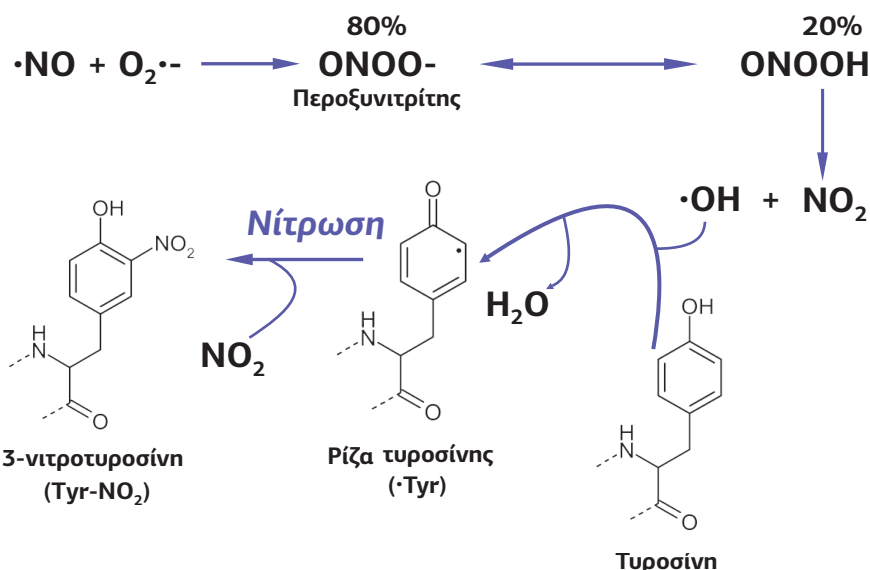
Σε κατάσταση ηρεμίας ο NF-κΒ βρίσκεται σε “απόσυρση” στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένος με τον αναστολέα IκΒ (Inhibitor of NF-κΒ). Διεγερτικά ερεθίσματα, όπως αντιγόνα ενεργοποιούν τους υποδοχείς TcRs, BcRs, οι οποίοι επάγουν τη φωσφορυλίωση του IκΒ από το σύμπλοκο IκΒ-κινάσης (IKKα, IKKβ και IKKγ ή NEMO), που οδηγεί στην ουβικουιτίνωση του IκΒ και την αποικοδόμησή του στα 26S πρωτεασώματα. Ως αποτέλεσμα, ο NF-κΒ μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου συνδέεται στους επαγωγείς των αντιφλεγμονωδών γονιδίων (βλ. **Εικόνα 9.34**, και **9.41**). Η S-νιτροσουλίσωση της Cys62, η οποία βρίσκεται στον βρόχο σύνδεσης στο DNA της p50 υπομονάδας του NF-κΒ, είτε από εξωγενές NO είτε ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της iNOS, αναστέλλει τη σύνδεση του NF-κΒ στο DNA, την ενεργοποίηση του επαγωγέα και άρα τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Επίσης, η φωσφορυλίωση του IκΒ από την ενεργοποιημένη IKK καταστέλλεται από αυξημένη συγκέντρωση NO, η οποία οδηγεί στην S-νιτροσουλίσωση της Cys179, που βρίσκεται στον βρόχο ενεργοποίησης “activation loop” της καταλυτικής υπομονάδας IKKβ, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της κινάσης IKK. Συνεπώς, η S-νιτροσουλίσωση εκτός του ότι αναστέλλει τη σύνδεση του NF-κΒ στο DNA, αναστέλλει και την πρωτεόλυση του IκΒ (**Εικόνα 6.20**).

Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης

Η νίτρωση (nitration) συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης πρωτεϊνών στόχων σε 3-νιτροτυροσίνη αντιπροσωπεύει μια οξειδωτική μετα-μεταγραφική τροποποίηση με καταστροφικά για το κύτταρο αποτελέσματα. Η τοξική δράση του $\cdot\text{NO}$ εξαρτάται από τη δημιουργία δευτερογενών ενδιάμεσων, όπως η ρίζα υπεροξεινιτρώδους ή **περοξυνιτρίτης** (peroxynitrite, ONOO^-) και η ρίζα **διοξειδίου του αζώτου** ($\cdot\text{NO}_2$), που είναι πολύ πιο δραστικά και τοξικά από το $\cdot\text{NO}$. Η δημιουργία αυτών των δραστικών ριζών αζώτου (RNS, Reactive Nitrogen Species) απαιτεί αυξημένες συγκεντρώσεις $\cdot\text{NO}$ και οξειδωτικών (π.χ. ρίζα υπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$)). Στα βιολογικά συστήματα το ONOO^- βρίσκεται σε ισορροπία με το συζευγμένο του οξύ ONOOH . Το 80% του υπεροξεινιτρώδους βρίσκεται με τη μορφή ONOO^- , ενώ το 20% ως ONOOH . Ωστόσο, ο περοξυνιτρίτης δεν αντιδρά άμεσα με την τυροσίνη. Η δραστικότητά του οφείλεται κατά κύριο λόγο στο συζευγμένο οξύ ONOOH , το οποίο είναι μόριο ασταθές (έχει χρόνο ημιζωής 5-20 msec) και διασπάται ταχύτατα σε διοξείδιο του αζώτου NO_2 και ρίζα υδροξυλίου $\cdot\text{OH}$. Τα προϊόντα αυτής της διάσπασης προκαλούν νίτρωση της τυροσίνης, η οποία επιτελείται σε 2 στάδια: αρχικά προσβολή της τυροσίνης από τη ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και δημιουργία ρίζας τυροσίνης ($\cdot\text{Tyr}$) και, σε δεύτερο στάδιο, ομοιοπολική σύνδεση του NO_2 στην 3-ορθο-θέση του αρωματικού δακτυλίου της $\cdot\text{Tyr}$, με παραγωγή 3-νιτροτυροσίνης (Tyr-NO_2) (**Εικόνα 6.21**). Το διοξείδιο του αζώτου (NO_2) μπορεί, επίσης, να σχημα-

Εικόνα 6.21

Η Νίτρωση καταλοίπων τυροσίνης. Η τοξική δράση του $\cdot\text{NO}$ εξαρτάται από τη δημιουργία δραστικών ριζών αζώτου (RNS), όπως ο περοξυνιτρίτης (ONOO^-) και η ρίζα διοξειδίου του αζώτου ($\cdot\text{NO}_2$). Η δημιουργία του ONOO^- απαιτεί αυξημένες συγκεντρώσεις $\cdot\text{NO}$ και $\text{O}_2\cdot^-$. Στα βιολογικά συστήματα το ONOO^- βρίσκεται σε ισορροπία με το συζευγμένο του οξύ ONOOH . Το 80% του υπεροξεινιτρώδους βρίσκεται με τη μορφή ONOO^- , ενώ το 20% ως ONOOH , το οποίο είναι μόριο ασταθές και διασπάται ταχύτατα σε NO_2 και $\cdot\text{OH}$. Τα προϊόντα αυτής της διάσπασης προκαλούν νίτρωση της τυροσίνης, η οποία επιτελείται σε 2 στάδια: αρχικά οξείδωση της τυροσίνης και δημιουργία ρίζας τυροσίνης ($\cdot\text{Tyr}$) και, σε δεύτερο στάδιο, σύνδεση του NO_2 στην $\cdot\text{Tyr}$, με παραγωγή 3-νιτροτυροσίνης (Tyr-NO_2).



τισθεί σε υδρόφοβο περιβάλλον από την αντίδραση του $\bullet\text{NO}$ με το O_2 , όταν και τα δύο βρίσκονται σε αυξημένες ποσότητες.

Η νίτρωση τυροσίνης είναι κυρίως μια μη ενζυμική διαδικασία, η οποία βασίζεται σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Λόγω της μικρής βιολογικής ημιζωής του υπεροξυνιτρώδους οι πρωτεΐνες στόχοι πρέπει να βρίσκονται κοντά στις υποκυτταρικές περιοχές που παράγονται οι δραστικές ρίζες αζώτου. Η νίτρωση οδηγεί σε σημαντικές δομικές και λειτουργικές αλλαγές, ορισμένες από τις οποίες συμβάλλουν στη μεταβολή της κυτταρικής ομοιόστασης.

Παρά το γεγονός ότι η χημεία της νίτρωσης δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη, έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον προσδιορισμό των υποστρωμάτων για νίτρωση. Νίτρωση υφίστανται συγκεκριμένες τυροσίνες πρωτεϊνών κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, ενώ ο ρυθμός αυξάνεται κάτω από συνθήκες οξειδωτικού stress και αυξημένης συγκέντρωσης $\bullet\text{NO}$ (π.χ. κατά τη φλεγμονή).

Πρωτεΐνες που μπορούν να υποστούν νίτρωση είναι η συνθάση της προστακυκλίνης, η κυκλοοξυγενάση (COX1), η υπεροξειδική δισμουτάση και η αντλία SERCA, οι οποίες αναστέλλονται, καθώς και η συνθάση της προσταγλανδίνης H_2 , η οποία ενεργοποιείται. Το ότι η νίτρωση τυροσίνης αποτελεί μηχανισμό μεταγωγής υποστηρίζεται από την ανακάλυψη του ενζύμου απονιτράση (denitrase). Πρόκειται για ένα ένζυμο αντίστοιχο της απονιτροσυλάσης, που αντιστρέφει το αποτέλεσμα της νίτρωσης. Η νίτρωση σχετίζεται με ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση, το Alzheimer, το Parkinson και η πλάγια αμυλοτροφική σκλήρυνση (ALS).

Ο ρόλος της νίτρωσης τυροσίνης στην αθηροσκλήρωση έχει πολλές όψεις. Η ισχύουσα θεωρία είναι ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν την iNOS. Η ενεργοποιημένη iNOS, στη συνέχεια, παράγει μεγάλες ποσότητες NO, ώστε να μπορεί να σχηματίσει υπεροξυνιτρώδες. Η προστακυκλίνη, η οποία παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της ομώνυμης συνθάσης, προκαλεί αγγειοδιαστολή και εμποδίζει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Η νίτρωση της συνθάσης της προστακυκλίνης οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή προστακυκλίνης, συμμετέχοντας στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που συνδέεται με την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών. Οι πλάκες αυτές προκαλούν στένωση ή και απόφραξη των αρτηριών, που έχει ως αποτέλεσμα την ισχαιμία ιστών και οργάνων.

3.3 | Δομή και ισομορφές των sGCs

Οι διαλυτές γουανυλικές κυκλάσες εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς. Οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος, οι νεφροί και ο αγγειακός ιστός είναι πλούσιοι σε sGCs. Ανάλυση των sGCs από διαφορετικούς ιστούς έδειξε πολλαπλές ισομορφές με διαφορετική σύνθεση υπομονάδων. Οι πιο συχνές υπομονάδες είναι οι $\alpha 1$ και $\beta 1$. Μεμονωμένη έκφραση της $\alpha 1$ ή της $\beta 1$ δεν εμφανίζει καταλυτική δραστηριότητα, ενώ συνέκφραση των $\alpha 1$ και $\beta 1$ δημιουργεί μια sGC, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από το NO.

Η $\beta 1$ υπομονάδα αποτελείται από 619 αμινοξέα και περιέχει στο NH_2 -τελικό άκρο μια εξελικτικά συντηρημένη περιοχή 200 αμινοξέων, που χρησιμεύει για τη σύνδεση της αίμης, μια περιοχή διμερισμού και μια καταλυτική περιοχή 250 αμινοξέων στο COOH -τελικό άκρο. Η $\beta 2$ υπομονάδα (~76 kDa) περιέχει 86 επιπλέον αμινοξέα στο COOH -τελικό της άκρο από το αντίστοιχο της $\beta 1$. Η πρόσθετη περιοχή περιέχει μια αλληλουχία CaaX, η οποία επιτρέπει την ισοπρενυλίωση, με αποτέλεσμα η $\beta 2$ να μπορεί να προσκολλάται στις μεμβράνες. Η $\beta 2$ υπομονάδα μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερές με την $\alpha 1$, αλλά αυτό το ολοένζυμο εμφανίζει μικρότερη εξειδικευμένη δραστηριότητα σε σχέση με το $\alpha 1\beta 1$. Το $\alpha 1\beta 1$ παράγει περισσότερο cGMP από το $\alpha 1\beta 2$.

Η ανθρώπινη $\alpha 1$ υπομονάδα αποτελείται από 717 αμινοξέα και εμφανίζει 34% ομολογία με την $\beta 1$. Η $\alpha 2$ υπομονάδα (~82 kDa) εμφανίζει 48% ομολογία με την $\alpha 1$ και σχηματίζει ετεροδιμερή με τις $\beta 1$ και $\beta 2$ (λιγότερο με $\beta 1$). Η $\alpha 2\beta 1$ έχει χαμηλότερη εξειδικευμένη δραστηριότητα από την $\alpha 1\beta 1$. Δύο άλλες υπομονάδες της

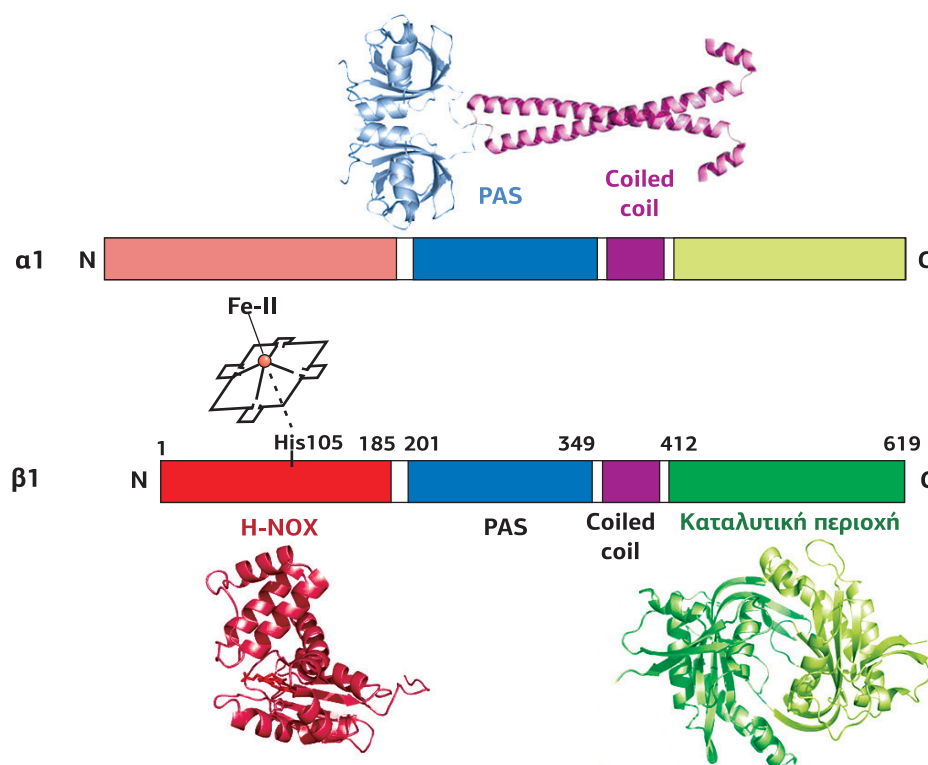
sGC είναι οι $\alpha 3$ και $\beta 3$. Αυτές οι πρωτεΐνες πρωτοκαταγράφησαν στα θηλαστικά, υπάρχουν όμως και στα έντομα, όπως η *Drosophila*, και στα ψάρια.

Δομή των υπομονάδων

Η απομόνωση της sGC το 1980 από τους πνεύμονες αρουραίων έδειξε ότι πρόκειται για μια ετεροδιμερή αιμοπρωτεΐνη που συνδέει NO και CO, όχι όμως O_2 . Αποτελείται από δύο υπομονάδες, α και β . Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 διακριτές περιοχές. Η $\beta 1$ υπομονάδα περιέχει μια NH_2 -τελική περιοχή πρόσδεσης της αίμης, μια περιοχή Per/Arnt/Sim (PAS), μια περιοχή coiled-coil και την $COOH$ -τελική καταλυτική περιοχή (Εικόνα 6.22, 6.23).

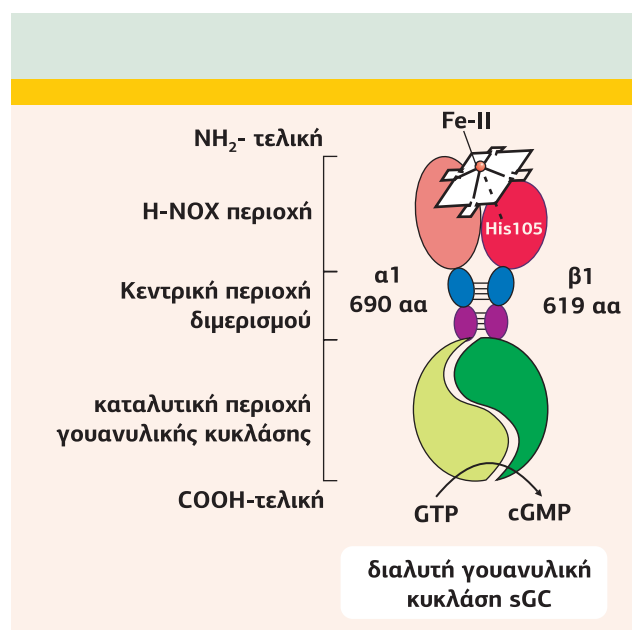
Η **περιοχή πρόσδεσης της αίμης** βρίσκεται στο NH_2 -τελικό άκρο κάθε υπομονάδας και είναι η θέση πρόσδεσης του NO. Η His105 στο NH_2 -τελικό άκρο της $\beta 1$ υπομονάδας είναι ο αξονικός προσδέτης του πεντασυντονισμένου ανηγμένου κέντρου σιδήρου της αίμης. Η His105 και η προσθετική ομάδα της αίμης, που περιέχει τον ανηγμένο σίδηρο, απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου από το NO. Μετάλλαξη της His έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία της sGC να προσδένει την αίμη και έτσι παράγεται ένα ένζυμο που δεν αποκρίνεται στο NO. Η αίμη της GC έχει υψηλή συγγένεια για το NO, σε αντίθεση με την αίμη της αιμοσφαιρίνης, που έχει υψηλή συγγένεια για O_2 . Το NH_2 -τελικό άκρο της $\alpha 1$ υπομονάδας είναι ομόλογο με το NH_2 -τελικό άκρο της $\beta 1$ υπομονάδας, με μεγάλη συγγένεια για την αίμη, αλλά λείπει η His που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της αίμης.

Η NH_2 -τελική περιοχή της sGC αποτελεί μέρος μιας καλά συντηρημένης οικογένειας πρωτεϊνών που συναντώνται και στους προκαρυωτικούς και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας χαρακτηρίζονται ως πρωτεΐνες που συνδέουν αίμη-NO (Heme-Nitric Oxide Binding), αισθητήρες NO (Sensors of Nitric Oxide) ή πρωτεΐνες που συνδέουν αίμη-NO και O_2 (Heme-Nitric Oxide and oxygen binding, H-NOX). **H-NOX** είναι η πιο κοινή συντόμηση που χρησιμοποιείται για αυτήν την οικογένεια. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς H-NOX πρωτεΐνες είναι μόνο οι sGCs, ενώ στα βακτήρια οι H-NOX συχνά αποτελούν τμήμα ενός συμπλόκου που περιέχει και μια κινάση His και παίζει ρόλο στη χημειοταξία.



Εικόνα 6.22

Οι περιοχές που απαρτίζουν τις δύο υπομονάδες (α και β) της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 4 διακριτές περιοχές: Μια NH_2 -τελική περιοχή πρόσδεσης της αίμης (ωστόσο, μόνο η $\beta 1$ προσδένει την αίμη μέσω της His105, η οποία απουσιάζει από την $\alpha 1$ υπομονάδα), μια περιοχή Per/Arnt/Sim (PAS), μια περιοχή coiled-coil και την $COOH$ -τελική καταλυτική περιοχή. [44]



Εικόνα 6.23
Σχηματική αναπαράσταση της δομής της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC). Οι διαλυτές γουανυλικές κυκλάσες αποτελούνται από δύο υπομονάδες, α και β . Η κάθε υπομονάδα περιέχει μία περιοχή σύνδεσης της αίμης, μία περιοχή PAS/coiled-coil, που δρα ως περιοχή διμερισμού, και μία καταλυτική περιοχή. [30]

3.4

Ενεργοποίηση και ρύθμιση των sGCs

Για να εκφραστεί η βασική καταλυτική δραστηριότητα και ενεργοποίηση της sGC από το NO, είναι απαραίτητες και οι δύο υπομονάδες, $\alpha 1$ και $\beta 1$. Η sGC ενεργοποιείται από το NO σε 3 στάδια:

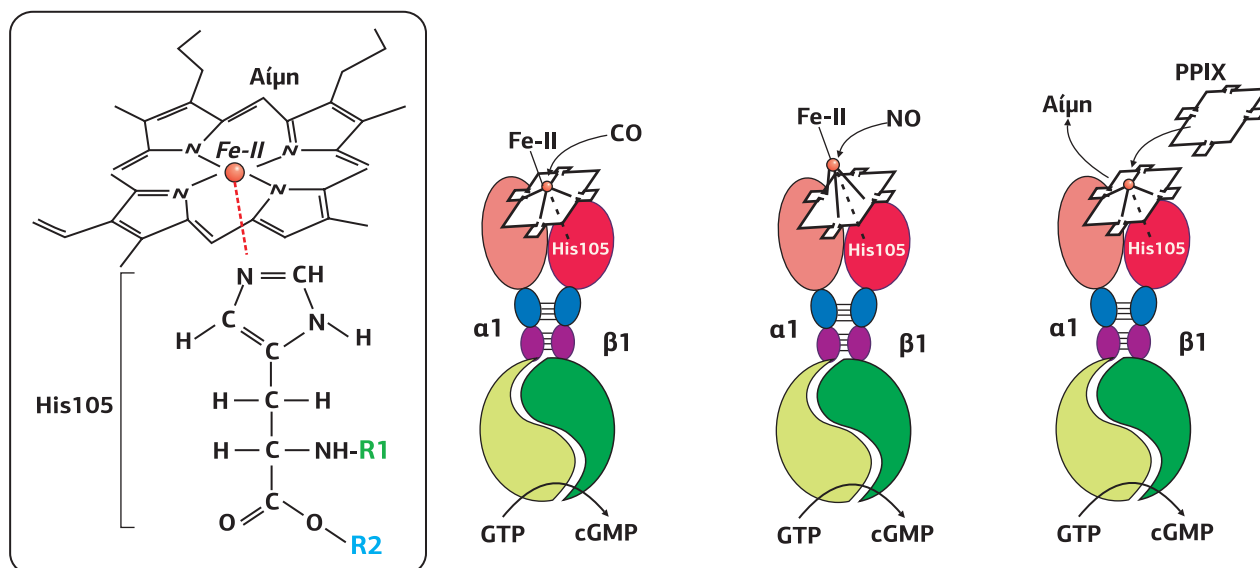
1. Αρχικά το ένζυμο είναι απενεργοποιημένο, αφού το NO δεν είναι συνδεδεμένο με αυτό. Ο Fe^{2+} της αίμης σε αυτό το στάδιο είναι πεντασυντονισμένος. Σχηματίζει έναν πορφυρινικό δακτύλιο στο μόριο της αίμης και έναν αξονικό δεσμό με την His105 της $\beta 1$ υπομονάδας.
2. Όταν το NO συνδεθεί με τον Fe^{2+} της αίμης, δημιουργείται ένα σύμπλοκο ανάμεσα στο NO-Fe^{2+} και ο Fe^{2+} γίνεται εξασυντονισμένος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η καταλυτική δράση της sGC κατά 4 φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά της επίπεδα.
3. Μετά τη σύνδεση του NO με την αίμη σπάει ο δεσμός ανάμεσα στον Fe^{2+} και στην His105 της $\beta 1$ υπομονάδας, ο Fe^{2+} απομακρύνεται και ο πορφυρινικός δακτύλιος ανοίγει. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η δράση του ενζύμου κατά 100 φορές, δηλαδή συνολικά κατά 400 φορές.

Το CO έχει, επίσης, την ικανότητα να συνδέεται απευθείας στην αίμη, αλλά είναι ασθενέστερος ενεργοποιητής της sGC από ό,τι το NO. Για παράδειγμα, ενώ το NO ενεργοποιεί τη sGC 100-200 φορές, το CO την ενεργοποιεί μόνο 4 φορές. Επίσης, είναι ασαφές αν το σήμα του CO έχει κάποιο φυσιολογικό αντίκτυπο. Η πρωτοπορφυρίνη IX (PPIX) είναι το πρόδρομο μόριο της αίμης και συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στην sGC (K_D 1,4 nM) μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του δακτυλίου της πορφυρίνης και της sGC, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο (**Εικόνα 6.24**).

Όπως η pGC, έτσι και η sGC απαιτούν δισθενή κατίοντα ως συμπράγοντες υποστρώματος και αλλοστερικούς τροποποιητές, ώστε να εκφραστεί η μέγιστη καταλυτική τους δραστηριότητα. Χρησιμοποιώντας Mg^{2+} ως συμπράγοντα υποστρώματος, οι pGCs και sGCs εμφανίζουν μια βασική καταλυτική δραστηριότητα, η οποία είναι ευαίσθητη σε περαιτέρω ενεργοποίηση από ATP και προσδέτες. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας Mn^{2+} , οι sGCs εμφανίζουν τη μέγιστη καταλυτική τους δραστηριότητα, η οποία δεν μπορεί να αυξηθεί επιπλέον, παρουσία ATP και προσδετών. Το Ca^{2+} παίζει, επίσης, τον ρόλο του συμπράγοντα υποστρώματος, αλλά εμφανίζεται να είναι αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής της sGC. Το Ca^{2+} και το cGMP

Οι περιοχές **Per/Arnt/Sim (PAS)** και **coiled-coil** αποτελούν το κεντρικό τμήμα της sGC, αλλά ο ρόλος τους δεν είναι ακόμη σαφώς προσδιορισμένος. Γενικά, οι περιοχές PAS συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών, ενώ συχνά έχει βρεθεί ότι συνδέουν αίμη, φλαβίνες και νουκλεοτίδια. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης έδειξαν ότι η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία λειτουργικών ετεροδιμερών.

Οι COOH-τελικές περιοχές των $\alpha 1$ και $\beta 1$ υπομονάδων αποτελούν την **καταλυτική περιοχή** της sGC και εμφανίζουν μεγάλη ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των pGCs και των αδενυλικών κυκλάσεων. Απαραίτητα αμινοξέα για τη δράση αυτής της καταλυτικής περιοχής είναι: δύο καλά συντηρημένα κατάλοιπα Asp της $\alpha 1$ υπομονάδας (D485, D529), που συνδέουν δύο ιόντα Mg^{2+} , το N548 της $\beta 1$ υπομονάδας, που προσανατολίζει τον δακτύλιο ριβόζης για την αντίδραση, και τα R552 της $\beta 1$ και R573 της $\alpha 1$, που αλληλεπιδρούν με το τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο.



έχουν ανταγωνιστική δράση σε πολλά φυσιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, η συστολή των λείων μυών των αγγείων επάγεται από αύξηση του $[Ca^{2+}]_i$, ενώ η χάλασή τους από την αύξηση του $[cGMP]_i$.

4. Οι Τελεστές του cGMP

Ενδογενείς κι εξωγενείς προσδέτες, όπως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές ή τοξίνες, προκαλούν την απόκριση του κυττάρου μέσω μονοπατιών που ενεργοποιούνται από το cGMP. Η εξειδίκευση της κυτταρικής απόκρισης στο cGMP εξαρτάται από τη σύνδεση του cGMP σε διάφορες πρωτεΐνες στόχους. Δύο εξελικτικά διαφορετικές θέσεις σύνδεσης του cGMP εντοπίζονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η μία είναι η περιοχή **CNBD** (Cyclic Nucleotide Binding Domain), που εντοπίζεται στις ρυθμιστικές περιοχές των **PKGs** (πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cGMP) και των **PKAs** (πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cAMP), καθώς και στα **CNG κανάλια** (κανάλια κατιόντων που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια), ενώ η άλλη θέση σύνδεσης του cGMP είναι η περιοχή **GAF**, που εντοπίζεται στις **cGMP-εξαρτώμενες PDEs** (φωσφοδιεστεράσες που εξαρτώνται από cGMP), αλλά και σε PDEs διπλής εξειδίκευσης. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τις PDE2, PDE5 και PDE6, οι οποίες έχουν έναν διπλό ρόλο στον μεταβολισμό του cGMP. Όχι μόνο ρυθμίζονται αλλοστερικά από το cGMP, το οποίο συνδέεται στις περιοχές GAF εκτός καταλυτικού κέντρου, αλλά επιπλέον υδρολύουν το cGMP σε 5'GMP. Η PDE5 και η PDE6 αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση το cGMP ως υπόστρωμα, ενώ η PDE2 υδρολύει και το cAMP και το cGMP.

Εικόνα 6.24

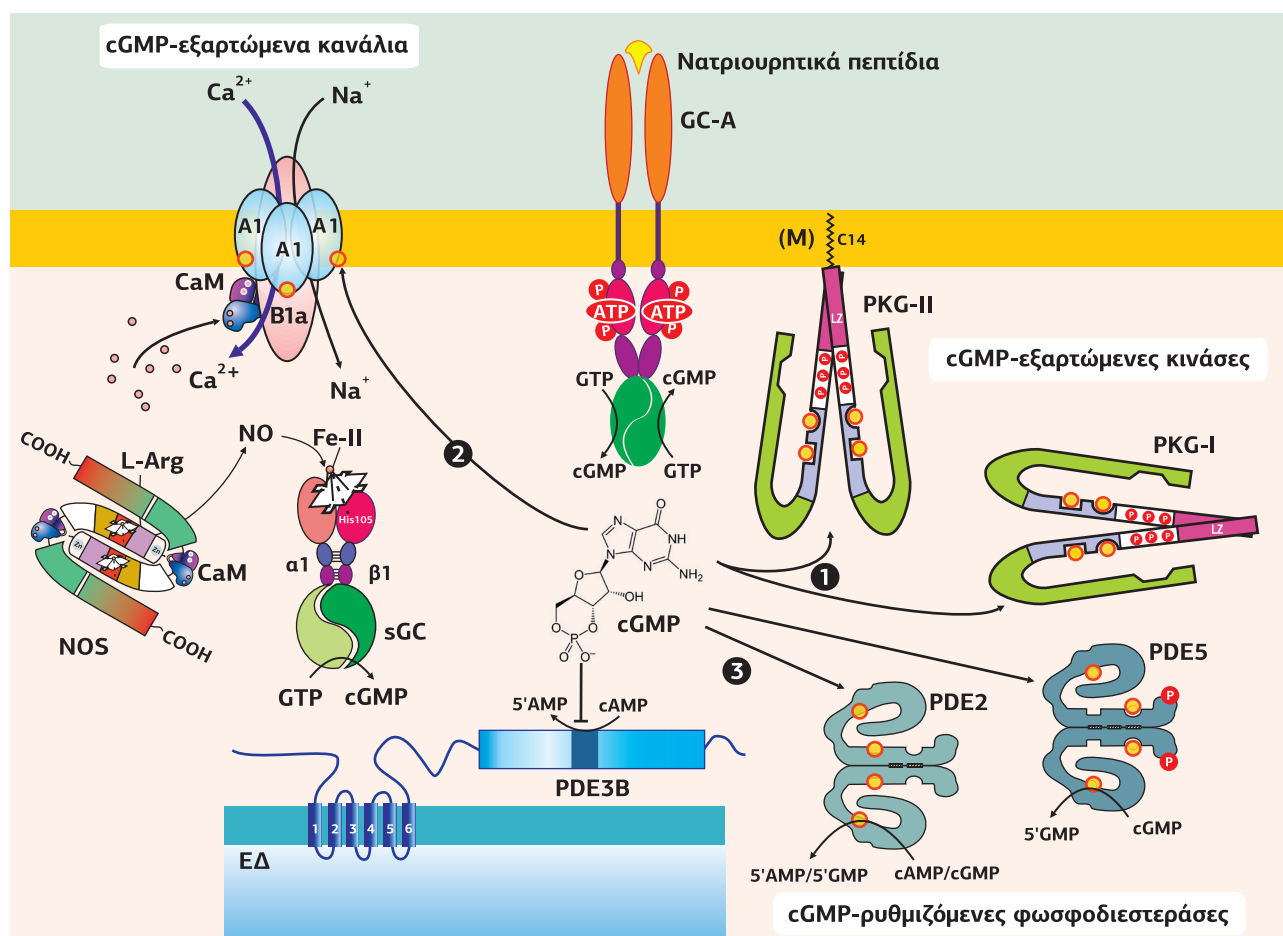
Μηχανισμός ενεργοποίησης της διαλυτής sGC από τους φυσικούς της προσδέτες.

Το **NO** ενεργοποιεί την sGC, συνδεόμενο απευθείας στον δακτύλιο της αίμης, και σχηματίζει δεσμό με τον σίδηρο του δακτυλίου της αίμης, δημιουργώντας ένα σίδηρο-νιτρώδες-αίμη σύμπλοκο. Το **CO**, επίσης, συνδέεται απευθείας στην αίμη, αλλά είναι ασθενέστερος ενεργοποιητής από το NO. Η πρωτοπορφυρίνη IX (**PPIX**) συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στην sGC μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο. [22]

4.1

Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cGMP (PKGs)

Μετά την αναγνώριση του cGMP ως ενδοκυττάριου δεύτερου διαβιβαστή ακολούθησε η αναζήτηση μιας εξαρτώμενης από το cGMP κινάσης (PKG), παρόμοιας με την κινάση που είχε ανακαλυφθεί στην περίπτωση του cAMP (PKA). Μελετώντας διάφορους ιστούς και οργανισμούς, οι Juh-Fa Kuo και Paul Greengard στο Yale University το 1969 διαπίστωσαν ότι μια μερικώς καθαρή πρωτεϊνική κινάση από την ουρά αστακών μπορούσε να ενεργοποιηθεί από το cAMP και, επίσης, από το cGMP. Σε άλλους ιστούς η διέγερση με cAMP ήταν πιο αποτελεσματική. Το 1976 η cGMP-ρυθμιζόμενη πρωτεϊνική κινάση απομονώθηκε από πνεύμονες βοοειδών, η παρουσία της αποδείχθηκε σε πολλούς ιστούς και ανακαλύφθηκαν οι δύο τύποι της (PKG-I και PKG-II).

**Εικόνα 6.25****Οι μοριακοί στόχοι του cGMP.**

Μετά την παραγωγή του από τις γονανυλικές κυκλάσες (pGCs ή sGCs), το cGMP μπορεί να ενεργοποιήσει τις πρωτεϊνικές κινάσες PKG-I και PKG-II, τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ και να συνδεθεί στις φωσφοδιεστεράσες PDE5, οι οποίες το καταβολίζουν σε 5'GMP ή να αναστείλει φωσφοδιεστεράσες (PDE3) που καταβολίζουν cAMP. Ενώ οι PDE2 και PDE5 βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, η PDE3 βρίσκεται κυρίως στη μεμβράνη του ΕΔ.

Οι PKGs αποτελούν τον κύριο στόχο του cGMP. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί δύο διαφορετικά γονίδια *pkg1* και *pkg2*, που κωδικοποιούν για τους δύο τύπους PKG-I και PKG-II.

Η **PKG-I** είναι ένα ομοδιμερές των 76 kDa που εκφράζεται ευρέως στους ιστούς των θηλαστικών, εντονότερα στα αιμοπετάλια, στην παρεγκεφαλίδα και στα λεία μυϊκά κύτταρα. Υπάρχουν δύο ισομορφές της PKG-I, η PKG-Iα, η οποία βρέθηκε κυρίως στα αγγεία, στους νεφρούς και στα επινεφρίδια, και η PKG-Iβ, η οποία εκφράζεται κυρίως στη μήτρα.

Η **PKG-II** είναι ένα ομοδιμερές των 86 kDa που προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη. Απουσιάζει από το καρδιαγγειακό σύστημα, εντοπίζεται στον εγκέφαλο και στο έντερο, ενώ εκφράζεται και στους πνεύμονες, στους νεφρούς και τα οστά.

Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις PKGs-I και PKGs-II, οι οποίες απορρέουν από τη διαφορετική δομή τους. Ειδικότερα:

- Η αλληλουχία αμινοξέων της PKG-II διαφέρει από αυτήν της PKG-I, κυρίως στο NH_2 -τελικό άκρο. Το άκρο αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου, καθώς στην PKG-II μυριστοϋλιώνεται και αγκυροβολεί την κινάση στην πλασματική μεμβράνη.
- Η PKG-I παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με το cGMP σε σχέση με την PKG-II.
- Η PKG-I λειτουργεί κυρίως ως ένας ενδοκυτταρικός ρυθμιστής της συγκέντρωσης $[\text{Ca}^{2+}]$, σε αντίθεση με την PKG-II, η οποία βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και ρυθμίζει την ομοιόσταση των υγρών στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου.
- Τα δύο είδη PKGs διαφέρουν στην επιλεκτικότητα των υποστρωμάτων.
- Τα δύο είδη PKGs εκφράζονται σε διαφορετικά κύτταρα και έχουν διαφορε-

τικούς λειτουργικούς ρόλους. Η PKG-I προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων, αγγειοδιαστολή και συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, ενώ η PKG-II παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση των εκκρίσεων του εντέρου, την αύξηση των οστών, την έκκριση της ρενίνης και τον κερκάρδιο ρυθμό.

Πρωτεϊνική κινάση G - I (cGMP-Dependent Protein Kinase I, PKG-I)

Η PKG-I συμμετέχει στη σηματοδότηση του cGMP, του οποίου η παραγωγή ενεργοποιείται από το NO. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις μεσολαβεί και στη σηματοδότηση του cGMP, η παραγωγή του οποίου ενεργοποιείται από τα νατριουρητικά πεπτίδια. Τα ισοένζυμα PKG-Iα και PKG-Iβ είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και διαφέρουν μόνο στα τελευταία 100 αμινοξέα του NH₂-τελικού τους άκρου. Οι διαφορές αυτές επηρεάζουν τη συγγένεια για το cGMP (η PKG-Iα έχει συγγένεια ~10-φορές μεγαλύτερη από την PKG-Iβ), την εξειδίκευση των υποστρωμάτων και την υποκυτταρική τοποθέτηση.

Το cGMP συνδέεται σε αλλοστερικές θέσεις στη ρυθμιστική περιοχή της PKG-I και αυξάνει τη δραστηριότητα φωσφομεταφοράς 3-10 φορές. Οι δύο ισομορφές της PKG-I βρέθηκαν σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα σε σύμπλοκα με ορισμένες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ή ακόμα ελεύθερες στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, είναι ικανές να μεταναστεύουν αντιστρεπτά ανάμεσα στα υποκυτταρικά διαμερίσματα, έπειτα από μεταβολές της συγκέντρωσης του cGMP.

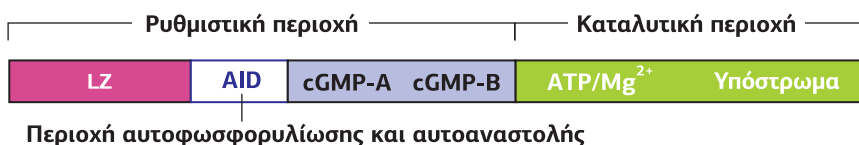
Δομικά χαρακτηριστικά

Η PKG-I είναι μια ομοδιμερής κινάση. Το κάθε μονομερές της αποτελείται από μια ρυθμιστική περιοχή στο NH₂-τελικό άκρο και μια καταλυτική περιοχή στο COOH-τελικό άκρο. Η ρυθμιστική περιοχή περιλαμβάνει: 1. Μια υποπεριοχή ομοδιμερισμού, αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και υποκυτταρικού εντοπισμού με ένα μοτίβο leucine zipper (LZ). Στην PKG-Iα το μοτίβο LZ περιλαμβάνει πέντε επαναλαμβανόμενες επτάδες που σταθεροποιούνται με υδρόφοβα αμινοξέα και δεσμούς υδρογόνου, ενώ στην PKG-Iβ περιλαμβάνει οκτώ (βλ. σελ. 161). 2. Μία ανασταλτική και μία υποπεριοχή αυτοφωσφορυλίωσης, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται. 3. Μία υποπεριοχή σύνδεσης του cGMP, η οποία περιέχει δύο ομόλογες

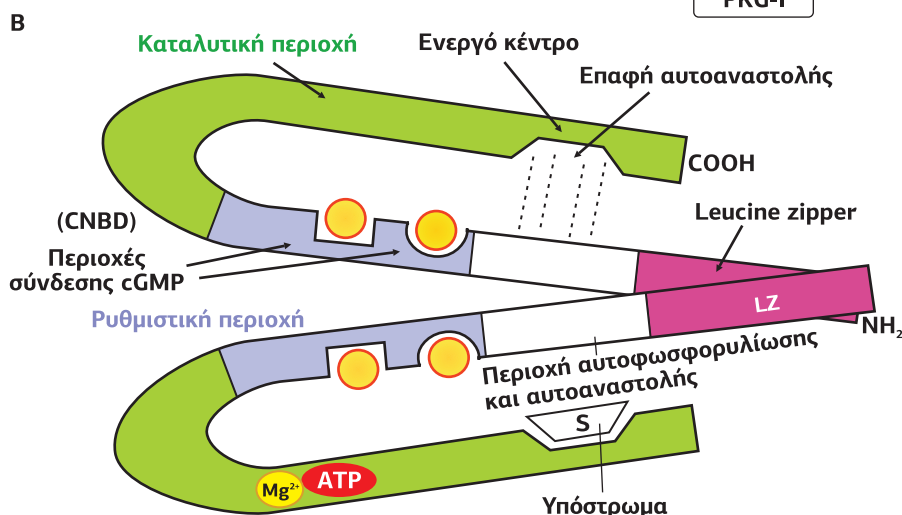
Εικόνα 6.26

Δομικά χαρακτηριστικά της cGMP-dependent protein kinase - I (PKG-I). Οι ισομορφές των PKG-I είναι ομοδιμερή. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία ρυθμιστική και μία καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή περιλαμβάνει ένα μοτίβο LZ υπεύθυνο για τον ομοδιμερισμό και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, μία ανασταλτική περιοχή και μία περιοχή αυτοφωσφορυλίωσης, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται, και τέλος δύο ομόλογες θέσεις σύνδεσης για το cGMP, διατεταγμένες παράλληλα (η μία από τις δύο έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το cGMP, συμβολίζεται με ημικύκλιο). Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από μία υποπεριοχή, όπου συνδέεται το Mg²⁺/ATP και μία υποπεριοχή, όπου συνδέεται το υπόστρωμα. [7]

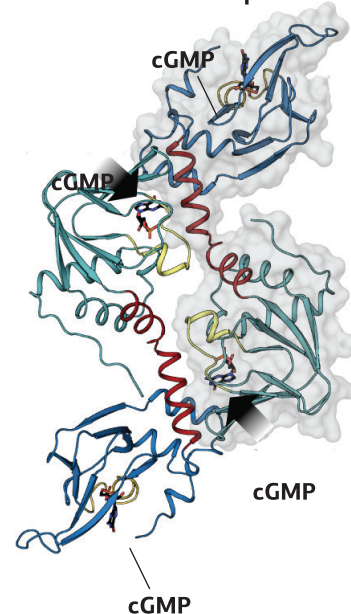
A

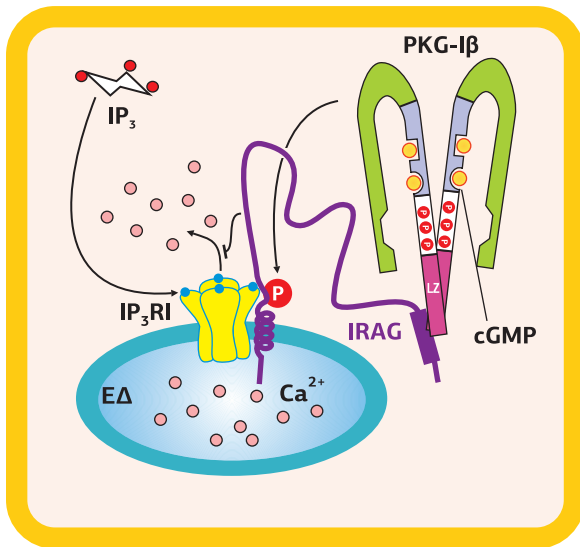


B



cNBD των δύο υπομονάδων



**Εικόνα 6.27**

Η IRAG (Inositol trisphosphate Receptor-Associated cGMP-kinase substrate) ως πρωτεΐνη αγκυροβόλιο της PKG-Iβ. Η

IRAG είναι μια πρωτεΐνη 125 kDa που βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ, όπου δημιουργεί ένα τριμερές σύμπλοκο IRAG/ PKG-Iβ/ IP₃R. Μετά τη φωσφορυλίωσή της από την PKG-Iβ κλείνει τα κανάλια Ca²⁺-υποδοχείς IP₃. [11]

substrate), μια πρωτεΐνη 125 kDa που βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ/ΣΔ και δρα ως αγκυροβόλιο της PKG-Iβ, δημιουργώντας ένα τριμερές σύμπλοκο IRAG/ PKG-Iβ/ IP₃R, κλείνοντας τα κανάλια Ca²⁺ IP₃R μετά τη φωσφορυλίωσή της από την PKG-Iβ (Εικόνα 6.27). Άλλες GKIPs είναι η φωσφοδιεστεράση 5 (PDE5), η τροπονίνη, ο Regulator of G-protein Signaling-2 (RGS2) και η cysteine-rich protein 2.

Αυτοαναστολή και ενεργοποίηση

Απουσία cGMP η δραστηριότητα της PKG καταστέλλεται λόγω αυτοανασταλτικών επαφών. Κατάλοιπα της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου συνδέονται άμεσα με την περιοχή αυτοαναστολής, η οποία απέχει ~50 με 75 αμινοξέα από το NH₂-τελικό άκρο. Αυτή η περιοχή παίζει τον ρόλο ψευδοϋποστρώματος, καθώς μιμείται την αλληλουχία σύνδεσης του πραγματικού υποστρώματος της PKG-I, αλλά της λείπει ένα χαρακτηριστικό αμινοξύ και δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί.

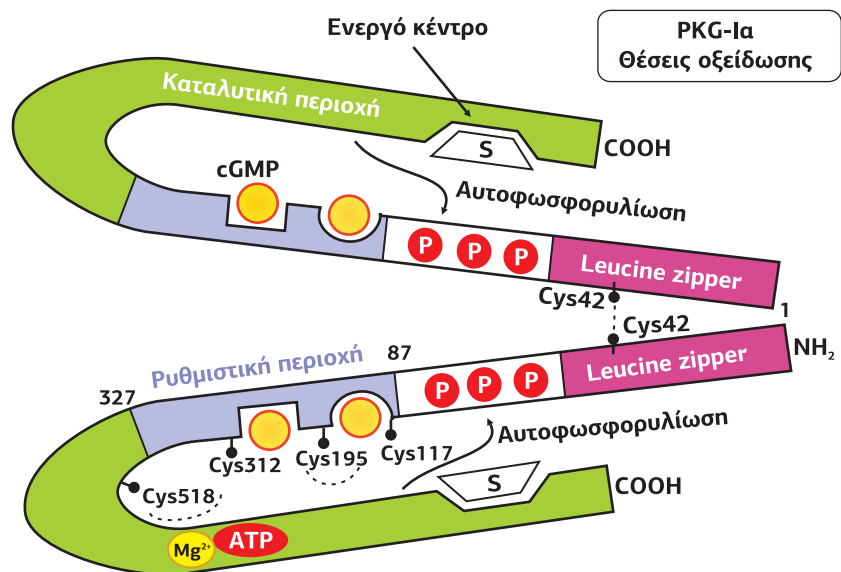
Η ενεργοποίηση της PKG-I απαιτεί τη σύνδεση του cGMP στις δύο θέσεις σύνδεσης. Η συγγένειά τους για το cGMP διαφέρει ~10-φορές και η cGMP-προκαλούμενη ενεργοποίηση εμφανίζει μια ισχυρή θετική συνέργεια. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από τη θέση σύνδεσης του ATP/Mg²⁺ και τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, που καταλύει τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στην υδρο-

Εικόνα 6.28

Οξείδωση και

αυτοφωσφορυλίωση της PKG-Iα. Υπάρχουν τρία

ζευγάρια κυστεϊνών, ικανά να οξειδωθούν και να σχηματίσουν δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αλλάζουν τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και ενεργοποιούν το ένζυμο. Οι Cys42-Cys42 δημιουργούν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των δύο μονομερών, ενώ οι Cys117-Cys195 και Cys312-Cys518 δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στο κάθε μονομερές. Η αυτοφωσφορυλίωση αυξάνει τη συγγένεια για το cGMP. [35]



ξυλομάδα μιας Ser/Thr της πρωτεΐνης στόχου. Η σύνδεση του cGMP και στις δύο θέσεις σύνδεσης οδηγεί σε αλλαγή διαμόρφωσης, η οποία αίρει την αυτοανασταλτική επαφή, επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος.

Η PKG-Ia περιέχει 11 κυστεΐνες, πέντε από τις οποίες μπορούν να οξειδωθούν. Η οξείδωση ενεργοποιεί, με έναν NO/cGMP-ανεξάρτητο μηχανισμό, την PKG-Ia δημιουργώντας έναν δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των Cys42 των δύο μονομερών. Επιπλέον, ως απόκριση στο οξειδωτικό stress δημιουργούνται δύο ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα σε κυστεΐνες του κάθε μονομερούς Cys117 με Cys195 και Cys312 με Cys518 (Εικόνα 6.28). Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι η PKG-Ia μπορεί να ενεργοποιηθεί με τον κλασικό τρόπο από το cGMP ή με τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών έπειτα από οξείδωση, ωστόσο οι δύο μηχανισμοί εμφανίζουν θετική συνέργεια.

Αυτοφωσφορυλίωση

Η PKG-Ia και η PKG-Ib υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση σε πολλαπλές θέσεις στη ρυθμιστική NH₂-τελική περιοχή. Η αυτοφωσφορυλίωση ορισμένων θέσεων αυξάνει τη συγγένεια για τη σύνδεση του cGMP και τη δραστηριότητα φωσφομεταφοράς. Η αύξηση της συγγένειας για το cGMP λόγω αυτοφωσφορυλίωσης αυξάνει την ενεργοποίηση της PKG σε χαμηλές συγκεντρώσεις cGMP και πιθανώς παρατείνει τη σηματοδότηση.

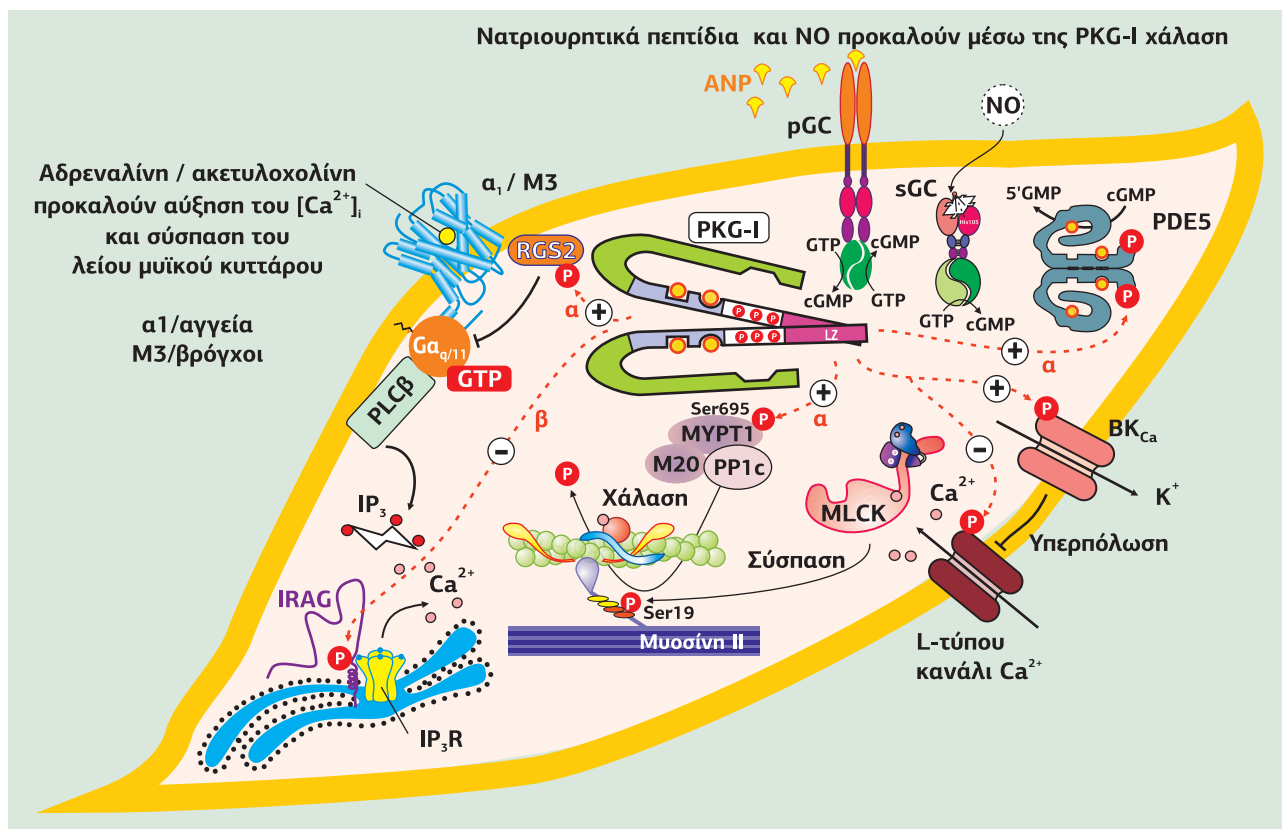
Υποστρώματα της PKG-I

Κλασικά υποστρώματα της PKG-I αποτελούν οι **υποδοχείς IP₃** και **ρυα-νοδίνης**, η φωσφορυλίωση των οποίων οδηγεί στο κλείσιμο του καναλιού, οδηγώντας σε μείωση του κυτταροπλασματικού Ca²⁺ και χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό υπόστρωμα είναι η **φωσφολαμβάνη**, η οποία μετά τη φωσφορυλίωσή της από την PKG-I ενεργοποιεί την Ca²⁺-ATPάση του ΕΔ/ΣΔ SERCA, οδηγώντας και πάλι σε μείωση του κυττα-

Εικόνα 6.29

Ο ρόλος της PKG-I στη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων.

Το cGMP που παράγεται μέσω των οδών NO/sGC ή των νατριουρητικών πεπτιδίων/pGC ενεργοποιεί την cGMP-dependent protein kinase (PKG-I). Η ενεργοποιημένη PKG-I φωσφορυλιώνει τα L-τύπου κανάλια Ca²⁺ Ca_v1.2, τα οποία κλείνουν, και τα Ca²⁺-εξαρτώμενα κανάλια K⁺ BK_{Ca}, τα οποία ανοίγουν και επιταχύνουν την υπερπόλωση του κυττάρου. Επίσης, φωσφορυλιώνει τη φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης MLCP, η οποία αποφωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλώντας χάλαση. Φωσφορυλιώνει την IRAG, η οποία κλείνει τους υποδοχείς IP₃ του ΕΔ, μειώνοντας το Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα, την RGS2, η οποία επιταχύνει την υδρόλυση του GTP από τη Gα_{q/11} αναστέλλοντας τη σηματοδότηση των αδρενεργικών υποδοχέων, και τέλος τη φωσφοδιεστεράση PDE5, η οποία μειώνει τη συγκέντρωση του cGMP. Η δράση των νατριουρητικών πεπτιδίων και του NO οδηγεί τελικά στη χάλαση του λείου μυϊκού κυττάρου, σε αντίθεση με τη δράση της αδρεναλίνης και της ακετυλοχολίνης που οδηγούν σε αύξηση του Ca²⁺ και σύσπαση. [37]



Η **αδρεναλίνη** μέσω του μονοπατιού $\alpha_1/\text{G}_q/\text{PLC}\beta$ / αύξηση του Ca^{2+} οδηγεί στη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και συνεπώς προκαλεί αγγειοσυστολή. Η **ακετυλοχολίνη** μέσω του μονοπατιού $\text{M}_3/\text{G}_q/\text{PLC}\beta$ / αύξηση του Ca^{2+} οδηγεί στη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των βρόγχων και συνεπώς προκαλεί βρογχοσυστολή.

ροπλασματικού Ca^{2+} . Άλλα υποστρώματα είναι η ρυθμιστική υπομονάδα της **PKA-I**, η φωσφοδιεστεράση **PDE5**, η φωσφορυλίωση της οποίας από την PKG-Ia αυξάνει τη συγγένειά της για το cGMP, η **βιμεντίνη**, μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, και το **υπόστρωμα G** (G-substrate), που εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στις ίνες του Purkinje της παρεγκεφαλίδας, όπου έχει κυρίως νευροπροστατευτικό ρόλο. Η PKG-I φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το υπόστρωμα G (G substrate), το οποίο δρα ως αναστολέας των πρωτεϊνικών φωσφατασών (PP1 και PP2).

Ως υποστρώματα της PKG-I έχουν χαρακτηριστεί πρόσφατα τα **κανάλια Ca^{2+} L-τύπου**, τα οποία κλείνουν με τη φωσφορυλίωση, τα **Ca^{2+} -εξαρτώμενα κανάλια K^+ (BK_{Ca})**, τα οποία ενεργοποιούνται με τη φωσφορυλίωση και, κατά συνέπεια, οδηγούν σε ταχύτερη υπερπόλωση του κυττάρου, η **RGS2**, η οποία φωσφορυλιώνεται από την PKG-Ia στις Ser46 και Ser64, αυξάνοντας τη δράση GTPάσης της G_q και συνεπώς αναστέλλοντας τη σηματοδότηση μέσω των GPCRs, και η ρυθμιστική υπομονάδα της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης, **MYPT1** (Myosin Phosphatase Targeting Protein). Η φωσφορυλιωμένη MYPT1 αυξάνει τη δραστηριότητα της MLCP, οδηγώντας σε αποφωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και σε χάλαση των λείων μυϊκών ινών, και αλληλεπιδρά με την περιοχή LZ της PKG-Ia. Τα περισσότερα, αν όχι όλα, από αυτά τα υποστρώματα φωσφορυλιώνονται από την PKG-Ia (**Εικόνα 6.29** και βλ. **Εικόνα 7.19**).

Πρωτεϊνική κινάση G - II (cGMP-Dependent Protein Kinase II, PKG-II)

Η PKG-II μοιράζεται την ίδια δομή με τις κινάσες PKG-Ia και PKG-Iβ. Είναι ομοδιμερές και το κάθε μονομερές αποτελείται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική περιοχή. Οι τρεις υπότυποι διαφέρουν ως προς την περιοχή με τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα LZ, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένες GKIPs. Για παράδειγμα, η PKG-Ia αλληλεπιδρά άμεσα με τη μικρή GTPάση RhoA και με τη ρυθμιστική υπομονάδα MYPT1 της φωσφατάσης MLCP, η PKG-Iβ με την IRAG (Inositol trisphosphate Receptor-Associated cGMP-kinase substrate), ενώ η PKG-II με πρωτεΐνες που την προσανατολίζουν κοντά στο κανάλι CFTR.

Το κύριο υπόστρωμα που φωσφορυλιώνεται από την PKG-II είναι το κανάλι **CFTR** (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης στα κύτταρα του εντέρου. Η ενεργοποιημένη από cGMP PKG-II φωσφορυλιώνει το κανάλι CFTR προκαλώντας την έξοδο Cl^- και, εν συνεχεία, έκκριση νερού στον αυλό του εντέρου. Έχει προταθεί ένα αντίστοιχο μοντέλο λειτουργίας στη μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων, όπου το CFTR συνεργάζεται με ένα κανάλι Cl^- και ελέγχει τη λειτουργία των επινεφριδίων. Πιστεύεται ότι κατ' αυτόν τον τρόπο ελέγχεται το σύστημα της ρενίνης, όπως και η ανάπτυξη των οστών, χωρίς όμως ακόμη να είναι γνωστές οι πρωτεΐνες στόχοι.

4.2 | Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το cAMP (PKA)

Επειδή οι περιοχές πρόσδεσης κυκλικών νουκλεοτιδίων των PKAs έχουν σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των PKGs, οι PKAs ενεργοποιούνται και από το cGMP, αν και παρουσιάζουν μικρότερη εξειδίκευση σ' αυτό απ' ό,τι στο cAMP. Ωστόσο, η ενεργοποίηση των PKA από το cGMP δεν είναι ξεκάθαρη. Πολλά από τα φυσιολογικά υποστρώματα για τις PKGs αποτελούν υποστρώματα και για τις PKAs. Επιπλέον, το cAMP σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες δρα σε συνάρτηση με το cGMP. Για παράδειγμα, τόσο οι PKGs όσο και οι PKAs αναστέλλουν την απελευθέρωση Ca^{2+} μέσω των υποδοχέων IP_3 και την παραγωγή IP_3 από τη $\text{PLC}\beta$ και προάγουν τη χάλαση των λείων γαστρικών μυϊκών ινών.

Στα σπονδυλωτά το cGMP και το cAMP προκαλούν χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και ρυθμίζουν την έκκριση νερού και χλωρίου στο έντερο. Το cAMP ενεργοποιεί την PKG σε πολλούς αγγειακούς ιστούς. Ομοίως, το cGMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία ρυθμίζει την έκκριση

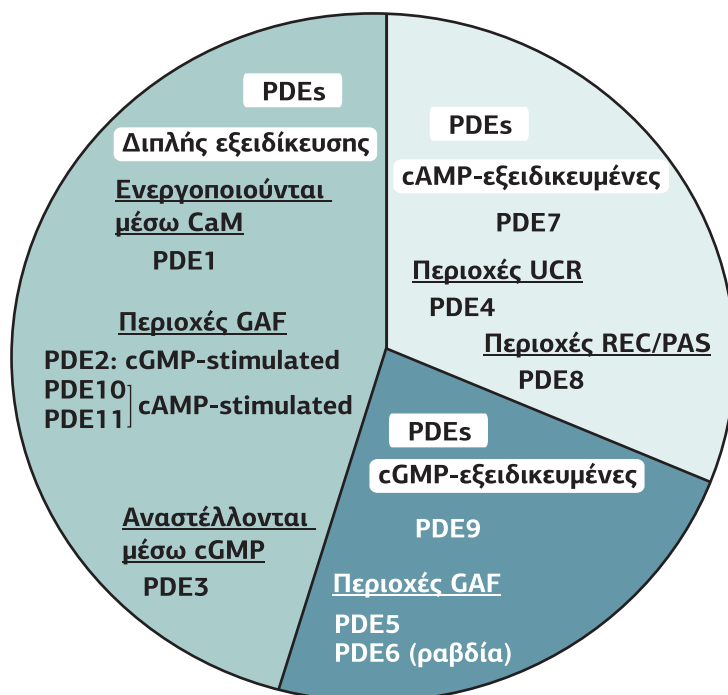
υγρών που επάγεται από τη σωματοστατίνη σε κύτταρα του ανθρώπινου εντέρου. Επίσης, το NO ενεργοποιώντας τη sGC έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του cGMP και την περαιτέρω ενεργοποίηση της PKA. Γενικότερα, τα δύο είδη κινασών δρουν σε συνεργασία και πολλές φορές η δράση της μιας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να λάβει χώρα το πλήρες αποτέλεσμα της δράσης της άλλης.

Αν και τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα πως το cGMP θα μπορούσε να αποτελεί σήμα ενεργοποίησης για την PKA, *in vivo* κάτι τέτοιο δεν ισχύει. Τα κύτταρα ενός οργανισμού παρουσιάζουν έντονη υποκυτταρική διαμερισματοποίηση, όπου εντοπίζονται συγκεντρωμένα δεύτεροι διαβιβαστές, ένζυμα και υποστρώματα που συνθέτουν σύνθετες δομικές μονάδες. Η υψηλού βαθμού αυτή διαμερισματοποίηση αποτελεί από μόνη της εμπόδιο για την συν-ενεργοποίηση. Επιπλέον, οι PKAs και οι PKGs είναι αναγκαίο να προσδεθούν σε συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες για να επιτελέσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Μεγάλος αριθμός πειραμάτων με πειραματόζωα ποντίκια αποδεικνύουν ότι το cGMP και το cAMP φέρνουν σε πέρας *in vivo* σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες σχετικά ανεξάρτητα και ότι ούτε η ενεργοποίηση της PKA από το cGMP ούτε η ενεργοποίηση της PKG από το cAMP μπορούν από μόνες τους να επιτελέσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία απουσία του ενός από τα δύο νουκλεοτίδια.

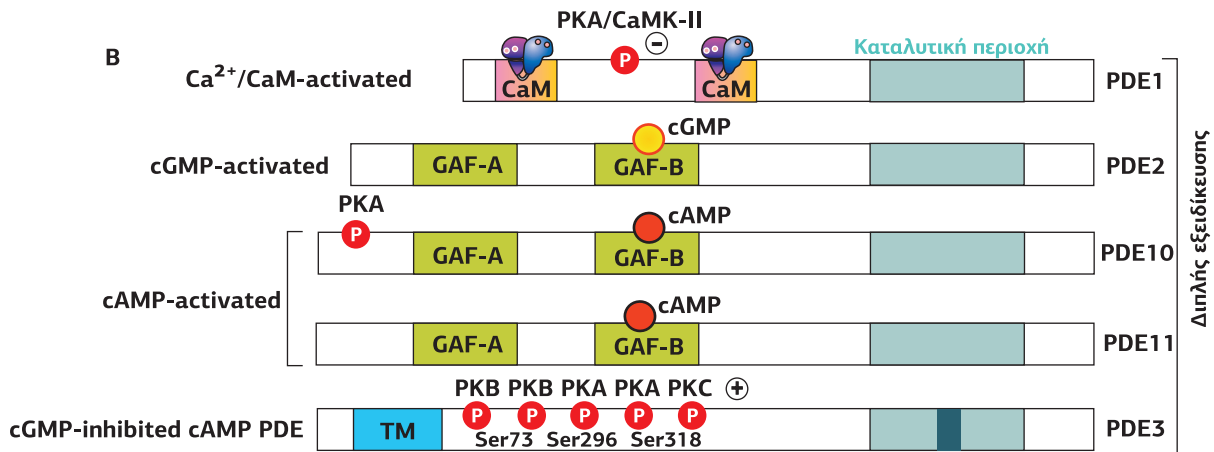
4.3 | cGMP-εξαρτώμενες φωσφοδιεστεράσες (PDEs)

Έχουν απομονωθεί 11 τουλάχιστον είδη γονιδίων που κωδικοποιούν PDEs στα θηλαστικά. Κάθε ένζυμο αυτής της οικογένειας περιέχει μία εξελικτικά διατηρημένη καταλυτική περιοχή 270 αμινοξέων. Αυτή η καταλυτική περιοχή διασπά τον φωσφοδιεστερικό δεσμό και υδρολύει τα 3' και 5' κυκλικά νουκλεοτίδια σε 5' μονοφωσφωρικά νουκλεοτίδια. Οι φωσφοδιεστεράσες 1, 2, 3, 10 και 11 υδρολύουν τόσο το cGMP όσο και το cAMP, είναι δηλαδή διπλής εξειδίκευσης. Οι PDEs 4, 7 και 8 διασπούν εκλεκτικά μόνο το cAMP, σε αντίθεση με τις PDEs 5, 6 και 9 που εμφανίζουν 100-φορές αυξημένη συγγένεια για το cGMP (**Εικόνα 6.30A**). Οι λειτουργίες των PDEs είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κυτταρική σηματοδότηση, καθώς ο μεταβολισμός των κυκλικών νουκλεοτιδίων διαμορφώνει σε μεγάλο βαθμό την ενδοκυτταρική συγκέντρωση και επηρεάζει κυτταρικές λειτουργίες, καθώς

A

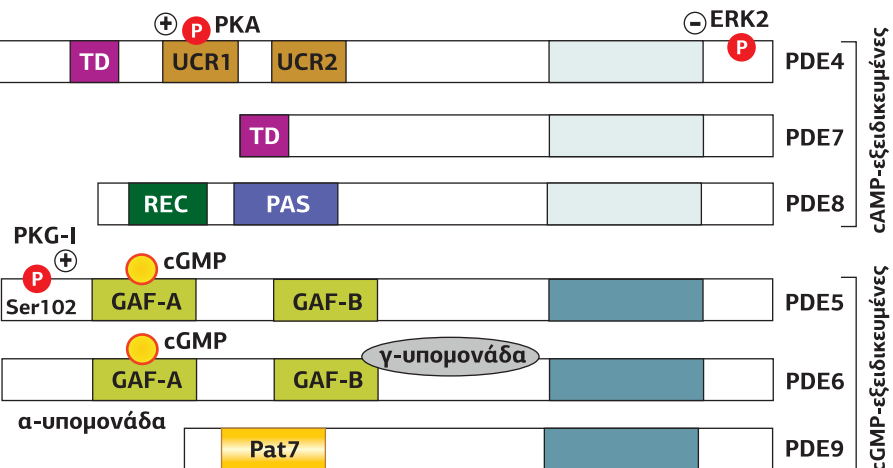


Εικόνα 6.30
Ταξινόμηση των φωσφοδιεστερασών σε τρεις κατηγορίες με βάση την εξειδίκευσή τους. Α. Οι 11 φωσφοδιεστεράσες διακρίνονται σε: διπλής εξειδίκευσης, ικανές να υδρολύσουν και τα δύο νουκλεοτίδια (PDE1, 2, 3, 10, 11), με εξειδικευμένη δράση ως προς το cAMP (PDE4, 7, 8) και με εξειδικευμένη δράση ως προς το cGMP (PDEs 5, 6, 9).



Εικόνα 6.30

Β. Από τις φωσφοδιεστεράσες διπλής εξειδίκευσης, η PDE1 ενεργοποιείται από το σύμπλοκο Ca^{2+} /καλμοδουλίνη, οι PDE2, 10 και 11 περιέχουν στη ρυθμιστική τους περιοχή τα μοτίβα GAF και η PDE3 έχει το χαρακτηριστικό ότι αυξημένη συγκέντρωση cGMP εμποδίζει την υδρόλυση του cAMP, και η PDE3 περιέχει μια διαμεμβρανική περιοχή TM (Transmembrane) και συναντάται στις μεμβράνες του ΕΔ. Από τις φωσφοδιεστεράσες που υδρολύουν εξειδικευμένα cGMP, οι PDE5 και 6 περιέχουν τα μοτίβα GAF. Η PDE6 αποτελείται από δύο α και δύο γ υπομονάδες. Από τις φωσφοδιεστεράσες που έχουν εξειδίκευση στο cAMP, η PDE7 δεν εμφανίζει κανένα ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό, η PDE4 έχει δύο ρυθμιστικά μοτίβα UCR (Upstream Conserved Region) και μια περιοχή TD (Targeting Domain), υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η PDE8 περιέχει μία περιοχή REC ομόλογη με τις περιοχές "receiver" των σηματοδοτικών συστημάτων των βακτηρίων (two-component signaling systems) και μία ρυθμιστική περιοχή PAS (ακρωνύμιο για τις πρωτεΐνες Period, Arnt και Sim) που συναντάται κυρίως σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον έλεγχο του κρκαδίου ρυθμού. Η PDE9 περιέχει ένα μοτίβο στρατολόγησης στον πυρήνα, το Pat7. [3]



και αντιδράσεις απόκρισης του κυττάρου ως προς το περιβάλλον του. Οι PDEs ρυθμίζουν την καρδιακή λειτουργία, τη στυτική αντίδραση των αρσενικών και τη φωτοδιαβίβαση. Η παρουσία αλλοστερικών θέσεων σύνδεσης επιτρέπει στο cGMP να ρυθμίζει τη δράση των PDEs με ποικίλους τρόπους.

Δομή των φωσφοδιεστερασών

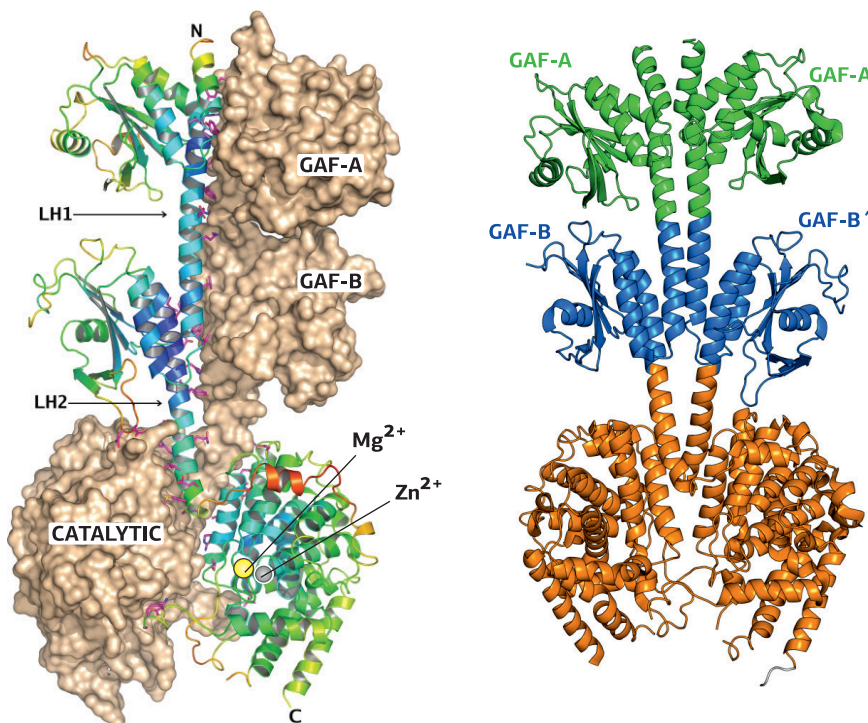
Οι φωσφοδιεστεράσες αποτελούνται από δύο υπομονάδες, η καθμία από τις οποίες περιέχει μία καταλυτική και μία ρυθμιστική περιοχή (Εικόνα 6.31).

Η **καταλυτική περιοχή** εμφανίζει μια ομολογία 25-35% ανάμεσα στις διάφορες οικογένειες των PDEs. Βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο και περιέχει τρεις υποπεριοχές που αποτελούνται συνολικά από 16 α-έλικες. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στην ένωση των ελίκων και αποτελείται από καλά συντηρημένα αμινοξέα. Εκτός από τη θέση σύνδεσης του υποστρώματος (cAMP ή cGMP), περιέχει και δύο θέσεις σύνδεσης δισθενών μεταλλικών κατιόντων (Zn^{2+} , Mg^{2+}).

Η περιοχή που προσδίδει την εξειδίκευση του υποστρώματος, cAMP ή cGMP, είναι ο ονομαζόμενος διακόπτης γλουταμίνης "**glutamine switch**". Στην καταλυτική περιοχή κάθε PDE υπάρχει μια καλά συντηρημένη γλουταμίνη, η οποία σταθεροποιεί τη σύνδεση του δακτυλίου της πουρίνης στον θύλακα σύνδεσης. Αυτή η γλουταμίνη πρέπει να είναι ικανή να περιστρέφεται ελεύθερα, ώστε να δημιουργηθεί ο κατάλληλος δεσμός υδρογόνου ανάμεσα σε αυτήν και τα δύο κυκλικά νουκλεοτίδια (το cAMP και το cGMP). Για τις PDEs που εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια για το cAMP, η γλουταμίνη αναγκάζεται από τα γειτονικά αμινοξέα σε μια περιστροφή ευνοϊκή για τον δεσμό υδρογόνου με το cAMP. Αντίθετα, για τις PDEs που προτιμούν το cGMP, η γλουταμίνη αναγκάζεται σε ευνοϊκή για το cGMP περιστροφή. Μια εξαίρε-

ση αποτελεί η PDE5, στην οποία δημιουργούνται επιπλέον αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές για την εξειδίκευσή της. Συνεπώς, στις PDEs διπλής εξειδίκευσης η γλουταμίνη περιστρέφεται ελεύθερα, ενώ ο διακόπτης γλουταμίνης αποτελεί τη μοριακή βάση της εξειδίκευσης του υποστρώματος ανάμεσα στις διαφορετικές PDEs.

Η μόνη κρυσταλλική δομή **ρυθμιστικής περιοχής** που έχει βρεθεί είναι η δομή της ρυθμιστικής περιοχής της PDE2A, η οποία αποτελείται από δύο παράλληλα τοποθετημένες υποπεριοχές GAF (GAF-A και GAF-B). Το ακρωνύμιο **GAF** προέρχεται από τρεις πρώτες πρωτεΐνες στις οποίες ανακαλύφθηκαν οι περιοχές αυτές (cGMP binding PDEs στα θηλαστικά, *Adenylyl cyclases* στην *Anabaena* και ο μεταγραφικός παράγοντας *EhlA* στα φυτά). Ενώ στις PDEs των θηλαστικών οι δύο περιοχές GAF είναι παράλληλα τοποθετημένες, στην αδενυλική κυκλάση της *Anabaena* είναι αντιπαράλληλες. Εκτός της PDE2, και άλλες PDEs (PDE5, 6, 10 και 11) περιέχουν στο NH₂-τελικό ρυθμιστικό τους άκρο περιοχές GAF. Στην PDE2A η περιοχή GAF-B και στην PDE5 η GAF-A περιέχει μια αλλοστερική θέση για το cGMP, η σύνδεση του οποίου ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση (Εικόνα 6.32). Αυτή η θέση σύνδεσης αποτελεί τμήμα μιας ομάδας αλλοστερικών θέσεων σύνδεσης μικρών μορίων που βρίσκονται στην περιοχή GAF.



Εικόνα 6.31

Φωσφοδιεστεράση PDE2A.

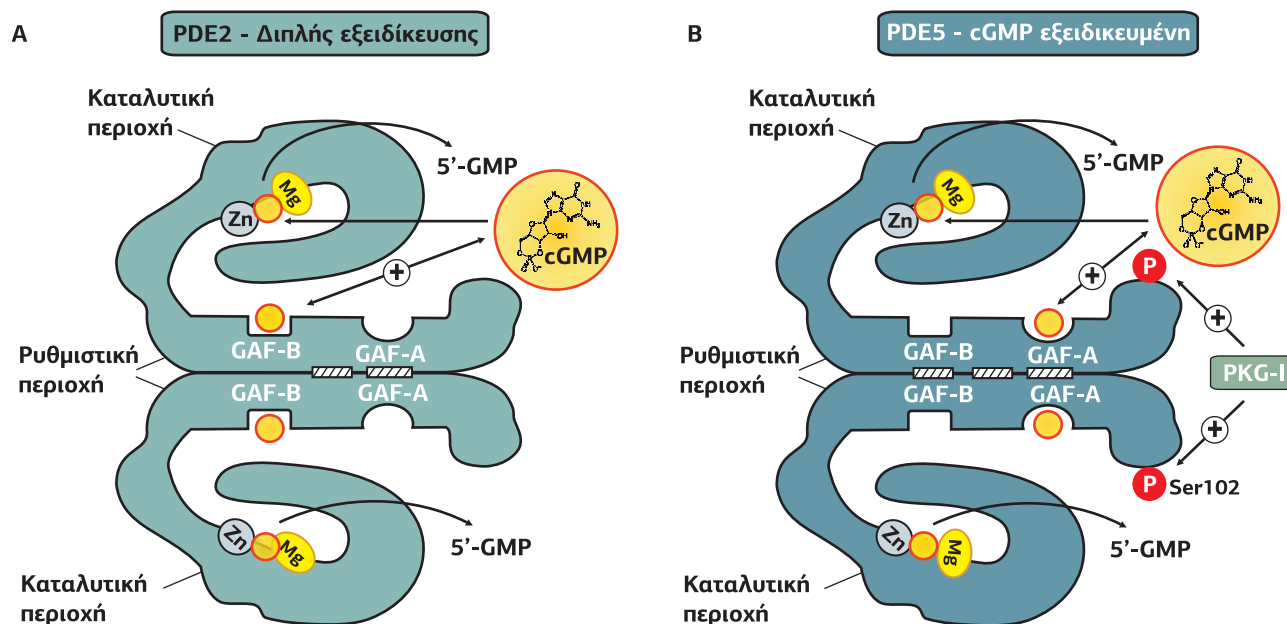
A. Η διμερής δομή της hPDE2A (215-900). Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από μία ρυθμιστική περιοχή (με τις δύο υποπεριοχές GAF, GAF-A και GAF-B), μία καταλυτική περιοχή και δύο έλικες LH1 και LH2 που συνδέουν τις δύο περιοχές μεταξύ τους. Στην καταλυτική περιοχή διακρίνονται οι 16 α-έλικες και οι θέσεις σύνδεσης των ιόντων Zn²⁺ και Mg²⁺ (τα οποία συμβολίζονται ως γκρι και κίτρινη σφαίρα, αντίστοιχα). B. Η δομή της διμερούς ρυθμιστικής περιοχής της PDE2A. Η κάθε ρυθμιστική περιοχή περιέχει μία GAF-A και μία GAF-B υποπεριοχή. Η GAF-B περιέχει την αλλοστερική θέση σύνδεσης του cGMP. [32]

Φωσφοδιεστεράσες που υδρολύουν εξειδικευμένα cGMP (PDE5, 6, 9)

Από τις 11 οικογένειες PDEs των θηλαστικών, μόνο τρεις, οι PDEs 5, 6, 9, έχουν πάνω από ~100-φορές αυξημένη προτίμηση για το cGMP αντί του cAMP ως υπόστρωμα και θεωρούνται κατά συνέπεια “cGMP-specific PDEs”. Η φωσφοδιεστεράση **PDE6** εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και παίζει κεντρικό ρόλο στην όραση. Οι PDE5 και PDE9 είναι οι μόνες cGMP-εξαρτώμενες φωσφοδιεστεράσες που εκφράζονται σε περιφερειακούς ιστούς. Η **PDE5** μεσολαβεί στα αποτελέσματα του μονοπατιού NO/cGMP στους λείους μυς των αγγείων των πνευμόνων, στην καρδιά και στο πέος. Η **PDE9** εκφράζεται στα επιθηλιακά μελανοφόρα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και σε ορισμένους νευρώνες. Σε κάποιες περιπτώσεις, η έκφρασή της στα νευρικά κύτταρα συμπίπτει με αυτή της sGC, υποθέτοντας ότι παίζει έναν ρόλο στη NO/cGMP σηματοδότηση σε αυτά τα κύτταρα.

Διπλής εξειδίκευσης φωσφοδιεστεράσες (PDEs 1, 2, 3, 10 και 11)

Ανάμεσα στις PDEs διπλής εξειδίκευσης (PDEs 1, 2, 3, 10 και 11) η συγγένεια για τα κυκλικά νουκλεοτίδια cAMP και cGMP ποικίλλει, ακόμη και μεταξύ των PDEs της ίδιας οικογένειας. Για παράδειγμα, η συγγένεια των ισομορφών της **PDE1** για το cGMP είναι 1 μM (PDE1C2), 3 μM (PDE1B1) και 5 μM (PDE1A2), συγκρινόμενη με 1, 24 και 113 μM, αντίστοιχα για το cAMP. Ωστόσο, ενώ η συγγένεια της **PDE3** για το cGMP (0.02–0.3 μM) είναι ανάλογη με αυτή του cAMP (0.2–0.4 μM), η V_{max} για το cAMP είναι 5 με 10 φορές μεγαλύτερη από ό,τι για το cGMP και η PDE3 χαρακτηρίζεται ως η “cGMP-inhibited cAMP-PDE”, καθώς το cGMP λόγω της υψηλής του συγγένειας αλλά της χαμηλής ταχύτητας της υδρόλυσής του συναγωνίζεται

**Εικόνα 6.32**

Η ενεργοποίηση των φωσφοδιεστερασών PDE2 και PDE5. Η PDE2 υδρολύει το cGMP και το cAMP και η σύνδεση του cGMP στην περιοχή GAF-B διεγείρει την υδρόλυση του cGMP από την καταλυτική περιοχή, με αποτέλεσμα ένα αρνητικό feedback στη συγκέντρωση του cGMP. Ένα ιόν Zn^{2+} και ένα Mg^{2+} (ή Mn^{2+}) συνδέονται στην καταλυτική περιοχή κοντά στη θέση όπου συνδέεται το cGMP βοηθώντας στην υδρόλυσή του.

Β. Η PDE5 υδρολύει κατά προτίμηση το cGMP και έχει ανάλογη δομή με την PDE2. Η φωσφορυλίωση της Ser102 του NH_2 -τελικού άκρου από την PKG-I και η αλλοστερική σύνδεση του cGMP στην GAF-A αυξάνουν τον ρυθμό υδρόλυσης του cGMP, όταν τα επίπεδα cGMP είναι αυξημένα. [7]

αποτελεσματικά το cAMP, παρεμποδίζοντας την υδρόλυση του cAMP. Η φωσφορυλίωση της PDE3 από την PKA αυξάνει την καταλυτική της δραστηριότητα. Η **PDE10** έχει ~70-φορές υψηλότερη συγγένεια για το cAMP σε σχέση με το cGMP. Η φωσφορυλίωση της PDE10 από την PKA δεν επηρεάζει την ενζυμική της δράση, αλλά οδηγεί στην απομάκρυνσή της από το signalosome AKAP150/PKA/PSD95/NMDA. Η **PDE11** υδρολύει και τα δύο κυκλικά νουκλεοτίδια με ανάλογη αποτελεσματικότητα και συγγένεια (η συγγένεια για το cAMP και το cGMP είναι 1 και 1.6 μM , αντίστοιχα).

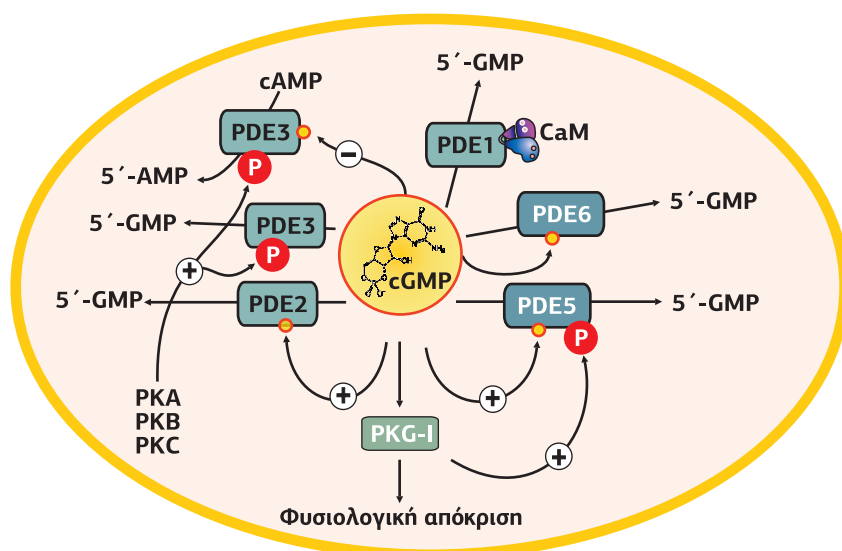
Κατανομή σε ιστούς των PDEs που υδρολύουν cGMP

Ένας κυτταρικός τύπος μπορεί να εκφράζει τρεις ή περισσότερες οικογένειες cGMP-PDEs. Σε ορισμένα κύτταρα μια PDE μπορεί να είναι η κυρίαρχη, όπως για παράδειγμα στα κύτταρα της μυελώδους μοίρας του φλοιού των επινεφριδίων (zona glomerulosa) η PDE2 αντιπροσωπεύει >90% των PDEs, στα αιμοπετάλια εκφράζεται κυρίως η PDE5, ενώ στα κύτταρα φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς (ραβδία και κωνία) η PDE6. Ορισμένες PDEs βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (π.χ. PDE3A, PDE5, PDE9A5), μία βρίσκεται στον πυρήνα (PDE9A1) και ορισμένες βρίσκονται συνδεδεμένες σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά οργανίδια (π.χ. η PDE3B στο ΕΔ και η PDE10A2 στο Golgi).

Ρύθμιση των PDEs που υδρολύουν cGMP

Οι PDEs που υδρολύουν cGMP ρυθμίζονται από το Ca^{2+} (η PDE1 ενεργοποιείται από τη σύνδεση του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης), την αλλοστερική σύνδεση του cGMP (PDE2, PDE5 και PDE6), τη φωσφορυλίωση (PDE3, PDE5 και PDE10) και το επίπεδο έκφρασης (PDE1, PDE3 και PDE5). Για παράδειγμα, η καταλυτική περιοχή της PDE5 εμφανίζει μέση συγγένεια για το cGMP και η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής από την PKG-I ή η σύνδεση cGMP στις αλλοστερικές θέσεις GAF αυξάνει τη συγγένεια της καταλυτικής περιοχής και τον ρυθμό κατάλυσης του cGMP. Η ρύθμιση της δράσης των PDEs οδηγεί στον έλεγχο του μεγέθους και της διάρκειας του σήματος του cGMP επηρεάζοντας τη σηματοδότησή του.

Το βιολογικό πλεονέκτημα μιας τόσο ποικιλόμορφης ομάδας ενζύμων με κοινή λειτουργία δεν είναι ξεκάθαρο, αλλά η εξειδικευμένη διαμερισματοποίηση ορισμένων PDEs μέσα στο κύτταρο, οι εμφανείς δράσεις αυτών των PDEs σε συγκεκριμένες δεξαμενές cGMP, καθώς και η ικανότητα διαφόρων PDEs να στοχεύουν στο cGMP, ανάλογα με τη συγκέντρωσή του, αρχίζουν να γίνονται εμφανείς.

**Εικόνα 6.33****Ρύθμιση των PDEs που υδρολύουν cGMP.**

Οι PDEs που υδρολύουν cGMP ρυθμίζονται από το Ca^{2+} (η PDE1 ενεργοποιείται από τη σύνδεση του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης), την αλλοστερική σύνδεση του cGMP (PDE2, PDE5 και PDE6), τη φωσφορυλίωση (η PDE5 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την PKG-I και η PDE3 από τις PKA, PKB και PKC, οι οποίες την ενεργοποιούν). Επίσης, η PDE3 χαρακτηρίζεται ως η “cGMP-inhibited cAMP-PDE”, καθώς το cGMP λόγω της υψηλής του συγγένειας αλλά της χαμηλής ταχύτητας της υδρόλυσής του συναγωνίζεται αποτελεσματικά το cAMP.

4.4**Κανάλια που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια**

Ο δεύτερος σημαντικότερος στόχος του cGMP, μετά τις κινάσες PKGs, είναι τα κανάλια που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια (CNGC, Cyclic Nucleotide Gated Channels). Ήταν μεγάλη έκπληξη όταν το 1985 ο Eugeny E. Fesenko ανακάλυψε ότι το cGMP μπορεί άμεσα να συνδεθεί και να ενεργοποιήσει κανάλια κατιόντων των ραβδίων. Τα κανάλια αυτά με βάση τη δομή τους ανήκουν στην υπεροικογένεια S5-S6, με τον χαρακτηριστικό P-βρόχο ανάμεσα στην S5 και την S6 διαμεμβρανική περιοχή (βλ. Κεφάλαιο 4, σσ. 160-162).

Τα cGMP/cAMP-εξαρτώμενα κανάλια αποτελούνται από 4 υπομονάδες (A και B). Οι A-υπομονάδες περιέχουν την περιοχή πρόσδεσης του κυκλικού νουκλεοτιδίου και οι B- παίζουν ρυθμιστικό ρόλο, έχοντας την ικανότητα να προσδένουν την καλμοδουλίνη. Η περιοχή πρόσδεσης του cGMP/cAMP ονομάζεται **CNBD** (Cyclic Nucleotide Binding Domain) και βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο των A-υπομονάδων. Είναι μια περιοχή εξελικτικά ομόλογη με αυτή των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από τα κυκλικά νουκλεοτίδια (PKA, PKG). Η επιλεκτική εξειδίκευση σε κυκλικά νουκλεοτίδια της περιοχής αυτής έγκειται στις οκτώ β-αλυσίδες και τις τρεις α-έλικες. Έτσι, αν και όλα τα CNG κανάλια ενεργοποιούνται από cGMP και από cAMP, κάποιες μορφές τους είναι πιο ευαίσθητες σε cGMP απ' ό,τι σε cAMP ή το αντίθετο.

Τα κανάλια που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο cGMP εκφράζονται στα ραβδία και στα κωνία του αμφιβληστροειδούς. Τα κανάλια των ραβδίων αποτελούνται από τρεις A1 και μια B1a-υπομονάδα, ενώ των κωνίων από δύο A3- και δύο B3-υπομονάδες (βλ. **Εικόνα 4.34**). Η B1a υπομονάδα των CNGC των ραβδίων περιέχει και μια περιοχή GARP (Glutamic Acid Rich Domain) μέσω της οποίας συνδέονται με την περιφερίνη της μεμβράνης των δίσκων (βλ. **Εικόνα 6.44**). Στον ρόλο των cGMP-εξαρτώμενων καναλιών στη φωτομεταγωγή θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

5. Το cGMP και η Φυσιολογία του Κυττάρου

Εκτός από το cAMP και την τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3), το cGMP είναι ένας πανταχού παρών δεύτερος διαβιβαστής στα προκαρυωτικά αλλά και στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Παράγεται από τις μεμβρανικές και τις διαλυτές γουανυλικές κυκλάσες μετά τη διέγερσή τους από διαφορετικά εξωκυττάρια μηνύματα (νατριουρητι-

κά πεπτίδια, ηλιακή ακτινοβολία ή NO) και παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση λειτουργιών, όπως η χάλαση των λείων μυών, η πίεση του αίματος, η κυτταρική αύξηση, η φωτομεταγωγή, η νευρωνική πλαστικότητα, η μνήμη και η μάθηση, η ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού και άλλα. Στη συνέχεια, θα αναφερθούμε στις διαφορετικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν το cGMP και οι αντίστοιχες γουανυλικές κυκλάσες που το παράγουν.

5.1 GC-A και ο φυσιολογικός της ρόλος

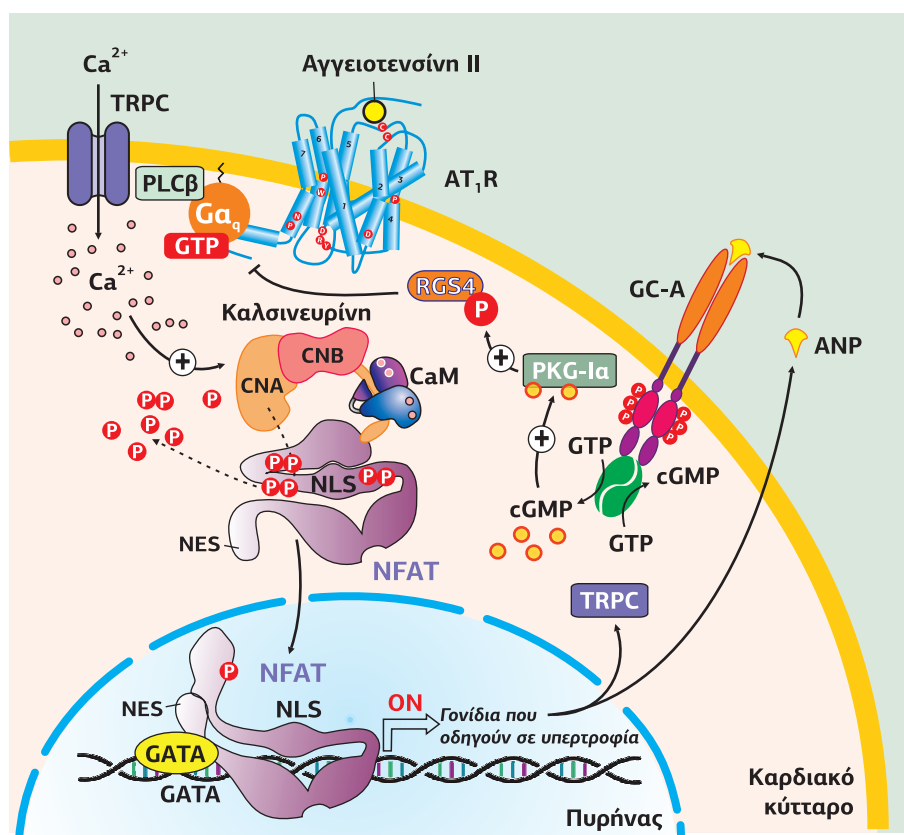
Η GC-A έχει αυξημένη έκφραση στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, στον εγκέφαλο, στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό. Σε χαμηλότερα επίπεδα εκφράζεται στην καρδιά. GC-A null ποντίκια εμφανίζουν καρδιακή υπερτροφία και αυξημένη πίεση του αίματος. Η εξωκυτταρική περιοχή της GC-A περιέχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και πέντε θέσεις N-γλυκοσυλίσωσης. Η GC-A είναι φωσφορυλιωμένη σε πέντε Ser και δύο Thr στην περιοχή KHD (Kinase Homology Domain), στη μη διεγερμένη της μορφή.

Η GC-A ενεργοποιείται από τα νατριουρητικά πεπτίδια **ANP** και **BNP**, τα οποία εκκρίνονται κυρίως από τα καρδιομυοκύτταρα σε απάντηση στην πίεση που δέχονται τα τοιχώματα της καρδιάς. Η δράση τους όπως είδαμε είναι διπλή: παρακρινής καθώς δρουν στα καρδιακά μυοκύτταρα αναστέλλοντας την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό τους και ενδοκρινής καθώς μεταφέρονται μέσω του αίματος στους νεφρούς, όπου ελαττώνουν την επαναρρόφηση Na^+ , στον φλοιό των επινεφριδίων, όπου αναστέλλουν την έκκριση αλδοστερόνης, στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων όπου προκαλούν χάλαση και αγγειοδιαστολή, στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης, όπου αναστέλλουν την έκκριση βασοπρεσίνης και, τέλος, στα λιποκύτταρα προκαλώντας λιπόλυση.

Εικόνα 6.34

Σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου το ANP αναστέλλει την καρδιακή υπερτροφία.

Αγωνιστές που προκαλούν καρδιακή υπερτροφία, όπως η αγγειοτενσίνη II, διεγείρουν GPCRs και ενεργοποιούν μέσω της G_q -πρωτεΐνης την PLC. Η παραγωγή DAG και IP_3 οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} (μέσω εισόδου από τα TRPC κανάλια) σε επίπεδα ικανά να ενεργοποιήσουν την καλμοδουλινο-εξαρτώμενη φωσφατάση καλσινευρίνη. Η ενεργοποιημένη καλσινευρίνη αποφωσφυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα NFAT, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα GATA ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία, αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν για το ANP και το BNP. Το ANP και το BNP ασκούν την αντιυπερτροφική τους δράση ενεργοποιώντας τον υποδοχέα GC-A, ο οποίος με τη σειρά του παράγει cGMP. Το cGMP ενεργοποιεί την PKG-Ia, η οποία φωσφορυλιώνει τον RGS4, έναν ενεργοποιητή της δράσης GTPάσης της G_q . Η αναστολή της G_q σταματά την καλσινευρίνη-NFAT σηματοδότηση, καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία. [12]



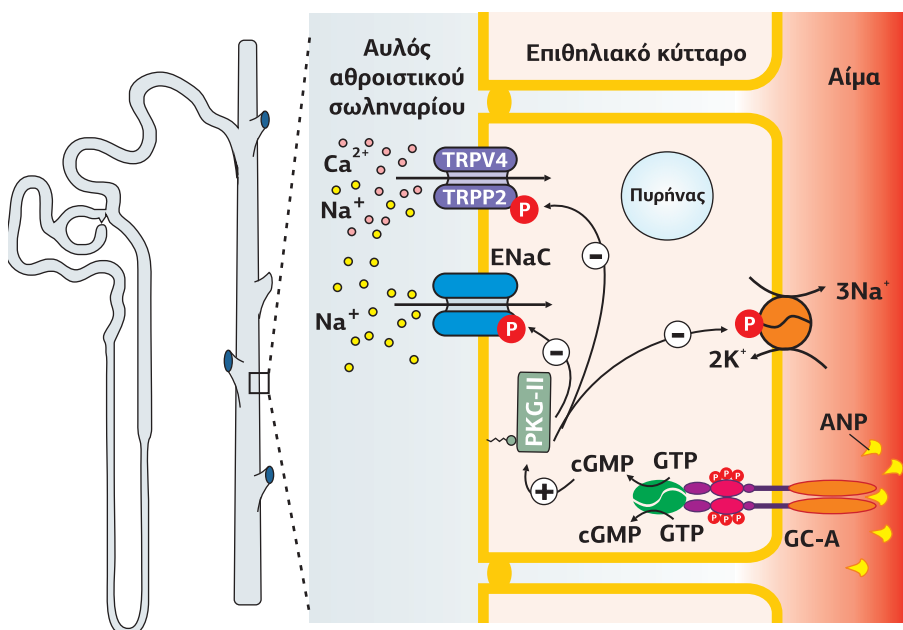
Καρδιοπροστατευτικός ρόλος

Ποντίκια knock-out GC-A εμφανίζουν καρδιακή υπερτροφία. Το ANP προστατεύει την καρδιά αναστέλλοντας το μονοπάτι της καλσινευρίνης, η οποία ενεργοποιείται από την αύξηση του Ca^{2+} που επάγει η αγγειοτενσίνη II, η νοραδρεναλίνη και η ενδοθηλίνη I, αγωνιστές που προκαλούν καρδιακή υπερτροφία. Οι αγωνιστές αυτοί διεγείρουν τους GPCR υποδοχείς τους και ενεργοποιούν μέσω της G_q -πρωτεΐνης την PLCβ. Η παραγωγή DAG και IP_3 οδηγεί σε είσοδο Ca^{2+} από τα κανάλια TRPC, αυξάνοντας τη συγκέντρωση Ca^{2+} σε επίπεδα ικανά να ενεργοποιήσουν την καλμοδουλινο-εξαρτώμενη φωσφατάση καλσινευρίνη. Όταν ενεργοποιηθεί, η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα GATA ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία, αλλά και γονιδίων που κωδικοποιούν για το ANP, το BNP και το κανάλι TRPC.

Τα ANP και BNP ασκούν την αντιυπερτροφική τους δράση ενεργοποιώντας τον υποδοχέα GC-A, ο οποίος με τη σειρά του παράγει cGMP. Το cGMP ενεργοποιεί την PKG-Ia, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον RGS4 (Regulator of G protein signaling Subtype 4), ο οποίος αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα GTPάσης της G_q . Η επιτάχυνση της υδρόλυσης του GTP από την G_q σταματά τη σηματοδότηση μέσω καλσινευρίνης-NFAT, καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων που οδηγούν σε υπερτροφία. Υπερέκφραση της RGS4 στα καρδιομυοκύτταρα GC-A knock-out ποντικών ελαττώνει σημαντικά το μέγεθος των καρδιακών κυττάρων και τη δραστηριότητα της καλσινευρίνης (Εικόνα 6.34).

Ελάττωση της επαναρρόφησης Na^+ από τους νεφρούς

Η ισορροπία ανάμεσα στην αγγειοσυστολή/κατακράτηση Na^+ και στην αγγειοδιαστολή/νατριούρηση είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης υγρών και ηλεκτρολυτών. Τα νατριουρητικά πεπτίδια ανήκουν στην κατηγορία των αγγειοδιασταλτικών/νατριουρητικών ουσιών. Στους νεφρούς το ANP συνδέεται στον υποδοχέα GC-A και αυξάνει τη συγκέντρωση του cGMP. Το cGMP ενεργοποιεί την PKG-II, η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την Na^+/K^+ -ATPάση της βασοπλευρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του νεφρώνα, τα κανάλια ENaC, καθώς και τα κανάλια $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ TRPV4/TRPP2, τα οποία κλείνουν. Κατά συνέπεια, εμποδίζεται η είσοδος Na^+ στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρώνα και αυξάνεται η απομάκρυνση του Na^+ μέσω των ούρων (Εικόνα 6.35).



Εικόνα 6.35

Το ANP μέσω της GC-A προκαλεί νατριούρηση. Το ANP κυκλοφορεί και φτάνει στα νεφρά μέσω του αίματος. Η ενεργοποίηση της γουανυλικής κυκλάσης A, GC-A, οδηγεί στην αύξηση του cGMP στα επιθηλιακά κύτταρα του νεφρώνα. Το cGMP προκαλεί μέσω της PKG-II κλείσιμο των καναλιών ENaC και TRPV4/TRPP2 και αναστολή της Na^+/K^+ -ATPάσης. [43]

Λιπολυτική δράση στα λιποκύτταρα

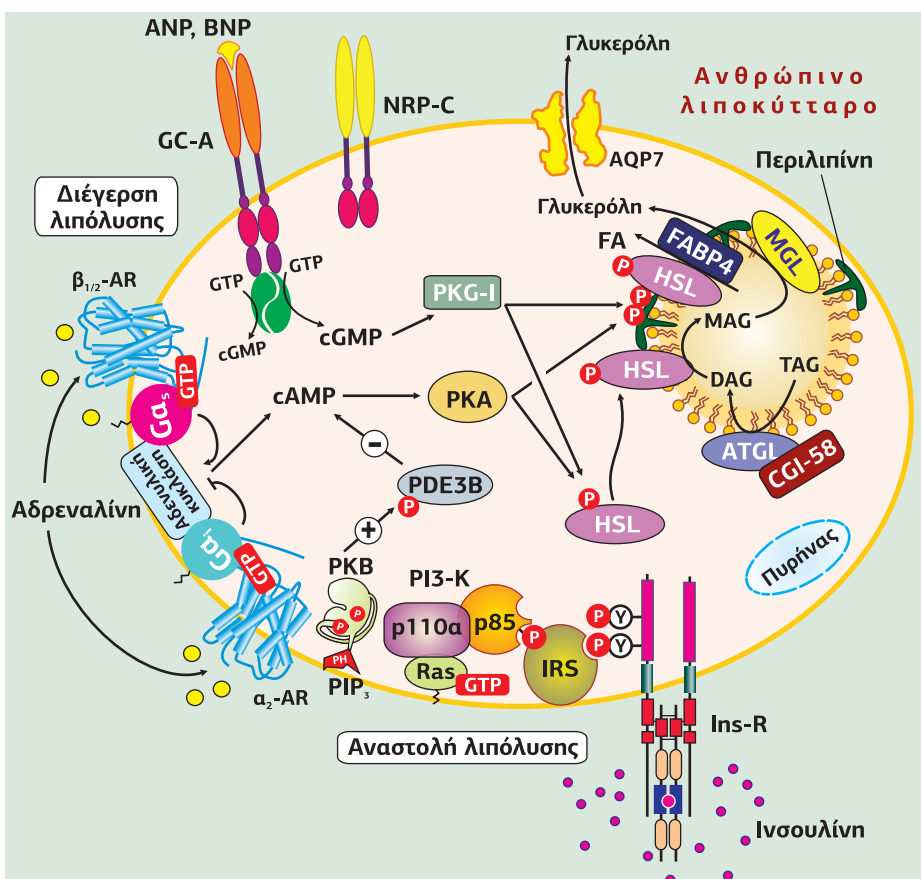
Δεν υποπτευόταν κανείς τον μεταβολικό ρόλο των ANP και BNP, έως την ανακάλυψη το 2000 ότι ασκούν ισχυρή λιπολυτική δράση στα ανθρώπινα λιποκύτταρα και αυξάνουν τα επίπεδα των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFAs, Non-Esterified Fatty Acids) στο πλάσμα, όταν εγχέονται ενδοφλέβια. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα νατριουρητικά πεπτιδία (NPs) εμφανίζουν ένα πολύ ευρύτερο φάσμα βιολογικών δράσεων από τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση των NPs στο πλάσμα είναι αισθητά μειωμένη σε παχύσαρκους και σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο ή διαβήτη, συμπεραίνοντας ότι έχουν προστατευτικό ρόλο ενάντια στην παχυσαρκία και στον διαβήτη τύπου 2.

Η λιπολυτική δράση του ANP μεσολαβείται από τον υποδοχέα GC-A και την ενεργοποίηση της παραγωγής cGMP, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την κινάση PKG-I. Η PKG-I φωσφορυλιώνει τη λιπάση HSL (Hormone-Sensitive Lipase) και την περιλιπίνη A (perilipin, PLIN). Η **περιλιπίνη A** (PLIN-A) είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται και περιβάλλει την επιφάνεια των λιπιδικών σταγονιδίων στα λιποκύτταρα, δρώντας ως προστατευτικό κάλυμμα των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων από τις λιπάσες, όπως η HSL, που καταβολίζουν τα τριγλυκερίδια σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα κατά τη διαδικασία της λιπόλυσης. Η περιλιπίνη υπερφωσφορυλιώνεται από την PKG-I, αλλάζει διαμόρφωση, επάγοντας: α. την απελευθέρωση του CGI-58 (Comparative Gene Identification) από την περιλιπίνη και τη σύνδεσή του στη λιπάση ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) στην οποία δρα ως ενεργοποιητής, και β. την έκθεση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων στις λιπάσες ATGL και HSL, ενεργοποιώντας τη λιπόλυση. Η φωσφορυλίωση της **HSL** προωθεί την ενεργοποίησή της και τη μεταφορά της από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια των λιπιδικών σταγονιδίων, όπου συνδέεται στην υπερφωσφορυλιωμένη περιλιπίνη. Αν και η φωσφορυλίωση αυξάνει τη δραστηριότητα της HSL, η μεγαλύτερη από 5-φορές αύξηση της κινητοποίησης των τριγλυκεριδίων (που προκαλούν οι

Εικόνα 6.36

Μηχανισμός της λιπόλυσης σε ανθρώπινα λιποκύτταρα και το σηματοδοτικό μονοπάτι των νατριουρητικών πεπτιδίων ANP, BNP μέσω του υποδοχέα GC-A.

Η ενεργοποίηση της γονανυλικής κυκλάσης GC-A οδηγεί στην παραγωγή cGMP, το οποίο έχει ως στόχο την κινάση PKG-I. Η PKG-I φωσφορυλιώνει την περιλιπίνη (PLIN), η οποία απομακρύνεται από την επιφάνεια των λιπιδικών σταγονιδίων εκθέτοντας τα αποθηκευμένα τριγλυκερίδια στις λιπάσες ATGL και HSL, επάγοντας την έναρξη της λιπόλυσης. Η φωσφορυλίωση της HSL από την PKG-I (και την PKA) προωθεί τη μετακίνησή της από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια των λιπιδικών σταγονιδίων. Η σύνδεση της πρωτεΐνης FABP4 (Fatty Acid-Binding Protein 4) στην HSL διευκολύνει την έξοδο στο κυτταρόπλασμα των μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFAs) που απελευθερώνονται από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (TAGs) και διγλυκεριδίων (DAGs). Στη συνέχεια, η γλυκερόλη που παράγεται από την υδρόλυση των MAGs εγκαταλείπει το κύτταρο μέσω της υδατοπορίνης AQP7. Στην εικόνα διακρίνεται και η αντιλιπολυτική δράση της ινσουλίνης, η οποία μέσω της ενεργοποίησης της PDE3B μειώνει τα επίπεδα cAMP και αναστέλλει την PKA. Ο ρόλος της αδρεναλίνης στα λιποκύτταρα είναι πολύπλοκος λόγω της συνδυαστικής δράσης των ετερογενών υποδοχέων $\beta_{1/2}$ και α_2 . [26] [20]



λιπολυτικές ορμόνες) οφείλεται στη φωσφορυλίωση της περιλιπίνης. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη FABP4 (Fatty Acid-Binding Protein 4) αγκυροβολείται κοντά στη λιπάση HSL διευκολύνοντας τη ροή στο κυτταρόπλασμα μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (FA), που απελευθερώθηκαν από την υδρόλυση της τριακυλογλυκερόλης (TAG, triacylglycerol) και της διακυλογλυκερόλης (DAG) (Εικόνα 6.36).

Ο υποδοχέας εκκαθάρισης των νατριουρητικών πεπτιδίων NPR-C, ο οποίος εκφράζεται στα ανθρώπινα λιποκύτταρα, σε συνεργασία με την ουδέτερη ενδοπεπτιδάση neprilysin εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των NPs στα λιποκύτταρα. Η φωσφοδιεστεράση PDE5, η οποία παίζει εξειδικευμένο ρόλο στην υδρόλυση του cGMP, έχει επίσης αναγνωριστεί στον λιπώδη ιστό.

Στα πρωτεύοντα η κύρια αντιλιπολυτική ορμόνη είναι η ινσουλίνη, η οποία αντισταθμίζει τα λιπολυτικά αποτελέσματα της αδρεναλίνης, χωρίς να διασταυρώνεται και να επηρεάζει τη λιπολυτική δράση των NPs. Η ινσουλίνη και η αδρεναλίνη δρουν με αντίθετη κατεύθυνση στο μονοπάτι cAMP/ PKA. Στα λιποκύτταρα η ινσουλίνη μέσω των υποδοχέων της (Ins-Rs) και της ενεργοποίησης της φωσφοδιεστεράσης PDE3B προωθεί τον καταβολισμό του cAMP, ενώ η αδρεναλίνη μέσω των β_1 -υποδοχέων της ενεργοποιεί μέσω της G_s την αδενυλική κυκλάση, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία, όπως και η PKG-I, φωσφορυλιώνει την περιλιπίνη και την HSL, ενεργοποιώντας τη λιπόλυση.

5.2 GC-B και ο ρόλος της στην ανάπτυξη των οστών

Η μεμβρανική γουανυλική κυκλάση GC-B είναι δομικά όμοια με την GC-A, αλλά ενεργοποιείται από το CNP. Η πιο εξειδικευμένη δράση του CNP είναι η διέγερση της ενδοχονδριακής οστεοποίησης (endochondrial ossification) που απαιτείται για την αύξηση των επιμήκων οστών. Η CNP-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της GC-B οδηγεί στην παραγωγή cGMP, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την **PKG-II**. Απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για το CNP, τη GC-B ή την κινάση PKG-II οδηγεί σε νανισμό. Τα υποστρώματα της PKG-II στο μονοπάτι της αύξησης των επιμήκων οστών δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Ωστόσο, υπερέκφραση του CNP φαίνεται να αναστέλλει τη δραστηριότητα της MAP κινάσης και μερικώς να αντισταθμίζει τον νανισμό που προκαλεί η ενεργοποίηση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR3, Fibroblast Growth Factor Receptor-3) σε ένα μοντέλο αχονδροπλασίας ποντικών.

5.3 GC-C και ο ρόλος της στην έκκριση υγρών από το εντερικό επιθήλιο

Η γουανυλική κυκλάση-C (GC-C) εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, όπου το 1990 αναγνωρίστηκε από την Stephanie Schulz στο Vanderbilt University Medical Center ως υποδοχέας των βακτηριακών θερμοανθεκτικών εξωτοξινών (STa, Heat-stable), οι οποίες παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία εντερικών παθογόνων, μεταξύ των οποίων η *Escherichia coli*, το *Citrobacter freundii*, το *Vibrio cholerae*, το *Vibrio mimicus* και η *Yersinia enterocolitica*. Οι STa δρουν ως υπερ-αγωνιστές της GC-C ενεργοποιώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη απελευθέρωση ηλεκτρολυτών και νερού στον αυλό του εντέρου, με αποτέλεσμα διάρροια και αφυδάτωση. Σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις, χωρίς την απαραίτητη θεραπεία, αυτός ο μηχανισμός είναι υπεύθυνος για περίπου μισό εκατομμύριο θανάτους τον χρόνο, κυρίως παιδιά σε αναπτυσσόμενες χώρες.

Ωστόσο, η GC-C έχει και ενδογενείς προσδέτες, την οικογένεια των πεπτιδίων γουανυλίνης (GPs), η οποία περιλαμβάνει τη γουανυλίνη (guanylin, GN), την ουρογουανυλίνη (uroguanylin, UGN), τη λεμφογουανυλίνη (lymphoguanin) και τη ρενο-

Η **αχονδροπλασία** είναι μια γενετική διαταραχή της οποίας το κύριο χαρακτηριστικό είναι ο νανισμός. Το 98% όλων των περιπτώσεων αχονδροπλασίας οφείλεται στη μετάλλαξη G380R στη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR3). Η μετάλλαξη αυτή επάγει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα απουσία προσδέτη. Ο FGFR3 είναι γνωστός ως αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης μακρών οστών. Η ενεργοποίηση FGFR3 που προκαλείται από τη μετάλλαξη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και οδηγεί σε υπερτροφική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων προκαλώντας τον φαινότυπο της αχονδροπλασίας. Ο CNP βρέθηκε να αναστέλλει τον FGFR3.

γουανυλίνη (renoguanlylin). Τα πεπτίδια αυτά χαρακτηρίζονται ως εντερικά νατριουρητικά πεπτίδια. Η ουρογουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 16 αμινοξέων που συντίθεται στο έντερο και στους νεφρούς, ενώ η γουανυλίνη είναι ένα πεπτίδιο 15 αμινοξέων που συντίθεται στον ειλέο και στο παχύ έντερο. Και τα δύο είναι εξελικτικά συντηρημένα στα διάφορα είδη, υποδεικνύοντας τον μοναδικό φυσιολογικό τους ρόλο.

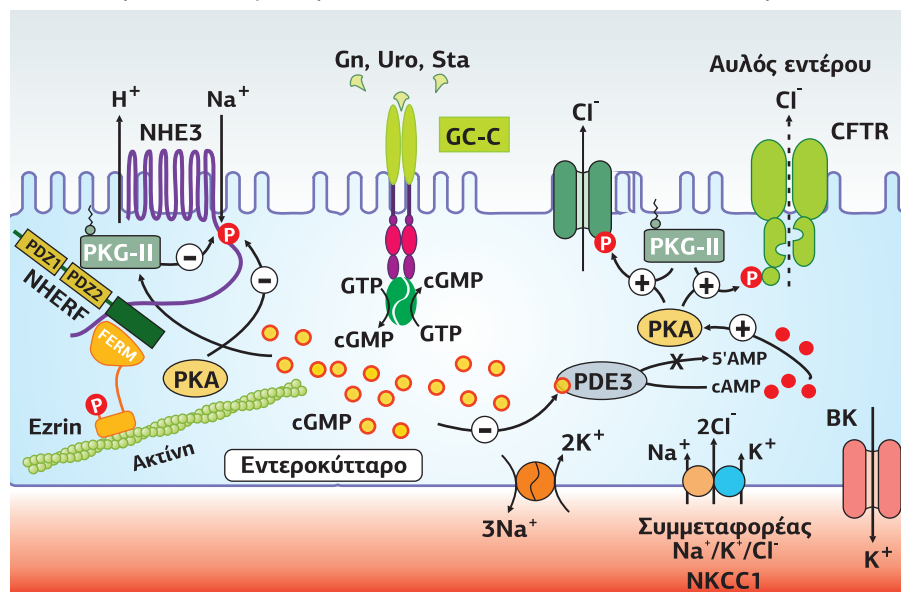
Η φυσιολογική λειτουργία του πεπτικού συστήματος δεν είναι μόνο η πέψη και

η απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, αλλά επίσης και η προετοιμασία του σώματος για την αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης, αμινοξέων, ηλεκτρολυτών και νερού στο αίμα. Είναι γνωστό ότι πολλές ορμόνες που εκκρίνονται από το έντερο έπειτα από ένα γεύμα, όπως η γαστρίνη, η σεκρετίνη, η χολοκυστοκίνη και ιδιαίτερα το γαστρικό ανασταλτικό πεπτίδιο GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide), αυξάνουν την παραγωγή ινσουλίνης, ακόμη και πριν οι συγκεντρώσεις γλυκόζης και αμινοξέων αυξηθούν σημαντικά στο αίμα. Ο R.J. Lennane το 1975 έδειξε ότι το άλας που λαμβάνεται από το στόμα αυξάνει την έκκριση ηλεκτρολυτών και νερού από τα νεφρά περισσότερο από ό,τι το ίδιο ποσό άλατος που δίνεται ενδοφλέβια, προτείνοντας την ύπαρξη εντερικών ορμονών, οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία των νεφρών. Μετά τη λήψη ενός

αλμυρού γεύματος εντερικά νατριουρητικά πεπτίδια, όπως η GN και η UGN, εκκρίνονται από τα επιθηλιακά εντεροκύτταρα και απελευθερώνονται στον αυλό του εντέρου, αναστέλλοντας την πρόσληψη Na^+ και ενεργοποιώντας την έκκριση ηλεκτρολυτών και νερού στον αυλό του εντέρου. Αντίθετα, λήψη τροφής χαμηλής σε αλάτι μειώνει τα επίπεδα mRNA της GN και UGN στον πεπτικό σωλήνα.

Πιο αναλυτικά, όταν οι γουανυλίνες εκκρίνονται στον αυλό του εντέρου, έπειτα από ένα αλμυρό γεύμα, διεγείρουν τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω της ενεργοποίησης της μεμβρανικής γουανυλικής κυκλάσης GC-C, η οποία βρίσκεται στην κορυφαία επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (στη μεμβράνη των μικρολαχνών). Η ενεργοποιημένη GC-C παράγει cGMP, το οποίο ενεργοποιεί την κινάση PKG-II. Η αύξηση του cGMP αναστέλλει τη φωσφοδιεστεράση PDE3, που είναι υπεύθυνη για τον καταβολισμό του cAMP. Η αναστολή της PDE3 οδηγεί σε αύξηση

Εικόνα 6.37
Τα GC-C εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια στο έντερο. Η GC-C εκφράζεται στη μεμβράνη των μικρολαχνών των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, όπου ενεργοποιείται από τις ενδογενείς ορμόνες ουρογουανυλίνη (UGN) και γουανυλίνη (GN), οι οποίες συντίθενται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και εκκρίνονται στον αυλό του εντέρου. Η GC-C είναι, επίσης, υποδοχέας για θερμοανθεκτικές τοξίνες (STa) που παράγονται από βακτήρια, όπως η *E. coli*. Η γουανυλίνη, η ουρογουανυλίνη και οι θερμοανθεκτικές τοξίνες ενεργοποιούν την GC-C, η οποία μετατρέπει το GTP σε cGMP, αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα cGMP. Το cGMP στα εντεροκύτταρα ενεργοποιεί την κινάση PKG-II και, άμεσα ή έμμεσα μέσω αναστολής της φωσφοδιεστεράσης PDE3, την κινάση PKA. Στη συνέχεια, οι PKA και PKG-II φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν τον ανταλλάκτη Na^+/H^+ (NHE3) και, κατά συνέπεια, ελαττώνουν την απορρόφηση Na^+ . Επίσης, ενεργοποιούν την έκκριση Cl^- μέσω φωσφορυλίωσης του καναλιού CFTR και του καναλιού CIC. [40] [36]



του ενδοκυτταρικού cAMP, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την κινάση PKA. Η PKG-II και η PKA φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν τον ανταλλάκτη Na^+/H^+ NHE3 και, κατά συνέπεια, την απορρόφηση του Na^+ από τον αυλό του εντέρου, εμποδίζοντας την αύξηση της συγκέντρωσης Na^+ στο αίμα μετά τη λήψη ενός αλμυρού γεύματος. Ο ανταλλάκτης Na^+/H^+ NHE3 συνδέεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού μέσω της πρωτεΐνης Ezrin, σύνδεση απαραίτητη για την ενδοκύτωση του NHE3. Η Ezrin συνδέεται στην COOH-τελική περιοχή του NHE3 είτε άμεσα μέσω της FERM περιοχής της είτε έμμεσα μέσω της σύνδεσής της στην COOH-τελική περιοχή της NHERF1-2, η οποία με τη σειρά της συνδέεται μέσω της PDZ2 περιοχής της στον NHE3. Η δημιουργία του συμπλόκου Ezrin/ NHERF1-2/ NHE3 είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του NHE3 από τις κινάσες PKA και PKG-II, καθώς και οι δύο κινάσες στρατολογούνται κοντά στον NHE3 μέσω της σύνδεσής τους στο σύμπλοκο Ezrin/NHERF1-2. Απαραίτητη για την αναστολή του NHE3 από την PKG-II είναι και η μυριστοϋλίωση της PKG-II, καθώς μη μυριστοϋλιωμένη PKG-II δεν μπορεί να αναστείλει τον NHE3 (Εικόνα 6.37).

Επίσης, η PKG-II και η PKA φωσφορυλιώνουν το κανάλι CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) ενεργοποιώντας την έκκριση στον αυλό του εντέρου, Cl^- , μέσω του CFTR, και HCO_3^- , μέσω ενός άγνωστου ακόμη καναλιού. Σε ασθενείς με κυστική ίνωση, που χαρακτηρίζονται από μη λειτουργικό CFTR, θερμοανθεκτικές εντεροτοξίνες δεν μπορούν να προκαλέσουν διάρροια.

Το εντερικό επιθήλιο αναγεννάται γρήγορα μέσα από επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, διαφοροποίησης και απόπτωσης. Αυτοί οι κύκλοι διατηρούν την ακεραιότητα του εντέρου. Η ουρογουανυλίνη και η γουανυλίνη μέσω της GC-C ρυθμίζουν την ομοίωση αναγέννησης του εντερικού επιθηλίου αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 6.38). Η GC-C αναγνωρίστηκε ως ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που ελέγχει τον πολλαπλασιασμό και τον μεταβολισμό των επιθηλιακών εντεροκυττάρων μέσω της κινάσης PKB/Akt. Επίσης, μεταλλάξεις loss-of-function στα γονίδια που κωδικοποιούν για τη γουανυλίνη και την ουρογουανυλίνη έχουν βρεθεί συχνά σε καρκίνους του παχέος εντέρου. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της GC-C αντιστρέφει τον καρκινογόνο φαινότυπο σε πειραματικά μοντέλα ποντικών και εμποδίζει τη μετάσταση αναστέλλοντας

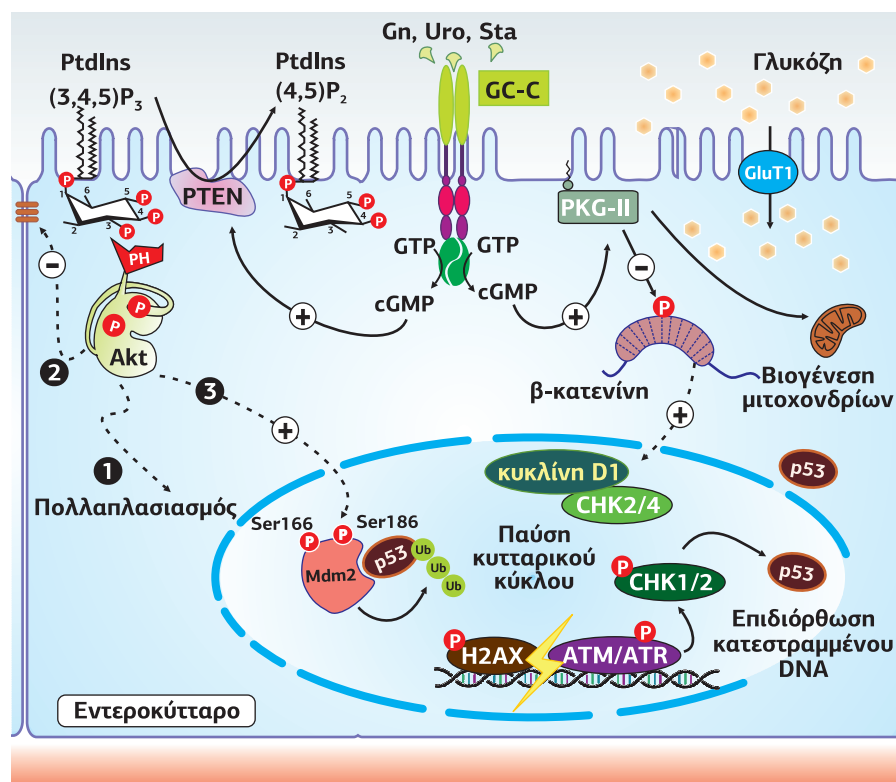
H NHERF1 (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor) είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής που περιέχει δύο περιοχές PDZ και μια COOH-τελική περιοχή αλληλεπίδρασης με την περιοχή FERM της Ezrin.

Εικόνα 6.38

Η GC-C είναι κύριος ρυθμιστής της εντερικής ομοιότητας και ακεραιότητας.

Η GC-C ελέγχει τον πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας τη σηματοδότηση της κινάσης Akt. Η αυξημένη συγκέντρωση cGMP ενεργοποιεί την έκφραση και τη δραστηριότητα της φωσφατάσης PTEN, η οποία αποφωσφορυλιώνει τα PIP_3 και αναστέλλει την PKB/Akt. Η PKB/Akt απενεργοποιείται και κατά συνέπεια:

1. ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου αναστέλλεται,
2. προστατεύεται η ακεραιότητα των στεγανών συνδέσμων, που συνδέουν τα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα μεταξύ τους, και
3. εμποδίζεται η λιγύση της οβικονιτίνης Mdm2 (Mouse double minute 2) και η Mdm2-εξαρτώμενη αποικοδόμηση του ογκοκατασταλτικού μεταγραφικού παράγοντα p53 προωθώντας την επιδιόρθωση κατεστραμμένου DNA και τη σταθερότητα του γονιδιώματος. Επίσης, η αυξημένη συγκέντρωση cGMP ενεργοποιεί την PKG-II, η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την β-κατενίνη, η οποία θα ενεργοποιούσε την κυκλίνη D1, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη θέση G1/S. Η ενεργοποίηση της GC-C προωθεί τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση, μειώνει την έκφραση του μεταφορέα της γλυκόζης (GluT1), μειώνοντας τη γλυκόλυση. Συνοπτικές: ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), CHK1/2 (Checkpoint Kinase 1/2), CHK2/4 (Checkpoint Kinase 2/4), H2AX (H2A Histone family, member X). [11]



τη μεταλλοπρωτεάση 9 (MPP9) της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που παράγεται από τα καρκινικά εντερικά κύτταρα.

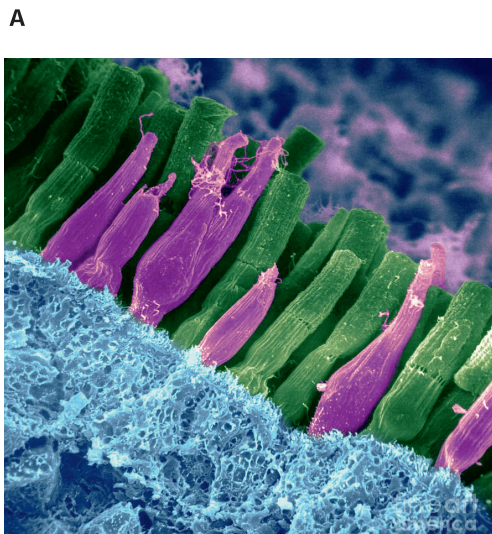
Μελέτες με GC-C null (*Gucy2c^{-/-}*) ποντίκια επιβεβαίωσαν τον κεντρικό ρόλο των GC-C στον έλεγχο της ομοιόστασης ηλεκτρολυτών και υγρών και, επιπλέον, βρέθηκε ότι τα GC-C^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν γρηγορότερη αύξηση με αυξημένη σωματική μάζα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Καθώς η όρεξη ελέγχεται κεντρικά από τον υποθάλαμο και η ουρογουανυλίνη δεν παράγεται στον εγκέφαλο, έχει προταθεί ότι η πρόδρομη προ-ουρογουανυλίνη μεταφέρεται από το έντερο μέσω του αίματος στον υποθάλαμο, όπου μετατρέπεται σε ουρογουανυλίνη και ενεργοποιεί την GC-C, η οποία εκφράζεται σε νευρώνες του υποθαλάμου. Ωστόσο, ένας περιφερικός μηχανισμός δεν αποκλείεται. Η συμμετοχή του cGMP και της κινάσης PKG-II έχει επιβεβαιωθεί στον έλεγχο της όρεξης, καθιστώντας την ουρογουανυλίνη μια νέα αντιορεξιογόνα ορμόνη που προκαλεί την αίσθηση κορεσμού.

5.4 GC-E και GC-F και ο ρόλος τους στη φωτοδιαβίβαση

Εικόνα 6.39

Τα ραβδία και τα κωνία.

A. Ηλεκτρονιομικρογραφία των κωνίων (με μωβ) και των ραβδίων (με πράσινο). B. Τα κύτταρα φωτούποδοχείς είναι υψηλά διαφοροποιημένα επιθηλιακά κύτταρα, στα οποία η φωτοευαίσθητη περιοχή αποτελεί το εξωτερικό τμήμα. Το εξωτερικό τμήμα περιέχει ενδοκυτταρικούς δίσκους, στη μεμβράνη των οποίων βρίσκεται η φωτοχρωστική ροδοψίνη. Το εσωτερικό τμήμα των φωτούποδοχών περιέχει τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και τα οργανίδια, υπεύθυνα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Οι απολήξεις του εσωτερικού τμήματος των φωτοευαίσθητων κυττάρων σχηματίζουν συνάψεις με τους διάμεσους νευρώνες.



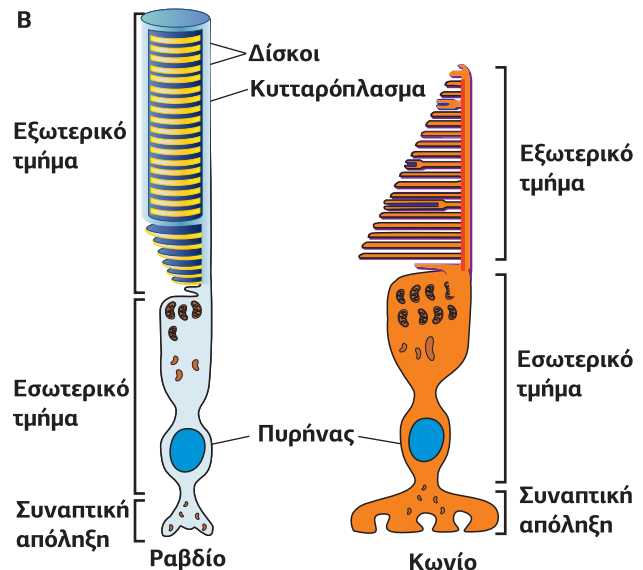
Το cGMP είναι ένας κεντρικός ρυθμιστής της φωτοδιαβίβασης, μια διαδικασία όπου τα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, τα ραβδία και τα κωνία, μετατρέπουν τα φωτόνια σε ηλεκτρικό σήμα παράγοντας εικόνα.

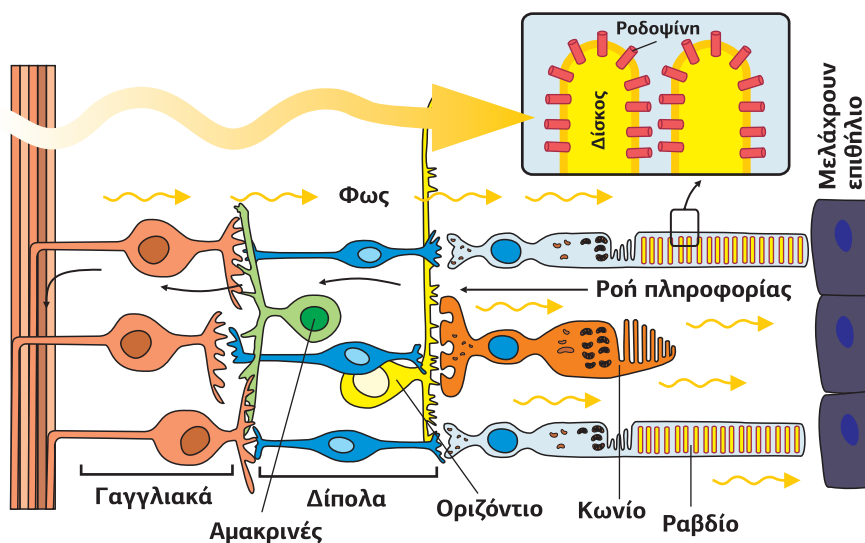
Τα ραβδία και τα κωνία περιέχουν δύο τύπους rGCs, την GC-E και την GC-F. Η GC-E εκφράζεται στα κωνία και στα ραβδία, ενώ η GC-F μόνο στα ραβδία. Εκεί σχηματίζουν ομοδιμερή, τα οποία ενεργοποιούνται από ειδικές Ca²⁺-binding proteins, τις GCAPs (Guanylyl Cyclase Activated Proteins). Οι GCAPs, όταν η [Ca²⁺]i είναι χαμηλή, συνδέονται στην κυτταροπλασματική περιοχή της κυκλάσης και την ενεργοποιούν, χωρίς την ύπαρξη εξωκυτταρικού προσδέτη.

Ραβδία και κωνία: τα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς

Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας αποτελείται από έξι τύπους κυττάρων, τα φωτοευαίσθητα ραβδία και κωνία, τα οποία μετατρέπουν το οπτικό ερέθισμα σε δυναμικά δράσης, που μεταφέρονται, μέσω των διάμεσων νευρικών οριζόντιων, δίπολων και αμακρινών κυττάρων, στους γαγγλιακούς νευρώνες, οι άξονες των οποίων δημιουργούν το οπτικό νεύρο (Εικόνα 6.40, και βλ. σελ. 93 Εικόνα 2.31).

Τα κύτταρα φωτούποδοχείς είναι νευροαισθητήρια κύτταρα, στα οποία η φωτοευαίσθητη περιοχή τους διαχωρίζεται από το κεντρικό σώμα του κυττάρου και είναι γνωστή ως **εξωτερικό τμήμα** (outer segment). Στο τμήμα αυτό υπάρχουν



**Εικόνα 6.40**

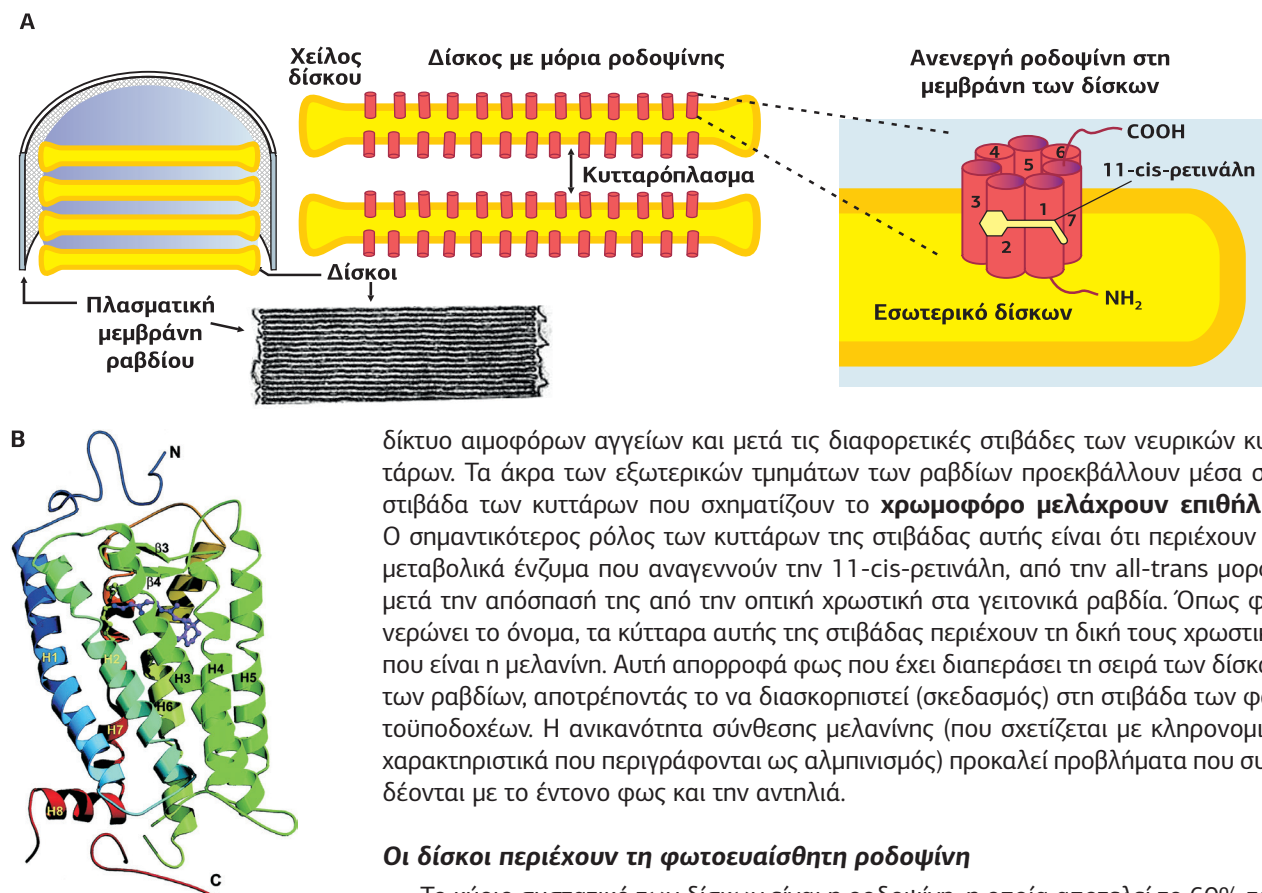
Οργάνωση του αμφιβληστροειδούς των θηλαστικών. Το φως εισέρχεται στα ραβδία και στα κωνία από το άκρο του εσωτερικού τους τμήματος, μακριά από το φωτοευαίσθητο εξωτερικό τμήμα. Προτού εισέλθει στους φωτοϋποδοχείς, πρώτα διαπερνά ένα δίκτυο αιμοφόρων αγγείων και μετά τις διαφορετικές στιβάδες των νευρικών κυττάρων. Τα άκρα των εξωτερικών τμημάτων των ραβδίων προεκβάλλουν μέσα στη στιβάδα των κυττάρων που σχηματίζουν το χρωμοφόρο μελάγχρου επιθήλιο.

παρατεταγμένοι ενδοκυτταρικοί δίσκοι, 1.000-2.000 στα ραβδία και πολύ λιγότεροι στα κωνία. Οι δίσκοι είναι πεπλατυσμένες κυψελιδικές δομές με πάχος γύρω στα 16 nm, οι μεμβράνες των οποίων περιέχουν τη φωτοχρωστική ροδοψίνη. Το **εσωτερικό τμήμα** (inner segment) των ραβδίων περιέχει τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και τα οργανίδια που συμμετέχουν στη σύνθεση των πρωτεϊνών (**Εικόνα 6.39**). Στα φωτοευαίσθητα κύτταρα η πρωτεϊνολύση είναι πολύ ενεργή, επιτρέποντας να αντισταθμίσουν την απώλεια των εξωτερικών δίσκων που έχουν ζωή μόνο λίγων εβδομάδων. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου οι δίσκοι μεταναστεύουν προσδευτικά στα απομακρυσμένα άκρα των εξωτερικών τμημάτων από όπου διαχέονται και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από τα χρωστικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι απολήξεις του εσωτερικού τμήματος των φωτοευαίσθητων κυττάρων σχηματίζουν συνάψεις με τους διάμεσους νευρώνες. Ο νευροδιαβιβαστής που απελευθερώνουν είναι το γλουταμινικό.

Τα **ραβδία** είναι υπεύθυνα για την όραση σε αμυδρά φωτισμένους χώρους (σκοτοπική όραση), ανέρχονται σε 120 εκατομμύρια περίπου (στον άνθρωπο) και είναι πιο πολλά στην περιφέρεια του αμφιβληστροειδούς. Γι' αυτόν τον λόγο στο ημίφως βλέπουμε καλύτερα ένα αντικείμενο παρατηρώντας το από πλάγια θέση. Τα ραβδία έχουν μεγάλη ευαισθησία, γιατί διεγείρονται και από ερεθίσματα μικρής έντασης, αλλά δεν μας βοηθούν να διακρίνουμε τις λεπτομέρειες, τα όρια και τα χρώματα των εικόνων. Είναι κοινή η εμπειρία να χάνεται η παρουσία χρωμάτων όταν παρατηρούμε αντικείμενα σε αμυδρό φως. Η φωτοευαίσθητη ουσία που περιέχουν τα ραβδία είναι η ροδοψίνη. Η ροδοψίνη αποτελείται από έναν GPCR, την οψίνη, η οποία έχει συνδεδεμένο προσδότη ένα παράγωγο της βιταμίνης A, την 11-*cis*-ρετινάλη.

Τα **κωνία**, έξι εκατομμύρια περίπου, χρησιμεύουν για την όραση σε έντονο φως (φωτοπική όραση) και την αντίληψη των χρωμάτων. Μεγαλύτερη συγκέντρωση κωνίων παρατηρείται στην ωχρά κηλίδα που βρίσκεται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς, ενώ δεν έχουμε ούτε ραβδία ούτε κωνία στην οπτική θηλή, δηλαδή στο σημείο που εισέρχεται το οπτικό νεύρο. Υπάρχουν τρεις τύποι κωνίων, καθένας από τους οποίους περιέχει μία από τρεις διαφορετικές χρωστικές. Καθεμία από αυτές, όπως η ροδοψίνη, αποτελείται από 11-*cis*-ρετινάλη που συνδέεται σε ένα μόριο οψίνης. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές οψίνες κωνίων που ρυθμίζουν το φάσμα απορρόφησης της περιεχόμενης ρετινάλης για τον σχηματισμό κόκκινης, πράσινης ή μπλε φωτοευαίσθητης χρωστικής.

Είναι ένα αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό (αν όχι μια ακόμη διαστροφή) του οπτικού συστήματος των σπονδυλωτών ότι το φως μπαίνει σε αυτά τα κύτταρα από το άκρο του κυτταρικού σώματος μακριά από το φωτοευαίσθητο εξωτερικό τμήμα. Και όχι μόνο αυτό, αλλά προτού εισέλθει στους φωτοϋποδοχείς, πρώτα διαπερνά ένα

**Εικόνα 6.41**

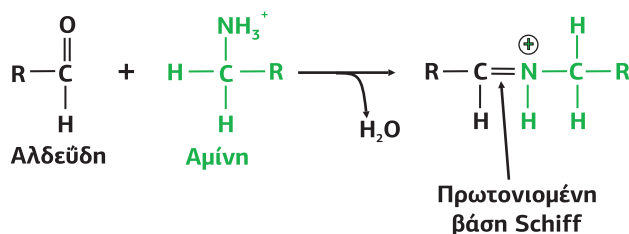
A. Οι δίσκοι είναι πεπλατυσμένες κυψελιδικές δομές με πάχος γύρω στα 16 nm, οι μεμβράνες των οποίων περιέχουν τη φωτοχρωστική ροδοψίνη.
B. Η ροδοψίνη αποτελείται από την πρωτεΐνη οψίνη, έναν GPCR, και το χρωμοφόρο ρετινάλη. Βρίσκεται στη μεμβράνη των δίσκων, με το NH₂-τελικό άκρο προς το εσωτερικό των δίσκων και την COOH-τελική περιοχή στο κυτταρόπλασμα. [23]

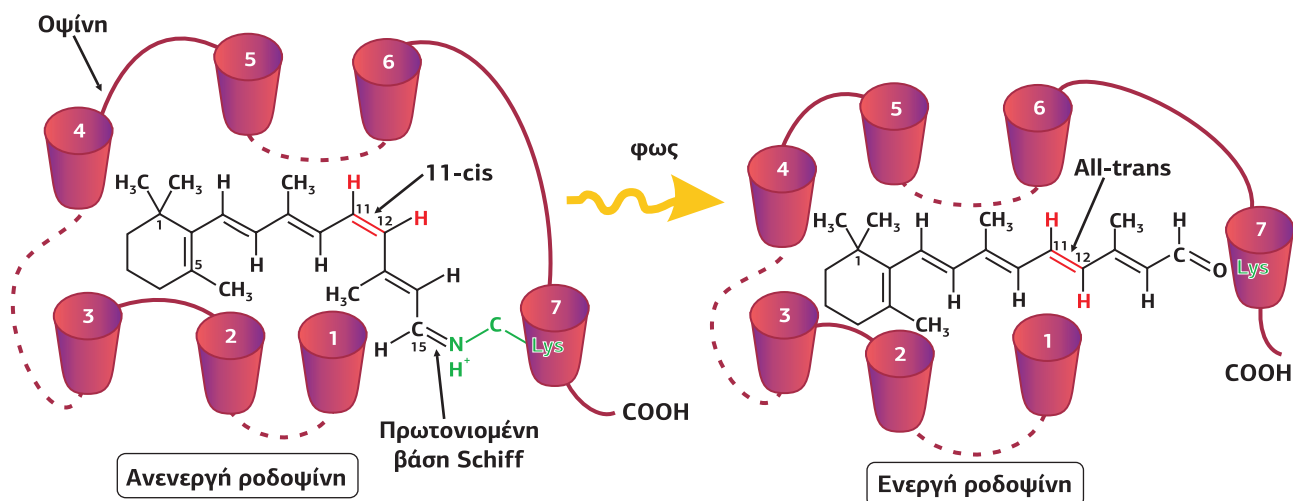
δίκτυο αιμοφόρων αγγείων και μετά τις διαφορετικές στιβάδες των νευρικών κυττάρων. Τα άκρα των εξωτερικών τμημάτων των ραβδίων προεκβάλλουν μέσα στη στιβάδα των κυττάρων που σχηματίζουν το **χρωμοφόρο μελάχρου επιθήλιο**. Ο σημαντικότερος ρόλος των κυττάρων της στιβάδας αυτής είναι ότι περιέχουν τα μεταβολικά ένζυμα που αναγεννούν την 11-cis-ρετινάλη, από την all-trans μορφή μετά την απόσπασή της από την οπτική χρωστική στα γειτονικά ραβδία. Όπως φανερώνει το όνομα, τα κύτταρα αυτής της στιβάδας περιέχουν τη δική τους χρωστική, που είναι η μελανίνη. Αυτή απορροφά φως που έχει διαπεράσει τη σειρά των δίσκων των ραβδίων, αποτρέποντάς το να διασκορπιστεί (σκεδασμός) στη στιβάδα των φωτοϋποδοχέων. Η ανικανότητα σύνθεσης μελανίνης (που σχετίζεται με κληρονομικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται ως αλμπινισμός) προκαλεί προβλήματα που συνδέονται με το έντονο φως και την αντηλία.

Οι δίσκοι περιέχουν τη φωτοευαίσθητη ροδοψίνη

Το κύριο συστατικό των δίσκων είναι η ροδοψίνη, η οποία αποτελεί το 60% των μεμβρανικών πρωτεϊνών των δίσκων. Ένα ανθρώπινο ραβδί περιέχει κατά μέσο όρο 10⁸ μόρια ροδοψίνης. Η ροδοψίνη αποτελείται από έναν GPCR, την οψίνη, η οποία έχει συνδεδεμένο προσδέτη την 11-cis-ρετινάλη. Το γλυκοσυλιωμένο NH₂-τελικό άκρο του υποδοχέα βρίσκεται στο εσωτερικό των δίσκων και η COOH-τελική περιοχή, που περιέχει πολλές πιθανές θέσεις φωσφορύλωσης (Ser/Thr) εκτίθεται στο κυτταρόπλασμα. Η τρανσδουσίνη, η G-πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από τη ροδοψίνη, βρίσκεται και αυτή σε αφθονία, αν και υστερεί αριθμητικά της ροδοψίνης. Τα ραβδία και τα κωνία είναι το μόνο παράδειγμα όπου ο αριθμός των υποδοχέων είναι υπερβολικά μεγαλύτερος του αριθμού των G-πρωτεϊνών με τις οποίες συνδέονται. Η ανάγκη για τόσο μεγάλες ποσότητες ροδοψίνης πιθανόν καθορίζεται από το γεγονός ότι τα φωτόνια ταξιδεύουν σε ευθείες γραμμές και, σε αντίθεση με τους κοινούς διαλυτούς προσδέτες, δεν διαχέονται στον εξωκυτταρικό χώρο έως ότου προσδεθούν στον ειδικό υποδοχέα τους. Είναι χαρακτηριστικό, επίσης, ότι η μεμβράνη των δίσκων περιέχει 35% ακόρεστα λιπίδια (αντί για 5% της πλασματικής μεμβράνης) επιτρέποντας την ευκολότερη διάχυση της ροδοψίνης στη μεμβράνη.

Η 11-cis-ρετινάλη συνδέεται, μέσω της αλδεϋδικής της ομάδας, στην α-αμινομάδα της λυσίνης (K296) της 7ης διαμεμβρανικής περιοχής της οψίνης (GPCR), ως μια πρωτονιωμένη **βάση Schiff**. Παρότι ομοιοπολικός, αυτός ο δεσμός σπάει έπειτα από την φωτοϊσομερίωση σε all-trans-ρετινάλη, η οποία απελευθερώνεται για να επαναχρησιμοποιηθεί.





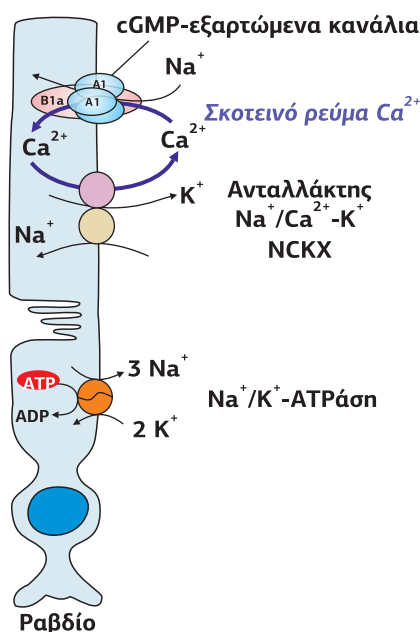
Σκοτεινό ρεύμα

Απουσία φωτισμού, το δυναμικό της μεμβράνης των φωτοϋποδεκτικών κυττάρων είναι περίπου -30mV . Είναι πολύ λιγότερο αρνητικό από το δυναμικό των διεγερσιμων νευρικών και μυϊκών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο σκοτεινό ρεύμα "dark current" που προκαλείται κυρίως από την εισροή Na^+ (80%) διαμέσου των CGMP-εξαρτώμενων καναλιών και του ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ που βρίσκονται στην εξωτερική περιοχή των ραβδίων και των κωνίων. Τα ιόντα Na^+ εξέρχονται μέσω της $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPάσης}$ που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη του εσωτερικού τμήματος. Από τα κανάλια CNGC εισέρχεται και Ca^{2+} (20%), το οποίο εξέρχεται από τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ (NCKX). Έτσι δημιουργείται μια συνεχής ροή κατιόντων μέσα και έξω από το κύτταρο (Εικόνα 6.43).

Στο σκοτάδι υπολογίζεται ότι 5.000-10.000 cGMP-εξαρτώμενα κανάλια κατιόντων διατηρούνται ανοικτά λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του κυκλικού GMP. Τρία μόρια cGMP δεσμεύονται σε κάθε κανάλι κατιόντων (στις τρεις A-υπομονάδες, η B-υπομονάδα παίζει ρυθμιστικό ρόλο) και το διατηρούν ανοικτό. Σε μάτι προσαρμοσμένο στο σκοτάδι, το cGMP βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του εξωτερικού τμήματος των ραβδίων σε συγκέντρωση 40-80 μM , περίπου 300 φορές υψηλότερη από αυτή των νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου. Υπάρχουν ουσιαστικά 10-20 moles cGMP για κάθε mole ροδοψίνης.

Επίδραση του φωτός

Η δράση του φωτός επάγει μια σειρά από μοριακές αναδιατάξεις της ροδοψίνης που οδηγούν στην ενεργοποιημένη ροδοψίνη (Rh^*), η οποία στη συνέχεια επάγει την ανταλλαγή GDP με GTP στην τρανσδοσίνη, απελευθερώνοντας τις $\text{G}_\alpha\text{-GTP}$ και $\text{G}_\beta\text{-υπομονάδες}$. Η $\alpha\text{-υπομονάδα}$, στη συνέχεια, ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση του cGMP PDE6 και το cGMP υδrolύεται σε 5' GMP. Η ακολουθία των γεγονότων που έπονται του φωτισμού εξασφαλίζει τεράστια ενίσχυση του σήματος, τέτοια ώστε ένα φωτόνιο, που προκαλεί μια φωτοϊσομερίωση οδηγεί στην υδρόλυση περισσότερων από 10^5 μορίων cGMP, κλείνο-



Εικόνα 6.42

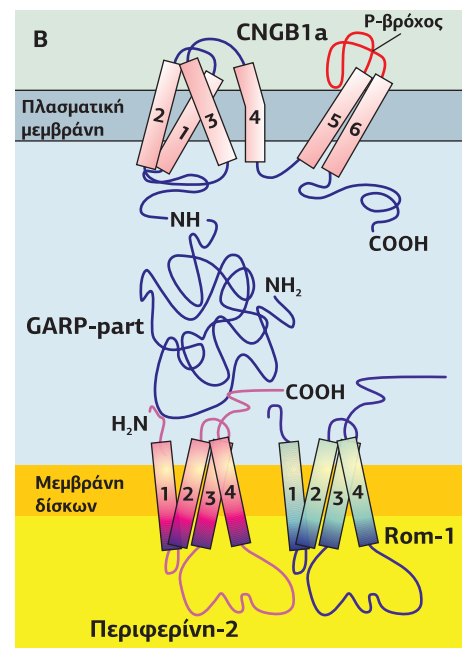
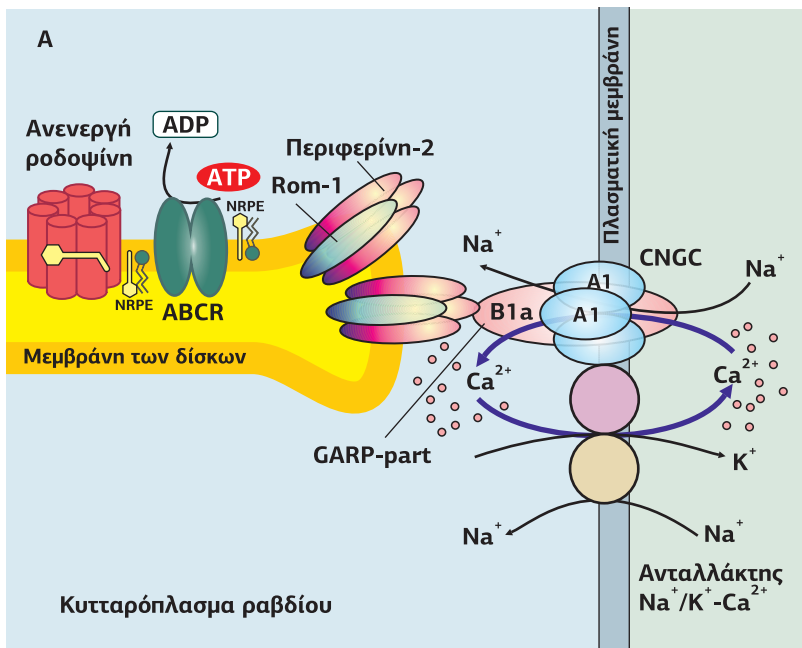
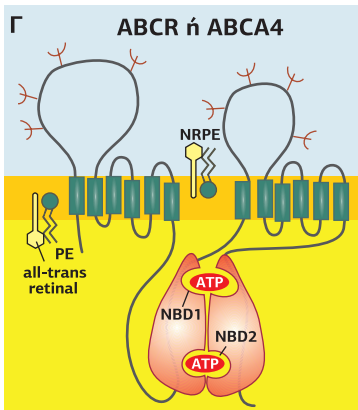
Σύνδεση της 11-cis-ρετινάλης στην α-αμινομάδα της λυσίνης (K296) της 7ης διαμεμβρανικής περιοχής, ως μια πρωτονιωμένη βάση Schiff. Ο δεσμός σπάει έπειτα από την φωτοϊσομερίωση σε all-trans-ρετινάλη, η οποία απελευθερώνεται.

Εικόνα 6.43

Οι κυριότερες μετακινήσεις κατιόντων διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης ενός ραβδίου στο σκοτάδι. Απουσία φωτισμού δημιουργείται ένα σκοτεινό ρεύμα «dark current» που προκαλείται κυρίως από το Na^+ (80%), το οποίο εισέρχεται από τα CGMP-εξαρτώμενα κανάλια και από τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ που βρίσκονται στην εξωτερική περιοχή των ραβδίων, ενώ εξέρχονται μέσω της $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPάσης}$ που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη του εσωτερικού τμήματος. Από τα κανάλια CNGC εισέρχεται και Ca^{2+} (20%), το οποίο εξέρχεται από τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$.

Εικόνα 6.44

Σύμπλοκο cGMP-εξαρτώμενων καναλιών με τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ και την περιφερίνη/Rds. Α. Τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια μέσω των A1-υπομονάδων συνδέονται με τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ και μέσω της B1a-υπομονάδας με την περιφερίνη 2, η οποία σχηματίζει τετραμερές σύμπλοκο με την ομόλογή της Rom-1. Περιφερίνη και Rom βρίσκονται στη μεμβράνη των δίσκων, όπου έχουν δομικό ρόλο. Β. Η περιφερίνη και η Rom είναι πρωτεΐνες με 4 διαμεμβρανικές α-έλικες η καθεμία. Η σύνδεση μεταξύ CNGB1a και περιφερίνης γίνεται μέσω της περιοχής GARP της B1a υπομονάδας. [1] Γ. Η δομή της μεταφορέα ABCA4 ή ABCR.



ντας περίπου 500 κανάλια κατιόντων και εμποδίζοντας την είσοδο 10^7 ιόντων Na^+ .

Τρία μόρια cGMP απαιτούνται για να διατηρηθεί το cGMP-εξαρτώμενο κανάλι ανοικτό, με αποτέλεσμα η καμπύλη ενεργοποίησης για το κλείσιμο του καναλιού να είναι πραγματικά απότομη. Η συνέπεια αυτού είναι ότι από τη στιγμή που πραγματοποιηθεί το άνοιγμα ή το κλείσιμο, εξαιτίας της απότομης αλλαγής της συγκέντρωσης του cGMP, υπάρχει πολύ μικρό περιθώριο αοριστίας. Όπως ένας ηλεκτρικός διακόπτης, το κανάλι τείνει να είναι είτε ανοικτό είτε κλειστό. Τα 500 και πλέον κανάλια κατιόντων σε ένα ραβδί που κλείνουν, ακολουθώντας τη δράση ενός φωτονίου, αντιπροσωπεύουν το 3% του συνολικού αριθμού αυτών που είναι ανοικτά στο σκοτάδι. Η επακόλουθη υπερπόλωση (το δυναμικό μεμβράνης γίνεται πιο αρνητικό) είναι περίπου 1 mV και διαρκεί περίπου 1 sec. Αυτό αρκεί για να μειώσει τον ρυθμό απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή στη σύναψη με τα νευρικά κύτταρα που μεταδίδουν το οπτικό μήνυμα.

Το γεγονός ότι η πρόσπτωση ενός και μόνο φωτονίου μπορεί να οδηγήσει στο κλείσιμο του 3% των καναλιών που είναι ανοικτά στο σκοτάδι, μπορεί να μας κάνει να θεωρήσουμε πως ο σταθερός φωτισμός ακόμη και πιο μέτριας έντασης θα οδηγούσε σε κλείσιμο όλων των καναλιών. Πράγματι, εάν η απόκριση του συστήματος ήταν άμεσα ανάλογη με τον αριθμό των μορίων ροδοψίνης που ενεργοποιούνται, τότε κορεσμός θα μπορούσε να επιτευχθεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα φωτός, καθώς όλα τα κανάλια θα έκλειναν. Εντούτοις, το ανθρώπινο μάτι είναι ικανό να αισθανθεί μικροδιαφορές στην ένταση του φωτός έναντι σε υψηλά επίπεδα. Είναι ξεκάθαρο πως πρέπει να υπάρχει ένας προσαρμοστικός μηχανισμός που ελαττώνει την ένταση, έτσι ώστε να υπάρχουν πάντα κάποια ανοικτά κανάλια όταν το "φόντο" είναι φωτεινό.

Επίσης, η δράση GTPάσης της τρανσδουσίνης επιταχύνεται από την πρωτεΐνη RGS9, η οποία ενεργοποιείται από την γ-υπομονάδα της PDE6. Ως αποτέλεσμα το σήμα σταματά (βλ. σελ. 256, **Εικόνα 5.33**).

Ο ρόλος του Ca^{2+} - ένας αρνητικός ρυθμιστής της φωτοδιαβίβασης

Ένα σημαντικό συστατικό του προσαρμοστικού μηχανισμού, με τον οποίο η ευαισθησία ρυθμίζεται από το επίπεδο φωτισμού του περιβάλλοντος, παρέχεται από την κυτταροπλασματική συγκέντρωση του Ca^{2+} . Το Ca^{2+} εισέρχεται από το εξωτερικό τμήμα των ραβδίων, ως ένα μικρό ποσοστό του σκοτεινού ρεύματος, μέσω των cGMP-εξαρτώμενων καναλιών, και εξέρχεται και πάλι από το εξωτερικό τμήμα των

ραβδίων μέσω του ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$. Τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια μέσω των A-υπομονάδων τους δημιουργούν ένα σύμπλοκο με τον ανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$. Το σύμπλοκο αυτό συνδέεται, μέσω της NH_2 -τελικής GARP περιοχής (Glutamic Acid-Rich Part) της ρυθμιστικής B1a υπομονάδας των καναλιών, σε μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο χείλος των δίσκων, στην **περιφερίνη/Rds**, η οποία σχηματίζει ετεροτετραμερές σύμπλοκο με την ομόλογή της Rom-1 (Retinal outer segment membrane protein 1). Στην περιοχή αυτή των δίσκων υπάρχει, επίσης, η ABCR ή ABCA4, μια γλυκοπρωτεΐνη 220 kDa μέλος των μεταφορέων ABC (ATP Binding Cassette Transporter - Retinal specific).

Καθώς τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια κατιόντων κλείνουν σε απάντηση της υδρόλυσης του cGMP, η συγκέντρωση του Ca^{2+} μειώνεται από τα >500 nM στο σκοτάδι, στα <50 nM κάτω από ισχυρό φωτισμό. Όπως πάντα, οι επιδράσεις του Ca^{2+} είτε διεγερτικές (π.χ. προκαλώντας τη συστολή του μυός) είτε ανασταλτικές (όπως στην παρούσα περίπτωση) μεσολαβούνται από ειδικές Ca^{2+} -δεσμευτικές πρωτεΐνες. Η σύνθεση του cGMP από τη γουανυλική κυκλάση ρυθμίζεται αντιστρεπτά και συνεργικά από το Ca^{2+} . Η ρύθμιση αυτή μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση του Ca^{2+} με την πρωτεΐνη **GCAP** (Guanylyl Cyclase Activating Protein), ένα μέλος της ομάδας των Ca^{2+} -δεσμευτικών πρωτεϊνών EF-hands. Όπως είδαμε προηγουμένως, σε ραβδία προσαρμοσμένα στο σκοτάδι, στα οποία η συγκέντρωση κυτταροπλασματικού Ca^{2+} είναι υψηλή, τρία Ca^{2+} συνδέονται σε ένα mole GCAP αναστέλλοντας τη GC-E/F. Αντιθέτως, κατά την ενεργοποίηση των ραβδίων από το φως προκαλείται μια δραματική μείωση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ τα επίπεδα Mg^{2+} παραμένουν σταθερά, και οι GCAPs αντί για Ca^{2+} συνδέουν τουλάχιστον δύο Mg^{2+} , διαμόρφωση η οποία ενεργοποιεί τη GC.

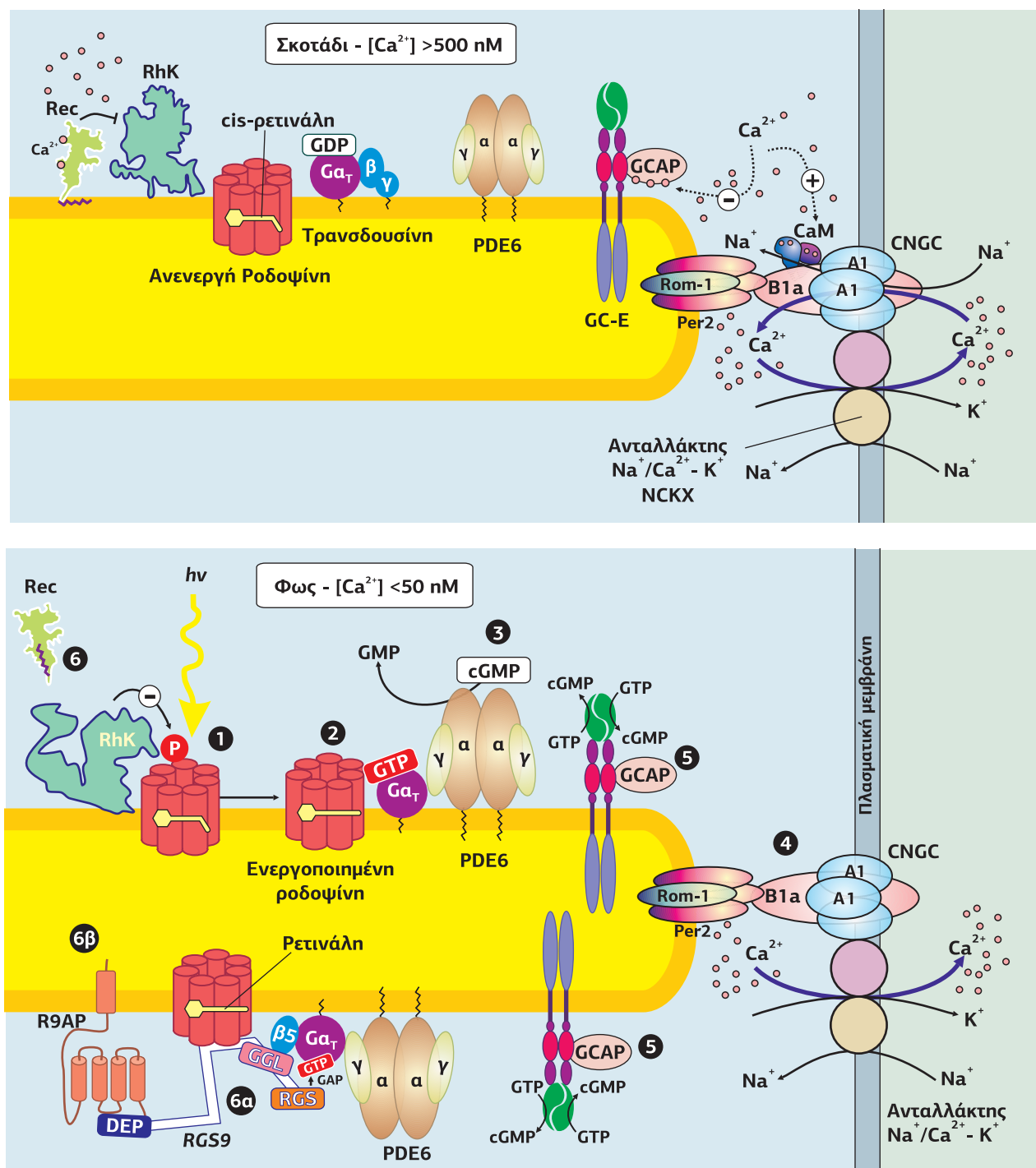
Γι' αυτό όταν τα επίπεδα Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα είναι υψηλά, ο ρυθμός σύνθεσης του cGMP είναι χαμηλός. Αυτό σημαίνει πως κάτω από συνθήκες χαμηλού φωτισμού, το cGMP που υδρολύεται δεν αναπληρώνεται τόσο εύκολα και το σύστημα διατηρείται στην πιο ευαίσθητη κατάστασή του.

Το ασβέστιο δρα ως ένα αρνητικό σήμα και σε άλλα σημεία της αλυσίδας των αντιδράσεων της φωτομεταγωγής. Παρότι η ταχύτητα της αντίδρασης φωσφοδιεστεράσης φαίνεται να είναι ανεπηρέαστη, η συγκέντρωση του Ca^{2+} ρυθμίζει τη διάρκεια ζωής του ενεργοποιημένου ενζύμου. Η υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} στο σκοτάδι ενεργοποιεί μία άλλη Ca^{2+} -δεσμευτική πρωτεΐνη EF-hand, τη **ρεκοβερίνη**, η οποία αναστέλλοντας την κινάση της ροδοψίνης (RhK ή GRK1), την εμποδίζει να φωσφορυλιώσει και να απευαισθητοποιήσει τη ροδοψίνη. Όπως έχουμε δει, η φωσφορυλίωση των GPCRs, στο COOH -τελικό τους άκρο, από τις κινάσες GRKs προσελκύει την αρρεστίνη οδηγώντας στην απευαισθητοποίηση του υποδοχέα (βλ. σσ. 243-245).

Η πτώση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} σε έντονο φωτισμό επιτρέπει τη φωσφορυλίωση της ροδοψίνης και αυτό απαραίτητα περιορίζει τη ζωή της ροδοψίνης και, κατά συνέπεια, και της ενεργοποιημένης φωσφοδιεστεράσης (PDE6). Η ρεκοβερίνη των ραβδίων, όπως και οι περισσότερες NCS, είναι μυριστοϋλιωμένη στο NH_2 -τελικό της άκρο. Η μυριστοϋλιωμένη ρεκοβερίνη συνδέεται στη μεμβράνη των δίσκων μόνο σε υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} . Αυτή η Ca^{2+} -επαγόμενη μεταφορά και σύνδεση στη μεμβράνη των πρωτεϊνών NCS ονομάζεται Ca^{2+} -μυριστοϋλικός διακόπτης " Ca^{2+} -myristoyl switch".

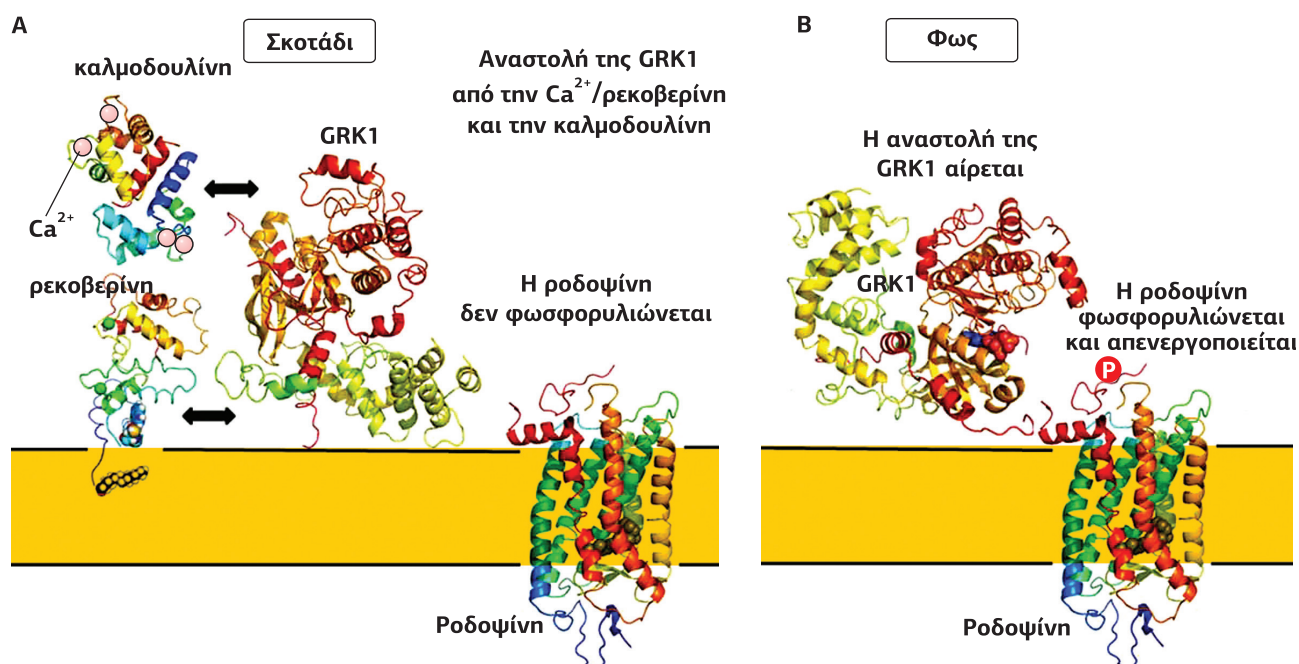
Άλλες θέσεις δράσης του Ca^{2+} περιλαμβάνουν την **τρανσδοουσίνη**, καθώς χαμηλή συγκέντρωση Ca^{2+} μπορεί να επιταχύνει την αντίδραση GTPάσης και έτσι να περιορίσει το σήμα ενεργοποίησης και σε αυτό το επίπεδο, και τα **cGMP-εξαρτώμενα κανάλια**. Καθώς η συγκέντρωση του ελεύθερου Ca^{2+} μειώνεται κατά τον φωτισμό, η συγγένεια των καναλιών για το κυκλικό GMP αυξάνει και αυτό πρέπει να αντιτίθεται στα αποτελέσματα της πτώσης της συγκέντρωσης του cGMP, αλλά και να ευνοεί την ανοιχτή διαμόρφωση. Η αναστολή της **καλμοδουλίνης** έχει ως αποτέλεσμα τον διαχωρισμό της από τα CNGC, αυξάνοντας την ικανότητα του cGMP να ανοίξει τα κανάλια.

Μετά την απορρόφηση του φωτονίου, οι οπτικές χρωστικές απελευθερώνουν την υψηλά δραστική ρετιναλδεΐδη NRPE (N-Retinylidene-Phosphatidyl Ethanolamine), η οποία μεταφέρεται, μέσω του μεταφορέα **ABCA4**, από τη μεμβράνη των δίσκων στο κυτταρόπλασμα για αναγωγή. Η NRPE σχηματίζεται από τη σύνδεση της all-trans-ρετινάλης με το PE (Phosphatidyl Ethanolamine). Ο ABCA4 απομακρύνει δηλαδή την NRPE, εμποδίζοντας τη συσσώρευση τοξικών bis-retinoids. Η NRPE, αν παραμείνει στη μεμβράνη των δίσκων, συνδέεται με ένα επιπλέον μόριο all-trans-ρετινάλης και δημιουργείται η A2PE (δύο all-trans-ρετινάλης+Phosphatidyl Ethanolamine), η οποία υδρολύεται από την PLD σε A2E, που δημιουργεί μέσω αυτοοξειδωσης τοξικά προϊόντα.



Εικόνα 6.45

Φωτομεταγωγή στα θηλαστικά. Α. Στο σκοτάδι τα cGMP-εξαρτώμενα κανάλια είναι ανοιχτά και η συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα των ραβδίων είναι υψηλή ($>500 \text{ nM}$). Β. Το φως, μέσω της ισομερίωσης της cis σε trans-ρετινάλ, ενεργοποιεί τη ροδοψίνη, η οποία στη συνέχεια επάγει την ανταλλαγή του GDP με GTP στην τρανσδουσίνη. Η α_T -GTP υπομονάδα ενεργοποιεί την PDE6 και το cGMP υδrolύεται σε 5' GMP. Η μείωση του cGMP οδηγεί στο κλείσιμο των cGMP-εξαρτώμενων καναλιών Na^+/Ca^{2+} . Η μείωση της συγκέντρωσης Ca^{2+} επιτρέπει στη GCAP να ενεργοποιήσει τη GC-E. Το σήμα οβήνει καθώς η παραγωγή cGMP οδηγεί στο άνοιγμα των CNGC και η μείωση του Ca^{2+} αναστέλλει τη ρεομερίνη, επιτρέποντας την κινάση της ροδοψίνης να φωσφορυλιώσει και να απενεργοποιήσει τη ροδοψίνη. Επίσης, η γ -υπομονάδα της PDE6 ενεργοποιεί την RGS9, η οποία επιταχύνει την υδρόλυση του GTP από την τρανσδουσίνη.



Συνοψίζοντας, αυτές οι ολοκληρωμένες μορφές αυτόματου ελέγχου εμφανίζονται ως απάντηση στα δύο σήματα που παράγονται μετά το κλείσιμο των μεμβρανικών καναλιών κατιόντων από το φως. Ένα από αυτά τα σήματα είναι καθαρά ηλεκτρικό και μεταβιβάζεται ως ένας παλμός υπερπόλωσης στη σύναψη, δηλαδή μειώνοντας τον ρυθμό απελευθέρωσης του διαβιβαστή, του γλουταμινικού. Το άλλο σήμα είναι χημικό και απορρέει από τη μείωση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca²⁺. Στην ουσία, το φωτεινό σήμα δρα στα ραβδία και τα κωνία ως αρνητικός ρυθμιστής. Στο σκοτάδι τα κύτταρα είναι αποτελεσματικά μερικώς εκπολωμένα και ο ρυθμός της απελευθέρωσης διαβιβαστή από τη σύναψη είναι ο μέγιστος. Στο φως τα κύτταρα υπερπολώνονται και ο ρυθμός απελευθέρωσης του διαβιβαστή μειώνεται.

Μια σημείωση για τη φωτομεταγωγή στα ασπόνδυλα

Έχουμε περιγράψει τα βασικά στοιχεία της διαδικασίας της φωτεινής μεταγωγής, όπως συμβαίνουν στα ραβδία των ματιών των σπονδυλωτών. Η κατάσταση στα ασπόνδυλα είναι πολύ διαφορετική, όπως περιληπτικά φαίνεται στην **Εικόνα 4.45**.

Κατά κάποιον τρόπο, η φωτομεταγωγή στις μύγες και σε άλλα έντομα εμφανίζεται να ακολουθεί πιο οικεία μονοπάτια. Εδώ, η φωτοενεργοποιημένη ροδοψίνη ενώνεται στη G-πρωτεΐνη Gα_q και όχι στην τρανσδουσίνη. Η Gα_q ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση Cβ, που παράγει IP₃ και DAG, και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάριου Ca²⁺ και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C. Όπως και στα σπονδυλωτά, αυτά τα γεγονότα επάγουν ηλεκτρικά και χημικά μηνύματα, αλλά εδώ το αποτέλεσμα είναι το άνοιγμα, όχι το κλείσιμο, TRP καναλιών της πλασματικής μεμβράνης. Αυτό προκαλεί μια παροδική εκπόλωση (αντί για υπερπόλωση) και περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca²⁺. Όπως και στα σπονδυλωτά, το Ca²⁺ παίζει πολλούς ρόλους ρυθμίζοντας την απενεργοποίηση του φωτοϋποδοχέα. Επιπλέον, η PLC είναι ο στόχος και ο ρυθμιστής της Gα_q, ενώ η PKC είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής των καναλιών Ca²⁺ Trp και TrpL (Trp-like).

Όπως και στα σπονδυλωτά, το χρωμοφόρο ρετινάλη είναι ένα εσωτερικό συστατικό της ροδοψίνης, αλλά με τη διαφορά ότι παραμένει προσκολλημένη στην οψίνη κατά τη διάρκεια του κύκλου ενεργοποίησης και ανάκτησης. Έπειτα από φωτισμό με κυανό φως (κάτω από τα 490 nm) η ρετινάλη υφίσταται γρήγορη ισομερίωση σε all-trans μορφή και η παραγόμενη μεταροδοψίνη καταλύει την ανταλλαγή GDP/

Εικόνα 6.46

A. Στο σκοτάδι, όταν τα επίπεδα Ca²⁺ είναι υψηλά, η RhK ή GRK1 αναστέλλεται από την ενεργοποιημένη ρεκοβερίνη. Η ρεκοβερίνη, μια Ca²⁺-εξαρτώμενη πρωτεΐνη, σε υψηλά επίπεδα Ca²⁺ βρίσκεται συνδεδεμένη στη μεμβράνη των δίσκων μέσω μιας μυριστοϋλικής ομάδας, δρα με συνεργικό τρόπο μαζί με την καλμοδουλίνη.

B. Σε έντονο φως η απενεργοποίηση της ροδοψίνης είναι κάτω από τον έλεγχο του Ca²⁺. Καθώς η συγκέντρωση Ca²⁺ μειώνεται, η ρεκοβερίνη απενεργοποιείται και η GRK1 φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη ροδοψίνη. [13]

GTP από την G_{α_q} . Αντίθετα με τα σπονδυλωτά, η ρετινάλη παραμένει στενά προσκολλημένη και η ενεργοποιημένη μεταροδοψίνη είναι τόσο σταθερή που μπορεί να έχει ημιζωή περισσότερο από 5 ώρες. Αυτό δεν θα βοηθούσε ιδιαίτερα τις μύγες, ωστόσο η φωσφορυλίωση και έπειτα η πρόσδεση της αρρεστίνης ευαισθητοποιούν το σύστημα σε ένα δεύτερο φωτόνιο, με μεγαλύτερο μήκος κύματος (580 nm, πορτοκαλί). Αυτό ξεκινάει την παλινόρθωση της 11-*cis*-ρετινάλης.

Βιβλιογραφία

1. Becirovic E, Nguyen ON, Paparizos C, Butz ES, Stern-Schneider G, Wolfrum U, Hauck SM, Ueffing M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Biel M, Peripherin-2 couples rhodopsin to the CNG channel in outer segments of rod photoreceptors, *Hum Mol Genet* **23**: 5989-97 (2014).
2. Benarroch EE, Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system, *Neurology* **77**: 1568-76 (2011).
3. Bender AT, Beavo JA, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use, *Pharmacol Rev* **58**: 488-520 (2006).
4. D'Souza SP, Davis M, Baxter GF, Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart, *Pharmacol Ther* **101**: 113-29 (2004).
5. Duda T, Pertzev A, Sharma RK, Atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase, ANF-RGC, transduces two independent signals, ANF and Ca^{2+} , *Front Mol Neurosci* **7**: 17 (2014).
6. Feil R, Kleppisch T, NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission, *Handb Exp Pharmacol*, **184**: 529-60 (2008).
7. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D, cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action, *Pharmacol Rev* **62**: 525-63 (2010).
8. Giannella RA, Mann EA, E. coli heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions, *Trans Am Clin Climatol Assoc* **114**: 67-85 (2003).
9. Hannig G, Tchernychev B, Kurtz CB, Bryant AP, Currie MG, Silos-Santiago I, Guanylate cyclase-C/cGMP: an emerging pathway in the regulation of visceral pain, *Front Mol Neurosci* **7**: 31 (2014).
10. Horio T, Kawano Y, Bio-Molecular Markers for cardiovascular disease: Significance of natriuretic peptides and adrenomedullin, *Korean Circ J* **38**: 507-513 (2008).
11. Kim GW, Lin JE, Waldman SA, GUCY2C: at the intersection of obesity and cancer, *Trends Endocrinol Metab* **24**: 165-73 (2013).
12. Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K, Kangawa K, Natriuretic peptide signaling via guanylyl cyclase GC-A: An endogenous protective mechanism of the heart, *Curr Cardiol Rev* **5**: 45-51 (2009).
13. Koch KW, Dell'Orco D, Protein and signaling networks in vertebrate photoreceptor cells, *Front Mol Neurosci* **8**: 67 (2015).
14. Koch KW, GCAP (Guanylate Cyclase-Activating Protein), *Encyclopedia of Signaling Molecules*, Springer, pp 769-773 (2012).
15. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY, Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide, *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F178-90 (2003).
16. Kots AY, Martin E, Sharina IG, Murad F, A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases, *Handb Exp Pharmacol* **191**: 1-14. (2009).
17. Kuhn M, Cardiac and intestinal natriuretic peptides: insights from genetically modified mice, *Peptides* **26**: 1078-85 (2005).
18. Kuhn M, It's cold, mom! It's cyclic GMP, *EMBO J* **34**: 270 (2015).

19. Kuhn M, Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on Guanylyl Cyclase-A, *Circ Res* **93**: 700-709 (2003).
20. Lafontan M, Moro C, Sengenès C, Galitzky J, Crampes F, Berlan M, An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides: the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 2032-42 (2005).
21. Lim S, Dizhoor AM, Ames JB, Structural diversity of neuronal calcium sensor proteins and insights for activation of retinal guanylyl cyclase by GCAP1, *Front Mol Neurosci* **7**: 19 (2014).
22. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA, Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP, *Pharmacol Rev* **52**: 375-413 (2000).
23. Menon ST, Han M, Sakmar TP, Rhodopsin: Structural basis of molecular physiology, *Physiol Rev* **81**: 1659-1688 (2001).
24. Misono KS, Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, Structural studies of the natriuretic peptide receptor: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signal transduction, *Peptides* **26**: 957-68 (2005).
25. Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, Young HS, Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase, *FEBS J* **278**: 1818-29 (2011).
26. Moro C, Lafontan M, Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**: H358-68 (2013).
27. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB, Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain, *Chem Soc Rev* **43**: 6814-6838 (2014).
28. Padayatti PS, Pattanaik P, Ma X, van den Akker F, Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases, *Pharmacol Ther*, **104**: 83-99 (2004).
29. Palczewski K, Sokal I, Baehr W, Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity, *Biochem Biophys Res Commun*, **322**: 1123-30 (2004).
30. Pan J, Zhong F, Tan Xiangshi, Soluble guanylate cyclase in NO signaling transduction, *Rev Inorgan Chem* **3**: 193-205 (2013).
31. Pandey KN, Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes phosphoinositide hydrolysis, Ca^{2+} release, and activation of protein kinase C, *Front Mol Neurosci* **7**: 75 (2014).
32. Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS, Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **106**: 18225-30 (2009).
33. Polans A, Baehr W, Palczewski K, Turned on by Ca^{2+} ! The physiology and pathology of Ca^{2+} -binding proteins in the retina, *Trends Neurosci* **19**: 547-54 (1996).
34. Potter LR, Guanylyl cyclase structure, function and regulation, *Cell Signal* **23**: 1921-6 (2011).
35. Prysyazhna O, Eaton P, Redox regulation of cGMP-dependent protein kinase Ia in the cardiovascular system, *Front Pharmacol* **6**: 139 (2015).
36. Rahbi H1, Narayan H, Jones DJ, Ng LL. The uroguanylin system and human disease, *Clin Sci (Lond)* **123**: 659-68 (2012).
37. Schlossmann J, Desch M, IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system, *Am J Physiol* **301**: H672-H682 (2011).
38. Schulz S. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor, *Peptides* **26**: 1024-34 (2005).
39. Sharma RK, Duda T, Membrane guanylate cyclase, a multimodal transduction

- machine: history, present, and future directions, *Front Mol Neurosci* **7**: 56 (2014).
40. Sindic A, Current understanding of guanylin peptides actions, *ISRN Nephrol* **2013**: Article ID 813648 (2013).
 41. Stocker R, Keaney JF Jr, Role of oxidative modifications in atherosclerosis, *Physiol Rev* **84**: 1381-1478 (2004).
 42. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y, The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system, *Cardiovasc Res* **51**: 489-494 (2001).
 43. Theilig F, Wu Q, ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology, *Am J Physiol Renal Physiol* **308**: F1047-55 (2015).
 44. Underbakke ES, Iavarone AT, Marletta MA, Higher-order interactions bridge the nitric oxide receptor and catalytic domains of soluble guanylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **110**: 6777-82 (2013).
 45. Wen XH, Dizhoor AM, Makino CL, Membrane guanylyl cyclase complexes shape the photoresponses of retinal rods and cones, *Front Mol Neurosci* **7**: 45 (2014).
 46. Woodard GE, Rosado JA, Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology, *Int Rev Cell Mol Biol* **268**: 59-93 (2008).