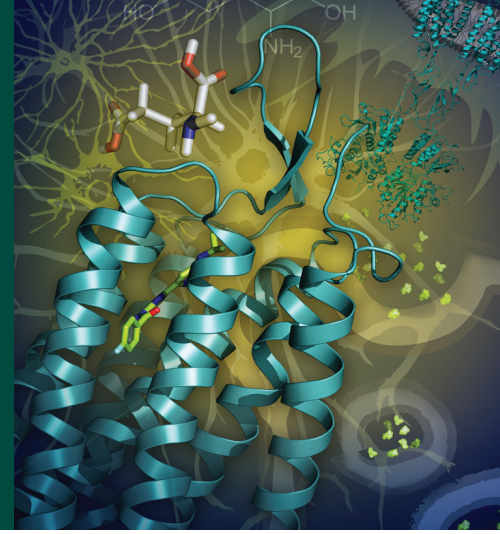


# 5

## Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Δομή και τελεστές



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

- 1.1 Μοντέλο μεταγωγής σήματος μέσω GPCRs
- 1.2 Υπεροικογένεια GPCRs: Κοινά δομικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση
- 1.3 GPCRs της Οικογένειας A: Χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία και ταξινόμηση
- 1.4 GPCRs της Οικογένειας B - Οικογένεια της σεκρετίνης
- 1.5 GPCRs της Οικογένειας C
- 1.6 Απευαισθητοποίηση, εσωτερίκευση και down-regulation των GPCRs

### 2. Ετεροτριμερείς πρωτεΐνες Gαβγ

- 2.1 Ανακάλυψη των G-πρωτεϊνών
- 2.2 Δομή των α- και βγ-υπομονάδων των G-πρωτεϊνών
- 2.3 Ο κύκλος των GTPασών
- 2.4 Διακοπή της σηματοδότησης ενεργοποιώντας τη δράση GTPάσης
- 2.5 Τελεστές των G-πρωτεϊνών
- 2.6 AGS πρωτεΐνες: μη εξαρτώμενη από υποδοχείς ενεργοποίηση των τριμερών G-πρωτεϊνών
- 2.7 Τοξίνες του κοκίτη και της χολέρας: ADP ριβοσυλίωση των G-πρωτεϊνών
- 2.8 Εξειδίκευση της σηματοδότησης GPCRs /G-πρωτεϊνών/Τελεστών

### 3. Αδενυλική κυκλάση και cAMP

- 3.1 Η δομή της αδενυλικής κυκλάσης
- 3.2 Οι διάφορες ισομορφές των αδενυλικών κυκλασών
- 3.3 Ο ρόλος της φορσκολίνης στη δράση της αδενυλικής κυκλάσης
- 3.4 Οι φωσφοδιεστεράσες του cAMP "σβήνουν" το σήμα

- 3.5 Το cAMP, ο πρώτος δεύτερος διαβιβαστής
- 3.6 Ο φυσιολογικός ρόλος του cAMP: Χαρακτηριστικά παραδείγματα

### 4. Φωσφολιπάση C και $InsP_3$ /διακυλογλυκερόλη

- 4.1 Οι ισομορφές των φωσφολιπασών C
- 4.2 Τα πολυφωσφολιπίδια της ινοσιτόλης (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης
- 4.3 Διακυλογλυκερόλη
- 4.4 Τριφωσφορική ινοσιτόλη [ $IP_3$  ή  $Ins(1,4,5)P_3$ ]
- 4.5 Πρωτεϊνική κινάση C: δομή και ενεργοποίηση από DAG και  $Ca^{2+}$
- 4.6 Η GPCR-εξαρτώμενη σηματοδότηση του  $Ca^{2+}$

### 5. Κινάση PI3K και $PtdIns(3,4,5)P_3$

- 5.1 Κινάσες φωσφοϊνοσιτιδίων
- 5.2 Τάξεις των PI3Ks
- 5.3 Η  $PtdIns(3,4,5)P_3$  ως δεύτερος διαβιβαστής
- 5.4 Βιολογικός ρόλος της GPCR-εξαρτώμενης PI3Kγ

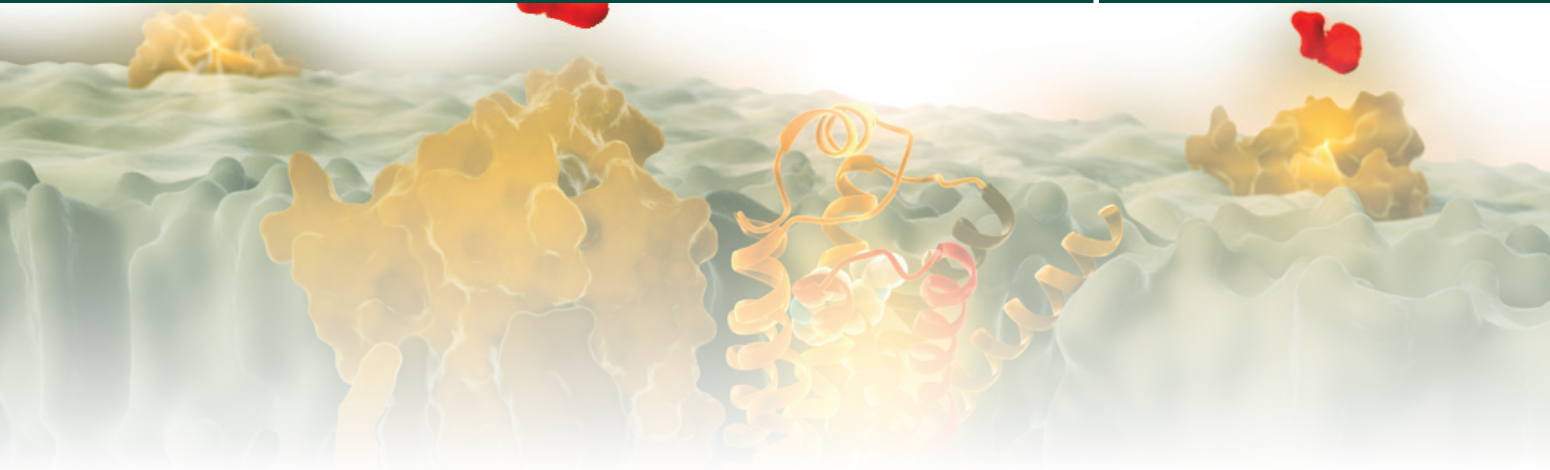
### 6. Φωσφολιπάση D και $A_2$ με στόχο τη φωσφατιδυλοχολίνη

- 6.1 Η φωσφολιπάση D και ο ρόλος του φωσφατιδικού οξέος
- 6.2 Η φωσφολιπάση  $A_2$  και ο ρόλος του αραχιδονικού οξέος
- 6.3 Τα εικοσανοειδή και ο ρόλος τους ως λιπιδικοί διαμεσολαβητές

### 7. Σφιγγομυελινάσες με στόχο τη σφιγγομυελίνη

- 7.1 Ο ρόλος των κεραμιδίων ως απόκριση στο κυτταρικό stress



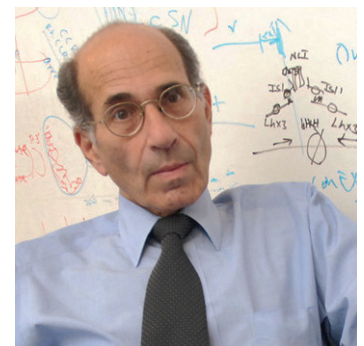


## 1. Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors: GPCRs)

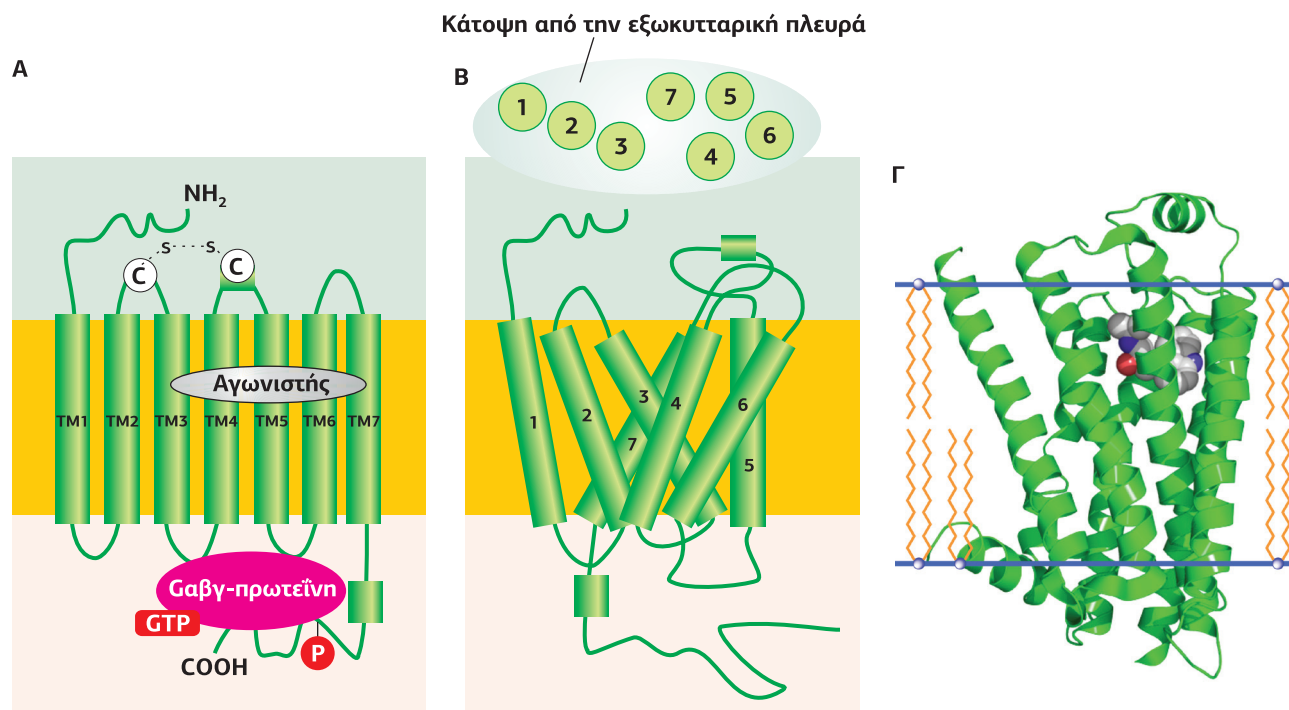
Οι GPCRs με τη χαρακτηριστική δομή των επτά διαμεμβρανικών α-ελίκων (7TM) αντιπροσωπεύουν το πιο επιτυχημένο μοντέλο εξέλιξης. Από την εμφάνιση της ροδοψίνης των αρχαίων, αυτή η συγκεκριμένη πρωτεϊνική δομή εξελίχθηκε στα ζώα ως η μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων και μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γονιδίων και πρωτεϊνών γενικότερα. Ενώ ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* περιέχει μόνο τρία γονίδια GPCR, ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans* έχει περισσότερα από 1.000 γονίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων αυτού του ζώου και κωδικοποιούν κυρίως χημειούποδοχείς, που αναγνωρίζουν περιβαλλοντικές οσμές και γευστικά ερεθίσματα, χαρακτηρίζοντας τον ιδιαίτερο τρόπο ζωής του νηματώδους.

Στον άνθρωπο έχουν αναγνωρισθεί **865** γονίδια που κωδικοποιούν για GPCRs, περίπου το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Από τους υποδοχείς αυτούς, οι **400** είναι λειτουργικοί οσφρητικοί υποδοχείς. Η ανακάλυψη της πληθώρας των οσφρητικών GPCRs οφείλεται στον Richard Axel (βραβείο Nobel 2004), ο οποίος απέδειξε ότι κάθε οσφρητικός νευρώνας εκφράζει ένα μόνο, ξεχωριστό είδος οσφρητικού υποδοχέα. Οι **370** μη οσφρητικοί GPCRs θεωρούνται λειτουργικοί (δηλαδή έχουν αναγνωρισθεί οι προσδέτες και τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια), ενώ οι υπόλοιποι **90** χαρακτηρίζονται ως “ορφανοί”, που σημαίνει ότι δεν έχει αναγνωρισθεί ακόμη ο ενδογενής τους προσδέτης.

Το δομικό χαρακτηριστικό των 7 αλληλοσυνδεδεμένων διαμεμβρανικών περιοχών έχει “εφευρεθεί” πολλές φορές κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, καθώς δεν υπάρχει σημαντική ομολογία αλληλουχιών μεταξύ των 7TM πρωτεϊνών των προ-



Richard Axel (1946-)



**Εικόνα 5.1**  
**Χαρακτηριστική δομή των G-Protein Coupled Receptors της οικογένειας της ροδοψίνης.** Α. Οι GPCRs που ανήκουν στην οικογένεια της ροδοψίνης αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM7), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με 3 εξωκυτταρικούς και 3 ενδοκυτταρικούς βρόχους, ένα κοντό εξωκυτταρικό NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο και ένα ενδοκυτταρικό COOH-τελικό άκρο. Ο αγωνιστής συνδέεται μέσα στη διαμεμβρανική περιοχή. Η εξωκυτταρική περιοχή σταθεροποιείται με έναν δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό βρόχο. Ο 3ος ενδοκυτταρικός βρόχος είναι η κύρια θέση αλληλεπίδρασης με την G-πρωτεΐνη, ενώ η COOH-τελική ουρά είναι στόχος φωσφορυλίωσης από κινάσες. Β. Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής των GPCRs έχει δείξει ότι η διάταξη των διαμεμβρανικών περιοχών στον χώρο είναι πιο περίπλοκη από ό,τι υπονοείται στο (Α) με τις διαμεμβρανικές περιοχές να έχουν κλίση για να σχηματίσουν τον θύλακα δέσμευσης του προσδέτη. [29] Γ. Η κρυσταλλική δομή του β<sub>2</sub>-αδρενεργικού υποδοχέα με συνδεδεμένο τον μερικό αντίστροφο αγωνιστή carazolol. [18]

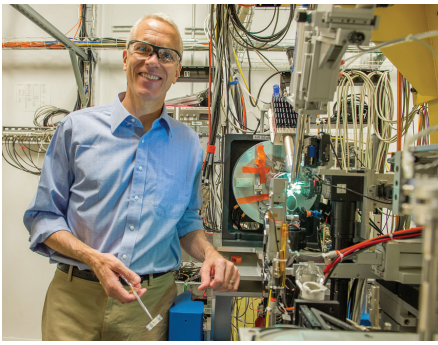
καρυωτών, των ασπόνδυλων και των θηλαστικών. Μια τέτοια έντονη εξελικτική σύγκλιση δείχνει ότι αυτή η δομή είναι μοναδικά κατάλληλη για την αλληλεπίδραση με σηματοδοτικά μόρια και τη μεταγωγή σημάτων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Η κυκλική διάταξη των 7 διαμεμβρανικών περιοχών, που συνδέονται με πολυπεπτιδικούς βρόχους, ξεκινώντας από μια NH<sub>2</sub>-τελική εξωκυτταρική πεπτιδική ουρά μεταβλητού μήκους, προσφέρει προφανώς μια σχεδόν απεριόριστη ικανότητα προσαρμογής σε κάθε πιθανή μορφή σηματοδοτικών μορίων (**Εικόνα 5.1**).

Ωστόσο, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι αυτό το εξελικτικά επιτυχημένο μοντέλο συναντάται μόνο στα ζώα. Στα φυτά και στους προκαρυώτες οι υποδοχείς επτά ελικών φαίνεται να είναι αρκετά σπάνιοι ή απόντες και η μεταγωγή σήματος κυριαρχείται από υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάσες πρωτεϊνών.

Λόγω του σημαντικού ρόλου που παίζουν οι GPCRs στη λειτουργία του οργανισμού, το βραβείο Nobel Χημείας 2012 απονεμήθηκε στους Brian Kobilka και Robert Lefkowitz για την έρευνά τους πάνω στους GPCRs (**Εικόνα 5.2**).

Φωτόνια, οσμές, νευροδιαβιβαστές, ορμόνες, χημειοκίνες, λιπίδια, νουκλεοτίδια, ιόντα ενεργοποιούν τους GPCRs και επάγουν μια πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών:

- **Όραση:** οι φωτοϋποδοχείς (η ροδοψίνη είναι ένας GPCR), μέσω μιας αντίδρασης φωτοϊσομερίωσης της 11-cis-ρετινάλης (προσδέτης) σε trans-ρετινάλη, μετατρέπουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε χημικό σήμα.
- **Όσφρηση:** οσμές και φερομόνες ενεργοποιούν τους GPCRs των νευρώνων του οσφρητικού επιθηλίου και του οσφρητικού οργάνου των τρωκτικών (VMN) και μεταφέρουν το οσφρητικό μήνυμα στον εγκέφαλο.
- **Διαβίβαση σημάτων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα:** οι νευροδιαβιβαστές, όπως σεροτονίνη, ακετυλοχολίνη, ντοπαμίνη, γλουταμινικό και GABA, ενεργοποιούν τους GPCRs του ΚΝΣ ελέγχοντας ποικίλες λειτουργίες, όπως η συμπεριφορά (σεροτονίνη, ντοπαμίνη), η ρύθμιση της κίνησης (ντοπαμίνη), η μνήμη και η μάθηση (ακετυλοχολίνη).
- **Διαβίβαση σημάτων στο Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα:** η αδρεναλίνη (νευροδιαβιβαστής του Συμπαθητικού ΑΝΣ) και η ακετυλοχολίνη (νευροδιαβιβαστής του Παρασυμπαθητικού ΑΝΣ) ενεργοποιούν GPCRs των ιστών στόχων, ελέγχοντας λειτουργίες, όπως η πίεση του αίματος, ο καρδιακός



Brian Kobilka (1955 - )

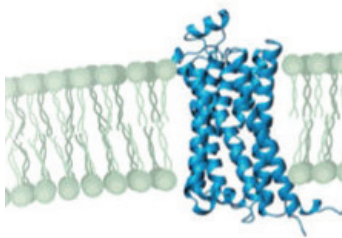


Robert Lefkowitz (1943- )

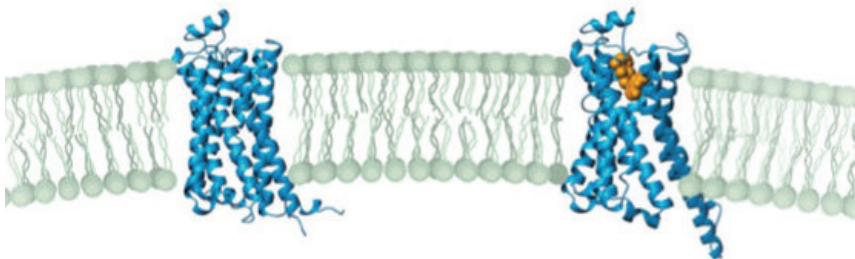
### Εικόνα 5.2

Οι Αμερικανοί Brian Kobilka και Robert Lefkowitz τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Χημείας 2012 για τις ανακαλύψεις τους πάνω στους GPCRs. Το 1968 ο Lefkowitz χρησιμοποίησε για πρώτη φορά ραδιοενεργό προσδέτη για να σημάνει τον β-αδρενεργικό υποδοχέα, ενώ στις αρχές του 1980 με τη βοήθεια του Kobilka απομόνωσε το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα αυτό. Η ανάλυση του γονιδίου οδήγησε στην ανακάλυψη ότι οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς ήταν όμοιοι με υποδοχείς που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή και δέχονται το φως. Τέλος, το 2011 ο Kobilka πέτυχε να αποθανατίσει την εικόνα του β-αδρενεργικού υποδοχέα τη στιγμή που ενεργοποιείται από τον αγωνιστή. Αυτή η εικόνα θεωρήθηκε ως "molecular masterpiece".

Ανενεργός GPCR



Ενεργός GPCR



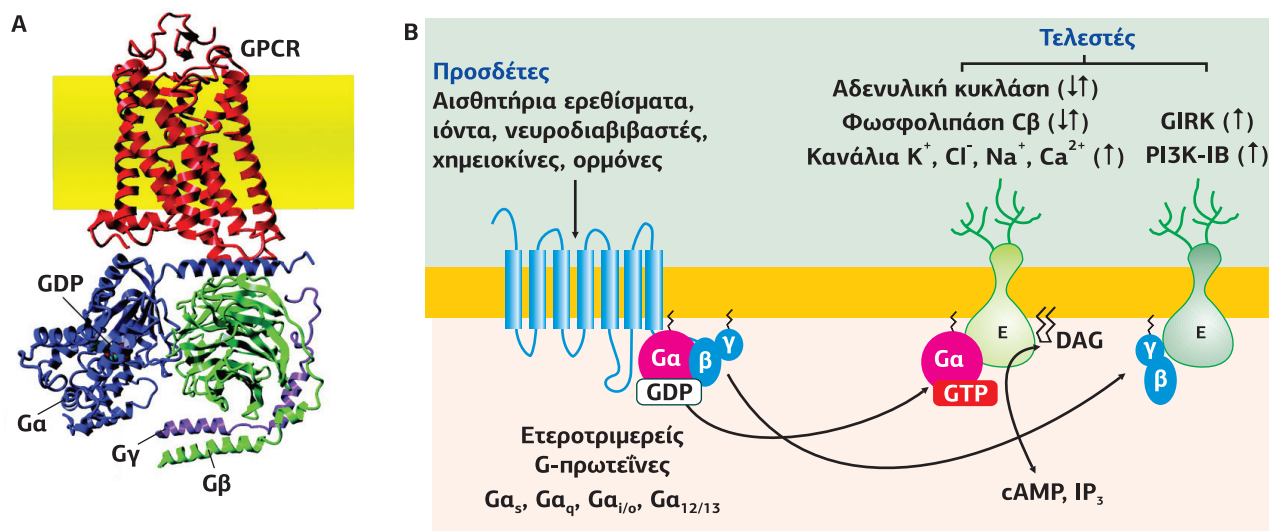
ρυθμός, η σύσπαση των βρόγχων, η πέψη.

- **Ρύθμιση της δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής:** οι χημειοκίνες ενεργοποιούν GPCRs επάγοντας τη χημειοταξία κυττάρων του ανοσοποιητικού κατά τη φλεγμονή, ενώ η ισταμίνη μέσω της σύνδεσής της στους GPCRs επιβάλλει στα κύτταρα στόχους την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης.
- **Ρύθμιση της ομοιόστασης:** Περίπου 100 GPCRs εκφράζονται στους διάφορους πυρήνες του υποθαλάμου ρυθμίζοντας πολλές λειτουργίες. Για παράδειγμα, το νευροπεπτίδιο ορεξίνη συνδέεται στους OX1-R/OX2-R σε πυρήνες του πλευρικού υποθαλάμου (LH, Lateral Hypothalamus) και διεγείρει την πρόσληψη τροφής, ενεργοποιεί την κατάσταση εγρήγορης του οργανισμού και ρυθμίζει το ισοζύγιο ενέργειας.

## 1.1

### Μοντέλο μεταγωγής σήματος μέσω GPCRs

Όλες τις λειτουργίες οι GPCRs τις κατευθύνουν μέσω μεταγωγικών μονοπατιών, που παρά την ποικιλομορφία τους βασίζονται σε ένα κοινό μοντέλο μεταγωγής σήματος. Ο υποδοχέας GPCR ενεργοποιεί μια ετεροτριμερή G πρωτεΐνη (α, βγ υπομονάδες), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον τελεστή (effector), ο οποίος μπορεί να είναι ένα ένζυμο (αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση C και A<sub>2</sub>, φωσφοδιεστεράση κ.λπ.) ή ένα κανάλι ιόντων. Ο τελεστής, στη συνέχεια, συνθέτει τον δεύτερο διαβιβαστή (second messenger) προκαλώντας μια σημαντική ενίσχυση του μηνύματος: παράγει 10.000 δεύτερους διαβιβαστές για κάθε μόριο αρχικού διαβιβαστή. Οι δεύτεροι διαβιβαστές (cAMP, cGMP, DAG, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>) διαχέονται στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα (εκτός της DAG) και ενεργοποιούν άμεσα ή έμμεσα πρωτεϊνικές κινάσες (PKA, PKC, PKG, CaMK κ.λπ.) ικανές να φωσφορυλιώσουν πρωτεΐνες στόχους (**Εικόνα 5.3**). Στις περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες αυτές είναι ένζυμα, προκαλείται μια δεύτερη ενίσχυση του αρχικού μηνύματος. Επίσης, μέσω της διασταύρωσης διαφορετικών μονοπατιών οι GPCRs ρυθμίζουν και σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων τύπων υποδοχέων, συμμετέχοντας σε πιο πολύπλοκα και πολλές φορές μη προβλεπόμενα αποτελέσματα.



**Εικόνα 5.3**

A. Τριδιάστατη μοριακή αναπαράσταση ενός GPCR σε σύμπλεγμα με μια  $G\alpha\beta\gamma$ , βασισμένη στην κρυσταλλική δομή της ροδοψίνης. Στην  $\alpha$ -υπομονάδα διακρίνεται συνδεδεμένο το GDP.

B. Η σύνδεση του προσδέτη μεταβάλλει τη διαμόρφωση του GPCR προωθώντας την ενεργοποίηση της  $G\alpha\beta\gamma$ , η  $\alpha$ -υπομονάδα της οποίας ανταλλάσσει το GDP με GTP.

Το γεγονός αυτό οδηγεί σε αποχωρισμό της  $\alpha$ - από τις  $\beta\gamma$ -υπομονάδες. Όσο διάστημα η  $G\alpha$  υπομονάδα έχει συνδεδεμένο το GTP, είναι ικανή να ενεργοποιεί τους τελεστές (αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση C $\beta$  ή κανάλια) οδηγώντας στην παραγωγή δευτέρων διαβιβαστών (cAMP, IP $_3$ , DAG). Οι  $\beta\gamma$  μπορεί να ενεργοποιήσουν κανάλια GIRK ή την κίνηση λιπιδίων PI3K-IB. [96]

## 1.2

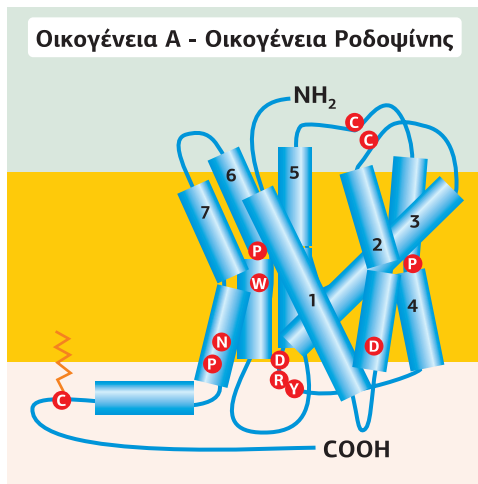
### Υπεροικογένεια GPCRs: Κοινά δομικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Όλοι οι υποδοχείς που ανήκουν στην υπεροικογένεια των GPCRs μοιράζονται κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Είναι γλυκοπρωτεΐνες 400 έως 600 αμινοξέων που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη 7 φορές. Ενδομεμβρανικά σχηματίζονται 7  $\alpha$ -έλικες (η καθεμία αποτελείται από 20-25 αμινοξέα), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με 3 εξωκυτταρικούς και 3 ενδοκυτταρικούς βρόχους. Το εξωκυτταρικό NH $_2$ -τελικό άκρο του υποδοχέα εμφανίζει θέσεις γλυκοσυλίωσης και το μέγεθός του ποικίλλει στις διάφορες οικογένειες των GPCRs, ενώ το ενδοκυτταρικό COOH-τελικό του άκρο είναι μια μακριά αλυσίδα που περιέχει κατάλοιπα Ser και Thr, τα οποία αποτελούν θέσεις φωσφορυλίωσης από κινάσες πρωτεϊνών (PKA, PKC και GRK), υπεύθυνες για την απενεργοποίηση του υποδοχέα. Ο 3ος ενδοκυτταρικός βρόχος, ο οποίος είναι και ο μεγαλύτερος, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς συμμετέχει στη σύνδεση του υποδοχέα με την G-πρωτεΐνη και καθορίζει το είδος της G-πρωτεΐνης με την οποία θα συνδεθεί ο υποδοχέας. Οι διαμεμβρανικές  $\alpha$ -έλικες είναι διευθετημένες με κυκλικό τρόπο (βλ. **Εικόνα 5.1B**).

Η υπεροικογένεια των GPCRs υποδιαιρείται σε 3 οικογένειες, με βάση συγκεκριμένες χαρακτηριστικές δομικές διαφορές.

Η **οικογένεια A ή οικογένεια της ροδοψίνης** έχει δομή όμοια με τον υποδοχέα ροδοψίνη, δηλαδή χαρακτηρίζεται από πολλά καλά συντηρημένα αμινοξέα (στην **Εικόνα 5.4** φαίνονται με κόκκινο), έναν δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει τον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό βρόχο, και μια παλμιτοϋλιωμένη κυστεΐνη στο COOH-τελικό άκρο, η οποία το αγκυροβολεί στη μεμβράνη. Η οικογένεια A περιλαμβάνει τα περισσότερα μέλη: **701** GPCRs, από τους οποίους μόνο για 519 έχουν αναγνωριστεί ενδογενείς προσδέτες. Στην οικογένεια A ανήκουν οι GPCRs βιογενών αμινών (αδρεναλίνη, ντοπαμίνη, σεροτονίνη, ακετυλοχολίνη, ισταμίνη), οι GPCRs μικρών νευροπεπτιδίων (NPY, PAF, εγκεφαλίνες), χημειοκινών, λιπιδίων (λευκοτριενίων, λυσοφωσφατιδικού οξέος, προστανοειδών), γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών (LH, FSH, TSH), οι φωτοϋποδοχείς, οι γευστικοί υποδοχείς (για το πικρό) και οι οσφρητικοί GPCRs.

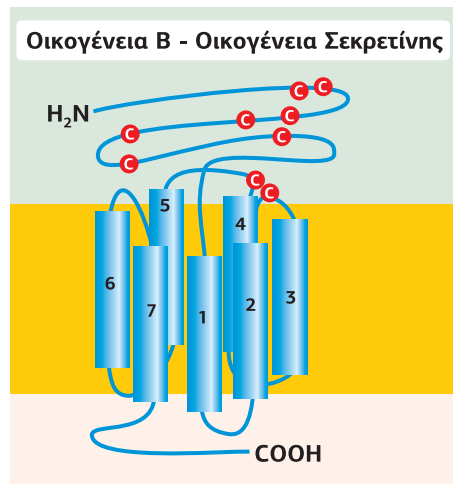
Η **οικογένεια B ή οικογένεια της σεκρετίνης** χαρακτηρίζεται από ένα σχετικά μεγάλο NH $_2$ -τελικό άκρο, το οποίο περιέχει πολλές κυστεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ένα δίκτυο δισουλφιδικών δεσμών. Η δομή τους είναι όμοια με αυτή της οικογένειας A, με τη διαφορά ότι λείπει η θέση παλμιτοϋλίωσης στο COOH-τελικό άκρο. Ο δεσμός θείου ανάμεσα στις κυστεΐνες των εξωκυτταρικών βρόχων δια-

**Εικόνα 5.4**

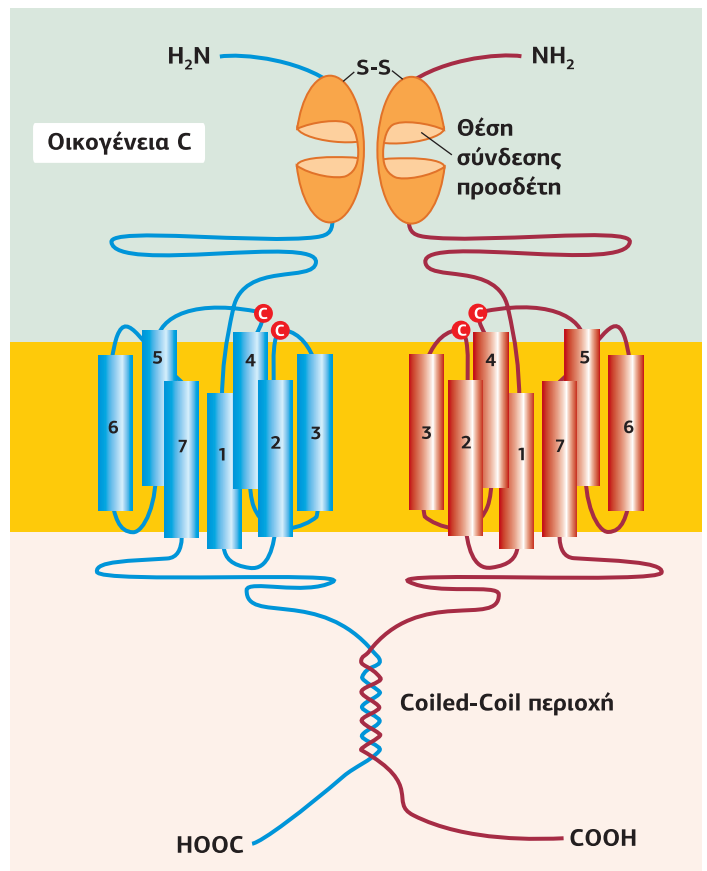
Οι GPCRs της οικογένειας A χαρακτηρίζονται από πολλά καλά συντηρημένα αμινοξέα (φαίνονται με κόκκινο), έναν δισουλφιδικό δεσμό που συνδέει τον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό βρόχο, και μια παλμιτοϋλιωμένη κυστεΐνη στο COOH-τελικό άκρο, που λειτουργεί ως άγκυρα λιπιδίων.

τηρείται, ενώ υπάρχουν διαφορετικά συντηρημένα αμινοξέα ή μοτίβα (**Εικόνα 5.5**). Η οικογένεια B περιλαμβάνει 50 GPCRs, από τους οποίους μόνο για 29 έχουν αναγνωριστεί οι ενδογενείς τους προσδέτες. Ως προσδέτες των GPCRs της οικογένειας B έχουν αναγνωριστεί πεπτιδικές ορμόνες 25-140 αα, όπως CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone), γλυκαγόνη, καλσιτονίνη, σεκρετίνη, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) και η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH). Οι προσδέτες των GPCRs της οικογένειας B συνδέονται στο μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό εξωκυτταρικό άκρο του υποδοχέα.

Η **οικογένεια C** χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο (που περιέχει τη θήκη σύνδεσης του προσδέτη, η οποία μοιάζει με το σαρκοφάγο φυτό εντομοπαγίδα της Αφροδίτης) και μια μεγάλη COOH-τελική ουρά. Το μόνο κοινό που έχουν με τη δομή των υποδοχών της οικογένειας A είναι ο δισουλφιδικός δεσμός που συνδέει τον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό τους βρόχο. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της οικογένειας C είναι ότι οι υποδοχείς εμφανίζονται σε διμερή μορφή, ως ομο- ή ετεροδιμερή (**Εικόνα 5.6**). Η οικογένεια C περιλαμβάνει 22 GPCRs, από τους οποίους μόνο για 15 έχουν αναγνωριστεί οι ενδογενείς προσδέτες. Στους υποδοχείς της οικογένειας C ανήκουν οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού, οι αισθητήρες Ca<sup>2+</sup>, οι μεταβολοτροπικοί υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος GABA<sub>B</sub> και οι γευστικοί υποδοχείς του γλυκού και των L-αμινοξέων (umami).

**Εικόνα 5.5**

Οι GPCRs της οικογένειας B χαρακτηρίζονται από ένα σχετικά μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, το οποίο περιέχει πολλές καλά συντηρημένες κυστεΐνες (με κόκκινο), οι οποίες σχηματίζουν ένα δίκτυο δισουλφιδικών δεσμών. Λείπει η θέση παλμιτοϋλίωσης στο COOH-τελικό άκρο, ενώ ο δεσμός θείου ανάμεσα στις κυστεΐνες των εξωκυτταρικών βρόχων, χαρακτηριστικό της οικογένειας A, διατηρείται. [27]

**Εικόνα 5.6**

Οι GPCRs της οικογένειας C είναι διμερείς και χαρακτηρίζονται από ένα μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο (που περιέχει τη θήκη σύνδεσης του προσδέτη, η οποία μοιάζει με το σαρκοφάγο φυτό εντομοπαγίδα της Αφροδίτης) και από ένα μεγάλο COOH-τελικό άκρο. [27]

## 1.3

## GPCRs της Οικογένειας A: Χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία και ταξινόμηση

Όλοι οι υποδοχείς της οικογένειας A, εκτός από τα κοινά τους δομικά χαρακτηριστικά (όπως είδαμε δημιουργούν έναν δεσμό S-S ανάμεσα στον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό βρόχο και έχουν μια θέση παλμιτοϋλίωσης σε κυστεΐνη του ενδοκυτταρικού COOH-τελικού άκρου), διαφέρουν στη θέση σύνδεσης του προσδέτη (binding site). Με βάση, λοιπόν, τη θέση σύνδεσης του προσδέτη οι υποδοχείς της οικογένειας A κατατάσσονται σε 3 ομάδες.

## Πίνακας 5.1

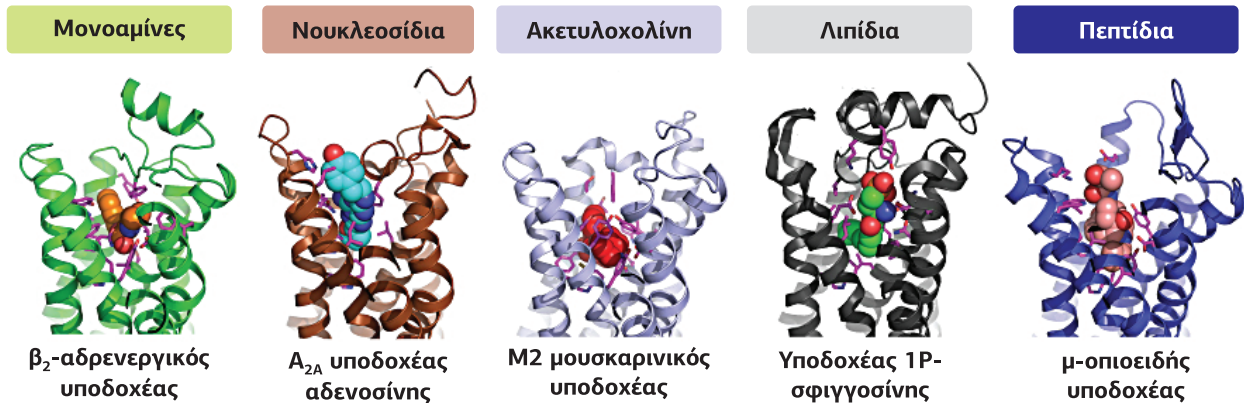
Ταξινόμηση των GPCRs της Οικογένειας A, με βάση τη θέση σύνδεσης του προσδέτη.

Οικογένεια A – Οικογένεια της ροδοψίνης	
Λειτουργικοί: 400 οσφρητικοί, 284 μη οσφρητικοί με αναγνωρισμένους ενδογενείς προσδέτες	
Υποοικογένεια A – 1η Ομάδα: Η θέση σύνδεσης του προσδέτη είναι ενδομεμβρανική	
	<p><b>Υποδοχείς ροδοψίνης</b></p> <p><b>Οσφρητικοί υποδοχείς/φερομονών</b></p> <p><b>Υποδοχείς βιογενών αμινών:</b> ακετυλοχολίνης μουσκαρινικοί (M1-M5), (νορ)αδρεναλίνης (<math>\alpha_{1A}</math>, <math>\alpha_{1B}</math>, <math>\alpha_{1D}</math>, <math>\alpha_{2A}</math>, <math>\alpha_{2B}</math>, <math>\alpha_{2C}</math>, <math>\beta_1</math>, <math>\beta_2</math>, <math>\beta_3</math>), ντοπαμίνης (<math>D_1 - D_5</math>), σεροτονίνης (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), ισταμίνης (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>)</p> <p><b>Υποδοχείς οπιοειδών πεπτιδίων:</b> delta, kappa, mu και νοσισεπτίνης</p>
	<p><b>Υποοικογένεια λιπιδίων:</b> υποδοχείς εικοσανοειδών (προσταγλανδινών: PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, PGE<sub>4</sub>, PGF<sub>F</sub>, PGI<sub>2</sub>, και θρομβοξάνης A<sub>2</sub>), λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA1-6), λευκοτριενίων (LTB4R), 1-P-σφιγγοσίνης, κανναβινοειδών (CNR)</p> <p><b>Υποδοχείς νουκλεοτιδίων:</b> αδενοσίνης (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>), πουρινεργικοί υποδοχείς ATP (P2YR<sub>1/2/4/6/11/12/13/14</sub>)</p>
Υποοικογένεια A – 2η Ομάδα: Η θέση σύνδεσης του προσδέτη μεταξύ του NH <sub>2</sub> -άκρου και των εξωκυτταρικών βρόχων	
	<p><b>Υποδοχείς χημειοκινών:</b> CCR1-10, CXCR3-7, ιντερλευκίνης-8 ή CXCL8 (CXCR1, 2)</p> <p><b>Υποδοχείς μικρών πεπτιδίων:</b> υποδοχείς αγγειοτενσίνης, βασοπρεσίνης, βραδυκινίνης, γαλανίνης (GALR1-3), ενδοθηλίνης, GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), μελανοκορτίνης/ACTH (Adrenocorticotropin), νευροτενσίνης, νευροκινίνης, NPY (Neuropeptide Y), ορεξίνης, ωκυτοκίνης, PRP (Prolactin-Releasing Peptide), σωματοστατίνης (SSTR1-5), TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) και χολοκυστοκινίνης (CCKAR)</p> <p><b>Υποδοχείς fMLP</b> (Formyl Met-Leu-Phe peptide)</p> <p><b>Υποδοχείς πρωτεασών:</b> θρομβίνης και τρυψίνης</p>
Υποοικογένεια A – 3η Ομάδα: Η θέση σύνδεσης του προσδέτη βρίσκεται στο NH <sub>2</sub> -άκρο	
	<p><b>Υποδοχείς μεγάλων γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών:</b> LH (Luteinizing Hormone) /hCG (human Chorionic Gonadotropin): LHR ή LHGR ή LCHR, FSH (Follicle Stimulating Hormone): FSH-R, TSH (Thyrotropin Stimulating Hormone): TSH-R</p>



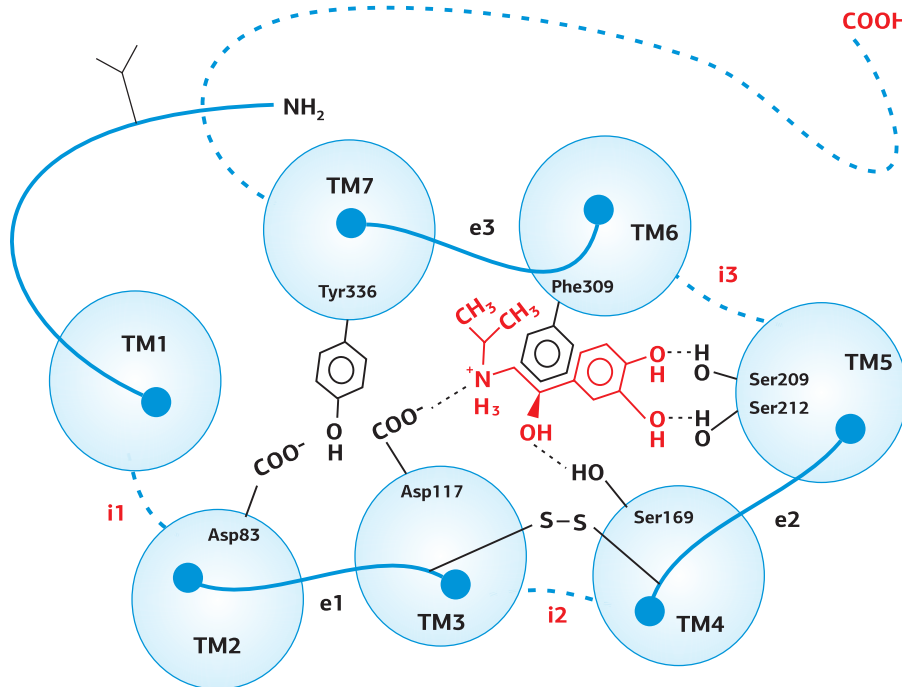
**Οικογένεια A - 1η Ομάδα**

Για τους προσδέτες μικρού MB (νευροδιαβιβαστές, οφίνες, οσφρητικά μόρια, νουκλεοσίδια, βιογενείς αμίνες, λιπιδικοί διαμεσολαβητές, μικρά οπιοειδή πεπτίδια) η θέση σύνδεσης βρίσκεται μέσα στη μεμβράνη. Τα αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών που συμμετέχουν στη σύνδεση του προσδέτη δημιουργούν έναν θύλακα σύνδεσης (binding pocket) (Εικόνα 5.7).



**Εικόνα 5.7**  
**Υποδοχείς GPCRs της οικογένειας A - 1η Ομάδα.**  
 Ανάλογα με το μέγεθός του, ο προσδέτης μπορεί να εισχωρήσει σε διαφορετικό βάθος μέσα στη μεμβράνη και να συνδεθεί σε αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών. Διακρίνεται ο β<sub>2</sub>-αδρενεργικός υποδοχέας με συνδεδεμένη μια μονοαμίνη (πορτοκαλί σφαίρες), ο A<sub>2A</sub> υποδοχέας της αδενοσίνης με συνδεδεμένο ένα νουκλεοσίδιο (μπλε σφαίρες), ο M2 μουσκαρινικός υποδοχέας με συνδεδεμένο το QNB, ένα ανάλογο της ακετυλοχολίνης (κόκκινες σφαίρες), ο υποδοχέας της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης με συνδεδεμένη την 1-P-σφιγγοσίνη (πράσινες σφαίρες) και τέλος ο μ-οπιοειδής υποδοχέας με συνδεδεμένο ένα οπιοειδές πεπτίδιο (ροζ σφαίρες). Ο θύλακας σύνδεσης, ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη, βρίσκεται σε διαφορετικό βάθος μέσα στη μεμβράνη. [33]

Στην περίπτωση που ο προσδέτης είναι μονοαμίνη (αδρεναλίνη, σεροτονίνη), βασικό ρόλο στη σύνδεσή του με τον υποδοχέα παίζει το Asp117 της III διαμεμβρανικής α-έλικας. Η καρβοξυλική ομάδα (COO<sup>-</sup>) του ασπαρτικού οξέος χρησιμεύει ως αντίθετο ιόν (counter-ion) στη σύνδεση της αμινομάδας (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) των μονοαμινών. Το ασπαρτικό οξύ, αν και παίζει κυρίαρχο ρόλο, δεν είναι το μόνο που απαιτείται για τη σύνδεση της αμίνης. Στους υποδοχείς των κατεχολαμινών, και ειδικότερα στον αδρενεργικό β<sub>3</sub>R, οι σερίνες Ser209 και Ser212 στην V διαμεμβρανική περιοχή χρησιμεύουν στη δημιουργία δεσμού υδρογόνου (H...OH) προσφέροντας το H<sup>+</sup>, ενώ οι κατεχολαμίνες προσφέρουν το O<sup>-</sup> (Εικόνα 5.8).



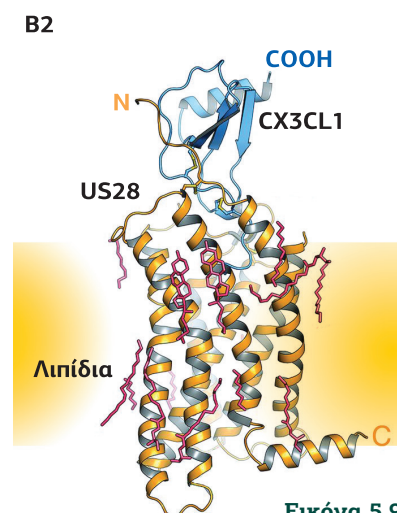
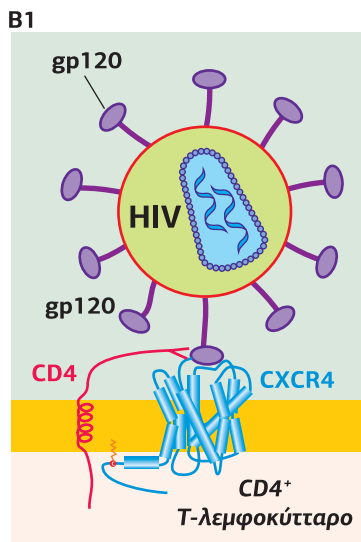
**Εικόνα 5.8**  
**Μοντέλο για τον θύλακα σύνδεσης του β<sub>3</sub>-αδρενοϋποδοχέα, σε κάτοψη.** Διακρίνονται το Asp117 της 3ης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3), οι δύο σερίνες (Ser209 και Ser212) της 5ης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5) και η Phe309 της 6ης περιοχής (TM6). Το μόριο στο κέντρο είναι η ισοπρεναλίνη (αγωνιστής του υποδοχέα). e1-e3: είναι οι 3 εξωκυτταρικοί βρόχοι, και i1-i3: είναι οι 3 ενδοκυτταρικοί βρόχοι. [85]

### Οικογένεια A - 2η Ομάδα

Στη 2η Ομάδα της Οικογένειας A ανήκουν οι υποδοχείς μικρών πεπτιδίων και χημειοκινών, καθώς και οι υποδοχείς πρωτεασών. Στους υποδοχείς αυτούς η θέση σύνδεσης του προσδέτη βρίσκεται ανάμεσα στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο και τους εξωκυττάριους βρόχους (Εικόνα 5.9A).

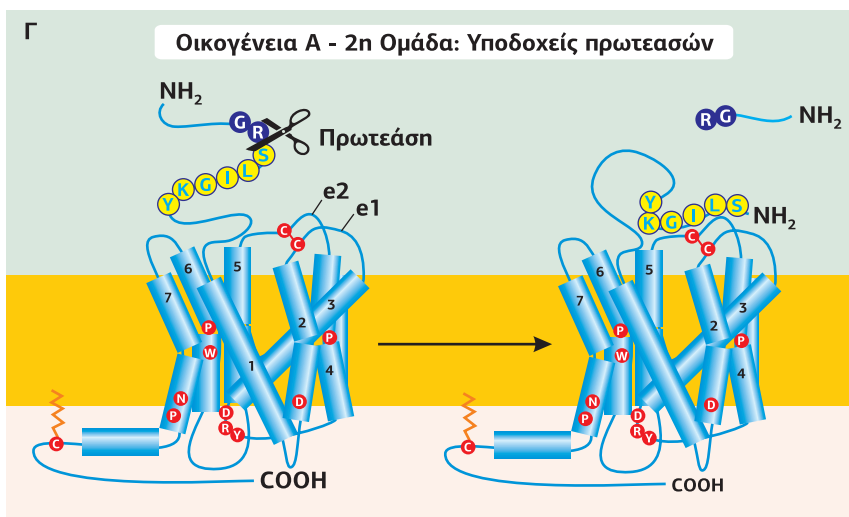
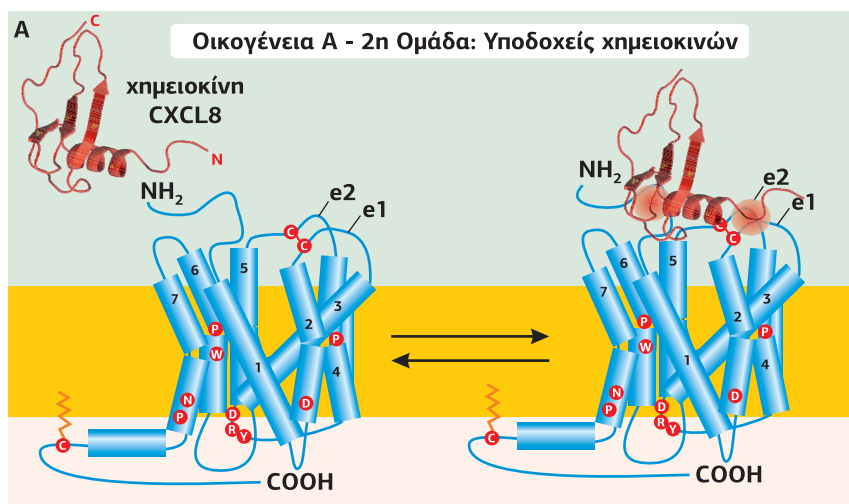
Οι υποδοχείς πρωτεασών ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1970 καθώς οι πρωτεάσες, για δεκαετίες, θεωρούνταν κυρίως αποικοδομητικά ένζυμα που παίζουν ποικίλους ρόλους στην πέψη ή σε θέσεις φλεγμονής “καθαρίζοντας” τα κυτταρικά απόβλητα. Το 1972 ανακαλύφθηκε ότι οι σερίνο-πρωτεάσες **τρυψίνη** και **θρομβίνη** ενεργοποιούν μια καινούρια ομάδα GPCRs, τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται από πρωτεάσες (Proteinases-Activated Receptors, PARs). Αυτοί οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με έναν μοναδικό μηχανισμό: οι πρωτεάσες στοχεύουν σε μια εξειδικευμένη θέση και αποκόβουν το τελικό τμήμα του εξωκυτταρικού NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου του υποδοχέα. Το τμήμα αυτό απομακρύνεται από τον υποδοχέα και εμφανίζεται ένα νέο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, το οποίο δρα ως ένας προσδέτης που συνδέεται ενδομοριακά στους εξωκυττάριους βρόχους και ενεργοποιεί τον υποδοχέα (Εικόνα 5.9Γ).

Έως σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί 4 PARs: PAR-1, PAR-3 και PAR-4, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τη θρομβίνη, και ο PAR-2 ο οποίος ενεργοποιείται από την τρυψίνη. Αν και αρχικά ανακαλύφθηκαν στα αιμοπετάλια, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες, οι PARs είναι ευρέως διαδεδομένοι και στο νευρικό σύστημα (νευρώνες και αστρογλία).



**Εικόνα 5.9**

A. Σύνδεση της χημειοκίνης CXCL8 στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο και στους εξωκυττάριους βρόχους του GPCR υποδοχέα της. [79] B1. Ο HIV μέσω της gp120 συνδέεται στον CXCR4 των T-κυττάρων. B2. Κρυσταλλική δομή του GPCR US28 του κυτομεγαλοϊού που προσβάλλει τον άνθρωπο (Human Cytomegalovirus, HCMV) σε σύνδεση με την ανθρώπινη χημειοκίνη CX3CL1. [14] Γ. Μηχανισμός ενεργοποίησης των PARs. Οι πρωτεάσες (τρυψίνη, θρομβίνη) κόβουν ένα τμήμα της εξωκυτταρικής NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής του υποδοχέα, εμφανίζοντας ένα νέο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, το οποίο συνδέεται ενδομοριακά στον δεύτερο εξωκυτταρικό βρόχο (e2) και ενεργοποιεί τον υποδοχέα.



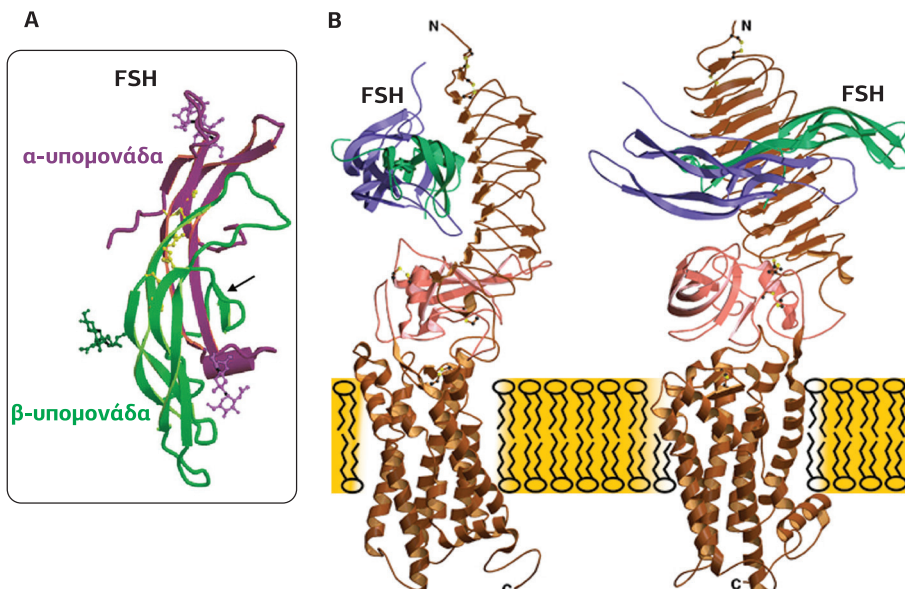
### Οικογένεια A - 3η Ομάδα

Στην 3η Ομάδα της Οικογένειας A ανήκουν οι υποδοχείς των μεγάλων γλυκοπρωτεϊνικών ορμονών. Οι γλυκοπρωτεϊνικές ορμόνες είναι διμερείς πρωτεΐνες περίπου 30 kDa, όπως η θυλακιοτροπίνη (FSH, Follicle Stimulating Hormone), η ωχρινιοτροπίνη (LH, Luteinizing Hormone ή lutropin), η θυρεοτροπίνη (TSH, Thyroid-Stimulating Hormone ή thyrotropin) και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG, human Chorionic Gonadotropin), οι οποίες αποτελούνται από μια α-υπομονάδα, κοινή για όλες τις γλυκοπρωτεΐνες, και μια εξειδικευμένη β-υπομονάδα.

Η FSH και η LH είναι υπεύθυνες στα θηλυκά άτομα για την ωρίμανση του ωοθυλακίου και οι υποδοχείς τους εκφράζονται στα κοκκιώδη κύτταρα (βλ. σελ. 91), ενώ στα αρσενικά άτομα για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και οι υποδοχείς τους εκφράζονται στα κύτταρα Sertoli. Η TSH διεγείρει τον θυρεοειδή αδέννα να παράγει θυροξίνη (T4) και τριιωδοθυρονίνη (T3), οι οποίες διεγείρουν τον μεταβολισμό σε όλους σχεδόν τους ιστούς.

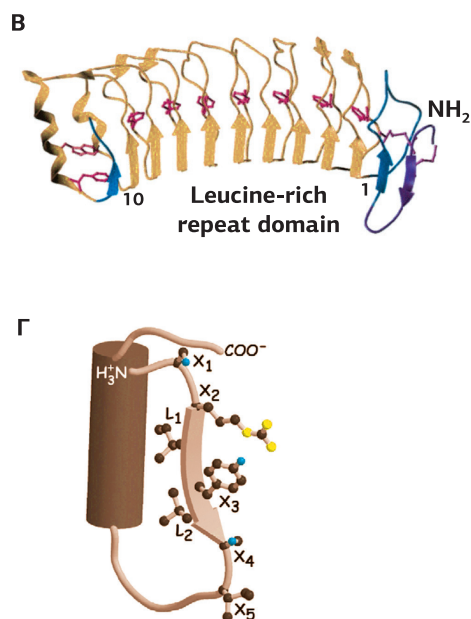
Οι υποδοχείς της 3ης Ομάδας έχουν ένα μεγάλο (350-400 aa) NH<sub>2</sub>-τελικό εξωκυτταρικό άκρο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εξειδικευμένη πρόσδεση των ορμονών (Εικόνα 5.10). Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο υπάρχουν 9-11 (ανάλογα με τον υποδοχέα) μοτίβα 20-25 αμινοξέων, πλούσια σε λευκίνη, LRR (Leucine-Rich Repeat), που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και στη σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης. Το κάθε μοτίβο LRR αποτελείται από έναν β-κλώνο στην κοίλη εσωτερική πλευρά, που συνδέεται με τον επόμενο β-κλώνο μέσω ενός βρόχου επιστροφής στην κυρτή πίσω πλευρά. Με στοχευμένες αντικαταστάσεις αμινοξέων στους β-κλώνους βρέθηκε ότι αμινοξέα, διαφορετικά της λευκίνης, δημιουργούν μία υδρόφοβη επιφάνεια που αλληλεπιδρά με τη γλυκοπρωτεΐνη (Εικόνα 5.11B, Γ).

Το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει επίσης τρία Cys-boxes. Το Cb-1 περιέχει μια Cys του NH<sub>2</sub>-άκρου, δύο Cys ενός αντιπαράλληλου β-πτυχωτού φύλλου και μια Cys από την 1η LRR περιοχή. Μετά την 11η και τελευταία LRR περιοχή υπάρχει το Cb-2 (με δύο Cys) και στη συνέχεια ένας εύκαμπτος σύνδεσμος (hinge-region), ο οποίος καταλήγει στο Cb-3 (με δύο Cys, η πρώτη σε ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο). Ο **εύκαμπτος σύνδεσμος** περιέχει μία sulfotyrosine, η οποία συμμετέχει στη σύνδεση της ορμόνης (Εικόνα 5.11A).



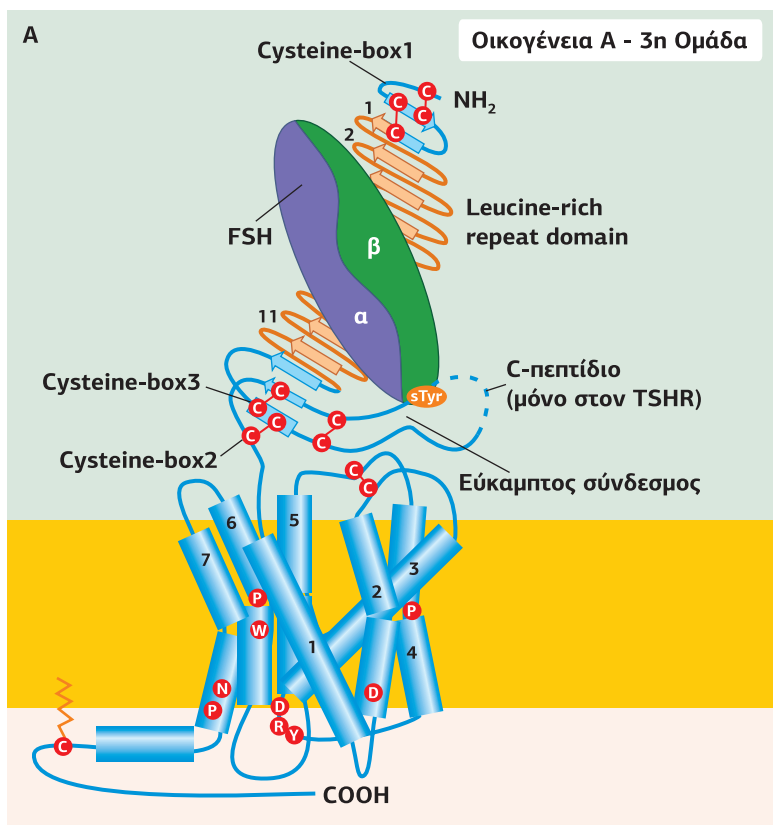
**Εικόνα 5.10**

A. Η θυλακιοτροπίνη (FSH), όπως και η ωχρινιοτροπίνη και η χοριονική γοναδοτροπίνη, αποτελείται από μια α-υπομονάδα, κοινή για όλες τις γλυκοπρωτεΐνες, και μια εξειδικευμένη β-υπομονάδα B. Χαρακτηριστική δομή του υποδοχέα FSH-R, πριν και μετά τη σύνδεση της FSH. Διακρίνεται το μεγάλο εξωκυτταρικό NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο (με τις πλούσιες σε Leu επαναλήψεις) που χαρακτηρίζει την 3η ομάδα, οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές και η ενδοκυτταρική περιοχή με τους 3 βρόχους και το COOH-τελικό άκρο. Για να συνδεθεί στην LRR περιοχή του FSH-R, η FSH αλλάζει διαμόρφωση δημιουργώντας μια θήκη, με την οποία αλληλεπιδρά το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του υποδοχέα. Η αλλαγή διαμόρφωσης του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου μεταφέρεται στις 7TM περιοχές ενεργοποιώντας τον υποδοχέα. [52]



**Εικόνα 5.11**

**Χαρακτηριστική δομή ενός υποδοχέα της Οικογένειας A - 3ης ομάδας.** Α. Σχηματική αναπαράσταση του ανθρώπινου FSH-R. Διακρίνονται τα δύο χαρακτηριστικά στοιχεία των GPCRs της οικογένειας A, ο δεσμός θείου ανάμεσα στον 1ο και 2ο εξωκυτταρικό βρόχο και η παλμιτοϋλιωμένη Cys στο COOH-άκρο. Το ιδιαίτερο δομικό στοιχείο που χαρακτηρίζει την 3η ομάδα είναι το μεγάλο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο που περιέχει 11 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε Leu (LRR). Το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει επίσης τρία Cys-boxes και έναν εύκαμπτο σύνδεσμο. [91][51][34] Β. Επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη, οι οποίες αποτελούνται από έναν β-κλώνο στην κοίλη εσωτερική πλευρά που συνδέεται με τον επόμενο β-κλώνο μέσω ενός βρόχου επιστροφής στην κυρτή πίσω πλευρά. [47] Γ. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στη σύνδεση της γλυκοπρωτεϊνικής ορμόνης είναι μη λευκίνες, που βρίσκονται στα β-πτυχωτά φύλλα ( $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5$ ). [95]



## 1.4

### GPCRs της Οικογένειας B – Οικογένεια της σεκρετίνης

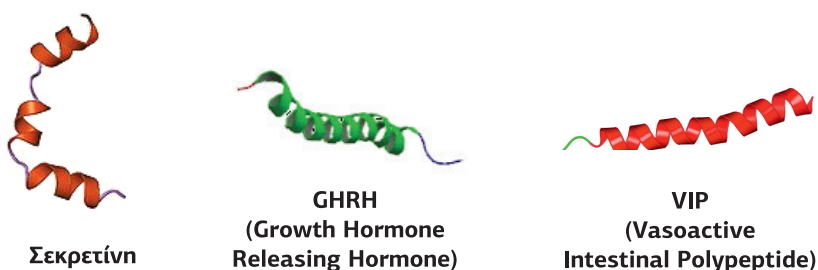
Η σεκρετίνη και ο υποδοχέας της κατέχουν μια ειδική θέση στην ιστορία καθώς είναι η πρώτη ορμόνη που ανακαλύφθηκε (Bayliss and Starling, 1902), και έδωσε ώθηση στην ανάπτυξη της ενδοκρινολογίας, με τους υποδοχείς της να είναι το πρώτο μέλος της Οικογένειας B, το οποίο κλωνοποιήθηκε (Ishihara et al., 1991).

Η οικογένεια B περιλαμβάνει GPCRs για πεπτιδικές ορμόνες, 25 ή παραπάνω αμινοξέων, με ελικοειδή διαμόρφωση κυρίως στο COOH-τελικό τους άκρο, όπως το VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide), το PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide), η γλυκαγόνη, το GLP (Glucagon-Like Peptide), το GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide), η καλσιτονίνη, το CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), η PTH (Parathyroid Hormone), η CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) και η GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) (**Εικόνα 5.12**).

Οι υποδοχείς αυτών των μικρών πεπτιδικών ορμονών αποτελούν στόχους σημαντικών φαρμάκων για τη θεραπεία μεταβολικών ασθενειών, όπως διαβήτης, οστεοπόρωση, παχυσαρκία, αλλά και ασθενειών του νευρικού συστήματος, όπως ημικρανία, άγχος, κατάθλιψη.

Ενώ οι υποδοχείς της Οικογένειας B μοιράζονται το κοινό δομικό μοντέλο των GPCRs με τις 7 διαμεμβρανικές α-έλικες, δεν μοιράζονται τα χαρακτηριστικά καλά συντηρημένα αμινοξέα της εκτεταμένα μελετημένης Οικογένειας A και παρουσιάζουν διαφορές:

α. Στη διαμόρφωση του GPCR. Το εξωκυτταρικό NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του υποδοχέα έχει μια καλά συντηρημένη διαμόρφωση που περιλαμβάνει δύο κεντρικά αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και μια α-έλικα στο άκρο της NH<sub>2</sub>-περιοχής, η οποία διασυνδέεται με πολλούς βρόχους και σταθεροποιείται με 3 καλά συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς. Επίσης, εμφανίζουν μια διαφορετική τριδιάστατη διαμόρ-



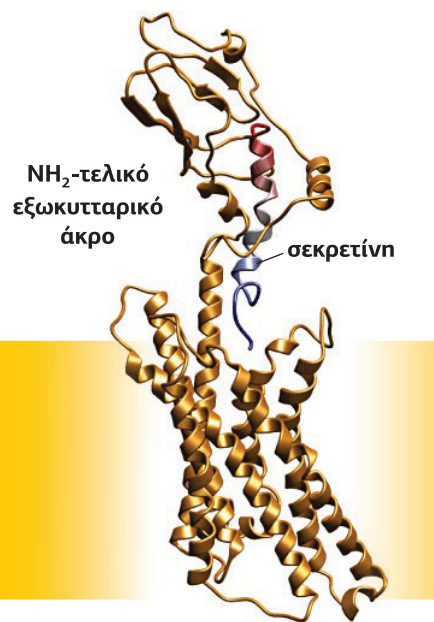
**Εικόνα 5.12**

Οι φυσικοί προσδέτες των GPCRs της Οικογένειας Β είναι μικρές πεπτιδικές ορμόνες, 25 ή παραπάνω αμινοξέων, με ελικοειδή διαμόρφωση.

φωση των 7ΤΜ περιοχών από τους GPCRs της Οικογένειας Α (Εικόνα 5.13 και βλ. Εικόνα 5.5).

β. Στον τρόπο σύνδεσης του φυσικού προσδέτη. Η σύνδεση του προσδέτη λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Αρχικά, η διαμόρφωση α-έλικας του COOH-τελικού άκρου της πεπτιδικής ορμόνης συνδέεται στη σχισμή ανάμεσα στα δύο β-πτυχωτά φύλλα του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου του υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή αλλάζει τόσο τη διαμόρφωση του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου του υποδοχέα όσο και τη διαμόρφωση του πεπτιδίου, το οποίο πλησιάζει προς τους εξωκυτταρικούς βρόχους, και η NH<sub>2</sub>-τελική πλευρά του πεπτιδίου εισέρχεται και συνδέεται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα. Ως αποτέλεσμα, αλλάζει η διαμόρφωση των διαμεμβρανικών α-ελίκων οδηγώντας στην ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης (Εικόνα 5.14).

Το 1902 ο William Bayliss και ο Ernest Starling μελετούσαν τον τρόπο με τον οποίο το νευρικό σύστημα ελέγχει τη διαδικασία της πέψης. Ήταν γνωστό ότι το πάγκρεας εκκρίνει πεπτικά υγρά ως απάντηση στο έρασμα των τροφών (χυμός) στο δωδεκαδάκτυλο. Κόβοντας όλα τα νεύρα προς το πάγκρεας σε πειραματόζωα, ανακάλυψαν ότι η διαδικασία αυτή δεν ήταν κάτω από τον έλεγχο του νευρικού συστήματος. Προσδιόρισαν ότι μια ουσία, που εκκρίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και διεγείρει το πάγκρεας. Ονόμασαν αυτή την ουσία **σεκρετίνη**. Αυτό το είδος της ουσίας που καλείται τώρα ορμόνη είναι ένας όρος που επινοήθηκε από τον Bayliss το 1905.

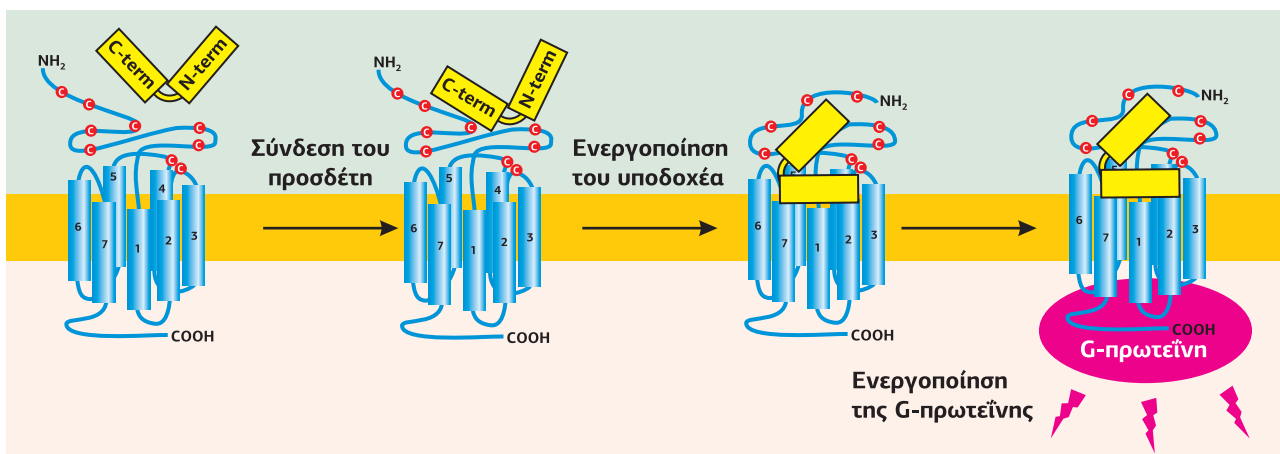


**Εικόνα 5.13**

Ο υποδοχέας της σεκρετίνης, ο οποίος αποτελεί το πρωτότυπο των υποδοχέων της Οικογένειας Β. Στην εικόνα διακρίνεται και η σεκρετίνη συνδεδεμένη στο NH<sub>2</sub>-άκρο του υποδοχέα. [60]

**Εικόνα 5.14**

Ο προσδέτης συνδέεται στον υποδοχέα σε δύο στάδια: Αρχικά, το COOH-τελικό άκρο του πεπτιδίου συνδέεται ανάμεσα στα δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα του NH<sub>2</sub>-εξωκυτταρικού άκρου του υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή προσελκύει το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του υποδοχέα, προς τις διαμεμβρανικές περιοχές και αλλάζει τη διαμόρφωση του πεπτιδίου, ώστε η NH<sub>2</sub>-τελική πλευρά του εισέρχεται και συνδέεται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα. Ως αποτέλεσμα, αλλάζει η διαμόρφωση των διαμεμβρανικών α-ελίκων οδηγώντας στην ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης. [81]



## 1.5 | GPCRs της Οικογένειας C

Η οικογένεια C περιλαμβάνει υποδοχείς για το γλουταμινικό, το GABA, ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , για τις γεύσεις γλυκό και umami, για βασικά αμινοξέα και ορισμένους ορφανούς. Το πρώτο μέλος της οικογένειας που κλωνοποιήθηκε το 1991 ήταν οι μεταβιοτροπικοί υποδοχείς του γλουταμινικού. Οι οκτώ υπότυποι **mGlu1-8** ενεργοποιούνται από το γλουταμινικό, τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ, και, συνεπώς, συμμετέχουν στη ρύθμιση της διέγερσης των κυττάρων και της συναπτικής διαβίβασης. Ο κύριος ανασταλτικός διαβιβαστής του ώριμου ΚΝΣ είναι το GABA, το οποίο συνδέομενο στους **GABA<sub>B</sub>R** υποδοχείς, οι οποίοι εκφράζονται προ- και μετασυναπτικά επηρεάζει την απελευθέρωση διαφόρων νευροδιαβιβαστών και αναστέλλει τα διεγερτικά μετασυναπτικά ρεύματα. Ο υποδοχέας **CaSR** ενεργοποιείται καταρχήν από ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , αλλά η ενεργοποίησή του ρυθμίζεται και από αμινοξέα, πολυαμίνες και άλλα δισθενή κατιόντα. Έχει την ιδιότητα να ανιχνεύει ανά πάσα στιγμή την αλλαγή στις συγκεντρώσεις του εξωκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  επιτρέποντας να διατηρηθεί η ομοιόσταση του εξωκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  μέσω της απελευθέρωσης της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH). Οι γεύσεις για το γλυκό και το umami συνδέονται σε ετεροδιμερείς υποδοχείς **T1R2/T1R3** (γλυκό) ή **T1R1/T1R3** (umami) στους γευστικούς κάλυκες της γλώσσας. Ο υποδοχέας umami διεγείρεται από L-αμινοξέα στα περισσότερα θηλαστικά, ενώ μόνο το όξινο γλουταμινικό νάτριο και το L-ασπαρτικό (τυπικά συστατικά των γαπωνέζικων φαγητών) ενεργοποιούν τον ανθρώπινο υποδοχέα.

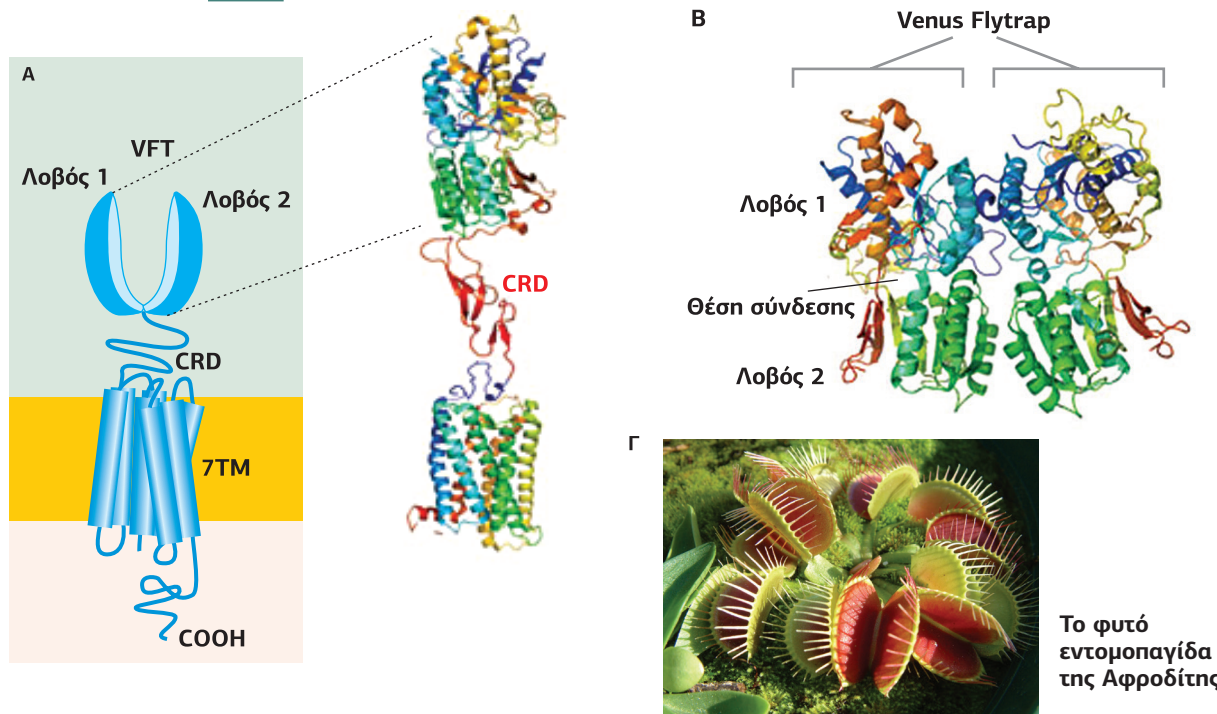
Μεταξύ των τριών οικογενειών GPCRs, η οικογένεια C καθορίζεται από δύο μοναδικά χαρακτηριστικά:

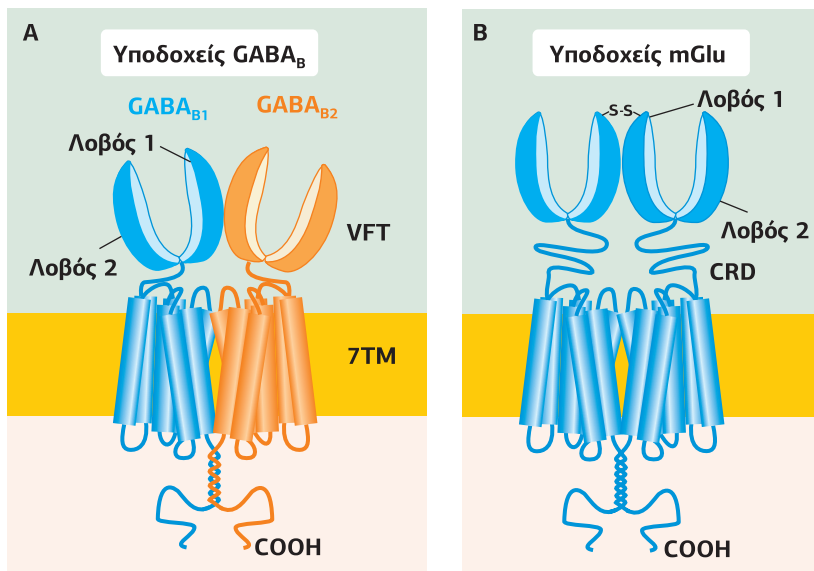
α. Ένα εξαιρετικά μεγάλο  $\text{NH}_2$ -τελικό εξωκυτταρικό άκρο που περιέχει το χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο **VFT** (Venus FlyTrap) ή εντομοπαγίδα της Αφροδίτης, και μια περιοχή **CRD** (Cysteine Rich Domain) 80 αμινοξέων με 9 καλά συντηρημένες κυστεΐνες. Η περιοχή VFT αποτελείται από δύο λοβούς, οι οποίοι χωρίζονται μεταξύ τους από μια σχισμή, όπου συνδέεται ο ενδογενής προσδέτης (**Εικόνα 5.15A**). Η δομή VFTs των GPCRs της Οικογένειας C παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με τις περιπλασματικές πρωτεΐνες σύνδεσης (PBPs, Periplasmic Binding Proteins) των βακτηρίων. Μια γενικά αποδεκτή υπόθεση είναι ότι η σύντηξη ενός προγονικού rhodopsin-like υποδοχέα και μιας PBP δημιούργησαν τον κοινό πρόγονο των

**CaSR:** Calcium Sensing Receptor

### Εικόνα 5.15

A. Δομική οργάνωση των GPCRs της Οικογένειας C. Οι υποδοχείς αυτοί μοιράζονται ένα μοναδικό χαρακτηριστικό, μια περιοχή VFT, η οποία έχει δύο λοβούς (λοβός 1 και λοβός 2) που χωρίζονται από μια σχισμή, μέσα στην οποία συνδέεται ο φυσικός προσδέτης. B. Τριδιάστατη αναπαράσταση της δομής VFT, στη διμερή της μορφή. [20] Γ. Το φυτό εντομοπαγίδα της Αφροδίτης, ένα μικρό σαρκοφάγο φυτό που φύεται στη δυτική ακτή των ΗΠΑ και του οποίου τα φύλλα κλείνουν παγιδεύοντας τη λεία τους.



**Εικόνα 5.16**

Σχηματική αναπαράσταση δύο πρωτότυπων υποδοχών της Οικογένειας C, ως ετεροδιμερή (υποδοχείς GABA<sub>B1</sub> και GABA<sub>B2</sub>) και ομοδιμερή (υποδοχείς mGlu). Στους υποδοχείς GABA<sub>B</sub>, η περιοχή VFT είναι άμεσα συνδεδεμένη στην TM1 διαμεμβρανική α-έλικα, σε αντίθεση με τους υποδοχείς mGlu, όπου είναι συνδεδεμένη μέσω της CRD. Επίσης, στους υποδοχείς GABA<sub>B</sub>, συνδέεται ένα μόριο φυσικού προσδέτη ανά διμερές (στον GABA<sub>B1</sub>), ενώ στον μεταβοτροπικό υποδοχέα του γλουταμινικού (mGluR) συνδέονται δύο προσδέτες. Στους υποδοχείς mGlu, οι περιοχές VFTs δημιουργούν ιδιόσυστατα διμερή, τα οποία σταθεροποιούνται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. [20]

GPCRs της οικογένειας C. Η περιοχή CRD, την οποία περιέχουν όλοι οι υποδοχείς της οικογένειας C, εκτός από τον υποδοχέα GABA<sub>B</sub>, παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Οι GPCRs της Οικογένειας C περιέχουν αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης στις 7 διαμεμβρανικές περιοχές τους, ενώ ο ενδογενής προσδέτης συνδέεται στην περιοχή VFT. Η COOH-τελική ουρά είναι μια υπερμεταβλητή περιοχή που παίζει ρόλο σκαλωσιάς αλλά και σύνδεσης με τα σηματοδοτικά μονοπάτια.

β. Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό των GPCRs της Οικογένειας C είναι ότι δημιουργούν ιδιόσυστατα διμερή, εξαιτίας των οποίων οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με έναν μοναδικό και πολύπλοκο τρόπο. Βρίσκονται στη μεμβράνη ως ομοδιμερή (mGluR και CaS-R) ή ετεροδιμερή (GABA<sub>B</sub>-R και T1Rs). Στην περίπτωση που ο υποδοχέας δημιουργεί ετεροδιμερή, το ένα μονομερές, (π.χ. ο GABA<sub>B1</sub>) είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του ενδογενούς προσδέτη, ενώ το άλλο μονομερές (π.χ. ο GABA<sub>B2</sub>) είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης. Αντιθέτως, οι υποδοχείς mGlu, οι οποίοι δημιουργούν ομοδιμερή, εμφανίζουν δύο θέσεις σύνδεσης του γλουταμινικού, μία σε κάθε μονομερές (**Εικόνα 5.16**).

### Σύνδεση του προσδέτη και μηχανισμός ενεργοποίησης του τελεστή

Η σύνδεση του φυσικού προσδέτη στη σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς της περιοχής VFT επάγει μια σειρά από αλλαγές στη διαμόρφωση όλων των περιοχών του υποδοχέα, οι οποίες μεταφέρονται στην G-πρωτεΐνη και την ενεργοποιούν. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης είναι πολύ πολύπλοκος λόγω του ιδιόσυστατου διμερισμού των υποδοχών αυτής της Οικογένειας. Οι διμερισμένοι υποδοχείς περιέχουν 4 ή 6 ανεξάρτητες περιοχές, στις οποίες οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ των δύο γειτονικών μονομερών, με τρόπο ώστε η αλλαγή διαμόρφωσης σε μια περιοχή να επάγει αλλαγές στις άλλες. Για μεγάλο χρονικό διάστημα έμεινε αδιευκρίνιστο το πώς οι διαφορετικές περιοχές δουλεύουν μαζί για να ενεργοποιήσουν την G-πρωτεΐνη. Το 2000 η πρώτη κρυσταλλική δομή που ανακαλύφθηκε, του υποδοχέα mGlu1, αποτέλεσε τη βάση για να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός τροποποίησης της VFT από το γλουταμινικό.

Στην κατάσταση ηρεμίας, οι δυο περιοχές VFT βρίσκονται σε μια ανοιχτή διαμόρφωση και ο λοβός 2 του ενός μονομερούς είναι απομακρυσμένος από τον λοβό 2 του άλλου μονομερούς. Στην ενεργή κατάσταση, στην περίπτωση των **ομοδιμερών** υποδοχών, με τη σύνδεση δύο μορίων φυσικού προσδέτη, οι VFT περιοχές κλείνουν και σταθεροποιούνται σε μια στενή επαφή μεταξύ τους, καθώς ο λοβός 2 του ενός μονομερούς μετακινείται και έρχεται σε επαφή με τον λοβό 2 του άλλου μονομερούς. Αν και η κλειστή διαμόρφωση με δύο συνδεδεμένους προσδέτες είναι πιο

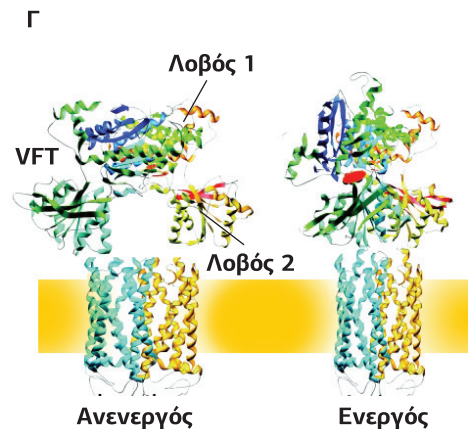
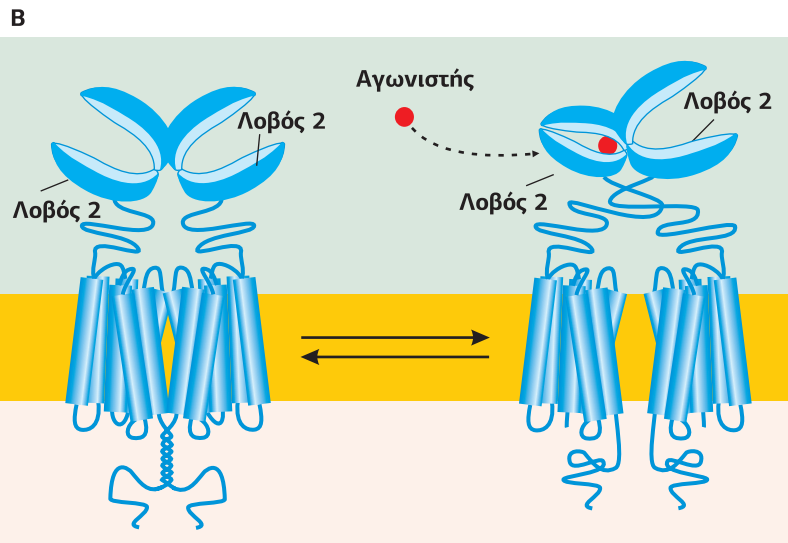
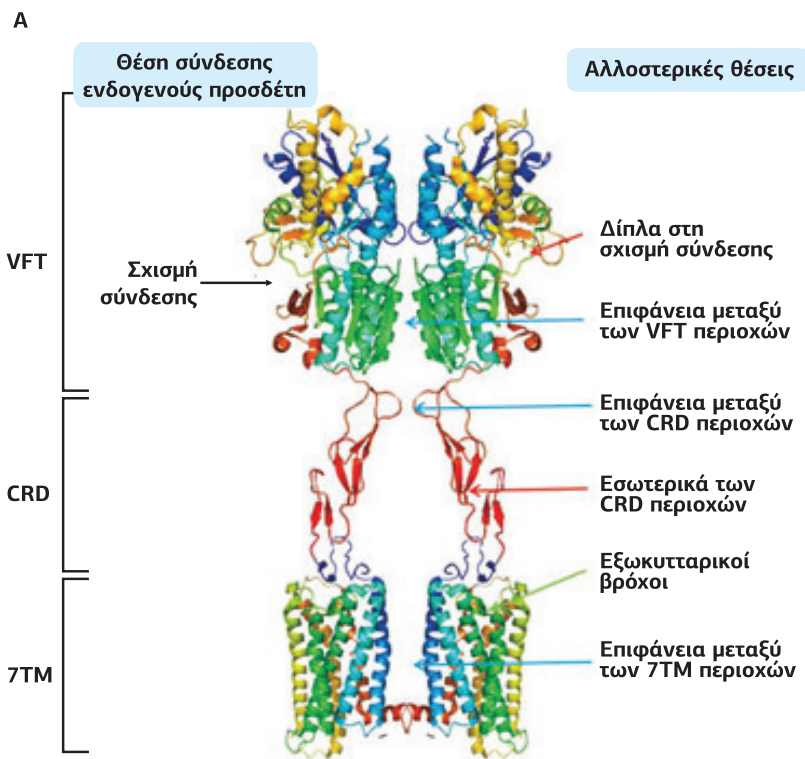
Η γεύση **umami** έχει προστεθεί πρόσφατα και αναφέρεται σε ένα είδος γεύσης που παρέχουν ορισμένα αμινοξέα και άλατά τους και κυρίως το γλουταμινικό και το ασπαρτικό οξύ, όπως και κάποια νουκλεοτίδια. Περιγράφεται ως γεύση πικάντικη (savoury), κρεατώδης (meaty) και ως γεύση ζωμού κρέατος (brothy) και αυτό περίπου είναι το νόημα της λέξης umami στην Ιαπωνική γλώσσα. Η γεύση umami θεωρείτο ανέκαθεν ως ξεχωριστή γεύση στην Ασιατική κουζίνα, όχι όμως και στη Δυτική. Συνδέεται με την περιεκτικότητα μιας τροφής σε πρωτεΐνες και τυπικό παράδειγμα γεύσης umami αποτελεί η γεύση του ψητού μπέικον και των ωριμασμένων τυριών (π.χ. παρμεζάνα, ροκφόρ). Το πλέον κοινό ενισχυτικό γεύσης που προστίθεται σε διάφορα τρόφιμα, το γλουταμινικό νάτριο βασίζεται στην ενίσχυση της γεύσης umami.

**Εικόνα 5.17**

A. Διμερές υποδοχέας της Οικογένειας C, όπου διακρίνονται η σχισμή σύνδεσης του ενδογενούς προσδέτη στην περιοχή VFT και οι πολλές αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης.  
 B. Στην κατάσταση ηρεμίας οι δύο περιοχές VFT βρίσκονται σε μια ανοικτή διαμόρφωση και ο λοβός 2 του ενός μονομερούς είναι μακριά από τον λοβό 2 του άλλου μονομερούς. Στην ενεργή κατάσταση, στην περίπτωση του ομοδιμερούς υποδοχέα mGlu-R, η σύνδεση ενός μόνο προσδέτη στη μια υπομονάδα οδηγεί στο κλείσιμο της μιας περιοχής VFT και αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα, παρόλο που για τη σταθεροποίηση της ενεργούς διαμόρφωσης απαιτείται η παρουσία ενός κατιόντος  $Gd^{3+}$ . [20]  
 Γ. Το μοντέλο ενεργοποίησης του ετεροδιμερούς  $GABA_B$ R ( $GABA_{B1}$  γαλάζιο και  $GABA_{B2}$  κίτρινο) σε τριδιάστατη διαμόρφωση. Διακρίνεται ο ανενεργός υποδοχέας με τις περιοχές VFT σε ανοικτή διαμόρφωση και ο ενεργός, παρουσία του ενδογενούς προσδέτη (με κόκκινο) συνδεδεμένου στη μία VFT περιοχή. [74]

σταθερή και έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενεργοποίησης, έχει δειχθεί ότι οι mGlu-Rs μπορούν να ενεργοποιηθούν και με τη σύνδεση ενός μόνο προσδέτη, αλλά για τη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης απαιτείται η παρουσία ενός κατιόντος  $Gd^{3+}$ , απουσία του οποίου η διαμόρφωση είναι ασταθής (Εικόνα 5.17B). Στην περίπτωση των **ετεροδιμερών** υποδοχέων, όπως ο  $GABA_B$ R, η σύνδεση ενός προσδέτη στη μια υπομονάδα οδηγεί στο κλείσιμο της μιας περιοχής VFT και αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης είναι ικανή να σταθεροποιήσει τον υποδοχέα στην ενεργή του διαμόρφωση και να φέρει σε επαφή τους λοβούς 2 των δύο μονομερών (Εικόνα 5.17Γ).

Σε γενικές γραμμές ο μηχανισμός ενεργοποίησης περιλαμβάνει τρία βήματα: 1. Ο φυσικός προσδέτης συνδέεται στη μία ή δύο περιοχές VFT του διμερούς υποδοχέα και σταθεροποιεί μια κλειστή διαμόρφωση. 2. Η κλειστή διαμόρφωση της ή των VFTs μεταφέρει το σήμα ενεργοποίησης στις 7TM περιοχές, άμεσα ή μέσω της περιοχής CRD. 3. Η αναδιαμόρφωση των 7TM ενεργοποιεί την G-πρωτεΐνη.





1.6

**Απευαισθητοποίηση, εσωτερίκευση και down-regulation των GPCRs**

Παρά τη μεγάλη τους ποικιλομορφία, όλοι οι GPCRs, σε όποια οικογένεια και να ανήκουν, ρυθμίζονται με έναν κοινό μηχανισμό απευαισθητοποίησης, ο οποίος εμπλέκει δύο οικογένειες πρωτεϊνών, τις **GRKs**, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τους συνδεδεμένους με τον ενδογενή προσδέτη υποδοχείς, και τις **αρρεστίνες**, οι οποίες συνδέονται στους φωσφορυλιωμένους υποδοχείς και εμποδίζουν τη σύνδεση της G-πρωτεΐνης (Εικόνα 5.18).

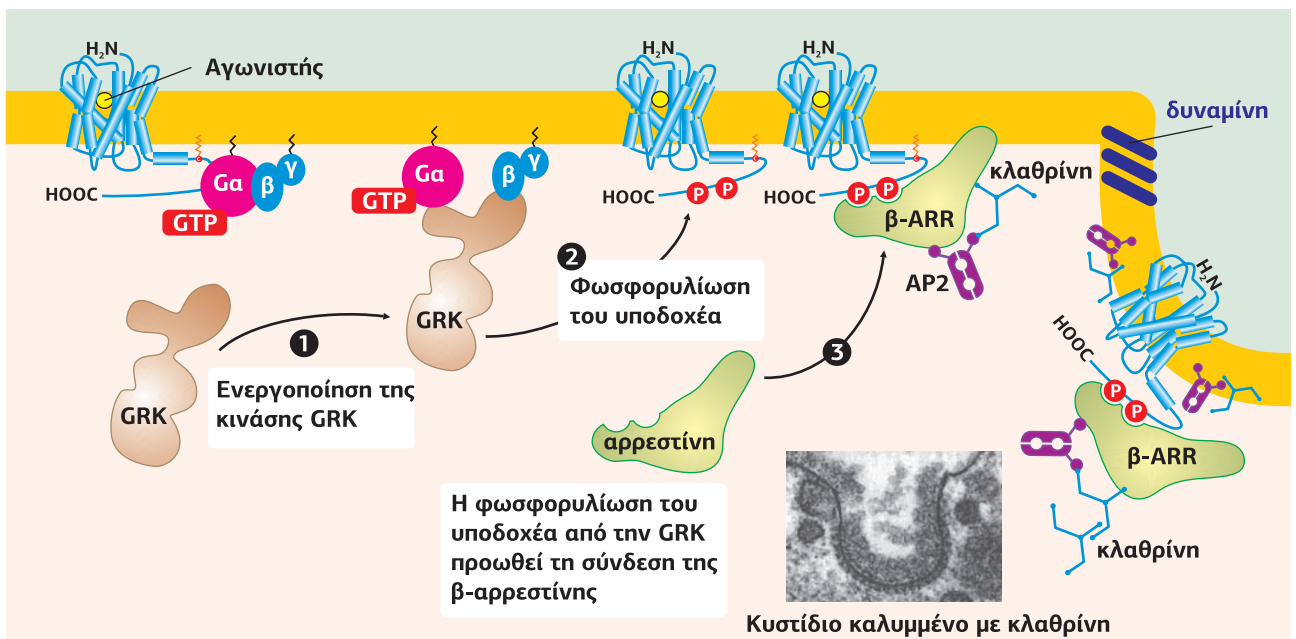
**Απευαισθητοποίηση των υποδοχέων και λήξη του μηνύματος**

**Απευαισθητοποίηση** (desensitization) συμβαίνει όταν έπειτα από διέγερση του υποδοχέα από ορμόνες, νευροδιαβιβαστές ή αισθητήρια ερεθίσματα, η μεταγωγή του μηνύματος εξασθενεί. Δηλαδή, παρά την ύπαρξη του εξωκυτταρικού ερεθίσματος, το μήνυμα παύει να περνάει στο εσωτερικό του κυττάρου ή περνάει εξαιρετικά εξασθενημένο. Όταν η περίοδος διέγερσης του υποδοχέα είναι σύντομη, ο υποδοχέας απευαισθητοποιείται και επανευαισθητοποιείται άμεσα, χωρίς να επηρεαστεί ο αριθμός των μεμβρανικών υποδοχέων. Όταν η περίοδος διέγερσης είναι παρατεταμένη, ο αριθμός των υποδοχέων της μεμβράνης μειώνεται μέσω του μηχανισμού της down-regulation.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί απευαισθητοποίησης, η ομόλογη και η ετερόλογη:

Η **ομόλογη απευαισθητοποίηση** συμβαίνει σε υποδοχείς οι οποίοι είναι ενεργοποιημένοι από έναν αγωνιστή και επάγουν οι ίδιοι την απευαισθητοποίησή τους. Ο ενεργοποιημένος GPCR επάγει την ανταλλαγή GDP με GTP στη  $G\alpha$  υπομονάδα, η οποία διαχωρίζεται από τις  $G\beta\gamma$ . Στη συνέχεια οι  $G\beta\gamma$  υπομονάδες προσελκύουν τις κινάσες GRKs (G-protein coupled Receptor Kinases), οι οποίες φωσφορυλιώνουν διάφορα κατάλοιπα Ser/Thr του 3ου ενδοκυτταρικού βρόχου και του COOH-τελικού άκρου του υποδοχέα. Για να απευαισθητοποιηθεί όμως ένας υποδοχέας, δεν αρκεί η διαδικασία της φωσφορυλίωσης. Η φωσφορυλίωση είναι ένα σκαλοπάτι για το επόμενο βήμα, το οποίο περιλαμβάνει την αντικατάσταση της G-πρωτεΐνης από μια β-αρρεστίνη. Οι β-αρρεστίνες είναι ευκαρυωτικές πρωτεΐνες που συνδέονται ειδικά στους φωσφορυλιωμένους GPCRs. Η φωσφορυλίωση από τις GRKs αυξάνει τη συγγένεια του GPCR για τη β-αρρεστίνη, η σύνδεση της οποίας εμποδίζει τη σύνδεση της G-πρωτεΐνης και σταματά το σήμα. Η διαδικασία της απευαισθητοποίησης είναι

**Εικόνα 5.18**  
**Απευαισθητοποίηση των GPCRs.** Παρά την ύπαρξη εξωκυτταρικού προσδέτη, οι GPCRs παραμένουν ενεργοποιημένοι για περιορισμένη διάρκεια, καθώς μετά την ενεργοποίησή τους, οι  $G\beta\gamma$  υπομονάδες προσελκύουν την κινάση GRK, η οποία φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Ser/Thr του COOH-τελικού άκρου του GPCR. Η φωσφορυλίωση δεν απευαισθητοποιεί τον υποδοχέα, αλλά αυξάνει τη συγγένειά του για τη β-αρρεστίνη. Η σύνδεση της β-αρρεστίνης εμποδίζει τη σύνδεση της G-πρωτεΐνης και ταυτόχρονα δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς προσελκύνοντας μόρια απαραίτητα για την εσωτερίκευση του υποδοχέα σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη. [31]



γρήγορη και αντιστρεπτή. Ωστόσο, αν το διεγερτικό σήμα έχει μεγάλη διάρκεια και ένταση, συμβαίνει down-regulation του υποδοχέα μέσω της διαδικασίας της ενδοκυτώσεως σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη (Εικόνα 5.18).

Η **ετερόλογη απευαισθητοποίηση** λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση του GPCR από κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση από τις κινάσες PKC και PKA διαφορετικών καταλοίπων Ser/Thr του 3ου ενδοκυτταρικού βρόχου και του COOH-τελικού άκρου, επίσης, αυξάνει τη συγγένεια των υποδοχέων για τη β-αρρεστίνη. Αυτού του τύπου η φωσφορυλίωση όμως δεν απαιτεί ο υποδοχέας να είναι ενεργοποιημένος, όπως στην ομόλογη απευαισθητοποίηση. Δηλαδή, η ενεργοποίηση ενός υποδοχέα που οδηγεί σε παραγωγή cAMP και ενεργοποίηση της PKA, μπορεί να οδηγήσει στη φωσφορυλίωση και την απενεργοποίηση υποδοχέων, οι οποίοι συμμετέχουν σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

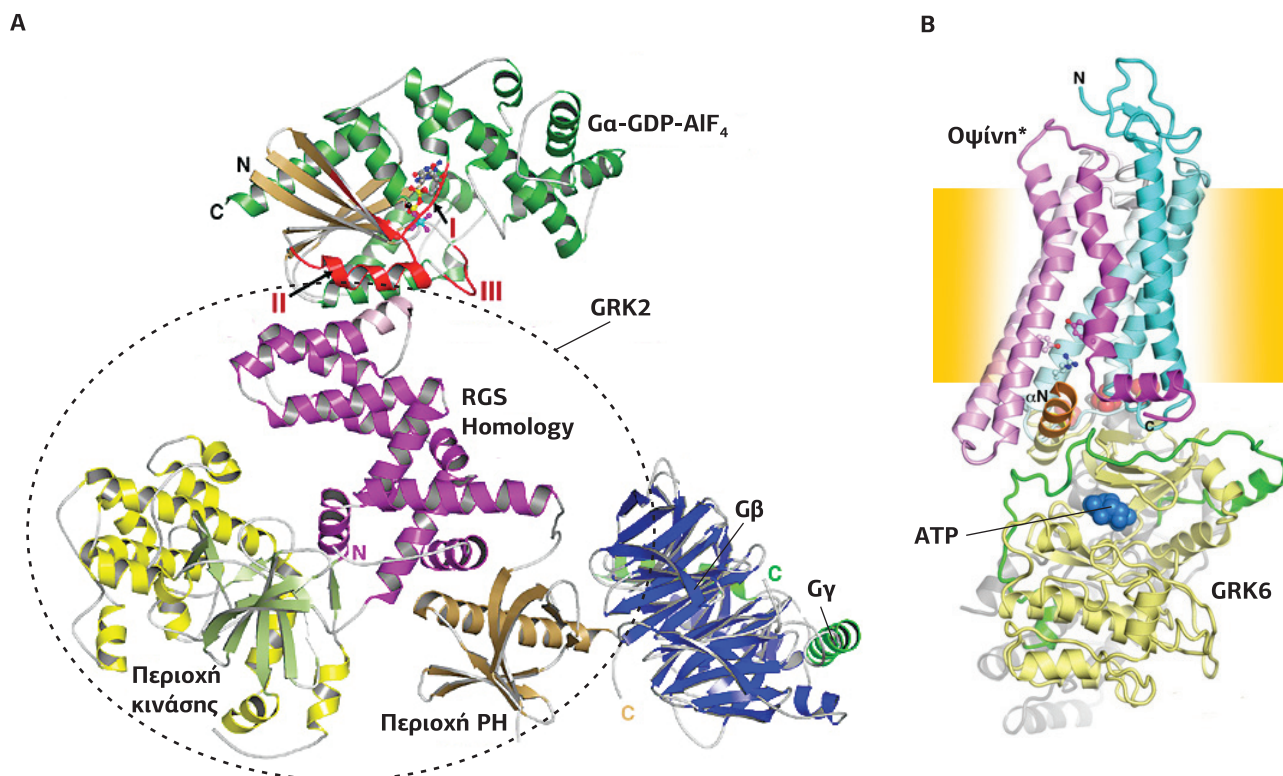
**ΟΙ ΚΙΝΑΣΕΣ GRKS (G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES)** είναι μια οικογένεια επτά πρωτεϊνικών κινάσων (στα θηλαστικά) που συμμετέχει στην ομόλογη απευαισθητοποίηση των GPCRs. Οι GRKs αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: μια περιοχή RGS (Regulator of G-protein Signaling) στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, μια περιοχή με δράση κινάσης, και μια περιοχή PH (οι GRK2/3), η οποία συμβάλλει στην τοποθέτηση της κινάσης στη μεμβράνη και βρίσκεται στο COOH-τελικό άκρο (Εικόνα 5.19A). Οι πρωτεΐνες RGS επιταχύνουν τη δραστηριότητα της Gα-υπομονάδας, δρώντας ως GTPase-Activating Proteins (GAPs).

Οι καλύτερα μελετημένες GRKs είναι η GRK1 ή κινάση της ροδοψίνης και η GRK2, η οποία εκφράζεται ευρέως σε πολλά είδη κυττάρων και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα η GRK αλληλεπιδρά με τις Gβγ υπομονάδες που την προσανατολίζουν σωστά, ώστε να φωσφορυλιώσει τον GPCR σε συγκεκριμένα κατάλοιπα Ser/Thr (βλ. Εικόνα 5.35). Σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων οι GRKs συνδέονται σε διαφορετικούς GPCRs και έχουν διαφορετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η **GRK2** στην καρδιά φωσφορυλιώνει τον β<sub>1</sub>-αδρενεργικό υποδοχέα (β<sub>1</sub>ARK), ενώ στα λεμφοκύτταρα φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα CCR5 μετά τη σύνδεση των χημειοκινών CCL4 και CCL5. Η **GRK3** και η **GRK5** εκφράζονται στους λείους μυς των αεραγωγών και ρυθμίζουν τη δρα-

Η Gα υπομονάδα έχει δράση GTPάσης και παραμένει ενεργή όσο διάστημα έχει συνδεδεμένο το GTP. Οι πρωτεΐνες **GAP** αυξάνουν τον ρυθμό υδρόλυσης του GTP σε GDP και, κατά συνέπεια, μειώνουν το διάστημα που παραμένει ενεργή η Gα-υπομονάδα. Βλ. Κεφάλαιο 1, σελ. 23.

### Εικόνα 5.19

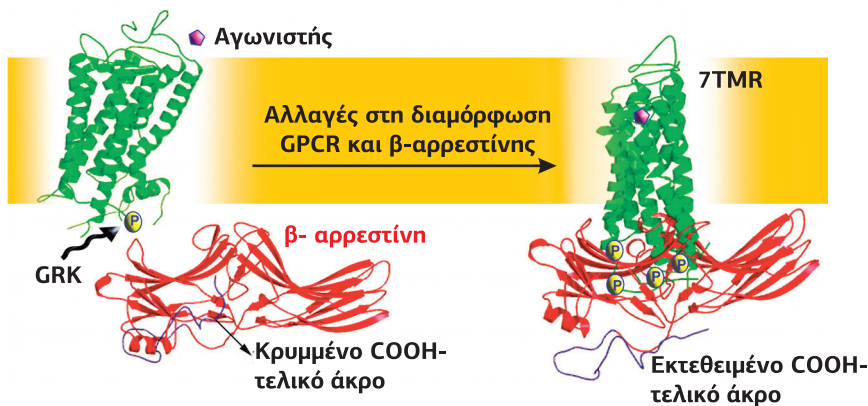
A. Το ετεροτριμερές Gα<sub>i</sub>-GRK2-Gβγ. Διακρίνονται οι τρεις χαρακτηριστικές περιοχές της GRK2, η περιοχή RGS στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, η περιοχή με δράση κινάσης, και η περιοχή PH στο COOH-τελικό άκρο. [87]  
B. Υποθετικό μοντέλο σύνδεσης της GRK6 στην ενεργοποιημένη ροδοψίνη. [41]



στηριότητα των M3 μουσκαρινικών χολινεργικών υποδοχών. Η **GRK6** εκφράζεται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπου loss-of-function μεταλλάξεις της οδηγούν σε μείωση της χημειοτακτικής απόκρισης των λεμφοκυττάρων στις χημειοκίνες CXCL12, που δρουν στους υποδοχείς CXCR4. Τα επίπεδα της GRK6 είναι χαμηλά σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, ενώ up-regulation της GRK2 και GRK3 παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από κατάθλιψη.

**ΑΡΡΕΣΤΙΝΕΣ.** Οι αρρεστίνες είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες σκαλωσιάς, οι οποίες δρουν σε συνδυασμό με τις GRKs για να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα των GPCRs. Υπάρχουν 4 ισομορφές αρρεστίνων. Οι αρρεστίνες 1 και 4 βρίσκονται μόνο στα κωνία και στα ραβδία, όπου ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της ροδοψίνης. Οι δύο άλλες ισομορφές, β-αρρεστίνη 2 και β-αρρεστίνη 3, έχουν πιο ευρεία έκφραση. Το πρόθεμα β- είναι ελαφρώς παραπλανητικό, μιας και οι β-αρρεστίνες με κανέναν τρόπο δεν περιορίζονται στους β-αδρενεργικούς υποδοχείς, αλλά αλληλεπιδρούν με τους περισσότερους υποδοχείς της οικογένειας GPCR. Οι αρρεστίνες είναι βασικές πρωτεΐνες, αφού γενετικά τροποποιημένα ζώα πεθαίνουν σε εμβρυακό στάδιο.

Σε σχέση με την απευαισθητοποίηση των υποδοχών, οι β-αρρεστίνες έχουν διπλό ρόλο. Αρχικά συνδέονται στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα και εμποδίζουν τη σύνδεσή του με την G-πρωτεΐνη (**Εικόνα 5.20**). Στη συνέχεια, σε περίπτωση παρατεταμένου σήματος, ενεργοποιούν την ενδοκύτωση του υποδοχέα, στρατολογώντας την πρωτεΐνη προσαρμογής AP2 και την κλαθρίνη.



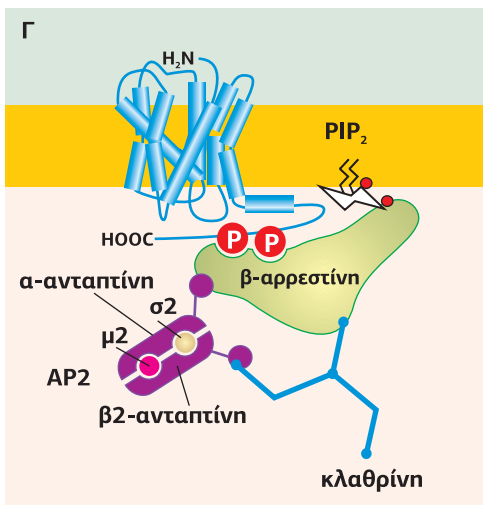
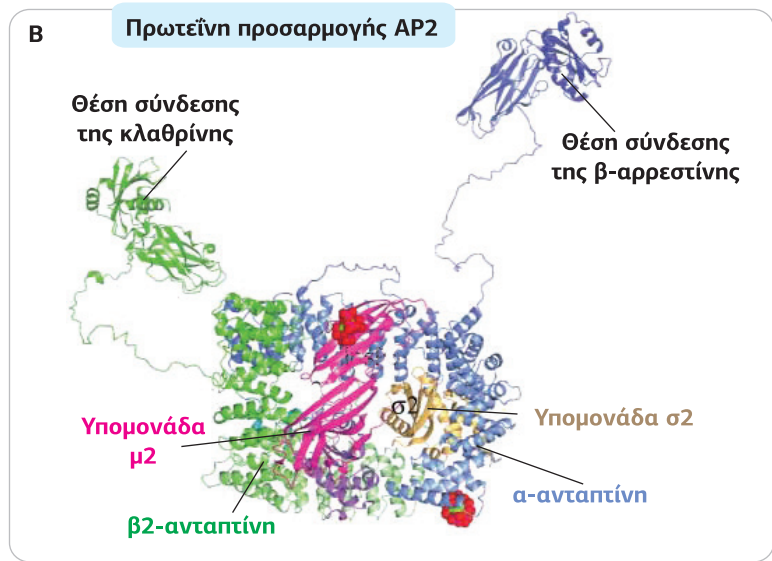
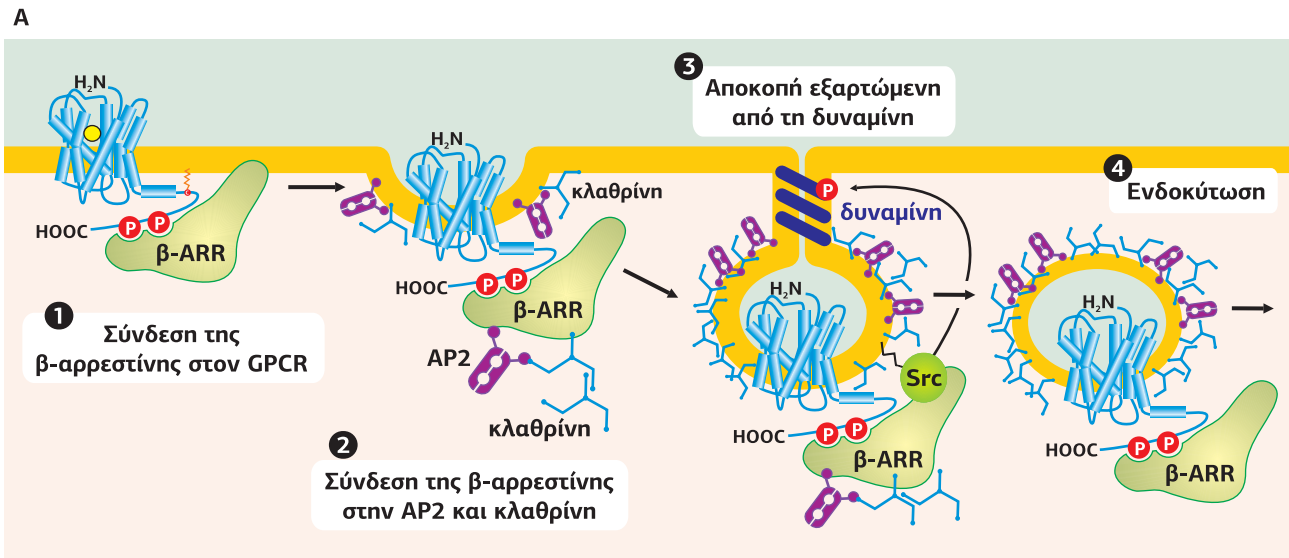
**Εικόνα 5.20**  
**Σύνδεση της β-αρρεστίνης σε έναν φωσφορυλιωμένο GPCR.** Ο συνδεδεμένος με τον αγωνιστή υποδοχέας φωσφορυλιώνεται από την GRK σε κατάλοιπα Ser/Thr του 3ου ενδοκυτταρικού βρόχου και του COOH-τελικού άκρου. Η συγγένεια του υποδοχέα για την β-αρρεστίνη αυξάνει και η β-αρρεστίνη, αλλάζοντας διαμόρφωση, συνδέεται στον υποδοχέα. [55]

### Εσωτερίκευση και ανακύκλωση των υποδοχών

Μετά την απευαισθητοποίησή τους οι υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται με μια διαδικασία που ονομάζεται **εσωτερίκευση** (internalization). Η εσωτερίκευση των υποδοχών μέσα στα ενδοκυτταρικά κυστίδια και τα ενδοσώματα είναι αναστρέψιμη, δίνοντας στο κύτταρο τη δυνατότητα να προσαρμόσει ραγδαία και με ευελιξία τον αριθμό των υποδοχών που είναι εκτεθειμένοι στην επιφάνεια, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Η εσωτερίκευση ξεκινά από εγκολληώσεις μέσα στη μεμβράνη, όπου συσσωρεύονται οι απευαισθητοποιημένοι υποδοχείς και εσωτερικεύονται σύμφωνα με τον μηχανισμό της ενδοκύτωσης.

Η β-αρρεστίνη, όταν συνδέεται στον GPCR, αλλάζει τη διαμόρφωσή της επάγοντας τη λειτουργία της ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς, προσελκύοντας ένα σύμπλοκο προσαρμογής, το AP2, το οποίο στη συνέχεια προσελκύει την κλαθρίνη (**Εικόνα 5.21**). Η AP2 και η κλαθρίνη συνδέονται στο COOH-τελικό άκρο της β-αρρεστίνης. Εάν οι απευαισθητοποιημένοι υποδοχείς στη συγκεκριμένη περιοχή της μεμβράνης είναι αρκετοί, προσελκύονται αρκετά μόρια κλαθρίνης δημιουργώντας ένα συσσωμάτωμα, η μεμβράνη εγκυστώνεται και, στη συνέχεια, το κυστίδιο αποκόπτεται με τη βοήθεια της GTPάσης δυναμίνης.

Η διαδικασία της εσωτερίκευσης ελέγχεται μέσω φωσφορυλίωσης, καθώς η φωσφορυλίωση της β-αρρεστίνης στη Ser412 από κινάσες, όπως η ERK ή η κινάση της καζεΐνης (η CK2 φωσφορυλιώνει τη β-αρρεστίνη 3) αυξάνει τη σύνδεση με την κλαθρίνη. Επιπλέον, η β-αρρεστίνη στρατολογεί και την κινάση Src, η οποία φωσφο-



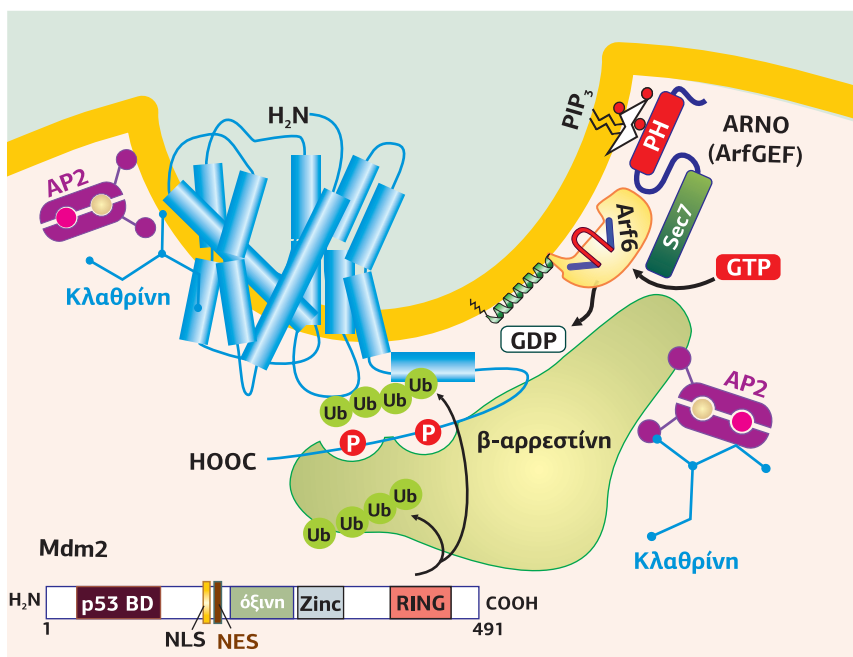
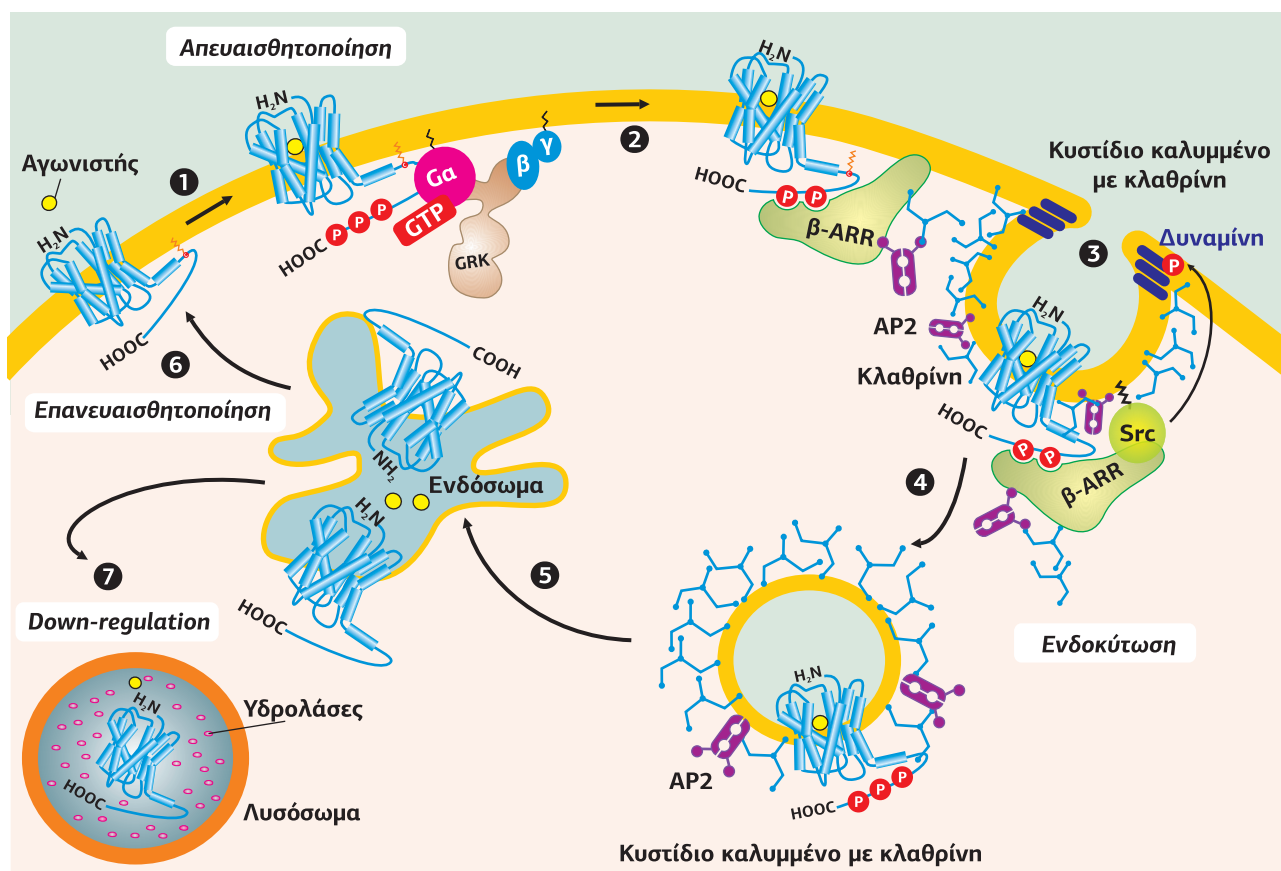
**Εικόνα 5.21**  
 Α. Εσωτερίκευση απευαισθητοποιημένου GPCR με τη βοήθεια της β-αρρεστίνης, η οποία δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς στρατολογώντας την πρωτεΐνη προσαρμογής AP2 και την κλαθρίνη. Τα κυστίδια αποκόπτονται από τη μεμβράνη με τη βοήθεια της δυναμίνης. [72] Β. Η πρωτεΐνη προσαρμογής AP2 είναι ένα ετεροτετραμερές (α- και β2-ανταπτίνη, μ2 και σ2 υπομονάδες), στο οποίο διακρίνονται οι θέσεις σύνδεσης της β-αρρεστίνης και της κλαθρίνης. [83] Γ. Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου του φωσφορυλιωμένου GPCR/β-αρρεστίνης/ AP2/ κλαθρίνης. [100]

ρυλιώνει τη δυναμίνη. Η δυναμίνη πολυμερίζεται γύρω από το στόμιο της εγκυστωμένης μεμβράνης, αποκόπτοντας το κυστίδιο. Η φωσφορυλίωση της δυναμίνης της προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την αλλαγή της διαμόρφωσής της, απαραίτητης για την αποκοπή του κυστιδίου από τη μεμβράνη.

Το 2001 ανακαλύφθηκε και ένας ακόμη ρόλος της β-αρρεστίνης στη μεταφορά των κυστιδίων, ως συμπαράγοντας ενεργοποίησης της μικρής G-πρωτεΐνης **Arf** (ADP-Ribosylation Factor). Η Arf6 βρίσκεται συνδεδεμένη στη μεμβράνη. Κοντά της προσελκύεται η β-αρρεστίνη, η οποία συνδέει και ενεργοποιεί τον παράγοντα ανταλλαγής GDP-GTP ARNO (Arf6 Nucleotide binding site Opener), επάγοντας την ανταλλαγή του GDP με GTP στην Arf6. Η ενεργοποίηση της Arf6 είναι ένα βήμα απαραίτητο για την εκβλάστηση του κυστιδίου (βλ. Κεφ.8, σσ. 593-597). Μετά την εσωτερικεύσή τους, οι υποδοχείς αποφωσφορυλιώνονται και είτε επιστρέφουν στη μεμβράνη και επανευαισθητοποιούνται είτε μεταφέρονται στα λυσοσώματα και αποικοδομούνται (**Εικόνα 5.22**).

**Down-regulation και μείωση του αριθμού των υποδοχέων από τη μεμβράνη**

Σε αντίθεση με την απευαισθητοποίηση, η οποία συμβαίνει γρήγορα και δεν παρατηρείται μείωση του αριθμού των υποδοχέων, η down-regulation είναι μια σχετικά αργή διαδικασία, η οποία απομακρύνει υποδοχείς από τη μεμβράνη. Μετά την εσωτερίκευση του κυστιδίου, η β-αρρεστίνη συνδέεται με την E3 λιγάση της ουβικουτι-



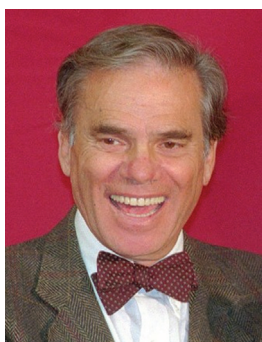
**Εικόνα 5.22**

Το προτεινόμενο μοντέλο για την εσωτερικευση των GPCRs βασίζεται σε μελέτες των β<sub>2</sub>-αδρενεργικών υποδοχών. 1. Μετά τη σύνδεση του αγωνιστή, ο GPCR φωσφορυλιώνεται από την κινάση GRK, προσελκύοντας τη β-αρρεστίνη. 2. Η β-αρρεστίνη συνδέει την AP2 και μόρια κλαθρίνης δημιουργώντας εκκολπώματα της μεμβράνης καλυμμένα με κλαθρίνη. 3. Στη β-αρρεστίνη συνδέεται και η κινάση Src, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη GTPάση δυναμίνη. 4. Το κυστίδιο αποκόπεται από τη μεμβράνη με τη βοήθεια της ενεργοποιημένης δυναμίνης. 5. Οι υποδοχείς, στη συνέχεια, μεταφέρονται στα ενδοσώματα, όπου αποφωσφορυλιώνονται και είτε επιστρέφουν στη μεμβράνη και επανευαισθητοποιούνται (6) είτε μεταφέρονται στα λυσοσώματα και αποικοδομούνται (7). [23]

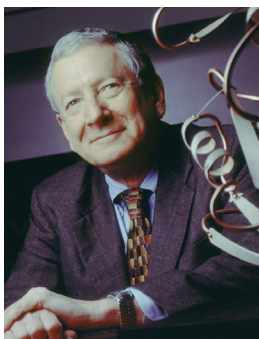
**Εικόνα 5.23**

Η δράση της β-αρρεστίνης ως συμπαραγόντας ενεργοποίησης της μικρής GTPάσης Arf6, η οποία μέσω της υδρόλυσης του GTP παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την εκβλάστηση των κυστιδίων. Η β-αρρεστίνη μαζί με την Arf6-GDP συνδέει και ενεργοποιεί τον παράγοντα ανταλλαγής GDP - GTP, ARNO, επάγοντας την ανταλλαγή του GDP με GTP στην Arf6. Ταυτόχρονα, η β-αρρεστίνη προσελκύει τη λιγάση της ουβικουιτίνης Mdm2, η οποία ουβικουιτινώνει την β-αρρεστίνη και τον GPCR.

Στην κατάσταση ηρεμίας του κυττάρου η **λιγάνση Mdm2** (Mouse double minute 2) βρίσκεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του p53 ουβικουιτινώνοντάς τον και οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση. Κατά συνέπεια, εμποδίζει την p53-μεσολαβούμενη απόπτωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση των οπισειδίων υποδοχέων διεγείρει τη δημιουργία ενός κυτταροπλασματικού συμπλόκου Mdm2/β-αρρεστίνης/υποδοχέα, συγκρατώντας την Mdm2 στο κυτταρόπλασμα. Η ελάττωση της συγκέντρωσης της Mdm2 στον πυρήνα οδηγεί σε μείωση της αποικοδόμησης του p53 και, κατά συνέπεια, σε αύξηση της p53-εξαρτώμενης μεταγραφικής δραστηριότητας και απόπτωσης.



Martin Rodbell (1925-1998)



Alfred Goodman Gilman (1941-2015)

νης Mdm2 (Mouse double minute 2). Η Mdm2 ουβικουιτινώνει την β-αρρεστίνη και τον GPCR. (**Εικόνα 5.23**). Η ουβικουιτινωση της β-αρρεστίνης αυξάνει τη συγγένεια σύνδεσης της κλαθρίνης, AP2 και ERK2, σταθεροποιώντας το σύμπλοκο. Κατά συνέπεια αυξάνεται ο ρυθμός εσωτερίκευσης του υποδοχέα, ο οποίος οδηγείται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση (down-regulation). Καθώς η μεμβράνη των λυσοσωμάτων είναι πλούσια σε αντλίες H<sup>+</sup>, τα λυσοσώματα έχουν χαμηλό pH στο εσωτερικό τους (4,8 αντί για pH 7,2 στο κυτταρόπλασμα), το οποίο οδηγεί στην αποδιάταξη του GPCR. Επίσης, τα λυσοσώματα περιέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία δρουν σε χαμηλό pH και αποικοδομούν τον υποδοχέα. Η πρωτεολυτική αποδόμηση του υποδοχέα στα λυσοσώματα αντικατοπτρίζει την τελική απάντηση των κυττάρων στην υπερδιέγερση. Στην επόμενη φάση, της αποκατάστασης, οι υποδοχείς πρέπει να συντεθούν εκ νέου.

Το εάν ο υποδοχέας επιστρέψει στη μεμβράνη ή ενδοκυτταρωθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων το είδος του υποδοχέα, η διάρκεια και η ένταση του σήματος. Οι GPCRs ρυθμίζονται, επίσης, και από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι αυξάνουν ή μειώνουν τη μεταγραφή των γονιδίων επηρεάζοντας τη σύνθεση νέων υποδοχέων (up- ή down-regulation), οι οποίοι μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη.

## 2. Ετεροτριμερείς Πρωτεΐνες Γαβυ

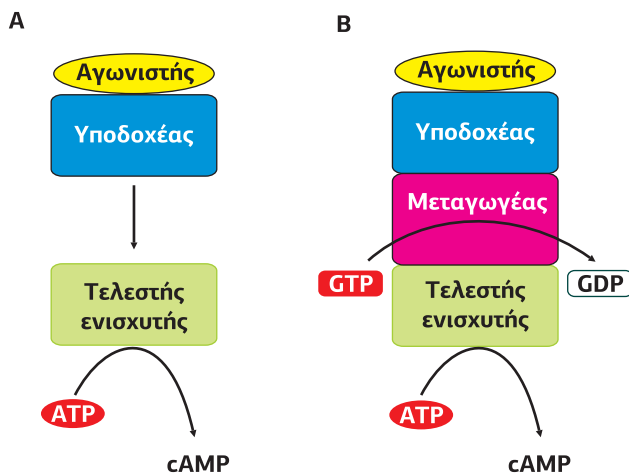
Η τρέχουσα ορολογία για τις πρωτεΐνες που συνδέουν το GTP (GTP-binding proteins) ή πιο σωστά για τις πρωτεΐνες που συνδέουν νουκλεοτίδια γουανίνης (Guanine nucleotide-binding proteins) υιοθετεί τους όρους **G-πρωτεΐνες** και **GTPάσες**, καθώς είναι όλες ικανές να υδρολύουν το GTP σε GDP. Ο όρος G-πρωτεΐνες χαρακτηρίζει την τάξη των πρωτεϊνών που συνδέουν το GTP και αλληλεπιδρούν με υποδοχείς με τη χαρακτηριστική δομή 7 διαμεμβρανικών περιοχών, GPCRs (G-Protein Coupled Receptors). Οι G-πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με GPCRs αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, τις α, β και γ, και έτσι αναφέρονται και ως ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες. Αυτό τις διαχωρίζει από την άλλη κατηγορία των πρωτεϊνών που συνδέουν GTP και εμπλέκονται στη σηματοδότηση, τις μονομερείς GTPάσες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών Ras.

### 2.1

#### Ανακάλυψη των G-πρωτεϊνών

Η ανακάλυψη του σημαντικού ρόλου της αδενυλικής κυκλάσης στην παραγωγή του δεύτερου διαβιβαστή cAMP χάρισε το 1971 το βραβείο Nobel της Φυσιολογίας στον Earl Sutherland. Ωστόσο, έμενε αναπάντητο το ερώτημα με ποιον τρόπο ο υποδοχέας ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Το 1969 ο Martin Rodbell έκανε την καθοριστική παρατήρηση ότι η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης απαιτούσε όχι μόνον ATP ως υπόστρωμα, αλλά, εντελώς απροσδόκητα και GTP, το οποίο υδρολυόταν σε GDP και ανόργανο φωσφορικό ιόν κατά την πορεία σχηματισμού του cAMP. Η ανακάλυψη αυτή συνέβη όταν γύρω στο 1970 το εμπορικά παραγόμενο ATP απέκτησε μεγαλύτερη καθαρότητα, γεγονός το οποίο στην περίπτωση των πειραμάτων της αδενυλικής κυκλάσης προκάλεσε την απώλεια της δραστηριότητας. Η αιτία απεδείχθη ότι ήταν η απομάκρυνση μολυσμένων ιχνών GTP από το δείγμα του ATP, καθώς η προσθήκη GTP επέτρεπε την επαγόμενη από την ορμόνη παραγωγή του cAMP. Ο Rodbell πρότεινε ότι ανάμεσα στον υποδοχέα (GPCR) και στον τελεστή (αδενυλική κυκλάση) υπάρχει ένας τρίτος παράγοντας, ο μεταγωγέας (transducer) που συνδέει και υδρολύει το GTP (**Εικόνα 5.24**).

Το ένζυμο που υδρολύει το GTP και βρίσκεται μεταξύ υποδοχέα και αδενυλικής κυκλάσης απεδείχθη, στη συνέχεια, από τον Alfred Goodman Gilman ότι είναι ένα

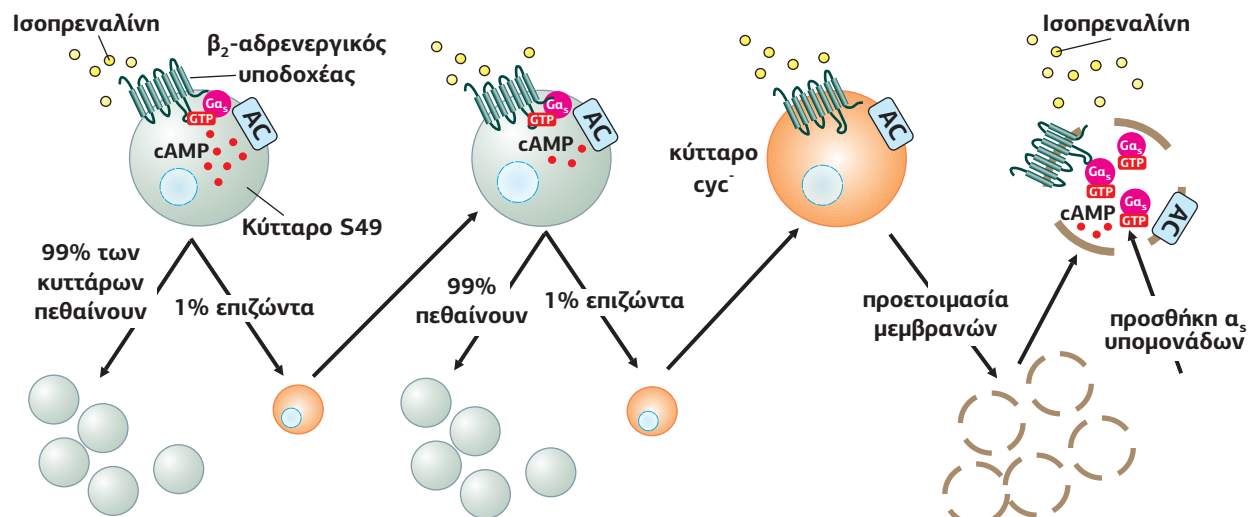


**Εικόνα 5.24**  
**Εισαγωγή από τον Rodbell της ιδέας ενός μεταγωγέα, ο οποίος μεταφέρει το μήνυμα από τον υποδοχέα στον τελεστή.**  
 Α. Η παλαιότερη άποψη, απουσία μεταγωγέα. Β. Η πρόταση του Rodbell: μια πρωτεΐνη που συνδέει και υδρολύει το GTP, μεταφέρει το μήνυμα από τον GPCR στο ένζυμο τελεστή (σε αυτήν την περίπτωση στην αδενυλική κυκλάση). [32]

σύμπλοκο που αποτελείται από τρεις υπομονάδες  $G_{\alpha\beta\gamma}$ , τις οποίες ο Gilman κατάφερε να απομονώσει το 1981. Η μελέτη των G-πρωτεΐνών, ανεξάρτητα από τους GPCRs και τα ένζυμα τελεστές, υπήρξε μια πειραματική πρόκληση. Επειδή οι υποδοχείς και οι τελεστές είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, δεν μπορούν να προστεθούν ή να αφαιρεθούν εύκολα σε ένα πειραματικό σύστημα και επιπλέον είναι ακόμη δυσκολότερο να διαχωριστεί ο ρόλος των  $G_{\alpha\beta\gamma}$  υπομονάδων.

Το 1978 η χρήση της **κυτταρικής σειράς S49 *cyc* του λεμφώματος** οδήγησε στην ταυτοποίηση της  $G_{\alpha}$ -υπομονάδας, ως το συστατικό της G-πρωτεΐνης που συνδέει GTP και μεταδίδει το σήμα από τους υποδοχείς στην αδενυλική κυκλάση. Στα κύτταρα S49 αγρίου τύπου η αύξηση του cAMP έχει ως αποτέλεσμα το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και, στη συνέχεια, την προαγωγή του κυτταρικού θανάτου. Τα κύτταρα S49 καλλιιεργήθηκαν παρουσία ισοπρεναλίνης, ένα ανάλογο της αδρεναλίνης που συνδέεται εξειδικευμένα στον  $\beta_2$ -αδρενεργικό υποδοχέα. Καθώς ο  $\beta_2$ -αδρενεργικός υποδοχέας ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, τα επίπεδα cAMP αυξήθηκαν και το 99% των κυττάρων πέθαναν. Το 1% των κυττάρων που επιβίωσαν απομονώθηκε και, επαναλαμβάνοντας αρκετές φορές την ίδια διαδικασία, δημιουργήθηκε μία ανθεκτική σειρά, η *cyc*, η οποία θεωρούσαν ότι δεν είχε αδενυλική κυκλάση (cyclase-) (**Εικόνα 5.25**). Αυτά τα κύτταρα, παρόλο που περιέχουν λειτουργικούς  $\beta_2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς καθώς και αδενυλική κυκλάση, η οποία μπορούσε να ενεργοποιηθεί άμεσα από το τερπενοειδές φορσκολίνη, δεν αποκρίνονται σε αγωνιστές που προσδένονται στους  $\beta_2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς. Συνεπώς, κάτι λείπει από αυτό το μονοπάτι μεταγωγής σήματος ή κάτι στέκεται στη μέση, έτσι ώστε η επικοινωνία μεταξύ υποδοχέα και ενζύμου τελεστή να είναι μπλοκαρισμένη.

**Εικόνα 5.25**  
**Το πείραμα που απέδειξε τον ρόλο της  $G_{\alpha}$  υπομονάδας στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης.** Ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων της κυτταρικής σειράς λεμφώματος S49 παρουσία ισοπρεναλίνης πεθαίνουν, λόγω της παραγωγής cAMP. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό (1%) των κυττάρων, τα οποία ονομάστηκαν *cyc*, καταφέρνουν να επιβιώσουν. Η κυτταρική σειρά S49 *cyc* δεν μπορεί να παράγει cAMP ως απάντηση στη διέγερση ισοπρεναλίνης παρά την ύπαρξη λειτουργικού  $\beta_2$ -αδρενεργικού υποδοχέα και αδενυλικής κυκλάσης (η οποία μεμονωμένα έχει την ικανότητα ενεργοποίησης). Η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης μπορεί να ανασταθεί σε απομονωμένες μεμβράνες των κυττάρων *cyc* με προσθήκη  $\alpha_s$ -υπομονάδων των G-πρωτεΐνών. [32]



Η επικοινωνία μεταξύ υποδοχέα και αδενυλικής κυκλάσης αποκαταστάθηκε με προσθήκη  $G_{\alpha_s}$ -υπομονάδων στις απομονωμένες μεμβράνες των *cyc<sup>-</sup>* κυττάρων. Μη μπορώντας να εκφράσουν την  $G_{\alpha_s}$ -υπομονάδα, τα *cyc<sup>-</sup>* κύτταρα αποφεύγουν την πιθανότητα της θανάσιμης αύξησης του cAMP.

Το 1994 απονεμήθηκε στους Αμερικανούς βιοχημικούς Martin Rodbell (1925-1998) και Alfred Goodman Gilman (1941-2015) το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής για την ανακάλυψη των G-πρωτεϊνών και του ρόλου τους στη σηματοδότηση.

## 2.2 | Δομή των $\alpha$ - και $\beta\gamma$ -υπομονάδων των G-πρωτεϊνών

**Εικόνα 5.26**

### Η δομή των ετεροτριμερών $G_{\alpha\beta\gamma}$ πρωτεϊνών.

**A.** Η  $G_{\alpha\beta\gamma}$  πρωτεΐνη και ο τρόπος σύνδεσής της στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας μυριστοϋλομάδας, η οποία συνδέεται μετα-μεταφραστικά στο  $NH_2$ -τελικό άκρο της  $\alpha$ -υπομονάδας, και μιας ομάδας γερανυλγερανυλίου συνδεδεμένης στο  $COOH$ -τελικό άκρο της  $\gamma$ -υπομονάδας. Στο τετράγωνο διακρίνεται σε κάτοψη η δομή της  $\beta$ -υπομονάδας, που αποτελείται από 7 ομάδες  $\beta$ -πτυχωτών φύλλων, οργανωμένες όπως οι λάμες μιας προπέλας. [32] **B.** Η G-πρωτεΐνη συνδεδεμένη σε έναν GPCR. Διακρίνονται:  $\alpha$ : η περιοχή GTPάσης, όπου συνδέεται το GTP, και  $\beta$ : η ελικοειδής περιοχή, η οποία συμμετέχει στη σύνδεση με τον τελεστή. Στην περιοχή GTPάσης διακρίνονται τρεις εύκαμπτες περιοχές διακόπτες (Switch I, II, III). [68]

### Η $\alpha$ -υπομονάδα

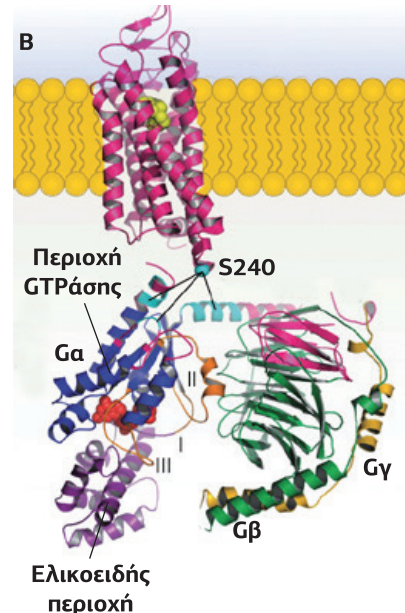
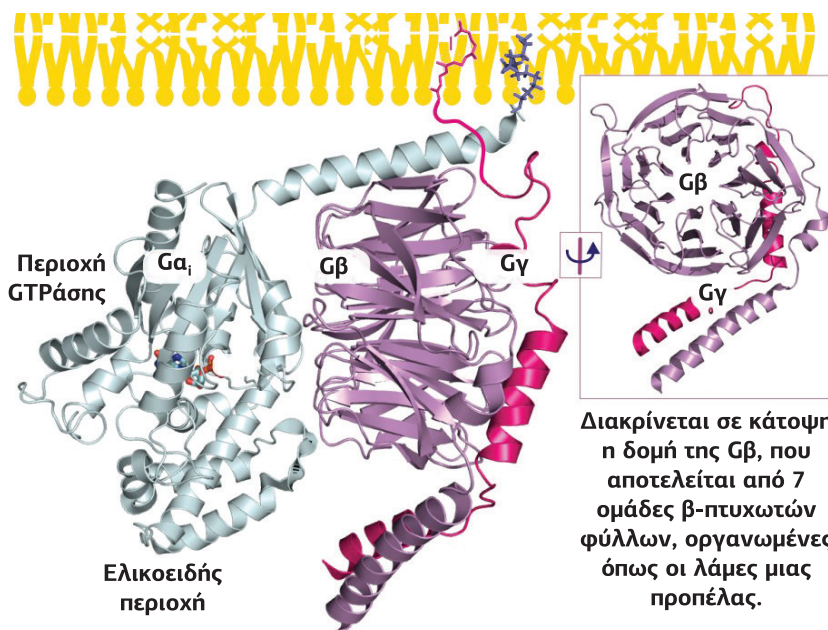
Η  $\alpha$ -υπομονάδα είναι ένα πολυπεπίδιο μοριακού βάρους 40-50 kDa, το οποίο εκτελεί χρέη GTPάσης, δηλαδή δεσμεύει το GTP και το υδρολύει σε GDP και  $P_i$ . Το  $COOH$ -τελικό άκρο των  $\alpha$ -υπομονάδων υπαγορεύει την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς, ενώ το  $NH_2$ -τελικό άκρο είναι η θέση αλληλεπίδρασης με τις  $\beta\gamma$ -υπομονάδες. Η τελική γλυκίνη του  $NH_2$ -τελικού άκρου της  $G_{\alpha_i}$  και  $G_{\alpha_o}$  υπομονάδας είναι η θέση πρόσδεσης του μυριστικού οξέος,  $CH_3(CH_2)_{12}COOH$ , μία τροποποίηση που διευκολύνει την ετεροτριμερή διαμόρφωση, αλλά και την αγκυροβόληση της  $\alpha$ -υπομονάδας στη μεμβράνη. Οι  $G_{\alpha}$ -υπομονάδες είναι επίσης στόχος των ακετυλο-παλμιτοϋλοτρανσφερασών, οι οποίες παλμιτοϋλιώνουν την Cys10 του  $NH_2$ -τελικού άκρου της  $\alpha$ -υπομονάδας.

Η  $\alpha$ -υπομονάδα περιέχει δύο κύριες περιοχές: 1. την περιοχή **RD** (Ras Domain), η οποία περιέχει τρεις περιοχές διακόπτες (Switch I, II, III), έχει δράση GTPάσης, είναι ανάλογη των πρωτεϊνών Ras και αποτελεί τη θήκη σύνδεσης του νουκλεοτιδίου της γουανίνης, και 2. την περιοχή **HD** (Helical Domain), η οποία αποτελείται από μια δέσμη έξι ελίκων, καλύπτει τη θήκη σύνδεσης του GTP και παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση με τους τελεστές (**Εικόνα 5.26**). Η περιοχή HD απουσιάζει από τη Ras και τις άλλες μονομερείς GTP-binding πρωτεΐνες.

### Οι $\beta\gamma$ -υπομονάδες

Η  $\beta$ -υπομονάδα είναι ένα πολυπεπίδιο μοριακού βάρους 35-36 kDa, ενώ η  $\gamma$ -υπομονάδα, η πιο πρόσφατα απομονωμένη, έχει μοριακό βάρος 5-11 kDa. Οι  $\beta$ - και  $\gamma$ -υπομονάδες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους, δεν αποχωρίζονται

A





ούτε μετά τη λήξη του μηνύματος και συμπεριφέρονται ως μία οντότητα, ως βγ-υπομονάδα.

Η β-υπομονάδα έχει μια δομή, η οποία αντίθετα με αυτή της α-υπομονάδας είναι πολύ καλά διατηρημένη από είδος σε είδος και από ιστό σε ιστό. Αποτελείται από επτά περιοχές β πτυχωτών φύλλων, οργανωμένες όπως οι λάμες μιας προπέλας. Με τη μία πλευρά της αλληλεπιδρά με το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο της α-υπομονάδας και με την άλλη με το COOH-τελικό άκρο της γ-υπομονάδας. Το όλο σύμπλεγμα αγκυροβολεί στη μεμβράνη με άγκυρες λιπιδίων (**Εικόνα 5.26A**). Οι γ-υπομονάδες των θηλαστικών είναι μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες στο COOH-τελικό άκρο με την προσθήκη μιας ομάδας γερανυλγερανυλίου 20-ανθράκων (τέσσερις μονάδες ισοπρενίου) ή μιας ομάδας φαρνεσυλίου 15-ανθράκων (τρεις μονάδες ισοπρενίου). Αυτή η υδρόφοβη προσθήκη εξασφαλίζει τη σύνδεσή τους στη μεμβράνη και μαζί τους και των συνδεδεμένων β-υπομονάδων (**Εικόνα 5.26A και 5.27**). Αν και οι μεταλλαγμένες γ-υπομονάδες, που είναι ανίκανες να δεχθούν αντίδραση πρενυλίωσης, παραμένουν συνδεδεμένες με τις β-υπομονάδες, τα ετεροδιμερή που προκύπτουν είναι διαλυτά και ανίκανα να αλληλοεπιδράσουν με α-υπομονάδες, όπως η α<sub>3</sub>.

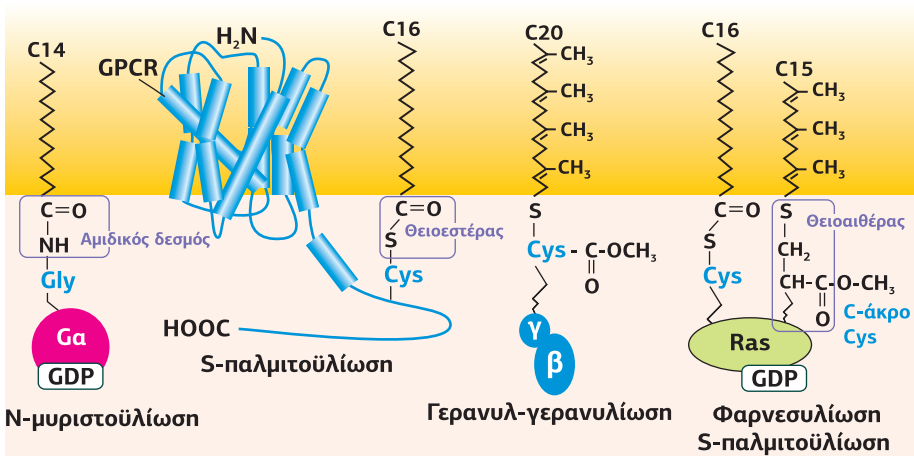
**Ισοπρένιο** ή 2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο είναι ένα κοινό οργανικό προϊόν της μορφής  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$ .

**Αγκυροβόληση στη μεμβράνη**

Ένα χαρακτηριστικό δομικό γνώρισμα των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών είναι ότι οι υπομονάδες τους αγκυροβολούν στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης κοντά σε GPCRs, μέσω λιπιδίων, τα οποία δεσμεύονται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε συγκεκριμένα αμινοξέα των G-υπομονάδων και ενεργούν ως υδρόφοβες “άγκυρες”. Το αγκυροβόλημα στη μεμβράνη των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος δεν περιορίζεται στις G-πρωτεΐνες, αλλά αντιπροσωπεύει μια γενική αρχή της οργάνωσης στα πρωτεϊνικά δίκτυα επεξεργασίας πληροφοριών. Για τον σκοπό αυτό τα κύτταρα εφαρμόζουν αρκετές βιοχημικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών (λιπιδιώσεις), που επιτρέπουν διαφορετικής σταθερότητας συνδέσεις με τη μεμβράνη.

Η λιπιδική άγκυρα μπορεί να κρυφτεί μέσα στο πρωτεϊνικό μόριο και να εκτεθεί μόνο με επαγόμενη από σήμα μεταβολή της διαμόρφωσης. Με τον τρόπο αυτό τα σήματα ενδέχεται να ελέγχουν μια αναστρέψιμη αγκυροβόληση πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Έχουν περιγραφεί οι ακόλουθες λιπιδικές άγκυρες (**Εικόνα 5.27**).

1. **Άγκυρα μυριστοϋλικής ομάδας (C<sub>14</sub>)**, η οποία προέρχεται από το μυριστικό οξύ και συνδέεται με αμιδικό δεσμό στην α-αμινομάδα της τελικής γλυκίνης (Gly) του NH<sub>2</sub>-άκρου της πρωτεΐνης. Η τροποποίηση αυτή είναι μη αντιστρεπτή, αφού ως τώρα δεν έχουν βρεθεί ένζυμα, τα οποία να υδρολύουν τον δεσμό. Παραδείγματα πρωτεϊνών που αγκυροβολούν με άγκυρα μυριστικού οξέος είναι οι α-υπομονάδες των τριμερών Gαβγ-πρωτεϊνών, η μικρή G-πρωτεΐνη Arf, καθώς και οι κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src.



**Εικόνα 5.27**  
**Λιπιδικές άγκυρες.** Η άγκυρα μυριστοϋλικής ομάδας συνδέεται με αμιδικό δεσμό στην α-αμινομάδα της τελικής γλυκίνης (Gly) του NH<sub>2</sub>-άκρου της Gα-πρωτεΐνης. Η άγκυρα παλμιτοϋλικής ομάδας συνδέεται με θειοεστερικό δεσμό στην ομάδα SH μιας κυστεΐνης (Cys) του COOH-τελικού άκρου ενός GPCR. Οι άγκυρες φαρνεσυλίου (C15) ή γερανυλγερανυλίου (C20) συνδέονται με θειοαιθερικό δεσμό στην ομάδα SH της τελευταίας κυστεΐνης (Cys) του COOH-τελικού άκρου της Ras GTPάσης ή της Gγ-πρωτεΐνης, αντίστοιχα. [37]

Οι **φαρνεσυλοτρανσφεράσες** αναγνωρίζουν ως X τα αμινοξέα μεθειονίνη (M), σερίνη (S), γλουταμίνη (Q), αλανίνη (A) και κυστεΐνη (C), ενώ οι γεραφυλοτρανσφεράσες ως X αναγνωρίζουν τη λευκίνη (L) και το γλουταμινικό (E).

- Άγκυρα παλμιτοϋλικής ομάδας (C<sub>16</sub>)**, η οποία προέρχεται από το παλμιτικό οξύ, συνδέεται με θειοεστερικό δεσμό στην ομάδα SH μιας κυστεΐνης (Cys). Σε αντίθεση με την άγκυρα μυριστούλίου, η άγκυρα παλμιτοϋλίου υδρολύεται και η τροποποίηση αυτή είναι αναστρέψιμη. Παλμιτοϋλιωμένες πρωτεΐνες είναι οι υποδοχείς GPCRs, μέσω του COOH-τελικού τους άκρου, οι μικρές G-πρωτεΐνες Ras και ορισμένες κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες.
- Πρενυλίωση** είναι η σύνδεση μιας ομάδας φαρνεσυλίου (C<sub>15</sub>) ή γεραφυλοτρανσφεράσης (C<sub>20</sub>) με θειοαιθερικό δεσμό στην ομάδα SH της τελευταίας κυστεΐνης (Cys) του COOH-τελικού άκρου μιας πρωτεΐνης. Η φαρνεσυλοτρανσφεράση και η γεραφυλοτρανσφεράση είναι παρόμοια ένζυμα με κοινό τρόπο δράσης: αναγνωρίζουν μια αλληλουχία CaaX του COOH-άκρου της πρωτεΐνης στόχου. C είναι η κυστεΐνη που πρενυλιώνεται, a είναι ένα οποιοδήποτε αλειφατικό αμινοξύ και η ταυτότητα του X καθορίζει ποιο από τα δύο ένζυμα θα δράσει στην πρωτεΐνη. Παραδείγματα πρωτεϊνών που αγκυροβολούν έπειτα από αντίδραση πρενυλίωσης είναι οι γ-υπομονάδες των τριμερών G-πρωτεϊνών, ποικίλες μικρές G-πρωτεΐνες, όπως οι Ras και οι Rab, και η κινάση GRK1 (κινάση της ροδοψίνης). Καθώς η ογκογόνος επίδραση των μεταλλαγμένων Ras εξαρτάται από την πρενυλίωση, οι αναστολείς των σχετικών ενζύμων θεωρούνται ως δυνητικά αντικαρκινικά φάρμακα.

### 2.3 Ο κύκλος των GTPασιών

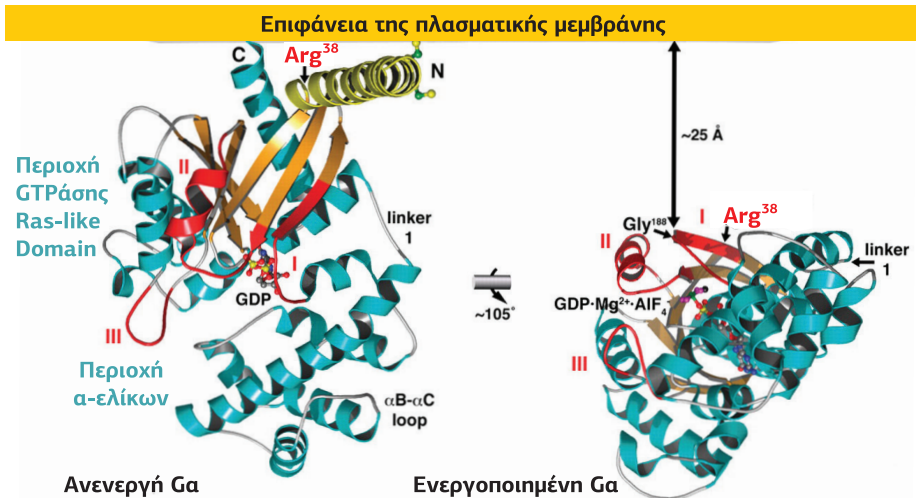
Ο κύκλος των γεγονότων που ρυθμίζονται από τις G-πρωτεΐνες αρχίζει και τελειώνει με το GDP τοποθετημένο στη θέση σύνδεσης των νουκλεοτιδίων της γουανίνης στην Ga-υπομονάδα. Στην κατάσταση ηρεμίας οι G-πρωτεΐνες είναι ετεροτριμερείς, με το GDP συνδεδεμένο στην Ga-υπομονάδα. Μετά τη σύνδεση του εξωκυτταρικού προσδέτη στον GPCR, ο υποδοχέας ενεργοποιείται και αλλάζει διαμόρφωση επιτρέποντας στην Ga-υπομονάδα να αλλάξει και αυτή διαμόρφωση. Ως αποτέλεσμα το GDP απομακρύνεται από την α-υπομονάδα και αντικαθίσταται από το GTP, του οποίου η συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα είναι δεκαπλάσια σε σχέση με το GDP (περίπου 100 μmol/l). Δηλαδή, ο ενεργοποιημένος GPCR δρα ως παράγοντας ανταλλαγής GDP-GTP (GEF). Στη συνέχεια, η επαφή μεταξύ της Ga-πρωτεΐνης και του συμπλόκου υποδοχέα-αγωνιστή χαλαρώνει, επιτρέποντας στον υποδοχέα να αποσυνδεθεί και να αναζητήσει άλλα ανενεργά μόρια G-πρωτεϊνών (1 υποδοχέας / 100 G-πρωτεΐνες). Αυτό το σημείο παρέχει μια ευκαιρία για ενίσχυση του σήματος. Η σύνδεση του GTP στην α-υπομονάδα αποσταθεροποιεί και διαχωρίζει και το σύμπλοκο της Ga-GTP με τις Gβγ-υπομονάδες (Εικόνα 5.28). Στη συνέχεια, η Ga-GTP

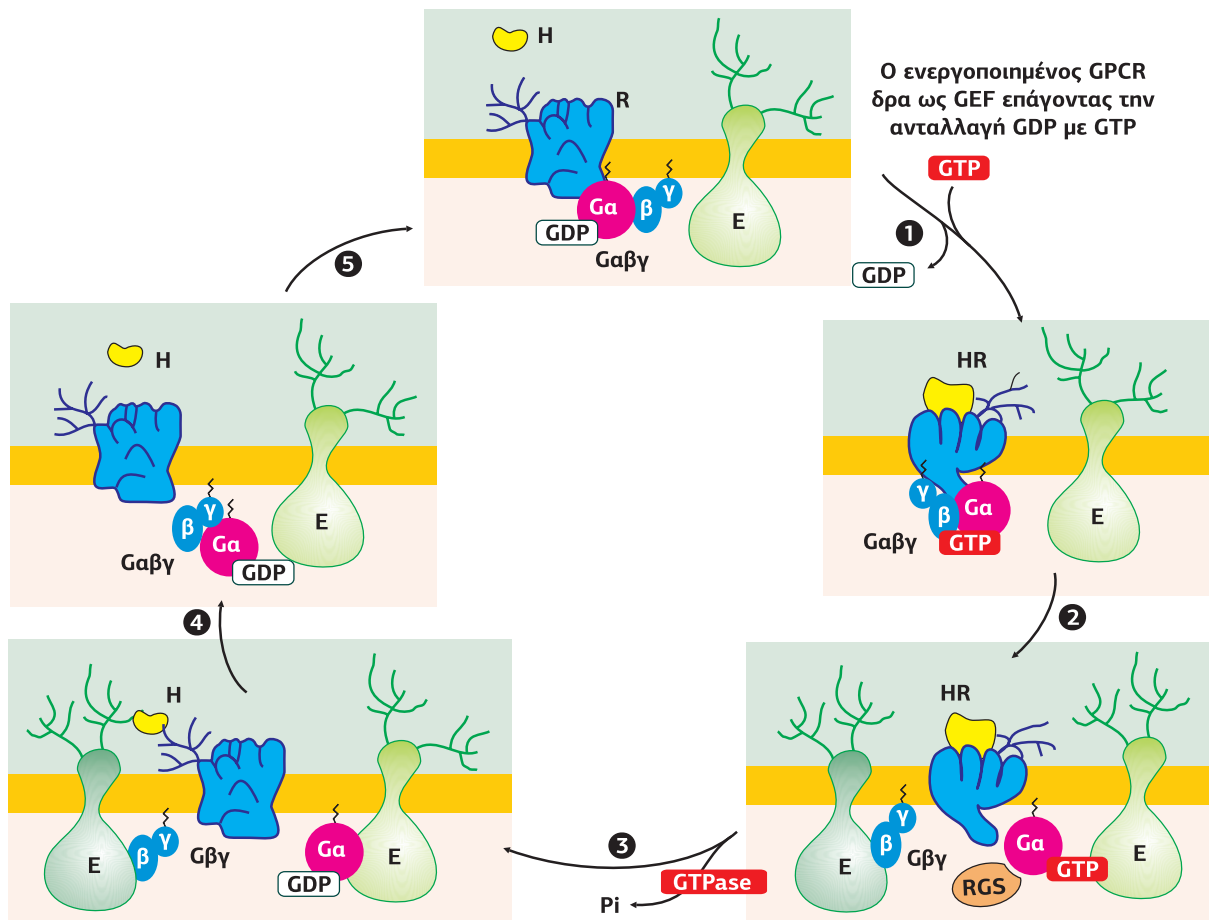
**Εικόνα 5.28**

Η απομάκρυνση του GDP και η σύνδεση του GTP αλλάζει τη διαμόρφωση στις τρεις περιοχές διακόπτες (Switch I, II, III), με αποτέλεσμα τον αποχωρισμό της Ga από τις Gβγ υπομονάδες.

Μετά την απομάκρυνση των βγ- από την α(GTP)-υπομονάδα, αυτή αλλάζει προσανατολισμό κατά 105° και απομακρύνεται από τη μεμβράνη κατά 25 Å.

Ωστόσο, η NH<sub>2</sub>-τελική της α-έλικα είναι αρκετά μακριά (37 aa), ώστε η παλμιτοϋλιωμένη Cys10 παραμένει κοντά στη μεμβράνη. Στην εικόνα δεν διακρίνονται οι βγ-υπομονάδες που είναι συνδεδεμένες με την ανενεργή διαμόρφωση της Ga(GDP), ούτε η κινάση GRK που είναι συνδεδεμένη με την ενεργοποιημένη διαμόρφωση της Ga(GTP). Επίσης, αντί για GTP, διακρίνεται το GDP.Mg<sup>2+</sup>.AlF<sub>4</sub>, καθώς η 3η φωσφορική ομάδα του GTP έχει αντικατασταθεί από το AlF<sub>4</sub> [87]





Εικόνα 5.29

**Ο ρόλος της G-πρωτεΐνης στη μετάδοση του μηνύματος της ορμόνης (H), από τον υποδοχέα (R, Receptor) στον ή στους τελεστές (E, Effector).** Ο υποδοχέας και ο τελεστής παρουσιάζονται ως γλυκοσυλιωμένα διαμεμβρανικά μόρια. Ο υποδοχέας εμφανίζεται σε δύο διαμορφώσεις, μία υψηλής συγγένειας (με δεσμευμένη την ορμόνη) και μία χαμηλής συγγένειας (χωρίς ορμόνη). (1) Η σύνδεση της ορμόνης (H) στον υποδοχέα (R) αλλάζει τη διαμόρφωσή του, μετατρέποντάς την σε διαμόρφωση υψηλής συγγένειας. Ο υποδοχέας με τη νέα του διαμόρφωση επιτρέπει την αλλαγή διαμόρφωσης της πρωτεΐνης  $G\alpha(GDP)\beta\gamma$ , ενεργοποιώντας την απομάκρυνση του GDP και την ανταλλαγή του με το GTP. (2) Το σύμπλοκο ορμόνη/υποδοχέα/( $aGTP\beta\gamma$ ) διαχωρίζεται σε RH,  $aGTP$  και σε  $\beta\gamma$ , και οι υπομονάδες  $aGTP$  και  $\beta\gamma$  ενεργοποιούν τους τελεστές τους. (3) Η  $\alpha$ -υπομονάδα εκτελεί χρέη GTPάσης υδρόλυσης το GTP σε GDP (που παραμένει δεσμευμένο στην  $\alpha$ -υπομονάδα) και ανόργανο φωσφορικό ( $P_i$ ). Τη δράση GTPάσης επιταχύνει η σύνδεση των RGS πρωτεϊνών. (4) Στη συνέχεια, τα σύμπλοκα  $aGDP/E$  και  $G\beta\gamma/E$  διασπώνται και η ορμόνη διαχωρίζεται από τον υποδοχέα, ο οποίος ξαναβρίσκει την παλιά του διαμόρφωση (διαμόρφωση χαμηλής συγγένειας). Οι τρεις υπομονάδες της G-πρωτεΐνης ενώνονται μεταξύ τους ( $aGDP + \beta\gamma = a(GDP)\beta\gamma$ ). (5) Τέλος, η ετεροτριμερής  $G\alpha\beta\gamma$  προσκολλάται στον GPCR. [8]

και η  $G\beta\gamma$  ενεργοποιούν τους τελεστές τους. Η  $G\alpha$  ως GTPάση, ενισχυμένη με τη δράση των RGS πρωτεϊνών, υδρόλυσε το GTP σε GDP. Ως αποτέλεσμα η  $G\alpha:GDP$  απομακρύνεται από τον τελεστή της και επανασυνδέεται με τις  $G\beta\gamma$ -υπομονάδες. Ο κύκλος κλείνει με τη σύνδεση της  $G\alpha(GDP)\beta\gamma$  στον GPCR (Εικόνα 5.29).

Ο ρόλος του ενεργοποιημένου από την ορμόνη υποδοχέα είναι να ενεργοποιεί την απομάκρυνση του GDP από την  $G\alpha$ , ώστε αυτή να μπορέσει να δεσμεύσει το GTP. Αυτό το πετυχαίνει ανοίγοντας τη θέση σύνδεσης του νουκλεοτιδίου, ώστε το GDP να αποδεσμευτεί και να συνδεθεί το GTP. Η περιοχή GTPάσης της  $G\alpha$ -υπομονάδας αποτελείται από τρία πολυπεπτιδικά ευέλικτα τμήματα διακόπτες (Switch I, II και III), τα οποία αλληλεπιδρούν είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη  $\gamma$ -φωσφορική ομάδα του GTP αλλάζοντας τη διαμόρφωσή τους. Οι δομικές αυτές αλλαγές μειώνουν τη συγγένεια της  $G\alpha$  προς το διμερές  $G\beta\gamma$ . Ο διαχωρισμός της ετεροτριμερούς G-πρωτεΐνης σε  $G\alpha$  και  $G\beta\gamma$  μεταδίδει το μήνυμα στον τελεστή.

## 2.4

### Διακοπή της σηματοδότησης ενεργοποιώντας τη δράση GTPάσης

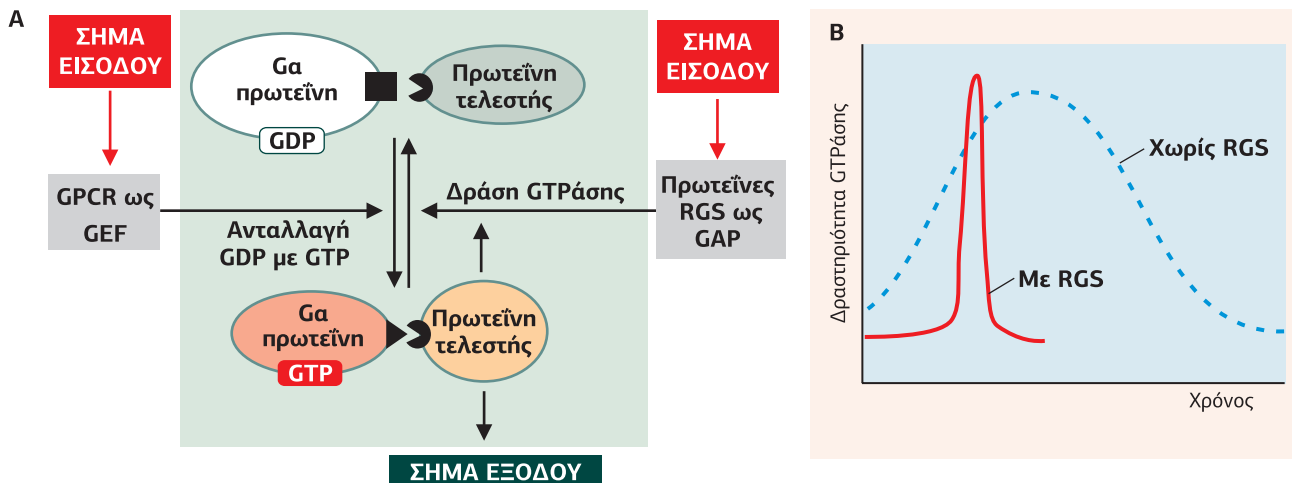
Αρχικά προκάλεσε έκπληξη η ανακάλυψη ότι ο ρυθμός της υδρόλυσης του GTP που καταλύεται από απομονωμένες G-πρωτεΐνες είναι πολύ αργός, για να εξηγήσει την παροδική φύση ορισμένων γνωστών αντιδράσεων, που επάγονται από G-πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η φωτομεταγωγή, η οποία σταματάει ταχύτατα, όπως για παράδειγμα όταν τα φώτα κλείνουν, αντιλαμβανόμεστε αμέσως το σκοτάδι. Εάν η τρανσδουσίνη ( $G_T$ , η G-πρωτεΐνη που συνδέεται με τη ροδοψίνη) παρέμενε στην ενεργή της μορφή ( $\alpha_T\text{-GTP}$ ) για μεγάλο διάστημα, λόγω του χαμηλού ρυθμού υδρόλυσης του GTP, θα σκοτεινίαζε σταδιακά καθώς προχωρούσε η υδρόλυση του GTP και δεν θα διακρίναμε αμέσως το σκοτάδι.

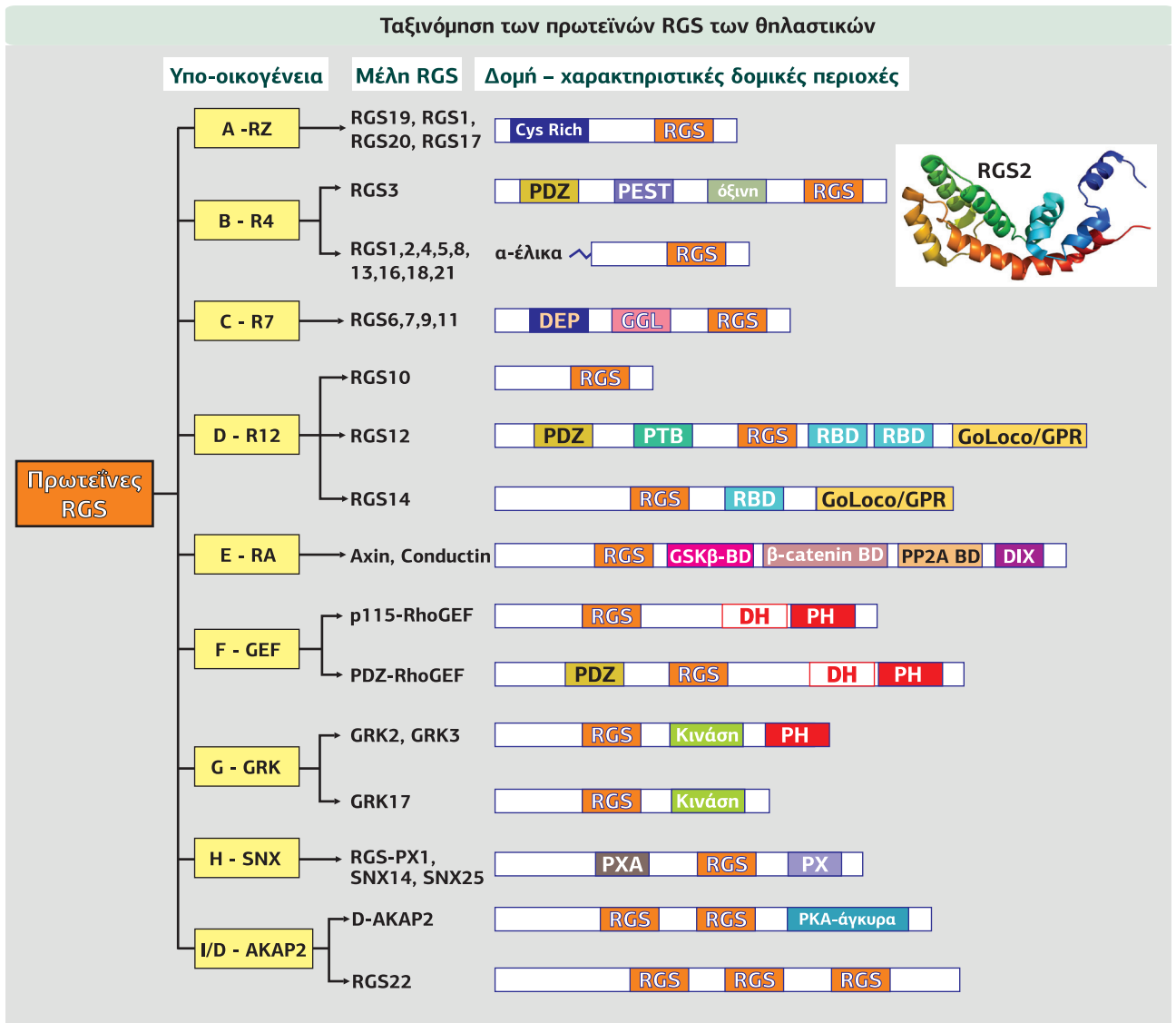
Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο ρυθμός της αντίδρασης GTPάσης αυξάνεται σημαντικά τη στιγμή που η ενεργοποιημένη  $\alpha$ -υπομονάδα έρχεται σε επαφή με το ένζυμο-τελεστή μέσω αρνητικής ανάδρομης σηματοδότησης. Για παράδειγμα, η ενεργοποιημένη από την  $G_{\alpha_{q/11}}$ -υπομονάδα φωσφολιπάση C $\beta$ , ταυτόχρονα με την υδρόλυση των PIP $_2$ , ενεργοποιεί και τη δραστηριότητα GTPάσης της  $G_{\alpha_q}$ , με σκοπό την άμεση λήξη της σηματοδότησης. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση της φωτομεταγωγής, όπου η ενεργοποίηση, από την τρανσδουσίνη, της φωσφοδιεστεράσης του GMP ενεργοποιεί και τη δραστηριότητα GTPάσης της τρανσδουσίνης.

Εκτός από τον τελεστή, τη δραστηριότητα GTPάσης των  $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_q}$  και  $G_{\alpha_{12/13}}$  πρωτεϊνών ή της οικογένειας  $G_{\alpha_s}$  ενεργοποιούν, πολύ πιο ισχυρά, ειδικές πρωτεΐνες “GTPase-activating”, που ονομάζονται **RGS** (Regulator of G-protein Signaling: ρυθμιστές της σηματοδότησης των G-πρωτεϊνών). Οι πρωτεΐνες RGS συνδέονται εξειδικευμένα στις  $\alpha$ -υπομονάδες και αυξάνουν τον ρυθμό υδρόλυσης του GTP περίπου 2.000 φορές (**Εικόνα 5.30**). Έχουν, συνεπώς, ανασταλτική δράση στη σηματοδότηση των GPCRs, καθώς η  $\alpha$ -υπομονάδα είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τον τελεστή όσο διάστημα έχει συνδεδεμένο το GTP. Η ανακάλυψη των RGS το 1996 έλυσε το παράδοξο ανάμεσα στη σύντομη διάρκεια σηματοδότηση των GPCRs *in vivo* και τον αργό ρυθμό υδρόλυσης του GTP από απομονωμένες  $G_{\alpha}$  υπομονάδες *in vitro*.

Οι πρωτεΐνες RGS αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια (περίπου 37 μέλη), που ανιχνεύεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, από τους ζυμομύκητες έως τον άνθρωπο, όπου παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Για παράδειγμα, στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* η RGS (ή Sst2, μέλος της οικογένειας RGS7) δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού των φερομονών (οι οποίες συνδέονται σε GPCRs και επάγουν την αναδιαμόρφωση του κυττάρου για να προωθήσουν τη σύζευξη) αυξάνοντας τον ρυθμό υδρόλυσης της Gpa1 (βλ. Κεφάλαιο 8). Στον μύκητα *Aspergillus nidulans* η Rgs-A διεγείρει την ανάπτυξη του μυκηλίου και την ενεργο-

**Εικόνα 5.30**  
**Ρύθμιση της δραστηριότητας των τριμερών G-πρωτεϊνών.**  
Α. Διπλός έλεγχος της δραστηριότητας της  $G_{\alpha}$ : θετικός έλεγχος από έναν GPCR που συμπεριφέρεται ως GEF και ανταλλάσσει το GDP με GTP ενεργοποιεί την  $G_{\alpha}$ , και αρνητικός έλεγχος είτε από τον τελεστή που ενεργοποιείται από την G-πρωτεΐνη (π.χ. φωσφολιπάση C $\beta$ , φωσφοδιεστεράση του cGMP) και μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης διεγείρει τη δράση GTPάσης, είτε από μία πρωτεΐνη RGS, η οποία επιταχύνει τον ρυθμό υδρόλυσης του GTP. Β. Γρήγορη και απότομη αύξηση της δραστηριότητας GTPάσης της  $G_{\alpha}$  από μία RGS πρωτεΐνη. [59]





ποίηση της αγενοούς αναπαραγωγής μέσω σπορίωσης, ενώ μειώνει την παραγωγή καφετιάς χρωστικής. Διαγραφή του γονιδίου *rgsA* οδηγεί σε μειωμένο μέγεθος της αποικίας. Τέλος, στον νηματώδη *Caenorhabditis elegans* η έλλειψη RGS οδηγεί σε δυσπλασίες του νευρικού του συστήματος.

Οι RGS είναι αρκετά ετερογενείς, με μόνο κοινό δομικό χαρακτηριστικό την περιοχή RGS (120 αμινοξέων), η οποία έπειτα από αλληλεπίδραση με μία συμπληρωματική περιοχή της Gα-υπομονάδας διεγείρει τη δραστηριότητα GTPάσης. Οι μικρότερες RGS (<220 κατάλοιπα) δεν έχουν συγκεκριμένες ομολογίες εκτός από τις διατηρημένες RGS περιοχές, ενώ οι μεγαλύτερες (370-1.400 κατάλοιπα) έχουν πολλαπλές περιοχές αλληλεπίδρασης που τους επιτρέπουν να συνδέονται με άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες και να συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα ρυθμιστικών διαδικασιών. Χαρακτηριστικές περιοχές αλληλεπίδρασης είναι η **DH** (Dbl Homology, ανακαλύφθηκε στις πρωτεΐνες Dbl, Diffuse B-cell Lymphoma, οι οποίες δρουν ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης ενεργοποιώντας άμεσα τις πρωτεΐνες της οικογένειας Rho), η **PH** (Pleckstrin Homology, αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια της μεμβράνης) και η **PTB** (PhosphoTyrosine-Binding domain, αλληλεπιδρά με φωσφορυλιωμένες τυροσίνες) (Εικόνα 5.31). Για παράδειγμα, η **AKAP2** δρα ως RGS και ταυτόχρονα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς που στρατολογεί τις πρωτεϊνικές κινάσες A (PKA), ενώ η **p115-RhoGEF**, μέσω της περιοχής RGS ενεργοποιεί τη δράση

### Εικόνα 5.31

#### Αντιπροσωπευτικές υπο-οικογένειες των RGS.

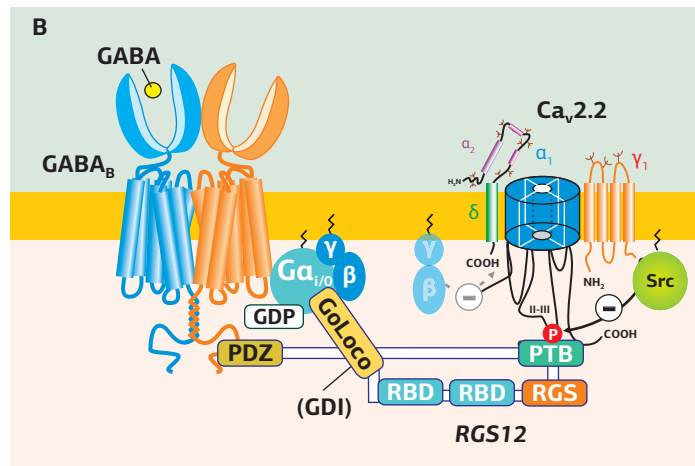
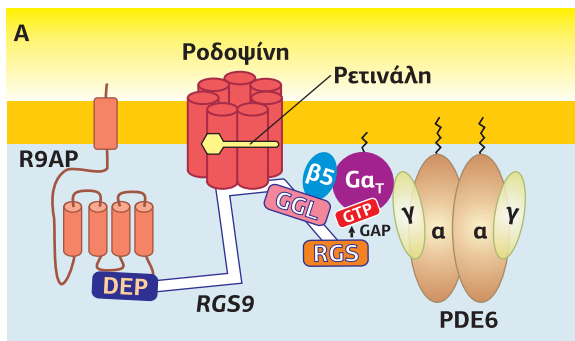
Διακρίνονται οι 9 υπο-οικογένειες (RZ, R4, R7, R12, RA, GEF, GRK, SNX, D-AKAP2), τα μέλη τους και οι χαρακτηριστικές περιοχές αλληλεπίδρασης που περιέχουν. Με πορτοκαλί συμβολίζεται η περιοχή RGS, η οποία αλληλεπιδρά με τις Gα υπομονάδες. [4] GPR (G-Protein Regulatory motif), PXA (Domain Associated with PX), PX (Phox): συνδέεται με φωσφοϊνοσιτιδία στις μεμβράνες, SNX (Sorting Nexin family), PEST (πλούσια σε αμινοξέα P, E, S και T): συναντάται σε πρωτεΐνες με μικρό ενδοκυτταρικό χρόνο ημιζωής, υποθέτοντας ότι δρα ως πεπτιδιο σήματος για αποικοδόμηση.



**Εικόνα 5.32**  
Η πρωτεΐνη RGS6.

**Εικόνα 5.33**

**A.** Η **RGS9**, η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη σκαλωσιάς **R9AP** και την **Gβ5**-υπομονάδα διεγείρεται από την ενεργοποιημένη **PDE**. Ως αποτέλεσμα επιταχύνει τη δράση **GTPάσης** της **τρανσδουσίνης** και η μετάδοση του σήματος σταματά. Η **RGS9** συνδέεται με τη μεμβρανική πρωτεΐνη **R9AP** μέσω της περιοχής **DEP**, με την **Gβ5**-υπομονάδα μέσω της **GGL** περιοχής και μέσω της **RGS** περιοχής επιταχύνει τον ρυθμό υδρόλυσης του **GTP** από την **Gα<sub>T</sub>**-υπομονάδα. **B.** Η **α<sub>1</sub>**-υπομονάδα των καναλιών **Ca<sub>v</sub>2.2** φωσφορυλιώνεται από την κίνηση **Src** μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων **GABA<sub>B</sub>**. Η **RGS12** μέσω της **PTB** περιοχής της συνδέεται στο φωσφορυλιωμένο κανάλι, ενώ μέσω της **PDZ** περιοχής της με τον υποδοχέα **GABA<sub>B</sub>**. Ως αποτέλεσμα, εμποδίζεται το κλείσιμο του καναλιού **Ca<sup>2+</sup>** που προκαλεί η ενεργοποίηση των **GABA<sub>B</sub>R**. [84]



**GTPάσης** των **Gα<sub>12/13</sub>**, και μέσω της περιοχής **DH** δρα ως **GEF** ενεργοποιώντας την ανταλλαγή **GDP-GTP** στη μικρή **GTPάση Rho**.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυλειτουργικών **RGS**, λόγω των πολλαπλών περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχουν, αποτελούν τα μέλη της υπο-οικογένειας **R7** (**RGS6**, **7**, **9** και **11**). Οι πρωτεΐνες **R7**, εκτός από την περιοχή **RGS**, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δραστηριότητα **GAP**, περιέχουν στο κέντρο μια περιοχή **GGL** (**Gγ-like**) μέσω της οποίας συνδέονται στην **Gβ5**-υπομονάδα, επιτρέποντας στις **RGS** να παίξουν ταυτόχρονα και τον ρόλο **Gγ**-υπομονάδων. Το σύμπλοκο **Gβ5/R7** σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες **Gβ5** στη μεμβράνη, μειώνοντας τον ρυθμό αποικοδόμησής τους στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, τα μέλη της υπο-οικογένειας **R7** περιέχουν στο **NH<sub>2</sub>**-τελικό τους άκρο μια περιοχή **DEP** (η οποία ανακαλύφθηκε στις πρωτεΐνες **D**ishevelled, **E**gl-10, **P**leckstrin), μέσω της οποίας συνδέονται στις μεμβρανικές πρωτεΐνες σκαλωσιάς **R7BP/R9AP** (**R7/9 Binding** ή **Associating Protein**) και προσελκύνονται κοντά στον υποδοχέα (**Εικόνα 5.32**, **5.33A**). Η σύνδεση της **R7BP** στις **RGS** της οικογένειας **R7** αυξάνει τη δράση **GAP** των **R7** κατά **70** φορές. Ανάλογα με το είδος της **Gα**-υπομονάδας, οι **R7** μπορούν να αναστείλουν τη σηματοδότηση ανάμεσα στον υποδοχέα και στην **G**-πρωτεΐνη είτε ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα **GTPάσης** της **Gα<sub>i</sub>** είτε διακόπτοντας τη φυσική αλληλεπίδραση υποδοχέα-**Gα<sub>i</sub>** (ανεξάρτητα της δραστηριότητας **GTPάσης**).

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ορισμένες **RGS** μπορούν και συνδέονται σε μια ποικιλία τελεστών, με αποτέλεσμα είτε την ενεργοποίηση της δράσης **GAP** τους είτε τη διακοπή της φυσικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην **Gα** και τον τελεστή.

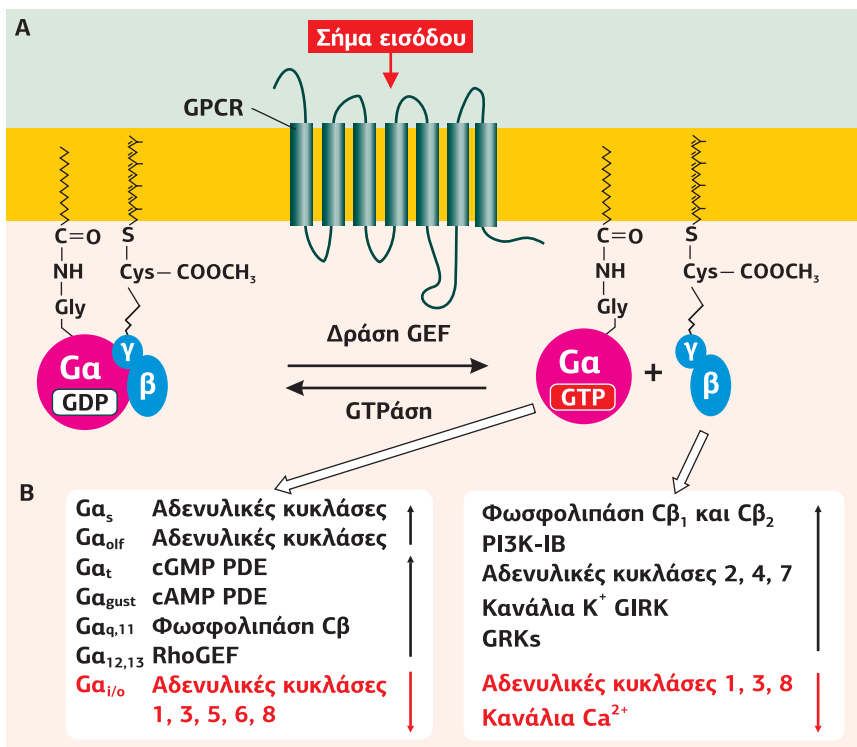
Ενεργοποίηση της δράσης **GAP** των **RGS**. Μετά την ενεργοποίησή της από την **τρανσδουσίνη**, η **φωσφοδιεστεράση** του **cGMP** συνδέεται μέσω της **γ**-υπομονάδας της (**PDEγ**) με την **RGS9** και την ενεργοποιεί, με αποτέλεσμα μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης να επιταχύνεται η δράση **GTPάσης** της **τρανσδουσίνης** (**Εικόνα 5.33A**). Με τον ίδιο μηχανισμό η ενεργοποιημένη **φωσφολιπάση Cβ** συνδέεται στην **RGS4**, την ενεργοποιεί και επιταχύνει τη δράση **GTPάσης** της **Gα<sub>q</sub>**.

Διακοπή της φυσικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην **Gα** υπομονάδα και στον τελεστή. Η **RGS2** συνδέεται μέσω του **NH<sub>2</sub>**-τελικού της άκρου με την **αδενυλική** **κυκλάση**, αναστέλλοντας την παραγωγή **cAMP** ανεξάρτητα από την επιτάχυνση της δράσης **GTPάσης** της **Gα<sub>s</sub>**. Η **RGS12** συνδέεται μέσω της **PDZ** περιοχής της με τον υποδοχέα **GABA<sub>B</sub>**, και μέσω της **PTB** περιοχής της με την **φωσφορυλιωμένη α<sub>1</sub>**-υπομονάδα των καναλιών **Ca<sub>v</sub>2.2**. Τα κανάλια **Ca<sup>2+</sup>** **N**-τύπου, **Ca<sub>v</sub>2.2** των γαγγλιακών νευρώνων φωσφορυλιώνονται από την κίνηση **Src**, λόγω της ενεργοποίησης των **GABA<sub>B</sub>**. Η **RGS12** παρεμβαίνει ανάμεσα στον **GABA<sub>B</sub>** και τα **Ca<sub>v</sub>2.2** εμποδίζοντας τη φυσική αλληλεπίδραση υποδοχέα-τελεστή. Καθώς η ενεργοποίηση των υποδοχέων **GABA<sub>B</sub>** μέσω των **βγ**-υπομονάδων της **G<sub>i/o</sub>**-πρωτεΐνης κλείνει τα **N**-τύπου κανάλια **Ca<sup>2+</sup>**, η **RGS12** αίρει αναστολή του ρεύματος **Ca<sup>2+</sup>** που προκαλεί το **GABA**. Η **RGS12** μέσω της περιοχής **GoLoco/GPR** δρα και ως **GDI** (**Εικόνα 5.33B**).

## 2.5 Τελεστές των G-πρωτεϊνών

Η ανταλλαγή του GDP με GTP, που επάγεται από τον υποδοχέα, προκαλεί μεταβολή της διαμόρφωσης της Ga-υπομονάδας, οδηγώντας στην απομάκρυνσή της από το διμερές Gβγ, το οποίο δεν διαχωρίζεται περαιτέρω. Αμέσως μετά την αποσύνδεση, τόσο η Ga.GTP όσο και οι Gβγ υπομονάδες μεταδίδουν τα σήματα εισόδου από τους υποδοχείς στις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες τελεστές (Εικόνα 5.34).

Το ποιος τελεστής αλληλεπιδρά και το κατά πόσον ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται εξαρτάται από τις ισομορφές των Ga- και Gβγ-υπομονάδων. Όπως και οι περισσότερες πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος, οι τριμερείς G-πρωτεΐνες υπάρχουν σε ποικίλες ισομορφές. Θεωρητικά, οι 16 Ga, 5 Gβ και 12 Gγ που εκφράζονται από τα κύτταρα των θηλαστικών, μαζί με δεκάδες παραλλαγές ματίσματος, μπορούν να συνδυαστούν για να σχηματίσουν περισσότερες από 1.000 διαφορετικές G-πρωτεΐνες. Ακόμη και αν δεν υλοποιούνται όλες, ο βαθμός πολυπλοκότητας είναι σχεδόν απεριόριστος, λαμβάνοντας υπόψη τις περισσότερες από 1.000 ισομορφές των GPCRs.



**Εικόνα 5.34**

**Τριμερείς G-πρωτεΐνες: σύνδεση στη μεμβράνη και τελεστές.** Α. Οι G-πρωτεϊνικές υπομονάδες αγκυροβολούν στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης με λιπιδικές άγκυρες μυριστοϋλίου και γερανυλγερανυλίου. Ο ενεργοποιημένος GPCR δρα ως παράγοντας ανταλλαγής GDP-GTP (GEF) και επάγει την απομάκρυνση της α.GTP- από τις βγ-υπομονάδες. Β. Στη συνέχεια α.GTP- και βγ-υπομονάδες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες τελεστές, οι οποίοι διακρίνονται στον άσπρο πίνακα (με κόκκινο συμβολίζεται η αναστολή και με μαύρο η ενεργοποίηση). Η δραστηριότητα GTPάσης της Ga καθιστά τη διαδικασία αναστρέψιμη. [59]

### Ισομορφές των α-υπομονάδων και οι τελεστές τους

Τα περισσότερα ζωικά κύτταρα εκφράζουν 9 με 10 από τις 16 Ga-υπομονάδες. Κάποια γονίδια, όπως τα α<sub>T</sub>, α<sub>olf</sub> και α<sub>gust</sub>, εκφράζονται μόνο σε κατηγορίες αισθητηρίων κυττάρων (φωτοϋποδοχείς-α<sub>T</sub>, οσφρητικοί υποδοχείς-α<sub>olf</sub>, και υποδοχείς γεύσης-α<sub>gust</sub>). Άλλα εκφράζονται σε κύτταρα με κοινή εμβρυακή προέλευση, όπως για παράδειγμα οι α<sub>o</sub> υπομονάδες εκφράζονται σε κύτταρα που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία και σε ενδοκρινείς ιστούς, όπως τα παγκρεατικά β-κύτταρα και η υπόφυση, και η α<sub>16</sub> εκφράζεται αποκλειστικά σε κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης. Μόνο οι α<sub>s</sub>, α<sub>12</sub> και α<sub>11</sub> υπομονάδες εκφράζονται γενικά σε ζωικά κύτταρα, ενώ τα περισσότερα κύτταρα εκφράζουν, επίσης, την α<sub>q</sub> και είτε την α<sub>1</sub> είτε την α<sub>3</sub>.

Όταν ευθυγραμμιστούν οι αλληλουχίες αμινοξέων των ποικίλων ισομορφών α-υπομονάδων, διακρίνεται ότι περίπου το 40% των αμινοξέων είναι αμετάβλητα. Επιπλέον, οι α-υπομονάδες είναι ισχυρά συντηρημένες κατά τη διάρκεια της εξέλι-

ξης. Είναι πιθανόν ότι αυτό το υψηλό επίπεδο συντήρησης έχει οδηγηθεί από την ανάγκη να διατηρηθούν οι πολύ εξειδικευμένες και ταυτόχρονα πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες καθενός από αυτά τα πρωτεϊνικά γονιδιακά προϊόντα.

Μπορούμε να ταξινομήσουμε την οικογένεια των  $\alpha$ -υπομονάδων σε τέσσερις κύριες ομάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει έναν αριθμό στενά συνδεδεμένων υποτύπων.

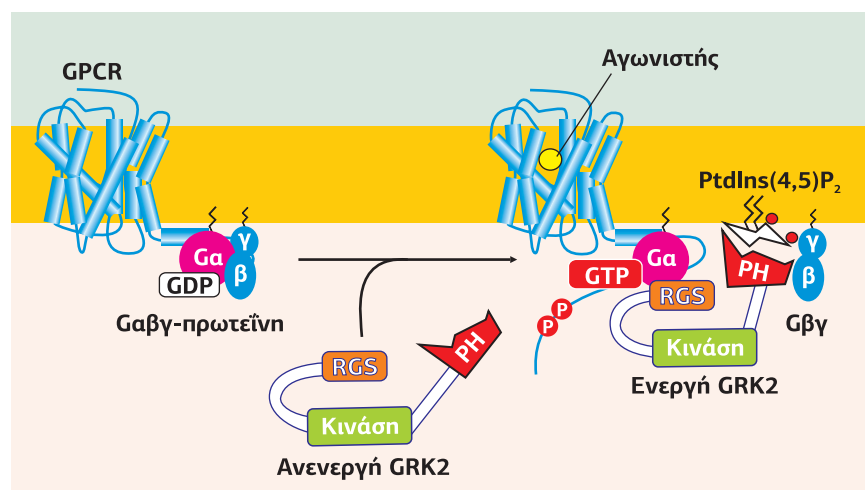
- 1. Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ  $G\alpha_s$  (G STIMULATORY).** Περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες  $G\alpha_s$ , που συναντώνται σε όλους τους ιστούς, και τις  $G\alpha_{olf}$ , που βρίσκονται μόνο σε νευρικούς ιστούς και ιδιαίτερα στους νευρώνες του οσφρητικού επιθηλίου. Οι πρωτεΐνες  $G\alpha_s$  ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση και συνεπώς αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι αποτελούν στόχο μιας τοξίνης που προέρχεται από το βακτήριο *Vibrio cholerae*, της τοξίνης της χολέρας (CTX: cholera toxine), η οποία ριβοσυλιώνοντας την  $G\alpha_s$  εμποδίζει την υδρόλυση του GTP σε GDP +  $P_i$  και, κατά συνέπεια, τη διάσπαση του συμπλόκου  $G\alpha_s$ -GTP/ αδενυλική κυκλάση. Ως αποτέλεσμα, η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης παρατείνεται.
- 2. Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ  $G\alpha_i$  (G INHIBITORY).** Ορισμένα μέλη της κατηγορίας αυτής ( $G\alpha_i1$ ,  $G\alpha_i2$ ,  $G\alpha_i3$ ) αναστέλλουν τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης, ορισμένα ( $G\alpha_i1$ ,  $G\alpha_i2$ ,  $G\alpha_i3$ ,  $G\alpha_o$ ) ρυθμίζουν τη λειτουργία καναλιών ιόντων και, τέλος, η  $G\alpha_T$  (transducin) ενεργοποιεί τη φωσφοδιεστεράση του cGMP. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν το χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι αποτελούν στόχο μιας τοξίνης που παράγεται από το βακτήριο *Bordetella pertussis*, της τοξίνης του κοκίτη (PTX: pertussis toxine), η οποία εμποδίζει τη σύνδεση της πρωτεΐνης  $G\alpha_i$  με τον υποδοχέα, αναστέλλοντας τη μετάδοση του μηνύματος.
- 3. Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ  $G\alpha_{q/11}$ .** Τα μέλη της κατηγορίας αυτής δεν αποτελούν στόχο για την PTX (PTX-resistants), ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C $\beta$  και είναι ικανά να ενεργοποιήσουν την κινάση τυροσίνης Btk (Bruton's tyrosine kinase).
- 4. Η ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ  $G\alpha_{12/13}$ .** Οι πρωτεΐνες  $G\alpha_{12/13}$  αλληλεπιδρώντας με περισσότερους από 20 τελεστές εμπλέκονται σε κυτταρικές διαδικασίες, όπως η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun και η διέγερση της ανταλλαγής  $Na^+/H^+$ . Επίσης, ενεργοποιούν GEFs των Rho GTPασών (βλ. σελ. 314).

### Εικόνα 5.35

**Οι  $G\beta\gamma$ -υπομονάδες ενεργοποιούν μέσω των GRKs τη δράση GTPάσης της  $G\alpha$  και την απεναισιωτοποίηση των GPCRs.** Οι κινάσες GRKs μέσω της PH περιοχής τους στρατολογούνται στη μεμβράνη κοντά στον ενεργοποιημένο GPCR, καθώς συνδέονται στα  $PIP_2$  της μεμβράνης και στις  $G\beta\gamma$ -υπομονάδες. Στη συνέχεια, μέσω της RGS περιοχής τους συνδέονται με την  $G\alpha$ -υπομονάδα και ενεργοποιούν τη δραστηριότητα GTPάσης, ενώ ταυτόχρονα φωσφορυλιώνουν τον GPCR καθιστώντας τον στόχο της  $\beta$ -αρρεστίνης, η οποία εμποδίζει τη σύνδεση υποδοχέα- $G\alpha$  υπομονάδας. [70]

### Ισομορφές των $\beta\gamma$ -υπομονάδων και τελεστές τους

Υπάρχουν 5 υπότυποι  $\beta$ -υπομονάδων (35-39 kDa) με 50-90 % ομολογία μεταξύ τους και τουλάχιστον 12 υπότυποι  $\gamma$ -υπομονάδων (5-10 kDa). Οι αλληλουχίες των





γ εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλία. Στη φύση δεν υπάρχουν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των διμερών βγ. Για παράδειγμα, υπάρχει ο β1γ2, αλλά όχι ο β2γ1.

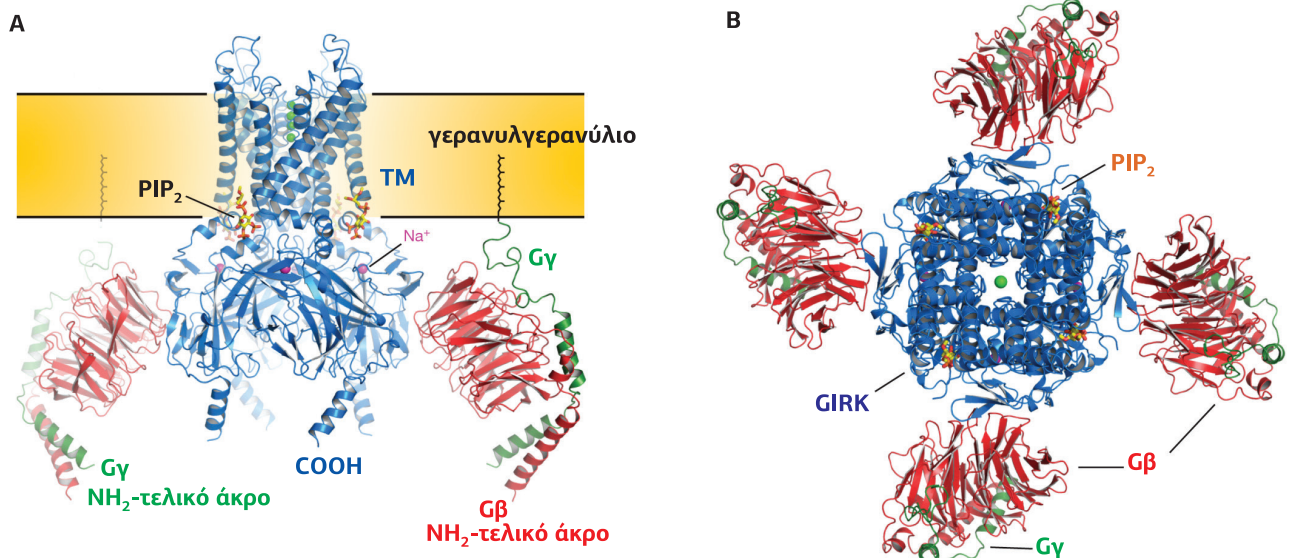
Είναι φανερό ότι οι Gα-υπομονάδες έχουν τον κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση των τελεστών. Αρχικά πίστευαν ότι οι Gβγ δρουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της Gα-σηματοδότησης, καθώς η Gα-πρωτεΐνη σε σύνδεση με τις Gβγ (δηλαδή στην ετεροτριμερή μορφή της G-πρωτεΐνης) έχει αυξημένη συγγένεια για το GDP, οδηγώντας την G-πρωτεΐνη στην ανενεργή της μορφή. Σήμερα είναι ξεκάθαρο ότι οι Gβγ αλληλεπιδρούν όχι μόνο με την Gα, αλλά και με GPCRs, τελεστές και ρυθμιστικά ένζυμα, όπως οι GRKs, παίζοντας έναν κεντρικό ρόλο στη σηματοδότηση των GPCRs. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση των **GRKs** από τις Gβγ σταματά τη σηματοδότηση, καθώς οι GRKs αφενός διεγείρουν τη δραστικότητα GTPάσης της Gα και αφετέρου φωσφορυλιώνουν τους GPCRs απευαισθητοποιώντας τους (**Εικόνα 5.35**).

Η πρώτη ένδειξη για άμεσο ρόλο των διμερών Gβγ στην κυτταρική σηματοδότηση ήρθε το 1987, από τη διαπίστωση ότι η ακετυλοχολίνη μέσω των M2 μουσκαρινικών υποδοχέων, οι οποίοι συνδέονται με μια  $G_{i/o}$  πρωτεΐνη (ευαίσθητη στην τοξίνη του κοκίτη), ελαττώνει τον καρδιακό ρυθμό και στη διαδικασία α. δεν εμπλέκεται κανένας διαλυτός δεύτερος διαβιβαστής και β. η G-πρωτεΐνη αλληλεπιδρά άμεσα με ένα κανάλι  $K^+$ . Η πρόταση ότι οι βγ-υπομονάδες είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του καναλιού  $K^+$  θεωρήθηκε αιρετική και δημιούργησε πολλές αντιδράσεις. Παρότι ανακαλύφθηκε ότι καθαρά βγ-διμερή, απομονωμένα από εγκεφάλους βοοειδών, προκαλούν άνοιγμα των καναλιών  $K^+$  όταν εισάγονται στην εσωτερική επιφάνεια απομονωμένων μεμβρανικών τμημάτων, υπήρχαν αντίθετα επιχειρήματα ότι το φαινόμενο οφείλεται στην παρουσία επιμολύνσεων α-υπομονάδων. Ταυτόχρονα, πειράματα που χρησιμοποίησαν καθαρές α-υπομονάδες έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η αλήθεια αποκαταστάθηκε το 1994, όταν αποδείχθηκε ότι συνέκφραση βγ-υπομονάδων και καναλιών  $K^+$  σε ωκύτταρα του *Xenopus* έχει ως αποτέλεσμα την ιδιόσυστατη παρατεταμένη δραστηριότητα των καναλιών  $K^+$ . Αντιθέτως, η εισαγωγή σε ωκύτταρα α-υπομονάδων συνδεδεμένων με GTPγS (μη υδρολύσιμο ανάλογο του GTP) ή συνέκφραση α-υπομονάδων με τα κανάλια  $K^+$  δεν οδήγησε σε κανένα αποτέλεσμα.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι βγ-υπομονάδες συνδέονται άμεσα και οδηγούν στο άνοιγμα των **καναλιών  $K^+$  GIRK** (G protein-coupled Inwardly-Rectifying potassium channel), τα οποία είναι ετεροτετραμερή και αποτελούν μέλη της οικογένειας των καναλιών Kir3. Τα κανάλια αυτά περιέχουν 4 θήκες σύνδεσης της Gβγ, οι οποίες δημιουργούνται από το  $NH_2$ -τελικό άκρο της μιας υπομονάδας και

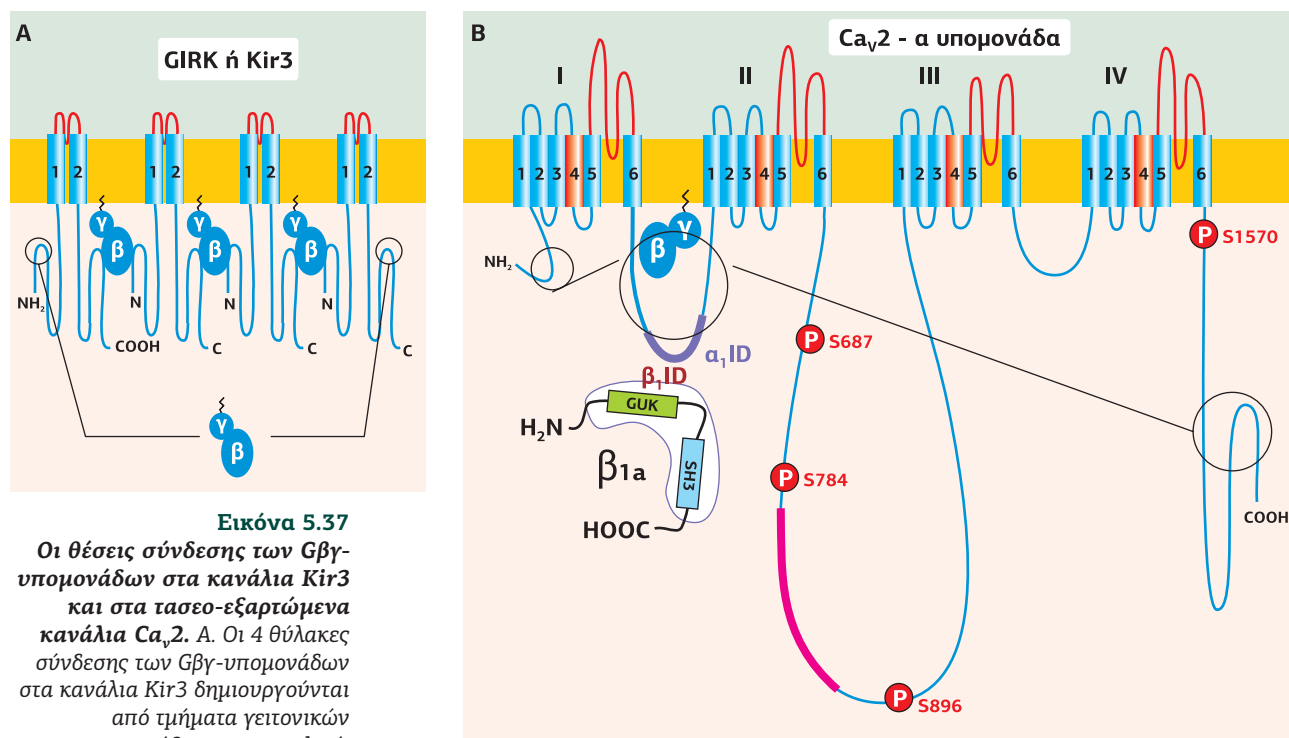
**Εικόνα 5.36**

Κρυσταλλική δομή του καναλιού Kir3 (GIRK), το άνοιγμα του οποίου ενεργοποιείται από τη σύνδεση 4 Gβγ-υπομονάδων και 4 μορίων  $PIP_2$ . [101]



το COOH-τελικό άκρο της γειτονικής της (**Εικόνα 5.37A**). Όπως και με τα περισσότερα κανάλια ιόντων, τα κανάλια Kir3 απαιτούν την παρουσία φωσφατιδυλο(4,5)-διφωσφορικής ινοσιτόλης (PIP<sub>2</sub>) για την ενεργοποίησή τους, καθώς η σύνδεση τριών μορίων PIP<sub>2</sub> στο κανάλι συνδέει το άνοιγμα της εσωτερικής πύλης με την πύλη G-βρόχου, στην οποία συνδέεται κατόπιν η Gβγ (**Εικόνα 5.36**). Απουσία PIP<sub>2</sub>, η σύνδεση της Gβγ ανοίγει μόνο την πύλη του G-βρόχου και δεν περνούν ιόντα μέσα από το κανάλι. Τα κανάλια Kir3 εκτός από την καρδιά, εκφράζονται και στο πάγκρεας, όπου μειώνουν την έκκριση ορμονών.

Τα **τασσο-εξαρτώμενα κανάλια Ca<sup>2+</sup> Ca<sub>v</sub>2**, παρότι ανοίγουν έπειτα από εκπόλωση της μεμβράνης, ρυθμίζονται και από τις Gβγ υπομονάδες. Τα κανάλια Ca<sub>v</sub>2.2 (N-τύπου) εκφράζονται στον εγκέφαλο στις προσυναπτικές απολήξεις, όπου επάγουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Ο ρόλος των Gβγ-υπομονάδων στη ρύθμιση των καναλιών Ca<sub>v</sub>2 ανακαλύφθηκε το 1981 από την ανασταλτική δράση της νοραδρεναλίνης στο ρεύμα Ca<sup>2+</sup> σε αισθητήριους νευρώνες κοτόπουλου. Είναι σήμερα καλά τεκμηριωμένο ότι οι GPCRs χρησιμοποιούν ποικίλους μηχανισμούς για τη ρύθμιση των καναλιών Ca<sup>2+</sup>, εκ των οποίων ο καλύτερα μελετημένος είναι μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης των Gβγ με τα κανάλια.



**Εικόνα 5.37**

**Οι θέσεις σύνδεσης των Gβγ-υπομονάδων στα κανάλια Kir3 και στα τασσο-εξαρτώμενα κανάλια Ca<sub>v</sub>2.** Α. Οι 4 θύλακες σύνδεσης των Gβγ-υπομονάδων στα κανάλια Kir3 δημιουργούνται από τμήματα γειτονικών υπομονάδων του καναλιού. Β. Ο θύλακας σύνδεσης της Gβγ στο κανάλι Ca<sub>v</sub>2 δημιουργείται από τμήματα γειτονικών υποπεριοχών της α<sub>1</sub>-υπομονάδας του Ca<sub>v</sub>, η οποία αποτελείται από 4 όμοιες επαναλαμβανόμενες υποπεριοχές. [46]

Τα κανάλια Ca<sub>v</sub> είναι ετερο-ολιγομερή πρωτεϊνικά συμπλέγματα που αποτελούνται από μια κεντρική α<sub>1</sub> υπομονάδα που σχηματίζει τον πόρο, μια κυτταροπλασματική Ca<sub>v</sub>β υπομονάδα και μια διαμεμβρανική α<sub>2</sub>δ. Η α<sub>1</sub> περιέχει τις θέσεις σύνδεσης για την Gβγ στον ενδοκυτταρικό βρόχο που συνδέει τις υποπεριοχές I και II, καθώς και στο NH<sub>2</sub>- και COOH-τελικό άκρο της (**Εικόνα 5.37B**, βλ. και **Εικόνα 4.33**). Αν και υπάρχουν πολλές θέσεις αλληλεπίδρασης της Gβγ στην α<sub>1</sub> υπομονάδα, δημιουργείται μόνο ένας θύλακας σύνδεσης στον οποίο συνδέεται ένα διμερές Gβγ. Η σύνδεση της Gβγ διαταράσσει τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή και τον ενδοκυτταρικό βρόχο I-II, κλείνοντας με αυτόν τον τρόπο το κανάλι και αναστέλλοντας την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή.

Οι **αδενυλικές κυκλάσες (AC)** ενεργοποιούνται κυρίως από υποδοχείς GPCRs συζευγμένους με Gα<sub>s</sub>- πρωτεΐνες και αναστέλλονται από GPCRs συζευγμένους με Gα<sub>i</sub>. Ωστόσο, πολλές ισομορφές αδενυλικών κυκλασών ρυθμίζονται άμεσα από Gβγ. Η επίδραση των Gβγ στη δραστηριότητα των ACs μπορεί να είναι διεγερτική ή

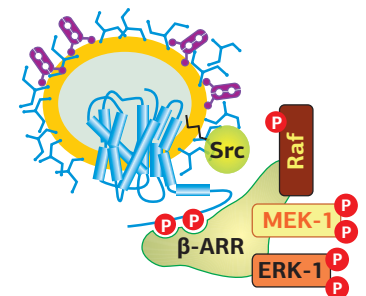
ανασταλτική ανάλογα με την ισομορφή της AC. Οι ισομορφές που διεγείρονται από την Gβγ είναι οι AC2, AC4, και AC7, ενώ αναστέλλονται οι ισομορφές AC1, AC3 και AC8. Οι Gβγ-υπομονάδες συνδέονται με το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο των ACs, σε αντίθεση με τις Gα-υπομονάδες που αλληλεπιδρούν με τις περιοχές C1 και C2 της AC.

Η **φωσφολιπάση C (PLC)** είναι ένας άλλος καλά μελετημένος τελεστής των G-πρωτεϊνών που ρυθμίζεται από τις Gβγ. Σήμερα είναι γνωστές 13 ισομορφές PLCs που κατατάσσονται σε έξι οικογένειες, PLCβ, γ, δ, ε, ζ, και η. Η πρώτη υπο-οικογένεια των PLCs που ανακαλύφθηκε να ρυθμίζεται από Gβγ ήταν η **PLCβ**. Οι ισομορφές PLCβ ρυθμίζονται διπλά από Gβγ και Gα<sub>q</sub>, καθώς και οι δύο G-υπομονάδες αυξάνουν τη δραστηριότητα φωσφολιπάσης, μολονότι η Gα<sub>q</sub> έχει υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης για το ένζυμο. Οι θέσεις αλληλεπίδρασης των υπομονάδων Gα<sub>q</sub> και Gβγ με την PLCβ βρίσκονται στα αντίθετα άκρα της πρωτεΐνης, η θέση δέσμευσης της Gα<sub>q</sub> βρίσκεται στην περιοχή C2 του COOH-τελικού άκρου, ενώ η Gβγ αλληλεπιδρά με την περιοχή PH του NH<sub>2</sub>-τελικού άκρου της PLCβ (βλ. **Εικόνα 5.63** και **5.64**). Το μέγεθος της διέγερσης του ενζύμου εξαρτάται τόσο από την ισομορφή της PLCβ (PLCβ1-β4) όσο και από τις διάφορες ισομορφές των Gβ και Gγ. Εκτός από την PLCβ, από διαφορετικές ισομορφές Gβγ, ρυθμίζονται και οι PLCε και PLCη.

Οι **κινάσες PI3Ks** είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση των φωσφατιδυλοϊνσιτιδίων στην 3' υδροξυλομάδα του δακτυλίου ινσιτόλης. Κύριο προϊόν τους είναι η φωσφατιδυλο(3,4,5)τριφωσφορική ινσιτόλη (PIP<sub>3</sub>), η οποία είναι ένας ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB/Akt). Μία μόνο ισομορφή PI3K ενεργοποιείται από Gβγ, η PI3Kγ, ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια καταλυτική (p110γ) και μία ρυθμιστική (p101) υπομονάδα (βλ. **Εικόνα 5.83**). Η ρυθμιστική p101 υπομονάδα συνδέεται στις Gβγ και, στη συνέχεια, στρατολογεί στη μεμβράνη την καταλυτική p110γ υπομονάδα. Οι θέσεις σύνδεσης PI3K και Gβγ φαίνεται να είναι πολλαπλές. Η ενεργοποίηση της PI3Kγ από τις Gβγ ανιχνεύτηκε αρχικά στα ουδετερόφιλα (βλ. **Εικόνα 5.86**). Η γενετική εξαίλιση της κινάσης PI3Kγ οδηγεί σε μείωση της μετανάστευσης των ουδετερόφιλων και μείωση της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Οι **κινάσες MAPKs** (Mitogen Activated Protein Kinases) είναι κρίσιμα συστατικά των αυξητικών σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζονται από τους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων με δράση κινάση τυροσίνης (RTKs, Receptors Tyrosine Kinases). Οι Gβγ υπομονάδες ενεργοποιούν έμμεσα τις MAP κινάσες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι Gβγ υπομονάδες μπορούν να διαμεσολαβούν στις επιδράσεις που προάγουν την αυξητική επίδραση πολλών GPCRs. Τα μονοπάτια των MAP κινάσεων ERK1, JNK και p38 διεγείρονται από GPCRs συζευγμένους με Gα<sub>i</sub>, όμως και οι Gβγ-υπομονάδες αποδείχθηκε ότι μπορούν να παίξουν ρόλο, με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο **πρώτος μηχανισμός** περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των κινάσεων PI3Ks ή την ενεργοποίηση της PLCβ. Ο **δεύτερος μηχανισμός** περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος: η Gβγ ενεργοποιεί τις GRKs που φωσφορυλιώνουν GPCRs, προωθώντας τη σύνδεση της β-αρρεστίνης, η οποία λειτουργεί ως μία πρωτεΐνη σκαλωσιάς για τη Src, που φωσφορυλιώνει τις κινάσες MAPKs. Ο  **τρίτος μηχανισμός** περιλαμβάνει trans-ενεργοποίηση του υποδοχέα αυξητικών παραγόντων, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί ένα κλασικό μονοπάτι MAPK σηματοδότησης.

Ο λόγος για τόσους πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν οι Gβγ για την ενεργοποίηση των MAPKs μπορεί να αντανακλά ειδικές απαιτήσεις ξεχωριστών κυτταρικών τύπων, GPCRs και G-πρωτεϊνών.



Η β-αρρεστίνη λειτουργεί ως μία πρωτεΐνη σκαλωσιάς για τη Src, που φωσφορυλιώνει τις κινάσες MAPKs.

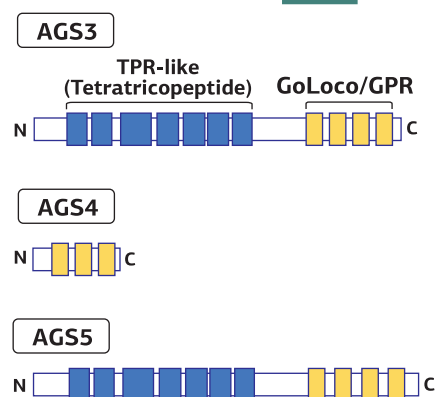
## 2.6

### AGS πρωτεΐνες: ενεργοποίηση των τριμερών G-πρωτεϊνών ανεξάρτητα από υποδοχείς

Ο μόνος αξιόπιστος κανόνας της κυτταρικής σηματοδότησης είναι πως δεν υπάρχει κανόνας χωρίς εξαίρεση. Επίσης, η θεώρηση ότι οι τριμερείς G-πρωτεΐνες

**Εικόνα 5.38**

**Ο ρόλος των AGS της ομάδας II στη σηματοδότηση.** Η AGS3 συνδέεται εξειδικευμένα στην  $G\alpha_{i/o}GDP$  υπομονάδα και παίζει τον ρόλο GDI, καθώς σταθεροποιεί την  $G\alpha_i$  στη GDP-συνδεδεμένη διαμόρφωσή της. Ως αποτέλεσμα ενεργοποιείται η σηματοδότηση μέσω  $G\beta\gamma$  και επιπλέον είναι πιθανό το σύμπλοκο AGS/ $G\alpha_iGDP$  να δρα ως σηματοδοτικό μόριο με εξειδικευμένους τελεστές. [88]

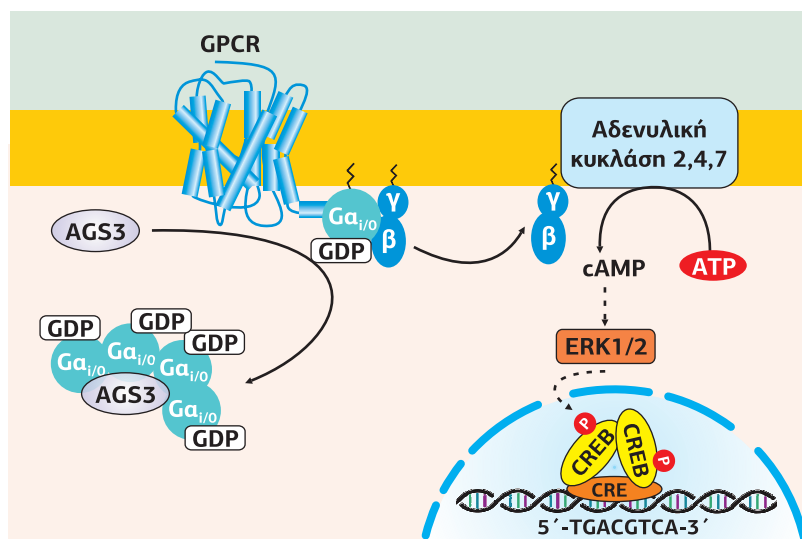


Το **μοτίβο GoLoco ή GPR** (G-Protein Regulatory) δρα ως GDI, εμποδίζει δηλαδή την απομάκρυνση του GDP στις  $G\alpha_i$ . Αποτελείται από τρεις μικρές  $\alpha$ -έλικες. Η καλά συντηρημένη τριάδα Asp-Gln-Arg του GoLoco συμμετέχει άμεσα στη σύνδεση του GDP, εκτείνοντας την πλευρική αλυσίδα της αργινίνης μέσα στον θύλακα σύνδεσης του νουκλεοτιδίου, θυμίζοντας κατά πολύ τον δάκτυλο της καταλυτικής αργινίνης που χρησιμοποιούν οι GAPs. Αυτή η προσθήκη της αργινίνης στον θύλακα πρόσδεσης επηρεάζει την αλληλεπίδραση του GDP με την  $G\alpha_i$  και ως εκ τούτου είναι σίγουρα σημαντική για τη δραστηριότητα GDI.

ενεργοποιούνται αποκλειστικά από υποδοχείς έχει ανακαλυφθεί μετά την ανακάλυψη των πρωτεϊνών AGS (Activators of G-protein Signaling), οι οποίες ενεργοποιούν τις τριμερείς G-πρωτεΐνες ανεξάρτητα από τους υποδοχείς. Οι AGS πρωτεΐνες ανακαλύφθηκαν έπειτα από αναζήτηση ενεργοποιητών των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών στον *Saccharomyces cerevisiae*. Η αναζήτηση οδήγησε στην αναγνώριση πρωτεϊνών που ενεργοποιούν την  $G\beta\gamma$ -εξαρτώμενη απάντηση στις φερομόνες χωρίς τη συμμετοχή των GPCRs των φερομονών.

Οι πρωτεΐνες AGS έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες (I, II, III), με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο ρυθμίζουν τη σηματοδότηση των G-υπομονάδων.

1. Η **ομάδα I** περιέχει ως χαρακτηριστικό εκπρόσωπο την AGS1, η οποία ενεργοποιεί εξειδικευμένα τη σηματοδότηση των  $G\alpha_{i/o}$  πρωτεϊνών, δρώντας ως ανταλλάκτης νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF, Guanine nucleotide Exchange Factor).
2. Η **ομάδα II** περιέχει τις πρωτεΐνες AGS3 - AGS6 (ή RGS12), οι οποίες αναστέλλουν τη σηματοδότηση των  $G\alpha_i$ -πρωτεϊνών αλληλεπιδρώντας μέσω ενός καλά συντηρημένου ρυθμιστικού μοτίβου **GPR** (G-Protein Regulatory motif) 25-30 αμινοξέων με την υπομονάδα  $G\alpha_iGDP$ , εμποδίζοντας την απομάκρυνση του GDP. Δρουν, δηλαδή, ως GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), καθώς σταθεροποιούν τη GDP-συνδεδεμένη διαμόρφωση της  $G\alpha_i$  υπομονάδας με τρία πιθανά αποτελέσματα: α. ενεργοποίηση της σηματοδότησης των  $G\beta\gamma$ , καθώς συναγωνίζονται την επανασύνδεση των  $G\beta\gamma$  στην  $G\alpha_iGDP$  υπομονάδα, β. το σύμπλοκο AGS/ $G\alpha_iGDP$  δρα ως σηματοδοτικό μόριο με εξειδικευμένους τελεστές και γ. το σύμπλοκο AGS/ $G\alpha_iGDP$  δρα ως υπόστρωμα των GEFs για τη δημιουργία συμπλόκου  $G\alpha_iGTP$  (**Εικόνα 5.38**).
3. Η **ομάδα III** περιέχει τις AGS2 και AGS7-AGS10, οι οποίες ενεργοποιούν τη σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης με τις  $G\beta\gamma$ -υπομονάδες.



Η ευρεία κατανομή των πρωτεϊνών AGS υποδηλώνει τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να παίξουν αυτές οι πρωτεΐνες στην εξαρτώμενη από τις G-πρωτεΐνες σηματοδότηση, κάτι όμως που δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητό. Είναι παρόλα αυτά ξεκάθαρο ότι παρακάμπτουν τους υποδοχείς και πιθανότατα ελέγχουν τις υπομονάδες των G-πρωτεϊνών σε υποκυτταρικές θέσεις, όπου δεν υπάρχουν υποδοχείς. Επιπλέον, πολλά δεδομένα δείχνουν πως οι πρωτεΐνες AGS συμμετέχουν και στη νευροδιαβίβαση. Γενικά, η ανακάλυψη αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εξαρτώμενη από τις G-πρωτεΐνες σηματοδότηση είναι πολύ πιο περίπλοκη και περισσότερο συνδεδεμένη με άλλα μονοπάτια από ό,τι έως τώρα υποθέταμε.

## 2.7

### Τοξίνες του κοκίτη και της χολέρας: ADP-ριβосуλίωση των G-πρωτεϊνών

Αν σκεφτούμε την κεντρική θέση των τριμερών G-πρωτεϊνών στη σηματοδότηση, είναι κατανοητό ότι η απορρύθμισή τους μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες στην υγεία. Ένα κλασικό παράδειγμα τέτοιων επιπλοκών είναι η ασθένεια της χολέρας και του κοκίτη. Και οι δύο οφείλονται σε βακτηριακές τοξίνες, οι οποίες είναι ένζυμα που καταλύουν την ομοιοπολική σύνδεση της ομάδας ADP-ριβόζης του NAD<sup>+</sup> στις α-υπομονάδες των G-πρωτεϊνών επηρεάζοντας τη δράση τους.

#### Τοξίνη της χολέρας (CTX)

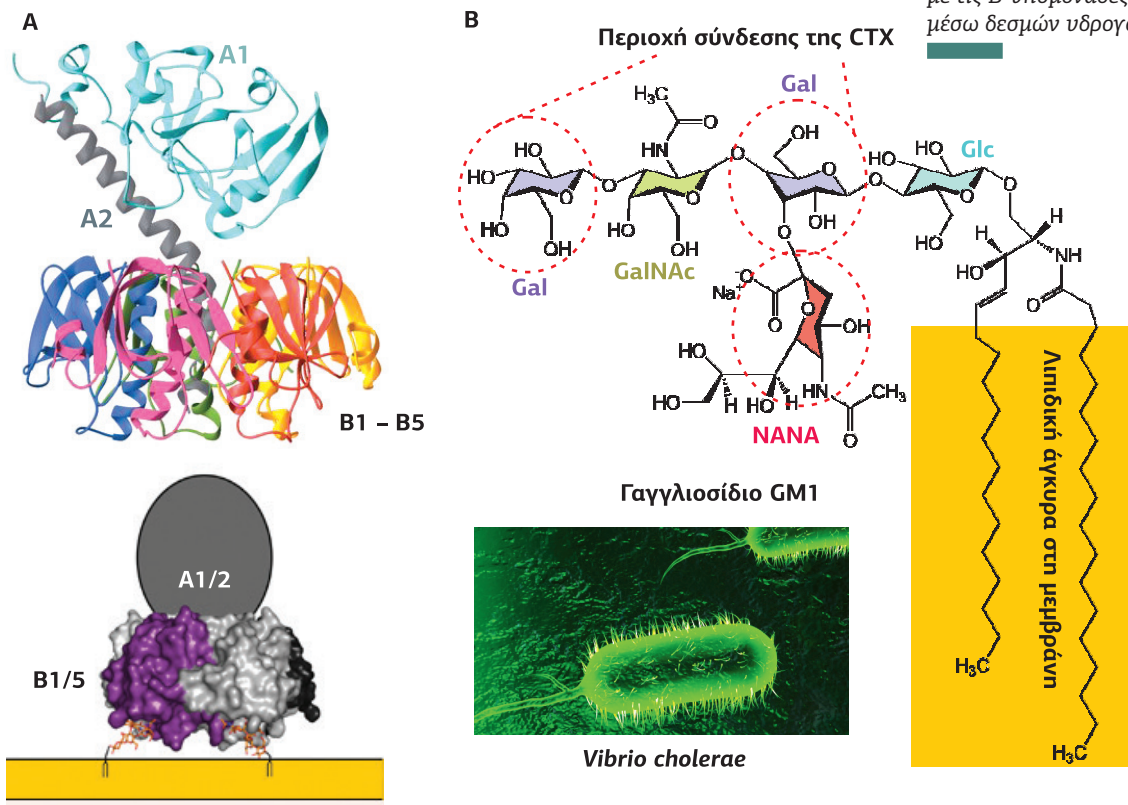
Η χολέρα οφείλεται στο βακτήριο *Vibrio cholerae*. Το κυριότερο σύμπτωμα της ασθένειας είναι η υπερβολική απώλεια υγρών διαμέσου του εντερικού επιθηλίου: αντί για 2L που είναι το κανονικό, αποβάλλονται 20-30L ημερησίως, κάτι το οποίο οδηγεί σε υψηλή θνησιμότητα. Η τοξίνη της χολέρας είναι μία ολιγομερής πρωτεΐνη 87 kDa με σύνθεση υπομονάδων AB<sub>5</sub>, όπου οι B υπομονάδες (103 αμινοξέα η καθεμιά) δημιουργούν ένα πεντάγωνο δακτυλίδι, στο οποίο συνδέεται η A υπομονάδα (240 αμινοξέα). Πριν από την έκκριση της τοξίνης της χολέρας η A υπομονάδα κόβεται από μια βακτηριακή πρωτεάση σε δύο κομμάτια: το A1 (του N-τελικού άκρου, 195 αμινοξέα), με δράση ριβουσολυτρασφεράσης, και το ελικοειδές A2 (του C-τελικού άκρου, 45 αμινοξέα). Τα δύο κομμάτια παραμένουν συνδεδεμένα με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Οι υπομονάδες B1-B5 της CTX συνδέονται σε γαγγλιοσίδια GM1 της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων στόχων (Εικόνα 5.39).

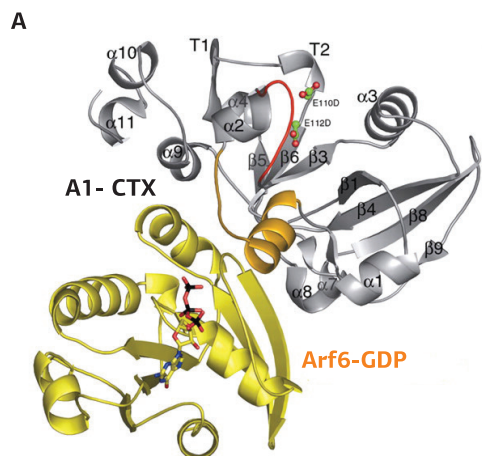
Μετά τη σύνδεση της CTX στη μεμβράνη όλο το σύμπλοκο εισέρχεται με ενδοκύτωση στο εσωτερικό του κυττάρου. Αφού μεταφερθεί με τα ενδοσώματα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η A1 διαχωρίζεται από την A2 υπομονάδα, με αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού που τις συνδέει, και απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Στην πλασματική μεμβράνη, συνδέεται με τη μικρή G-πρωτεΐνη **Arf6** (ADP-ribosylation factor 6), η οποία την ενεργοποιεί, δηλαδή η A1 αλλάζει δια-

**Εικόνα 5.39**

#### Η τοξίνη της χολέρας.

A. Κρυσταλλική δομή της τοξίνης της χολέρας, όπου διακρίνονται οι A υπομονάδες (A1 και A2) και το πενταμερές των B υπομονάδων (B1-B5). [97] B. Η τοξίνη της χολέρας συνδέεται στα γαγγλιοσίδια GM1 της πλασματικής μεμβράνης μέσω των B1-B5 υπομονάδων της. Διακρίνεται η δομή πεντασακχαρίτη των GM1 (με Gal συμβολίζεται η γαλακτόζη, με GalNac η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, με NANA το N-ακετυλονευραμινικό οξύ και με Glc η γλυκόζη). Τα σάκκαρα Gal και NANA είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση με τις B-υπομονάδες της CTX μέσω δεσμών υδρογόνου. [82]





**Εικόνα 5.40**

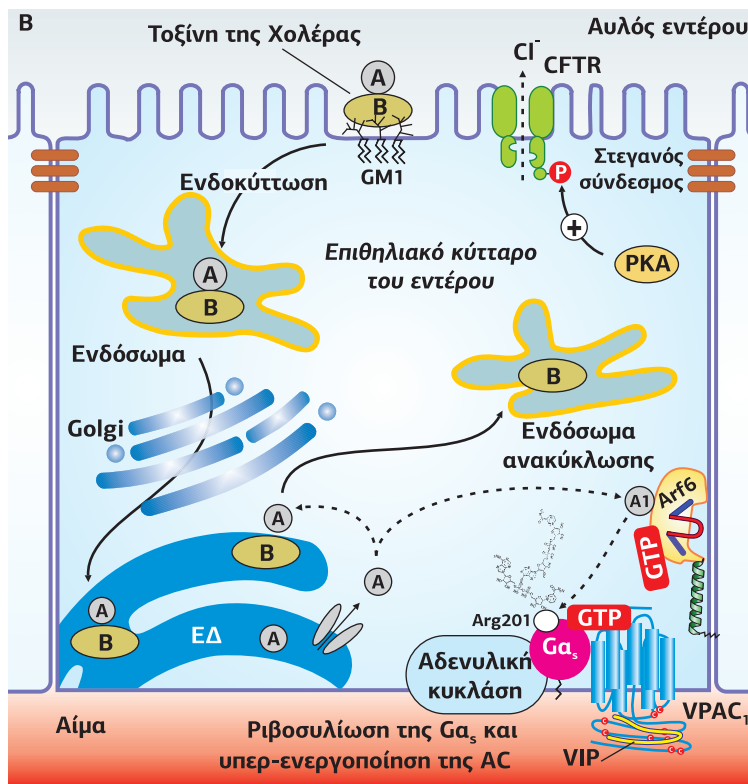
A. Τριδιάστατη διαμόρφωση της A1 υπομονάδας (με γκρι) και της Arf6 με συνδεδεμένο το GDP (με κίτρινο). [69]

B. Μετά τη σύνδεσή της στα γαγγλιοσίδια GM1 της μεμβράνης, η τοξίνη της χολέρας ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται μέσω του Golgi στο ΕΔ. Στο ΕΔ η A1-υπομονάδα αποχωρίζεται και απελευθερώνεται

στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα η A1 υπομονάδα μετά τη σύνδεσή της με τη μικρή G-πρωτεΐνη Arf6 αλλάζει διαμόρφωση, ενεργοποιείται και ριβοσυλιώνει την  $G_{\alpha_s}$  υπομονάδα.

Η ριβοσυλιωμένη  $G_{\alpha_s}$  δεν μπορεί να υδρολύσει το GTP, με αποτέλεσμα να υπερενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Η αυξημένη παραγωγή cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία φωσφορυλιώνει το κανάλι CFTR, οδηγώντας στην αυξημένη έξοδο ιόντων  $Cl^-$  στον αυλό του εντέρου.

[92]



μόρφωση και εκθέτει το ενεργό της κέντρο ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα ADP-ριβουσολτοτρανσφεράσης (**Εικόνα 5.40**). Η A1 είναι πλέον ικανή να καταλύσει μη αντιστρεπτά τη μεταφορά της ADP-ριβόζης από το  $NAD^+$  στην Arg201 της  $G_{\alpha_s}$  υπομονάδας. Η Arg201 βρίσκεται κοντά στην γ-φωσφορική ομάδα του συνδεδεμένου GTP και η ριβοσυλίωσή της παρεμποδίζει τη δράση GTPάσης της  $G_{\alpha_s}$ , με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η υδρόλυση του GTP και, συνεπώς, η  $G_{\alpha_s}$  υπομονάδα να παραμένει ενεργοποιημένη. Η διάρροια που προκαλεί η CTX οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή cAMP λόγω της υπερενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης από την  $G_{\alpha_s}$  υπομονάδα (βλ. **Εικόνα 4.96**).

### Τοξίνη του κοκίτη (PTX)

Η τοξίνη του κοκίτη έχει την ίδια δομή και τον ίδιο μηχανισμό δράσης με την τοξίνη της χολέρας, με τη μόνη διαφορά ότι μεταφέρει την ADP-ριβόζη σε μια Cys της  $G_{\alpha_i}$  υπομονάδας που βρίσκεται τέσσερις θέσεις πριν από το COOH-τελικό άκρο. Η ριβοσυλίωση σε αυτήν τη θέση παρεμποδίζει τη σύνδεση υποδοχέα- $G_{\alpha_i}$  υπομονάδας, καθιλώνοντας την  $G_{\alpha_i}$  στην GDP-διαμόρφωση. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η αρνητική δράση της  $G_{\alpha_i}$  πρωτεΐνης. Επιπλέον, μπλοκάρονται όλες οι σηματοδοτικές αλληλεπιδράσεις που μεσολαβούνται από τις  $G_{\beta\gamma}$ -υπομονάδες, οι οποίες απελευθερώνονται κυρίως από τις  $G_{i/o}$  πρωτεΐνες.

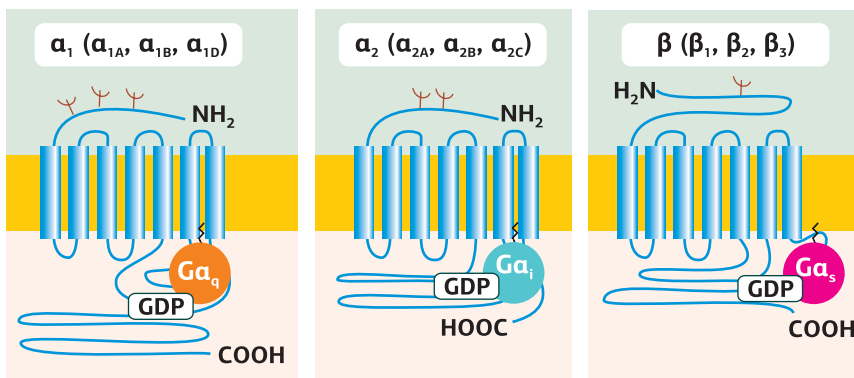
Συνοψίζοντας, οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες είναι βασικά στοιχεία της διαμεμβρανικής σηματοδότησης. Κατά την αλληλεπίδραση με έναν ενεργοποιημένο GPCR, ο οποίος λειτουργεί ως ανταλλάκτης νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF), οι G-πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε α.GTP- και βγ-υπομονάδες, οι οποίες μεταφέρουν το μήνυμα αλληλεπιδρώντας με ένζυμα που παράγουν δεύτερους διαβιβαστές ή με κανάλια ιόντων. Ανάλογα με τον τελεστή που ενεργοποιούν, διακρίνονται αρκετές υποοικογένειες των G-πρωτεϊνών. Επιπλέον, ορισμένες τριμερείς G-πρωτεΐνες ενεργοποιούνται, όχι μόνο από GPCRs, αλλά και από πρωτεΐνες AGS. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως οι G-πρωτεΐνες αυτο-αδρανοδοποιούνται μέσω της ενεργότητας GTPάσης που διαθέτουν. Συχνά αυτή η διαδικασία διεγείρεται επιπλέον από τις πρωτεΐνες RGS, οι οποίες χάρη στις περιοχές αλληλεπίδρασης που

διαθέτουν, διασυνδέουν τις G-πρωτεΐνες με ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι α-υπομονάδες των τριμερών  $G_s$ - και  $G_{i/o}$ - πρωτεϊνών είναι στόχοι βακτηριακών τοξινών, που διαθέτουν ενεργότητα ADP-ριβουσυλοτρανσφεράσης.

## 2.8

### Εξειδίκευση της σηματοδότησης GPCRs/G-πρωτεϊνών/Τελεστών

Το πρώτο επίπεδο εξειδίκευσης αφορά την εξειδίκευση υποδοχέα/G-πρωτεΐνης, η οποία εξαρτάται από τη δομή του υποδοχέα, έτσι ώστε ομόλογοι υποδοχείς να εμφανίζουν παρόμοια σύνδεση. Για παράδειγμα, η οικογένεια των σεροτονεργικών υποδοχέων 5-HT<sub>1</sub> αποτελείται από 5 μέλη, τα οποία συνδέονται με τις πρωτεΐνες  $G_{i/o}$  και αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση, ενώ η οικογένεια των υποδοχέων 5-HT<sub>2</sub> συνδέεται με την  $G_q$  και διεγείρει την PLCβ. Επίσης, οι αδρενεργικοί υποδοχείς  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) συνδέονται με μια  $G_q$  πρωτεΐνη και ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση Cβ, οι υποδοχείς  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) συνδέονται με μια  $G_{i/o}$  πρωτεΐνη και απενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση, ενώ οι β-αδρενοϋποδοχείς ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) συνδέονται με μια  $G_s$  πρωτεΐνη και ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (**Εικόνα 5.41**). Αυτό δείχνει ότι η δομή του υποδοχέα και κυρίως οι ενδοκυτταρικές του περιοχές, που αναγνωρίζουν τις G-πρωτεΐνες, καθορίζει εν μέρει την επιλογή των υπομονάδων των G-πρωτεϊνών.



**Εικόνα 5.41**

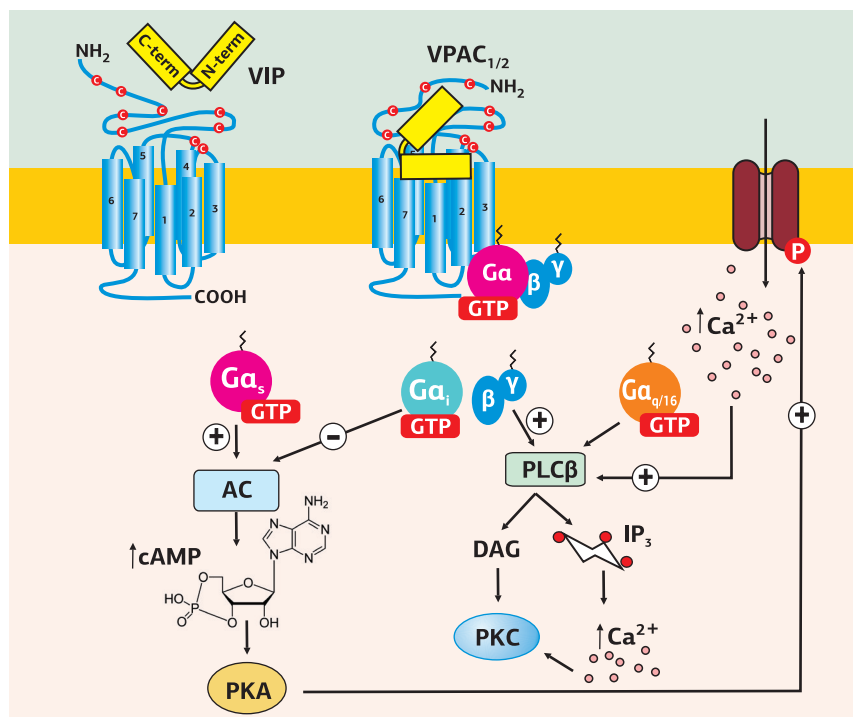
Υποδοχείς με δομική ομολογία, οι οποίοι ανήκουν σε μια συγκεκριμένη υποοικογένεια, εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς το είδος της G-πρωτεΐνης με την οποία συνδέονται. Τα μέλη της κάθε υποοικογένειας  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  και  $\beta$  των αδρενεργικών υποδοχέων εμφανίζουν μια μεγάλη ομολογία αλληλουχίας μεταξύ τους και συνδέονται με την ίδια G-πρωτεΐνη. Οι υποδοχείς της υποοικογένειας  $\alpha_1$  συνδέονται με την  $G_q$ , της  $\alpha_2$  με την  $G_i$ , και της υποοικογένειας  $\beta$  με την  $G_s$ .

Όμως, χάρη σε πειράματα που έγιναν για μία σειρά υποδοχέων, όπως ο 5HT<sub>1A</sub>, ο  $\alpha_2$ -αδρενεργικός και ο GABA<sub>B</sub>, οι οποίοι συνδέονται με την  $G_i$  υπομονάδα, διαπιστώθηκε η έλλειψη μίας κοινής αλληλουχίας αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης της G-πρωτεΐνης στον υποδοχέα. Επιπλέον, υπάρχουν υποδοχείς, οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν περισσότερες από μία οικογένειες G-πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας VPAC (VIP and PACAP receptor) όταν ενεργοποιηθεί από το πεπτίδιο VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) μπορεί να ενεργοποιήσει τις  $G_s$ ,  $G_i$  και  $G_{q/16}$ , με διαφορετική αποτελεσματικότητα (**Εικόνα 5.42**). Επομένως, ο τύπος του κυττάρου και η αφθονία των G-πρωτεϊνών σε διαφορετικά κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την εξειδίκευση ενός συγκεκριμένου τύπου υποδοχέα για την G-πρωτεΐνη.

Το δεύτερο επίπεδο εξειδίκευσης υπαγορεύεται από τους υποτύπους των G υπομονάδων, οι οποίοι καθορίζουν την εξειδίκευση G-πρωτεΐνης / τελεστή. Όπως είδαμε, η οικογένεια  $G_{q/11}$  ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση Cβ (PLCβ), ενώ οι  $G_s$  και  $G_i$  αναγνωρίζουν την αδενυλική κυκλάση (AC), αλλά συνδέονται σε διαφορετικές θέσεις σύνδεσης και την ενεργοποιούν ( $\alpha_s$ ) ή την απενεργοποιούν ( $\alpha_i$ ). Ωστόσο, η ακριβής εξειδίκευση των G-πρωτεϊνών για έναν τελεστή είναι δύσκολο να οριστεί λόγω της ύπαρξης πολλαπλών ισομορφών του κάθε τελεστή, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Για να χρησιμοποιήσουμε το παράδειγμα του υποδοχέα του VIP, ο οποίος μπορεί να συνδεθεί με διαφορετικούς τύπους Ga-υπομονάδων, στην περίπτωση της  $G_i$ , ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, μπορεί να αναστείλει μια αδενυλική κυκλάση ή να ενεργοποιήσει μια φωσφολιπάση Cβ. Επιπλέον, αν προσθέσει κανείς και τον

**Εικόνα 5.42**

Ο υποδοχέας VPAC μετά τη σύνδεση με το πεπτίδιο VIP, μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διαφορετικών G-πρωτεϊνών διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Κατά προτίμηση συνδέεται στην  $G_{\alpha_s}$  υπομονάδα οδηγώντας στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και την παραγωγή cAMP, το οποίο ενεργοποιεί την κινάση PKA. Επίσης, ο υποδοχέας VPAC μπορεί να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες  $G_{\alpha_i}$  και  $G_{\alpha_{q/16}}$  και να ενεργοποιήσει το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C (PLC), το οποίο οδηγεί στην αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  και την ενεργοποίηση της κινάσης PKC. Η Gi-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της PLC μεσολαβείται από τις  $G\beta\gamma$  υπομονάδες, ενώ η  $G_{\alpha_i}$  υπομονάδα μπορεί επίσης να απενεργοποιήσει την αδενυλική κυκλάση. [54]



ρόλο που παίζουν οι  $G\beta\gamma$ -υπομονάδες, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να ενεργοποιήσει ένας υποδοχέας ανάλογα με την εξειδίκευση των G-πρωτεϊνών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπου εκφράζονται διαφορετικές isoμορφές τελεστών (αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση C, κινάση PI3K κ.λπ.) περιπλέκονται.

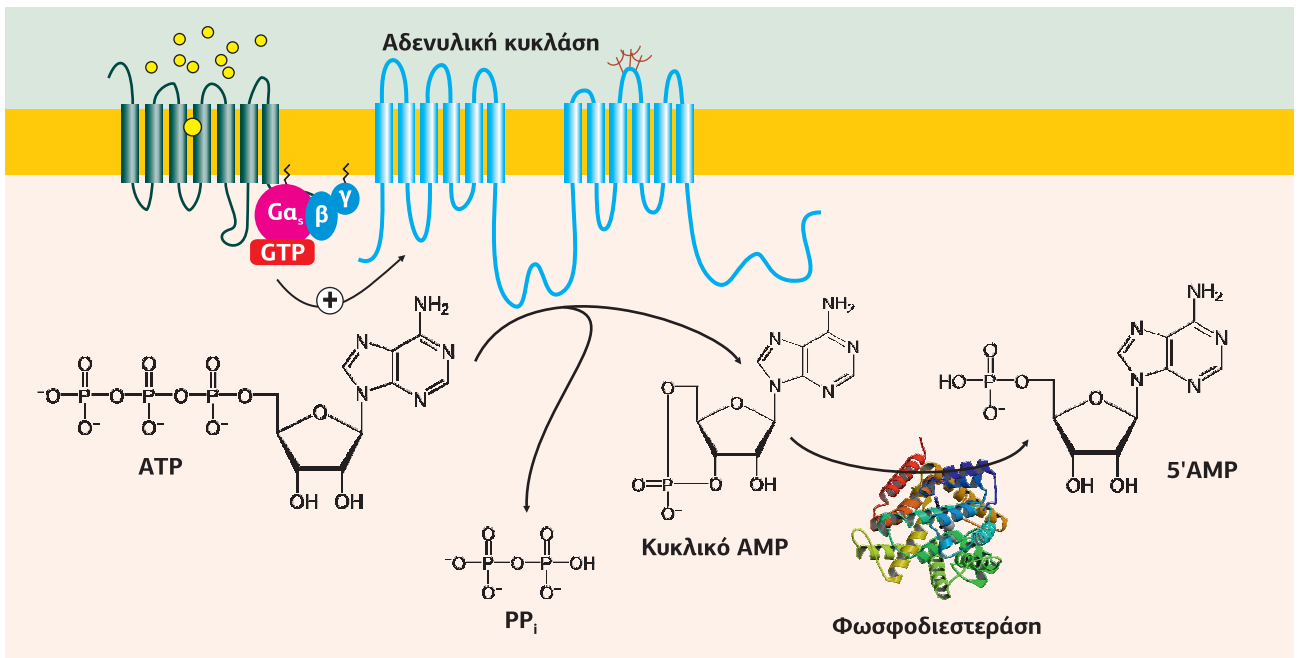
Στη συνέχεια, θα περιγράψουμε τους σημαντικότερους τελεστές των G-πρωτεϊνών, τους δεύτερους διαβιβαστές που παράγουν, τους κυριότερους στόχους τους, καθώς και ορισμένα από τα χαρακτηριστικότερα φυσιολογικά τους αποτελέσματα. Οι σημαντικότεροι τελεστές των G-πρωτεϊνών, τους οποίους θα αναλύσουμε είναι:

- Οι αδενυλικές κυκλάσες (ACs), οι οποίες παράγουν cAMP.
- Οι φωσφολιπάσες C (PLCs), οι οποίες υδρολύουν φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης της μεμβράνης και παράγουν διακυλογλυκερόλη (DAG) και τριφωσφορική(1,4,5) ινοσιτόλη ( $InsP_3$ ). Οι δεύτεροι αυτοί διαβιβαστές επάγουν την αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$ , που παίζει και αυτό σημαντικό ρόλο δεύτερου διαβιβαστή.
- Οι κινάσες των φωσφατιδυλοϊνοσιτιδίων (PI3Ks), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την 3' υδροξυλομάδα των φωσφατιδυλοϊνοσιτιδίων και παράγουν φωσφατιδυλο(3,4)διφωσφορική ινοσιτόλη ( $PIP_2$ ) και φωσφατιδυλο(3,4,5)τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $PIP_3$ ).
- Οι φωσφολιπάσες D και  $A_2$ , οι οποίες υδρολύουν τη φωσφατιδυλοχολίνη παράγοντας φωσφατιδικό οξύ και αραχιδονικό οξύ (πρόδρομος των εικοσανοειδών), αντίστοιχα.
- Οι σφιγγομυελινάσες, οι οποίες υδρολύουν τη σφιγγομυελίνη σε κεραμίδια.

### 3. Αδενυλική κυκλάση και cAMP

Ανάμεσα στα ένζυμα τελεστές των G-πρωτεϊνών, οι αδενυλικές κυκλάσες (ACs) ήταν οι πρώτες που ανακαλύφθηκαν. Εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, όπου έχουν έναν κοινό ρόλο: τη μετατροπή του ATP σε κυκλικό AMP (cAMP), το οποίο δρα στη συνέχεια ως δεύτερος διαβιβαστής. Το cAMP που παραμένει αδέσμευτο, ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα, καταστρέφεται γρήγορα από τις φωσφοδιεστεράσες του cAMP (cAMP-PDEs), ένζυμα που υδρολύουν το cAMP (κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη) σε 5' AMP (5' μονοφωσφορική αδενοσίνη) (Εικόνα 5.43).





### 3.1 Η δομή της αδενυλικής κυκλάσης

Μετά την κλωνοποίηση της πρώτης ισομορφής αδενυλικής κυκλάσης AC1 το 1989, έχουν απομονωθεί και κλωνοποιηθεί στα θηλαστικά οκτώ ισομορφές αδενυλικής κυκλάσης (AC2-AC9), οι οποίες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου σχηματίζουν σηματοδοτικά σύμπλοκα με G-πρωτεΐνες, υποδοχείς και κανάλια ιόντων, και μία διαλυτή ισομορφή (AC10), η οποία ανακαλύφθηκε το 1975 στα σπερματοζώαρια με διακριτές καταλυτικές και ρυθμιστικές ιδιότητες.

Οι μεμβρανικές αδενυλικές κυκλάσες είναι γλυκοπρωτεΐνες μοριακού βάρους 120-150 kDa, με μεγάλη ομολογία (40-60%) στις αλληλουχίες τους. Αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές M1 και M2, η καθεμία από τις οποίες είναι οργανωμένη σε 6 υδρόφοβες α-έλικες συνδεδεμένες μεταξύ τους με τρεις εξωκυτταρικούς και δύο ενδοκυτταρικούς βρόχους. Οι M1 και M2 περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με έναν μεγάλο ενδοκυτταρικό βρόχο 40 kDa, ο οποίος ονομάζεται C1. Το NH<sub>2</sub>-τελικό και το COOH-τελικό άκρο (ονομάζεται C2) της πρωτεΐνης βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Οι περιοχές C<sub>1</sub> και C<sub>2</sub> χωρίζονται σε υποπεριοχές C<sub>1a</sub>/C<sub>1b</sub> και C<sub>2a</sub>/C<sub>2b</sub> (Εικόνα 5.44A).

Η περιοχή C<sub>1a</sub> βρίσκεται σε επαφή με την C<sub>2a</sub> δημιουργώντας δύο υψηλά συντηρημένους θύλακες, στον ένα συνδέεται το ATP και είναι το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενώ στον άλλο συνδέεται η διεγερτική ουσία φορσκολίνη. Η θέση σύνδεσης της Gα<sub>s</sub> απέχει περίπου 3 nm από το ενεργό κέντρο και έχει εντοπιστεί σε ένα τμήμα της C<sub>2a</sub>, που αποτελείται από μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια και μια υδρόφοβη “σπηλιά” (Εικόνα 5.44B).

Παρόλο που οι θέσεις σύνδεσης των Gα<sub>i/o</sub>-υπομονάδων δεν έχουν πλήρως προσδιοριστεί, δεν συναγωνίζονται με την Gα<sub>s</sub> καθώς φαίνεται να συνδέονται σε τμήματα της C<sub>1</sub> και πολύ πιο κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρότι το ATP, η φορσκολίνη και η Gα<sub>s</sub> συνδέονται σε κατάλοιπα τόσο της C<sub>1a</sub> όσο και της C<sub>2a</sub>, οι βγ-υπομονάδες ρυθμίζουν τη δράση της αδενυλικής κυκλάσης αλληλεπιδρώντας με το NH<sub>2</sub>-τελικό της άκρο. Αυτό προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση που έμμεσα οδηγεί στην τροποποίηση της διαμόρφωσης της υποπεριοχής C<sub>2a</sub> και, συνεπώς, έμμεσα προάγει την ευνοϊκότερη ευθυγράμμιση της καταλυτικής θέσης.

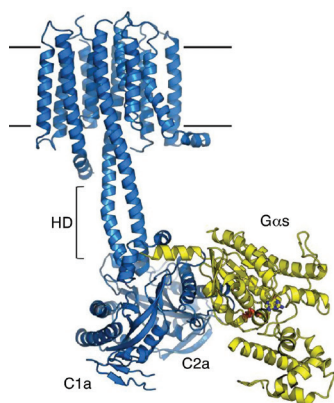
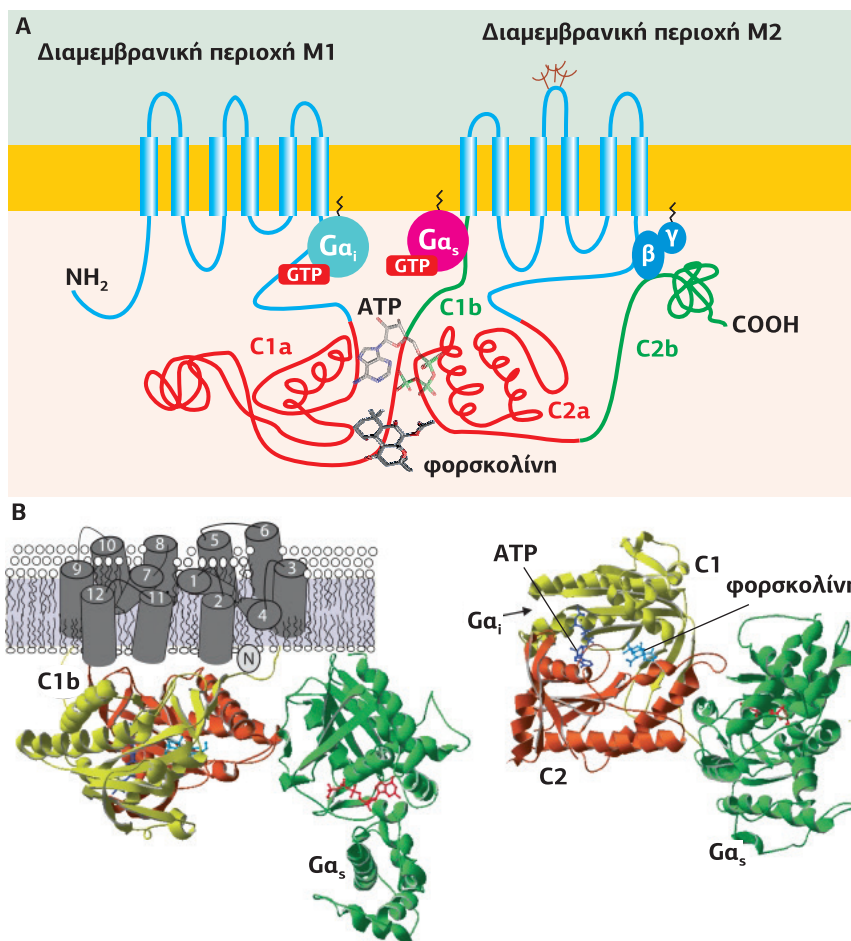
**Εικόνα 5.43**

Η αδενυλική κυκλάση μετατρέπει το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) σε cAMP (κυκλική 3',5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη), το οποίο γρήγορα υδρολύεται από τις φωσφοδιεστεράσες σε 5'AMP (5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη).

**Εικόνα 5.44**

A. Σχηματική αναπαράσταση της δομής της αδενυλικής κυκλάσης. Διακρίνονται οι δύο διαμεμβρανικές περιοχές των 6 α-ελίκων (M1 και M2), ο μεγάλος ενδοκυτταρικός βρόχος C1 που συνδέει τις M1 και M2, το μικρό NH<sub>2</sub>-τελικό κυτταροπλασματικό άκρο και το COOH-άκρο με τις C2a και C2b υποπεριοχές του. Διακρίνονται, επίσης, οι θύλακες σύνδεσης του ATP και της φορσκολίνης και η θέση γλυκοσυλίωσης στον 2ο εξωκυτταρικό βρόχο της M2 περιοχής. [102] [73]

B. Αναπαράσταση της δομής της αδενυλικής κυκλάσης, όπου διακρίνεται η κρυσταλλική δομή των C1 (με κίτρινο) και C2 (με κόκκινο) περιοχών. Επίσης, διακρίνεται με πράσινο η Gα<sub>s</sub> υπομονάδα. Οι υποπεριοχές C1a και C2a είναι ομόλογες και δημιουργούν ένα " ενδομοριακό" ψευδοδιμερές που αποτελεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου συνδέεται το ATP και η φορσκολίνη. Η θέση σύνδεσης της Gα<sub>s</sub> διαφέρει από τη θέση σύνδεσης της Gα<sub>i</sub>. [80]



Κρυσταλλική δομή AC9/Gα<sub>s</sub>. Από Khannanavar B, Mehta V, Qi C, Korkhov V. Structure and function of adenylyl cyclases, key enzymes in cellular signaling. *Curr Opin Struct Biol.* 2020; 63: 34-41.

Παρόλο που οι περιοχές M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> "αγκυροβολούν" το ένζυμο στη μεμβράνη, θα μπορούσε να φανταστεί κανείς ότι γι' αυτόν τον σκοπό θα αρκούσαν μία ή δύο διαμεμβρανικές περιοχές και είναι εύλογο να αναρωτηθούμε γιατί αυτά τα ένζυμα έχουν δώδεκα. Η απάντηση πιθανώς προέρχεται από τη γενεαλογική τους εξέλιξη. Η γενική μεμβρανική τοπολογία των κυκλασών των θηλαστικών και συγκεκριμένα οι δύο ομάδες των έξι διαμεμβρανικών περιοχών εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με γνωστές δομές καναλιών, όπως είναι ο διαμεμβρανικός ρυθμιστής της αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης (CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Ωστόσο, δεν έχει ανιχνευτεί δράση καναλιού ιόντων για καμία από τις αδενυλικές κυκλάσες των θηλαστικών και ούτε παρουσιάζουν ομοιότητα αλληλουχίας με κανένα από τα γνωστά κανάλια.

### 3.2 | Οι διάφορες ισομορφές των αδενυλικών κυκλασών

Όπως είδαμε, έχουν βρεθεί 9 ισομορφές διαμεμβρανικών αδενυλικών κυκλασών (AC1-AC9) στα θηλαστικά. Όλες ενεργοποιούνται από τις Gα<sub>s</sub>-υπομονάδες, παρόλο που διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους σε άλλα σήματα, όπως η σηματοδότηση από Gα<sub>i</sub>- και Gβγ-υπομονάδες ή ιόντα Ca<sup>2+</sup> (σε σύμπλοκο ή όχι με την καλμοδουλίνη).

Ανάλογα με τον τρόπο ρύθμισής τους και την εξειδικευμένη κατανομή τους σε ιστούς και όργανα, οι αδενυλικές κυκλάσες κατατάσσονται σε 4 ομάδες:

- Στην Ομάδα 1 ανήκουν οι AC1, AC3, AC8, οι οποίες ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης, ενώ αναστέλλονται από τις Gα<sub>i</sub> και Gβγ-υπομονάδες. Οι AC1 και AC8 εκφράζονται κυρίως στον εγκέφαλο, όπου

**Πίνακας 5.2**

Οι 9 ισομορφές των διαμεμβρανικών αδενυλικών κυκλασών και ο τρόπος ρύθμισής τους από τις G-υπομονάδες καθώς και από τα ιόντα Ca<sup>2+</sup>, σε σύμπλοκο ή όχι με την καλμοδουλίνη.

	Gα <sub>s</sub>	Gβγ	Gα <sub>i</sub>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> /CaM	CaMK	PKC	PKA
AC1	+	-	-	0	+	-	+	0
AC3	+	-	-	0	+	-	+	0
AC8	+	-	-	0	+	-	0	0
AC2	+	+	0	0	0	-	+	0
AC4	+	+	0	0	0	-	-	0
AC7	+	+	0	0	0	-	+	0
AC5	+	0	-	-	0	-	+	-
AC6	+	0	-	-	0	-	+	-
AC9	+	0	-	0	0	+	-	0

παίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης, και η AC3 εκφράζεται στο οσφρητικό επιθήλιο, όπου συμμετέχει στη διαδικασία της όσφρησης.

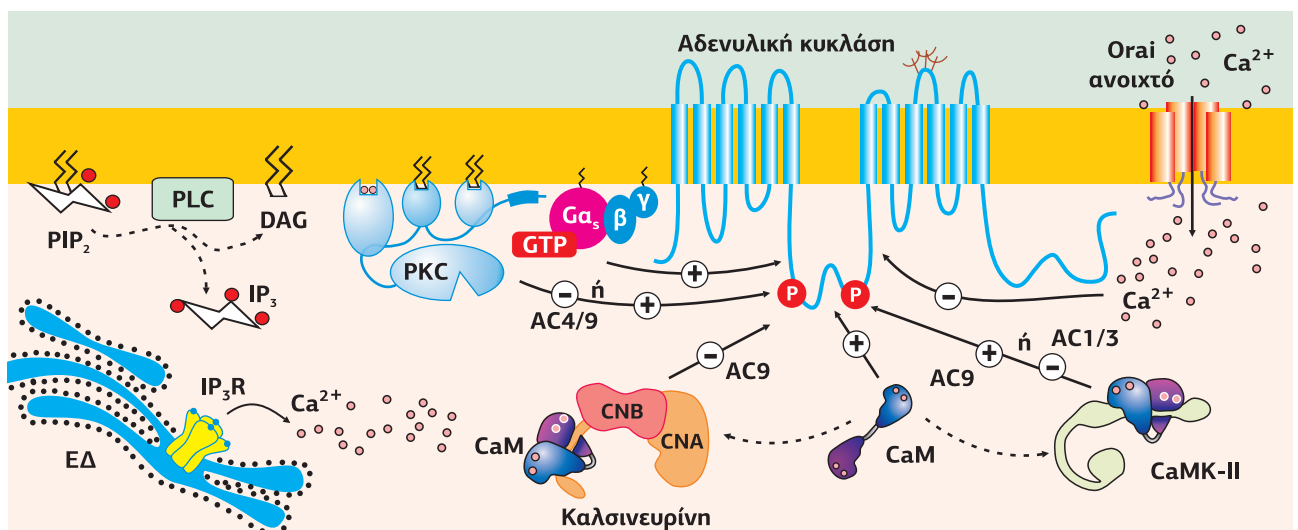
- Στην Ομάδα 2 ανήκουν οι AC2, AC4, AC7, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις Gβγ-υπομονάδες.
- Στην Ομάδα 3 ανήκουν οι AC5 και AC6, οι οποίες αναστέλλονται από την Gα<sub>i</sub>-υπομονάδα και τα ιόντα Ca<sup>2+</sup>. Οι AC5 και AC6 εκφράζονται κυρίως στην καρδιά.
- Στην Ομάδα 4 ανήκει η AC9, η οποία χαρακτηρίζεται ως ξεχωριστή άτυπη ισομορφή με περιορισμένη έκφραση.

Το Ca<sup>2+</sup> μπορεί άμεσα ή έμμεσα να ρυθμίσει τις αδενυλικές κυκλάσες. Η άμεση σύνδεση των ιόντων Ca<sup>2+</sup> (σε συγκεντρώσεις 0,1-1 μmol/l, οι οποίες επιτυγχάνονται μετά την ενεργοποίηση υποδοχών που κινητοποιούν το Ca<sup>2+</sup>) στην καταλυτική περιοχή των ισομορφών AC5 και AC6 αναστέλλει τη δράση τους, ενώ η έμμεση σύνδεση μέσω του συμπλόκου Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης, το οποίο συνδέεται στην υποπεριοχή C1b, ενεργοποιεί τις ισομορφές AC1, AC3 και AC8. Επιπλέον, το Ca<sup>2+</sup> μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των αδενυλικών κυκλασών α. μέσω της Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης εξαρτώμενης κινάσης CaMK-II, η οποία ενεργοποιεί την AC9, ενώ αναστέλλει τις AC1 και AC3, β. μέσω της Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης εξαρτώμενης φωσφατάσης καλσινευρίνης, η οποία αναστέλλει την AC9, και γ. μέσω της κινάσης

**Εικόνα 5.45**

**Άμεση και έμμεση ρύθμιση της δραστηριότητας των αδενυλικών κυκλασών από τα ιόντα Ca<sup>2+</sup>.**

Η άμεση σύνδεση των ιόντων Ca<sup>2+</sup> στις ισομορφές AC5 και AC6 αναστέλλει τη δράση τους, ενώ έμμεσα μέσω του συμπλόκου Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης το Ca<sup>2+</sup> ενεργοποιεί τις ισομορφές AC1, AC3 και AC8, μέσω της κινάσης CaMK-II ενεργοποιεί την AC9, μέσω της καλσινευρίνης (CaN) την αναστέλλει και, τέλος, μέσω της κινάσης PKC ενεργοποιεί όλες τις ισομορφές AC εκτός από τις AC4 και 9, τις οποίες αναστέλλει, ενώ στην AC8 δεν έχει αναφερθεί κάποια δράση. [37]



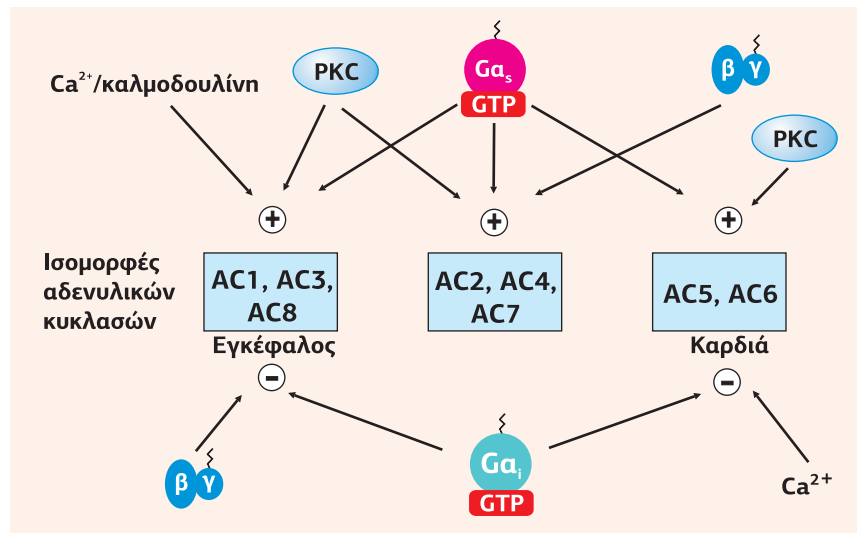
PKC, η οποία ενεργοποιεί τις AC1, AC2, AC3, AC5, AC6 και AC7, ενώ αναστέλλει τις AC4 και AC9. Τέλος, η PKA χρησιμεύει ως αναστολέας ανατροφοδότησης για τις AC5 και AC6, φωσφορυλιώνοντας αυτές τις ισομορφές σε ένα κατάλοιπο Ser στο τέλος της C1b περιοχής (Εικόνα 5.45).

Οι διαφορές στον τρόπο ρύθμισης της κάθε ισομορφής αδενυλικής κυκλάσης έχουν σημαντικό φυσιολογικό αντίκτυπο. Για παράδειγμα, οι ισομορφές AC5 και AC6, οι οποίες εκφράζονται κυρίως στα καρδιομυοκύτταρα, ενεργοποιούνται μέσω του  $G_{\alpha_s}$  μονοπατιού από την αδρεναλίνη (διαβιβαστής του συμπαθητικού συστήματος) και αναστέλλονται μέσω του  $G_{\alpha_{i/o}}$  μονοπατιού από την ακετυλοχολίνη (διαβιβαστής του παρασυμπαθητικού). Ως αποτέλεσμα, η δραστηριότητα της καρδιάς είτε επιταχύνεται είτε επιβραδύνεται. Επιπλέον, η είσοδος του  $Ca^{2+}$  που συνοδεύει τη σύσπαση των καρδιακών μυοκυττάρων αναστέλλει τις AC5 και AC6, προκαλώντας ένα αρνητικό ανάδρομο αποτέλεσμα.

Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα τα ιόντα  $Ca^{2+}$  ελέγχουν κυτταρικές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων η μνήμη και η μάθηση. Οι κυρίαρχες αδενυλικές κυκλάσες στους νευρώνες του εγκεφάλου είναι οι AC1 και AC8, οι οποίες ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνης, και η AC9, η οποία αναστέλλεται από την  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλινο-εξαρτώμενη φωσφατάση καλσινευρίνη. Αυτές οι αδενυλικές κυκλάσες εκφράζονται έντονα κατά τη διαδικασία της εκμάθησης, μεσολαβώντας στην  $Ca^{2+}$ - και cAMP-εξαρτώμενη έκφραση γονιδίων, που απαιτείται για τη δημιουργία νέων συνάψεων. Knock-out AC1<sup>(-/-)</sup> ποντίκια που δημιουργήθηκαν το 1995, ενώ εμφανίζουν φυσιολογική ανάπτυξη και μορφολογία, παρουσιάζουν δυσκολία στην αποθήκευση της χωρικής μνήμης. Διπλά knock-out AC1<sup>(-/-)</sup> και AC8<sup>(-/-)</sup> χάνουν τελείως τη δυνατότητα παραγωγής LTP (μακρόχρονης ενδυνάμωσης), υπεύθυνης για τη δημιουργία νέων συνάψεων.

Στους νευρώνες, καθώς και στα καρδιομυοκύτταρα, οι  $Ca^{2+}$ -ευαίσθητες αδενυλικές κυκλάσες βρίσκονται σε στενή επαφή με τασσο- και προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια, όπως τα L-τύπου κανάλια  $Ca^{2+}$  και οι NMDA υποδοχείς, εξασφαλίζοντας μια γρήγορη αλληλεπίδραση.

**Εικόνα 5.46**  
 Η αδενυλική κυκλάση ανάλογα με την ισομορφή της μπορεί να ενεργοποιηθεί ή να απενεργοποιηθεί από ξεχωριστούς τύπους  $G_{\alpha}$ -υπομονάδων, από τις υπομονάδες  $G_{\beta\gamma}$ , από το  $Ca^{2+}$  και το σύμπλοκο  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνη, ακόμη και από κινάσες (PKC). [50]



### 3.3

#### Ο ρόλος της φορσκολίνης στη δράση της αδενυλικής κυκλάσης

Αντίθετα με άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, σχεδόν καμία από τις ναρκωτικές ουσίες και ελάχιστα δηλητήρια επιδρούν άμεσα στις αδενυλικές κυκλάσες. Μια εξαίρεση αποτελεί το διτερπένιο φορσκολίνη, που εξαγεται από τις ρίζες ενός ινδι-

κού φυτού του *Coleus forskohlii*, ευρέως διαδεδομένο στην Ινδία για τη θεραπεία καρδιακών και αναπνευστικών παθήσεων, καθώς και για την αϋπνία και τους σπασμούς.

Η φορσκολίνη υπερενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, αυξάνοντας την παραγωγή του cAMP έως και 10 φορές πάνω από τη φυσιολογική συγκέντρωσή του στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα ένας νευροδιαβιβαστής ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση μέσω του υποδοχέα του και της πρωτεΐνης  $G_s$ , μπορεί να αυξήσει την παραγωγή του cAMP έως δύο φορές maximum.



*Coleus forskohlii*

### 3.4 | Οι φωσφοδιεστεράσες του cAMP “σβήνουν” το σήμα

Η αποτελεσματικότητα της σηματοδοτικής διαδικασίας εξαρτάται άμεσα από την εξάλειψη του σήματος. Η δημιουργία σήματος και η εξάλειψή του είναι ισοδύναμα γεγονότα, καθώς και τα δύο ελέγχονται από σήματα εισόδου. Η λήξη της σηματοδότησης του cAMP (και του cGMP) επιτυγχάνεται από τις φωσφοδιεστεράσες, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση κυκλικών νουκλεοτιδίων.

Στα κύτταρα των θηλαστικών οι φωσφοδιεστεράσες κωδικοποιούνται από τουλάχιστον 21 γονίδια, ενώ από το εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να παραχθούν περισσότερα από 50 μετάγραφα. Τα ισοένζυμα αυτά κατηγοριοποιούνται σε 11 υποοικογένειες με βάση την ομολογία της αμινοξικής τους αλληλουχίας, την έκφρασή τους σε διάφορους ιστούς και την εξειδίκευσή τους σε διαφορετικά υποστρώματα. Οι φωσφοδιεστεράσες PDE1, 2, 3, 10 και 11 είναι διπλής εξειδίκευσης, υδρολύουν γενικά κυκλικά νουκλεοτίδια (αδενίνης και γουανίνης), οι PDE4, 7 και 8 υδρολύουν εξειδικευμένα cAMP, ενώ οι PDE5, 6 και PDE9 είναι εξειδικευμένες ως προς την υδρόλυση του cGMP. Το γεγονός ότι υπάρχουν περισσότερες φωσφοδιεστεράσες από ό,τι κυκλάσες υπογραμμίζει την έντονη σημασία τους στη σηματοδότηση.

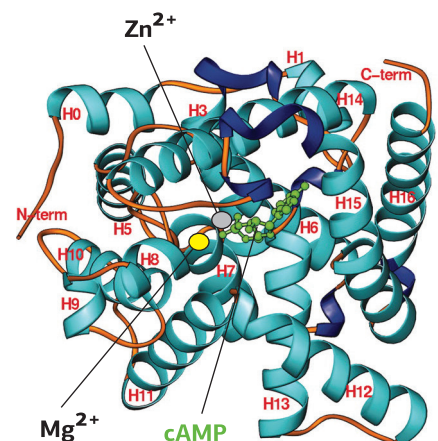
Οι φωσφοδιεστεράσες αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η κάθε υπομονάδα περιέχει: α. μία καταλυτική περιοχή 300 αμινοξέων, κοινή και καλά συντηρημένη σε όλες τις ισομορφές, που διαθέτει, εκτός από τη θέση σύνδεσης του cAMP ή cGMP, δύο θέσεις σύνδεσης μεταλλικών δισθενών κατιόντων ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), και β. ένα μεγάλο  $NH_2$ -τελικό άκρο, το οποίο παίζει τον ρόλο ρυθμιστικής περιοχής, η οποία σε αντίθεση με την καταλυτική περιοχή εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με τη μεγάλη ποικιλία των σημάτων εισόδου (Εικόνα 5.47 και βλ. σσ. 370-371).

Οι φωσφοδιεστεράσες ρυθμίζονται τόσο αυστηρά όσο οι κυκλάσες. Όπως και οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι φωσφοδιεστεράσες σε κατάσταση ηρεμίας, απουσία σήματος, βρίσκονται σε κατάσταση αυτοαναστολής, καθώς μία αλληλουχία αναστολέας μπλοκάρει το καταλυτικό τους κέντρο. Αυτή η αλληλουχία μπορεί να αποτελεί μέρος του ενζύμου ή μπορεί να είναι ξεχωριστή υπομονάδα.

Τα σήματα που ενεργοποιούν τις φωσφοδιεστεράσες υπερνικούν την αυτοαναστολή επάγοντας μία αλλοστερική αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης. Εκτός από την PDE6, η οποία βρίσκεται στον αμφιβληστροειδή και ενεργοποιείται από την ετεροτριμερή G-πρωτεΐνη τρανσδουσίνη, τα σήματα που ενεργοποιούν τις φωσφοδιεστεράσες είναι τα ιόντα  $Ca^{2+}$ , το cGMP και η φωσφορυλίωση. Για παράδειγμα, οι φωσφοδιεστεράσες της υποοικογένειας PDE1 (που υδρολύουν cAMP και cGMP) διεγείρονται από  $Ca^{2+}$ -καλμοδουλίνη, συνδέοντας με αυτόν τον τρόπο τα  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια με αυτά που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια.

Οι φωσφοδιεστεράσες της υποοικογένειας PDE2, οι οποίες υδρολύουν και τα δύο κυκλικά νουκλεοτίδια, ενεργοποιούνται αλλοστερικά από το cGMP. Η αλλοστερική θέση σύνδεσης cGMP στη ρυθμιστική περιοχή είναι γνωστή ως περιοχή GAF (βλ. Εικόνα 5.54) και είναι διαφορετική από τη θέση σύνδεσης cGMP στο καταλυτικό κέντρο της PDE2. Η PDE2 παίζει

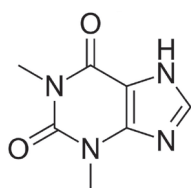
**Εικόνα 5.47**  
Κρυσταλλική δομή της καταλυτικής περιοχής της PDE10. Διακρίνονται ένα ιόν  $Zn^{2+}$  (ως γκρι σφαίρα), ένα ιόν  $Mg^{2+}$  (ως κίτρινη σφαίρα) και το cAMP με πράσινο. [98]



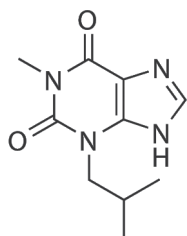
σημαντικό ρόλο στην ορμονική ρύθμιση του όγκου και της πίεσης του αίματος. Στον φλοιό των επινεφριδίων η φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (ACTH) ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση μέσω ενός υποδοχέα που συνδέεται με  $G_{\alpha_s}$ -πρωτεΐνη και το cAMP που παράγεται προάγει με τη σειρά του την παραγωγή και απελευθέρωση της αλδοστερόνης. Η αλδοστερόνη δρα στα νεφρά προκαλώντας αύξηση στον όγκο και στην πίεση του αίματος. Αυτά τα αποτελέσματα αντισταθμίζονται από το νατριουρητικό πεπτίδιο ANP, που απελευθερώνεται από τα κύτταρα των κόλπων της καρδιάς και συνδέεται στον υποδοχέα του, στον φλοιό των επινεφριδίων. Ο υποδοχέας του ANP είναι η γουανυλική κυκλάση GC-A που παράγει cGMP, το οποίο ενεργοποιεί την PDE2. Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα του cAMP στα κύτταρα των επινεφριδίων μειώνονται και η απελευθέρωση αλδοστερόνης σταματά.

Τα ένζυμα της υποοικογένειας **PDE3** και **PDE4** είναι ευρέως κατανεμημένα. Όντας στόχοι πολυάριθμων φαρμακευτικών ουσιών με καρδιοτονωτική, αγγειοδιασταλτική και θρομβολυτική δράση, έχουν ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον. Οι PDE3 και PDE4 ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση, η οποία καταλύεται από την cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Μέσω αυτού του μηχανισμού αναστέλλουν μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης τα μονοπάτια που ελέγχονται από το cAMP, όπως η γλυκογονόλυση και η λιπόλυση. Μία άλλη πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιεί την PDE3 είναι η PKB/Akt. Αυτό το ένζυμο είναι ένα συστατικό των σηματοδοτικών μονοπατιών που διεγείρονται από την ινσουλίνη, τη λεπτίνη και άλλες ορμόνες. Σε αντίθεση με την PDE2, η PDE3 αναστέλλεται, παρά διεγείρεται από το cGMP (βλ. σσ. 371-72 και **Εικόνα 6.30**).

Δυσλειτουργία των φωσφοδιεστερασών συνδέεται με το άσθμα, τη στυτική δυσλειτουργία, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease), αυτοάνοσα νοσήματα, υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, σχιζοφρένεια και κατάθλιψη. Γι' αυτό οι αναστολείς των PDEs έχουν μεγάλη κλινική χρήση. Με εξαίρεση τις PDE8 και PDE9, όλες οι ισομορφές των φωσφοδιεστερασών αναστέλλονται συναγωνιστικά από μεθυλοξανθίνες, όπως η καφεΐνη, η θεοφυλλίνη και η ισοβουτυλομεθυλοξανθίνη (IBMX).



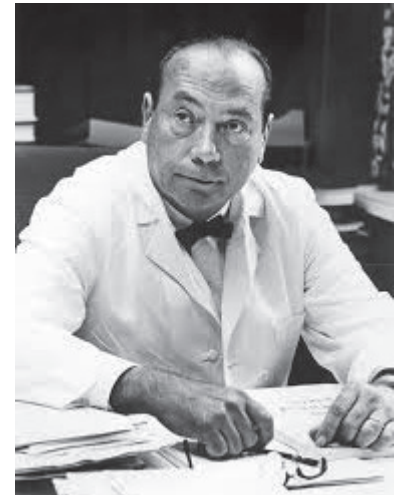
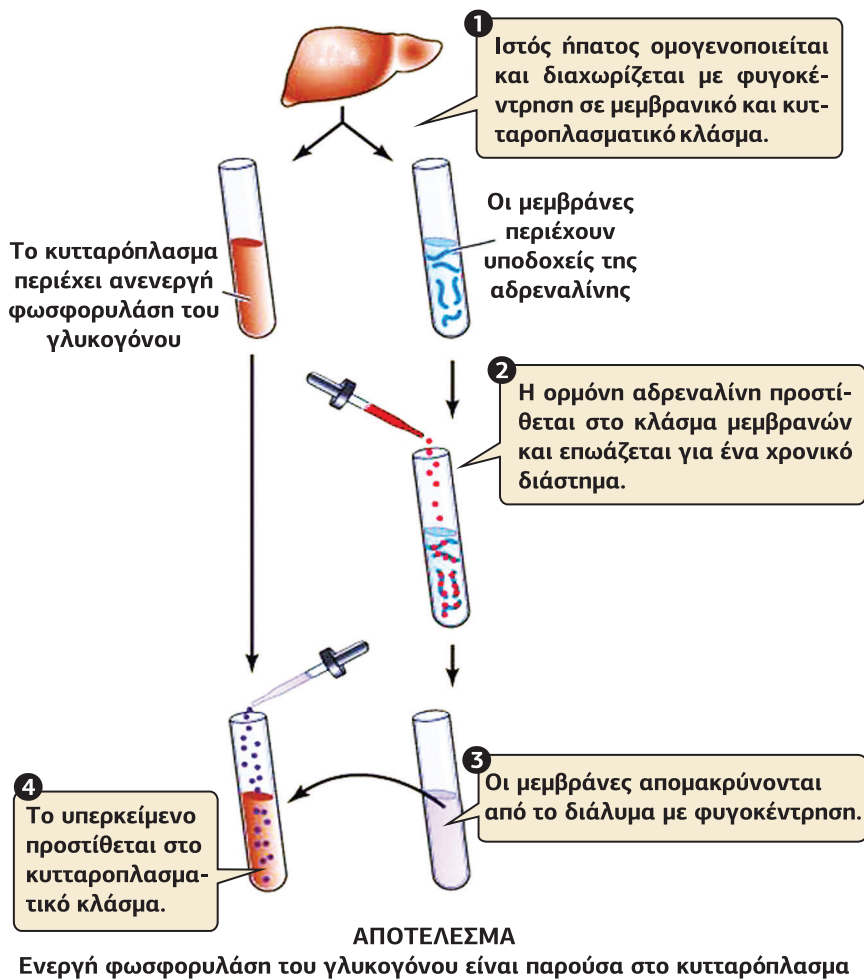
Θεοφυλλίνη



IBMX

### 3.5 | Το cAMP, ο πρώτος δεύτερος διαβιβαστής

Μελετώντας τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ο Earl Sutherland το 1956 ανακάλυψε ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να ενεργοποιηθεί από την αδρεναλίνη σε άθικτα ηπατικά κύτταρα (χρησιμοποιούσε λεπτές φέτες ηπατικού ιστού). Καθώς η αδρεναλίνη συνδέεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς και η φωσφορυλάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, υπέθεσε ότι ένας κυτταροπλασματικός παράγοντας μεταδίδει το μήνυμα από τον υποδοχέα της αδρεναλίνης στη φωσφορυλάση. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης ομογενοποιήθηκε ιστός ήπατος και διαχωρίστηκε στα μεμβρανικά και τα κυτταροπλασματικά συστατικά του, που περιέχουν τους υποδοχείς της αδρεναλίνης και το ένζυμο, αντίστοιχα. Προστέθηκε αδρεναλίνη στο κλάσμα των μεμβρανών και επωάστηκε για ένα χρονικό διάστημα. Το μεμβρανικό κλάσμα φυγοκεντρήθηκε, το ίζημα με τις μεμβράνες απομακρύνθηκε, ενώ το υπερκείμενο προστέθηκε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, το οποίο στη συνέχεια αναλύθηκε για τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης. Η ανάλυση έδειξε ότι το κυτταροπλασματικό κλάσμα περιείχε ενεργή φωσφορυλάση. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι ως απόκριση στη σύνδεση της αδρεναλίνης με τον υποδοχέα της παράγεται ένας διαλυτός δεύτερος διαβιβαστής, ο οποίος διαχέεται στο κυτταρόπλασμα για να ενεργοποιήσει το ένζυμο (**Εικόνα 5.48**). Αργότερα, ο Sutherland προσδιόρισε το cAMP ως τον δεύτερο αγγελιοφόρο και το 1971 του απονεμήθηκε το Βραβείο Nobel Ιατρικής για τις ανακαλύψεις του σχετικά με “τους μηχανισμούς δράσης ορμονών”. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στο ερώτημα του πώς η δέσμευση της ορμόνης οδηγεί στον σχηματισμό του cAMP στο κύτταρο. Πρόσθετες μελέτες αποκάλυψαν ότι το cAMP σχηματίζεται από το ATP μέσω της δράσης ενός ενζύμου που ονομάζεται αδενυλική κυκλάση.



Earl Sutherland (1915 – 1974)  
Αμερικάνος φαρμακολόγος και βιοχημικός (Βραβείο Nobel 1971)

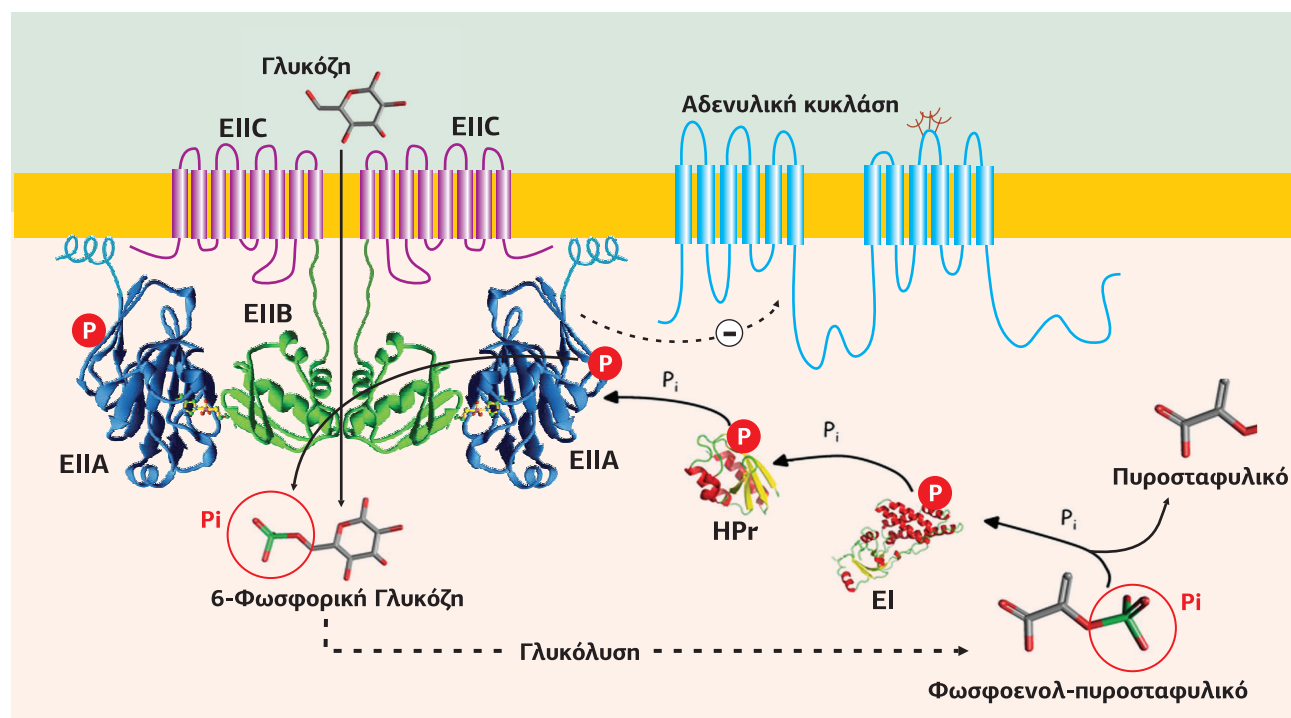
#### Εικόνα 5.48

Το πείραμα του Sutherland, το 1957, με το οποίο ανακαλύφθηκε ότι η ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως αποτέλεσμα της δράσης της αδρεναλίνης στο συκώτι, μεσολαβείται από έναν διαλυτό κυτταροπλασματικό παράγοντα, που παίζει τον ρόλο δεύτερου διαβιβαστή. Ο παράγοντας αυτός αποδείχθηκε στη συνέχεια ότι είναι το cAMP.

#### Το cAMP στη διάρκεια της εξέλιξης

Το cAMP βρίσκεται και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, αρχαία και ευβακτήρια. Αν και οι λειτουργίες του ως ρυθμιστής είναι τελείως διαφορετικές στους προκαρυώτες από ό,τι στους ευκαρυώτες, σε γενικές γραμμές το cAMP παράγεται ως αποτέλεσμα της έλλειψης γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρύθμιση της παραγωγής του cAMP από τη διαθεσιμότητα ή μη της γλυκόζης στο βακτήριο *Escherichia coli*. Εάν τα *E. coli* αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη και λακτόζη, θα χρησιμοποιήσουν ως πρωταρχική πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και στη συνέχεια τη λακτόζη. Όταν λοιπόν η γλυκόζη είναι διαθέσιμη, εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όπου φωσφορυλιώνεται μέσω ενός ενζυμικού συστήματος φωσφομεταφοράς, που χρησιμοποιεί ως αρχικό δότη της φωσφορικής ομάδας το φωσφοενολ-πυροσταφυλικό (PEP). Η φωσφορική ομάδα του PEP μεταφέρεται μέσω των διαλυτών ενζύμων EI και HPI στο ενζυμικό σύμπλοκο EII, του οποίου οι υπομονάδες EIIB και EIIC δρουν ως περμεάσες, ενώ η EIIA μεταφέρει τη φωσφορική ομάδα που δέχεται στην EIIB και από εκεί στη γλυκόζη. Στη συνέχεια, η 6-φωσφορική γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης μετατρέπεται σε PEP, που αποτελεί πλούσια πηγή ενέργειας για το βακτήριο. Όσο υπάρχει διαθέσιμη γλυκόζη στο κυτταρόπλασμα, το ένζυμο EIIA βρίσκεται στη μη φωσφορυλιωμένη του μορφή, καθώς υπάρχει διαθέσιμο υπόστρωμα (η γλυκόζη) στο οποίο μεταφέρει τη φωσφορική ομάδα (Εικόνα 5.49). Το EIIA στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή του αφενός δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την αδενυλική κυκλάση -και ως εκ τούτου η συγκέντρωση του cAMP είναι μειωμένη- και, αφετέρου, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης αναστέλλει την περμεάση της λακτόζης



Εικόνα 5.49

**Έλεγχος της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης από τη διαθεσιμότητα γλυκόζης μέσω ενός συστήματος φωσφομεταφοράς στο βακτήριο *Escherichia coli*.** Τα ένζυμα IIA, IIB, και HPr αποτελούν το σύστημα φωσφομεταφοράς.

Όταν η γλυκόζη είναι διαθέσιμη, εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί φωσφορυλιώνεται μέσω ενός συστήματος φωσφομεταφοράς με αρχικό δότη τη φωσφορική ομάδα του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού (PEP). Η φωσφορική ομάδα του PEP μεταφέρεται μέσω των διαλυτών ενζύμων EI και HPr στο ενζυμικό σύμπλοκο EII, του οποίου οι υπομονάδες EIIB και EIIIC δρουν ως περμεάσες, ενώ η EIIA μεταφέρει τη φωσφορική ομάδα που δέχεται στην EIIB και από εκεί στη γλυκόζη. Στη συνέχεια, η φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε PEP. Όσο η γλυκόζη είναι παρούσα, το ένζυμο EIIA βρίσκεται στη μη φωσφορυλιωμένη του μορφή, καθώς η γλυκόζη αποτελεί το υπόστρωμα και συνεπώς τον δέκτη της φωσφορικής ομάδας που μεταφέρει το EIIA. Το μη φωσφορυλιωμένο EIIA δεν έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιήσει την αδενυλική κυκλάση. [21]

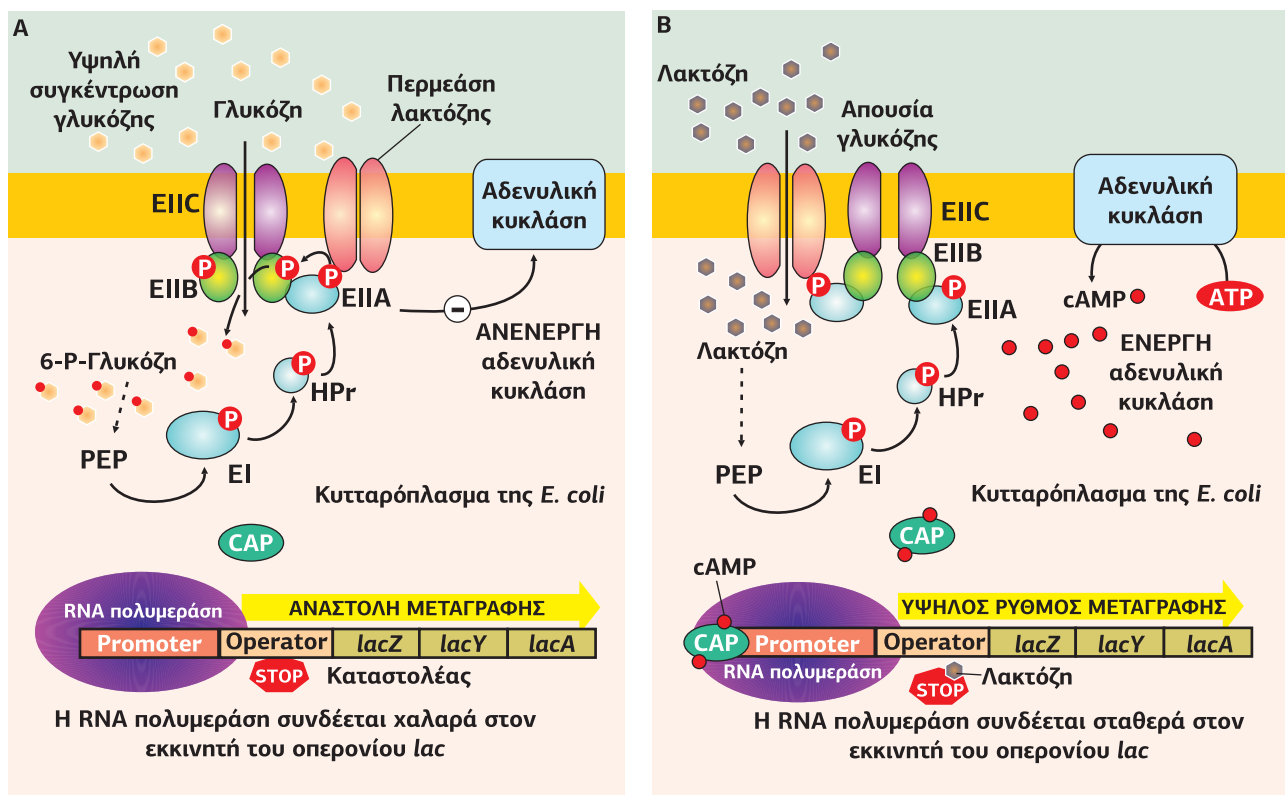
Όταν η γλυκόζη καταναλωθεί από το βακτήριο, τότε αυτό χρησιμοποιεί τη δεύτερη πηγή άνθρακα, τη λακτόζη, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων της λακτόζης (οπερόνιο *lac*) και, κατά συνέπεια, τη σύνθεση της β-γαλακτοσιδάσης, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cAMP με τον παρακάτω μηχανισμό: εφόσον η γλυκόζη απουσιάζει από το κυτταρόπλασμα, η φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου EIIA συσσωρεύεται (ελλείψει υποστρώματος), με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθεί η αδενυλική κυκλάση, η οποία παράγει cAMP. Το cAMP συνδέεται στην CAP και το σύμπλοκο συνδέεται στον επαγωγέα του οπερονίου *lac* (Εικόνα 5.50). Ωστόσο, αυτό δεν είναι αρκετό για να αρχίσει η μεταγραφή των γονιδίων της λακτόζης. Η λακτόζη πρέπει να είναι παρούσα μέσα στο βακτήριο, για να απομακρύνει τον καταστολέα της λακτόζης (μεταγραφική ρύθμιση). Όταν αυτές οι δύο συνθήκες ικανοποιούνται, σημαίνει ότι η γλυκόζη απουσιάζει και είναι διαθέσιμη η λακτόζη. Στη συνέχεια, τα βακτήρια αρχίζουν να μεταγράφουν το οπερόνιο της λακτόζης και να παράγουν β-γαλακτοσιδάση, υπεύθυνη για τον καταβολισμό της λακτόζης.

(LacY) και η λακτόζη δεν μπορεί να εισέλθει στο βακτήριο. Η μειωμένη συγκέντρωση του cAMP έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων της λακτόζης (οπερόνιο *lac*) και, κατά συνέπεια, την καταστολή της σύνθεσης της β-γαλακτοσιδάσης (η οποία συμμετέχει στην υδρόλυση της λακτόζης).

Οι προκαρυώτες είναι ικανοί να διακόπουν και να θέτουν σε λειτουργία τα γονιδια τους με έναν συγκεκριμένο και σηματοδοτικά ελεγχόμενο τρόπο, ώστε να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες του βιοτόπου. Μια χαρακτηριστική ιδιομορφία των προκαρυωτών είναι ότι τα γονιδια που ελέγχουν μια ξεχωριστή μεταβολική διαδικασία συνδυάζονται σε λειτουργικές δομικές μονάδες, γνωστές ως οπερόνια. Τα οπερόνια μεταγράφονται ως σύνολο σε ένα RNA και είναι κάτω από τον έλεγχο διεγερτικών και ανασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων. Σε αντίθεση με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπου ο έλεγχος των μεταγραφικών παραγόντων από το cAMP είναι έμμεσος, στους προκαρυωτικούς το cAMP συνδέεται και, συνεπώς, επηρεάζει άμεσα μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Ο πρώτος παράγοντας που ελέγχεται από το cAMP ανακαλύφθηκε στην *E. Coli* και ονομάζεται cAMP receptor protein (CRP) ή catabolite activator protein (CAP). Όταν η CAP συνδέεται με το cAMP δρα ως ενεργοποιητής του οπερονίου της λακτόζης (*lac*). Απουσία cAMP, το οπερόνιο *lac* βρίσκεται σε καταστολή.

Όταν η γλυκόζη καταναλωθεί από το βακτήριο, τότε αυτό χρησιμοποιεί τη δεύτερη πηγή άνθρακα, τη λακτόζη, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων της λακτόζης (οπερόνιο *lac*) και, κατά συνέπεια, τη σύνθεση της β-γαλακτοσιδάσης, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cAMP με τον παρακάτω μηχανισμό: εφόσον η γλυκόζη απουσιάζει από το κυτταρόπλασμα, η φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου EIIA συσσωρεύεται (ελλείψει υποστρώματος), με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθεί η αδενυλική κυκλάση, η οποία παράγει cAMP. Το cAMP συνδέεται στην CAP και το σύμπλοκο συνδέεται στον επαγωγέα του οπερονίου *lac* (Εικόνα 5.50). Ωστόσο, αυτό δεν είναι αρκετό για να αρχίσει η μεταγραφή των γονιδίων της λακτόζης. Η λακτόζη πρέπει να είναι παρούσα μέσα στο βακτήριο, για να απομακρύνει τον καταστολέα της λακτόζης (μεταγραφική ρύθμιση). Όταν αυτές οι δύο συνθήκες ικανοποιούνται, σημαίνει ότι η γλυκόζη απουσιάζει και είναι διαθέσιμη η λακτόζη. Στη συνέχεια, τα βακτήρια αρχίζουν να μεταγράφουν το οπερόνιο της λακτόζης και να παράγουν β-γαλακτοσιδάση, υπεύθυνη για τον καταβολισμό της λακτόζης.





Συμπερασματικά, στο εντεροβακτήριο *Escherichia coli* η παραγωγή του cAMP από την αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται από την απουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο. Ως αποτέλεσμα, το cAMP συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα CAP και επάγει τη μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης, με σκοπό να ενεργοποιηθεί η υδρόλυση της λακτόζης σε γαλακτόζη και γλυκόζη από τη γαλακτοσιδάση.

Οι συνθήκες αστίας επάγουν την παραγωγή cAMP και σε ένα πρώτιστο, τη βλεννώδη μούχλα *Dictyostelium discoideum*. Τα *Dictyostelium*, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, αναπτύσσονται ως μεμονωμένα κύτταρα, ενώ η απουσία τροφής επάγει τη δημιουργία συσσωματώματος, με τη μορφή αποικίας, τα κύτταρα της οποίας παράγουν και εκκρίνουν cAMP (βλ. **Εικόνα 1.59**). Το cAMP παράγεται περιοδικά από τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο του συσσωματώματος και μεταφέρεται στα γειτονικά, όπου συνδέεται σε ειδικούς GPCRs, τους cARs. Υπό την επίδραση του cAMP τα *Dictyostelium* πολώνονται και αρχίζουν να κινούνται προς το κέντρο του συσσωματώματος, ενώ παράλληλα ξεκινούν να παράγουν και αυτά cAMP. Η αποικία συνεχίζει να μεγαλώνει όσο συνεχίζει να εκπέμπεται σήμα cAMP. Η σύνδεση του cAMP στους cARs ενεργοποιεί διάφορους τελεστές, όπως η PLC, η PI3K και η αδενυλική κυκλάση τύπου A (AC-A), εξειδικευμένη για τη διαδικασία συσσωμάτωσης των *Dictyostelium*. Η AC-A παράγει cAMP, το οποίο απελευθερώνεται στο περιβάλλον ενισχύοντας το αρχικό σήμα. Το cAMP εκτός από τον ρόλο που παίζει στη μετακίνηση του πρώτιστου προς το κέντρο του συσσωματώματος, ελέγχει και άλλα στάδια του κύκλου ζωής του, ρυθμίζοντας γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τις διαδικασίες της ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Από τους τέσσερις υποδοχείς cAMP (cAR1-cAR4) που έχουν βρεθεί, ο cAR1 είναι υπεύθυνος για τη συσσωμάτωση. Περισσότερα για τον ρόλο του cAMP στη συσσωμάτωση του *Dictyostelium* στο Κεφάλαιο 1 (σσ. 60-61).

### Οι στόχοι του cAMP στους ευκαρυώτες

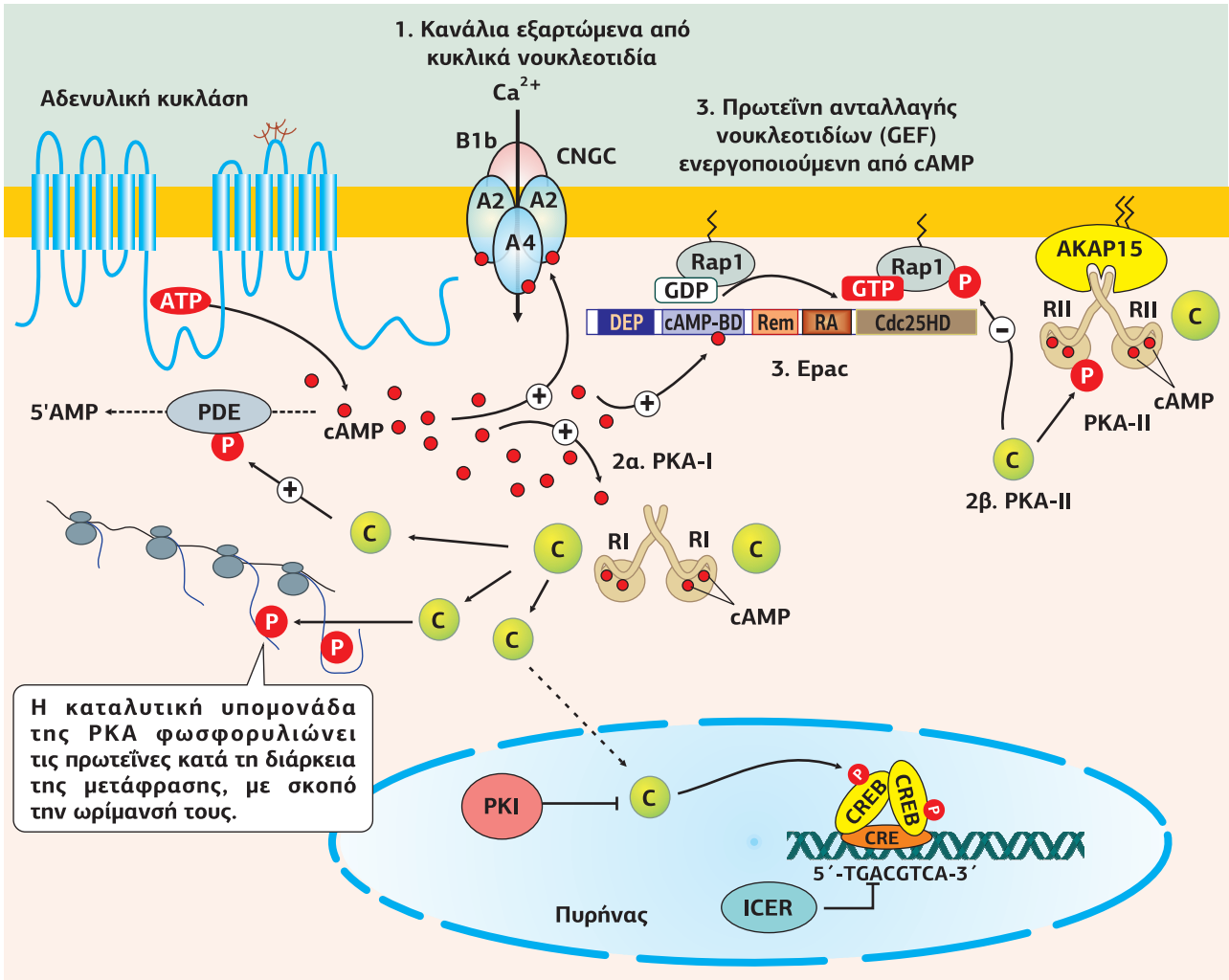
Το κυκλικό AMP στο κυτταρόπλασμα παίζει τον ρόλο του δεύτερου διαβιβαστή ενεργοποιώντας ποικίλους στόχους. Ο κύριος στόχος του cAMP είναι ειδικές πρωτεϊνικές κινάσες PKA (Protein Kinase cAMP-dependent). Ένας δεύτερος στό-

### Εικόνα 5.50

#### Άμεσος έλεγχος του μεταγραφικού παράγοντα CAP από το cAMP, στο βακτήριο *Escherichia coli*.

A. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο περιβάλλον είναι μεγάλη, η αδενυλική κυκλάση παραμένει ανενεργή και τα επίπεδα cAMP στο κυτταρόπλασμα είναι πολύ χαμηλά, με αποτέλεσμα το οπερόνιο της λακτόζης να είναι σε καταστολή.

B. Όταν απουσιάζει η γλυκόζη από το περιβάλλον, η αδενυλική κυκλάση ενεργοποιείται, τα επίπεδα cAMP στο κυτταρόπλασμα αυξάνονται, με αποτέλεσμα τη σύνδεση του cAMP στον μεταγραφικό παράγοντα CAP, που επάγει την έναρξη της μεταγραφής του οπερονίου lac. Επίσης, λόγω έλλειψης της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα συσσωρεύεται η φωσφορυλιωμένη μορφή του EI-A, με αποτέλεσμα η περμεάση της λακτόζης ανοίγει και εισέρχεται λακτόζη στο κύτταρο, απομακρύνοντας τον καταστολέα της λακτόζης από το οπερόνιο lac. [30]



**Εικόνα 5.51**

**Οι τρεις κύριοι στόχοι του cAMP.**

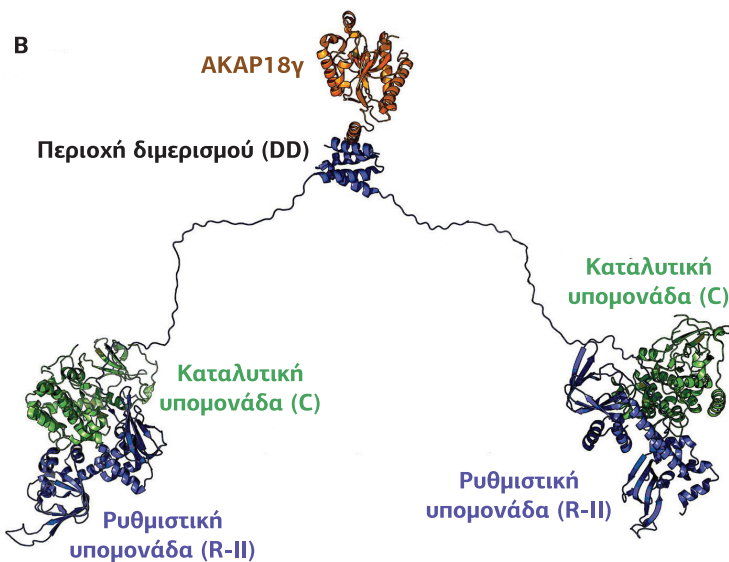
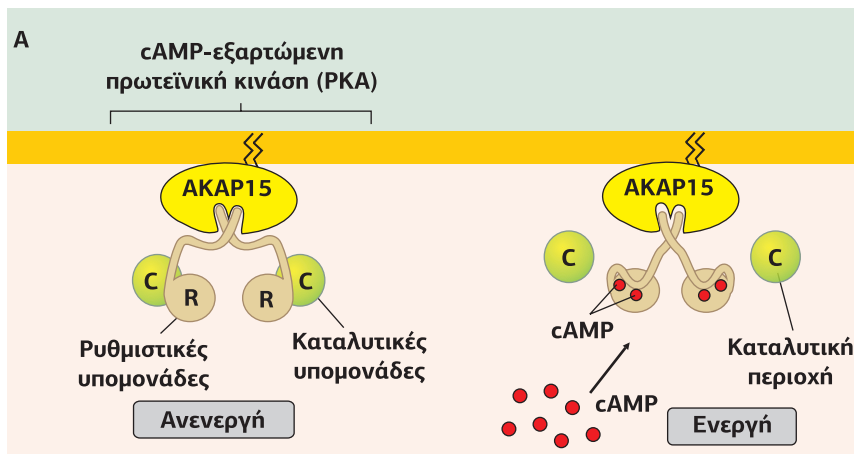
Το cAMP που παράγεται από την AC μπορεί να συνδεθεί:

- σε ένα cAMP-εξαρτώμενο κανάλι ιόντων προκαλώντας το άνοιγμά του,
- στις ρυθμιστικές υπομονάδες της κινάσης PKA-I ή PKA-II απελευθερώνοντας τις καταλυτικές υπομονάδες, οι οποίες φωσφορυλιώνουν διάφορους στόχους (διακρίνονται πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, η PDE, ο μεταγραφικός παράγοντας CREB και η GTPάση Rap1), και
- στον Epac, μια πρωτεΐνη που καταλύει την ανταλλαγή του GDP με GTP στη μικρή GTPάση Rap1. Ο ICER (Inducible cAMP Early Repressor) είναι ένας ενδογενής καταστολέας της CRE-μεσολαβούμενης μεταγραφής, και ο PKI (Protein Kinase Inhibitor), ένα πεπτίδιο που αναστέλλει τη δράση της PKA. [49]

χοι είναι τα cAMP-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων, που εκφράζονται στο οσφρητικό επιθήλιο. Επιπλέον, πρόσφατα έχει βρεθεί ένας τρίτος στόχος του cAMP, ο Epac (Exchange protein directly activated by cAMP), μια πρωτεΐνη που εξειδικευμένα καταλύει την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γουανίνης στη μικρή GTPάση Rap1, ενεργοποιεί δηλαδή τη Rap1 (Εικόνα 5.51).

Οι PKA κινάσες είναι κινάσες Ser/Thr που αποτελούνται από τέσσερις υπομονάδες: δύο καταλυτικές (C) και δύο ρυθμιστικές (R). Τέσσερα μόρια cAMP πρέπει να δεσμευτούν στις ρυθμιστικές υπομονάδες (δύο σε κάθε υπομονάδα), ώστε αυτές να αλλάξουν διαμόρφωση απελευθερώνοντας τις δύο καταλυτικές υπομονάδες (Εικόνα 5.52Α).

Η κάθε R-υπομονάδα έχει μια θέση αναστολέα που φράζει το ενεργό κέντρο της C-υπομονάδας απουσία cAMP και διατηρεί την PKA ως ένα σταθερό, αδρανές σύμπλοκο. Στο COOH-τελικό άκρο τους, οι R-υπομονάδες έχουν δύο θέσεις σύνδεσης για το cAMP, CBD (cAMP Binding Domain), όμοιες με αυτές των Epac, ενώ το NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο, εκτός από περιοχή διμερισμού, χρησιμεύει και ως μία θέση σύνδεσης για τις πρωτεΐνες σκαλωσιάς AKAPs (A Kinase-Anchoring Proteins), οι οποίες τοποθετούν το ολοένζυμο PKA κοντά στα εξειδικευμένα του υποστρώματα (Εικόνα 5.52Β). Η σύνδεση του cAMP στις R-υπομονάδες απελευθερώνει τις C-υπομονάδες από το ολοένζυμο αυξάνοντας τον ρυθμό φωσφομεταφοράς από 20 υποστρώματα/sec σε 250-500 υποστρώματα/sec, καθιστώντας την PKA την ταχύτερη από όλες τις κινάσες. Οι καταλυτικές υπομονάδες της PKA φωσφορυλιώνουν περισσότερες από 1.000 πρωτεΐνες στόχους, συμπεριλαμβανομένων κα-

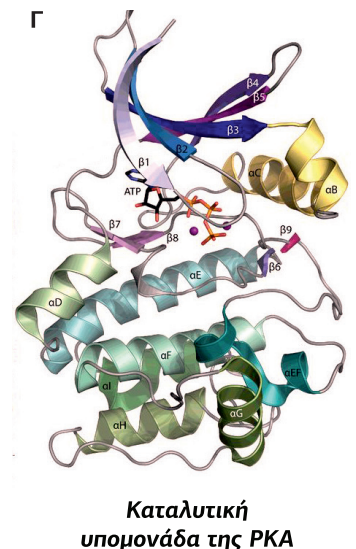


ναλίων ιόντων, μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. CREB και NF-κB), μεταφορέων, ενζύμων του μεταβολισμού και αποπτωτικών πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών.

Τα **κανάλια ιόντων που ενεργοποιούνται από το cAMP**, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικούς τύπους. Τα κανάλια **HCN** (Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-modulated), τα οποία εξαρτώνται από το δυναμικό και ρυθμίζονται από τη σύνδεση του cAMP, και τα κανάλια **CNG** (Cyclic Nucleotide-Gated channels), τα οποία ανοίγουν με τη σύνδεση των κυκλικών νουκλεοτιδίων (cAMP, cGMP) και είναι ανεξάρτητα από το δυναμικό. Και οι δύο τύποι καναλιών περιέχουν μια όμοια περιοχή σύνδεσης του κυκλικού νουκλεοτιδίου (CNBD) στο κυτταροπλασματικό COOH-τελικό τους άκρο, αλλά εμφανίζουν διακριτά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τα κανάλια HCN ανοίγουν όταν το κύτταρο υπερπολωθεί και το δυναμικό ηρεμίας πέσει κάτω από μια συγκεκριμένη τιμή. Η σύνδεση του cAMP ή cGMP (και τα δύο μπορούν να συνδέονται) στην περιοχή CNBD αλλάζει τη διαμόρφωση των καναλιών HCN, με αποτέλεσμα να απαιτείται μικρότερη μείωση του δυναμικού ηρεμίας για να ανοίξουν. Τα κανάλια HCN είναι κατά προτίμηση κανάλια  $\text{Na}^+$ , ενώ ενδοκυτταρικά ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  μπορούν να δράσουν ως αναστολείς του πόρου. Καθώς η ενεργοποίησή τους μεταβάλλει την καρδιακή και νευρωνική ρυθμικότητα, τα κανάλια HCN ονομάζονται “κανάλια βηματοδότες” (βλ. Κεφάλαιο 4, σελ. 161). Τα CNG κανάλια εντοπίστηκαν για πρώτη φορά σε αισθητήρια κύτταρα που σχετίζονται με την όραση ή την όσφρηση. Τα κανάλια CNG που βρίσκονται στα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς ανταποκρίνονται κυρίως στο cGMP, ενώ αυτά που

### Εικόνα 5.52

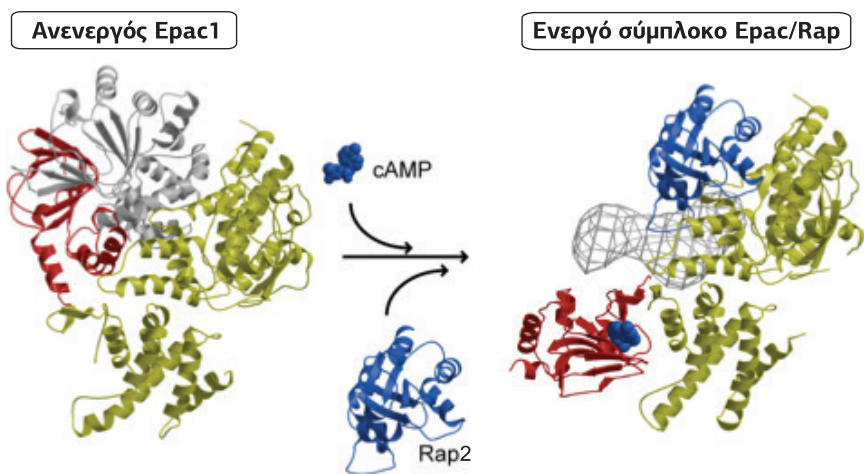
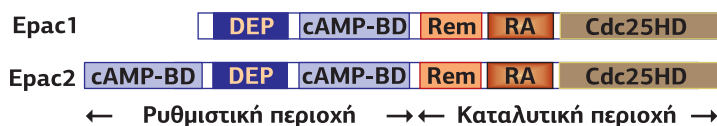
A. Ενεργοποίηση της PKA από το cAMP. Τέσσερα μόρια cAMP συνδέονται με την PKA, δύο σε κάθε ρυθμιστική της υπομονάδα (R), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των 2 καταλυτικών της υπομονάδων (C), οι οποίες στη συνέχεια θα φωσφορυλιώσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Στην εικόνα η PKA διακρίνεται συνδεδεμένη, μέσω της περιοχής διμερισμού (DD) των ρυθμιστικών υπομονάδων της, με την AKAP15. B. Το ολοένζυμο PKA (με πράσινο οι καταλυτικές και με μπλε οι ρυθμιστικές υπομονάδες) σε σύμπλοκο με την AKAP18γ. [67] Γ. Κρυσταλλική δομή της καταλυτικής υπομονάδας της PKA. Διακρίνονται οι χαρακτηριστικοί N- και C-λοβός.



βρίσκονται στους οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες είναι κυρίως ευαίσθητα σε cAMP (βλ. Κεφάλαιο 4, σελ. 162). Τα κανάλια CNG δεν είναι επιλεκτικά, επιτρέποντας τη διέλευση του  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ή  $\text{Ca}^{2+}$ .

Κατά τη διάρκεια της αναζήτησης πρωτεϊνών που μεσολαβούν στη δράση του cAMP ανεξάρτητα από την PKA, αναγνωρίστηκε το 1998 μια πρωτεΐνη ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης που ενεργοποιείται άμεσα από cAMP, **Epac** (Exchange protein directly activated by cAMP). Οι πρωτεΐνες Epac εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες στις οποίες συμμετέχει το cAMP, τόσο διαφορετικές όσο η κυτταρική προσκόλληση, η έκκριση ινσουλίνης, η κυτταρική διαφοροποίηση ή η καρδιακή υπερτροφία. Υπάρχουν δύο παραλλαγές του Epac, Epac1 (ή RapGEF3), με μία περιοχική δέσμευσης κυκλικών νουκλεοτιδίων, και Epac2 (ή RapGEF4) με δύο περιοχές. Και τα δύο είδη Epac μετά τη σύνδεση του cAMP δρουν ως παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης για τη μικρή GTPάση Rap1/2 (**Εικόνα 5.53**). Ο Epac1 στρατολογείται στη μεμβράνη, όπου βρίσκεται η πρωτεΐνη Rap (καθώς έχει μεταμεταφραστικά υποστεί πρενυλίωση), ενεργοποιώντας τη GTP-συνδεδεμένη διαμόρφωση. Στα καρδιομυοκύτταρα η Rap1-GTP ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C, η οποία με τη σειρά της μέσω  $\text{IP}_3$ , DAG και  $\text{Ca}^{2+}$  ενεργοποιεί την PKC. Παρά το γεγονός ότι η Epac και η PKA μπορεί να δρουν ανεξάρτητα, υπάρχει συχνά μια αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο στοιχείων σηματοδότησης. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της Rap1 από την PKA οδηγεί στην απενεργοποίηση της GTPάσης και στην απομάκρυνσή της από τη μεμβράνη.

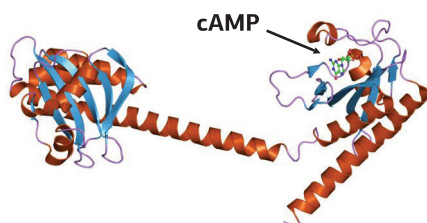
**Εικόνα 5.53**  
**Ενεργοποίηση του Epac από το cAMP.** Ο Epac είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF). Υπάρχουν δύο είδη Epac, ο Epac1 και ο Epac2, με μία ή δύο θέσεις σύνδεσης του cAMP, αντίστοιχα. Η σύνδεση του cAMP στον Epac ενεργοποιεί την ανταλλαγή του GDP με GTP στη μικρή G-πρωτεΐνη Rap1, καθιστώντας την ενεργή. Οι Epacs αποτελούνται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή περιέχει μία ή δύο περιοχές σύνδεσης του cAMP (CBD, cAMP-Binding Domain) και μια περιοχή DEP (Deshevelled-Egln-10-Pleckstrin), η οποία συμμετέχει στη σύνδεση του Epac στη μεμβράνη. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από την Cdc25-homology domain, υπεύθυνη για τη δραστηριότητα ανταλλαγής GDP/GTP, από το Ras exchange motif (Rem) που σταθεροποιεί την καταλυτική έλικα της Cdc25HD, και μια περιοχή RA (RalGDS/AF6Ras-association domain), που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. [77]



Το cAMP μπορεί, επίσης, να ρυθμίζει άμεσα τη δράση ενός αριθμού ενζύμων. Ορισμένες φωσφοδιεστεράσες (PDEs) και αδενυλικές κυκλάσες (ACs) έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν cAMP σε μια αλλοστερική θέση σύνδεσης που ονομάζεται

**GAF (Εικόνα 5.54)**. Ενώ οι 5 από τις 11 οικογένειες PDEs των θηλαστικών περιέχουν περιοχές GAF στο  $\text{NH}_2$ -τελικό άκρο τους, μόνο η GAF της PDE10 συνδέει εξειδικευμένα cAMP, η GAF της PDE11 συνδέει και τα δύο κυκλικά νουκλεοτίδια, ενώ οι GAF της PDE2, PDE5, PDE6 συνδέουν μόνο cGMP.

**Εικόνα 5.54**  
**Η περιοχή GAF της PDE10.** Η περιοχή GAF πήρε το όνομά της από τις πρωτεΐνες στις οποίες βρέθηκε: cGMP-specific phosphodiesterases, Adenyl cyclases και FhlA. Είναι μια περιοχή ικανή να δεσμεύει cAMP ή cGMP.



### 3.6

#### Ο φυσιολογικός ρόλος του cAMP: Χαρακτηριστικά παραδείγματα

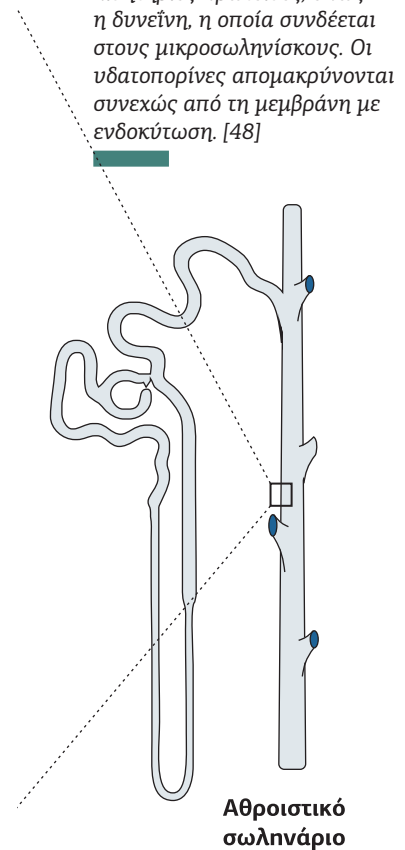
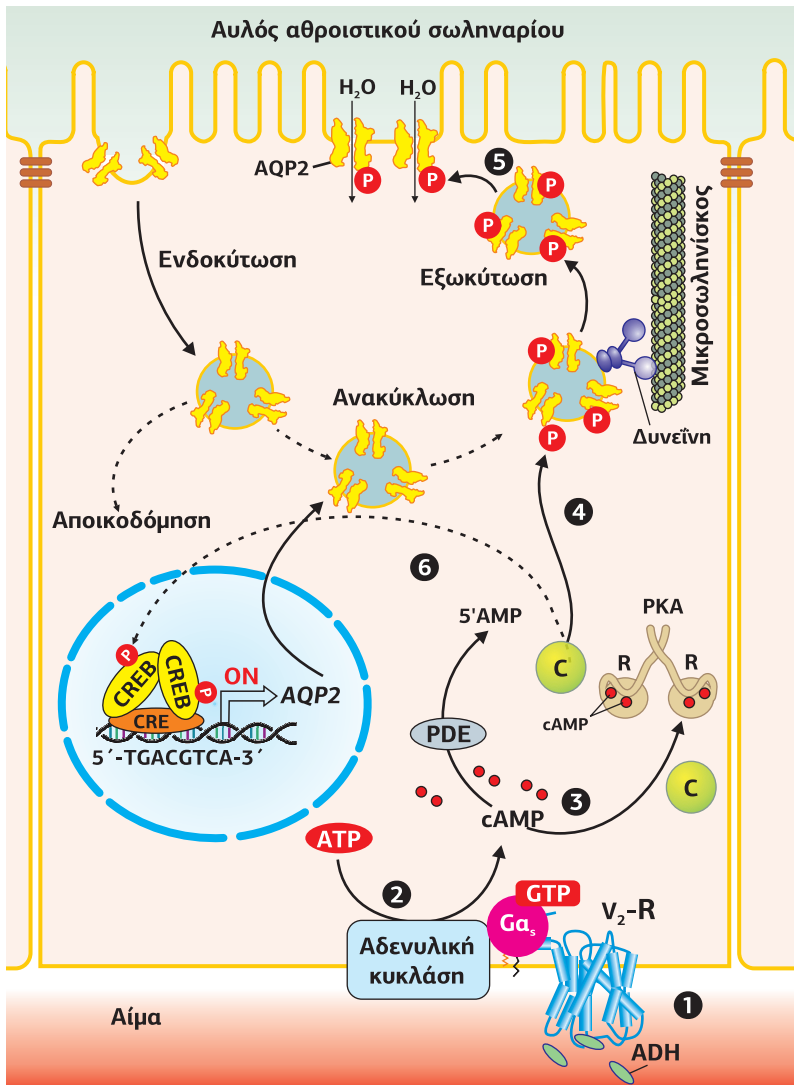
Παρόλο που το cAMP είναι το πιο διάσημο ενδοκυττάριο μήνυμα που επάγει την αποικοδόμηση, αλλά και αναστέλλει τη σύνθεση του γλυκογόνου στο συκώτι, αποτελεί, επίσης, έναν μεσολαβητή κλειδί για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, που ξεκινούν από την ενεργοποίηση GPCRs.

Μετά τη δέσμευση του προσδέτη οι υποδοχείς διευκολύνουν την ανταλλαγή GDP με GTP στις διεγερτικές  $G_{\alpha_s}$  πρωτεΐνες ή τις ανασταλτικές  $G_{\alpha_i}$  πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στην ενεργοποίηση ή την αναστολή, αντίστοιχα, των διαμεμβρανικών αδενυλικών κυκλάσων. Οι προσδέτες που **ενεργοποιούν αποκλειστικά  $G_{\alpha_s}$  πρωτεΐνες**, αυξάνοντας έτσι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα cAMP, περιλαμβάνουν τη **βασοπρεσίνη**, (ή αντιδιουρητική ορμόνη, ADH) η οποία ενεργοποιώντας τους  $V_2$  υποδοχείς αυξάνει το cAMP και ενεργοποιεί την PKA, μέσω της οποίας αυξάνονται οι υδατοπορίνες στη μεμβράνη των αθροιστικών σωληναρίων, οδηγώντας στην επαναπρόσληψη  $H_2O$  (Εικόνα 5.55), τις **γοναδοτροπίνες** και γενικά ορμόνες που ενεργοποιούν GPCRs της οικογένειας A-II.

Άλλοι προσδέτες ενεργοποιούν τις  $G_{\alpha_i}$  πρωτεΐνες και μειώνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση cAMP, μεταξύ των οποίων η σωματοστατίνη, η ακετυλοχολίνη, το γλουταμινικό και το γ-αμινοβουτυρικό.

**Εικόνα 5.55**

Οι υποδοχείς  $V_2$  εκφράζονται στους νεφρούς, (στο άνω τμήμα της αγκύλης του Henle και στο αθροιστικό σωληνάριο), όπου μέσω της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης διαμορφώνουν την αντιδιουρητική δράση της βασοπρεσίνης (ADH, Antidiuretic Hormone). Η αύξηση του cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CREB. Ο CREB ενεργοποιεί τη μεταγραφή των υδατοπορινών AQP2. Ταυτόχρονα, η PKA φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις AQP2, οι οποίες μεταφέρονται με ενδοκυτταρικά κυστίδια στη μεμβράνη, προς τον αυλό του νεφρικού σωληναρίου, όπου προκαλούν την επαναρρόφηση νερού, συμπυκνώνοντας τα ούρα. Στη μεταφορά των κυστιδίων συμμετέχουν κινητήριες πρωτεΐνες, όπως η δυνείνη, η οποία συνδέεται στους μικροσωληνίσκους. Οι υδατοπορίνες απομακρύνονται συνεχώς από τη μεμβράνη με ενδοκύτωση. [48]

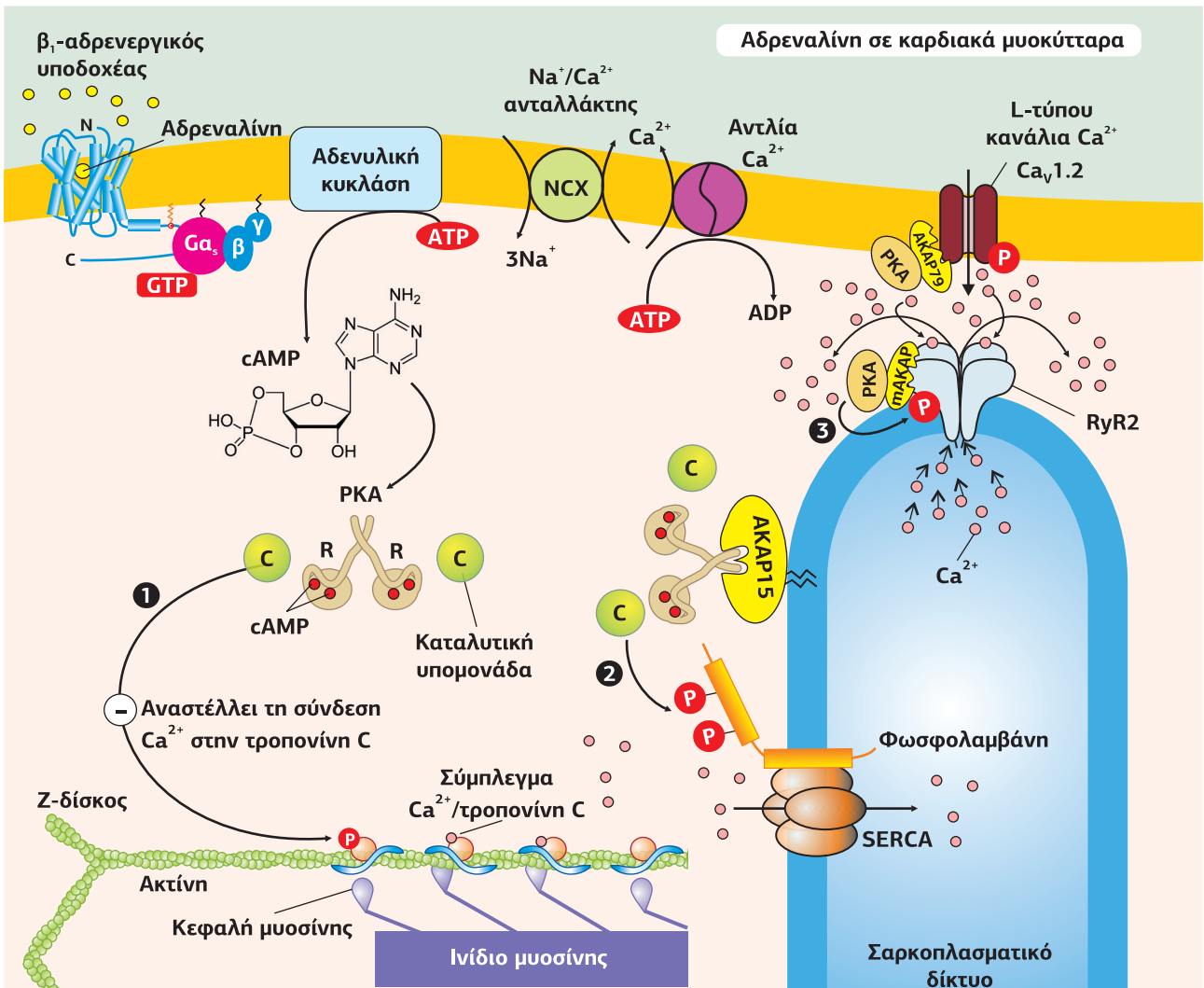


**Εικόνα 5.56**

Η απελευθέρωση της αδρεναλίνης από τα συμπαθητικά νεύρα ενεργοποιεί τους  $\beta_1$ -R των καρδιομυοκυττάρων. Οι  $\beta_1$  μέσω της  $G_{\alpha_s}$  ενεργοποιούν την AC αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA που φωσφορυλιώνει τη φωσφολαμβάνη, η οποία επάγει το άνοιγμα της SERCA και την είσοδο  $Ca^{2+}$  μέσα στο ΣΔ. Η μείωση του  $Ca^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του καρδιακού ρυθμού. Η ενεργοποίηση των  $\beta_1$ -R, μέσω της PKA, επάγει τη φωσφορυλίωση της τροπονίνης C, με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού αποσύνδεσης του  $Ca^{2+}$  από την τροπονίνη C, και την αύξηση του ρυθμού με τον οποίο επέρχεται η χάλαση. Η PKA φωσφορυλιώνει, επίσης, τα κανάλια RyR2 αυξάνοντας τη συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$ . [35]

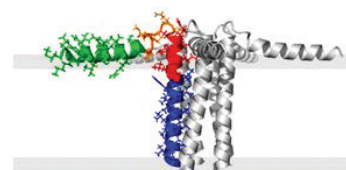
**Ορισμένοι προσδέτες παράγουν αντίθετα αποτελέσματα** ανάλογα με τον ιστό, καθώς έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν διαφορετικά είδη GPCRs, οι οποίοι συνδέονται με  $G_{\alpha_s}$  ή με  $G_{\alpha_i}$  πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, η αδρεναλίνη στον εγκέφαλο ενεργοποιεί τους  $\alpha_2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με μια πρωτεΐνη  $G_{\alpha_i}$ , στην καρδιά ενεργοποιεί τους  $\beta_1$  και στο ήπαρ τους  $\beta_2$ , συζευγμένοι και οι δύο με μια πρωτεΐνη  $G_{\alpha_s}$ , με διαφορετικά σε κάθε περίπτωση αποτελέσματα. Η ενεργοποίηση των προσυναπτικών  $\alpha_2$  υποδοχέων μέσω της μείωσης του cAMP οδηγεί στη μείωση της απελευθέρωσης της αδρεναλίνης από τον προσυναπτικό νευρώνα.

Η ενεργοποίηση των  $\beta_1$  υποδοχέων του φλεβόκομβου, του βηματοδότη της καρδιάς, μέσω της αύξησης του cAMP ενεργοποιεί τα κανάλια HCN αυξάνοντας τον καρδιακό ρυθμό. Η ενεργοποίηση των  $\beta_1$  υποδοχέων των κόλπων, μέσω της PKA, φωσφορυλιώνει τη φωσφολαμβάνη, η οποία στη μη φωσφορυλιωμένη της μορφή κρατά κλειστή την αντλία  $Ca^{2+}$  του σαρκοπλασματικού δικτύου (SERCA, Sarcoplasmic/Endoplasmatic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase). Η φωσφορυλιωμένη φωσφολαμβάνη επάγει την ενεργοποίηση της SERCA και την είσοδο  $Ca^{2+}$  μέσα στο ΣΔ. Η μείωση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του χρονικού διαστήματος ανάμεσα σε δύο αυτόματες εκπολώσεις και, συνεπώς, την αύξηση του καρδιακού ρυθμού (χρονοτρόπος δράση). Η ενεργοποίηση των  $\beta_1$  υποδοχέων των κόλπων, μέσω της PKA, επάγει τη φωσφορυλίωση της τροπονίνης C, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού αποσύνδεσης

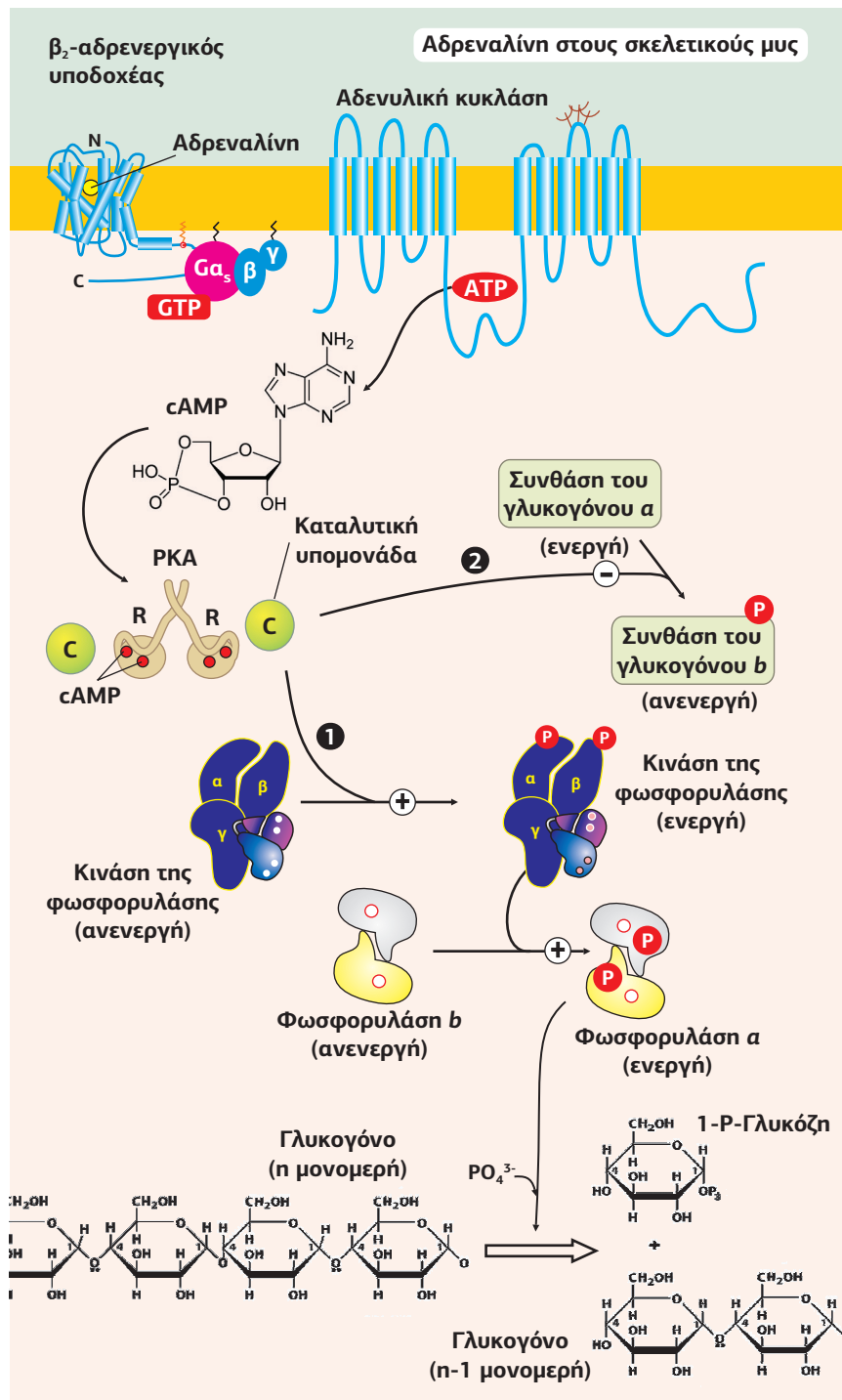


του  $Ca^{2+}$  από την τροπονίνη C και, κατά συνέπεια, την αύξηση του ρυθμού με τον οποίο επέρχεται η χάλαση (θετική ινότροπος δράση). Η PKA, μέσω της πρωτεΐνης  $\beta$ AKAP, βρίσκεται συνδεδεμένη στους υποδοχείς ριανοδίνης RyR2, τους οποίους φωσφορυλιώνει προκαλώντας το άνοιγμα των καναλιών και την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$ . Ωστόσο, η δράση αυτή της PKA φαίνεται να μην έχει φυσιολογικό αποτέλεσμα, αλλά να ευθύνεται για τις αρρυθμίες (Εικόνα 5.56 και βλ. Εικόνα 7.12).

Τέλος, η ενεργοποίηση των  $\beta_2$  υποδοχέων στους σκελετικούς μυς μέσω της αύξησης του cAMP και της φωσφορυλίωσης της κινάσης της φωσφορυλάσης από την PKA επάγει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη (Εικόνα 5.57).



Πενταμερές φωσφολαμβάνης



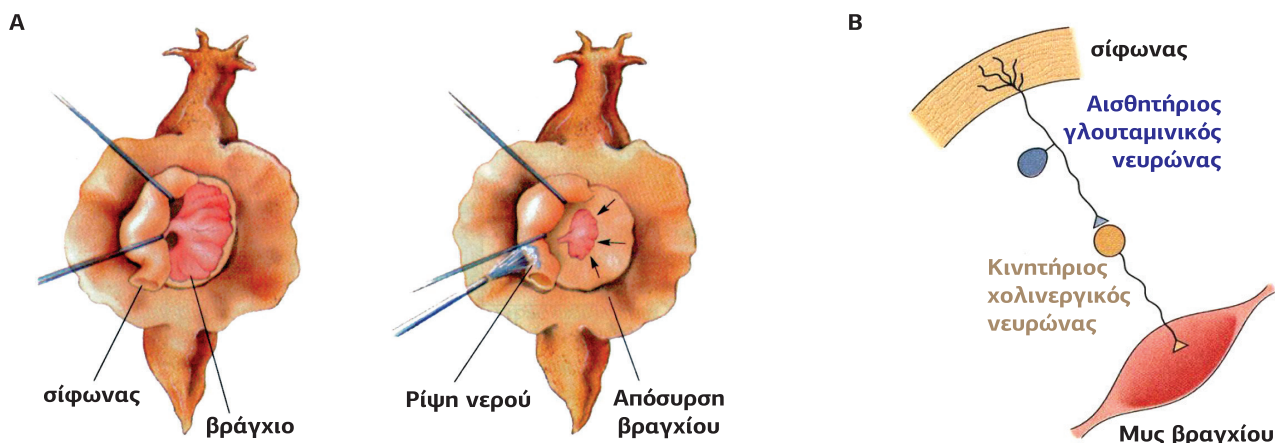
Εικόνα 5.57

**Ο ρόλος του cAMP στην γλυκογονόλυση.** Σε περίπτωση έντονης άσκησης, όταν οι απαιτήσεις σε ενέργεια είναι μεγάλες, απελευθερώνεται αδρεναλίνη, η οποία ενεργοποιεί τους  $\beta_2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς των σκελετικών μυών. Μέσω του μονοπατιού  $G_s$ /αδενυλικής κυκλάσης/cAMP ενεργοποιείται η κινάση PKA. Στη συνέχεια, η PKA ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, που μετατρέπει το γλυκογόνο σε γλυκόζη, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια. Ταυτόχρονα, η PKA φωσφορυλιώνει και τη συνθάση του γλυκογόνου, καθιστώντας την ανενεργή, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση του γλυκογόνου. Στο ήπαρ η γλυκογονόλυση ενεργοποιείται εκτός από την αδρεναλίνη και από τη γλυκαγόνη, η οποία απελευθερώνεται από το πάγκρεας, ως απόκριση στη μείωση της γλυκόζης στο αίμα, και δρα στους υποδοχείς γλυκαγόνης (GPCRs συζευγμένους με  $G_s$  πρωτεΐνη) στο ήπαρ. [5]

**Η βραχύχρονη μάθηση** οδηγεί σε αλλαγές της αποτελεσματικότητας της συναπτικής διαβίβασης, σε αντίθεση με τη μακρόχρονη μάθηση, η οποία απαιτεί παραγωγή πρωτεϊνών και δημιουργία νέων συνάψεων.

### Εικόνα 5.58

A. Το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου στο θαλάσσιο σαλιγκάρι *Aplysia californica* είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εξοικείωσης, μορφή βραχύχρονης μνήμης. Όταν ο σίφωνας δέχεται για πρώτη φορά ένα ήπιο απτικό ερέθισμα, π.χ. νερό υπό πίεση, το βράγχιο “αποσύρεται” μέσα στη μανδρακλή κοιλότητα, ενώ εάν το ερέθισμα συνεχιστεί κατ’ επανάληψη (κάθε 90 sec), ο μυς του βραγχίου σταματά να αποκρίνεται. B. Η πίεση που δέχεται ο σίφωνας ενεργοποιεί έναν μηχανο-αισθητήριο γλουταμινικό νευρώνα, ο οποίος ενεργοποιεί τον κινητήριο χολινεργικό νευρώνα που προκαλεί τη σύσπαση του βραγχιακού μυ.



### Ο ρόλος του cAMP στην αποθήκευση μνήμης στην *Aplysia californica*

Η αποθήκευση μνήμης βραχείας και μακράς διάρκειας μελετήθηκε από τον Eric Kandel το 1960 στο θαλάσσιο σαλιγκάρι *Aplysia californica*, χρησιμοποιώντας το μοντέλο του αντανακλαστικού απόσυρσης του βραγχίου (gill-withdrawal reflex): όταν ο σίφωνας δέχεται ένα ήπιο απτικό ερέθισμα, π.χ. νερό υπό πίεση, το βράγχιο “αποσύρεται” μέσα στη μανδρακλή κοιλότητα. Το μοντέλο αυτό επιδεικνύει τα τρία χαρακτηριστικά της απλής μάθησης: την εξοικείωση (habituation), την ευαισθητοποίηση (sensitization) και την κλασική εξαρτημένη μάθηση (classical conditioning).

Η πίεση που δέχεται ο σίφωνας ενεργοποιεί μηχανο-αισθητήριους νευρώνες του, οι οποίοι απελευθερώνουν γλουταμινικό στις συνάψεις με τους κινητήριους χολινεργικούς νευρώνες, που νευρώνουν τον μυ του βραγχίου (Εικόνα 5.58). Το γλουταμινικό ενεργοποιεί τους ιοντοτροπικούς υποδοχείς AMPA και NMDA των κινητηρίων νευρώνων. Τα κανάλια ανοίγουν και εισέρχεται  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  προκαλώντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στη σύναψη με τον μυ του βραγχίου. Στη συνέχεια, η ακετυλοχολίνη ενεργοποιεί τους νικοτινικούς υποδοχείς των μυϊκών κυττάρων, προκαλώντας τη σύσπαση του μυ και τη συρρίκνωση του βραγχίου. Εάν η ρίψη του νερού επαναληφθεί κάθε 90 sec, το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου σταδιακά καταστέλλεται (εξοικείωση). Το ζώο, δηλαδή, αντιδρά λιγότερο σε ένα επαναλαμβανόμενο ερέθισμα. Η εξοικείωση οφείλεται στη μείωση των προσυναπτικών κυστιδίων που περιέχουν γλουταμινικό. Λόγω των μειωμένων κυστιδίων ελαττώνεται η απελευθέρωση Glu από τον αισθητήριο νευρώνα, και κατά συνέπεια ελαττώνεται η διέγερση του κινητήριου νευρώνα, παρά την επαναλαμβανόμενη διέγερση του σίφωνα.

Μία πιο σύνθετη μορφή βραχύχρονης μάθησης είναι η **ευαισθητοποίηση**, όπου χαρακτηριστικό ρόλο παίζει το cAMP. Η ευαισθητοποίηση του αντανακλαστικού απόσυρσης του βραγχίου προκαλείται από την εφαρμογή ενός βλαβερού ερεθίσματος σε μία άλλη θέση του σώματος, π.χ. στην ουρά. Για παράδειγμα, εάν σε μια *Aplysia* που έχει υποστεί εξοικείωση διεγείρουμε με ένα ισχυρό βλαβερό ερέθισμα την ουρά της, η απόσυρση του βραγχίου ως απάντηση σε μια ασθενή διέγερση του σίφωνα θα είναι υπερβολικά έντονη. Δηλαδή, ένα βλαβερό ερέθισμα στην ουρά **ευαισθητοποιεί** το ζώο, ώστε να αντιδρά υπερβολικά σε μια ασθενή μη βλαβερή διέγερση του σίφωνα. Ακόμη και μετά από ένα μεμονωμένο ερέθισμα στην ουρά το αντανακλαστικό απόσυρσης του βραγχίου παραμένει ενεργό για μία ώρα τουλάχιστον.

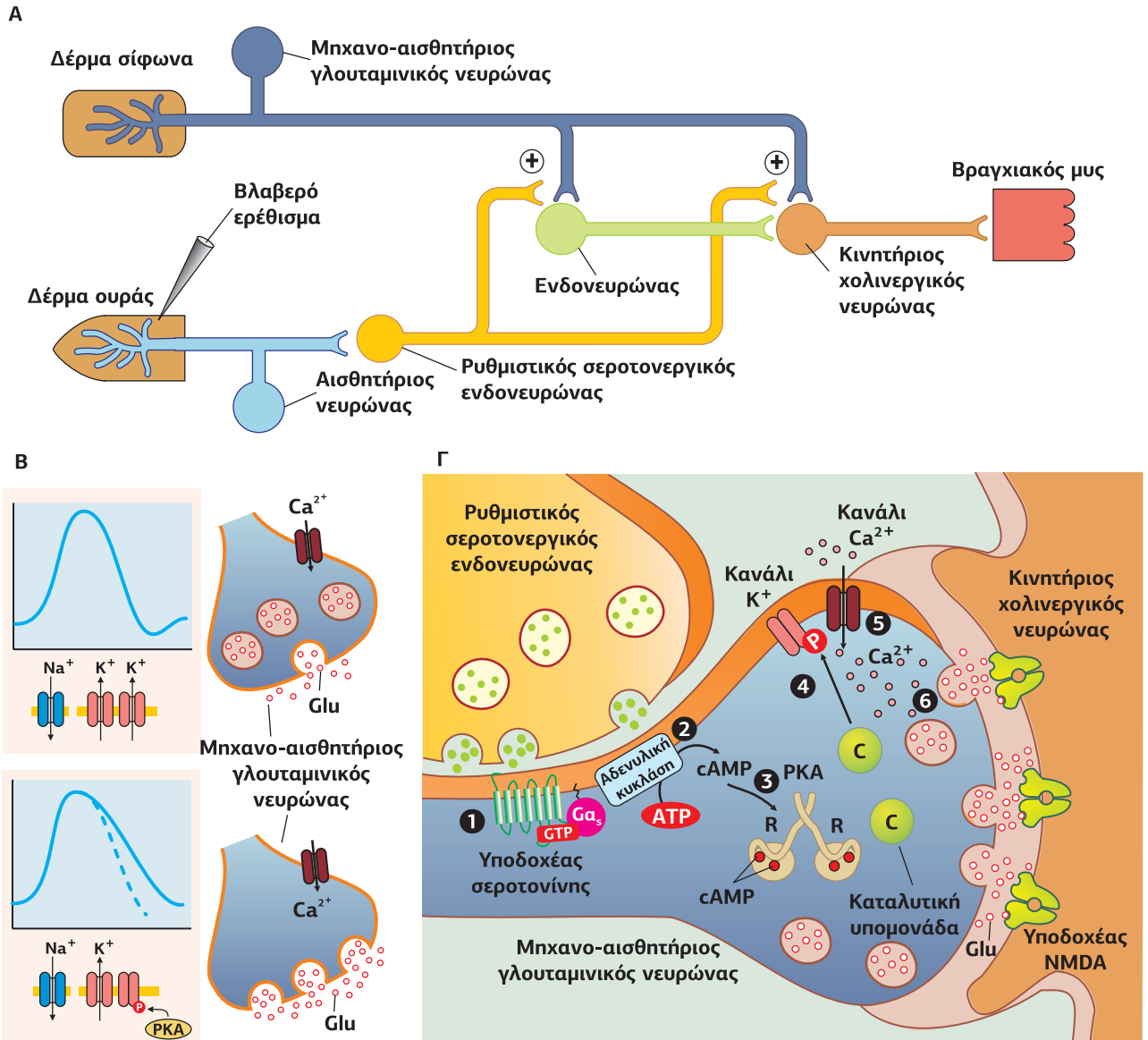
Το βλαβερό ερέθισμα στην ουρά τροποποιεί τη συναπτική διαβίβαση του νευρικού κυκλώματος του αντανακλαστικού απόσυρσης του βραγχίου, μέσω ρυθμιστικών σεροτονεργικών ενδονευρώνων, με τον ακόλουθο μηχανισμό: Το βλαβερό ερέθισμα στην ουρά ενεργοποιεί αισθητήριους νευρώνες της ουράς, οι οποίοι μεταδίδουν τη διέγερση στους ρυθμιστικούς ενδονευρώνες, οι οποίοι συνάπτονται με τους μηχανο-αισθητήριους γλουταμινικούς νευρώνες του σίφωνα. Η διέγερση των ρυθμιστικών ενδονευρώνων οδηγεί σε απελευθέρωση σεροτονίνης (5-HT, 5-hydroxytryptamine), η οποία ενεργοποιεί τους σεροτονεργικούς υποδοχείς των αισθητηρίων γλουταμινικών νευρώνων του σίφωνα. Οι σεροτονεργικοί υποδοχείς



με τη σειρά τους ενεργοποιούν μέσω μιας  $G_{\alpha_s}$  πρωτεΐνης μία αδενυλική κυκλάση, αυξάνοντας τα επίπεδα cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την κίνηση PKA, η οποία φωσφορυλιώνει κανάλια  $K^+$  του προσυναπτικού άκρου. Η φωσφορυλίωση οδηγεί στο κλείσιμο των τασηο-εξαρτώμενων καναλιών  $K^+$ , γεγονός που παρατείνει τη διάρκεια των προσυναπτικών δυναμικών δράσης και, κατά συνέπεια, αυξάνει την είσοδο  $Ca^{2+}$  από τα προσυναπτικά τασηο-εξαρτώμενα κανάλια  $Ca^{2+}$ . Ως αποτέλεσμα αυξάνεται η ποσότητα γλουταμινικού που απελευθερώνεται στη σύναψη με τους κινητήριους νευρώνες και ως εκ τούτου η σύσπαση των μυϊκών κυττάρων του βραχχίου είναι ενισχυμένη (Εικόνα 5.59).



*Aplysia californica*

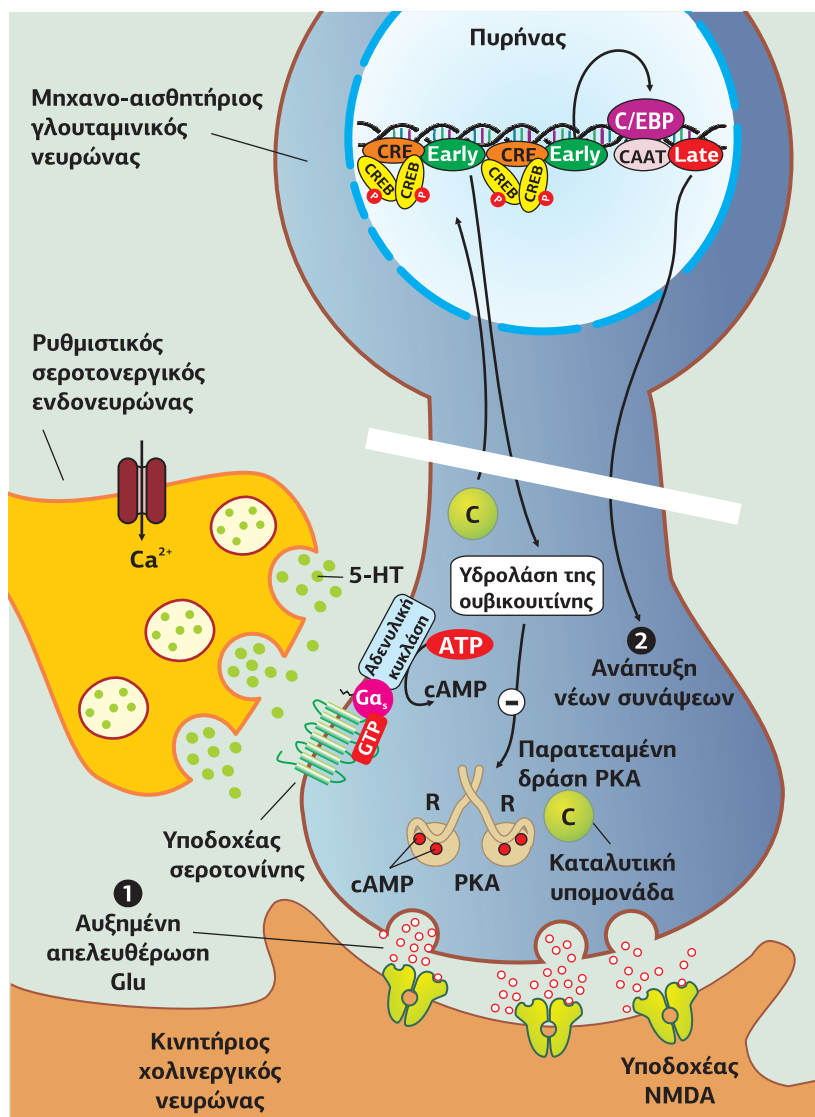


**Εικόνα 5.59**

A. Το νευρικό κύκλωμα της εναισθητοποίησης στην *Aplysia*. Η εφαρμογή βλαβερού ερεθίσματος στην ουρά του ζώου διεγείρει ρυθμιστικούς ενδονευρώνες, οι οποίοι μεταβάλλουν τη συναπτική διαβίβαση μεταξύ των αισθητηρίων νευρώνων του σίφωνα και των κινητηρίων του βραχχίου, προκαλώντας εναισθητοποίηση. B. Το δυναμικό δράσης δημιουργείται από τασηο-εξαρτώμενα κανάλια  $Na^+$  και  $K^+$ . Η φωσφορυλίωση των καναλιών  $K^+$  κλείνει τα κανάλια και παρατείνει το δυναμικό δράσης, με αποτέλεσμα την αυξημένη είσοδο  $Ca^{2+}$  στο προσυναπτικό άκρο και την αυξημένη απελευθέρωση γλουταμινικού. Γ. Η απελευθέρωση 5-HT από τον ρυθμιστικό ενδονευρώνα ενεργοποιεί υποδοχείς του αισθητήριου νευρώνα του σίφωνα. Η ενεργοποίησή τους διεγείρει την AC, αυξάνει το cAMP, ενεργοποιεί την PKA, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει κανάλια  $K^+$ , με αποτέλεσμα την αύξηση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού (Glu).

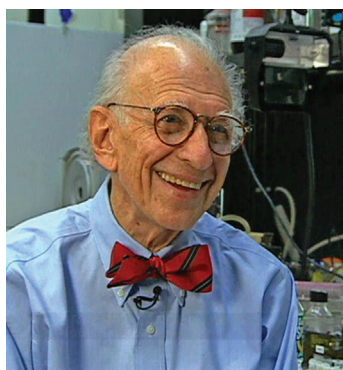
Εικόνα 5.60

Ο μηχανισμός της μακροχρόνιας ευαισθητοποίησης έπεται από επαναλαμβανόμενα βλαβερά ερεθίσματα στην ουρά της *Aplysia*. Η συνεχιζόμενη διέγερση των αισθητήριων νευρώνων του σίφωνα οδηγεί στην παρατεταμένη ενεργοποίηση της PKA, η οποία ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα CREB. Ο CREB συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης του cAMP (CRE) σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων πρώιμης απόκρισης (*early response genes*) (π.χ. την υδρολάση της ουβικουτίνης), και του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP. Ο C/EBP συνδέεται στην περιοχή του DNA CAAT επάγοντας τη μεταγραφή άγνωστων ακόμη γονιδίων (*Late genes*), που οδηγούν στην αύξηση του αριθμού συνάψεων. [44]



Η μακροχρόνια ευαισθητοποίηση βασίζεται και αυτή στην ενίσχυση της απελευθέρωσης του γλουταμινικού, που επάγεται από τη σεροτονίνη. Ωστόσο, στην περίπτωση της μακροχρόνιας ευαισθητοποίησης το κύκλωμα επηρεάζεται έως και για εβδομάδες. Η παρατεταμένη διάρκεια οφείλεται σε μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης και, συνεπώς, της σύνθεσης πρωτεϊνών. Με επαναλαμβανόμενα βλαβερά ερεθίσματα στην ουρά η PKA, που εμπλέκεται στη βραχύχρονη ευαισθητοποίηση, φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα CREB (cAMP Response Element-Binding protein). Ο CREB συνδέεται σε στοιχεία απόκρισης του cAMP (CREs, cAMP Response Elements) σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων (*Early response genes*), όπως του ενζύμου υδρολάση της ουβικουτίνης (*Aplysia ubiquitin C-hydrolase, Ap-uch*), η οποία διεγείρει την αποικοδόμηση της ρυθμιστικής υπομονάδας της PKA. Κατά συνέπεια, αυξάνεται ο αριθμός των ελεύθερων καταλυτικών υπομονάδων της PKA, αυξάνοντας τη δραστηριότητά της, χωρίς να απαιτείται η παρουσία της σεροτονίνης. Ο CREB διεγείρει, επίσης, και τη μεταγραφή του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Protein), ο οποίος επάγει τη μεταγραφή άγνωστων ακόμη γονιδίων (*Late genes*) που οδηγούν στην αύξηση του αριθμού συνάψεων ανάμεσα στους αισθητήριους και τους κινητήριους νευρώνες (Εικόνα 5.60).

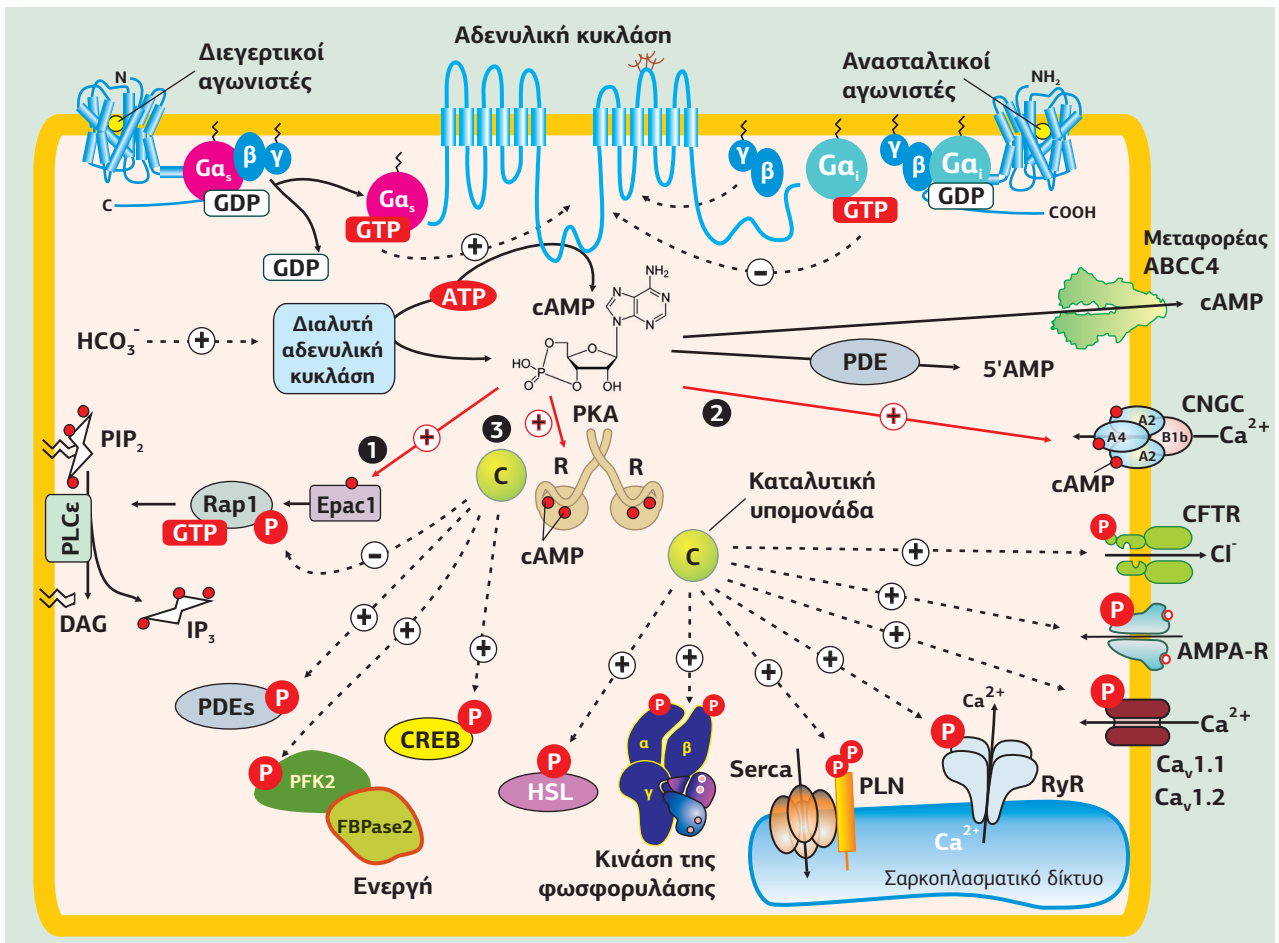
Ο Eric Richard Kandel (1929-), Αμερικανός νευροψυχίατρος, καθηγητής Βιοχημείας και Βιοφυσικής στο Πανεπιστήμιο Columbia, τιμήθηκε το 2000 με το βραβείο Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής για τις έρευνές του σχετικά με την αποθήκευση μνήμης.



Eric Richard Kandel (1929-)

Συνοψίζοντας, το cAMP είναι ένας πολύ διαδεδομένος δεύτερος διαβιβαστής που παίζει κύριο ρόλο σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες. Η βασική απαίτηση για τη σηματοδότηση μέσω cAMP είναι μια πηγή παραγωγής cAMP (η αδενυλική κυκλάση), μια πρωτεΐνη ικανή να συνδέει το cAMP και να μεταδίδει το μήνυμα, και ένας μηχανισμός τερματισμού του μηνύματος (οι φωσφοδιεστεράσες). Μεταξύ των στόχων που ενεργοποιεί το cAMP είναι: α. κανάλια που ενεργοποιούνται από κυκλικά νουκλεοτίδια, τα οποία εκφράζονται στο οσφρητικό επιθήλιο και παίζουν σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της όσφρησης, β. ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Eras), ο οποίος ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση Rap1/2, και γ. η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες δράσεις του cAMP. Μεταξύ των χαρακτηριστικότερων πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνει η PKA είναι ο μεταγραφικός παράγοντας CREB, κανάλια ιόντων, όπως τα τάση-εξαρτώμενα κανάλια  $Ca^{2+}$  ( $Ca_v1.1$  και  $Ca_v1.2$ ), τα κανάλια  $Cl^-$  CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), τα κανάλια υποδοχείς ρυανοδίνης (RYRs) και οι υποδοχείς AMPA, ένζυμα του μεταβολισμού, όπως η φωσφατάση της φρουκτόζης (fructose 2,6-bisphosphate phosphatase), η λιπάση και η κινάση της φωσφορυλάσης. Στόχοι της PKA είναι και συστατικά άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει τα φυσιολογικά αποτελέσματα άλλων σηματοδοτικών οδών. Για παράδειγμα, η PKA φωσφορυλιώνει τις φωσφοδιεστεράσες του cGMP ή του cAMP και τη φωσφολαμβάνη (PLN), η οποία ελέγχει την  $Ca^{2+}$ -ATPάση SERCA του σαρκοπλασματικού δικτύου. (Εικόνα 5.61).

**Εικόνα 5.61**  
**Οργάνωση και λειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών του cAMP.** Το cAMP παράγεται από διαμεμβρανικές αδενυλικές κυκλάσες, αλλά και από μια διαλυτή αδενυλική κυκλάση που είναι ευαίσθητη στα  $HCO_3^-$ . Η παραγωγή του ρυθμίζεται τόσο από διεγερτικούς αγωνιστές που δρουν μέσω  $G_{\alpha_s}$  πρωτεϊνών όσο και από ανασταλτικούς αγωνιστές, οι οποίοι δρουν μέσω των  $G_{\alpha_i}$  ή των  $G_{\beta\gamma}$  υπομονάδων. Η αύξηση του cAMP ενεργοποιεί τρεις κύριους τελεστές: 1. Τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Eras, ο οποίος ενεργοποιεί τη μικρή G-πρωτεΐνη Rap2 και αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση Cε και την παραγωγή  $IP_3$  και DAG. 2. Τα κανάλια που ελέγχονται από κυκλικά νουκλεοτίδια (CNGCs) οδηγώντας στην είσοδο ιόντων  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα. 3. Την κινάση PKA, η οποία φωσφορυλιώνει έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο CREB, κανάλια ιόντων, όπως οι υποδοχείς AMPA, ρυανοδίνης και κανάλια CFTR, ένζυμα του μεταβολισμού, όπως η φωσφατάση της 2,6 διφωσφορικής φρουκτόζης (FBPase2), η λιπάση HSL και η κινάση της φωσφορυλάσης, οι φωσφοδιεστεράσες και η φωσφολαμβάνη (PLN), η οποία ελέγχει την  $Ca^{2+}$ -ATPάση SERCA.

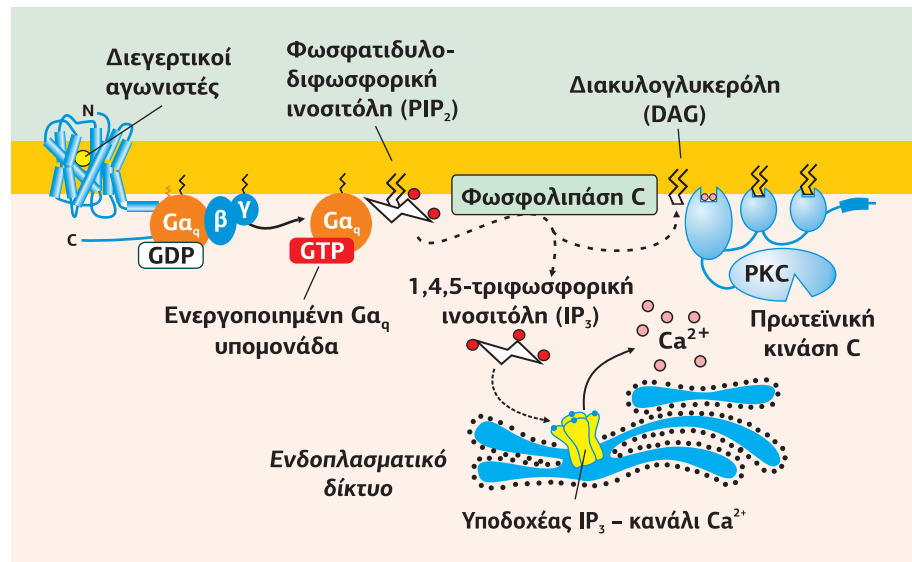


## 4. Φωσφολιπάση C και $\text{InsP}_3$ /διακυλογλυκερόλη

Η φωσφολιπάση C (phospholipase C, PLC) αποτελεί έναν σημαντικό τελεστή των G-πρωτεϊνών. Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη και εκτελεί χρέη φωσφοδιεστεράσης: υδρολύει, δηλαδή, τη φωσφατιδυλοδιφωσφορική ινοσιτόλη ( $\text{PIP}_2$ ) σε διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG), η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, λειτουργώντας ως θέση αγκυροβόλησης και ως ενεργοποιητής της PKC και μερικών άλλων ενζύμων, και σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol-1,4,5-triphosphate,  $\text{InsP}_3$ ), η οποία ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου ανοίγει τα κανάλια  $\text{Ca}^{2+}$  του ενδοπλασματικού δικτύου (**Εικόνα 5.62**). Έτσι τα σήματα που ενεργοποιούν τη δράση της PLC αυξάνουν τα επίπεδα κυτταροπλασματικού  $\text{Ca}^{2+}$  με εκτεταμένες φυσιολογικές συνέπειες. Ιδιαίτερα στους νευρώνες οι PLCs έχουν μία επιπλέον σημαντική λειτουργία: αποικοδομώντας την  $\text{PIP}_2$ , ελέγχουν το άνοιγμα των μη ειδικών καναλιών κατιόντων TRP, μερικά από τα οποία αναστέλλονται, ενώ άλλα ενεργοποιούνται από τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης. Όπως είδαμε στο Κεφάλαιο 4, τα κανάλια TRP παίζουν ρόλο κλειδί στη μεταγωγή αισθητήριων σημάτων, στη γονιμοποίηση και στην ομοίωση του ασβεστίου.

**Εικόνα 5.62**

Ο GPCR μέσω της  $\text{G}_q$  ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (PLC), η οποία υδρολύει τη φωσφατιδυλοδιφωσφορική ινοσιτόλη ( $\text{PIP}_2$ ) σε διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία παραμένει στην κυτταρική μεμβράνη, όπου στρατολογεί και ενεργοποιεί την PKC, και σε τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $\text{IP}_3$ ), η οποία ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και επάγει την απελευθέρωση του  $\text{Ca}^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο.



### 4.1 Οι ισομορφές των φωσφολιπασών C



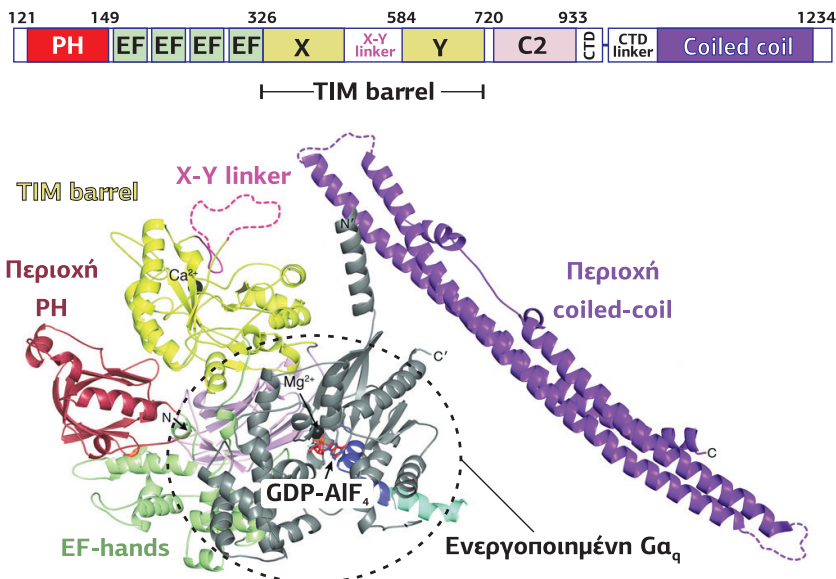
Mabel Hokin (1924-2003)

Οι PI-ειδικές PLCs είναι  $\text{Ca}^{2+}$ -εξαρτώμενα κυτταροπλασματικά ένζυμα. Η ύπαρξη δραστηριότητας PLC προτάθηκε το 1953 από την Mabel Hokin (1924-2003) και τον σύζυγό της Lowell Hokin, οι οποίοι ανέφεραν την εξειδικευμένη υδρόλυση φωσφοϊνοσιτιδίων στο πάγκρεας περιστεριών έπειτα από χολινηργική διέγερση. Το 1981 ο Robert Mitchell έδειξε ότι η υδρόλυση των  $\text{PIP}_2$  της μεμβράνης από μια άγνωστη φωσφολιπάση συνδέεται με την αύξηση της σηματοδότησης του  $\text{Ca}^{2+}$ , ενώ το 1989 ο Sue Goo Rhee αναγνώρισε τη φωσφολιπάση C υπεύθυνη για την υδρόλυση των  $\text{PIP}_2$  σε DAG και  $\text{IP}_3$ . Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα κύτταρα εκφράζουν τουλάχιστον 13 ισομορφές PLCs, καθώς επίσης και πολλά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Με βάση τις δομικές ομοιότητες χωρίζονται σε 6 υποοικογένειες: PLCβ (PLCβ1-4), PLCγ (PLCγ1-2), PLCδ (PLCδ1,3,4), PLCε, PLCζ και PLCη (PLCη1-2). Αν και αρχικά πίστευαν ότι η PLCα είναι ξεχωριστή ισομορφή, σήμερα θεωρείται ότι είναι προϊόν αποικοδόμησης της PLCδ1.

### Δομικά χαρακτηριστικά

Όλες οι PLCs μοιράζονται μία κοινή καταλυτική περιοχή, η οποία χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές X και Y, που αποτελούνται από 147 και 118 αμινοξέα, αντίστοιχα, και συνδέονται μεταξύ τους με ένα X-Y linker. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από α-έλικες και β-κλώνους, που εναλλάσσονται μεταξύ τους, και μοιάζει με τη δομή α/β-βαρελιού της ισομεράσης της φωσφορικής τριόζης (Triose phosphate Isomerase, TIM), γι' αυτό ονομάζεται TIM-barrel.

Οι PLCs περιέχουν, επίσης, τέσσερα EF-χέρια για τη σύνδεση του  $\text{Ca}^{2+}$ , από τα οποία μόνο τα δύο πρώτα μπορούν να συνδέουν ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , μια περιοχή ομόλογη της πλεξτρίνης (PH, Pleckstrin Homology domain) για την αγκυροβόληση στα φωσφοϊνοσιτίδια της μεμβράνης και μια περιοχή C2, η οποία συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη της μεμβράνης και αλληλεπιδρά με ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ . Αν και τα EF-χέρια συνδέουν το  $\text{Ca}^{2+}$ , η  $\text{NH}_2$ -τελική περιοχή των PLCs που περιέχει τα μοτίβα αυτά δεν φαίνεται να είναι η θέση, μέσω της οποίας το ένζυμο ρυθμίζεται από το  $\text{Ca}^{2+}$ . Ωστόσο, η περιοχή αυτή παίζει σημαντικό ρόλο, αφού όταν εξαλείφεται, καταργείται η δράση του ενζύμου (Εικόνα 5.63).



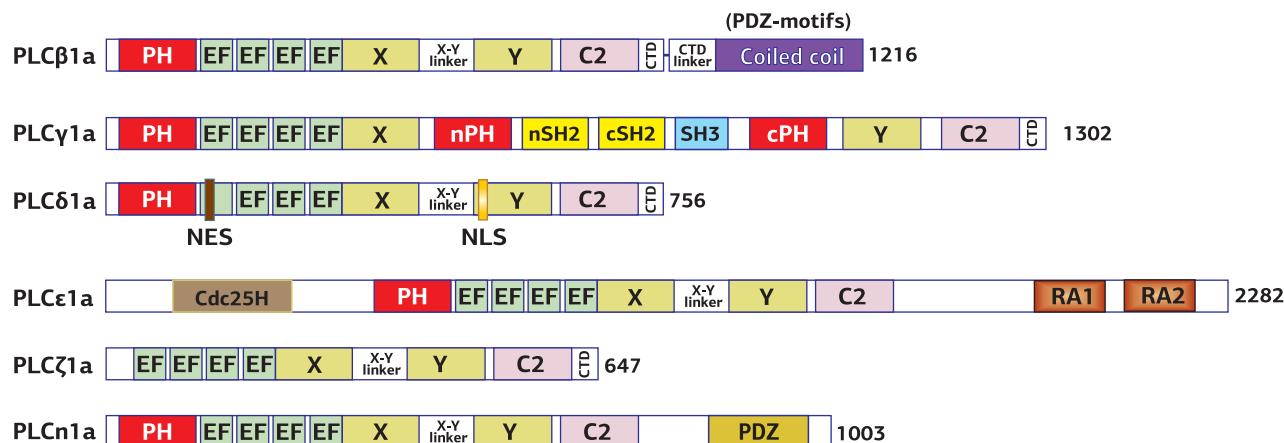
**Εικόνα 5.63**

**Η τριδιάστατη κρυσταλλική δομή της φωσφολιπάσης Cβ (PLCβ3).** Διακρίνεται η περιοχή PH, μέσω της οποίας δεσμεύεται στη φωσφατιδυλο-διφωσφορική ινοσιτόλη ( $\text{PIP}_2$ ) της μεμβράνης, η περιοχή με τα 4 EF-χέρια, που δεσμεύει το  $\text{Ca}^{2+}$ , η καταλυτική περιοχή (TIM-barrel) και η απομακρυσμένη  $\text{COOH}$ -τελική περιοχή υπό μορφή ελικοειδούς δεσμίδας (coiled-coil). Διακρίνεται, επίσης, με σκούρο γκρι η  $\text{Ga}_q$  υπομονάδα στην ενεργή μορφή της με συνδεδεμένο το GTP ( $\text{GDP-AIF}_4$ ). [58]

Καθεμία από τις PLCs (εκτός από την PLCδ) εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η **PLCβ** μετά την περιοχή C2 περιέχει μια επέκταση ~400 αμινοξέων με μορφή ελικοειδούς δεσμίδας (coiled-coil), η οποία αποτελείται από τρία αντιπαράλληλα τμήματα. Η περιοχή αυτή είναι καλά συντηρημένη και παίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση της PLCβ στη μεμβράνη, βελτιστοποιεί τον προσανατολισμό του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου, ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων. Η αποκοπή όλης της coiled-coil περιοχής της PLCβ1 δεν καταστρέφει την καταλυτική δραστηριότητα, αλλά εμποδίζει την ενεργοποίηση του ενζύμου από την  $\text{Ga}_q$ . Επίσης, η coiled-coil περιοχή διεγείρει τη δράση GTPάσης της  $\text{Ga}_{q/11}$ , της G-πρωτεΐνης δηλαδή που ενεργοποιεί την PLCβ. Συνεπώς, η ίδια η PLCβ δρα και ως αρνητικός ρυθμιστής ανατροφοδότησης. Η coiled coil περιέχει ένα PDZ μοτίβο αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες και ένα μοτίβο NLS, που επιτρέπει τη στρατολόγηση της PLCβ στον πυρήνα.

Η **PLCγ** περιέχει δύο SH2 περιοχές και μία SH3 περιοχή, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των καταλυτικών περιοχών X και Y. Αυτές οι περιοχές αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που έχουν φωσφορυλιωμένες Tyr (η SH2) και ακολουθίες πλούσιες σε προλίνη (η SH3). Τέλος, η **PLCε** περιέχει μία RasGEF περιοχή (Cdc25-H), μέσω της οποίας ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση Ras, και δύο περιοχές RA (RalGDS/AF6Ras-Association Domain), μέσω των οποίων συνδέεται με τις GTPάσεις της υπεριοκογένειας Ras (π.χ. Rap1) (Εικόνα 5.64).

Η 3η φωσφορική ομάδα του GTP έχει αντικατασταθεί από το  $\text{AIF}_4$ , για να εμποδιστεί η υδρόλυση προσδίδοντας μεγαλύτερη σταθερότητα.



**Εικόνα 5.64**  
Οι **ισομορφές της φωσφολιπάσης C (PLCβ, PLCγ, PLCδ, PLCε, PLCζ και PLCη)**.

Κοινό όλων των PLCs είναι η καταλυτική περιοχή, η οποία χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές X και Y, οι οποίες συνδέονται με τον X-Y linker. Επίσης, όλες οι PLCs (εκτός από την PLCζ) περιέχουν μια περιοχή πλεξτρίνης (PH) και μια περιοχή C2, μέσω των οποίων δεσμεύονται στα φωσφοϊνοσιτίδια  $PIP_2$  της μεμβράνης, καθώς και μια περιοχή με 4 EF-χέρια ικανή να δεσμεύει το  $Ca^{2+}$ . Στην **PLCβ** στο COOH-τελικό άκρο διακρίνεται η ελικοειδής δεσμίδα (coiled-coil) η οποία περιέχει PDZ περιοχές.

Στην **PLCγ** διακρίνονται οι δύο περιοχές SH2, που συνδέονται στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, και η μία SH3 περιοχή, που συνδέεται σε περιοχές πλούσιες σε προλίνη.

Στην **PLCε** διακρίνονται μία RasGEF περιοχή (Cdc25H), μέσω της οποίας ενεργοποιεί τη μικρή GTPάση Ras, και δύο περιοχές RA (RalGDS/AF6Ras-association domain), μέσω των οποίων συνδέονται με τις GTPάσες της υπεροικογένειας Ras (π.χ. Rap1).

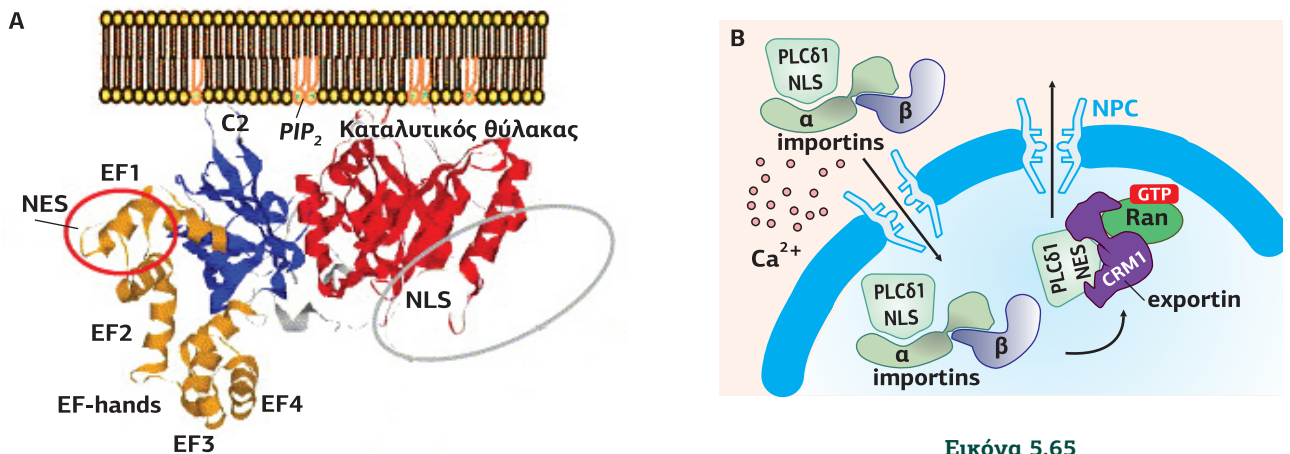
[64] [22]

Οι PLCs ως κυτταροπλασματικά ένζυμα πρέπει να στρατολογηθούν στην κυτταρική μεμβράνη για να έρθουν σε επαφή με το υπόστρωμά τους, που είναι τα φωσφολιπίδια ινοσιτόλης της μεμβράνης. Η στρατολόγηση στη μεμβράνη είναι μια διαδικασία κλειδί για την ενεργοποίησή τους. Η κάθε ισομορφή PLC οδηγείται με διαφορετικό μηχανισμό, αλλά όλες βασίζονται στην αλληλεπίδραση με ενεργοποιητές αγκυροβολημένους στη μεμβράνη, γεγονός που αντιπροσωπεύει τη συμμετοχή των ενζύμων PLC σε ένα σύνθετο δίκτυο μονοπατιών σηματοδότησης.

Τα ένζυμα της υποοικογένειας **PLCβ** στρατολογούνται και ενεργοποιούνται από τις  $G_{q/11}$ - υπομονάδες που είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη. Οι PLCβ1-3 αλληλεπιδρούν, επίσης, με  $G_{\beta\gamma}$ -υπομονάδες. Αυτό σημαίνει ότι οι δεύτεροι διαβιβαστές DAG και  $InsP_3$  παράγονται όχι μόνο μέσω του  $G_{q/11}$  μονοπατιού, αλλά και μέσω της ενεργοποίησης των  $G_{\alpha_{i/o}}$  πρωτεϊνών, οι οποίες είναι η κύρια πηγή των  $G_{\beta\gamma}$ -υπομονάδων στο κύτταρο. Η PLCβ1 και η PLCβ3 είναι ευρέως κατανεμημένες, ενώ η PLCβ2 εκφράζεται στο αιμοποιητικό σύστημα και η PLCβ4 σε νευρικά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς.

Τα ένζυμα της υποοικογένειας **PLCγ** δεν ενεργοποιούνται από τις G-πρωτεΐνες, αλλά στρατολογούνται στους ενεργοποιημένους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων-κινάσες Tyr (RTKs), συνδέονται μέσω των SH2 περιοχών τους στις φωσφορυλιωμένες Tyr των ενεργοποιημένων υποδοχέων και, στη συνέχεια, φωσφορυλιώνονται από αυτούς (βλ. **Εικόνα 8.30**).

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της **PLCδ** είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Επειδή αυτά τα ένζυμα ανταποκρίνονται με μεγάλη ευαισθησία στο  $Ca^{2+}$ , μία αύξηση στην κυτταροπλασματική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , η οποία δημιουργείται από ποικίλα σήματα, είναι πιθανόν αρκετή για την ενεργοποίησή τους. Έχουν το μικρότερο μοριακό βάρος και δεν περιέχουν περιοχές που να είναι μοναδικές σ' αυτές. Καθώς στους απλούς ευκαρυώτες, όπως οι ζυμομύκητες, το *Dictyostelium* και τα ανθοφόρα φυτά εκφράζονται μόνο οι PLCδs, θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν την αρχέγονη μορφή φωσφολιπασών C. Υπάρχει δε μία σκέψη ότι η PLCδ αρχικά ήταν μία  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη γεννήτρια διακυλογλυκερόλης (DAG), η οποία, στη συνέχεια, ενεργοποιούσε την PKC. Σε αυτήν την περίπτωση, το υδατοδιαλυτό προϊόν, η  $IP_3$ , δεν έπαιζε κανένα ρόλο στη σηματοδότηση. Αργότερα κατά την εξέλιξη, όταν η  $IP_3$  έγινε δεύτερος διαβιβαστής, ρυθμίζοντας τα επίπεδα κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$ , εμφανίστηκαν οι πιο σύνθετες δομές PLCs (η β και η γ) που ρυθμιζόνταν από τους υποδοχείς. Όλα τα είδη κυττάρων εκφράζουν τουλάχιστον μία από τις τρεις ισομορφές PLCδ: Την **PLCδ1** (**Εικόνα 5.65**), η οποία είναι κυτταροπλασματική, συναντάται στη μεμβράνη, αλλά περιέχει και αλληλουχίες NLS (Nuclear Localization Sequence) και NES (Nuclear Export Signal), που της επιτρέπουν την είσοδο και έξοδο από τον πυρήνα. Η PLCδ1 στον πυρήνα συσσωρεύεται στη φάση G1/S, διευκολύνοντας το πέρασμα στη φάση S (αρνητικά μεταλλάγματα της PLCδ1 καθυστερούν τη διάρκεια της φάσης S και το πέρασμα στη φάση G2, μειώνοντας τον ρυθμό αύξησης και πολλαπλα-



Εικόνα 5.65

A. Η τριδιάστατη δομή της φωσφολιπάσης Cδ1 (PLCδ1). Διακρίνονται οι αλληλουχίες NLS (Nuclear Localization Sequence) και NES (Nuclear Export Signal), χάρη στις οποίες η PLCδ1 έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται και να εξέρχεται από τον πυρήνα. Β. Την είσοδο της PLCδ1 στον πυρήνα επάγει η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>, η οποία κλείνει και τους πυρηνικούς πόρους (NPC) εμποδίζοντας την άμεση έξοδο της PLCδ1 στο κυτταρόπλασμα. Η είσοδος της PLCδ1 στον πυρήνα γίνεται με τη βοήθεια των importins α/β1, ενώ η έξοδος με τη βοήθεια της exportin CRM1 και της Ran-GTP. [105]

σιασμού των κυττάρων). Επίσης εκφράζουν την PLCδ3 και την PLCδ4, οι οποίες συναντώνται στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη.

Η **PLCε** είναι μοναδική ανάμεσα στις άλλες φωσφολιπάσες C, γιατί εκτός από δράση φωσφολιπάσης έχει και δράση ανταλλάκτη νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) σε μικρές GTPάσες της οικογένειας Ras. Επιπλέον, εκτός από την περιοχή GEF (GTPase nucleotide Exchange Factor domain), μέσω της οποίας ενεργοποιεί τη Rap1, περιέχει και δύο περιοχές RA (RalGDS/AF6Ras-Association domain), μέσω των οποίων συνδέεται με τις GTPάσες της υπεροικογένειας Ras (π.χ. Ras και Rap2) και ενεργοποιείται από αυτές (βλ. **Εικόνα 8.63**). Οι ποικίλες φυσιολογικές της δράσεις ανακαλύφθηκαν σε knock out PLCε<sup>-/-</sup> ποντίκια, όπου, για παράδειγμα, η απουσία PLCε φαίνεται να προκαλεί υπερτροφία της καρδιάς. Στην περίπτωση αυτή η αναστολή της λειτουργίας PLCε θα μπορούσε να είναι μια στρατηγική για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας.

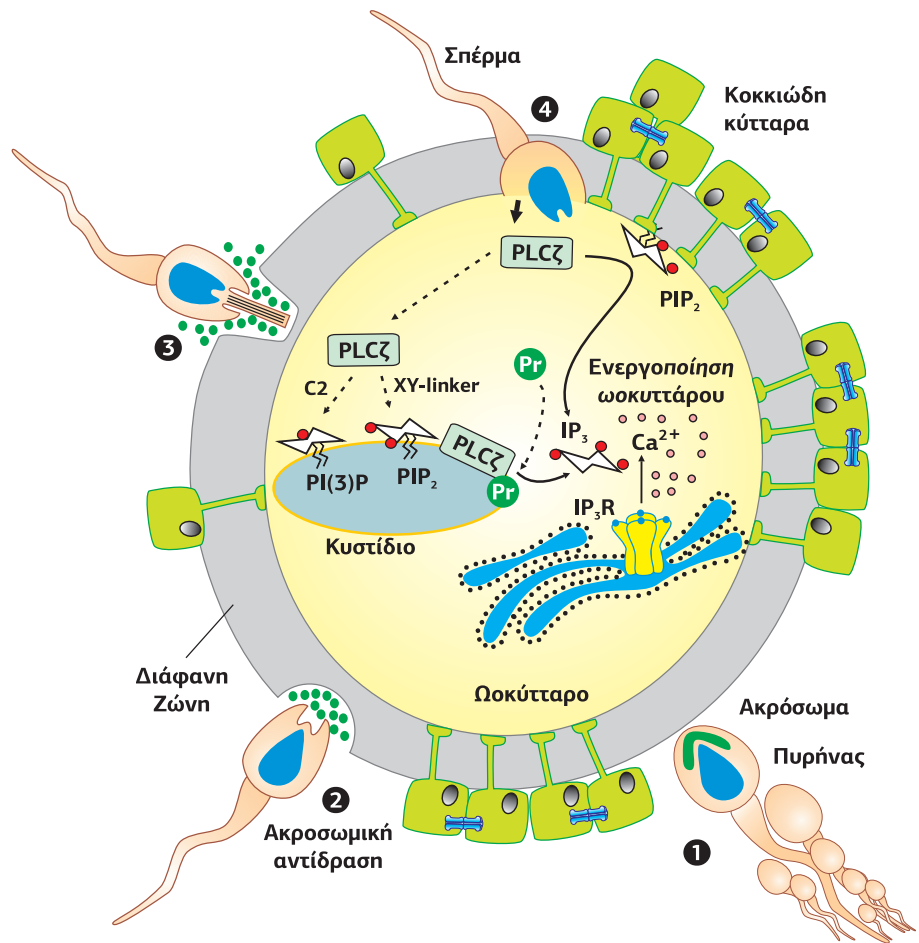
Το 2002 ανακαλύφθηκε στα σπερματοζωάρια μία ακόμα ισομορφή, η **PLCζ**. Αυτό το ένζυμο που είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο Ca<sup>2+</sup> φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο στην ενεργοποίηση του ωαρίου. Είναι καλά τεκμηριωμένο σε όλα τα είδη των θηλαστικών, αλλά και σε πολλά είδη μη-θηλαστικών (π.χ. αχιός), ότι η ενεργοποίηση του ωαρίου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup> του ωαρίου. Μία από τις υποθέσεις που προσπαθούν να εξηγήσουν την αύξηση του Ca<sup>2+</sup> στο ωάριο μετά την είσοδο του σπερματοζωαρίου είναι η "sperm factor hypothesis". Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης η PLCζ του σπερματοζωαρίου εισάγεται στο ωάριο, κατευθύνεται σε ειδικά κυστίδια, των οποίων η μεμβράνη είναι πλούσια σε PIP<sub>2</sub>, και με την υδρόλυση των PIP<sub>2</sub> απελευθερώνει InsP<sub>3</sub>, η οποία επάγει την έξοδο Ca<sup>2+</sup> από το ενδοπλασματικό δίκτυο (**Εικόνα 5.66**). Η έρευνα για την PLCζ έχει μεγάλο ιατρικό ενδιαφέρον, καθώς το ένζυμο αναμένεται να διευκολύνει την τεχνητή γονιμοποίηση και την παραγωγή εμβρυικών βλαστικών κυττάρων.

Η **PLCη** ανακαλύφθηκε το 2005 ως το τελευταίο μέλος της οικογένειας, το οποίο εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες του εγκεφάλου. Επειδή είναι η πιο ευαίσθητη PLC στο Ca<sup>2+</sup>, θεωρείται ότι δρα ως αισθητήρας του Ca<sup>2+</sup> των νευρώνων, ικανή να ανταποκρίνεται σε πολύ γρήγορες αλλαγές της συγκέντρωσης κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>. Ανάμεσα στις φυσιολογικές λειτουργίες που προτείνονται για την PLCη είναι η διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, η διαδικασία της μνήμης, η ρύθμιση του κερκιδίου ρυθμού, η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή και η παθογένεση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, που συνδέονται με ανεξέλεγκτη σηματοδότηση του Ca<sup>2+</sup>, όπως η ασθένεια Alzheimer.

Συνοψίζοντας, οι φωσφολιπάσες C (PLCs) είναι μια μεγάλη οικογένεια κυτταροπλασματικών ενζύμων, η οποία περιλαμβάνει 13 μέλη. Οι PLCβ στρατολογούνται στη μεμβράνη έπειτα από ενεργοποίηση των GPCRs που είναι συνδεδεμένοι με Gα<sub>q/11</sub> ή Gα<sub>i</sub> (ως πηγή των Gβγ), ενώ οι PLCγ στρατολογούνται στη μεμβράνη έπει-

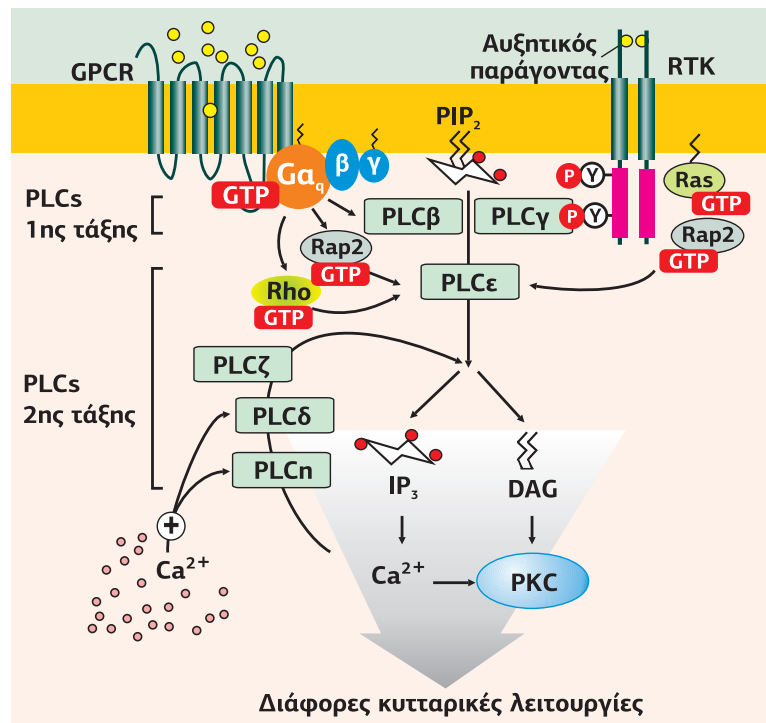
**Εικόνα 5.66**

**Υποθετικός μηχανισμός της ρύθμισης της PLCζ.** Μετά τη σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωαρίου η PLCζ διαχέεται από το σπερματοζώαριο στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου και κατευθύνεται σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά κυστίδια, των οποίων η μεμβράνη περιέχει PIP<sub>2</sub>. Η περιοχή με τα EF-χέρια της PLCζ της προσδίδει υψηλή ευαισθησία στο Ca<sup>2+</sup>, επιτρέποντας στο ένζυμο να ενεργοποιηθεί στα επίπεδα ηρεμίας του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup> (nM) του ωαρίου, με αποτέλεσμα την ολοένα και αυξανόμενη δραστηριότητά του όσο το Ca<sup>2+</sup> αυξάνεται. Η σύνδεση της PLCζ στη μεμβράνη των κυστιδίων πραγματοποιείται μέσω της C2 περιοχής, η οποία αλληλεπιδρά είτε με PI(3)P είτε/και με μια άγνωστη ακόμη πρωτεΐνη (Pr). Τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της περιοχής XY-linker σταθεροποιούν τη σύνδεση της PLCζ στη μεμβράνη μέσω αλληλεπιδράσεων με τα αρνητικά φορτισμένα PIP<sub>2</sub>. Μετά τη σύνδεσή της στη μεμβράνη η καταλυτική περιοχή της PLCζ υδρολύει τα PIP<sub>2</sub> παράγοντας IP<sub>3</sub>, η οποία στη συνέχεια επάγει την έξοδο Ca<sup>2+</sup> από το ενδοπλασματικό δίκτυο. [66]



**Εικόνα 5.67**

Οι PLCβ και PLCγ χαρακτηρίζονται ως 1ης τάξης PLCs, καθώς ενεργοποιούνται από υποδοχείς, όπως οι PLCβ μέσω GPCRs και των πρωτεϊνών Gα<sub>q</sub> ή Gβγ και οι PLCγ μέσω υποδοχών αυξητικών παραγόντων-κινασών Tyr. Οι υπόλοιπες PLCs χαρακτηρίζονται ως 2ης τάξης, καθώς δεν ενεργοποιούνται άμεσα από υποδοχείς. Για παράδειγμα, η PLCε ενεργοποιείται από τις μικρές GTPάσες Rho/Rap (οι οποίες ενεργοποιούνται από τους RTKs και τους GPCRs), ενώ οι PLCδ και PLCη ενεργοποιούνται από τα ιόντα Ca<sup>2+</sup>. Όσον αφορά τον τρόπο ενεργοποίησης της PLCζ δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Πιθανολογείται ότι είναι το Ca<sup>2+</sup>. Οι ενεργοποιημένες PLCs υδρολύουν τα PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> παράγοντας δύο δευτέρους διαβιβαστές, τη διακυλογλυκερόλη (DAG), η οποία ενεργοποιεί την PKC, και την τριφωσφορική ινositόλη (IP<sub>3</sub>), η οποία επάγει την απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το ενδοπλασματικό δίκτυο. [107]





τα από ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (RTKs). Καθώς και οι δύο ενεργοποιούνται άμεσα από υποδοχείς, χαρακτηρίζονται PLCs 1ης τάξης. Οι υπόλοιπες PLCs χαρακτηρίζονται ως 2ης τάξης, καθώς στρατολογούνται στη μεμβράνη είτε έπειτα από ενεργοποίηση των GTPασών της υπεροικογένειας Ras (π.χ. Rho, Rap2) είτε μετά την αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$ . Στη μεμβράνη υδρολύουν τα φωσφολιπίδια ινοσιτόλης  $PIP_2$  σε λιπόφιλη διακυλογλυκερόλη (DAG) και σε υδατοδιαλυτή τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $IP_3$ ) (Εικόνα 5.67). Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των 13 διαφορετικών ισομορφών φωσφολιπασών είναι η αύξηση του  $Ca^{2+}$  και η ενεργοποίηση της κινάσης PKC, με ποικίλα φυσιολογικά αποτελέσματα, λόγω της εξειδικευμένης κατανομής της κάθε ισομορφής και των διαφορετικών περιοχών αλληλεπίδρασης που περιέχει. Η απορρύθμιση των φωσφολιπασών είναι υπεύθυνη για έναν σημαντικό αριθμό ανθρώπινων ασθενειών και οι PLCs έχουν ταυτοποιηθεί ως θεραπευτικοί στόχοι για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών αυτών.

## 4.2

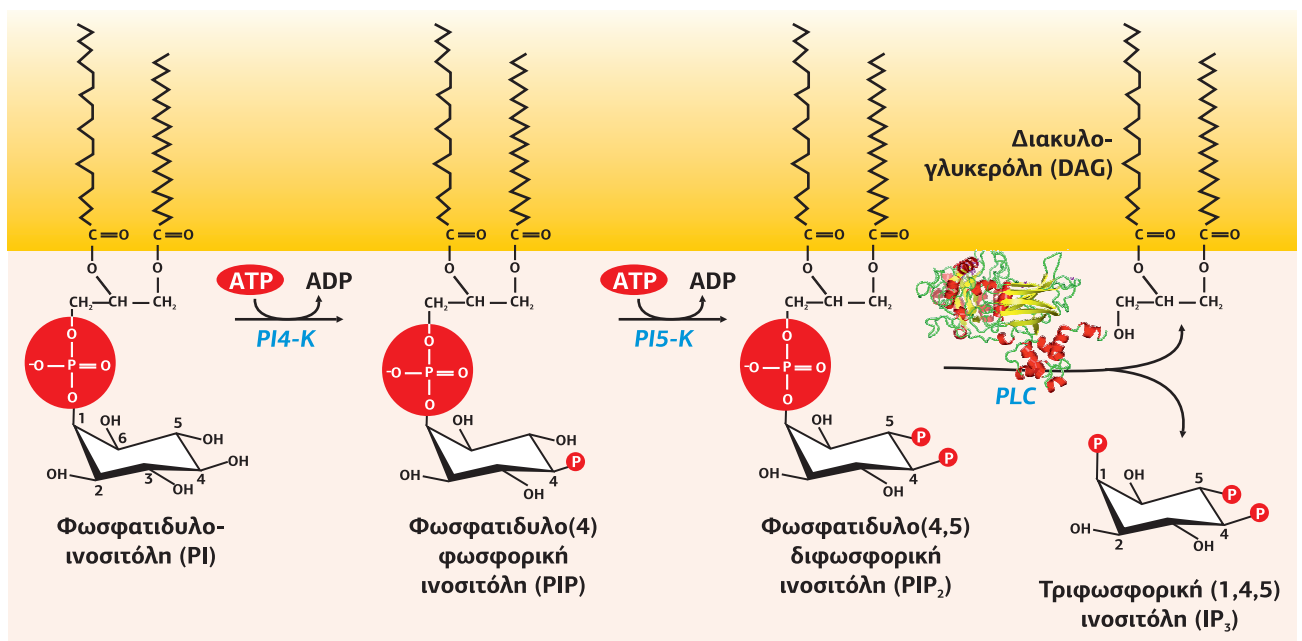
### Τα πολυφωσφοϊνοσιτίδια της ινοσιτόλης (PPI) της κυτταρικής μεμβράνης

Η  $PIP_2$  είναι το μόριο που υδρολύουν οι φωσφολιπάσες C σε  $IP_3$  και DAG. Είναι ένα ασυνήθιστο γλυκεροφωσφολιπίδιο της μεμβράνης, γιατί περιέχει τρεις φωσφορικές ομάδες αντί για μία που έχουν όλα τα άλλα λιπίδια της μεμβράνης. Ονομάζεται φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινοσιτόλη, γιατί παράγεται από τη **φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI)**, η οποία φωσφορυλιώνεται από την κινάση PI4K και προσλαμβάνει μια φωσφορική ομάδα στο 4ο άτομο άνθρακα του κύκλου της ινοσιτόλης της, παράγοντας τη **φωσφατιδυλο(4)μονοφωσφορική ινοσιτόλη (PIP)**. Στη συνέχεια, η PIP φωσφορυλιώνεται από την κινάση PI5K και προσλαμβάνει ακόμη μια φωσφορική ομάδα στο 5ο άτομο άνθρακα και μετατρέπεται σε **φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινοσιτόλη ( $PIP_2$ )** (Εικόνα 5.68).



Αυτά τα φωσφολιπίδια της ινοσιτόλης ονομάζονται πολυφωσφοϊνοσιτίδια (PPI) και αποτελούν μόλις το 1% των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης ενός ευκαρυωτικού κυττάρου.

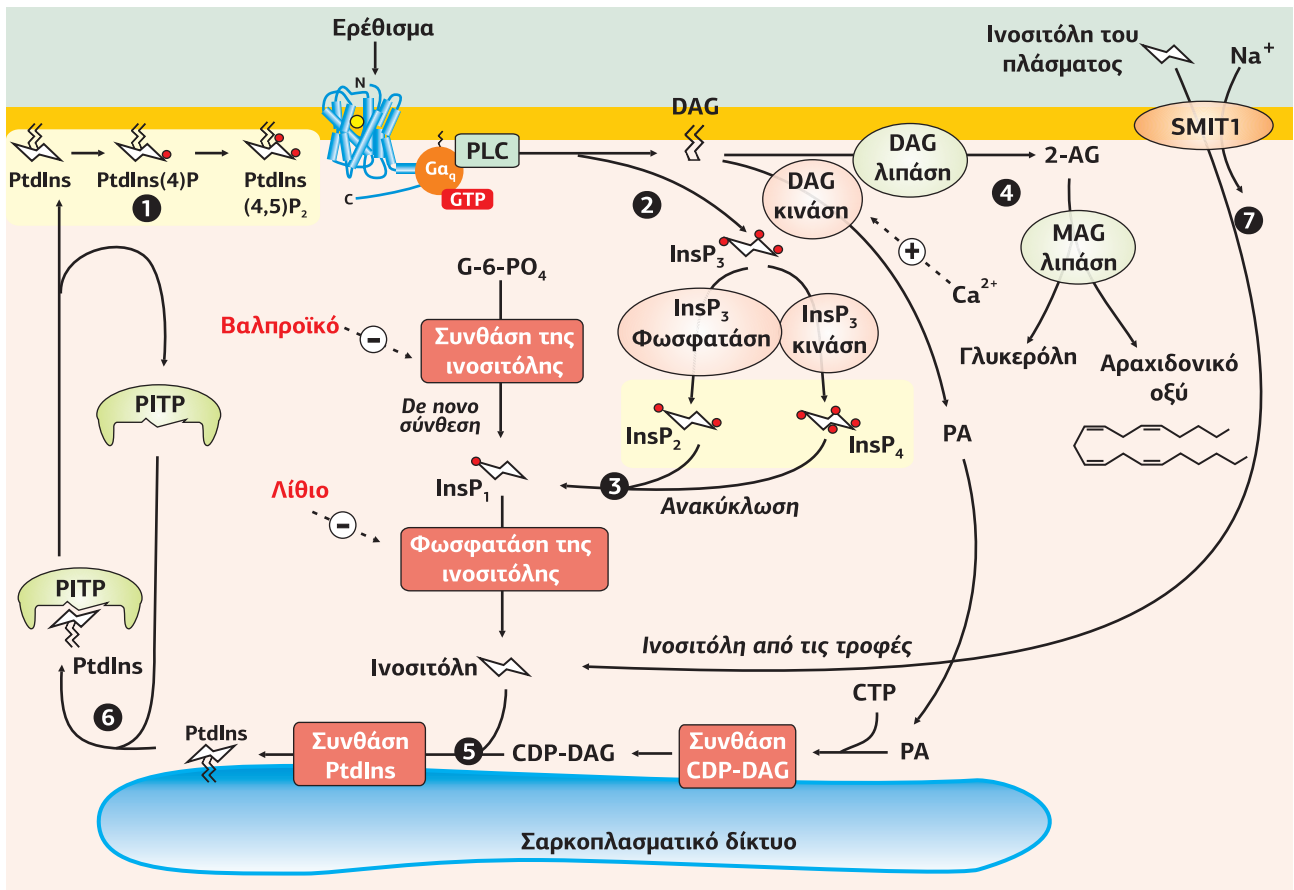
**Εικόνα 5.68**  
**Παραγωγή της  $PIP_2$  με διαδοχικές φωσφορυλιώσεις και η υδρόλυσή της σε  $IP_3$  και DAG.** Η PI μέσω της PI4-Κινάσης μετατρέπεται σε PIP, η οποία μέσω της PI5-Κινάσης μετατρέπεται σε  $PIP_2$ . Η  $PIP_2$  υδρολύεται από τη φωσφολιπάση C (PLC) σε  $IP_3$ , η οποία απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και DAG, η οποία παραμένει στη μεμβράνη. [56]



### 4.3 Διακυλογλυκερόλη

Η διακυλογλυκερόλη είναι ο μόνος δεύτερος διαβιβαστής που δεν εγκαταλείπει την κυτταρική μεμβράνη. Αρχικά φαινόταν παράδοξο ότι μόρια τόσο κοινά, όπως οι διακυλογλυκερόλες, μπορούσαν να παίξουν τον ρόλο δεύτερου διαβιβαστή. Και χρησιμοποιούμε πληθυντικό γιατί υπάρχουν τόσες διακυλογλυκερόλες όσες οι ποικιλίες των λιπαρών οξέων  $R_1COOH$  και  $R_2COOH$ , ικανών να εστεροποιήσουν τη γλυκερόλη.

Ενώ το  $R_1COOH$  διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (π.χ. στα αιμοπετάλια είναι το στεατικό οξύ), το  $R_2COOH$  είναι πάντοτε το αραχιδονικό οξύ, γεγονός που δεν είναι τυχαίο, αφού το λιπαρό αυτό οξύ είναι ο πρόδρομος των εικοσανοειδών: προσταγλανδινών (που παίζουν σημαντικό ρόλο στον φυσιολογικό μηχανισμό της φλεγμονής), λευκοτριενίων και θρομβοξανών.



**Εικόνα 5.69**

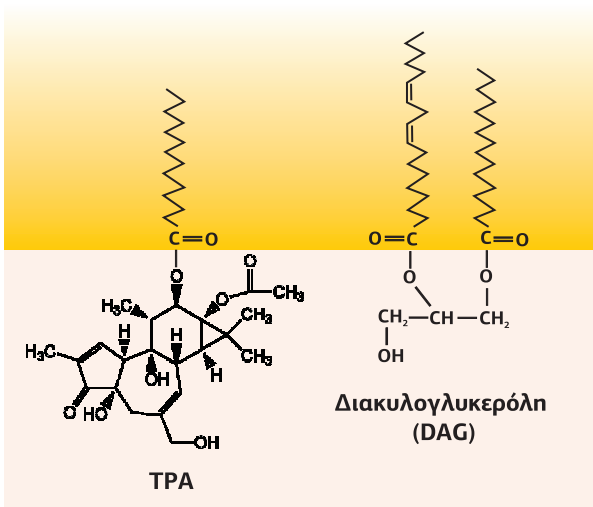
**Ο μεταβολικός κύκλος και η αναγέννηση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI ή PtdIns).** 1. Η PtdIns της μεμβράνης με δύο διαδοχικές φωσφορυλιώσεις μετατρέπεται σε PtdIns(4)P και PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ή PIP<sub>2</sub>. 2. Η PIP<sub>2</sub> μέσω της φωσφολιπάσης C (PLC) μετατρέπεται σε Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> και DAG. Η DAG φωσφορυλιώνεται από την DAG κινάση και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA), από το οποίο μέσω της CDP-DAG συνθάσης και με την προσθήκη CTP παράγεται η CDP-διακυλογλυκερόλη στη μεμβράνη του ΕΔ. 5. Από τη CDP-διακυλογλυκερόλη, με την προσθήκη ινοσιτόλης και με τη βοήθεια της συνθάσης της PtdIns, παράγεται η PtdIns, η οποία μεταφέρεται με την PI-τρανσφεράση (PITP, Phosphatidylinositol Transfer Protein) από τη μεμβράνη του ΕΔ στην πλασματική μεμβράνη. 4. Η DAG εκτός από τη φωσφορυλίωση υδρολύεται από την DAG-λιπάση σε 2-αραχιδονο-γλυκερόλη (2AG), η οποία στη συνέχεια υδρολύεται από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL) σε γλυκερόλη, και 2-αραχιδονικό οξύ (2AA), η κύρια πηγή σύνθεσης των εικοσανοειδών. 3. Η IP<sub>3</sub> αποφωσφορυλιώνεται σταδιακά σε IP<sub>2</sub>, IP<sub>1</sub> και ινοσιτόλη από αντίστοιχες φωσφατάσες. Στην εικόνα διακρίνονται οι τρεις πηγές ινοσιτόλης, η ινοσιτόλη που προκύπτει από την αποφωσφορυλίωση της IP<sub>3</sub> ή IP<sub>4</sub>, η ινοσιτόλη που συντίθεται *de novo* από την 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6-PO<sub>4</sub>) και η ινοσιτόλη που προέρχεται από την τροφή και εισέρχεται στα κύτταρα με τη βοήθεια του μεταφορέα SMIT1.

Η DAG, χωρίς να εγκαταλείψει την κυτταρική μεμβράνη, μεταδίδει το μήνυμα ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση C, PKC (Protein Kinase-Calcium dependent). Για την ενεργοποίηση της κινάσης αυτής χρειάζονται τρεις ενεργοποιητές: το ασβέστιο ( $\text{Ca}^{2+}$ ), η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η διακυλογλυκερόλη (DAG) (βλ. **Εικόνα 5.75**). Η φωσφατιδυλοσερίνη βρίσκεται σε αφθονία στις μεμβράνες και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, η αύξηση του  $\text{Ca}^{2+}$  στρατολογεί την PKC στη μεμβράνη, όπου η DAG ρυθμίζει τη δραστηριότητά της. Η PKC ενεργοποιεί με τη σειρά της (φωσφορυλιώνοντας) άλλες πρωτεΐνες.

Η διακυλογλυκερόλη καταβολίζεται μέσω δύο οδών (**Εικόνα 5.69**):

1. Υδρολύεται από την **DAG λιπάση (DAGL)** σε 2-αραχιδονογλυκερόλη (2AG), η οποία στη συνέχεια υδρολύεται από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης (MAGL) και παράγεται γλυκερόλη και 2-αραχιδονικό οξύ (2AA), η κύρια πηγή σύνθεσης των εικοσανοειδών.
2. Φωσφορυλιώνεται από την **DAG κινάση** (η οποία μεταφέρεται στη μεμβράνη ως απόκριση στην αύξηση του κυτταροπλασματικού  $\text{Ca}^{2+}$ ) και μετατρέπεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA). Το PA είναι η πηγή αναγέννησης των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, καθώς μεταφέρεται στο ΕΔ, όπου με προσθήκη CTP (Cytidine TriPhosphate) παράγεται η CDP-διακυλογλυκερόλη. Από τη CDP-διακυλογλυκερόλη, με την προσθήκη ινσοιτόλης και με τη βοήθεια της συνθάσης της PtdIns, παράγεται η φωσφατιδυλο-ινσοιτόλη (PI ή PtdIns) της μεμβράνης.

Οι **φορβολεστέρες** (εστέρες της φορβόλης) είναι μια κατηγορία φυτικών ουσιών που εξάγονται από τους σπόρους ενός φυτού της ΝΑ Ασίας, την ευφόρβια. Έχουν ανάλογη δομή με τη διακυλογλυκερόλη (**Εικόνα 5.70**) και ενεργοποιούν απευθείας την PKC. Οι ουσίες αυτές κορηγούμενες προκαλούν καρκινογένεση και ονομάζονται προωθητές όγκων. Η δράση τους αυτή εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κινάσης PKC, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί το μονοπάτι των MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases), που παίζει μεγάλο ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη αλλά και στον καρκίνο.



**Εικόνα 5.70**  
Οι φορβολεστέρες έχουν παρόμοια δομή με τη διακυλογλυκερόλη και ενεργοποιούν απευθείας την PKC. Στην εικόνα διακρίνεται η δομή του φορβολεστέρα TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) και της διακυλογλυκερόλης (DAG).



Ευφόρβια ή γαλατσίδα

Η **ευφόρβια ή γαλατσίδα** πήρε το όνομά της από τον Eurphorbos, τον Έλληνα γιατρό του βασιλιά Juba της Νουμίδας, ο οποίος παντρεύτηκε την κόρη του Αντωνίου και της Κλεοπάτρας. Ο Eurphorbos ήταν ένας πολυγραφότατος συγγραφέας σε διάφορα θέματα, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής ιστορίας. Σε ένα από τα βιβλία του περιέγραψε έναν κάκτο (σήμερα ονομάζεται *Euphorbia obtusifolia*), του οποίου οι ρίζες είχαν χρησιμοποιηθεί ως ισχυρό καθαρτικό. Το 1753 ο Carl Linnaeus έδωσε το όνομα Euphorbia σε ολόκληρο το γένος προς τιμήν του ιατρού. Πολλά φυτά της οικογένειας Euphorbiaceae προκαλούν συμπτώματα δηλητηρίασης με κάψιμο και πόνους στο στομάχι, εμετούς, αιματηρές κενώσεις, σπασμωδικές κινήσεις του εντέρου, άγχος, κατάπτωση δυνάμεων και θάνατο μέσα σε γενική εξάντληση. Αρκούν δε μερικές σταγόνες από τον χυμό του φυτού στο δέρμα για να προκληθούν φλύκταινες και σοβαρές φλεγμονές.

#### 4.4 | Τριφωσφορική ινσοιτόλη [ $\text{IP}_3$ ή $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ]

Η ανακάλυψη ότι η φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινσοιτόλη ( $\text{PIP}_2$ ) υδρολύεται σε DAG και  $\text{IP}_3$  από μια άγνωστη φωσφολιπάση και στη συνέχεια η ανακάλυψη του ρόλου της  $\text{IP}_3$  ως δεύτερου διαβιβαστή, ο οποίος “ταξιδεύει” μέσω του κυτταροπλάσματος στο ΕΔ, όπου διεγείρει την απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$ , μπορεί να θεωρηθεί ως μία



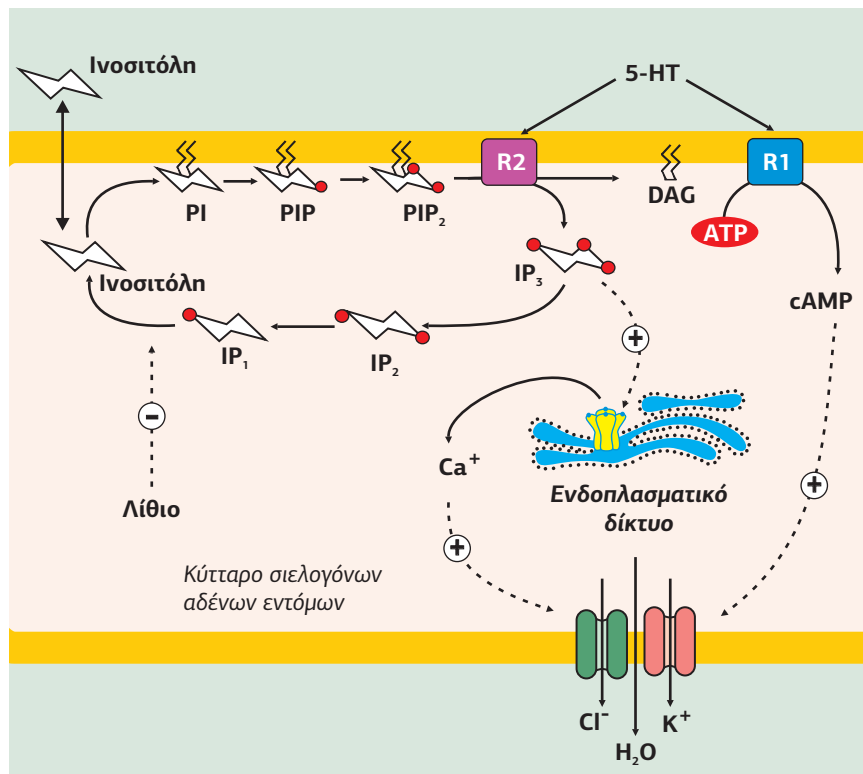
Sir Michael John Berridge  
(1938 -2020)

από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στην κατανόηση του πώς τα κύτταρα μπορούν να μεταφράσουν ένα εξωτερικό χημικό ερέθισμα σε αύξηση ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Η ανακάλυψη της $\text{IP}_3$ ως δεύτερου διαβιβαστή από τον Michael Berridge

Ο Sir Michael John Berridge (1938-2020) είναι ένας Βρετανός φυσιολόγος και βιοχημικός. Το ενδιαφέρον του για το  $\text{Ca}^{2+}$  προέκυψε μελετώντας τον μηχανισμό που ελέγχει την έκκριση σάλιου από τους σιελογόνους αδένες εντόμων, μετά τη διέγερσή τους από τη σεροτονίνη (5-HT) κατά τη διάρκεια του γεύματος. Επρόκειτο για τη μεταδιδακτορική έρευνα του Berridge στο Case Western Reserve University, στο Cleveland, όπου ο Earl Sutherland μόλις είχε ανακαλύψει το cAMP και είχε αναπτύξει την ιδέα του δεύτερου διαβιβαστή. Το 1968 ο Berridge ανακάλυψε ότι η διεγερτική δράση της 5-HT διπλασιαζόταν με την προσθήκη cAMP. Στη συνέχεια, ανακάλυψε ότι το cAMP ενεργοποιούσε την έξοδο  $\text{K}^+$ . Το  $\text{Cl}^-$  ακολουθούσε παθητικά και αυτή η μεταφορά  $\text{KCl}$  δημιουργούσε την ωσμωτική βαθμίδωση, η οποία οδηγούσε στην έκκριση του σάλιου. Ωστόσο, η παθητική έξοδος  $\text{Cl}^-$  ενεργοποιούνταν από την 5-HT ανεξάρτητα του cAMP, προτείνοντας ότι η 5-HT έχει δύο δράσεις, η μία μέσω του cAMP οδηγεί στην έξοδο του  $\text{K}^+$ , και η άλλη αυξάνει την έξοδο  $\text{Cl}^-$ . Γρήγορα ανακαλύφθηκε ότι για την έξοδο  $\text{Cl}^-$  υπεύθυνο είναι το  $\text{Ca}^{2+}$ , το οποίο απελευθερώνεται από ενδοκυτταρικές αποθήκες. Συνεπώς, η σεροτονίνη δρα μέσω δύο τύπων υποδοχέων, καθένας από τους οποίους συνδέεται με διαφορετικό μεταγωγικό μονοπάτι, ο R1 χρησιμοποιεί cAMP για να ενεργοποιήσει την έξοδο  $\text{K}^+$  και ο R2 χρησιμοποιεί το  $\text{Ca}^{2+}$  για να ανοίξει κανάλια  $\text{Cl}^-$  (Εικόνα 5.71).

Καθώς έψαχνε να συνδέσει τους μεμβρανικούς υποδοχείς με τις ενδοκυτταρικές αποθήκες  $\text{Ca}^{2+}$ , ο Berridge βασίστηκε στις έρευνες των Hokin και Hokin, οι οποίοι το 1953 ανακάλυψαν ότι η ακετυλοχολίνη μπορεί να διεγείρει τον μεταβολισμό των φωσφατιδυλο-ινοσιτιδίων (PI). Το 1975 ο R. Michell πρότεινε ότι αυτή η υδρόλυση των  $\text{PIP}_2$  συνδέεται με τη σηματοδότηση  $\text{Ca}^{2+}$ . Για μια άμεση απόδειξη ότι η υδρόλυση των  $\text{PIP}_2$  συνδέεται με τη σηματοδότηση  $\text{Ca}^{2+}$ , ο Berridge προσπάθησε να δείξει ότι η εξάντληση της ινοσιτόλης αναστέλλει τη σηματοδότηση. Όταν οι αδένες διεγέρθηκαν επί δύο ώρες με υψηλή δόση 5-HT και ξεπλύθηκαν επα-



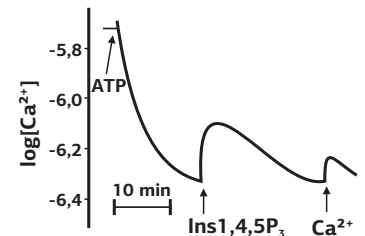
**Εικόνα 5.71**

Το ολοκληρωμένο μονοπάτι που προτάθηκε από τον Sir Michael Berridge, μέσω του οποίου η σεροτονίνη (5-HT) ενεργοποιεί την έκκριση σάλιου από τους σιελογόνους αδένες εντόμων. Η 5-HT δρα μέσω δύο υποδοχέων, του R1, ο οποίος μέσω του cAMP ενεργοποιεί την έξοδο ιόντων  $\text{K}^+$ , και του R2, ο οποίος μέσω της υδρόλυσης των  $\text{PIP}_2$  οδηγεί στην απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από το ΕΔ ενεργοποιώντας την έξοδο ιόντων  $\text{Cl}^-$ . [7]

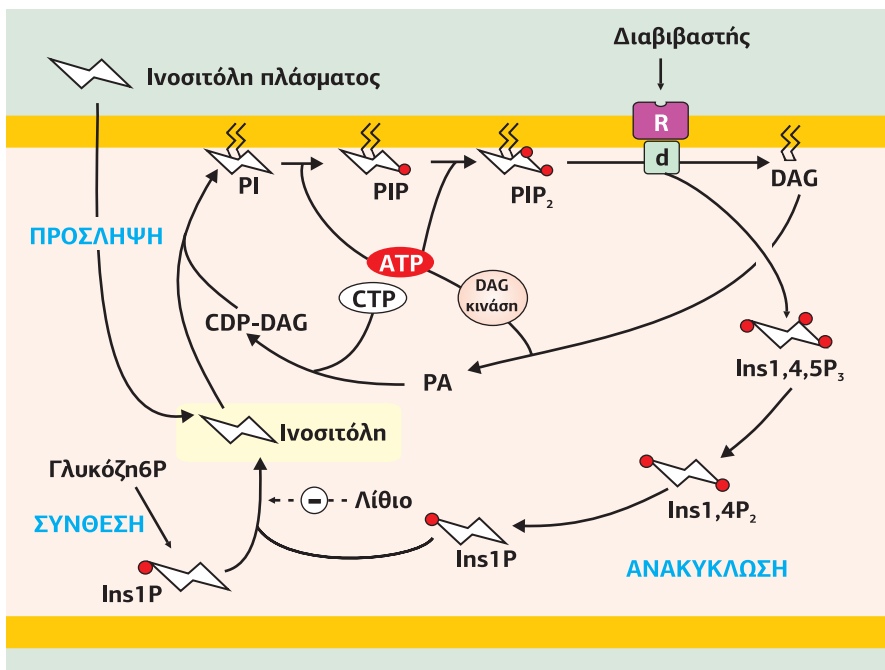
νείλημμένα, για να απομακρυνθεί η ινοσιτόλη, υπήρξε μια δραματική μείωση της σηματοδότησης  $Ca^{2+}$ . Ιδιαίτερα σημαντικό ήταν το γεγονός ότι η σηματοδότηση  $Ca^{2+}$  επανερχόταν έπειτα από επώαση των αδένων με ινοσιτόλη, επιτρέποντας την ανασύσταση των επιπέδων των  $PIP_2$  που απαιτούνται για τη σηματοδότηση. Ήταν σαφές από αυτά τα πειράματα ότι η υδρόλυση των  $PIP_2$  ήταν άμεσα συνδεδεμένη με την αύξηση  $Ca^{2+}$  και το επόμενο πρόβλημα ήταν να ανακαλυφθεί ο μηχανισμός.

Για την αποκάλυψη του μηχανισμού κρίσιμο ρόλο έπαιξε το  $Li^+$ , το οποίο ήταν ισχυρός ανταγωνιστής της φωσφατάσης της ινοσιτόλης, η οποία αποφωσφορυλιώνει τη μονοφωσφορική ινοσιτόλη  $IP_1$  σε ινοσιτόλη. Επώαση των αδένων με  $Li^+$  πριν από την ενεργοποίηση της υδρόλυσης των  $PIP_2$  μειώνει τα επίπεδα ινοσιτόλης, καθώς αναστέλλει την αποφωσφορυλίωση της  $IP_1$  σε ινοσιτόλη. Προσπαθώντας να μετρήσει τα προϊόντα της υδρόλυσης των  $PIP_2$  μετά τον διαχωρισμό τους σε στήλες ανταλλαγής ανιόντων, ο Berridge ανακάλυψε ότι, εκτός από τη μεγάλη συσσώρευση  $IP_1$  κατά την αναστολή με  $Li^+$ , εμφανίζονταν δύο επιπλέον κορυφές, οι οποίες αποδείχθηκε ότι ήταν η διφωσφορική(1,4)ινοσιτόλη ( $IP_2$ ) και η τριφωσφορική(1,4,5)ινοσιτόλη ( $IP_3$ ). Έπειτα από μελέτες κινητικής αποκάλυψε ότι η  $IP_3$  δημιουργείται πρώτη και πολύ γρήγορα και ακολουθεί η  $IP_2$ , ενώ η  $IP_1$  και η ινοσιτόλη εμφανίζονται πολύ αργότερα. Η ανακάλυψη ότι μετά την προσθήκη 5-HT υπήρχε μια περίοδος 1-2 sec πριν από την έναρξη της ηλεκτρικής αλλαγής, που προκαλείται από την  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενη ενεργοποίηση των καναλιών  $Cl^-$ , και τα επίπεδα της  $IP_3$  ήταν αυξημένα πριν από αυτή την φυσιολογική απόκριση οδήγησαν τον Berridge να προτείνει ότι η  $IP_3$  θα μπορούσε να είναι ο δεύτερος διαβιβαστής-αγγελιοφόρος, ο οποίος διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και συνδέει την ενεργοποίηση του υποδοχέα με την κινητοποίηση των εσωτερικών αποθηκών  $Ca^{2+}$ .

Η ύπαρξη εσωτερικών αποθηκών  $Ca^{2+}$ , οι οποίες απελευθερώνουν μέρος του περιεχομένου τους έπειτα από διέγερση εξωκυτταρικού διαβιβαστή έγινε γνωστή στα τέλη του 1970 από την Irene Schultz στη Γερμανία. Η Schultz χρησιμοποιώντας απορρυπαντικά, όπως η σαπωνίνη, εφύρξε μια τεχνική που καθιστούσε τα κύτταρα διαπερατά, επιτρέποντας την είσοδο στα κύτταρα φωσφορυλιωμένων μορίων, όπως το ATP και η  $IP_3$ . Ο Berridge και ο Robin Irvine απομόνωσαν μεγάλες ποσότητες  $IP_3$  στο Cambridge και τις έστειλαν στη Γερμανία στη Schultz να τις ελέγξει στο σύστημά της. Το 1983 ο Berridge, ο Irvine και η Schultz απέδειξαν ότι η  $IP_3$  ήταν ικανή να απελευθερώσει  $Ca^{2+}$  από εσωτερικές αποθήκες (μη μιτοχονδριακές),



Στο παραπάνω πείραμα ο Berridge συνεργάστηκε με την Irene Schulz, η οποία είχε ένα παρασκεύασμα διαπερατών παγκρεατικών κυττάρων, στο οποίο προσθήκη ATP οδηγούσε σε ενεργή πρόσληψη  $Ca^{2+}$  από το ΣΔ/ΕΔ.



**Εικόνα 5.72**  
Προτεινόμενο μοντέλο από τον Berridge για τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν την υδρόλυση των  $PIP_2$  της μεμβράνης, υπό την επίδραση ενός εξωκυτταρικού διαβιβαστή. [6]

Berridge MJ, Irvine RF (1984), Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312(5992): 315-21.

δημοσιεύοντας άρθρο στο περιοδικό *Nature*. Στη συνέχεια, η αρχική παρατήρηση επιβεβαιώθηκε σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ήπατος, κυττάρων που εκκρίνουν ινσουλίνη και λευκοκυττάρων, καθιστώντας σαφές ότι η  $IP_3$  ήταν ο περιζήτητος δεύτερος διαβιβαστής που κινητοποιούσε το εσωτερικό  $Ca^{2+}$ .

### Το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιεί η $IP_3$

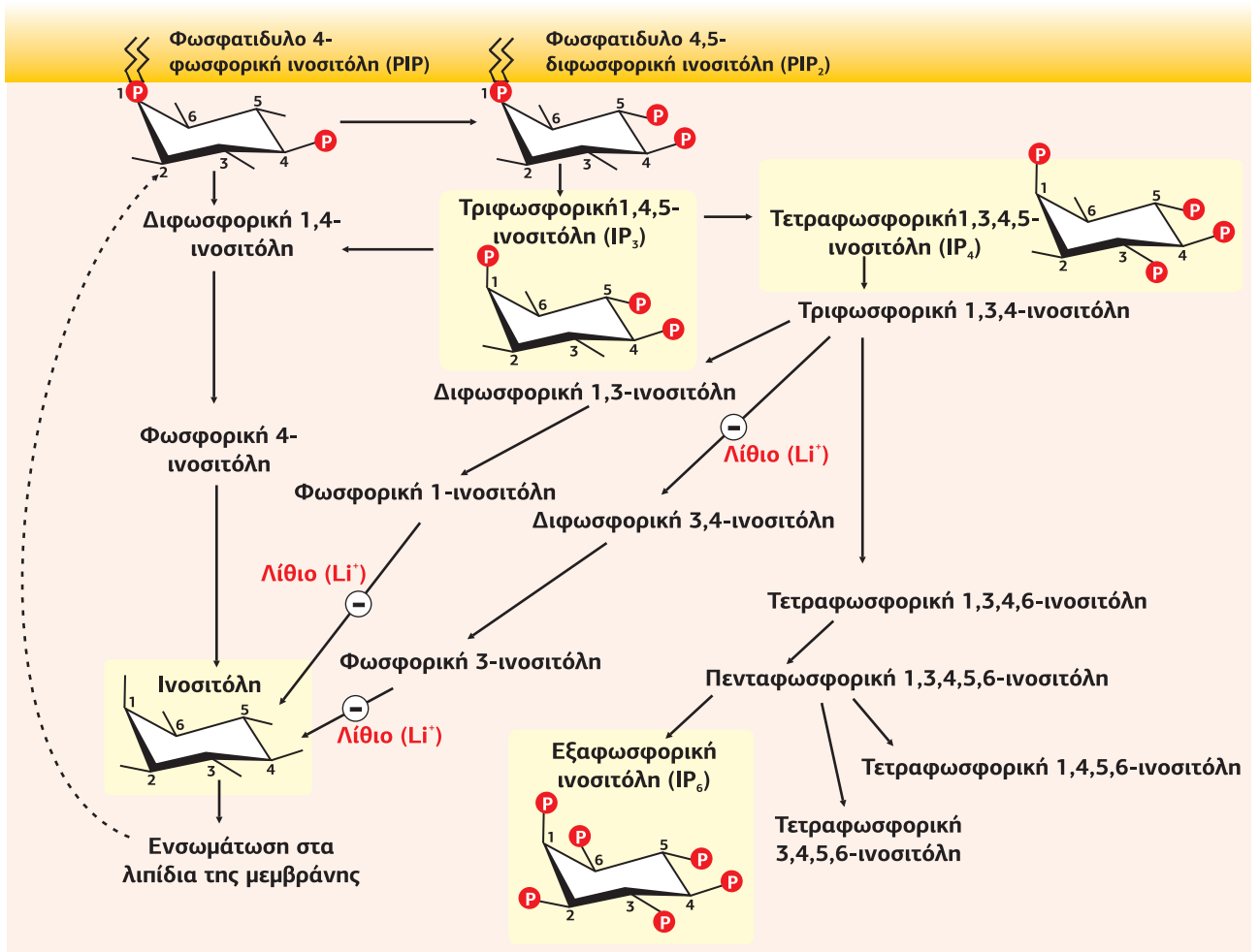
Η  $IP_3$  δεσμεύεται σ' έναν ειδικό υποδοχέα κανάλι  $Ca^{2+}$  που βρίσκεται στη μεμβράνη του ΕΔ. Με την ενεργοποίηση του υποδοχέα  $IP_3$  ανοίγει το κανάλι και το  $Ca^{2+}$  απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Η συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  είναι 15.000 φορές μεγαλύτερη στον εξωκυτταρικό χώρο από ό,τι στο κυτταρόπλασμα, γιατί το  $Ca^{2+}$  είναι αποθηκευμένο σε εσωτερικές αποθήκες, όπου βρίσκεται συνδεδεμένο με ειδικές πρωτεΐνες, όπως η καλρετικουλίνη, η οποία επειδή έχει χαμηλή συγγένεια για το  $Ca^{2+}$ , έχει ικανότητα σύνδεσης μεγάλης ποσότητας  $Ca^{2+}$ . Η αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  είναι ένα επιπλέον στάδιο ενίσχυσης του αρχικού μηνύματος. Κάθε μόριο  $IP_3$  αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου κατά 20 ιόντα  $Ca^{2+}$ . Το ασβέστιο συνδέεται, στη συνέχεια, σε πρωτεΐνες, όπως η καλμοδουλίνη (CaM, calmodulin), οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση και ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες στόχους, όπως οι  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνο-εξαρτώμενες κινάσες (CaM-kinases).

### Ο μεταβολισμός της $Ins(1,4,5)P_3$

Όπως είδαμε από την υδρόλυση των  $PIP_2$  προκύπτει η  $Ins(1,4,5)P_3$ . Καθώς η ινοσιτόλη έχει την ιδιότητα να φέρει από καμία έως 6 φωσφορικές ομάδες ( $IP_6$  ή  $InsP_6$ ), δημιουργεί μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων, με την  $IP_3$  να βρίσκεται στο κέντρο, οδηγώντας στη δημιουργία υψηλότερα φωσφορυλιωμένων συστατικών με 4, 5, 6 φωσφορικές ομάδες ή χαμηλότερα φωσφορυλιωμένων μορφών, όπως η  $IP_2$  και η ινοσιτόλη (**Εικόνα 5.73**). Η προσθήκη φωσφορικών ομάδων στην ινοσιτόλη καταλύεται από κινάσες, ενώ η απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων καταλύεται από φωσφατάσες.

Ποιον σκοπό, όμως, εξυπηρετεί η ύπαρξη όλων αυτών των φωσφορυλιωμένων μορφών της ινοσιτόλης; Αρχικά, απενεργοποιείται η  $IP_3$  και, συνεπώς, "σβήνει" το σήμα. Για παράδειγμα, αν η  $IP_3$  μετατραπεί σε μια άλλη μορφή είτε με περισσότερες είτε με λιγότερες φωσφορικές ομάδες, η συγκέντρωσή της στο κυτταρόπλασμα μειώνεται, κατά συνέπεια περιορίζεται η απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από το ΕΔ και η σηματοδότηση σταματά. Κατά δεύτερο λόγο, οι νέες φωσφορυλιωμένες μορφές ινοσιτόλης που δημιουργούνται μπορούν να έχουν από μόνες τους έναν σηματοδοτικό ρόλο. Η  $IP_3$  δεν είναι η μόνη φωσφορυλιωμένη ινοσιτόλη που δρα ως σηματοδοτικό μόριο. Για παράδειγμα, η  $Ins(1,4,5)P_3$  φωσφορυλιώνεται από την  $IP_3$ -κινάση ( $IP_3K$ , μια κυτταροπλασματική κινάση που ενεργοποιείται από την αύξηση του  $Ca^{2+}$ ) σε  $Ins(1,3,4,5)P_4$  ή  $IP_4$ , η οποία δρα συνεργατικά με την  $IP_3$  ενεργοποιώντας την είσοδο  $Ca^{2+}$  από κανάλια της πλασματικής μεμβράνης. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πρόδρομων Τ-λεμφοκυττάρων και στην απόκρισή τους στα αντιγόνα, συμμετέχοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TcRs (T-cell Receptors). Μειωμένη παραγωγή  $InsP_4$  στα λεμφοκύτταρα προκαλεί ανοσοανεπάρκεια και συμβάλλει στη φλεγμονώδη αγγειίτιδα της νόσου Kawasaki.

Με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην  $IP_4$  δημιουργείται η πενταφωσφορική ινοσιτόλη ( $IP_5$ ). Θεωρητικά υπάρχουν έξι πιθανές μορφές  $IP_5$ , αλλά στα ζώα η πιο διαδεδομένη μορφή είναι η  $Ins(1,3,4,5,6)P_5$ . Κάποιες μορφές  $IP_5$  βρέθηκαν στα φυτά και στο *Dictyostelium* θεωρώντας ότι οι  $IP_5$  μπορούν να παίξουν έναν καθοριστικό ρόλο. Αφαίρεση μιας φωσφορικής ομάδας από την  $Ins(1,3,4,5,6)P_5$  οδηγεί στη δημιουργία δύο  $IP_4$ , της  $Ins(3,4,5,6)P_4$  (αν και ο ακριβής της ρόλος μένει να αποδειχθεί, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει εξειδικευμένα επιθηλιακά  $Ca^{2+}$ -εξαρτώμενα κανάλια  $Cl^-$ ) ή της  $Ins(1,4,5,6)P_4$ , ενώ πρόσθεση μιας φωσφορικής ομάδας οδηγεί στη δημιουργία της  $IP_6$ . Παρά το γεγονός ότι η εξαφωσφορική ινοσιτόλη ( $InsP_6$ ) είναι η πιο διαδεδομένη φωσφορυλιωμένη μορφή ινοσιτόλης στη φύση, ο κυττα-



ρικός της ρόλος παραμένει αδιευκρίνιστος. Αυτό είναι εν μέρει μια συνέπεια της απουσίας απόκρισης της  $InsP_6$  σε εξωκυτταρικά σήματα, με αξιοσημείωτη εξαίρεση την απόκριση του *Schizosaccharomyces pombe* σε υπέρτονο ωσμωτικό σοκ, η οποία οδηγεί σε ταχύτατη αύξηση των επιπέδων της  $InsP_6$ . Ένας ρόλος για την  $InsP_6$  στην κυτταρική σηματοδότηση προτάθηκε πρόσφατα στα β-κύτταρα του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη, όπου δείχθηκε ότι προσθήκη 10 mM  $InsP_6$  αυξάνει το L-ρεύμα  $Ca^{2+}$ .

Όπως η πρόσθεση, έτσι και η αφαίρεση φωσφορικών ομάδων από την ινοσιτόλη έχει μεγάλη σημασία, όχι μόνο για τη δημιουργία πολλών φωσφορυλιωμένων παραγώγων ινοσιτόλης, αλλά και για την απελευθέρωση της ινοσιτόλης, η οποία επιστρέφει στην πλασματική μεμβράνη, όπου χρησιμοποιείται ως πρώτο συνθετικό για τη δημιουργία της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI). Το δεύτερο συνθετικό είναι η CDP-διακυλογλυκερόλη, η οποία όπως είδαμε παράγεται από το φωσφατιδικό οξύ (που δημιουργείται από τη φωσφορυλίωση της διακυλογλυκερόλης από την DAG κινάση), το οποίο αντιδρά με την τριφωσφορική κυτοσίνη (CTP) στη μεμβράνη του ΕΔ (βλ. **Εικόνα 5.69**).

Η 5-φωσφατάση των πολυφωσφορικών ινοσιτολών είναι ένα αρκετά κοινό ένζυμο, το οποίο απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα από τη θέση 5' της ινοσιτόλης, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα διάφορα φωσφορυλιωμένα παράγωγα ινοσιτόλης. Για παράδειγμα, υδρολύει την  $Ins(1,4,5)P_3$  δημιουργώντας την  $Ins(1,4)P_2$ , που στη συνέχεια υδρολύεται από την 4-φωσφατάση και μετατρέπεται σε  $Ins(1)P$ , η οποία τελικά αποφωσφορυλιώνεται σε ινοσιτόλη. Η  $Ins(1,4)P_2$  προέρχεται, επίσης, και από την υδρόλυση της  $PtdIns(4)P$  (PIP). Οι πολλές και διαφορετικές μορφές των φωσφα-

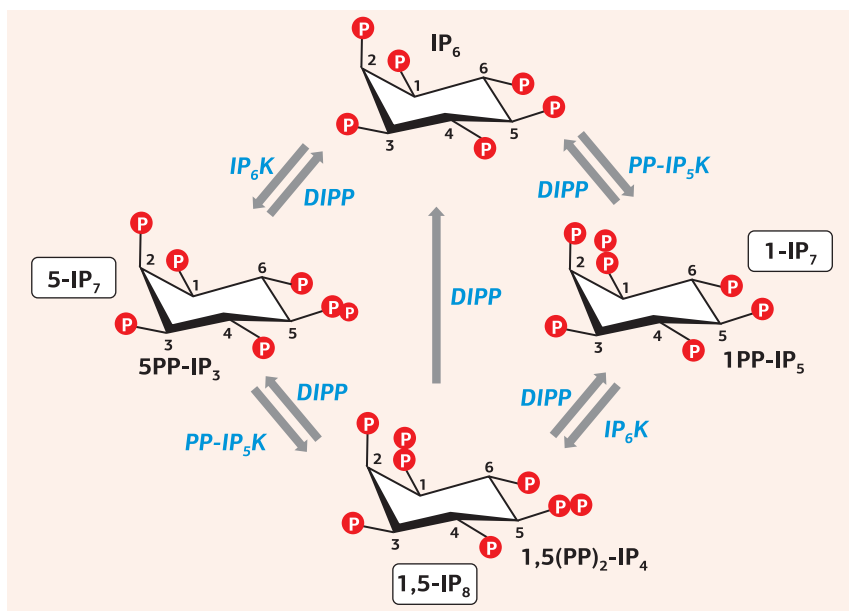
### Εικόνα 5.73

#### Μεταβολισμός της $Ins(1,4,5)P_3$ .

Η τριφωσφορική(1,4,5)ινοσιτόλη ( $InsP_3$  ή  $IP_3$ ) παράγεται από την υδρόλυση των  $PIP_2$ . Βρίσκεται στο κέντρο μιας μεγάλης ποικιλίας φωσφορυλιωμένων παραγώγων της ινοσιτόλης, η οποία μπορεί να προσλάβει από μία έως έξι φωσφορικές ομάδες. Συνεπώς, η  $IP_3$  με συνεχείς φωσφορυλιώσεις μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία υψηλότερα φωσφορυλιωμένων συστατικών της ινοσιτόλης με 4, 5, 6 φωσφορικές ομάδες, ενώ με συνεχείς αποφωσφορυλιώσεις οδηγεί σε χαμηλότερα φωσφορυλιωμένες μορφές, όπως η  $IP_2$ , η  $IP$  και η ινοσιτόλη. Στην εικόνα διακρίνεται, επίσης, η υδρόλυση των  $PtdIns4P$  (PIP), η οποία οδηγεί στη δημιουργία  $Ins(1,4)P_2$ .

**Εικόνα 5.74**

Η φωσφορυλίωση της  $IP_6$  από την  $IP_6$ -κινάση ( $IP_6K$ ) μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή  $5-IP_7$  και  $1-IP_7$ , των οποίων η φωσφορυλίωση οδηγεί σε  $1,5-IP_8$ . Όλες οι πυροφωσφορικές ινοσιτόλες αποφωσφορυλιώνονται από ειδικές φωσφατάσες DIPP (Diphosphoinositide Phosphate Phosphohydrolases) [17]



τασών που έχουν ανακαλυφθεί και οι πιθανές αντιδράσεις που καταλύουν αυτά τα ένζυμα συντείνουν στο ότι ο ρόλος τους δεν είναι μόνο η απομάκρυνση της  $IP_3$  από το κύτταρο, αλλά ότι τα προϊόντα τους έχουν καθορισμένους σηματοδοτικούς ρόλους.

Μια άλλη σημαντική φωσφατάση είναι η *1-φωσφατάση*, η οποία απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα από τη θέση 1' της ινοσιτόλης. Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από το λίθιο ( $Li^+$ ), το οποίο εμποδίζει τη δημιουργία ινοσιτόλης από  $Ins(1)P$ , προκαλώντας συσσώρευση των  $Ins(1)P$ ,  $Ins(1,4)P_2$  και  $Ins(1,4,5)P_3$ . Στη δράση αυτή του λιθίου έχει αποδοθεί ο θεραπευτικός του ρόλος στη μανιο-κατάθλιψη.

Άλλες μορφές φωσφορυλιωμένων ινοσιτολών είναι οι **πυροφωσφορικές ινοσιτόλες**, οι οποίες περιέχουν δύο φωσφορικές ομάδες συνδεδεμένες σε έναν άνθρακα. Αυτές οι μορφές είναι πολύ κοινές στο *Dictyostelium*, αλλά και στα θηλαστικά έχει βρεθεί ότι φωσφορυλίωση της  $IP_6$  από την  $IP_6$ -κινάση μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή  $5-IP_7$  και  $1-IP_7$ , των οποίων η φωσφορυλίωση οδηγεί σε  $1,5-IP_8$  (**Εικόνα 5.74**). Απουσία της κινάσης της εξαφωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_6K$ ) σε ποντίκια αποκαλύπτει τον ρόλο του ενζύμου αυτού στην ομοιόσταση της ινσουλίνης, στην παχυσαρκία και στην ανοσολογική απόκριση.

## 4.5

### Πρωτεϊνική κινάση C: δομή και ενεργοποίησή από DAG και $Ca^{2+}$

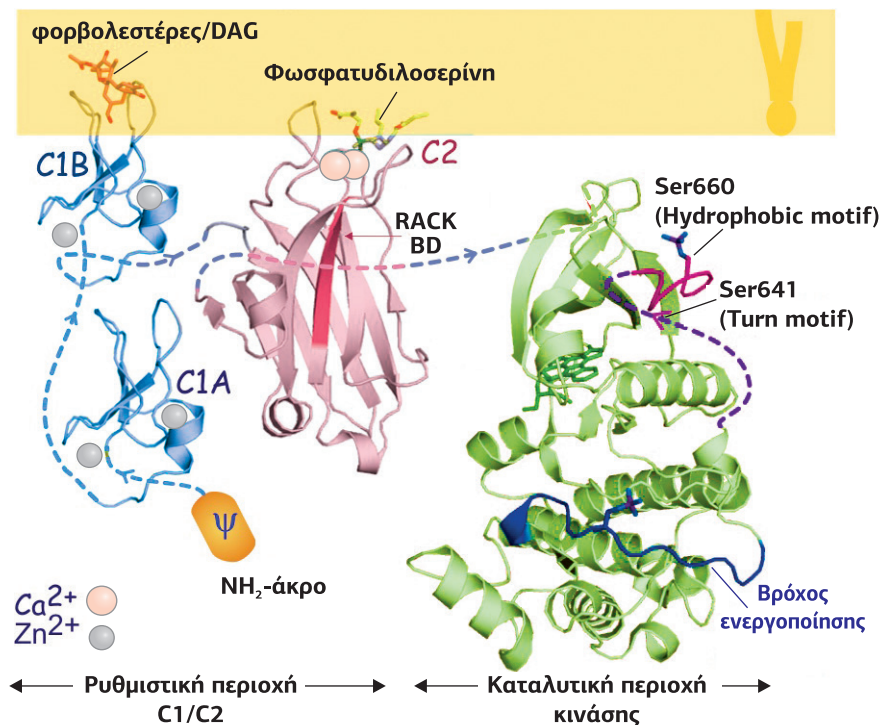
Η αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  και η παρουσία της DAG στην πλασματική μεμβράνη οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), μιας πρωτεϊνικής κινάσης που φωσφορυλιώνει κατάλοιπα Ser/Thr σε πολλές πρωτεΐνες στόχους. Έχουν αναγνωριστεί 12 διαφορετικές ισομορφές PKC, από τις οποίες οι περισσότερες ρυθμίζονται από  $Ca^{2+}$  και DAG.

Οι PKCs, σύμφωνα με τη χαρακτηριστική δομή των ευκαρυωτικών κινασών, αποτελούνται από μια καταλυτική (βλ. **Εικόνα 1.32**) και μια ρυθμιστική περιοχή, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο (hinge region). Στο COOH-τελικό άκρο βρίσκεται η καταλυτική περιοχή κινάσης, όμοια με της PKA. Στη ρυθμιστική περιοχή υπάρχει η **περιοχή C2**, η οποία δρα ως αισθητήρας  $Ca^{2+}$  και επιπλέον συνδέεται με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης και ιδιαίτερα με τη φωσφατιδυλοσερίνη, καθώς και η **περιοχή C1**, η οποία συνδέεται στη διακυλογλυκερόλη, αλλά και σε μη ενδογενή ανάλογα, όπως οι φορβολεστέρες. Η περιοχή C1 αποτελείται από δύο μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες, **C1A** και **C1B**, καθένα από τα



οποία οργανώνεται γύρω από δύο ιόντα  $Zn^{2+}$ . Τέλος, στο  $NH_2$ -τελικό άκρο της PKC υπάρχει μια αλληλουχία της μορφής -A-R-K-G-A-L-R-Q-K-, η οποία μοιάζει με την αλληλουχία των υποστρωμάτων που φωσφορυλιώνονται από τις PKCs, χωρίς όμως να περιέχει κατάλοιπα Ser/Thr για φωσφορυλίωση. Η αλληλουχία αυτή ονομάζεται **αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος**, γιατί σε κατάσταση ηρεμίας συνδέεται και φράζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, παρεμποδίζοντας τη δέσμευση του υποστρώματος (Εικόνα 5.75 και βλ. Εικόνα 7.23).

Πριν από την ενεργοποίησή της η PKC βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα. Με την υδρόλυση της  $PIP_2$  από τη φωσφολιπάση C η συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  και DAG αυξάνεται, με αποτέλεσμα τη σύνδεσή τους στις περιοχές C2 και C1, αντίστοιχα, στρατολογώντας την PKC στη μεμβράνη. Η αλληλεπίδραση της PKC με τη μεμβράνη απομακρύνει το ψευδοϋπόστρωμα από το ενεργό κέντρο, καθιστώντας την PKC έτοιμη να φωσφορυλιώσει κατάλοιπα Ser/Thr σε κατάλληλες αλληλουχίες υποστρωμάτων (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφάλαιο 7: Πρωτεϊνικές κινήσεις και φωσφατάσες Ser/Thr, σσ. 416-425).

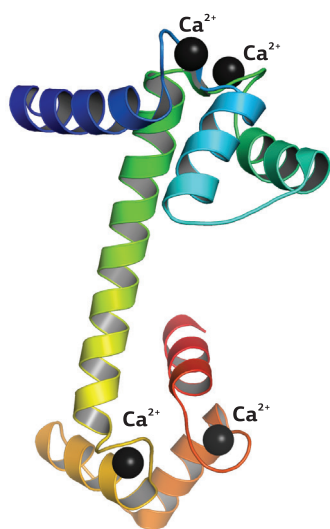


**Εικόνα 5.75**  
Η στρατολογημένη στη μεμβράνη PKC, μετά την αύξηση της συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$  και της DAG. Διακρίνεται η καταλυτική περιοχή, ο εύκαμπτος σύνδεσμος, ο οποίος συνδέει την καταλυτική με τη ρυθμιστική περιοχή (C1, C2 και ψευδοϋπόστρωμα). Η περιοχή C2 δρα ως αισθητήρας  $Ca^{2+}$  και συνδέεται σε φωσφολιπίδια της μεμβράνης, κυρίως στη φωσφατυδιλοσερίνη, επίσης περιέχει μια περιοχή σύνδεσης της RACK (RACK Binding Domain) (βλ. σελ. 420). Η περιοχή C1 συνδέεται στη διακυλογλυκερόλη και στους φορβολεστέρες. Η περιοχή του ψευδοϋποστρώματος ( $\psi$ ) έχει απομακρυνθεί από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, επιτρέποντας τη δέσμευση του υποστρώματος. Στην καταλυτική περιοχή διακρίνεται ο βρόχος ενεργοποίησης και τα δύο μοτίβα, Turn motif (Ser641) και Hydrophobic motif (Ser660), που πρέπει να φωσφορυλιωθούν για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου (βλ. και Εικόνα 7.23). [32]

## 4.6 | Η GPCR-εξαρτώμενη σηματοδότηση του $Ca^{2+}$

Όπως είδαμε, η υδρόλυση των  $PIP_2$  από τη φωσφολιπάση C οδηγεί στην έξοδο του  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών στόχων μέσω δύο κύριων μηχανισμών:

1. Πολλές πρωτεΐνες (ένζυμα, κανάλια ιόντων, μεταφορείς) περιέχουν ειδικές θέσεις σύνδεσης για το  $Ca^{2+}$  και η δραστηριότητά τους εξαρτάται άμεσα από τη σύνδεση του  $Ca^{2+}$ . Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η PKC.
2. Ο άλλος κεντρικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος μέσω  $Ca^{2+}$  εμπλέκει ειδικές πρωτεΐνες που συνδέουν  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -binding proteins), γνωστές και ως **υποδοχείς  $Ca^{2+}$** . Οι υποδοχείς  $Ca^{2+}$  έχουν υψηλή συγγένεια ( $K_D < 10^{-6}M$ ) και μεγάλη εξειδίκευση για το  $Ca^{2+}$ . Οι υποδοχείς αυτοί δρουν ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούν πρωτεΐνες στόχους. Ο πιο γνωστός



**Εικόνα 5.76**  
**Το σύμπλοκο  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνη.** Η καλμοδουλίνη είναι μια πρωτεΐνη 150 αμινοξέων, που μπορεί να δεσμεύσει τέσσερα  $\text{Ca}^{2+}$  στα τέσσερα EF-χέρια της.

υποδοχέας  $\text{Ca}^{2+}$  είναι η **καλμοδουλίνη**, μια μικρή πρωτεΐνη 150 αμινοξέων, η οποία έχει 4 EF-χέρια και συνδέει 4  $\text{Ca}^{2+}$  (**Εικόνα 5.76**). Το σύμπλοκο  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνη έχει μια πολύ εύπλαστη δομή. Η ευκινησία αυτή έχει μεγάλη σημασία για τη δράση του συμπλόκου.

Μέσω της καλμοδουλίνης το  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να ενεργοποιήσει περισσότερα από 100 διαφορετικά ένζυμα. Για παράδειγμα:

- Ενεργοποιεί την **κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης** (MLCK: Myosin Light Chain Kinase), η οποία φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλώντας τη σύσπαση της ακτινομυοσίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα.
- Ενεργοποιεί τη **συνθάση του NO**, η οποία παράγει NO, έναν αέριο διαβιβαστή, ο οποίος εισέρχεται στα λεία μυϊκά κύτταρα προκαλώντας χάλαση.
- Η καλμοδουλίνη αποτελεί τη δ-υπομονάδα της **κινάσης της φωσφορυλάσης**, της πρώτης πρωτεϊνικής κινάσης που ανακαλύφθηκε. Η  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνη ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση, οδηγώντας στον καταβολισμό του γλυκογόνου.
- Ενεργοποιεί τις πολυλειτουργικές **CAM-εξαρτώμενες κινάσες** (CAMK-I, CAMK-II και CAMK-IV), οι οποίες φωσφορυλιώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Μεταξύ αυτών, η CAMK-II παίζει κύριο ρόλο στη μνήμη και στη μάθηση.
- Ενεργοποιεί τις **αδενυλικές κυκλάσες τύπου I** (κυρίως ισομορφές στον εγκέφαλο), οι οποίες παράγουν cAMP, και τη **φωσφοδιεστεράση διπλής εξειδίκευσης PDE1**. Η ρύθμιση αυτών των δύο ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη αυξομείωση του cAMP στους νευρώνες.

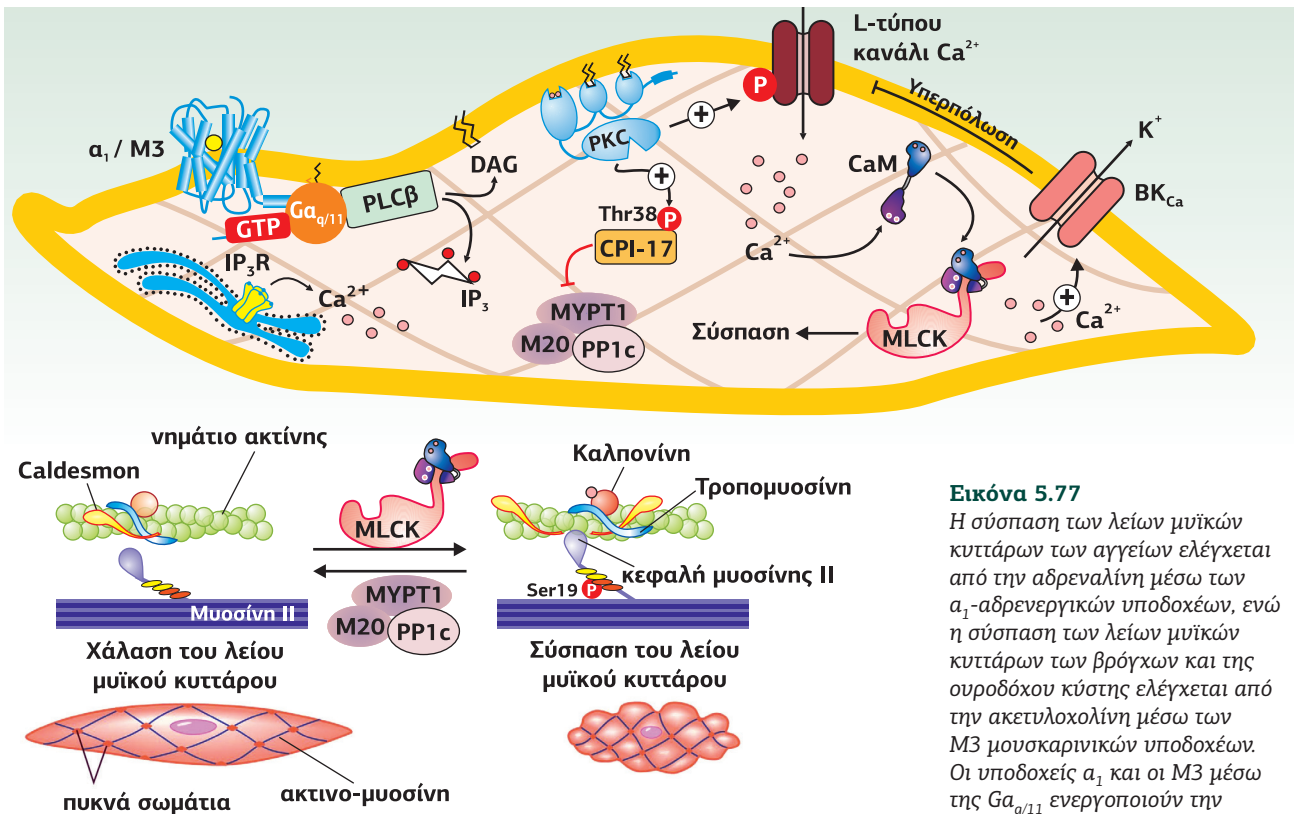
### Ενεργοποίηση της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων

Τα λεία μυϊκά κύτταρα καλύπτουν τον γαστρεντερικό και τον αναπνευστικό σωλήνα, τα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία, τη μήτρα, τις σάλπιγγες, τον κόλπο, την ουροδόχο και τη χοληδόχο κύστη, καθώς και πολλούς άλλους ιστούς. Δέχονται σήματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα, το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό, ελέγχουν τη σύσπαση και, κατά συνέπεια, τη λειτουργία των οργάνων που περιβάλλουν.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρατεταμένη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων από την αδρεναλίνη, η οποία απελευθερώνεται σε καταστάσεις stress από το συμπαθητικό ΝΣ. Η αδρεναλίνη συνδέεται στους  $\alpha_1$  αδρενεργικούς υποδοχείς (GPCRs), οι οποίοι ενεργοποιούν την πρωτεΐνη  $G_{q/11}$  και μέσω αυτής τη φωσφολιπάση C $\beta$  (PLC $\beta$ ), παράγοντας DAG και IP $_3$ . Η IP $_3$  ενεργοποιεί τους υποδοχείς IP $_3$  του ενδοπλασματικού δικτύου, οι οποίοι απελευθερώνουν  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη, και το σύμπλοκο  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνη ενεργοποιεί την **κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης** (MLCK, Myosin Light Chain Kinase). Η κινάση MLCK φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική, ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλώντας τη σύσπαση της ακτινομυοσίνης. Η σύσπαση σταματά με την αποφωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης από τη **φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης** (MLCP, Myosin Light Chain Phosphatase). Η MLCP αποτελείται από τρεις υπομονάδες, μία καταλυτική υπομονάδα PP1c, μία υπομονάδα που συνδέεται με την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης MYPT (MYosine Phosphatase Target subunit) και μία ρυθμιστική ανασταλτική υπομονάδα CPI-17 (C-kinase potentiated protein Phosphatase-1 Inhibitor, 17 kDa). Η φωσφατάση της MLC απενεργοποιείται έμμεσα από την κινάση PKC (και την κινάση ROCK). Η PKC φωσφορυλιώνει την Thr38 της CPI-17 και την ενεργοποιεί. Στη συνέχεια, η CPI-17 δρα ως αναστολέας εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο άλλες υπομονάδες της MLCP (**Εικόνα 5.77**). Η αναστολή της MLCP αυξάνει τη διάρκεια φωσφορυλίωσης της μυοσίνης και πα-

Τα λεία μυϊκά κύτταρα δεν περιέχουν την πρωτεϊνική τροπομυοσίνη. Η **τροπομυοσίνη** είναι παρούσα στον λείο μυ, όπου εκτείνεται σε επτά μονομερή G-ακτίνης και είναι διατεταγμένη από άκρο σε άκρο σε όλο το μήκος των λεπτών νημάτων. Ενώ στον σκελετικό μυ η τροπομυοσίνη εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις ακτίνης-μυοσίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις  $\text{Ca}^{2+}$ , στον λείο μυ, η λειτουργία της είναι άγνωστη. Η **καλπονίνη** (calponin) είναι μια  $\text{Ca}^{2+}$ -binding πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με την ακτίνη. Βρίσκεται στα πυκνά σωμάτια των λείων μυών και αναστέλλει τη δραστηριότητα ΑΤΡάσης της μυοσίνης στα λεία μυϊκά κύτταρα. Η φωσφορυλίωσή της από την CAMK-II αίρει αυτή την αναστολή.

Η **Caldesmon** είναι μια  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin binding πρωτεΐνη, ικανή να συνδέει την ακτίνη, τη μυοσίνη, την τροπομυοσίνη και τα φωσφολιπίδια. Μαζί με την τροπομυοσίνη, ρυθμίζουν την πρόσβαση της μυοσίνης στην ακτίνη.



**Εικόνα 5.77**  
 Η σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων ελέγχεται από την αδρεναλίνη μέσω των α<sub>1</sub>-αδρενεργικών υποδοχέων, ενώ η σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των βρόγχων και της ουροδόχου κύστης ελέγχεται από την ακετυλοχολίνη μέσω των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς α<sub>1</sub> και οι M3 μέσω της Gα<sub>q/11</sub> ενεργοποιούν την PLCβ, η οποία υδρολύει την PIP<sub>2</sub> σε DAG και IP<sub>3</sub>. Η IP<sub>3</sub> επάγει έξοδο του Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ. Το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης ενεργοποιεί την κινάση MLCK, η οποία φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλώντας σύσπαση του λείου μυός. Επίσης, μέσω της DAG, ενεργοποιείται και η PKC, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον ειδικό αναστολέα CPI-17 της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης MLCP, παρατείνοντας τη σύσπαση. Τέλος, η αύξηση του Ca<sup>2+</sup> ανοίγει τα κανάλια BK<sub>Ca</sub> οδηγώντας σε έξοδο K<sup>+</sup>, υπερπόλωση του κυττάρου και τερματισμό του μηνύματος.

πατείνει τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων, χωρίς να απαιτείται αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup>. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως **ευαισθητοποίηση του Ca<sup>2+</sup>** και συμβαίνει ως απάντηση στη διέγερση του λείου μυός από την αδρεναλίνη.

Μέσω του ίδιου ακριβώς μηχανισμού η ακετυλοχολίνη, η οποία απελευθερώνεται από τα παρασυμπαθητικά νεύρα, πατείνει τη σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων των βρόγχων (προκαλώντας βρογχοσυστολή) και της ουροδόχου κύστης (προκαλώντας τη διάθεση για διούρηση), μέσω των M3 μουσκαρινικών υποδοχέων.

**Ενεργοποίηση της συνθάσης του NO και χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων**

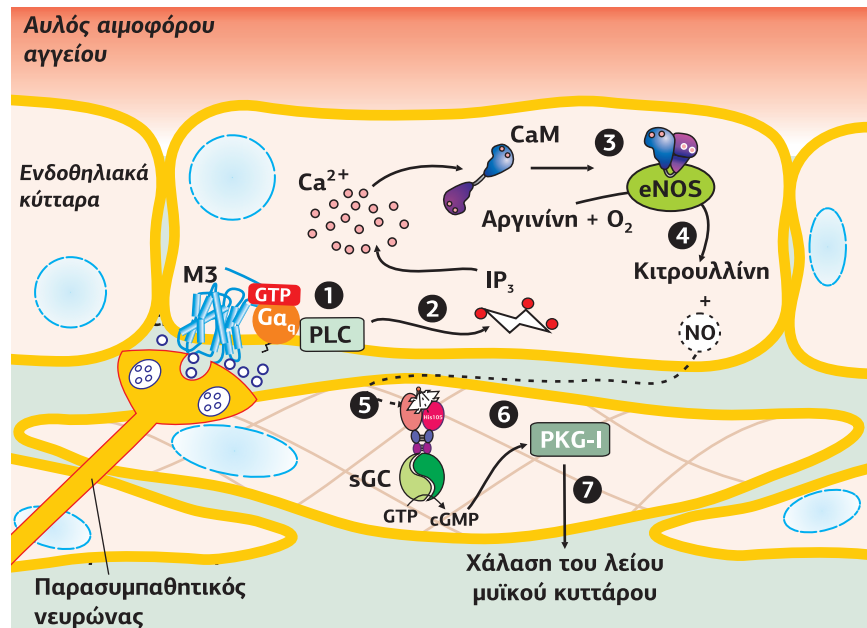
Οι M3 μουσκαρινικοί υποδοχείς βρίσκονται και στα επιθηλιακά κύτταρα των αγγείων, όπου η ενεργοποίησή τους από την ακετυλοχολίνη, μέσω της οδού Gα<sub>q/11</sub>/ PLCβ/ IP<sub>3</sub> - DAG, οδηγεί στην αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>. Η αύξηση του Ca<sup>2+</sup> ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη και το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνη ενεργοποιεί τη συνθάση του NO (eNOS), η οποία με πρώτη ύλη την αργινίνη παράγει κιτρουλλίνη και οξείδιο του αζώτου (NO). Το NO ως αέριος διαβιβαστής απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα και εισέρχεται στα γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων, όπου ακόμη και σε ποσότητες ημολι ενεργοποιεί μια διαλυτή γουανυλική κυκλάση που συνθέτει cGMP. Στη συνέχεια, το cGMP ενεργοποιεί την cGMP-εξαρτώμενη κινάση I (PKG-I), η οποία μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών (ελαττώνει την είσοδο Ca<sup>2+</sup> και ενεργοποιεί τη φωσφατάση MLCP, η οποία αποφωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης) προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και κατά συνέπεια αγγειοδιαστολή (**Εικόνα 5.78**). Η αγγειοδιαστολή οδηγεί στη μείωση της πίεσης του αίματος (βλ. σελ. 367, **Εικόνα 6.29**).

Συνοψίζοντας, η υδρόλυση των PI(4,5)P<sub>2</sub> από τις φωσφολιπάσες C οδηγεί στην παραγωγή DAG και IP<sub>3</sub>. Η DAG, χωρίς να εγκαταλείψει τη μεμβράνη, δρα ως δεύτερος διαβιβαστής είτε άμεσα ενεργοποιώντας την PKC (σε συνέργεια με το

**Εικόνα 5.78**

**Η ακετυλοχολίνη μέσω των M3 υποδοχέων ενεργοποιεί τη NOS και προκαλεί χάλαση των λείων μυών των αγγείων.**

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων ενεργοποιούνται από την ακετυλοχολίνη, η οποία μέσω του μουσκαρινικού M3 υποδοχέα ενεργοποιεί την PLC. Η PLC υδρολύοντας τα PIP<sub>2</sub> της μεμβράνης παράγει DAG και IP<sub>3</sub>. Η IP<sub>3</sub> μέσω του IP<sub>3</sub> υποδοχέα του ΕΔ επάγει την έξοδο Ca<sup>2+</sup> από ΕΔ προκαλώντας αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>. Το σύμπλοκο Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνη ενεργοποιεί τη NOS, η οποία παράγει NO. Τα αέριο NO διαχέεται στα γειτονικά λεία μυϊκά κύτταρα, όπου προκαλεί ενεργοποίηση της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (sGC) και την παραγωγή cGMP. Στόχος του cGMP είναι η κίνηση PKG-I, η οποία ελαττώνοντας την είσοδο Ca<sup>2+</sup> και ενεργοποιώντας την MLCP (η οποία αποφωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης) προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων. [38]



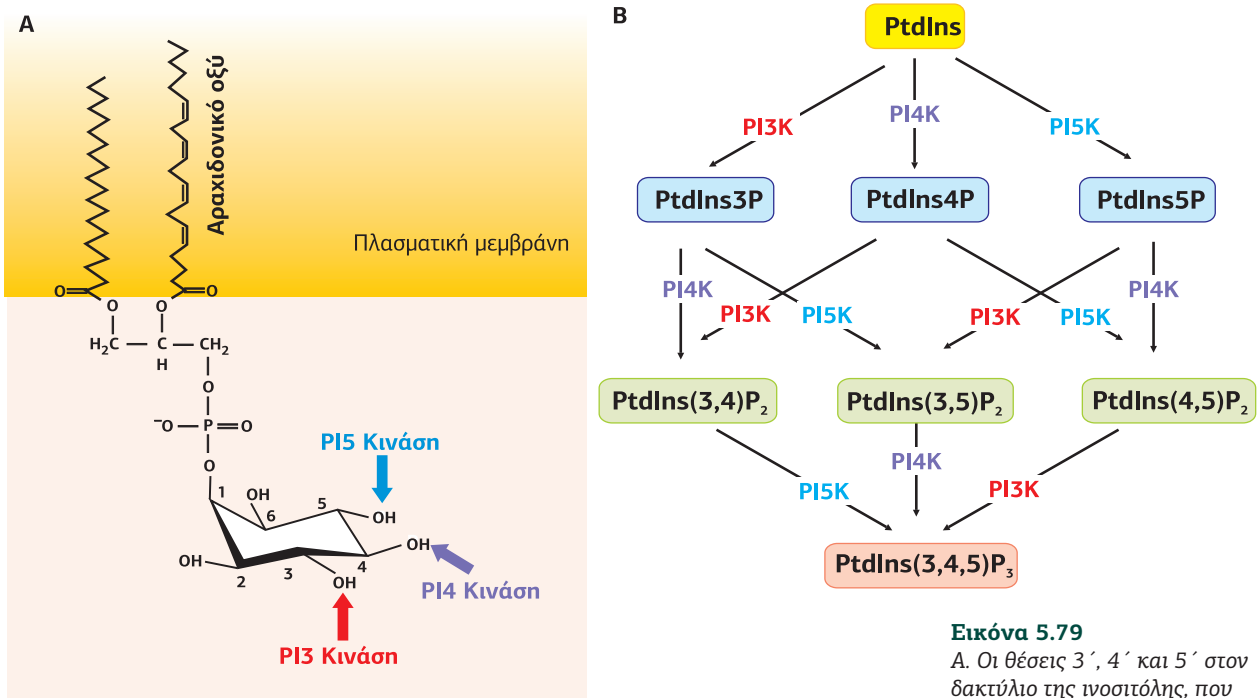
Ca<sup>2+</sup> και τη φωσφατιδυλοσερίνη) είτε έμμεσα, καθώς μετατρέπεται σε αραχιδονικό, την κύρια πηγή σύνθεσης των εικοσανοειδών. Η IP<sub>3</sub> είναι ο δεύτερος διαβιβαστής που διαμεσολαβεί στη μετάφραση των εξωκυτταρικών μηνυμάτων σε αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>, καθώς διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και προκαλεί το άνοιγμα καναλιών Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ και στην έξοδο του Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση Ca<sup>2+</sup> οδηγεί σε άμεση ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνών, όπως η PKC, είτε σε έμμεση ενεργοποίηση μέσω της καλμοδουλίνης α. της MLCK, η οποία φωσφορυλιώνει την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης προκαλεί σύσπαση των λείων μυϊκών κυττάρων, β. της **συνθάσης του NO**, η οποία παράγει NO, που απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, εισέρχεται στα λεία μυϊκά προκαλώντας χάλαση, και γ. της **κινάσης της φωσφορυλάσης**, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση ενεργοποιώντας τον καταβολισμό του γλυκογόνου, κ.λπ. Ωστόσο, η IP<sub>3</sub> δεν είναι η μόνη φωσφορυλιωμένη ινσοσιτόλη που δρα ως δεύτερος διαβιβαστής. Η IP<sub>4</sub> παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων, η IP<sub>6</sub> στα β-κύτταρα του παγκρέατος μεσολαβεί στην έκκριση ινσουλίνης κ.λπ.

## 5. Κινάση PI3K και PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>

Είναι πλέον καλά κατανοητό ότι τα παράγωγα της φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλης (PtdIns, PI) αποτελούν βασικούς ρυθμιστές σε πολλές κυτταρικές διεργασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πολυφωσφοϊνσοσιτίδια, PPIs (μονο- και πολυφωσφορυλιωμένες προσθήκες στον δακτύλιο ινσοσιτόλης της PtdIns), τα οποία βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά των κυτταρικών μεμβρανών. Τα PPIs, εκτός από τον δομικό τους ρόλο, συμμετέχουν και στη σηματοδότηση μέσω δύο μηχανισμών:

α. μέσω της υδρόλυσής τους από την PLC, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό των δύο δεύτερων διαβιβαστών IP<sub>3</sub> και DAG, και

β. μέσω της φωσφορυλίωσης του δακτυλίου της ινσοσιτόλης, η οποία καταλύεται από ειδικές κινάσες φωσφοϊνσοσιτιδίων, PI3K, PI4K, PI5K, που χρησιμοποιούν ATP ως δότη φωσφορικής ομάδας και έχουν ως στόχο τις θέσεις 3', 4' και 5' του δακτυλίου της ινσοσιτόλης, αντίστοιχα. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν βρεθεί τουλάχιστον 7 τύποι PPIs που διαφέρουν στη θέση και στον βαθμό φωσφορυλίωσης.



**Εικόνα 5.79**  
 Α. Οι θέσεις 3', 4' και 5' στον δακτύλιο της ινοσιτόλης, που φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων PI3-K, PI4-K και PI5-K, αντίστοιχα. Β. Τα μεμβρανικά φωσφοϊνοσιτίδια είναι μία πηγή ποικίλων σηματοδοτικών μορίων που δημιουργούνται από κινάσες, οι οποίες καταλύουν την εξαρτώμενη από ATP φωσφορυλίωση της ινοσιτόλης (PtdIns).

## 5.1 Κινάσες φωσφοϊνοσιτιδίων

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωρισθεί 10 αντιδράσεις φωσφορυλίωσης φωσφοϊνοσιτιδίων, που καταλύονται από 19 ειδικές κινάσες φωσφολιπιδίων (Εικόνα 5.79). Επιπλέον, υπάρχουν πολλαπλές ισομορφές για μια συγκεκριμένη κινάση φωσφοϊνοσιτιδίου, οι οποίες εμφανίζουν επικαλυπτόμενη κατανομή ανά ιστό, και επίσης ένα μεμονωμένο κύτταρο μπορεί να εκφράσει διάφορες ισομορφές.

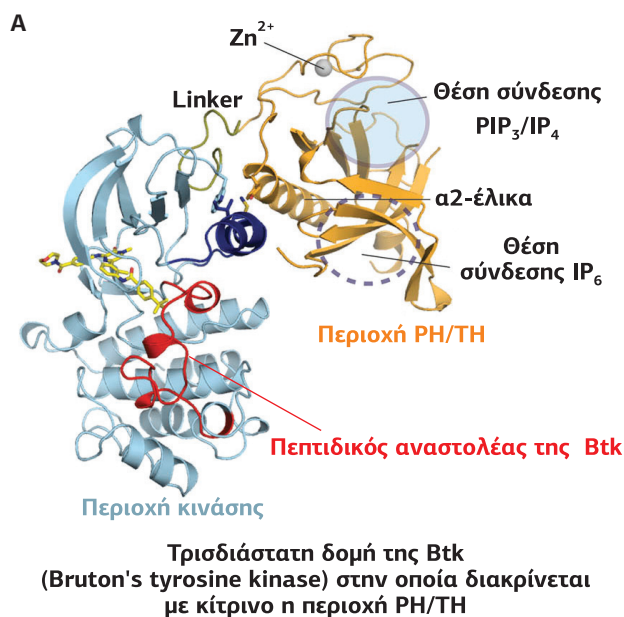
Το κύριο χαρακτηριστικό των φωσφοϊνοσιτιδίων που προκύπτουν είναι η ικανότητά τους να στρατολογούν πρωτεΐνες που περιέχουν ειδικές περιοχές αλληλεπίδρασης με τα φωσφοϊνοσιτίδια. Παραδείγματα περιοχών αλληλεπίδρασης με PPIs είναι (Εικόνα 5.80):

- **PH περιοχή:** μια περιοχή 120 αμινοξέων, ομόλογη της πλεξτρίνης (η πλεξτρίνη είναι το κύριο υπόστρωμα της PKC στα αιμοπετάλια). Είναι η πιο κοινή περιοχή αλληλεπίδρασης με PPIs στα ανθρώπινα κύτταρα. Συνδέεται με πολλούς τύπους φωσφοϊνοσιτιδίων, με προτίμηση στα φωσφοϊνοσιτίδια που περιέχουν δύο γειτονικές φωσφορικές ομάδες στον δακτύλιο της ινοσιτόλης, π.χ. PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> ή PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.
- **PX περιοχή:** μια περιοχή που πρωτοανακαλύφθηκε στις υπομονάδες p40phox και p47phox της οξειδάσης της NADPH (phox από phagocytic oxidase) και αλληλεπιδρά με τις PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> και PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.
- **FYVE περιοχή:** πήρε το όνομά της από τις 4 πρωτεΐνες Fab1, YotB, Vac1, EEA1 στις οποίες ανακαλύφθηκε. Αυτή η περιοχή δεσμεύει επιλεκτικά την PtdIns(3)P και βρίσκεται ιδιαίτερα σε πρωτεΐνες των ενδοσωμάτων.

Κοινό δομικό χαρακτηριστικό αυτών των περιοχών είναι ένας θύλακας σύνδεσης (binding rocket), ο οποίος καλύπτεται από βασικά αμινοξέα, τα οποία συνδέονται ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες των PPIs. Η εξειδίκευση εξασφαλίζεται από επιπλέον αμινοξέα.

Η στόχευση στη μεμβράνη παίζει σημαντικό ρόλο στη στρατολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων, που περιέχουν τις κατάλληλες αλληλουχίες, κοντά στους διαμεμβρα-

**Fab 1**, η ομόλογη PIKfyve (FYVE finger-containing phosphoinositide kinase) του σακχαρομύκητα. Η PIKfyve, μέσω της περιοχής FYVE finger, συνδέεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των PtdIns(3)P των ενδοσωμάτων και φωσφορυλιώνει τα PtdIns(3)P σε PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Απώλεια δραστηριότητας της PIKfyve οδηγεί σε υπερμεγέθη λυσοσώματα, τα οποία αδυνατούν να συντηχθούν μεταξύ τους. **Vac1** συμμετέχει στη μεταφορά κυστιδίων από το Golgi στα ενδοσώματα στον σακχαρομύκητα. Δρα ως πρωτεΐνη προσαρμογής ανάμεσα στις Rab και στο σύμπλοκο SNARE. **EEA1** (Early Endosome Antigen 1), ένα αυτοαντιγόνο. Συμμετέχει στη μεταφορά πρωτεϊνών μέσω ενδοσωμάτων.



Εικόνα 5.80

A. Τριδιάστατη δομή της κινάσης Btk (Bruton's tyrosine kinase), στην οποία διακρίνεται με κίτρινο η PH περιοχή. [99]  
 B. Οι περιοχές αλληλεπίδρασης με φωσφοϊνοσιτίδια, PH, PX, FYVE. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν μία από αυτές τις περιοχές στρατολογούνται στην πλασματική μεμβράνη ή σε κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα. [93] [52]

Περιοχή αλληλεπίδρασης	Στόχος
<b>PH domain</b>	Φωσφοϊνοσιτίδια που περιέχουν δύο γειτονικές φωσφορικές ομάδες στον δακτύλιο της ινοσιτόλης $PI(4,5)P_2$ , $PI(3,4)P_2$ , $PI(3,4,5)P_3$
<b>PX domain</b>	Κυρίως σε $PI(3)P$ , $PI(3,4)P_2$ , $PI(3,5)P_2$ , $PI(4,5)P_2$ και $PI(3,4,5)P_3$
<b>FYVE</b>	Δεσμεύεται επιλεκτικά στην $PI(3)P$

κούς υποδοχείς, καθώς επίσης και στη μεταφορά των πρωτεϊνών στα διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Λόγω της αυστηρής διαμερισματοποίησης των κινασών και των φωσφατασών των φωσφοϊνοσιτιδίων, τα PPIs κατανέμονται σε συγκεκριμένες θέσεις και όχι τυχαία μέσα στις κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, η  $PI(3)P$  βρίσκεται κυρίως στα ενδοσώματα στρατολογώντας πρωτεΐνες με περιοχές FYVE, ενώ η  $PI(4)P$  βρίσκεται κυρίως στη συσκευή Golgi και η  $PIP_2$  στην πλασματική μεμβράνη.

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται στα φωσφοϊνοσιτίδια περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφολιπάσες, κανάλια ιόντων, πρωτεΐνες σκαλωσιάς, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής μεταφοράς.

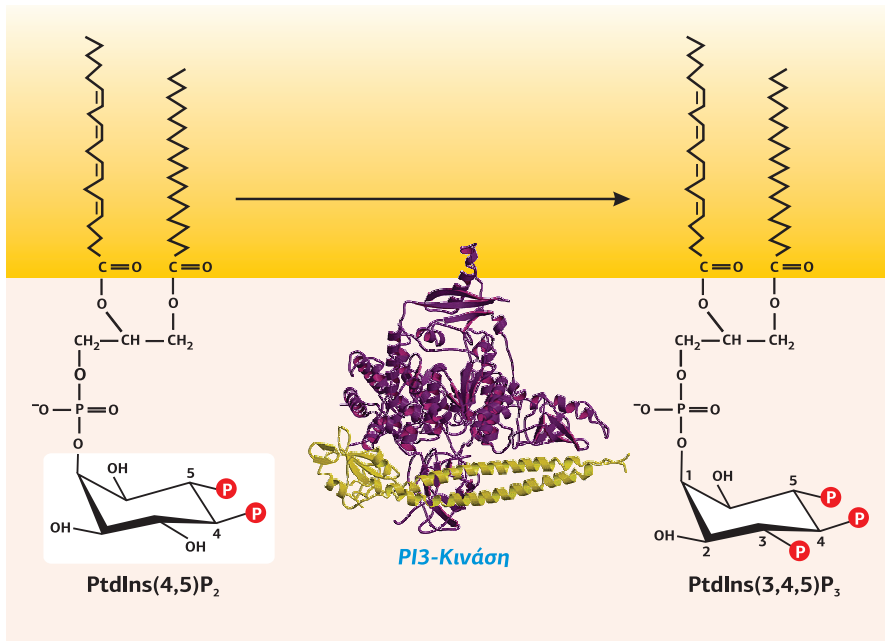
## 5.2 | Τάξεις των PI3Ks

Μεταξύ των φωσφολιπιδικών κινασών οι PI3Ks είναι οι προεξέχουσες και καλύτερα μελετημένες, καθώς κατέχουν θέση κλειδί στην κυτταρική διαδικασία σηματοδότησης. Η κύρια αντίδραση που καταλύεται από αυτά τα ένζυμα είναι η φωσφορυλίωση των  $PI(4)P$  και  $PI(4,5)P_2$ . Τα προϊόντα είναι η  $PI(3,4)P_2$  και η  $PI(3,4,5)P_3$ , αντίστοιχα (Εικόνα 5.79 και 5.81). Και τα δύο λιπίδια παραμένουν στη μεμβράνη, δρώντας ως θέσεις αγκυροβόλησης και ως ενεργοποιητές πρωτεϊνικών κινασών και πολλών άλλων πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος.

Η οικογένεια των PI3Ks περιλαμβάνει ένζυμα που διαφέρουν στο μέγεθος της καταλυτικής υπομονάδας, στη φύση των ρυθμιστικών υπομονάδων και στη ρύθμισή τους. Οι οκτώ PI3Ks έχουν ταξινομηθεί σε 3 τάξεις, ανάλογα με τη δομή τους, την εξειδίκευση του υποστρώματός τους και τον τρόπο ρύθμισής τους.

### 1. Η τάξη I των PI3Ks

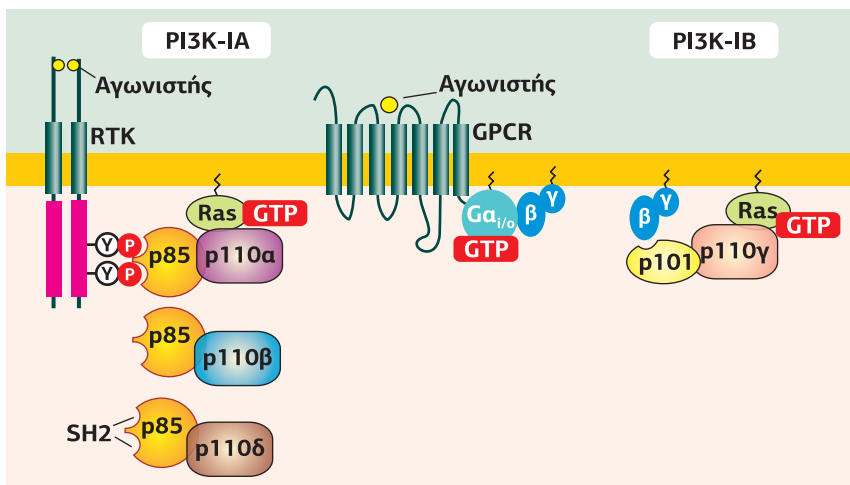
Είναι ετεροδιμερή ένζυμα, τα οποία κατά προτίμηση φωσφορυλιώνουν την  $PtdIns(4,5)P_2$  παράγοντας φωσφατιδυλο(3,4,5)τριφωσφορική ινοσιτόλη,



**Εικόνα 5.81**  
Οι PI3Ks καταλύουν τη φωσφορυλίωση της θέσης 3' της ινοσιτόλης των φωσφατιδυλϊνοσιτιδίων. Κυριότερη αντίδραση αποτελεί η φωσφορυλίωση της PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> σε PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. [57]

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, ένα λιπίδιο κλειδί με ρόλο δεύτερου διαβιβαστή που ελέγχει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών αποκρίσεων.

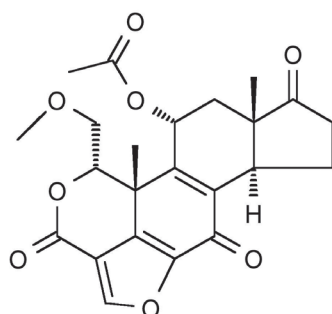
Οι PI3Ks της τάξης I αποτελούνται από μια καταλυτική (p110α, β, γ ή δ) και μια ρυθμιστική υπομονάδα (p85α/β, p55α/γ, p50α, p84/87 ή p101). Η καταλυτική υπομονάδα περιέχει μια COOH-τελική περιοχή λιπιδικής κινάσης και μια C2 περιοχή που διευκολύνει τη σύνδεση στη μεμβράνη με Ca<sup>2+</sup>-εξαρτώμενο τρόπο. Η αντιστρεπτή στρατολόγηση των PI3Ks στη μεμβράνη είναι ένα κρίσιμο βήμα στην ενεργοποίησή τους, γιατί αυτά τα κυτταροπλασματικά ένζυμα δεν θα είχαν διαφορετικά πρόσβαση στα φωσφολιπιδικά τους υποστρώματα. Χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο των καταλυτικών υπομονάδων των PI3Ks είναι, επίσης, η περιοχή RBD (Ras Binding Domain), μέσω της οποίας συνδέονται στην GTP μορφή της μικρής GTPάσης Ras και ενεργοποιούνται από αυτήν. Οι ρυθμιστικές υπομονάδες περιέχουν μια περιοχή δέσμευσης των Gβγ-υπομονάδων και περιοχές αλληλεπίδρασης (όπως η SH2 και SH3). Επειδή η Ras και οι Gβγ-υπομονάδες είναι αγκυροβολημένες στη μεμβράνη, αυτές οι αλληλεπιδράσεις προωθούν τη στρατολόγηση στη μεμβράνη και την ενεργοποίηση των PI3Ks. Η ρυθμιστική υπομονάδα παίζει τον ρόλο πρωτεΐνης προσαρμογής (adaptor) συνδέοντας το ένζυμο με σηματοδοτικές πρωτεΐνες άλλων μονοπατιών. Ανάλογα με τον τύπο των σημάτων από τα οποία ενεργοποιούνται, οι PI3Ks της οικογένειας I υποδιαιρούνται στις τάξεις IA και IB (**Εικόνα 5.82**).



**Εικόνα 5.82**  
Οι PI3Ks της τάξης I, ανάλογα με το μονοπάτι από το οποίο ενεργοποιούνται, διακρίνονται σε IA (οι οποίες ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, RTKs) και IB (οι οποίες ενεργοποιούνται από τις Gβγ υπομονάδες). Και στις δύο περιπτώσεις οι PI3Ks στρατολογούνται στη μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης με την ενεργοποιημένη μικρή GTPάση Ras. [89]

**Wortmannin, ένας αναστολέας της PI3K.**

Η wortmannin είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium wortmannii* και αρχικά αναγνωρίστηκε ως τοξικός παράγοντας που προκαλεί άμεση νέκρωση του λεμφικού ιστού, μυοκαρδιακή αιμορραγία και αιμοσφαινουρία. Σε κατάλληλη δόση είναι, επίσης, και αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Η wortmannin δρα ως ισχυρός, μη αντιστρεπτός, αλλά μη ειδικός, αναστολέας της PI3K ( $IC_{50}$  in vitro 5 nM). Εμφανίζει ανάλογη ανασταλτική δράση και για τις τρεις τάξεις των PI3Ks (I, II, III), αλλά και για άλλα PI3K-συνδεδεμένα ένζυμα, όπως mTOR, DNA-PKs, ορισμένες PI4Ks, MLCK, Polo-like κινάση και MAPK, σε υψηλότερες όμως συγκεντρώσεις. Η wortmannin είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο στην κυτταρική βιολογία για την αναστολή της επιδιόρθωσης του DNA και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



Wortmannin

Τα ένζυμα της τάξης IA (PI3Kα, β και δ) αποτελούνται από μια καταλυτική υπομονάδα (p110α, p110β ή p110δ) και μια ρυθμιστική υπομονάδα (p85α/β, p55γ/α ή p50α). Μέσω των SH2 περιοχών της ρυθμιστικής τους υπομονάδας οι PI3K-IA συνδέονται και ενεργοποιούνται από τους **υποδοχείς κινάσες τυροσίνης** (RTKs) (βλ. σελ. 555), συμπεριλαμβανομένων των υποδοχών της ινσουλίνης, των αυξητικών παραγόντων, των κυτοκινών, των αντιγόνων και των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Η ενεργοποίηση απαιτεί τη στρατολόγηση στη μεμβράνη της PI3K από τη Ras-GTP, η οποία ενεργοποιείται από τα μονοπάτια των RTKs.

Η τάξη IB έχει μοναδικό μέλος την PI3Kγ, η οποία αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα (p110γ) και μια ρυθμιστική υπομονάδα (p101, p87 ή p84). Η PI3Kγ στρατολογείται στη μεμβράνη και ενεργοποιείται από τις **Gβγ υπομονάδες** και γι' αυτό είναι κατά κύριο λόγο κάτω από τον έλεγχο σημάτων που δημιουργούνται από υποδοχείς που συνδέονται με  $G_{\alpha_{i/o}}$  πρωτεΐνες (θυμηθείτε ότι οι  $G_{\alpha_{i/o}}$  πρωτεΐνες είναι η κύρια πηγή των Gβγ υπομονάδων). Οι Gβγ συνδέονται σε περιοχές και των δύο υπομονάδων.

**2. Η τάξη II των PI3Ks**

Οι PI3Ks της τάξης II (PI3K-C2α, β και γ) είναι **μονομερή** ένζυμα, τα οποία αποτελούνται μόνο από μία καταλυτική υπομονάδα, η οποία περιέχει μια καταλυτική περιοχή, μία RBD, δύο C2 περιοχές και μια περιοχή PX, που εμπλέκεται στη σύνδεση των φωσφοϊνοσιτιδίων της μεμβράνης (**Εικόνα 5.83A**). Ενεργοποιούνται από δισθενή κατιόντα ( $Ca^{2+}$  ή  $Mg^{2+}$ ) και μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Και οι τρεις PI3Ks της τάξης II κατά προτίμηση φωσφορυλιώνουν τα PtdIns(4)P, παράγοντας PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>.

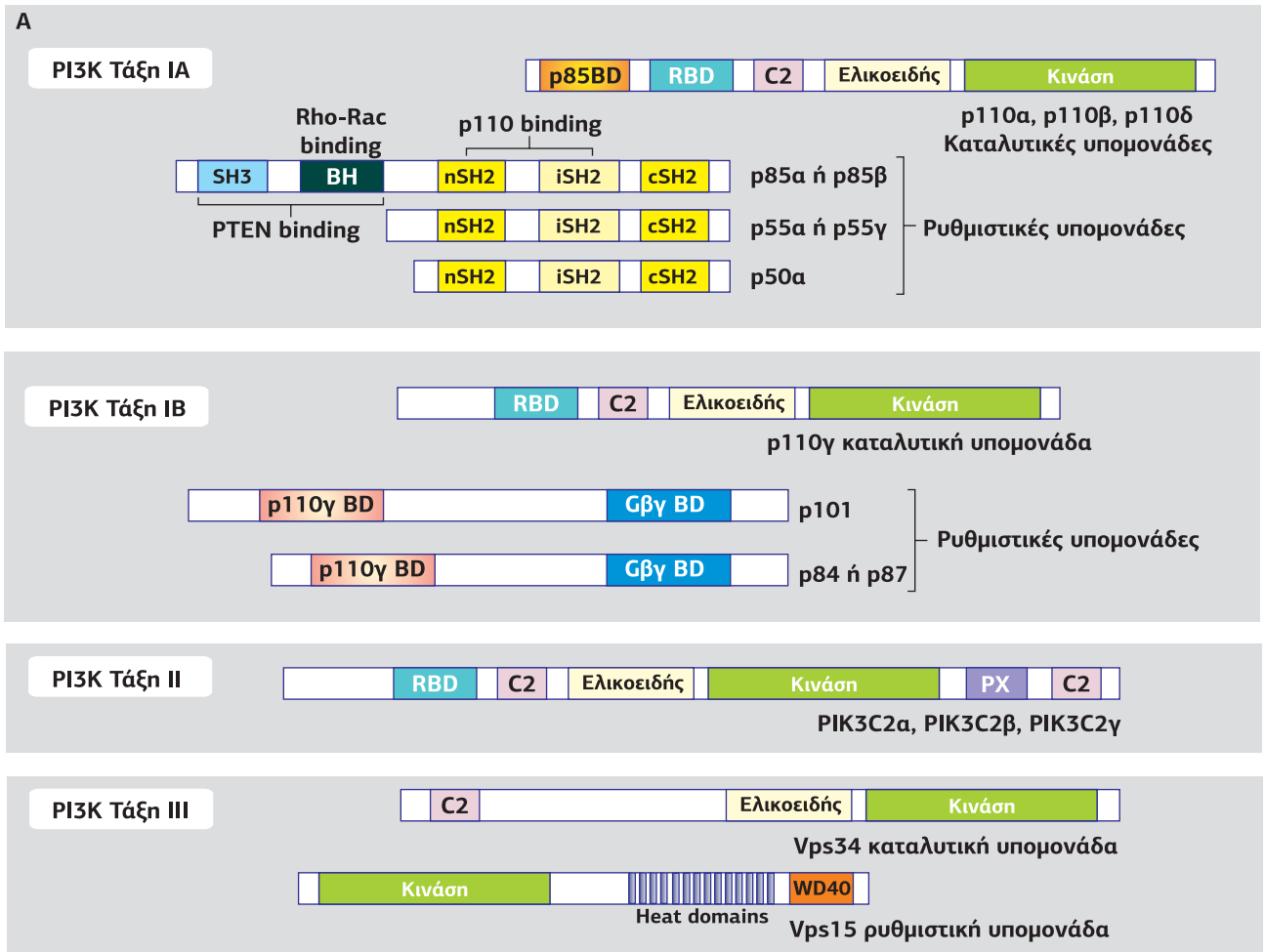
**3. Η τάξη III των PI3Ks**

Η τάξη III έχει ένα μόνο μέλος, του οποίου η καταλυτική υπομονάδα Vps34 (Vacuolar protein sorting 34 ή PI3K-C3) δημιουργεί ετεροδιμερές με τη μυριστοϋλιωμένη ρυθμιστική υπομονάδα Vps15 ή p150. Η Vps34 πρωτοανακαλύφθηκε ως τμήμα του συμπλόκου μεταφοράς των κυστιδίων στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και κλωνοποιήθηκε το 1990, ενώ το ομόλογο γονίδιο στα θηλαστικά (hVps34) κλωνοποιήθηκε το 1995. Η Vps15 έχει μια περιοχή κινάσης, πιθανόν ανενεργή, **περιοχές HEAT** (πήραν το όνομά τους από τις πρωτεΐνες στις οποίες πρωτοανακαλύφθηκαν *Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *protein phosphatase 2A* και η κινάση του σακχαρομύκητα *IOR1*) με αντιπαράλληλες α-έλικες, που εμπλέκονται στην ενδοκυτταρική μεταφορά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, και **επαναλήψεις WD40** (περιοχές 40 αμινοξέων, που τελειώνουν με το διπεπτιδίο τρυπτοφάνη-ασπαρτικό οξύ, W-D), που χρησιμοποιούνται ως περιοχές σκαλωσίας για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (**Εικόνα 5.83A**). Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ο ρόλος της hVps34 στην ικανότητα των κυττάρων να αποκρίνονται σε αλλαγές στη συγκέντρωση των θρεπτικών μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού mTOR [mammalian TOR (Target Of Rapamycin)] που ρυθμίζει τη σύνθεση πρωτεϊνών ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Επίσης, η Vps34 απαιτείται για την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας κατά τη φάση στέρσης θρεπτικών, ενώ και η ίδια ρυθμίζεται από τα θρεπτικά. Ένας σημαντικός αριθμός ερευνών υποδεικνύουν ότι υπάρχει μια σύνδεση ανάμεσα στην hVps34 και στις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες. Ο ακριβής ρόλος μένει να αποδειχθεί.

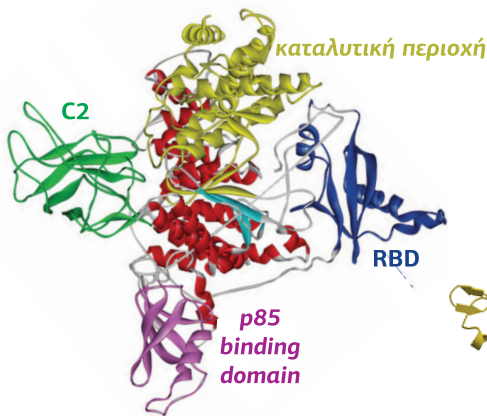
**5.3****Η PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> ως δεύτερος διαβιβαστής**

Το προϊόν που παράγεται από τις PI3Ks και έχει τη μεγαλύτερη φυσιολογική σημασία είναι η PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, η οποία παραμένει συνδεδεμένη στη μεμβράνη, όπου στρατολογεί και συνδέει πρωτεΐνες μέσω της PH περιοχής τους. Υπάρχουν περίπου 60-70 πρωτεΐνες με PH περιοχές στο γονιδίωμα των θηλαστικών, από τις

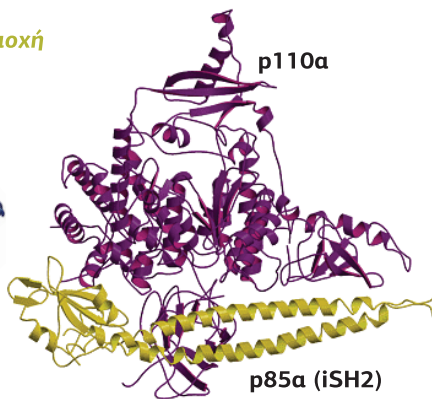




**B** p110α καταλυτική υπομονάδα



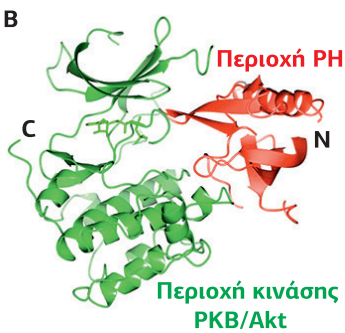
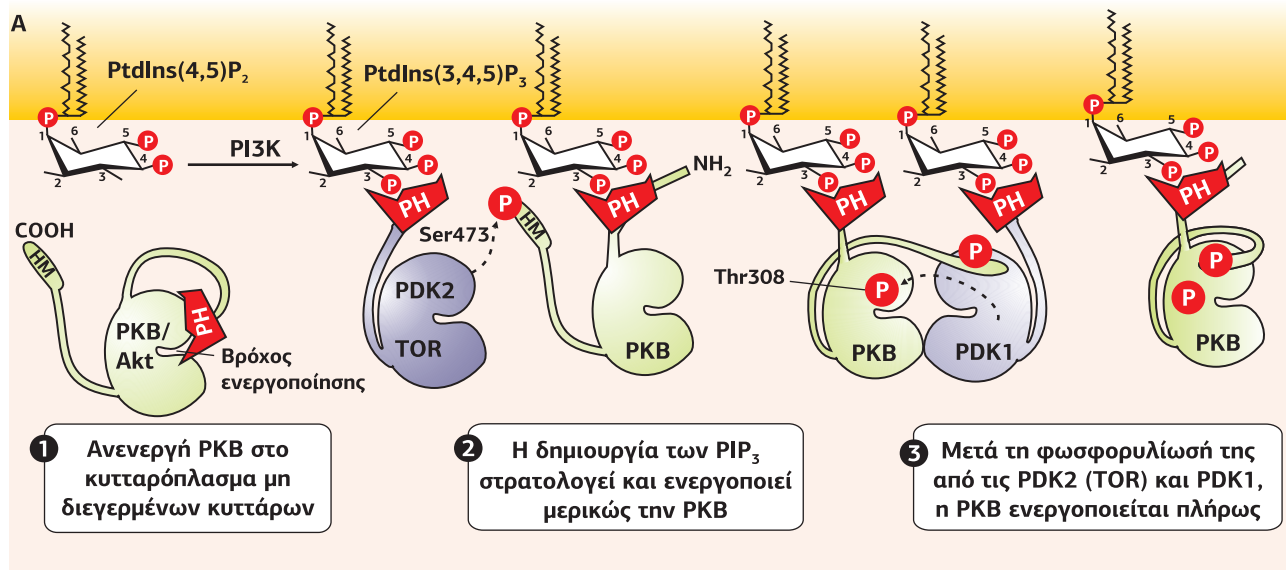
Ολοένζυμο PI3K



**Εικόνα 5.83**

A. Η οργάνωση των δομικών περιοχών από τις οποίες αποτελούνται οι καταλυτικές και ρυθμιστικές υπομονάδες των τριών τάξεων των PI3Ks. Οι PI3Ks της τάξης I (IA και IB) και III είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από μια καταλυτική και μια ρυθμιστική υπομονάδα, ενώ οι PI3Ks της τάξης II είναι μονομερή. Δομικές περιοχές κοινές σε όλες τις PI3Ks είναι η Ras Binding (εκτός από την τάξη III), η C2 και η καταλυτική περιοχή κινάσης. [56] B. Τριδιάστατη δομή της καταλυτικής υπομονάδας p110α και της p110α σε σύμπλοκο με τη ρυθμιστική p85α. BH: Bcr (Breakpoint cluster region) Homology, από την οποία όμως απουσιάζει το καταλυτικό αμινοξύ Arg και δεν εμφανίζει δράση RhoGAP, αλλά μπορεί να συνδέεται με τις Rho-Rac πρωτεΐνες.

οποίες ο σημαντικότερος τελεστής της  $PtdIns(3,4,5)P_3$  είναι η **κινάση PKB/Akt** (Protein Kinase B). Η Akt δεν ενεργοποιείται από τη σύνδεση στην  $PtdIns(3,4,5)P_3$ . Για την ενεργοποίησή της απαιτείται η φωσφορυλίωση της Ser473 από την PDK2 (Phosphoinositide-Dependent protein Kinase2), η οποία μέσω της PH περιοχής της, επίσης, συνδέεται στην  $PtdIns(3,4,5)P_3$ . Η σύνδεση της Akt στην  $PtdIns(3,4,5)P_3$  και η φωσφορυλίωσή της από την PDK2 (ή TOR) προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης, που επιτρέπει τη φωσφορυλίωσή της στην Thr308 (η οποία βρίσκεται στον βρόχο ενεργοποίησης), από την ιδιόσυστατα ενεργή PDK1, ώστε να καταστεί πλήρως ενεργή (**Εικόνα 5.84**).



**Εικόνα 5.84**  
**Η κινάση PKB/Akt.**

A. Στην κατάσταση αυτοαναστολής η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή PH φράζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου καθιστώντας την PKB/Akt ανενεργή. Με τη δημιουργία της PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> η κινάση PKB στρατολογείται στη μεμβράνη, συνδέεται στην PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> μέσω της PH περιοχής της και αλλάζει διαμόρφωση. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται από την κινάση PDK2 (ή TOR) στη Ser473 και από την κινάση PDK1 στη Thr308 και καθίσταται πλήρως ενεργή. [57] [32] B. Κρυσταλλική δομή της Akt1 σε αυτοαναστολή μετά τη σύνδεση της PH στο ενεργό κέντρο του ενζύμου

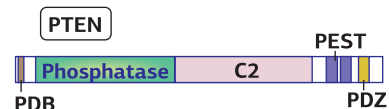
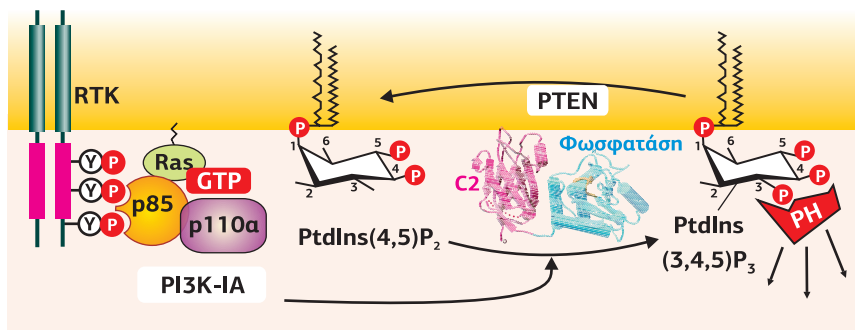
Στη συνέχεια, η Akt μπορεί να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή να αναστείλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), φωσφορυλιώνοντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους. Ένα υπόστρωμα της Akt είναι ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, η Bad, η οποία προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο διεγείροντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η φωσφορυλίωση της Bad από την Akt δημιουργεί μια θέση σύνδεσης για τις πρωτεΐνες 14-3-3, οι οποίες συγκρατούν την Bad στο κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας τη μεταφορά της στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Επίσης, η Akt φωσφορυλιώνει και αναστέλλει μια ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων (p21, p27, Myt1, FoxO) οι οποίοι δρουν ως αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζοντας την κυτταρική επιβίωση. Επιπλέον, η Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3), ένα άλλο αντιπολλαπλασιαστικό ένζυμο. Συνεπώς, το μονοπάτι PI3K/Akt ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση με τη βοήθεια διαφορετικών τελεστών (βλ. σελ. 427, 436).

Η **φωσφατάση PTEN** (από το Phosphatase και TENsin, καθώς περιέχει μια περιοχή ομόλογη της τενσίνης, μιας πρωτεΐνης του κυτταροσκελετού) παίζει έναν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ισορροπίας μεταξύ κυτταρικής επιβίωσης και κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Ανεργά μεταλλάγματα της PTEN έχουν βρεθεί σε διάφορα είδη καρκίνων, καθώς καθιστούν το κύτταρο ανθεκτικό στην απόπτωση. Η PTEN αποφωσφορυλιώνει όλα τα 3'-φωσφορυλιωμένα φωσφοϊνοσιτίδια, εμποδίζοντας τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση των ενζύμων, όπως η Akt και η PDK1 και, συνεπώς, εμποδίζοντας το μονοπάτι επιβίωσης του κυττάρου (**Εικόνα 5.85**).

## 5.4 Βιολογικός ρόλος της GPCR-εξαρτώμενης PI3Kγ

Η PI3Kγ αποτελείται από μια καταλυτική p110γ υπομονάδα σε συνδυασμό με μια ρυθμιστική υπομονάδα, την p84 ή την p101. Η καταλυτική και η ρυθμιστική υπομονάδα είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους και αλληλεπιδρούν με τις Gβγ υπομονάδες για να ενεργοποιηθούν (βλ. **Εικόνα 5.83**).

Η PI3Kγ εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως σιτευτικά, ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα, όπου παίζει έναν ρόλο κλειδί στη διαδικασία της φλεγμονής. Ποντίκια PI3Kγ<sup>-/-</sup> εμφανίζουν φυσιολογική ανάπτυξη, αλλά δεν αναπτύσσουν φλεγμονή σε πειραματικά μοντέλα ασθενειών, όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή της αναφυλαξίας. Η PI3Kγ φαίνεται να παίζει μια ποικιλία



**Εικόνα 5.85**

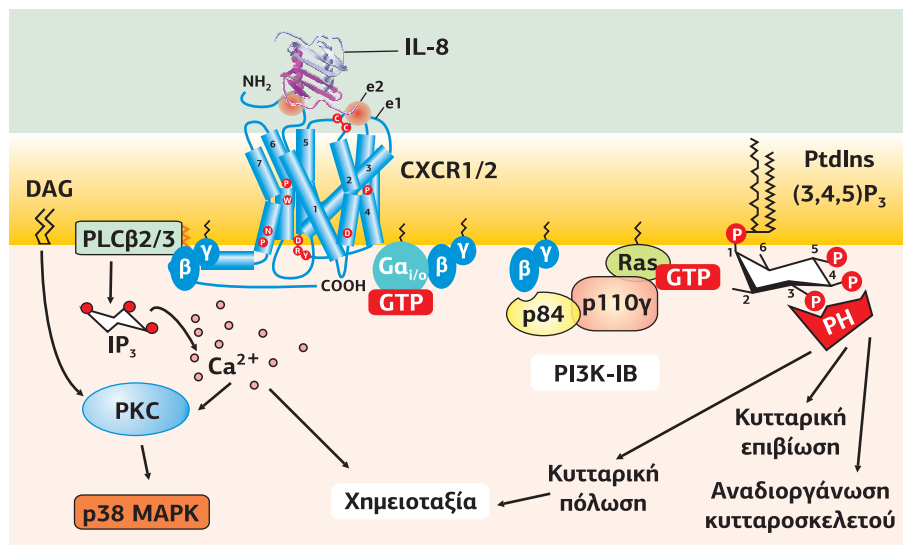
Τα  $PIP_2$  φωσφορυλιώνονται στη θέση 3' από την κινάση PI3K και δημιουργούνται  $PIP_3$ , στα οποία συνδέονται πρωτεΐνες μέσω των PH περιοχών τους. Στη συνέχεια, τα  $PIP_3$  αποφωσφορυλιώνονται σε  $PIP_2$  από τη φωσφατάση PTEN. Η PTEN αποτελείται από μια περιοχή  $PIP_2$  Binding Domain (PDB), μια περιοχή φωσφατάσης, μια περιοχή C2, δύο περιοχές PEST και μια περιοχή PDZ.

σημαντικών ρόλων και σε άλλους τύπους κυττάρων, όπου είναι μόλις ανικνεύσιμη. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της PI3K στην καρδιά καταστέλλει τη σηματοδότηση του cAMP και τη συστατικότητα των μυοκυττάρων -ως εκ τούτου μπορεί να είναι ένας χρήσιμος θεραπευτικός στόχος σε ορισμένους τύπους καρδιακής ανεπάρκειας. Επίσης, συμμετέχει στον μεταβολισμό των λιπιδίων, ενεργοποιώντας την εναπόθεση λίπους. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η PI3K συμμετέχει στην ανάπτυξη και εξέλιξη των καρκινικών όγκων.

Τα **ουδετερόφιλα** είναι τα πιο άφθονα (40% έως 75%) κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα στο αίμα των θηλαστικών. Έχουν μικρό χρόνο ζωής και εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα. Είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά της βακτηριακής μόλυνσης. Με την είσοδο του βακτηρίου τα ουδετερόφιλα διαπερνούν τα αιμοφόρα αγγεία και μεταναστεύουν προς τη θέση της φλεγμονής, ως απόκριση σε διάφορα χημειοελκυστικά σήματα που δέχονται, όπως η ιντερλευκίνη-8 (IL-8), το φορμυλο-πεπτίδιο fMLP (N-formyl-Methionine-Leucine-Phenylalanine) και το λευκοτριένιο  $B_4$ , με μια διαδικασία που ονομάζεται χημιοταξία. Τα σήματα αυτά αναγνωρίζονται από GPCRs της πλασματικής μεμβράνης των ουδετερόφιλων (βλ. σελ. 645), οι οποίοι ενεργοποιούν τη χημιοτακτική μετανάστευση των ουδετερόφιλων, μέσω ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών της  $G_{\alpha_{i/o}}$  οικογένειας και μάλιστα μέσω των  $G_{\beta\gamma}$  υπομονάδων. Θα πρέπει, ωστόσο, να αναφερθεί ότι οι περισσότεροι από αυτούς τους συνδέτες (ειδικά το φορμυλο-πεπτίδιο fMLP, τα λιπίδια διαμυσολαβητές και το θραύσμα του συμπληρώματος C5a) μπορούν να προκαλέσουν και άλλες αντιδράσεις, εκτός από χημιοταξία, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής και της απελευθέρωσης των ROS, καθώς και της εξωκύτωσης.

Η ενεργοποίηση των  $G_{\alpha_{i/o}}$  πρωτεϊνών από τα χημειοελκυστικά μόρια οδηγεί μέσω των  $G_{\beta\gamma}$  υπομονάδων στην άμεση ενεργοποίηση δύο παράλληλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (**Εικόνα 5.86**):

α. Ενεργοποιείται η φωσφολιπάση PLC $\beta$ 2/3, η οποία μέσω της παραγωγής  $IP_3$



**Εικόνα 5.86**

**Η ενεργοποίηση της PI3K στα ουδετερόφιλα.** Η σύνδεση χημειοελκυστικών σημάτων, όπως η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) στους υποδοχείς των ουδετερόφιλων, ενεργοποιεί τη διαδικασία της χημιοταξίας με τον παρακάτω μηχανισμό: Ο GPCR (στην εικόνα διακρίνεται ο υποδοχέας της IL-8, CXCR1/2) ενεργοποιεί μέσω των  $G_{\beta\gamma}$  υπομονάδων δύο σηματοδοτικά μονοπάτια: της φωσφολιπάσης  $CB2/3$  και της κινάσης λιπιδίων PI3K. Η PLC $\beta$ 2/3 υδρολύοντας τα  $PIP_2$  παράγει  $IP_3$  και DAG, οδηγώντας στην αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  και στην ενεργοποίηση της PKC. Παράλληλα, η PI3K ( $p110\gamma/p84$ ) φωσφορυλιώνοντας τα  $PIP_2$  παράγει  $PtdIns(3,4,5)P_3$ , στα οποία συνδέεται μέσω της PH περιοχής της η κινάση PKB/Akt, ενεργοποιώντας τη διαδικασία της χημιοταξίας. [103]

**Εικόνα 5.87**  
**Οι κυριότεροι τύποι λιπιδίων που συμμετέχουν στη σύνθεση των βιομεμβρανών.**

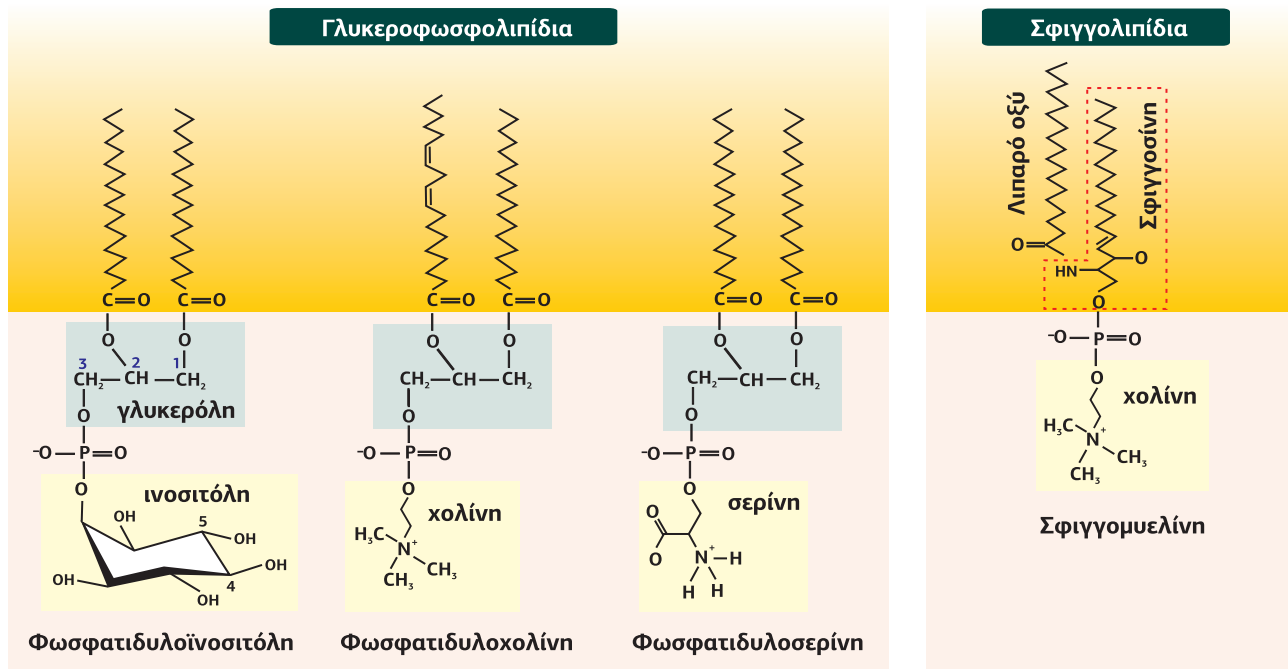
Τα γλυκεροφωσfolιπίδια έχουν ως βάση τη γλυκερόλη, μία αλκοόλη τριών ανθράκων συνδεδεμένη με δύο λιπαρά οξέα και με μία φωσφορυλιωμένη αλκοόλη. Ανάλογα με τον τύπο της φωσφορυλιωμένης αλκοόλης τα γλυκεροφωσfolιπίδια κατατάσσονται σε φωσφατιδυλοχολίνες (PC), φωσφατιδυλοσερίνες (PS) και φωσφατιδυλοϊνoισιτόλες (PI). Τα σφιγγολιπίδια έχουν ως βάση τη σφιγγοσίνη, μία αμινοαλκοόλη που περιέχει μία ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα. Η αμινομάδα της συνδέεται με ένα λιπαρό οξύ, ενώ η υδροξυλομάδα της συνδέεται με μία φωσφορυλιωμένη αλκοόλη. Όταν η αλκοόλη είναι η χολίνη, προκύπτει το πιο κοινό σφιγγολιπίδιο, η σφιγγομυελίνη.

και DAG οδηγεί στην αύξηση του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  και την ενεργοποίηση των συμβατικών ισομορφών της PKC.

β. Ενεργοποιείται η κινάση PI3Kγ. Οι Gβγ αφού αποσπασθούν από την  $G_{\alpha/o}$ , συνδέονται στη ρυθμιστική υπομονάδα p84 της PI3Kγ, η οποία ενεργοποιείται και, στη συνέχεια, αλληλεπιδρά, μέσω της RBD περιοχής της καταλυτικής υπομονάδας με τη GTP-συνδεδεμένη μορφή της Ras. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει διαμορφωτικές αλλαγές και επαναπροσανατολισμό στη μεμβράνη της κινάσης PI3Kγ σε σχέση με το υπόστρωμά της, τη φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινοσιτόλη [PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>], αυξάνοντας έτσι περαιτέρω τη δράση της, η οποία οδηγεί στην παραγωγή PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Η ύπαρξη PIP<sub>3</sub> στη μεμβράνη στρατολογεί την κινάση PKB/Akt, η οποία συνδέεται στα φωσfolιπίδια μέσω της PH περιοχής της και ενεργοποιείται σταδιακά. Εκτός από την PKB, και η πρωτεΐνη RacGEF συνδέεται στα PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> και ενεργοποιείται, με αποτέλεσμα τη διέγερση του μονοπατιού των μικρών G-πρωτεϊνών Rac/Cdc42, οι οποίες συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και τη δημιουργία ελασματοποδίων.

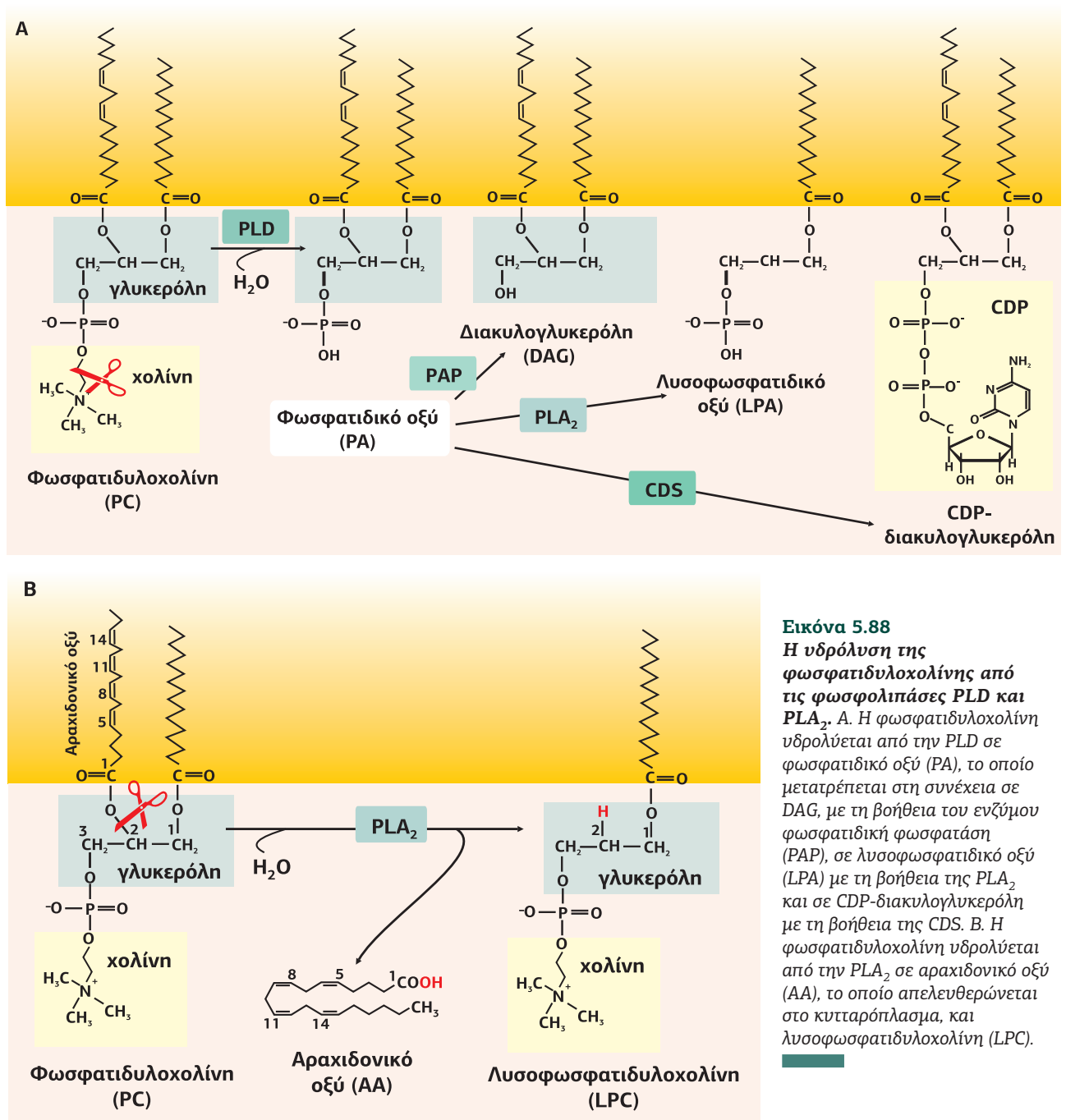
Τα ουδετερόφιλα που απομονώθηκαν από ποντίκια, τα οποία στερούνταν της καταλυτικής p110γ υπομονάδας της PI3Kγ, εμφάνισαν ελαττωματική παραγωγή PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> και μειωμένη ενεργοποίηση της κινάσης PKB/Akt κατά τη διέγερση από διάφορους αγωνιστές των GPCR, συμπεριλαμβανομένων του fMLP, του C5a και της IL-8. Τα PI3Kγ<sup>-/-</sup> ουδετερόφιλα ήταν, επίσης, ελαττωματικά στη χημειοτακτική προσέλκυση προς το fMLP, C5a ή IL-8 και εμφάνιζαν ελαττωματική αναπνευστική έκρηξη κατά την ενεργοποίηση από το fMLP ή C5a.

Συνοψίζοντας, οι PI3Ks είναι οι σημαντικότερες κινάσες των φωσφοϊνοσιτιδίων, οι οποίες καταλύουν τη φωσφορυλίωση της θέσης 3' της ινοσιτόλης παράγοντας PI(3,4)P<sub>2</sub> και PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, δύο λιπίδια που παραμένουν στη μεμβράνη, και δρουν ως θέσεις αγκυροβόλησης και ενεργοποιητές πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος, που περιέχουν περιοχές PH και PX. Από τις διάφορες κατηγορίες των PI3Ks μόνο η PI3Kγ ενεργοποιείται από GPCRs. Η PI3Kγ εκφράζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα, όπου ενεργοποιείται από τις Gβγ-υπομονάδες που συνδέονται με τους GPCRs των χημειοπροσελκυστικών σημάτων. Η δημιουργία PIP<sub>3</sub> προσελκύει στη μεμβράνη την κινάση PKB/Akt και τον RacGEF, οι οποίοι οδηγούν στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, προκαλώντας την προσέλκυση των ουδετερόφιλων στο σημείο της φλεγμονής.



## 6. Φωσφολιπάση D και A<sub>2</sub> με στόχο τη φωσφατιδυλοχολίνη

Όπως είδαμε, η δημιουργία σηματοδοτικών μορίων από τα λιπίδια της μεμβράνης παίζει κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος των κυττάρων. Δύο είναι οι κυριότεροι τύποι λιπιδίων που συμμετέχουν στη σύνθεση των βιομεμβρανών: τα **γλυκεροφωσfolιπίδια**, τα οποία έχουν ως βάση τη γλυκερόλη, μία αλκοόλη τριών ανθράκων συνδεδεμένη με δύο λιπαρά οξέα και με μία φωσφορυλιωμένη αλκοόλη (χολίνη, σερίνη ή ινοσιτόλη), και τα **σφιγγολιπίδια**, τα οποία έχουν ως βάση τη σφιγγοσίνη, μία αμινοαλκοόλη με μία ακόρεστη υδρογονανθρακική αλυσίδα, η αμινομάδα της οποίας συνδέεται με ένα λιπαρό οξύ, ενώ η υδροξυλομάδα



**Εικόνα 5.88**  
 Η υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης από τις φωσfolιπάσες PLD και PLA<sub>2</sub>. A. Η φωσφατιδυλοχολίνη υδrolύεται από την PLD σε φωσφατιδικό οξύ (PA), το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε DAG, με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφατιδική φωσφατάση (PAP), σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) με τη βοήθεια της PLA<sub>2</sub> και σε CDP-διακυλογλυκερόλη με τη βοήθεια της CDS. B. Η φωσφατιδυλοχολίνη υδrolύεται από την PLA<sub>2</sub> σε αραχιδονικό οξύ (AA), το οποίο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC).

της συνδέεται με μια φωσφορυλιωμένη αλκοόλη (όταν η αλκοόλη είναι η χολίνη, προκύπτει το πιο κοινό από τα σφιγγολιπίδια, η σφιγγομυελίνη) (**Εικόνα 5.87**). Και τα δύο είδη λιπιδίων έχουν διπλή λειτουργία: ως δομικά συστατικά και ως πηγή σηματοδοτικών μορίων.

Από τα γλυκεροφωσfolιπίδια τα καλύτερα μελετημένα για τον ρόλο τους στη σηματοδότηση είναι τα φωσfolιπίδια της ινοσιτόλης, τα οποία, όπως είδαμε, είναι τα αρχικά προϊόντα για τον σχηματισμό σημαντικών δεύτερων διαβιβαστών, όπως η τριφωσφορική ινοσιτόλη, η διακυλογλυκερόλη και η  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ .

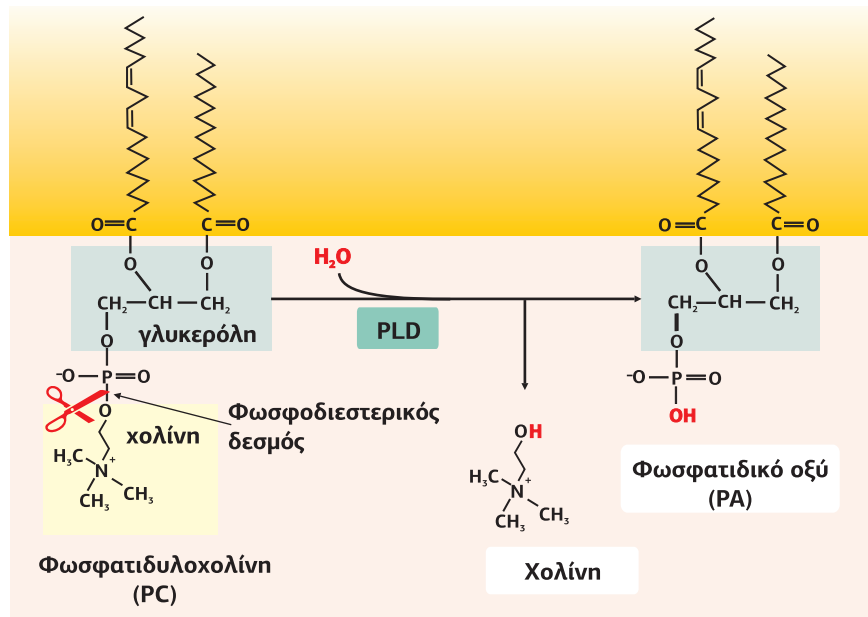
Εκτός από τα φωσfolιπίδια της ινοσιτόλης, τα άλλα γλυκεροφωσfolιπίδια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση είναι οι **φωσφατιδυλοχολίνες (PC)**, οι οποίες είναι πρόδρομος πολλών σηματοδοτικών μορίων. Η φωσφατιδυλοχολίνη υδρολύεται από (**Εικόνα 5.88**):

- Τη φωσfolιπάση D (PLD) σε φωσφατιδικό οξύ (PA), το οποίο μετατρέπεται στη συνέχεια σε DAG, με τη βοήθεια του ενζύμου φωσφατιδική φωσφατάση (PAP, Phosphatidic Acid Phosphatase ή phosphatidate phosphatase), σε λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) με τη βοήθεια της  $\text{PLA}_2$  και σε CDP-διακυλογλυκερόλη με τη βοήθεια της CDS (CDP-Diacylglycerol Synthase ή phosphatidate cytidyltransferase).
- Τη φωσfolιπάση  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) σε αραχιδονικό οξύ (AA) και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC).

## 6.1 | Η φωσfolιπάση D και ο ρόλος του φωσφατιδικού οξέος

Δραστηριότητα φωσfolιπάσης D αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1947 από τους Donald J. Hanahan και I.L. Chaikoff. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης της PLD στην υδρόλυση της υδρόφιλης κεφαλής των φωσfolιπιδίων διαλευκάνθηκε το 1975 σε κύτταρα θηλαστικών. Η φωσfolιπάση D (PLD) είναι μία ευρέως κατανεμημένη (σε ιούς, βακτήρια, ζυμομύκητες, φυτά και ζώα) διεστεράση φωσfolιπιδίων που υδρολύει τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σε φωσφατιδικό οξύ (PA), το οποίο παίζει ρόλο λιπιδικού δεύτερου διαβιβαστή, και στην υδατοδιαλυτή χολίνη (**Εικόνα 5.89**). Καθώς η χολίνη βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα, η δραστηριότητα της PLD δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδά της και είναι απίθανο να παίζει κάποιο ρόλο στη σηματοδότηση.

**Εικόνα 5.89**  
Η υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης από τη φωσfolιπάση PLD. Η PLD υδρολύει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα στη χολίνη (μία αλκοόλη με ένα θετικά φορτισμένο τεταρτοταγές αμμώνιο) και στο φωσφατιδικό οξύ.

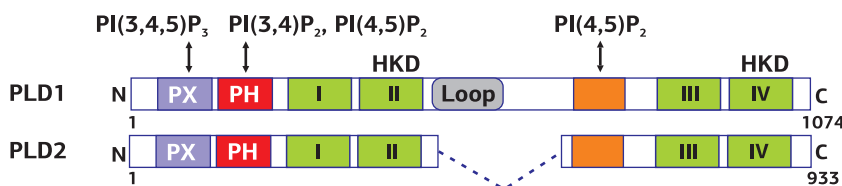


Η PLD ενεργοποιείται ως απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα και η παραγωγή του PA θεωρείται ότι διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, όπως η κινητοποίηση του  $Ca^{2+}$ , η ενδοκύτωση υποδοχέων, η εξωκύτωση, η μεταφορά κυστιδίων, η κυτταρική μετανάστευση, η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού και η απόπτωση. Μέσω αυτών των διαδικασιών εμπλέκεται και σε ασθένειες, όπως η φλεγμονή, ο διαβήτης, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Parkinson και Alzheimer).

### Δομή της φωσφολιπάσης D

Οι PLDs είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες περίπου 1.000 αμινοξέων που χαρακτηρίζονται από τέσσερις καλά διατηρημένες περιοχές (I-IV), οι οποίες σχηματίζουν τον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου και περιβάλλονται από ρυθμιστικές αλληλουχίες. Οι περιοχές II και IV είναι ιδιαίτερα υψηλά συντηρημένες και περιέχουν το αναλλοίωτο φορτισμένο μοτίβο HKD [HxxxxKxD, ιστιδίνη (H), οποιοδήποτε αμινοξύ (x), λυσίνη (K) και ασπαρτικό οξύ (D)]. Το μοτίβο HKD είναι υπεύθυνο για την καταλυτική δραστηριότητα της PLD και είναι διατηρημένο σε όλα τα μέλη της υπεροικογένειας. Στο  $NH_2$ -τελικό άκρο της περιοχής III βρίσκεται μια καλά συντηρημένη αλληλουχία βασικών αμινοξέων που συνδέεται με  $PI(4,5)P_2$ . Η περιοχή PH συνδέεται με χαμηλή εξειδίκευση σε ανιονικά φωσφολιπίδια, όπως  $PI(3,4)P_2$  ή  $PI(4,5)P_2$ , και είναι σημαντική για τον εντοπισμό της PLD στη μεμβράνη. Ωστόσο, αποκοπή της PH περιοχής έδειξε ότι δεν είναι απαραίτητη ούτε για την ενζυμική δραστηριότητα της PLD ούτε επηρεάζει την εξάρτησή της από τα φωσφοϊνοσιτίδια  $PI(4,5)P_2$ . Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη ενός νέου μοτίβου αλληλεπίδρασης (PX) με τα  $PI(4,5)P_2$  κοντά στην καταλυτική περιοχή. Η περιοχή PX δεσμεύεται με υψηλή εξειδίκευση σε πολυφωσφοϊνοσιτίδια, όπως η φωσφατιδυλο(3,4,5)τριφωσφορική ινοσιτόλη [ $PI(3,4,5)P_3$ ], εμφανίζει χαμηλότερη επιλεκτικότητα σε ανιονικά λιπίδια, και εμπλέκεται, επίσης, σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως η δυναμίνη και η Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (Εικόνα 5.90).

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί δύο ισομορφές PLD, η PLD1 (1.074 αμινοξέα) και η PLD2 (933 αμινοξέα), οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική υποκυτταρική κατανομή. Η PLD1 εντοπίζεται κυρίως σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, όπως η συσκευή Golgi, τα ενδοσώματα και η περιπυρηνική περιοχή, ενώ η PLD2 βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην πλασματική μεμβράνη και σε λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts).



### Ρύθμιση της φωσφολιπάσης D

Η δραστηριότητα της PLD ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων μικρές GTPάσες, κινάσες και φωσφοϊνοσιτίδια. Η πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ενεργοποιητής της PLD των θηλαστικών *in vitro* ήταν η GTPάση **Arf** (ADP ribosylation factor). Έως σήμερα δεν έχει σαφώς καθοριστεί η θέση σύνδεσης της Arf στην PLD. Θεωρείται, όμως, ότι βρίσκεται κοντά στην καταλυτική περιοχή της PLD. Επίσης, η οικογένεια των Rho GTPασών (RhoA, Cdc42, Rac1 και Rac2), ενεργοποιεί τις PLDs των θηλαστικών. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι στη ρύθμιση της δραστηριότητας PLD συμμετέχει και η πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι PLDs των θηλαστικών έχουν μια περιοχή δέσμευσης των  $PI(4,5)P_2$ . Ως εκ τούτου, η δραστηριότητα PLD μπορεί να διεγερθεί από τα  $PI(4,5)P_2$ . Επίσης, η  $PIP_3$  ενεργοποιεί την PLD με μειωμένη αποτελεσματικότητα.

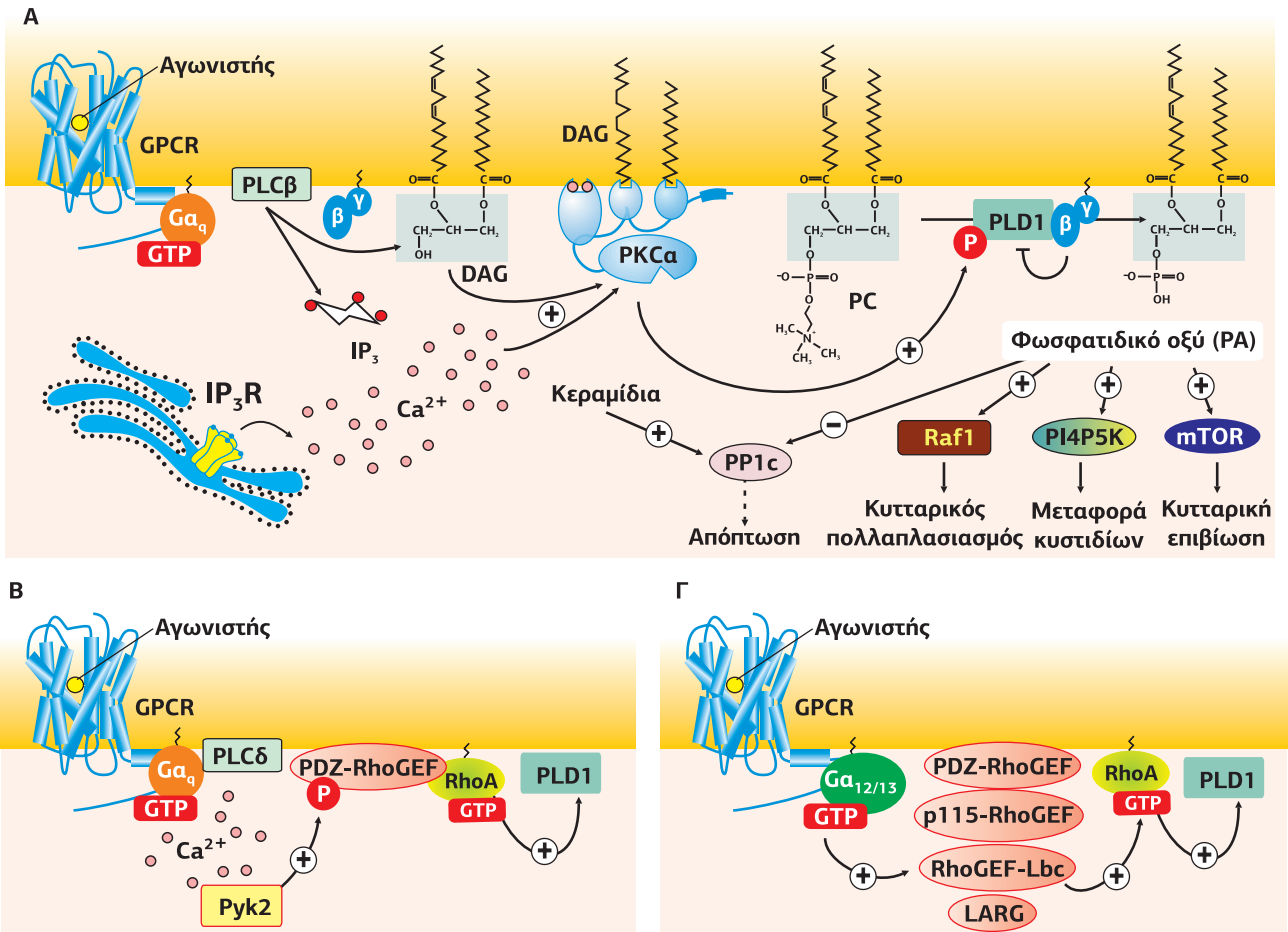
**Εικόνα 5.90**  
Δομή των δύο ισομορφών της φωσφολιπάσης PLD, όπου διακρίνονται οι διαφορετικές περιοχές της. Οι ισομορφές PLD1 (1.074 αμινοξέα) και PLD2 (933 αμινοξέα) περιέχουν στο  $NH_2$ -τελικό άκρο τις περιοχές PX και PH, καθώς και τις υψηλά συντηρημένες περιοχές I-IV. Οι περιοχές II και IV περιέχουν το μοτίβο αλληλουχίας HKD, που είναι απαραίτητο για την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Στο  $NH_2$ -τελικό άκρο της περιοχής III βρίσκεται μια καλά συντηρημένη αλληλουχία βασικών αμινοξέων που συνδέεται με  $PI(4,5)P_2$ . Η PLD1 διακρίνεται από την PLD2 από μια περιοχή βρόχου που φαίνεται να συμβάλλει στη ρύθμιση της δραστηριότητάς της. [13]

**Σηματοδότηση PLD που ελέγχεται από GPCRs**

Η δραστηριότητα της PLD ελέγχεται από υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs) και υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (GPCRs), όπως οι μ-οπιοειδείς, οι υποδοχείς των κανναβινοειδών, του φορμυλο-πεπτιδίου και οι ντοπαμινεργικοί D<sub>2</sub> υποδοχείς. Οι GPCRs ελέγχουν την ενεργοποίηση της PLD με διάφορους μηχανισμούς: 1. Η Gα<sub>q</sub> διεγείρει μέσω της PLCβ την υδρόλυση των PI(4,5)P<sub>2</sub>, παράγοντας DAG και IP<sub>3</sub>. Η IP<sub>3</sub> και η DAG συνεργικά ενεργοποιούν την PKCα, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την PLD1. Ταυτόχρονα, οι Gβγ υπομονάδες, επίσης, ενεργοποιούν την PLCβ και έμμεσα, μέσω της PKC, την PLD1. Ωστόσο, οι Gβγ μπορούν άμεσα να αναστείλουν τη δραστηριότητα της PLD1 μέσω αλληλεπίδρασης με την καταλυτική της περιοχή (**Εικόνα 5.91A**). 2. Η Gα<sub>q</sub> διεγείρει μέσω της PLCδ την υδρόλυση των PI(4,5)P<sub>2</sub>, παράγοντας DAG και IP<sub>3</sub>. Η IP<sub>3</sub> οδηγεί στην αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca<sup>2+</sup>, το οποίο ενεργοποιεί την κινάση τυροσίνης Pyk2. Η Pyk2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον PDZ-RhoGEF, ο οποίος ανταλλάσσοντας το GDP με το GTP οδηγεί στην ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης RhoA. Η RhoA, στη συνέχεια, ενεργοποιεί την PLD1 (**Εικόνα 5.91B**). 3. Οι G-πρωτεΐνες της οικογένειας Gα<sub>12/13</sub> ενεργοποιούν τους p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, LARG και RhoGEF-Lbc, οι οποίοι επάγοντας την ανταλλαγή GDP/GTP ενεργοποιούν την RhoA και κατ' επέκταση την PLD1 (**Εικόνα 5.91Γ**).

Η ενεργοποίηση της PLD οδηγεί στην παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA). Το PA είναι εξαιρετικά βραχύβιο και αποφωσφορυλιώνεται γρήγορα από το ένζυμο φωσφατιδική φωσφατάση (PAP) σχηματίζοντας διακυλογλυκερόλη (DAG). Η DAG μπορεί, επίσης, να μετατραπεί σε PA με τη βοή-

**Εικόνα 5.91**  
**Οι GPCRs ενεργοποιούν με διάφορους μηχανισμούς την PLD.** Α. Ενεργοποίηση της PLD1 μέσω της Gα<sub>q</sub> και της πρωτεϊνικής κινάσης PKCα. Η παραγωγή φωσφατιδικού ενεργοποιεί τις κινάσες Raf1, PI4P5K (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) και mTOR. Επίσης, αναστέλλει τη φωσφατάση PP1c οδηγώντας σε αναστολή της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση της PP1 από τα κεραμίδια είναι υπεύθυνη για την αποπτωτική δράση των κεραμιδίων. Β. Ενεργοποίηση της PLD1 μέσω της Gα<sub>q</sub> της πρωτεϊνικής κινάσης Pyk2 και της GTPάσης RhoA. Γ. Οι G-πρωτεΐνες της οικογένειας Gα<sub>12/13</sub> ενεργοποιούν τους p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF, LARG και RhoGEF-Lbc, οι οποίοι επάγοντας την ανταλλαγή GDP/GTP ενεργοποιούν την RhoA και κατ' επέκταση την PLD1. [13]





θεια της DAG κινάσης. Παρά το γεγονός ότι PA και DAG είναι αλληλομετατρέψιμα, δεν ενεργούν στα ίδια μονοπάτια. Ερεθίσματα που ενεργοποιούν την PLD δεν ενεργοποιούν τα ένζυμα, τα οποία βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο της DAG.

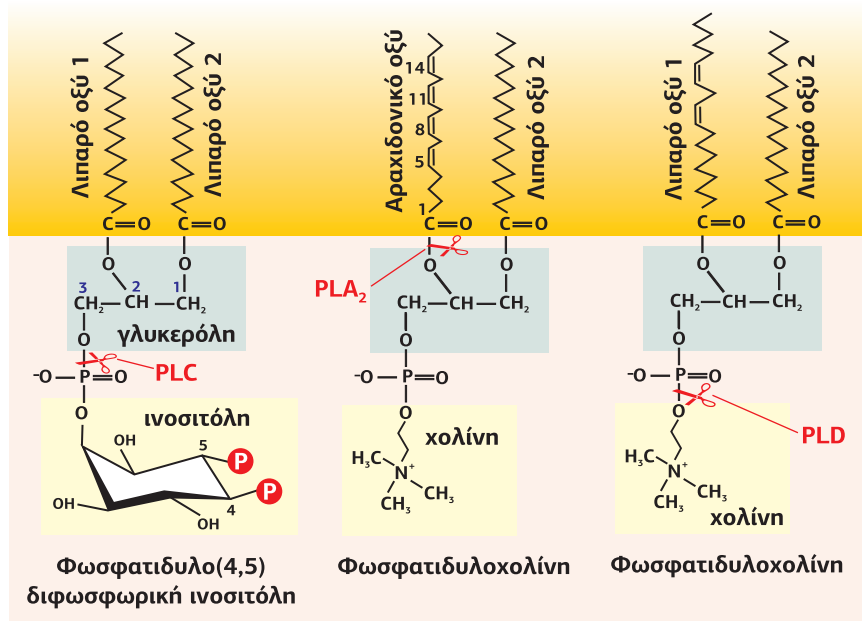
Το PA δρα ως δεύτερος διαβιβαστής ενεργοποιώντας διάφορα ένζυμα, όπως τον βασικό στόχο της ραπαμυκίνης **mTOR** (mammalian Target Of Rapamycin), μια κινάση Ser/Thr που ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική κινητικότητα και την επιβίωση. Άλλοι στόχοι του PA είναι η **κινάση Raf1**, η στρατολόγηση της οποίας στην πλασματική μεμβράνη απαιτεί την άμεση αλληλεπίδρασή της με το PA, η **κινάση της σφιγγοσίνης, η καταλυτική υπομονάδα της φωσφατάσης 1α** (PP1α), η οποία αναστέλλεται από το PA, και η κινάση **PI4P5K** (phosphatidylinositol-4-phosphate 5'kinase), η οποία παράγει PI(4,5)P<sub>2</sub>. Εκτός από αυτή τη σηματοδοτική του δράση, τοπική συσσώρευση του PA, λόγω της μικρής υδρόφιλης κεφαλής του, μεταβάλλει τις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης δημιουργώντας εγκοιλώσεις, διευκολύνοντας τη δημιουργία κυστιδίων υπεύθυνων για την εσωτερίκευση και ανακύκλωση των μεμβρανικών υποδοχών.

## 6.2 | Η φωσφολιπάση A<sub>2</sub> και ο ρόλος του αραχιδονικού οξέος

Οι φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) είναι ένζυμα που απελευθερώνουν λιπαρά οξέα από τη δεύτερη ομάδα άνθρακα της γλυκερόλης. Αναγνωρίζουν εξειδικευμένα τη θέση sn-2 της γλυκερόλης, κυρίως της φωσφατιδυλοχολίνης, τον υδρολύουν και παράγουν λυσοφωσφολιπίδια (λυσοφωσφατιδυλοχολίνη), τα οποία παραμένουν στη μεμβράνη, και αραχιδονικό οξύ, το οποίο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (**Εικόνα 5.92** και βλ. **Εικόνα 5.88B**). Στη συνέχεια, το αραχιδονικό οξύ μετατρέπεται από τις κυκλοοξυγενάσες σε ενεργά συστατικά που ονομάζονται εικοσανοειδή. Τα εικοσανοειδή περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως αντιφλεγμονώδη και φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές.

### Ανακάλυψη και ταξινόμηση της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A<sub>2</sub>

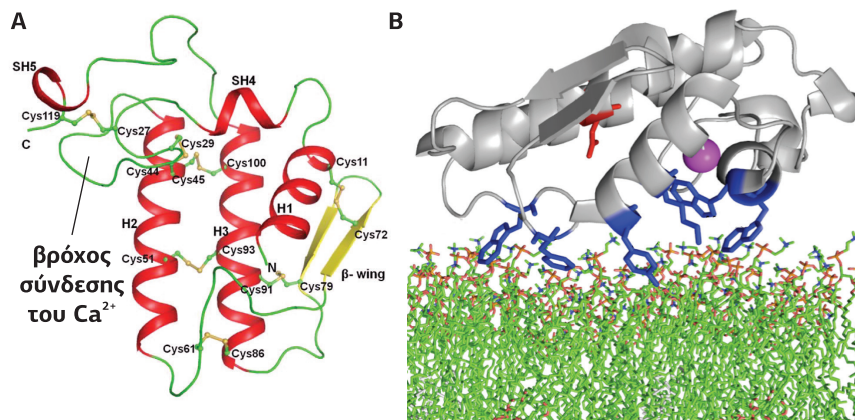
Οι φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> ταξινομούνται σε τέσσερις οικογένειες με κοινή ενζυμική δραστηριότητα. Οι δύο σημαντικότερες οικογένειες είναι οι εκκρινόμενες και οι κυτταροπλασματικές PLA<sub>2</sub>, οι οποίες απαιτούν για τη δραστηριότητά τους Ca<sup>2+</sup>,



Η **ραπαμυκίνη** ανακαλύφθηκε σε ένα δείγμα εδάφους από το Νησί του Πάσχα, που είναι γνωστό και ως Rapa Nui, στη δεκαετία του 1970. Το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus*, που απομονώθηκε από το δείγμα, παράγει έναν αντιμυκητιακό παράγοντα, ο οποίος ονομάστηκε ραπαμυκίνη από το όνομα του νησιού. Η ραπαμυκίνη σταματά τη δραστηριότητα του μύκητα στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Στα θηλαστικά καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα αναστέλλοντας τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S σε T-λεμφοκύτταρα. Έτσι, χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικό έπειτα από μεταμόσχευση οργάνου.

**Εικόνα 5.92**  
Οι θέσεις υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης από τους διαφορετικούς τύπους φωσφολιπασών. Η PLC υδρολύει τον γλυκεροφωσφορικό δεσμό της φωσφατιδυλο(4,5) διφωσφορικής ινοσιτόλης παράγοντας διακυλογλυκερόλη (που παραμένει στη μεμβράνη) και τριφωσφορική ινοσιτόλη (που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα). Η PLA<sub>2</sub> υδρολύει τον sn-2 δεσμό της γλυκερόλης της φωσφατιδυλοχολίνης παράγοντας λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (που παραμένει στη μεμβράνη) και αραχιδονικό οξύ (που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα). Τέλος η PLD υδρολύει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό (ανάμεσα στη φωσφορική ομάδα της γλυκερόλης και στη χολίνη) της φωσφατιδυλοχολίνης και παράγει φωσφατιδικό οξύ (που παραμένει στη μεμβράνη) και χολίνη (που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα).

**Εικόνα 5.93**  
**Εκκρινόμενη φωσφολιπάση A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>).** Α. Η δομή εκκρινόμενης PLA<sub>2</sub>, όπου διακρίνεται ο μεγάλος αριθμός κυστεϊνών και ο βρόχος στον οποίο συνδέεται το Ca<sup>2+</sup>. [62] Β. Μοντέλο σύνδεσης της sPLA<sub>2</sub> στη μεμβράνη. Καθώς οι sPLA<sub>2</sub> εκκρίνονται από τα κύτταρα και απαιτούν για την ενεργοποίησή τους συγκεντρώσεις Ca<sup>2+</sup> mM, στοχεύουν φωσφολιπίδια της εξωκυτταρικής πλευράς της πλασματικής μεμβράνης. Με μωβ σφαίρα συμβολίζεται το Ca<sup>2+</sup>. [24]



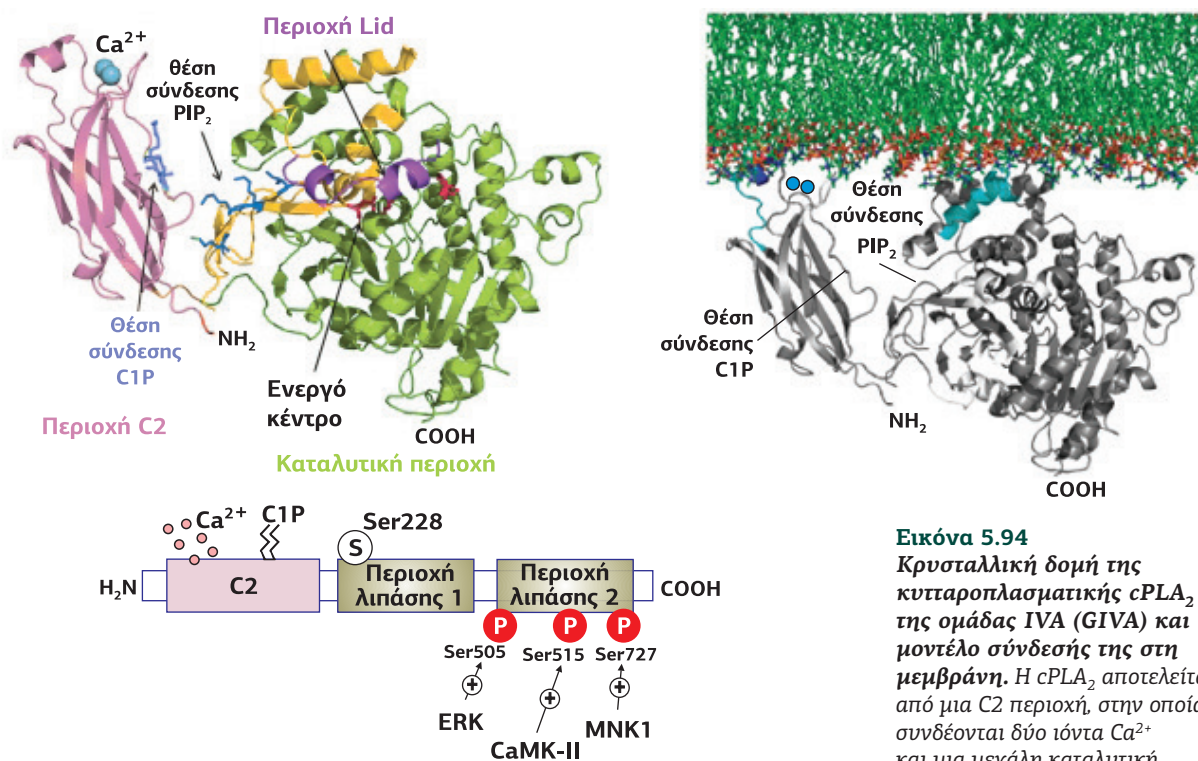
ενώ μικρότερης σημασίας είναι οι οικογένειες των Ca<sup>2+</sup>-ανεξάρτητων PLA<sub>2</sub> και οι σχετιζόμενες με λιποπρωτεΐνες PLA<sub>2</sub>. Από τις τέσσερις οικογένειες μόνο οι κυτταροπλασματικές PLA<sub>2</sub> παίζουν ρόλο στη σηματοδότηση.

Οι **εξωκυτταρικές ή εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>** (sPLA<sub>2</sub>, secreted PLA<sub>2</sub>) ήταν οι πρώτες φωσφολιπάσες A<sub>2</sub> που απομονώθηκαν στα τέλη του 19ου αιώνα από διάφορα δηλητήρια (φιδιών, μελισσών, κ.λπ.). Με την αλληλούχιση της πρωτεΐνης το 1970 έγινε φανερός ο ασυνήθιστα μεγάλος αριθμός κυστεϊνών (το 10% των αμινοξέων) που περιέχουν και η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ τους (**Εικόνα 5.93A**). Την ίδια περίοδο, λόγω του ίδιου προτύπου δισουλφιδικών δεσμών, ως PLA<sub>2</sub> αναγνωρίστηκαν τα παγκρεατικά πεπτικά ένζυμα των θηλαστικών που υδρολύουν φωσφολιπίδια, ενώ το 1988 από το αρθρικό υγρό της άρθρωσης του γόνατος απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε η πρώτη ανθρώπινη, μη παγκρεατική, εκκρινόμενη PLA<sub>2</sub>. Όλα αυτά τα ένζυμα κατατάσσονται στις εκκρινόμενες sPLA<sub>2</sub> και χαρακτηρίζονται από μικρό MB (13–15 kDa). Έως σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί δεκαεπτά ισομορφές sPLA<sub>2</sub> σε θηλαστικά, έντομα, μαλάκια, ερπετά, φυτά και βακτήρια, με ένα ευρύ φάσμα διακριτών φυσιολογικών λειτουργιών.

Οι sPLA<sub>2</sub> του παγκρέατος χρησιμεύουν για την πέψη των φωσφολιπιδικών ενώσεων των τροφών. Οι sPLA<sub>2</sub> των δηλητηρίων ενεργοποιούνται από τη μεγάλη συγκέντρωση μελιττίνης που περιέχεται στο δηλητήριο και, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης και δραστηριότητας PLA<sub>2</sub> που προκύπτει από το τσίμπημα εντόμου ή φιδιού, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης δυσανάλογα, με αποτέλεσμα να προκαλεί φλεγμονή και πόνο στο σημείο του τσιμπήματος. Τέλος, στα τρωκτικά οι sPLA<sub>2</sub> συμμετέχουν στην ωρίμανση του σπέρματος.

Οι **κυτταροπλασματικές PLA<sub>2</sub>** (cPLA<sub>2</sub>, cytosolic Phospholipases A<sub>2</sub>) αναγνωρίστηκαν το 1986 στα κύτταρα των θηλαστικών ως μια ενδοκυτταρική δραστηριότητα PLA<sub>2</sub>, σε αντίθεση με την εξωκυτταρική εκκρινόμενη δραστηριότητα, που παρατηρείται στο δηλητήριο φιδιών και στο πάγκρεας. Το 1992 απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε η πρώτη κυτταροπλασματική cPLA<sub>2</sub> από μια κυτταρική σειρά μακροφάγων. Η αλληλουχία των αμινοξέων της δεν συνδεόταν με αυτή των εκκρινόμενων ενζύμων. Αυτό το ένζυμο έχει τελείως διαφορετική τριδιάστατη διαμόρφωση και είναι πολύ μεγαλύτερο (περιέχει 749 αμινοξέα, 85 kDa) από τις εκκρινόμενες PLA<sub>2</sub>. Αποτελείται από μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή C2 και δύο καταλυτικές περιοχές (άλφα/βήτα υδρολάσης). Η πρώτη καταλυτική περιοχή περιέχει τη συναινετική αλληλουχία λιπάσης, GxSGS, με τη Ser228, μέσω της οποίας ξεκινά ο καταλυτικός μηχανισμός. Η δεύτερη καταλυτική περιοχή περιέχει σερίνες, που είναι στόχοι φωσφορυλίωσης από τις κινάσες ERK, CaMK-II, MNK1 (**Εικόνα 5.94**).

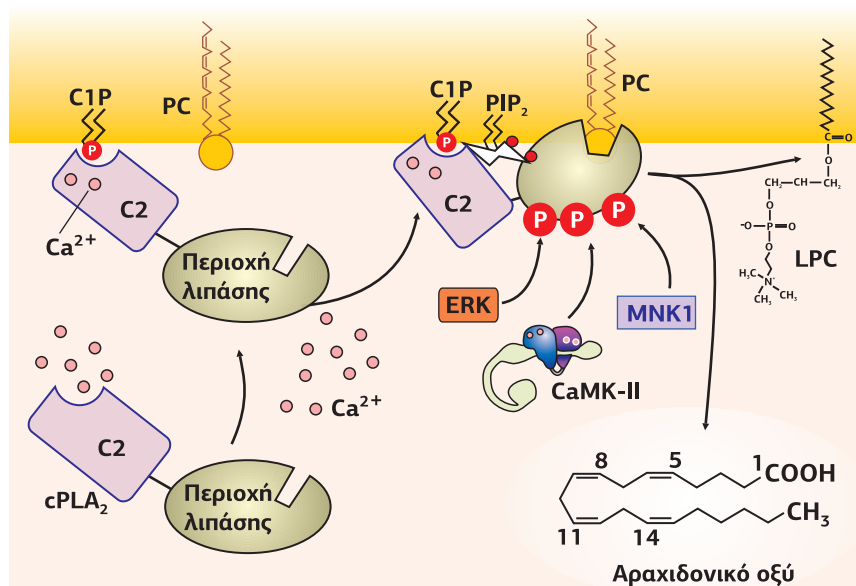
Η cPLA<sub>2</sub> ρυθμίζεται από το ενδοκυτταρικό Ca<sup>2+</sup>, το οποίο δεσμεύεται στην περιοχή C2 και στρατολογεί την πρωτεΐνη στη μεμβράνη. Ο σωστός προσανατολισμός και η σταθεροποίηση του ενζύμου στη μεμβράνη απαιτεί τη σύνδεση των PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> και των 1-φωσφορικών κεραμιδίων C1P, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα με την περιο-



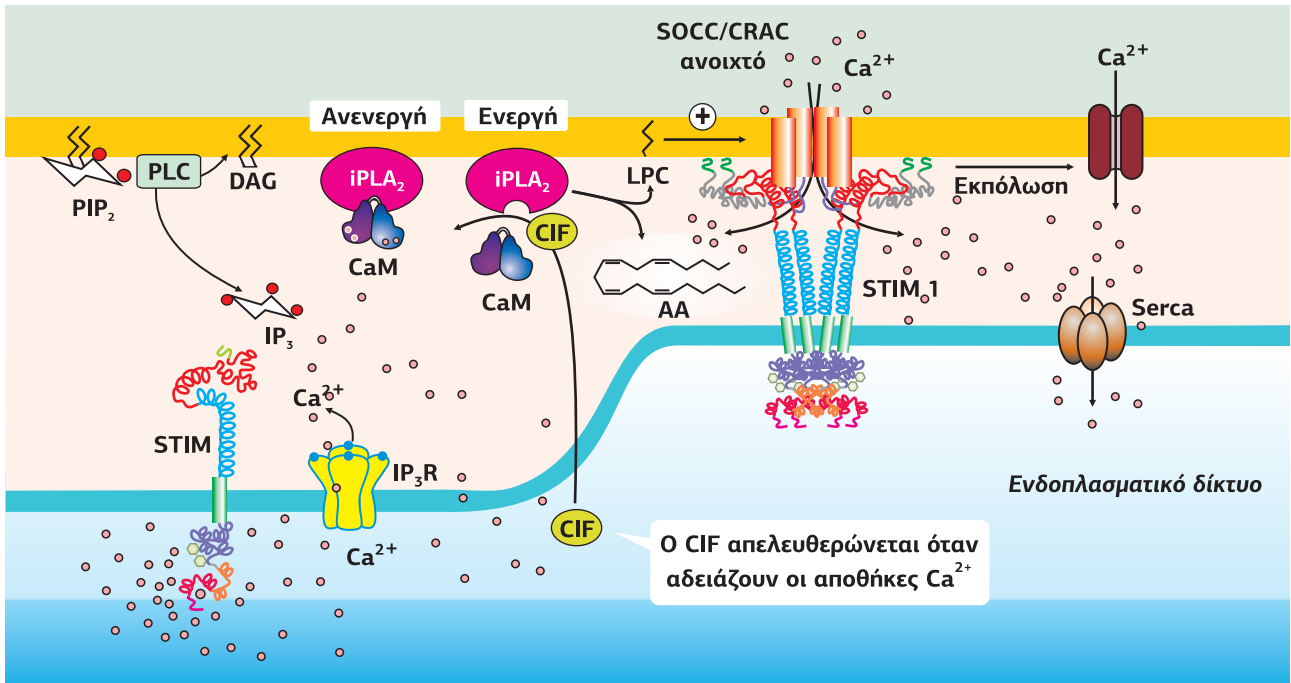
**Εικόνα 5.94**  
Κρυσταλλική δομή της κυτταροπλασματικής cPLA<sub>2</sub> της ομάδας IVA (GIVA) και μοντέλο σύνδεσής της στη μεμβράνη. Η cPLA<sub>2</sub> αποτελείται από μια C2 περιοχή, στην οποία συνδέονται δύο ιόντα Ca<sup>2+</sup> και μια μεγάλη καταλυτική περιοχή. Στην κατηγορία GIVA των cPLA<sub>2</sub> συναντάται και μια περιοχή καπάκι (Lid region), η οποία εμποδίζει τον σωστό προσανατολισμό του φωσφολιπιδικού υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έχει προταθεί ότι το ένζυμο πρέπει να υποστεί μια αλλαγή διαμόρφωσης, παρουσία του υποστρώματος, ώστε να ανοίξει η περιοχή Lid. [15]

κή C2. Μετά τον εντοπισμό στη μεμβράνη η καταλυτική περιοχή της cPLA<sub>2</sub> καταλύει την υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης. Εκτός από την αύξηση του Ca<sup>2+</sup>, η cPLA<sub>2</sub> ενεργοποιείται και από φωσφορυλίωση, συνήθως από μία MAP κινάση, κατά κύριο λόγο την ERK, αλλά και τις κινάσες CaMK-II και MNK1 (Εικόνα 5.95).

Συνεπώς, ο πολύ μεγάλος αριθμός σημάτων που δέχονται και επεξεργάζονται οι MAP κινάσες μπορεί να ελευθερώσει αραχιδονικό οξύ, με την προϋπόθεση ότι το Ca<sup>2+</sup> έχει γίνει διαθέσιμο από ένα άλλο σήμα. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή αραχιδονικού, αλλά και των παραγώγων του (εικοσανοειδή: λευκοτριένια, προσταγλανδίνες), είναι ένα συχνό φαινόμενο στη φυσιολογία του κυττάρου. Στην πραγματικότητα, το αραχιδονικό απελευθερώνεται από μία μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών, όπως και ορμονικών, ανοσολογικών και νευρικών ερεθισμάτων, τα οποία δρουν σε



**Εικόνα 5.95**  
Στρατολόγηση στη μεμβράνη και ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής PLA<sub>2</sub>. Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup>, το οποίο δεσμεύεται στην περιοχή C2, στρατολογεί την cPLA<sub>2</sub> στη μεμβράνη κοντά στα λιπίδια φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου απαιτείται η σύνδεση των PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> και των φωσφορικών κεραμιδίων C1P, τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα με την C2 περιοχή, καθώς και η φωσφορυλίωση από τις κινάσες ERK, CaMK-II, MNK1. [90]

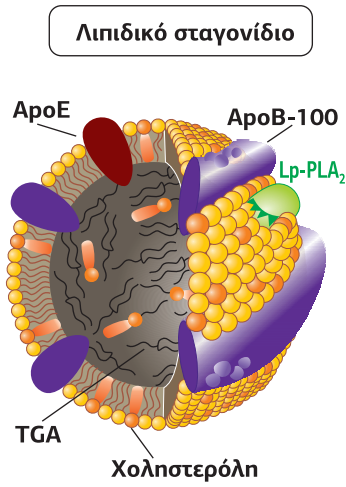


**Εικόνα 5.96**  
**Προτεινόμενος μηχανισμός ενεργοποίησης της iPLA<sub>2</sub>.** Η iPLA<sub>2</sub> βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση λόγω της σύνδεσής της με την καλμοδουλίνη, η οποία απομακρύνεται με τη σύνδεση του παράγοντα CIF, ο οποίος απελευθερώνεται όταν αδειάζουν οι αποθήκες ασβεστίου του κυττάρου. Το άδειασμα του ΕΔ οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση των SOCCs, μέσω των οποίων εισέρχεται Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα. [10]

GPCRs, όπως οι σεροτονεργικοί υποδοχείς 5-HT<sub>2</sub> και οι γλουταμινεργικοί mGluR1, σε υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs), όπως οι υποδοχείς bFGF ή σε υποδοχείς που συνδέονται με κινάσες Tyr, όπως οι IFNα-R και IFNγ-R. Έως σήμερα μόνο οι κυτταροπλασματικές φωσφολιπάσες (cPLA<sub>2</sub>) έχει δείχθει ότι βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο υποδοχέων και συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Το 1995 απομονώθηκε από τα μακροφάγα ακόμη μία κυτταροπλασματική PLA<sub>2</sub>, της οποίας η δραστηριότητα ήταν ανεξάρτητη από το Ca<sup>2+</sup>, η αλληλουχία των αμινοξέων της πολύ διαφορετική και χαρακτηρίστηκε ως **Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub>** (iPLA<sub>2</sub>). Παρότι σε πολλούς κυτταρικούς τύπους η iPLA<sub>2</sub> είναι κυρίαρχη, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος ο τρόπος ενεργοποίησής της. Ένα ενδιαφέρον σενάριο προτάθηκε το 2001, βάσει του οποίου η iPLA<sub>2</sub> βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση λόγω της σύνδεσής με την καλμοδουλίνη, η οποία απομακρύνεται με τη σύνδεση του παράγοντα CIF (Ca<sup>2+</sup> Influx Factor), που απελευθερώνεται όταν αδειάζουν οι αποθήκες ασβεστίου του κυττάρου. Η ενεργοποίηση της iPLA<sub>2</sub> οδηγεί στην παραγωγή αραχιδονικού και λυσοφωσφολιπιδίων, τα οποία διευκολύνουν το άνοιγμα των καναλιών Ca<sup>2+</sup> SOCC (Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channel) (Εικόνα 5.95, 5.96).

Επίσης, το 1995 απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε από το ανθρώπινο πλάσμα του αίματος ένα ένζυμο που υδρολύει τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων PAF (Platelet Activating Factor), μια φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία περιέχει μια ακετυλομάδα στη θέση sn-2 (Εικόνα 5.97). Αυτό το ένζυμο αναγνωρίστηκε ως μια PLA<sub>2</sub> με εξειδίκευση στην κοντή ακετυλο-αλυσίδα της θέσης sn-2 και ονομάστηκε **lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>** (Lp-PLA<sub>2</sub>), καθώς βρίσκεται στο πλάσμα σε σύμπλοκο με τις λιποπρωτεΐνες LDL (Low-Density Lipoproteins). Η Lp-PLA<sub>2</sub> είναι ένα ένζυμο 45 kDa, ανεξάρτητο από το Ca<sup>2+</sup>, που εκκρίνεται από μακροφάγα και ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα. Εκτός από την LDL, αναγνωρίζει και υδρολύει την oxLDL οδηγώντας στη δημιουργία λυσοφωσφολιπιδίων (LPC), τα οποία μέχρι σε ένα σημείο μπορεί να είναι προστατευτικά. Όμως όταν τα Lyso-PC συσσωρεύονται στο τοίχωμα των αρτηριών συμμετέχουν στην αρτηριακή φλεγμονή και στην αθηροσκλήρωση.



**Αραχιδονικό οξύ και ο ρόλος του ως δεύτερος διαβιβαστής**

Το αραχιδονικό οξύ (AA), το οποίο προκύπτει από την υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης από την PLA<sub>2</sub>, αλλά και από την υδρόλυση της DAG από την DAG λιπάση, είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ 20 ατόμων C (C<sub>20</sub>) που περιέχει τέσσε-

ρις διπλούς δεσμούς. Αν και παλαιότερα η κύρια λειτουργία που είχε αποδοθεί στο αραχιδονικό ήταν ο έλεγχος της ρευστότητας των μεμβρανών, πιστεύεται πλέον ότι παίζει έναν ρόλο κλειδί στη μεταγωγή σήματος, δρώντας ως δεύτερος διαβιβαστής, αλλά και ως πρόδρομος μιας πολύ μεγάλης και πολύπλευρης οικογένειας σηματοδοτικών λιπιδίων, των **εικοσανοειδών**.

Μετά την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης από την PLA<sub>2</sub>, το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται είτε στον εξωκυτταρικό χώρο είτε στο κυτταρόπλασμα. Το εξωκυτταρικό AA δρα με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο και έχει δείχθει ότι μπορεί να διεγείρει την έκκριση της ινσουλίνης από τα νησίδια του Langerhans, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αλλά και το κλείσιμο L-τύπου τασεο-εξαρτώμενων καναλιών Ca<sup>2+</sup> (στα καρδιακά κύτταρα) και καναλιών Na<sup>+</sup> (στα νευρικά κύτταρα). Το αραχιδονικό οξύ στο κυτταρόπλασμα έχει μικρή διάρκεια ζωής, γιατί είτε επανενσωματώνεται αμέσως στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης είτε οξειδώνεται σε εικοσανοειδή, γεγονός που καθιστά τον ρόλο του όχι πλήρως κατανοητό. Θεωρείται, όμως, ότι μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα ορισμένες ισομορφές της κινάσης PKC και της φωσφολιπάσης PLD.

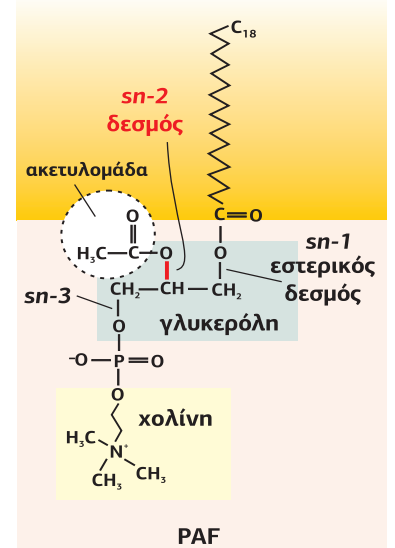
### 6.3 Τα εικοσανοειδή και ο ρόλος τους ως λιπιδικοί διαμεσολαβητές

Το δομικό χαρακτηριστικό του αραχιδονικού οξέος (όπως και των υπόλοιπων πολυακόρεστων οξέων) είναι ότι οι διπλοί δεσμοί του έχουν *cis* διαμόρφωση και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στο οξυγόνο, αυτο-οξειδώνονται πολύ γρήγορα δίνοντας μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Η βιολογική εξέλιξη επωφελήθηκε από αυτήν τη δραστηριότητα, υποβάλλοντας την αυτο-οξείδωση των πολυακόρεστων οξέων κάτω από τον έλεγχο της ενζυμικής κατάλυσης. Ως αποτέλεσμα, ένζυμα όπως οι **κυκλοοξυγενάσες** (COX), οι **λιποξυγενάσες** (LOX) και το **κυτόχρωμα P450** (CYP450) οξειδώνουν το AA, παράγοντας ένα πλήθος από λιπιδικούς διαβιβαστές που ονομάζονται εικοσανοειδή (eicosanoids), καθώς το πρόδρομο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ είναι το C<sub>20</sub>. Οι κυκλοοξυγενάσες οδηγούν στην παραγωγή των προσταγλανδινών G<sub>2</sub> και H<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub> και PGH<sub>2</sub>), οι οποίες είναι πρόδρομοι των προστανοειδών, οι λιποξυγενάσες μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε λευκοτριένια, και το CYP450 οδηγεί στην παραγωγή εποξυ-εικοσατριενικών οξέων (EETs) και υδροξυ-εικοσατετρανοϊκών οξέων (HETEs) (**Εικόνα 5.98**).

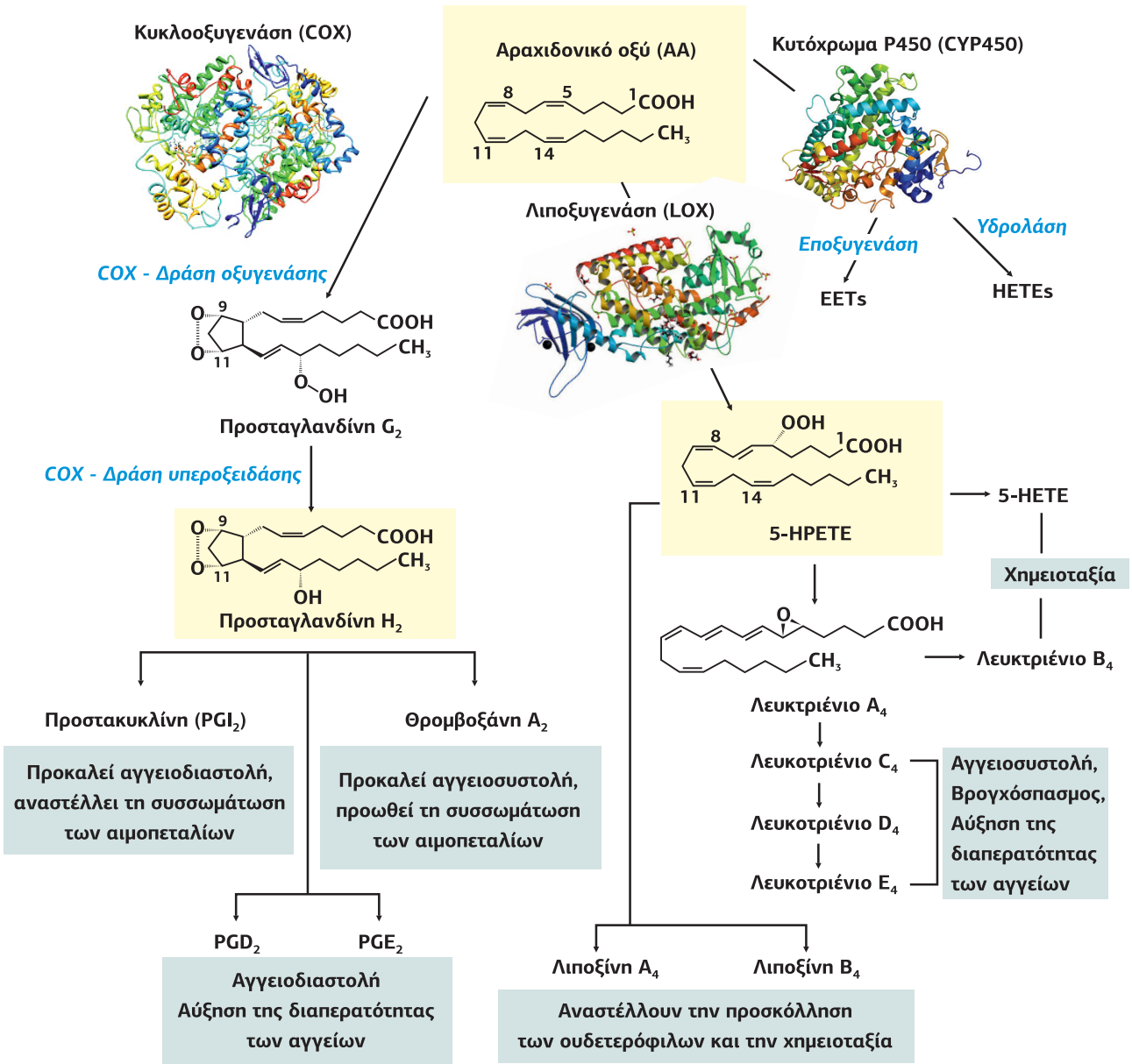
Η σύντομη διάρκεια ζωής ισχύει και για τα εικοσανοειδή, επειδή και αυτά αυτο-οξειδώνονται, απενεργοποιούνται μεταβολικά ή ενσωματώνονται στα φωσφολιπίδια. Ως αποτέλεσμα, το εύρος δράσης τους περιορίζεται στον συγκεκριμένο ιστό ή έστω στην τοπική ομάδα κυττάρων. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι λειτουργούν ως **τοπικοί διαμεσολαβητές** (ονομάζονται επίσης τοπικές ορμόνες και autocooids).

#### Η ανακάλυψη των προσταγλανδινών

Η πρώτη προσταγλανδίνη απομονώθηκε από το σπερματικό υγρό το 1935 από τον Ulf von Euler. Ονόμασε τη νέα ουσία προσταγλανδίνη, δεδομένου ότι θεωρούσε ότι εκκρίνεται από τον αδένιο του προστάτη. Στην πραγματικότητα οι προσταγλανδίνες παράγονται από τη σπερματοδόχο κύστη. Το 1964 οι Bengt Samuelsson και Sune Bergström αναγνώρισαν ότι οι προσταγλανδίνες προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ και απέδειξαν ότι πολλοί ιστοί εκκρίνουν προσταγλανδίνες με διάφορες λειτουργίες. Χαρακτηριστικά, αναφερόμενος στον ρόλο των προσταγλανδινών, ο Samuelsson είπε “[...] it is a control system for the cells that participates in many biological functions. There are endless possibilities of manipulating this system in drug development.” Το 1971 ο John Vane έδειξε ότι η ασπιρίνη αναστέλλει τη σύνθεση των προσταγλανδινών. Ο von Euler έλαβε το βραβείο Nobel Ιατρικής το 1970 και οι Samuelsson, Vane και Bergström το 1982.



**Εικόνα 5.97**  
**Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF.** Ο PAF είναι ένα προφλεγμονώδες γλυκεροφωσφολιπίδιο, το οποίο περιέχει μια C<sub>18</sub> αλυσίδα στη θέση sn-1, μια ακετυλομάδα στη θέση sn-2 και στη θέση sn-3 την κεφαλή της φωσφοχολίνης. Η υδρόλυσή του από την Lp-PLA<sub>2</sub>, η οποία κόβει τον sn-2 δεσμό, οδηγεί στη δημιουργία lysoPAF/ λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) και κοντών και/ή οξειδωμένων λιπαρών οξέων, τα περισσότερα από τα οποία δρουν ως προφλεγμονώδεις μεσολαβητές. [63]

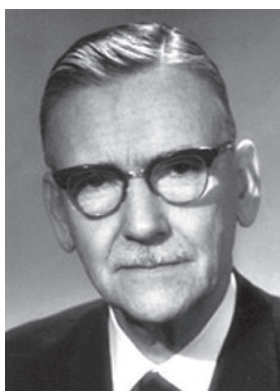


**Εικόνα 5.98**

**Μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος από κυκλοοξυγενάσες, λιποξυγενάσες και το κυτόχρωμα P450.** Η δράση οξυγενάσης της COX μετατρέπει το AA σε PGG<sub>2</sub>, ενώ η δράση υπεροξειδάσης μετατρέπει την PGG<sub>2</sub> σε PGH<sub>2</sub>, πρόδρομο των προστανοειδών. Το AA με τη βοήθεια της λιποξυγενάσης οξειδώνεται σε λευκοτριένια, ενώ με τη βοήθεια του CYP450 σε εποξυ-εικοσατριενικά οξέα (EETs) και υδροξυ-εικοσατετρανοικά οξέα (HETEs).

**Κυκλοοξυγενάσες και η παραγωγή προστανοειδών (προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες)**

Τα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζουν δύο ισομορφές κυκλοοξυγενασών. Η **κυκλοοξυγενάση 1 (COX1)** είναι το ιδιόσυστατα ενεργό ένζυμο υπεύθυνο για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων των προσταγλανδινών, ενώ η **κυκλοοξυγενάση 2 (COX2)** εκφράζεται παροδικά στους πιο πολλούς ιστούς μόνο σε περιπτώσεις αυξημένης απαίτησης για προσταγλανδίνες, όπως σε περίπτωση μόλυνσης, πληγής ή αυξανόμενου όγκου. Τόσο η COX1 όσο και η COX2 αναστέλλονται από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (για να διακριθούν από τα αντιφλεγμονώδη στεροειδή, όπως τα γλυκοκορτικοειδή). Το πρωτότυπο αυτών των φαρμάκων είναι το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, γνωστό ως ασπιρίνη. Τα πολύ γνωστά αποτελέσματά του τεκμηριώνουν τον κεντρικό ρόλο που παίζουν τα εικοσανοειδή στην αντίδραση της φλεγμονής και στον πόνο. Η COX2 υπερεκφράζεται στους πιο πολλούς ανθρώπινους και ζωικούς όγκους. Αντιθέτως, η ασπιρίνη και άλλοι αναστολείς των



Ulf von Euler (1905 - 1983)



J. Vane (1927 - 2004) B. Samuelsson (1934 - ) S. Bergström (1916 - 2004)

**Εικόνα 5.99**

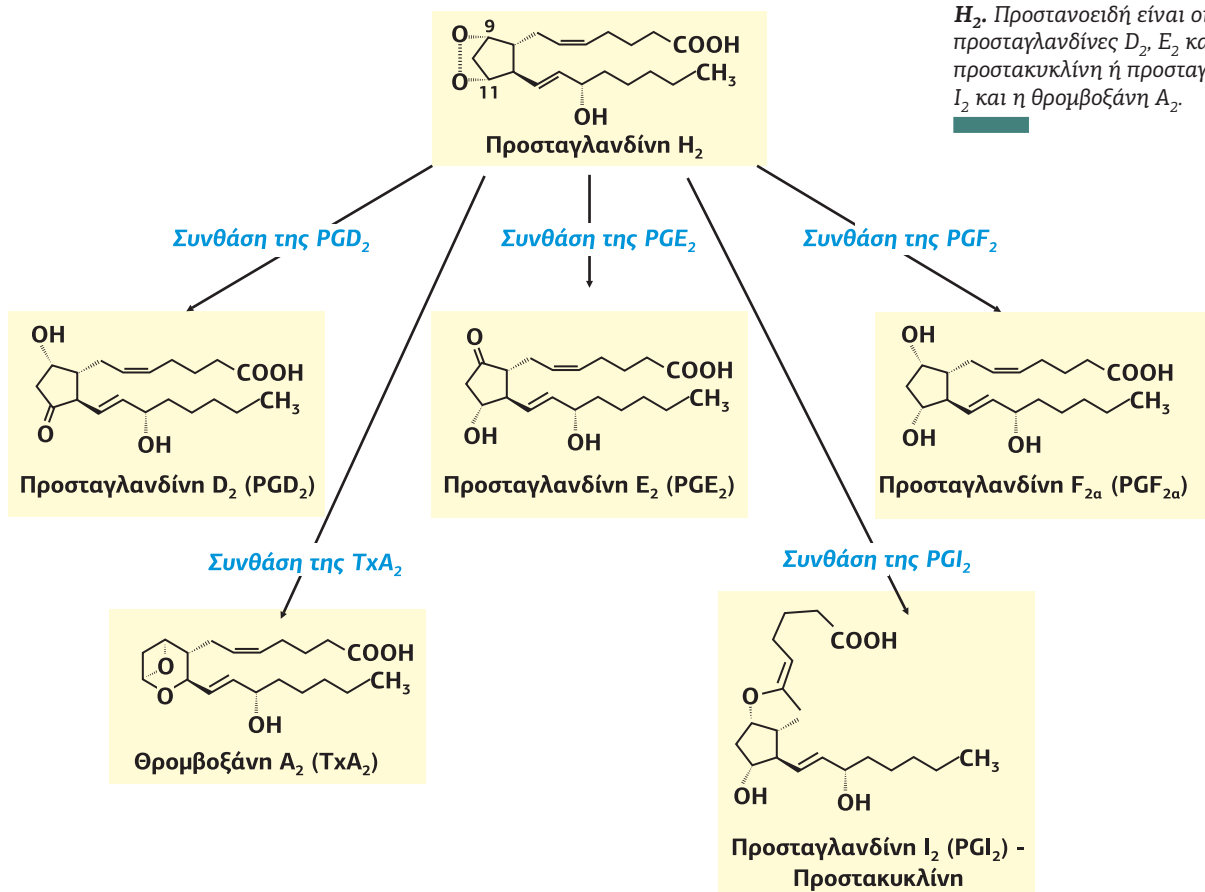
Ο von Euler (Σουηδός φαρμακολόγος που ανακάλυψε τις προσταγλανδίνες) έλαβε το Βραβείο Nobel Ιατρικής το 1970. Ο John Vane (Άγγλος φαρμακολόγος που ανακάλυψε την ανασταλτική δράση της ασπιρίνης στην COX) και οι Σουηδοί βιοχημικοί Bengt Samuelsson και Sune Bergström τιμήθηκαν με το βραβείο Nobel Ιατρικής το 1982 για την ανακάλυψη των πολλαπλών δράσεων των προσταγλανδινών.

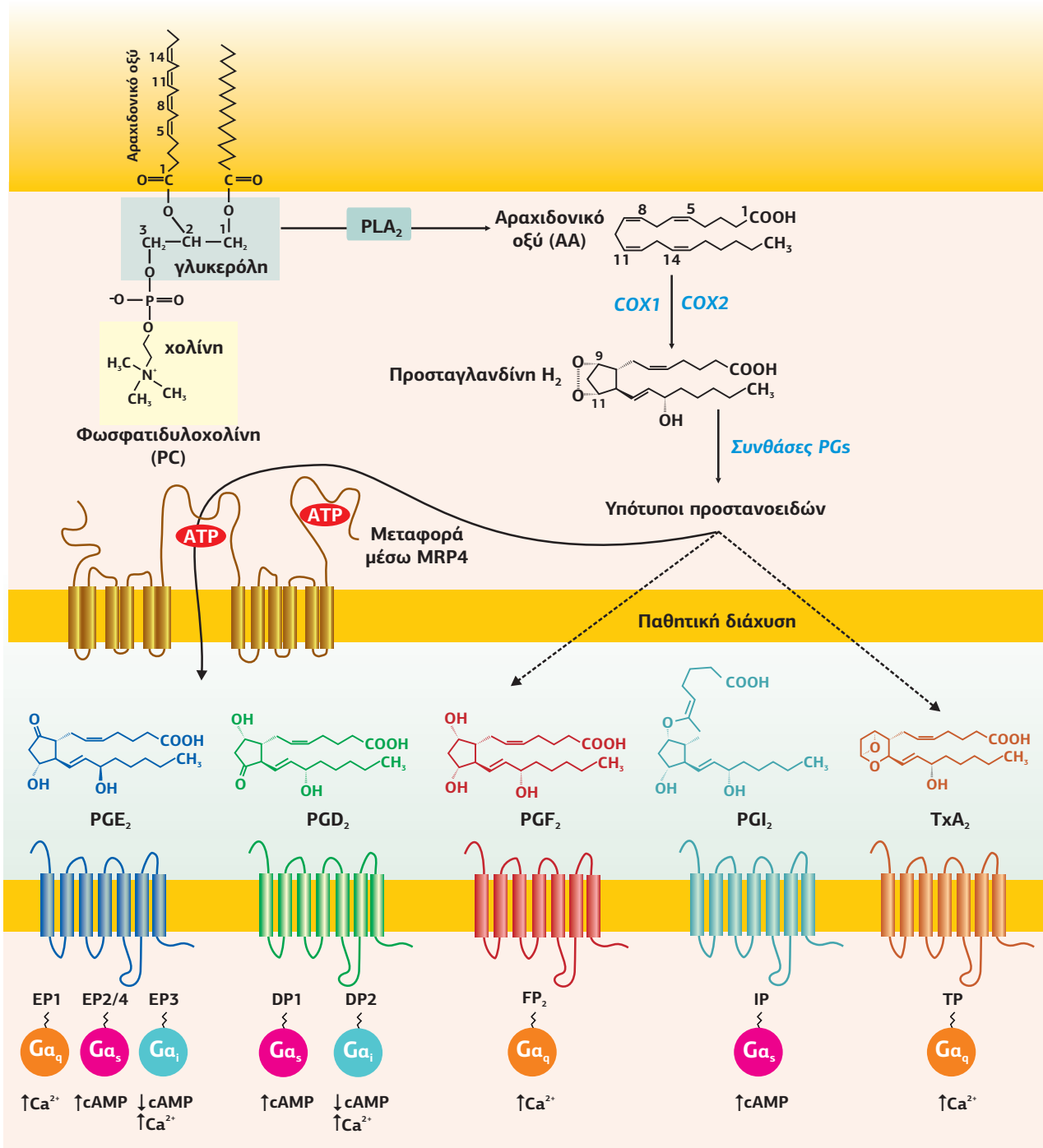
COX έχει βρεθεί ότι επιβραδύνουν ή σταματούν την ανάπτυξη όγκων, προτού αυτοί ακόμα γίνουν κακοήθεις, δείχνοντας ότι τέτοια φάρμακα μπορεί να είναι χρήσιμα στην πρόληψη του καρκίνου.

Οι κυκλοοξυγενάσες είναι αιμοπρωτεΐνες που συνδυάζουν δύο ενζυμικές δραστηριότητες, της οξυγενάσης και της υπεροξειδάσης, και καταλύουν τη μετατροπή του AA σε προσταγλανδίνες σε δύο στάδια. Πρώτον, δύο μόρια O<sub>2</sub> προστίθενται σε δύο διπλούς δεσμούς του AA δημιουργώντας δύο δεσμούς υπεροξειδίου και έναν πενταμερή δακτύλιο άνθρακα στο μέσο της αλυσίδας. Ως αποτέλεσμα δημιουργείται ένα βραχύβιο, ασταθές ενδιάμεσο προϊόν, η **προσταγλανδίνη G<sub>2</sub>** (PGG<sub>2</sub>). Σ' ένα δεύτερο στάδιο η δράση υπεροξειδάσης της COX ανάγει την PGG<sub>2</sub> στην αντίστοιχη αλκοόλη **προσταγλανδίνη H<sub>2</sub>** (PGH<sub>2</sub>), η οποία αποτελεί τη βάση για τη δημιουργία των **προστανοειδών**, δηλαδή των υπόλοιπων προσταγλανδινών (D, E, F), της

**Εικόνα 5.100**

**Σύνθεση των προστανοειδών από την προσταγλανδίνη H<sub>2</sub>**. Προστανοειδή είναι οι προσταγλανδίνες D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> και F<sub>2</sub>, η προστακυκλίνη ή προσταγλανδίνη I<sub>2</sub> και η θρομβοξάνη A<sub>2</sub>.





**Εικόνα 5.101**

Τα προστανοειδή προέρχονται από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος, η οποία καταλύεται από τις κυκλοοξυγενάσες (COX1 και COX2). Οι προσταγλανδίνες E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> και I<sub>2</sub>, καθώς και η θρομβοξάνη A<sub>2</sub> δρουν σε ειδικούς GPCRs, οι οποίοι συνδέονται με G<sub>αs</sub>, G<sub>αi</sub> και G<sub>αq</sub> πρωτεΐνες. [76]

προστακυκλίνης ή προσταγλανδίνης I και της θρομβοξάνης A. Όλα τα προστανοειδή χαρακτηρίζονται από δύο διπλούς δεσμούς και έναν πενταμερή δακτύλιο.

Οι προσταγλανδίνες χαρακτηρίζονται από ένα γράμμα (A - I) ανάλογα με τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών στον πενταμερή δακτύλιο. Έτσι οι PGA έως PGE και η PGJ έχουν μια κετονομάδα σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου, ενώ η PGF έχει δύο υδροξυλομάδες. Επιπλέον, ένας αριθμητικός δείκτης (1 έως 3) χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει τον συνολικό αριθμό των διπλών δεσμών της προσταγλανδίνης.

Μετά τη σύνθεσή τους στο κυτταρόπλασμα, τα προστανοειδή απελευθερώνονται από τα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης λόγω της υψηλής λιποφιλίας τους, αλλά και με τη βοήθεια ενός ειδικού μεταφορέα MRP4 (ATP-dependent Multidrug

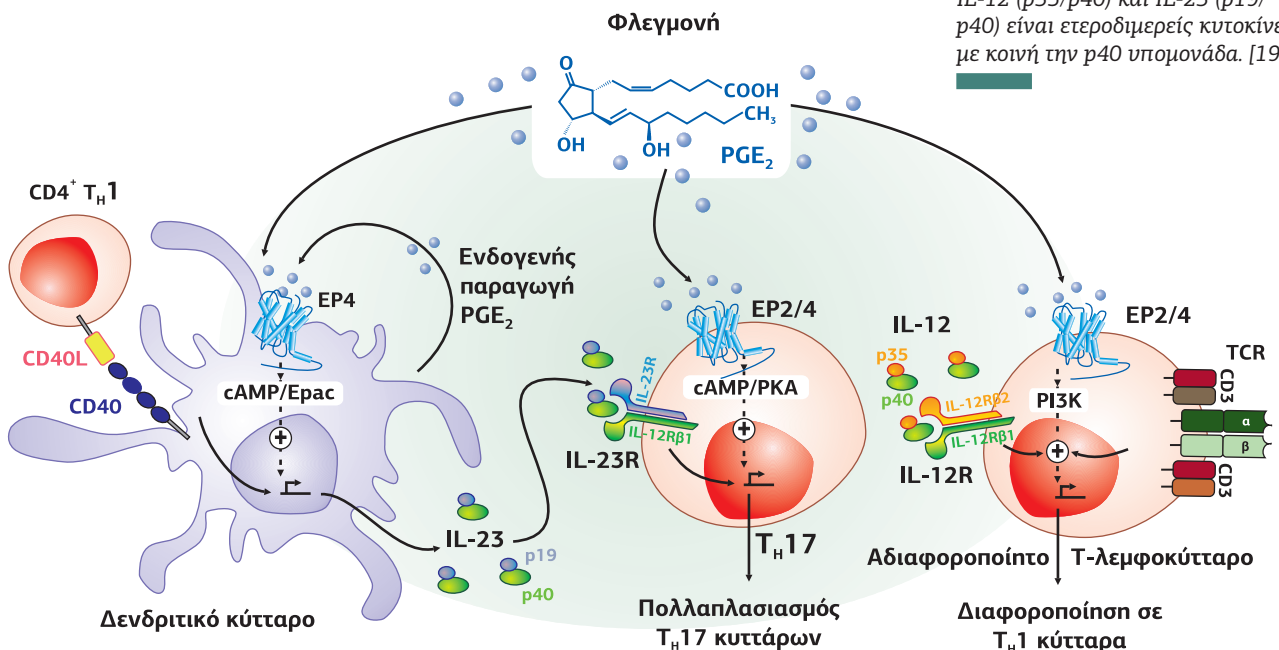


Resistance Protein-4), μέλος της υπερικογένειας μεταφορέων της ATP-binding cassette (ABC μεταφορείς). Λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους δρουν ως αυτοκρινείς ή παρακρινείς μεσολαβητές συνδεδεμένοι σε υποδοχείς GPCRs. Για την προσταγλανδίνη E<sub>2</sub> έχουν αναγνωριστεί οι υποδοχείς EP1-4 (E Prostanoid receptor 1-4), για την PGD<sub>2</sub> οι DP1-2, για την PGF<sub>2</sub> ο υποδοχέας FP<sub>2</sub>, για την PGI<sub>2</sub> ο υποδοχέας IP και για τη θρομβοξανίνη A<sub>2</sub> ο υποδοχέας TP. Οι υποδοχείς αυτοί είτε συνδέονται με G<sub>α<sub>s</sub></sub>-πρωτεΐνες και ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (οι υποδοχείς EP2, EP4, DP1, DP2 και IP) είτε συνδέονται με μια G<sub>α<sub>q</sub></sub>-πρωτεΐνη και ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC) και την αύξηση του Ca<sup>2+</sup> (οι υποδοχείς EP1, FP2 και TP) είτε συνδέονται με μια G<sub>α<sub>i</sub></sub>-πρωτεΐνη, όπως ο EP3 της PGE<sub>2</sub> (Εικόνα 5.101).

Λόγω των πολλών υποδοχέων και των διαφορετικών συστημάτων μεταγωγής με τα οποία συνδέονται, η εικόνα των δράσεων των προστανοειδών είναι πολύπλοκη, καθώς μπορούν να ενεργοποιήσουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες, μερικές φορές αντίθετες, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τη φύση της απόκρισης και τον τύπο του υποδοχέα. Για παράδειγμα, η PGE<sub>2</sub> όταν απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών ενεργοποιεί τους υποδοχείς EP2/EP4 των λείων μυϊκών κυττάρων, οι οποίοι συνδέονται με την G<sub>α<sub>s</sub></sub>-πρωτεΐνη και την αδενυλική κυκλάση, προκαλώντας χάλαση των λείων μυών και ως εκ τούτου βρογχοδιαστολή. Αντίθετως, η PGF<sub>2α</sub> και η TXA<sub>2</sub> μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων FP<sub>2</sub> και TP, αντίστοιχα, που συνδέονται με την G<sub>α<sub>q</sub></sub>-πρωτεΐνη και τη φωσφολιπάση C (PLC) προκαλούν αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup> και, συνεπώς, σύσπαση των λείων μυών.

Η σημαντικότερη λειτουργία των προσταγλανδινών και των θρομβοξανών είναι η συμμετοχή τους στη **φλεγμονώδη αντίδραση** (την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε μόλυνση ή καταστροφή του ιστού, που οδηγεί στην απομάκρυνση των εξωγενών παραγόντων και στην αποκατάσταση της δομής και της φυσιολογικής λειτουργίας των ιστών). Η δράση τους είναι πολύπλοκη, καθώς μπορεί να είναι προ- και αντι-φλεγμονώδης, ανάλογα με τη φύση του ερεθίσματος, το είδος των προστανοειδών που παράγονται, τους υποδοχείς που ενεργοποιούνται και τον τύπο των κυττάρων. Υπό κανονικές συνθήκες, τα επίπεδα προστανοειδών στα κύτταρα είναι χαμηλά, ενώ κατά τη διάρκεια της φλεγμονής τόσο η φύση όσο και η συγκέντρωσή τους μεταβάλλεται δραματικά. Για παράδειγμα, τα μακροφάγα παράγουν PGE<sub>2</sub> και TXA<sub>2</sub>, αλλά ο λόγος τους αλλάζει με αυξημένη τη συγκέντρωση της PGE<sub>2</sub> έπειτα από φλεγμονώδες ερέθισμα. Η PGE<sub>2</sub>, ειδικότερα, μετά τον σχηματισμό της μεταφέρεται ενεργά διαμέσου της μεμβράνης από τον ATP-

**Εικόνα 5.102**  
**Η δράση της προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ως προφλεγμονώδους μεσολαβητής στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και στα T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (T Helper cells).**  
 Η PGE<sub>2</sub> που παράγεται κατά τη φλεγμονή επηρεάζει τα DCs και τα T<sub>H</sub> μέσω τριών μηχανισμών:  
 1. Η PGE<sub>2</sub> δρα στους υποδοχείς EP4 και ενεργοποιεί την παραγωγή της ιντερλευκίνης IL-23 στα DCs, μέσω της αύξησης του cAMP και της ενεργοποίησης του Erac. Για την παραγωγή της IL-23 απαιτείται και ενδογενής παραγωγή PGE<sub>2</sub> από τα DCs έπειτα από διέγερση του υποδοχέα CD40 από τον προσδέτη CD40L (που βρίσκεται στη μεμβράνη των T-λεμφοκυττάρων).  
 2. Ο πολλαπλασιασμός των T<sub>H</sub>17 λεμφοκυττάρων που επάγεται από την IL-23 διευκολύνεται με τη δράση της PGE<sub>2</sub> στους υποδοχείς EP2 και EP4 μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού cAMP-PKA.  
 3. Η PGE<sub>2</sub> δρώντας στους υποδοχείς EP2 και EP4 διευκολύνει την επαγόμενη από την IL-12 διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων σε T<sub>H</sub>1 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού που εμπλέκει την κίνηση PI3K. Οι IL-12 (p35/p40) και IL-23 (p19/p40) είναι ετεροδιμερείς κυτοκίνες με κοινή την p40 υπομονάδα. [19]



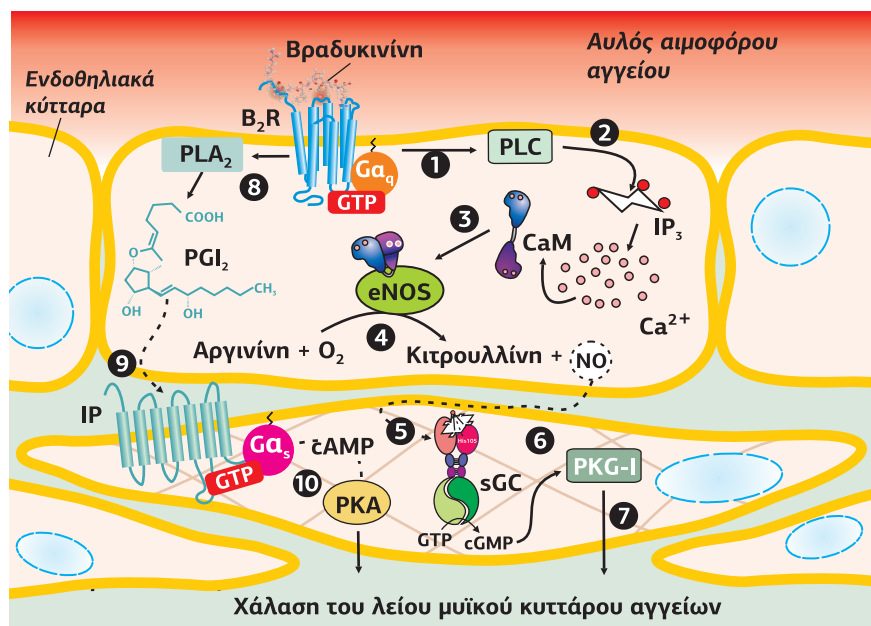
εξαρτώμενο μεταφορέα MRP4 (ATP-dependent Multidrug Resistance Protein-4) ή διαχέεται μέσω της πλασματικής μεμβράνης για να δράσει στη θέση έκκρισης, όπου συνδέεται στους διαφορετικούς υποδοχείς της και ρυθμίζει τη λειτουργία πολλών τύπων κυττάρων, που οδηγούν τόσο προ- όσο και αντι-φλεγμονώδεις επιδράσεις. Ως προ-φλεγμονώδης μεσολαβητής η PGE<sub>2</sub> συμμετέχει σε όλες τις διαδικασίες που οδηγούν στα κλασικά συμπτώματα της φλεγμονής: ερυθρότητα, οίδημα, πυρετός και πόνος. Η ερυθρότητα και το οίδημα είναι αποτέλεσμα της αύξησης της ροής του αίματος στον φλεγμαίνοντα ιστό που προκαλείται από την αύξηση της αρτηριακής διαστολής και την αυξημένη μικροαγγειακή διαπερατότητα. Ο πόνος προκύπτει από τη δράση της PGE<sub>2</sub> σε περιφερικούς αισθητήριους νευρώνες, στον νωτιαίο μυελό και στον εγκέφαλο. Επίσης, η PGE<sub>2</sub> ενεργοποιεί την έκφραση κυτοκινών στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και προωθεί τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς βοηθητικά T<sub>H</sub>1 ή T<sub>H</sub>2 και τον πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 5.102). Από την άλλη πλευρά, ως αντι-φλεγμονώδης μεσολαβητής καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή ορισμένων ιντερλευκινών. Ως εκ τούτου, η PGE<sub>2</sub> έχει έναν ρόλο στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης και στην τελική έκβασή της.

Εκτός από τον ρόλο που διαδραματίζουν στη φλεγμονή, τα προστανοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο και στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Δύο προσταγλανδίνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές και έχουν ουσιώδεις, αλλά αντίθετες δράσεις στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης, η θρομβοξάνη (TXA<sub>2</sub>) και η προστακυκλίνη ή προσταγλανδίνη I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Η TXA<sub>2</sub> συντίθεται κυρίως στα αιμοπετάλια (τα οποία εκφράζουν μόνο COX1), η παραγωγή της ενισχύεται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και προάγει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την αγγειοσυστολή και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, ακόμη και αν έχει έναν χρόνο ημιζωής μόνο 20-30 sec. Αντιθέτως, η PGI<sub>2</sub> παράγεται μόνο όταν απαιτείται και δρα ως ισχυρό αγγειοδιασταλτικό, τοπικά μέσω του υποδοχέα IP (Εικόνα 5.103), ενώ αναστέλλει και τη συσσωρευση των αιμοπεταλίων καθώς και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. Με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει ουσιαστικά στην προστασία του μυοκαρδίου. Η COX2 είναι το ένζυμο που παρέχει την κύρια πηγή της προσταγλανδίνης PGI<sub>2</sub>. Η TXA<sub>2</sub> και η PGI<sub>2</sub> είναι, συνεπώς, σημαντικοί μεσολαβητές παθολογικών αγγειακών επεισοδίων, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης και της αθηρογένεσης, ενώ είναι προφανές ότι η σωστή ισορροπία μεταξύ των δύο προστανοειδών είναι απαραίτητη για την καλή καρδιαγγειακή υγεία. Η αναλογία TXA<sub>2</sub>:PGI<sub>2</sub> φαίνεται να είναι πιο σημαντική από τις απόλυτες πο-

### Εικόνα 5.103

Η προστακυκλίνη ή προσταγλανδίνη I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) είναι από τους κύριους παράγοντες που προκαλούν χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και ως εκ τούτου αγγειοδιαστολή.

Η βραδυκινίνη, ένας από τους μεσολαβητές της φλεγμονής, συνδέεται στους GPCRs της στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και ενεργοποιεί μέσω B<sub>2</sub>R / Gα<sub>q</sub> / PLC / IP<sub>3</sub> / αύξησης του Ca<sup>2+</sup> την παραγωγή του NO, και μέσω της PLA<sub>2</sub> την παραγωγή PGI<sub>2</sub>. Η PGI<sub>2</sub> απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα, συνδέεται στους υποδοχείς IP των λείων μυϊκών κυττάρων και μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού αδενυλική κυκλάση, cAMP και PKA, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κίνηση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), προκαλώντας χάλαση. Επίσης, η PKA φωσφορυλιώνει τη φωσφολαμβάνη επάγοντας την είσοδο Ca<sup>2+</sup> στο ΣΔ μέσω της SERCA, αλλά και τα κανάλια BK<sub>Ca</sub> οδηγώντας μέσω της υπερπόλωσης σε κλείσιμο των τασο-εξαρτώμενων καναλιών Ca<sup>2+</sup>. Και τα δύο γεγονότα οδηγούν σε χάλαση. Το NO μέσω του μονοπατιού γουανυλική κυκλάση / cGMP / PKG-I οδηγεί, όπως και η PKA, στη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της MLCP, όπως θα δούμε στο επόμενο κεφάλαιο.

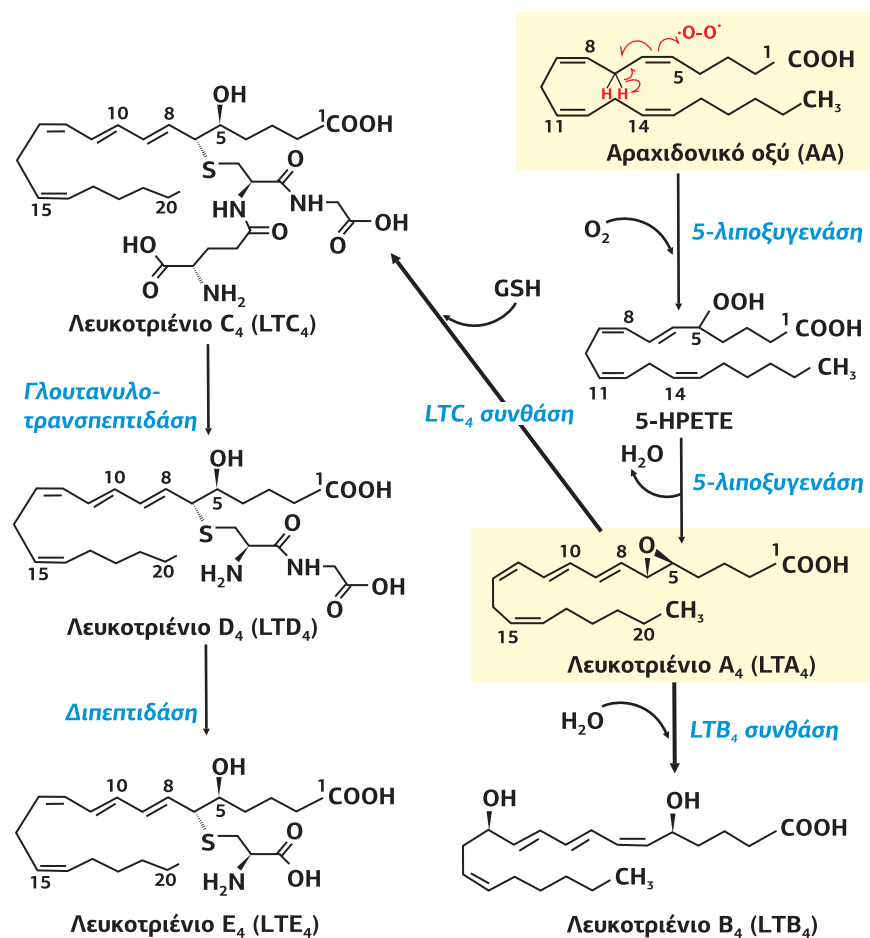


σώπτες αυτών των μεσολαβητών που παράγονται *in vivo*. Η καρδιο-προστατευτική επίδραση της ασπιρίνης οφείλεται στη μη αναστρέψιμη μακροπρόθεσμη αναστολή της COX1 των αιμοπεταλίων και, συνεπώς, της βιοσύνθεσης της ΤΧΑ<sub>2</sub>, ενώ έχει μικρή επίδραση στη σύνθεση της PGI<sub>2</sub>.

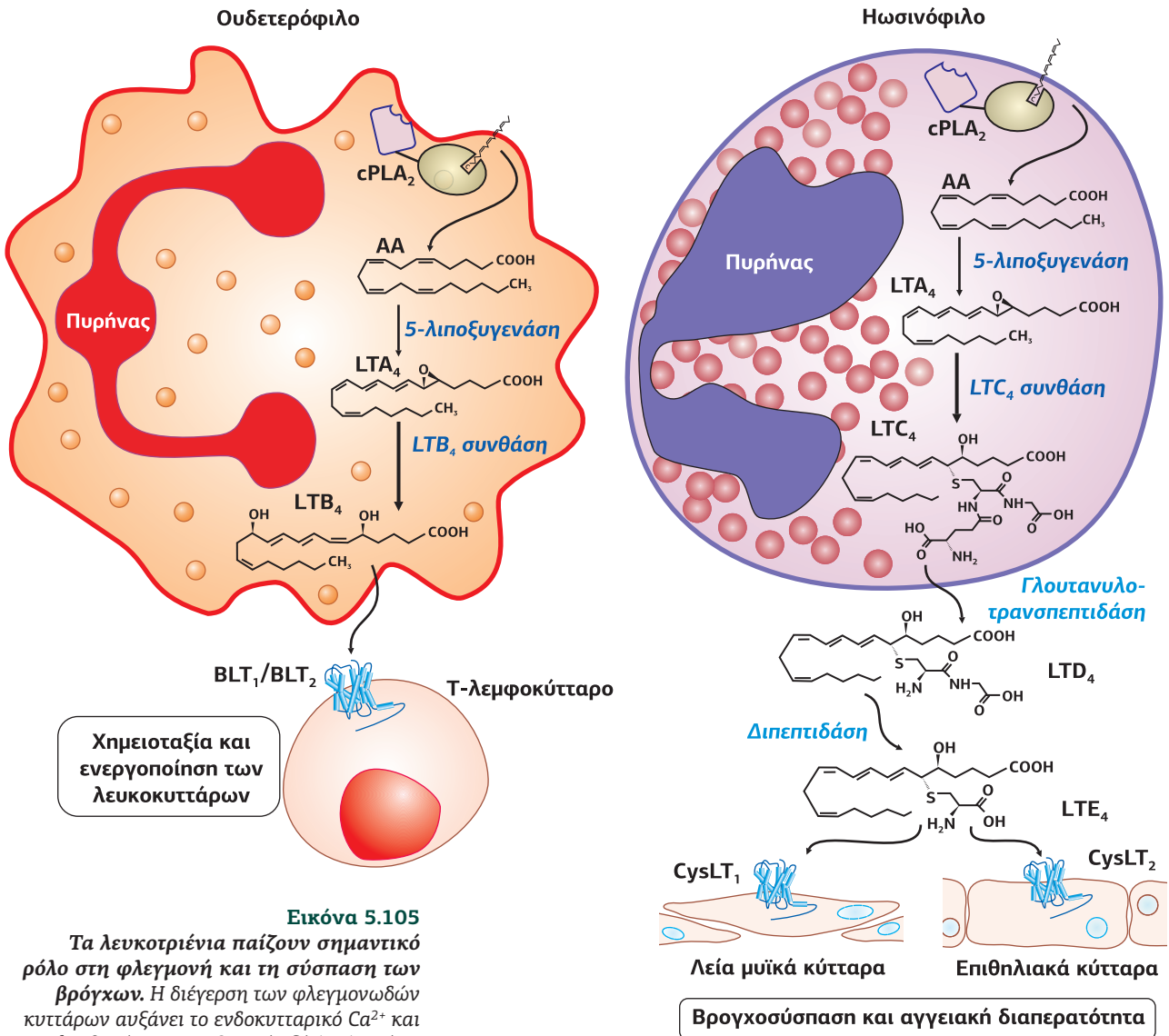
Οι προσταγλανδίνες συμμετέχουν, επίσης, σε πολλές πτυχές της αναπαραγωγής, από την ωορρηξία και τη γονιμοποίηση έως τον τοκετό. Ειδικότερα, η σύνθεση των PGE<sub>2</sub> και PGF<sub>2α</sub> αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του τοκετού. Η PGE<sub>2</sub>, μέσω των EP2/4, έχει την ικανότητα να προκαλεί αγγειοδιαστολή και χάλαση των λείων μυών της μήτρας. Επιπλέον, μαλακώνει τον τράχηλο μέσω της αύξησης του περιεχομένου του σε πρωτεογλυκάνες και της μεταβολής των βιοφυσικών ιδιοτήτων του κολλαγόνου. Αντιθέτως, η PGF<sub>2α</sub> μέσω των υποδοχέων FP2 που συνδέονται με μια Gα<sub>q</sub> πρωτεΐνη προκαλεί σύσπαση των λείων μυών της μήτρας. Οι δύο αντικρουόμενες δράσεις των προσταγλανδινών προκαλούν τις συσπάσεις της μήτρας κατά τον τοκετό.

### Λιποξυγενάσες και η παραγωγή λευκοτριενίων

Η 5-λιποξυγενάση προσθέτει μοριακό οξυγόνο στερεοεξειδικευμένα στα 1,4-cis-cis-πενταδιένα προκαλώντας υδροπεροξειδωση μαζί με μία μετατόπιση και μία cis-trans ισομερείωση του διπλού δεσμού. Το προϊόν είναι το 5-υδροπεροξεικοσατετραενικό οξύ (5-HPETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acid), το οποίο γρήγορα μετατρέπεται στο ασταθές λευκοτριένιο A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Το LTA<sub>4</sub>, στη συνέχεια, είτε υδρολύεται σε λευκοτριένιο B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) είτε προστίθεται στο τριπεπτιδίο γλουταθειόνη GSH (Glu-Cys-Gly), σχηματίζοντας το λευκοτριένιο C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). Το LTC<sub>4</sub> υφίσταται άμεση αποκοπή της γλουταθειόνης για τη δημιουργία των κυστεϊνυλ-λευκοτριενίων LTD<sub>4</sub> και LTE<sub>4</sub>. Τα λευκοτριένια είναι μια ομάδα φυσιολογικά ενεργών ενδοκυτταρι-



**Εικόνα 5.104**  
Σύνθεση των λευκοτριενίων από το αραχιδονικό οξύ μέσω της οδού της 5-λιποξυγενάσης (5-LO). Η 5-LO οξειδώνει το AA σε 5-HPETE, το οποίο άμεσα μετατρέπεται στο ασταθές LTA<sub>4</sub>. Το LTA<sub>4</sub> είτε υδρολύεται σε LTB<sub>4</sub> είτε προστίθεται στο τριπεπτιδίο γλουταθειόνη GSH (Glu-Cys-Gly), σχηματίζοντας το LTC<sub>4</sub>. Το LTC<sub>4</sub> υφίσταται άμεση αποκοπή της γλουταθειόνης για τη δημιουργία των κυστεϊνυλ-λευκοτριενίων LTD<sub>4</sub> και LTE<sub>4</sub>.



**Εικόνα 5.105**

Τα λευκοτριένια παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και τη σύσπαση των βρόγχων. Η διέγερση των φλεγμονωδών κυττάρων αυξάνει το ενδοκυτταρικό  $Ca^{2+}$  και απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ (AA) από τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης μέσω της  $PLA_2$ . Στη συνέχεια, το AA οξυγονώνεται μέσω της 5-λιποξυγενάσης και παράγεται το ασταθές  $LTA_4$ . Αυτό το ενδιάμεσο προϊόν σε κύτταρα που είναι εξοπλισμένα με  $LTB_4$  συνθάση, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, μετατρέπεται στο  $LTB_4$ , το οποίο είναι ένα ισχυρό χημειοελκυστικό δρώντας στους υποδοχείς  $BLT_1$  και  $BLT_2$  των λευκοκυττάρων. Σε κύτταρα που εκφράζουν τη συνθάση  $LTC_4$ , όπως τα σιτευτικά και τα ηωσινόφιλα, το  $LTA_4$  συζεύγνται με το τριπεπτιδίο γλουταθειόνη, για να σχηματίσει το πρώτο από τα κυστεϊνυλλευκοτριένια, το  $LTC_4$ . Έξω από το κύτταρο το  $LTC_4$  μπορεί να μετατραπεί διαδοχικά σε  $LTD_4$  και  $LTE_4$ , τα οποία συνδέονται στους υποδοχείς  $CysLT_1$  και  $CysLT_2$  και προκαλούν βρογχοσύσπαση και αύξηση της διαπερατότητας των μικρών αιμοφόρων αγγείων.

κών διαβιβαστών, που πήραν το όνομά τους από τις λέξεις λευκοκύτταρα και τριένια, καθώς περιέχουν τρεις συζευγμένους διπλούς δεσμούς.

Το **λευκοτριένιο  $B_4$**  είναι ένα από τα πιο ισχυρά χημειοπροσελκυστικά για τα λευκοκύτταρα και διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση. Μέσω της σύνδεσής του στους GPCRs των λευκοκυττάρων  $BLT_1$  και  $BLT_2$ , οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με μια  $G_{\alpha_{11}}$  πρωτεΐνη, ενεργοποιείται το μονοπάτι  $PLC\beta$ ,  $InsP_3$ , αύξηση του  $Ca^{2+}$  και διευκολύνεται η προσέλκυσή τους στο σημείο της φλεγμονής.

Το **λευκοτριένιο  $C_4$**  προκαλεί, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού GPCR/  $G_{\alpha_{11}}$ /  $PLC\beta$ /  $InsP_3$ /  $Ca^{2+}$ , τη σύσπαση των λείων μυών των αεραγωγών. Η απελευθέρωσή του, για παράδειγμα κατά τη διάρκεια της αλλεργικής αντίδρασης θεωρείται μία από τις κύριες αιτίες εκδήλωσης βρογχικού άσθματος. Το λευκοτριένιο  $C_4$  συνεργάζεται με την ισταμίνη, τον αρχικό μεσολαβητή της αλλεργίας, με θετική ανατροφοδότηση: ο κάθε παράγοντας επάγει την απελευθέρωση του άλλου.

Συνοψίζοντας, η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) μέσω της  $PLD$  υδρολύεται σε φωσφατιδικό οξύ (PA) και μέσω της  $PLA_2$  σε αραχιδονικό οξύ (AA). Η δραστηριότητα της  $PLD$  ελέγχεται από τους GPCRs είτε μέσω  $G_{\alpha_q}$ /  $PLC\beta$ /  $IP_3$ /  $PKCa$  είτε μέσω  $G_{\alpha_{12}}$ /  $RhoA/ROCK$ . Το PA αν και εξαι-

ρετικά βραχύβιο δρα ως δεύτερος διαβιβαστής ενεργοποιώντας ένζυμα, όπως οι κινάσες mTOR και Raf1, και η φωσφατάση 1 (PP1). Από τις PLA<sub>2</sub>s μόνο η κυτταροπλασματική cPLA<sub>2</sub> ρυθμίζεται από GPCRs, οι οποίοι οδηγώντας σε αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca<sup>2+</sup> στρατολογούν την πρωτεΐνη στη μεμβράνη. Το AA που παράγεται, απελευθερώνεται είτε στον εξωκυτταρικό χώρο είτε στο κυτταρόπλασμα και παίζει ρόλο κλειδί στη μεταγωγή σήματος άμεσα, δρώντας ως δεύτερος διαβιβαστής ή έμμεσα ως πρόδρομος μιας πολύ μεγάλης και πολύπλευρης οικογένειας σηματοδοτικών λιπιδίων, των εικοσανοειδών. Τα εικοσανοειδή (προσταγλανδίνες και θρομβοξανές που παράγονται από τις κυκλοοξυγενάσες, λευκοτριένια που παράγονται από τις λιποξυγενάσες και EETs και HETEs που παράγονται από το CYP450) μέσω της σύνδεσης στους GPCRs τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη αντίδραση.

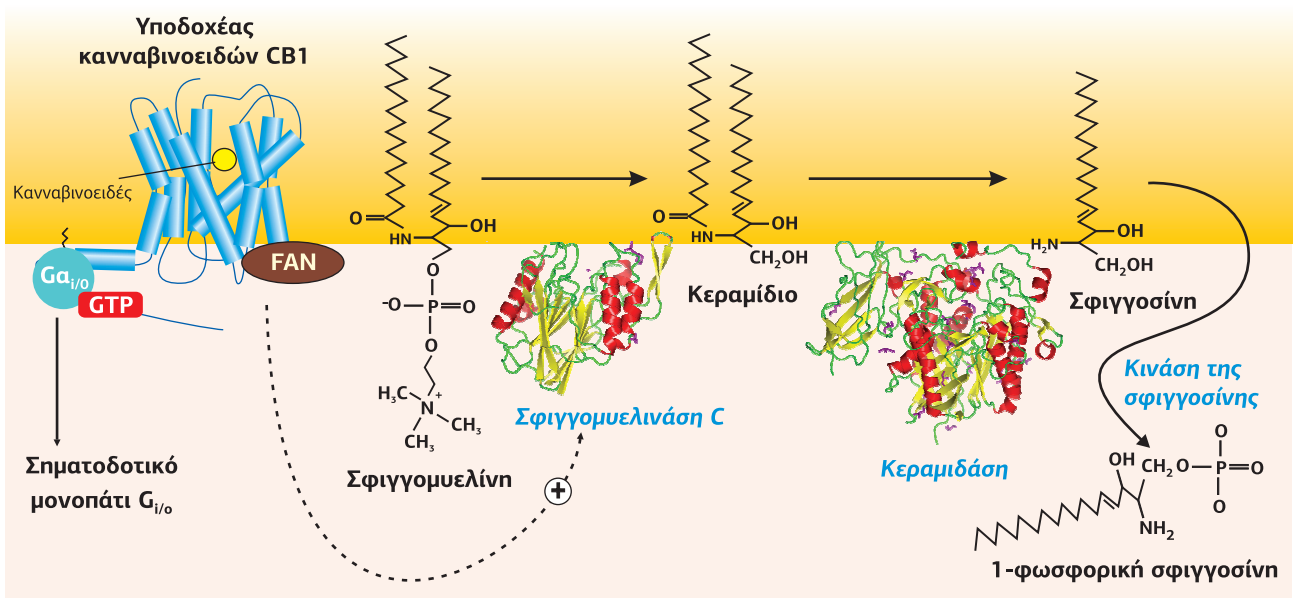
## 7. Σφιγγομυελινάσες με στόχο τη σφιγγομυελίνη

Το stress καθώς και μια σειρά από ενδογενείς μεσολαβητές ενεργοποιούν τις **σφιγγομυελινάσες** (SMases), επάγοντας την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης σε κεραμίδιο και φωσφορική χολίνη. Οι SMases είναι ευρέως διαδεδομένες από τα βακτήρια έως τους ανθρώπους. Υπάρχουν τρεις οικογένειες ενζύμων, τα μέλη των οποίων διαφέρουν ανάλογα με την εξάρτησή τους από το pH. Όσον αφορά τη μεταγωγή, οι ουδέτερες SMases έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς. Οι όξινης SMases απαιτούνται για τον καταβολισμό των λιπιδίων στα λυσοσώματα και, όταν εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια, για την εξωκυτταρική παραγωγή των κεραμιδίων. Οι αλκαλικές SMases βρίσκονται ευρέως στον γαστρεντερικό σωλήνα και θεωρούνται πεπτικά ένζυμα.

Τα **κεραμίδια** υδρολύονται από κεραμιδάσες σε σφιγγοσίνες και μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα. Όπως οι SMases, οι κεραμιδάσες υπάρχουν σε αρκετές ισομορφές και η δραστηριότητά τους ελέγχεται από σήματα. Ενώ οι όξινης κεραμιδάσες περιορίζονται στα λυσοσώματα, λειτουργώντας ως καταβολικά ένζυμα, οι ουδέτερες κεραμιδάσες είναι μεμβρανικά ένζυμα με τις καταλυτικές τους περιοχές προς την εξωτερική μεμβράνη. Θεωρείται ότι ελέγχουν το επίπεδο των κεραμιδίων και των σφιγγοσινών στο πλάσμα του αίματος και σε άλλα υγρά του σώματος.

Οι σφιγγομυελινάσες και οι κεραμιδάσες ενεργοποιούνται σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, όπως σε θερμικό και οξειδωτικό stress και σε έλλειψη αυξη-

**Εικόνα 5.106**  
**Απελευθέρωση 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης έπειτα από ενεργοποίηση GPCRs.** Τα ενδοκανναβινοειδή είναι λιπίδια που παίζουν τον ρόλο νευροδιαβιβαστών στον εγκέφαλο ρυθμίζοντας την όρεξη, την αίσθηση του πόνου, τη διάθεση και τη μνήμη μέσω των συμβατικών μονοπατιών που ενεργοποιεί η Gα<sub>i/o</sub>-πρωτεΐνη (π.χ. αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση ή ανοίγει κανάλια GIRK και κανάλια Ca<sup>2+</sup>, μέσω των Gβγ). Τα ενδοκανναβινοειδή απελευθερώνονται και ως απόκριση στο stress. Σε αυτήν την περίπτωση ο υποδοχέας CB1 ενεργοποιεί, μέσω μιας πρωτεΐνης προσαρμογής FAN, το ένζυμο σφιγγομυελινάση, παράγοντας κεραμίδια (τα οποία θα καθορίσουν την τύχη του κυττάρου) και σφιγγοσίνη που παραμένουν συνδεδεμένα στη μεμβράνη. Η σφιγγοσίνη φωσφορυλιώνεται σε διαλυτή 1-φωσφορική σφιγγοσίνη. [50]



τικών παραγόντων, καθώς επίσης και παρουσία ενδογενών σημάτων stress, όπως η ιντερλευκίνη-1, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων και ο προσδέτης Fas. Επίσης, οι SMases διεγείρονται από μια σειρά GPCRs. Η επαφή μεταξύ GPCR και SMase γίνεται μέσω μιας ειδικής πρωτεΐνης προσαρμογής FAN (Factor Associated with N-sphingomyelinase). Αυτό φαίνεται στην **Εικόνα 5.106** για τον υποδοχέα κανναβινοειδών ως παράδειγμα, αλλά ισχύει και για τον υποδοχέα κυτοκινών.

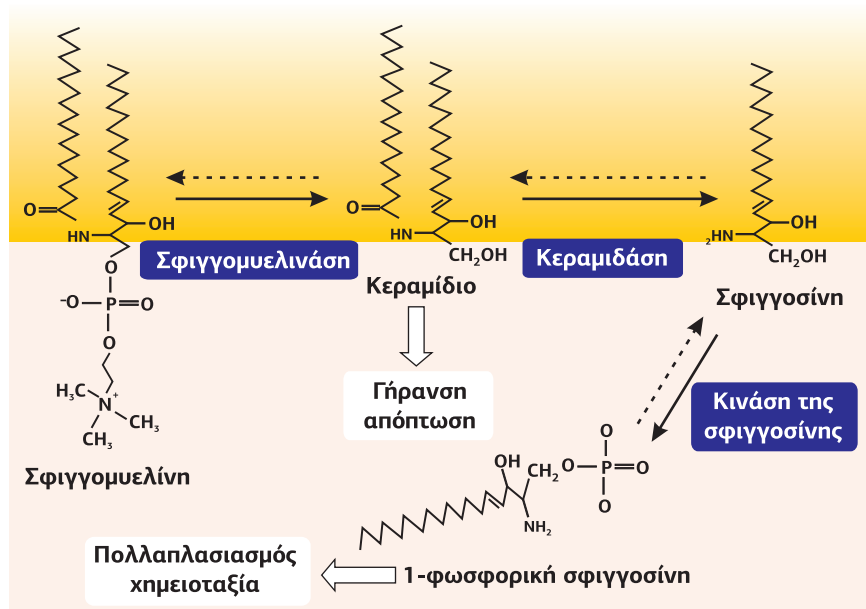
### 7.1 | Ο ρόλος των κεραμιδίων ως απόκριση στο κυτταρικό stress

Κατά κανόνα, τα κεραμίδια επηρεάζουν την τύχη του κυττάρου, αναστέλλουν, για παράδειγμα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, επάγουν την τελική διαφοροποίηση, τη γήρανση ή την απόπτωση. Αυτές οι επιδράσεις οφείλονται σε δομικές αλλαγές των κυτταρικών μεμβρανών. Τα κεραμίδια προωθούν τη διαμόρφωση μιας ειδικής λιπιδικής περιοχής, μιας **σχεδίας λιπιδίων** (lipid rafts) όπου, για παράδειγμα, ο προ-αποπτωτικός υποδοχέας θανάτου Fas συσσωρεύεται, σχηματίζοντας μεγάλα σηματοδοτικά συμπλέγματα DISCs (Death Inducing Signaling Complex). Επιπλέον, καθιστούν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη διαπερατή, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Το αν εκπληρώνουν τα κεραμίδια τα κριτήρια για δεύτερους διαβιβαστές είναι ακόμα θέμα συζήτησης, καθώς δεν έχουν βρεθεί ακόμα ειδικά μοτίβα αλληλεπίδρασης με κεραμίδια σε πρωτεΐνες. Ωστόσο, έχουν βρεθεί πρωτεΐνες τελεστές των κεραμιδίων, μεταξύ των οποίων πρωτεϊνικές φωσφατάσες και πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από κεραμίδια. Οι φωσφατάσες ανήκουν στις οικογένειες PP1 και PP2A και μεσολαβούν στα αντι-πολλαπλασιαστικά και αποπτωτικά αποτελέσματα των κεραμιδίων, καθώς α. αποφωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο, και β. αποφωσφορυλιώνουν και απενεργοποιούν τον αντι-αποπτωτικό παράγοντα Bcl-2. Στις κινάσες που ενεργοποιούνται από τα κεραμίδια ανήκουν η **άτυπη PKCζ**, η οποία ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ενσωματώνεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν είτε σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε σε κυτταρικό θάνατο, και οι **MAPKs** (βλ. **Εικόνα 8.60**) και ως εκ τούτου ενεργοποιείται ο καταρράκτης κινασών Raf/MEK/ERK, ο οποίος είναι ένα μονοπάτι επιβίωσης.

Η σφιγγοσίνη και τα κεραμίδια είναι πηγές πρόσθετων σηματοδοτικών μορίων, όπως το **1-φωσφορικό κεραμίδιο** (C1P) και η **1-φωσφορική σφιγγοσίνη** (S1P) που παράγονται από τις κινάσες των κεραμιδίων και της σφιγγοσίνης (**Εικόνα**

Οι **πρωτεΐνες Bcl-2** (B-cell lymphoma gene 2) είναι μια οικογένεια 25 πρωτεϊνών, ορισμένες από τις οποίες προστατεύουν το κύτταρο από την απόπτωση (Bcl-2, Bcl-xL, CED9), ενώ άλλες (Bad, Bid, Bim) διεγείρουν την απόπτωση. Η **Bcl-2** είναι το ιδρυτικό μέλος της οικογένειας. Η φωσφορυλίωσή της στη Ser70 από την PKC είναι απαραίτητη για την αντιαποπτωτική της δράση, ενώ η αποφωσφορυλίωσή της από την PP2A την απενεργοποιεί.

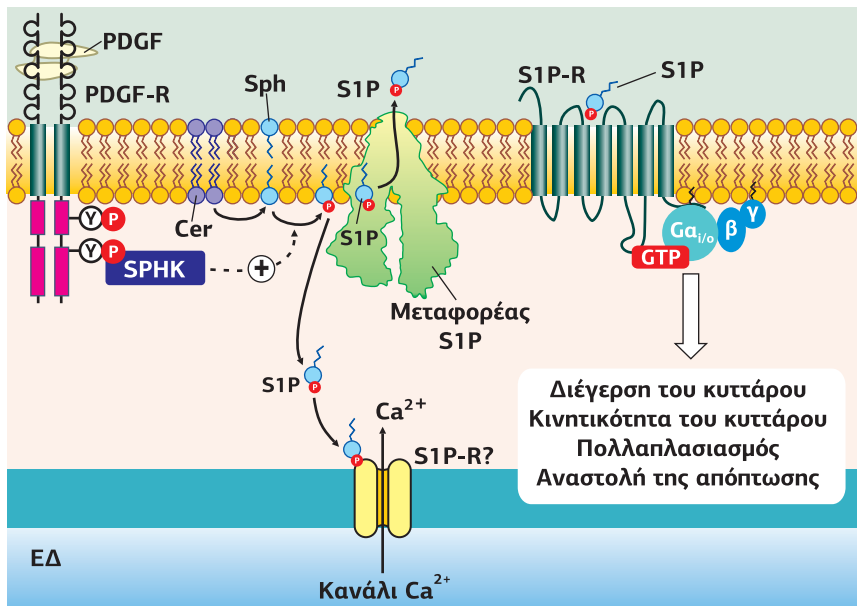
**Εικόνα 5.107**  
Βιοσύνθεση σηματοδοτικών μορίων με βάση τη σφιγγομυελίνη. Οι λειτουργίες των χημικών ενώσεων φαίνονται στα άσπρα πλαίσια.



**5.107).** Τα C1Ps και οι S1Ps είναι λειτουργικοί ανταγωνιστές των κεραμιδίων και των σφιγγοσινών. Ως τυπικά σήματα επιβίωσης διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική κινητικότητα, ενώ αναστέλλουν την απόπτωση.

Εκτός από ρόλο δεύτερου διαβιβαστή στο κυτταρόπλασμα, η S1P απελευθερώνεται από τα κύτταρα μέσω ενός ABC μεταφορέα. Η εξωκυττάρια S1P αντιδρά με τους GPCRs που εκφράζονται στα κύτταρα των θηλαστικών σε πέντε S1P-ειδικές ισομορφές, οι οποίες συνδέονται με διαφορετικές G-πρωτεΐνες ( $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_{q/11}}$ ,  $G_{\alpha_{12/13}}$ ) και προάγουν την επιβίωση των κυττάρων. Η S1P ως εξωκυτταρικός διαβιβαστής παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ιδιαίτερος στο αγγειακό και το ανοσοποιητικό σύστημα. Η σημασία της υπογραμμίζεται από την παρατήρηση ότι τα ποντίκια με *knocked-out* το γονίδιο του υποδοχέα S1P1 πεθαίνουν πριν από τη γέννηση, καθώς το τριχοειδικό δίκτυο δεν έχει αναπτυχθεί σωστά. Επιπλέον, επειδή η S1P ενισχύει και ολοκληρώνει τα αποτελέσματα των προ-φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, δρα ως χημειοτακτικό σήμα σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και κατά την διαδικασία επούλωσης πληγών.

Οι δράσεις αυτές της εξωκυττάριας S1P μεσολαβούνται από τους GPCRs, οι οποίοι μέσω δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, ένα που ελέγχεται από τις Gβγ υπομονάδες και την PI3K και ένα από την Ras και το μονοπάτι των MAPK Raf/MEK/ERK, ενεργοποιούν τις Rho και τις στενά συγγενικές Rac πρωτεΐνες. Οι Rho/Rac είναι μικρές G-πρωτεΐνες που ελέγχουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού ακτίνης. Παράλληλα, μέσω του μονοπατιού  $G_{\alpha_{q/11}}$ / PLCβ/  $InsP_3$ , απελευθερώνονται ιόντα  $Ca^{2+}$  από το ΕΔ, ενεργοποιώντας το σύμπλεγμα ακτινομοσίνης και, κατά συνέπεια, την κυτταρική κινητικότητα, καθώς και εκκριτικές διαδικασίες. Ως ενδοκυττάριος διαβιβαστής, η S1P μοιάζει πολύ με την  $InsP_3$  στο ότι διεγείρει την απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από το ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλά μέσω ενός ασαφούς μηχανισμού.



**Συμπέρασμα:** Οι λιπιδικό διαβιβαστές είναι υψηλότερης τάξης δεύτερο διαβιβαστές

Με μία πρώτη ματιά οι διάφοροι τύποι και οι ποικίλες λειτουργίες των λιπιδικών διαμεσολαβητών παρουσιάζουν μία εικόνα σύγχυσης. Παρ' όλα αυτά, ένας κοινός παρονομαστής έχει αρχίσει να αναδύεται. Στην πραγματικότητα οι πιο πολλοί λιπιδικό διαμεσολαβητές αντιπροσωπεύουν έναν καινούργιο τύπο δεύτερων διαβιβαστών, οι οποίοι, έπειτα από διέγερση του κυττάρου από ένα αρχικό σήμα (περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ορμόνες), απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και στον εξωκυττάριο χώρο. Ενώ μέσα στο κύτταρο τα λιπίδια δρουν ως συμβατικοί

Η **finngolimod** μεταβολίζεται από την κινάση της σφιγγοσίνης στο δραστικό μεταβολίτη φωσφορική **finngolimod**, η οποία συνδέεται με μεγάλη συγγένεια στον υποδοχέα της 1-φωσφορικής σφιγγοσίνης (S1P-R) που βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό για να συνδεθεί στον S1P-R των νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο. Δρώντας ως ανταγωνιστής των S1P-R στα λεμφοκύτταρα, η φωσφορική **finngolimod** αναστέλλει την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τους λεμφαδένες, προκαλώντας ανακατανομή μάλλον, παρά μείωση, των λεμφοκυττάρων. Αυτή η ανακατανομή μειώνει τη διήθηση παθολόγων λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ, όπου θα συμμετείχαν στη φλεγμονή και στη βλάβη του νευρικού ιστού. Υπό την ονομασία **Gilenya** κυκλοφορεί από τη **NOVARTIS** (1.600 ευρώ το πακέτο των 6 καπιών) για τη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

**Εικόνα 5.108**

**Η 1-φωσφορική σφιγγοσίνη: ένας ενδο-εξωκυττάριος διαβιβαστής.** Ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από τα αιμοπετάλια, PDGF, συνδέεται στον υποδοχέα κινάση τυροσίνης και ενεργοποιεί την κινάση της σφιγγοσίνης (SphK), η οποία φωσφορυλιώνει τη σφιγγοσίνη (Sph). Η 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P) που παράγεται είτε δρα ως ενδοκυττάριος διαβιβαστής, ανοίγοντας μία ειδική τάξη καναλιών  $Ca^{2+}$  στο ενδοπλασματικό δίκτυο, είτε απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως μία παρακρινής ή αυτοκρινής ορμόνη, αλληλεπιδρώντας με έναν GPCR. Μέσω του ενεργοποιημένου υποδοχέα της, η S1P διεγείρει πολλά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγώντας στην ενεργοποίηση, στην κινητικότητα, στον πολλαπλασιασμό και στην αναστολή της απόπτωσης του κυττάρου στόχου.

δεύτεροι διαβιβαστές, ο ρόλος τους έξω από το κύτταρο είναι ο συντονισμός και η ρύθμιση (ενίσχυση, ενσωμάτωση ή άμβλυση) της συνολικής απόκρισης των ιστών στο αρχικό ερέθισμα. Κατά συνέπεια, παίζουν έναν ρόλο κλειδί στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

Ένα παράδειγμα παρέχεται από την κυκλοφορία του αίματος. Όταν, για παράδειγμα, μια ορμόνη διεγείρει τη λειτουργία ενός αδένου, η αύξηση στη ροή του αίματος είναι απαραίτητη για τη γρήγορη κατανομή της ορμόνης που εκκρίνει ο αδένος, ενώ η μυϊκή δραστηριότητα που ενεργοποιείται από έναν νευροδιαβιβαστή απαιτεί αυξημένη παροχή οξυγόνου και γλυκόζης μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η φλεγμονώδης απόκριση, η οποία απαιτεί συνεργασία διαφόρων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων, των αιμοπεταλίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, των αλγο-ευαίσθητων νευρώνων, των ινοβλαστών, των επιθηλιακών κυττάρων κ.λπ. Για τον συντονισμό και τη διαμόρφωση αυτής της σύνθετης αλληλεπίδρασης, λιπιδικοί μεταβιβαστές, όπως τα προστανοειδή, διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο. Δεδομένου ότι οι λιπιδικοί διαμεσολαβητές μάλλον βοηθούν παρά αντικαθιστούν τον πρώτο διαβιβαστή, πολλοί από αυτούς δεν είναι βασικοί, παρόλο που έλλειψή τους μπορεί να οδηγήσει σε έντονες λειτουργικές διαταραχές.

## Βιβλιογραφία

1. Abramow-Newerly M, Roy A, Nunn C, Chidiac P, RGS proteins have a signaling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors and auxiliary proteins, *Cell Signal* **18**: 579-591 (2006).
2. Albert PR, Robillard L, G protein specificity: Traffic direction required, *Cell Signal* **14**: 407-418 (2002).
3. Albert PR, Tiberi M, Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors, *Trends Endocrinol Metab* **12**: 453-460 (2001).
4. Bansal G, Druey KM, Xie Z, R4 RGS proteins: Regulation of G-protein signaling and beyond, *Pharmacol Ther* **116**: 473-495 (2007).
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Biochemistry, 7th edition, W. H. Freeman Editions (2011).
6. Berridge MJ, Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers, *Biochem J* **220**: 345-360 (1984).
7. Berridge MJ, Inositol trisphosphate and calcium signaling mechanisms, *Biochim Biophys Acta* **179**: 933-940 (2009).
8. Birnbaumer L, Codina J, Mattera R, Yatani A, Scherer N, Toro MJ, Brown AM, Signal transduction by G proteins, *Kidney Inter Suppl* **32**: S14-S37 (1987).
9. Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P, GPCR interacting proteins (GIP), *Pharmacol Ther* **103**: 203-221 (2004).
10. Bolotina VM, Orai1, STIM1 and iPLA2 $\beta$  determine arterial vasoconstriction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 1066-7 (2012).
11. Bosanac I, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M, Structural insights into the regulatory mechanisms of IP<sub>3</sub> receptors, *Biochim Biophys Acta* **1742**: 89-102 (2004).
12. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F, The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism, *Nature* **349**: 117-127 (1991).
13. Brandenburg LO, Pufe T, Koch T, Role of Phospholipase D in G-Protein Coupled Receptor Function, *Membranes (Basel)* **4**: 302-318 (2014).
14. Burg JS, Ingram JR, Venkatakrishnan AJ, Jude KM, Dukkupati A, Feinberg EN, Angelini A, Waghray D, Dror RO, Ploegh HL, Garcia KC, Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor, *Science* **347**: 1113-17 (2015).



15. Burke JE, Dennis EA, Phospholipase A<sub>2</sub> structure / function, mechanism, and signaling, *J Lipid Res* **50(Suppl)**: S237–S242 (2009).
16. Cao TT, Deacon HW, Reczek D, Bretscher A, von Zastrow M, A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor, *Nature* **401**: 286–290 (1999).
17. Chakraborty A, Kim S, Snyder SH, Inositol pyrophosphates as mammalian cell signals, *Sci Signal* **4(188)**: re1 (2011).
18. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC, High-resolution crystal structure of an engineered human β<sub>2</sub>-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science* **318**: 1258–65 (2007).
19. Chizzolini C, Brembilla NC, Prostaglandin E<sub>2</sub>: igniting the fire, *Immunol Cell Biol* **87**: 510–511 (2009).
20. Chun L, Zhang WH, Liu JF, Structure and ligand recognition of class C GPCRs, *Acta Pharmacol Sin* **33**: 312–323 (2012).
21. Clore GM, Venditti V, Structure, dynamics and biophysics of the cytoplasmic protein-protein complexes of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, *Trends Biochem Sci* **38**: 515–30 (2013).
22. Cockcroft S, The latest phospholipase C, PLCeta, is implicated in neuronal function, *Trends Biochem Sci* **31**: 4–7 (2006).
23. Delom F, Fessart D, Role of phosphorylation in the control of clathrin-mediated internalization of GPCR, *Int J Cell Biol* **2011**: 246954 (2011).
24. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G, Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chem Rev* **111**: 6130–85 (2011).
25. Dodge K, Scott JD, AKAP79 and the evolution of the AKAP model, *FEBS Letters* **476**: 58–61 (2000).
26. Edwards AS, Scott JD, A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond, *Curr Opin Cell Biol* **12**: 217–221 (2000).
27. Ellis C, The state of GPCR research in 2004, *Nat Rev Drug Discov* **3**: 577–626 (2004).
28. Estelle M, Cytokinin action: Two receptors better than one? *Curr Biol* **8**: R539–R541 (1998).
29. Foreman JC, Johansen T, Gibb AJ, Textbook of Receptor Pharmacology, CRC Press 3rd Edition “Chapter 2: Structure and function of 7-TM G-protein coupled receptors p79” (2010).
30. Freeman S, Biological Science, 4th Edition, Published by Pearson Prentice Hall (2010).
31. Glading A, Lauffenburger D, Wells A, Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility, *Trends Cell Biol* **12**: 46–54 (2002).
32. Gomperts B, Kramer I, Tatham P, Signal Transduction, 2nd edition, Academic Press p.576 (2009).
33. Granier S, Kobilka B, A new era of GPCR structural and chemical biology, *Nat Chem Biol* **8**: 670–673 (2012).
34. Grzesik P, Kreuchwig A, Rutz C, Furkert J, Wiesner B, Schuelein R, Kleinau G, Gromoll J, Krause G, Differences in signal activation by LH and hCG are mediated by the LH/CG receptor's extracellular hinge region, *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 140 (2015).
35. Gustavsson M, Verardi R, Mullen DG, Mote KR, Traaseth NJ, Gopinath T, Veglia G, Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **110**: 17338–43 (2013).
36. Halls ML, Cooper DMF, Regulation by Ca<sup>2+</sup> signaling pathways of adenylyl cyclases, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a004143 (2011).
37. Hannoush RN, Sun JL, The chemical toolbox for monitoring protein fatty

- acylation and prenylation, *Nat Chem Biol* **6**: 498–506 (2010).
38. Herrmann J, Lerman L, Lerman A, Simply say yes to NO? Nitric oxide (NO) sensor-based assessment of coronary endothelial function, *Eur Heart J* **31**: 2834-6 (2010).
  39. Hill S, G-protein-coupled receptors: past, present and future, *Br J Pharmacol* **147**: S27-37 (2006).
  40. Hollenstein K, de Graaf C, Bortolato A, Wang M-W, Marshall FH, Stevens RC, Insights into the structure of class B GPCRs, *Trends Pharmacol Sci* **35**: 12-22 (2014).
  41. Huang C, Tesmer J, Recognition in the face of diversity: interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor kinases with activated GPCRs, *J Biol Chem* **286**: 7715-21 (2011).
  42. Hubbard K, Hepler J, Cell signalling diversity of the G $\alpha_q$  family of heterotrimeric G proteins, *Cell Signal* **18**: 135-150 (2006).
  43. Hur EM, Kim KT, G protein-coupled receptors signaling and cross-talk. Achieving rapidity and specificity, *Cell Signal* **14**: 397-405 (2002).
  44. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Principles of Neural Science, New York: McGraw-Hill (2000).
  45. Ke H, Huai Q, Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants, *Biochem Biophys Res Comm* **311**: 1095-11102 (2003).
  46. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure J-P, Labbé J-C, Miller GJ, Hébert TE, The expanding roles of G $\beta\gamma$  Subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action, *Pharmacol Rev* **65**: 545-577 (2013).
  47. Kleinau G, Jaschke H, Neumann S, Lattig J, Paschke R, Krause G, Identification of a novel epitope in the thyroid-stimulating hormone receptor ectodomain acting as intramolecular signaling interface, *J Biol Chem* **279**: 51590-51600 (2004).
  48. Koeppen BM, Stanton BA, Berne & Levy Physiology, 6th Edition, Elsevier (2010).
  49. Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland S, cAMP effector mechanisms. Novel twists for an “old” signaling system, *FEBS Letters* **546**: 121-126 (2003).
  50. Krauss G, Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 4th Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 626 pp., (2008).
  51. Kreuchwig A, Kleinau G, Krause G, Research resource: novel structural insights bridge gaps in glycoprotein hormone receptor analyses, *Mol Endocrinol* **27**: 1357-63 (2013).
  52. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Williams Textbook of Endocrinology, 11th edition, Elsevier (2008).
  53. Kutateladze TG, Translation of the phosphoinositide code by PI effectors, *Nat Chem Biol* **6**: 507–513 (2010).
  54. Langer I, Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies, *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 129 (2012).
  55. Lefkowitz RJ, Shenoy SK, Transduction of receptor signals by beta-arrestins, *Science* **308**: 512-7 (2005).
  56. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ, Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer, *Nat Rev Drug Discov* **8**: 627-644 (2009).
  57. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P, Molecular Cell Biology, 6th edition, W. H. Freeman, pp.973 (2007).
  58. Lyon AM, Dutta S, Boguth CA, Skiniotis G, Tesmer JG, Full-length G $\alpha_q$ -phospholipase C- $\beta_3$  structure reveals interfaces of the C-terminal coiled-coil domain, *Nat Struct Mol Biol* **20**: 355–362 (2013).

59. Marks F, Klingmüller U, Müller-Decker K, Cellular Signal Processing, Garland Science Editions (2009).
60. Miller LJ, Dong M, Harikumar KG, Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor, *Br J Pharmacol* **16**: 18-26 (2012).
61. Milligan G, White JH, Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 513-517 (2001).
62. Mirza Z, Pillai VG, Zhong WZ, Structure of N-terminal sequence Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser of A $\beta$ -peptide with phospholipase A<sub>2</sub> from venom of andaman cobra sub-species, *Int J Mol Sci* **15**: 4221-4236 (2014).
63. Münzel T, Gori T, Lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>, a marker of vascular inflammation and systemic vulnerability, *Eur Heart J* **30**: 2829-31 (2009).
64. Nahorski S, Pharmacology of intracellular signaling pathways, *Br J Pharmacol* **147**: S38-45 (2006).
65. Nakamura Y, Fukami K, Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development, *Physiology* **24**: 332-341 (2009).
66. Nomikos M, Kashir J, Swann K, Lai FA, Sperm PLC $\zeta$ : From structure to Ca<sup>2+</sup> oscillations, egg activation and therapeutic potential, *FEBBS Lett* **587**: 3609-3616 (2013).
67. Nygren PJ, Scott JD, Therapeutic strategies for anchored kinases and phosphatases: exploiting short linear motifs and intrinsic disorder, *Front Pharmacol* **6**: 158 (2015).
68. Oldham WM, Hamm HE, Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 60-71 (2008).
69. O'Neal CJ, Jobling MG, Holmes RK, Hol WGJ, Structural basis for the activation of cholera toxin by human ARF6-GTP, *Science* **309**: 1093-1096 (2005).
70. Pearce LR, Komander D, Alessi DR, The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 9-22 (2010).
71. Perry SJ, Lefkowitz RJ, Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation, *Trends Cell Biol* **12**: 130-138 (2002).
72. Pierce KL, Lefkowitz RJ, Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of GPCRs, *Nat Rev Neurosci* **2**: 727-733 (2001).
73. Pierre S, Eschenhagen T, Geisslinger G, Scholich K, Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets, *Nat Rev Drug Discov* **8**: 321-335 (2009).
74. Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P, Prézéau L, G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABA<sub>B</sub> receptors, *J Physiol* **587**: 5337-44 (2009).
75. Prinster S, Hague C, Hall R, Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance, *Pharmacol Rev* **57**: 289-298 (2005).
76. Rahnama'i MS, van Kerrebroeck PE, de Wachter SG, van Koeveringe GA, The role of prostanoids in urinary bladder physiology, *Nat Rev Urol* **9**: 283-290 (2012).
77. Rehmann H, Prakash B, Wolf E, Rueppel A, de Rooij J, Bos JL, Wittinghofer A, Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2, *Nat Struct Biol* **10**: 26-32 (2003).
78. Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN, GABA<sub>B2</sub> is essential for G-protein coupling of the GABA<sub>B</sub> receptor heterodimer, *J Neurosci* **21**: 8043-52 (2001).
79. Rojo D, Suetomi K, Navarro JB, Structural biology of chemokine receptors, *Biol Res* **32**: 263-72 (1999).
80. Sadana R, Dessauer CW, Physiological roles for G protein-regulated adenylyl

- cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies, *Neurosignals* **17**: 5-22 (2009).
81. Sakmar TP, Receptors: Clicking class B GPCR ligands, *Nat Chem Biol* **7**: 500-501 (2011).
  82. Sanchez J, Holmgren J, Cholera toxin - A foe & a friend, *Indian J Med Res* **133**:153-63 (2011).
  83. Schmid EM, McMahon HT, Integrating molecular and network biology to decode endocytosis, *Nature* **448**: 883-888 (2007).
  84. Siderovski D, Willard F, The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits, *Int J Biol Sci* **1**: 51-66. (2005).
  85. Strosberg D, Pietri-Rouxel F, Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor, *Trends Pharmacol Sci* **17**: 373-381 (1996).
  86. Taylor C, da Fonseca C, Morris E, IP<sub>3</sub> receptors: the search for structure, *Trends Biol Sci* **29**: 210-219 (2004).
  87. Tesmer VM, Kawano T, Kozasa T, Tesmer JG, Snapshot of activated G proteins at the membrane: The Gα<sub>q</sub>-GRK2-Gβγ complex, *Science* **310**: 1686-1690 (2005).
  88. Tse MK, Wong YH, Neuronal functions of activators of G protein signaling, *Neurosignals* **21**: 259-271 (2013).
  89. Tzenaki N, Papakonstanti EA, p110δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer, *Front Oncol* **3**: 40 (2013).
  90. Ueda H, Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination, *Mol Pain* **4**: 11(2008).
  91. Ulloa-Aguirre A, Uribe A, Zariñán T, Bustos-Jaimes I, Pérez-Solis MA, Dias JA, Role of the intracellular domains of the human FSH receptor in Gα<sub>s</sub> protein coupling and receptor expression, *Mol Cell Endocrinol* **260-262**: 153-162 (2007).
  92. Valério E, Chaves S, Tenreiro R, Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review, *Toxins* **2**: 2359-2410 (2010).
  93. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas L, Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice, *Trends Biochem Sci* **30**: 194-204 (2005).
  94. van Leeuwen W, Okrész L, Bögre L, Munnik T, Learning the lipid language of plant signaling, *Trends Plant Sci* **9**: 378-84 (2004).
  95. Vassart G, Pardo L, Costagliola S, A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors, *Trends Biochem Sci* **29**: 119-26 (2004).
  96. Vilardaga JP, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F, G-protein-coupled receptor heteromer dynamics, *J Cell Sci* **123**: 4215-4220 (2010).
  97. Voet D, Voet JG, Biochemistry, 3rd edition, Wiley and Sons (2004).
  98. Wang H, Liu Y, Hou J, Zheng M, Robinson H, Ke H, Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10, *Proc Natl Acad Sci (USA)* **104**: 5782-7 (2007).
  99. Wang Q, Vogan EM, Nocka LM, Rosen CE, Zorn JA, Harrison SC, Kuriyan J, Autoinhibition of Bruton's tyrosine kinase (Btk) and activation by soluble inositol hexakisphosphate, *Elife* **20**: 4 (2015).
  100. Wendland B, Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 971-977 (2002).
  101. Whorton MR, MacKinnon R, X-ray structure of the mammalian GIRK2-βγ G-protein complex, *Nature* **498**: 190-197 (2013).
  102. Willoughby D, Cooper D, Organization and Ca<sup>2+</sup> regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains, *Physiol Rev* **87**: 965-1010 (2007).
  103. Wu X, Kim D, Young AT, Haynes CL, Exploring inflammatory disease drug effects on neutrophil function, *Analyst* **139**: 4056-4063 (2014).
  104. Xia HJ, Yang G, Inositol(1,4,5)trisphosphate 3-kinases: functions and

regulations, *Cell Res* **15**: 83–91 (2005).

- 105.** Xiao B, Tu JC, Worley PF, Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function, *Curr Opin Neurobiol* **10**: 370-374 (2000).
- 106.** Yagisawa H, Okada M, Naito Y, Sasaki K, Yamaga M, Fujii M, Coordinated intracellular translocation of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\delta$  with the cell cycle, *Biochim Biophys Acta* **1761**: 522-534 (2006).
- 107.** Yang YR, Follo MY, Cocco L, Suh PG, The physiological roles of primary phospholipase C, *Adv Biol Regul* **53**: 232–241 (2013).

