Transmembranski receptori (GPCR)

Sladić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:229146

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Kristina Sladić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

TRANSMEMBRANSKI RECEPTORI (GPCR)

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Biokemiju Kemijskog odjeka PMF-a

Mentor rada: doc.dr.sc. Boris Mildner

Zagreb,2016.

Predložak za izradu Završnog rada na Kemijskom odsjeku PMF-a *Autor predloška: T. Hrenar,datum zadnje promjene: 2016-05-12*
Ovaj dokument je isključivo vlasništvo Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu i mogu ga koristiti samo studenti i nastavnici Kemijskog odsjeka za izradu Završnog rada. Dokument se ne smije koristiti u druge svrhe ili distribuirati bez pismene suglasnosti Kemijskog odsjeka PMF-a u Zagrebu. Prije predaje Završnog rada izbrisati ovaj tekst.

DATUM POLAGANJA I OCJENA ZAVRŠNOG ISPITA: .....

Mentor rada: dr.sc. Boris Mildner, docent Potpis:

Predstojnik zavoda: dr.sc. Ita Gruić Sovulj, izvanredni profesor Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak 7
§ 1. Uvod 9
§ 2. Prikaz odabrane teme 10
2.1. Provođenje (transdukcija) signala 10
2.2. G-proteini vezani za receptore (GPCR) i njihova signalizacija 11
2.3. Regulacija GPCR 15
2.4. Kristalna struktura 20
2.5. Popis kratica 24
§ 3. Literaturna vrela 25

§ Sažetak

GPCR (receptori na koje su vezani G-proteini) čine obitelj receptora sa sedam transmembranskih zavojnica (7TM receptori) koji prenose izvanstanični signal aktivirajući unutrastanične molekule, poznate pod nazivom sekundarni glasnici, koje su posrednici u daljnjoj aktivaciji preostalih komponenti signalnog puta koje potiču stanični odgovor.

Vezanjem izvanstaničnih signalnih molekula dolazi do konformacijskih promjena u citoplazmatskim receptorskim domenama pri čemu se aktivira G protein, koji dalje prenosi signal. Glavnu ulogu u regulaciji GPCR signalizacije imaju arestini. Prvotna uloga im je bila opisana kao slabljenje (gašenje) signalizacije, no kasnije je otkrivena uloga β-arestina kao adaptora signalnih molekula u endocitozi GPCR-a te kao proteini koji omogućuju signalizaciju neovisnu o G-proteinu, potičući dodatne signalne putove.

Razvojem metoda stabilizacije i kristalizacije GPCR-a otkriveno je postojanje različitih struktura aktivnih te inaktivnih receptora. Postojanje tih kristalnih struktura omogućilo je lakše razumijevanje kako se i na koji način vežu agonisti i kako se aktiviraju GPCR receptori.

Istraživanjima provedenima s pročišćenim izoliranim grelinskim receptorom, receptor za čimbenik lučenja hormona rasta, došlo se do modela koji objašnjava kako funkcionalno različiti ligandi stabiliziraju različite konformacije istog receptora, što je direktno povezano s aktivacijom različitih signalnih putova.

§ 1. Uvod

Stanice reagiraju na specifične spojeve iz svojeg okoliša i međusobno komuniciraju aktivacijom receptora smještenih na površini stanice. GPCR (engl. G- protein-coupled-receptors), receptori vezani s G-proteinima, pripadaju najvećem razredu takvih receptora, 7TM receptorima. 7TM receptori su receptori sa 7 transmembranskih uzvojnica koje prolaze kroz dvosloj stanične membrane te prenose najrazličitije informacije koje su posljedice djelovanja vanstaničnih signalnih molekula, glasnika, kao što su neurotransmiteri, hormoni, odoransi (tvari koje potiču osjet njuha), gustansi (tvari koje potiču osjet okusa) čak i fotoni. Kao odgovor na njihovu prisutnost stanice prilagođavaju svoj metabolizam ili mijenjaju obrazac genskog izražaja. Signalni put čini nekoliko koraka: otpuštanje prvog glasnika, prihvat prvog glasnika, unutarstanični prijenos poruke drugim glasnicima, aktivacija izvršitelja koji izravno mijenjaju stanični odgovor te završetak signala.

Ključnu ulogu u GPCR signalizaciji ima G-protein. Vezanjem signalne molekule (agonista) na izvanstanični dio receptora dolazi do promjene konformacije receptora čime se aktivira upravo G-protein. G-protein u neaktivnom obliku je heterotrimerni protein sastavljen od podjedinica α,β i γ. G_α podjedinica član je porodice NTP-aza s P-petljom , a P-petlja sudjeluje u vezanju nukleotida. Nukloetidi koje veže su gvanilni nukleotidi odakle i naziv G-.protein. U neaktivnom stanju je vezan gvanilni nukleotid GDP. Aktivacija G-proteina uključuje zamjenu GDP s GTP-om, a protein disocira na podjedinice G_α i $G_{\beta\gamma}$. Tako aktivirani G-protein dalje prenosi signal preko unutarstaničnih molekula aktivirajući različite signalne puteve koji dovode do aktivacije različitih kinaza, enzima koje fosforiliraju specifične aminokiselinske ostatke na ciljanim proteinima.

Međutim, fosforilacijom receptora i vezanjem molekula β-arestina, na kompleks agonist-receptor dolazi do gašenja signalizacije. β-arestini inhibiraju G-protein te mu onemogućuju daljnju interakciju i prenošenje signala. Također, β-arestini imaju ulogu scaffold proteina (proteina nosača) pomoću kojih se ostvaruju dodatni signalizacijski putevi. Dakle, prestanak jednog signalnog puta može dovesti do pokretanja drugog pomoću β-arestina.

§ 2. Prikaz odabrane teme

2.1. Provođenje (transdukcija) signala

Stanice posjeduju izraženu sposobnost reagiranja na specifične signalne molekule iz svojeg okoliša. Poruka signalne molekule prevodi se u specifične promjene metabolizma ili genskog izražaja (ekspresije) aktivacijom kompleksnih mreža koje nazivamo putovima provođenja signala, odnosno transdukcijom signala. Tri primjera molekulskih signala koji izazivaju fiziološke stanične odgovore su adrenalin, inzulin i epidermalni čimbenik rasta.

2.1.1. Putevi provođenja signala

Sastoje se od sljedećih koraka:

1. Otpuštanje prvog glasnika

Podražaj poput ozljede ili probavljenog obroka okida otpuštanje signalne molekule – prvi glasnik

2. Prihvat prvog glasnika

Signalne molekule ne ulaze u stanicu.

Signal iz okoliša primaju specifični proteini, površinski specifični stanični receptori. Receptori premošćuju staničnu membranu te posjeduju unutarstanične i izvanstanične dijelove. Vezno mjesto na izvnastaničnom dijelu specifično prepoznaje signalne molekule, agoniste. Međudjelovanje signalne molekule s receptorom mijenja tercijarnu ili kvaternu strukturu receptorskih proteina, uključujući i njegove unutarstanične dijelove.

3. Unutarstanični prijenos poruke drugim glasnicima

Drugi su glasnici unutarstanične molekule čija koncentracija ovisi o okolišnim signalima. Te promjene koncentracije čine sljedeći stupanj u molekulskom informacijskom krugu. Neki od posebno važnih drugih glasnika, često nazivanih i sekundarnim glasnicima, su ciklički AMP, ciklički GMP, kalcijevi ioni, inozitol -1,4,5-trifosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG).

Uporaba drugih glasnika omogućuje višestruko pojačanje signala. Izravnim vezanjem primarnih signalnih molekula moguće je potaknuti samo manji broj receptorskih proteina, no svaka aktivirana receptorska molekula može dovesti do nastanka mnogih molekula sekundarnog glasnika. Na taj način niska koncentracija signalne molekule u okolišu, čak i jedna jedina molekula, može izazvati snažni unutarstanični signal i posljedični odgovor.

4. Aktivacija izvršitelja koji izravno mijenjaju stanični odgovor

Konačni učinak jest poticanje (ili potiskivanje) crpki, enzima i/ili čimbenika prepisivanja gena (transkripcijskih faktora) koji izravno nadziru metaboličke putove, aktivaciju gena i procese poput prijenosa živčanih podražaja.

5. Završetak signala

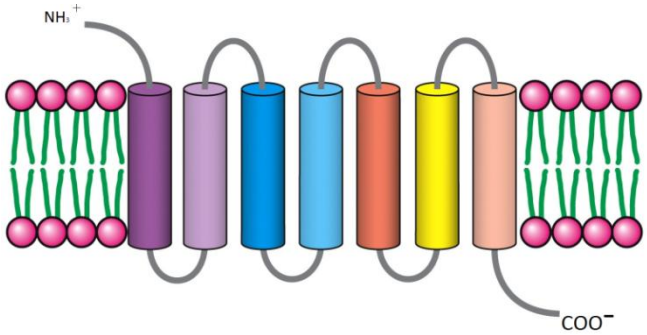
Nakon svršetka staničnog odgovora signalni se proces mora prekinuti kako bi stanica mogla odgovoriti na novi signal. Osim toga, signalni proces koji nije završen kako treba može u stanici izazvati ozbiljne posljedice. [5]

2.2. G-proteini vezani za receptore (GPCR) i njihova signalizacija

2.2.1. Struktura 7TM receptora

GPCR čine razred receptora sa sedam transmembranskih uzvojnica (7TM receptori) .

Kao što im samo ime govori, riječ je o receptorima koji se sastoje od sedam uzvojnica koje prolaze kroz dvosloj stanične membrane te prevode izvanstanični signal u unutrastanični odgovor. Prvi član porodice 7TM receptora kojem je utvrđena prostorna građa, bio je rodopsin koji ima ključnu ulogu o osjetu vida. Mnogi 7TM receptori sliče rodopsinu, dok neki posjeduju dulje izvanstanične domene.



Slika 1. Prostorna građa 7 TM receptora [6]

2.2.2. Aktivacija heterotrimernog G-proteina

G-protein koji je u interakciji sa receptorom je heterotrimerni protein koji se sastoji od α,β i γ podjedinica. Podjedinice α i γ obično su usidrene u membrani putem kovalentno vezanih masnih kiselina. Podjedinica α član je porodice NTP-aza s P-petljom, a P-petlja sudjeluje u vezanju nukleotida, dakle ta podjedinica veže gvanilne nukleotide.

Gvanilni nukleotid koji je vezan kada je protein u aktivnom stanju je GTP, dok je GDP specifičan za neaktivno stanje. U odsutnosti izvnastaničnog signala heterotrimerni protein je asociran i u neaktivnom je stanju, dakle vezan je GDP. Vezanjem signalne molekule na izvanstanični dio receptora dolazi do konformacijskih promjena, o čemu ćemo detaljno govoriti kasnije, koje aktiviraju G-protein.

Aktivacija G-proteina uključuje zamjenu vezanog GDP sa GTP-om, te disocijaciju kompleksa na GTP vezan za α podjedinicu i βγ dimer. Disocijacija G-proteinskog heterotrimera prenosi poruku o vezanju signalne molekule na receptor. Jedan kompleks hormon-receptor može potaknuti zamjenu nukleotida velikog broja G-proteinskih heterotrimera. Na taj način , za svaku molekulu vezanog agonista, dolazi do zamjene GDP u GTP kod stotina molekula G_α , čime se odgovor mnogostruko pojačava. Aktivirani G-proteini dalje prenose signal aktiviranjem unutarstaničnih molekula, sekundarnih glasnika. Upravo zbog signalizacije putem G-proteina 7TM receptori se nazivaju i receptorima povezanim s G-proteinima.

Stanice su razvile dva mehanizma, signalizacija ovisna o G-proteinu i signalizacija neovisna o G-proteinu. [5]

2.2.3. Signalizacija ovisna o G-proteinu

Postoje četiri vrlo dobro proučena signalna puta posredovana različitim oblikom G-proteina korištenog u unutarstaničnoj signalizaciji. Tipovi G_α podjedinice o kojima ovise signalni putevi su:

a)$G_{\alpha s}$, aktivira adenilat ciklazu, time potiče sintezu cAMP i aktivaciju daljnjih efektora tog signalnog puta

b) $G_{\alpha i/0}$, inhibira adenilat ciklazu i time sintezu cAMP

c) $G_{\alpha q/11}$, aktivira fosfolipazu C koja katalizira cijepanje PIP_2 (fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat) na sekundarne glasnike DAG(diacilglicerol) i IP_3(inozitol-1,4,5-trifosfat)

d) $G_{\alpha 12/13}$ aktiviraju Ro gvanin faktore izmjene

e) $G_{\alpha\ transducin}$, aktivira cGMP fosfodiesterazu

Receptori mogu aktivirati više različitih podtipova proteina G. Ligand koji je selektivno vezan na receptor aktivirati će jedan podtip G_α proteina što nazivamo funkcionalna selektivnost. Ukoliko agonist ima sposobnost aktivacije više podtipova, aktivirat će više različitih G-proteina. Također, konformacija koja prvenstveno aktivira jednu G_α izoformu može aktivirati neku drugu izoformu, ako je preferirani protein manje dostupan.

Aktivacijom različitog podtipa G_α podjedinice nekoliko je osnovnih načina prijenosa signala posredovana receptorima sa vezanim G-proteinom, od kojih su najbolje proučeni cAMP i fosfatidilinozitolni signalni put.

2.2.4. cAMP signalni put

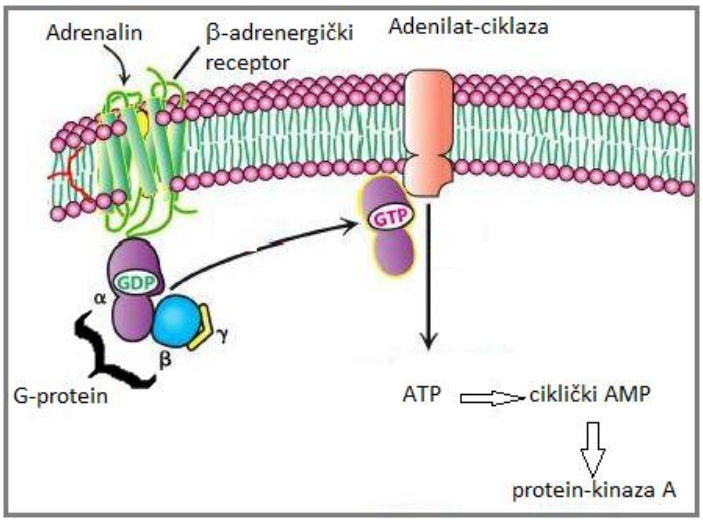
β-adrenergički receptor (β-AR), 7TM receptor, veže hormon adrenalin kao signalnu molekulu i time započinje (adrenalinsku) signalizaciju. Uloga receptora na koji je vezan hormon jest kataliza zamjene molekule vezanog GDP, u neaktivnom G-proteinskom kompleksu, s molekulom GTP, odnosno aktivacija G-proteina. Protein G disocira na podjedinice G_α i $G_{\beta\gamma}$. U GTP obliku površina G_α-proteina koja je bila vezana za βγ dimer mijenja svoj oblik tako da više nema veliki afinitet za βγ dimer. Ta je površina sada spremna za vezanje drugih proteina. U sklopu puta β-AR taj je protein adenilat-ciklaza, enzim koji prevodi ATP u cAMP.

Adenilat ciklaza je membranski protein koji se sastoji od 12 transmembranskih uzvojnica; dvije velike citoplazmatske domene čine katalitički dio enzima. Podtip proteina G_α koji je u interakciji s adenilat-ciklazom je podjedinica $G_{\alpha s}$. Ona, G_α, preferira katalitički aktivniju konformaciju enzima, potičući tako sintezu cAMP. Konačni rezultat vezanja adrenalina za receptor na površini stanice jest porast proizvodnje cAMP u unutrašnjosti aktivirane stanice. Sinteza cAMP posredovana adenilat-ciklazom sljedeća je razina pojačanja signala, jer svaka aktivirana molekula adenilat-ciklaze može prevesti mnogo molekula ATP u cAMP.

Povišena koncentracija cAMP može utjecati na mnoštvo staničnih procesa. Te učinke cikličkog AMP posreduje ključni enzim protein-kinaza A (PKA). Kinaze su enzimi koji kataliziraju fosforilaciju proteina.

PKA se sastoji od dvaju regulacijskih (R) i dvaju katalitičkih (C) lanaca. U odsutnosti cAMP, kompleks R_2C_2 katalitički je inaktivan. Vezanje cAMP za regulacijske lance (podjedinice) dovodi do otpuštanja katalitičkih podjedinica, koje posjeduju katalitičku aktivnost. Aktivirana PKA potom fosforilira specifične serinske i treoninske ostatke različitih ciljnih enzima u metaboličkom putu te na taj način provodi fiziološki stanični odgovor.

Također, PKA potiče ekspresiju specifičnih gena fosforilacijom transkripcijskog aktivatora koji se naziva veznim proteinom elementa koji odgovara na cAMP. Ta aktivnost PKA pokazuje da put provođenja signala može doprijeti do jezgre i promijeniti ekspresiju gena. [5]



Slika 2. Aktivacija protein-kinaze A putem G-proteina [7]

2.2.5. *Fosfatidilinozitolni signalni put*

Kao primjer fosfoinozitidne kaskade opisan je signalni put potaknut receptorom za hormon uključen u nadzor krvnog tlaka, angiotenzina II. Dok β-AR aktivira G-protein G_{α}, receptor za angiotenzin II aktivira G-protein $G_{\alpha q}$. Aktivirani oblik G-proteina se veže na β-izoformu enzima fosofolipaze C čime je ujedno aktivira. Fosfolipaza cijepa membranski lipid fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat na dva sekundarna glasnika: diacilglicerol (DAG) koji se zadržava u membrani i inozitol-1,4,5-trifosfat (IP_3) koji difuzijom napušta membranu.

IP_3 potiče brzo otpuštanje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma koji služi kao skladište unutarstaničnog Ca^{2+} koje se puni posredovanjem kalcijeve ATP-aze (Ca^{2+}). Nakon vezanja IP_3 na specifične kalcijeve kanalne proteine na membrani endoplazmatske mrežice, ti se IP_3 receptori-kanali otvaraju omogućujući obilni izlazak Ca^{2+} iona u staničnu citplazmu. Ca $^{2+}$ion je sam po sebi signalna molekula: posjeduje sposobnost vezanja na proteine, kao što je kalmodulin, kao i sposobnost aktiviranja enzima, kao što je protein kinaza C. Na taj način povišena razina Ca^{2+} potiče fiziološke procese.

DAG vezan uz plazmatsku membranu aktivira protein-kinazu C, koja fosforilira serinske i treoninske ostatke na mnogim cijlnim proteinima. Specijalizirane domene te kinaze koje vežu DAG zahtijevaju vezani Ca^{2+} prije vezanja DAG-a.

IP_3 i DAG djeluju u suradnji: IP_3 povisuje koncentraciju Ca^{2+}, a Ca^{2+} olakšava aktivaciju protein kinaze C. [5]

2.2.6. $G_{\alpha\ transducin}$

Transducin (G_t) je protein prirodno eksprimiran u štapićima i čunjićima mrežnice kralježnjaka. Aktiviraju ga konformacijske promjene u rodopsinu uzrokovane svjetlosnim podražajima. Aktivirani transducin na kojem je vezan GTP disocira na podjedinice α i βγ. Podjedinica α dalje aktivira cGMP fosfodiesterazu.

Signalizacija putem G-proteina aktivirana niskim koncentracijama kalcijevih iona u stanici uključuje gvanilat ciklazu kao enzim koji prevodi GMP u cGMP, kojeg smo spomenuli kao sekundarnog glasnika. Gvanilat ciklazu aktivira vezanje NO. Nastanak cGMP otvara kanale za ulazak Ca^{2+} iona u stanicu. Bitnu ulogu u regulaciji ima cGMP fosfodiesteraza, koja hidrolizira fosfodiestersku vezu i prevodi cGMP natrag u GMP. Smanjenje koncentracije cGMP dovodi do zatvaranja kanala za katione kalcija.

2.3. Regulacija GPCR

2.3.1. *β-arestini*

Kod sisavaca su eksprimirana 4 tipa arestina: 2 optička arestina (u štapićima i čunjićima), β-arestin1 i β-arestin2. Optički arestin je originalno otkriven kao protein potreban za inhibiciju signalizacije rodopsinom. Na temelju toga da mogu inihibirati aktivaciju G-proteina β_2-adrenergičkih receptora dovelo je do otkrića β-arestina 1 i 2. Te molekule su odgovorne za inaktivaciju velikog broja GPCR receptora.

β-arestini, osim u inaktivaciji, također igraju ulogu koja prije nije bila primjećena i smatrala se nebitnom, a radi se u ulozi adaptera koji sudjeluju u endocitozi te kao scaffold proteini (proteini nosači) koji aktiviraju još nekoliko signalnih putova GPCR receptora. Kao i u ulozi β-arestina u inaktivaciji GPCR signalizacije i ove navedene funkcije uključuju interakciju β-arestina sa fosforiliranim kompleksom ligand-receptor. β-arestini reagiraju s najmanje dvije osnovne klase signalnih proteina. U ulozi adaptera reagiraju s klasom proteina kao što su klatrin, AP-2 i NSF, dok u ulozi scaffold proteina stupaju u interakciju sa molekulama kinaza kao što su Src, Raf, Erk, ASK1 i JNK3.

2.3.2. β-arestini kao inhibitori G-proteina

Niz eksperimenata *in vitro* koji uključuju kompleks β_2AR i gašenje aktivnosti efektora adenilat-ciklaze doveli su do zaključka da su za inaktivaciju 7TM receptora potrebna minimalno dva koraka, naime, fosforilacija serinskih i treoninskih ostataka na kompleksu ligand-receptor, koju provodi na G-protein vezana receptorska kinaza (GRK), omogućava da se na fosforilirane receptore β_2AR velikim afinitetom vežu neoptički arestini. GRK obitelj se sastoji od 7 homologa, od kojih GRK2-6 reguliraju različite članove velike obitelji 7TM receptora a isto tako i druge stanične površinke receptore. β-arestini i GRK služe kao univerzalni regulatori 7TM receptora.

Aktivacija 7TM receptora uključuje stvaranje kompleksa ligand-receptor koji postaje supstrat GRK. Kao posljedica toga fosforilirani receptori regrutiraju citosolne adaptore β-arestine 1 i 2. Vezanjem β-arestina inhibira se daljnja aktivacija G-proteina. β-arestin sterički ometa vezanje G-proteina s receptorom te time uzrokuje gašenje signala.[3]

2.3.3. Regulacija cAMP signalnog puta

Podjedinice G_α posjeduju inherentnu GTP-aznu aktivnost koja služi za hidrolizu vezanog GTP u GDP i P_i. Vezani GTP djeluje poput unutarnjeg sata koji nakon određenog vremena spontano inaktivira podjedinicu G_α. Nakon hidrolize GTP i otpuštanja P_i, G_α koja sada veže GDP ponovno se spoji s $G_{\beta\gamma}$ u neaktivni oblik heterotrimernog proteina.

Aktivirani receptor treba se inaktivirati kako bi se spriječio trajni poticaj G-proteina. Proces inaktivacije receptora uključuje dva procesa. Prvo, hormon se odvoji od receptora. Drugo, kompleks hormon-receptor inaktivira se fosforilacijom serinskih i treoninskih ostataka na karboksilnom kraju receptora, tu funkciju obavlja G-protein receptorska kinaza 2 (GRK2). Ona fosforilira samo kompleks hormon-receptor, ali ne i receptor na kojem nije vezan ligand. Konačno molekula β-arestina veže se na fosforilirani receptor dodatno smanjujući njegovu sposobnost aktivacije G-proteina . [5]

2.3.4. β-arestini su neophodni za endocitozu 7TM receptora

Endocitoza (internalizacija) je proces kojim se u stanice unose makromolekule, u ovom slučaju receptor-ligand kompleksi. U procesu endocitoze receptora formiraju se vezikule koje sadrže kompleks ligand-receptor kako bi se i ligand uspješno unio u stanicu. Nekoliko endocitoznih mehanizama, uključujući klatrin posredovanu i kaveola posredovanu endocitozu, imaju ulogu u

endocitozi receptora. Dva su otkrića dovela do hipoteze da, osim već prethodno opisane uloge u terminaciji G-proteina, β-arestini imaju funkciju endocitoznih adaptorskih proteina .

Prvo je primjećeno da brza regrutacija (vezanje) β-arestina na fosforilirane β_2-AR je neophodna, da ligandom aktivirani receptori, započnu internalizaciju formiranjem unutarstaničnih vezikula. Mutanti β_2-AR, koji su nepotpuni agonisti (slabi supstrati) u fosforilaciji posredovanoj sa GRK, ne mogu regrutirati β-arestine niti započeti internalizaciju receptor-ligand kompleksa. Dodatno, mutanti β–arestina djeluju kao dominantni inhibitori internalizacije receptorskih kompleksa. Ti podatci ukazuju da β-arestini, uz to što se mogu vezati na receptore, mogu djelovati i kao adaptori proteina u endocitozi receptora.

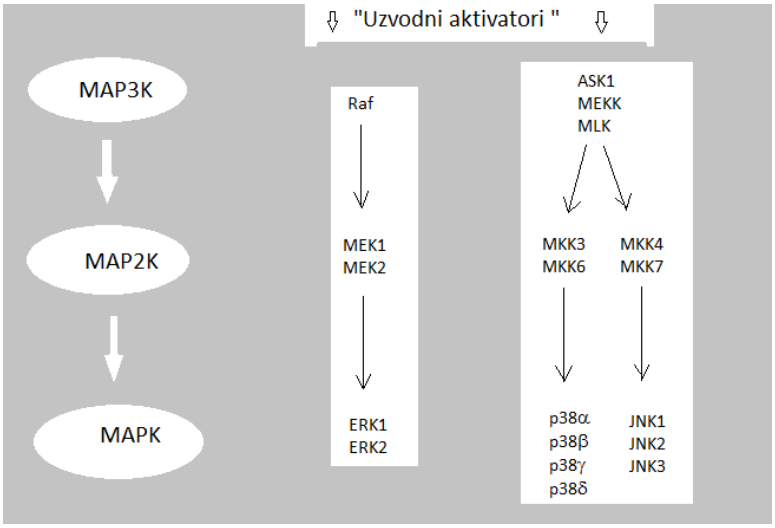
Drugo, također je primjećeno da β-arestini reagiraju direktno s klatrinom pri stvaranju proteinskog kompleksa (motiva) potrebnog za internalizaciju (endocitozu) aktiviranih GPCR-a. To da vizualni arestini ne reagiraju s klatrinom i himerima β-arestina te da vizualni arestini koji ne posjeduju klatrin veznu domenu ne mogu započeti internalizaciju, ukazuje kako je interakcija β-arestina s klatrinom važna za proces endocitoze. Klatrin je strukturni protein koji oblaže vezikule u dijelu membrane, koja se naziva klatrinom obložena jama.

β-arestini također reagiraju i s drugim proteinima koji su uključeni u internalizaciju posredovanu klatrinom. Adapter protein 2 (AP-2) je vezan s klatrinom i neophodan je za formiranje klatrinom obloženih jama. AP-2 reagira s nekoliko tirozin kinaznih receptora (RTK) kako bi potaknuli regrutaciju klatrina i internalizaciju receptora unutar klatrin obloženih jama. β-arestini direktno reagiraju s AP-2. RTK indirektno reagiraju s klatrinom preko AP-2, GPCRs reagiraju preko β-arestina i sa klatrinom i s AP-2. Klatrin i AP-2 su samo dva od mnogih proteina uključenih u endocitozu posredovanu klatrinom. NSF (N-etil-maleimid-senzitivni fuzijski protein) je ATP-aza čija je katalitička aktivnost esencijalna za unutrastanično prometovanje (trafficking) vezikula između membrana. Dodatna istraživanja ukazuju na to da β-arestini reagiraju s ATP-NSF, sugerirajući da hidroliza NSF-ATP može biti uključena u internalizaciju receptora. Nije razjašnjeno na koji način molekulske interakcije između β-arestina i klatrina, AP-2 i NSF specifično reguliraju stvaranje obloženih jama. Ono što je jasno je da su β-arestini posrednici u tom procesu. [3]

2.3.5. Uloga β-arestina kao proteina koji povezuju GPCR s fosforilacijskom kaskadom koju provode kinaze aktivirane mitogenom

Uloga β-arestina je da služe kao proteini nosači (scaffold proteins), proteini koji imaju ključnu ulogu u regulaciji mnogih signalnih putova. Scaffold proteinima nije definirana funkcija, poznati su po tome što su u reakciji i/ili vezani sa nekoliko članova signalnog puta. U ovoj ulozi β-arestini pokreću

nekoliko dodatnih GPCR signalnih kaskada. c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i izvnastanično regulirane kinaze (ERK) pripadaju velikoj obitelji poznatoj pod nazivom mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK). Slika 3. prikazuje ključne članove MAPK kaskade.



Slika 3. Shema koja prikazuje ključne članove MAPK kaskade

2.3.6. Regulacija JNK signalizacije

Aktivacija JNK signalnog puta je unutarstanični posredni odgovor na stres. Budući da aktivacijom signalnog puta dolazi do fosforilacije transkripcijskog faktora c-Jun, od tud im potječe i naziv. Danas je poznato da JNKs fosforiliraju mnoge proteine, uključujući i one koje su u citoplazmi. JNK obitelj sadrži gene koji kodiraju najmanje tri proteina (JNK1, JNK2 JNK3). JNK signalni put sadrži najmanje dvije dodatne uzvodne(prethodne) kinaze koje se aktiviraju prije aktivacije JNK. MAP3K kinaze (ASK1,MEKK i MLK) fosforiliraju MAP2K kinaze (MKK4 i MKK7), koji vode do fosforilacije MAPK (JNK1-3) (slika 3).

U stanici, β-arestin2 specifično reagira i sa JNK3 i sa ASK1 kako bi izazvao snažnu stimulaciju fosforilacije JNK3, koja se također može stimulirati aktivacijom GPCR receptora za angiotenzin tipa IA (ATIA). Prema tome, β-arestini su u mogućnosti da specifično reagiraju sa JNK3 što omogućava mnogo robusniju aktivaciju JNK3 te dodatno stavlja tu regulaciju pod kontrolu ATIA receptora. Interakcija između β-arestina i JNK3 za posljedicu ima lokalizaciju aktivne JNK3 u citoplazmi. Uloga β-arestina2 u aktivaciji JNK3 funkcijom podsjeća na funkciju nekoliko različitih proteina nosača, koja su opisana u zadnjih par godina.

Prvi takav scaffold protein je protein Ste5 iz kvasca. Ste5 potiče MAPK kaskadu vežući se na sve kinaze u toj kaskadi. Odgovarajući učinak tih kinaza vodi do aktivacije MAPK, Fus3, koji regulira feromonski odgovor. [3]

Studije su pokazale kako β-arestin2 može biti uključen kao scaffold protein u stimulaciji MAPK kao i JNK3. β-arestin2 se veže i na MAP3K(ASK1) i na MAPK(JNK3), stimulirajući signalni put bez direktnog vezanja na MAP2K(MKK4).

Iako MKK4 kinaza nije direktno povezana s kompleksom MAP2K preko β-arestina2, MKK4 svejedno reagira s kompleksom bilo preko ASK1 ili JNK3 kinaza. Moguće je da β-arestini2 simultano stupaju u interakciju s ASK1 i JNK3 kako bi omogućili MKK4 vezanje na kompleks, ili da β-arestini2 stabiliziraju neki drugi važan aspekt signalnog puta između te tri kinaze. Iako Ste5 i β-arestini nisu strukturno slični, dijele svojstvo koje nije pronađeno kod ostalih proteina nosača (scaffolda) MAPK. Njihovu staničnu distribuciju kontroliraju 7TM receptori. Stoga, funkcija β-arestina2 kao scaffold proteina ne samo da poboljšava signalizaciju putem JNK kaskade, nego i stavlja aktivaciju kao i staničnu distribuciju kaskade pod kontrolu GPCR-a. Važno je utvrditi koji se proteini fosforiliraju GPCR/β-arestinom-2, aktiviranog JNK3 signalnog puta, i kako te fosforilacije utječu na GPCR signalni put. [3]

2.3.7. Regulacija ERK signalizacije

Kao odgovor na stimulaciju stanice mitogenima dolazi do aktivacije velikog broja receptora, uključujući GPCR i RTK. Kao i kod JNK signalizacije i ovaj put uključuje nekoliko kinaza, koje djeluju u nizvodnoj kaskadi (downstream). Aktivacija ERK1 i ERK2 vodi do prijenosa aktivne kinaze u jezgru gdje aktivira ogroman broj transkripcijskih faktora koji sudjeluju u mitogenezi i proliferacji. Obitelj Src kinaza imaju veliku ulogu u aktivaciji ERK-kinaza, aktiviranih posredovanjem GPCR-a, a dominantni inhibitori Src kinaza su inhibitori ovog puta. β-arestini mogu povezati Src aktiviranjem β_2-AR. Izgleda da β-arestini reagiraju direktno sa Src kinazama putem protein-protein interakcija , uključujući i Src homolog 3 (SH3) domene kao i katalitičke domene Src kinaza. Src-kinaza koja je asocirana sa β-arestinom i aktiviranim β_2-AR ima defosforiliran tirozinski ostatak (Tyr530) zbog čega je katalitički aktivna. Povezivanjem aktivne Src kinaze s aktiviranim agonist-receptor kompleksom dovodi do fosforilacije Shc, te nastaje Shc-Grb2 kompleks i dolazi do aktivacije ERK. Interakcija Src kinaze s aktiviranim GPCR-agonist kompleksom je važna kako za ERK kaskadu posredovanu β_2-AR tako i za internalizaciju receptora, gdje se posredstvom Src fosforiliraju komponente koje imaju ključne uloge u endocitozi. [3]

Glavne značajke interakcije Src kinaze, posredovane β-arestinom, i GPCR-om nisu poznate, međutim nedavna izvješća predlažu da β-arestini mogu posredno povezivati Src kinaze i s drugim različitim GPCR receptorima, osim β_2-AR. Slično aktivaciji β_2-AR, supstanca P aktivacijom neurokinonskih receptora aktiviraju ERK kaskadu, procesom u kojem β-arestini dovode Src kinaze prema aktiviranim receptorima. Dodatno, β-arestinom posredovano povezivanje Hck kinaza (obitelj Src kinaza) sa IL8 receptorima (CXCR1) se čini neophodnima za IL8- posredovano oslobađanje granula iz neutrofila. Iako regrutacija Hck prema CXCR1 ne mora biti nužno uključena u aktivaciju ERK signalnog puta, paralele mogu biti povučene između ovog puta i internalizacije β_2-AR posredovane sa Src kinazama. Komponente koje se koriste u endocitozi su slične onima koje se koriste tijekom oslobađanja granula te je moguće da Src kinaze mogu biti uključene i u fosforilaciju ključnih komponenti koje su vezane uz regulacije oba signalna puta.[3]

Zanimljivo je to da Src kinaza nije jedina komponenta ERK signalnog puta koja se regrutira s aktiviranim GPCR posredstvom β-arestina. Ostale kinaze ERK kaskade, uključujući Raf (MAPK3) i ERK (MAPK) kinaze, također reagiraju s β-arestinima. Lokalizacija tih kinaza, komponenti MAPK kaskade, se uspostavila kao jako bitna za optimalnu transmisiju signala te je ustanovljeno kako β-arestini reguliraju subcelularnu lokalizaciju Raf i ERK kinaza na analogni način kako je opisano za aktivaciju JNK kaskade. [3]

2.4. Kristalna struktura

Razvojem metoda stabilizacije i kristalizacije GPCR-a, otkriveno je postojanje različitih struktura aktivnih te neaktivnih receptora. Postojanje tih kristalnih struktura omogućilo je lakše razumijevanje kako se i na koji način vežu agonisti i kako se aktiviraju GPCR receptori.

2.4.1. Raznolikost konformacijskih stanja kao odgovor na vezanje liganda

Prema velikom broju podataka pretpostavljen je model prema kojem GPCR receptori mogu poprimiti velik broj različitih konformacijskih stanja ovisno o signalu, odnosno ligandu (agonistu) koji se veže. Primjerice, pokazano je da funkcionalno različiti ligandi aktiviraju različite konformacije vezanjem na α-AR (adrenergicni receptor), δ-opioidni receptor ili β_2AR. U novije vrijeme koristeći originalnu BRET (bioluminiscence resonance energy transfer) tehnologiju koja ima senzore za aktivirane G-proteine,

dobiveni su dokazi koji sugeriraju kako različiti ligandi mogu stabilizirati različite konformacije AT1A (angiotensin II tipa 1A) receptora, koje odgovaraju različitim signalnim putevima.

β_2AR se intenzivno koriste za eksperimentalnu demonstraciju kako bi se pokazalo da ligandi sa različitim farmakološkim svojstvima mogu mijenjati konformacijsko stanje receptora iz jednog u drugo. Niz pokusa sa fluorescentno obilježenim β_2AR su prvi dokazali da konformacija inducirana potpunim agonistom može biti različita od one inducirane djelomičnim agonistom. Sve češće se upotrebljava masena spektroskopija kako bi se pokazala značajna varijabilnost u konformaciji receptora ovisno o ligandu. Sukladno tome, NMR je korišten da bi se pokazalo kako različiti ligandi uzrokuju selektivne efekte na strukturnu dinamiku β_2Ar. Uz β_2AR i ostali GPCR receptori su se proučavali te se također i kod drugih receptora dokazala raznolikost konformacijskih stanja. [4]

Djelovanjem agonista različite učinkovitosti (potpuni,djelomični i inverzni) stabiliziraju se različite konformacije što je istraženo na primjeru serotoninskog receptora 5-HT (5-hidroksitriptamin) pomoću CD spektroskopske metode i intrizične fluorescencije.

U svrhu proučavanja kako i na koji način vezanje liganda utječe na promjenu konformacije receptora koristi se receptor za grelin , GHS-R1a (receptor za čimbenik lučenja hormona rasta). GHS1-R1a receptor monomeri ugrađeni su lipidne čestice koje su potom obilježene sa “bimane-om“. “Bimane“ je heterociklička kemijska tvar koja formira srž fluorescirajuće boje.

Kao što je prikazano na slici 4. vezanjem svih komponenti osim neutralnog agonista popraćeno je značajnom promjenom u “bimane“ emisiji, ukazujući na to da receptor mijenja konformaciju kao odgovor na vezanje različitog liganda. Važno je, da se konformacijska stanja mijenjaju, ovisno o tome veže li se potpuni, djelomični , neutralni ili ireverzibilni agonist .

2.4.2. Raznolikost konformacijskih stanja kao odgovor na vezanje receptora sa signalnim proteinom (G-proteinom)

Osim vezanjem agonista, različita konformacijska stanja se stabiliziraju i asociranjem aktiviranog receptora sa G- proteinom. Metoda obilježavanja cisteina fluorecentnom bojom je korištena kako bi se odredili G-proteini koji utječu na interakciju nekih aminokiselinskih ostataka lokaliziranih u TM6, TM7 i izvanstaničnoj petlji 2 κ-opoidnog receptora. Metoda je primijenjena kako bi se dokazalo da vezanje (interakcija) G-proteina s receptorom zaista ima efekt na strukturu receptora.

Na temelju spektroskopskih podataka provedenih za β_2AR i rodopsin, predloženo je da vezanje G-proteina na aktivno stanje receptora mijenja energiju stabilizacije ternarnog kompleksa, koji tada

postaje dominantnija konformacija. To je i dokazano prema kristalografskim strukturama β_2AR na koji je vezan agonist u prisustvu i u odsutnosti $G_{\alpha s}$. Uspoređujući te dvije kristalne strtukture pokazano je kako je energija vezanja G-proteina zaista neophodna za stabilizaciju aktivne konformacije liganda i receptora.

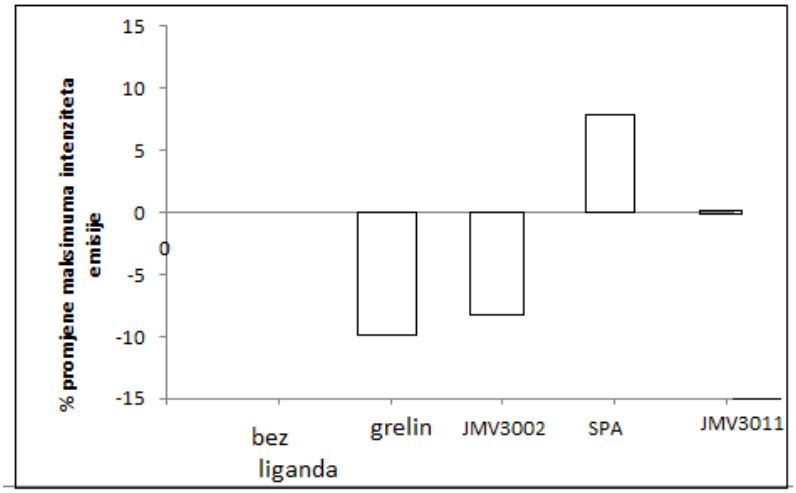
Također su analizirani efekti vezanja signalnih proteina (G-proteina i arestina) na konformaciju grelinskih receptora ponovno koristeći "bimane" fluorescirajuće sonde. Vezanjem G_q dolazi do značajne promjene u "bimane" emisiji u usporedbi s onom promatranom u odsutnosti G-proteina (slika 4.). Analiza vremenskog tijeka "bimane" fluorecencije sugerira kako vezanje G-proteina ne stabilizira dodatnu konformaciju nego radije povećava stabilnost konformacije ligandom aktiviranog receptora. [4]

To se može poistovjetiti modelu energijskih nivoa kojeg su predložili Deupi i Kobilka.[4]

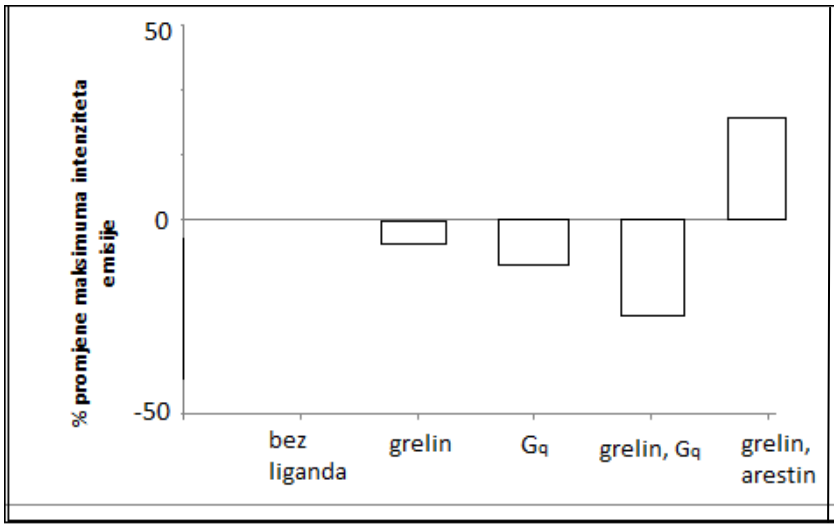
Prema tom modelu, vezanje agonista na receptor izaziva, odnosno povećava dinamiku receptora što bi preferiralo konformacijsko stanje niže energije. Vezanje G-proteina potom smanjuje dinamiku kompleksa receptor-agonist te na taj način stabilizira aktivnu konformaciju ligand-receptor-protein-G kompleksa. Takva aktivna konformacija kompleksa onda postaje dominantnija, što je eksperimentalno dokazano za grelinski receptor. [4]

Analizirani su i utjecaji drugih velikih signalnih proteina, arestina-2, na konformacijski krajolik grelinskog receptora. Kao i u slučaju sa G-proteinom, dodatak arestina u prisutsvu komponente koja potiče regrutaciju arestina također utječe na intenzitet "bimane" emisije (slika 4.).

Za razliku od vezanja receptora s G-proteinom, negativna promjena intenziteta "bimane" emisije je primjećena samo u prisutstvu agonista. To vodi do spoznaje da vezanje arestina na aktivirani receptor inducira konformaciju receptora koja je različita od one u prisutstvu samo grelina ili u prisutstvu grelina i G_q. Arestin i G-protein stoga različito utječu na konformaciju grelinskog receptora. Vezanje G-proteina na agonistom aktivirani receptoir će stabilizirati jednu konformaciju, dok će vezanje arestina na agonist-receptor kompleks preferirati konformaciju različitu od one u prisutstvu G-proteina. Ta činjenica može se povezati sa razlikama u njihovim signalizacijskim putevima. [4]



a)



b)

Slika 4. Promjene u konformaciji grelinskog receptora kao odgovor na vezanje liganda i signalnog proteina; a) Postotak promjene u intenzitetu „bimane“ induciran funkcionalno različitim ligandima: potpuni agonist (grelin),djelomični (biased) agonist G_q (JMV3002), inverzni agonist (SPA) ili neutralni agonist (JMV3011); b) Postotak promjene u intenzitetu emisije „bimane“ induciran G_q ili arestinom u prisutnosti potpunog agonista grelina [4]

2.5. Popis kratica

AP-2	adaptor-protein 2
ATIA	angiotenzin tipa IA
β2-AR	β2-adrenergični receptor
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat
DAG	diacilglicerol
ERK	izvanstanično regulirana kinaza
GPCR	receptor na koji je vezan G-protein
GRK	GPCR kinaza
GHS-R1a ¸	receptor za hormon rasta
5HT	5-hidroksitriptamin
IP_2	fosfatidilinzitol-4,5-bisfosfat
IP_3	inozitol-1,4,5-trifosfat
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
MAP2K	MAPK kinaza
MAP3K	MAP2K kinaza
NSF	N-etil-maleimid-senzitivni fuzijski protein
PKA	protein-kinaza A
RTK	tirozin receptorska kinaza
Src	Src kinaza (kinaza je prvo detektirana u sarkomima)
Ste5	protein nosač (scaffold) u kvascu
7TM	transmembranski receptori sa 7 uzvojnica

§ 3. Literaturna vrela

[1] B. Silversten , N. Holliday, A. N. Madsen i B.B. Holst, *Functionallybiased signaling properties of 7TM receptors – opportunities for drug development for the ghrelin receptor,* British J. pharmacol. **170** (2013) 1349-1362

[2] D. S. Kang, X.Tian I J. L. Benovic, *role of β-arrestins and arrestin domain-containing proteins* in *G-protein-coupled receptor trafficking*, Curr. Opin. Cell Biol. **0**(2014) 63-71

[3] W. E. Miller I R. J. Lefkowitz, *Expanding roles for β-arrestinsas scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking,* Curr. Opin. Cell Biol. **13** (2001) 139- 145

[4] S. Mary, J. A. Fehrentz, M. Damian, P. Verdie, J. Martinez, J. Marie J.L. Baneres, *How ligands and signaling proteins affect G-protein-coupled receptors conformational landscape,* Biochem. Soc. Trans. **41** (2013) 144-147

[5] J. M. Berg, J-L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 381-390

[6] http://oregonstate.edu/instruct/bb450/450material/stryer7/14/figure_14_04.jpg (preuzeto 03.08.2016.)

[7] http://oregonstate.edu/instruct/bb450/fall14/stryer6/ch14/figure14-05.jpg (preuzeto 03.08.2016)