

## RECEPTORII FARMACOLOGICI

## II. Proteinele G și semnalizarea transmembranară

M.E. Hinescu\*, V.A. Voicu\*\*

1. Schema generală a proceselor de recunoaștere moleculară
2. Din nou despre terminologie sau despre mesagerii chimici
3. Cum ajung liganzii la nivelul receptorilor
4. Proteinele G în semnalizarea transmembranară
  - 4.1. Superfamilia proteinelor G
  - 4.2. Cooperarea receptor - proteine G - efector
  - 4.3. Atenuarea sau terminarea semnalului: mecanisme generice
  - 4.4. Proteinele G: De la desensibilizarea la hipersensibilitatea receptorilor
  - 4.5. Participare la mecanismele toleranței farmacologice?
  - 4.6. Proteinele G în patologice
5. Bibliografie

## REZUMAT

Al doilea episod al seriei dedicate conceptului de receptor în biologie și în farmacologie inaugurează trecerea în revistă a mecanismelor prin care operează semnalizarea transmembranară. După câteva aspecte generale ale comunicării și recunoașterii moleculare, sunt prezentate datele disponibile până în prezent, referitoare la cooperarea dintre cea mai numeroasă categorie de receptori și proteinele G heterotrimerice. Ori de câte ori este posibil, aspecte particulare ale semnalizării transmembranare sunt prezentate schematic, cu intenția de a oferi un tablou cât mai simplificat al unei literaturi abundente, cu numeroase detalii și nu întotdeauna ușor de citit.

**Cuvinte cheie:** receptori, căi de semnalizare transmembranară, proteine G heterotrimerice

## ABSTRACT

## Pharmacological Receptors.

## II. G Proteins and Cell Signaling

The second paper in this series about cell receptors in biology and pharmacology is dedicated to the mechanisms regarding cell signaling through G protein-coupled receptors. There are presented available data concerning the biochemistry and molecular biology of mechanisms through which cell interpret and translate a huge variety of signals for a limited number of cell signaling pathways. When possible, mechanisms are schematically depicted in order to offer an as simple as possible picture of a (often) not easy affordable (to read) literature.

**Key words:** receptors, cell signaling, heterotrimeric G proteins

## 1. Schema generală a proceselor de recunoaștere moleculară

Comunicarea între celule poate fi abordată în cele mai variate moduri. Se pot încerca generalizări ale celor mai diferite aspecte.

De altfel, de unul sau altul dintre aspectele comunicării în general se ocupă specialiști din numeroase domenii: semiotică, teoria informației, multimedia, design molecular asistat de computer, biologie moleculară sau biochimie, pentru a da doar câteva exemple.

Este interesant de observat că, în timp ce unele generalizări asupra comunicării, examinate în alte teritorii ale cunoașterii decât științele medicale, se pot aplica perfect acestui domeniu, altele nu au un corespondent.

Astfel, dacă funcția referențială a comunicării este aplicabilă tuturor domeniilor ce operează cu acest concept, alte funcții, cum ar fi, spre exemplu, funcțiile cognitive sau metalingvistică nu se aplică decât anumitor domenii (38).

Ca demers intelectual însă, nu ar trebui eliminată, din start, posibilitatea de a analiza tipuri particulare ale comunicării (cum ar fi comunicarea dintre celule), chiar și din aceste puncte de vedere. Deși această afirmație poate părea (cel) puțin curioasă, trebuie să ne reamintim că, în urmă cu câțiva ani, abordări de genul examinării *comportamentului celulelor din perspectiva contextului lor "social"*, erau neobișnuite, iar, între timp, au devenit lucruri comune (31), după cum, *sinuciderea celulelor* este în prezent intens "mediatizată".

Ceea ce încearcă în prezent lumea medicală să facă în

\*Dr. M.E. Hinescu, - Catedra de Histologie și Biologie celulară, U.M.F. "Carol Davila" - Centrul de cercetări științifice medico-militare

\*\*Prof. Dr. Victor A. Voicu, șeful Catedrei de Toxicologie Clinică, U.M.F. "Carol Davila" - Centrul de cercetări științifice medico-militare

acest teritoriu, este încercarea de a-și apropia o formă de comunicare încă necunoscută. Mesajele de natură chimică, spre exemplu, sunt ele doar simboluri, litere ale unor cuvinte sau chiar cuvintele din compunerea unor fraze? Multitudinea de mesaje, de același tip, sau diferite, ar putea fi asemănată cu multitudinea de semne grafice dintr-o carte? Desigur, deocamdată este prematur să catalogăm aceste întrebări altfel decât ca simple speculații.

**Figura 1** schematizează elementele participante în cursul unui proces de comunicare. Codificarea informației are ca scop păstrarea specificității și eliminarea distorsiunilor generate de factori perturbatori, cum ar fi zgomotul de fond, spre exemplu. Cel mai adesea comunicarea are de nevoie însă de mai multe niveluri de codificare (38).

Este nevoia de codificare pe niveluri ierarhice (și) rezultatul proprietăților ce decurg din organizarea de o manieră ierarhică a materiei, de la nivel atomic, la nivel supramolecular sau polimolecular?

În **figura 2** sunt reprezentate schematic procesele în care participă procesul de recunoaștere moleculară. Informația transferată este prelucrată diferit, iar interacțiunile dintre liganzi și proteinele capabile de recunoaștere moleculară reprezintă instrumente adaptate unor funcții diferite. Astfel, legarea unui ligand este destinată unui scop predeterminat. Din această perspectivă receptorul (sau transportorul ori enzima) și substratul specific corespund **nivelului molecular de complexitate** al organizării. Nivelul imediat superior de complexitate este reprezentat de **nivelul supramolecular de organizare**. Acesta este gândit ca fiind corespunzător structurii complexe, cu durată de viață scurtă, de tipul receptor-ligand sau substrat-enzimă. Structurile ce elaborează răspunsul celular propriu-zis (în cazul receptorilor), sau structurile ce beneficiază de rezultatul activității celorlalte molecule implicate în recunoașterea moleculară (transportori sau enzime) reprezintă **nivelul polimolecular** al complexității (ansambluri moleculare organizate) (11).

## 2. Din nou despre terminologie sau despre mesagerii chimici

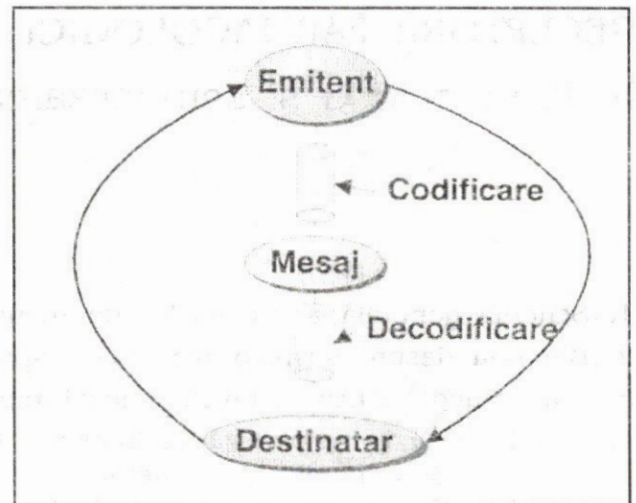
Literatura referitoare la receptori a impus o serie de termeni, cu care (se) operează foarte frecvent. Dar, ca în cazul conceptului de receptor, adeseori acești termeni sunt utilizați de o manieră intuitivă, astfel încât capătă conotații diferite, la autori diferiți. De aceea, pe parcursul acestei serii de referate generale, vom reveni, ori de câte ori vom considera că este util, asupra unor aspecte de terminologie.

Substanțele secretate de neuroni au fost denumite **neuromediatorii** și pot fi clasificate în trei categorii: neurotransmițători, neuromodulatori și neurohormoni. (6)

**Neurotransmițătorii** sunt molecule ce mediază transmisia sinaptică în sistemul nervos. Receptorii pentru neurotransmițători au fost clasificați în două categorii mari: receptori-canal ionice operate de ligand și receptori cuplați cu proteine G.

**Criteriile** ce trebuie îndeplinite de o substanță pentru a putea fi clasificată drept neurotransmițător sunt:

- sinteză la nivel neuronal;
- prezență în terminațiile presinaptice și eliberare în cantitate suficient de mare pentru a putea determina un răspuns la nivelul celulei post-sinaptice;



**Fig. 1 - Schema generală a comunicării**

— aplicarea exogenă (ca medicament) poate mima acțiunea transmițătorului endogen;

— asocierea cu un mecanism de îndepărtare de la locul acțiunii (sau inactivare) (36).

Transportorii pentru neurotransmițători sau sistemele de recaptare sunt proteine ce funcționează ca sisteme de transport și contribuie la limitarea duratei de viață a semnalului, prin legarea și internalizarea ligandului în terminația nervoasă presinaptică sau în celulele gliale.

Moleculele semnal cu care operează sistemul nervos au fost grupate în două mari categorii: transmițătorii cu greutate moleculară mică și, respectiv peptidele neuroactive (36)

Termenul de **amine biogene** este imprecis, dar a fost utilizat în literatură câteva decenii pentru a defini neurotransmițătorii derivați ai unor aminoacizi: tirozină (pentru dopamină, noradrenalină și adrenalină), triptofan (pentru serotonina) sau histidină (pentru histamina).

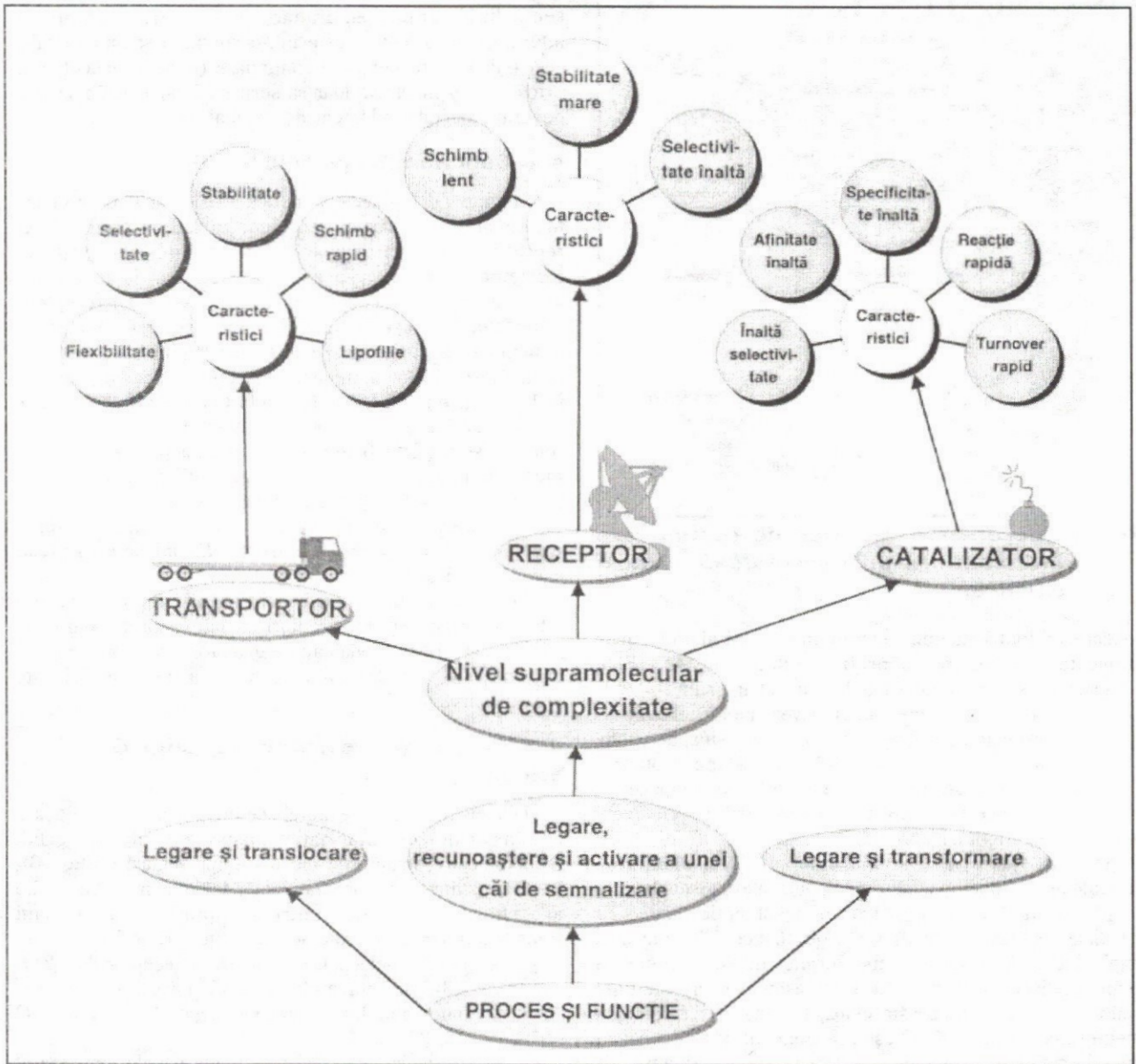
Studiile referitoare la biochimia transmisiei sinaptice au dus la formularea unei generalizări: "*un neuron matur face uz de același transmițător la nivelul tuturor sinapselor sale*". (Eccles, 1957) Ulterior, o dată cu descoperirea aspectelor legate de co-transmisia sinaptică această generalizare a fost reformulată: "*un neuron face uz de aceeași combinație de mesagerii chimici la nivelul tuturor sinapselor sale*" (36). Astfel, specializarea sau diferențierea, la nivel neuronal, ar avea printre elementele definitorii capacitatea celulelor de a opera cu un set bine definit de procese biochimice.

Aceste generalizări trebuie însă privite cu precauție, atâta timp cât nu a fost încă precizat conținutul în neuromediatorii al unui însemnat număr de lanțuri neuronale (6).

Termenul de **autocoizi** a intrat în uz pentru substanțele ce acționează asupra receptorilor de pe membrana celulelor care le-au sintetizat (autoreceptori). Un exemplu de astfel de compus este histamina.

Conceptul de **neuromodulatorii** (sau **neuroregulatorii**) acoperă reglarea activității celulelor neuronale prin alte mecanisme decât transmisia sinaptică, efectuată de neurotransmițătorii clasici.

Distincția între neurotransmițătorii și neuromodulatorii este deci de natură funcțională, pentru că, în general, neuromodulatorii nu acționează direct asupra



**Fig. 2. Reprezentarea schematică a proceselor în care este implicată recunoașterea moleculară. Acesta presupune nu doar legarea ci și selecția unei funcții specifice, altfel spus, recunoașterea moleculară presupune "legarea cu un scop" (11).**

membranelor celulare, ci prin intermediul unor reacții chimice.

**Hormonii** sunt mesageri de natură chimică, a căror principală caracteristică este aceea că acționează la distanță de celulele în care au fost sintetizați (ca urmare a difuziunii prin sânge, fluidele extracelulare, până la celulele țintă) (6). Elementele definitorii pentru acest tip de substanțe sunt: sinteza la distanță de țintă, difuziunea și durata acțiunii.

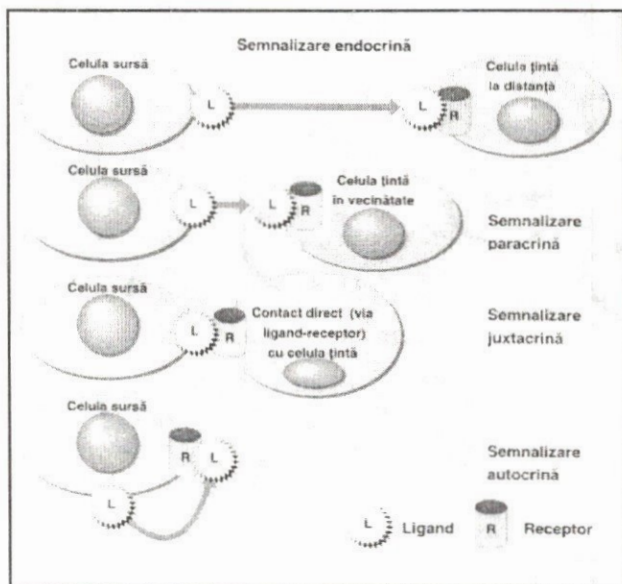
Pot aceste distincții de natură semantică să contribuie la înțelegerea organizării și funcționării sistemelor de comunicare dintre celule? Pornind de la aceste distincții, s-a formulat un model conceptual conform căruia ar exista două tipuri de **rețele informaționale**: una "executivă", cu răspuns prompt, și care operează via transmițători, și una "reglatoare", cu răspuns lent, ce operează cu o selectivitate anatomică mai restrânsă, și care reglează structurile primei rețele. (Chauvet, 1996).

### 3. Cum ajung liganzii la nivelul receptorilor

Înainte de a aborda unele detalii asupra modului în care operează cea mai numeroasă categorie de receptori vom prezenta pe scurt modalitățile și etapele parcurse în eliberarea moleculelor semnal.

Drumul pe care moleculele semnal îl parcurg până la țintă poate fi mai lung sau mai scurt, iar în raport cu această distanță semnalizarea intercelulară a fost divizată (13) în patru categorii generice: semnalizare endocrină, paracrină, autocrină și juxtacrină (fig.3).

La nivelul terminațiilor nervoase au fost studiate la scară moleculară etapele parcurse de veziculele sinaptice ce conțin neuro-transmițători. Aceste etape sunt simplificat prezentate în fig. 4. Fiecare din etapele identificate până în prezent presupune participarea unui număr mare de proteine



**Fig. 3. Mecanisme generice de comunicare intercelulară prin semnale de natură chimică.**

celulare. Sudhof a întocmit chiar un miniglosar al proteinelor implicate în eliberarea neurotransmițătorilor (41). El a clasificat aceste proteine sinaptice în patru grupuri:

- proteine din compunerea veziculelor sinaptice;
- proteine ce se asociază veziculelor sinaptice, într-o etapă sau alta a ciclului veziculelor sinaptice;
- proteine ale membranei plasmatică sinaptice;
- proteine ce se pot asocia reversibil cu proteinele membranei plasmatică (41).

În plus, merită a fi subliniat faptul că la eliberarea veziculelor sinaptice participă elemente ale citoscheletului. În prima etapă a ciclului, veziculele sinaptice ajung în imediata vecinătate a membranei plasmatică. Ele sunt însă împiedicate să se atașeze membranei de filamentele de actină corticale ce formează o rețea asemănătoare unui gel pentru a preveni, la această etapă, fuziunea veziculelor cu membrana plasmatică. Creșterea concentrației de calciu duce la activarea proteinelor ce separă (reindividualizează) filamentele de actină din starea de gel, cu trecere spre o stare de sol. Astfel se poate realiza fuziunea veziculelor cu membrana plasmatică (15).

Concomitent cu examinarea detaliilor organizării moleculare a versantului presinaptic, au fost făcute numeroase cercetări asupra arhitecturii compartimentului post-sinaptic (43).

#### 4. Proteinele G și semnalizarea transmembranară

Trecerea în revistă a căilor de semnalizare transmembranară reprezintă în prezent o încercare dificil de realizat. Dificultatea este dată, pe de o parte, de multitudinea tipurilor de comunicare, pe de altă parte, de diversitatea proprietăților semnalelor reunite sub emblema aceluiași tip de semnalizare. În plus, din cauza absenței criteriilor universal acceptate de clasificare a receptorilor celulari, cât și datorită rapidității cu care (grație tehnicilor de biologie moleculară) sunt relevate noi detalii ale

semnalizării transmembranare, tabloul transferului de informație către celule este într-o continuă schimbare. De aceea, datele prezentate în continuare (în acest articol și în următoarele) încearcă doar să surprindă aspectele cele mai generale ale diferitelor căi de semnalizare.

##### 4.1. Superfamilia proteinelor G

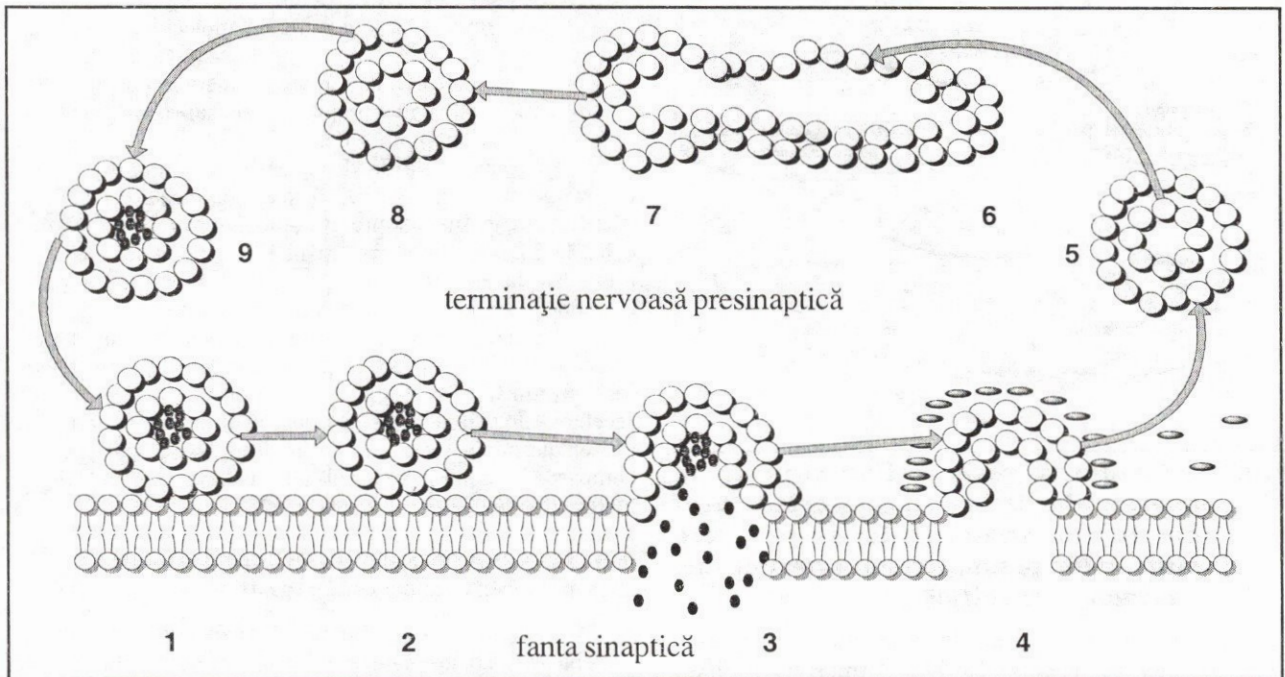
Studiile de inginerie genetică (mai exact, de clonare moleculară) au arătat că receptorii cuplați cu proteinele G reprezintă una dintre cele mai mari familii de proteine existente în natură. S-a estimat că există, la mamifere, aproximativ 1.000 de tipuri diferite de astfel de receptori. (42) Ritmul în care sunt descoperiți noi receptori cu 7 domenii transmembranare descoperiți este atât de alert încât Floyd E. Bloom, redactor șef al revistei Science, afirma în 1996: "Este un adevărat tur de forță organizarea unui site (pe rețeaua Internet), în care sunt menținute la zi informații referitoare la (virtual) toți receptorii cuplați cu proteine G, membrii fiecărei ramuri a superfamiliei de receptori, proprietățile lor fiziologice și mecanismele de semnalizare (4). (Adresa acestui site este: URL <http://receptor.mgh.harvard.edu/GCRDBHOME.html>, iar autorul său este Frank Kolakowski.) (4).

Pornind de la detaliile arhitecturii moleculare ale diferitelor categorii de receptori cuplați cu proteinele G, s-au încercat variate modalități de grupare a acestor receptori în subfamilii (2). Rezultatul unei astfel de încercări este prezentat în fig. 5.

##### 4.2. Cooperarea receptor - proteine G - efector

Dincolo de schema generală de organizare și funcționare a transferului de informație dinspre complexul ligand-receptor către structurile efectoare (prezentată în fig. 6), în ultimul timp au fost examinate, tot mai în detaliu, alte aspecte ale cooperării dintre receptorii cu 7 domenii transmembranare și proteinele G heterotrimerice:

- detalii moleculare ale activării receptorului (2, 7, 33), mecanismele ce declanșează schimbarea nucleotidului guanozinic legat de proteinele G (3, 27, 30, 40);
- mecanismele prin care unele canale ionice sunt modulate de proteinele G (10, 20, 22, 26);
- funcțiile subunităților  $\beta$  și  $\gamma$  (8, 14, 18);
- mecanismele prin care sunt îndepărtate moleculele liganzilor după activarea receptorilor (5, 17, 19);
- mecanismele de sensibilizare și desensibilizare a receptorilor (17, 29);
- modularea expresiei genelor ce codifică pentru acești receptori (9, 34);
- cooperarea dintre proteinele G și fosfolipaze (12);
- semnificația fiziologică a proteinelor regatoare ale semnalizării prin proteinele G, ("regulators of G-protein signaling", "RGS") ce constituie, la rândul lor, o familie numeroasă (au fost identificați până în prezent 16 membri ai acestei familii) (25);
- endocitoza mediată de receptor, degradarea receptorilor, mecanismele ce asigură echilibrul dintre sinteza și degradarea receptorilor (17);
- informațiile pe care le pot oferi instrumente de tipul oligonucleotidelor antisens (1), sau de tipul



**Fig. 4. Etapele ciclului veziculelor sinaptice, la nivelul unei terminații nervoase presinaptice.**  
**1. Veziculele sinaptice, umplute cu neurotransmițător stabilesc primul contact cu membrana celulară, în teritoriul activ, ce mărginește fanta sinaptică.**  
**2. Etapa a doua este caracterizată printr-un proces de maturare a veziculelor sinaptice, care devin apte de fuziune rapidă cu membrana celulară, ca urmare a unei oscilații rapide a concentrației ionilor de calciu.**  
**3. Procesul de fuziune/exocitoză necesită mai puțin de 0,3 ms însă numai unul dintre fiecare serie de 3 până la 10 potențiale de acțiune duce la exocitoză.**  
**4. Veziculele golite sunt rapid internalizate prin transport cu vezicule acoperite.**  
**5. Veziculele acoperite își pierd învelișul și sunt reciclate.**  
**6. Fuziunea cu endozomi.**  
**7. Veziculele sunt regenerate prin "înmugurire" din endozomi.**  
**8. Preluarea neurotransmițătorului prin transport activ, în virtutea unui gradient electrochimic, creat de o pompă protonică.**  
**9. Translocarea veziculelor pline cu neurotransmițător în teritoriul activ, fie prin difuziune, fie printr-un proces de transport la care participă elemente ale citoscheletului. (adaptare după ref. 23, 28, 32, 41)**

animalelor transgenice, în disecția farmacologică a transducției semnalului (24) ;

— patologia în care proteinele G sunt implicate (16, 21).

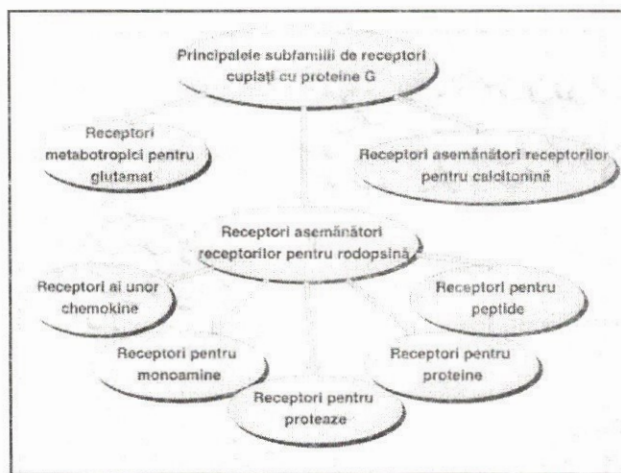
**Figura 7** prezintă schematic modificările arhitecturii moleculare a receptorului cuplat cu o proteină G în momentul activării.

Cel mai mare volum de informații referitoare la interacțiunea receptor-proteină G au fost obținute din experimentele efectuate cu rodopsină, moleculă cu rol de fotoreceptor. Modificările arhitecturii moleculare a receptorului sunt relativ restrânse, ele se referă la orientarea relativă a domeniilor transmembranare (TM): mișcarea către exterior a porțiunii TM 3 și a porțiunii TM 6, însoțită de o rotație orară de circa 30°. Similitudinile în organizarea moleculară a diferitelor categorii de receptori cuplați cu proteine G au condus la ideea că modificările conformaționale obiectivate în cercetările asupra rodopsinei ar putea fi similare cu cele produse la activarea altor receptori.

Legarea unui ligand cu acest tip generic de receptor duce la recunoașterea unui set limitat de proteine G. Familia proteinelor G este, la rândul său numeroasă. Mai multe laboratoare au încercat să indentifice care sunt domeniile responsabile pentru această selectivitate. Adeseori, aceste experimente au utilizat receptori hibridi (sau himerici), obținuți prin reunirea, în aceeași moleculă, a unor subunități aparținând unor receptori distincți sub aspect funcțional. S-a stabilit, astfel, că ansele citoplasmice i2, i3 și i4 din molecula receptorului participă la realizarea cooperării dintre receptor și clase individuale de proteine G. Aceste domenii ale moleculei receptorului nu sunt (în întregime) accesibile heterotrimerului proteinei G în stare de repaus (în absența ligandului).

În plus, la realizarea acestei cooperări selective (anumiți receptori/clase particulare de proteine G) mai participă:

- densitatea proteinelor G;
- localizarea predilectă a unor proteine G și a unor receptori în anumite teritorii delimitate ale membranei celulare; în acest context apare tot



**Fig. 5. Gruparea receptorilor cuplați cu proteinele G, pe baza criteriului omologiei structurale și pe baza situsurilor presupuse de interacțiune cu liganzii specifici.**

mai des în literatură conceptul de grupare a unor complexe moleculare în **microdomenii** ale celulei (8, 28);

- informațiile structurale ce țin de clasele particulare de receptori sau proteine G.

Cercetările diferitelor grupuri au identificat, pentru anumite clase de receptori care sunt lanțurile polipeptidice necesare pentru activarea eficientă precum și situsurile de contact între receptor și proteinele G (42). Tehnologiile folosite pentru aceste determinări sunt: cristalografia cu raze X, metodele de mutagenză dirijată, studii de fotoliză, studii de dichroism circular, spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier, proteoliză limitată etc.

Într-un model propus recent, al activării proteinei G de către receptor, se consideră că proteina G posedă o suprafață ce vine în contact cu membrana celulară. GDP este legat la o distanță de circa 30 Å de membrana celulară. Eliberarea GDP de către subunitatea  $\alpha$  a proteinei G este consecința unui mecanism alosteric, întrucât nucleotidul nu poate ajunge în contact direct cu ansele citoplasmice ale receptorului (42).

Participarea subunităților  $\beta\gamma$  din compunerea proteinelor G la transducția semnalelor a fost inițial considerată ca nesemnificativă. Ulterior tot mai multe date experimentale au demonstrat că și complexul  $\beta\gamma$  poate modula direct activitatea unor canale ionice, de potasiu, de calciu, și a unor enzime precum fosfolipaza C și adenilat ciclaza (8, 14).

#### 4.3. Atenuarea sau terminarea semnalului: mecanisme generice

Un aspect mai puțin abordat (în literatura internațională) este acela al atenuării (sau terminării) răspunsului generat prin activarea receptorilor cuplați cu proteinele G. Aceste mecanisme sunt organizate ierarhic și sunt redundante (17). **Fig. 8** prezintă o încercare de generalizare a acestor mecanisme. Fiecare dintre cele trei niveluri la care se poate interveni, pentru a limita sau atenua transferul de informație, cuprinde numeroase verigi intermediare, sau puncte de întretăiere cu alte mecanisme implicate în semnalizarea transmembranară.

Aceste trei niveluri sunt:

- diminuarea concentrației moleculelor semnal;
- decuplarea (sau desensibilizarea) receptorilor;
- modificarea sub aspect numeric a populației de receptori funcționali de pe suprafața (sau din interiorul) unei celule.

Mecanismele de decuplare a receptorilor au fost examinate și ele în detaliu. Au fost identificate cel puțin 2 căi de intervenție asupra receptorilor, în urma cărora celulele își pot limita răspunsul la un agonist. Ele sunt prezentate în **fig. 9**.

Endocitoza mediată de receptor reprezintă o modalitate de a internaliza temporar receptorul (decuplare temporară a receptorului) sau poate fi una dintre etapele unui proces mai cuprinzător, de reglare a echilibrului numeric între receptorii nou sintetizați și cei degradați. În **figura 10** sunt prezentate modalitățile diferite în care celulele pot procesa complexul receptor-ligand după internalizare, prin endocitoză mediată de receptor.

#### 4.4. Proteinele G: De la desensibilizarea la hipersensibilitatea receptorilor

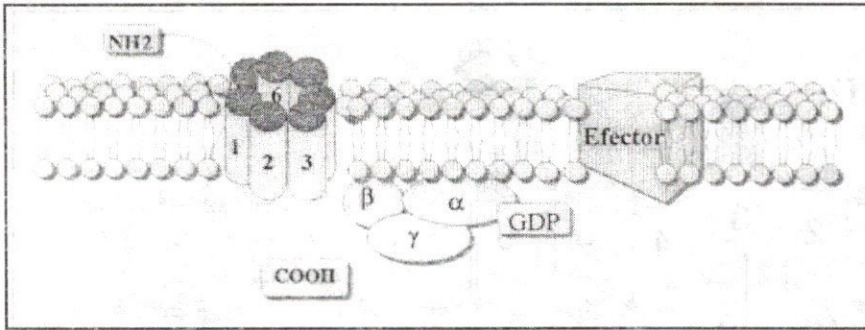
Mecanismele desensibilizării receptorilor cuplați cu proteinele G au fost intens cercetate în ultimii ani (5, 17, 29).

Două tipuri de mecanisme, ambele derulate cu participarea unor sisteme de fosforilare, au fost identificate până în prezent și au fost denumite desensibilizare omologă și, respectiv, heterologă.

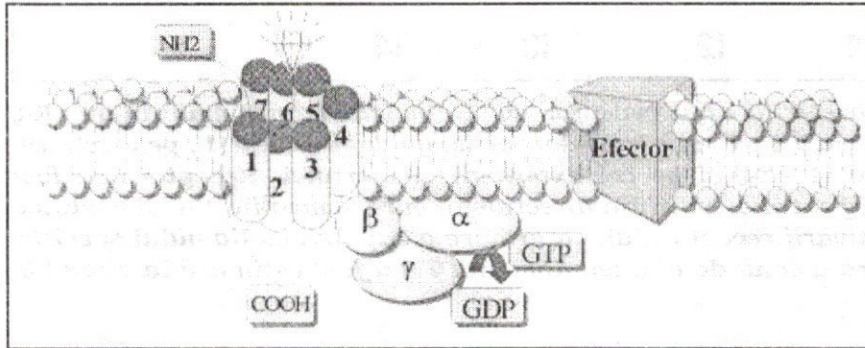
*Desensibilizarea omologă* se produce în urma activării de către agonist a aceleiași clase de receptori, în timp ce cea heterologă este declanșată în urma activării unei alte clase de receptori (17). Elementul comun celor două mecanisme de desensibilizare este fosforilarea receptorului. Ceea ce deosebește cele două tipuri de desensibilizare sunt efectorii propriu-ziși ai acestei fosforilări.

În desensibilizarea omologă, efectorii fosforilării (declanșate într-un interval cuprins între câteva secunde și câteva minute de la activarea receptorilor) sunt serin/treonin-kinaze, denumite kinaze ale receptorilor cuplați cu proteinele G (GRK). Un element caracteristic al acestei familii de protein-kinaze este acela că ele fosforilează numai receptorii ocupați de agonist (17). Au fost deja precizate o serie de detalii referitoare la: componența familiei GRK, specificitatea lor, situsurile de fosforilare, modalitățile de translocare a GRK din citosol în imediata vecinătate a membranei plasmice, localizarea izoformelor acestor enzime în diferite tipuri de țesuturi etc. (5, 17). A fost, de asemenea, evidențiată participarea subunităților  $\beta\gamma$  la mecanismele de translocare a GRK în vecinătatea membranei, și, implicit, la etapele procesului de desensibilizare a receptorilor. (8).

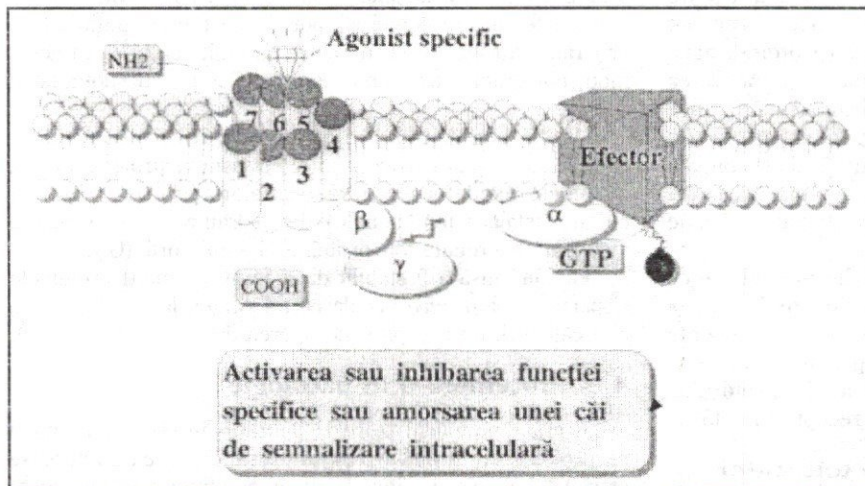
Acțiunea GRK asupra receptorilor este limitată la fosforilarea acestora. Fosforilarea nu este însă suficientă pentru a provoca desensibilizarea receptorului. Aceasta este realizată, în fapt, de reprezentanții unei alte familii de proteine, denumite *arestine*. Acestea, denumite co-factori ai GRK, au rolul de a se lega de receptorii fosforilați, și, în acest fel, de a împiedica interacțiunea receptorului cu proteinele G. Studiile ultrastructurale au identificat reprezentanți ai familiei *arestinelor* în corpii multiveziculari neuronală, sugerând că aceste proteine ar participa și la mecanisme asociate endocitozei mediate de receptor.



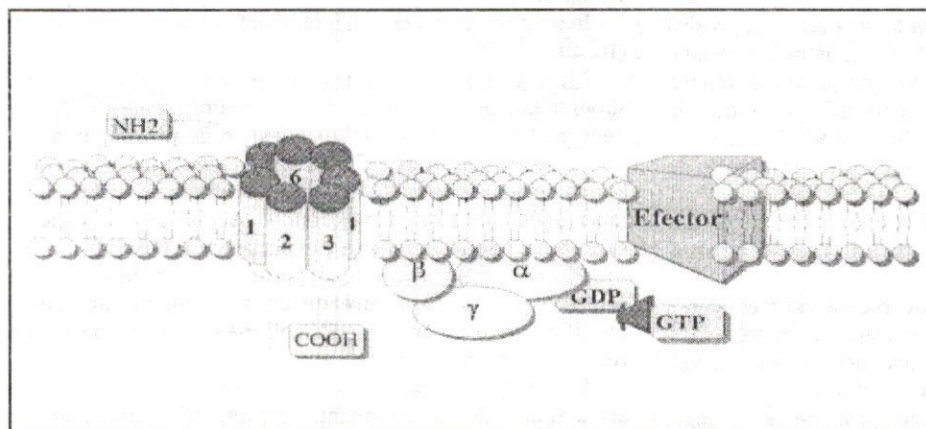
A. Reprezentarea schematică a raporturilor dintre proteinele G și receptorii cu 7 domenii transmembranare. Aceste domenii transmembranare sunt legate prin lanțuri de aminoacizi aflate atât pe versantul extern cât și pe cel intern al membranei.



B. Proteinele G sunt heterotrimeri, cele trei subunități sunt denumite  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ . Subunitatea  $\alpha$  are capacitatea de a lega nucleotide guano-zinice: GDP sau GTP. În stare de repaus, subunitatea  $\alpha$  leagă GDP. La cuplarea receptorului cu ligandul subunitatea schimbă GDP cu GTP.

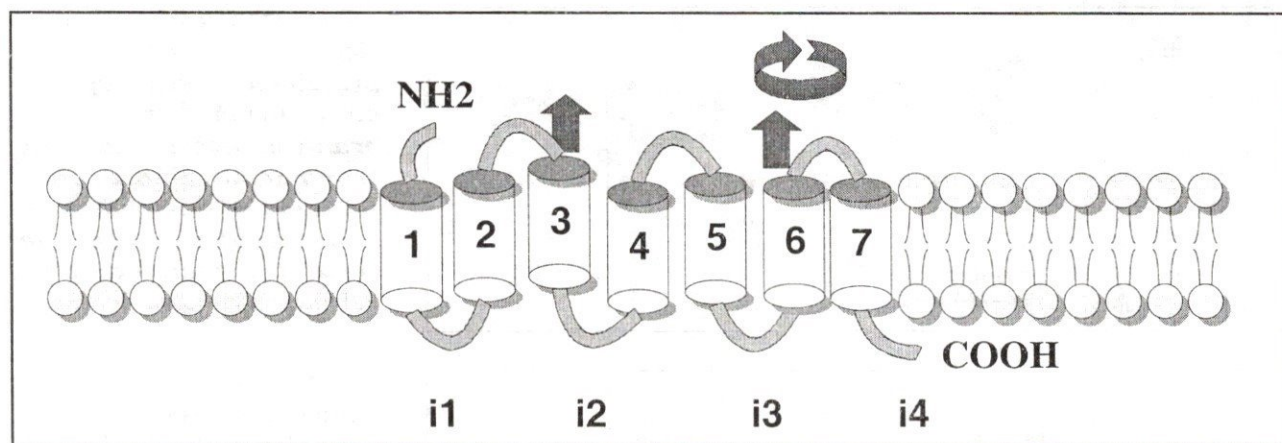


C. Subunitatea  $\alpha$ , după activare, se detașează de celelate două subunități și activează următorul element al căii de semnalizare, o moleculă efector, cu rol de enzimă sau canal ionic. Exemplul cel mai cunoscut este activarea adenilat ciclazei de către subunitatea  $\alpha$  a proteinei G, urmată de creșterea concentrației de AMP ciclic intracelular.



D. Transferul informației se încheie cu hidroliza GTP de către subunitatea  $\alpha$ . Ca urmare, subunitatea  $\alpha$  se detașează de celelate două subunități ale proteinei G și se revine la starea de dinaintea cuplării ligandului cu receptorul. Interacțiunea ligand receptor este, la rândul ei reversibilă.

Fig. 6. Schema generală a mecanismului prin care proteinele G cooperează cu receptorii cu 7 domenii transmembranare



**Fig. 7. Reprezentarea "desfășurată" a unui receptor cu 7 domenii transmembranare (TM) (notate cu cifre arabe, de la 1 la 7), și a "anselor" ce leagă domeniile TM, pe versantul citoplasmatic (notate cu i1 - i4) și pe cel extern al membranei. Receptorul a fost reprezentat în acest mod pentru a evidenția direcțiile în care domeniile TM își modifică poziția, în momentul activării receptorului, ca urmare a cuplării cu ligandul specific. Mișcarea de rotație orară a celui de al 6-lea domeniu TM a fost estimată la circa 30° (41).**

Protein-kinazele activate de mesageri secunzi au fost identificate ca efectori ai celui de al doilea tip de *desensibilizare*: cea *heterologă*. La aceste mecanisme pot participa protein-kinaze, precum PKA (protein-kinaza activată de AMP ciclic), PKC (protein-kinaza C). Activarea acestor protein-kinaze se produce în urma cuplării unor receptori specifici cu agoniștii lor. Denumirea de *desensibilizare heterologă* este dată de faptul că ea este inițiată de agoniști ce ai unei alte clase de receptori decât cei asupra se va exercita efectul de fosforilare și, consecutiv, de desensibilizare.

În ultimul timp au fost examinate și alte mecanisme ce ar putea participa la sensibilizarea/desensibilizarea receptorilor. Unul dintre aceste mecanisme îl reprezintă acela al atașării / detașării unui radical palmitoil, la nivelul celui de-al VII-lea domeniu transmembranar al receptorului, mecanism ce ar modifica sensibilitatea receptorului (5).

#### 4.5. Participare la mecanismele toleranței farmacologice?

Toleranța farmacologică reprezintă scăderea progresivă a efectului unui medicament, după administrare repetată.

Faptul că receptorii pentru opioizi fac parte din familia mare a receptorilor cuplați cu proteinele G a dus la formularea ipotezei conform căreia fenomenul de toleranță farmacologică ar putea fi asociat cu mecanismele de desensibilizare a receptorilor (29).

Teoretic, atenuarea răspunsului la opioizi al receptorilor specifici ar putea surveni ca rezultat al mai multor mecanisme:

- reducerea numărului de receptori (reducerea transcrierii și/sau internalizarea receptorilor);
- fosforilarea receptorilor (via mecanismul omolog, descris mai sus: GRK + arestine);
- modificarea activității altor proteine ce pot regla activitatea subunității a (proteinele RGS).

Acest ultim mecanism a fost enunțat în urma cercetărilor care au dus la identificarea (în ultimii doi ani) a unei familii de proteine cu funcție de reglatori ai proteinelor

G, familie ce cuprinde până în prezent 16 membri. Aceste proteine (care nu au efect asupra legării nucleotidului de subunitatea a a proteinei G) pot crește (de cel puțin 40 de ori) rata hidrolizei GTP de către subunitatea a, și, în acest mod, pot grăbi reasocierea complexului bg cu subunitatea a (25).

O altă ipoteză, mai recent investigată, avansează ideea că opioizii ar putea avea și un efect asupra proteinelor Gs, cu efecte excitatorii asupra celulelor nervoase, care, în cursul instalării fenomenelor de toleranță s-ar contrapune efectelor exercitate via proteine G inhibitorii (Gi).

Rămâne însă a fi stabilit dacă (și în ce mod) proteinele G participă și *in vivo* instalarea toleranței, la opioizi, sau la alte categorii de receptori ce operează via proteine G (29).

#### 4.6. Proteinele G în patologie

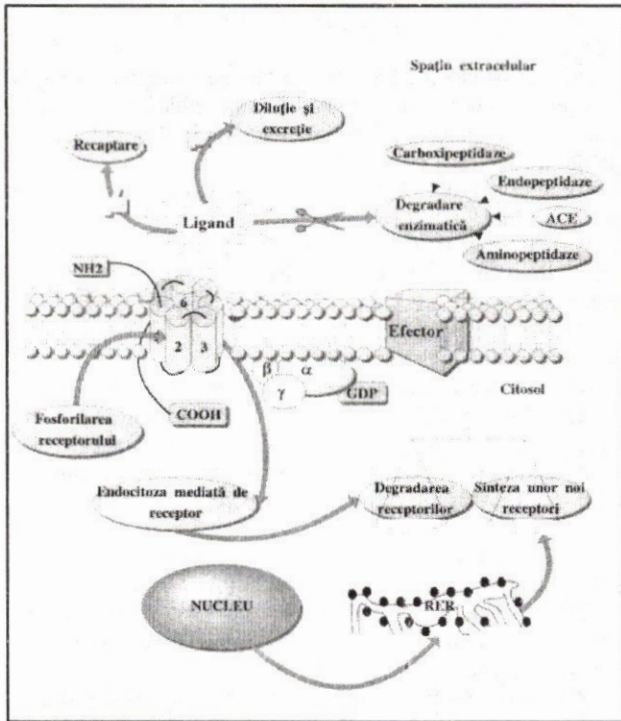
*A priori*, numărul mare al tipurilor de receptori cuplați cu proteine G ne poate face să presupunem că numeroase stări patologice s-ar putea derula în condițiile unor disfuncții ale acestor proteine.

În ultimii 3-4 ani această ipoteză a fost examinată extensiv (16, 21, 29, 37, 39).

Mutații la nivelul unor gene ce codifică pentru subunitățile proteinelor G au fost diagnosticate în cursul unor sindroame endocrine, manifestate fie prin hipofuncție, fie prin hiperfuncție (distrofia ereditară Albright, acromegalie, sindromul McCune-Albright, noduli tiroidieni hiperfuncționali, unele tumori endocrine tiroidiene, ovariene, suprarenale sau secretante de prolactină) (16, 39).

Alterări ale expresiei/funcției unor subunități ale proteinelor G au fost corelate cu afecțiuni în care apare modificarea transcrierii sub acțiunea unor hormoni cu receptori intranucleari (16).

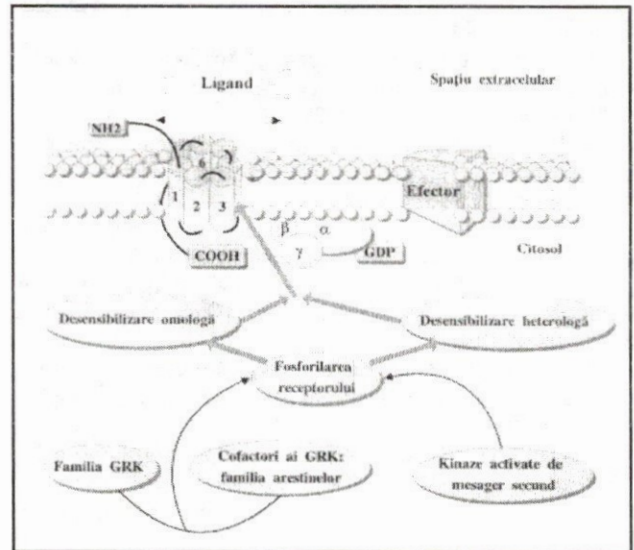
Dintre mecanismele autoimune, cel mai studiat a fost acela al apariției unor autoanticorpi împotriva unor domenii din compunerea receptorilor cuplați cu proteinele G (21). Dintre maladiile cardio-vasculare pentru care acest mecanism ar putea înclua printre virgile patogenice au fost studiate: unele forme de cardiomiopatie dilatativă, maladia



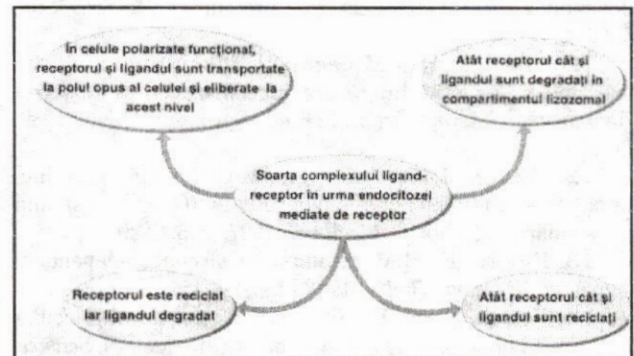
**Fig. 8. Modalități de atenuare (terminare) a semnalului, la nivelul receptorilor cuplați cu proteinele G. Pot fi identificate trei modalități generice de a încheia transmisia unui mesaj: a) diminuarea concentrației moleculei semnal prin diluție, eliminare, degradare enzimatică (în figură sunt reprezentate doar câteva categorii de enzime ce pot participa la degradarea enzimatică a unor clase de molecule semnal) sau recaptare (35); b) decuplarea receptorului (prin fosforilare); c) modificarea echilibrului dintre numărul de receptori nou sintetizați și cei degradați sau doar transferați în compartimentul intracelular, prin endocitoza mediată de receptor.**

Chagas, hipertensiunea malignă de origine renovasculară, în afara unei suferințe de tip glomerulonefrită (21, 37).

Descoperirea efectelor pe care unele toxine microbiene le au asupra proteinelor G a permis, dincolo de înțelegerea unor meca-nisme patogene, utilizarea acestor toxine drept adevărate instrumente de lucru. În sisteme experimentale *in vivo sau in vitro*, se poate obține blocarea (spre exemplu, toxina pertussis, "PTX" catalizează ADP-ribozilarea subunității a a proteinei Gi și previne disocierea subunităților bg de subunitatea a) sau activarea constitutivă a unor subunități ale proteinelor G (toxina holerică, spre exemplu, catalizează ADP-ribozilarea subunității a Gs,) (39).



**Fig. 9. Mecanismele de desensibilizare și decuplare a receptorilor cuplați cu proteinele G, în care elementul central este procesul de fosforilare a receptorilor, ca modalitate de atenuare sau terminare a semnalului. GRK = protein-kinaze ale receptorilor cuplați cu proteinele G.**



**Fig. 10. Reprezentarea schematică a modalităților prin care endocitoza mediată de receptor poate participa la atenuarea sau terminarea semnalului, evidențiind soarta ligandului și a receptorului în urma acestui proces.**

În concluzie, numeroase aspecte legate de mecanismele moleculare ale participării superfamiliei proteinelor G la semnalizarea transmembranară, cât și consecințele unor disfuncții în aceste procese sunt descifrate doar parțial. De aceea este de așteptat ca, în viitorul apropiat, să apară foarte multe date noi, care vor contura un tablou mai precis al patologiei asociate unor alterări ale meca-nismelor cu care operează receptorii cuplați cu proteinele G. Este, de asemenea de așteptat ca unele dintre verigile participante în acest lanț de evenimente biochimice să devină ținta acțiunii unor medicamente noi.

## 5. BIBLIOGRAFIE

1. ALBERT P.R., S.J. MORRIS, Antisense knockouts: molecular scalpels for the dissection of signal transduction, *Tr. Pharmacol. Sci.*, 1994, 15:250-254
2. BECK-SICKINGER A.G., Structural characterization and binding sites of G-protein-coupled receptors, *Drug Discov. Today*, 1996, 1:502-513
3. BIRNBAUMER L., G proteins in signal transduction, *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990, 30:675-705
4. BLOOM F.E., An Internet review: the complete neuroscientist scours the World Wide Web, *Science*, 1996, 274:1104-1108
5. BOHM S.K., GRADY E.F., N.W. BUNNETT, Regulatory mechanisms that modulate signaling by G-protein-coupled receptors, *Biochem. J.*, 1997, 322:1-18
6. CHAUVET G.A., Neurohormonal regulations in: *Theoretical Systems in Biology, Hierarchical and Functional Integration*, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Science, 1996, vol. III, pp.312-356
7. CHIDIAC P., Rethinking receptor-G protein-effector interactions, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 55:549-556
8. CLAPHAM D.E., E.J. NEER, G protein  $\beta$  subunits, *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, 37:167-203
9. COLLINS S., M.G. CARON, R.J. LEFKOWITZ, From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors, *Trend. Biochem. Sci.*, 1992, 15:291-298
10. DOLPHIN A.C., Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins, *J. Physiol.*, 1998, 506:3-11
11. DUGAS H., Molecular recognition and the supramolecular level, in: *Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer Verlag, 1989, pp.17-22
12. EXTON J.H., Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 243:10-20
13. FAGOTTO F., B.M. GUMBINER, Cell contact-dependent signaling, *Develop. Biol.*, 1996, 180:445-454
14. FORD C.E., N. P., SKIBA, H. BAE ET AL., Molecular basis for interactions of G  $\beta$  subunits with effectors, *Science*, 1998, 280:1271-1274
15. FUELLER G.M., D. SHIELDS, The cytoskeleton, in: *Molecular Basis of Medical Cell Biology*, Appleton and Lange, 1998, pp. 124-147
16. GORDELADZE J.O., P.W. JOHANSEN, R.H. PAULSEN, E.J. PAULSEN, K.M. GAUVIK, G-proteins: implications for pathophysiology and disease, *Eur. J. Endocrinol.*, 1994, 131:557-574
17. GRADY E.F., S.K. BOHM, N.W. BUNNETT, Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors, *Am. J. Physiol.*, 1997, 273:G586-601
18. HAMM H.E., A. GILCHRIST, Heterotrimeric G proteins, *Curr. Op. Cell Biol.*, 1996, 8:189-196
19. HEDIGER M.A., Membrane permeability. The diversity of transmembrane transport processes, *Curr. Op. Cell Biol.*, 1997, 9:543-546
20. HILLE B., Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors, *Trend. Neurol. Sci.*, 1994, 17:531-536
21. HOEBEKE J., La seconde boucle extracellulaire des recepteurs couples au proteines G: une cible preferentielle pour des autoanticorps fonctionnels, *M/S Med. Sci.*, 1995, 11:1661-1667
22. JAN L.Y., Y.N. JAN., Receptor-regulated ion channels, *Curr. Op. Cell Biol.*, 1997, 9:155-160
23. KANDEL E.R., Transmitter release, in: KANDEL E.R., J.H. SCHWARTZ, T.M. JESSEL (Eds.), *Principles of Neural Sciences*, Appleton & Lange, 1991, pp. 194-212
24. KOCH W.J., C.A. MILANO, R.J. LEFKOWITZ, Transgenic manipulation of myocardial G protein-coupled receptors and receptor kinases, *Circ. Res.*, 1996, 78:511-516
25. KOELLE M.R., A new family of G-protein regulators - the RGS proteins, *Curr. Op. Cell Biol.*, 1997, 9:143-147
26. KURACHI Y., G protein regulation of cardiac muscarinic potassium channel, *Am J. Physiol.*, 1995, 269:C821-830
27. LAMB T.D., E.N. PUGH JR., G-protein cascades: gain and kinetics, *Trend. Neurol. Sci.*, 1992, 15:291-298
28. NEHER E., Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release, *Neuron*, 1998, 20:389-399
29. NESTLER E.J., Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction, *Curr. Op. Neurobiol.*, 1997, 7:713-719
30. NEUBIG R.R., Membrane organization in G-protein mechanisms, *FASEB J.*, 1994, 8:939-946
31. RAFF M.C., Social controls on cell survival and cell death, *Nature*, 1992, 356:397-400
32. RAHAMIMOFF R., J.M. FERNANDEZ, Pre- and postfusion regulation of transmitter release, *Neuron*, 1997, 18:17-27
33. RODBELL M., Signal transduction: Evolution of an idea (Nobel Lecture), *Biosci. Rep.*, 1995, 15:117-133
34. ROHRER D.K., B.K. KPBILKA, G protein-coupled receptors: Functional and mechanistic insights through altered gene expression, *Physiol. Rev.*, 1998, 78:35-52
35. SADEE W., V. DRUBBISCH, G.L. AMIDON, Biology of membrane transport proteins, *Pharmaceut. Res.*, 1995, 12:1823-1837
36. SCHWARTZ J.H., Chemical messengers: small molecules and peptides, in: KANDEL E.R., J.H. SCHWARTZ, T.M. JESSEL (Eds.), *Principles of Neural Sciences*, Appleton & Lange, 1991, pp. 213-224
37. SIEFFERT W., G proteins, hypertension, and coronary heart disease - novel findings and hypotheses, *Kidney Blood Press. Res.*, 1996, 19:71-80
38. SLOANE A., Communication, in: *Multimedia Communication*, Mc Graw-Hill Comp., 1996, pp. 1-23
39. SPIEGEL A.M., The molecular basis of disorders caused by defects in G proteins, *Horm. Res.*, 1997, 47:89-96
40. STERNWEIS P.C., I.H. PANG, The G protein-channel connection, *Tr. Neurol. Sci.* 1990, 13:122-126
41. SUDHOF T.C., The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein - protein interactions, *Nature*, 1995, 375:645-653
42. WESS J., G protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, *FASEB J.*, 1997, 11:346-354
43. ZIFF E.B., Enlightening the postsynaptic density, *Neuron*, 1997, 19:1163-1174