

# SISTEMUL FOSFATIDIL INOZITOLILOR ȘI AL PRODUȘILOR DE HIDROLIZĂ A ACESTORA

A. A. Tica\*, V. Tica\*\*, C. Georgescu\*

## REZUMAT

Complexul fosfatidilinozitolilor reprezintă principalul mecanism de semnalizare intracelulară.  $IP_3$ -ul rezultat în urma hidrolizei  $PIP_2$ , mobilizează calciul din depozitele intracelulare, declanșând activarea celulară.  $IP_3$  se fixează pe receptori specifici, care sunt canale de calciu, localizate pe membrana calciozomilor. Afinitatea  $IP_3$  pentru structurile receptoare poate fi modulată de o serie întreagă de factori: *protein kinaza A*, *protein kinaza C*, *Ca<sup>2+</sup>-calmodulin kinaza*, Ph-ul,  $Mg^{2+}$ , ATP și chiar de receptorul însuși. De menționat faptul că există și alți fosfoinozitolii, care prezintă afinitate pentru receptorul pentru  $IP_3$  dar care au și receptori specifici. Rolul lor biologic este însă incomplet cunoscut.

**CUVINTE CHEIE:** Fosfatidil inozitoli, inozitol trifosfat

Primele experiențe care au evidențiat importanța inozitolilor în semnalizarea celulară, deci în transmiterea unei informații de la nivel extracelular la nivelul unor efectori situați în interior, datează din 1953, în urma lucrărilor lui Hokin & Hokin (Hokin M.R. și Hokin L.E., 1953). În 1975 s-a demonstrat că, în urma activării receptorilor celulari, are loc o hidroliză intensă a fosfatidil inozitolilor din structurile lipidice membranare, cu creșterea marcată a  $Ca^{2+}$  (Michel R.H., 1975). A fost identificat cu aceeași ocazie și fosfatidilinozitol (4,5)difosfat ( $PI(4,5)P_2$ ) (Berridge M.J., 1983). Imediat a fost stabilită și enzima ce catalizează hidroliza acestor structuri și anume fosfolipaza C (PLC) (Cockcroft S. și Thomas G.M.H., 1992).

Astăzi se cunoaște că activarea PLC este legată de activarea receptorilor transmembranari legați de proteinele G (RTLPG) sau de activarea receptorilor factorilor de creștere - *Factorul de creștere epidermal* (EGF), *Factorul de creștere plachetar* (PDGF) etc. - care prezintă direct sau indirect activitate de tip tirozin kinazică (Cockcroft S. și Thomas G.M.H., 1992, Berridge M.J., 1993).

În urma acțiunii PLC are loc hidroliza  $PI(4,5)P_2$  în inozitol (1,4,5) trifosfat ( $I(1,4,5)P_3$ , notat simplu  $IP_3$ ) sau D-myo-inozitol și 1,2 diacil-glicerol (DAG).

$IP_3$  are un rol fundamental în mobilizarea  $Ca^{2+}$  din depozitele interne iar DAG rămâne la nivelul membranei celulare, stimulând cea mai mare parte a familiei protein-kinazelor C (PKC), care, la rândul lor, fosforilează alte structuri, cum ar fi canale ionice, proteine membranare, miozină etc. determinând activarea sau blocarea acestora

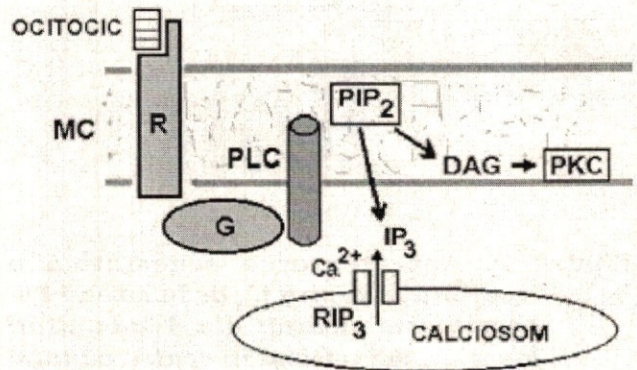
## ABSTARCT

### The phosphatidil inositol complex and its products of hydrolysis

The phosphatidil inositol complex represents the main mechanism for intracellular signal, following membranal receptor activation.  $IP_3$  is the most important member of this group, but not the only one.  $IP_3$  induces mobilization of the calcium from internal stores, after coupling with its receptor ( $Ca^{2+}$ -channel). This calcium will start different cellular processes. The interaction of  $IP_3$  with the specific receptor is modulated by several mechanisms, like protein kinase A, protein kinase C,  $Ca^{2+}$ -calmodulin kinase, pH,  $Mg^{2+}$ , ATP and also by calciu or by the receptor itself. The biological role of the others phosphoinositols is still unknown. They have some affinity for the  $IP_3$ -receptor but there were identified some other receptors, specific for them, also with not well established significance.

**KEY WORDS:** Phosphatidil inositols, inositol triphosphat

(Fig. 1).



**Figura 1. Mobilizarea  $Ca^{2+}$  prin sistemul  $IP_3$ .**

Prin fixarea unui ocitocic pe receptorul specific (R), are loc activarea unei proteine G (G), care va stimula, la rândul ei, fosfolipaza C (PLC). Aceasta va hidroliza fosfatidil (4,5) difosfatul ( $PIP_2$ ), cu generarea a doi mesageri secundari, inozitol(1,4,5) trifosfatul ( $IP_3$ ) și diacil glicerolul (DAG).  $IP_3$  se va fixa pe receptorul său ( $RIP_3$ ), cu mobilizarea  $Ca^{2+}$  din calciosomi iar DAG va rămâne la

\* Disciplina de Farmacologie, Facultatea de Medicină, U.M.F. -Craiova,

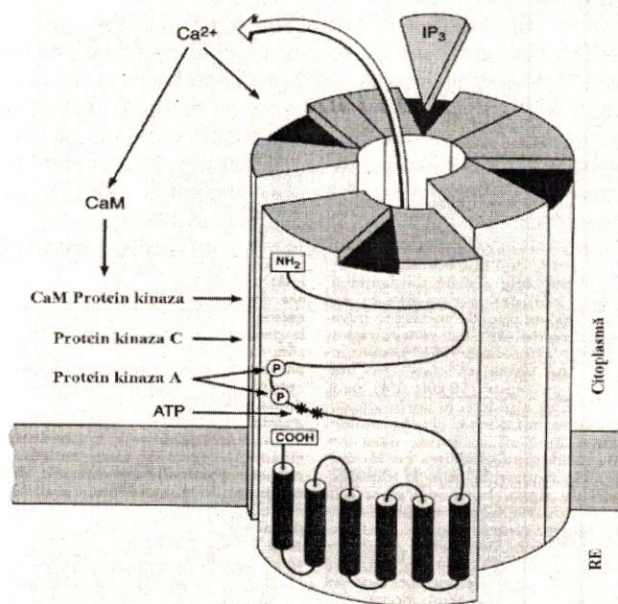
\*\* Disciplina de Obstetrică și Ginecologie, Facultatea de Medicină, Universitatea din Constanța

nivelul membranei celulare, activând *protein kinaza C* (PKC) (pe lângă alte structuri). Aceasta, la rândul ei, poate fosforila canale ionice sau alte proteine membranare.

În afară de  $IP_3$ , care reprezintă de departe cel mai important membru al grupului, o serie întreagă de fosfați de inozitol au capacitatea de a mobiliza  $Ca^{2+}$  din rezervele intracelulare (Fig. 3).

Receptorul pentru  $IP_3$  este cuplat cu canalul de  $Ca^{2+}$  și este localizat la nivelul membranei reticulului endoplasmatic (RE) - de fapt la nivelul depozitelor calcice aflate la acest nivel, denumite *calciosomi*.

Acest receptor este alcătuit din 4 subunități identice, având fiecare o greutate moleculară de 260 kDa. Fiecare din ele prezintă o porțiune transmembranară, alcătuită probabil din 6 domenii de partea porțiunii C-terminală a lanțului peptidic și o porțiune mai mare, către citoplasmă, alcătuită dintr-o zonă de legare pentru  $IP_3$  și o zonă legată de canalul de  $Ca^{2+}$  (Ferris C.D. și Snyder S.H., 1992) (Fig. 2).



**Figura 2. Reprezentarea schematică a receptorului pentru  $IP_3$  de la nivelul RE. Acesta este alcătuit din 4 subunități identice, delimitând în centru canalul de calciu. Cele 6 domenii transmembranare ale fiecărei subunități, sunt localizate în porțiunea C-terminală a lanțului peptidic iar situsul de legare în porțiunea N-terminală. Sunt arătate locurile de acțiune ale protein kinazei A (PKA) și ATP-ului. Nu este cunoscut locul de acțiune al protein kinazei C (PKC) și al protein kinazei dependente de complexul  $Ca^{2+}$ -calmodulină.**

Între timp au fost evidențiate mai multe tipuri de receptori pentru  $IP_3$ , produse de 4 gene diferite, iar fiecare dintre aceștia prezentând mai multe izoforme (Mikoshihba M., 1993).

Un lucru deosebit de interesant s-a dovedit a fi variația intensității efectului obținută prin stimularea cu  $IP_3$  a receptorului său specific.

Astfel, s-a observat că, în concentrație mică ( $<0,3?M$ ), calciul intracelular acționează ca un co-agonist al  $IP_3$ , eliberarea din depozite a  $Ca^{2+}$  fiind amplificată (Iino M., 1990; Ogden D.C. și col., 1993). La concentrații mari însă,  $Ca^{2+}$  inhibă legarea  $IP_3$  de receptor (âncepând cu  $0,4?M$ ). S-a demonstrat însă că receptorul purificat de  $IP_3$  este insensibil la variația concentrației de  $Ca^{2+}$ , dar sensibilitatea este reinstalată prin adăugarea unei proteine membranare de 15kDa, denumită calmedină (Danoff S.K. și col., 1988). Se pare că acest complex,  $Ca^{2+}$ -calmedină este răspunzător de inhibarea cuplării  $IP_3$  pe receptor (Fig. 2).

În condiții de repaus, concentrația de calciu intracelular este aproximativ  $10^7?M$ , depozitele intracelulare sunt pline, iar afinitatea receptorului pentru  $IP_3$  este maximă. Prin acțiunea acestuia din urmă, un număr mare de canale calcice se deschid, atingându-se rapid un vârf concentrațional de  $Ca^{2+}$ . Totuși, procentul de  $Ca^{2+}$  mobilizat din depozite este destul de mic, canalele de  $Ca^{2+}$  închizându-se imediat ce concentrația intracelulară a acestui ion este suficient de mare. Apoi cantitatea de  $Ca^{2+}$  din depozite se reface grație pompelor de  $Ca^{2+}$ .

O serie întreagă de alți compuși - *protein-kinaze*, adenzină, cationi bivalenți - sau pH-ul, pot modela reactivitatea receptorului pentru  $IP_3$  și participa astfel indirect la controlul eliberării de  $Ca^{2+}$  din depozitele intracelulare.

Astfel, activitatea maximă a receptorului, pare a fi realizată la un pH de 8,0-8,5, valoare ce corespunde unei afinități maxime pentru  $IP_3$ . Este posibil ca alcalinizarea citosolului, ce apare ca urmare a stimulării celulare prin hormoni sau factori de creștere, să determine o facilitare a eliberării de  $Ca^{2+}$  din depozitele intracelulare.

Ionul de  $Mg^{2+}$ , la concentrații între  $10\mu M$  și  $1mM$ , inhibă legarea  $IP_3$  de receptor dar nu se cunoaște importanța fiziologică a acestui fapt.

*Protein kinaza A* dependentă de AMPc (PKA) acționează prin fosforilarea în două locuri a lanțului peptidic al fiecărei unități aparținând receptorului  $IP_3$  (Ferris C.D. și Snyder S.H., 1992) (Fig. 2). În urma acestei acțiuni, afinitatea receptorului este diminuată. Totuși, fenomenul nu a fost demonstrat decât la nivelul neuronilor aparținând SNC.

În același timp, se știe însă că AMPc poate stimula mobilizarea ionului de  $Ca^{2+}$  din depozitele intracelulare, putându-se afirma că receptorul pentru  $IP_3$  joacă un rol important în cuplarea diferitelor mecanisme de modulare a concentrației de  $Ca^{2+}$  în celulă, mecanisme în care sunt implicați și alți mesageri secunzi, în afara  $IP_3$ .

*Protein kinaza C* (PKC) și *protein kinaza dependentă de complexul  $Ca^{2+}$ -calmodulină* ( $Ca^{2+}$ -calmodulin protein kinaza -  $Ca^{2+}$ -CPK) pot determina fosforilarea receptorului, dar locul lor de acțiune nu a fost evidențiat (Fig. 2).

Mai mult, s-a demonstrat că însuși receptorul are activitate intrinsecă de tip *serin-kinazică*, fiind capabil de un proces de autofosforilare (cu scăderea afinității pentru  $IP_3$ ), precum și de fosforilarea altor substraturi (Ferris C.D., Cameron A.M. și col., 1992).

Importanța fiziologică a acestor procese de fosforilare este însă incertă.

ATP-ul, la concentrații mai mari de  $0,5mM$ , acționează ca un inhibitor competitiv al  $IP_3$  pentru situsul de legare al acestuia pe receptor. Dar la concentrații cuprinse între 10



**Fosfatidil inozitol (4,5) difosfatul - PI(4,5)P<sub>2</sub>**, poate fi: a)hidrolizat sub acțiunea *fosfolipazei C* (PLC), cu formare de **inozitol (1,4,5) trifosfat - I(1,4,5)P<sub>3</sub>** și **diacil glicerol (DAG)**; b)hidrolizat de *fosfolipaza D* (PLD), rezultând **acid fosfatidic (AF)** și **inozitol (4,5) difosfat - I(4,5)P<sub>2</sub>**; c)hidrolizat de *fosfolipaza A<sub>2</sub>* (PLA<sub>2</sub>), generându-se **lizo-fosfatidil inozitol (4,5) difosfat - L-PI(4,5)P<sub>2</sub>** și **acid arahidonic (AA)**; d)fosforilat de către *fosfatidil inozitol (4,5) difosfat 3-kinază (PIP<sub>2</sub>3-kinaza)*, cu formare de **fosfatidil inozitol (3,4,5) trifosfat - PI(3,4,5)P<sub>3</sub>**. Toate aceste trei reacții generează mesageri secundari, implicați în semnalizarea intracelulară. Este arătată și calea de metabolizare a inozitol polifosfaților. Defosforilarea finală a **I(1)P**, **I(3)P** și **I(4)P** la **inozitol (I)**, realizată de *monofosfatazele 1, 3 și 4*, este inhibată de **Li<sup>+</sup>**. (**L-AF=acid lizofosfatidic**; **MAG=monoacil glicerol**; **KZ=kinază**; **FZ=fosfatază**; liniile de culoare neagră evidențiază căile principale de transformare iar cele gri, pe cele secundare.)

Au fost identificați, de asemenea, inozitoli polifosfați cu legarea de grupări polifosfat în pozițiile 1 și 2 ale inelului inozitolic (Stephens L. și col., 1993). Acești compuși se pare că sunt capabili să acționeze ca donori de grupări fosfat, deci să acționeze ca depozite de energie, o astfel de moleculă înmagazinând o cantitate de energie echivalentă cu a unei molecule de ADP.

Hidroliza inozitol-fosfaților se încheie prin defosforilarea de către o *monofosfatază* a izomerilor de inozitol monofosfat, cu formarea de inozitol, ce va servi în continuare la refacerea cantității inițiale de fosfatidil-inozitol (Fig. 3). *Monofosfataza* este blocată de **Li<sup>+</sup>**, fenomen care ar putea reprezenta un mecanism de acțiune al **Li<sup>+</sup>** în cadrul tratamentului tulburărilor maniaco-depresive.

Această etapă, deci defosforilarea finală la inozitol, constituie de fapt încheierea semnalizării celulare pe calea inozitol-fosfaților.

DAG-ul este fosforilat la acid fosfatidic, constituind apoi sursă pentru generarea de fosfolipide sau este hidrolizat sub acțiunea *fosfolipazei A<sub>2</sub>* (PLA<sub>2</sub>), rezultând acid arahidonic, punct de plecare al unui alt sistem de semnalizare celulară - sistemul eicozanoizilor.

O altă cale importantă de semnalizare celulară, în care este implicat **PI(4,5)P<sub>2</sub>**, o reprezintă fosforilarea acestuia de către **PI(4,5)P<sub>2</sub> 3-kinază** la **PI(3,4,5)P<sub>3</sub>** (Stephens L.R. și col., 1991).

Activarea acestei enzime nu este legată de activarea PLC, ea realizându-se prin intermediul unor receptori membranari de tip *tirozin-kinazic*, cum ar fi cei ai factorilor de creștere (PDGF, EGF etc.). Acești receptori suferă un proces de auto-fosforilare pe grupări tirozinice. Există de asemenea posibilitatea ca fosforilarea să aibă loc sub acțiunea unor *tirozin-kinaze* intracelulare (Downess C.P. și Carter A.N., 1991).

Un fapt deosebit de interesant îl constituie intricarea celor două căi, implicând fosfatidil-inozitol și anume s-a demonstrat că **PI(4,5)P<sub>2</sub> 3-kinaza** este sensibilă la câteva tipuri de subunități βγ, provenite prin activarea proteinelor G după stimularea RTLPG (activare care antrenează stimularea PLC cu formarea de IP<sub>3</sub>), deci existând posibilitatea demarării a două sisteme de semnalizare celulară prin stimularea unui singur tip de receptor.

## BIBLIOGRAFIE

- Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, 1993; 361: 315-25.
- Berridge M.J. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse phosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem. J.*, 1983; 212: 849-58.
- Cockcroft S., Thomas G.M.H. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.*, 1992; 288: 1-14.
- Danoff S.K., Supattapone S., Snyder S.H. Characterization of a membrane protein from brain mediating the inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding by calcium. *Biochem. J.*, 1988; 254: 701-5.
- Downess C.P., Carter A.N. Phosphoinositide 3-kinase: a new effector in signal transduction? *Cell Signal.*, 1991; 3: 501-13.
- Erneux C., Takazawa K. Intracellular control of inositol phosphates by their metabolizing enzymes. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1991; 12: 174-5.
- Erneux C., Vanweyenberg V., De Smedt F., Communi. Implication des phosphatidil-inozitols et de leurs produits d\*hydrolyse dans la signalisation cellulaire. *Médecine/Science*, 1995; 11: 240-6.
- Ferris C.D., Cameron A.M., Bredt D.S., Haganir R.L., Snyder S.H. Autophosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 7036-41.
- Ferris C.D., Snyder S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 1992; 54: 469-88.
- Hilly M., Piétri-Rouxel F., Coquil J.F., Guy M., Mauger J.P. Thiol reagents increase the affinity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 16488-94.
- Hokin M.R., Hokin L.E. Enzyme secretion and the incorporation of <sup>32</sup>P into phospholipids of pancreatic slices. *J. Biol. Chem.*, 1953; 203: 967-77.
- Iino M. Biphasic Ca<sup>2+</sup> dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig *Taenia caeci*. *J. Gen. Physiol.*, 1990; 95: 11031-22.
- Irvine R.F., Moor R.M. Micro-injection of (1,3,4,5)P<sub>4</sub> activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. J.*, 1986; 240: 917-20.
- Kress H.G. Effects of general anaesthetics on second messenger systems. *Eur. J. Anaesth.*, 1995; 12: 83-97.
- Mauger J.P. Régulation du récepteur de l'inositol 1,4,5-tri-phosphate. *Médecine/Science*, 1994; 10: 1013-7.
- Meldolesi J., Madeddu L., Pozzan T. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage organelles in non-muscle cells. Heterogeneity and functional assignment. *Biochem. Biophys. Acta*. 1990; 1065: 130-40.
- Michel R.H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1975; 415: 81-147.
- Mikoshiha M. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 1993; 14: 86-9.
- Ogden D.C., Khodakhah K., Carter T.D., Gray P.T.A., Capiod T. Mechanism of intracellular calcium release during hormone and neurotransmitter action investigated with flash photolysis. *J. Exp. Biol.*, 1993; 184: 105-27.

20. Schofl C., Sanchez-Bueno A., Brabant G., Cobbold P.H., Cuthbertson K.S.R. **Frequency and amplitude enhancement of calcium transients by cyclic AMP in hepatocytes.** *Biochem. J.*, 1991; 273: 799-802.
21. Shears S.B. **Metabolism of the inositol phosphoares produced upon receptor activation.** *Biochem. J.*, 1989; 18: 53-6.
22. Stephens L.R., Hughes K.T., Irvine R.F. **Pathway for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate syntesis in activated neutrophils.** *Nature*, 1991; 18: 53-6.
23. Stephens L., Radenberg T., Thiel U., Vogel G., Khoo K., Dell A., Jackson P., Hawkins P., Mayr G.I. **The detection, purification, structural characterization and metabolism of diphosphoinositol pentakiphosphate and bis-diphosphoinositol tetrakiphosphate.** *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 4009-15.
24. Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schultz I. **Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>.** *Nature*, 1983; 306: 67-9.
25. Theibert A.B., Estevez V.A., Ferris C.D., Danoff S.K., Barrow R.K., Snyder S.H. **Inositol 1,3,4,5-tetrakiphosphate receptor proteins.** *Proc Natl. Acad. Sci., USA* 1991; 88: 3165-9.
26. Vanayaplanich M., Scultz C., Rudolf M.T., Wasserman M., Enyeti P., Craxton A., Shears S., Tsien R., Narett K.E., Traynor-Kaplan A. **Long term uncoupling of chloride secretion from intracellular calcium levels by Ins(3,4,5,6)P<sub>4</sub>.** *Nature* 1994; 371: 711-4.
27. Volgmaier S., Keen J., Murphy J., Ferris C., Pretswich G., Snyder S., Theibert A. **Inositol hexakiphosphate receptor identified as the clatrin assembly protein AP-2.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187: 158-63.
28. Wilcox R.A., Challis R.A.J., Baudin G., Vasella V., Potter B.V.L., Nahorsky S.R. **Stereo-selectivity of Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> induced Ca<sup>2+</sup> mobilization.** *Biochem. J.* 1993; 294: 191-4.