



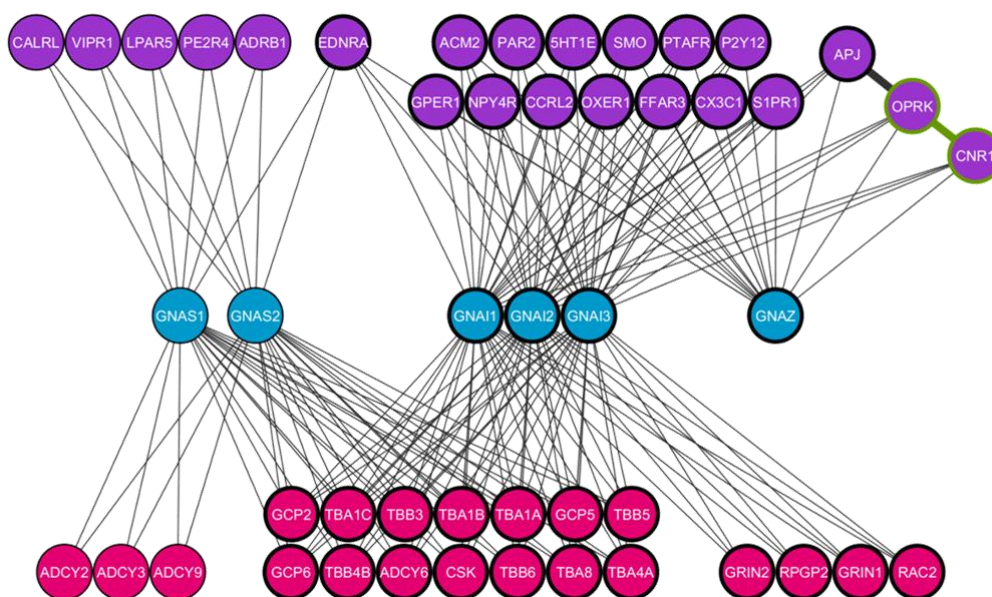
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Υπολογιστικές μελέτες συσχέτισης των
σηματοδοτικών μονοπατιών των Συζευγμένων
με G-πρωτεΐνες Υποδοχέων (GPCRs) με
βιολογικές διεργασίες και ασθένειες»**



Αυγή Έλενα Αποστολάκου

Πτυχιούχος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2017



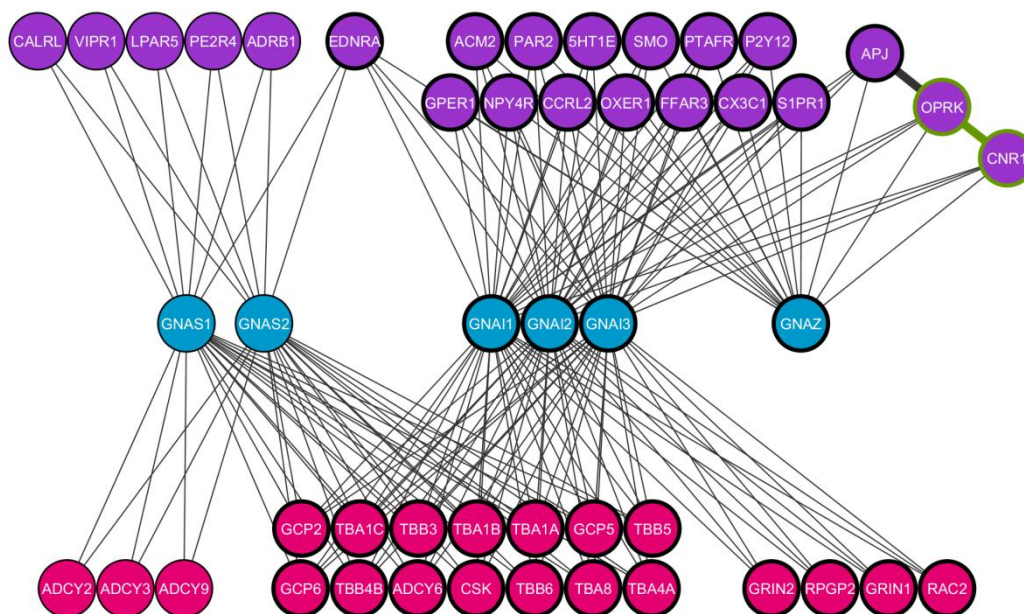
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN “BIOINFORMATICS”

Master Diploma Thesis

**«Computational studies correlating
G-protein Coupled Receptor (GPCR)
signaling pathways with biological
processes and diseases»**



Avgi Elena Apostolakou

BSc in Biology, National and Kapodistrian University of Athens

ATHENS 2017



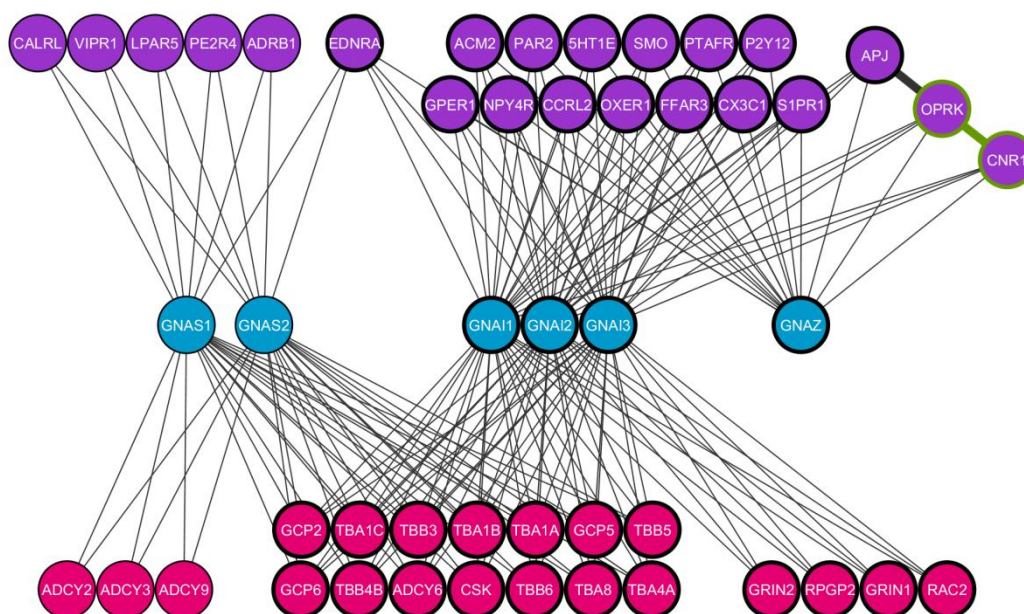
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Υπολογιστικές μελέτες συσχέτισης των σηματοδοτικών μονοπατιών των Συζευγμένων με G-πρωτεΐνες Υποδοχέων (GPCRs) με βιολογικές διεργασίες και ασθένειες»



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου (Επιβλέπουσα)

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.*

Ομότιμος Καθηγητής Σταύρος Χαμόδρακας

*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.*

Αναπληρωτής Καθηγητής Παντελής Μπάγκος

*Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών στον τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοπληροφορικής υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βασιλικής Οικονομίδου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Σταύρο Χαμόδρακα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του κατά την εκπόνηση της προπτυχιακής και της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου. Είναι ο άνθρωπος που με εισήγαγε στο θαυμάσιο πεδίο της Βιοπληροφορικής και μου προκάλεσε το ενδιαφέρον σε αυτή. Με την εμπειρία και τις συμβουλές του με καθοδήγησε στην ερευνητική εργασία και μου έμαθε τον επιστημονικό τρόπο σκέψης. Ένα από τα πιο σημαντικά πράγματα που μου έδειξε είναι η σημασία της δομής των συστατικών της ζωής.

Θέλω να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου που δέχθηκε να επιβλέψει την παρούσα εργασία. Την ευχαριστώ για το ενδιαφέρον και τη κατανόηση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Ότι σχόλια και συμβουλές μου πρόσφερε με βοήθησαν να βελτιώσω τη δουλειά μου και τον εαυτό μου.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παντελή Μπάγκο για τη συμμετοχή του στη τριμελή εξεταστική επιτροπή της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τον ίδιο, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, για τα πολύτιμα μαθήματα που δίδαξαν στο μεταπτυχιακό.

Έπειτα θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Υποψήφιο Διδάκτορα Φώτη Μπαλτούμα για τη βοήθεια του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Η καθοδήγηση του ήταν πολύτιμη και καθοριστική, και η συνεργασία του άψογη.

Στη συνέχεια θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υπέροχη και ζεστή ατμόσφαιρα που υπήρχε καθημερινώς στο χώρο του εργαστηρίου. Ειδικά ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα Κατερίνα Νάστου και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αθηνά Αμανατίδου για την υποστήριξη τους.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Βοργιά που με δέχθηκε στο μεταπτυχιακό και όλους τους διδάσκοντες για τα μαθήματα τους.

Τέλος ευχαριστώ τη μητέρα μου για την αγάπη και την υποστήριξη που μου έδειξε σε όλη τη ζωή μου. Αφιερώνω αυτή την εργασία στη αγαπημένη μου γιαγιά.

Περίληψη

Οι Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες Υποδοχείς (GPCRs) είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο ποικιλόμορφες υπεροικογένειες μεμβρανικών υποδοχέων σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχουν σημαντικούς ρόλους σε βασικές βιολογικές διεργασίες και φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ορμονική ρύθμιση και η όραση. Εξαιτίας των κρίσιμων ρόλων τους διαταραχή της σηματοδότησης των GPCR συχνά προκαλεί ασθένειες. Είναι κύριοι φαρμακευτικοί στόχοι με περισσότερα από το 30% των διαθέσιμων φαρμάκων να στοχεύουν σε GPCRs. Μεταγωγή σήματος από αυτούς τους υποδοχείς επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των G-πρωτεϊνών (υπομονάδες G α , G β , G γ), καθώς και μέσω άλλων πρωτεϊνών όπως οι β-αρρεστίνες. Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών GPCRs και να βρεθούν ποιες βιολογικές διεργασίες και ασθένειες συσχετίζονται με αυτούς. Ένας άλλος στόχος ήταν η ενσωμάτωση δεδομένων για έκφραση σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους και πως στοχεύοντας τη μελέτη σε συγκεκριμένα κύτταρα μπορεί να βοηθήσει στη μελέτη της σηματοδότησης GPCR. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν: συλλογή μη οσφρητικών GPCR, αλληλεπιδράσεων GPCR – G α υπομονάδων και G α – τελεστών, ενσωμάτωση δεδομένων έκφρασης σε ιστούς/κυτταρικούς τύπους, οπτικοποίηση των σηματοδοτικών δικτύων, συσχέτιση των σηματοδοτικών μονοπατιών GPCR με βιολογικές διεργασίες και ασθένειες. Οι GPCRs του ανθρώπου και πληροφορίες για αυτούς συλλέχθηκαν από τη UniProtKB/SwissProt, υπήρχαν 830 GPCRs με 406 από αυτούς να μην είναι οσφρητικοί. Αλληλεπιδράσεις συλλέχθηκαν από τη Human-grDB, βάση δεδομένων για GPCRs του ανθρώπου, 1223 αλληλεπιδράσεις για GPCR – G α και 315 για G α – τελεστή. Δεδομένα έκφρασης σε κυτταρικούς τύπους συλλέχθηκαν από τον Human Protein Atlas, ήταν διαθέσιμα για 180/406 GPCRs, 15/17 G α και 61/75 τελεστές των G α . Το γενικό δίκτυο σηματοδότησης και τα ανά κυτταρικό τύπο δίκτυα οπτικοποιήθηκαν με το Cytoscape. Όροι γονιδιακής οντολογίας (GO) για βιολογικές διεργασίες που επέστρεψε η ανάλυση εμπλουτισμού όρων GO με το BinGO και όροι για ασθένειες από τη DisGeNET συσχετίστηκαν με GPCRs και τα σηματοδοτικά μονοπάτια τους. Το γενικό δίκτυο, και η πλειοψηφία των δικτύων κυτταρικών τύπων, ήταν περίπλοκα και συνδεδεμένα, με μεγάλο αριθμό των GPCR σηματοδοτικών μονοπατιών να αλληλεπικαλύπτονται είτε στο επίπεδο G-πρωτεϊνών ή σε αυτό των τελεστών. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών σε αυτά τα δίκτυα έχουν φαρμακολογικό ενδιαφέρον, αφού σχετίζονται με ασθένειες, όπως η επιληψία, ο υπερθυρεοειδισμός και η υπέρταση, και είναι στόχοι φαρμάκων. Ενσωμάτωση δεδομένων έκφρασης σε κυτταρικούς τύπους περιορίζει τον αριθμό

των διαθέσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών και μπορεί να έχει αποτέλεσμα GPCRs σε διαφορετικά κύτταρα να έχουν τελείως διαφορετικά μονοπάτια. Συμπερασματικά, σηματοδότηση GPCR ειδική ανά κύτταρο μπορεί να προκαλέσει απρόβλεπτα και ανεπιθύμητα αποτελέσματα λόγω μη στοχευμένης δράσης φαρμάκων. Επιπρόσθετα, ο υψηλός βαθμός αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών GPCR σημαίνει ότι διαταράσσοντας ένα GPCR μπορεί να επηρεαστεί η σηματοδότηση άλλων GPCR στο δίκτυο.

Abstract

G-protein coupled receptors (GPCRs) are one of the largest and most varied superfamilies of membrane receptors in eukaryotes. They play significant roles in major biological processes and physiological functions, such as hormonal regulation and vision. Due to their critical roles disruption of GPCR signaling can often cause diseases. They are a major pharmaceutical target with more than 30% of available drugs targeting GPCRs. Signal transduction by these receptors is mainly achieved via heterotrimeric G-proteins (subunits $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$), as well as via other protein such as β -arrestins. The aim of this work was to study the overlap amongst GPCR signaling pathways and to find which biological functions and diseases correlate with them. Another important goal was the integration of tissue and cell type data and how focusing on specific cells can assist the study of GPCR signaling. The methodology employed here was: retrieval of non olfactory GPCRs, GPCR – $G\alpha$ subunit and $G\alpha$ –effector interactions, incorporation of tissue/cell type expression data, visualization of signaling networks, correlation of signaling pathways with biological processes and diseases. Human GPCRs and information about them were collected from UniProtKB/SwissProt; there were 830 GPCRs with 406 of them being non olfactory. Interactions were retrieved from Human-gpDB, a database for human GPCRs, 1223 interactions for GPCR – $G\alpha$ and 315 for $G\alpha$ – effector. Cell type expression data were retrieved from the Human Protein Atlas, they were available for 180/406 GPCRs, 15/17 $G\alpha$ and 61/75 $G\alpha$ effectors. The general signaling network and cell type specific networks were visualized with Cytoscape. Gene ontology (GO) terms for biological processes that resulted from GO term enrichment with BinGO and disease terms from DisGeNET were associated with GPCRs and their signaling pathways. The general signaling network, and most cell type specific, was complex and connected, with a great number of GPCR signaling pathways overlapping either at the G-protein or the effector level. The majority of proteins in these networks are of pharmacological interest, as they are associated with diseases, such as epilepsy, hyperthyroidism and hypertension, and are drug targets. Integration of cell type expression data limits the number of available signaling pathways and can result in entirely different pathways for the same GPCR in different cells. In conclusion, cell specific GPCR signaling can cause unexpected and unwanted results from mistargeted drug action. In addition, the high degree of overlap between GPCR signaling pathways means that disrupting a GPCR can affect the signaling of other GPCRs in the network.

Περιεχόμενα

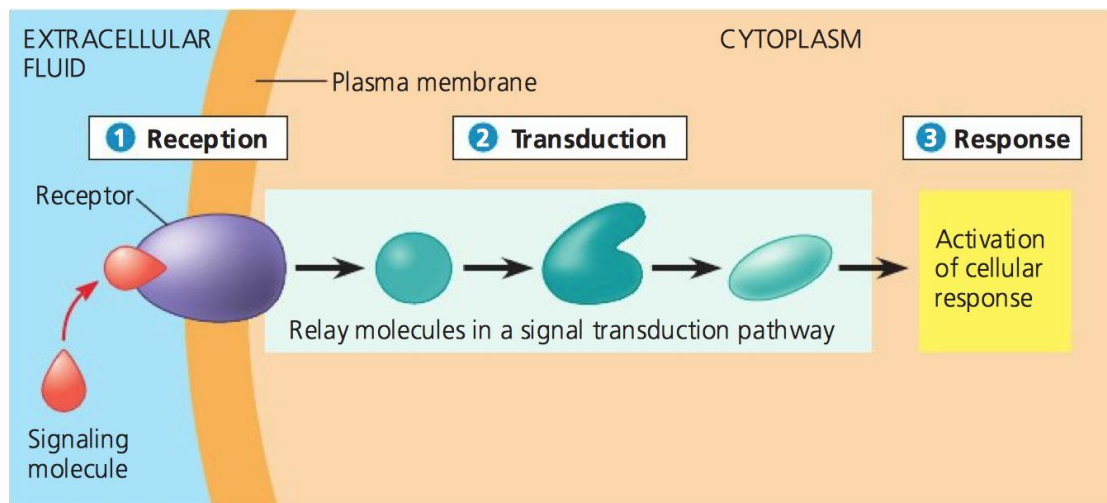
1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Μεταγωγή σήματος.....	1
1.1.1	Δίκτυα σηματοδότησης.....	4
1.1.2	Υποδοχείς.....	5
1.2	Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs).....	7
1.2.1	Εισαγωγή.....	7
1.2.2	Ταξινόμηση των GPCRs.....	9
1.2.3	Δομικά χαρακτηριστικά.....	11
1.2.4	Ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες.....	13
1.2.5	Κύκλος ενεργοποίησης των GPCRs.....	18
1.2.6	Αίτια πολυπλοκότητας σηματοδότησης GPCR.....	20
2	Σκοπός.....	25
3	Υλικά και μέθοδοι.....	27
3.1	Μεθοδολογία.....	27
3.2	Συλλογή των GPCRs.....	27
3.3	Σηματοδότηση μέσω των G-πρωτεϊνών.....	28
3.4	Σηματοδότηση μέσω άλλων πρωτεϊνών.....	32
3.5	Ολιγομερισμός GPCRs.....	33
3.6	Εύρεση δεδομένων έκφρασης σε ιστούς.....	34
3.7	Οπτικοποίηση δικτύων.....	35
3.8	Ανάλυση εμπλουτισμού με όρους γονιδιακής οντολογίας.....	35
3.9	Συσχέτιση πρωτεϊνών με ασθένειες και φάρμακα.....	38
4	Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	39
4.1	Σύνολο δεδομένων.....	39
4.1.1	Πρωτεΐνες.....	39
4.1.2	Αλληλεπιδράσεις G-πρωτεϊνών με GPCRs.....	40
4.1.3	Αλληλεπιδράσεις G-πρωτεϊνών με τελεστές.....	41
4.1.4	Έκφραση πρωτεϊνών σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους.....	41

4.1.5	Συνοπτικός πίνακας δεδομένων	46
4.2	Δίκτυα	47
4.2.1	Συνολικό δίκτυο σηματοδότησης από Human-gpDB.....	47
4.2.2	Δίκτυα σηματοδότησης ανά κυτταρικό τύπο.....	48
4.3	Εξειδίκευση ζευγαριών GPCR – Γα ανά κυτταρικό τύπο	49
4.4	Εξειδίκευση ετεροδιμερών GPCR ανά κυτταρικό τύπο.....	51
4.5	Αλληλοεπικάλυψη σηματοδοτικών μονοπατιών διαφορετικών GPCRs ..	53
4.6	Ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας.....	56
4.7	Συσχέτιση με ασθένειες και φάρμακα.....	57
4.8	Παραδείγματα μελέτης.....	59
4.8.1	Μουσκαρινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης M3	59
4.8.2	Υποδοχέας θυρεοειδοτρόπου ορμόνης	62
4.8.3	Υποδοχέας ισταμίνης 1.....	64
4.8.4	β1-αδρενεργικός υποδοχέας.....	68
5	Συμπεράσματα.....	72
7	Βιβλιογραφία	75
8	Παράρτημα	82

1 Εισαγωγή

1.1 Μεταγωγή σήματος

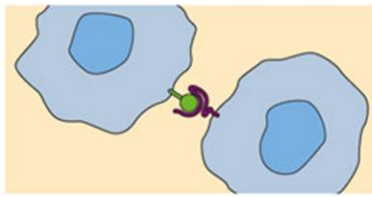
Κάθε κύτταρο βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με το περιβάλλον του. Το κύτταρο αντιλαμβάνεται αλλαγές στο περιβάλλον και ανταποκρίνεται σε αυτές με σκοπό την συνέχεια της ομαλής λειτουργίας του. Η διαδικασία μέσω της οποίας ένα κύτταρο δέχεται ένα μήνυμα και αποκρίνεται σε αυτό λέγεται μεταγωγή σήματος. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το σύστημα των πρωτεϊνών που διέπουν τη μεταγωγή σήματος είναι ιδιαίτερα περίπλοκο. (Kiel, et al., 2010)



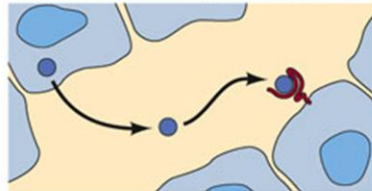
Εικόνα 1 Τα βασικά βήματα της μεταγωγής σήματος. (1) Αναγνώριση του σήματος. (2) Μεταγωγή προς το εσωτερικό του κυττάρου. (3) Απόκριση του κυττάρου στο σήμα. (Reece and Campbell, 2011)

Σε πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως είναι ο άνθρωπος, είναι απαραίτητος ο συντονισμός όλων των κυττάρων (Cooper and Hausman, 2007). Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός τα κύτταρα επικοινωνούν μέσω μηνυμάτων, συνήθως με τη μορφή χημικών μορίων. Αυτά τα μηνύματα μπορεί να προέρχονται από το ίδιο το κύτταρο, από γειτονικά κύτταρα ή από απομακρυσμένα. Στη παρακάτω εικόνα φαίνονται οι κύριες κατηγορίες ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, άμεσης επαφής, παρακρινής, αυτοκρινής και ενδοκρινής (Lodish, 2013).

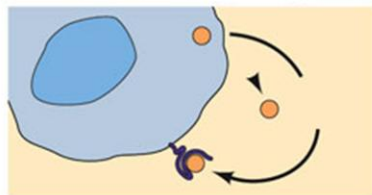
A) Άμεσης επαφής σηματοδότηση



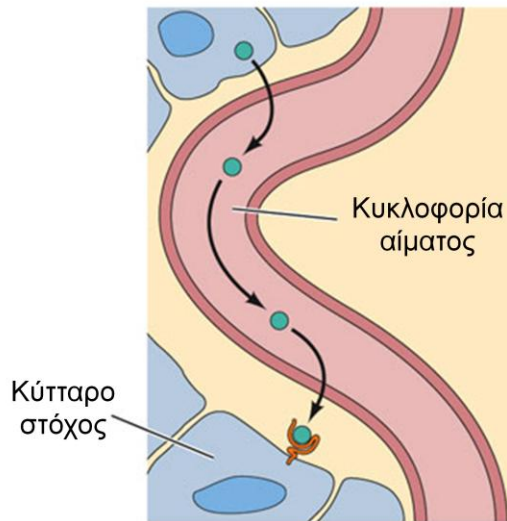
B) Παρακρινής σηματοδότηση



Γ) Αυτοκρινής σηματοδότηση




4) Ενδοκρινής σηματοδότηση



THE CELL, Fourth Edition, Figure 15.1 © 2005 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Εικόνα 2 Κατηγορίες ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Α) Άμεσης επαφής σηματοδότηση όπου απαιτείται η επαφή μεταξύ σηματοδοτικών μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των δύο κυττάρων. Β) Παρακρινής σηματοδότηση, το σήμα μεταφέρεται σε μόνο σε γειτονικά κύτταρα. Γ) Αυτοκρινής σηματοδότηση όπου το κύτταρο εκκρίνει σηματοδοτικά μόρια με στόχο το ίδιο το κύτταρο. Δ) Ενδοκρινής σηματοδότηση, λαμβάνει χώρο μεταξύ απομακρυσμένων κυττάρων μέσω των ορμονών που εκκρίνονται στη κυκλοφορία του αίματος. (Cooper and Hausman, 2007)

Η μεταγωγή σήματος αποτελείται από ορισμένα βασικά στοιχεία. Το πρώτο από αυτά περιλαμβάνει το σήμα, το οποίο είναι συνήθως ένα χημικό μόριο οπότε και ονομάζεται **υποκαταστάτης** ή προσδέτης (ligand). Υπάρχουν πολλές κατηγορίες σημάτων, που κυμαίνονται από μικρά μόρια και ιόντα ως μεγάλες στεροειδείς ορμόνες και πεπτιδία ή και σήματα μη χημικής μορφής όπως η ακτινοβολία (όραση) και η μηχανική πίεση. Το σήμα αυτό το λαμβάνει ένας **υποδοχέας** (receptor) που είναι πρωτεϊνικής φύσεως και βρίσκεται στην επιφάνεια ή το εσωτερικό του κυττάρου. Ο υποδοχέας θα ενεργοποιήσει ενδιάμεσες σηματοδοτικές πρωτεΐνες που θα μεταφέρουν στο σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτές οι πρωτεΐνες θα δράσουν με τη σειρά τους σε πρωτεΐνες **τελεστές** (effector). Στη διάρκεια αυτή τη διαδικασίας μπορεί να γίνει παραγωγή **δεύτερων διαβιβαστών** (second messengers) που είναι μικρά χημικά μόρια (π.χ. Ca^{2+} , cAMP) τα οποία θα μεταβάλουν τη λειτουργία πρωτεϊνών του κυττάρου και μπορούν να οδηγήσουν σε **ενίσχυση** (amplification) του σήματος. Το συνολικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας θα είναι η μεταβολή της λειτουργίας πρωτεϊνών του κυττάρου ή/και της έκφρασης γονιδίων, και θα αποτελέσει την απόκριση του κυττάρου.

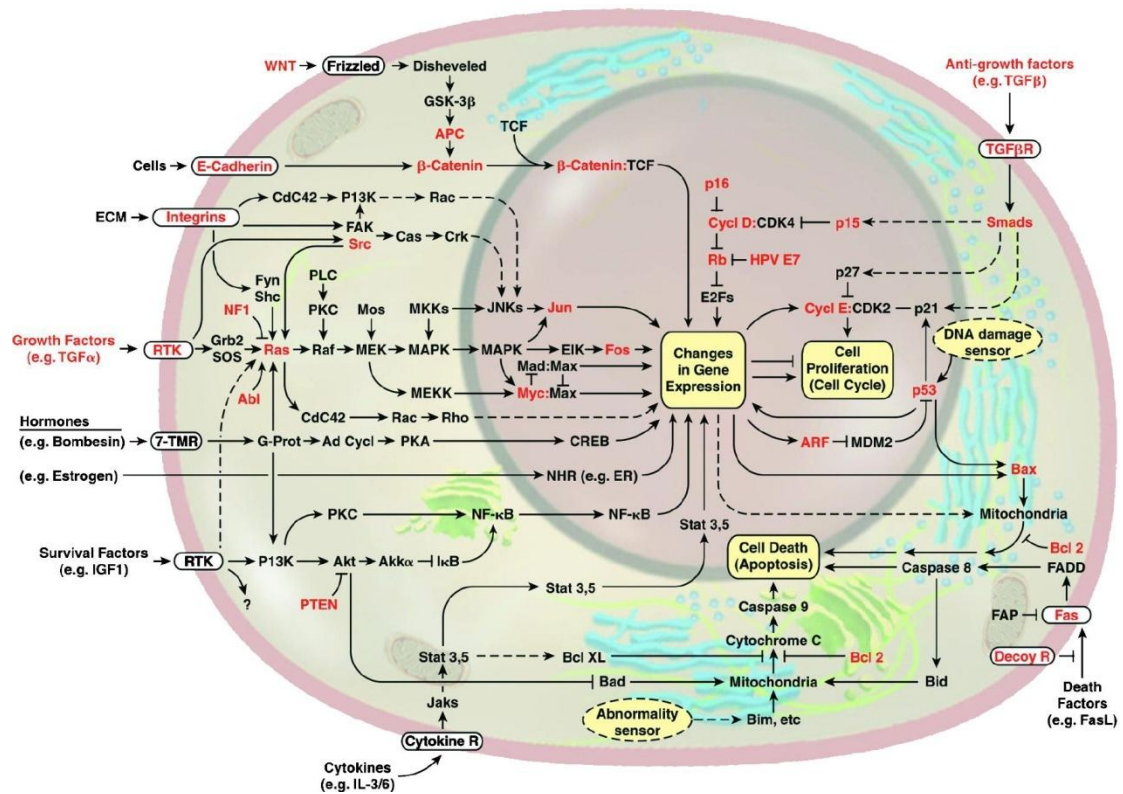
(a) Signaling pathway	(b) Number of molecules activated
RECEPTION Binding of epinephrine to G protein-linked receptor 	1 molecule
TRANSDUCTION Inactive G protein → Active G protein Inactive adenylyl cyclase → Active adenylyl cyclase ATP → Cyclic AMP Inactive protein kinase A → Active protein kinase A Inactive phosphorylase kinase → Active phosphorylase kinase Inactive glycogen phosphorylase → Active glycogen phosphorylase	10^2 molecules 10^2 molecules 10^4 molecules 10^4 molecules 10^5 molecules 10^6 molecules
RESPONSE Glycogen → Glucose-1-phosphate	10^8 molecules

© 2012 Pearson Education, Inc.

Εικόνα 3 Παραπάνω φαίνεται πως η ενίσχυση σήματος μπορεί να οδηγήσει σε μια ισχυρή κυτταρική απόκριση ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης ενός μόνο μορίου υποκαταστάτη. Αριστερά φαίνεται η μεταγωγή σήματος ως αποτέλεσμα της δέσμευσης ενός μορίου επινεφρίνης σε έναν υποδοχέα. Δεξιά είναι ο αριθμός των ενεργοποιημένων μορίων για το κάθε στάδιο. (Hardin, et al., 2012)

1.1.1 Δίκτυα σηματοδότησης

Συχνά τα σηματοδοτικά μονοπάτια διαφορετικών υποδοχέων περιέχουν κοινές σηματοδοτικές πρωτεΐνες ή μόρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλληλοεπικάλυψη τους και το σχηματισμό ενός δικτύου σηματοδότησης. Η επικοινωνία μεταξύ σηματοδοτικών μονοπατιών συμβαίνει συχνά στα θηλαστικά και μπορεί να γίνεται μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών υποδοχέων (Jordan, et al., 2000). Τα δίκτυα αυτά είναι συχνά μεγάλα και περίπλοκα, αποτελούνται από διαφορετικές οντότητες που αλληλεπιδρούν και μπορεί να απαιτούνται υπολογιστικές μέθοδοι για τη μελέτη τους (Eungdamrong and Iyengar, 2004).



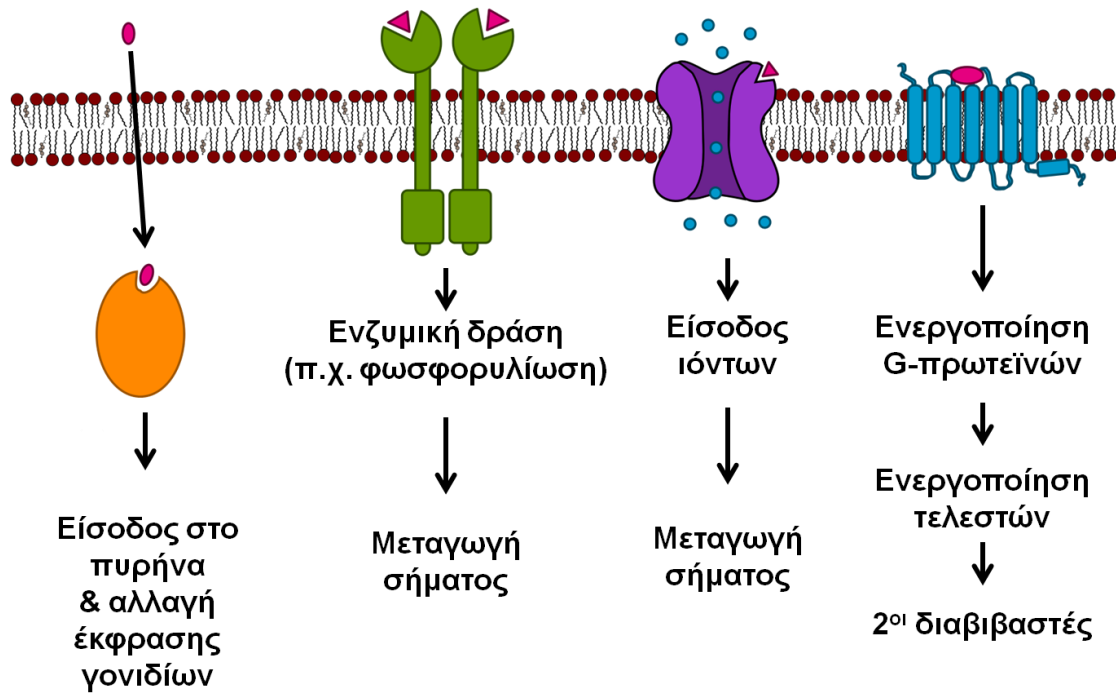
Εικόνα 4 Δίκτυο σηματοδότησης με τους πιο κύριους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος σε θηλαστικά. (Hanahan and Weinberg, 2000)

1.1.2 Υποδοχείς

Πρωταρχικό ρόλο στη σηματοδότηση έχουν οι υποδοχείς. Το ποια σήματα μπορεί να λάβει ένα κύτταρο, και εν μέρει το πώς θα αποκριθεί σε αυτά, εξαρτάται από το είδος των υποδοχέων που έχει ένα κύτταρο. Οι υποδοχείς χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη θέση τους στο κύτταρο, τους **ενδοκυτταρικούς** και του **επιφανειακού** υποδοχείς. Οι ενδοκυτταρικοί (κυτταροπλασματικοί ή πυρηνικοί) υποδοχείς είναι σφαιρικές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες στο εσωτερικό του κυττάρου και δέχονται μηνύματα τα οποία εισέρχονται μέσα στο κύτταρο. Τέτοια μηνύματα μπορεί να είναι μικρά λιπόφιλα μόρια τα οποία διαπερνούν ελεύθερα τη μεμβράνη, για παράδειγμα οι στεροειδείς ορμόνες. Μετά την ενεργοποίησή τους οι ενδοκυτταρικοί υποδοχείς συνήθως δρουν μεταβάλλοντας την έκφραση γονιδίων - στόχων. (Raven and Johnson, 2002)

Οι επιφανειακοί υποδοχείς βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου (κυτταρική μεμβράνη) και είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, δηλαδή πρωτεΐνες που διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστοιβάδα μία ή περισσότερες φορές. Ενεργοποιούνται από ποικιλία εξωκυττάρων σηματοδοτικών μορίων τα οποία δεν εισέρχονται στο κύτταρο. Οι επιφανειακοί υποδοχείς, ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους, χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες (Raven and Johnson, 2002):

- **Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς** (G-Protein Coupled Receptors - GPCRs): υποδοχείς που δρουν μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών.
- **Υποδοχείς με ενζυμική ενεργότητα**: αποτελούνται από το εξωκυττάριο τμήμα που προσδένει τον υποκαταστάτη και το ενδοκυττάριο τμήμα που έχει ενζυμική λειτουργία, συνήθως κινάσης, με τη καταλυτική ενεργότητα του να εξαρτάται από τη πρόσδεση του υποκαταστάτη.
- **Υποδοχείς-κανάλια ιόντων**: ιοντικά κανάλια με θέση αναγνώρισης υποκαταστατών. Πρόσδεση του υποκαταστάτη στο εξωκυττάριο τμήμα οδηγεί στο άνοιγμα ή το κλείσιμο του καναλιού, επιτρέποντας την είσοδο ή έξοδο ιόντων και με αποτέλεσμα την αλλαγή της συγκέντρωσης αυτών των ιόντων στο κύτταρο.



Εικόνα 5 Κατηγορίες υποδοχέων από αριστερά προς τα δεξιά: κυτταροπλασματικοί υποδοχείς, υποδοχείς με ενζυμική ενεργότητα, υποδοχείς κανάλια ιόντων και GPCRs.

1.2 Συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς (GPCRs)

1.2.1 Εισαγωγή

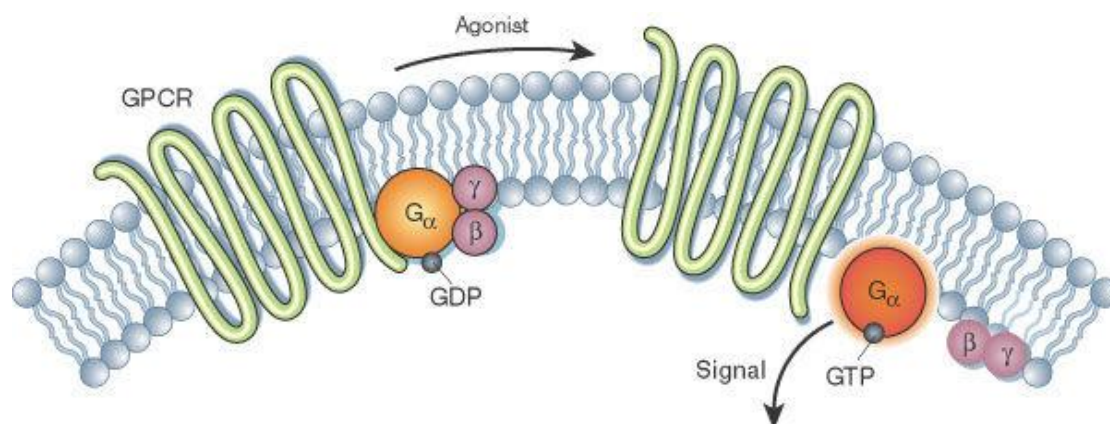
Η υπεροικογένεια των GPCRs είναι μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεμβρανικών υποδοχέων ευκαρυωτικών οργανισμών. Είναι μία ποικιλόμορφη οικογένεια πρωτεϊνών που παίζει κύριο ρόλο στη μεταγωγή σήματος ως υποδοχείς εξωκυττάριων σημάτων. Βρίσκονται σε πληθώρα οργανισμών, όπως θηλαστικά, μύκητες, ασπόνδυλα και φυτά (de Mendoza, et al., 2014). Όπως υποδηλώνει και το όνομα τους, ο τυπικός τρόπος λειτουργίας τους είναι μέσω των G-πρωτεϊνών.

Στον άνθρωπο υπάρχουν περισσότεροι από 800 GPCRs, με τους μισούς να είναι οσφρητικοί υποδοχείς (Cvacek, et al., 2016). Είναι υπεύθυνοι για σημαντικές βιολογικές διεργασίες και φυσιολογικές λειτουργίες. Συμμετέχουν στην αντίληψη αισθήσεων όπως η όραση (Feuda, et al., 2012), η όσφρηση (Glusman, et al., 2001) και η γεύση (Cygankiewicz, et al., 2014). Άλλες κύριες λειτουργίες που ρυθμίζονται από GPCRs είναι η νευροδιαβίβαση (Feuda, et al., 2012), η ορμονική ρύθμιση (Kleinau, et al., 2016) και η ανοσολογική απόκριση (Sun and Ye, 2012). Τα σήματα που αναγνωρίζουν οι GPCRs ποικίλουν, είναι ιόντα, αμινοξέα, πεπτιδία, πρωτεΐνες, φωτόνια, κ.α.. Για ορισμένους GPCRs δεν είναι ακόμα γνωστοί οι υποκαταστάτες που προσδένουν και οι λειτουργίες που ρυθμίζουν, και χαρακτηρίζονται ως ορφανοί (orphan GPCRs).

Οι GPCRs έχουν ιδιαίτερη φαρμακολογική και ιατρική αξία. Σχετίζονται με πολλές ασθένειες όπως είναι η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Retinitis pigmentosa), το άσθμα, ασθένεια Grave's, η οικογενής υπερασβεστιαμία (Familial hypocalciuric hypercalcemia - FHH) (Thompson, et al., 2014) κλπ. Το γεγονός ότι σχετίζονται με τόσες ασθένειες και ρυθμίζουν πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες εξηγεί το ότι είναι σημαντικοί στόχοι φαρμάκων. Μάλιστα πάνω από το 30% των υπαρχόντων φαρμάκων στοχεύουν σε GPCRs (Santos, et al., 2017). Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά στοχεύουν σε ορισμένους GPCRs, αφήνοντας αρκετούς άλλους GPCRs, μερικούς από αυτούς ορφανούς, ανεξερεύνητους από φαρμακολογική άποψη (Lagerstrom and Schioth, 2008).

Ο τυπικός τρόπος σηματοδότησης των GPCRs είναι μέσω των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών, που αποτελούνται από τις G_α, G_β και G_γ υπομονάδες. Πρόσδεση του υποκαταστάτη στο εξωκυττάριο τμήμα του GPCR το καθιστά ενεργό. Αυτός είναι πλέον ικανός να ενεργοποιήσει τις G-πρωτεΐνες επάγοντας την ανταλλαγή του GDP με GTP από τη G_α υπομονάδα. Η G_α υπομονάδα αποχωρίζεται από το

ετεροδιμερές Gβγ, και η Gα και το Gβγ δρουν πάνω σε πρωτεΐνες τελεστές. Το σήμα τερματίζεται όταν η Gα υπομονάδα υδρολύσει το προσδεμένο GTP σε GDP, με την εγγενή ενεργότητα GTPάσης της. (Oldham and Hamm, 2008)



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών από έναν GPCR. (Li, et al., 2002)

Η θέση των GPCRs στο κύτταρο είναι κανονικά στη κυτταρική μεμβράνη, είναι πλέον όμως γνωστό ότι βρίσκονται λειτουργικοί GPCRs και σε άλλες θέσεις. Για την απευαισθητοποίηση των GPCR ενδοκυτταρώνονται και ενώ βρίσκονται στο ενδόσωμα μπορούν να συνεχίσουν να σηματοδοτούν (Irannejad and von Zastrow, 2014). Επίσης, πρόσφατα βρέθηκαν GPCRs στη πυρηνική μεμβράνη οι οποίοι φαίνεται να έχουν σημαντικούς ρόλους σε κυτταρικές διεργασίες (Cattaneo, et al., 2016). Είναι ακόμα πιθανό ορισμένοι GPCRs να βρίσκονται και στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Hebert-Chatelain, et al., 2016).

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μελών της ποικιλόμορφης οικογένειας των GPCRs είναι η τοπολογία τους. Διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη επτά φορές, με τα διαμεμβρανικά τμήματα να έχουν δομή α-έλικας, το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο και το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Λόγω αυτής της κοινής τοπολογίας, αλλά και επειδή υπάρχουν GPCRs που μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα των G-πρωτεϊνών, έχει προταθεί να χρησιμοποιείται η εναλλακτική ονομασία επτά διαμεμβρανικών υποδοχέων (seven transmembrane receptors – 7TM receptors). Παρόλα αυτά η ονομασία GPCR συνεχίζει να επικρατεί.

1.2.2 Ταξινόμηση των GPCRs

Έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες δημιουργίας ενός συστήματος ταξινόμησης των GPCRs βάσει της ομοιότητας αλληλουχίας, φυλογενετικών αναλύσεων, υποκαταστατών ή άλλων χαρακτηριστικών. Ένα από τα πρώτα συστήματα και το πιο διαδεδομένο είναι αυτό του Kolakowski. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην ομοιότητα της αλληλουχίας των GPCRs και χωρίζει τους GPCRs σπονδυλωτών και ασπόνδυλων σε 6 οικογένειες A-F (Kolakowski, 1994). Μόνο 4 από αυτές τις οικογένειες (A-C, F) εκπροσωπούνται στα μετάζωα.

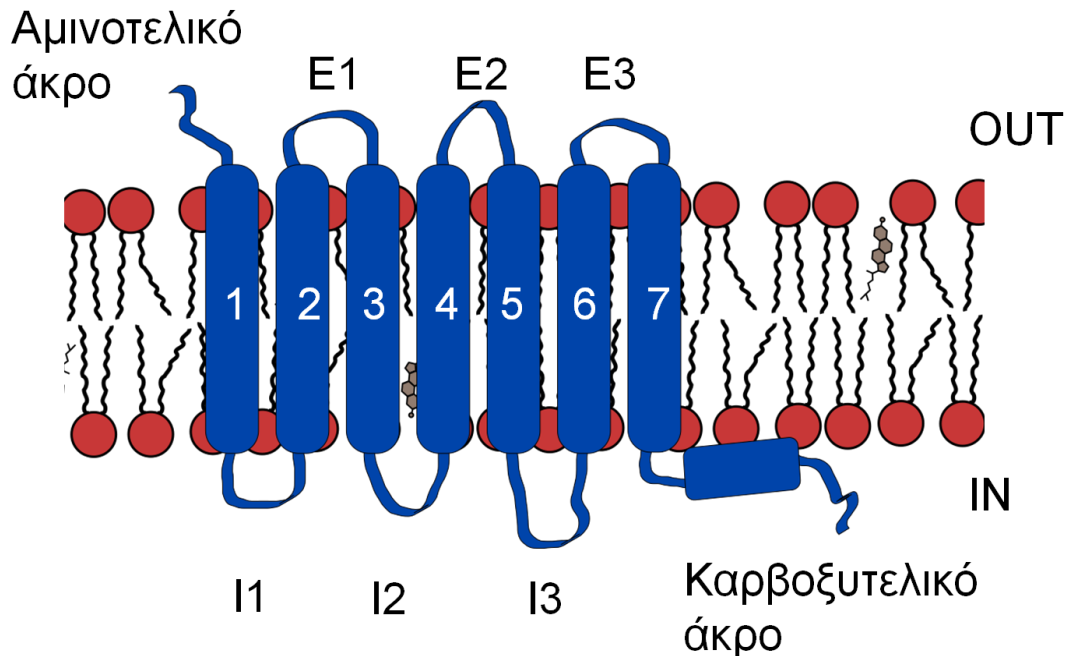
Αναλυτικά οι οικογένειες A-F περιλαμβάνουν τα εξής (Lagerstrom and Schioth, 2008):

- **Οικογένεια A ή 1:** Είναι η μεγαλύτερη οικογένεια των GPCRs με ~700 μέλη, περίπου 400 εκ των οποίων είναι οσφρητικοί υποδοχείς. Υποκαταστάτες υποδοχέων αυτής της οικογένειας είναι πεπτιδία, πρωτεΐνες, μικρές οργανικές ουσίες, νουκλεοτίδια και λιπίδια. Είναι μία ποικιλόμορφη οικογένεια με κοινό χαρακτηριστικό μικρό αμινοτελικό άκρο. Παράδειγμα είναι οι υποδοχείς ροδοψίνης, αδρενεργικοί, κανναβιδοειδείς, οπιοειδείς.
- **Οικογένεια B ή 2:** Αποτελείται από δύο ξεχωριστές ομάδες, υποδοχείς που ομοιάζουν του υποδοχέα της σεκρετίνης και τους υποδοχείς προσκόλλησης. Η πρώτη ομάδα αφορά υποδοχείς πεπτιδικών ορμονών, όπως οι υποδοχείς σεκρετίνης, καλσιτονίνης και γλουκαγόνου. Οι υποδοχείς προσκόλλησης έχουν τεράστια αμινοτελικά άκρα που μπορούν να περιέχουν πολλές αυτοτελείς δομικές περιοχές, ενώ πολλοί από αυτούς είναι ορφανοί.
- **Οικογένεια C ή 3:** Περιέχει υποδοχείς για αμινοξέα, κατιόντα, καθώς και υποδοχείς γεύσης τύπου 1. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ορισμένων από αυτούς τους υποδοχείς είναι μεγάλο αμινοτελικό άκρο με αυτοτελή δομική περιοχή σχήματος σαν Διωναία η μυγοπαγίδα (Venus Flytrap). Μέλη της είναι οι υποδοχείς για γλουταμικό, ασβέστιο, γ-αμινοβουτυρικό οξύ, κ.α..
- **Οικογένεια D ή 4:** Υποδοχείς φερομόνων στου μύκητες.
- **Οικογένεια E ή 5:** Υποδοχείς κυκλικού AMP (cAMP) στα είδη του πρωτόζωου *Dictyostelium*.
- **Οικογένεια F ή 6:** Συγκροτείται από 10 Frizzled και έναν Smoothened υποδοχείς. Υποκαταστάτες των Frizzled είναι πρωτεΐνες Wnt, ενώ η σηματοδότηση τους πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται κυρίως ανεξάρτητα των G-πρωτεϊνών.

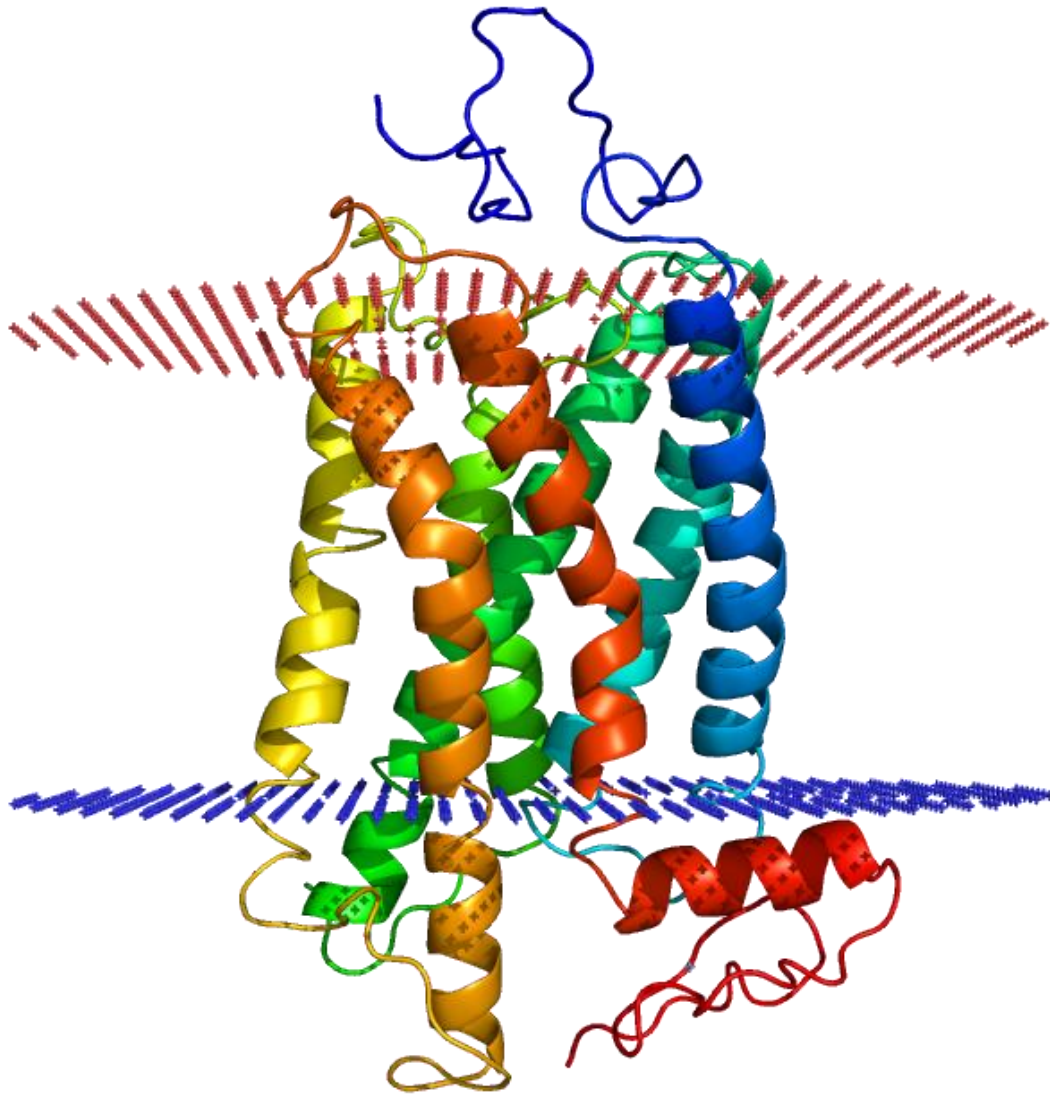
Πιο πρόσφατα οι Fredriksson *et al* έκαναν φυλογενετικές αναλύσεις στους GPCRs του ανθρώπου και δημιούργησαν το σύστημα ταξινόμησης GRAFS (Fredriksson, *et al.*, 2003), το οποίο μετά επεκτάθηκε στα αμφίπλευρα (bilateria) (Fredriksson and Schioth, 2005). Το σύστημα GRAFS χωρίζει τους GPCRs σε 5 οικογένειες οι οποίες ονομάζονται σύμφωνα με χαρακτηριστικούς υποδοχείς τους, τις Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2 και Secretin. Η οικογένεια της Ροδοψίνης (Rhodopsin) αντιστοιχεί στην A ή 1, οι οικογένειες Σεκρετίνης (Secretin) και Προσκόλλησης (Adhesion) στην B ή 2 και η οικογένεια Γλουταμικού (Glutamate) στην C ή 3. Η οικογένεια Frizzled/Taste2 περιέχει τους υποδοχείς της οικογένειας F ή 6 και τους υποδοχείς γεύσης τύπου 2 που δεν ήταν γνωστοί όταν δημιουργήθηκε το σύστημα του Kolakowski. Αν και αρχικά οι υποδοχείς γεύσης 2 τοποθετήθηκαν στην οικογένεια των Frizzled (Fredriksson, *et al.*, 2003), πιο πρόσφατες ενδείξεις τους τοποθετούν στην οικογένεια Ροδοψίνης/A (Alexander, *et al.*, 2015; Nordstrom, *et al.*, 2011).

1.2.3 Δομικά χαρακτηριστικά

Όλοι οι GPCRs αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικά τμήματα δομής α-έλικας, τα οποία συνδέονται με 3 εξωκυττάριους και 3 ενδοκυττάριους βρόχους. Το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο ενώ το καρβοξυτελικό άκρο στον ενδοκυττάριο. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει μια 8η α-έλικα στο καρβοξυτελικό άκρο που είναι παράλληλη στο επίπεδο της μεμβράνης (Sensoy and Weinstein, 2015). Η τοπολογία αυτή επιβεβαιώνεται από τις κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές GPCRs. Τη τελευταία δεκαετία έχει γίνει εκρηκτική αύξηση των κρυσταλλογραφικά λυμένων δομών GPCR λόγω της προόδου μεθοδολογιών (Ghosh, et al., 2015) και πλέον έχουμε τουλάχιστον μία δομή υποδοχέα και για τις τέσσερις οικογένειες GPCRs των μεταζώων (A, B, C και F).



Εικόνα 7 Απλό διάγραμμα που δείχνει τη κύρια τοπολογία των GPCR. Ο GPCR (μπλε) αποτελείται από 7 διαμεμβρανικά τμήματα, 3 εξωκυττάριους και 3 ενδοκυττάριους βρόχους. Το αμινοτελικό του άκρο βρίσκεται εκτός του κυττάρου, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο εντός του κυττάρου.

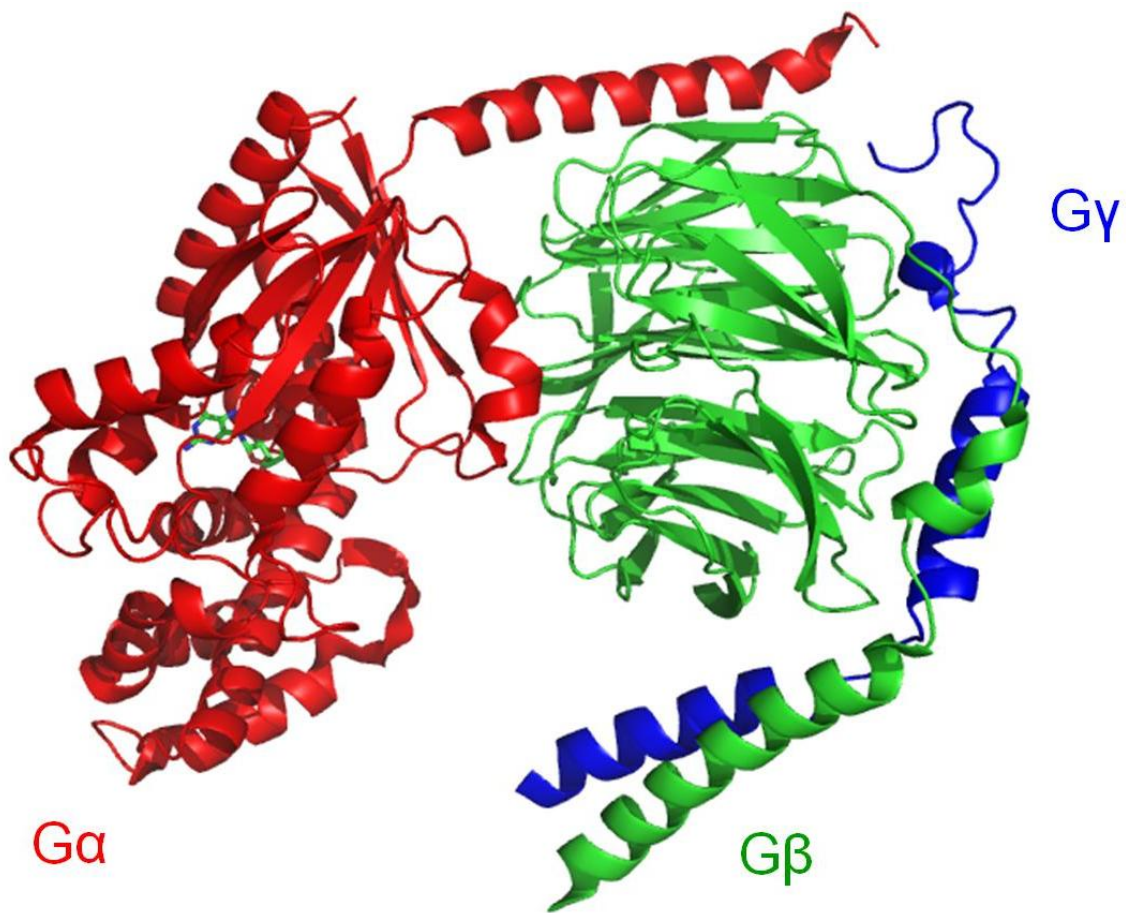


Εικόνα 8 Αναπαράσταση της κρυσταλλογραφικά λυμένης δομής της ροδοψίνης του βοδιού (PDB ID: 1U19) με χρήση του προγράμματος μοριακών γραφικών PyMOL. Με κόκκινες και μπλε σφαίρες απεικονίζεται το εξωτερικό και εσωτερικό επίπεδο του υδρόφοβου πυρήνα της μεμβράνης αντίστοιχα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Orientations of Proteins in Membranes (OPM) (Lomize, et al., 2006).

Λειτουργικά μπορούμε να χωρίσουμε τους GPCRs σε δύο τμήματα. Το εξωκυττάριο, όπου γίνεται η πρόσδεση των υποκαταστατών από το αμινοτελικό άκρο, τους 3 βρόχους ή/και τα διαμεμβρανικά τμήματα και το ενδοκυττάριο τμήμα, που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες όπως οι G-πρωτεΐνες, οι β-αρρεστίνες και διάφοροι ρυθμιστές. Πρόσδεση του υποκαταστάτη στο εξωκυττάριο τμήμα θα οδηγήσει σε αλλαγή της στερεοδιάταξης του πακέτου των 7 διαμεμβρανικών α-ελίκων και επομένως και του ενδοκυτταρίου τμήματος (Kobilka, 2007).

1.2.4 Ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες

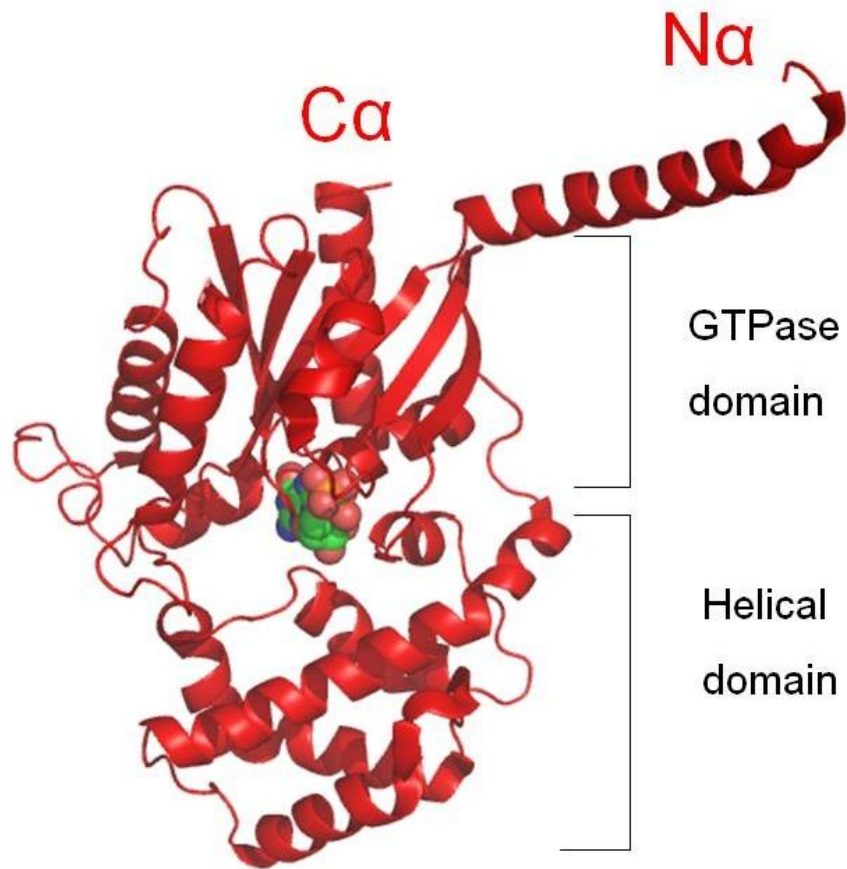
Η οικογένεια των G-πρωτεϊνών αποτελείται από τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες που είναι ενδιάμεσοι της μεταγωγής σήματος των GPCR και τις μικρές G-πρωτεΐνες ή μικρές GTPάσες (Kristiansen, 2004). Οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες τις $G\alpha$, $G\beta$ και $G\gamma$. Η $G\alpha$ υπομονάδα προσδένει GDP ή GTP και οι υπομονάδες $G\beta$ και $G\gamma$ βρίσκονται μόνιμα ως ετεροδιμερές. Όταν η $G\alpha$ έχει δεσμευμένο GDP έχει υψηλή συγγένεια για το $G\beta\gamma$, ανταλλαγή του GDP για GTP οδηγεί στον αποχωρισμό των $G\alpha$ και $G\beta\gamma$ και τις καθιστά ενεργές. Οι ενεργές G-πρωτεΐνες δρουν πάνω σε πρωτεΐνες τελεστές ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας τες, οδηγώντας στην απόκριση του κυττάρου στο σήμα.



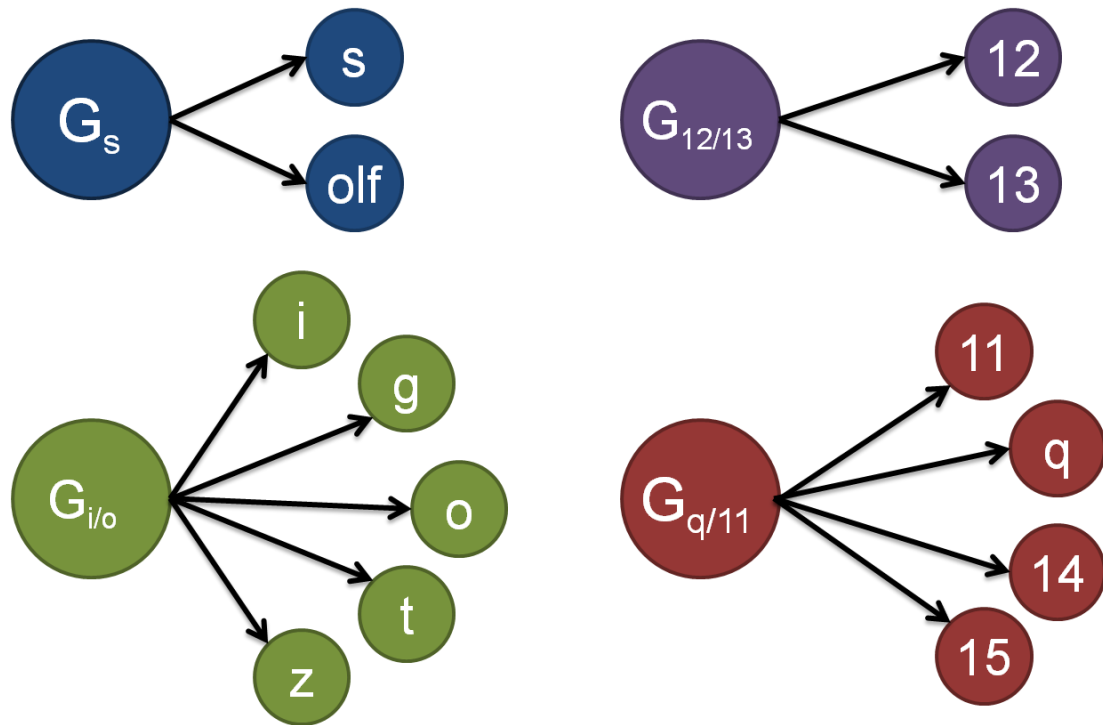
Εικόνα 9 Ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, με κόκκινο είναι η $G\alpha$ υπομονάδα, με πράσινο η $G\beta$ και με μπλε η $G\gamma$. PDB ID:1GP2

Στον άνθρωπο υπάρχουν 16 γονίδια που κωδικοποιούν για 17 $G\alpha$ πρωτεΐνες. Οι G-πρωτεΐνες χωρίζονται σε 4 οικογένειες ($G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, και $G\alpha_{12/13}$) σύμφωνα με ομοιότητα των $G\alpha$ υπομονάδων (Cabrerá-Vera, et al., 2003). Η $G\alpha$ υπομονάδα αποτελείται από δύο αυτοτελείς δομικές περιοχές, μία GTPάσης και μία ελικοειδής, και μία αμινοτελική έλικα (Lambright, et al., 1996). Η περιοχή GTPάσης είναι

υπεύθυνη για τη δέσμευση και την υδρόλυση του GTP, ενώ η ελικοειδής περιοχή θάβει το GTP στο πυρήνα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 10 Η Gα υπομονάδα αποτελείται από μία αμινοτελική α-έλικα (Na) , μια αυτοτελή δομική περιοχή GTPάσης και μια ελικοειδής περιοχή. Με χωροπληρωτικό μοντέλο ανάμεσα στις δύο περιοχές φαίνεται το δεσμευμένο μόριο GDP. PDB ID:1GP2



Εικόνα 11 Οι οικογένειες των G-πρωτεϊνών σύμφωνα με την ομοιότητα των Ga υπομονάδων. Με μεγάλους κόμβους είναι οι οικογένειες και με μικρούς οι υπο-οικογένειες.

Περιγραφή των οικογενειών των Ga (Wettschureck and Offermanns, 2005):

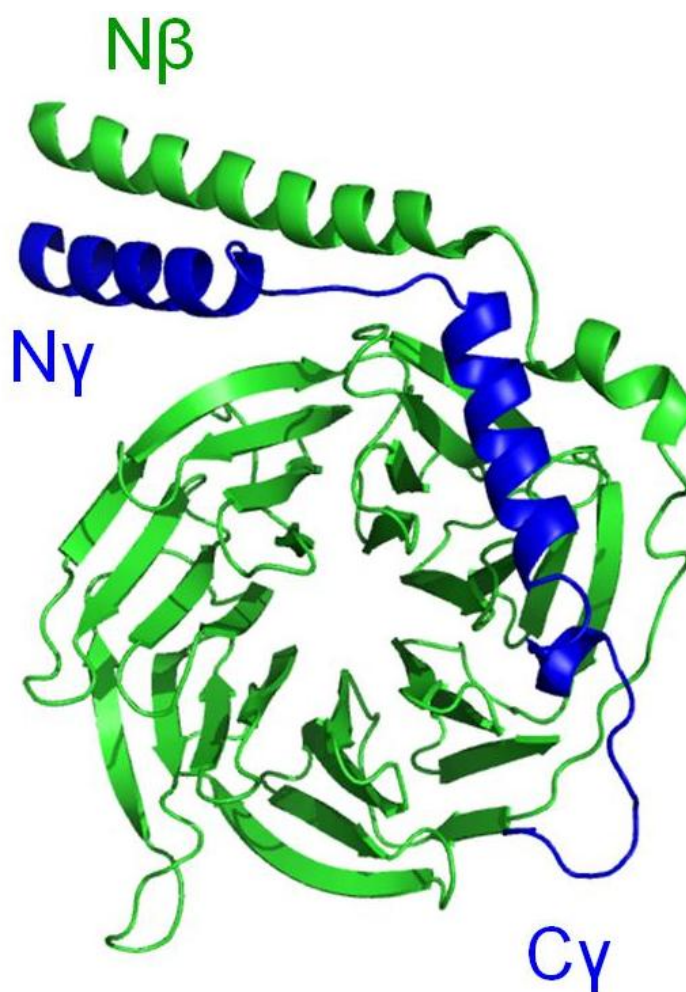
G_{i/o}: Αποτελείται από τις πρωτεΐνες G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G_o, G_{t1}, G_{t2}, G_g και G_z. Οι G_i αναστέλλουν αδενυλικές κυκλάσες. Οι G_t και G_g είναι αισθητήριες G-πρωτεΐνες και δρουν ενεργοποιώντας cGMP φωσφοδιεστεράσες, οι G_t βρίσκονται στα ραβδία και τα κωνία και μεταβιβάζουν το σήμα φωτοϋποδοχέων και η G_g συνδέεται με τους υποδοχείς γεύσης. Ενώ για τις G_o και G_z δεν είναι τελείως γνωστή η λειτουργία τους.

G_{αs}: Έχει τρία μέλη, τις G_{s1}, G_{s2} και G_{olf}. Οι G_{s1} και G_{s2} είναι εναλλακτικά προϊόντα του ίδιου γονιδίου και λειτουργούν ενεργοποιώντας αδενυλικές κυκλάσες. Η G_{olf}, αλλιώς οσφρητική G-πρωτεΐνη, είναι υπεύθυνη για τη μεταγωγή σήματος μέσω οσφρητικών υποδοχέων, η παρουσία της όμως σε μεγάλη ποσότητα σε ιστούς εκτός του οσφρητικού επιθήλιου είναι ισχυρή ένδειξη ότι έχει και άλλες λειτουργίες.

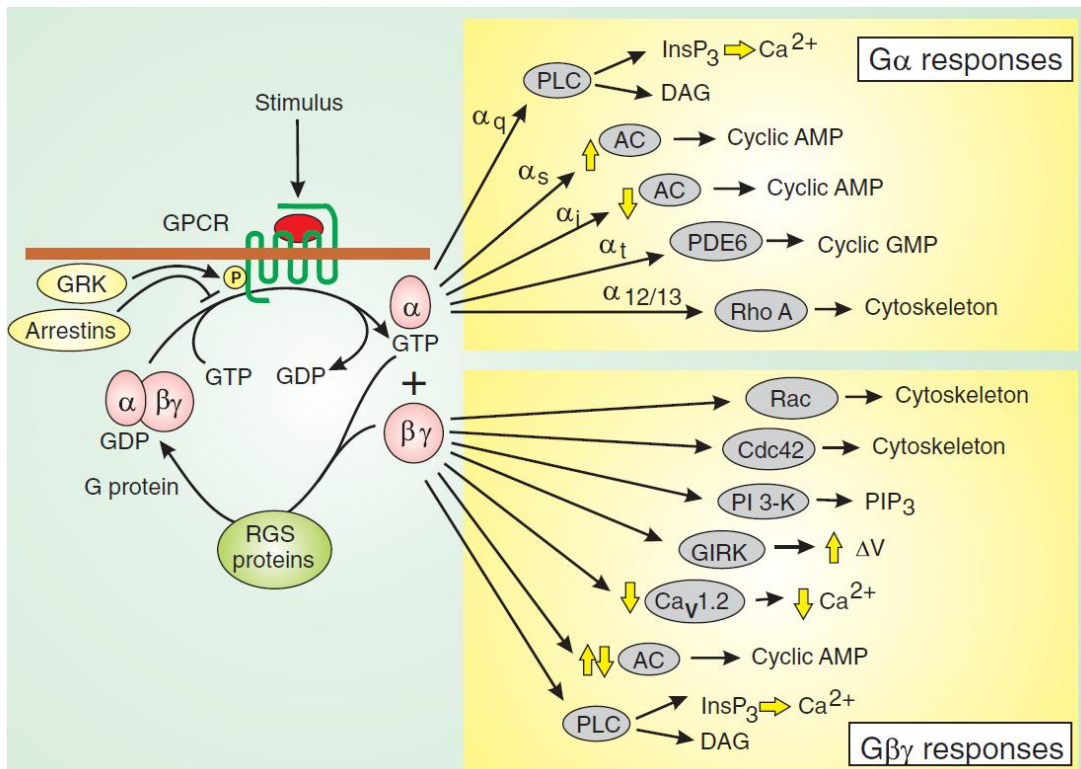
G_{αq/11}: Μέλη της είναι οι πρωτεΐνες G_q, G₁₁, G₁₄ και G_{15/16}. Οι G_q και G₁₁ εκφράζονται σε πολλούς ιστούς και ενεργοποιούν τις β-ισομορφές φωσφολιπάσης C. Οι G₁₄ και G_{15/16} έχουν πιο περιορισμένη έκφραση και δεν είναι απόλυτα κατανοητή η λειτουργία τους.

G_{α12/13}: Αποτελείται από τις πρωτεΐνες G₁₂ και G₁₃, οι οποίες ενεργοποιούν έμμεσα τη Rho πρωτεΐνη και επηρεάζουν στοιχεία του κυτταροσκελετού.

Αρχικά πιστεύονταν ότι το Gβγ παίζει υποστηρικτικό ρόλο στη Gα υπομονάδα, βρέθηκε όμως ότι το Gβγ συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος δρώντας σε διάφορους τελεστές (Smrcka, 2008). Υπάρχουν 7 Gβ και 12 Gγ υπομονάδες στον άνθρωπο, αυτές συνδυάζονται δημιουργώντας Gβγ με ξεχωριστές λειτουργίες (Dupre, et al., 2009). Η Gβ υπομονάδα αποτελείται από μία αμινοτελική α-έλικα και μία β-προπέλα 7 λεπίδων, αποτελούμενη από 7 επαναλήψεις WD40. Η Gγ υπομονάδα συγκροτείται από δύο α-έλικες, με τις αμινοτελικές α-έλικες των Gβ και Gγ να σχηματίζουν μια υπερέλικα α-ελίκων (Lambright, et al., 1996).



Εικόνα 12 Οι υπομονάδες Gβ (πράσινο) και Gγ (μπλε). Η Gβ αποτελείται από μία αμινοτελική α-έλικα και από μία β-προπέλα 7 λεπίδων, αποτελούμενη από 7 επαναλήψεις WD40. Η Gγ αποτελείται από δύο α-έλικες με την αμινοτελική α-έλικα να σχηματίζει υπερέλικα με την α-ελικά της Gβ. PDB ID:1GP2



Εικόνα 13 Στο αριστερό τμήμα της εικόνας φαίνεται συμπυκνωμένος ο κύκλος ενεργοποίησης των G-πρωτεϊνών από GPCR. Ενώ στο δεξιό τμήμα φαίνονται οι τελεστές των G-πρωτεϊνών και η δράση τους. (Berridge, 2014)

1.2.5 Κύκλος ενεργοποίησης των GPCRs

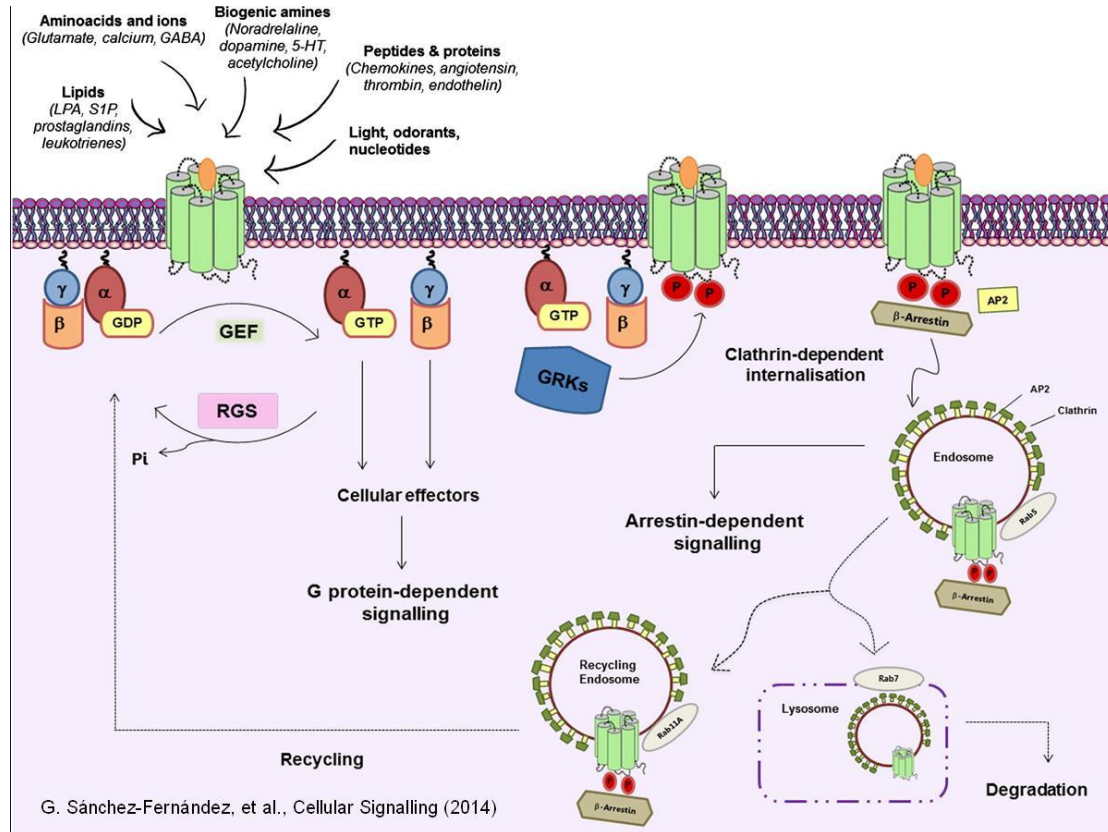
Η διαδικασία μέσω της οποίας ξεκινάει, διαδραματίζεται και τερματίζεται η μεταγωγή σήματος των GPCRs είναι περίπλοκη, ποικίλη και δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Για αυτό το λόγο παρακάτω περιγράφονται τα βασικά βήματα της κλασικής σηματοδότησης των GPCRs μέσω των G-πρωτεϊνών. Επίσης θα γίνει αναφορά σε μερικά από τα πιο κύρια στοιχεία που περιπλέκουν τη διαδικασία αυτή και σε ορισμένα αναπάντητα ακόμα ερωτήματα.

Η έναρξη γίνεται με τη πρόσδεση ενός υποκαταστάτη που θα ενεργοποιήσει τον GPCR. Θα γίνει αλλαγή στη στερεοδιάταξη του υποδοχέα λόγω αυτής της πρόσδεσης, που θα τον καταστήσει ικανό να προσδέσει και να ενεργοποιήσει G-πρωτεΐνες. Ο ενεργός υποδοχέας προωθεί την απελευθέρωση του GDP από τη Gα υπομονάδα, δηλαδή δρα ως ένας παράγοντας ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου γουανίνης (GEF – Guanine nucleotide Exchange Factor). Εξαιτίας της κατά αρκετές φορές μεγαλύτερης συγκέντρωσης του GTP σε σχέση με το GDP, ένα μόριο GTP θα προσδεθεί στην Gα υπομονάδα. Η πρόσδεση του GTP οδηγεί στη μείωση της συγγένειας της Gα υπομονάδας και του ετεροδιμερούς Gβγ και στον αποχωρισμό τους. Η Gα και το Gβγ είναι πλέον ελεύθερα να δράσουν πάνω σε διάφορους τελεστές. (Kristiansen, 2004)

Η σηματοδότηση των G-πρωτεϊνών θα συνεχιστεί ώσπου να δράσει η εγγενής ενεργότητα GTPάσης της Gα υπομονάδας και να υδρολύσει το GTP σε GDP. Η υδρόλυση του GTP μπορεί να επιταχυνθεί μέσω των πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τη δράση της GTPάσης (GAPs – GTPase Activating Protein). Πρωτεΐνες που δρουν σαν GAPs είναι ορισμένοι τελεστές των G-πρωτεϊνών και πρωτεΐνες ρυθμιστές της σηματοδότησης μέσω των G-πρωτεϊνών (RGS – Regulators of G-protein Signaling). Οι GAPs δεσμεύουν ενεργές Gα πρωτεΐνες και επιταχύνουν το ρυθμό υδρόλυσης του GTP ως και 2,000 φορές. (Ross and Wilkie, 2000)

Η διαδικασία μέσω της οποίας σταματάει η σηματοδότηση ενός ενεργού υποδοχέα ονομάζεται απευαισθητοποίηση. Ο ενεργοποιημένος GPCR είναι στόχος των κινασών των GPCR (GRK – G protein-coupled Receptor Kinases) που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης που βρίσκονται στο 3^ο ενδοκυττάριο βρόχο ή/και στο καρβοξυτελικό άκρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση των β-αρρεσινών που έχουν υψηλή συγγένεια για το φωσφορυλιωμένο υποδοχέα. Η β-αρρεσίνη πλέον εμποδίζει τη δέσμευση G-πρωτεϊνών και την σηματοδότηση μέσω αυτών. Το σύμπλοκο GPCR – β-αρρεσίνης θα εσωτερικευθεί συνήθως μέσω κλαθρινών. Υπάρχουν τρία πιθανά αποτελέσματα

της ενδοκύττωσης του υποδοχέα, α) θα ανακυκλωθεί, οπότε θα επιστρέψει στη κυτταρική μεμβράνη έτοιμος να δεχθεί νέο σήμα, β) θα οδηγηθεί στο λυσόσωμα για αποικοδόμηση και γ) η ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. (Reiter and Lefkowitz, 2006)



Εικόνα 14 Κύκλος ενεργοποίησης των GPCR. Οι GPCRs δέχονται πληθώρα μηνυμάτων που τους ενεργοποιούν. Ο ενεργός GPCR θα ενεργοποιήσει τις ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, ωθώντας την ανταλλαγή του GDP με GTP από τη Gα υπομονάδα οδηγώντας στον αποχωρισμό της από το Gβγ. Η Gα και το Gβγ θα δράσουν σε διάφορους τελεστές ώσπου η Gα υπομονάδα υδρολύσει το GTP σε GDP με χρήση της εγγενούς ενεργότητας GTPάσης της. Η διαδικασία αυτή επιταχύνεται από τις RGS πρωτεΐνες. Ο ενεργός GPCR είναι στόχος των κινασών GRK που φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα. Οι β-αρρεστίνες προσδένουν το φωσφορυλιωμένο υποδοχέα και οδηγούν στην ενδοκύττωση του. Όσο βρίσκεται στο ενδόσωμα ο GPCR σηματοδοτεί μέσω των β-αρρεστίνων. Ο υποδοχέας είτε θα ανακυκλωθεί επιστρέφοντας στη κυτταρική μεμβράνη ή θα οδηγηθεί στο λυσόσωμα όπου θα αποικοδομηθεί.

1.2.6 Αίτια πολυπλοκότητας σηματοδότησης GPCR

1.2.6.1 Ζευγάρια GPCR – G-πρωτεϊνών

Ένας GPCR που αλληλεπιδρά με και ενεργοποιεί μία G-πρωτεΐνη λέγεται ότι ζευγαρώνει (couples) με αυτή. Λόγω του περιορισμένου αριθμού τους είναι φανερό ότι η κάθε G-πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με πολλαπλούς GPCRs. Επίσης πολλοί GPCRs αλληλεπιδρούν με περισσότερες της μίας G-πρωτεΐνης, με ορισμένους μάλιστα να αλληλεπιδρούν με όλες τις οικογένειες G-πρωτεϊνών. (Hollmann, et al., 2005) Εκτός αυτού είναι γνωστή και η ύπαρξη πρωτεϊνών που δεν είναι GPCRs και δρουν σαν GEFs ενεργοποιώντας τις G-πρωτεΐνες (Sato, et al., 2006). Τίθεται λοιπόν το ερώτημα του πώς γίνεται η εξειδίκευση του σήματος ώστε να οδηγηθεί το κύτταρο στη συγκεκριμένη και κατάλληλη απόκριση.

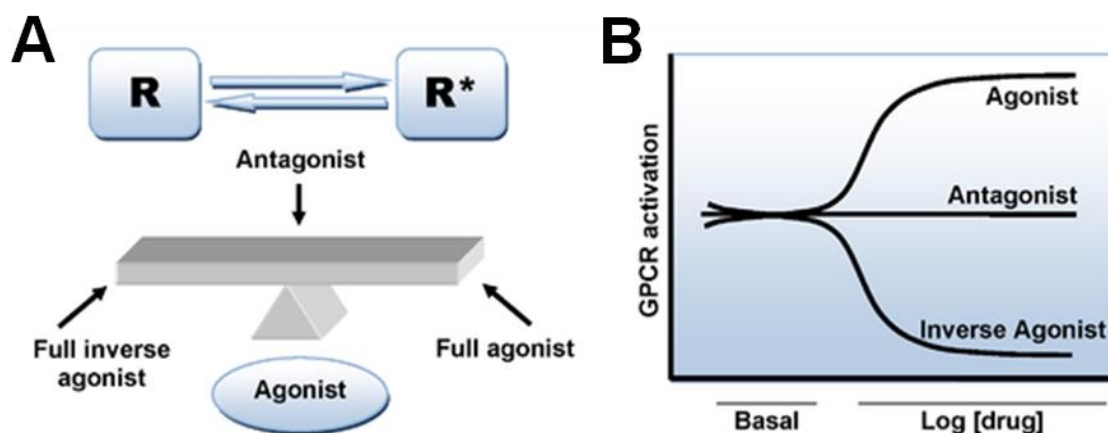
Ένα άλλο ζήτημα αφορά το αν γίνεται σχηματισμός ζευγαριού GPCR – G-πρωτεΐνης πριν τη πρόσδεση του υποκαταστάτη ή όχι. Το μοντέλο προσυγκρότησης (preassembly model) υποστηρίζει την αλληλεπίδραση του ανενεργού GPCR με τη G-πρωτεΐνη. Ενώ σύμφωνα με το μοντέλο σύγκρουσης (collision model) μόνο ένας ενεργός GPCR μπορεί να αλληλεπιδράσει με G-πρωτεΐνες. Υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν το κάθε μοντέλο. Φαίνεται ότι το πιο μοντέλο υπερισχύει εξαρτάται από το συγκεκριμένο ζευγάρι GPCR – G-πρωτεΐνης και πιθανώς να αποτελεί μηχανισμό ρύθμισης και εξειδίκευσης. (Ayoub, 2014)

1.2.6.2 Μοντέλα καταστάσεων των GPCRs

Η παραπάνω περιγραφή σηματοδότησης των GPCRs αντικατοπτρίζει το μοντέλο τριμερούς συμπλόκου (ternary complex) που πιστεύονταν αρχικά ότι ισχύει για τους GPCRs. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο ένας υποδοχέας πρέπει να έχει προσδέσει υποκαταστάτη για να μπορέσει να ενεργοποιήσει G-πρωτεΐνες, ενώ ένας GPCR που δεν έχει προσδέσει υποκαταστάτη θα είναι ανενεργός. Αυτό το μοντέλο δεν εξηγούσε όμως τη βασική ενεργότητα (constitutive/basal activity) που εμφανίζουν ορισμένοι GPCRs, την ικανότητα δηλαδή του υποδοχέα να ενεργοποιεί G-πρωτεΐνες ή άλλες πρωτεΐνες ακόμα και απουσία υποκαταστάτη. (Perez and Karnik, 2005)

Έτσι δημιουργήθηκε το μοντέλο δύο καταστάσεων/στερεοδιατάξεων, όπου ο GPCR βρίσκεται σε μία ισορροπία ανάμεσα σε δύο καταστάσεις/στερεοδιατάξεις την ενεργή και την ανενεργή. Οπότε ακόμα και απουσία υποκαταστάτη ένα μέρος του GPCR μπορεί να βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση. Ανάλογα με το πώς επιδρά σε αυτή την ισορροπία ο υποκαταστάτης ονομάζεται πλήρης αγωνιστής (full agonist) – σταθεροποιεί την ενεργή στερεοδιάταξη, ανταγωνιστής (antagonist) - δεν επηρεάζει την ισορροπία ή αντίστροφος αγωνιστής (inverse agonist) – σταθεροποιεί την

ανενεργή στερεοδιάταξη. Ούτε αυτό το μοντέλο όμως μπόρεσε να εξηγήσει όλα τα παρατηρηθέντα φαινόμενα. (Perez and Karnik, 2005)



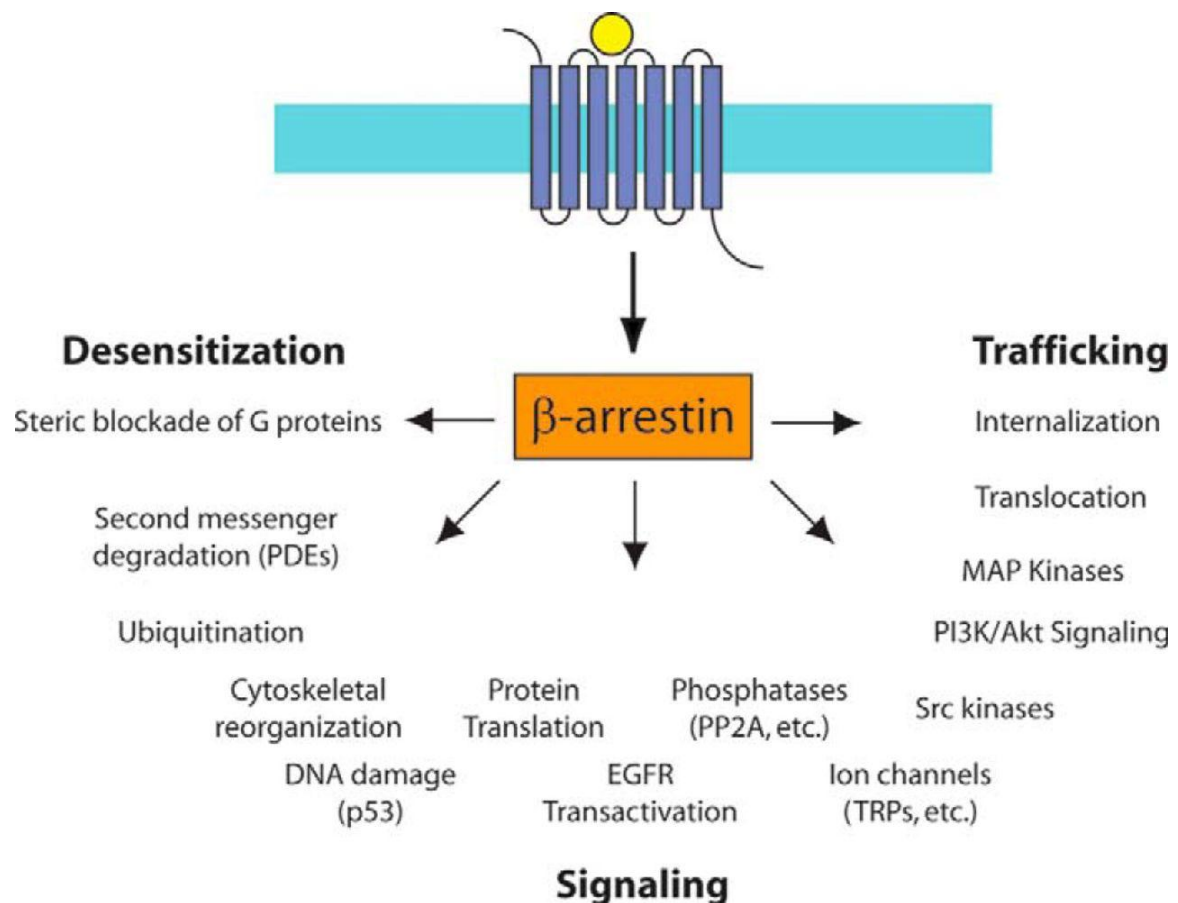
Εικόνα 15 Μοντέλο δύο καταστάσεων υποδοχέα. Α) Η ισορροπία μεταξύ της ενεργής και της ανενεργής κατάστασης του υποδοχέα και πως επηρεάζεται από την πρόσδεση διαφορετικών υποκαταστατών. Β) Ο κάθετος άξονας είναι η ενεργότητα του GPCR, αριστερά φαίνεται η βασική ενεργότητα και δεξιά πως μεταβάλλεται μετά την πρόσδεση υποκαταστατών.

Το μοντέλο δύο καταστάσεων δεν εξηγεί, για παράδειγμα, την ύπαρξη επιλεκτικών αγωνιστών. Πρόσδεση ενός τέτοιου υποκαταστάτη σε ένα GPCR που ζευγαρώνει με περισσότερες από μία G-πρωτεΐνες θα οδηγήσει στην σηματοδότηση κυρίως μέσω κάποιων εξ αυτών, ενεργοποιώντας την επιλεκτικά. Έχουν βρεθεί επίσης αγωνιστές που μπορούν να ενεργοποιούν επιλεκτικά μονοπάτια β-αρρεστινών έναντι αυτών των G-πρωτεϊνών, ή και το αντίστροφο. Με κάθε στοιχείο της σηματοδότησης των GPCRs που προσθέτουμε στο μοντέλο, αυτό γίνεται και πιο περίπλοκο. Τέλος, δεν υπάρχει κάποιο κοινά αποδεκτό μοντέλο που να εξηγήει όλες τις όψεις της σηματοδότησης των GPCRs. (Perez and Karnik, 2005)

1.2.6.3 Σηματοδότηση μέσω άλλων πρωτεϊνών

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη πληθώρας ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, εκτός των G-πρωτεϊνών, με τις οποίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν οι GPCRs. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι β-αρρεστίνες οι οποίες, εκτός από την ενδοκύττωση των GPCRs, είναι ικανές να βοηθήσουν στη σηματοδότηση GPCR από το εσωτερικό του κυττάρου. Πολλοί GPCRs περιέχουν την αυτοτελή δομική περιοχή PDZ στο καρβοξυτελικό τους άκρο, με την οποία μπορεί να δεσμεύουν διάφορες πρωτεΐνες ανεξάρτητα των G-πρωτεϊνών. Σε ορισμένες περιπτώσεις GPCRs μπορούν να ενεργοποιήσουν μικρές GTPάσες, πιθανώς με άμεση αλληλεπίδραση με αυτές. Ακόμα είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς Frizzled και Smoothed δρουν χωρίς να κάνουν χρήση G-πρωτεϊνών. (Marinissen and Gutkind, 2001)

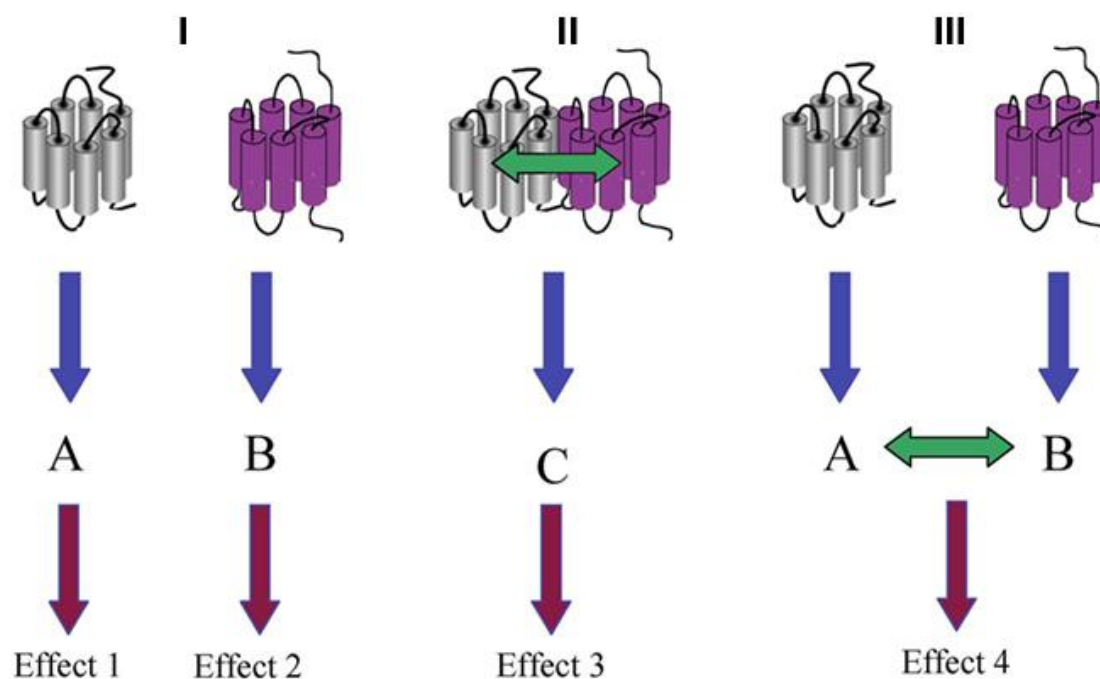
Η πιο καλά μελετημένη οδός σηματοδότησης των GPCRs ανεξάρτητα των G-πρωτεϊνών είναι αυτή μέσω των αρρεσινών. Οι αρρεσίνες είναι πρωτεΐνες-ικριώματα χωρίς κάποια καταλυτική ικανότητα, οι οποίες αυξάνουν την αποδοτικότητα της μεταφοράς πληροφορίας μεταξύ ενζύμων σε σηματοδοτικό καταρράκτη, μειώνουν την επικάλυψη διαφορετικών σηματοδοτικών καταρρακτών και στοχεύουν πρωτεΐνες για μετακίνηση. Οι αρρεσίνες που αλληλεπιδρούν με GPCRs είναι οι δύο οπτικές αρρεσίνες, που βρίσκονται στον αμφιβληστροειδή, και δύο β-αρρεσίνες. Οι β-αρρεσίνες αλληλεπιδρούν με πολλές πρωτεΐνες και ρυθμίζουν λειτουργίες όπως η κυτταρική επιβίωση, η χημειόταξη και λειτουργίες του νευρικού συστήματος. Πιο γνωστή είναι η δράση β-αρρεσινών μέσω του καταρράκτη ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινάσων (MAPKs - Mitogen-Activated Protein Kinases), όπου οι β-αρρεσίνες αλληλεπιδρούν με αυτές τις κινάσες και τις φέρνουν σε επαφή. (Peterson and Luttrell, 2017)



Εικόνα 16 Το φάσμα των λειτουργιών των β-αρρεσινών. (Smith and Rajagopal, 2016)

1.2.6.4 Ολιγομερισμός GPCRs

Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι οι GPCRs βρίσκονταν και λειτουργούσαν αποκλειστικά ως μονομερή. Είναι πλέον αποδεκτό ότι αυτό δεν ισχύει πάντα, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα υποδοχείς της οικογένειας C ή 3 που είναι λειτουργικοί μόνο ως διμερή. Υπάρχουν ενδείξεις για υποδοχείς της οικογένειας A ή 1 που να είναι λειτουργικά μονομερή, αλλά και ενδείξεις για ολιγομερισμό τους. (Ferre, et al., 2014) Ο ολιγομερισμός των GPCR μπορεί να δημιουργήσει νέες οντότητες με καινούργιες λειτουργίες και φαρμακολογικές ιδιότητες (Farran, 2017). Επομένως ο σχηματισμός των ομοιο- ή ετερο- διμερών και των μεγαλύτερης τάξης ολιγομερών των GPCRs πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τη μελέτη της σηματοδότησης τους, της συσχέτισης τους με ασθένειες και της δημιουργίας φαρμάκων.



Εικόνα 17 Αλληλεπίδραση μεταξύ GPCRs. I) Δύο GPCRs που δεν αλληλεπιδρούν και σηματοδοτούν ανεξάρτητα μεταξύ τους. II) Οι GPCRs βρίσκονται σε επαφή και σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές και έχουν κοινή επίδραση στο κύτταρο. III) Αν και οι GPCRs δεν είναι σε επαφή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους λειτουργικά, καθώς τα σηματοδοτικά μονοπάτια τους αλληλεπικαλύπτονται. (Kamal and Jockers, 2011)

1.2.6.5 Αλληλοεπικάλυψη σηματοδοτικών μονοπατιών GPCRs

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αλληλοεπικάλυψης (crosstalk) μεταξύ των διάφορων GPCRs. Ο πιο άμεσος είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων υποδοχέων (ολιγομερισμός) που μπορεί να επηρεάσει την μετακίνησή τους μέσα στο κύτταρο και τη λειτουργία τους. Το επόμενο επίπεδο είναι των G-πρωτεϊνών, δύο GPCRs μπορεί να ζευγαρώνουν με την ίδια G-πρωτεΐνη. Τέλος μπορούν στα σηματοδοτικά τους μονοπάτια να βρίσκονται κοινοί τελεστές. Η αλληλεπίδραση των

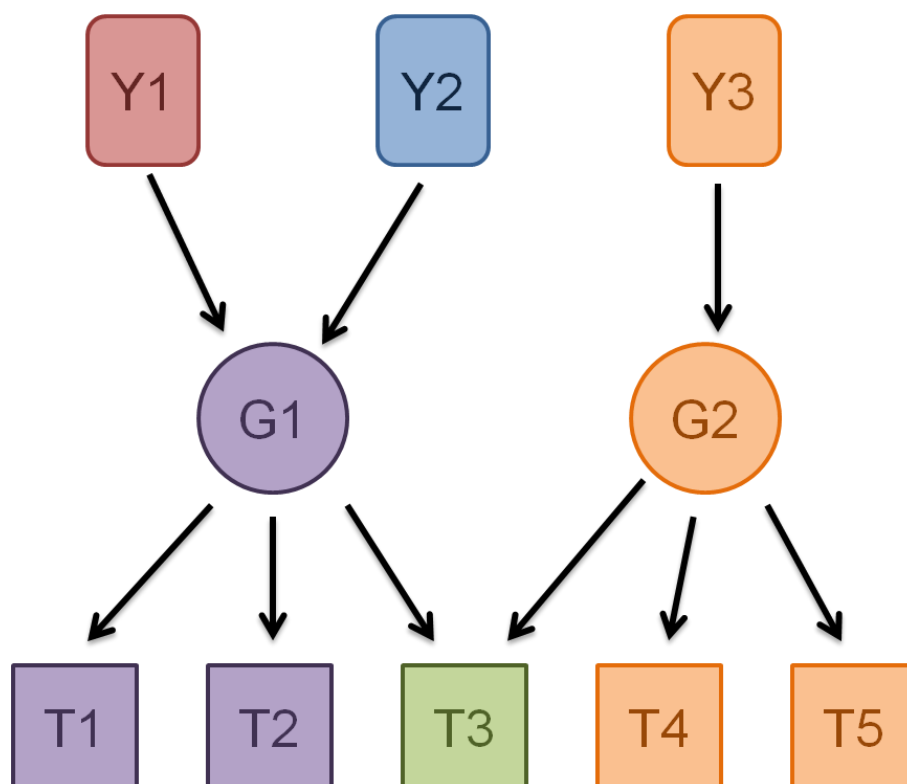
σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να είναι ανταγωνιστική ή συνεργατική. (Cordeaux and Hill, 2002)

Εκτός της αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των GPCRs, υπάρχει και το φαινόμενο επικάλυψης με τα σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων υποδοχέων. Το πιο μελετημένο παράδειγμα είναι αυτό της επικοινωνίας των σηματοδοτικών μονοπατιών των GPCRs και των υποδοχέων με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (RTK – Receptor Tyrosine Kinases). Αυτή γίνεται με διάφορους τρόπους, ενώ είναι δυνατή ακόμα και η ενεργοποίηση των RTK από τη σηματοδότηση ενός GPCR. Έτσι επιτυγχάνεται η ρύθμιση της απόκρισης ενός κυττάρου σε πολλαπλά σήματα και ο έλεγχος διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. (Natarajan and Berk, 2006)

2 Σκοπός

Ο κύριος στόχος αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των GPCRs, το πως αυτά αλληλεπικαλύπτονται και να οπτικοποιηθεί το δίκτυο σηματοδότησης των GPCR που δημιουργείται λόγω αυτής της αλληλοεπικάλυψης. Ακόμα, να γίνει η συσχέτιση αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών με όρους βιολογικής διεργασίας και ασθένειες. Τέλος να ερευνηθεί το πως μεταβάλλεται το δίκτυο σηματοδότησης των GPCR όταν λαμβάνεται υπόψη η διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνών σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους.

Διαφορετικοί GPCR δρουν μέσω της ίδιας G-πρωτεΐνης και διαφορετικές G-πρωτεΐνες μπορεί να ελέγχουν τον ίδιο τελεστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σηματοδοτικά μονοπάτια δύο GPCR να μπορούν να αλληλεπικαλύπτονται είτε στις G-πρωτεΐνες ή στους τελεστές. Έτσι δημιουργείται ένα δίκτυο όπου διαταραχή της σηματοδότησης ενός GPCR μπορεί να επηρεάσει και τους υπόλοιπους GPCR του δικτύου.



Εικόνα 18 Αλληλοεπικάλυψη σηματοδοτικών μονοπατιών GPCR. Οι υποδοχείς 1 και 2 ελέγχουν την ίδια G-πρωτεΐνη (1) και ως εκ τούτου τους ίδιους τελεστές (1-3). Άρα τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια αλληλεπικαλύπτονται αφού ελέγχουν την ίδια G-πρωτεΐνη. Ο υποδοχέας 3 δρα μέσω της G-πρωτεΐνης 2, οι άλλοι υποδοχείς δεν αλληλεπιδρούν με αυτή. Όμως και οι δύο G-πρωτεΐνες 1 και 2 ελέγχουν τον τελεστή 3, ως αποτέλεσμα το σηματοδοτικό μονοπάτι του Y3 αλληλεπικαλύπτεται με αυτά των Y1 και Y2 καθώς θα επιδράσουν πάνω σε ένα κοινό τελεστή.

Το γενικό δίκτυο σηματοδότησης που περιέχει όλα τα δυνατά μονοπάτια για το κάθε GPCR είναι χρήσιμο, αλλά όχι πραγματικό. Είναι γνωστό ότι σε κάθε κύτταρο

εκφράζεται μόνο ένα υποσύνολο των σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών δικτύων σηματοδότησης σε κάθε κύτταρο. Έτσι ένας GPCR μπορεί να σηματοδοτεί μέσω ξεχωριστών μονοπατιών σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Στη παρούσα εργασία έγινε συλλογή δεδομένων αλληλεπιδράσεων GPCR – G-πρωτεϊνών και G-πρωτεϊνών – τελεστών, για τη συγκρότηση του σηματοδοτικού δικτύου των GPCR μέσω των G-πρωτεϊνών. Μελετήθηκε το πως ο συνδυασμός του δικτύου αυτού με δεδομένα έκφρασης σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους, όρους βιολογικών διεργασιών και ασθενειών, μπορεί να βοηθήσει στη μελέτη των GPCRs. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται παρακάτω.

3 Υλικά και μέθοδοι

3.1 Μεθοδολογία

Κύρια βήματα:

- Συλλογή από τη UniProtKB/SwissProt όλων των ανθρώπινων GPCRs και αφαίρεση από το σύνολο όσων ήταν χαρακτηρισμένοι ως οσφρητικοί υποδοχείς.
- Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων με πληροφορίες για GPCRs για εύρεση ζευγαριών GPCR – G-πρωτεϊνών. Επιλέχθηκε η βάση δεδομένων Human-grDB που είχε πληροφορίες για αλληλεπιδράσεις GPCR – Gα και Gα – τελεστών σε επίπεδο Gα πρωτεΐνης.
- Οπτικοποίηση δεδομένων ως δίκτυο σηματοδότησης με το εργαλείο Cytoscape.
- Αναζήτηση για δεδομένα έκφρασης των πρωτεϊνών σε κυτταρικούς τύπους στο Human Protein Atlas. Σύμφωνα με τις πληροφορίες για τις θέσεις έκφρασης συγκροτήθηκαν δίκτυα σηματοδότησης για κάθε κυτταρικό τύπο.
- Ανάλυση εμπλουτισμού όρων γονιδιακής οντολογίας, για να γίνει η συσχέτιση με βιολογικές διεργασίες.
- Συσχέτιση των πρωτεϊνών με ασθένειες από τη DisGeNET και φάρμακα από τη DrugBank.

3.2 Συλλογή των GPCRs

Έγινε αναζήτηση στη βάση δεδομένων UniProtKB (The UniProt Consortium, 2017) για πρωτεΐνες του ανθρώπου χαρακτηρισμένες ως μέλη της οικογένεια «g protein coupled receptor» (KW-0297) και καλά σχολιασμένες (εγγραφές της SwissProt). Από τα αποτελέσματα αφαιρέθηκαν οι οσφρητικοί υποδοχείς, καθώς λόγω του μεγάλου αριθμού τους (>50% του συνόλου) και του ότι είναι φτωχά μελετημένοι θα δημιουργούσαν «θόρυβο». Από τις εγγραφές των πρωτεϊνών συλλέχθηκαν πληροφορίες, όπως είναι οι υποοικογένειες στις οποίες ανήκουν σύμφωνα με τη UniProtKB, όνομα γονιδίου, συσχετίσεις με φάρμακα και ασθένειες, κ.α.. Χρησιμοποιήθηκε η έκδοση της UniProtKB 2017_03.

3.3 Σηματοδότηση μέσω των G-πρωτεϊνών

Τρεις βάσεις δεδομένων βρέθηκαν να περιέχουν πληροφορία για το ζευγάρι GPCRs με G-πρωτεΐνες, η Reactome (Fabregat, et al., 2016), η GtoPdb (Southan, et al., 2016) και η Human-gpDB (Satagopam, et al., 2010). Οι πρώτες δύο ανανεώνονται σχετικά συχνά, ενώ η Human-gpDB δεν έχει ανανεωθεί από τη δημιουργία της το 2010. Παρόλο που και η GPCRdb (Isberg, et al., 2016) παρέχει πληροφορίες για το ζευγάρι GPCRs/G-πρωτεϊνών, δεν περιλαμβάνεται στη παραπάνω λίστα καθώς, όπως αναφέρει, χρησιμοποιεί τα δεδομένα από τη GtoPdb.

Όνομα	Διεύθυνση	Αναφορά	Περιεχόμενο
Human-gpDB	bioinformatics.biol.uoa.gr/human_gpdb schneider.embl.de	(Satagopam, et al., 2010)	Πληροφορίες για GPCRs, G-πρωτεΐνες και τελεστές του ανθρώπου.
Reactome	reactome.org	(Fabregat, et al., 2016)	Σχολιασμένα μονοπάτια μεταβολισμού, σηματοδότησης, κ.α..
GtoPdb	www.guidetopharmacology.org	(Southan, et al., 2016)	Πληροφορίες για πρωτεΐνες στόχους φαρμάκων.

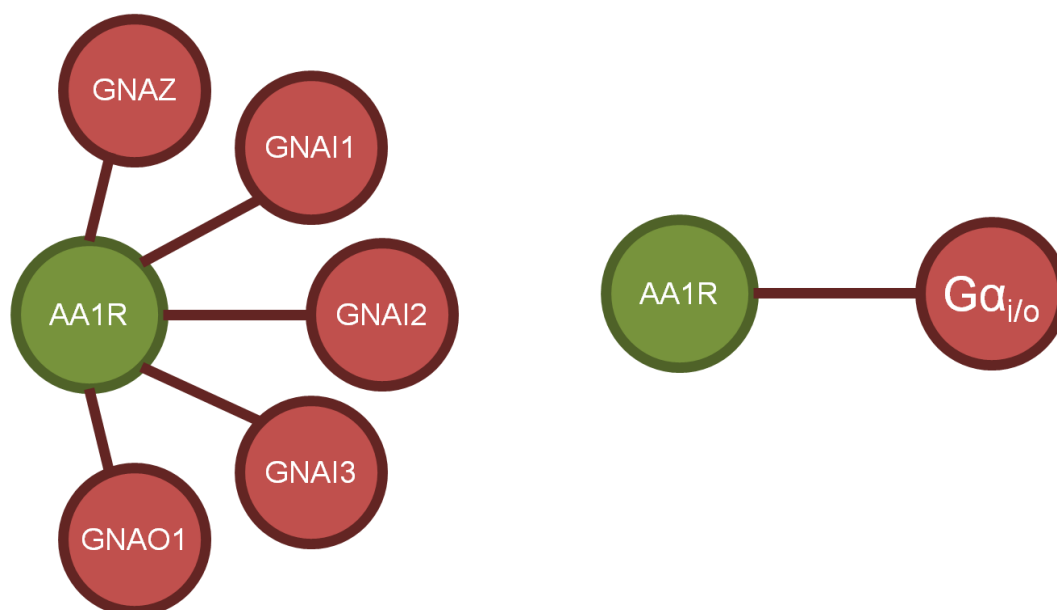
Η **Reactome** είναι μία βάση δεδομένων ανοιχτού κώδικα, ελεύθερης πρόσβασης, σχολιασμένων από έμπειρους βιολόγους και αξιολογημένων από κριτές μονοπάτια. Σκοπός της είναι να μετατρέψει τα πλούσια σε πληροφορίες διαγράμματα μονοπατιών που βρίσκουμε σε βιβλία και δημοσιεύσεις, σε λεπτομερή και υπολογιστικά προσβάσιμη μορφή. Παραδείγματα βιολογικών μονοπατιών στη Reactome, είναι μονοπάτια μεταβολισμού, σηματοδότησης, έμφυτης και επίκτητης ανοσίας, μεταγραφικής ρύθμισης, απόπτωσης και ασθένειας.

Η βάση δεδομένων **Guide to PHARMACOLOGY** (GtoPdb) είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας των The British Pharmacological Society (BPS) και International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). Σκοπός της δημιουργίας της ήταν να αποτελέσει μια κύρια και πλήρη δίοδο σε φαρμακολογικές πληροφορίες. Περιέχει πληροφορίες για στόχους φαρμάκων, όπως είναι οι GPCRs, κανάλια ιόντων, πυρηνικοί υποδοχείς και ένζυμα, και ποσοτικά δεδομένα για τη πρόσδεση υποκαταστατών.

Η **Human-gpDB** είναι μία πλούσια βάση δεδομένων που αφορά ανθρώπινους GPCRs, G-πρωτεΐνες και τελεστές τους. Περιέχει δεδομένα από τη gpDB, μια βάση για τις ίδιες πρωτεΐνες σε 469 οργανισμούς, καθώς και καινούργια δεδομένα. Έχει

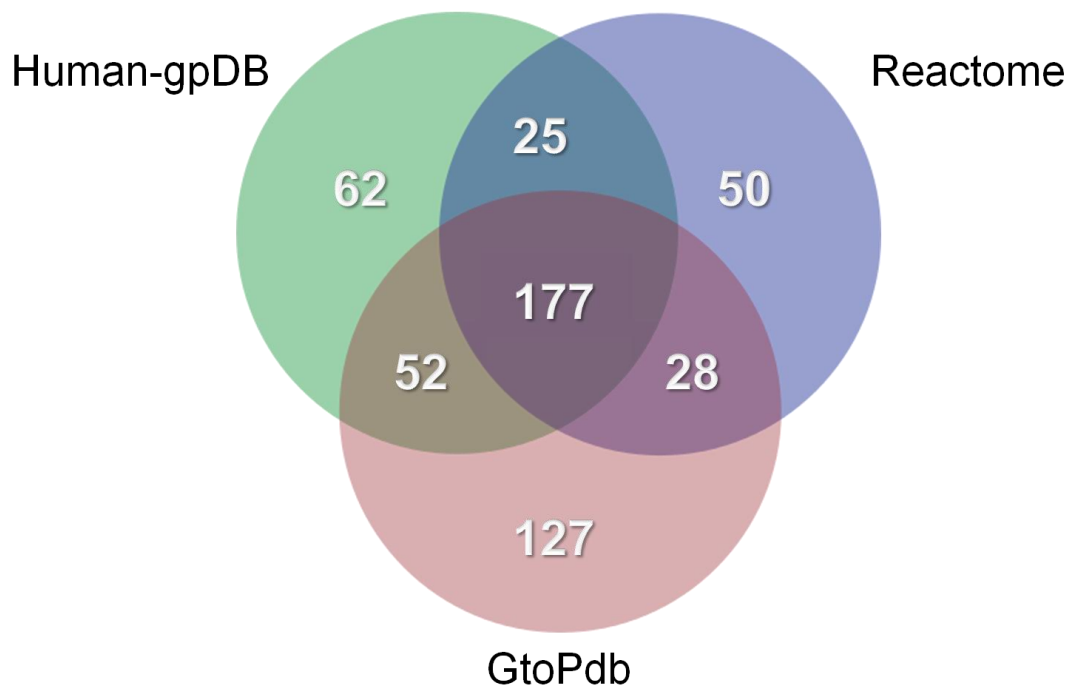
πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις G-πρωτεϊνών με GPCRs και τελεστές, και παρέχει τουλάχιστον μία βιβλιογραφική αναφορά που να υποστηρίζει τη κάθε αλληλεπίδραση.

Οι Reactome και GtoPdb δίνουν πληροφορίες για ποια/ες οικογένειες Gα πρωτεϊνών ενεργοποιεί ο κάθε GPCR (π.χ. οικογένεια Gα_{i/o}), ενώ η Human-grDB αναφέρεται σε συγκεκριμένες Gα πρωτεΐνες (π.χ. πρωτεΐνη Gα_{i3}). Για κάθε ζευγάρι οι Human-grDB και GtoPdb δίνουν τουλάχιστον μία αναφορά που να υποστηρίζει το ζευγάρι, ενώ η Reactome όχι. Για να καταστεί δυνατή η σύγκριση των τριών βάσεων έγινε αντιστοίχιση των δεδομένων της Human-grDB σε επίπεδο οικογένειας των Gα.



Εικόνα 19 Στην αριστερή πλευρά είναι ζευγάρια GPCR – Gα στο επίπεδο Gα πρωτεΐνης. Στη δεξιά πλευρά είναι ζευγάρι στο επίπεδο οικογένειας Gα.

Στο επίπεδο οικογένειας των G-πρωτεϊνών βρέθηκαν 280 ζευγάρια στη Reactome, 384 στη GtoPdb και 316 στη Human-grDB. Συνολικά και στις 3 βάσεις δεδομένων υπάρχουν 521 ζευγάρια για 323 μη οσφρητικούς GPCRs. Από τα 521 ζευγάρια 239 υπήρχαν σε μία βάση δεδομένων, 105 σε δύο βάσεις και 177 υπήρχαν και στις τρεις βάσεις.



Εικόνα 20 Διάγραμμα Venn με τα ζευγάρια GPCR – Ga οικογένεια στις τρεις βάσεις δεδομένων Human-gpDB, Reactome και GtoPdb.

Και οι τρεις βάσεις περιέχουν πληροφορίες για τη σηματοδότηση μέσω G-πρωτεϊνών. Η Reactome προσφέρει διαγράμματα για σηματοδότηση μέσω των κύριων τελεστών G-πρωτεϊνών (Ga οικογένειες και Gβγ). Η GtoPdb περιέχει ελάχιστες πληροφορίες για το αποτέλεσμα της δράσης των Ga. Αντιθέτως η Human-gpDB διαθέτει πληροφορίες για κύριους και μη τελεστές των Ga πρωτεϊνών, καθώς και για τελεστές του Gβγ, και για την επίδραση των G-πρωτεϊνών πάνω τους.

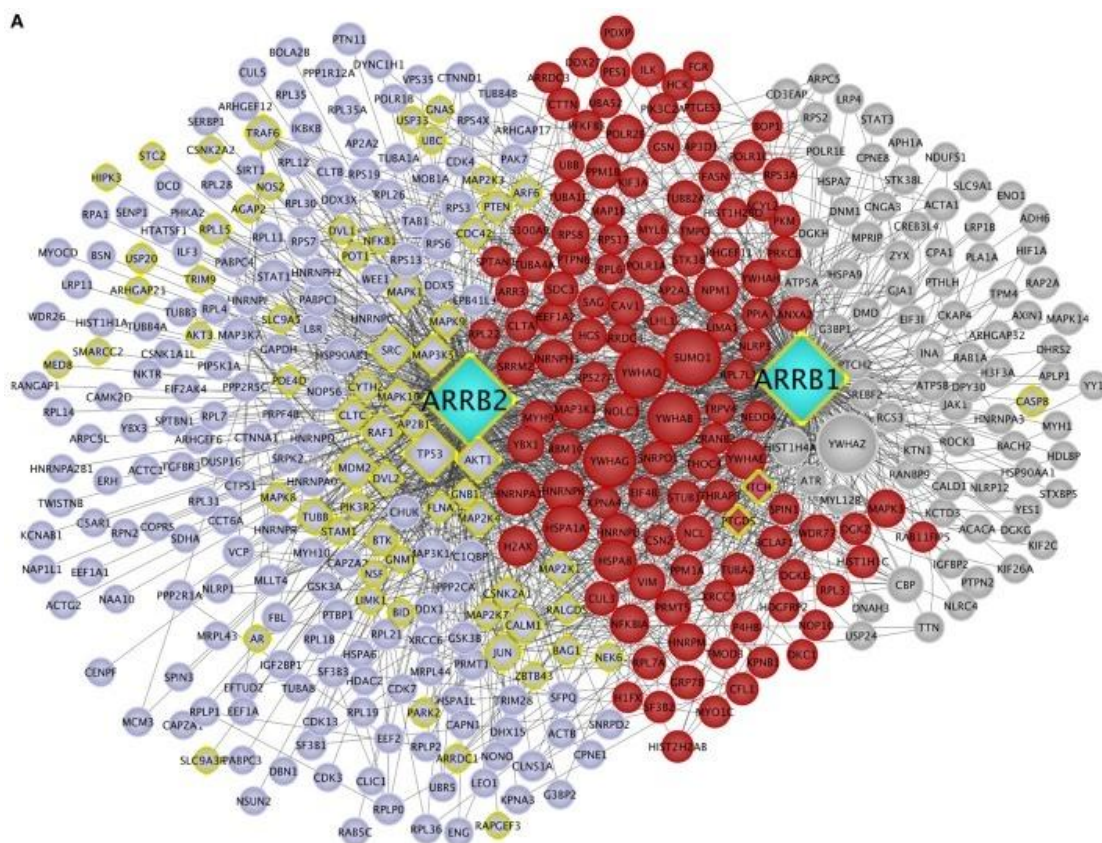
Για τις Gβ και Gγ πρωτεΐνες δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Η Human-gpDB περιέχει πληροφορίες για τελεστές του Gβγ. Καμία βάση δεν προσφέρει πληροφορίες για το ποιοι τύποι Gβ και Gγ σχηματίζουν ετεροδιμερή, καθώς και για το πώς επηρεάζει αυτή η επιλεκτικότητα τη δράση τους σε τελεστές. Και επομένως, δεν υπάρχει πληροφορία για προτιμήσεις τύπων των G-πρωτεϊνών για το σχηματισμό του ετεροτριμερούς.

Τελικά μόνο δεδομένα από τη Human-gpDB χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία. Η Human-gpDB μειονεκτεί εν μέρει σε σχέση με τις άλλες βάσεις, αφού δεν έχει ανανεωμένες πληροφορίες. Παρόλα αυτά υπερτερεί στο βάθος των πληροφοριών που διαθέτει. Είναι η μόνη με πληροφορίες στο επίπεδο πρωτεΐνης Ga και όχι απλώς οικογένειας, ενώ οι πληροφορίες για τους τελεστές και τη δράση των G πρωτεϊνών σε αυτούς είναι μοναδικές.

Εφόσον η Human-gpDB δεν έχει ανανεωθεί έπρεπε να γίνει σύγκριση των δεδομένων για τις πρωτεΐνες με την UniProtKB. Δύο άλλες πρωτεΐνες αφορούσαν εγγραφές της UniProtKB που καταργήθηκαν, ενός πιθανού οσφρητικού υποδοχέα και ενός πιθανού υποδοχέα γεύσης 2 (κωδικοί: Q32VQ0 και P59531). Μία εγγραφή οσφρητικού υποδοχέα (κωδικός: Q15614) έχει πλέον διασπαστεί σε δύο εγγραφές στη UniProtKB και οι δύο είναι GPCRs, ενώ μία άλλη (κωδικός: P33765) διασπάστηκε σε δύο εγγραφές με μόνο τη μία να είναι GPCR. Επίσης 119 πρωτεΐνες χαρακτηρισμένες ως GPCRs στη UniProtKB, δεν βρίσκονταν στην Human-gpDB. Όσον αφορά τις G-πρωτεΐνες, η Human-gpDB και η UniProtKB περιέχουν τις ίδιες εγγραφές. Ενώ από τους τελεστές μόνο μία πρωτεΐνη είχε καταργηθεί στη UniProtKB (κωδικός: Q99867).

3.4 Σηματοδότηση μέσω άλλων πρωτεϊνών

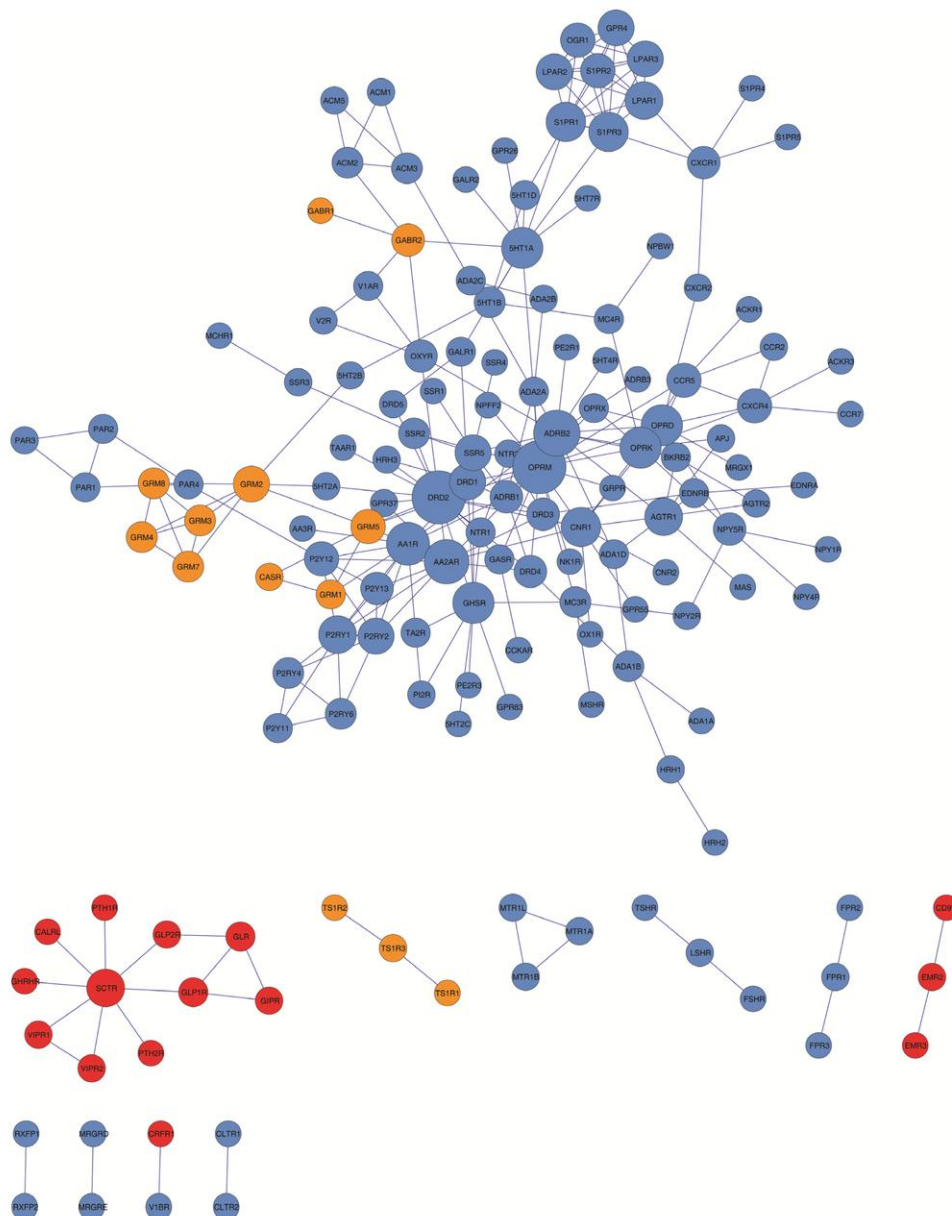
Όταν ξεκίνησε η εκπόνηση αυτής της εργασίας δεν υπήρχαν διαθέσιμες συγκεντρωμένες πληροφορίες για την ανεξάρτητη των G-πρωτεϊνών σηματοδότηση των GPCRs. Το Μάρτιο του 2017 δημοσιεύθηκε μία εργασία (Crepieux, et al., 2017) όπου οι Crepieux *et al*/ συγκέντρωσαν πληροφορίες διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων και στη βιβλιογραφία για τις β-αρρεστίνες. Στο πρόσθετο υλικό της δημοσίευσης είναι διαθέσιμα τα δεδομένα για GPCRs και άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι β-αρρεστίνη 1 και 2. Έγινε σύγκριση μεταξύ των τελεστών των G-πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις β-αρρεστίνες για να δούμε αν ενδεχομένως υπάρχει επικάλυψη μεταξύ σηματοδότησης G-πρωτεϊνών και β-αρρεστίνων.



Εικόνα 21 Δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των β-αρρεστίνων – β-Arrestinome. (Crepieux, et al., 2017)

3.5 Ολιγομερισμός GPCRs

Το GPCR-HetNet είναι ένα δίκτυο από ετεροδιμερή των GPCRs (Borrotto-Escuela, et al., 2014). Κατασκευάστηκε από τους Borrotto-Escuela *et al* οι οποίοι συλλέξαν και επιβεβαίωσαν δεδομένα για αλληλεπιδράσεις μεταξύ GPCRs από βάσεις δεδομένων και τη βιβλιογραφία. Κατέληξαν στη δημιουργία ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων που αποτελούνταν από 183 GPCRs και 537 αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Τα δεδομένα για το σχηματισμό των ετεροδιμερών χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία.

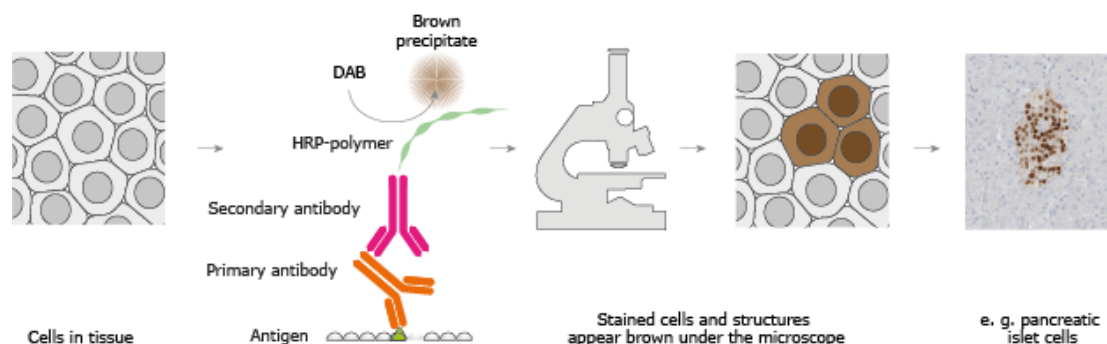


Εικόνα 22 Δίκτυο ετεροδιμερών GPCR – HetNet. Με μπλε χρώμα είναι GPCRs της οικογένειας 1, με κόκκινο της οικογένειας 2 και με πορτοκαλί της οικογένειας 3. (Borrotto-Escuela, et al., 2014)

3.6 Εύρεση δεδομένων έκφρασης σε ιστούς

Ο Human Protein Atlas (HPA, www.proteinatlas.org) (Uhlen, et al., 2015) περιέχει πληροφορίες για την υποκυτταρική θέση και την έκφραση σε ιστούς, φυσιολογικούς και καρκινικούς, για τη πλειοψηφία των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Οι πληροφορίες αυτές βασίζονται σε πειραματικά δεδομένα από πρωτεΐνες και RNA. Τα δεδομένα για πρωτεΐνες προέρχονται από πειράματα ανοσοϊστοχημείας και καλύπτουν 46 ιστούς, που χωρίζονται περαιτέρω σε 85 κυτταρικούς τύπους.

Έγινε χρήση των δεδομένων που προέρχονται από πειράματα σε πρωτεΐνες, συγκεκριμένα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, αφενός γιατί δεν απαιτούν παραδοχές για συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης RNA και πρωτεΐνης και αφετέρου γιατί πρόσφεραν πληροφορίες σε επίπεδο κυττάρου. Συλλέχθηκαν δεδομένα για την έκφραση των GPCRs, G-πρωτεϊνών και των τελεστών σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το αρχείο με τα δεδομένα έκφρασης σε φυσιολογικούς ιστούς της έκδοσης του HPA 16.1. Η αντιστοίχιση γονιδίων και πρωτεϊνών έγινε με το όνομα γονιδίου όπως δίνεται από τη UniProtKB. Για πρωτεΐνες χωρίς πληροφορίες έκφρασης, έγινε επιπλέον αναζήτηση στην ιστοσελίδα του HPA με το κωδικό της UniProtKB για να ελεγχθεί η πιθανότητα χρήσης εναλλακτικού ονόματος γονιδίου.



Εικόνα 23 Βασικές αρχές του προσδιορισμού του ιστού έκφρασης ενός γονιδίου μέσω ανοσοϊστοχημείας. Αρχικά τμήμα ιστού εγκλεισμένο σε παραφίνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα που δεσμεύει με υψηλή ειδικότητα την πρωτεΐνη στόχο. Ακολουθεί έκπλυση για την απομάκρυνση μη δεσμευμένων αντισωμάτων. Μετά επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, που είναι σημασμένο και δεσμεύει με υψηλή ειδικότητα το πρωτογενές αντίσωμα, και γίνεται ξανά έκπλυση. Τέλος γίνεται ανίχνευση του δευτερογενούς αντισώματος και καθορισμός της απουσίας ή παρουσίας και θέσης της πρωτεΐνης στόχου στον εξεταζόμενο ιστού. (www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry)

3.7 Οπτικοποίηση δικτύων

Το Cytoscape (Shannon, et al., 2003) είναι μια ανοιχτού κώδικα πλατφόρμα λογισμικού που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση και το σχολιασμό δικτύων μοριακών αλληλεπιδράσεων και βιολογικών μονοπατιών. Ο πυρήνας του Cytoscape προσφέρει πληθώρα επιλογών για τη βασική οπτικοποίηση και ανάλυση δικτύων. Υπάρχουν επίσης και πρόσθετα εργαλεία, οι εφαρμογές (Apps), που είναι ελεύθερα διαθέσιμα και επεκτείνουν σημαντικά τις δυνατότητες του. Έγινε χρήση του Cytoscape 3.4 για τη δημιουργία, οπτικοποίηση και ανάλυση δικτύων σηματοδότησης GPCRs, το συνολικό δίκτυο και δίκτυα για επιμέρους κυτταρικούς τύπους, καθώς και για δίκτυα συσχέτισεως με ασθένειες και φάρμακα.

3.8 Ανάλυση εμπλουτισμού με όρους γονιδιακής οντολογίας

Το πρόγραμμα Γονιδιακή Οντολογία (Gene Ontology/GO) (The Gene Ontology Consortium, 2015) αποτελεί μια σημαντική βιοπληροφορική συνεργασία που δημιούργησε ένα ελεγχόμενο λεξιλόγιο όρων που περιγράφουν γονίδια και τα προϊόντα τους. Οντολογία είναι μία επίσημη αναπαράσταση της γνώσης εντός μίας δεδομένης κατηγορίας. Οι οντολογίες συνήθως αποτελούνται από ένα σύνολο κλάσεων ή όρων που συσχετίζονται μεταξύ τους. Οι κατηγορίες που εκπροσωπούνται στη γονιδιακή οντολογία (GO) είναι οι βιολογική διεργασία (biological process), υποκυτταρική θέση (cellular component) και μοριακή λειτουργία (molecular function). Η δομή της GO μπορεί να περιγραφεί ως ένας κατευθυνόμενος μη κυκλικός γράφος, όπου κάθε όρος GO είναι ένας κόμβος και οι σχέσεις μεταξύ των όρων είναι οι ακμές. Είναι ιεραρχική με το παιδί ενός κόμβου να είναι πιο ειδικευμένο, με κάθε κόμβο όμως να μπορεί να έχει πολλαπλούς γονείς. Στόχος της GO ήταν η δημιουργία ενός δομημένου, επακριβώς ορισμένου, κοινού και ελεγχόμενου λεξιλογίου που να περιγράφει τα γονίδια και τα προϊόντα οποιουδήποτε οργανισμού. Με την αυστηρά ορισμένη δομή της, η GO κάνει προσιτή τη γνώση σε ανθρώπους και υπολογιστές. (Ashburner, et al., 2000)

Κατηγορίες της GO (Ashburner, et al., 2000):

Βιολογική διεργασία (biological process), περιγράφει μια σειρά από γεγονότα που επιτυγχάνονται μετά από μια σειρά μοριακών δράσεων. Γενικοί όροι της βιολογικής διεργασίας είναι η μεταγωγή σήματος (signal transduction) ή ανάπτυξη και συντήρηση του κυττάρου (cell growth and maintenance), ενώ ειδικοί όροι είναι η

βιοσύνθεση του cAMP (cAMP biosynthesis) ή ο μεταβολισμός πυριμιδίνων (pyrimidine metabolism).

Υποκυτταρική θέση (cellular component), αναφέρεται στη τοποθεσία όπου ένα γονιδιακό προϊόν είναι ενεργό. Πολλοί τέτοιοι όροι αφορούν τη δομή των ευκαρυωτικών κύτταρων. Παράδειγμα όρων αυτής της κατηγορίας είναι το πρωτεάσωμα (proteasome), τη πυρηνική μεμβράνη (nuclear membrane) και το σύστημα Golgi (Golgi apparatus).

Μοριακή λειτουργία (molecular function), ορίζεται ως η βιοχημική ενεργότητα που έχει το προϊόν ενός γονιδίου. Περιγράφει μόνο το τι γίνεται χωρίς να αναφέρει το που και πότε λαμβάνει θέση το γεγονός. Παραδείγματα γενικών όρων είναι ένζυμο (enzyme) ή μεταφορέας (transporter), ενώ ειδικοί όροι είναι αδενυλική κυκλάση (adenylate cyclase) ή υποκαταστάτης υποδοχέα Toll (Toll receptor ligand).

Μία από τις πιο συχνές χρήσεις της GO είναι στην **ανάλυση εμπλουτισμού** (GO term enrichment). Η ανάλυση εμπλουτισμού χρησιμοποιείται για το λειτουργικό χαρακτηρισμό μίας λίστας γονιδίων ή πρωτεϊνών, αποτέλεσμα για παράδειγμα από ένα πείραμα μικροσυστοιχιών. Χρησιμοποιείται κάποιο στατιστικό τεστ που υπολογίζει τη πιθανότητα (p-value) σε ένα τυχαίο σύνολο πρωτεϊνών ίδιου μεγέθους να βρεθεί ο ίδιος ή μεγαλύτερος αριθμός πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από το συγκεκριμένο όρο, συνήθως βιολογικής διεργασίας. Ένας όρος θεωρείται στατιστικά σημαντικά εμπλουτισμένος αν το p-value είναι μικρότερο από το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας που ορίστηκε από τους ερευνητές (συνήα p-value < 0.05). Υπάρχουν διάφορα διαθέσιμα εργαλεία που κάνουν ανάλυση εμπλουτισμού και επιστρέφουν μια λίστα εμπλουτισμένων όρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χαρακτηρισμό της λίστας πρωτεϊνών (Huang da, et al., 2009). Εκτός από τους όρους GO, στην ανάλυση εμπλουτισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν μονοπάτια, ασθένειες, φάρμακα, κ.α..

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο **BiNGO** (Maere, et al., 2005) εφαρμογή του Cytoscape. Το BiNGO είναι ένα ελεύθερα διαθέσιμο εργαλείο που βρίσκει όρους γονιδιακής οντολογίας που υπερ ή υπο εκπροσωπούνται σε ένα σύνολο πρωτεϊνών. Το σύνολο εισόδου μπορεί να δοθεί κατευθείαν από το δίκτυο του Cytoscape ή ως απλό κείμενο. Το BiNGO βρίσκει με ποιους όρους χαρακτηρίζεται η κάθε πρωτεΐνη και επεκτείνει το σχολιασμό της αναθέτοντας της και όλους τους γονεϊκούς όρους. Προσφέρει δύο στατιστικά τεστ, το υπεργεωμετρικό τεστ που δίνει ακριβή τιμή p-value και το δυνωμικό τεστ που δίνει μια εκτίμηση του p-value, αλλά απαιτεί λιγότερο υπολογιστικό χρόνο. Ως σύνολο υποβάθρου μπορεί

να χρησιμοποιηθεί το δίκτυο ή το σύνολο των σχολιασμένων πρωτεϊνών. Προτείνεται τα αρχεία οντολογίας και σχολιασμού που χρησιμοποιούνται να είναι η τελευταία έκδοση από τη ιστοσελίδα του GO.

Λίγα λόγια για την υπεργεωμετρική κατανομή και το υπεργεωμετρικό τεστ. Η υπεργεωμετρική κατανομή είναι μια διακριτή κατανομή πιθανότητας που περιγράφει τη πιθανότητα k επιτυχιών σε n δοκιμές, χωρίς επανατοποθέτηση, από ένα πεπερασμένο σύνολο N με K επιτυχίες. Μια παρόμοια κατανομή είναι η δυνωμική, όπου υπάρχει επανατοποθέτηση. Το υπεργεωμετρικό τεστ όταν χρησιμοποιείται για υπερεκπροσώπηση υπολογίζει ένα p -value που αντιπροσωπεύει τη πιθανότητα k ή περισσότερων επιτυχιών μετά από n δοκιμές, όταν στο σύνολο μεγέθους N υπάρχουν K επιτυχίες.

Επειδή το BiNGO ελέγχει τη σημαντικότητα όλων των όρων που υπάρχουν στο σύνολο εισόδου, καταλήγει να κάνει ως και μερικές χιλιάδες ελέγχους. Όταν γίνονται πολλαπλοί έλεγχοι υποθέσεων πρέπει να γίνεται διόρθωση της τιμής p -value για να περιοριστεί το σφάλμα τύπου I. Μία από τις πιο βασικές διορθώσεις είναι η διόρθωση Bonferroni, η οποία θεωρείται αρκετά συντηρητική και είναι διαθέσιμη στο BiNGO. Μία άλλη διόρθωση η Benjamini & Hochberg's false discovery rate (FDR) χρησιμοποιείται συχνά σε τέτοιες αναλύσεις. Η διόρθωση FDR μειώνει τον αριθμό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, με κόστος την αύξηση των ψευδώς θετικών. (Maere, et al., 2005)

Σύμφωνα με τις συστάσεις του εργαλείου επιλέχθηκε το υπεργεωμετρικό τεστ (hypergeometric test) και η διόρθωση Benjamini & Hochberg's false discovery rate (FDR). Έγινε έλεγχος για όρους της γονιδιακής οντολογίας που υπερεκπροσωπούνται. Ως σύνολο υποβάθρου χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των σχολιασμένων πρωτεϊνών. Τα αρχεία οντολογίας και σχολιασμού πρωτεϊνών του ανθρώπου πάρθηκαν από το Gene Ontology Consortium (<http://geneontology.org/>, Μάρτιο 2017).

Επίσης έγινε προσπάθεια συσχέτισης όρων βιολογικής διεργασίας με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του κάθε GPCR. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο όροι που βρέθηκαν από το BiNGO ως εμπλουτισμένοι στο σύνολο των πρωτεϊνών. Ένας όρος σχετίζεται με το σηματοδοτικό μονοπάτι ενός υποδοχέα αν χαρακτηρίζει είτε τον ίδιο τον υποδοχέα, ή τουλάχιστον έναν από τους τελεστές μέσω των οποίων δρα.

3.9 Συσχέτιση πρωτεϊνών με ασθένειες και φάρμακα

Η **DisGeNET** (Pinero, et al., 2017) είναι μια βάση δεδομένων που ενσωματώνει ανθρώπινες συσχετίσεις γονιδίων με ασθένειες από διάφορες βάσεις δεδομένων σχολιασμένες από ειδικούς, από μοντέλα ζώων και από εξόρυξη κειμένου. Για κάθε συσχέτιση γονιδίου-ασθένειας είναι διαθέσιμα ένα σκορ αξιοπιστίας, βιβλιογραφικές αναφορές και η αρχική πηγή. Για τη συσχέτιση των πρωτεϊνών με ασθένειες χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της DisGeNET v4.0 που ήταν σχολιασμένα από ειδικούς. Τα δεδομένα αυτά προέρχονταν από τις βάσεις δεδομένων UniProt, ClinVar (Landrum, et al., 2016), Orphanet (Rath, et al., 2012), κατάλογο GWAS (genome-wide association study) (Welter, et al., 2014) και Comparative Toxicogenomics Data base (δεδομένα για τον άνθρωπο) (Davis, et al., 2015).

Η συσχέτιση των πρωτεϊνών με φάρμακα έγινε με χρήση των δεδομένων της μέσω του αρχείου της UniProtKB. Η **DrugBank** (Law, et al., 2014) είναι μια βάση δεδομένων που συνδυάζει λεπτομερείς πληροφορίες για φάρμακα με πληροφορίες για τους στόχους τους. Περιέχει φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration) καθώς και πειραματικά φάρμακα. Για κάθε φάρμακο αναφέρονται οι πρωτεΐνες στόχος του και αν υπάρχει γνωστή επίδραση σε αυτές, καθώς και για ποιες ασθένειες ενδείκνυται αυτό το φάρμακο.

4 Αποτελέσματα & Συζήτηση

4.1 Σύνολο δεδομένων

4.1.1 Πρωτεΐνες

Στη UniProtKB/SwissProt βρέθηκαν **830** εγγραφές του ανθρώπου που ήταν χαρακτηρισμένες ως μέλη της οικογένειας «g protein coupled receptor». Από αυτές οι 424 εγγραφές αφορούσαν οσφρητικούς GPCRs. Οι **406** μη οσφρητικοί υποδοχείς χωρίζονται σε οικογένειες σύμφωνα με τη UniProtKB ως εξής: 298 GPCRs στην οικογένεια 1, 49 στην οικογένεια 2, 22 στην οικογένεια 3, 11 στην οικογένεια Frizzled/Smoothed, 25 στην οικογένεια Taste 2 receptors και 1 στην οικογένεια Ocular albinism. Η τελευταία οικογένεια, Ocular albinism, περιέχει μόνο δύο πρωτεΐνες, μία στον άνθρωπο και μία στο ποντίκι (*Mus musculus*), οι οποίες σχετίζονται με μορφή αλφισμού που επηρεάζει μόνο τα μάτια.

Η Human-gpDB περιέχει 709 εγγραφές που αντιστοιχούν στη UniProtKB, 422 αφορούν οσφρητικούς GPCRs και **287** μη οσφρητικούς. Όσον αφορά τις G-πρωτεΐνες, η Human-gpDB περιέχει συνολικά 17 G α , 7 G β και 12 G γ πρωτεΐνες. Συνολικά έχει πληροφορίες για 98 τελεστές, για 4 από αυτούς δεν υπάρχει πληροφορία για το αν αλληλεπιδρούν με G-πρωτεΐνη. Από τους υπόλοιπους 94 τελεστές, οι 49 βρίσκονται υπό τον κοινό έλεγχο G α και G $\beta\gamma$, οι 26 είναι τελεστές μόνο των G α και οι 19 είναι τελεστές μόνο του G $\beta\gamma$. Συνολικά οι G α πρωτεΐνες δρουν σε 75 τελεστές και το G $\beta\gamma$ σε 68.

Οι Crepieux *et al* συγκέντρωσαν συνολικά 435 πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι β -αρρεστίνες. Βρήκαν 250 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την β 1-αρρεστίνη και 325 με την β 2-αρρεστίνη, με 140 πρωτεΐνες από αυτές να αλληλεπιδρούν και με τις δύο. Από τις 435 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τουλάχιστον μία β -αρρεστίνη, οι 14 είναι τελεστές των G α και G $\beta\gamma$, 4 είναι τελεστές μόνο των G α και 3 είναι τελεστές μόνο του G $\beta\gamma$. Αυτό σημαίνει ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των G-πρωτεϊνών και τα μονοπάτια μέσω των β -αρρεστινών επικαλύπτονται.

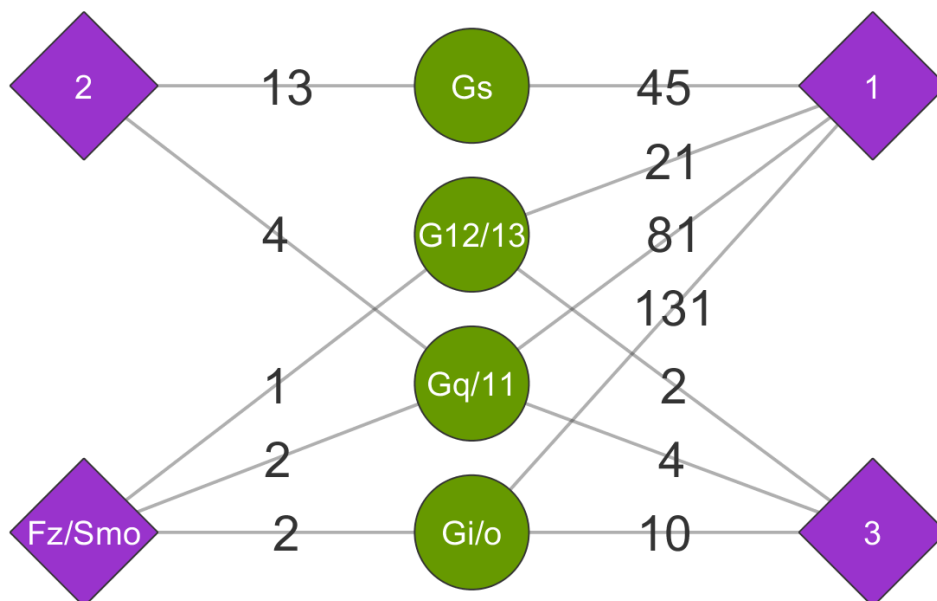
4.1.1.1 Λειτουργική κατηγοριοποίηση τελεστών G α

Οι τελεστές των G α πρωτεϊνών κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη κύρια λειτουργία τους (για αναλυτικό πίνακα βλέπε παράρτημα). Η κατηγορία με τους περισσότερους τελεστές (26) είναι οι τουμπουλίνες, οι πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελούνται οι

μικροσωληνίσκοι, σημαντικό συστατικό του κυτταροσκελετού. Μετά είναι οι αδενυλικές κυκλάσες (9), ένζυμα που είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και καταλύουν τη μετατροπή ATP σε cAMP το οποίο δρα ως δεύτερος διαβιβαστής. Άλλη κατηγορία είναι cGMP φωσφοδιεστεράσες (5), που βρίσκονται στα κωνία και τα ραβδία, και καταλύουν τη μετατροπή του cGMP σε GMP. Τα κανάλια ασβεστίου (3) τα οποία κλείνουν μετά από την απενεργοποίησή τους από τη Gα πρωτεΐνη. Κινάσες που φωσφορυλιώνουν GPCRs αλλιώς GRKs (4). Κινάσες PI3 (3) και φωσφολιπάσες C (4), που παράγουν τους δεύτερους διαβιβαστές PIP3, και IP₃ και DAG, αντίστοιχα. Άλλες κατηγορίες είναι οι μικρές G-πρωτεΐνες (4) και οι GEFs (4) και οι GAPs, που ενεργοποιούν και απενεργοποιούν G-πρωτεΐνες αντίστοιχα. Τέλος έχουμε άλλες κινάσες (4), πρωτεΐνες ικρίωμα (2) και άλλες (4).

4.1.2 Αλληλεπιδράσεις G-πρωτεϊνών με GPCRs

Από τη Human-grpDB συλλέχθηκαν 1,223 ζευγάρια μεταξύ Gα πρωτεϊνών και μη οσφρητικών GPCRs, στο επίπεδο πρωτεΐνης. Για 49 από τους 287 μη οσφρητικούς υποδοχείς δεν υπήρχε πληροφορία για ποιες G-πρωτεΐνες ενεργοποιούν. Τα περισσότερα ζευγάρια (1,093) είναι με υποδοχείς της οικογένειας 1. Η οικογένεια 1 είναι η μόνη που έχει ζευγάρια με όλες τις οικογένειες των Gα πρωτεϊνών, σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-grpDB. Η οικογένεια 2 έχει ζευγάρια με τις οικογένειες G_s και G_{q/11} και οι οικογένειες GPCR 3 και 6 (Fz/Smo) με τις οικογένειες G_{12/13}, G_{i/o} και G_{q/11}.

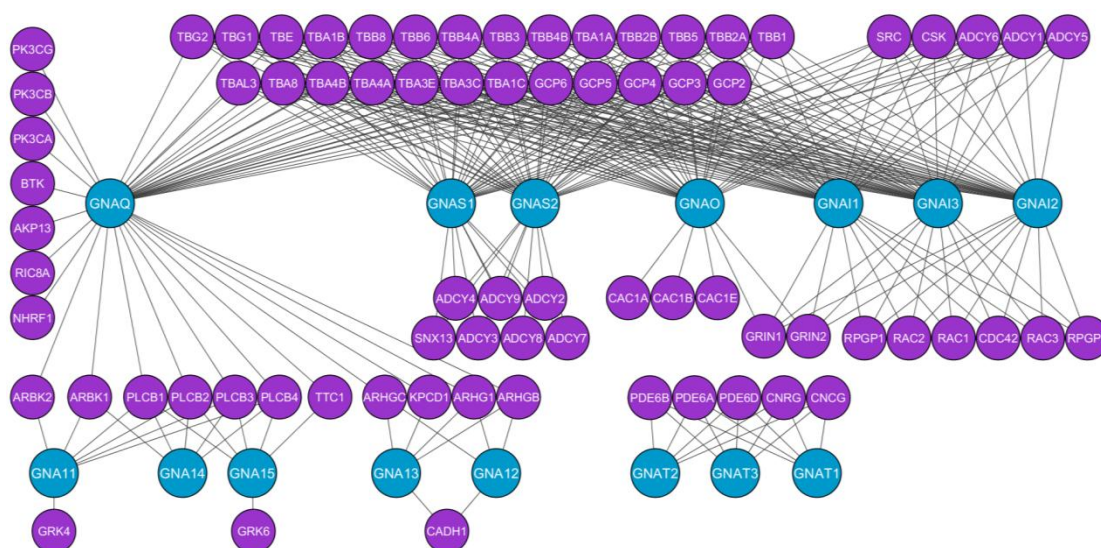


Εικόνα 24 Αριθμός GPCR ανά οικογένεια που δρουν με οικογένειες των Gα σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-grpDB. Με χρώμα μωβ και σχήμα ρόμβου είναι οι οικογένειες GPCR, ενώ με πράσινο και ως κύκλοι είναι οι οικογένειες των Gα πρωτεϊνών.

Η λεγόμενη οσφρητική Gα πρωτεΐνη (Gα_{olf}) σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-grDB αλληλεπιδρά μόνο με τους οσφρητικούς υποδοχείς. Αφού οι οσφρητικοί υποδοχείς έχουν αφαιρεθεί από το σύνολο πρωτεϊνών και η Gα_{olf} βγήκε εκτός του συνόλου. Αξίζει να σημειωθεί πάντως ότι η Gα_{olf} έχει βρεθεί να εκφράζεται σε υψηλή ποσότητα σε ιστούς εκτός του οσφρητικού επιθήλιου και να αλληλεπιδρά με μη οσφρητικούς υποδοχείς (Herve, 2011).

4.1.3 Αλληλεπιδράσεις G-πρωτεϊνών με τελεστές

Στη Human-grDB βρέθηκαν 315 αλληλεπιδράσεις μεταξύ Gα πρωτεϊνών και τελεστών. Για τις πρωτεΐνες Gα_{olf} και Gα_z δεν υπήρχαν καταγεγραμμένες πληροφορίες για αλληλεπίδραση με τελεστές, ενώ η Gα_q έχει τους περισσότερους τελεστές. Οι Gα_{t1-3} έχουν 5 κοινούς τελεστές, στους οποίους δεν επιδρούν άλλες Gα πρωτεΐνες. Στη παρακάτω εικόνα φαίνεται το δίκτυο αλληλεπίδρασης μεταξύ Gα και τελεστών.

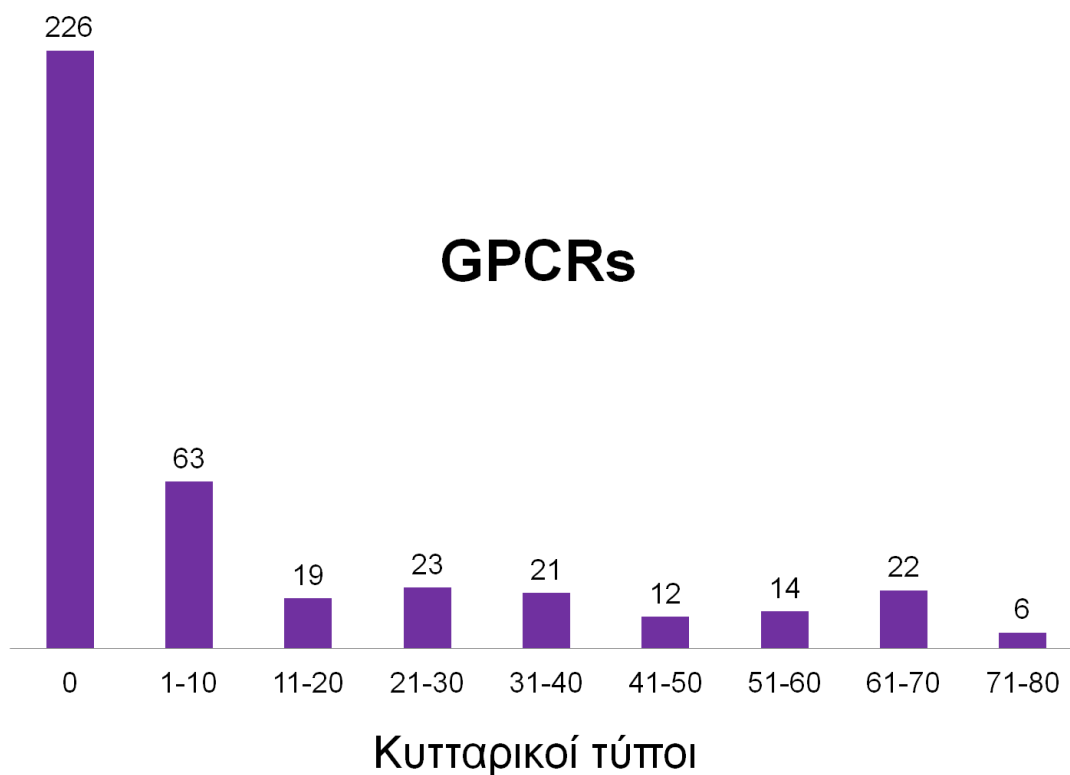


Εικόνα 25 Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ Gα πρωτεϊνών και τελεστών σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-grDB. Με μπλε χρώμα είναι οι Gα πρωτεΐνες και μωβ οι τελεστές. Γραμμένο πάνω στους κόμβους είναι το ID της πρωτεΐνης από τη UniProtKB.

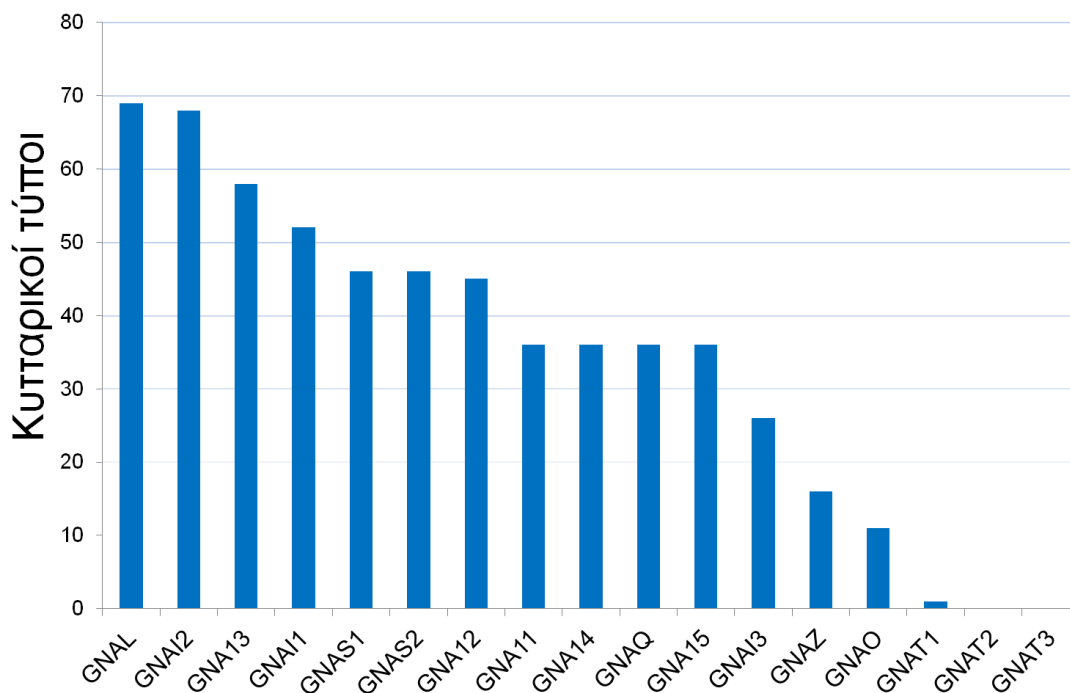
4.1.4 Έκφραση πρωτεϊνών σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους

Στο HPA βρέθηκαν πληροφορίες από πειράματα ανοσοϊστοχημείας για την έκφραση σε ιστούς για 180 από τους 406 μη οσφρητικούς GPCRs, για 15 από τις 17 Gα πρωτεΐνες και για 61 από τους 75 τελεστές των Gα. Οι περισσότερες πρωτεΐνες, από αυτές με πληροφορία για έκφραση, φαίνεται να εκφράζονται σε πολλούς ιστούς. Ενώ ένας σημαντικός αριθμός GPCRs έχουν περιορισμένη έκφραση (σε <10 κυτταρικούς τύπους). Με εξαίρεση έναν GPCR, όλες οι πρωτεΐνες για τις οποίες δεν

είναι γνωστές οι θέσεις έκφρασης, δεν έχουν ελεγχθεί πειραματικά ακόμα από τον ΗΡΑ. Παρακάτω υπάρχουν διαγράμματα με τη κατανομή του αριθμού θέσεων έκφρασης ανά κατηγορία πρωτεϊνών.



Εικόνα 26 Ραβδόγραμμα με τον αριθμό των κυτταρικών τύπων που εκφράζονται οι GPCRs. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο αριθμός κυτταρικών τύπων, ενώ ο αριθμός πάνω σε κάθε ράβδο είναι ο αριθμός των GPCRs.



Εικόνα 27 Ραβδόγραμμα με τον αριθμό των κυτταρικών τύπων που εκφράζεται η κάθε Ga πρωτεΐνη. Στον κάθετο άξονα είναι ο αριθμός κυτταρικών τύπων και στον οριζόντιο άξονα το ID από τη UniProtKB της κάθε Ga πρωτεΐνης.



Εικόνα 28 Ραβδόγραμμα με τον αριθμό των κυτταρικών τύπων που εκφράζονται οι τελεστές των Ga πρωτεϊνών. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο αριθμός κυτταρικών τύπων, ενώ ο αριθμός πάνω σε κάθε ράβδο είναι ο αριθμός των τελεστών.

Οι Ga πρωτεΐνες olf, i1-3 και s1-2 εκφράζονται σε περισσότερους από τους μισούς κυτταρικούς τύπους, ακολουθούν οι 11-15 και η με περίπου 30 θέσεις

έκφρασης, και οι z και o με περίπου 10. Από τις t μόνο για την 1 υπάρχει γνωστή μία θέση, ενώ για τις άλλες δύο δεν έχουν γίνει πειράματα ακόμα από τον HPA. Σημειώνεται ότι παρά την ονομασία της ως οσφρητική Gα, φαίνεται να εκφράζεται σε σχεδόν όλους τους κυτταρικούς τύπους. Αυτή είναι μια ισχυρή ένδειξη της ύπαρξης κάποιας βασικής λειτουργίας της οσφρητικής Gα, πέρα από τη μεταγωγή οσφρητικών σημάτων.

Όλοι οι κυτταρικοί τύποι έχουν τουλάχιστον έναν GPCR, ενώ οι μόνοι κυτταρικοί τύποι χωρίς Gα ή/και τελεστές τους είναι από τους ιστούς του αμφιβληστροειδή (retina) και της υπόφυσης (pituitary gland) για τους οποίους έχουν γίνει ελάχιστα πειράματα από τον HPA. Κατά μέσο όρο σε κάθε κυτταρικό τύπο εκφράζονται 62 GPCRs, 7 Gα και 36 τελεστές τους.

4.1.4.1 Συμφωνία ζευγαριών με δεδομένα έκφρασης

Για να μπορέσει μια Gα πρωτεΐνη να αλληλεπιδράσει με ένα GPCR ή ένα τελεστή, θα πρέπει να εκφραστούν στο ίδιο κύτταρο. Το ίδιο ισχύει και για να δημιουργηθεί ένα ετεροδιμερές GPCR. Ένα ζευγάρι ή ετεροδιμερές μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανό, μόνο αν υπάρχει τουλάχιστον μία κοινή θέση έκφρασης, δηλαδή πρέπει να εκφράζονται μαζί σε τουλάχιστον ένα κυτταρικό τύπο. Από τα 1,223 ζευγάρια GPCR και Gα για τα 600 δεν υπήρχε πληροφορία για τις θέσεις έκφρασης του GPCR ή/και της Gα, για 50 δεν υπήρχε κάποια κοινή θέση έκφρασης, ενώ για τα υπόλοιπα 573 υπάρχει τουλάχιστον μία κοινή θέση και επομένως υπάρχει συμφωνία με τα δεδομένα έκφρασης. Αντίστοιχα για τα ετεροδιμερή GPCR που συλλέξαν οι Borroto-Escuela *et al* από τα συνολικά 537 ετεροδιμερή για 466 δεν υπήρχαν δεδομένα έκφρασης για τουλάχιστον έναν από τους GPCR, για 13 δεν υπήρχε κοινή θέση έκφρασης, ενώ για 58 ετεροδιμερή υπήρχε συμφωνία με τα δεδομένα έκφρασης.

4.1.5 Συνοπτικός πίνακας δεδομένων

Πίνακας 1 Στη πρώτη στήλη είναι η κατηγορία των δεδομένων. Η μεσαία στήλη είναι ο αριθμός δεδομένων που βρέθηκαν μετά τον αποκλεισμό των οσφρητικών υποδοχέων και της οσφρητικής Γα. Τέλος, στη τρίτη στήλη είναι αριθμός των πρωτεϊνών με δεδομένα έκφρασης σε κυτταρικούς τύπους και οι αλληλεπιδράσεις που υποστηρίζονται από αυτά τα δεδομένα.

	Αριθμός	Δεδομένα έκφρασης
GPCRs με ζευγάρι	238	113
Γα πρωτεΐνες	16	14
Τελεστές των Γα	75	61
Αλληλ. GPCR - Γα	1,223	573
Αλληλ. Γα - τελεστής	315	246
Αλληλ. GPCR – GPCR*	238	50

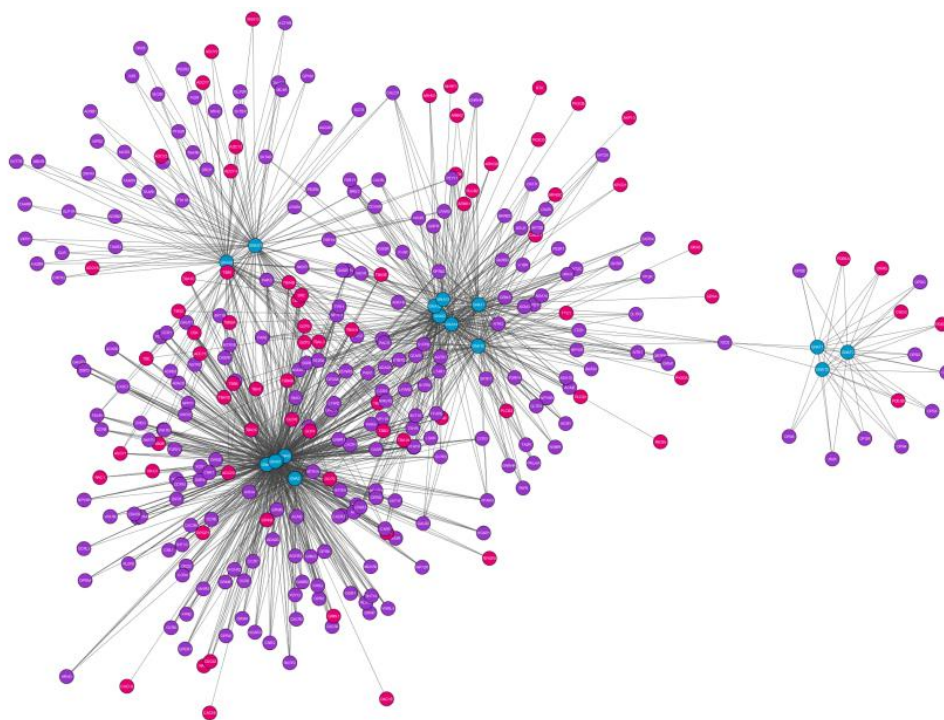
*αφορά αλληλεπιδράσεις μόνο μεταξύ των GPCR με ζευγάρι

4.2 Δίκτυα

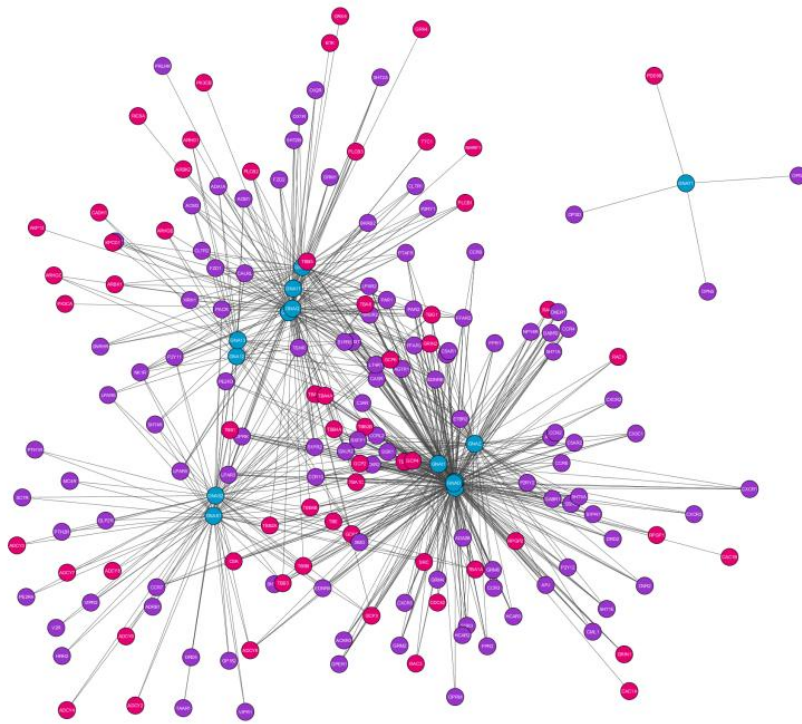
4.2.1 Συνολικό δίκτυο σηματοδότησης από Human-gpDB

Δημιουργήθηκε δίκτυο σηματοδότησης με τα δεδομένα της Human-gpDB το οποίο αποτελείται από 329 κόμβους και 1538 ακμές. Οι κόμβοι αντιστοιχούν σε 238 GPCR, 16 Gα και 75 τελεστές. Οι ακμές είναι αλληλεπιδράσεις των Gα με GPCRs και τελεστές. Αφαίρεση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών χωρίς γνωστή κοινή θέση έκφρασης, έχει ως αποτέλεσμα ένα νέο δίκτυο με 187 κόμβους (GPCRs:119, Gα:14, τελεστές:60) και 819 ακμές. Και στα δύο δίκτυα κεντρικό ρόλο έχουν οι Gα πρωτεΐνες.

Όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες, και τα δύο δίκτυα αποτελούνται από ένα ενιαίο στοιχείο, χωρίς δηλαδή να διασπάται το δίκτυο σε επιμέρους μη συνδεδεμένα στοιχεία. Αξίζει να σημειωθεί επίσης η εμφανής πολυπλοκότητα των δικτύων, ειδικά αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι βλέπουμε μόνο ένα μέρος της σηματοδότησης των GPCRs, αυτό μέσω των Gα πρωτεϊνών, και μόνο για ένα μέρος των GPCRs. Από τα δίκτυα αυτά λείπουν στοιχεία όπως η σηματοδότηση μέσω άλλων οδών (Gβγ, β-αρρεστίνες και άλλες πρωτεΐνες), ρυθμιστικά στοιχεία (π.χ. GRKs, GAPs), υποκαταστάτες, αλληλεπίδραση με σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων υποδοχέων (όπως υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης).



Εικόνα 29 Δίκτυο σηματοδότησης GPCRs μέσω Gα σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-gpDB. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετική κατηγορία πρωτεϊνών: γαλάζιο – Gα, μωβ – GPCRs, ροζ – ΤΕΛΕΣΤΕΣ.



Εικόνα 30 Το ίδιο δίκτυο με τη παραπάνω εικόνα μετά την αφαίρεση αλληλεπιδράσεων χωρίς γνωστή κοινή θέση έκφρασης. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε διαφορετική κατηγορία πρωτεϊνών: γαλάζιο – Gα, μωβ – GPCRs, ροζ – τελεστές

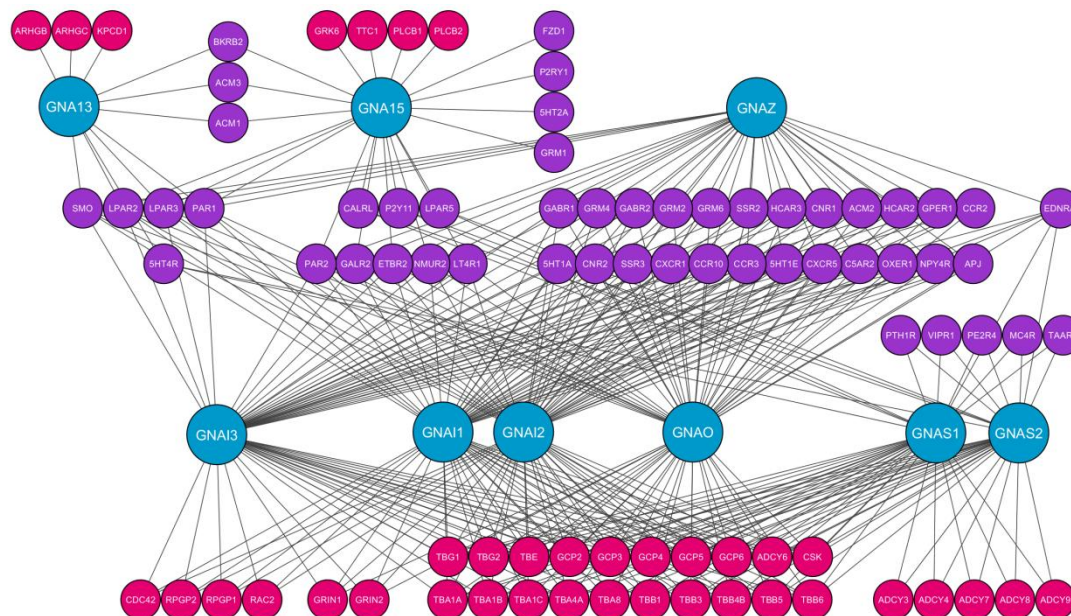
4.2.2 Δίκτυα σηματοδότησης ανά κυτταρικό τύπο

Δίκτυα σηματοδότησης που αποτελούνται από όλα τα δυνατά μονοπάτια είναι χρήσιμα καθώς προσφέρουν μια γενική εικόνα της διαδικασίας αυτή. Επιτρέπουν τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιμέρους στοιχείων που διεκπεραιώνουν τη μετάδοση σήματος προς το εσωτερικό του κυττάρου. Στη πραγματικότητα όμως αυτά τα δίκτυα δεν είναι υπάρχουν αυτούσια σε κανένα κύτταρο, καθώς δεν είναι δεδομένο ότι όλες οι πρωτεΐνες του δικτύου εκφράζονται στο ίδιο κύτταρο.

Ανάλογα με το κυτταρικό τύπο, τη φάση του κυτταρικού κύκλου και άλλων συνθηκών το κάθε κύτταρο εκφράζει μόνο ένα μικρό μέρος από όλες τις δυνατές πρωτεΐνες. Επομένως κάθε κύτταρο περιέχει μόνο ορισμένες σηματοδοτικές πρωτεΐνες, αυτές καθορίζουν τι είδους σήματα μπορεί να αντιληφθεί, αλλά και πώς αποκρίνεται σε αυτά το κύτταρο. Τελικά μέσα σε κάθε κύτταρο δρα ένα υποδίκτυο του συνολικού δικτύου σηματοδότησης.

Εκτός από τα συνολικά δίκτυα, κατασκευάστηκαν δίκτυα για κάθε κυτταρικό τύπο. Αυτά αποτελούνται από όσες πρωτεΐνες του συνολικού δικτύου εκφράζονται στο κυτταρικό τύπο και όλες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι μόνοι κυτταρικοί τύποι για τους οποίους δεν μπορούσε να κατασκευαστεί δίκτυο ανήκαν στον ιστό του αμφιβληστροειδή ή της υπόφυσης. Αυτό ήταν γιατί δεν υπήρχαν δεδομένα έκφραση

G-πρωτεϊνών ή τελεστών σε αυτούς τους ιστούς, για τους οποίους, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχουν γίνει ελάχιστα πειράματα από τον HPA. Ως παράδειγμα παρατίθεται παρακάτω το δίκτυο σηματοδότησης του κυτταρικού τύπου νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού.



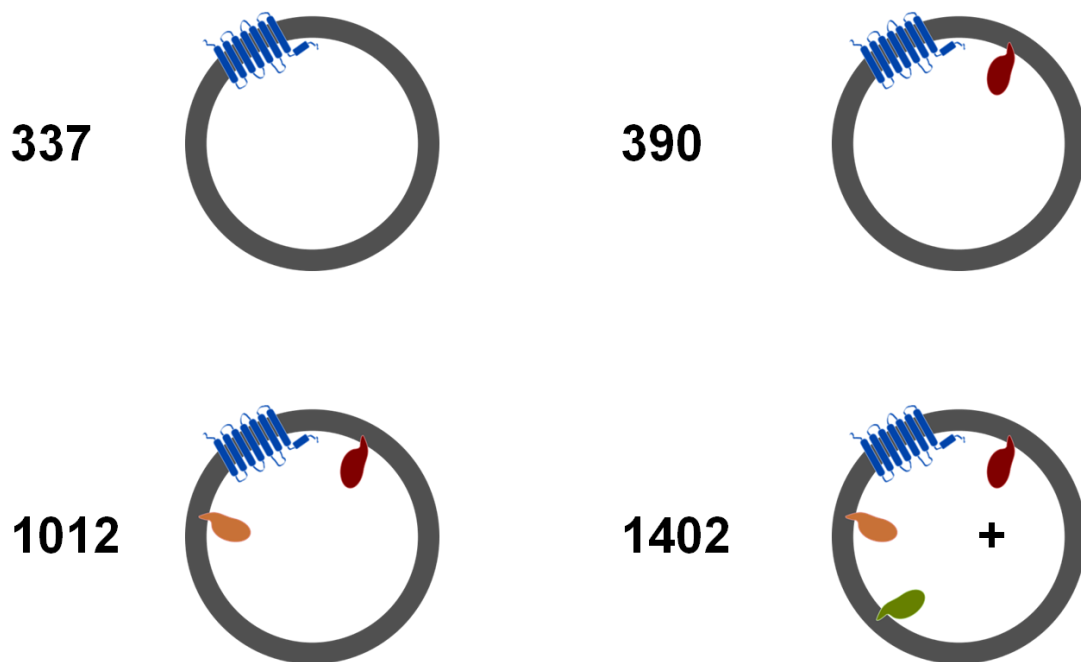
Εικόνα 31 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Το δίκτυο αυτό είναι σαφώς πιο μικρό από το γενικό δίκτυο. Αποτελείται από 97 πρωτεΐνες, 50 GPCRs (μωβ χρώμα), 9 Ga (γαλάζιο) και 38 τελεστές (ροζ). Ως ετικέτα στους κόμβους είναι το UniProtKB ID της πρωτεΐνης.

4.3 Εξειδίκευση ζευγαριών GPCR – Ga ανά κυτταρικό τύπο

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, καθώς και από τα δεδομένα της εργασίας, ότι πολλοί GPCRs αλληλεπιδρούν με περισσότερες τις μίας Ga πρωτεΐνης και κάθε Ga με τη σειρά της αλληλεπιδρά με πολλαπλούς GPCRs. Τίθεται επομένως το ερώτημα του πως διασφαλίζεται η εξειδίκευση που απαιτείται για την μεταγωγή του κάθε σήματος. Ένας γνωστός τρόπος με τον οποίο εξασφαλίζεται η εξειδίκευση είναι υποκαταστάτες που ενεργοποιούν επιλεκτικά ορισμένα από τα πιθανά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Άλλος πιθανός τρόπος είναι μέσω της έκφρασης διαφορετικών Ga σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Για το σύνολο των GPCRs με πληροφορίες για την αλληλεπίδραση με Ga υπολογίστηκε ο αριθμός των κυτταρικών θέσεων όπου εκφράζονται χωρίς κάποια Ga πρωτεΐνη με την οποία αλληλεπιδρούν, με μία, με δύο ή με τρεις ή περισσότερες Ga. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι είναι πιθανό να εξασφαλίζεται εν μέρει η εξειδίκευση μέσω της έκφρασης ορισμένων Ga στους κυτταρικούς τύπους.

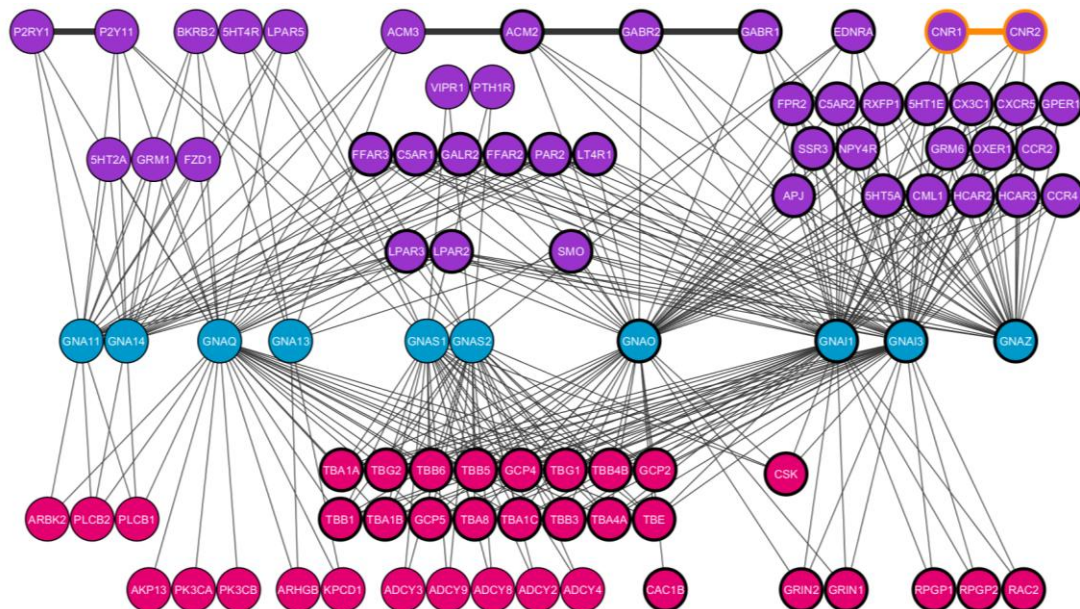
Σε 337 περιπτώσεις έχουμε έκφραση GPCR χωρίς Gα με την οποία αλληλεπιδρά. Πιθανές εξηγήσεις για αυτές είναι ότι τα δεδομένα έκφρασης δεν είναι πλήρη, αλληλεπιδρούν με κάποια άλλη Gα, συμμετέχουν σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι ανεξάρτητο των G-πρωτεϊνών, κ.α.. Σε 390 περιπτώσεις συνεκφράζονται με μόνο μία Gα με την οποία αλληλεπιδρούν, σε 1,012 με δύο Gα και σε 1,402 με τρεις ή περισσότερες Gα.



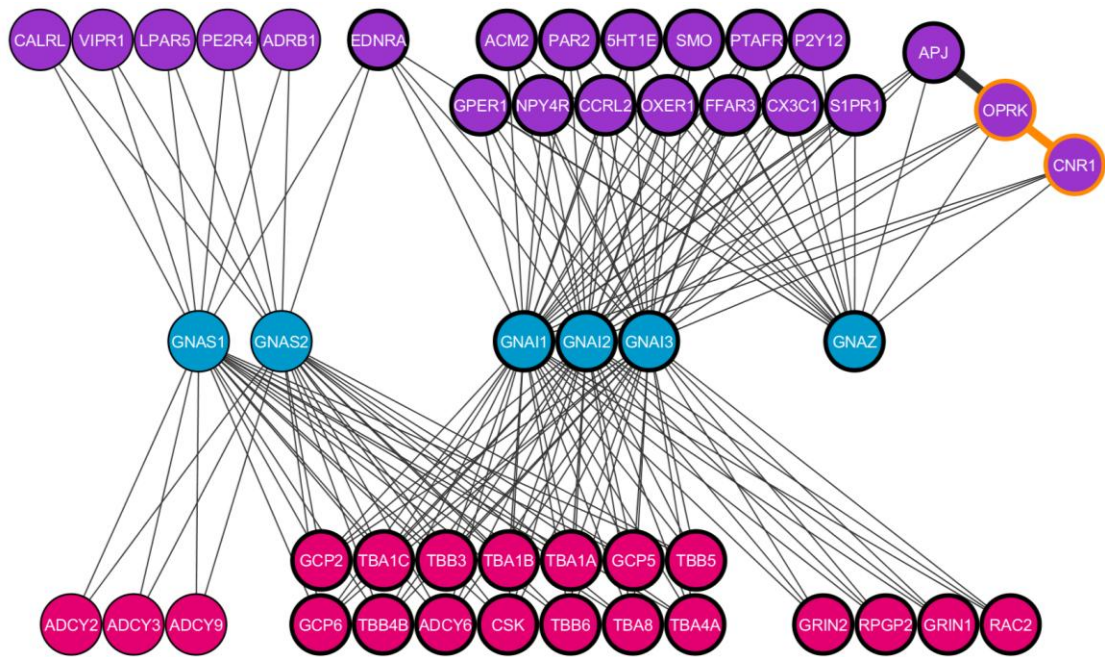
Εικόνα 32 Απεικονίζονται οι διάφορες περιπτώσεις συνέκφρασης GPCR και Gα με τις οποίες αλληλεπιδρούν. Πάνω αριστερά δεν εκφράζεται Gα με την οποία αλληλεπιδρά μαζί με το GPCR στο ίδιο κύτταρο. Πάνω δεξιά εκφράζεται μόνο μία, κάτω αριστερά δύο και κάτω δεξιά τρεις ή περισσότερες Gα.

4.4 Εξειδίκευση ετεροδιμερών GPCR ανά κυτταρικό τύπο

Ομοίως με τα ζευγάρια GPCR – Gα, ο σχηματισμός ετεροδιμερών GPCRs καθοδηγείται από την έκφραση διαφορετικών GPCRs στο κάθε κυτταρικό τύπο. Ένας GPCR που μπορεί να σχηματίσει διαφορετικά ετεροδιμερή και εκφράζεται σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους, μπορεί να σχηματίζει διαφορετικά ετεροδιμερή σε κάθε θέση έκφρασης. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ένα τέτοιο παράδειγμα, όπου ο GPCR κανναβινοειδής υποδοχέας 1 σχηματίζει ετεροδιμερές με τον κανναβινοειδή υποδοχέα 2 στους νευρώνες του κερκοφόρου πυρήνα, και με τον οπιοειδή υποδοχέα τύπου κάππα στα γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Και οι τρεις υποδοχείς έχουν σοβαρό θεραπευτικό ενδιαφέρον καθώς είναι στόχοι φαρμακευτικών και ναρκωτικών ουσιών. Τα διαφορετικά ετεροδιμερή μπορεί να επηρεάζουν τη δράση αυτών των ουσιών στα διαφορετικά μέρη του εγκεφάλου.



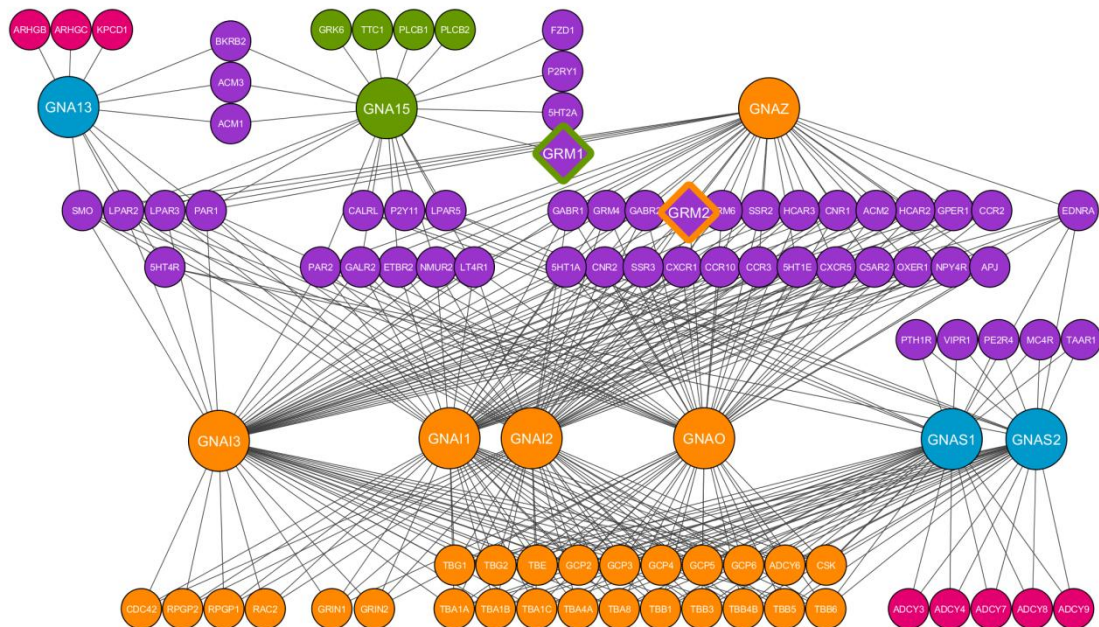
Εικόνα 33 Δίκτυο σηματοδότησης κυτταρικού τύπου νευρώνες του κερκοφόρου πυρήνα. Με παχιά γραμμή συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των GPCRs. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται το ετεροδιμερές που σχηματίζεται μεταξύ του κανναβινοειδή υποδοχέα 1 και του κανναβινοειδή υποδοχέα 2.



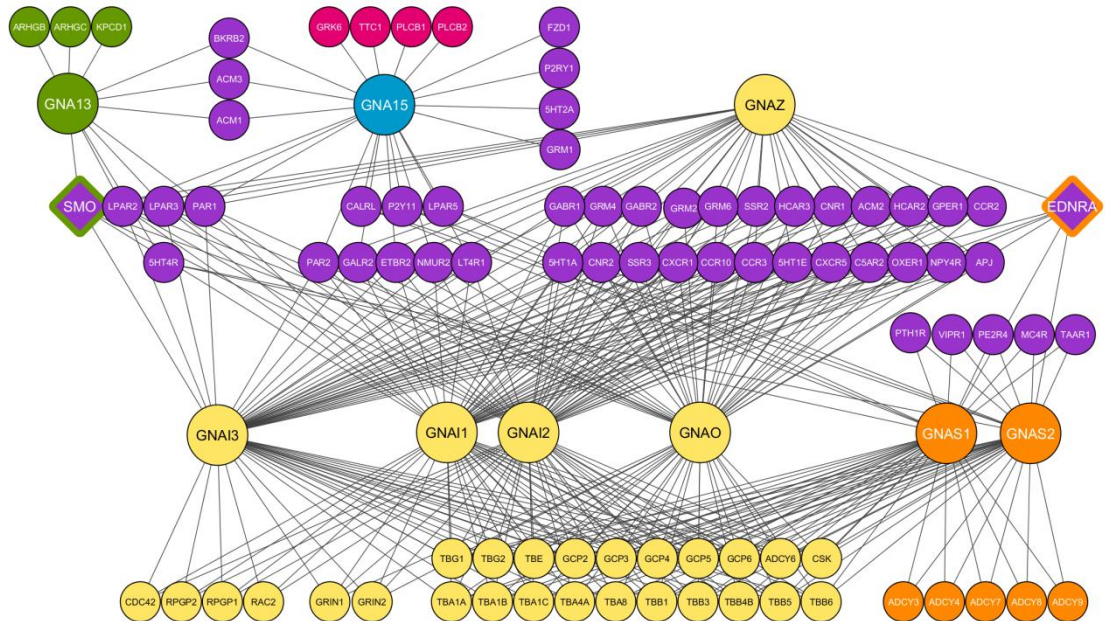
Εικόνα 34 Δίκτυο σηματοδότησης κυτταρικού τύπου γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Με παχιά γραμμή συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των GPCRs. Με πορτοκαλί χρώμα σημειώνεται το ετεροδιμερές που σχηματίζεται μεταξύ του κανναβινοειδή υποδοχέα 1 και του οπιοειδή υποδοχέα τύπου κάππα.

4.5 Αλληλοεπικάλυψη σηματοδοτικών μονοπατιών διαφορετικών GPCRs

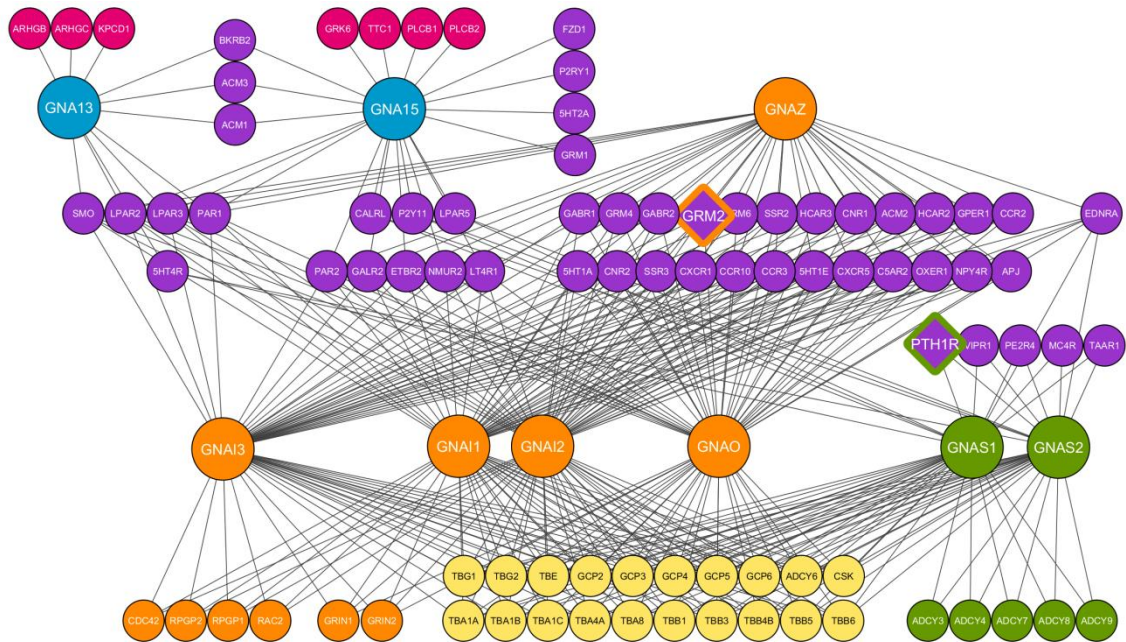
Υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός G-πρωτεϊνών, με κάθε G-πρωτεΐνη να αλληλεπιδρά με περισσότερων του ενός GPCR, καθώς και με GPCRs που αλληλεπιδρούν με περισσότερες από μία G-πρωτεΐνη. Επίσης ορισμένοι τελεστές αλληλεπιδρούν με περισσότερες της μία Gα πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια δύο GPCRs είναι πιθανό να επικαλύπτονται είτε γιατί επιδρούν πάνω στην ίδια Gα πρωτεΐνη, είτε επειδή επιδρούν σε διαφορετικές Gα που αλληλεπιδρούν με τον ίδιο τελεστή. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται παραδείγματα για τρεις περιπτώσεις: τα μονοπάτια δύο GPCRs δεν επικαλύπτονται, επικαλύπτονται σε Gα πρωτεΐνη και επικαλύπτονται σε τελεστή.



Εικόνα 35 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Με μεγαλύτερο μέγεθος και σχήμα ρόμβου είναι σημειωμένοι δύο GPCRs, με πράσινο περίγραμμα ο μεταβοτροπικός υποδοχέας γλουταμικού 1 (GRM1) και με πορτοκαλί περίγραμμα ο μεταβοτροπικός υποδοχέας γλουταμικού 2 (GRM2). Με αντίστοιχο χρώμα είναι χρωματισμένοι οι κόμβοι που ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα. Όπως φαίνεται εδώ τα σηματοδοτικά μονοπάτια των δύο υποδοχέων δεν αλληλεπικαλύπτονται.



Εικόνα 36 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Με μεγαλύτερο μέγεθος και σχήμα ρόμβου είναι σημειωμένοι δύο GPCRs, με πράσινο περίγραμμα ο smoothed υποδοχέας (SMO) και με πορτοκαλί περίγραμμα ο υποδοχέας ενδοθηλίνης 1 (EDNRA). Με αντίστοιχο χρώμα είναι χρωματισμένοι οι κόμβοι που ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα, κόμβοι που ανήκουν και στα δύο μονοπάτια είναι χρώματος κίτρινο. Όπως φαίνεται εδώ τα σηματοδοτικά μονοπάτια των δύο υποδοχέων αλληλεπικαλύπτονται, καθώς αλληλεπιδρούν με τέσσερις κοινές Ga πρωτεΐνες.



Εικόνα 37 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού. Με μεγαλύτερο μέγεθος και σχήμα ρόμβου είναι σημειωμένοι δύο GPCRs, με πράσινο περίγραμμα ο υποδοχέας παραθυρεοειδικής ορμόνης 1 (PTH1R) και με πορτοκαλί περίγραμμα ο μεταβοτροπικός υποδοχέας γλουταμικού 2 (GRM2). Με αντίστοιχο χρώμα είναι χρωματισμένοι οι κόμβοι που ανήκουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα, κόμβοι που ανήκουν και στα δύο μονοπάτια είναι χρώματος κίτρινο. Όπως φαίνεται εδώ τα σηματοδοτικά μονοπάτια των δύο υποδοχέων αλληλεπικαλύπτονται, καθώς οι Ga πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρούν, αν και διαφορετικές, έχουν κοινούς τελεστές.

Το φαινόμενο της αλληλοεπικάλυψης των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη μελέτη ασθενειών και φαρμάκων. Όταν η λειτουργία ενός υποδοχέα διαταραχθεί, λόγω μιας μεταλλαγής ή της δράσης ενός φαρμάκου, θα επηρεαστούν όλες οι Gα πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά και οι αντίστοιχοι τελεστές τους. Αυτό σημαίνει ότι θα διαταραχθεί η σηματοδότηση όλων των υποδοχέων των οποίων τα σηματοδοτικά μονοπάτια αλληλεπικαλύπτονται με αυτά του πρώτου υποδοχέα. Οποιαδήποτε μεταβολή σε έναν GPCR θα διαδοθεί στο υπόλοιπο δίκτυο.

4.6 Ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακής οντολογίας

Από το σύνολο των πρωτεϊνών του δικτύου σηματοδότησης, 327 χαρακτηρίζονται από τουλάχιστον έναν όρο γονιδιακής οντολογίας που ανήκει σε βιολογική διεργασία. Στατιστική ανάλυση μέσω του εργαλείου BiNGO με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.01$ είχε ως αποτέλεσμα 828 όρους βιολογικής διεργασίας που ήταν εμπλουτισμένοι. Αυτό σημαίνει ότι βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά περισσότερες πρωτεΐνες που σχετίζονταν με το κάθε όρο, από όσες θα αναμενόταν λόγω τύχης για το μέγεθος του συνόλου των πρωτεϊνών.

Πολλοί από αυτούς τους όρους σχετίζονταν με τη σηματοδότηση και τους GPCRs, όπως ήταν αναμενόμενο. Για παράδειγμα οι γενικοί όροι κυτταρική επικοινωνία (cell communication), μεταγωγή σήματος (signal transduction) και σηματοδοτικό μονοπάτι συζευγμένου με G-πρωτεΐνες υποδοχέα (G-protein coupled receptor signaling pathway), που χαρακτηρίζουν σχεδόν όλες τις πρωτεΐνες του δικτύου. Υπήρχαν επίσης όροι που σχετίζονταν με περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, αλλά που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με GPCRs, όπως ρύθμιση της αδενυλικής κυκλάσης ($p = 2.296E-60$), θετική ρύθμιση καταρράκτη MAP κινασών ($p = 5.9249E-21$), οπτικής μεταγωγής ($p = 1.13E-15$) και σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt ($p = 2.26E-07$). Ακόμα, βρέθηκαν πολλοί όροι που σχετίζονται με το κυτταροσκελετό και τη βιοσύνθεση κυκλικών νουκλεοτιδίων, αποτέλεσμα της ύπαρξης στο σύνολο μεγάλου αριθμού τουμπουλινών και αδενυλικών κυκλασών και ρυθμιστών τους, αντίστοιχα.

Άλλοι όροι σχετίζονται με φυσιολογικές λειτουργίες, που μπορεί να βρίσκονται υπό τον έλεγχο των GPCRs. Όροι που σχετίζονται με το κυκλοφοριακό σύστημα, όπως κυκλοφορία του αίματος (blood circulation), ρύθμιση διαμέτρου αγγείου αίματος (regulation of blood vessel diameter), αιμόσταση (hemostasis), πήξη αίματος (blood coagulation). Τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μετανάστευση των T κυττάρων (T cell migration) και χημειόταξη λευκοκυττάρων (leukocyte chemotaxis). Τις λειτουργίες του εγκεφάλου, ρύθμιση της συμπεριφοράς (regulation of behavior), γνωστική λειτουργία (cognition), κίνηση (locomotion). Καθώς και άλλες λειτουργίες, για παράδειγμα σύσπαση μυών (muscle contraction), ρύθμιση κερκαδικού ρυθμού (regulation of circadian rhythm), νεφρικό σύστημα (renal system process).

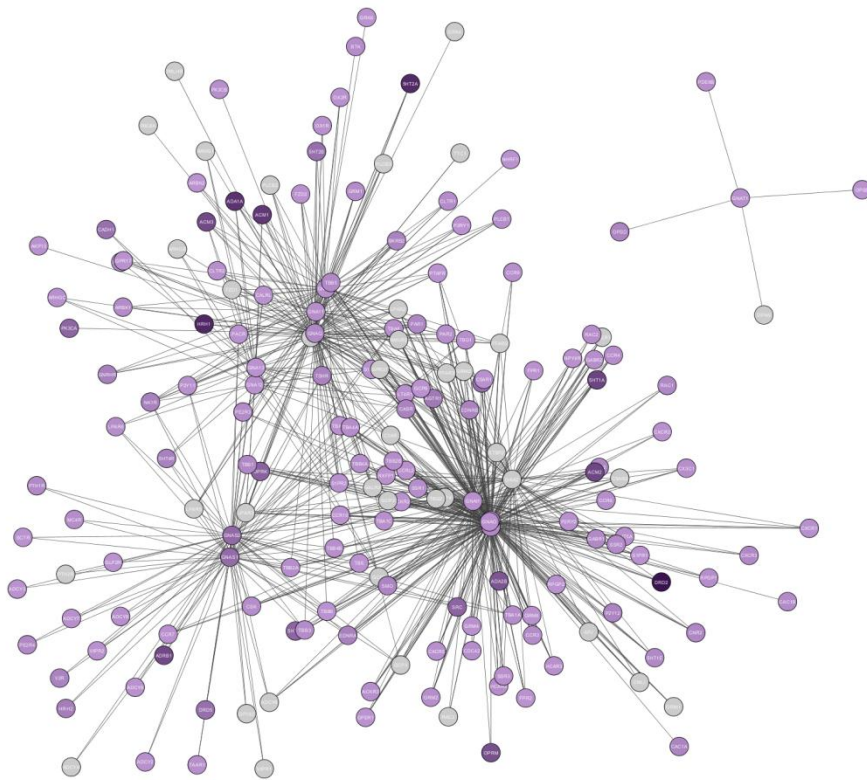
4.7 Συσχέτιση με ασθένειες και φάρμακα

Οι περισσότερες πρωτεΐνες του δικτύου της Human-gpDB σχετίζονται με τουλάχιστον μία ασθένεια (224 πρωτεΐνες) και σχεδόν οι μισές είναι στόχος φαρμάκου (155 πρωτεΐνες). Το ίδιο ισχύει για το περιορισμένο με δεδομένα έκφρασης δίκτυο, με 138 πρωτεΐνες να σχετίζονται με ασθένειες και 87 να είναι στόχος φαρμάκου. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα δίκτυα αυτά με το χρώμα των κόμβων να αντιστοιχεί στον αριθμό ασθενειών ή/και φαρμάκων με τα οποία σχετίζεται η κάθε πρωτεΐνη.

Ασθένειες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες του δικτύου συμπεριλαμβάνουν σοβαρές ψυχιατρικές ασθένειες, όπως είναι η σχιζοφρένεια. Επίσης, τα στοιχεία του δικτύου φαίνονται να σχετίζονται με ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος, όπως υπέρταση και υπόταση, παθήσεις που σχετίζονται με την εξάρτηση από ουσίες σαν τη κοκαΐνη και το αλκοόλ, με την αίσθηση του πόνου και την υπεραλγησία, δηλαδή την αυξημένη αίσθηση του πόνου. Τέλος εντοπίζονται συσχετίσεις με διάφορες μορφές καρκίνου, για παράδειγμα καρκίνο του στομάχου, του στήθους και μελάνωμα.



Εικόνα 38 Δίκτυο σηματοδότησης με τα δεδομένα της Human-gpDB. Κόμβοι με το χρώμα γκρι είναι πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται με ασθένειες και φάρμακα. Με χρώμα μωβ είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με ασθένειες ή/και φάρμακα, όσο πιο σκούρο τόσες πιο πολλές ασθένειες/φάρμακα.



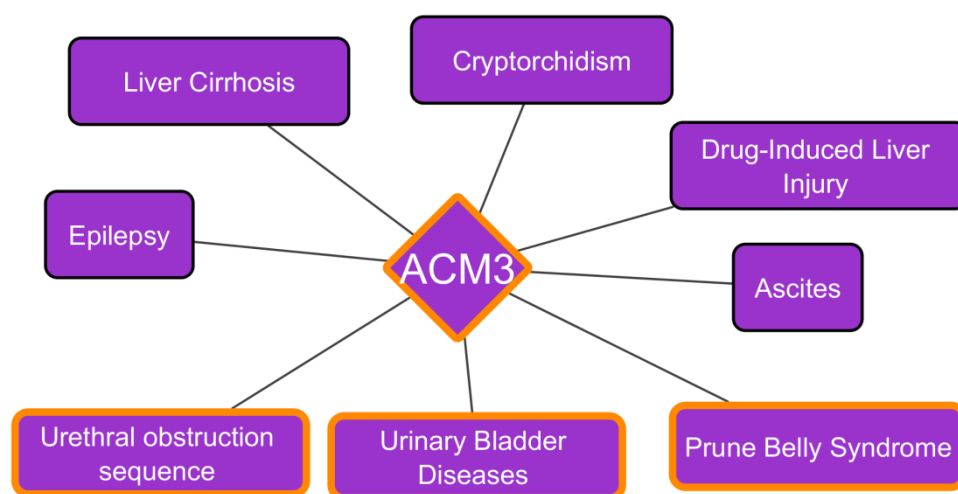
Εικόνα 39 Δίκτυο σηματοδότησης με τα δεδομένα της Human-gpDB περιορισμένο με δεδομένα έκφρασης. Κόμβοι με το χρώμα γκρι είναι πρωτεΐνες που δεν σχετίζονται με ασθένειες και φάρμακα. Με χρώμα μωβ είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με ασθένειες ή/και φάρμακα, όσο πιο σκούρο τόσες πιο πολλές ασθένειες/φάρμακα.

4.8 Παραδείγματα μελέτης

4.8.1 Μουσκαρινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης M3

Ο μουσκαρινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης M3 (ACM3) ελέγχει τη σύσπαση λείων μυών και την έκκριση αδένων. Εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, όπως είναι ο εγκέφαλος (Weston-Green, et al., 2012), β-κύτταρα του παγκρέατος (Ruiz de Azua, et al., 2012) και στους λείους μυς του αναπνευστικού συστήματος (Roffel, et al., 1990). Είναι στόχος 61 φαρμάκων σύμφωνα με τα δεδομένα της DrugBank. Φάρμακα τα οποία δρουν μέσω του ACM3 δίνονται για προβλήματα όπως είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), το σύνδρομο της υπερδραστήριας ουροδόχου κύστης (Over Active Bladder) και για πεπτικά έλκη (peptic ulcer).

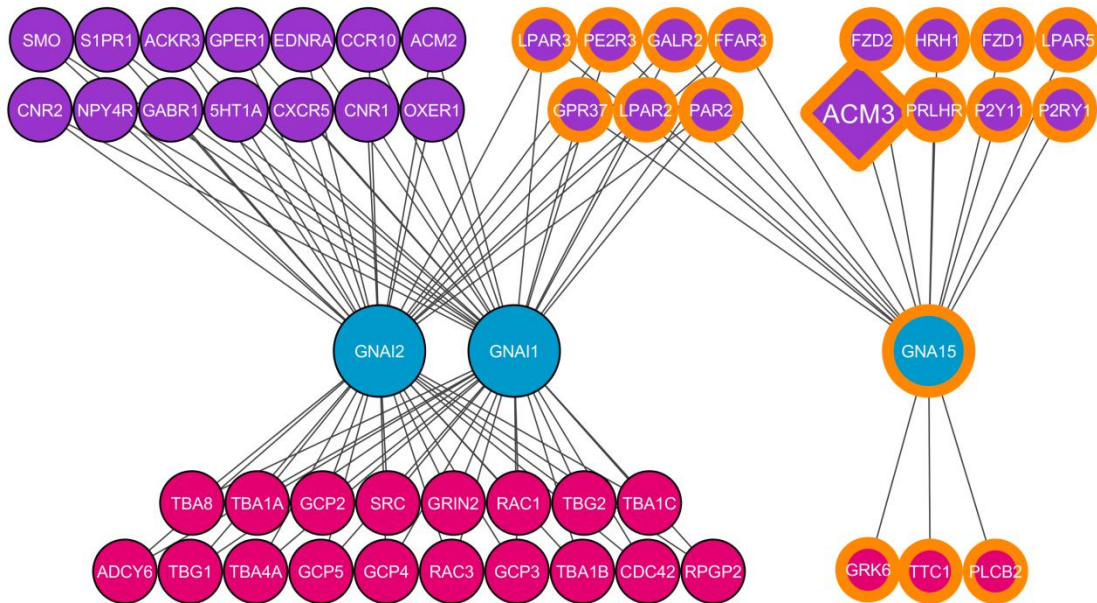
Αλλά υπάρχουν και πολλά φάρμακα των οποίων είναι στόχος και δεν υπάρχει, ή δεν είναι γνωστό αν υπάρχει, κάποια φαρμακολογική δράση ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης τους. Σε αυτά περιλαμβάνονται φάρμακα για κατάθλιψη, αλλεργίες, παυσίπονα, αλλά και φάρμακα για σοβαρές ψυχιατρικές ασθένειες, όπως είναι αντιψυχωτικά φάρμακα. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι γνωστή η επίδραση αυτών των φαρμάκων στον ACM3.



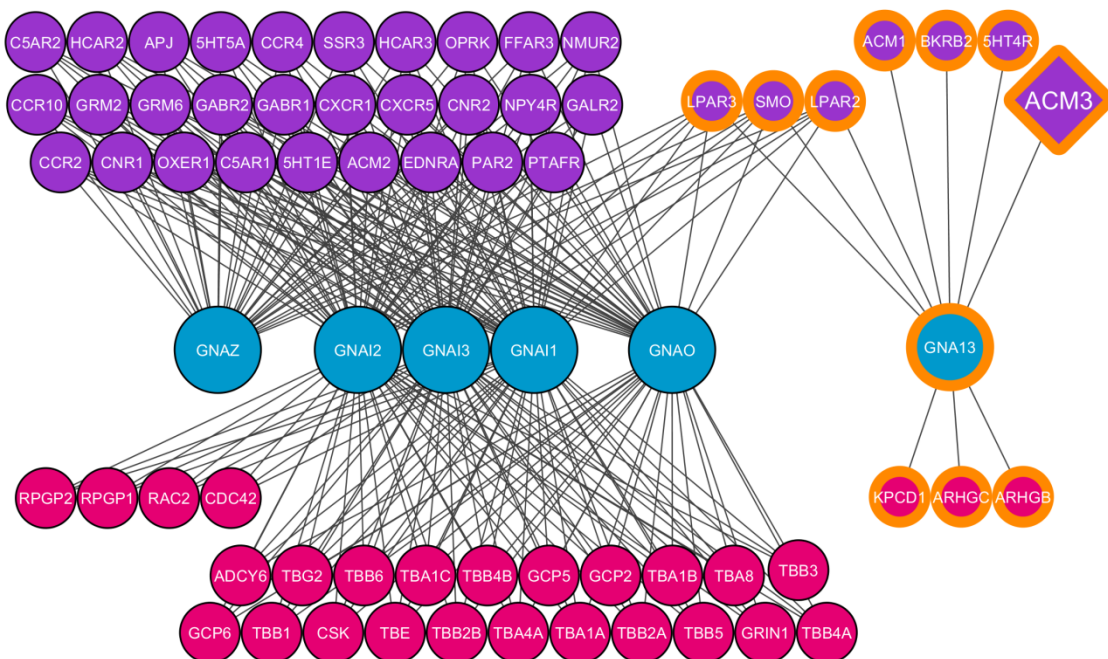
Εικόνα 40 Εδώ φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται ο μουσκαρινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης M3 (ACM3) σύμφωνα με τα δεδομένα της DisGeNET. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι ασθένειες που αφορούν την ουροδόχο κύστη.

Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα δίκτυα σηματοδότησης σε δύο από τους κυτταρικούς τύπους όπου εκφράζεται ο ACM3. Στο κυτταρικό τύπο λεία μυϊκά κύτταρα ο GPCR αλληλεπιδρά με τη $G_{\alpha_{15}}$ η οποία δρα πάνω σε 3 τελεστές, ενώ στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του ιππόκαμπτου ο ACM3 αλληλεπιδρά με τη $G_{\alpha_{13}}$ που αλληλεπιδρά με 3 διαφορετικούς τελεστές. Φαίνεται το πώς η έκφραση διαφορετικών

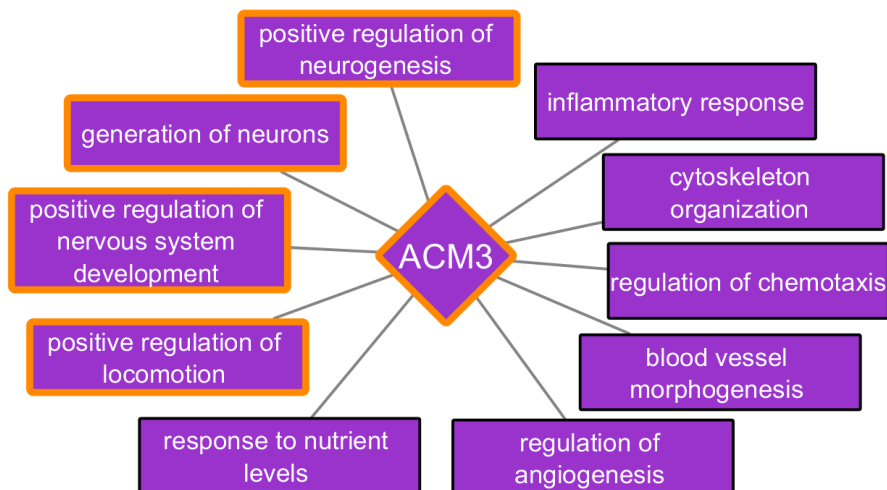
πρωτεϊνών στη κάθε θέση οδηγεί σε διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης για τον ίδιο GPCR.



Εικόνα 41 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο λεία μυϊκά κύτταρα. Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και περίγραμμα χρώματος πορτοκαλί είναι ο ACM3. Στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο αλληλεπιδρά με τη $G_{\alpha 15}$. με πορτοκαλί περίγραμμα φαίνονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και οι GPCRs οι οποίοι σηματοδοτούν μέσω των ίδιων πρωτεϊνών. Αλλαγή στη σηματοδότηση του ACM3 θα επηρεάσει τη σηματοδότηση αυτών των υποδοχέων.



Εικόνα 42 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο νευρώνες του ιππόκαμπτου. Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και περίγραμμα χρώματος πορτοκαλί είναι ο ACM3. Στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο αλληλεπιδρά με τη $G_{\alpha 13}$. με πορτοκαλί περίγραμμα φαίνονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και οι GPCRs οι οποίοι σηματοδοτούν μέσω των ίδιων πρωτεϊνών. Αλλαγή στη σηματοδότηση του ACM3 θα επηρεάσει τη σηματοδότηση αυτών των υποδοχέων.

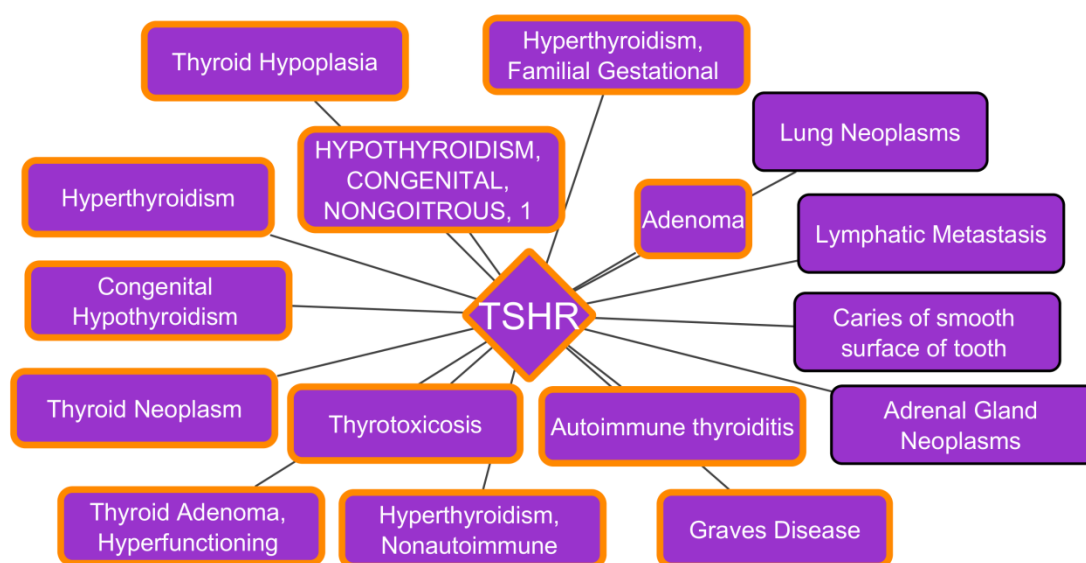


Εικόνα 43 Στη παραπάνω εικόνα φαίνονται ορισμένες από τις βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του ACM3 στους νευρώνες του ιππόκαμπου, αλλά όχι στα λεία μυϊκά κύτταρα. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι όροι που σχετίζονται με το νευρικό σύστημα.

Όπως προαναφέρθηκε, ο ACM3 είναι στόχος φαρμάκων. Ένα φάρμακο το οποίο δρα πάνω στον υποδοχέα στα λεία μυϊκά κύτταρα, μπορεί να έχει απρόβλεπτη και ανεπιθύμητη δράση σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Μάλιστα λόγω της αλληλοεπικάλυψης των σηματοδοτικών μονοπατιών διαφορετικών GPCRs, είναι πιθανό να επηρεαστεί και η σηματοδότηση άλλων GPCRs στο ίδιο κύτταρο. Αντίστοιχα ένα φάρμακο, π.χ. ένα αντιψυχωτικό, που έχει ως στόχο μια άλλη πρωτεΐνη, αλλά μπορεί παρόλα αυτά να προσδεθεί στον ACM3 πιθανώς να επηρεάσει τη λειτουργία του, αλλά και άλλων GPCR στους νευρώνες του ιππόκαμπου μέσω αυτής της αλληλοεπικάλυψης. Αυτά τα παραδείγματα μη σκόπιμης δράσης φαρμάκων μπορεί να αποτελέσει αιτία παρενεργειών.

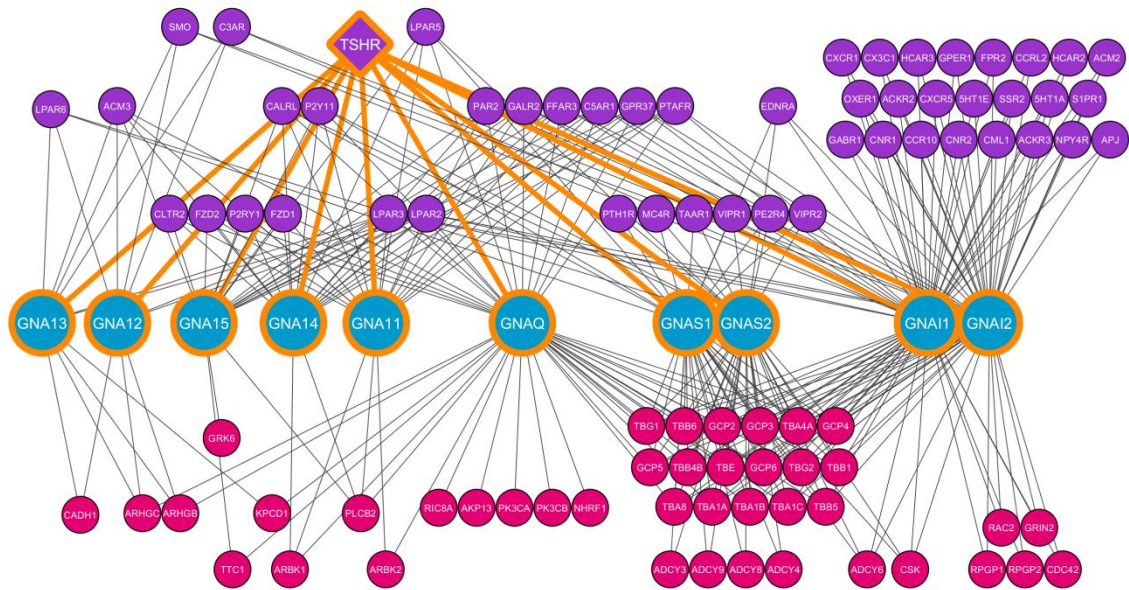
4.8.2 Υποδοχέας θυρεοειδοτρόπου ορμόνης

Ο υποδοχέας θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSHR) εκφράζεται στα θυλακοειδή κύτταρα του θυρεοειδή αδένος. Η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη εκκρίνεται από την υπόφυση και είναι απαραίτητη για τη σύνθεση και έκκριση ορμονών του θυρεοειδή αδένος. Λόγω της σημαντικής λειτουργίας αυτής της ορμόνης, ανωμαλίες του υποδοχέα TSHR σχετίζονται με τη παθογένεια ποικίλων ασθενειών του θυρεοειδή αδένος. Μία τέτοια περίπτωση είναι μεταλλαγή στον TSHR που τον καταστεί ενεργό απουσία της ορμόνης, που οδηγεί σε υπερθυρεοειδισμό. (Ταο, 2008)



Εικόνα 44 Εδώ φαίνονται οι ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται ο υποδοχέας θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSHR) σύμφωνα με τα δεδομένα της DisGeNET. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι οι ασθένειες που αφορούν το θυρεοειδή αδένος.

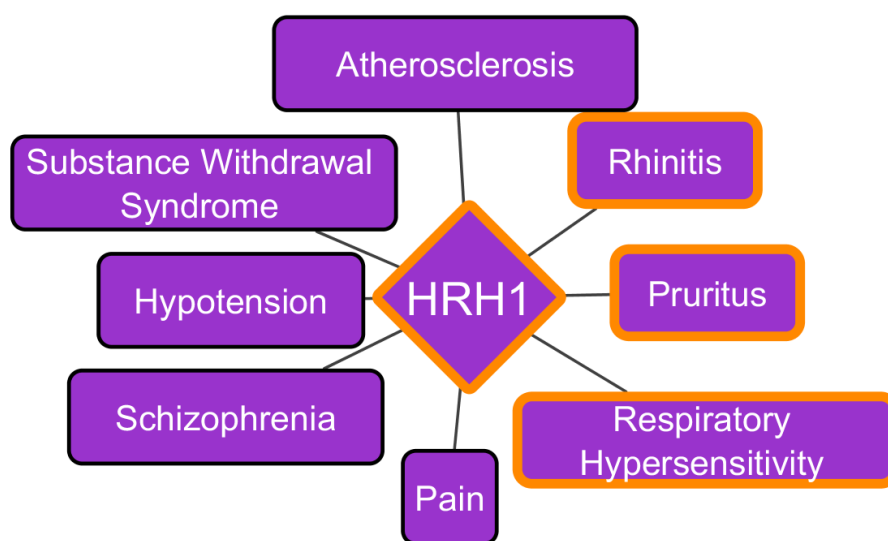
Σύμφωνα με τα δεδομένα από τη Human-gpDB ο TSHR αλληλεπιδρά με όλες τις οικογένειες Gα. Στο κυτταρικό τύπο θυλακοειδή κύτταρα θυρεοειδή ο TSHR αλληλεπιδρά με όλες τις Gα πρωτεΐνες (10) που εκφράζονται εκεί. Αυτές οι Gα με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με 49 άλλους GPCR στον ίδιο κυτταρικό τύπο. Μεταλλαγή που καθιστά τον TSHR ως μόνιμα ενεργό διαταράσσει, όχι μόνο τη δική του σηματοδότηση αλλά και αυτή των άλλων υποδοχέων. Ακόμα και αν αποτέλεσμα της μεταλλαγής είναι η ενεργοποίηση μόνο μίας ή ορισμένων Gα πρωτεϊνών, σημαντικός αριθμός GPCR θα επηρεαστεί. Το γεγονός ότι διαταράσσεται η σηματοδότηση τόσο των υποδοχέων μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη σοβαρότητα της ασθένειας.



Εικόνα 45 Δίκτυο σηματοδότησης του κυτταρικού τύπου θυλακοειδή κύτταρα θυρεοειδή. Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και πορτοκαλί περίγραμμα είναι ο υποδοχέας TSHR. Με παχιά και πορτοκαλί γραμμή φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με τις Gα πρωτεΐνες του δικτύου. Οποιαδήποτε διαταραχή της λειτουργίας του έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη σηματοδότηση όλων των υπόλοιπων GPCR του δικτύου.

4.8.3 Υποδοχέας ισταμίνης 1

Η ισταμίνη είναι μία βιογενής αμίνη που παίζει κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής. Εκκρίνεται ως αποτέλεσμα αλλεργικής αντίδρασης, είναι υπεύθυνη για πολλά από τα άμεσα συμπτώματα της και για αυτό το λόγο οι υποδοχείς της είναι κύριοι στόχοι αντιαλλεργικών φαρμάκων. Ο υποδοχέας ισταμίνης 1 (HRH1) είναι υπεύθυνος για πολλές από τις δράσεις της ισταμίνης, είναι ένας GPCR που δρα μέσω της οικογένειας $G_{\alpha/11}$ και βρίσκεται σε διάφορους ιστούς, όπως σε λείους μύες, νευρώνες, ενδοθήλια. (Bryce, et al., 2006)

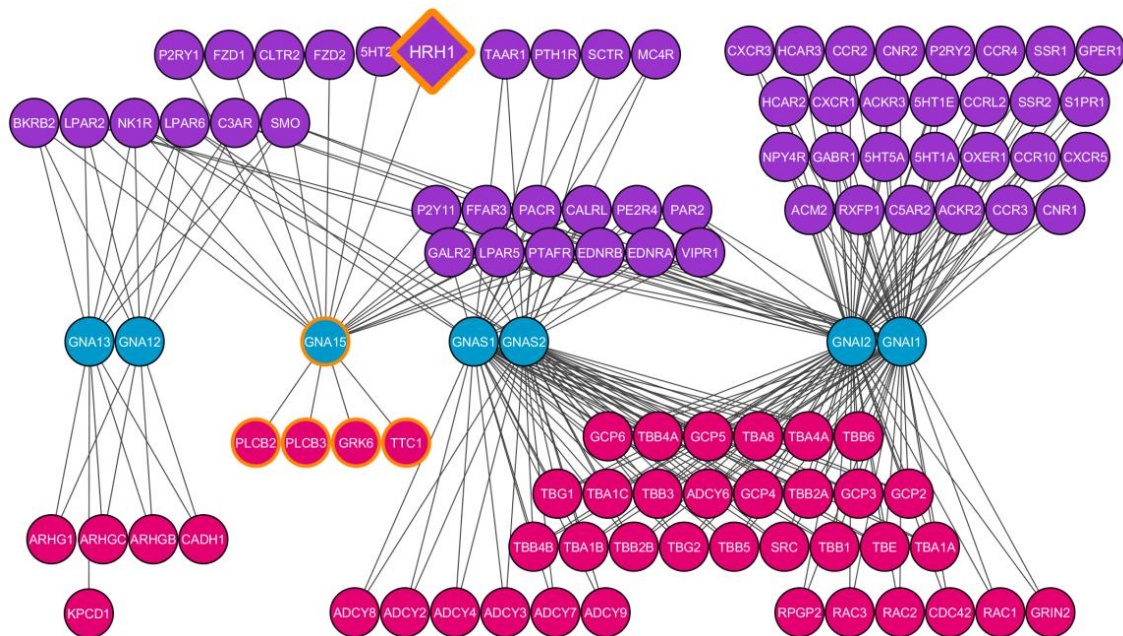


Εικόνα 46 Ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται ο HRH1 σύμφωνα με τη DisGeNET. Με πορτοκαλί χρώμα είναι σημειωμένες ασθένειες/συμπτώματα που σχετίζονται με αλλεργίες.

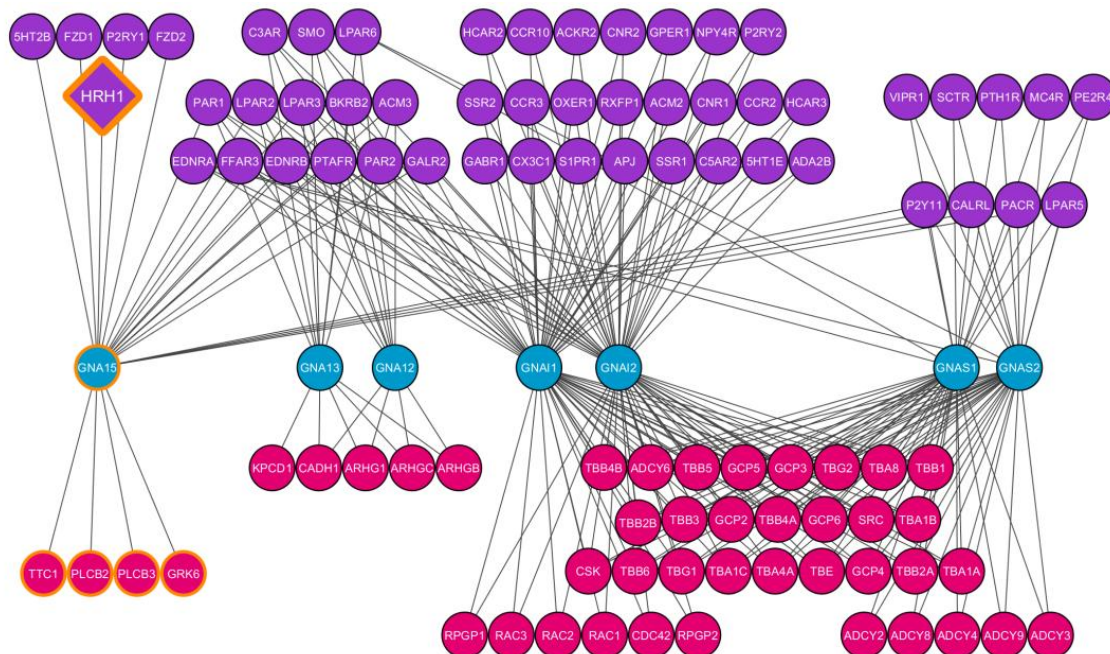
Τα αντιισταμινικά φάρμακα δρουν μέσω του HRH1 και είναι γνωστό ότι προκαλούν ορισμένες παρενέργειες με πιο χαρακτηριστική τη υπνηλία ή νάρκωση (Hindmarch and Shamsi, 1999). Χορηγούνται για την αντιμετώπιση του άσθματος και της αλλεργικής ρινίτιδας. Μία από τις θέσεις δράσεις αυτών των φαρμάκων είναι τα επιθήλια, και πιο συγκεκριμένα το ρινικό επιθήλιο και βρογχικό επιθήλιο (Devalia and Davies, 1999). Υποστηρίζεται ότι τα αντιισταμινικά φάρμακα δεύτερης γενιάς δεν προκαλούν υπνηλία, όμως έχειδειχθεί ότι όλα τα αντιισταμινικά μπορούν να διαπεράσουν το φράγμα αίματος – εγκεφάλου και επομένως ενδέχεται να έχουν κάποια δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), όπου εκφράζονται ισταμινικοί υποδοχείς (Ramaekers and Vermeeren, 2000).

Σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τη DrugBank ο HRH1 είναι στόχος για 92 φάρμακα. Πολλά εκ των οποίων είναι αντιισταμινικά φάρμακα, όπως τα Hydroxyzine, Triprolidine και Clemastine, και μπορεί να προκαλέσουν υπνηλία. Αν και είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας αυτός εκφράζεται και στον εγκέφαλο, ο Human

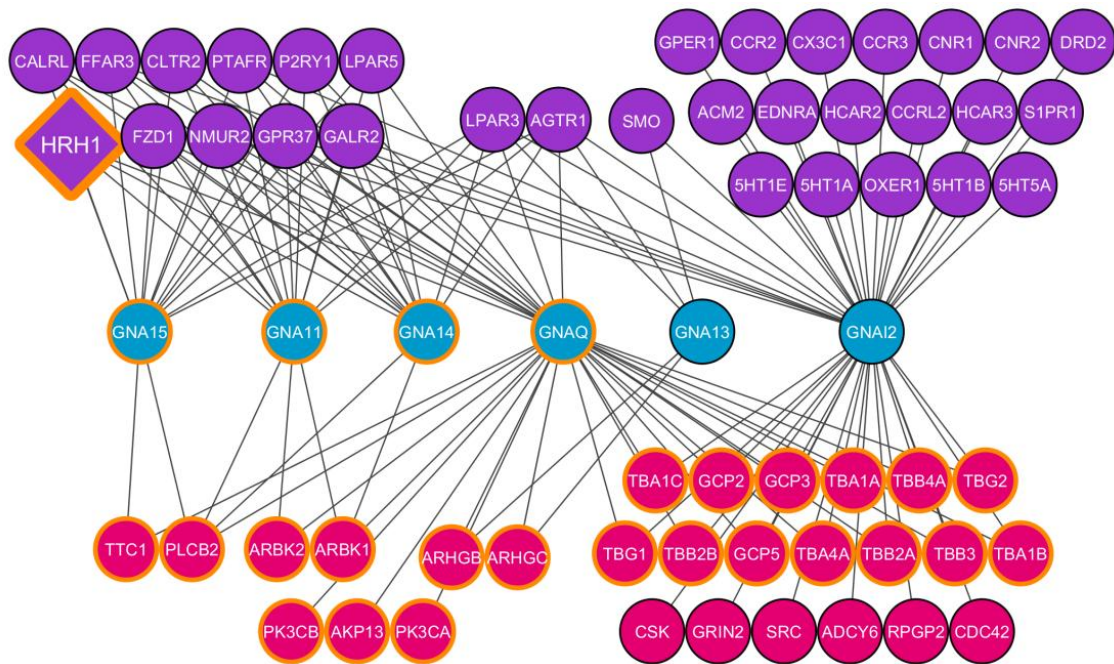
Protein Atlas δεν έχει δεδομένα για έκφραση του στον εγκέφαλο. Αλλά σύμφωνα με τον HPA ο HRH1 εκφράζεται στο βρογχικό και ρινικό αναπνευστικό επιθήλιο και στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο. Παρακάτω βλέπουμε τα δίκτυα σηματοδότησης GPCR σε αυτούς τους ιστούς.



Εικόνα 47 Δίκτυο σηματοδότησης των GPCR στο βρογχικό επιθήλιο (bronchus respiratory epithelial cells). Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και πορτοκαλί περίγραμμα είναι ο υποδοχέας HRH1.

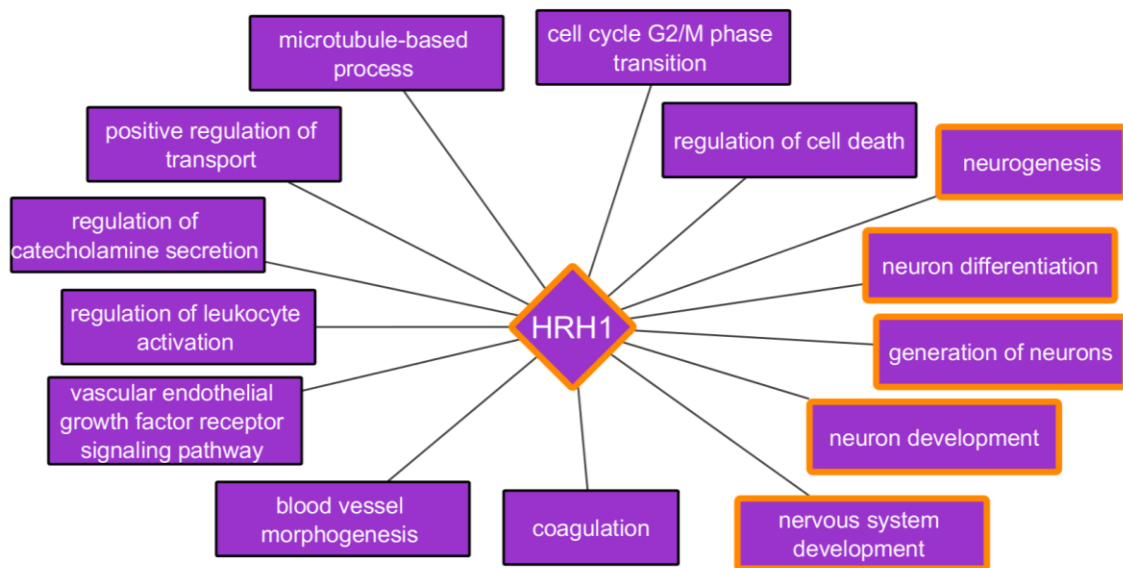


Εικόνα 48 Δίκτυο σηματοδότησης των GPCR στο ρινικό επιθήλιο (nasopharynx respiratory epithelial cells). Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και πορτοκαλί περίγραμμα είναι ο υποδοχέας HRH1.



Εικόνα 49 Δίκτυο σηματοδότησης των GPCR στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο (cerebral cortex endothelial cells). Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και πορτοκαλί περίγραμμα είναι ο υποδοχέας HRH1.

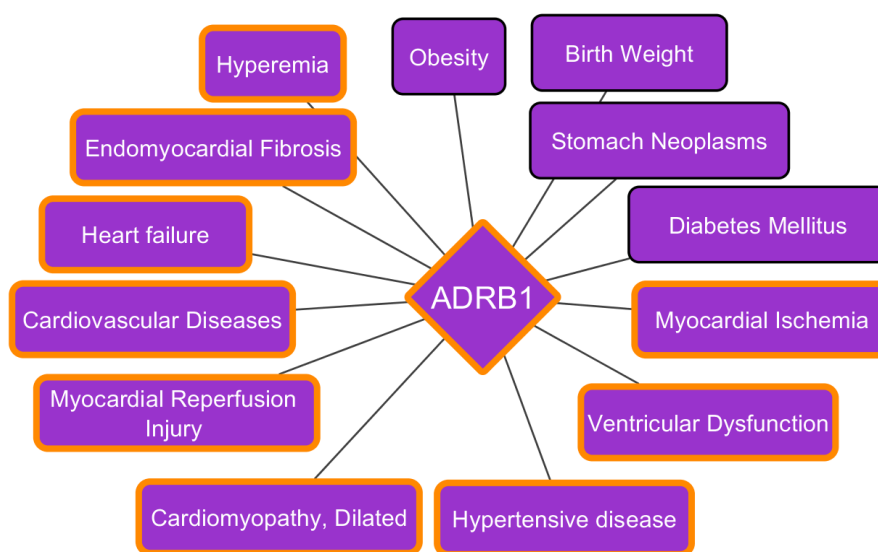
Όπως φαίνεται στις εικόνες, τα σηματοδοτικά μονοπάτια του HRH1 στο βρογχικό και ρινικό επιθήλιο είναι τα ίδια. Ο υποδοχέας δρα μέσω της $G_{\alpha_{15}}$ και ελέγχει 4 τελεστές και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Αντίθετα, στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο εκφράζονται όλα τα μέλη της οικογένειας $G_{\alpha_{q/11}}$ και ο HRH1 αλληλεπιδρά με όλα τα μέλη της και επηρεάζει συνολικά 22 τελεστές. Επομένως είναι δυνατό τα αντισταμινικά φάρμακα να επηρεάζουν τη λειτουργία του εγκεφαλικού ενδοθηλίου, και μάλιστα με πιθανώς διαφορετικό τρόπο από αυτόν με τον οποίο δρουν στο βρογχικό και ρινικό επιθήλιο. Εφόσον το εγκεφαλικό ενδοθήλιο συγκροτεί το φράγμα αίματος – εγκεφάλου (Wylot, et al., 2015), μπορεί να συμβάλει στη παρενέργεια της υπνηλίας που προκαλείται, είτε άμεσα ως αποτέλεσμα της δράσης τους εκεί ή πιθανώς μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα του φράγματος επιτρέποντας την είσοδο των φαρμάκων στο ΚΝΣ όπου δρα στους νευρώνες. Εν πάση περιπτώσει, είτε είναι η δράση των αντισταμινικών στα ενδοθηλιακά ή τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου που προκαλεί τη παρενέργεια, είναι φανερό ότι δράση του φαρμάκου στον υποδοχέα στόχο αλλά όχι στον ιστό στόχο μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα.



Εικόνα 50 Στη παραπάνω εικόνα φαίνονται ορισμένες από τις βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του HRH1 στο εγκεφαλικό ενδοθήλιο, αλλά όχι στο αναπνευστικό επιθήλιο. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι όροι που σχετίζονται με το νευρικό σύστημα.

4.8.4 β1-αδρενεργικός υποδοχέας

Ο β1-αδρενεργικός υποδοχέας (ADRB1) βρίσκεται κυρίως στη καρδιά και είναι ο επικρατέστερος τύπος β-αδρενεργικών υποδοχέων στη καρδιά (Madamanchi, 2007). Οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς προσδένουν τις κατεχολαμίνες αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη και δρουν μέσω της Gas ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση. Εκτός από τη καρδιά, ο ADRB1 εκφράζεται και στον εγκέφαλο, κυρίως στους νευρώνες, και πιθανώς να σχετίζεται με τη συναπτική πλαστικότητα (Χυ, et al., 2001).



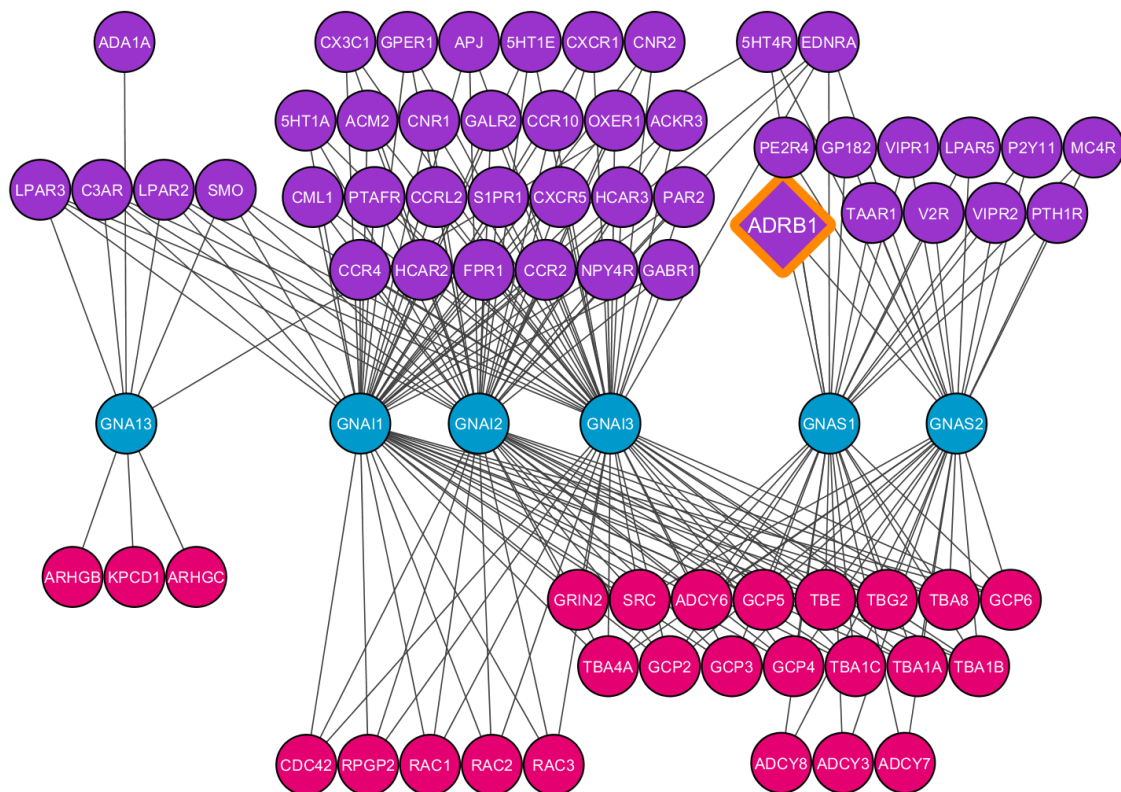
Εικόνα 51 Ασθένειες με τις οποίες σχετίζεται ο ADRB1 σύμφωνα με τη DisGeNET. Με πορτοκαλί χρώμα είναι σημειωμένες ασθένειες που σχετίζονται με καρδιακή δυσλειτουργία.

Φάρμακα τα οποία αναστέλλουν τη λειτουργία των β-αδρενεργικών υποδοχέων λέγονται β-blockers και χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας (Warne, et al., 2008). Οι β-blockers προκαλούν διάφορες παρενέργειες, ορισμένες από αυτές σχετίζονται με το νευρολογικό σύστημα όπως είναι η υπνηλία, κούραση, ληθαργία, καταλιπτικές τάσεις, διαταραχή του ύπνου, εφιάλτες, παραισθήσεις, και πιο σπάνια παραλήρημα και παρανοϊκή ψύχωση (Koella, 1985). Ένας μηχανισμός δράσης που προκαλεί κάποιες από αυτές τις παρενέργειες είναι η δράση των β-blockers σε αδρενεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

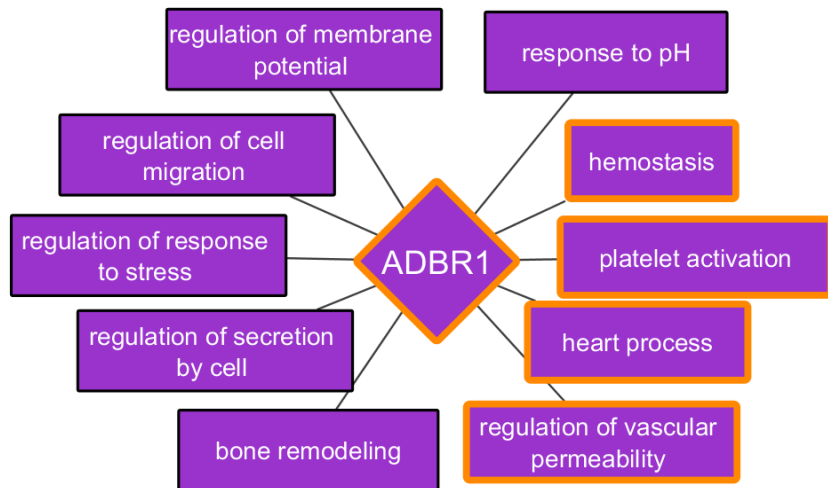
Σύμφωνα με τα δεδομένα από τον HPA ο ADRB1 εκφράζεται σε 6 κυτταρικούς τύπους τα γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού, του ιππόκαμπου και του κερκοφόρου πυρήνα, τους νευρώνες του ιππόκαμπου, τα κύτταρα του καρδιακού μυ και στο πλακούντα. Παρά την έκφραση του σε 6 κυτταρικούς τύπους, ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται στα δίκτυα σηματοδότησης μόνο 3 εξ αυτών (γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού, κύτταρα του καρδιακού μυ, πλακούντα). Αυτό συμβαίνει γιατί σύμφωνα με τα δεδομένα της Human-gpDB ο ADRB1 αλληλεπιδρά μόνο με τις G_{α_s1}

και $G_{\alpha_{s2}}$, οι οποίες δεν εκφράζονται στους άλλους κυτταρικούς τύπους. Τα δεδομένα από τον HPA μπορεί να μην είναι πλήρη και κάποια G_{α_s} να εκφράζεται σε αυτούς ή να είναι σφάλμα ότι εκφράζεται εκεί ο ADRB1. Μία άλλη εξήγηση είναι η σηματοδότηση του ADRB1 μέσω άλλων G-πρωτεϊνών, β-αρρεσινών ή και άλλων πρωτεϊνών.

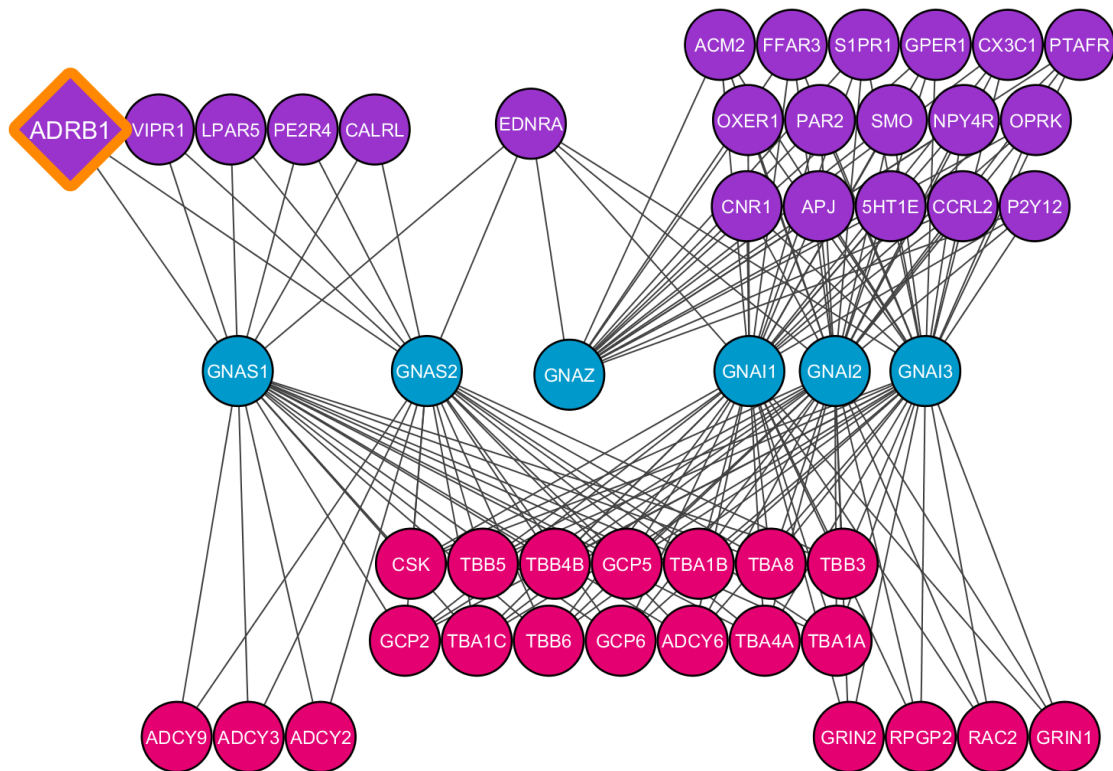
Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτής της εργασίας ο ADRB1 εκφράζεται στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα και σε τουλάχιστον ένα κυτταρικό τύπο στον εγκέφαλο. Επίσης είναι στόχος για 56 φάρμακα με ορισμένα να είναι β-blockers και να χορηγούνται για υπέρταση, αρρυθμίες και άλλες καρδιακές δυσλειτουργίες, για παράδειγμα τα φάρμακα pindolol, betaxolol, esmolol και oxprenolol. Τα φάρμακα αυτά έχουν παρενέργειες με κάποιες να σχετίζονται με το ΚΝΣ. Αυτές πιθανώς να οφείλονται στη πρόσδεση και δράση των φαρμάκων στον ADRB1 στον εγκέφαλο.



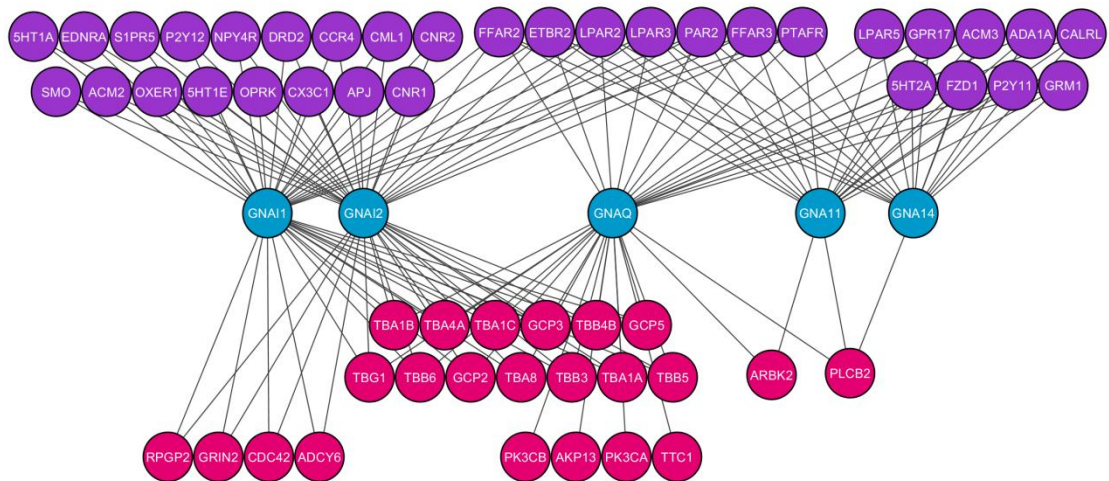
Εικόνα 52 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο κύτταρα του καρδιακού μυ (heart muscle myocytes). Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και περίγραμμα χρώματος πορτοκαλί είναι ο ADRB1.



Εικόνα 53 Ορισμένες βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του ADRB1 στα κύτταρα του καρδιακού μυ, αλλά όχι στα γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού. Με πορτοκαλί περίγραμμα είναι όροι που σχετίζονται με το καρδιαγγειακό σύστημα.



Εικόνα 54 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο γλοιακά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού (cerebral cortex glial cells). Με μεγαλύτερο μέγεθος, σχήμα ρόμβου και περίγραμμα χρώματος πορτοκαλί είναι ο ADRB1.



Εικόνα 55 Δίκτυο σηματοδότησης στο κυτταρικό τύπο γλοιακά κύτταρα του κερκοφόρου πυρήνα (caudate glial cells). Παρόλο που ο *ADRB1* εκφράζεται εδώ σύμφωνα με τον HPA, δεν εμφανίζεται στο παραπάνω δίκτυο γιατί οι G-πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά δεν εκφράζονται εδώ.

5 Συμπεράσματα

Η οικογένεια των Συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs) παίζει κύριο ρόλο στη μεταγωγή σήματος σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι GPCRs συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών και φυσιολογικών λειτουργιών. Είναι επόμενο λοιπόν ότι σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Για αυτό το λόγο μάλιστα αποτελούν και κύριο στόχο φαρμάκων. Επομένως είναι απαραίτητη η μελέτη τους και η εξακρίβωση του τρόπου λειτουργίας τους.

Ο κύριος μηχανισμός σηματοδότησης των GPCRs είναι μέσω των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών. Έμφαση έχει δοθεί στο ποια Gα υπομονάδα ενεργοποιεί ο κάθε GPCR, καθώς αυτή με τη σειρά της καθορίζει ποιοι τελεστές θα ενεργοποιηθούν και εν μέρει ποια θα είναι η απόκριση του κυττάρου. Υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός Gα πρωτεϊνών, με κάθε Gα να αλληλεπιδρά με πολλούς GPCR και με GPCRs αν αλληλεπιδρούν με περισσότερες της μίας Gα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλληλοεπικάλυψη των σηματοδοτικών μονοπατιών GPCR και τη δημιουργία ενός δικτύου σηματοδότησης.

Το συνολικό δίκτυο σηματοδότησης μέσω Gα πρωτεϊνών συγκροτήθηκε από τα δεδομένα της Human-gpDB. Αποτελείται από 238 GPCRs, 16 Gα και 75 τελεστές, είναι ένα ισχυρά συνδεδεμένο δίκτυο και είναι αρκετά περίπλοκο. Η πολυπλοκότητα του δικτύου είναι ιδιαίτερα περιέργη καθώς από το δίκτυο απουσιάζουν κύρια στοιχεία της σηματοδότησης των GPCRs (Gβγ, β-αρρεστίνες, ρυθμιστές, κ.α.).

Μία εξήγηση για τη πολυπλοκότητα του, είναι ότι το δίκτυο περιέχει όλα τα πιθανά μονοπάτια σηματοδότησης μέσω των Gα. Στη πραγματικότητα αυτό το δίκτυο δεν είναι υπαρκτό σε κανένα κύτταρο, καθώς δεν εκφράζονται όλες οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες του δικτύου στο ίδιο κύτταρο. Είναι επομένως χρήσιμο, αλλά και απαραίτητο για να υπάρχει βιολογικό νόημα, να περιορίζεται το δίκτυο ανάλογα με το ποιες πρωτεΐνες εκφράζονται στο υπό μελέτη κύτταρο.

Υπάρχουν διάφορες πηγές για δεδομένα έκφρασης πρωτεϊνών σε ιστούς ή/και κυτταρικούς τύπους. Οι περισσότερες περιέχουν δεδομένα από πειράματα αλληλούχισης RNA, που κάνουν έμμεση σύνδεση της έκφρασης RNA και πρωτεΐνης, για τη πλειοψηφία των ανθρώπινων γονιδίων και αφορούν ιστούς. Στη προκειμένη περίπτωση, για να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν οι πρωτεΐνες και να επιτευχθεί η μεταγωγή σήματος πρέπει οι πρωτεΐνες να βρίσκονται στο ίδιο κύτταρο. Για αυτό το λόγο έγινε χρήση δεδομένων από πειράματα ανοσοϊστοχημείας που αφορούν

έκφραση πρωτεϊνών σε κυτταρικούς τύπους, παρόλο που καλύπτουν μόνο μέρος των πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με τα δεδομένα έκφρασης η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων από τη Human-gpDB είναι πιθανές. Αυτό σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν εκφράζονται μαζί σε τουλάχιστον ένα κυτταρικό τύπο. Οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι περιέχουν πρωτεΐνες και από τις τρεις κατηγορίες (GPCR, Ga, τελεστές) και σχηματίζεται ένα μικρότερου μεγέθους δίκτυο σηματοδότησης σε αυτούς.

Αφού ορισμένοι GPCR μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πολλαπλές Ga, τίθεται το ζήτημα της εξειδίκευσης σηματοδότησης. Εν μέρει το πρόβλημα λύνεται με την έκφραση υποσύνολου των Ga πρωτεϊνών σε κάθε κυτταρικό τύπο. GPCRs με πολλαπλά ζευγάρια με Ga έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με ορισμένες μόνο Ga σε κάθε κυτταρικό τύπο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα σηματοδοτικά μονοπάτια του ίδιου GPCR να διαφέρουν ανάλογα με το κυτταρικό τύπο. Το ίδιο ισχύει και για το σχηματισμό ετεροδιμερών GPCRs. Η έκφραση διαφορετικών GPCRs σε κάθε κυτταρικό τύπο οδηγεί στο σχηματισμό διαφορετικών ετεροδιμερών, τα οποία έχουν πιθανώς διαφορετική λειτουργία και φαρμακολογία.

Ακόμα και όταν περιορίζουμε τις πρωτεΐνες σε αυτές που εκφράζονται σε ένα κυτταρικό τύπο, υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών διαφορετικών GPCR. Σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους εκφράζονται αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες για να δημιουργηθεί ένα σχετικά συνδεδεμένο δίκτυο. Αυτό σημαίνει ότι αν διαταραχθεί η λειτουργία ενός υποδοχέα (π.χ. λόγω μεταλλαγής ή δράσης ενός φαρμάκου) είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα επηρεαστούν σηματοδοτικά μονοπάτια άλλων GPCR στο κύτταρο και επομένως η λειτουργία τους.

Ένας GPCR που είναι στόχος φαρμάκου μπορεί να εκφράζεται σε περισσότερους του ενός κυτταρικού τύπου. Η επιθυμητή δράση του μπορεί να είναι η ρύθμιση της λειτουργίας του υποδοχέα σε μία θέση. Το ίδιο φάρμακο όμως μπορεί να απορρυθμίζει τον υποδοχέα σε άλλες θέσεις όπου ο υποδοχέας δρα μέσω άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Καθώς επίσης να διαταράσσει τη λειτουργία άλλων GPCRs των οποίων τα σηματοδοτικά μονοπάτια αλληλεπικαλύπτονται με αυτά του GPCR στόχου. Αυτή η μη επιθυμητή δράση του φαρμάκου μπορεί να είναι η αιτία παρενεργειών και για αυτό το λόγο αξίζει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό φαρμάκων.

Τέλος, σε κάθε είδος κυττάρου σχηματίζεται ένα διαφορετικό δίκτυο σηματοδότησης GPCR. Αυτά τα δίκτυα είναι ισχυρά συνδεδεμένα και ως

αποτέλεσμα η δράση ενός GPCR έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη λειτουργία άλλων GPCR του κυττάρου. Ακόμα και αν ένα φάρμακο, μια μεταλλαγή ή κάποιος άλλος παράγοντας διαταράξει τη λειτουργία ενός μη απαραίτητου GPCR, η αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών μπορεί να αποτελέσει σε σημαντική απορρύθμιση του κυττάρου. Η απορρύθμιση αυτή μπορεί τελικά να οδηγήσει σε κάποια ασθένεια.

Συνοπτικά, παρατηρούμε ότι κάνοντας χρήση της πληροφορίας για την έκφραση σε ιστούς διευκολύνεται και βελτιώνεται η στοχευμένη μελέτη των λειτουργικών και φαρμακολογικών γνωρισμάτων που χαρακτηρίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των GPCRs. Η εξειδικευμένη γνώση του ιστού έκφρασης των GPCRs, των G-πρωτεϊνών των τελεστών και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους επιτρέπει τη στοχευμένη μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών και, κατά συνέπεια, των βιολογικών διεργασιών και ασθενειών που σχετίζονται με κάθε ιστό. Μέσω αυτής της στοχευμένης μελέτης μπορούμε να οδηγηθούμε στην κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας των φαρμάκων που στοχεύουν σε GPCRs και την πιθανή αποσαφήνιση των δράσεών τους στο σώμα και των παρενεργειών τους. Κατά συνέπεια, ο προτεινόμενος συνδυασμός των δεδομένων έκφρασης σε ιστούς με την ανάλυση δικτύων αλληλεπιδράσεων μπορεί να αξιοποιηθεί στον σχεδιασμό νέων, πιο αποτελεσματικών και πιο ασφαλών φαρμακευτικών αγωγών.

7 Βιβλιογραφία

- Alexander, S.P., *et al.* (2015) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors, *British journal of pharmacology*, **172**, 5744-5869.
- Ashburner, M., *et al.* (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nature genetics*, **25**, 25-29.
- Ayoub, M.A. (2014) The Couple G Protein-Coupled Receptor-G Protein: Preassembly versus Agonist-Induced Interaction, *Receptors & Clinical Investigation*, **1**.
- Berridge, M.J. (2014) Module 2. In, *Cell Signalling Biology*.
- Borrito-Escuela, D.O., *et al.* (2014) The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components, *International journal of molecular sciences*, **15**, 8570-8590.
- Bryce, P.J., *et al.* (2006) The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses, *The Journal of clinical investigation*, **116**, 1624-1632.
- Cabrera-Vera, T.M., *et al.* (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation, *Endocrine reviews*, **24**, 765-781.
- Cattaneo, F., *et al.* (2016) Intranuclear Signaling Cascades Triggered by Nuclear GPCRs, *J Cell*.
- Cooper, G.M. and Hausman, R.E. (2007) *The cell : a molecular approach*. ASM Press ;Sinauer Associates, Washington, D.C.
- Cordeaux, Y. and Hill, S.J. (2002) Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors, *Neuro-Signals*, **11**, 45-57.
- Crepieux, P., *et al.* (2017) A Comprehensive View of the beta-Arrestinome, *Frontiers in endocrinology*, **8**, 32.
- Cvicek, V., Goddard, W.A., 3rd and Abrol, R. (2016) Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications, *PLoS computational biology*, **12**, e1004805.
- Cygankiewicz, A.I., Maslowska, A. and Krajewska, W.M. (2014) Molecular basis of taste sense: involvement of GPCR receptors, *Critical reviews in food science and nutrition*, **54**, 771-780.
- Davis, A.P., *et al.* (2015) The Comparative Toxicogenomics Database's 10th year anniversary: update 2015, *Nucleic acids research*, **43**, D914-920.
- de Mendoza, A., Sebe-Pedros, A. and Ruiz-Trillo, I. (2014) The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the

transition to metazoan multicellularity, *Genome biology and evolution*, **6**, 606-619.

Devalia, J.L. and Davies, R.J. (1999) Effect of antihistamines on epithelial cells, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **29 Suppl 3**, 64-68; discussion 69-71.

Dupre, D.J., *et al.* (2009) The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes, *Annual review of pharmacology and toxicology*, **49**, 31-56.

Eungdamrong, N.J. and Iyengar, R. (2004) Modeling cell signaling networks, *Biology of the cell*, **96**, 355-362.

Fabregat, A., *et al.* (2016) The Reactome pathway Knowledgebase, *Nucleic acids research*, **44**, D481-487.

Farran, B. (2017) An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers, *Pharmacological research*, **117**, 303-327.

Ferre, S., *et al.* (2014) G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives, *Pharmacological reviews*, **66**, 413-434.

Feuda, R., *et al.* (2012) Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 18868-18872.

Fredriksson, R., *et al.* (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Molecular pharmacology*, **63**, 1256-1272.

Fredriksson, R. and Schioth, H.B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes, *Molecular pharmacology*, **67**, 1414-1425.

Ghosh, E., *et al.* (2015) Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution, *Nature reviews. Molecular cell biology*, **16**, 69-81.

Glusman, G., *et al.* (2001) The complete human olfactory subgenome, *Genome research*, **11**, 685-702.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70.

Hardin, J., *et al.* (2012) *Becker's world of the cell*. Benjamin Cummings, Boston.

Hebert-Chatelain, E., *et al.* (2016) A cannabinoid link between mitochondria and memory, *Nature*, **539**, 555-559.

- Herve, D. (2011) Identification of a specific assembly of the g protein golf as a critical and regulated module of dopamine and adenosine-activated cAMP pathways in the striatum, *Frontiers in neuroanatomy*, **5**, 48.
- Hindmarch, I. and Shamsi, Z. (1999) Antihistamines: models to assess sedative properties, assessment of sedation, safety and other side-effects, *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **29 Suppl 3**, 133-142.
- Hollmann, M.W., *et al.* (2005) Receptors, G proteins, and their interactions, *Anesthesiology*, **103**, 1066-1078.
- Huang da, W., Sherman, B.T. and Lempicki, R.A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic acids research*, **37**, 1-13.
- Irannejad, R. and von Zastrow, M. (2014) GPCR signaling along the endocytic pathway, *Current opinion in cell biology*, **27**, 109-116.
- Isberg, V., *et al.* (2016) GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors, *Nucleic acids research*, **44**, D356-364.
- Jordan, J.D., Landau, E.M. and Iyengar, R. (2000) Signaling networks: the origins of cellular multitasking, *Cell*, **103**, 193-200.
- Kamal, M. and Jockers, R. (2011) Biological Significance of GPCR Heteromerization in the Neuro-Endocrine System, *Frontiers in endocrinology*, **2**, 2.
- Kiel, C., Yus, E. and Serrano, L. (2010) Engineering signal transduction pathways, *Cell*, **140**, 33-47.
- Kleinau, G., Muller, A. and Biebermann, H. (2016) Oligomerization of GPCRs involved in endocrine regulation, *Journal of molecular endocrinology*, **57**, R59-80.
- Kobilka, B.K. (2007) G protein coupled receptor structure and activation, *Biochimica et biophysica acta*, **1768**, 794-807.
- Koella, W.P. (1985) CNS-related (side-)effects of beta-blockers with special reference to mechanisms of action, *European journal of clinical pharmacology*, **28 Suppl**, 55-63.
- Kolakowski, L.F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database, *Receptors & channels*, **2**, 1-7.
- Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function, *Pharmacology & therapeutics*, **103**, 21-80.

- Lagerstrom, M.C. and Schioth, H.B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery, *Nature reviews. Drug discovery*, **7**, 339-357.
- Lambright, D.G., *et al.* (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein, *Nature*, **379**, 311-319.
- Landrum, M.J., *et al.* (2016) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants, *Nucleic acids research*, **44**, D862-868.
- Law, V., *et al.* (2014) DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism, *Nucleic acids research*, **42**, D1091-1097.
- Li, J., *et al.* (2002) The Molecule Pages database, *Nature*, **420**, 716-717.
- Lodish, H.F. (2013) *Molecular cell biology*. W.H. Freeman and Co., New York.
- Lomize, M.A., *et al.* (2006) OPM: orientations of proteins in membranes database, *Bioinformatics*, **22**, 623-625.
- Madamanchi, A. (2007) Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure, *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students*, **10**, 99-104.
- Maere, S., Heymans, K. and Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks, *Bioinformatics*, **21**, 3448-3449.
- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms, *Trends in pharmacological sciences*, **22**, 368-376.
- Natarajan, K. and Berk, B.C. (2006) Crosstalk Coregulation Mechanisms of G Protein- Coupled Receptors and Receptor Tyrosine Kinases. In Ali, H. and Haribabu, B. (eds), *Transmembrane Signaling Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 51-77.
- Nordstrom, K.J., *et al.* (2011) Independent HHsearch, Needleman--Wunsch-based, and motif analyses reveal the overall hierarchy for most of the G protein-coupled receptor families, *Molecular biology and evolution*, **28**, 2471-2480.
- Oldham, W.M. and Hamm, H.E. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors, *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 60-71.
- Perez, D.M. and Karnik, S.S. (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors, *Pharmacological reviews*, **57**, 147-161.
- Peterson, Y.K. and Luttrell, L.M. (2017) The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling, *Pharmacological reviews*, **69**, 256-297.

- Pinero, J., *et al.* (2017) DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants, *Nucleic acids research*, **45**, D833-D839.
- Ramaekers, J.G. and Vermeeren, A. (2000) All antihistamines cross blood-brain barrier, *BMJ*, **321**, 572.
- Rath, A., *et al.* (2012) Representation of rare diseases in health information systems: the Orphanet approach to serve a wide range of end users, *Human mutation*, **33**, 803-808.
- Raven, P.H. and Johnson, G.B. (2002) *Biology*. McGraw-Hill, Boston.
- Reece, J.B. and Campbell, N.A. (2011) *Campbell biology*. Benjamin Cummings / Pearson, Boston.
- Reiter, E. and Lefkowitz, R.J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **17**, 159-165.
- Roffel, A.F., Elzinga, C.R. and Zaagsma, J. (1990) Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle, *Pulmonary pharmacology*, **3**, 47-51.
- Ross, E.M. and Wilkie, T.M. (2000) GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins, *Annual review of biochemistry*, **69**, 795-827.
- Ruiz de Azua, I., *et al.* (2012) Critical metabolic roles of beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors, *Life sciences*, **91**, 986-991.
- Santos, R., *et al.* (2017) A comprehensive map of molecular drug targets, *Nature reviews. Drug discovery*, **16**, 19-34.
- Satagopam, V.P., *et al.* (2010) GPCRs, G-proteins, effectors and their interactions: human-gpDB, a database employing visualization tools and data integration techniques, *Database : the journal of biological databases and curation*, **2010**, baq019.
- Sato, M., *et al.* (2006) Accessory proteins for G proteins: partners in signaling, *Annual review of pharmacology and toxicology*, **46**, 151-187.
- Sensoy, O. and Weinstein, H. (2015) A mechanistic role of Helix 8 in GPCRs: Computational modeling of the dopamine D2 receptor interaction with the GIPC1-PDZ-domain, *Biochimica et biophysica acta*, **1848**, 976-983.
- Shannon, P., *et al.* (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome research*, **13**, 2498-2504.

Smith, J.S. and Rajagopal, S. (2016) The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors, *The Journal of biological chemistry*, **291**, 8969-8977.

Smrcka, A.V. (2008) G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **65**, 2191-2214.

Southan, C., *et al.* (2016) The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands, *Nucleic acids research*, **44**, D1054-1068.

Sun, L. and Ye, R.D. (2012) Role of G protein-coupled receptors in inflammation, *Acta pharmacologica Sinica*, **33**, 342-350.

Tao, Y.X. (2008) Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics, *Pharmacology & therapeutics*, **120**, 129-148.

The Gene Ontology Consortium (2015) Gene Ontology Consortium: going forward, *Nucleic acids research*, **43**, D1049-1056.

The UniProt Consortium (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic acids research*, **45**, D158-D169.

Thompson, M.D., *et al.* (2014) G protein-coupled receptor mutations and human genetic disease, *Methods Mol Biol*, **1175**, 153-187.

Uhlen, M., *et al.* (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome, *Science*, **347**, 1260419.

Warne, T., *et al.* (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*, **454**, 486-491.

Welter, D., *et al.* (2014) The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations, *Nucleic acids research*, **42**, D1001-1006.

Weston-Green, K., *et al.* (2012) Effects of olanzapine on muscarinic M3 receptor binding density in the brain relates to weight gain, plasma insulin and metabolic hormone levels, *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **22**, 364-373.

Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions, *Physiological reviews*, **85**, 1159-1204.

Wylot, B., *et al.* (2015) Isolation of vascular endothelial cells from intact and injured murine brain cortex-technical issues and pitfalls in FACS analysis of the nervous tissue, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, **87**, 908-920.

Xu, J., *et al.* (2001) beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-

2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95,
The Journal of biological chemistry, **276**, 41310-41317.

8 Παράρτημα

Πίνακας με τους τελεστές των Gα πρωτεϊνών από τη Human-gpDB, κατηγοριοποιημένοι σύμφωνα με τη κύρια λειτουργία τους. Με αστερίσκο σημειώνονται οι τελεστές που αλληλεπιδρούν με β-αρρεστίνες και με υπογράμμιση αυτοί που είναι υπό τον έλεγχο του Gβγ.

AC	ID	Όνομα πρωτεΐνης
Αδενυλικές κυκλάσες		
Q08828	ADCY1	Adenylate cyclase type 1
Q08462	ADCY2	Adenylate cyclase type 2
*O60266	ADCY3	Adenylate cyclase type 3
Q8NFM4	ADCY4	Adenylate cyclase type 4
O95622	ADCY5	Adenylate cyclase type 5
O43306	ADCY6	Adenylate cyclase type 6
P51828	ADCY7	Adenylate cyclase type 7
*P40145	ADCY8	Adenylate cyclase type 8
*O60503	ADCY9	Adenylate cyclase type 9
Φωσφοδιεστεράσες		
*P16499	PDE6A	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha
*P35913	PDE6B	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta
*O43924	PDE6D	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta
*P18545	CNRG	Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma
*Q13956	CNCG	Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma
Κανάλια ασβεστίου		
O00555	CAC1A	Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A
Q00975	CAC1B	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B
Q15878	CAC1E	Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha-1E
GRKs		
P25098	ARBK1	Beta-adrenergic receptor kinase 1
P35626	ARBK2	Beta-adrenergic receptor kinase 2
*P32298	GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4
*P43250	GRK6	G protein-coupled receptor kinase 6
Κινάσες		
<u>Q06187</u>	BTK	Tyrosine-protein kinase BTK
*P41240	CSK	Tyrosine-protein kinase CSK
Q15139	KPCD1	Serine/threonine-protein kinase D1

AC	ID	Όνομα πρωτεΐνης
*P12931	SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
Κινάσες PI3		
P42336	PK3CA	PI3-kinase subunit alpha
P42338	PK3CB	PI3-kinase subunit beta
P48736	PK3CG	PI3-kinase subunit gamma
Φωσφολιπάσες C		
Q9NQ66	PLCB1	Phosphoinositide phospholipase C-beta-1
Q00722	PLCB2	Phosphoinositide phospholipase C-beta-2
Q01970	PLCB3	Phosphoinositide phospholipase C-beta-3
*Q15147	PLCB4	Phosphoinositide phospholipase C-beta-4
Πρωτεΐνες ικρίωμα		
*Q12802	AKP13	A-kinase anchor protein 13
*O14745	NHRF1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1
Μικρές G-πρωτεΐνες		
P60953	CDC42	Cell division control protein 42 homolog
P63000	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
P15153	RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
P60763	RAC3	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3
GEFs		
*Q92888	ARHG1	Rho guanine nucleotide exchange factor 1
*O15085	ARHGB	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
*Q9NZN5	ARHGC	Rho guanine nucleotide exchange factor 12
*Q9NPQ8	RIC8A	Synembryn-A
GAPs		
*Q9Y5W8	SNX13	Sorting nexin-13
P47736	RPGP1	Rap1 GTPase-activating protein 1
Q684P5	RPGP2	Rap1 GTPase-activating protein 2
Άλλες πρωτεΐνες		
*Q7Z2K8	GRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1
*O60269	GRIN2	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2
*Q99614	TTC1	Tetratricopeptide repeat protein 1
*P12830	CADH1	Cadherin-1
Τουμπουλίνες		
Q71U36	TBA1A	Tubulin alpha-1A chain
P68363	TBA1B	Tubulin alpha-1B chain
Q9BQE3	TBA1C	Tubulin alpha-1C chain

AC	ID	Όνομα πρωτεΐνης
<u>Q13748</u>	TBA3C	Tubulin alpha-3C/D chain
Q6PEY2	TBA3E	Tubulin alpha-3E chain
<u>P68366</u>	TBA4A	Tubulin alpha-4A chain
<u>Q9NY65</u>	TBA8	Tubulin alpha-8 chain
A6NHL2	TBAL3	Tubulin alpha chain-like 3
Q9H853	TBA4B	Putative tubulin-like protein alpha-4B
<u>P07437</u>	TBB5	Tubulin beta chain
Q9H4B7	TBB1	Tubulin beta-1 chain
<u>Q13885</u>	TBB2A	Tubulin beta-2A chain
Q9BVA1	TBB2B	Tubulin beta-2B chain
<u>Q13509</u>	TBB3	Tubulin beta-3 chain
<u>P04350</u>	TBB4A	Tubulin beta-4A chain
<u>P68371</u>	TBB4B	Tubulin beta-4B chain
Q9BUF5	TBB6	Tubulin beta-6 chain
Q3ZCM7	TBB8	Tubulin beta-8 chain
Q9UJT0	TBE	Tubulin epsilon chain
P23258	TBG1	Tubulin gamma-1 chain
Q9NRH3	TBG2	Tubulin gamma-2 chain
Q9BSJ2	GCP2	Gamma-tubulin complex component 2
Q96CW5	GCP3	Gamma-tubulin complex component 3
Q9UGJ1	GCP4	Gamma-tubulin complex component 4
Q96RT8	GCP5	Gamma-tubulin complex component 5
Q96RT7	GCP6	Gamma-tubulin complex component 6
Q9UJT0	TBE	Tubulin epsilon chain