

## Clases de GPCRs

- A. Tipo rodopsina
- B. Tipo secretina
- C. Tipo metabotrópico glutamato/ feromona
- D. Feromona hongos
- E. Receptores cAMP (Dictyostelium)
- Subfamilia Frizzled/Smoothed

## Cada GPCR tiene requerimientos estructurales distintos para su activación

Receptors for Amines, Nucleotides, Eicosanoids, and Lipid Moieties



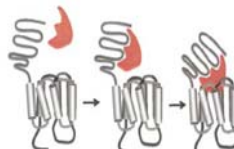
Peptide Hormone Receptors



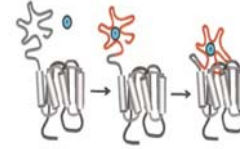
Protease (Thrombin) Activated Receptor



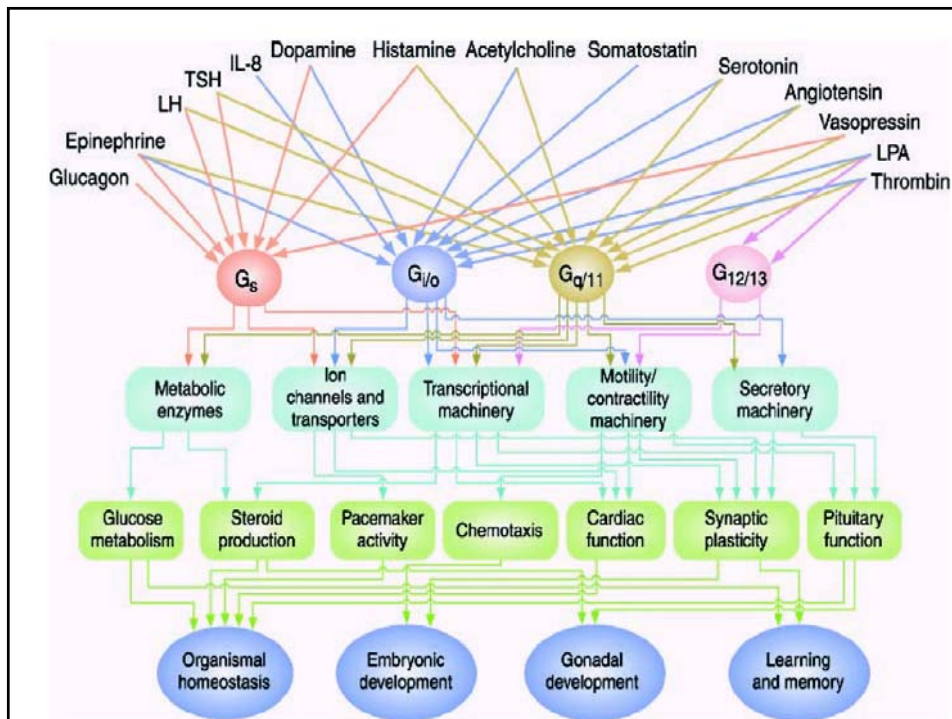
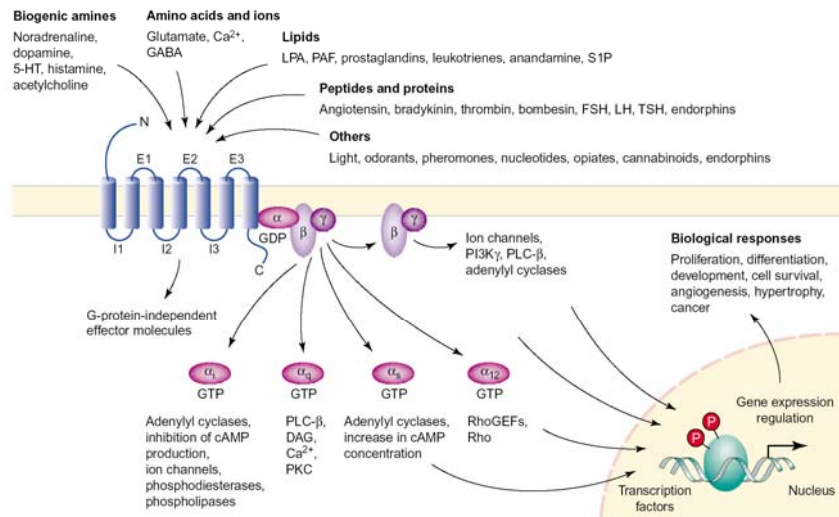
Glycoprotein Hormone (LH, FSH, hCG, TSH) Receptor



Neurotransmitter ( $\text{Ca}^{2+}$ , glutamate, GABA) Receptor

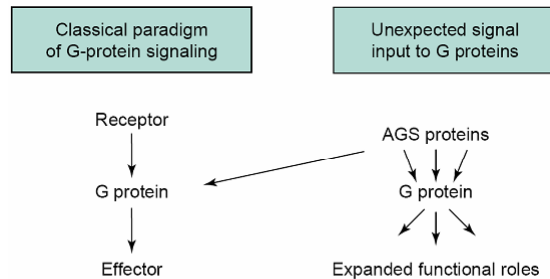


# Diversidad de GPCRs

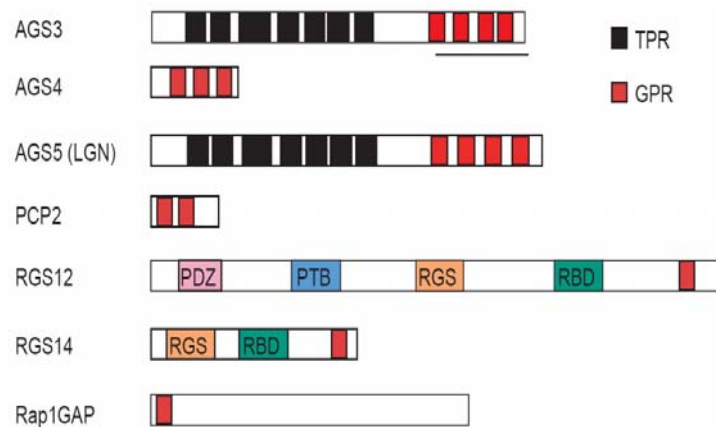


## Characteristics of AGS proteins

- Interact with different G-protein subunits and/or conformations
- Exhibit selectivity for different G proteins
- Use different mechanisms to regulate the G-protein activation-deactivation cycle

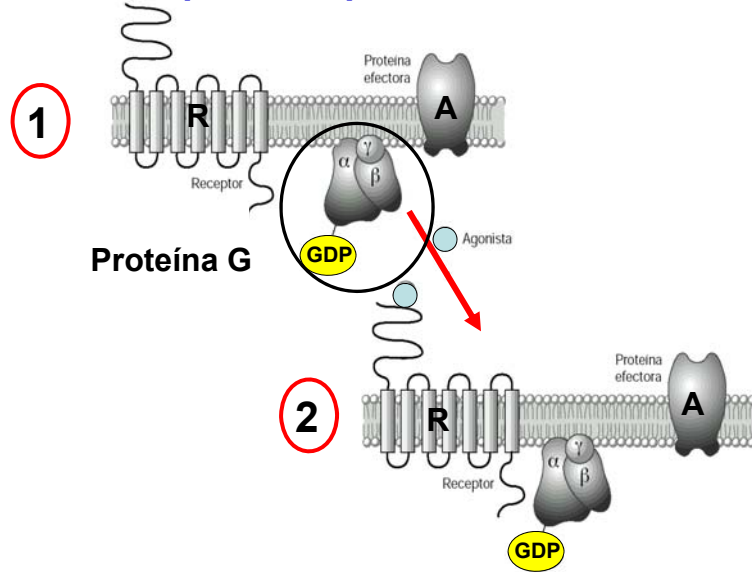


## RGS

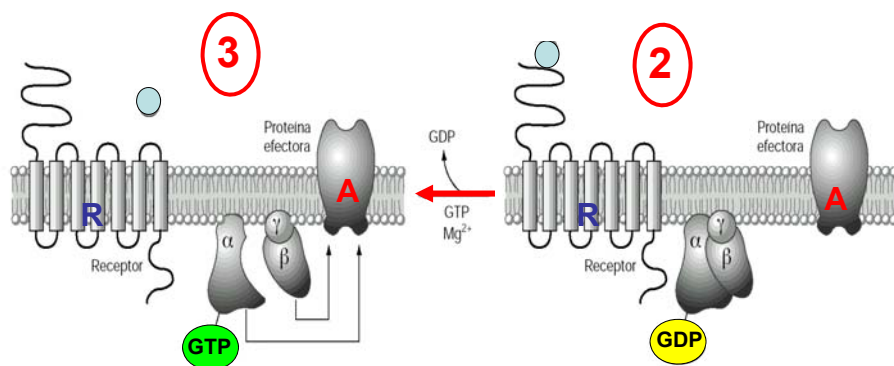


RBD, Ras binding domain  
RGS, regulator of G-protein signaling domain

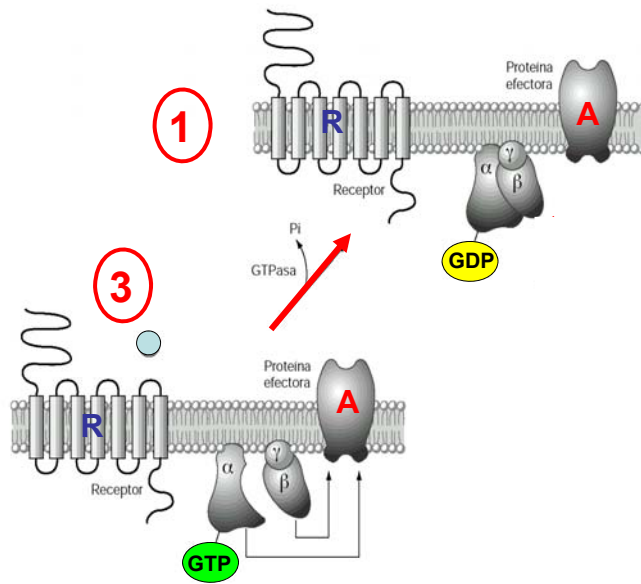
## Mecanismo de activación de receptores acoplados a proteína G



## Activación de receptores acoplados a proteína G



## Activación de receptores acoplados a proteína G



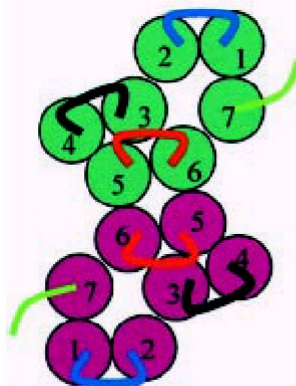
## Regulación de GPCRs

## 1. POR DIMERIZACION DE GPCRs

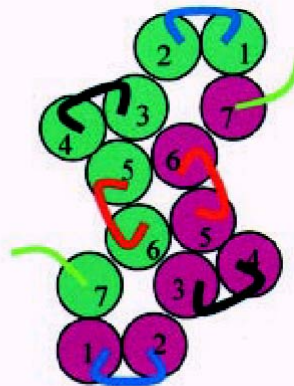
- Por coimmunoprecipitación se ha determinado que existen como dímeros u oligómeros
- Por métodos biofísicos (FRET-fluorescencia) se ha confirmado existencia de dímeros en las células vivas
- Dímeros participan en la biogénesis y función del receptor
- Hay dímeros tempranamente formados después de su biosíntesis y en otros casos este proceso su formación es inducida por su propio ligando.
- Homo- y heterodimerización: impacto en el desarrollo y búsqueda de nuevos fármacos.

### Potential GPCR dimer interfaces

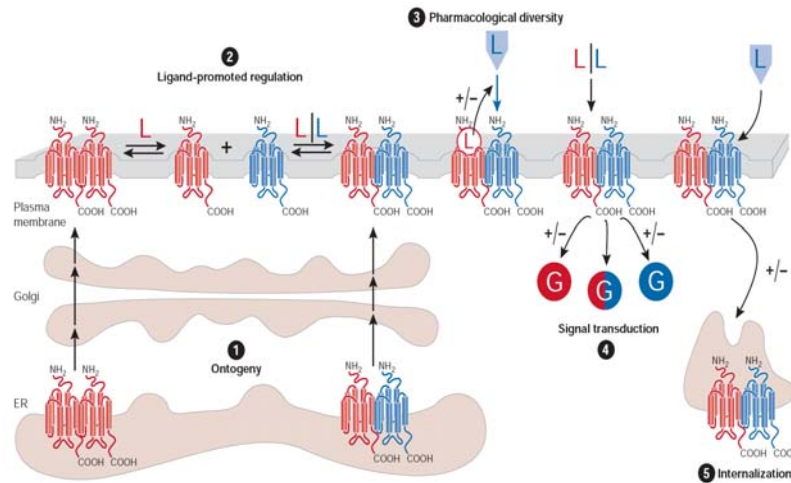
Contact dimers



Domain swapped dimers



## GPCR dimerization during the GPCR life cycle



### Functional Consequences of GPCR Heterodimerization

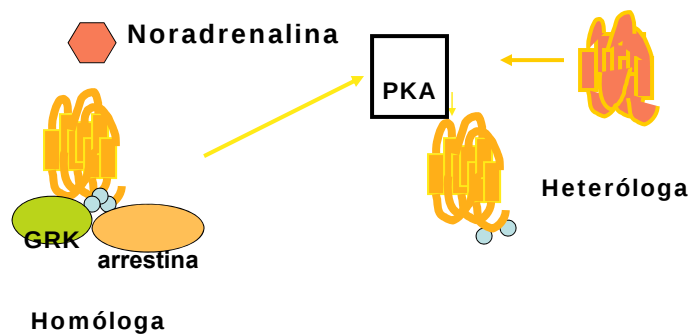
| Changes in Receptor Pharmacology | Codesensitization or Internalization in Response to Partner Agonist | Altered Receptor Targeting via Novel Interactions With Scaffold Proteins | Altered Coupling to G Proteins and/or Signal Transduction Pathways; Synergy in Signaling |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha_2$ AR- $\beta_1$ AR (96) | $\alpha_2$ AR- $\beta_1$ AR (96)                                    | CaR-mGluR1 (118)                                                         | mGluR1a-A1AR (44)                                                                        |
| D1-A1a AR (115)                  | AT <sub>1</sub> R-B <sub>2</sub> (105, 107)                         | CaR-mGluR5 (118)                                                         | AT <sub>1</sub> R-B <sub>2</sub> (105, 107)                                              |
| m2-m3 (124)                      | $\beta_2$ AR- $\delta$ OR, $\beta_2$ AR- $\kappa$ OR (57)           |                                                                          | CCR2-CCR5 (21)                                                                           |
| $\delta$ - $\mu$ OR (56)         | TRH1-TRH2 (125)                                                     |                                                                          | $\delta$ - $\mu$ OR (56)                                                                 |
| $\delta$ - $\kappa$ OR (45, 55)  | $\beta_1$ - $\beta_2$ AR (93)                                       |                                                                          | $\beta_2$ AR- $\delta$ OR, $\beta_2$ AR- $\kappa$ OR (57)                                |
|                                  | SST2a-SST3a (58)                                                    |                                                                          | mGluR5-A2a (117)                                                                         |
|                                  | SST2a- $\mu$ OR (58)                                                |                                                                          |                                                                                          |
|                                  | A2a-D2 (116)                                                        |                                                                          |                                                                                          |

## 2. Desensibilización (pérdida de respuesta):

Por disminución del acoplamiento del receptor a la proteína G o cambios en actividad de efectores

Por fosforilación del receptor dependiente del agonista

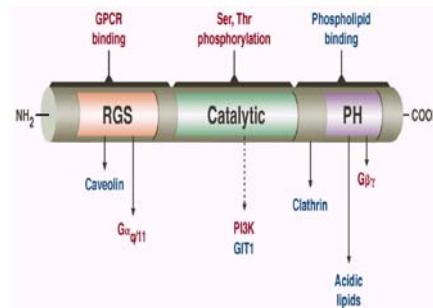
- Desensibilización heteróloga: PKA
- Desensibilización homóloga: GRK



## Regulación de GPCRs por GRK

- ✓ Sistema GRK -  $\beta$ -arrestina
- ✓ Fosforilación del GPCR por GRK estimula su unión a arrestina
- ✓ Hay 7 GRKs (3 subgrupos), ampliamente distribuidas (excepto GRK 4, 1 y 7), GRK2 es la mejor estudiada
- ✓ Son proteínas serina-treoninas kinasas

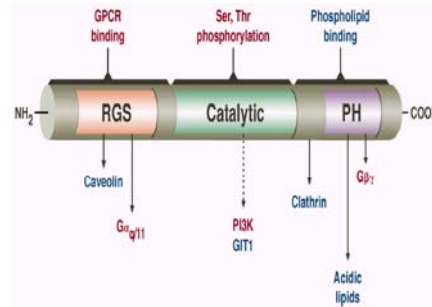
### GRKs



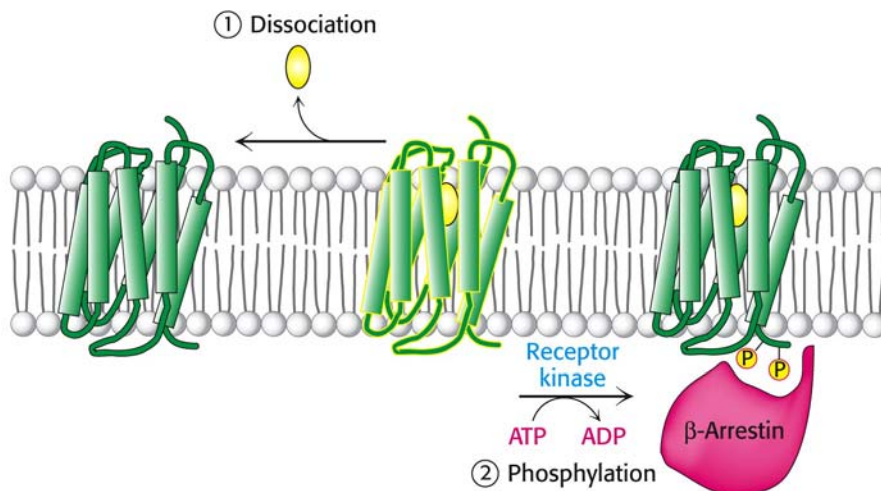
Son proteínas kinasas activadas alostéricamente por GPCR activados

También interactúan con subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  de proteínas G, clatrina, GRK-interacting protein GIT1, caveolina-1, PI3K  $\alpha/\gamma$ , proteínas citoesqueleto (tubulina y actina) y varias proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$

# GRKs



GRK2 también se une a Gαq/11 activa y funciona como GAP.  
PKA y PKC fosforilan y activan GRK2, promoviendo su asociación a la membrana



Amino-terminal GPCR binding Domain

RGS Domain

Catalytic Domain

Carboxyl-terminal Domain

GRK1 cys-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

GRK2  $\beta$ -binding domain

GRK3  $\beta$ -binding domain

GRK4

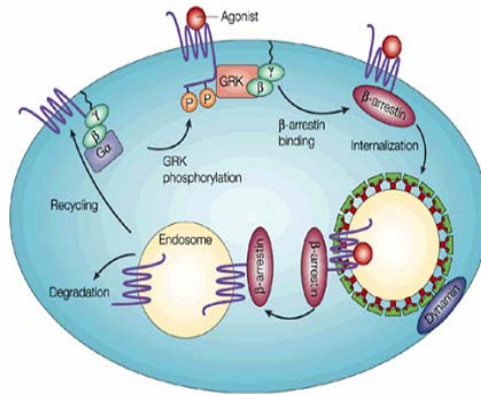
GRK5

GRK6

GRK7 cys-CO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

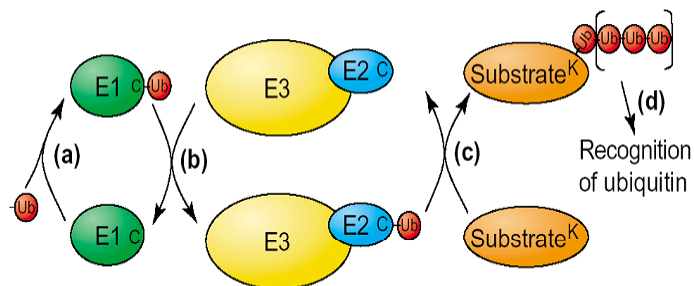
| Family Name             | Size (kDa) | Polypeptide Variants | Tissue Distribution <sup>a</sup>                                   | Covalent Modification    | Activators                         | Inactivators    |
|-------------------------|------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------|
| GRK1 (rhodopsin kinase) | 63         | N.D.                 | Retina (ROS) > pineal                                              | Farnesylation            | Polycations                        | Recoverin       |
| GRK2 (βARK1)            | 79         | N.D.                 | <i>pbl</i> > <i>cx</i> > <i>h</i> > <i>lu</i> > <i>k</i>           | N.D.                     | Gβγ, PIP <sub>2</sub> , PKC, c-Src | MAPK            |
| GRK3 (βARK2)            | 80         | N.D.                 | <i>olf</i> > <i>b</i> > <i>s</i> > <i>h</i> > <i>lu</i> > <i>k</i> | N.D.                     | Gβγ, PIP <sub>2</sub>              | N.D.            |
| GRK4                    | 66         | Four                 | <i>t</i> >>> <i>b</i>                                              | Palmitoylation           | N.D.                               | N.D.            |
| GRK5                    | 68         | N.D.                 | <i>h</i> , <i>lu</i> > <i>sk</i> > <i>b</i> , <i>l</i> > <i>k</i>  | N.D.                     | Polycations, PIP <sub>2</sub>      | PKC, calmodulin |
| GRK6                    | 66         | Yes                  | <i>b</i> , <i>sk</i> >> <i>h</i> , <i>lu</i> , <i>k</i> > <i>l</i> | Palmitoylation           | Polycations                        | N.D.            |
| GRK7                    | 62         | N.D.                 | Retina (cone)                                                      | N.D.<br>(Farnesylation?) | N.D.                               | N.D.            |

## Reciclamiento del receptor: internalización-tráfico

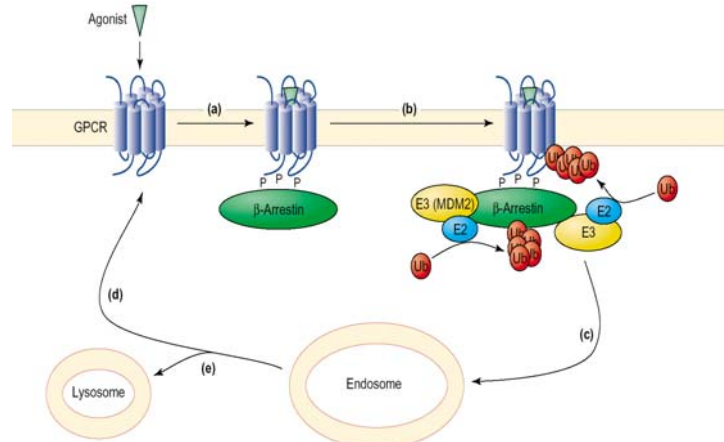


**Proceso de endocitosis**  
Cada GPCR tiene un  
recambio característico  
**Desensibilización-**  
**Resensibilización**  
Ocurre vía clatrina-  
coated pits, caveolas o  
vesículas no cubiertas

## Reacciones de ubiquitinación



## Ubiquitinación en la internalización y tráfico de GPCR



### Ubiquitinación del $\beta_2$ AR activado y de $\beta$ -arrestina

La estimulación del  $\beta_2$ -ARs por agonistas produce una rápida ubiquitinación del receptor y  $\beta$ -arrestina.

Inhibidores del proteasoma: ↓ internalización y degradación del  $\beta_2$ AR

$\beta$ -arrestina media la ubiquitinación del  $\beta_2$ AR

$\beta$ -arrestina está unida a Mdm2 (E3 ubiquitina ligasa).

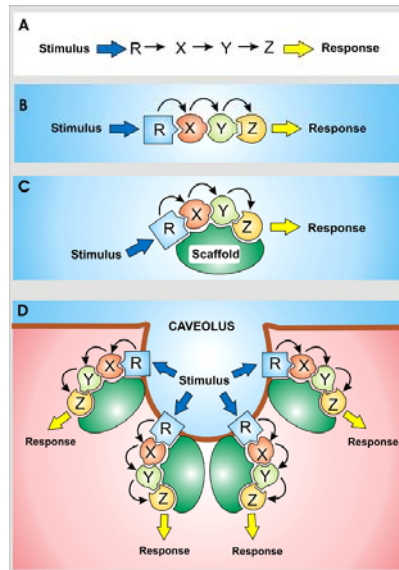
Ubiquitinación del receptor y  $\beta$ -arrestina tienen distintos roles en el tráfico y degradación del receptor.

## Efecto de ubiquitinación de GPCR

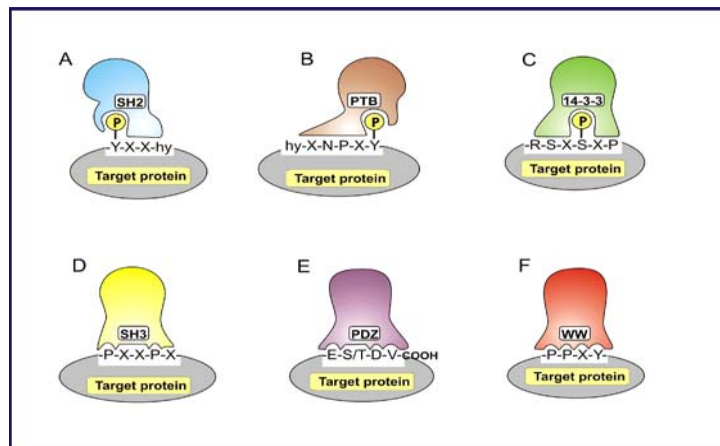
| Protein or protein family                           | Poly- or mono-ubiquitination <sup>c</sup> | Effect of GPCR activation on ubiquitination | Consequence of ubiquitination                                     |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| $\beta_2$ -Adrenoceptor                             | Poly                                      | Increase                                    | Sorting to lysosomes after endocytosis                            |
| Chemokine receptor CXCR4                            | Mono                                      | Increase                                    | Sorting to lysosomes after endocytosis                            |
| Vasopressin $V_2$ receptor                          | Poly                                      | Increase                                    | Proteasomal degradation                                           |
| $\beta$ -Arrestin1 and 2                            | Poly                                      | Increase                                    | Modified interaction with GPCRs, facilitates GPCR internalization |
| GRK2                                                | Poly                                      | Increase                                    | Proteasomal degradation                                           |
| Ins(1,4,5) $P_3$ receptors                          | Poly                                      | Increase                                    | Proteasomal degradation                                           |
| PKC $\alpha$ , $\delta$ and $\epsilon$ <sup>d</sup> | Poly                                      | Increase                                    | Proteasomal degradation                                           |
| Delta and mu opioid receptors                       | Poly                                      | No change                                   | Proteasomal degradation                                           |
| TRH receptor                                        | Poly                                      | No change                                   | Proteasomal degradation                                           |
| Mutant rhodopsin                                    | Poly                                      | Not examined                                | Proteasomal degradation                                           |
| Transducin $\gamma$ -subunit                        | Mono                                      | No change                                   | Proteasomal degradation of $\beta\gamma$ -subunit                 |
| RGS7                                                | Poly                                      | Not examined                                | Proteasomal degradation                                           |
| G-protein $\gamma_2$ -subunit                       | Poly                                      | Not examined                                | Proteasomal degradation                                           |

## Regulación del receptor por compartimentalización: ensamblaje de complejos transduccionales

## Organización espacial de vías de transducción



## Principales módulos en transducción de señales

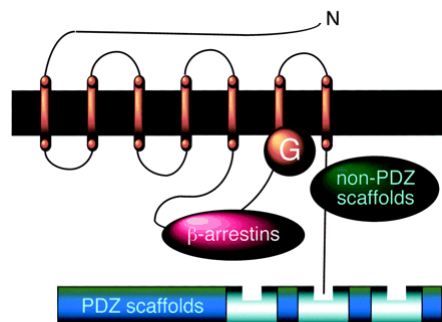


La fidelidad de la transferencia de información entre componentes de una vía transduccional depende de interacciones altamente específicas entre: variedad de dominios de transducción y correspondientes secuencias específicas en la proteína blanco

## Proteínas Scaffold

- Aumentan eficiencia y/o especificidad de una vía transduccional
- Participan en la transactivación o cross-talk de vías transduccionales
- Participan en la transducción independiente de proteína G

## Interacción de GPCRs con proteínas andamiaje (“Scaffold”)



- Scaffolds con dominios PDZ – porción distal del COOH -terminal
- Scaffolds sin PDZ
- $\beta$ -Arrestinas

## Interacciones de los GPCRs con Scaffold

| G Protein-Coupled Receptor                      | Scaffold                           | Scaffold-Associated Proteins                                                                                                          |
|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Drosophila</i> rhodopsin                     | InaD <sup>12</sup>                 | PLC, PKC, TRP, calmodulin <sup>8</sup>                                                                                                |
| $\beta_1$ -Adrenergic receptor                  | PSD-95 <sup>20</sup>               | NMDAR, <sup>95</sup> Kv1.4 channels, <sup>96</sup> nNOS, <sup>97</sup> neuroligins, <sup>98</sup> Fyn <sup>99</sup>                   |
| $\beta_1$ -Adrenergic receptor                  | MAGI-2 <sup>21</sup>               | NMDAR, <sup>100</sup> $\beta$ -catenin, <sup>101</sup> PTEN, <sup>102</sup> $\delta$ -catenin, <sup>103</sup> atrophin <sup>104</sup> |
| $\beta_2$ -Adrenergic receptor                  | NHERF-1/2 <sup>23</sup>            | NHE3, <sup>23</sup> ezrin, <sup>105</sup> CFTR, <sup>106-108</sup> PDGFR, <sup>109</sup> Taz <sup>110</sup>                           |
| $\beta_2$ -Adrenergic receptor                  | AKAP79/250 <sup>37-40</sup>        | PKA, PKC, calcineurin <sup>36</sup>                                                                                                   |
| Angiotensin AT <sub>1</sub> receptor            | Jak2 <sup>51</sup>                 | STAT1 <sup>51</sup>                                                                                                                   |
| Metabotropic glutamate receptors 1 and 5        | Homer1/2/3 <sup>54</sup>           | Shank, <sup>50</sup> IP3R, <sup>56</sup> syntaxin 13 <sup>65</sup>                                                                    |
| Metabotropic glutamate receptors 1, 2, 3, and 5 | Tamalin <sup>31</sup>              | ARNO <sup>31</sup>                                                                                                                    |
| Metabotropic glutamate receptor 7               | PICK1 <sup>32-34</sup>             | PKC, <sup>111</sup> AMPA receptors, <sup>112</sup> monoamine transporters <sup>113</sup>                                              |
| Many G protein-coupled receptors                | $\beta$ -Arrestin1/2 <sup>68</sup> | Src, <sup>75</sup> Jnk3, <sup>81</sup> ASK1, <sup>81</sup> Arf, ARNO, <sup>73</sup> Mdm2, <sup>74</sup> ERKs <sup>77,79,83</sup>      |
| Serotonin 5-HT <sub>2C</sub> receptor           | MUPP1 <sup>84,85</sup>             | NG2, <sup>114</sup> c-kit, <sup>115</sup> TAPP1 <sup>116</sup>                                                                        |
| Somatostatin SSTR2 receptor                     | CortBP1 <sup>86</sup>              | Cortactin <sup>117</sup>                                                                                                              |
| Prolactin-releasing hormone receptor            | PICK1 <sup>87</sup>                | PKC, <sup>111</sup> AMPA receptors, <sup>112</sup> monoamine transporters <sup>113</sup>                                              |
| Dopamine D2,3 receptors                         | $\alpha$ -Filamin <sup>88,89</sup> | Actin, <sup>118</sup> integrins <sup>119</sup>                                                                                        |
| Calcium-sensing receptor                        | $\alpha$ -Filamin <sup>90,91</sup> | Actin, <sup>118</sup> integrins <sup>119</sup>                                                                                        |
| Cannabinoid CB1 receptor                        | FAN <sup>92</sup>                  | TNF receptor <sup>120</sup>                                                                                                           |
| Prostaglandin EP3 receptor                      | Muskelin <sup>93</sup>             | Thrombospondin-1 <sup>121</sup>                                                                                                       |
| $\alpha_2$ -Adrenergic receptors                | 14-3-3 <sup>94</sup>               | PKC, <sup>122</sup> Raf-1, <sup>123</sup> ASK1 <sup>124</sup>                                                                         |

## $\beta$ -Arrestinas:

**Asociación independiente de módulos especializados**

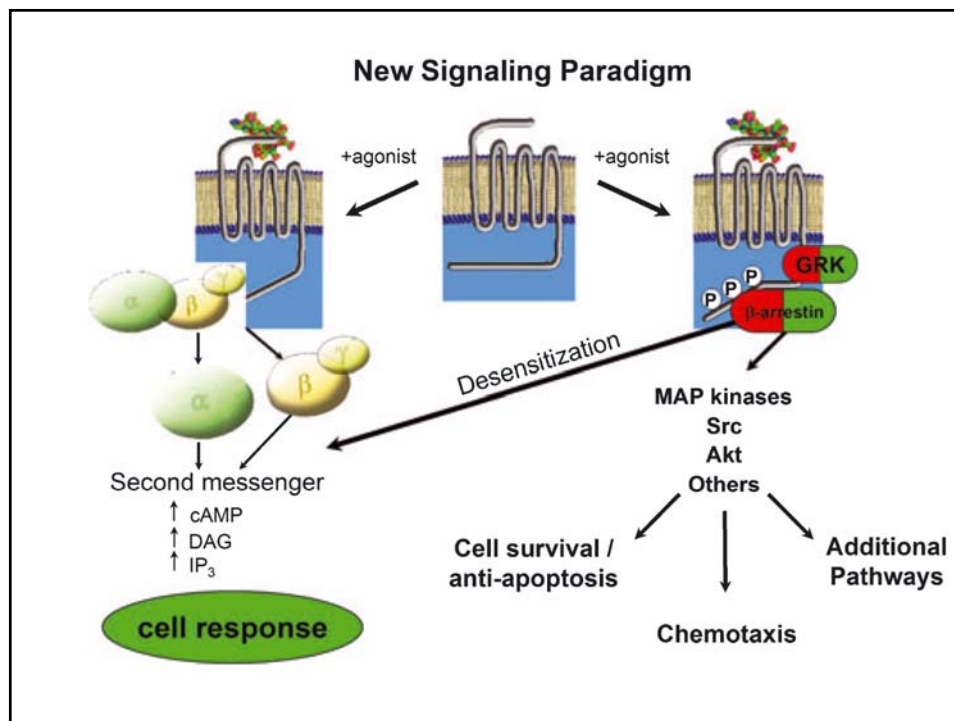
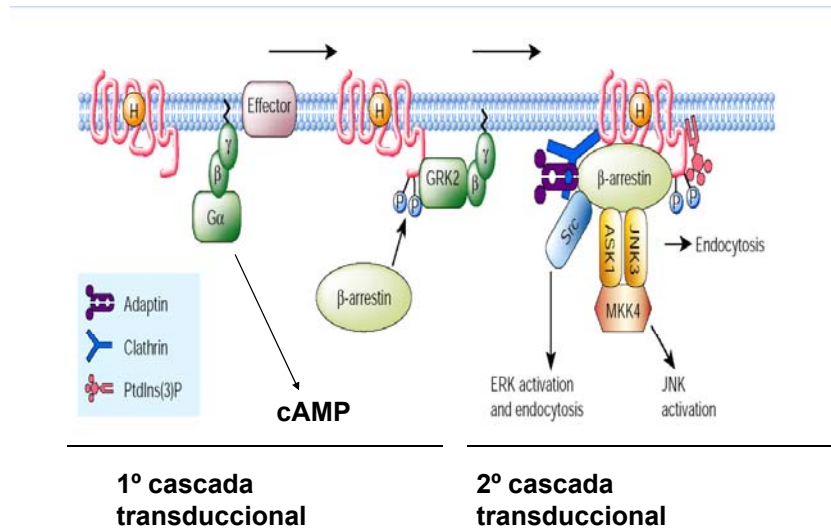
**Generalmente se unen al 3° citoloop del GPCR**

**$\beta$ -arrestina-1 se asocia con la proteína tirosina kinasa Src**

**$\beta$ -arrestina-2 une JNK3 (MAPK) y ASK1**

**$\beta$ -arrestinas-1/2 unen ERK1/2 : independiente de proteína G**

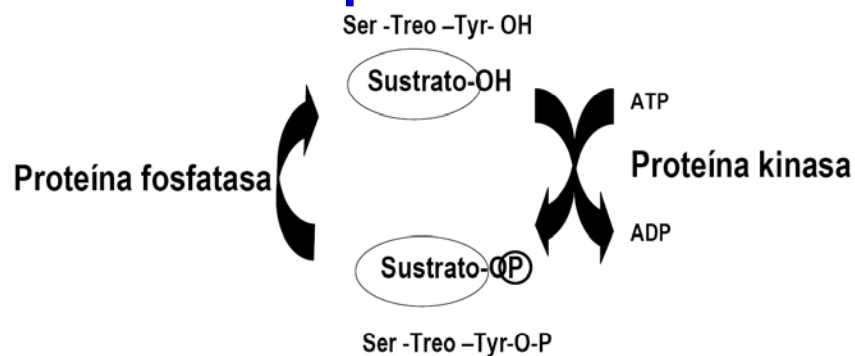
## Activación de diferentes vías transduccionales por GPCRs



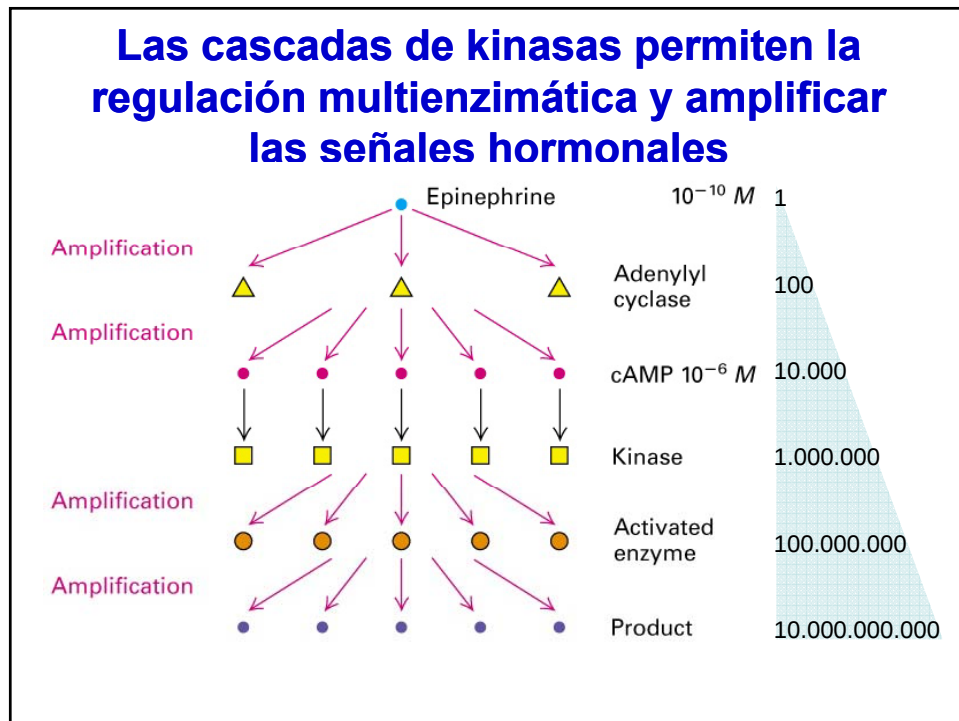
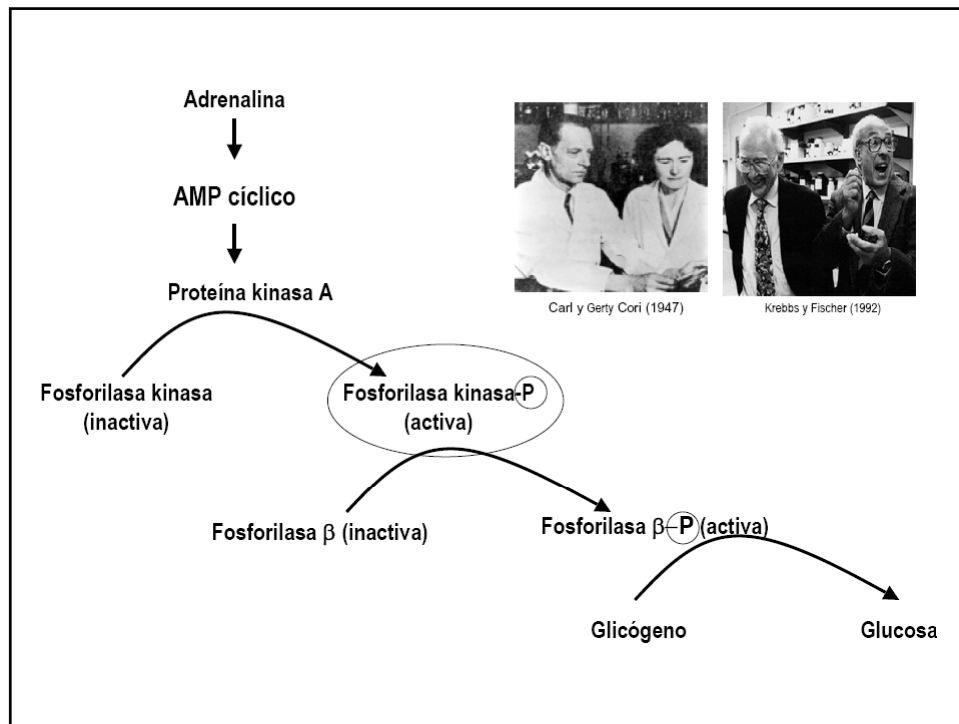
## Proteína kinasas

- Proteína (Enzima)
- Se activa por 2º mensajeros
- Sustrato (proteína que tiene Serina-Treonina-Tirosina)
- Catalizan reacción fosforilación es decir introducción de grupo fosfato en el sustrato
- Sustrato-fosforilado: activa o inactivo debido al cambio de conformación espacial

## Fosforilación- desfosforilación de proteínas

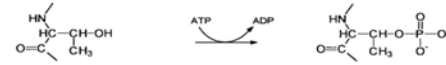
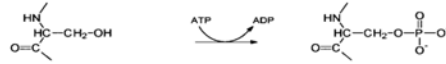


Son reacciones de adición o de remoción de un grupo fosfato a o desde una proteína catalizadas por proteínas kinasas o proteínas fosfatasas

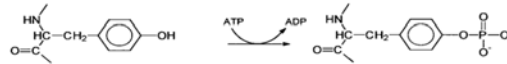


## Especificidad aminoacídica de las proteínas kinasas

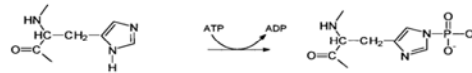
Ser/Thr-specific protein kinases



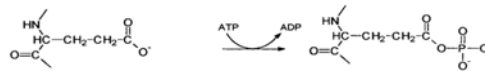
Tyr-specific protein kinases



His-specific protein kinases

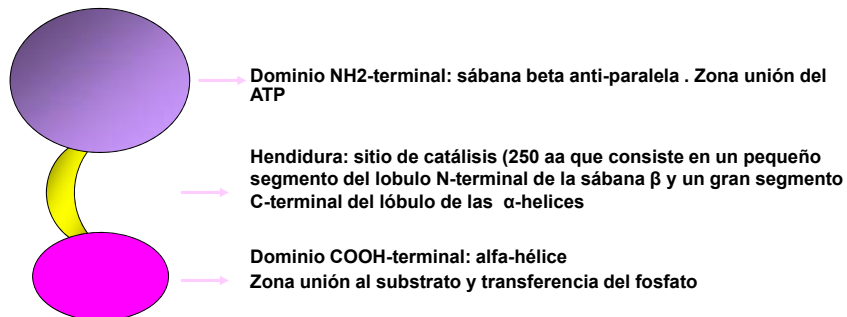


Asp/Glu-specific protein kinases



## PROTEINAS KINASAS

- Gran superfamilia de proteínas homólogas multifuncionales
- Estructura bi-lobular de 13 subdominios conservados



## Proteínas kinasas

Existen en **formas activas e inactivas** y su transición se controla por varios mecanismos:

- Unión de proteínas activadoras
- Unión de proteínas inhibidoras
- Unión controlada por ligando de subunidades reguladoras
- Activación de cofactores
- Modificación covalente por fosforilación en Ser/Thr y/o Tyr
- Regulación de localización subcelular
- Cambios en el estado de oligomerización

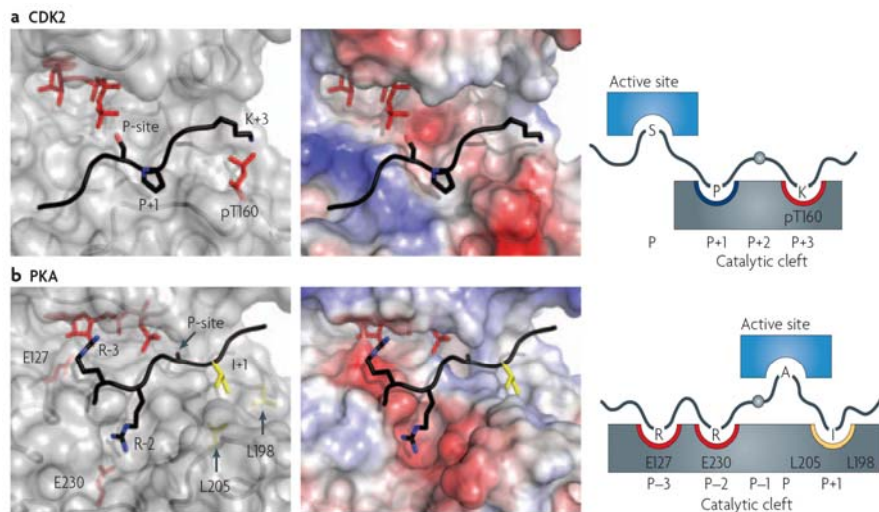
## La fosforilación de proteínas por PKs modifica su función y actividad:

- Induce cambio conformacional
- Interfiere directamente con la unión del sustrato u otro factor
- Crea sitios de unión para moléculas efectoras en su secuencia:
  - Unión de Tyr-P a SH2 y PTB o
  - Unión de Ser-P a proteínas 14-3-3

## Sitio de consenso de fosforilación de kinasas

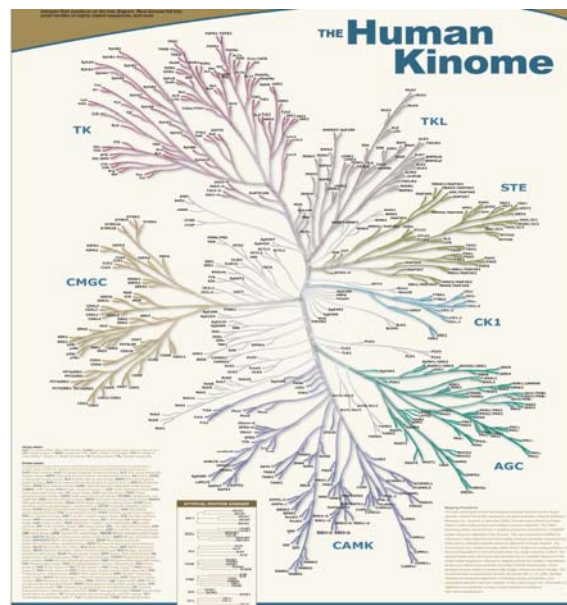
| Kinase           | Full name                                         | Consensus phosphorylation site |
|------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| PKA              | Protein kinase A or cAMP-dependent protein kinase | R-R-X-S/T-Φ                    |
| CDK              | Cyclin-dependent kinase                           | S/T-P-X-K/R                    |
| ERK2             | Extracellular-regulated kinase-2                  | P-X-S/T-P                      |
| CK1 <sup>A</sup> | Casein kinase-1                                   | pS-X-X-S/T                     |
| CK2 <sup>†</sup> | Casein kinase-2                                   | S/T-D/E-X-E/D                  |
| GSK3             | Glycogen synthase kinase-3                        | S-X-X-X-pS                     |
| CaMK2            | Calmodulin-dependent protein kinase-2             | R-X-X-S/T                      |
| ABL              | Abelson murine leukaemia virus tyrosine kinase    | I/V/L-Y-X-X-P/F                |
| EGFR             | Epidermal growth factor receptor                  | E-E-E-Y-F                      |
| Src              | Rous sarcoma virus tyrosine kinase                | E-E-I-Y-E/G-X-F                |
| IRK              | Insulin receptor tyrosine kinase                  | Y-M-M-M                        |
| PKB/AKT          | Protein kinase B                                  | R-X-R-X-X-S/T                  |
| PKD              | Protein kinase D                                  | L/I-X-R-X-X-S/T                |
| PIM1-3           | Proviral integration site kinases 1-3             | R-X-R-X-X-S/T                  |

## Interacciones locales son importantes para la especificidad

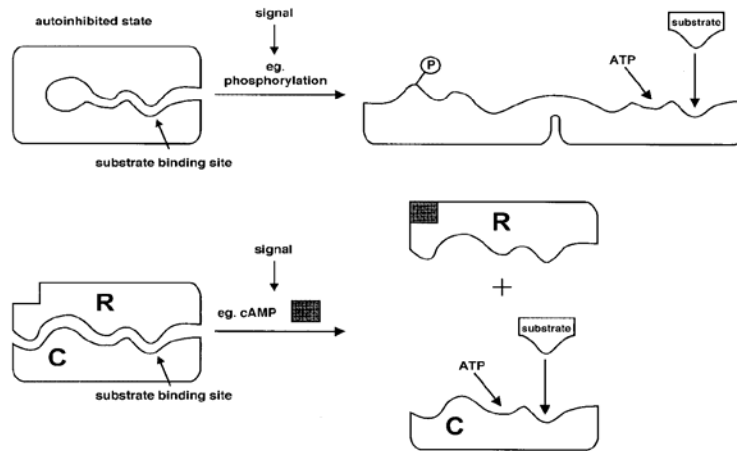


## Principales familias de PKs

- AGC: proteínas kinasas A-G-C
- CAMK:  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase
- CK1 : casein kinase 1
- MAPK: mitogen activated protein kinase
- TK : tyrosine kinase
- TKL: tyrosine kinase-like
- RGC: receptor guanylate cyclase.
- Otras : familias sin similitud a otros grupos.

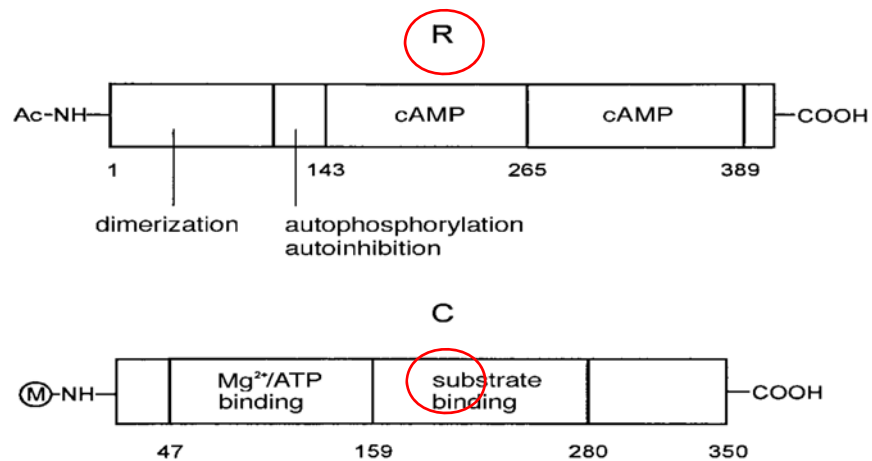


## Mecanismos de autoinhibición y activación de PKs

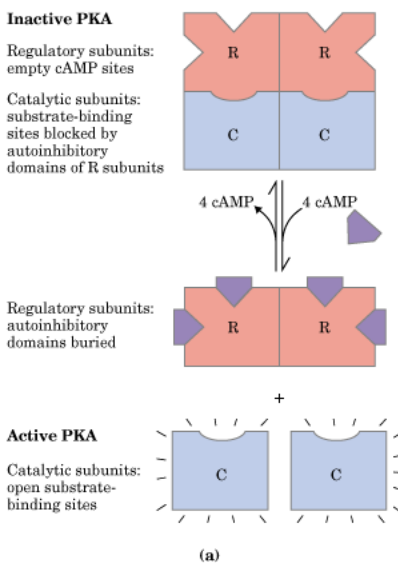


49

## Dominios funcionales de PKA



50



51

## PKA

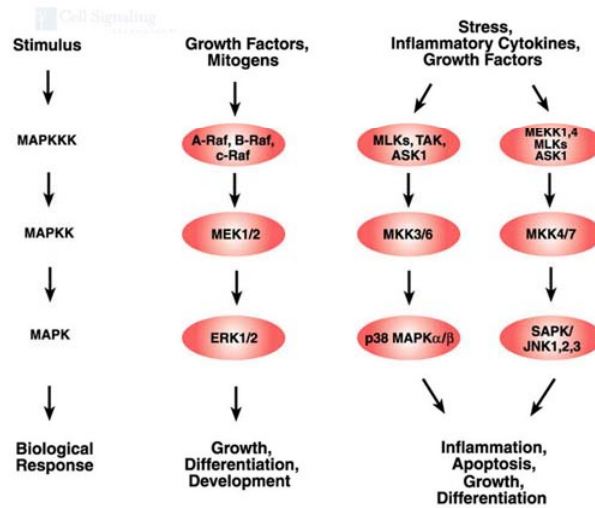
- PKA tiene dos dominios – N y C
- Su centro catalítico está formado por residuos de ambos lóbulos
- Dominio N es flexible en el estado sin ligando (conformación abierta)
- La región del loop rica en glicina con secuencia consenso Y-Gly-XGly-(Phe/Tyr)-Gly-X-Val une ATP.
- La unión del ATP y sustrato lleva a la formación del estado cerrado.
- Estudios de comparación de secuencias, mutagénesis y bioquímicos indican que los residuos Lys72, Asp166 y Asp184 son esenciales en la función catalítica de transferencia de fosfato

## Fosforilación en el segmento de activación

- Varias PKs requieren su fosforilación de residuos de Ser/Thr o Tyr para lograr máxima actividad.
- Esta ocurre en una parte de la estructura vecina al centro activo (segmento de *activación*)
- *Realizada por otras PKs o autofosforilación en trans*

53

### MAPK signaling cascades



54

## **FAMILIA ERK**

### **ERK clásicas**

**Cascada de activación ERK1-ERK2**

**Requieren de proteínas scaffold específicas (KSR) para activación máxima**

### **Big MAPKs (ERK3, 5, 7, 8)**

**Tienen dominio kinasa**

**En el C-terminal, poseen dominio de 60-100 kDa que participa en la interacción con otros dominios proteicos que regulan localización, activación y actividad transcripcional**

**ERK7 - ERK8 son inducibles. Hay niveles extremadamente bajos en células en cultivo y tejidos.**