

HANNA FABCZAK, KATARZYNA SOBIERAJSKA i STANISŁAW FABCZAK

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: h.fabczak@nencki.gov.pl

k.sobierajska@nencki.gov.pl

s.fabczak@nencki.gov.pl

DIMER $\beta\gamma$ BIAŁKA G – CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA

WPROWADZENIE

Wiele hormonów, neurotransmiterów, chemokin oraz lokalnych aktywatorów i czynników sensorycznych oddziałując z serpentinowymi (siedmio-transbłonowymi) receptorami (ang. G-protein coupled receptor, GPCR), zlokalizowanymi w błonie komórkowej, inicjuje szlaki przekazywania sygnału, których jednym z głównych elementów są heterotrimeryczne białka G. Białka G, wiążące i hydrolizujące GTP, zbudowane są z trzech podjednostek: α , β i γ (STRYER i BOURNE 1986, GILMAN 1987, NEER i CLAPHAM 1988, BIRNBAUMER 1990). Głównie ze względu na GTP-azowe własności podjednostki α , początkowo badania nad sygnalizacyjną rolą białek G skupiły się na poznaniu funkcji tego polipeptydu (GILMAN 1987, STRYER 1986). Uważano, że tylko ta podjednostka pełni funkcje sygnalizacyjne, podczas gdy dimerowi $\beta\gamma$ przypisywano jedynie rolę regulatora $G\alpha$ i czynnika zakotwiczonego białko G w błonie komórkowej (CLAPHAM i NEER 1997). Obecnie jednak już wiadomo, że kompleks $\beta\gamma$ odgrywa nie mniej ważną rolę niż $G\alpha$ i jest odpowiedzialny nie tylko za właściwą interakcję białka G z receptorem po jego aktywacji (FIGLER i współaut. 1996, YASUDA i współaut. 1996), ale również za inicjację wymiany GDP na GTP przyłączanych do podjednostki $G\alpha$ (TAYLOR i współaut. 1996,

YASUDA i współaut. 1996). Ponadto wykazano, że kompleks $\beta\gamma$ może oddziaływać z wieloma efektorami i odgrywa dominującą rolę w kontroli niektórych funkcji komórki. Dla przykładu w drożdżach $G\beta\gamma$ jest głównym przekaznikiem sygnału inicjowanego przez feromony (WHITEWAY i współaut. 1995). Również w odpowiedzi chemotaktycznej zarówno leukocytów (ARAI i współaut. 1997, NEPTUNE i BOURNE 1997), jak i *Dictyostelium discoideum* (WU i współaut. 1995, PERACINO i współaut. 1998), $G\beta\gamma$ odgrywa kluczową rolę. Wiele doniesień wskazuje, że $G\beta\gamma$ jest regulatorem przewodności jonowej selektywnych kanałów K^+ (I_{KACH}) w komórkach mięśnia sercowego i mózgu (LOGOTHESIS i współaut. 1987, SCHNEIDER i współaut. 1997), fosfolipazy $C\beta$ (RHEE i BAE 1997), cykazy adenylanowej (SUNAHARA i współaut. 1996) oraz kinaz receptorów związanych z białkami G (ang. G-protein coupled receptor kinases, GRKs) (PITCHER i współaut. 1992). Sygnalizacyjne własności zarówno podjednostki $G\alpha$, jak i kompleksu $G\beta\gamma$, stwarzają szansę równoczesnego kontrolowania dwóch efektorów po aktywacji receptora. Dodatkowo, zróżnicowanie struktury białek G (obecność wielu typów podjednostek $G\alpha$ -20, $G\beta$ -6 i $G\gamma$ -18) daje możliwość zwielokrotnienia liczby punk-

tów docelowych, do których dociera sygnał, mechanizmów kontroli i rodzaju włączanych wtórnych przekazników.

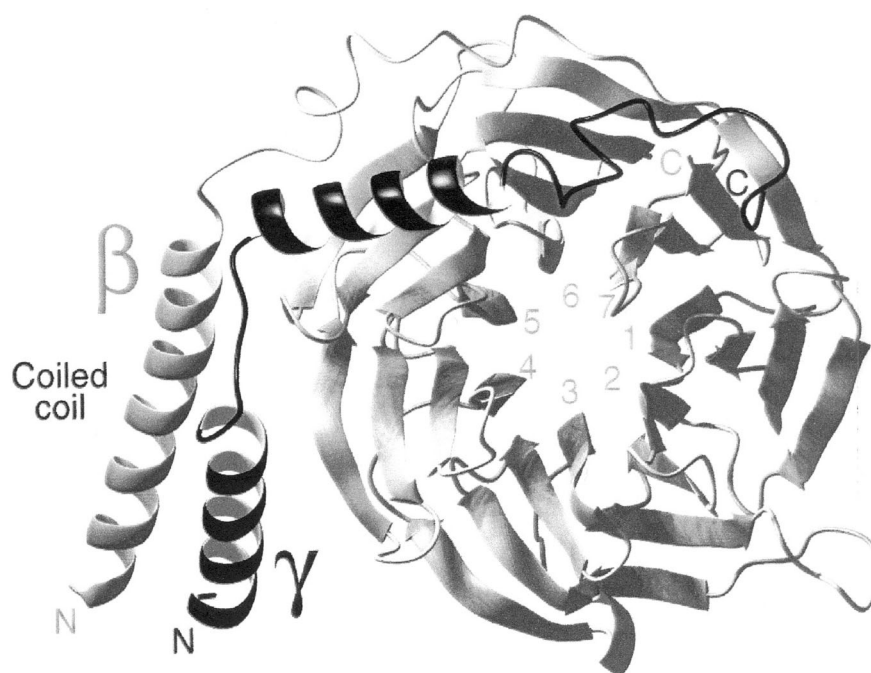
Celem tej pracy jest omówienie struktury, szlaków sygnalizacyjnych i możliwości regulacji aktywności dimeru $G\beta\gamma$.

STRUKTURA I ODDZIAŁYWANIE $G\beta\gamma$

Wprawdzie podjednostka $G\beta\gamma$ zbudowana jest z dwóch polipeptydów β i γ , to jednak funkcjonuje ona jako monomer, gdyż podjednostki te ulegają dysocjacji jedynie po denaturacji kompleksu. Dowodów na zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi typami podjednostek β i γ w komórkach ssaków dostarczyło molekularne klonowanie cDNA tych polipeptydów. Pierwsze badania izolowanego cDNA kodującego podjednostki β wykazały istnienie dwóch różnych genów kodujących białka o masie cząsteczkowej 36 kDa i 35 kDa. Do tej pory zidentyfikowano 6 typów podjednostek β , włączając w to warianty powstałe w wyniku alternatywnego składania (ang. splicing) genów oraz 12 typów podjednostki γ (CLAPHAM i NEER 1997). Na podstawie homologii sekwencji aminokwasów wyróżniono kilka podrodzin, do których zakwalifikowano poszczególne podjednostki. W przypadku $G\beta$ podjednostki $\beta 1$ - $\beta 4$ charakteryzują się 80% identycznością w ponad 340 aminokwasowej sekwencji, natomiast $\beta 5$ i jej dłuższa forma, $\beta 5L$, różnią się od pozostałych podjednostek i wykazują zaledwie 53% homologię z pozostałymi członkami tej ro-

dziny. Znalazło to odbicie w lokalizacji tych dwóch typów podjednostek, podjednostka $\beta 5$ występuje wyłącznie w centralnym układzie nerwowym, zaś $\beta 5L$ jedynie w siatkówce oka (WATSON i współaut. 1994, 1996).

W podjednostce $G\beta$ można wyróżnić dwa strukturalnie odmienne rejony. Na N-końcu, około 20 aminokwasów tworzy α helisę, zaś reszta molekuly utworzona jest przez motyw sekwencyjny, powtórzony 7-krotnie. Taka forma wielokrotnych powtórzeń sekwencji, nazwana powtórzeniami WD, nie występuje jedynie w $G\beta$, lecz można ją znaleźć również w wielu innych białkach (około 150), zaliczanych do nadrodziny WD-powtórzeń (NEER i współaut. 1994). Białka należące do tej rodziny, mimo podobieństwa w strukturze cząsteczki pełnią odmienne funkcje (SMITH i współaut. 1999). Analiza struktury krystalicznej fragmentu WD $G\beta$, przeprowadzona w dwóch niezależnych laboratoriach wykazała, że fragment WD-powtórzeń jest utworzony z β -pasm (ang. β -strands), które ułożone są w pierścień, tworzący strukturę „turbiny” (Ryc. 1). Każda łopatką „turbiny” jest utwo-



Ryc. 1 Struktura dimeru $G\beta 1\gamma 2$. Zaznaczono fragment WD-powtórzeń (wg GAUTAMA i współaut. 1998).

rzona z czterech skreconych β pasm, a kolistość całej struktury jest utrzymana dzięki zamknięciu molekularnego zatrasku (ang. *velcro-snap*) na 7 łopatkach (CLAPHAM i NEER 1997, GAUTAM i współaut. 1998).

Badania krystalograficznej struktury heterotrimerycznego kompleksu $G\alpha\beta\gamma$ wykazały, że centrum cząsteczki stanowi podjednostka $G\beta$ posiadająca kilka różnych powierzchni oddziaływania. Między $G\alpha$ i $G\beta$ występują dwa nie zachodzące na siebie rejony kontaktu, z których ten ważniejszy zlokalizowany jest na krótkim odcinku, w pobliżu regionu aktywnego (ang. *switch II* $G\alpha$). Przyłączenie GTP, podczas aktywacji szlaku sygnalizacyjnego, prowadzi do zmian konformacyjnych cząsteczki $G\alpha$, których konsekwencją jest jej dysocjacja od kompleksu $G\beta\gamma$. Powierzchnia oddziaływania między $G\beta$ i $G\gamma$ przebiega na całej długości cząsteczki γ , a na N-końcu około 20 aminokwasowych fragmenty α helisy obu podjednostek formują strukturę skręconej śruby (ang. *coiled-coil*) (WALL i współaut. 1995). W podjednostce $G\gamma$ nie występuje oddziaływanie między domenami tej cząsteczki, ale wszystkie miejsca wiązania znajdują się między $G\beta$ i $G\gamma$ (CLAPHAM i NEER 1997).

Pomimo wysokiej homologii jaka występuje w rodzinie $G\beta$ ($\beta 1$ - $\beta 4$), nie wszystkie jej typy mogą łączyć się z wszystkimi rodzajami

$G\gamma$. PRONIN i GAUTAM (1992) wykazali, że $\gamma 1$ może tworzyć kompleks z $\beta 1$, lecz nie z $\beta 2$, podczas gdy obie podjednostki β łączą się z $\gamma 2$ i $\gamma 3$. Wykazano, że podjednostki $\beta 1$ i $\beta 2$ są w 90% identyczne, więc interesujące jest, które z 33 reszt aminokwasowych, którymi różnią się między sobą te białka, są odpowiedzialne za specyficzność kompleksu z odpowiednią podjednostką γ . Regiony nazywane *coiled-coil* obu podjednostek β są bardzo homologiczne i różnią się jedynie dwoma aminokwasami (*Lys versus Arg* w pozycji 15 i *Ala versus Ser* w pozycji 28). Wydaje się jednak, że region ten jest główną domeną dimeryzacyjną i nie decyduje o specyficzności wiązania, za którą najprawdopodobniej odpowiedzialne są domeny zlokalizowane na 5 i 6 „łopatkach” domeny WD $G\beta$ (GARRITSEN i SIMONDS 1994). Natomiast region w cząsteczce $G\gamma$, który określa specyficzność tworzenia kompleksu z poszczególnymi podjednostkami $G\beta 1$ lub $G\beta 2$ zlokalizowany jest w segmencie zbudowanym z 14 aminokwasów, blisko środka cząsteczki (SPRING i NEER 1994). Późniejsze badania wykazały, że 5 reszt aminokwasowych występujących w 14 aminokwasowym segmencie pełni istotną rolę w omawianym procesie, a szczególne znaczenie mają triplety Glu38-Glu39-Phe40 (LEE i współaut. 1995) i Cys36-Cys37-Glu38 (MEISTER i współaut. 1995).

POTRANSLACYJNA MODYFIKACJA KOMPLEKSU $G\beta\gamma$

IZOPRENYLACJA PODJEDNOSTKI γ

Podjednostki γ nie wykazują tak wysokiej homologii, jaka występuje w przypadku $G\beta$, dlatego funkcjonalne zróżnicowanie kompleksu $G\beta\gamma$ przypisuje się raczej γ podjednostce. W zależności od przyjętych kryteriów białka należące do tej rodziny można podzielić na kilka podrodzin, ale chyba najbardziej przejrzysta klasyfikacja tych polipeptydów opiera się na typie potranslacyjnej modyfikacji. Podjednostki $\gamma 1$, γc występujące w komórkach fotoreceptorowych należą do podrodziny I (PENG i współaut. 1992, ONG i współaut. 1995). Do tej samej grupy zalicza się $\gamma 11$, której sekwencja aminokwasowa wykazuje 76% podobieństwo do $\gamma 1$ i dlatego początkowo przypuszczano, że lokalizacja tego białka jest również ograniczona do siatkówki (GAUTAM i współaut. 1998). Obecnie wiadomo, że występuje ono także w płucach, mózgu oraz płytkach krwi (MORISHITA i współaut. 1998). Grupę drugą stanowią

pozostałe podjednostki. Wśród nich $\gamma 2$, $\gamma 3$ i $\gamma 4$ wykazują wyższą homologię w stosunku do siebie. Jednak nie ma to związku z ich lokalizacją w organizmie. Podjednostki $\gamma 3$ i $\gamma 4$ występują w mózgu, podczas gdy $\gamma 2$, podobnie jak $\gamma 5$, $\gamma 7$, $\gamma 12$, można znaleźć w różnych tkankach. Z kolei, podjednostka $\gamma 8$ ulega ekspresji w komórkach węchowych (GAUTAM i współaut. 1989, CALI i współaut. 1992, KALYANARAMAN i współaut. 1995, ASANO i współaut. 1995, MORISHITA i współaut. 1998).

Białka należące do rodziny podjednostek γ ulegają potranslacyjnej modyfikacji, prenylacji, polegającej na przyłączeniu izoprenoidu do cysteiny w zlokalizowanym na C-końcu cząsteczki motywie CAAX (C-cysteina, A-aminokwas alifatyczny, X-dowolny aminokwas). Po prenylacji trzy aminokwasy (AAX) są odcinane i odsłonięta reszta cysteinowa ulega metylacji.

Ostatni aminokwas X, występujący w tym motywie, determinuje rodzaj modyfikacji. Spośród 11 białek należących do rodziny $G\gamma$, do

trzech z nich ($\gamma 1$, γc i $\gamma 11$), stanowiących podrodzinę I przyłącza się 15 węglowa reszta farnezylowa, podczas gdy pozostałe białka ulegają modyfikacji przez przyłączenie 20 węglowej reszty geranylgeranylu (MYUNG i współaut. 1999). Farnezyłacja lub geranylgeranyłacja $G\gamma$ nie jest wymagana do dimeryzacji $G\beta$ i $G\gamma$. Jednak proteolityczne odcięcie trzech aminokwasów z C-końca $G\gamma$, odpowiedzialnych za izoprenylację czyni takie białko niezdolnym do połączenia z $G\beta$. Sugeruje to, że utworzenie kompleksu $G\beta\gamma$ następuje przed usunięciem trzech ostatnich aminokwasów i metylacją cysteiny (HIGGINS i CASEY 1994).

Lipidowa modyfikacja podjednostki γ jest ważna ze względu na możliwość zakotwiczenia kompleksu $G\beta\gamma$ w błonie komórkowej (FUKADA i współaut. 1990, WEDEGAERTNER i współaut. 1995). Nieznany jest wprawdzie mechanizm, dzięki któremu taka modyfikacja białek γ przyczynia się do lepszego umiejscowienia ich w błonie, ale należy przypuszczać, że izoprenylova reszta zakotwicza się bezpośrednio w hydrofobowej błonie lipidowej. Nasuwa się jednak pytanie, czy ta modyfikacja jest wystarczająca do zakotwiczenia kompleksu

która mogłaby być dodatkowo palmitylowana (TAKIDA i WEDEGAERTNER 2003). Prawdopodobnie dlatego ekspresja $G\beta\gamma$ w komórkach HEK293 wykazała, że kompleks ten w takich warunkach doświadczalnych bardzo słabo wiąże się z błoną komórkową i głównie zlokalizowany jest w błonie retikulum endoplazmatycznego, a dopiero ko-ekspresja $G\beta\gamma$ i $G\alpha$ prowadzi do silnego połączenia $G\beta\gamma$ z błoną komórkową (EVANKO i współaut. 2001). W następnym etapie badań wykazano, że izoprenylacja podjednostki γ jest konieczna, ale nie wystarczająca do zakotwiczenia kompleksu $G\beta\gamma$ do błony komórkowej. Dodatkowym niezbędnym wymaganiem jest połączenie z podjednostką α , która jest palmitylowana. W mutantach pozbawionych zdolności ekspresji podjednostki α , ale tak zmienionych, aby $G\gamma$ ulegała palmitylacji, kompleks $G\beta\gamma$ łączy się z błoną komórkową (TAKIDA i WEDEGAERTNER 2003).

Modyfikacje lipidowe γ podjednostki są niezbędne nie tylko do utworzenia prawidłowego kompleksu, ale mają również swoje następstwa funkcjonalne. W Tabeli 1 zestawiono przykłady białek będących potencjalnymi

Tabela 1. Efekt lipidowej modyfikacji kompleksu $G\beta\gamma$.

Prenylacja	Oddziaływanie	Funkcjonalne następstwa
$\beta 1\gamma 1$	$G\alpha$	brak prenylacji $\beta 1\gamma 1$; brak wspomagania ADP-rybozylacji przez PTX α_o i α_t (1, 2)
$\beta 1\gamma 2$	cyklaza adenylowa (AC)	brak prenylacji $\beta 1\gamma 2$; brak hamowania AC typu I lub brak stymulacji AC typu II w błonie (3, 4)
$\beta 1\gamma 1$	fosfolipaza C (PLC)	brak prenylacji $\beta 1\gamma 1$; brak stymulacji PLC β (4, 5)
G_t	rodopsyna	farnezylowany peptyd odpowiadający C końcowi $\gamma 1$ specyficznie hamuje oddziaływanie G_t z receptorem (rodopsyną) (6)

Referencje: (1) HIGGINS i CASEY 1994, (2) OHGURO i współaut. 1992, (3) INIGUEZ-LLUHI i współaut. 1992, (4) MYUNG i współaut. 1999, (5) DIETRICH i współaut. 1994, (6) KISSELEV i współaut. 1994.

$G\beta\gamma$ w błonie komórkowej. Inne białka prenylowane, np. białka należące do rodziny małych białek G (białka Ras), korzystają z dodatkowego mechanizmu (palmitylacji) łączącego je z błoną komórkową (HANCOCK i współaut. 1990, TAKIDA i WEDEGAERTNER 2003). Podobnie, w przypadku podjednostki γ białka G z drożdży, stwierdzono palmitylację cysteiny w pobliżu motywu CAAX (HIRSCHMAN i JENNESS 1999). Jednak w cząsteczce $G\gamma$ człowieka nie znaleziono w pobliżu motywu CAAX domeny,

efektorami $G\beta\gamma$ i wymagającymi do swojej aktywacji izoprenylacji dimeru.

FOSFORYLACJA $G\beta\gamma$

WIELAND i współaut. (1993) wykazali, że w ludzkich komórkach leukemicznych (ang. human leukemia cells, HL-60) $G\beta$ może być fosforylowana na reszcie histydynowej przez specyficzny enzym wykorzystujący GTP jako substrat. W podobny sposób transducyna (G_t) w

siatkówce oka może być fosforylowana przez analog GTP, GTP γ S (WIELAND i współaut. 1992). Autorzy sugerują, że grupa fosforanowa może być przenoszona z ufosforylowanej histydyny na GDP związane z podjednostką α . W ten sposób mogłaby funkcjonować alternatywna droga aktywacji $G\alpha$ (KOWLURU i współaut. 1996). Mimo swojej atrakcyjności przypuszczenie takie jest bardzo kontrowersyjne, gdyż wielu badaczy uważa, że możliwość aktywacji szlaków sygnalizacyjnych z pominięciem receptora nie ma miejsca w systemach biologicznych (HOHENEGGER i współaut. 1996). Z drugiej strony, w regulatorze osmolarności u drożdży wykazano możliwość przesunięcia grupy fosforanowej z histydyny na białko, które moduluje szlak kinaz MAP (MAEDA i współaut. 1994). Również ostatnie doniesienia dowodzą w badaniach *in vitro*, że transfer wysokoenergetycznej reszty fosforanowej z jednej z histydyn $G\beta$ (His-266) przy udziale kinazy nukleoty-

dowej B (ang. nucleoside diphosphate kinase, NDPK B) może prowadzić do aktywacji heterotrimerycznych białek G. His-266 jest konserwowana w podjednostkach $\beta 1$ - $\beta 4$, nie występuje natomiast w podjednostce $\beta 5$, która różni się znacznie od pozostałych białek należących do tej rodziny i w pozycji 266 posiada lizynę (CUELLO i współaut. 2003).

Kolejnym przykładem fosforylacji jest białko Set4 (odpowiednik $G\beta$ u drożdży), które w odpowiedzi na stymulację feromonem ulega fosforylacji w dodatkowym regionie 41 reszt aminokwasowych, umiejscowionym pomiędzy 5 a 6 łopatką domeny WD. U innych Eukaryota nie stwierdzono sekwencji homologicznych do dodatkowych aminokwasów białka Set4. Usunięcie tego łącznika nie wyklucza udziału Set4 w odpowiedzi na feromon, ale czyni takie mutanty bardziej wrażliwymi na stymulację i zaburza procesy adaptacyjne (COLE i REED 1991).

REGULACJA $G\beta\gamma$ PRZEZ FOSDUCYNĘ

W przekazywaniu sygnału w komórkach eukariotycznych oprócz receptora, białek G, efektorowych białek enzymatycznych oraz wtórnych przekaźników, istotną rolę odgrywają dodatkowe białka regulatorowe, kontrolujące aktywność białek G. Można wśród nich wyróżnić dwie zasadnicze grupy. Do pierwszej grupy należą białka RGS (ang. regulators of G-protein signaling), które łączą się bezpośrednio do aktywnej, połączonej z GTP, podjednostki α białka G ($G\alpha$) (HOLLINGER i HEPLER 2002). Do drugiej – białka z rodziny fosducyn, które posiadają w swojej cząsteczce domeny odpowiedzialne za wiązanie się z podjednostkami $\beta\gamma$ białka G ($G\beta\gamma$) (SCHULZ 2001, FABCZAK i współaut. 2003). To właśnie ta zdolność i współzawodnictwo między fosducyną a $G\alpha$ w wiązaniu się z podjednostkami $G\beta\gamma$ jest jedną z możliwości kontroli mechanizmu przekazywania sygnału w komórce. Utworzenie kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$ wiąże się z translokacją $G\beta\gamma$ do cytoplazmy i zjawisko to jest prawdopodobnie odpowiedzialne za hamowanie szlaku sygnalizacyjnego z udziałem białek G. Tak więc, dysocjacja i reasocjacja podjednostek $G\beta\gamma$ z udziałem fosducyny jest jednym z głównych czynników regulujących aktywność białek G (LEE i współaut. 1987, 1990). Charakter oddziaływań fosducyny z podjednostkami $G\beta\gamma$ był badany przy wykorzystaniu promienio-

wania X (GAUDET i współaut. 1996). Uporządkowanie krystalograficzne struktury fosducyny wskazuje na obecność dwóch głównych domen. Pierwsza domena to polarny N-końiec (pierwsze 105 aminokwasów) z dwoma helisami, tworzący powierzchnię oddziaływania z „górną” powierzchnią $G\beta$, powierzchnią, która oddziałuje z $G\alpha$ w kompleksie $G\alpha\beta\gamma$ (HAWES i współaut. 1994, GAUDET i współaut. 1996, XU i współaut. 1995). Domena ta współzawodniczy z $G\alpha$ w wiązaniu do $G\beta\gamma$ i uniemożliwia utworzenia heterotrimeru $G\alpha\beta\gamma$. Pierwsze 63 aminokwasy wchodzące w skład helisy 1 tworzą rdzeń N-końca, a w pozycji 29 występuje ważny funkcjonalnie aminokwas, tryptofan (Try-29), istotny w interakcji fosducyny z podjednostką $G\beta$ (XU i współaut. 1995). Wiązanie fosducyny do $G\beta\gamma$ jest możliwe jedynie w przypadku, kiedy fosducyna występuje w formie zdefosforylowanej. LOEW i współaut. (1998) sugerują, że wiązanie fosducyny do podjednostek $G\beta\gamma$ powoduje zmiany konformacyjne, w konsekwencji których następuje przemieszczenie kompleksu $G\beta\gamma$ z błony do cytoplazmy. Translokacja ta mogłaby być odpowiedzialna za hamowanie przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (LEE i współaut. 1990).

Druga domena zlokalizowana na końcu C fosducyny, jest strukturalnie podobna do tio-

redoksyny (GAUDET i współaut. 1996) i łączy się tylko z zewnętrznym pasmem podjednostki $G\beta$. Powinowactwo C-końca fosducyny do podjednostki β białka G jest dwukrotnie niższe niż stwierdzono to w przypadku N-końca (HAWES i współaut. 1994, Xu i współaut. 1995, TANAKA i współaut. 1997). Obie domeny, które w fosducynie rozdzielone są przestrzenią, prawdopodobnie również pełnią odmienne funkcje w komórce. N-końcowa domena odpowiedzialna jest za współzawodnictwo z podjednostką $G\alpha$ w wiązaniu podjednostek $G\beta\gamma$, natomiast C-końcowa domena, tioredoksynowa, miałaby odpowiadać za translokację podjednostek $G\beta\gamma$ z błony do cytoplazmy. Badanie wiązania dwóch domen fosducyny z $G\beta\gamma$, jako niezależnych struktur, okazało się bardzo użyteczne w poznaniu różnych aspektów oddziaływania podjednostek białka G z efektorami i podjednostką $G\alpha$. Doświadczenia przeprowadzone przez HAWESA i współaut. (1994) oraz XU i współaut. (1995) potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, co do funkcji N-końcowej domeny fosducyny. Badacze ci wykazali, że N-końiec fosducyny po przyłączeniu podjednostek $G\beta\gamma$, tak jak zakładano wcześniej, może hamować ich funkcje. Oddziaływanie to jest jednak niewystarczające do odłączenia $G\beta\gamma$ od błony (TANAKA i współaut. 1996). Natomiast pozbowienie fosducyny domeny N-końcowej nie przeszkadza w interakcji końca C tego białka z $G\beta\gamma$ (SATO i współaut. 1998), ale połączenie to także nie jest w stanie spowodować trans-

lokacji podjednostek $G\beta\gamma$ do cytoplazmy. Prawdopodobnie w tym przypadku, przy braku N-końca, powierzchnia oddziaływania tych dwóch białek jest jednak zbyt mała, aby wytworzyć stabilne oddziaływania między nimi (TANAKA i współaut. 1996).

Podjednostki $G\beta\gamma$ zakotwiczone są do błony komórkowej za pośrednictwem hydrofobowej reszty farnezylowej przyłączonej do podjednostki γ białka G (MURRAY i współaut. 2001). Wiązania hydrofobowe są dodatkowo wzmocnione oddziaływaniami elektrostatycznymi. Przyłączenie fosducyny powoduje osłabienie wiązań elektrostatycznych pomiędzy błoną a $G\beta\gamma$ o jeden rząd wielkości. Ponadto należy pamiętać, że przyłączenie fosducyny następuje tylko po oddysocjowaniu $G\alpha$. Rozdzielenie heterotrimeru może być również powodem osłabienia wiązania $G\beta\gamma$ do błony (omawiano to powyżej). Równocześnie następują nieznaczne zmiany konformacyjne podjednostki $G\beta$, które dodatkowo osłabiają wiązanie dimeru $G\beta\gamma$ z błoną i w rezultacie powodują translokację kompleksu fosducyna- $G\beta\gamma$ do cytoplazmy (LOEW i współaut. 1998, MURRAY i współaut. 2001). Ponadto należy zaznaczyć, że fosducyna wiąże się z podobnym powinowactwem do różnych kombinacji kompleksu podjednostki $G\beta$ z podjednostką $G\gamma$ (GAUDET i współaut. 1996, 1999, MÜLLER 1996). Nie stwierdzono natomiast kontaktu fosducyny z podjednostką $G\gamma$ w kompleksie $G\beta\gamma$.

ODDZIAŁYWANIE $G\beta\gamma$ Z RECEPTOREM

Do aktywacji białek G w wyniku stymulacji receptora wymagana jest obecność heterotrimeru $G\alpha\beta\gamma$. W układzie tym dimer $G\beta\gamma$ wzmacnia wiązanie $G\alpha$ do odpowiedniego receptora (HIGASHIJIMA i współaut. 1987, HEITHIER i współaut. 1992, PHILLIPS i współaut. 1992a). Ponadto wykazano, że kompleks $G\beta\gamma$ wiąże się bezpośrednio do oczyszczonego receptora β adrenergicznego (HEITHIER i współaut. 1992) oraz do rodopsyny (PHILLIPS i współaut. 1992 a, b). Badania wykorzystujące fluorescencyjnie znakowane podjednostki $G\beta\gamma$ sugerują, że kompleks ten może pozostawać związany z rodopsyną przez cały cykl aktywacji, nawet po dysocjacji $G\alpha$ (PHILLIPS i współaut. 1992a, b). Wiadomo też, że $G\beta\gamma$ może hamować fosforylację rodopsyny przez kinazę rodopsyny (KELLERHER i JOHNSON 1988, KISSELEV i współaut.

1995a, b). Ze względu na fakt, że odmiennie niż w przypadku innych kinaz receptorów związanych z białkami G (np. GRK 2 i GRK3), kinaza rodopsyny nie wiąże się z $G\beta\gamma$, zatem efekt hamowania fosforylacji może być skutkiem wiązania się kompleksu $G\beta\gamma$ bezpośrednio do receptora. W drożdżach obecność $G\beta\gamma$ wymagana jest do związania białka G z receptorem feromonu (BLUMER i THORNER 1990), natomiast badania na mutancie *Dictyostelium* pozbawionym $G\beta$ wykazały obniżone powinowactwo wiązania chemoatraktantów do receptora, potwierdzając wcześniejsze sugestie, że do prawidłowego funkcjonowania receptora niezbędny jest kompleks $G\beta\gamma$ (WALL i współaut. 1995, WU i współaut. 1995). Zdolność wiązania kompleksu $G\beta\gamma$ do receptora zależy od typu γ podjednostki wchodzącej w skład dimeru. Di-

mer utworzony z $\beta 1\gamma 1$ umożliwia połączenie Gat (podjednostka α transducyny) z rodopsyną. Jednak po zamianie $\gamma 1$ na $\gamma 2$ kompleks ten traci swoje własności (KISSELEV i współaut. 1995a). Kluczowe domeny odpowiedzialne za połączenie między receptorem a białkiem G (rodopsyną a transducyną) zlokalizowane są na farnezylowanym końcu C podjednostki γ (KISSELEV i współaut. 1994, 1999). Najnowsze badania wskazują, że podjednostki łączą się z receptorem w określonej sekwencji zdarzeń, a nie równocześnie, jak uprzednio sądzono (CHERFILS i CHABRE 2003, GAUTAM 2003). Proces inicjowany jest połączeniem podjednostki γ z receptorem (rodopsyną), co umożliwia przyłączenie do niego podjednostki α . Konsekwencją tego są zmiany konformacyjne w cząsteczce $G\alpha$, w wyniku których następuje uwolnienie związanego GDP i przyłączenie w to miejsce GTP (HERRMANN i współaut. 2004).

Większość z przedstawionych wyników dotyczy badań w systemach *in vitro*. Zaskakujące wyniki przedstawili ostatnio AKGOZ i współaut. (2004), wykorzystując znakowanie kompleksu $G\beta\gamma$ -GFP (ang. green fluorescent protein) w żywych komórkach. Autorzy ci wykazali, że po stymulacji białek G przez receptor następuje natychmiastowa translokacja dimeru $G\beta\gamma$ do aparatu Golgiego. Powrót kompleksu $G\beta\gamma$ do błony komórkowej odbywa się dopiero po inaktywacji receptora. Obserwowany proces jest bardzo szybki i czas wymagany do przebycia drogi w obie strony jest rzędu kilku sekund, a wydajność translokacji jest zależna od typu podjednostki γ . Szybkie przemieszczenie kompleksu $G\beta\gamma$ do aparatu Golgiego po aktywacji receptora może sugerować, że po pierwsze, proces ten zachodzi dzięki dyfuzji, a po drugie, że w aparacie Golgiego występuje potencjalny efektor lub efekторы dimeru $G\beta\gamma$ (AKGOZ i współaut. 2004).

Omawiając zjawisko oddziaływania kompleksu $G\beta\gamma$ z receptorem nie można pominąć roli, jaką pełni on w jego fosforylacji przez serynowo/treoninowe kinazy białkowe recep-

torów sprzężonych z białkami G, kinazy GRK. Kinazy te, to cytoplazmatyczne białka, które przejściowo łączą się z błoną komórkową podczas stymulacji receptorów GPCR. Fosforylacja receptora powoduje jego przejściową inaktywację i jest kluczowym mechanizmem wyłączającym receptor z procesu przekazywania sygnału. W przypadku dwóch izoform tych kinaz, GRK2 i GRK3, niezbędnym pośrednikiem w procesie fosforylacji jest dimer $G\beta\gamma$ (PITCHER i współaut. 1992, DAAKA i współaut. 1997). Bezpośrednie połączenie kompleksu $G\beta\gamma$ z domeną plekstrynową na C-końcu GRK2 i GRK3 powoduje translokację kinaz do błony komórkowej (KOCH i współaut. 1993). „Okaleczając” GRK2 poprzez usunięcie domeny plekstrynowej pokazano, że na końcu N kinazy zlokalizowane jest drugie miejsce wiązania $G\beta\gamma$, które bierze udział w regulacji GRK2 przy niższych stężeniach $G\beta\gamma$ (EICHMANN i współaut. 2003). Obecność tego miejsca wydaje się niezbędna w prawidłowym funkcjonowaniu kinazy, gdyż wyłączenie jego funkcji na skutek podania specyficznych przeciwciał uniemożliwia fosforylację rodopsyny przez GRK2. Oddziaływanie pomiędzy dimerem $G\beta\gamma$ a GRK2 jest przykładem wzajemnej regulacji. Połączenie $G\beta\gamma$ i GRK2 wymagane jest do aktywacji kinazy, ale z drugiej, strony kinaza GRK2 może regulować aktywność sygnalizacyjną kompleksu $G\beta\gamma$. Stwierdzono zahamowanie stymulacji $PLC\beta$ przez $G\beta\gamma$ po przyłączeniu dimeru do GRK, niezależnie czy dimer został przyłączony do miejsca wiązania na końcu C czy N kinazy (EICHMANN i współaut. 2003).

Należy również wspomnieć, że prawdopodobnie regulatorem procesu łączenia się GRK z $G\beta\gamma$ może być fosducyna, tak jak to wykazali w komórkach układu węchowego BOEKHOFF i współaut. (1997). W formie defosforylowanej, fosducyna silnie wiąże się z podjednostką $G\beta\gamma$, co uniemożliwia zakotwiczenie GRK3 do wspólnego miejsca wiązania na tej podjednostce (BOEKHOFF i współaut. 1997, FABCZAK i współaut. 2003).

BIAŁKA EFEKTOROWE DLA $G\beta\gamma$

Od dawna uwaga badaczy skupia się na poznaniu molekularnych oddziaływań między $G\beta\gamma$ i poszczególnymi efektorami, jednak wiedza na ten temat jest nadal niepełna. Wykazano, że w obszernym fragmencie $G\beta$, pomiędzy

60 a 150 resztą aminokwasową, zlokalizowane są domeny odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami efektorowymi (CHEN i współaut. 1995, 1997, WENG i współaut. 1996; YAN i GAUTAM 1996; FORD i współaut. 1998). Od-

działywania pomiędzy efektorami zostały częściowo wyjaśnione dzięki badaniom wykorzystującym mutagenezę odpowiedniego fragmentu $G\beta$ (PANCHENKO i współaut. 1998, BUCK i współaut. 1999, ALBSOUL-YOUNES i współaut. 2001). Większość z tych badań wykazała obecność wielu miejsc w cząsteczce $G\beta\gamma$ oraz w cząsteczce białka efektorowego, które są odpowiedzialne za ich wzajemne oddziaływania. Obserwacja poczyniona przez SONDKA i współaut. (1996) dowodzi, że $G\beta\gamma$ nie zmienia swojej konformacji po odłączeniu się od $G\alpha$. Wydaje się więc, że połączenie z $G\alpha$ i utworzenie heterotrimeru $G\alpha\beta\gamma$ ogranicza zdolność $G\beta\gamma$ do aktywacji efektorów. Równocześnie sugeruje to, że miejsca wiązania $G\alpha$ do $G\beta\gamma$ oraz miejsca wiązania efektorów i $G\beta\gamma$ zlokalizowane są w tym samym fragmencie cząsteczki (LI i współaut. 1998). Należy jednak zaznaczyć, że chociaż domeny odpowiedzialne za wiązanie poszczególnych efektorów lub $G\alpha$ zlokalizowane są w tym samym fragmencie $G\beta\gamma$, to jednak nie są one identyczne, gdyż tworzą je sekwencje różnych reszt aminokwasowych. Poniżej szerzej omówione zostaną interakcje pomiędzy wybranymi efektorami a dimerem $G\beta\gamma$, a w Tabeli 2 zestawiono poznane do tej pory białka efektorowe oddziaływujące z $G\beta\gamma$.

CYKLAZA ADENYLANOWA

Udział kompleksu $G\beta\gamma$ w regulacji aktywności cyklazy adenyłanowej (AC) był niedoceniany i przez długi czas uważano, że jedynie podjednostka $G\alpha$ kontroluje syntezę cAMP (TANG i współaut. 1991). Zgodnie z tym założeniem wyłącznie podjednostka $G\alpha_s$ odpowiedzialna byłaby za stymulację syntezy tego nukleotydu, podczas gdy $G\alpha_{i/z}$ hamowałaby jego aktywność. Późniejsze badania dowiodły, że również $G\beta\gamma$ w zróżnicowany sposób reguluje aktywność odmiennych form cyklazy adenyłanowej. Wykazano, że $G\beta\gamma$ stymuluje aktywność izoform AC2, AC4 i AC7, hamuje natomiast aktywność AC1 i AC8, równocześnie ograniczając działanie aktywatorów cyklazy adenyłanowej, forskoliny, Ca-CaM, $G\alpha_s$ (TANG i współaut. 1991, GAO i współaut. 1991). Stymulujące działanie $G\beta\gamma$ na izoformy AC2, AC4 i AC7 stwierdzono jedynie w przypadku równoczesnej aktywacji przez $G\alpha_s$. Ma ono charakter synergistyczny, gdyż następuje wówczas wielokrotne wzmocnienie efektu działania $G\alpha_s$.

Przypuszczalne miejsca wiązania dimeru $G\beta\gamma$ na cząsteczce AC (AC2, AC4 i AC7) zlokalizowano pomiędzy 956 a 982 resztą aminokwasową położoną w środkowej części drugiej ka-

Tabela 2. Zestawienie znanych efektorów dla $G\beta\gamma$.

Efektor	$G\beta\gamma$	Referencje
Jonowe kanały potasowe (GIRK)	+	(1–4)
Jonowe kanały wapniowe $I_{Ca(N,P/Q)}$	–	(4–7)
Fosfolipaza A_2	+	(8)
Odpowiedź drożdży na feromon	+	(9–11)
PLCb	+	(13, 14)
Cyklaza adenyłanowa	±	(15)
GRK	+	(16–19)
PI3K	+	(20)
Kaskada MAP kinaz	+	(21–23)
Kinazy tyrozynowe	+	(24, 25)
RACK	+	(26)

(1) LOGOTHETIS i współaut. 1987; (2) CLAPHAM i NEER 1988; (3) MIRSHAHI i współaut. 2002; (4) DASCAL 2001; (5) IKEDA 1996; (6) HERLITZE i współaut. 1996; (7) LU i współaut. 2001; (8) JELSEMA i współaut. 1987; (9) WHITEWAY i współaut. 1989; (10) CLARK 1993; (11) HASSON i współaut. 1994; (12) STERNWEIS 1994; (14) CAMPS i współaut. 1992a,b; (15) TANG i GILMAN 1991; (16) HAGA i współaut. 1994; (17) BÜNEMANN i HOSEY 1999; (18, 19) LODOWSKI i współaut. 2003a, b; (20) KERCHNER i współaut. 2004; (21) STEPHENS i współaut. 1994; (22) INGLESE i współaut. 1995; (23) MATTINGLY i MACARA 1996; (24) PUMIGLIA i współaut. 1995; (25) TSUKADA i współaut. 1994; (25) LANGHANS-RAJASEKARAN i współaut. 1995; (26) CHEN i współaut. 2004.

talitycznej domeny AC (CHEN i współaut. 1995). Nie znaleziono takiej sekwencji aminokwasowej (956-982) w izoformach, które nie są regulowane przez $G\beta\gamma$. Ponadto sekwencja ta zawiera motyw QXXER, który występuje w innych efektorach $G\beta\gamma$ i jest miejscem wiązania dimeru do białka efektorowego. Badania z wykorzystaniem syntetycznych polipeptydów pozwoliły ustalić, że region pomiędzy 75-165 resztą aminokwasową $G\beta\gamma$ jest najprawdopodobniej włączony w interakcję z AC (CHEN i współaut. 1997). Wiele reszt aminokwasowych z tego rejonu (Lys-78, Trp-99 i Asn-119) również jest zaangażowanych w kontakt $G\beta\gamma$ z $G\alpha$ (LAMBRIGHT i współaut. 1996). Stanowi to poparcie założenia, że aktywacja efektora przez $G\beta\gamma$ jest uniemożliwiona, gdy białko G występuje w postaci heterotrimeru. Zastosowanie do badań syntetycznych peptydów, których sekwencja odpowiadała sekwencji regionu pomiędzy 86-105 oraz 115-135 resztą aminokwasową podjednostki $G\beta$ pokazało, że peptyd $G\beta$ (86-105) powodował zahamowanie stymulacji AC2 i zmniejszenie efektu blokującego na AC1 przez $G\beta\gamma$. Podobne działanie zaobserwowano po zastosowaniu drugiego peptydu $G\beta$ (115-135), jednakże jego efekt był mniejszy. Mutacja polegająca na wymianie Tyr-124 na Val w peptydzie $G\beta$ (115-135) obniżała efekt jego działania. Natomiast konsekwencją zamiany Met-101 na Asn w peptydzie $G\beta$ (86-105) było usunięcie wcześniej opisanego efektu działania peptydu. Należy zaznaczyć, że użycie peptydów $G\beta$ nie powodowało całkowitego zniesienia efektu $G\beta\gamma$ na stymulację lub hamowanie, w zależności od zastosowanej izoformy AC. Może to wskazywać na obecność dodatkowego miejsca kontaktu pomiędzy $G\beta\gamma$ a AC, bądź, tak jak ma to miejsce w przypadku innego efektora, kanału potasowego (GIRK), włączenie w regulację aktywności AC również drugiej podjednostki tworzącej dimer, $G\gamma$ (CHEN i współaut. 1997).

FOSFOLIPAZA $C\beta$

Przynajmniej 30 receptorów związanych z białkami G stymuluje fosfodiesterazę fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu ($PLC\beta$), a ogniwem pośrednim są białka G, zarówno $G\alpha$, jak i $G\beta\gamma$. Stwierdzono, że oczyszczone białko $G\beta\gamma$ może aktywować różne formy fosfolipazy, $PLC\beta$ 1, $PLC\beta$ 2 oraz $PLC\beta$ 3 (SMRCKA i STERNWEIS 1993, PATERSON i współaut. 1995). Analo-

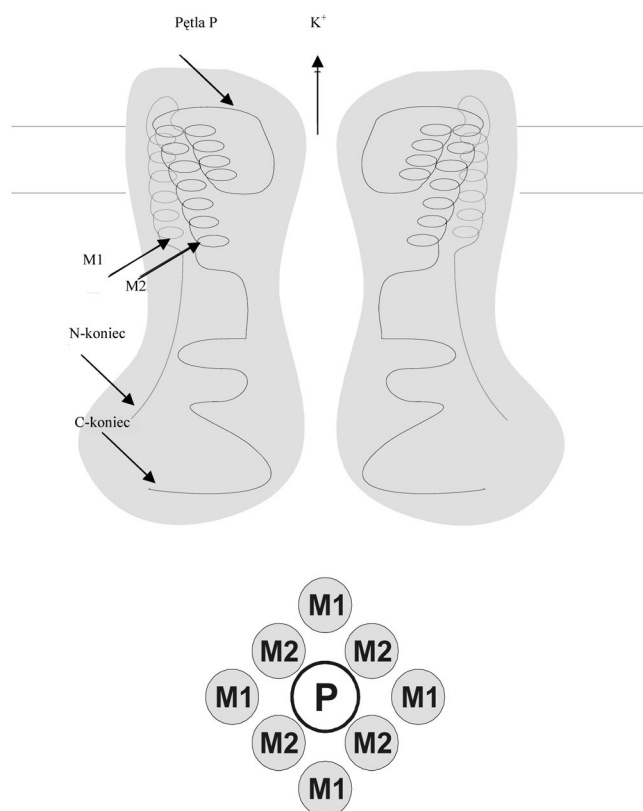
gicznie jak w przypadku cykazy adenylationowej (CHEN i współaut. 1997), BUCK ze współautorami (1999), stosując syntetyczne polipeptydy, przeanalizowali udział dwóch fragmentów $G\beta$ w aktywacji $PLC\beta$ 2. Wykazali oni, że $G\beta$ posiada dwie, lecz pełniące odmienne funkcje, domeny zaangażowane w aktywacji $PLC\beta$. Peptyd $G\beta$ (86-105) bierze udział bezpośrednio w przekazywaniu sygnału do $PLC\beta$ 2. Fragment ten może regulować aktywność $PLC\beta$ zarówno sam, jak i w obecności $G\beta\gamma$. Ponieważ drugi fragment $G\beta$ (115-135) nie jest w stanie regulować aktywności $PLC\beta$, natomiast hamuje stymulację enzymu przez $G\beta\gamma$, wydaje się więc, że jest on odpowiedzialny wyłącznie za wiązanie $G\beta\gamma$ z $PLC\beta$ i nie bierze udziału w przekazywaniu sygnału. Stosując różnie zaprojektowane peptydy ustalono, które reszty aminokwasowe odgrywają ważną rolę w stymulacji $PLC\beta$. W pierwszej kolejności stwierdzono, że wymiana dwóch reszt aminokwasowych obciążonych ładunkiem, Lys 89 i Arg 96, powoduje utratę przez peptyd zdolności aktywacji $PLC\beta$ (BUCK i współaut. 1999). Konstruując kolejne peptydy dowiedziono, że w podjednostce β występuje dodatkowy region, zlokalizowany między 42 a 54 resztą aminokwasową, który odpowiedzialny jest za stymulację enzymu. Model zaproponowany przez BUCKA i współautorów (2002) zakłada, że kontakt między obu białkami, jaki ma miejsce w rejonach przekazywania sygnału i wspomagany przez oddziaływanie między domenami odpowiedzialnymi za połączenie obu białek, indukcje $PLC\beta$ do osiągnięcia takiego „stanu gotowości”, aby sygnały z wielu regionów sygnalizacyjnych mogły być efektywnie przekazane na efektor. Autorzy podkreślają, że to oddziaływanie ma charakter dynamiczny i nie polega na wytworzeniu statycznego połączenia między białkami (BUCK i współaut. 2002).

KANAŁY JONOWE

Białka G mogą regulować bezpośrednio aktywność dwóch grup kanałów jonowych. Pierwszą grupę stanowi rodzina napięciowo czułych kanałów wapniowych, które są hamowane przez $G\beta\gamma$, a drugą – rodzina kanałów potasowych typu GIRKs (ang. G protein-gated inwardly rectifying K^+), które są aktywowane przez $G\beta\gamma$ (CLAPHAM 1994, HUANG i współaut. 1995, SCHNEIDER i współaut. 1997).

Kanały GIRKs odgrywają ważną rolę w kontrolowaniu pobudliwości błony komórkowej i przekazu synaptycznego (LÜSCHER i współaut. 1997). W skład rodziny kanałów GIRKs u ssaków wchodzi 4 rodzaje kanałów, GIRK1-GIRK4, które zostały zlokalizowane w sercu (WICKMAN i współaut. 1998), mózgu (LÜSCHER i współaut. 1997, GUATTEO i współaut. 2000) oraz komórkach endokrynnych (YAMADA i współaut. 1998). Badania stechiometryczne wykazują, że funkcjonalny kanał GIRK zbudowany jest z 4 homomerycznych lub 2 par heteromerycznych podjednostek (Ryc. 2). W każdej podjednostce transbłonowy rdzeń zbudowany jest z dwóch rozciągniętych przez całą szerokość błony α -helis (M1 i M2) oddzielo-

kanałów potasowych (DOYLE i współaut. 1998, DASCAL 2001). Każda z helis zakończona jest domenami cytozolowymi. *In vivo*, po aktywacji receptora sprzężonego z białkami G, uwolniona $G\beta\gamma$ wiąże się bezpośrednio do N- i C-końcowej domeny cytoplazmatycznego regionu kanału GIRK (INANOBE i współaut. 1995, YAMADA i współaut. 1998) powodując kilkukrotne zwiększenie prawdopodobieństwa otwarcia kanału (IVANOVA-NIKOLOVA i BRETWISER 1997, YAKUBOVICH i współaut. 2000). Jednak zmiany strukturalne, następstwem których jest otwarcie kanału po połączeniu z $G\beta\gamma$, nadal nie są poznane. Jeden z modeli zakłada, że C-końiec działa jako blokada, która oddziałuje przejściowo z porem kanału



Ryc. 2. Struktura kanału GIRK (wg DASEALA 2001).

nych pętlą (ang. P-loop). M2 tworzy wewnętrzną helisę, która stanowi krawędź poru, podczas gdy M1 skierowana jest w stronę dwuwarstwy lipidowej. W pętli, która formuje selektywny filtr w najwęższym miejscu poru, usytuowana jest helisa i motyw GYG, określający selektywność poru dla jonów potasu. Struktura poru kanału oparta jest na strukturze potasowego kanału bakteryjnego i jest ona prawdopodobnie wspólna dla wszystkich

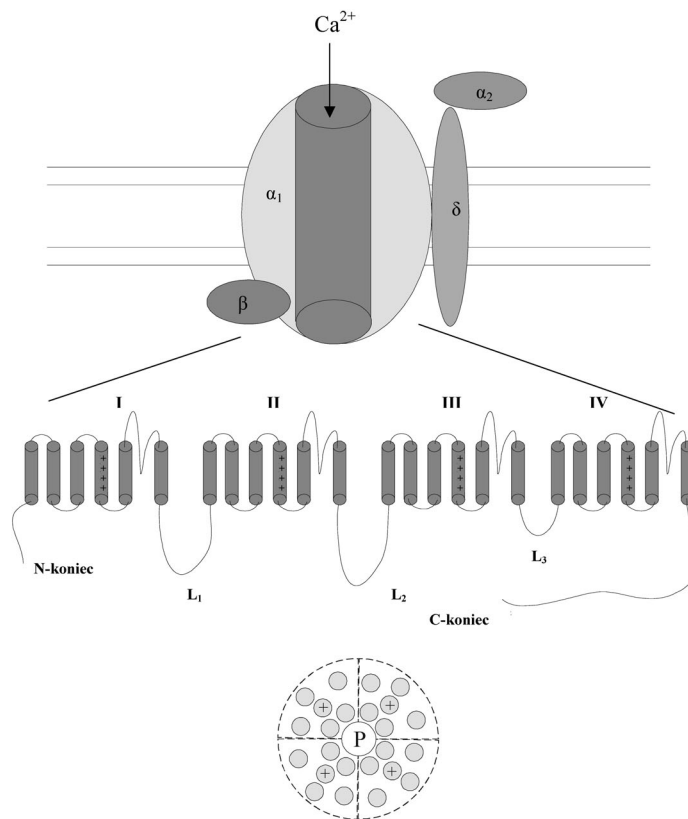
(PESSIA i współaut. 1995). Ponieważ na C-końcu zlokalizowane są domeny odpowiedzialne za wiązanie $G\beta\gamma$, PIP_2 , i Na^+ , jak również sekwencje, które tworzą motyw odpowiedzialny za przemieszczanie się cząsteczki w obrębie błony, wydaje się zatem zrozumiałe, że ten region może regulować aktywność kanału.

Prace mające na celu poznanie miejsc wiązania pomiędzy dimerem $G\beta\gamma$ i cząsteczką kanału skupiły się początkowo na udziale w

tym procesie oddziaływań wyłącznie podjednostki $G\beta$ (MIRSHAHI i współaut. 2002). Jak wykazano, podjednostka $G\beta 1$ jest zdolna sama przyłączyć się do cząsteczki kanału, ale nie wpływa to na zmianę wielkości prądu przewodzonego przez kanał, jaką obserwuje się po przyłączeniu dimeru $G\beta 1\gamma 2$. Dlatego badacze zainteresowali się potencjalną rolą $G\gamma 2$ w regulacji funkcji kanałów GIRKs. Część C-końcowa podjednostki $G\gamma 2$ wydaje się pełnić istotną rolę w aktywacji kanału. Region między 35 a

$G\beta\gamma$ (KAWANO i współaut. 1999), ale także moduluje ona funkcję efektorów (kanału GIRK) poprzez precyzyjną regulację efektywności dimeru $G\beta\gamma$.

Kanały wapniowe typu L, N oraz P/Q są kanałami bramkowanymi napięciem i przewodzącymi selektywnie jony wapnia. Na Ryc. 3 przedstawiono schemat budowy kanału wapniowego zależnego od napięcia. Por takiego kanału tworzy podjednostka α_1 i dwie pomocnicze podjednostki $\alpha_2\delta$ i β . Podjednostka α_1



Ryc. 3. Struktura napięciowo zależnego kanału przewodzącego jony wapnia (wg DASCALA 2001).

71 resztą aminokwasową $G\gamma$ jest wymagany do pełnej stymulacji kanału GIRK4 przez $G\beta 1\gamma 2$. Dziesięć reszt aminokwasowych z tego regionu tworzy swoistą sieć oddziaływań z $G\beta$ ograniczając krytyczny region $G\beta\gamma$, który określa stymulujący wpływ dimeru na aktywność GIRK4. Wykazano, że podwójna mutacja $G\gamma$ (36 Asp na Thr oraz 48 Asp na Asn) eliminuje zdolność stymulacji kanału, nie wpływając jednocześnie na wiązanie z $G\beta$. Te dwie reszty aminokwasowe odpowiedzialne za wiązanie $G\gamma$ z $G\beta$ utrzymują precyzyjną konformację $G\beta\gamma$ wymaganą do pełnej stymulacji GIRK4 (PENG i współaut. 2003). Wyniki te sugerują, że $G\gamma$ nie tylko jest wymagana do aktywacji GIRK przez

składa się z 4 homologicznych transbłonowych domen (I-IV) i 5 wewnątrzkomórkowych segmentów, N-końca, C-końca oraz trzech łączników, L_1 - L_3 , występujących pomiędzy transbłonowymi domenami (DASCAL 2001). Aktywność tych kanałów może być hamowana po aktywacji receptora sprzężonego z białkami G dwoma drogami, z wykorzystaniem mechanizmu zależnego i niezależnego od napięcia. Hamowanie poprzez napięciowo-niezależny mechanizm przebiega z wykorzystaniem wielu szlaków sygnalizacyjnych i pośredniczą w tym procesie wtórne przekazy (HILLE 1994). W zależności od neuroprzekaznika, rodzaju komórki i miejsca w neuronie

w hamowaniu aktywności kanałów pośredniczącą $G\alpha_i$, $G\alpha_q$, $G\beta\gamma$ (KAMMERMEIER i współaut. 2000a, b). Istnieją wprawdzie przesłanki wskazujące na to, że niektóre typy hamowania niezależnego od napięcia są wynikiem bezpośredniego oddziaływania $G\alpha$ lub $G\beta\gamma$ z kanałami wapniowymi typu N lub P/Q, jednak nie zostało to w pełni udowodnione (DASCAL 2001). Wykazano natomiast, że dimer $G\beta\gamma$ bezpośrednio uczestniczy w hamowaniu aktywności kanałów zależnych od napięcia. Regulacja tego typu występuje w kanałach wapniowych typu N lub P/Q i nie dotyczy kanałów typu L. Wydaje się, że to $G\beta$ jest główną podjednostką regulującą aktywność tych kanałów. Zidentyfikowano wiele miejsc oddziaływania pomiędzy kompleksem $G\beta\gamma$ a cząsteczką kanału. Zlokalizowane są one w rejonie łącznika pomiędzy segmentem I a II $\alpha 1$ podjednostki kanału (PAGE i współaut. 1997, ZAPOMNI i współaut. 1997, DOERING i współaut. 2004) i na C-końcu (QIN i współaut. 1997). Hamowanie napięciowo-zależne jest szybkie, a zaaplikowanie impulsu wywołującego depolaryzację błony komórkowej przed aktywacją kanału, uniemożliwia przyłączenie $G\beta\gamma$ do cząsteczki kanału (DASCAL 2001, MIRSHAHI i współaut. 2002). Przebadano 5 typów podjednostek $G\beta$ i stwierdzono, że

różne kombinacje dimeru hamują aktywność napięciowo zależnych kanałów wapniowych typu N (GARCIA i współaut. 1998, RUIZ-VELASCO i IKEDA 2000). Postanowiono więc sprawdzić, które reszty aminokwasowe odgrywają kluczową rolę w tym procesie. Poddano mutacji Asn110, Tyr111 i Val 112, które są silnie konserwowane we wszystkich typach podjednostki $G\beta$. Zamiana tych reszt aminokwasowych spowodowała zanik hamującego działanie $G\beta$ na kanał typu N. Region 110-112 $G\beta$, zlokalizowany jest poza domenami interakcji z $G\alpha$ (WALL i współaut. 1995, DOERING i współaut. 2004) i nie był on wcześniej identyfikowany jako ważna funkcjonalnie domena $G\beta$. Podobny efekt, tzn. utratę własności hamujących, stwierdzono po zamianie reszt aminokwasowych w dwóch sąsiadujących ze sobą rejonach pomiędzy 140-168 i 186-204 resztami aminokwasowymi. Rejony te są odmienne od tych, które wcześniej opisano jako domeny odpowiedzialne za oddziaływanie z innymi efektorami. Dodatkowo, na $G\beta$ zidentyfikowano miejsce, które służy jako molekularny czujnik stanu fosforylacji przez kinazę C zależnych od napięcia kanałów wapniowych typu N (DOERING i współaut. 2004).

PODSUMOWANIE

Dimer $G\beta\gamma$ wchodzący w skład heterotrimerycznego białka G, początkowo uważany za nieaktywną komponentę służącą jedynie zakotwiczeniu białka G do błony komórkowej, w swojej prawie 20. letniej historii okazał się niezwykle ważną cząsteczką sygnałową. W istnieniu wielu izomerów poszczególnych podjednostek tworzących ten dimer należy upatrywać jego różnorodności, zarówno struktural-

nej, jak i funkcjonalnej. Dzięki temu może on kontrolować i regulować funkcję tak wiele odmiennych efektorów (np. kanały jonowe, fosfolipaza $C\beta$, cyklaza adenylanowa, kinazy receptorów związanych białkami G oraz innych, których listę przedstawiono w Tabeli 2), a w następstwie szlaki sygnalizacyjny i w konsekwencji odpowiedź komórki na sygnał.

DIMER $\beta\gamma$ OF G PROTEIN – SIGNALING MOLECULE

S u m m a r y

The extracellular signals received by receptors with seven membrane-spanning regions that activate the G proteins, are routed to several distinct intracellular pathways. The G proteins consist of two functional units, $G\alpha$ subunit, that binds guanine nucleotides and $G\beta\gamma$ dimer that functions as a single unit. The regulation of signal transduction by the $G\beta\gamma$ com-

plex at different protein interfaces: subunit – subunit, receptor – G protein, and $G\beta\gamma$ – effector, are reviewed. $G\beta\gamma$ dimer regulates over twelve cellular effectors including phospholipase- β , adenyl cyclases, ion channels and G-protein coupled receptor kinases, which control a broad range of cellular processes.

LITERATURA

- AKGOZ M., KALYANARAMAN V., GAUTAM N., 2004. *Receptor mediated reversible translocation of the G protein betagamma complex from the plasma membrane to the Golgi complex*. J. Biol. Chem. (w druku).
- ALBSOUL-YOUNES A. M., STERNWEIS P. M., ZHAO P., NAKATA H., NAKAJIMA S., NAKAJIMA Y., KOZASA T., 2001. *Interaction sites of the G protein beta subunit with brain G protein-coupled inward rectifier K^+ channel*. J. Biol. Chem. 276, 12712–12717.
- ARAI H., TSOU C. L., CHARO I. F., 1997. *Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of Galpha-coupled receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14495–14499.
- ASANO T., MORISHITA R., OHASHI K., NAGAHAMA M., MIYAKE T., KATO K., 1995. *Localization of various forms of the gamma subunit of G protein in neural and nonneural tissues*. J. Neurochem. 64, 1267–1273.
- BLUMER K. J., THORNER J., 1990. *Beta and gamma subunits of a yeast guanine nucleotide-binding protein are not essential for membrane association of the alpha subunit but are required for receptor coupling*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4363–4367.
- BIRNBAUMER L., 1990. *G proteins in signal transduction*. Ann. Rev. Pharmacol Toxicol. 30, 675–705.
- BOEKHOFF I., TOUHARA K., DANNER S., INGLESE J., LOHSE M. J., BREER H., LEFKOWITZ R. J., 1997. *Phosducin, potential role in modulation of olfactory signaling*. J. Biol. Chem. 272, 4606–4612.
- BUCK E., LI J., CHEN Y., WENG G., SCARLATA S., IYENGAR R., 1999. *Resolution of a signal transfer region from a general binding domain in Gbeta for stimulation of phospholipase C-beta2*. Science 283, 1332–1335.
- BUCK E., SCARLATA S., IYENGAR R., 2002. *Role of dynamic interactions in effective signal transfer for Gbeta stimulation of phospholipase C-beta2*. J. Biol. Chem. 277, 49707–49715.
- BÜNEMANN M., HOSEY M. M., 1999. *G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signaling*. J. Physiol. 517, 5–23.
- CALI J. J., BALCUEVA E. A., RYBALKIN I., ROBISHAW J. D., 1992. *Selective tissue distribution of G protein gamma subunits, including a new form of the gamma subunits identified by cDNA cloning*. J. Biol. Chem. 267, 24023–24027.
- CAMPS M., CAROZZI A., SCHNABEL P., SCHEER A., PARKER P. J., GIERSECHIK P., 1992a. *Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits*. Nature 360, 684–686.
- CAMPS M., HOU C., SIDIROPOULOS D., STOCK J. B., JAKOBS K. H., GIERSECHIK P., 1992b. *Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein beta gamma subunits*. Eur. J. Biochem. 206, 821–831.
- CHEN J., DEVIVO M., DINGUS J., HARRY A., LI J., SUI J., CARTY D. J., BLANK J. L., EXTON J. H., STOFFEL R. H., INGLESE J., LEFKOWITZ R. J., LOGOTHETIS D. E., HILDEBRANDT J. D., IYENGAR R., 1995. *A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits*. Science 268, 1166–1169.
- CHEN Y., WENG G., LI J., HARRY A., PIERONI J., DINGUS J., HILDEBRANDT J. D., GUARNIERI F., WEINSTEIN H., IYENGAR R., 1997. *A surface on the G protein β -subunit involved in interactions with adenylyl cyclases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 2711–2714.
- CHEN S., DELL E. J., LIN F., SAI J., HAMM H. E., 2004. *RACK1 regulates specific functions of $G\beta\gamma$* . J. Biol. Chem. 279, 17861–17863.
- CHERFILS J., CHABRE M., 2003. *Activation of G-protein Galpha subunits by receptors through Galpha-Gbeta and Galpha-Ggamma interactions*. Trends Biochem. Sci. 28, 13–17.
- CLAPHAM D. E., 1994. *Direct G protein activation of ion channels?* Annu. Rev. Neurosci. 17, 441–464.
- CLAPHAM D., NEER E. J., 1988. *Activation of atrial muscarinic-gated K^+ channels by beta gamma-subunits of G proteins*. Am. J. Physiol. 254, H192–197.
- CLAPHAM D. E., NEER E. J., 1997. *G protein $\beta\gamma$ subunits*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37, 167–203.
- CLARK K. L., DIGNARD D., THOMAS D. Y., WHITEWAY M., 1993. *Interactions among the subunits of the G protein involved in Saccharomyces cerevisiae mating*. Mol. Cell Biol. 13, 1–8.
- COLE G. M., REED S. I., 1991. *Pheromone-induced phosphorylation of a G protein beta subunit in S. cerevisiae is associated with an adaptive response to mating pheromone*. Cell 64, 703–716.
- CUELLO F., SCHULZE R. A., HEEMEYER F., MEYER H. E., LUTZ S., JAKOBS K. H., NIROOMAND F., WIELAND T., 2003. *Activation of heterotrimeric G proteins by a high energy phosphate transfer via nucleoside diphosphate kinase (NDPK) B and Gbeta subunits. Complex formation of NDPK B with Gbeta gamma dimers and phosphorylation of His-266 in Gbeta*. J. Biol. Chem. 278, 7220–7226.
- DAAKA Y., PITCHER J. A., RICHARDSON M., STOFFEL R. H., ROBISHAW J. D., LEFKOWITZ R. J., 1997. *Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2180–2185.
- DASCAL N., 2001. *Ion-channel regulation by G proteins*. Trends Endocrinol. Metab. 12, 391–398.
- DIETRICH A., MEISTER M., BRAZIL D., CAMPS M., GIERSECHIK P., 1994. *Stimulation of phospholipase C-beta 2 by recombinant guanine-nucleotide-binding protein beta gamma dimers produced in a baculovirus/insect cell expression system. Requirement of gamma-subunit isoprenylation for stimulation of phospholipase C*. Eur. J. Biochem. 219, 171–178.
- DOERING C. J., KISILEVSKY A. E., FENG Z. P., ARNOT M. I., PELOQUIN J., HAMID J., BARR W., NIRDOSH A., SIMMS B., WINKFEIN R. J., ZAMPONI G. W., 2004. *A single Gbeta subunit locus controls cross-talk between protein kinase C and G protein regulation of N-type calcium channels*. J. Biol. Chem. 279, 29709–29717.
- DOYLE D. A., MORAIS CABRAL J., PFUETZNER R. A., KUO A., GULBIS J. M., COHEN S. L., CHAIT B. T., MACKINNON R., 1998. *The structure of the potassium channel: molecular*

- lecular basis of K⁺ conduction and selectivity.* Science 280, 69–77.
- EICHMANN T., LORENZ K., HOFFMANN M., BROCKMANN J., KRASEL C., LOHSE M. J., QUITTERER U., 2003. *The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site.* J. Biol. Chem. 278, 8052–8057.
- EVANKO D. S., THIYAGARAJAN M. M., SIDEROVSKI D. P., WEDEGAERTNER P. B., 2001. *Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galpha_s and Galpha_q.* J. Biol. Chem. 276, 23945–23953.
- FABCZAK H., SOBIERAJSKA K., FABCZAK S., 2003. *Fosducyna i jej izoformy- regulatory aktywności białek G.* Postępy Biologii Komórki 30, 745–761.
- FIGLER R. A., GRABER S. G., LINDORFER M. A., YASUDA H., LINDEN J., GARRISON J. C., 1996. *Reconstitution of recombinant bovine A1 adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition.* Mol. Pharmacol. 50, 1587–1595.
- FORD C. E., SKIBA N. P., BAE H., DAAKA Y., REUVENY E., SHEKTER L. R., ROSAL R., WENG G., YANG C. S., IYENGAR R., MILLER R. J., JAN L. Y., LEFKOWITZ R. J., HAMM H. E., 1998. *Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors.* Science 280, 1271–1274.
- FUKADA Y., TAKAO T., OHGURO H., YOSHIZAWA T., AKINO T., SHIMONISHI Y., 1990. *Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding.* Nature 346, 658–660.
- GARCIA D. E., LI B., GARCIA-FERREIRO R. E., HERNANDEZ-OCHOA E. O., YAN K., GAUTAM N., CATTERALL W. A., MACKIE K., HILLE B., 1998. *G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels.* J. Neurosci. 18, 9163–9170.
- GARRITSSEN A., SIMONDS W. F., 1994. *Multiple domains of G protein beta confer subunit specificity in beta gamma interaction.* J. Biol. Chem. 269, 24418–24423.
- GAO B., N., GILMAN A. G., 1991. *Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10178–10182.
- GAUDET R., BOHMA A., SIGLER P. B., 1996. *Crystal structure at 2.4 Å resolution of the complex of transducin βγ and its regulators, phosducin subunits of G-proteins.* Cell 87, 577–588.
- GAUDET R., SAVAGE J. R., McLAUGHLIN N., WILLARDSON B. M., SIGLER P. B., 1999. *A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heteromeric G proteins by phosducin.* Mol. Cell 3, 649–660.
- GAUTAM N., BAETSCHER M., AEBERSOLD R., SIMON M. I., 1989. *A G protein gamma subunit shares homology with ras proteins.* Science 44, 971–974.
- GAUTAM N., 2003. *A conformational switch regulates receptor-G protein interaction.* Structure (Camb) 11, 359–360.
- GAUTAM N., DOWNES G. B., YAN K., KISSELEV O., 1998. *The G-protein betagamma complex.* Cell. Signal., 10, 447–455.
- GILMAN A. G., 1984. *G proteins and dual control of adenylyl cyclase.* Cell 36, 577–579.
- GILMAN A. G., 1987. *G proteins: transducers of receptor-generated signals.* Ann. Rev. Biochem. 56, 615–649.
- GUATTEO E., FUSCO F. R., GIACOMINI P., BERNARDI G., MERCURI N. B., 2000. *The weaver mutation reverses the function of dopamine and GABA in mouse dopaminergic neurons.* J. Neurosci. 20, 6013–6020.
- HAGA T., HAGA K., KAMEYAMA K., 1994. *G protein-coupled receptor kinases.* J. Neurochem. 63, 400–412.
- HANCOCK J. F., PATERSON H., MARSHALL C. J., 1990. *A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane.* Cell 63, 133–139.
- HASSON M. S., BLINDER D., THORNER J., JENNESS D. D., 1994. *Mutational activation of the STE5 gene product bypasses the requirement for G protein beta and gamma subunits in the yeast pheromone response pathway.* Mol. Cell Biol. 14, 1054–1065.
- HAWES B. E., TOUHARA K., KUROSE H., LEFKOWITZ R. J., INGLESE J., 1994. *Determination of the Gβγ-binding domain of phosducin, A regulatable modular of Gβγ signaling.* J. Biol. Chem. 269, 29825–29830.
- HEITHER H., FROHLICH M., DEES C., BAUMANN M., HARING M., GIERSCHIK P., SCHILTZ E., VAZ W. L., HEKMAN M., HELMREICH E. J., 1992. *Subunit interactions of GTP-binding proteins.* Eur. J. Biochem. 204, 1169–1181.
- HERLITZ S., GARCIA D. E., MACKIE K., HILLE B., SCHEUER T., CATTERALL W. A., 1996. *Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits.* Nature 380, 258–262.
- HERRMANN R., HECK M., HENKLEIN P., HENKLEIN P., KLEUSS C., HOFMANN K. P., ERNST O. P., 2004. *Sequence of interactions in receptor-G protein coupling.* J. Biol. Chem. 279, 24283–24290.
- HIGASHIJIMA T., FERGUSON K. M., STERNWEIS P. C., SMIGEL M. D., GILMAN A. G., 1987. *Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins.* J. Biol. Chem. 262, 762–766.
- HIGGINS J. B., CASEY P. J., 1994. *In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex.* J. Biol. Chem. 269, 9067–9073.
- HILLE B., 1994. *Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors.* Trends Neurosci. 17, 531–536.
- HIRSCHMAN J. E., JENNESS D. D., 1999. *Dual lipid modification of the yeast gamma subunit Ste18p determines membrane localization of G betagamma.* Mol. Cell Biol. 19, 7705–7711.
- HOHENEGGER M., MITTERAUER T., VOSS T., NANOFF C., FREISSMUTH M., 1996. *Thiophosphorylation of the G protein beta subunit in human platelet membranes: evidence against a direct phosphate transfer reaction to G alpha subunits.* Mol. Pharmacol. 49, 73–80.
- HOLLINGER S., HEPLER J. R., 2002. *Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling.* Pharmacol. Rev. 54, 527–559.

- HUANG C. L., SLESINGER P. A., CASEY P. J., JAN Y. N., JAN L. Y., 1995. Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K^+ channel is important for channel activation. *Neuron* 15, 1133–1143.
- IKEDA S. R., 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 255–258.
- INANOBE A., MORISHIGE K. I., TAKAHASHI N., ITO H., YAMADA M., TAKUMI T., NISHINA H., TAKAHASHI K., KANAHO Y., KATADA T., KURACHI Y., 1995. G beta gamma directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic K^+ channel, GIRK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 1022–1028.
- INIGUEZ-LLUHI J. A., SIMON M. I., ROBISHAW J. D., GILMAN A. G., 1992. G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma. *J. Biol. Chem.* 267, 23409–23417.
- INGLESE J., KOCH W. J., TOUHARA K., LEFKOWITZ R. J., 1995. G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 20, 151–156.
- IVANOVA-NIKOLOVA T. T., BREITWIESER G. E., 1997. Effector contributions to G beta gamma-mediated signaling as revealed by muscarinic potassium channel gating. *J. Gen. Physiol.* 109, 245–253.
- JELSEMA C. L., AXELROD J., 1987. Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3623–3627.
- KALYANARAMAN S., KALYANARAMAN V., GAUTAM N., 1995. A brain-specific G protein gamma subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 126–132.
- KAMMERMEIER P. J., XIAO B., TU J. C., WORLEY P. F., IKEDA S. R., 2000a. Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J. Neurosci.* 20, 7238–7245.
- KAMMERMEIER P. J., RUIZ-VELASCO V., IKEDA S. R., 2000b. A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J. Neurosci.* 20, 5623–5629.
- KAWANO T., CHEN L., WATANABE S. Y., YAMAUCHI J., KAZIRO Y., NAKAJIMA Y., NAKAJIMA S., ITOH H., 1999. Importance of the G protein gamma subunit in activating G protein-coupled inward rectifier K^+ channels. *FEBS Lett.* 463, 355–359.
- KELLEHER D. J., JOHNSON G. L., 1988. Transducin inhibition of light-dependent rhodopsin phosphorylation: evidence for beta gamma subunit interaction with rhodopsin. *Mol. Pharmacol.* 34, 452–460.
- KERCHNER K. R., CLAY R. L., MCCLEERY G., WATSON N., MCINTIRE W. E., MYUNG C. S., GARRISON J. C., 2004. Differential sensitivity of phosphatidylinositol 3-kinase p110[gamma] to isoforms of Gprotein [beta][gamma] dimers. *J. Biol. Chem.* 279, 44554–44562.
- KISSELEV O. G., ERMOLAEVA M. V., GAUTAM N., 1994. A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling. *J. Biol. Chem.* 269, 21399–21402.
- KISSELEV O., ERMOLAEVA M., GAUTAM N., 1995a. Efficient interaction with a receptor requires a specific type of prenyl group on the G protein gamma subunit. *J. Biol. Chem.* 270, 25356–25358.
- KISSELEV O., PRONIN A., ERMOLAEVA M., GAUTAM N., 1995b. Receptor-G protein coupling is established by a potential conformational switch in the beta gamma complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9102–9106.
- KISSELEV O. G., MEYER C. K., HECK M., ERNST O. P., HOFMANN K. P., 1999. Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4898–4903.
- KOCH W. J., INGLESE J., STONE W. C., LEFKOWITZ R. J., 1993. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 8256–8260.
- KOWLURU A., SEAVEY S. E., RHODES C. J., METZ S. A., 1996. A novel regulatory mechanism for trimeric GTP-binding proteins in the membrane and secretory granule fractions of human and rodent beta cells. *Biochem. J.* 313, 97–107.
- LAMBRIGHT D. G., SONDEK J., BOHM A., SKIBA N. P., HAMM H. E., SIGLER P. B., 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311–319.
- LANGHANS-RAJASEKARAN S. A., WAN Y., HUANG X. Y., 1995. Activation of Tsk and Btk tyrosine kinases by G protein beta gamma subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8601–8605.
- LEE C., MURAKAMI T., SIMONDS W. F., 1995. Identification of a discrete region of the G protein gamma subunit conferring selectivity in beta gamma complex formation. *J. Biol. Chem.* 270, 8779–8784.
- LEE R. H., LIEBERMAN B. S., LOLLEY R. N., 1987. A novel complex from, bovine visual cells of 33000-dalton phosphoprotein with β - and γ -transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry* 26, 3983–3990.
- LEE R. H., BROWN B. M., LOLLEY R. N., HO Y. K., 1990. Protein kinase A phosphorylates retinal phosphoducin on serine 73 in situ. *J. Biol. Chem.* 265, 15860–15866.
- LI Y., STERNWEIS P. M., CHARNECKI S., SMITH T. F., GILMAN A. G., NEER E. J., KOZASA T., 1998. Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 273, 16265–16272.
- LODOWSKI D. T., BARNHILL J. F., PITCHER J. A., CAPEL W. D., LEFKOWITZ R. J., TESMER J. J., 2003a. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbeta1gamma2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 936–939.
- LODOWSKI D. T., PITCHER J. A., CAPEL W. D., LEFKOWITZ R. J., TESMER J. J., 2003b. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* 300, 1256–1262.

- LOEW A., HO Y. K., BLUNDELL T., BAX B., 1998. *Phosducin induces a structural change in transducin β* . Structure 6, 1007–1019.
- LOGOTHETIS D. E., KURACHI Y., GALER J., NEER E. J., CLAPHAM D. E., 1987. *The $G\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart*. Nature 325, 321–326.
- LU Q., ATKISSON M. S., JARVIS S. E., FENG Z. P., ZAMPONI G. W., DUNLAP K., 2001. *Syntaxin 1A supports voltage-dependent inhibition of $\alpha 1B$ Ca^{2+} channels by Gbetagamma in chick sensory neurons*. J. Neurosci. 21, 2949–2957.
- LÜSCHER C., JAN L. Y., STOFFEL M., MALENKA R. C., NICOLL R. A., 1997. *G protein-coupled inwardly rectifying K^+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons*. Neuron 19, 687–695.
- MAEDA T., WURGLER-MURPHY S. M., SAITO H., 1994. *A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast*. Nature 369, 242–245.
- MATTINGLY R. R., MACARA I. G., 1996. *Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits*. Nature 382, 268–272.
- MEISTER M., DIETRICH A., GIERSECHIK P., 1995. *Identification of a three-amino-acid region in G protein gamma 1 as a determinant of selective beta gamma heterodimerization*. Eur. J. Biochem. 34, 171–177.
- MIRSHAHI T., MITTAL V., ZHANG H., LINDER M. E., LOGOTHETIS D. E., 2002. *Distinct sites on G protein beta gamma subunits regulate different effector functions*. J. Biol. Chem. 277, 36345–36350.
- MORISHITA R., UEDA H., KATO K., ASANO T., 1998. *Identification of two forms of the gamma subunit of G protein, gamma10 and gamma11, in bovine lung and their tissue distribution in the rat*. FEBS Lett. 428, 85–88.
- MÜLLER S., STRAUB A., BAUER P. H., LOHSE M. H., 1996. *Interactions of phosducin with defined G protein $\beta\gamma$ -subunits*. J. Biol. Chem. 271, 11781–11788.
- MURRAY D., McLAUGHLIN S., HONIG B., 2001. *The role of electrostatic interactions in the regulation of the membrane association of G protein $\beta\gamma$ heterodimers*. J. Biol. Chem. 276, 45153–45159.
- MYUNG C. S., YASUDA H., LIU W. W., HARDEN T. K., GARRISON J. C., 1999. *Role of isoprenoid lipids on the heterotrimeric G protein gamma subunit in determining effector activation*. J. Biol. Chem. 274, 16595–16603.
- NEER E. J., CLAPHAM D. E., 1988. *Roles of G protein subunits in transmembrane signalling*. Nature 333, 129–134.
- NEER E. J., SCHMIDT C. J., NAMBU DRIPAD R., SMITH T. F., 1994. *WD repeat proteins: an ancient family of regulatory proteins*. Nature 371, 297–300.
- NEPTUNE E. R., BOURNE H. R., 1997. *Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14489–14494.
- ONG O. C., YAMANE H. K., PHAN K. B., FONG H. K., BOK D., LEE R. H., FUNG B. K., 1995. *Molecular cloning and characterization of the G protein gamma subunit of cone photoreceptors*. J. Biol. Chem. 270, 8495–8500.
- OHGURO H., NAKAGAWA T., KITAMURA K., AKINO T., 1992. *Lack of association of Ca^{2+} -calmodulin with the beta gamma-subunits of the photo-receptor G protein (transducin)*. Biochem. Int. 26, 51–57.
- PAGE K. M., STEPHENS G. J., BERROW N. S., DOLPHIN A. C., 1997. *The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel*. J. Neurosci. 17, 1330–1338.
- PANCHENKO M. P., SAXENA K., LI Y., CHARNECKI S., STERNWEIS P. M., SMITH T. F., GILMAN A. G., KOZASA T., NEER E. J., 1998. *Sites important for PLCbeta2 activation by the G protein betagamma subunit map to the sides of the beta propeller structure*. J. Biol. Chem. 273, 28298–28304.
- PATERSON A., BOYER J. L., WATTS V. J., MORRIS A. J., PRICE E. M., HARDEN T. K., 1995. *Concentration of enzyme-dependent activation of PLC-beta 1 and PLC-beta 2 by G alpha 11 and beta gamma-subunits*. Cell Signal. 7, 709–720.
- PENG L., MIRSHAHI T., ZHANG H., HIRSCH J. P., LOGOTHETIS D. E., 2003. *Critical determinants of the G protein gamma subunits in the Gbetagamma stimulation of G protein-activated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel activity*. J. Biol. Chem. 278, 50203–50211.
- PENG Y. W., ROBISHAW J. D., LEVINE M. A., YAU K. W., 1992. *Retinal rods and cones have distinct G protein beta and gamma subunits*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10882–10886.
- PERACINO B., BORLEIS J., JIN T., WESTPHAL M., SCHWARTZ J. M., WU L., BRACCO E., GERISCH G., DEVREOTES P., BOZZARO S., 1998. *G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton*. J. Cell Biol. 141, 1529–1537.
- PESSIA M., BOND C. T., KAVANAUGH M. P., ADELMAN J. P., 1995. *Contributions of the C-terminal domain to gating properties of inward rectifier potassium channels*. Neuron 14, 1039–1045.
- PHILLIPS W. J., CERIONE R. A., 1992a. *Rhodopsin/transducin interactions. I. Characterization of the binding of the transducin-beta gamma subunit complex to rhodopsin using fluorescence spectroscopy*. J. Biol. Chem. 267, 17032–17039.
- PHILLIPS W. J., WONG S. C., CERIONE R. A., 1992b. *Rhodopsin/transducin interactions. II. Influence of the transducin-beta gamma subunit complex on the coupling of the transducin-alpha subunit to rhodopsin*. J. Biol. Chem. 267, 17040–17046.
- PITCHER J. A., INGLESE J., HIGGINS J. B., ARRIZA J. L., CASEY P. J., KIM C., BENOVIĆ J. L., KWATRA M. M., CARON M. G., LEFKOWITZ R. J., 1992. *Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors*. Science 257, 1264–1267.
- PRONIN A. N., GAUTAM N., 1992. *Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6220–6224.
- PUMIGLIA K. M., LEVINE H., HASKE T., HABIB T., JOVE R., DECKER S. J., 1995. *A direct interaction between*

- G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase.* J. Biol. Chem. 270, 14251–14254.
- QIN N., PLATANO D., OLCESE R., STEFANI E., BIRNBAUMER L., 1997. *Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal Gbetagamma-binding domain of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8866–8871.
- RHEE S. G., BAE Y. S., 1997. *Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes.* J. Biol. Chem. 272, 15045–15048.
- RUIZ-VELASCO V., IKEDA S. R., 2000. *Multiple G-protein betagamma combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons.* J. Neurosci. 20, 2183–2191.
- SATOH N., ABVE T., NAKAJIMA A., OHKOSHI M., KOIZUMI T., TAMADA M., SAKURAGI S., 1998. *Analysis of uveitogenic sites in phosducin molecule.* Curr. Eye Res. 17, 677–680.
- SCHNEIDER T., IGELMUND P., HESCHELER J., 1997. *G protein interaction with K^+ and Ca^{2+} channels.* Trends Pharmacol. Sci. 18, 8–11.
- SCHULZ R., 2001. *Pharmacology of phosducin.* Pharmacol. Res. 43, 1–10.
- SMITH T. F., GAITATZES C., SAXENA K., NEER E. J., 1999. *The WD repeat: a common architecture for diverse functions.* Trends Biochem. Sci. 24, 181–185.
- SMRCKA A. V., STERNWEIS P. C., 1993. *Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits.* J. Biol. Chem. 268, 9667–9674.
- SONDEK J., BOHM A., LAMBRIGHT D. G., HAMM H. E., SIGLER P. B., 1996. *Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution.* Nature 379, 369–374.
- SPRING D. J., NEER E. J., 1994. *A 14-amino acid region of the G protein gamma subunit is sufficient to confer selectivity of gamma binding to the beta subunit.* J. Biol. Chem. 269, 22882–22886.
- STEPHENS L., SMRCKA A., COOKE F. T., JACKSON T. R., STERNWEIS P. C., HAWKINS P. T., 1994. *A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits.* Cell 77, 83–93.
- STERNWEIS P. C., 1994. *The active role of beta gamma in signal transduction.* Curr. Opin. Cell Biol. 6, 198–203.
- STRYER L., 1986. *Cyclic GMP cascade of vision.* Ann. Rev. Neurosci. 9, 87–119.
- STRYER L., BOURNE H. R., 1986. *G proteins: a family of signal transducers.* Ann. Rev. Cell Biol. 2, 391–419.
- SUNAHARA R. K., DESSAUER C. W., GILMAN A. G., 1996. *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 461–480.
- TAKIDA S., WEDEGAERTNER P. B., 2003. *Heterotrimer formation, together with isoprenylation, is required for plasma membrane targeting of Gbetagamma.* J. Biol. Chem. 278, 17284–17290.
- TANAKA H., KUO C.-H., MATSUDA T., FUKADA Y., HAYASHI F., DING Y., IRIE Y., MIKI N., 1996. *MEKA/phosducin attenuates hydrophobicity of transducin $\beta\gamma$ subunits without binding to farnesyl moiety.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 587–591.
- TANAKA H., IWAM C., KUO C.-H., DING G. Y., DO E., IRIE Y., MIKI N., 1997. *Analysis of the T $\beta\gamma$ binding domain of MEKA/phosducin.* Neurochem. Int. 31, 625–634.
- TANG W. J., GILMAN A. G., 1991. *Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits.* Science 254, 1500–1503.
- TAYLOR J. M., JACOB-MOSIER G. G., LAWTON R. G., VANDORT M., NEUBIG R. R., 1996. *Receptor and membrane interaction sites on Gbeta. A receptor-derived peptide binds to the carboxyl terminus.* J. Biol. Chem. 271, 3336–3339.
- TSUKADA S., SIMON M. I., WITTE O. N., KATZ A., 1994. *Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11256–11260.
- WALL M. A., COLEMAN D. E., LEE E., INIGUEZ-LLUHI J. A., POSNER B. A., GILMAN A. G., SPRANG S. R., 1995. *The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2.* Cell 83, 1047–1058.
- WATSON A. J., KATZ A., SIMON M. I., 1994. *A fifth member of the mammalian G-protein beta-subunit family. Expression in brain and activation of the beta 2 isotype of phospholipase C.* J. Biol. Chem. 269, 22150–22156.
- WATSON A. J., ARAGAY A. M., SLEPAK V. Z., SIMON M. I., 1996. *A novel form of the G protein beta subunit Gbeta5 is specifically expressed in the vertebrate retina.* J. Biol. Chem. 270, 4189–4192.
- WEDEGAERTNER P. B., WILSON P. T., BOURNE H. R., 1995. *Lipid modifications of trimeric G proteins.* J. Biol. Chem. 270, 503–506.
- WENG G., LI J., DINGUS J., HILDEBRANDT J. D., WEINSTEIN H., IYENGAR R., 1996. *Gbeta subunit interacts with a peptide encoding region 956–982 of adenylyl cyclase 2. Cross-linking of the peptide to free Gbetagamma but not the heterotrimer.* J. Biol. Chem. 271, 26445–26448.
- WHITEWAY M., HOUGAN L., DIGNARD D., THOMAS D. Y., BELL L., SAARI G. C., GRANT F. J., O'HARA P., MACKAY V. L., 1989. *The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor-coupled G protein.* Cell 56, 467–477.
- WHITEWAY M. S., WU C., LEEUW T., CLARK K., FOUREST-LIEUVIN A., THOMAS D. Y., LEBERER E., 1995. *Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p.* Science 269, 1572–1575.
- WICKMAN K., NEMEC J., GENDLER S. J., CLAPHAM D. E., 1998. *Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice.* Neuron 2, 103–114.
- WIELAND T., RONZANI M., JAKOBS K. H., 1992. *Stimulation and inhibition of human platelet adenylyl cyclase by thiophosphorylated transducin beta gamma-subunits.* J. Biol. Chem. 267, 20791–20797.
- WIELAND T., NURNBERG B., ULIBARRI I., KALDENBERG-STASCH S., SCHULTZ G., JAKOBS K. H., 1993. *Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein beta-sub-*

- nits. Characterization of the phosphorylated amino acid. *J. Biol. Chem.* 268, 18111–18118.
- WU L., VALKEMA R., VAN HAASSTERT P. J., DEVREOTES P. N., 1995. The G protein beta subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 129, 1667–1675.
- XU J., WU D., SLEPAK V. Z., SIMON M. I., 1995. The N terminus of phosducin is involved in binding of $\beta\gamma$ -subunits of G-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2086–2090.
- YAKUBOVICH D., PASTUSHENKO V., BITLER A., DESSAUER C. W., DASCAL N., 2000. Slow modal gating of single G protein-activated K^+ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 524, 737–755.
- YAMADA M., INANOBE A., KURACHI Y., 1998. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol. Rev.* 50, 723–757.
- YAN K., GAUTAM N., 1996. A domain on the G protein beta subunit interacts with both adenylyl cyclase 2 and the muscarinic atrial potassium channel. *J. Biol. Chem.* 271, 17597–17600.
- YASUDA H., LINDORFER M. A., WOODFORK K. A., FLETCHER J. E., GARRISON J. C., 1996. Role of the prenyl group on the G protein gamma subunit in coupling trimeric G proteins to A1 adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 18588–18595.
- ZAMPONI G. W., BOURINET E., NELSON D., NARGEOT J., SNU-TCH T. P., 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* 385, 442–446.