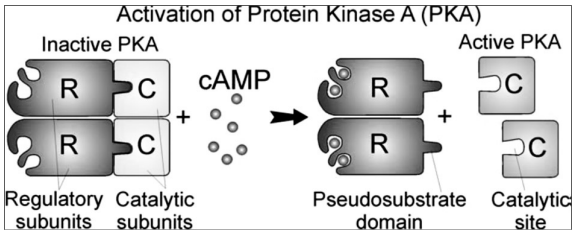
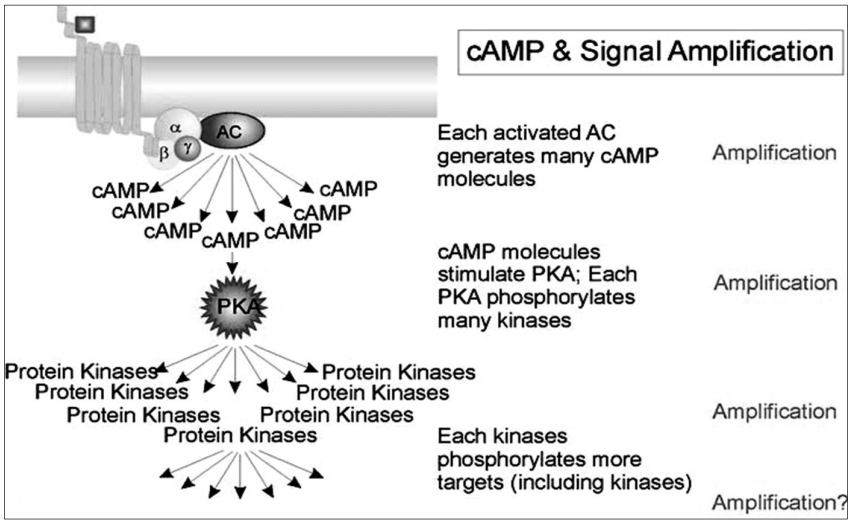
6. cAMP Regulation of PKA

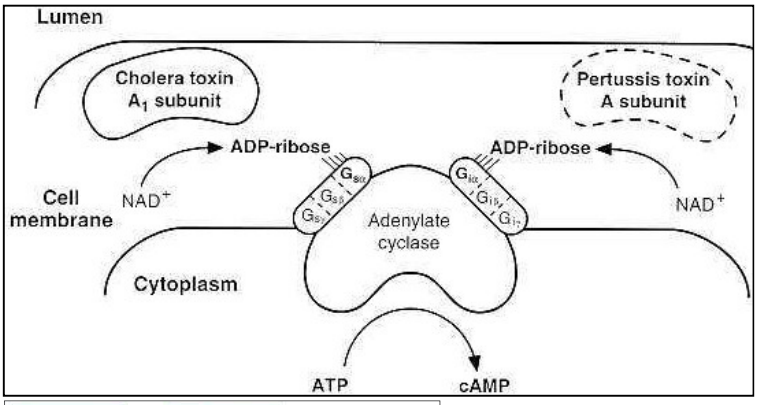


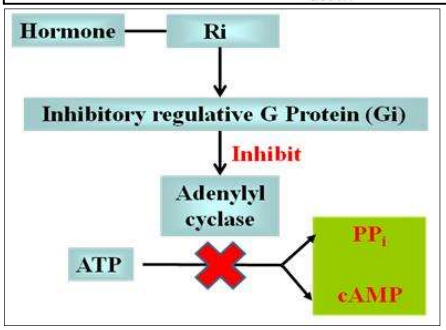
Protein kinase A विभिन्न प्रकार के ऊतकों और सेल प्रकारों में cAMP का एक प्राथमिक लक्ष्य है। इसकी निष्क्रिय अवस्था में दो regulatory subunits एक निष्क्रिय अवस्था में दो सब्सट्रेट बाइंडिंग (उत्प्रेरक) सबयूनिट रखते हैं। regulatory subunits में एक pseudosubstrate डोमेन उत्प्रेरक सबयूनिट के उत्प्रेरक डोमेन को बांधता है। Regulatory subunits के लिए cAMP के बाइंडिंग से pseudosubstrate डोमेन की रचना में परिवर्तन होता है जिसके परिणामस्वरूप अब सक्रिय PKA उत्प्रेरक सबयूनिट्स का disassociation होता है। सक्रिय PKA अब लक्ष्य प्रोटीन फास्फोराइलेट कर सकता है। Glucose mobilization में उस फ़ंक्शन के ऊपर उल्लिखित दो लक्ष्यों के अलावा, phosphorylase kinase, और glycogen synthase, PKA में कई अन्य सब्सट्रेट प्रोटीन हैं जो कि फॉस्फोराइलेट कर सकते हैं। इनमें protein phosphatase-1 (regulation of glucose metabolism), heart muscle troponin (contraction), myosin light chain kinase (muscle contraction), phosphofructokinase (anaerobic metabolism), and CREB (transcription factor) है।



2. G_i : G inhibitory

यह adenylyl cyclase को **inhibit** (**i** = "inhibitory") करता है, cell में cAMP का level low होता है। $G\alpha_i$ somatostatin के receptor से activated होता है।





► **Cholera toxin, $G_{s\alpha}$** के covalent modification को catalyze करता है। ADP-ribose को **NAD^+** से $G_{s\alpha}$ की GTPase active site पर arginine residue पर स्थानान्तरित किया जाता है, ADP-ribosylation $G_{s\alpha}$ द्वारा **GTP hydrolysis** रोकता है। **Stimulatory** G-protein **permanently activated** होता है। परिणामस्वरूप cAMP का लगातार high levels intestinal epithelium के cells से salts का अत्यधिक नुकसान करते हैं। अत्यधिक मात्रा में water osmosis के साथ बाहर निकलता हैं, जिसकी वजह से diarrhoea हो जाता हैं, जो fatal हो सकता है, अगर salts और water जल्दी replace ना किये जायें तो।

► **Pertussis toxin** (whooping cough disease) ADP-ribosylation को **$G_{i\alpha}$** के cysteine residue पर catalyze करता है; जिससे inhibitory G_α **GDP to GTP से exchange करने में** असमर्थ **हो जाता है और Inhibitory** pathway रूक जाता है। **ADP-ribosylation** एक सामान्य प्रक्रिया है, जिससे बहुत से proteins की activity नियमित होती है, eukaryotes (including mammals) और यहां तक कि prokaryotes में भी।

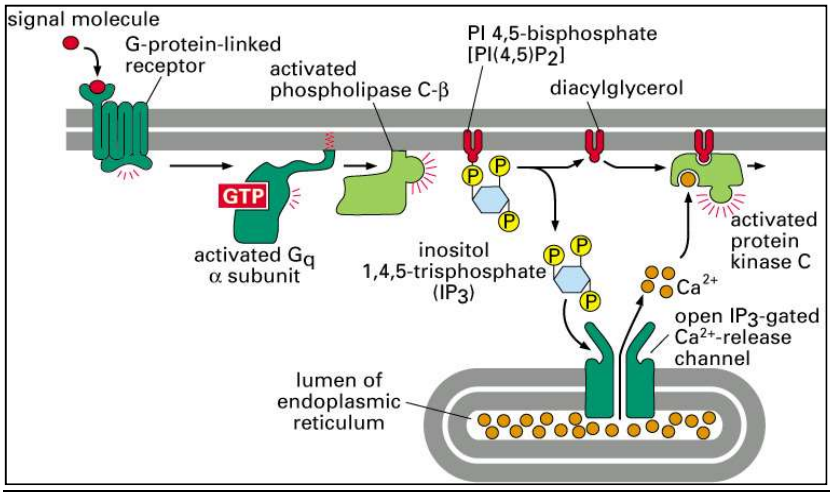
3. $G\alpha_q$

यह **phospholipase C** (PLC) को activate करता है, जो second messengers को पैदा करता है:

- inositol trisphosphate (**IP_3**)
- diacylglycerol (**DAG**)

$G\alpha_q$, G proteins में पाया जाता है, coupled to receptors for:

- vasopressin
- thyroid-stimulating hormone (**TSH**) और
- angiotensin



Phosphatidylinositol signal cascades:

1. phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP_2) **प्राप्त** करने के लिए Kinases Pi को ATP से inositol ring के 5 & 4 position **के** hydroxyl group पर sequential transfer **को** catalyze करते हैं, ।
2. PIP_2 Phospholipase C से cleaved होता है।
   - ► Phospholipase C की **अलग अलग** isoforms में **विभिन्न** regulatory domains होते हैं और इस तरह अलग अलग signals के लिए respond करते हैं।
   a. एक G-protein, called G_q Phospholipase C की एक रूप को सक्रिय करता है। जब एक particular GPCR (receptor) activate होता है, GTP, GDP के लिए आदान–प्रदान हो जाता है। फिर $G_{q\alpha}$-GTP Phospholipase C को सक्रिय करता है।
   - ► Ca^{2+}, जो Phospholipase C की activity के लिए चाहिए होता है, negatively charged residues और phosphorylated inositol के phosphate moieties को active site के साथ परस्पर क्रिया करता है।
3. PIP_2 का Phospholipase C द्वारा cleavage **से** 2 secondary messengers **प्राप्त होते** है: inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3), और diacylglycerol (DG)
4. Diacylglycerol, Ca^{2+} के साथ Protein Kinase C को सक्रिय करता है, जो कई cellular proteins के phosphorylation को catalyze करके, उनकी सक्रियता बदल देते है।
5. IP_3 (inositol-1,4,5-trisphosphate), endoplasmic reticulum (ER) membranes में Ca^{2+} release channels सक्रिय करता है। ER में stored Ca^{2+} cytosol में मुक्त होता है। जहाँ ये calmodulin से जुड सकता है या Protein Kinase C को सक्रिय कर सकता है।

Protein Kinase C (PKC)

They have following features: -

• **ये** Ser/Thr Kinases **होते है। जो कि** Ca2+, phospholipids and diacylglycerol (DAG) **द्वारा सक्रिय होते है।**

• **सामान्यतः ये** cytosol **में रहते है लेकिन सक्रिय होने पर ये** cell membrane **पर पहुँचकर कई** substrates **को** Phosphorylate **करते है जैसे** (e.g., Myristoylated Arginine Rich C Kinase Substrate, MARCKS)

साथ ही ये कई सारे आवश्यक प्रक्रियाओं में जैसे learning & memory, cell division & cancer **में भी सम्मिलित होते है।**

Signal turn-off OH, Ca^{2+}-ATPase pumps और IP_3 degradation से cytosol में से Ca^{2+} का removal शामिल **करता है:** IP_3 (inositol-1,4,5-trisphosphate) के enzyme-catalysed hydrolysis द्वारा sequential dephosphorylation से inositol प्राप्त होता है, जो कि phosphatidylinositol के संश्लेषण का एक substrate होता है।

a. Kinases, जो PI (phosphatidylinositol) को PIP2 (PI-4,5-bisphosphate,) में **बदलते** हैं, inositol ring की ATP से hydroxyls की positions 4 & 5 से phosphate को transfer करती है।

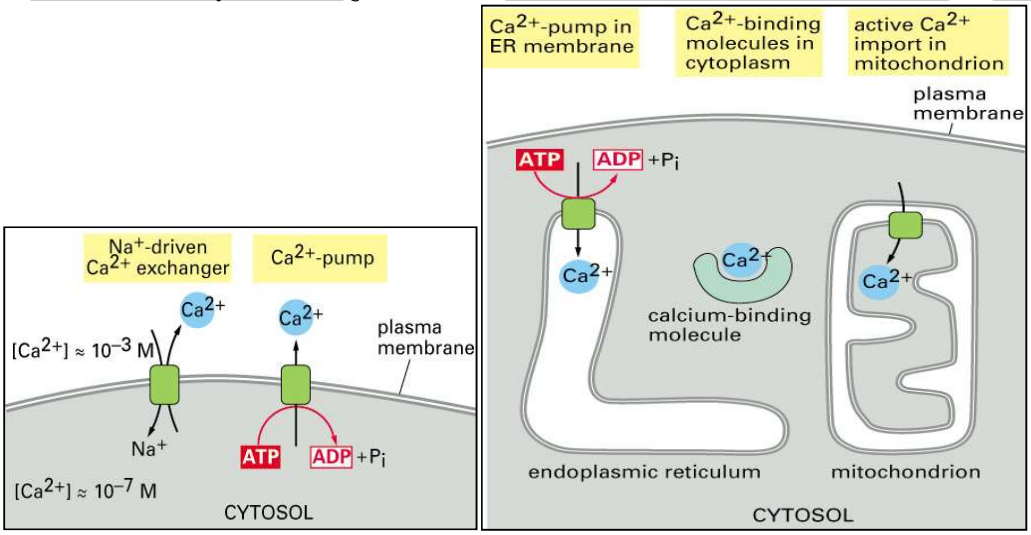
b. Phosphatidylinositol-3-Kinases जबकि catalyze phosphatidylinositol का inositol ring की 3 positions पर phosphorylation catalyze करता है। **For example:** phosphatidylinositol-3-phosphate (PI-3-P) . **PI-3-P, PI-3,4-P_2, PI-3,4,5-P_3, और PI-4,5-P_2** के signaling roles होते हैं।

Activated **Protein Kinase B (also called Akt) ब**हुत से proteins के serine threonine residues का phosphorylation catalyze करता है। इसके metabolism, cell growth और apoptosis पर कई प्रभाव देखे जाते हैं। Protein Kinase B activity का downstream metabolic effect glycogen synthesis, glycolysis को उत्तेजित करना, और gluconeogenesis को रोकना भी सम्मिलित है।

Ca^{++} Signals

Modulation of Cytosolic [Ca^{++}]

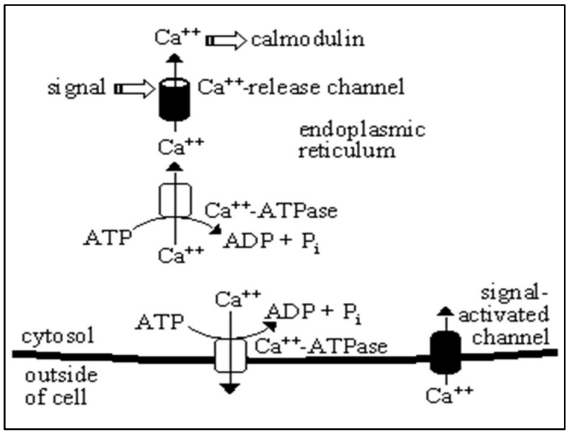
- Cytosolic [Ca^{2+}] सामान्यतः one micromolar से कम होता है, किसी और endoplasmic reticulum (ER) membrane में मौजूद Ca^{2+}- ATPase pumps इस low concentration को बनाये रखते हैं, Ca^{2+} को cytosol से दूर cell के बाहर या ER में transport करके।
- Extracellular Ca^{2+} level mammalian organisms में millimolar range में होता है। Plasma membrane Ca^{2+} channels की opening Ca^{2+} signal को शुरू या बनाये रख सकती है।
- Ca^{2+} ER में भी तुलनात्मक रूप से ज्यादा होता है, जो एक major internal reservoir की तरह कार्य करता है, जिसमें से Ca^{2+} signaling के दौरान cytosol में Ca^{2+} release होता है।
- Mitochondria और lysosomes भी कुछ परिस्थितियों में Ca^{2+} release करते हैं और Ca^{2+} reservoir की तरह कार्य करते हैं।



- ER lumen में Ca^{2+}-binding domains free Ca^{2+} concenteration को buffer करते हैं और Ca^{2+} storage के लिए क्षमता बढा देते हैं। ER Ca^{2+}-binding proteins में per molecule 20-50 low affinity Ca^{2+}-binding sites होती हैं, acidic residues consist करती हैं। Examples:

- **Calsequestrin** SR के lumen में होता है, [muscle का specialized ER: sarcoplasmic reticulum (SR)].
- **Calreticulin** → non-muscle cells के lumen में होता है, protein folding में भी भूमिका निभाता है।

  Cytosol या other cell compartments में Ca^{2+} concentration indicator dyes या उन proteins से monitor किया जाता है, जो या तो luminescent हैं या फिर Ca^{2+} से जुड के अपनी fluorescence change कर लेते हैं। **Fluorescent indicators confocal fluorescence microscopy में use होने वाले, high-resolution imaging और cells में Ca^{2+} fluctuations का quantitation provide करते हैं।**



Ca^{2+} (cytosolic) में transient increase one या Ca^{2+}-release या Ca^{2+}-entry channels की vicinity में localized किया जा सकता है। ऐसा localized Ca^{2+} "puff" या "spark" उन effectors को activate करता है, जो additional Ca^{2+} release induce करते हैं, जिनसे cytosolic Ca^{2+} में more widespread increase होता है। Higher cytosolic Ca^{2+} की एक “wave” neighboring cells में भी फैल सकती है।

Ryanodine Receptor:

एक Ca^{2+} Release Channel

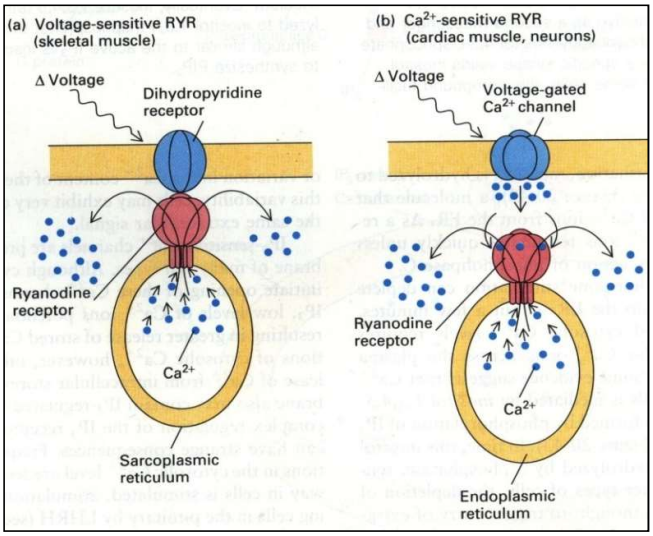
Sarcoplasmic reticulum (SR) की membrane में एक large Ca^{2+}-release channel, ryanodine receptor(इसकी plant alkaloid ryanodine से sensitivity की वजह से) कहलाता है। जब SR lumen से cytosol में Ca^{2+} ryanodine receptor के द्वारा release होता है Skeletal और cardiac muscle का संकुचन सक्रिय होता है ।

T tubules muscle cell plasma membrane के धसने से बनती हैं। **T tubule membrane में voltage-gated Ca^{2+} channels closely apposed SR membrane में ryanodine receptors से** परस्पर क्रिया **करती हैं।** T tubule में एक action potential द्वारा voltage-gated Ca^{2+} channels का activation ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels को खोलता है। Ca^{2+} पहलें ryanodine receptor के transmembrane **हिस्से** से लेकर बाद में ryanodine receptor's की cytoplasmic domain से होता हुआ SR lumen से cytosol में **जाता** है।

- Ryanodine receptor cytosolic Ca^{2+} से micromolar concentrations पर अपने आप ही सक्रिय होता है। अतः cytosol में कम मात्रा में Ca^{2+} का प्रवेश, further Ca^{2+} को मुक्त करता है।
- High (e.g., mM) cytosolic Ca^{2+} ryanodine receptor channel को निष्क्रिय करता है, जिससे signal बन्द हो जाते है।

IP_3 receptor Ca^{++} Release Channel

बहुत सी mammalian cells में, IP_3 (inositol-1,4,5-trisphosphate), endoplasmic reticulum से Ca^{2+} release trigger करता है। "Second messenger" IP_3 उत्पन्न करता है, जैसे: in response to hormonal signals, from the membrane lipid phosphatidylinositol.



♦ **IP_3 receptor** एक **ligand-gated Ca^{2+}-release channel** है, जो endoplasmic reticulum membranes में embedded होता है। यह ryanodine receptor channel से distinct होता है, परन्तु partly homologous भी होता है।

♦ **IP_3 receptor** की cytosolic domain पर जुड़ता है, **channel opening** को बढाता है। IP_3 एक regulatory phospho-protein **IRBIT** को नियमित करता है, जो कि same site पर bind करता है।

♦ **Ca^{2+}**, IP_3 receptor के ligand-binding domain पर जुड़ता है और **channel opening** को बढ़ाता है। However, **high cytosolic Ca^{2+}**, जो कि channel opening के बाद विकसित होती है, **channel closure** को बढ़ाती है।

अतः IP_3-activated और ryanodine-sensitive channels दोनों low cytosolic Ca^{++} से सक्रिय होते है और high cytosolic Ca^{2+} से निष्क्रिय होते हैं।

High cytosolic Ca^{2+} द्वारा Ca^{2+} का **feedback inhibition**, Ca^{2+}-ATPase pumps की activity के साथ, **signal turn-off** में contribute करते हैं और Ca^{2+} concentration में observed **oscillations** संभव बनाते हैं।

Some Cellular Responses Mediated by G-Protein-linked Receptors Coupled to the Inositol-Phospholipid Signaling Pathway

Target Tissue	Signaling Molecule	Major Response
Liver	vasopressin	glycogen breakdown
Pancreas	acetylcholine	amylase secretion
Smooth muscle	acetylcholine	contraction
Mast cells	antigen	histamine secretion
Blood platelets	thrombin	aggregation