

## Χαρακτηρισμός Καταλοίπων στη β Υπομονάδα της Διαλυτής Γουανυλικής Κυκλάσης που Εμπλέκονται στην Ενεργοποίησή της

Αντωνία Μαραζιώτη<sup>1</sup>, Γιώργος Δάλκας<sup>2</sup>, Γιώργος Σπυρούλιας<sup>2</sup> και Ανδρέας Παπαπετρόπουλος<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας, <sup>2</sup>Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας, Πάτρα, Ελλάδα

Λέξεις κλειδιά: Διαλυτή γουανυλική κυκλάση, HMR-1766, SNP, τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαλυτή γουανυλική κυκλάση (δΓΚ) είναι ετεροδιμερής αιμοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την α<sub>1</sub> ή την α<sub>2</sub> και την β<sub>1</sub>, και παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσα στο κύτταρο. Το ένζυμο αυτό ενεργοποιείται από το οξειδίο του αζώτου, όπου αλληλεπιδρά με την ομάδα της αίμης που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της β<sub>1</sub> υπομονάδας, οδηγώντας στη μετατροπή του GTP σε cGMP.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναγνώριση καταλοίπων στη ρυθμιστική περιοχή της β<sub>1</sub> υπομονάδας που να ρυθμίζουν την απόκριση της δΓΚ σε αγωνιστές των οποίων η δράση εξαρτάται ή όχι από την αίμη.

### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιώντας τεχνικές Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ρυθμιστικής περιοχής της β<sub>1</sub> υπομονάδας και συγκεκριμένα στην περιοχή των προπιονικών ομάδων της αίμης όπου διαπιστώθηκαν σημαντικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Με τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση δημιουργήθηκαν οι αντίστοιχες σημειακές μεταλλάξεις. Πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση COS-7 κυττάρων με την αγρίου τύπου α<sub>1</sub> και την αγρίου τύπου β<sub>1</sub> υπομονάδα ή τη μεταλλαγμένη β<sub>1</sub> υπομονάδα της δΓΚ, επώασή τους με ενεργοποιητές εξαρτώμενους από την αί-

μη, όπως το νιτροπρωσσικό νάτριο, και ανεξάρτητους από την αίμη, όπως το HMR-1766 και μέτρηση του παραγόμενου cGMP. Τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων της δΓΚ επιβεβαιώθηκαν με ανοσοαποτύπωση.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η δΓΚ με τη πρώτη μετάλλαξη (αντικατάσταση ασπαραγίνης στη θέση 45 από γλουταμικό οξύ) δεν παρουσίασε καμιά απόκριση είτε στο NO είτε στο HMR-1766, δεικνύοντας ότι το παραγόμενο ένζυμο είναι τελείως ανενεργό. Από την άλλη πλευρά, η δΓΚ με τη δεύτερη μετάλλαξη (αντικατάσταση αργινίνης στη θέση 116 από αλανίνη) ενεργοποιούταν από το NO, αλλά παρουσίασε 45% περίπου χαμηλότερα επίπεδα στο cGMP, όταν διεγέρθηκε από το νιτροπρωσσικό νάτριο. Επιπρόσθετα, το ίδιο ένζυμο παρήγαγε τα ίδια επίπεδα cGMP με την κανονική δΓΚ, όταν επώαστηκε με το HMR-1766.

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο της β<sub>1</sub> υπομονάδας επηρεάζουν διαφορετικά την απόκριση της δΓΚ σε αγωνιστές των οποίων η δράση εξαρτάται ή όχι από την αίμη και το NO.

## Characterization of Residues Involved in Soluble Guanylate Cyclase Activation

Antonia Marazioti<sup>1</sup>, George Dalkas<sup>2</sup>, George Spyroulias<sup>2</sup> and Andreas Papapetropoulos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, <sup>2</sup>Laboratory of Pharmacognosy & Chemistry of Natural Products, Department of Pharmacy, University of Patras, Hellas

**Key words:** Soluble guanylate cyclase, HMR-1766, SNP, site-directed mutagenesis

Soluble guanylate cyclase (sGC) is a heterodimeric hemoprotein composed of two subunits,  $\alpha_1$  or  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  that plays a key role in various signal transduction pathways. The enzyme is stimulated by nitric oxide (NO) following its interaction with the heme moiety bound to the N-terminus of the  $\beta_1$  subunit. The aim of the present work was to identify residues in the regulatory domain of the  $\beta_1$  subunit that regulate the responsiveness of the enzyme on heme dependent and heme independent agonists. Molecular dynamics calculations suggested mutations to perturb the native network of electrostatic interactions at the area of Heme propionic groups. Respective mutants were generated by using site-directed mutagenesis. COS-7 cells were then

co-transfected with the wild type  $\alpha_1$  subunit and wild-type or mutated  $\beta_1$  subunit of sGC. The expression levels of the sGC subunits were confirmed by Western blot analysis. One of the mutants exhibited no responsiveness to neither NO nor HMR-1766, indicating that the generated enzyme was devoid of any activity. On the other hand, a residue was identified that was 45% less responsive to NO, when stimulated by sodium nitroprusside. Interestingly, cGMP generation of this latter mutant following activation by HMR-1766 was identical to that of wild-type sGC. In the present work we have identified residues that differentially affect the responsiveness to heme-NO- independent sGC activators versus NO-releasing stimulators.

### REFERENCES

1. Garbers D.L.: *J. Biol. Chem.* 254: 240-243 (1979)
2. Gerzer R., Bohme E., Hofmann F., Schultz G.: *FEBS Lett.* 132: 71-74 (1981)
3. Kamisaki Y., Saheki S., Nakane M., Palmieri J.A., Kuno T., Chang B.Y., Waldman S.A., Murad F.: *J. Biol. Chem.* 261: 7236-7241 (1986)
4. Mulsch A., Gerzer R.: *Methods Enzymol.* 195: 377-383 (1991)
5. Hardman J.G., Sutherland E.W.: (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 6363-6370 (1969)
6. Stone J.R., Marletta M.A.: *Biochemistry* 34: 14668-14674 (1995)