

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

La capacità delle cellule di ricevere e rispondere a segnali che provengono dall'esterno della membrana plasmatica è un processo fondamentale per la vita. Negli organismi multicellulari le cellule con funzioni diverse si scambiano molte informazioni e segnali (Es: conc. di ioni, di glucosio).

Il segnale (INFORMAZIONE) è rilevato da RECETTORI SPECIFICI e convertito in una risposta cellulare che implica SEMPRE un processo CHIMICO. La conversione dell'informazione in una modificazione chimica si chiama TRASDUZIONE DEL SEGNALE.

Le vie di trasduzione del segnale sono molto **specifiche** ed estremamente **sensibili**.

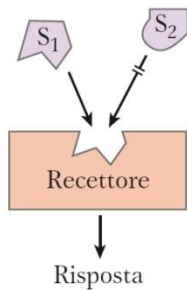
La **specificità** deriva dalla complementarità tra segnale e recettore

La straordinaria **sensibilità** delle vie di trasduzione del segnale dipende da:

- l'alta **affinità** dei recettori per le molecole segnale;
- la **cooperatività** nell'interazione ligando-recettore;
- l'**amplificazione** del segnale.

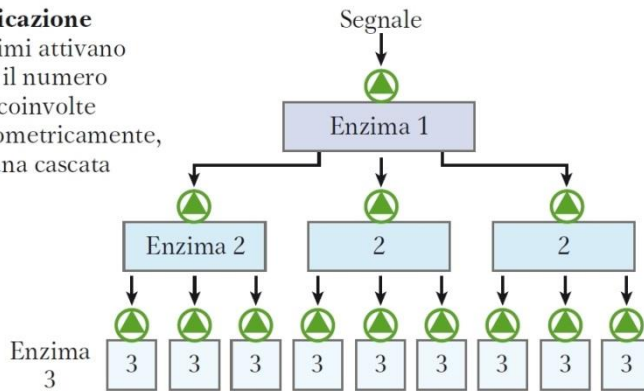
(a) Specificità

Alcune molecole segnale si legano a un sito complementare sul recettore; altre non possono invece adattarsi al sito.



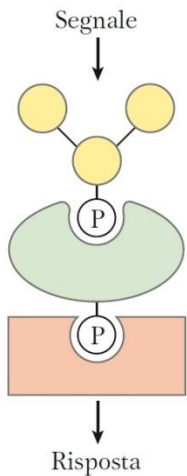
(b) Amplificazione

Quando enzimi attivano altri enzimi, il numero di molecole coinvolte aumenta geometricamente, generando una cascata enzimatica.



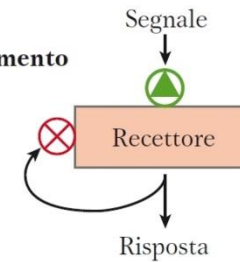
(c) Modularità

Le proteine con affinità polivalenti formano diversi complessi di segnalazione a partire da moduli tra loro intercambiabili. La fosforilazione fornisce punti di interazione reversibile.



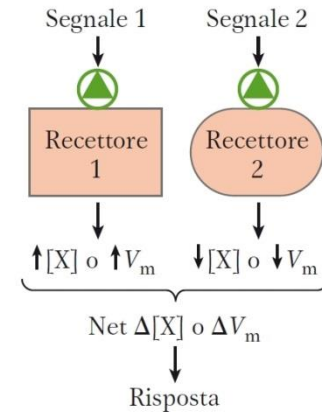
(d) Desensibilizzazione/adattamento

L'attivazione del recettore innesca un circuito retroattivo che spegne il recettore o lo rimuove dalla superficie cellulare.



(e) Integrazione

Quando due segnali hanno effetti opposti sulla stessa caratteristica metabolica, come la concentrazione di un secondo messaggero X o il potenziale di membrana V_m , la regolazione finale è il risultato di un segnale integrato proveniente da entrambi i recettori.



(f) Risposta localizzata

Quando l'enzima che distrugge un messaggio intracellulare si raggruppa col produttore del messaggio, il messaggio viene degradato prima che possa diffondersi lontano, così la risposta è soltanto locale e breve.

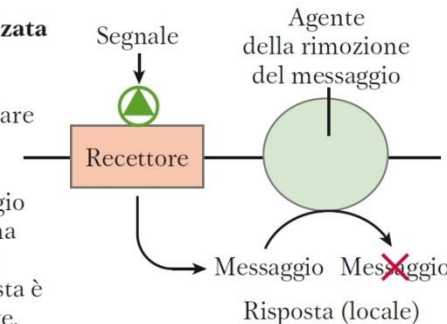


Figura 12.1 Le sei caratteristiche fondamentali dei sistemi di trasduzione del segnale.

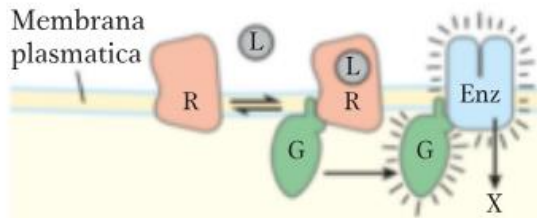
I DIVERSI TIPI DI RECETTORI

- 1. Recettori accoppiati alle proteine G:** attivano attraverso le proteine G enzimi che generano secondi messaggeri. Es: sistema β -adrenergico (visione, olfatto, gusto)
- 2. Recettori enzimatici:** per esempio con attività tirosin chinasi. Catalizzano la fosforilazione di proteine citosoliche e di membrana. Es: recettore per l'insulina
- 3. Canali ionici controllati:** si aprono e si chiudono in risposta al legame di un ligando chimico o a variazioni del potenziale di membrana. Es: recettore per l'acetilcolina.
- 4. Recettori nucleari:** sono i recettori steroidei. Si legano a specifici ligandi ed alterano la velocità di trascrizione e traduzione di alcuni geni.

I DIVERSI TIPI DI RECETTORI

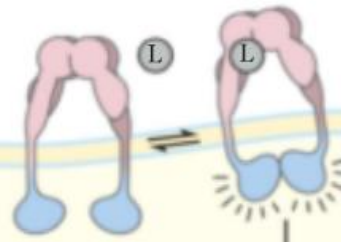
1. Recettori accoppiati alle proteine G

Il legame di un ligando esterno (L) al recettore (R) attiva una proteina intracellulare che lega il GTP (G); essa a sua volta regola l'attività di un enzima (Enz), che genera un secondo messaggero intracellulare (X).



2a. Recettore con attività tirosina chinasi

Il legame del ligando innesca l'attività tirosina chinasi mediante autofosforilazione.

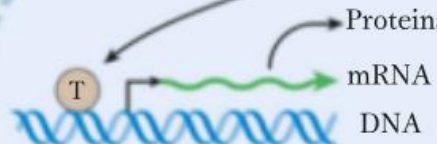


2b. La chinasi attiva un fattore di trascrizione (T), alterando l'espressione genica.

Cascata chinasi

T

Sacca nucleare



4. Recettore nucleare

Il legame dell'ormone permette al recettore di regolare l'espressione di geni specifici.

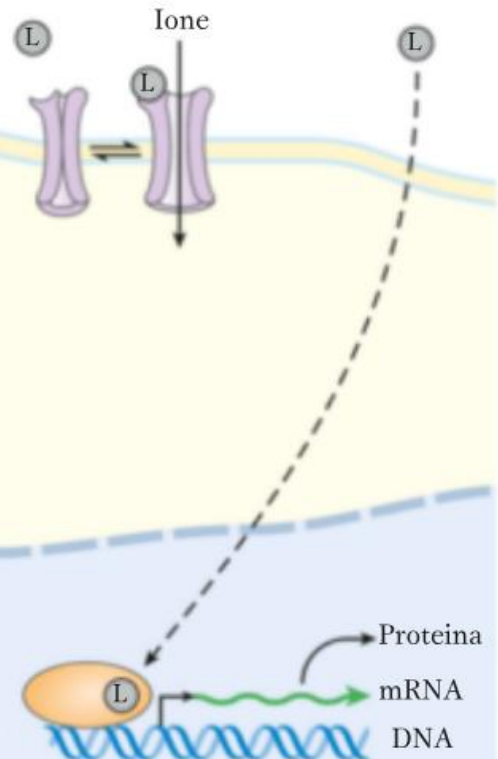


Figura 12.2 Quattro tipi generali di trasduttori di segnali.

RECETTORI ACCOPPIATI ALLE PROTEINE G (GPCR)

IL COMPLESSO ADRENALINA-RECETTORE β ADRENERGICO

L'adrenalina si lega al recettore proteico presente sulla membrana cellulare. Ci sono 4 tipi di recettori adrenergici: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, presenti in tessuti bersaglio diversi. Sono definiti in base all'affinità e alle risposte generate verso agonisti e antagonisti. Mediano risposte diverse all'adrenalina. I recettori β adrenergici sono presenti nelle cellule del fegato, del muscolo e del tessuto adiposo. Essi attivano una proteina G_s , che a sua volta porta ad un aumento della concentrazione di cAMP. I recettori α invece hanno come secondo messaggero IP_3 .

I PROTAGONISTI

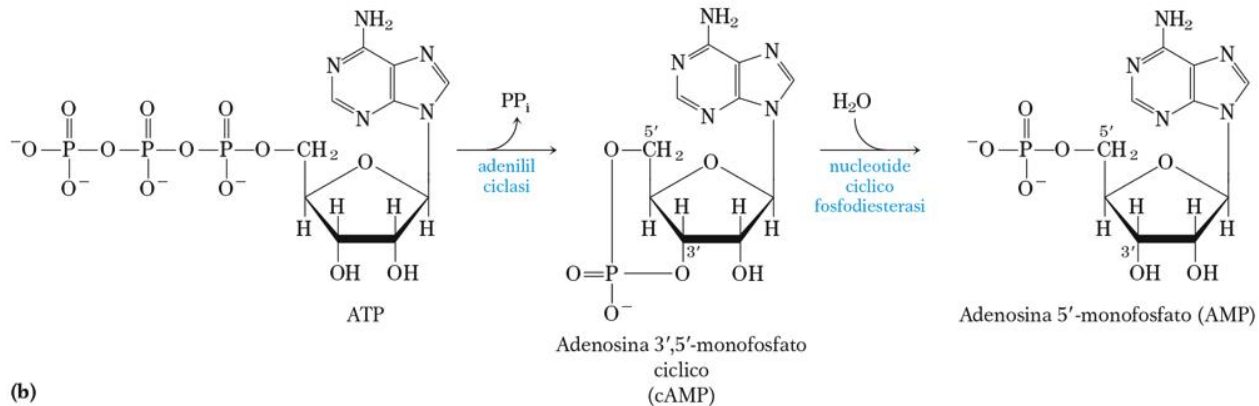
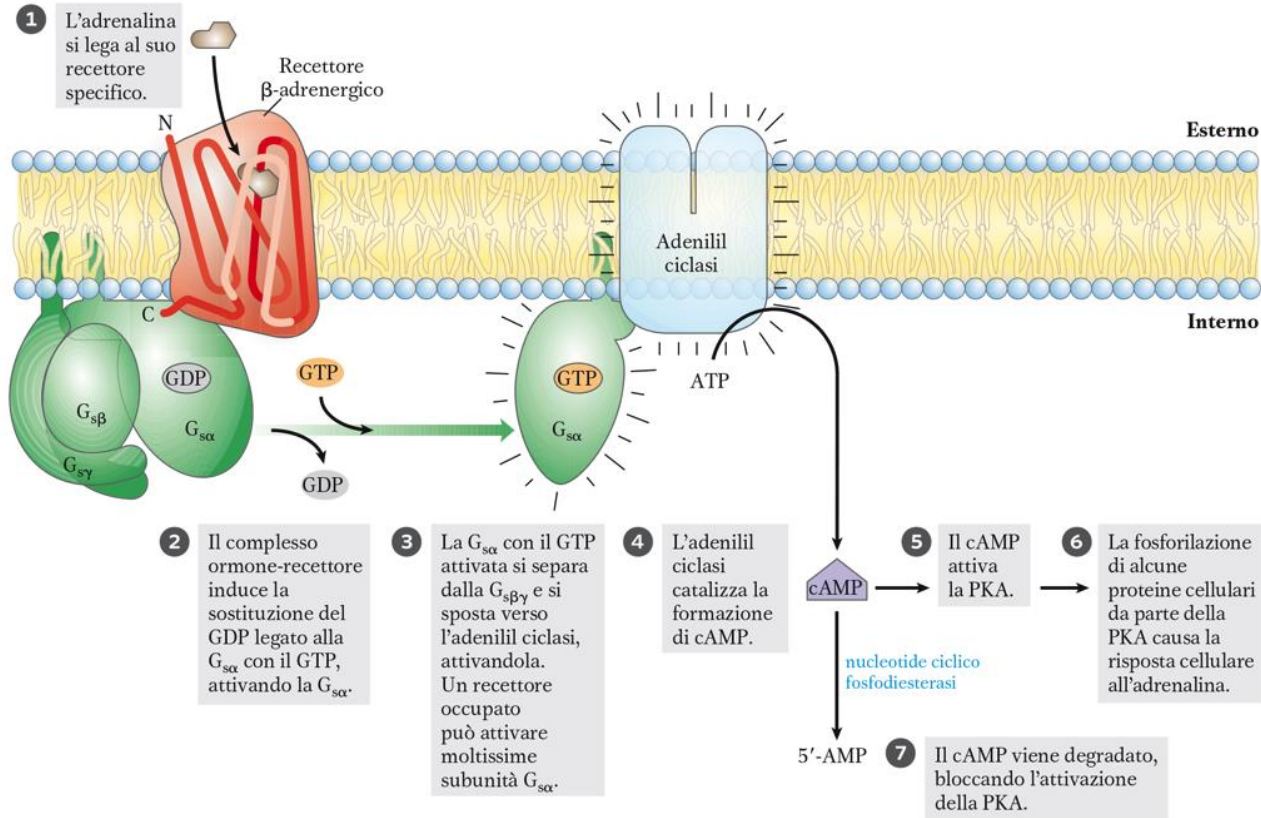
- Ormone
- Recettore ormonale
- Adenilato ciclasasi
- Proteina G
- Proteina chinasi cAMP dipendente
- Nucleotide ciclico fosfodiesterasi

I recettori β adrenergici sono proteine integrali di membrana. Il sito di legame per l'adrenalina sta sulla faccia esterna della membrana. Il legame dell'adrenalina induce una modificazione conformazionale del recettore, inclusa la sua parte citosolica. Questa modificazione permette al recettore di interagire con la seconda proteina della via di trasduzione, che lega GTP. Questa è la proteina G stimolatrice (Gs) e si trova sulla faccia citosolica della membrana plasmatica.

Quando Gs lega il GTP è nella forma attiva, può interagire con l'adenilato ciclasi, attivandola a sua volta. Quando la proteina lega GDP è invece inattiva e incapace di attivare la ciclasi. Il legame dell'adrenalina induce il recettore a catalizzare la sostituzione di GDP con GTP sulla proteina Gs, attivandola ($Gs\alpha$). Due subunità (β e γ) si dissociano dalla subunità α che lega il GTP; quest'ultima si sposta verso la molecola di adenilato ciclasi più vicina.

TRASDUZIONE DEL SEGNALE DELL'ADRENALINA

(a)



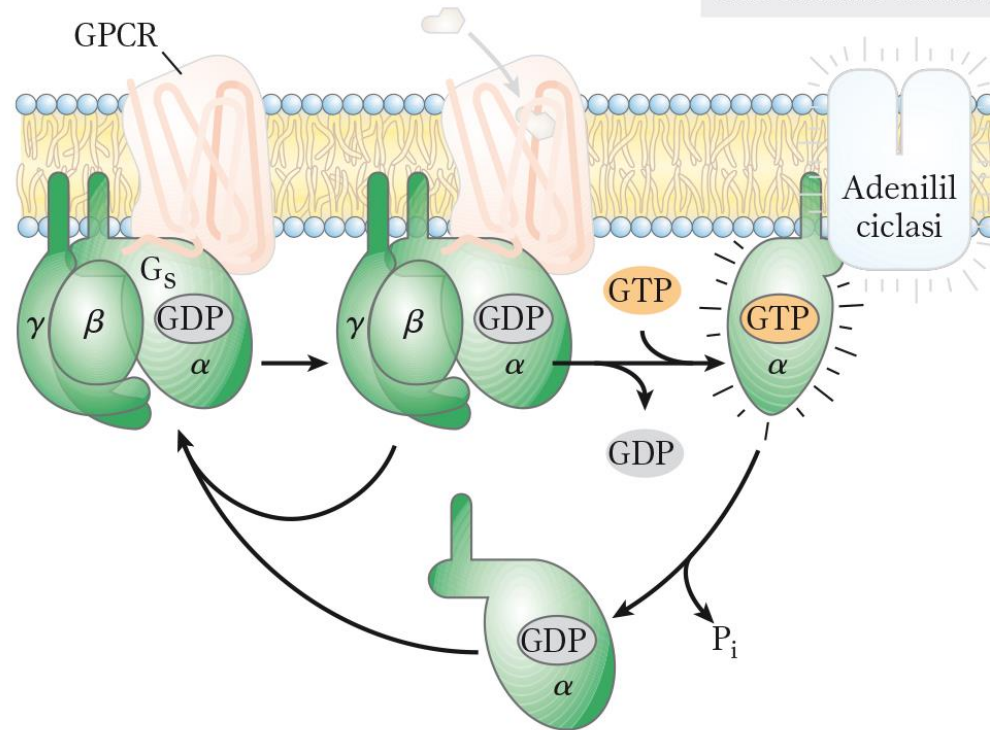
(b)

Attività GTPasica della proteina G

1 G_s con legato il GDP è spenta; essa non può attivare l'adenilil ciclasi.

2 Il contatto di G_s con il complesso recettore-ormone determina la sostituzione del GDP legato con il GTP.

3 G_s con legato il GTP si dissocia nelle subunità α e $\beta\gamma$. La subunità $G_{s\alpha}$ con il GTP legato è attiva e può stimolare l'attività dell'adenilil ciclasi.

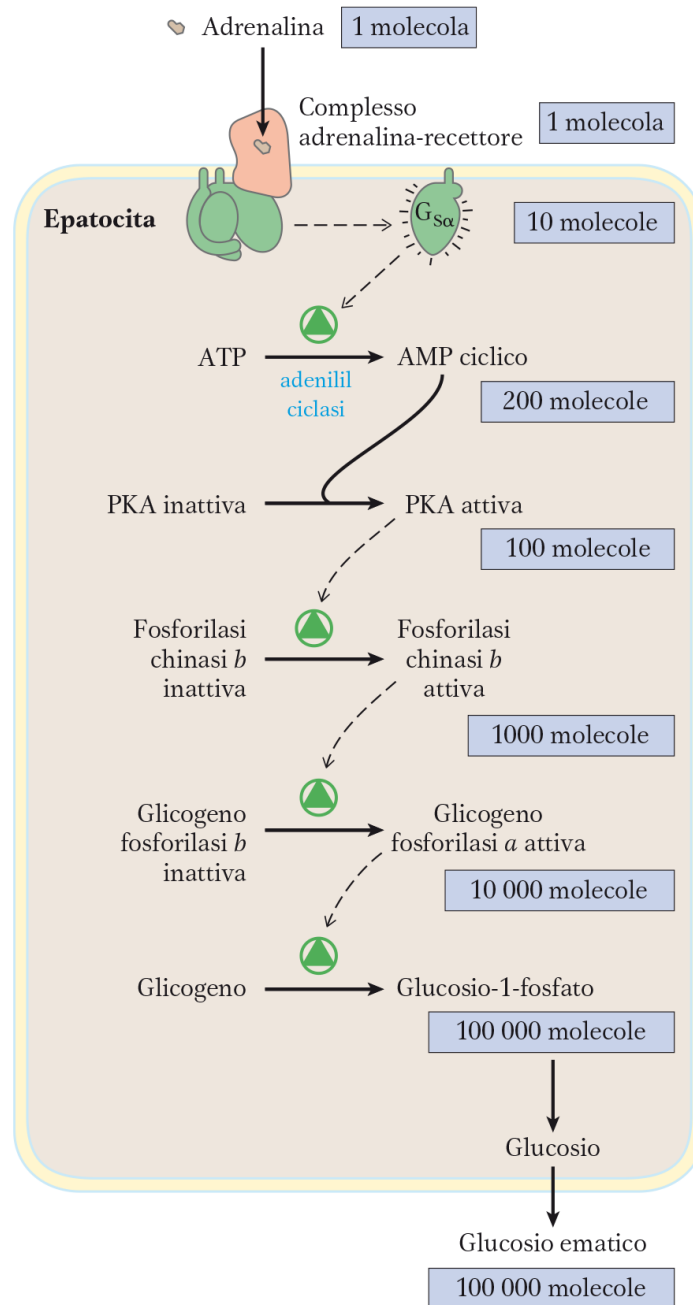


4 Il GTP legato a $G_{s\alpha}$ viene idrolizzato dall'attività GTPasica intrinseca alla stessa proteina $G_{s\alpha}$; in tal modo questa proteina si autospinge. La subunità α inattiva si associa nuovamente alle subunità β e γ .

L'adenilato ciclasi è una proteina integrale della membrana plasmatica, col sito attivo verso il citosol. L'associazione con la $G_s\alpha$ converte la ciclasi nella sua forma attiva. Si ha quindi produzione di cAMP a partire da ATP. L'attivazione dell'adenilato ciclasi da parte di $G_s\alpha$ è autolimitante. Infatti la $G_s\alpha$ si inattiva da sola idrolizzando GTP a GDP. La forma inattiva si dissocia dall'adenilato ciclasi e si riassocia con le altre due subunità. Questo porta all'inattivazione anche della adenilato ciclasi. La proteina G_s ricomposta può interagire con un altro recettore.

Il segnale viene amplificato a vari livelli: una molecola di ormone attiva più proteine G_s e una molecola di G_s , attivando l'adenilato ciclasi, porta alla sintesi di molte molecole di cAMP. Questa amplificazione spiega perché sono sufficienti concentrazioni molto limitate di adrenalina per determinare l'attività biologica.

AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE



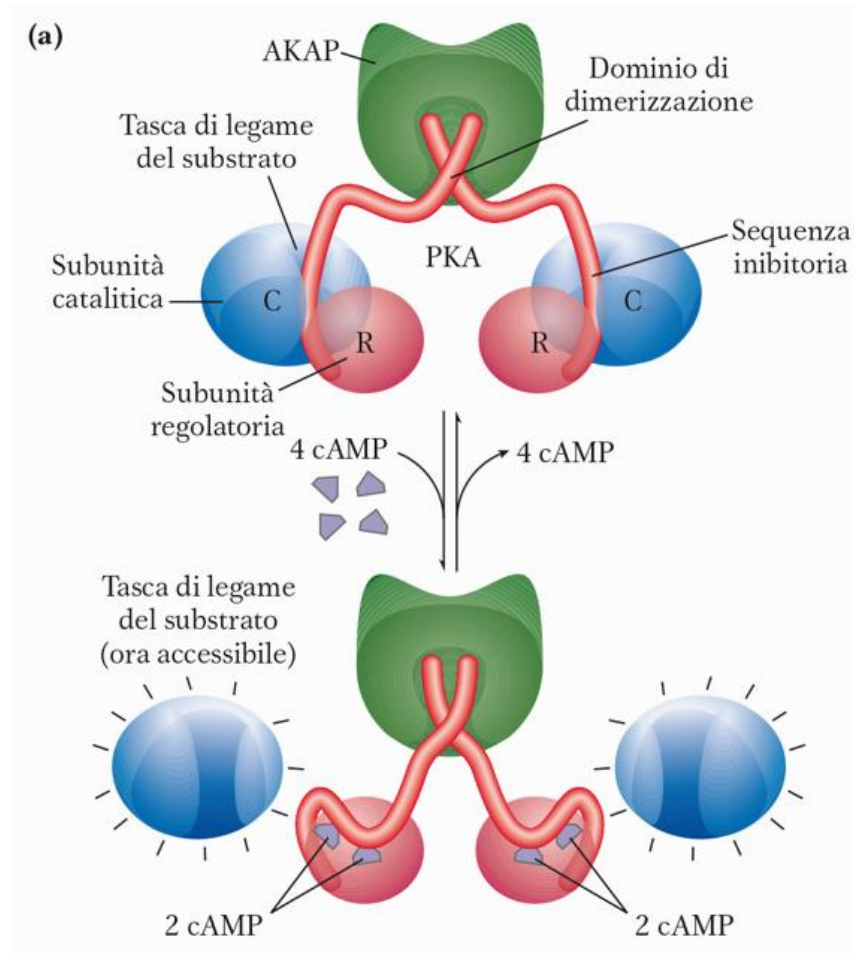
Il cAMP è il secondo messaggero. Ha vita breve perché viene rapidamente degradato dalla nucleotidasi ciclica fosfodiesterasi a 5'AMP. Il segnale intracellulare persiste solo per il tempo in cui il recettore lega l'adrenalina.

Il bersaglio del cAMP è una proteina chinasi cAMP dipendente (PKA). Questa proteina è costituita da due subunità catalitiche (C) e due regolatrici (R). La proteina C₂R₂ è inattiva. Il cAMP si lega sulle subunità R, che in seguito ad una modificazione conformazionale, si dissociano dalle altre subunità e lasciano così libere le subunità C in forma attiva.

Questa proteina chinasi può fosforilare residui di Thr o Ser in un certo numero di enzimi importanti, modificando la loro attività catalitica.

I segnali ormonali determinano spesso la fosforilazione di uno o più enzimi. Il cAMP è il secondo messaggero anche del glucagone e di altri ormoni.

ATTIVAZIONE DELLA PKA



PROTEINE AKAP

Confinamento del processo di segnalazione in una specifica regione cellulare da parte di proteine adattatrici che NON hanno attività enzimatica. Mantengono unite proteine che agiscono insieme

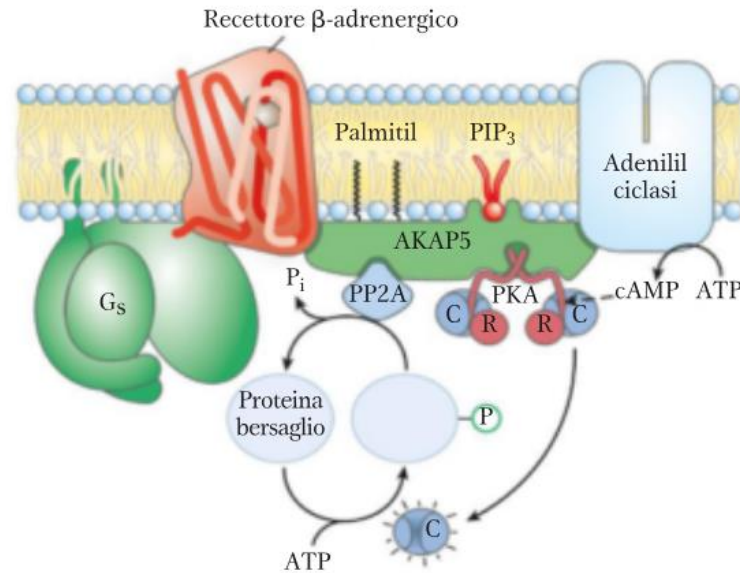


Figura 12.10 Nucleazione di complessi sopramolecolari da parte delle proteine che ancorano la chinasi A (AKAP). AKAP5 rappresenta una famiglia di proteine che agiscono come impalcature polivalenti, che sequestrano le subunità catalitiche della PKA, tramite interazione con la subunità regolatrice della PKA, in prossimità di una particolare regione o struttura cellulare. AKAP5 è associata alla superficie citoplasmatica della membrana plasmatica attraverso due gruppi palmitilici legati covalentemente e un sito che lega il fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP_3) nella membrana. AKAP5 ha anche siti di legame per il recettore β -adrenergico, per l'adenilil ciclasi, per la PKA e per la fosfoproteina fosfatasi (PP2A), raggruppando questi enzimi

sulla superficie della membrana. Quando l'adrenalina si lega al recettore β -adrenergico, la $G_{s\alpha}$ stimola l'adenilil ciclasi a produrre il cAMP, che raggiunge molto velocemente e con pochissima diluizione la vicina PKA. La PKA fosforila la sua proteina bersaglio, alterandone l'attività, fino a che la fosfoproteina fosfatasi non rimuove il gruppo fosforico e la proteina bersaglio ritorna allo stato in cui era prima che arrivasse lo stimolo. In questo ma anche in altri casi le AKAP realizzano un'elevata concentrazione locale di enzimi e di secondi messaggeri, in modo che il circuito di segnalazione rimanga strettamente localizzato e che la durata del segnale rimanga molto limitata.

TERMINAZIONE DELLA RISPOSTA DEL RECETTORE β -ADRENERGICO

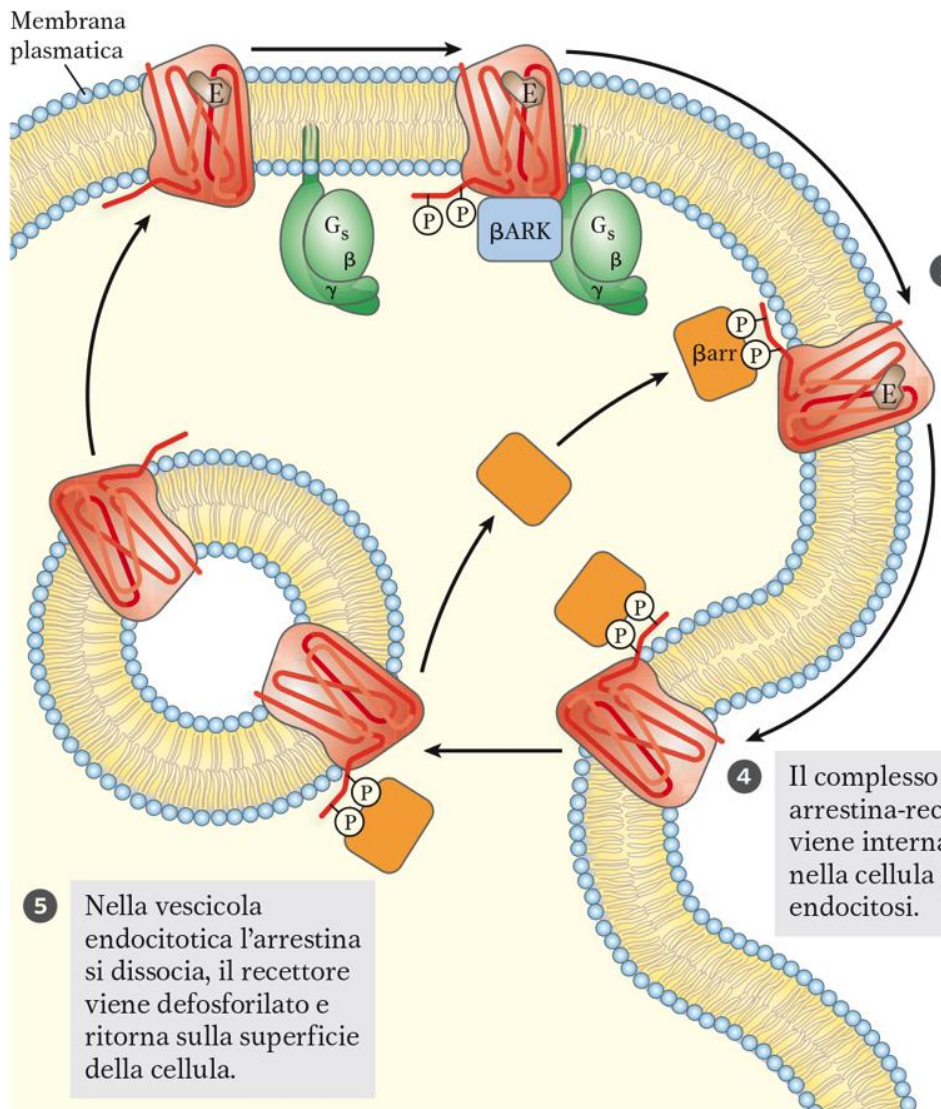
- a) La **desensibilizzazione** diminuisce l'intensità della risposta anche quando lo stimolo permane.
- b) Quando la **concentrazione di adrenalina scende** al di sotto di un certo valore nel sangue, l'ormone si dissocia dal suo recettore.
- Il GTP legato a $G\alpha$ viene idrolizzato in una reazione catalizzata dall'attività GTPasica intrinseca della proteina G.
 - Idrolisi di cAMP per azione della fosfodiesterasi dei nucleotidi ciclici.
 - Ci sono fosfoproteine fosfatasi che idrolizzano i gruppi fosfato. Quando la concentrazione di cAMP diminuisce e la PKA assume la sua forma inattiva, la defosforilazione prevale sulla fosforilazione.

DESENSIBILIZZAZIONE DEL RECETTORE β ADRENERGICO

β ARK = chinasi del recettore β adrenergico
 β arr = β arrestina

desensibilizzazione = diminuzione dell'intensità della risposta anche quando il segnale persiste nel tempo

- 1 Il legame dell'adrenalina (E) al recettore β -adrenergico innesca la dissociazione di $G_{s\beta\gamma}$ da $G_{s\alpha}$ (non mostrato).
- 2 $G_{s\beta\gamma}$ richiama β ARK sulla membrana, dove la chinasi fosforila i residui di serina presenti nella regione carbossiterminale del recettore.



3 La β -arrestina (β arr) si lega al dominio carbossiterminale fosforilato del recettore.

β -Arr blocca i siti del recettore che interagiscono con proteina G

4 Il complesso arrestina-recettore viene internalizzato nella cellula per endocitosi.

5 Nella vescicola endocitotica l'arrestina si dissocia, il recettore viene defosforilato e ritorna sulla superficie della cellula.

cAMP COME SECONDO MESSAGGERO

Alcuni ormoni (adrenalina, glucagone, ACTH) attivano l'adenilato ciclasi mentre altri ormoni la inibiscono. Questa inibizione abbassa i livelli di cAMP, e di conseguenza, reprime la fosforilazione di proteine cAMP-dipendenti.

Esempi. La somatostatina si lega al suo recettore e attiva una proteina G inibitrice (Gi). Gi inibisce l'adenilato ciclasi, causando un abbassamento della concentrazione di cAMP. Quando l'adrenalina si lega ai recettori α_2 adrenergici, causa un abbassamento di cAMP, perché questi recettori sono accoppiati con una Gi.

Conclusioni: i segnali extracellulari possono avere effetti diversi su tessuti o cellule diverse a seconda (1) del tipo di recettore, (2) del tipo di proteina G (Gs o Gi) accoppiata al recettore, (3) del tipo di enzimi bersaglio della PKA.

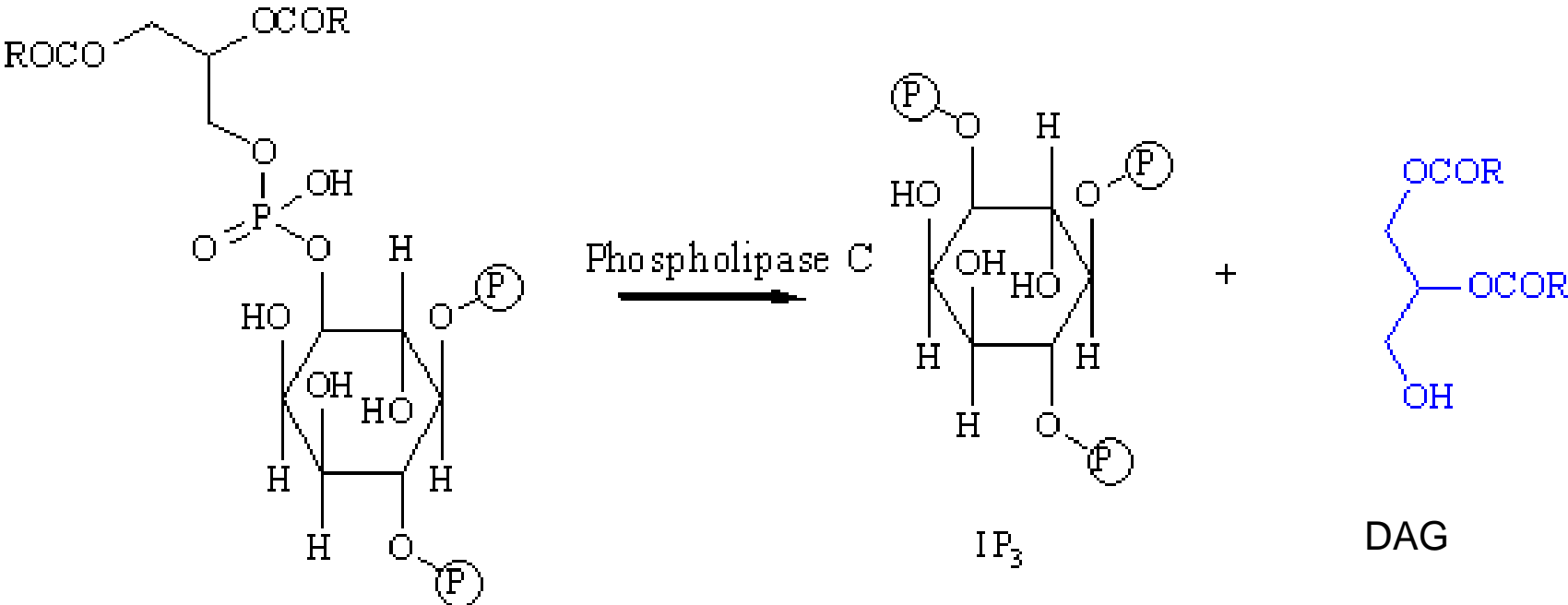
Le cellule sommano i fattori che aumentano e diminuiscono [cAMP] ed integrano così tutti i segnali.

**PROTEINE G
E ALTRI
SECONDI MESSAGGERI**

IL FOSFATIDILINOSITOLO (PI)

Una seconda classe di trasduttori di segnali è associata attraverso le proteine G all'enzima di membrana **fosfolipasi C (PLC)** specifico per il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (**PIP2**). L'enzima attivato forma due secondi messaggeri: diacilglicerolo e inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP3). Molti ormoni agiscono mediante produzione di questi messaggeri. Quando questi tipi di ormone si legano al loro recettore, il complesso ormone-recettore catalizza lo scambio di GDP con GTP sulla proteina G (Gq) attivandola. La proteina Gq attivata stimola una specifica fosfolipasi C legata alla membrana plasmatica che produce diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-trisfosfato per idrolisi di fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato. L'IP3 diffonde dalla membrana plasmatica al RE dove si lega a caratteristici recettori e determina l'apertura di canali per il Ca^{2+} , che viene rilasciato nel citosol aumentando la sua concentrazione di circa 100 volte. Il DAG assieme al Ca^{2+} attiva la proteina chinasi C (PKC), enzima legato alla membrana e Ca^{2+} dipendente. PKC fosforila residui di Ser o Thr di specifiche proteine bersaglio, modificandone la loro attività.

Formazione di DAG e IP3



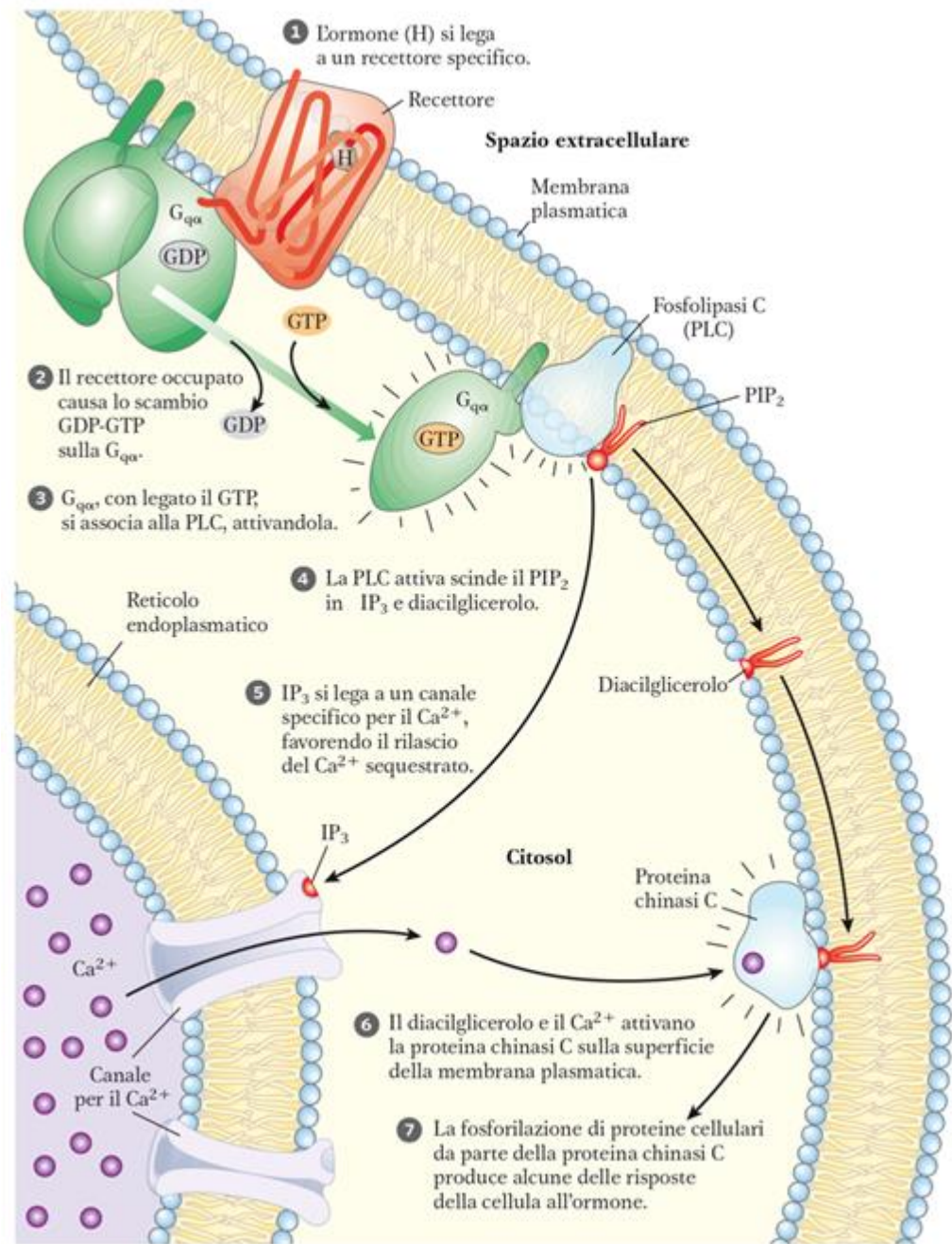
fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato
PIP2

FOSFOLIPASI C ATTIVATA DALL'ORMONE E PRODUZIONE DI IP₃

Più isoizimi PKC

Proteine bersaglio della PKC:
Proteine del citoscheletro,
enzimi e proteine nucleari.

Ampio spettro di azioni
cellulari: funzioni neuronali e
immunitarie, regolazione
della divisione cellulare



IL CALCIO COME SECONDO MESSAGGERO

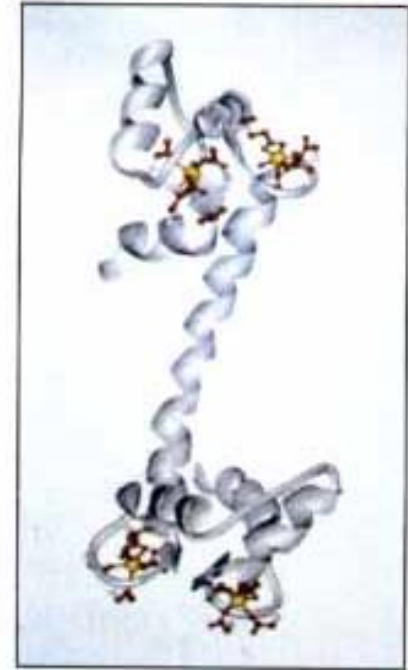
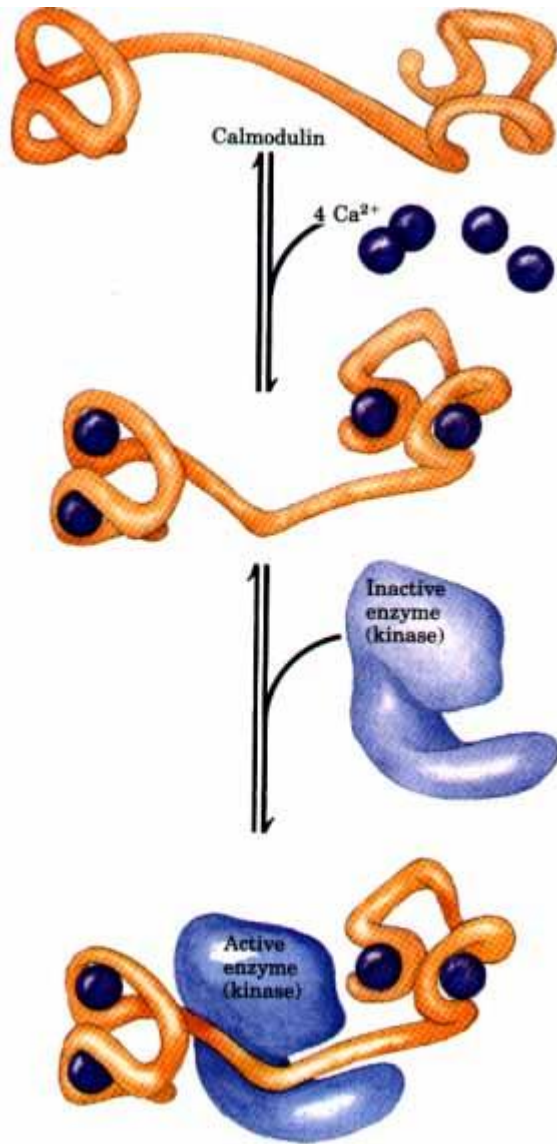
In alcuni tipi di cellule (neuroni, cellule endocrine, cellule muscolari) il Ca^{2+} funziona da secondo messaggero. Tra i processi indotti dal Ca^{2+} ci sono l'esocitosi nelle cellule nervose ed endocrine e la contrazione nel muscolo. Normalmente i livelli di Ca^{2+} nel citosol sono mantenuti molto bassi ($<10^{-7}$ M) dalla pompa del Ca^{2+} della membrana plasmatica e delle membrane del RE e dei mitocondri. Gli stimoli ormonali, neuronali o altri provocano un aumento della concentrazione di Ca^{2+} attraverso specifici canali posti sulla membrana plasmatica o il rilascio del Ca^{2+} sequestrato all'interno del RE o dei mitocondri.

L'aumento di $[Ca^{2+}]$ viene “sentito” da alcune proteine che legano il Ca^{2+} e regolano enzimi calcio-dipendenti. Una di queste proteine è la calmodulina. Quando la $[Ca^{2+}]$ aumenta, esso si lega alla calmodulina e causa una modificazione della sua conformazione. La calmodulina legata al calcio si associa a diverse proteine e ne modula l'attività.

La calmodulina è una subunità delle proteina chinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente (CaM chinasi) (I-IV tipi).

Il cambiamento conformazionale causato dal legame del Ca^{2+} alla calmodulina si ripercuote sulla CaM chinasi che a sua volta fosforila e regola l'attività di enzimi bersaglio.

La calmodulina è anche una subunità regolatrice della glicogeno fosforilasi b chinasi muscolare. In questo caso attiva la demolizione del glicogeno.



(b)

L'attività di secondo messaggero del Ca^{2+} è limitata nel tempo, mediante rimozione prima che possa diffondere in settori cellulari più lontani.

Interscambio di informazioni (cross talk) fra i sistemi di segnalazione mediati da cAMP e Ca^{2+} . In alcuni tessuti gli enzimi che sintetizzano e degradano il cAMP sono stimolati dal Ca^{2+} . Quindi variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]$ possono produrre variazioni della $[\text{cAMP}]$ portando ad attivazione/inattivazione di enzimi specifici.

RECETTORI CON ATTIVITA' TIROSIN CHINASICA

I recettori con attività tirosin chinasi (RTK) possiedono attività tirosin chinasi intrinseca. In generale hanno un dominio sulla faccia extracellulare della membrana che lega il ligando ed un sito attivo enzimatico sulla faccia citoplasmatica. Il dominio citoplasmatico è una tirosin chinasi che fosforila i residui di tirosina di specifiche proteine bersaglio.

IL RECETTORE PER L'INSULINA (INSR)

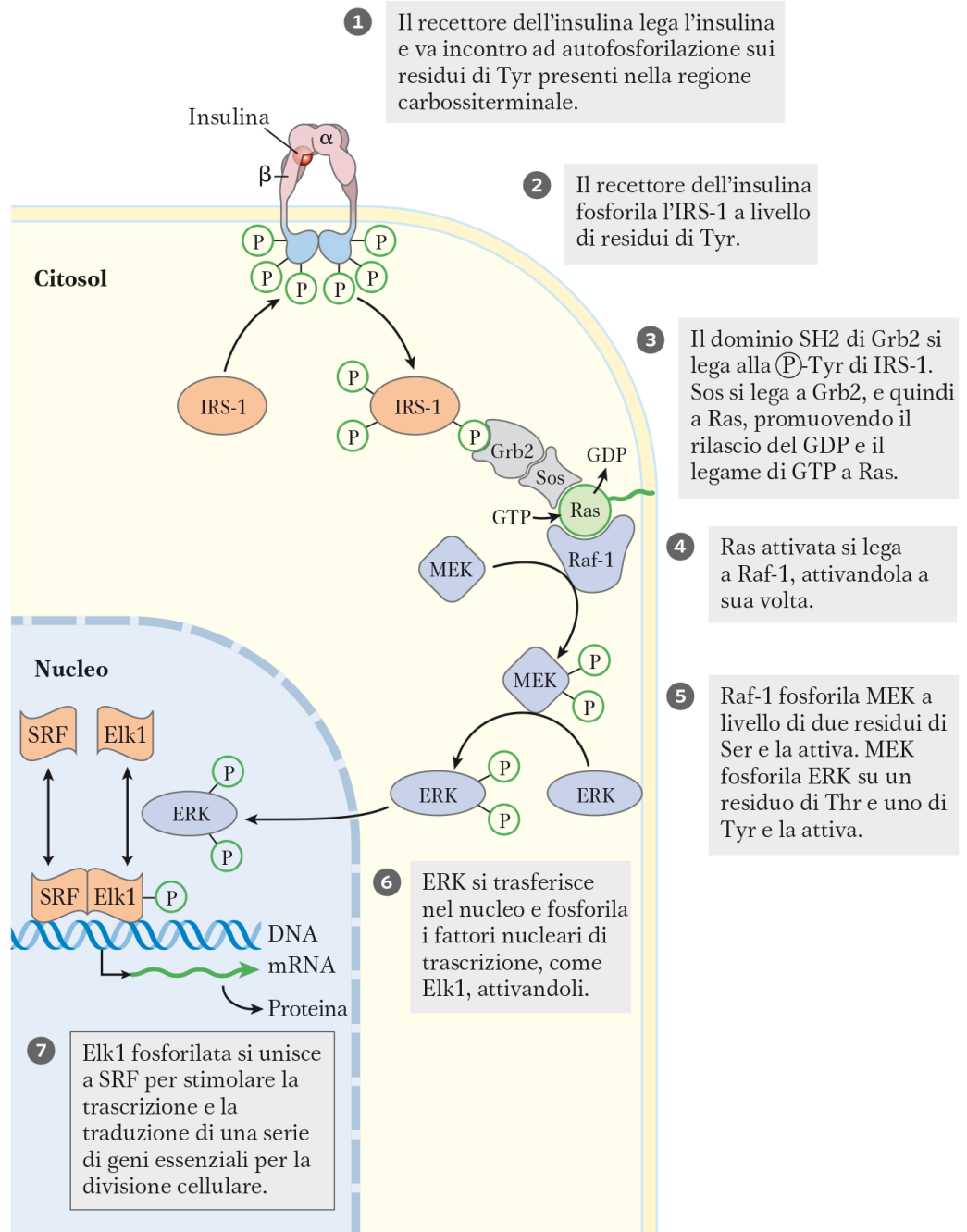
Il recettore per l'insulina è una proteina chinasi che trasferisce 6 gruppi P dall'ATP a residui di Tyr. E' costituito da due catene α identiche sulla superficie esterna della membrana plasmatica e da due subunità β transmembrana. Le catene α contengono il dominio che lega l'insulina, mentre le β hanno attività tirosin chinasi. Il legame dell'insulina alle catene α attiva l'enzima, che prima fosforila se stesso a livello di residui Tyr delle catene β e successivamente fosforila altre proteine bersaglio. Il risultato finale è la regolazione dell'attività di diversi enzimi e l'attivazione della trascrizione e traduzione di oltre 100 geni.

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DA PARTE DELL'INSULINA

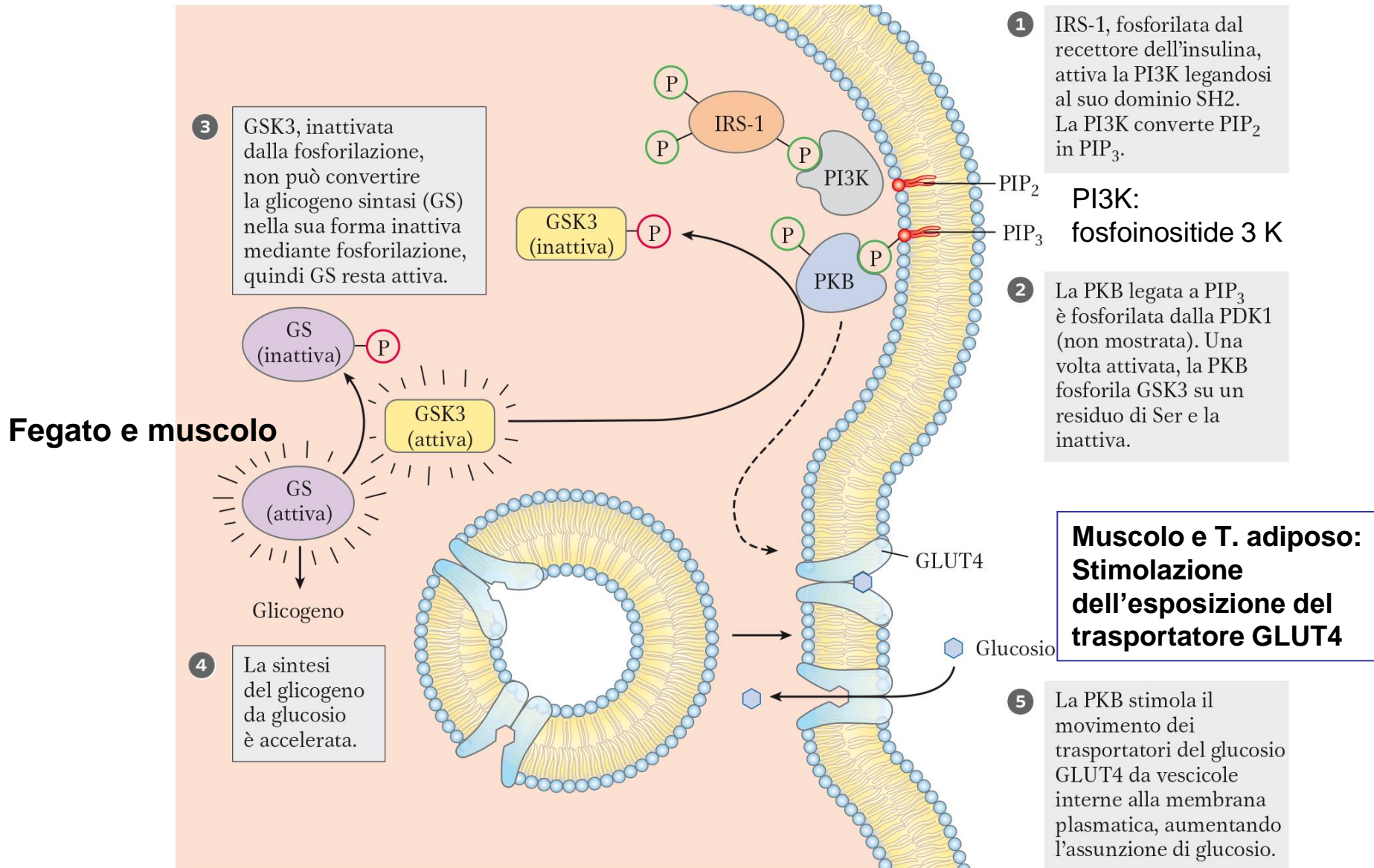
IRS-1 = substrato 1 del recettore dell'insulina

MEK = una chinasi

ERK = una chinasi



ATTIVAZIONE DELLA GLICOGENO SINTASI DA PARTE DELL'INSULINA



MECCANISMO DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO DEL GLICOGENO

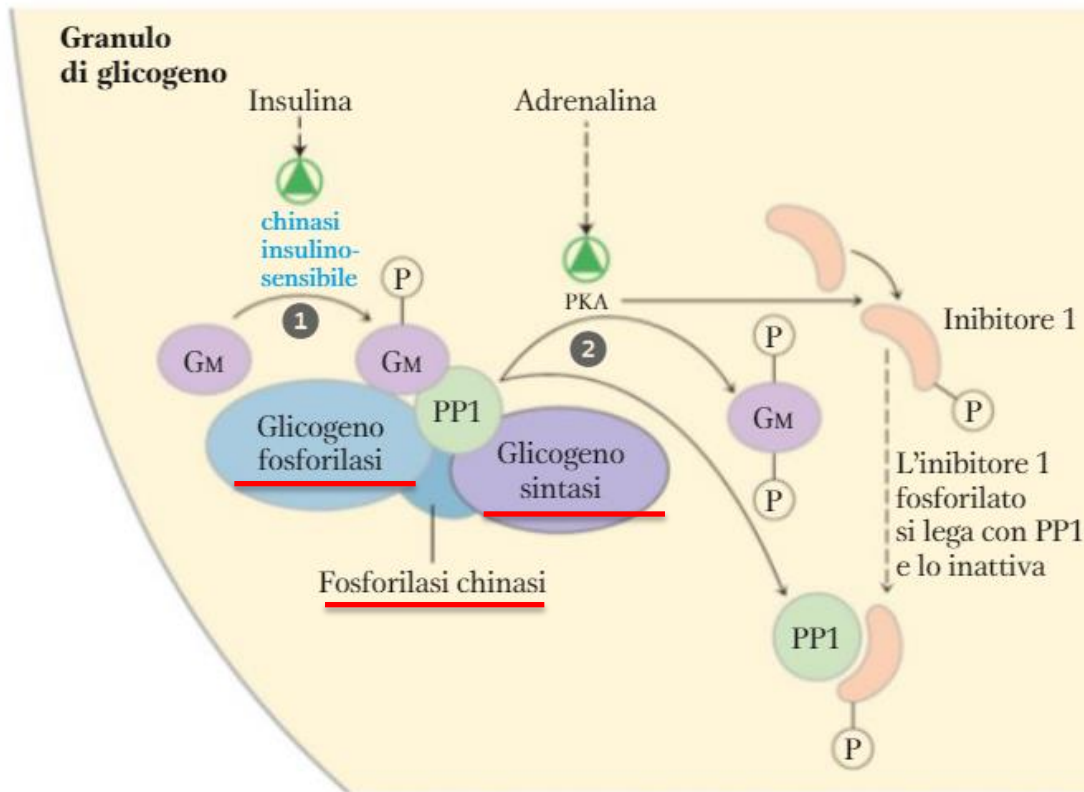


Figura 15.42 La proteina GM ha come bersaglio il glicogeno. La proteina GM fa parte di una famiglia di proteine che legano altre proteine (fra cui PP1) alle particelle di glicogeno. GM può essere fosforilata in due diverse posizioni in risposta all'insulina o all'adrenalina.

① La fosforilazione stimolata dall'insulina del sito 1 di GM attiva PP1, che defosforila la fosforilasi chinasi, la glicogeno fosforilasi e la glicogeno sintasi. ② La fosforilazione del sito 2 di GM stimolata dall'adrenalina provoca la dissociazione di PP1 dalle particelle di glicogeno, impedendo il suo accesso alla glicogeno fosforilasi e alla glicogeno sintasi. La PKA fosforila anche una proteina (l'inibitore 1) che, quando è fosforilata, inibisce PP1. Attraverso questi meccanismi l'insulina inibisce la degradazione e stimola la sintesi del glicogeno, mentre l'adrenalina (o il glucagone nel fegato) ha l'effetto contrario.

PP1 = fosfoproteina fosfatasi 1

INSULINA: attiva PP1 e inattiva GSK3

INFORMAZIONE INCROCIATA (CROSS TALK)

Estesa rete di interconnessione fra i diversi sistemi di segnalazione. In molti tessuti l'insulina contrasta gli effetti dell'adrenalina, perché l'attivazione del segnale dell'insulina attenua il sistema di segnalazione β -adrenergico. Il recettore dell'insulina attivato stimola:

- 1) l'internalizzazione del recettore β -adrenergico dell'adrenalina mediante fosforilazione.
- 2) la fosforilazione del recettore β -adrenergico inizia la nucleazione di proteine portando alla formazione del complesso proteico (MEK-ERK) uguale a quello promosso dal legame dell'insulina al suo recettore. L'effetto del legame dell'insulina al suo recettore viene aumentato di 5-10 volte in presenza del recettore β -adrenergico.