

## TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Gli organismi pluricellulari sono comparsi circa 4000 anni dopo la comparsa della prima forma di vita perché creare un organismo multifunzionale richiede da parte delle cellule la messa a punto di **sistemi di dialogo** che le cellule primordiali non avevano sviluppato.

Si è passati da cellule organizzate a formare semplicemente aggregati cellulari a cellule che interagiscono tra loro. Il passo verso la multicellularità fu molto lungo; ciò fu permesso da **organismi fotosintetici** in particolare un alto livello di multicellularità si è ottenuto con **VOLVOX**, una sfera che contiene sferule più piccole.

- **Gonodium:** le cellule interne, si occupano dei processi di riproduzione
- **Soamtiche:** gestiscono la migrazione e la risposta alla luce, cellule di rivestimento

Negli organismi multicellulari c'è un grande lavoro da parte di tutte le cellule nel garantire uno sviluppo controllato dell'organismo. Questo controllo sincrono avviene non solo nelle fasi di formazione ma anche durante i processi di divisione e crescita e accompagna la specializzazione delle cellule tanto da differenziarle notevolmente come già sappiamo.

La cellula non risponde ad un singolo segnale per volta ma diversi segnali contribuiscono alla sua sopravvivenza. Ci devono essere sostanze nell'ambiente circostante che le permettano questo. Anche la morte per apoptosi è una risposta cellulare in molte circostanze. Le cellule rispondono sempre a segnali esterni:

- Per sopravvivere
- Per ingrandirsi
- Per dividersi
- Per differenziarsi

Le cellule di organismi pluricellulari devono parlare tra di loro per garantire l'ordine all'interno dell'organismo e la capacità di svolgere le funzioni di cui esso necessita, per di più in questo parlarsi risentono contemporaneamente di più segnali differenti, quindi al loro interno devono fare sintesi

Nel corso dell'acquisizione della pluricellularità si è andato modificando il rapporto tra superficie cellulare e volume perché, essendo la membrana plasmatica l'interfaccia tra cellula e ambiente, tanto più essa è grande tanto più la cellula potrà percepire gli stimoli esterni.

Le prime tappe della comunicazione cellulare sono:

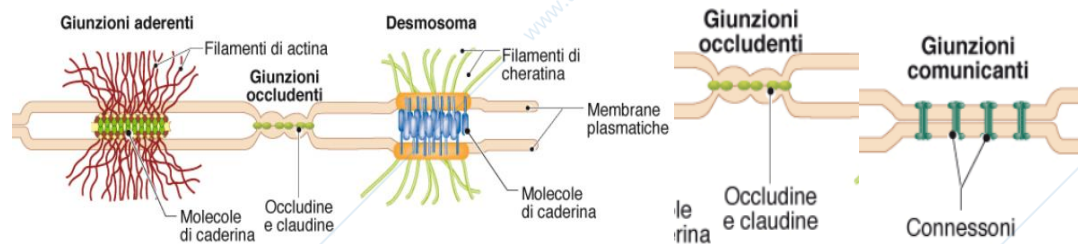
1. **Sintesi** delle molecole segnale
2. **Secrezione** delle molecole segnale
3. **Trasporto** verso le molecole bersaglio
4. **Legame** della molecola segnale con il recettore (molecola bersaglio) e cambiamento conformazionale
5. **Attivazione** delle **vie trasduzionali** del segnale che da extracellulare diventa intracellulare
6. **Risposta** cellulare
  - a. Rapida: rimodellamento citoscheletro, modifica post traduzionale delle proteine,
  - b. Lenta: richiede cambiamenti nell'informazione genica, il segnale deve arrivare nel nucleo
7. **Modulazione** del segnale, la cellula non recepisce il segnale sempre allo stesso modo, ha l'opportunità di spegnerlo.
8. **Spegnimento** del segnale, tanto importante quanto l'innesco. Rende la cellula disponibile per la recezione di un nuovo segnale o la rende per alcuni periodi refrattaria alle sollecitazioni esterne

### Trasporto delle molecole segnale alle cellule bersaglio

Una delle vie principali di comunicazione cellula – cellula è contraddistinta da:

1. **Molecole segnale sulla superficie esterna:** ci sono peptidi delle proteine trans-membrana che determinano la formazione di giunzioni specializzate tra cellule adiacenti, ciascuna di esse con funzione specifica:
  - a. **Giunzioni aderenti**, come i desmosomi collegano i citoscheletri di cellule adiacenti, contraddistinti da interazione tra proteine di membrana appartenenti alle **caderine**
  - b. **Giunzioni comunicanti:** collegano i citoplasmici veicolate da connessioni

- c. **Giunzioni occludenti:** sbarrano gli spazi tra le cellule vicine tenute insieme da **occludine e claudine**



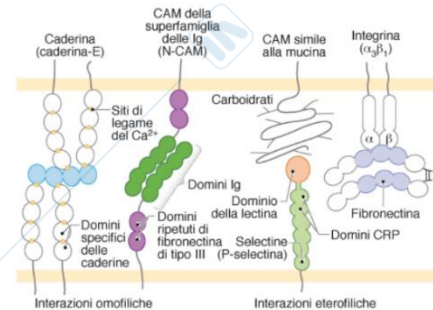
L'interazione che queste mediano tra due cellule vicine può essere:

- a. **Omofilica**, risente del calcio all'esterno della cellula

- ❖ es. **Caderine** e **CAM**: le caderine di una cellula prendono contatto con le caderine di un'altra cellula
- ❖ Proteine delle **CALL**: garantiscono interazione omofilica

- b. **Eterofilica**, una proteina di membrana riconosce qualcosa di diverso da sé

- ❖ Es: **selettine**, riconoscono strutture di carboidrati su cellule adiacenti
- ❖ Es: **integrine**, usate per il legame della cellula con la matrice extracellulare.



Le integrine sono costituite da un **peptide  $\alpha$**  e un **peptide  $\beta$**  che attraversano ciascuno una sola volta il doppio strato fosfolipidico e interagiscono esternamente con una struttura a testa ripiegata.

Nel momento in cui la subunità  $\beta$  viene legata dalla proteina citoplasmatica **talina**, l'interazione con la talina determina un cambiamento conformazionale dell'integrina tale per cui essa riesce a creare un solco all'interno del quale può accogliere proteine con domini molto semplici di **arginina, glicina e acido aspartico**

- ❖ ad es. **collagene** presenta questi trimeri di aminoacidi che vengono riconosciuti da integrine le quali hanno assunto questa forma e sono in grado di ancorare le cellule alla matrice cellulare.).

**Interazioni focali:** La talina fa da ponte tra la ECM e le integrine creando una continuità tra le cellule; è il citoscheletro che crea attraverso questa struttura interazioni focali che consentono alla cellula di stare agganciata al substrato nel quale essa è presente. Sono stati identificati diversi geni che possono assortirsi a formare integrine che hanno specialità differenti e che quindi riconoscono proteine extracellulari di natura differente. Le adesioni focali permettono anche alle cellule in coltura di aderire alla piastra su cui vengono coltivate.

**Emidesmosomi:** le integrine fanno da ponte tra ECM e i filamenti intermedi; quindi le integrine legano sia i filamenti di actine sia i filamenti intermedi alla MEC, connettendo pesantemente il citoscheletro all'ambiente circostante.

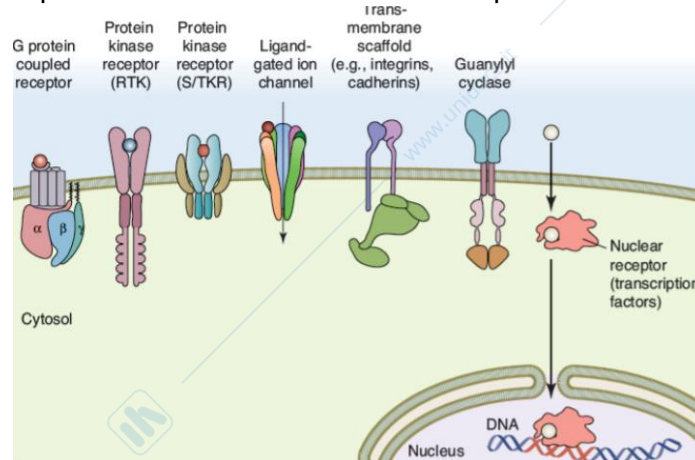
2. **Giunzioni GAP:** le cellule mettono in comune direttamente i loro citoplasmi
  - a. 6 connessioni formano un emi connesone
  - b. 2 emiconnesoni formano un connesione, cioè un canale tra citoplasmi; la sua apertura è regolata dal pH o da concentrazioni di Ca
3. **Secrezione di segnali chimici:** che agiscono su cellule che possono essere non necessariamente vicine; la strada che percorre il segnale prima di arrivare alla cellula bersaglio non è sempre la stessa.
  - a. **Endocrino**, trova il suo bersaglio in recettori su cellule molto distanti. Li raggiunge tramite il sangue
  - b. **Paracrino**, tra due cellule adiacenti
  - c. **Autocrino**, influenza la stessa cellula che lo ha secreto; la cellula produce un segnale ma è essa stessa sensibile al segnale perché presenta sulla membrana plasmatica i recettori per lo stesso

d. **Paracrino a distanza**, il segnale percorre ampia strada sotto forma di variazione di potenziale di membrana prima di raggiungere la cellula bersaglio, ma la molecola segnale raggiunge la sua cellula bersaglio facendo un piccolo tragitto.

- ❖ Es. trasmissione del neurotrasmettitore nelle sinapsi: il segnale parte dal corpo cellulare e attraversa tutto l'assone come sottoforma di variazione della differenza di potenziale della membrana e soltanto quando raggiunge il bottone sinaptico si ha il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio extracellulare, il quale farà una strada breve per raggiungere il suo bersaglio.

I recettori che si occupano di internalizzare questo segnale possono essere classificati in base a caratteristiche morfologiche e funzionali in sei gruppi differenti:

1. **Associati a proteine G;**
2. **Ad attività tirosin-chinasica;**
3. **Ad attività chinasi:** che è di tipo serina-treonina, canali ionici che rispondono alla presenza di un determinato ligando aprendosi e chiudendosi;
4. **Recettori che risentono delle condizioni dell'ambiente extracellulare**, come le integrine;
5. **Ad attività guanilil-ciclasica**, che convertono il GMP in GMP ciclico;
6. **Recettori nucleari:** proteine recettori all'interno del citoplasma o del nucleo



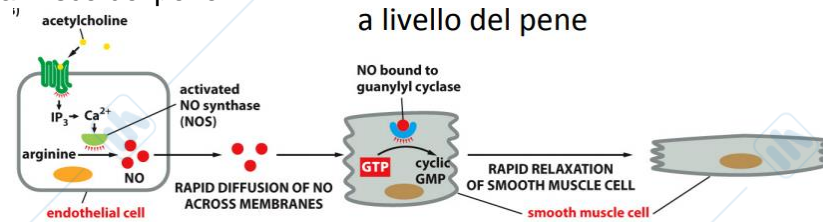
Per quanto riguarda la natura del segnale ricevuto dalla cellula, questo può essere classificato sulla base delle caratteristiche chimica del **segnale**:

1. **Ormoni steroidei:** passano attraverso il doppio strato e sono in grado di attivare direttamente fattori di trascrizione che sono allo stesso tempo anche recettori. Sono derivati del colesterolo (**ormoni sessuali, corticosteroidi**) e ciascuno di essi ha un proprio distretto di produzione e può differenziare il metabolismo di cellule distanti avvalendosi del sistema di segnalazione endocrino. Vengono legati da recettori nucleari che hanno un **dominio di legame per l'ormone**, un **dominio per il DNA** e una **regione di modulazione trascrizionale**. Cambiano di conformazione e possono attivarsi legando il DNA oppure disattivarsi staccandosi.
  - ❖ Es. Il recettore per l'ormone tiroideo si trova già nel nucleo e, quindi, il legame recettore-ormone non altera la capacità del recettore di legare il DNA e il recettore dell'ormone tiroideo lega in ogni caso il DNA.
    - In assenza di ormone il recettore recluta **Iston-Deacetilasi** spegnendo la trascrizione.
    - In presenza del ligando, recluta **Istone Acetil – Transferasi** attivando il processo trascrizionale: c'è modulazione nella capacità di questo fattore trascrizionale di reclutare i complessi della cromatina.
2. **Sostanze che evocano risposte direttamente sulla superficie**
  - Es. **NO** è un gas rilasciato dall'endotelio che induce il rilassamento delle cellule muscolari lisce che circondano i vasi.

In presenza di opportuna stimolazione l'**Acetilcolina** attiva la trasduzione del segnale che porta alla degradazione dell'**Arginina** e al rilascio di NO il quale diffonde facilmente al di fuori della cellula per attraversare la membrana plasmatica delle cellule adiacenti muscolari lisce che rivestono il vaso e qui trova il suo recettore citoplasmatico, una **Guanilil-Ciclastasi**, enzima che converte GTP a cGMP che a sua volta induce il rilassamento.

Quando ci sono problemi di **angine**, ossia di contrazione dei vasi che irrorano il sangue e creando una sorta di insufficienza cardiaca, viene usata la **nitroglicerina** che produce NO che rilassa la muscolatura andando ad interferire con la produzione di **GMP** all'interno della muscolatura liscia.

Anche il viagra inibisce la produzione di GMP aumentando la vasodilatazione a livello delle cellule muscolari lisce del pene.



3. **Sostanze che hanno bisogno di un recettore di membrana:** perché il segnale si converte in risposta cellulare, la risposta si ha già sulla membrana (es. apertura del canale).
4. **Informazioni trasdotte attraverso recettori sulla superficie della membrana:** il segnale produce cambiamenti all'interno della cellula e viene trasmesso da una proteina all'altra all'interno per essere convertito in segnale intracellulare

Affinché una proteina possa essere classificata come recettore devono essere soddisfatti diversi criteri:

- **Specificità:** un recettore deve essere in grado di distinguere tra segnali spesso strettamente correlati (il recettore deve sapere distinguere ad esempio un estrogeno da un progesterone);
- **Alta affinità:** i segnali sono spesso presenti a basse concentrazioni;
- **Saturabilità:** una cellula ha un numero finito di recettori, quindi vi è un limite al numero di molecole ligando che una cellula può legare.
- **Reversibilità:** l'associazione ligando recettore non è covalente: quando la concentrazione del ligando diminuisce il complesso può dissociarsi;
- **Accoppiamento:** essere accoppiato a un sistema intracellulare di trasmissione, il recettore trasferisce un segnale dal ligando alla cellula.

Una volta che il ligando ha raggiunto il suo recettore, i passaggi della traduzione del segnale all'interno della cellula prevedono processi di:

- **Fosforilazione:** il segnale può indurre la fosforilazione di una determinata proteina e questa fosforilazione causare la risposta a valle della cellula, ma il segnale all'interno della cellula può essere spento da **fosfatasi** che riportano nella condizione di partenza la cellula stessa;
- Attivazione per scambio **GTP/GDP:** il segnale può indurre lo scambio tra GTP e GDP attivando le proteine G, però anche questo meccanismo può essere spento attraverso il processo di **idrolisi** garantendo alla cellula non solo la risposta al ligando ma anche la capacità di spegnere il segnale e tornare in una condizione di riposo.

Una volta che il recettore si è modificato conformazionalmente e che questo cambiamento ha attivato cambiamenti nell'attività di chinasi, il segnale compie una serie di passaggi all'interno del citoplasma prima di dare la risposta finale, cioè non basta l'attivazione di una sola proteina chinasi o proteina G del GTP perché immediatamente dopo avvenga la risposta cellulare, ma **tante reazioni a cascata** si susseguono l'una dopo l'altra per consentire al segnale di venire amplificato.

**Secondo messaggero:** sostanze intracellulari diffusibili che possono entrare a far parte dei meccanismi di trasduzione del segnale; fa da ponte tra il **complesso recettore-ligando** e una **molecola bersaglio intercellulare**, la quale può essere citoplasmatica o nucleare. Mentre i recettori di membrana sono svariati e differenti nei vari compartimenti cellulari, il numero di secondi messaggeri e di vie di segnalazione attivate è ristretto.

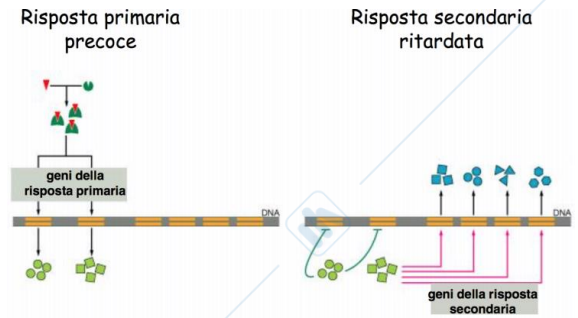
### Secondi Messaggeri:

sono piccole sostanze intracellulari che collegano il recettore/ligando a una molecola bersaglio intracellulare.

1. Molecole **idrofobiche** come **diacilglicerolo** o **fosfatidilinositolo**
2. Molecole **idrofiliche** come **cAMP**, **cGMP** **IP3** e **Ca**
3. Molecole gassose **NO**

**Differenza Velocità:**

- a. **Risposta rapida:** limitata a eventi che si realizzano nel citoplasma
- b. **Risposta lenta:** richiede nuova trascrizione ad opera del nucleo; si distinguono in seguito alla ricezione del segnale della cellula almeno due risposte trascrizionali
  - i. **Risposta primaria precoce:** scaturisce dalla trascrizione controllata di geni che sono fattori di trascrizione che devono essere tradotti
  - ii. **Risposta secondaria tardiva:** i fattori trascrizionali vanno ad agire su geni bersaglio e ne regolano la trascrizione, questi geni daranno la risposta.



Si tratta di un'amplificazione del segnale che avviene a livello nucleare, quindi c'è un primo gruppo di geni i cui prodotti proteici vengono riutilizzati per regolare la trascrizione altri geni che daranno una risposta. L'amplificazione è importante perché consente alla cellula di rispondere in modo robusto a dei segnali scarsi, dall'altra perché il passaggio step by step del segnale all'interno della cellula consente l'integrazione di più segnali che arrivano alla cellula contemporaneamente; per differenziare una cellula ha bisogno di stimoli che le garantiscono la sopravvivenza e il differenziamento e deve incorporare queste informazioni per dare una risposta. Il fatto che tale risposta non avvenga immediatamente ma a gradini fa sì che ogni gradino possa essere un punto di interpolazione tra vie di trasduzione del segnale differenti; quindi, l'attivazione di questa chinasi è fondamentale per la divisione cellulare e la sua funzionalità determinerà un processo di divisione cellulare, la risposta della cellula deve fare sintesi di tutta una serie di informazioni ambientali che non saranno solo informazioni positive, ma ci saranno segnali che non saranno idonei a far sì che la cellula proceda nel ciclo cellulare: allora su questa chinasi incomberà la trasduzione di tutti i segnali cellulari.

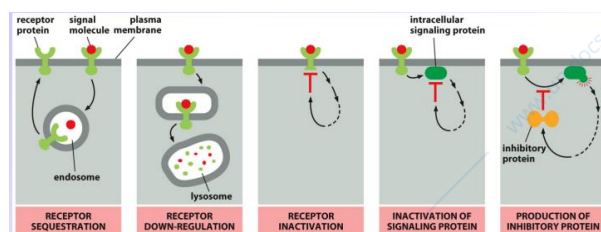
- Se prevarranno segnali positivi, il ciclo procede e la cellula si divide
- Se prevarranno i segnali negativi, la chinasi non si attiverà e la divisione cellulare non avverrà;

La funzionalità di questi numerosi passaggi di trasduzione del segnale hanno la logica di creare un'interazione alla quale corrisponde l'output della cellula.

**Sensibilità:** le cellule modulano diversamente la sensibilità ai loro segnali grazie all'internalizzazione di recettori che sono responsivi per un segnale e, riducendo la loro capacità di risposta a quel segnale, una volta che i recettori sono stati internalizzati attraverso processi di endocitosi, questa internalizzazione può essere momentanea oppure possono essere rimossi e indotti alla degradazione lisosomiale con cessazione completa alla risposta della cellula a quel determinato segnale.

Un altro modo con cui le cellule possono regolare la sensibilità ai segnali è quello secondo cui un recettore attivato con attività enzimatica abbia come target non solo altre proteine citoplasmatiche ma anche se stesso e questo auto bersagliamento ne determini la disattivazione, oppure questo spegnimento può avvenire a carico di una proteina segnale intracellulare, che viene attivata dal recettore e attiva a sua volta una serie di cascate a valle e induce una modificazione di se stessa, ne definisce il blocco funzionale.

**Inibizione:** una via di inibizione determinata da inibitori proteici è quella per cui il recettore attiva una proteina citoplasmatica e questa ha un inibitore di se stesso tra i suoi bersagli, inibitore che prima era inattivo e in seguito viene attivato e svolge il suo compito di inibire chi l'ha attivato determinando un feedback negativo che spegne il segnale. I feedback negativi sono comuni nella risposta a molte molecole segnale.



**Feedback:**

Vediamo un segnale che viene trasdotto da una **proteina chinasi** la quale attiva a sua volta una **proteina chinasi** che fosforila, e di conseguenza attiva, una **fosfatasi** che fa sì che seppure il segnale sia presente, il grado di fosforilazione della seconda proteina chinasi sia minore poiché ha attivato una **fosfatasi inibitoria**. Ci sarà quindi una risposta immediata piuttosto elevata della cellula al segnale quando ancora l'inibitore non è stato attivato, ma nel momento in cui la chinasi 1 fosforila la chinasi 2 e questa attiva l'inibitore, la risposta della cellula al segnale sarà diminuita fin tanto che il segnale dura.

- **Feedback negativo:** la risposta della cellula sarà prima più intensa e poi più bassa se l'intervallo di tempo fra l'attivazione della chinasi 2 e dell'inibitore è breve; se è lungo succede che seppur la fosfatasi influisce sull'attività della chinasi, contemporaneamente anche il segnale avrà incidenza sull'abbondanza della chinasi 2 fosforilata determinando una risposta a picchi e avvallamenti e per tutta la durata del segnale della cellula avrà una risposta alternata al segnale presente nell'ambiente circostante.
- **Feedback positivo:** la chinasi in presenza del segnale attiva una seconda chinasi fosforilandola. Essa avrà tra i suoi target anche se stessa. Se anche la cellula ha una fosfatasi che è in grado di indirizzare la risposta al segnale, la presenza del feedback crea un effetto prolungato della chinasi 2 nel tempo anche quando il segnale è cessato. I livelli di chinasi continuano ad essere alti perché la chinasi attiva continua ad attivare se stessa.
- **Assenza di Feedback:** senza controllo fin tanto che il segnale dura ci sarà l'attivazione della chinasi 2; al termine del segnale la fosfatasi riporta tutta la chinasi 2 alla forma inattiva, spegnendo l'attività.

**1. RECETTORI ASSOCIATI A PROTEINE G**

La cellula riceve dall'esterno un primo messaggero, questo si lega al suo recettore e il recettore attiva una serie di proteine dette G che, attivate, modificano l'attività funzionale di una proteina citoplasmatica detta **effettore**, la quale produrrà un secondo messaggero che andrà a modulare la risposta della cellula attivando o inibendo molecole di varia natura; il secondo messaggero può modulare tali proteine direttamente o avvalersi di un meccanismo ulteriore di amplificazione attraverso fosforilazione a cascata che avrà come target altri enzimi cellulari. I secondi messaggeri associati a GPCR sono piccole molecole idrofiliche che diffondono il segnale nella cellula (ad eccezione del DAG che è un secondo messaggero legato alla membrana).

Il secondo messaggero può essere registrato da un recettore con attività **tirosinchinasica** che indurrà una cascata di fosforilazioni all'interno del citoplasma con l'obiettivo di modulare le proteine bersaglio.

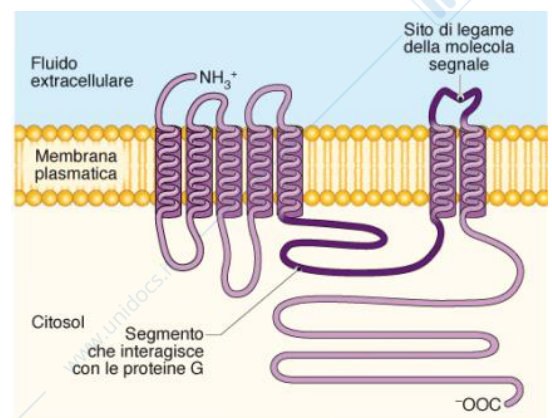
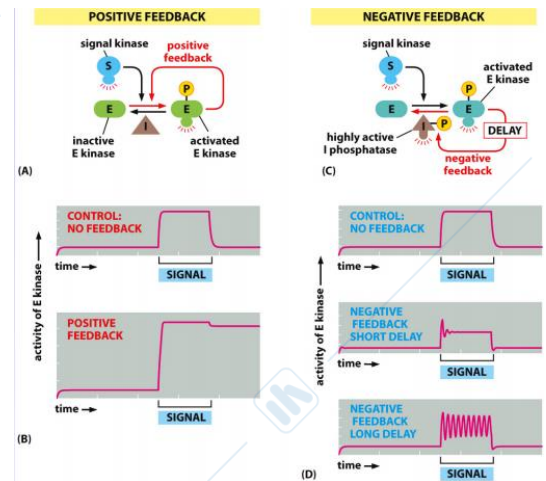
I principali secondi messaggeri sono:

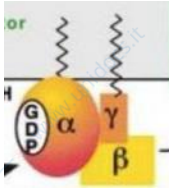
- cAMP
- cGMP
- IP3
- DAG: unico non idrofilico ma legato alla membrana

I recettori (**GPCR: recettori collegati a proteine G**) sono proteine trans-membrana con **7 alpha eliche** che presentano:

- L'estremità N-terminale nella porzione extracellulare della membrana plasmatica
- L'estremità C-terminale nella porzione citoplasmatica.

Le anse che collegano l'elica 6 con l'elica 7 sono la **regione di legame** per il **ligando**, mentre l'ansa citoplasmatica che collega l'elica 5 con la 6 è la **regione di legame** con le **proteine G**.





I recettori associati a proteine G sono associati a proteine G **eterotrimeriche** ancorate in membrana grazie al legame covalente coi fosfolipidi. Hanno 3 subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ed è la **subunità  $\alpha$**  che lega catalizza l'idrolisi del GTP in GDP. Le altre due subunità rimangono associate a formare un unico complesso. Tutte e tre sono ancorate alla membrana plasmatica

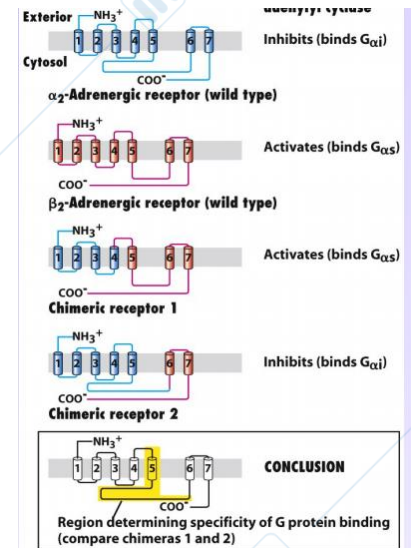
Questa famiglia di recettori è costituita da un migliaio di proteine in grado di recepire segnali di varia natura, hanno funzioni biologiche differenti e la risposta a determinati segnali dipende dal tipo di recettori presenti in membrana e a che tipo di proteine G sono associati, che tipo di effettori attivano e che tipo di substrati trovano all'interno della cellula.

I principali bersagli delle proteine G, attraverso i quali i GPCR controllano i diversi aspetti delle funzioni cellulari, sono i seguenti:

- Adenilato ciclasi: l'enzima responsabile della formazione del cAMP;
- Fosfolipasi C: l'enzima responsabile della formazione dell'inositolo trifosfato e del diacilglicerolo;
- Canali ionici: in particolare i canali del calcio e del potassio.

La funzionalità e l'effetto dei recettori associati a proteine G dipendono da che tipo di proteine G sono associati ad esso: non tutte le proteine G funzionano allo stesso modo, alcune sono inibitrici altre attivatrici, esistono proteine G diverse:

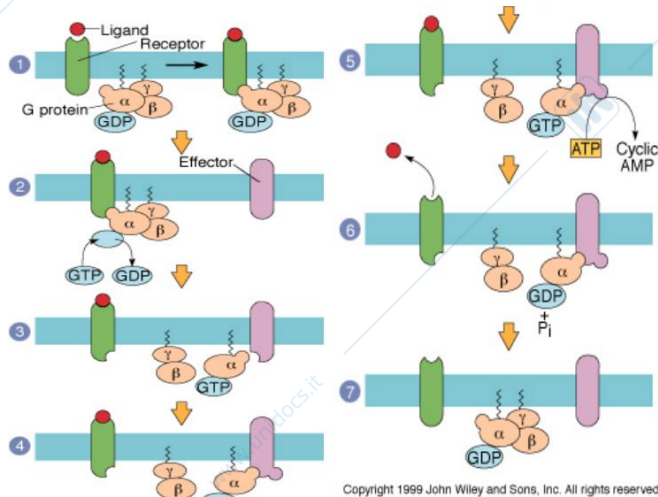
- **$\alpha_s$** : ha la porzione  $\alpha$  stimolante, attiva l'adenilato ciclasi
- **$\alpha_i$** : ha la porzione  $\alpha$  inibitoria, inibisce l'adenilato ciclasi
- **$\alpha_q$** : attiva la **Fosfolipasi C**
- **13/14**: regola le proteine Rh0, proteine monomeriche coinvolte nella strutturazione del citoscheletro



Per definire il legame tra recettore, proteine G ad esso associate e la porzione citoplasmatica tra l'elica 5 e 6, sono stati fatti degli esperimenti di produzione di proteine chimeriche e di fusione per capire quale fosse il dominio con cui il recettore legava le sue proteine G.

❖ Es: prendo un recettore **adrenergico** inibitorio che lega la proteina **Gai**, prendo un recettore adrenergico **attivatorio** che lega proteina **Gas**.

Creando una proteina di fusione (**chimere**) tra l'inibitorio e l'attivatorio era proprio la seconda parte della proteina che definiva la funzione del recettore definendolo attivatorio; ma se si andava a sostituire in questa proteina chimera la porzione tra l'alfa elica 5 e l'alfa elica 6 facendo una chimera differente, le capacità di questo recettore diventavano opposte, da attivatorio ad inibitorio.



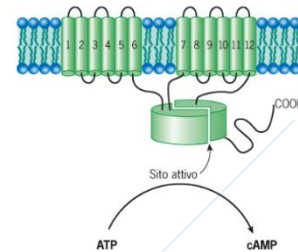
Vediamo che se il recettore associato a proteine G ha come proteine effettore un adenilato ciclasi succede che il **ligando** si lega al **recettore** che cambia conformazione esponendo il sito di legame per la **proteina G** che nella conformazione a riposo lega **GDP**.

Il legame proteina G eterotrimerica - recettore determina sostituzione di GDP con GTP sulla subunità  $\alpha$  che si stacca da  $\beta$  e  $\gamma$ , si muove lungo la membrana plasmatica perché associata ad essa da una coda lipidica e si lega all'effettore **adenilato ciclasi** che si attiva e produce cAMP.

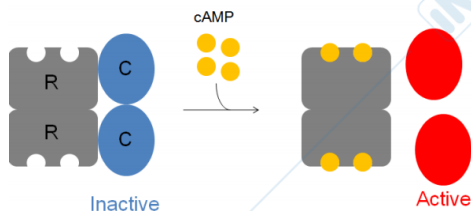
A questo punto GTP viene idrolizzato e il GDP associato porta a cambiamento conformazionale che rende il recettore inattivo.

Anche l'**adenilato ciclasi** è una proteina trans membrana con 12  $\alpha$ -eliche.

La porzione tra l'elica 6 e la 7 e la porzione C-terminale sono il sito attivo responsabile della produzione di cAMP. Una volta aumentata la concentrazione di cAMP esso è coinvolto come secondo messaggero in varie risposte cellulari e tipi cellulari differenti avranno risposte differenti all'amp-ciclico a secondo della loro disponibilità enzimatica, cioè l'amp ciclico andrà ad attivare o inibire proteine specificatamente presenti in un determinato tipo cellulare, in particolare attiva una **protein chinasi** detta **A** perchè amp ciclico dipendente.



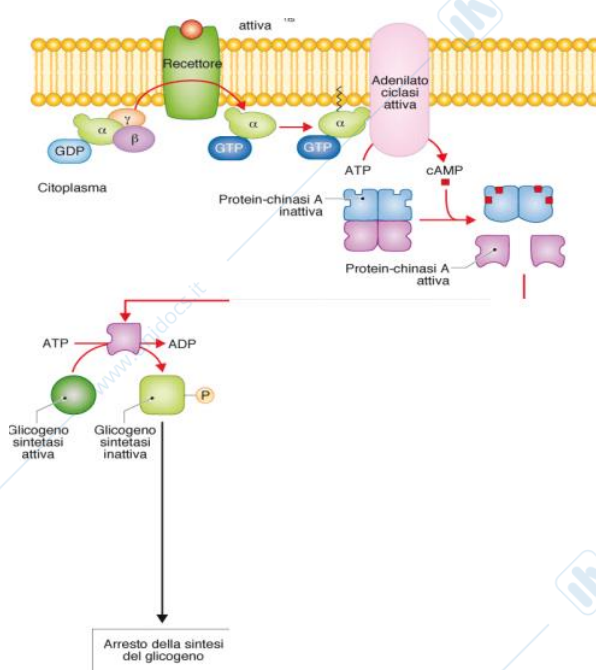
**PKA:** è una serina/tronina chinasi con 2 **domini regolativi** e 2 **catalitici**.



- In **assenza di cAMP**: i 4 domini interagiscono e la proteina non è funzionale.
- In **presenza di cAMP**: questo si lega ai domini regolativi permettendo il distacco di quelli catalitici consentendone la funzionalità.

La protein chinasi a che ha un miliardo di proteine bersaglio all'interno della cellula, la risposta cellulare viene indirizzata mediante un meccanismo di smistamento della pka che si troverà in alcuni tipi cellulari compartimentalizzata in regioni specifiche e lì determinerà la fosforilazione dei suoi substrati. Le proteine **AKAP** concentrano PKA in compartimenti cellulari diversi favorendo l'incontro con i loro substrati e quindi gran parte della specificità di risposta cellulare mediata dal secondo messaggero amp ciclico dipende dal tipo di proteine AKAPS espresse in un determinato tipo cellulare che ne concentreranno la funzionalità in specifici distretti.

Target tissue	Hormone	Major response
Thyroid gland	Thyroid-stimulating hormone (TSH)	Thyroid hormone synthesis and secretion
Adrenal cortex	Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)	Cortisol secretion
Ovary	Luteinizing hormone (LH)	Progesterone secretion
Muscle	Adrenaline	Glycogen breakdown
Bone	Parathormone	Bone resorption
Heart	Adrenaline	Increase in heart rate and force of contraction
Liver	Glucagon	Glycogen breakdown
Kidney	Vasopressin	Water resorption
Fat	Adrenaline, ACTH, glucagon, TSH	Triglyceride breakdown



I recettori associati a proteine G danno una **risposta combatti o fuggi** ovvero tutti quei cambiamenti metabolici e funzionali all'interno delle cellule che in condizioni di pericolo consentono di avere una reazione immediata e robusta e che quindi sono mediate da un segnale che può essere l'adrenalina o epinefrina e inducono variazioni funzionali a livelli di differenti tipi cellulari (aumento frequenza cardiaca, respiratoria etc). Esse sono mediate da **adrenalina** ed **epinefrina**.

❖ Es: a livello delle cellule del fegato e della muscolatura fegato l'**adrenalina** si lega al recettore, attiva la proteina G che attiva l'adenilato ciclastasi, aumenta il cAMP e si attiva la PKA che ha come proteina bersaglio la chinasi **glicogeno-sintetasi**, coinvolta nella sintesi del glicogeno, che viene disattivata, bloccando così l'accumulo di glicogeno. Contemporaneamente la **PKA** ha come bersaglio anche la **fosforilasi-chinasi** che viene attivata e attiva la **glicogeno-fosforilasi** che demolisce il glicogeno a glucosio.

Quindi da una parte abbiamo bloccato la produzione di glicogeno dall'altra abbiamo aumentato la fruizione del glucosio.

La protein chinasi a ha anche un fattore di trascrizione che si chiama **CREB** (Campo response element-binding protein); una volta fosforilato entra nel nucleo e si lega a sequenze conservate. L'attivazione di questi elementi CREB determina la sintesi di enzimi coinvolti nella gluconeogenesi e una serie infinita di enzimi che stimolano in modi differenti la risposta cellulare alla disponibilità di glucosio.

**Spegnimento:**

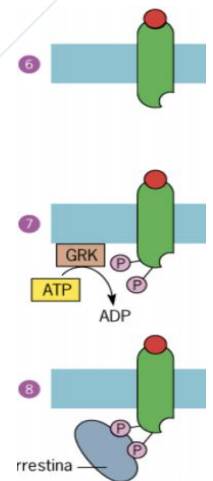
1. La subunità alpha si distacca dal recettore per attivare la proteina effettrice il recettore perde affinità per il ligando che viene rilasciato interrompendo la trasmissione del segnale a valle.
2. Idrolisi del GTP da parte della proteina g che interrompe la modulazione dell'adenilato ciclasi, la proteina effettrice
3. Delle **fosfodiesterasi** idrolizzano il cAMP ad AMP.
4. Fosfatasi attivate dalla PKA stessa inducono lo spegnimento

**Desensibilizzazione:**

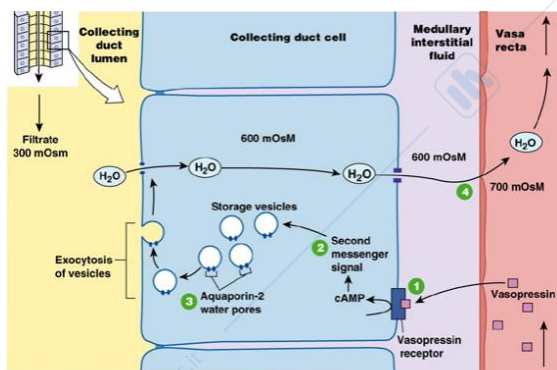
Ci sono poi meccanismi che la cellula adotta per desensibilizzarsi, cioè per essere meno suscettibile alla presenza di un ligando comunque presente nell'ambiente circostante; tali meccanismi di desensibilizzazione nel caso di recettori associati a proteine g sono legati alla presenza di **GRK-chinasi** del recettore che sono serina-treonina chinasi e fosforilano il dominio citoplasmatico del recettore disattivandolo.

Nel momento in cui il recettore è fosforilato a livello del citoplasma alcune proteine fra cui la **arrestina** è in grado di legarsi al recettore competendo con la proteina G eterotrimerica, scalzandola dalla sua interazione col recettore.

Non solo c'è una fase di competizione che spegne il segnale non consentendo l'attivazione di ulteriori effettori, ma le arrestine possono favorire l'internalizzazione del recettore perché sono un punto di ancoraggio delle vescicole rivestite di clatrina e inducono endocitosi del recettore associato a proteine G.

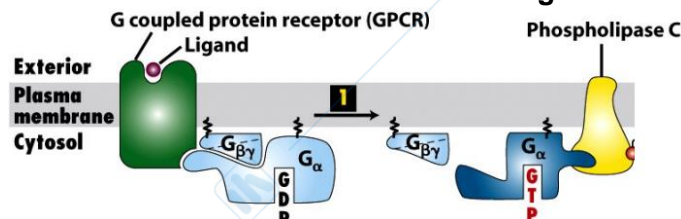


Tra le chinasi che possono avere come bersaglio tali tipologie di recettori ci sono le pka che sono tra i trasduttori finali del segnale che, attraverso un feedback negativo, vanno a regolare l'attività del recettore.



❖ Es. **AQP2** non è sempre presente a livello delle cellule apicali del tubo collettore ma è regolata dalla **vasopressina**, l'ormone antidiuretico dell'ipofisi. Attraverso il flusso sanguigno la vasopressina arriva al **recettore** che induce la produzione di cAMP che favorisce l'internalizzazione di vescicole di riciclo e ne consente l'esocitosi andando questa volta non a ridurre la quantità della proteina presente a livello di una determinata membrana ma ad aumentarla. Il recettore della vasopressina altro non è che un recettore associato a proteine g.

Per quanto riguarda un altro tipo di effettore a valle dei recettori associati a proteine g è la **fosfolipasi c**, responsabile della formazione **dell'inositolo trifosfato** e del **diacilglicerolo**.

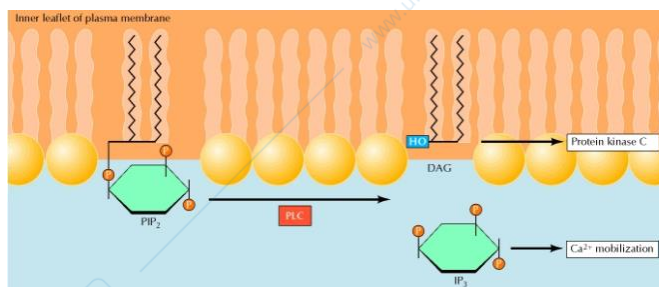


Meccanismo: arriva il **ligando**, si lega al **recettore** che recluta la **proteina G**, che attiva (subunità alfa + gtp) la **fosfolipasi C** che è in grado di processare i fosfolipidi introducendo tagli a diversi livelli:

1. **Fosfolipasi a**: rimuove solo gli acidi grassi
2. **Fosfolipasi b**: taglia tra la testa polare e il fosfato
3. **Fosfolipasi c**: rimuove la testa polare e il gruppo fosfato lasciando in membrana il **DAG**, il **Fosfatidil-Inositolo** subisce un primo taglio diventando fosfatidil-inositolo-4P e un secondo per diventare fosfatidil-inositolo-4,5 biP.

Chi taglia la fosfolipasi c riconosce l'**inositolo bifosfato**, questo vuol dire che il fosfatidil inositolo deve subire un primo processo di fosforilazione a livello del carbonio 4 per diventare **fosfatidil inositolo 1 fosfato** in posizione quattro, un secondo processo di fosforilazione a carico del carbonio 5 per diventare **fosfatidil inositolo 4 5 bifosfato** e questo è substrato per la fosfolipasi c che a questo punto produce l'**inositolo trifosfato** e il **diacilglicerolo**.

La fosfolipasi C è dotata di un dominio **PH** che le dà la possibilità di legare IP<sub>4,5</sub>-DiP determinandone il taglio in IP<sub>3</sub>.



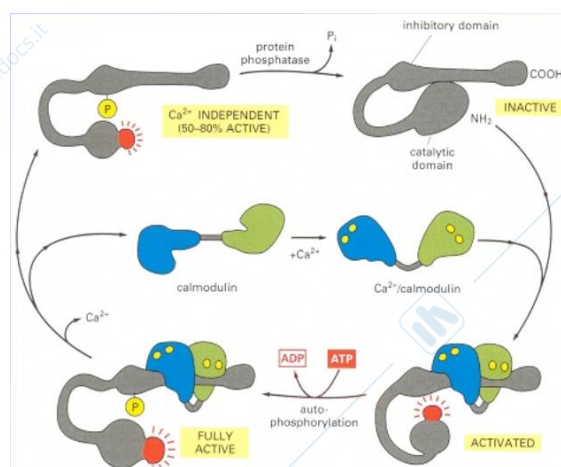
**Cosa succede ai due secondi messaggeri?** il **diacilglicerolo (DAG)** attiva le PKC che attivano una cascata di fosforilazioni che determina la risposta specifica ad un determinato stimolo.

Il destino dell'**inositol trifosfato (IP3)**, un secondo messaggero immette nel citoplasma il **Calcio** consentendone la fuoriuscita dal RE per apertura della sua proteina canale, segue un legame del calcio con la **calmodulina** proteina dalla struttura simmetrica ad osso in grado di legare 4 ioni Calcio.

Quando si lega acquisisce la capacità di ripiegarsi e prende contatto con **chinasi-calcio calmodulina dipendenti** che hanno livelli di attivazione sequenziali:

- Inattivo
- Parzialmente attivo quando legate alla calcio/calmodulina
- Attive quando si autofosforilano

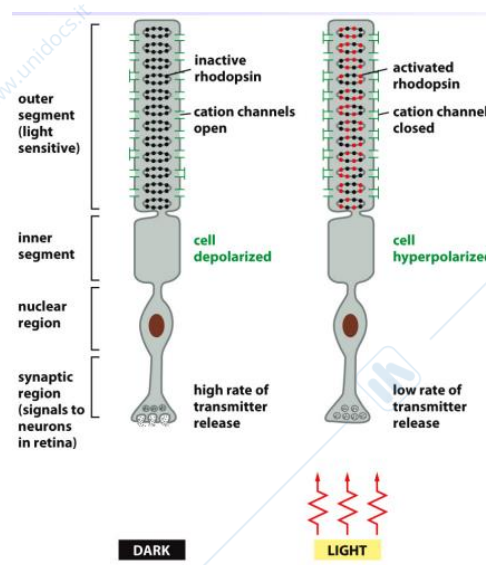
Seguirà una fase di spegnimento dovuta alla rimozione del calcio e della calmodulina e alla defosforilazione a causa di fosfatasi, quindi diciamo che la trasduzione del segnale intrapresa dalla via del calcio trova il suo spegnimento nella disattivazione calcio-calmodulina dipendenti.



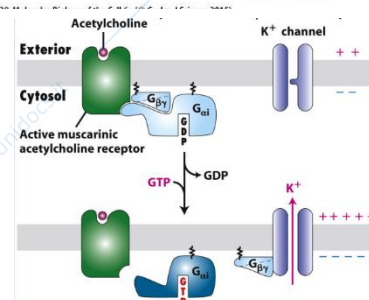
Attivata l'apertura dei canali del calcio, l'abbondanza citoplasmatica del calcio determina una serie di fattori (contrazione muscolare, attivazione cellule infiammatorie, apoptosi etc.).

**Cosa succede ai canali ionici associati a proteine dipendenti dall'interazione di proteine g eterotrimeriche?**

- ❖ Es. **rodopsina**: recettore della luce nei bastoncelli dell'occhio dei vertebrati, al buio presentano una cellula nervosa depolarizzata con **canali cationici** aperti e rodopsina inattiva. Quando la luce è presente essa modifica la struttura del **retinale** cambiandone la conformazione da CIS a TRANS che induce il cambiamento della componente proteica che si attiva e prende contatto con la proteina G - **trasducina** che attiva delle **fosfodiesterasi**, enzimi che idrolizzano il cGMP a GMP. La diminuzione di cGMP determina la chiusura dei canali cationici e la variazione del potenziale di membrana. Le cellule diventano iperpolarizzate e trasmettono l'informazione al cervello

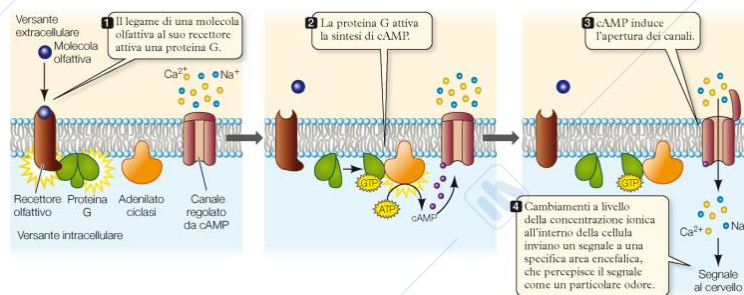


- ❖ Es. **Recettori dell'acetilcolina del muscolo cardiaco**: l'**acetilcolina** si lega al **recettore**, si ha lo scambio da GDP a GTP e le subunità **β e γ** attivano i **canali del potassio** che passano alla conformazione attiva aperta con variazioni del potenziale di membrana.



- ❖ Es. **Recettori olfattivi**: la **molecola olfattiva** attiva recettori olfattivi che sono accoppiati a proteine G la cui attivazione determina l'apertura di canali ionici e la depolarizzazione della membrana che verrà trasmesso al cervello. Alcune tossine interferiscono con le proteine G e bloccano il pathway di trasduzione che c'è a valle di tali recettori.

- La tossina **colerica** impedisce l'idrolisi del GTP e l'adenilato-ciclastasi resta sempre attiva. Questo porta a una fuoriuscita di acqua e Cloro.
- La tossina della **pertosse** causa una **ribosilazione** post-traduzionale della subunità  $\alpha$  non permettendo alla proteina-G $\alpha$  di convertire il GTP a GDP.



L'adenilato ciclastasi è attivata costitutivamente invece di essere inattivata. Porta a condizioni patologiche nella mucosa bronchiale.

## 2. RECETTORI CON ATTIVITÀ TIROSIN-CHINASICA

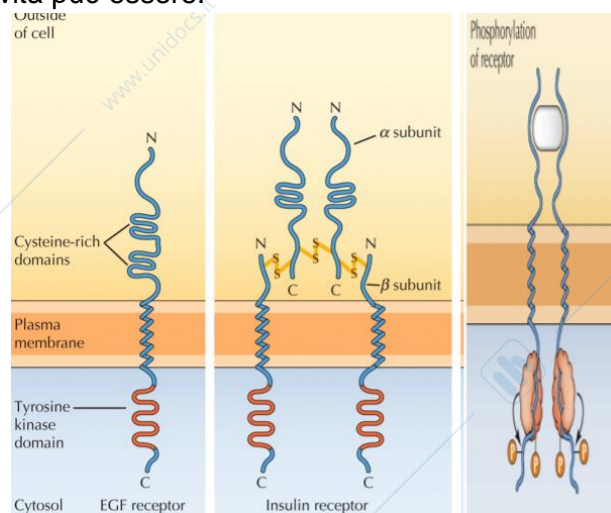
Percepiscono segnali nell'ambiente esterno veicolati da ormoni come l'insulina e fattori di crescita (come **NGF**, neuronale) ovvero la serie di proteine in grado di modulare le funzioni cellulari come la proliferazione, sopravvivenza, migrazione, molti di quei segnali di cui la cellula ha bisogno per sopravvivere e per svolgere la sua funzione.

I recettori di questi fattori di crescita sono delle proteine transmembrana ad un singolo passo, quindi con una sola alfa elica che attraversa il doppio strato fosfolipidico e una porzione ovviamente extracellulare in grado di legare il ligando, una porzione intracellulare tirosinchinasica e una lunga coda citoplasmatica contenente diverse tirosine.

Vediamo un pannello di recettori tirosinchinasici che manifestano la loro ampia variabilità soprattutto nella regione esterna della cellula dove identificano in modo specifico il fattore di crescita/ormone cui devono dare risposta

I recettori sono chinasi che fosforilano le tirosine, tale attività può essere:

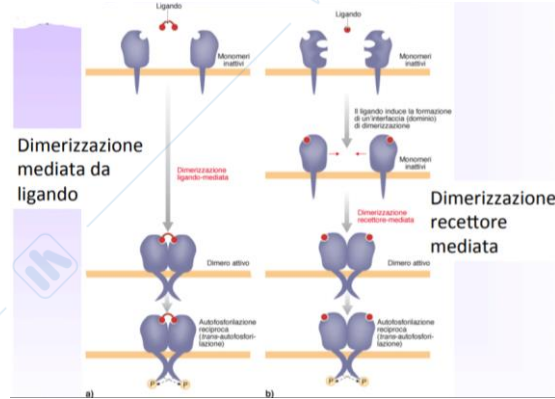
- Attività chinasi intrinseca**: singolo polipeptide che lega il ligando e ha attività Chinasi.
- Attività Estrinseca**: costituiti da almeno due polipeptidi di cui uno si occupa del **legame al ligando** ed è esposto all'esterno della cellula mentre l'altro associato covalentemente col primo attraversa il doppio strato ed opera **con attività chinasi** nel citoplasma.
- Attività non recettoriale**: il recettore lega il suo **ligando** e funziona nella regione citoplasmatica da ancoraggio per **chinasi citoplasmatiche** in grado di attivarsi reagendo col recettore quando il ligando è presente



La prima caratteristica dei recettori tirosinchinasici è il fatto che nel momento in cui inizia il funzionamento vengono dimerizzati, funzionano come dimeri. La dimerizzazione può essere:

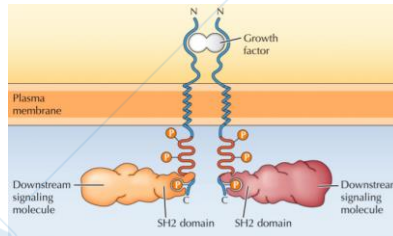
- Mediata da ligando**: se il **ligando** è una molecola simmetrica in grado contemporaneamente di legare due monomeri di recettore
  - Il ligando a natura covalente fa da ponte e li costringe alla dimerizzazione
  - In seguito a ciò il dominio **chinasi citoplasmatico** si attiva con una **trans-fosforilazione**: la chinasi di un polipeptide fosforila la chinasi dell'altro e viceversa

- II. **Mediata da recettore:** ciascun **ligando** si lega a una regione specifica del recettore, lo modifica ed espone i **siti di dimerizzazione** a livello della proteina recettoriale, a questo punto il recettore dimerizza e si trans-fosforila (si dice anche che si autofosforila).



L'autofosforilazione dei recettori tirosinchinasici ha un duplice ruolo:

- I. La fosforilazione delle tirosine del **dominio catalitico** incrementa l'attività chinasi della proteinchinasi stessa.
- II. La fosforilazione al di fuori del **sito catalitico** permette la creazione di siti di legame per proteine necessarie perché il segnale venga trasmesso all'interno della cellula ben oltre il livello sottostante la membrana plasmatica.



Questi punti di ancoraggio sono riconosciuti dai domini:

- a. **SH2** identificato per la prima volta in proteine **SARC**, le proteine che contengono questi domini riconoscono sequenze specifiche localizzate nelle vicinanze delle tirosine fosforilate

Riconoscono il recettore in 2 punti:

- I. Una tasca si lega alla tirosina fosforilata
- II. Una tasca varia da proteina a proteina, e quindi è specifica per una sequenza aminoacidica particolare.

Le due tasche insieme determinano il punto in cui le proteine citoplasmatiche legheranno il recettore **tirosin-chinasico**.

Recettori che possono essere fosforilati in diversi punti, possono quindi reclutare proteine differenti le quali riconoscono, attraverso il dominio SH2, la tirosina, identificano una tirosina specifica sulla base del contesto in cui queste tirosine differenti si trovano.

Le proteine SH2 possono svolgere all'interno della cellula funzioni diverse:

- **Fattori di trascrizione** come STA
- **Fosfolipasi**
- **Chinasi** come la sarc
- **Proteine adattatrici** con solo domini di legame
  - **Specifiche:** funzionano da ponte fra il recettore e una particolare proteina a valle
    - ❖ Es. GRB2 adattatrice associa SOS al recettore attivato dal ligando
  - **Di attracco:** in grado di legare il recettore, vengono da questo fosforilate creando nuovi siti di legame a cui altre proteine con domini SH2 si possono attaccare.

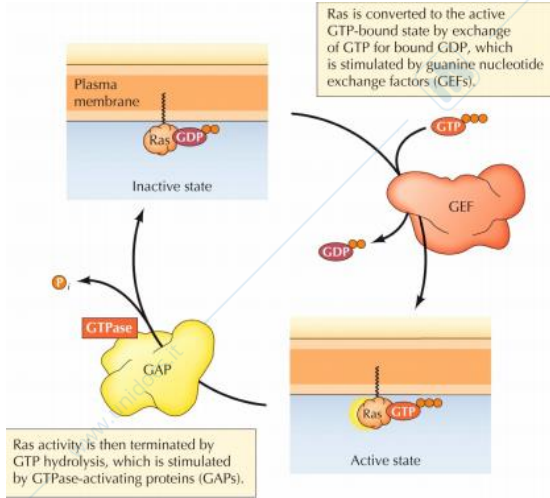
- b. **PTB** domini di legame per fosfotirosina, riconoscono una tirosina associata a una triade di aminoacidi, quando la tirosina si trova in un contesto aminoacidico particolare si lega alle PTB

Quindi le proteine di attracco, in qualche modo, sono recettive per mettere in contatto il recettore con proteine che trasdurranno il segnale che hanno funzioni differenti.

I recettori associati all'attività tirosinchinasica possono attivare contemporaneamente diverse vie di segnalazione:

- Via mediata da Ras
- Via del fosfatidil-inositolo 3 chinasi
- Proteinchinasi C calcio mediata

### Cascata di trasduzione Ras – Map dipendente



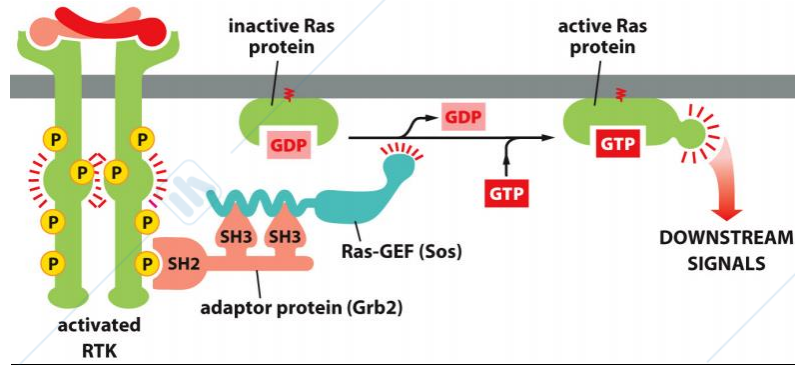
Una delle più importanti vie di segnalazione della cellula è presente nella mitogenesi cioè nella regolazione del ciclo cellulare ad opera di fattori di crescita che ne regolano il funzionamento.

La **proteina-G monomerica RAS**, idrolizza il GTP e ha **interattori** che ne facilitano il processo **GTP-asico** e la aiutano a cambiare GTP a GDP.

Ha le sue **GEF-protein**, **GAP-protein** che favoriscono lo scambio da GDP a GTP e le **GDI-protein** che inibiscono la dissociazione del GDP.

RAS è stata identificata per la prima volta come **oncogeno** nel virus che causa sarcoma nei ratti inducendo iperproliferazione del ciclo cellulare.

### Come funziona? Via delle Map Chinasi MAPK mitogen activated protein kinases

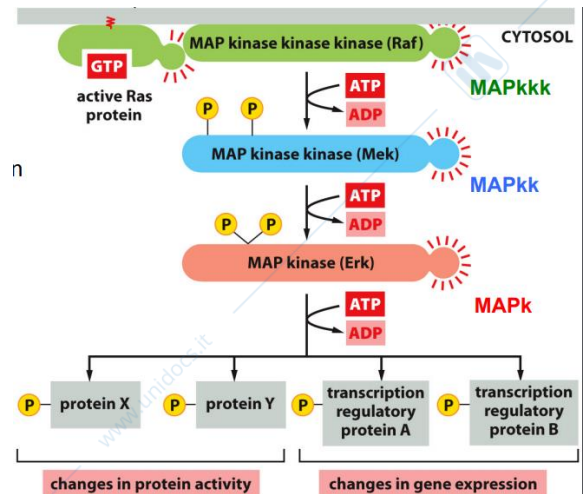


Nel momento in cui un **fattore di crescita** è presente nell'ambiente circostante (Es: il fattore di crescita epidermico tirosinchinasico) esso induce una dimerizzazione mediata da ligando.

Segue l'**autofosforilazione** del recettore e la creazione dei domini di ancoraggio per le proteine **SH2**. A questi siti di ancoraggio nel caso del fattore di crescita epidermico si associa la proteina **GRB2** con il suo dominio SH2. Essa presenta altri domini simili **SH3** che sono in grado di reclutare **SOS**, ovvero una **GEF-protein** in grado di promuovere lo scambio GDP-GTP sulla **proteina RAS**, che come le ras eteromeriche è associata alla **membrana plasmatica**.

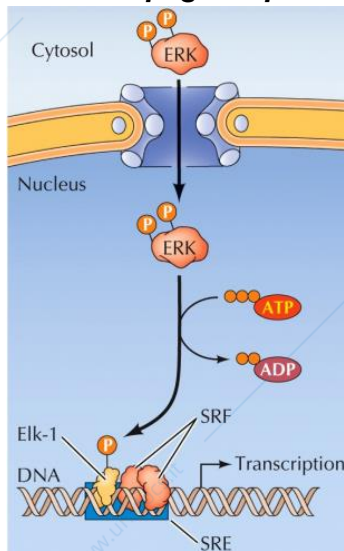
Dunque l'attivazione del recettore recluta SOS in prossimità di RAS consentendo di scambiare GDP-GTP e quindi di attivarsi.

A questo punto RAS attivata va a stimolare la funzionalità di una proteina a valle che fa parte di un fattore di crescita epidermico che è una **protein-chinasi** detta **MAP/MAPKKK**, una serina-treonina-chinasi che fosforila la **MAPk** (erk) che è l'ultima chinasi di questa cascata di fosforilazioni che troverà nel citoplasma e nel nucleo della cellula molti bersagli, li fosforilerà definendo la risposta della cellula alla presenza del fattore di crescita. Fosforila proteine che non sono chinasi dunque è l'ultima MAP chinasi.



Quindi il ligando attiva ras e come abbiamo visto questa dà il via alla cascata di fosforilazioni che continuano con Mek e finiscono con Erk che andrà a fosforilare le proteine che determineranno la risposta.

**Come si spegne il pathway MAPk?**



Ci sono delle fosfatasi dette dual specific phosphatases, DUSP che sono in grado di muovere i residui di serina e treonina inseriti in stadi che si sono aggiunti nei processi di attivazione delle chinasi andando a spegnere il segnale.

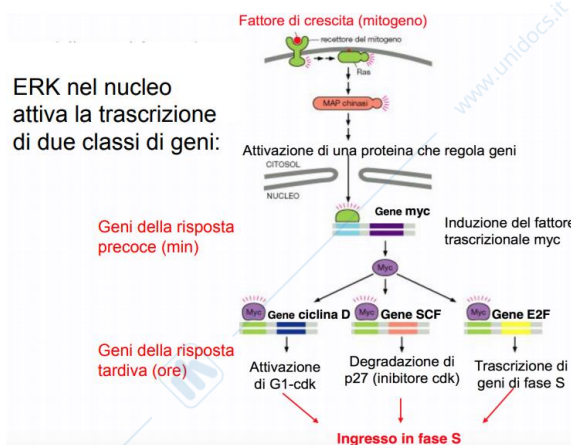
Tra le componenti che ERK fosforila vi sono anche **fattori trascrizionali** che andranno a mediare una risposta a livello della regolazione dell'espressione genica della proteina. In particolare Erk una volta fosforilato è tra le altre cose in grado di migrare nel nucleo dove fosforila i fattori trascrizionali **SRF e ELK1** (abbondanti nel siero = sangue) che regolano la trascrizione di specifici geni riconoscendo le **SRE**, cioè le sequenze di risposta al siero che definiranno l'attivazione della trascrizione di specifici geni.

Questi fattori sono abbondanti nel siero del sangue, per questo le sequenze responsive ai fattori di crescita sono denominati Serum Response Element.

Il pathway delle map chinasi determina a livello del nucleo 2 risposte sequenziali attivando 2 categorie di geni:

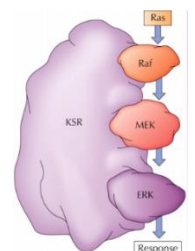
- a. C'è una risposta **precoce**: si converte nella trascrizione nell'arco di pochi minuti dalla recezione del segnale di nuovi trascritti.
- b. La risposta **tardiva** necessita del prodotto proteico derivante dalla risposta precoce. Il prodotto proteico in genere è un fattore di trascrizione. Quindi quello che succede in particolare è che Erk fosforila i substrati Erk1 e Srf e va ad attivare la trascrizione di:
  - Geni **MYC** fattori trascrizionali che una volta prodotto va ad attivare
    - Gene **ciclina C**,
    - Gene **SCF**
    - Gene **E2F**

Sono tutti coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nell'inizio della fase di sintesi del DNA



Quindi stiamo vedendo dal punto di vista molecolare che in presenza di condizioni di crescita ideali la cellula si divide, duplica il suo DNA.

**Come fanno in questa cascata di fosforilazione le proteine a incontrarsi nell'ampio spazio del citoplasma?** La proteina RAS incontra RAF, MEK ed ERK grazie alle proteine di supporto come **KSR** che ancorano le varie serina-treonina chinasi ponendole in prossimità le une con le altre.

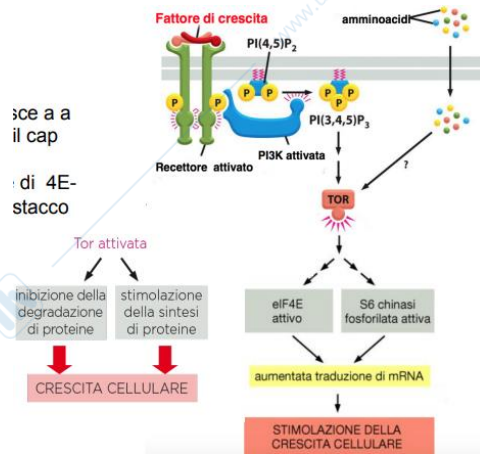


**Spegnimento:**

Fosfatasi **DUSP** rimuovono residui di serina e treonina aggiunti nei processi di attivazione delle MAP-chinasi



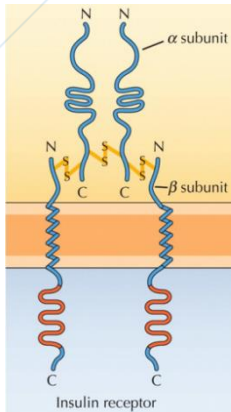
Uno stesso segnale è una stessa via di trasduzione del segnale porta da una parte al blocco dei processi apoptotici, dall'altra stimola la crescita cellulare coordinando 2 eventi opposti.



**PTEN** è una fosfatasi in grado di spegnere la cascata di traduzione che passa attraverso la PI3K perché rimuove i fosfati. È un meccanismo di spegnimento gene, noto come onco soppressore che pone un freno al ciclo cellulare.

Laddove nelle cellule tumorali questo pathway è accelerato, la presenza di PTEN pone un freno. Dall'altra parte la sua assenza determina una proliferazione incontrollata.

## 2.a RECETTORE PER L'INSULINA



Appartiene alla categoria di recettori con attività estrinseca

- Polipeptide  $\alpha$ : lega il ligando
- Polipeptide  $\beta$ : nella porzione citoplasmatica con attività chinasi.

Con il ligando presente il recettore funziona come un dimero di 4 polipeptidi.

L'insulina è necessaria per contenere l'abbondanza di glucosio a livello ematico e interviene dopo i pasti ad abbassare i livelli di zucchero alternandosi con il glucagone che riporta i livelli in alto.

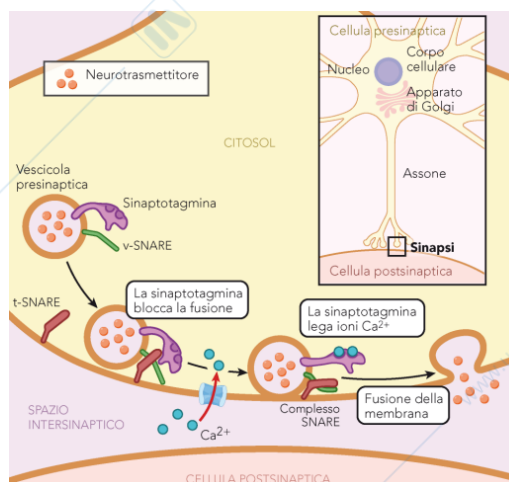
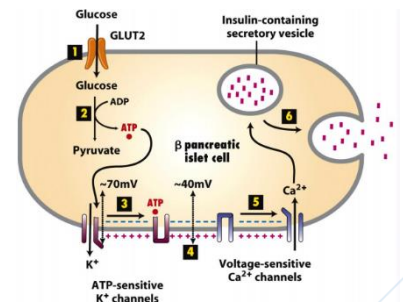
Sono entrambi prodotti dal pancreas:

- Glucagone dalle cellule  $\alpha$
- Insulina dalle cellule  $\beta$

Il rilascio avviene a livello delle cellule  $\beta$ : il glucosio entra grazie a **GLUT2** e aumenta i livelli di **ATP** grazie alla respirazione.

L'innalzamento di ATP apre i **canali del K** che portano a una variazione del potenziale di azione di membrana che apre i **canali del Calcio** sensibili alla differenza di potenziale.

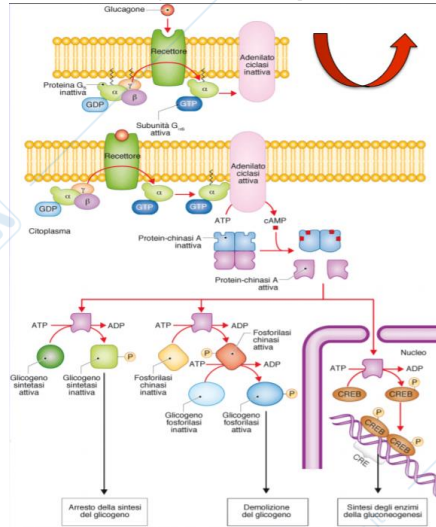
Il Calcio entra nella cellula e consente il rilascio **dell'insulina** presente in granuli maturi in prossimità della membrana plasmatica; il rilascio è mediato dalle **sinaptogamine** che consentono alle **VSNARE** e **TSNARE** di interagire consentendo la fusione e il rilascio dei granuli maturi.





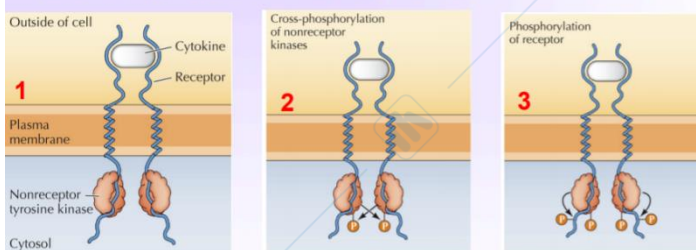
La PKA fosforila:

- Glicogeno sintetasi inibendola
- Fosforilasi chinasi attivandola e inducendo fosforilazione attivatoria su glicogeno fosforilasi
- Entrano nel nucleo e fosforilando Creb (**cAMP respons element binding protein**)



## 2.b RECETTORI CON ATTIVITÀ NON RECETTORIALE

1. L'interazione tra fattore di crescita e recettore induce la dimerizzazione del recettore;
2. chinasi intracellulari vengono reclutate a livello del recettore e attivate per transfosforilazione;
3. la successiva fosforilazione del recettore crea domini di interazione per proteine contenenti domini SH2.



Hanno un'attività chinastica al di fuori di quella del recettore e quello che succede è che l'interazione con il ligando determina la dimerizzazione del recettore (quindi un cambio di conformazione dello stesso) il quale a questo punto recluta delle chinasi citoplasmatiche vicine tra loro che si autofosforilano e fosforilano contemporaneamente anche la porzione citoplasmatica del recettore creando siti di ancoraggio per SH2

❖ Es. **proteine RHO** (famiglia delle Ras) che trasducono il segnale di interazione tra cellula-cellula e cellula-ECM.

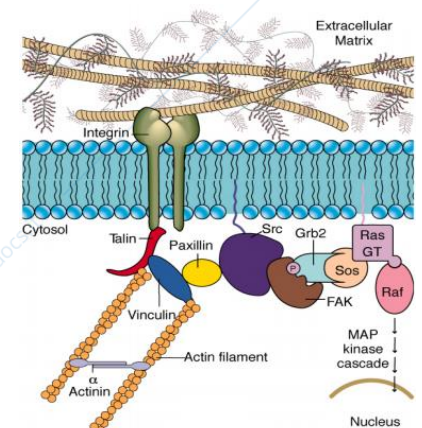
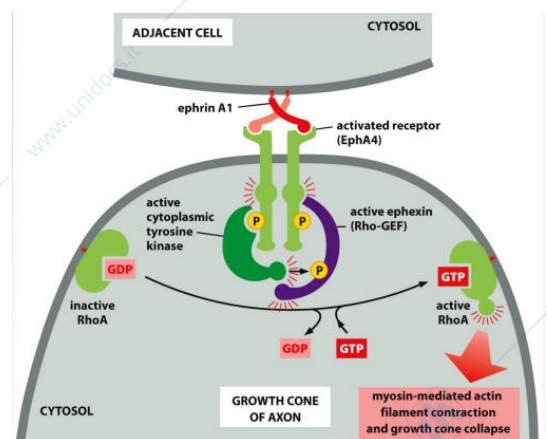
In questo caso il recettore per delle proteine esposte sulla cellula adiacente che sono chiamate **efrine**, dimerizza, cambia conformazione e richiama la **tirosin-chinasi** che lo fosforila rendendolo capace di essere legato da una **GEF-protein** che stimola lo scambio GDP-GTP sul gruppo delle proteine monomeriche **RHO**.

A questo punto RHO passa alla forma attiva e porta a un cambiamento conformazionale del citoscheletro che consente la risposta alla cellula vicina

- Es. contatti tra cellula neuronale

❖ Es. nelle **giunzioni focali**

Altri recettori associati all'attività tirosin-chinastica estrinseca sono anche presenti a livello delle giunzioni focali che sono mediati dalle **integrine** che prendono contatto con la ECM facendo da ponte con il citoscheletro della cellula e contemporaneamente sono il punto di ancoraggio di proteine chinasi citoplasmatiche e **FAK (focal adhesion kinase)** che attivano il pathway delle MAP chinasi attivando la via mitogenica che porta alla divisione cellulare.



Vedremo infatti che le cellule si possono dividere se sono ancorate ad un substrato che ne coordina da una parte l'organizzazione citoscheletrica e dall'altra ne consentono la divisione cellulare.

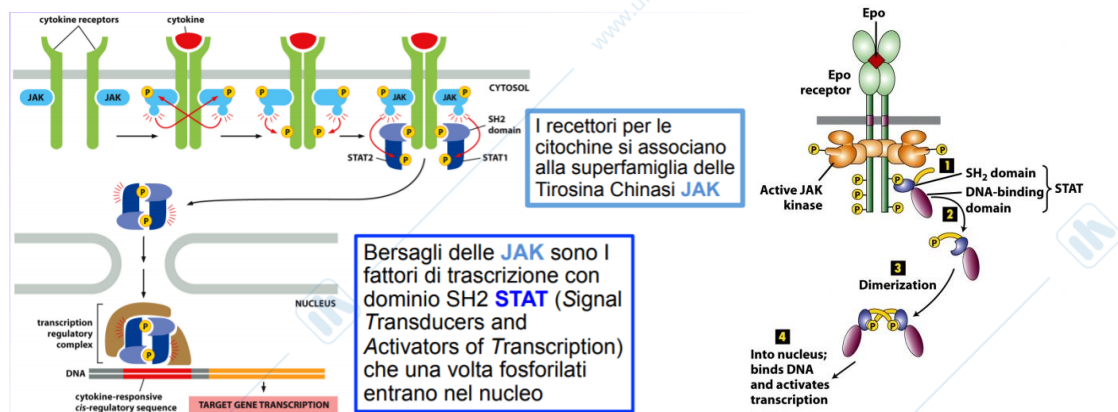
Le cellule tumorali perdono questo controllo dovuto all'adesione focale, anche se non legate alla ECM mantengono la capacità di dividersi.

- ❖ Es. recettori della famiglia **JAK/STAT** per le **citochine**, poco diverse dai fattori di crescita, piccole molecole segnale (circa 160 aa) che controllano divisione e differenziamento.

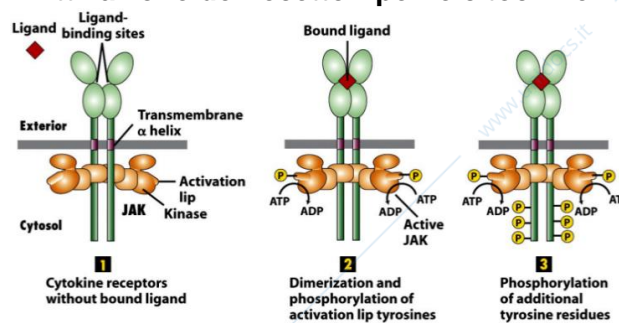
Appartengono a questa categoria di recettori i recettori che determinano il differenziamento delle cellule del sistema eritrocitario. Un altro esempio è il recettore per l'ormone della crescita, molto importante nello sviluppo dell'individuo. E infine il segnale di risposta per gli interferoni alfa e gamma che consentono la risposta in caso di infezioni virali o infiammazione di altro genere.

### Come funzionano questi recettori?

Sono associati a tirosin chinasi **JAK**, nel momento in cui il ligando, quindi la citochina, è presente nell'ambiente circostante le JAK si **transfosforilano** e fosforilano il recettore che diviene capace di reclutare un fattore di trascrizione **STAT1** che una volta legato al recettore subisce la fosforilazione da parte di JAK e si stacca dal recettore, dimerizzando nel citoplasma. Entra nel nucleo dove svolge la sua funzione di fattore di trascrizione.

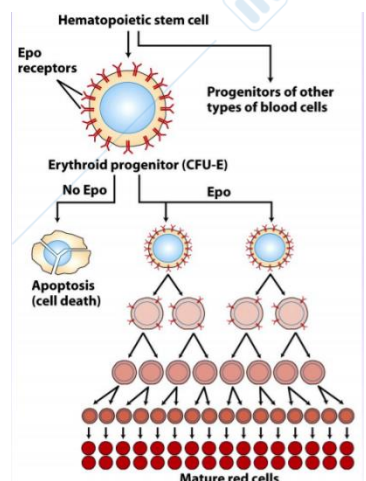


### Attivazione dei recettori per le citochine:



- ❖ Es. **recettore per eritropoietina**, ormone responsabile del differenziamento dei precursori eritroidi ad eritrociti.

In assenza del recettore le cellule vanno incontro ad apoptosi già nelle fasi precoci dello sviluppo dell'embrione in cui l'assenza del recettore dell'eritropoietina porta alla non presenza delle cellule differenziate. Il pathway è quello delle **JAK/STAT5**: l'eritropoietina si lega al recettore, le JAK si autofosforilano e fosforilano il recettore, chiamano le STAT che dimerizzano e controllano i geni specifici per il differenziamento eritropoietico e per la proteina **BCLXL** antiapoptotica.



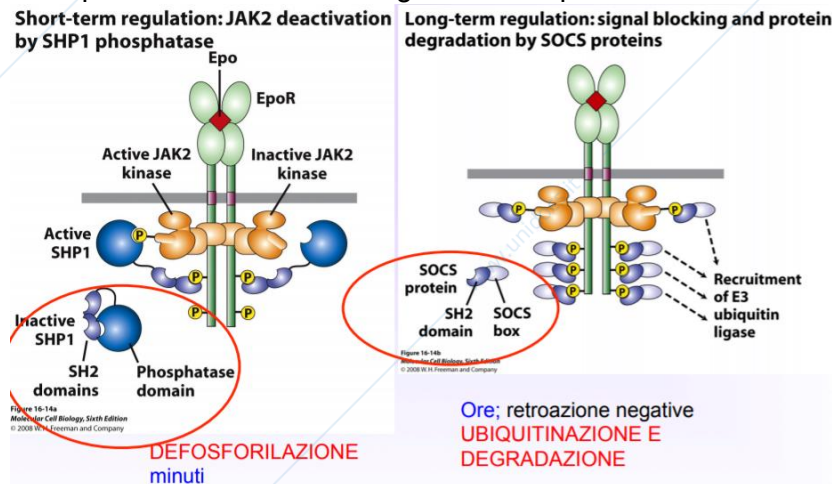
La presenza di eritropoietina fa due cose:

- Consente la sopravvivenza della cellula attivando la trascrizione di BCL – XL
- Ne determina il differenziamento andando a regolare l'espressione dei geni specifici dei globuli rossi.

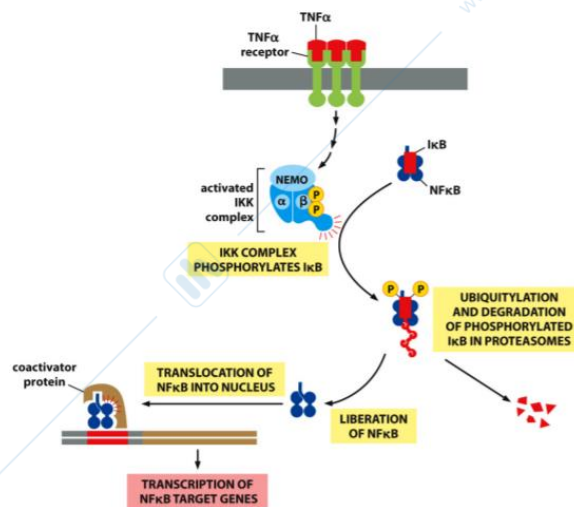
### Come si spegne il sistema JAK – STAT?

C'è un sistema veloce e uno lento:

- **Spegnimento veloce:** prevede la defosforilazione della JAK attraverso una fosfatasi dotata di un dominio SH2 che si lega prima al recettore fosforilato e va a defosforilare la JAK spegnendo il segnale
- **Spegnimento lento:** con proteine con domini SH2 che fanno da ponte e quindi da proteine adattatrici in grado di reclutare l'**ubiquitina E3 ligando** determinando la rimozione del recettore dalla membrana e procedere con la sua degradazione "proteasoma-mediata"



- ❖ Es. Altra categoria di recettori legati ai fattori di trascrizione sono i recettori per il **TNF (tumor necrosis Factor)**, citochina specifica che induce infiammazione e morte cellulare, esistono due forme:
  - a. **Forma legata in membrana, recettore TNF -75** (indica il peso molecolare in Dalton): induce produzione citochine e inibisce apoptosi.
  - b. **Forma solubile, recettore TNF1-55** che è la forma tagliata di quella in membrana, induce apoptosi.



### Come funziona il TNF?

TNF si lega al suo recettore che è un **trimerico** ovvero costituito da 3 monomeri che formano un dominio funzionale quando TNF è presente. Viene attivata la **chinasi IKK** che fosforila la proteina **IKB** determinandone la sua ubiquitinazione e degradazione. Quando TNF non è presente IKB è associata a **NFKB**, fattore di trascrizione, e ne costringe la localizzazione nel citoplasma.

NFKB una volta che è libero da IKB è in grado di traslocare nel nucleo e trascrivere i geni per la produzione di citochine che inibiscono l'apoptosi

**Spegnimento:** tra i geni target di NFKB c'è IKB stesso quindi NFKB nel nucleo attiva la produzione di citochine e l'apoptosi e induce la cellula a produrre la proteina silenziante IKB e quindi attraverso un feedback negativo si ha lo spegnimento del segnale.

### 3. Con attività chinasi serina-treonina

Il recettore per il **trasforming growth factorB** è una piccola proteina che controlla la proliferazione di molti tipi cellulari, non è più un tirosin-chinasi ma è una **serina treonina chinasi**.

Il recettore è formato da 2 **eterodimeri** composti dalla **subunità R1** e dalla **subunità R2** (in totale quindi 4 polipeptidi). Normalmente i singoli monomeri non sono associati sulla membrana ma è la presenza delle **TGFβ** che determina la formazione del recettore funzionale.

Quando le 4 subunità si trovano vicine i polipeptidi R2 con dominio serina-treonina chinasi inducono la fosforilazione del polipeptide R1 che così diviene punto di ancoraggio per le proteine citoplasmatiche **SMADR** che si legano al recettore e vengono da questo fosforilate.

Una volta fosforilati si staccano dal recettore e prendono contatto con **SMAD4** (smad citoplasmatica) formando un complesso che entra nel nucleo e funziona come fattore trascrizionale.

Il sistema può non funzionare correttamente se:

- **Manca il segnale**
  - ❖ Es. diabete tipo 1 dove non viene prodotta insulina
- **Il segnale è ignorato**
  - ❖ Es. diabete 2 dove l'insulina è presente ma non è legata dal recettore
- **Una cellula risponde in assenza di segnale**
  - ❖ Es. mutazioni associate ad insorgenza di tumori
  - ❖ Es. 1960 olimpiadi invernali, sciatore di fondo vince sette medaglie, hanno scoperto in lui una mutazione nel gene per il recettore per l'**eritropoietina** (coinvolto nel differenziamento e produzione dei globuli rossi) lo rende insensibile all'inibizione immediata del segnale e l'individuo riesce a produrre quantità di globuli rossi nettamente superiore a quella delle altre persone consentendo maggior trasporto di ossigeno ai muscoli e una migliore performance sportiva.

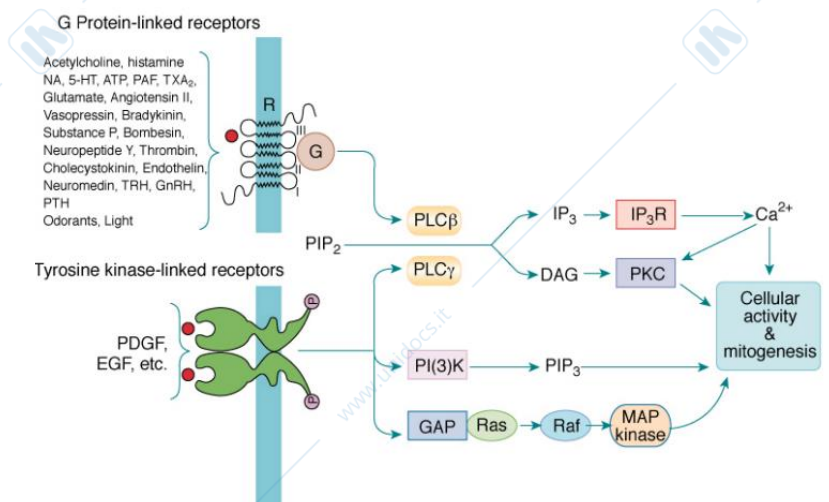
### Mutazioni per i recettori dei fattori di crescita sono alla base di insorgenza tumorali

- ❖ Es. i recettori della famiglia **HER** per la crescita dell'epidermide sono scarsamente espressi in cellule epiteliali normali, sono però abbondanti ad esempio nel carcinoma mammario.

### Differenti vie di trasduzione del segnale interagiscono tra loro per formare un network regolativo all'interno della cellula

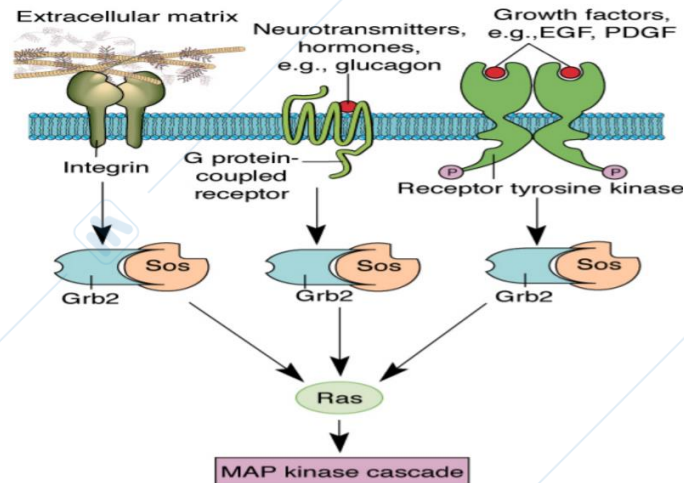
La cascata di trasduzione è funzionale al fatto che il segnale venga amplificato e consenta di controllare la risposta della cellula a segnalazioni che vengono dall'esterno della cellula.

Uno dei punti di contatto fra i pathway di trasduzione mediati da recettori tirosin-chinasi e quelli associati a proteine G è la via che prevede la produzione di IP3 e DAG



La via intracellulare che porta alla formazione dei secondi messaggeri in inositolo 3 fosfato e diacil glicerolo può essere attivata sia dai recettori tirosin-chinasici sia recettori legati alle proteine G.

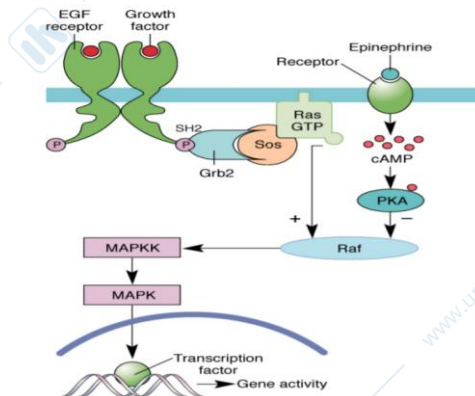
**Vie convergenti di segnalazione:**



I recettori tirosin-chinasici attivano la fosfolipasi C di tipo  $\gamma$  che possiede domini SH2, che può essere traslocata dal citoplasma alla membrana raggiungendo il substrato, svolgere il suo lavoro e generare i secondi messaggeri che permettono il rilascio del calcio dalle cisterne del RE

La produzione di secondi messaggeri avviene sia a carico di un tipo di segnale dovuto all'acetilcolina o vasopressina o neuropeptidi ma viene anche rafforzato dalla presenza di fattori di crescita e citochine.

Altro punto di convergenza è l'attivazione del pathway delle MAP-chinasi che può essere attivata da recettori **GRB2/SOS**. Le proteine G riescono ad attivare RAF anche indipendentemente da SOS



**Modalità silenziante** andando a scatenare il pathway della attivazione dell'adenilato ciclasti:

- Canali ionici
- Proteine trans-membrana, risentono delle interazioni con la ECM (es. integrine, proteine da interazione cellula-cellula e cellula-matrice)
- Con attività guanilil-ciclastica, convertono GMP in cGMP
- Citoplasmatici/nucleari