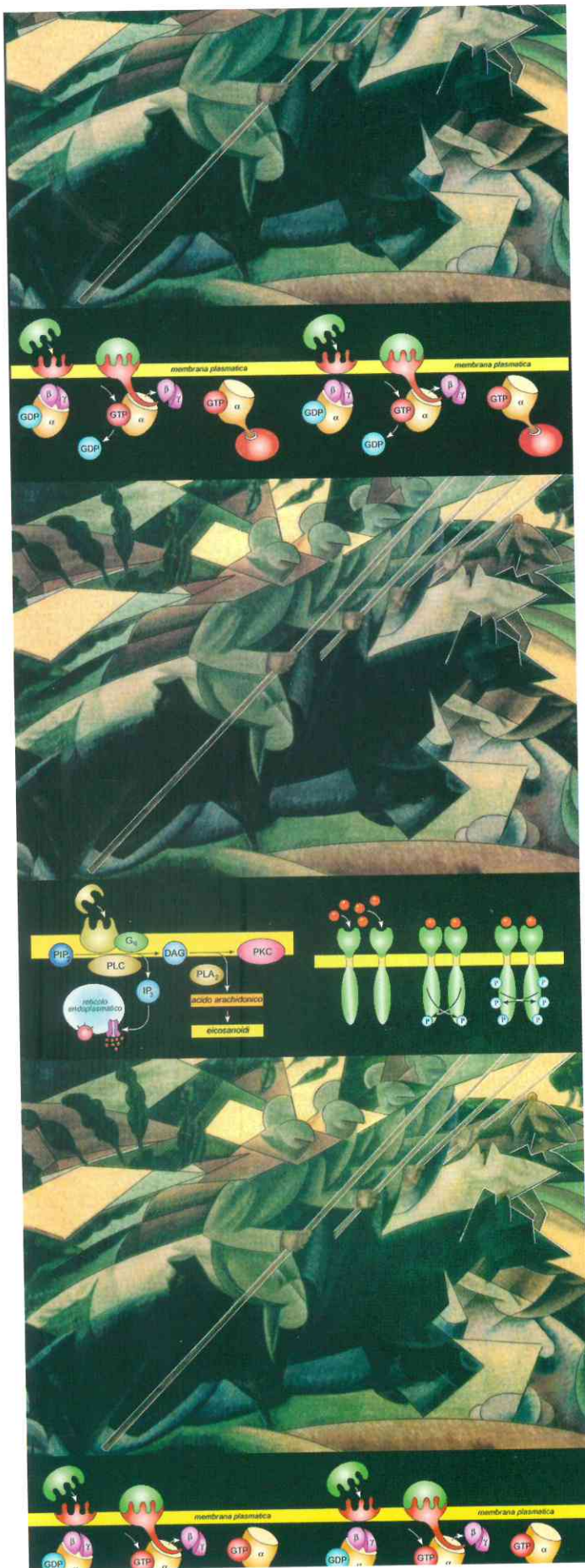




CAPITOLO VI:

La trasduzione dei segnali chimici

Anche nel più semplice degli organismi, le cellule scambiano continuamente tra loro "segnali" chimici, costituiti da molecole che esercitano una profonda azione regolatrice di quasi tutte le funzioni, da quelle basilari quali la crescita, il metabolismo, la moltiplicazione e la differenziazione, fino a quelle specializzate che si manifestano nei vari apparati degli organismi più evoluti (*).

Ogni cellula infatti, almeno potenzialmente, è capace di elaborare e di liberare uno o più *messaggeri chimici extracellulari*, che le permettono di comunicare con altre cellule. Queste "molecole messaggere" possono essere di diversissima natura chimica (peptidica, lipidica, steroidea o persino inorganica), ma sono sempre particolarmente *reattive* perché debbono esplicare la loro azione a *concentrazioni bassissime* (inferiori a 10^{-8} Moli/l).

D'altra parte, per poter ricevere ed interpretare i segnali chimici, ogni cellula è dotata di un caratteristico corredo di *recettori*: molecole capaci di rivelare con altissima specificità l'arrivo di un messaggero extracellulare e di innescare, in modo program-

mato e caratteristico, la risposta richiesta. Ogni messaggero extracellulare raggiunge un gran numero di tipi cellulari diversi, ma ottiene una risposta solo dalle proprie *cellule bersaglio*: quelle dotate di recettori chimici per esso specifici.

Col termine "*trasduzione del segnale*" s'intende la successione di eventi che, a partire dall'attivazione di un recettore, porta al suo effetto finale sulle funzioni delle cellule bersaglio (^{2*}). Le vie di trasduzione del segnale sono certamente complesse, tuttavia il loro numero è largamente inferiore a quello delle molecole (ormoni, neurotrasmettitori, fattori di crescita, ecc.) aventi carattere di messaggeri extracellulari.

(*) Negli organismi unicellulari, invece, la regolazione di tutte le funzioni avviene direttamente all'interno di una stessa unità cellulare. Ciò non toglie che anche gli organismi unicellulari possano ricevere (ed inviare) "messaggi" dall'ambiente in cui vivono e da altri individui.

(^{2*}) La trasduzione del segnale, in termini informatici, può essere interpretata come la *traduzione* di un "messaggio" extracellulare in una "risposta" intracellulare.

I RECETTORI CHIMICI

I recettori chimici sono per così dire i "sensori" dei messaggeri extracellulari. Essi sono sempre *molecole proteiche*, foggiate in modo da "legare" con *affinità altissima* (*) quelle dei messaggeri, che infatti sono chiamati genericamente *ligandi*. Si tratta di legami relativamente *labili* (ponti idrogeno, legami idrofobici, forze di Van der Waals), quindi facilmente *reversibili*: una condizione necessaria affinché la risposta delle cellule bersaglio possa seguire, senza ritardi, le fluttuazioni temporali dell'arrivo dei messaggeri.

La comunicazione mediata dai messaggeri extracellulari richiede anzitutto che i recettori chimici siano accessibili ai rispettivi ligandi. Si distinguono perciò (Fig. 6.1):

1) i *recettori intracellulari*, ubicati nel citoplasma

o nel nucleo, accessibili soltanto dai messaggeri extracellulari *liposolubili* che possono superare per *diffusione nella "matrice" fosfolipidica* la membrana della cellula bersaglio. Generalmente i recettori intracellulari esplicano la loro azione regolando direttamente svariati processi di *trascrizione genica* che presiedono alla sintesi di nuove proteine (strutturali o enzimatiche), quindi sono capaci di modificare profondamente le funzioni cellulari in tutti i loro aspetti;

2) i *recettori membranali* (o di *superficie*), riservati ai messaggeri extracellulari *idrosolubili* i quali, per le dimensioni e le caratteristiche delle loro molecole, non possono superare per semplice diffusione la membrana della cellula bersaglio. Il gruppo dei recettori di superficie, per i quali è particolarmente evidente la capacità di "trasdurre" i segnali extracellulari in segnali intracellulari ricchi di significato informativo per la cellula bersaglio, comprende la maggior parte dei recettori chimici.

(*) con costanti di affinità (K_a) superiori a 10^8 M/l.

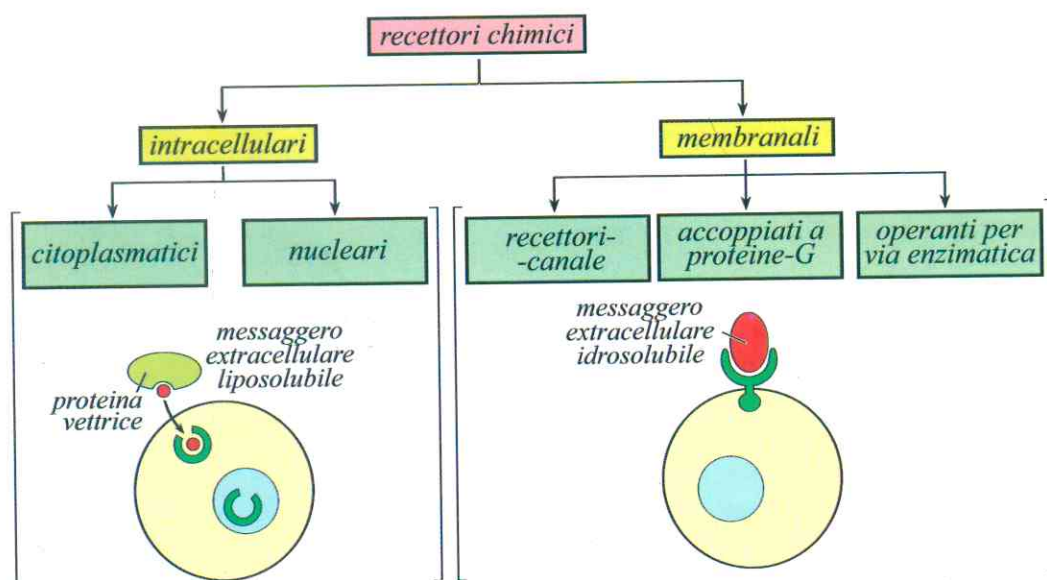


Fig. 6.1 - Classificazione dei recettori chimici. Si noti che i messaggeri extracellulari liposolubili, attivi sui recettori intracellulari, non si trovano disciolti in forma libera nel sangue e nel liquido interstiziale, ma sono legati a "vettori" proteici da cui si dissociano prima di entrare nella cellula bersaglio.

I recettori intracellulari

Le molecole dei messaggeri liposolubili (spesso di natura *aromatica*) sono veicolate fino alle cellule bersaglio dai liquidi circolanti (sangue, emolinfa), legate a speciali *proteine vettrici* per formare complessi idrofili. Per raggiungere i recettori intracellulari, le molecole liposolubili vengono separate dalla "proteina vettrice" ed attraversano, in forma idrofobica, la membrana della cellula bersaglio.

Sia che si trovino nel citoplasma o nel nucleo, i recettori intracellulari, una volta che siano stati attivati dallo specifico ligando, accedono al DNA nucleare, sul quale operano come *fattori di trascrizione* (Vol. I, pag. 40). Essi infatti facilitano o inibiscono, a seconda dei casi, la trascrizione di particolari geni, quindi la *sintesi di nuove proteine*, strutturali o enzimatiche. Regolando l'espressione dell'informazione genica, essi possono modificare le funzioni vitali in tutti i loro aspetti, fino a cambiare pro-

fondamento (*) il fenotipo della cellula bersaglio.

La classe dei recettori intracellulari comprende proteine che presentano forti analogie strutturali e funzionali, tanto da far ritenere che i geni che le codificano siano evoluti da un gene ancestrale comune. Si distinguono:

a) i *recettori intracellulari del tipo I*, che sono disposti *nel citoplasma* e sono specifici per gli *ormoni steroidei*. Fanno parte di questo gruppo i recettori per i *glicocorticoidi* (ad esempio il *recettore CORT* per il cortisolo), per i *mineral-corticoidi* (ad esempio il *recettore ALDO* per l'aldosterone), e per gli *ormoni sessuali* (androgeni, estrogeni e progesterone) (2*);

b) i *recettori intracellulari del tipo II*, che sono disposti *nel nucleo* e comprendono i recettori per gli *ormoni tiroidei* (tri-iodotironina T3 e tiroxina T4), quelli per le vitamine D ed A (*vitamine liposolubili*) e quelli per l'*acido retinoico*: un derivato della Vitamina A che interviene in vario modo nella differenziazione cellulare.

La molecola dei recettori intracellulari (Fig. 6.2) comprende tre domini fondamentali:

1) un *dominio recettoriale* ("ligand binding domain", lipofilo), situato al lato C-terminale della

(*) soprattutto nella vita fetale.

(2*) Alcuni classificano a parte i recettori per gli estrogeni, indicandoli come *recettori intracellulari del tipo III*.

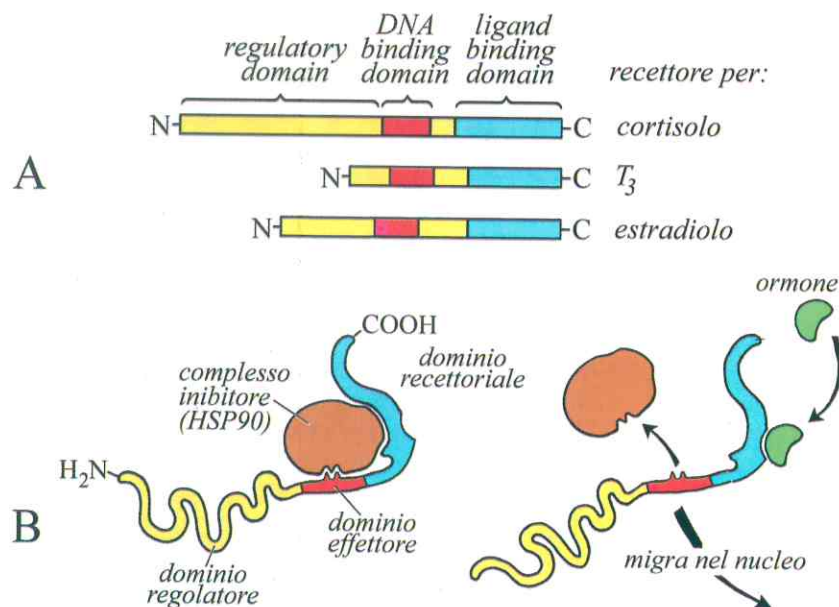


Fig. 6.2 - A: successione di domini nella catena polipeptidica in tre esempi di recettori intracellulari. B: attivazione dei recettori intracellulari del tipo I (citoplasmatici e dotati del complesso inibitore HSP90).

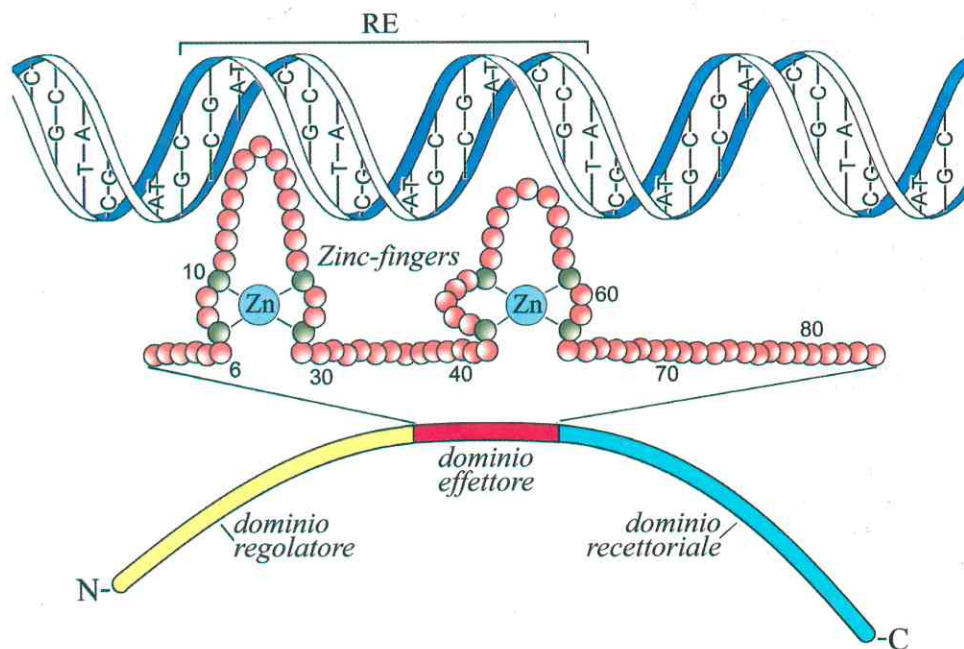


Fig. 6.3 – Le Zinc-fingers sono formate, nel dominio effettore dei recettori intracellulari, dal legame covalente tra un atomo di Zn e 4 cisteine (o una coppia di cisteine ed una coppia di istidine, in verde). Le Zinc-fingers riconoscono, nella doppia elica di DNA, l'elemento di risposta (RE) all'ormone.

catena polipeptidica e predisposto per il legame con la molecola di ciascun ligando;

2) un breve *dominio effettore* ("DNA binding domain"), che occupa la parte centrale della catena polipeptidica. Esso è strutturato in modo da specificare l' "indirizzo" dei complessi ormone-recettore, cioè della particolare sequenza di DNA nucleare la cui trascrizione, come richiesto dall'ormone, dev'essere facilitata o inibita;

3) un *dominio regolatore* ("regulatory domain", idrofilo), tramite il quale può essere modificata l'affinità del recettore per il ligando e dove, se richiesto, può agire il "segnale" che i recettori si uniscano in dimeri.

Modalità operative - Le molecole dei *recettori del primo tipo* (ad esempio i recettori per il cortisolo, il testosterone, il progesterone o l'estradiolo), in assenza del legame con l'ormone, sono mantenute inattive nel citoplasma (Fig. 6.2/B) perchè vincolate ad un *complesso inibitore* denominato *Hsp 90* (*). Quando però la molecola ormonale occupa il domi-

nio recettoriale, il complesso inibitore si distacca e ciò attiva il recettore, rendendo disponibili i siti di legame per il DNA del dominio effettore.

L'insieme recettore+ormone migra allora nel nucleo, affinché possa legarsi a specifiche sequenze di DNA denominate "*elementi di risposta all'ormone*" (HRE: "*Hormone Responsive Elements*"). Sebbene esistano diversità tra i diversi ormoni, gli HRE risiedono sempre nella *regione promoter* (Vol. I, pag. 37), quindi "a monte" del gene che presiede alla sintesi delle proteine richiesta dal messaggio ormonale.

Come mostra la Fig. 6.3, l'esatto "accoppiamento" tra ogni recettore attivato dal suo ligando e l'elemento di risposta nel DNA è assicurato dalla presenza, nel suo dominio effettore, di almeno un "motivo" di circa 80 aminoacidi (spesso replicato), nel quale sono presenti due strette ripiegature, ciascuna creata da un atomo di Zn legato con 4 residui di cisteina. Le ripiegature, per il loro aspetto, sono denominate "*dita di Zinco*" (Zinc-fingers) e possono insinuarsi nel "solco" della doppia elica di DNA in modo da raggiungere le basi nucleotidiche che costituiscono il bersaglio molecolare di ciascun tipo di recettore intracellulare attivato. Alla coppia di "dita di Zinco" di ciascun recettore infatti fa riscontro, nel-

(*) Si tratta di una proteina del gruppo delle *chaperonine*, che viene chiamata *Hsp* (*Heath shock protein*) perchè si libera in grande quantità nelle cellule sottoposte a *shock termico*.

l'elemento di risposta, una coppia di "sequenze di consenso", ognuna formata dalla successione di almeno 6 basi, che verranno riconosciute dalle "dita" per il loro codice (a), per la loro distanza (b) e per il loro orientamento (c) nella doppia elica.

Il modo di operare dei recettori del secondo tipo (per gli ormoni tiroidei, le vitamine A e D e l'acido retinoico) è simile a quello appena descritto, anche se sono ubicati nel nucleo delle cellule bersaglio (*). Anche in questo caso, una volta esposto e reso attivo, il dominio-effettore del recettore modifica la trascrizione di particolari elementi di risposta tramite "dita di Zinco".

Di notevole interesse, anche applicativo, è l'osservazione che la maggior parte dei recettori intracellulari, per poter agire sugli elementi di risposta, non solo devono essere attivati dal ligando, ma devono anche trovarsi nella forma di dimeri. Molto spesso i dimeri sono formati da due molecole uguali (omodimeri), ma nel caso dei recettori del secondo tipo possono anche essere formati da due molecole diverse (eterodimeri, ad esempio un recettore per un ormone tiroideo ed un recettore per l'acido retinoico). E' evidente che nel primo caso l'espressione dell'informazione genica sarà regolata da un solo ligando; se invece gli elementi di risposta sono predisposti a legare i recettori nella forma di eterodimeri, l'azione di un ligando sarà condizionata dalla presenza dell'altro, che eserciterà su di esso un'azione permissiva.

Le risposte delle cellule bersaglio all'attivazione dei recettori intracellulari si sviluppano spesso in due fasi successive: una risposta primaria, che si manifesta nel giro di 20-30 minuti e consiste nella trascrizione di un numero ristretto di geni; ed una risposta secondaria o ritardata, che consiste nell'induzione (o nella repressione) della trascrizione di molti (a volte moltissimi) geni da parte dei prodotti della risposta primaria. In tal modo, esplicando un'azione "moltiplicativa" della trascrizione, una piccola molecola a carattere ormonale è in grado di modificare molto profondamente il quadro dell'espressione

ne genica della cellula bersaglio.

(*) E' quindi certo che i rispettivi ligandi, una volta superata la membrana cellulare, devono migrare fino nel nucleo prima di legarsi al proprio recettore.

Recettori per gli ormoni tiroidei sono anche presenti nei mitocondri, dove regolano l'espressione del DNA mitocondriale.

I recettori membranali (di superficie)

Un gran numero di messaggeri extracellulari idrosolubili (ad esempio i neurotrasmettitori sinaptici, gli ormoni proteici e molti fattori di crescita) esplicano la loro azione legandosi a recettori chimici che sono *proteine intrinseche* della membrana plasmatica delle cellule bersaglio. Per poter svolgere la propria funzione recettoriale e promotrice della risposta cellulare, la molecola di un recettore membranale deve comprendere sempre almeno due "domini":

a) un *dominio recettoriale*, che presenta uno o più "siti" di legame, strutturati in modo atto a combinarsi con la molecola del messaggero extracellulare;

b) un *dominio effettore* che, attivato dalla formazione del complesso messaggero-recettore, innescava la risposta cellulare. Ciò comporta una modificazione strutturale della molecola del recettore, che ha *carattere allosterico* (*).

Come già indicato nello schema di Fig. 6.1, esistono tre classi di recettori membranali, che differiscono sia per la struttura molecolare che per il modo prevalente con cui essi inducono la risposta cellulare:

a) la classe dei *recettori-canali ionici* (Fig. 6.4/A), brevemente detti *recettori-canale*. Questi recettori, quando siano attivati dal messaggero extracellulare, aprono nella loro molecola un "condotto" transmembranario che consente il transito di ioni. In tal modo, essi modificano direttamente le *conduttanze ioniche* della membrana in cui si trovano, determinando una pronta variazione del potenziale di membrana; essi appartengono quindi alla classe dei *canali ionici chemio-dipendenti* (pag. 30). Questa variazione del potenziale di membrana può esaurirsi in un semplice *messaggio elettrico* trasmesso alla cellula bersaglio oppure, quando sia associata all'ingresso nella cellula di ioni Ca^{2+} , può evocare o regolare i numerosi *processi Ca-dipendenti* intracel-

lulari in cui spesso consiste la risposta al messaggero extracellulare (Tab. 6.6);

b) la classe dei *recettori operanti per proteine-G e secondi messaggeri* (Fig. 6.4/B). Questi recettori, per intermediazione di una *proteina-G trimetrica* (^{2*}), attivano un enzima di membrana (E) che sintetizza un *secondo messaggero* (intendendosi per "primo messaggero" il ligando extracellulare); questo a sua volta darà inizio agli eventi molecolari che culminano nella risposta della cellula bersaglio. Si tratta di una classe di recettori membranali molto ampia, che può controllare una molteplicità di funzioni cellulari;

c) la classe dei *recettori operanti per via enzimatica* (Fig. 6.4/C). Questi recettori sono essi stessi capaci di dare inizio, direttamente (E) o indirettamente (E'), ad una catena di attivazioni enzimatiche più o meno complessa che alla fine produrrà la risposta della cellula bersaglio. Anche in questo caso, si tratta di una classe di recettori che controllano un amplissimo ventaglio di risposte, molte delle quali richiedono la *regolazione della trascrizione genica*.

Dal confronto delle tre classi di recettori ora descritte, appare subito evidente che i recettori-canale ionico, per la semplicità del loro meccanismo, sono i più *veloci e pronti* nell'evocare la risposta della cellula bersaglio, che però si diversifica solo quando mutino il tipo del messaggero extracellulare e del rispettivo recettore. Molto più ampia è invece la *versatilità operativa* dei recettori delle altre due classi, nei quali la facoltà di dirigere la trasduzione del segnale verso un ampio ventaglio di "bersagli" molecolari tramite "catene" di attivazioni intracellulari più o meno complesse ed articolate, fa sì che anche l'attivazione di un solo tipo di recettore possa evocare *risposte molto differenziate* ed adeguate alle mutevoli richieste della vita cellulare.

Nelle catene intracellulari delle attivazioni iniziate da queste due ultime classi di recettori, hanno particolare importanza le *proteine-chinasi*: un'ampia famiglia di *proteine enzimatiche fosforilanti*, destinate primariamente a portare in attività le proteine-bersaglio attuatrici delle varie risposte cellulari. Le più note *proteine-chinasi* sono: la *proteine-chinasi-A*

(*) Si ricorderà che Monod ha proposto di chiamare "allosteriche" le molecole proteiche che modificano la loro struttura e la loro attività per azione di una molecola regolatrice (in questo caso il messaggero extracellulare).

(^{2*}) Tra le numerose proteine cui è affidata la trasduzione del segnale all'interno della cellula, le *proteine-G trimetriche* (pag. 204) sono le prime di cui si parla. Ne incontreremo molte altre.

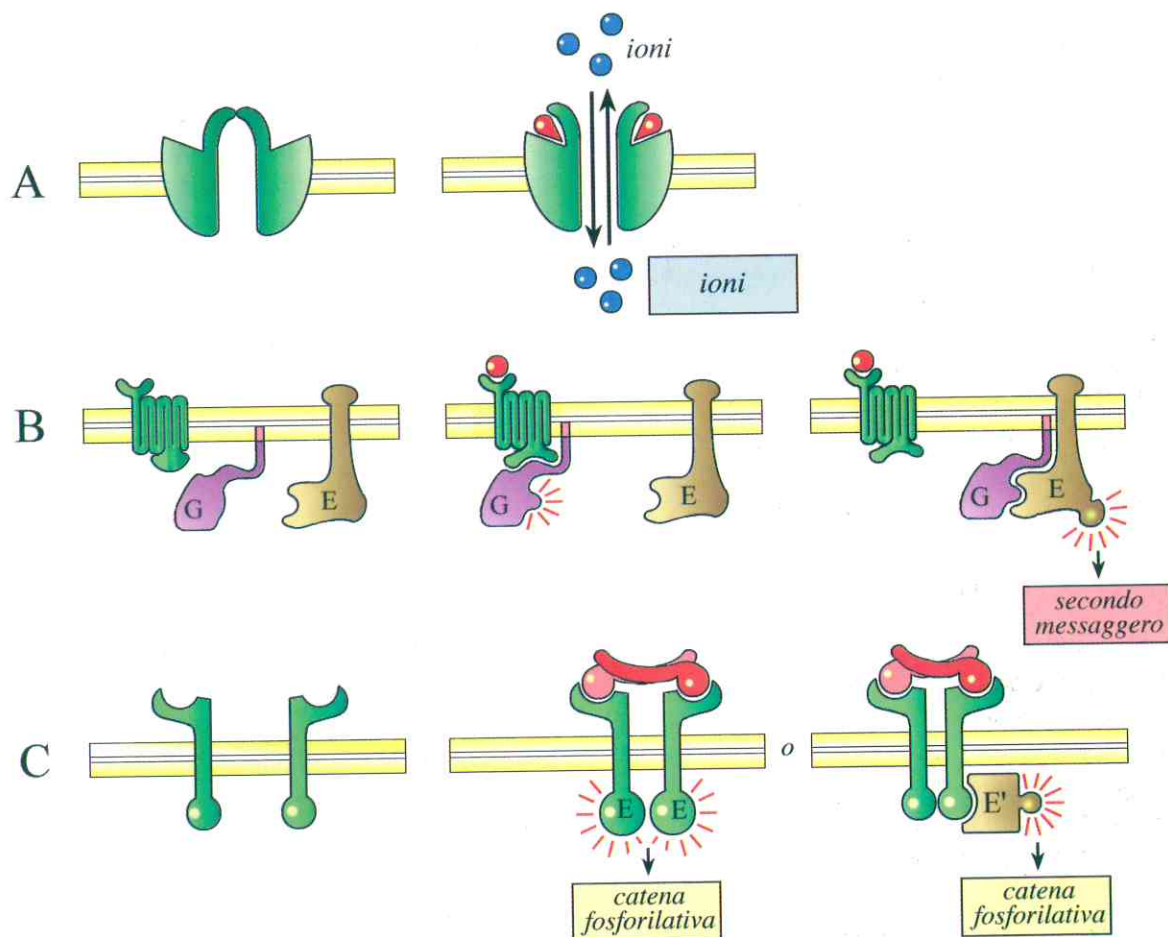


Fig. 6.4 - Rappresentazione schematica dei tre tipi di recettori membranali e del loro prevalente modo di operare. A: recettori-canale. B: recettori operanti per proteine-G trimeriche e secondi messaggeri. C: recettori operanti (direttamente o indirettamente) per via enzimatica.

(PKA), la *protein-chinasi-C* (PKC), la *protein-chinasi-G* (PKG), le *MAP-chinasi* nonché le *protein-chinasi Calmodulina-dipendenti* (CaM-chinasi). Della loro funzione si parlerà adeguatamente in successivi paragrafi.

I recettori-canale - La molecola di questi recettori presenta una *porzione recettrice*, esposta al lato extracellulare della membrana e dotata da uno o più *siti di legame* per la molecola del messaggero, ed una *porzione effettrice* costituita da un *canale ionico*, che attraversa tutto lo spessore della membrana.

Il canale possiede una "gate" (pag. 27), che ne controlla lo stato di apertura o di chiusura, ed è provvisto di un "filtro di selettività" (pag. 25), che lo rende permeabile solo a determinate specie ioniche. Lo stato (aperto o chiuso) in cui viene portato il recettore-canale dal legame con il messaggero extracellulare, ammette o preclude il transito degli ioni per esso specifici, determinando così una variazione del potenziale di membrana.

Tipici recettori-canale si ritrovano nelle *sinapsi chimiche* delle cellule nervose e muscolari, dove sono attivati dai rispettivi *neurotrasmettitori* (Vol. III). I tre tipi di recettori-canale meglio conosciuti, ven-

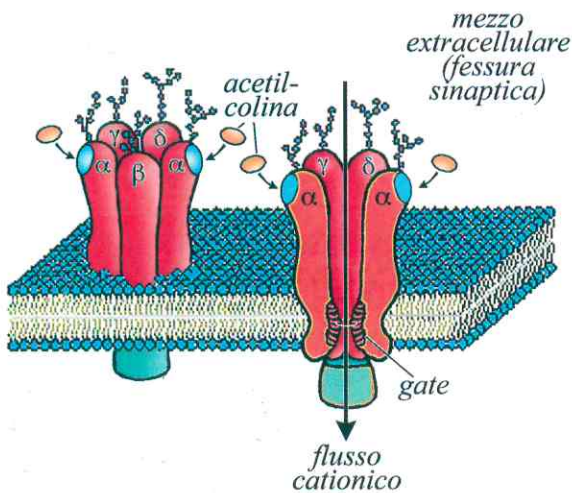


Fig. 6.5 - Organizzazione molecolare del recettore-canale "nicotinico" per l'acetilcolina.

gono qui solo elencati perchè saranno oggetto di un'estesa trattazione in altri capitoli, ai quali si rinvia il lettore:

a) i *recettori per l'acetilcolina di tipo nicotinico* (Fig. 6.5), alla cui attivazione è affidata la trasmissione sinaptica neuro-muscolare nei muscoli scheletrici, ma anche in sinapsi interneuroniche del sistema nervoso centrale, nonché in tutte le sinapsi gangliari del sistema nervoso vegetativo. Il canale ionico che essi costituiscono è relativamente poco selettivo, perchè percorribile dalla maggior parte dei cationi (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) presenti nei liquidi fisiologici. Sono i recettori di cui è nota da maggior tempo la struttura molecolare;

b) i *recettori per l'acido glutamico*, che pure mediano la trasmissione in numerosissime sinapsi interneuroniche eccitatorie dei centri encefalici ed anche in molte sinapsi cito-neurali degli organi di senso. La struttura molecolare di questi recettori, che si presentano in molti tipi diversi, è meno conosciuta;

c) i *recettori per l'acido γ -amino-butyrico (GABA)*, che invece operano in sinapsi interneuroniche inibitorie del sistema nervoso centrale ed nelle sinapsi neuro-muscolari di certi Invertebrati. Anche i recettori-GABA si presentano in tipi diversi, di cui uno solo (il GABA_A) ha carattere di canale

ionico selettivamente permeabile agli ioni Cl^- .

I recettori operanti per proteine-G trimeriche e secondi messaggeri - Si tratta di una grande classe di proteine intrinseche alla membrana plasmatica, che comprende molte centinaia di membri. La loro larga diffusione nella membrana di tutte le cellule è in accordo con la capacità che essi hanno, grazie alla versatile mediazione di secondi messaggeri, di attivare (o di inibire) una grande varietà di processi intracellulari.

La sequenza di eventi intracellulari che fa seguito all'attivazione di questi recettori inizia con la produzione di un secondo messaggero e prosegue con l'attivazione seriale di una catena di proteine enzi-

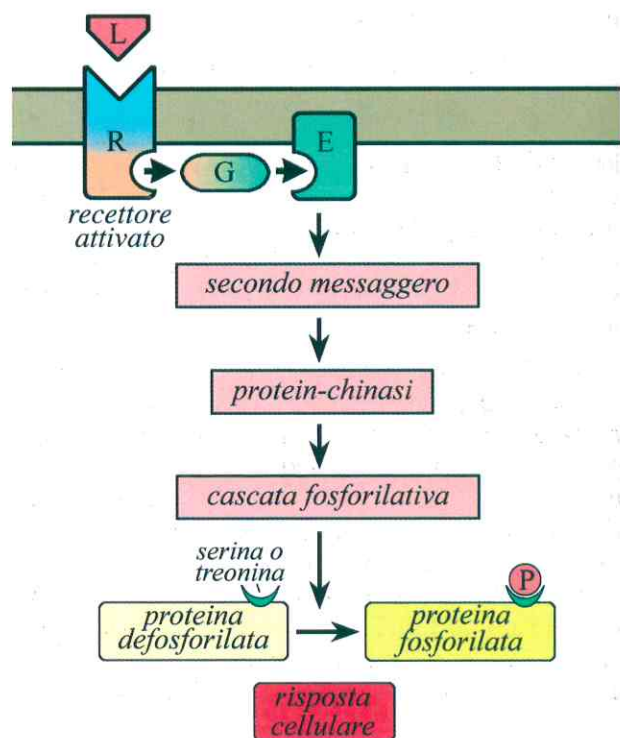


Fig. 6.6 - Schema della sequenza di eventi innescata dal legame di un messaggero extracellulare (L) con un recettore (R) accoppiato a proteina-G trimerica (G). E: enzima che produce (o libera) il secondo messaggero. Il secondo messaggero può entrare in vario modo nelle catene di trasduzione del segnale che portano alla risposta finale della cellula; qui si immagina che la risposta sia sostenuta dall'attivazione di una protein-chinasi e dalla fosforilazione di una proteina bersaglio.

matiche denominate globalmente "proteine segnale" in quanto vettrici di un segnale destinato alle "proteine-bersaglio": le proteine operatrici della risposta cellulare.

Essa può essere così riassunta (Fig. 6.6):

1) il recettore (*R*), attivato dal messaggero extracellulare (*L*), comunica il segnale ad una proteina-G trimerica (*G*) la quale, operando come una "navetta", trasferisce l'attivazione all'enzima (*E*) produttore del secondo messaggero (*). Nel più comune dei casi, l'enzima su cui agisce la proteina-G trimerica è una *adenil-ciclastasi* ed il secondo messaggero che viene prodotto è l'*adenosin-monofosfato ciclico* (AMPc, pag. 186); spesso però l'enzima è una *fosfolipasi*, che porta alla formazione di due secondi messaggeri (pag. 191): l'*inositolo-trifosfato* (IP₃) ed il *diacilglicerolo* (DAG) (2*);

2) in alcuni casi, i secondi messaggeri sono capaci di attivare *direttamente* canali ionici o di aumentare la concentrazione intracellulare degli ioni Ca²⁺ (non illustrato in Fig. 6.6). Molto più frequentemente, tuttavia, essi attivano una *protein-chinasi* (pag. 200), che diviene capace di rendere operative (direttamente o indirettamente, ma sempre *per via fosforilativa*), le proteine-bersaglio attuatrici della risposta cellulare.

Tra i messaggeri extracellulari che attivano recettori accoppiati a proteine-G trimeriche, figurano numerosi *ormoni* (ad es. l'adrenalina e l'ormone paratiroideo), vari *neurotrasmettitori* (ad es. la noradrenalina e la dopamina), molti *fattori locali* (ad es. l'istamina) nonché, nell'ambito sensoriale, le *sostanze olfattive e gustative* e gli *stimoli luminosi*.

Attivabili da uno stesso messaggero, possono esistere *numerosi sottotipi* dello stesso recettore, distinguibili farmacologicamente. Sono noti ad esempio almeno 9 recettori per l'adrenalina ed

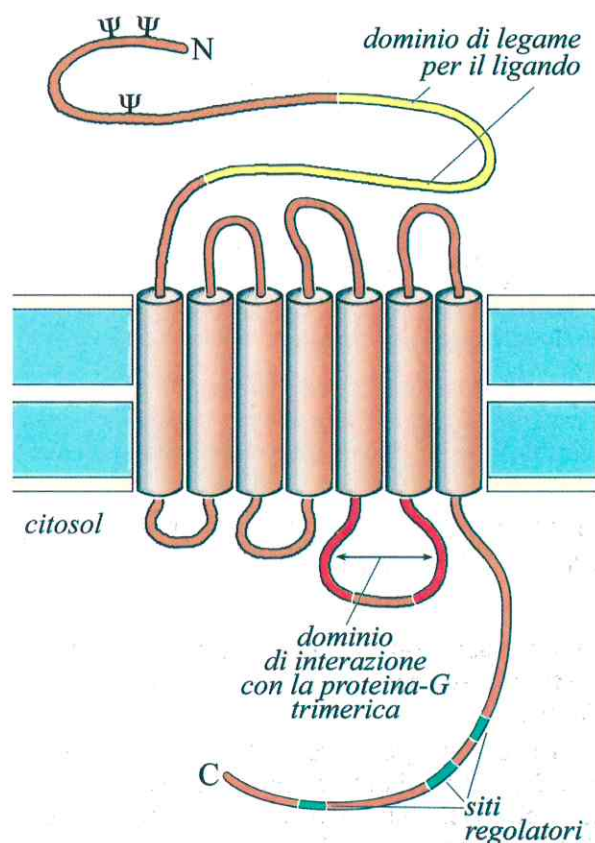


Fig. 6.7 – Rappresentazione planare di un generico recettore operante per proteina-G trimerica e secondo messaggero (uno schema della sua organizzazione tridimensionale è riportato in Vol. I, Fig. 2.8). ΨΨΨ: siti di possibile glicosilazione. La fosforilazione dei siti regolatori del terminale citosolico (in verde) può modificare la sensibilità del recettore.

almeno 5 recettori muscarinici per l'acetilcolina.

Alla grande diversificazione funzionale dei recettori di questa classe, fa riscontro una sorprendente *unitarietà strutturale* della loro molecola, che infatti è costituita da una sola catena polipeptidica a 7 *segmenti transmembrana*, da cui la denominazione alternativa di "*recettori a 7 segmenti transmembrana*" oppure, in modo più immaginifico, di *recettori "serpentine"*.

Struttura molecolare dei recettori a 7 segmenti transmembrana - I 7 segmenti idrofobici transmembrana dei recettori "serpentine" (ognuno

(*) Si vedrà (pag. 205) che esistono due classi di proteine-G trimeriche: *eccitatorie* (es. G_s) ed *inibitorie* (es. G_i); ciò amplia notevolmente il ventaglio di risposte cellulari che possono essere controllate per la via dei recettori operanti tramite proteine-G.

(2*) Una particolare classe di enzimi membranari: le *guanil-ciclastasi*, portano alla formazione di un secondo messaggero (il GMPc) senza l'intervento di proteine-G trimeriche. Le guanil-ciclastasi appartengono alla classe dei *recettori operanti per via enzimatica*.

di 22-28 aminoacidi), sono connessi da 6 anse (Fig. 6.7): 3 extracellulari e 3 intracellulari; la terza ansa intracellulare contiene il *dominio di interazione con la proteina-G trimerica*.

L'estremità N-terminale della catena polipeptidica si sviluppa nell'ambiente extracellulare e contiene, oltre a diversi "siti" di possibile glicosilazione, il *dominio recettoriale* contenente i *siti di legame* per il messaggero extracellulare (*).

L'estremità C-terminale si estende nel citosol, e contiene diversi *siti regolatori*.

La struttura molecolare dei recettori a 7 segmenti transmembranari è *largamente conservata* in tutti i viventi, e la si ritrova anche in molte proteine di membrana non destinate ad interagire con le proteine-G trimeriche. Ne è un esempio la *batteriorodopsina*: una pompa protonica che conferisce luminescenza ad alcune specie batteriche (2*). Nei Vertebrati, anche i *chemiocettori gustativi* ed *olfattivi* sono recettori a 7 segmenti transmembranari.

La somiglianza molecolare di recettori che svolgono funzioni così diverse fa pensare che essi siano evoluti da proteine ancestrali di organismi unicellulari (nei quali tuttora esse svolgono *funzioni sensoriali*), conservandone la matrice molecolare anche quando abbiano assunto il compito della trasduzione dei messaggi extracellulari.

I recettori operanti per via enzimatica — I recettori operanti per via enzimatica sono proteine membranali intrinseche, che presentano tutte un *dominio recettoriale* (che sporge al lato extracellulare come un lungo pennacchio) ed un *dominio effettore* (che sporge al lato intracellulare); i due domini sono connessi da un *singolo segmento transmembranario*.

In questi recettori, a differenza di quanto accade nei recettori a 7 segmenti transmembranari, il dominio effettore ha già in sé il carattere di *enzima*, e può attivare direttamente una proteina-bersaglio *senza*

l'intermediazione di proteine-G trimeriche. Nella maggior parte dei casi, il dominio effettore comprende una porzione enzimatica con carattere di *proteina-chinasi* (3*), capace di fosforilare le proteine-bersaglio su residui di *tirosina* (4*). I recettori che presentano queste caratteristiche, chiamati perciò *recettori tirosin-chinasi* e brevemente indicati dalla sigla *RTK*, sono nettamente più numerosi degli altri, tanto da essere considerati i prototipi dell'intera classe e di meritare una descrizione particolare.

I recettori tirosin-chinasi (RTK) — Come mostra la Fig. 6.8/A, i recettori tirosin-chinasi costituiscono una famiglia di proteine suddivisa in diverse "sottofamiglie", nelle quali la specificità per il rispettivo ligando è definita da vistose differenze strutturali del dominio recettoriale. La popolazione dei ligandi è molto eterogenea: vi si trovano *ormoni* come l'*insulina*, *messaggeri locali* come il *fattore di crescita dell'epidermide* (EGF) o il *fattore di crescita del sistema nervoso* (NGF), e proteine che intervengono nei processi infiammatori, note come *citochine*.

La famiglia comprende anche non pochi *recettori non-enzima* (o *recettori associati ad enzima*, Fig. 6.8/B), il cui dominio effettore non possiede di per sé un'attività tirosin-chinasica, ma può facilmente acquisirla associandosi ad una *tirosin-chinasi solubile* libera nel citosol, detta dal canto suo *tirosin-chinasi-non-recettore*: *NRTK*. Legandosi alle code citosoliche dei recettori, queste tirosin-chinasi solubili (codificate da geni separati) ne completano la funzione, fornendo loro i "siti" tirosin-chinasici che li rendono funzionalmente identici ai recettori-enzima.

Coerentemente con l'eterogeneo carattere dei possibili ligandi, le risposte delle cellule bersaglio all'attivazione dei recettori tirosin-chinasi possono riguardare svariati aspetti delle funzioni di base della cellula, come il *metabolismo*, la *moltiplicazione*, la *crescita* e la *differenziazione*. Non deve quindi sorprendere se la mutazione di un gene codificante per un recettore tirosin-chinasi si trova spesso associata alla *trasformazione degenerativa* o

(*) Al riconoscimento delle molecole messaggere (soprattutto se di piccola dimensione, come ad esempio quelle dell'adrenalina), partecipano spesso anche le porzioni più esterne dei segmenti transmembranari (in particolare il VII). In questi casi il dominio recettoriale è parzialmente affondato nella membrana.

(2*) La batteriorodopsina è stato il primo membro della classe a rivelare la sua struttura tridimensionale.

(3*) Ma può anche essere un *enzima defosforilante* con carattere di *fosfatasi*.

(4*) In qualche caso, tuttavia, le proteine-bersaglio vengono fosforilate su residui di *serina* o *treonina*. Il dominio effettore ha allora il carattere di una *serina/treonin-chinasi*.

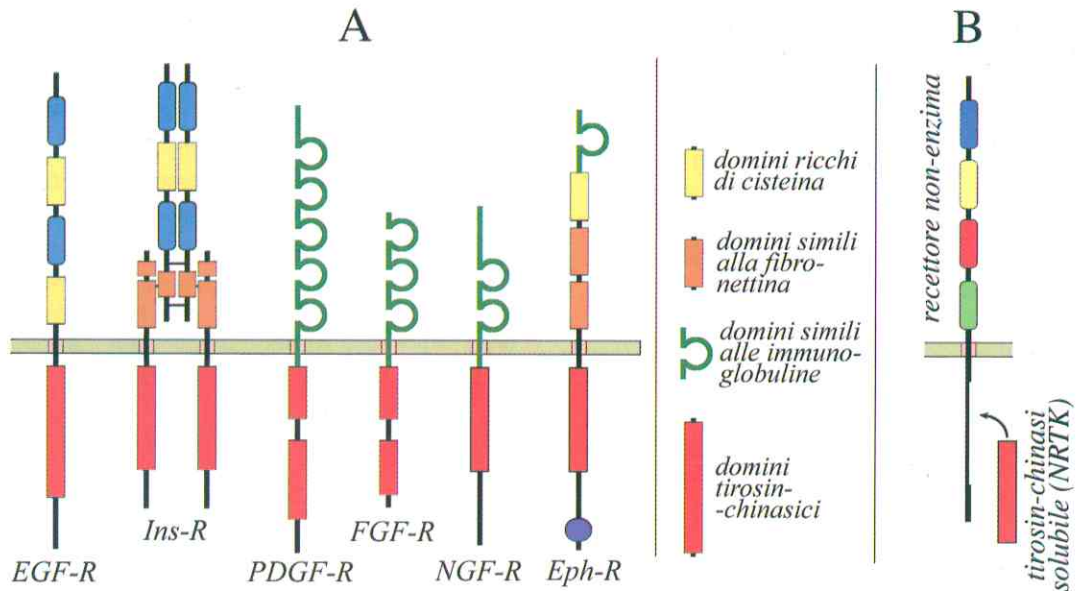


Fig. 6.8 – A: le molecole dei recettori tirosin-chinasi sono proteine a singolo segmento transmembranario, costituite da un migliaio di aminoacidi; la struttura dei loro domini recettoriali è molto diversificata. *EGF-R*: recettore per il fattore di crescita dell'epidermide, *Ins-R*: recettore per l'insulina, *PDGF-R*: recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine, *FGF-R*: recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti; *NGF-R*: recettore per il fattore di crescita nervoso; *Eph-R*: recettore per le efrine. B: struttura molecolare di un generico recettore non-enzima (un recettore-non-tirosin-chinasi) che si associa ad una tirosin-chinasi solubile (NRTK).

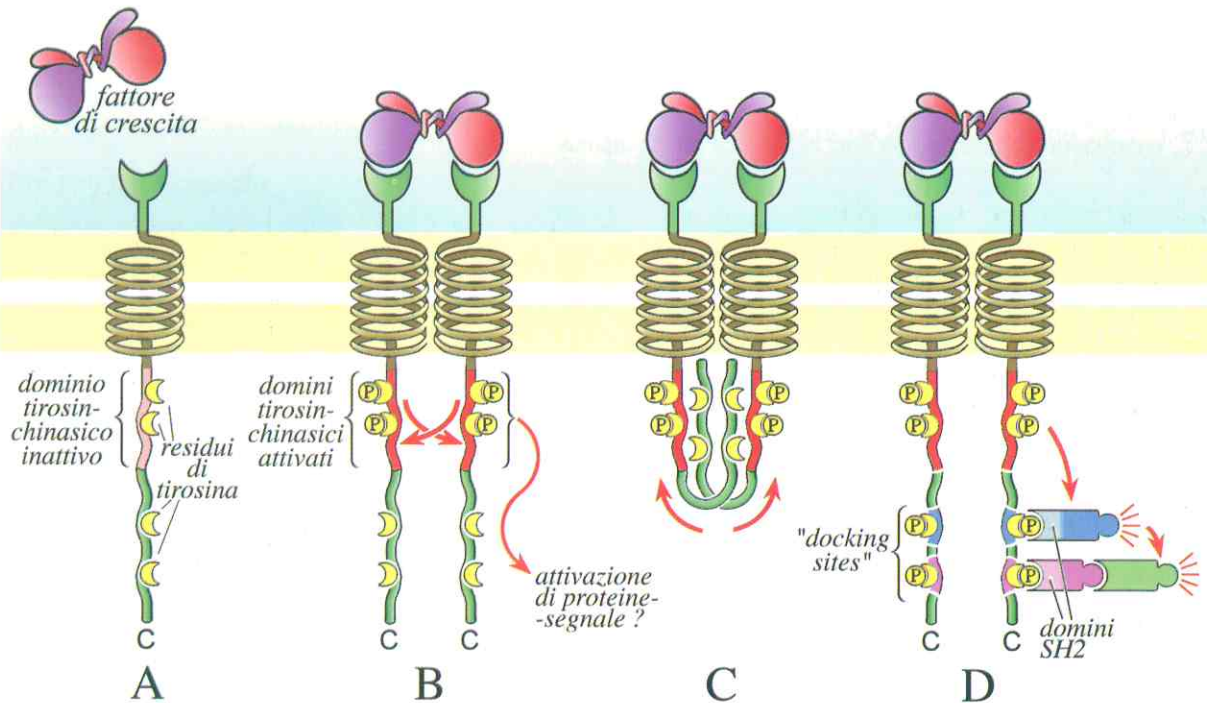


Fig. 6.9 – A: recettore tirosin-chinasi (s'immagina che si tratti di un recettore per un fattore di crescita, ad esempio l'EGF), rappresentato in forma monomerica; B: il legame col fattore di crescita determina la dimerizzazione e l'autofosforilazione crociata dei domini tirosin-chinasici; C: fosforilazioni di residui tirosinici situati al di fuori dei domini tirosin-chinasici; D: attracco ai "docking sites" di proteine-segnale dotate di un dominio SH2 e loro fosforilazione in cascata.

anche *neoplastica* di un ceppo cellulare.

Caratteristica comune ai recettori tirosin-chinasi (come a tutti i recettori operanti per via enzimatica) è la necessità, per divenire operativi, di unirsi in forma di *dimeri* (*omodimeri*, Fig. 6.9). Anche se in alcuni casi la struttura dimerica del recettore preesiste nella forma inattiva (*), di regola la dimerizzazione è *indotta* dal legame del messaggero extracellulare, che molto spesso è anch'esso un dimero.

La necessità della dimerizzazione si spiega perché la prima tappa dell'attivazione del dimero (Fig. 6.9/B) è una *autofosforilazione crociata* tra i suoi domini effettori (^{2*}), che si estende ben presto a residui tirosinici delle "code" situati al di fuori dei domini chinasi (Fig. 6.9/C).

Si creano così, su ogni coda citosolica degli RTK, 5-7 "punti di attracco" (*docking sites*) per altrettante proteine-segnales fosforilabili, caratterizzate dal possedere un particolare "dominio di ancoraggio" denominato *SH2* ("*Src homology domain*" ^{3*}). Molte di queste proteine sono anch'esse enzimi (tirosin-chinasi, fosfatasi o fosfolipasi), che dopo l'attracco verranno fosforilati, o dai domini chinasi degli RTK o da una tirosin-chinasi già legata ai "docking sites". Altre non sono enzimi (Fig. 6.9/D), ma *proteine adattatrici* ("*adapters*") che consentono l'attracco (^{4*}) ad enzimi destinati ad essere fosforilati dagli RTK pur non essendo dotati di un dominio *SH2*.

Volendo dare un'interpretazione finalistica alla complessità operativa dei recettori tirosin-chinasi, essa sembra intesa ad aumentare sia la velocità che la precisione in una catena di fosforilazioni multiple.

(*) ne è un tipico esempio il recettore per l'insulina.

(^{2*}) senza la quale sarebbe difficile immaginare come l'attivazione del dominio recettoriale, tramite la compagine di un singolo segmento transmembranario, possa trasferirsi al dominio effettore.

(^{3*}) da *Src* (pronuncia "sarc"): il nome della prima proteina-segnales che è stata riconosciuta capace di ancorarsi alle code citosoliche di recettori tirosin-chinasi. Il dominio *SH2* è caratterizzato da due siti distinti: uno sempre uguale, che riconosce la fosfo-tirosina, l'altro specifico, che riconosce la particolare sequenza aminoacidica che fiancheggia la fosfo-tirosina.

(^{4*}) Tramite un particolare dominio detto *SH3*, che serve ad agganciare (in un dominio complementare ricco di *prolina*) proteine-segnales sprovviste di dominio *SH2*.

Infatti, l'ordinamento lineare delle code citosoliche dei recettori permette di predisporre precise sequenze di proteine-segnales, che verranno attivate tutte assieme *in un colpo solo*, come se fossero già pronte e *disponibili in uno "scaffale"* (^{5*}). Un altro vantaggio di predisporre un certo numero di proteine-segnales l'una accanto all'altra, quindi di facilitarne l'interazione seriale, viene dalla drastica riduzione dei gradi di libertà che esse avrebbero se fossero libere di agire in modo casuale su numerosi possibili substrati vaganti nel citosol. In tal modo il "comando" portato dal messaggero, anziché perdersi in direzioni che potrebbero essere inutili o indesiderate, viene subito "incanalato" verso il suo obiettivo.

Un'esemplificazione dei numerosi messaggeri extracellulari che operano mediante recettori-tirosin-chinasi è contenuta nelle Tab. 6.1 e 6.2. Per le risposte evocate dai diversi messaggeri, si rinvia ad altri capitoli (Vol. III).

(^{5*}) Da qui la denominazione di "*scaffali molecolari*" (*scaffolding domains*) che viene attribuita ai domini effettori dei recettori tirosin-chinasi. Gli "scaffolding domains" sono anche presenti in diverse proteine (solubili) della rete di segnalazione intracellulare, che pure hanno la funzione di legare assieme più proteine-segnales in un unico complesso funzionale, e spesso di tenerlo vincolato in una posizione strategica.

TRASDUZIONE DEI SEGNALI CHIMICI

Tab.6.1 – Elenco dei più noti ligandi che agiscono tramite recettori tirosin-chinasi (*insulina e fattori di crescita*).

<i>messaggero extracellulare</i>	<i>sigla</i>	<i>risposta principale</i>
<i>Insulina</i>	Ins	stimola l'utilizzo dei carboidrati e la sintesi proteica
<i>Fattore di crescita simile all'insulina</i>	IGF1, IGF2	stimola la crescita e la sopravvivenza delle cellule
<i>Fattore di crescita dell'epidermide</i>	EGF	stimola la proliferazione di molti tipi di cellule
<i>Fattore di crescita nervoso</i>	NGF	stimola la sopravvivenza e la crescita di particolari neuroni
<i>Fattore di crescita derivato dalle piastrine</i>	PDGF	stimola la sopravvivenza, la crescita e la proliferazione di molti tipi di cellule
<i>Fattore di crescita dei fibroblasti</i>	FGF1-FGF24	stimola la proliferazione di molti tipi di cellule; inibisce la differenziazione di alcuni tipi di cellule
<i>Fattore di crescita vascolare endoteliale</i>	VEGF	stimola l'angiogenesi
<i>Efrine</i>	EphA, EphB	stimolano l'angiogenesi; guidano la migrazione cellulare e lo sviluppo delle fibre nervose

Tab. 6.2 - Elenco dei più noti ligandi che agiscono tramite recettori *associati a* tirosin-chinasi (*ormoni e citochine*).

<i>messaggero extracellulare</i>	<i>risposta principale</i>
<u><i>Ormoni:</i></u>	
<i>Prolattina</i>	stimola la secrezione del latte nella ghiandola mammaria
<i>Ormone della crescita</i>	stimola la crescita corporea inducendo la produzione di IGF-1
<i>Eritropoietina</i>	stimola l'eritropoiesi nel midollo osseo
<u><i>Citochine:</i></u>	
<i>Interferoni</i>	aumentano le resistenze cellulari alle infezioni virali
<i>IL-3</i>	stimola l'emopoiesi
<i>GM-CSF</i>	stimola la produzione di granulociti e di macrofagi

I recettori guanil-ciclasa (guanil-ciclasa particolare o pGC) – Si tratta di una famiglia di recettori operanti per via enzimatica del tutto particolare; il loro dominio catalitico, infatti, anziché essere una protein-chinasi (o una protein-fosfatasi), è una *ciclasa* che produce il *guanil-monofosfato-ciclico* (GMPc): l'unico *secondo messaggero* che non provenga dalla "via" delle proteine-G (pag. 194).

Anche nella forma inattiva, le molecole dei recettori guanil-ciclasa sono costituite da due unità mole-

colari identiche (si tratta quindi di *omodimeri*), affiancate nella membrana plasmatica ed unite da un vincolo situato nella porzione citosolica della loro catena polipeptidica (Fig. 6.10/A).

In ogni monomero si susseguono:

a) un *dominio recettoriale*, N-terminale e ricco di cisteine, disponibile per il legame con il messaggero extracellulare. I domini recettoriali dei due monomeri affiancati formano un unico sito di legame per la molecola del messaggero extracellulare;

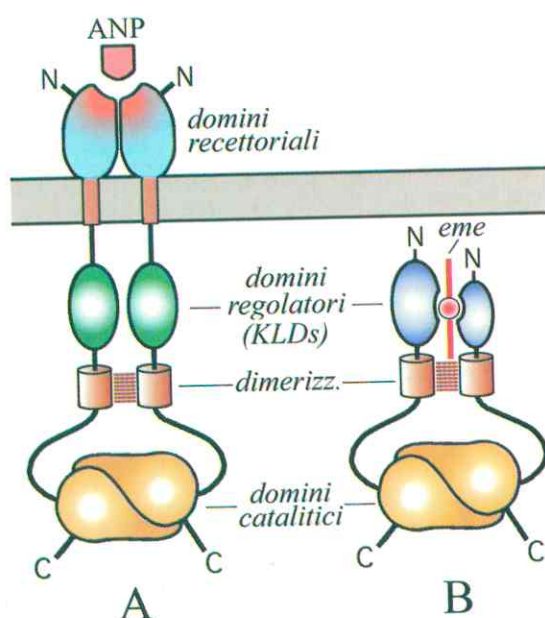


Fig. 6.10 – Organizzazione molecolare delle guanil-ciclasasi *membranali o particellari* (A) e delle guanil-ciclasasi *citosoliche o solubili* (B). ANP: peptide natriuretico atriale.

b) un *singolo segmento transmembranario* di circa 25 aminoacidi, che attraversa il doppio strato fosfolipidico della membrana;

c) un *dominio regolatore*, su cui possono agire diversi fattori di regolazione (ATP, ioni Ca^{2+} , calmoduline, protein-chinasi), capaci di stimolare o precludere l'attività dell'enzima, anche *indipendentemente dal legame del dominio recettoriale col messaggero extracellulare*. Poiché nel dominio regolatore è presente una sequenza aminoacidica tipica delle protein-chinasi, esso è anche detto "*dominio simil-chinasico*" (*kinase-like domain: KLD*);

d) un *dominio catalitico*, di forma allungata, C-terminale. In modo analogo a quanto avviene per l'adenil-ciclasa (Fig. 6.14), i domini catalitici dei due monomeri si uniscono "testa-coda" a costituire una sola unità enzimaticamente operativa che attua la sintesi del secondo messaggero GMPc a partire dal GTP.

Tra il dominio regolatore ed il dominio catalitico è stato individuato un *dominio di dimerizzazione* di circa 50 aminoacidi, che stabilisce il vincolo tra le

due unità molecolari.

I più noti messaggeri extracellulari che agiscono sui recettori guanil-ciclasa sono i *fattori natriuretici atriali* (ANP, pag. 195) prodotti dai miociti atriali del cuore, che partecipano alla regolazione della escrezione renale del Na^+ e della volemia.

Le guanil-ciclasasi solubili (sGC) – Oltre ai recettori guanil-ciclasa (detti anche *guanil-ciclasa particellari* perché visibili al microscopio elettronico), molte cellule possono esprimere una seconda forma (*citosolica*) di enzimi guanil-ciclasici: le *guanil-ciclasasi solubili*.

Le molecole delle guanil-ciclasasi citosoliche o solubili (Fig. 6.10/B) mancano dei domini recettoriali e dei segmenti transmembranari (*); anche in questo caso si tratta di *dimeri*, costituiti però da due unità molecolari diverse (α e β ; le sGC sono dunque degli *eterodimeri*). Ogni monomero contiene una sequenza aminoacidica che partecipa, combinandosi "testa-coda" con la sequenza omologa dell'altro monomero, alla formazione di *un unico dominio catalitico* avente attività guanil-ciclasica.

Le sGC hanno la caratteristica di contenere, legato nel loro dominio regolatore, un *eme ferroso*; grazie a questo gruppo prostetico, esse possono venire attivate dal messaggero gassoso *monossido di azoto* (NO, Vol. III), il quale può raggiungere le sGC diffondendo attraverso la membrana cellulare (^{2*}).

Degli effetti di questa via di trasduzione si parlerà in un paragrafo successivo (pag. 195).

(*) Potrebbero dunque essere definite delle *guanil-ciclasasi-non-recettore*.

(^{2*}) Nello stesso sito si può legare anche l'*ossido di Carbonio* (CO), che tuttavia attiva la sGC meno potentemente dell'NO.

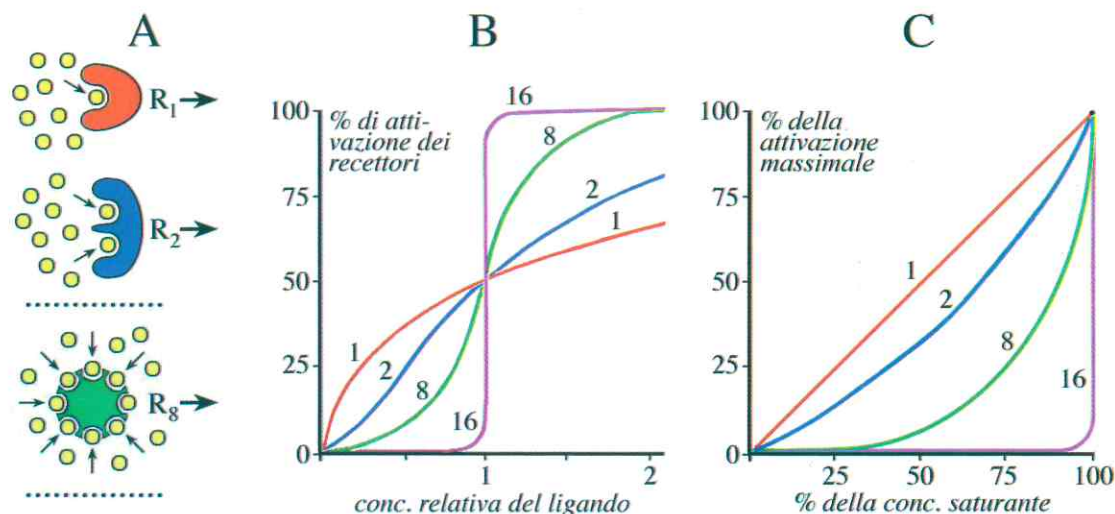


Fig. 6.11 – A: schema teorico dell'interazione recettore-ligando, nell'ipotesi che ogni recettore venga attivato da una sola molecola (R_1), da 2 molecole (R_2) o da 8 molecole (R_8). B: curve di attivazione percentuale dei recettori da parte del ligando. C: stesse relazioni, espresse come percentuale della concentrazione saturante del ligando.

Curve di attivazione e regolazione della funzione recettoriale

L'interazione tra messaggero extracellulare e recettori chimici, siano essi membranali o intracellulari, è la tappa iniziale da cui dipende tutta la "catena" di eventi intracellulari che porterà alla risposta della cellula bersaglio. Ha senso quindi chiedersi quale sarà, in presenza di una data concentrazione del messaggero, il grado di attivazione della popolazione di recettori della cellula e l'intensità della sua risposta.

Di regola i recettori si trovano tutti nella forma inattiva quando il messaggero è assente, e l'intensità dell'attivazione recettoriale *aumenta al crescere della concentrazione* del messaggero fino ad un livello massimo (di *saturazione*), al quale i recettori si trovano tutti nello stato attivato. La legge con cui l'attivazione di una popolazione recettoriale passa dal livello zero a quello massimale è esprimibile graficamente dalla sua *curva di attivazione percentuale*.

Le curve di attivazione - Il caso più semplice (Fig. 6.11/A1) è che ogni recettore passi nello stato

attivato ("off" → "on") in conseguenza del legame con *una sola* molecola del messaggero, e che l'attivazione dell'intera popolazione di recettori sia la somma di tanti di questi eventi uguali e statisticamente indipendenti. In questo caso, in cui ciascun evento ha una *probabilità singola* di verificarsi, la curva di attivazione percentuale avrà un *andamento iperbolico* (Fig. 6.11/B1) simile a quello voluto dall'equazione di Michaelis-Menten (Vol. I, pag. xx); infatti essa tenderà ad un limite di *saturazione* quando tutti i recettori disponibili saranno attivati da un'elevata concentrazione del ligando e la probabilità che se ne attivino altri diviene nulla (*). Ad una curva di attivazione iperbolica, corrisponde una relazione di perfetta *proporzionalità* tra la *percentuale* della massima attivazione della popolazione recettoriale e la *percentuale* della concentrazione saturante del messaggero (Fig. 6.11/C1).

Più frequentemente, tuttavia, ogni recettore possiede due o più "siti" di legame per le molecole del ligando, e questi debbono essere occupati *simultaneamente* per determinarne l'attivazione. Vi sarà

(*) Ne viene che solo nell'ambito di concentrazioni sufficientemente basse da essere lontane dal punto di saturazione, dove l'andamento iperbolico può essere approssimato da un andamento lineare, ci si può attendere che l'attivazione percentuale dei recettori cresca *quasi* proporzionalmente alla concentrazione del ligando.

allora *cooperazione* tra i singoli eventi che portano all'attivazione di ogni recettore, col risultato che il grado di attivazione della popolazione recettoriale dipenderà dalla *probabilità congiunta* che 2 o più legami siano in atto contemporaneamente, quindi dal *prodotto delle probabilità* che ciascun legame ha di stabilirsi. Le curve di attivazione percentuale assumeranno allora un andamento *sigmoideo* (Fig. 6.11/B) che sarà tanto più ripido, nel punto di flesso, quanto maggiore è il numero di legami richiesto per attivare ogni recettore. Di conseguenza, le relazioni percentuali tra attivazione e concentrazione (Fig. 6.11/C) si allontanano dalla linearità, perchè l'attivazione tende a crescere sempre più rapidamente mano a mano che aumenta la concentrazione del ligando. Quando il numero di legami cooperativi richiesto sia elevato (ad es. 16), l'attivazione si manifesterà "di colpo" (in modo *tutto-o-nulla*), cioè sarà trascurabile al di sotto di una certa concentrazione critica, mentre raggiungerà subito il livello massimale non appena questa concentrazione venga superata (*).

Modalità di regolazione – E' ben noto che l'intensità della risposta di una cellula bersaglio ad una data concentrazione del messaggero extracellulare può variare ampiamente a seconda del particolare momento funzionale. Ciò può avvenire o perchè la sensibilità dei recettori viene modificata, oppure perchè viene modificata l'intensità dei segnali lungo le vie di trasmissione intracellulari. Il risultato finale è lo stesso nei due casi, e viene denominato *sensitizzazione* (o "*up-regulation*") quando la sensibilità della cellula bersaglio al messaggero extracellulare è aumentata, *desensitizzazione* (o "*down-regulation*", o *tolleranza*, o *tachifilassi*) quando è diminuita. Riferendoci alla regolazione recettoriale, essa può avvenire:

- 1) - mediante *variazioni dell'affinità* dei recettori per il messaggero;
- 2) - mediante *variazioni del numero* di recettori disponibili.

Le due diverse modalità di regolazione si possono facilmente riconoscere quando sia possibile

costruire la curva di attivazione dei recettori. Infatti, nel caso che avvenga per variazione di *affinità*, si osservano *spostamenti della curva lungo l'asse delle concentrazioni* (verso sinistra nel caso della sensitizzazione e verso destra nel caso della desensitizzazione) senza che il livello di saturazione della curva venga modificato (Fig. 6.12/A); nel caso invece che avvenga per *variazione numerica* (in aumento o in diminuzione) dei recettori disponibili (Fig. 6.12/B), si osservano corrispondenti *variazioni del livello di saturazione della curva*. Generalmente la regolazione della risposta consiste in una "*down-regulation*" quando vi sia *eccesso* di ligando, ed in una "*up-regulation*" quando ve ne sia *carenza*.

La *variazione di affinità* consiste in un riassetto molecolare del recettore (^{2*}), che rende i "siti" di legame più o meno disponibili a combinarsi con il messaggero. Si tratta di un effetto piuttosto *rapido* (si instaura nell'arco di secondi o minuti) ed altrettanto rapidamente regredibile.

La *variazione numerica* dei recettori disponibili è un meccanismo di regolazione intrinsecamente più *lento*, ma più duraturo (minuti o ore); può essere dovuta al *modificato "turnover"* dei recettori (cioè del rapporto tra le velocità di sintesi e di degradazione delle loro molecole), ma più frequentemente è la conseguenza dei due opposti processi di *endocitosi* (che sottrae recettori dalla membrana plasmatica, determinando "*down-regulation*") o di *esocitosi* (che ve li apporta, determinando "*up-regulation*"). Dopo l'interiorizzazione per endocitosi, i recettori possono essere *demoliti* dagli enzimi lisosomiali (Vol. I, pag. xx), oppure possono andare a costituire, negli endosomi precoci, una "*riserva*" di *recettori riciclabili* che al momento opportuno potranno tornare alla membrana plasmatica per esocitosi.

Sia la desensitizzazione che la sensitizzazione possono conseguire all'azione prolungata di uno stesso messaggero attivatore, nel qual caso la regolazione si definisce *omologa*, oppure può conseguire all'interazione tra due diversi segnali attivatori, nel qual caso la regolazione si definisce *eterologa*.

La *desensitizzazione omologa* è un fenomeno molto frequente e studiato soprattutto nel caso dei

(*) Le risposte del tipo "tutto-o-nulla" si osservano frequentemente nell'azione dei fattori di crescita.

(^{2*}) Quasi sempre dovuta alla *fosforilazione* (promossa da protein-chinasi) o alla combinazione con ioni Ca^{2+} dei siti regolatori dei domini intracellulari.

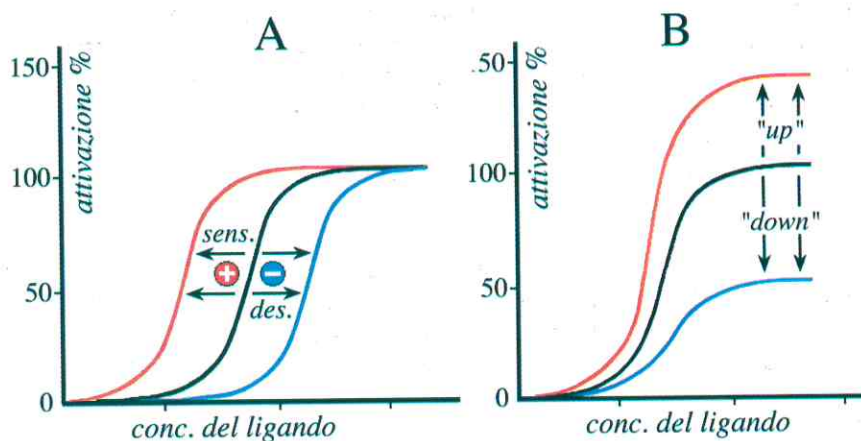


Fig. 6.12 - Regolazione della curva di attivazione dei recettori, nel caso che vari l'affinità dei recettori per il messaggero extracellulare (A) o nel caso che vari il numero di recettori disponibili (B).

recettori accoppiati a proteine-G trimeriche, dove solitamente insorge quando un messaggero attivatore agisca a lungo in concentrazione elevata. Essa è paragonabile allo stabilirsi di una "assuefazione" del recettore ad uno stimolo che ha perso significato informativo perché troppo intenso o protratto, e può essere considerata l' "equivalente chimico" dei processi di accomodazione e di adattamento allo stimolo nella risposta elettrica di una cellula eccitabile (pag. xx). Un noto esempio di desensitizzazione omologa di recettori neuronali è dato dall'assuefazione alle droghe, tipicamente alle sostanze oppioidi come la morfina.

Il fenomeno opposto della *sensitizzazione omologa*, cioè l'aumentata sensibilità dei recettori ad un messaggero extracellulare al crescere della sua concentrazione, è un effetto che si manifesta solo in alcuni casi particolari. Esso infatti ha un'azione "destabilizzante" e conferisce *carattere rigenerativo* (per *feed-back positivo*) alla risposta cellulare, fino a renderla "esplosiva". Ne è un tipico esempio la desinnesca del follicolo ovarico (ovulazione) nel ciclo sessuale femminile.

La desensitizzazione e la sensitizzazione *eterologhe* dei recettori chimici avvengono quando diversi messaggeri extracellulari interagiscono a livello della stessa cellula bersaglio, in modo *sottrattivo* nel primo caso o in modo *additivo* nel secondo; quando, in altre parole, uno dei due messaggeri inibisce o facilita l'azione dell'altro. Questo tipo di interazione è molto frequente in campo ormonale; ne sono esempi l'azione *permissiva* tra ormoni tiroidei ed

adrenalina, e quella tra progesterone ed ossitocina.

LE "VIE" DEI SECONDI MESSAGGERI

I fondamentali secondi messaggeri sono: l'*adenosin-monofosfato ciclico* (AMPc), l'*inositolo-trifosfato* (IP3) ed il *diacil-glicerolo* (DAG), il *guanosin-monofosfato ciclico* (GMPc) nonché, in molte loro funzioni, gli ioni Ca^{2+} (pag. 209).

La "via" dell'adenosin-monofosfato ciclico (AMPc)

L'AMPc (*) agisce da secondo messaggero in quasi tutte le cellule finora studiate. Come indicato in Fig. 6.13, esso si forma dall'*adenosin-trifosfato* (ATP) per eliminazione di *pirofosfato* (P_iP_i); la rea-

zione richiede, in presenza di ioni Mg^{2+} , l'intervento in un enzima membranale: l'*adenil-ciclasi*.

Dal luogo di formazione, l'AMPc può raggiungere per diffusione le strutture intracellulari sulle quali esplica la sua azione. Questa è generalmente "fascia" (cioè limitata nel tempo); infatti, dopo l'arrivo del messaggero extracellulare che ne ha evocata la formazione, il livello citosolico di AMPc (2*) aumenta di 5-10 volte in 5-10 secondi per la rapida *sintesi* di nuove molecole, controbilanciata in breve tempo da

(*) identificato fin dal '59 come mediatore intracellulare dell'azione dell'adrenalina sul muscolo scheletrico (pag. 190).

(2*) normalmente inferiore a 10^{-7} M/l.

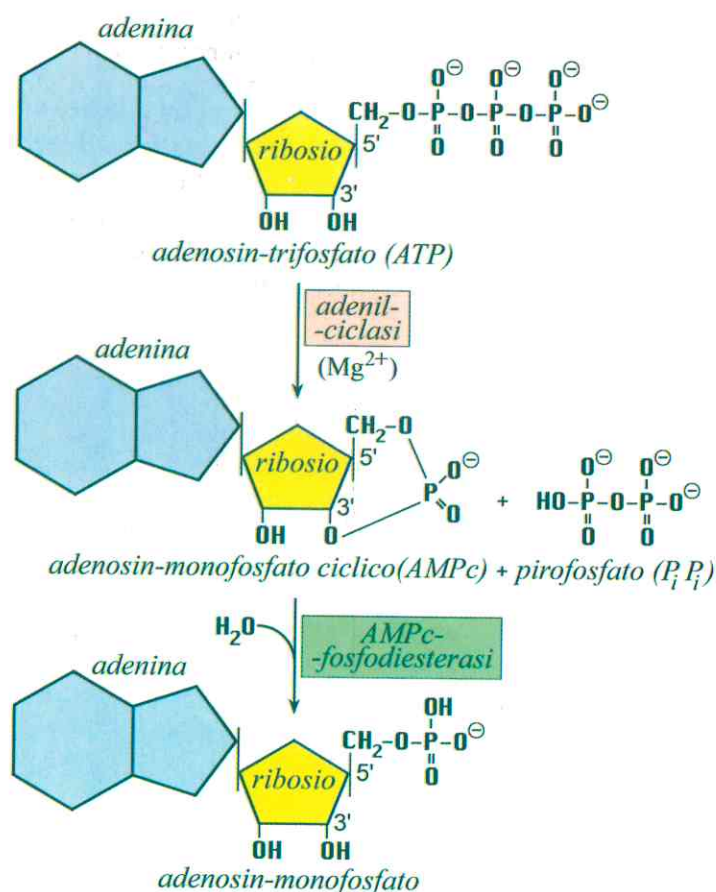


Fig. 6.13 - Sintesi e demolizione dell'adenosin-5'-monofosfato ciclico (AMPc).

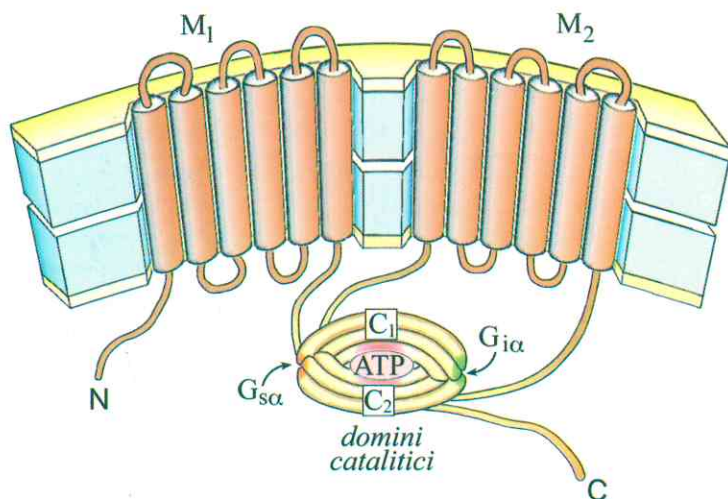


Fig. 6.14 - Rappresentazione planare della molecola dell'adenil-ciclastasi inserita nella membrana plasmatica.

una degradazione altrettanto rapida. La demolizione avviene ad opera dell'AMPc-fosfodiesterasi (PDE), enzima che idrolizza l'AMPc ad AMP (adenosin-5'-monofosfato).

L'adenil-ciclastasi (AC) - L'adenil-ciclastasi (Fig. 6.14) è costituita da una molecola di notevoli dimensioni (nei Mammiferi è composta da più di 1000 residui aminoacidici). La lunga catena polipeptidica dell'AC è inserita nella membrana plasmatica con due subunità di 6 segmenti idrofobici (M_1 ed M_2), che danno origine ad un unico dominio catalitico che si immerge nel citosol. Anche le due estremità (N-terminale e C-terminale) dell'intera molecola si estendono nel citosol.

Il dominio catalitico è una struttura anulare allungata, data dalla giustapposizione di due componenti (C_1 e C_2 , emanazioni rispettivamente della subunità M_1 ed M_2), ognuna formata da tre "sandwich" α/β uniti in ripetuti "testa-coda". Il dominio catalitico dell'AC contiene tutti i "siti" che le conferiscono e ne regolano l'operatività enzimatica: all'interno dell'anello si trova il sito ATPasico (in sua vicinanza risiede anche il sito di legame per lo ione Mg^{2+}), mentre ai due poli esterni dell'anello si trovano i siti di legame per le subunità- α delle proteine-G di controllo (G_s e G_i).

Sono state descritte a tutt'oggi nei Mammiferi almeno 8 isoforme di AC, espresse in modo caratteristico in diversi tipi cellulari, con proprietà regola-

torie notevolmente diverse (*).

Proteine-G trimeriche ed attivazione dell'AC -

Nello svolgere la sua azione di accoppiamento tra un recettore a 7 segmenti transmembranari e l'adenil-ciclastasi, la molecola di una proteina-G trimerica mantiene un costante rapporto con il foglietto interno della membrana cellulare, sulla quale ha però una notevole libertà di scorrere. Essa è strutturata in tre subunità (α , β e γ), debolmente vincolate alla tela fosfolipidica membranale da un gruppo prenilico appartenente alla subunità γ . La subunità α dispone di tre "siti" di legame: uno per il recettore a 7 segmenti transmembranari, uno per il nucleotide guanilico (GTP o GDP) ed uno per la molecola dell'adenil-ciclastasi; inoltre ha la facoltà di staccarsi dal complesso β/γ e di migrare, nella forma attivata, fino a raggiungere la molecola dell'adenil-ciclastasi e ad agire su di essa. L'intero processo avviene nella forma ciclica illustrata in Fig. 6.15:

1) *condizione di riposo*: il messaggero extracellulare (L) non ha ancora raggiunto ed attivato il

(*) 5 isoforme dell'AC sono regolate non solo da proteine-G, ma anche dagli ioni Ca^{2+} (3 isoforme sono stimulate, 2 sono inibite). Queste isoforme Ca-dipendenti dell'AC sono localizzate, nella membrana, vicino ai canali ionici del Ca^{2+} . Tutte le AC sono stimulate dalla forskolina: una molecola diterpenica che viene usata frequentemente negli esperimenti in cui si voglia aumentare il livello di AMPc nelle cellule oggetto di studio.

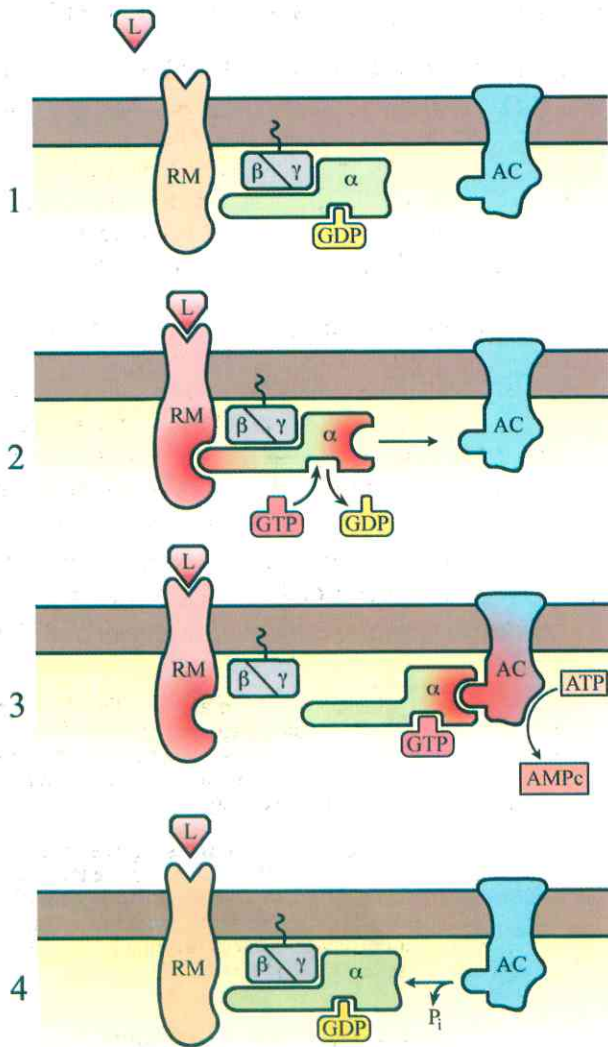


Fig. 6.15 - Schema del modo di operare di una proteina G-trimerica. L: messaggero extracellulare; RM: recettore membranale a 7 domini transmembranari; α , β , γ : subunità della proteina-G; AC: adenilciclastasi. Le regioni delle molecole che si trovano in stato di attivazione sono indicate in rosso.

recettore membranale (RM), la subunità- α è ancora legata al complesso β/γ ed è inattiva (si trova nella forma G_{α} -GDP);

2) *innesco dell'attivazione*: il messaggero extracellulare raggiunge il recettore, il cui dominio catalitico, interagendo con G_{α} -GDP, funge da "trigger" per la *transizione sostitutiva* G_{α} -GDP $\rightarrow$ G_{α} -GTP, quindi per l'attivazione della proteina-G;

188

3) *trasferimento dell'attivazione all'AC*: la sostituzione GDP $\rightarrow$ GTP distacca G_{α} -GTP dal complesso β/γ ; e la rende libera di migrare fino a raggiungere l'AC; questa, attivata, trasforma l'ATP in AMPc;

4) *ritorno alla condizione di riposo*: il legame di G_{α} -GTP con l'AC stimola (con un certo ritardo) la sua azione GTPasica (*), che fa passare G_{α} -GTP nella forma inattiva G_{α} -GDP (con liberazione di P_i). G_{α} -GDP si distacca dall'AC, si lega nuovamente al complesso β/γ e si ritorna alla condizione di quiescenza. Nel frattempo, l'AC avrà compiuto alcuni cicli operativi.

In teoria, se il messaggero extracellulare fosse costantemente presente (come indicato in Fig. 6.15/4), il ciclo operativo della proteina-G trimerica continuerebbe a ripetersi e, con il moto di "spola" del complesso G_{α} -GTP, manterrebbe l'AC in uno stato di persistente attivazione.

Dato che l'intero processo richiede il continuo intervento dei nucleotidi guanilici, esso viene bloccato dalla loro indisponibilità, o da una modificazione della loro struttura molecolare. E' ben noto ad esempio che la *solforazione* dei gruppi fosfato nella molecola del GTP o del GDP (^{2*}) altera profondamente il ciclo della proteina-G.

Inibizione dell'AC - Come avviene nella regolazione di quasi tutte le reazioni enzimatiche, l'attività dell'AC (e la produzione di AMPc) dipende dall'e-

(*) Si è visto però recentemente che in molti casi l'attività GTPasica della subunità- α non viene tanto innescata dal legame con l'AC, quanto dal legame con una particolare proteina regolatrice appartenente al gruppo delle *proteine-RGS* (*Regulators of G-protein Signalling*). Si pensa che le proteine RGS assolvano al compito di interrompere le risposte mediate dalle proteine-G trimeriche, svolgendo un ruolo analogo a quello delle *proteine GAP* nel ciclo operativo delle proteine-G monometriche (pag. 206). Il genoma umano codifica per circa 25 proteine RGS, ognuna specifica per un particolare gruppo di proteine-G trimeriche.

(^{2*}) Quando nella molecola del GTP venga solforato il gruppo fosfato in posizione γ (-P[γ]), il composto che si forma (GTP- γ S) può ugualmente legarsi alla subunità- α e renderla attiva, ma è sprovvisto di attività GTPasica, per cui mantiene l'AC *permanentemente operativa* e la risposta della cellula bersaglio diviene *esagerata*. Qualora invece venga solforato nel GTP il gruppo -P[β], si forma il complesso G_{α} -GTP- β S, che è *sprovvisto di attività*; in questo caso è impedita l'attivazione dell'enzima effettore e la risposta cellulare è *depressa o manca totalmente*.

Fig.
mer
una
rece
son
son
l'ac
opp

qui
init
oro
go
pos
trin
bite
del
cor

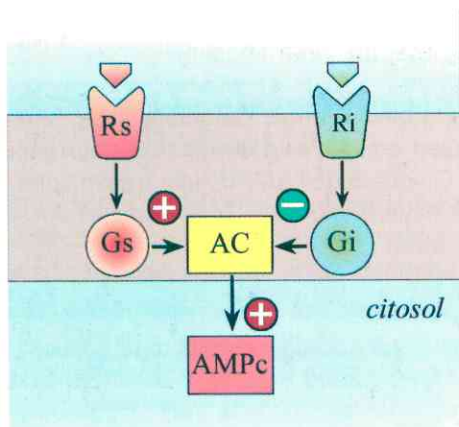


Fig. 6.16 – L'attività dell'adenil-ciclasi (AC), normalmente stimolata dall'attivazione di recettori R_s tramite una proteina- G_s , può essere depressa dall'attivazione di recettori R_i tramite una proteina- G_i . I più noti recettori R_s sono elencati in Tab. 6.4. I più noti esempi di recettori R_i sono: i recettori per l'adrenalina di tipo α_2 , i recettori per l'acetilcolina di tipo muscarinico (M), quelli per gli oppiati, per l'adenosina e per la somatostatina.

quilibrio tra azioni contrapposte di attivazione e di inibizione. Infatti, in alternativa al ciclo operativo ora descritto (eccitatorio dell'AC), esiste un analogo ciclo che porta invece all'inibizione dell'AC. Ciò è possibile perché esistono due classi di proteine-G trimeriche (pag. xx): una *eccitatoria* ed una *inibitoria*, che agiscono in modo opposto sull'attività dell'AC. I segnali eccitatori ed inibitori provengono, come mostra la Fig. 6.16, da recettori "eccitatori"

(R_s) ed "inibitori" (R_i) della produzione dell'AMPc.

Le risposte mediate dall'AMPc – Via via che viene prodotto dall'adenil-ciclasi, l'AMPc esplica la sua azione tramite enzimi fosforilanti (*); tra questi spicca una protein-chinasi-AMPc-dipendente: la *protein-chinasi-A* (PKA). Si tratta di una *serina-treonin-chinasi* che si trova in tutte le cellule animali, dove è responsabile della mediazione di quasi tutti gli effetti dell'AMPc.

I messaggeri extracellulari che esplicano la loro azione per la "via" AC $\rightarrow$ AMPc $\rightarrow$ PKA sono molto numerosi; alcuni esempi sono riportati in Tab. 6.3. Dalla Tabella si può vedere che le risposte evocate per la "via" dell'AMPc interessano un esteso ventaglio di processi intracellulari, la cui varietà dipende dal corredo enzimatico delle cellule bersaglio (^{2*}).

Un esempio molto noto di effetti ormonali mediati dall'AMPc è l'azione dell'*adrenalina* sul muscolo scheletrico (Fig. 6.17), sulle cui fibre essa accresce

(*) Non si deve però dimenticare che in alcune cellule l'AMPc può regolare *direttamente* lo stato di apertura dei *canali ionici dipendenti dai nucleotidi ciclici (CNGC)*. Questa azione diretta dell'AMPc sui canali CNGC ha grande importanza funzionale in campo sensoriale e cardiaco (pag. 127).

(^{2*}) Ne è una prova l'osservazione che messaggeri extracellulari *diversi*, che in *una stessa* cellula bersaglio mettano tutti capo all'attivazione della PKA, evocano la *medesima* risposta. Si noterà ad esempio nell'ultima riga della Tab. 6.3 che vi sono ben 4 ormoni diversi che determinano, attivando tutti la "via" dell'AMPc, *lipolisi* nelle cellule adipose.

Tab. 6.3 - Esempi di risposte indotte da alcuni messaggeri extracellulari tramite la "via" dell'AMPc.

<i>messaggero extracellulare</i>	<i>organo bersaglio</i>	<i>risposta principale</i>
Adrenalina	muscolo scheletrico	demolizione del glicogeno
Adrenalina	cuore	aumento della frequenza e della forza di contrazione
Ormone tireotropo (TSH)	tiroide	sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei
Ormone adrenocorticotropo (ACTH)	corteccia surrenale	secrezione di cortisolo
Ormone luteinizzante (LH)	ovaio	secrezione di progesterone
Glucagone	fegato	demolizione del glicogeno
Ormone antidiuretico (ADH)	rene	riassorbimento di acqua
Paratormone	osso	riassorbimento dell'osso
Adrenalina, TSH, ACTH, Glucagone	tessuto adiposo	lipolisi

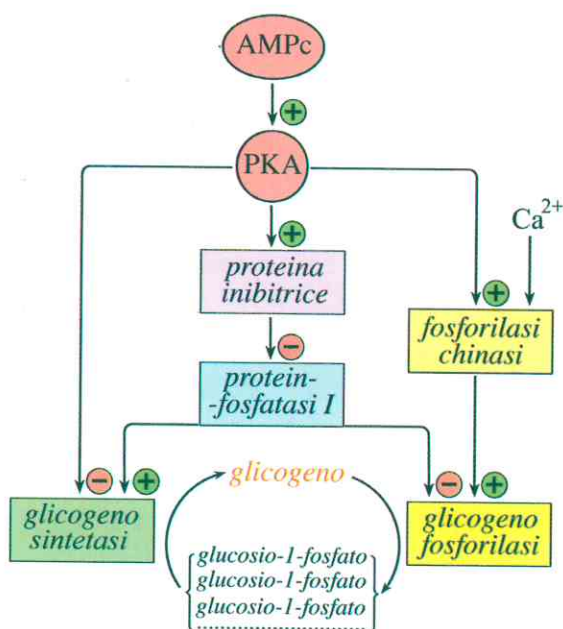


Fig. 6.17 – Regolazione fosforilativa degli enzimi coinvolti nel metabolismo del glicogeno nelle fibre muscolari scheletriche. Si noti che la *protein-fosfatasi-I*, che tenderebbe di per sé a frenare l'attivazione dei due enzimi-chiave che presiedono alla sintesi ed alla demolizione del glicogeno, è *inibita* da un terzo bersaglio molecolare della PKA: la *proteina inibitrice della fosfatasi*.

la disponibilità di glucosio utile per la contrazione. Ciò avviene perché, tramite l'attivazione di *recettori β-adrenergici*, l'adrenalina *stimola* la *glicogenolisi* (attivando la *glicogeno-fosforilasi*) ed *inibisce* la *glicogenosintesi* (inibendo la *glicogeno-sintetasi*).

Un esempio molto diverso, prodotto questa volta da una *diminuzione* dell'AMPc intracellulare, è la *riduzione della frequenza cardiaca* (effetto *cronotropo negativo*), provocata dal neurotrasmettore *acetilcolina* alle terminazioni delle fibre vagali che innervano il cuore. L'effetto è dovuto alla ritardata apertura di particolari canali ionici (I_f) nelle fibrocellule miocardiche "segna-passo" che sostengono l'automatismo cardiaco.

Più complesse sono le azioni ormonali, mediate dall'AMPc, che richiedono una *regolazione dell'espressione genica*. Queste azioni sono possibili perché esistono geni che presentano, nelle loro regioni "promoter", una breve sequenza di basi chiamata

elemento di risposta all'AMPc (CRE), la quale viene riconosciuta da una speciale proteina citosolica denominata *CREB* (*proteina che lega CRE*). Questa, quando venga fosforilata dalla PKA, passa nel nucleo ed attiva la trascrizione dei geni predisposti. Gli effetti dell'AMPc sulla trascrizione genica sono *relativamente lenti* (occorrono alcune ore per manifestarsi).

Regressione ed estinzione delle risposte -

Come si è già ricordato, le risposte cellulari mediate dall'AMPc hanno in genere carattere transitorio, soprattutto per effetto della *demolizione* enzimatica dell'AMPc e della *defosforilazione* delle proteine che sono state attivate dalla PKA.

Questi processi di inattivazione sono affidati a due diverse classi enzimatiche: la *fosfodiesterasi* (PDE), che trasformano l'AMPc nel composto inattivo 5'-AMP (*), e le *fosfatasi*, enzimi defosforilanti di molti substrati. Tra le fosfatasi, si ritiene che la *protein-fosfatasi-I* (Fig. 6.17) sia particolarmente attiva nel deprimere le risposte mediate dalla via AMPc → PKA (2*).

(*) Specifici inibitori della fosfodiesterasi sono le *metilxantine* (la *caffeina* e la *teofillina* contenute nelle comuni bevande caffè e tè) che sono perciò capaci di facilitare le risposte cellulari AMPc-dipendenti. A conferma delle complesse interconnessioni tra le vie di comunicazione intracellulare, è stato recentemente osservato che l'AMPc-fosfodiesterasi può essere *inibita* dal GMPc.

(2*) Ad esempio è la *protein-fosfatasi-I* che pone termine, *defosforilando CREB*, all'aumentata sintesi proteica promossa dall'AMPc in alcune cellule bersaglio

La "via" dei messaggeri inositidici (DAG ed IP3)

Molti recettori a 7 domini transmembranari (Fig. 6.18) esercitano la loro azione attivando, tramite una specifica proteina-G trimerica chiamata G_q , un altro enzima membranario: la *fosfolipasi-C* (PLC *).

La PLC è capace di scindere un componente minore della "tela" fosfolipidica della membrana plasmatica: il *fosfatidil-inositolo-difosfato* (PIP2), in due composti aventi tipica funzione di secondi messaggeri: l'*inositolo-trifosfato* (IP3) ed il *diacil-glicerolo* (DAG).

Il ciclo dei fosfoinositidi - La formazione del DAG e dell'IP3 a partire dal PIP2 è la reazione-chiave nel cosiddetto "ciclo dei fosfoinositidi membranari" (Fig. 6.19): una sequenza di reazioni che dà anche origine, oltre ai due secondi messaggeri inositidici, ad una serie di composti biologicamente attivi. Un prodotto della demolizione enzimatica del DAG: l'*acido arachidonico*, non solo può fungere anch'esso da *secondo messaggero* (Vol. III), ma dà origine ad un gran numero di composti, anch'essi molto attivi, noti come *eicosanoidi* (2*). D'altro canto dall'IP3, per ulteriore *fosforilazione*, si passa alla formazione di *altri fosfoinositidi* (IP4, IP5, IP6), che si ritiene possano fungere da *punti d'ancoraggio* alla membrana plasmatica per particolari proteine citosoliche (3*), essenziali per l'equilibrio strutturale e

(*) Col nome di "fosfolipasi-C" si indica in realtà un gruppo di enzimi genericamente attivi nel metabolismo dei fosfolipidi. Nei Mammiferi, se ne conoscono almeno 6 tipi, che contengono tutte due regioni di omologia chiamate "X-box" ed "Y-box", separate da un numero caratteristico di aminoacidi. La PLC destinata alla produzione dei messaggeri inositidici è precisamente il tipo "beta" (*fosfolipasi-C β*). L'idrolisi del PIP2 è anche catalizzata da un'altra fosfolipasi (la *fosfolipasi-C γ*), attivata da *recettori tirosin-chinasi*.

(2*) Tra gli eicosanoidi figurano la *prostaciclina*, i *leucotrieni*, le *prostaglandine* ed i *trombossani*. Tutti partecipano in vario modo al fenomeno dell'*infiammazione* (Vol. III); la maggior parte dei farmaci largamente usati come anti-infiammatori (es. *aspirina*, *ibufen*, *cortisone*), agiscono inibendo la sintesi dell'*acido arachidonico* o degli eicosanoidi.

(3*) queste proteine sono tutte dotate di un caratteristico "dominio PH" ("Plekstrin Homology").

per la crescita della cellula.

I messaggeri extracellulari che attivano (4*) la "via" dei messaggeri inositidici tramite recettori serpentinici e proteina-G trimerica G_q sono abbastanza numerosi: se ne contano circa 25. Le risposte che essi evocano differiscono in relazione alla funzione delle cellule bersaglio; alcuni noti esempi sono riportati in Tab. 6.4.

Modalità operative dei messaggeri inositidici - I modi di operare dell'IP3 e del DAG all'interno delle cellule (Fig. 6.20) sono accomunati da due caratteristiche generali: a) si esplicano preferenzialmente a livello di *strutture membranali*; b) avvengono in modo strettamente collegato con gli ioni Ca^{2+} . Essi sono però nettamente distinti e debbono essere descritti separatamente.

Le azioni dell'IP3 - Come avviene per l'AMPC, l'IP3 può *diffondere* nel citosol, tuttavia, a differenza dell'AMPC, esso agisce *senza l'intervento di enzimi fosforilanti*.

L'azione dell'IP3 è elettivamente indirizzata alla membrana del *reticolo endoplasmatico*, dal quale promuove un pronto *rilascio di Ca^{2+}* nel citosol, perchè porta in apertura i *canali ionici IP3-dipendenti* (pag. 211), largamente distribuiti nel reticolo tutte le cellule. L'attivazione di questi canali ad opera dell'IP3 viene poi rafforzata ed estesa, in un processo che può assumere carattere *autorigenerativo* (5*), dagli stessi ioni Ca^{2+} che via via si rendono liberi nel citosol.

La mediazione del Ca^{2+} , estende di molto la varietà e l'intensità delle risposte all'IP3; tra queste hanno particolare rilievo quelle *motorie*, come la contrazione della muscolatura liscia viscerale

(4*) meno frequentemente gli effetti sono inibitori. Un esempio è dato dall'attivazione dei recettori per la *dopamina* di tipo D_2 .

(5*) Questo "*Ca-activated-Ca-release*" sostiene probabilmente le *oscillazioni* del Ca^{2+} intracellulare (una successione di "picchi" del Ca^{2+} citosolico, ognuno della durata di secondi o minuti) che si osservano frequentemente quando la "via" dell'IP3 sia continuamente attivata dalla presenza di un opportuno messaggero extracellulare. Il "*Ca-activated-Ca-release*" spiega l'osservazione che il rilascio di Ca^{2+} si propaga spesso, all'interno della cellula, come un'onda *autorigenerativa* che invade tutto il citosol partendo da una regione limitrofa al punto ove ha avuto inizio.

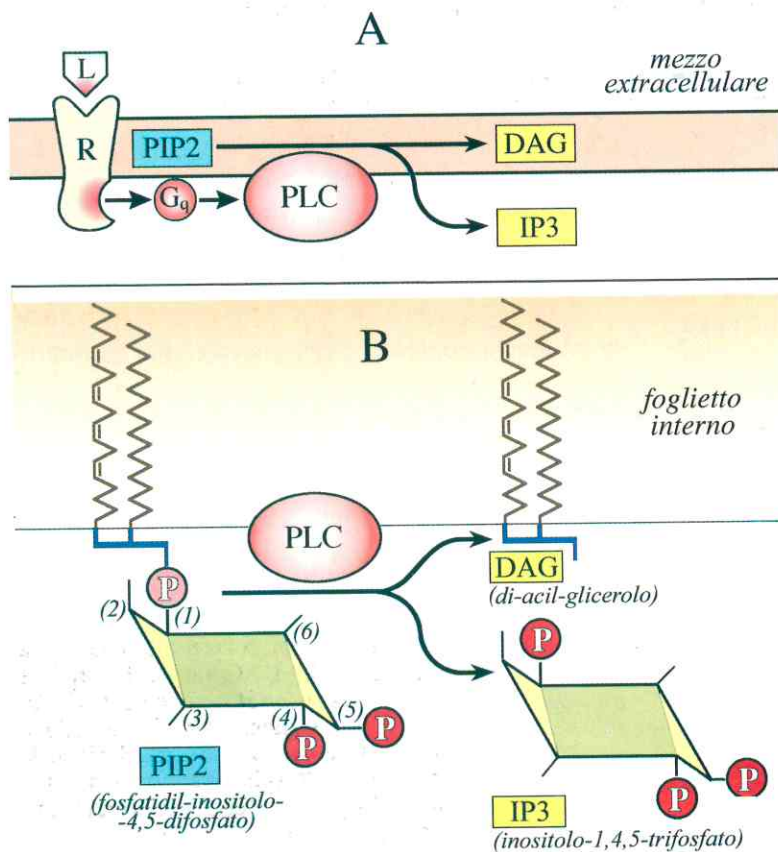


Fig. 6.18 – A: attivazione della fosfolipasi-C (PLC) e formazione dei due messaggeri inositidici per idrolisi del PIP2. *L*: messaggero extracellulare, *R*: recettore a 7 domini trans-membranari. B: l'IP3, essendo idrofilo, diffonde nel citosol; il DAG invece, che è invece liposolubile, resta nel foglietto interno della componente fosfolipidica della membrana.

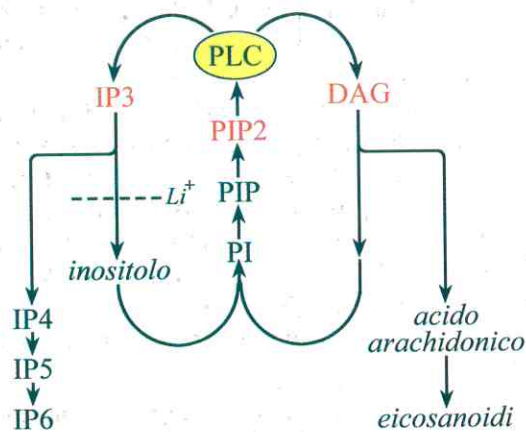


Fig. 6.19 – “Ciclo” dei fosfoinositidi. *PI*: fosfatidil-inositolo (rappresenta circa l'1% dei fosfolipidi della membrana plasmatica); *PIP*: fosfatidil-inositolo-monofosfato (origina dalla fosforilazione del *PI*, catalizzata dalla *PI-chinasi*); *PIP2*: fosfatidil-inositolo-difosfato (origina dalla fosforilazione del *PIP*, catalizzata dalla *PIP-chinasi*); *IP3*: inositolo tri-fosfato (origina dall'idrolisi del *PIP2*, catalizzata dalla *PLC*); *IP4*, *IP5*, *IP6*: inositolo tetra-, penta-, esa-fosfato (originano dalla fosforilazione dell'*IP3*, catalizzata dall'*IP3-chinasi*). La formazione dell'acido arachidonico a partire dal DAG è catalizzata dalla fosfolipasi A_2 (PLA_2).

I sali di Litio (ad esempio il carbonato, molto usato nella cura della depressione bipolare), bloccano selettivamente la defosforilazione dell'*IP3*; questo blocco inizialmente protrae l'azione del messaggero inositidico, ma poi arresta la sua produzione da parte della PLC per carenza di substrato (l'inositolo). I sali di Litio perciò producono un decadimento generale delle risposte ai messaggeri fosfo-inositidici.

Tab. 6.4 - Esempi di risposte indotte tramite la "via" dei messaggeri inositidici.

messaggero extracellulare	organo bersaglio	risposta principale
Acetilcolina	pancreas	secrezione di amilasi
Acetilcolina	muscolo liscio	contrazione
Trombina	piastrine	aggregazione
Ormone antidiuretico (ADH)	fegato	glicogenolisi

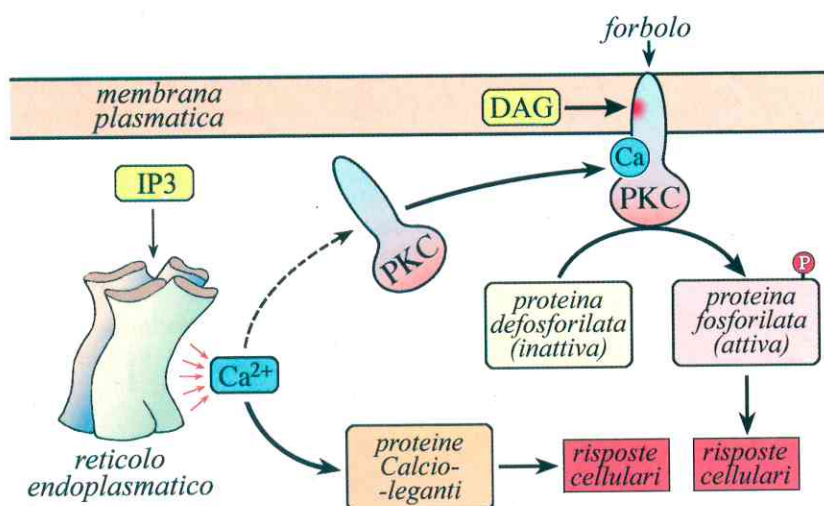


Fig. 6.20 - Rappresentazione schematica delle azioni del DAG (attiva la PKC) e dell'IP3 (promuove il rilascio del Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico). L'attivazione della PKC ad opera del DAG richiede l'inserimento (Ca-dipendente) di una sua estremità (quella N-terminale) nella membrana plasmatica.

(*), ma non mancano risposte attinenti a processi molto diversi, quale l'aggregazione delle piastrine promossa dalla trombina (2*).

Anche le azioni dell'IP3 devono recedere non appena cessa di giungere il messaggero extracellulare eccitatorio che le ha evocate. A rendere pronta questa regressione cooperano almeno tre processi: a) la defosforilazione dell'IP3 (ad IP2 e poi a IP) ad opera di uno specifico enzima defosforilante; b) la sua ulteriore fosforilazione ad IP4, di cui s'è fatto cenno pocanzi, ed infine c) i diversi meccanismi di espulsione o di sequestro ("clearance") degli ioni Ca^{2+} (pag. 212), che ne abbassano la concentrazione intracellulare al livello di riposo.

(*) per azione della innervazione vegetativa parasimpatica, che impiega come neurotrasmettitore l'acetilcolina.

(2*) La trombina è un fattore della coagulazione che agisce sulle piastrine come messaggero extracellulare.

Le azioni del DAG - L'azione del DAG si sviluppa all'interno della membrana plasmatica, tuttavia il suo meccanismo operativo assomiglia a quello dell'AMPc in quanto anch'esso attiva una *protein-chinasi* specifica: la *protein-chinasi-C* (PKC). Questa funge da "ponte" tra membrana e citosol, trasferendo l'attivazione (per fosforilazione su residui di serina o treonina) a varie proteine citoplasmatiche, enzimatiche o strutturali.

Col nome di "protein-chinasi-C" si indica in realtà un gruppo di enzimi (se ne conoscono almeno 10 isoforme, distinte con lettere greche) che risiedono nel citosol, ma possono essere attivati dal DAG dopo che il legame della sua molecola con gli ioni Ca^{2+} (3*) ne abbia consentito l'inserimento nella membrana plasmatica (Fig. 6.20).

Le azioni del DAG interessano una sfera partico-

(3*) La PKC viene denominata "C" proprio in ragione dello stretto vincolo della sua azione al livello intracellulare dei Ca^{2+} .

larmente ampia di funzioni cellulari; tra queste, il controllo dei canali ionici per il Ca^{2+} , l'attività della pompa del Ca^{2+} e del contro-trasporto Na^+/Ca^{2+} hanno fatto annoverare il DAG tra i fattori che partecipano all'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare (pag. 209).

In molte cellule bersaglio, l'azione del DAG può toccare l'attività mitotica e l'apoptosi, perchè esso può condizionare la trascrizione di particolari geni "DAG-dipendenti". In queste azioni è però richiesta l'intermediazione di proteine regolatrici nucleari le quali si legano ad opportuni elementi di risposta; di queste proteine regolatrici, se ne conoscono almeno tre: *Elk-1*, *NF-KB* ed il "fattore di risposta al siero" (SRF).

Merita infine di essere ricordata, per il suo interesse in campo sperimentale, la specifica azione stimolante sull'attività della PKC degli esteri del *forbolo* (*). Questi composti agiscono applicati al versante extracellulare della membrana (Fig. 6.20) ed esplicano un'azione mimetica di quella del DAG, tanto che essa viene ritenuta prova sicura che una risposta cellulare è mediata dalla "via" DAG → PKC.

La "via" del guanosin-monofosfato ciclico (GMPc)

Considerato per molti anni il "fratello minore e povero" dell'AMPc, il GMPc riscuote oggi un interesse almeno equivalente, per l'importanza delle funzioni in cui opera come fattore essenziale.

Il GMPc presenta molte analogie con l'AMPc. Infatti:

a) si forma anch'esso dal corrispondente nucleoside-trifosfato (il GTP) per azione di una *guanil-ciclastasi* (che può essere *membranale* o *citoplasmica*, pag. 181), per eliminazione di *pirofosfato*. Anche questa reazione necessita della presenza di ioni Mg^{2+} ;

b) anche il GMPc esplica generalmente la sua azione attivatrice tramite una specifica *protein-chinasi*: la *protein-chinasi GMPc-dipendente* (detta *protein-chinasi-G* o *PKG*) che è anch'essa (come la PKA) una *serina-treonina-chinasi*;

c) esplicita la sua azione, il GMPc viene rapidamente degradato a 5'-GMP da una *fosfodiesterasi*: la *GMPc-fosfodiesterasi*.

Tuttavia, a differenza dell'AMPc (e coerentemente col carattere di *recettori operanti per via enzimatica* delle *guanil-ciclastasi* membranali), la formazione del GMPc segue immediatamente l'attivazione della molecola *guanil-ciclastica*, senza la mediazione di una *proteina-G* trimetrica.

Risposte mediate dal GMPc – Il GMPc opera di solito attivando la PKG (ed innescando quindi una "cascata" fosforilativa all'interno della cellula), ma può agire anche *in modo diretto*, regolando lo stato di apertura di *canali ionici dipendenti dai nucleotidi ciclici* (CNGC, pag. 126).

Esso inoltre può influenzare la "via" dell'AMPc, regolando l'attività dell'AMPc-fosfodiesterasi.

La gamma delle risposte cellulari mediate dal GMPc va dal controllo della *muscolatura liscia vasale*, nella quale induce *rilasciamento* (vasodilatazione), alla regolazione dell'attività *secernente* ed *assorbente* degli *epiteli intestinale e renale*, all'attivazione di alcuni *recettori sensoriali*, come avviene nella *trasduzione degli stimoli visivi e gustativi*.

(*) Il più noto di questi è il 12-*o*-tetradecanoil-13-acetato di *forbolo*, comunemente indicato con la sigla TPA.

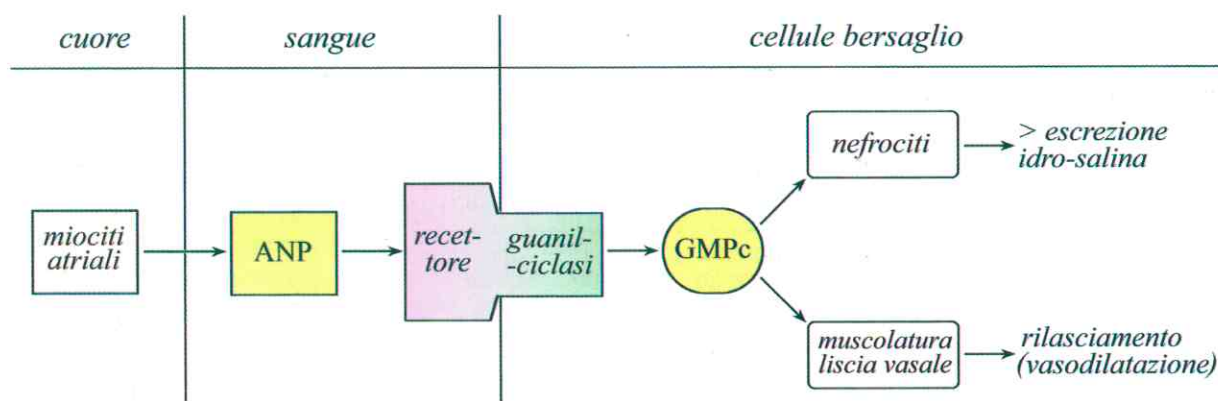


Fig. 6.21 – Schema delle modalità operative del peptide natriuretico atriale (ANP).

I messaggeri extracellulari che agiscono tramite la "via" del GMPc sono di natura estremamente varia e forse non tutti ben conosciuti; verrà qui dedicato un breve approfondimento solo a quelle azioni mediate dal GMPc che sono ricordate più frequentemente.

Rilascio della muscolatura liscia vasale (risposta all'NO) -

Le fibrocellule muscolari lisce dei vasi sanguigni sono abbondantemente provviste di *guanil-ciclastasi solubili* (pag. 182) sensibili ad un messaggero gassoso: il *monossido d'Azoto* (NO); il GMPc che esse producono sotto l'azione di questo messaggero, annoverabile tra i "fattori locali" (Vol. III) ha una potente azione rilasciante (*). L'NO può liberarsi nelle cellule endoteliali dall'aminoacido *arginina*, ed essendo facilmente diffusibile attraverso le membrane cellulari, può agire sulle guanil-ciclastasi citosoliche. L'interesse di questa azione è anche medico, infatti è nota da lungo tempo l'azione farmacologica della *nitroglicerina* ("trinitrina"), usata empiricamente allo scopo di alleviare il dolore provocato dall'ischemia del miocardio (*angina pectoris*). Oggi si sa che la nitroglicerina, nel distretto coronarico, è un "donatore esogeno" di NO (cioè viene convertita dalle cellule dell'endotelio vasale in NO) e che l'NO stimola la produzione di GMPc nelle fibrocellule muscolari lisce, quindi determina **vasodilatazione nel distretto coronarico**.

I "media" hanno recentemente portato alla ribal-

ta del grande pubblico l'effetto vasodilatatore dell'NO (e del GMPc) a proposito dell'impiego terapeutico di un prodotto largamente commercializzato: il *Viagra*, nei disturbi dell'*erezione maschile*. Il principio attivo del "*Viagra*" **inibisce specificamente l'isoforma della GMPc-fosfodiesterasi che viene espressa nelle fibrocellule muscolari dei vasi sanguigni** che regolano l'afflusso del sangue ai *corpi cavernosi*, quindi vi determina un **innalzamento del livello intracellulare di GMPc**. Ciò provoca, in conseguenza di un'intensa vasodilatazione locale, l'*erezione del pene*.

Le risposte ai "peptidi natriuretici" - I "peptidi natriuretici" (NP) sono degli *oligopeptidi* (2*) che hanno *carattere ormonale*, infatti vengono secreti nel circolo sanguigno ed agiscono come messaggeri extracellulari su cellule bersaglio di diversi tessuti. Come si è già accennato, i più noti di questi peptidi sono quelli prodotti dai *miociti atriali* del cuore (gli ANP, dove "A" sta per "*atrial*"), ma sono anche prodotti da *neuroni encefalici* (i BNP, dove "B" sta per "*brain*"). Curiosamente, i peptidi natriuretici sono gli unici ligandi, che siano stati finora identificati con sicurezza, per i numerosi tipi di *guanil-ciclastasi particolate* (pag. 181) che le tecniche della biologia molecolare hanno rivelato.

Gli ANP (Fig. 6.21) sono liberati dalle fibrocellule cardiache dell'*atrio sinistro* in risposta ad un **aumento della pressione venosa centrale**. I recettori degli

(*) Si ritiene infatti che un'aumentata formazione di GMPc diminuisca la fosforilazione delle catene leggere della miosina che sostiene la contrazione delle fibrocellule dei muscoli lisci.

(2*) Tutti presentano un "motivo" strutturale comune, dato da un anello di 17 residui aminoacidici, 10 dei quali sono conservati in tutti i peptidi natriuretici.

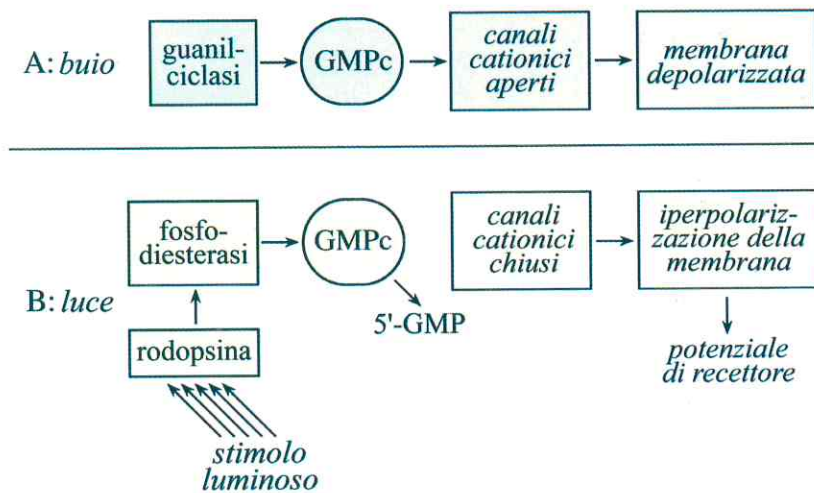


Fig. 6.22 - Ruolo del GMPc nella fototrasduzione dei recettori retinici, in condizione di buio (A) e sottoposti ad uno stimolo luminoso (B).

ANP sono *recettori guanil-ciclastasi*, situati nelle membrane di alcune cellule del rene (*nefrociti **) ed in quella delle fibrocellule muscolari lisce dei vasi sanguigni. L'attivazione di questi recettori guanil-ciclastasi induce, per un'aumentata formazione di GMPc:

a) *nel rene*, un aumento della filtrazione glomerulare associato ad una diminuzione del riassorbimento tubulare di Na^+ e di H_2O ;

b) *nella muscolatura liscia vasale*, rilasciamento, quindi vasodilatazione.

Ambedue queste risposte tendono a *diminuire la pressione nel circolo sanguigno*, ed a *correggere l'iniziale stimolo ipertensivo*.

Regolazione della secrezione idro-salina della mucosa intestinale – Il GMPc svolge un ruolo non secondario anche nella regolazione della secrezione idro-salina intestinale. Nei microvilli degli enterociti dell'intestino tenue sono infatti presenti *recettori guanil-ciclastasi*, il cui dominio recettoriale, esposto al lato luminale della mucosa, è attivabile da messaggeri extracellulari presenti nel contenuto intestinale, tra i quali figurano anche alcune *tossine alimentari*. La risposta a questa attivazione consiste in un'aumentata formazione nell'enterocita di GMPc, cui consegue un'accresciuta secrezione idro-salina prevalentemente dovuta all'*apertura di*

canali ionici del Cl^- del tipo CFTR (pag. 125).

Anche se il meccanismo è diverso, l'effetto finale è simile a quello prodotto dalla *tossina colerica* (CTX) per la via dell'AMPc (pag. 205).

GMPc e foto-trasduzione - Il processo di fototrasduzione che avviene nel segmento esterno dei fotorecettori della retina dei Vertebrati è un noto esempio dell'intervento del GMPc in un delicato processo di trasduzione intracellulare..

Nella membrana dei "dischi", che occupano interamente, impilati l'uno sull'altro, il segmento esterno dei fotorecettori, una *guanil-ciclastasi retinica* (*RetGC*) produce costantemente GMPc il quale, diffondendo nell'ambiente citoplasmatico, raggiunge ed attiva, nella membrana plasmatica del fotorecettore, canali ionici del tipo CNGC (pag. 126). Si tratta di *canali cationici* permeabili al Na^+ , al K^+ ed al Ca^{2+} , che, in assenza di stimoli luminosi (al *buio*), sono mantenuti nello stato *aperto* dalla presenza di GMPc; in condizioni di buio, quindi, un costante flusso cationico "entrante" attraverso questi canali *mantiene depolarizzata* la membrana plasmatica dei fotorecettori (Fig. 6.22/A).

All'arrivo dello stimolo luminoso (^{2*}), viene attivata una proteina fotosensibile, situata anch'essa

(*) *cellule epiteliali dei tubuli renali ed anche cellule mesangiali dei glomeruli renali.*

(^{2*}) Si noti che, nel caso della foto-trasduzione, il "messaggero" extracellulare non è costituito da molecole, ma bensì da fotoni.

nella membrana dei "dischi": la *rodopsina* (Fig. 6.22/B). La rodopsina (detta anche "*porpora visiva*") è una proteina a 7 domini transmembranari, accoppiata ad una proteina-G trimerica di tipo eccitatorio denominata *trasducina* (G_t); questa porta in attività l'enzima *GMPc-fosfodiesterasi* (*PDE*), che prontamente inattiva il GMPc. Abbassandosi il livello intracellulare di GMPc, i canali cationici della membrana plasmatica che delimita il segmento esterno dei fotorecettori (che erano aperti) passano in *chiusura*. Si genera così una *iperpolarizzazione* della membrana plasmatica, che costituisce il *potenziale di recettore* del recettore retinico. Si tratta di un caso insolito in cui la risposta di un recettore sensoriale consiste in un'iperpolarizzazione, anziché una depolarizzazione, membranale.

L'ATTIVAZIONE DELLE PROTEINE-SEGNALE

I messaggi chimici provenienti dall'ambiente extracellulare, superata la membrana plasmatica ad opera dei recettori di superficie, vengono trasferiti alle proteine attuatrici delle risposte (dette *proteine-bersaglio*) da diverse vie di trasduzione intracellulare (*). In queste vie (Fig. 6.23) operano come "vettori" del messaggio numerose proteine (*proteine-G*, *ciclas*i e *protein-chinasi*, di cui si è parlato nei precedenti paragrafi), definibili *proteine-segnale* perchè, anche se molto diversificate funzionalmente, sono tutte accomunate dalla proprietà di passare rapidamente da uno stato "inattivo" ad uno stato "attivo" (o viceversa), modificando la propria configurazione in modo reversibile.

Ciò ha fatto assimilare le "catene" delle proteine-segnale ad una serie di "interruttori molecolari" ("relais") interconnessi che, passando dallo stato "off" (stato inattivo) allo stato "on" (stato attivo), consentono di trasmettere il comando di attuare la risposta, in una sorta di "effetto domino", dai recettori fino alle proteine-bersaglio terminali. Mentre la transizione "off -> on" di ogni elemento della catena *abilita* la trasmissione, la transizione inversa, "on -> off", *interrompe* la trasmissione.

Il passaggio dallo stato inattivo allo stato attivo (e

(*) Ad eccezione dei messaggi mediati da *recettori-canale*, che sono già in sè delle *proteine-bersaglio*.

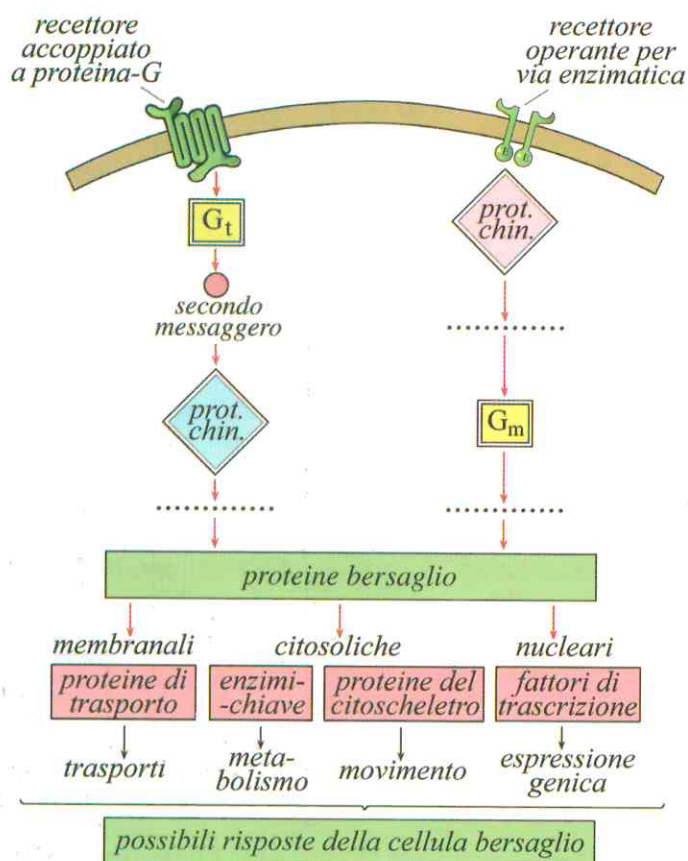


Fig. 6.23 - Schema molto semplificato della trasmissione intracellulare dei segnali provenienti da un recettore accoppiato a proteina-G e da un recettore operante per via enzimatica. Le proteine-segnale sono indicate con un doppio riquadro. G_t : proteina-G trimerica; G_m : proteina-G monomerica. Le protein-chinasi simboleggiate con la losanga azzurra sono quasi tutte serina/treonin-chinasi; quelle simboleggiate con la losanga rosa sono quasi tutte tirosin-chinasi.

quella opposta) di una proteina-segnale può essere evocato in due diversi modi:

a) il primo modo, di gran lunga il più comune, consiste nella *fosforilazione* (o nella *defosforilazione*) della sua molecola;

b) il secondo modo, ristretto alla sola classe delle *proteine-G* (PG), avviene tramite il legame coi *fosfonucleotidi guanilici* (GTP e GDP): PG-GTP (stato attivo), PG-GDP (stato inattivo).

L'attivazione (e l'inattivazione) fosforilativa

Nelle cellule eucariotiche, le reazioni di fosforilazione (e di defosforilazione) costituiscono certamente il più diffuso meccanismo di *modificazione post-traduzionale* della struttura (quindi della funzione) delle proteine (*).

La reazione di *fosforilazione* consiste nel trasfe-

(*) Infatti non solo le proteine-segnale, ma anche le proteine-bersaglio vengono solitamente attivate (o inibite) per via fosforilativa. Per via fosforilativa, può essere modificata in vario modo anche la stessa funzionalità dei recettori di superficie (ad esempio nella *desensitizzazione*, pag. 184).

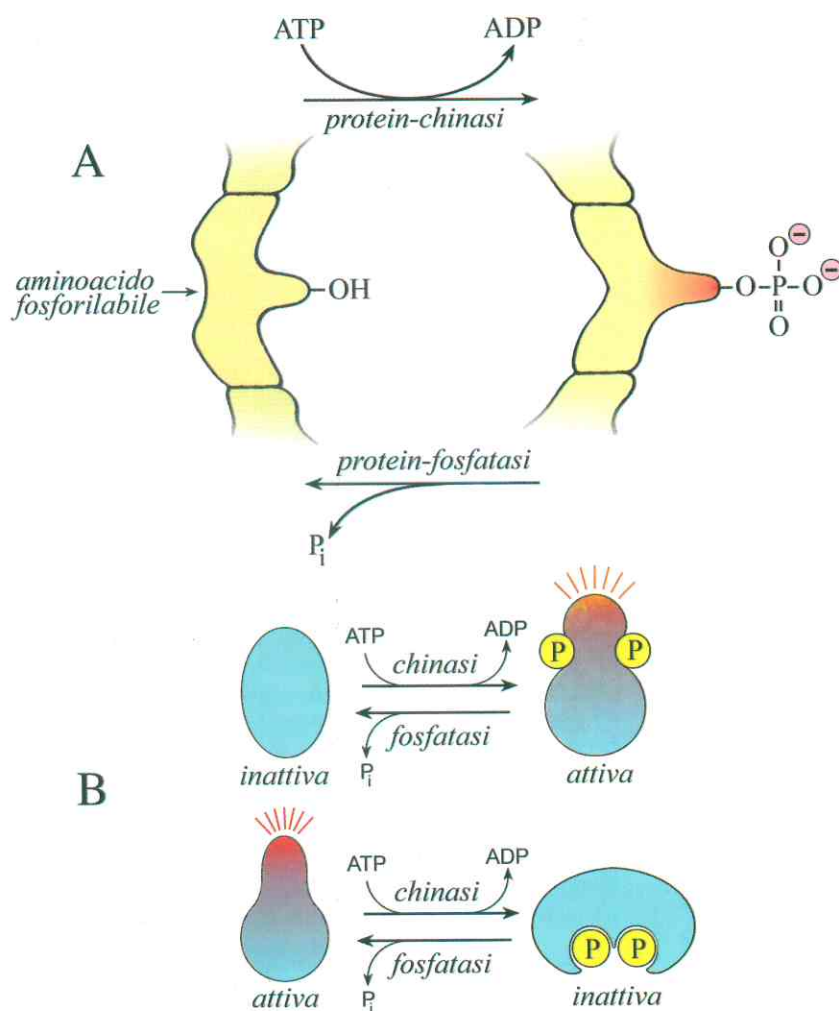


Fig. 6.24 – A: la fosforilazione (promossa da una protein-chinasi) e la defosforilazione (promossa da una protein-fosfatasi) di uno o più aminoacidi nella catena polipeptidica di una proteina possono modificarne profondamente la struttura terziaria. B: sia le fosforilazioni che le defosforilazioni possono attivare o disattivare una molecola proteica, a seconda della posizione del "sito" aminoacidico in cui esse si verificano in relazione alla sua struttura complessiva.

rimento di un gruppo fosfato ($P^{\sim}$), derivante solitamente dall'idrolisi dell'ATP, sull'ossidrile di uno o più residui aminoacidici della molecola proteica che viene fosforilata. L'aminoacido può essere una *serina*, una *treonina* o una *tirosina* (*); il legame è di tipo esterico, quindi *covalente*. La reazione inversa di *defosforilazione* consiste invece nel distacco (per idrolisi) dei gruppi fosforici dagli aminoacidi che erano stati fosforilati.

Le due opposte reazioni sono catalizzate da due classi distinte di enzimi: le *protein-chinasi* (fosforilanti) e le *protein-fosfatasi* (defosforilanti).

La fosforilazione di una molecola proteica può modificarne profondamente la struttura; infatti (Fig. 6.24/A), la forte carica negativa portata dal gruppo fosfato ad un aminoacido delle catene polipeptidiche esercita, sugli aminoacidi limitrofi dotati di carica, intense forze elettrostatiche che prima non c'erano e che possono deformare le strutture circostanti. I riflessi funzionali di una trasformazione di questo tipo possono essere rilevanti: ad esempio un "dominio" enzimatico che prima era nascosto nella profondità della molecola e silente, può affiorare alla sua superficie e divenire operativo; oppure può essere deformata un'interfaccia molecolare, rendendola irriconoscibile dall'interfaccia complementare.

Il segno dell'effetto della fosforilazione è criticamente dipendente dalla *posizione*, nell'edificio molecolare, dell'aminoacido interessato. Di solito la proteina viene *attivata* dalla fosforilazione (e disattivata dalla defosforilazione), ma può anche avvenire il contrario, che la proteina venga *disattivata* dalla fosforilazione ed attivata dalla defosforilazione (Fig. 6.24/B).

Gli effetti sull'attività di una proteina si manifestano in un arco di tempo variabile a seconda delle caratteristiche delle proteine e degli aminoacidi di cui avviene la fosforilazione.

Le protein-chinasi (PK) - Il numero di proteine cellulari che devono in ogni momento essere selettivamente attivate (o deattivate) per via fosforilativa è elevatissimo; ciò spiega l'altrettanto elevato numero di protein-chinasi (molte identificate ma molte certamente ancora sconosciute) che devono

essere costantemente disponibili in ogni cellula (^{2*}). L'analisi del genoma umano ha rivelato che circa il 2% dell'intera dotazione genica codifica per una protein-chinasi, e si calcola che ogni cellula esprima mediamente *qualche centinaio di tipi diversi* di protein-chinasi.

La classe delle protein-chinasi comprende:

a) quelle che agiscono fosforilando residui aminoacidici di *serina o treonina* (*serinal/treonin-chinasi: Se/Tr-PK*), solitamente attive nelle catene di proteine-segnale connesse ai *recettori operanti per proteine-G trimeriche e secondo messaggero* (losanga azzurra in Fig. 6.23). Sono talmente diffuse da essere spesso chiamate "protein-chinasi" *tout court*;

b) quelle che fosforilano residui aminoacidici di *tirosina* (*tirosin-chinasi: Tyr-PK*), tipicamente attive nelle catene di proteine-segnale connesse ai *recettori operanti per via enzimatica* (losanga rosa in Fig. 6.23). Pur svolgendo ruoli cruciali nella regolazione di fondamentali funzioni cellulari (pag. 181), le Tyr-PK sono *molto meno numerose* delle Se/Tr-PK (^{3*}) ed ancora non del tutto conosciute.

Le molecole delle *Se/Tr-PK* presentano costantemente almeno un *dominio catalitico* ed un *dominio regolatore* (Fig. 6.25/A).

Il *dominio catalitico*, che di solito è costituito da una porzione globulare della molecola disposta verso l'estremità N-terminale della catena polipeptidica, presenta un elevatissimo grado di omologia tra le diverse chinasi, suggerendo che i rispettivi geni codificanti si sono evoluti da un unico gene ancestrale. Esso contiene:

a) un "*sito di riconoscimento*", che definisce l'elettività della protein-chinasi per una determinata

(^{2*}) Si calcola che almeno il 20% delle proteine cellulari sia bersaglio di una protein-chinasi (e di una protein-fosfatasi). L'azione di ogni protein-chinasi è solitamente molto specifica, ristretta a poche proteine-bersaglio, spesso ad una sola; non infrequentemente, il loro raggio d'azione è limitato dall'ancoraggio a particolari strutture o compartimenti intracellulari. Le protein-chinasi che fosforilano un gran numero di proteine-bersaglio, avendo una bassa specificità d'azione, sono relativamente rare; esse sono dette *protein-chinasi multifunzionali*.

(^{3*}) Si calcola che i bersagli molecolari delle tirosin-chinasi siano *meno dell'1%* delle proteine cellulari oggetto di regolazione fosforilativa.

(*) o anche, più raramente, una *istidina*.

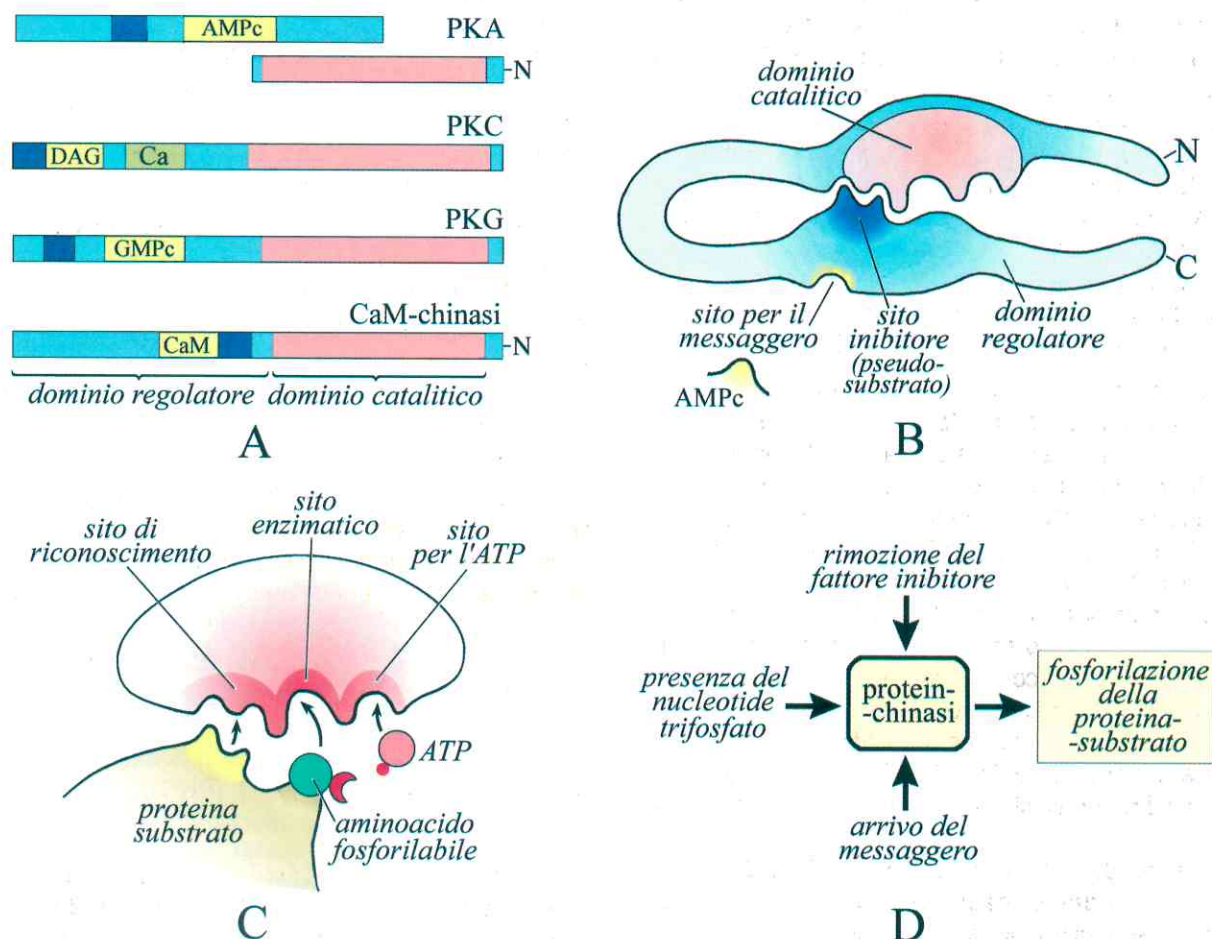


Fig. 6.25 – A: dominio catalitico (in rosa) e dominio regolatore (in azzurro), comprendente il “sito inibitore” (in blu) ed il “sito” per il messaggero (in giallo) delle più note protein-chinasi. *PKA*, attivata dall'AMPc; *PKC*, attivata dal DAG; *PKG*, attivata dal GMPc; *CaM-chinasi*, attivata dal Ca²⁺ intracellulare. B: rappresentazione della molecola di una PK nella forma “ripiegata” (inattiva). C: modello dell'interazione fosforilativa tra il dominio catalitico di una PK e la proteina-substrato, in presenza di ATP. D: assimilazione della funzione di una protein-chinasi a quella di un “chip” integratore, il cui segnale “in uscita” (la fosforilazione della proteina-substrato) richiede 3 segnali “in entrata”.

proteina-substrato. Esso è infatti specifico per particolari sequenze aminoacidiche (dette “sequenze di consenso”) del substrato, che precedono o seguono il residuo di serina (o di treonina) che dev'essere fosforilato;

b) un “sito enzimatico”, ove avverrà la fosforilazione di un residuo aminoacidico (di serina o treoni-

na) della proteina-substrato;

c) un “sito per il nucleotide” donatore di fosfato (solitamente l'ATP) e per lo ione Mg²⁺.

Il dominio regolatore, che in condizioni di riposo è ripiegato sul dominio catalitico (Fig. 6.25/B), dispone di:

a) un “sito inibitore”, che occupa il sito di riconoscimento destinato alla proteina-substrato ma, essendo sprovvisto della sequenza di consenso,

(*) Per la PKA, per esempio, la sequenza di consenso è Arg-Arg-X-Ser/Treo-Y, dove X è un aminoacido qualunque ed Y un aminoacido idrofobico.

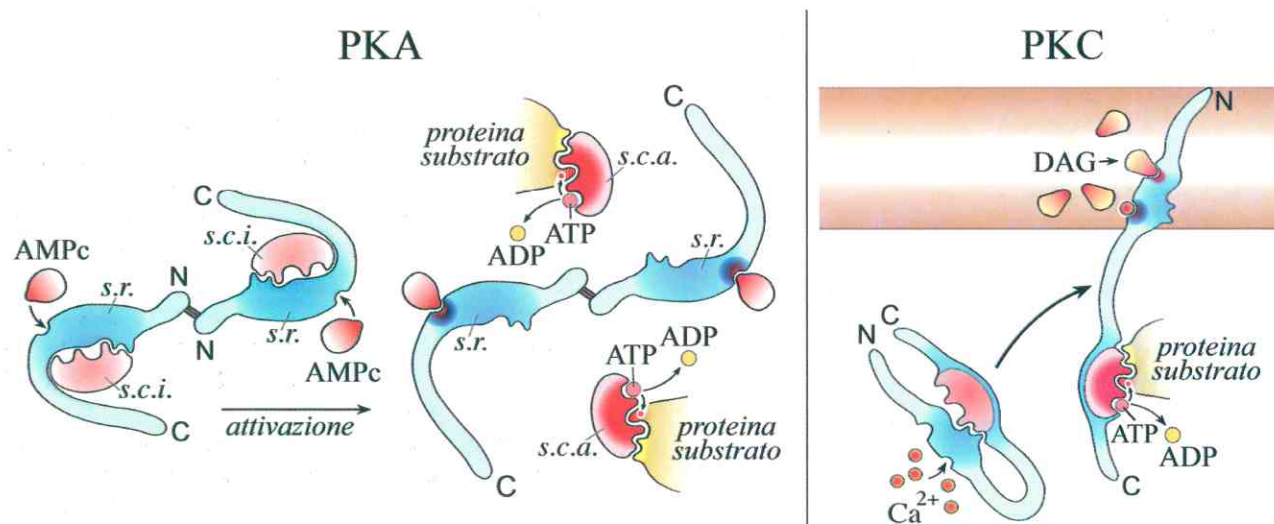


Fig. 6.26 – A: modalità operativa della PKA. *s.r.*: subunità regolatrice; *s.c.i.*: subunità catalitica inattiva; *s.c.a.*: subunità catalitica attiva. B: modalità operativa della PKC. L'attivazione della PKC ad opera del DAG richiede l'inserimento (Ca-dipendente) della sua estremità N-terminale nella membrana plasmatica.

funge da "pseudo-substrato" del dominio catalitico e lo mantiene inattivo;

b) uno o più "siti per il messaggero" (AMPc, GMPc, DAG, ioni Ca²⁺). Quando vengano occupati dai rispettivi ligandi, questi "siti" fanno passare la molecola della PK dalla disposizione "ripiegata" di riposo ad una disposizione "distesa", che allontana lo pseudo-substrato dal dominio catalitico, il quale così diviene accessibile alla proteina-substrato. In questo modo il secondo messaggero funge da innescio ("trigger") dell'azione fosforilativa della PK.

Considerato modellisticamente, il modo di operare, della molecola di una protein-chinasi può essere assimilata ad quello di un "chip" integratore (Fig. 6.25/D), in cui l' "output" (la fosforilazione del substrato) sia abilitato dalla convergenza di 3 "inputs": la presenza del donatore di fosfato, la rimozione dell'autoinibizione e l'arrivo della molecola "trigger".

Fermo restando il loro generale modo di operare sulla proteina-substrato che dev'essere fosforilata, esistono differenze anche notevoli tra le diverse protein-chinasi, se non altro perchè esse si possono presentare in forma monomerica, dimerica o polimerica. La *protein-chinasi attivata dall'AMPc* (PKA), ad esempio (Fig. 6.26/A), agisce in forma di

dimero formato da due unità uguali, unite specularmente dalle loro estremità N-terminali; nella forma attivata, il dominio catalitico della PKA si separa dal resto della molecola ed agisce a distanza. La *proten-chinasi attivata dal DAG* (PKC), invece (Fig. 6.26/B), agisce in forma monomerica ma in modo più complesso. Infatti, come s'è già accennato, affinché il "sito" per il messaggero divenga accessibile al DAG, è necessaria la preliminare azione dello ione Ca²⁺, che determina l'estensione del dominio regolatore fino a consentirne l'inserimento nella membrana plasmatica, dove il DAG si è formato e risiede. L'azione combinata del Ca²⁺ e del DAG disinibisce il dominio catalitico, che può così fosforilare la proteina-substrato.

Le protein-fosfatasi - Le risposte cellulari che si manifestano per via fosforilativa (siano esse attivatrici o disattivatrici di proteine-segnalet o proteinebersaglio), non solo devono prontamente insorgere, ma anche *estinguersi* altrettanto rapidamente quando il segnale extracellulare non sia più presente. A ciò provvede un'intera classe di enzimi diffusi in tutte le cellule: la classe delle *protein-fosfatasi* (o *fosfo-protein-fosfatasi*) endocellulari. Si tratta di potenti enzimi defosforilanti, che in un tempo variabile da caso a caso (ma certamente con un ritardo

sufficiente per consentire alle proteine fosforilate di espletare la loro funzione) distaccano il gruppo fosfato dai residui aminoacidici, estinguendo gli effetti della loro fosforilazione.

Il modo di operare a livello molecolare delle protein-fosfatasi è meno conosciuto di quello delle protein-chinasi; si ritiene comunque che anch'esso sia basato sull'azione combinata di un dominio catalitico (che pure presenta un elevato grado di omologia tra i diversi membri della classe) con uno o più domini regolatori.

In generale le protein-fosfatasi presentano una *minor specificità d'azione* delle protein-chinasi. Infatti, pur essendo abbondantemente distribuite in tutte le cellule, costituiscono una classe enzimatica meno numerosa.

La minor specificità delle protein-fosfatasi porta a pensare che esse costituiscano un *permanente sottofondo* "moderatore" delle attivazioni (o disattivazioni) fosforilative, che ne limita costantemente l'intensità, la durata e la localizzazione.

Le proteine-G

Nelle cellule eucariotiche, le proteine-segnale che si attivano legandosi al GTP costituiscono la classe delle *proteine-G* (*G-proteins* o *GP*).

La molecola di tutte le proteine-G ha la facoltà, caratteristica di tutte le proteine-segnale, di passare dallo stato *inattivo* (*GP-GDP*, "off") allo stato *attivo* (*GP-GTP*, "on") per l'intervento di un'adatta molecola "trigger" che può essere, come si vedrà tra breve, un recettore a 7 segmenti transmembranari oppure un'altra molecola-segnale a ciò destinata. Questa attivazione tuttavia *non ha carattere propriamente fosforilativo* (Fig. 6.27/B), perchè non comporta il trasferimento di un gruppo fosfato (P^-) dal GTP alla molecola della proteina-G, ma solo la sostituzione dell'intera molecola del GDP con quella del GTP nella sede ove questa si trova.

La *deattivazione* della proteina-G, invece (Fig. 6.27/B), richiede l'idrolisi del GTP ($GP-GTP \rightarrow GP-GDP + P_i$), che avviene per "autocatalisi" ad opera della stessa GP, che possiede *attività GTP-asi*.

Una GP quindi è una proteina-segnale che può

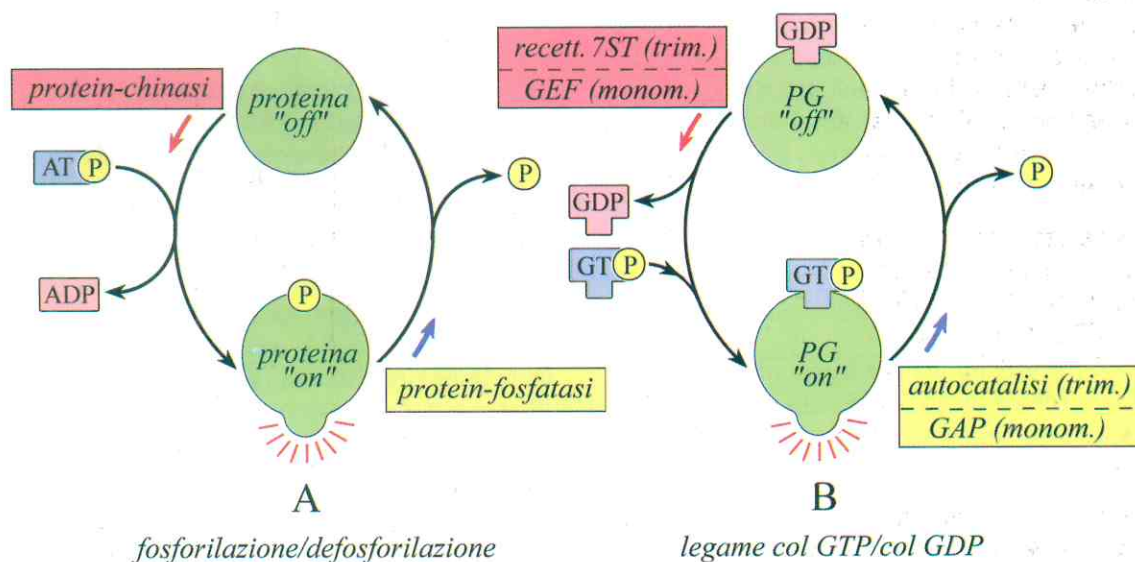


Fig. 6.27 – A: attivazione e deattivazione di una proteina per fosforilazione o defosforilazione, promosse rispettivamente dalle *protein-chinasi* e dalle *protein-fosfatasi*. B: attivazione e deattivazione di una proteina-G. L'attivazione richiede la sostituzione del GDP con GTP ed è innescata da un recettore a 7 segmenti transmembranari (*recett. 7ST*) nelle proteine-G trimeriche o da una proteina-GEF (*GEF*) in quelle monomeriche. La deattivazione richiede l'idrolisi del GTP ed avviene per autocatalisi nelle proteine-G trimeriche o è innescata da una proteina-GAP (*GAP*) in quelle monomeriche.

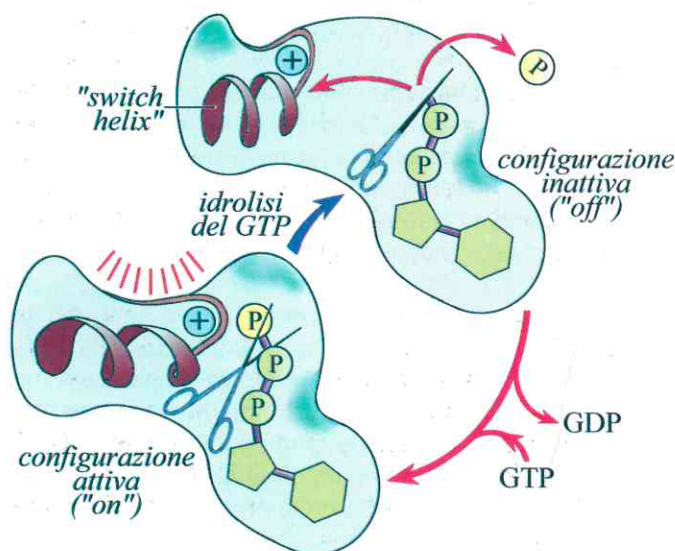


Fig. 6.28 - Ipotetico modello della transizione di una proteina-G dallo stato attivo a quello inattivo (ci si riferisce ad una proteina-G monomerica o alla subunità- α di una proteina-G trimerica). Quando una molecola di GTP è inserita nella propria sede, l'attrazione elettrostatica esercitata dal gruppo fosfato terminale determina un'estensione della "switch helix", che attiva la proteina-G ("on"). Quando invece il gruppo fosfato terminale viene rimosso dall'azione GTPasica della stessa proteina-G, la "switch helix" si retrae e la proteina-G diviene inattiva ("off").

assumere uno stato "on" (GP-GTP) o uno stato "off" (GP-GDP); si ritiene che la modificazione allosterica che conferisce alla molecola della proteina-G la facoltà di assumere l'uno o l'altro stato risieda in una sua particolare regione strutturata ad α -elica, detta "switch-helix". Come illustrato in Fig. 6.28, ad un'estremità della "switch-helix" si troverebbe una forte carica positiva che renderebbe l'intera elica sensibile all'attrazione elettrostatica del gruppo fosfato terminale del GTP; le variazioni di lunghezza dell'elica, prodotte dalla presenza o meno di questo gruppo, modificherebbero l'intera struttura molecolare della proteina-G determinandone le transizioni di stato ("off" $\rightarrow$ "on" oppure "on" $\rightarrow$ "off").

Nell'estesa classe delle proteine-G si riconoscono due superfamiglie:

a) le *proteine-G trimeriche*, la cui molecola è un eterotrimerico, che trasferiscono l'attivazione da un recettore a 7 segmenti transmembranari ad un enzima produttore di un secondo messaggero oppure ad un canale ionico;

b) le *proteine-G monomeriche*, costituite da singole unità molecolari, che trasferiscono l'attivazione da recettori operanti per via enzimatica ad un esteso ventaglio di proteine-segnaie dedicate a sostenere o regolare svariati processi intracellulari quali il traffico delle vescicole, l'organizzazione dei filamen-

ti citoscheletrici, il trasferimento al nucleo di segnali regolatori dell'espressione genica. Lo spettro delle azioni delle GP-monomeriche è ampliato dal fatto che molte di esse sono attivabili, oltre che dai recettori, anche dall'aumento della concentrazione citosolica degli ioni Ca^{2+} .

Le proteine-G trimeriche – La molecola di una proteina-G trimerica comprende tre subunità (α , β e γ) che godono di una relativa indipendenza, pur essendo debolmente vincolate alla membrana plasmatica. Per molti anni si è ritenuto che la modalità operativa della molecola (certamente valida per l'attivazione dell'enzima adenil-ciclasa, produttore dell'AMPc) fosse quella descritta a pag. 188, in cui è la sola subunità- α quella attivatrice dell'enzima, e che il complesso β/γ avesse solo il ruolo di inibire la subunità- α . Recenti acquisizioni hanno invece dimostrato che in alcuni casi è il complesso β/γ che attiva l'enzima produttore del secondo messaggero, o che attiva direttamente (o inibisce) canali ionici. E' provato inoltre che esistono vari tipi di subunità- β e subunità- γ , le quali, combinandosi in diverso modo, formano complessi β/γ con funzioni diversificate. Ne viene che le proprietà di ogni GP-trimerica dipenderanno dalla particolare combinazione di subunità α , β e γ che la caratterizzano (* pag. 205).

La tipologia delle GP-trimeriche presenti anche

nell'organismo umano è molto variegata e comprende sia GP *eccitatorie* che GP *inibitorie*; queste ultime sono capaci di *inibire* l'enzima effettore, col risultato di deprimere la produzione del secondo messaggero o addirittura di *invertire il segno* della risposta cellulare. Le GP-trimeriche di cui è meglio conosciuta la funzione sono elencate nella Tab. 6.5; esse sono suddivise in 3 famiglie (I, II e III), ognuna dedicata all'attivazione di un particolare gruppo di enzimi o di canali ionici.

Tra le particolarità delle diverse GP-trimeriche, merita di essere ricordata la specifica azione delle tossine batteriche del *vibrio colerico* (CTX) e del *bacillo della pertosse* (PTX) sulle GP-trimeriche G_s , G_i e G_o ; l'azione delle due tossine permette di rivelare sperimentalmente la partecipazione di una di queste GP ad una determinata funzione cellulare.

La CTX agisce specificamente sulla subunità- α di G_s , impedendone l'attività GTPasica e quindi la transizione $G_{\alpha}\text{-GTP} \rightarrow G_{\alpha}\text{-GDP}$, che porrebbe termine all'attività dell'adenil-ciclastasi; così questa, continuando la sua azione, induce un'eccessiva rispo-

sta della cellula bersaglio ^(2*);

La PTX produce un effetto analogo ma con meccanismo diverso: essa infatti inattiva la subunità- α di G_i e G_o , inducendovi una ribosilazione e bloccando la transizione $G_{\alpha}\text{-GDP} \rightarrow G_{\alpha}\text{-GTP}$. Va così perduta la funzione di freno delle proteine-G inibitorie sull'attività dell'adenil-ciclastasi, col risultato che l'AMPC viene prodotto in eccesso e determina una risposta cellulare patologica ^(3*).

Le proteine-G monomeriche - Come per le proteine-G trimeriche, anche le molecole di quelle monomeriche sono legate in modo covalente ad un lipide che le ancora al foglietto membranale interno; anch'esse sono attive quando sono legate al GTP, ed inattive quando sono legate al GDP.

Il modo di funzionare di una proteina-G mono-

^(2*) Si spiega così l'imponente perdita di liquidi per via intestinale e la conseguente grave disidratazione, tipiche dell'*infezione colerica* dell'uomo. Essa è dovuta ad un'eccessiva produzione (indotta dalla CTX) di AMPC, che negli enterociti inibisce il riassorbimento dell'NaCl dal lume intestinale, con conseguente perdita di sali e di acqua.

^(3*) Il meccanismo con cui la PTX determina la sintomatologia della *pertosse* non è del tutto chiarito, anche se si sa che un eccesso intracellulare di AMPC paralizza il moto ciliare nell'epitelio vibratile delle vie respiratorie e lo espone all'attacco di agenti infiammatori.

(*) Nell'organismo umano esistono 27 geni per la subunità- α , almeno 4 geni per la subunità- β e 13 per la subunità- γ . Il numero delle combinazioni possibili è probabilmente limitato dall'incompatibilità di certe coppie β/γ per certe subunità- α .

Tab. 6.5 - Classificazione e proprietà delle più note proteine-G trimeriche. AC: adenil-ciclastasi; PLC: fosfo-lipasi-C; PDE: fosfo-diesterasi. G_i : trasducina.

Famiglia	Esempi	Subunità attiva	Funzione preminente	Sensibile alla tossina
I	G_s	α_s	attiva l'AC, attiva canali del Ca	CTX
	G_{olf}	α_{olf}	attiva l'AC nei neuroni olfattori	
II	G_i	α_i β/γ	inibisce l'AC attiva canali del K	PTX
	G_o	$\alpha_o + \beta/\gamma$ β/γ	attiva la PLC(β) attiva canali del K, inattiva canali del Ca	PTX
	G_t	α_t	attiva la GMPc-PDE nei bastoncelli retinici	CTX e PTX
	G_{gust}	α_{gust}	attiva la GMPc-PDE nei recettori gustativi	
III	G_q	α_q	attiva la PLC(β)	nessun effetto

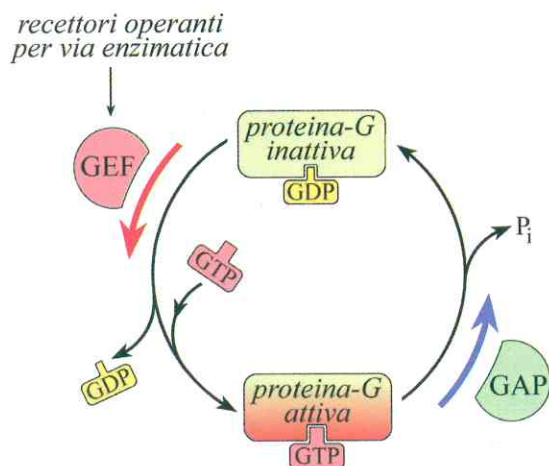


Fig. 6.29 - Ciclo operativo delle proteine-G monomeriche. In condizioni di riposo, le GEF sono scarsamente attive e le GAP mantengono circa il 95% delle proteine-G nella forma inattiva.

merica ha molti punti di somiglianza con quello della subunità- α di una proteina-G trimerica, ma è del tutto indipendente dai recettori a 7 segmenti transmembranari. Infatti, come mostra la Fig. 6.29, l'attivazione delle proteine-G monomeriche è promossa da un gruppo di proteine-segnale chiamate *fattori di scambio dei guanil-nucleotidi* (*Guanyl Exchange Factors* = GEF), attivate a loro volta da *recettori operanti per via enzimatica*. Nella forma attivata, una proteina-GEF agisce su una ben precisa GP monomerica, provocando la transizione sostitutiva GP-GDP $\rightarrow$ GP-GTP.

A differenza delle trimeriche, inoltre, l'attività GTPasica intrinseca delle proteine-G monomeriche è molto *lenta* e non potrebbe avvenire spontaneamente in tempi utili. Per essere efficace, essa viene accelerata da un gruppo di proteine-segnale chiamate *proteine attivatrici della GTPasi* (*GTPase activating proteins* = GAP); le proteine-GAP (*), determinando l'idrolisi del GTP legato a GDP, *inattivano* le proteine-G monomeriche.

Anche una proteina-G monomerica opera quindi come un interruttore molecolare, passando da uno

stato inattivo ad uno stato attivo e viceversa; le transizioni tra i due stati richiedono però l'intervento di due agenti esterni distinti: una proteina GEF (che attiva lo scambio GTP $\rightarrow$ GDP) per il passaggio nello stato "on", ed una proteina GAP (che attiva l'idrolisi del GTP) per il passaggio nello stato "off".

Sono note forme mutanti di proteine-G monomeriche le quali, essendo *resistenti all'azione delle proteine GAP*, restano sempre legate al GTP (^{2*}), quindi permangono nello stato attivo. L'osservazione che la loro presenza è molto frequente nelle cellule neoplastiche appare di evidente interesse.

Le proteine-G monomeriche finora identificate costituiscono una "superfamiglia" suddivisa in tre gruppi:

a) i membri della famiglia *Rab*, che partecipano alla regolazione del traffico intracellulare di vescicole (Vol. I, pag. 109);

b) i membri della famiglia *Rho*, che sono implicati nella trasduzione di segnali dalla membrana cellulare al citoscheletro (soprattutto ai filamenti di actina);

c) i membri della famiglia *Ras*, che partecipano al trasferimento intracellulare dei segnali fino al nucleo, dove regolano l'espressione genica (pag. 207).

(*) che svolgono un ruolo analogo a quello delle *proteine RGS* sulle subunità- α delle proteine-G trimeriche (nota a pag. 188).

(^{2*}) in modo analogo ad una proteina-G_s avvelenata dalla CTX, o in presenza di GTP- γ S.

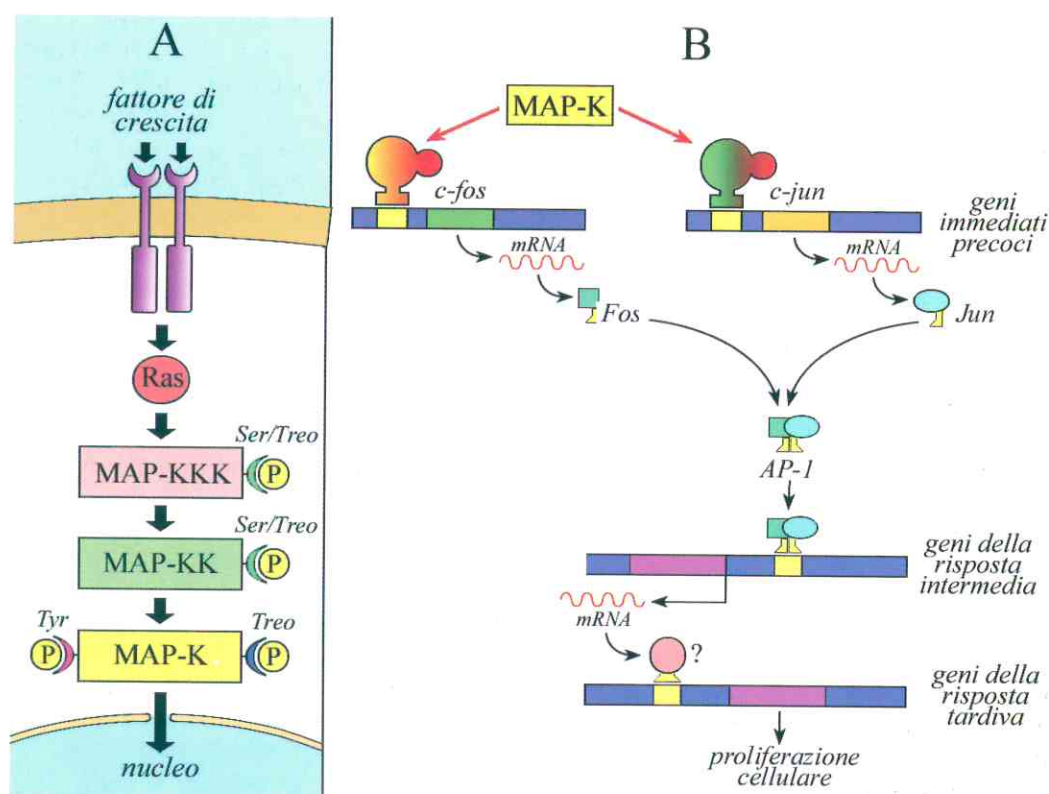


Fig. 6.30 - A: schema della "via" Ras → MAP-chinasi. B: le modificazioni dell'espressione genica che ne risultano cambiano sotto molti riguardi il comportamento della cellula.

Le MAP-chinasi (MAPK)

Le protein-chinasi attivate dagli agenti che stimolano la divisione cellulare (*mitògeni*), comunemente dette *MAP-chinasi* (*), formano una classe poco numerosa (attualmente se ne conoscono solo 3 gruppi: *ERK*, *JNK* e *p38*), ma rivestono grande interesse perché sono implicate in alcuni processi basilari della vita cellulare quali la *moltiplicazione* e la *differenziazione*, la genesi delle *reazioni infiammatorie* ed anche l'insorgenza e la metastasizzazione delle *neoplasie*. Esse possono agire nella trasmissione intracellulare di segnali che giungono fino al nucleo, influenzando la *trascrizione genica*.

Le MAPK si distinguono dalle altre protein-chinasi perché la loro completa attivazione richiede la fosforilazione sia di una *treonina* che di una *tirosina*,

separate nella loro molecola da un singolo aminoacido. L'enzima capace di catalizzare questa duplice fosforilazione (Fig. 6.30/A) si chiama *MAP-chinasi-chinasi* (MAP-KK), la quale è attivata per via fosforilativa (questa volta in serina/treonina) da una *MAP-chinasi-chinasi-chinasi* (MAP-KKK), attivata a sua volta dalla proteina-G monomerica *Ras* in risposta alla stimolazione di *recettori tirosin-chinasi*. Il messaggero extracellulare che attiva la catena è solitamente un *fattore di crescita*.

Le MAP-chinasi così attivate possono *migrare nel nucleo*, dove fosforilano diverse proteine che regolano la trascrizione di una serie di geni, detti "*immediati precoci*" (*Immediate Early Genes* o *IEG*) per la velocità con cui avviene la loro regolazione (nel giro di *pochi secondi*).

Complessa (e solo parzialmente conosciuta) è la catena delle proteine nucleari attivate dalla MAP-chinasi (Fig. 6.30/B); si possono ricordare: *Elk-1*, che agisce sulla regione regolatrice del gene "*precoce*" *fos*, e la proteina *Jun*, che si combina con una *proteina Fos* per formare una terza proteina regola-

(*) L'acronimo "MAP", riferito alle protein-chinasi "*Mitogen Activated*", con va confuso con quello che si usa per indicare le proteine MAP, "*microtubule associated*" (Vol. I, pag. 88).

trice chiamata AP-1. Anche se il ruolo di AP-1 non è ancora stato stabilito con precisione, si sa che essa attiverà altri geni (detti "geni della *risposta intermedia*"), i quali a loro volta, sempre tramite proteine regolatrici, attiveranno la "*risposta ritardata*" (*late response*) alla stimolazione della cellula.