

I RECETTORI ACCOPPIATI A PROTEINE G

I recettori accoppiati a proteine G sono costituiti da un'unica subunità formata da un filamento di aminoacidi che attraversa 7 volte la membrana plasmatica

Il sito di legame con l'agonista è situato sul versante extracellulare del recettore

Sul versante intracellulare del recettore è presente il sito di legame con la proteina G

Il termine "proteina G" identifica un complesso di 3 proteine dette alfa, beta e gamma

In condizioni di riposo, la subunità alfa lega una molecola di GDP e le subunità beta e gamma rimangono associate alla subunità alfa.

Quando il recettore è attivato da un agonista, la subunità alfa si libera del GDP e assume una molecola di GTP e le subunità beta e gamma si dissociano dalla alfa.

Le tossine colerica e della pertosse inibiscono selettivamente alcune fasi del ciclo GDP/GTP della proteina G

La subunità alfa con GTP attiva/inibisce enzimi (PLC, Adenilato ciclasi, ecc) o canali ionici: essi vengono detti "effettori"

La subunità alfa con GTP rimane attiva fino a che non idrolizza (grazie alla sua attività GTPasica) il GTP a GDP. Quando ciò avviene, si riforma il complesso inattivo alfa-beta-gamma

Questa sequenza di eventi e quella che segue chiariscono come la stimolazione di un recettore accoppiato a proteina G possa produrre effetti amplificati e prolungati (differenza rispetto alle risposte rapide tipiche dei recettori-canale)

Esistono diverse G proteine che differiscono per sequenza aminocidica, recettore con cui interagiscono, effettore che comandano

Gli effettori delle proteine G possono essere enzimi che producono secondi messaggeri o canali ionici

L'effettore ADENILATOCICLASI è un enzima di membrana che forma AMP ciclico (cAMP). Esso è stimolato da proteine G dette Gs e inibito da Gi

Il cAMP è normalmente degradato da enzimi detti FOSFODIESTERASI. Sostanze come la teofillina e analoghi presenti in bevande stimolanti (es the, caffè) inibiscono le fosfodiesterasi causando un aumento della concentrazione di cAMP e prolungamento dell'effetto della stimolazione di un recettore accoppiato a stimolazione dell'adenilato ciclasi (ad es. recettore beta adrenergico)

Il cAMP attiva un enzima fosforilante, detto proteinchinasi A (PKA) che fosforila substrati specifici.

L'aumento della forza di contrazione muscolare scheletrica e cardiaca indotta da agonisti catecolaminergici che stimolano il recettore beta adrenergico è spesso dovuta a fosforilazione da parte di PKA del canale al calcio voltaggio-dipendente. Questo causa maggiore ingresso di calcio e maggiore forza di contrazione

Nelle cellule muscolari lisce l'attivazione della PKA causa inibizione della contrazione: per questo la stimolazione del recettore beta adrenergico bronchiale causa broncodilatazione

L'effetto della fosforilazione prodotta da PKA termina solo quando il substrato è defosforilato da fosfatasi

Le proteine Gq stimolano l'enzima fosfolipasi C (PLC)

PLC stacca dalla membrana plasmatica un fosfoinositide detto IP3

IP3 attiva un canale al calcio presente in vescicole intracellulari. Quando la sua concentrazione aumenta il calcio esce dalle vescicole e la sua concentrazione aumenta nel citoplasma.

Altre vescicole rilasciano calcio quando la concentrazione dello ione aumenta (calcium-induced calcium release; rilascio di calcio indotto dal calcio). In questo modo un recettore di membrana causa aumento della concentrazione intracellulare dello ione calcio

Il calcio può aumentare anche per ingresso attraverso canali ionici (ad esempio operati dal voltaggio)

L'aumento del calcio intracellulare causa contrazione sia nelle cellule muscolari striate che in quelle lisce.

Molti degli effetti del calcio sono legati ad attivazione di chinasi calcio-calmodulina dipendenti

Le proteine Go stimolano canali ionici. Un esempio è il canale al potassi attivato via Go dal recettore muscarinico per l'acetilcolina (effetto bradicardizzante del sistema vagale)

Tab. 7.1. Esempi di recettori accoppiati alle proteine G.

Per ogni recettore, o specifico sottotipo recettoriale, sono indicati il tipo di proteina G con cui interagisce e l'effettore regolato. Si noti che un determinato recettore può attivare più di un tipo di proteina G e una determinata proteina G può regolare più di un effettore. Oltre a quelli riportati nella tabella, altri recettori accoppiati alle proteine G sono: i recettori metabotropi per il glutammato, un tipo di recettore per l'acido γ -aminobutirrico ($GABA_B$), i recettori per gli oppioidi, l'istamina, le purine, la sostanza P, l'angiotensina II, la secretina e il peptide vasoattivo intestinale (VIP).

Recettore per	Proteina G	Effettore	Recettore per	Proteina G	Effettore
Neurotrasmettitori:			Ormone di rilascio del TSH (TRH)		
Catecolamine				G_q	↑ Fosfolipasi C
Adrenergico β_1	G_s	↑ Adenilato ciclasi ↑ Canali al Ca^{2+}	Fattore di rilascio dell'ACTH (CRF)	G_s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico β_2, β_3	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Somatostatina	G_i/G_o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K^+ ↓ Canali al Ca^{2+}
Adrenergico α_1	G_q	↑ Fosfolipasi C	Vasopressina		
Adrenergico α_2	G_i/G_o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K^+ ↓ Canali al Ca^{2+}	V_1	G_q	↑ Fosfolipasi C
Dopamina			V_2	G_s	↑ Adenilato ciclasi
D_1	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Glucagone	G_s	↑ Adenilato ciclasi
D_2	G_i/G_o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K^+ ↓ Canali al Ca^{2+}	Ormone paratiroideo (PTH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi
Serotonina			Calcitonina	$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₁	G_i	↓ Adenilato ciclasi		G_s	↑ Adenilato ciclasi
5-HT ₂	G_q	↑ Fosfolipasi C		$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₄	G_s	↑ Adenilato ciclasi		$G_q?$	↑ Fosfolipasi C
Acetilcolina			Altri fattori di regolazione:		
Muscarinico M_1, M_3, M_5	G_q	↑ Fosfolipasi C	Trombina	G_i	↓ Adenilato ciclasi
Muscarinico M_2, M_4	G_i	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K^+		G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormoni peptidici:			Bradichinina		
Ormone adrenocorticotropo (ACTH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	B_2	G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormone luteinizzante (LH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Eicosanoidi:		
	$G_q?$	↑ Fosfolipasi C	Prostaglandina PGE_2		
Ormone follicolo-stimolante (FSH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	EP_1	G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormone tireotropo (TSH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	EP_2	G_s	↑ Adenilato ciclasi
	G_q	↑ Fosfolipasi C	EP_3	G_i	↓ Adenilato ciclasi
Ormone di rilascio del GH (GHRH)	G_s	↑ Adenilato ciclasi	Prostaglandina PGF_{2a}	G_q	↑ Fosfolipasi C
Ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH)	G_q	↑ Fosfolipasi C	Prostaciclina PGI_2	G_s	↑ Adenilato ciclasi
			Leucotrieni LTC_4, LTD_4	G_q	↑ Fosfolipasi C
			Trombossano TXA_2	G_q	↑ Fosfolipasi C
			Fotoni		
			Rodopsina	G_t	↑ cGMP fosfodiesterasi

↑ = stimolazione ↓ = inibizione

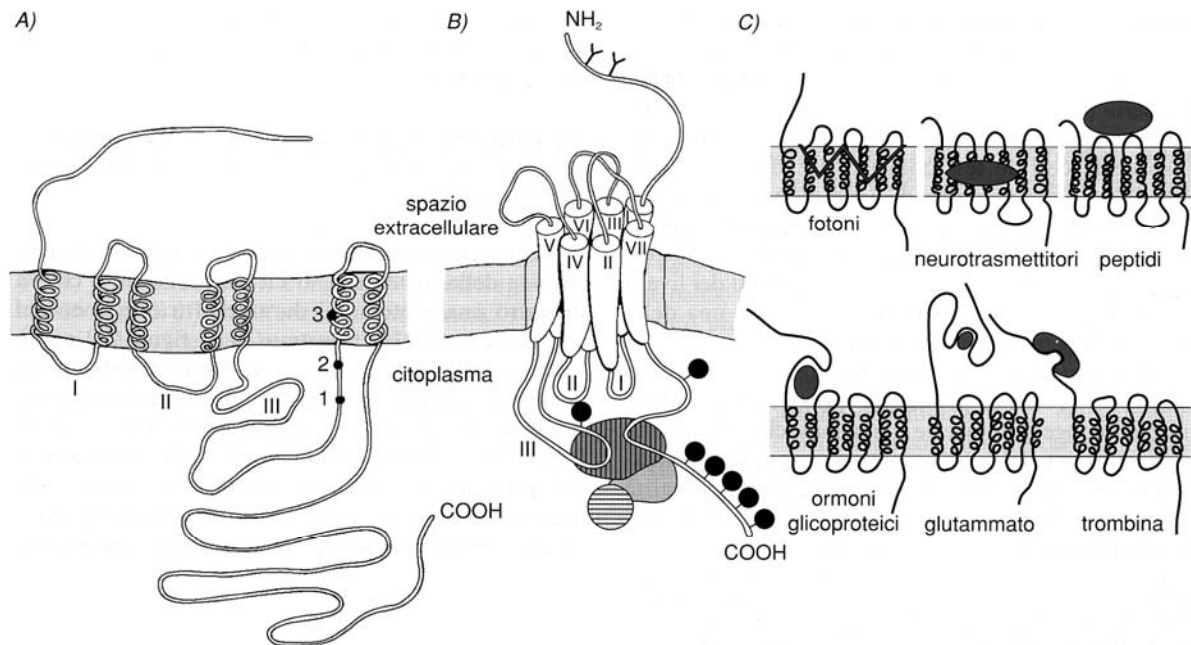


Fig. 7.1. I recettori accoppiati a proteine G sono formati da un unico filamento proteico che attraversa sette volte la membrana plasmatica (mostrato in modo schematico nella figura A). La sequenza aminoacidica ha il terminale aminico in posizione extracellulare mentre quello carbossilico è intracellulare; oltre ai sette territori transmembrana, numerati da I a VII (numerazione mostrata in B), vi sono tre tratti (chiamati *loops* o anse) extracellulari e tre intracellulari. La figura B) mostra un modello tridimensionale di recettore accoppiato a proteina G. Le Y presenti al terminale NH₂ indicano i siti di glicosilazione mentre i tondini pieni presenti nei territori intracellulari indicano i siti di fosforilazione. In questo modello si vede bene come il sito di legame per la proteina G, da cui dipende la specificità della risposta all'attivazione recettoriale, è formato dalla III ansa intracellulare in combinazione con il territorio carbossiterminale. In queste anse sono presenti anche siti di fosforilazione importanti per il controllo cellulare della funzionalità del recettore. Mutazioni della sequenza originale di un recettore possono essere causa di patologie: nella figura A) sono evidenziati i siti delle mutazioni spontanee identificati nei recettori per TSH (1, 2) e LH (3). Queste mutazioni, che rendono i recettori costitutivamente attivi, sono responsabili rispettivamente della formazione di adenomi tiroidei e di pubertà precoce. Nella figura C) sono mostrate le diverse strategie utilizzate dai recettori accoppiati a G proteine per legare l'agonista e trasdurne il messaggio. Nel caso dei fotoni, di alcuni neurotrasmettitori e di piccoli ligandi, il sito di legame per l'agonista è formato da alcuni territori transmembranari e localizzato in una tasca presente nello spessore della membrana plasmatica. Peptidi e citochine riconoscono un sito di legame presente sulla superficie extracellulare del recettore. Ormoni glicoproteici si legano ad una porzione N-terminale del loro recettore: qui fissati, essi vengono portati a contatto con la zona attiva del sito di legame che è presente sulla superficie extracellulare del recettore. Nel caso di glutammato e trombina, l'attivazione è dovuta ad interazione della superficie del recettore con un tratto N-terminale del recettore stesso. Il glutammato compie questo processo legandosi al terminale aminico e costringendolo a piegarsi sulla superficie extracellulare del recettore; la trombina invece taglia un pezzo del recettore generando un nuovo terminale aminico capace di attivare il recettore stesso.

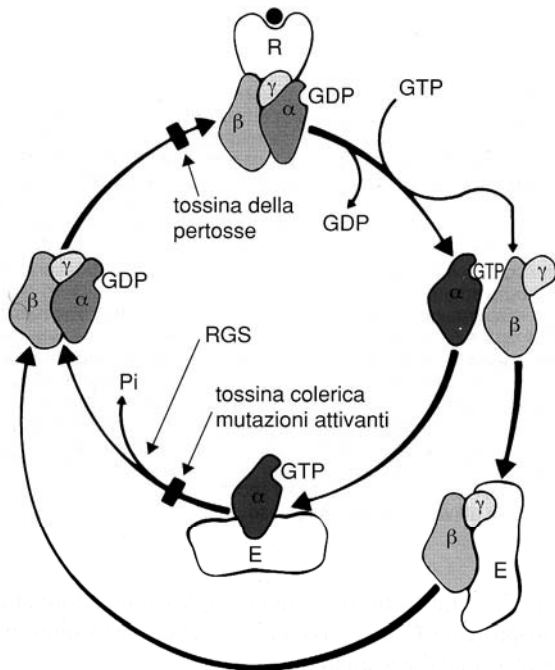


Fig. 7.2. Ciclo delle proteine G. Il legame dell'agonista al recettore (R) stimola la formazione del complesso recettore-proteina G; questa è in fase trimerica e porta, nel sito di legame per i nucleotidi guanilici, una molecola di GDP. Il recettore stimola lo scambio GDP-GTP a seguito del quale la proteina G si dissocia dal recettore e le tre subunità si separano a formare la subunità α , a cui è legato il GTP, e il complesso $\beta\gamma$. La subunità α attivata e il complesso $\beta\gamma$ si legano agli effettori (E) modulandone l'attività. La subunità α è dotata anche di attività GTPasica e quindi idrolizza il GTP che porta legato e lo trasforma in GDP; a questo punto essa perde la capacità di legare l'effettore e si riassocia al complesso $\beta\gamma$. Le proteine RGS accelerano la velocità di idrolisi del GTP da parte della subunità α . Le tossine batteriche del colera e della pertosse sono in grado di modificare la subunità α , alterando il normale funzionamento del ciclo della proteina G.

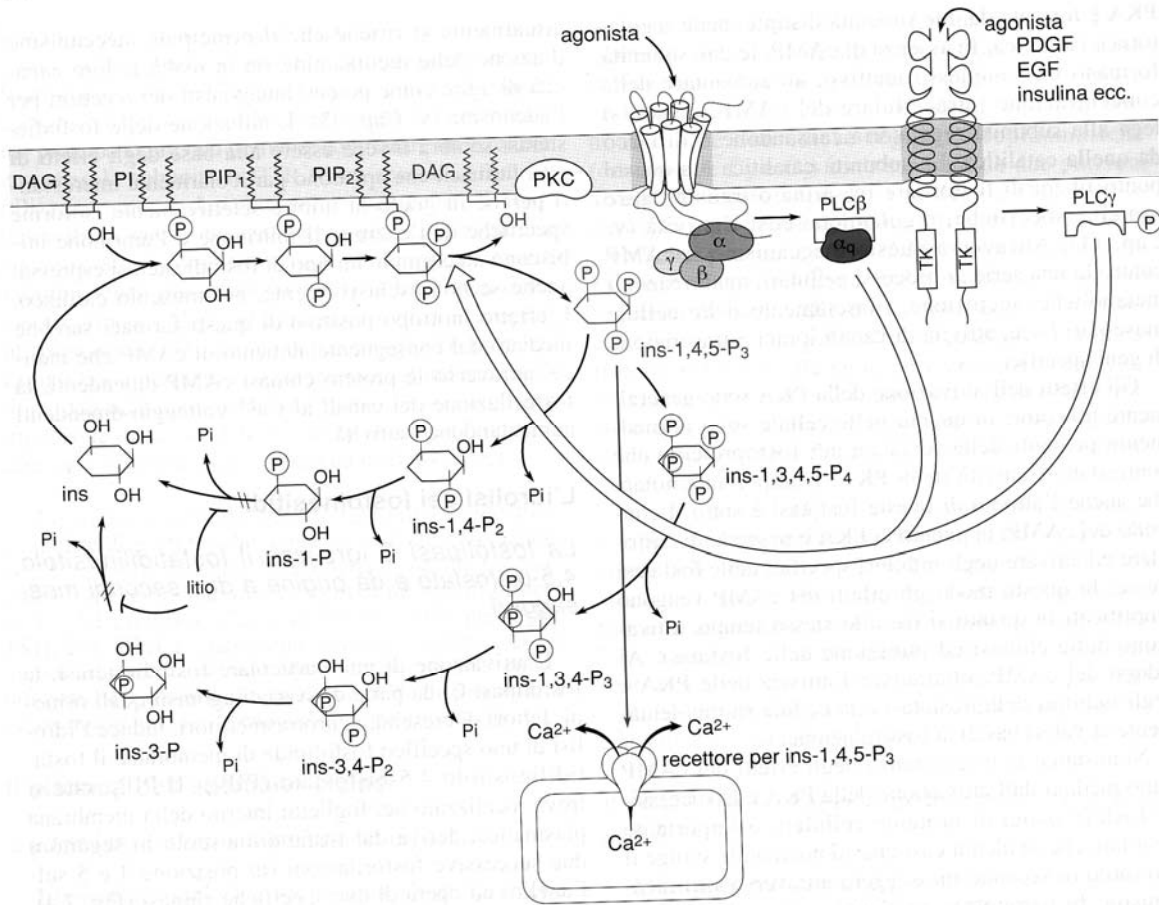


Fig. 7.4. Idrolisi dei fosfoinositidi. Sono rappresentati i due meccanismi di attivazione delle fosfolipasi C (PLC) di tipo β e di tipo γ da parte di recettori accoppiati a proteine G e di recettori ad attivazione tirosin chinasi, rispettivamente. Per chiarezza di disegno le due fosfolipasi sono rappresentate nel citoplasma. Nella realtà, come descritto nel testo, in seguito ad attivazione le fosfolipasi traslocano alla membrana dove sono localizzati i fosfoinositidi. Qui esse idrolizzano il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2) generando inositolo-1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG): il primo, interagendo con un suo recettore specifico, induce liberazione di ioni calcio da un deposito intracellulare a rapido scambio mentre il secondo è fondamentale per l'attivazione della proteinkinasi C (PKC). Sono rappresentate anche le vie metaboliche principali dell' IP_3 con i siti d'azione del litio, seguite dal ciclo di risintesi dei fosfoinositidi dall'inositolo e dal diacilglicerolo. PIP_2 = fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato; PIP_1 = fosfatidilinositolo 4-fosfato; PI = fosfatidilinositolo; DAG = diacilglicerolo; Ins = inositolo; PKC = proteinkinasi C.

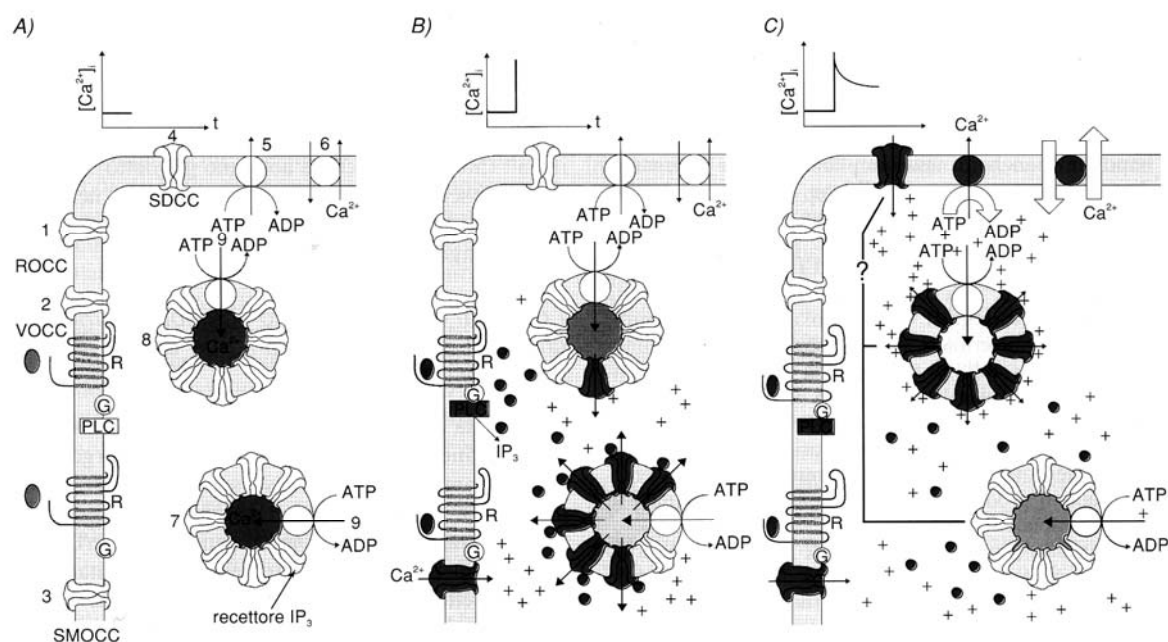


Fig. 8.4. Meccanismi omeostatici di controllo. La $[Ca^{2+}]_i$ è il risultato dell'equilibrio tra meccanismi che controllano il passaggio dello ione Ca^{2+} attraverso le membrane plasmatiche e di organuli intracellulari. L'influsso attraverso la membrana plasmatica può avvenire per attivazione di ROCC, VOCC, SMOCC e SDCC (numeri da 1 a 4 nella figura A), mentre la sua estrusione è controllata dall'attività della pompa al calcio che consuma ATP (5) o dello scambiatore (6) che utilizza il gradiente per il Na^+ come fonte di energia. Il rilascio di Ca^{2+} dai depositi a rapido scambio richiede l'attivazione di recettori-canale sensibili a IP_3 (7) o al Ca^{2+} stesso (8). Il catione viene sequestrato da questi organuli grazie all'attività di ATPasi della famiglia SERCA (9). Vengono illustrati i diversi processi subcellulari responsabili della variazione transiente della $[Ca^{2+}]_i$ indotta da attivazione di recettori accoppiati (con proteina G) alla fosfolipasi C e a SMOCC.

In condizioni di riposo gli organuli a rapido scambio sono carichi di calcio legato alle proteine luminali (A). Quando il recettore (R) accoppiato alla fosfolipasi C (PLC) viene attivato dal proprio agonista, si forma IP_3 (pallini) che induce rilascio di Ca^{2+} dai depositi dotati di recettori specifici (A). Contemporaneamente si può avere influsso di ione attraverso lo SMOCC (B). Il Ca^{2+} stesso (+) attiva i recettori per la rianodina presenti in altri depositi a rapido scambio (C). Molto rapidamente gli organuli esauriscono la loro carica e la $[Ca^{2+}]_i$ inizia a decadere per l'azione di rimozione di SERCA e delle pompe e trasportatori della membrana plasmatica, ma si mantiene ancora a livelli elevati grazie all'influsso attraverso gli SMOCC e i canali SDCC attivati da un segnale (?) generato dai depositi "svuotati" (C). Grazie all'attività delle SERCA, i depositi vengono ricaricati di calcio in breve tempo e resi disponibili per rispondere ad un nuovo stimolo. Per questo motivo tali organuli sono anche chiamati "depositi di Ca^{2+} a rapido scambio". È importante considerare che se l'unico strumento a disposizione di una cellula per aumentare la $[Ca^{2+}]_i$ fosse l'influsso dall'esterno, sarebbe impossibile produrre aumenti della $[Ca^{2+}]_i$ in porzioni profonde del citoplasma senza sovraccaricare le porzioni a più stretto contatto della membrana plasmatica.

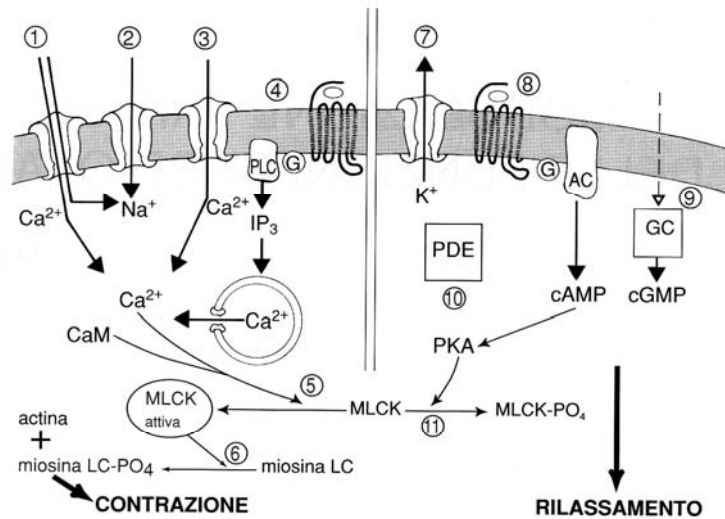


Fig. 38.1. Il grado di contrazione della cellula muscolare liscia dipende dall'equilibrio tra eventi che portano a contrazione o a rilassamento. L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ induce attivazione della cascata enzimatica che porta a contrazione: esso può essere indotto da attivazione di recettori-canale permeabili a cationi come il recettore P2 per le purine indicato col numero 1, da attivazione di canali al sodio voltage-dipendenti (2) e, di conseguenza, da attivazione di canali permeabili al calcio (3) o da attivazione recettoriale della fosfolipasi C (PLC) che porta a formazione del secondo messaggero IP_3 e a rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari a rapido scambio (4). L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ causa l'attivazione della chinasi della catena leggera della miosina (MLCK) da parte del complesso Ca^{2+} /calmodulina (CaM) (5); la MLCK attivata fosforila la catena leggera della miosina (6) ed innesca la contrazione. Il rilassamento è favorito da eventi che portano a riduzione dell'eccitabilità, ad es., causata da attivazione di canali al potassio (7), o da aumento della concentrazione intracellulare di nucleotidi ciclici (cAMP, cGMP). Questo può avvenire per (8) attivazione di recettori accoppiati positivamente all'adenilato ciclasi (AC) o per attivazione della guanilato ciclasi, per esempio da parte di NO (9). Le fosfodiesterasi (PDE) invece riducono le concentrazioni intracellulari dei nucleotidi ciclici (10). Da ricordare che spesso le chinasi attivate dai nucleotidi ciclici modulano le conduttanze dei canali voltage-dipendenti. Inoltre la protein chinasi attivata da cAMP è in grado di fosforilare MLCK inattivandola (11) e quindi di ridurre ulteriormente la possibilità d'interazione tra miosina e actina. Gli strumenti farmacologici disponibili per ridurre la $[Ca^{2+}]_i$ comprendono i farmaci antagonisti dei recettori accoppiati ad idrolisi dei fosfoinositidi, i calcio-antagonisti attivi sui canali al calcio voltage-dipendenti di tipo L, farmaci attivi su canali al Na^+ e al K^+ che possono influenzare l'eccitabilità cellulare. Per aumentare la concentrazione intracellulare di nucleotidi ciclici sono disponibili farmaci agonisti su recettori che attivano l'adenilato ciclasi, nitroderivati attivi sulla guanilato ciclasi e farmaci che inibiscono le fosfodiesterasi.