

3.3. Semnalizarea celulară

Probabil că nimic din ceea ce se întâmplă la nivelul membranelor nu prezintă o complexitate mai mare decât fenomenele de semnalizare. Când pătrunzi în această temă a biologiei celulare, te simți ca intrat într-o junglă: nu știi de unde poate veni sprijinul în a găsi calea de răzbatere în drumul ales, nu știi de unde poate veni pericolul. (Rugăm cititorii ca, dincolo de pregătirea pentru dificultatea temei, să înțeleagă din această metaforă că fenomenele de semnalizare sunt, pe de o parte, esențiale pentru buna funcționare a celulelor, dar, pe de altă parte, atunci când ies din limitele normalului însoțesc procese patologice dintre cele mai diverse.) Au fost scrise cărți întregi care încearcă să sistematizeze cunoștințele noastre despre semnalizarea celulară. Problema este că, deși suntem ca într-o junglă, cunoscând o groază de aspecte, care mai de care mai provocatoare, cunoaștem prea puține pentru a găsi drumul către esențe. Acumularea de cunoștințe în domeniul semnalizării celulare este un proces continuu, susținut de interesul major pentru acest subiect din cercetarea biomedicală contemporană, cu efecte atât în cunoașterea celulei normale, cât și în ceea ce înseamnă patologii dependente de aceste fenomene membranare, respectiv celulare. Din 1957, când Earl Wilbur Sutherland, Jr. a identificat adenozin-monofosfatul ciclic (AMPc) ca moleculă produsă intracelular (rezultate publicate un an mai târziu [1, 2]) și pe care în 1965 a supranumit-o mesager secund, fiind implicată în răspunsul celular la semnalul primit de la epinefrină (adrenalină) [3], interesul pentru ce se întâmplă în celulă, când aceasta interacționează cu molecule semnal (numite și mesageri primari) a crescut permanent, iar informațiile s-au acumulat în ritm din ce în ce mai alert, ajungând în acest moment la o explozie de cunoștințe în permanentă creștere, exponențială. Munca de pionierat a lui Sutherland¹ și a grupului său a permis elaborarea unui model de acțiune a hormonilor potrivit căruia molecula semnal (mesagerul primar) nu trebuie să intre în celulă pentru a transmite un mesaj. Conform acestui model, hormonul se leagă de un receptor expus pe suprafața celulară stimulând formarea, în mediul intracelular, a mesagerului secund, care la rândul său poate să moduleze (să activeze sau să inhibe) diverse procese metabolice. Rolul pe care mesagerii secundii îl au în semnalizarea celulară a fost înțeles, din ce în ce mai bine, pe parcursul următorilor 50 de ani de la descoperirea AMPc, iar eforturile depuse pentru descifrarea rolului nucleotidelor ciclice (atât al AMPc, cât și al unui alt compus înrudit, guanozin-monofosfatul ciclic – GMPc) au fost răsplătite prin decernarea a nu mai puțin de cinci Premii Nobel [4]. Descoperirea rolului de mesager secund pentru AMPc a fost începutul unei evoluții spectaculoase a cunoștințelor despre ceea ce numim acum semnalizare celulară, iar implicarea mesagerilor secundii s-a dovedit a fi o regulă fără aplicabilitate generală, întrucât există multiple căi de semnalizare care nu necesită participarea acestor intermediari, după cum se va vedea în acest subcapitol.

Demersul prezentării temei într-o carte generală despre biomembrane, care are și rolul unui manual, este unul dificil, deoarece necesită o sistematizare atentă care să nu creeze confuzie și să lase mintea cititorului deschisă. Ne asumăm dificultatea și riscurile unei reușite de un nivel aflat sub exigențele celor inițiați.

3.3.1. Câteva aspecte generale despre semnalizarea celulară

Semnalizarea celulară, care mai general ar putea fi denumită semnalizare intercelulară (deoarece există de regulă o celulă care transmite un semnal și o altă celulă care îl receptează, deși unele celule pot recepta și semnale fizice), reprezintă

¹ Earl Wilbur Sutherland Jr. a fost distins în 1971 cu Premiul Nobel pentru fiziologie sau medicină, cu următoarea motivație a juriului: „for his discoveries concerning the mechanisms of the action of hormones”.

modalitatea esențială prin care celulele pot comunica între ele prin schimb de informații, indiferent de distanța la care se află. O altă denumire a ceea ce generic numim semnalizare celulară mai poate fi aceea de semnalizare transmembranară, deoarece oricare ar fi calea prin care celula primește din afara sa sau transmite în afară informațiile, mesajul trebuie să străbată membrana, să treacă prin planul acesteia. Așadar, semnalizarea celulară presupune, de regulă, cooperarea între două celule; una care trimite semnalul, cealaltă care îl receptează și fenomene care se petrec la nivelul membranelor (pentru trecerea semnalului din interior în exterior, la celula semnalizatoare și pentru trecerea mesajului prin membrana celulei receptoare, de la exterior la interior, pentru a fi folosit mesajul).

3.3.1.1. Clasificarea căilor de semnalizare

În funcție de distanța la care se află celulele care semnalizează între ele (celula care transmite semnalul, respectiv celula care îl receptează), căile de semnalizare se împart în (Fig. 3.17):

- **endocrine** (Fig. 3.17, A), atunci când celulele se află la distanță, iar molecula semnal trebuie să fie transportată de umorile organismului (de regulă de sânge și de lichidul interstițial);
- **paracrine** (Fig. 3.17, B), atunci când celulele care comunică se află în imediata vecinătate;
- **autocrine** (Fig. 3.17, C), atunci când semnalul este transmis și receptat de aceeași celulă;
- **juxtacrine** (Fig. 3.17, D), căi prin care sunt receptate semnale, atunci când celulele sunt jonctionate, adică legate una de alta (tocmai datorită stării lor de atașare).

Această clasificare este necesar să fie nuanțată, deoarece există o modalitate de semnalizare deosebită, între două celule dintre care cel puțin cea care transmite semnalul este neuron și care se află în imediata apropiere (deci corespunde definiției semnalizării paracrine), dar este denumită specific și anume semnalizare prin sinapse sau semnalizare sinaptică (vezi ce se întâmplă la nivelul sinapselor așa cum a fost prezentat în Fig. 3. 5). Altă situație, care ar părea a nu respecta, în mod rigid, clasificarea și definițiile date pentru diversele tipuri de căi de semnalizare, este cea legată de faptul că unele celule care comunică paracrin se pot afla la mare distanță unele de altele, deoarece celulele care semnalizează trimit prelungiri citoplasmice foarte lungi. Așa se întâmplă în cazul telocitelor care trimit lungi telopode, de ordinul sutelor de μm [5]. Pentru aceste tipuri de celule și capacitatea lor de a semnaliza au fost descrise și ultrastructuri ce se numesc sinapse stromale, realizate cu celule tisulare rezidente sau migrate din sânge [6]. În sfârșit, între aceste cazuri deosebite de procese de semnalizare, care nuanțează clasificarea, trebuie menționată și semnalizarea prin intermediul joncțiunilor comunicante (Fig. 3.17, E), care de fapt reprezintă o cale prin care celule stimulate prin interacțiunea unor receptori proprii cu molecule semnal, trimit informația stimulului celulelor din jur, cu care au stabilit joncțiunile. Această transmitere de informații se face prin difuziunea directă a unor mesageri secunzi pe calea conexonilor, complexe proteice transmembranare (vezi în volumul al II-lea).

Revenind la clasificare, pentru primele trei căi menționate, semnalizarea se face prin molecule secretate de celula semnalizatoare. Acestea trebuie să se deplaseze prin spațiile intercelulare pentru a ajunge la țintă, adică la alte celule (în primele două cazuri), sau la aceeași celulă pentru semnalizarea autocrină. Semnalizarea juxtacrină presupune interacțiunea unor molecule din structura membranelor celor două celule (celula semnalizatoare, respectiv celula țintă). De remarcat că, în această

situație, ambele celule transmit semnal și ambele receptează informații prin semnalul transmis de partenerul de interacțiune.

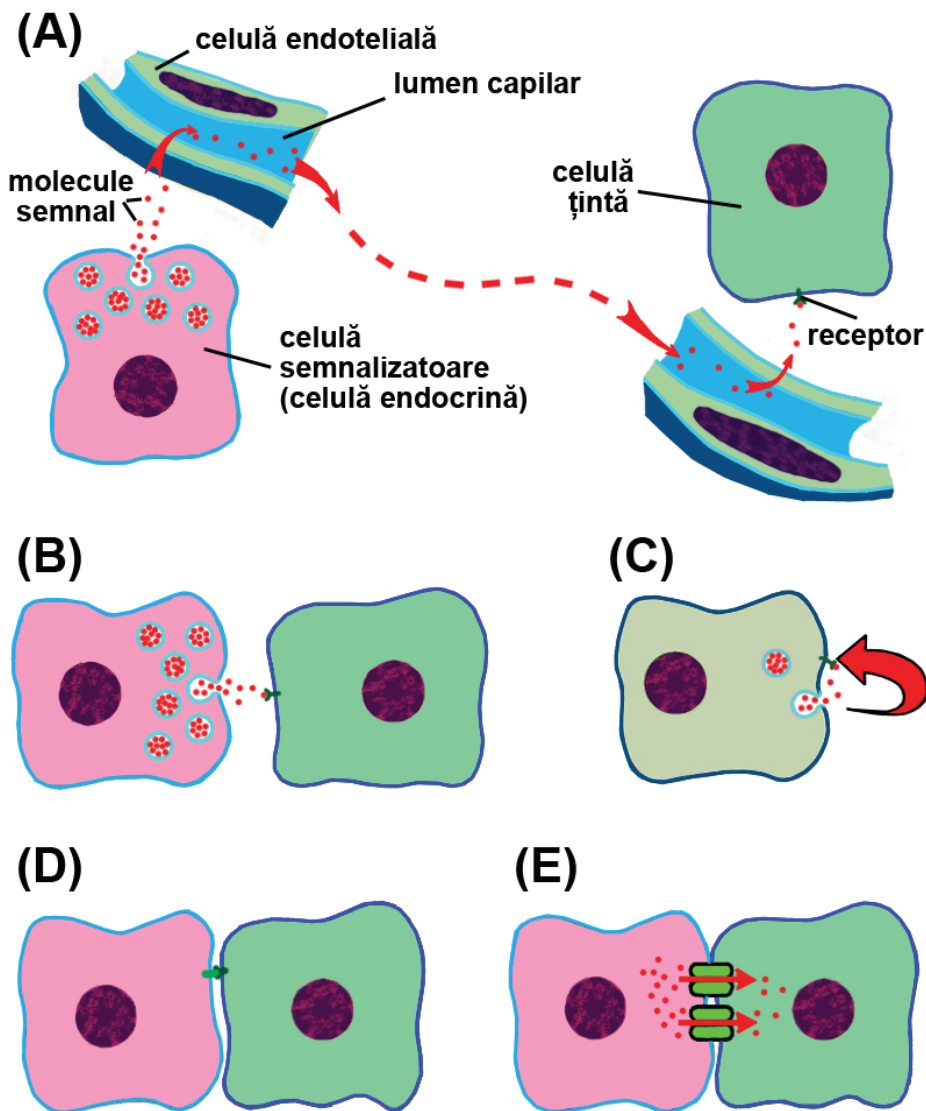


Fig. 3.17. Tipuri de căi de semnalizare. Săgețile roșii, unde există, indică direcția de mișcare a moleculelor semnal. **A.** Calea endocrină reprezintă semnalizarea în care celula care trimite semnalul se află într-un țesut din altă zonă a organismului. Celula secretă molecula semnal (ligandul) prin exocitoză, iar aceasta ajunge în circulația sanguină prin care este dusă la celula țintă. Intrarea moleculelor semnal în capilare se face prin transcitoză (dinspre țesut către lumenul vasului de sânge) sau prin fenestre (deschideri diafragmate în corpul celulelor endoteliale), iar la nivelul țesuturilor ce conțin celulele țintă are loc procesul de transcitoză în sens invers (dinspre lumenul capilarului către spațiul subendotelial). Odată ajunse în zona celulelor țintă, moleculele semnal se leagă de receptorul specific, declanșând procesul de semnalizare celulară. **B.** Semnalizarea paracrină implică două celule aflate în proximitate. Moleculele semnal exocitate de celula semnalizatoare găsesc pe suprafața celulelor vecine receptorul cu care interacționează, activându-l și inițiind mecanismul de semnalizare. **C.** În semnalizarea autocrină, celula care eliberează molecula semnal o și recunoaște prin receptorul aflat în propria membrană, auto-stimulându-se. **D.** Semnalizarea juxtacrină implică interacțiunea a două celule prin componente, de regulă, transmembranare. În această situație ambele celule transmit semnale și ambele receptează starea de legătură în care se află. **E.** Semnalizare prin eludarea unui receptor din celula țintă. Acest tip de semnalizare operează în celulele țesuturilor în care este nevoie de comportament sincron. Aceste celule stabilesc joncțiuni comunicante (vezi în volumul al II-lea al cărții, la secțiunea despre joncțiuni celulare) prin intermediul unor complexe transmembranare denumite conexoni. Avantajul unor asemenea nanostructuri joncționale, destinate comunicării intercelulare, este dat de faptul că nu este nevoie ca fiecare celulă să fie stimulată de molecula semnal în mod direct, prin propriii receptori, ci o singură celulă stimulată transmite informația tuturor celorlalte celule din împrejur. © Mircea Leabu, 2014.

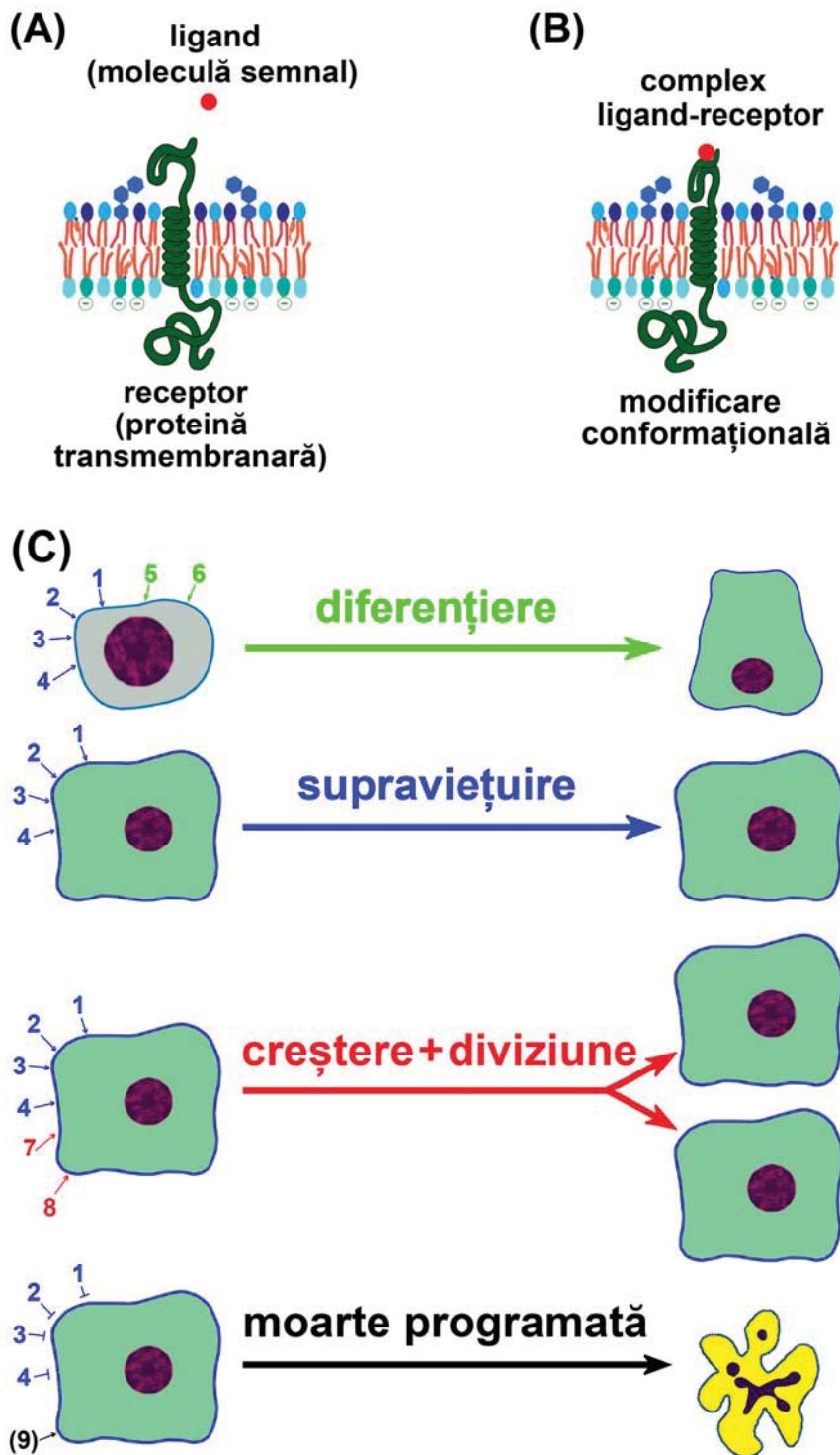


Fig. 3. 18. Componentele esențiale pentru declanșarea semnalizării și efectele semnalelor. A. Pentru declanșarea unui proces de semnalizare sunt necesari doi factori: molecula semnal, numită și ligand, în spațiul extracelular și receptor accesibil, cel mai adesea în membrană. **B.** Procesul de semnalizare celulară se inițiază, însă, numai prin interacționarea ligandului cu receptorul pe care îl activează prin modificarea conformației. **C.** Orice celulă receptează o mare diversitate de semnale. Cea mai mare parte a semnalelor (indicate în figură prin numere de la 1 la 4) sunt destinate supraviețuirii și funcționării normale a celulelor. Celulele stem și cele progenitoare au nevoie de stimuli specifici (5 și 6) pentru a se diferenția corespunzător. Diviziunea celulară și toate procesele ce pregătesc această etapă a ciclului celular necesită o combinație adecvată de stimuli, inclusiv unii specifici (7 și 8) care induc proliferarea. În situația în care celulele nu mai primesc stimulări de nici un fel, respectiv combinații neadecvate de semnale, sau anumite semnale (9), acestea pot duce la declanșarea morții celulare programate (de regulă apoptoză) sau la situații patologice (ceea ce nu este prezentat în figură). Săgețile dinspre cifrele care indică stimulii au semnificația acțiunii acestora, iar liniile barate înseamnă că semnalele respective sunt blocate. © Mircea Leabu, 2014.

Un caz aparte de semnalizare juxtacrină este reprezentat de atașarea celulelor la componente ale matricei extracelulare; în această situație, celula care interacționează cu componenta extracelulară „conștientizează” starea ei: se află angrenată într-o interacțiune cu matricea extracelulară sau se află detașată de aceasta, comportându-se diferit, adică răspunzând nuanțat în funcție de starea în care se află.

3.3.1.2. Aspecte generale legate de mecanismul semnalizării celulare

Oricare ar fi tipul de cale de semnalizare, la inițierea fenomenului participă două componente (Fig. 3.18, A, B): (i) **molecula semnal**, numită și **ligand** (secretată sau expusă la suprafața membranei de celula semnalizatoare; ligandul poate fi și o macromoleculă din matricea extracelulară) și (ii) **receptorul** de la nivelul celulei țintă.

Ca urmare a interacțiunii receptorului cu ligandul, deci ca urmare a receptării unui semnal, celula țintă declanșează unele procese ce se constituie ca reacție la primirea informației purtate de molecula semnal și se finalizează cu ceea ce se numește răspuns la semnalul receptat. Legarea moleculei semnal atrage modificări conformaționale la nivelul receptorului ce induc inițierea mecanismului prin care celula primește și prelucrează semnalul. Răspunsurile celulare sunt de o mare diversitate. Această mare diversitate de răspunsuri are la bază, în primul rând, marea varietate de molecule semnal. Există sute de molecule semnal care pot afecta celulele. Cum simultan pot să se exercite diverse semnale (diferite molecule semnal receptate simultan de aceeași celulă), rezultă că celulele pot răspunde, teoretic, la milioane de combinații posibile. Cum capacitatea unei celule de a recepta un semnal este dependentă de prezența receptorului corespunzător, rezultă că diversitatea răspunsurilor celulare este dependentă și de setul de receptori disponibili. Dar tipul de răspuns pe care celula îl creează este dependent și de setul de proteine efectoare, adică acele proteine care preiau semnalul de la receptor și contribuie la desfășurarea proceselor intracelulare care constituie răspunsul. Acesta este motivul pentru care același stimul (aceeași moleculă semnal) poate duce la răspunsuri diferite, în tipuri diferite de celule. De exemplu, acetilcolina determină contracția la nivelul celulelor musculare striate scheletale (vezi în Fig. 3.5 cum se determină această contracție), dar conduce la relaxarea mușchiului cardiac, pe când în celulele secretoare ale mucoasei gastrice sau din medulosuprarenală duce la secreție, inducând exocitoză.

Oricare ar fi combinația de semnale care acționează asupra unei celule la un moment dat, răspunsul celular va determina un comportament îndreptat spre unul dintre următoarele patru efecte posibile (Fig. 3.18, C):

- (i) **diferențierea**, însoțită de autoregenerare, pentru celule stem sau progenitoare în perioada dezvoltării embrionare și formării țesuturilor, inclusiv în organismele tinere, dar și în organismele adulte, în situații de regenerare tisulară sau în procesele legate de hematopoieză;
- (ii) **supraviețuirea**, care reprezintă efectul cel mai des întâlnit ca răspuns și care se bazează pe cea mai mare diversitate de combinații, fiecare celulă necesitând stimuli specifici pentru a răspunde prin supraviețuire și funcționare normală;
- (iii) **proliferația**, este declanșată la anumite combinații de semnale ce apar atunci când este nevoie de sporirea populației celulare într-o anumită zonă a unui țesut (ține de capacitatea organismului de a-și menține homeostazia celulară și capacitatea de a reface țesuturile);
- (iv) **moartea celulară programată** (de regulă sub formă de **apoptoză**), apare în lipsa oricărui semnal care să determine supraviețuirea sau în prezența unor semnale specifice.

Indiferent de răspunsul celular pe care îl determină, putem defini patru etape ale procesului de semnalizare celulară, etape care sunt general valabile (dar nu în exclusivitate). Celula și-a creat alternative la aceste principii ale procesului de semnalizare pentru a eficientiza satisfacerea nevoilor sale, deoarece uneori nu este cazul să recurgă la procese deosebit de elaborate. Etapele de principiu ale mecanismelor de semnalizare celulară sunt:

1. **Inițierea semnalizării** prin legarea ligandului (moleculii semnal) de receptor (Fig. 3.18, B și Fig. 3.19, momentul 1). **Legarea ligandului de receptor** presupune o interacțiune de afinitate, de mare specificitate, caracteristică sistemelor biologice, care se bazează pe o multitudine de forțe fizico-chimice, dintre cele mai diverse, exercitate simultan (punți de hidrogen, interacțiuni electrostatice, interacțiuni hidrofobe), toate contribuind la punerea în comun a unor suprafețe organizate de structurile terțiare și/sau cuaternare ale celor două molecule.

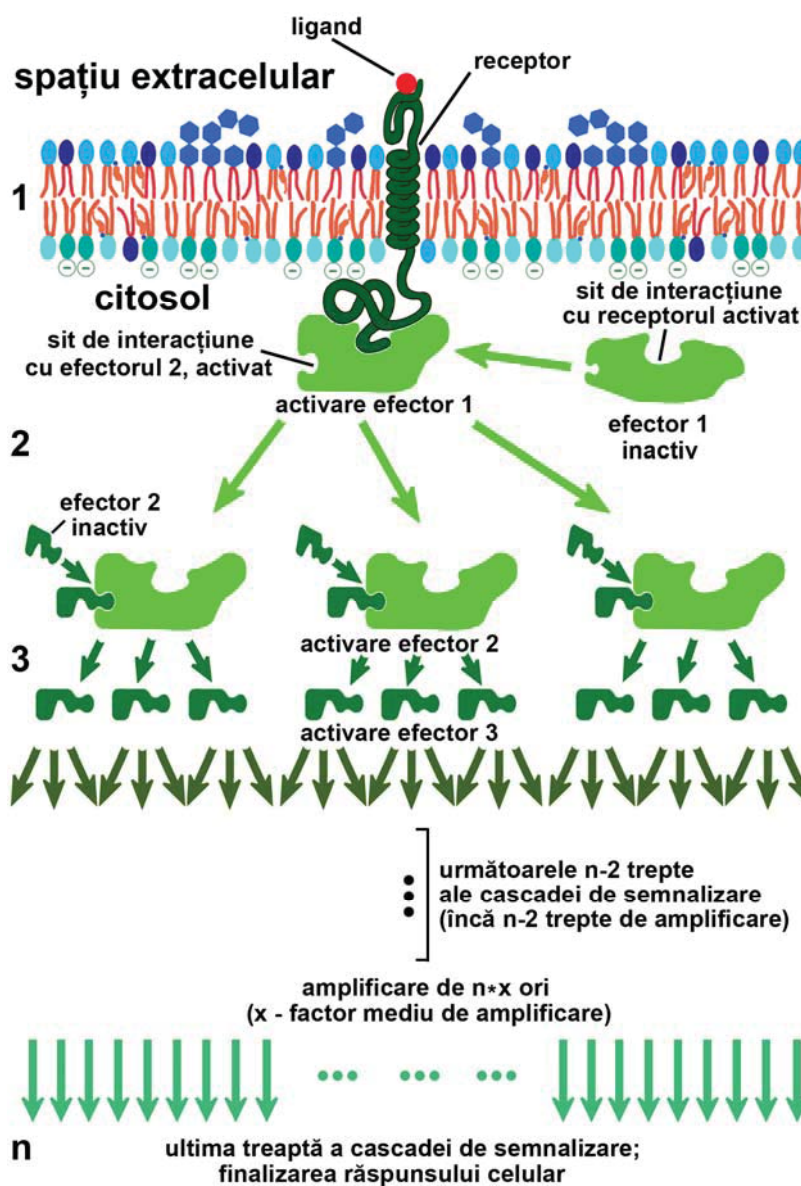


Fig. 3.19. Mecanismul de semnalizare celulară în cascadă. 1. Inițierea semnalizării are loc la nivelul membranei prin realizarea interacțiunii ligand-receptor. Legarea moleculei semnal de receptor induce modificări conformaționale ale lanțului polipeptidic al receptorului care se propagă prin domeniul transmembranar până la endodomeniu, mesajul fiind transdus. Informația purtată de molecula semnal traversează astfel planul membranei ajungând în citosol și are loc activarea receptorului. 2. Receptorul activat leagă molecula primului efector, activându-l. Cât persistă starea stimulată a receptorului, acesta poate activa un număr mai mare de molecule ale primului efector. Are loc prima treaptă a amplificării semnalului. 3. Primul efector activat interacționează, la rândul său, cu efectorul al doilea din cascadă stimulându-l în număr multiplu, ceea ce sporește amplificarea. Procesul continuă în aceeași manieră, de n ori, iar la sfârșit, ultimul tip de efector din cascada de semnalizare, activat pentru un număr de molecule

corespunzător amplificării ($n \times x$), contribuie la finalizarea răspunsului celular. Factorul de amplificare 3, folosit în primele trepte, este aleatoriu, după cum aleatorie este situația în care, în toate treptele cascadei de semnalizare, amplificarea ar respecta un factor constant. În figură nu este reprezentat pasul 4 al semnalizării, atenuarea semnalului, care implică fenomene complexe și diverse. © Mircea Leabu, 2014.

2. **Transducția semnalului și activarea receptorului:** Transducția semnalului² are la bază modificări conformaționale la nivelul moleculei receptorului, datorate interacțiunii cu ligandul. Pentru receptorii aflați la nivelul membranei celulare, cei mai numeroși din cunoștințele noastre de până acum, modificările se propagă, prin intermediul domeniului transmembrantar al receptorului, la endodomeniu, atrăgând activarea receptorului.
3. **Activarea efectorului și amplificarea semnalului** (Fig. 3.19, momentele de la 2 la n): Receptorul stimulat prin legarea ligandului activează, la rândul său, proteina efectoră din pasul imediat următor al semnalizării. O primă amplificare a semnalului este efectuată chiar la acest nivel deoarece un receptor stimulat poate, cât se află în această stare, să activeze un număr mai mare de molecule ale efectorului. Ținând cont de faptul că un proces de semnalizare presupune un număr mai mare de tipuri de efectori acționând secvențial, fiecare preluând semnalul de la tipul anterior (din amonte) și transmițându-l tipului următor (în aval), amplificarea semnalului crește în fiecare etapă a căii de semnalizare, până la finalizarea răspunsului celular.
4. **Atenuarea semnalului și desensibilizarea celulei:** Această etapă presupune inactivarea efectorilor și controlul complexului ligand-receptor (fie desfacerea ligandului și degradarea intracelulară a acestuia, fie degradarea simultană a celor doi protagoniști ai inițierii procesului de semnalizare, ceea ce presupune implicarea fenomenului de endocitoză). Inactivarea efectorilor poate însemna cel mai adesea lizarea moleculelor activatoare (de exemplu scindarea GTP la GDP), metabolizarea mesagerilor secunzi (vezi mai jos definirea acestora), dacă aceștia sunt implicați în calea de semnalizare în cauză, sau scoaterea funcțiilor activatoare de pe molecula efectorului (de exemplu defosforilarea, dacă fosforilarea a presupus activarea), sau alte modalități de modificare post-traducere³ (de exemplu fosforilarea dacă forma activă presupune defosforilarea). Desfacerea complexului ligand-receptor se face, de regulă, după internalizarea acestuia în sistemul endozomal, care poate fi urmată de sortări și direcționări ale ligandului sau chiar și ale receptorului către lizozomi, pentru degradare. Alteori receptorul, care eliberează ligandul în endozom, este reciclat la suprafața celulei, pentru a reîntra în rol în interesul celulei.

3.3.2. Tipuri de receptori și modalități de acțiune

Marea diversitate a receptorilor cunoscuți se poate clasifica în funcție de mai multe criterii. Un prim criteriu îl reprezintă proprietățile fizico-chimice ale moleculei semnal. În funcție de acest criteriu, împărțim receptorii celulari în două categorii:

1. **Receptori pentru molecule semnal liposolubile/lipofile** (hidrofobe);
2. **Receptori pentru molecule semnal hidrosolubile/hidrofile.**

3.3.2.1. Receptorii pentru liganzi lipofili sunt proteine localizate în citosol sau în nucleu care preiau ligandul după difuzia acestuia prin membrană. Este firesc ca acești liganzi, având proprietăți lipofile (adică fiind solubili în lipide), să poată străbate membrana prin difuziune simplă, adică să treacă printre lipidele bistratului.

² Deși nu există neapărat o controversă, sintagma de transducție a semnalului a fost inițial înțeleasă ca introducerea semnalului purtat de ligand din exteriorul celulei, în interior și transmiterea mesajului mai departe către elementele implicate în realizarea răspunsului celular. În prezent, unii consideră că prin transducția semnalului trebuie să înțelegem atât trecerea mesajului prin planul membranei și activarea receptorului, cât și procesele de transmitere în cascadă a informației primite de celulă, cu amplificarea efectului, pentru realizarea răspunsului celular. În carte, noi folosim prima accepțiune.

³ Prin modificări post-traducere înțelegem schimbări ale diferitelor funcțiuni ale aminoacizilor din lanțul polipeptidic al unei proteine, după ce biosinteza acesteia a fost finalizată. Aceste modificări post-traducere sunt efectuate de enzime specializate.

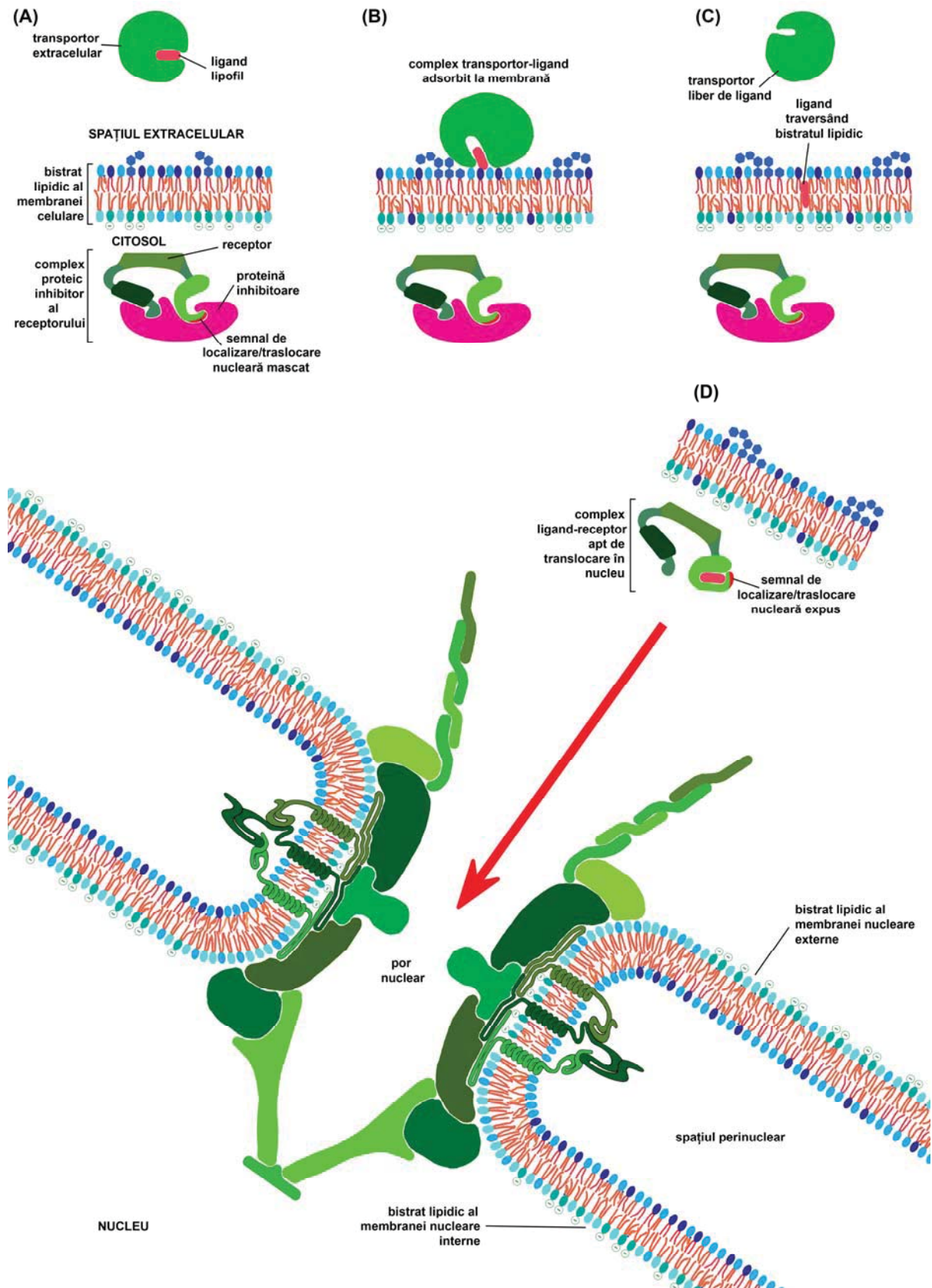


Fig. 3.20. Modul de acțiune a receptorilor pentru liganzi lipofili. A. Liganzul este purtat către membrana celulei țintă de un transportor extracelular, care îl izolează de hidrofilicitatea mediului. B. La nivelul membranei țintă transportorul se adsoarbe la suprafața celulei, creând premisele eliberării liganzului către bistratul lipidic. C. După eliberare, liganzul traversează bistratul lipidic membranar. D. După traversarea bistratului lipidic, liganzul este preluat de receptor în citosolul cortical; receptorul trece în stare activată, gata să călătorească spre și să pătrundă prin porii nucleari în nucleu, pentru a acționa asupra genei țintă. © Mircea Leabu, 2014.

Ca să ajungă la membrana celulei țintă, însă, liganzii trebuie să fie purtați prin spațiul extracelular de către transportori miscibili cu apa, adică proteine care îi leagă în complexe specifice, mascându-i de hidrofilicitatea mediului. Ajunși prin această intermediere la celulele țintă, sunt eliberați la nivelul plasmalemei, permițându-li-se străbaterea bistratului datorită proprietăților lor fizico-chimice. Mai departe fenomenele se pot rezuma astfel: **(i)** pentru receptorii localizați în citosol (Fig. 3.20), după formarea complexului ligand-receptor acesta este transportat în nucleu, unde își îndeplinește funcția, aceea de a modula exprimarea genelor și **(ii)** pentru receptorii localizați direct în nucleu, liganzii sunt conduși acolo de alte proteine transportoare, aflate în citosol, care îi izolează de hidrofilicitatea mediului intracelular, îi translochează prin porii nucleari și, odată ajunși în spațiul în care sunt localizați receptorii, îi transferă acestora activându-i și declanșând transcrierea genelor țintă.

Sunt cunoscute 6 tipuri de receptori pentru liganzi lipofili: **receptor pentru cortizol**, **receptor pentru estrogeni**, **receptor pentru progesteron**, **receptor pentru vitamină D**, **receptor pentru hormoni tiroidieni** și **receptor pentru acid retinoic**.

Pe lângă receptorii ai căror liganzi lipofili sunt cunoscuți, există și receptori care au fost identificați și incluși în clasa receptorilor nucleari doar pe baza descifrării secvenței de ADN, fără ca ligandul lor să fie cunoscut. Aceștia au primit denumirea de **receptori nucleari orfani** și sunt intens dezbătuți și studiați, reprezentând pentru comunitatea științifică o țintă de dezvoltare a cunoașterii, inclusiv o posibilă țintă terapeutică [7, 8].

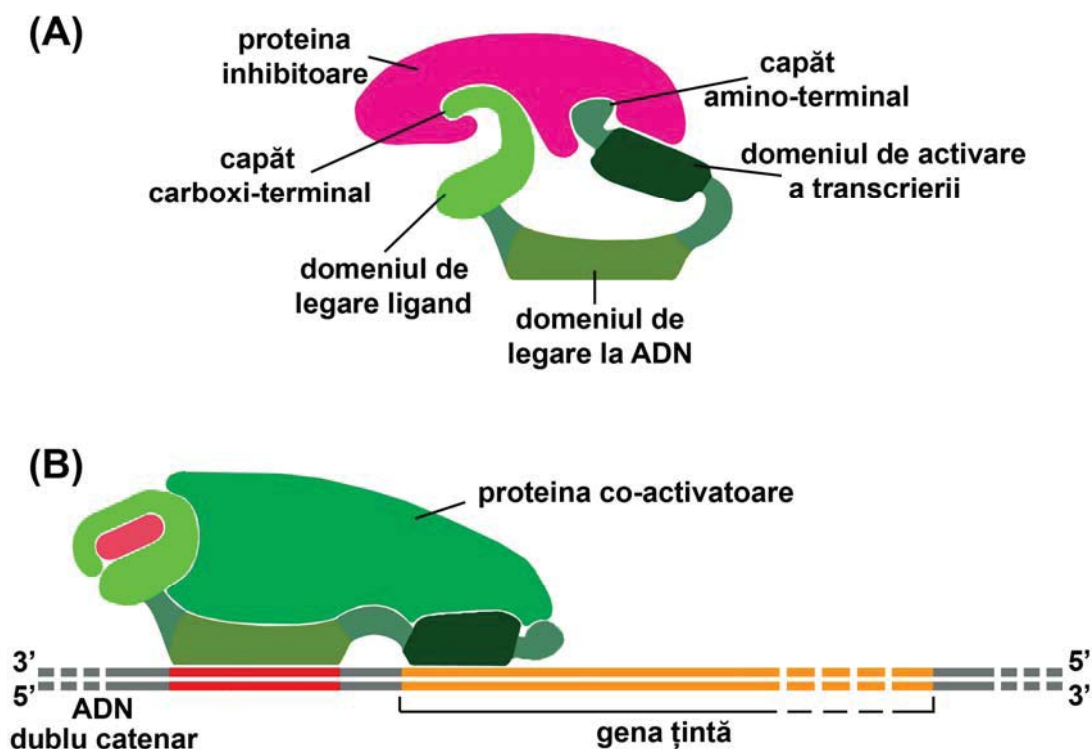


Fig. 3.21. Organizarea moleculară și modul de acțiune caracteristice receptorilor pentru liganzi lipofili. **A.** Receptorul în complexul inhibitor și domeniile funcționale ale sale. **B.** Receptor activat atașat la elementul de legare a receptorului din structura ADN (în roșu) și cu domeniul de activare a transcrierii la nivelul genei țintă. © Mircea Leabu, 2014.

Oricare ar fi tipul de receptor din această categorie, ei prezintă unele caracteristici structurale și funcționale comune. Acestea sunt: un sit de legare a ligandului, un sit de legare la secvențe specifice din ADN și un domeniu de activare a transcrierii (Fig. 3.21, A). Similar este și mecanismul de activare. În stare inactivă, înainte de a interacționa cu ligandul, receptorul este cuplat la un complex proteic inhibitor (Fig. 3.21, A). În această stare complexată, inactivă, receptorul are mascate situl de legare la ADN și domeniul de activare a transcrierii. După legarea ligandului, receptorul se desprinde de complexul de inactivare și, dacă se află inițial în citosol, este gata de transportat (translocat) în nucleu. Ajuns acolo, declanșează fenomenele pe care le facilitează și receptorii localizați permanent în nucleu, adică datorită expunerii locului de legare la ADN, se atașează în zone favorabile activării genei specifice și prin domeniul de activare a transcrierii, devenit accesibil, procesul este declanșat (Fig. 3.21, B). Transcrierea genei și exprimarea acesteia în celulă, prin proteina codificată, determină producerea răspunsului specific perechii respective receptor-ligand.

3.3.2.2. Receptorii pentru liganzi hidrofilii sunt cei mai numeroși și sunt localizați la nivelul membranei celulare, expunând situl de legare a moleculei semnal la suprafața celulei. Acești receptori se pot împărți, în funcție de tipul de mecanism de semnalizare pe care îl declanșează, în 3 clase principale:

1. **Receptori cu funcție de canal ionic** (deja amintite canale comandate chimic, de la transportul prin membrană);
2. **Receptori cuplați cu proteine G heterotrimerice**;
3. **Receptori cu funcție enzimatică sau cuplați cu enzime**.

Chiar din denumirile lor se poate deduce faptul că mecanismele prin care receptorii la liganzi hidrofilii sunt activați se caracterizează prin mare diversitate. Pentru a nuanța și mai mult ideea de diversitate, în cazul receptorilor pentru liganzi hidrofilii, menționăm că cei cu funcție enzimatică sau cuplați cu enzime se clasifică, la rândul lor, în 6 tipuri:

- i. Receptori cu activitate tirozin-kinazică* – acționează direct ca enzime atunci când sunt activați și fosforilează tirozine specifice din propriile structuri (mai exact, ale partenerului de dimerizare, un alt monomer al receptorului) sau din structura unui mic set de proteine de semnalizare, intracelulare;
- ii. Receptori cuplați cu tirozin-kinaze citosolice* – nu au activitate enzimatică intrinsecă, dar transmit semnalul prin asocierea directă cu proteine intracelulare cu funcție tirozin-kinazică ;
- iii. Receptori cu activitate serin/treonin-kinazică* – au funcție enzimatică și fosforilează serine și/sau treonine din propriile structuri și/sau din structura unor proteine reglatoare cu care se asociază și care, după activare, modulează transcrierea unor gene specifice;
- iv. Receptori dependenți de o activitate histidin-kinazică* – activează o cale de semnalizare cu două componente: mai întâi se produce autofosforilarea kinazei la histidină, după care are loc transferul grupării fosfat unei proteine de semnalizare secundară, efector al acestor căi;
- v. Receptori cu activitate guanilat-ciclică* – au funcție enzimatică și catalizează, prin activarea endodomeniului, formarea directă de GMP ciclic (GMPc) în spațiul citosolic submembranar;
- vi. Receptori cu activitate fosfatazică* – acționează ca enzime, hidrolizând grupări fosfat grefate pe tirozine din structura unor proteine de semnalizare intracelulare, specifice; se numesc și **tirozin-fosfataze asemănătoare receptorilor** deoarece liganzii prezumtivi nu au fost încă identificați, iar funcția lor de receptori nu a fost evidențiată direct.

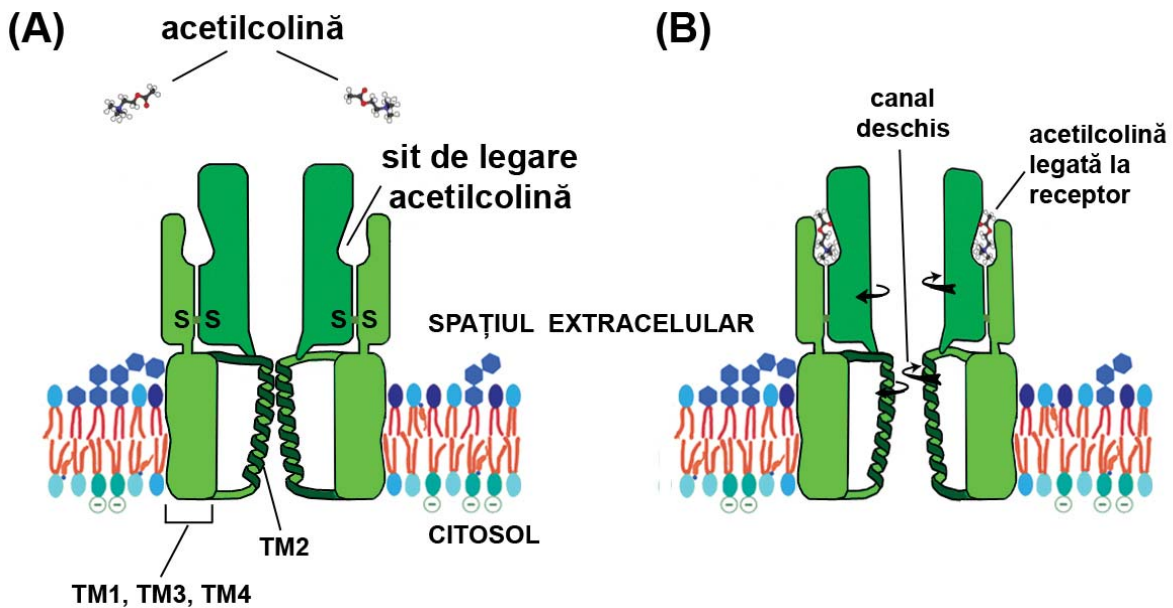


Fig. 3.22. Receptor cu funcție de canal, exemplificat prin receptorul pentru acetilcolină. **A.** În stare inactivă, lipsa interacțiunii cu ligandul, contribuie la menținerea domeniilor transmembranare TM2, ale complexului pentameric, în poziții prin care obturează calea de trecere a ionului (sunt prezentate în imagine numai cele două subunități α , ale complexului proteic ce organizează canalul). **B.** După ocuparea sitului de legare a acetilcolinei, modificările conformaționale din ectodomeniul complexului transmembranar induc o deplasare a TM2, printr-o mișcare de răsucire (direcțiile de rotire sunt indicate de săgeți) ce se finalizează cu deschiderea căii de trecere a ionului specific. © Mircea Leabu, 2014.

Este momentul să detaliem puțin informațiile despre canalele comandate prin liganzi, despre care am mai vorbit la subcapitolul anterior, transportul membranar. Ne amintim că sunt complexe proteice transmembranare, multipas cu rol în transportul ionilor și ele funcționează și ca receptori cu funcție de canal. Un exemplu de **receptor cu funcție de canal ionic** a fost deja amintit la transportul prin membrană. Este vorba de **receptorul pentru acetilcolină** (Fig. 3.22) de la nivelul sarcolemei (membrana celulei musculare striate scheletale), localizat în membrana de la nivelul sinapsei neuro-musculare. Acest receptor este un complex transmembranar format din cinci subunități (2α , β , γ și δ), fiecare cu câte patru treceri în α -helix prin bistratul lipidic (TM1-TM4). Trei dintre aceste segmente transmembranare sunt orientate către lipidele bistratului (TM1, TM3 și TM4), iar unul (TM2) către axul pentamerului, unde se formează calea de trecere a ionului [5]. Ectodomeniile celor 5 subunități sunt mari și formează 2 situri de legare a acetilcolinei cu participarea în principal a celor două subunități α . Când receptorul interacționează cu ligandul, modificările conformaționale de la nivelul ectodomeniului complexului atrag deplasarea TM2 la nivelul zonei transmembranare și se deschide calea de trecere a ionului [9-11]. Organizarea descrisă mai sus și mecanismul de acțiune (Fig. 3.22) sunt valabile și pentru alte categorii de receptori cu funcție de canal aflați în membrana celulară și comandați de liganzi extracelulari.

Un alt exemplu de canal implicat în procese de semnalizare îl reprezintă **receptorul pentru IP_3** , numit și **canal de calciu controlat de IP_3** , din membrana reticulului endoplasmic (reticul sarcoplasmic în celulele musculare), al cărui ligand este citosolic. Receptorul se găsește într-un număr mare de tipuri celulare și apare în toate formele de organisme de la nematode la om. Rolul său este acela de a elibera Ca^{2+} din rezervele intracelulare, cel mai adesea din reticulul

endoplasmic. Controlează o mare diversitate de fenomene dependente de Ca^{2+} , cum ar fi contracția musculară, secreția celulară, proliferarea celulară, apoptoza, fertilizarea, motilitatea celulară și altele. Receptorul este proteină transmembranară cu ~2700 aminoacizi în moleculă și o masă de ~300kDa. Domeniul transmembranar implică porțiunea carboxi-terminală a lanțului polipeptidic, are 6 treceri în α -helix prin bistratul lipidic prin care organizează canalul de calciu, trecerile 5 și 6 fiind critice în formarea căii ionice. Canalul pentru ion se formează la nivelul unei structuri tetramerică (patru monomeri de receptor pentru IP_3 se asociază în membrană pentru a forma complexul unui canal funcțional). Capătul amino-terminal al proteinei monomerice, orientat către citosol structurează situl de legare a IP_3 (până spre aminoacidul 650) și conține trei aminoacizi bazici prezenți în toate cele trei izoforme ale receptorului: Arg-265, Lys-508 și Arg-511. Între regiunea responsabilă de legarea ligandului și porțiunea proteinei care formează domeniul transmembranar, se află o zonă amplă de control și modulare a funcției receptorului la nivelul căreia se află situri de legare a diverși modulatori cum ar fi ATP, calmodulină sau situri de fosforilare sub acțiunea unor kinaze [12-14].

Receptorii cuplați cu proteine G heterotrimerice⁴ (Fig. 3.23) sunt proteine transmembranare multipas de tip I, cu 7 treceri prin planul membranei.

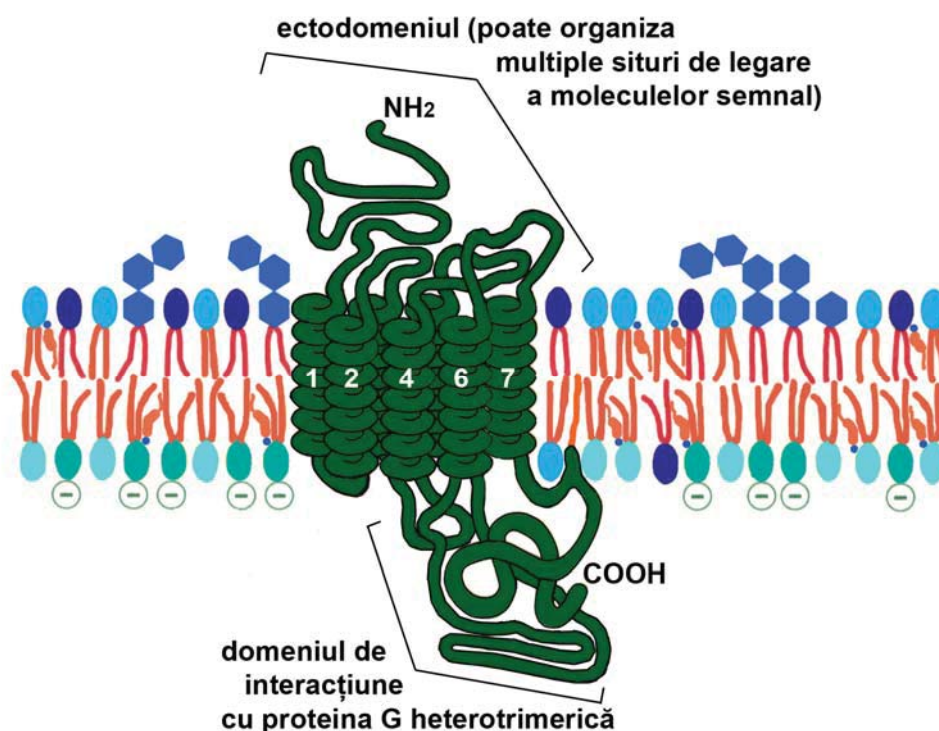


Fig. 3.23. Organizarea transmembranară a receptorilor cuplați cu proteine G heterotrimerice. Ectodomeniul proteinei poate organiza situri de interacțiune cu o diversitate de molecule semnal. Aceste situri se pot afla la nivelul capătului N-terminal al lanțului polipeptidic, la nivelul buclor extracelulare, dar și în spațiul creat, pe fața externă a membranei, de domeniile transmembranare TM3, TM5, TM6 și TM7, cu asistarea, la exterior, prin bucla dintre TM4 și TM5. La nivelul endodomeniului, receptorul organizează interfața de interacțiune cu proteinele G heterotrimerice.
© Mircea Leabu, 2014.

⁴ În 2012, Robert J. Lefkowitz și Brian K. Kobilka au primit Premiul Nobel pentru chimie, pentru contribuția lor la cunoașterea acestor receptori, iar motivația succintă a juriului a fost: "for studies of G-protein-coupled receptors". Mai mult, anterior, în 1994, Alfred G. Gilman și Martin Rodbell au primit Premiul Nobel pentru medicină sau fiziologie pentru studii destinate proteinelor G heterotrimerice cu următoarea motivație a juriului: "for their discovery of G-proteins and the role of these proteins in signal transduction in cells".

Ectodomeniul receptorului este mare și structurează situri pentru diverși liganzi, iar endodomeniul conține situl de interacțiune cu proteinele G heterotrimerice, cât și locuri de fosforilare necesare desensibilizării.

Organizarea transmembranară a receptorului [15] implică expunerea la suprafața celulei a capătului amino-terminal, iar cele șapte domenii transmembranare (TM₁ la TM₇) organizează trei bucle externe între TM₂ și TM₃, TM₄ și TM₅, respectiv TM₆ și TM₇ (aceste bucle împreună cu capătul N-terminal formând ectodomeniul), ca și trei bucle interne între TM₁ și TM₂, TM₃ și TM₄, respectiv TM₅ și TM₆, bucle care, împreună cu capătul carboxi-terminal expus pe fața citosolică, formează endodomeniul receptorului, responsabil de transmiterea mesajului către proteinele G heterotrimerice. În endodomeniu, bucla dintre TM₅ și TM₆, ca și capătul C-terminal prezintă mare variabilitate structurală de la o formă la alta de receptori din această clasă. Pe ectodomeniu se pot afla multiple situri de legare pentru diverși liganzi organizate fie la nivelul porțiunii N-terminale a lanțului polipeptidic, fie de buclele extracelulare, fie de zone superficiale din TM₃, TM₅, TM₆ și TM₇, împreună cu bucla extracelulară dintre TM₄ și TM₅ aflată deasupra. Diversitatea de situri de legare a unor molecule semnal explică și potențialul deosebit al acestor receptori pentru fiziologia celulară. La aceasta se adaugă diversificarea pe care o pot asigura seturile de efectori intracelulari din diferitele tipuri de celule care folosesc acești receptori.

Au fost identificate circa 1000 de tipuri de receptori cuplați cu proteine G heterotrimerice. Numărul lor mare poate fi corelat cu faptul că recunosc și mediază răspunsuri la stimularea celulară printr-o gamă foarte diversă de molecule semnal (peptide și hormoni peptidici, neurotransmițători sau mediatori lipidici) și prin stimuli senzoriali.

Ca să argumentăm mai concludent marea diversitate a receptorilor cuplați cu proteine G heterotrimerice, putem da drept exemplu pe cei sensibili la substanțele odorante din mucoasa nazală. Există un număr foarte mare de receptori olfactivi diferiți, circa 350 subtipuri în mucoasa nazală la om și aproximativ 1000 la șoarece, ceea ce explică simțul olfactiv mai dezvoltat la cel din urmă.

Numărul acestor receptori este amplificat și de faptul că pentru același ligand pot exista mai mulți receptori; de exemplu există 9 receptori activați prin adrenalină, 5 pentru acetilcolină și cel puțin 15 pentru serotonină.

Succint, mecanismul de acțiune al acestor receptori implică următoarele patru etape:

1. legarea ligandului și activarea receptorului;
2. interacțiunea receptorului activat cu proteinele G heterotrimerice și activarea acestora prin eliberarea GDP, urmată de legarea GTP și disocierea trimerului în subunitatea α și heterodimerul $\beta\gamma$, ambele elemente rezultate în urma disocierii efectuând pași independenți în semnalizare;
3. transmiterea semnalului la efectorul din aval care poate avea fie funcție enzimatică (adenilat-ciclaza, fosfolipaza C- β , GMPc-fosfodiesteraza), fie rol de canal ionic.
4. dezactivarea proteinei G heterotrimerice prin hidroliza GTP datorată funcției GTP-azice a subunității α ; în acest fel, subunitatea α revine la conformația inițială, inactivă, cu GDP legat, formă care are mare afinitate pentru dimerul $\beta\gamma$ cu care se reasociază, rezultând structura heterotrimerică ce poate începe un nou ciclu.

Ca în toate celelalte procese de semnalizare, fixarea ligandului determină reorganizarea conformației unor segmente transmembranare din structura receptorului și expunerea unor motive cheie de aminoacizi la nivelul buclelor citosolice dintre domeniile transmembranare și de la nivelul segmentului C-terminal

al lanțului polipeptidic. Aceste motive permit modularea interacțiunilor endodomeniului receptorului cu proteina G heterotrimerică. Proteinele G heterotrimerice funcționează ca un „releu” ce cuplează funcțional receptorul din amonte de efectori din aval. Activarea lor de către receptor se concretizează prin schimbarea GDP cu GTP pe subunitatea α și desfacerea trimerului în $G\alpha$ activată și heterodimerul activat $G\beta\gamma$, fiecare dintre aceste elemente activate având propriile roluri în cascade de semnalizare de sine stătătoare (Fig. 3.24).

Receptorii cuplați cu proteinele G heterotrimerice au mecanisme diferite, deoarece acționând asupra unor efectori diverși induc răspunsuri diferențiate, în funcție de tipul de proteină G heterotrimerică implicată și setul de efectori ai celei stimulate. Au fost identificate mai multe tipuri de proteine G heterotrimerice, cunoscându-se cam 20 subunități α , cel puțin 6 subunități β și 12 subunități γ [16, 17] pentru celulele mamiferelor. La om au fost evidențiate 16, 5, respectiv 11 gene diferite care codifică subunitățile α , β și γ [18]. Punctăm 7 dintre aceste subunități α :

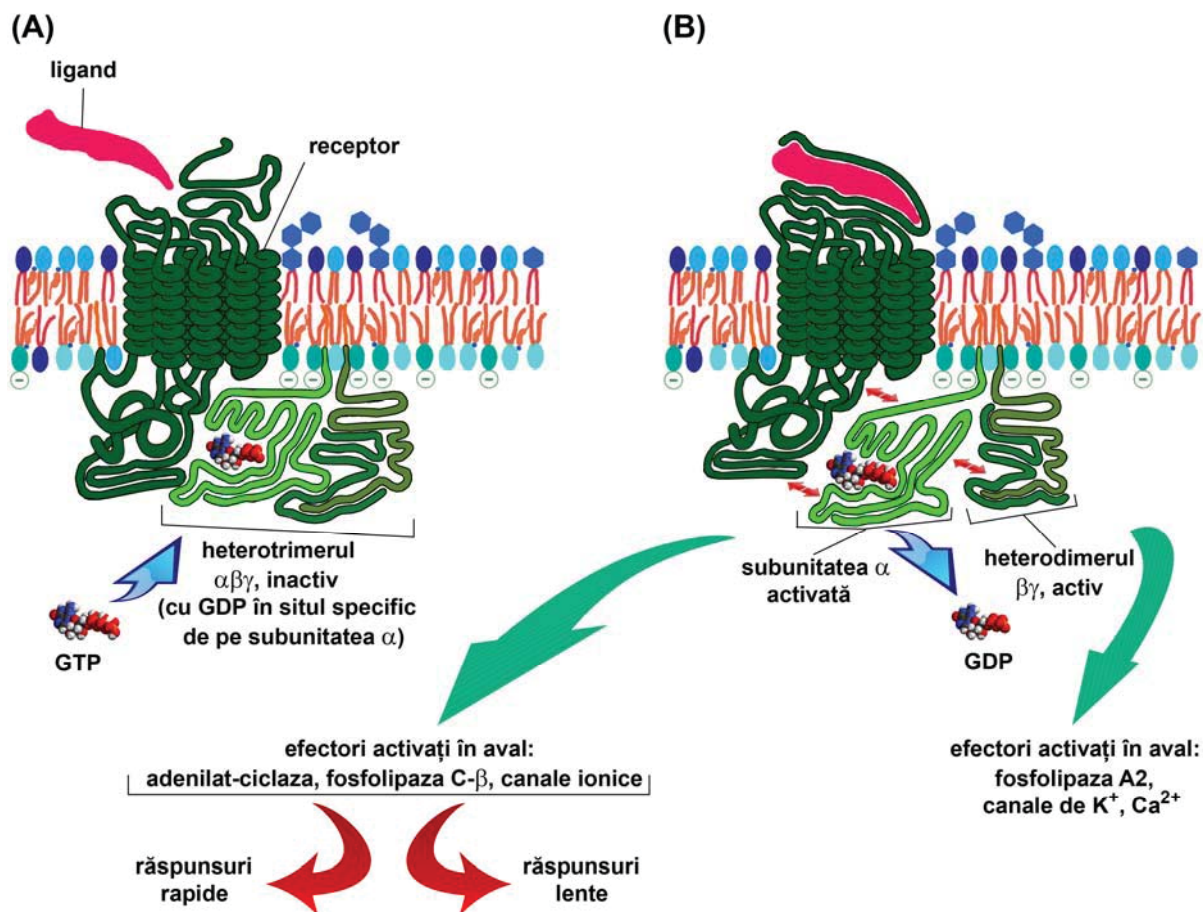


Fig. 3.24. Inițializarea semnalizării prin receptorii cuplați cu proteine G heterotrimerice și diversitatea de căi ce pot fi urmate. A. Complexul receptor-efector în stare inactivă. Ligandul nu este legat pe situl specific, ceea ce menține receptorul și heterotrimerul proteinei G în stare inactivă. Săgeata albastră indică disponibilitatea GTP de a dezlocui GDP de pe subunitatea α a heterotrimerului. B. Ligandul legat de receptor activează endodomeniul care se comportă ca factor de schimbare a GDP cu GTP pe subunitatea α a proteinei G heterotrimerice. Această înlocuire determină desfacerea complexului (săgețile roșii, duble, în contrasens) în trei elemente: receptor, subunitatea $G\alpha$ activată și dimerul $\beta\gamma$, de asemenea activat. Sunt menționate căile ulterioare de transmitere a semnalului pentru elementele active ale proteinei G heterotrimerice, fiind evidentă diversitatea de modalități de folosire de către celule a acestei clase de receptori, ca și faptul că răspunsurile pot fi rapide sau lente. © Mircea Leabu, 2014.

1. α_s din proteine G stimulatorie (G_s), care activează adenilat-ciclaza și canale de Ca^{2+} ;
2. α_i pentru proteine G inhibitorie (G_i), inhibând adenilat-ciclaza și activând canale de K^+ ;
3. α_q în organizarea proteinelor G_q , care activează fosfolipaza C- β ;
4. α_{olf} în proteine G olfactorii (G_{olf}), activând adenilat-ciclaza în neuronii olfactivi;
5. proteine G_o , care conțin α_o inhibând canale de Ca^{2+} și activând canale de K^+ și fosfolipaza C- β ;
6. α_t din proteine G_t (transducină), care activează GMPC-fosfodiesteraza în celulele fotosensibile cu bastonașe;
7. α_{12} , sau α_{13} din organizarea proteinelor G12/13, care activează factori de schimbare a guanozin-nucleotidelor (abreviat **GEF**, de la numele englezesc *Guanine nucleotide Exchange Factors*) în **GTP-azele mici** (numite și **proteine G mici** sau **proteine G monomerică**) din familia Rho GTP-azelor.

Din diversitatea de fenomene controlate de receptorii cuplați cu proteinele G heterotrimerice alegem două pentru exemplificare, ambele folosind ca efector **adenilat-ciclaza** și ca mesager secund **adenozin-monofosfatul ciclic** (AMPC), produs din ATP de enzima menționată. Prin acțiunea adenilat-ciclazei, dintr-o moleculă de ATP rezultă o moleculă de AMPC cu eliberarea de pirofosfat. Cele două fenomene alese pentru detaliere vizează răspunsurile rapide (prima exemplificare), respectiv răspunsurile lente (a doua exemplificare), ambele fiind dependente de protein-kinaza A activată de AMPC (Fig. 3.25, A).

Răspunsul rapid ales pentru exemplificare (Fig. 3.25, B) se referă la modularea metabolismului glicogenului în mușchiul striat scheletal și controlează homeostazia glucozei în celulele acestui țesut. Mecanismul este declanșat de **protein-kinaza A**, efector al cascadei pornite de receptorul cuplat cu proteine G heterotrimerice din sarcolemă (membrana celulei musculare). Protein-kinaza A este activată de AMPC, produs de adenilat-ciclază, care este efectorul din amonte stimulat de subunitatea α a proteinelor G heterotrimerice, după primirea semnalului de către celulă.

Activarea protein-kinazei A implică desprinderea subunităților catalitice de cele inhibitorie care le împiedică să acționeze în absența AMPC (așa cum se prezintă în Fig. 3.25, A). Așadar, când adenilat-ciclaza este activată de stimularea receptorilor cuplați cu proteina G heterotrimerică are loc formarea de AMPC care interacționează cu subunitățile inhibitorie din complexul de repaus, inactiv al protein-kinazei A. Interacțiunea cu AMPC schimbă conformația subunităților inhibitorie, iar subunitățile catalitice se eliberează, cu situsul kinazic activ. Odată activată, protein-kinaza A țintește enzimele implicate în metabolismul glucozei, inhibând formarea glicogenului (glicogenogeneza) și favorizând eliberarea monozaharidului (glicogenoliza).

Eliberarea glucozei se face sub formă de glucozo-1-fosfat, ca urmare a unui proces celular ce începe cu activarea fosforilaz-kinazei, prin fosforilarea indusă de protein-kinaza A. Fosforilaz-kinaza fosforilată (așadar în formă activată), transmite informația, mai departe, la glicogen-fosforilază. Glicogen-fosforilaza este activată, prin fosforilare, de către fosforilaz-kinază și acționează asupra depozitelor de glicogen, eliberând glucozo-1-fosfatul. Glucozo-1-fosfatul astfel eliberat este convertit în glucozo-6-fosfat și intră sub această formă în procesul de glicoliză. Așadar, procesul de eliberare a glucozei din glicogen face parte din fenomenele de răspuns rapid induse de receptorii cuplați cu proteinele G heterotrimerice.

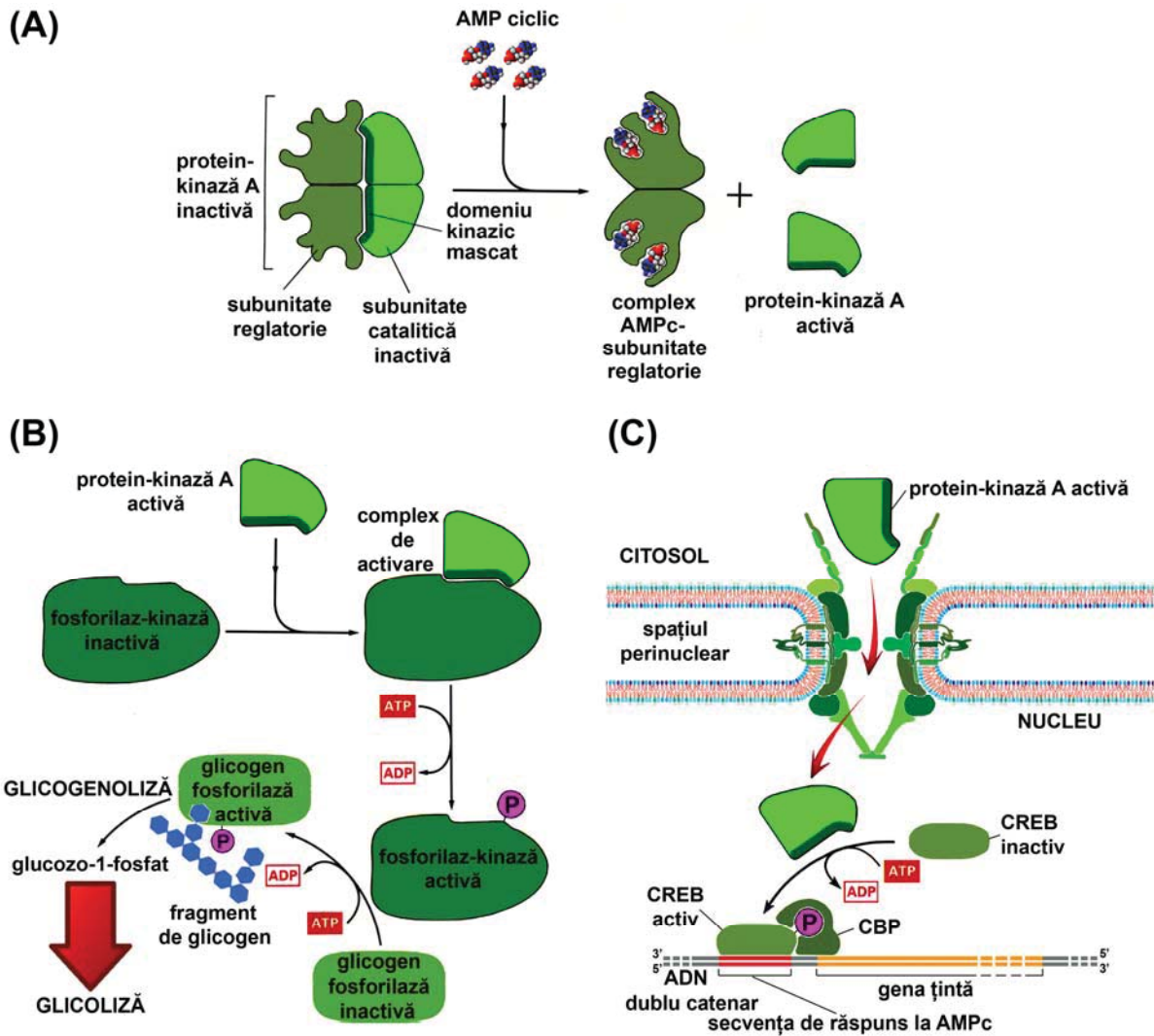


Fig. 3.25. Căi de semnalizare induse de receptorii cuplați cu proteine G heterotrimerice, având adenilat-ciclaza ca efector. **A.** Mesagerul secund produs de activarea adenilat-ciclazei, AMP ciclic, se leagă de elementele subunității reglatorii, ducând la desprinderea acestora de subunitățile catalitice ale protein-kinazei A care devine activă. **B.** Exemplu de răspuns rapid, prin care se controlează depozitele de glucoză reprezentate de incluziunile de glicogen. Protein-kinaza A activează fosforilază-kinaza, care, la rândul său, stimulează glicogen-fosforilaza. Glicogen-fosforilaza activată eliberează glucoza din glicogen sub formă fosforilată la hidroxilul glicozidic. Glucozo-1-fosfatul, astfel mobilizat din depozitul de glicogen, intră în procesul de glicoliză, contribuind la metabolismul energetic celular. **C.** Exemplu de răspuns lent, prin care se modulează exprimarea unor gene. Protein-kinaza A activată în citosol este translocată în nucleu unde activează, prin fosforilare, CREB, proteină specifică pentru elemente (secvențe de ADN) de răspuns la AMPc. CREB astfel activat se leagă de secvența specifică și recrutează CBP declanșând transcrierea genei țintă. **N.B.** În figură nu este sugerată complexitatea transportului din citosol în nucleu a protein-kinazei A, prin porul nuclear, fenomen care este el însuși bine controlat și reglat de celulă prin intermediul complexului proteic al porului care este prezent în figură, în mod schematic. © Mircea Leabu, 2014.

Dar, așa cum am menționat, activarea receptorilor cuplați cu proteine G heterotrimerice poate induce și răspunsuri celulare lente (Fig. 3.25, C). Astfel de răspunsuri, mediate tot de protein-kinaza A (activată de creșterea concentrației de AMPc), presupun transcrierea unor gene specifice și se derulează pe parcursul unor intervale de timp de ordinul orelor, și nu de ordinul secundelor așa cum se întâmplă în cazul răspunsurilor rapide. Numeroase gene, a căror transcriere este activată de AMPc, prezintă în regiunea reglatoare secvențe scurte de ADN denumite elemente de răspuns la AMPc sau **CRE** (abreviere de la termenul din limba engleză *Cyclic AMP Response Element*). Aceste secvențe sunt recunoscute de factorul transcripțional

CREB (de la *CRE-Binding protein*) ce este substrat al protein-kinazei A. Așadar, protein-kinaza A, activată de AMPc, fosforilează proteina nucleară CREB (la hidroxilul unei serine), iar, ulterior, proteina CREB fosforilată recrutează un coactivator transcripțional denumit **CBP** (de la *CREB-Binding Protein*), stimulând transcrierea genelor țintă. Factorul transcripțional CREB este implicat într-o mare diversitate de procese celulare: proliferare, supraviețuire, diferențiere, răspunsuri adaptative, homeostazia glucozei, spermatogeneză, reglarea răspunsurilor imune, plasticitatea sinaptică asociată cu memorizarea, reglarea ritmului circadian, dar este implicat și în procese mai puțin fiziologice, cum este dezvoltarea dependenței de droguri [19-21].

Pentru o mai corectă și completă înțelegere a rolului protein-kinazei A în semnalizare, câteva aspecte sintetice merită subliniate. În primul rând, faptul că activarea protein-kinazei A de către AMPc presupune o modificare a structurii cuaternare a acesteia. Astfel, în stare inactivă protein-kinaza A este alcătuită din două subunități catalitice și două subunități reglatoare (Fig. 3.25, A). AMPc se leagă de subunitățile reglatoare, modificându-le conformația și determinând eliberarea subunităților catalitice. Subunitățile catalitice eliberate acționează mai departe, fosforilând resturi de serină sau treonină atât la proteine țintă din citoplasmă (de exemplu fosforilaz-kinaza) cât și la proteine din nucleu (de exemplu proteina CREB). Un alt aspect ce trebuie subliniat este faptul că protein-kinaza A nu mediază absolut toate efectele AMPc de la nivel celular. De exemplu, în neuronii olfactivi AMPc activează direct anumite canale ionice din membrana celulară, fără intervenția protein-kinazei A [22-24].

În sfârșit, tot pentru extinderea informațiilor, a cunoașterii și, de ce nu, a înțelegerii să punctăm câteva aspecte legate de adenilat-ciclază. Există cel puțin 8 izoforme de adenilat-ciclaze membranare, clasificate în patru grupe în funcție de mecanismele reglatorii care le guvernează activitatea [25], dar au fost identificate și forme solubile ale acestei enzime [26]. Încercând o sinteză a ceea ce se cunoaște despre formele membranare ale acestui efector intracelular, putem spune că adenilat-ciclaza este o proteină integrală cu 12 treceri prin bistrat, notate cu TM1 la TM12 [25, 27]. Ambele capete terminale (amino, respectiv carboxil) ale lanțului polipeptidic se află pe fața citosolică a bistratului lipidic membranar. Dincolo de aceste elemente grosiere de organizare, se cunoaște faptul că cele 12 segmente transmembranare sunt grupate în două blocuri: primele 6 într-un prim bloc, urmat de o buclă citosolică generoasă de cel puțin 400 de aminoacizi (componentă importantă a endodomeniului), urmată de al doilea bloc transmembranar cu celelalte 6 segmente care străbat bistratul lipidic, iar capătul carboxi-terminal, de asemenea amplu, contribuie semnificativ la endodomeniu, în timp ce celelalte bucle citosolice sunt mult mai mici. La organizarea endodomeniului participă substanțial și porțiunea N-terminală a lanțului polipeptidic, având o lungime semnificativă. Pe bucla citosolică ce urmează primului bloc transmembranar există o porțiune de aproximativ 230 de aminoacizi (notată C1a) care prezintă omologie de aproape 40% cu un fragment al porțiunii citosolice C-terminale (notată C2a), aceste două segmente ale lanțului polipeptidic (porțiuni ale endodomeniului) fiind responsabile de organizarea sitului catalitic [25]. Ectodomeniul este mai puțin abundent, dar conține situri N-glicozilate pe buclele dintre TM9 și TM10 (Asp805), respectiv TM11 și TM12 (Asp890). Interesant este de remarcat că aceste structuri glucidice influențează activitatea catalitică a adenilat-ciclazei deoarece eliminarea lor afectează funcția enzimei [27], ceea ce sugerează posibilități de modulare extracelulară. Aceste informații reprezintă argumente suplimentare asupra diversității și complexității mecanismelor celulare potențiale în care este implicată adenilat-ciclaza.

Să nu uităm că suntem la o discuție asupra diversității de fenomene de semnalizare declanșate de receptorii cuplați cu proteine G heterotrimerice și la exemplificări pentru tipuri de răspunsuri rapide, *versus* tipuri de răspunsuri lente.

Un alt răspuns rapid, declanșat de receptorii cuplați cu proteine G heterotrimerice, se datorează activării fosfolipazei C- β prin subunitatea α a efectorului din prima linie. Această cale de semnalizare duce la declanșarea **cascadei fosfoinozitudelor** (vezi Fig. 2.9) și se află printre primele fenomene de semnalizare descifrate. Fosfatidilinozitolii sunt mai întâi fosforilați succesiv la hidroxilii din diversele poziții ale inozitolului (de exemplu la hidroxilii din pozițiile 4 și 5). Apoi, fosfolipaza C- β , specifică pentru fosfoinozitide, scindează fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfații la inozitol-1,4,5-trisfosfat (IP₃) și diacilgliceroli. IP₃ difuzează rapid de la nivelul membranei celulare în citosol, activând canale de calciu comandate chimic aflate în membrana reticulului endoplasmic/sarcoplasmic, determinând eliberarea de Ca²⁺ din lumenul organitului și creșterea concentrației acestuia în citosol. Creșterea concentrației citosolice de Ca²⁺ determină efecte diverse, în funcție de tipul celulei. În celulele musculare striate cardiace, IP₃ deschide canalul de calciu activat chimic din membrana reticulului sarcoplasmic, determinând contracția musculară.

Moleculele mici de tipul AMPc sau IP₃ cu rol în transmiterea semnalelor dinspre receptori către efectori sunt denumite **mesageri secunzi**.⁵

Diacilglicerolul eliberat din fosfatidilinozitol-trisfosfați are, la rândul său, două potențiale roluri în semnalizare, acționând și el ca mesager secund și inducând răspunsuri lente.

Pe de o parte, poate activa **protein-kinaze C**, efectori cu activitate serin/treonin-kinazică dependentă de Ca²⁺ (de unde și numele de protein-kinaze C). Activarea protein-kinazelor C are loc după recrutarea acestora din citosol la nivelul feței citoplasmice a membranei celulare. Această recrutare este dependentă de creșterea concentrației citosolice de Ca²⁺. Ajunse la nivelul feței citoplasmice a membranei, protein-kinazele C sunt activate prin efectul cumulat al Ca²⁺, diacilglicerolului și fosfatidilserinelor (fosfolipide anionice prezente, în condiții normale, numai în foița internă a bistratului). Activarea protein-kinazelor C este urmată de fosforilarea unei diversități de efectori, diferind de la un tip la altul de celulă și declanșând o diversitate de răspunsuri.

Alt posibil rol al diacilglicerolului este acela de a elibera (sub acțiunea fosfolipazelor A₂) un alt compus care, prin metabolizare, duce la formarea de molecule implicate în fenomene de semnalizare. Fosfolipazele A₂ eliberează acidul arahidonic din compoziția diacilglicerolului. Acest acid gras cu patru duble legături este apoi prelucrat de enzime specifice la patru categorii de molecule mesager cu rol în semnalizări autocrine sau paracrine:

- (i) **prostaglandine** (molecule mesager cu acțiune autocrină sau paracrină);
- (ii) **prostaciclina** (moleculă mesager cu acțiune paracrină produsă de celulele endoteliale);
- (iii) **tromboxani** (mesageri cu acțiune paracrină produși de plachete);

⁵ A se remarca faptul că atât efectorii celulari, cât și mesagerii secunzi fac același lucru: preiau semnalul din amonte și îl transmit în aval. Folosirea a două sintagme: efectori intracelulari, respectiv mesageri secunzi este însă îndreptățită și diferențiază între compuși de natură polipeptidică (proteine, deci macromolecule) implicate în procesele de semnalizare și compuși de greutate moleculară mică și de diverse naturi biochimice, inclusiv ioni, ce participă în desfășurarea proceselor de semnalizare. În plus, este de remarcat că sintagma corectă, în contextul semnalizării celulare, este aceea de mesageri secunzi, nu secundari, pentru a evidenția faptul că sunt la fel de importanți în derularea eficientă și corectă a procesului de semnalizare ca toate celelalte elemente implicate. Este, dacă vreți similar cu terminologiile din marină: vorbim de căpitan secund și nu secundar, tocmai pentru importanța funcției, aceea de a suplini activitatea superiorului când acesta devine indisponibil. Singura deosebire este că în semnalizarea celulară mesagerii secunzi nu suplinesc alți factori implicați de drept.

(iv) **leucotriene** (molecule mesager evidențiate a fi produse de leucocite – de unde și denumirea: triene produse de leucocite – dar și de alte celule ale sistemului imunitar, cu acțiune tot în semnalizarea autocrină sau paracrină).

Primele trei categorii sunt formate pe calea ciclo-oxigenazelor, cea de-a patra pe calea lipo-oxigenazei. Toți acești metaboliți ai acidului arahidonic fac parte din clasa **eicosanoizilor** și acționează în reacțiile inflamatorii și în producerea senzațiilor de durere. Medicamentele antiinflamatorii (aspirina, antiinflamatoarele nesteroidice sau cortizonul) acționează prin inhibarea producerii de eicosanoizi.

De remarcat că, în exemplele de mecanisme amintite mai sus, am introdus noțiunea de **efector intracelular**. Se deduce că *numim efector intracelular orice proteină implicată în mecanismele de semnalizare celulară care primește mesajul din amonte, activându-se și îl transmite în aval stimulând următorul partener din proces*. În amonte de un anumit efector se poate afla receptorul însuși, un mesager secund sau un alt efector activat.

Mergem mai departe încercând să exemplificăm și celelalte tipuri de receptori pentru liganzi hidrofilii.

Receptorii cu activitate guanilat-ciclazică sunt și ei de o mare diversitate [24]. Trebuie menționat că pentru declanșarea mecanismelor de semnalizare acești receptori dimerizează după legarea ligandului [28].

Ca exemplu de **receptor cu activitate guanilat-ciclazică** menționăm receptorul pentru factorul natriuretic atrial. În plămânilor bovin, de exemplu, acesta este o glicoproteină transmembranară, unipass, tip I, cu masa moleculară de ~135kDa care, după legarea ligandului pe ectodomeniu, activează domeniul guanilat-ciclazic din endodomeniu [29]. De remarcat că endodomeniul receptorului conține și un domeniu omolog kinazic a cărui menire nu este cunoscută, dar sunt dovezi experimentale care indică faptul că acesta este implicat în modularea/reglarea activității receptorului [28, 30]. Guanozin-monofosfatul ciclic (GMPc) format este mesagerul secund care transmite semnalul unor protein-kinaze dependente de GMPc (G-kinaze) care fosforilează specific la Ser sau Thr proteine efectoare din aval necesare creării răspunsului celular. Efectele factorului natriuretic atrial (se numește așa deoarece este secretat de cardiomiocitele atriale) sunt: stimularea eliminării de sodiu și apă la nivelul rinichilor și relaxarea celulelor musculare netede din peretele vascular, ambele conducând la reducerea tensiunii arteriale.

Receptorii cu activitate tirozin-kinazică sunt cei mai numeroși, din datele de care dispunem în acest moment, între receptorii suprafeței celulare din clasa **receptori cu funcție enzimatică sau cuplați cu enzime**. Ei se caracterizează printr-o mare diversitate structurală acoperind semnalizarea celulară prin cea mai mare parte a factorilor de creștere cunoscuți. Acești receptori sunt divizați în 20 de subfamilii, caracterizându-se prin același domeniu omolog cu activitate tirozin-kinazică [31, 32]. Primul identificat a fost receptorul la factorul de creștere epidermal (EGF). Ligandul acestui receptor este un peptid de ~6kDa, cu 53 aminoacizi în structură.

De regulă, receptorii cu activitate tirozin-kinazică (Fig. 3.26) sunt proteine transmembranare unipass, tip I, care există ca monomeri în stare liberă (face excepție receptorul la insulină, aflat sub formă de dimeri, legați prin punte disulfurică), iar după interacțiunea cu ligandul dimerizează. Domeniul transmembranar este structurat în α -helix și conține între 28 și 35 de aminoacizi. În ciuda diversității lor, există câteva trăsături comune reprezentate prin anumite domenii structurale relativ bine conservate. O trăsătură comună la nivelul porțiunii citosolice este reprezentată de o zonă cu activitate tirozin-kinazică (domeniu tirozin-kinazic). Ectodomeniul (domeniul extracelular) reprezintă o porțiune semnificativă a lanțului polipeptidic cu capătul N-terminal al acestuia și este glicozilat. La nivelul ectodomeniului se pot găsi

domenii repetitive bogate în leucină, domenii bogate în cisteine, domenii repetitive fibronectinice de tip III sau domenii de tip imunoglobulinic. Existența unor asemenea domenii reprezintă o posibilitate de clasificare a acestor receptori în familii și subfamilii. În acest moment există o clasificare pe baza tipului de ligand cu care receptorii interacționează. Pe de altă parte, pe baza asemănărilor structurale receptorii tirozin-kinazici se pot include în superfamilii de proteine. Receptorii cu domenii de tip imunoglobulinic sunt incluși în superfamilia imunoglobulinelor.

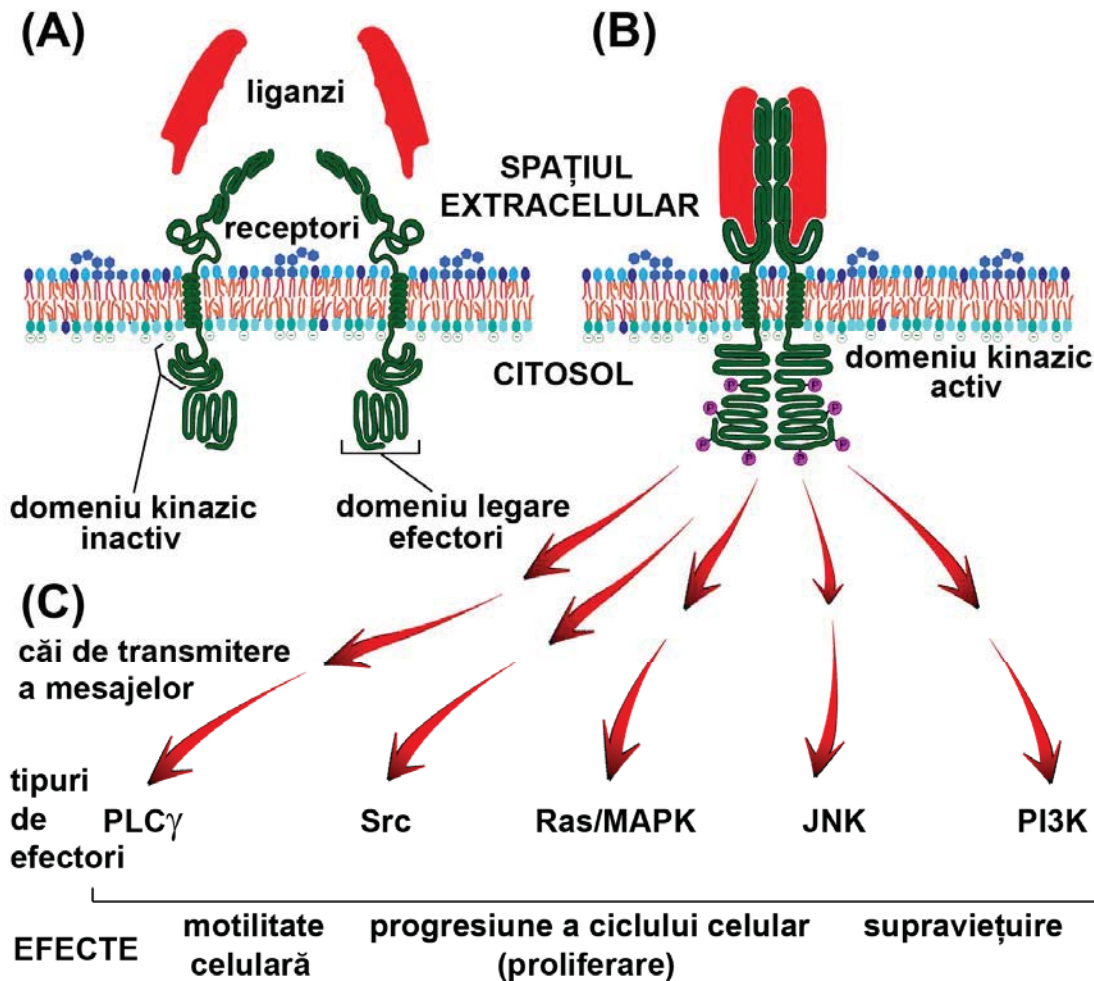


Fig. 3.26. Organizarea domeniilor și modul de activare a receptorilor cu activitate tirozin-kinazică. **A.** Receptorii în absența interacțiunii cu ligandul sunt în stare inactivă și sub formă monomerică în membrană. Au domeniul transmembranar format dintr-un singur α -helix. Ectodomeniul poartă situsul de legare a ligandului și unități repetitive fie de același tip (cum apare în figură), fie în combinații de diferite tipuri (vezi în text despre ce tipuri de unități repetitive este vorba). Endodomeniul prezintă domeniul kinazic și o porțiune care poate lega efectori după activare. **B.** Legarea ligandului determină dimerizarea și activarea receptorului prin trans-fosforilare. Trans-fosforilarea (reprezentată prin simbolul P din cercurile cu fond de culoare magenta) se poate efectua atât la nivelul domeniului kinazic (sporind activitatea catalitică), cât și la nivelul altor tirozine din porțiunea de legare a efectorilor. După aceste fosforilări, efectorii se leagă prin domeniile SH2, fiind activați și transmitând astfel semnalul în aval. **C.** Este sugerată diversitatea de căi de semnalizare declanșate de receptorii cu activitate tirozin-kinazică și efectele pe care acestea le pot induce. © Mircea Leabu, 2014.

CASETA 3.1. Proteina Src și domeniile modulare de legare, de tip SH

Proteina Src (prescurtarea este de la *sarcoma* și în lumea științifică se pronunță „sarc”, adică în conformitate cu pronunția engleză a abreviației, întrucât „r” se pronunță „ar”) este o proteină cu activitate kinazică, ce este codificată de proto-oncogenă *c-src*, similară oncogenei virale *v-src* (identificată la virusul sarcomei Rous). Src joacă un rol important în reglarea dezvoltării embrionare și a creșterii celulare. În celulele mamiferelor au fost identificate 11 tipuri de proteine cu secvențe omoloage și particularități comune cu cele ale proteinei Src [33]. Ele formează o familie de proteine cunoscute sub numele de kinazele familiei Src. Reprezentanții acestei familii de kinaze interacționează cu numeroase proteine citosolice, nucleare și membranare pe care le modifică prin fosforilare pe resturi de tirozină, specifice. Prin exercitarea funcției protein-tirozin-kinazice, membrii familiei de proteine Src reglează o mare diversitate de procese celulare: creștere celulară, diviziune, diferențiere, supraviețuire, moarte celulară programată, răspunsuri imune, adeziune celulară, motilitate și endocitoză. Controlul strict al activității lor este esențial pentru funcționarea celulară normală, dereglarea activității lor fiind incriminată în etiologia unor forme de cancer.

Protein kinazele aparținând familiei Src au o organizare structurală multimodulară: (i) o regiune N-terminală care, prin miristilare și/sau palmitilare, asigură ancorarea mai fermă a endoproteinei la bistratul lipidic și menținerea ei la nivelul feței citosolice a membranei celulare, (ii) un domeniu SH3 prin intermediul căruia se fixează de motive structurale bogate în resturi de prolină din structura partenerilor de interacțiune, (iii) un domeniu SH2 care recunoaște secvențe scurte de aminoacizi ce includ tirozina fosforilată, (iv) un domeniu cu funcție kinazică (abreviat SH1) și (v) o regiune C-terminală importantă pentru reglarea activității kinazice [34, 35].

Menționăm că domeniile SH reprezintă structuri modulare ce au fost identificate ulterior la numeroase clase de proteine celulare implicate în lanțuri de semnalizare.

Mecanismul de principiu prin care acești receptori funcționează ar putea fi sintetizat prin următoarele etape:

1. Legarea ligandului atrage atât activarea domeniului catalitic de la nivelul porțiunii citoplasmice, cât și dimerizarea receptorilor datorită modificărilor conformaționale pe care le induce (în cazul receptorului la factorul de creștere derivat din plachete, prescurtat PDGF – de la „*Platelet-Derived Growth Factor*” – ligandul este dimer și dimerizarea receptorului este atrasă de această caracteristică a factorului de creștere);
2. Activarea și dimerizarea realizează condițiile unor autofosforilări încrucișate (trans-autofosforilare) la multiple tirozine ale domeniilor citosolice ale receptorului. Procesul de autofosforilare are loc la nivelul a două tipuri de tirozine: (i) tirozine localizate în domeniul kinazic, a căror fosforilare determină o creștere marcantă a activității kinazice și (ii) tirozine aflate în afara domeniului kinazic, care servesc ca situri de ancorare pentru un mare număr de proteine implicate în procesul de semnalizare. Majoritatea siturilor de autofosforilare tirozinică sunt localizate în regiunile necatalitice ale domeniului citosolic;
3. Atragerea și interacțiunea cu proteine de semnalizare intracelulare (efectori enzimatici, proteine adaptoare sau proteine reglatoare) care conțin domenii omoloage Src de tip 2, abreviate prin **domenii SH2**, cu SH de la *Src Homology* (pentru că au fost evidențiate pentru prima oară la proteina Src). Tirozinele modificate prin fosforilare reprezintă zonele de interacțiune cu domeniile SH2 (vezi CASETA 3.1). Așadar, proteinele de semnalizare, care se leagă de tirozinele fosforilate din domeniul citoplasmatic al receptorilor activați, pot fi: efectori enzimatici, proteine adaptoare, respectiv proteine reglatoare. Toate acestea au structuri și funcții diferite, dar au drept caracteristică structurală, comună prezența domeniilor SH2;
4. Activarea efectorilor legați prin SH2, care înseamnă transmiterea semnalului în aval, prin diferite mecanisme dependente de natura proteinelor cu domenii SH2 recrutate la nivelul tirozinelor fosforilate din domeniul citoplasmatic al receptorilor. Astfel, mecanismele de transmitere a semnalului în aval constau în

activarea efectorilor enzimatici, respectiv în structurarea unor complexe de semnalizare prin intermediul proteinelor adaptoare, toate evenimentele fiind dependente de domenii SH2. Domeniile SH2 sunt implicate chiar și în atenuarea semnalului, atunci când aceasta este făcută prin declanșarea endocitozei urmată de sortarea compușilor internalizați la nivelul endozomilor timpurii, pentru corecta lor direcționare către lizozomi și degradare.

Din categoria efectorilor enzimatici, alții decât kinazele Src, care au fost deja amintite, menționăm fosfolipaza C- γ , enzimă care prezintă două domenii SH2. După legarea la receptorul activat, fosfolipaza C- γ declanșează calea semnalizării prin fosfoinozotide, așa cum a fost prezentat mai sus în cazul fosfolipazei C- β . Așadar, cascada fosfoinozitudelor poate fi declanșată atât prin activarea receptorilor cuplați cu proteine G heterotrimerice, cu implicarea fosfolipazei C- β , cât și prin activarea receptorilor tirozin-kinazici cu implicarea fosfolipazei C- γ .

Alt efector cu activitate enzimatică este **fosfatidilinozitol 3'-kinaza** (abreviat **PI3K**, de la numele englezesc). Are tot două domenii SH2, contribuie după activare la formarea unor derivați de fosfatidilinozitol [fosfatidilinozitol 3-fosfat, fosfatidilinozitol (3,4)-bisfosfat sau fosfatidilinozitol (3,4,5)-trisfosfat]. Deși PI3K este acceptat că acționează în reglarea proliferării celulare, ca și în dinamica morfologiei celulare și motilitate, detaliile mecanismelor acestor procese sunt departe de a fi pe deplin elucidate.

Proteinele adaptoare reprezintă altă categorie de proteine cu domenii SH2 care interacționează cu receptorii tirozin-kinazici activați. Acestea nu au activitate catalitică, dar au funcție de **proteine platformă** și mediază asocierea fizică dintre receptorii fosforilați și alți efectori din aval. Proteinele adaptoare au în structura lor cel puțin două domenii SH care mediază interacțiuni proteină-proteină. Se consideră că proteinele adaptoare pot juca în afara rolului structural de punte de legătură și un rol în procesarea semnalului, prin optimizarea amplitudinii și duratei răspunsului la stimuli.

Un exemplu de proteină adaptoare este **Grb2** (de la **Growth factor receptor bound protein 2**). Grb2 face legătura, în sens fizic, între receptorii pentru factorii de creștere și o cale de semnalizare cunoscută sub numele de calea **Ras-MAPK** (Ras de la **Rat sarcoma** sau de la **Retrovirus-associated DNA sequences**, și MAPK de la **Mitogen-Activated Protein Kinase**) prin intermediul domeniilor SH din structura sa. Grb2 are un domeniu SH2 și două domenii SH3. Așadar, Grb2 se fixează cu domeniul SH2 de receptorul tirozin-kinazic activat și folosește domeniile SH3 pentru a recruta alte proteine în complexul de semnalizare (proteine care au în structura lor motive bogate în resturi de prolină). O astfel de proteină recrutată de Grb2 este proteina **Sos** (de la **Son-of-sevenless**). Sos are un domeniu C-terminal bogat în prolină prin intermediul căruia interacționează cu domeniile SH3 al proteinei Grb2 și un alt domeniu, denumit **Ras-GEF** (GEF de la **Guanosine nucleotide Exchange Factor**), prin intermediul căruia interacționează cu **proteina Ras**. Așadar proteinele cu domenii modulare SH participă la structurarea unor complexe de semnalizare multiproteice, în cadrul cărora proteina Ras, după cum vom vedea în continuare, joacă un rol foarte important.

O altă categorie de efectori pe care o amintim este cea din superfamilia căreia îi aparține și Ras. Este vorba de **GTP-azele mici** [36]. GTP-azele mici sunt proteine monomerice cu o masă moleculară în jur de 25kDa care au proprietatea de a lega GTP pe care îl hidrolizează, datorită funcției lor GTP-azice intrinseci (viteza reacției de hidroliză a GTP datorată funcției GTP-azice intrinseci este foarte mică), dar mai ales cu concursul unor proteine care activează hidroliza GTP, notate simbolic cu **GAP**, de la **GTP-ase-Activating Protein**. GTP-azele mici sunt activate cât timp conțin GTP și se inactivează după hidroliza acestuia. Datorită capacității lor de a

trece ciclic din stare activă în stare inactivă sunt cunoscute și sub numele de „comutatori moleculari”. În ciclul de activare-inactivare mai participă și alte proteine partenere și anume factorii de schimbare a guanin-nucleotidului, notate simbolic cu **GEF**, de la **Guanine nucleotide Exchange Factors**. GEF stimulează schimbul GDP cu GTP, așadar determină activarea GTP-azei mici. Când nu este nevoie de funcția lor, GTP-azele mici sunt localizate în citosol, complexate cu o proteină inhibitoare numită **inhibitor de disociere a guanozin-nucleotidului**, prescurtat **GDI**, de la **Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor**. Cel mai adesea activarea GTP-azelor mici este însoțită de recrutarea lor la nivelul membranelor (plasmalemă sau endomembrane), recrutare favorizată și de acilare (palmitilare și prenilare) [37]. Din superfamilia GTP-azelor monomerice fac parte reprezentanți ai familiilor de proteine Ras, Rab, Rac, Ran, Rho. Dintre acestea numai familiile Ras și Rho au legătură cu receptorii suprafeței celulare. Un alt rol al GTP-azelor este acela de a participa la controlul corectitudinii traficului structurilor membranare în celulă, cum ar fi traficul dintre reticulul endoplasmic și aparatul Golgi sau traficul veziculelor de secreție către și ancorarea acestora la membrana celulară (vezi și Fig. 3.14, A).

Revenind la complexul de semnalizare structurat prin participarea proteinelor cu domeniul SH, rezumăm secvența de evenimente:

- (i) activarea receptorului tirozin-kinazic este indusă de fixarea ligandului, fiind însoțită de dimerizare și fosforilarea unor tirozine din endodomeniul partenerului de dimerizare;
- (ii) tirozinele fosforilate servesc ca situri de recrutare a proteinelor cu domeniul SH2 (de exemplu Grb2), care la rândul lor recrutează alți participanți (pentru Grb2 este vorba de proteina Sos, care este plasată în vecinătatea Ras astfel încât funcția de GEF, să poată media schimbul nucleotidic GDP cu GTP);
- (iii) forma activă Ras-GTP inițiază calea de semnalizare Ras-MAP kinazică (un sistem enzimatic de tip “releu” ce implică o cascadă de reacții catalizate de protein kinaze ce se activează secvențial).

Pe lângă efectorii enzimatici și proteinele adaptoare, de receptorii tirozin-kinazici activați se pot lega (prin intermediul domeniilor SH2) și proteine reglatoare care atenuază procesul de semnalizare, printr-un mecanism de reacție negativă. Un exemplu în acest sens este proteina **c-Cbl** (abreviație de la **Casitas B-cell lymphoma**). Această proteină se poate atașa de receptori tirozin-kinazici activați (de exemplu de receptorul pentru factorul de creștere epidermal, abreviat EGF) și determină modificarea covalentă a acestora prin ubiquitinare. Mai precis, c-Cbl catalizează grefarea covalentă a câte unei singure molecule de **ubiquitină** (proces denumit mono-ubiquitinare) în unul sau mai multe situri din structura receptorului. Mono-ubiquitinarea promovează endocitoza și degradarea receptorului în lizozomi, această modificare mediată de proteina c-Cbl fiind așadar responsabilă de atenuarea semnalului [38]. Ubiquitina este o proteină înalt conservată în decursul evoluției speciilor și are roluri multiple în celulă (vezi *CASETA* 3.2).

Receptorii cuplați cu tirozin-kinaze citosolice includ o mare diversitate de proteine transmembranare. Din această categorie fac parte receptorii pentru **hormonii de creștere**, cei pentru **citokine**, **receptorii specifici antigenelor** (receptorii pentru antigene) din limfocitele T și B devenite imunocompetente.

Mecanismul de acțiune a acestor receptori implică dimerizarea/multimerizarea receptorului, după legarea ligandului, aceasta inducând activarea și transmiterea semnalului prin tirozin-kinaze citosolice asociate. Mai bine cunoscute sunt tirozin-kinazele citosolice din **familia Src**, în timp ce cele din **familia Janus**, relativ de curând descrise, sunt mai puțin cunoscute.

CASETA 3.2. Ubiquitina și ubiquitinarea cu multiplele ei roluri

Ubiquitina este o proteină alcătuită din 76 de aminoacizi (8,5 kDa), extrem de bine conservată din punct de vedere filogenetic. Ubiquitina se poate fixa covalent de proteine țintă sub formă de mono-, multi- și poli-ubiquitină. Aceste modificări post-traducere determină localizarea, funcționalitatea și stabilitatea proteinelor respective [39]. Una dintre cele mai studiate funcții ale ubiquitinei se referă la reglarea proteolizei. Astfel, conjugarea mai multor molecule de ubiquitină la o proteină țintă prin poli-ubiquitinare (constând în grefarea unor catene liniare formate din 4-6 molecule succesive de ubiquitină) marchează proteina respectivă pentru degradare. Această degradare are loc în *proteazom*, organit nedelimitat de endomembrane, sub acțiunea complexului proteolitic ATP-dependent, major al celulei. Ubiquitinarea poate să determine pe lângă degradarea proteolitică și alte “destine” ale proteinelor țintă. De exemplu, modificările prin mono-ubiquitinare servesc ca semnal de recunoaștere în traficul de membrane, endocitoză, repararea ADN și în exportul nuclear [40]. Atragem atenția că trebuie făcută diferența între termenul de poli-ubiquitinare (grefarea de ubiquitine legate succesiv, deci a unor lanțuri de ubiquitine) și multi-ubiquitinare (care constă în mono-ubiquitinări multiple, deci în grefarea câte unei singure molecule de ubiquitină în mai multe locuri de pe proteina țintă).

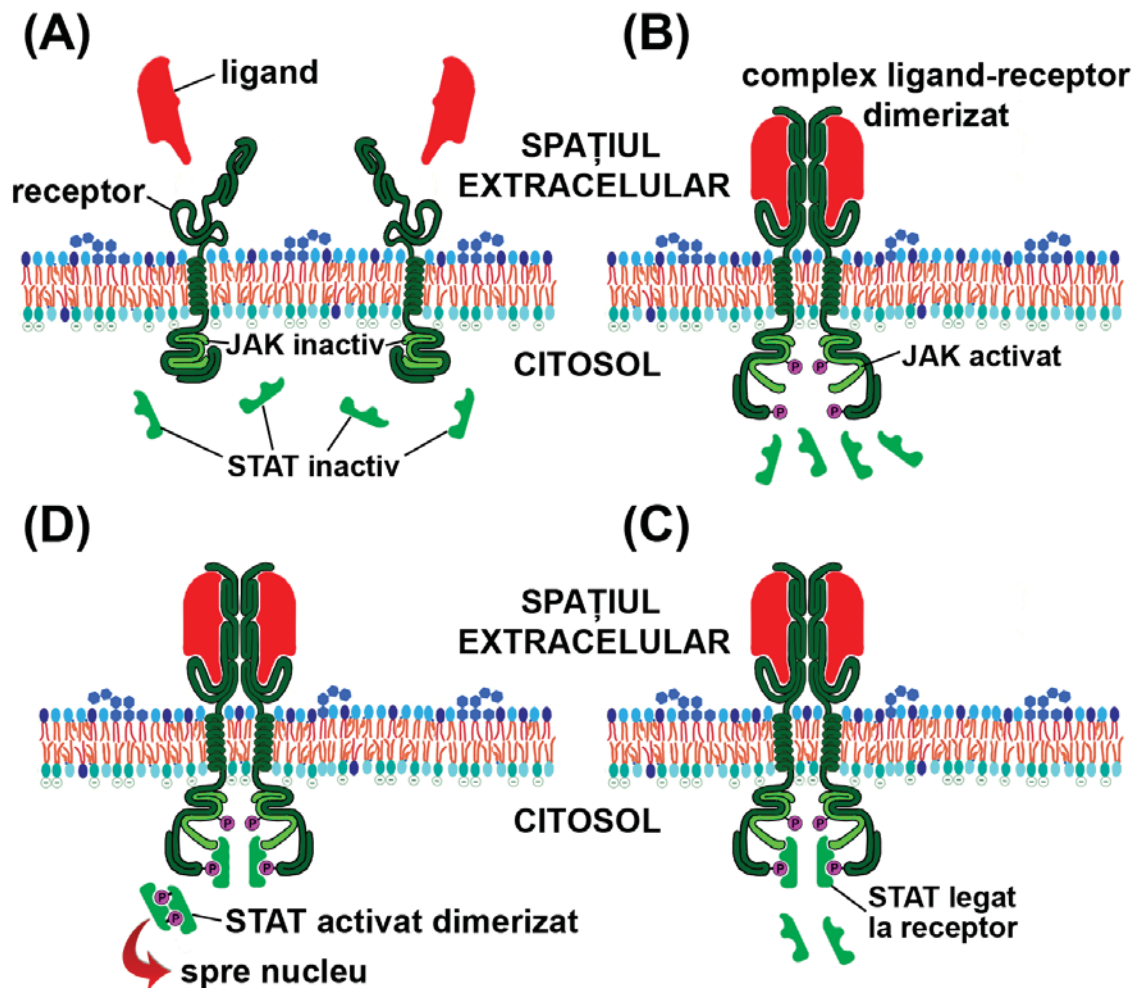


Fig. 3.27. Calea de semnalizare JAK/STAT aferentă receptorilor cuplați cu protein-kinaze citosolice. A. În absența interacțiunii cu ligandul, receptorul inactiv poartă pe endodomeniu JAK inactiv. B. Legarea ligandului la receptor determină dimerizarea receptorului, ceea ce permite transfosforilarea moleculelor JAK, care se activează astfel și determină fosforilarea siturilor de legare a efectorului, pe endodomeniile receptorilor din dimer (simbolul P în cercurile pe fond magenta). C. Fosforilarea receptorilor determină legarea efectorului STAT care este fosforilat de JAK activat. D. Moleculele STAT fosforilate se desprind de complexul receptor stimulat-JAK activat sub forma unui dimer de STAT activ. Sub această formă, dimerul STAT fosforilat este translocat în nucleu unde determină transcrierea unor gene specifice. © Mircea Leabu, 2014.

Tirozin-kinazele citosolice fosforilează o multitudine de efectori, transmițând mesajul primit de celulă în aval, pentru inducerea răspunsului celular adecvat. Calea JAK-STAT (abreviațiile efectorilor vin de la *Janus kinase*⁶-*Signal Transducer and Activator of Transcription*) este un exemplu pentru asemenea mecanisme de semnalizare (Fig. 3. 27), care se finalizează prin transcrierea unor gene, cum se întâmplă la semnalizarea indusă de eritropoietină, hormonul de creștere sau prolactină [41, 42]. Activarea căii de semnalizare JAK-STAT de către citokine /factori de creștere/hormoni poate stimula proliferarea celulară, diferențierea, migrarea celulară sau apoptoza. Aceste evenimente celulare sunt esențiale pentru hematopoieză, răspunsurile imune, dezvoltarea glandei mamare, lactație și diverse alte procese celulare. Dereglarea transmiterii semnalului pe calea JAK-STAT, așa cum se poate anticipa cu ușurință, este însoțită de o serie de manifestări patologice: procese inflamatorii, eritrocitoză, gigantism și tumorigeneză [43].

Calea de semnalizare JAK-SAT este relativ simplă din punctul de vedere al mecanismului și implică participarea unui număr mic de componente cu rol de „actori” principali: ligandul, receptorul, kinaza asociată (JAK) și efectorul STAT. Activarea JAK este determinată de dimerizarea/multimerizarea receptorului indusă de interacțiunea cu ligandul, astfel încât, ca urmare a modificărilor conformaționale din endodomeniul receptorului, moleculele de JAK ajung în imediata vecinătate, expuse și se pot fosforila încrucișat (trans-fosforilare) la nivelul domeniilor lor cu activitate kinazică. Kinazele asociate receptorului (JAK) astfel activate fosforilează, ulterior, tirozine din endodomeniile receptorilor și din diverse alte substraturi, principala proteină țintă fiind STAT. Proteinele STAT sunt factori transcripționali latenți, cu localizare citosolică, până în momentul activării lor. La mamifere au fost identificate șapte tipuri de STAT, toate având drept caracteristici structurale comune un rest de tirozină plasat în apropierea capătului C-terminal, care reprezintă situsul de fosforilare pentru JAK, precum și un domeniu SH2 care îndeplinește două funcții, de ancorare la receptorul fosforilat de JAK și, respectiv, de dimerizare. Așadar, JAK în formă activă fosforilează tirozine aparținând receptorului care, ulterior, servesc ca situri de ancorare pentru STAT. Odată fixată de receptor, proteina STAT este fosforilată de JAK, iar această modificare determină disocierea STAT de receptor. Fosforilarea de către JAK a tirozinei din apropierea capătului C-terminal al proteinei STAT este responsabilă și de homodimerizarea proteinelor STAT, întrucât fosfotirozina este recunoscută și fixată prin intermediul domeniului SH2 din structura partenerului de dimerizare. STAT în formă de dimer este translocat în nucleu și se fixează la ADN, pe secvențe specifice cu rol reglator, care activează sau represează transcrierea genelor țintă. Prin această secvență de evenimente, calea de semnalizare JAK-STAT asigură un mecanism direct de traducere a unui semnal extracelular într-un răspuns transcripțional. Cu toate acestea, chiar dacă mecanismul acestei căi de semnalizare pare să fie relativ simplu (cel puțin teoretic), trebuie avut în vedere că modularea semnalizării JAK-STAT este extrem de complexă, întrucât alături de componentele principale pot interveni o multitudine de proteine efectoare [44]. Exemple, în acest sens, sunt proteinele **STAM** (*Signal-Transducing Adapter Molecules*) și **StIP** (*Stat-Interacting Protein*). Proteinele STAM reprezintă substraturi de fosforilare pentru JAK, având capacitatea de a interveni în activarea

⁶ Abrevierea vine de la o viziune metaforică ce pleacă de la faptul că pe aceste kinaze există două situri kinazice (unul standard și unul mai neobișnuit a cărui funcție a fost într-o oarecare dezbateră, deși acum sunt dovedite rolurile lui modulatorie), ceea ce a condus pe cei care au denumit enzima la ideea asemănării cu Janus, zeul cu două fețe din mitologia romană. Alți autori (mai puțin sensibili la mitologie?) consideră abrevierea ca provenind de la *Just Another Kinase* (vezi această alternativă la originea abrevierii în **Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Cleveland JL, Yi T, Ihle JN.** (1993) Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(18): 8429-33).

transcripțională a unor gene țintă specifice (printr-un mecanism care nu a fost încă elucidat). Proteinele StIP se pot asocia atât cu JAK, cât și cu STAT (în formă nefosforilată) și servesc, probabil, ca platformă (proteine adaptoare) pentru a facilita fosforilarea STAT de către JAK. În plus, au fost identificate și proteine reglatoare care atenuază semnalizarea JAK-STAT printr-un mecanism de reacție negativă [45]. Stingerea semnalului prin inactivarea proteinelor JAK și STAT presupune defosforilări ale fosfotirozinelor (care fosforilate au rol activator) sub acțiunea unor fosfotirozin-fosfataze specifice.

Receptorii cu activitate Ser/Thr-kinazică sunt reprezentați de receptorii pentru factorii de creștere transformanți β . **Factorii de creștere transformanți β** reprezintă o familie de peptide ce mediază, prin intermediul receptorilor lor, o multitudine de fenomene celulare în vertebrate. Efectele diferă de la un tip de celulă la altul, putând inhiba proliferarea, putând stimula sinteza de proteine de matrice extracelulară inclusiv formarea de os, sau putând determina mișcarea celulară chemotactică.

Cât privește **receptorii cu activitate fosfatazică**, putem aminti ca exemplu glicoproteina transmembranară, unipass **CD45** din membrana limfocitelor T și B care participă în mod esențial la activarea prin antigene. (Prescurtarea CD vine de la *Cluster of Differentiation*, semnificând tipuri de proteine de pe suprafața celulară prin care sunt desemnate limfocitele în diferite faze din cursul diferențierii.)

Pentru o imagine mai completă a diversității fenomenelor pe care receptorii le pot declanșa în celule, trebuie menționat că aceasta sporește prin faptul că activarea lor se poate face diferențiat în diferite momente. Celula este determinată să se comporte astfel cum îi impune combinația de semnale pe care le primește la un moment dat. Comportamentul ei ține de echilibrul între răspunsurile sinergice la stimuli.

Un ultim aspect pe care îl abordăm în contextul semnalizării celulare este legat de rolul integrinelor și/sau moleculelor de adeziune celulară, în asemenea fenomene membranare. Menționăm că prescurtarea internațională a sintagmei molecule de adeziune celulară este **CAM** și vine de la numele englezesc al ei: *Cell Adhesion Molecule*. Aceste tipuri de semnalizare, prin integrine, respectiv CAM, pot fi incluse în categoria semnalizărilor juxtacrine.

Integrinele sunt proteine transmembranare organizate ca heterodimeri $\alpha\beta$. Fiecare subunitate reprezintă o proteină transmembranară unipass, tip I. După datele cunoscute și recunoscute în prezent de comunitatea științifică a domeniului, există 18 tipuri de subunități α și 8 tipuri de subunități β . Totuși, numai 24 de integrine (adică de heterodimeri $\alpha\beta$) au fost identificate până în prezent [46]. Integrinele sunt receptori celulari pentru proteinele de matrice extracelulară. Ele transmit semnale celulei despre starea ei de atașare și despre caracteristici ale ambianței extracelulare. Celula se comportă diferit dacă este atașată la matrice sau nu. Mai mult, integrinele sunt implicate în motilitatea celulară. Motilitatea celulară este un fenomen dependent și de semnale primite de celulă de la alte tipuri de liganzi, prin receptorii corespunzători. În această situație, în care motilitatea este indusă de răspunsul celular la semnale primite de la molecule pentru care există receptori pe suprafața celulei care se mișcă, este vorba de fenomenul numit **chemotaxie**. Atunci când motilitatea este indusă numai de interacțiunile celulei cu matricea extracelulară, fenomenul poartă numele de **haptotaxie**. Mecanismele haptotaxiei sunt mai puțin cunoscute în acest moment. Dincolo de răspunsul prin motilitate la stimuli, fenomen în care sunt implicate integrinele, practic semnalele pe care celula le primește prin receptorii pentru proteinele matricei extracelulare, analizate simultan cu celelalte semnale, influențează și alte fenomene, cum ar fi: proliferarea celulară, diferențierea

celulară, apoptoza (tip de moarte celulară programată). Apoptoza indusă de detașarea celulelor de substrat este denumită **anoikis**.

Integrinele sunt exemplul sugestiv de componente membranare implicate în semnalizarea celulară în ambele sensuri [46-48]: din exteriorul celulei către interior, așa cum este cazul în toate căile de semnalizare sistematizate și prezentate succint în cele de mai sus, dar și din interiorul celulei către exterior. Pentru realizarea rolului lor, în diversitatea de procese celulare amintite mai sus, integrinele cooperează cu kinaze citosolice (**kinazele adeziunii focale**, prescurtat **FAK**, de la denumirea englezească *Focal Adhesion Kinase*, **kinazele asociate integrinelor**, abreviate prin **ILK**, de la *Integrin-Linked Kinase*, sau **Src**) [49-52], cu proteine adaptoare (paxilină, Grb2, abreviație de la *Growth factor receptor-bound protein 2*) [50] sau cu comutatori moleculari din clasa GTP-azelor mici (**RhoA**, **Rac1**, **Cdc42**) [53, 54]. Dintre cele două subunități α , respectiv β ale heterodimerului, cele cu implicarea de bază, în asemenea procese celulare, sunt subunitățile β , iar mecanismele prin care acestea inițiază procese de semnalizare sunt mai bine cunoscute. Totuși, există dovezi experimentale conform cărora și subunitățile α asistă procesele de semnalizare prin integrine [50, 55], modulându-le discret, dar semnificativ, deși mecanismele prin care aceste componente ale heterodimerului acționează sunt mai puțin descifrate.

Că integrinele sunt o unealtă pentru semnalizarea celulară în dublu sens, se poate argumenta simplu, prin descrierea organizării heterodimerului în membrană și modificările pe care conformația diferitelor sale domenii (ectodomeniul, domeniul transmembranar, respectiv endodomeniul) le suferă în timpul exercitării funcției. În stare de repaus, forma inactivă a dimerului $\alpha\beta$ are o structură pliată cu partea distală a ectodomeniului îndoită către plasmalemă, precum lama unui briceag în teacă. Diferitele zone ale ectodomeniului astfel pliat au primit, sugestiv, denumiri care ne conduc la părțile anatomice ale piciorului: gambă, pentru porțiunea pliată (partea distală a lanțului polipeptidic care structurează ectodomeniul), coapsă, pentru porțiunea proximală plasmalemei din ectodomeniul heterodimerului și genunchi, pentru porțiunea cu rol de balama, la nivelul căreia se petrece pliarea [46, 56]. În stare pliată, adică inactivă, ectodomeniul integrinelor se extinde până la o distanță de 10nm față de aliniamentul bistratului lipidic. Asta înseamnă că în stare inactivă siturile de interacțiune cu ligandul ale integrinelor sunt mascate în glicocolix, care are o grosime minimă de 20nm. Prin activare, ectodomeniul heterodimerului se extinde, precum lama briceagului cu acționare prin buton, expunând siturile de legare la suprafața glicocalixului, unde pot interacționa cu partenerii, care sunt proteine ale matricei extracelulare. Activarea este controlată și comandată din interiorul celulei, adică răspunde la un semnal din interior în afară. După activare, atâta timp cât integrina nu este legată de proteina de matrice specifică, endodomeniile celor două subunități rămân apropiate unul de altul, într-o conformație numită strânsă [57], astfel încât efectorii intracelulari nu au acces la siturile de legare. După interacțiunea cu ligandul, adică, după interacțiunea cu proteina de matrice, endodomeniile celor două subunități α , respectiv β se separă lăsând accesibile siturile de interacțiune cu efectorii, iar procesele de semnalizare se declanșează. În sfârșit, o ultimă modificare conformațională propusă pentru ectodomeniul integrinelor active, după legarea partenerului, este una angulară, flexată, stabilă prin care strânge componentele legate, apropiind elementele de matrice extracelulară de membrană și întărind forța legăturii, ceea ce se întâmplă odată cu aglomerarea complexelor integrină-proteină de matrice la nivelul microdomeniului de membrană corespunzător porțiunii jonctionate [46].

Pentru a finaliza această succintă referire la procesele de semnalizare pe care integrinele le declanșează, este demn de menționat că acestea sunt prin excelență un mijloc de interferență (diafonie) cu semnalizările prin intermediul receptorilor la

liganzii solubili, indiferent de tipul de receptori cărora aceștia le sunt destinați, având loc astfel modulări dintre cele mai diverse în comportamentul celulelor ce receptează o pluralitate de stimuli concomitent [58, 59]. Se produc astfel asamblări și dezasamblări ale atașărilor celulare la substrat, pentru a facilita funcțiile celulelor în cadrul țesuturilor în cazuri deosebite, când este nevoie de formarea sau refacerea acestora [60].

CAM sunt proteine transmembranare, unipale implicate în adeziunea celulelor între ele. Deoarece în stabilirea interacțiunilor homofile dintre CAM la nivelul joncțiunilor este nevoie de ioni de calciu, aceste proteine transmembranare se mai numesc **caderine** (aderine dependente de calciu). Caderinele, care formează o familie de proteine, transmit semnale celulei dacă sunt sau nu implicate în asemenea interacțiuni, la nivelul unor microdomenii de membrană numite, de regulă, joncțiuni celulare. Celula se comportă diferit dacă este aderată de alte celule sau este liberă. În momentul de față sunt dovedite două fenomene celulare pe care semnalizarea prin caderine le poate induce: inhibiția de contact a locomoției [61], respectiv inhibiția de contact a proliferării [62]. Ambele au putut fi evidențiate în studii ale celulelor în cultură, dar se caută semnificația lor *in vivo*, existând raportări care dovedesc implicarea acestor fenomene în procese de dezvoltare embrionară [63]. Ca și integrinele, caderinele cooperează în funcțiile lor cu proteinele G mici din familia Rho-GTPazelor, care modulează citoscheletul de actină și interferă cu semnalizările altor receptori. De exemplu, la inhibiția de contact a proliferării, contactul dintre celule reduce sensibilitatea acestora la factorii de creștere prin inhibarea receptorilor specifici [62].

3.3.3. Considerații finale asupra semnalizării celulare

Ce putem extrage ca semnificație biologică, adică ce putem esențializa referitor la fenomenele de semnalizare pentru înțelegerea importanței lor în buna funcționare a celulei și, de aici, pentru buna funcționare a biostructurilor (țesuturi, organe) la formarea cărora celulele participă? Întrebarea nu este deloc retorică.

Din tot ce a fost prezentat în subcapitolul pe care îl încheiem aici, referitor la acest subiect provocator de biologie celulară a biomembranelor, este ușor de reamintit diversitatea de fenomene de semnalizare ce se declanșează la nivelul membranelor (în cazul moleculelor semnal hidrofile) sau pe care membrana le facilitează, permițând difuzia moleculelor semnal prin planul ei (în cazul liganzilor lipofili). Din datele acumulate până în prezent, diversitatea de fenomene de semnalizare prin receptori membranari este mai mare decât pentru receptori intracelulari, chiar dacă între aceștia au fost identificați (pe baza studiului genomului) unii denumiți sugestiv receptori orfani, deoarece liganzii lor ne sunt încă necunoscuți. De remarcat că pe măsură ce liganzii sunt identificați, acești receptori se renumesc receptori orfani adoptați. Așadar, diversitatea de fenomene de semnalizare poate fi în primul rând argumentată prin diversitatea de tipuri de receptori. Acest lucru se leagă cu caracterul eterogen al organizării moleculare a biomembranelor și semnificația biologică a acestei realități. Dincolo de diversitatea datorată marii variabilități a tipurilor de receptori, varietatea de fenomene ce se petrec în celule, după receptarea de semnale, se explică și prin setul de efectori pe care o celulă sau alta îl au la dispoziție. De aceea, aceeași moleculă semnal poate induce în diverse celule răspunsuri diferite. În sfârșit, diversitatea de comportamente celulare la receptarea unuia sau a altuia dintre semnale este guvernată și de setul de semnale pe care o celulă le primește simultan, inclusiv de intensitatea fiecăruia (adică răspunsul celulei depinde de echilibrul dintre diferitele semnale primite). Așadar, totalitatea semnalelor primite simultan de o celulă creează interferențe între căile de semnalizare pe care fiecare dintre stimuli le declanșează, rezultatul fiind unul reieșit din echilibrul care se stabilește în celulă între diferitele fenomene menite să ducă la

crearea răspunsului optim. Fără această capacitate de a găsi calea de echilibru, celula nu s-ar putea adapta, supraviețui și funcționa în limite normale. De altfel, multe patologii sunt legate de pierderea de către celulă a acestei abilități de echilibrare a stimulilor.

În ciuda acestei diversități de fenomene și elemente biochimice care concurează la producerea lor, există câteva aspecte principale, care pot crea câteva idei generale, dar nu absolute, referitor la mecanismele semnalizării:

- (i) orice proces de semnalizare nu poate fi inițiat în absența a doi factori: molecula semnal (numită generic și ligand), respectiv receptorul specific, acești doi factori biochimici trebuind să interacționeze pentru declanșarea fenomenelor;
- (ii) interacțiunea ligand-receptor duce la stimularea/activarea celui din urmă și, în această stare, receptorul activează, la rândul său, elemente intracelulare care participă la procesul de semnalizare (efectori intracelulari, mesageri secunzi);
- (iii) elementele intracelulare implicate preiau semnalul din amonte (de la receptori direct sau de la efectori, sau mesageri secunzi aflați înaintea lor în calea de semnalizare) și îl transmit în aval altor efectori;
- (iv) procesele menționate la punctele (ii) și (iii) reprezintă și momente de amplificare a semnalului, deoarece receptorii activați de liganzi sau efectorii activați de participanții din amonte la fenomen, cât sunt în stare activă transmit informația la un număr mai mare de efectori din aval (activează mai mulți efectori de după ei în calea de semnalizare sau produc mai multe molecule de mesager secund); de aceea se vorbește de cascade de semnalizare: informația primită de celulă este amplificată într-un torent (de menționat că nu toate procesele de semnalizare implică, obligatoriu, amplificare);
- (v) căile de semnalizare conțin mai mulți sau mai puțini pași, până când celula ajunge în faza de a realiza răspunsul adecvat la semnalul primit; putem puncta aici o regulă de principiu, cu extindere în tot ce se întâmplă în celulă: cu cât procesul celular este mai complex, are mai mulți pași, cu atât celula are mai multe posibilități de control asupra acestuia; în contextul subiectului nostru, cu cât o cale de semnalizare este mai complexă, cu atât celula o poate controla mai bine, iar punctele de interferență pot fi mai numeroase, ceea ce, atâta timp cât fenomenele sunt sub control adecvat, este spre binele celulei;
- (vi) după realizarea răspunsului la stimul, celula trebuie să se desensibilizeze pentru a putea reveni la disponibilitatea de a primi același semnal în orice moment în viitor;
- (vii) o ultimă mențiune este cea referitoare la ce pot să însemne activările diversilor participanți la mecanismul semnalizării; în primul rând diferitele interacțiuni atrag modificări ale conformațiilor proteinelor implicate; nu întotdeauna acestea sunt suficiente activării propriu-zise, ci adesea sunt necesare modificări post-traducere ale lanțului polipeptidic, în varii poziții; cel mai adesea este vorba de jocul fosforilare/defosforilare sau de schimbări de molecule mici în diferite complexe, cum se întâmplă la proteinele G (fie ele heterotrimerice sau monomerice); așadar activările implică modificări conformaționale, chimice sau chiar de ambele naturi care sunt reversibile, această reversibilitate reprezentând practic posibilitatea de trecere a proteinelor de semnalizare din stare inactivă în stare activă și invers.

Dincolo de această diversitate de fenomene de semnalizare, în celulă lucrurile se petrec coerent, unitar deoarece există mecanisme de control și de interferare a semnalelor în orice combinație ar stimula ele celula țintă la un moment dat. Putem așadar vorbi și în contextul semnalizării celulare de unitate născută din diversitate.

Bibliografie specifică

1. **Rall TW, Sutherland EW.** (1958) Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem.* **232**(2): 1065-1076.
2. **Sutherland EW, Rall TW.** (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem.* **232**(2): 1077-1091.
3. **Sutherland EW, Oye I, Butcher RW.** (1965) The action of epinephrine and the role of the adenylyl cyclase system in hormone action. *Recent Prog Horm Res.* **21**: 623-646.
4. **Beavo JA, Brunton LL.** (2002) Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 710-718.
5. **Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS.** (2010) TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med.* **14**(4):729-740. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x.
6. **Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D, Radu E.** (2005) The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ. *J Cell Mol Med.* **9**(3): 714-730.
7. **Mullican SE, Dispirito JR, Lazar MA.** (2013) The orphan nuclear receptors at their 25-year reunion. *J Mol Endocrinol.* **51**(3): T115-T140. DOI: 10.1530/JME-13-0212.
8. **Shi Y.** (2007) Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today.* **12**(11-12): 440-445.
9. **Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N.** (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* **423**(6943): 949-955.
10. **Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA.** (2004) Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci.* **27**(6): 329-336.
11. **Doyle DA.** (2004) Structural changes during ion channel gating. *Trends Neurosci.* **27**(6): 298-302.
12. **Yoshida Y, Imai S.** (1997) Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn J Pharmacol.* **74**(2): 125-137.
13. **Bosanac I, Yamazaki H, Matsu-Ura T, Michikawa T, Mikoshiba K, Ikura M.** (2005) Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Mol Cell.* **17**(2): 193-203.
14. **Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO.** (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev.* **87**(2): 593-658.
15. **Haga T.** (2013) Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **89**(6): 226-256.
16. **Berman DM, Gilman AG.** (1998) Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem.* **273**: 1269-1272.
17. **Patel TB.** (2004) Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades. *Pharmacol Rev.* **56**: 371-385.
18. **Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H.** (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein α , β , and γ subunit genes. *DNA Res.* **7**: 111-120.
19. **Sakamoto KM, Frank DA.** (2009) CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* **15**: 2583-2587.
20. **Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS.** (2010) The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol.* **185**: 6413-6419.
21. **Larson EB, Graham DL, Arzaga RR, Buzin N, Webb J, Green TA, Bass CE, Neve RL, Terwilliger EF, Nestler EJ, Self DW.** (2011) Overexpression of CREB in the nucleus accumbens shell increases cocaine reinforcement in self-administering rats. *J Neurosci.* **31**: 16447-16457.
22. **Müller F, Bönigk W, Sesti F, Frings S.** (1998) Phosphorylation of mammalian olfactory cyclic nucleotide-gated channels increases ligand sensitivity. *J Neurosci* **18**: 164-173.
23. **Boccaccio A, Lagostena L, Hagen V, Menini A.** (2006) Fast adaptation in mouse olfactory sensory neurons does not require the activity of phosphodiesterase. *J Gen Physiol* **128**: 171-184.
24. **Pifferi S, Cenedese V, Menini A.** (2012) Anoctamin2/TMEM16B: a calcium activated chloride channel in olfactory transduction. *Exp Physiol.* **97**: 193-199.
25. **Sadana R, Dessauer CW.** (2009) Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals.* **17**(1): 5-22. DOI: 10.1159/000166277.
26. **Tresguerres M, Levin LR, Buck J.** (2011) Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.* **79**(12): 1277-1288. DOI: 10.1038/ki.2011.95.

27. **Willoughby D, Cooper DM.** (2007) Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev.* **87**(3): 965-1010.
28. **Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA.** (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* **52**(3): 375-414.
29. **Uchida K, Mizuno T, Shimonaka M, Sugiura N, Nara K, Ling N, Hagiwara H, Hirose S.** (1989) Purification and properties of active atrial-natriuretic-peptide receptor (type C) from bovine lung. *Biochem J.* **263**(3): 671-678.
30. **Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, Young HS.** (2011) Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J.* **278**(11): 1818-1829. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08083.x.
31. **Zwick E, Bange J, Ullrich A.** (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer.* **8**(3): 161-173.
32. **van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA.** (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* **10**: 251-337.
33. **Hunter T.** (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol.* **21**: 140-146.
34. **Okada M.** (2012) Regulation of the Src family kinases by Csk. *Int J Biol Sci.* **8**: 1385-1397.
35. **Roskoski R Jr.** (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* **324**: 1155-1164.
36. **Goldfinger LE.** (2008) Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst.* **4**: 293-299.
37. **Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR.** (2012) Regulating the regulator: post-translational modification of Ras. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 39-51.
38. **Pennock S, Wang Z.** (2008) A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in epidermal growth factor receptor downregulation. *Mol Cell Biol.* **28**: 3020-3037.
39. **Grabbe C, Husnjak K, Dikic I.** (2011) The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**: 295-307.
40. **Miranda M, Sorkin A.** (2007) Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv.* **7**: 157-167.
41. **Watowich SS.** (2011) The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J Investig Med.* **59**(7): 1067-1072. DOI:10.231/JIM.ob013e31820fb28c.
42. **Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA.** (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* **19**(3): 225-268.
43. **Sansone P, Bromberg J.** (2012) Targeting the interleukin-6/Jak/Stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol.* **30**: 1005-1014.
44. **Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA.** (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* **117**: 1281-1283.
45. **Kiu H, Nicholson SE.** (2012) Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors.* **30**(2): 88-106. DOI: 10.3109/08977194.2012.660936.
46. **Hynes RO.** (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**: 673-687.
47. **Coppolino MG, Dedhar S.** (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* **32**: 171-188.
48. **Kim M, Carman CV, Springer TA.** (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science.* **301**(5640): 1720-1725.
49. **Schwartz MA.** (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* **11**: 466-470.
50. **Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH.** (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci.* **113**(Pt 20): 3563-3571.
51. **Playford MP, Schaller MD.** (2004) The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene.* **23**: 7928-7946.
52. **Blattner SM, Kretzler M.** (2005) Integrin-linked kinase in renal disease: connecting cell-matrix interaction to the cytoskeleton. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **14**: 404-410.
53. **Schwartz MA, Shattil SJ.** (2000) Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci.* **25**(8): 388-391.
54. **Wong KW, Isberg RR.** (2005) Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasion-promoted bacterial uptake. *Curr Opin Microbiol.* **8**: 4-9.

55. **Leabu M, Uniyal S, Xie J, Xu YQ, Vladau C, Morris VL, Chan BM.** (2005) Integrin alpha2beta1 modulates EGF stimulation of Rho GTPase-dependent morphological changes in adherent human rhabdomyosarcoma RD cells. *J Cell Physiol.* **202**(3): 754-766.
56. **Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA.** (2003) New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood.* **102**(4): 1155-1159.
57. **Valdembri D, Serini G.** (2012) Regulation of adhesion site dynamics by integrin traffic. *Curr Opin Cell Biol.* **24**(5): 582-591. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.08.004.
58. **Giancotti FG, Tarone G.** (2003) Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**: 173-206.
59. **Ffrench-Constant C, Colognato H.** (2004) Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends Cell Biol.* **14**: 678-686.
60. **Wehrle-Haller B.** (2012) Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* **24**(5): 569-581. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.06.010.
61. **Mayor R, Carmona-Fontaine C.** (2010) Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol.* **20**(6): 319-328. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.03.005.
62. **McClatchey AI, Yap AS.** (2012) Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol.* **24**(5): 685-694. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.06.009.
63. **Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, Stern CD, Mayor R.** (2008) Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature.* **456**(7224): 957-961. DOI: 10.1038/nature07441.

3.4. Unitatea în diversitate, rezultat al modului integrativ de funcționare a biomembranelor

După atâtea cunoștințe acumulate până aici, am putea să ne întrebăm, în ideea căpătării înțelepciunilor care pot fi extrase: de unde ideea unității în diversitate în contextul biomembranelor? În capitolul anterior, nădăjduim că am reușit să argumentăm ideea de diversitate. Diversitatea se bazează pe ceea ce am prezentat despre organizarea moleculară a biomembranelor. Am văzut că este vorba de o multitudine de biocomponente, ceea ce induce eterogenitatea moleculară a biomembranelor. Mai mult, componente biochimice care alcătuiesc membranele se află într-o dispunere asimetrică la nivelul ultrastructurii și într-o continuă mișcare, ceea ce induce fluiditate, o fluiditate care se manifestă bidimensional. Am detaliat acolo aspectele legate de aceste caracteristici și am și tras concluzii asupra semnificației biologice a acestor proprietăți. O componentă celulară formată dintr-o multitudine de elemente asigură potențialul unei mari diversități de fenomene ce se pot petrece la nivelul ei. Este momentul să argumentăm acum în ce constă ideea de unitate care se plasează deasupra acestei diversități, folosind-o eficient. Este vorba de unitatea (în sensul de coerență) pe care o conferă modul de funcționare a biomembranelor.

Membranele celulare acționează ca sisteme integrative la nivelul cărora componentele moleculare, deși sunt de o mare diversitate, cooperează pentru asigurarea schimbului de substanță și de informație dintre celulă și mediu. Fără aceste schimburi, celula nu poate supraviețui și nici nu se poate adapta. Membrana trebuie să fie o barieră selectivă, cu selectivitate modulabilă în funcție de condiții, deoarece numai astfel poate asigura adaptarea celulei la ce se întâmplă în afara ei, pentru a asigura supraviețuirea, dar și funcționarea corespunzătoare.

Fenomenele de schimb de substanță între celulă și mediu poartă denumirea de transport membranar. Fenomenele de transport membranar sunt de o mare diversitate, ceea ce explică și, mai mult, impune prezența unei varietăți de componente biochimice în organizarea biomembranelor. O sistematizare eficientă a cunoștințelor legate de transportul membranar poate fi făcută prin clasificarea fenomenelor pe baza diferitelor considerente/criterii, ceea ce a și fost făcut în prima parte a acestui capitol. Să încercăm să rezumăm, în contextul imaginii integrative pe care ne-am propus-o prin titlul secțiunii.

Puține sunt substanțele care pot trece liber prin biomembrane (altfel nu ar fi posibilă funcția de barieră), fenomenele de transport pe care acestea le execută purtând denumirea de difuziune simplă. Trecerea componentelor de acest tip prin membrană se face pe baza miscibilității lor cu lipidele (ceea ce le oferă posibilitatea trecerii) și a diferenței de concentrație în care ele se află de o parte, respectiv de cealaltă a bistratului lipidic (aceasta reprezentând motorul transportului). Dincolo de aceste situații ale difuziunii simple, majoritatea schimburilor de substanță se realizează cu concursul principal al proteinelor membranare, fenomenele făcând parte din ceea ce numim transport facilitat prin membrană. Totuși, proteinele nu sunt independente, în funcția lor, de lipidele membranare. Caracteristicile fizico-chimice ale lipidelor bistratului influențează funcția proteinelor prin efectele pe care le induc în aranjamentele conformaționale ale porțiunilor lanțurilor polipeptidice imersate în bistrat. Pentru transportul de ioni și molecule polare, până la un anumit gabarit (o anumită greutate moleculară), există structuri proteice numite canale, pompe, respectiv transportori. Toate aceste tipuri de transport sunt reunite sub categoria denumită transport prin membrană. Din cele rezumate în acest paragraf, transportul prin membrană se poate face pasiv, fără consum concomitent de energie (cazurile de difuziune simplă sau difuziune facilitată) sau activ, când trecerea

componentelor transportate se face împotriva gradientului de concentrație, necesitând consum de energie din partea celulei.

Pentru macromolecule sau material insolubil (particule, debriuri celulare) transportul se face cu implicarea unor ultrastructuri delimitate de membrane, unele definite ca microdomenii de membrană (caveole, vezicule cu înveliș) sau vezicule de secreție). Acest transport este numit transport cu membrană. În funcție de sensul transportului definim endocitoza (transport cu membrană din exterior, adică din mediul extracelular în interiorul celulei), exocitoza (transport cu membrană din celulă în exterior) și un al treilea fenomen de transport cu membrană, specific celulelor epiteliale monostratificate, numit transcitoză. Transcitoza reprezintă transportul cu membrană prin care celula preia substanța de transportat de la un pol (apical sau latero-bazal), o traversează prin corpul ei și o elimină la polul celălalt. În această „excursie” substanța poate sau nu să fie modificată de celulă.

Pentru argumentarea ideii de integrativitate, rugăm cititorii să identifice, printr-un efort personal, dar facil pentru cine a citit cu motivație, multiplele situații în care diferitele fenomene de transport membranar se condiționează reciproc. Pentru ghidare, noi amintim doar cazul exocitozei semnalizate, proces de transport cu membrană, care depinde de semnale primite de celula secretoare, de funcționarea canalelor de calciu, dar implică și pompe de calciu care restabilesc condițiile bazale de concentrație a acestui ion bivalent în citosol.

În contextul acestei secțiuni, care încearcă să așeze ca un corolar al cunoștințelor câteva aspecte de principiu, trebuie menționate și fenomenele de transport cu membrană din interiorul celulei, pe care nu le-am abordat aici, dar le vom prezenta în volumul al doilea al cărții, fenomene cunoscute sub numele generic de trafic intracelular al membranelor. Vom rememora acolo o serie de evenimente moleculare de care ne-am ocupat aici, care însoțesc procesele membranare ce asigură traficul intracelular de materiale și care implică endomembranele.

Alături de schimbul de substanță amintim că ”datoria” membranelor este și aceea de a culege din, sau de a transmite în mediul extracelular informații.

Schimbul de informație este realizat de celulă prin fenomenele de semnalizare celulară. Componentele ce asigură acest schimb sunt tot proteine denumite, în general, receptori membranari. Lor li se adaugă molecule/macromolecule care pot transmite semnale dinspre celula care trimite mesaj spre exterior (de regulă aceste molecule/macromolecule acționând ca liganzi pentru receptorii din membranele celulelor țintă).

Receptorii sunt, în mare parte, proteine transmembranare unipas, dar asta nu este o regulă absolută. Dimpotrivă, există suficient de mulți receptori care sunt proteine transmembranare multipas. A fost evidențiată o mare diversitate de tipuri de receptori care presupun o multitudine de mecanisme de semnalizare. Totuși, se pot puncta unele aspecte general valabile ale fenomenelor de semnalizare. O mare parte dintre semnale sunt amplificate în interiorul celulei și de aceea nu este nevoie de concentrații ridicate de stimul (ligand) pentru ca celula să răspundă și nici de cantități mari de receptori în membrane, pentru ca celula să simtă stimulul. Amplificarea se realizează prin mesageri secunzi și/sau efectori intracelulari. La unele mecanisme de semnalizare participă și lipide membranare a căror complexitate structurală este exploatată fericit și eficient de celulă. Lipidele sunt implicate în mecanisme cu mesageri secunzi. Implicarea lipidelor membranare în procesele de semnalizare este un alt argument al funcționării integrative a biomembranelor. Tot ce se află în organizarea unei membrane se implică în menirea ultrastructurii într-un fel sau altul.

În biologia celulară, noțiunea de receptor este îmbogățită în conținut în comparație cu cea folosită în farmacologie. Astfel, proteine membranare care sunt parteneri de interacțiune ai altor proteine din matricea celulară (cazul integrinelor)

sau din membrana altor celule (cazul moleculelor de adeziune celulară, în principal caderine) au și rol de transmitere de semnale celulelor cărora le aparțin, deci rol de receptor.

Pentru argumentarea integrativității membranelor în funcționare, trebuie amintit faptul că diferitele căi de semnalizare, declanșate de diverși stimuli prin receptorii specifici, dacă sunt inițiate concomitent, pot interfera modulându-se reciproc, astfel încât celula să se comporte în cel mai adecvat mod, impus de situația concretă în care se află. Aceste realități asigură coerența comportamentului celular, deci aspectul unitar al fenomenelor biologice, fără ca diversitatea de procese să afecteze supraviețuirea și funcționarea, ambele utile sistemului din care celula face parte. Atâta timp cât celula își păstrează capacitatea de a echilibra fenomenele, totul decurge normal, însă, atunci când această capacitate se pierde, apar fenomenele patologice.

În sfârșit, ideea de integralitate în ceea ce au membranele de făcut, mai poate fi argumentată și de dependența unor fenomene de transport de procese de semnalizare și invers. Ca exemple putem, pe de o parte, face iarăși referire la exocitoza semnalizată, în care un proces de transport membranar depinde de semnalele pe care celula le primește, sau, pe de altă parte, de transmiterea semnalelor de-a lungul axonilor, care depinde de fenomene de transport prin membrană, adică de funcția unor canale ionice comandate electric.

Dincolo de aceste exemple, lăsăm cititorilor bucuria de a identifica alte situații concrete de cooperare între fenomenele ce se petrec la nivelul membranelor și care contribuie la comportamentul unitar al celulei, situații care pot fi găsite chiar în fenomenele biologice abordate în această carte.

Toată argumentarea din această secțiune reprezintă un fundament pentru ideea unității în diversitate, unitate în diversitate pe care biomembranele o asigură în interesul bunei funcționări a celulelor, a țesuturilor, a organelor, respectiv a organismelor. Această caracteristică nu este specifică biomembranelor, ci se extinde la toate elementele de organizare și de funcționare a celulelor considerate individual sau în cooperarea lor pentru asigurarea caracterului holistic al unității elementare de organizare morfo-funcțională a lumii vii. Când se pierde caracterul unitar, celulele deviază de la comportamentul normal, ceea ce afectează pe de o parte funcționarea individuală a lor și, mai departe, influențează normalitatea întregului căruia acestea le aparțin; se dezvoltă patologicul, care, în opoziție cu frumusețea armoniei fiziologice, devine o hidoșenie cu care medicina trebuie să se lupte și să o învingă. Suntem încă atât de neputincioși adesea...

Avem, totuși, motive să ne păstrăm optimismul pe termen lung.