**CELBIOLOGIE HOOFDSTUK 16: Signaaltransductie**

1. Basisconcepten signaaltransductie

* Cellen reageren op wijzigende omstandigheden
* Multi-cellulaire organismen coördineren cellulaire functies in verschillende weefsels
* Ook enkelcelligen communiceren met elkaar
* **Basisconcepten signaaltransductie:**
  + Ontvangst van een signaal
    - Receptor-ligand interactie
  + Transductie van het signaal
    - Intracellulaire signaalmoleculen
    - Second messengers
  + Cellulaire respons
    - Effectorproteïnen

1.1 Ontvangst van een signaal

* Ontvangst van een signaal
  + Receptor ligand interactie
  + Oppervlaktereceptoren of intracellulaire receptoren
    - Oppervlaktereceptoren
      * = receptor in plasmamembraan
      * Hierop binden hydrofiele liganden
    - Intracellulaire receptoren
      * Hierop binden de hydrofobe liganden
  + Ligand = **primaire** boodschapper
    - Vb: groeifactoren, hormoon, neurotransmitter
    - Binding met receptor -> leidt tot productie **second** messengers
      * = kleine additionele moleculen of ionen
      * = transfereren signaal snel van ontvangstlocatie naar binnenste vd cel en zetten een cascade van veranderingen in gang
  + Ligand ingedeeld op basis van actieradius = afstand tussen productie en doelwit
    - Endocriene signalen
      * = grote afstand en via bloedcirculatie naar doelwit
    - Paracriene signalen
      * = worden lokaal vrijgesteld en diffunderen op beperkte afstand naar doelwit
    - Juxtacriene signalen
      * = signalen doorgegeven op zo’n korte afstand dat er fysiek contact is tussen uitsturende en ontvangende cellen
    - Autocriene signalen
      * = signalen ageren op zelfde cellen als waar signaal vertrekt
  + Specificiteit ligand-receptor
    - bepaald door doelwitweefsel
    - Sleutel slot herkenning ter hoogte vd bindingsite
  + Bindingskinetiek
    - ~ kinetiek van enzym
    - Gekenmerkt door saturatie en receptoraffiniteit Kd
      * Saturatie
        + Hoeveelheid ligand-gebonden receptor ~ concentratie ligand tot er saturatie optreedt
      * Affiniteit
        + Hoge affiniteit receptor

Lage ligandconcentraties + alle receptoren bezet

* + - * + Lage affiniteit receptor

Hoge ligandconcentraties + weinig receptoren bezet

* + - * + Dissociatieconstante Kd

= concentratie ligand nodig om 50% vd receptoren te bezetten

* + Receptor neerregulatie
    - = adaptatie waarbij een hogere ligandconcentratie nodig is om reactie van receptor op ligand te stimuleren
      * Vb: wanneer ligand langdurig is gebonden op receptor -> w ongevoelig
    - = cellen kunnen hun gevoeligheid voor ligand aanpassen
    - 2 manieren
      * Endocytose
        + Vermindering vd receptordensitiet via endocytose
        + Densiteit daalt
      * Densensitisatie
        + Proces waarbij een verlaagde affiniteit krijgt voor haar ligand
        + Door bv fosforylatie

1.2 Transductie van een signaal

* Signaaltransductie
  + Productie van second messengers
    - Ca2+, cAMP, cGMP, IP3, DAG, NO
    - Korte maar snelle versterking signaal
  + Receptorbinding initieert(de)activatie cascade van molecular switches
    - Door binding -> conformationele wijziging -> initieert cascade
    - Molecular switches
      * Fosforylatie
      * GTP-ase
  + Signaalamplificatie:
    - = minuscule hoeveelheden ligand zijn voldoende om grote respons in een doelwitcel te lokken
    - Reden:
      * Elke tussenstap in de signaaltransductie cascade zorgt voor productie van vele intermediaire signaalmoleculen -> signaal zal exponentieel toenemen
  + Cascades
    - = basisprincipe
    - Vrijstelling Ca2+ ionen = centraal proces in signaaltransductie cascades
    - ER opslag calcium 1.10-7M
    - ER in cytoplasma 1.10-3M
* Conclusie: door molecular switches en vrijsteling second messengers -> signaaltransductie

1.3 Cellulaire respons

* Effectoren
* Cellulaire respons
  + Snelle en trage mechanismen
  + Signaalintegratie
    - Combinatie van signalen bepalen finale geprogrammeerde celrespons
      * Crosstalk
        + = verschillende pathways beïnvloeden elkaar
      * Één receptor activeert verschillende pathways
        + Vb: GPCr, RTK
      * Verschillende pathways convergeren in gemeenschappelijke signalen
        + Vb: second messengers

1.4 Groepen receptoren

* 3 grote groepen:
  + Ionkanaal gekoppelde receptoren
  + G-proteïne gekoppelde receptoren
  + Enzym-gekoppelde receptoren

2. Receptoren: G-proteïne gekoppelde receptoren

2.1 Algemeen

* G proteïne gekoppelde receptoren GPCR
  + = ligand binding veroorzaakt een wijziging in de receptor die leidt tot activatie van een guanine nucleotide bindend proteïne = G-proteïne
  + Een deel van dit geactiveerd G proteïne bindt en (de)activeert een doelwit proteïne zoals een enzym of kanaal

2.2 Structuur

* GPCR
  + Aanwezigheid van 7 transmembraansegmenten
  + Extracellulaire deel
    - Heeft binding site
  + Cytoplasmatische deel
    - Interactie met G proteïnen mogelijk

2.2 GPCR pathway via membraangebonden enzymen

* G-proteïnen
  + = molecular switches
    - Aan of uit status wordt bepaald door type nucleotide waarmee het gebonden is -> GTP of GDP
* Receptor (de)activatie
  + 1) Heterotrimeer G-proteïne heeft 3 subunits
    - α,β, γ
    - grootste sub-unit = α
  + 2) α subunit bindt met GDP
  + 3) GPCR bindt met ligand -> conformationele wijziging -> G-proteïne zal hierdoor met de GPCR receptor associëren
  + 4) door binding GPCR en G-proteïne -> α subunit laat GDP los en bindt GTP
    - α subunit komt los van de andere 2 subunits
  + 5) signaal wordt doorgegeven
  + 5) maar α subunit katalyseert hydrolyse dus zal terug GDP moeten binden
    - Hierop volgt een inactivatie en reassociatie met β, γ
* GTPase
  + Springt in bij stap 4)
  + = GAPs = GTPase activating proteïns
  + Zal de hydrolyse van G-proteïnen beïnvloeden
  + Reguleert dus de activatie en deactivatie vd α subunit van G-proteïnen
* **cAMP pathway**
  + **Activatie** 
    - 1) signaalmolecule
      * Vb: Glucagon, Epinephrine
    - 2) receptor
      * GPCR\*
    - 3) GTPase
      * Gαq
    - 4) Enzymen
      * Adenylyl cyclase
      * Enzymen zijn normaal inactief -> enzym geactiveerd door binding met geactiveerd α subunit (door GTP-ase) -> enzym zal ATP omzetten naar second messenger cAMP
    - 5) Second messengers
      * Gegenereerd door interactie van de α subunit met de enzymen
      * cAMP
    - 6) Target enzyme
      * PKA, CREB
        + = serine/threonine kinase met multipele targets
        + Targets: vasodilateratie, glycogeenafbraak
      * PKA stimuleert de glycogeenafbraak door activatie glycogeenfosforylase (GP) en deactivatie glycogeensynthase (GS)
  + **Inactivatie**
    - 1) Dissociatie
      * GPCR\* -> GPCR
    - 2) Hydrolyse
      * Gαs +GTP -> Gα + GDP
    - 4) Fosfodiesterase (PDE)
      * Door GTP hydrolyse zal G α terug ontkoppelen en adenylyl cyclase inactiveren
      * Maar om de cytoplasmatische cAMP pool terug te verlagen is er nood aan fosodiesterase
      * cAMP -> 5’ AMP
        + knippen
    - 5) Fosforylatie
      * PKA -> GPCR
      * De-activatie zorgt voor negatieve feedback
* **Calcium pathway** 
  + 1) Signaalmolecule
    - Vb: Norepinephrine
  + 2) receptor
    - GPCR
    - Ligand bindt receptor
  + 3) GTPase
    - Gαq
    - Activatie vd α subunit
  + 4) Enzyme
    - Fosfolipase C
    - Activatie vd α subunit leidt tot activatie van fosfolipase C -> vorming IP3 en DAG
      * Fosfolipase C splitst PIP2 (fosfatidylinositol 4,5 bifosfaat) in IP3 (inositol 1,4,5 trifosfaat) en DAG (diaglycerol)
        + fosfatidylinositol 4,5 bifosfaat = binnenkant membraan
      * IP3 is wateroplosbaar en diffundeert snel door het cytosol om te binden met een calcium kanaal (ER) = IP3 receptor
        + Binding zorgt voor vrijstelling Ca2+
  + 5) 2nd messenger
    - Ca2+, DAG
    - Ca2+ en DAG (membraangebonden) zullen proteïne kinase C (PKC) activeren
  + 6) Target enzyme
    - PKC
      * = een serine/threonine kinase met multipele targets
    - Targets: vasoconstrictie & celgroei&….

2.3 Ca2+ werkt via calciumbindende eiwitten

* Ca2+ bindt direct op verschillende effector proteïnen, waarbij het hun activatie wijzigt
* Voorbeeld: Calmoduline
  + Eiwit die een conformationele wijziging ondergaat bij Ca2+ binding -> kan zich rond proteïne wikkelen

2.4 GPCR activatie kan ook leiden tot communicatie tussen cellen

* Second messengers
  + Naast Ca2+ en cAMP bestaat ook cyclisch GMP (cGMP)
* cGMP = cyclisch GMP
  + wordt geproduceerd uit GTP door enzym guanylyl cyclase
  + speelt een rol in de regulatie van vasodilatatie samen met NO (stikstofoxide)
    - NO ontstaat bij de conversie van arginine naar citruline door NO synthase enzyme
* Proces signaaltransductie
  + Acetylcholine bindt GPCR vd endotheliale cellen
  + Fosfolipase C activatie leidt via IP3 tot Ca2+ vrijstelling uit ER
  + C2+ ionen en calmoduline activeren de NO synthase
  + Geproduceerde NO diffundeert naar naburige spiercellen -> activeert guanylylcyclase -> cGMP concentratie zal toenemen
  + cGMP activeert proteine kinase G/PKG -> leidt tot spierrelaxatie -> (vasodilatatie)
  + cGMP terug afgebroken door fosfodiësterase
  + NO ook door neuronen uitgestuurd om met naburige cellen te communiceren
    - Vb: in penis -> NO door neuronen uitgestuurd om bloedvat dilatatie te induceren -> erectie
    - Viagra = inhibitor vh fosfodiesterase dat cGMP zou afbreken
      * Dus cGMP niveau hoog -> stimuleert de NO productie en erectie behoud
  + Conclusie:
    - Dus dezelfde Ca2+ pathway, maar ander doelwitenzyme
* Bewijs dat pathways over cellen heen kunnen gaan
  + Vb: synaps

3. Receptoren: Kinase-geassocieerde/enzymgekoppelde receptoren

* GPCR geven signalen door via een geactiveerd G-proteïne -> initieert signaaltransductie
  + Dit was de eerste methode
* De enzymgekoppelde receptoren/ kinese-geassocieerde receptoren
  + Receptoren die bij ligand binding enzymatische activiteiten (kinasen) stimuleren
  + Vb: tyrosin en de serine/threonine receptor kinasen
  + Spelen rol in cellulaire processen
    - Voor celdeling ook juiste groeifactoren nodig
      * Groeifactoren werken in op receptor tyrosine kinases RTK’s vb: insuline, fibroblast growth factor en epidermal growth factor

3.1 RTK/ Receptor Tyrosine Kinase

* RTK = receptor tyrosine kinase
  + Bouw
    - Beschikken slechts over een enkele polypeptide keten
    - 1 transmembraansegment <-> GPCRs
    - Extracellulaire deel: ligand bindende domein
    - Cytoplasmatische deel: katalytische tyrosine activiteit + tyrosine residuen als substraat
  + Proces
    - Ligand bindt op tyrosine -> veroorzaakt dimerisatie RTK’s
    - Er gebeurt cross-fosforylatie van tyrosine residuen
      * Autofosforylatie want de receptoren fosforyleren hetzelfde type receptoren
    - Na autofosforylatie -> rekrutering van cytosolische proteïnen
      * Elk proteïne herkent via een SH2 domein een gefosforyleerd tyrosine residu
    - Associatie van tyrosine en SH2 domeinen -> activeert pathways
      * IP3-Ca2+ pathway, RAS pathway en/of PI 3 kinase pathway
* Dus RTK’s activeren verschillende pathways:
* **IP3-Ca2+ pathway**
* **RAS pathway**
  + RAS
    - belangrijke rol in regulatie celgroei
    - = een GTPase = zet GTP om naar GDP
  + Proces
    - Geactiveerde RTK activeert o.a. het monomere GTPase RAS
      * Activatie RAS door uitwisseling GDP naar GTP via GEF
        + **GEF = guanine-nucleotide exchange factor**
        + GEF wordt gerekruteerd aan RTK
    - Geactiveerd RAS zet cascade ingang -> leidt tot activatie van mitogen-activated protein kinases of MAP kinases (MAPKs)
      * Functie: fosforylatie van transcriptiefactoren
    - Inactivatie RAS door GTp hydrolyse: GTP -> GDP
  + Kortlevend signaal -> langdurige effecten
    - Vb: MAPK pathway
* **PI-3-Kinase pathway**
  + RTK’s activeren enzymen zoals fosfatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase)
    - PI3 kiniase fosforyleert het plasmamembraanlipide fosfatidylinositol
  + PI3 wordt niet gesplitst maar wel herkend door specifieke enzymen bv: Akt
  + Akt bevordert verschillende processen bv: celoverleving

3.2 Mutante receptoren geven informatie over functie

* Dominant negatieve mutaties
  + als mutante receptoren nog in staat zijn om te binden met normale receptoren, maar geen autofosforylatie genereren
  + er zijn dus 2 normale receptoren nodig voor autofosforylatie
* constitutief actieve mutaties
  + wanneer er activatie optreedt wanneer er geen ligand is
  + = omgekeerde

3.3 Groeifactor receptor pathways hebben elementen gemeen

* Gemeenschap tussen alle pathways:
  + Ligand binding resulteert in activatie en/of clustering van receptoren
    - Receptoractivatie leidt daarop tot een cascade van gebeurtenissen waarbij intermediaire producten gefosforyleerd of gedefosforyleerd worden
  + Eindresultaat
    - Proteïnen migreren naar de kern -> veroorzaken wijzigingen in genexpressie

4. Hormonale signalisatie

* Groeifactoren
  + In beperkte actieradius
  + Coördineren functie van verschillende celtypes en weefsels over grote afstanden via hormonen = groeifactor

4.1 Algemeen

* Endocriene hormonen
  + Ingedeeld op basis vd afstand die ze afleggen
  + Worden gesynthetiseerd in endocriene weefsels
    - Gesecreteerd in bloed
    - Tijdens circulatie in bloed -> komen verschillende receptoren tegen
    - Hormoon spreekt specifiek weefsel aan = doelwitweefsel
      * Vb: epinefrine -> hart en lever
      * Vb: insuline -> lever en skeletspieren
  + 4 categoriën
    - Aminozuurderivaten (epinefrine)
    - Peptiden
    - Proteïnen (insuline)
    - Lipide achtige hormonen (steroïden)

4.2. Schoolvoorbeeld van endocriene regulatie: glucose metabolisme

* Endocriene hormonen: de adrenerge hormonen
  + De adrenerge hormonen epifrine (adrenaline) en norepinefrine (AZ)
  + Functie
    - Normale lichaamsfuncties stil leggen en vitale grondstoffen naar hart en skeletspieren leiden
    - Verhoogde alertheid
  + Vecht of vluchtrespons
    - Wanneer ze in bloedstroom terechtkomen -> wijzigen ze weefsels -> doel: lichaam voorbereiden op gevaarlijke of stresserende situaie
    - Hoe?
      * Verminderde bloedtoevoer naar viscerale organen -> leidt bloed om naar hart of spieren
    - Verhoogde hartfunctie en bloedoxygenatie
    - Verhoogde glycogeenafbraak en spierfunctie
  + 2 soorten
    - Adrenerge hormonen binden receptoren vh GPCR type
    - α1-adrenerge receptoren:
      * Op spieren van viscerale bloedvaten
      * Binden epinefrine en norepinefrine
      * Geassocieerd met Gq proteïnen -> activering IP3 en Ca2+ pathway -> spiercontractie -> verminderde bloedtoevoer
    - β-adrenerge receptoren:
      * op spieren van hartbloedvaten en bronchiolen
      * binden preferentieel epinefrine
      * geassocieerd met Gs proteïnen -> activeren cAMP pathway -> spierontspanning -> verhoogde bloedtoevoer (+ glycogeenafbraak)

4.3 Suikerspiegel is een evenwichtsoefening tussen opslag en afbraak

* gereguleerd door 2 enzymen
  + signaaltransductie
    - 1) binding epinefrine aan β-adrenerge receptor
    - 2) activatie van Gs proteïne stimuleert adenylylcyclase
    - 3) stijging cAMP activeert PKA
  + PKA
    - Initieert een fosforylatie cascade met activatie van **glycogeenfosforylase** 
      * Glycogeenfosforylase
        + = enzym die glycogeenafbraak bevorderd
        + = enzym dat de splitsing vd glycoside brug doet met vorming van glucose 1 fosfaat
        + = actief door fosforylatie
    - Initieert een fosforylatie met inactivatie van **glycogeensynthase**
* Gereguleerd door 2 peptide hormonen
  + Insuline & glucagon
    - Regelen de glucose balans in het loed
    - Worden aangemaakt in eilandjes van Langerhans
  + Glucagon
    - Stimuleert glycogeenafbraak via β-adrenerge GPCR en cAMp pathway
    - Wanneer glucose hoeveelheid in bloed te laag is
  + Insuline
    - Stimuleert de opname van glucose in spier en vetweefsel en de glycogeensynthase
    - Verlaagt de suikerspiegel door binding RTK en PI3 pathway
  + Bevordering glucose opname (snel) en glycogeensynthese (traag)
  + Types
    - Diabetes I
      * Verlies van insuline producerende beta cellen
      * Opl: toedienen van insuline
    - Diabetes II
      * Resistentie tegen insuline

1. Kernpunten

* Signaaltransductie bestaat uit een receptor-ligand interactie, transductie en amplificatie van het signaal via second messengers, en een finale cel respons
* Hydrofiele liganden binden oppervalkte-receptoren, hydrofobe liganden binden intracellulaire receptoren
* Receptoren hebben een kenmerkende affiniteit maar kunnen neer worden gereguleerd
* Signaalmoleculen worden ingedeeld op basis van actieradius
* De meeste intracellulaire signaalproteïen ageren als moleculaire schakelaars die worden geactiveerd door fosforylatie of GTP binding
* Signaalintegratie bepaalt finale cel respons
* Ere zijn 3 groepen membraangebonden receptoren: kanaalgekoppelde, G-proteïne gekoppelde en enzymgekoppelde receptoren
* GPCR induceren verschillende gepreprogrammeerde responsen via een cAMP of Ca2+ afhankelijke pathway
* Calcium is een belangrijke second messenger. Normaal wordt Ca2+ concentratie in de cel zeer laag gehouden (10.000 keer lager dan buiten de cel) door actief export uit de cel of in het ER en de mitochondriën
* Endocriene hormonen zijn chemische signalen die via het vasculair systeem de functie van de doelwitweefsels bijsturen
* Adrenerge hormonen reguleren de vecht- of vluchtrespons door regulatie van bloedtoevoer, hart- en spierfunctie en glycogeenafbraak
* Basale glucose niveaus worden gereguleerd door insuline en glucagon