



Insegnamento di:

**BIOCHIMICA DELLA TRASDUZIONE**

del corso integrato di:

**Statistica e Bioinformatica per le Biotecnologie**

*Fondamenti di comunicazione intercellulare*

Michele Sallese

12/03/2021

# Organizzazione del corso

- Lezioni frontali: circa 30 ore
  - Sezioni di circa 45 minuti seguiti da una pausa di 10-15 minuti
- Ultimi minuti della giornata dedicati a domande, chiarimenti e discussione
- Giornata dedicata alle vostre presentazioni
- Gruppi di 5-6 persone studiano un articolo scelto dal docente, preparano un PPT e lo presentano in aula (circa 5 min a persona)
  - Domande e discussione finale (max 30 minuti per gruppo)
- Esercitazioni in laboratorio
  - Attivazione del recettore  $\beta$ 2ADR e misurazione di cAMP (1 giornata)
  - Attivazione del recettore EGF e misurazione di p-ERK e/o p-AKT e/o p-Tyr (3 giornate)
  - Saggio MTT in cellule stimulate
- **Esame finale consistente in un colloquio dove dovrete dimostrare di conoscere i principi della biosegnalazione, le molecole coinvolte e le possibili implicazioni fisiopatologiche**

# Programma

- **Principi generali di comunicazione intercellulare**
- Inviare e ricevere segnali per l'organizzazione funzionale di organismi pluricellulari.
- Raggio d'azione delle molecole segnale
- Concetto di primo e secondo messaggero
- 
- **Caratteristiche distintive della trasduzione del segnale**
- Specificità dell'interazione ligando-recettore
- Amplificazione della risposta
- Modularità degli elementi di una cascata di segnalazione
- Integrazione di segnali per la risposta biologica
- Shut-down della risposta
- Desensibilizzazione/adattamento
- Limitata diffusione intracellulare

- **PRINCIPALI FAMIGLIE DI RECETTORI DI MEMBRANA.**
- 
- **I recettori accoppiati alle proteine G (GPCR)**
- Struttura e meccanismo d'azione dei GPCR
- Accoppiamento recettore/proteina G eterotrimerica
- Ciclo GDP/GTP nelle proteine G eterotrimeriche
- Accoppiamento proteina G/effettori (adenilato ciclasi, fosfolipasi, canali ionici etc...)
- Ruolo delle GRKs: chinasi specifiche per i GPCR
- Ruolo dell'arrestina
- 
- **Esempi di funzioni fisiologiche svolte dai GPCRs**
- Il meccanismo biochimico della visione
- Il meccanismo biochimico del gusto
- Il meccanismo biochimico dell'olfatto
-

- **Secondi messaggeri:**
- cAMP: ciclasi, fosfodiesterasi e PKA;
- Secondi messaggeri generati dal metabolismo dei polifosfoinositidi: l'idrolisi e il ciclo del PI(4,5)P<sub>2</sub>
- Interazione tra domini proteici (es. C1, PH) e metaboliti generati dai polifosfoinositidi
- Il calcio come secondo messaggero: la calcio-calmodulina chinasi
- 
- **Recettori tirosin chinasi**
- Generalità struttura funzione dei recettori tirosina chinasi
- la trasduzione del segnale dell'Insulina come esempio di recettore tirosina chinasi
- Interazione di domini SH2/fosfotirosine nei pathways di trasduzione del segnale.
- Il pathway delle MAPK
- Regolazione ormonale della sintesi/degradazione del glicogeno
- **Cenni sui recettori di adesione per le integrine, recettori con attività guanilil ciclasica, recettori nucleari e canali ionici controllati.**

- **Esempi di Approcci sperimentali utilizzati per studiare la trasduzione del segnale**
- Saggi di proliferazione con MTT e  $^3\text{H}$  timidina
- Wound-healing
- Co-immunoprecipitazione
- Radio immunoassay (RIA)
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Western blotting
- Microscopia a fluorescenza.....
- **Segnalazione iniziata da stimoli intracellulari**
- Cenni sui meccanismi di folding di proteine neosintetizzate e organizzazione della via secretoria
- Il signalling della risposta integrata allo stress e della risposta a proteine unfolded (UPR).
- Conseguenze della risposta UPR in base al contesto fisiopatologico.
- Targeting della segnalazione UPR come approccio terapeutico in patologie tumorali e neurodegenerative.
- Circuiti di segnalazione attivati da proteine che escono dal reticolo endoplasmatico
- Le vie di segnalazione del recettore KDEL una proteina a sette domini trans membrana capace di attivare le proteine G eterotrimeriche pur non essendo un GPCR.

# Orario delle lezioni

- Marzo
  - 12 Overview della biosegnalazione con cenni su trasmissione nervosa e endocrina
  - 19 Signalling dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR)
  - 26 Signalling della visione, gusto e olfatto
- Aprile
  - 9 Signalling recettori tirosin chinasi, Recettori nucleari e integrine. *Presentazione articoli che dovrete discutere*
  - 16 Signalling UPR e malattie neurodegenerative
  - 23 Metodologie e presentazione delle esercitazioni
  - 30 **Esperienza cAMP**
- Maggio
  - 7 **Esperienza EGFR**
  - 14 **Esperienza EGFR**
  - 21 **Esperienza MTT**
  - 28 Presentazione studenti 5 gruppi-30 min per gruppo/articolo

# BIOSEGNALAZIONE

- Un organismo vivente è capace di percepire l'ambiente circostante.
- I cambiamenti sono rilevati sotto forma di **SEGNALI** (fisici o chimici).
- La ricezione di un segnale genera una **RISPOSTA** da parte dell'organismo.



# BIOSEGNALAZIONE

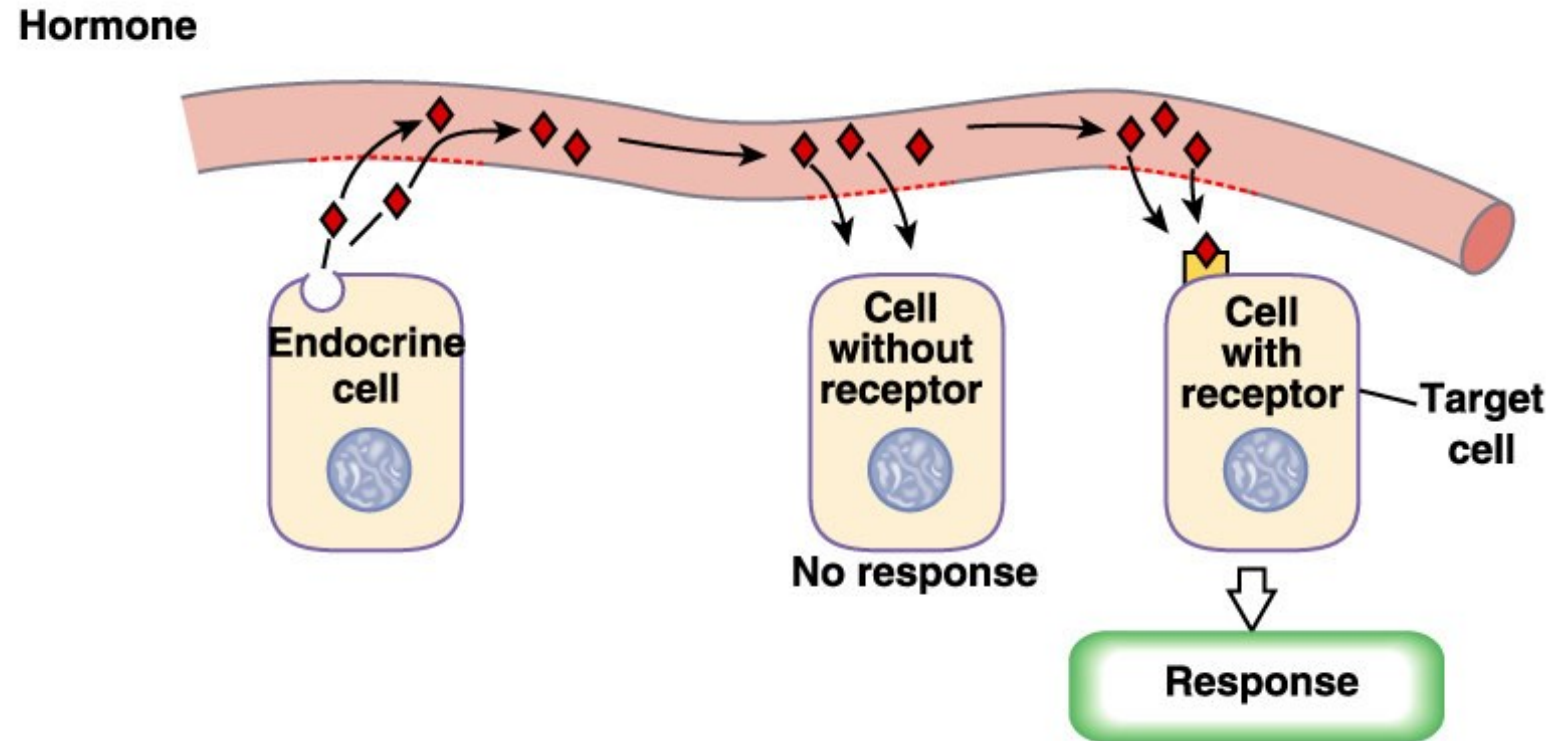
All'interno di un organismo, le singole cellule di un organo/tessuto percepiscono le modificazioni nell'ambiente che le circonda e rispondono in vario modo

**Es.** producono una sostanza chimica/proteina che raggiungendo una nuova cellula bersaglio innesca una modificazione dell'attività della cellula bersaglio

## Raggio d'azione delle molecole segnale

- Comunicazione a **distanza** tramite sostanze chimiche trasportate dal sangue o segnali elettrici propagati dalle cellule nervose
- Comunicazione chimica **locale** tramite neuromodulatori, sostanze autocrine o paracrine
- Trasferimento citoplasmatico **diretto** di segnali chimici ed elettrici attraverso le giunzioni comunicanti

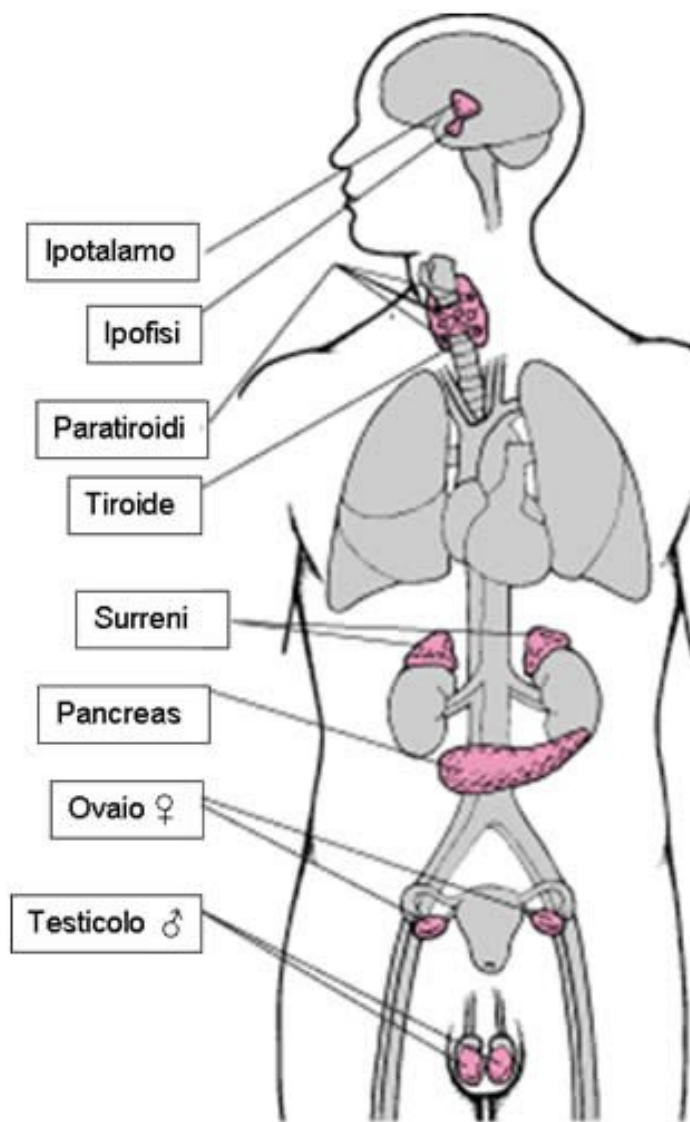
# Comunicazione a distanza



Gli ormoni sono secreti da cellule e ghiandole endocrine direttamente nel circolo ematico.

Solo le cellule che esprimono recettori per l'ormone sono in grado di rispondere al segnale.

Il Sistema Endocrino è costituito da **GHIANDOLE ENDOCRINE** che secerno **ORMONI**



Gli ormoni (dal greco ormao= eccitare) sono dei messaggeri chimici che vengono riversati direttamente nel sangue per essere trasportati ad un organo bersaglio (*target*) dove esercitano la loro funzione

Caratteristiche degli ormoni:

- Sono immessi direttamente nel circolo sanguigno
- Sono trasportati dal sangue alle cellule o organi bersaglio
- Si legano a recettori specifici presenti nelle cellule bersaglio
- Un ormone può esplicare effetti molteplici sullo stesso tessuto bersaglio

# Classificazione degli ormoni:

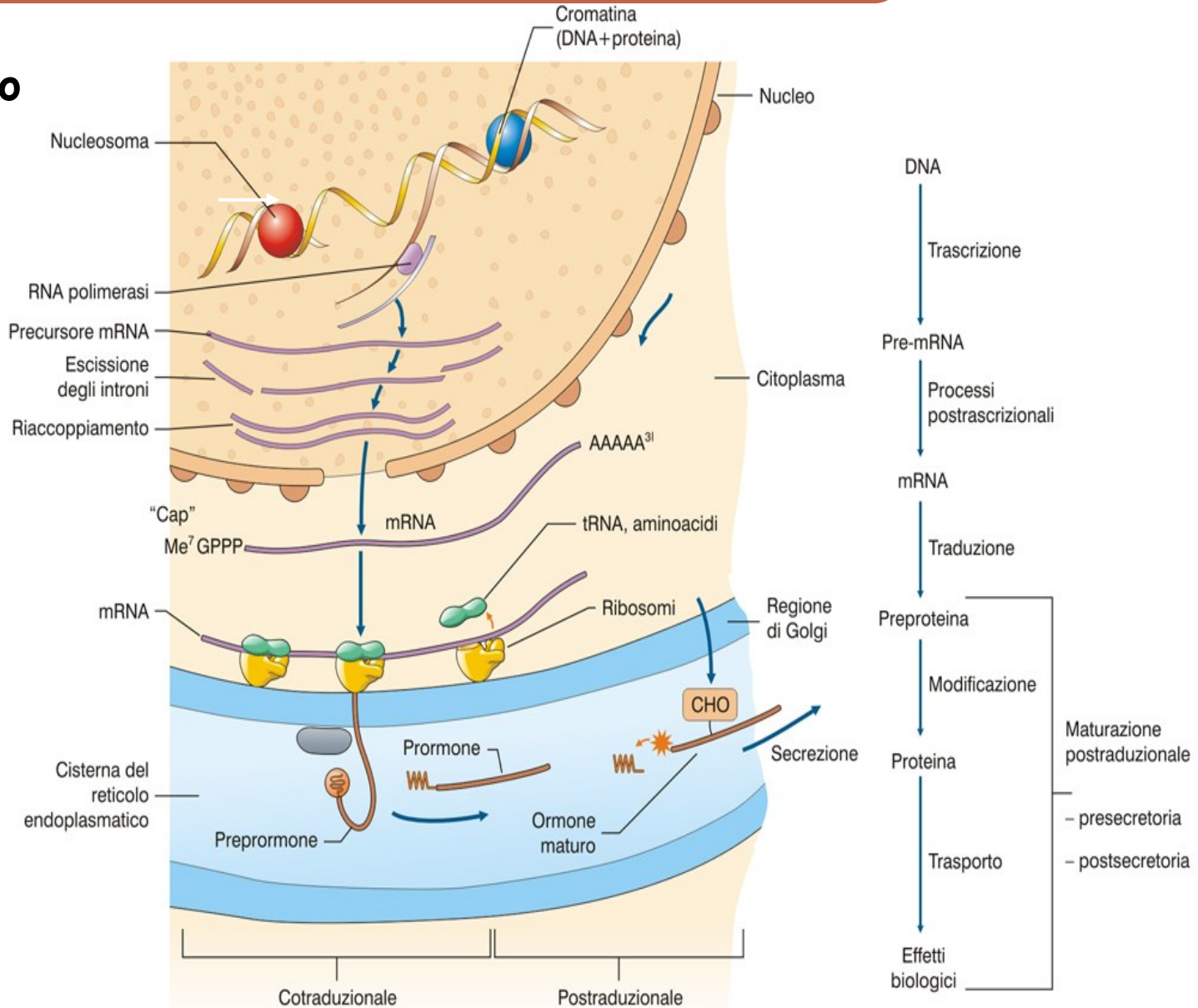
- Ormoni peptidici (costituiti da tre o più amminoacidi)
- Ormoni lipidici
  - steroidi (derivanti dal colesterolo)
  - Eicosanoidi (derivati dell'acido arachidonico)
- Ormoni amminici (derivanti di amminoacidi)

# Sintesi ormoni peptidici

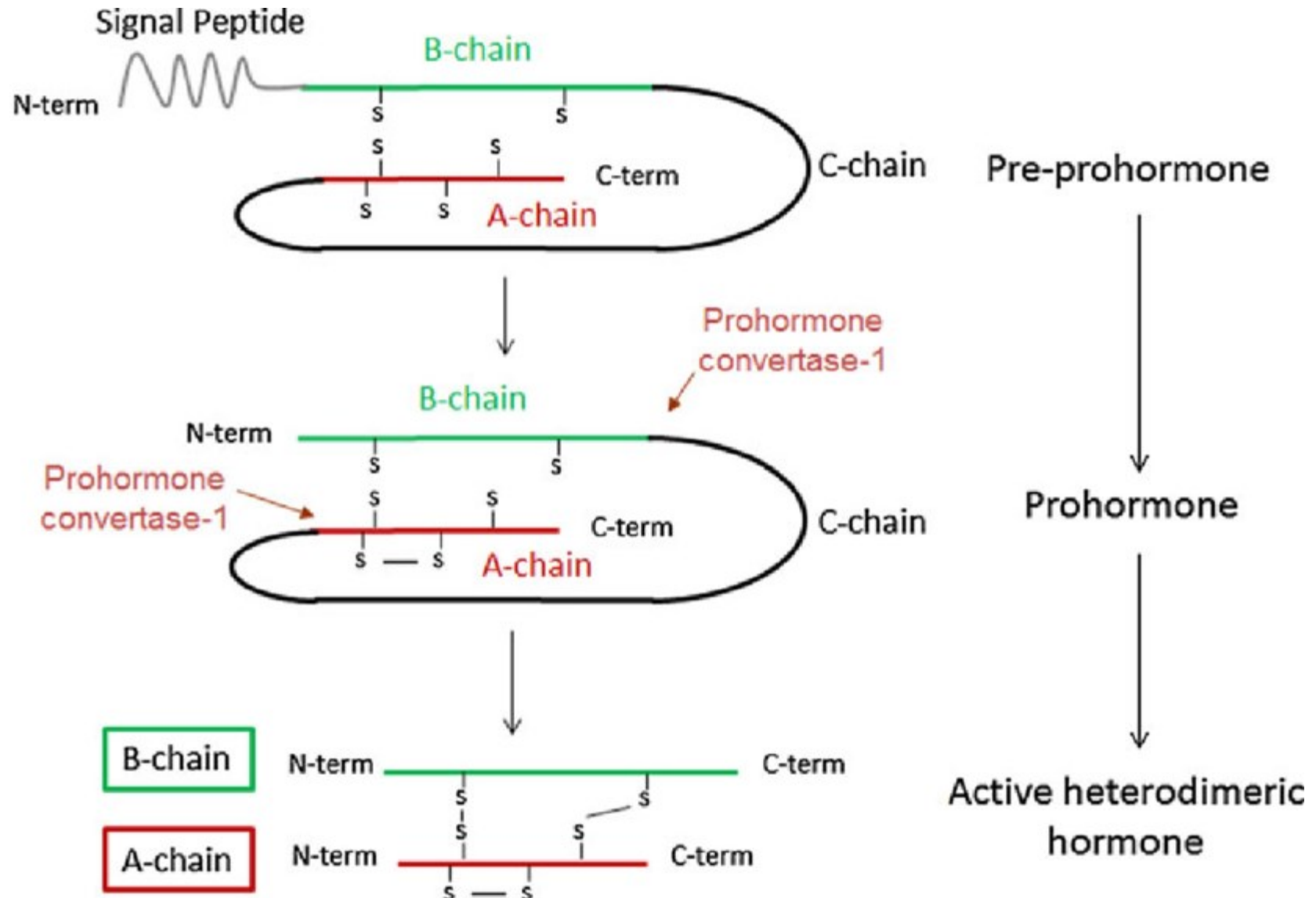
1) Gli ormoni peptidici vengono sintetizzati e immagazzinati in vescicole secretorie

- Preproormone
- proormone
- ormone attivo

- Rilasciati per esocitosi



# Processamento dell'insulina



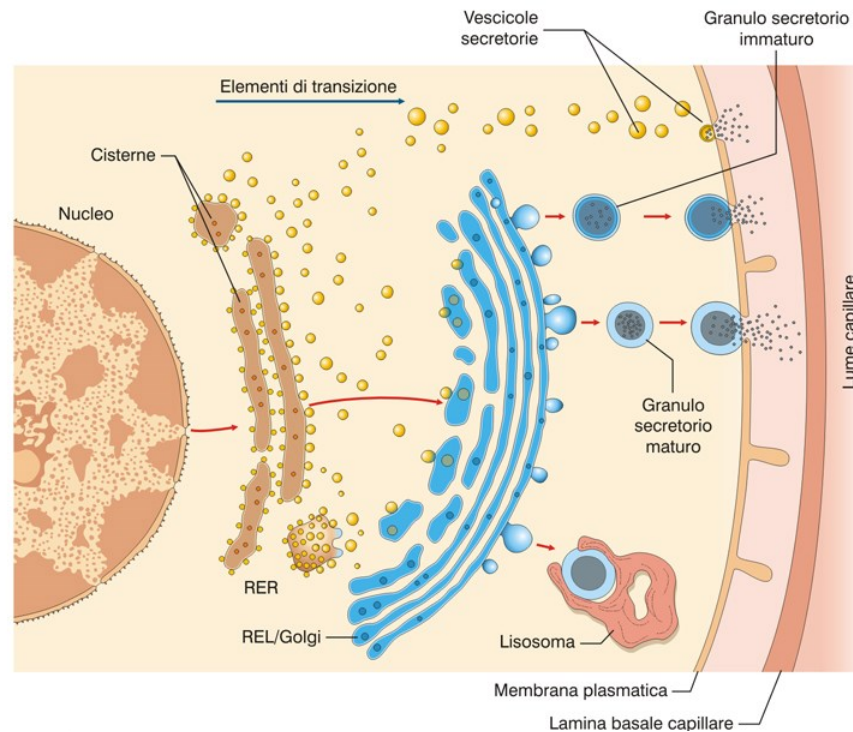
# Produzione, rilascio e distribuzione

## 1) ORMONI PEPTIDICI

Sintesi e immagazzinamento in vescicole secretorie fino a quando la cellula non riceve un messaggio per la secrezione.

Gli ormoni peptidici **sono idrofili**, **viaggiano nel plasma in forma libera** e si legano ad un recettore specifico.

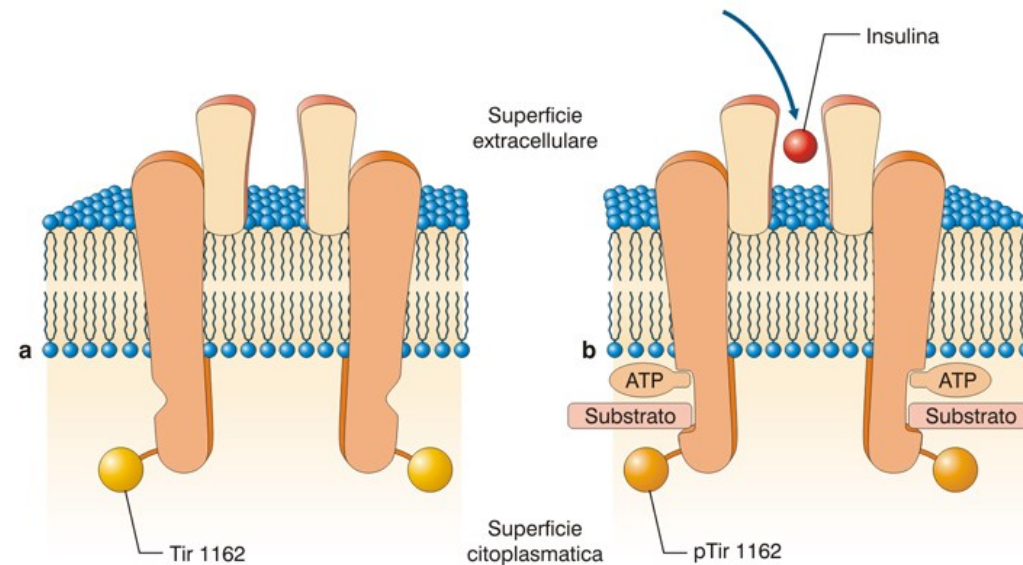
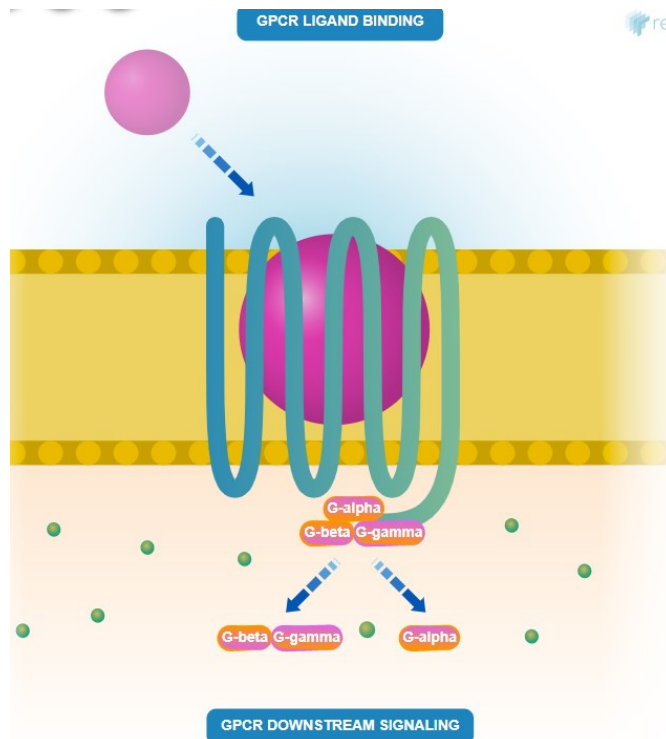
Il complesso ormone-recettore innesca la risposta cellulare.





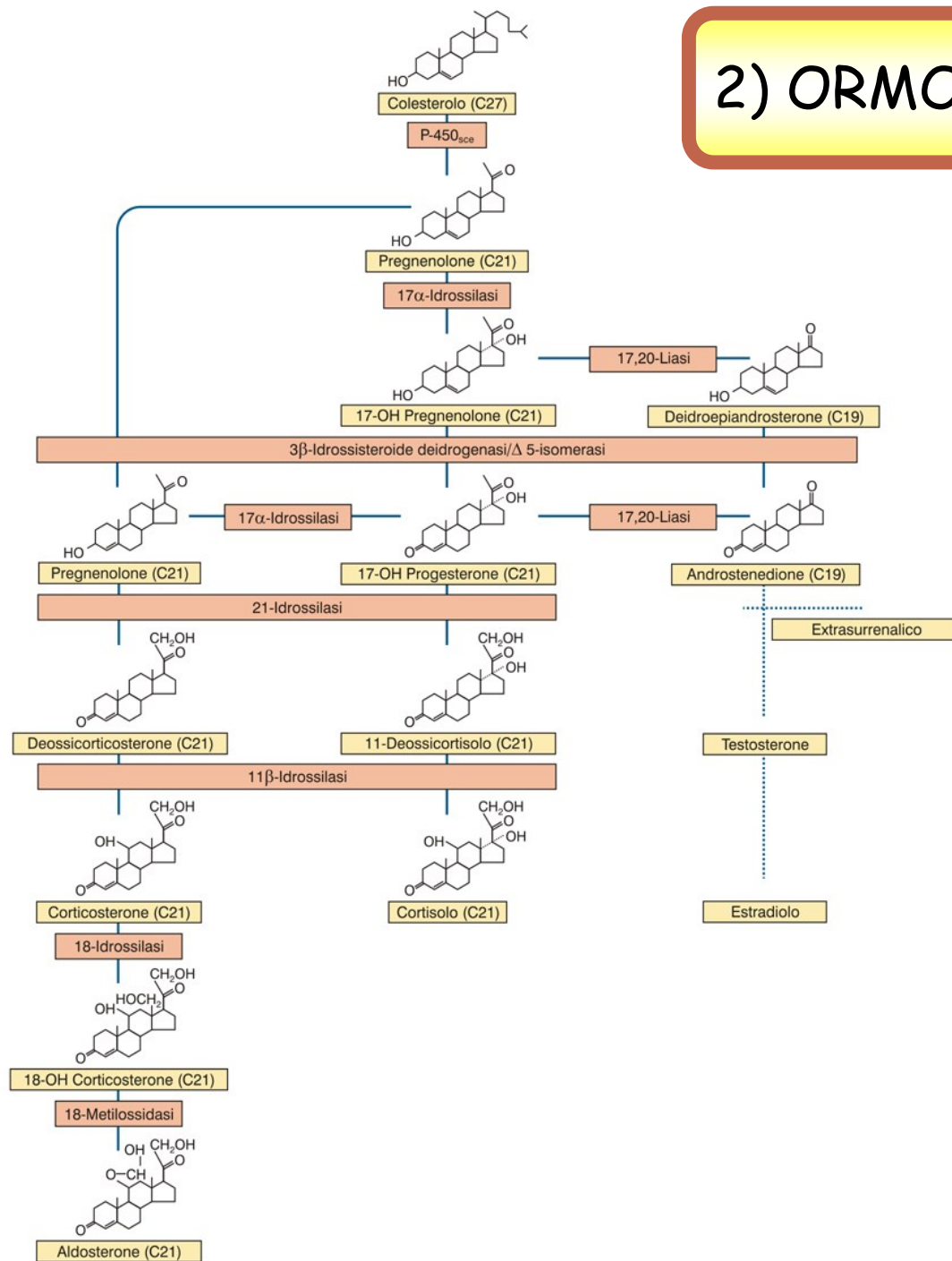
# I RECETTORI PER GLI ORMONI PEPTIDICI

- Sono situati sulla membrana cellulare
- Determinano modificazioni enzimatiche dentro la cellula
- Possono attivare la sintesi di secondi messaggeri (cAMP, cGMP, DAG, Ca<sup>++</sup>)



© 2005 edi.ermes milano

## 2) ORMONI STEROIDEI



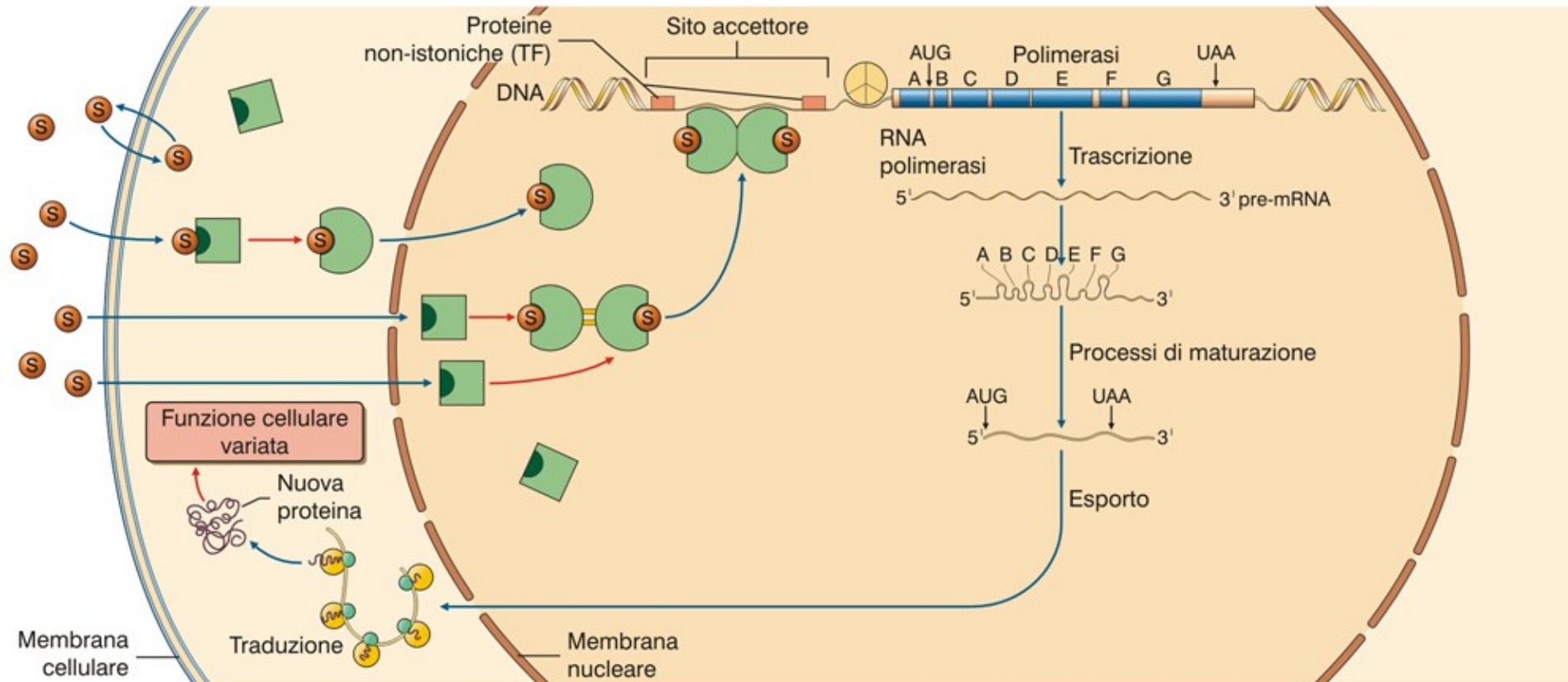
Il colesterolo è il precursore di tutti gli ormoni steroidei.

Gli ormoni steroidei non sono immagazzinati in vescicole secretorie ma uno stimolo converte il precursore in ormone attivo che diffonde per diffusione semplice in quanto sostanze lipofili che attraversano facilmente la membrana cellulare.

Non sono solubili nel plasma e per questo si legano a proteine trasportatrici

# RECETTORI PER GLI ORMONI STEROIDEI

- Si trovano nel compartimento intracellulare
- Il complesso ormone-recettore si lega al DNA attivando uno o più geni
- L'mRNA dirige la sintesi di nuove proteine



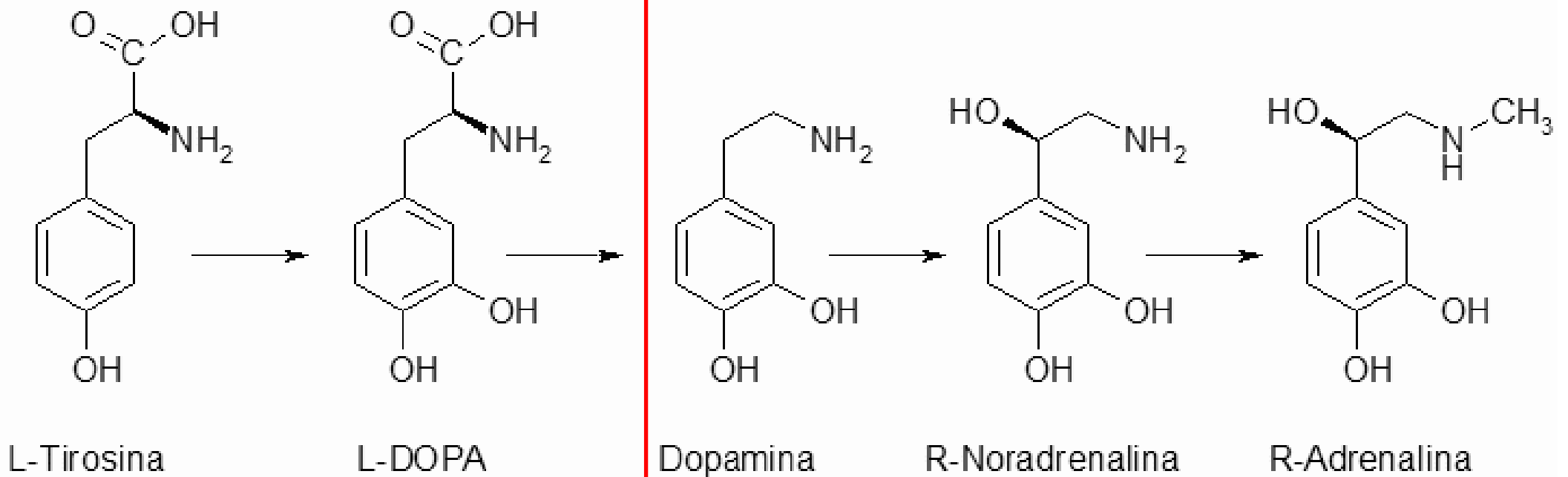
### 3) ORMONI AMMINICI

I principali ormoni amminici sono:

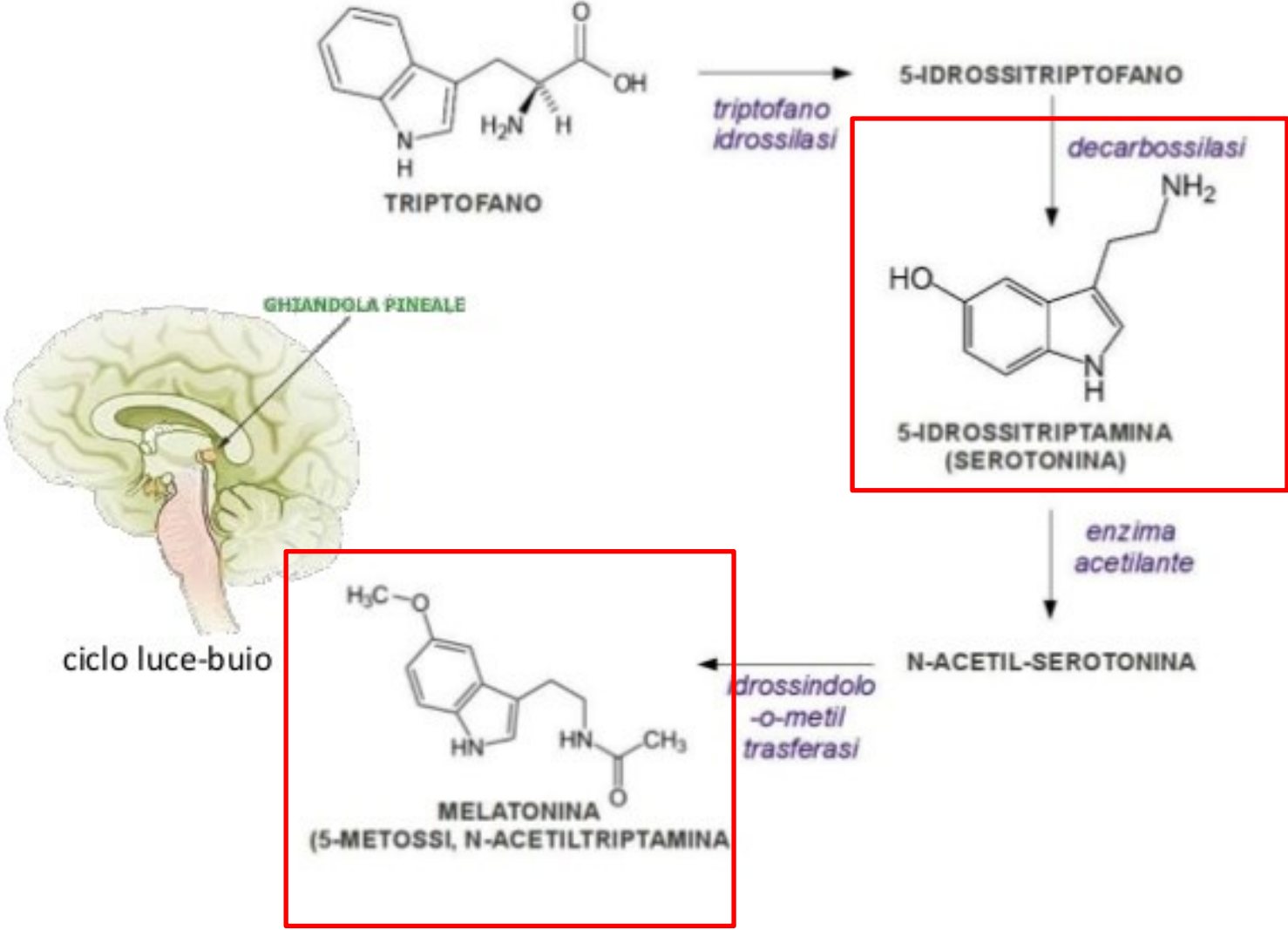
- **CATECOLAMINE**
  - **ORMONI TIROIDEI**
  - **MELATONINA**
  - **SEROTONINA** non proprio un ormone
- derivati dall'amminoacido Tirosina
- derivati dall'amminoacido Triptofano

- ✓ Le catecolamine e la serotonina hanno recettori di membrana come gli ormoni peptidici
- ✓ Gli ormoni tiroidei hanno recettori nucleari come gli ormoni steroidei
- ✓ La melatonina interagisce con recettori di membrana e proteine intracellulari

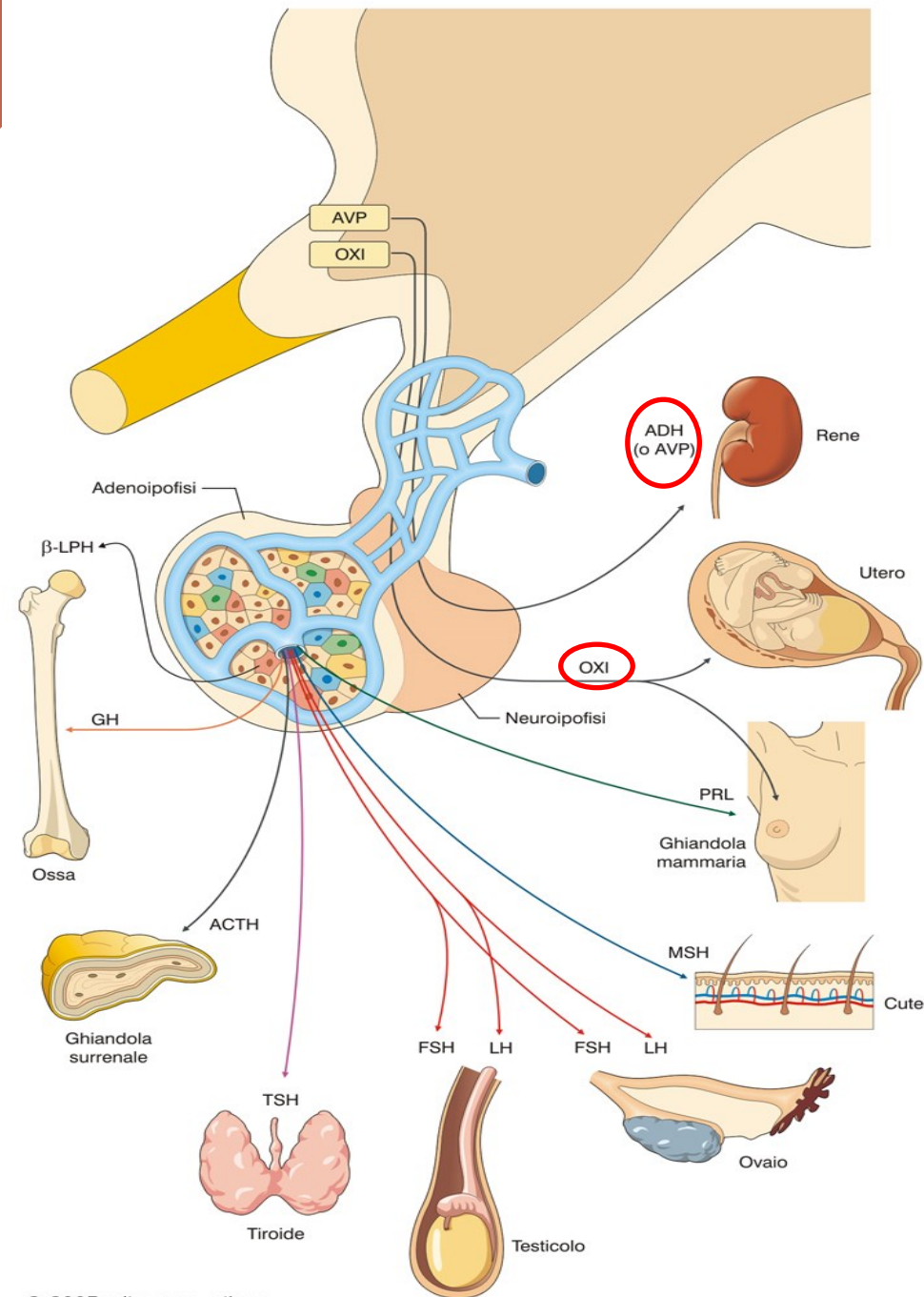
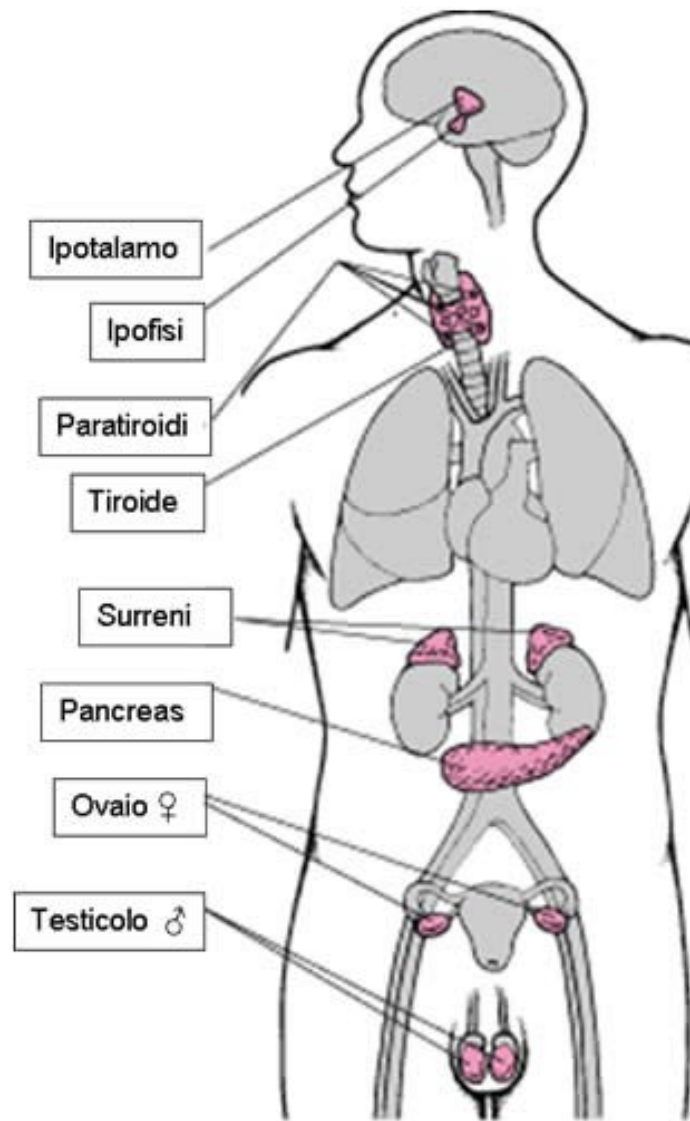
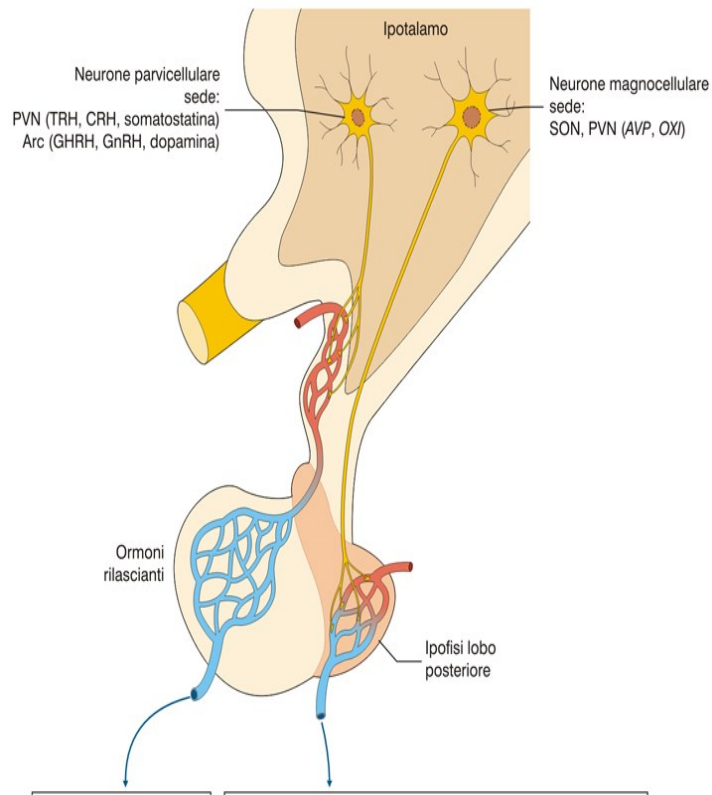
# Catecolammine



# BIOSINTESI SEROTONINA e MELATONINA



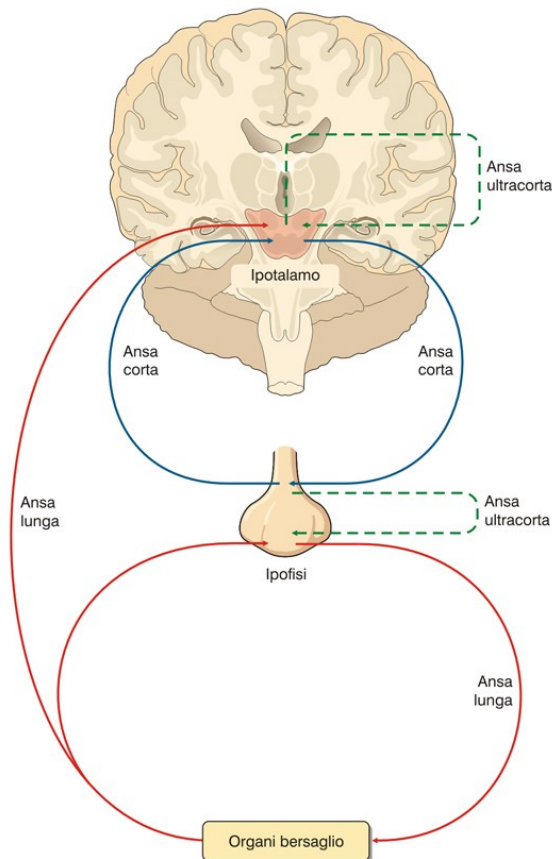
# PANORAMICA SISTEMA ENDOCRINO



# Regolazione della secrezione ormonale

L'attività secretoria dei tessuti endocrini è controllata con un meccanismo a feedback negativo.

Esistono due circuiti di retroazione: 1. Breve 2. Lungo



Nel feedback a circuito breve, la risposta del tessuto bersaglio principale viene a ricadere sulla ghiandola endocrina.

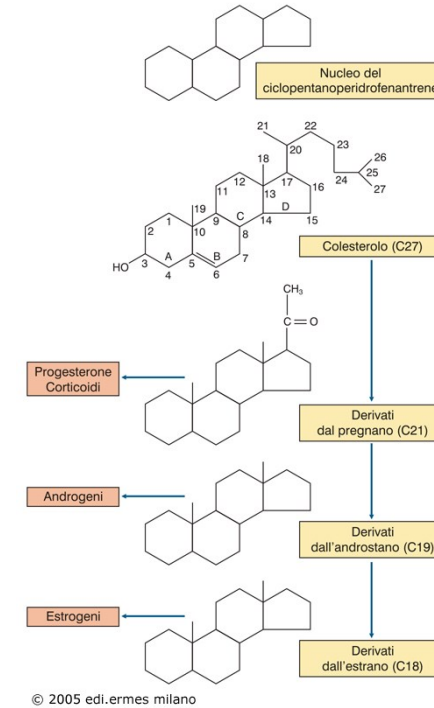
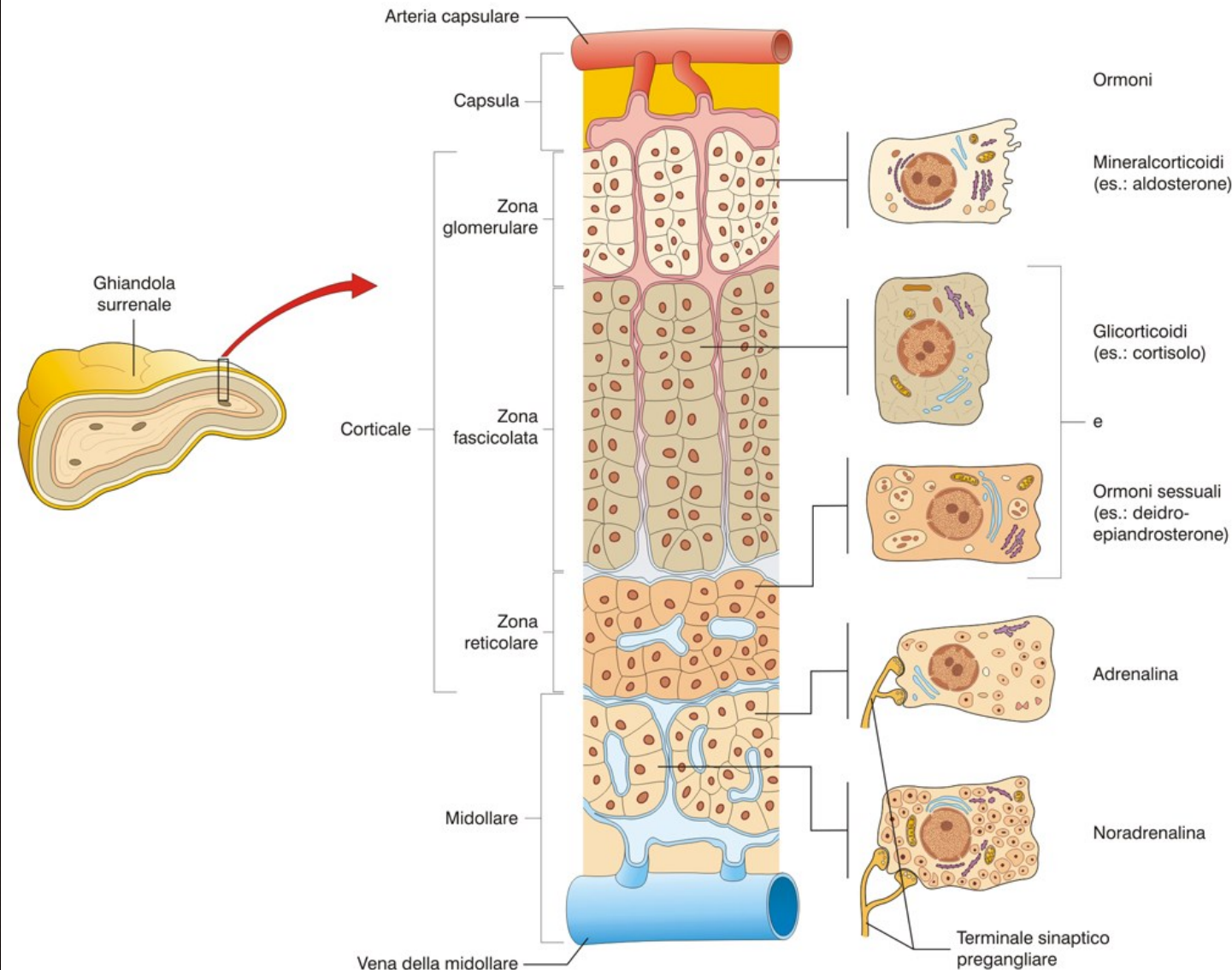
Nel feedback a circuito lungo, un segnale proveniente da tessuti bersaglio secondari controlla l'attività secretrice dei tessuti endocrini.



# ORMONI DELL'IPOFISI ANTERIORE

ORMONE	SIGLA	NATURA CHIMICA	AZIONE PRINCIPALE: STIMOLA .....
Somatotropo	GH	Proteina	La crescita corporea e la sintesi proteica nelle cellule
Prolattina	PRL	Proteina	Lo sviluppo e la secrezione latte della ghiandola mammaria
Adreno-corticotropo	ACTH	Polipeptide	La secrezione di corticosteroidi dalla corticale del surrene
Tireotropo	TSH	Glicoproteina	La secrezione degli ormoni tiroidei dalla tiroide
Follicolo-stimolante	FSH	Glicoproteina	Lo sviluppo dei follicoli e la secrezione degli ormoni estrogeni nell'ovaio; la spermatogenesi nel testicolo
Luteinizzante	LH	Glicoproteina	L'ovulazione e la formazione del corpo luteo; la secrezione di androgeni dalle cellule di Leydig del testicolo

# ORMONI PRODOTTI DALLE GHIANDOLE SURRENALI



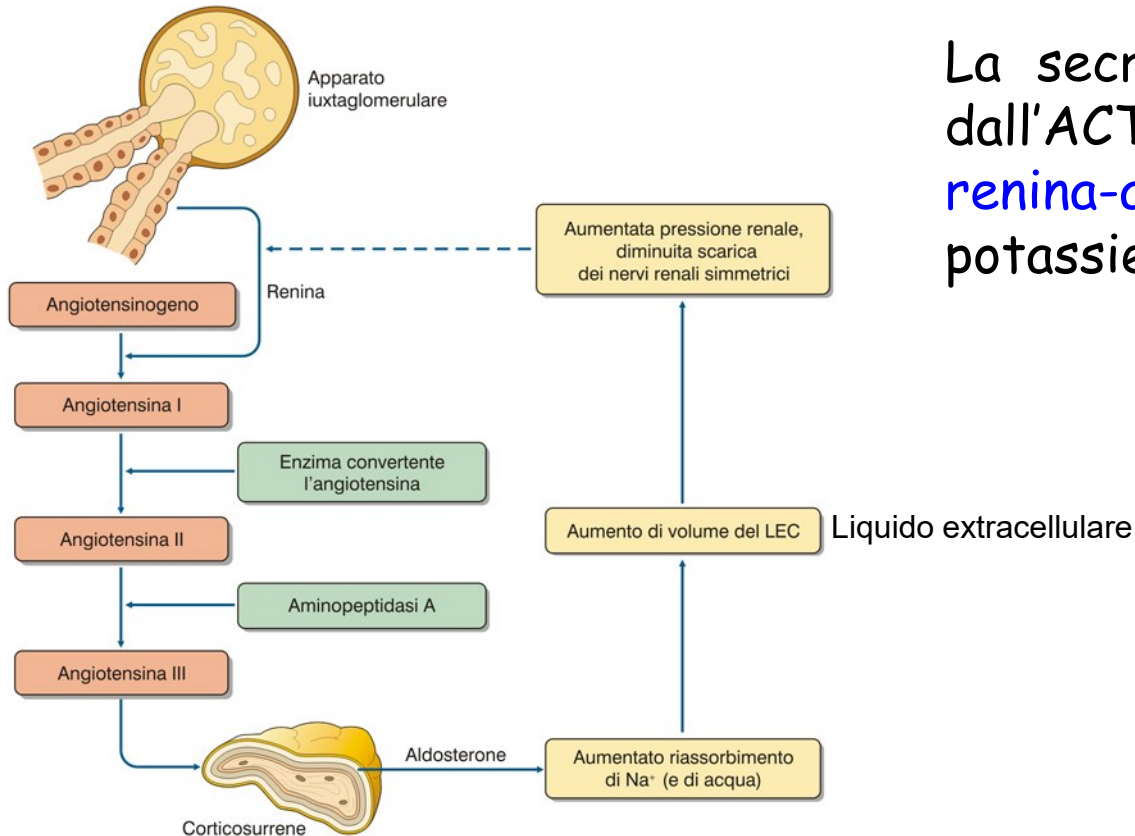
Le cellule corticali contengono depositi intracellulari di colesterolo, prevalentemente sottoforma di estere, che costituiscono la forma più immediata di colesterolo per la steroidogenesi.

Il colesterolo, proveniente dalle LDL o sintetizzato *ex novo* dall'acetato, è il precursore degli ormoni corticoidi.

# I MINERALCORTICOIDI

Il principale mineralcorticoide prodotto dalla zona glomerulare è l'**ALDOSTERONE**.

Il segnale per la sintesi dell'aldosterone viene generato quando l'organismo richiede una maggiore pressione sanguigna, un maggior volume plasmatico e un aumento di ioni  $\text{Na}^+$  nel sangue.



La secrezione dell'aldosterone è stimolata poco dall'ACTH, ma è **stimolata soprattutto dal sistema renina-angiotensina II** e da un aumento della potassiemia.

# I GLUCOCORTICOIDI

Il principale glucocorticoide prodotto dalla zona fascicolata è il **CORTISOLO**.

La secrezione del cortisolo è stimolata dall'ACTH prodotto dall'ipofisi in risposta all'ormone ipotalamico specifico per il suo rilascio il CRH.

Le azioni principali riguardano la regolazione del metabolismo glucidico (da cui deriva il loro nome) e l'adattamento dell'organismo agli stati di stress di lunga durata, tra i quali anche il digiuno prolungato.

Il cortisolo favorisce in diversi tessuti il catabolismo proteico e al livello del fegato e, in minor misura del rene, la gluconeogenesi

Ha effetto diabetogeno, in quanto antagonista dell'insulina, e lipolitico

I glucocorticoidi **stimolano la secrezione acida gastrica**, **aumentano il riassorbimento osseo e l'escrezione urinaria di calcio**, la responsività degli adrenorecettori alle catecolamine, la velocità di filtrazione glomerulare, la percezione e l'integrazione di stimoli sensoriali (acustici, tattili, olfattivi e gustativi).

## ORMONI SESSUALI

Nella zona corticale reticolare del surrene sono prodotti alcuni androgeni deboli:

- *deidroepiandrosterone (DHEA)*
- *deidroepiandrosterone solfato DHEAS*

Sono destinati ad essere trasformati perifericamente nel più potente androgeno che è il TESTOSTERONE.

Nel maschio gli androgeni surrenalici hanno un significato biologico marginale, perché il testosterone ottenuto da essi è secondario a quello prodotto *ex novo* nelle gonadi maschili.

Nella donna, gli androgeni sono una fonte di estrogeni in cui sono convertiti nel tessuto adiposo dalle aromatasi. Un eccesso di androgeni surrenalici può causare virilizzazione della donna.

## ORMONI DELLA MIDOLLARE DEL SURRENE

I neuroormoni della midollare del surrene sono le catecolamine **adrenalina** o epinifrina (80%) e **noradrenalina** o norepinefrina (20%), sintetizzate a partire dall'aminoacido tirosina. **La sintesi è regolata dall'innervazione simpatica, dal cortisolo, dall'ACTH.**

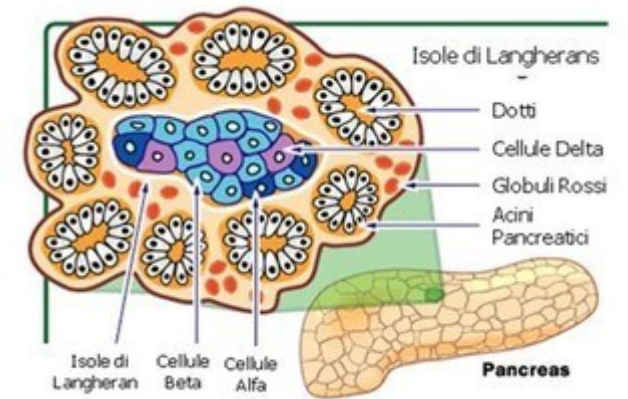
L'adrenalina interagisce con i recettori  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenergici  
la noradrenalina interagisce soprattutto con i recettori  $\alpha$ -adrenergici.

Dal punto di vista metabolico l'adrenalina stimola nelle **cellule muscolari la glicogenolisi** e nelle cellule epatiche, oltre alla glicogenolisi, anche la gluconeogenesi con effetto iperglicemizzante.

Negli adipociti stimola la lipolisi, liberando acidi grassi e glicerolo nel sangue.

L'adrenalina rinforza i suoi effetti sul metabolismo agendo anche sul pancreas endocrino, stimolando al secrezione di glucagone e inibendo quella dell'insulina.

# PANCREAS ENDOCRINO



Il pancreas è una ghiandola con funzione sia esocrina (97-99%) che endocrina (1-3%).

Le "isole pancreatiche", secernono nel sangue ormoni regolatori del metabolismo e sono costituite da cinque tipi di cellule, ciascuno secernente un ormone distinto:

1. le cellule  $\alpha$  (10-20%) che secernono glucagone,
2. le cellule  $\beta$  (70-75%) che secernono insulina,
3. le cellule  $\delta$  (3-4%) che secernono somatostatina (SS),
4. Le cellule  $\epsilon$  (1-2%) che secernono grelina
5. le cellule  $\phi$  (3-5%) che secernono il polipeptide pancreatico (PP).

**Gli ormoni pancreatici più importanti sono il glucagone e l'insulina coinvolti nell'omeostasi glicemica (valori normali: 75-110).**

# GLUCAGONE

Il glucagone è un ormone peptidico trasportato in forma libera nel plasma, la cui secrezione è stimolata dall'ipoglicemia, mentre è inibita dall'iperglicemia.

Il glucagone agisce soprattutto tramite il fegato, dove stimola le cellule epatiche a rilasciare glucosio attivando gli enzimi preposti alla **glicogenolisi e alla gluconeogenesi**.

Contemporaneamente impedisce che le cellule epatiche utilizzino il glucosio per la glicolisi e la glicogenosintesi. L'azione iperglicemizzante del glucagone si sovrappone a quella dell'adrenalina, degli ormoni tiroidei e dei glucocorticoidi.

Nelle cellule epatiche, il glucagone stimola l'ingresso di aminoacidi glucogenetici dal plasma perché li trasformino in glucosio.

Stimola, inoltre il metabolismo dei lipidi **attivando la lipolisi**, da cui sono ottenuti glicerolo per la gluconeogenesi, e NEFA per la  $\beta$ -ossidazione mentre è inibito il loro utilizzo nella sintesi dei trigliceridi.

Per questi effetti lipolitici, il glucagone ha azione chetogenica.



# INSULINA

La liberazione in circolo dell'insulina è stimolata primariamente dalla concentrazione plasmatica del glucosio (iperglicemia) alla quale le cellule  $\beta$  sono specificatamente sensibili.

L'effetto ipoglicemizzante dell'insulina è ottenuto attraverso la stimolazione della captazione del glucosio ematico all'interno dei tessuti insulino dipendenti (tessuto epatico, muscolare scheletrico e adiposo), la sua utilizzazione a scopo energetico (glicolisi) o nella sintesi e nel deposito del glicogeno nei tessuti epatico e muscolare, mentre negli stessi è inibita la glicogenolisi. Nel tessuto epatico è inibita anche la gluconeogenesi.

L'insulina favorisce l'ingresso degli aminoacidi e dei NEFA rispettivamente nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, dove promuove la sintesi delle proteina e dei lipidi (trigliceridi) e inibisce la proteolisi e la lipolisi.

Nel fegato stimola la sintesi dei trigliceridi, del colesterolo, delle proteine e delle lipoproteine a densità molto bassa (VLDL).

# CARATTERISTICHE DELLA SEGNALAZIONE ORMONALE

## SINERGISMO

Due ormoni hanno lo stesso effetto anche se agiscono con meccanismi diversi.  
La loro interazione produce un effetto maggiore della somma dei loro singoli effetti

Es.      Glucagone > livelli di glicemia nel sangue 10mg/ml  
          Adrenalina > livelli di glicemia nel sangue 5mg/ml  
Glucagone + Adrenalina > livelli di glicemia nel sangue 22mg/ml

## ANTAGONISMO

Due ormoni hanno azione fisiologica opposta

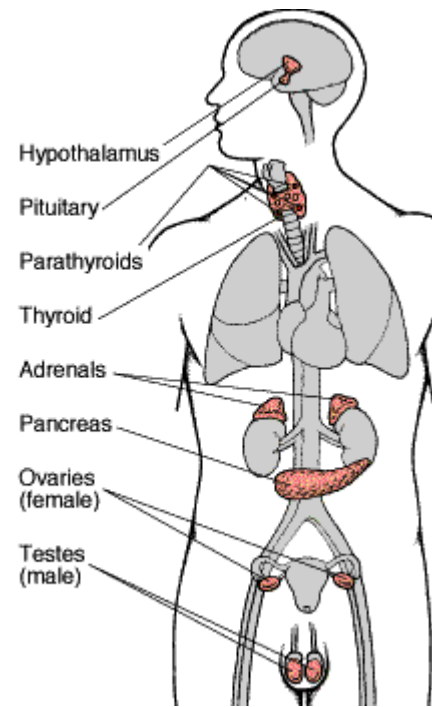
Es.      Glucagone **aumenta** livelli di glicemia nel sangue  
          Insulina **riduce** livelli di glicemia nel sangue

## PERMISSIVISMO

Un ormone non può espletare completamente il suo effetto se non è presente un secondo ormone

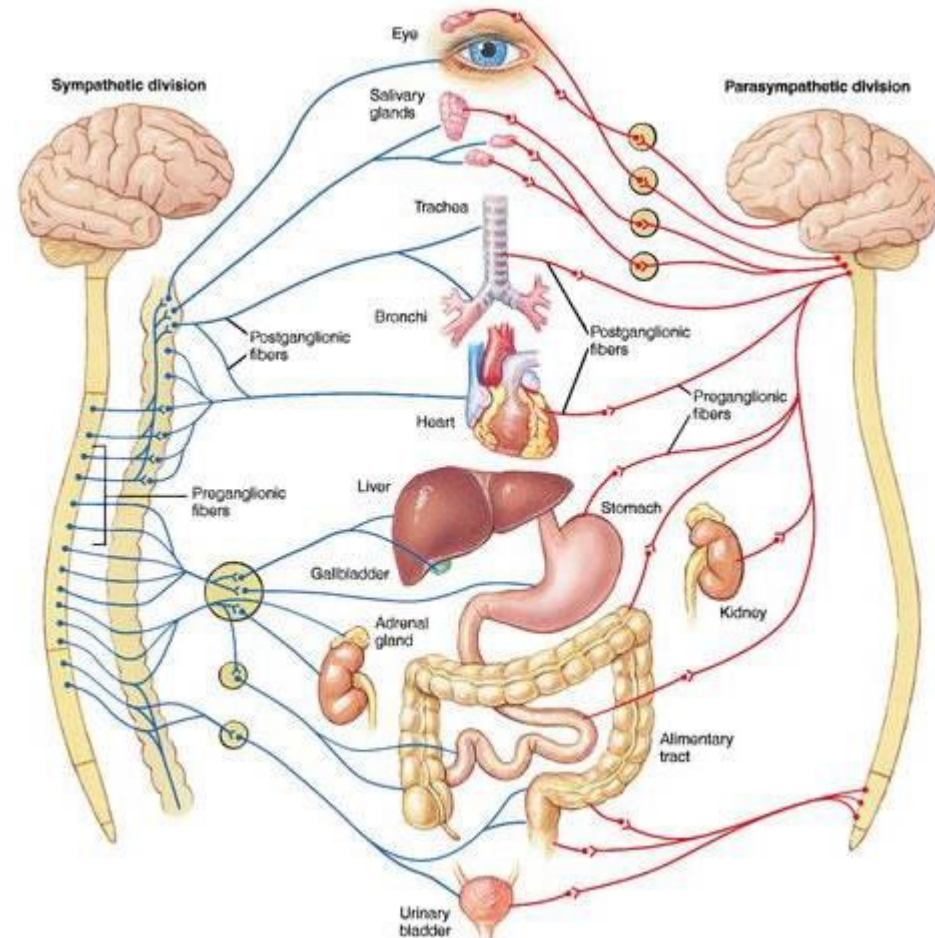
Es. ormoni tiroidei e fattore di crescita insulino-simile IGF-1:  
      l'IGF-1 stimola la crescita scheletrica in presenza degli ormoni tiroidei, mentre questi, direttamente, stimolano poco la crescita ossea.

## Controllo ormonale



## Controllo nervoso

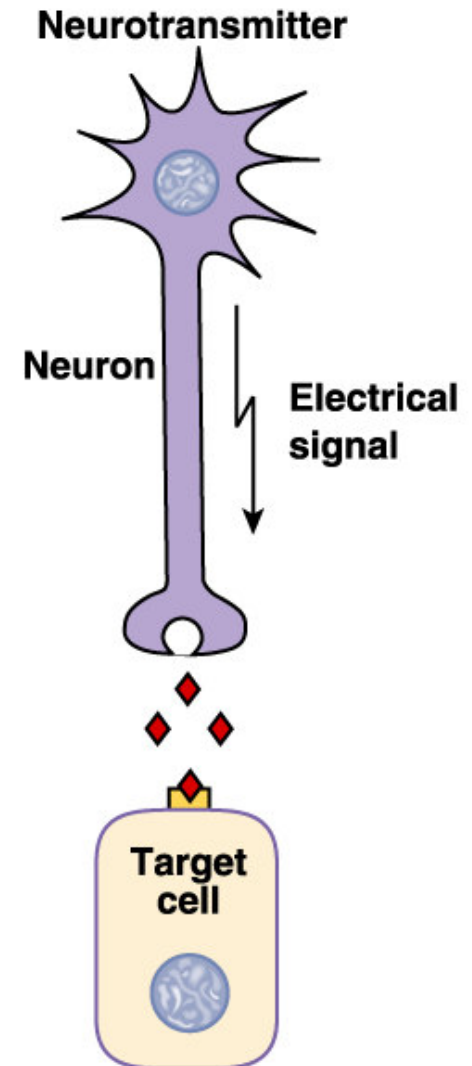
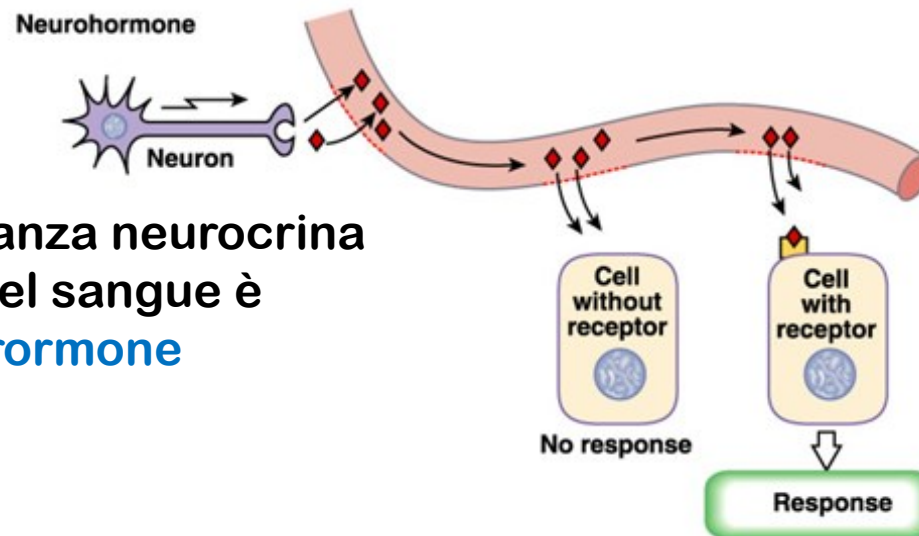
Il sistema nervoso AUTONOMO :



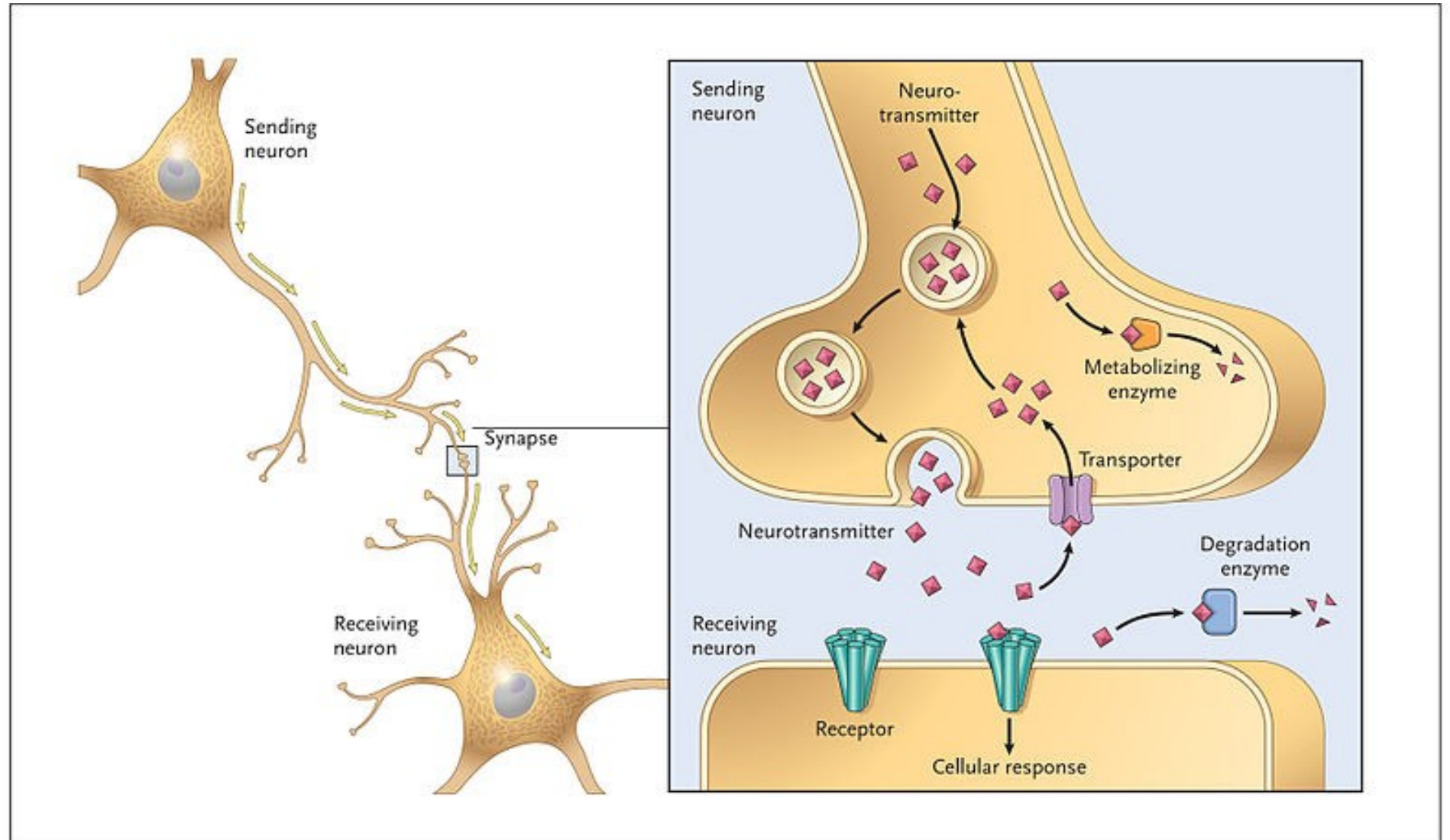
# Comunicazione a distanza mediata dal sistema nervoso

Un **segnale elettrico** viaggia lungo la cellula nervosa (lunghezza fino a 1m) fino alla sua parte terminale dove viene tradotto in un **segnale chimico** secreto dal neurone: **neurotrasmettitore** o **neuromodulatore**

Se la sostanza neurocrina diffonde nel sangue è detto **neuromone**



# Peculiarità della trasmissione nervosa la sinapsi



# Neurotrasmettitori

I neurotrasmettitori appartengono a due grandi categorie:

Neurotrasmettitori classici: molecole a basso peso molecolare:

- Monoamine (dopamina, noradrenalina, istamina, serotonina)
- Aminoacidi (glutammato, glicina, GABA)
- Acetilcolina
- ATP

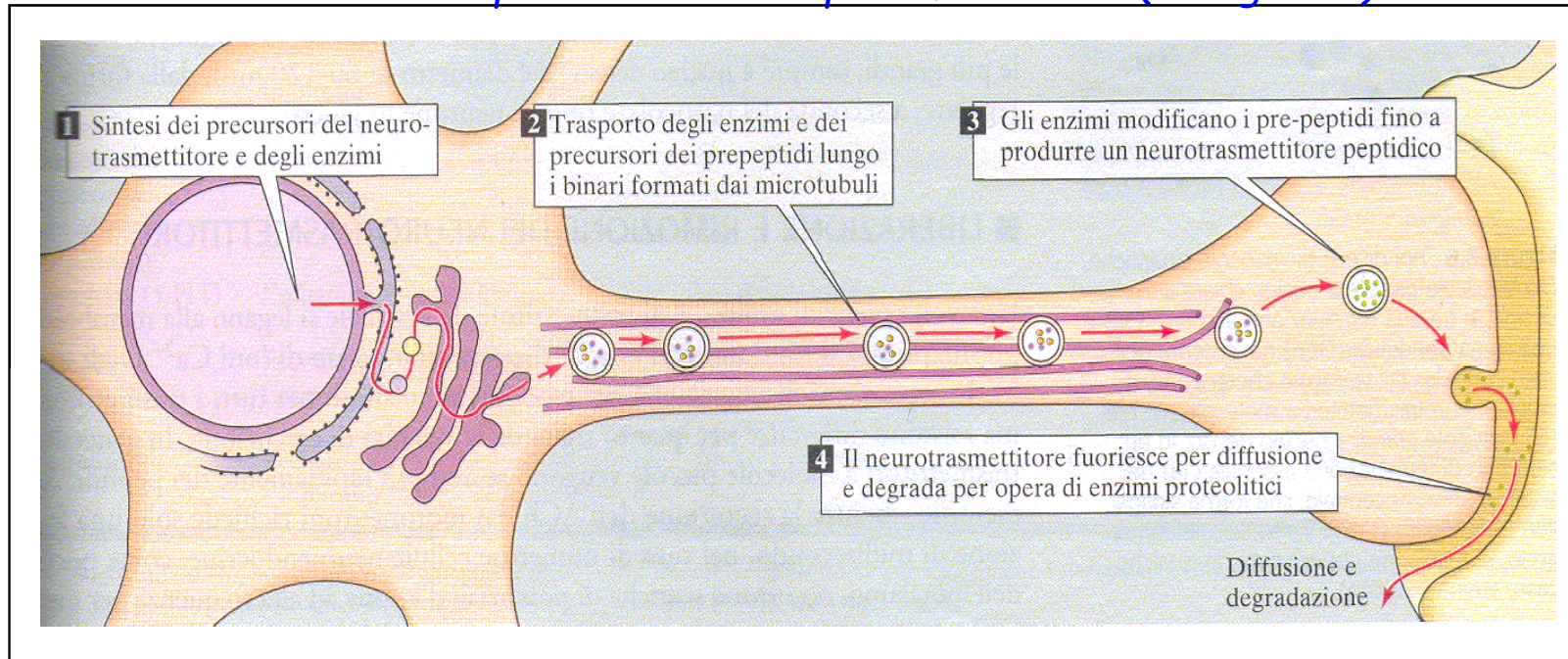
Neuropeptidi (almeno 50 identificati, tra cui):

Oppioidi (endorfine), sostanza P, ormoni neuroipofisari, tachichinine, secretine, somatostatine, gastrine, etc.

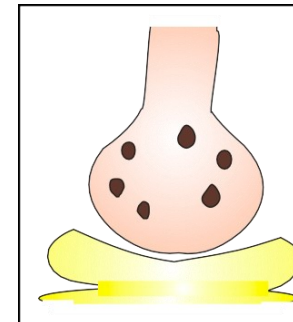
## Sintesi neurotrasmettitori peptidici

I precursori sono trasportati in vescicole lungo i microtuboli e trasformati nel neurotrasmettitore definitivo, da enzimi specifici.

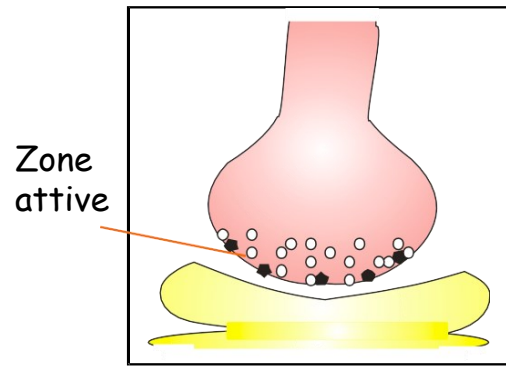
*Trasporto assonico rapido: fino a 400 (mm/giorno)*



I neuropeptidi sono immagazzinati in vescicole di 90 - 250 nm, le cui membrane, dopo endocitosi, sono di nuovo indirizzate verso il soma e riciclate (trasporto retrogrado).

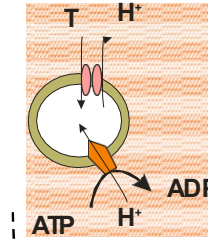


# Sintesi dei neurotrasmettitori a molecola piccola

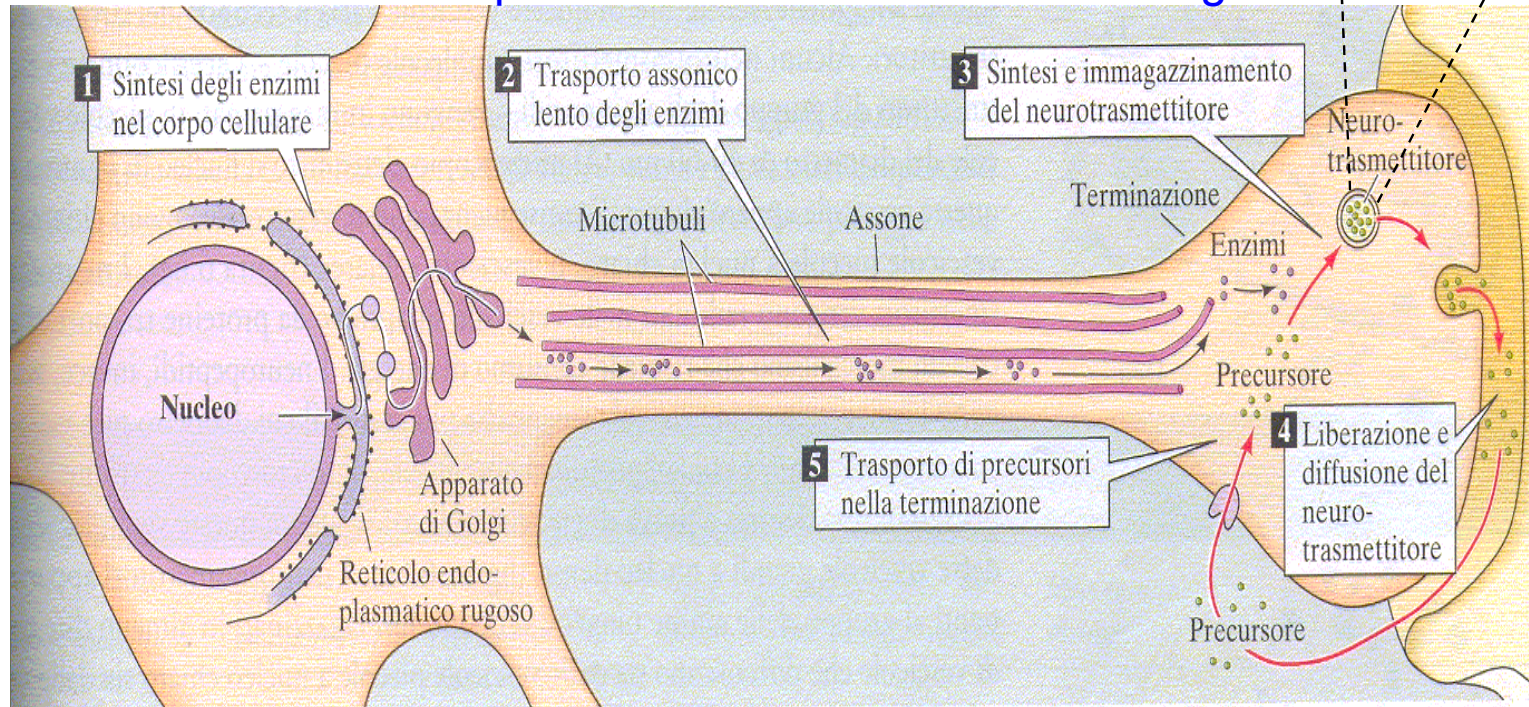


I trasmettitori a molecola piccola vengono sintetizzati nella terminazione sinaptica e immagazzinati in vescicole piccole (40-60 nm)

vescicola sinaptica

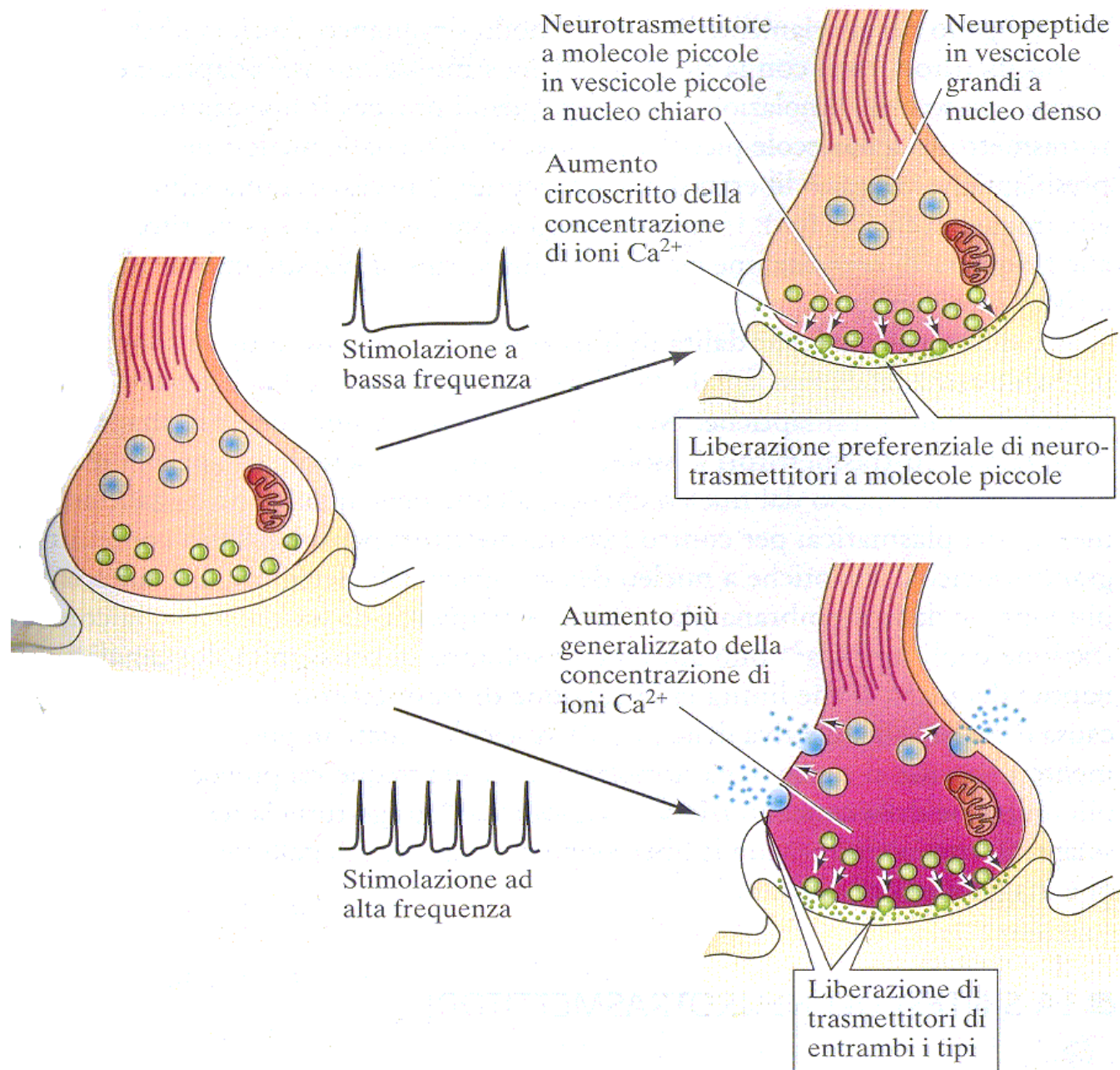


Trasporto assonico lento: 0.5 – 5 mm/giorno





# Le terminazioni nervose possono contenere entrambi i tipi di vescicole



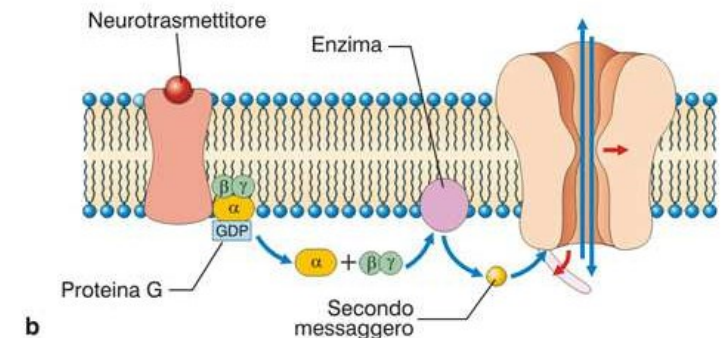
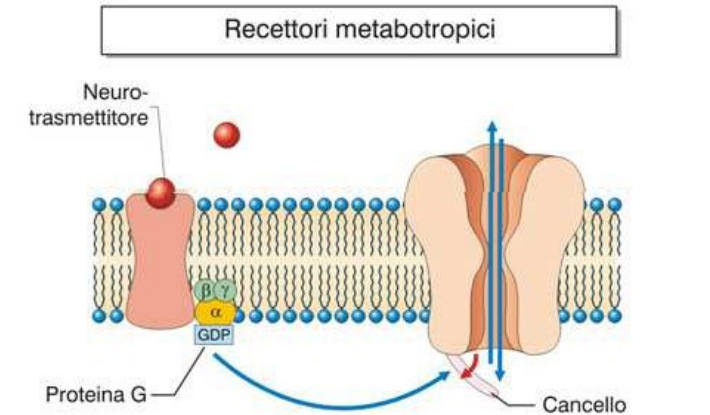
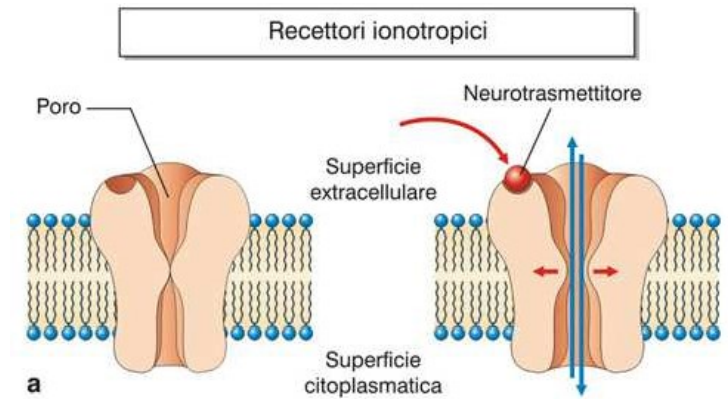
# TIPI DI RECETTORI

➤ **Ionotropici**- canali ionici non selettivi. Mediano risposte rapide e di breve durata.

➤ **Metabotropici**- modulano l'attività di un canale ionico attraverso una cascata di eventi. Mediano risposte lente.

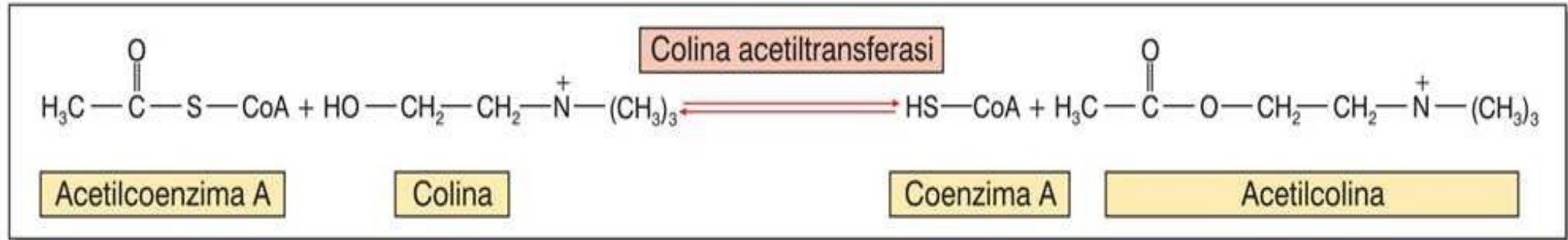
- **Recettori accoppiati a proteina G** (di diversi neurotrasmettitori e neuropeptidi)
- **Recettori con attività tirosin-chinasica** (di ormoni, neuropeptidi, fattori di crescita)
- **Recettori ad attività guanilato-ciclasica**

I recettori per neurotrasmettitori possono essere localizzati anche a livello pre-sinaptico dove funzionano da **autorecettori** e controllano il rilascio del neurotrasmettitore.



# Principali neurotrasmettitori e recettori

# Acetilcolina (ACh)



© 2005 edi.ermes milano

Neurotrasmettitore di:

- Motoneuroni
- Neuroni pre- e post-gangliaridel parasimpatico
- Neuroni di varie zone del SNC, dove svolge un ruolo essenziale nei processi cognitivi (degenerazione neuroni colinergici in Alzheimer).

Recettori:

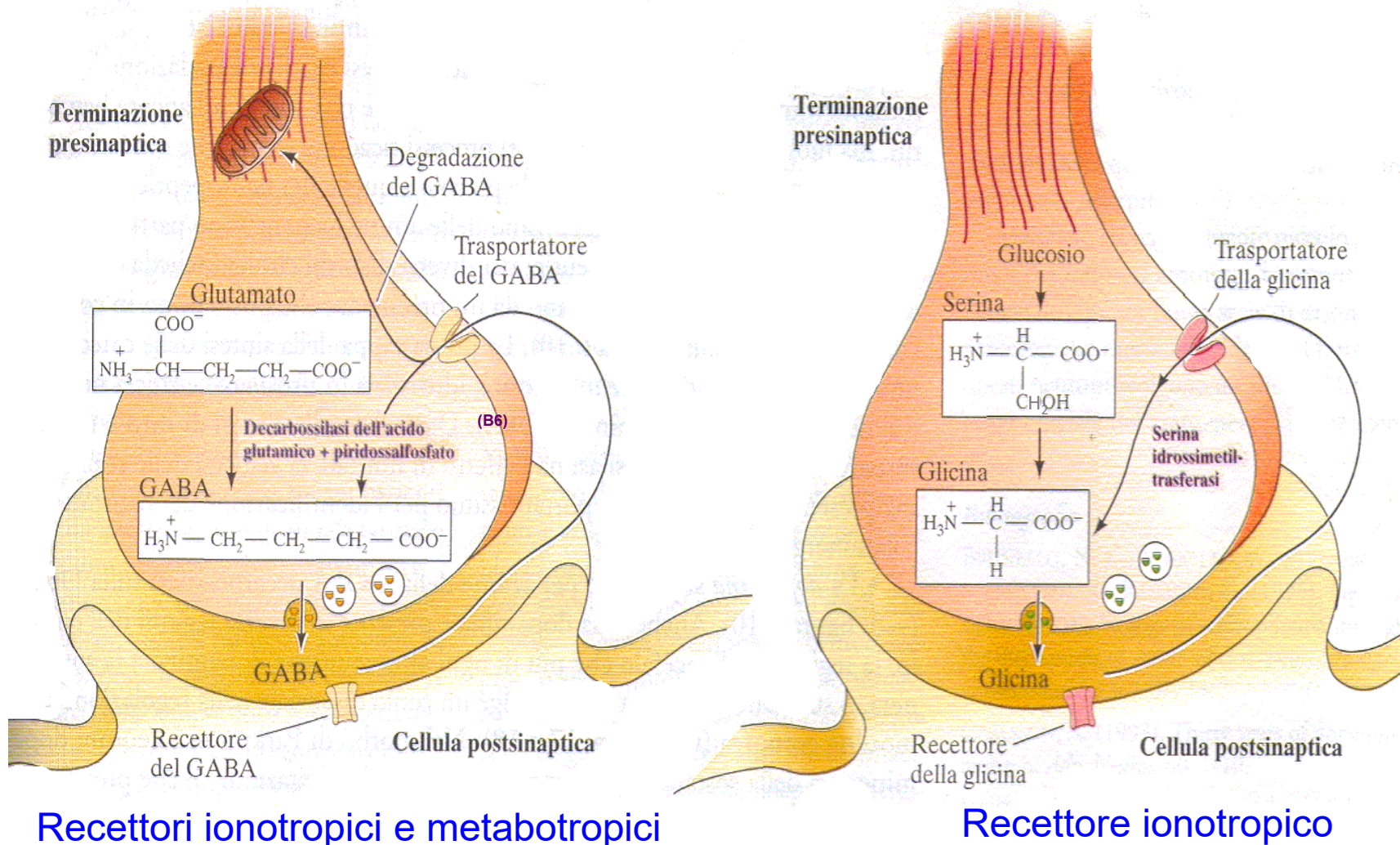
- **Ionotropici** (Nicotinici): periferici ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), centrali (elevata permeabilità al  $\text{Ca}^{2+}$ ) depolarizzazione
- **Metabotropici** (Muscarinici  $\text{M}_1$ - $\text{M}_5$ ):  **$\text{M}_1$ ,  $\text{M}_3$  e  $\text{M}_5$  attivazione fosfolipasi C**  
 **$\text{M}_2$  e  $\text{M}_4$  inibizione adenilato ciclasasi**

# GABA e GLICINA

**GABA:** principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC.

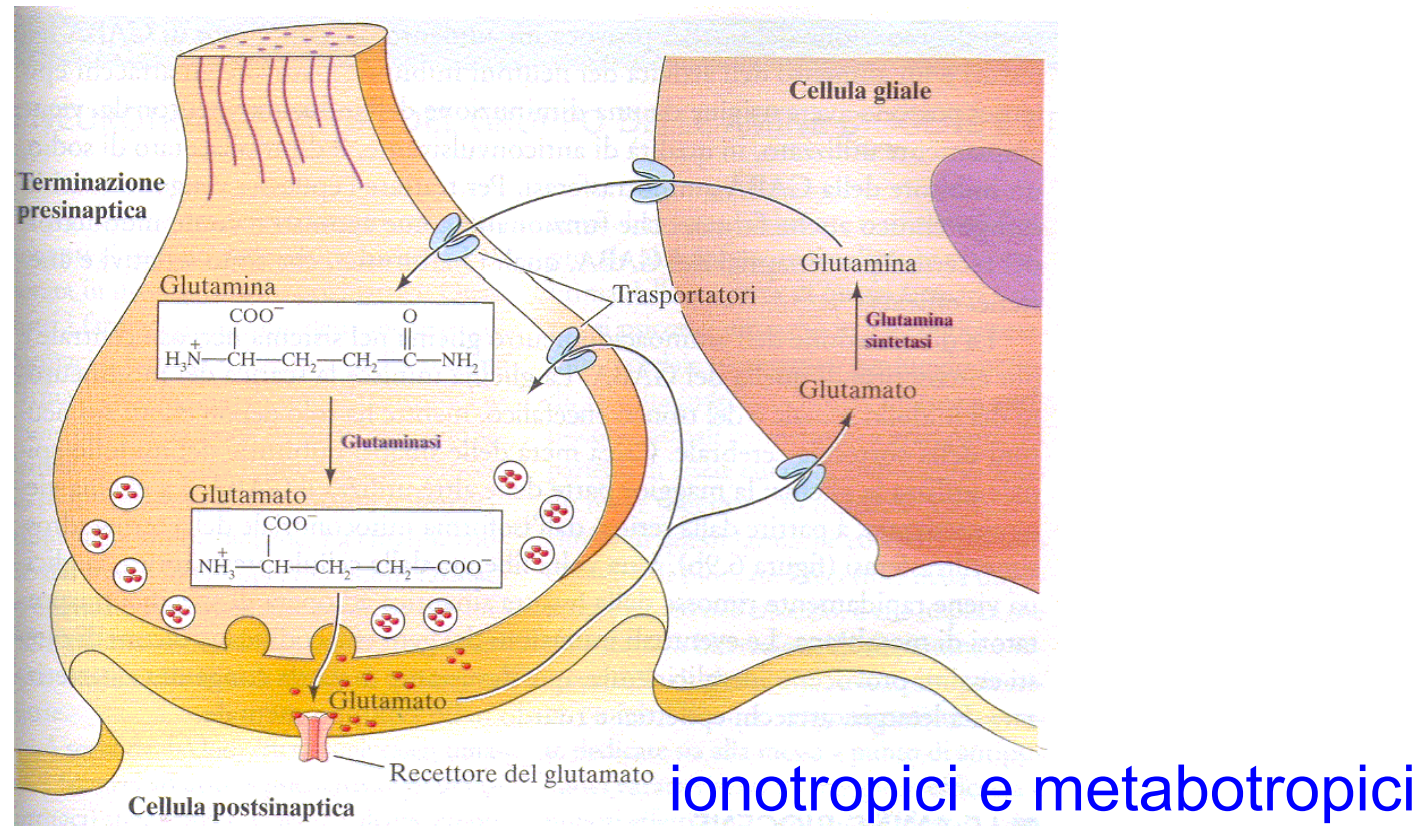
**Glicina:** neurotrasmettitore inibitorio del midollo spinale e midollo allungato.

E' coinvolta nei riflessi spinali e nella coordinazione motoria.



# GLUTAMMATO: E' il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC

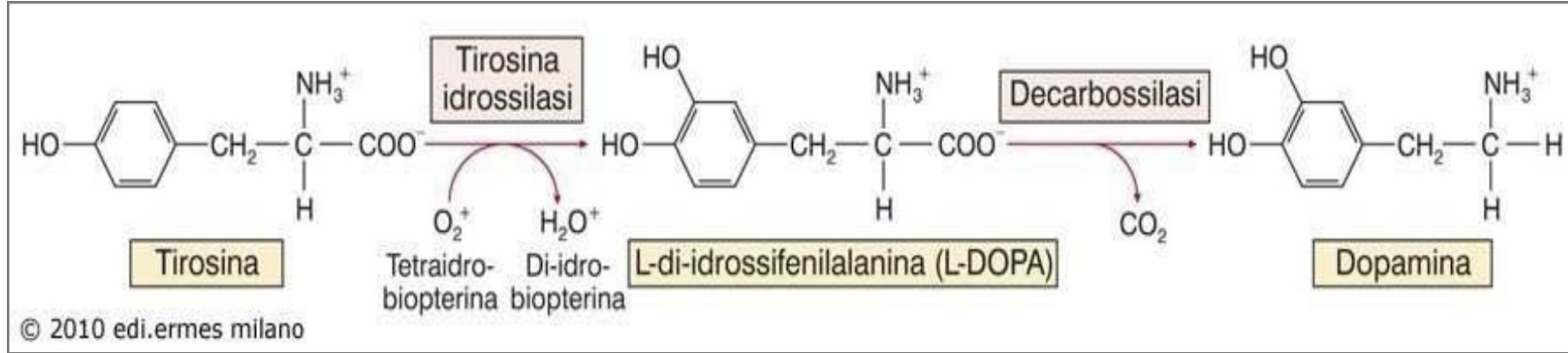
Prodotto per transaminazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato o per idrolisi della glutamina



Dopo la liberazione, è ricaptato da trasportatori specifici presenti nella glia e nei neuroni. L'eccesso di glutammato (esempio in ischemia) determina effetti eccitotossici che possono portare a morte cellulare.

Le amine biogene

# DOPAMINA



**Dopamina**- Substantia nigra (mesencefalo) e nucleo arcuato (ipotalamo).  
La via nigrostriale è alterata nel morbo di Parkinson ed in altri disturbi motori.

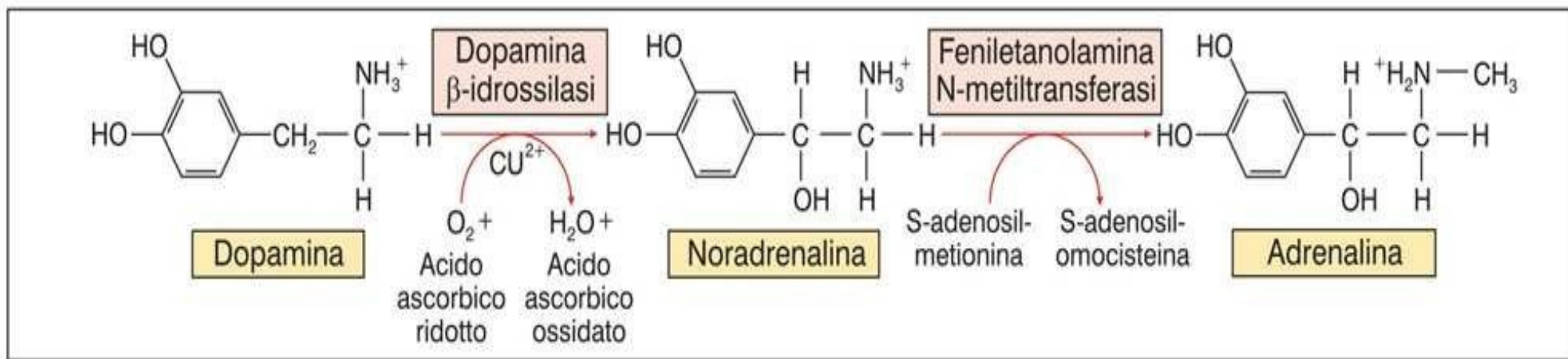
**Recettori metabotropici** suddivisi in due classi:

D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>: attivazione adenilato ciclastasi

D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>: inibizione adenilato ciclastasi



# NORADRENALINA



**Noradrenalina**- SNC: n. locus coeruleus a proiezione diffusa (corteccia, cervelletto, midollo spinale).

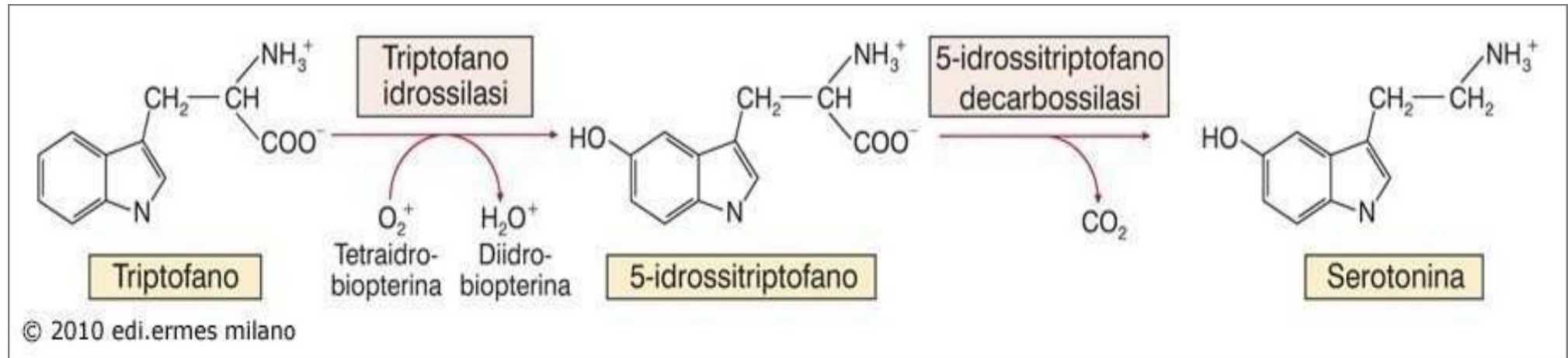
SNA: neuroni postgangliari simpatico.

**Recettori metabotropici** suddivisi in due classi:

$\alpha$  ( $\alpha_1$  attivazione fosfolipasi C,  $\alpha_2$  **inibizione adenilato ciclasi**)

$\beta$  ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ) **attivazione adenilato ciclasi**.

# SEROTONINA

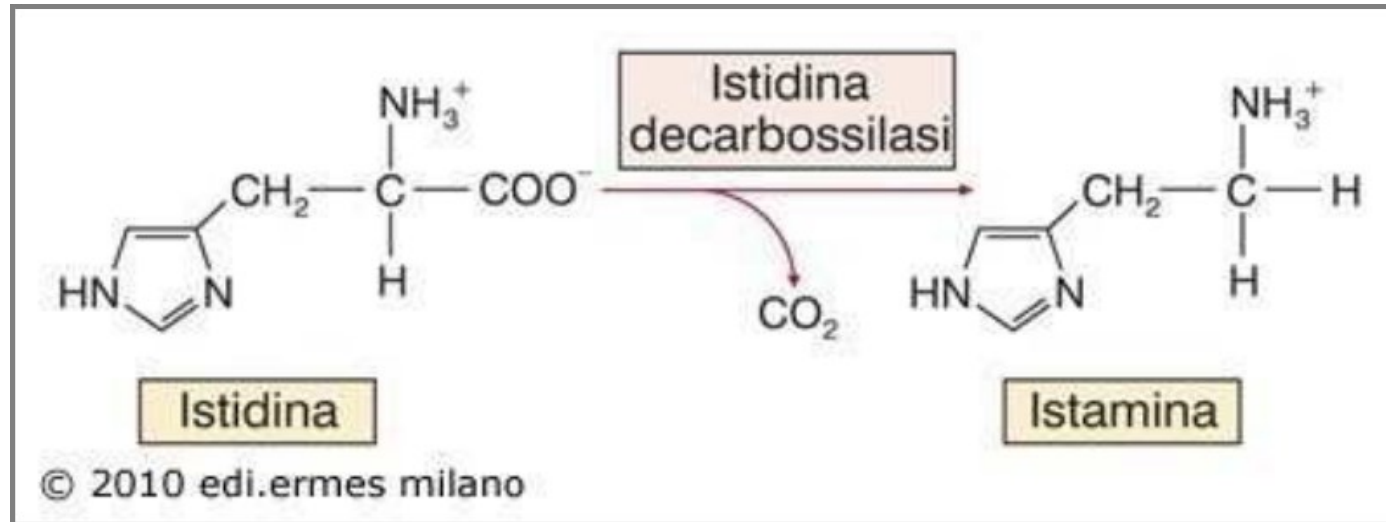


**Serotonina (5-HT)-** Nuclei del rafe (tronco encefalo) a proiezione su diversi nuclei cerebrali e midollari, coinvolti in funzioni cognitive complesse e nel ritmo sonno-veglia.

Implicata nella patogenesi delle forme depressive.

**Recettori:** 7 sottotipi: ionotropico (5-HT<sub>3</sub>) e metabotropici (5-HT<sub>1</sub> - T<sub>7</sub>)  
1 e 5 accoppiati a Gi; 4, 6 e 7 accoppiati a Gs, 2 accoppiato a Gq

# ISTAMINA



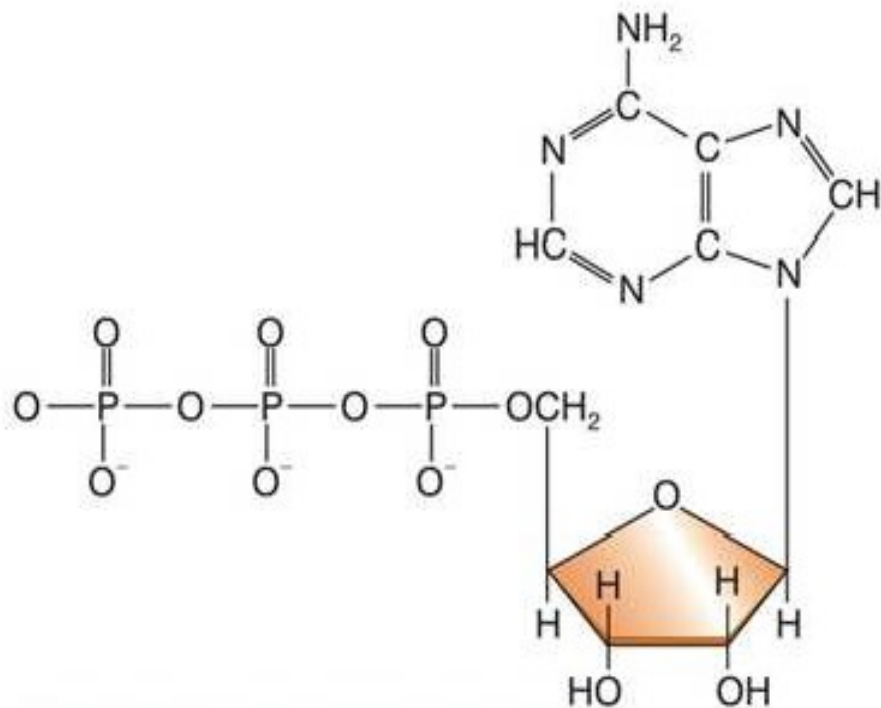
**Istamina:** Nucleo tuberomammillare (ipotalamo posteriore) a proiezione su quasi tutte le strutture del SNC.

Implicata nella regolazione dello stato di vigilanza e nel controllo neuroendocrino.

**Recettori metabotropici** suddivisi in tre classi:

Postsinaptici eccitatori: H1 (fosfolipasi c) e H2: (stimolo adenilato ciclasi),  
presinaptico: H3 (inibizione adenilato ciclasi), H4 (inibizione adenilato ciclasi)  
sistema immunitario

# ATP ed adenosina (purine)



Adenosina 5'-trifosfato (ATP)

Sono utilizzate nel SNC e in alcune parti del SNA (simpatico).

Importanti per la trasmissione del dolore.

## Recettori per ATP:

- ionotropici (P2X<sub>1-7</sub>, permeabili al Ca<sup>2+</sup>).
- metabotropici (P2Y<sub>1-6</sub>)

## Recettori per adenosina:

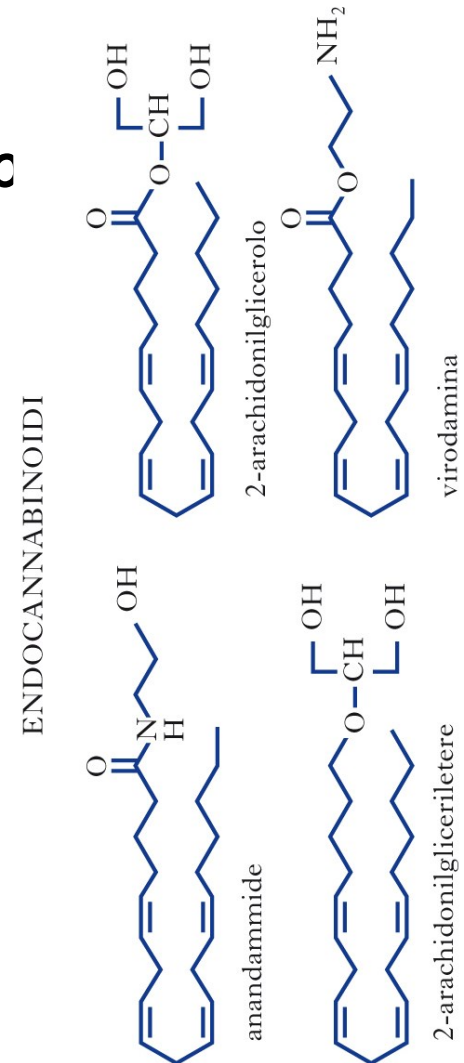
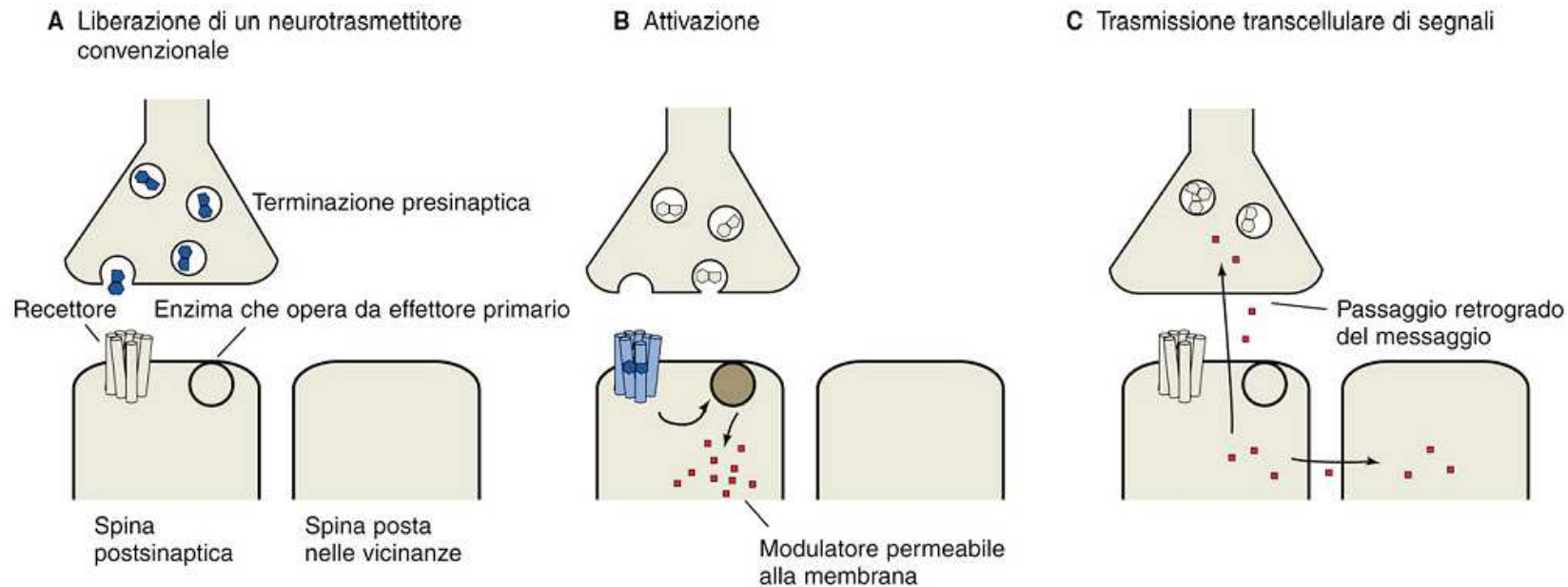
- metabotropici (A<sub>1</sub>: Gi; A<sub>2</sub>: Gs; A<sub>3</sub>: Gi)

Possono essere localizzati a livello pre-sinaptico (controllano liberazione di altri neurotrasmettitori).

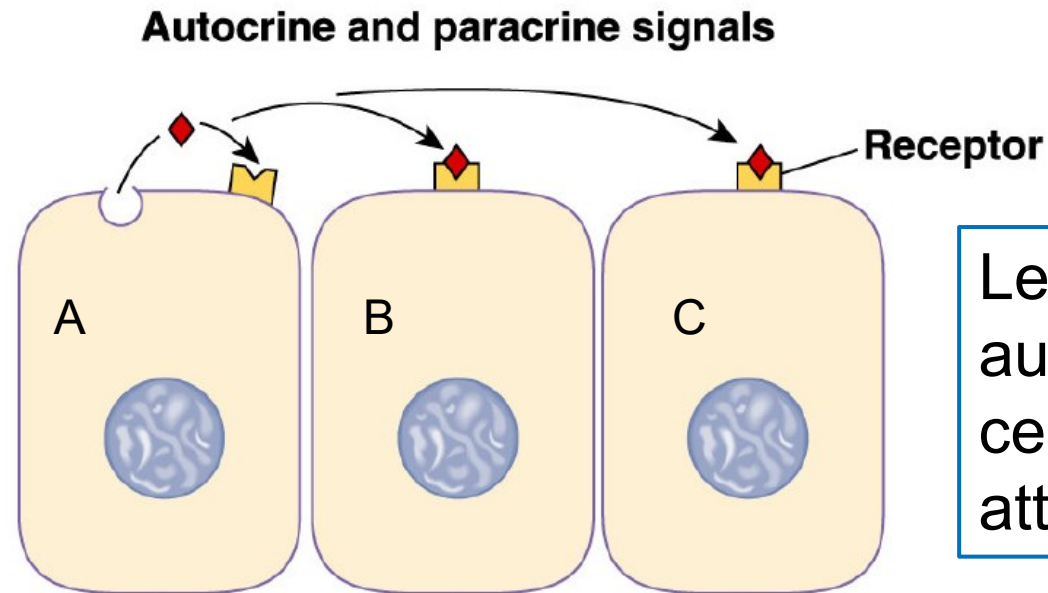
# Messaggeri retrogradi e neuromodulatori

Sono facilmente diffusibili attraverso le membrane (messaggeri transcellulari).  
**Sintetizzati a livello post-sinaptico**, diffondono al terminale pre-sinaptico dove modificano il rilascio di neurotrasmettitore.

- Gassosi: NO e CO (coinvolti nei fenomeni di potenziamento sinaptico)
- Acido arachidonico e/o i suoi metaboliti (Endocannabinoidi)



# Comunicazione chimica locale

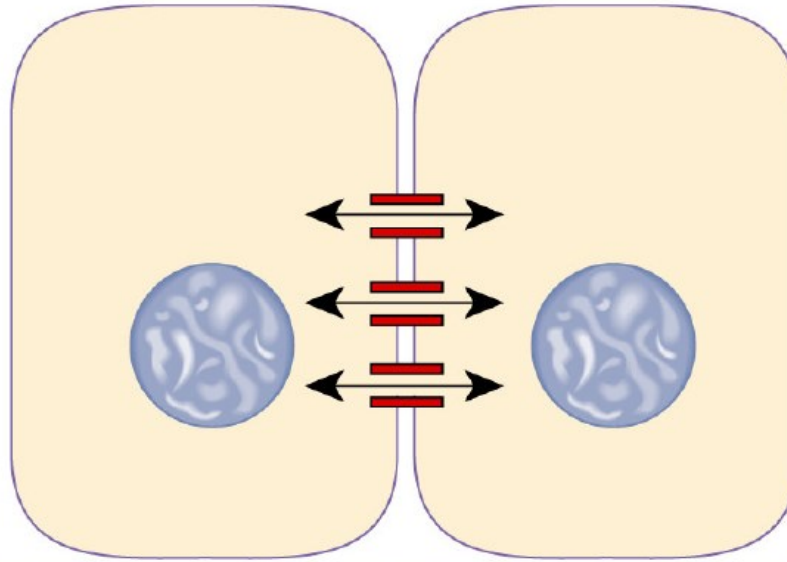


Le sostanze paracrine e autocrine raggiungono le loro cellule bersaglio per diffusione attraverso il liquido interstiziale.

Le **sostanze autocrine** (alcune citochine: IL1 e monociti; IL2 e linfociti T) agiscono sulla stessa cellula che le ha secrete.

Le **sostanze paracrine** (insulina agisce sulle cellule **alpha** del pancreas inibendo il rilascio di glucagone) sono secrete da una cellula e diffondono (per diffusione attraverso il liquido interstiziale) per agire su cellule adiacenti.

# Gap Junctions

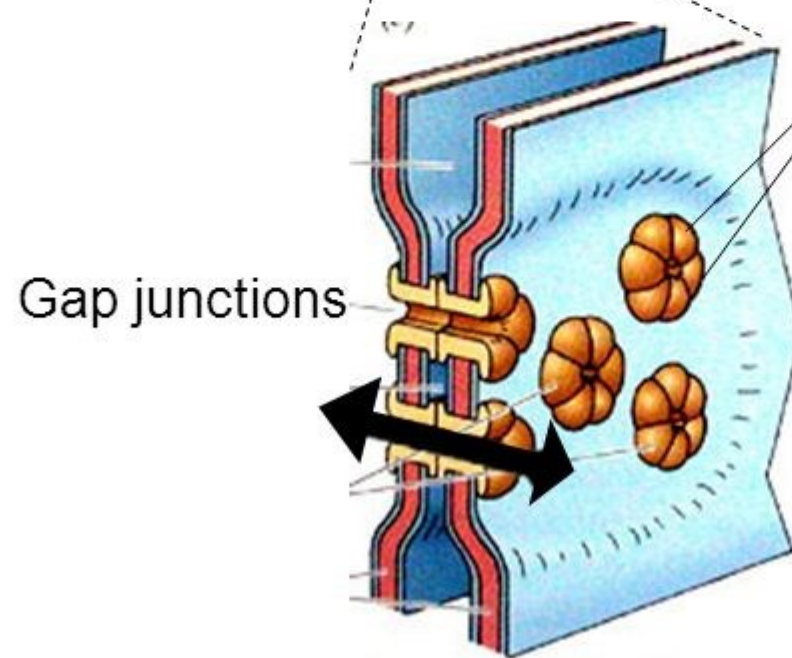
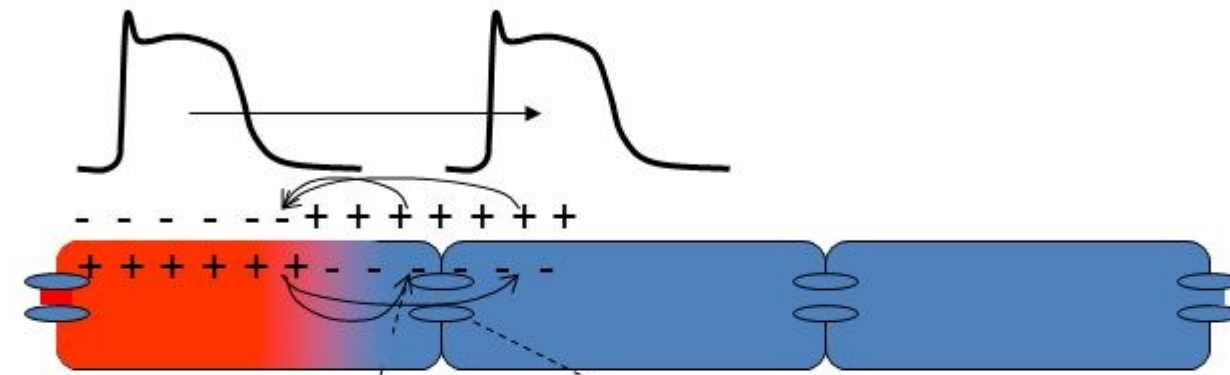


Le giunzioni comunicanti sono dei canali proteici di connessione che creano ponti citoplasmatici tra due cellule adiacenti attraverso cui si ha **trasferimento diretto dei segnali chimici ed elettrici**.

**Es.** cellule muscolari **cardiache**, i segnali elettrici passano rapidamente da una cellula all'altra creando un'onda di contrazione muscolare (battito cardiaco).

Anche le cellule muscolari lisce dell'**intestino** sono connesse da giunzioni comunicanti, e i segnali elettrici che le attraversano ne coordinano le contrazioni.

# Propagation of the Action Potential Along Cardiac Cells



- Connexons
- Large-conductance pores permeable for ions and small molecules
  - Consist of two sets of six subunits (connexons)
  - Responsible for electrical coupling of myocytes



# RIASSUNTO PRIMA PARTE

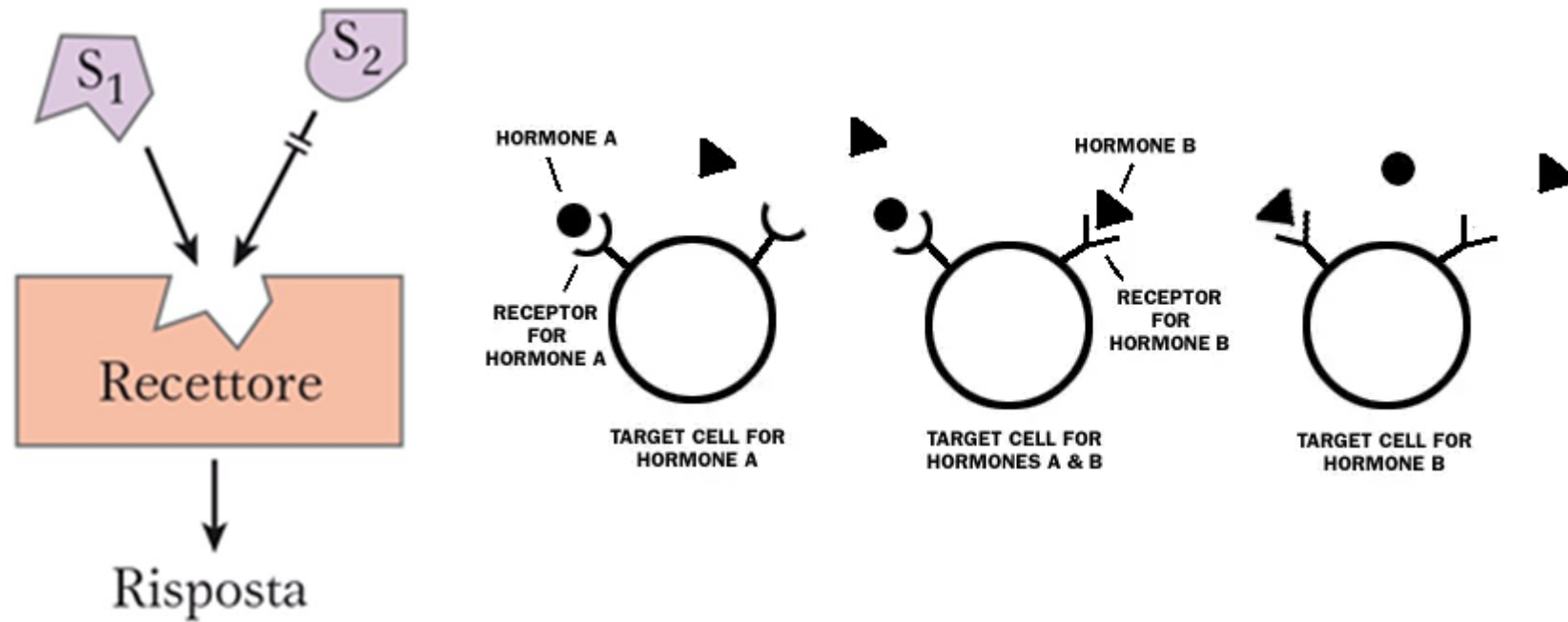
- Segnali biologici e distanze di comunicazione
- Molecole segnale utilizzate dal sistema endocrino
  - Effetti fisiologici degli ormoni
- Molecole segnale utilizzate dal sistema nervoso

## Caratteristiche distintive della trasduzione del segnale

- 1. Specificità**
- 2. Amplificazione**
- 3. Modularità**
- 4. Integrazione**
- 5. Desensibilizzazione/adattamento**
- 6. Diffusione intracellulare limitata**

1

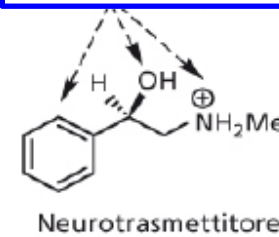
# Specificità



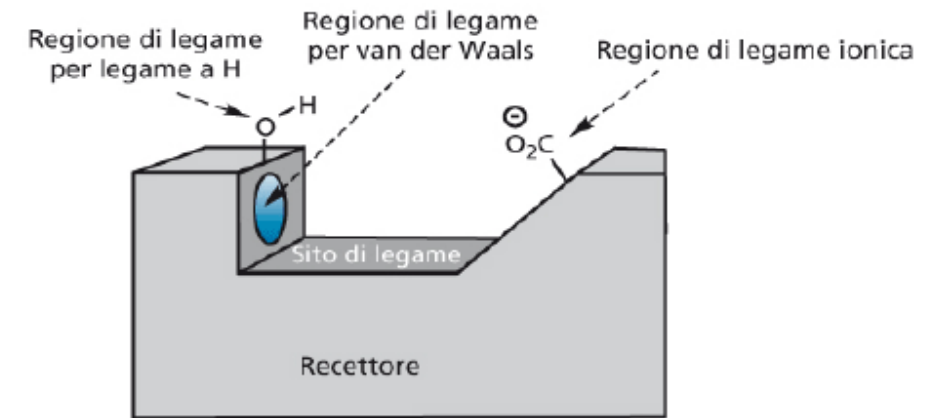
Gruppi funzionali e residui carboniosi presenti nel **LIGANDO** interagiscono con gruppi funzionali e residui carboniosi complementari presenti nel recettore.

I primi si definiscono **gruppi di legame**, i secondi **siti di legame**.

**Gruppi di legame:**



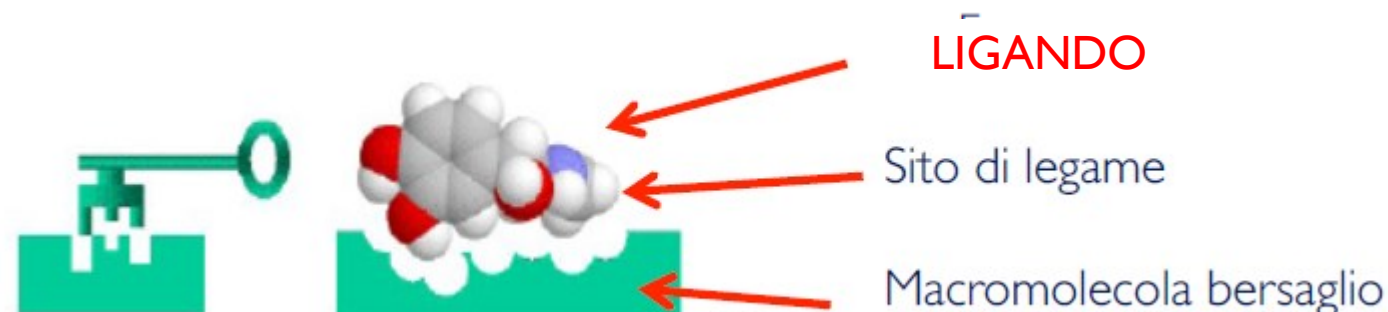
**Siti di legame:**



**Sito di legame (sito di binding):** piccola e specifica zona della macromolecola in cui ha luogo l'interazione di legame tra il farmaco e la macromolecola stessa.

Tipicamente una insenatura o una fenditura nella superficie macromolecolare.

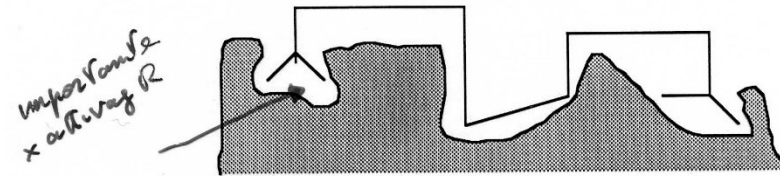
La complementarità strutturale richiesta è analoga a quella richiesta tra una chiave ed una serratura.



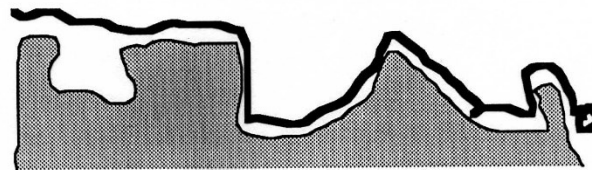
# Specificità: agonisti e antagonisti

Su uno stesso recettore possono agire LIGANDI con struttura diversa che comporta:

- Affinità diversa
- Effetto diverso (agonista/antagonista)

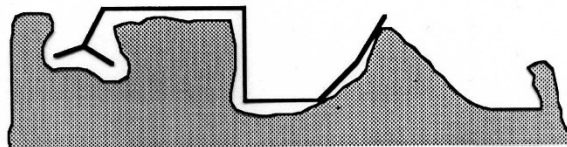


Sullo stesso recettore possono legarsi farmaci con struttura in parte diversa; varierà la capacità di legame (affinità) e l'effetto



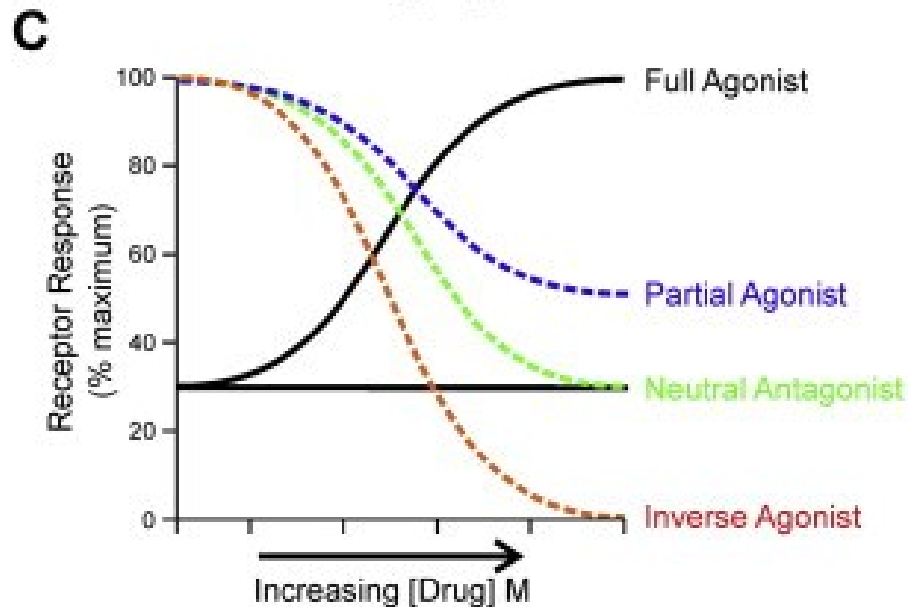
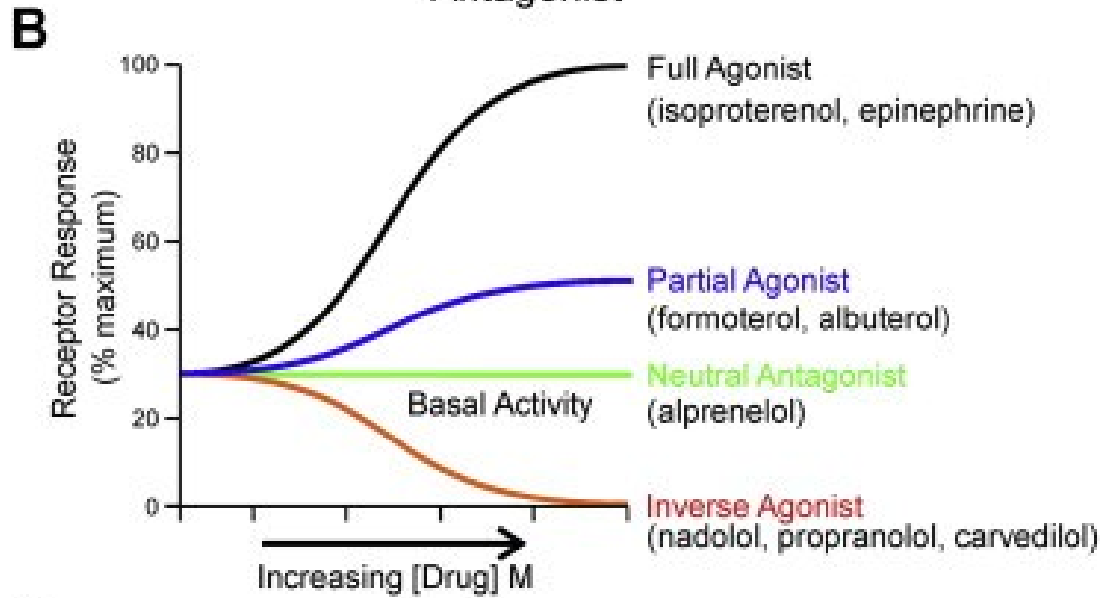
alta affinità

antagonista



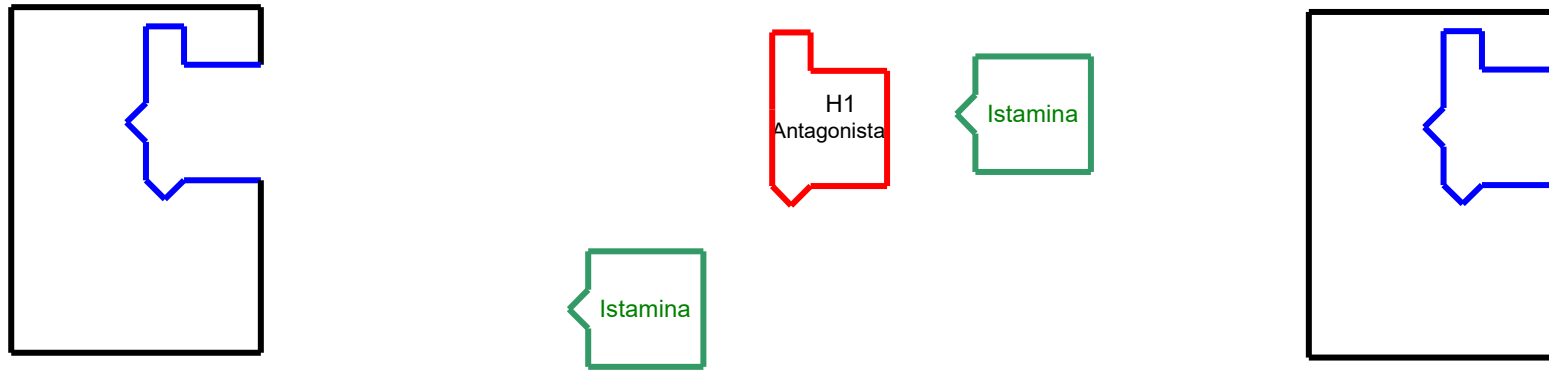
bassa affinità

agonista

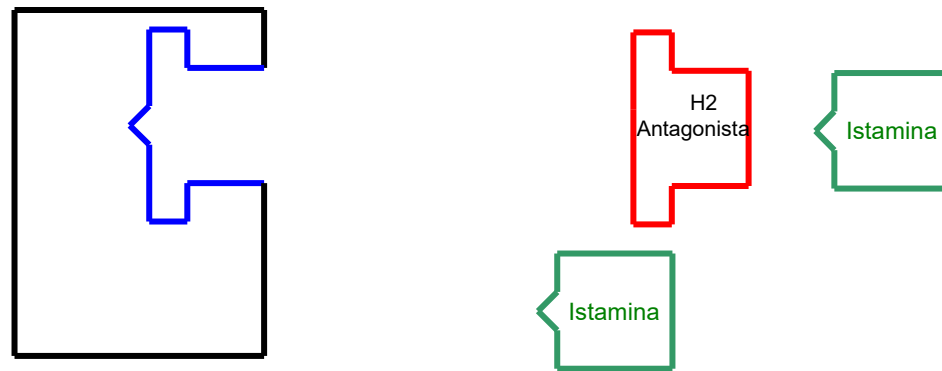


# Agonisti, antagonisti e....

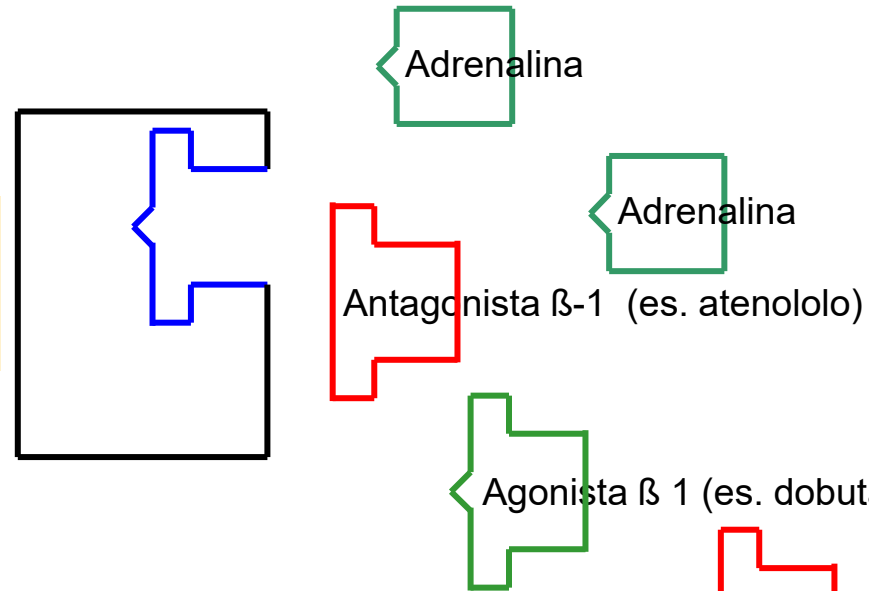
## Recettore H1 dell'istamina (es. cellule endoteliali)



## Recettore H2 dell'istamina (es. mucosa gastrica)

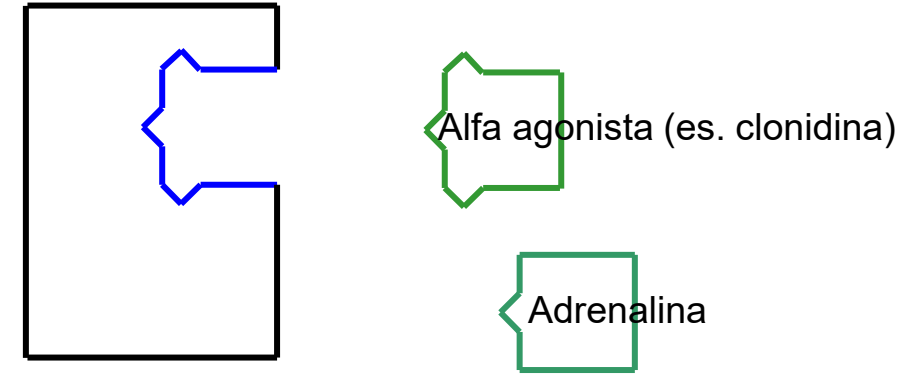


### $\beta$ 1 recettori (cuore)

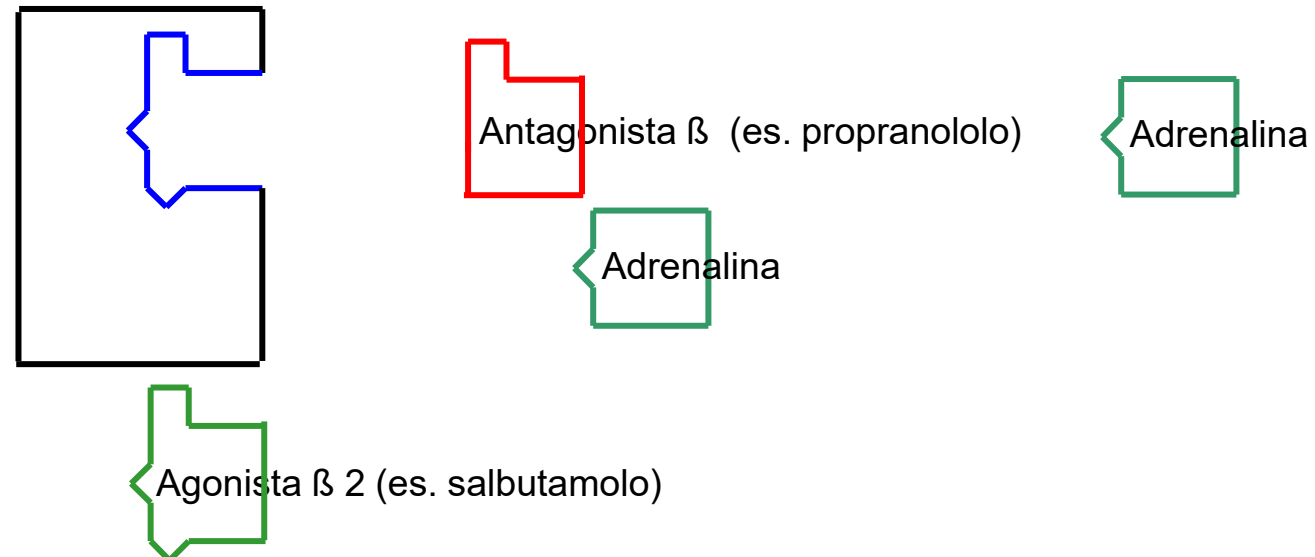


- Aumento della contrattilità del miocardio
- Aumento della frequenza cardiaca
- Aumento della velocità di conduzione
- Aumento dell'eccitabilità

### $\alpha$ 1 recettori (vasocostrizione)



### $\beta$ 2 recettori – (bronchi)

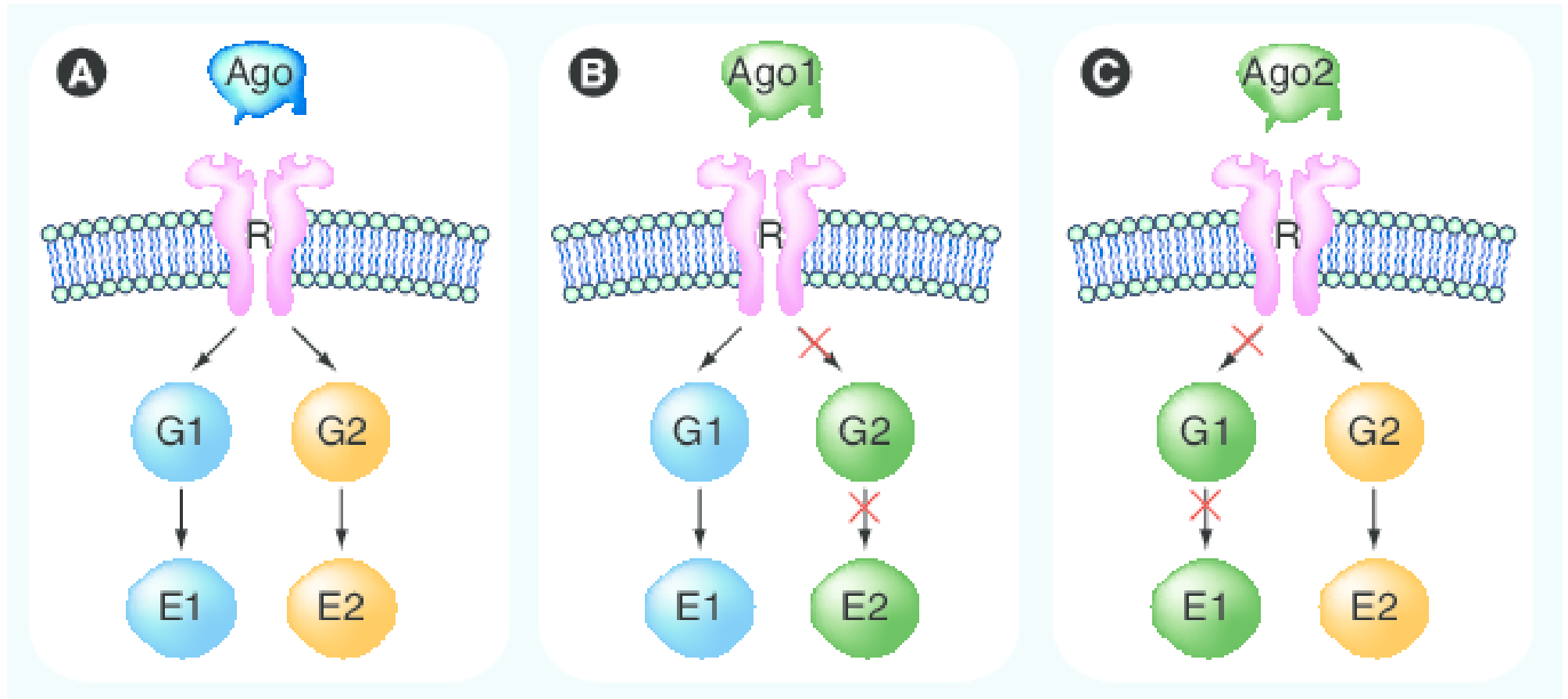


- Broncodilatazione.



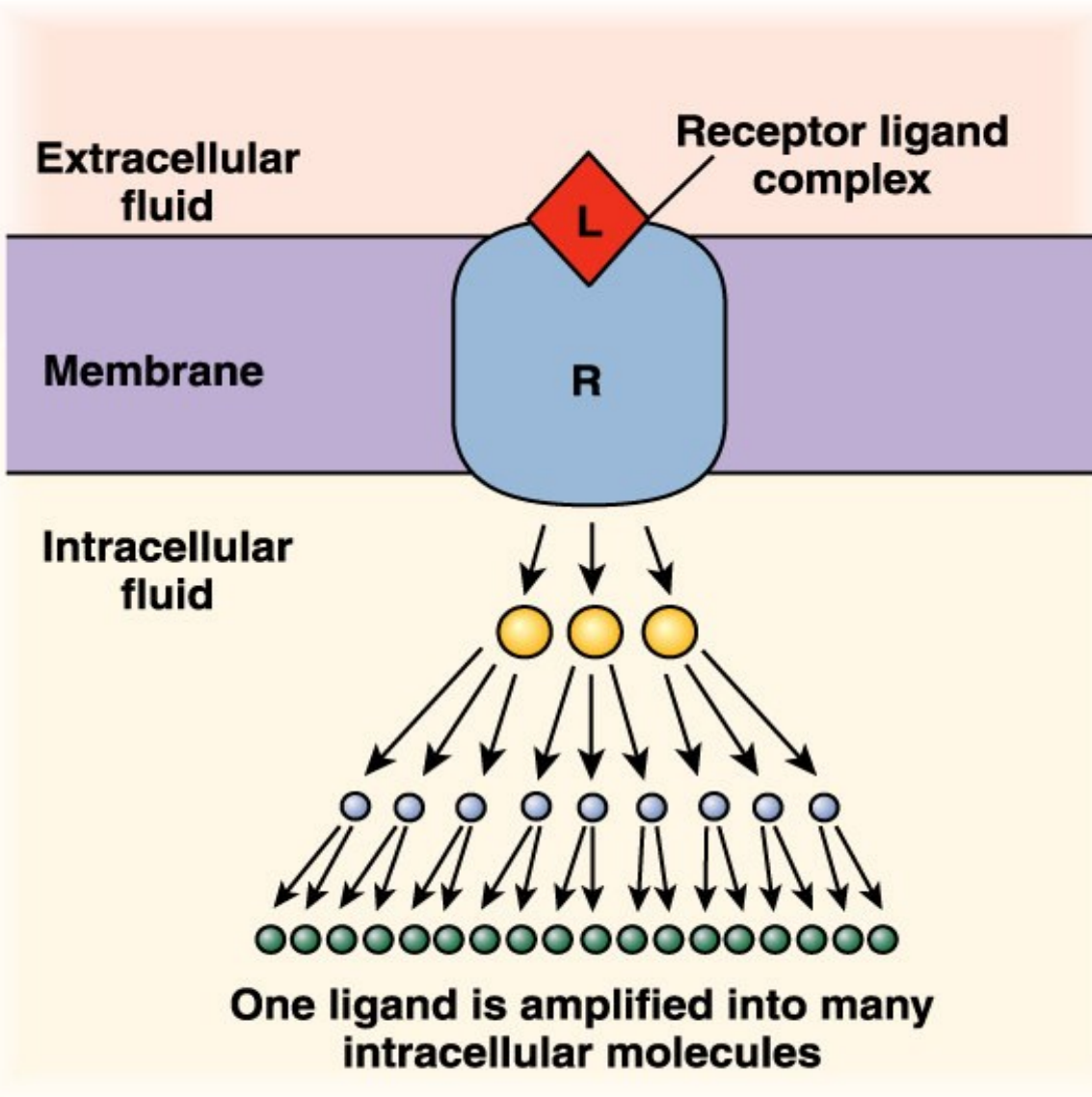
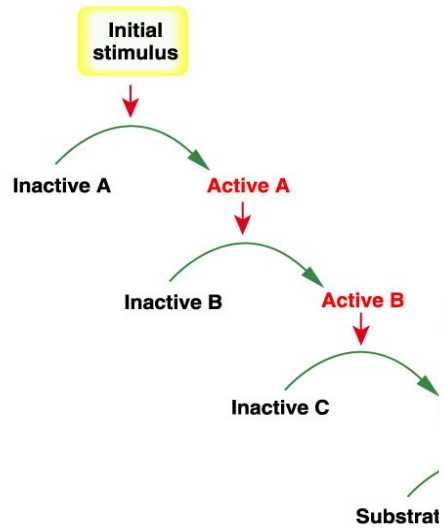


# Intrinsic activity and Biased agonists



# 2

# Amplificazione

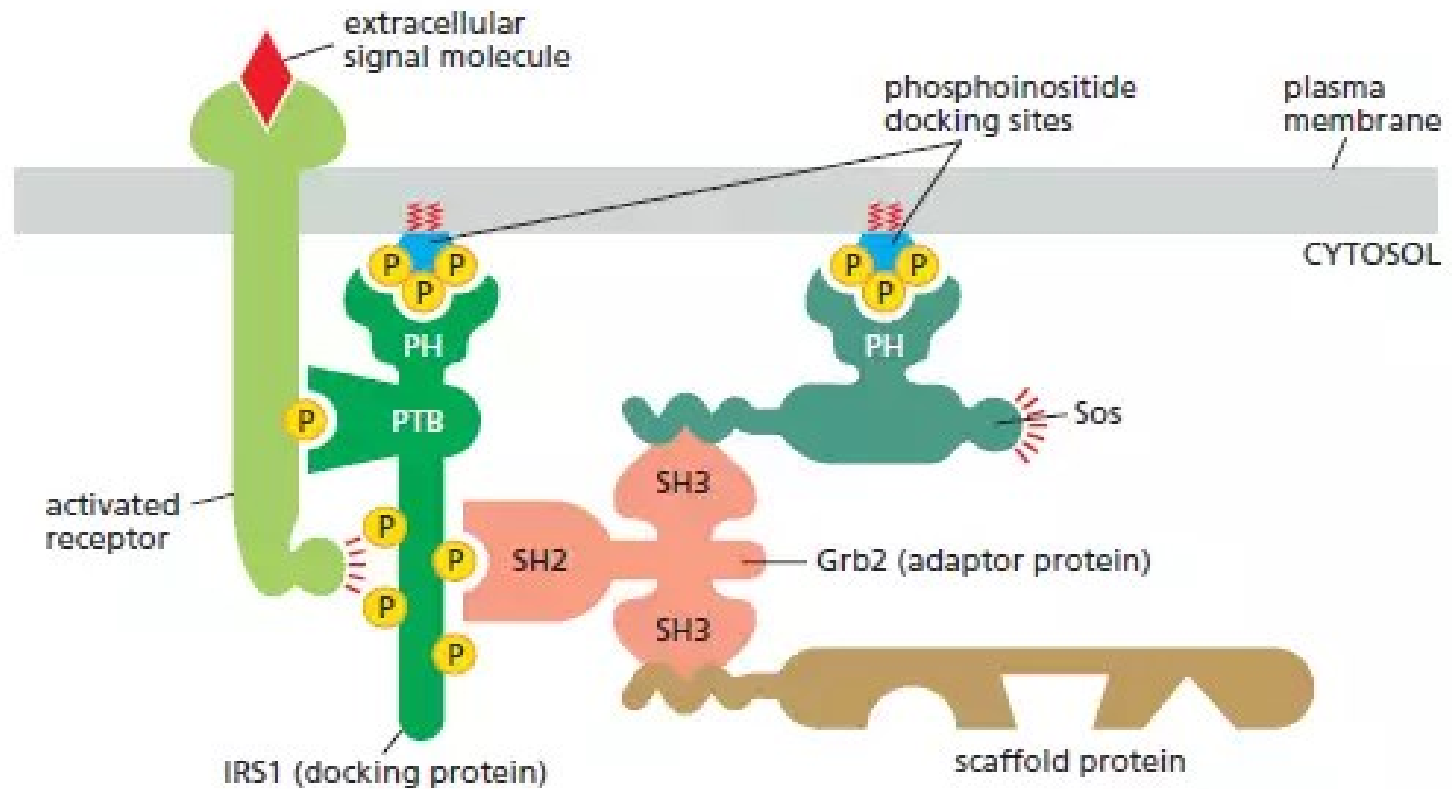
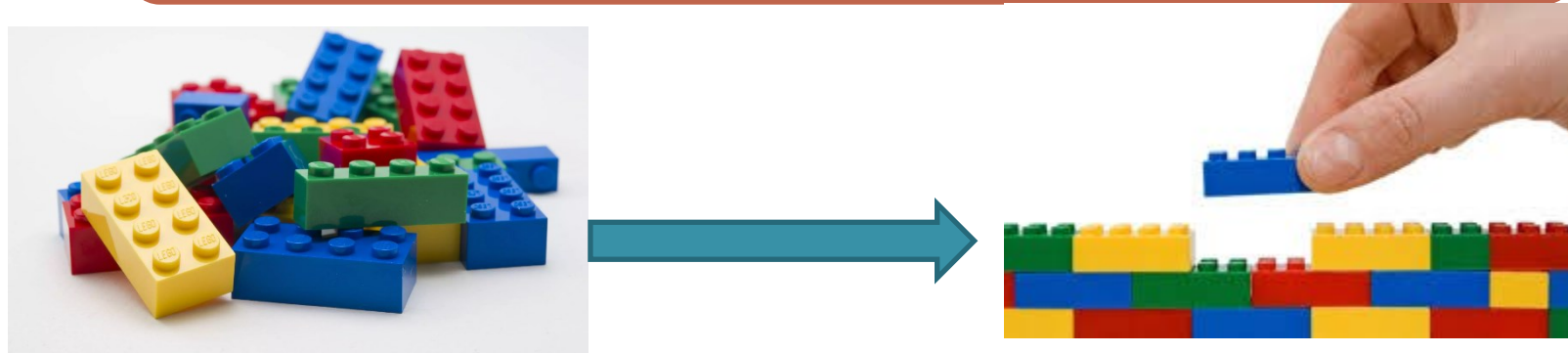


(b) Number of molecules activated
1 molecule
$10^2$ molecules
$10^2$ molecules
$10^4$ molecules
$10^4$ molecules
$10^5$ molecules
$10^6$ molecules
$10^8$ molecules

One ligand is amplified into many intracellular molecules

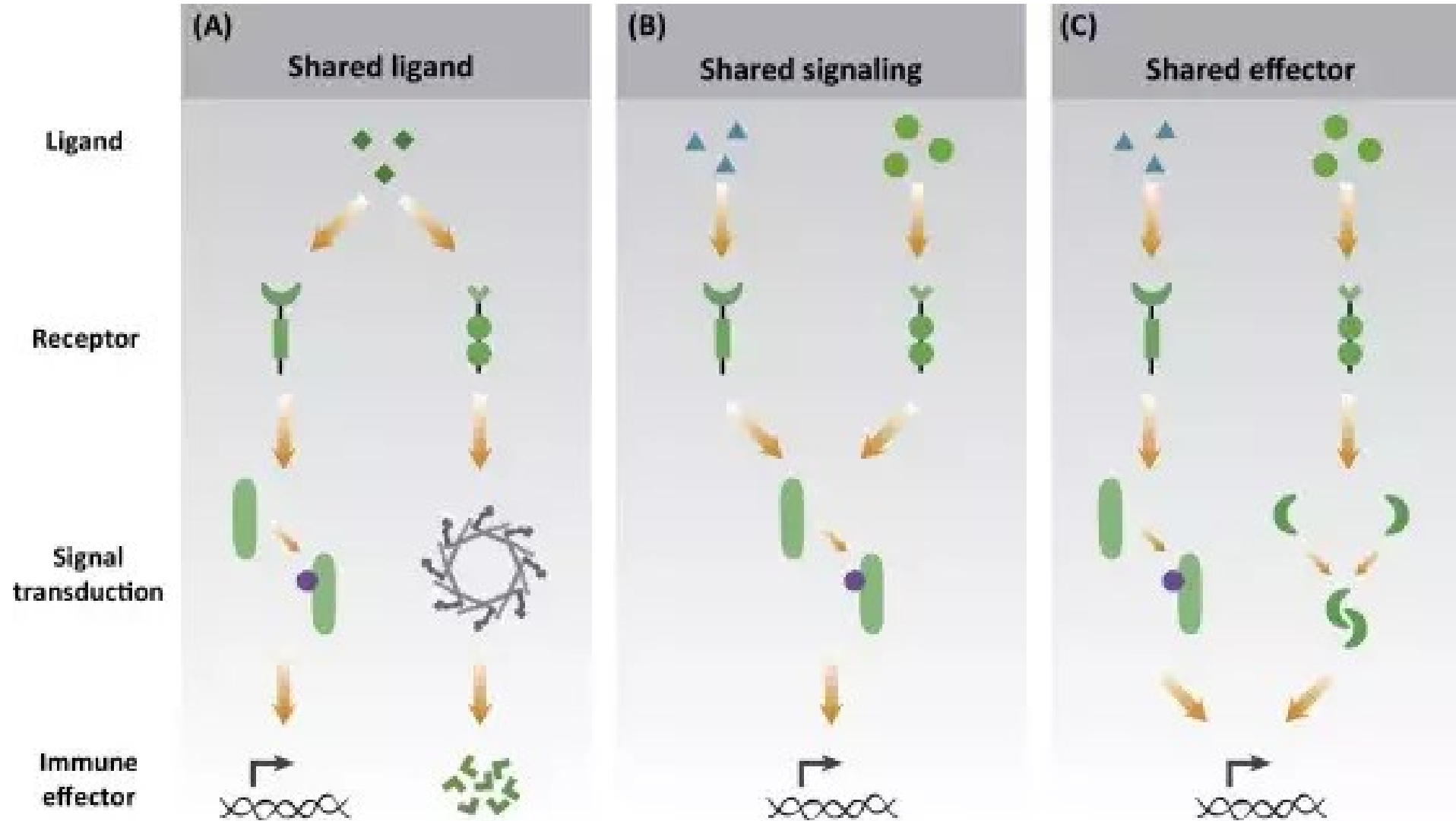
3

# Modularità



# 4

# Integrazione



# 4

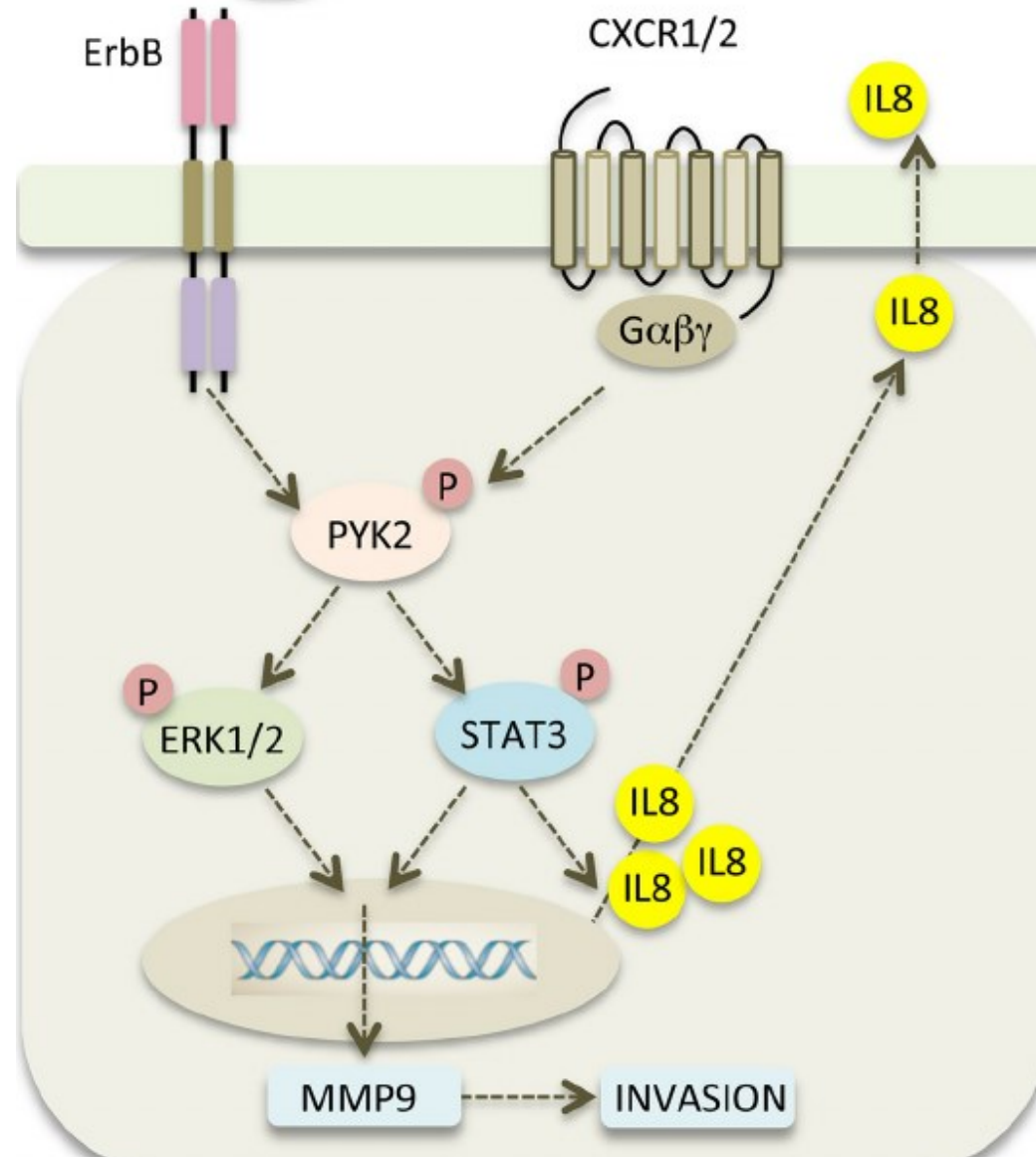
## Integrazione: shared signaling

Epidermal growth factor

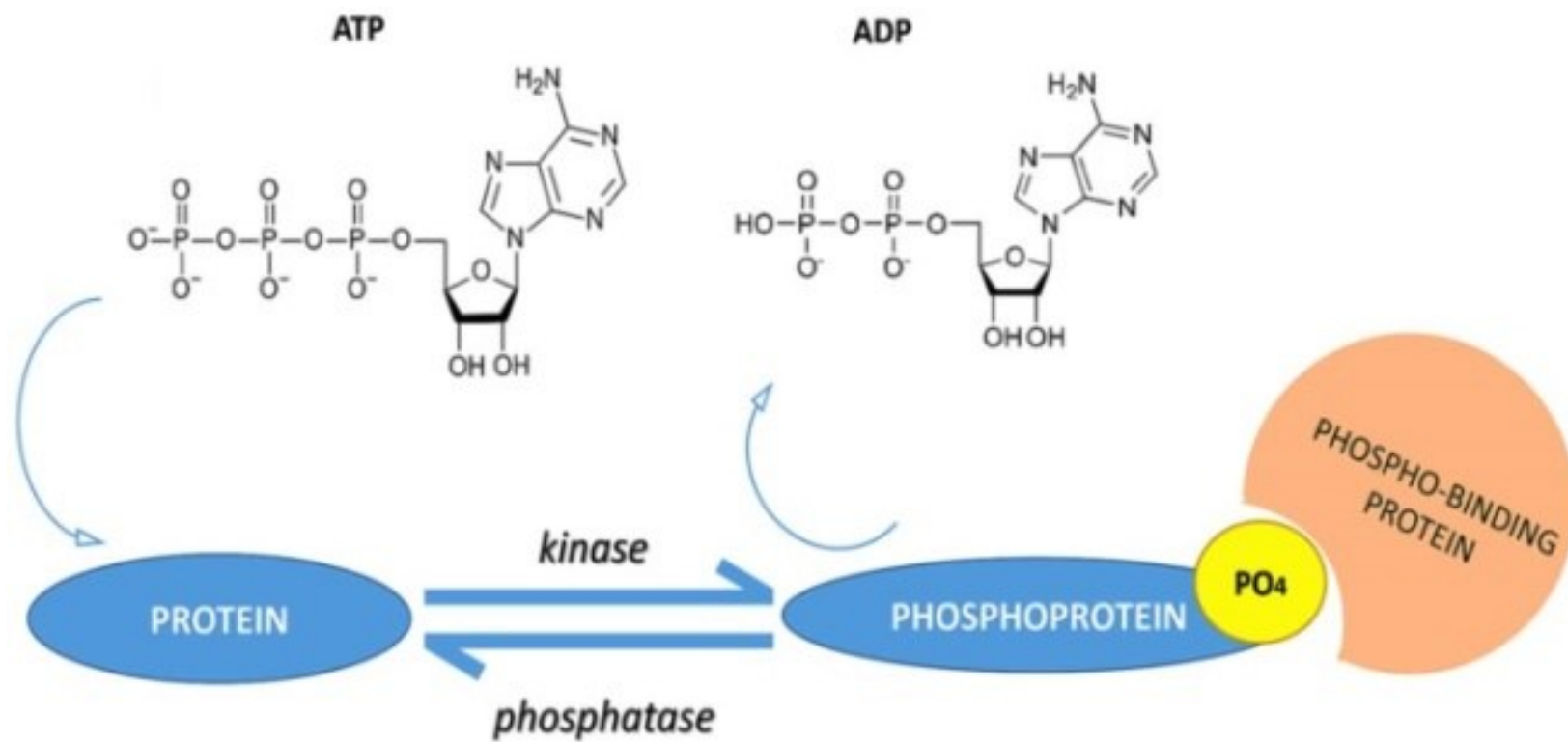
EGF

HRG

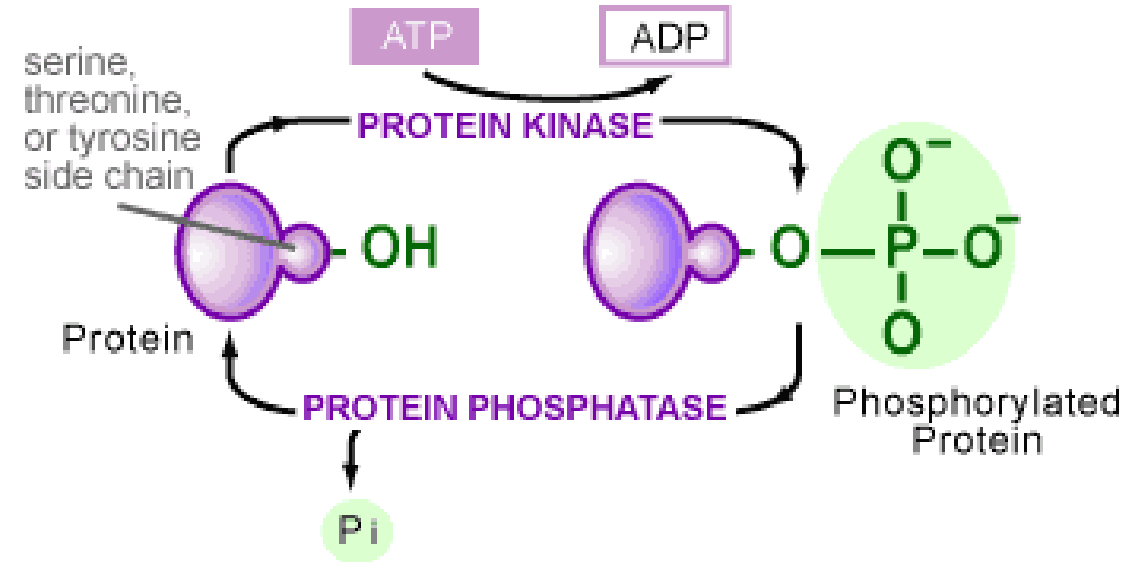
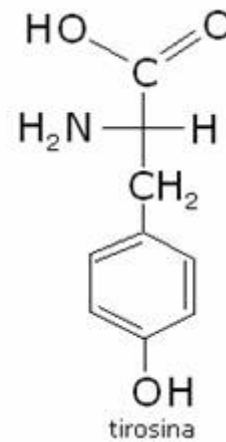
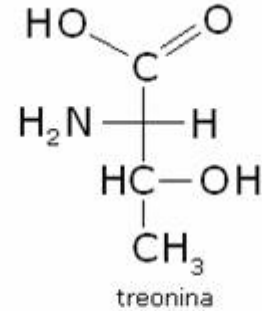
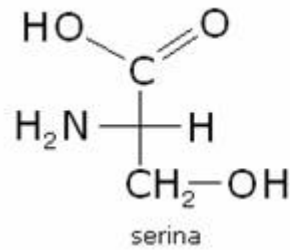
Heregulin



# FOSFORILAZIONE



# Proteine chinasi

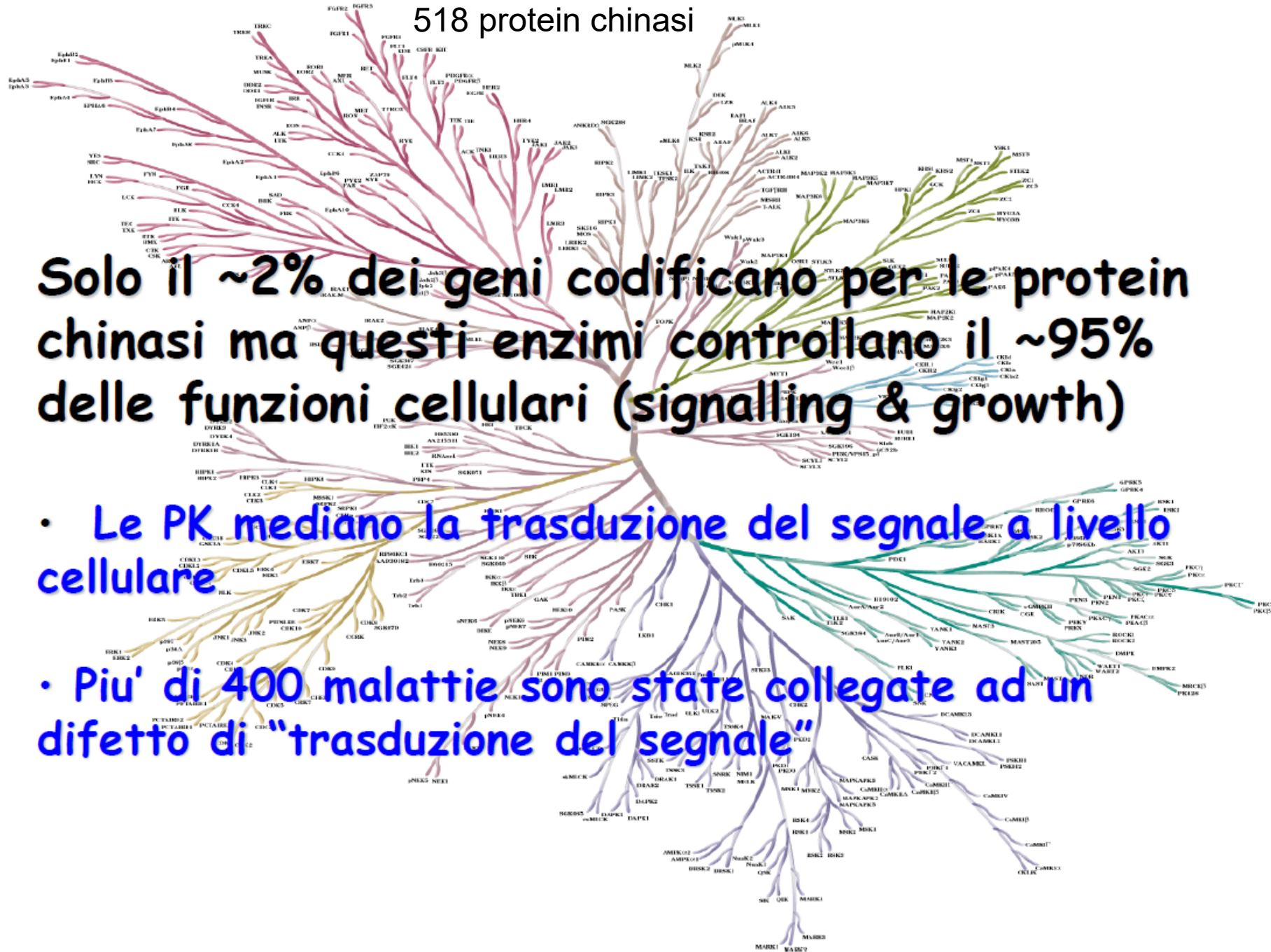


## Protein Kinases

- ❑ The enzymes that catalyze the ATP-dependent phosphorylation of serine, threonine or tyrosine residues in proteins.
- ❑ **Essential components of intracellular signalling pathways.** When activated, cause phosphorylation and activation/inactivation (through conformational changes) of selected target proteins. This results in a change in cellular activity.
- ❑ The kinome – the full complement of protein kinases encoded by an organism's genome.



## 518 protein chinasi



**Solo il ~2% dei geni codificano per le protein chinasi ma questi enzimi controllano il ~95% delle funzioni cellulari (signalling & growth)**

- **Le PK mediano la trasduzione del segnale a livello cellulare**
- **Piu' di 400 malattie sono state collegate ad un difetto di "trasduzione del segnale"**

## Family: *Pkinase* (PF00069)

771 architectures 25281 sequence: 22 interactions 2486 species 395 structures

### Summary

Domain organisation

Alignments

Trees

Curation & models

Species

Interactions

Structures

Jump to...

enter ID/acc

### Summary

#### Protein kinase domain

No Pfam abstract.

#### Literature references

1. Hunter T, Plowman GD; , Trends Biochem Sci 1997;22:18-22.: The protein kinases of budding yeast: six score and more. [PUBMED:9020587](#)
2. Hanks SK, Hunter T; , FASEB J 1995;9:576-596.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. [PUBMED:7768349](#)
3. Hanks SK, Quinn AM; , Methods Enzymol 1991;200:38-62.: Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. [PUBMED:1956325](#)

#### Interpro entry [IPR000719](#)

Eukaryotic protein kinases [PUBMED:12734000](#), [PUBMED:7768349](#), [PUBMED:1835513](#), [PUBMED:1956325](#), [PUBMED:3291115](#) are enzymes that belong to a very extensive family of proteins which share a conserved catalytic core common with both serine/threonine and tyrosine protein kinases. There are a number of conserved regions in the catalytic domain of protein kinases. In the N-terminal extremity of the catalytic domain there is a glycine-rich stretch of residues in the vicinity of a lysine residue, which has binding. In the central part of the catalytic domain there is a conserved [aspartic acid residue](#) which is important for enzyme activity. This entry includes protein kinases from eukaryotes and viruses and may include

#### Clan

This family is a member of clan [PKinase \(CL0016\)](#), which contains the following 13 members:

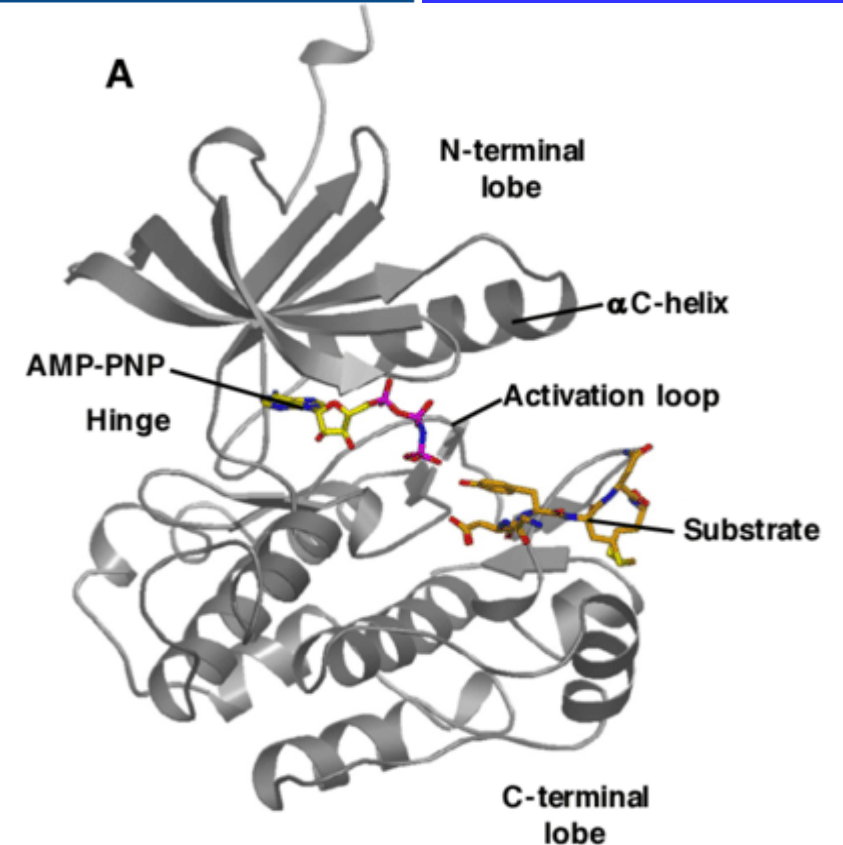
[ABC1](#)  
[DUF227](#)  
[Pox\\_ser-thr\\_kin](#)

[APH](#)  
[Fructosamin\\_kin](#)  
[RIO1](#)

[APH\\_6\\_hur](#)  
[Kdo](#)  
[WaaY](#)

[Choline\\_kinase](#)  
[Pkinase](#)

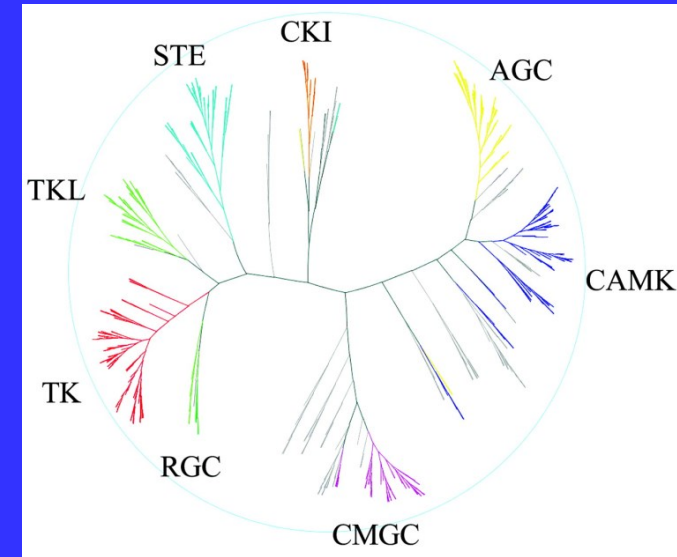
[DUF167](#)  
[Pkinase](#)

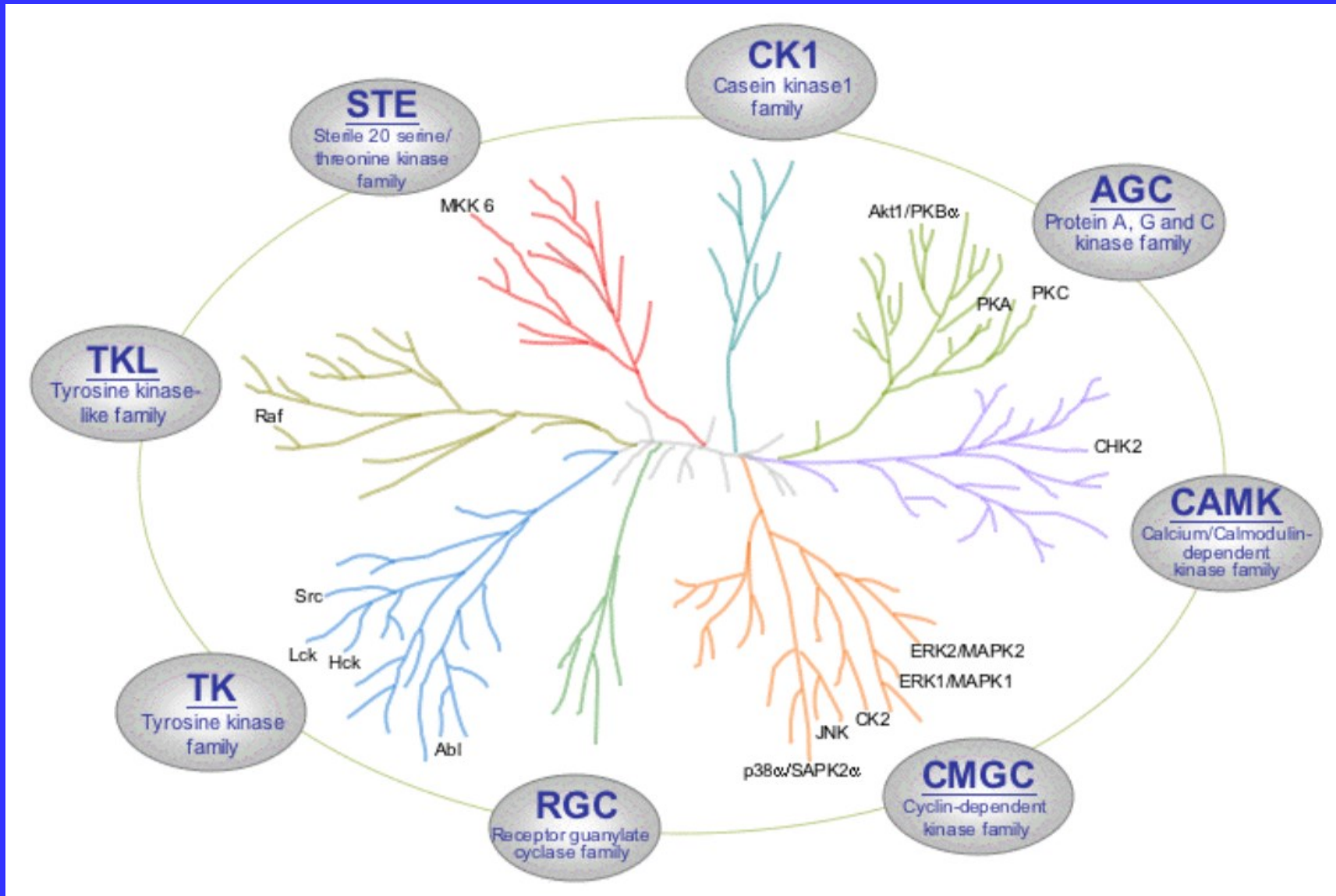


Eukaryotic protein kinases share a conserved catalytic core common to both serine/threonine and tyrosine protein kinases.

# Famiglie di proteine chinasi

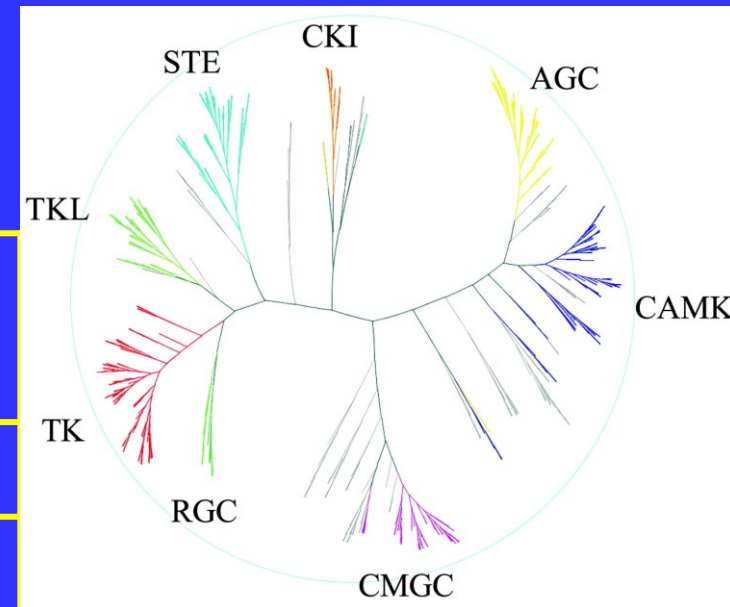
1. **AGC** - cyclic nucleotide regulated protein kinase family, diacylglycerol/phospholipid-dependent protein kinase C family, G-protein-coupled receptor kinases, S6 kinases etc (AGC - protein kinase A, cGMP-dependent protein kinase and protein kinase C).
2. **CAMK**- Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases.
3. **CKI** - casein kinase 1.
4. **CMGC** - cyclin-dependent kinases, MAP kinases itself, GSK-3.
5. **STE** - MAP kinase cascade family members.
6. **TK** - tyrosine kinases e.g. Src family, Abl family, Tyk2/Jak1 family, EGF receptor family, PDGF receptor family, FGF receptor family, insulin receptor family.
7. **TKL** - tyrosine kinase-like - a diverse group of families that actually resemble both tyrosine and serine/threonine kinases. e.g. IRAK [interleukin-1 (IL-1) receptor associated kinase].
8. **RGC** - receptor guanylate cyclase - similar in domain sequence to the tyrosine kinases.
  - It consists entirely of pseudokinases that lack certain residues that are critical for phosphate transfer.





## Human protein kinase distribution by major groups.

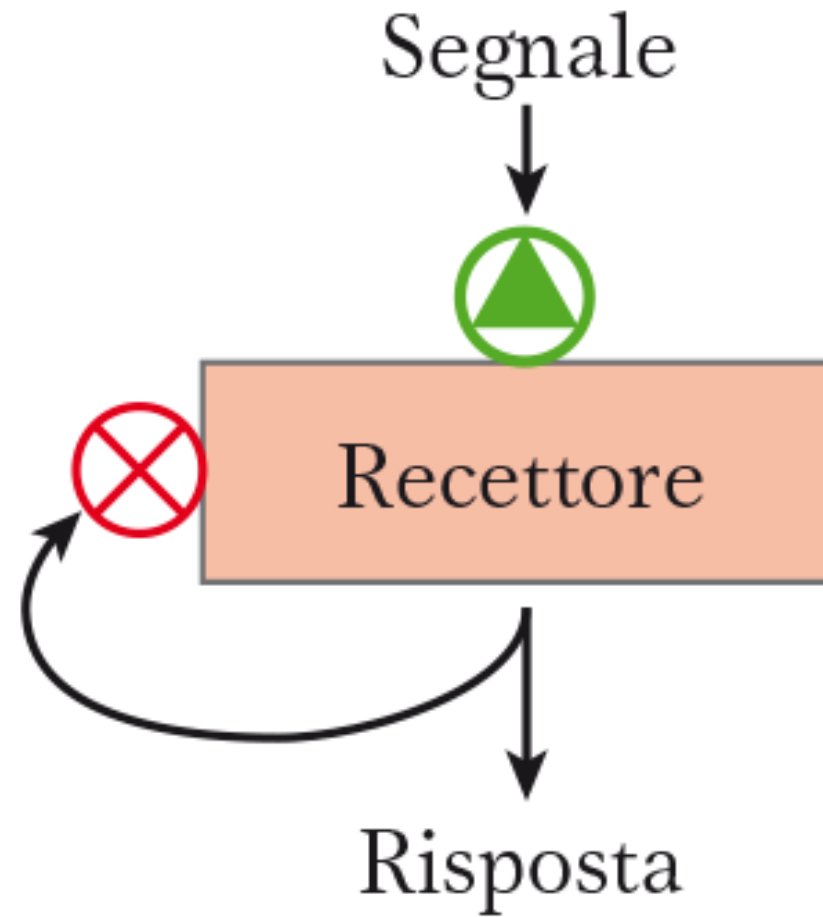
Group	Families	Subfamilies	Protein Kinase Genes	Pseudo-genes	Novel Kinases
AGC	14	21	63	6	7
CAMK	17	33	74	39	10
CK1	3	5	12	5	2
CMGC	8	24	61	12	3
Other	37	39	83	21	23
STE	3	13	47	6	4
Tyrosine kinase	30	30	90	5	5
Tyrosine kinase-like	7	13	43	6	5
RGC	1	1	5	3	0



- Most protein kinases act in networks and are modulated by autophosphorylation and phosphorylation by other kinases.
- Other domains within these proteins regulate kinase activity, link to other signalling modules or signal subcellular localization of the protein.
- The most common domains mediate interaction with other signalling proteins
  - e.g. 24 kinases contain Src homology 2 (SH2) domains. Other domains link to GTPase signalling, lipid signalling, calcium signalling, target the kinase to the cytoskeleton, or mediate specific interactions with other proteins or RNA.

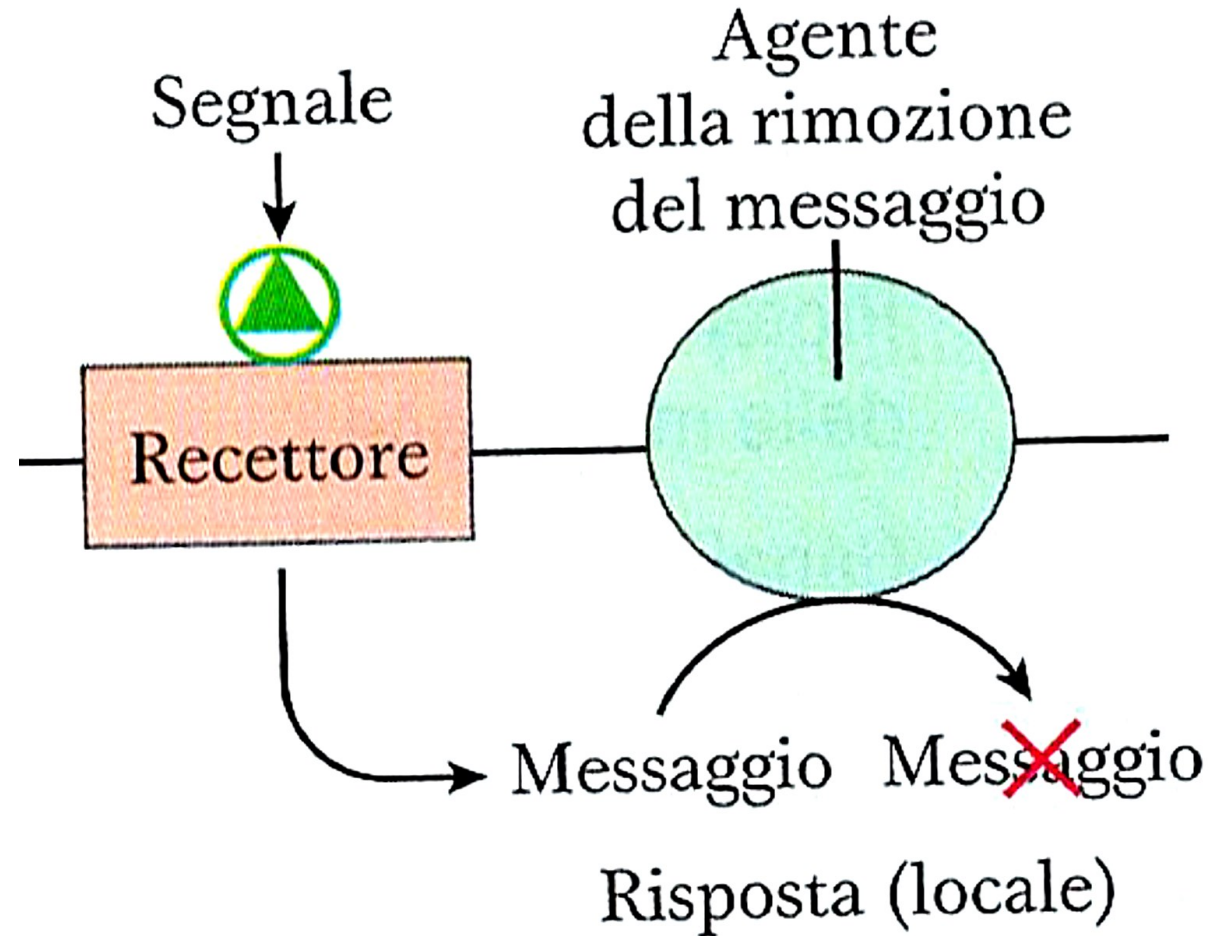
5

# Desensibilizzazione/adattamento



6

# Risposta localizzata

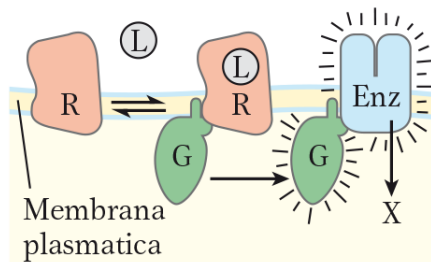




# Principali tipi di recettori

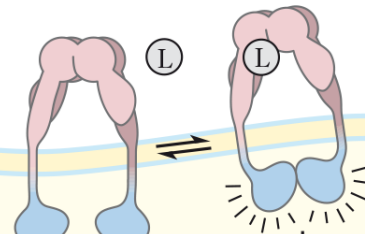
## 1. Recettori accoppiati alle proteine G

Il legame di un ligando esterno (L) al recettore (R) attiva una proteina intracellulare che lega il GTP (G); essa a sua volta regola l'attività di un enzima (Enz), che genera un secondo messaggero intracellulare (X).



## 2a. Recettore con attività tirosina chinasi

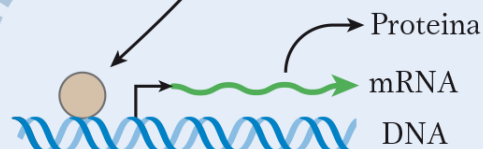
Il legame del ligando innesca l'attività tirosina chinasi mediante autofosforilazione.



2b. La chinasi attiva un fattore di trascrizione, alterando l'espressione genica.

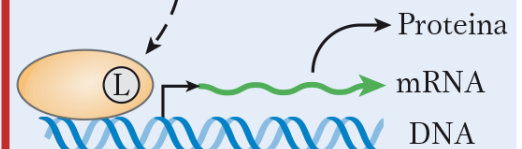
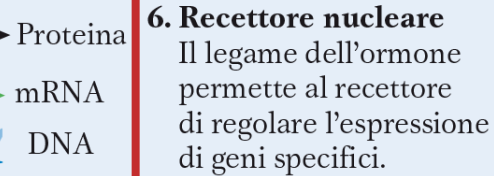
Cascata chinasi

Membrana nucleare



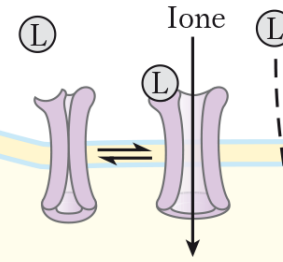
Proteina  
mRNA  
DNA

**6. Recettore nucleare**  
Il legame dell'ormone permette al recettore di regolare l'espressione di geni specifici.



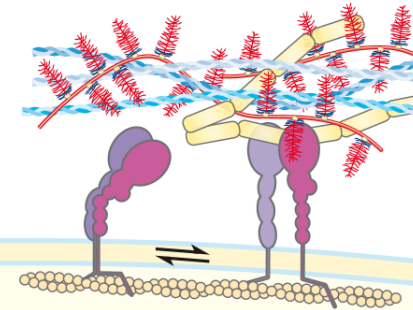
## 4. Canale ionico controllato

Si apre e si chiude in risposta alla concentrazione del ligando segnale o al potenziale di membrana.



## 5. Recettore di adesione (integrina)

Lega molecole della matrice extracellulare, cambia la propria conformazione e altera l'interazione con il citoscheletro.



Grazie per l'attenzione