



## Trasduzione del segnale:

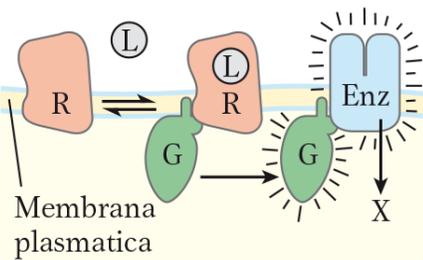
- canali ionici controllati
- recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs)

Michele Sallese

# Canali ionici controllati

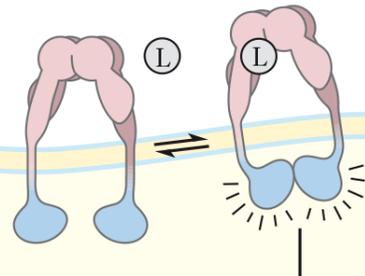
## 1. Recettori accoppiati alle proteine G

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 chinasa

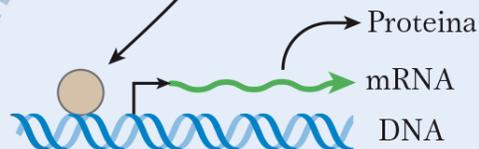
Il legame del ligando innesca l'attività tirosina chinasa mediante autofosforilazione.



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

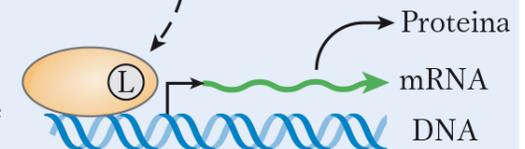
Cascata chinasa

Membrana nucleare



Proteina  
mRNA  
DNA

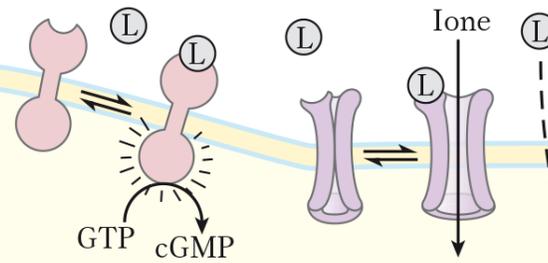
6. Recettore nucleare  
Il legame dell'ormone permette al recettore di regolare l'espressione di geni specifici.



Proteina  
mRNA  
DNA

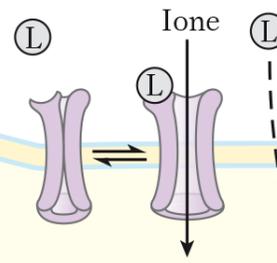
## 3. Recettore con attività guanilil ciclasica

Il legame del ligando al dominio extracellulare stimola la formazione del secondo messaggero, il GMP ciclico (cGMP).



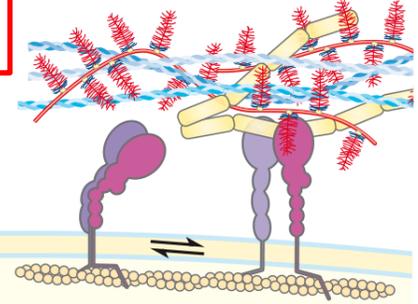
## 4. Canale ionico controllato

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



## 5. Recettore di adesione (integrina)

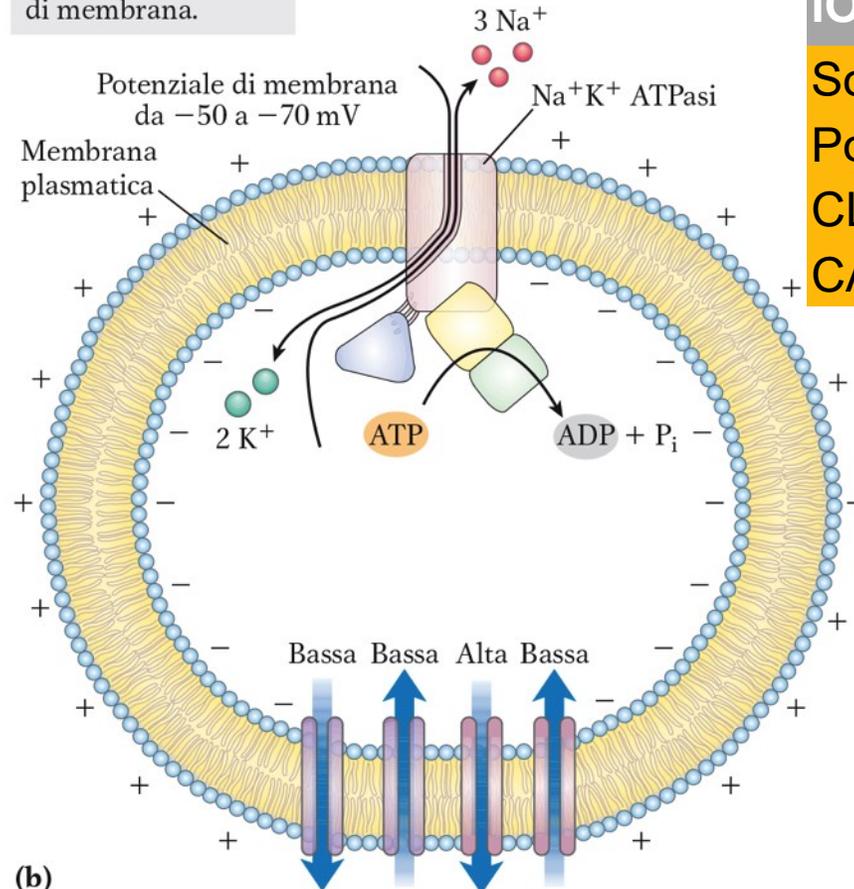
Legna molecole della matrice extracellulare, cambia la propria conformazione e altera l'interazione con il citoscheletro.



# Canali ionici controllati

(a)

La  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasi elettrogenica genera un potenziale di membrana.



(b)

Gli ioni tendono a muoversi attraverso una membrana polarizzata in favore del gradiente elettrochimico.

IONE	CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE	CONCENTRAZIONE EXTRACELLULARE
Sodio	15mM	145 mM
Potassio	150mM	4mM
CLORO	5mM	120 mM
CALCIO	10-7m	2mM

L'attivazione di canali ionici produce segnali elettrici cioè una variazione del potenziale di membrana

# I CANALI IONICI

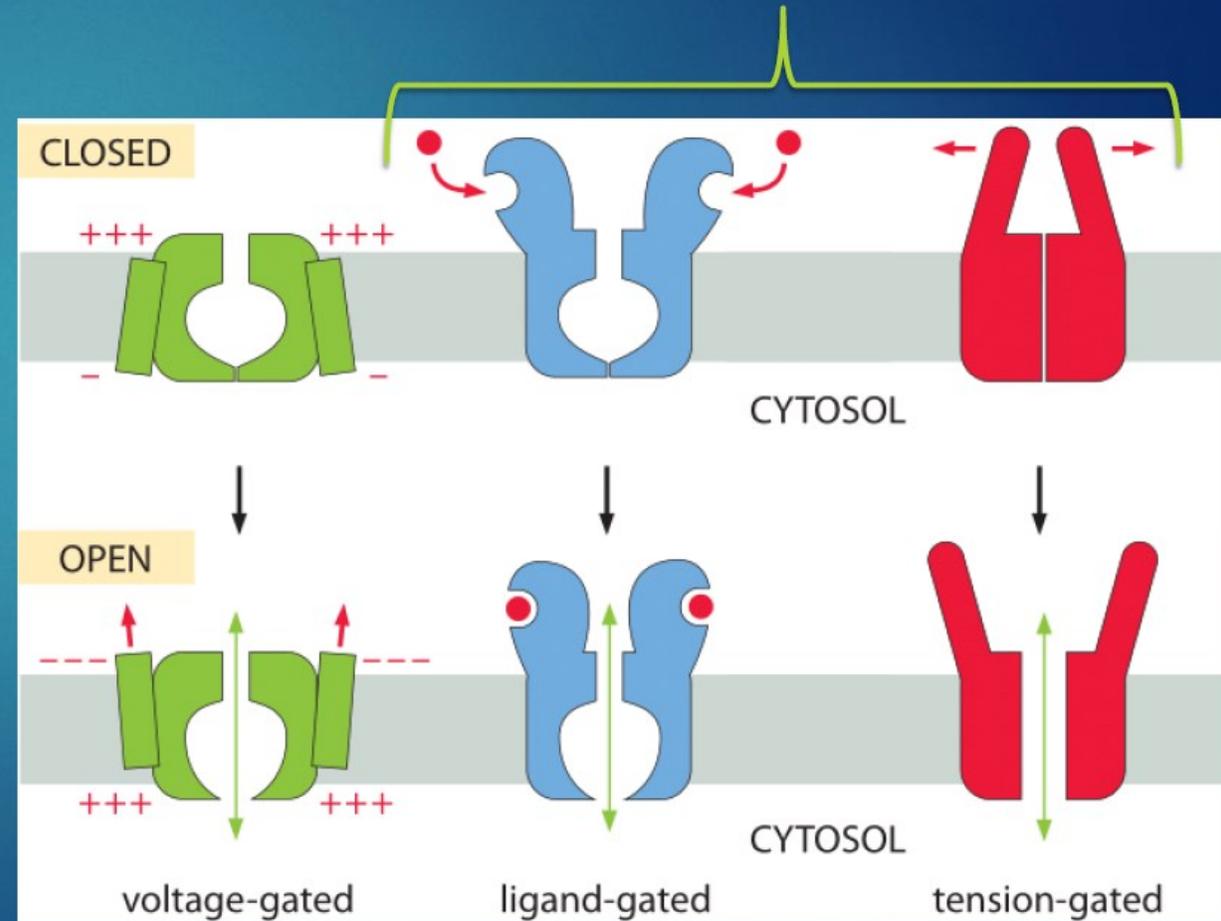
Poiché canali dedicati al passaggio dello stesso ione possono avere organizzazioni strutturali diverse, si preferisce di norma classificare i canali ionici in base alla modalità di regolazione della loro apertura.

Seguendo questi criteri i canali vengono raggruppati in **famiglie** di canali relativamente omogenei fra loro sia dal punto di vista funzionale che strutturale.

Possiamo avere:

- Canali regolati **dal potenziale di membrana**
- Canali regolati **da ligando**
- Canali regolati **da altre modalità (tensione meccanica)**

## RECETTORI IONOTROPI



# I RECETTORI-CANALE SONO SELETTIVI PER CARICA

In base alla carica che lasciano passare i recettori-canale si dividono in:

**1- cationici:** fanno passare ioni con **cariche positive** come sodio e Calcio; esempio recettori per

l'acetilcolina,  
il glutammato,  
le purine,  
la serotonina  
i nucleotidi ciclici

**2- anionici:** fanno passare ioni con **cariche negative** come cloro;  
Esempio recettore per

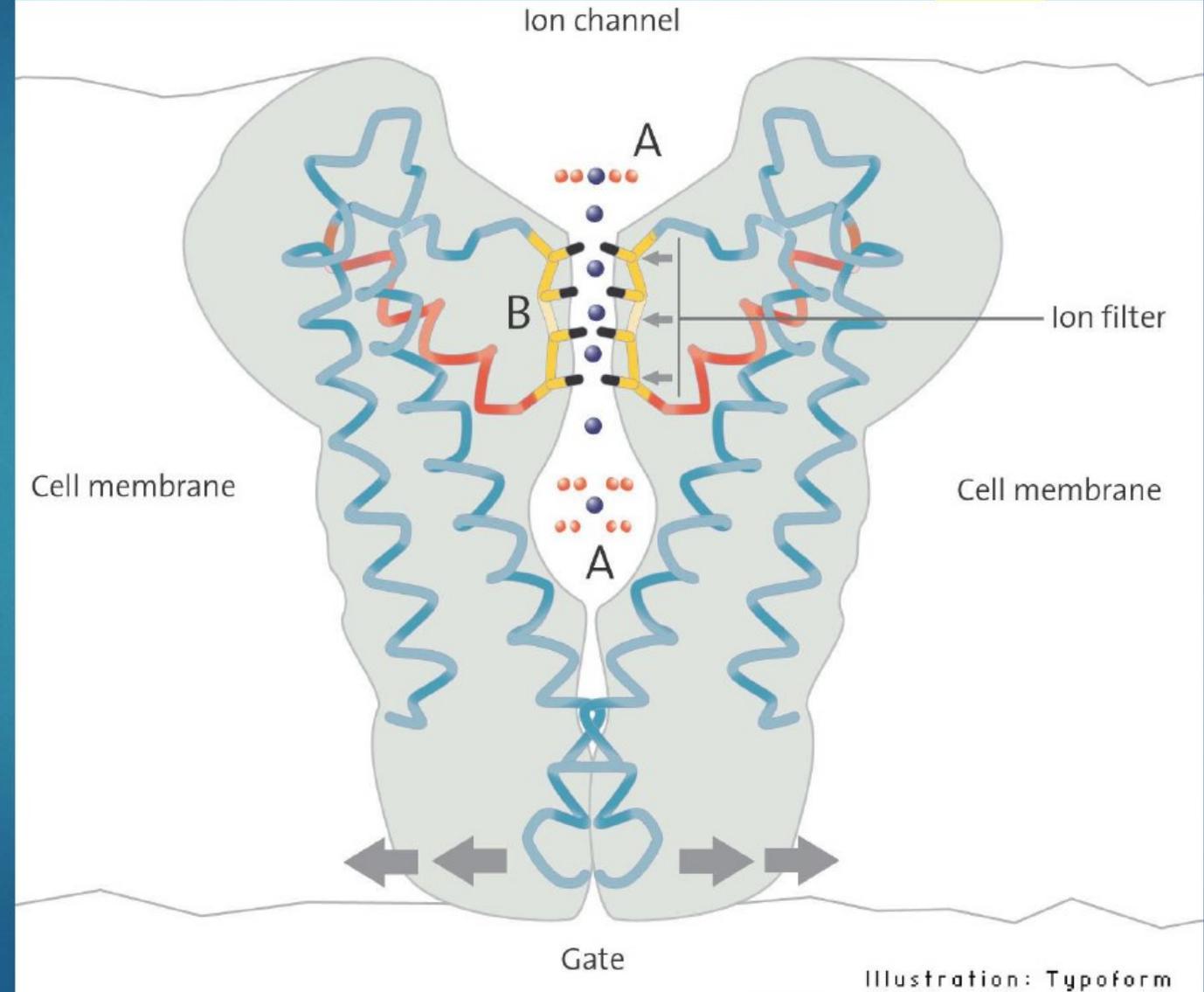
il GABA,  
la glicina

## I CANALI IONICI

Un'importante caratteristica dei canali ionici è la loro selettività per un dato ione o un dato tipo di ione (anioni, cationi).

Tale proprietà dipende dalle caratteristiche strutturali ed elettrostatiche del poro acquoso. Infatti l'imboccatura del canale è di norma dotata di un **filtro** (o **anello**) di **selettività**, composto da amminoacidi con carica elettrica positiva o negativa.

Altri fattori di selettività dipendono dalla dimensione e dalla struttura del poro acquoso, nonché nel meccanismo molecolare di trasferimento dello ione attraverso il poro (Ioni spogliati del guscio di idratazione)



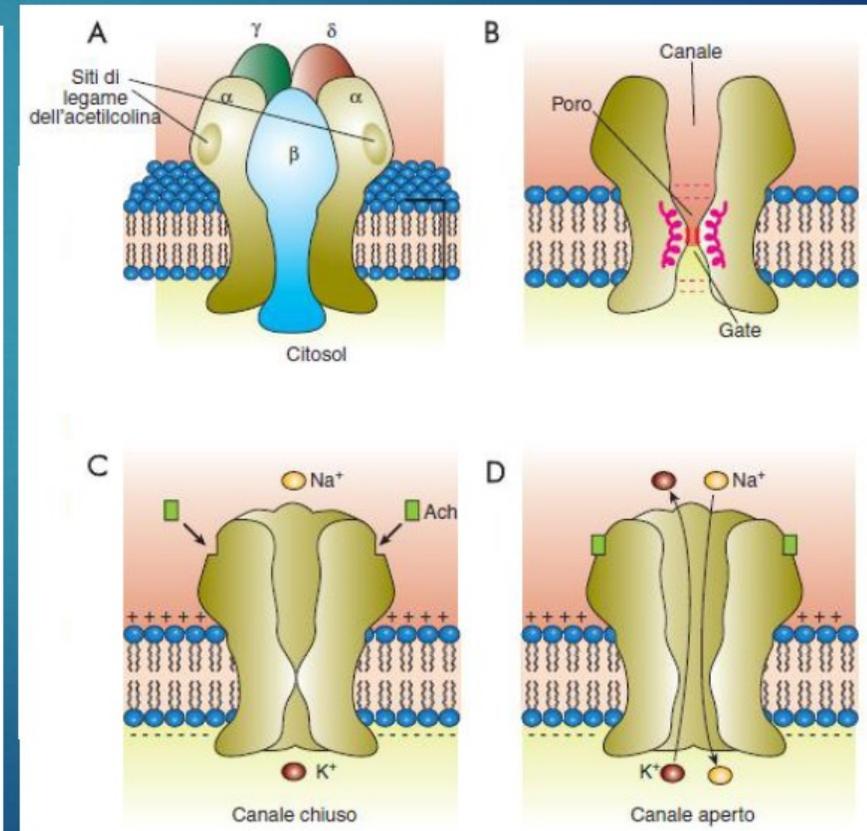
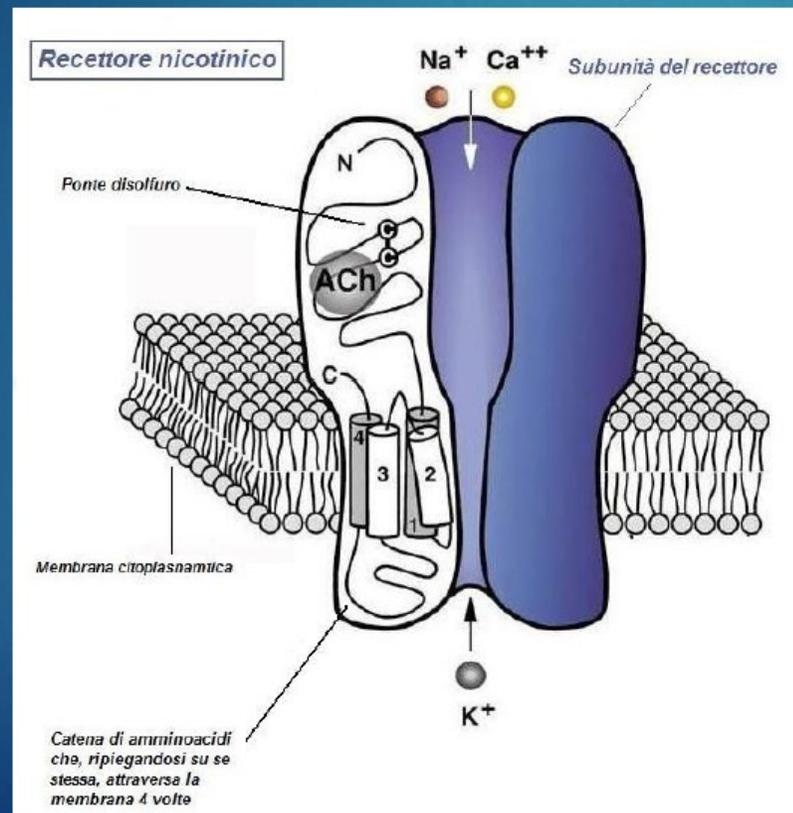
# Recettori ionotropici

- I recettori ionotropici presentano una grande variabilità strutturale
- Sono costituiti da 3 a 5 subunità e possono essere suddivisi in classi strutturali:
  1. Recettori ionotropici della superfamiglia dei recettori nicotinici
  2. Recettori ionotropici per il glutammato
  3. Recettori ionotropici per i nucleotidi ciclici
  4. Recettori ionotropici purinergici

Recettore nicotino dell'Acetilcolina

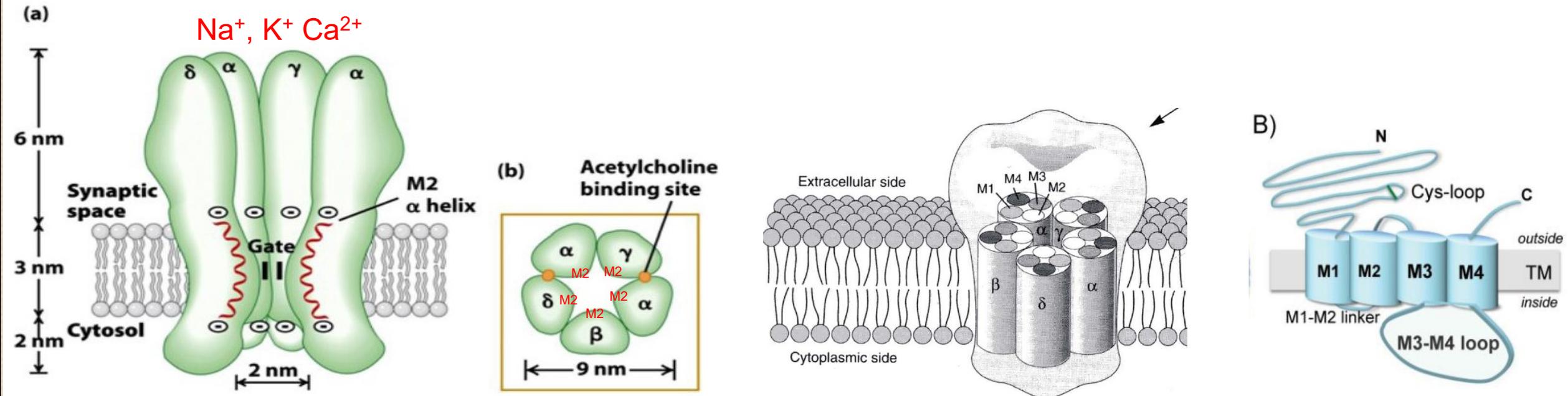
I recettori nicotinici dell'Acetilcolina (ACh), prendono il loro nome per via del loro potente agonista **nicotina**.

Essendo stati i primi recettori ionotropi ad essere studiati e classificati essi fungono da paradigma per tutti i recettori ionotropi pentamerici.



# Recettore-canale attivato da ligando (acetil colina)

Il recettore muscolare è costituito da 5 subunità ( $\alpha_2\beta\gamma\delta$ )  
Ciascuna con 4 eliche (M1-M4) transmembrana



Quando due molecole di acetilcolina si legano alla subunità alfa del recettore, si apre un canale ionico che permette il passaggio all'interno della cellula di ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  con conseguente depolarizzazione ed eccitazione cellulare.

## Recettore nicotino dell'Acetilcolina

La struttura e la funzionalità dei recettori per l'ACh sono diverse a seconda del tessuto in cui essi sono espressi.

È possibile infatti avere:

- Recettori muscolari (con sub-unità  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ed  $\epsilon$ )
- Recettori neuronali (con sub-unità  $\alpha$  e  $\beta$ )

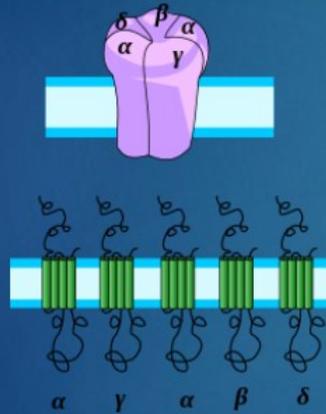
Tipo neuronale					Tipo muscolare
I	II	III			IV
$\alpha 9,$	$\alpha 7, \alpha 8$	1	2	3	$\alpha 1, \beta 1, \delta, \gamma, \epsilon$
		$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$	$\beta 2, \beta 4$	$\beta 3, \alpha 5$	

I sottotipi dei recettori nicotini.				
Sottotipi	Localizzazione sinaptica	Risposta fisiologica	Agonisti	Antagonisti
Muscolare ( $\alpha 1$ ) <sub>2</sub> $\beta 1 \delta \epsilon$	Giunzione neuro-muscolare: postsinaptico	Eccitatoria aumentano la permeabilità ai cationi ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )	ACh Carbacolo Suxametonio	Tubocurarina Pancuronio Esametonio $\alpha$ -Conotossina
Gangliare ( $\alpha 4$ ) <sub>2</sub> ( $\beta 4$ ) <sub>3</sub>	Gangli autonomi: postsinaptico	Eccitatoria	ACh Carbacolo Nicotina DMPP Epibatidina	Mecamilamina Trimetafano
Neuronale ( $\alpha 4$ ) <sub>2</sub> ( $\beta 2$ ) <sub>3</sub>	Cervello: pre e post-sinaptici	Eccitatoria – pre e post sinaptica, aumentano la permeabilità ai cationi ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ )	Nicotina Epibatidina ACh Citosina	Mecamilamina Metilaconitina $\alpha$ -Conotossina
( $\alpha 7$ ) <sub>5</sub>	Cervello: pre e post-sinaptici	$\text{Ca}^{2+}$	Epibatidina DMPP	Metilaconitina $\alpha$ -Bungarotossina

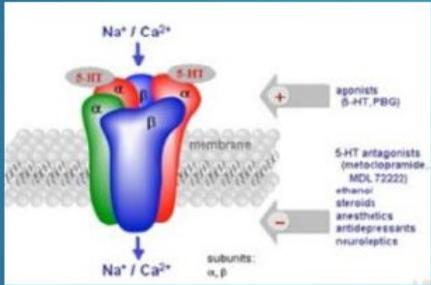
# Recettori ionotropi della superfamiglia dei recettori nicotinici

## Recettori nicotinici

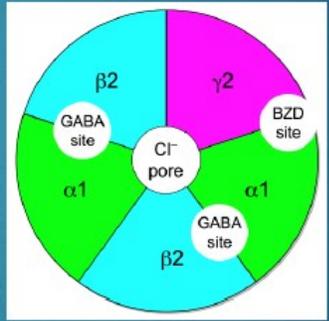
### Acetilcolina



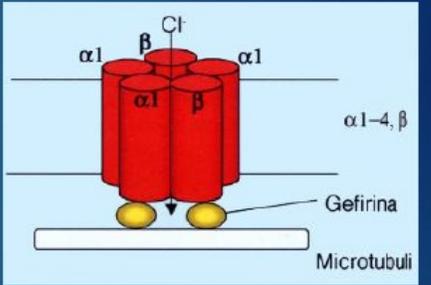
### Serotonina



### GABA



### Glicina



Eccitatori - depolarizzazione

Inibitori - iperpolarizzazione

## Recettore nicotinico della serotonina

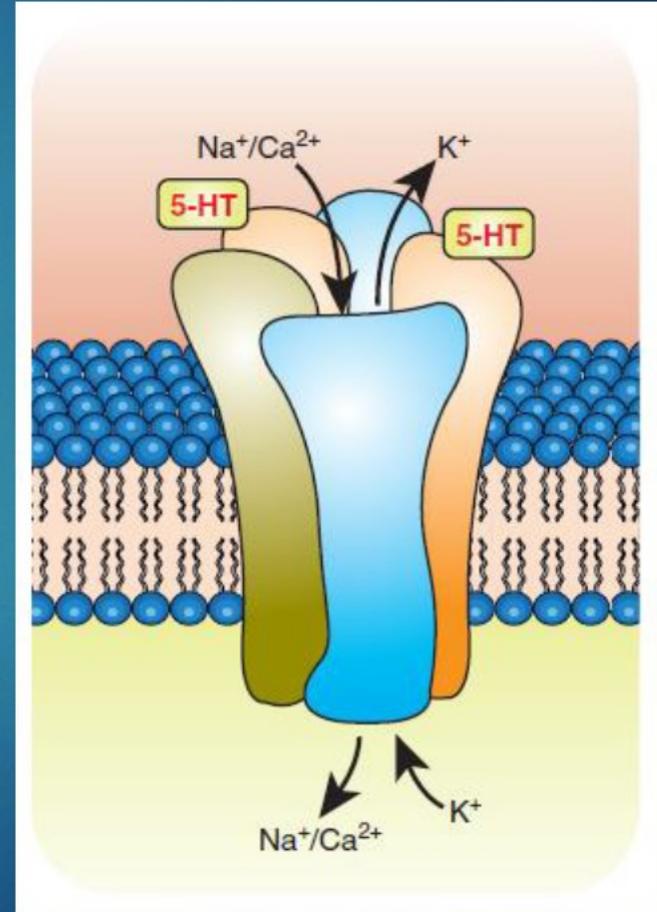
Il **recettore 5-HT<sub>3</sub>** è un recettore-canale attivato dal ligando serotonina (5-idrossitriptamina) che permette il flusso di Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>; ha una struttura di membrana simile a quella del recettore colinergico nicotinico, con 5 sub-unità chiamate 5-HT<sub>3a-e</sub>. La subunità 5-HT<sub>3a</sub> è portatrice del sito di legame con la serotonina ed è quindi presente in ogni recettore in combinazione con le altre subunità.

Il legame della serotonina su due siti recettoriali determina l'apertura di un canale permeabile ai cationi Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> con conseguente depolarizzazione desensibilizzante.

Questi recettori sono localizzati sulle terminazioni parasimpatiche nel tratto gastrointestinale e anche nelle afferenze vagali e splancniche.

Nel sistema nervoso centrale (SNC), invece, vi è una elevata densità di recettori 5-HT<sub>3</sub> nel nucleo del tratto solitario e nell'area postrema (dove c'è il centro del vomito), ma anche nel nucleus accumbens, amigdala, ippocampo, corteccia entorinale e frontale)

I recettori 5-HT<sub>3</sub> presenti nel canale gastroenterico e nel SNC sono coinvolti nella risposta emetica e costituiscono la base anatomica per le proprietà antiemetiche degli antagonisti recettoriali 5-HT<sub>3</sub>.

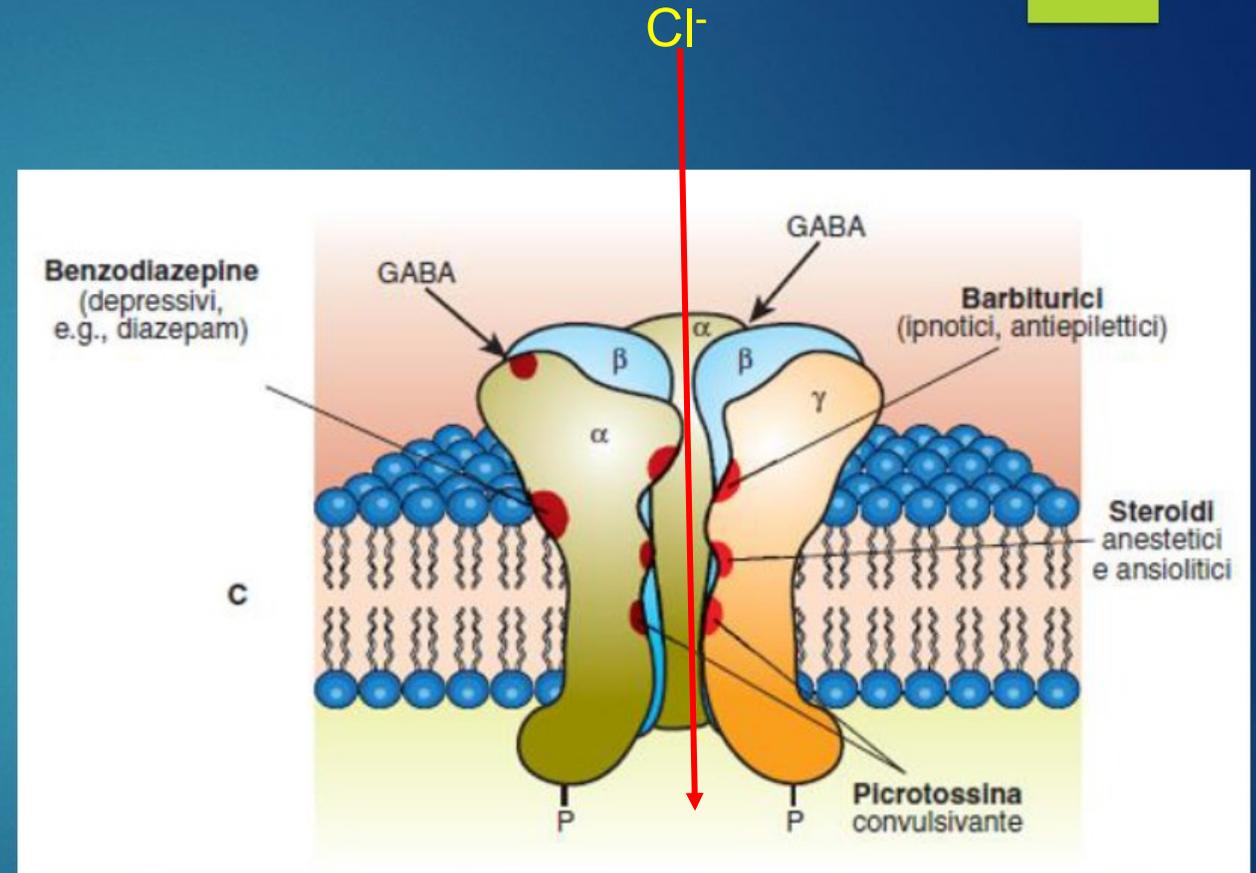


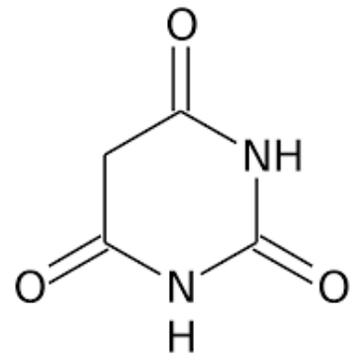
## Recettore nicotinico del GABA

Il GABA-A è il recettore per l'acido gamma-amminobutirrico (GABA) che è il più importante neurotrasmettitore inibitorio del cervello. Il GABA è agonista endogeno del recettore e si lega sul sito di legame, mediando una modificazione allosterica che fa aprire il canale per gli anioni, principalmente  $\text{Cl}^-$ .

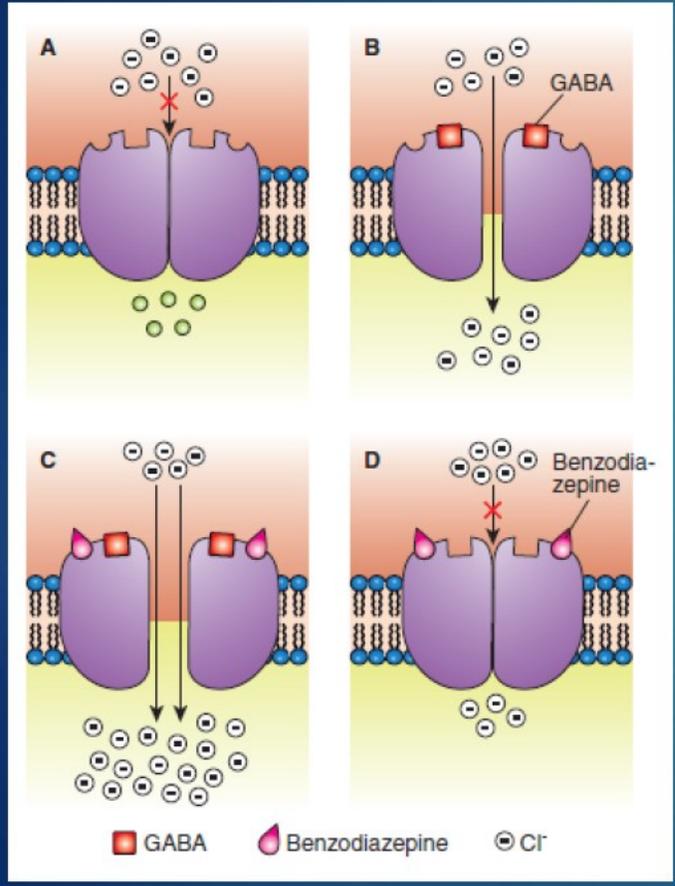
Il canale è formato da diverse subunità, leggermente diverse a seconda del distretto nervoso in cui si trova:

- 2 subunità  $\alpha$
- 2 subunità  $\beta$
- 1 subunità  $\gamma$





## Recettore nicotinico del GABA



Esistono molti agonisti ed antagonisti del recettore GABA<sub>A</sub>, che si legano alle diverse subunità su diversi siti di legame specifici, a loro dedicati, i più importanti comprendono:

- Benzodiazepine (ansiolitici)
- Barbiturici (sedativi, ipnotici)
- Steroidi (ormoni derivanti dal cortisolo)
- Etanolo (effetto simil-ansiolitico)
- Picrotossina (antagonista)

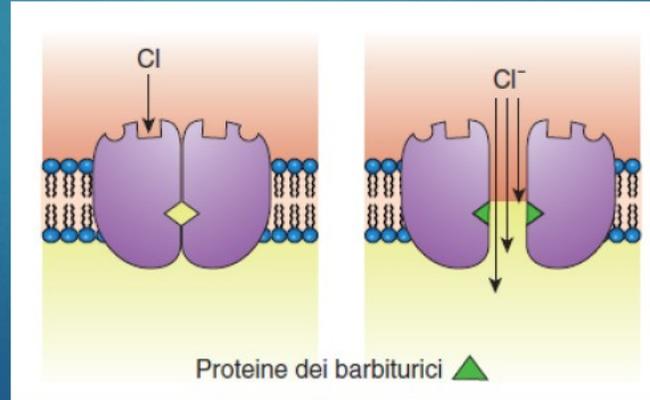


Fig. 5.21 - I barbiturici sono potenti agonisti del GABA<sub>A</sub>. Legandosi a un sito posto all'interno del canale, i barbiturici lo aprono, ad alte dosi, in modo permanente causando un continuo influsso di Cl<sup>-</sup>, indipendentemente dalla presenza di GABA sul sito di legame.

## Recettore nicotinico del GABA

Anche nel caso del GABA-A, le varie sub-unità possono presentare diverse isoforme.

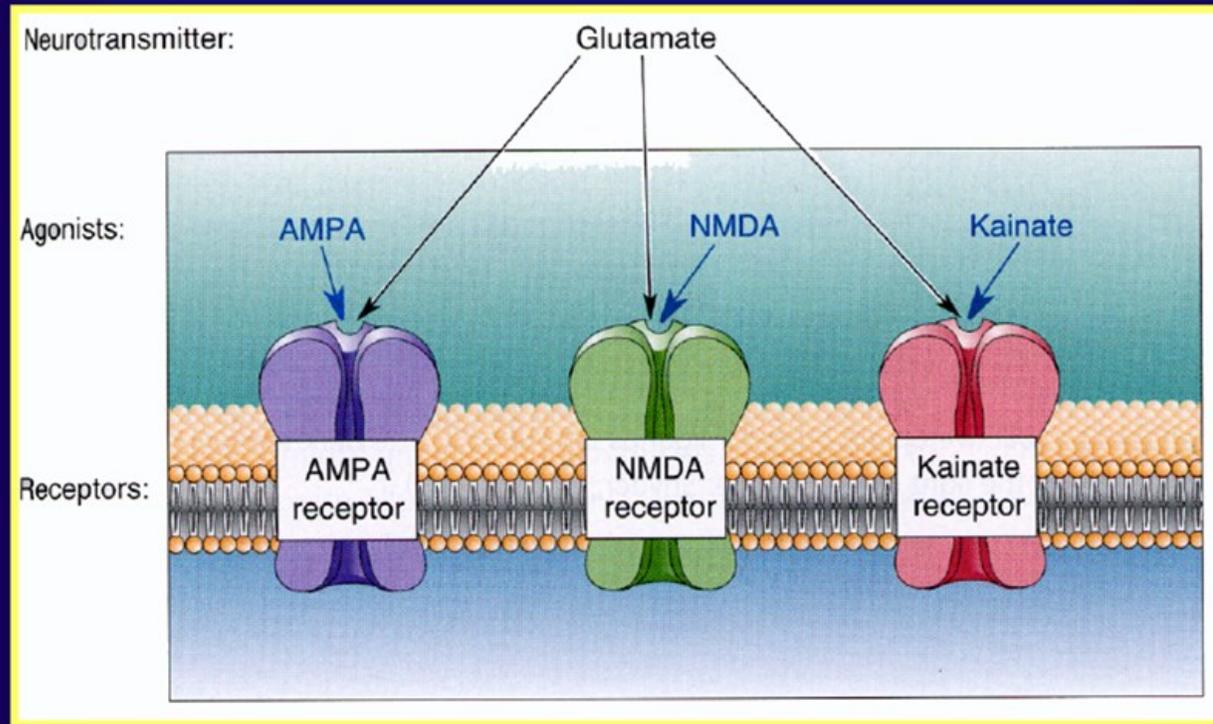
In particolare abbiamo 6 isoforme per l'unità alpha, 4 isoforme per la beta, e 4 isoforme per la gamma.

Queste isoforme si combinano fra loro in modo vario dando origine ad un ampio repertorio di sottotipi recettoriali espressi in modo specifico nei vari distretti del SNC

Tab. 5.2 - I principali sottotipi dei recettori GABA<sub>A</sub> nel cervello del ratto

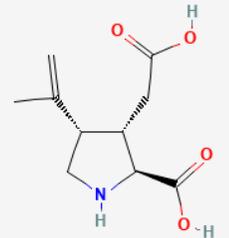
Sottotipo recettoriale	Abbondanza relativa nel cervello del ratto (%)	Localizzazione
$\alpha_1\beta_2\gamma_3$	43	Pressoché ubiquitario. In particolare abbondante negli interneuroni dell'ippocampo e della corteccia e nelle cellule di Purkinje del cervelletto
$\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$	18	Motoneuroni del midollo spinale e cellule piramidali dell'ippocampo
$\alpha_3\beta_n\gamma_2/\gamma_3$	17	Neuroni colinergici e monoaminergici, ove regola il turnover dell'Acetilcolina e delle monoammine
$\alpha_2\beta_n\gamma_1$	8	Glia di Bergmann e nuclei del sistema limbico
$\alpha_5\beta_3\gamma_2/\gamma_3$	4	Cellule piramidali dell'ippocampo
$\alpha_6\beta\gamma_2$	2	Neuroni granulari del cervelletto
$\alpha_6\beta\delta$	2	Neuroni granulari del cervelletto; insensibile alle benzodiazepine
$\alpha_4\beta\delta$	3	Talamo e giro dentato dell'ippocampo; insensibile alle benzodiazepine
Altri sottotipi minori	3	Intero cervello

## RECETTORI IONOTROPI PER IL GLUTAMMATO



AMPA: acido  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico

NMDA: N-metil-D-aspartato



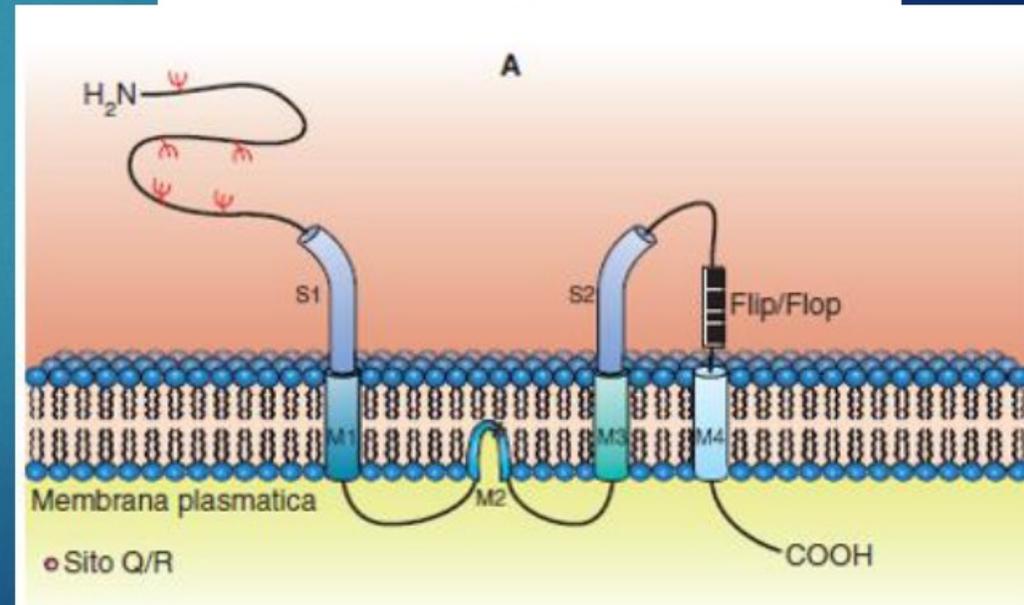
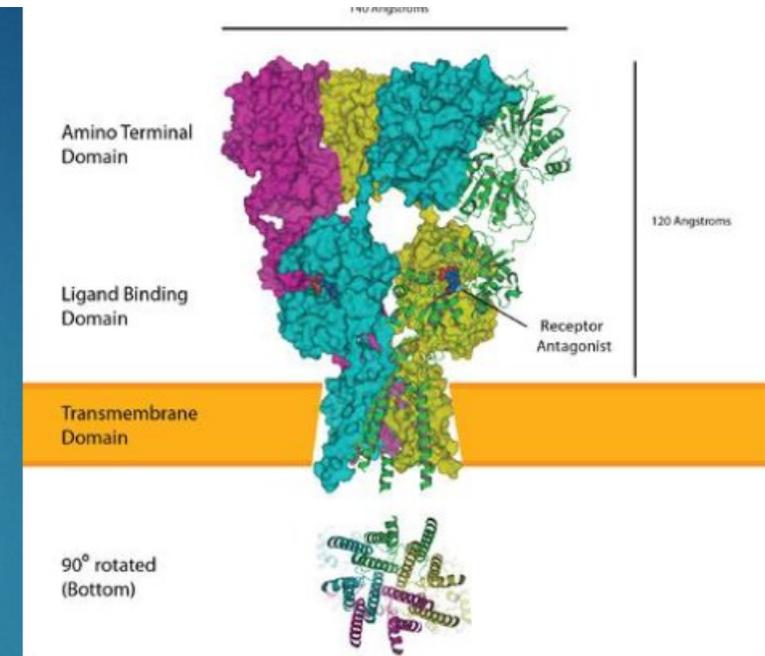
La loro importanza deriva dal fatto che il glutammato è il neurotrasmettente in assoluto più presente nel cervello e costituisce il principale agente della neurotrasmissione eccitatoria.

Questi recettori mediano importanti funzioni come la plasticità sinaptica (apprendimento e memoria), ma se stimolati eccessivamente (ictus, epilessia) possono dare il via a processi di neurotossicità che porta alla morte cellulare. Per tale motivo è possibile che questi recettori abbiano un ruolo alla base delle malattie neurodegenerative.

## Recettori ionotropi del glutammato

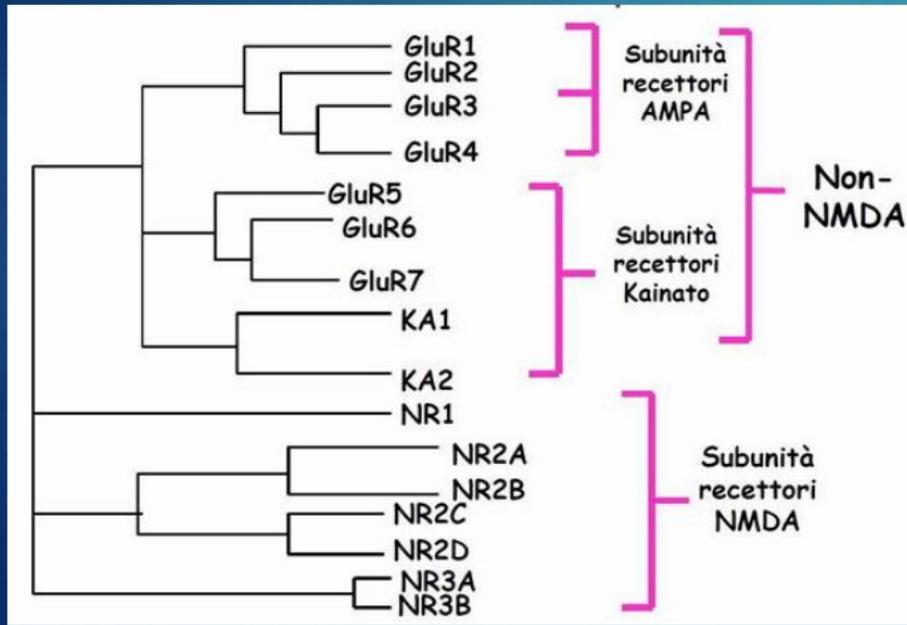
Dal punto di vista strutturale, questi recettori sono composti da 4 o 5 sub-unità principali, caratterizzate da una comune organizzazione di base della catena polipeptidica, con l'estremità N-terminale in ambiente extracellulare e l'estremità C-terminale in ambiente intra-cellulare.

Ogni subunità contiene sempre 3 regioni trans-membrana (M1, M3 ed M4) ed un ansa (M2) situata nel versante intracellulare il cui scopo è controllare la permeabilità del poro acquoso.



## Recettori ionotropi del glutammato

La specificità e l'importanza di questi recettori è indirettamente confermata dalla molteplicità dei tipi di sub-unità che li compongono. Queste sub-unità possono essere divise in gruppi sulla base delle somiglianze nelle loro sequenze amminoacidiche



Tab. 5.3 - Le subunità dei recettori del glutammato nell'uomo

Gruppo	Recettore	Subunità	Gene	Localizzazione cromosomica
1	AMPA	GluR1	GRIA1	5q33
1	AMPA	GluR2	GRIA2	4q32-33
1	AMPA	GluR3	GRIA3	Xq25-26
1	AMPA	GluR4	GRIA4	11q22-23
2	Kainato	GluR5	GRIK1	21q21.1-22.1
2	Kainato	GluR6	GRIK2	6q16.3-q21
2	Kainato	GluR7	GRIK3	1p34-p33
3	Kainato	KA-1	GRIK4	11q22.3
3	Kainato	KA-2	GRIK5	19q13.2
4	NMDA	NR1	GRIN1	9q34.3
5	NMDA	NR2A	GRIN2A	16p13.2
5	NMDA	NR2B	GRIN2B	12p12
5	NMDA	NR2C	GRIN2C	17q24-q25
5	NMDA	NR2D	GRIN2D	19q13.1qter
6	NMDA	NR3A	GRIN3A	9q34
6	NMDA	NR3B	GRIN3B	19p13.3

## Recettori ionotropi del glutammato

### Recettori del glutammato

AMPA

GluR1  
GluR3  
GluR3  
GluR4

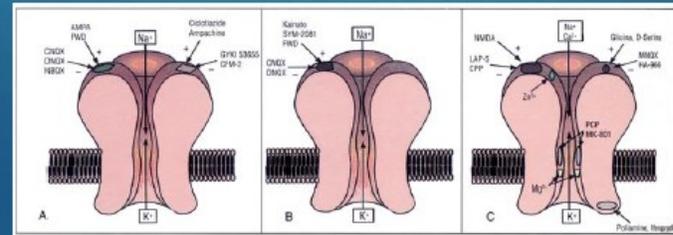
Kainato

KA1, 2  
GluR5  
GluR6  
GluR7

NMDA

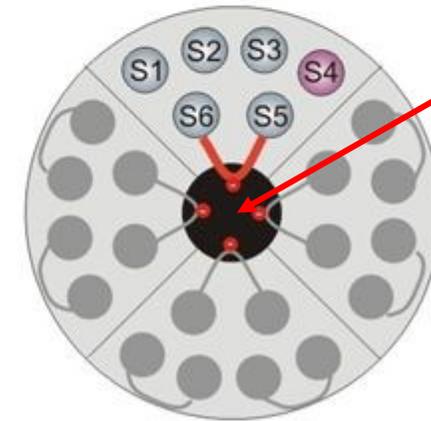
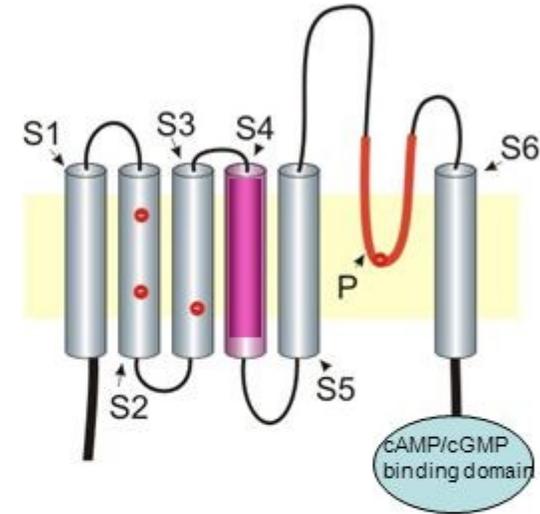
NR1  
NR2A,B  
C,D  
NR3A,B

Eccitatori - depolarizzazione



# I canali CNG

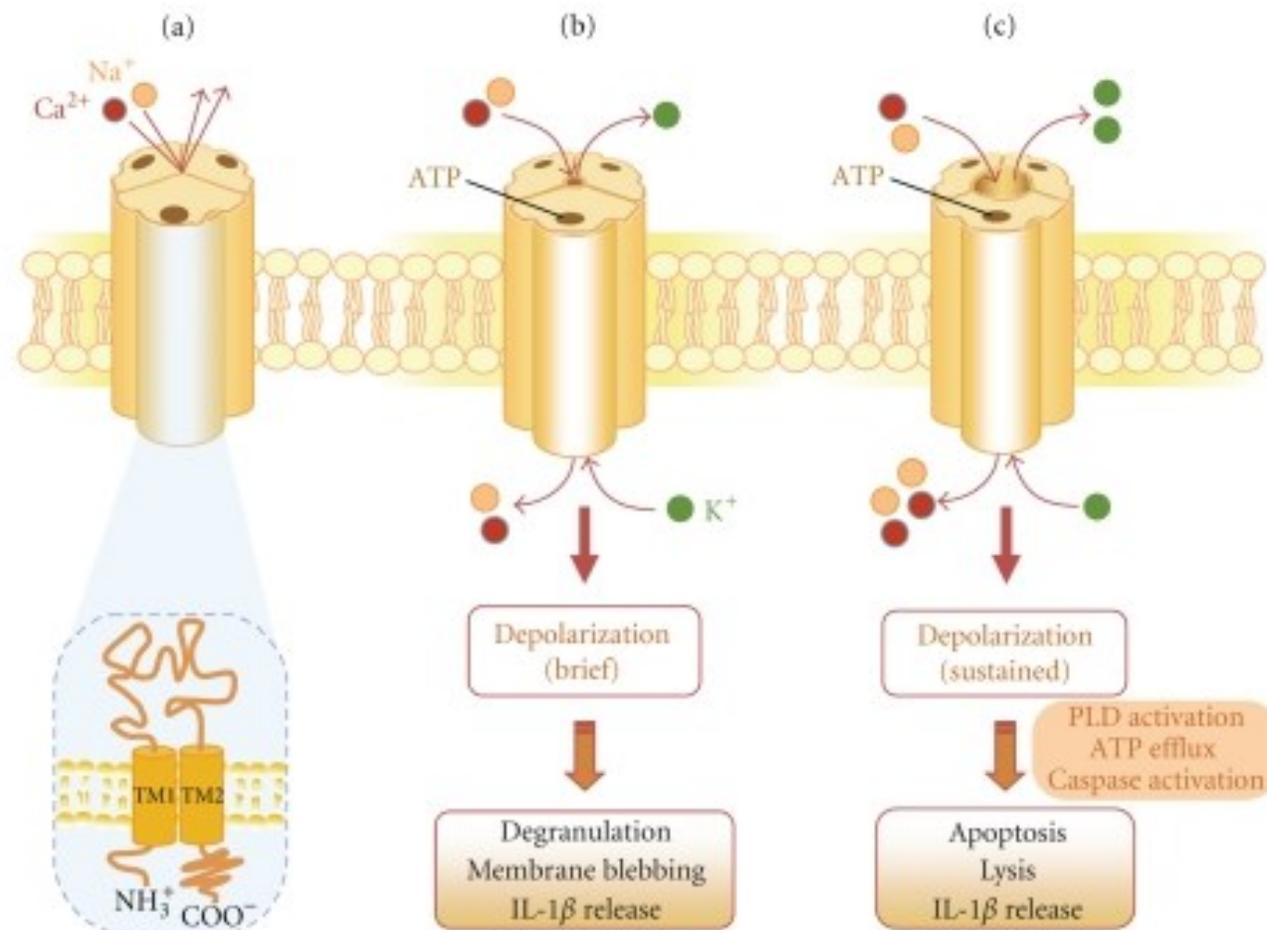
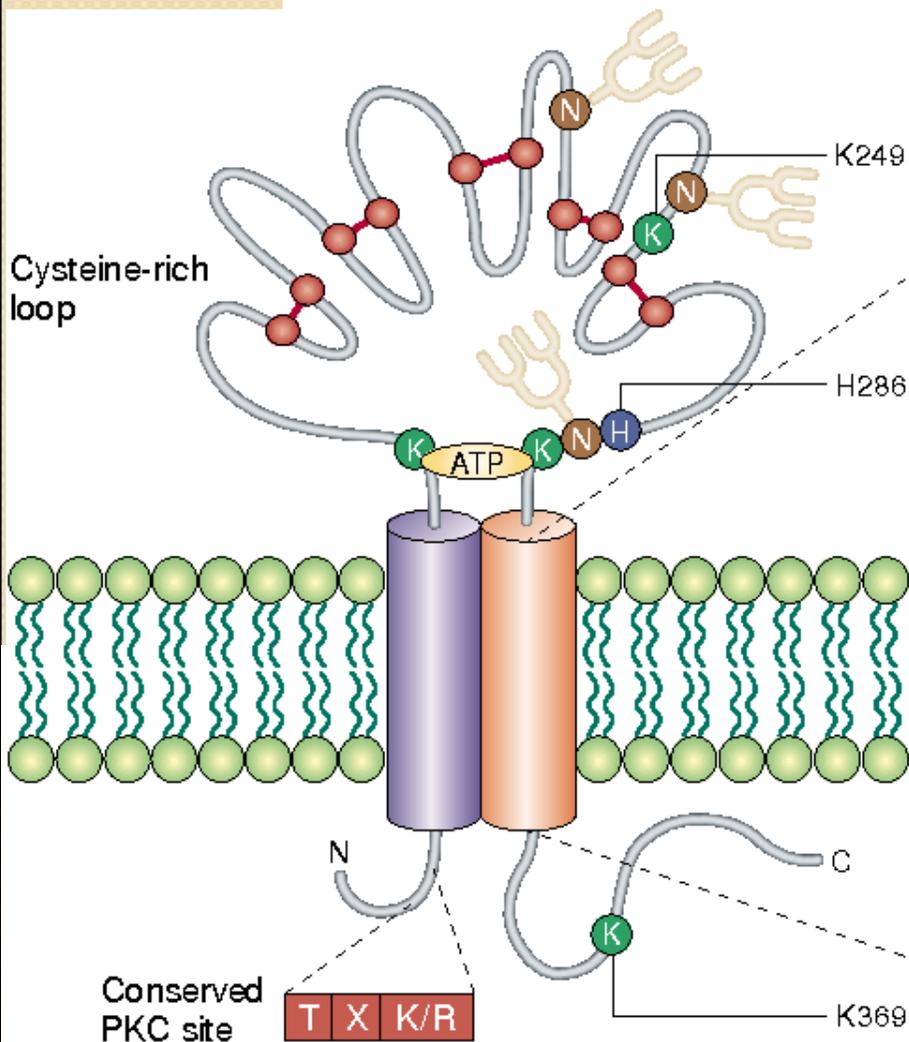
- Struttura omologa ai canali voltaggio-dipendenti per il K
- Tetramero, 6 eliche transmembrana, 1 regione P tra S5 e S6
- Differenze significative:
  - Poro senza filtro di selettività per il K
  - S4 senza cariche sensore del voltaggio
  - Dominio C-terminale per legame nucleotidi ciclici (cAMP, cGMP)
- Due sottofamiglie: alfa (CNGA1-4) e beta (CNGB1,3)



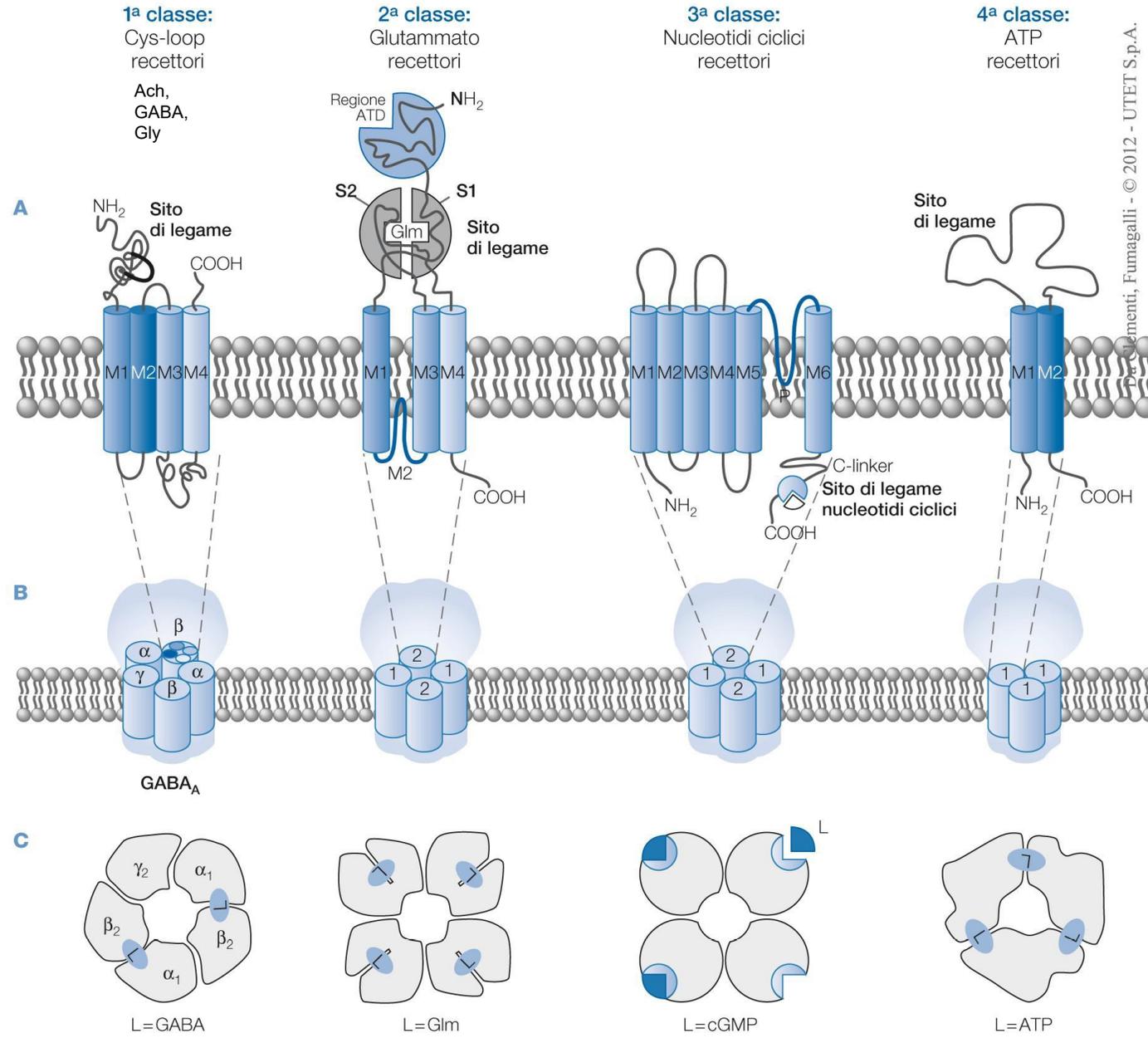
vista dall'alto

# Recettori ionotropi per ATP

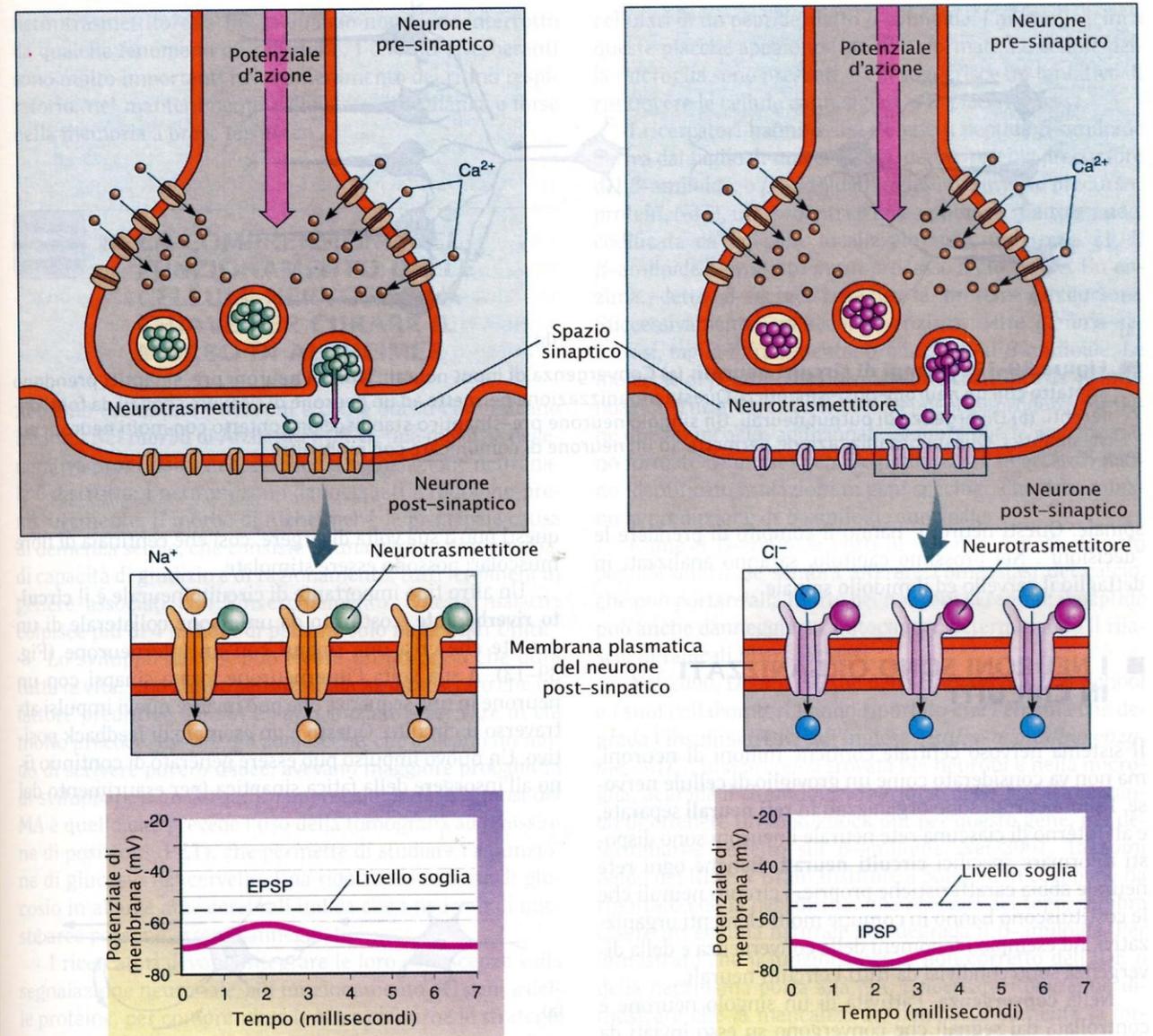
Omotrimeri di 7 differenti subunità (P2X1-7) formati da due segmenti transmembrana. Poro selettivo ai cationi (calcio +/- sodio)



# Struttura molecolare dei recettori-canale



A seconda della carica permeante, la stimolazione recettoriale può portare a depolarizzazione o iperpolarizzazione



(a) Input eccitatorio

(b) Input inibitorio

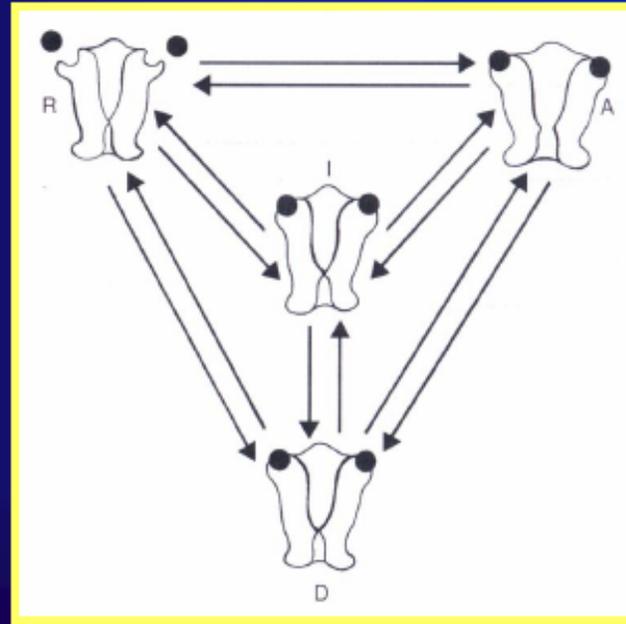
■ **Figura 39-11 Confronto tra (a) un potenziale post-sinaptico eccitatorio (EPSP) e (b) un potenziale post-sinaptico inibitorio (IPSP).** Da notare che un neurotrasmettitore, che apre i canali per il  $Na^+$  genera EPSP. Questo porta alla genesi di un potenziale d'azione. Un neurotrasmettitore che apre i canali per il  $Cl^-$  genera IPSP e in questo modo iperpolarizza la membrana.

## DESENSITIZZAZIONE DEI RECETTORI CANALE

Per questa superfamiglia di recettori la desensitizzazione equivale a una riduzione della capacità di andare incontro alle modificazioni conformazionali necessarie per produrre l'apertura del canale ionico.

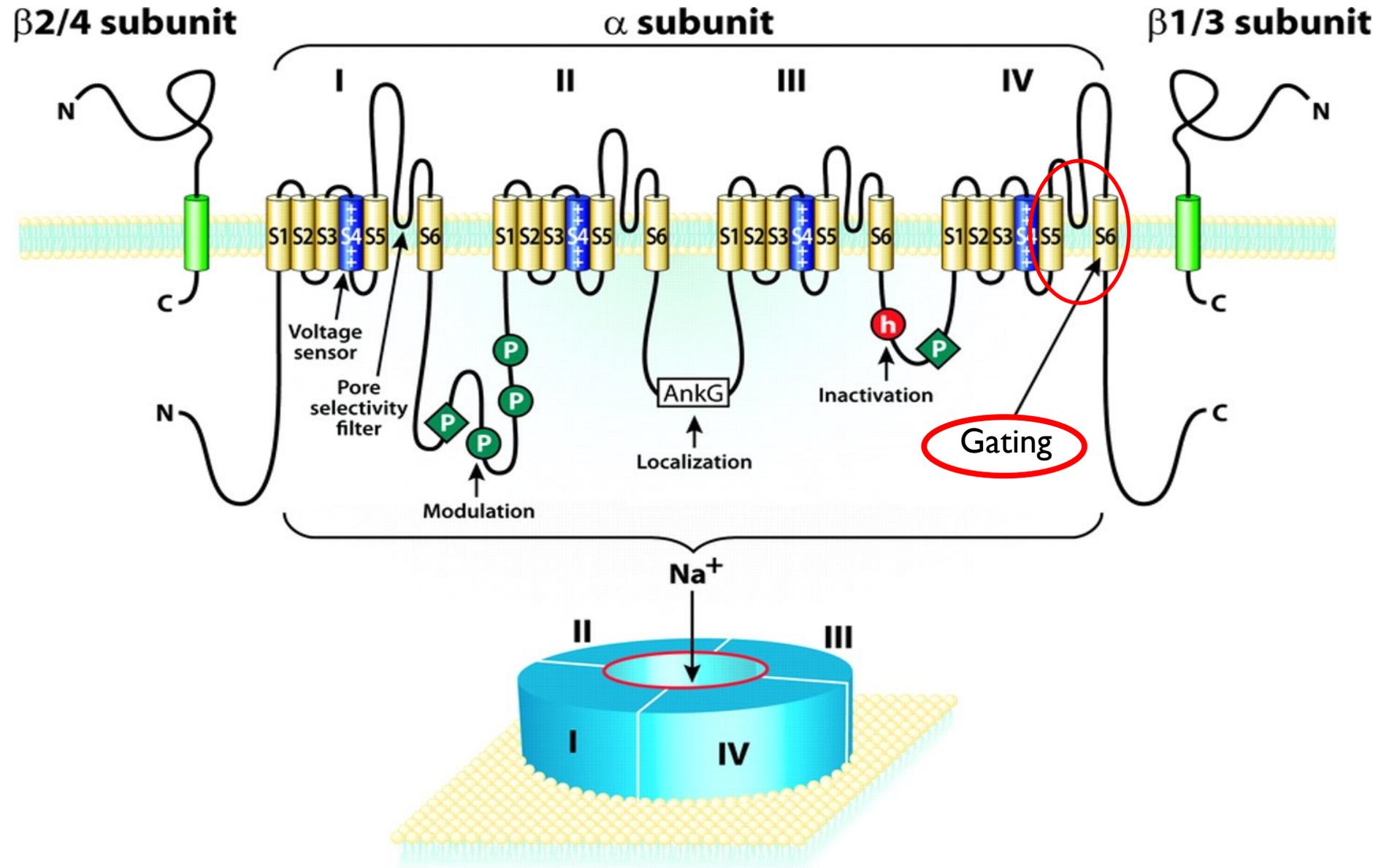
Applicazione AGONISTI e loro legame al recettore:

- 1) dopo pochi msec apertura del canale e flusso ionico (A)
- 2) successivamente transizione del R nello stato desensitizzato: il canale rimane chiuso nonostante l'affinità per l'agonista aumenti notevolmente (I e D)

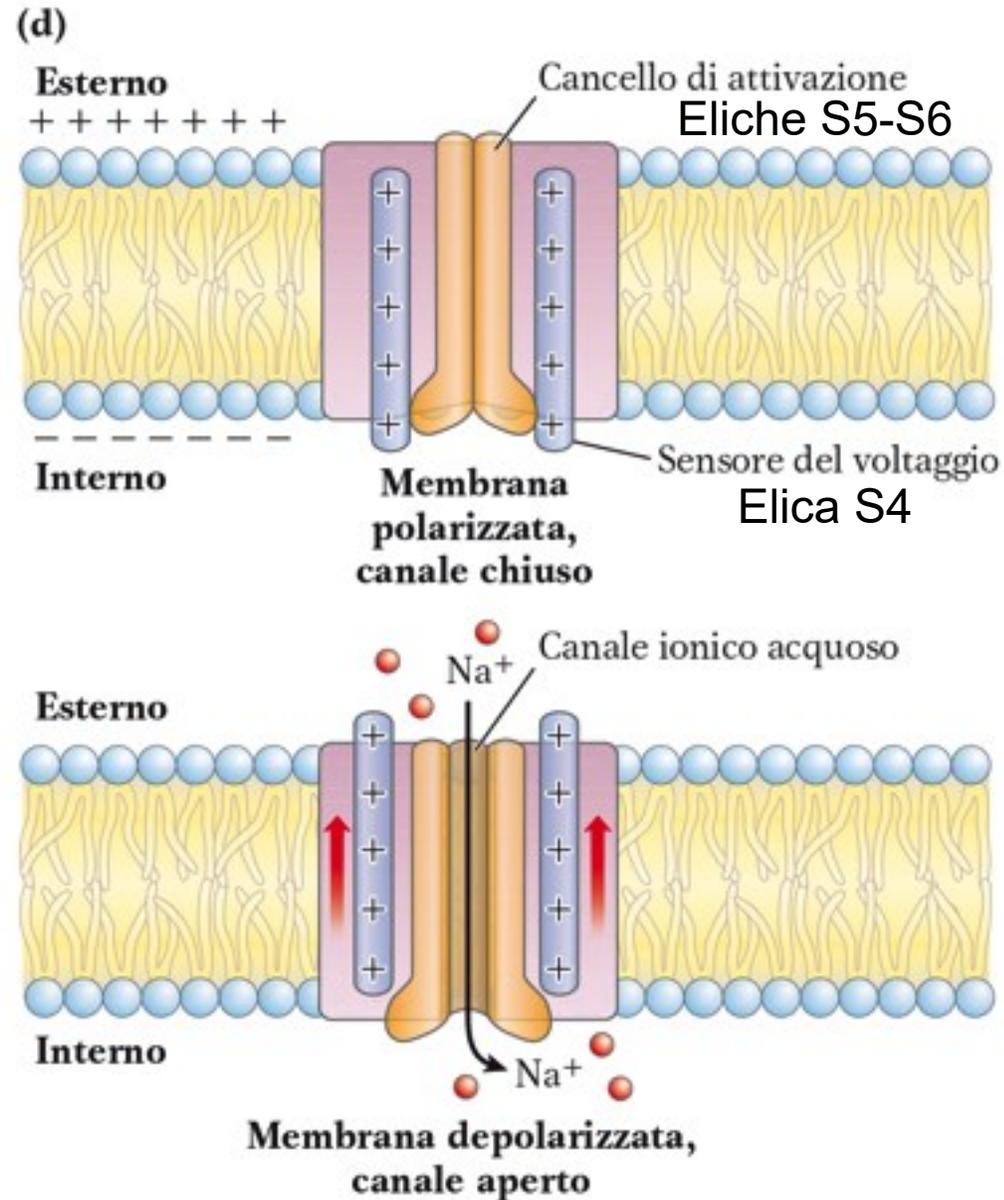


R= a riposo;  
A= stato attivo;  
I= componente rapida della desensitizzazione (stato desensitizzato);  
D= componente lenta della desensitizzazione (stato refrattario)

# Canale del Na<sup>+</sup> **v**oltaggio dipendente

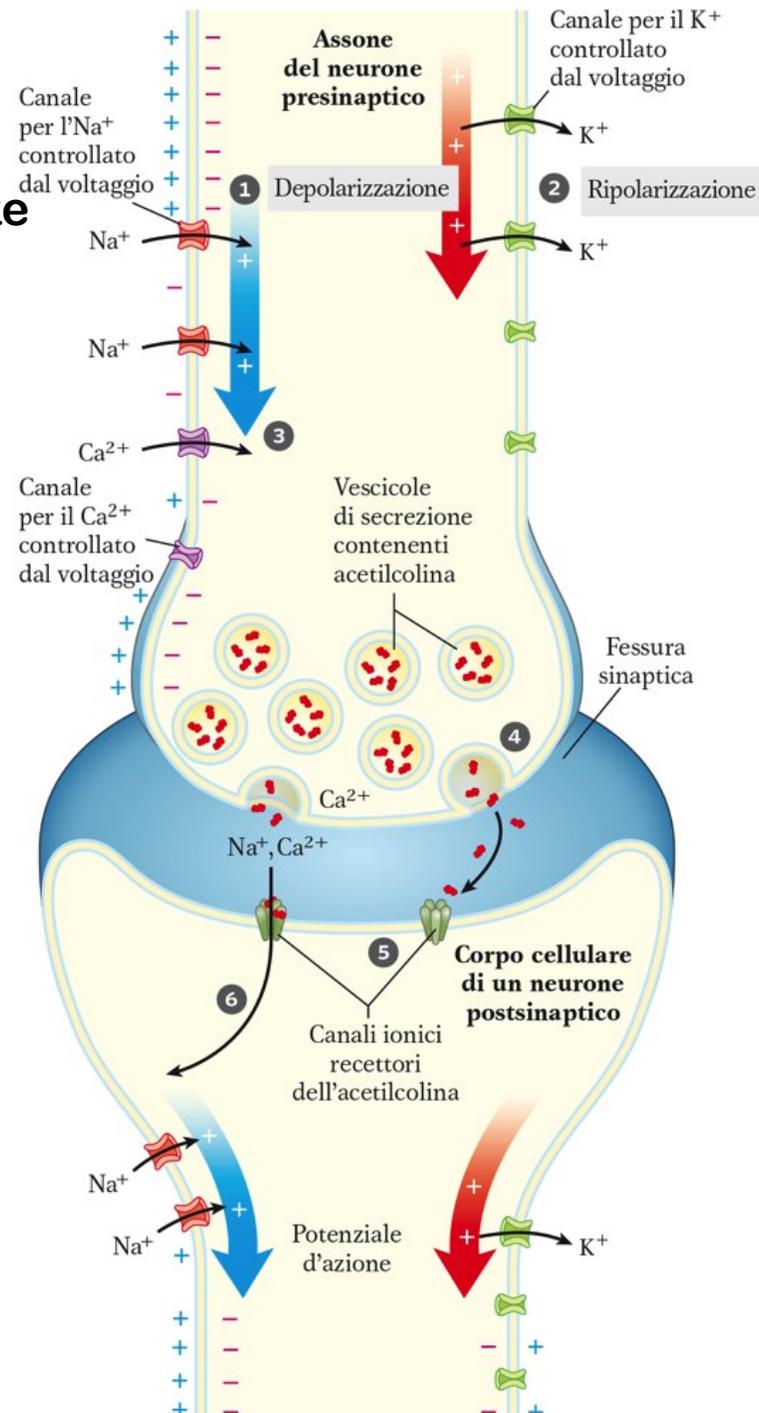


# Canale del $\text{Na}^+$ voltaggio dipendente

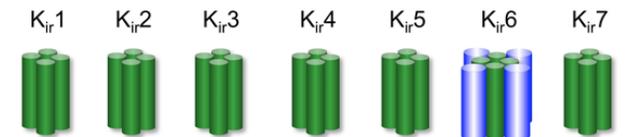
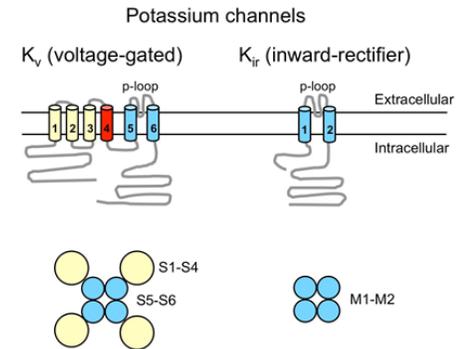


Si aprono quando la membrana si depolarizza localmente in risposta ad uno stimolo (neurotrasmettitore)

I canali per il  $\text{Na}^+$  hanno un periodo refrattario che assicura la trasmissione unidirezionale dell'impulso elettrico



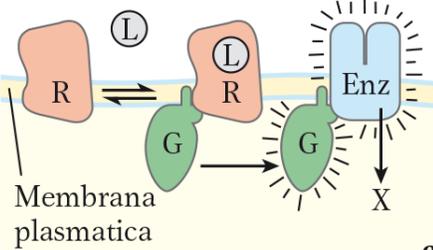
I canali  $\text{K}^+$  si aprono una frazione di secondo dopo i canali per il  $\text{Na}^+$  e contribuiscono a ripolarizzare la membrana



# Principali tipi di recettori/trasduttori di segnale

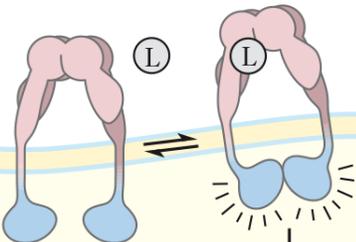
## 1. Recettori accoppiati alle proteine G

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).

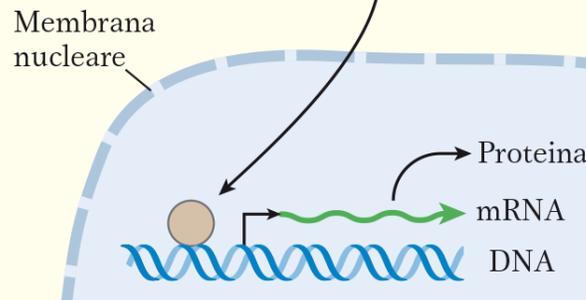


## 2a. Recettore con attività tirosina chinasi

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

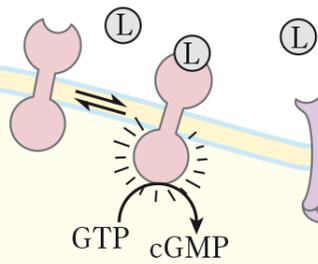


2b. La chinasi attiva un fattore di trascrizione, alterando l'espressione genica.



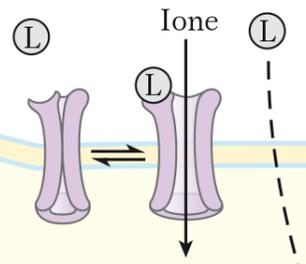
## 3. Recettore con attività guanilil ciclasica

Il legame del ligando al dominio extracellulare stimola la formazione del secondo messaggero, il GMP ciclico (cGMP).



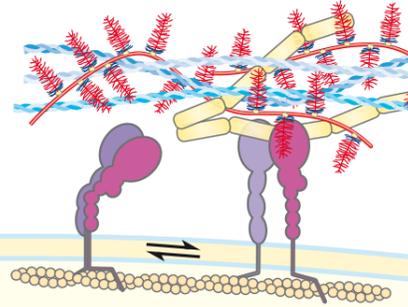
## 4. Canale ionico controllato

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



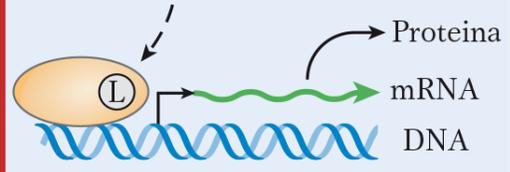
## 5. Recettore di adesione (integrina)

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



## 6. Recettore nucleare

Il legame dell'ormone permette al recettore di regolare l'espressione di geni specifici.



# GPCRs classification

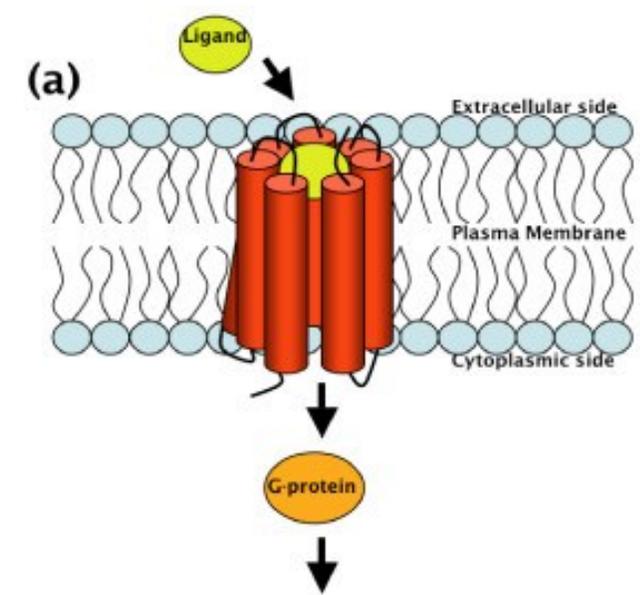
based on  
sequence homology

based on  
phylogenetic origin

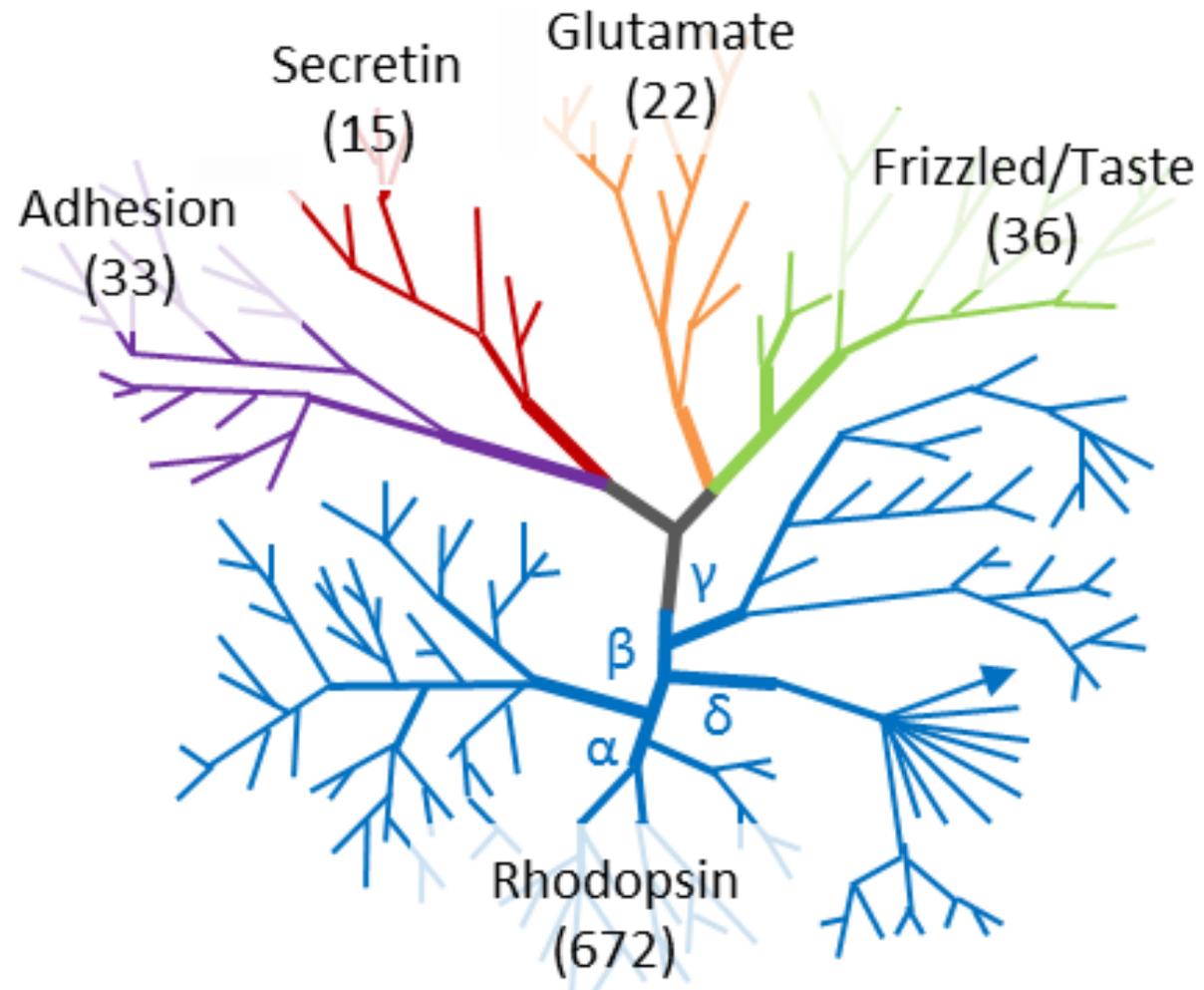
%	
85.5	<b>Class A (or 1)</b> Rhodopsin-like
7	<b>Class B (or 2)</b> Secretin-like
3.81	<b>Class C (or 3)</b> Metabotropic/Glutamate
0.45	<b>Class D (or 4)</b> Fungal mating receptors
0.38	<b>Class E (or 5)</b> Cyclic nucleotide receptors
2.84	<b>Class F (or 6)</b> Frizzled/smoothened

G  
R  
A  
F  
S  
  
S  
Y  
S  
T  
E  
M

<b>Glutamate</b> (22 members)
<b>Rhodopsin</b> (701 members)
<b>Adhesion</b> (33 members)
<b>Frizzled/Taste 2</b> (11 members)
<b>Secretin</b> (15 members)

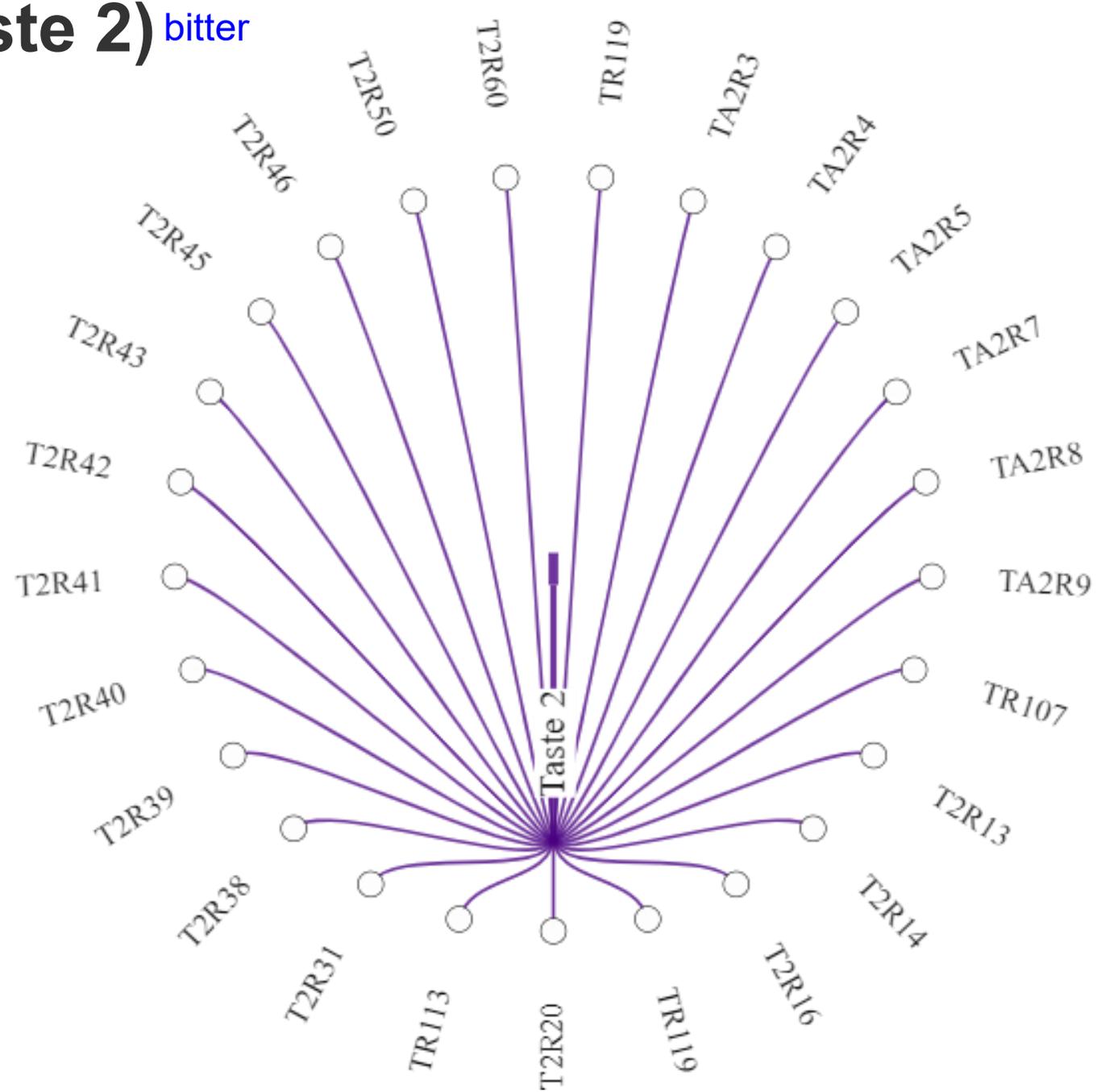


# La superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR)



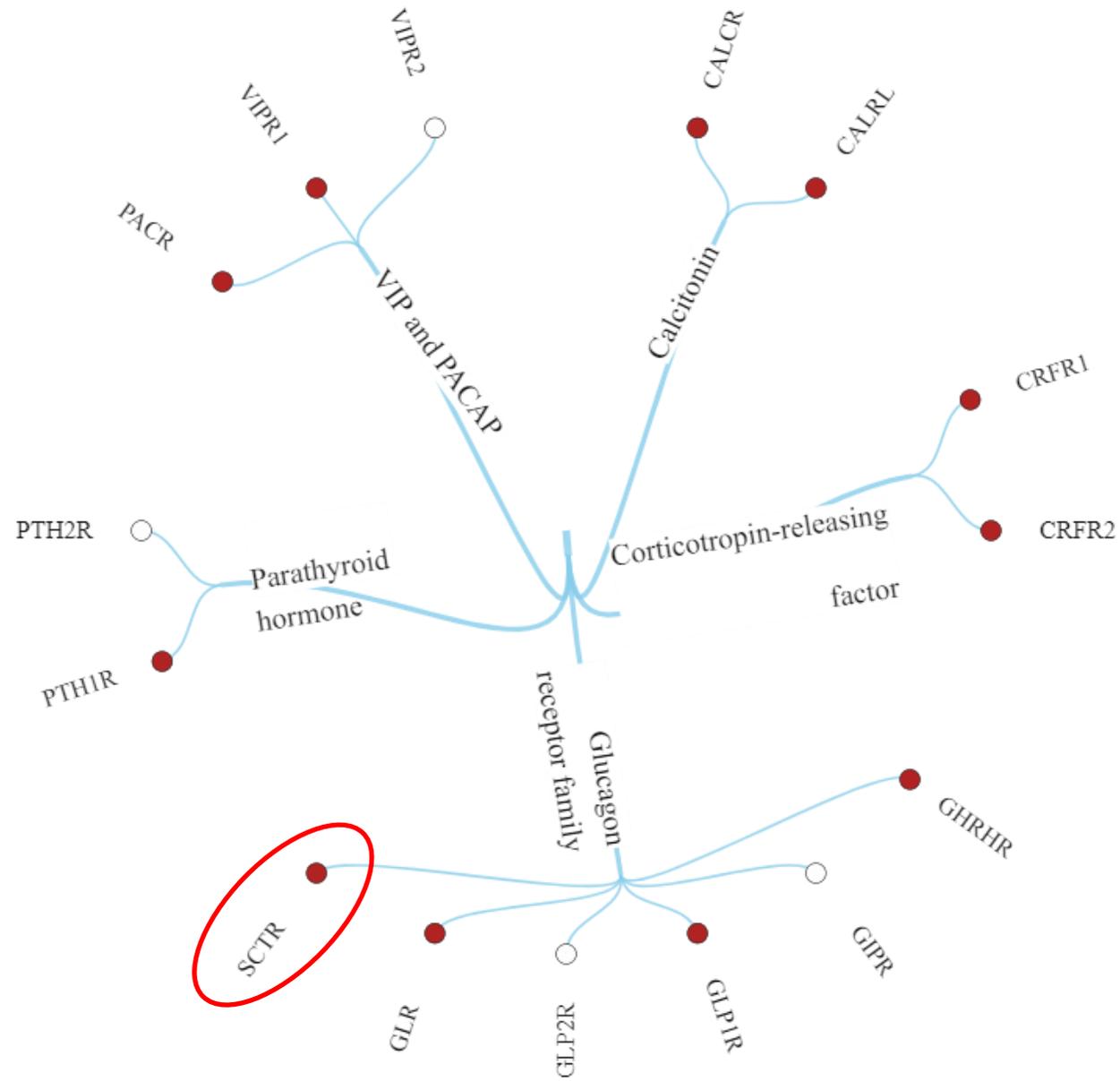


# Class T (Taste 2) <sup>bitter</sup>

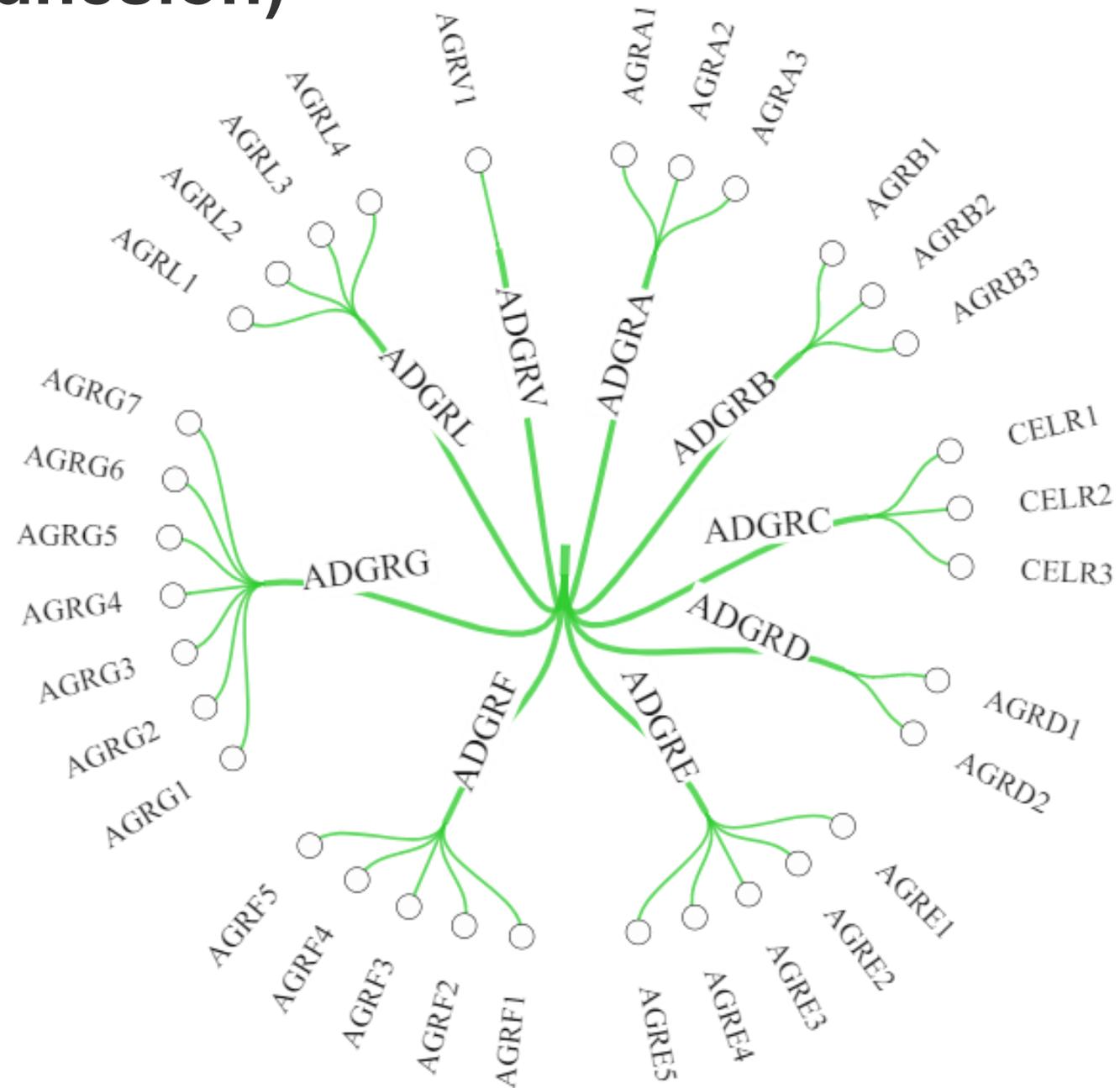


# Class B1 (Secretin)

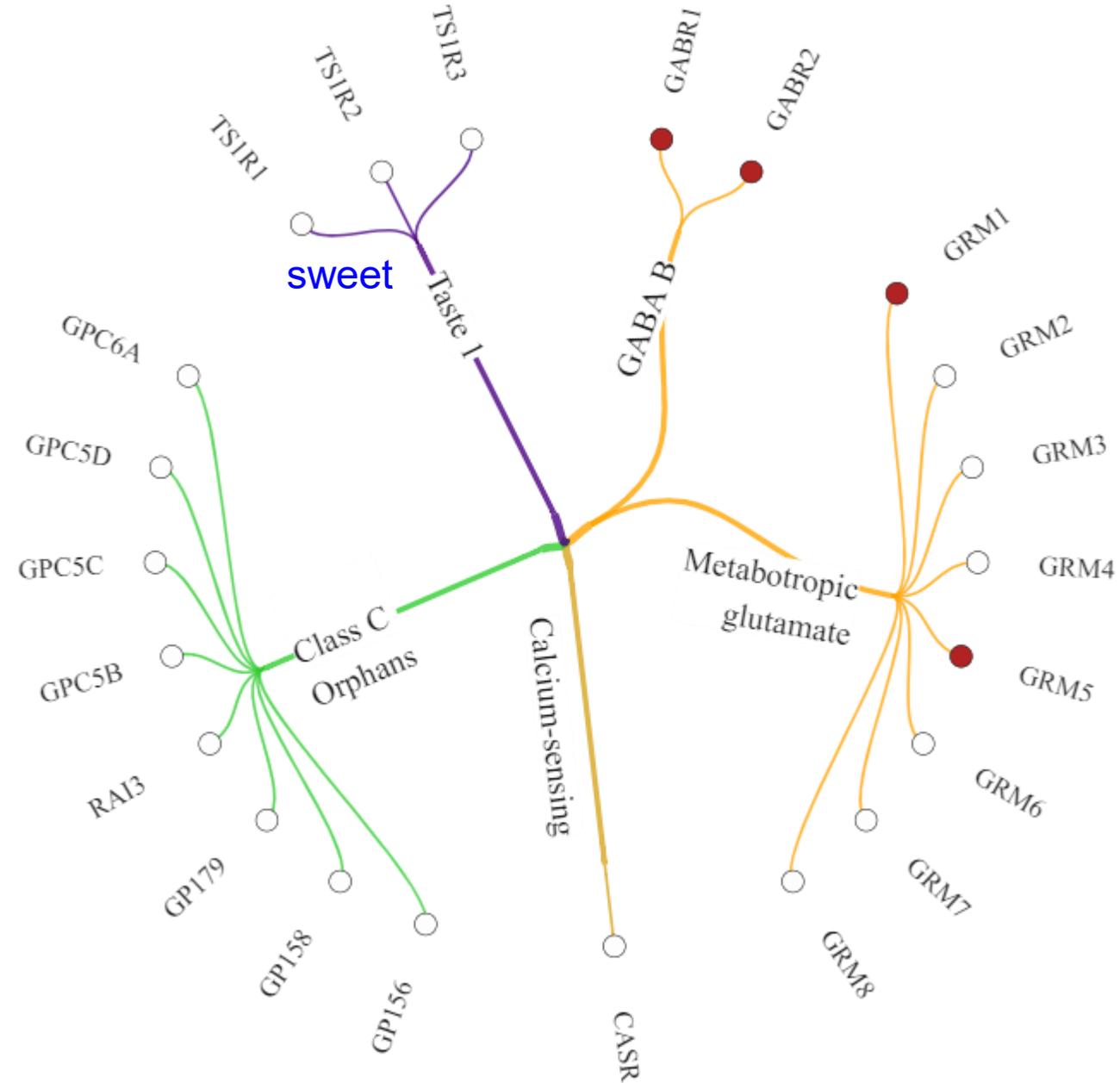
# Ormone prodotto dal duodeno



# Class B2 (Adhesion)

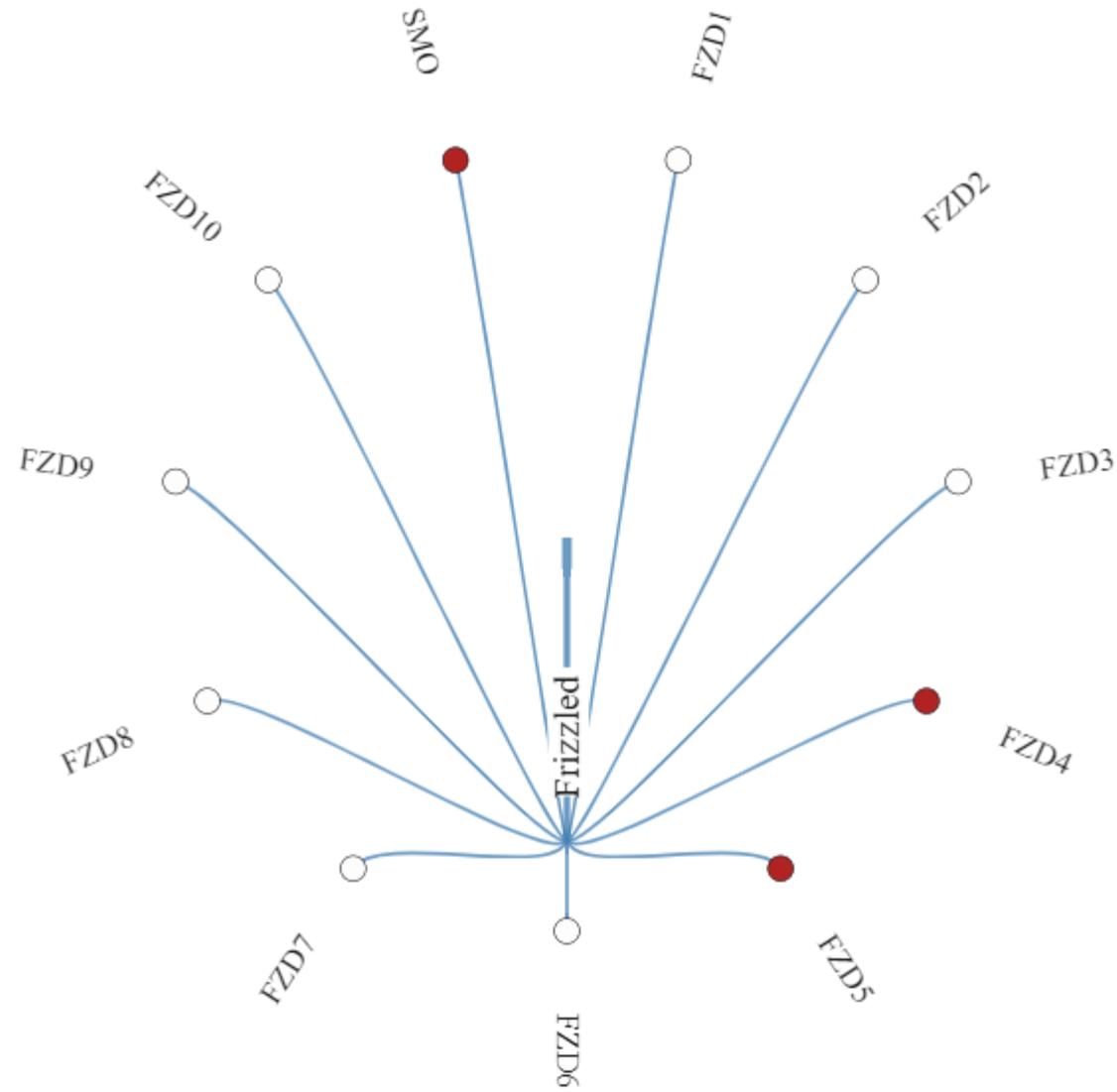


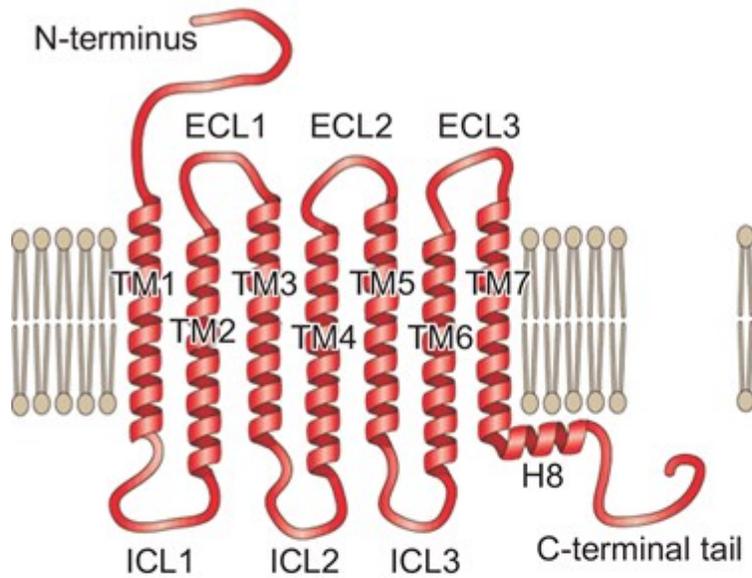
# Class C (Glutamate)



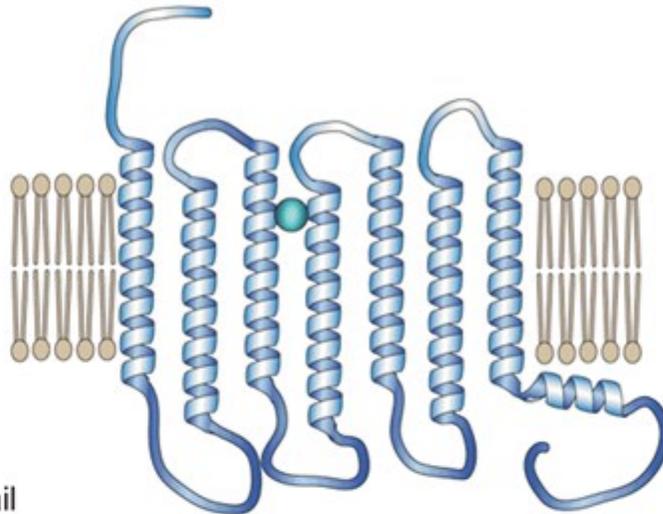
# Class F (Frizzled)

# Recettori per Wnt

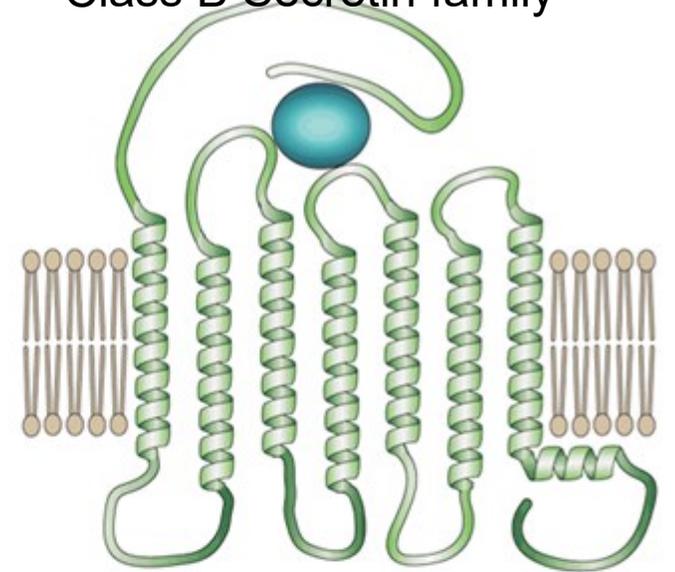




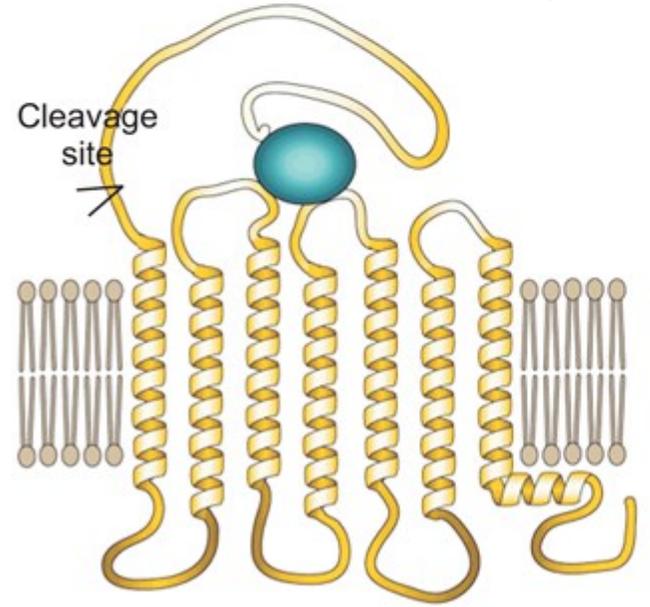
Class A Rhodopsin family



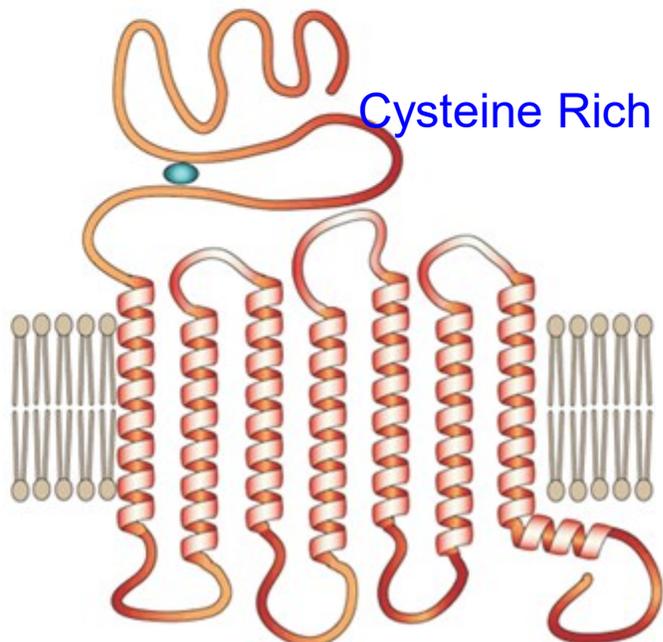
Class B Secretin family



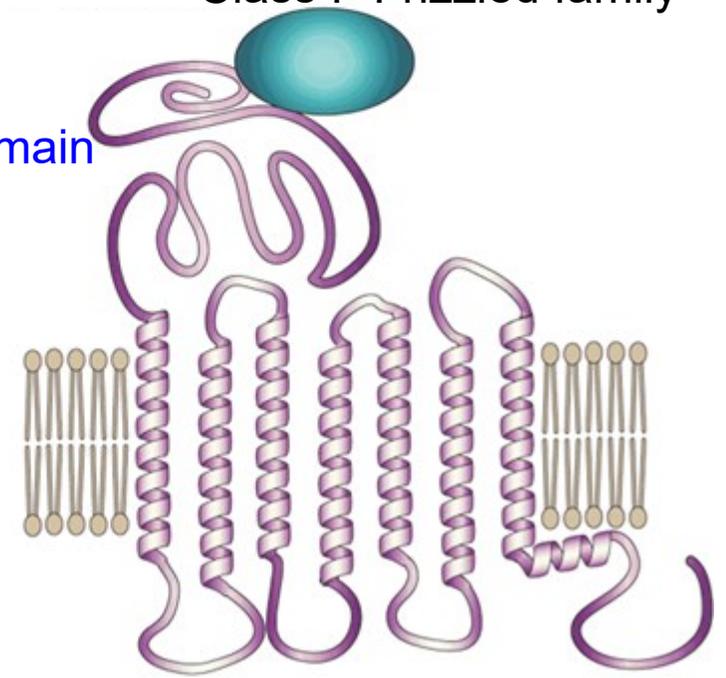
Class B Adhesion family



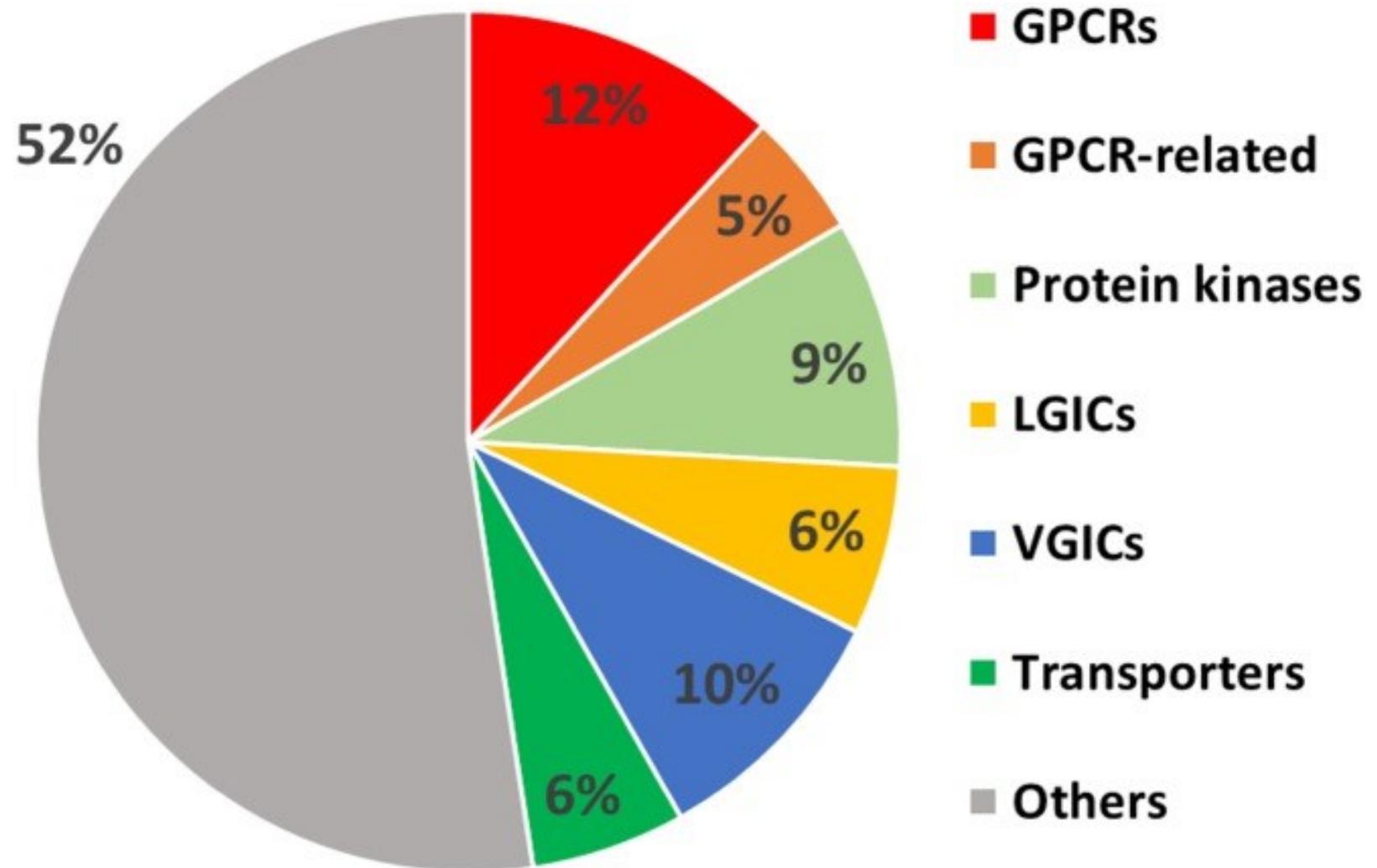
Class C Glutamate family



Class F Frizzled family



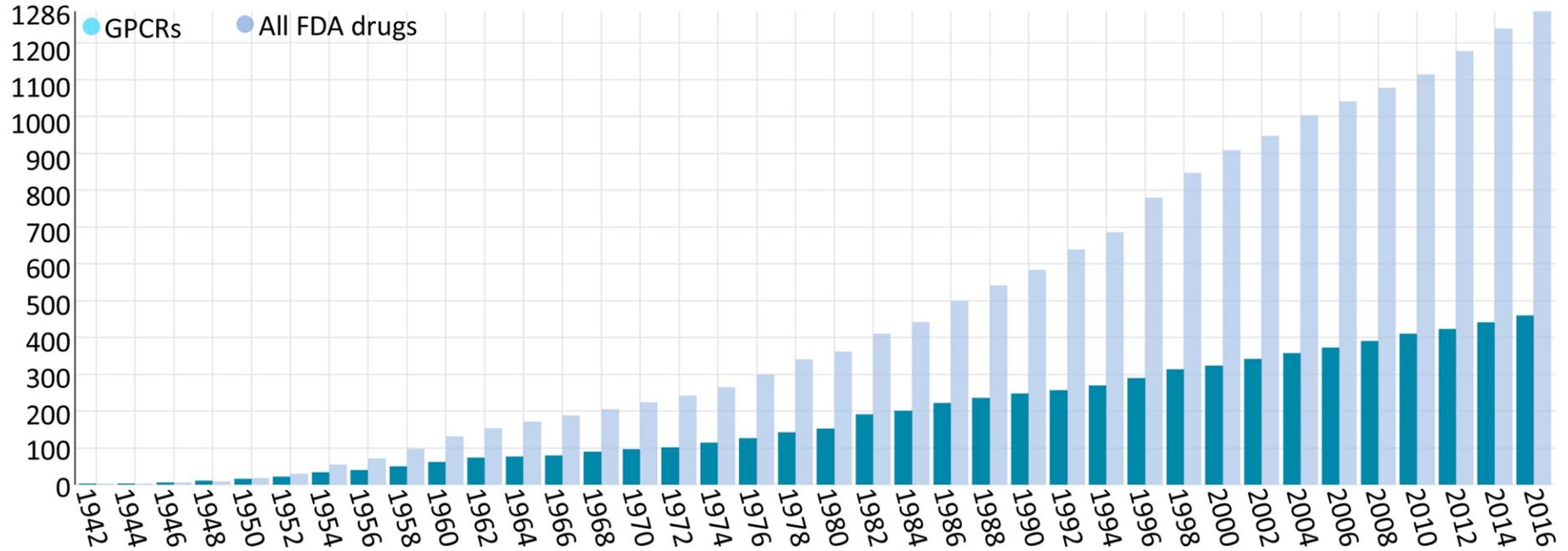
The estimated proportion of genes from different gene families that are targets for approved drugs.



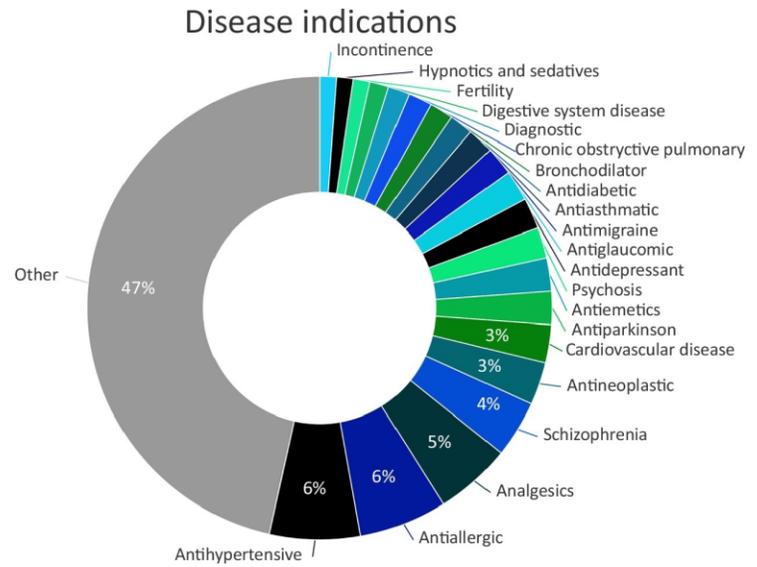
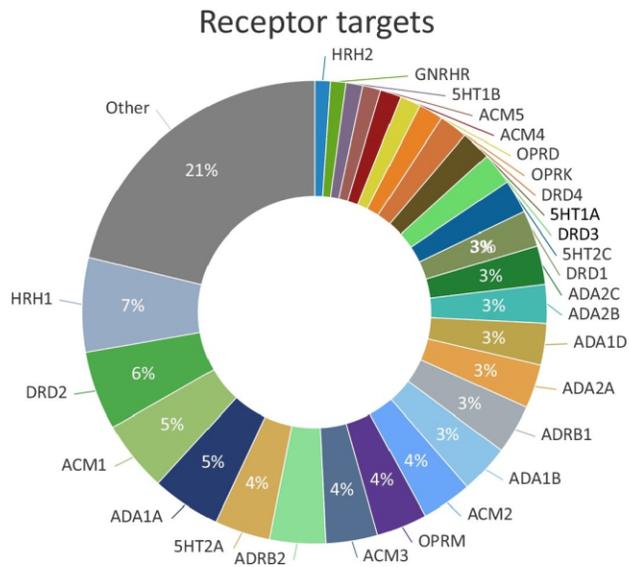
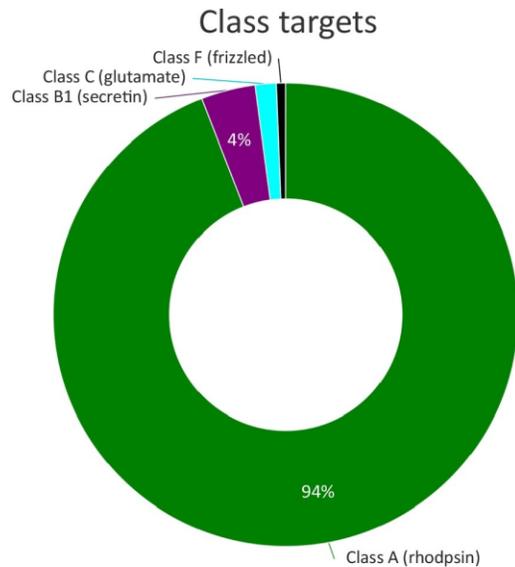
~1100 human gene/protein targets for approved drugs

# There are 1286 drugs approved by the FDA, of which 460 drugs (36%) target GPCRs

(A)



(B)



# **GPCR signalling cascades**