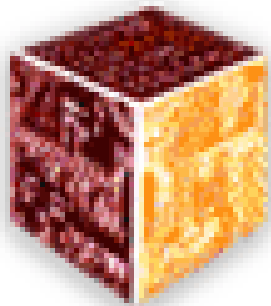


UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

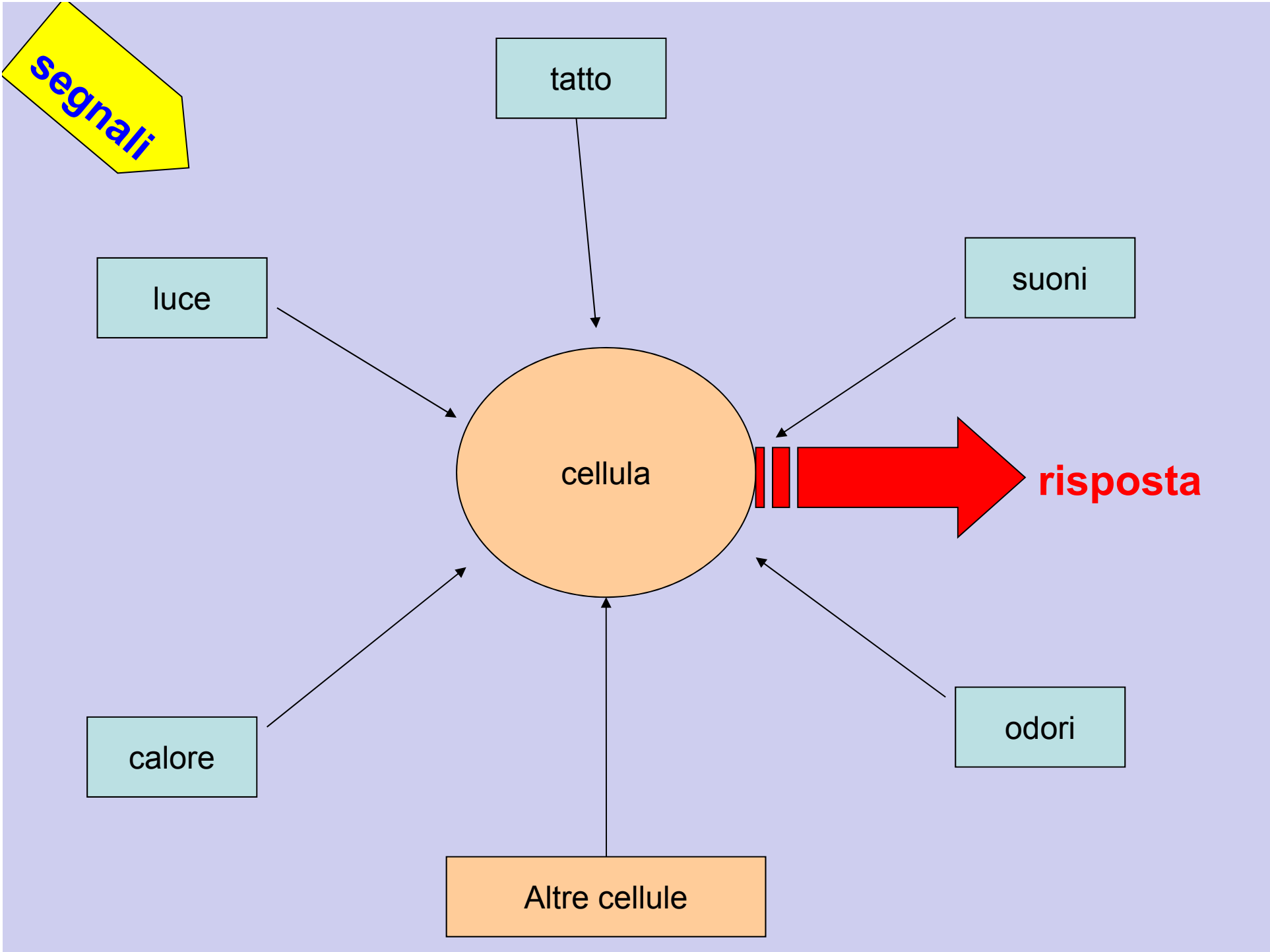
“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

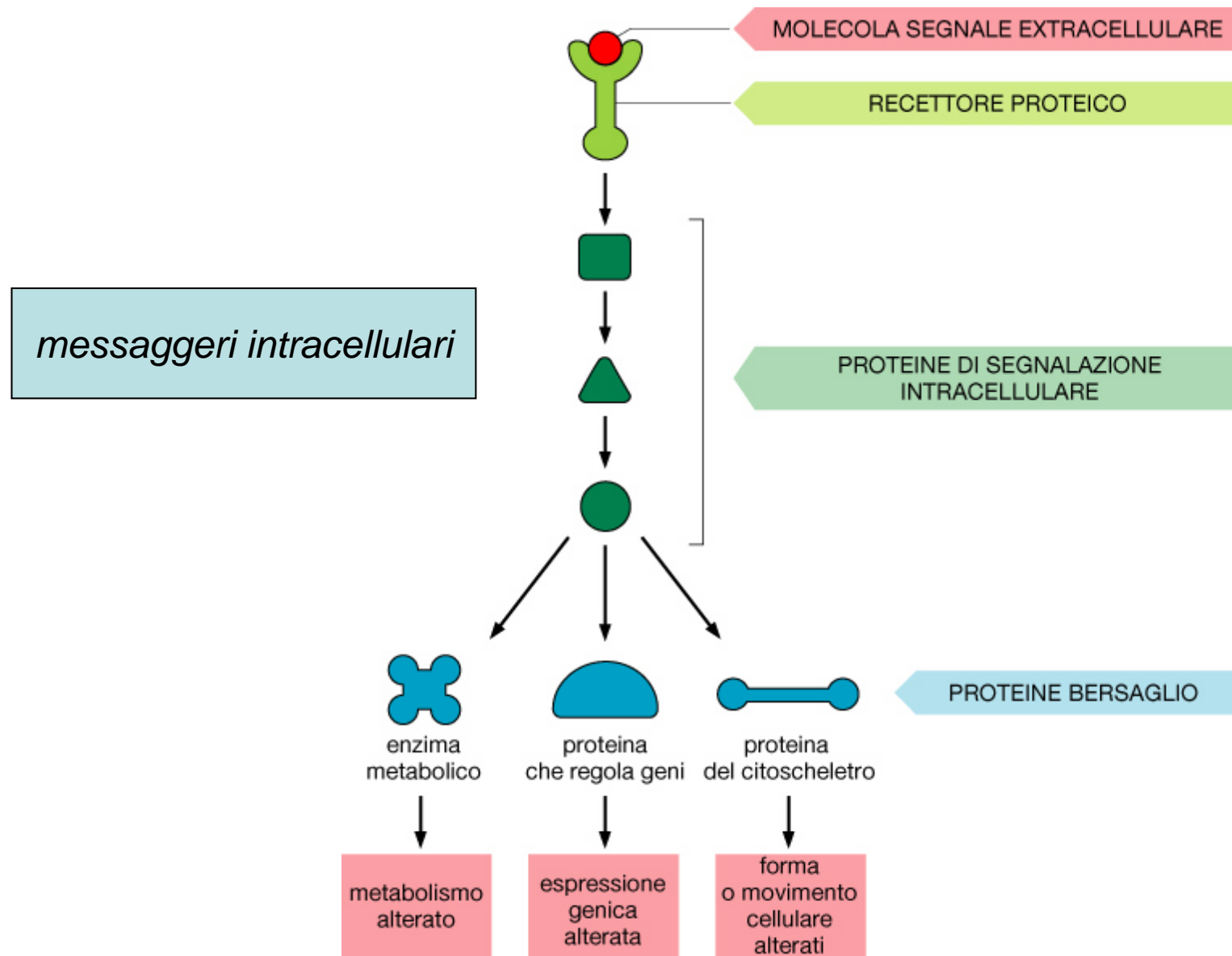
“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

COMUNICAZIONE INTERCELLULARE e SEGNALAZIONE INTRACELLULARE

- La maggior parte delle cellule di un organismo pluricellulare devono ricevere costantemente **SEGNALI** di varia natura per mantenersi vive e funzionare.
- Tutti gli organismi hanno anche **sistemi di segnalazione** che li avvertono della presenza di patogeni e che determinano una risposta di difesa.
- Anche i sistemi biologici presentano step comuni delle **vie di segnalazione**, lo stesso sistema di segnalazione può portare a risposte molto diverse in differenti cellule o organismi.



Semplice via di segnalazione intracellulare attivata da una molecola segnale extracellulare



Segnalazione intercellulare

- ❖ Secrezione **SEGNALI**
- ❖ **RECETTORI** per la ricezione dei segnali
- ❖ **COMUNICAZIONE DIRETTA** tramite **GJ**

Segnali immediati

Metabolismo cellulare
Funzioni cellulari

**Segnali a lungo
termine**

Espressione genica

Tipi di segnalazione intercellulare

Segnali per contatto cellulare avvengono fra cellule che devono avere membrane plasmatiche adiacenti.

Segnali autocrini si legano ai recettori sulla cellula che li secreta.

Segnali paracrini si legano ai recettori e stimolano le cellule adiacenti.

Segnali sinaptici sono simili ai paracrini ma vi è una speciale struttura chiamata sinapsi fra la cellula che origina il segnale e la cellula che lo riceve.

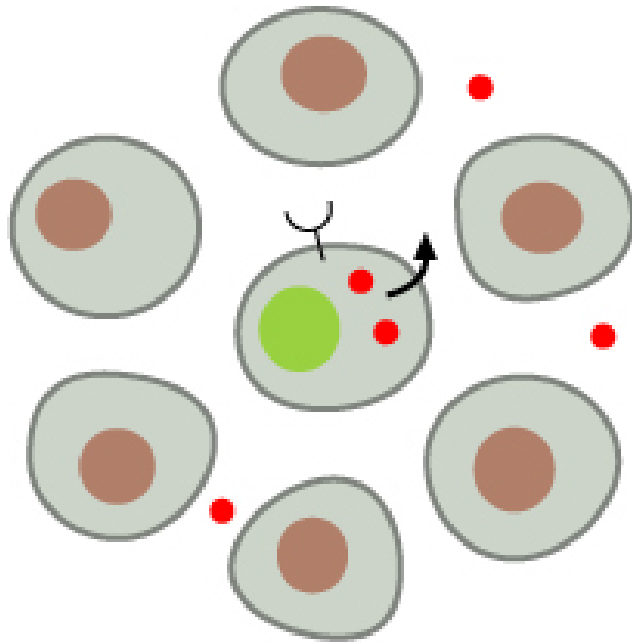
I segnali sinaptici avvengono solo fra cellule che formano sinapsi
(*es. sinapsi neuromuscolare*)

Segnali endocrini avvengono quando le cellule secernono molecole segnale nel sangue (*es. le ovaie nelle femmine e i testicoli nei maschi sono stimolati dagli ormoni prodotti dal cervello*).

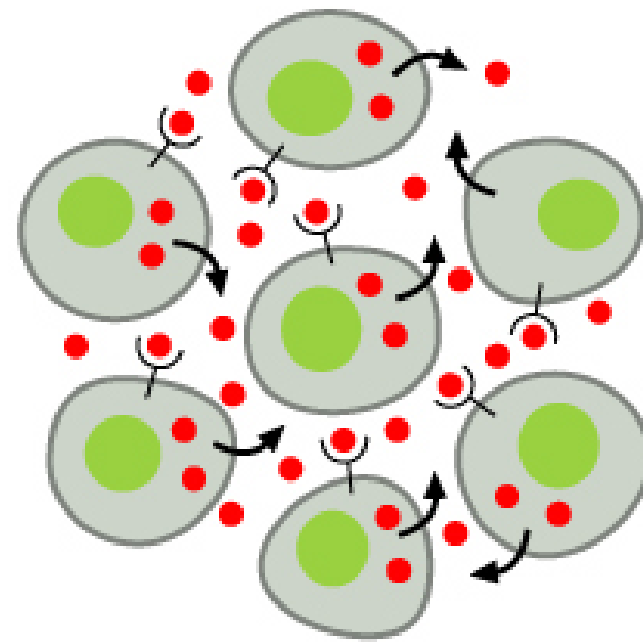
Segnalazione diretta tramite GJ

Segnalazione autocrina

UNA CELLULA PRODUCE MOLECOLE SEGNALE
CHE POSSONO LEGARSI AI PROPRI RECETTORI

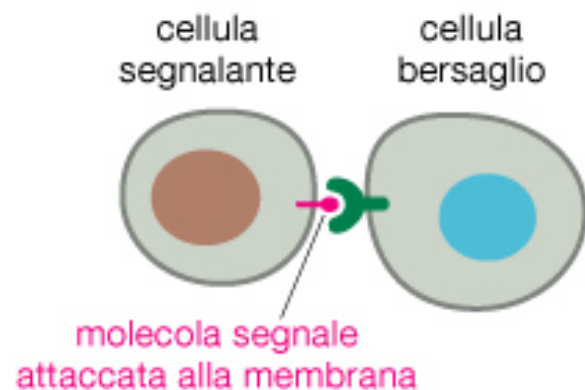


UNA SINGOLA CELLULA SEGNALANTE
RICEVE UN DEBOLE SEGNALE
AUTOCRINO

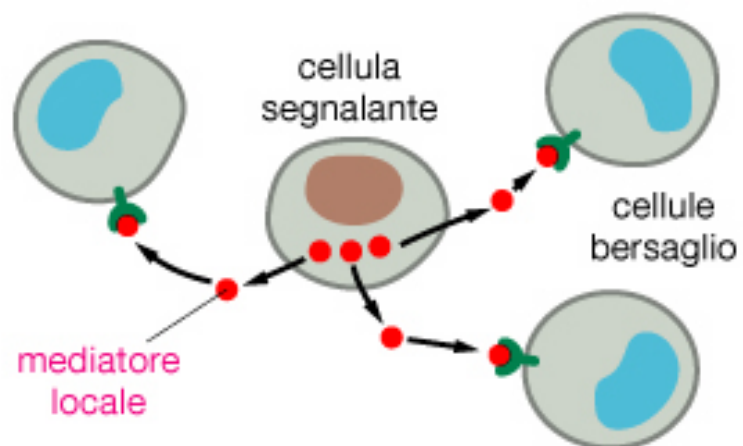


IN UN GRUPPO DI CELLULE
SEGNALANTI IDENTICHE, CIASCUNA
CELLULA RICEVE UN FORTE SEGNALE
AUTOCRINO

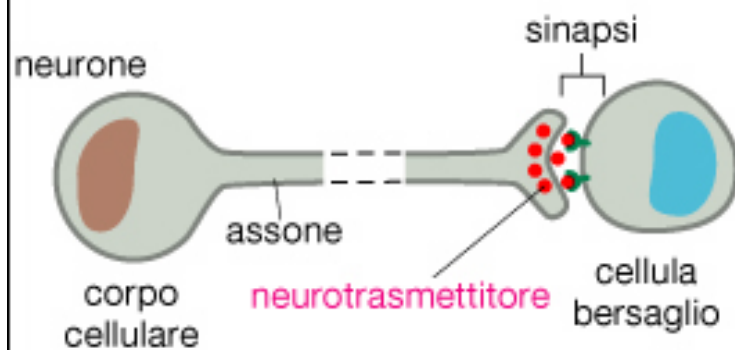
(A) DIPENDENTE DA CONTATTO



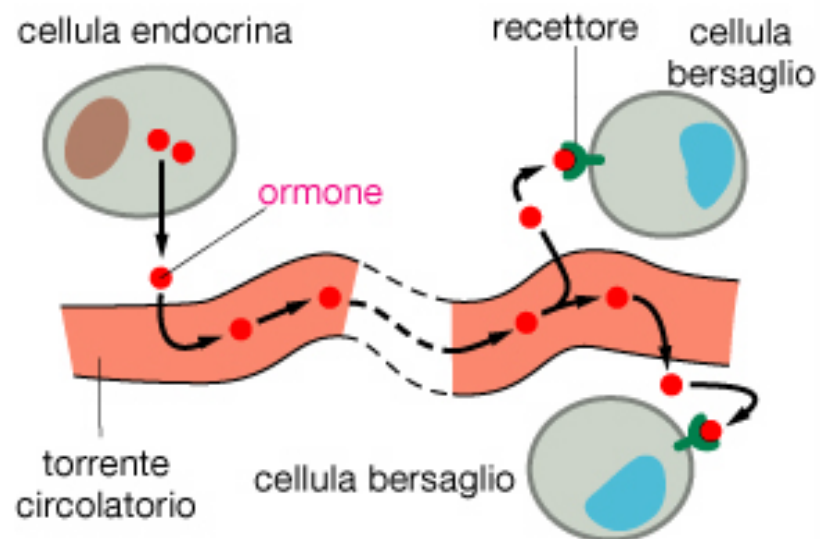
(B) PARACRINA



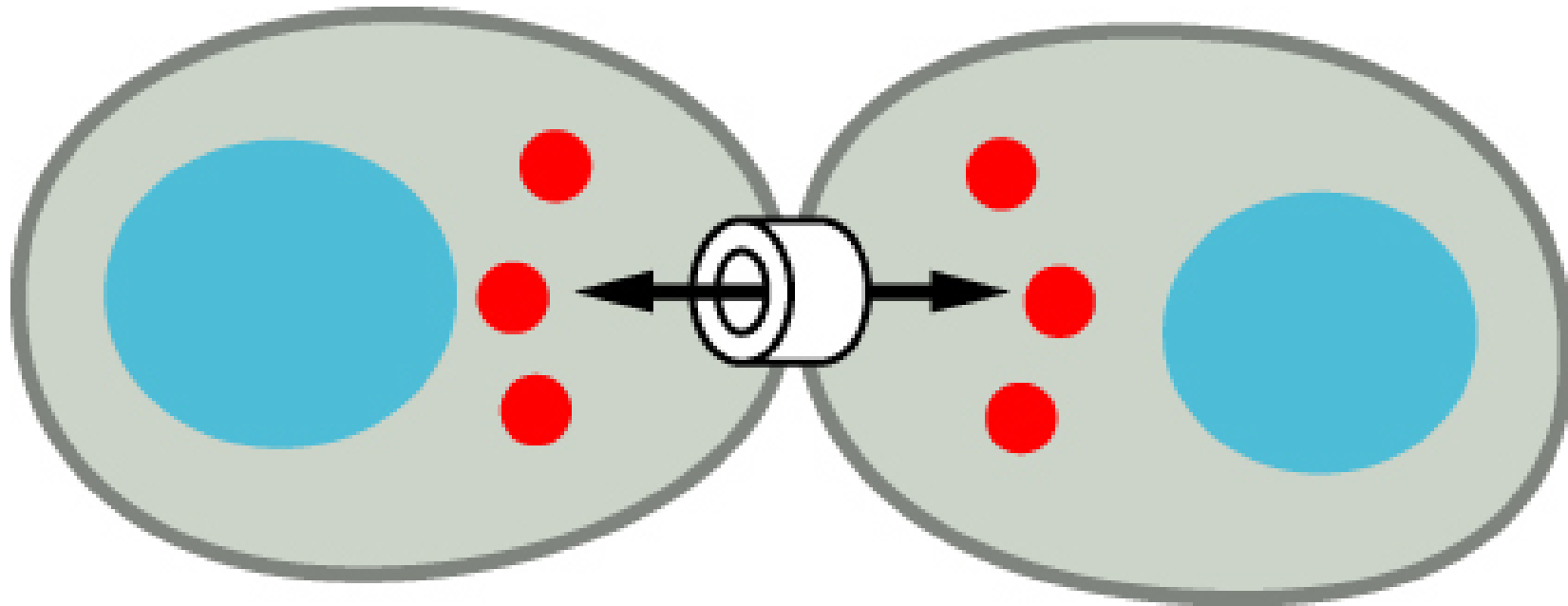
(C) SINAPTICA



(D) ENDOCRINA

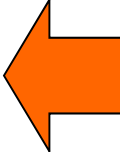


SEGNALAZIONE TRAMITE GIUNZIONI GAP (GJ)



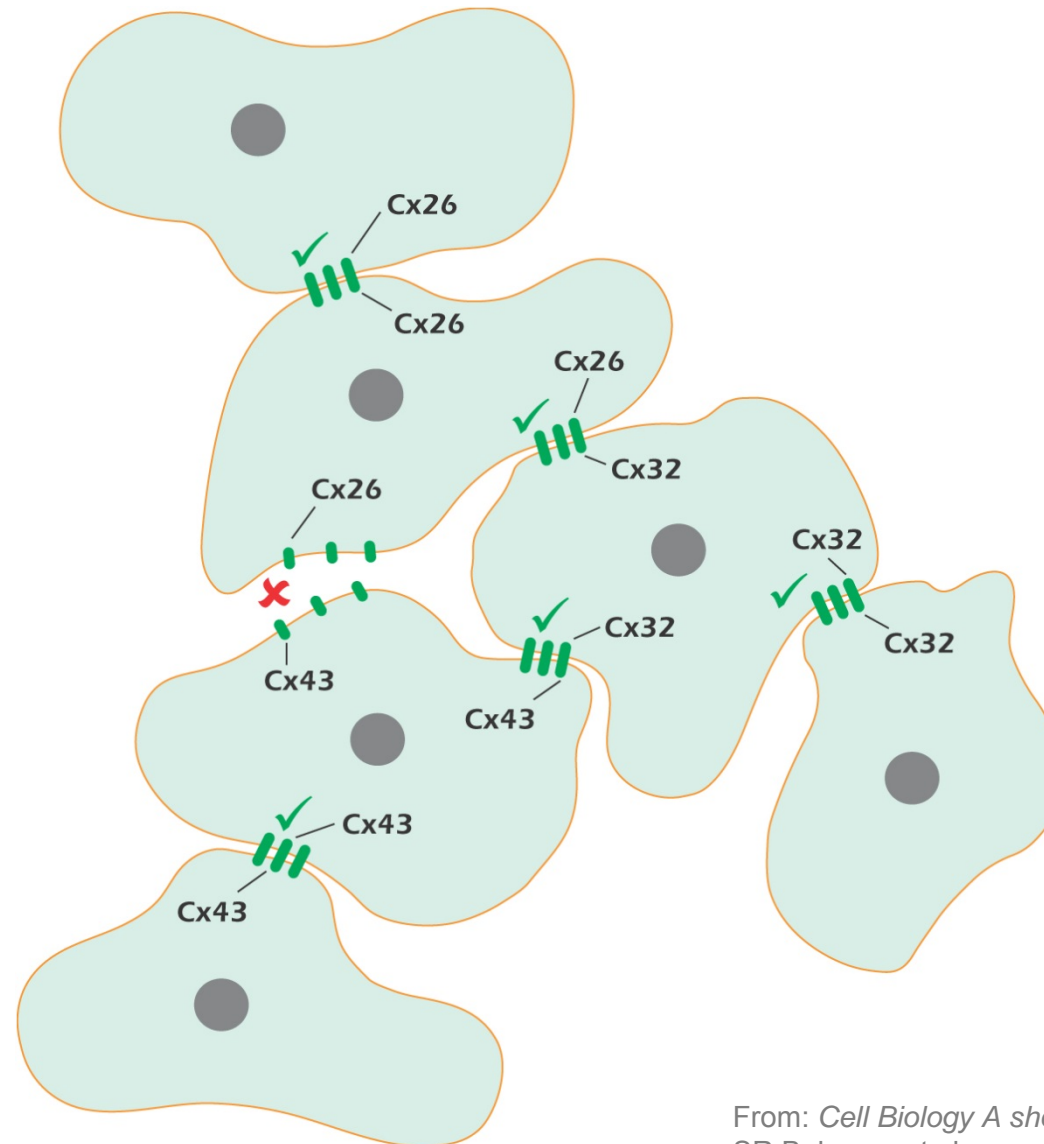
LE CELLULE CONNESSE DA GAP JUNCTIONS CONDIVIDONO PICCOLE MOLECOLE SEGNALE (PM <1000 Da), ad es. Ca²⁺ e cAMP, E POSSONO PERCIO' RISPONDERE A SEGNALI EXTRACELLULARI IN MODO COORDINATO

Le connessioni cellulari dirette, come le **giunzioni comunicanti (gap)** nelle cellule animali, permettono:

- A. alle cellule adiacenti di aderire strettamente le une alle altre.
- B. ai messaggeri secondari prodotti in una cellula di diffondere rapidamente e stimolare eventi nelle cellule confinanti. 
- C. alle cellule adiacenti di formare una stretta barriera di acqua fra le loro membrane.
- D. alle proteine chinasi di fluire fra le cellule, coordinando la risposta cellulare in un tessuto.
- E. il rapido scambio di informazioni genetiche fra le cellule adiacenti.

Non tutte le connessine sono compatibili

✓ indica una GJ funzionante



From: *Cell Biology A short course*
SR Bolsover et al.
Wiley-Blackwell

Un fattore di crescita secreto dalla cellula che ha un tasso di diffusione basso, ed interagisce solo con le cellule in una ristretta area è un esempio di segnalazione:

- **endocrina**

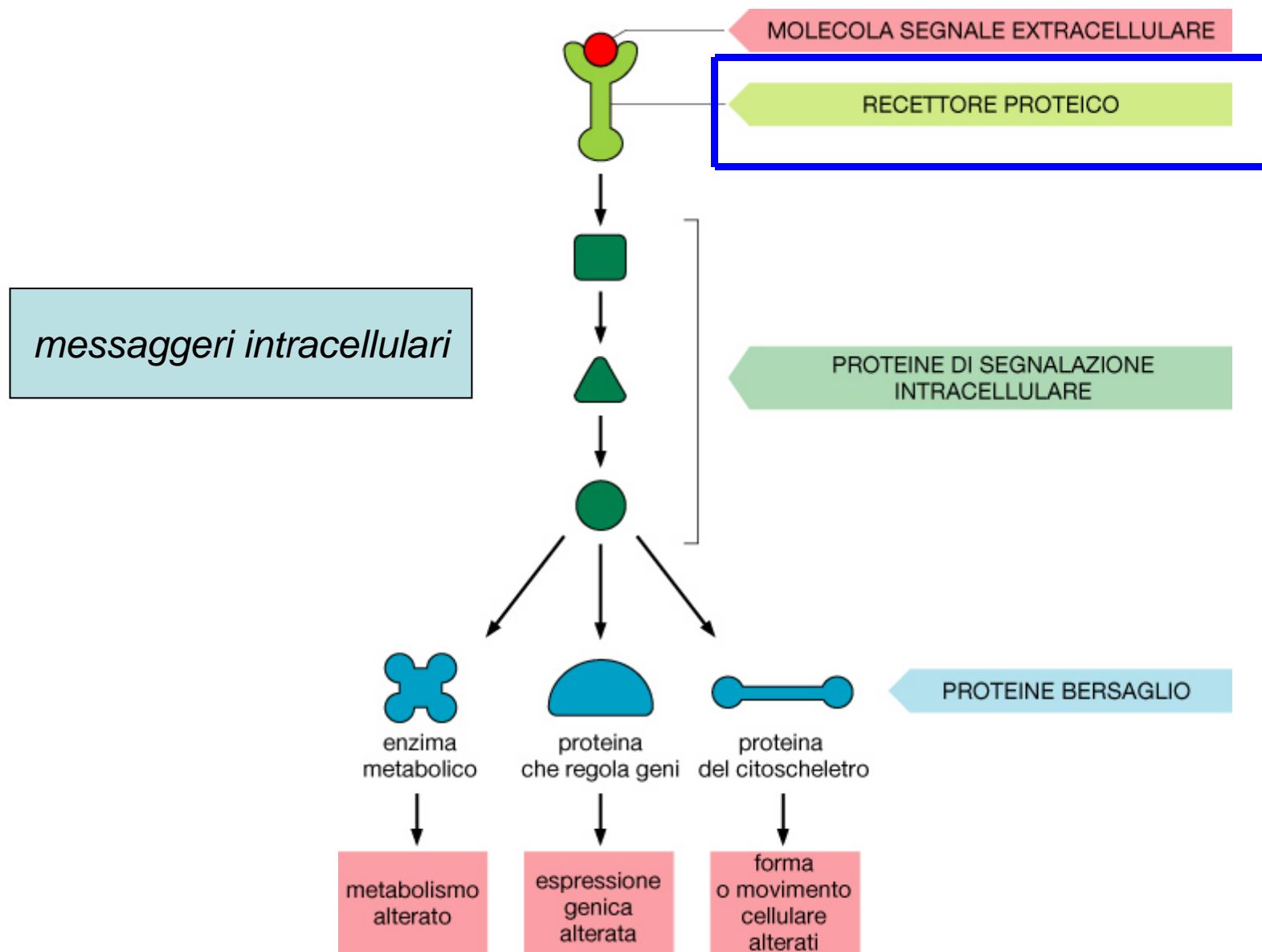
- **sinaptica**

- **paracrina**

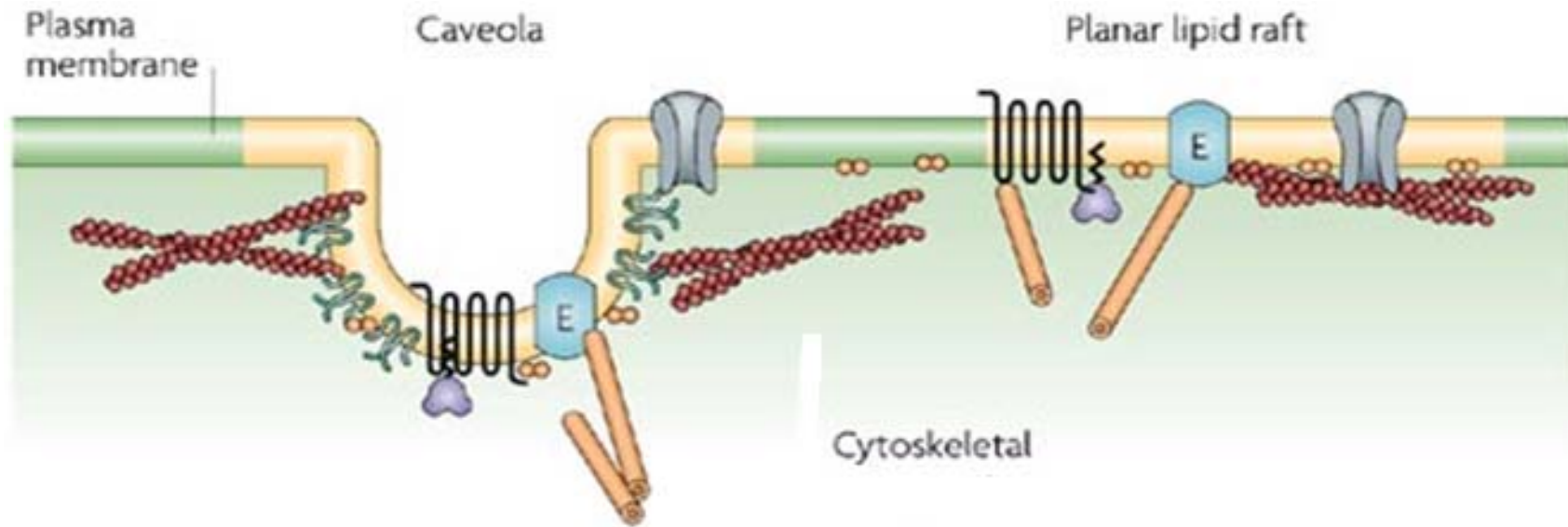
i segnali paracrini sono prodotti da cellule e si legano ai recettori delle altre cellule **nelle immediate vicinanze.**

- **contatto cellulare**

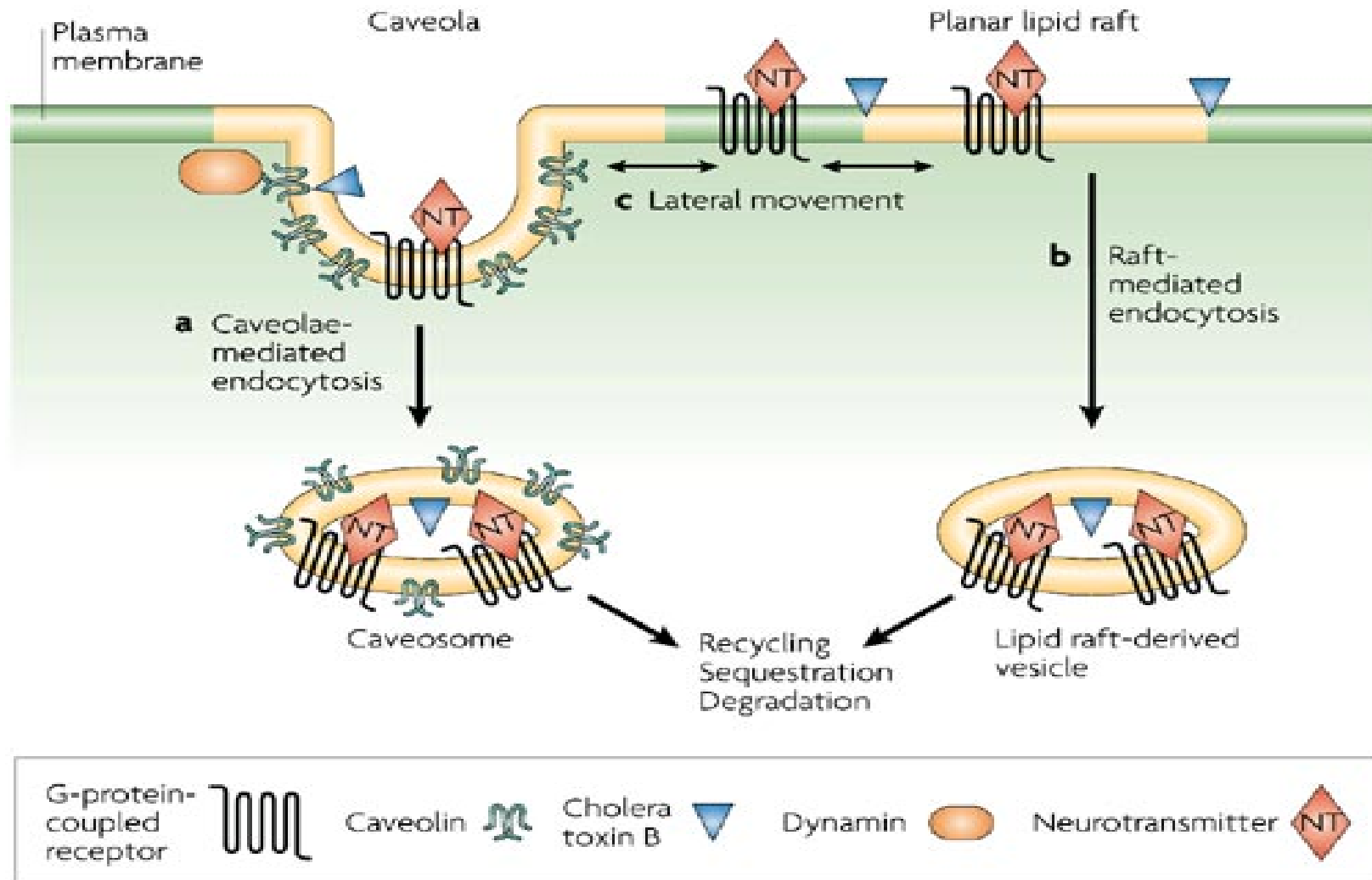
Semplice via di segnalazione intracellulare attivata da una molecola segnale extracellulare



La specializzazione funzionale delle m. plasmatiche (es. presenza di RAFT lipidici e CAVEOLE) consente una efficiente organizzazione del sistema segnale-recettore e la rapida attivazione delle vie di segnalazione intracellulare

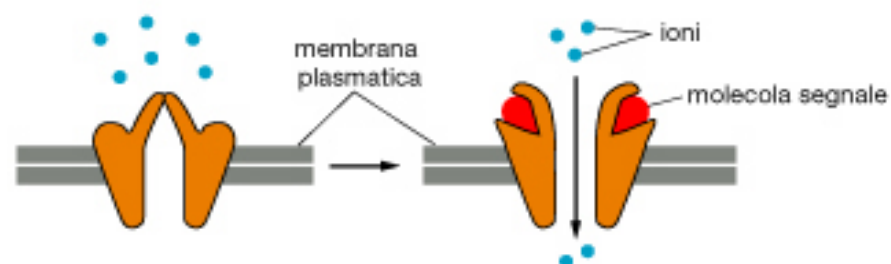


La specializzazione funzionale delle m. plasmatiche (es. presenza di RAFT lipidici) consente una efficiente organizzazione del sistema segnale-recettore e la rapida attivazione delle vie di segnalazione intracellulare

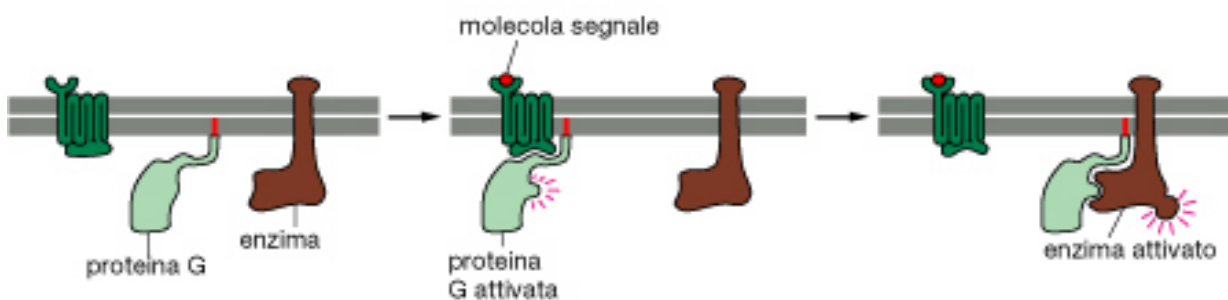


Le 3 classi più grandi di recettori di superficie

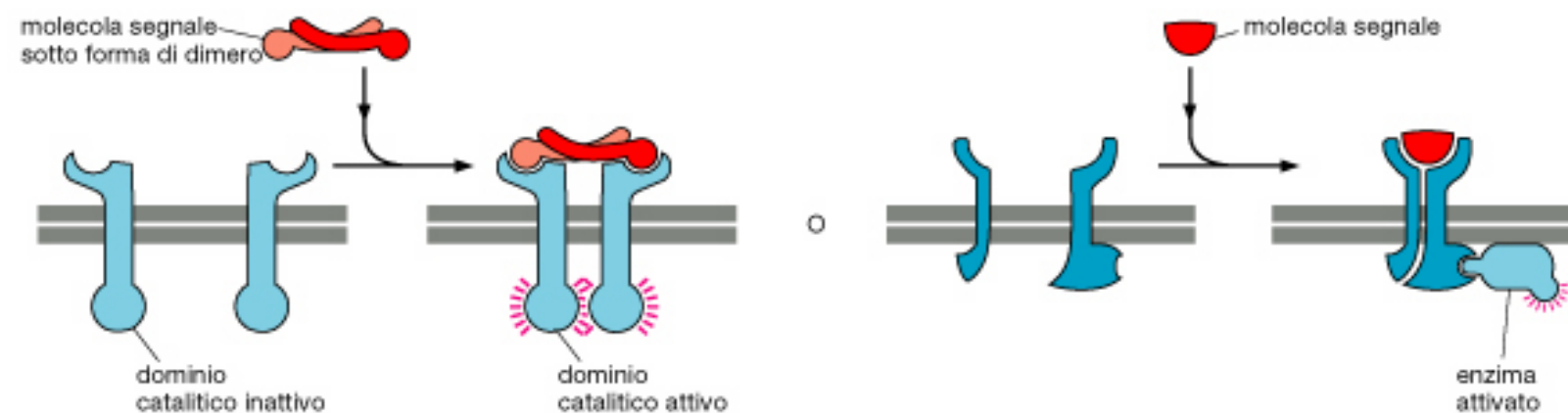
(A) RECETTORI COLLEGATI A CANALI IONICI



(B) RECETTORI COLLEGATI A PROTEINE G



(C) RECETTORI COLLEGATI AD ENZIMI

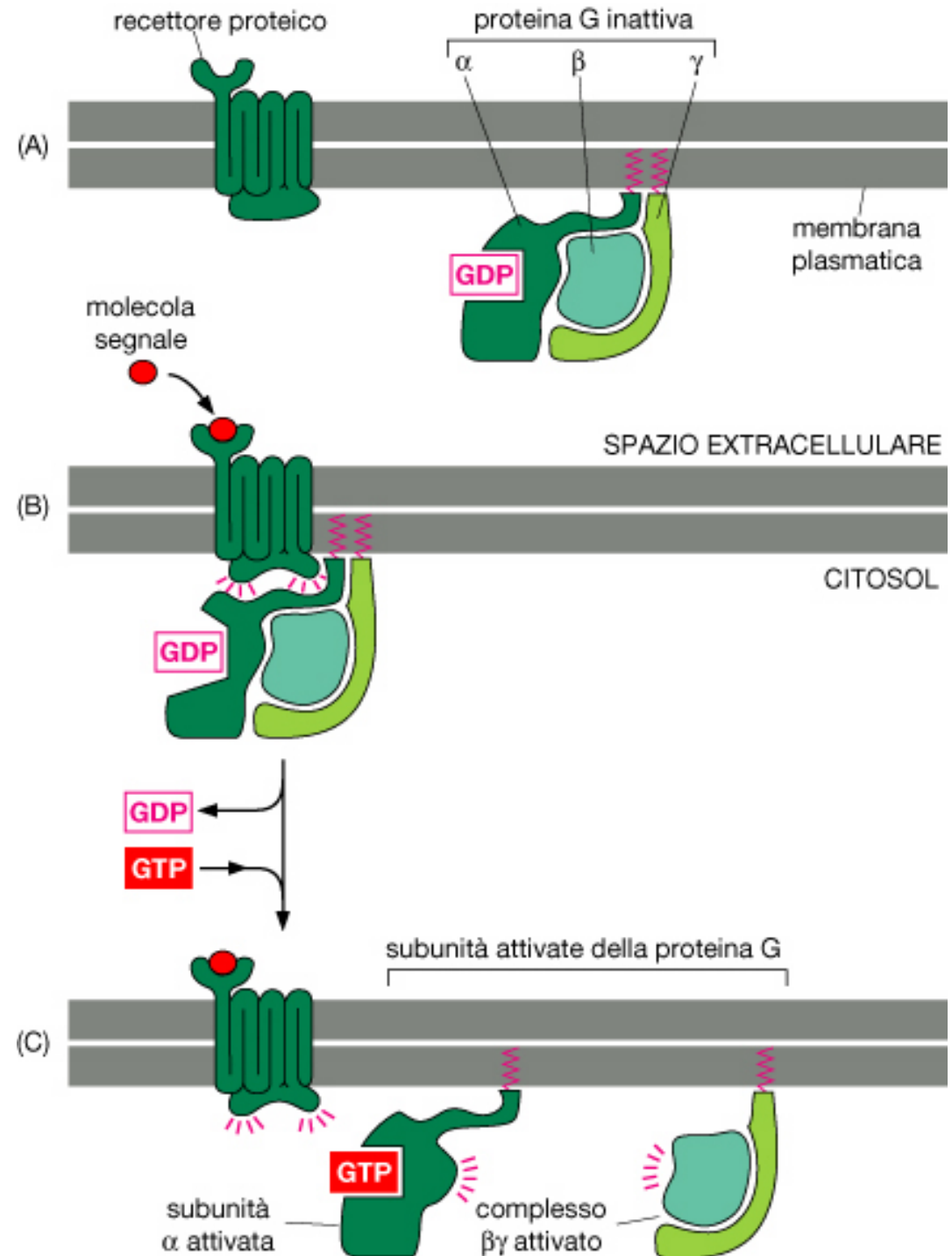


Attivazione di una proteina G

Un segnale extracellulare agendo su recettore ne cambia la conformazione; questo a sua volta altera la conformazione della proteina G

L'alterazione della subunità alfa permette di scambiare GDP con GTP

La proteina G si divide in due componenti: subunità alfa e complesso beta-gamma entrambi i quali possono regolare l'attività di proteine bersaglio sulla M plasmatica



Attivazione di una
proteina G

Il recettore resta attivo finché
la molecola segnale resta
attaccata ad esso e perciò
può catalizzare l'attivazione di
molte molecole di proteina G

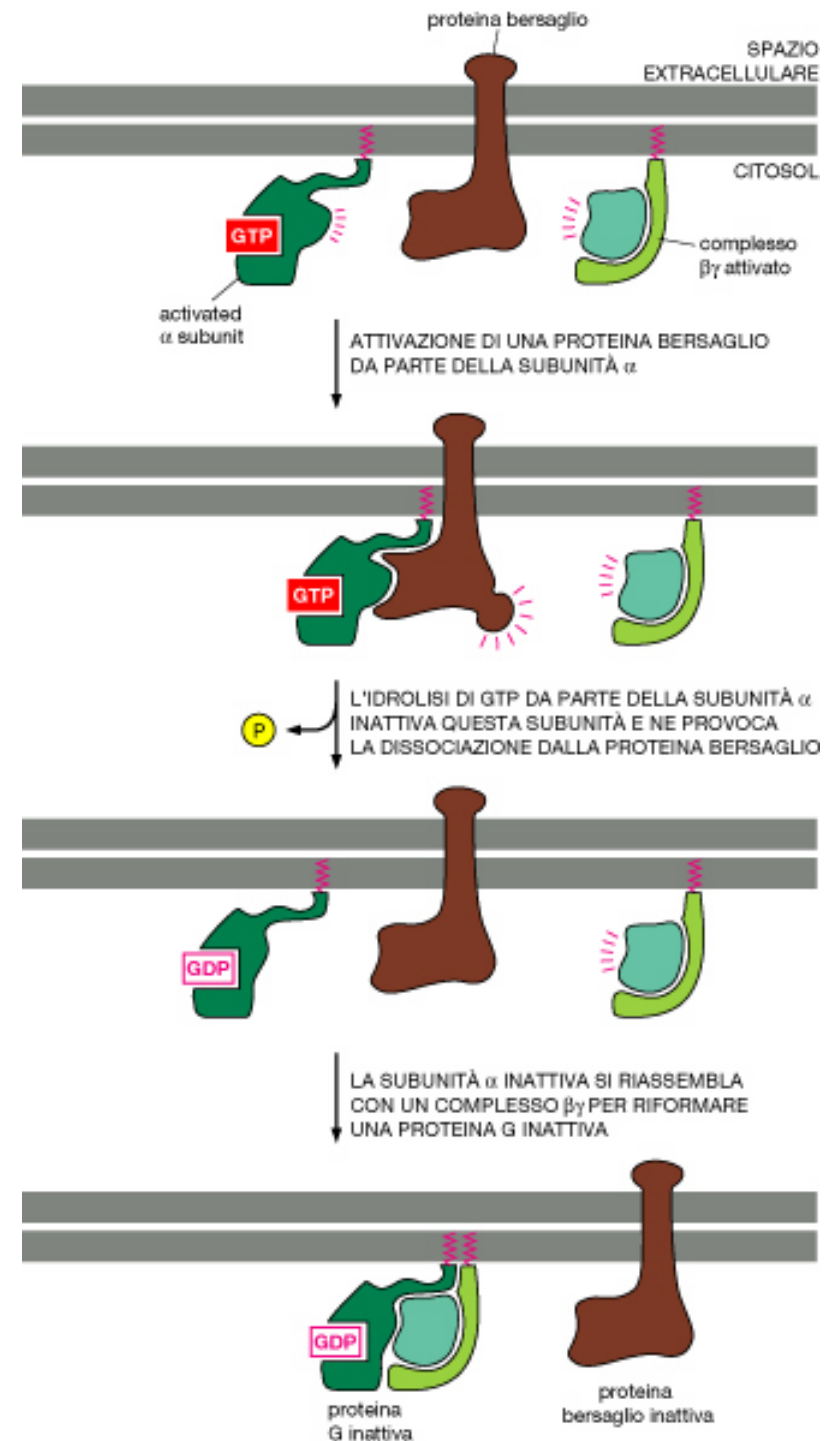
Disattivazione di una
proteina G



Disattivazione della proteina G per idrolisi del GTP legato alla subunità alfa

Dopo che la subunità alfa attivata dal GTP ha attivato la sua proteina bersaglio **si spegne da sola** idrolizzando il GTP a GDP.

Ciò inattiva la **subunità alfa** che si **dissocia dalla proteina bersaglio** e si riassocia al complesso beta-gamma riformando la proteina G inattiva.



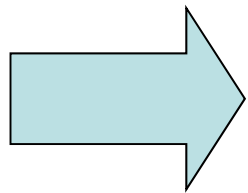
L' attività endogena GTPasica della proteina G serve a:

- idrolizzare il GTP riportando la proteina G a livello di attività pre-stimolazione

le risposte ai segnali extracellulari devono essere **reversibili**.

*In alcune forme di **cancro**, le mutazioni di una proteina G (detta Ras) diminuiscono la attività della GTPasi*

Il Ras permanentemente attivato porta ad una divisione cellulare irregolare nel cancro.



I **recettori di membrana** responsabili della segnalazione cellulare devono attraversare la membrana; sono tutti **proteine integrali** che trasmettono segnali attraverso il doppio strato lipidico

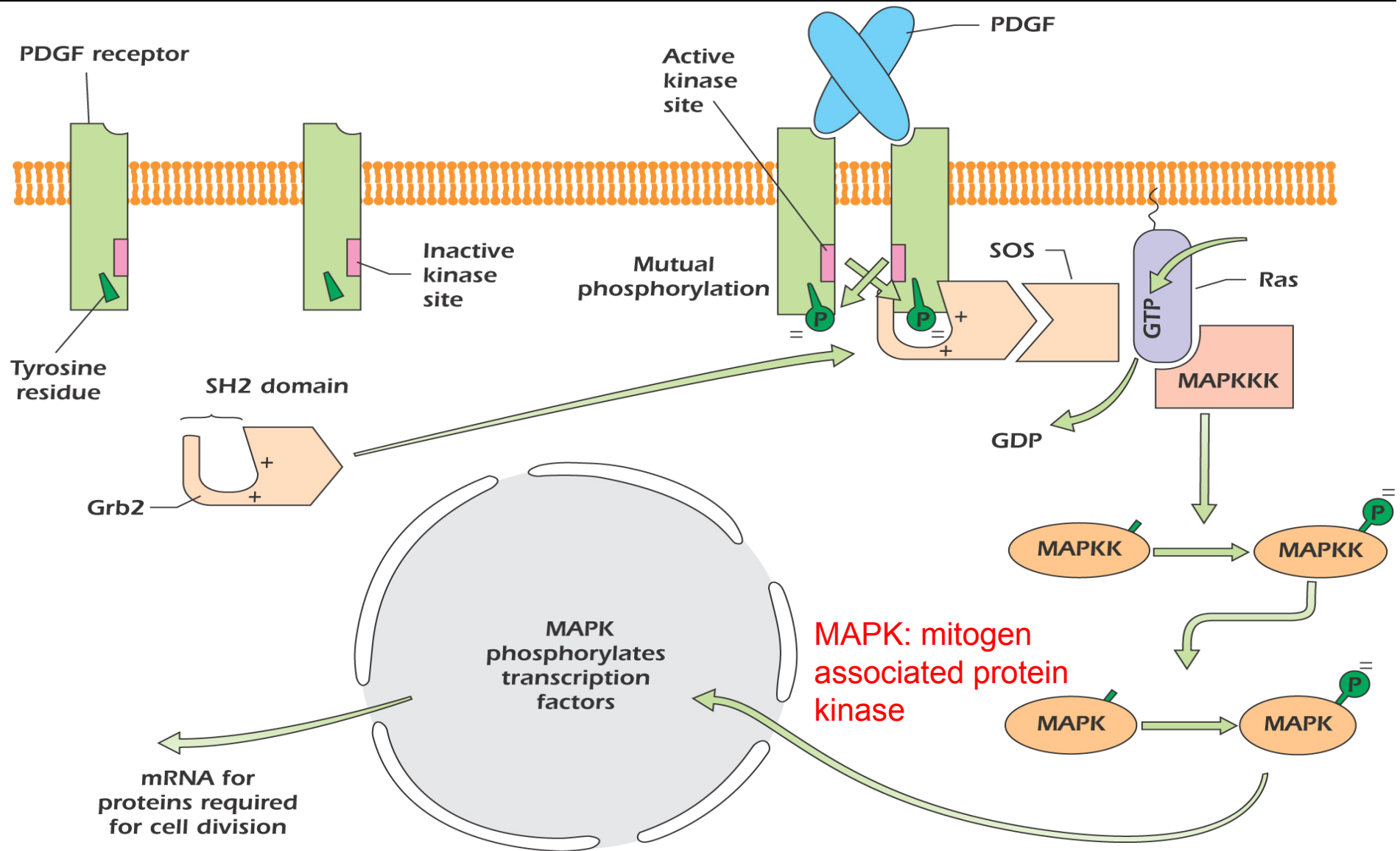
RECETTORI TIROSIN KINASI

- Legame Growth factors (es. EGF, PDGF,...)
- Dimerizzazione
- Fosforilazione (trans-fosforilazione) su tirosina
- Reclutamento di proteine citoplasmatiche con dominio SH2
- Attivazione vie di trasduzione Ras e MAPK



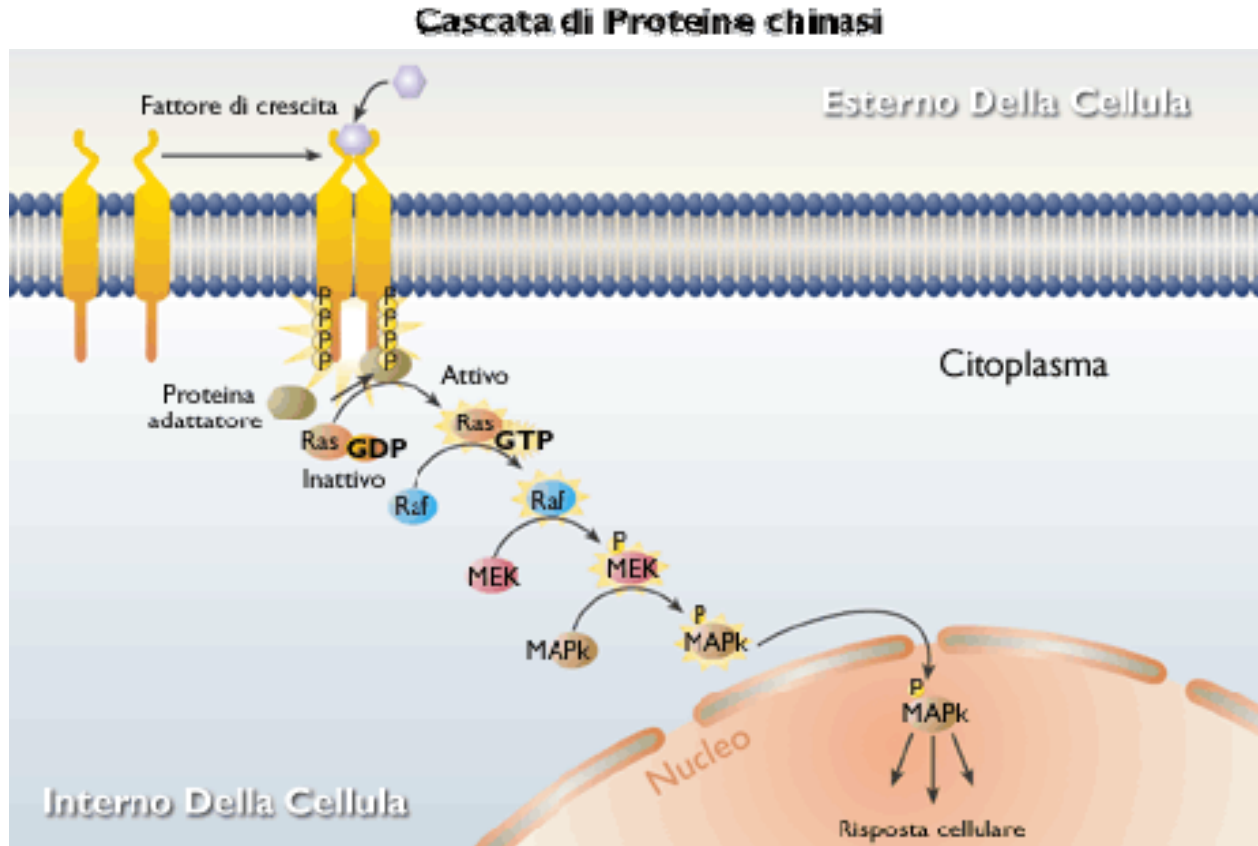
Sintesi DNA
Divisione cellulare

RECETTORI TIROSIN KINASI



Il recettore per il fattore di crescita PDGF è un recettore TK e come altri recettori TK attiva la GTPase Ras e conseguentemente la cascata delle MAP kinasi (MAPK)

Attivazione di una proteina chinasi



•Le proteine chinasi trasferiscono il gruppo fosfato su proteine target causando una risposta cellulare

•L' attivazione porta frequentemente a una cascata di proteine chinasi:
il **SISTEMA A CASCATA** porta ad una rapida amplificazione del segnale

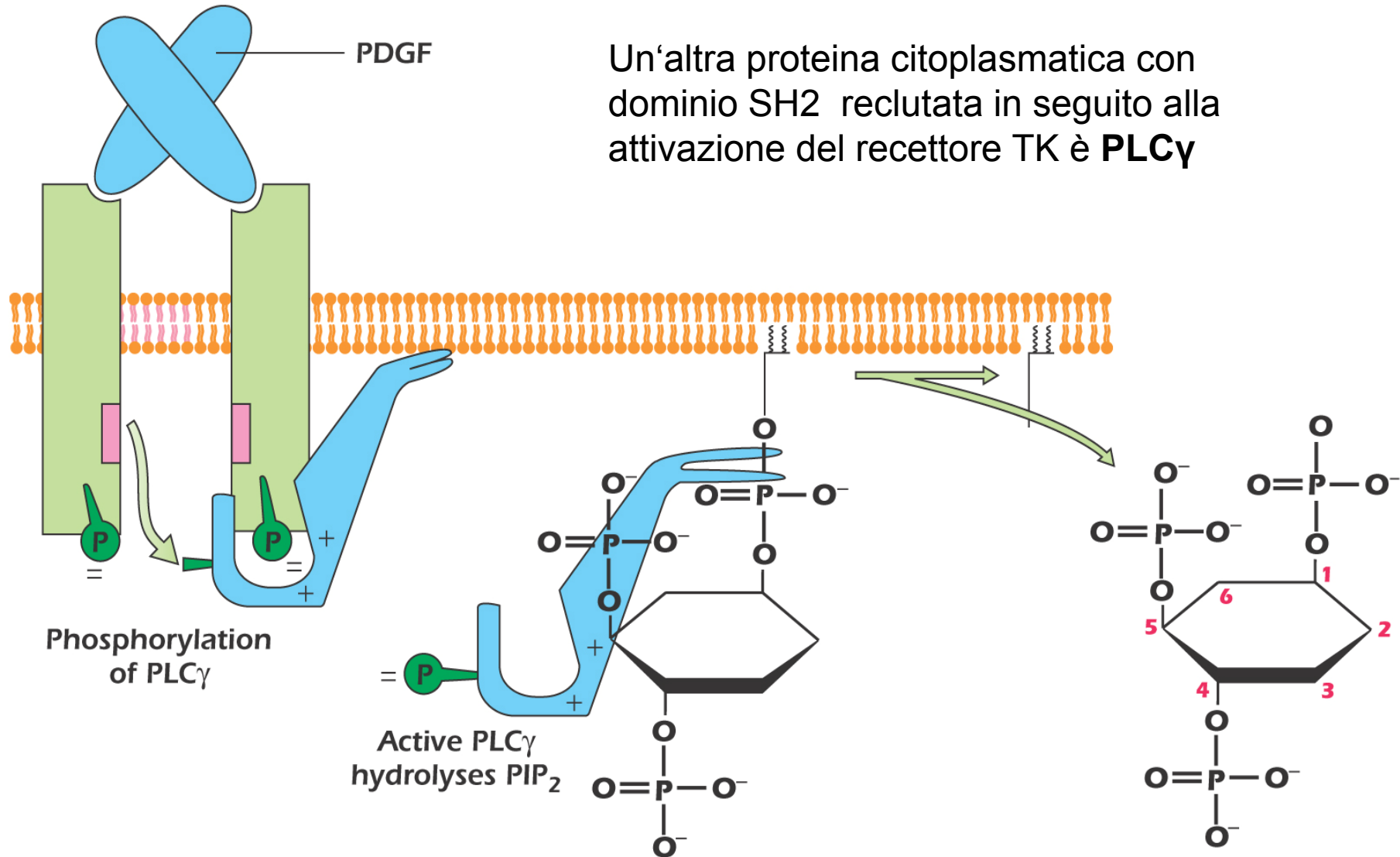
Le risposte ai segnali da parte dei sistemi di trasferimento devono essere reversibili → **FOSFATASI**: rimuovono il gruppo fosfato

I recettori TK per il fattore di crescita attivano una **cascata di proteine chinasi** a cui partecipano enzimi multipli che effettuano un cambio dell' espressione di un gene.

- Segnali esterni possono portare a **cambiamenti della espressione genica**.
- I passaggi multipli determinano una **amplificazione del segnale**.
- I passaggi multipli che portano all'attivazione delle chinasi possono dare **diverse risposte cellulari**, secondo la presenza o assenza di **proteine bersaglio**.

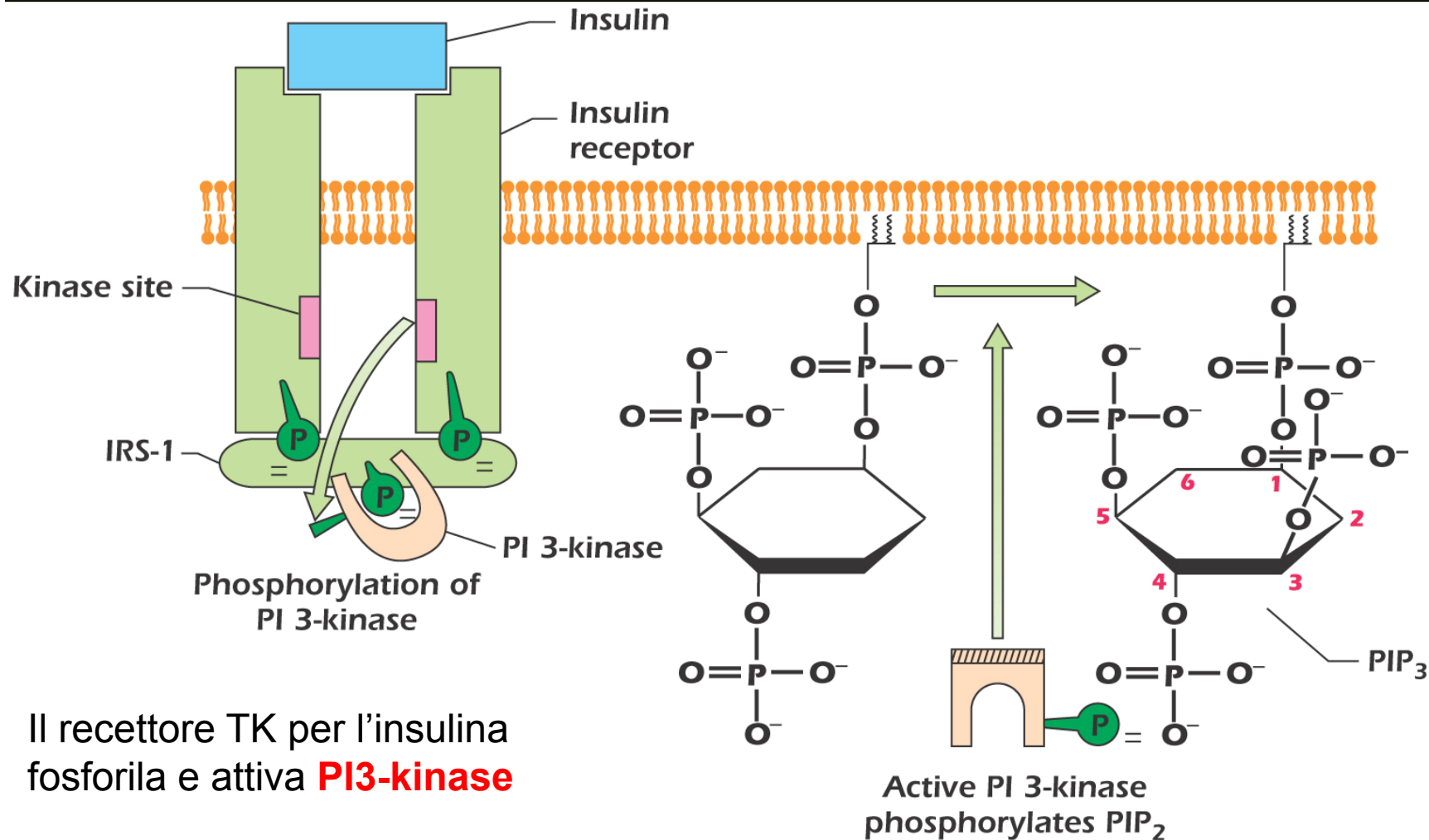
Le mutazioni nel modello di segnalazione sono una delle significative caratteristiche della crescita delle cellule cancerose

RECCETTORI TIROSIN KINASI



La **PLC γ** attivata esplica la sua attività enzimatica idrolizzando **PIP $_2$** in IP $_3$ e DAG

RECCETTORI TIROSIN KINASI

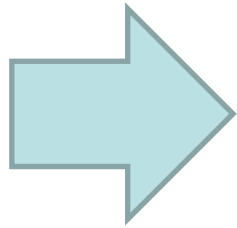


Il recettore TK per l'insulina fosforila e attiva **PI3-kinase**

PI3-kinasi agisce su **PIP2** aggiungendo un altro gruppo P e formando **PIP3**

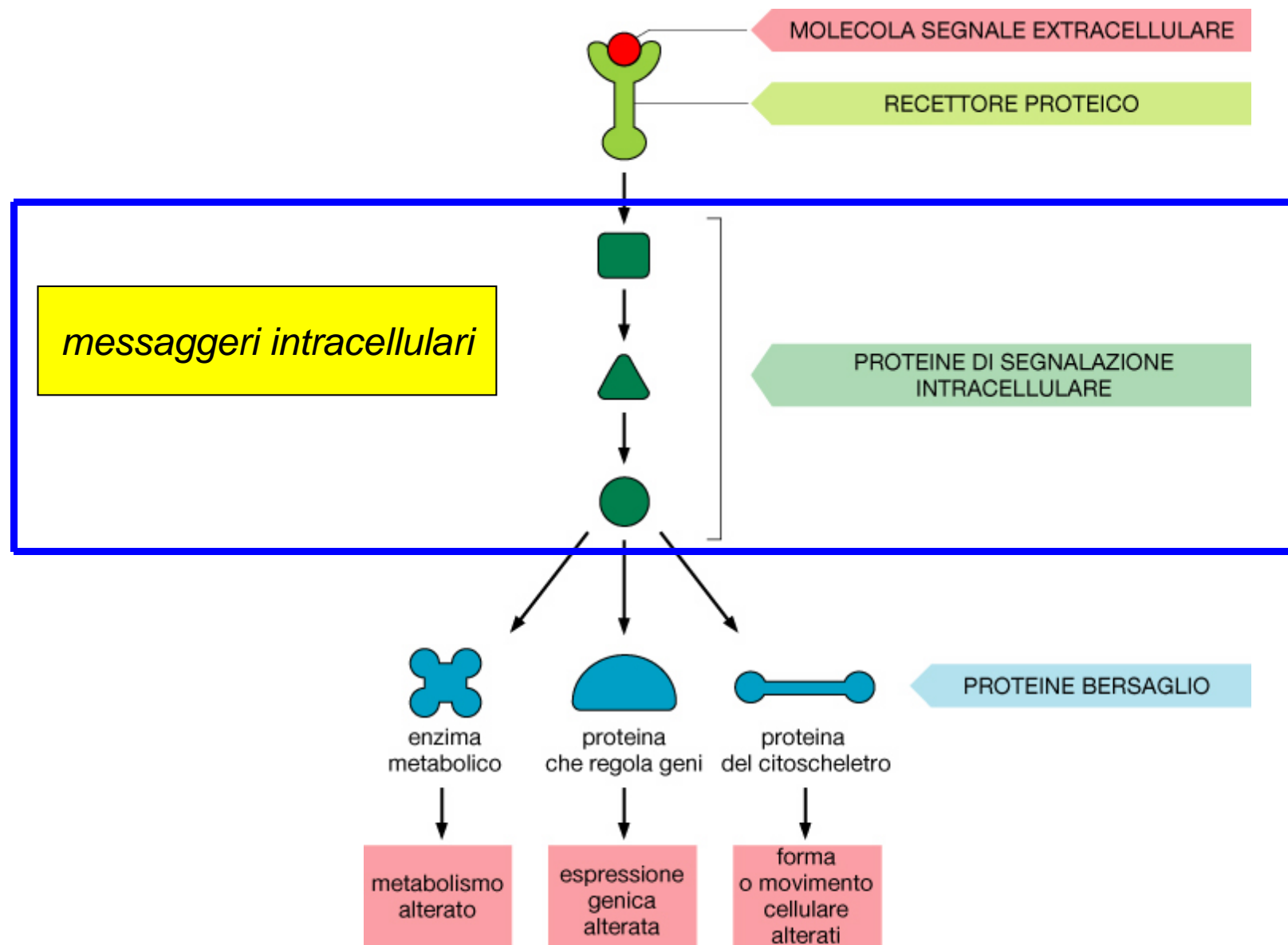
PIP3 lega **PKB** attivandola portando alla traslocazione alla m. plasmatica del **trasportatore per il glucosio** (così cellule muscolari e adipociti possono captare grandi quantità di glucosio dall'ambiente extracellulare)

La **segnalazione fra le cellule** normalmente risulta nella attivazione di proteine



Molti recettori di membrana legano molecole segnale che attivano una **proteina chinasi**

Semplice via di segnalazione intracellulare attivata da una molecola segnale extracellulare



MESSAGGERI INTRACELLULARI

**Es. Un segnale provoca l'attivazione di una proteina G
(il segnale originario normalmente non entra nella cellula)**

Conseguentemente si ha la produzione di messaggeri secondari dentro la cellula

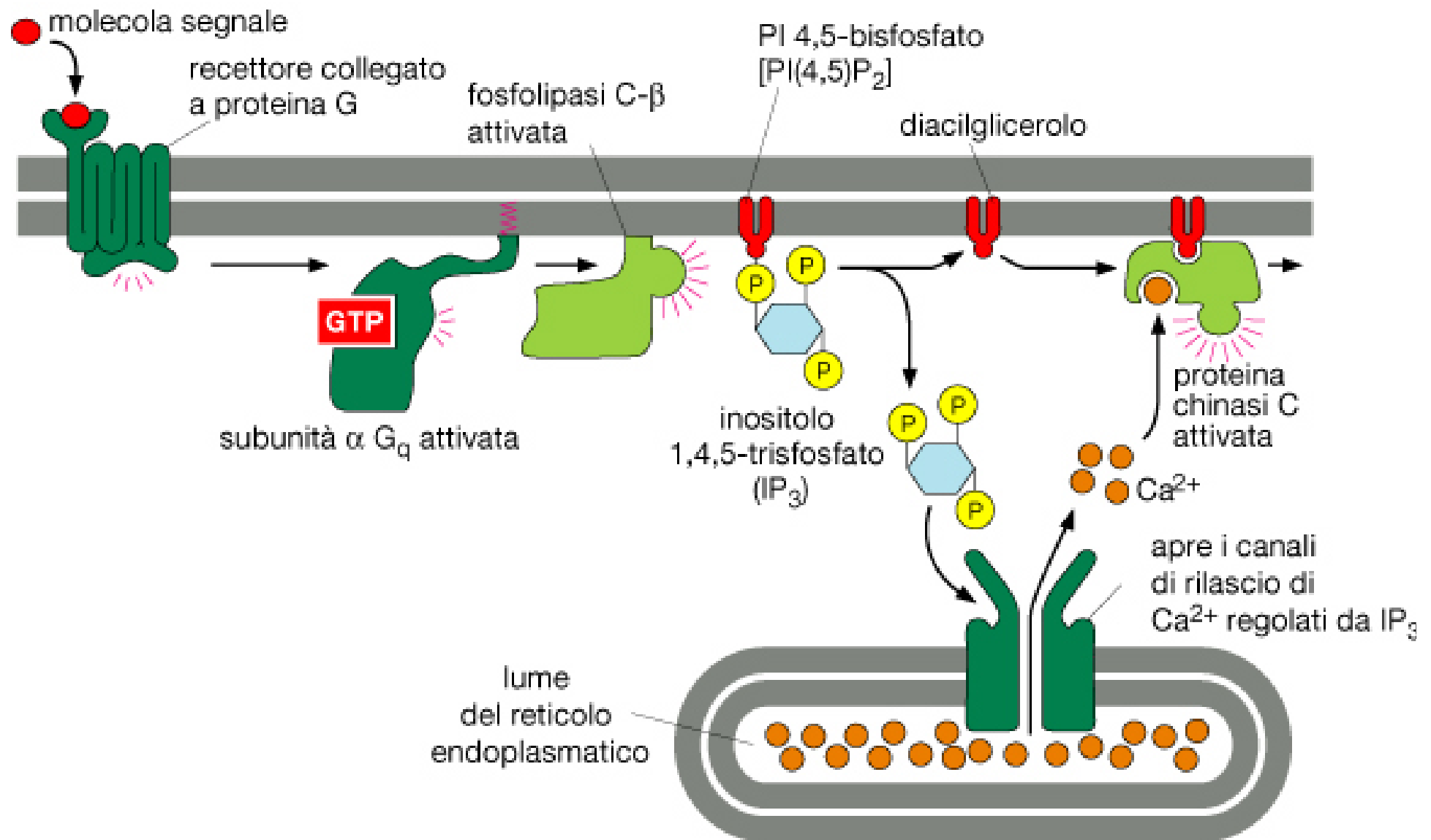
L'invio di un **segnale** attraverso la membrana cellulare può portare alla formazione di **MESSAGGERI SECONDARI** dentro la cellula.

- **Ca⁺⁺**
- **cAMP**
- **DAG**
- **IP3**
- **NO (ossido di azoto)**

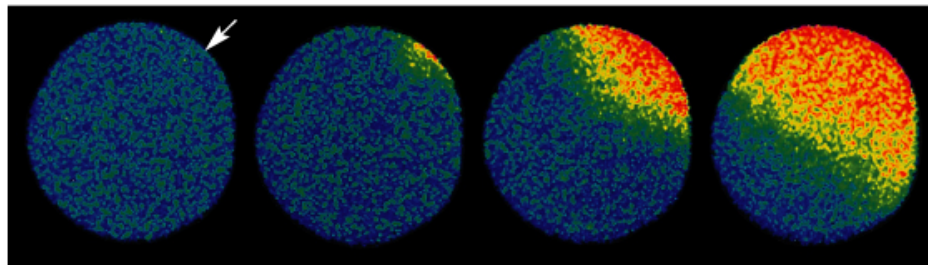
Svariate molecole possono agire come "messaggeri secondari".
I messaggeri secondari vengono prodotti quando un segnale (ligando) si lega ad un recettore di membrana. Le cellule sono programmate per le risposte, **lo stesso segnale e messaggero secondario possono avere differenti effetti secondo il programma che opera nella cellula.**

La risposta prodotta dalla cellula dipende da quale bersaglio è disponibile per la proteina bersaglio attivata

Alcune proteine G, attivando la fosfolipasi C, attivano la **via di segnalazione dell'inositolo fosfolipide** che produce due messaggeri intracellulari: **IP3** e **DAG**

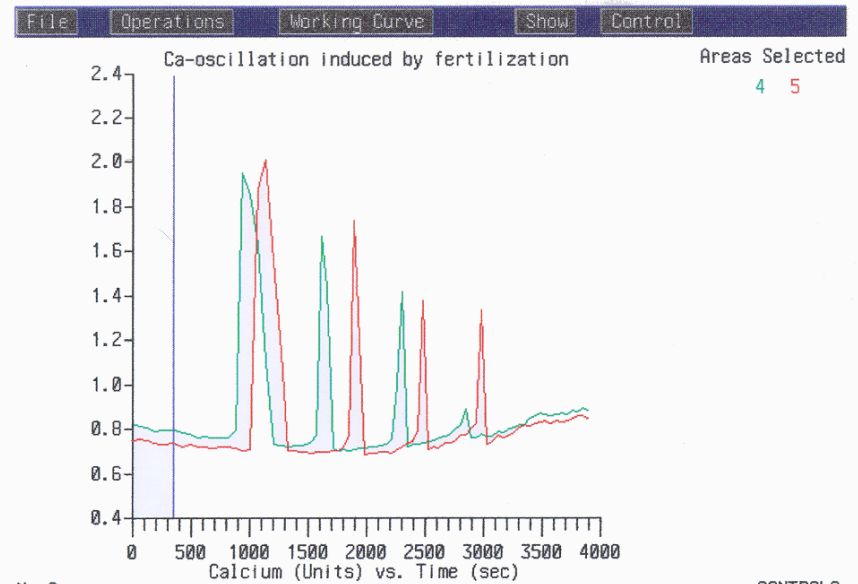


**Il Ca^{++} ha la funzione di
messaggero intracellulare
ubiquitario**



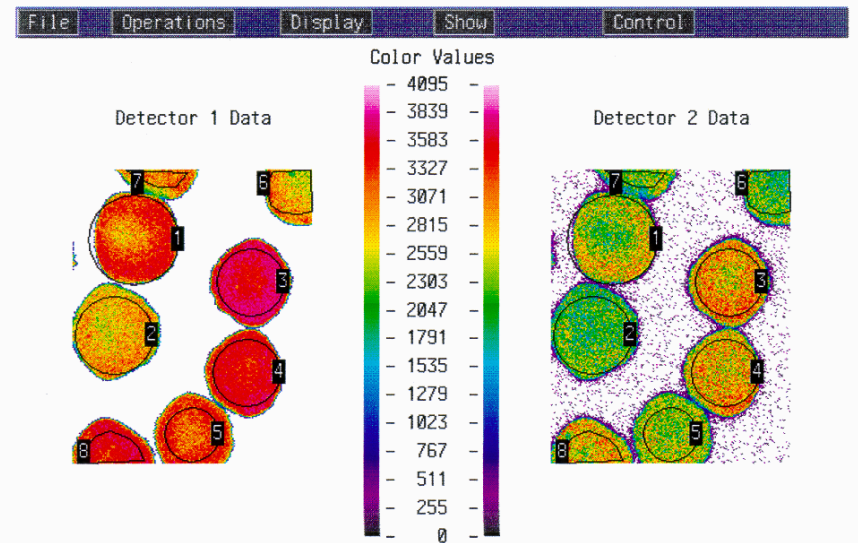
tempo 0 sec 10 sec 20 sec 40 sec

**La fecondazione da parte di
uno spz scatena un
aumento di Ca^{++} citosolico
che porta all'attivazione
della cellula uovo**



No Curve
Select Option Above or Click Bottom to Continue

APR 02, 1998 05:31 AM



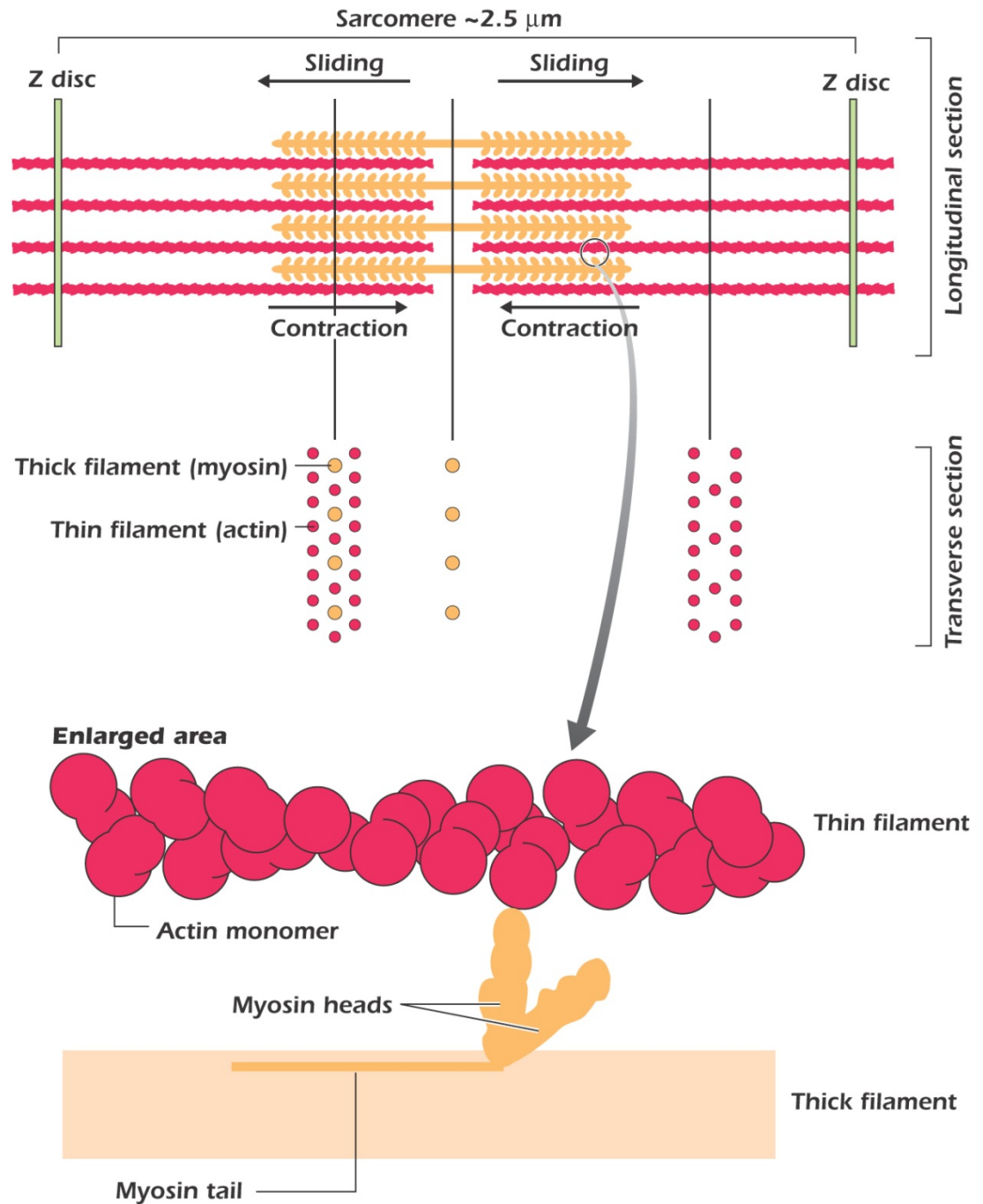
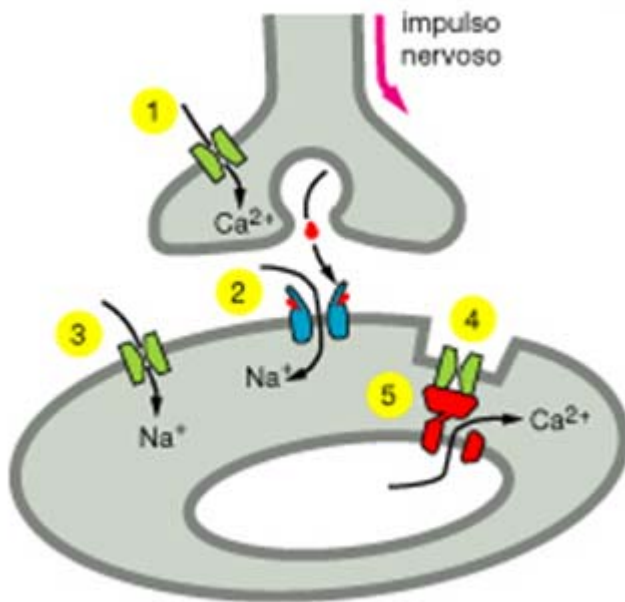
CONTROL2.S76

Select Option Above. (Select CANCEL to Exit.)

APR 02, 1998 06:08 AM

**Il Ca^{++} ha la funzione di
messaggero intracellulare
ubiquitario**

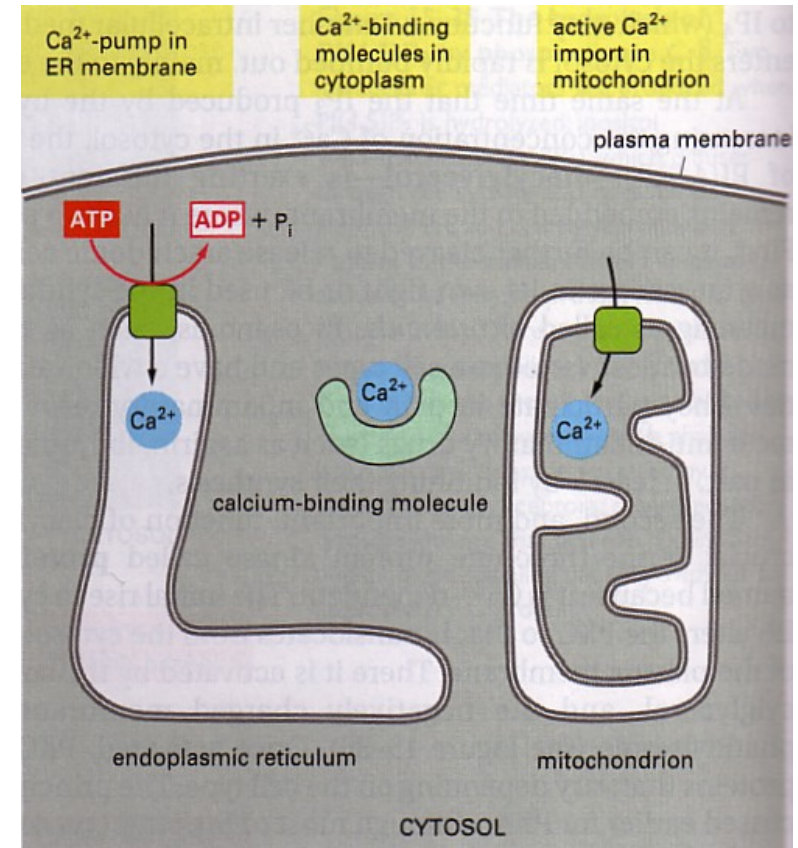
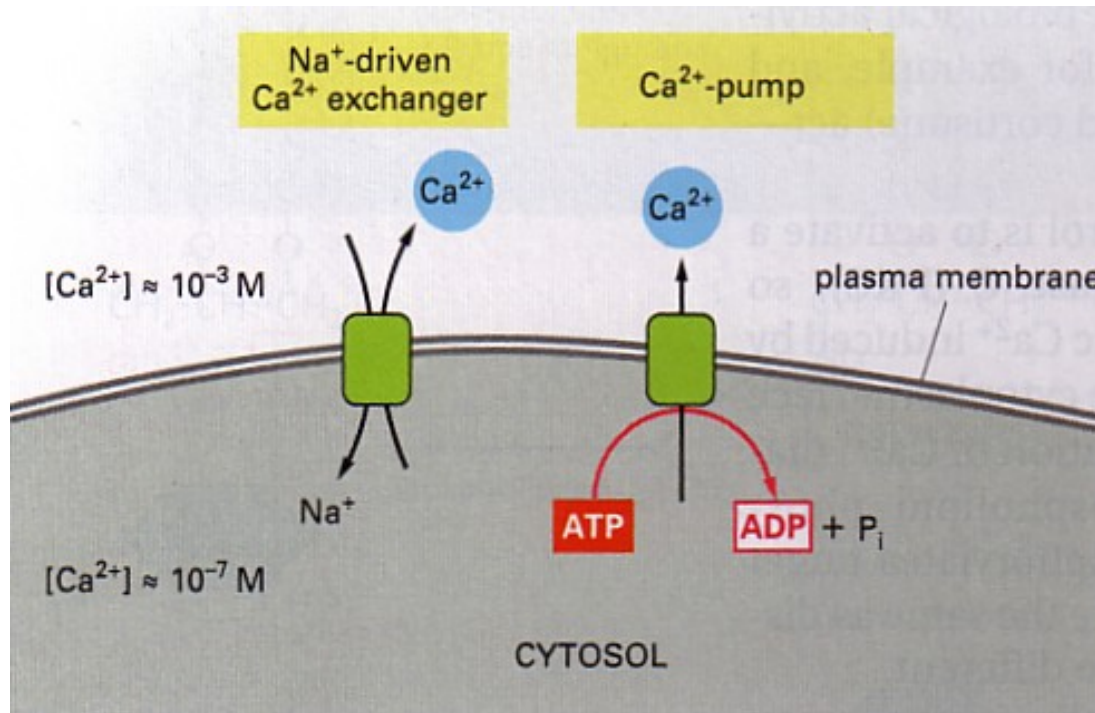
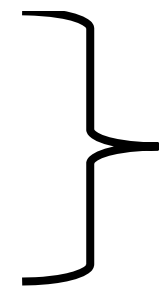
GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE ATTIVATA



Intracellular $[Ca^{++}]$ is kept low, $10^{-7}M$

Extracellular or of ER lumen $[Ca^{++}]$ is kept high, $10^{-3}M$

Steep gradient
to enable rapid
increase in $[Ca^{++}]_i$



REGULATION OF INTRACELLULAR $[Ca^{++}]$ CONCENTRATION

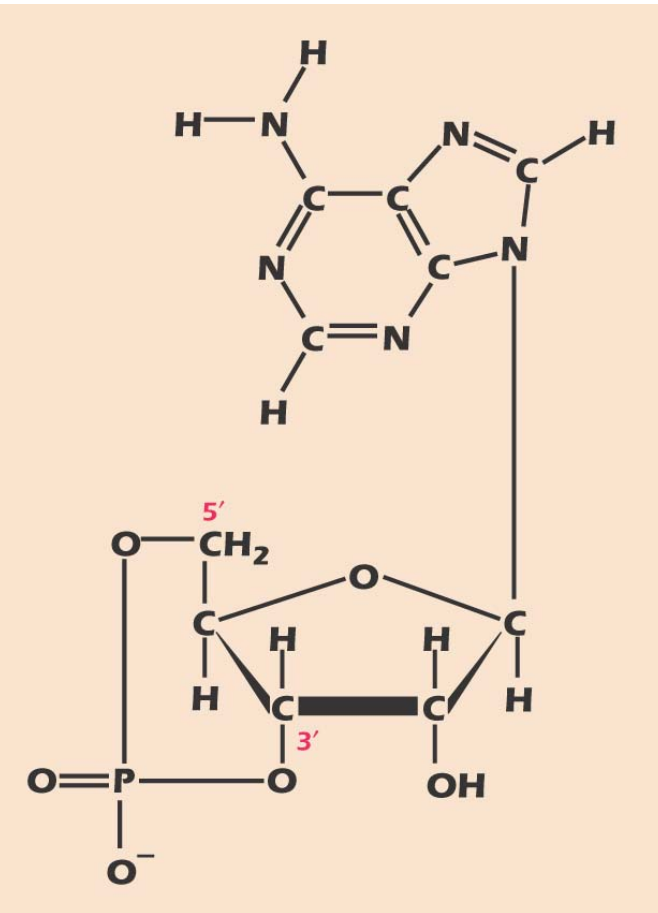
La piccola molecola di "cAMP" è stato il primo messaggero secondario identificato

Intracellular concentration 10^{-7} M

An extracellular signal can \uparrow x20 fold in seconds

➤ **cAMP** is synthesised from **ATP** by membrane bound *adenylyl cyclase*

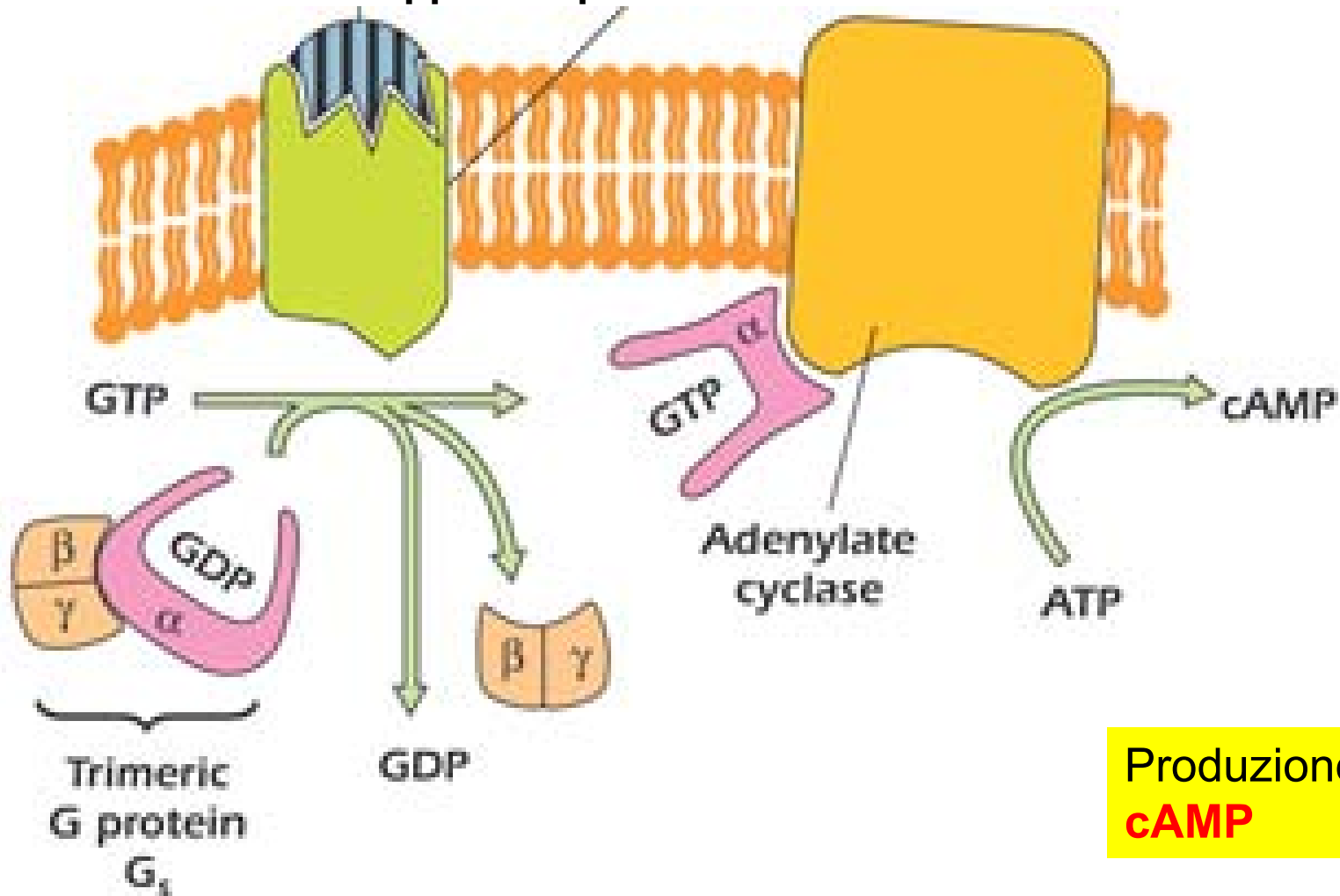
➤ **cAMP** is destroyed by **cAMP phosphodiesterases** to *adenosine 5' monophosphate (5'AMP)*



In most animal cells, cAMP works via PKA

Legame di una molecola segnale a un **recettore accoppiato a proteina G**

Attivazione dell'AC



Molte delle **azioni del cAMP** sono poi **mediate dalla PKA**, una serina-treonina kinasi cAMP-dipendente

cAMP-dependent protein kinase (PKA)

PKA catalyses the **transfer of terminal phosphate group** from ATP to specific serines or threonines of selected target proteins

➤ **Some cAMP mediated responses are rapid (seconds)**

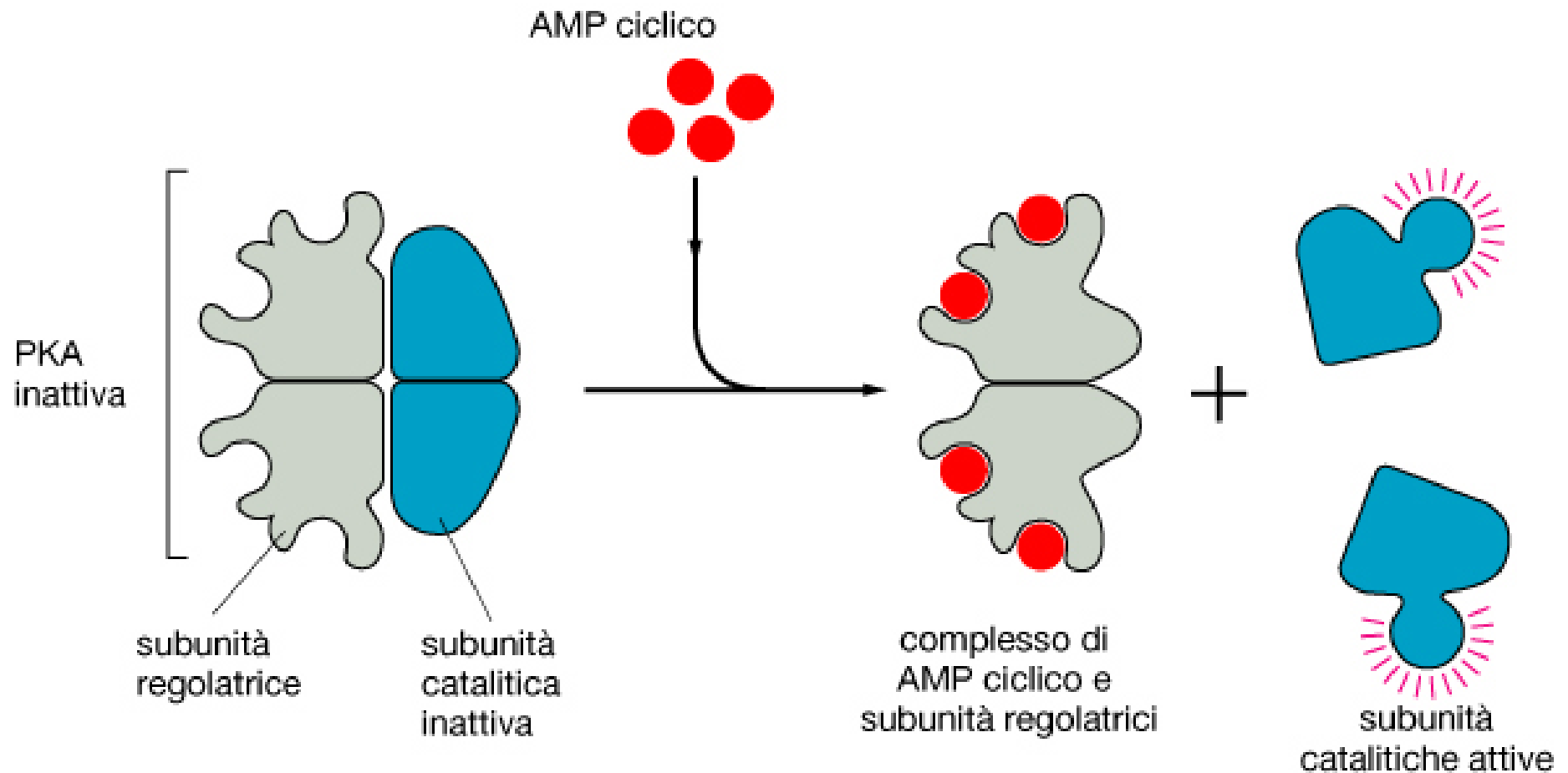
-Skeletal muscle cells

Activated PKA phosphorylates enzymes involved in glycogen metabolism

➤ **Some are slow (hours)**

Transcription of the genes (regulation)

La **PKA cAMP-dipendente** è una proteina chinasi che media la maggior parte degli effetti prodotti dal **cAMP**



In una reazione di aggressione o di fuga, l' **epinefrina** viene rilasciata dalle ghiandole che producono adrenalina e **si lega ai recettori di membrana delle cellule muscolari**. I **seguenti eventi avvengono** a causa del legame fra ligando e recettore:

- La **proteina G viene attivata** dal legame con il GTP e **determina la produzione di cAMP** da parte della adenil ciclasi.
- Il messaggero secondario, **cAMP**, **attiva la proteina chinasi A** che inibisce la glicogeno sintetasi **bloccando la sintesi di glicogeno**.
- La proteina chinasi A **attiva altre chinasi**, portando alla fosforilazione di enzimi coinvolti nel **metabolismo del glucosio**
- Il **glucosio prodotto** nel giro di poche sec è disponibile per la **produzione di energia per la contrazione muscolare**.

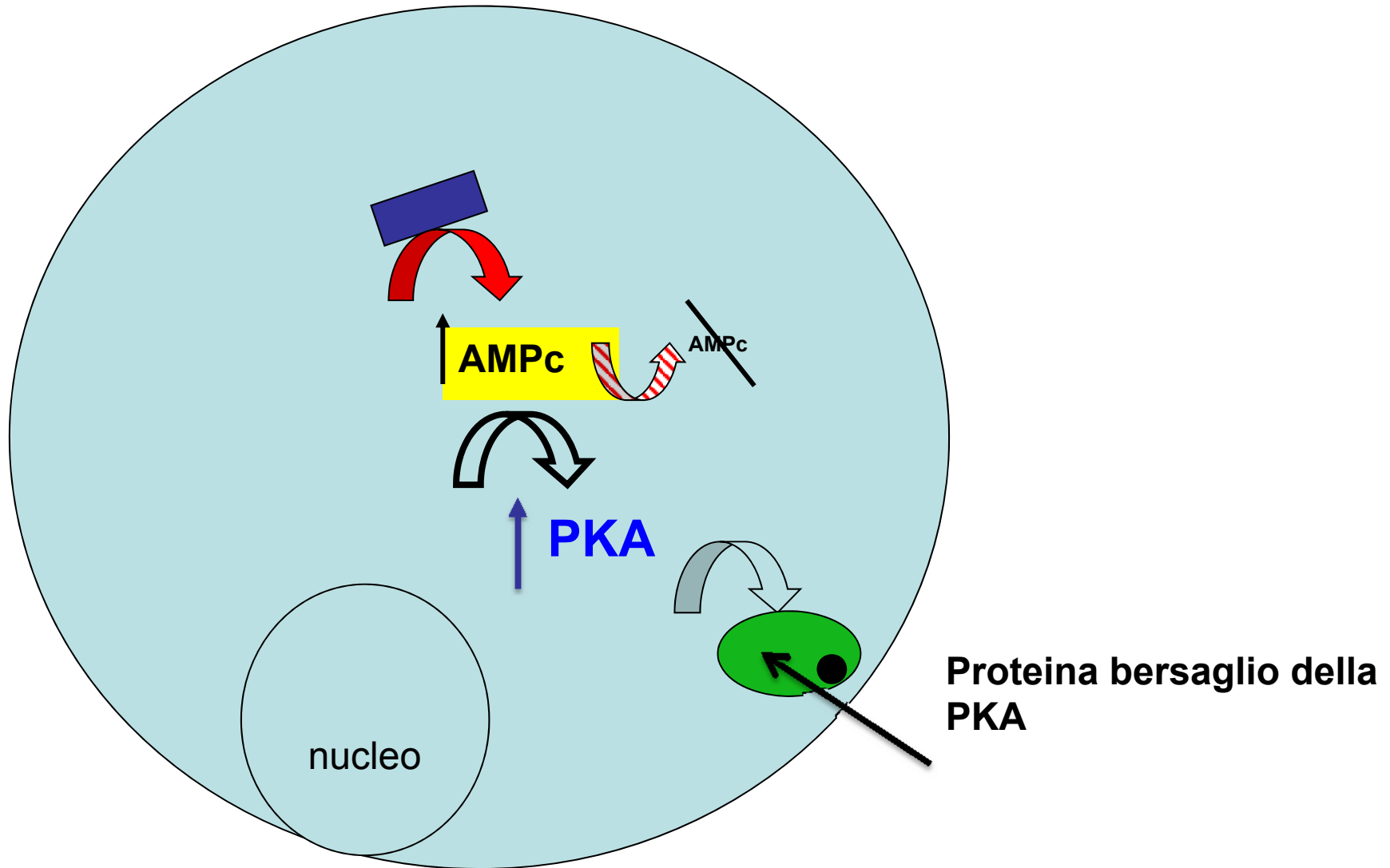
la risposta all'epinefrina, nel fegato e nei muscoli, è un **esempio di cascata** che determina il cambiamento di enzimi per assicurare che il glucosio libero sia disponibile per la glicolisi nei tessuti muscolari

cAMP: in tutte le specie di mammifero svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi molecolari che regolano la **MATURAZIONE DEL GAMETE FEMMINILE (fase M=MEIOSI)**, determinando il **mantenimento dell'arresto meiotico**



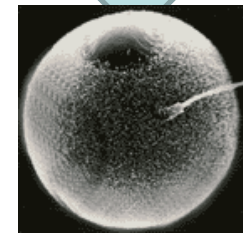
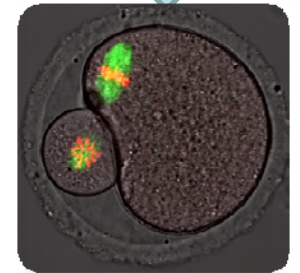
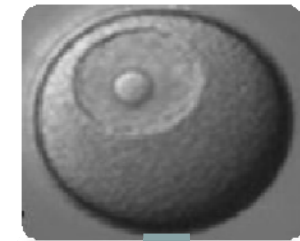
La maturazione della cellula uovo

Alti livelli intracellulari di cAMP mantengono l'oocita bloccato allo stadio di profase della meiosi

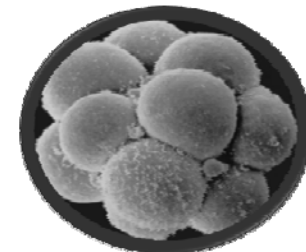


**Il PROCESSO DI
MATURAZIONE MEIOTICA**
della cellula uovo è
necessario per la
fecondazione e la
conseguente formazione
dell'embrione, da cui può
originare un nuovo
individuo

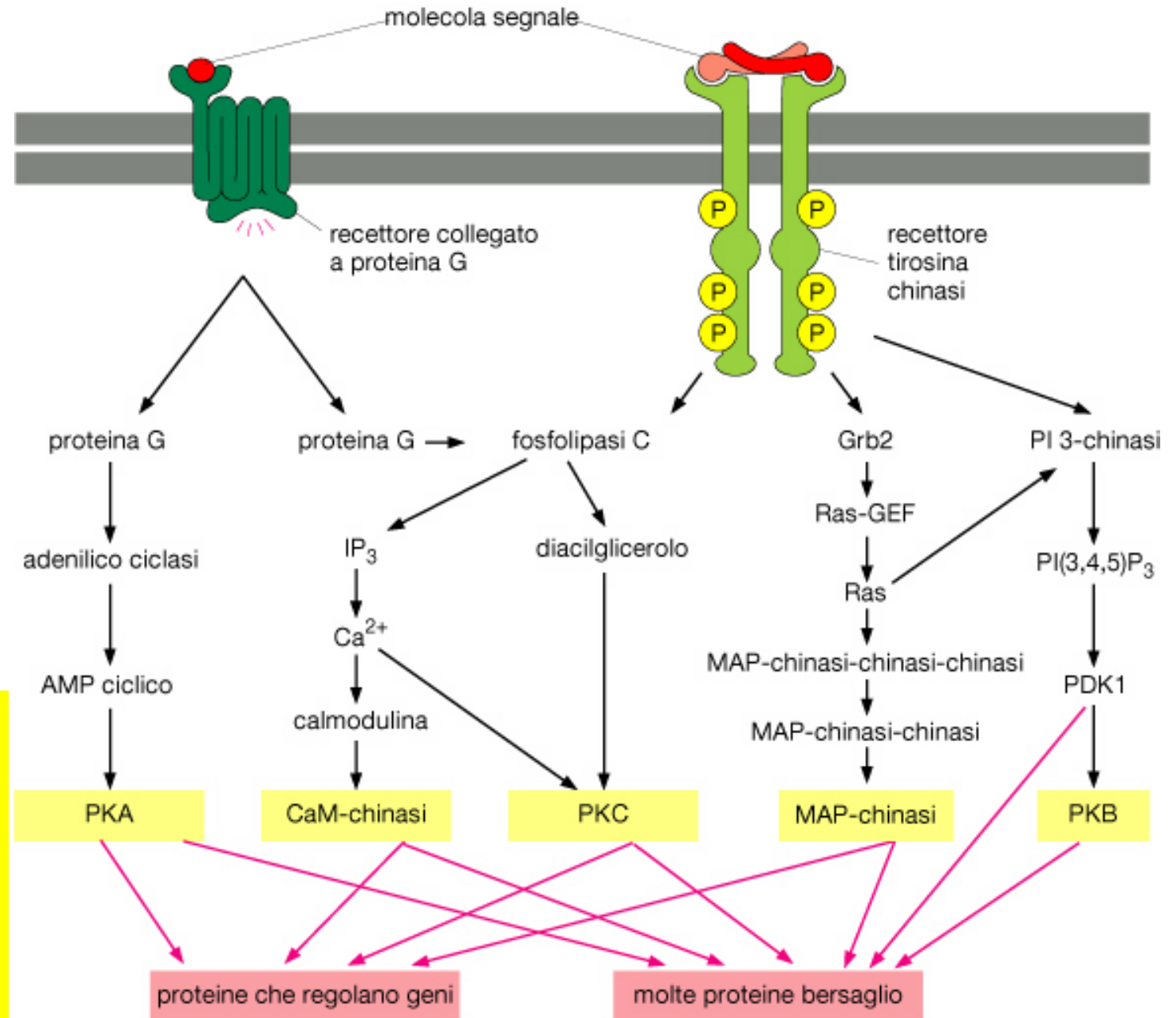
OOCITA



EMBRIONE

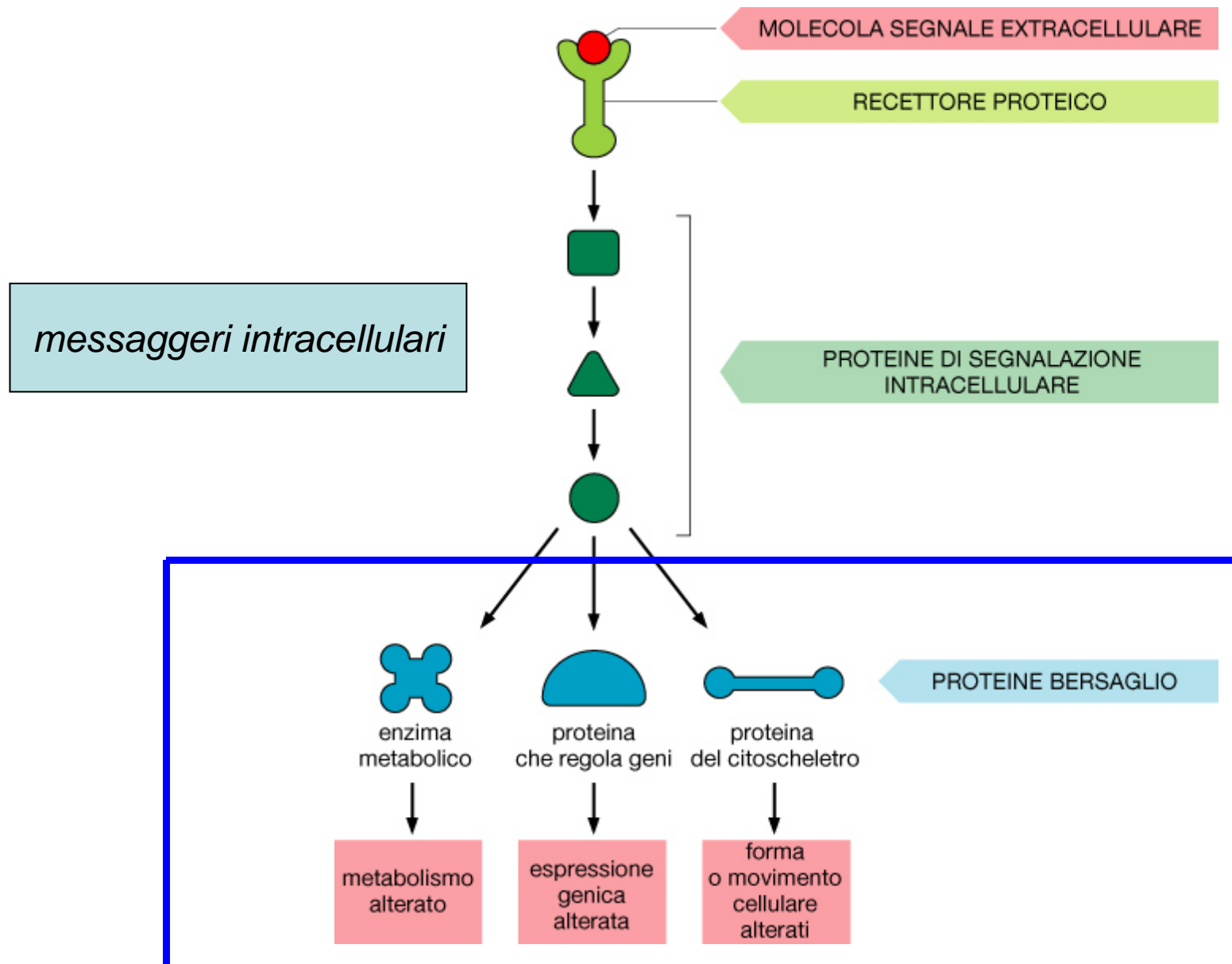


5 vie parallele di segnalazione intracellulare



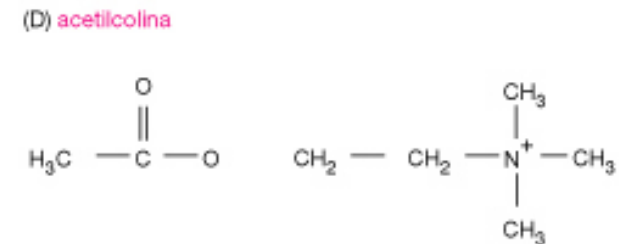
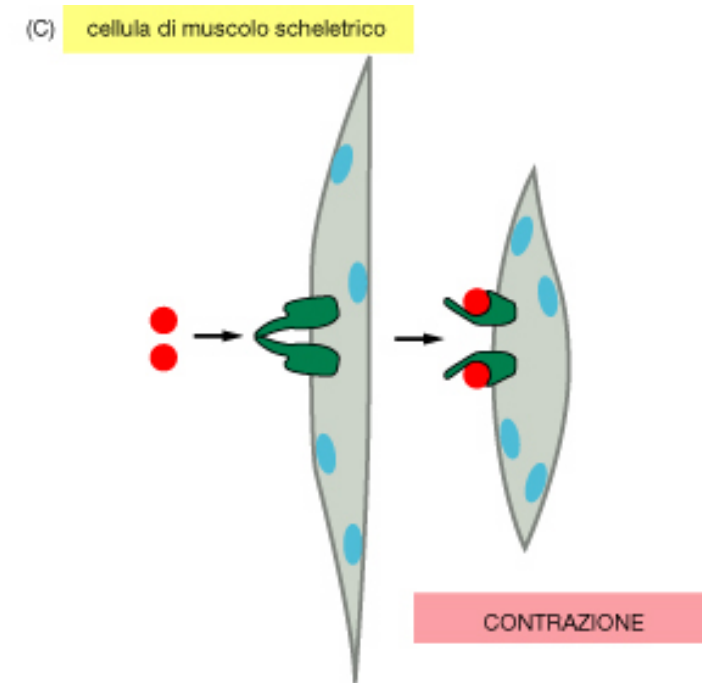
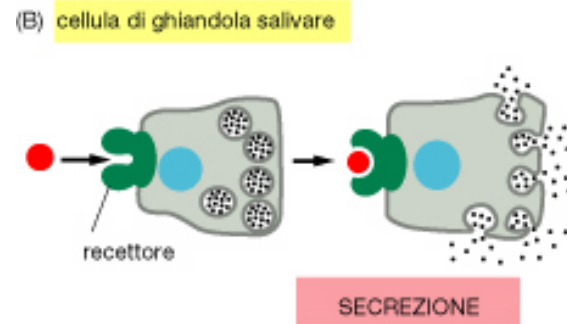
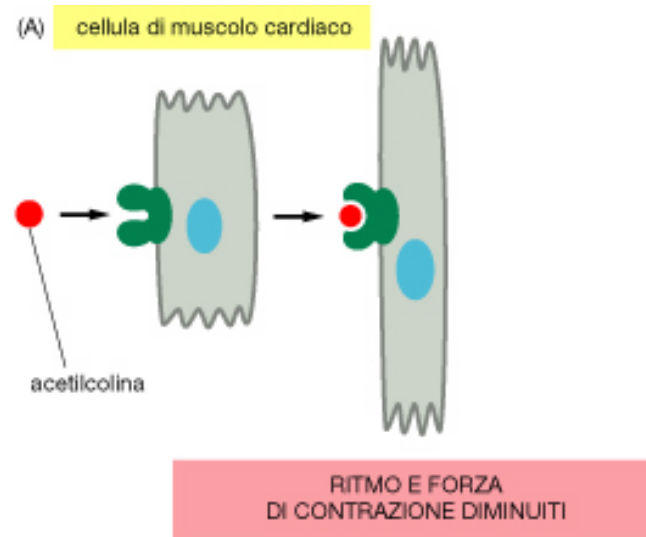
Le **chinasi** alla fine di ciascuna via fosforilano **proteine bersaglio**, alcune delle quali sono attivate da più di una chinasi

Semplice via di segnalazione intracellulare attivata da una molecola segnale extracellulare



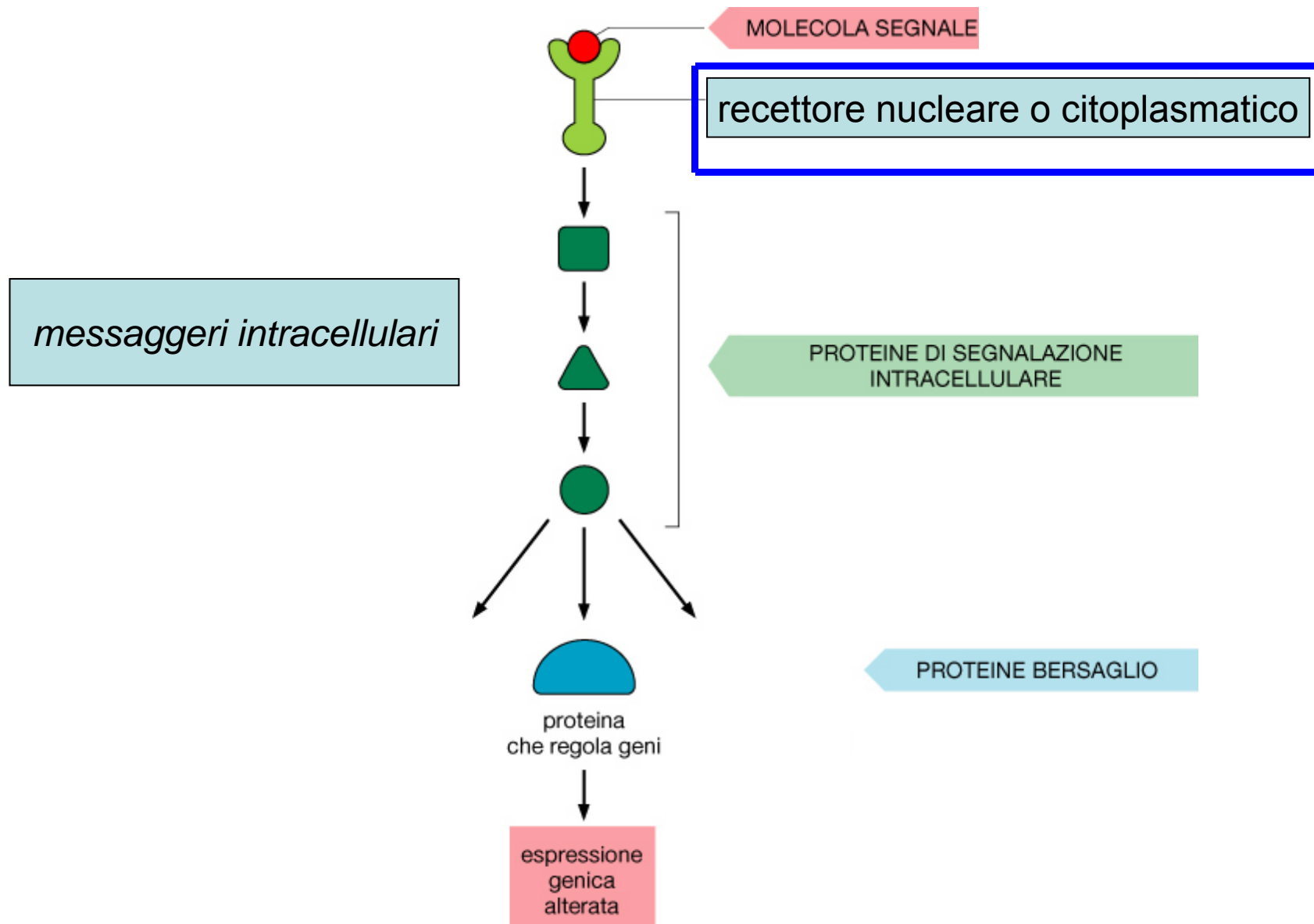
Varie risposte indotte dallo stesso neurotrasmettitore, l'acetilcolina

tipi cellulari diversi sono specializzati a rispondere in modo diverso allo stesso neurotrasmettitore

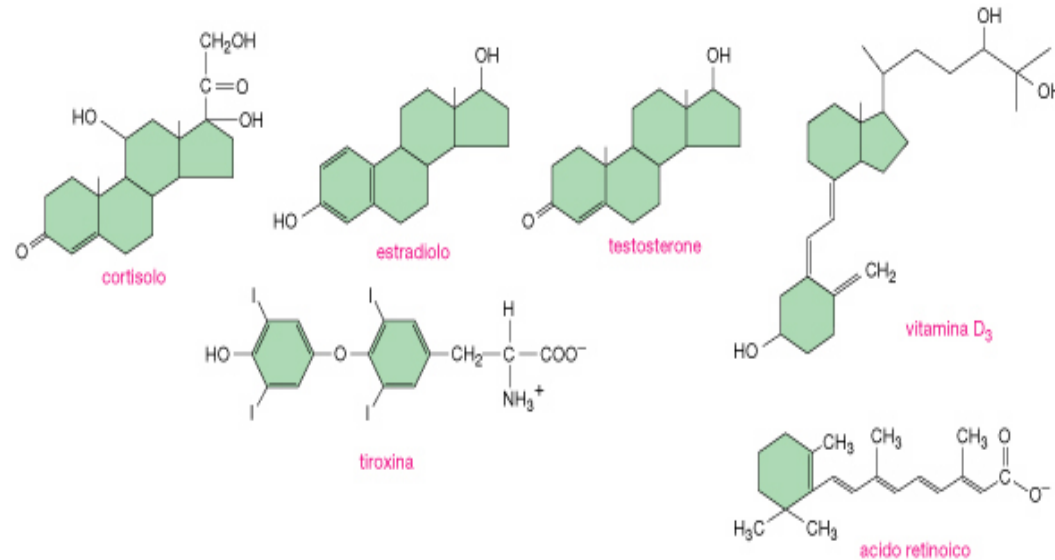


lo stesso segnale (e messaggero secondario) può avere differenti effetti su cellule diverse

ALCUNE MOLECOLE SEGNALE AGISCONO SU RECETTORI INTRACELLULARI

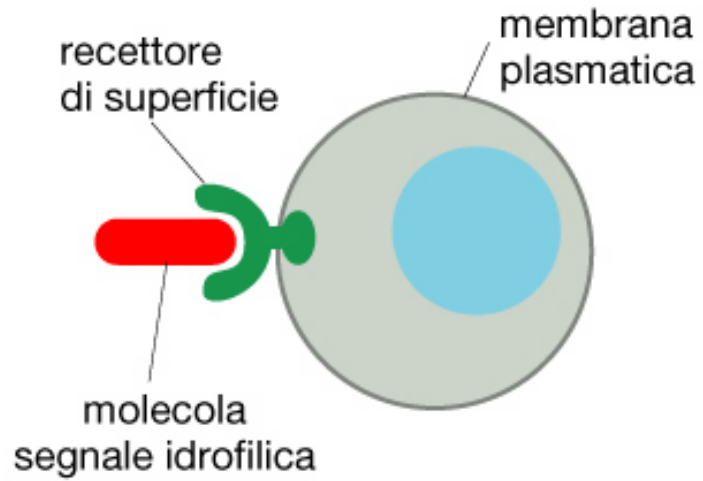


Gli estrogeni e il testosterone sono ormoni steroidei e si legano a RECETTORI CITOPLASMATICI

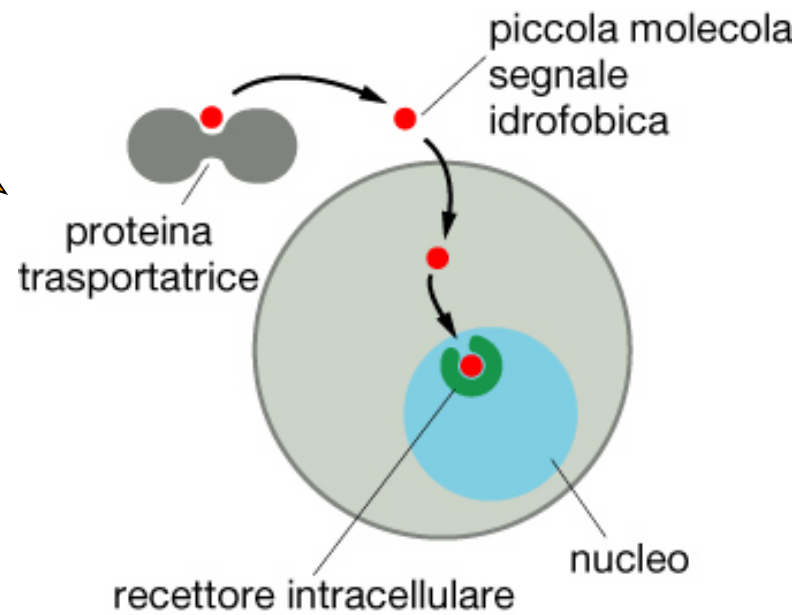


Gli ormoni steroidei, estrogeni e testosterone sono **non polari** e possono passare attraverso il doppio strato lipidico senza legarsi a un recettore di membrana. Gli ormoni steroidei **si legano a speciali recettori nel citoplasma della cellula**. Questi recettori si modificano e migrano verso il nucleo dove **attivano la trascrizione**.

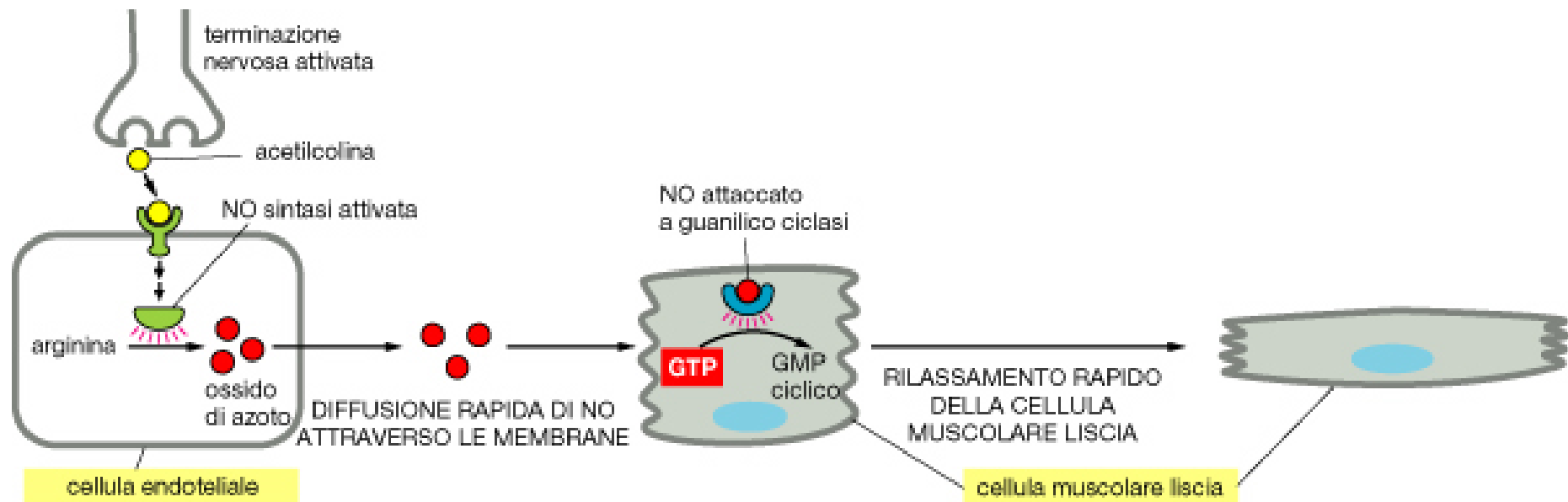
RECETTORI DI SUPERFICIE



RECETTORI INTRACELLULARI



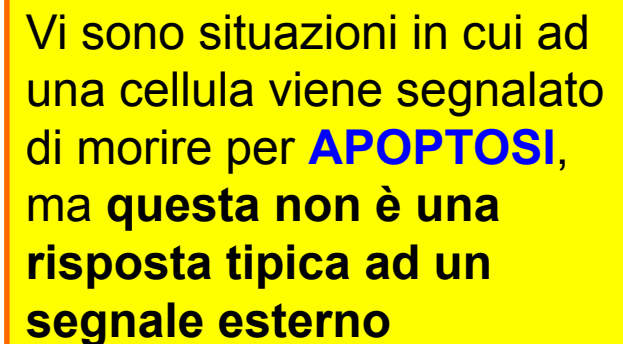
L' **ossido di azoto (NO)** è una molecola segnale sia negli animali che nei vegetali entra nella cellula e si lega direttamente ad un enzima **dentro** la cellula bersaglio



Ruolo dell'NO nel rilassamento della muscolatura liscia nella parete di un vaso sanguigno

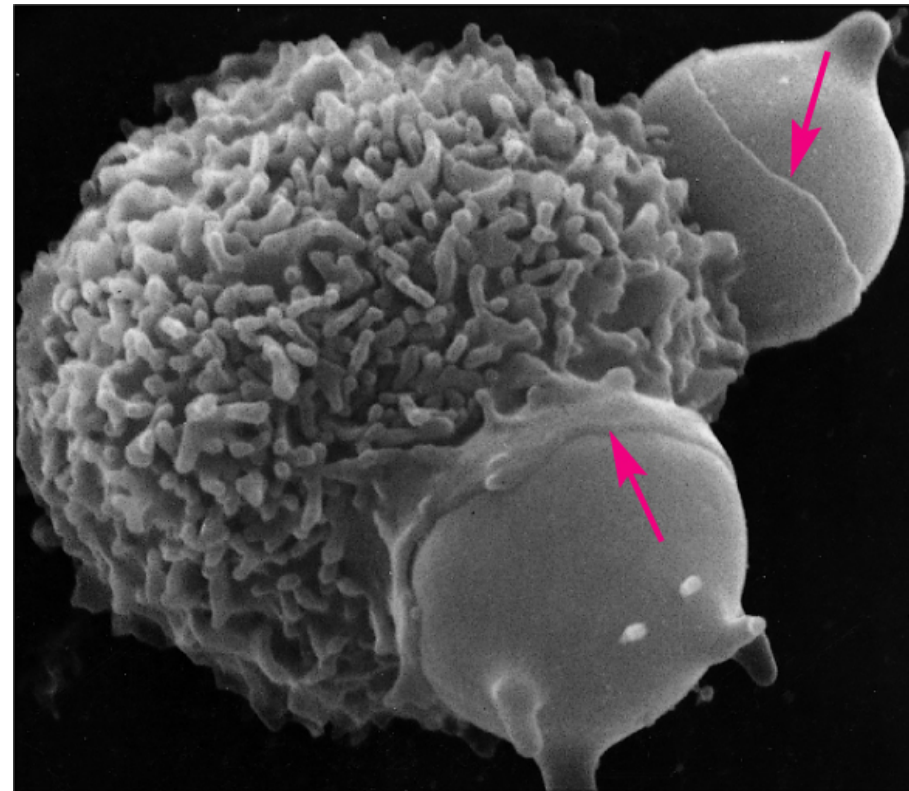
Quale delle seguenti **NON** è una **risposta tipica** associata ad una segnalazione cellulare?

- **Attivazione della proteina G** tramite lo scambio fra GTP e GDP
- **Produzione di messaggeri secondari** (cAMP e IP₃,...)
- **Attivazione di una proteina chinasi** (PKA, PKC,...)
- **Rilascio di ioni calcio nel citosol cellulare**
- **Stimolazione dell 'apoptosi**



Vi sono situazioni in cui ad una cellula viene segnalato di morire per **APOPTOSI**, ma **questa non è una risposta tipica ad un segnale esterno**

Le cellule possono andare incontro anche ad un processo di morte cellulare programmata:
APOPTOSI



5 μm

rimozione di cellule apoptotiche da parte di un macrofago