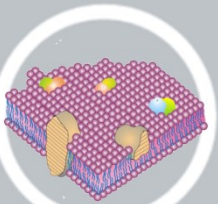


Modulo A3

Le membrane biologiche e i processi di membrana



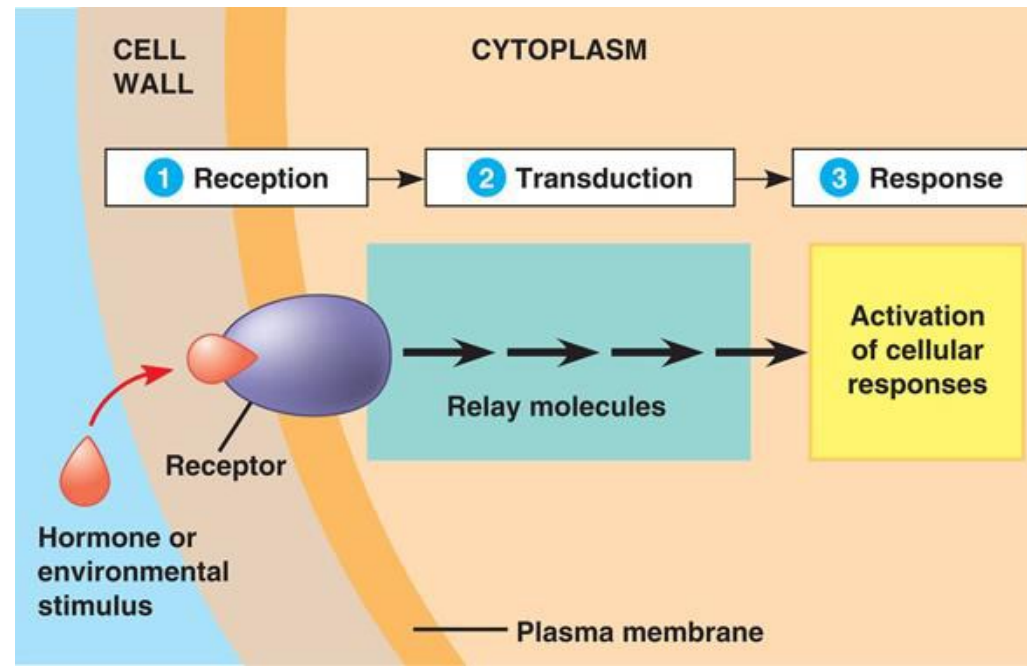
Modulo A3_C Trasduzione del segnale

2023-24

TRASDUZIONE DEL SEGNALE: Reception – Transduction - Response

- ▶ La capacità di ricevere e rispondere a segnali esterni alla cellula, attraverso la membrana citoplasmatica è un processo fondamentale per la vita.
- Le cellule negli organismi pluricellulari si **scambiano informazioni**:
segnale chimico = Informazione
- l'informazione è **rilevata da specifici recettori**, proteine che riconoscono e recepiscono questi stimoli chimici e li convertono in una risposta cellulare
- la **trasduzione del segnale** è il processo mediante il quale i **segnali esterni** sono **trasmessi** nella cellula attraverso una serie di eventi molecolari, che alla fine si **traduce** in una **risposta cellulare** (variazione del metabolismo, espressione genica, propagazione, movimento etc)

SEGNALE ESTERNO



RECETTORI DI MEMBRANA e TRASDUZIONE DEL SEGNALE

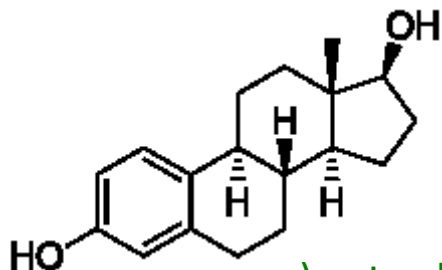
- ▶ I recettori di membrana recepiscono segnali fisici o chimici provenienti dall'esterno della cellula
 - i segnali percepiti possono essere di molti diversi tipi:

SEGNALE EXTRACELLULARE			
Tipo di segnale	esempio	Tipo di segnale	
fisico	calore	chimico esogeno	ipossia
	luce		PRAMP (patogeni)
meccanico	segnali tattili	chimico endogeno	ormoni
	vibrazioni dell'aria		componenti matrice
chimico esogeno	molecole odorose		chemochine
	molecole gustative		citochine

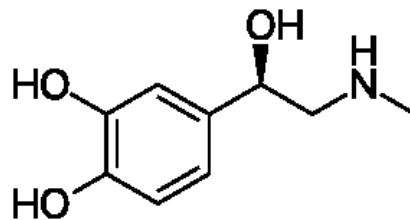
- ▶ Trasduzione - i meccanismi con cui gli stimoli esterni sono trasdotti in segnali chimici interni si basano su:
 - un ridotto numero di **vie di trasduzione**
 - che utilizzano un ridotto numero di **componenti di base**

TRASDUZIONE DEL SEGNALE: 1° messaggeri

- Il segnale è spesso trasdotto da **1° messaggero** (segnale chimico intercellulare) a **2° messaggeri** (segnali chimici intracellulari)
- i **1° messaggeri** sono ormoni che coordinano l'attività metabolica nelle cellule in organismi pluricellulari
- sono sintetizzati da tessuti specializzati (**ghiandole**) e secreti direttamente nel sangue
- permettono alle cellule di **comunicare fra di loro**, alterando l'attività delle cellule bersaglio in maniera **specific**a e **transiente**.
- Sono essenzialmente di tre tipi:
 - a) **steroidi** (derivati dal colesterolo) – lipofili, possono attraversare la membrana per diffusione semplice e hanno recettori intracellulari
 - b) **piccole molecole organiche** (spesso derivate da aminoacidi) – acetilcolina, glutammato, acido γ -aminobutirico, adrenalina, dopamina, istamina, opiat
 - c) **peptidici** – es. glucagone, insulina.



a) estradiolo



b) adrenalina

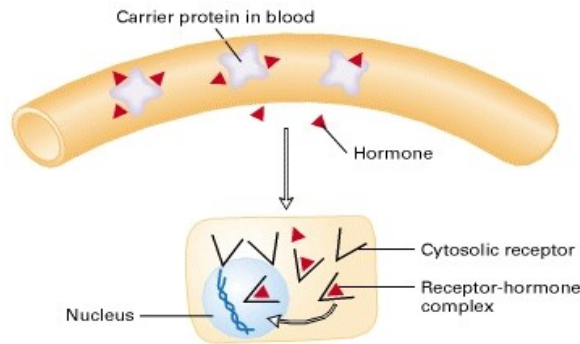
c) insulina



LOCALIZZAZIONE dei recettori

► La localizzazione dei recettori dipende dalle *proprietà chimico-fisiche* dei segnali

Molecole liposolubili



Le membrane biologiche **NON** costituiscono una barriera alla loro diffusione

(I)
RECETTORI INTRACELLULARI (NUCLEARI)

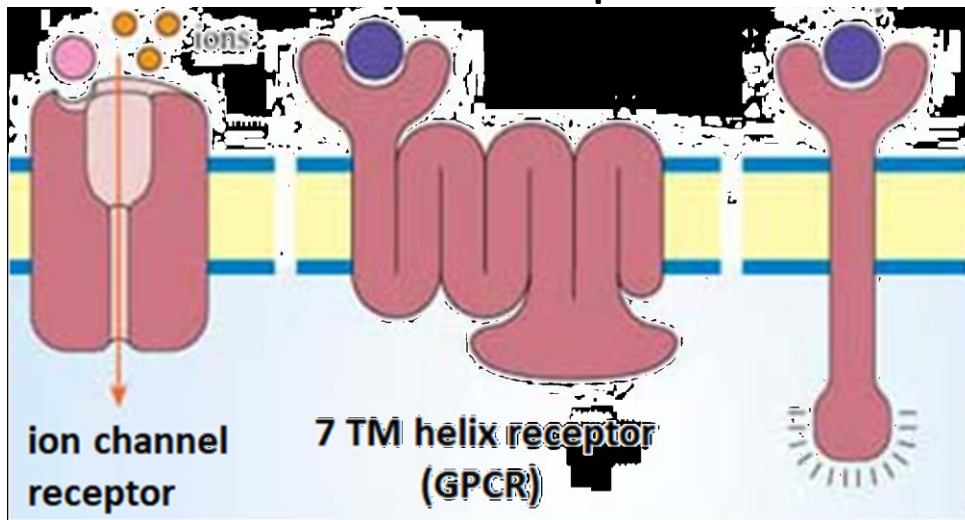
Molecole idrosolubili

(III)

(II)

(IV)

Receptor with intrinsic enzyme



Le membrane biologiche costituiscono una barriera alla loro diffusione

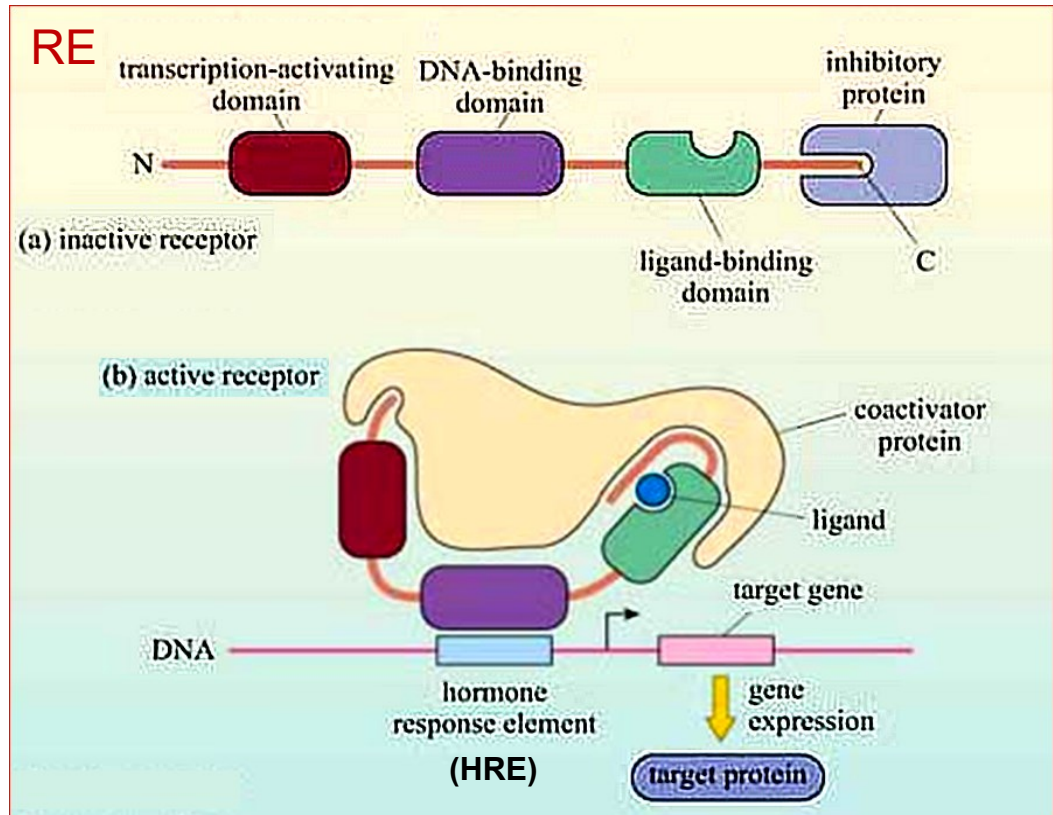
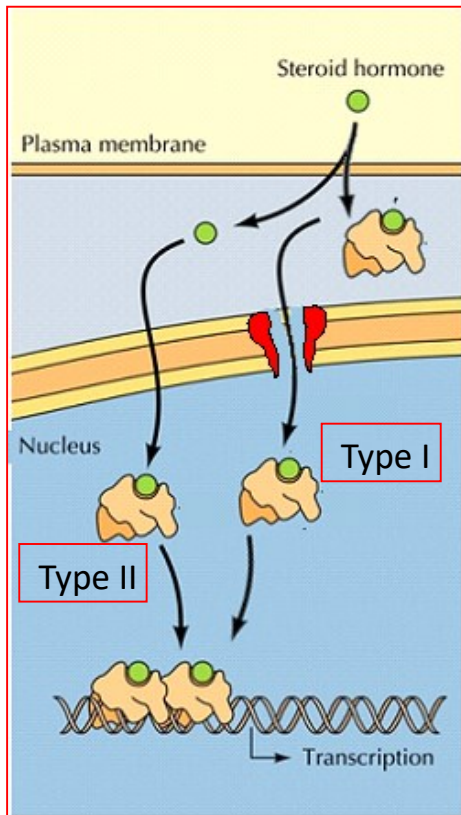
RECETTORI DI MEMBRANA

- trasducono il **segnale extracellulare** in **segnali chimici intracellulari** (2° messaggeri)
- innescano **cascate enzimatiche** che **amplificano il segnale**
- Il segnale **deve essere transiente**
- la **terminazione** è inclusa nella via di trasduzione

(I) RECETTORI INTRACELLULARI (per steroidi)

► Recettori legano ormoni steroidei all'interno della cellula (entrano per diffusione semplice)

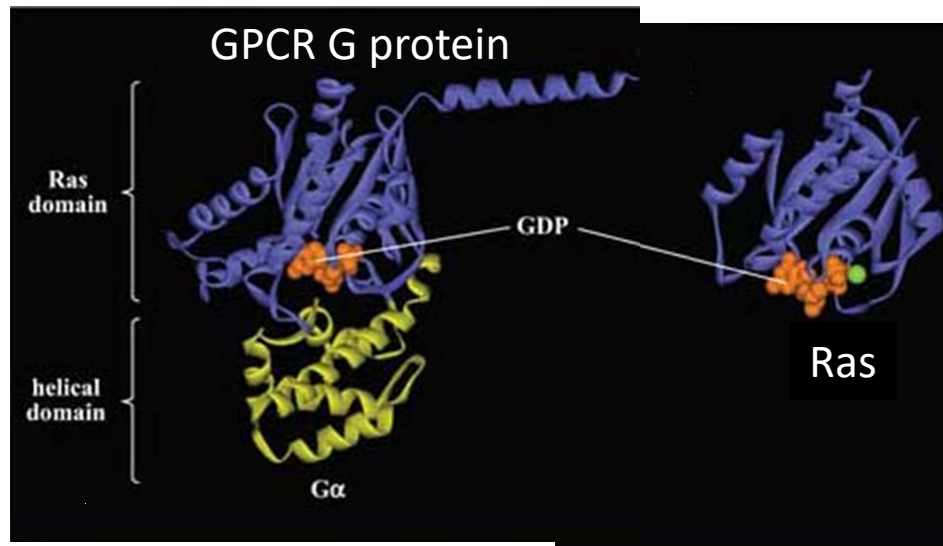
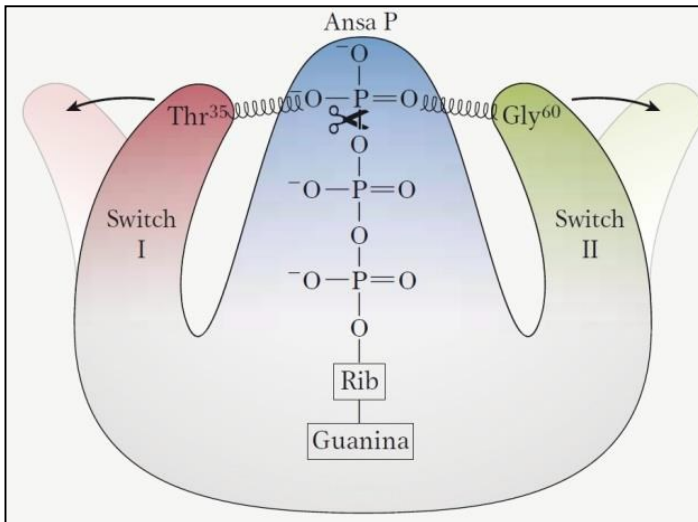
- recettori intracellulari di **tipo I** legano la molecola segnale nel citoplasma, subiscono una trasformazione e si spostano nel nucleo dove mediano la trascrizione del gene bersaglio
- recettori di **tipo II** sono già residenti nel nucleo
- sono **nuclear response elements (RE)**; alcuni rispondono a **1° messaggeri**, altri a **2° messaggeri**



response element (RE): to hormone → HRE to vitamin D → VDRE to cAMP → CRE

RECETTORI ASSOCIATI A PROTEINE G: cosa sono le proteine G?

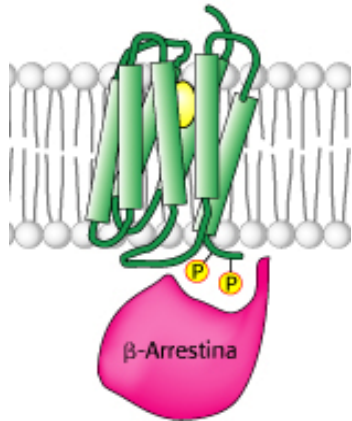
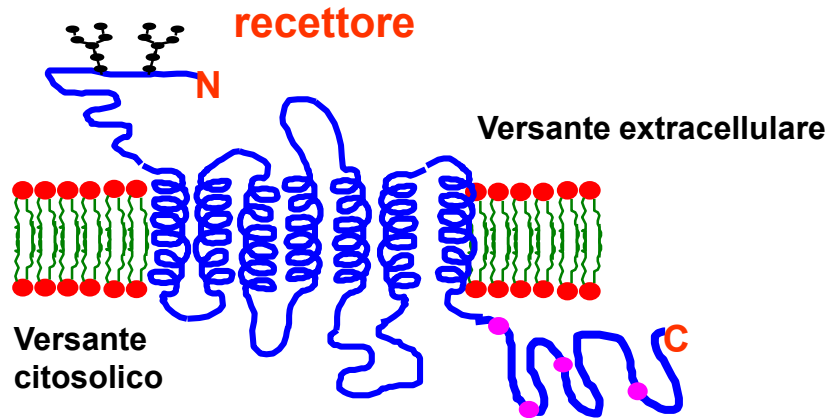
- ▶ Le proteine Ras sono proteine G monomeriche non associate a recettori
- sono il **prototipo** per le proteine G e sono **ancorate alla membrana** con coda lipidica
- **legano GTP** e lo **idrolizzano a GDP + Pi** e agiscono come **attivatori molecolari** (*molecular switches*) in molti importanti processi cellulari; sono **GTPasi lente** (**timer chimici**) e il legame di GTP è mediato da **GEF** (**G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actors), mentre l'idrolisi viene regolata da **GAP** (**G**-protein **A**ctivating **P**rotein)
- Quando si lega, **GTP forma legami-H** con due regioni di **Ras/GTP** (note come **switch I** e **II**) che **permette l'interazione con le proteine che attiva**; l'idrolisi rimuove i legami-H e **Ras/GDP** non è più in grado di attivare le proteine regolate
- nei **GPCR** le proteine G hanno un **dominio Ras** (ancorato alla membrana) e un **dominio elicoidale (AH)** che forma un **cappuccio sul sito di legame per GTP**



Recettori a 7 eliche transmembrana associati a proteine G (7TMH/GPCR)

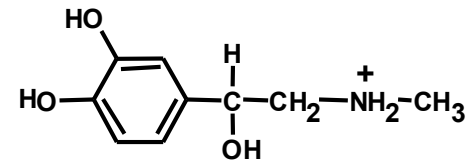
- Grande gruppo di recettori di membrana negli eucarioti – attivati da ligandi o luce
- partecipano in due modi principali per la trasduzione del segnale: 1) cAMP signal pathway

1) cAMP signal pathway



2) phosphoinisitol « «

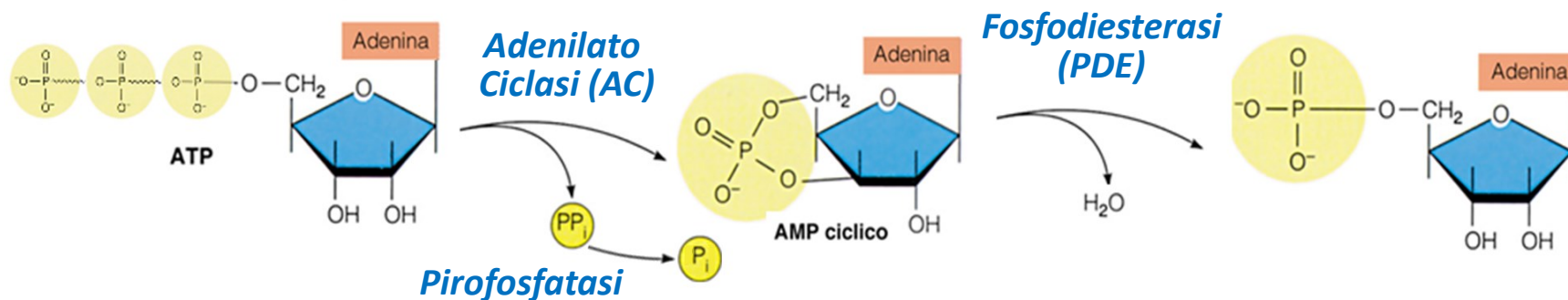
ADRENALINA (EPINEFRINA) (*deriva da Tyr*)



GLUCAGONE (ormone peptidico)

cAMP – 2° messaggero

► Il cAMP è formato dall'ATP (5'-ATP) tramite una reazione di ciclizzazione con perdita di PPi.

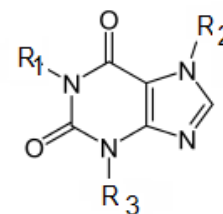


- sarebbe energeticamente non favorevole se non fosse accompagnata dall'idrolisi del pirofosfato.
- [cAMP] transiente; dipende dal bilancio tra l'attività di **AC** e **PDE** specifica che idrolizza il legame fosfodiesterico ciclico a livello dell'OH sul carbonio 3', producendo 5'-AMP

PDE – fosfodiesterasi cAMP e cGMP specifiche sono **importanti bersagli terapeutici**



- ci sono varie famiglie di **fosfodiesterasi (PDE)**, 11 nei mammiferi)
- inibitori di **cAMP-PDE** o di **cGMP-PDE** portano all'aumento di [cAMP] o di [cGMP] (con effetti potenzialmente utili).
- **Metilxantine** (**teofillina**, **teobromina**, **caffeina**) sono inibitori di **PDE3** (cAMP-specifica).
- **Viagra**, **Cialis** e **Levitra** sono inibitori di **PDE5** (cGMP-specifica)

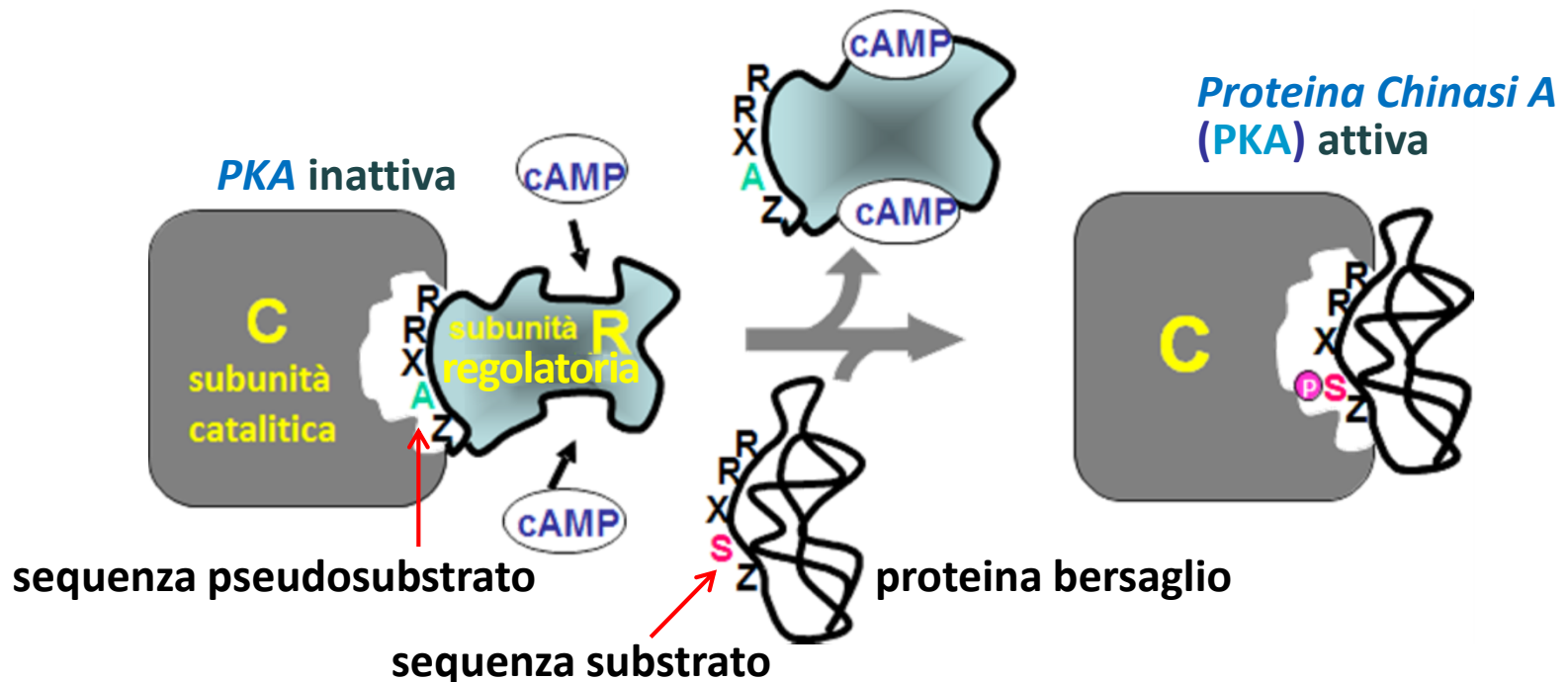
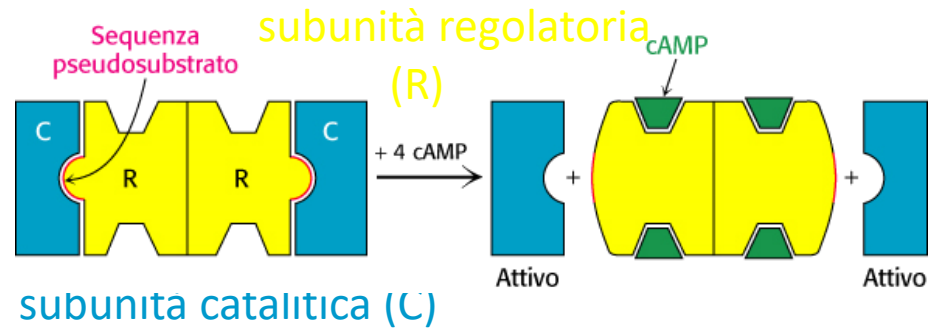


	R ₁	R ₂	R ₃
Caffeine	CH ₃	CH ₃	CH ₃
theobromine	H	CH ₃	CH ₃
theophylline	CH ₃	H	CH ₃

NO → **guanilato ciclasi** → **cGMP** → **effectors** → **smooth muscle relaxation**

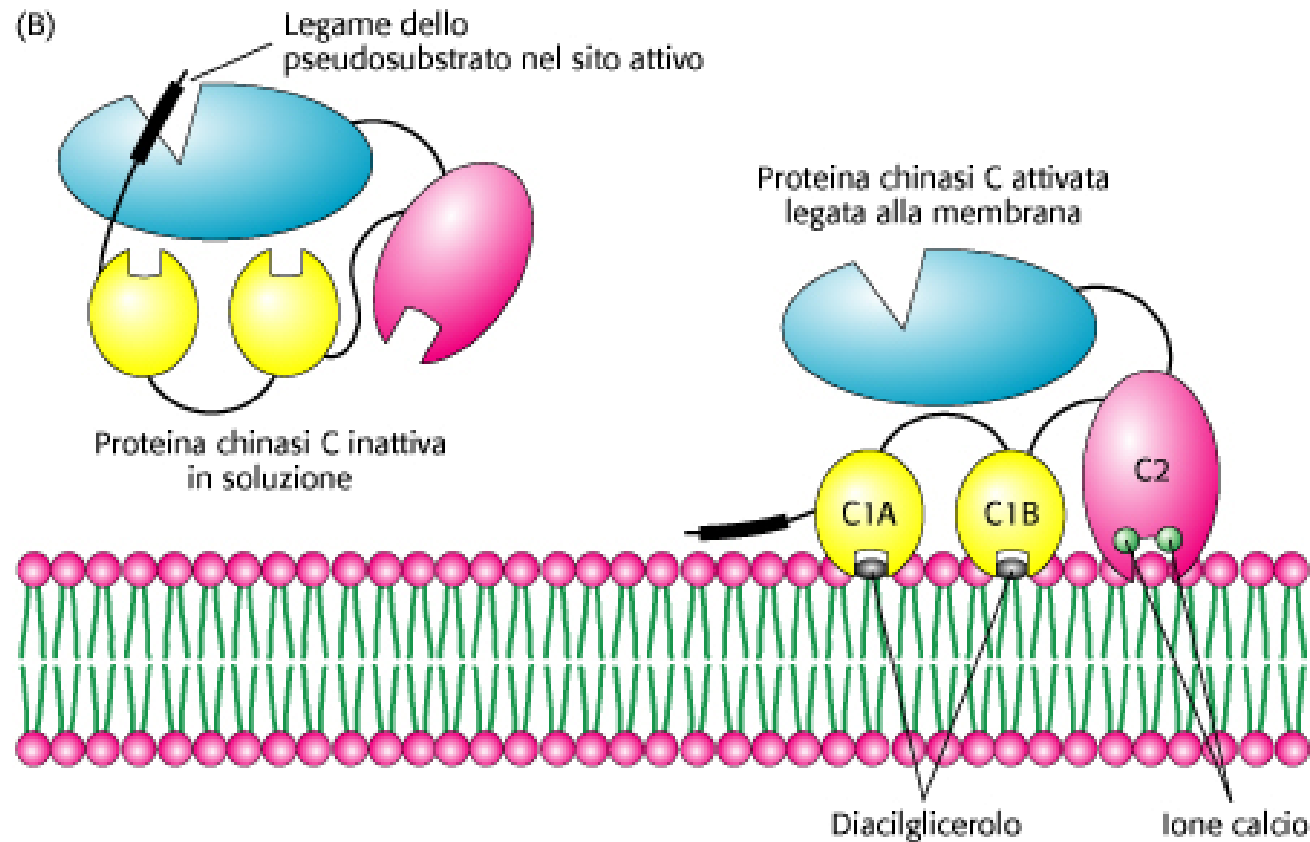
ATTIVAZIONE DELLA PROTEINA CHINASI A (PKA)

- ▶ La **proteina chinasi A (PKA)** è regolata da una subunità regolatoria che la inibisce
 - questa subunità ha una sequenza di pseudosubstrato che interagisce con il sito catalitico
 - a concentrazioni di ~ 10 nM, 4 molecole di **cAMP** interagiscono con 2 subunità regolatorie, rimuovendole
 - le subunità regolatorie hanno sequenze pseudosubstrato (-RRX**A**Z-), che mimano quelle fosforilate nelle proteine bersaglio (-RRX**S**Z-)



Cascata del fosfoinositolo – attivazione della *PKC*

La *proteina chinasi C* (*PKC*) è un altro esempio di chinasi inibita da pseudosubstrato.



Il legame di due domini al **diacilglicerolo (DAG)** libera il sito attivo dalla sequenza del pseudosubstrato.

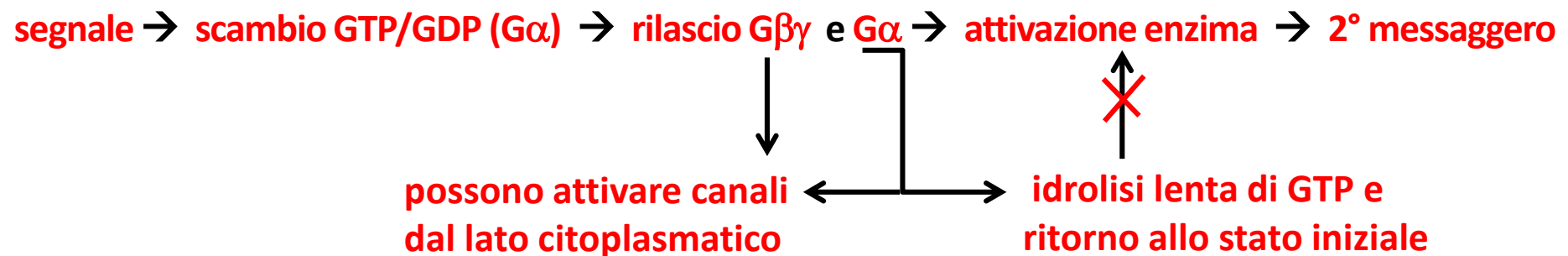
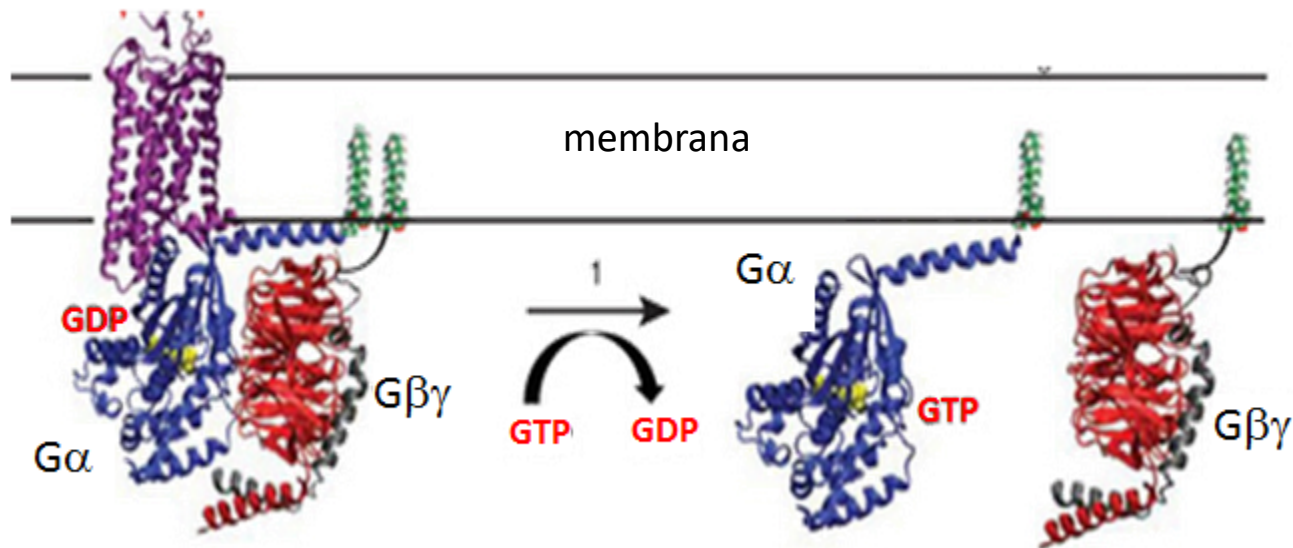
l'attività di *PKC* dipende anche da **ioni di Ca²⁺**, che contribuiscono ad ancorarla sulla membrana (due 2° messaggeri che agiscono in modo integrato)

anche **DAG** e **IP₃** sono **molecole transienti**, rapidamente metabolizzate e rimosse

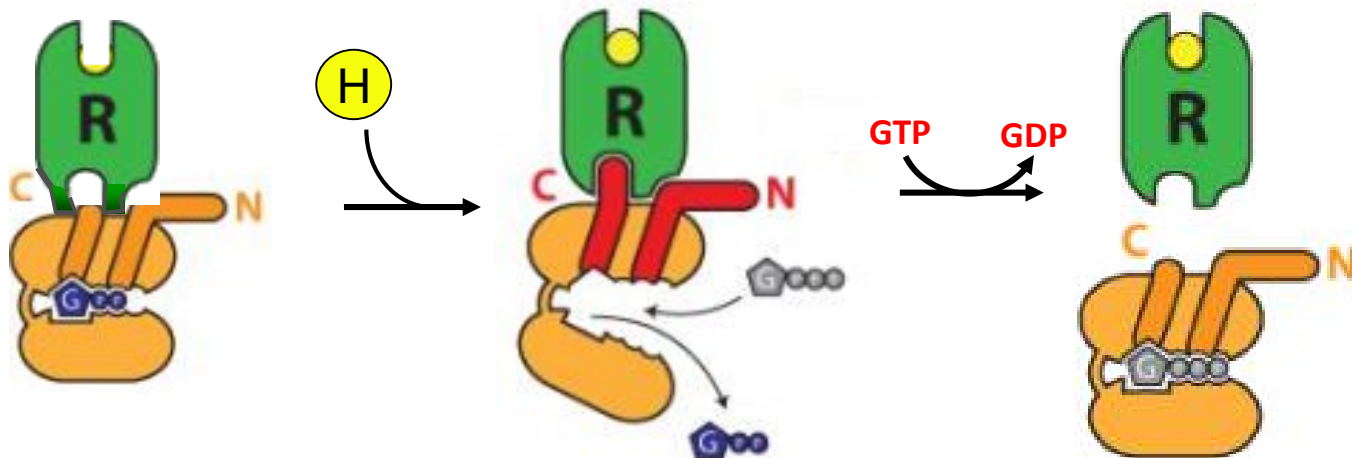
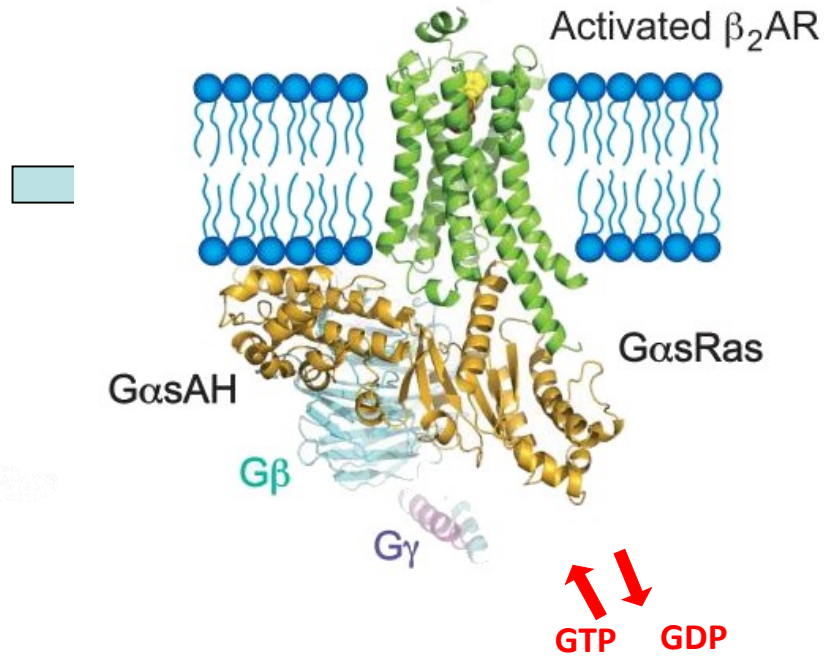
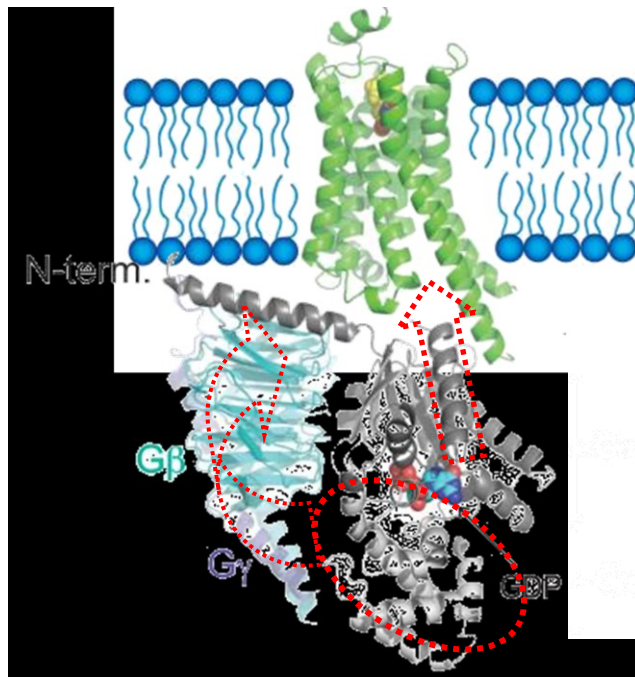
GPCR – caratteristiche e meccanismo d'azione

► È il gruppo di recettori più numeroso nel uomo (~ 4% dei geni umani)

- 3 tipi principali



GPCR – caratteristiche e meccanismo d'azione (cont.)



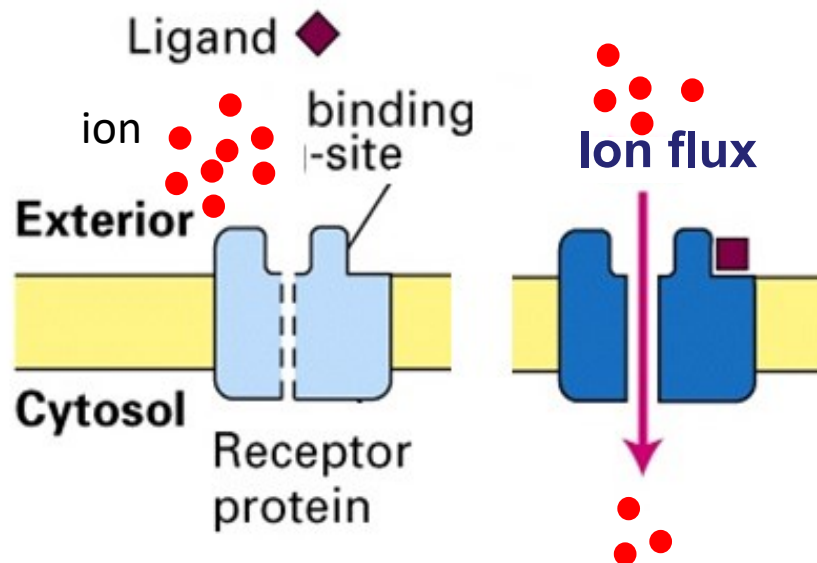
(III) Ion Channels: attivazione ionotropica e metabotropica

- IC possono essere attivati da un 1° messaggero (IONOTROPICI) o da un evento intracellulare (2° messaggero, proteina G, fosforilazione) (METABOTROPICI)
- termini generalmente utilizzati per sistemi di signal transduction attivati da neurotrasmettitori

Ionotropic Ion-Channel Receptor (ICR)

ligand → channel receptor → ion flux

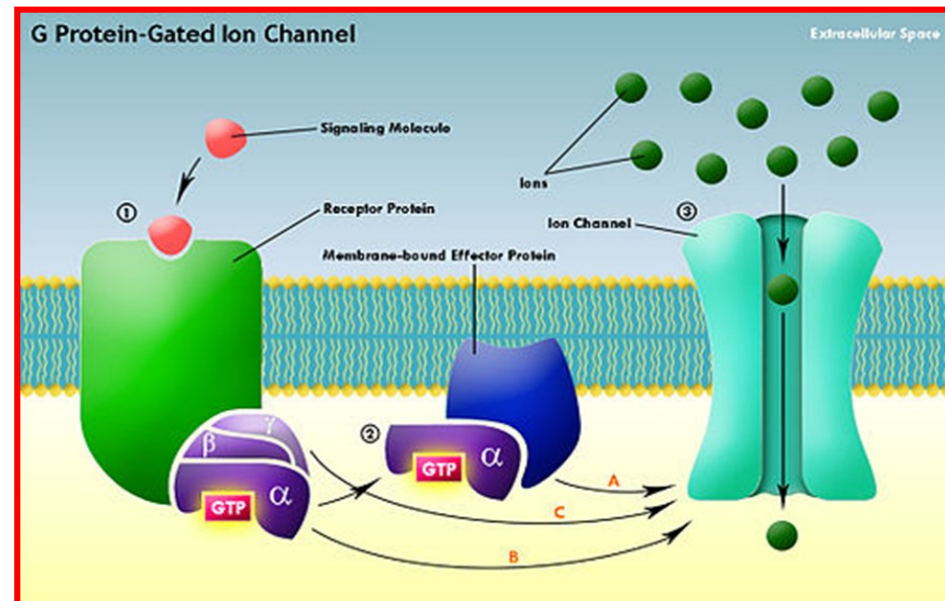
- **veloci** (millisec.) ed **effetto localizzato**
- channel **opening** ⊕
- es. recettori nicotinici per l'acetilcolina, ionotropici per Glu, seratonina e GABA_A



Metabotropic receptor-linked ion channel

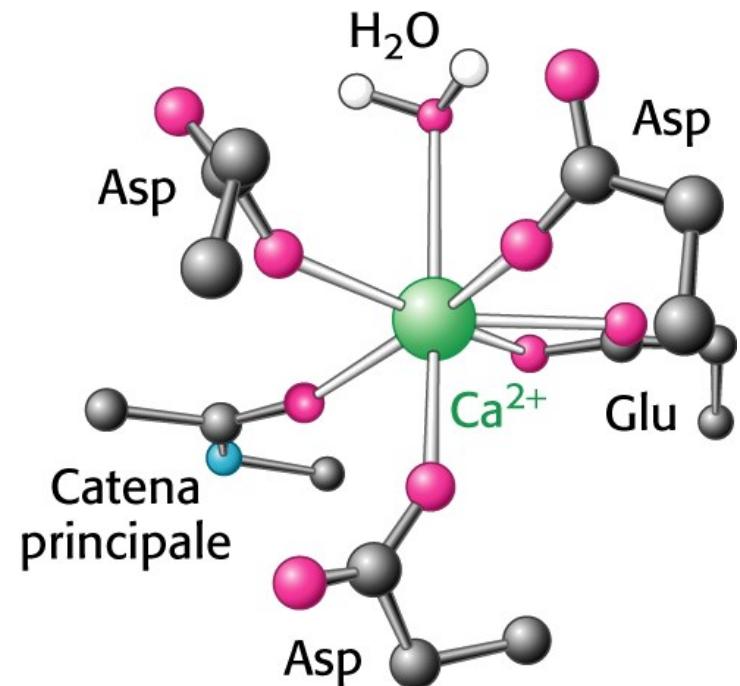
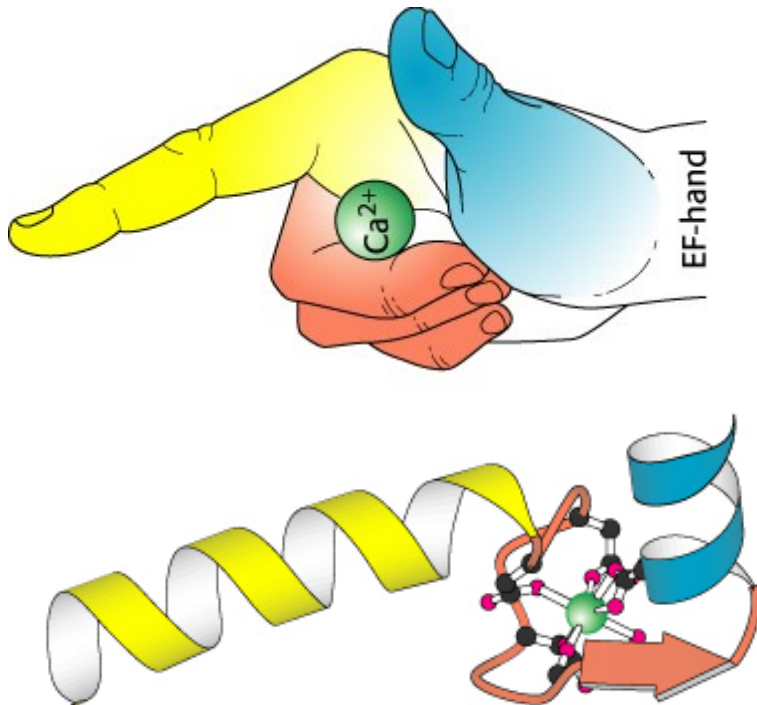
ligand → GPCR → 2nd messenger → ion flux

- **più lenti** (sec./min.) ed **effetto più diffuso**
- channel **opening** ⊕ and **closing** ⊖
- es. recettori muscarinici per l'acetilcolina, metabotropici per Glu, seratonina e GABA_B



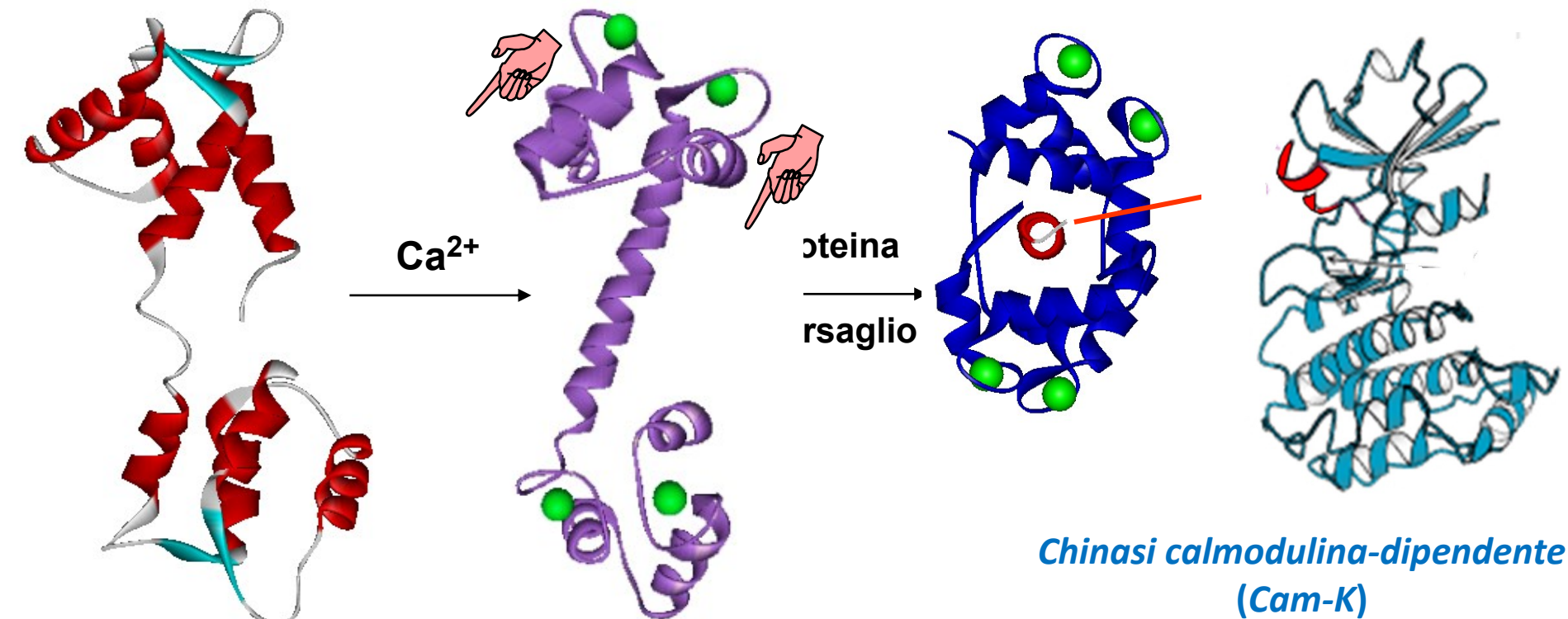
Ruolo del CALCIO come 2° messaggero

- Può formare legami di coordinazione multipli con atomi di ossigeno nella catena peptidica (principale o laterale di alcuni residui amminioacidici, es. Asp, Asn, Glu, Gln).
- questo induce notevoli **alterazioni conformazionali** nelle proteine alle quali si lega
- l'effetto di Ca^{2+} negli eucarioti è mediato anche dalla **CALMODULINA (CAM)**, che è in grado di legare 4 ioni, e ne funge da sensore; è attivata da $[\text{Ca}^{2+}] > 500 \text{ nM}$.
- CAM è composta da **due domini che legano il calcio**, che per la loro forma simile ad mano che punta un dito indice, sono noti come **"EF hand"**

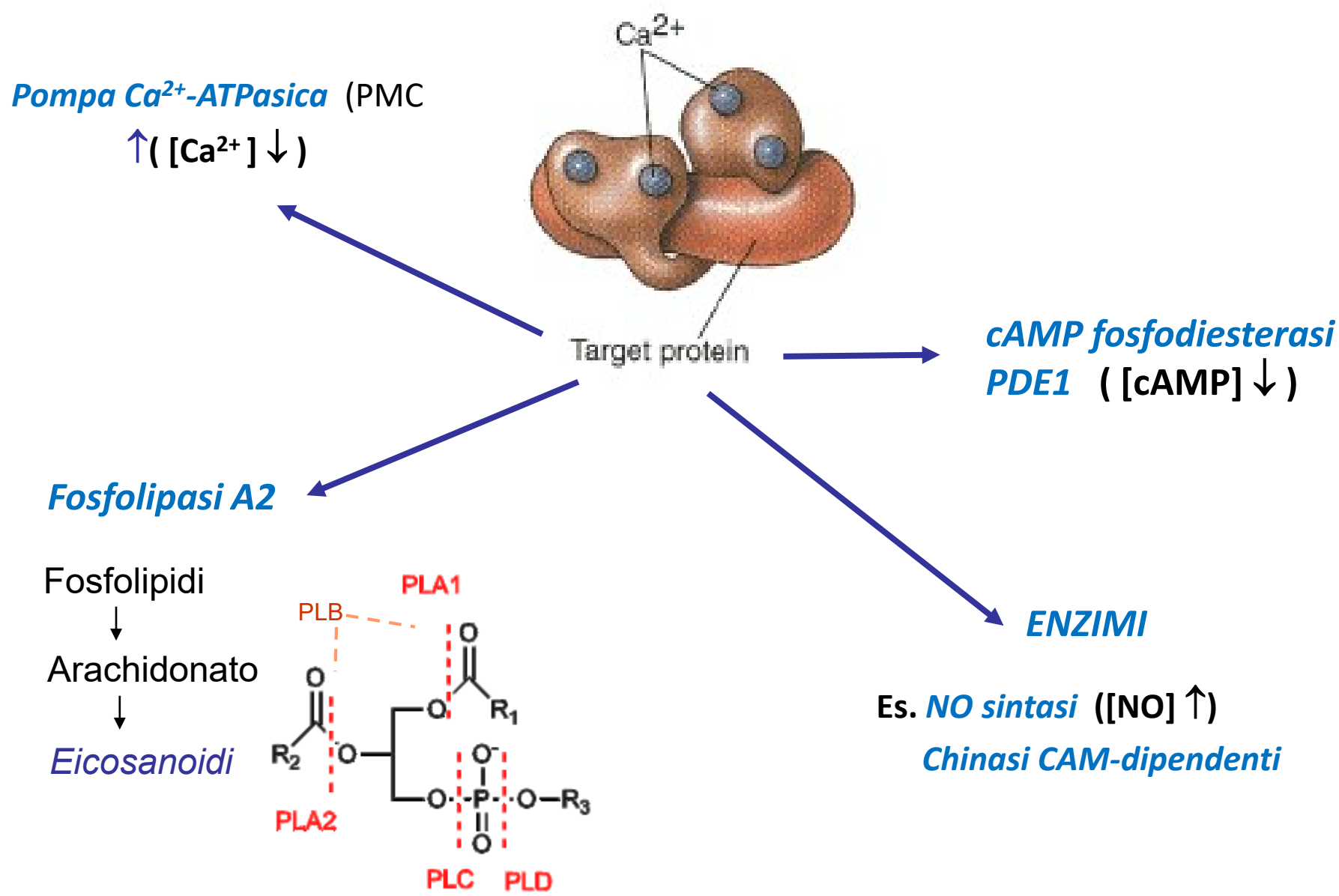


IL Ca^{2+} COME 2° MESSAGGERO: Calmodulina

- ▶ La calmodulina (CAM) - una proteina regolatrice attivata dal calcio
- è composta da **due domini che legano il calcio**, in sua assenza connessi da un tratto disordinato
- in sua presenza questo si irrigidisce per formare da una lunga α -elica ma questa si comporta come una **sbarretta flessibile** che può alterare la conformazione
- riconosce e abbraccia specifiche sequenze ad **α -elica anfipatica** nelle proteine bersaglio, in modo che i domini globulari ai terminali si incontrino (causa una notevole variazione strutturale)
- CAM si trova spesso come subunità di proteine con importanti funzioni (es. **CAM-chinasi**)



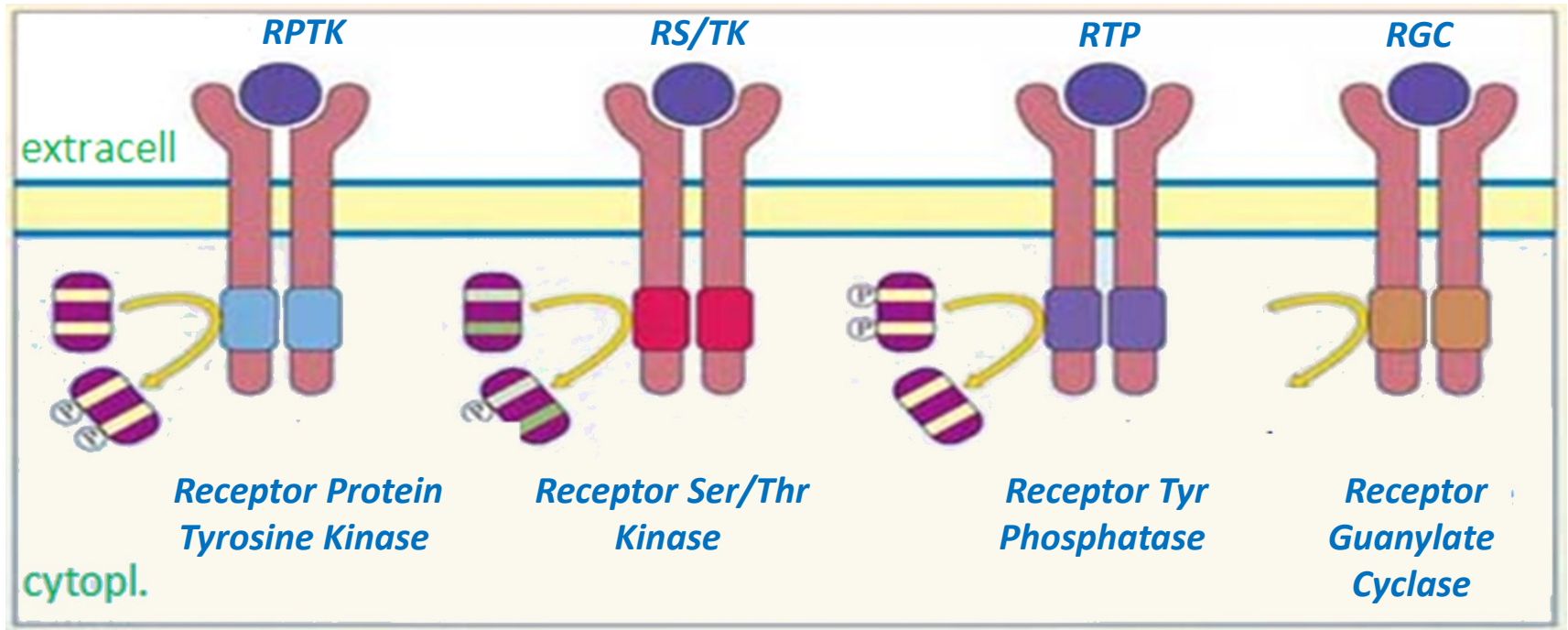
PROCESSI ATTIVATI DA Ca^{2+} E CALMODULINA



(IV) RECEPTOR WITH INTRINZIC ENZYME ACTIVITY (RIEA)

► Secondo gruppo più numeroso di recettori dopo i GPCR

- 4 tipi diversi a secondo dell'attività catalitica intrinseca del dominio citoplasmatico.



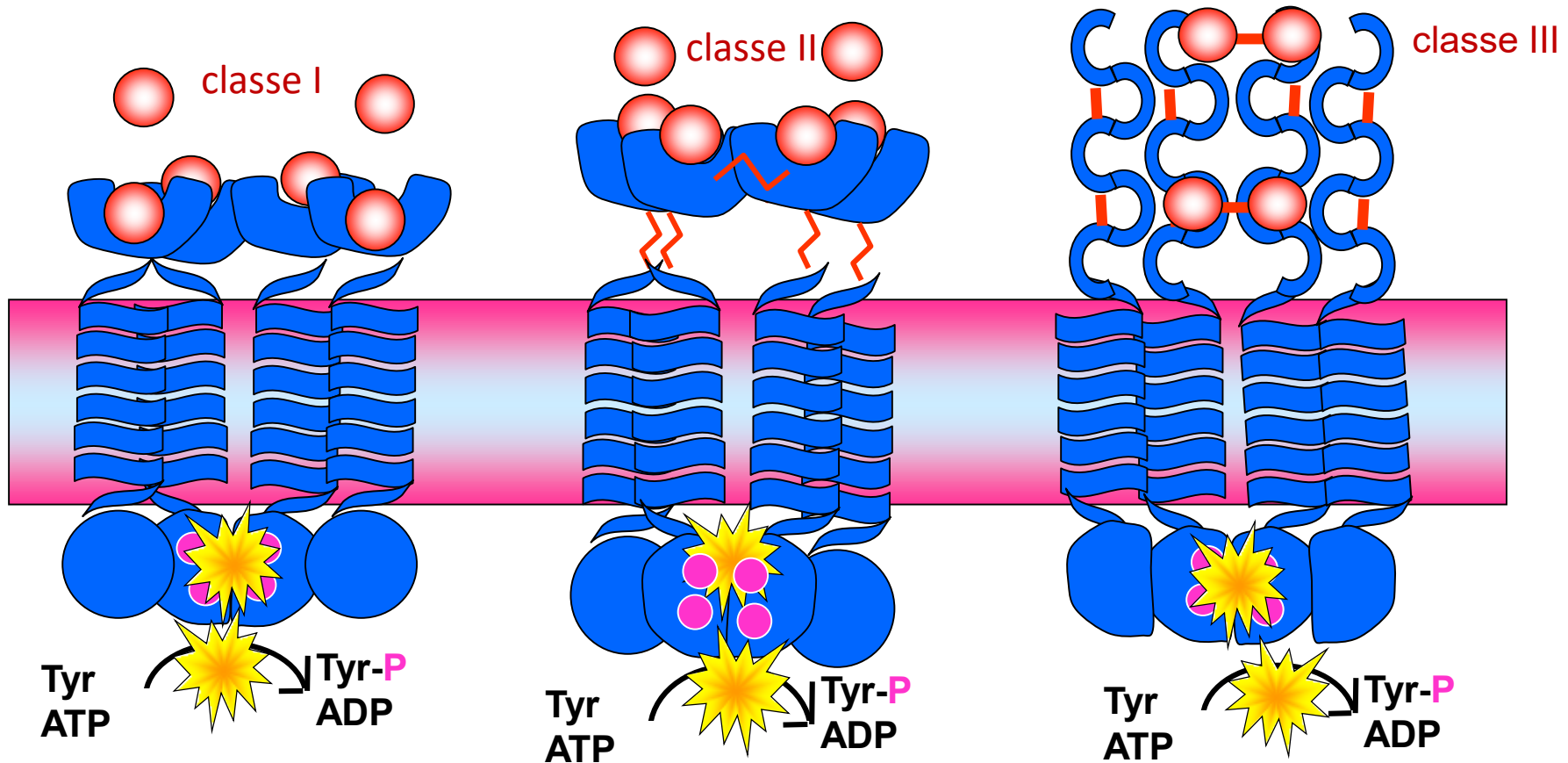
► RPTK (*Receptor Protein Tyrosine Kinase*)

- 7 sottofamiglie di RPTK
- hanno un **singolo segmento ad α -elica transmembrana**
- normalmente **monomerici a riposo** o dimero lasco
- possono formare **omo-** o **etero-dimeri** o **oligomeri** quando attivati.



RPTK – meccanismo d'attivazione

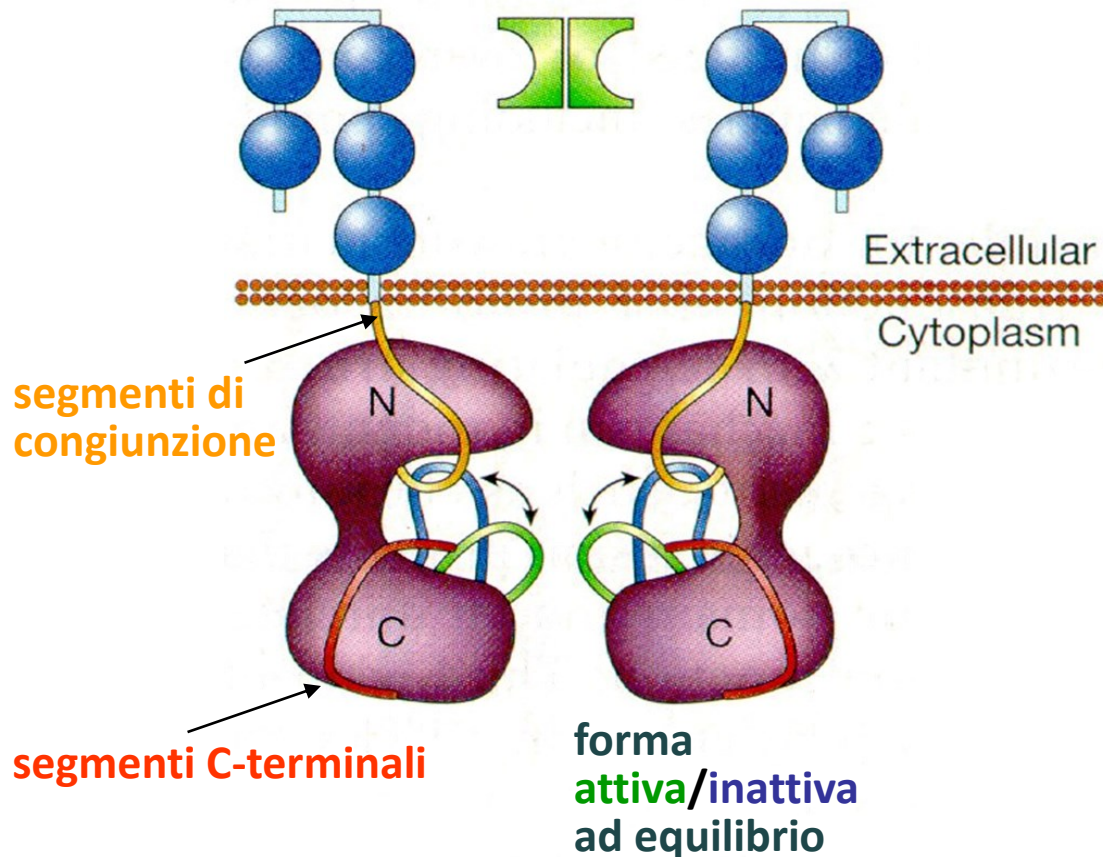
- ▶ I recettori di membrana a singola elica TM hanno una attività enzimatica intrinseca
 - questa attività si trova nel dominio citoplasmatico e può essere di diverso tipo (*tirosina chinasi*, ma anche *serina chinasi*, *fosfatasi* o *guanilato ciclasi*)
 - sono **monomerici** nella forma inattiva e il ligando causa la **dimerizzazione/attivazione**
 - gli **RTK sono di tre tipi** e agiscono in due modi: **1) fosforilando altre proteine**
 - **2) autofosforilando** e creando punti di ancoraggio per altre proteine



RPTK: meccanismo d'attivazione (cont.)

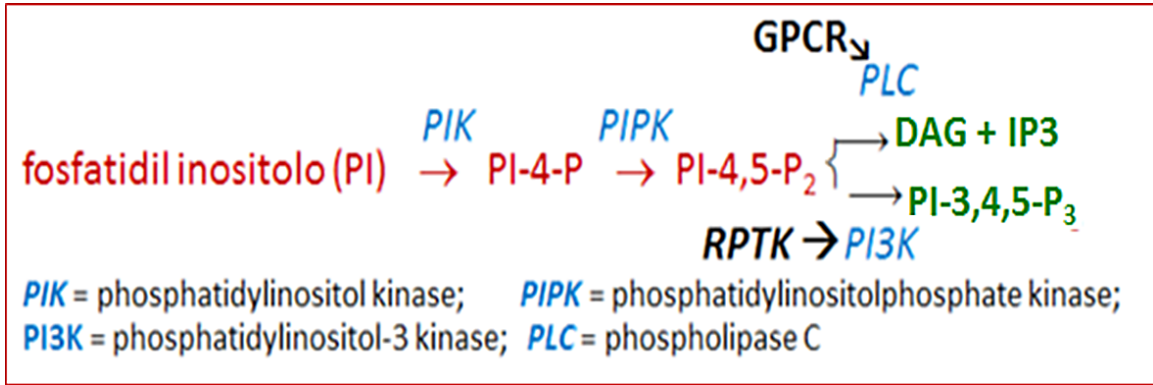
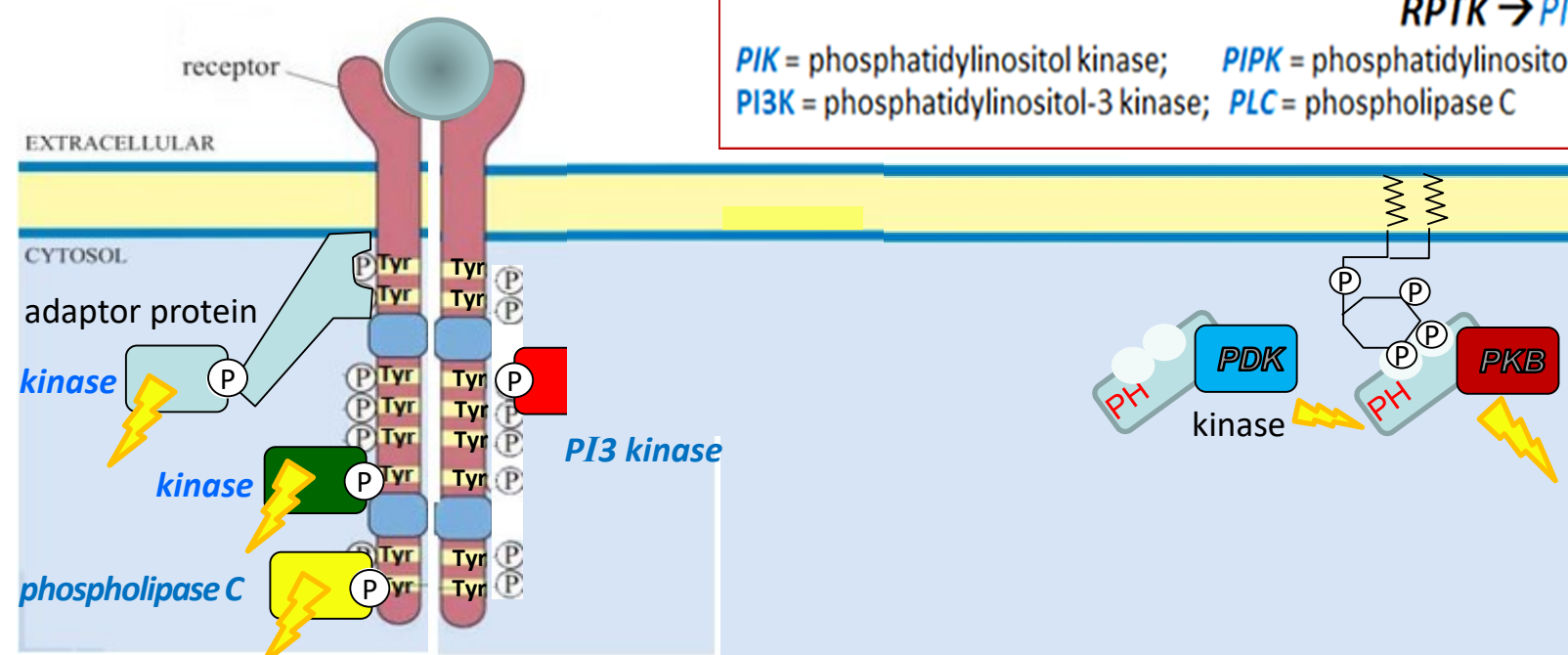
► Nel recettore monomero, il dominio catalitico è schermato

- i segmenti che connettono il dominio catalitico a quello TM (in giallo), e i segmenti C-terminali (in rosso) bloccano parzialmente il sito di legame per ATP
- Il dominio catalitico esiste nelle forme attiva ed inattiva in equilibrio, che favorisce la forma inattiva
- la dimerizzazione favorisce l'autofosforilazione, rendendo l'enzima completamente attivo e fornendo punti di ancoraggio per altre proteine



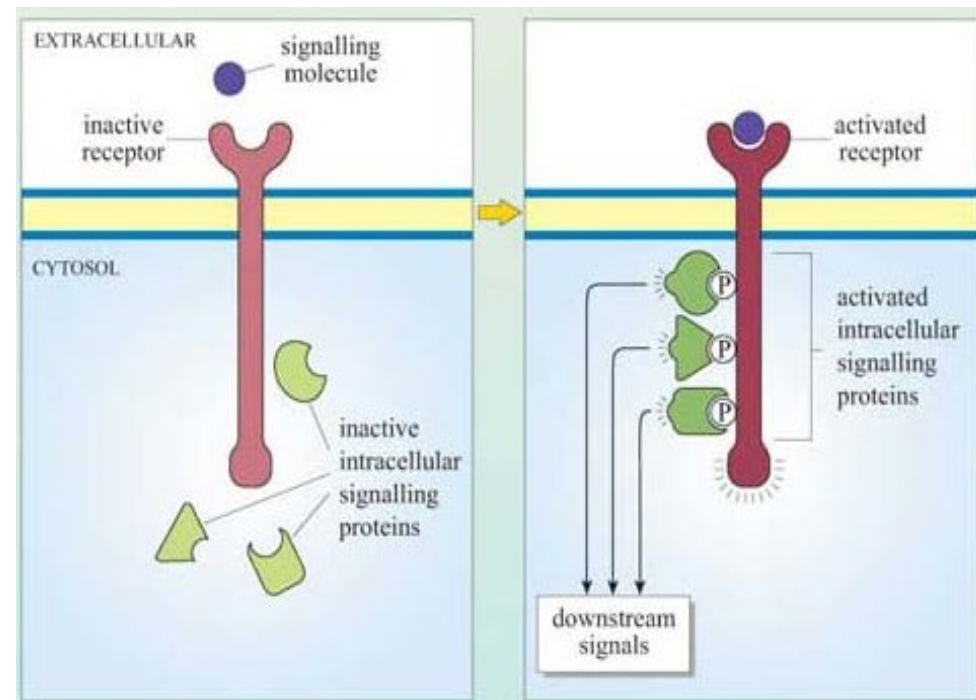
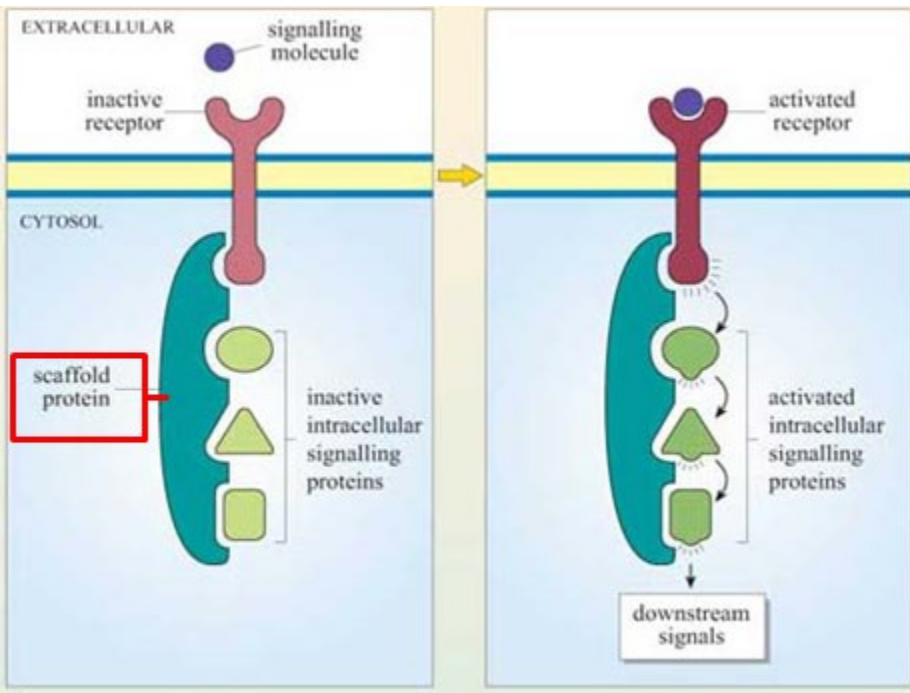
RECETTORI RTK: meccanismo di trasduzione del segnale

- ▶ i siti di autofosforilazione legano domini SH2 presenti in proteine effettrici o adattatrici
- *Src homology domain 2* (SH2) sono presenti alcune *chinasi* o *lipasi*, che si legano al recettore e si attivano, o in *proteine adattatrici* che legano e posizionano quelle effettrici
- Es. la *chinasi di tipo PI3* (*PI3K*), si lega mediante un dominio SH2 aggiunge un fosfato al *fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato* (*PI-4,5-P2*) producendo *PI-3,4,5-P3* (3,4,5-trifosfato)
- *PIP3* ancora e attiva importanti *chinasi* che contengono *plekstrin homology domain* (PH)
es. *phosphatidylinositol-dependent kinase1* (*PDK1*)
es. *Proteina chinasi B* (*PKB/Akt*).



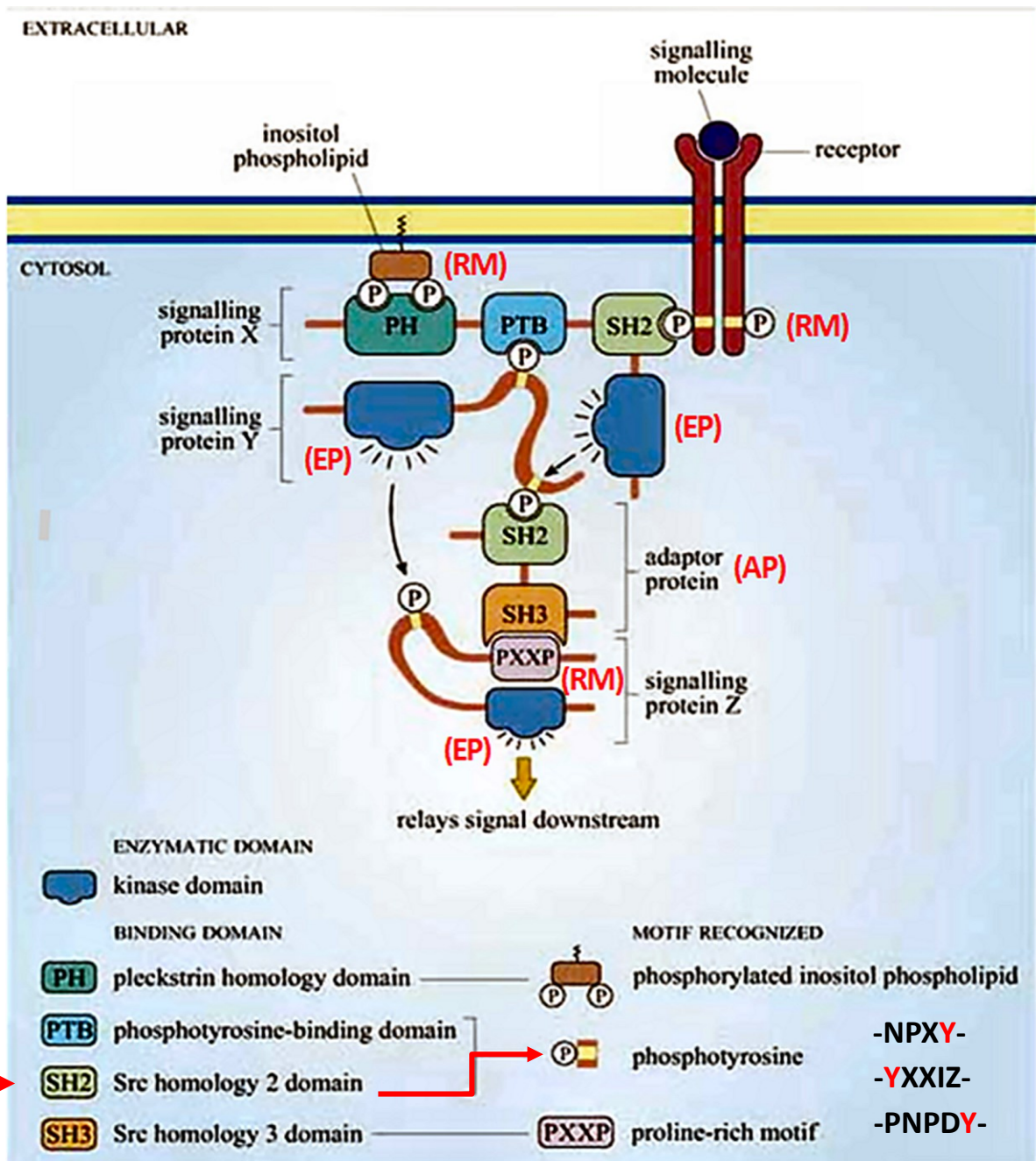
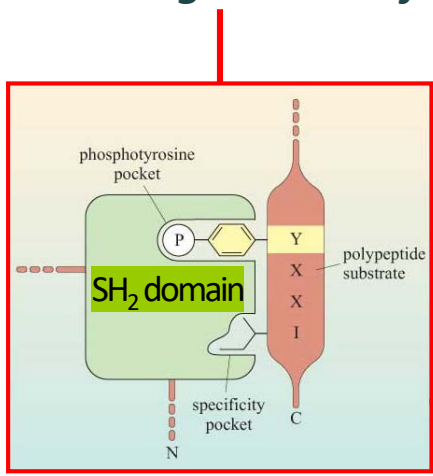
RPTK: Cytoplasmic signalling complexes

- La trasduzione del segnale può essere mediato da complessi proteici preformati o transienti
- questi complessi possono essere **pre-assemblati su una impalcatura proteica (scaffold protein)**, e i suoi componenti sono **innescati in maniera sequenziale** quando il recettore è attivato dal segnale
- alternatively, l'**auto-fosforilazione** in siti multipli del dominio citoplasmatico permette di **reclutare proteine** a valle nella via del segnale, che possono essere **proteine effettrici** (es. *chinasi* o *fosfatasi*) oppure **proteine adattatrici**, che legano proteine effettrici
- Il '**docking**' è mediato da **specifici domini** (es. *Src homology domain 2*, **SH2**, e pleckstrin homology domains, **PH**)



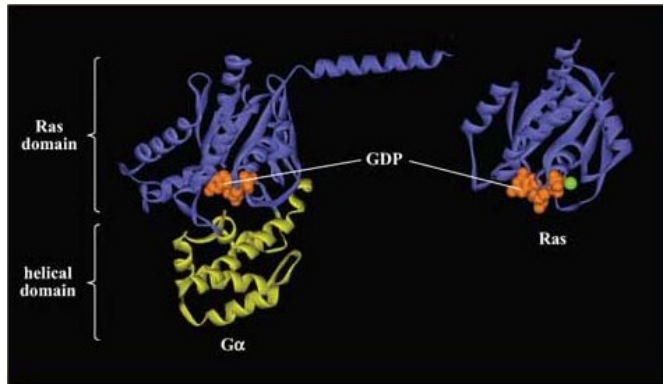
RPTK: Multiple protein interactions in signal transduction

- questa ipotetica via del segnale evidenzia le interazioni fra i **'binding domains' (BD)** ed i rispettivi **'recognition motifs' (RM)** (es. SH2,SH3 e PH).
- le proteine che partecipano possono contenere solo **'binding domains' (proteine adattatrici) (AP)** o **'binding domains' associati a domini catalitici (es. SH2 + chinasi) (proteine effettrici) (EP)**
- ogni **binding domain** interagisce con un specifico **recognition motif**

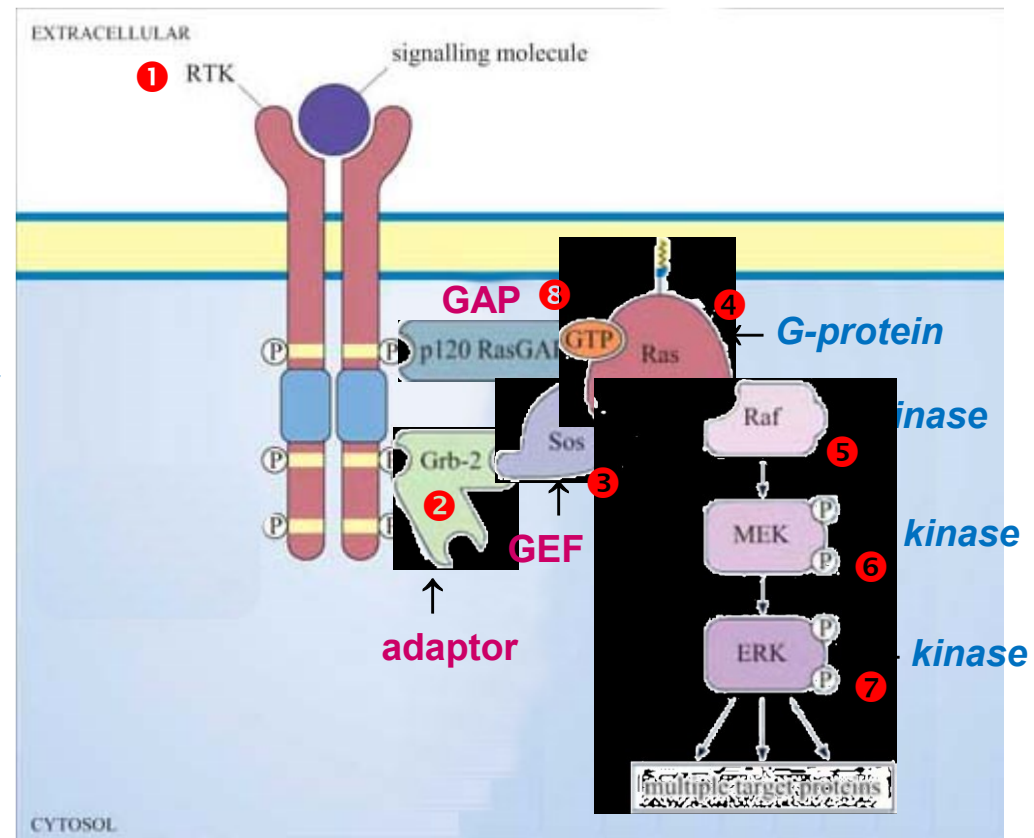


I recettori RIEA possono attivare proteine G monomeriche (Ras)

- Ras sono strutturalmente correlate con il **dominio GTPasico della subunità α** delle proteine G trimeriche, e sono **ancorate alla membrana** in modo simile mediante una coda lipidica.
- legano **GTP** e lo idrolizzano a **GDP + Pi** (agiscono come *timed molecular switches*)
- Il legame di **GTP** è mediato da **GEF** (**G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actor), e l'idrolisi è mediata da **GAP** (**G**-protein **A**ctivating **P**rotein)



- La via **Ras/MAP chinasi** parte da un **RPTK** attivato da un fattore di crescita ❶.
- **RPTK** autofosforilato lega l'**adaptor** (**Grb**) ❷
- posiziona un **GEF** (**Sos**) ❸ che
- attiva **Ras** (scambio **GDP/GTP**) ❹
- per reclutare ed attivare la **Raf chinasi** ❺ che attiva la **MEK chinasi** ❻ che attiva la **MAP chinasi** multifunzionale **ERK** ❼ (**Mitogen-activated protein kinase**)
- **RPTK** lega anche una **GAP** che regola **Ras** ❽

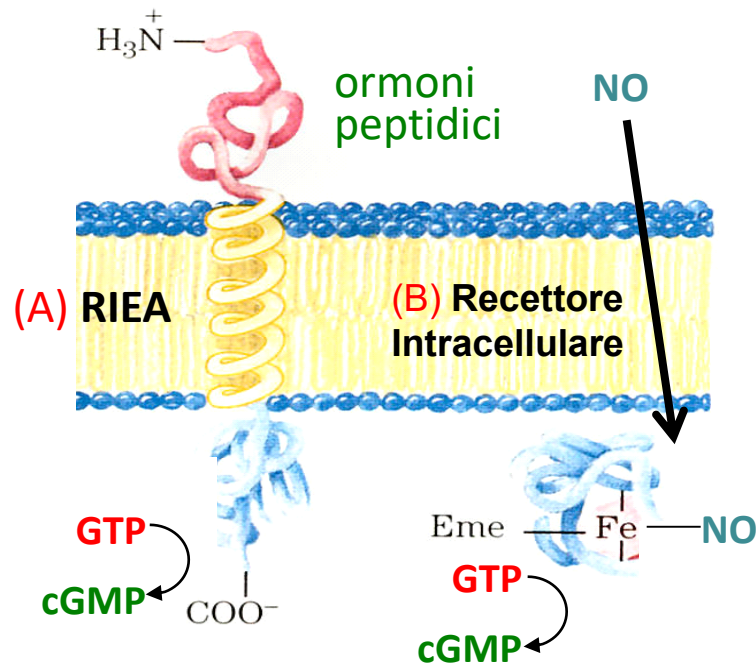


(ERK = extracellular signal-regulated kinase)

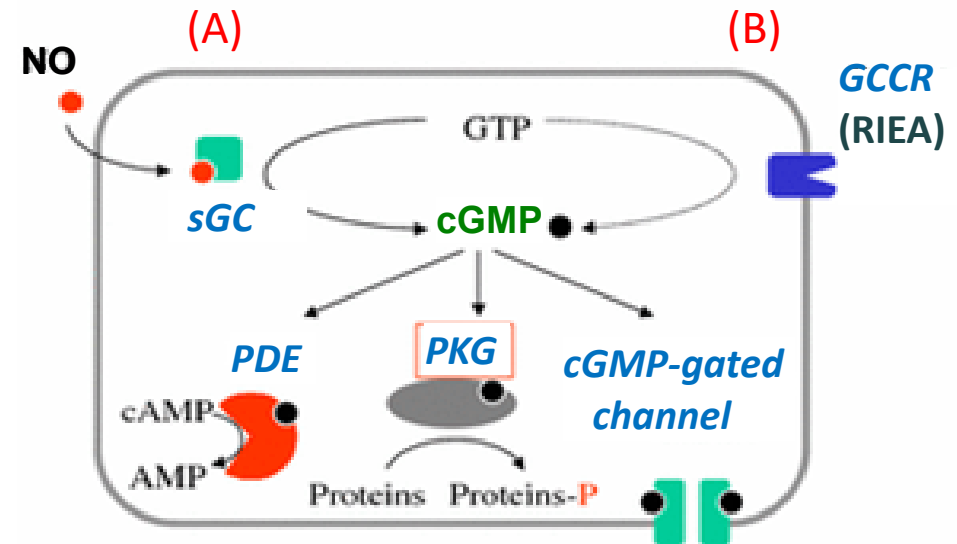
cGMP – sotto controllo di diverse “signalling pathways” (RIEA, NO)

► cGMP è prodotto direttamente da RECETTORI DI MEMBRANA o INTRACELLULARI

Produzione di cGMP



Effetti di cGMP



Guanilate Cyclase-Coupled
Recceptor (GCCR)



produce cGMP

soluble Guanilate Cyclase
(sGC)



produce cGMP

Fosfodiesterasi
(PDE)



inattiva cAMP
inibisce PKA

Proteina chinasi G
(PKG)



modula altri
enzimi

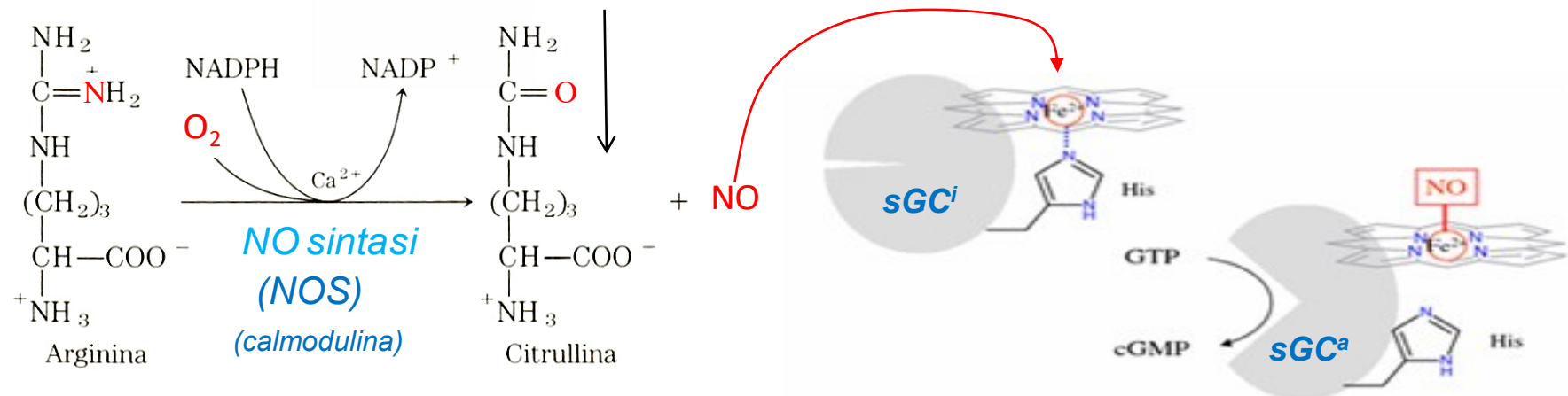
Canali
metabotropici



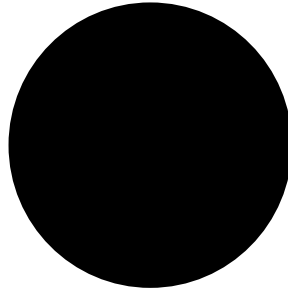
modula Ca^{2+}
signal

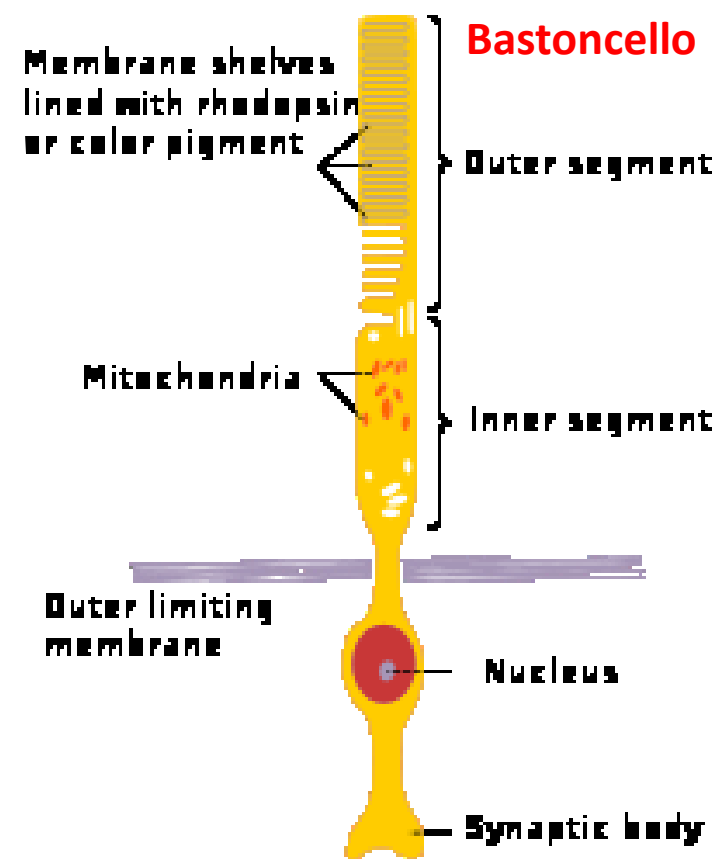
Traduzione del segnale mediato da cGMP

► cGMP è prodotto da un recettore intracellulare attivato da NO (*soluble Guanylate Cyclase*)



Ruolo di cGMP nella visione

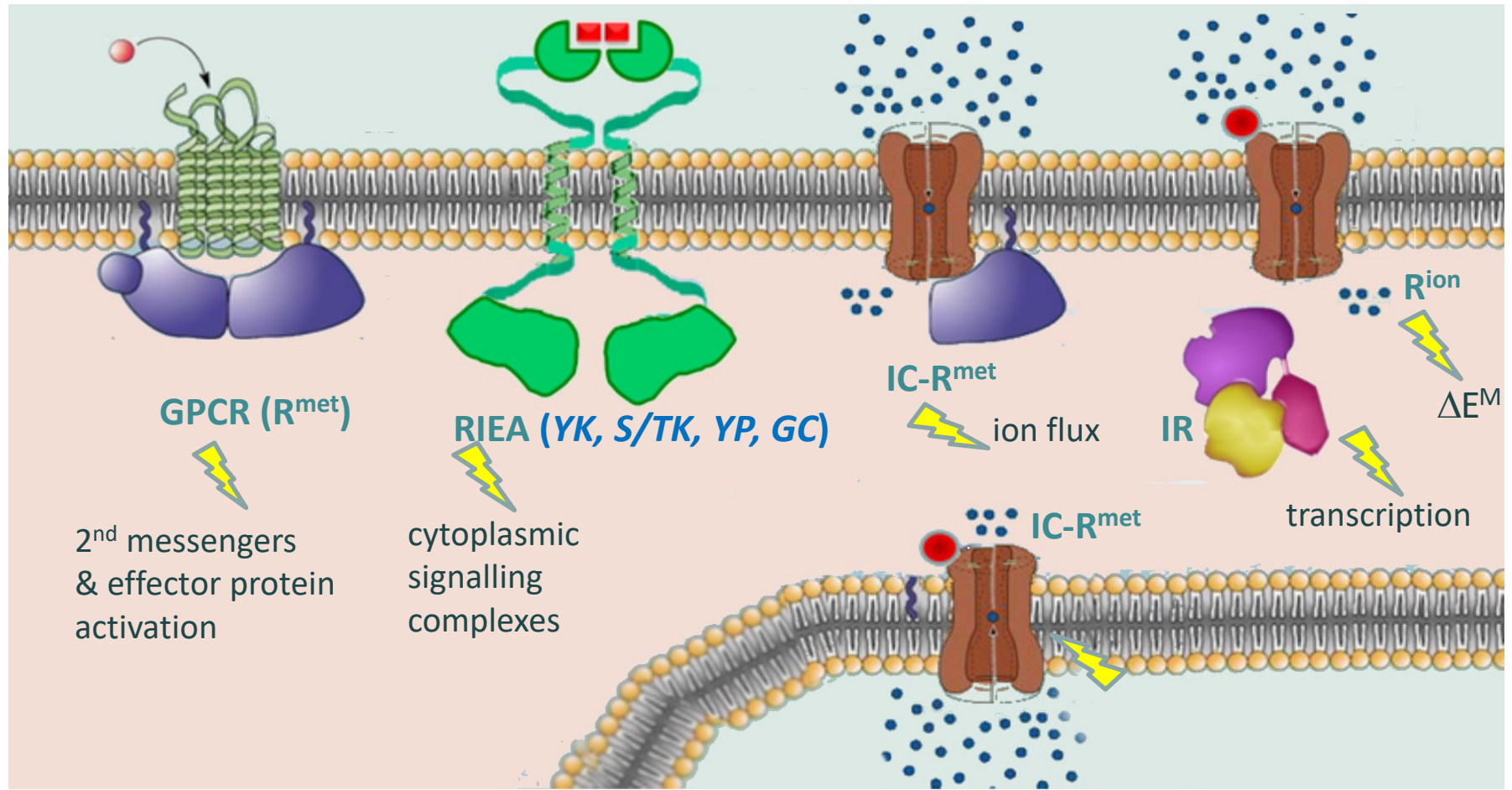




- Nei bastoncelli l' E_M è determinato da canali non selettivi (Na, Ca) **cGMP dipendenti**.
- Al buio, la guanilato ciclasi produce [cGMP] sufficiente per tenere il canale aperto, ma è inibita dal Ca^{2+} che entra
- L'omeostasi del Ca^{++} e del Na^+ sono garantite anche dallo scambiatore Na/Ca (estromette Ca) e Na/K ATPasi (estromette Na)

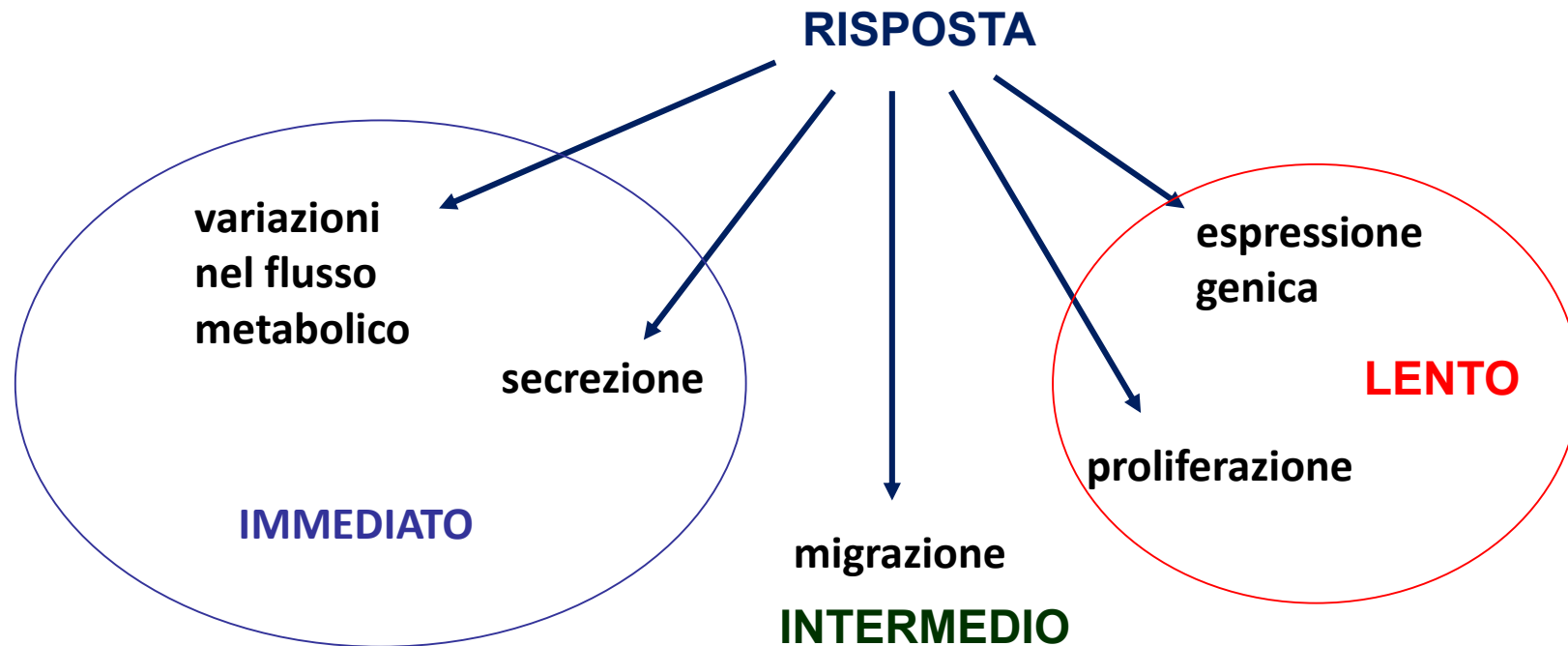
RECETTORI CELLULARI - SINOPSI

GPCR (Recettore Metabotropico / R^{met})	→ Gα-protein → <i>AC, PL</i> → cAMP, DAG, IP3, Ca^{2+}
ICR (Ion Channel Receptor Ionotropico / R^{ion})	→ fast, local ion flux → ΔE^{M}
IC-R^{met} (Metabotropic receptor - linked IC)	→ slower, delocalized ion flux
RIEA (Receptor with Intrinziic Enzymatic Activity)	→ <i>YK, S/TK, YP, GC</i> & cytopl. signalling compl.
IR (Intracellular Receptor)	→ gene transcription



DURATA DEL SEGNALE

- La risposta biologica ad uno stimolo dipende anche dalla durata del processo



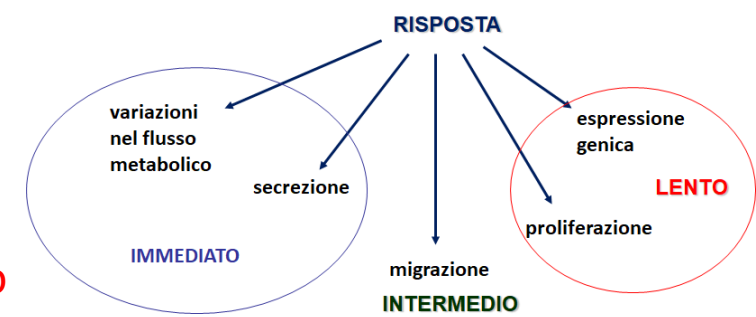
- le **strategie di omeostasi** (rimozione del segnale) riflettono la durata del processo
- l'obiettivo è di **limitare la durata dello stimolo** al tempo necessario
- queste strategie possono quindi essere **veloci** (pochi ms), **intermedie** (s, min) o **lente** (min/ore)

L'omeostasi (dal greco *stessa fissità*) «tendenza al raggiungimento di una relativa stabilità interna»

Cascata del cAMP – effetti veloci e lenti

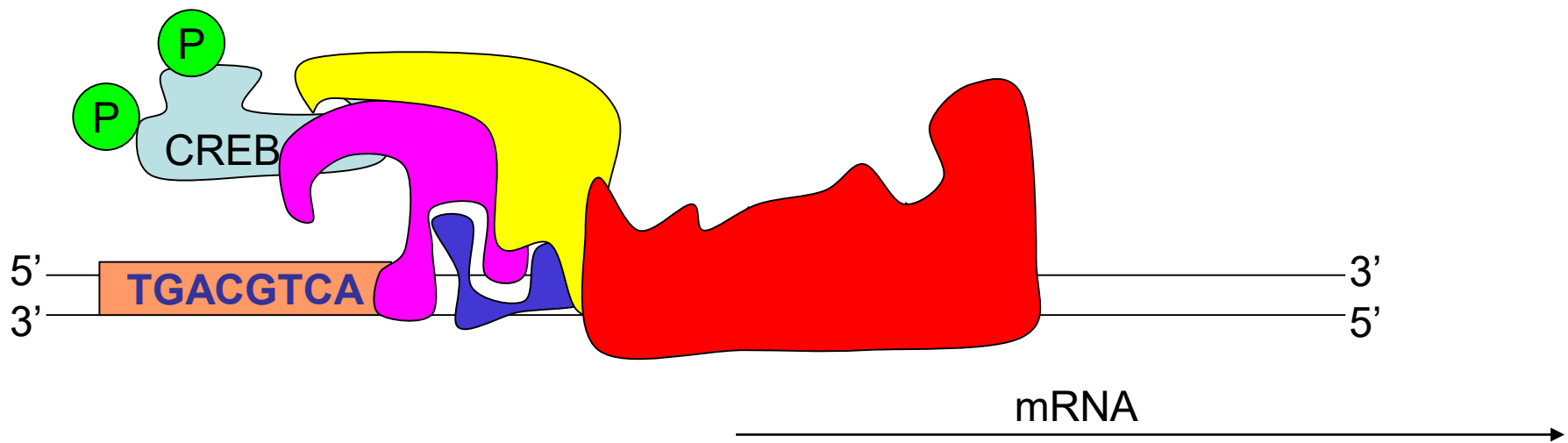
- ▶ GPCR che agiscono mediante attivazione di *PKA* hanno un effetto veloce - il cAMP è transiente

proteina G → *AC* → *cAMP* → *PKA*^{attivo} → target fosforilato



- ▶ Se cAMP permane più a lungo ci possono essere effetti sull'espressione genica (lenti)

- nei geni la cui espressione è regolata dal cAMP sono presenti sequenze di DNA specifiche (TGACGTCA) note come cAMP responsive elements (**CRE**), nella regione del promotore a monte del gene
- queste sequenze legano la CRE Binding Protein (**CREB**) ma solo se è fosforilata (es. da *PKA*)
- l'associazione di **CRE** con **CREB** recluta in sequenza proteine co-attivatrici della trascrizione
- il complesso che si crea premette il legame della *RNA Polimerasi II* e l'inizio della trascrizione
- l'attivazione eccessiva di CREB è però associata alla progressione di tumori



Strategie di inattivazione del segnale

► Strategie rapide - rimuovere lo stimolo

- **Degradazione:** un enzima idrolizza la molecola segnale:

es.1 l'*acetilcolinesterasi* rimuove acetilcolina dalla superficie esterna della membrana post-sinaptica

es.2 le *fosfodiesterasi* (*PDE*) idrolizzano **cAMP** e **cGMP**

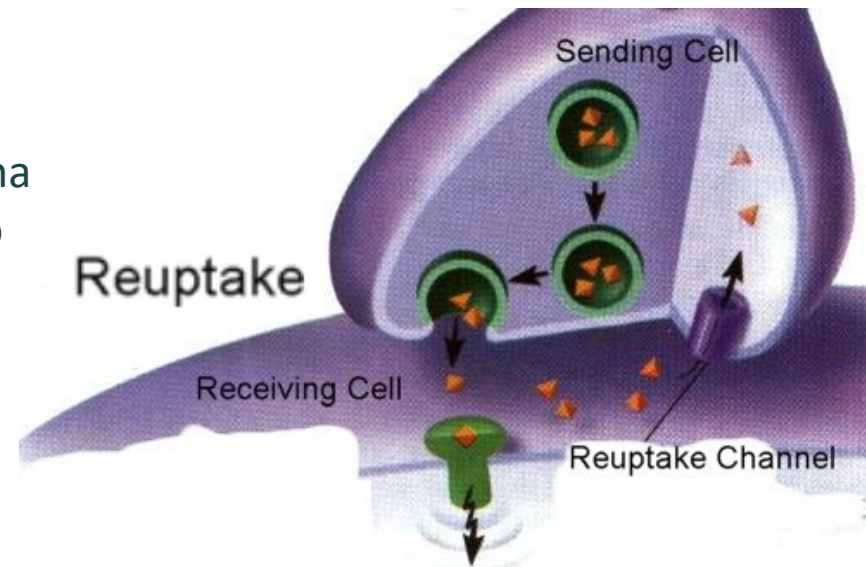
es.3 **cAMP** è prodotta dall'adenilato ciclasi, attivata dalla **proteina- $G_{\alpha s}$ /GTP**, ma il legame con **AC** stimola l'idrolisi e riduce il tempo di attivazione a pochi minuti

es.4 le **GAP** (**GTPase Activating protein**) aumentano la velocità di idrolisi e di disattivazione delle proteine- G_{α}

- **Ricaptazione** (reuptake): trasportatori di membrana allontanano diversi neurotrasmettitori dallo spazio extracellulare (*Ultrafast endocytosis 30-50 ms*)

- **Sequestro** : da parte di una proteina solubile con sito di legame simile a quello del sito recettoriale.

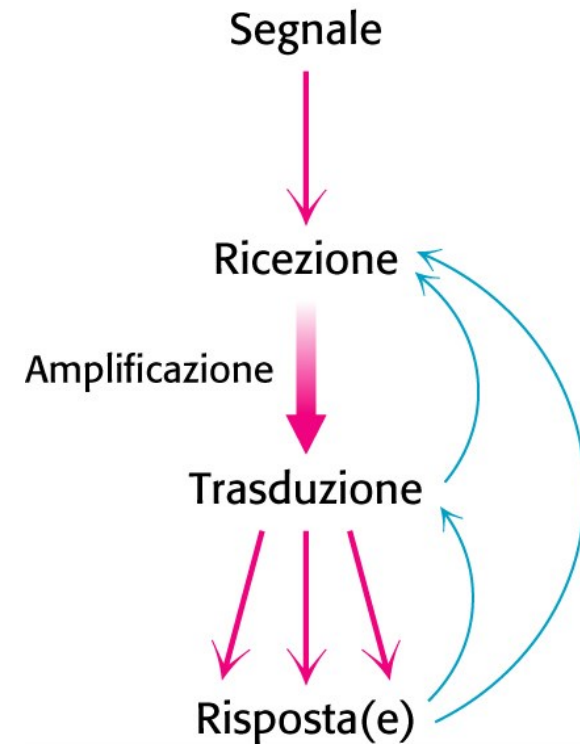
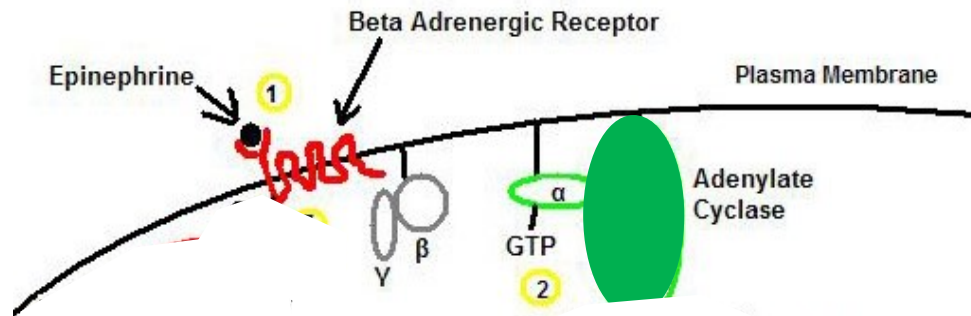
es. le cellule gliali dei molluschi producono e rilasciano **AcCh-binding protein** nello spazio intersinaptico, che agisce come spugna per questo neurotrasmettitore



Strategie di inattivazione del recettore

► Strategie intermedie - desensibilizzazione del recettore

- modificazioni (es. fosforilazioni) del recettore che impediscono la trasduzione del segnale



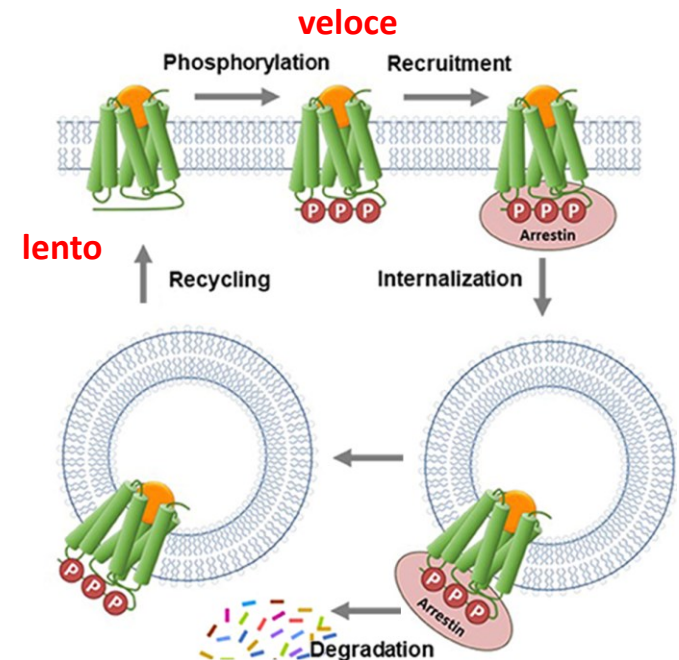
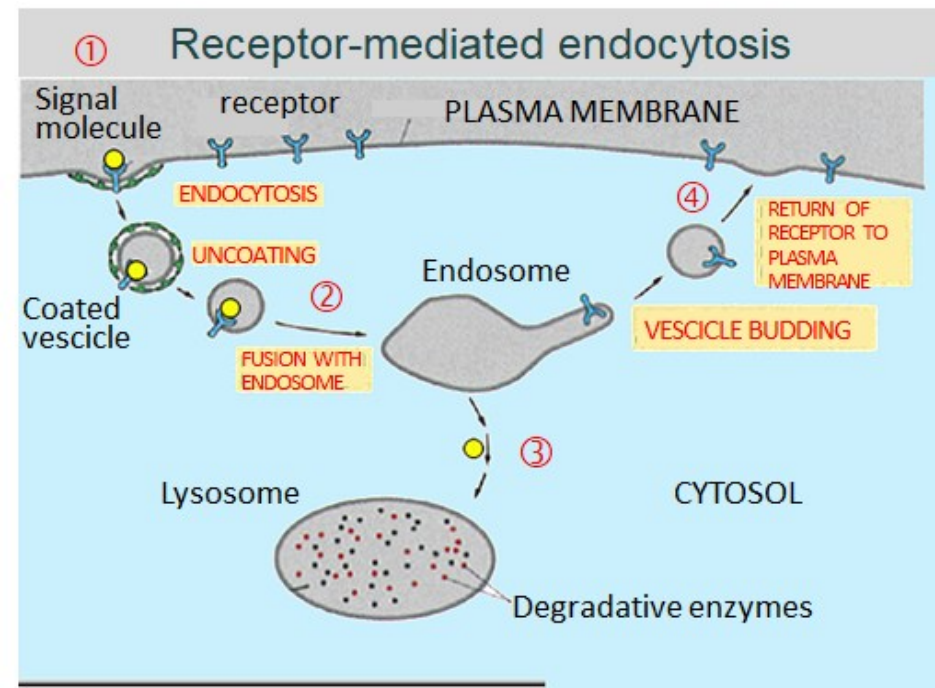
Strategie inattivazione del segnale (cont.)

► Strategie lente 1) endocitosi del recettore

- eventi come **attivazione del recettore**, oppure la sua inattivazione con **β -arrestina** possono fare scattare l'**internalizzazione del recettore**: ① il recettore attivato è incorporato in '**clathrin coated vesicles**'; ② si forma una vescicola che entra nella cellula, dove la clatrina viene rimossa e la vescicola si fonde con l'endosoma; ③ la molecola segnale (o) è inviato al lisosoma per essere degradato; ④ il recettore viene riciclato alla membrana. Serve anche per rimuovere l'arrestina.
- la cellula diventa transitoriamente "insensibile" al segnale (per diversi min.)

2) downregulation del recettore

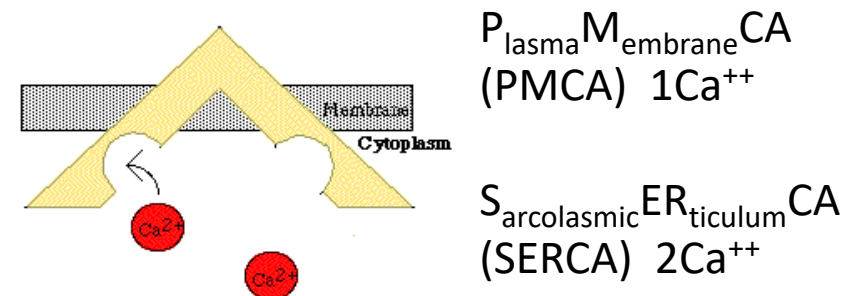
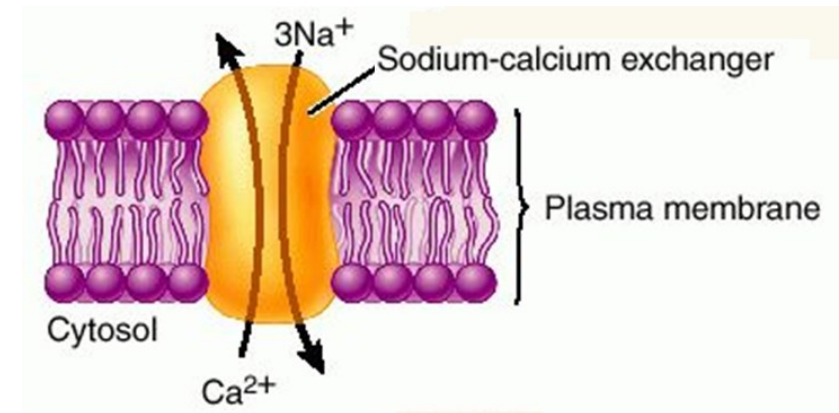
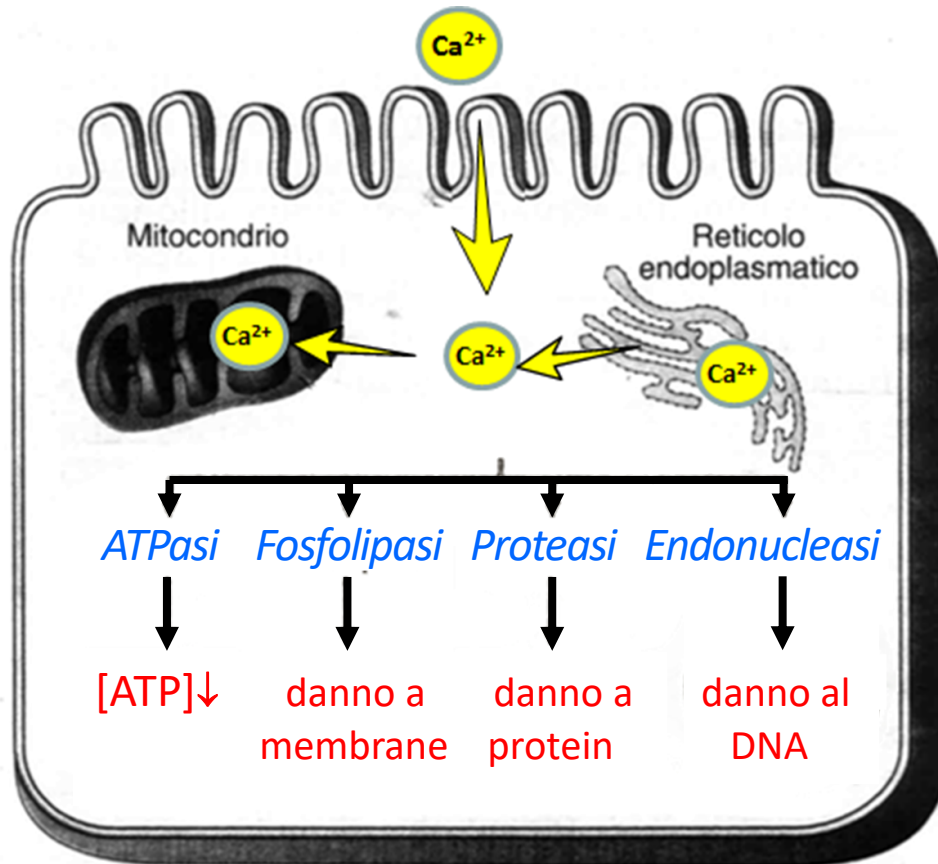
- all'endocitosi segue la **degradazione del recettore** e anche **repressione della sua espressione** (gene silencing); la cellula diventa "**insensibile**" al segnale fino al ripristino dell'espressione



Omeostasi del calcio

► Un eccessivo aumento dello ione calcio causa la morte cellulare

- a concentrazioni $> 5\text{mM}$ Ca^{2+} attiva processi quali **necrosi o apoptosi** mediante l'attivazione di una serie di attività enzimatiche dannose
- la sua concentrazione intracellulare è quindi **attivamente controllata**
- viene rapidamente diminuita inizialmente da **scambiatore antiporto Na/Ca**, e poi subentrano le **pompe Ca ATPasiche (PMCA e SERCA)** per ridurre la concentrazione a livelli sub- μM nel citoplasma



Meccanismi che determinano l'omeostasi del calcio

► ENTRY:

Voltage-Gated Ca^{2+} Channels (VGCC) (membrana citoplasmatica)

- High Voltage Activated (HVA) ion channel (soglia -20/-10 mV)
cinetica di inattivazione lenta

Ligand-Gated Ca^{2+} Channels (LGCC)

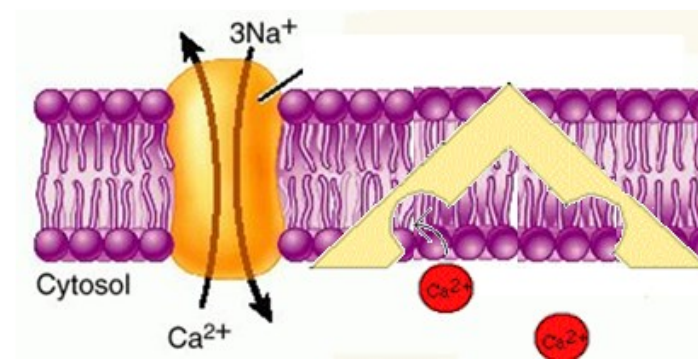
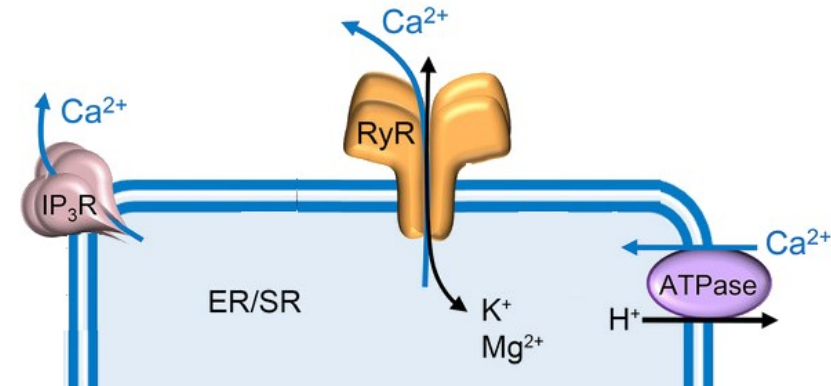
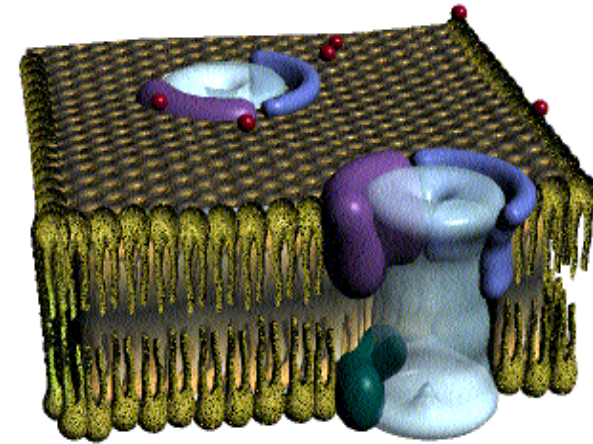
(membrana del reticolo endoplasmatico)

- Il RE è un sistema continuo di cisterne racchiuse da membrana che si estende per tutta la cellula
- una delle sue molteplici funzioni è quella di accumulare attivamente ioni Ca^{2+} mediante la pompa SERCA, sottraendolo dal citoplasma.
- Il calcio accumulato può diffondere al citoplasma attraverso canali ligand-gated strettamente controllati da ligandi citoplasmatici.

a) **Recettore per la rianodina**(il ligando è il Ca^{2+} stesso).

b) **Recettore per IP_3** (2° messaggero **GPCR**)

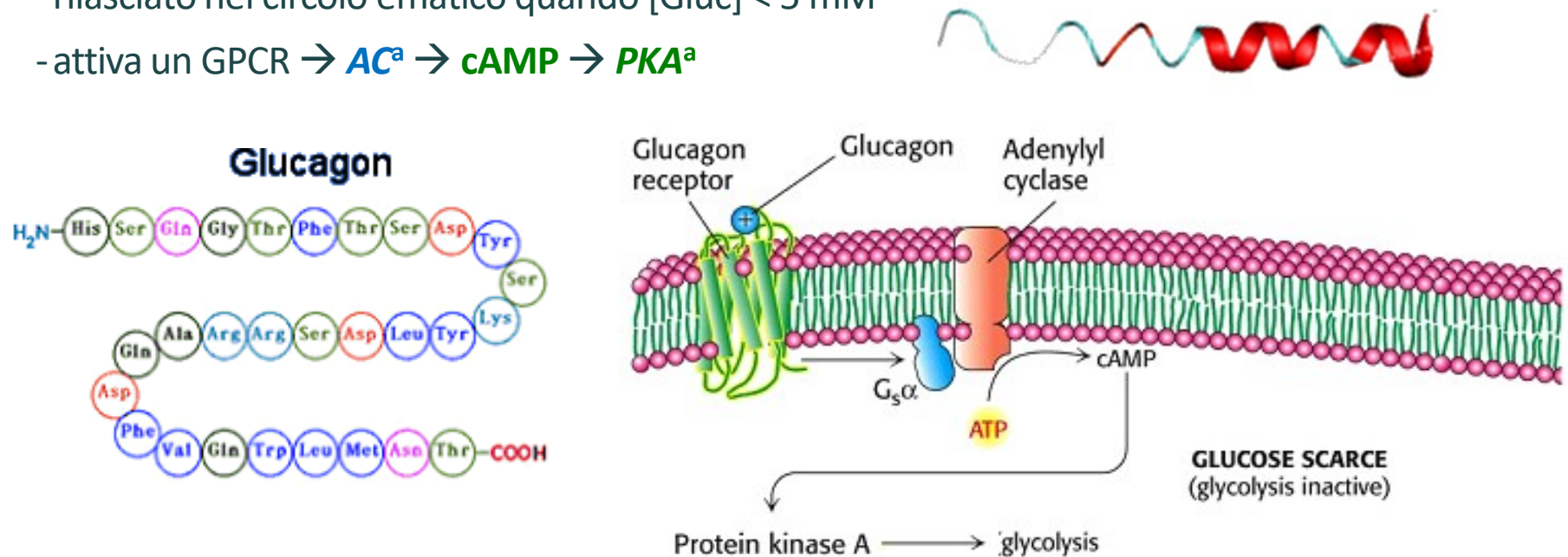
► EXIT: Na-Ca Exchanger e CaATPases (SERCA, PMCA)



I PRIMI MESSAGGERI

► GLUCAGONE: favorisce il catabolismo di glucosio e degli AG

- **ormone peptidico** (29 residui) secreto nel pancreas dalle **cellule α** delle isole di Langerhans
- rilasciato nel circolo ematico quando $[Gluc] < 5 \text{ mM}$
- attiva un GPCR $\rightarrow AC^a \rightarrow cAMP \rightarrow PKA^a$



► Tessuti bersaglio: Fegato e Tessuto Adiposo



Stimola la gluconeogenesi (*Gluc for export*)

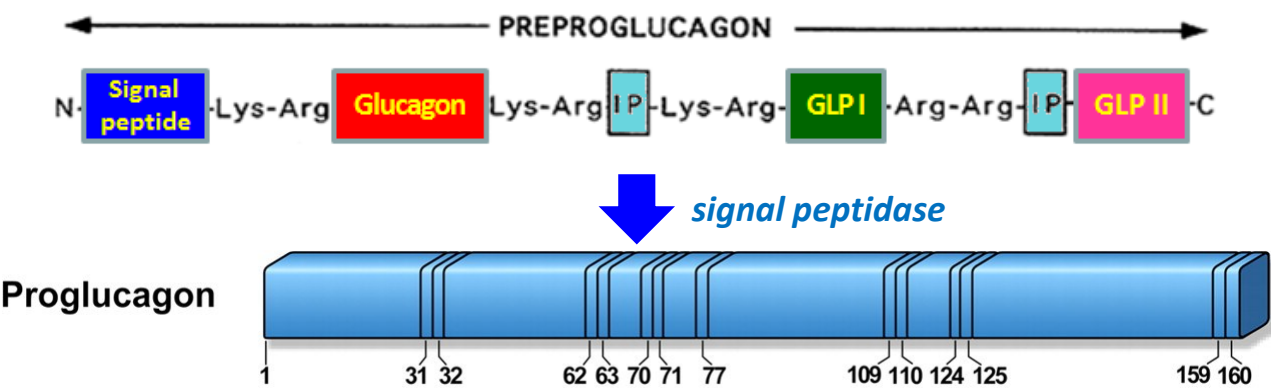
Stimola la glicogenolisi (*Gluc for export*)

Stimola la β -ossidazione AG (*Ac-CoA for internal energy use, ketone bodies for export*)

Stimola l'idrolisi di TAG (triacilgliceroli)
(*AG for export*)

Biogenesi del glucagone

- **Precursore:** glucagone, GLP (*glucagon-like peptides*), Glicentine e GLP sono una famiglia di peptidi (**secretine**) , evolutivamente correlati e molto conservati nei mammiferi, che regolano l'attività di diversi **GPCR** (famiglia dei recettori per le secretine)
- biosintetizzati sotto forma di **precursore (preproglucagone)**, poi processato ai diversi ormoni

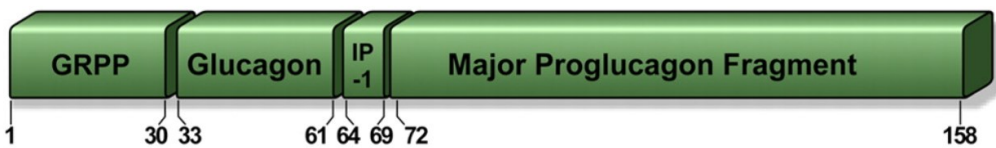


- tissue specific alternative processing

Glucagon, $t_{1/2} = \approx 5$ min, degraded by *dipeptidyl peptidase-4*

GRPP (Glicentin-like polypeptide – funzione?)

Pancreas



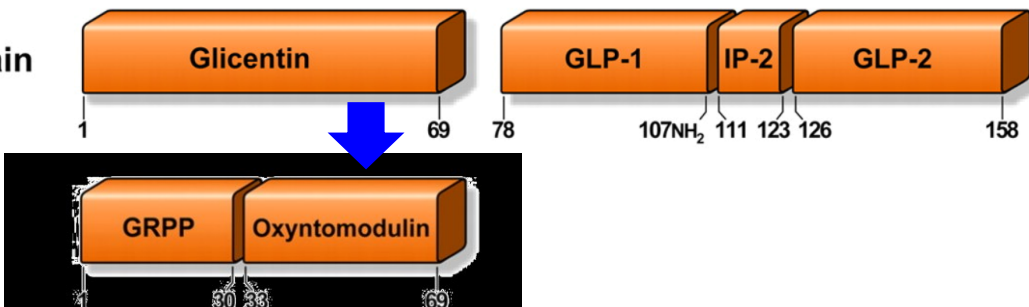
Glicentina (funzione ?)

GRPP (funzione ?)

OXM (funzione ? Sopprime appetito)

GLP-1 & 2 (**Incretine**, **Insulina** ↑ **Glucagone** ↓
riducono Gluc ematico)

Gut/ Brain



INSULINA

► STRUTTURA

- proteina di 5.8 kDa (51 aminoacidi), dimerica, con 3 ponti S-S
- deriva dal taglio proteolitico di un precursore monomerico

► FUNZIONE

- ormone iperglicemico
- agisce su RPTK che si attiva ed auto-fosforila

① si attiva la **PI-3K** che produce **PIP₃** che a sua volta attiva **PKB**.

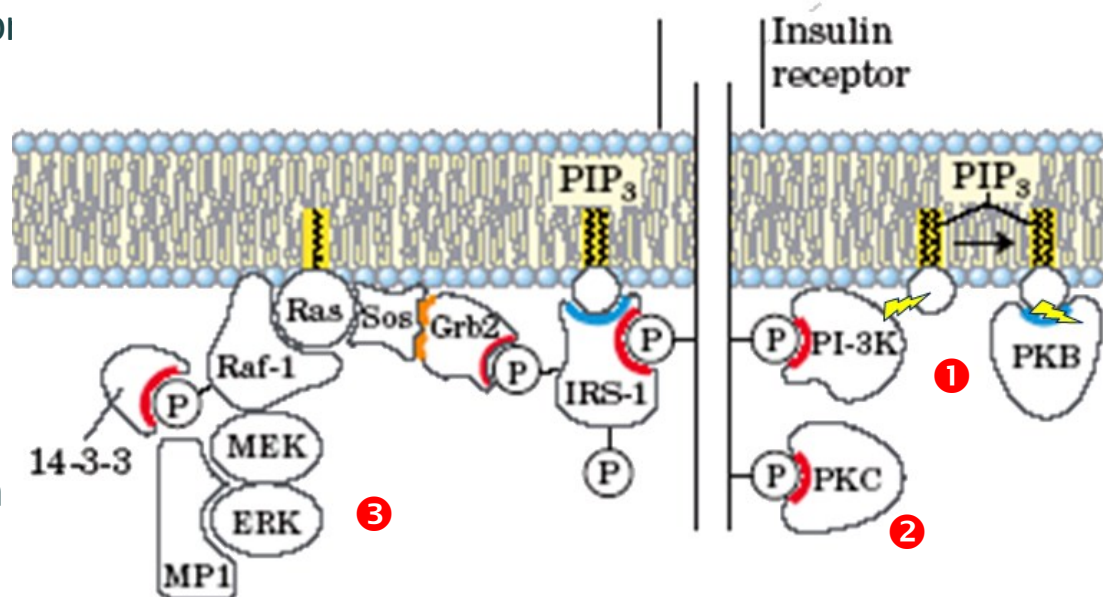
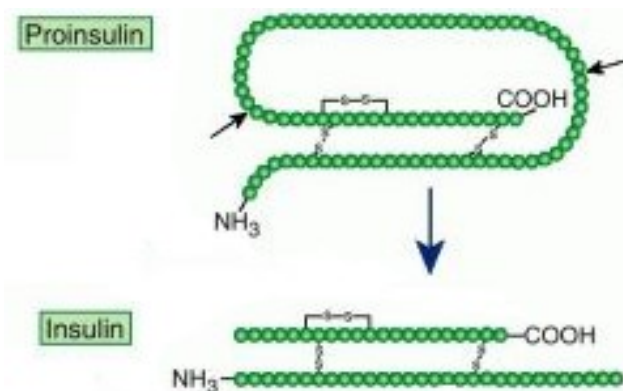
- trascrizione geni metabolici
- attivazione sintesi AG
- attivazione **PP1**

② si attiva una isoforma di **PKC**

③ si attiva la via di trasduzione che tramite **Ras** attiva la **MAP chinasi ERK** che ha un effetto sull'espressione genica di enzimi metabolici

► TESSUTI BERSAGLIO

- **tessuto adiposo:** **PKB** attiva la **citrato liasi** (inizio sintesi AG)
- **muscolo:** **PP1** defosforila e attiva la **PFK II** nella glicolisi. Attiva la **fusione di vescicole con GLUT4**
- **fegato:** **PP1** defosforila e disattiva la **PFK II** nella glicolisi. **PKB** attiva trascrizione geni gluconeogenetici



Effetti metabolici dell'insulina

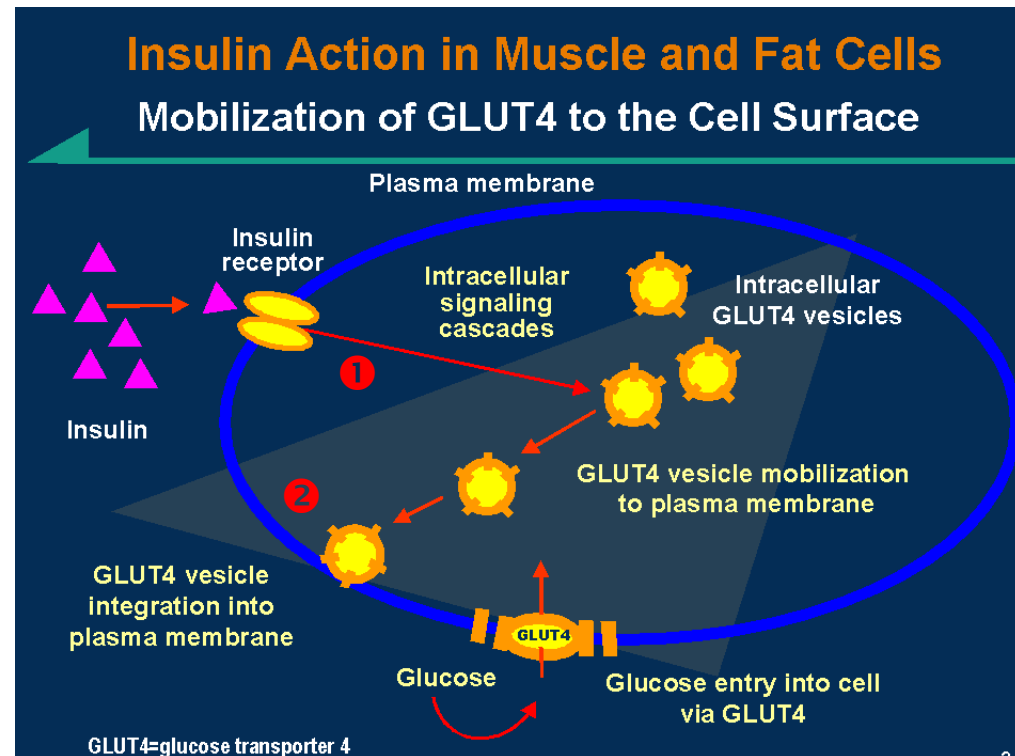
► Attivazione di chinasi e fosfatasi multifunzionali

- a **proteina chinasi B (PKB)** fosforila e rende attiva la **citrato liasi** che **scinde il citrato** in ossalacetato e **Acetil-CoA** (utile per la biosintesi di acidi grassi)
- **PKB** inizia un processo che porta all'attivazione la **protein fosfatasi 1 (PPP1)** che defosforila gran parte degli enzimi fosforilati da **PKA**, **PKC** a **CaM-K** nel fegato, nel muscolo e nel tessuto adiposo (organi bersaglio). **Stimola l'anabolismo** (biosintesi)

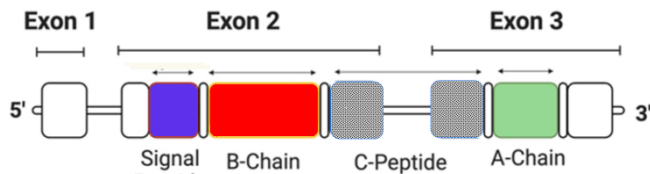
► Stimola la fusione di vescicole con GLUT4 e la membrana citoplasmatica (muscolo, tessuto adiposo)

- La cascata del segnale che parte con l'attivazione di **PKB** ① induce la fusione di vescicole ricche in GLUT4 con la membrana plasmatica ②
- **aumenta il trasporto di glucosio** in quei tessuti (effetto **ipoglicemizzante**)
- GLUT4 ha un $K_M \approx 5\text{mM}$, meno di GLUT 2 e in questo caso non aumenta l'efficienza del trasporto ma il numero di trasportatori

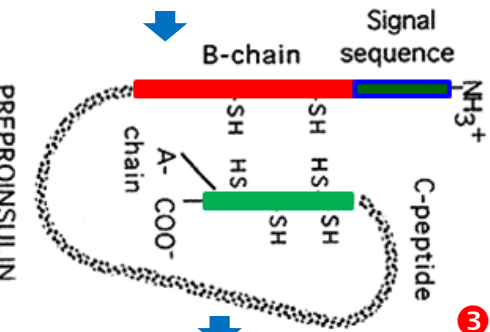
NB: glicemia - [Gluc] ematico = 4-6 mM a digiuno e 7-12 mM dopo un pasto



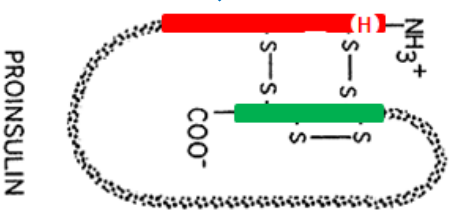
Biogenesi dell'insulina



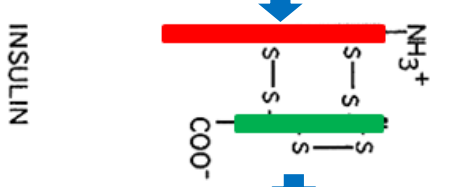
1 gene transcription – signal peptide directs ribosome to rough ER



2 translation into ER, signal peptide removed and S-S bonds formed

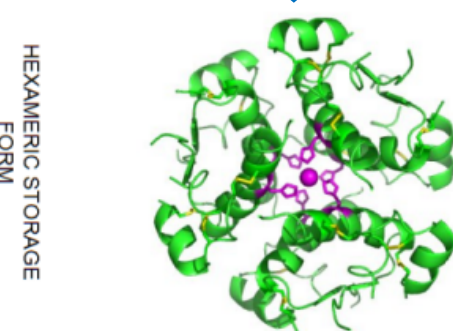


3 transport of pro-insulin to cis-Golgi



4 maturation of pro-insulin continues in Golgi and secretory vesicles

5 maturation completed in mature insulin granules

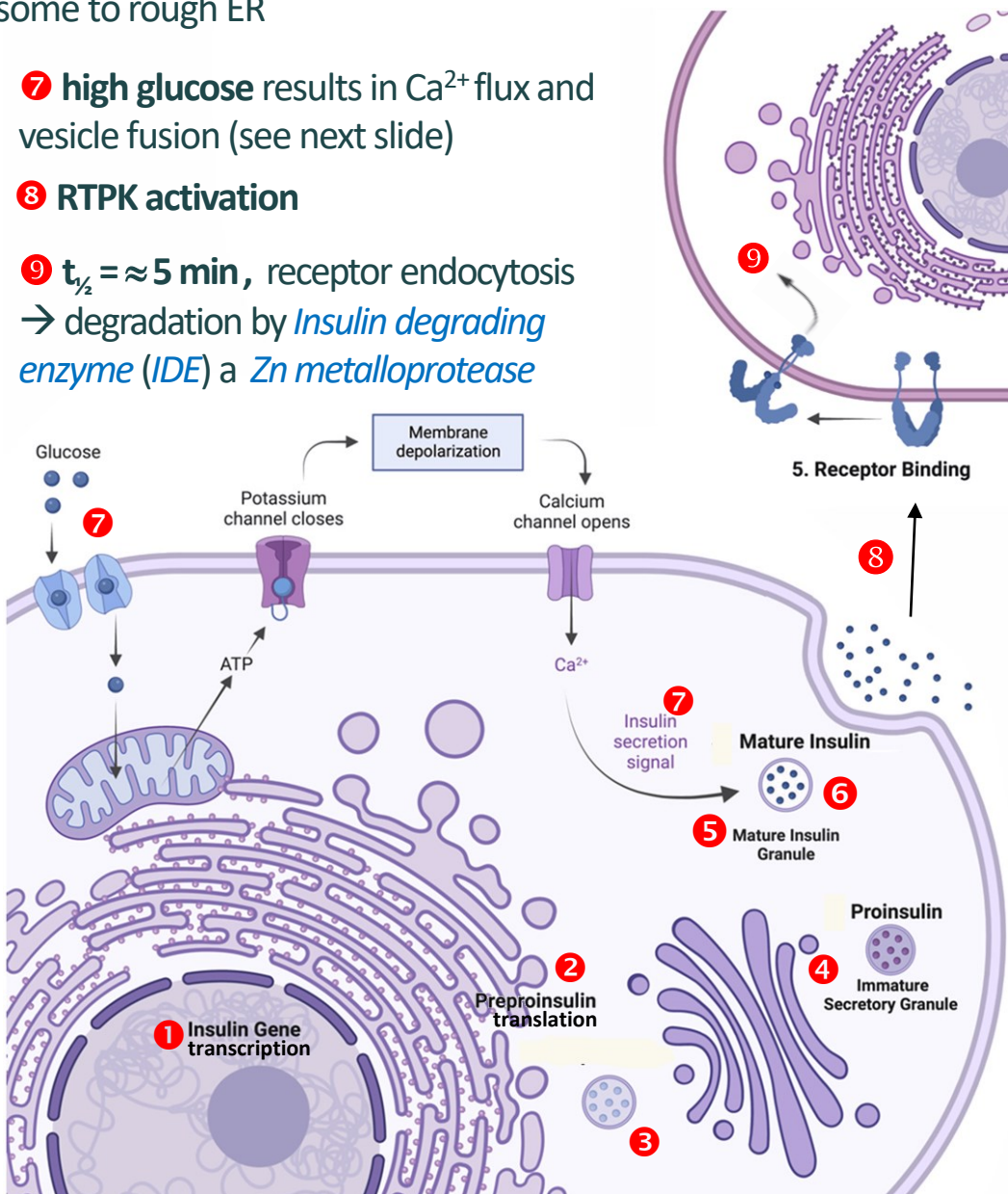


6 tight packing by coordination to Zn ions (Ins)₆Zn

7 high glucose results in Ca²⁺ flux and vesicle fusion (see next slide)

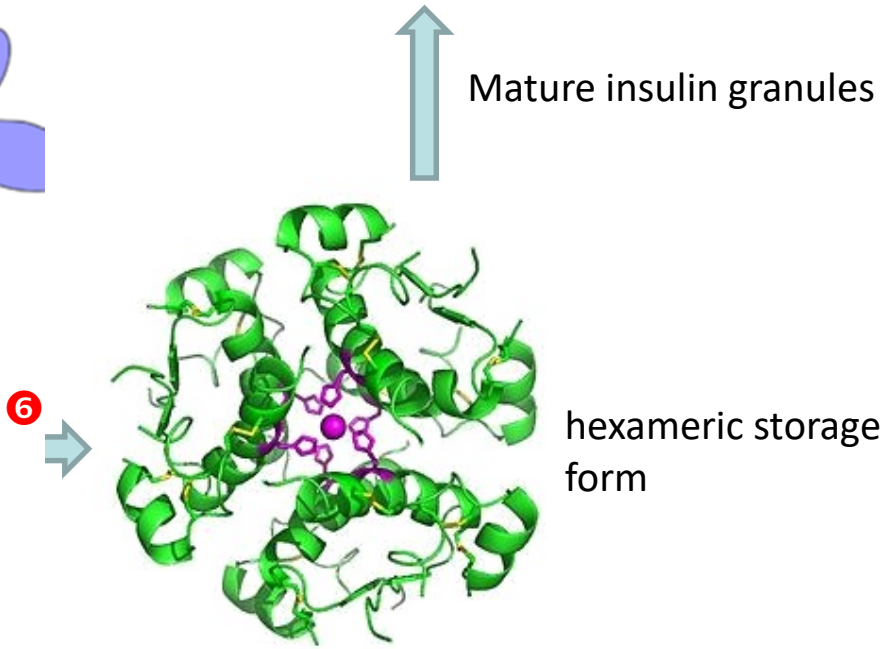
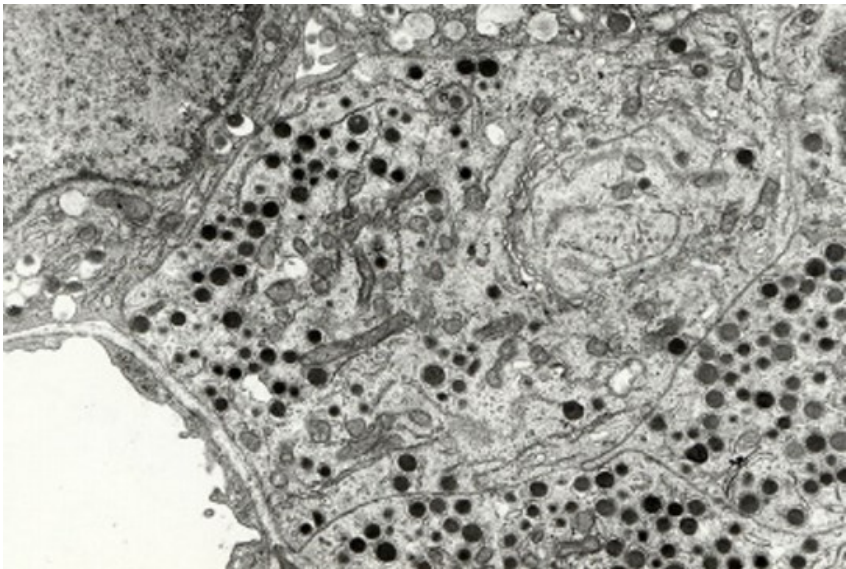
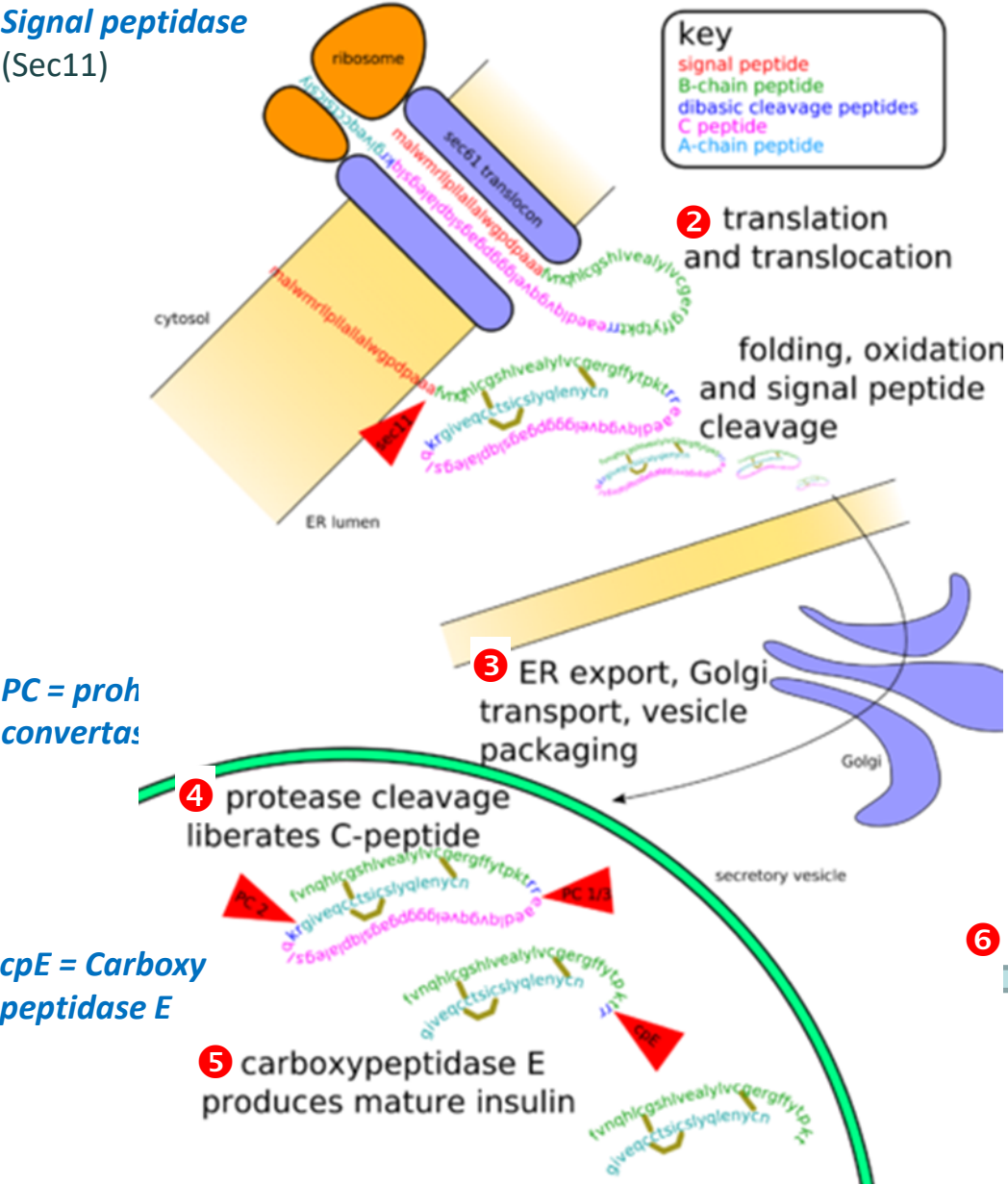
8 RPTK activation

9 $t_{1/2} \approx 5 \text{ min}$, receptor endocytosis → degradation by *Insulin degrading enzyme (IDE)* a *Zn metalloprotease*



Biogenesi dell'insulina (cont.)

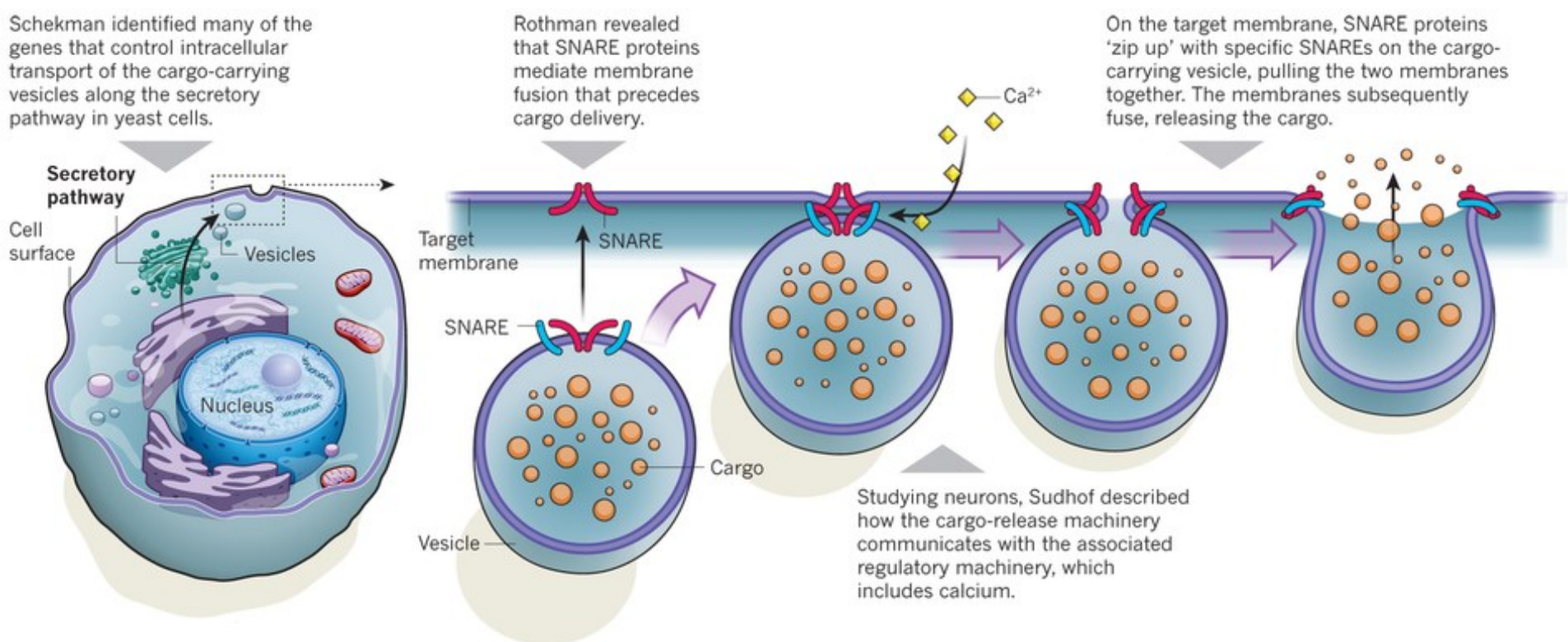
Signal peptidase
(Sec11)



Insulina – traffico vescicolare ed esocitosi

► Il rilascio dell'insulina richiede fusione delle vescicole con la PM (SNARE e Ca^{2+})

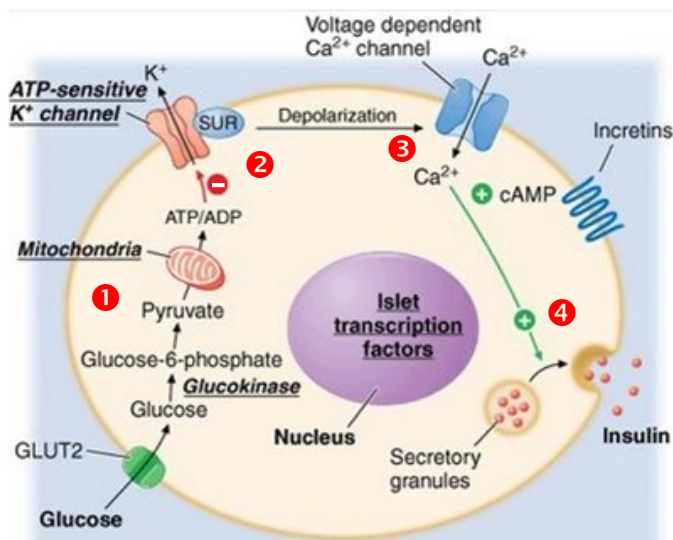
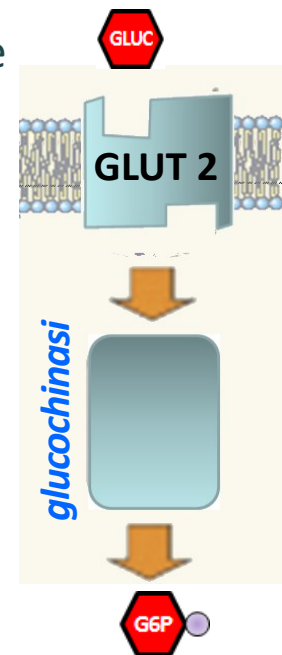
- le vescicole raggiungono la membrana citoplasmatica (PM) dove si forma il **complesso SNARE**, che è poi attivato da un flusso di ioni calcio, portando all'esocitosi.
- Questo è **un meccanismo comune per la fusione di tutte vescicole con membrane** (premio Nobel 2013 Scheckman, Rothman and Südhof)



SNARE = **SNAP** (Soluble [NSF](#) Attachment Protein) **RE**ceptor NSF = N-ethylmaleimide-sensitive factor

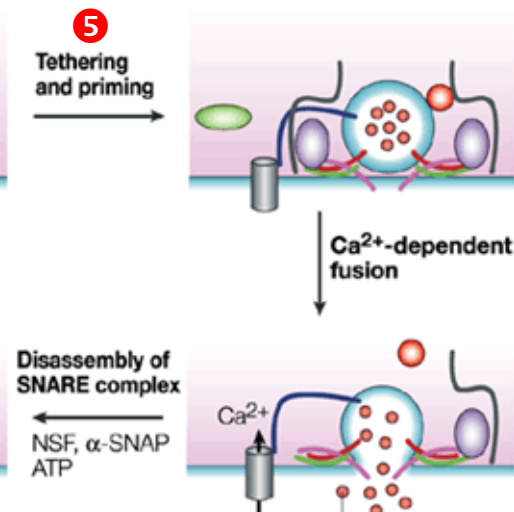
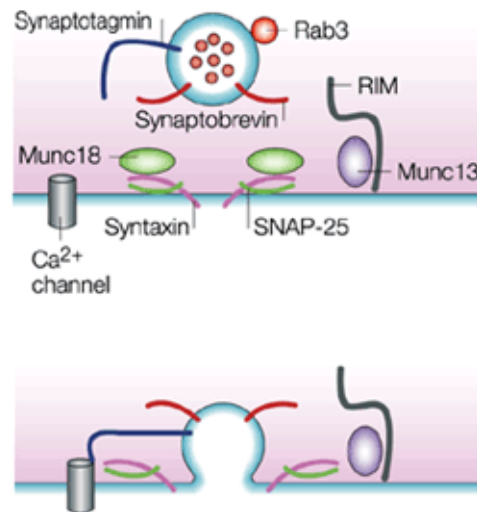
Insulina – controllo della secrezione

- la **concentrazione ematica di glucosio** è il più importante segnale che regola la secrezione dell'**insulina**
- le cellule β pancreatiche esprimono **GLUT2** ($K_M > 7\text{mM}$) con **bassa affinità ma elevata efficienza** per il trasporto di glucosio che garantisce il suo **rapido ingresso** dopo un pasto
- **GLUT2 + glucochinasi** sono l'**"unità glucosensoria"** e il glucosio è processato in quantità proporzionali a quelle dell'ambiente extracellulare (non si saturano anche a $>14\text{mM}$)
- il metabolismo del glucosio **1** porta all'**aumento di ATP** che inibisce **canali K^+ ATP-dipendenti**
- la conseguente depolarizzazione della membrana **2** attiva **voltage-gated Ca channels** **3**
- l'influsso di **Ca^{++}** attiva l'**esocitosi di vescicole cariche di insulina** **4** (meccansimo SNARE **5**)
- GLP-1 è un potente stimolatore dell'espressione genica dell'insulina – potenziale terapeutico **6**



6
(GLP-1)

Exenatide
Liraglutide
(incretin mimetics)



Farmaci basati su GLP-1 – incretin mimetics

► Analoghi o derivati di GLP-1 sono usati nel diabete per stimolare la produzione d'insulina

- **Exenatide**, su peptide sintetico basato **Exendin-4**, peptide salivario del mostro di Gila (*Heloderma suspectum*) è un analogo, ma non un ortologo, di GLP-1
 - è in grado di attivare il suo recettore e ha un'emivita lunga
 - **Liraglutide**, frammento di GLP-1 con una sostituzione R→K per permettere il legame di un **AG C16** alla catena laterale (e poi R→K per impedirla)
 - Permette di legare alla siero albumina e aumenta la biodisponibilità
- 



Exenatide

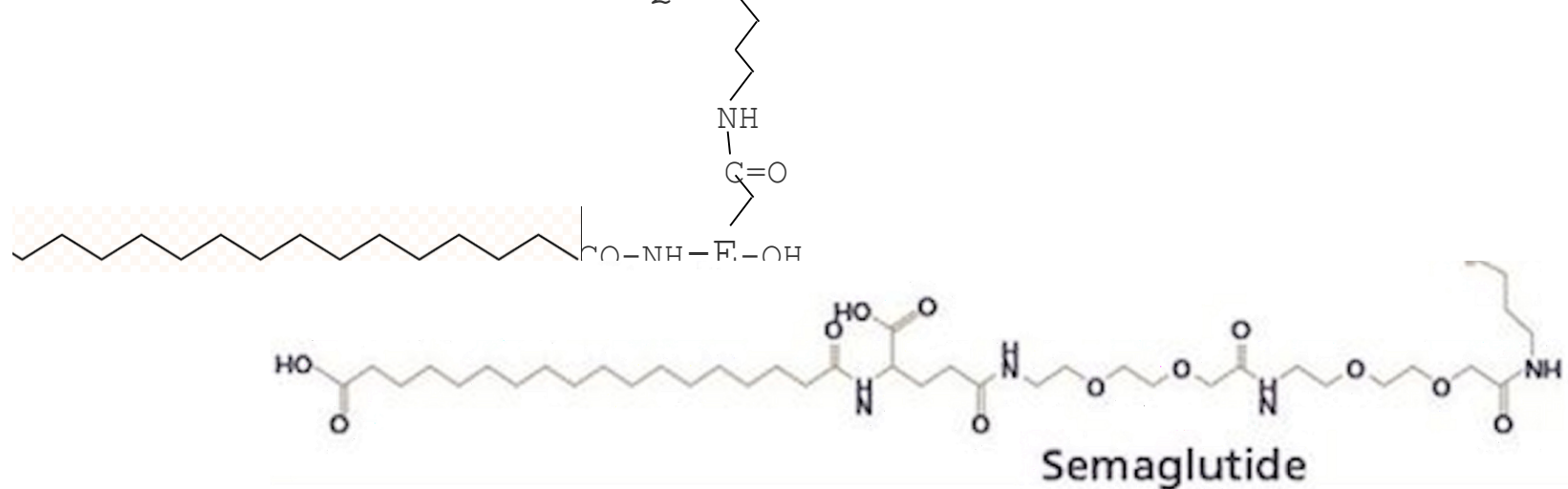
HEG**T**FT**S**DL**S**KQ**M**EE**E**AV**R**LF**I**EW**L**KN**G**GPSSGAPPPS-NH₂

GLP-1

HDEFER**HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI**AWLVKGR-NH

Liraglutide

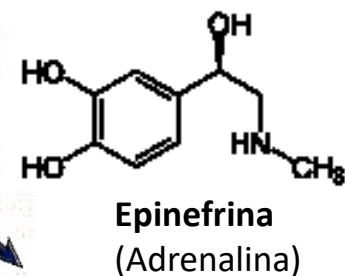
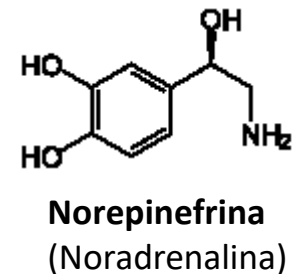
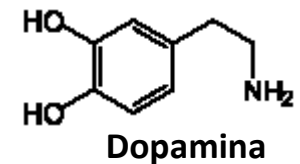
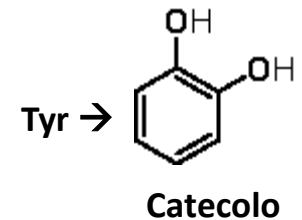
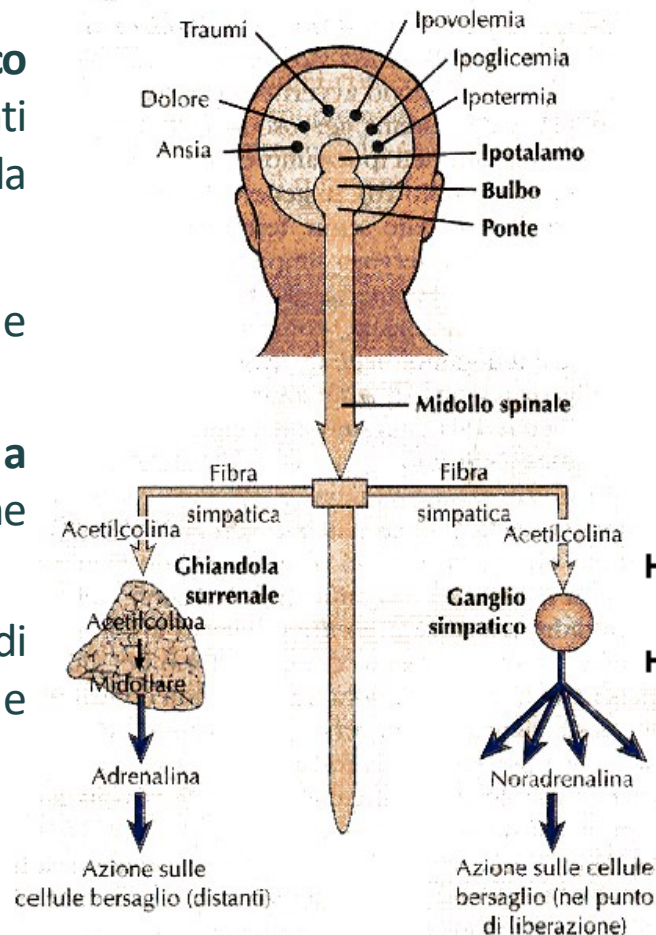
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG-OH



Le catecolamine – segnali per stress

► Ormoni prodotti e secreti in risposta ad uno **stress ACUTO**

- prodotti dalla **midollare del surrene** e dai **neuroni del Sistema Nervoso Simpatico**
- il SNS risponde a diversi stimoli che **generano “stress”** e sollecitano l'organismo ad avvertire **pericolo**.
- la risposta è mediata da **neuroni del tronco dell'encefalo** che tramite vie discendenti attivano i gangli del **sistema ortosimpatico** e la **midollare del surrene**.
- **Noradrenalina** è liberata dai gangli simpatici e **agisce localmente**
- **Adrenalina** è liberata dalla midollare e **agisce a distanza** (entra nel flusso ematico) e dà origine ad una **risposta coordinata allo stress**.
- **Dopamina** è liberata dal SNC (sensazione di benessere) ma anche dagli organi mesenterici e assiste nella digestione



Recettori adrenergici

► 3 sottotipi principali di adrenorecettori

α_1 -adrenergic receptors: *proteina $G\alpha_q$* $\rightarrow$ DAG & $IP_3 \rightarrow Ca^{2+} \uparrow$ & *PKC attiva*
 $\downarrow$
CAM-K attiva

α_2 -adrenergic receptors: *proteina $G\alpha_i$* ---| *Adenilato ciclasi* ($ATP \downarrow$)

β -adrenergic receptors: *proteina $G\alpha_s$* $\rightarrow$ *Adenilato ciclasi* $\rightarrow$ $cAMP \uparrow \rightarrow PKA attivo$

- sottotipi b1, b2 e b3, attivati da **adrenalina** e **noradrenalina** (*epinefrina/norepinefrina*)

Tessuto	Recettore	Proteina $G\alpha$	Proteine effettrici	Effetto
Fegato	CPCR α_1	α_q	<i>PKC, CamK</i> $\uparrow$	stimola glicogenolisi, glocuneogenesi
Muscolo scheletrico	CPCR β	α_s	<i>PKA</i> $\uparrow$	stimola glicogenolisi, glicolisi e β -ox AG
Muscolo cardiaco	CPCR β	α_s	<i>PKA</i> $\uparrow$	aumento forza/frequenza contrazione
Muscolo liscio - sfinteri - genito-urinario - vene - radiale iride	CPCR α_1	α_q	<i>PKC, CamK</i> $\uparrow$	aumento catablismo ossidativo contrazione contrazione contrazione $\rightarrow$ vasocostrizione contrazione $\rightarrow$ apertura pupilla
- arteriole - visceri	CPCR β	α_s	<i>PKA</i> $\uparrow$	rilassamento $\rightarrow$ vasodilatazione rilassamento
Pancreas (α cell)	CPCR α_1	α_q	<i>PKC, CamK</i>	secrezione glucagone
Pancreas (β cell)	CPCR α_2	α_i	<i>PKA</i> $\downarrow$	diminuita secrezione insulina

