

Farmacologia cellulare e molecolare

Prof. Patrizia Romualdi, PhD

Classificazione dei recettori
e
modulazione delle risposte cellulari

In base alla localizzazione subcellulare i RECETTORI si dividono in:

RECETTORI DI MEMBRANA

RECETTORI INTRACELLULARI

trasducono il segnale da

mediatori idrofilici
(NT, fatt. crescita, citochine)

ormoni e mediatori lipofilici
(steroidi, vit. D, ac. retinoico)

differiscono per il meccanismo di trasduzione

modificazione conformazionale
e biochimica della cellula

modificazione espressione
genica e → proteica

RECETTORI INTRACELLULARI

steroidi

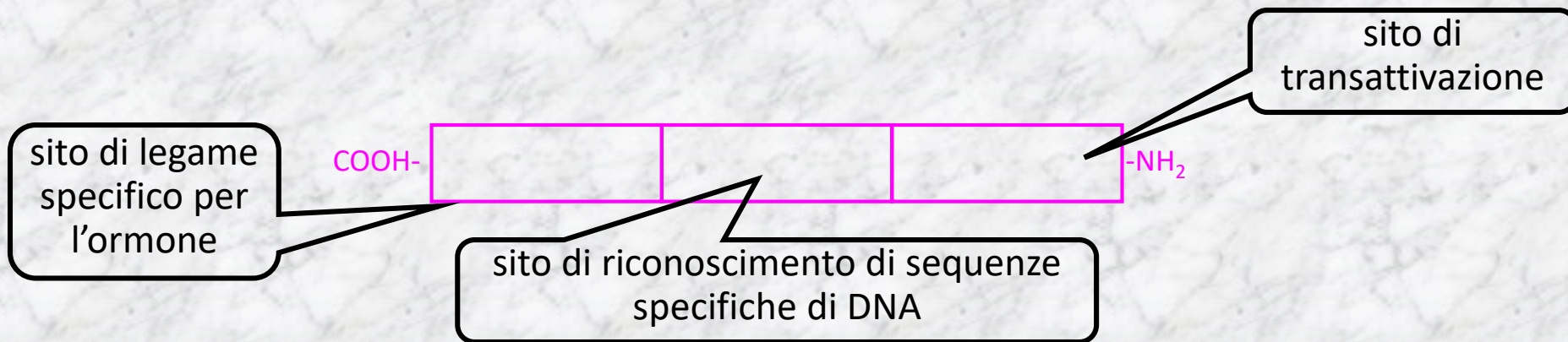
vitamine A e D

tiroxina

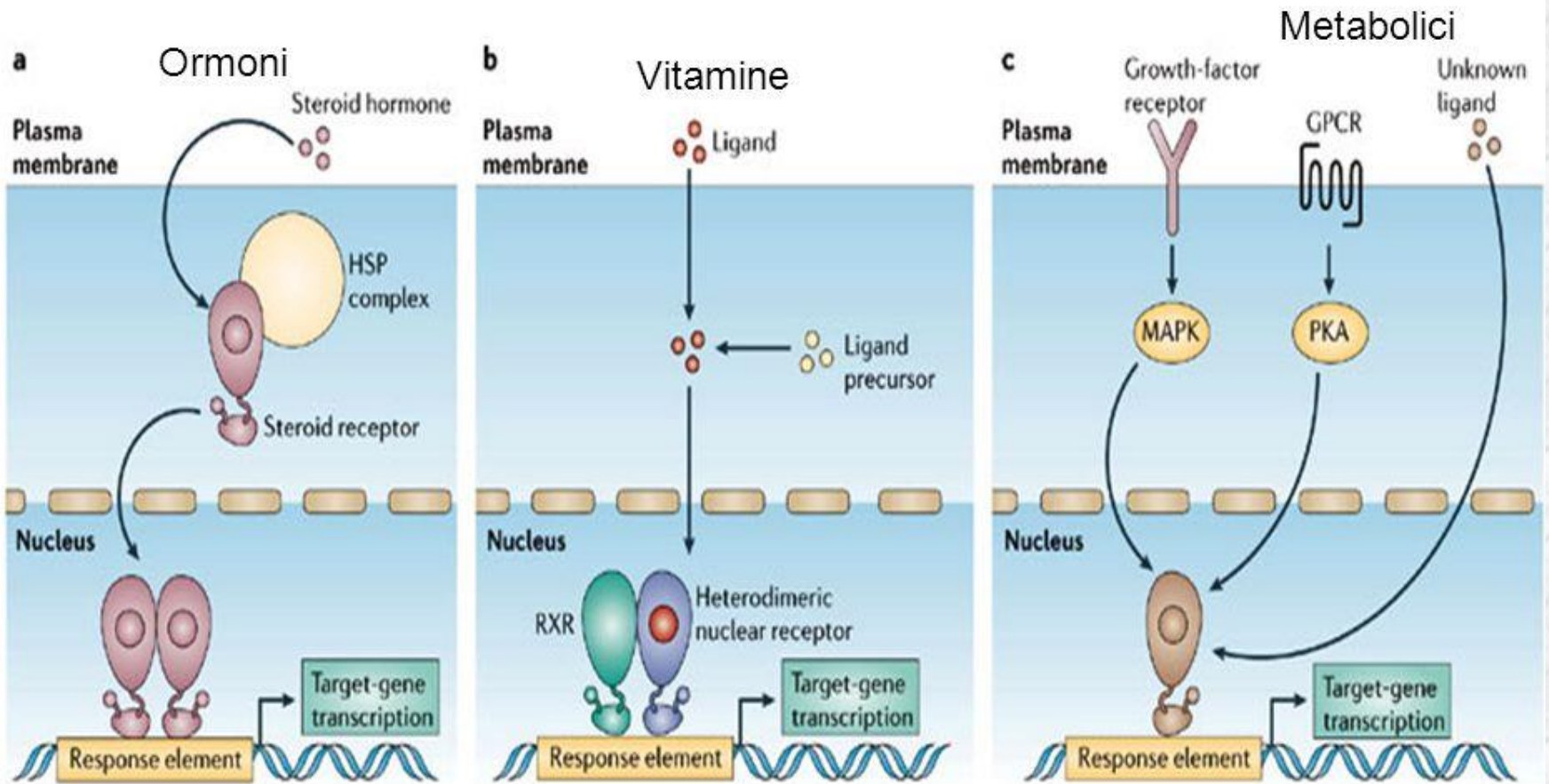
fattori di differenziamento (ac. retinoici)

- ❖ sono proteine citosolubili,
- ❖ legano il DNA
- ❖ regolano la trascrizione genica

sono simili tra di loro, sono a catena peptidica singola e con 3 zone:



Classificazione dei recettori nucleari

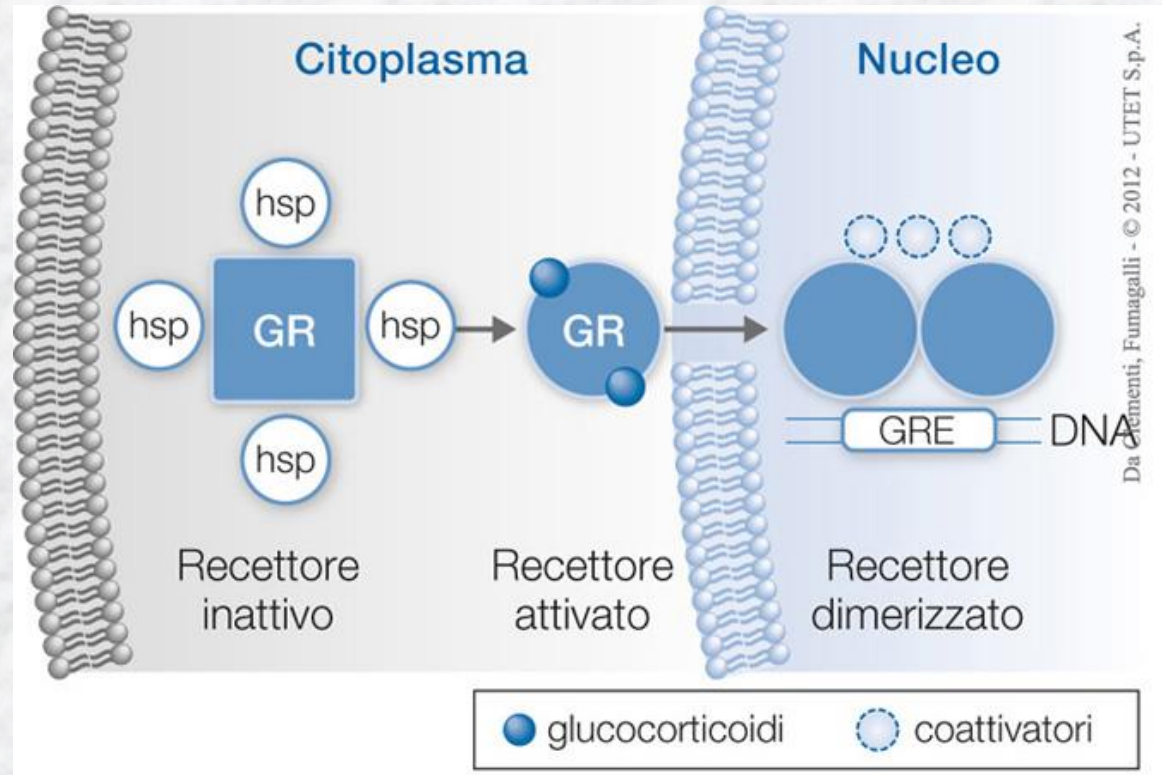


Ormoni tiroidei, recettore TR alfa e beta
 Estrogeni, recettore ER, alfa e beta
 Testosterone, recettore AR
 Progesterone recettore PR
 Aldosterone, recettore MR
 Cortisolo, recettore GR

1,25- (OH)₂-coleciferolo: recettore VDR
 Acidi retinoici: recettore acido retinoico alfa, beta e gamma
 Acido 9-cisretinoico: recettore RXR i alfa, beta e gamma

Acidi grassi, recettore PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) alfa, beta e gamma
 Ossisteroli recettore LXR alfa e beta
 Acidi biliari, recettore BAR

Schema del meccanismo di trasduzione del segnale dei recettori per gli ormoni steroidei.

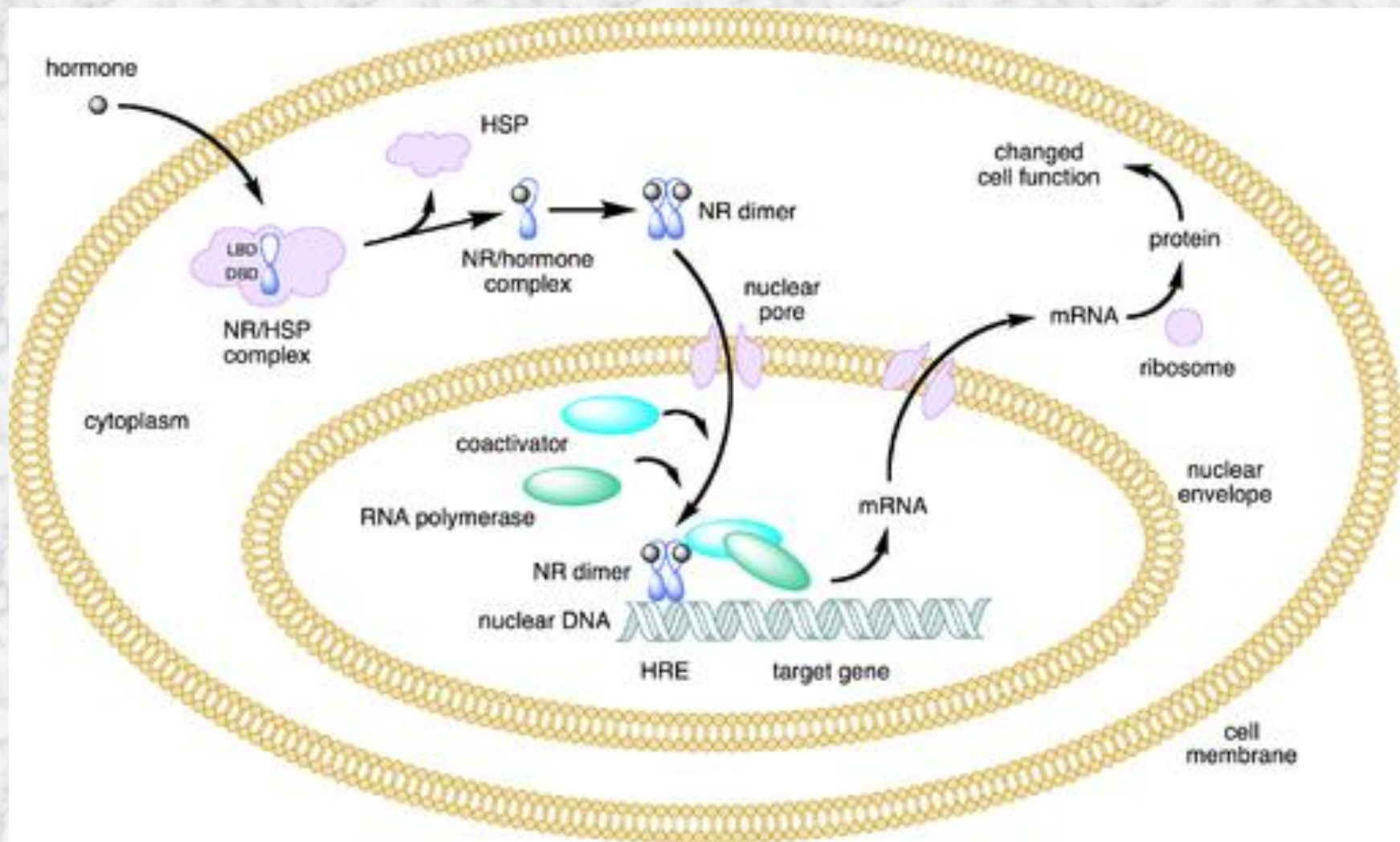


Gli ormoni e le molecole lipofile possono passare la membrana cellulare e attivare un recettore intracellulare,.

Es. **il recettore per i glucocorticoidi (GR) che è citoplasmatico**, ma alcuni recettori di questo tipo sono nucleari.

Il GR è associato a delle *heat-shock proteins* (hsp) e in forma monomerica e inattiva.

Quando il glucocorticoide si lega al recettore, esso cambia conformazione, si dissocia dalle hsp inibitorie, dimerizza e può essere trasportato nel nucleo. Qui interagisce con sequenze specifiche di DNA, dette *Glucocorticoid Responsive Elements* (GRE) presenti nel promotore di geni sensibili ai glucocorticoidi e recluta proteine coattivatrici (o corepressorie in altri casi). In tal modo il complesso recettoriale attiva o inibisce la trascrizione del gene.



FARMACI

(analoghi degli ormoni steroidei)

interferiscono con l'attivazione di questi recettori
e con questo sistema di trasduzione del segnale

RECETTORI DI MEMBRANA

1) Recettori canale (veloci)

2) Recettori accoppiati alle proteine G (lenti)

(alcuni NT li legano entrambi evocando risposte lente o veloci)

3) Recettori ad attività tirosin chinase intrinseca

4) Recettori per le citochine

5) Recettori per il TNF

6) Recettori ad attività guanilato ciclasica

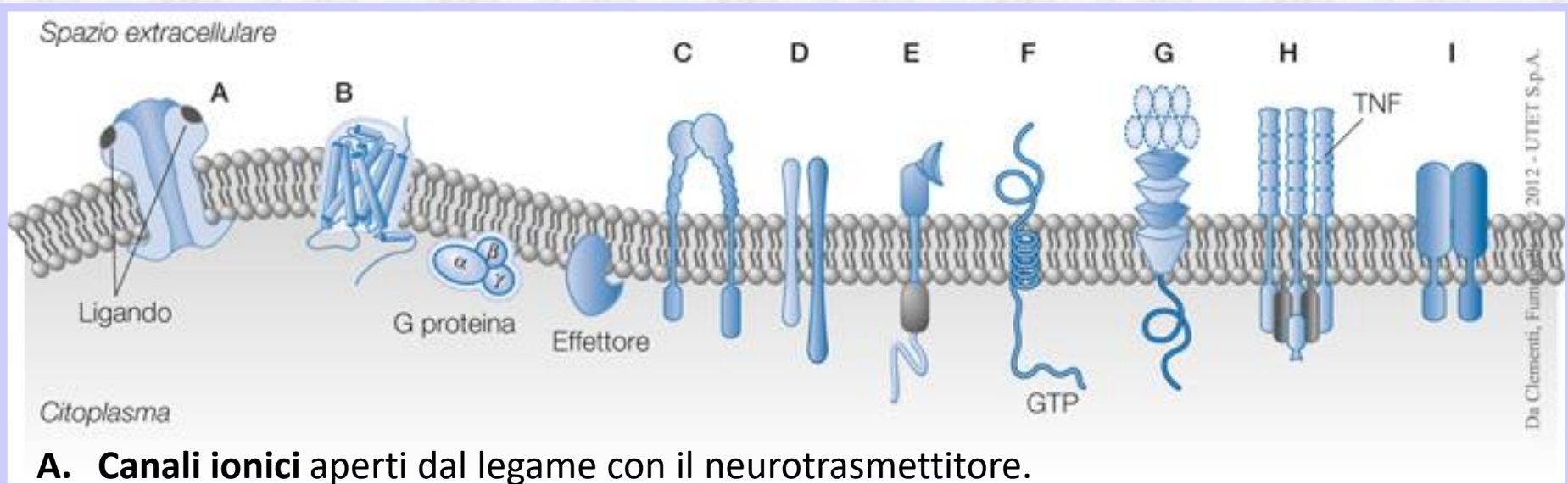
7) Recettori di adesione cellulare

8) Recettori Toll-like

9) Recettori per le lipoteine

10) Recettori Decoy

Superfamiglie dei RECETTORI DI MEMBRANA



- A. Canali ionici** aperti dal legame con il neurotrasmettitore.
- B. Recettori accoppiati a proteine G** con la caratteristica struttura a sette zone transmembrana
- C. Recettori per la matrice extracellulare (integrine)**
- D. Recettori per le citochine**
- E. Recettori che possiedono attività proteinchinasica intrinseca** (cilindro grigio) che fosforila residui di tirosina e/o serina
- F. Recettori che possiedono un'attività guanilato ciclasica intrinseca**
- G. Recettori per le lipoproteine**
- H. Recettori per il TNF** o recettori di morte
- I. Recettori "toll-like"**

1) Recettori canale

**Costituiti da più unità
monomeriche**



Le proteine si possono assemblare per formare un canale ionico che attraversa la membrana cellulare e consente il passaggio di ioni = cioè molecole dotate di carica

L'ATTIVAZIONE di questo recettore determina una repentina variazione delle concentrazioni ioniche intracellulari e del potenziale elettrico transmembranario

INDUCONO RISPOSTE MOLTO VELOCI (mmsec) per questo sono così abbondanti a livello nervoso e nella giunzione neuromuscolare

SONO ATTIVATI DA FARMACI AGONISTI O DA NEUROTRASMETTITORI

Esempi di recettore canale:

nicotinico per Ach

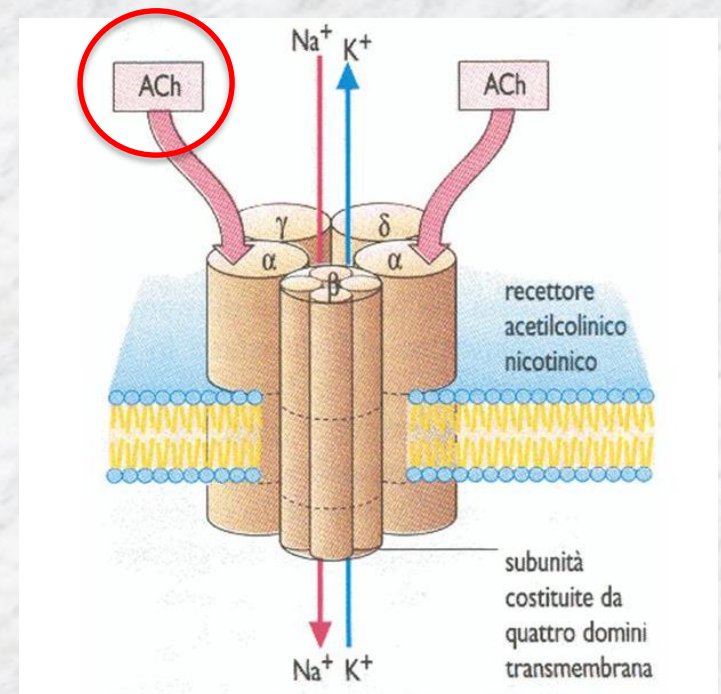
GABA_A

per la glicina

per il glutammato

5HT₃

P_{2x} per le purine



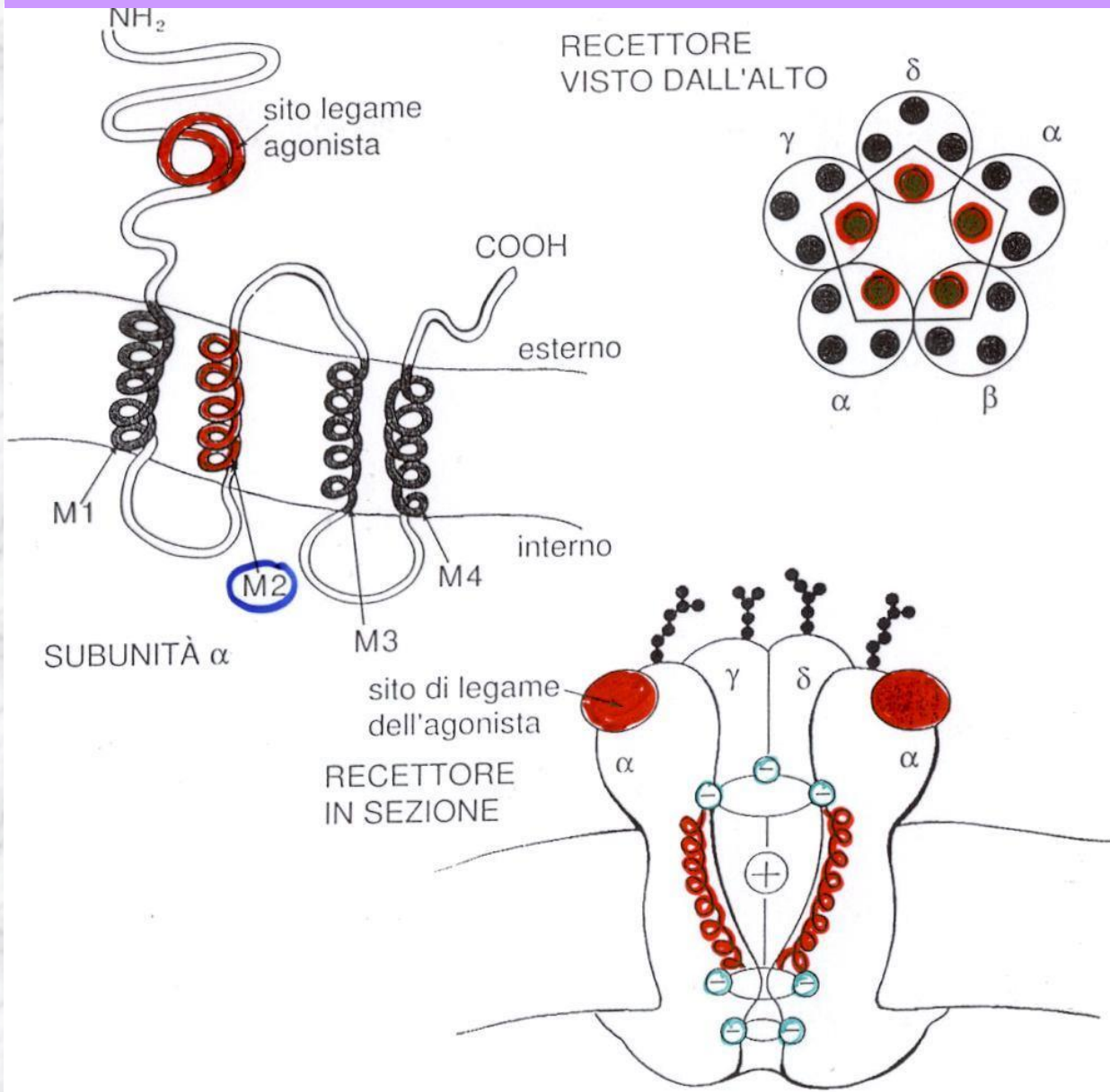
Neurotrasmettitori con recettori a trasduzione del segnale

Neurotrasmettitore	Risposta veloce	Risposta lenta
Acetilcolina	Nicotinici	Muscarinici
GABA	GABA _A	GABA _B
Glutammato	Ionotropi	Metabotropi
Serotonina	5-HT ₃	5-HT _{1,2,4,5}
ATP	P _{2x}	P _{2y}

Struttura molecolare del recettore canale

- ❖ **4 o 5 subunità che delimitano un canale idrofilico**
- ❖ ogni subunità è formata da 1 catena singola che ha in genere **4 domini** transmembranari (TM) in corrispondenza di regioni ricche di aa idrofobici (**regioni M**)
- ❖ **il lume del canale è delimitato sempre dalla M2**, ricca di aa carichi elettricamente disposti a formare degli anelli di cariche positive o negative dentro il canale
- ❖ **il sito per l'AGONISTA è sulla porzione amminica extracellulare su una subunità fissa, esistono più siti allosterici**
- ❖ esistono siti di fosforilazione nella porzione intracellulare

Struttura molecolare del recettore canale



I Farmaci possono essere attivi tramite:

- interazione con il sito dell'Agonista**
(i curari per il recettore nicotinic)
- interazione con un sito allosterico**
(BDZ per GABA_A)
- interazione all'interno del lume**
(esametonio per il recettore nicotinic)

**Poiché l'apertura dipende dal legame con il ligando
sono ligando dipendenti**

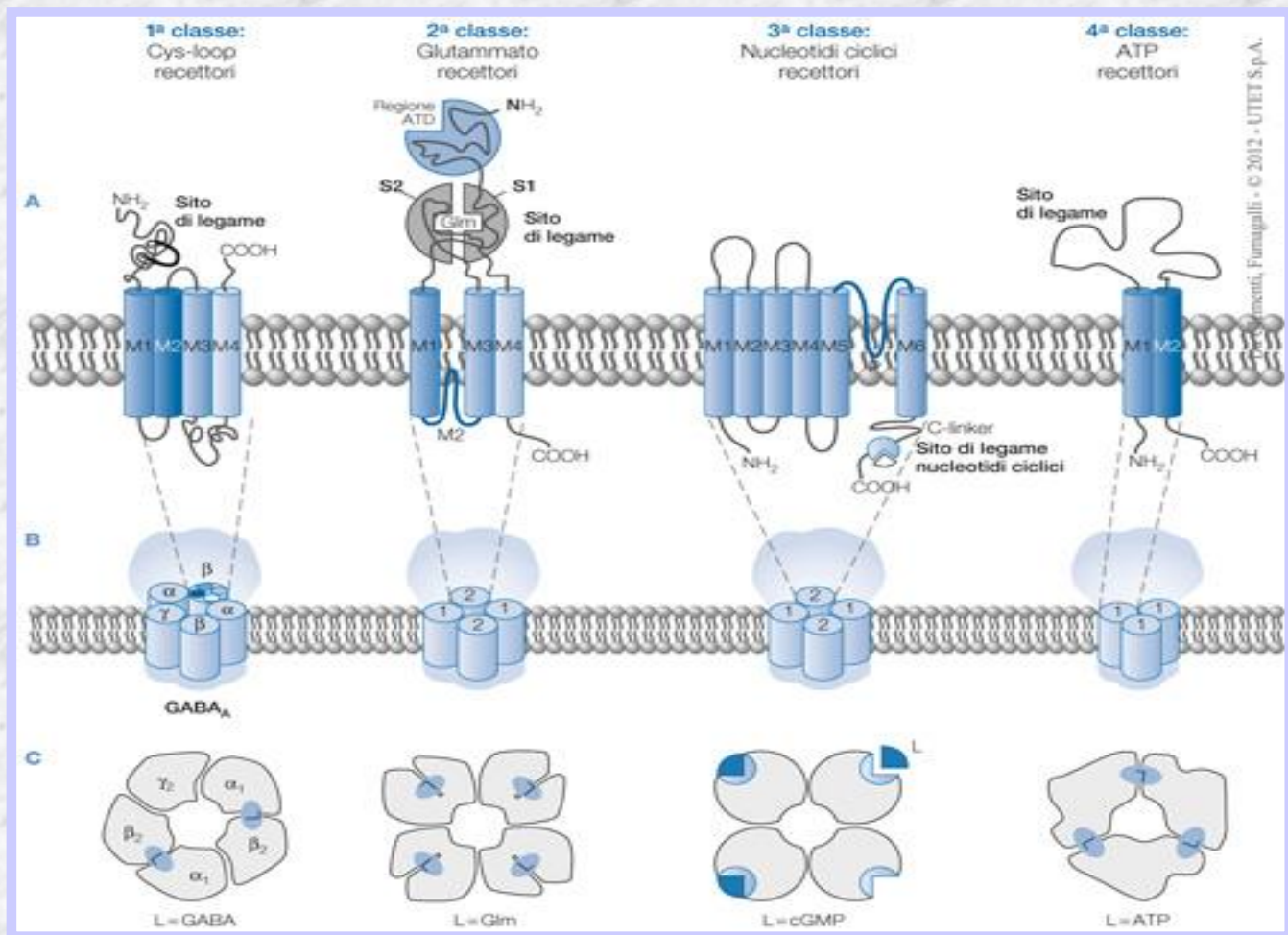
In base al grado di omologia della sequenza aa delle subunità e stechiometria possono essere divisi in quattro classi qui rappresentate.

I° = i recettori Cys-loop → recettori per l'ACh, GABA, glicina e serotonina;

II° = i recettori per il glutammato;

III° = i recettori per nucleotidi ciclici;

IV° = i recettori per l'ATP.

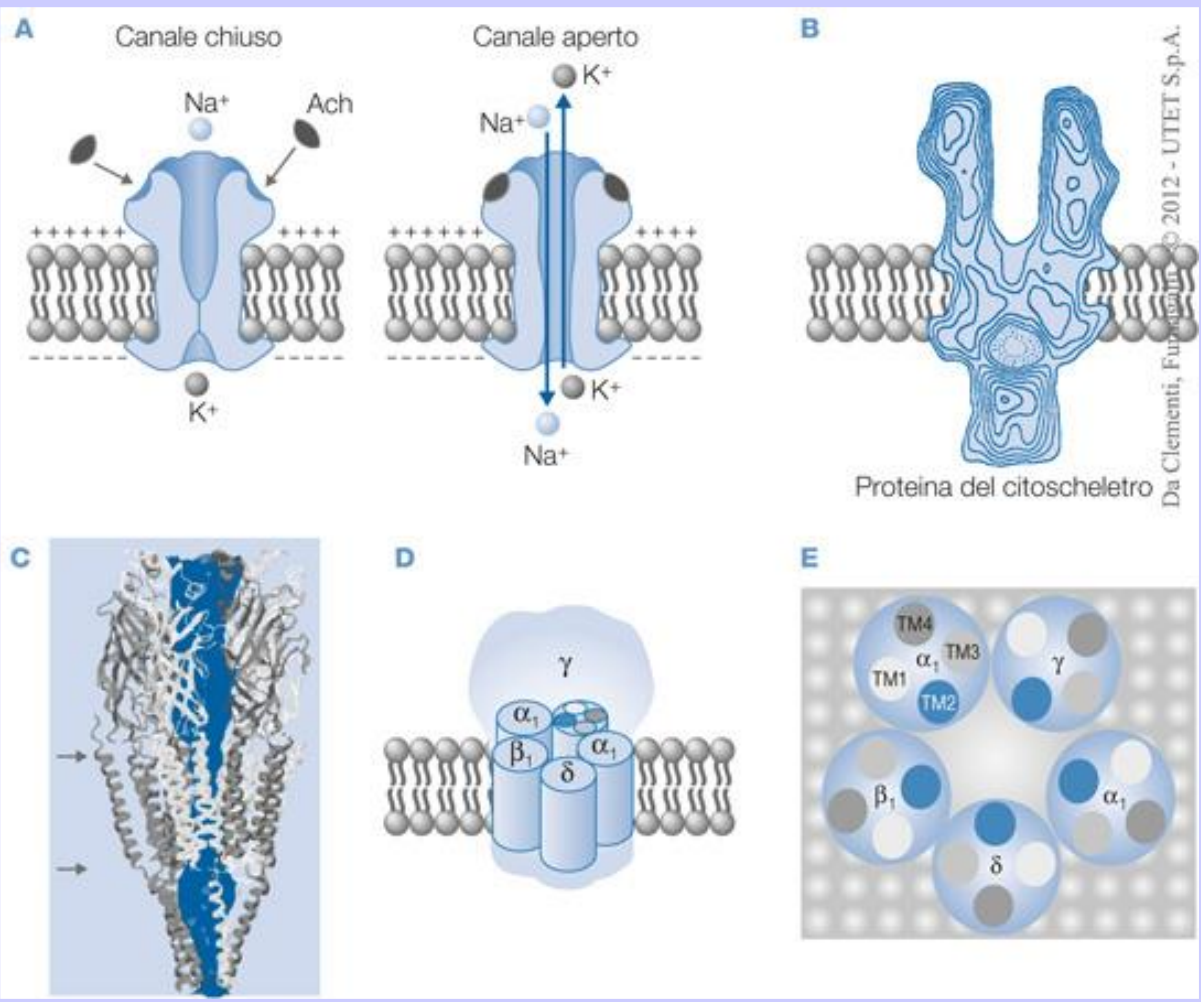


A → NH₂ regione N-terminale; COOH, regione C-terminale.

B → Schema dell'arrangiamento delle subunità α formare i recettori.

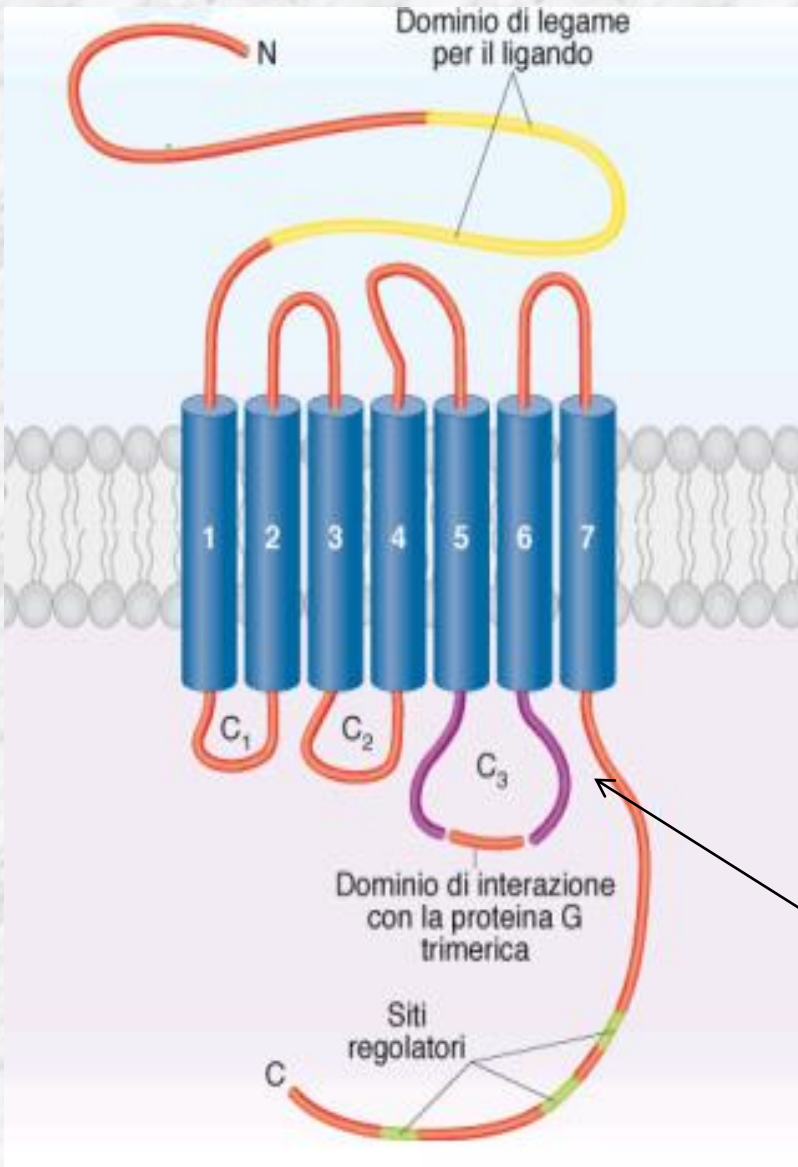
C → Sezione trasversale dei recettori che mostra la stechiometria delle subunità che compongono le diverse classi di recettore.

Schema dell'apertura del recettore nicotinic dell'ACh muscolare e della sua struttura molecolare.



- A. Dopo il legame di due molecole di ACh alle due subunità $\alpha_1 \rightarrow$ modificazione conformazionale del recettore e conseguente apertura del canale
- B. Immagine ricostruita al microscopio elettronico ed ottenuta mediante elaborazione delle immagini del **recettore colorato con la tecnica del negative staining**. Si può osservare la lunga cavità extracellulare che forma l'imbuto nel quale vengono raccolti gli ioni che devono essere traslocati, il restringimento del lume a livello della membrana plasmatica dove avvengono la selezione e il passaggio degli ioni
- C. Struttura tridimensionale del recettore nicotinic tramite analisi cristallografiche a raggi X. **Le subunità α_1 sono presentate in bianco e le non- α -subunità in grigio**. La superficie interna del canale è indicata in blu. Le frecce indicano i limiti della membrana cellulare.
- D. Struttura pentamerica del recettore nicotinic muscolare.
- E. Sezione trasversale, vista dall'alto, delle cinque subunità associate a formare il canale in cui sono indicate le posizioni (M1-M4) e le regioni M2 che delimitano le pareti del canale.

2) Recettori accoppiati a proteine G



- Una superfamiglia di R costituiti da una singola catena aa che attraversa 7 volte la membrana in corrispondenza di regioni idrofobiche della proteina e che si dispone a formare una struttura sferica
- Il sito di legame PER L'AGONISTA è posto sulla porzione amminica extracellulare
- La sequenza tra TM5 e TM6 è intracellulare ed è quella più importante per il riconoscimento della proteina G specifica per cui si ottiene l'attivazione del sistema di trasduzione e quindi >>> l'effetto

TABELLA 13.1 Esempi di recettori accoppiati alle proteine G*

Recettore per	Proteina G	Effettore	Recettore per	Proteina G	Effettore
Neurotrasmettitori			Vasopressina		
Catecolamine			V ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Adrenergico β ₁ , β ₂ , β ₃	G _s	↑ Adenilato ciclasi	V ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C	Glucagone	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Secretina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Dopamina			VIP	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₁	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Ormone paratiroideo (PTH)	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
Serotonina			Calcitonina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
5-HT ₁ , 5-HT ₅	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C	Altri mediatori		
5-HT ₄ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Istamina		
Acetilcolina			H ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Muscarinico M ₁ , M ₃ , M ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	H ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Muscarinico M ₂ , M ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	H ₃ , H ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↓ Canali al Ca ²⁺
GABA			Adenosina		
GABA _B	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	A ₁ , A ₃	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↓ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺
Glutammato			A ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
mGlu ₁ , mGlu ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	ATP		
mGlu ₂ , mGlu ₃ , mGlu ₄ , mGlu ₆ , mGlu ₇ , mGlu ₈	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Oppioidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
Cannabinoidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Angiotensina II		
Ormoni			AT ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
ACTH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Bradichinina	G _q	↑ Fosfolipasi C
LH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Trombina		
	G _q	↑ Fosfolipasi C	PAR-1	G _i	↓ Adenilato ciclasi
FSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G _q	↑ Fosfolipasi C
TSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G ₁₂	↑ RhoGEF
	G _q	↑ Fosfolipasi C	PAR-4	G _q	↑ Fosfolipasi C
GHRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G ₁₂	↑ RhoGEF
CRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Acido lisofosfatidico		
GnRH	G _q	↑ Fosfolipasi C	LPA ₁ , LPA ₂ , LPA ₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
TRH	G _q	↑ Fosfolipasi C		G _q	↑ Fosfolipasi C
Somatostatina	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G ₁₂	↑ RhoGEF
			LPA ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
				G _q	↑ Fosfolipasi C
			LPA ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Eicosanoidi		
			Prostaglandina PGE₂		
			EP ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
			EP ₂ , EP ₄	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			EP ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
			Prostaglandina PGF _{2α}	G _q	↑ Fosfolipasi C
			Prostaciclina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			Trombossano A ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Fotoni		
			Rodopsina	G _t	↑ cGMP fosfodiesterasi

* Sono indicati le principali proteine G e i principali effettori regolati da diversi recettori o specifici sottotipi recettoriali. Si noti che un determinato recettore può attivare più di un tipo di proteina G e una determinata proteina G può regolare più di un effettore. ACTH: ormone adrenocorticotropo; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; TSH: ormone tireotropo; GHRH: ormone stimolante il rilascio di GH; CRH: ormone stimolante il rilascio di ACTH; GnRH: ormone stimolante il rilascio delle gonadotropine; TRH: ormone stimolante il rilascio di TSH; ↑: stimolazione; ↓: inibizione

✓ **è la famiglia più numerosa (maggior bersaglio di farmaci)**

✓ **trasduzione del segnale generato dal legame → attivazione delle PROT. G**

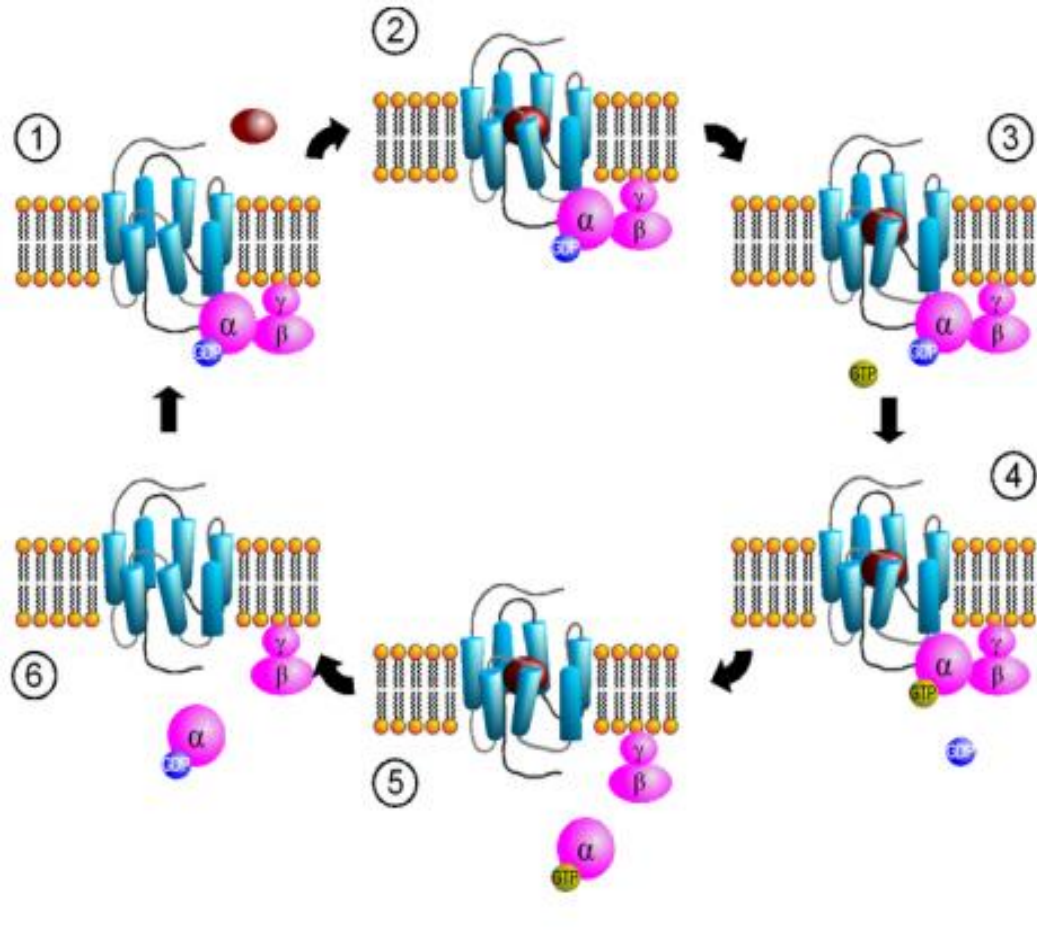
le proteine G sono famiglie di proteine eterotrimeriche (3 subunità α , β e γ) il cui nome deriva dalla capacità di **legare il GTP** e di avere un'**attività GTPasica intrinseca**

✓ quando un recettore è attivato, **subisce una modificazione conformazionale che attiva una specifica proteina G** che, a sua volta, incorpora una molecola di GTP presente nel citoplasma

✓ **soltanto la subunità α è capace di legare ed idrolizzare il GTP**

✓ **il legame con il GTP provoca la dissociazione delle 3 subunità** (l' α si dissocia dalle β e γ)

Le proteina G sono posizionate nel versante interno della membrana e regolano le funzioni delle PROTEINE EFFETTRICI = **Le proteine G fungono da mediatori.**

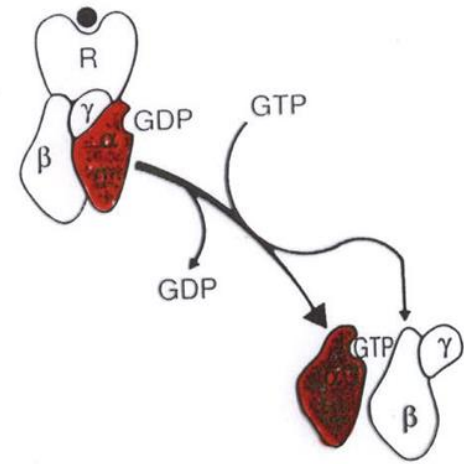
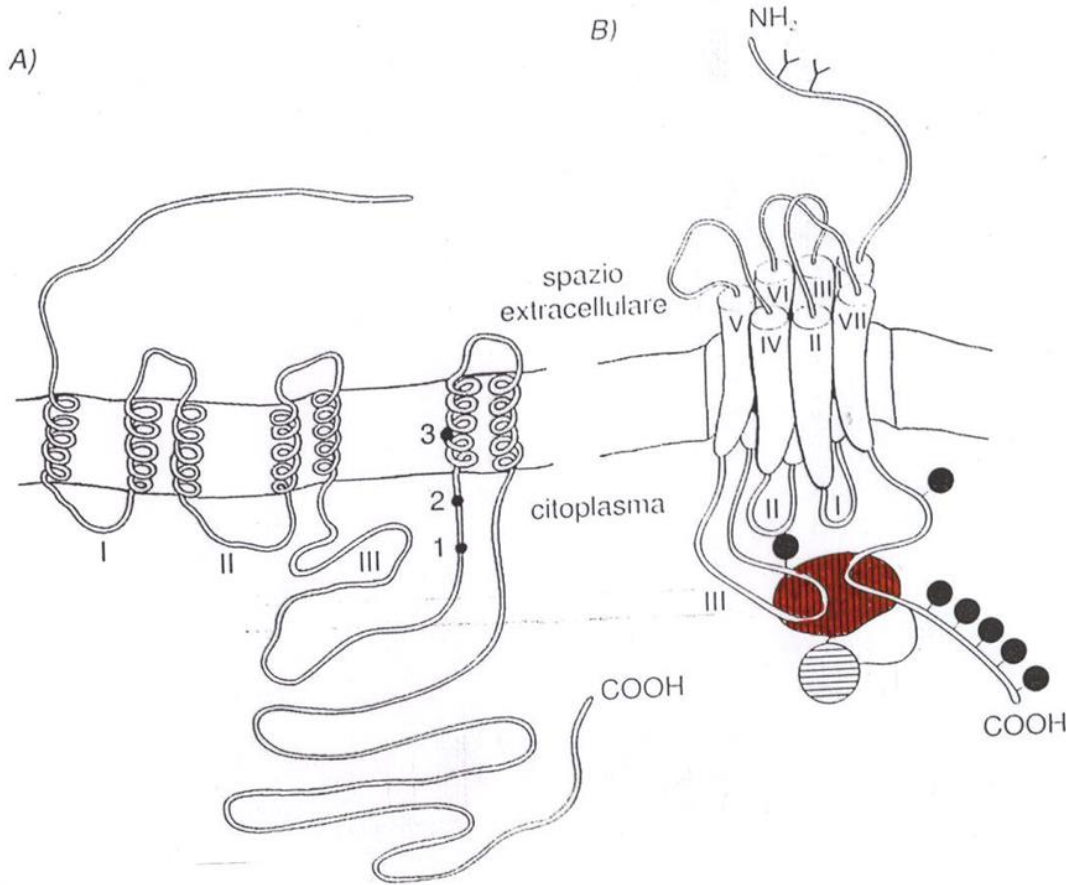


Le preteine G sono proteine trimeriche, ossia composte da 3 subunità: α , β , γ .

- In condizione di riposo (recettore accoppiato alla proteina G senza ligando) una proteina G si trova in forma di trimero $\alpha\beta\gamma$ e presenta legato il GDP sulla subunità α .
- Quando il recettore è attivato dal legame con un ligando (che rappresenta il *primo messaggero*), cambia conformazione nella parte intracellulare acquistando alta affinità per il GTP. Pertanto, il GDP si distacca, sostituito dal GTP nel suo legame con la subunità α .
- Il legame col GTP determina il distacco della subunità *alfa* dal restante dimero *beta/gamma*. e quest'ultimo dalla superficie interna del recettore. Questi due complessi formati (*alfa-GTP* e *beta/gamma*) possono agire su *effettori* diversi; ne consegue che uno stesso recettore può controllare più funzioni attraverso la subunità *alfa-GTP* che agisce su determinati effettori e il dimero *beta/gamma* che agisce su altri effettori.

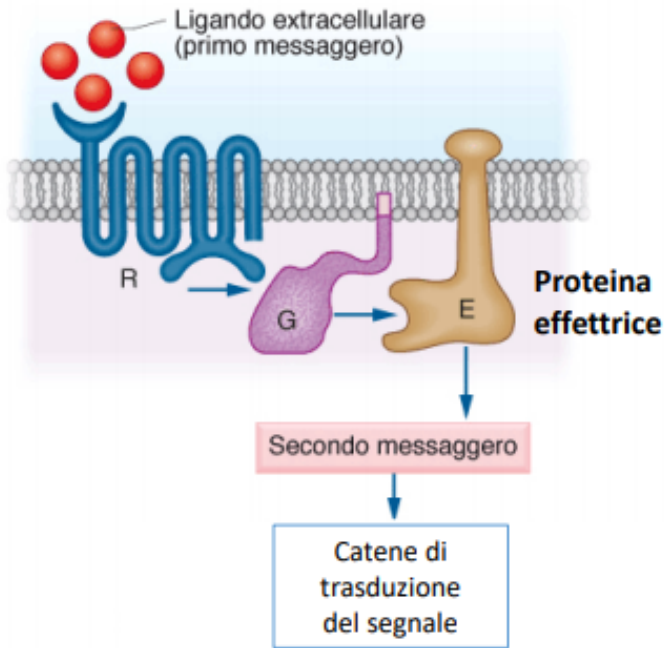
- Grazie all'attività GTPasica intrinseca la subunità α idrolizza il GPT a GDP e si riunisce alle altre due subunità e il tutto è pronto per un'altra attivazione

Recettori di membrana



Le proteine G possono essere accoppiate a tre classi di subunità di tipo α

- 1) α_s **STIMOLATORIA** = induce AD a produrre AMPc (accoppiate a R. tipo β adrenergico)
- 2) α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_o **INIBITORIE** che accoppiano R come α_2 adren, somatostatina, inducono AD a ridurre la produzione di AMPc
 - le α_i inibiscono AC e attivano canali al K
 - l' α_o inibisce l'attività di canali per il calcio
- 3) α_q stimola la fosfolipasi C da parte di R come il muscarinico M1 e R per TRH



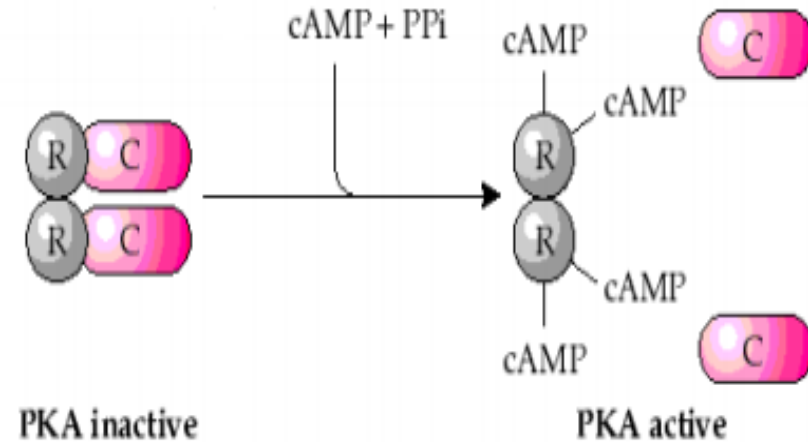
- Le proteine effettrici enzimatiche sono enzimi che catalizzano la formazione di un *secondo messaggero* (adenilato-ciclasti, guanilato-ciclasti, fosfolipasi C) il quale, a sua volta, entra in vario modo nelle catene di trasduzione del segnale che portano alla risposta finale della cellula.

Principali proteine effettrici sono:

- ➔ **adenilato ciclasti** che catalizza la conversione di ATP in cAMP;
- ➔ **fosfolipasi C** che converte un fosfolipide di membrana in due differenti molecole (DAG e IP₃), entrambe secondi messaggeri.

L'attivazione di **ADENILATO CICLASI** o delle **Fosfolipasi** produce poi la sintesi di secondi messaggeri (cAMP, IP₃, diacilglicerolo) che a loro volta iniziano una reazione a cascata che determina l'effetto (la cascata dura anche minuti > effetto lento)

AMPC a sua volta attiva la PKA (A = attivata da AMPC)



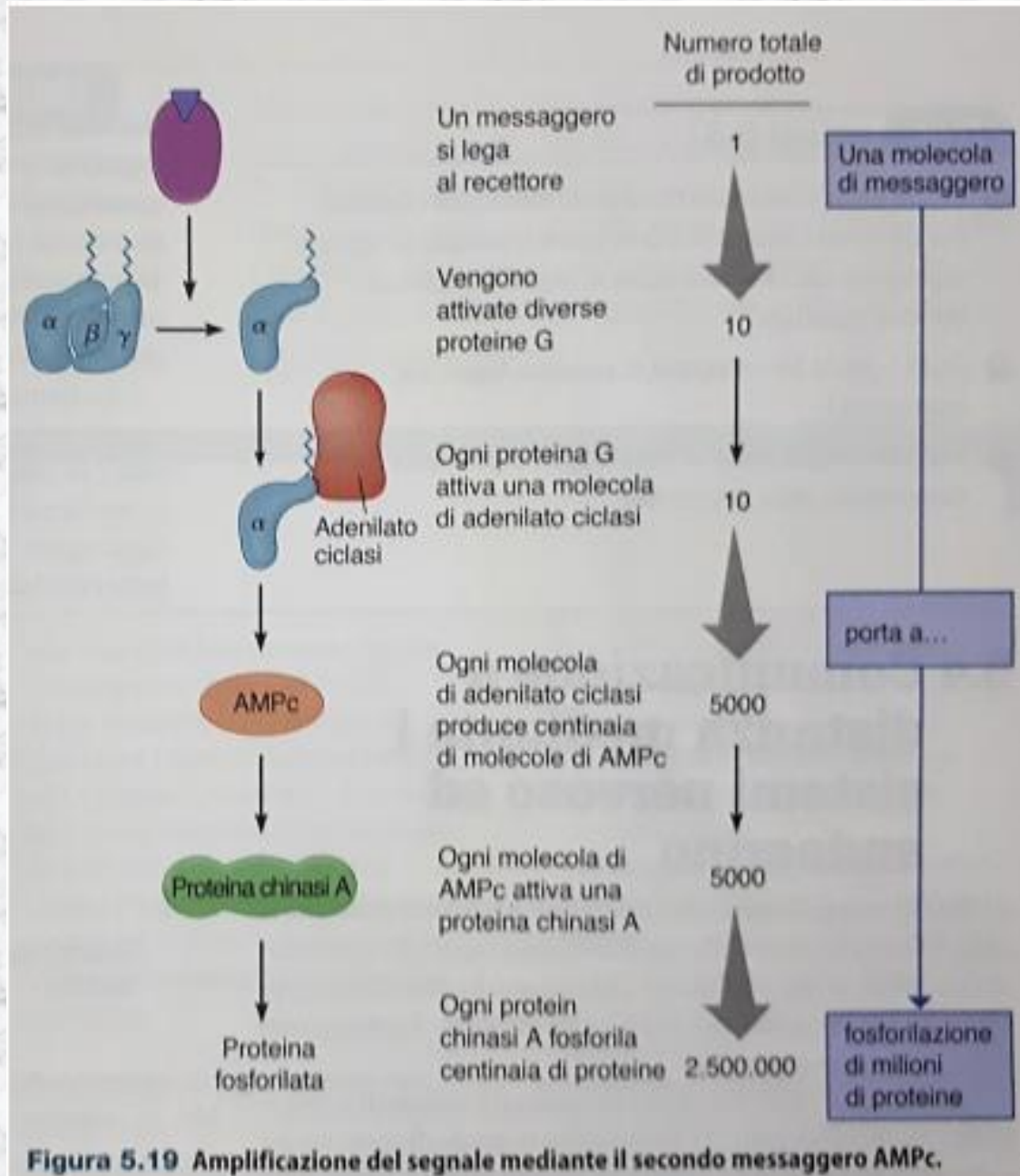
Le protein-kinasi A (A = attivata da AMP ciclico) (PKA) sono costituite da 2 siti regolatori e da 2 siti catalitici. Due molecole di cAMP si legano ai siti regolatori e tale legame libera le subunità catalitiche che possono agire sui vari substrati citoplasmatici.

L'idrolisi dell'AMPC da parte delle fosfodiesterasi permette la ricostituzione della forma inattiva della PKA.

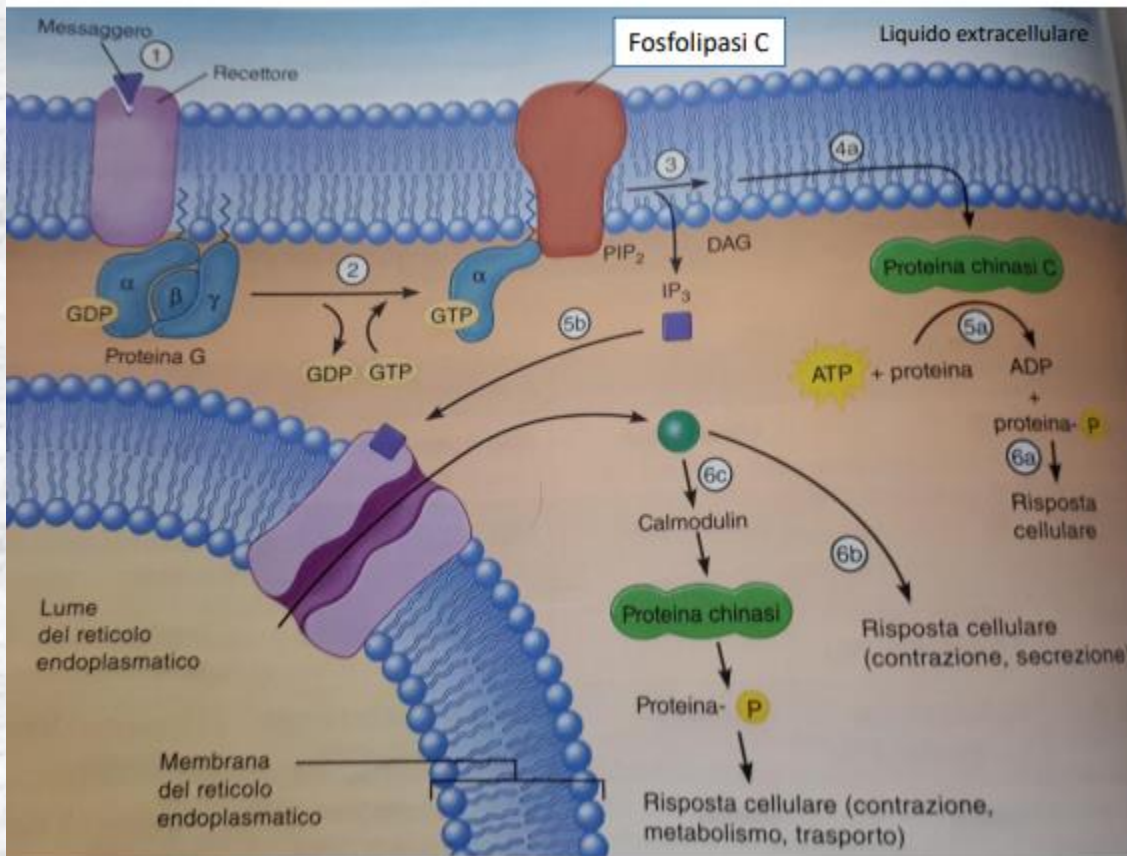
DURATA dell'EFFETTO dipende:

>>>>>> dalla durata dell'interazione F-R

>>>>>> dall'efficienza del macchinario cellulare che riduce i secondi messaggeri o abolisce le modificazioni post-trasduzionali indotte



PROTEINE EFFETTICI: FOSFOLIPASI C



La fosfolipasi C è un enzima che idrolizza i fosfolipidi di membrana, in particolare idrolizza il legame estereo tra il glicerolo e il residuo fosfato in posizione C3.

L'attivazione di un recettore accoppiato ad una proteina G di tipo q (Gq) stimola, attraverso la subunità α attivata, la fosfolipasi C.

La fosfolipasi C catalizza la conversione del fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato (PIP_2) in diacilglicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP_3), che funzionano da secondi messaggeri.

Il DAG rimane nella membrana e attiva l'enzima proteina chinasi C (PKC).

La PKC a sua volta catalizza la fosforilazione di una proteina bersaglio attuatrice della risposta cellulare.

Allo stesso tempo:

- l'inositolo trifosfato (IP_3) diffonde nel citosol;
- l' IP_3 induce la liberazione di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico attivando i canali del Ca^{2+} qui presenti.

Il Ca^{2+} a sua volta rappresenta un terzo messaggero intracellulare il quale provvede ad attivare varie proteine bersaglio.

Recettori accoppiati a proteina G

1° messaggio

neurotrasmettitori - ormoni

recettori

proteine G

adenilato ciclasi

fosfolipasi

canali ionici

2° messaggio

cAMP

DAG

IP₃

Ca²⁺

Ca²⁺

PKC

calmodulina

fosfatidilserina

protein chinasi
cAMP
dipendenti

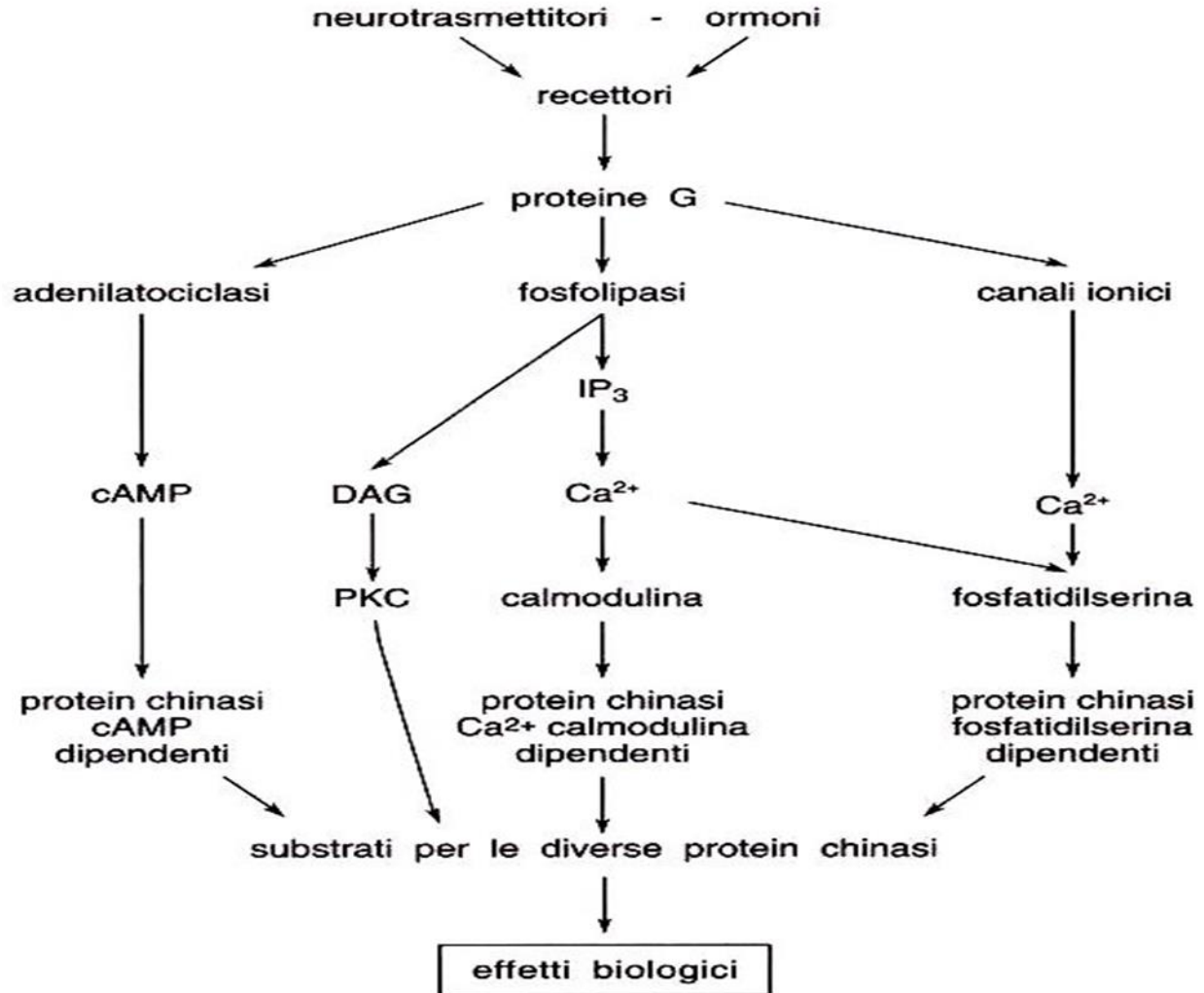
protein chinasi
Ca²⁺ calmodulina
dipendenti

protein chinasi
fosfatidilserina
dipendenti

3° messaggio

substrati per le diverse protein chinasi

effetti biologici



Uno degli scopi della Farmacologia applicata è anche quello di poter intervenire sulla funzionalità recettoriale:

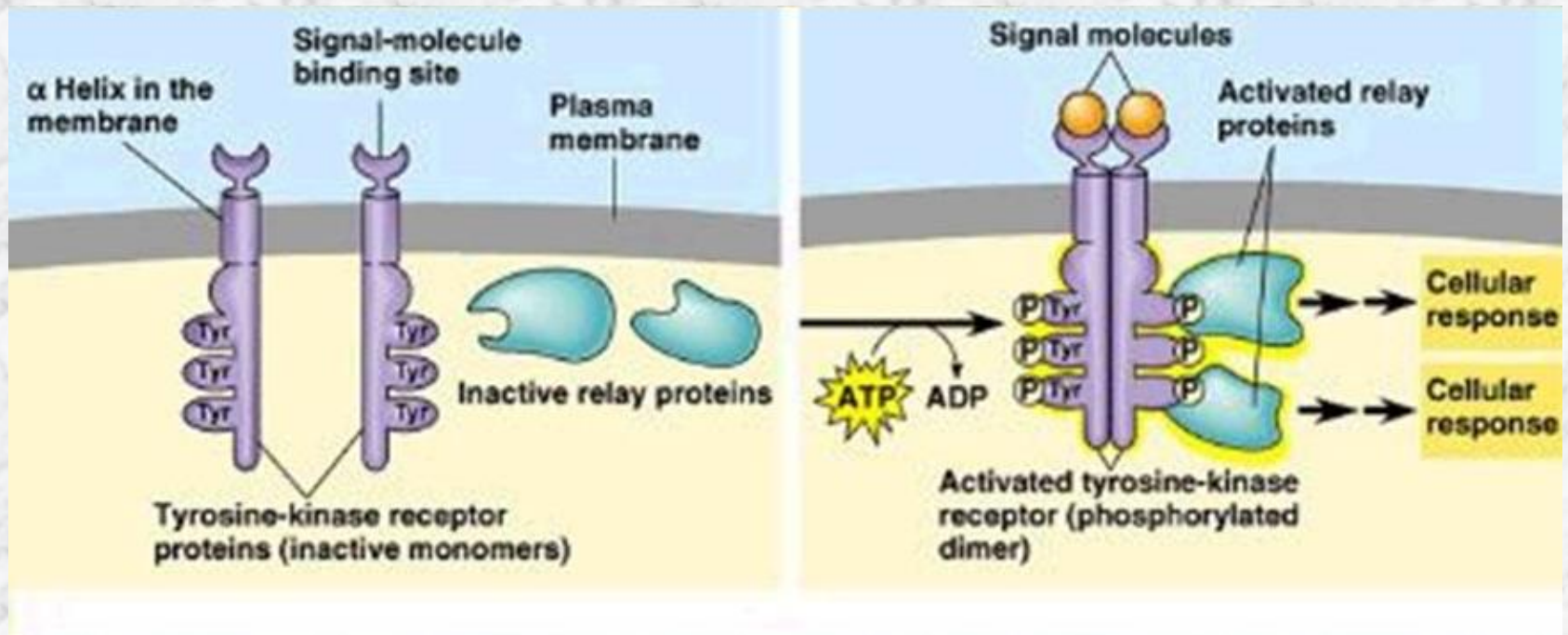
- **a livello del sito AGO/ANTAG**
- **a livello dell'attiv. proteina G**
- **a livello del sistema effettore**

- **sulla distruzione del secondo messaggero**
- **sulle variazioni indotte dai secondi messaggeri**

3) Rec. con attività enzimatica tirosin chinastica intrinseca

Sono proteine spesso dimeriche ciascuna costituita da una catena polipeptidica che attraversa una sola volta la membrana plasmatica.

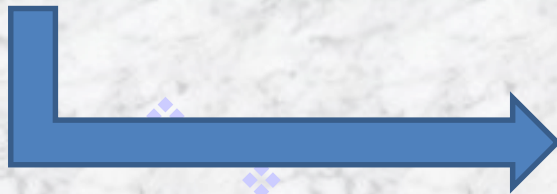
Quando avviene il legame con il ligando (nella porzione extra cellulare) si ottiene la dimerizzazione e la loro attivazione.



Sono dotati di **attività tirosin chinase intrinseca**: sono cioè capaci di **autofosforilare** residui di tirosina presenti nel loro dominio citosolico e anche varie substrati proteici

L'interazione X-R porta alla **DIMERIZZAZIONE** del Recettore che è la **tappa fondamentale** responsabile dell'attivazione della tirosin chinase intrinseca

L'**AUTOFOSFORILAZIONE** dei residui di **TIROSINA** della porzione citoplasmatica del recettore **porta** all'associazione del R con proteine citoplasmatiche (ad esempio ENZIMI) che iniziano una cascata di eventi che portano alla



**proliferazione
differenziamento**

- sono Recettori per Fattori di crescita TGF, IGF, NGF, EGF, FGF
- Recettori per CITOCHINE
- Insulina

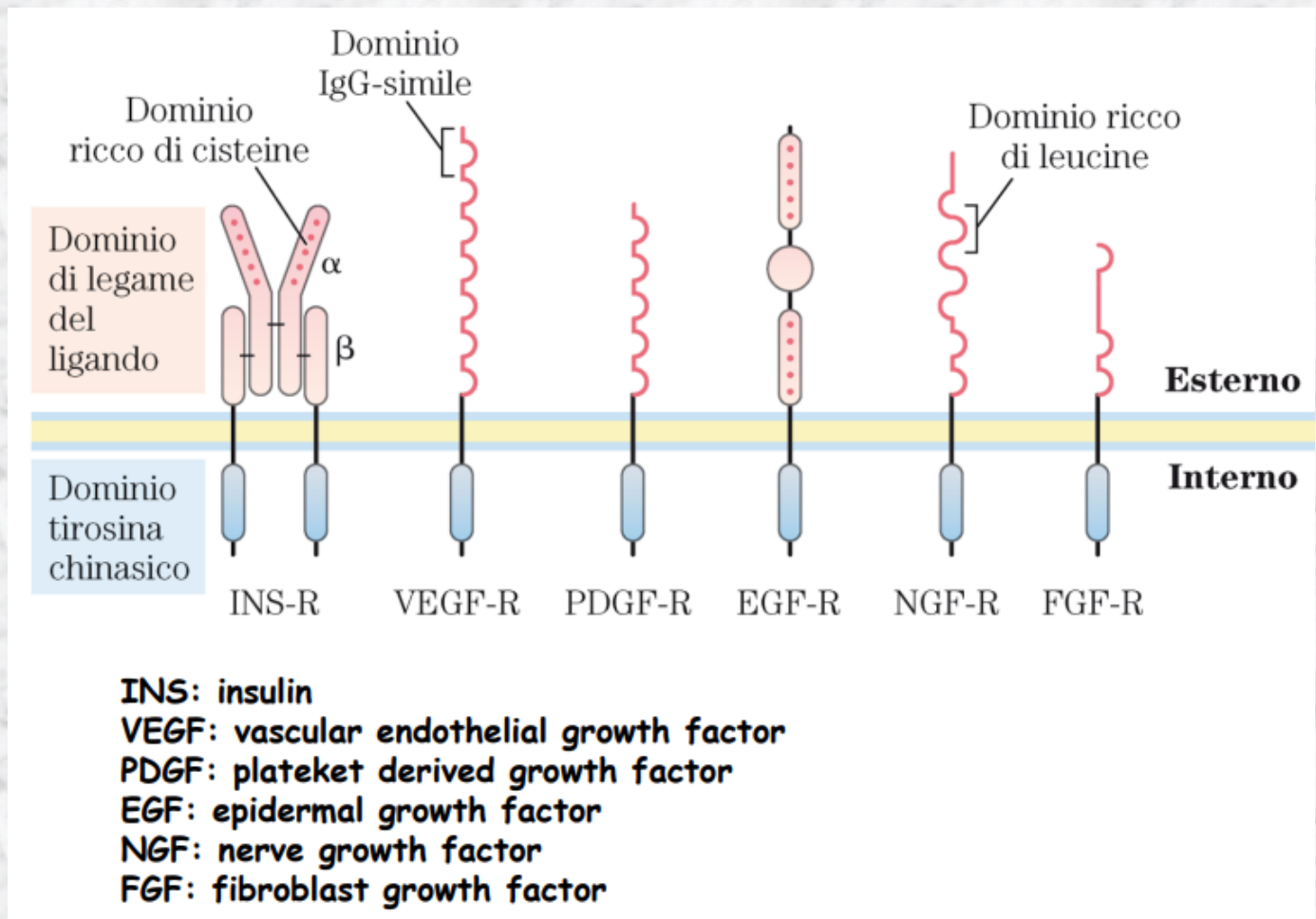
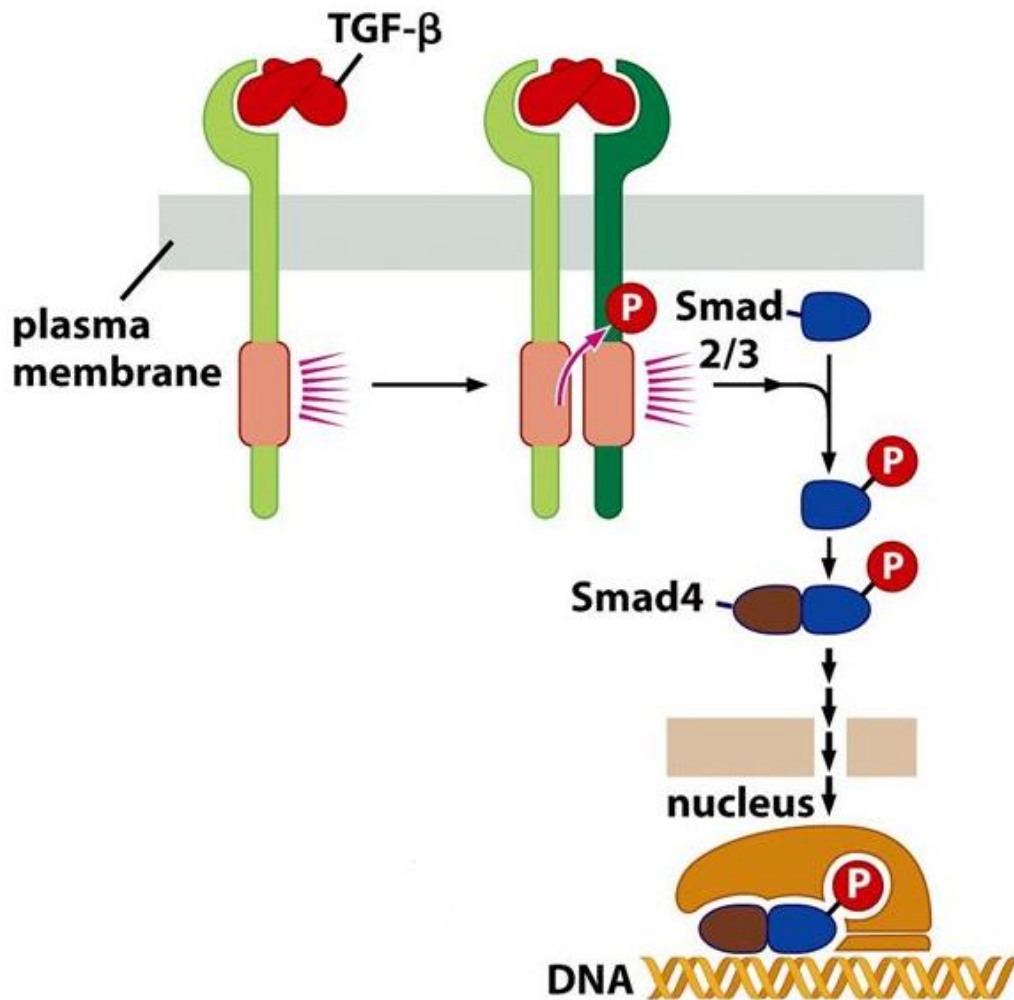


Table 15–4 Some Signal Proteins That Act Via RTKs

SIGNAL PROTEIN	RECEPTORS	SOME REPRESENTATIVE RESPONSES
Epidermal growth factor (EGF)	EGF receptors	stimulates cell survival, growth, proliferation, or differentiation of various cell types; acts as inductive signal in development
Insulin	insulin receptor	stimulates carbohydrate utilization and protein synthesis
Insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2)	IGF receptor-1	stimulate cell growth and survival in many cell types
Nerve growth factor (NGF)	Trk A	stimulates survival and growth of some neurons
Platelet-derived growth factors (PDGF AA, BB, AB)	PDGF receptors (α and β)	stimulate survival, growth, proliferation, and migration of various cell types
Macrophage-colony-stimulating factor (MCSF)	MCSF receptor	stimulates monocyte/macrophage proliferation and differentiation
Fibroblast growth factors (FGF1 to FGF24)	FGF receptors (FGFR1–FGFR4, plus multiple isoforms of each)	stimulate proliferation of various cell types; inhibit differentiation of some precursor cells; act as inductive signals in development
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF receptors	stimulates angiogenesis
Ephrins (A and B types)	Eph receptors (A and B types)	stimulate angiogenesis; guide cell and axon migration



Il TGF- β ha un duplice ruolo: inibizione della crescita e conferimento di caratteristiche di trasformazione (indipendenza da ancoraggio).

Delezione di recettori, mutazioni di Smad2, 3 o 4.

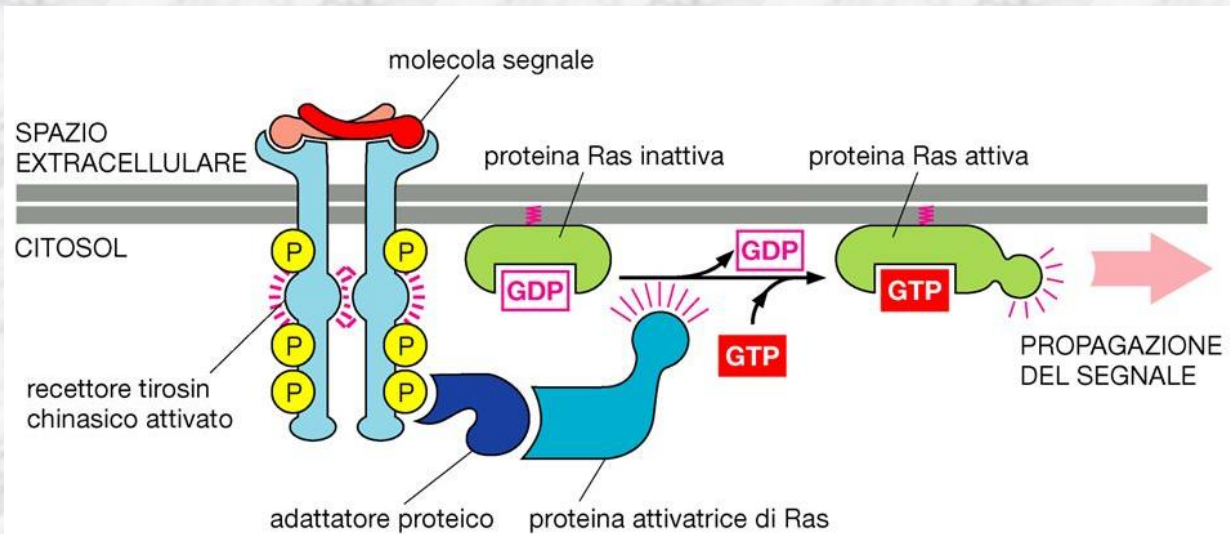
Inattivazione indiretta e parziale

Molti oncogeni sono recettori per Fattori di crescita mutati che hanno perso la loro regolazione fisiologica

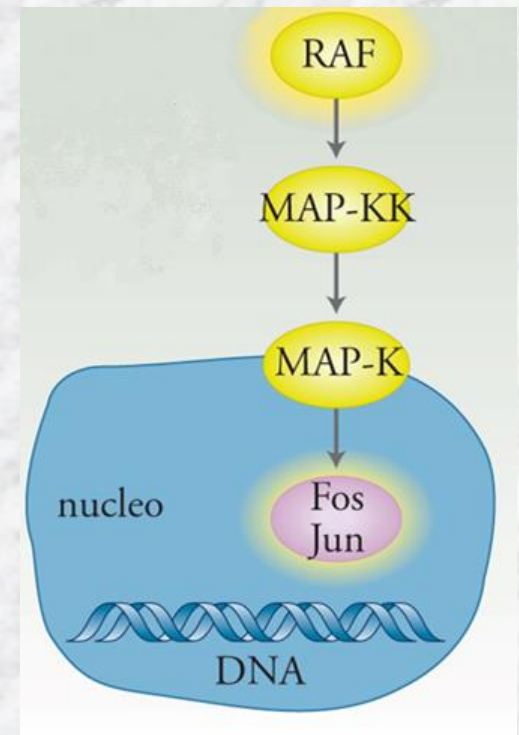
Es. si possono usare

ANTAGONISTI dei rec. Attività Tyr-kinasica per il trattamento di alcuni tumori

Attivazione di Ras attiva la cascata delle MAP chinasi



In questo caso, la fosforilazione dei residui Tyr determina l'attivazione della proteina RAS, proteina estremamente importante nel controllo della proliferazione cellulare.

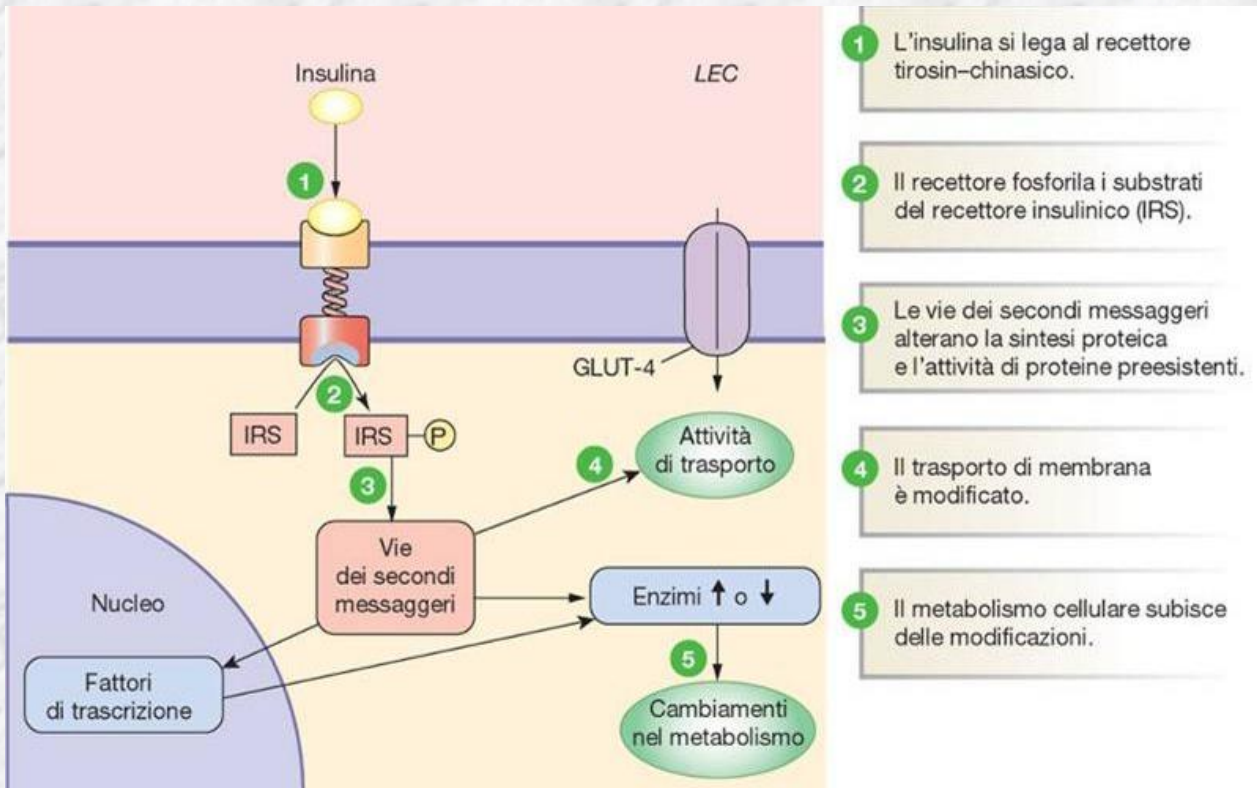


changes in protein activity

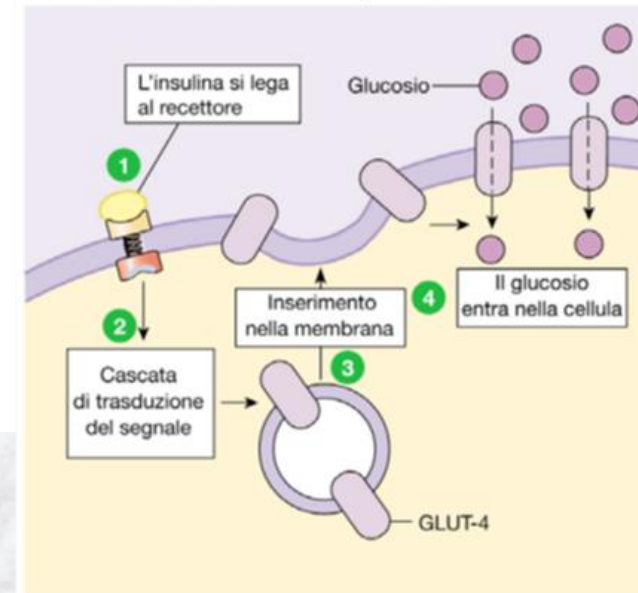
changes in gene expression

AZIONE DELL' **INSULINA** SUL RECETTORE AD ATTIVITA' TIROSIN CHINASICA

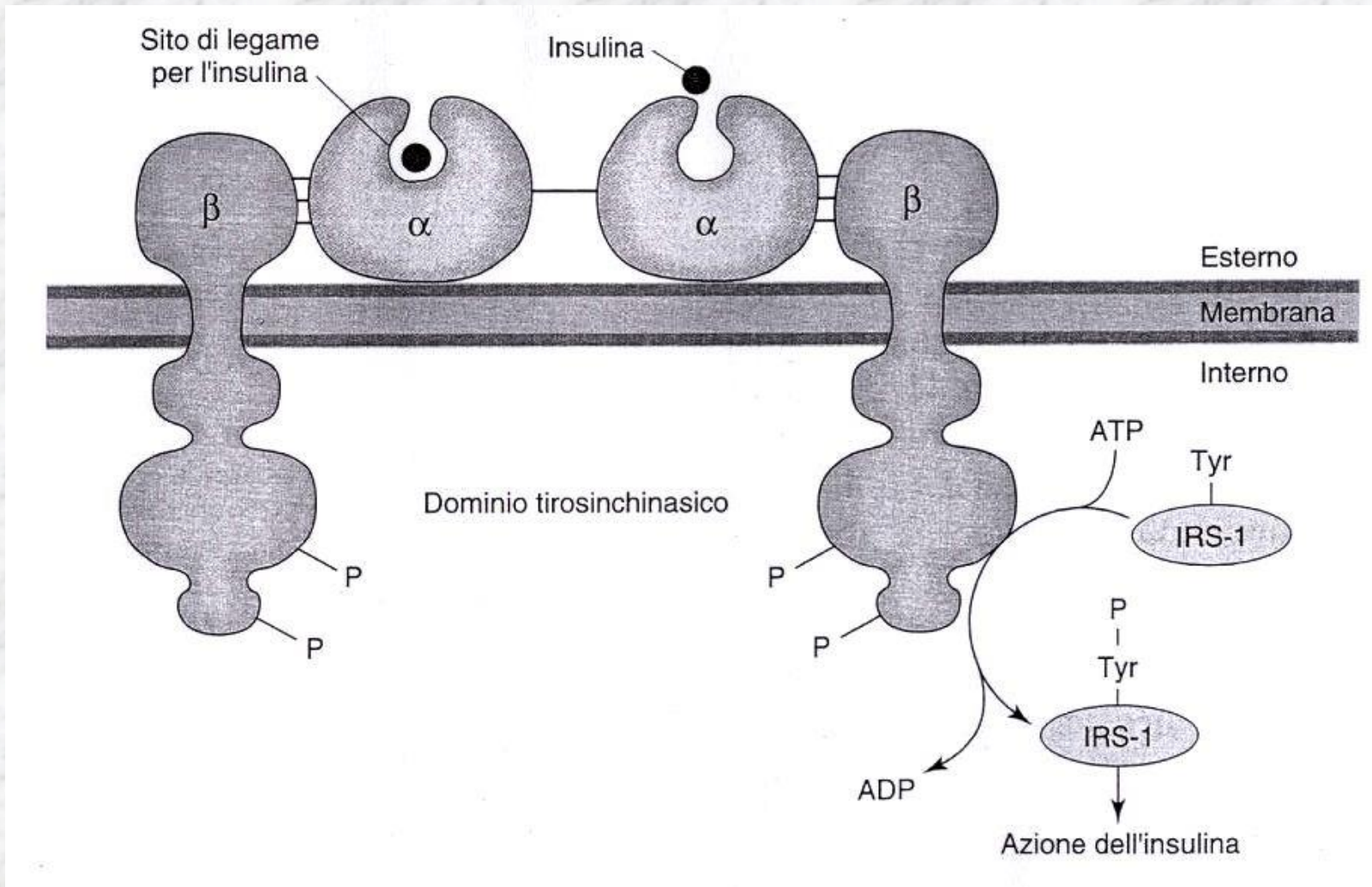
Le preparazioni a base di **insulina** (ad azione rapida, ultra rapida, intermedia e lenta) vanno ad agire sui medesimi recettori



(b) L'insulina segnala alla cellula di inserire trasportatori GLUT-4 nella membrana, permettendo al glucosio di entrare nella cellula.



Struttura tetramericata del recettore insulinico nello stato di attivazione



4) Recettori per le citochine

La risposta immunitaria dell'organismo agli agenti infettivi coinvolge una serie di complesse interazioni tra differenti tipologie di cellule, che sono guidate nelle loro funzioni **da una rete di proteine secrete "simil-ormone"** dette **CITOCHINE**

Le CITOCHINE sono fondamentali per la regolazione dell'infiammazione e per il differenziamento ed attivazione delle cellule nella risposta immune, (inclusi i linfociti B, T) e la loro espressione è normalmente transiente

Fattori di regolazione



sistema immunitario

sistema emopoietico

2 famiglie:

➤ **Tipo I**

➤ **Tipo II**

Quasi tutte le citochine hanno un **effetto PLEIOTROPICO** (attività biologica multipla)

- Diverse citochine hanno attività biologica sovrapponibile;
- Una singola cellula interagisce con diverse citochine con, apparentemente, la stessa risposta - cross-talk

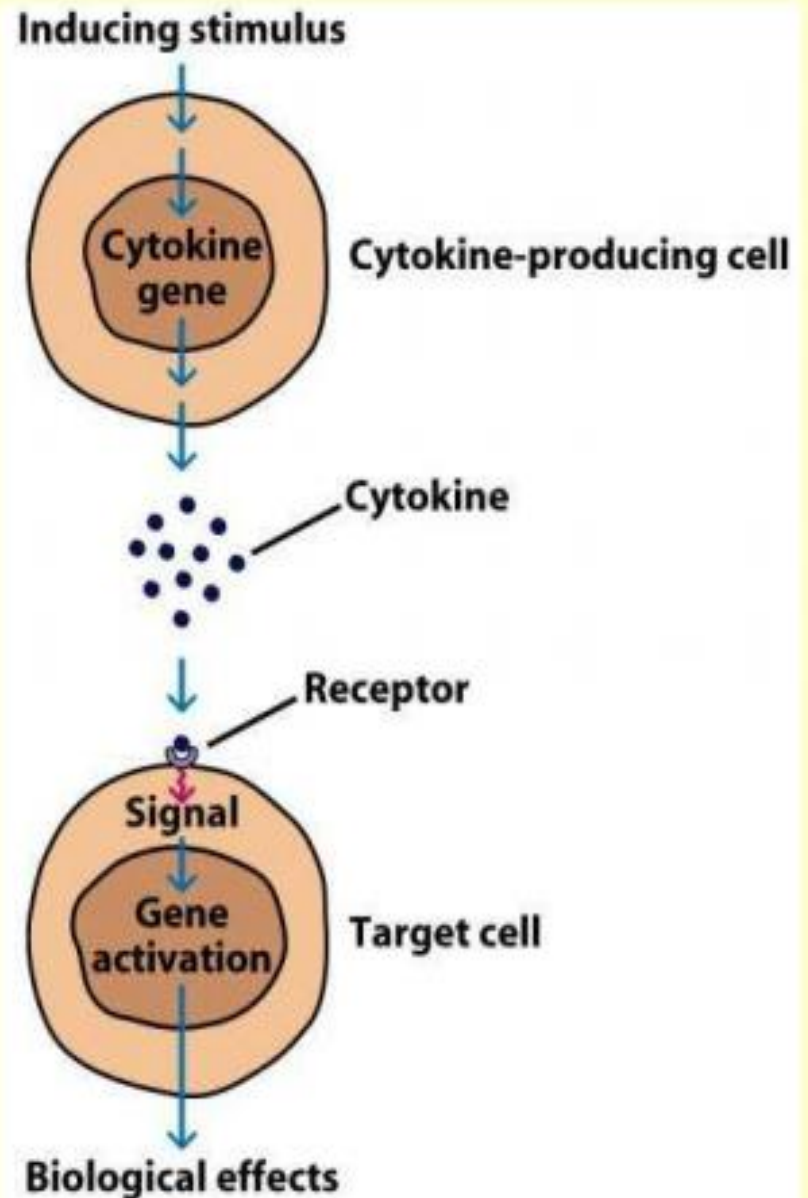
Classificazione per categorie

- *Interleuchine*
 - prodotte esclusivamente dai leucociti;
- *Linfochine*
 - prodotte dai linfociti
- *Monochine*
 - prodotte esclusivamente dai monociti
- *Interferoni*
 - coinvolti nella risposta antivirale
- *Colony Stimulating Factors (CSF)*
 - supportano la crescita cellulare in mezzi semisolidi
- *Chemochine*
 - promuovono la chemiotassi



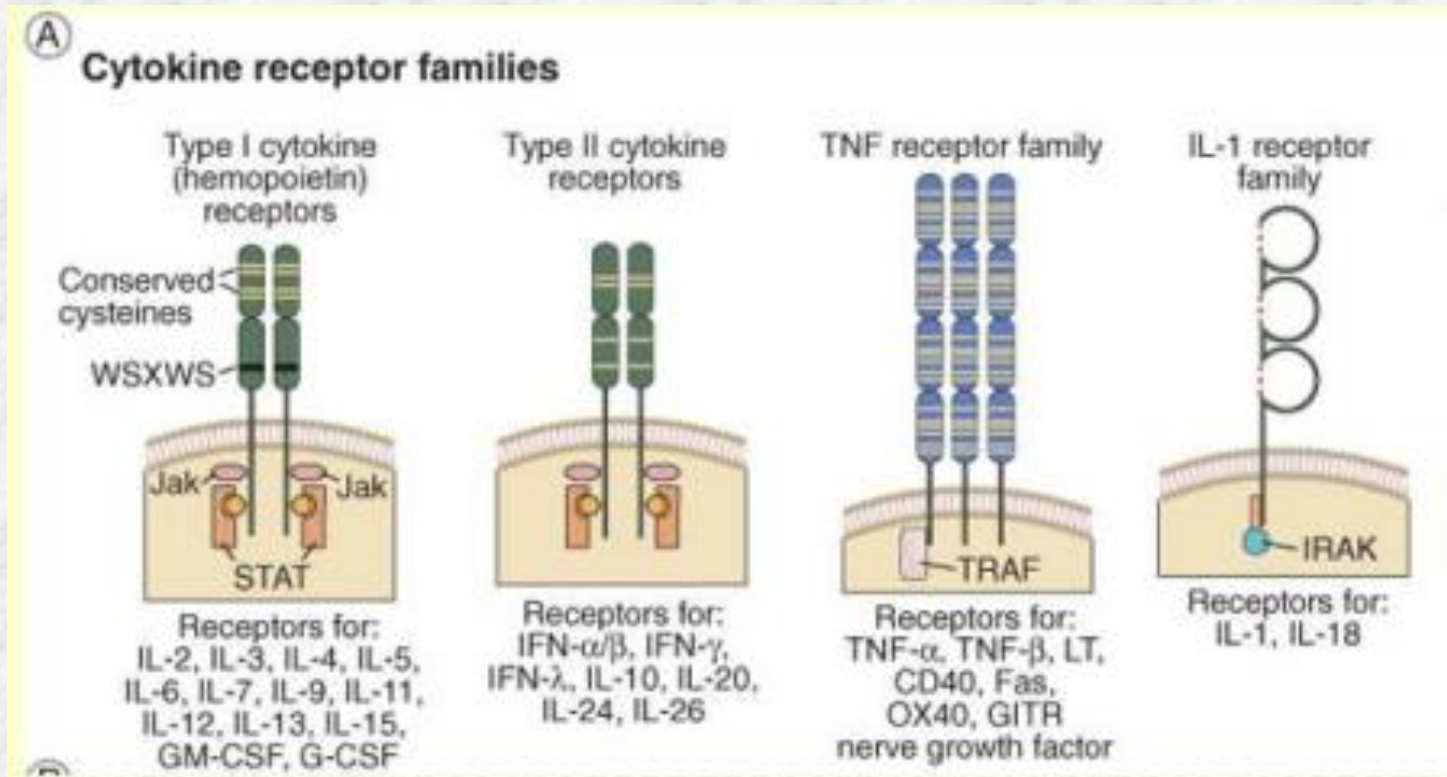
PROMUOVONO: attivazione e reclutamento (chemiotassi) dei leucociti nei siti di flogosi, o per regolare il traffico dei leucociti nell'organismo.

UNA VOLTA
PRODOTTE LE
CITOCHINE
PER
ESERCITARE IL LORO
EFFETTO
BIOLOGICO DEVONO
LEGARSI AD UN
RECETTORE
ESPRESSO SULLA
CELLULA BERSAGLIO



I RECETTORI PER LE CITOCHINE SONO COSTITUITI DA:

- Una porzione extra-cellulare deputata al legame con la citochina
- Una porzione intracellulare che serve a reclutare le chinasi citoplasmatiche → che a loro volta attivano fattori di trascrizione che entrando nel nucleo inducono la trascrizione di geni specifici, il differenziamento e la proliferazione della cellula.



LA LORO CLASSIFICAZIONE SI BASA SU DUE CRITERI:

- omologie strutturali del dominio extracellulare
- condivisione di una molecola che trasduce il segnale

IL3, IL7 = Fattori di crescita del sistema ematopoietico

TNF, IL1, IL6 e IL12, IL15, IFN = Mediatori dell'immunità innata

IL2, IL4, IL5, IL6 e TNF = Mediatori dell'immunità specifica

Come agiscono le citochine

- Possono attivare diversi tipi di cellule
- Possono avere un effetto pleiotropico (differenti effetti in differenti cellule)
- Possono dare:
 - Ridondanza:
 - *più citochine con la stessa azione;*
 - Sinergia:
 - *l'azione combinata di due citochine è maggiore della somma degli effetti delle singole;*
 - Antagonismo:
 - *azione inibente di una citochina nei confronti di un'altra.*

FARMACI IMMUNOSTIMOLANTI

citochine ricombinanti

Il rec. della IL-2 : La sua attivazione stimola la proliferazione e la sopravvivenza dei LINFOCITI T, B e delle cellule NK ma anche la loro attivazione

→ **provocando un aumento nella produzione di interferone γ (IFN- γ)**

→ Hanno breve emivita e possono provocare effetti collaterali anche gravi (ipotensione, febbre ed edema polmonare)

5) Recettori per il TNF α

Il fattore di necrosi tumorale α (solitamente abbreviato come TNF α , Tumor necrosis factor) è una citochina pro-infiammatoria coinvolta nell'infiammazione. È prodotta principalmente dai macrofagi (anche da Linfociti T CD4+, cellule NK, neutrofili, mastociti, eosinofili e neuroni).

Il principale ruolo del TNF è nella **regolazione delle cellule del sistema immunitario!!!**

Ruoli fisiologici del TNF- α

- Apoptosi
- Attivazione cellulare (cellule T, cellule B, macrofagi)
- Induzione della sintesi di altre citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF)
- ↑ permeabilità endoteliale ed espressione di molecole di adesione

- Reclutamento di cellule infiammatorie (neutrofili, eosinofili)

Ruoli patologici del TNF- α

- Eccessiva produzione di TNF α a livello sia locale che sistemico nelle IMID (immune-mediated inflammatory diseases)
→ contributo diretto al danno tissutale

Il $\text{TNF}\alpha$ è espresso in due forme **una solubile**, circolante nel plasma prodotto tramite azione proteolitica dell'enzima TACE ($\text{TNF}\alpha$ *converting enzyme*), e una **legata alla membrana**.

Le sue azioni sono mediate da due tipi di recettori che modulano diversi destini di segnalazione:

- TNF-R1/p55 = lega principalmente la forma solubile di $\text{TNF-}\alpha$
- TNF-R2/p75 = lega principalmente il $\text{TNF}\alpha$ associato alla membrana

Dopo interazione con il ligando i recettori formano dei trimeri → cambiamento conformazionale che porta alla **dissociazione di una proteina inibitoria** dal dominio intracellulare detto “di morte” (*Death Domain, DD*) e **associazione con una proteina adattatrice TRADD**.

Legata TRADD possono iniziare tre diverse vie biochimiche:

- **Attivazione di NF-Kb**
- **Attivazione della via della MAP chinasi**
- **Induzione di segnali di morte**

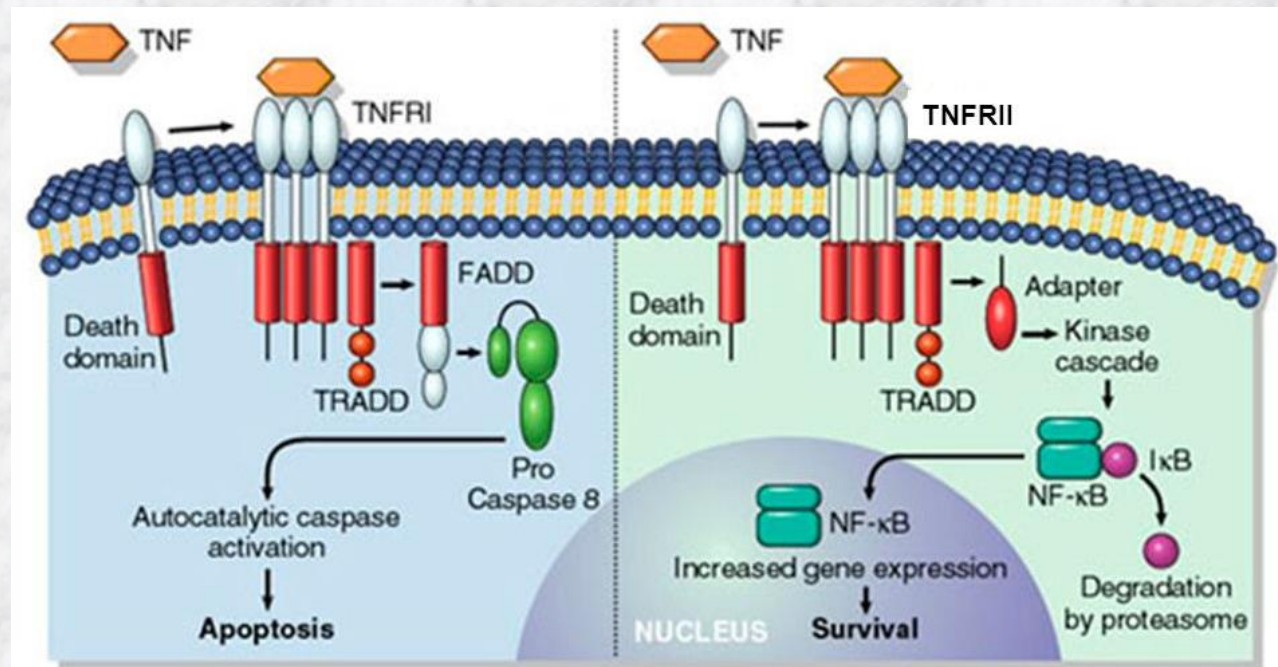


Fig. 1. Apoptosis vs. survival induced by Tumor Necrosis Factor (TNF).

Esistono due antagonisti del TNF α :

Infliximab = un anticorpo monoclonale chimerico umano/murino anti-TNF- α proposto per il trattamento delle malattie autoimmuni

Etanercept = una versione ricombinante del recettore umano p75

Entrambi prevengono il legame del TNF ai recettori specifici della superficie cellulare inibendone l'attività biologica.

Dati sempre più convincenti indicano che gli inibitori del TNF-alfa siano utili nel controllo delle riacutizzazioni **dell'artrite reumatoide** e nel trattamento a medio termine di tale malattia.

L'etanercept è stato approvato dalla FDA nel 1998 per il trattamento dell'artrite reumatoide refrattaria dell'adulto mentre l'infliximab è stato approvato per il morbo di Crohn refrattario ad altre terapie.

6) Rec. con attività enzimatica guanilato ciclasica

IL **GMP ciclico** (Guanosin-monofosfato ciclico o cGMP)

è un secondo messaggero generato dalla ciclizzazione di una molecola di guanosin-trifosfato , o **GTP**, ad opera di due diversi enzimi:

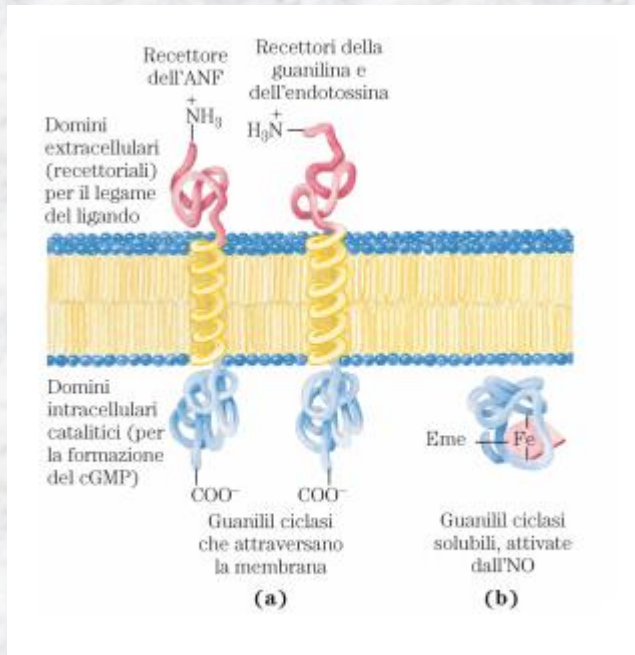
- **guanilato ciclasi di membrana intrinseca** ad un recettore esterno per il peptide natriuretico atriale, che attiva il dominio interno che poi produce GMP ciclico
- **guanilato ciclasi citosolica**

SONO RECETTORI poco presenti negli animali superiori

SONO RECETTORI MOLTO SEMPLICI

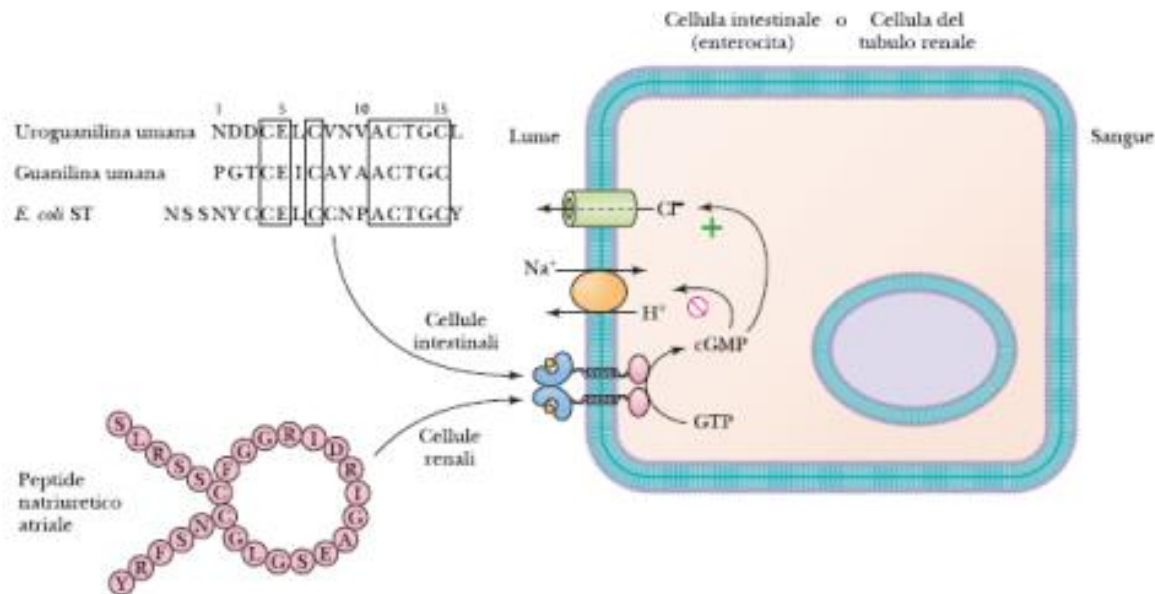
Struttura molecolare: 1 singola catena aa che attraversa una volta sola la membrana

Il legame del ligando al dominio extracellulare stimola la **formazione del 2° messaggero GMPc** → **che si occupa della regolazione del trasporto ionico e ritenzione idrica, rilassamento muscolo cardiaco e sviluppo del cervello.**



Nel cuore GMPc riduce la forza di contrazione

- ❖ esiste un dominio extracellulare: che lega l'ormone
- ❖ esiste un dominio intracellulare: che ha attività guanilato ciclasica intrinseca



Fattore Natriuretico Atriale: rilasciato dalle cellule dell'atrio cardiaco, quando il cuore si distende per aumento del volume sanguigno. Si lega ai recettori espressi a livello dei tubuli renali (aumento di acqua) e del muscolo vascolare liscio (vasodilatazione con aumento del flusso sanguigno e diminuzione della pressione sanguigna).

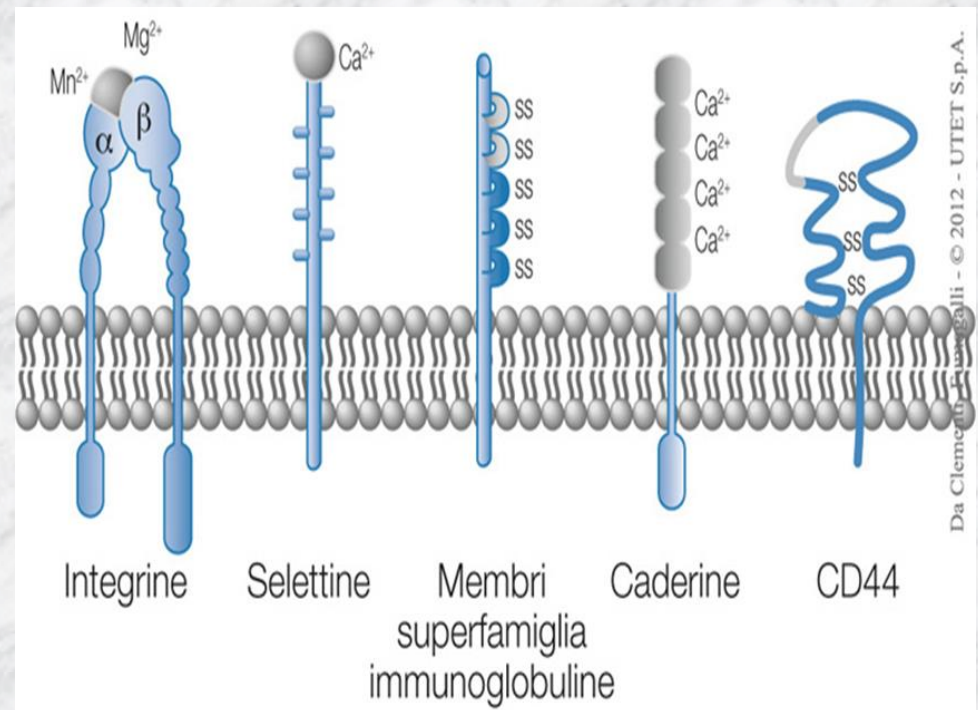
7) Recettori di adesione cellulare

Le molecole **di adesione** (o CAM, "Cell Adhesion Molecule") sono proteine collocate sulla superficie cellulare coinvolte nel legame con altre cellule o con la matrice extracellulare e sono principalmente rec. transmembrana

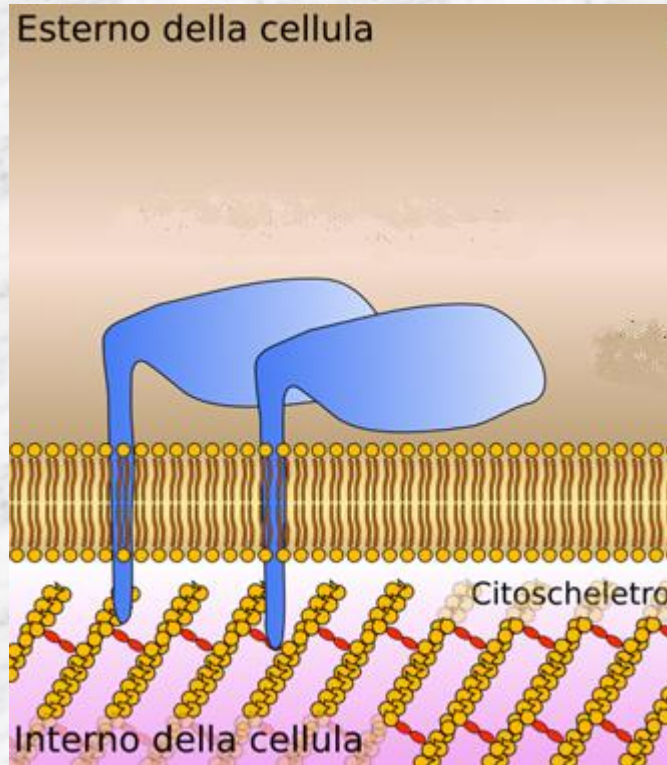
- ✓ **Interazione tra cellula e microambiente**
- ✓ **Regolano l'adesione tra cellule e matrice extracellulare**
- ✓ **Controllo di:**
 - migrazione cellulare**
 - riparazione di strutture vascolari**

- ✓ **Trasmettono segnali che regolano:**

- ❖ movimento
- ❖ proliferazione
- ❖ sopravvivenza
- ❖ trascrizione



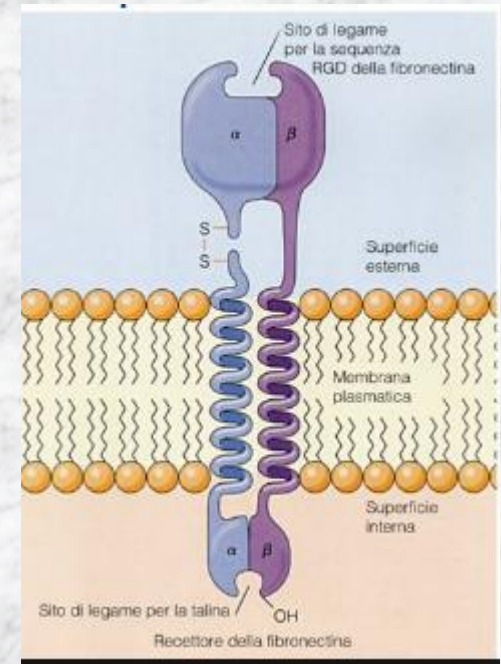
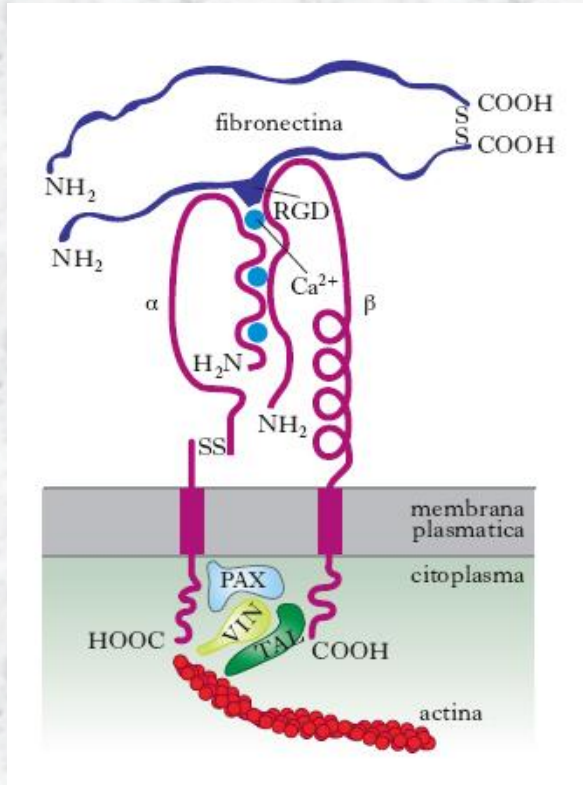
Le INTEGRINE sono una grande famiglia di **glicoproteine di membrana** coinvolte nelle interazioni delle cellule con proteine della matrice extracellulare (ECM) e nell'adesione cellula-cellula.



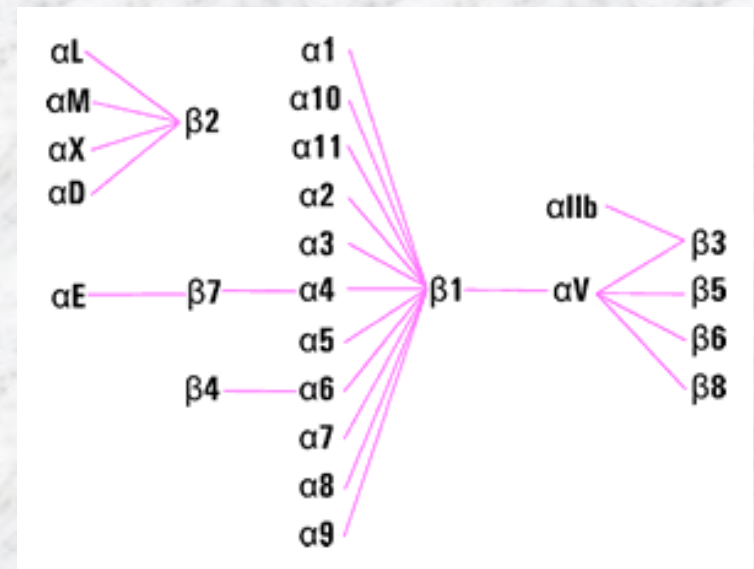
- Domini extracellulari sono in genere collegati alle proteine della ECM
- Domini intracellulari sono collegati funzionalmente al citoscheletro

TRASFERISCONO IL SEGNALE IN ENTRAMBE LE DIREZIONI COSI' LA CELLULA INTEGRA INFORMAZIONI TRA AMBIENTE INTRA- ED EXTRA- CELLULARE

Le integrine sono **ETERODIMERI**
 composti da una subunità α e una subunità β



**ESISTONO MOLTI TIPI DI INTEGRINE
 IN DIFFERENTI TIPI CELLULE**



Le integrine :

mediano vari aspetti della risposta immunitaria, della coagulazione del sangue, dell'angiogenesi svolgendo un ruolo fondamentale nelle metastasi tumorali

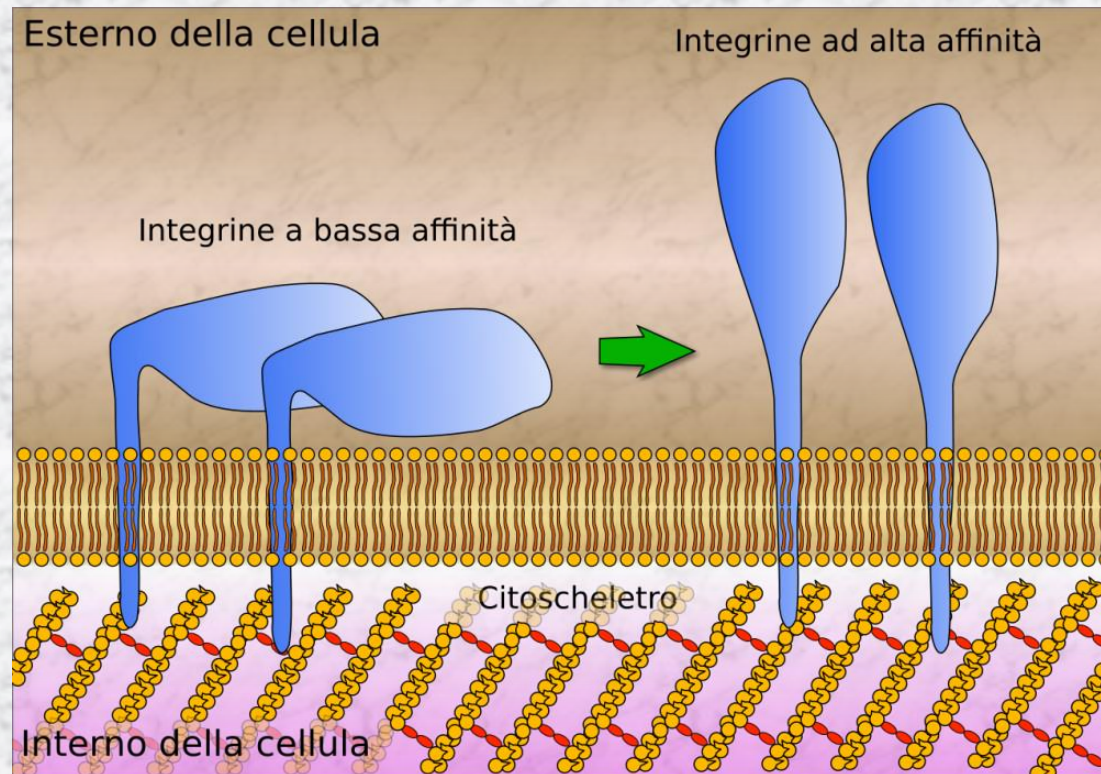
Ruolo importante nello sviluppo delle cellule gliali
(prima di completare il loro differenziamento in neuroni del sistema nervoso autonomo, le cellule della cresta neurale migrano nell'organismo)

Una delle funzioni più importanti è la migrazione cellulare!!!

Nella conformazione a bassa affinità le teste globulari sono ripiegate verso la superficie cellulare.

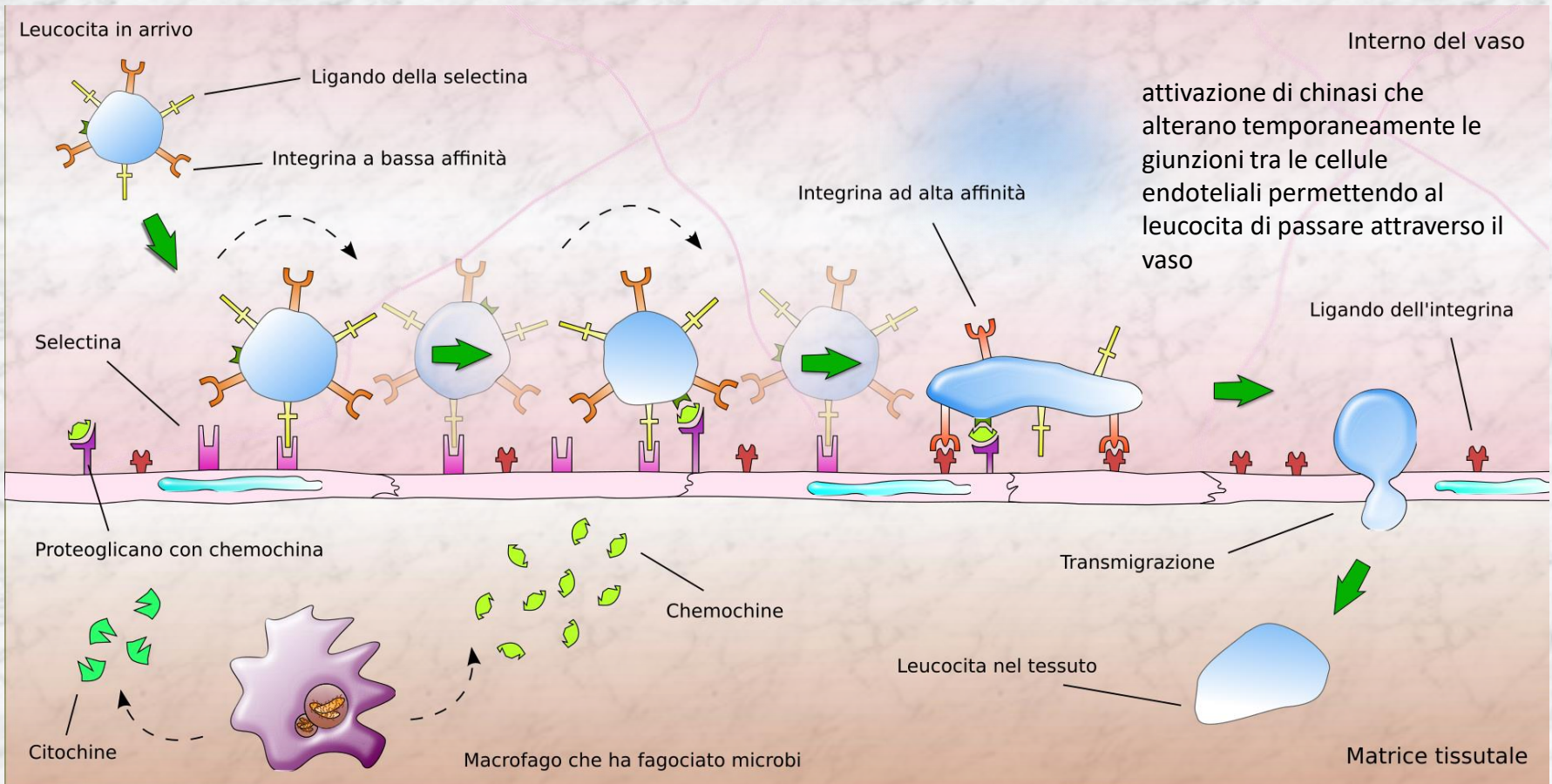
il passaggio nella conformazione ad alta affinità nella quale le teste globulari si estendono in avanti per essere più disponibili al legame con il ligando.

In questa modalità le integrine sono responsabili del legame stabile endotelio-leucocita.



Al momento del legame chemochina-recettore presente sull'endotelio **viene innescata una serie di segnali intracellulari detti di *inside-out signaling*** (segnalazione dentro-fuori) in ragione del fatto che porta ad una modificazione del citoscheletro (inside) che si riflette poi sulla conformazione esterna delle integrine (out).

Nella conformazione ad alta affinità le integrine sono responsabili del legame stabile endotelio-leucocita.



FARMACI CHE AGISCONO SULLE INTEGRINE

FARMACI ANTI- INTEGRINE TESSUTO SPECIFICI
NELLA TERAPIA DELLE **MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

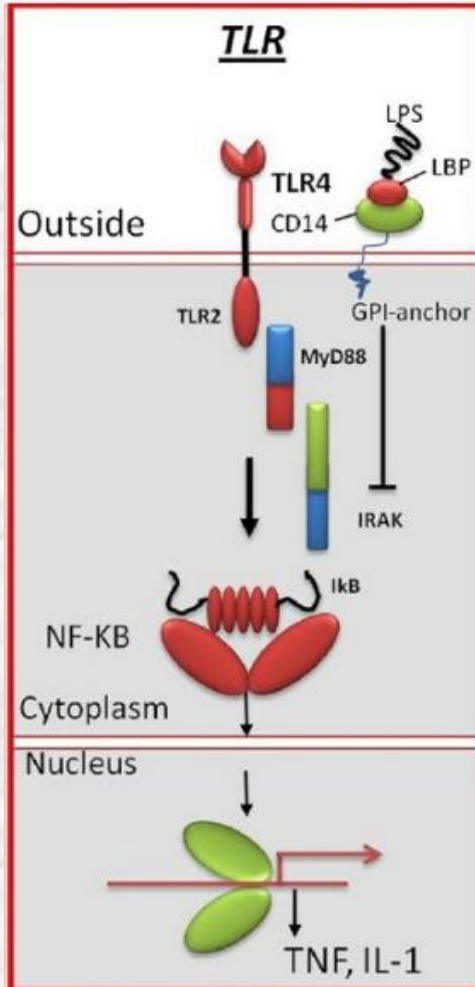
VEDOLIZUMAB → anticorpo monoclonale umanizzato
è usato nel trattamento della colite ulcerosa e morbo di Crohn

STUDI di COMPARAZIONE con antagonisti del TNF α
evidenziano tassi di guarigione della mucosa più elevata

NATALIZUMAB → **SM, sclerosi multipla**

8) Recettori Toll-like

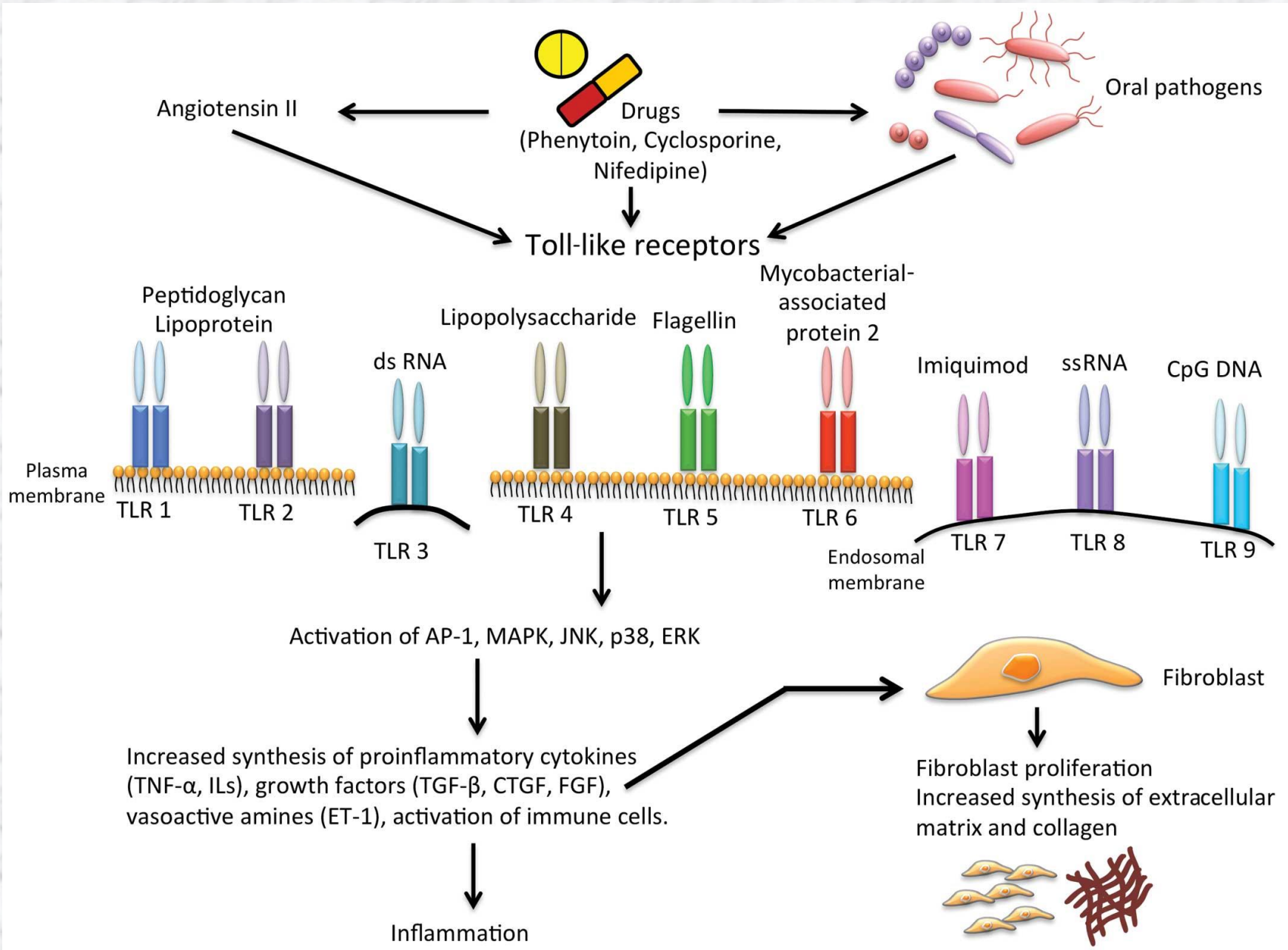
Sono una classe di proteine costituite da 1 catena aa (extra ricca di leucina) che giocano un ruolo chiave nella difesa dell'organismo, **in particolare nell'immunità innata**, perché:



- **Determinano la produzione di citochine pro-infiammatorie**
- **Promuovono la maturazione delle cellule dendritiche**
- **Favoriscono una risposta orientata verso un profilo di tipo T *helper* 1**

I segnali prodotti dai vari TLR reclutano i linfociti T e B del sistema dell'immunità adattativa affinché inizino la loro risposta immune umorale e cellulare.

Mutazioni a carico dei recettori toll-like contribuiscono, quindi, ad aumentare la suscettibilità ad alcune infezioni.



FARMACI e toll-like receptors

Nat Med. 2010 Apr;16(4):413-9. doi: 10.1038/nm.2127. Epub 2010 Mar 28.

Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures.

Maroso M¹, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, Bianchi ME, Vezzani A.

Author information

¹ Department of Neuroscience, Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Milano, Italy.

Abstract

Brain inflammation is a major factor in epilepsy, but the impact of specific inflammatory mediators on neuronal excitability is incompletely understood. Using models of acute and chronic seizures in C57BL/6 mice, we discovered a proconvulsant pathway involving high-mobility group box-1 (HMGB1) release from neurons and glia and its interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4), a key receptor of innate immunity. Antagonists of HMGB1 and TLR4 retard seizure precipitation and decrease acute and chronic seizure recurrence. TLR4-defective C3H/HeJ mice are resistant to kainate-induced seizures. The proconvulsant effects of HMGB1, like those of interleukin-1beta (IL-1beta), are partly mediated by ifenprodil-sensitive N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors. Increased expression of HMGB1 and TLR4 in human epileptogenic tissue, like that observed in the mouse model of chronic seizures, suggests a role for the HMGB1-TLR4 axis in human epilepsy. Thus, HMGB1-TLR4 signaling may contribute to generating and perpetuating seizures in humans and might be targeted to attain anticonvulsant effects in epilepsies that are currently resistant to drugs.

i neuroni e le cellule della glia, sottoposti a uno stimolo che causa l'epilessia, rilasciano HMGB1, che a sua volta stimola i recettori Toll-like.

Il trattamento con farmaci che bloccano gli effetti della molecola HMGB1, oppure dei recettori Toll-like 4, ha mostrato potenti effetti anti-convulsivanti anche su animali con crisi resistenti ai farmaci oggi utilizzati.

Toll-like receptors and their role in persistent pain.

[Lacagnina MJ](#)¹, [Watkins LR](#)², [Grace PM](#)³.

⊕ Author information

Abstract

One of the fundamental mechanisms whereby the innate immune system coordinates inflammatory signal transduction is through Toll-like receptors (TLRs), which function to protect and defend the host organism by initiating inflammatory signaling cascades in response to tissue damage or injury. TLRs are positioned at the neuroimmune interface, and accumulating evidence suggests that the inflammatory consequences of TLR activation on glia (including microglia and astrocytes), sensory neurons, and other cell types can influence nociceptive processing and lead to states of exaggerated and unresolved pain. In this review, we summarize our current understanding of how different TLRs and their accessory or adaptor molecules can contribute to the development and maintenance of persistent pain. The challenges and opportunities of targeting TLRs for new treatment strategies against chronic pain are discussed, including the therapeutic context of TLR-mediated signaling in opioid analgesia and chemotherapy-induced pain. Considering the prevalence of persistent pain and the insufficient efficacy and safety of current treatment options, a deeper understanding of Toll-like receptors holds the promise of novel therapies for managing pathological pain.

Copyright © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Glia; Inflammation; Innate immunity; Nociception; Pain; TLR

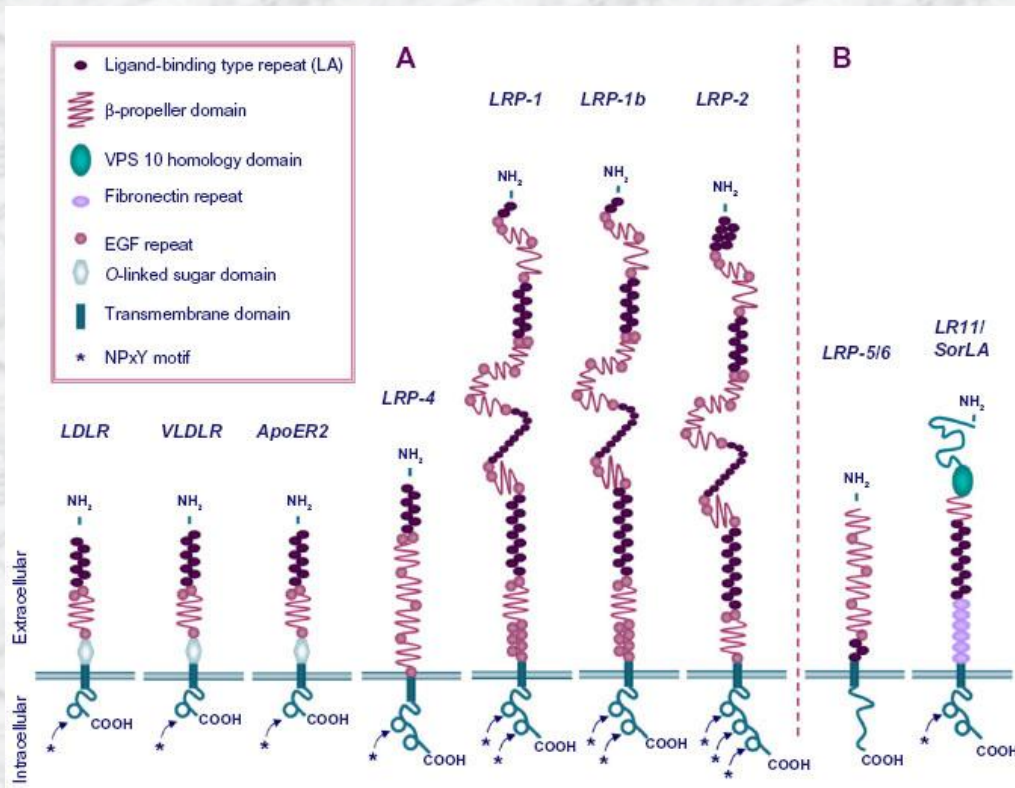
9) Recettori per le lipoproteine

Le lipoproteine si dividono in diverse classi a seconda della dimensione, della densità, del rapporto tra trigliceridi ed esteri del colesterolo nel nucleo e della natura delle apoproteine situate in superficie.

	Proteine	Triglic.	Colest.	Fosfolipidi
Chilom.	1%	90%	6%	3%
VLDL	10%	65%	13%	12%
LDL	25% (di cui 98% ApoB)	10%	43%	22%
HDL	50% (di cui 90% ApoA)	2%	18%	30%

I **recettori delle lipoproteine** legano le lipoproteine con l'importante funzione di internalizzare le lipoproteine e i lipidi ad essi legati e **ciò è essenziale per la loro acquisizione cellulare e metabolismo**

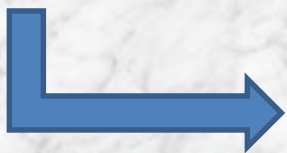
(Tali recettori possono anche modulare l'attività sinaptica e soprattutto l'attività del recettore del glutammato di tipo NMDA).



Coinvolti nel fenomeno di INTERNALIZZAZIONE di lipoproteine

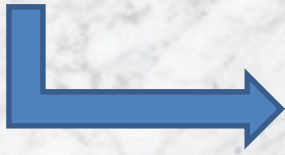
cascata: \uparrow Ca intra,
 \uparrow IP₃,
 \uparrow ERK

Le LDL ossidate non sono riconosciute dal recettore LDL ma piuttosto dai recettori "scavenger" nei macrofagi e nelle cellule muscolari lisce endoteliali vascolari.

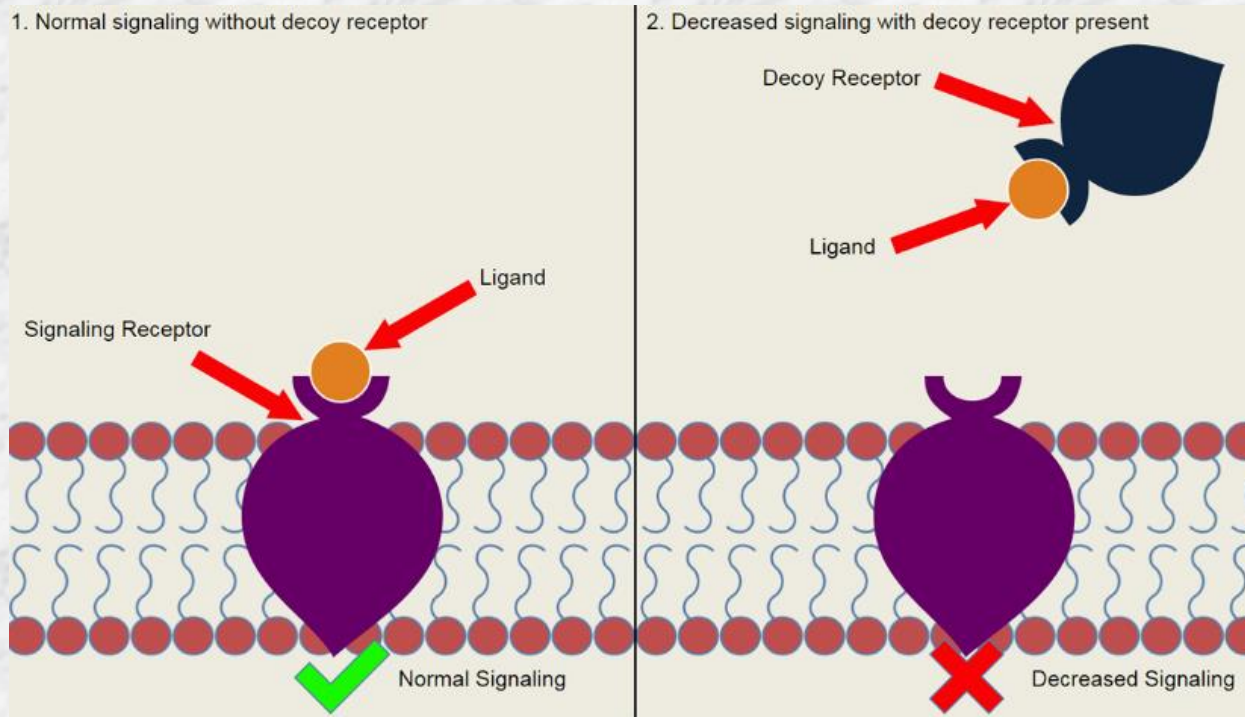


Questo metabolismo porta alla formazione di placche aterosclerotiche.

10) Recettori Decoy



o recettori troncati sono detti **silenti** perché agiscono come **inibitori** perché impediscono al ligando di legarsi al suo recettore



Sono in grado di riconoscere e legare in modo efficiente anche specifici fattori di crescita o citochine, ma non è strutturalmente in grado di trasdurre un segnale

Sono abbondanti nei tessuti maligni, costituendo un argomento significativo nella ricerca sul cancro

Crosstalk between Signaling Cascades

