

BIOLOGIA MOLECOLARE

della CELLULA

Si occupa di:

- segnalazione cellulare
- comunicazione cellulare
- controllo ciclo cellulare
- interazione proteina – proteina

TRADUTTORI → trasducono il segnale

- il messaggio, attraverso un serie di passaggi, raggiunge il bersaglio finale
- geni implicati tantissimi

SEGNALAZIONE EXTRACELLULARE:

- 1) segnalazione endocrina → le ghiandole endocrine producono molecole (ormoni) rilasciati nel sangue e raggiungono gli organi bersaglio (cellule) anche lontani dalla ghiandola di partenza
- 2) segnalazione paracrina → la cellula produce una molecola segnale e la cellula bersaglio si trova vicino. Le molecole sono rilasciate nell'ambiente esterno (sinapsi)
- 3) segnalazione autocrina → nella stessa cellula viene rilasciata una molecola segnale (ligando extracellulare) in grado di interagire con recettori presenti sulla stessa cellula
- 4) segnalazione da proteine attaccate alla membrana plasmatica → molecola segnale legata alla membrana plasmatica e sulla cellula adiacente ci sono R che danno risposte (proteine della matrice extracellulare)

MOLECOLE SEGNALE:

ORMONI:

- secreti da ghiandole endocrine → sangue
- bersagli lontani
- [ormone] nel sangue è bassa
- vita breve

PROSTENOIDI:

- prostaglandine, trombassani, leucotrieni
- secreti da molti tipi di cellule
- tessuti bersaglio vicini
- molto labili
- mediatori chimici locali

NEUROTRASMETTITORI

FATTORI DI CRESCITA

FEROMONI:

- comunicazioni tra cellule di diversi organismi ma di = specie
- idrosolubili: peptici, derivati da aa
- legano R di membrana

- danno risposte rapide
- liposolubili: ormoni steroidei, della tiroide, acido retinoico
- legano R intracellulari
- risposte + lente e durature
- entrano per diffusione

COMUNICAZIONE TRAMITE SEGNALI EXTRACELLULARI:

- sintesi → della molecola segnale nella cellula
- rilascio → può essere controllato o meno
- trasporto a cellule bersaglio
- incontro molecola segnale – recettore
- traduzione del segnale
- risposte → metabolica, trascrizione, movimento
- rimozione del segnale → degradazione

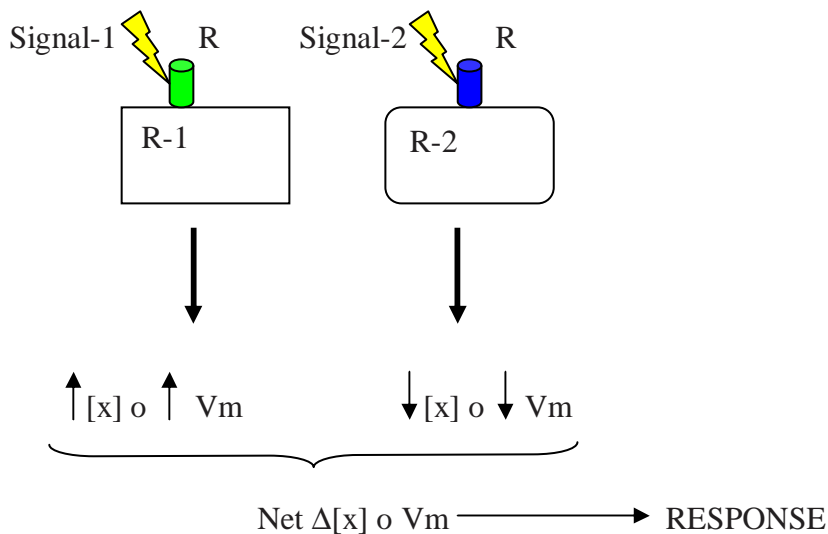
SPECIFICITA': interazioni deboli tra ligando e recettore

AMPLIFICAZIONE:

- basta 1 molecola per attivare tante altre
- gli enzimi + bassi a livello quantitativo sono di +

DESENSITIZZAZIONE o ADATTAMENTO → diminuzione della risposta

INTEGRAZIONE → una cellula presenta vari R capaci di captare molecole diverse



Una cellula può avere R diversi per ligandi diversi

Lo stesso ligando su cellule diverse interagisce con recettori diversi

Lo stesso ligando interagisce con = R ma su cellule diverse → risposta diversa (Ach)

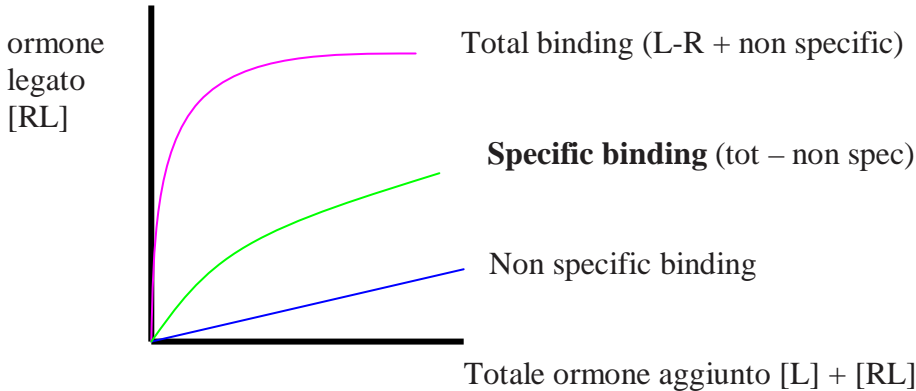
RECETTORI

- proteine
- cellule con R
- ligando → interazione → misurazione effetto
- affinità
- n° di R per un tipo di L
- peso e struttura

Per studiare i R occorre un L radioattivo in modo da misurare se si lega o no e per vedere cosa accade a L quindi si usano:

- *polipeptidi*: per renderli radioattivi vengono iodati con ^{135}I
- *ormoni steroidei*: “ “ “ “ \rightarrow trizio ^3H
- L legato a particelle di *oro-colloidale* \rightarrow M.E. (Microscopio elettronico)
- Coniugare queste molecole a *elementi fluorescenti* \rightarrow microscopio

In + capsule Petri si aggiunge a [] crescenti L^* e mettendo in grafico i risultati \rightarrow saturazione (L-R)



Rielaboro i dati per ottenere informazioni quantitative come il n° di R e l'affinità per il L:

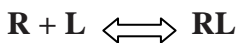
ANALISI DI SCATCHARD:

R = recettore

L = ligando

RL = complesso

N = R totali



All'EQUILIBRIO: $K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = 1/\text{mol} (10^6 \sim 10^9)$

$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} = M (10^{-6} \sim 10^{-9})$

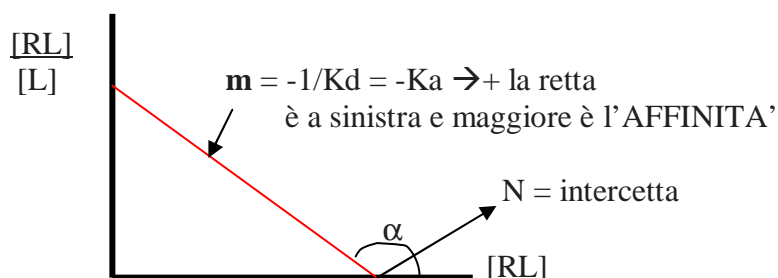
$K_d = P_{50} = [L]$ per la quale $\frac{[R]}{[RL]} = 1$ (R è per metà legato e per metà non legato)

$m =$ inclinazione retta

Trasformo l'iperbole in una retta: ricorda che $[R] = [N-RL]$

$$\frac{[RL]}{[L]} = K_a * [R] \rightarrow K_a * [N-RL] \rightarrow K_a * N - K_a * [RL]$$

$$\frac{[RL]}{[L]} = K_a * N - K_a * [RL] \rightarrow \boxed{Y = q - mx}$$



Spesso I R vengono endocitati dalla cellula (~ 37°C) e quindi non si raggiunge l'equilibrio per cui gli esperimenti vanno fatti a 4°C dove l'equilibrio si può raggiungere.

Per CALCOLARE il P.M. del RECETTORE:

- esegue un'elettroforesi su SDS
- R legato al L
- Molecole *cross-linkanti* legano covalentemente R-L
- Gel
- L* → banda radioattiva
- $RL - L = PM \text{ di R}$
- LogPM è proporzionale alla migrazione (cm)

Per PURIFICARE i RECETTORI:

- cromatografia per affinità
- palline di separamio (substrato inerte con legato covalentemente L) legano il L → colonnina
- 99% delle proteine passano e le proteine recettoriali si legano al separamio
- lavo la colonna → recettore
- stacco R da L → R purificato

Se conosco la sequenza nucleotidica di un R → cDNA per quel R → trasfettato in cellule che esprimono R → mutagenesi sito-specifica → osservo.

CLASSIFICAZIONE RECETTORI DI SUPERFICIE:

- 1) Accoppiati a proteine-G → GPLR; a 7 domini transmembrana (7M)
 - 2) Recettori canale → nicotinici; acetilcolina
 - 3) Recettori tirosinkinasi → fattori di crescita
 - 4) Recettori tirosinfosfatasi
 - 5) Recettori guanilaticiclasici → catalizza $GTP \rightarrow cGMP$ (2° mex) + Pyr
 - 6) Recettori legati a proteinkinasi → per la Tyr o Ser o Thr
- } attività enzimatica intrinseca