

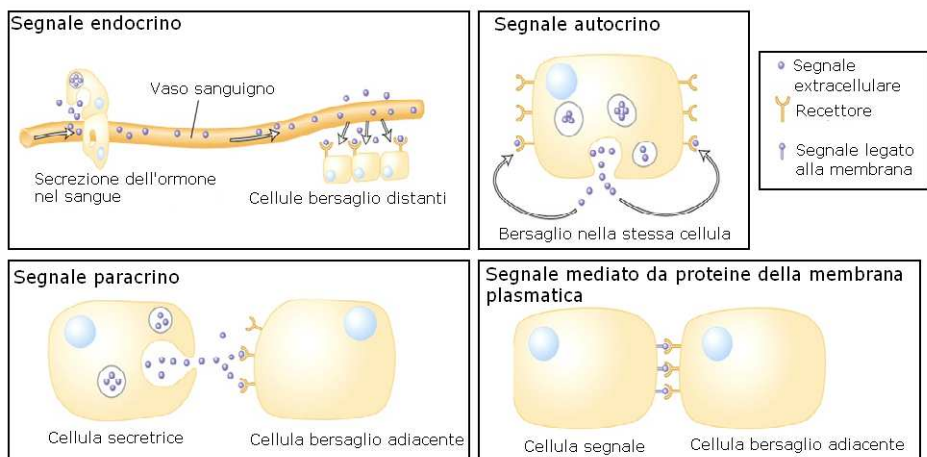
Meccanismi molecolari di trasduzione del segnale



Copyright © 2001-2016 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

M04-01 - Versione 1.5.2 - Nov-16

TRASDUZIONE DEL SEGNALE: comunicazione extracellulare



Trasduzione del segnale

- **Catena di reazioni che**, ricevendo segnali molecolari (ormoni) tramite recettori proteici (della superficie cellulare o del nucleo), **agisce su bersagli molecolari intracellulari per attivare o disattivare processi** (metabolismo, espressione genica ecc.) **essenziali per il funzionamento della cellula.**

Trasduzione del segnale

- Avviene quando un segnale extracellulare viene trasdotto modificando il comportamento della cellula bersaglio.
- La trasduzione avviene tramite **recettori**, proteine di membrana, o proteine solubili, che possiedono una grande affinità per un ligando (proteina, acido nucleico, molecola a basso peso molecolare).
- Gli eventi che seguono il legame del ligando al recettore vanno sotto il nome di **cascata di trasduzione del segnale**
- Per generare una risposta cellulare specifica il segnale deve essere trasferito all'interno della cellula: questo avviene grazie all'azione di una serie di molecole: **secondi messaggeri**

Trasduzione del segnale

- Si possono individuare tre grandi famiglie di recettori impegnati nei meccanismi di trasduzione del segnale **a livello della membrana plasmatica**, classificati mediante il meccanismo di segnalazione:
 - i recettori canale (chiamati anche recettori ionotropici): il legame del ligando apre o chiude un canale ionico (che permette cioè il passaggio di ioni attraverso la membrana plasmatica) formato dal recettore stesso.
 - i recettori accoppiati a proteine G (GPCR): questi recettori regolano l'attività di proteine bersaglio (enzimi o canali ionici) legate alla membrana plasmatica. L'interazione tra il recettore e la proteina bersaglio è mediata da una terza proteina: proteina G eterotrimerica.
 - i recettori tirosin-kinasici (RTK): quando vengono attivati questi recettori si comportano essi stessi da enzimi o attivano enzimi a cui sono associati direttamente.

Segnali

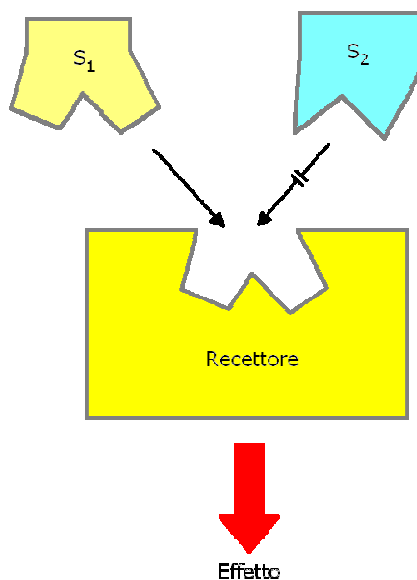
- Fisici (fotoni, stimoli meccanici ...)
- Molecole organiche (adrenalina ...)
- Peptidi (insulina, glucagone ...)

Proprietà dei recettori

- Proteine che convertono un segnale chimico in un segnale biologico.
 - I recettori sono specifici;
 - Permettono l'amplificazione del segnale;
 - Possono essere modulati;
 - Possono fornire risposte integrate

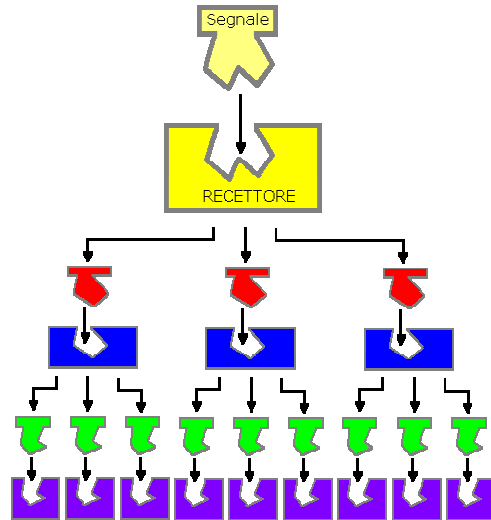
Specificità

- C'è una specificità molecolare che lega un segnale al proprio recettore:
 - Solo alcune molecole si legano altre no.



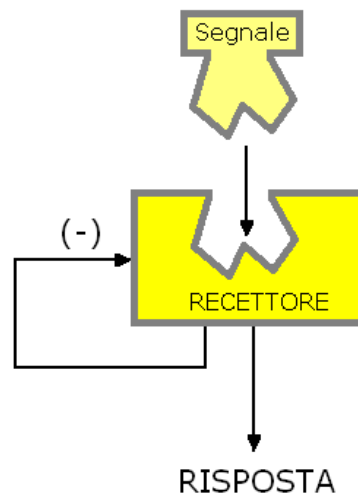
Amplificazione

- L'attivazione di un recettore attiva, spesso, un meccanismo a cascata che porta ad una amplificazione del segnale.



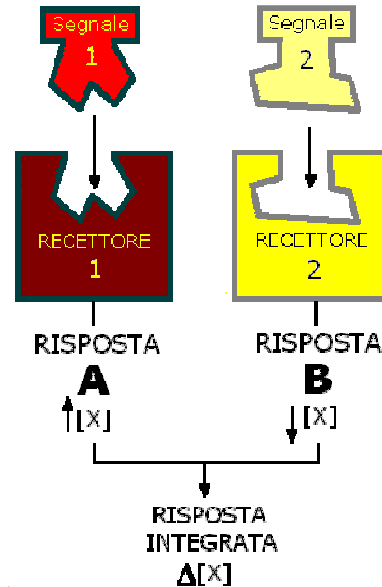
Adattamento - Desensibilizzazione

- L'attivazione di un recettore innesca un circuito di retroazione che ne riduce l'attività.



Integrazione

- Quando due segnali agiscono, attraverso specifici recettori, su una stessa grandezza in modo opposto, il risultato è una grandezza che integra le risposte.



Sensibilità

- La sensibilità delle vie di trasduzione dipende da tre fattori:
 - **l'affinità** tra il ligando (segnale) e il suo recettore può essere espressa dalla costante di dissociazione del complesso (K_d) che spesso ha valori intorno a 10^{-10} M;
 - **la cooperatività** nelle interazioni ligando-recettore determina una grande variazione nello stato di attivazione del recettore in risposta a una piccola variazione della concentrazione del ligando;
 - **l'amplificazione**: l'attivazione di un singolo enzima associato al recettore del segnale catalizza, a sua volta, l'attivazione di molte molecole di un secondo enzima, ognuna delle quali determina poi l'attivazione di un terzo enzima e così via. Con queste cascate si possono ottenere amplificazioni di diversi ordini di grandezza in pochi millisecondi.

Sensibilità

- La **sensibilità** dei recettori può essere **modulata**.
 - quando un segnale perdura nel tempo, si ha una **desensibilizzazione** del recettore; quando la concentrazione dello stimolo scende sotto un certo livello, il sistema riacquista la sua sensibilità.
 - Sistema di trasduzione visivo quando si passa dalla luce al buio e viceversa;
 - Saturazione dei chemocettori in batteri

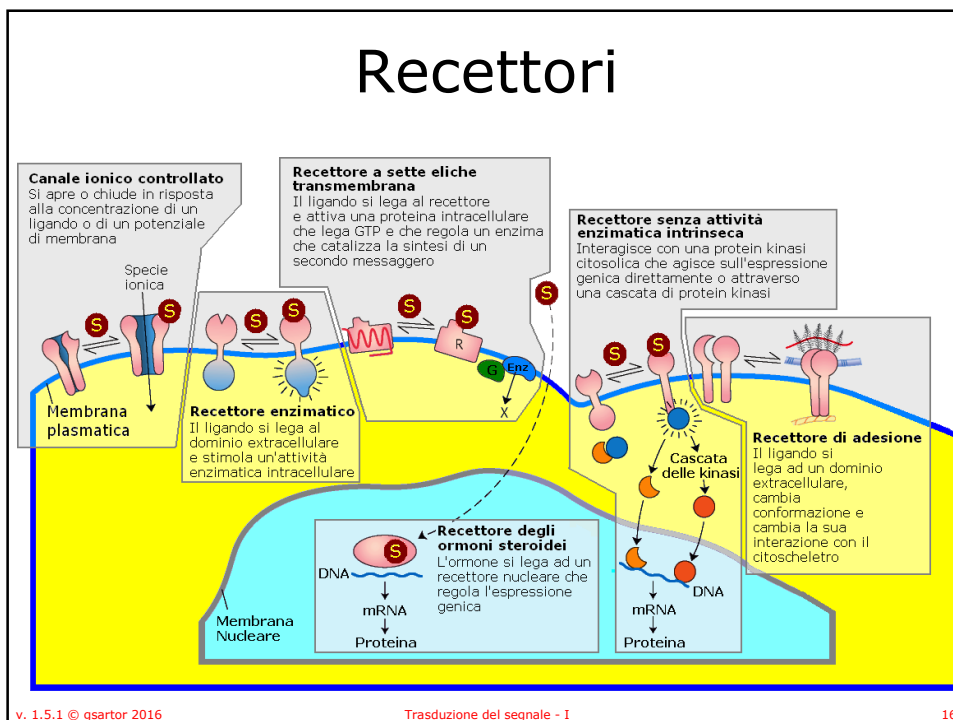
Sensibilità

- La **sensibilità** dei recettori può essere **modulata**.
 - **integrazione**, la capacità del sistema di ricevere segnali multipli e di produrre una sola risposta appropriata alle necessità della cellula o dell'organismo.
 - Vie diverse di trasduzione del segnale convergono l'una con l'altra a diversi livelli generando un insieme di interazioni che serve a mantenere l'omeostasi nelle cellula o nell'organismo.

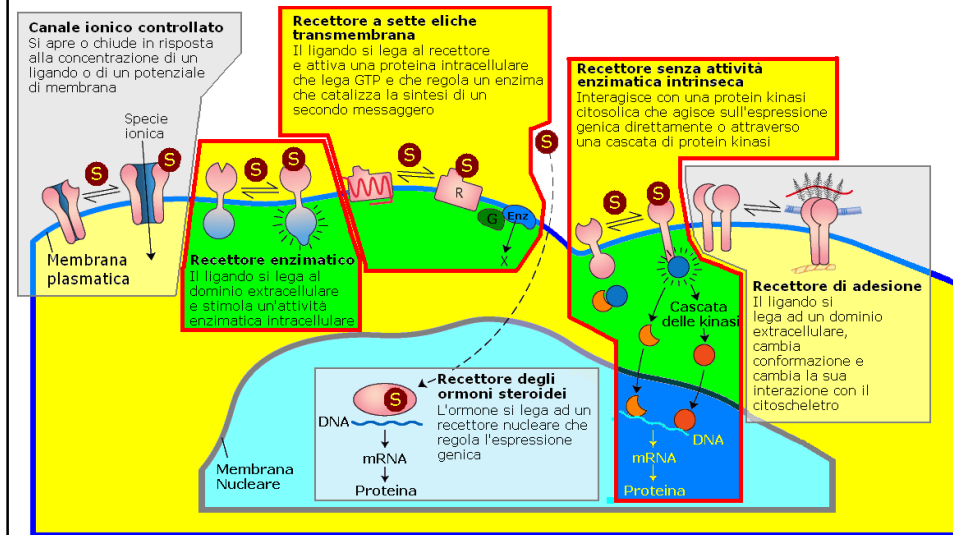
Meccanismo

- Il fattore di innesco è diverso per ogni sistema, ma le caratteristiche generali delle vie di trasduzione del segnale sono comuni a tutte:
 1. un segnale interagisce con il suo recettore;
 2. il recettore attivato interagisce con una macchina cellulare che produce un secondo segnale o una modificazione dell'attività di una proteina cellulare;
 3. l'attività metabolica (il comportamento) della cellula bersaglio viene alterata;
 4. la trasduzione è terminata e la cellula ritorna allo stato originario.

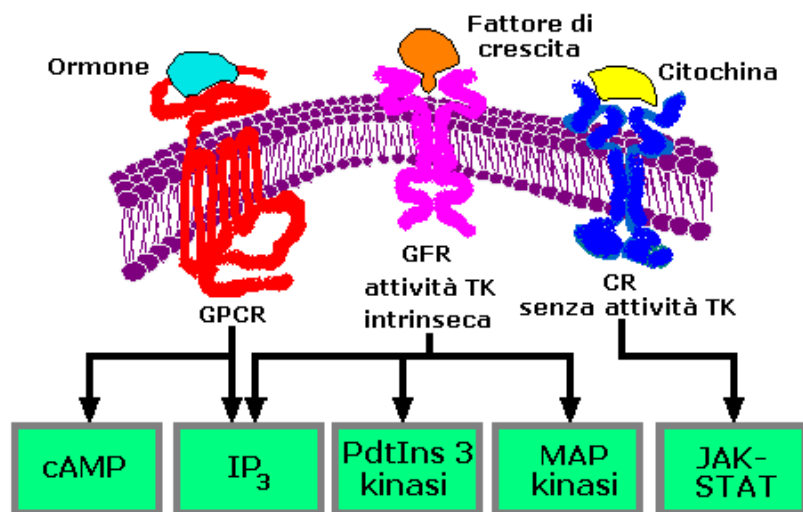
Recettori



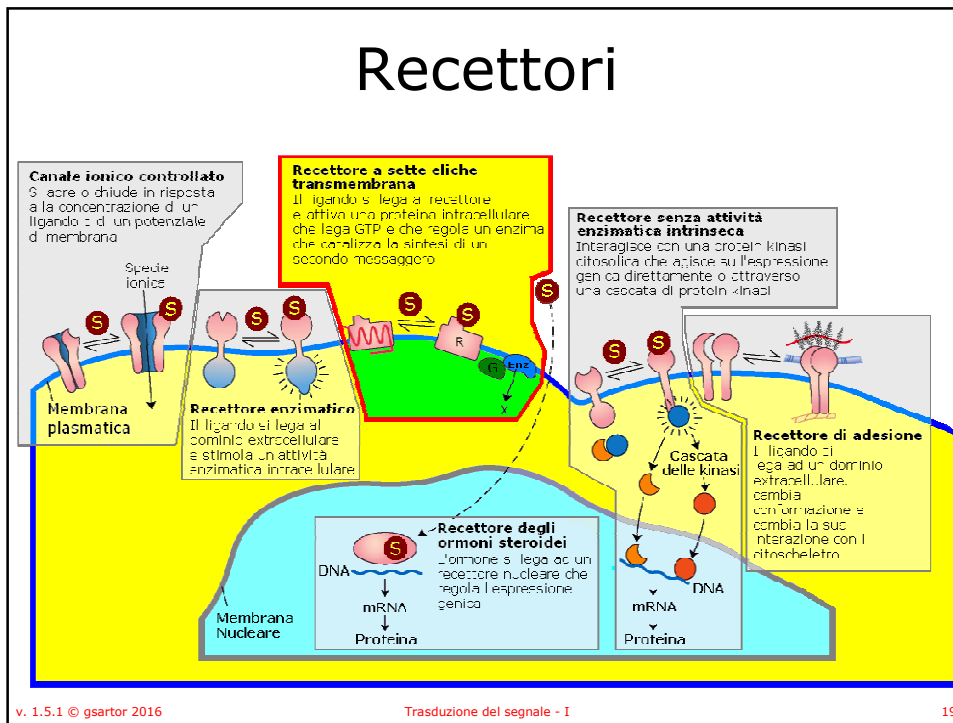
Recettori di superficie



Traduzione del Segnale da Recettori di Superficie



Recettori



Recettori a sette eliche transmembrana

O

Recettori accoppiati a proteine G

- Sette tratti transmembrana;
- Più di duemila recettori;
- Presenti in tutti gli eucarioti;
- Funzioni biologiche diverse;
- Molecole segnale:
 - proteine, peptidi, lipidi e altre molecole;
- Strutturalmente simili.

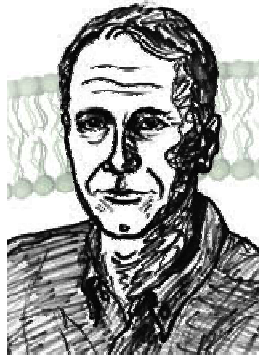


The Nobel Prize in Chemistry 2012
Robert J. Lefkowitz, Brian K. Kobilka

The Nobel Prize in Chemistry 2012	
Robert J. Lefkowitz	▼
Brian K. Kobilka	▼



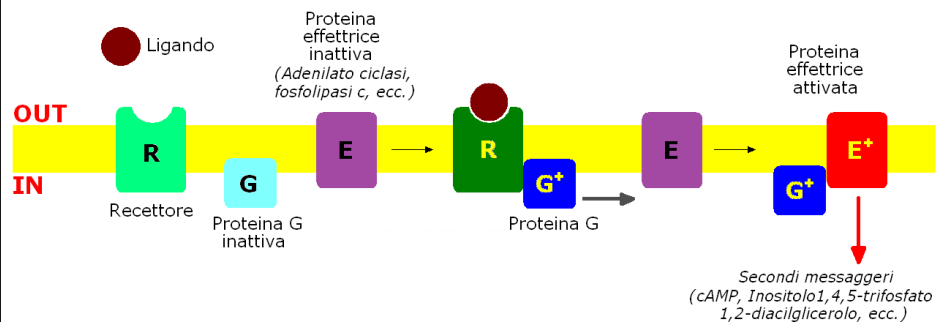
Robert J. Lefkowitz



Brian K. Kobilka

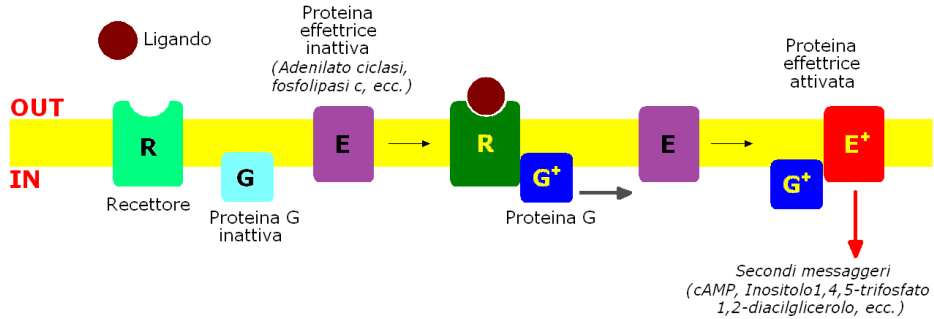
The Nobel Prize In Chemistry 2012 was awarded jointly to Robert J. Lefkowitz and Brian K. Kobilka "for studies of G-protein-coupled receptors"

Recettori accoppiati a proteine G



- Recettori proteici della membrana plasmatica che attivano indirettamente, attraverso proteine che legano il GTP (proteine G), enzimi che a loro volta producono un secondo messaggero.

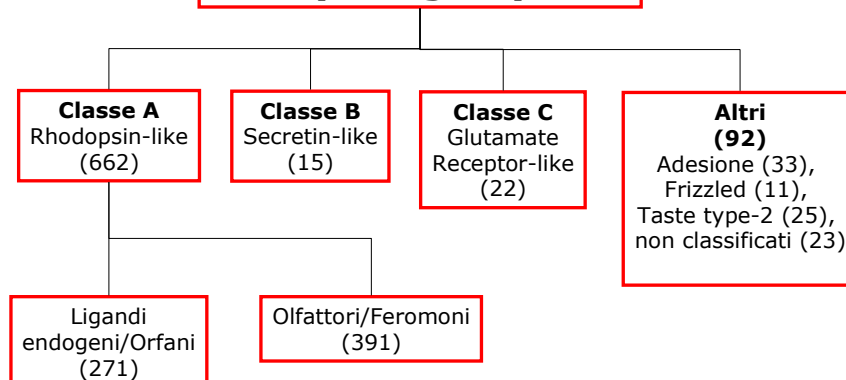
G Protein Coupled Receptors



- Recettori proteici della membrana plasmatica che attivano indirettamente, attraverso proteine che legano il GTP (proteine G), enzimi che a loro volta producono un secondo messaggero.

Classificazione

Superfamiglia GPCR (791 geni)



Il 50% dei farmaci sono attivi su questi recettori
(di questi il 25% dei 200 farmaci più usati)

Family-B G-protein-coupled receptors

Anthony J Harmar

Address: Department of Neuroscience, University of Edinburgh, 1 George Square, Edinburgh EH8 9JZ, UK. E-mail: Tony.Harmar@ed.ac.uk

Published: 23 November 2001

Genome Biology 2001, 2(12):reviews3013.1-3013.10

All G-protein-coupled receptors (GPCRs) share a common molecular architecture (with seven putative transmembrane segments) and a common signaling mechanism. In that they interact with G proteins (heterotrimeric GTPases) to regulate the synthesis of intracellular second messengers such as cyclic AMP, inositol phosphates, diacylglycerol and calcium ions. Historically, GPCRs have been classified into six families, which were thought to be unrelated; three of these are found in vertebrates. Recent work has identified several new GPCR families and suggested the possibility of a common evolutionary origin for all of them. Family B (the secretin-receptor family or 'family 2') of the GPCRs is a small but structurally and functionally diverse group of proteins that includes receptors for polypeptide hormones, molecules thought to mediate intercellular interactions at the plasma membrane and a group of *Drosophila* proteins that regulate stress responses and longevity. Family-B GPCRs have been found in all animal species investigated, including mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, but not in plants, fungi or prokaryotes. In this article, I describe the structures and functions of family-B GPCRs and propose a simplified nomenclature for these proteins.

Family-B G-protein-coupled receptors

Anthony J Harmar

Address: Department of Neuroscience, University of Edinburgh, 1 George Square, Edinburgh EH8 9JZ, UK. E-mail: Tony.Harmar@ed.ac.uk

Published: 23 November 2001

Genome Biology 2001, 2(12):reviews3013.1-3013.10

Family A
Visual pigments (rhodopsins)
Monoamine receptors
Peptide receptors
Receptors for glycoprotein hormones (such as FSH)
Chemokine receptors
Prostanoid receptors
Nucleotide receptors

C. elegans Sro-1 and related genes

Mammalian olfactory receptors

Putative pheromone receptors from basal vomeronasal epithelium

C. elegans acropituitary receptors (such as Sra-1 and Odr-10)

Family F
Cyclic AMP receptors from *L. discoideum*

Ocular albinism protein

Family B
Peptide receptors (such as the secretin receptor)
Putative cell-surface signaling molecules (e.g. CD97)
Methuselah and related *Drosophila* proteins

Frizzled/Smoothed family
Drosophila smoothed (Smo)
Drosophila frizzled (Fz)
More than 10 orthologs in man

Family E
Fungal pheromone A- and M-factor receptors

Family C
Metabotropic glutamate receptors
Calcium-sensing receptor
GABA_B receptors
Putative pheromone receptors from apical vomeronasal epithelium
Drosophila Bride of sevenless (Boss)
Human RA3 gene product

Family D
Fungal pheromone P- and α-factor receptors

Yeast GPR1 glucose receptor

Table 1. The total number of GPCRs in the repertoires of mouse and human

Group	Number in mouse	Number in human	Peptide ligand	Biogenic amine ligand	Lipid ligand	Purin ligand	Other ligand	Orphan
<i>Glutamate</i>	79	22	0	10	0	0	4	65 (8)
<i>Rhodopsin (α)</i>	105	101	8	49 (41)	20	4	6 (8)	18 (20)
<i>Rhodopsin (β)</i>	46	43	36 (37)	0	0	0	0	10 (6)
<i>Rhodopsin (γ)</i>	67	64	49 (51)	0	4	0	2	12 (7)
<i>Rhodopsin (δ)</i>	82	63	43 (22)	0	11	10 (12)	2 (1)	16 (17)
<i>Adhesion</i>	31	33	0	0	0	0	1 (2)	30 (31)
<i>Frizzled</i>	11	11	0	0	0	0	11	0
<i>Taste type 2</i>	34	25	0	0	0	0	1 (4)	33 (23)
<i>Secretin</i>	15	15	15	0	0	0	0	0
<i>V1R</i>	165	3	—	—	—	—	—	—
<i>Olfactory</i>	1037	388	—	—	—	—	—	—
<i>Others</i>	25 ^a	23 ^a	—	—	—	—	—	—
Total	1667	791	151 (133)	69 (51)	35	14 (16)	27 (32)	184 (112)

The GPCRs are divided into families according to the GRAFS classification system (*Glutamate*, *Rhodopsin (α)*, *Rhodopsin (β)*, *Rhodopsin (γ)*, *Rhodopsin (δ)*, *Adhesion*, *Frizzled*, *Taste2*, *Secretin*). Additionally the most recent published numbers for pheromone receptors type 1 (*V1R*) [29] and [30] and *Olfactory* receptors [18] and [19] are given. A ligand preference for the different families is showed in columns 3–8. *Others* (all receptors are found in both species unless otherwise noted): DARC (Duffy) GPR137 (C11ORF4), GPR23, GPR88, GPR120, GPR135, GPR139, GPR141 (and Gpr141b only in mouse), GPR142, GPR146, GPR152, GPR160, GPR151 (GPCR-2037), HGPCR19, GPR149 (IEDA), GPR143 (OA1), GPR172A (PERVAR1) (found only in human), GPR172B (PERVAR2) (found only in human), TRHR (and Trhr2 only in mouse), GPR137B (TM7SF1), GPR137C (TM7SF1.2), TM7SF3, GPR175 (TPRA40).

Genomics
Volume 88, Issue 3, September 2006, Pages 263-273

Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse

Thóra K. Bjarnadóttir, David E. Gloriam, Sofia H. Hellstrand, Helena Kristiansson, Robert Fredriksson, Helgi B. Schiöth

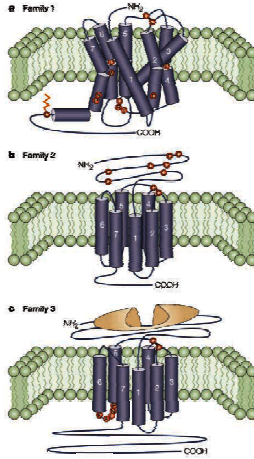
Classificazione GRAFS

- Più recentemente è stato proposto il sistema di classificazione GRAFS (*Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Taste2*, *Secretin*).
- Questo sistema prevede il raggruppamento in sei classi basate sulla omologia di sequenza e sulla funzione
 - Classe A (o 1) (*Rhodopsin*-like)
 - Classe B (o 2) (*Secretin* receptor family)
 - Classe C (o 3) (*Metabotropic glutamate/pheromone*)
 - Classe D (o 4) (*Fungal mating pheromone* receptors)
 - Classe E (o 5) (*cAMP* receptors)
 - Classe F (o 6) (*Frizzled/Smoothened*)

Classificazione

Box 1 Classification of G-protein-coupled receptors

G-protein-coupled receptors (GPCRs) can be divided phylogenetically into six families (see the **GPCR database** website). Schematic representations of receptor monomers showing some key structural aspects of the three main families are shown. Family 1 (found in also referred to as family A or the rhodopsin-like family) is by far the largest subgroup and contains receptors for odourants, small molecules such as the catecholamines and steroids, some peptides and glycoprotein hormones. Receptors of family 1 are characterized by several highly conserved motifs and some of which are indicated in the diagram by red circles and a double-headed arrow that connects the first and second extracellular loops (ECLs). Most of these receptors also have a conserved cysteine in the carboxy-terminal tail. The recent determination of the crystal structure of rhodopsin has indicated that the human rhodopsin (LR) domain of family 1 receptors is "folded" as shown. Family 2 or family B GPCRs (panel b) are characterized by a relatively long extracellular domain that contains several cysteines, which presumably form a network of disulfide bridges. Their architecture is similar to those family 1 receptors, but they do not share any sequence homology. For example, the family 2 receptors also contain a disulfide bridge that connects ECL1 and ECL2, but the polypeptide chain is missing the conserved residues seen in family 1 receptors. The site of binding of the conserved residues are different from the conserved residues in the family 1 receptors and the TRP (tryptophan, arginine, proline) motif adjacent to TM3 is absent. Little is known about the orientation of the TM domains but — given the divergence in amino acid sequence — it is probably quite distinct from that of rhodopsin. Ligands for family 2 GPCRs include hormones, such as glucagon, gonadotropin-releasing hormone and parathyroid hormone. Family 3 (panel c) contains the metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and the mammalian and *Drosophila* olfactory receptors. These receptors are characterized by a long intracellular tail. The ligand-binding domain is located in the extracellular domain, which is often described as being like a "thumb" in shape. Each of the cytoplasmic ECL1 and ECL2 that form a putative disulfide bridge, the family 3 receptors do not have any of the key features that characterize family 1 and 2 receptors. A unique characteristic of the family 3 receptors is that the third intracellular loop is absent. Highly conserved, although the structure of the amino terminus is not characterized, similar to the family 2 receptors, little is known about the orientation of the TM domains.

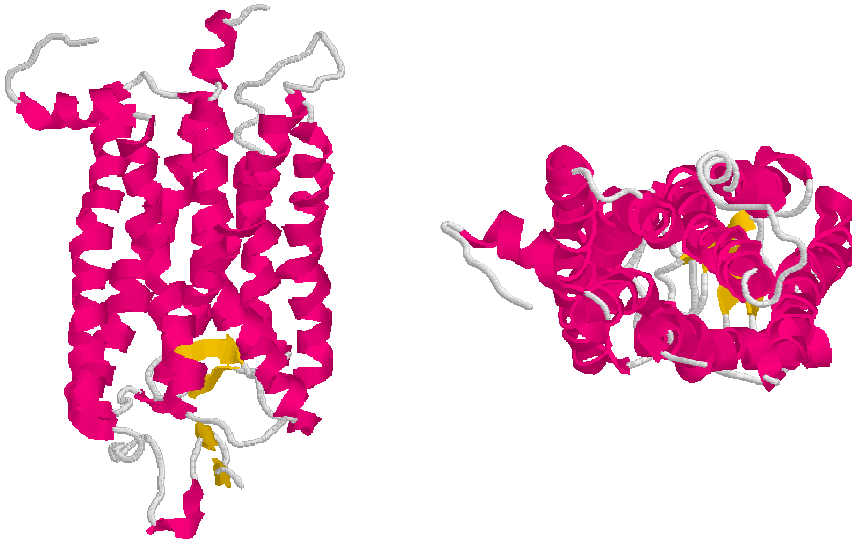


G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR OLIGOMERIZATION AND ITS POTENTIAL FOR DRUG DISCOVERY

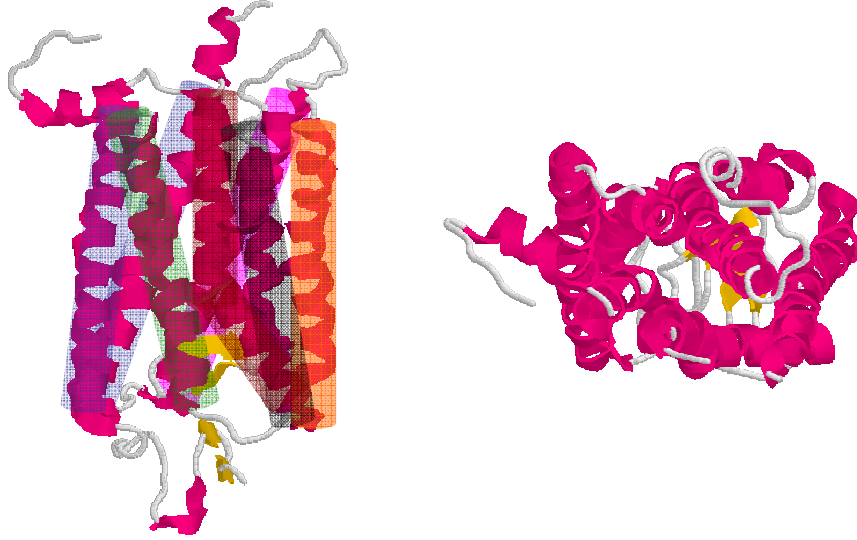
Steven E. Gearty^{1,2}, Doreen L. O'Donnell² and Samuel J. Lee¹

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
308 | OCTOBER 2002 | VOLUME 1

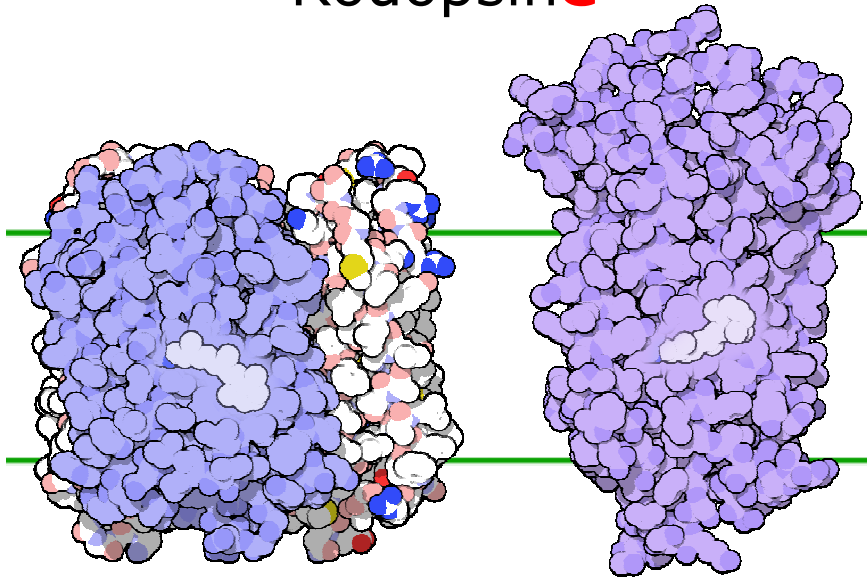
Rodopsina

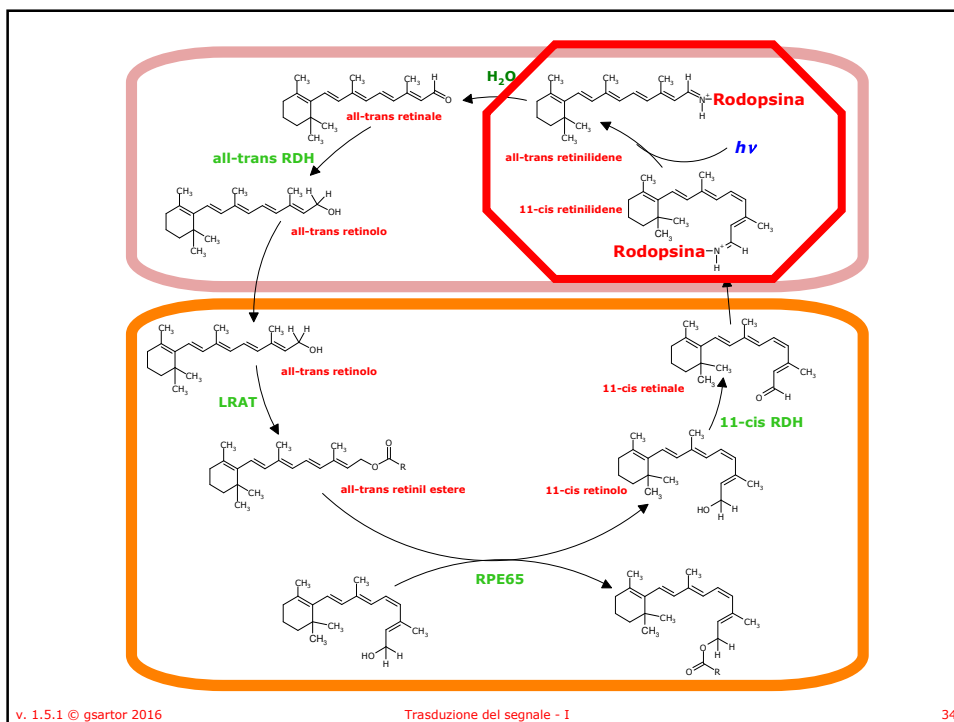
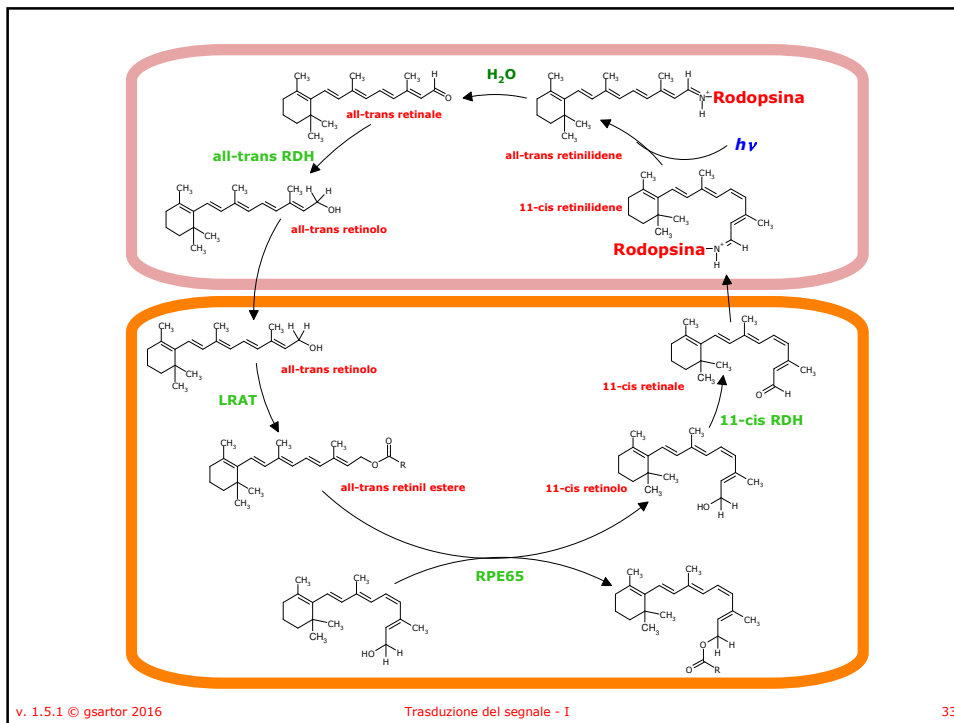


Rodopsina

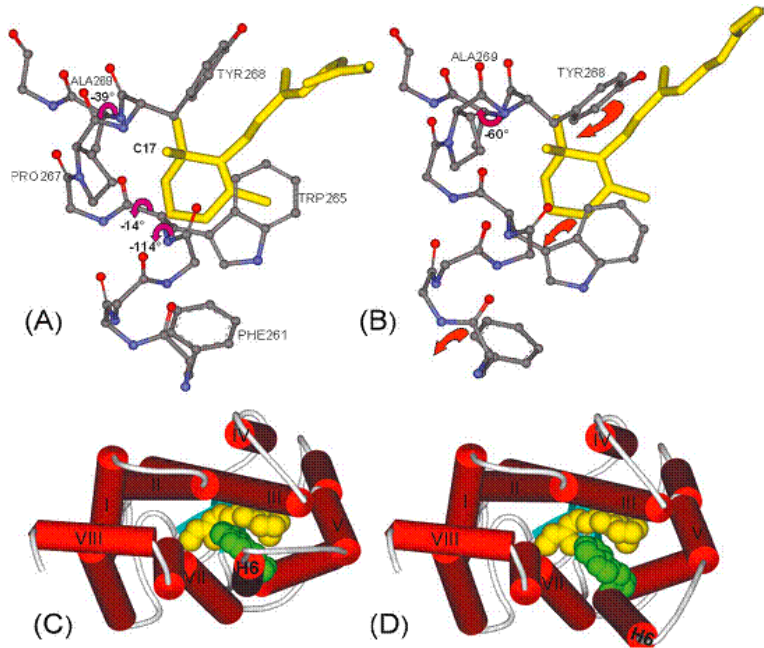
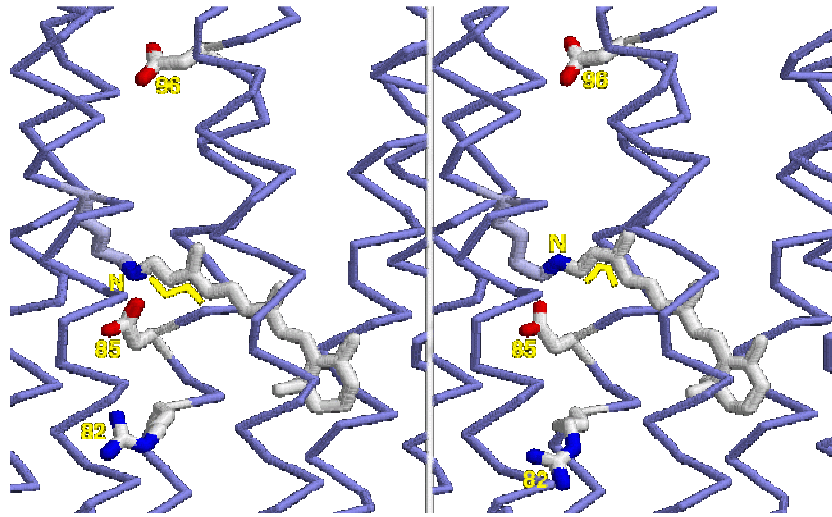


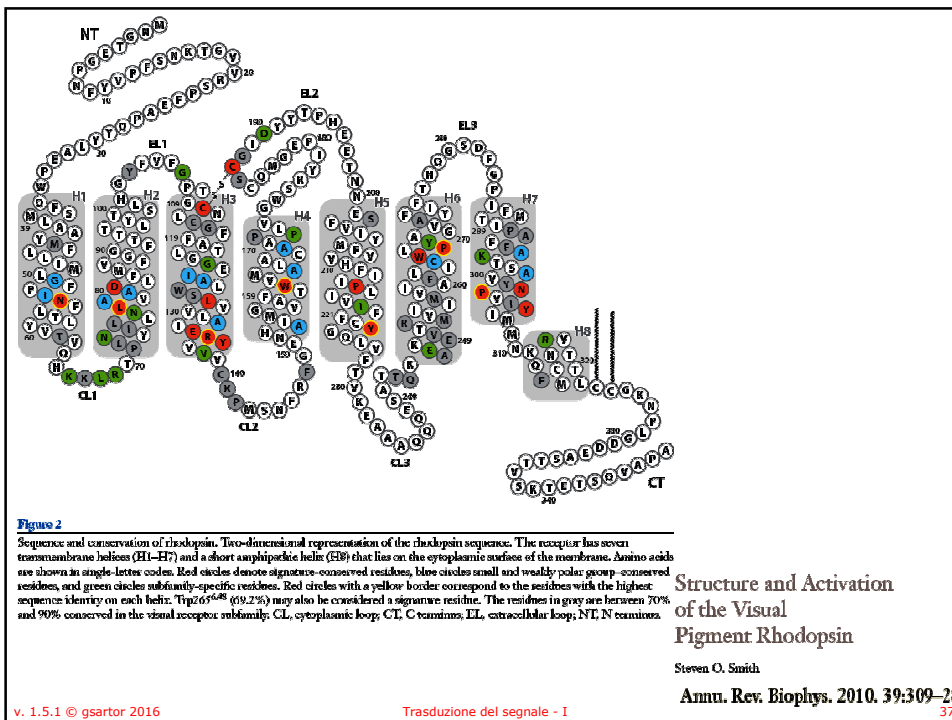
Rodopsine





Rodopsina



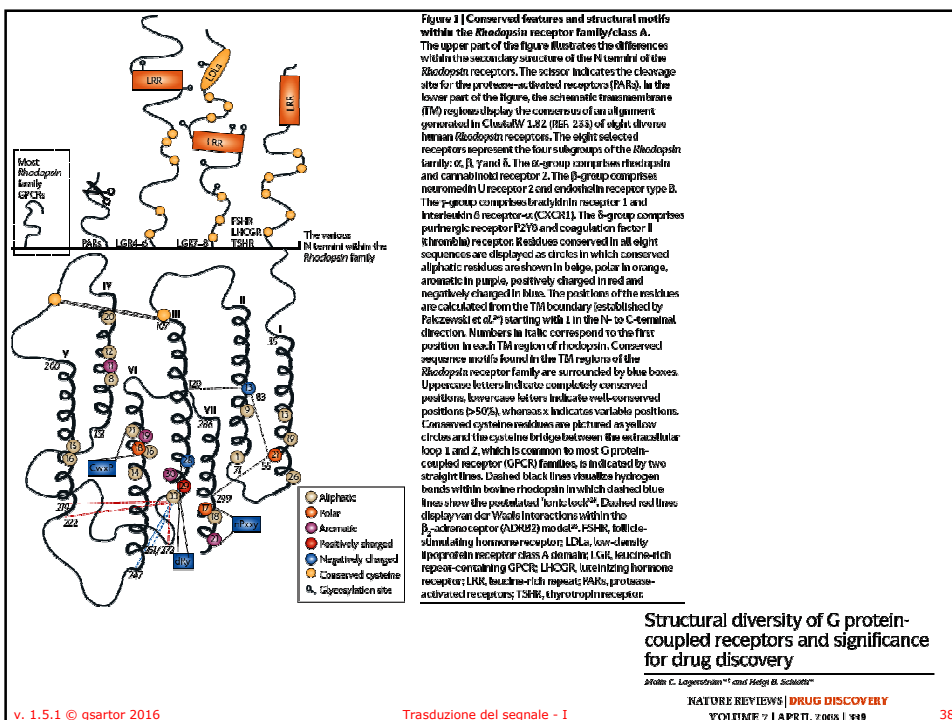


Structure and Activation of the Visual Pigment Rhodopsin

Steven O. Smith

Annu. Rev. Biophys. 2010. 39:309–28

37

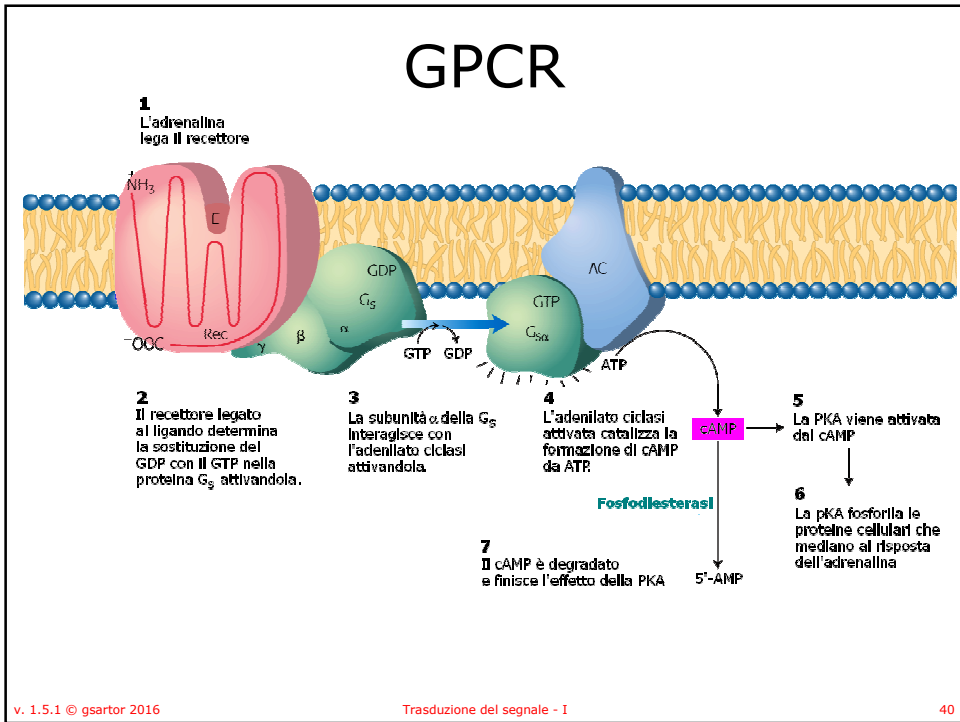


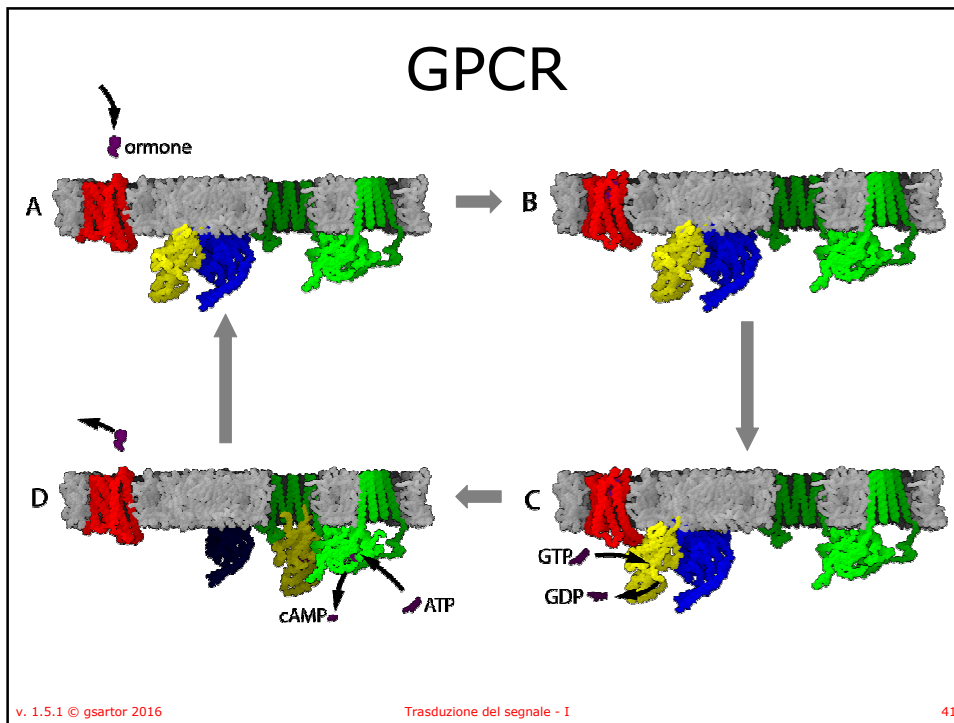
Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery

John C. Lagerstrom^{1,2} and Ned S. Schaff²

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
 VOLUME 7 | APRIL 2008 | 319

38





nature

THE INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE

STIMULUS PACKAGE

Structure of a G-protein-coupled-receptor membrane signalling complex **PAGES 540, 545 & 611**

29 SEPTEMBER 2011 | VOL 477

<p>THERAPEUTICS</p> <p>A SUITABLE CASE FOR TREATMENT</p> <p>Four ways to revitalize the clinical trial PAGE 535</p>	<p>COSMOLOGY</p> <p>GENERAL RELATIVITY</p> <p>Gravitational redshift from galactic clusters at latest test PAGES 541 & 567</p>	<p>POLICY</p> <p>REASONS TO BE CHEERFUL</p> <p>Well-being as an index of social progress PAGE 532</p>	<p>NATURE.COM/NATURE</p> <p>ISSN 0950-0688</p> <p>UK £77.00 US\$95</p> <p>9 770088 033015</p>
--	---	--	---

3 - I 42

Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex

Søren G. F. Rasmussen^{1,2*}, Brian T. DeVree^{3*}, Yaozhong Zou¹, Andrew C. Kruse¹, Ka Young Chung¹, Tong Sun Kobilka¹, Foon Sun Thian¹, Pil Seok Chae⁴, Els Pardon^{5,6}, Diane Calinski³, Jesper M. Mathiesen¹, Syed T. A. Shah⁷, Joseph A. Lyons⁷, Martin Caffrey⁷, Samuel H. Gellman⁴, Jan Steyaert^{5,6}, Georgios Skiniotis⁸, William I. Weis^{1,9}, Roger K. Sunahara³ & Brian K. Kobilka¹

G protein-coupled receptors (GPCRs) are responsible for the majority of cellular responses to hormones and neurotransmitters as well as the senses of sight, olfaction and taste. The paradigm of GPCR signalling is the activation of a heterotrimeric GTP binding protein (G protein) by an agonist-occupied receptor. The β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) activation of Gs, the stimulatory G protein for adenylyl cyclase, has long been a model system for GPCR signalling. Here we present the crystal structure of the active state ternary complex composed of agonist-occupied monomeric β_2 AR and nucleotide-free Gs heterotrimer. The principal interactions between the β_2 AR and Gs involve the amino- and carboxy-terminal α -helices of Gs, with conformational changes propagating to the nucleotide-binding pocket. The largest conformational changes in the β_2 AR include a 14 Å outward movement at the cytoplasmic end of transmembrane segment 6 (TM6) and an α -helical extension of the cytoplasmic end of TM5. The most surprising observation is a major displacement of the α -helical domain of Gs relative to the Ras-like GTPase domain. This crystal structure represents the first high-resolution view of transmembrane signalling by a GPCR.

29 SEPTEMBER 2011 | VOL 477 | NATURE | 549

Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex

Søren G. F. Rasmussen^{1,2*}, Brian T. DeVree^{3*}, Yaozhong Zou¹, Andrew C. Kruse¹, Ka Young Chung¹, Tong Sun Kobilka¹, Foon Sun Thian¹, Pil Seok Chae⁴, Els Pardon^{5,6}, Diane Calinski³, Jesper M. Mathiesen¹, Syed T. A. Shah⁷, Joseph A. Lyons⁷, Martin Caffrey⁷, Samuel H. Gellman⁴, Jan Steyaert^{5,6}, Georgios Skiniotis⁸, William I. Weis^{1,9}, Roger K. Sunahara³ & Brian K. Kobilka¹

G protein-coupled receptors (GPCRs) are responsible for the majority of cellular responses to hormones and neurotransmitters as well as the senses of sight, olfaction and taste. The paradigm of GPCR signalling is the activation of a heterotrimeric GTP binding protein (G protein) by an agonist-occupied receptor. The β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) activation of Gs, the stimulatory G protein for adenylyl cyclase, has long been a model system for GPCR signalling. Here we present the crystal structure of the active state ternary complex composed of agonist-occupied monomeric β_2 AR and nucleotide-free Gs heterotrimer. The principal interactions between the β_2 AR and Gs involve the amino- and carboxy-terminal α -helices of Gs, with conformational changes propagating to the nucleotide-binding pocket. The largest conformational changes in the β_2 AR include a 14 Å outward movement at the cytoplasmic end of transmembrane segment 6 (TM6) and an α -helical extension of the cytoplasmic end of TM5. The most surprising observation is a major displacement of the α -helical domain of Gs relative to the Ras-like GTPase domain. This crystal structure represents the first high-resolution view of transmembrane signalling by a GPCR.

29 SEPTEMBER 2011 | VOL 477 | NATURE | 549

Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex

Soren G. F. Rasmussen^{1,2*}, Brian T. DeVree^{3*}, Yaozhong Zou¹, Andrew C. Kruse¹, Ka Young Chung¹, Tong Sun Kobilka¹, Foon Sun Thian¹, Pil Seok Chae⁴, Els Pardon^{5,6}, Diane Calinski³, Jesper M. Mathiesen¹, Syed T. A. Shah⁷, Joseph A. Lyons⁷, Martin Caffrey⁷, Samuel H. Gellman⁴, Jan Steyaert^{5,6}, Georgios Skiniotis⁸, William I. Weiss^{1,9}, Roger K. Sunahara³ & Brian K. Kobilka¹

G protein-coupled receptors (GPCRs) are responsible for the majority of cellular responses to hormones and neurotransmitters as well as the senses of sight, olfaction and taste. The paradigm of GPCR signalling is the activation of a heterotrimeric GTP binding protein (G protein) by an agonist-occupied receptor. The β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) activation of Gs, the stimulatory G protein for adenylyl cyclase, has long been a model system for GPCR signalling. Here we present the crystal structure of the active state ternary complex composed of agonist-occupied monomeric β_2 AR and nucleotide-free Gs heterotrimer. The principal interactions between the β_2 AR and Gs involve the amino- and carboxy-terminal α -helices of Gs, with conformational changes propagating to the nucleotide-binding pocket. The largest conformational changes in the β_2 AR include a 14Å outward movement at the cytoplasmic end of transmembrane segment 6 (TM6) and an α -helical extension of the cytoplasmic end of TM5. The most surprising observation is a major displacement of the α -helical domain of Gs relative to the Ras-like GTPase domain. This crystal structure represents the first high-resolution view of transmembrane signalling by a GPCR.

29 SEPTEMBER 2011 | VOL 477 | NATURE | 549

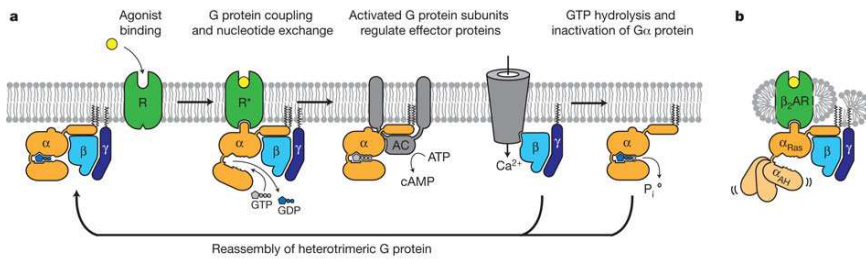
Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor–Gs protein complex

Soren G. F. Rasmussen^{1,2*}, Brian T. DeVree^{3*}, Yaozhong Zou¹, Andrew C. Kruse¹, Ka Young Chung¹, Tong Sun Kobilka¹, Foon Sun Thian¹, Pil Seok Chae⁴, Els Pardon^{5,6}, Diane Calinski³, Jesper M. Mathiesen¹, Syed T. A. Shah⁷, Joseph A. Lyons⁷, Martin Caffrey⁷, Samuel H. Gellman⁴, Jan Steyaert^{5,6}, Georgios Skiniotis⁸, William I. Weiss^{1,9}, Roger K. Sunahara³ & Brian K. Kobilka¹

G protein-coupled receptors (GPCRs) are responsible for the majority of cellular responses to hormones and neurotransmitters as well as the senses of sight, olfaction and taste. The paradigm of GPCR signalling is the activation of a heterotrimeric GTP binding protein (G protein) by an agonist-occupied receptor. The β_2 adrenergic receptor (β_2 AR) activation of Gs, the stimulatory G protein for adenylyl cyclase, has long been a model system for GPCR signalling. Here we present the crystal structure of the active state ternary complex composed of agonist-occupied monomeric β_2 AR and nucleotide-free Gs heterotrimer. The principal interactions between the β_2 AR and Gs involve the amino- and carboxy-terminal α -helices of Gs, with conformational changes propagating to the nucleotide-binding pocket. The largest conformational changes in the β_2 AR include a 14Å outward movement at the cytoplasmic end of transmembrane segment 6 (TM6) and an α -helical extension of the cytoplasmic end of TM5. The most surprising observation is a major displacement of the α -helical domain of Gs relative to the Ras-like GTPase domain. This crystal structure represents the first high-resolution view of transmembrane signalling by a GPCR.

29 SEPTEMBER 2011 | VOL 477 | NATURE | 549

G protein cycle for the $\beta 2AR$ -Gs complex



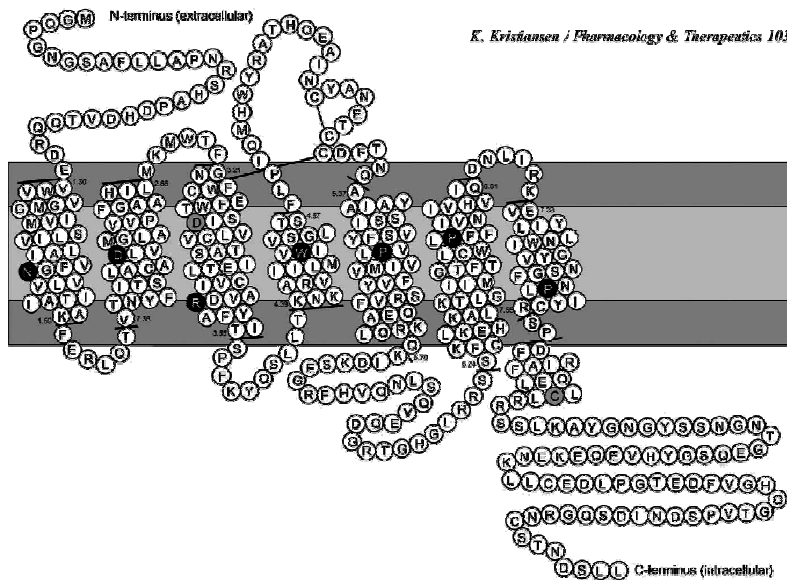
SGF Rasmussen et al. Nature 549-555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

nature

47



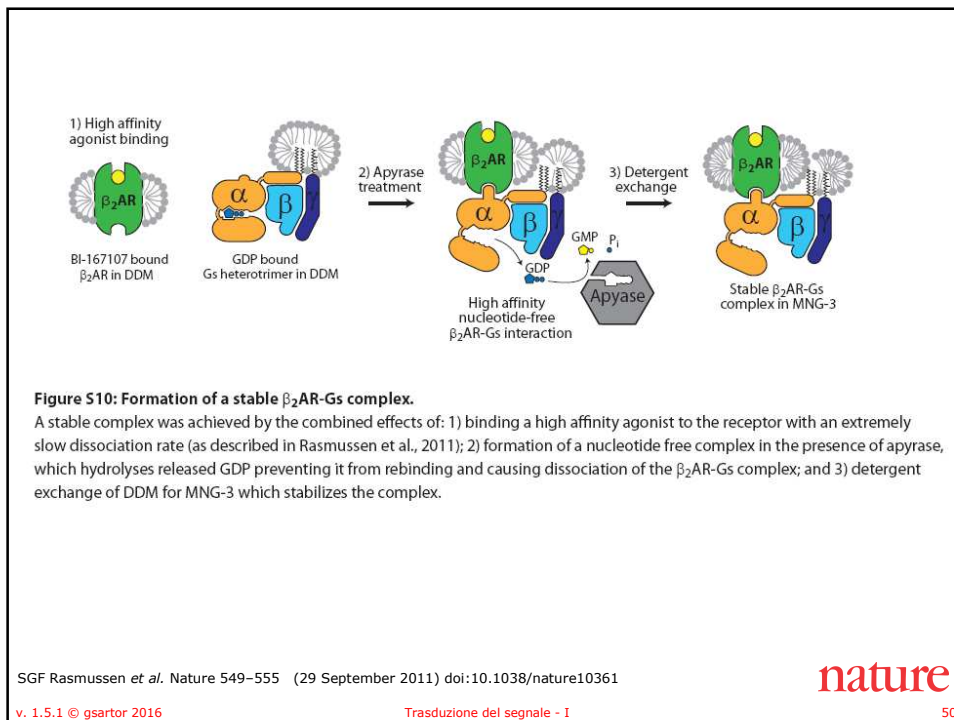
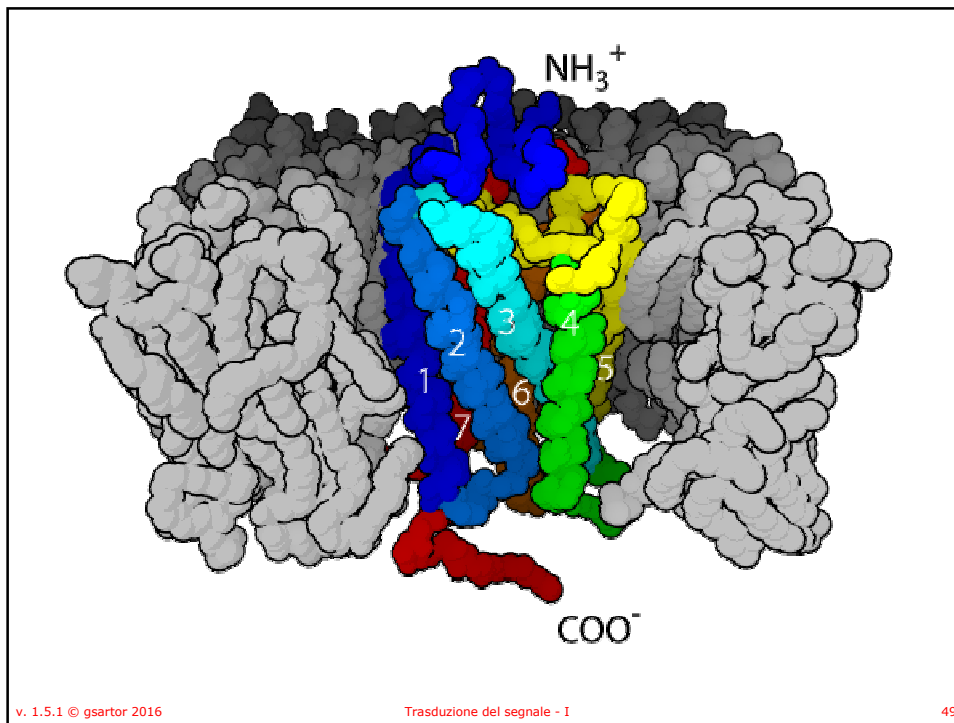
K. Kristiansen / Pharmacology & Therapeutics 103 (2004) 21-80

Fig. 1. Schematic representation of the membrane topology of the human β_2 adrenergic receptor. The localizations of TMHs in the human β_2 -adrenoceptor are indicated (black lines). The core and water-lipid interface regions of the lipid membrane are indicated with light gray and dark gray colors on the background. Each of the 7 TMHs have one characteristic residue (black circles with white text), which is found among the majority of family A receptors (Asn51(1.30); Asp79(2.50); Arg131(3.50); Trp211(4.50); Pro288(5.50); Pro323(6.50); and Pro323(7.50)). Disulfide bridge formation between Cys106/Cys191 and Cys184/Cys190 (Noda et al., 1994), a palmitoylation site (Cys341, gray color) in the C terminus (Mouillac et al., 1992). Asp(3.32) residue (gray color) is the counterion for the binding of protonated amine agonists and antagonists to biogenic amine receptors.

v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

48



Snapshot of a signalling complex

G-protein-coupled receptors initiate signalling pathways by forming complexes with agonist molecules and G proteins. The first crystal structure of such a complex is both reassuring and provocative. [SEE ARTICLE P 549](#) & [LETTER P 611](#)

THUE W. SCHWARTZ & THOMAS P. SAKMAR

540 | NATURE VOL 477 | 29 SEPTEMBER 2011

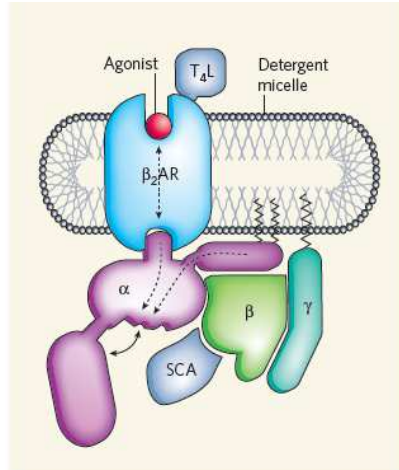


Figure 1 | Activated receptor-G-protein complex. Transmembrane G-protein-coupled receptors (GPCRs) form complexes with agonist molecules and G proteins to initiate a wide range of signalling pathways in cells. Rasmussen *et al.*¹ report the first crystal structure of a complete, activated GPCR signalling complex: the agonist-bound β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) in complex with its G protein, G_s . In this schematic of the complex, α , β and γ are the three subunits of G_s . Also pictured are the protein T4-lysozyme (T4L) and a single-chain antibody (SCA), which were incorporated into the complex to facilitate its crystallization. The detergent micelle acts in lieu of a cell membrane and maintains the structure of the complex. The zigzag lines on α and γ are endogenous lipid modifications that anchor the G protein to the micelle. Broken arrows within the α -subunit indicate structural changes that lead to the separation of its two domains (solid double-headed arrow), which allows the G protein to exchange one nucleotide (GDP) for another (GTP; nucleotides not shown). The broken, double-headed arrow in β_2 AR indicates the allosteric mechanism that connects G-protein binding to high-affinity agonist binding. (Graphic designed by Karina Åberg.)

v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

51



Figure S2: Crystals of the T4L- β_2 AR-Gs-Nb35 complex in sponge-like mesophase

SGF Rasmussen *et al.* Nature 549–555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

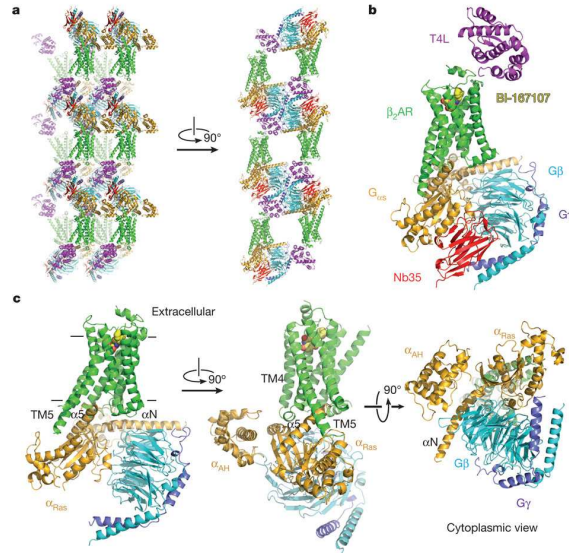
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

nature

52

Overall structure of the β 2AR-Gs complex



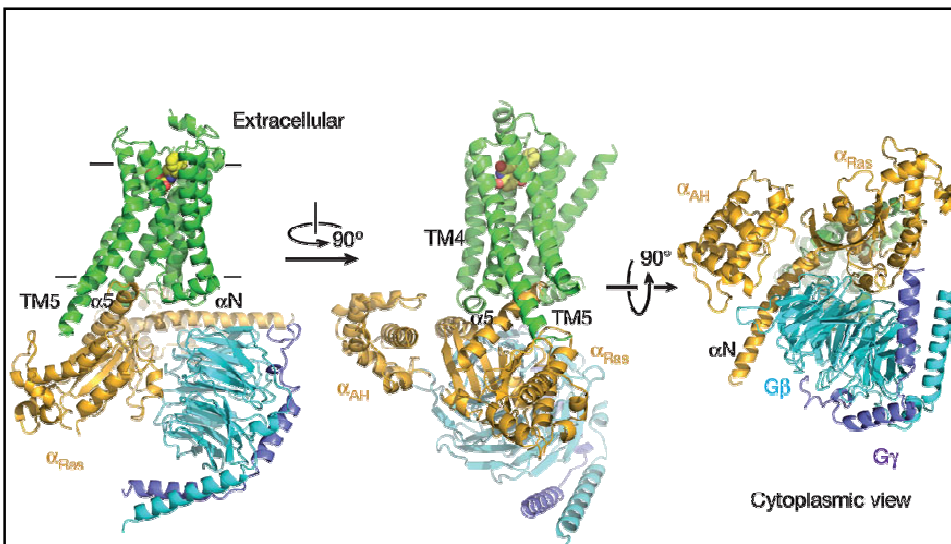
SGF Rasmussen et al. Nature 549-555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

nature

53

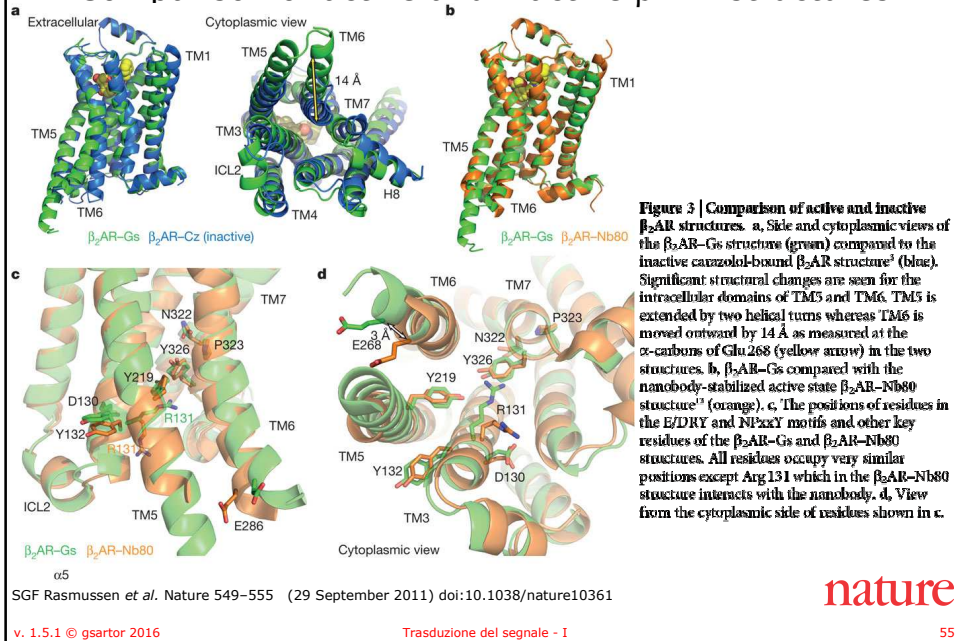


v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

54

Comparison of active and inactive β_2 AR structures



Receptor-G protein interactions

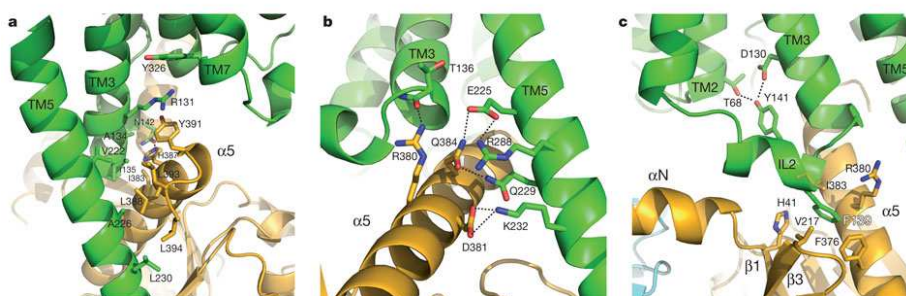


Figure 4 | Receptor-G protein interactions. **a**, **b**, The $\alpha 5$ -helix of Gs docks into a cavity formed on the intracellular side of the receptor by the opening of transmembrane helices 5 and 6. **a**, Within the transmembrane core, the interactions are primarily non-polar. An exception involves spacing of Tyr391 of the $\alpha 5$ -helix against Arg131 of the conserved DRY sequence in TM3 (see also Supplementary Fig. 3). Arg131 also packs against Tyr326 of the conserved

NPxxY sequence in TM7. **b**, As $\alpha 5$ -helix exits the receptor, it forms a network of polar interactions with TM5 and TM3. **c**, Receptor residues Thr98 and Asp130 interact with the K112 helix of the $\beta 3$ AR via Tyr141, positioning the helix so that Phe189 of the receptor docks into a hydrophobic pocket on the G protein surface, thereby structurally linking receptor-G protein interactions with the highly conserved DRY motif of the β_2 AR.

Receptor-G protein interactions

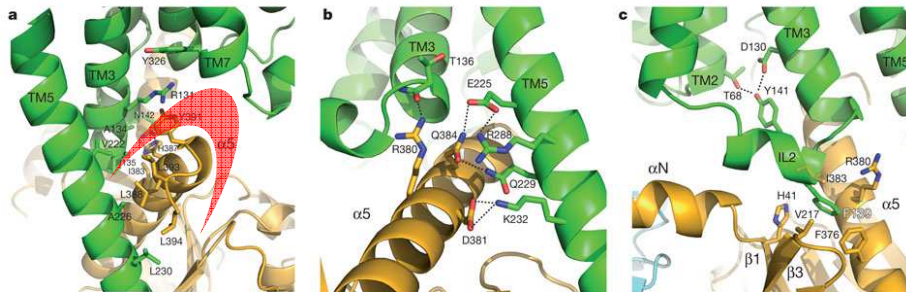


Figure 4 | Receptor-G protein interactions. a, b, The $\alpha 5$ -helix of Gs docks into a cavity formed on the intracellular side of the receptor by the pairing of transmembrane helices 5 and 6. a, Within the transmembrane core, the interactions are primarily non-polar. An exception involves spacing of Tyr291 of the $\alpha 5$ -helix against Arg131 of the conserved DRY sequence in TM3 (see also Supplementary Fig. 3). Arg131 also packs against Tyr326 of the conserved

NPxxY sequence in TM7. b, As $\alpha 5$ -helix exits the receptor it forms a network of polar interactions with TM3 and TM5. c, Receptor residues Thr68 and Asp130 interact with the ICL2 helix of the β_2 AR via Tyr141, positioning the helix so that Thr139 of the receptor docks into a hydrophobic pocket on the G protein surface, thereby structurally linking receptor-G protein interactions with the highly conserved DRY motif of the β_2 AR.

SGF Rasmussen et al. Nature 549–555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

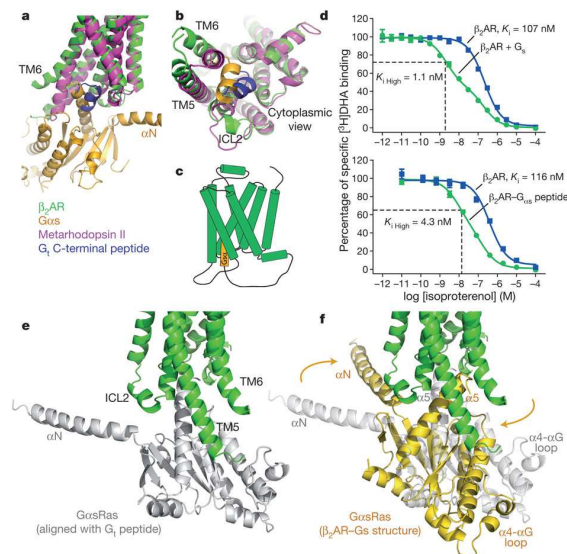
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

nature

57

Possible sequence of β_2 AR-Gs complex formation



SGF Rasmussen et al. Nature 549–555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

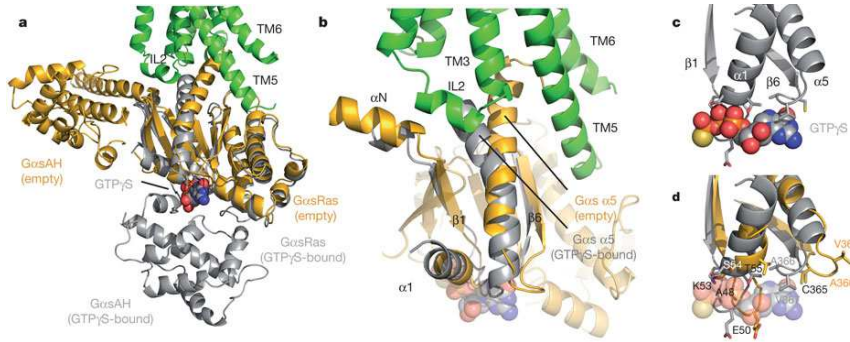
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Traduzione del segnale - I

nature

58

Conformational changes in G α s



SGF Rasmussen et al. Nature 549–555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

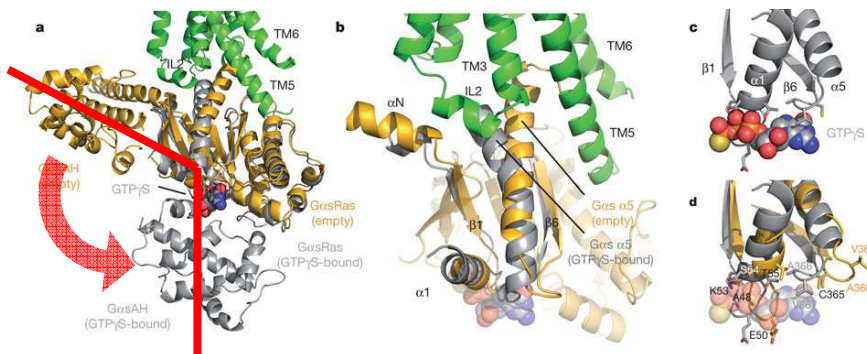
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Trasduzione del segnale - I

nature

59

Conformational changes in G α s



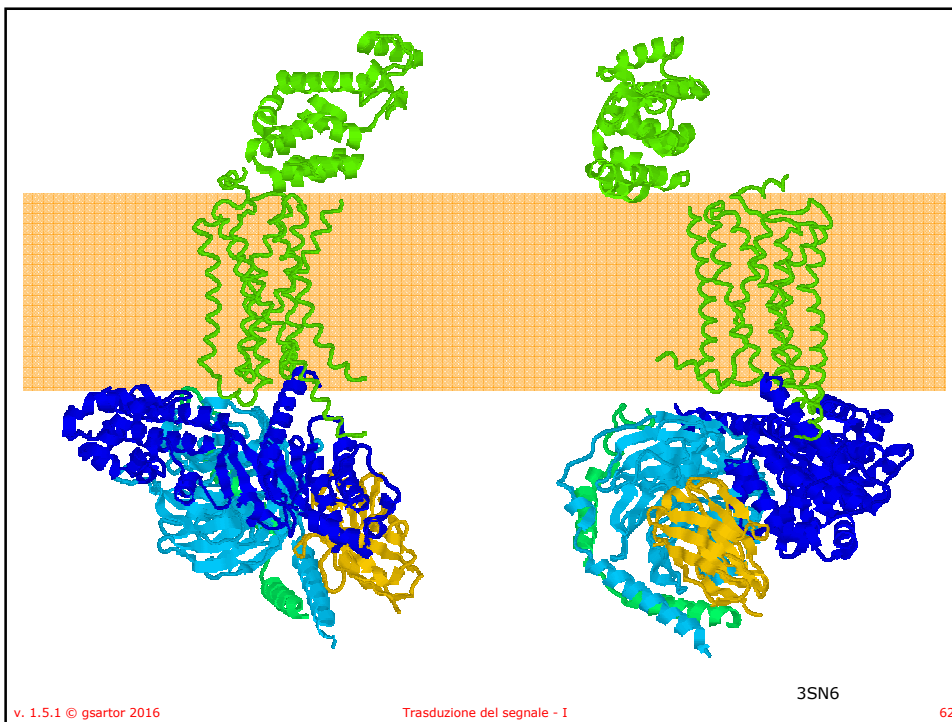
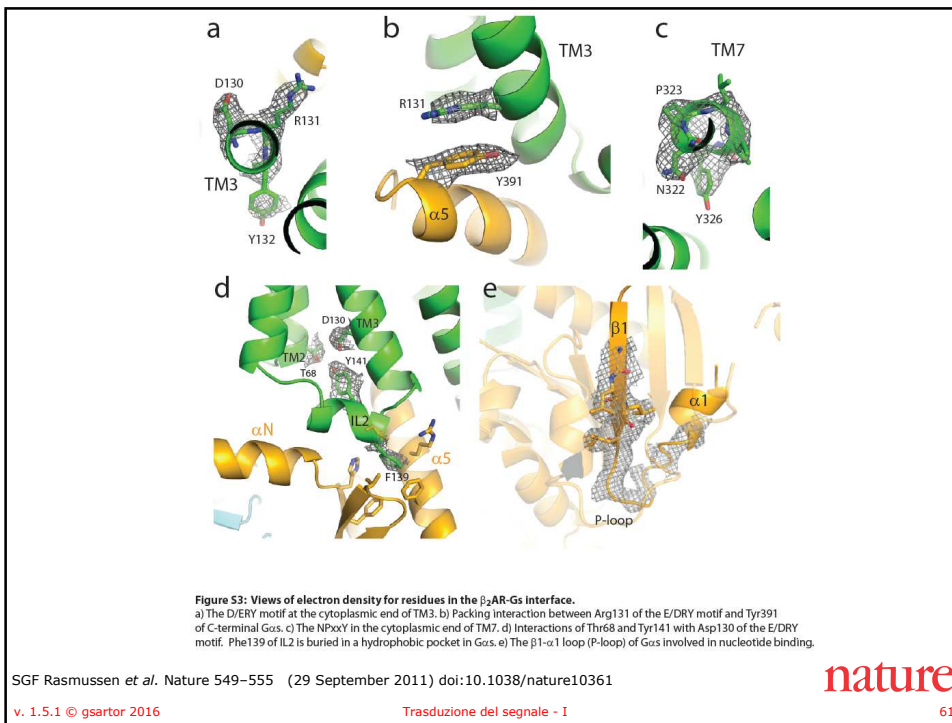
SGF Rasmussen et al. Nature 549–555 (29 September 2011) doi:10.1038/nature10361

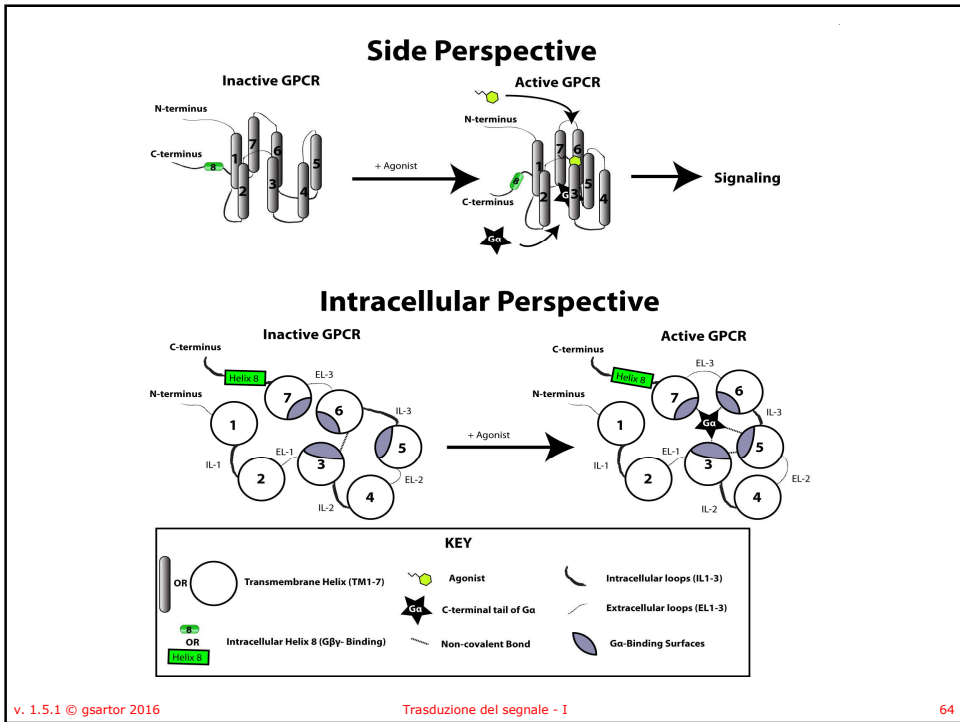
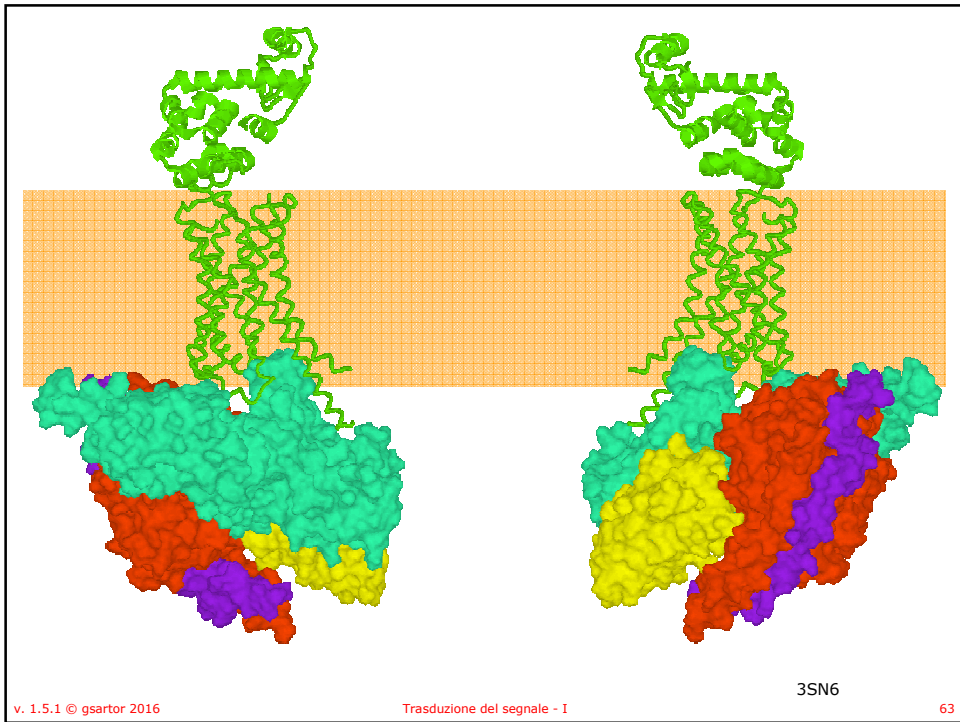
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Trasduzione del segnale - I

nature

60





Oligomeri

Table 1 | GPCRs that form homo-oligomers

Receptor

Family 1 receptors

A₁ adenosine
 β₂-adrenoreceptor
 AT₁ angiotensin II
 B₂ bradykinin
 CCR2 chemokine
 CCR5 chemokine
CCR4 chemokine
 D₁ dopamine
 D₂ dopamine
 D₃ dopamine
H₂ histamine
H₃ histamine
 Luteinizing hormone/hCG
 MT₁ melatonin
 MT₂ melatonin
M₂ muscarinic acetylcholine
M₃ muscarinic acetylcholine
 μ-opioid

δ-opioid
 κ-opioid
 5-HT_{1D} serotonin
 5-HT_{1E} serotonin
 SSTR_{1A} somatostatin
 SSTR_{2B} somatostatin
 SSTR_{3D} somatostatin
 SSTR_{4A} somatostatin
 Thyrotropin
 V₂ vasopressin

Family 2 receptors

IgG heparin
 Gonadotropin-releasing hormone

Family 3 receptors

Metabotropic mGlu₁
 Metabotropic mGlu₅
 Ca²⁺-sensing
 GABA_{Aα1}
 GABA_{Aα2}

Family 4 receptor

Yeast α-factor receptor

Table 2 | GPCRs that form hetero-oligomers

Receptor

5-HT_{1D}-5-HT_{1E} serotonin
 A₁ adenosine-D₁ dopamine
 A₁ adenosine-mGlu₁
A₁ adenosine-P2Y₁ purinergic
 A₂ adenosine-D₂ dopamine
AT₁-AT₂ angiotensin
 AT₁ angiotensin-B₂ bradykinin
 CCR2-CCR5 chemokine
 D₂-D₃ dopamine
 GABA_{Aα1}-GABA_{Aα2}
 M₂-M₃ muscarinic acetylcholine
 MT₁-MT₂ melatonin
 SSTR_{1A}-SSTR_{2B} somatostatin
 SSTR_{1A} somatostatin-μ-opioid
 SSTR_{1A}-SSTR_{3D} somatostatin
 SSTR_{1A} somatostatin-D₃ dopamine
T1R1-T1R3 amino-acid taste
T1R2-T1R3 amino-acid taste
 δ- and κ-opioid
 μ- and δ-opioid
 δ-opioid-β₂-adrenoreceptor
 κ-opioid-β₂-adrenoreceptor

G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR OLIGOMERIZATION AND ITS POTENTIAL FOR DRUG DISCOVERY

Steven B. George¹, Brian E. O'Donnell² and Samuel B. Lee¹

NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY

808 | OCTOBER 2002 | VOLUME 1



Proteine G

- Il genoma umano contiene:
 - 20 geni che codificano per subunità α
 - 5 geni per subunità β
 - 6 geni per subunità γ
 - In teoria almeno 1000 combinazioni diverse.
 - Amplificazione e diversificazione del segnale

Table 1 | Classification and functional properties of G α subunits*

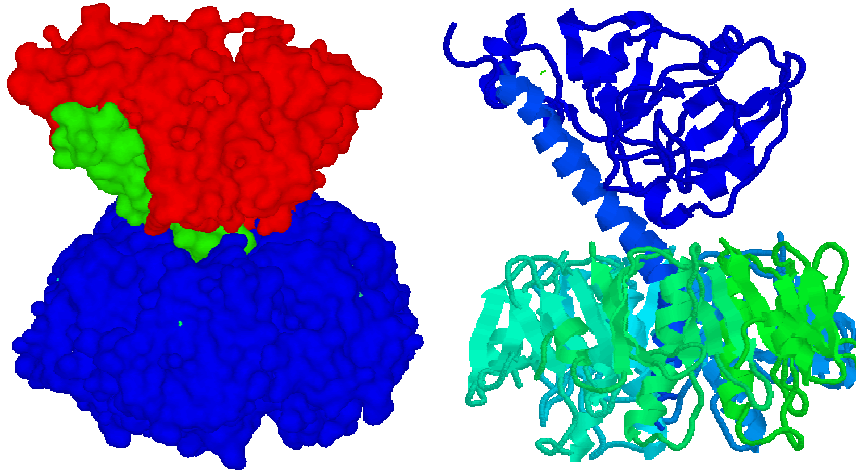
Family [†]	Isoform	Gene	Expression	Effectors	PTX/CTX sensitivity
G _s	G α_{s1} ^(a)	<i>GNAS</i>	Ubiquitous	AC \uparrow	CTX
	G α_{s2} ^(b)	<i>GNAS</i>	Neuronal, neuroendocrine	AC \uparrow	CTX
	G α_{s3} ^(c)	<i>GNAL</i>	Olfactory epithelium, brain, testes, pancreas	AC \uparrow	CTX
G _i	G α_{i1}	<i>GNAI1</i>	Retinal rods, taste cells	cGMP-PDE \uparrow	CTX, PTX
	G α_{i2}	<i>GNAI2</i>	Retinal cones	cGMP-PDE \uparrow	CTX, PTX
	G α_{i3}	<i>GNAI3</i>	Taste cells, GI brush cells	PDE \uparrow ?	CTX, PTX
	G α_{i4}	<i>GNAI1</i>	Widely, preferentially neuronal	ACI, VVI \downarrow , (GIRK \uparrow , PLC β \uparrow ?) ^(d)	PTX, (CTX)
	G α_{i5}	<i>GNAI2</i>	Ubiquitous	ACI, VVI \downarrow , (GIRK \uparrow , PLC β \uparrow , PI3K \uparrow) ^(e)	PTX, (CTX)
	G α_{i6}	<i>GNAI3</i>	Widely, preferentially non-neuronal	ACI, VVI \downarrow , (GIRK \uparrow , PLC β \uparrow , PI3K \uparrow ?) ^(f)	PTX, (CTX)
	G α_{i7}	<i>GNAO1</i>	Neuronal, neuroendocrine, cardiac myocytes?	AC \downarrow ?, VDCC \downarrow ?	PTX, (CTX)
G _q	G α_{q1}	<i>GNAQ</i>	Ubiquitous	PLC β \uparrow , Rho-GEF	
	G α_{q2}	<i>GNA11</i>	Widely, not platelets	PLC β \uparrow , Rho-GEF	
	G α_{q3}	<i>GNA14</i>	Testes, hematopoietic cells and tissues	PLC β \uparrow	
	G α_{q4}	<i>GNA15</i>	Hematopoietic cells and tissues	PLC β \uparrow	
G ₁₂	G α_{12}	<i>GNA12</i>	Ubiquitous	Rho-GEF \uparrow , Btk \uparrow , Gap1 TM \uparrow , cadherin	
	G α_{13}	<i>GNA13</i>	Ubiquitous	Rho-GEF \uparrow , radixin	

*For selected reviews, see REFS 204–224. †Heterotrimeric G proteins are composed of three different subunits, and are classified into four subfamilies on the basis of their G α amino-acid-sequence similarity. (a) and (b) indicate short and long splice variants of G α_{s1} ; (c) and (d) indicate additional (extra)-long splice variants of G α_{s1} . ‡Receptor coupling of G α_{s2} has not been demonstrated so far. §Regulation of the effector presumably depends on direct interaction with G $\beta\gamma$ dimers released from a PTX-sensitive heterotrimeric G protein. For additional effectors, see TABLE 3. ¶G α_{i7} corresponds to deaminated G α_{i1} . (¶)Asn \rightarrow Asp, representing 93% of total G α_{i1} in brain. *G α_{i4} and G α_{i5} are the mouse and human homologues of the *GNA15* gene product, respectively. † = stimulatory; ‡ = inhibition; § = AC, adenylyl cyclase; Btk, Bruton's tyrosine kinase; cGMP-PDE, cGMP-dependent phosphodiesterase; CTX, cholera toxin sensitive; (CTX), CTX-sensitive only in the presence of agonist-activated receptors; Gap1TM, Ras GTPase-activating protein; GI, gastrointestinal; (GI), GI; (GIRK), G-protein-regulated inward rectifier K⁺ channel; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC β , phospholipase C β ; (PLC), phospholipase C; (PI3K), phosphatidylinositol 3-kinase; (PI3K), C-protein-regulated inward rectifier K⁺ channel; VDCC, voltage-dependent Ca²⁺ channel. Table prepared by Bernd Nürnberg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Klinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany; e-mail: bernd.nuernberg@uni-duesseldorf.de.

The state of GPCR research in 2004

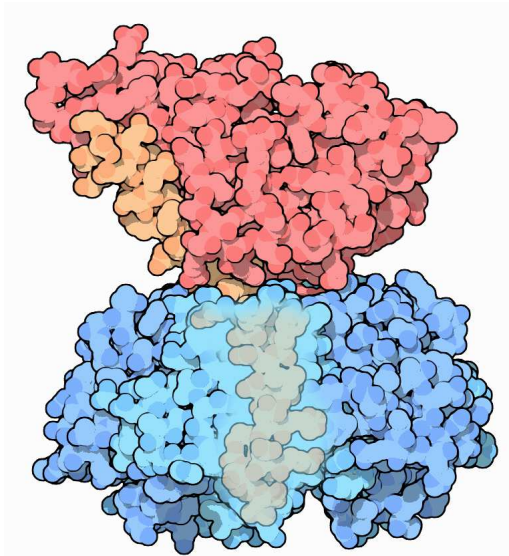
Clare Ellis & The Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants.
Nature Reviews – Drug Discovery p577 | doi:10.1038/nrd1458

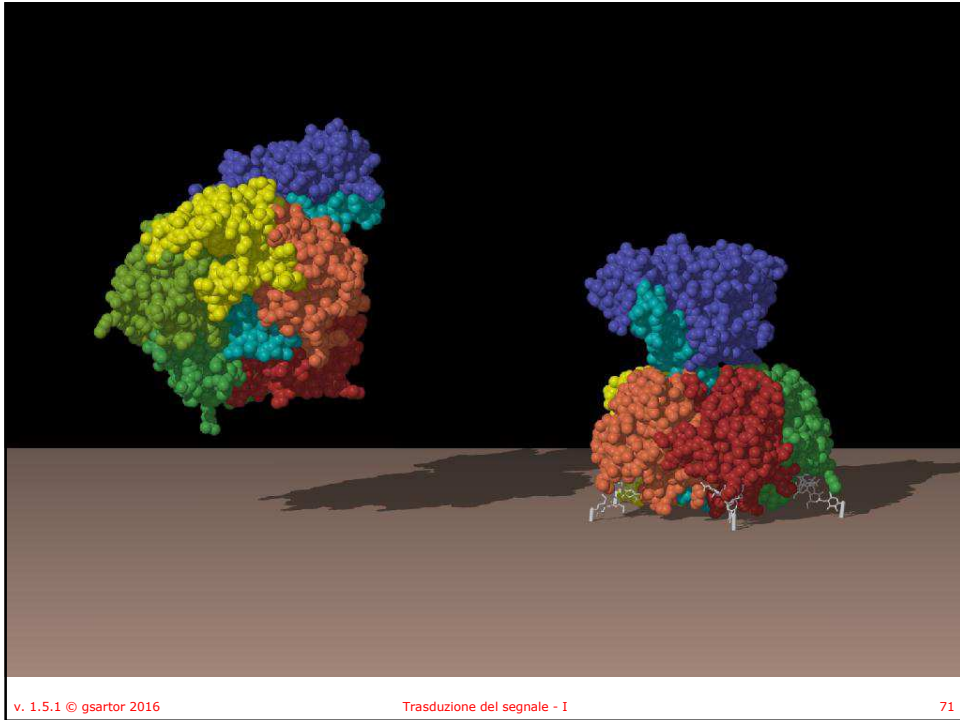
Colera



1xtc

Tossina colerica





Meccanismo d'azione

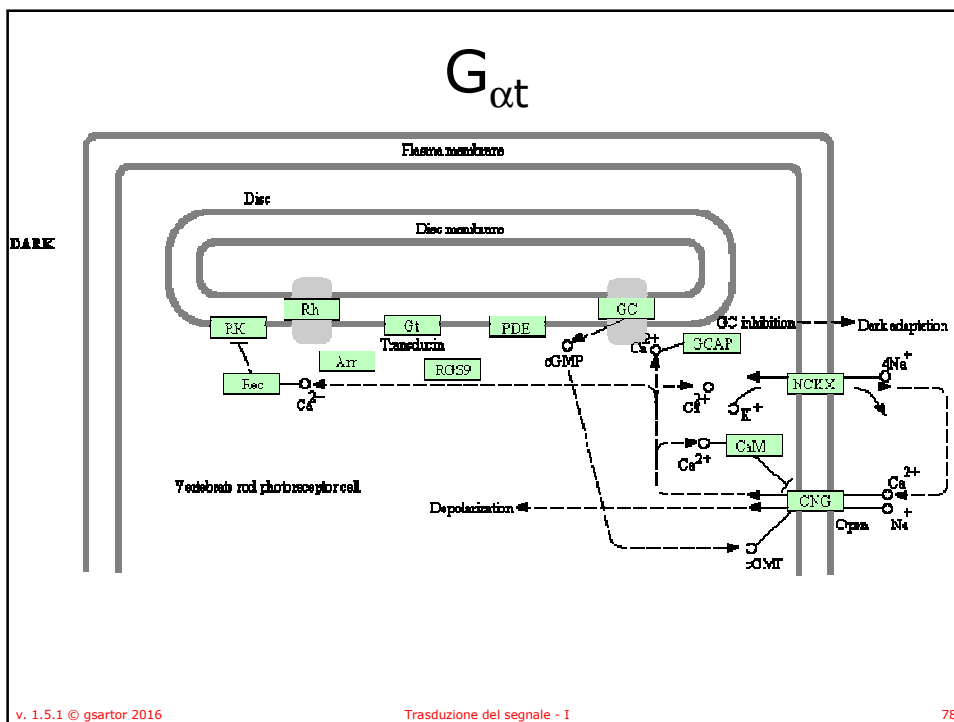
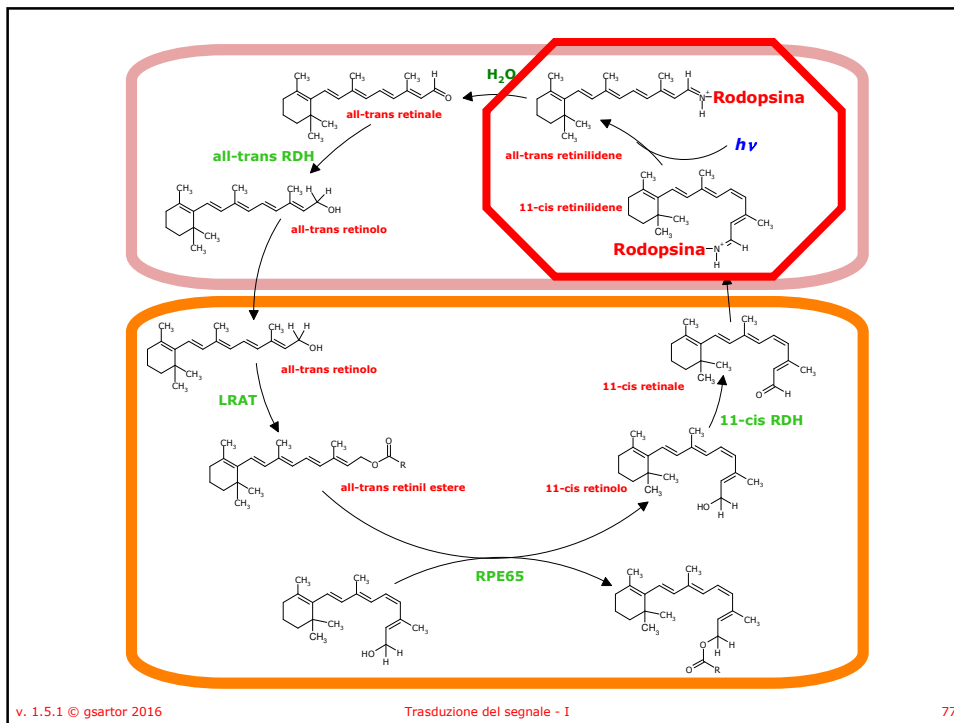
- Il bersaglio della tossina è il funzionamento della Adenilato ciclastasi presente nelle membrane basolaterali delle cellule epiteliali dell'intestino la cui attività viene regolata dai recettori accoppiati alle proteine G:
- La tossina si lega alla cellula attraverso il pentamero B che riconosce un recettore ganglioside inserito nella membrana plasmatica delle cellule bersaglio;
- La subunità A entra nella cellula, probabilmente attraverso endosomi, ed è tagliata da proteasi in due peptidi A1 e A2.

Meccanismo d'azione

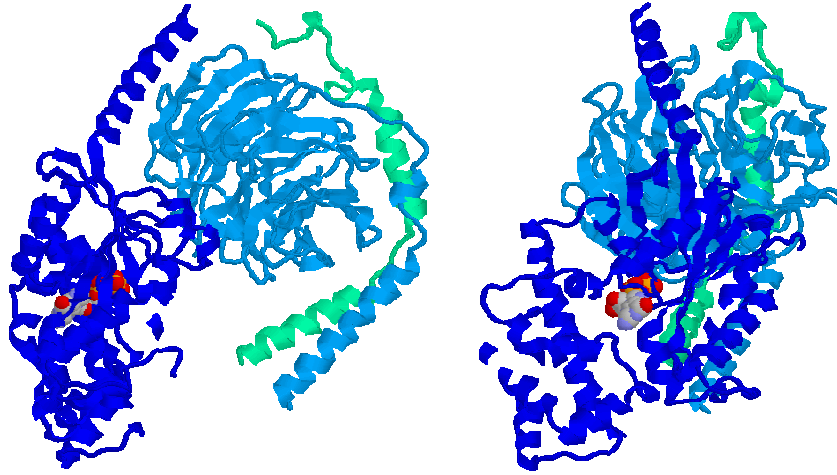
- Il peptide A1 è attivato e trasferisce un ADP-ribosio (ADPR) alla subunità $G_{\alpha s}$ la quale si dissocia dall'eterotrimerico $G_{\alpha\beta\gamma}$ e attiva la Adenilato ciclasi, aumentando la concentrazione di cAMP nella cellula.
- Sono stati ipotizzati tre possibili modi con i quali la tossina attiva la Adenilato ciclasi:
 1. Il peptide A1 trasloca attraverso la membrana apicale lasciando legato alla membrana il pentamero B;
 2. Il peptide A1 ADP-ribosila la $G_{\alpha s}$ nella membrana apicale e questa attraversa la cellula per agire sulla Adenilato ciclasi;
 3. L'intera tossina entra nella cellula attraverso l'endosoma e la subunità A è quindi traslocata attraverso la membrana, il peptide A1 ADP-ribosila la $G_{\alpha s}$ localizzata nella membrana basolaterale, probabilmente dopo fusione tra l'endosoma e la membrana plasmatica

Famiglie di proteine G_{α}

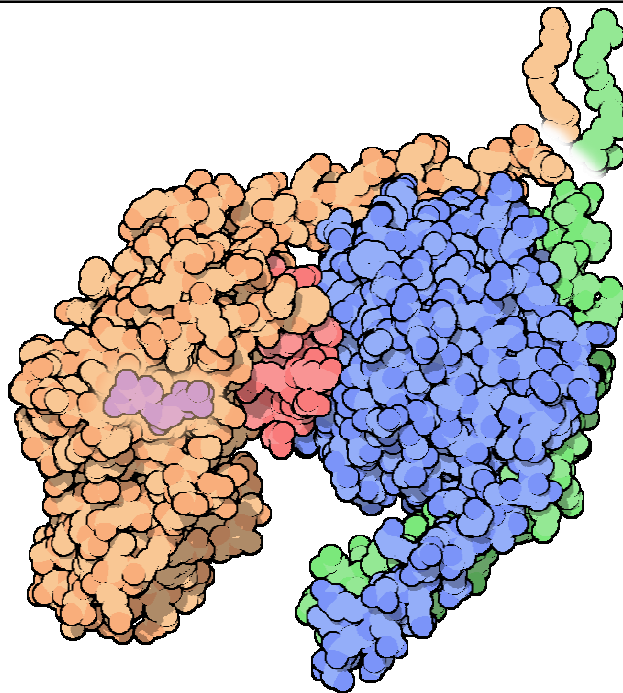
Classe	Segnale	Effetto
G_s	Amine β -adrenergiche, glucagone, ecc.	Stimola Adenilato ciclasi
G_i	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Inibisce Adenilato ciclasi
G_t	Fotoni	Stimola cGMP diesterasi
G_q	Acetilcolina, Amine α -adrenergiche, ecc.	Aumenta sintesi IP_3 e Ca^{++} intracellulare
G_{13}	Trombina ecc.	Stimola scambio Na^+/H^+

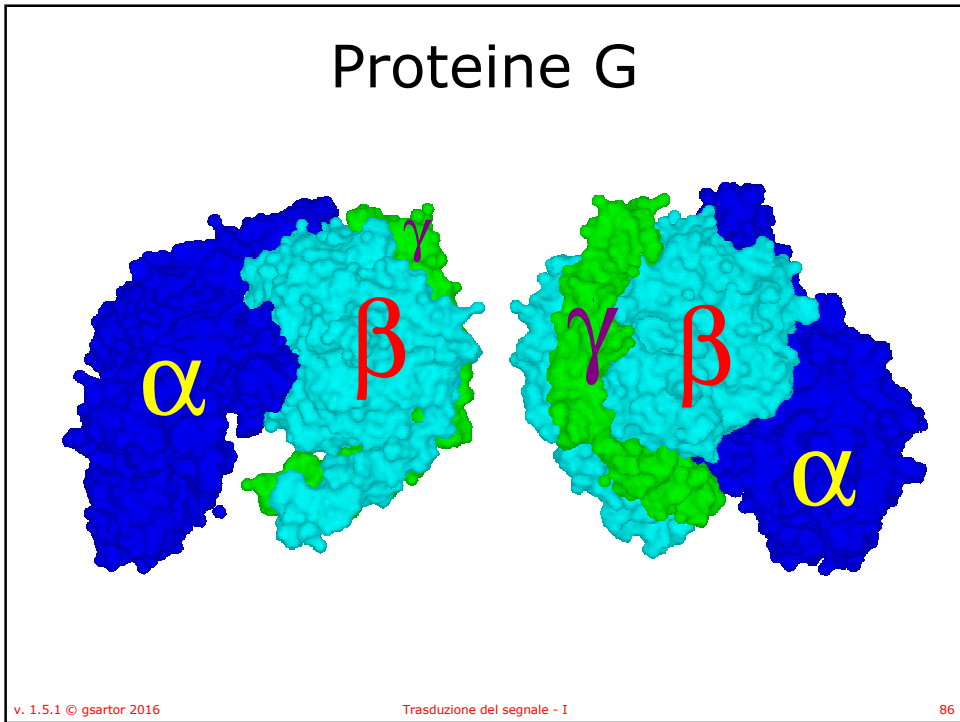
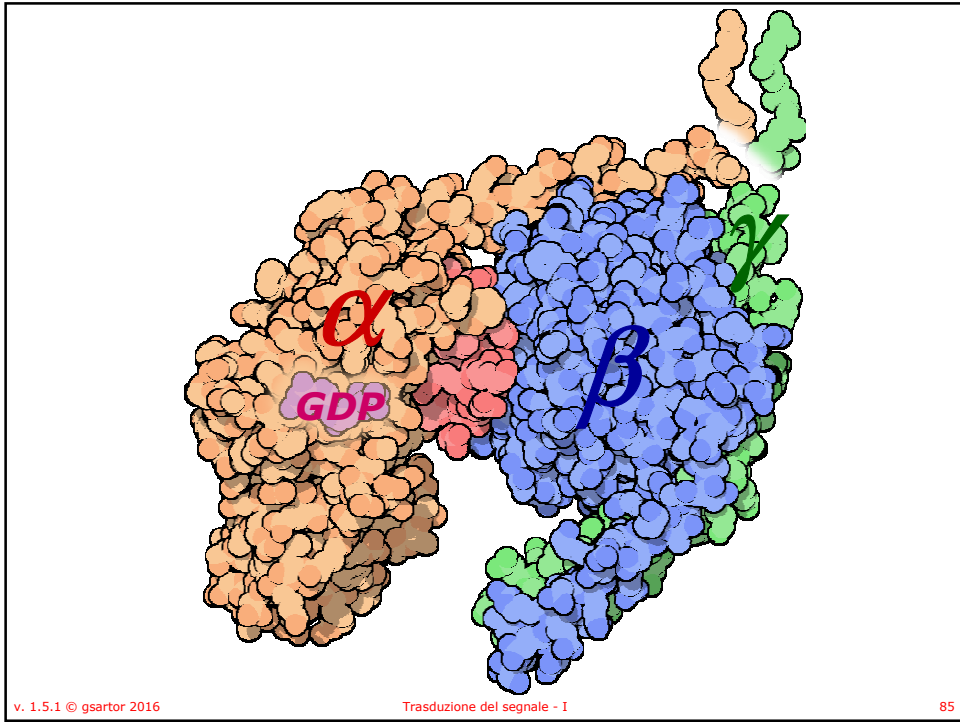


Proteine G

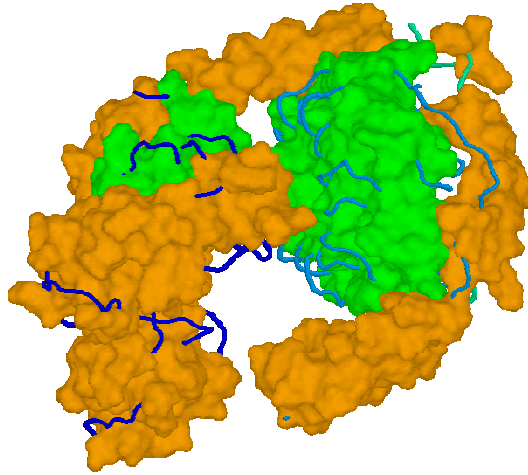


1GOT





α -eliche e β -sheets



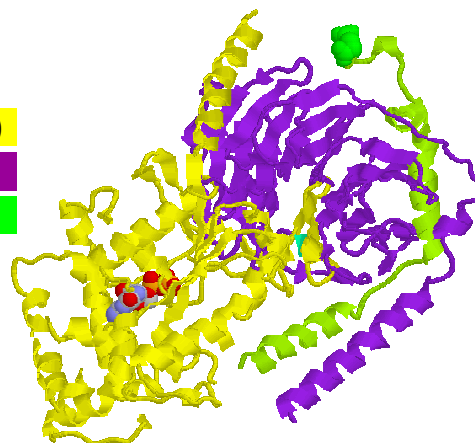
Proteine G

- Il tipico eterotrimerico delle proteine G consiste in:

- subunità α (45-47 kD)

- subunità β (35 kD)

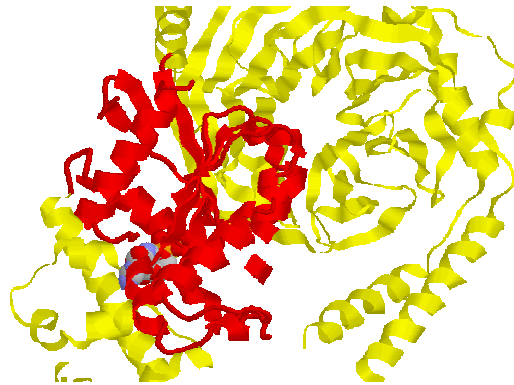
- subunità γ (7-9 kD)



1GOT

Proteine G – subunità α

- La subunità α dell'eterotrimerico consiste in due domini:
- Il dominio GTPasico e il dominio α -elica, il dominio GTPasico è simile alla struttura di P21ras e agli altri membri della superfamiglia delle GTPasi:
 - Consiste in una struttura a cinque eliche che circondano un β -sheet con cinque strand paralleli e uno antiparallelo;
 - La seconda delle eliche è un'elica 3_{10} .



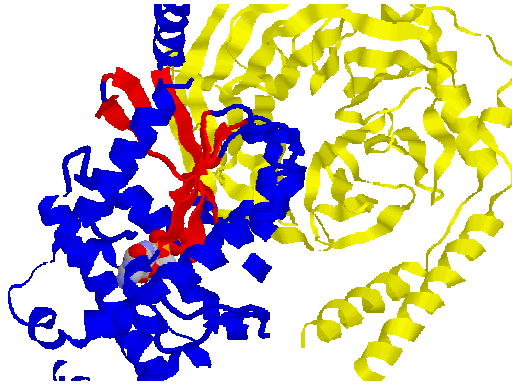
Proteine G – subunità α

- La subunità α dell'eterotrimerico consiste in due domini:
- Il dominio GTPasico e il dominio α -elica, il dominio GTPasico è simile alla struttura di P21ras e agli altri membri della superfamiglia delle GTPasi:
 - Consiste in una struttura a **cinque eliche** che circondano un β -sheet con cinque strand paralleli e uno antiparallelo;
 - La seconda delle eliche è un'elica 3_{10} .



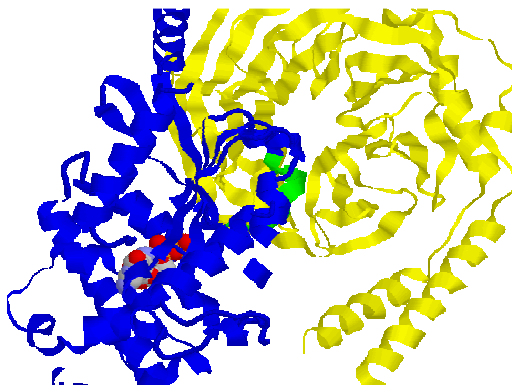
Proteine G – subunità α

- La subunità α dell'eterotrimerico consiste in due domini:
- Il dominio GTPasico e il dominio α -elica, il dominio GTPasico è simile alla struttura di P21ras e agli altri membri della superfamiglia delle GTPasi:
 - Consiste in una struttura a cinque eliche che circondano un β -sheet con cinque strand paralleli e uno antiparallelo;
 - La seconda delle eliche è un'elica 3_{10}



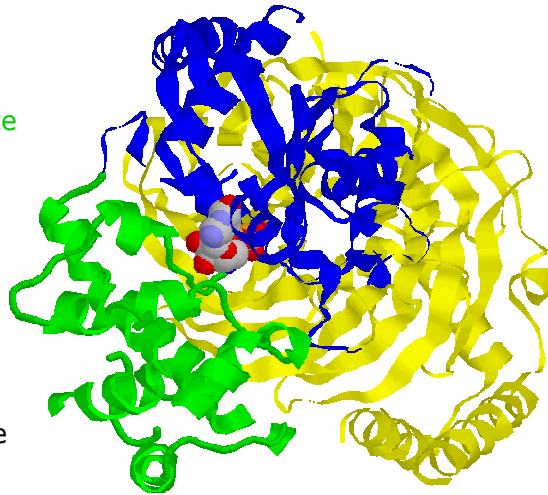
Proteine G – subunità α

- La subunità α dell'eterotrimerico consiste in due domini:
- Il dominio GTPasico e il dominio α -elica, il dominio GTPasico è simile alla struttura di P21ras e agli altri membri della superfamiglia delle GTPasi:
 - Consiste in una struttura a cinque eliche che circondano un β -sheet con cinque strand paralleli e uno antiparallelo;
 - La seconda delle eliche è un'elica 3_{10} .



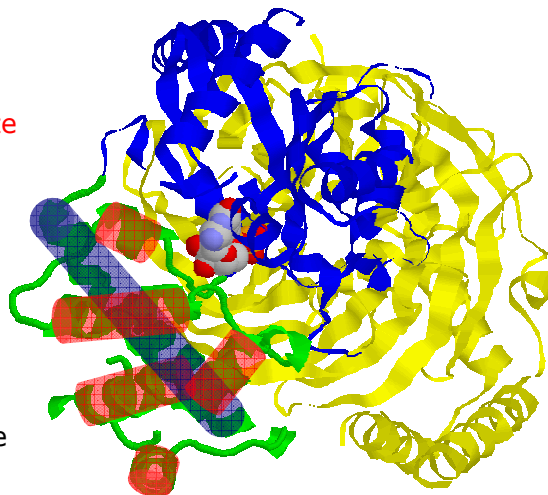
Proteine G – subunità α

- Il dominio α -elica è costituito da una lunga elica centrale circondata da cinque eliche più corte
- Il dominio α -elica è connesso al dominio GTPasico attraverso due strands:
 - linker 1 (54-58)
 - linker 2 (173-179).
- Tra i due linker è posizionata la fenditura che accoglie il nucleotide (GTP o GDP).



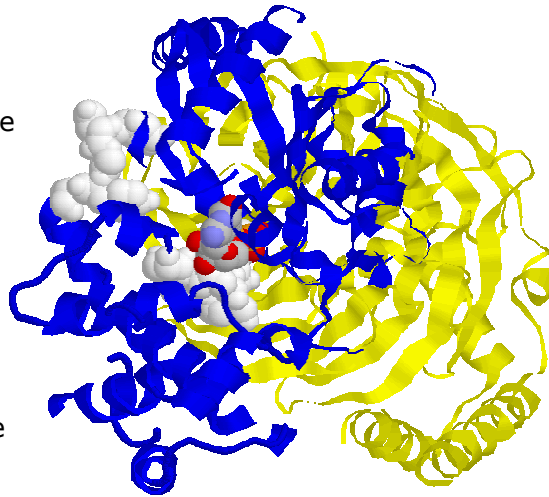
Proteine G – subunità α

- Il dominio α -elica è costituito da una lunga elica centrale circondata da cinque eliche più corte
- Il dominio α -elica è connesso al dominio GTPasico attraverso due strands:
 - linker 1 (54-58)
 - linker 2 (173-179).
- Tra i due linker è posizionata la fenditura che accoglie il nucleotide (GTP o GDP).



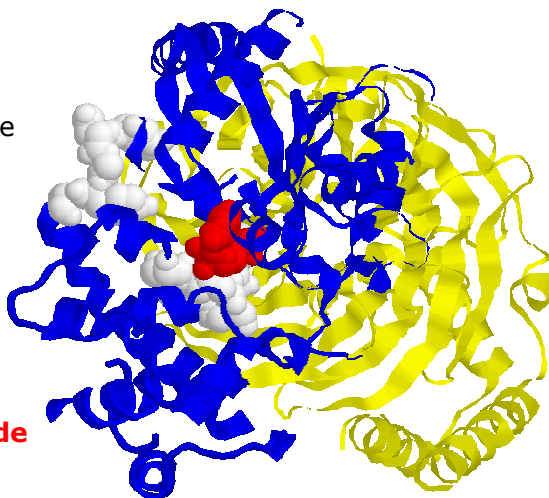
Proteine G – subunità α

- Il dominio α -elica è costituito da una lunga elica centrale circondata da cinque eliche più corte
- Il dominio α -elica è connesso al dominio GTPasico attraverso due strands:
 - linker 1 (54-58)
 - linker 2 (173-179).
- Tra i due linker è posizionata la fenditura che accoglie il nucleotide (GTP o GDP).



Proteine G – subunità α

- Il dominio α -elica è costituito da una lunga elica centrale circondata da cinque eliche più corte
- Il dominio α -elica è connesso al dominio GTPasico attraverso due strands:
 - linker 1 (54-58)
 - linker 2 (173-179).
- Tra i due linker è posizionata la fenditura che accoglie **il nucleotide (GTP o GDP)**.

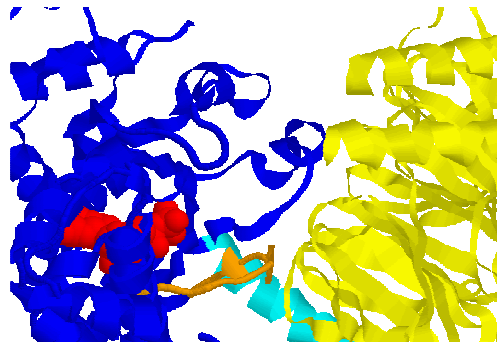


Proteina G

- La subunità α dell'eterotrimerico cambia conformazione quando il GDP è scambiato con il GTP
- Vi è la dissociazione dal complesso delle subunità β - γ e il complesso β - γ può agire da segnale legandosi a una proteina bersaglio attivandola o disattivandola.

Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - **Switch I: residui 173-183;**
 - Switch II: residui 195-215;
 - Switch III: residui 227-238.



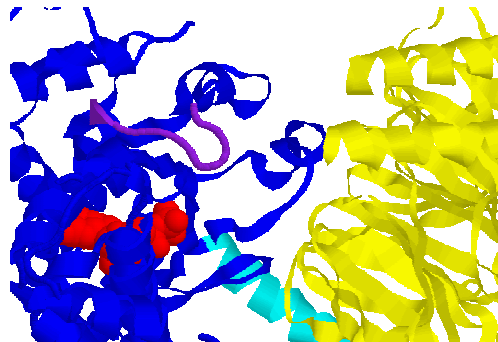
Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - Switch I: residui 173-183;
 - **Switch II: residui 195-215;**
 - Switch III: residui 227-238.



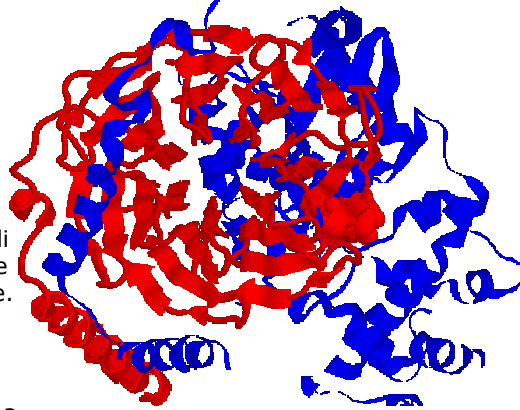
Proteina G

- I cambiamenti strutturali indotti dallo scambio del nucleotide sono localizzati alla superficie della subunità α a contatto con la β inclusa l' α -elica della subunità α e le tre regioni adiacenti
- Poiché la funzione segnale e l'attività GTPasica sono "accese" e "spente" da questo cambiamento conformazionale si parla di
 - Switch I: residui 173-183;
 - Switch II: residui 195-215;
 - **Switch III: residui 227-238.**



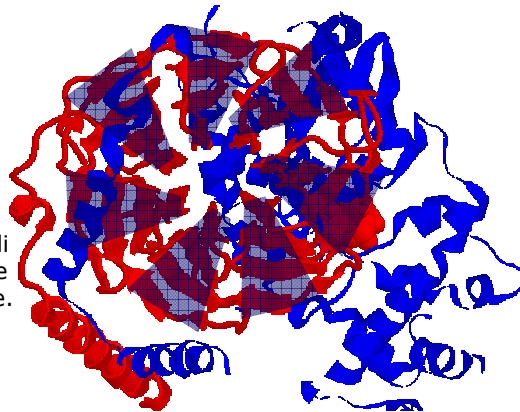
Proteine G – subunità β

- La struttura della **subunità β** dell'eterotrimerico è estremamente interessante.
- È un "β-propulsore" formato da sette domini β-sheet arrangiate come lame in un propulsore
- L'estremità N-terminale della subunità β contiene un α -elica di 25 residui (26-45) e un loop che connette l'elica con il propulsore.
- Le lame del propulsore sono fatte di un β -sheet antiparallelo avvolto su sé stesso.
- La presenza di questa struttura a sette lame sembra esser coinvolta nel legame con le proteine bersaglio.



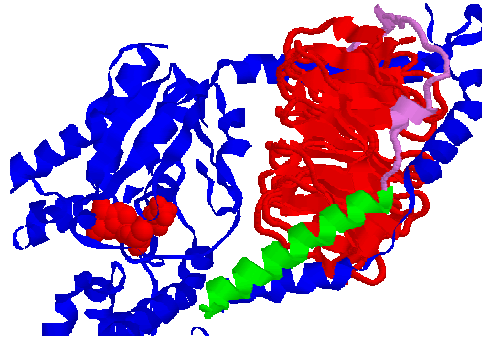
Proteine G – subunità β

- La struttura della **subunità β** dell'eterotrimerico è estremamente interessante.
- È un "β-propulsore" formato da sette domini β-sheet arrangiate come **lame** in un propulsore
- L'estremità N-terminale della subunità β contiene un α -elica di 25 residui (26-45) e un loop che connette l'elica con il propulsore.
- Le lame del propulsore sono fatte di un β -sheet antiparallelo avvolto su sé stesso.
- La presenza di questa struttura a sette lame sembra esser coinvolta nel legame con le proteine bersaglio.



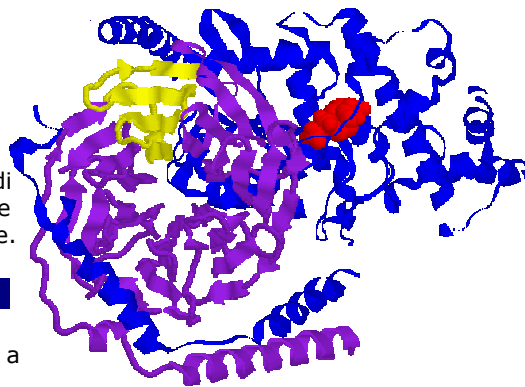
Proteine G – subunità β

- La struttura della subunità β dell'eterotrimerico è estremamente interessante.
- È un "β-propulsore" formato da sette domini β-sheet arrangiate come lame in un propulsore
- L'estremità N-terminale della subunità β contiene un α -elica di 25 residui (26-45) e un loop che connette l'elica con il propulsore
- Le lame del propulsore sono fatte di un β-sheet antiparallelo avvolto su sé stesso.
- La presenza di questa struttura a sette lame sembra esser coinvolta nel legame con le proteine bersaglio.



Proteine G – subunità β

- La struttura della subunità β dell'eterotrimerico è estremamente interessante.
- È un "β-propulsore" formato da sette domini β-sheet arrangiate come lame in un propulsore
- L'estremità N-terminale della subunità β contiene un α -elica di 25 residui (26-45) e un loop che connette l'elica con il propulsore.
- Le lame del propulsore sono fatte di un β-sheet antiparallelo avvolto su sé stesso.
- La presenza di questa struttura a sette lame sembra esser coinvolta nel legame con le proteine bersaglio.



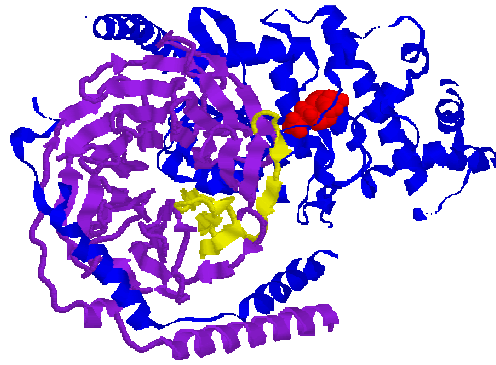
Proteine G – subunità β

- La subunità β contiene anche il motivo WD :

[x6-94-(GH-x23-41-WD)]

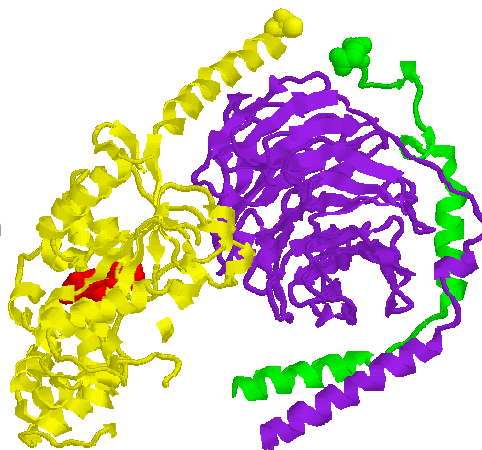
che possiede un dominio N-terminale variabile seguito da un core di lunghezza costante legato attraverso una coppia GH (Gly-His) ad una estremità ed da una coppia WD (Trp-Asp) all'altra

- Proteine che possiedono questo motivo contengono generalmente da quattro ad otto motivi connessi.



Proteine G – Interazione con la membrana

- Sia la subunità α che la subunità γ sono ancorate ai lipidi della membrana.
- La subunità α può avere il suo N-terminale legato ad una catena miristoile o palmitoile mentre la subunità γ può essere legata a farnesile o geranylgeranile al C-terminale
- I due terminali sono giustapposti suggerendo una stretta interazione con il bilayer.



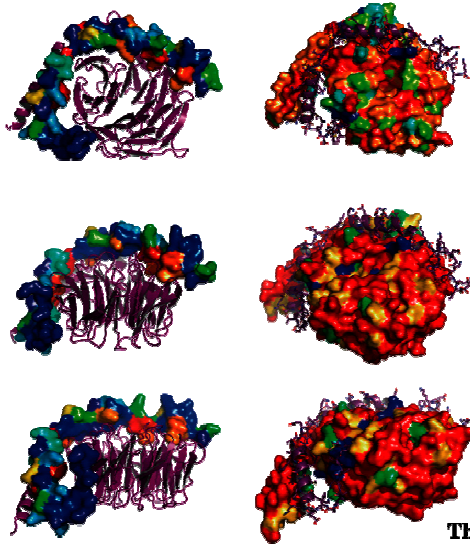


Fig. 3. Structural mapping of $G\beta\gamma$ subunits. Modeling of conserved and nonconserved regions of $G\beta_{1,3}$ and $G\gamma_{1,12}$, based on the published structures of $G\beta_{1,71}$ and $G\gamma_{1,70}$. SWISS MODEL was used to generate structures. The align feature (cluster) in Pymol was used to align the different subunits. Probscan (Duprez et al., 2006) was used to color the gradient of conservation (red: conserved, blue: nonconserved). Views from three different vantage points are presented with either the $G\gamma$ (left) or $G\beta$ (right) colored using Probscan. Nonconserved N termini, large, and C termini of $G\gamma$ subunits are located on the external face of the $G\beta\gamma$ subunit. $G\beta$ subunits show greater conservation (especially on the face which contacts $G\alpha$).

The Expanding Roles of $G\beta\gamma$ Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action

Shahmoradian M, Miani M, Zhou S, Gao S, Peter S, Kottmann J, Sun F, Philippe L, Lavie A, Jean-Claude L, Gregory J, Miller G, and Thomas R. H. (2013)

Pharmacol Rev 65:545-577, April 2013

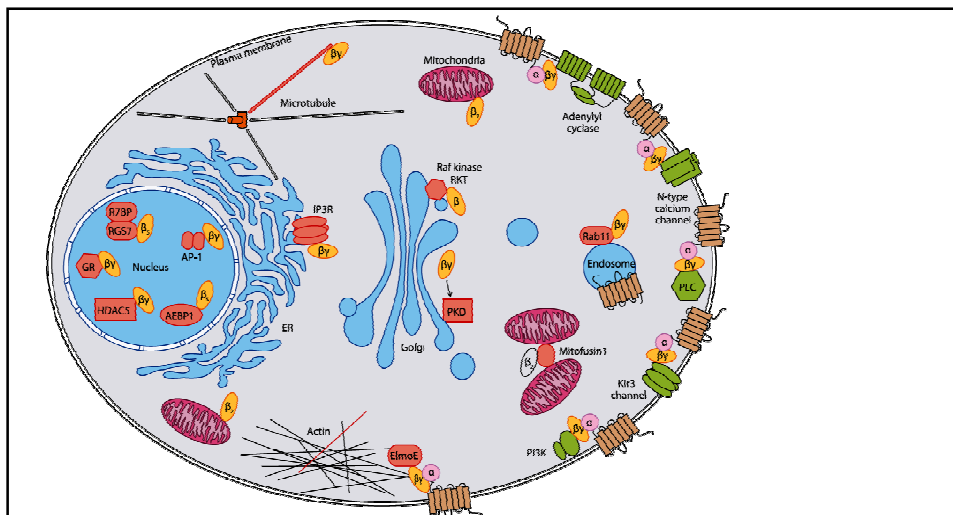


Fig. 4. Canonical and noncanonical $G\beta\gamma$ effectors. $G\beta\gamma$ subunits regulate a number of effectors at the cell surface, including adenylyl cyclase isoforms, K_{IR} and voltage-gated calcium channels, phospholipase C β isoforms, and PKC isoforms, among others. More recently, a number of novel binding proteins have been identified which transduce $G\beta\gamma$ signals to other extracellular components such as endosomes, mitochondria, ER (IP₃ receptors), Golgi apparatus (Raf kinase, PKD), cytosol (HDAC5), nucleus (AP-1, KIF3, AEBP1 (adaptor/enhancer-binding protein), GR, and possibly TBPAL1), and cytoskeleton (actin, filamin). Whether all of these intracellular events require $G\beta\gamma$ is in the subunits remains to be determined. The examples presented here are representative and do not include all of either classes or novel effectors. See text for details.

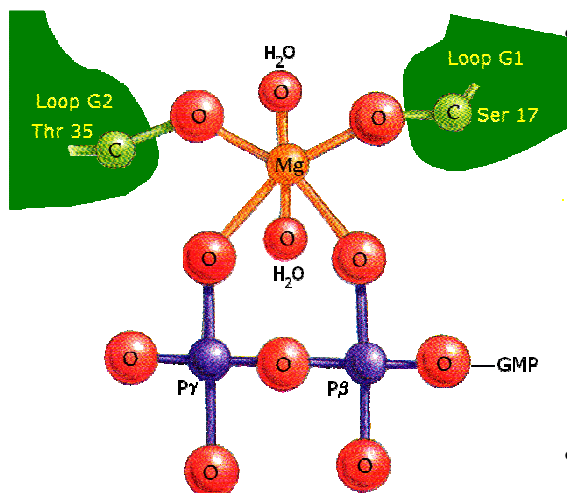
The Expanding Roles of $G\beta\gamma$ Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action

Shahmoradian M, Miani M, Zhou S, Gao S, Peter S, Kottmann J, Sun F, Philippe L, Lavie A, Jean-Claude L, Gregory J, Miller G, and Thomas R. H. (2013)

Pharmacol Rev 65:545-577, April 2013

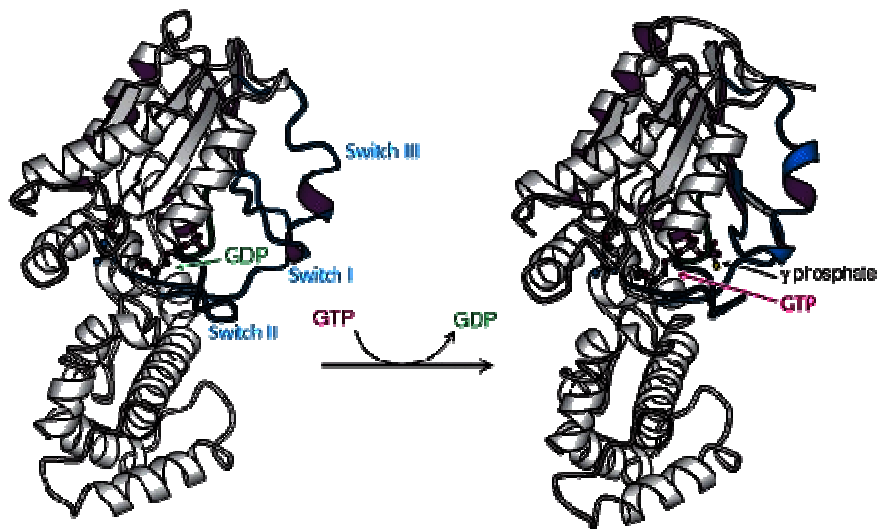
Attività GTPasica di $G\alpha$

- L'attività GTPasica della subunità $G\alpha$ determina la durata della permanenza del segnale nella forma attiva;
- l'idrolisi del GTP a GDP riporta la subunità $G\alpha$ nella forma inattiva che si lega al dimero $G\beta\gamma$.



- Quasi tutti gli enzimi che idrolizzano nucleosidi fosfati trifosfati, compresi Ras e $G\alpha$, richiedono ioni Mg^{2+} per l'attività catalitica. Il Mg^{2+} è coordinato a un atomo di ossigeno del fosfato β e γ del GTP e alle catene laterali dei residui Ser 17 e Thr 35 di Ras.
- Due molecole di acqua completano la coordinazione del magnesio.

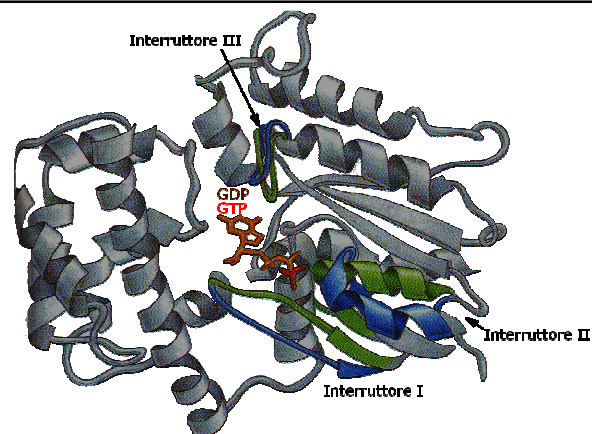
Attività GTPasica



v. 1.5.1 © gsartor 2016

Trasduzione del segnale - I

111

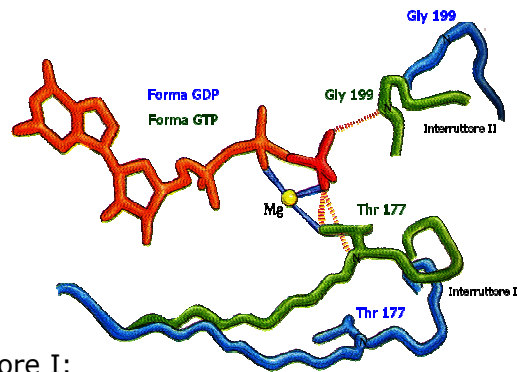


- Passando da $G\alpha$ -GDP inattiva a $G\alpha$ -GTP attiva le differenze strutturali interessano le tre regioni del dominio GTPasico: l'interruttore I e II, l'interruttore III è un loop che collega $\beta 4$ con $\alpha 3$, corrispondente alla regione G4 in Ras.
- L'elemento che scatena il cambiamento conformazionale della forma GDP alla forma GTP sembra essere la formazione di legami idrogeno tra la proteina e il fosfato γ del GTP accoppiata alla formazione di nuovi legami con lo ione Mg^{2+} da parti di ligandi della proteina.

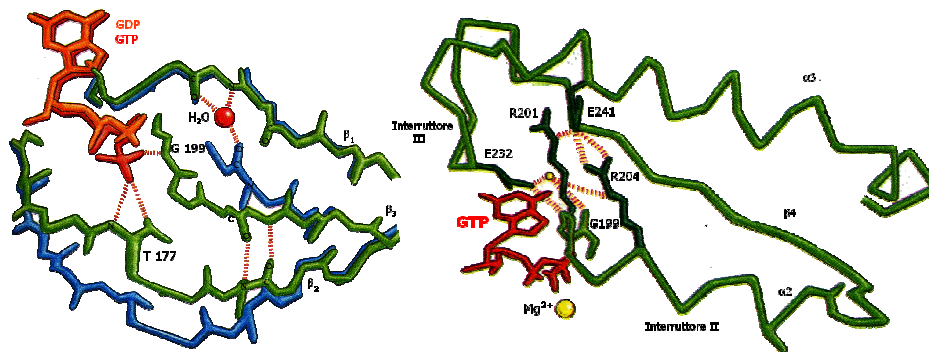
v. 1.5.1 © gsartor 2016

Trasduzione del segnale - I

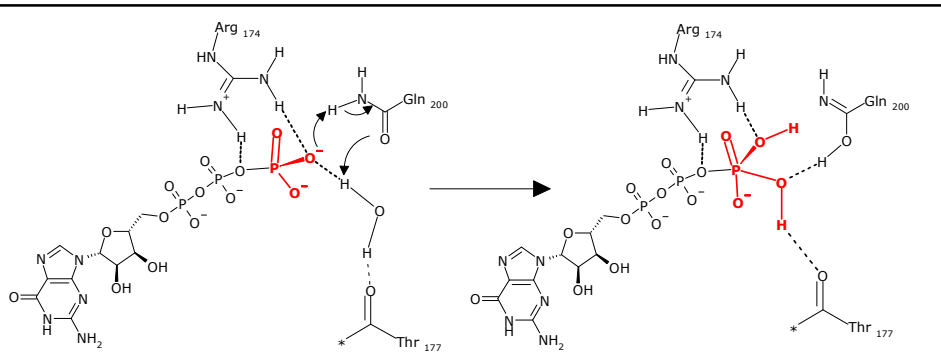
112



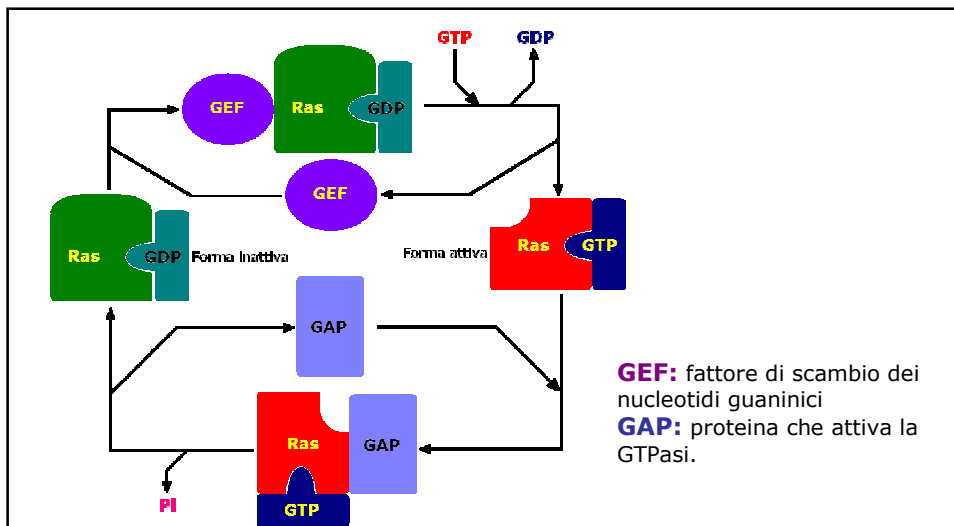
- Interruttore I:
 - la regione viene tirata verso il fosfato γ in modo da portare la catena laterale del residuo di Thr 177 in posizione per formare un legame idrogeno con l'atomo di ossigeno del fosfato e anche in prossimità del Mg^{2+} , dove sostituisce una delle due molecole di acqua presenti nella forma legata al GDP.
- Interruttore II:
 - si forma un legame a idrogeno tra il gruppo NH della catena appartenente al residuo Gly 199 e il fosfato γ del GTP.



- Il loop contenente la Gly 199 è accoppiato all'elica $\alpha 2$ e il movimento di questo loop comporta lo stiramento e la rotazione con conformazione diversa da quella che assume nella forma legata al GDP.
- Ne consegue che l'estremità $\beta 3$ si sposta da $\beta 1$ interrompendo due legami a idrogeno. La nuova conformazione è stabilizzata da altri legami idrogeno tra $\beta 3$ e $\beta 2$ e da ponti salini tra residui di Arg presenti nell'interruttore II e residui di glutammato nella regione III.
- Interruttore III: la regione non ha interazioni dirette con il fosfato γ ma forma una rete di interazioni altamente conservate con residui presenti nell'interruttore II.
- I cambiamenti strutturali negli interruttori I e II, innescati dal fosfato γ si propagano indirettamente all'interruttore III.
- Questi tre interruttori sono collocati in un'area della subunità $G\alpha$ che è implicata in interazioni sia con la subunità β di $G\beta\gamma$ sia con le molecole attivatrici della funzione GTPasica.



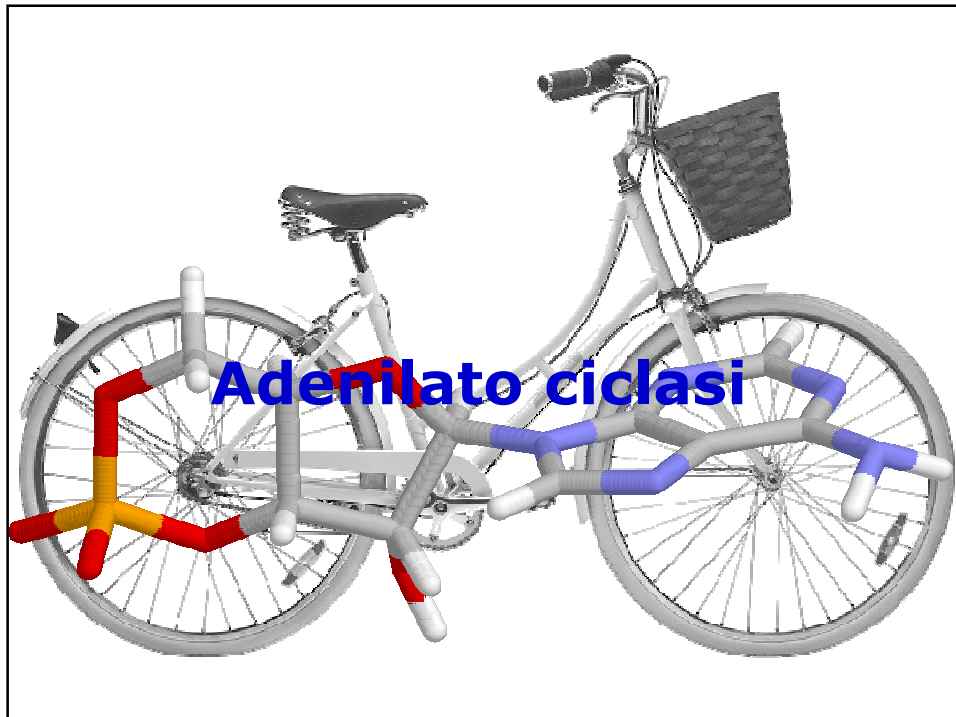
- Idrolizzano il GTP a GDP e Pi mediante un trasferimento diretto all'acqua del fosfato γ senza la formazione di un intermedio legato covalentemente.
- Questo meccanismo richiede la presenza di una base che possa sottrarre un protone da una molecola d'acqua producendo un gruppo ossidrilico che attacca l'atomo di fosforo del fosfato γ .
- Il residuo di Gln della regione dell'interruttore II viene portato in profondità vicino al fosfato γ , ed è importante per la catalisi quando il suo atomo di ossigeno accetta un protone da una molecola d'acqua mentre l'atomo di azoto della Gln cede un protone al fosfato γ .
- Il residuo di Gln, insieme a uno di Arg e uno di Thr appartenenti alla regione interruttore I, riduce la carica negativa del fosfato γ attraverso la formazione di legami a idrogeno stabilizzando in questo modo il presunto complesso dello stato di transizione.

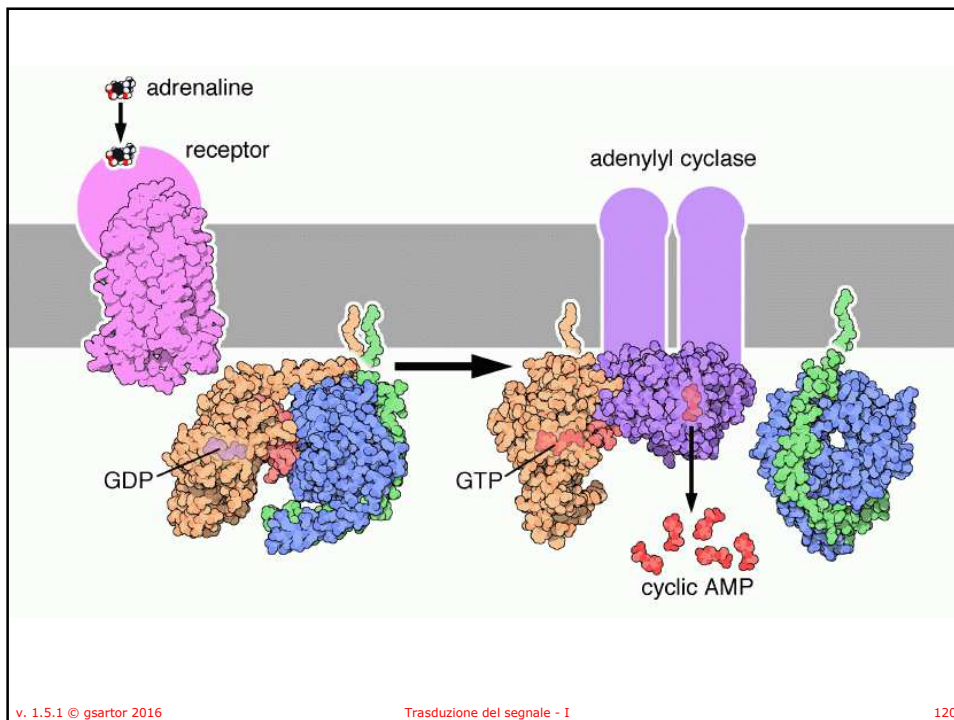
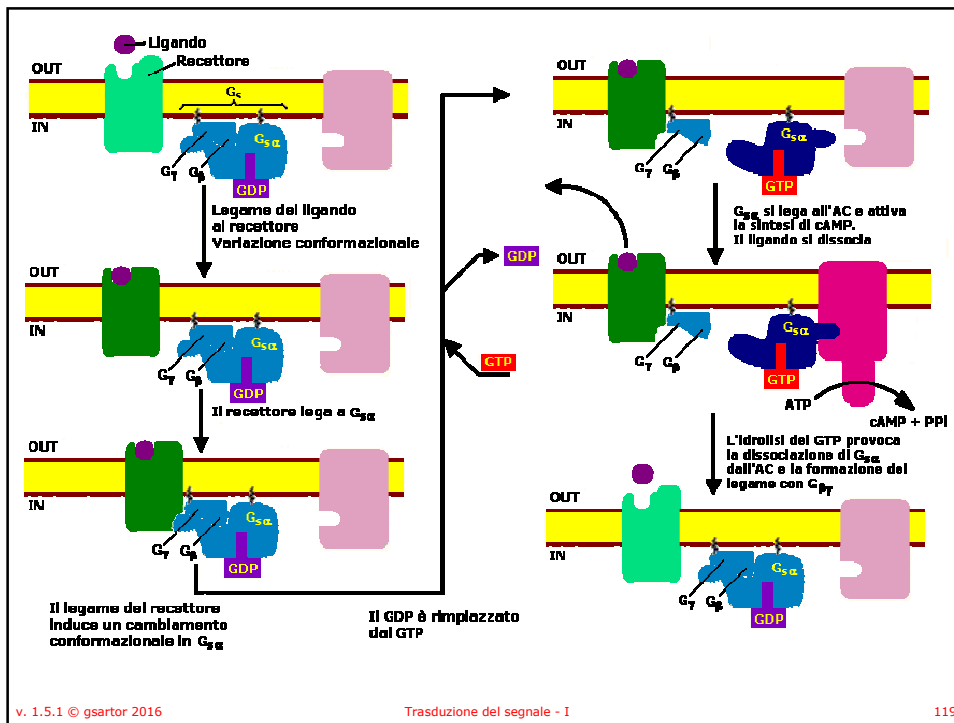


- Ras non possiede il residuo di Arg nell'interruttore I che stabilizza la transizione quindi interviene una GAP. La struttura del complesso Ras-GAP mostra che la GAP fornisce un residuo di Arg al sito attivo di Ras.

Attivazione/Disattivazione $G\alpha$

- Le $G\alpha$ hanno una debole attività GTPasica e sono necessari minuti per idrolizzare il GTP.
- Esistono delle **GTPase activating proteins (GAPs)** le quali aumentano l'attività GTPasica di $G\alpha$ funzionando quindi come regolatori negativi delle proteine G.
- Tra queste le **Regulator of G protein signaling (RGS)** sono una famiglia di GAPs che si ritiene essere richiesta per "spegnere" i segnali mediati dalle $G\alpha$.
- L'affinità delle diverse GAPs per le diverse $G\alpha$ permette una regolazione molto fine dei processi cellulari.



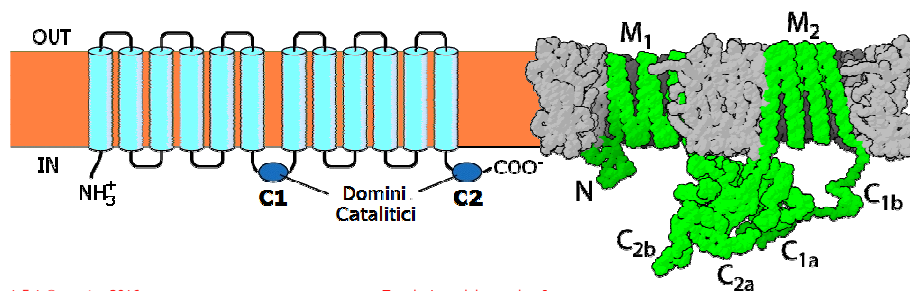


Classificazione di AC

- Classe I
 - AC batterica. In *E. coli* deprivato di glucosio produce cAMP che funziona come segnale per l'espressione di geni per l'importazione e il metabolismo di altri zuccheri.
 - Enzima citosolico (~100 kDa) con un dominio regolatorio di circa 50 kDa che funziona da sensore indiretto del livello di glucosio.
- Classe II
 - Tossina secreta da batteri patogeni (*Bacillus anthracis* e *Bordetella pertussis*) durante l'infezione. I batteri secernono un sistema di "iniezione" che permette alla tossina di entrare nell'ospite alterando i processi endogeni mediati da cAMP.

Classificazione di AC

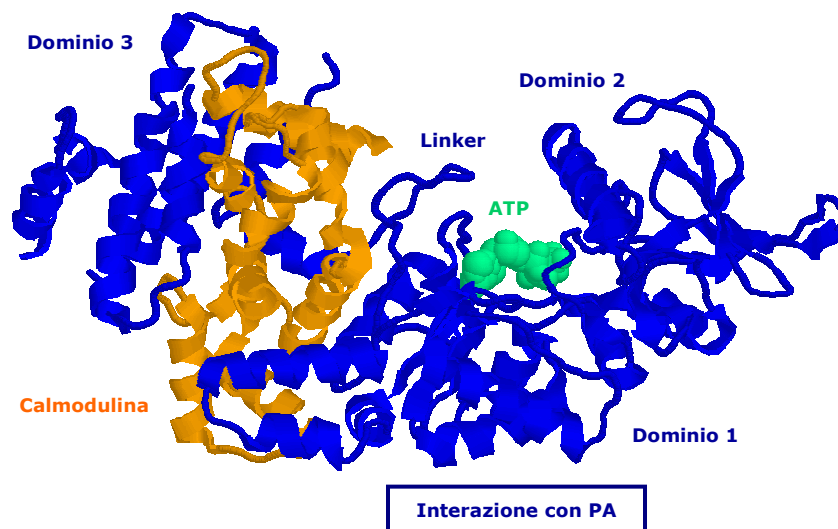
- Classe III
 - Proteine formate da 12 eliche transmembrana organizzati i sei domini transmembrana, un dominio citoplasmatico C1, altri sei domini transmembrana e un altro dominio citosolico (C2).
 - Per il funzionamento sono importanti l' N-terminale, C1 e C2.
 - I sottodomini C1a e C2a sono omologhi e formano un dimero intramolecolare che forma il sito attivo.
 - In *Mycobacterium tuberculosis*, AC-III il polipeptide è lungo la metà rispetto quello dei mammiferi ma si aggrega per formare un omodimero che assomiglia alla AC umana.



Fattore edematoso dell'Antrace

- Peso molecolare 84 kDa
- È una adenilato-ciclastasi-calmodulina dipendente che provoca un aumento di cAMP;
- L'aumento di cAMP disturba l'omeostasi cellulare dell'acqua e questo provoca l'edema (vedi tossina colerica).

Fattore edematoso



Classificazione di AC

- Classe III

- Si conoscono dieci isoforme di AC nei mammiferi: ADCY1 - ADCY10 le quali sono tutte regolate da G proteins (stimolate da $G_{\alpha s}$ e inibite da $G_{\alpha i}$) e si differenziano per il sistema di regolazione:
 - ADCY3, 5 e 8 sono (anche) stimolate da Ca^{2+} /calmodulina.
 - ADCY1 e 6 sono inibite dal Ca^{2+} in modo calmodulino indipendente.
 - ADCY2, 4 e 9 sono stimolate da $G_{\beta\gamma}$
 - ADCY1, 5 e 6 sono fortemente inibite da G_i mentre le altre isoforme subiscono meno la inibizione
 - Esiste una AC solubile che NON è regolata da G proteins e funziona come sensore di bicarbonato/pH e produce una variazione locale del livello di cAMP.
 - Nei neuroni la AC sensibile al calcio è localizzata nelle vicinanze dei canali ionici del Ca^{2+} e si sospetta sia coinvolta nei processi di apprendimento.

Classificazione

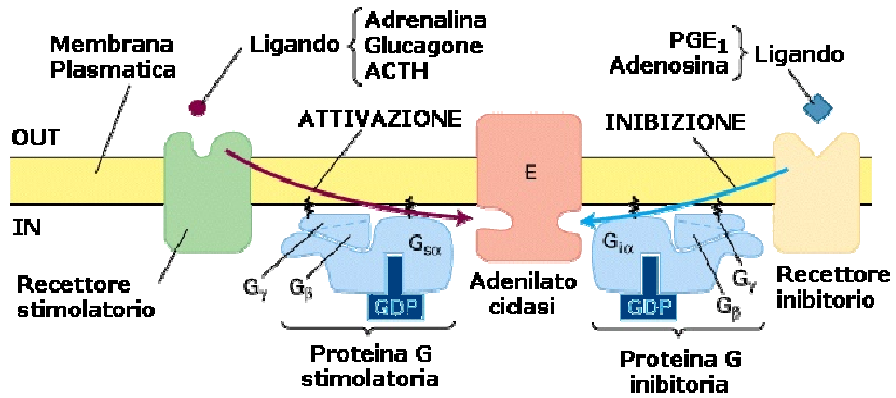
- Classe IV

- È stata definita la struttura di AC-IV da *Yersinia pestis*. Un dimero formato da due subunità da 19 kDa.

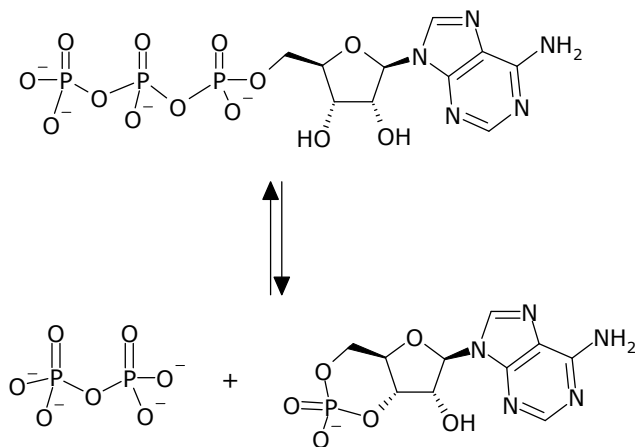
- Classe V e VI

- Queste AC sono state riportate essere proprie di specifici batteri, rispettivamente *Prevotella ruminicola* e *Rhizobium etti*.

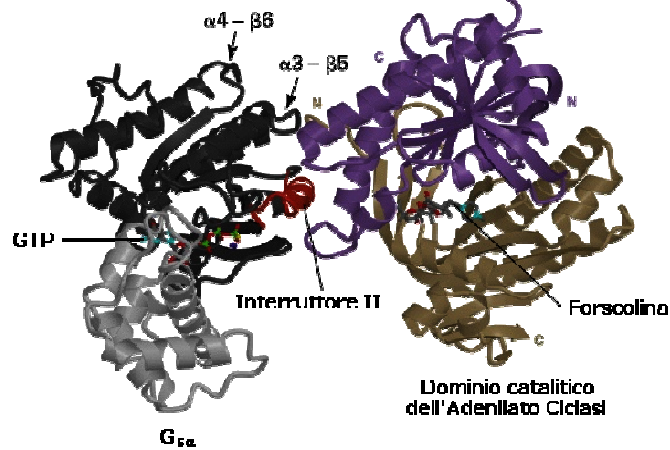
Adenilato ciclasi



Adenilato ciclasi (EC:4.6.1.1)



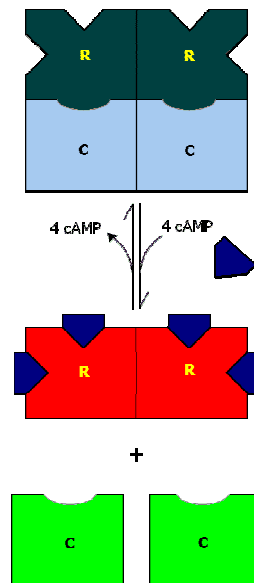
Adenilato ciclasti



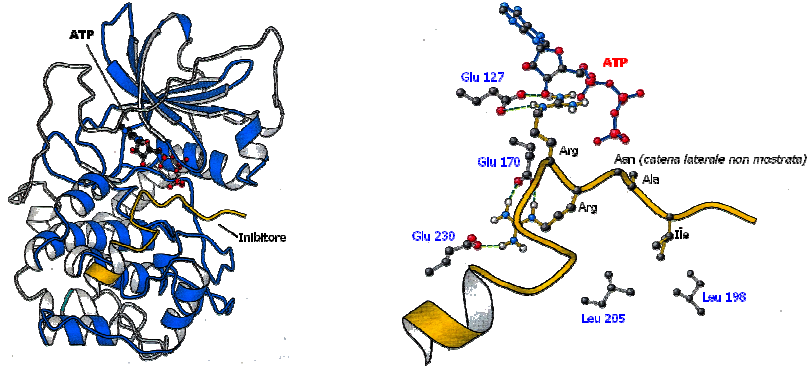
- Sono due sono le regioni di $G\alpha$ -GTP che interagiscono con l'adenilato ciclasti.
 - $G\alpha_s$ -GTP: l'elica dell'interruttore II e l'ansa $\alpha 3$ - $\beta 5$.
 - $G\alpha_i$ -GTP: l'elica dell'interruttore II e l'ansa $\alpha 4$ - $\beta 6$.

Protein Kinasi A

- cAMP attiva la PKA.
- La PKA è costituita da due tipi di subunità:
 - una subunità regolatrice (R) di 49 kd, con alta affinità per cAMP e
 - una subunità catalitica (C) di 38 kd.
- In assenza di cAMP la subunità regolatrice e la subunità catalitica formano un complesso R_2C_2 enzimaticamente inattivo.
- Il legame di due molecole di cAMP a ciascuna delle due subunità regolatrici determina la dissociazione di R_2C_2 in una subunità R_2 e due subunità C.



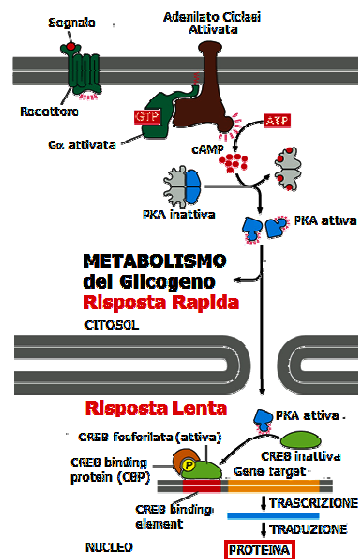
Protein Kinasi A

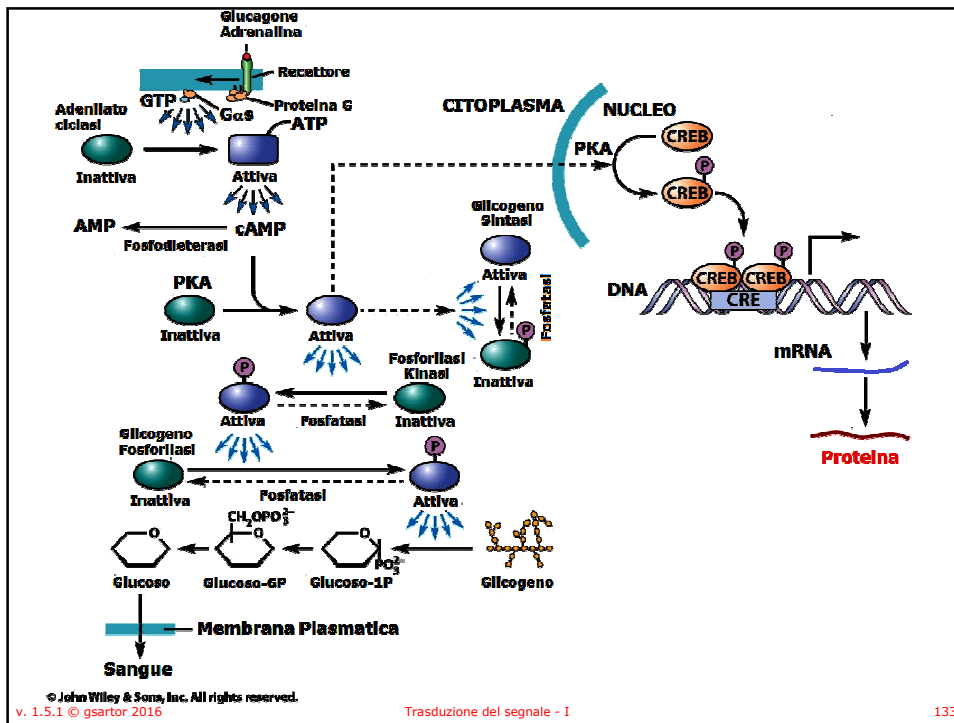


- Ciascuna catena R contiene la sequenza *Arg-Arg-Gly-Ala-Ile*, uguale alla sequenza consenso per la fosforilazione se si eccettua la presenza di Ala al posto di una Ser.
- Nel complesso R_2C_2 questa *sequenza pseudosubstrato* di R occupa il sito catalitico di C, impedendo l'entrata di altri substrati proteici.
- Il legame di cAMP alle catene R_2 estrae allostericamente le sequenze pseudosubstrato dai siti catalitici.
- Le catene C rilasciate sono libere di legare e fosforilare proteine bersaglio.

Risposta rapida e risposta lenta alla attivazione di PKA

- Alcuni degli effetti della PKA sono rapidi:
 - Stimolazione alla depolimerizzazione del glicogeno a causa della fosforilazione di proteine coinvolte nel metabolismo dei glucidi (secondi)
- Alcuni effetti sono lenti:
 - Attivazione dell'espressione genica:
 - PKA attiva viene traslocata nel nucleo
 - Catalizza la fosforilazione del fattore di trascrizione **CREB (cAMP response element binding protein)**
 - **CREB** fosforilato lega **CRE (cAMP response element)**
 - **CREB-binding protein (CBP)** lega **CREB** e attiva la trascrizione del gene che contiene **CRE**



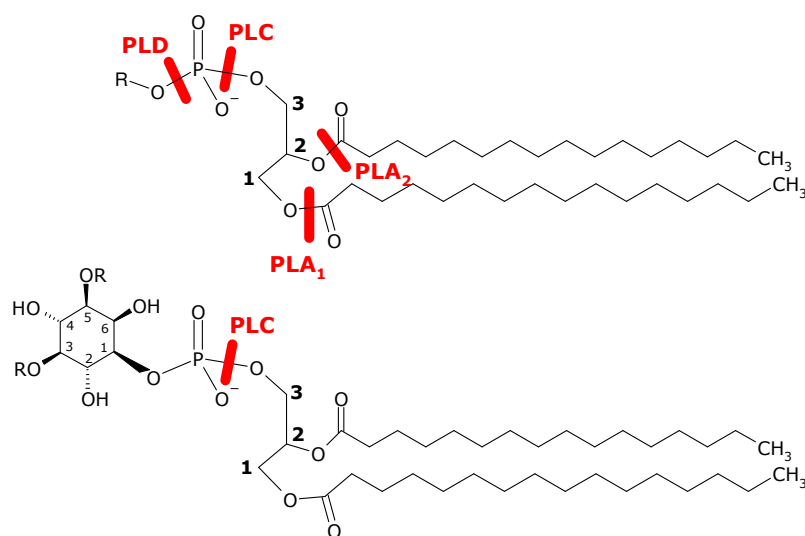


Fosfolipasi

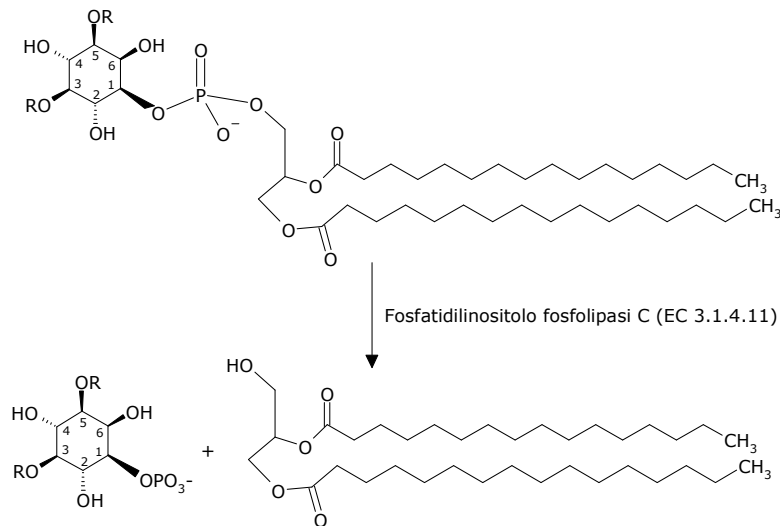
- Fosfolipasi A₁ EC 3.1.1.32
- Fosfolipasi A₂ EC 3.1.1.4
- **Fosfolipasi C EC 3.1.4.3**
- Fosfolipasi D EC 3.1.4.4

- Lipasi EC 3.1.1.3

Fosfolipasi



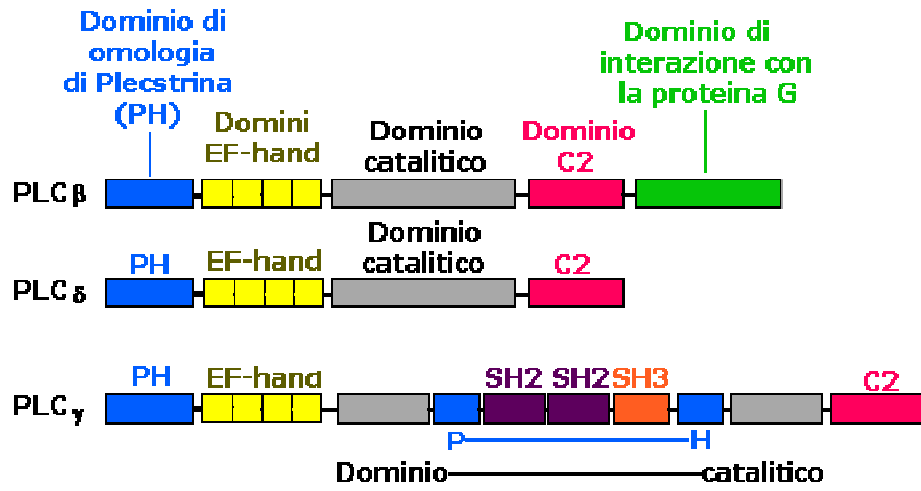
Fosfatidilinositolo fosfolipasi C



PI → **PIP** → **PIP₂** → **DAG** + **IP₃**
 Fosfatidilinositolo 4-kinasi (EC:2.7.1.67) Fosfatidilinositolo-4-P 5-kinasi (EC:2.7.1.68) Fosfolipasi C-β (EC:3.1.4.11)

- I fosfatilinositoli (PI) sono localizzati nello strato interno del bilayer della membrana plasmatica
- PI-4-fosfato e PI-4,5-bisfosfato (PIP₂) sono prodotti per azione sequenziale di PI kinasi e PIP kinasi
- PI 4,5 bisfosfato (PIP₂) è estremamente importante perché la sua idrolisi produce due differenti secondi messaggeri
- PIP₂ è il meno abbondante dei PI (1%)
- Gαq attiva la fosfolipasi C-β che taglia **PIP₂** per produrre **diacilglicerolo (DAG)** and **inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP₃)**
 - **IP₃** è un secondo messaggero solubile
 - **DAG** rimane nella membrana e può diffondere lateralmente sulla superficie interna della membrana plasmatica.

Fosfolipasi C

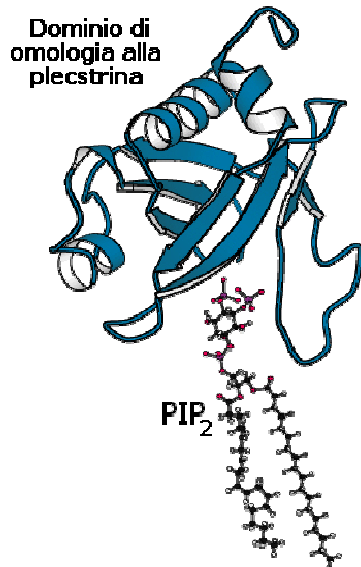


Fosfolipasi C



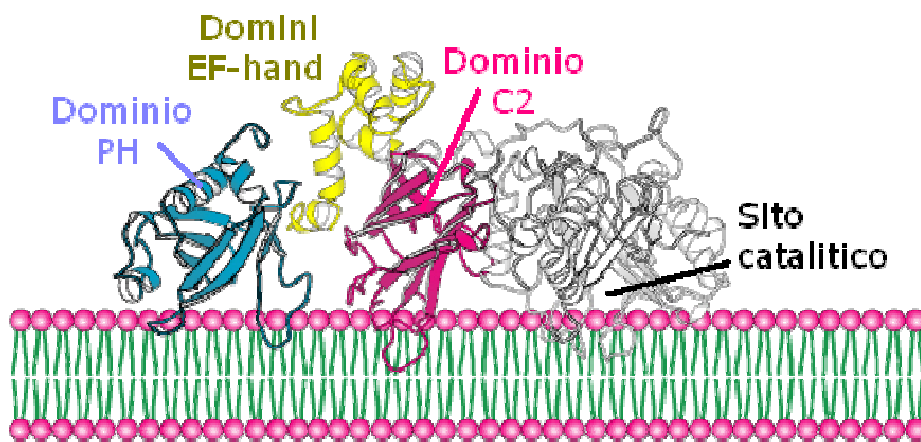
1DJX

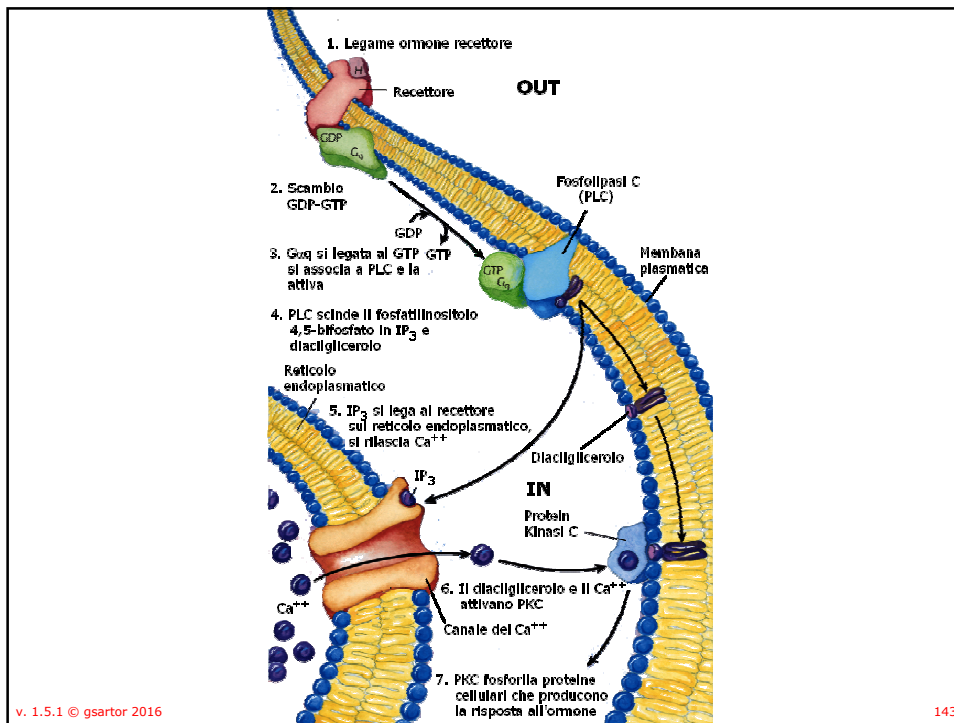
Fosfolipasi C



- Dominio di circa 120 residui che lega la testa polare dei lipidi come il PIP₂.

- La fosfolipasi agisce sulla superficie della membrana.
- I domini PH e C2 della fosfolipasi aiutano a posizionare il sito catalitico dell'enzima per facilitare l'accesso al legame fosfodiesterico del substrato lipidico di membrana, PIP₂.





IP3

- L'IP₃ determina il rapido rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico interagendo con un canale controllato da IP₃.

The structural models show the IP₃ receptor channel as a tetramer of four identical subunits. On the left, a 'Vista lungo il poro' (view along the pore) shows the channel's structure. On the right, 'Una singola subunità' (a single subunit) is shown in detail, highlighting the binding site for IP₃ on its cytosolic face.

- Essa è costituita da quattro subunità identiche e forma un canale ionico simile a quello del potassio. Almeno 3 molecole di IP₃ si legano ai siti posti sulla faccia citosolica del recettore per aprire il canale ionico.

v. 1.5.1 © gsartor 2016 144

Ca²⁺ come secondo messaggero

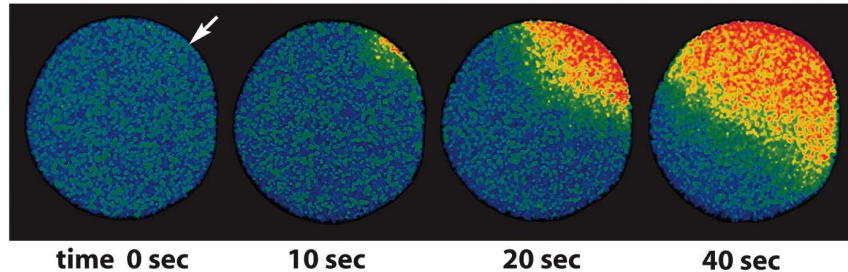
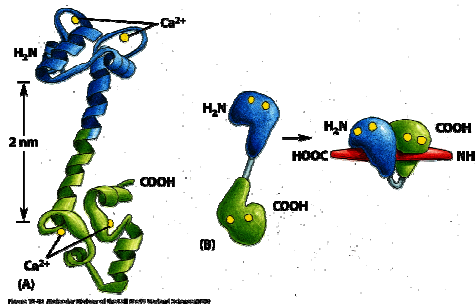


Figure 15-40 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

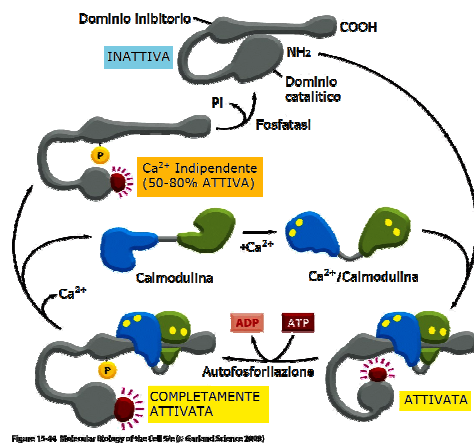
- La concentrazione di Ca²⁺ intracellulare è bassa mentre è alta (mM) sia all'esterno che nel reticolo.
- Piccole quantità di calcio in aumento nel citosol porta a rapide variazioni di concentrazione dell'ordine di 10-20 volte.

Calmodulina



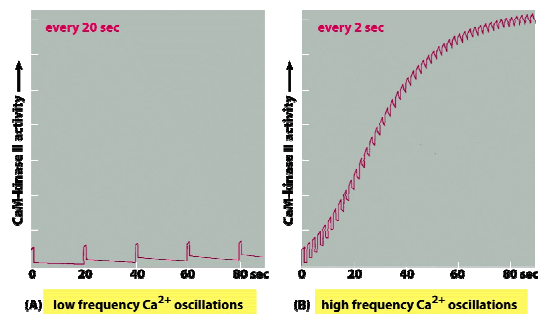
- La Calmodulina è una proteina di 16 kD legante il Ca²⁺ con quattro siti ad alta affinità per lo ione
- È estremamente abbondante (1%)
- Il legame con almeno due ioni calcio provoca una variazione conformazionale che la fa funzionare come un interruttore che agisce all'aumentare della concentrazione di Ca²⁺
- La Calmodulina non ha funzioni enzimatiche ma si lega ad altre proteine cambiandone la conformazione
- Uno dei bersagli più importanti della calmodulina è la Protein-kinasi Ca²⁺/Calmodulina dipendente CaM-Kinasi.

CaM-kinasi II



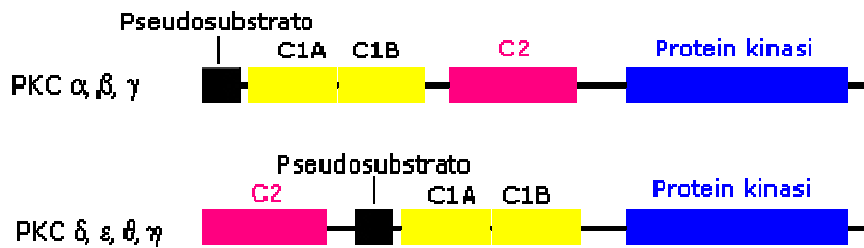
- La CaM-kinasi II è un complesso di 12 subunità
- A seguito del legame con Ca^{2+} /calmodulina CaMKII cambia conformazione e si attiva
- Una volta attivata CaMKII si autofosforila in un dominio autoinibitorio
- Ciò sostiene l'attività dell'enzima in assenza Ca^{2+} /calmodulina di due modi:
 - Blocca il legame Ca^{2+} /calmodulina in modo tale che non si dissocia a meno che non si torni ad un livello basso di Ca^{2+} per tempi prolungati
 - Converte l'enzima nella forma Ca^{2+} indipendente
- CaMKII può essere disattivata solo se tutte le sue subunità sono defosforilate.

CaMKII è un "Frequency Decoder" per i flussi di calcio

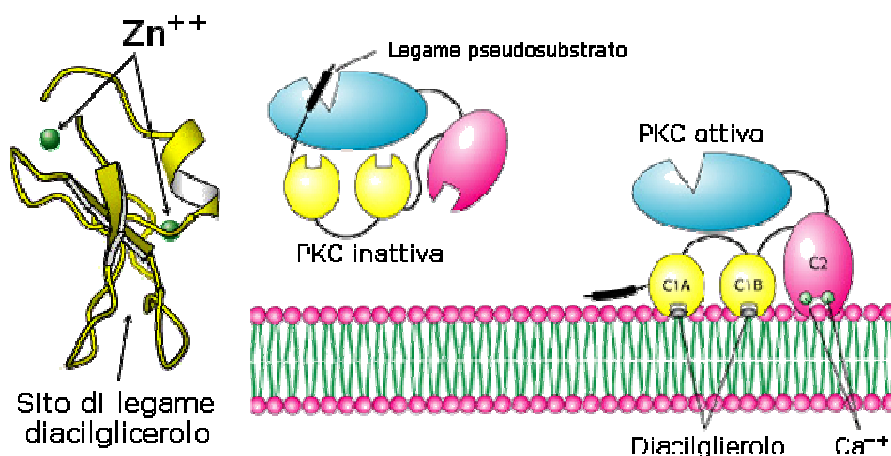


- Per oscillazioni a bassa frequenza della concentrazione di Ca^{2+} CaMKII non è attiva e non c'è differenza tra due successive attivazioni di CaMKII.
- In presenza di variazioni ad alta frequenza della concentrazione di Ca^{2+} , la quantità di CaMKII attiva continua a crescere per ogni successivo aumento di Ca^{2+} perché non mai completamente inattivata.
- Ciò avviene fino a che tutte le 12 subunità sono attive e rimangono attive anche in assenza di Ca^{2+} .
- CaMKII può quindi "ricordare" il precedente rilascio di Ca^{2+} .
- CaMKII è critica per la memoria spaziale, è circa il 2% delle proteine del cervello.

Il diacilglicerolo attiva la proteina kinasi C



- Gli isoenzimi α , β e γ della proteina kinasi C possiedono un dominio catalitico omologo a quello della PKA in prossimità del C-terminale.
- Nelle vicinanze al dominio c'è un dominio C2 di interazione con i lipidi, seguito da due domini C1 che si organizzano intorno ad uno ione zinco, questi domini legano il diacilglicerolo.
- È presente la sequenza pseudosubstrato.

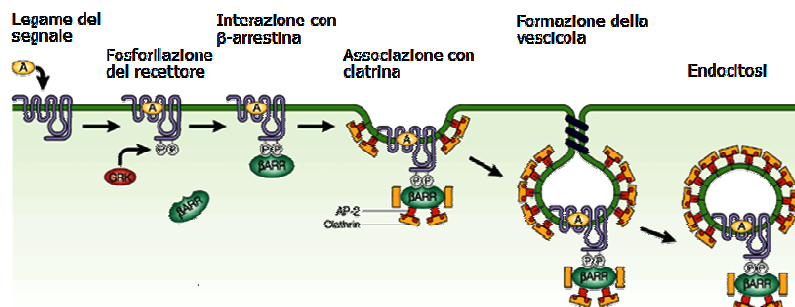


- Prima dell'attivazione la PKC è libera in soluzione.
- In seguito all'idrolisi del PIP2 nella membrana ad opera della fosfolipasi C, il dominio C1B lega il diacilglicerolo e il dominio C2 interagisce coi fosfolipidi di membrana, l'enzima si associa alla membrana.
- Il legame col dominio C1A al diacilglicerolo rimuove la sequenza pseudosubstrato dal sito attivo

Modulazione

- Varie proteine interagiscono con i recettori GPCR o, più in generale, con recettori a eliche transmembrana per modularne l'attività.
- Gli effetti di queste interazioni includono:
 - alterata affinità per il ligando,
 - dimerizzazione del recettore che può aumentarne o alterarne l'attività,
 - alterata localizzazione del recettore,
 - ecc.

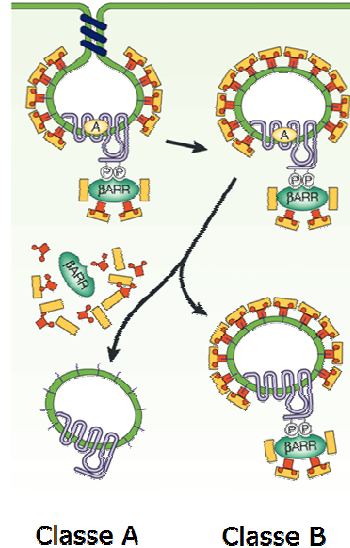
Desensitizzazione



- Dopo un certo tempo che si è stabilito il legame dell'agonista al GPCR, una chinasi (GRK) fosforila alcuni residui intracellulari del recettore;
- La fosforilazione porta a un disaccoppiamento del GPCR dalla G proteina (**desensitizzazione**) e al reclutamento della **β -arrestina**;
- La β -arrestina a sua volta recluta molecole di **clatrina**;
- Le molecole di clatrina favoriscono la formazione di una cavità da cui originerà la vescicola;
- La successiva endocitosi della vescicola provocherà l'internalizzazione del recettore.

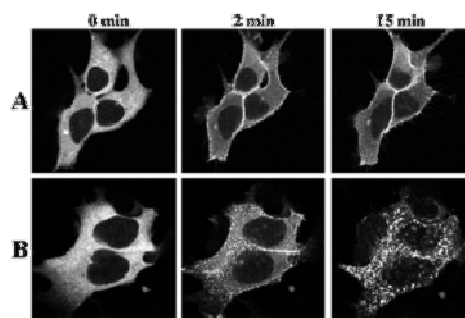
Due classi di GPCRs

- Le proprietà dell'internalizzazione definiscono due classi di GPCRs.
 - Nel caso dei recettori di classe A (β 2-Adrenergici), l'interazione β -arrestina-GPCR è transitoria, e la β -arrestina non si localizza con i GPCR negli endosomi.
 - Per i recettori di classe B (Vaso2), l'interazione β -arrestina-GPCR è più stabile, e recettore e β -arrestina co-localizzano negli endosomi.



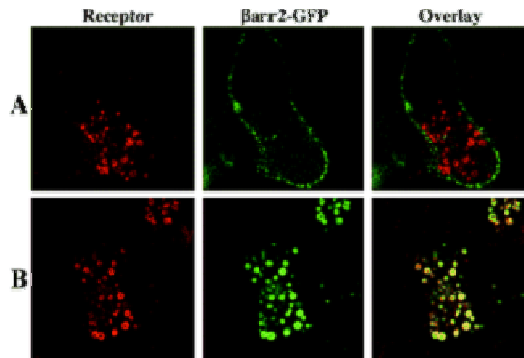
Traffico Cellulare della β arr2-GFP con i Recettori β 2AR e V2R

- Assenza di agonista, la β arr2-GFP era omogeneamente distribuita nel citoplasma delle cellule che esprimevano β 2AR o V2R. (0 min)
- Aggiunta di agonista, viene promossa la rapida redistribuzione dal citosol alla membrana plasmatica (2 min)
- Una esposizione più prolungata esposizione all'agonista produce una marcata differenza nel traffico della β arr2-GFP(15 min):
 - β 2AR: rimane nella membrana plasmatica (A)
 - V2R : nell'arco di 2-3 min, finisce nelle vescicole endocitotiche (B)



Traffico cellulare della β -arr2-GFP con i Recettori β 2AR e V2R

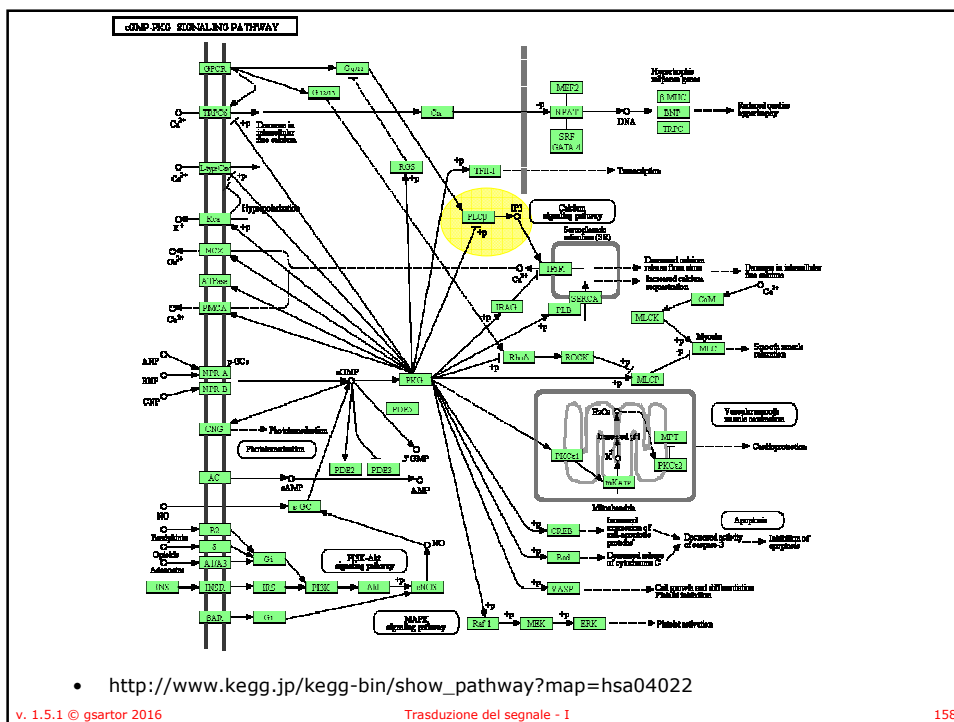
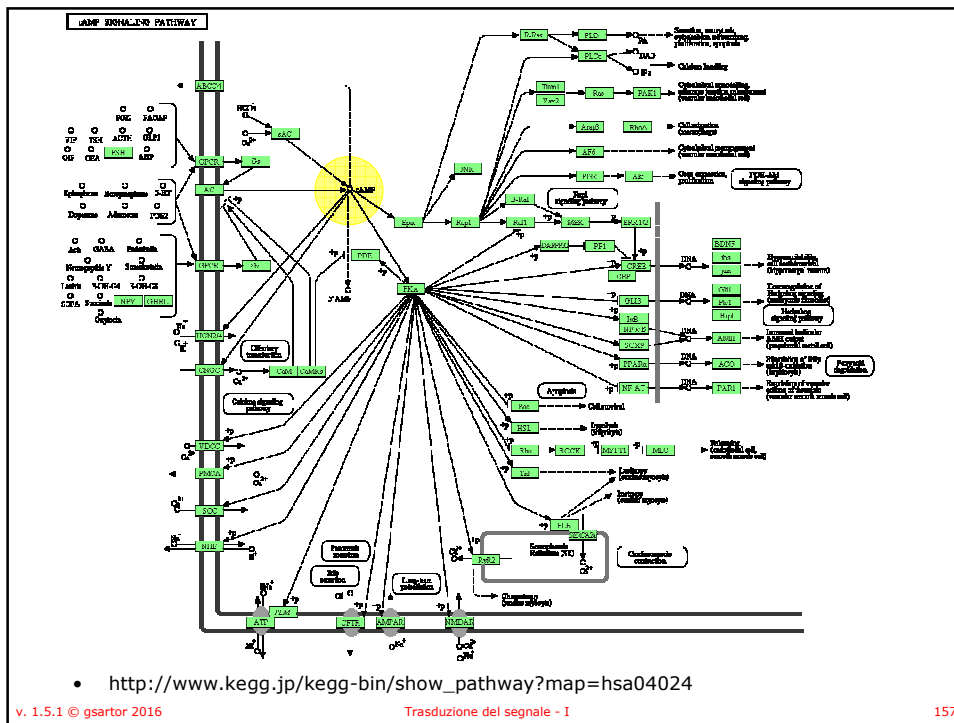
- I recettori β 2AR e V2R reclutano β -arrestina con un meccanismo comune durante le fasi iniziali, ma poi c'è divergenza.
- Il complesso β -arrestina- β 2AR si dissocia a livello della membrana.
- Il complesso β -arrestina-V2AR viene internalizzato in vescicole endocitotiche.
- (Cellule HEK-293)

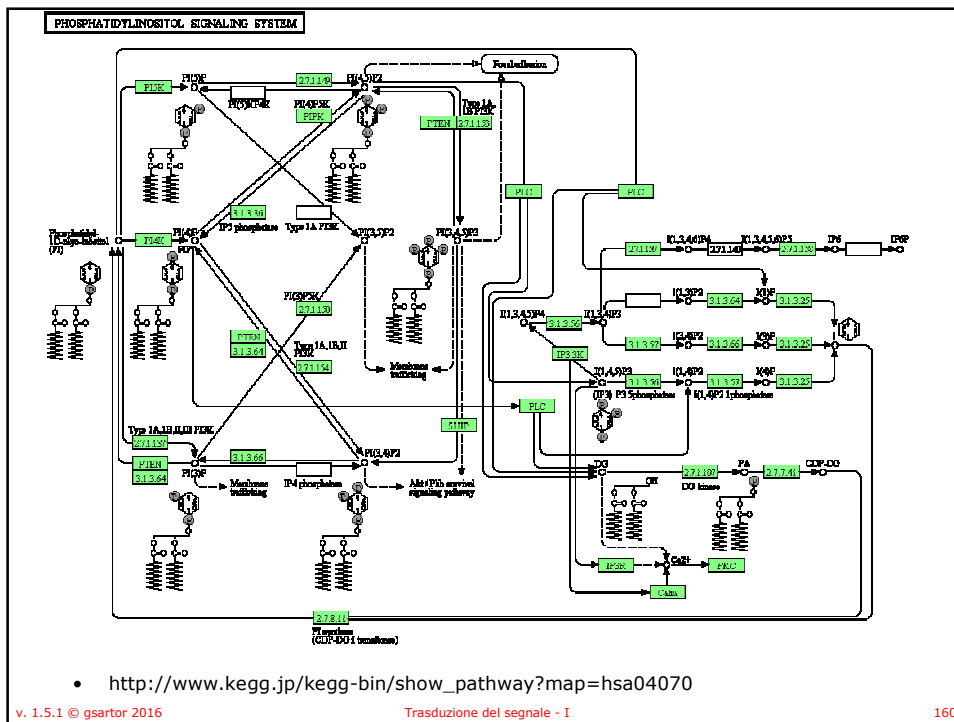
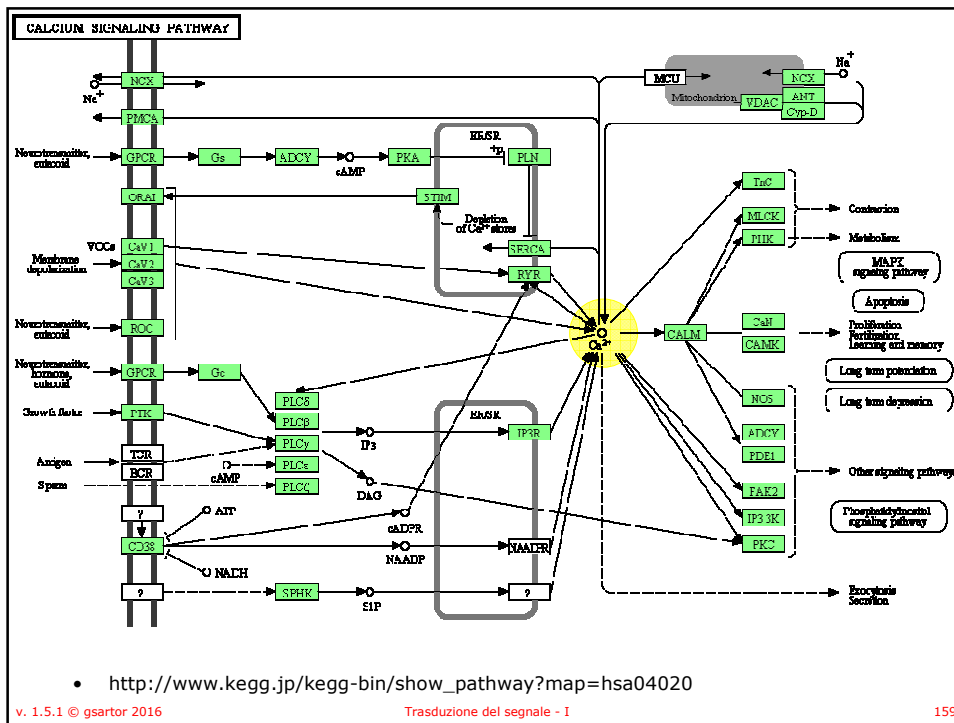


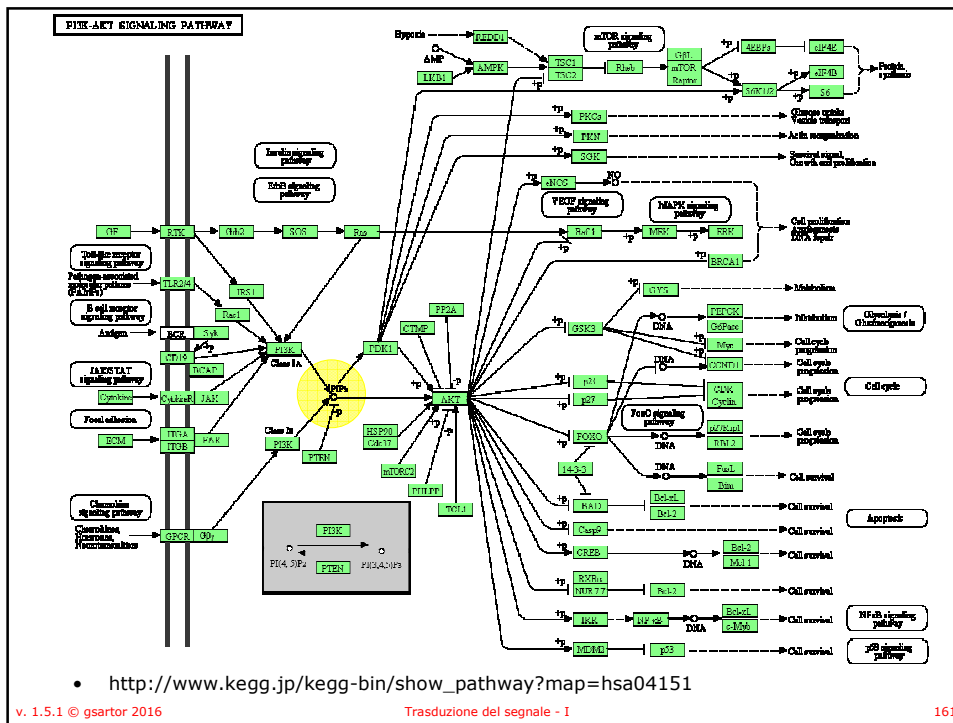
A. β 2AR: nessuna colocalizzazione
B. V2R: estesa colocalizzazione

Riassunto

- Vie di segnalazione mediate da GPCR
 - cAMP (adenilato ciclasi)
 - cGMP (fosfodiesterasi)
 - IP3 e DAG Ca^{++} (fosfolipasi C)







Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expsy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbdb.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute:
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna

Giorgio Sartor
Ufficiale: giorgio.sartor@unibo.it
Personale: giorgio.sartor@gmail.com

Aggiornato il 03/11/2016 15:37:48