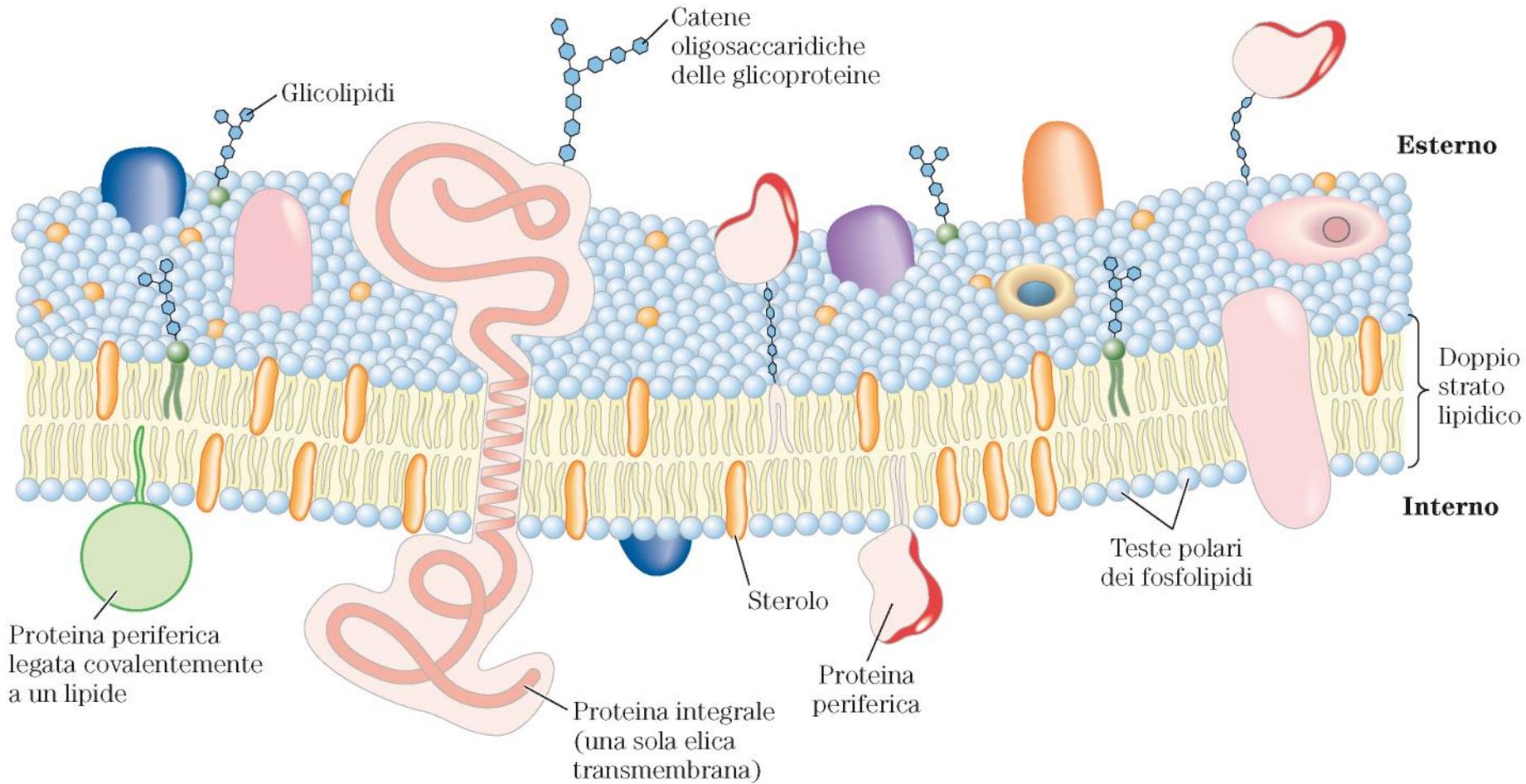


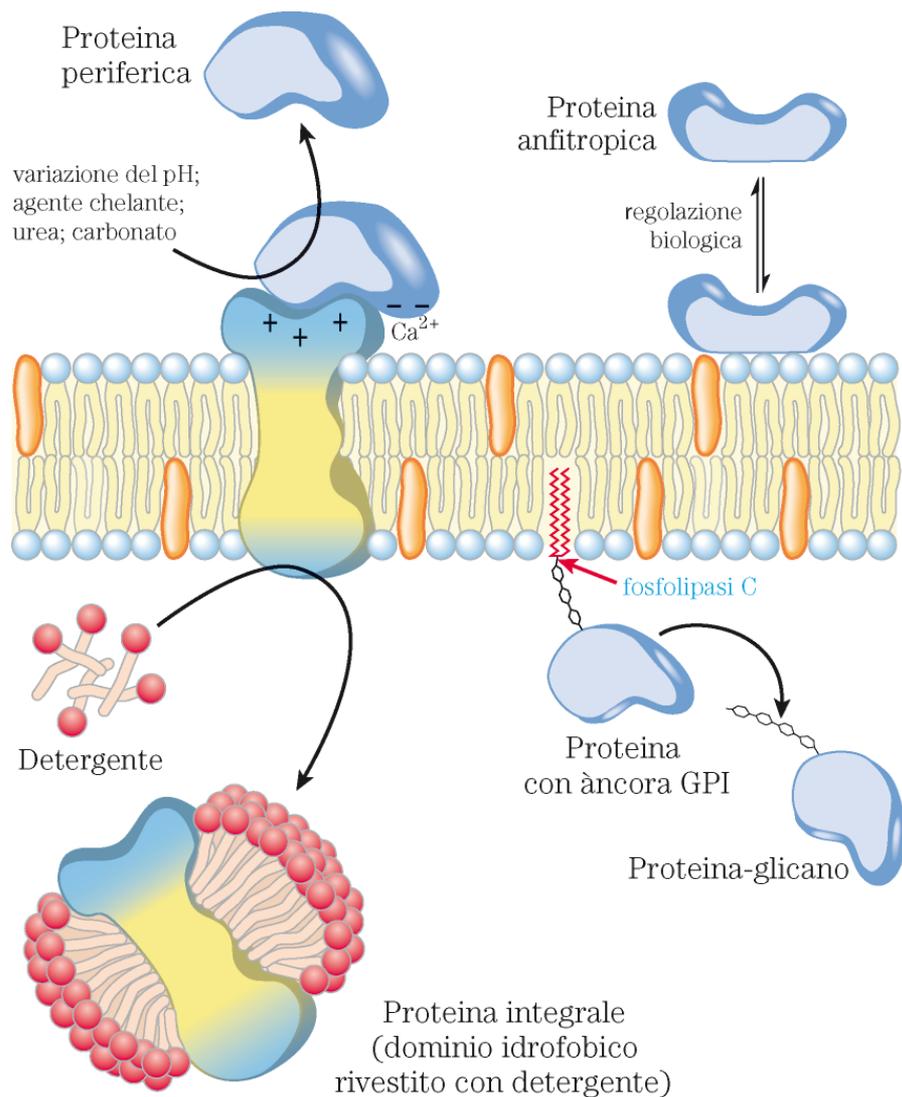
# Le membrane biologiche

# Modello a mosaico fluido



# Proteine integrali di membrana

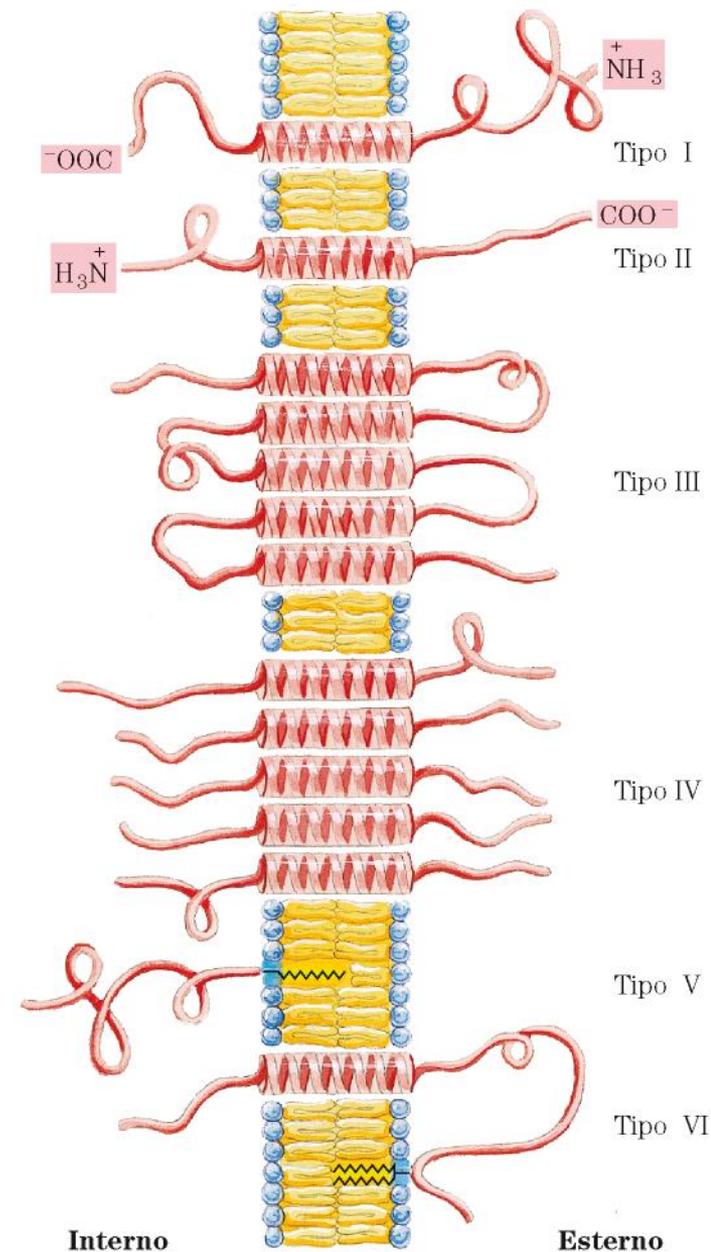
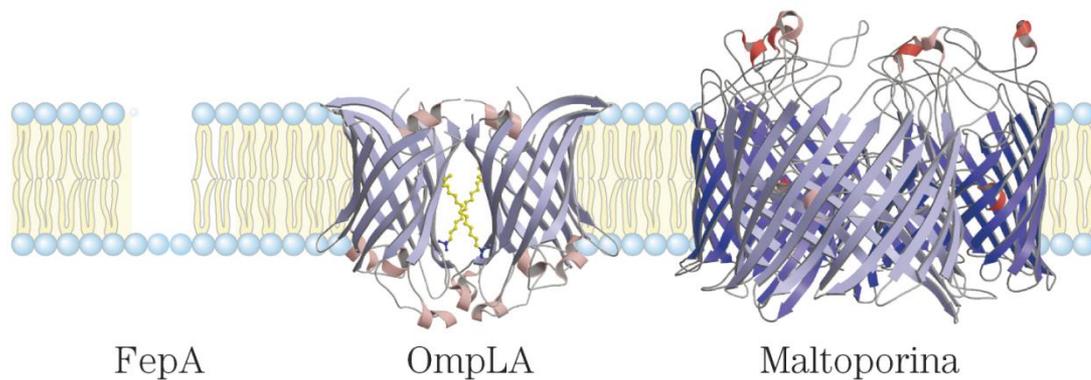
Le proteine periferiche si associano alla membrana tramite interazioni elettrostatiche e legami idrogeno con le proteine integrali (domini idrofilici) e le teste polari dei lipidi di membrana.



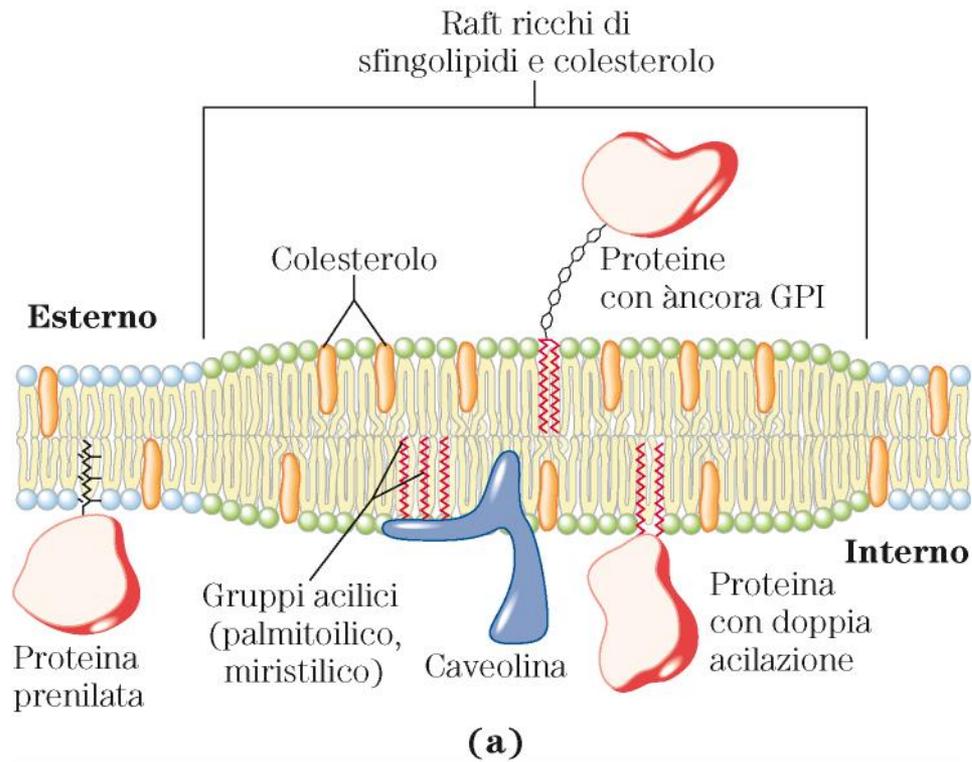
## Proteine integrali di membrana

Sono associate alla membrana tramite interazioni forti con i domini idrofobici delle proteine ed i lipidi di membrana.

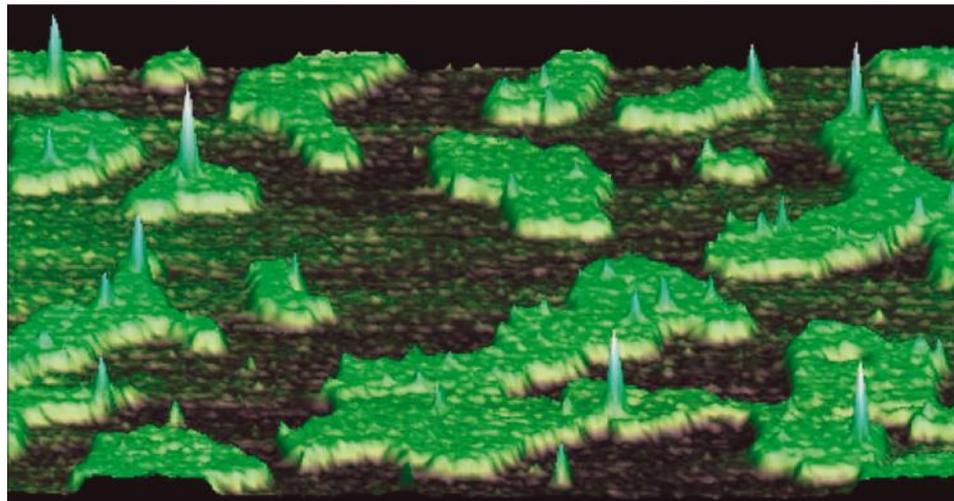
Le sequenze idrofobiche sono abbastanza lunghe da attraversare il doppio strato con conformazione ad  $\alpha$  elica, o a barile  $\beta$  come nelle porine.







(a)

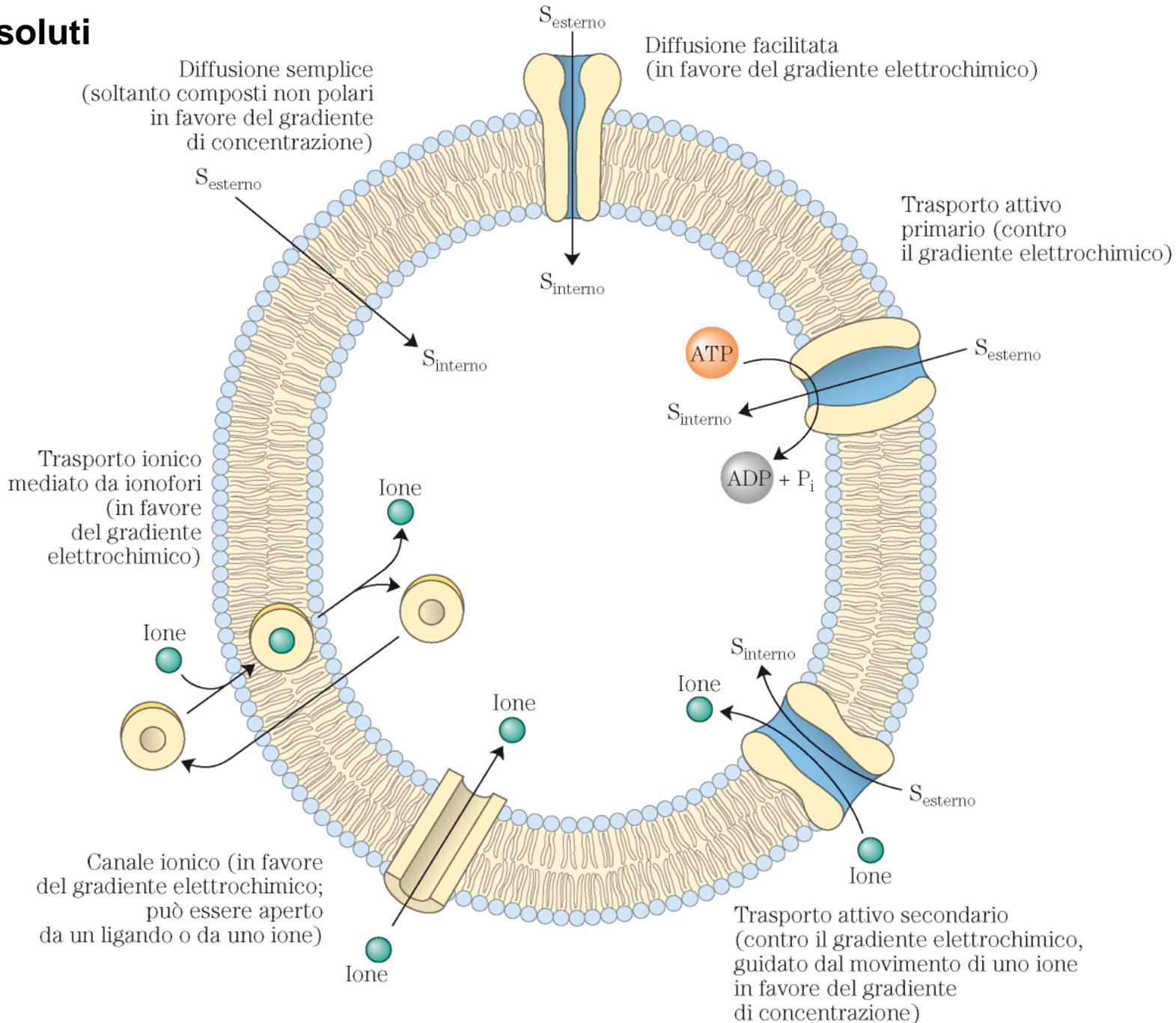


(b)

I raft (zattere) sono delle aree della membrana (foglietto esterno) formate da colesterolo e sfingolipidi. Dall'osservazione al microscopio a forza atomica appaiono piu' compatti e ordinati.

I raft sono particolarmente ricchi di proteine integrali di membrana legate covalentemente attraverso lunghe catene di acidi grassi saturi e proteine ancorate al GPI.

# Trasporto di soluti attraverso le membrane



Trasportatori

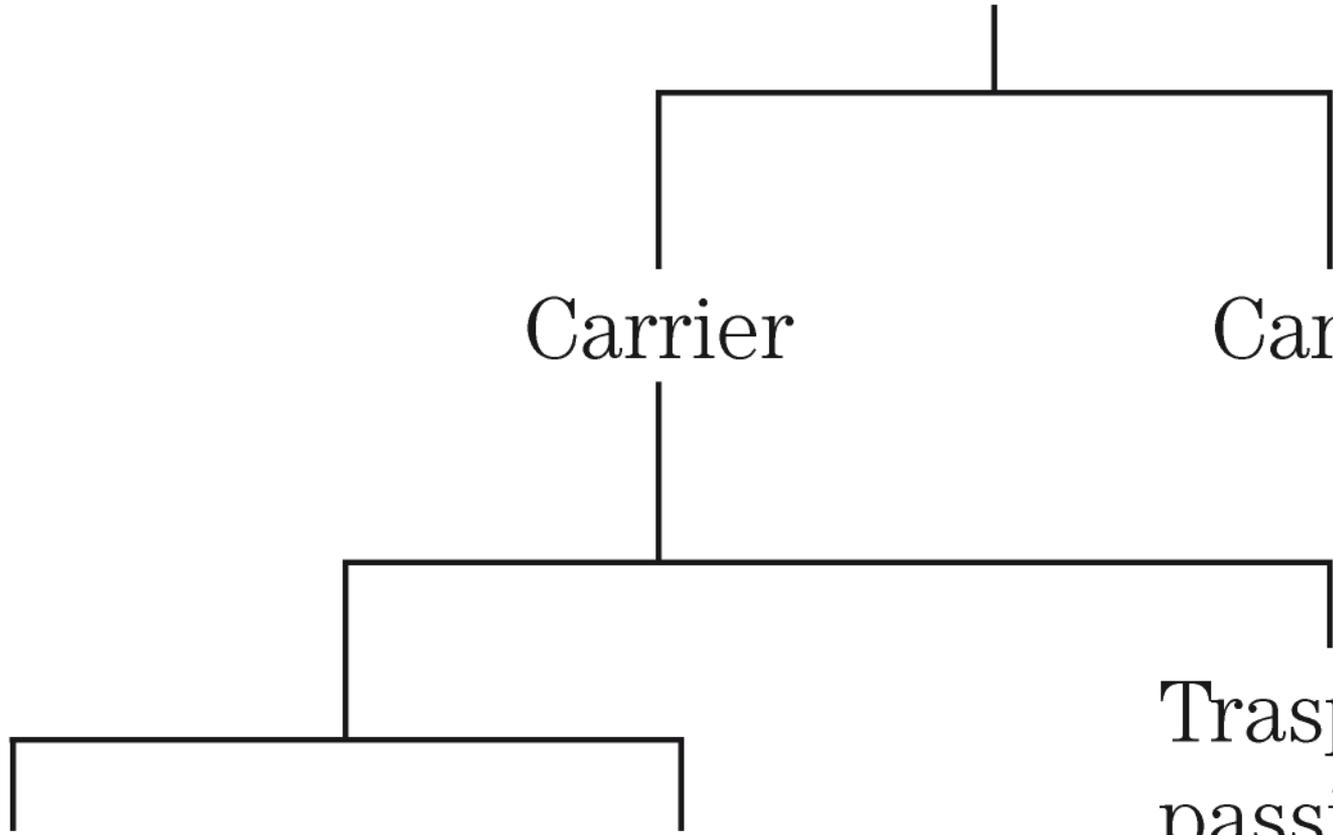
Carrier

Canali

Trasportatori  
passivi

Trasportatori  
attivi secondari

Trasportatori  
attivi primari



I trasportatori (carrier) legano i substrati con elevata stereospecificità, catalizzano il trasporto e sono saturabili (come gli enzimi). Oltre un'alta concentrazione di substrato non aumenta la velocità di trasporto.

I canali permettono il trasporto transmembrana a velocità molto più elevata, vicino ai valori della diffusione semplice. I canali sono meno stereospecifici e normalmente non saturabili.

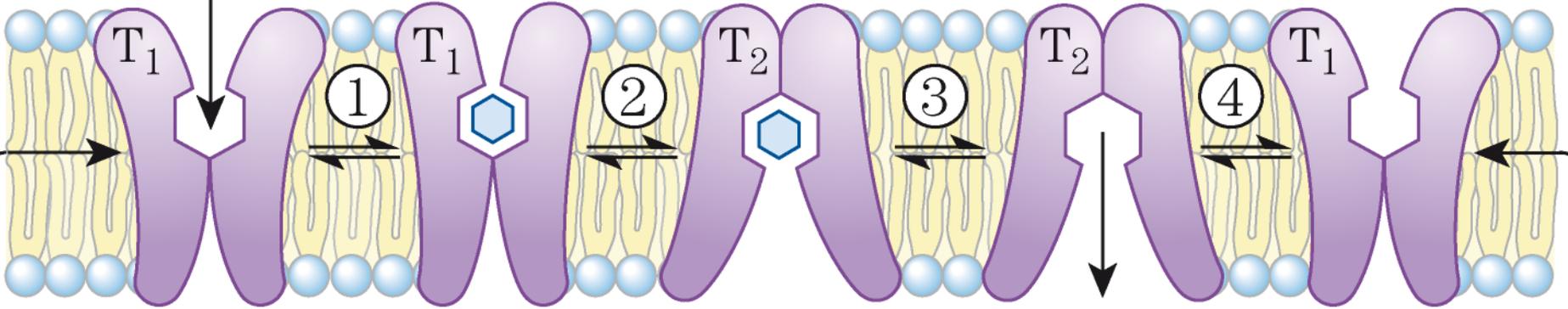
Tra i carrier si possono distinguere trasportatori passivi che facilitano la diffusione secondo gradiente di concentrazione, e trasportatori attivi che possono trasportare attraverso le membrane contro gradiente di concentrazione sfruttando l'energia chimica o il trasporto accoppiato di un altro substrato.

Un esempio di trasporto passivo: il glucosio negli eritrociti attraverso il GLUT1

D-Glucosio



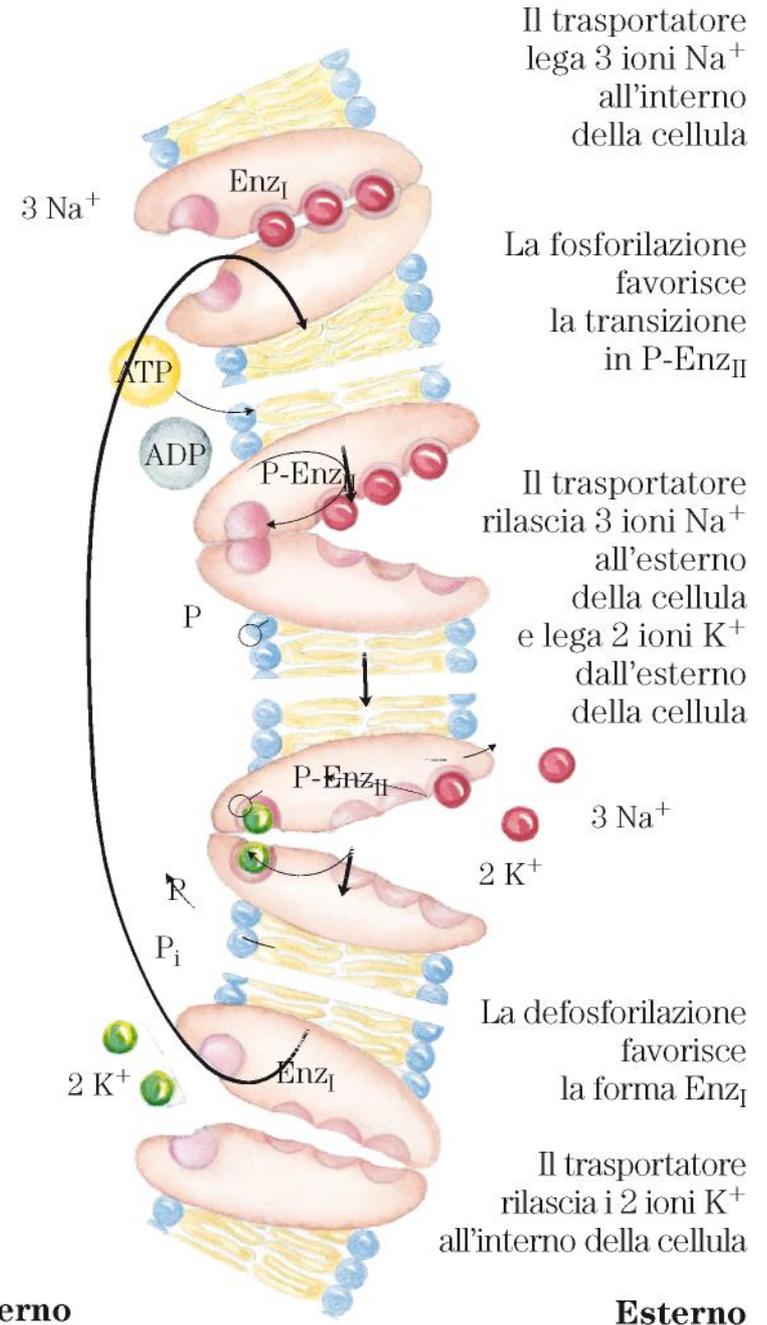
**Esterno**



**Interno**



Le ATPasi sono trasportatori attivi che vengono fosforilate durante il trasporto di substrati come gli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$



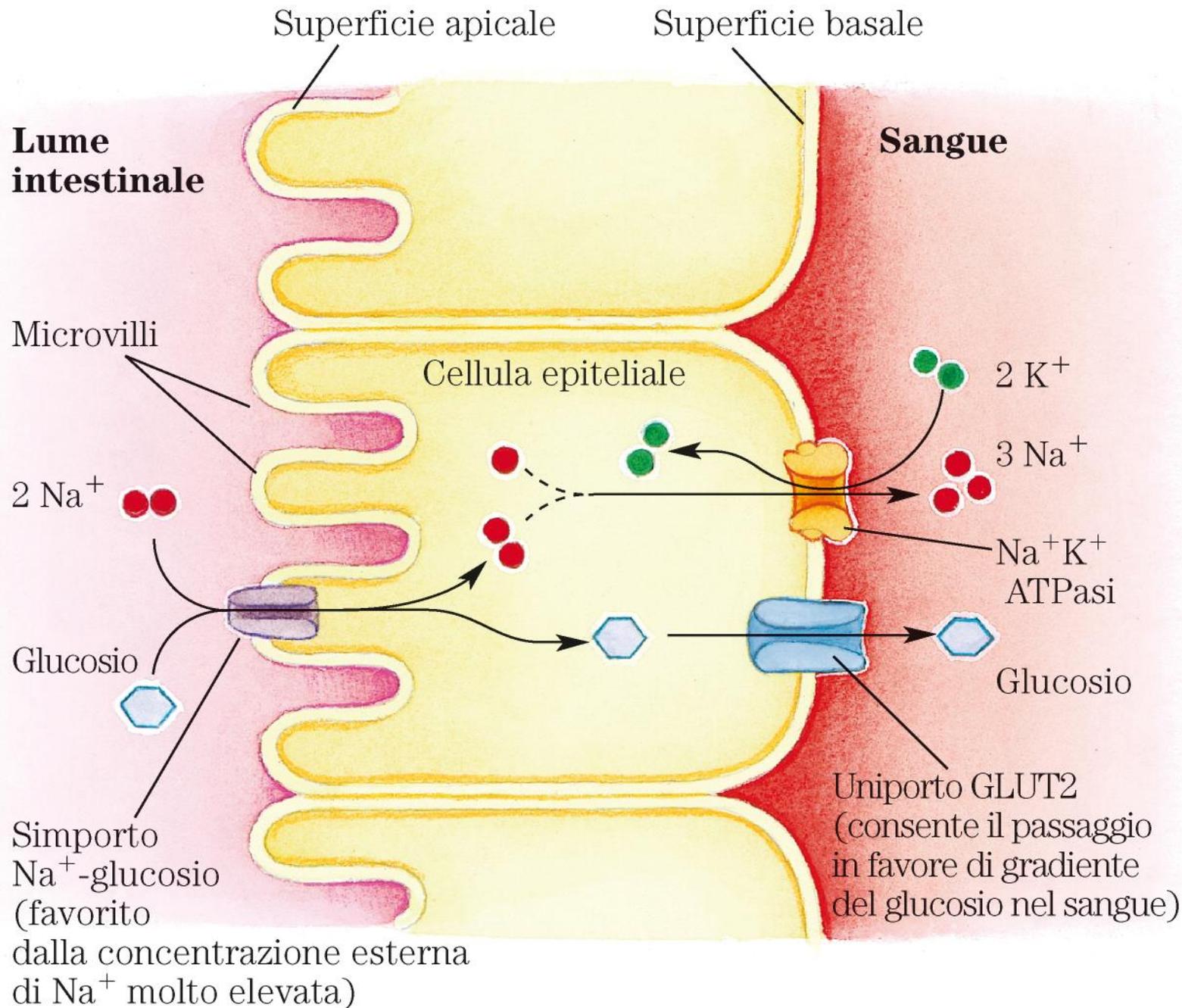
Il trasportatore lega 3 ioni  $\text{Na}^+$  all'interno della cellula

La fosforilazione favorisce la transizione in P-Enz<sub>II</sub>

Il trasportatore rilascia 3 ioni  $\text{Na}^+$  all'esterno della cellula e lega 2 ioni  $\text{K}^+$  dall'esterno della cellula

La defosforilazione favorisce la forma Enz<sub>I</sub>

Il trasportatore rilascia i 2 ioni  $\text{K}^+$  all'interno della cellula



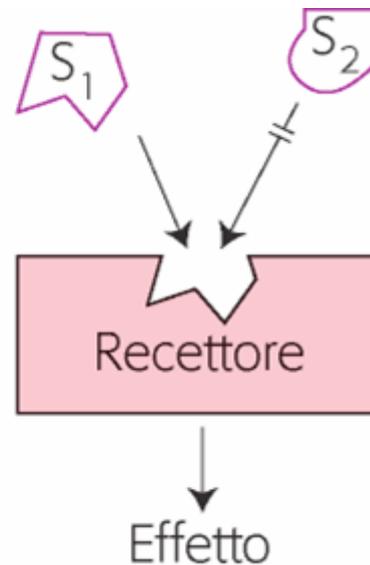
# Biosegnalazione

**Trasduzione del segnale:** proprietà universale delle cellule viventi: capacità delle cellule di ricevere e rispondere a segnali che arrivano dall'esterno della membrana plasmatica.

La **specificità** delle vie di trasduzione del segnale è data dalla complementarità tra le molecole segnale ed i recettori.

**(a) Specificità**

Alcune molecole segnale sono complementari al sito di legame sul recettore; altre non possono adattarsi al sito



L'alta sensibilità delle vie di trasduzione del segnale dipende da tre fattori:

1. **affinità** dei recettori per le molecole segnale:

il recettore può identificare anche concentrazioni bassissime di ligando

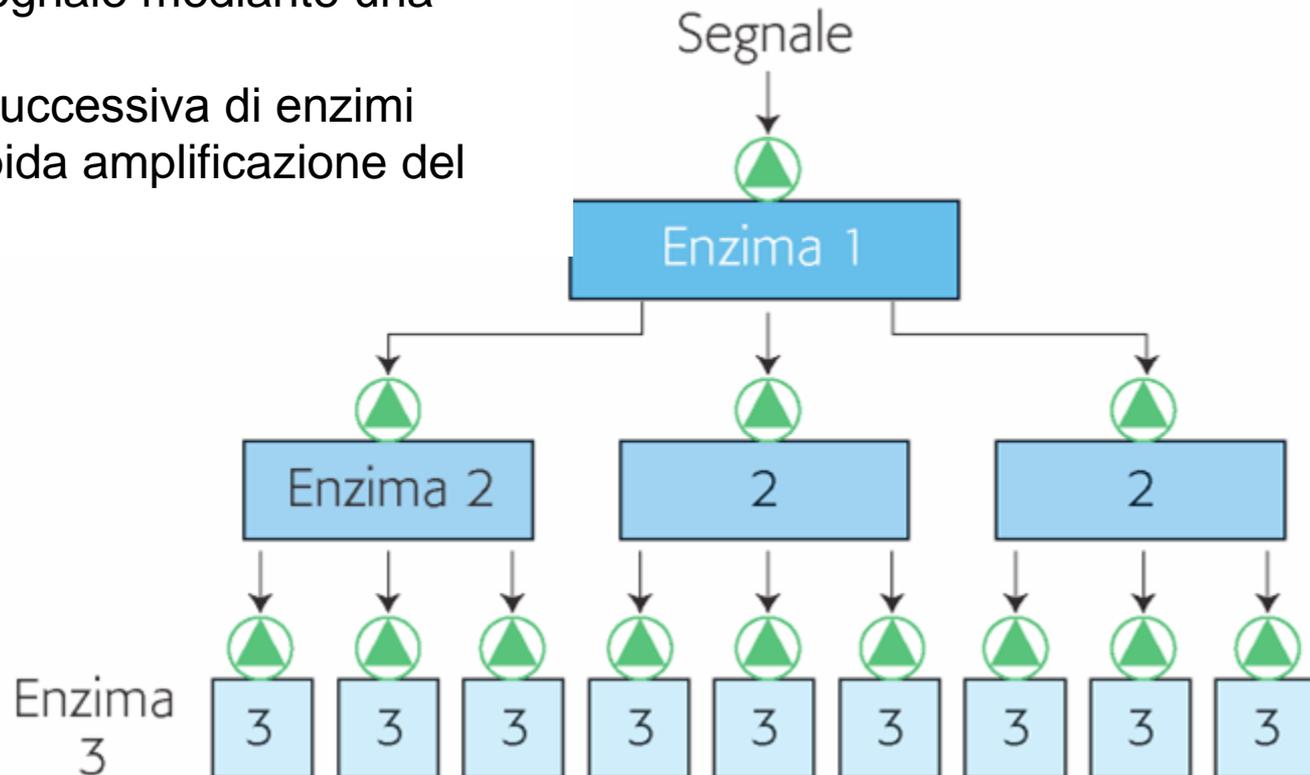
2. **cooperatività** nell'interazione ligando-recettore:

determina una grande variazione nello stato di attivazione del recettore in risposta a piccole variazioni nella concentrazione di ligando (es. emoglobina-ossigeno)

3. **amplificazione** del segnale mediante una

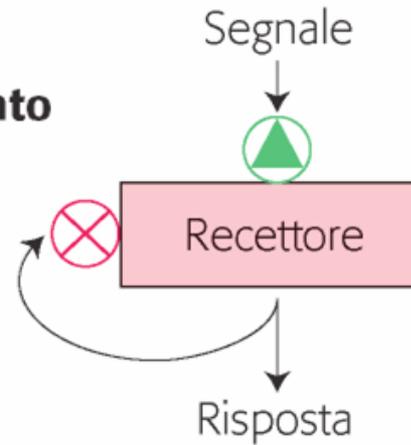
cascata enzimatica:

attraverso l'attivazione successiva di enzimi diversi si ottiene una rapida amplificazione del segnale



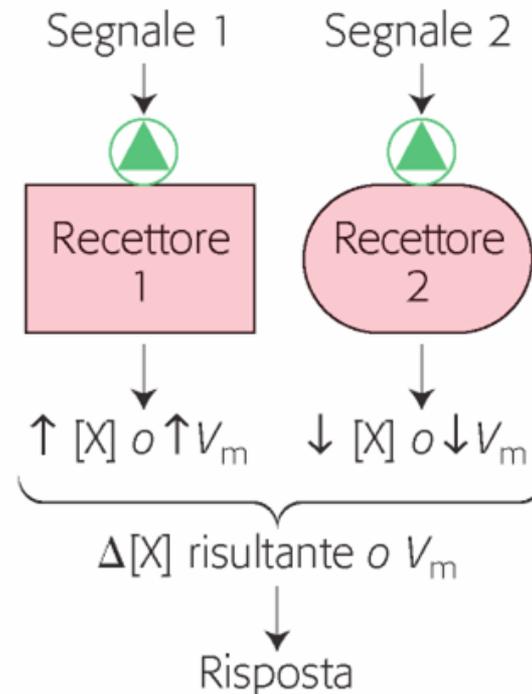
### (c) Desensibilizzazione/adattamento

L'attivazione del recettore innesca un circuito retroattivo che spegne il recettore o lo rimuove dalla superficie



### (d) Integrazione

Quando due segnali hanno effetti opposti su una caratteristica metabolica, come la concentrazione di un secondo messaggero  $X$  o il potenziale di membrana  $V_m$ , il risultato finale è un segnale integrato da entrambi i recettori



In generale, i passaggi della trasduzione del segnale si possono riassumere come segue:

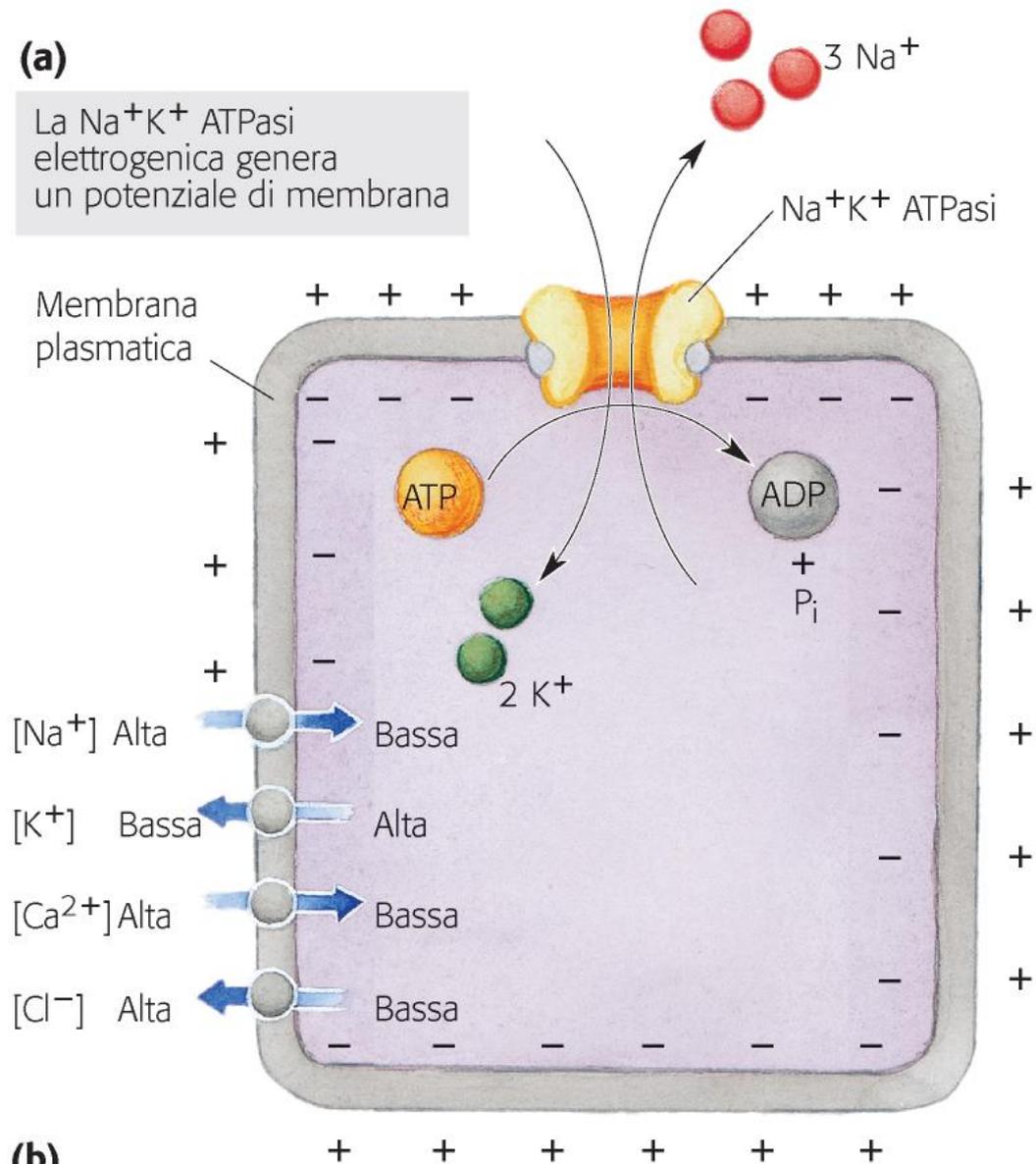
1. Rilascio della molecola segnale (primo messaggero)
2. Interazione del segnale con il suo recettore
3. Recettore attivato interagisce con un sistema cellulare che produce un secondo segnale o modificazioni dell'attività di proteine cellulari
4. Alterazione dell'attività metabolica della cellula bersaglio
5. Fine della trasduzione e ritorno della cellula allo stato originario

Le cellule eucariotiche possiedono 6 tipi generali di meccanismi di segnalazione:

- canali ionici,
- recettori enzimatici,
- proteine di membrana che agiscono mediante proteine G,
- recettori nucleari,
  
- recettori non enzimatici che legano e attivano proteine chinasi solubili,
- recettori di adesione che scambiano informazioni tra matrice extracellulare e citoscheletro.

**(a)**

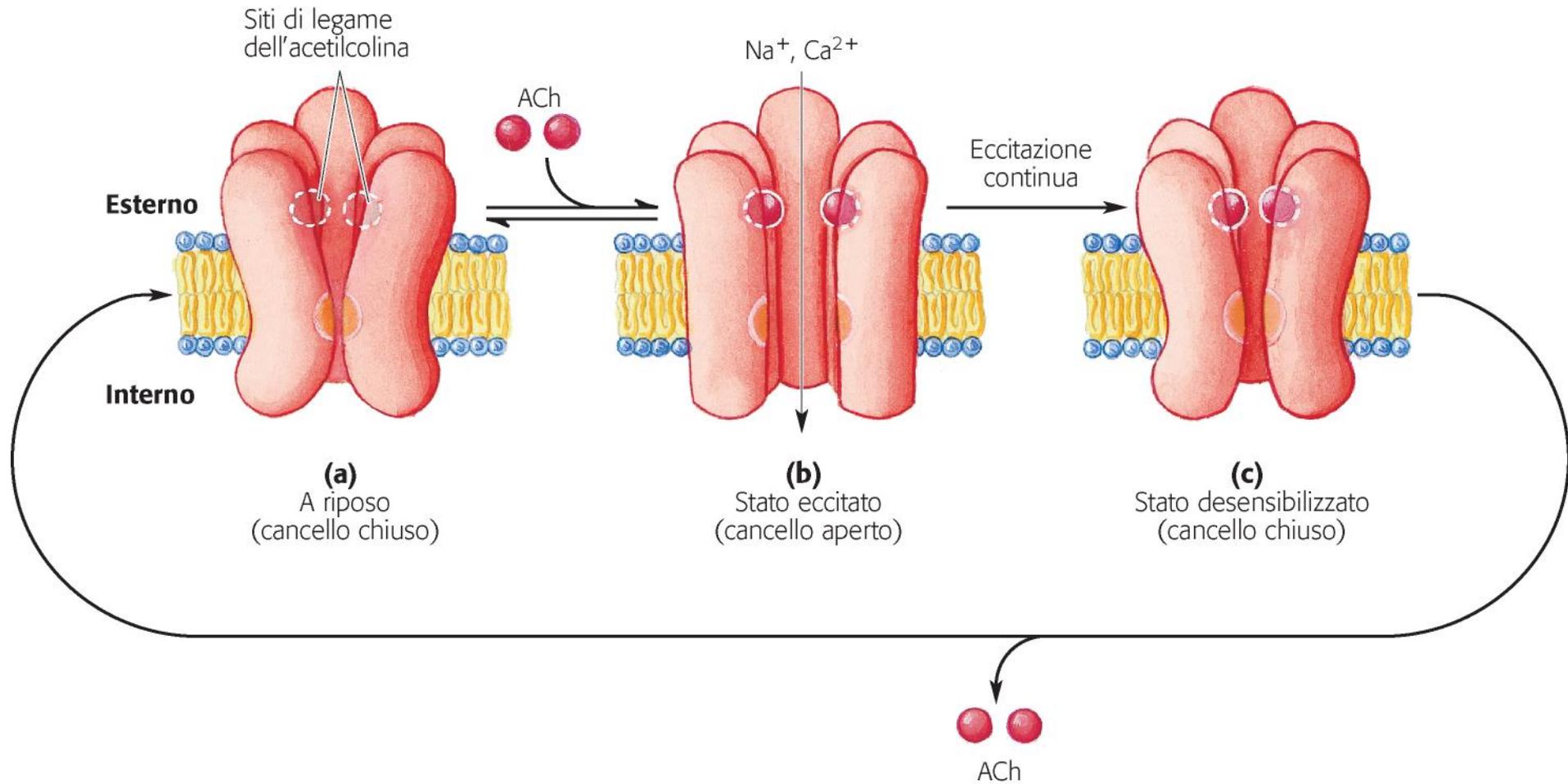
La  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasi elettrogenica genera un potenziale di membrana



I **canali ionici** della membrana plasmatica si aprono e si chiudono in risposta al legame di ligandi chimici o a variazioni del potenziale di membrana

**(b)**

Gli ioni tendono a muoversi attraverso una membrana polarizzata in favore del gradiente elettrochimico



(a) La breve esposizione del canale ionico a riposo all'acetilcolina produce (b) l'apertura del canale. (c) Esposizioni lunghe determinano una desensibilizzazione e chiusura del canale.

L'enzima acetilcolinesterasi (*AChE*), presente nello spazio sinaptico, degrada ACh nei due metaboliti inattivi colina e acido acetico.

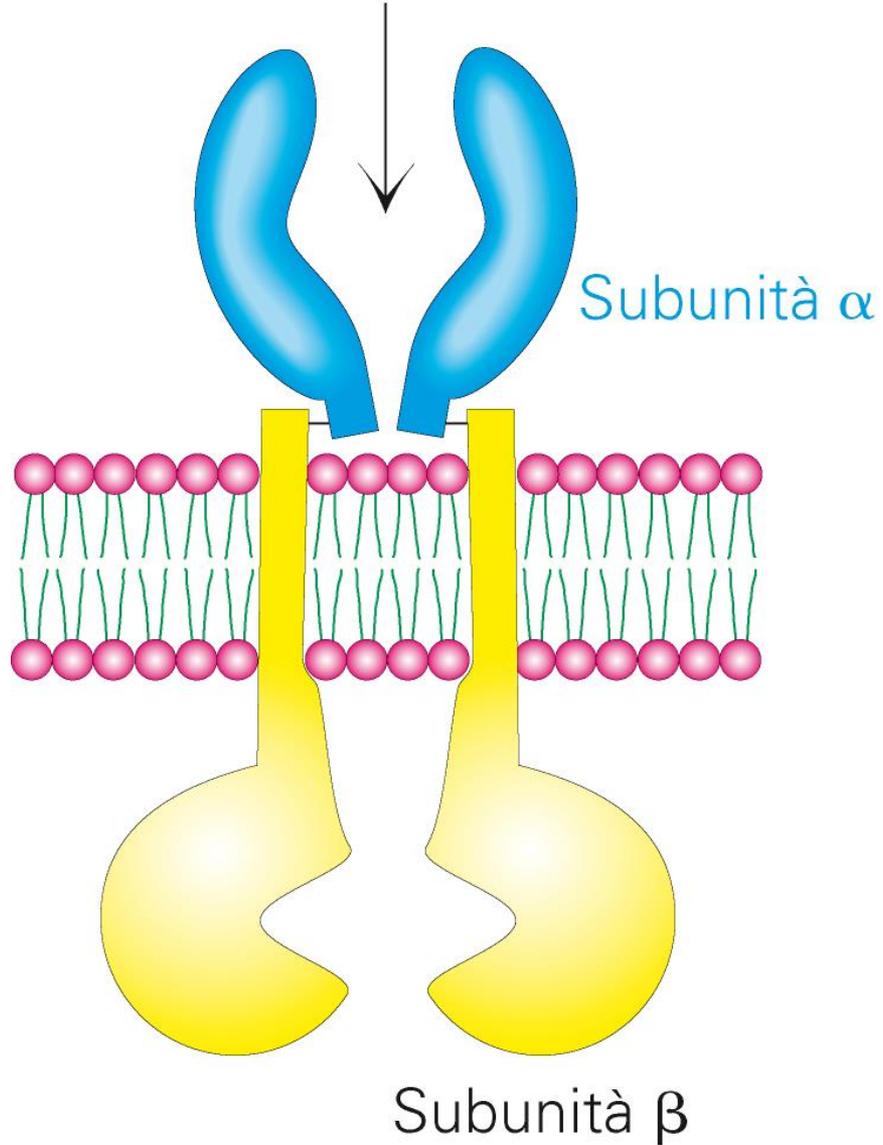
I **recettori enzimatici** sono proteine che possiedono un dominio che lega il ligando sulla superficie extracellulare della membrana, ed un dominio con un sito attivo enzimatico sulla faccia intracellulare della membrana.

Tra i recettori enzimatici si distinguono l'attività di **proteine chinasi** che fosforilano residui di tirosina in proteine bersaglio (**recettore insulina**) oppure attività enzimatiche che producono il **secondo messaggero intracellulare cGMP** in risposta a segnali extracellulari (**recettore del peptide natriuretico atriale**)

**Proteina chinasi:** enzima che trasferisce un gruppo fosforico dall'ATP alla catena laterale di un residuo amminoacidico di una proteina.

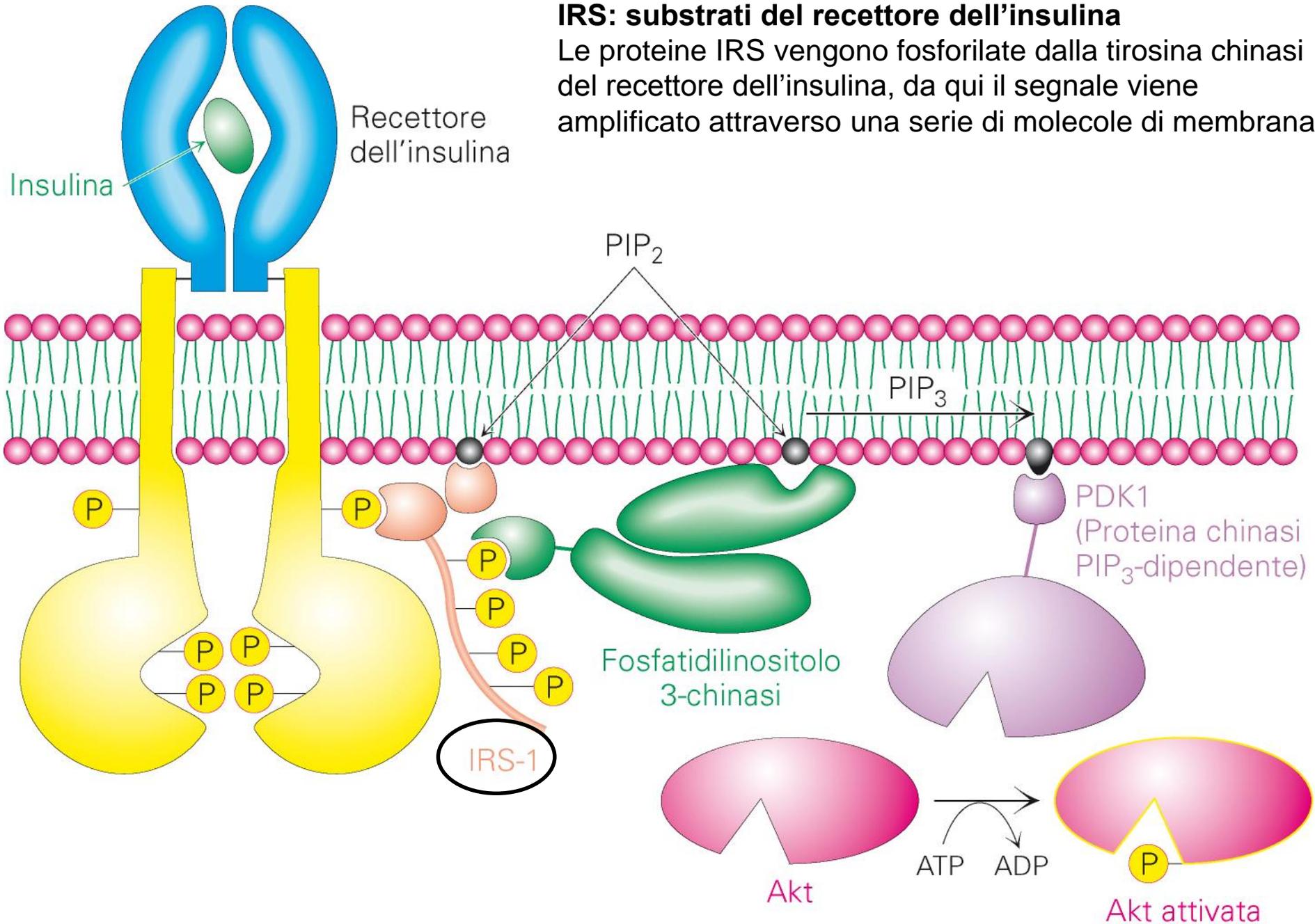
Sito di legame dell'insulina

2 subunità  $\alpha$  extracellulari  
2 subunità  $\beta$  transmembrana

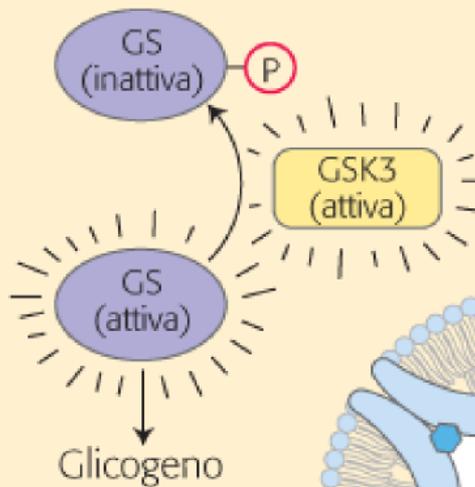


## IRS: substrati del recettore dell'insulina

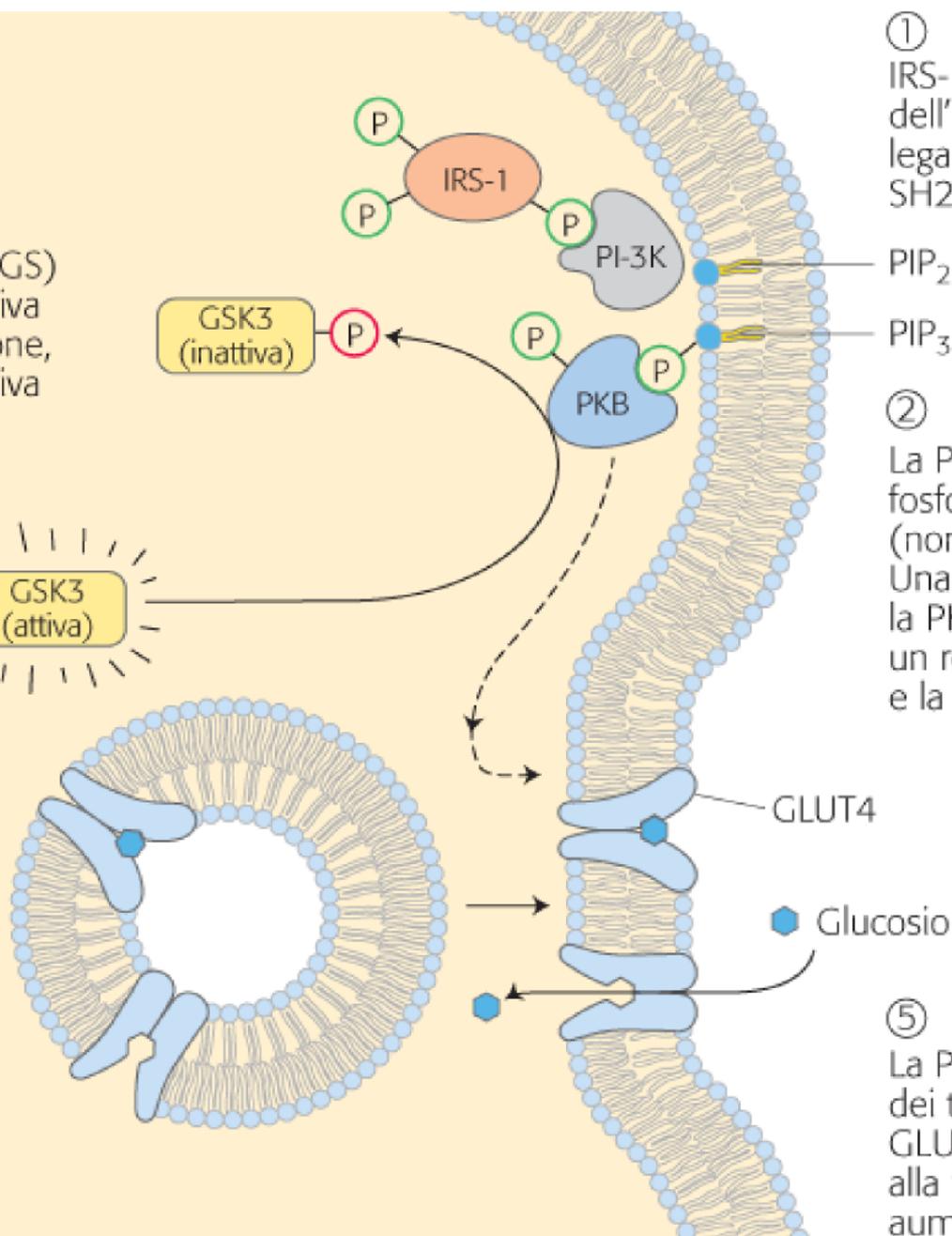
Le proteine IRS vengono fosforilate dalla tirosina chinasi del recettore dell'insulina, da qui il segnale viene amplificato attraverso una serie di molecole di membrana



③ GSK3, inattivata dalla fosforilazione, non può convertire la glicogeno sintasi (GS) nella sua forma inattiva mediante fosforilazione, e quindi GS resta attiva



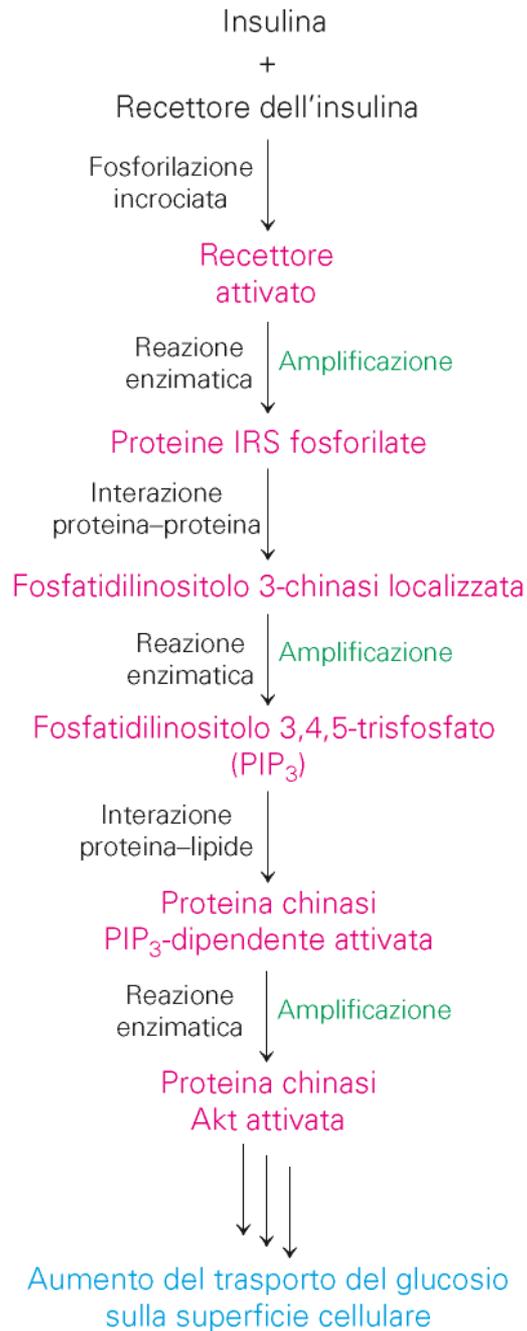
④ La sintesi del glicogeno da glucosio è accelerata

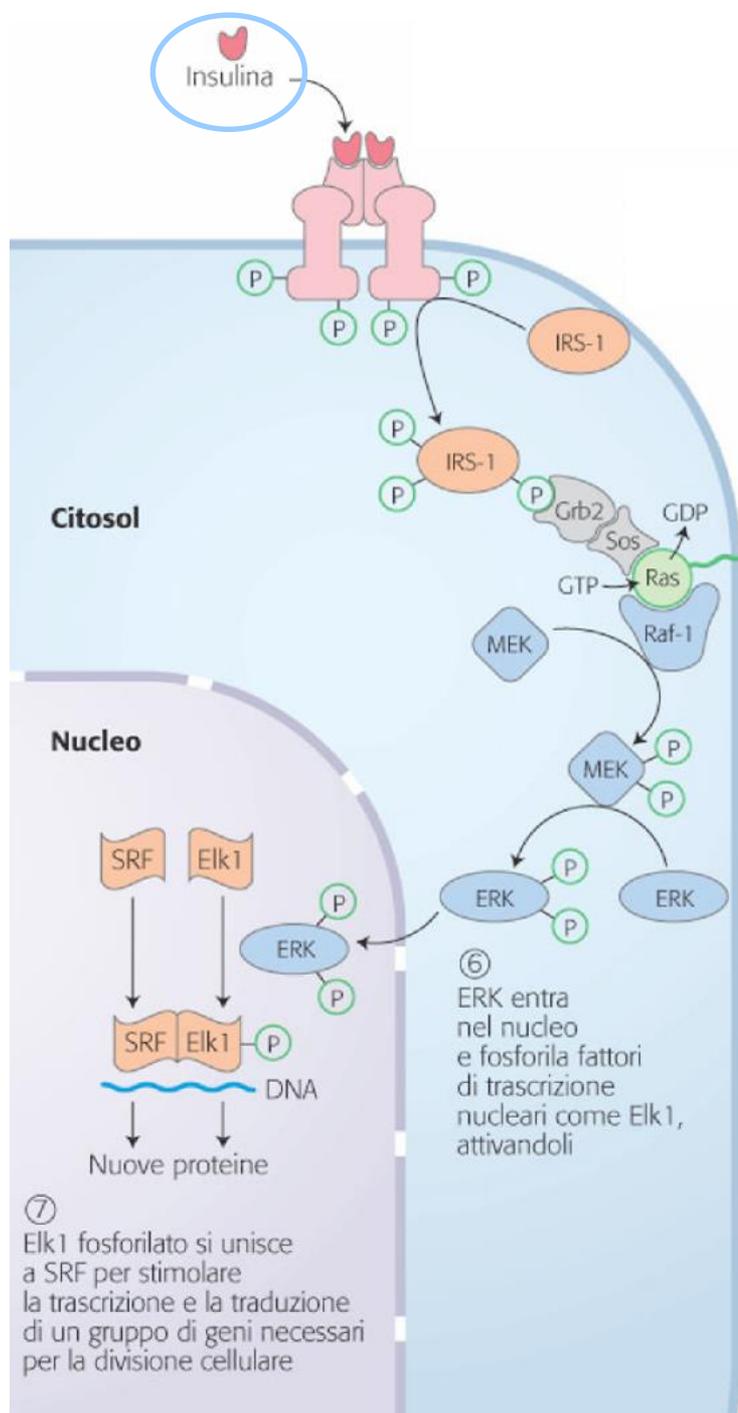


① IRS-1, fosforilata dal recettore dell'insulina, attiva la PI-3K legandosi al suo dominio SH2. La PI-3K converte PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub>

② La PKB legata a PIP<sub>3</sub> è fosforilata dalla PDK1 (non mostrata). Una volta attivata, la PKB fosforila GSK3 su un residuo di Ser e la inattiva

⑤ La PKB stimola il movimento dei trasportatori del glucosio GLUT4 da vescicole interne alla membrana plasmatica, aumentando l'assunzione di glucosio





① Il recettore dell'insulina lega l'insulina e va incontro a un'autofosforilazione sui residui di Tyr nel dominio carbossi-terminale

② Il recettore dell'insulina fosforila IRS-1 a livello dei residui di Tyr

③ Il dominio SH2 di Grb2 lega la (P)-Tyr di IRS-1. Sos si lega a Grb2 e poi a Ras, causando il rilascio di GDP e la sua sostituzione con GTP

④ La forma di Ras attivata si lega e attiva Raf-1

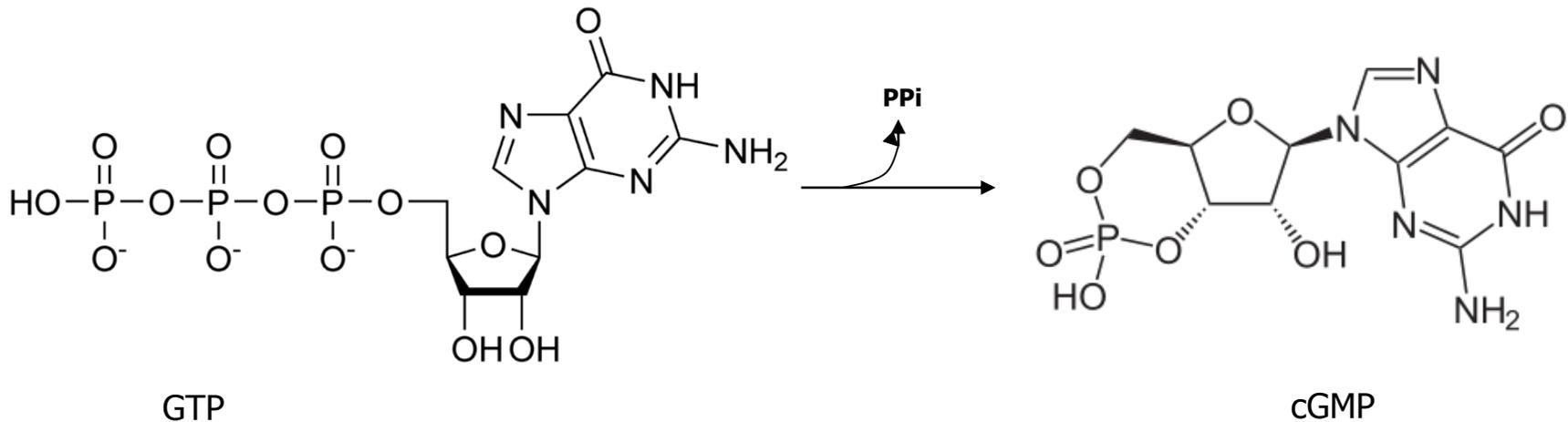
⑤ Raf-1 fosforila MEK a livello di due residui di Ser, attivandola. MEK fosforila ERK su un residuo di Thr e su uno di Tyr, attivandola

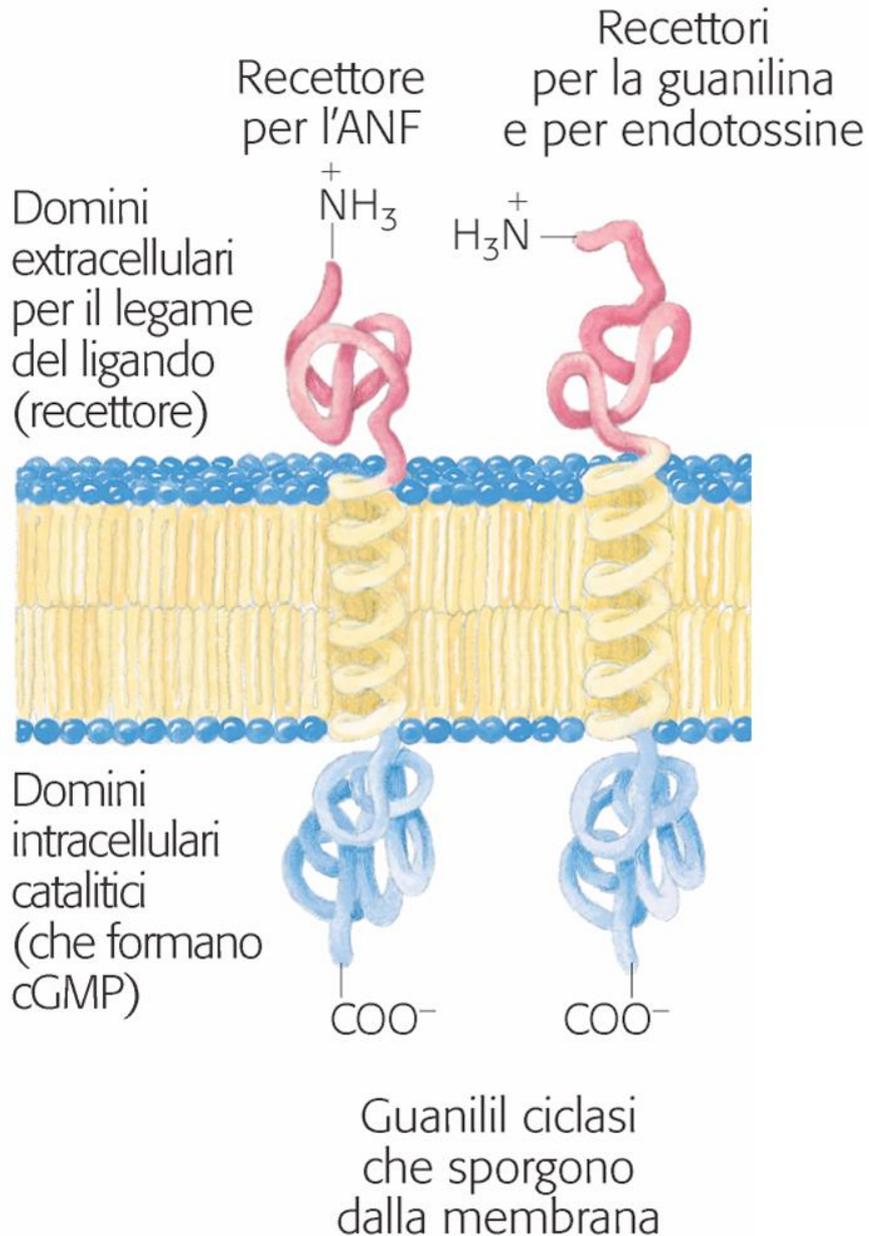
⑦ Elk1 fosforilato si unisce a SRF per stimolare la trascrizione e la traduzione di un gruppo di geni necessari per la divisione cellulare

La **guanilil ciclasi** è un recettore enzimatico che, una volta attivato, produce guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (**GMP ciclico o cGMP**) a partire da GTP.

Il cGMP è un **secondo messaggero** che innesca risposte diverse a seconda del tessuto.

Es.: La guanilil ciclasi del rene è attivata **dall'ormone fattore natriuretico atriale (ANF)**, rilasciato dalle cellule dell'atrio quando il cuore è dilatato da un aumento del volume di sangue.





ANF viene trasportato col sangue al rene dove attiva la guanilil ciclasti.

L'aumento della concentrazione di cGMP incrementa la velocità di escrezione renale di  $\text{Na}^+$ , e quindi di acqua, riducendo il volume del sangue.

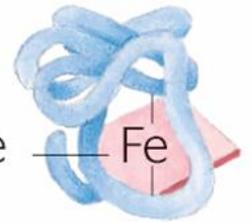
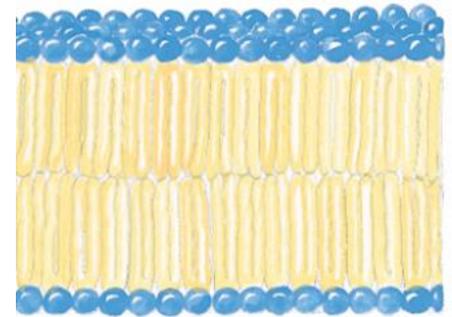
Una isoforma diversa della guanilil ciclasasi (endocellulare) associata ad un gruppo eme viene attivata **dall'ossido nitrico (NO)**.

NO diffonde liberamente nelle cellule vicine, si lega al gruppo eme della guanilil ciclasasi e attiva la produzione di cGMP.

Una specifica **fosfodiesterasi (PDE)** converte cGMP in 5'-GMP inattivo. Diverse isoforme di PDE sono variamente distribuite nei tessuti.

- Azione rilassante sul muscolo cardiaco.

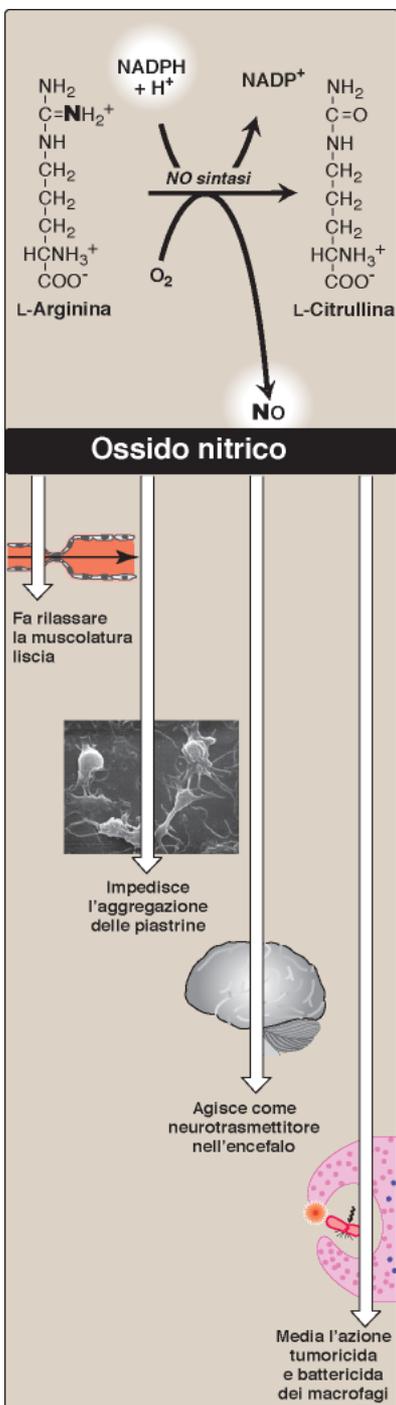
- Effetto di **nitroglicerina e nitrovasodilatatori** nella cura dell'angina (inibizione PDE).



Eme

Guanilil ciclasasi  
solubile attivata  
da NO

**(b)**



- L'NO è il **fattore rilassante di derivazione endoteliale**, che provoca vasodilatazione facendo rilassare la parete della muscolatura liscia delle pareti vascolari

- Svolge anche altre funzioni nell'organismo (antiaggregante piastrinico e neurotrasmettitore)

- Ha un'emivita molto breve e viene rapidamente convertito in nitriti e nitrati in seguito alla reazione con l'ossigeno e con il superossido

- L'NO viene sintetizzato a partire dall'**arginina** che reagisce con l'O<sub>2</sub> in presenza di **NADPH** in una reazione catalizzata dalla **NO sintasi**

**I recettori accoppiati a proteine G e a secondi messaggeri** sono definiti da 3 componenti essenziali:

1. Un recettore sulla membrana plasmatica
2. Un enzima nella membrana plasmatica che genera un secondo messaggero
3. Una proteina che lega nucleotidi guanosinici (proteina G)

La proteina G stimolata dal recettore attivato, scambia il GDP con il GTP.

Il complesso proteina-GTP si dissocia dal recettore occupato e si lega ad uno adiacente alterandone l'attività (recettore  $\beta$  adrenergico)

## Le proteine G

Il nome deriva dalla capacità di **legare nucleotidi della guanina**.

Le proteine di membrana che legano il GTP interagiscono con i sistemi recettoriali che **attivano** o **inibiscono l'adenilato ciclasi** (effettore).

Delle diverse proteine G ad oggi descritte, le due meglio caratterizzate sono: le **Gs** (**stimolazione** dell'adenilato ciclasi) e le **Gi** (**inibizione** dell'adenilato ciclasi).

Queste due famiglie di proteine G agiscono **anche** con **altri recettori** e con **proteine bersaglio diverse** dall'adenilato ciclasi.

L'azione dell'ormone è limitata dalla **lenta idrolisi del GTP** legato.

NB: l'azione del ligando sulla proteina **Gi** è **analoga** a quella sulla proteina **Gs**, ma **l'effetto è contrario sull'adenilato ciclasi**.

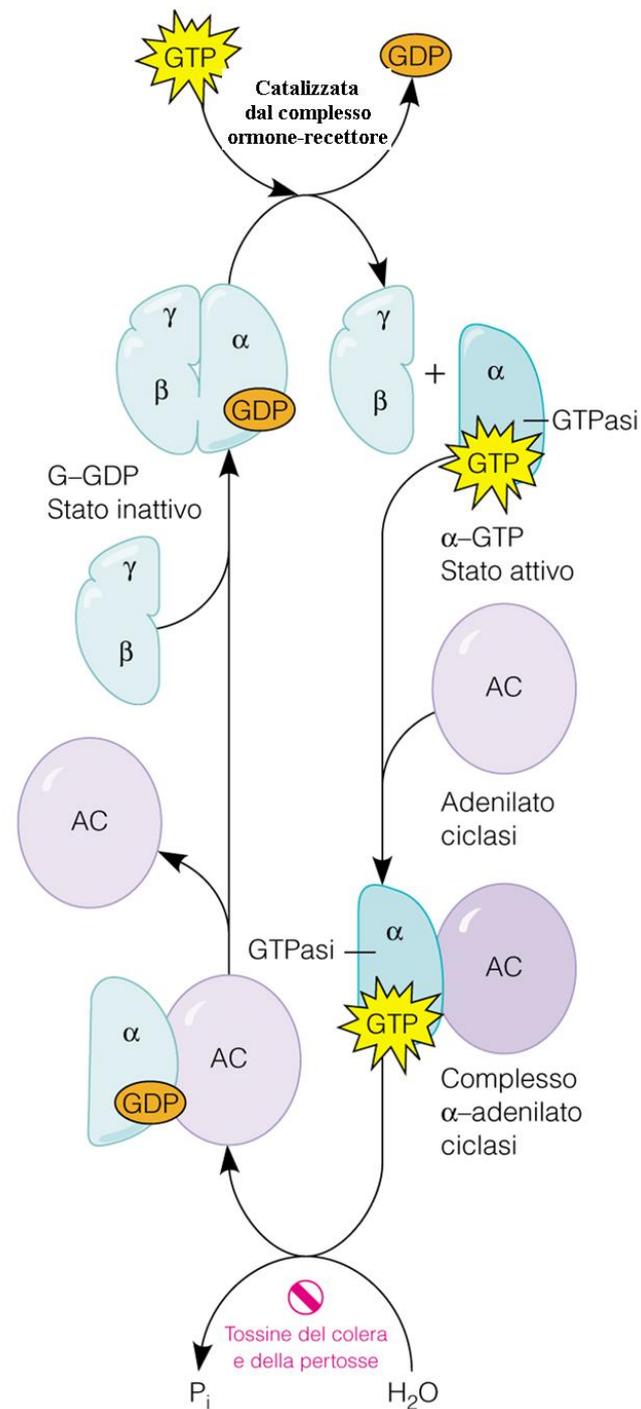
Il legame del **GTP** provoca un'interazione **inibitoria** della **Gi** con l'adenilato ciclasi: diminuzione della sintesi di cAMP.



**Attività GTPasica della proteina G:** idrolisi del GTP legato a GDP (avviene **lentamente**). Anche questo processo è **assistito da proteine** (GAP, GTPase activating protein).

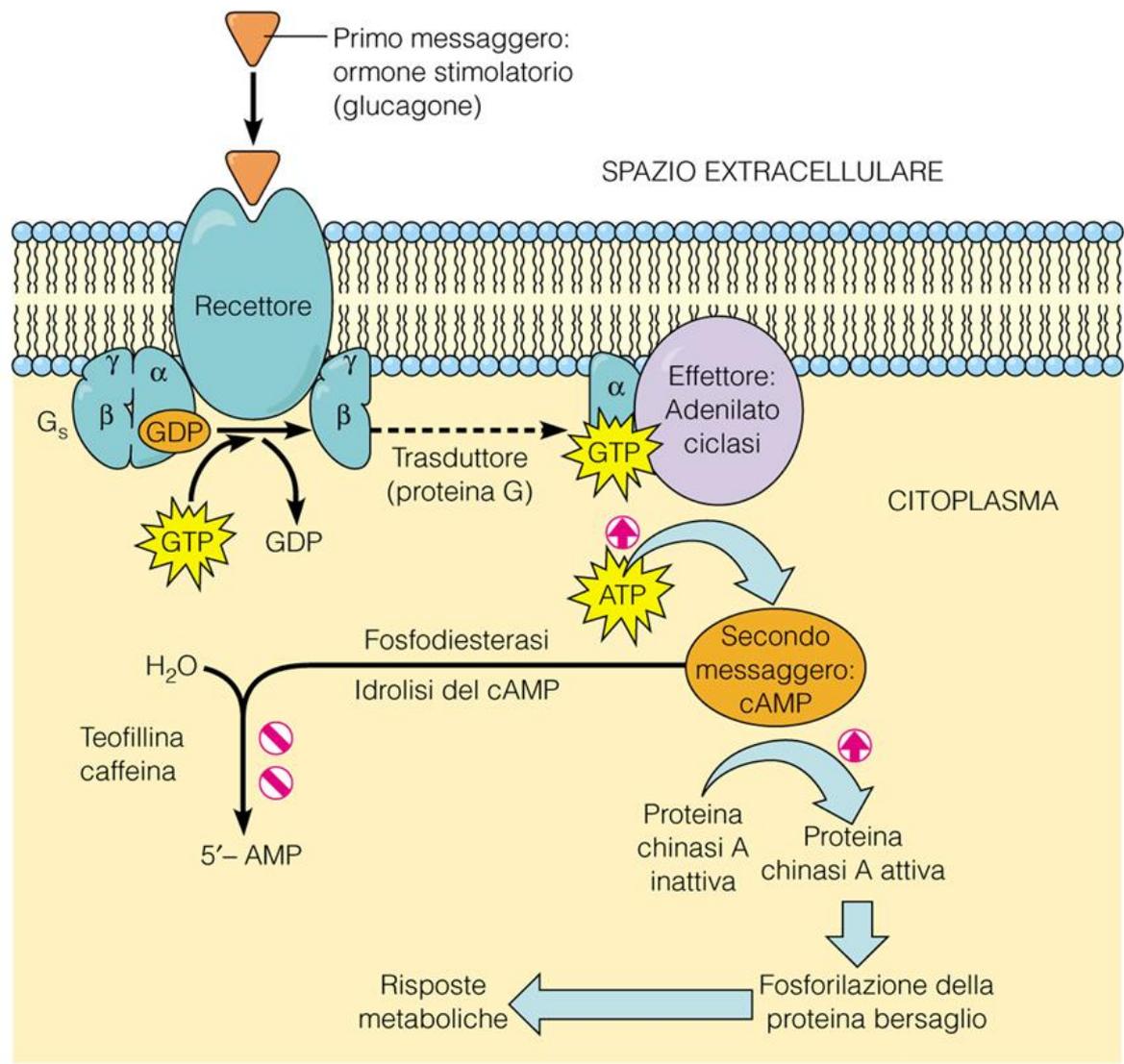
Il **permanere** dell'attivazione di Gs dipende dalla presenza di **GTP legato**.

Si viene quindi ad **attivare** la proteina chinasi cAMP dipendente (**proteina chinasi A, PKA**), con conseguente fosforilazione di proteine bersaglio intracellulari (**attivazione o inibizione di reazioni metaboliche**).



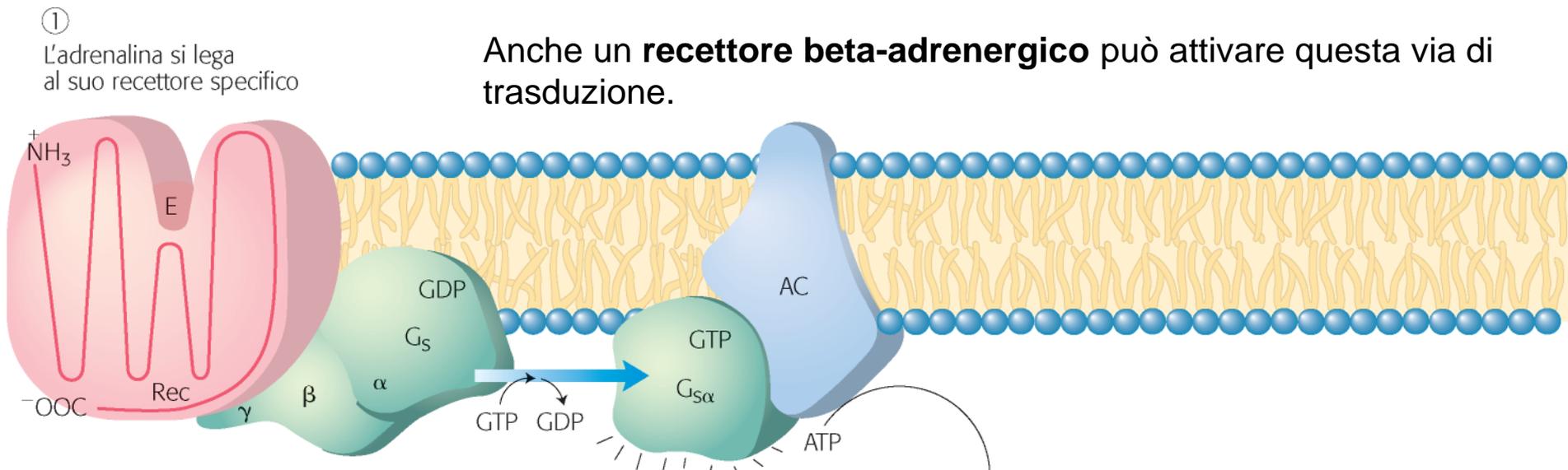
**Esempio** di via di trasduzione del segnale che coinvolge l'adenilato ciclasi: innesco della glicogenolisi da parte del **glucagone**.

La **teofillina** e la **cafeina** (componenti del tè e del caffè) **inibiscono** il **catabolismo del cAMP** e **promuovono** di conseguenza **le vie da esso stimulate**.



Legenda:  
 ⬆️ Risposta stimolatoria  
 ⬇️ Risposta inibitoria

Anche un **recettore beta-adrenergico** può attivare questa via di trasduzione.



① L'adrenalina si lega al suo recettore specifico

② Il recettore occupato dall'ormone determina la sostituzione del GDP legato alla G<sub>s</sub> con GTP, attivando la G<sub>s</sub>

③ G<sub>s</sub> (la subunità α) interagisce con l'adenilil ciclasi e la attiva

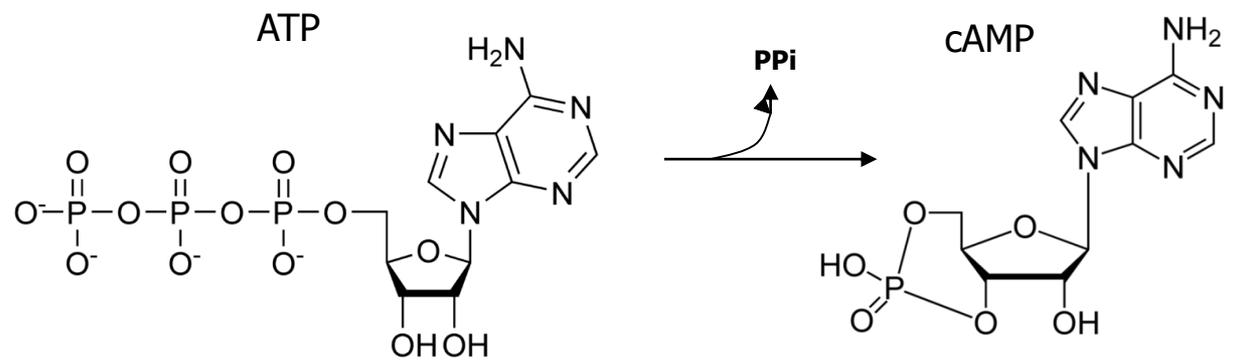
④ L'adenilil ciclasi catalizza la formazione di cAMP

⑤ La PKA viene attivata dal cAMP

⑥ La fosforilazione di proteine cellulari da parte della PKA causa la risposta cellulare all'adrenalina

⑦ Il cAMP è degradato e viene a cessare l'attivazione della PKA

nucleotide ciclico fosfodiesterasi



①

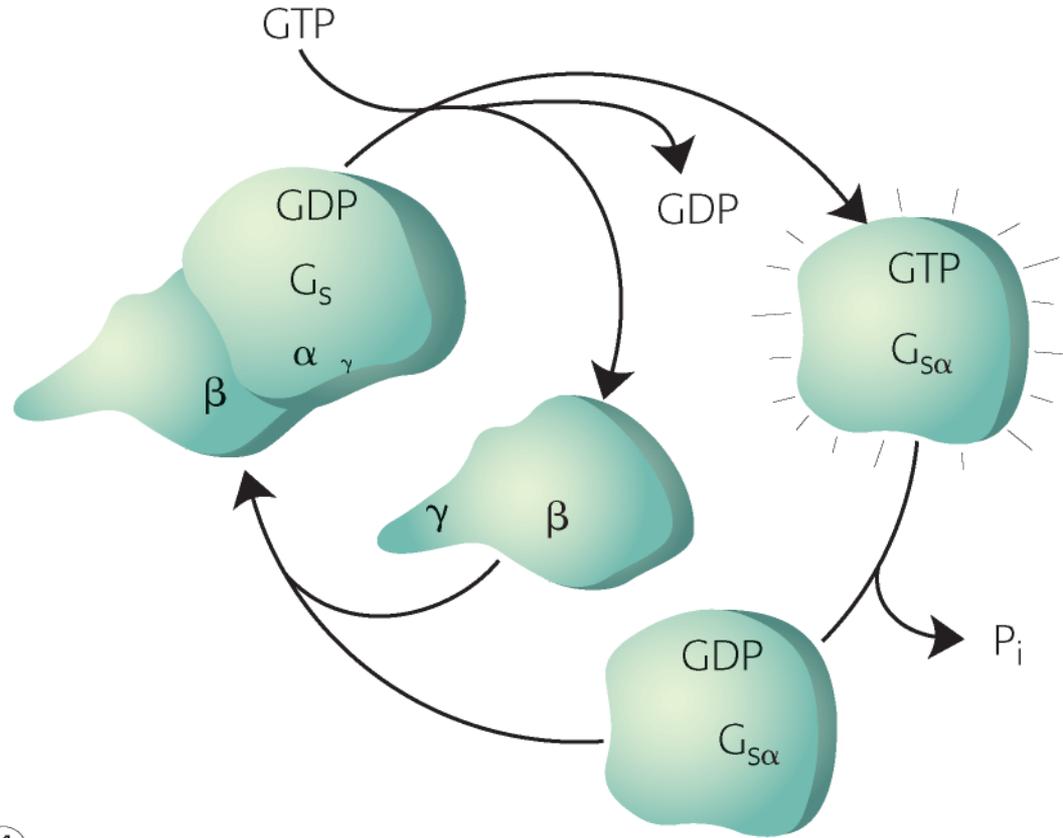
$G_s$  con legato il GDP è spenta; essa non può attivare l'adenilil ciclasi

②

Il contatto di  $G_s$  con il complesso recettore-ormone determina la sostituzione di GDP con GTP

③

$G_s$  con legato il GTP si dissocia nelle subunità  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ . La subunità  $G_{s\alpha}$  con il GTP è attiva e può stimolare l'attività dell'adenilil ciclasi

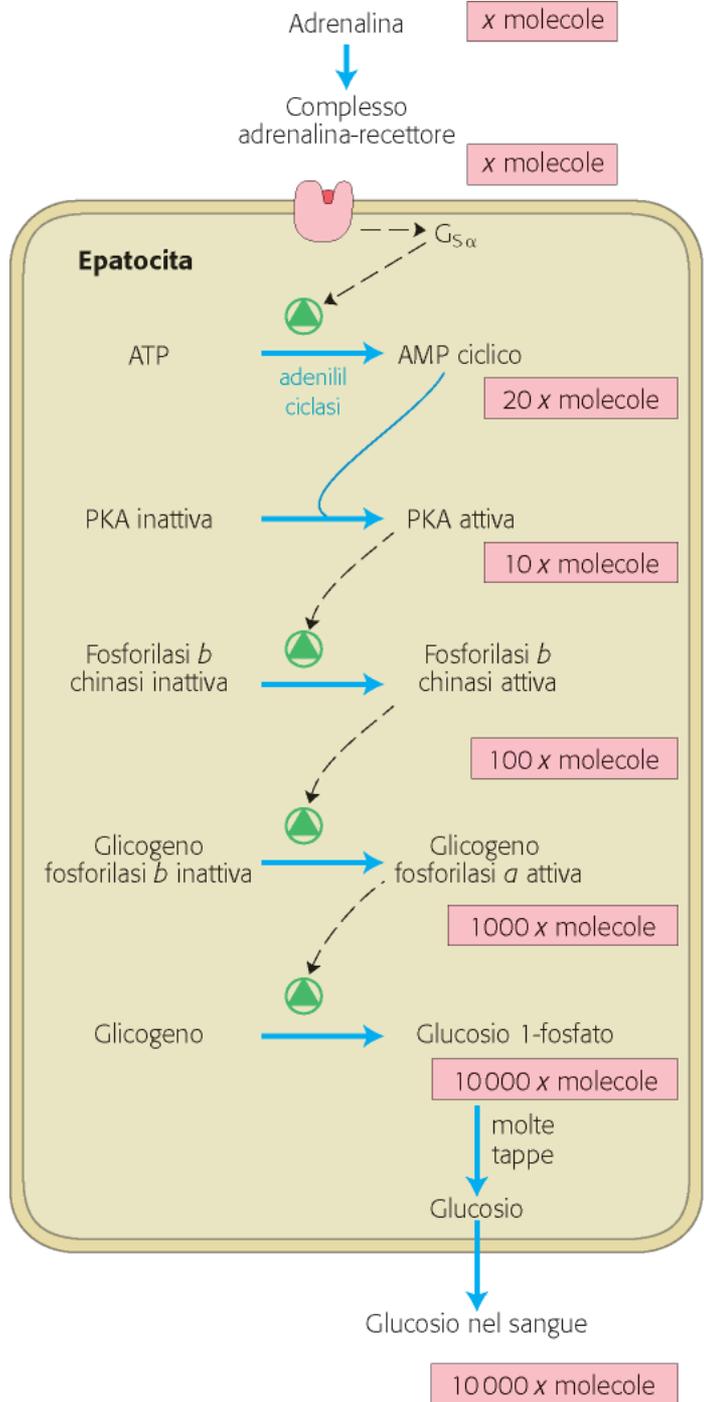


La stimolazione di  $G_s$  è autolimitata attraverso una attività GTPasica che converte il GTP in GDP.

La proteina  $G_s$  inattiva si dissocia dall'adenilil ciclasi ed è disponibile per una nuova interazione

④

Il GTP legato a  $G_{s\alpha}$  viene idrolizzato da un'attività GTPasica intrinseca alla stessa proteina  $G_{s\alpha}$ ; in questo modo questa proteina si autospegne. La subunità  $\alpha$  inattiva si riassocia alle subunità  $\beta$  e  $\gamma$



Esempio: L'adrenalina innesca nell'epatocita una cascata di reazioni enzimatiche e genera una grande amplificazione del segnale.

La proteina G può attivare un altro enzima legato alla membrana: la **fosfolipasi C**.

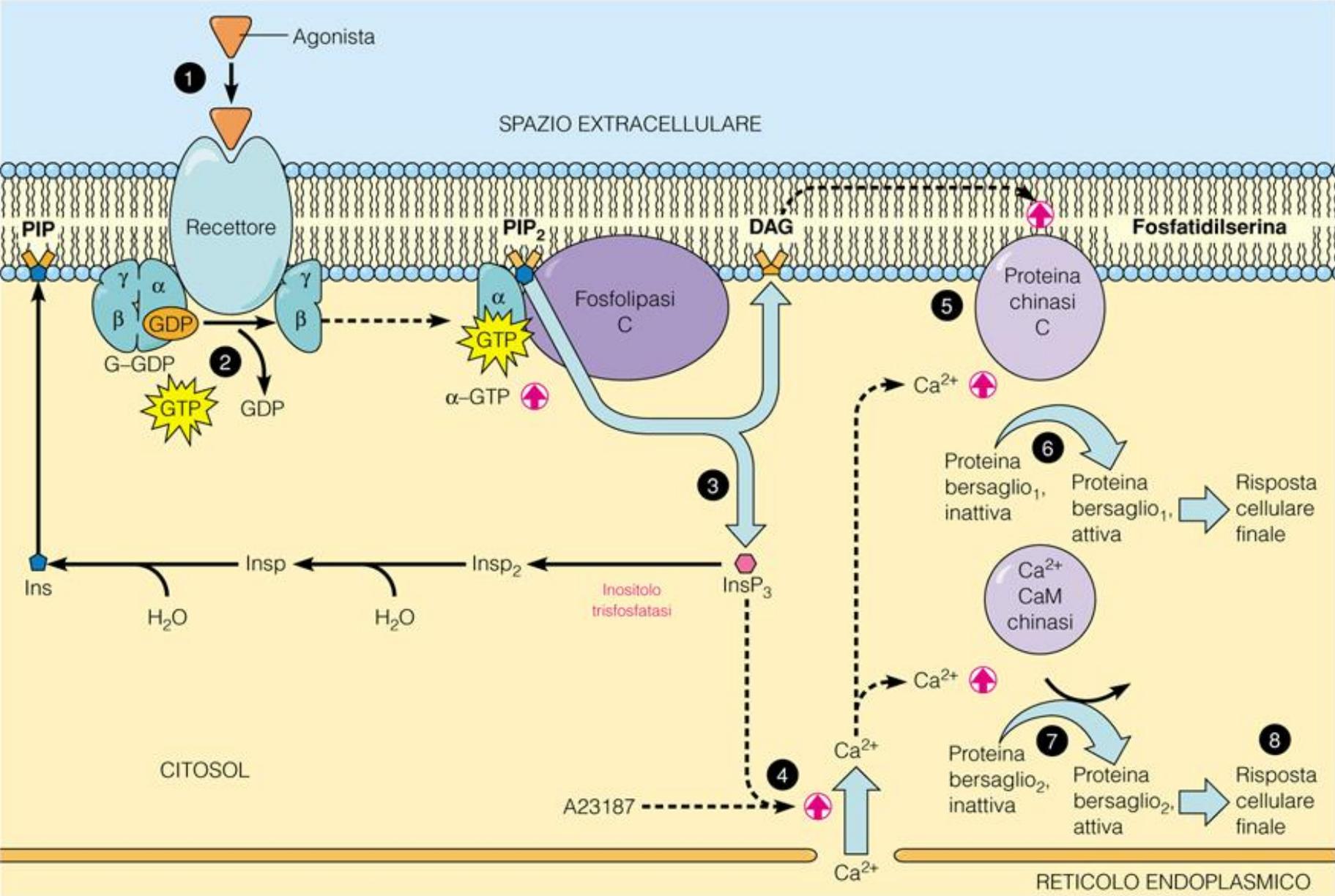
La fosfolipasi C rompe il **fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato** ( $\text{PIP}_2$ ) formando due prodotti: l'**1,2-diacilglicerolo** (DAG) e l'**inositolo 1,4,5-trisfosfato** ( $\text{InsP}_3$  o  $\text{IP}_3$ ).

Il  $\text{PIP}_2$  è uno specifico lipide della famiglia dei **fosfoinositidi** (lipidi di membrana).

Questa via di trasduzione del segnale comporta il **riciclo dei fosfoinositidi**.

Vengono **rilasciati ioni calcio** che **stimolano** sia la **proteina chinasi C** sia la **calmodulina chinasi**.

La **proteina chinasi C** (Calcio dipendente) richiede per la sua attività **calcio** e **fosfatidilserina**.

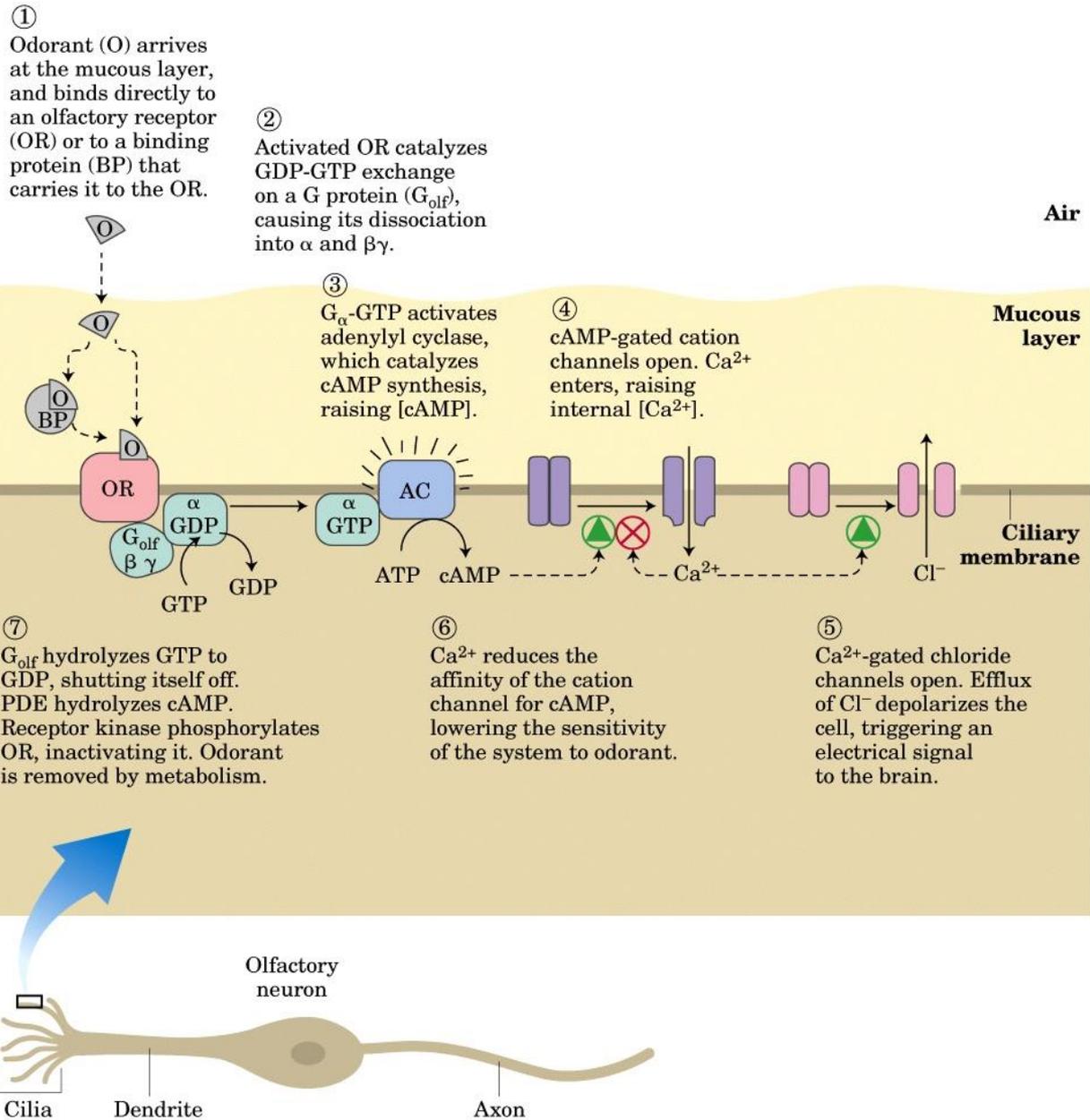


I processi **metabolici** controllati dal flusso di **calcio** e dalla **fosforilazione di proteine** specifiche sono **tanti**, quindi il **sistema dei fosfoinositidi** possiede una **grande versatilità** come meccanismo di **controllo**.

Esiste un **ruolo** per il sistema dei fosfoinositidi **anche** nel controllo della **crescita cellulare**: il fattore di crescita derivato dalle piastrine (**PDGF**) funziona stimolando l'idrolisi del  $PIP_2$ .

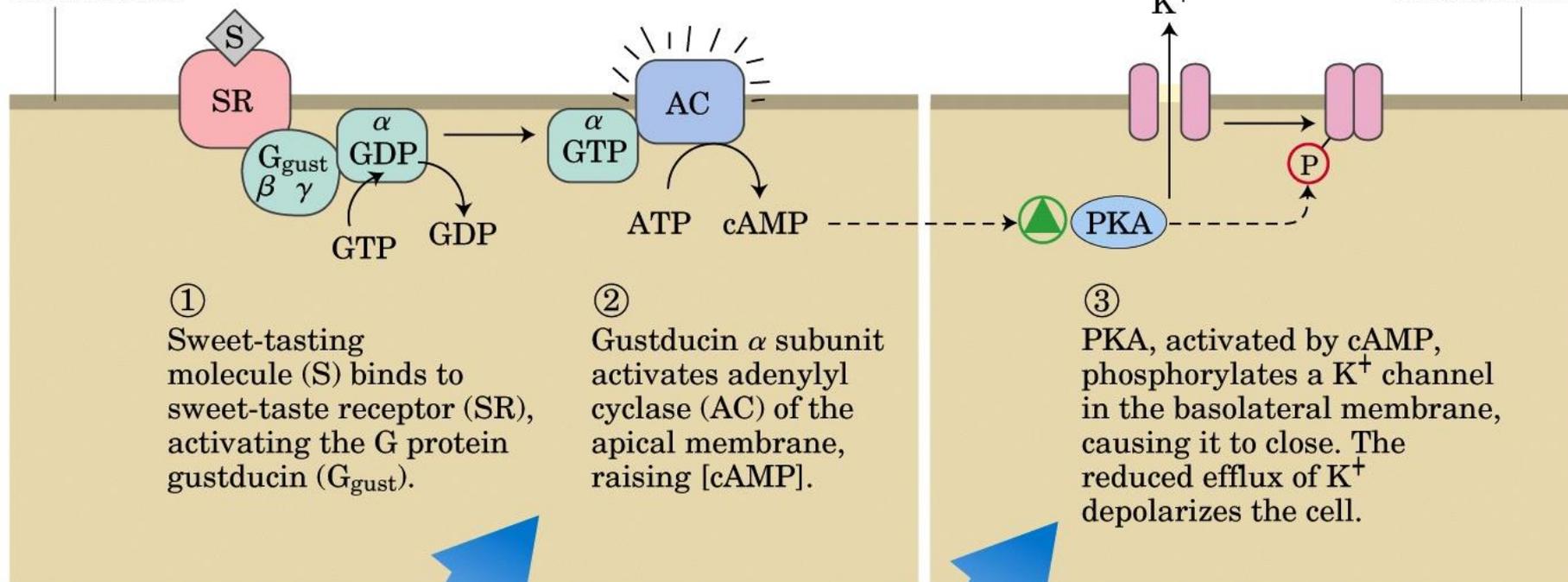
**Altre proteine bersaglio** (oltre alla calmodulina) conosciute sono:

il recettore dell'insulina, il trasportatore del glucosio, l'HMG-CoA reduttasi, il recettore  $\beta$ -adrenergico, il citocromo P-450 e la tirosina idrossilasi.



Apical membrane

Basolateral membrane

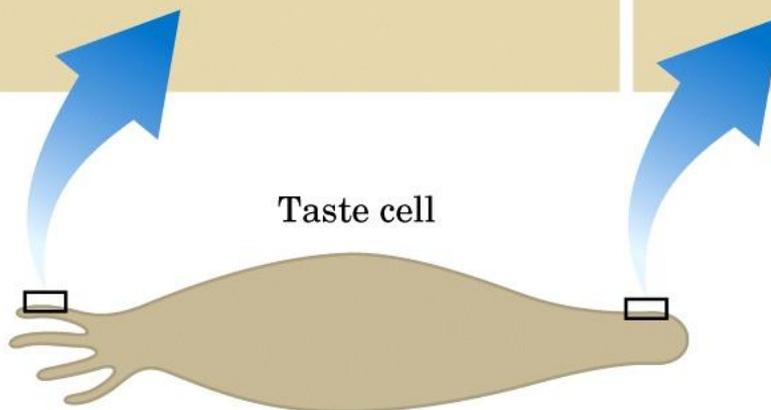


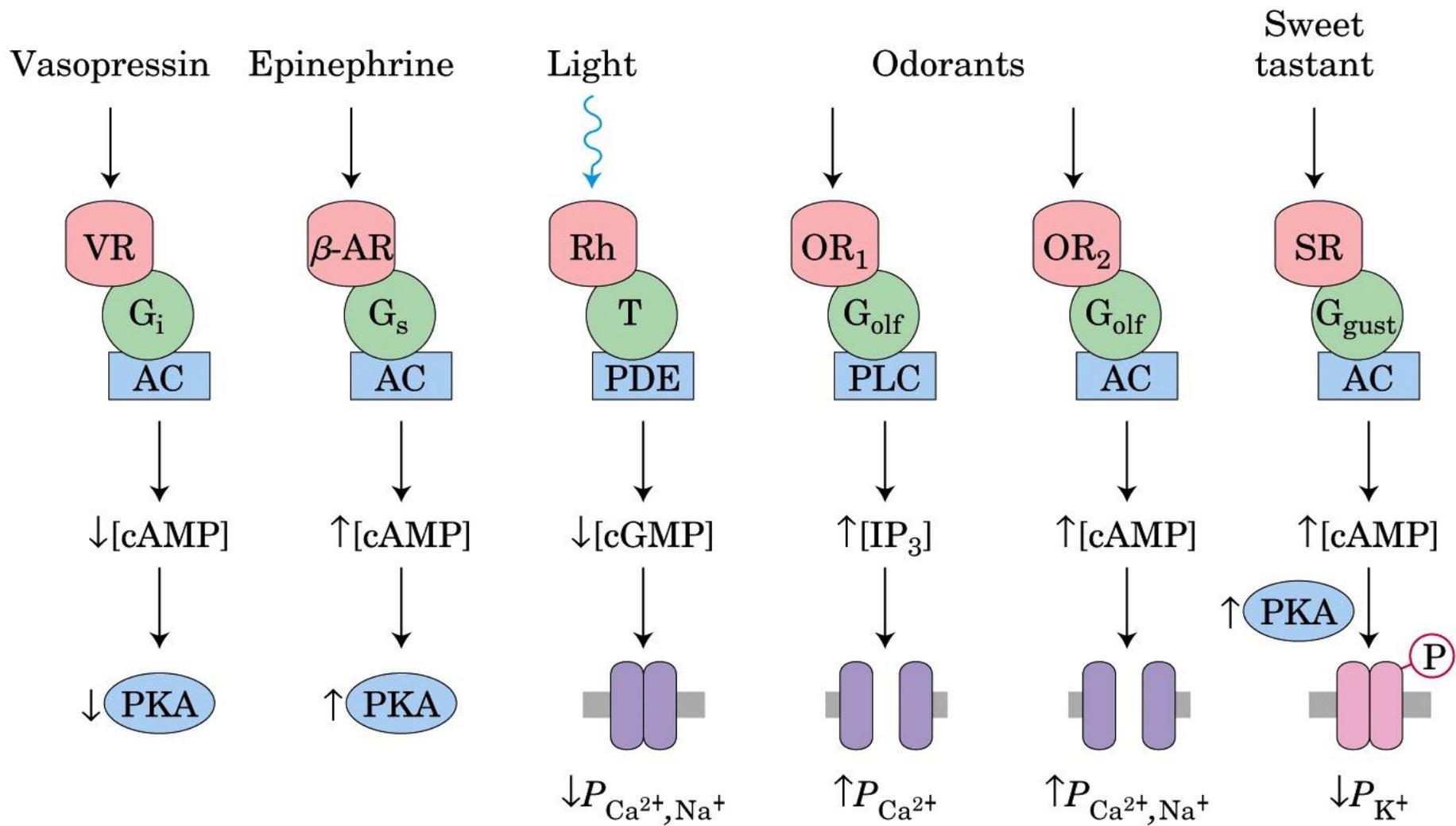
① Sweet-tasting molecule (S) binds to sweet-taste receptor (SR), activating the G protein gustducin ( $G_{gust}$ ).

② Gustducin  $\alpha$  subunit activates adenylyl cyclase (AC) of the apical membrane, raising [cAMP].

③ PKA, activated by cAMP, phosphorylates a  $K^+$  channel in the basolateral membrane, causing it to close. The reduced efflux of  $K^+$  depolarizes the cell.

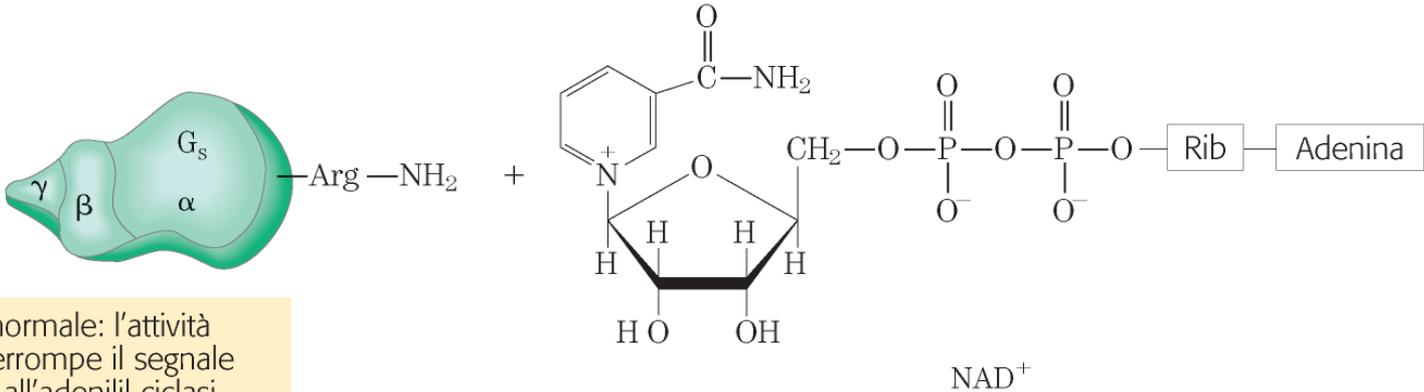
Taste cell



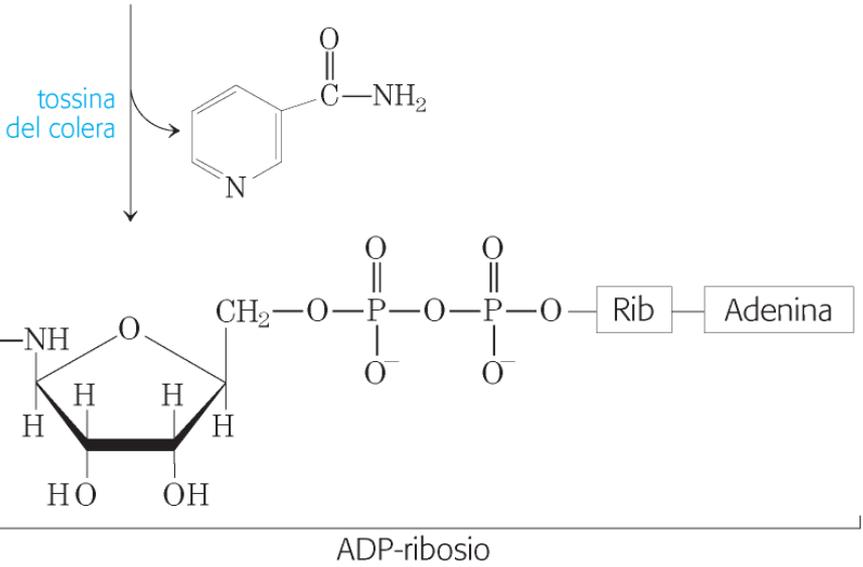


Le tossine che provocano il **colera e la pertosse** sono enzimi che trasferiscono l'unità di ADP-ribosio dal NAD<sup>+</sup> a un residuo di Arg di una proteina G: G<sub>s</sub> nel caso del colera, G<sub>i</sub> nel caso della pertosse.

Le proteine G modificate non rispondono più ai normali stimoli ormonali. In entrambi i casi le condizioni patologiche derivano da una regolazione difettosa dell'adenilil ciclastasi e da una sovrapproduzione di cAMP.



Proteina G<sub>s</sub> normale: l'attività GTPasica interrompe il segnale dal recettore all'adenilil ciclastasi.

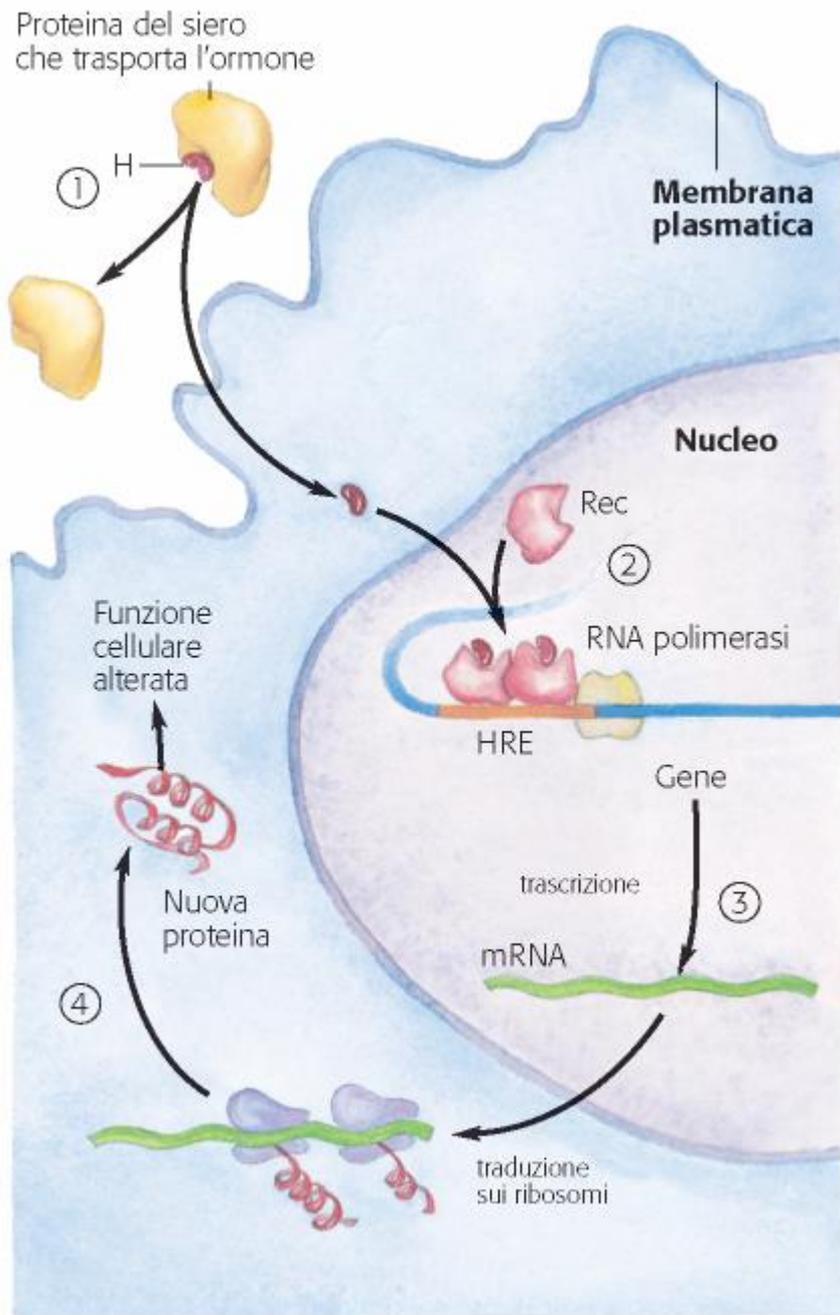


Proteina G<sub>s</sub>-ADP ribosilata: l'attività GTPasica viene inattivata; G<sub>s</sub> attiva continuamente l'adenilil ciclastasi

Alcuni tipi di ormoni agiscono attraverso **recettori nucleari**.

Gli ormoni steroidei, l'acido retinoico e gli ormoni tiroidei agiscono direttamente nel nucleo alterando l'espressione di alcuni geni.

Questi ormoni sono molto idrofobici e vengono trasportati nel sangue da specifiche proteine fino alle cellule bersaglio. Essi attraversano la membrana plasmatica per diffusione e si legano a specifici recettori nel nucleo.



①

L'ormone (H), trasportato al tessuto bersaglio attraverso il siero da una proteina di legame, diffonde attraverso la membrana plasmatica e si lega a uno specifico recettore proteico (Rec) nel nucleo

②

Il legame dell'ormone modifica la conformazione di Rec; esso forma un omodimero con altri complessi recettore-ormone e si lega a una specifica regione regolatrice chiamata elemento di risposta ormonale (HRE), presente nel DNA adiacente al gene specifico

③

Il legame regola la trascrizione del gene o dei geni adiacenti, aumentando o diminuendo la velocità di formazione di mRNA

④

I livelli alterati di prodotto genico regolato dall'ormone producono la risposta cellulare all'ormone

**Tamoxifene:** compete con l'estrogeno per il legame con il recettore. Il complesso farmaco-recettore non ha alcun effetto sull'espressione genica.

Viene utilizzato per il trattamento del cancro al seno perchè spesso la divisione delle cellule cancerose dipende dalla presenza continua dell'ormone estrogeno.

**RU486:** usato per l'interruzione precoce di gravidanza. E' un antagonista dell'ormone progesterone, blocca le sue essenziali attività per l'impianto dell'uovo fecondato nell'utero.