

## DISPENSA DI BIOCHIMICA II (PROF.SSA BARACCA)

La dispensa raccoglie le lezioni della Prof.ssa Baracca su (1) Membrana biologica, (2) Regolazione ormonale, (3) Trasduzione del segnale. Tutte le lezioni sono state sbobinate, controllate, corrette ed integrate approfonditamente dal Lehninger

**Riccardo Camiletti**



Il trasporto di ioni soluti è fondamentale ai fini di:

- **realizzazione dei processi metabolici** sia di sintesi che di degradazione ossidativa dei nutrienti;
- **mantenimento dello stato cellulare**;
- realizzazione del **trasferimento di segnali extracellulari**, portati da messaggeri chimici come

## MEMBRANA BIOLOGICA

### MODELLO A MOSAICO FLUIDO

La membrana viene presentata secondo il **modello a mosaico fluido** di Singer, che fu proposto negli anni '70, ma che ancora oggi è riconosciuto come valido.

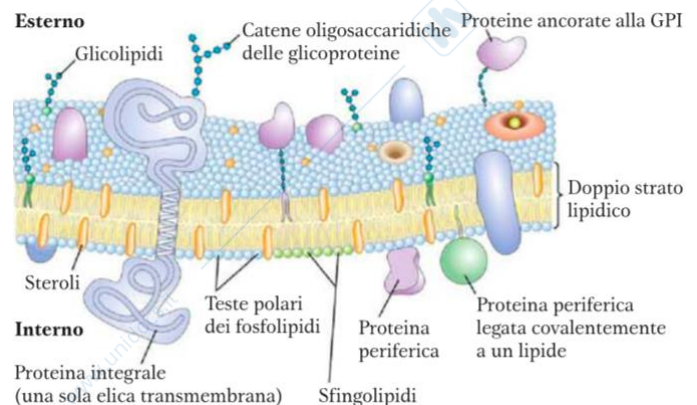
Struttura. I fosfolipidi formano un doppio strato in cui le regioni non polari dei lipidi sono disposte all'interno della struttura e le teste polari guardano invece verso l'esterno, interagendo con la fase acquosa su entrambi i lati.

Le proteine sono immerse in questo foglietto lipidico a doppio strato a intervalli irregolari e sono mantenute nella posizione corretta da interazioni idrofobiche tra i lipidi di membrana e i domini idrofobici delle proteine.

### Caratteristiche di membrana.

1. **Asimmetria:** l'orientamento delle proteine nel doppio strato è asimmetrico, e rende la membrana altrettanto asimmetrica; i domini di una proteina esposti su un lato della membrana sono diversi da quelli esposti sull'altro lato.
2. **Fluidità:** la fluidità del mosaico di membrana è data dal fatto che le interazioni tra i suoi componenti sono non covalenti, e ogni singola molecola lipidica e proteica è libera di spostarsi lateralmente nel piano della membrana.
3. **Lipid raft:** i glicosfingolipidi, che sono caratterizzati da lunghe catene di acidi grassi saturi, sul foglietto esterno formano transitoriamente dei gruppi di lipidi, che escludono i glicerofosfolipidi che di norma contengono un acido grasso insaturo e un corto acido grasso saturo. Il lungo gruppo acilico saturo degli sfingolipidi può formare associazioni più stabili e più compatte interagendo con il lungo anello di colesterolo. I microdomini colesterolo-sfingolipidi sono detti lipid raft.

Significato del mosaico fluido. Tale denominazione mette in evidenza un aspetto fondamentale comune a tutte le membrane biologiche; infatti il caratteristico stato di gel delle membrane, che consiste in uno stato fisico intermedio tra uno stato solido e uno liquido, è fondamentale al fine della preservazione dello stato fisico della membrana stessa. È necessario che questo stato di gel venga conservato, ciò si verifica tramite la preservazione della composizione lipidica della membrana biologica; lo scopo ultimo di tale conservazione è quello di permettere alle membrane di svolgere le diverse funzioni che hanno sempre in questi compartimenti cellulari.



## Componente lipidica.

La componente lipidica è responsabile della struttura base della membrana biologica, la quale è data da:

- **Fosfolipidi** → appartengono a due classi:
  - **glicerolfosfolipidi**, che sono i maggiori costituenti delle membrane.
  - **sfingolipidi**, gli sfingolipidi che contengono un gruppo fosforico sono dette sfingomieline e hanno la testa polare di fosfocolina o di fosfoetanolamina.
- **Colesterolo libero** → presente in quantità più o meno abbondanti a seconda del tipo di membrana; presenta l'ossidrilico sul C3 rivolto verso la fase acquosa (extracellulare o intracellulare, a seconda del monostrato considerato).
- **Glicolipidi** → sono molecole lipidiche caratterizzate da un gruppo di natura saccaridica (legato alla testa polare), che riveste un ruolo importante nel riconoscimento da parte di specifiche molecole e nella realizzazione di specifici processi biologici.

## STATO FISICO

È proprio la componente lipidica quindi ad essere responsabile dello stato fisico della membrana, più precisamente, gli elementi fondamentali che vanno a definire lo stato fisico sono le **catene aciliche** dei lipidi e il **colesterolo**.

Libertà di movimento. Sebbene la struttura del doppio strato lipidico sia abbastanza stabile, le singole molecole di fosfolipidi e steroli hanno una certa libertà di movimento, in base alla temperatura e alla composizione lipidica.

- Al di sotto delle temperature fisiologiche, i lipidi nel doppio strato formano uno **stato liquido ordinato** (Lo) semisolido, in cui tutti i tipi di movimento delle singole molecole sono fortemente limitati e il doppio strato è paracrillino.

- Al di sopra delle temperature fisiologiche, le singole catene idrocarburiche degli acidi grassi sono in costante movimento dovuto alla rotazione dei legami C-C delle lunghe catene aciliche laterali e alla diffusione laterale delle singole molecole lipidiche all'interno del piano del doppio strato. Questo è lo **stato liquido disordinato** (Ld).

Nella transizione da stato Lo a Ld vengono normalmente mantenute forma e dimensioni generale del doppio strato, mentre il grado di movimento permesso alle singole molecole lipidiche varia continuamente.

Per quanto riguarda le catene aciliche, occorre fare una distinzione tra catene aciliche sature ed insature, in quanto le prime tendono a ridurre il grado di fluidità della membrana, mentre le seconde tendono a favorirlo:

- **Catene aciliche SATURE:** riducono il grado di fluidità di membrana.  
Questo è conseguenza del fatto che le catene aciliche sature tendono ad associarsi l'una con l'altra formando un elevato numero di interazioni idrofobiche tra di loro, e questo fa sì che, ad una determinata temperatura, l'energia che viene fornita non sia sufficiente per rompere queste interazioni, e non sia quindi sufficiente per causare la transizione da un sistema ordinato e denso, dove le molecole si trovano fortemente aggregate l'una con l'altra, ad un sistema più disordinato e fluido.
- **Catene aciliche INSATURE:** favoriscono il grado di fluidità di membrana.  
Le catene aciliche insature non sono in grado di formare molte interazioni, quindi, ad una data temperatura, come a temperatura ambiente o comunque corporea, si trovano in uno stato

disordinato. Ciò è dovuto al fatto che l'energia che queste richiedono per passare da uno stato di massima possibilità di interazione ad uno stato di bassa possibilità di interazione è molto minore rispetto a quella richiesta dalle catene aciliche sature, proprio perché in questo caso ci sono poche interazioni chimiche che devono essere rotte per indurre la transizione dell'aggregato di catene aciliche da uno stato ordinato e denso ad uno stato disordinato e meno denso.

Per quanto riguarda invece il colesterolo, questa è una molecola che ha un effetto variabile dipendentemente dal *dominio* in cui si va ad inserire:

- *Quando si inserisce tra catene aciliche sature*, il colesterolo riduce il numero di interazioni chimiche presenti nel dominio, e quindi, quando la membrana viene portata da una bassa temperatura ad un'alta temperatura, *incrementa il grado di disordine* di tale dominio di membrana, e perciò promuove un aumento della fluidità di membrana a livello di quel dominio.
- *Quando si inserisce tra catene aciliche insature*, dato che queste hanno poche interazioni idrofobiche, il colesterolo ha effetto opposto, in quanto *incrementa le interazioni chimiche* a livello del microambiente idrofobico della membrana tra catene aciliche, colesterolo, e altre catene aciliche.

Le proprietà delle membrane biologiche dipendono sia dalla loro componente lipidica che dalla componente proteica.

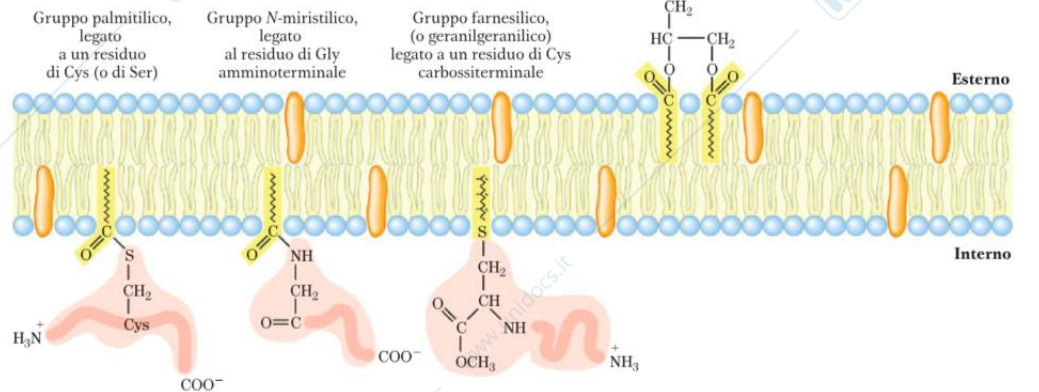
Componente proteica.

Vi sono delle differenze per quanto riguarda le componenti proteiche di membrana e il **rapporto proteine-lipidi** delle diverse membrane, per esempio, le membrane mitocondriali interne sono particolarmente ricche di proteine rispetto a quanto non lo siano quelle plasmatiche.

Una classificazione generale delle molecole proteiche, a livello delle membrane biologiche, vede la distinzione di:

- **Proteine integrali**: si tratta di proteine strettamente associate al doppio strato lipidico. Possono avere un dominio polare che sporge solo da un lato della membrana o da entrambi i lati (a seconda del tipo di proteina).
- **Proteine periferiche**, si trovano associate:
  - alle teste polari dei lipidi, con cui interagiscono attraverso la formazione di **interazioni di tipo ionico**, o di **legami idrogeno**.
  - ad altre molecole proteiche inserite nel doppio strato, quindi a proteine integrali di membrana, attraverso la formazione di **interazioni deboli di natura elettrostatica**.
  - alla componente lipidica delle membrane tramite **legami di tipo covalente**:
    - proteine associate covalentemente a elementi di natura lipidica localizzati nel monostrato rivolto verso il **lato citosolico**:  
il legame covalente si instaura a seconda del tipo di proteina, per esempio attraverso la formazione di un **legame tioestere** tra un residuo di cisteina e il carbonio carbossilico di un acido palmitico; alcune proteine si legano a singole molecole di acido miristico, tramite un **legame di tipo carboamidico** che si instaura tra il gruppo carbossilico e un residuo di glicina ammino-terminale oppure può avvenire la formazione di un **legame tioestere** tra un residuo di cisteina carbossi-terminale e un gruppo farnesilico (gruppo che si ottiene per condensazione di due unità isopreniche).

**Figura 11.15 Proteine di membrana legate a lipidi.** I lipidi legati covalentemente ancorano le proteine di membrana al doppio strato lipidico. Una catena di acido palmitico è unita mediante un legame tioestere a un residuo di Cys; una catena di acido *N*-miristilico è legata di solito a un residuo di Gly *N*-terminale. I gruppi farnesilici o geranilgeranilici, che si legano a residui C-terminali di Cys, sono unità isoprenoidi rispettivamente a 15 e a 20 atomi di carbonio. Questi tre tipi di ancoraggio sono stati identificati solo sulla faccia interna della membrana plasmatica. Le ancore di glicosilfosfatidilinositolo (GPI) derivano dal fosfatidilinositolo, e sull'inositolo è inserito un breve oligosaccaride unito covalentemente attraverso la fosfoetanolamina al gruppo carbossilico terminale di una proteina. Le proteine ancorate a GPI si trovano sempre sulla superficie extracellulare della membrana plasmatica. Le proteine di membrana farnesilate e palmitoilate si trovano sulla faccia interna della membrana plasmatica, mentre le proteine miristilate hanno domini su entrambe le superfici interna ed esterna della membrana plasmatica.



- o proteine legate covalentemente al **monostrato rivolto verso lo spazio extracellulare**: queste sono frequentemente legate a un **glicosilfosfatidilinositolo**. Si tratta di un fosfatidilinositolo (un glicerolfosfolipide, che ha come testa polare il gruppo fosforico, a cui è legato un inositolo, cioè una molecola di natura alcolica) a cui è legato un gruppo oligosaccaridico. Questa molecola lega indirettamente la proteina, attraverso un'unità di fosfoetanolamina (quindi attraverso la formazione di un **legame carboamidico** con il gruppo carbossi-terminale della proteina).

## ASIMMETRIA DI MEMBRANA

La distribuzione asimmetrica sia delle componenti lipidiche che di quelle proteiche è la caratteristica propria delle membrane biologiche, strettamente connessa agli aspetti funzionali delle membrane stesse.

### 1. Distribuzione asimmetrica lipidica.

Analizzando le membrane plasmatiche si può osservare che la componente lipidica del monostrato citosolico è diversa da quella del monostrato rivolto verso la matrice extracellulare. Precisamente, si osserva che:

- i **glicerolfosfolipidi** sono prevalentemente localizzati sul monostrato citosolico;
- gli **sfigolipidi** e le molecole di **colesterolo** sono localizzati prevalentemente sul monostrato rivolto verso lo spazio extracellulare.

Non è molto chiaro il significato di questa distribuzione asimmetrica lipidica, ma è sicuramente funzionale all'assunzione di conformazioni che permettano alle molecole proteiche di svolgere la loro funzione.

### 2. Distribuzione asimmetrica proteica.

Tale distribuzione è fondamentale ai fini dello svolgimento delle diverse funzioni da parte delle diverse proteine. Una proteina deve essere sempre inserita nel doppio strato lipidico con un **determinato orientamento**.

Nel caso della membrana mitocondriale, tutte le molecole di ATP sintasi sono distribuite in maniera da avere la porzione idrofilica che sporge nella matrice mitocondriale, e  $F_0$  rivolto verso lo spazio intermembrana.

### SPOSTAMENTI DI LIPIDI E PROTEINE ATTRAVERSO IL DOPPIO STRATO

La membrana è un sistema fluido dove sia le molecole lipidiche che quelle proteiche sono in grado di muoversi liberamente all'interno del doppio strato. Tale libertà di movimento è essenziale per la realizzazione di processi, ad esempio processi enzimatici che implicano la partecipazione di più complessi (come avviene nel caso della catena respiratoria mitocondriale).

#### **Spostamento laterale.**

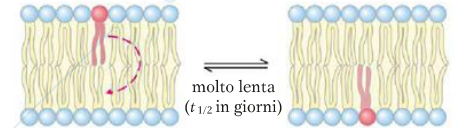
Lo spostamento laterale di una molecola lipidica, che implica che un lipide si sposti rimanendo nel proprio monostrato, avviene molto più rapidamente rispetto al movimento laterale di una molecola proteica, a causa delle grosse dimensioni di queste ultime.

La scala di tempi di diffusione laterale dei *lipidi* è dell'ordine dei **millisecondi**; per quanto riguarda le *proteine* invece si deve parlare di tempi dell'ordine del **secondo**.

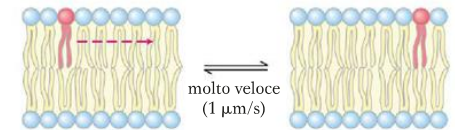
#### **Spostamento trasversale.**

Mentre sia le molecole lipidiche che quelle proteiche sono in grado di muoversi lateralmente in una membrana biologica, i lipidi sono anche in grado di compiere dei movimenti trasversali, ovvero di diffondere da un monostrato all'altro: questa diffusione trasversale viene anche definita come diffusione a **flip-flop**.

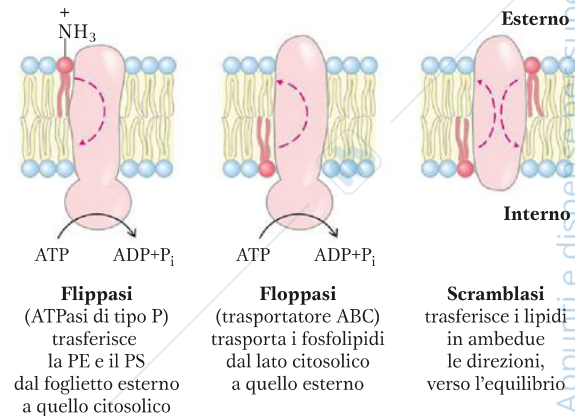
(a) Diffusione trasversale non catalizzata ("flip-flop")



(b) Diffusione laterale non catalizzata



(c) Traslocazione trasversale catalizzata



### SISTEMI DI TRASPORTO DI LIPIDI

Una serie di sistemi di trasporto, la cui funzione è quella di catalizzare in particolare la **traslocazione trasversale** di molecole lipidiche, contribuiscono alla realizzazione ed alla preservazione della distribuzione asimmetrica dei lipidi.

Esistono diversi tipi di sistemi di trasporto dei lipidi: alcuni che mediano e permettono la realizzazione di un processo che a priori è endoergonico (quindi non potrebbe realizzarsi, poiché lo spostamento va **contro il gradiente** di concentrazione delle molecole lipidiche stesse). Questo vale per le flippasi e le floppasi:

- **Flippasi:** sono dei sistemi di trasporto che appartengono alle ATPasi di tipo P, una classe molto importante di proteine di trasporto. Sfruttano, al fine di realizzare il trasporto, l'energia fornita da una molecola di ATP attraverso la scissione di un legame fosfoanidridico, che porta alla formazione di ADP e Pi: le flippasi consumano circa un ATP per molecola di fosfolipide traslocata. Catalizzano la traslocazione di due ammino fosfolipidi dal foglietto esterno al foglietto citosolico della membrana plasmatica, contribuendo alla distribuzione asimmetrica dei fosfolipidi.

Traslocano contro gradiente due soli tipi di fosfolipidi:

- fosfatidiletanolamina
- fosfatidilserina. Sono entrambi glicerolfosfolipidi che nelle membrane biologiche troviamo maggiormente rappresentati nel monostrato citosolico.

- **Floppasi:** sono trasportatori appartenenti alla classe dei **trasportatori ABC**. Tale classe ha tra le varie funzioni quella di rimuovere sostanze tossiche dall'interno della cellula, portandole all'esterno, nella matrice extracellulare.
- Le floppasi, a differenza delle flippasi, non hanno una specificità per una o diverse classi lipidiche e trasportano i fosfolipidi contro gradiente, dal monostrato citosolico a quello rivolto verso lo spazio extracellulare.

Esistono anche sistemi di trasporto che catalizzano spostamenti di lipidi **secondo gradiente** di concentrazione:

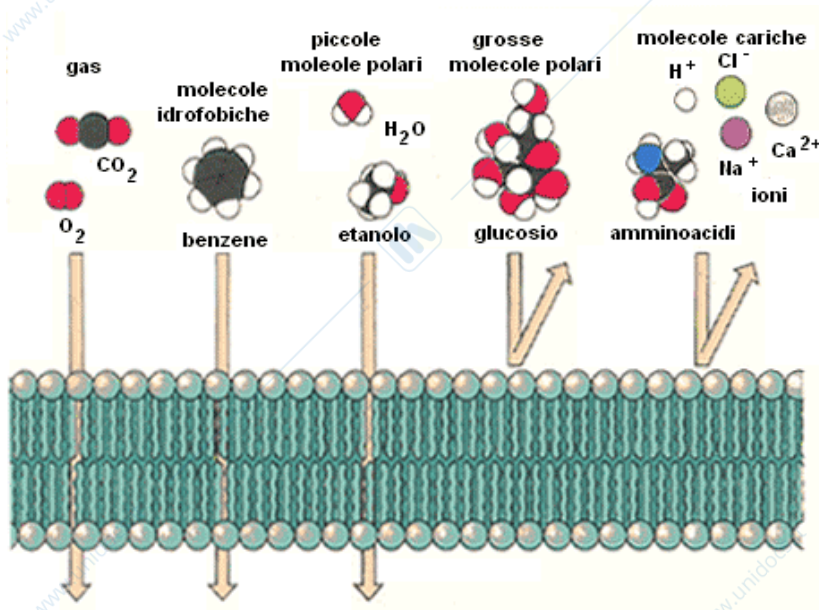
- **Scramblasi:** sono dei sistemi che trasportano contestualmente due molecole lipidiche. Si tratta di un tipo di trasporto che non richiede energia, quindi avviene secondo gradiente di concentrazione di quella specie lipidica. Le scramblasi sono quindi proteine che trasferiscono qualunque fosfolipide di membrana attraverso il doppio strato lipidico, secondo il gradiente di concentrazione. Sono importanti, ad esempio, nell'**apoptosi** cellulare; uno degli eventi terminali di questo processo è infatti realizzato dall'azione delle scramblasi, che agiscono trasferendo la fosfatidilserina dal monostrato citosolico a quello rivolto verso lo spazio extracellulare. La presenza della fosfatidilserina funge da segnale di riconoscimento per i macrofagi, che quindi vengono portati in prossimità della cellula, promuovendone la distruzione.

#### FUNZIONI DELLE MEMBRANE BIOLOGICHE

Tra le moltissime funzioni che le membrane biologiche svolgono, esse devono:

- **delimitare e isolare** le cellule e gli organelli;
- **tenere ancorato il citoscheletro** per far sì che questo sostenga e preservi la morfologia della cellula;
- mediare le **interazioni tra cellula e cellula**;
- "ospitare" **processi di tipo enzimatico**, che si svolgono a livello delle membrane plasmatiche stesse;
- contenere molecole proteiche che permettono la **ricezione di segnali extracellulari** che vengono poi trasferiti all'interno della cellula, portando alla modulazione dello stato funzionale della cellula stessa;
- **trasportare selettivamente molecole polari**, che possono essere neutre o cariche, e **ioni**.

Quest'ultima è la funzione su cui ora ci soffermeremo.



### TRASPORTO SELETTIVO

Il trasporto selettivo di molecole è dovuto alla presenza di specifici trasportatori per queste stesse molecole a livello della membrana plasmatica. L'esistenza dei trasportatori è conseguenza diretta del fatto che la membrana plasmatica ha un **carattere prevalentemente idrofobico**, che non permette la diffusione libera di molecole polari (cariche o neutre) e di ioni, cioè rappresenta una **barriera fisica al passaggio di molecole e ioni**.

Tale aspetto è alla base della preservazione della composizione chimica della cellula sia in termini quantitativi che qualitativi, cioè alla base del mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Le membrane sono **permeabili** a:

- molecole apolari allo stato gassoso come l'ossigeno e anidride carbonica;
- composti fortemente idrofobici, come benzene;
- (in modo discreto) molecole polari di piccole dimensioni come l'acqua.

Ma sono assolutamente **non permeabili** a:

- molecole polari neutre, come il glucosio;
- molecole polari cariche, quali gli amminoacidi;
- ioni.

Quest'affermazione non è formalmente corretta: in questo caso, per permeabilità, si intende il fatto che la diffusione di una determinata specie chimica (come può essere l'ossigeno), si realizza in **tempi compatibili con i processi biologici** e biochimici. Anche il **glucosio** sarebbe in grado di permeare una membrana biologica, ma la natura chimica polare di questa molecola fa sì che la velocità con cui questo processo si realizzerebbe sarebbe del tutto incompatibile con i tempi dei processi biologici → La membrana è definibile non permeabile a queste specie chimiche in quanto questi processi, anche se termodinamicamente favoriti, si realizzano con velocità che non sono compatibili con i tempi dei processi biologici.

MOLECOLE APOLARI (ossigeno e anidride carbonica):

per la loro natura sono in grado di diffondere liberamente e rapidamente attraverso una membrana senza la necessità di molecole proteiche che medino il processo → si parla di meccanismo di **diffusione semplice**.

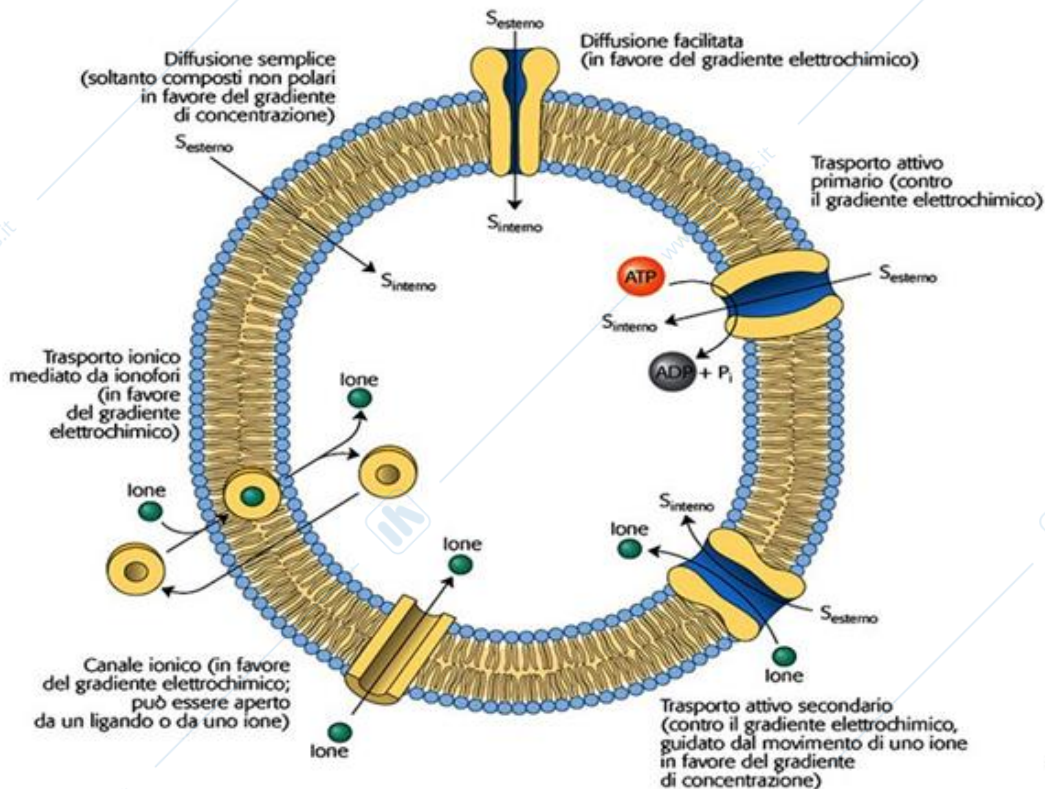
IONI e MOLECOLE POLARI (neutre o cariche):

A differenza delle molecole apolari, il trasporto di ioni e molecole polari, cariche o neutre che siano, attraverso le membrane biologiche è **sempre mediato da molecole proteiche**:

- sistemi di trasporto che mediano il trasporto secondo gradiente, quindi un processo di **diffusione facilitata**:
  - **sistemi di trasporto passivo**: per **molecole polari cariche** e anche per **ioni**
  - **sistemi canale**: mediano prevalentemente la diffusione di **specie ioniche**.
- sistemi di trasporto che mediano il trasporto contro gradiente:
  - **Trasporto attivo** primario
  - Trasporto attivo secondario.

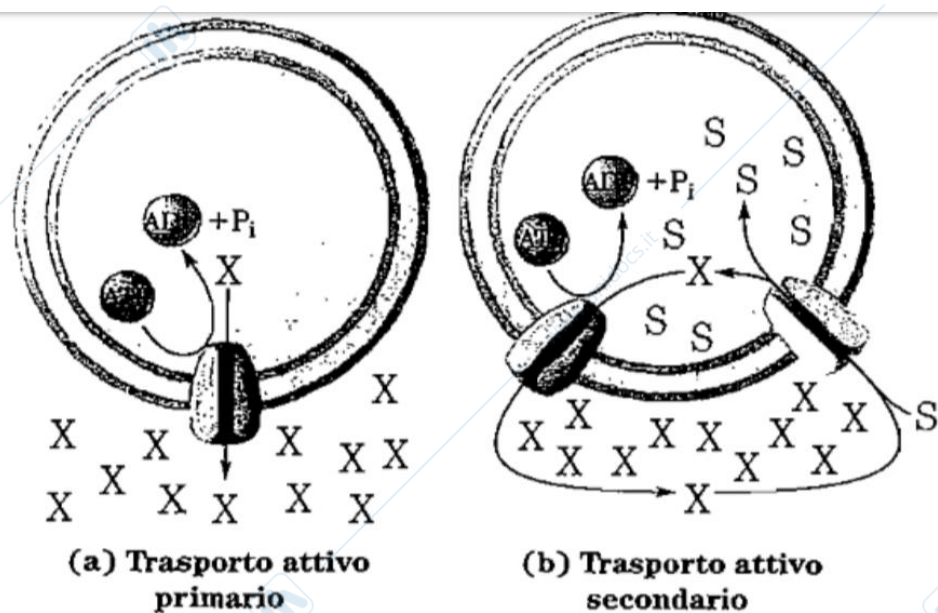
Distinguiamo quindi un trasporto passivo, quando avviene secondo gradiente, da un trasporto di tipo attivo.

## Trasporto di membrana (2)



**TERMODINAMICA (1)** Dal punto di vista degli aspetti termodinamici dei processi di trasporto che questi sistemi mediano, li distinguiamo fondamentalmente in 2 categorie:

1. Trasportatori che mediano processi esoergonici, quindi che trasportano secondo gradiente. Può trattarsi di **trasportatori passivi** (permeasi), o di **canali ionici**.
2. Sistemi che consentono la realizzazione di un trasporto contro gradiente, quindi la realizzazione di un processo che a priori sarebbe endoergonico. Si tratta perciò di **sistemi di trasporto attivo**, il quale può essere:
  - **Trasporto attivo primario:** il trasporto di un substrato contro gradiente si realizza tramite un apporto energetico che viene fornito direttamente da ATP, sfruttando l'energia rilasciata dalla scissione del legame fosfoanidridico.
  - **Trasporto attivo secondario:** l'apporto energetico viene fornito dall'energia conservata sotto forma di gradiente transmembrana, dovuto al pompaggio, per esempio, di uno ione dal compartimento intracellulare allo spazio extracellulare (trasferimento contro gradiente effettuato da un trasportatore attivo primario). Vi è quindi un trasportatore attivo primario che determina la formazione di un gradiente transmembrana attraverso l'utilizzo dell'energia fornita dall'ATP, e un trasportatore attivo secondario che sfrutta questa energia per promuovere il trasferimento contro gradiente di un certo substrato → ATP fornisce l'energia indirettamente per effettuare il trasporto contro gradiente.



SPONTANEITÀ DEL PROCESSO DI TRASPORTO

Come si valuta la **spontaneità** o meno del processo di trasporto?

### 1. Specie chimica polare neutra.

La spontaneità del processo di trasporto di una specie chimica polare neutra può essere valutata sulla base dell'energia libera molare parziale della specie presente nei due compartimenti separati dalla membrana.

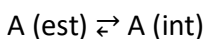
Dato che tutti i processi avvengono in una condizione di **omeostasi** (quindi il trasporto non comporta variazioni delle concentrazioni delle specie chimiche), la variazione di energia libera che accompagna il trasporto è data dalla differenza, in termini di energia libera molare parziale, tra la specie chimica che si trova nel compartimento interno e quella che si trova in quello esterno.

È necessario calcolare tale differenza per valutare se il trasporto dallo spazio extracellulare al citosol è termodinamicamente favorito: se il valore della differenza di potenziale chimico è negativo, il processo è favorito.

Di fatto, considerando un processo di trasporto transmembrana, dall'esterno verso l'interno, definiamo la specie chimica del compartimento esterno come reagente del processo, mentre la quella chimica del compartimento interno è il prodotto della reazione.

Essendo in una condizione di omeostasi, la variazione dell'energia libera (a seguito del trasferimento di una mole della specie chimica dall'esterno all'interno), è data dalla differenza tra il contributo dato all'energia libera del sistema da parte di una mole della specie quando è presente nel compartimento interno e quando lo è nel compartimento esterno.

Prendendo in considerazione una specie chimica A, e considerandone il trasporto:



la differenza di potenziali chimici è data da:

$$\Delta G = \Delta G_{A(\text{int})} - \Delta G_{A(\text{est})} = RT \ln \frac{[A]_{\text{int}}}{[A]_{\text{est}}}$$

Infatti il contributo all'energia libera del sistema da parte di una singola mole di una determinata specie chimica è dato da:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln [A]$$

ma dato che la specie chimica è la stessa, nel caso di un processo di trasporto, il potenziale chimico standard è lo stesso.

Quindi, qualora la specie chimica sia una specie polare neutra, la variazione di energia libera che accompagna il trasporto può essere calcolata conoscendo le concentrazioni della specie chimica nei due

compartimenti e il prodotto  $RT \ln \frac{[A]_{\text{int}}}{[A]_{\text{est}}}$ .

È **spontaneo** il trasporto nella direzione che determina il trasferimento di una specie chimica dal compartimento in cui è presente in concentrazione maggiore a quello in cui è presente in concentrazione minore, poiché ciò porta il sistema verso uno **stato di equilibrio** (ciò non vale ovviamente per un sistema cellulare, che non arriverà mai all'equilibrio, ma il concetto è lo stesso).

**2. Specie chimica carica (ione).** Il movimento di uno ione, senza lo spostamento contemporaneo di un altro ione con carica opposta in direzione contraria, determina la separazione endoergonica delle cariche positive da quelle negative, producendo un potenziale elettrico transmembrana; questo tipo di trasporto viene detto **elettrogenico**. Il potenziale elettrico transmembrana è creato dalla distribuzione asimmetrica di ioni (sodio, potassio, calcio, cloro, ecc.), protoni e complessi enzimatici. Questa è creata e mantenuta grazie alla presenza di sistemi di rapporto che hanno ruolo di creare gradienti elettrici (per esempio nella membrana mitocondriale il gradiente protonico).

$\Delta\Psi$  La differenza di potenziale elettrico transmembrana può essere definita come  $V_m$  (potenziale elettrico transmembrana) o  $\Delta\Psi$ : è un fattore che, in base alla differenza di concentrazione delle specie chimiche, influisce sulla spontaneità del processo.

**Spontaneità.** Conseguentemente la spontaneità del trasporto delle specie cariche dipende (1) dalla concentrazione della specie chimica nei due compartimenti separati dalla membrana e (2) dal lavoro elettrico che deve essere eventualmente effettuato per trasportare la specie chimica carica.

→ Il potenziale elettrico transmembrana determina l'esistenza di una forza che favorisce il movimento di specie chimiche cariche che tendono a ridurre  $V_m$  stesso, per portarlo ad uno stato di equilibrio, e si oppone ai movimenti che tendono ad aumentare  $V_m$ .

**Formula.** Differenza di concentrazione e potenziale elettrico dunque influenzano questi processi. La direzione verso cui un soluto carico tende a muoversi spontaneamente attraverso una membrana dipende dal gradiente chimico e dal gradiente elettrico ( $V_m$ ) attraverso la membrana. Questi due fattori, considerati insieme, costituiscono il gradiente **elettrochimico**.

Il costo energetico del movimento di uno ione dipende dal suo potenziale **elettrochimico**, cioè dalla somma del *gradiente chimico e del potenziale elettrico*

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2/C_1) + Z\mathcal{F}\Delta\Psi$$

dove  $Z$  è la carica dello ione,  $\mathcal{F}$  è la costante di Faraday (96 480 J/V · mole) e  $\Delta\Psi$  è il potenziale elettrico transmembrana (in volt).

- La variazione di energia libera che accompagna la traslocazione di una specie chimica è infatti espressa dalla somma tra rapporto delle concentrazioni interne ed esterne su  $\ln$  moltiplicate per  $RT$ .
- La  $\Delta\Psi$  sta a indicare il contributo positivo-negativo dato dalla presenza di potenziale elettrico,  $Z$  è la carica dello ione. Quando parliamo di potenziale elettrico trans membrana, nelle cellule, varia da -50 a -80 mV.  
 $\Delta\Psi$  si calcola normalmente come
  1. Differenza tra il potenziale elettrico presente nel lato della membrana rivolta verso il *citosaol*, meno il potenziale della membrana rivolta verso il *versante extracellulare*.
  2. Quando dobbiamo calcolare il  $\Delta G_t$  inserendo il  $\Delta\Psi$ , quest'ultimo è dato dalla differenza di potenziale elettrico del compartimento di arrivo del soluto, meno il potenziale elettrico del compartimento di partenza.
- Il  $\Delta G$  per flussi *secondo* gradiente elettrochimico ha un valore negativo, mentre per il trasporto *contro* gradiente elettrochimico il  $\Delta G$  ha un valore positivo.

Il **trasporto attivo** di una specie carica può essere tale perché può avvenire contro:

- 1) gradiente chimico
- 2) gradiente elettrico
- 3) gradiente elettrochimico

**CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI DI TRASPORTO:**

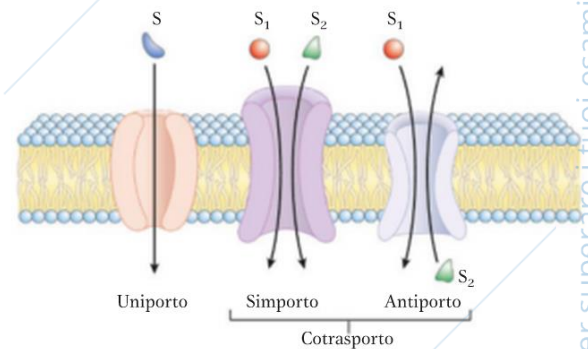
1. Termodinamica: si dividono in proteine in grado di compiere un lavoro (trasportatori attivi) e pseudocatalizzatori (trasportatori passivi)
2. Numero di specie molecolari che traslocano tra due compartimenti separati da membrana (uniporto o cotrasporto). I sistemi di cotrasporto sono i sistemi che trasportano simultaneamente due soluti attraverso una membrana.
3. Trasportatore elettrogenico o non elettrogenico (detto anche elettroneutro), se creano un potenziale elettrico trans-membrana o meno.

**Numero di specie molecolari**

**Sistemi uniporto:** (es: trasportatori glucosio) il trasportatore trasporta unicamente una singola specie chimica. Può essere sia trasporto passivo che trasporto attivo.

**Sistemi co-trasporto:** trasportano congiuntamente e simultaneamente 2 soluti molecolari. Si distinguono in:

- **Sistemi simporto:** i due soluti sono trasportati nella stessa direzione
- **Sistemi antiporto:** trasportati in direzione opposta



**Elettrogenesi.** Un sistema uniporto che trasporta una specie carica è necessariamente un trasportatore elettrogenico.

Se invece il sistema è un cotrasporto, dipende da quali cariche sono trasportate e come queste sono trasportate nella membrana: se è un simporto che sposta una carica positiva e una negativa sicuramente non è elettrogenico, stessa cosa se in un sistema antiporto sono spostate lo stesso numero di cariche con lo stesso segno.

## SISTEMI DI TRASPORTO PASSIVO

**Definizione.** Quando due compartimenti acquosi contenenti concentrazioni diverse di uno ione sono separati da un divisorio permeabile (membrana), il soluto carico si muove per **diffusione facilitata**, dalla regione a maggior concentrazione verso quella a minor concentrazione.

**Necessità.** L'esistenza di una diffusione facilitata è necessaria per il trasporto del soluto in tempi compatibili con i processi biologici, creando microambienti idrofilici, che favoriscono le reazioni con la molecola idrofilica non idratata.

**Permeasi.** La diffusione è *facilitata* da permeasi: questi sistemi di trasporto hanno il ruolo di incrementare la velocità di permeazione dei vari soluti. Il loro modo di agire è simile agli enzimi e agiscono come catalizzatori. Similmente agli enzimi hanno una forte stereospecificità, dovuta alle interazioni deboli non covalenti, e sono in grado di aumentare la velocità di trasporto riducendo l'energia di attivazione del processo.

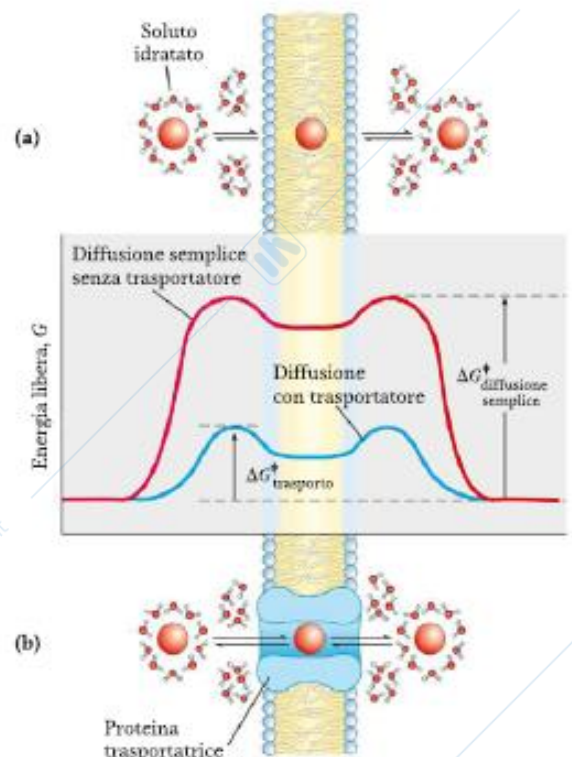
**Meccanismo.** (Vedi immagine).

1. Per passare attraverso un doppio strato lipidico, un soluto polare o carico deve prima perdere le sue molecole di acqua di idratazione, poi diffondere per 3 nm attraverso un solvente in cui è poco solubile. L'energia spesa per eliminare le molecole di acqua di idratazione e per condurre il soluto polare o carico attraverso il doppio strato lipidico viene riguadagnata quando il composto lascia la membrana dall'altro lato e viene reidratato.

2. La tappa intermedia del passaggio transmembrana rappresenta però uno stato altamente energetico, paragonabile allo stato di transizione di una reazione chimica catalizzata da un enzima. Il trasporto di un qualunque prodotto è caratterizzato da un'elevata energia di attivazione  $\Delta G^\ddagger$ . L'energia di attivazione  $\Delta G^\ddagger$  necessaria per la traslocazione di un soluto polare attraverso il doppio strato lipidico è così grande che i doppi strati lipidici sono praticamente impermeabili alle specie polari e alle specie cariche nei tempi biologici.

3. La causa di questa elevata energia di attivazione è legata alla disidratazione del soluto: comporta un elevato aumento di energia libera, quindi soltanto le molecole che raggiungono lo stato di transizione possono essere traslocate. Questi due passaggi (disidratazione e stato di transizione) limitano il numero di molecole che possono passare in ogni istante.

4. In un sistema di trasporto passivo, il trasportatore proteico, similmente a un enzima, sfrutta le interazioni che si vengono a creare col soluto per permettergli il passaggio. Grazie alla formazione di interazioni deboli con il dominio proteico sul lato della membrana dove deve immettersi il soluto, viene rilasciata energia di legame: queste interazioni promuovono così la disidratazione della molecola. È sufficiente che le molecole, grazie a un processo di parziale disidratazione, raggiungano un contenuto di energia libera modesto rispetto a quello raggiunto in una disidratazione totale, la completa disidratazione del soluto avverrà soltanto dopo la formazione di interazioni chimiche, al fine di consentire a un maggior numero di molecole di essere trasferito da un lato all'altro della membrana.

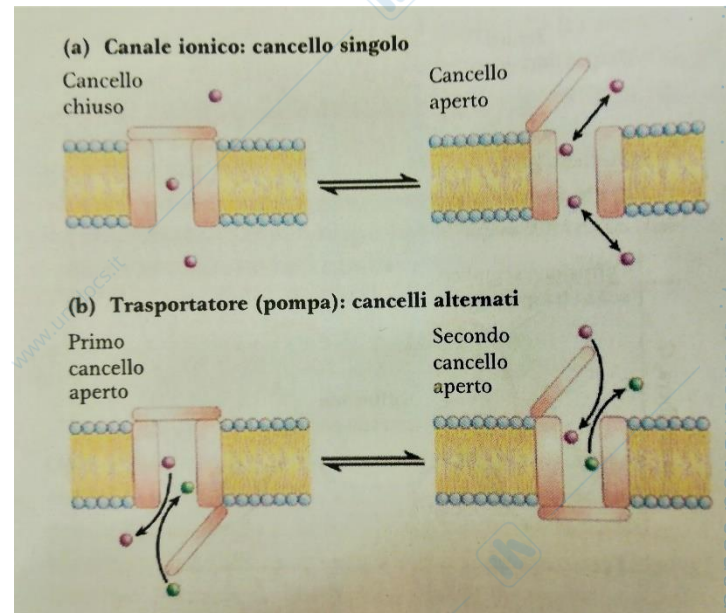


5. La variazione di energia libera di segno negativo generata dalla formazione delle interazioni deboli ( $\Delta G_{legame}$ ) controbilancia la variazione di energia libera di segno positivo dovuta alla perdita dell'acqua di idratazione da parte del substrato ( $\Delta G_{deidratazione}$ ) abbassando quindi l'energia di attivazione  $\Delta G^\ddagger$  per l'attraversamento della membrana da parte del substrato.

6. La leggera conca che si viene a creare nella coordinata di reazione è data da interazioni idrofobiche che vengono a crearsi con i gruppi apolari che possono essere presenti nel soluto. Una volta che il soluto viene rilasciato, quest'ultimo viene reidratato e torna allo stadio di energia basale.

### CANALI IONICI E TRASPORTATORI

Oltre alla prima tipologia di trasporto passivo che avviene tramite le permeasi, ne esiste una seconda mediata dai **canali ionici**. Essi, come le permeasi, trasportano soluti secondo il gradiente elettrochimico e pertanto appartengono alla categoria di trasporto passivo.



### Trasportatori (attivi e passivi)

1. MODALITA' DI TRASPORTO. Nei trasportatori sia attivi sia passivi, sono presenti due domini che controllano il flusso del soluto. L'ingresso del soluto nel citosol avverrà in più fasi: inizialmente con l'apertura del primo cancello il soluto si integra nella molecola proteica, poi, dopo la richiusura del primo cancello, si aprirà il secondo liberando il soluto nel citosol.

2. STEREOSPECIFICITA'. I trasportatori attivi e passivi hanno come caratteristica di base, similmente agli enzimi, quella di possedere un'elevata stereospecificità per il proprio soluto: presentano una complementarità chimica e geometrica per il soluto.

3. VELOCITA' MASSIMA. La velocità di trasporto dipende dalla concentrazione del soluto. La velocità con cui possono traslocare un soluto ha un limite e questo limite corrisponde ad una velocità massima. Questo si verifica perché il trasporto di un soluto è limitato dalla quantità di molecole proteiche che sono specifiche per quel soluto. Quando la concentrazione del compartimento acquoso di partenza è tale da far sì che tutti i sistemi di trasporto specifici per quel soluto siano complessati col soluto stesso, quindi vengano saturati, si raggiunge la velocità massima possibile.

→ EFFICIENZA. I trasportatori incrementano di numerosi ordini di grandezza il trasporto di un soluto. L'incremento è dell'ordine di  $10^4$  o  $10^6$  volte. Tuttavia sono molto meno efficienti dei canali ionici.

### Canali

1. MODALITA' DI TRASPORTO. Dal punto di vista meccanicistico, i canali sono presenti in soli due stati conformazionali stabili, uno stato chiuso e uno stato aperto, e la transizione tra questi, che permette il passaggio dello ione, è controllata soltanto da un dominio proteico, detto cancello.

2. STEREOSPECIFICITA'. I canali ionici sono a specificità variabile: alcuni canali che hanno una discreta specificità, altri in cui invece è molto modesta (alcuni trasportano diverse specie cationiche.)

3. VELOCITA' MASSIMA. A differenza dei trasportatori, i canali ionici non presentano una velocità massima di trasporto: non possono essere **saturati** da un substrato. La diffusione di una specie ionica attraverso un canale o avviene o non avviene, cioè se è chiuso non c'è passaggio, se è aperto la velocità è estremamente elevata. Non c'è un limite perché la traslocazione non presuppone la formazione di un complesso soluto-proteina, come invece avviene nei trasportatori passivi e attivi

→ EFFICIENZA. La velocità di diffusione degli ioni attraverso i canali ionici si avvicina al limite con cui questi ioni diffondono liberamente in una base acquosa (circa nell'ordine di  $10^8$ ). Mediamente un canale ionico trasloca ioni ad una velocità di  $10^7$  ioni per secondo, una velocità altissima per una molecola proteica.

Riassumendo quindi le differenze fondamentali sono:

	Trasportatori (sia attivi che passivi)	Canali ionici
Modalità di trasporto	Due cancelli: il soluto entra dopo l'apertura nel primo e si lega alla proteina poi, dopo la chiusura del primo, si apre il secondo rilasciando il soluto nel citosol	Un cancello: gli ioni entrano dopo l'apertura finché non si richiude
Specificità	Altamente stereospecifici	Variabile
Velocità	Elevata, ma esiste una velocità massima dovuta alla saturabilità del trasportatore.	Elevata, non esiste una velocità massima in quanto il canale non è saturabile dal soluto
→ Efficienza	$10^4$ - $10^6$	$10^7$

Analisi di due trasportatori passivi:

1 I trasportatori del glucosio

2 Anion exchange protein (AE1)

### 1. I trasportatori del glucosio GLUT

Esistono 12 isoforme per il trasporto del glucosio attraverso le membrane plasmatiche. Le più importanti sono:

-**GLUT1**: presente negli eritrociti. Il metabolismo energetico dell'eritrocita è di tipo glicolitico, perché alla maturità perdono i mitocondri. Gli eritrociti dipendono da un rifornimento costante di glucosio nel plasma sanguigno, dove la concentrazione dello zucchero viene mantenuta intorno a **5 mM**. GLUT 1 trasporta il glucosio dal sangue all'eritrocita per soddisfare la richiesta energetica da parte dell'eritrocita. È un trasportatore ubiquitario, cioè presente in tutti i tessuti, ma normalmente, esclusi gli eritrociti, non è l'isoforma più presente negli altri tessuti.  $K_t = 3 \text{ mM}$

-**GLUT2**: è l'isoforma più espressa nel pancreas, nel fegato, nell'intestino. È caratterizzata da una attività espressa dalla  $K_t$  molto bassa per il glucosio. È l'unico sistema di trasporto bidirezionale (tutti gli altri sono unidirezionali, anche se teoricamente, essendo trasportatori utili per una diffusione a trasporto passivo, il senso di trasporto dovrebbe dipendere unicamente dal gradiente di concentrazione tra ambiente interno ed esterno).  $K_t = 17 \text{ mM}$

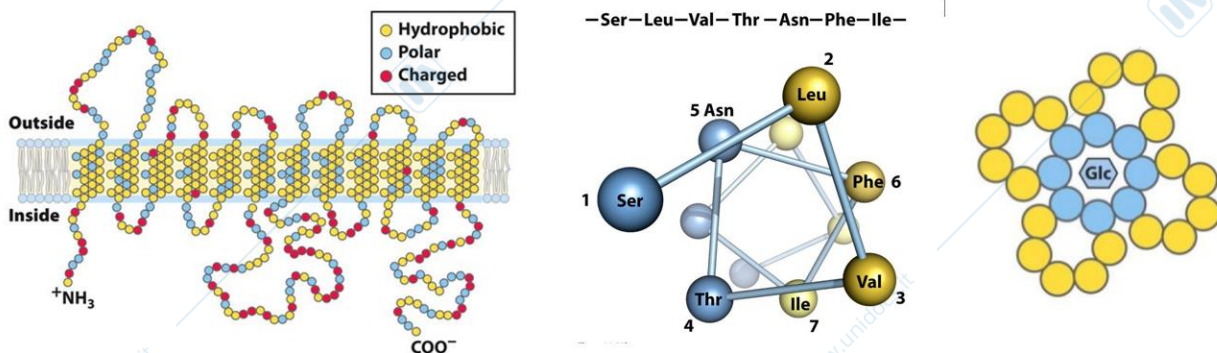
-**GLUT3**: è l'isoforma più presente nel cervello e con maggiore affinità per il glucosio. Ciò è dovuto al fatto che il cervello deve avere la capacità di ottenere glucosio anche in condizioni di ipoglicemia, poiché non è in grado di ossidare acidi grassi e quindi il glucosio è il substrato energetico principale (è capace di utilizzare anche corpi chetonici come combustibile).  $K_t = 1,4$

-**GLUT4**: presente nel tessuto muscolare scheletrico, in quello cardiaco e nelle membrane plasmatiche degli adipociti. Presenta un  $K_t^1$  intermedio.  $K_t = 5 \text{ mM}$

**TABELLA 11.3** Trasportatori del glucosio nel genoma umano

Trasportatore	Tessuto(i) dove è espresso	Gene	Ruolo*
GLUT1	Ubiquitario	<i>SLC2A1</i>	Assunzione basale del glucosio
GLUT2	Fegato, isole del pancreas, intestino	<i>SLC2A2</i>	Nel fegato, rimozione dell'eccesso di glucosio dal sangue; nel pancreas, regolazione del rilascio di insulina
GLUT3	Cervello (neurone)	<i>SLC2A3</i>	Assunzione basale del glucosio
GLUT4	Muscolo, grasso, cuore	<i>SLC2A4</i>	Attività aumentata dall'insulina
GLUT5	Intestino, testicoli, rene, sperma	<i>SLC2A5</i>	Trasporto primario del fruttosio
GLUT6	Milza, leucociti, cervello	<i>SLC2A6</i>	Probabilmente nessuna funzione di trasporto

#### ANALISI DI GLUT1



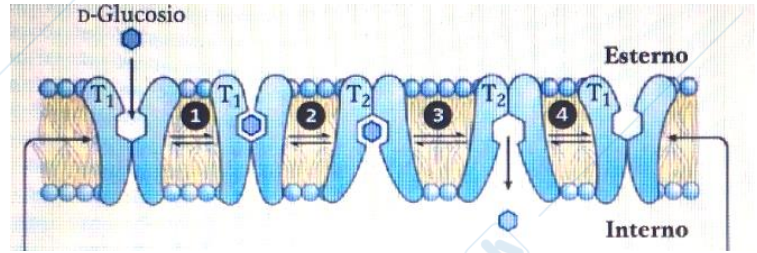
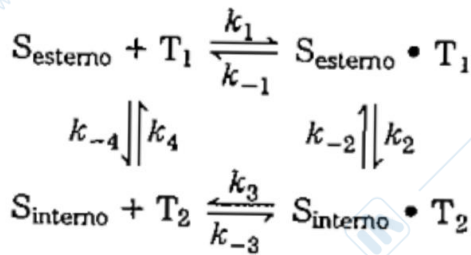
**Struttura.** - È un trasportatore formato da una singola catena polipeptidica.

**12:** Non si conosce ancora la sua struttura tridimensionale, tuttavia tramite studi di predizione della catena polipeptidica all'interno della membrana è stata dedotta, a livello di organizzazione secondaria, la presenza di dodici segmenti ad  $\alpha$ -elica che attraversano la membrana stessa.

**9:** Nove delle dodici eliche contengono tre o più amminoacidi polari o carichi, spesso separati da numerosi residui idrofobici. Su questi 9 segmenti sono presenti residui polari (azzurro) e apolari (giallo): la natura di ogni  $\alpha$  elica è anfipatica, in quanto, tagliando sagittalmente l'elica in due emifacce, i residui polari sono su un lato dell'elica e i residui apolari sull'altro.

**4:** L'associazione lato contro lato di quattro eliche anfipatiche, ognuna con la parte polare rivolta verso la cavità centrale, genera un canale transmembrana rivestito di residui polari o carichi. Questo canale ha molte opportunità di formare legami idrogeno con il glucosio che si muove al suo interno.

**Meccanismo.** Formalmente il trasporto può essere descritto dalle equazioni che seguono:



Il trasportatore può avere due conformazioni: **T1**, con il sito che lega il glucosio esposto sulla superficie **esterna** della membrana plasmatica, **T2** con il sito di legame del glucosio esposto sulla faccia **interna**.

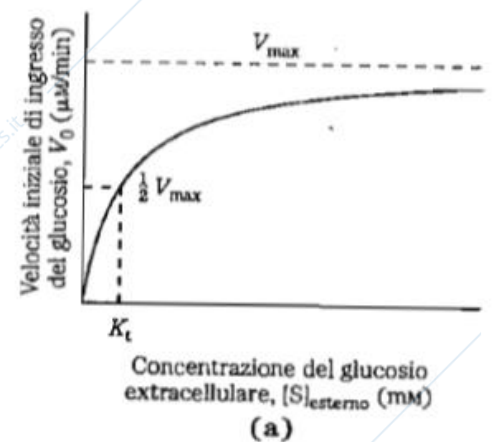
Il meccanismo attraverso cui si realizza il trasporto del glucosio è basato sull'assunzione da parte del trasportatore di glucoformazioni stabili con T1 e T2 e si realizzerebbe in 4 fasi:

1. Il glucosio si lega al sito attivo del trasportatore, formando così il complesso dato dal trasportatore in conformazione T1 e il glucosio
2. Il glucosio<sub>esterno</sub> + T1 andrebbe spontaneamente incontro a cambiamento conformazionale e quindi passerebbe da un trasportatore in conformazione T1 ad uno in conformazione T2, formando il complesso glucosio<sub>interno</sub> + T2.
3. In conformazione T2 si ha una riduzione dell'affinità del trasportatore per il glucosio e questo permette il rilascio di glucosio nel compartimento citosolico.
4. Il trasportatore libero torna alla conformazione T1, pronto per trasportare una seconda molecola.

**Cinetica.** Il processo di trasporto del glucosio può essere descritto in modo analogo a una reazione enzimatica, in cui il 'substrato' è il glucosio all'esterno della cellula ( $S_{\text{esterno}}$ ) e il 'prodotto' è il glucosio all'interno della cellula ( $S_{\text{interno}}$ ) e l'"enzima" è il trasportatore, T.

1. Essendo un trasportatore passivo, quando la velocità iniziale di ingresso del glucosio viene misurata in funzione della concentrazione esterna del glucosio, la curva che si ottiene ha un andamento **iperbolico**. Questo andamento iperbolico è la conseguenza del fatto che la velocità iniziale varia al variare della concentrazione di substrato interno con il soluto esterno

2. A concentrazioni di glucosio esterne elevate, la velocità di ingresso tende a raggiungere la  $V_{\text{max}}$ .



**Michaelis-Menten e applicabilità.**

→ La cinetica di trasporto di un soluto ha un andamento simile a quello della cinetica degli enzimi che soddisfano i criteri di applicabilità delle teorie di Michaelis-Menten. Soltanto gli enzimi che soddisfano i criteri di applicabilità della teoria M-M presentano una correlazione iperbolica tra la velocità iniziale della reazione e la concentrazione di substrato.

Rimando ai criteri di applicabilità:

1. È necessario che la tappa limitante sia la seconda tappa della reazione (conversione del complesso enzima-substrato in enzima libero e prodotto).
2. Nella reazione l'enzima deve possedere una unica specie chimica come substrato (infatti in tutte le reazioni è scritto E+S) e possieda o un solo sito attivo o più siti attivi identici ma indipendenti tra loro. Non devono esistere meccanismi di cooperatività tra i legami dei substrati nei siti attivi, quindi l'enzima non può essere allosterico.
3. Affinché la reazione abbia una curva iperbolica, è necessario che abbia raggiunto lo stato stazionario: raggiungimento della situazione in cui la velocità di formazione del complesso enzima-substrato diventa identica alla velocità con cui questo viene decomposto (equilibrio). Questo si realizza a seguito di quello che viene definito stato prestazionario, periodo nel quale si hanno, per i diversi rapporti di velocità delle due tappe (formazione e decomposizione), una rapida diminuzione di concentrazione dell'enzima e un aumento di concentrazione del complesso enzima-substrato. Quando le velocità si eguagliano ho raggiunto lo stato stazionario.

Equazione. L'equazione della velocità del processo di trasporto può essere descritta come quella delle reazioni catalizzate da due enzimi, utilizzando di conseguenza un'espressione analoga all'equazione di Michaelis-Menten., dipendentemente da quanto descritto dalla seguente equazione:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]_{\text{esterno}}}{K_t + [S]_{\text{esterno}}}$$

Dove  $V_0$  è la velocità iniziale di accumulo del glucosio all'interno della cellula, quando la sua concentrazione nel mezzo esterno è  $[S]_{\text{esterno}}$  e  $K_{\text{trasporto}}$  è una costante analoga alla costante di Michaelis-Menten.

→  $K_t$ : parametro che misura l'attività del trasportatore, il cui significato è analogo a  $K_m$ , ovvero è equivalente alla concentrazione di soluto utile a far sì che la velocità con cui si realizza l'importo del soluto stesso sia la metà della velocità massima.

Conseguenze e significati dell'equazione.

1. Questa equazione descrive l'andamento della velocità *iniziale*, cioè la velocità misurata quando  $[S]_{\text{interno}}$  è uguale a 0.
2. Quando  $[S] = K_t$ , la quantità di assunzione è  $\frac{1}{2} V_{\max}$ : il processo di trasporto è saturato per metà.
3. Dato che la concentrazione di glucosio nel sangue è tra 4,5 e 5 mM, un valore circa 3 volte più elevato di quello della  $K_t$  del trasportatore, di conseguenza GLUT1 è quasi sempre saturo la velocità del suo trasporto è vicina a  $V_{\max}$ .
4. Poiché nella conversione di  $S_{\text{esterno}}$  in  $S_{\text{interno}}$  non vi è né formazione né rottura di legami chimici, il 'substrato' non è più o meno stabile del 'prodotto', e il processo di ingresso è completamente **reversibile**. Quando  $[S]_{\text{interno}}$  tende a diventare uguale a  $[S]_{\text{esterno}}$ , le velocità di ingresso e di uscita del substrato risultano uguali. In queste condizioni il sistema non è in grado di accumulare il substrato (glucosio) all'interno della cellula a una concentrazione superiore a quella del mezzo circostante; è stato semplicemente raggiunto un punto di equilibrio tra il glucosio interno e il glucosio esterno a una velocità molto superiore rispetto a quella possibile in assenza dello specifico trasportatore.
5. Il trasportatore del glucosio è specifico per il D-glucosio e ha una  $K_t$  di circa 6mM. Per molecole molto

simili, come gli analoghi del glucosio D-mannosio e D-galattosio, che differiscono solo per la posizione di un ossidrilico, i valori della  $K_t$  diventano rispettivamente 20 e 30 mM, mentre per l'L-glucosio la  $K_t$  supera il valore di 3000 mM.

→ GLUT1 presenta le tre caratteristiche del trasporto passivo: alta velocità di diffusione nella direzione del gradiente chimico, saturabilità e specificità.

## 2. AE1 – Anion Exchanger 1

**Elettro-neutrale.** AE1 (anion exchanger - scambiatore di anioni) che media il cotrasporto tra bicarbonato e ione cloro (antiporto) nella membrana degli eritrociti. Questa proteina media uno spostamento simultaneo di due anioni: per ogni  $\text{HCO}_3^-$  che si muove in una direzione, uno ione  $\text{Cl}^-$  si sposta nella direzione opposta e non vi è trasferimento netto di cariche. Lo scambio viene quindi detto **elettro-neutrale**.

Esistono tre isoforme di AE1:

- Isoforma 1 negli eritrociti
- Isoforma 2 nel fegato
- Isoforma 3 in diversi tessuti tra cui il cuore

**Struttura.** Non si conosce la struttura tridimensionale della proteina, ma si sa che è una singola catena polipeptidica e attraversa la membrana plasmatica grazie a dodici eliche transmembrana.

**Funzione.** È un trasportatore ancora più efficiente del sistema uniporto del trasportatore di GLUT1, in quanto incrementa la velocità di entrata del  $\text{HCO}_3^-$  nell'eritrocita di 1 milione di volte (è quindi un ottimo catalizzatore). Rimuove l'anidride carbonica dai tessuti e la riforma a livello polmonare.

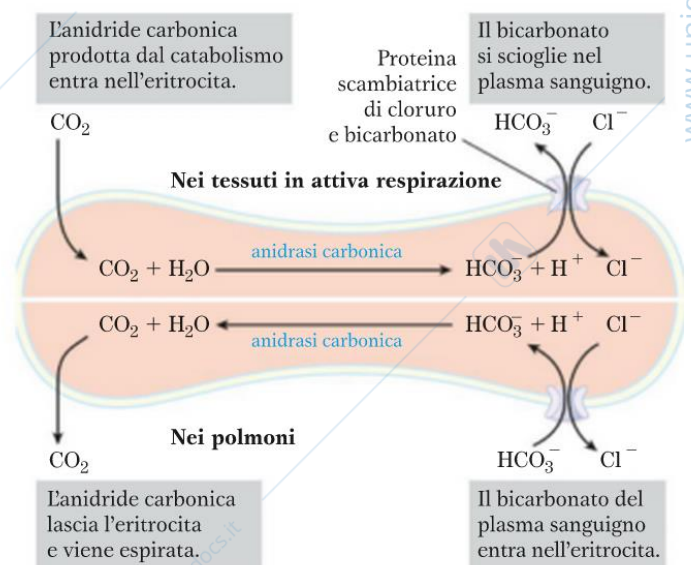
### Trasporto $\text{CO}_2$ .

Il 10% della  $\text{CO}_2$  viaggia disciolta nel plasma: il 50% viene idrata dando acido carbonico.

Il 90% entra nel globulo rosso: 65% è trasformato in  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dalla anidrase carbonica, il 20% si lega all'estremità amminotermine di ciascuna catena globinica generando carbamminoemoglobina.

**Fisiologia.** Il significato biochimico e fisiologico del trasportatore AE1 consiste nel fatto che la sua presenza è fondamentale per convertire il 90% della  $\text{CO}_2$  dei tessuti periferici in bicarbonato, ma anche per riconvertirlo in  $\text{CO}_2$  a livello polmonare e rendere così possibile la sua eliminazione tramite l'espiazione.

Nei tessuti periferici circa il 65% della  $\text{CO}_2$  prodotta dai processi ossidativi entra nell'eritrocita e viene trasformata in bicarbonato e protoni (è un processo di idratazione catalizzato dall'enzima anidrase carbonica che converte  $\text{CO}_2$  in acido carbonico che a sua volta si dissocia in bicarbonato e protoni).



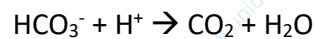
Di fatto la conversione del 65% della  $\text{CO}_2$  prodotta in bicarbonato è data dall'esistenza dell'antiporto AE1 che agisce secondo gradiente esportando  $\text{HCO}_3^-$  ed importando ioni cloro. Questo sposta l'equilibrio della

reazione verso destra in quanto sto rimuovendo un prodotto ( $\text{HCO}_3^-$ ) e permette la conversione dentro l'eritrocita della  $\text{CO}_2$ .

Un altro 20% dell'anidride carbonica prodotta a livello periferico viene legata dalle catene  $\alpha$  e  $\beta$  dell'emoglobina a livello delle estremità amminoterminali, quindi la carbamminazione dell'emoglobina fa sì che anche questa quota di  $\text{CO}_2$  sia trasportata a livello polmonare.

Periferia e polmoni. AE1 ha due funzioni in base a dove si trovano gli eritrociti:

- a LIVELLO PERIFERICO sposta l'equilibrio della reazione per convertire anidride carbonica in bicarbonato e favorire il rilascio di quest'ultimo che poi si muoverà con il flusso sanguigno fino ad arrivare ai polmoni a LIVELLO POLMONARE, dove avviene l'ossigenazione dell'emoglobina, e quindi il rilascio di  $\text{CO}_2$  e protoni. La  $\text{CO}_2$  è apolare quindi diffonde liberamente e velocemente tra le membrane, passa dall'eritrocita al plasma, poi a livello del tessuto polmonare e infine nel tratto aereo dove può essere espirata. In questo modo ho una continua rimozione del prodotto della reazione e un'aggiunta di  $\text{H}^+$  (reagente) da parte dell'emoglobina:



Richiamo emoglobina.

1 La deossiemoglobina T presenta ampia cavità, è stabilizzata da ponti salini e ha bassa affinità.

L'ossiemoglobina R presenta stretta cavità, è stabilizzata da  $\text{O}_2$  e ha alta affinità.

2 Il legame con l'ossigeno induce modificazioni strutturali che si propagano a livello dell'interfaccia  $\alpha$ - $\beta$  di protomeri diversi: ciò provoca la rottura dei ponti salini. Il legame di 3 molecole di  $\text{O}_2$  provoca la rotazione di un protomero rispetto all'altro e la chiusura della cavità.

3. Meccanismo: nello stato T il  $\text{Fe}^{2+}$  non è allineato con l'anello porfirinico, ma è spostato verso l'istidina prossimale, a cupola. Il legame con l' $\text{O}_2$  induce uno spostamento di  $\text{Fe}^{2+}$  che si porta in linea con l'anello. La modulazione si propaga a tutte le subunità inducendo la transizione verso R.

4 Effetto Bohr. Alla periferia, l'emoglobina è sensibile a variazione di  $\text{H}^+$ . L'ossigenazione provoca la rottura dei ponti salini che stabilizzano His C-3. Ciò provoca un abbassamento della pKa a 6,0 e il rilascio di protoni  $\text{H}^+$  e la rottura dei ponti salini. Nei tessuti, l'aumento di pH tende a riprotonare l'His C-3. La riprotonazione comporta la riformazione di ponti salini con Asp FG1 e la transizione da R a T. Alla transizione segue il rilascio di  $\text{O}_2$ .

Esempi di trasportatori passivi studiati:

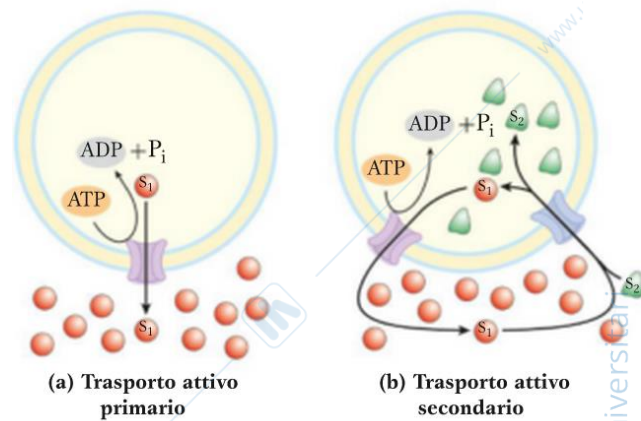
- Il **trasportatore del citrato** nella biosintesi degli acidi grassi (mediato da trasportatori proteici) è un *uniporto elettrogenico*
- Il **trasportatore dell'AMP** trasporta simultaneamente un ATP verso il citosol e un ADP verso la matrice mitocondriale è quindi un *antiporto elettrogenico* (ATP ha quattro cariche negative mentre ADP ne ha tre, processo anche chiamato separazione delle cariche transmembrana)
- Sempre in ambito del metabolismo lipidico, nella  $\beta$ -ossidazione lo **shuttle della carnitina** per importare gli acidi grassi nel mitocondrio utilizza un *antiporto acil-carnitina*
- Anche il **trasporto del potere riducente** dal citosol alla matrice mitocondriale è un *antiporto passivo*, ho ingresso del malato e uscita  $\alpha$ -chetoglutarato (non è elettrogenico)

## SISTEMI DI TRASPORTO ATTIVO

Questi trasportatori rendono possibili dei processi sfavoriti termodinamicamente.

Nel trasporto attivo **primario** l'accumulo del soluto è accoppiato direttamente a una reazione esoergonica, come la conversione di ATP in ADP + P<sub>i</sub>.

Il trasporto attivo **secondario** avviene quando il trasporto endoergonico (contro gradiente) di un soluto è accoppiato a un flusso esoergonico (nella direzione del gradiente) di un soluto diverso, che era stato in precedenza accumulato su un lato della membrana da un trasporto attivo *primario*.



### TRASPORTATORI PRIMARI PRINCIPALI:

- P-ATPasi
- V-ATPasi
- F-ATPasi
- Traportatori ABC

#### P-ATPasi.

La famiglia delle ATPasi di tipo P comprende trasportatori attivi di cationi, che vengono reversibilmente fosforilati dall'ATP. Trasportano cationi contro gradiente, con qualche eccezione come la flippasi che è un trasportatore primario specifico per fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina dal monostrato extracellulare a quello verso il citosol.

Meccanismo. Questi trasportatori sfruttano l'energia dell'ATP per attuare un cambiamento conformazionale, che si realizza grazie partecipazione covalente ATP per permettere il processo di traslocazione dei cationi. La caratteristica comune a tutte le ATPasi di tipo P è che sono inibite dal vanadato (ione con struttura simile al fosfato inorganico).

#### Trasportatori di questa classe:

1. **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi:** sono un sistema di *cotrasporto elettrogenico* (spingono tre ioni sodio fuori dalla cellula mentre fanno entrare tre ioni potassio)

Questo trasportatore è principalmente responsabile della creazione e del mantenimento del gradiente elettrico transmembrana.

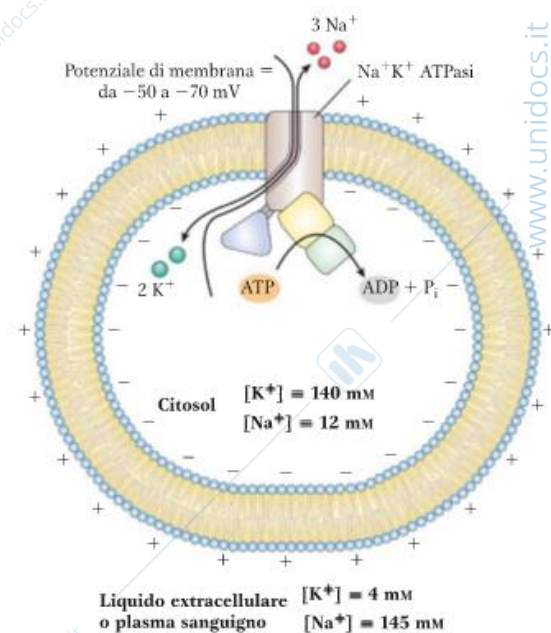
[Na<sup>+</sup>] dentro cellula = 12 mM

[Na<sup>+</sup>] fuori cellula = 145 mM

[K<sup>+</sup>] dentro cellula = 140 mM

[K<sup>+</sup>] fuori cellula = 4 mM

Potenziale. Il significato primario dei trasportatori P-ATPasi è quello di creare un gradiente elettrico e quindi mantenere il potenziale transmembrana (da -50mV a -70 mV). Il potenziale transmembrana (-70mV) è dato dalla differenza matematica tra potenziale interno ed esterno quindi la negatività deriva dal fatto che il potenziale interno è minore di quello esterno e non al fatto che ci sia prevalenza di cariche negative.



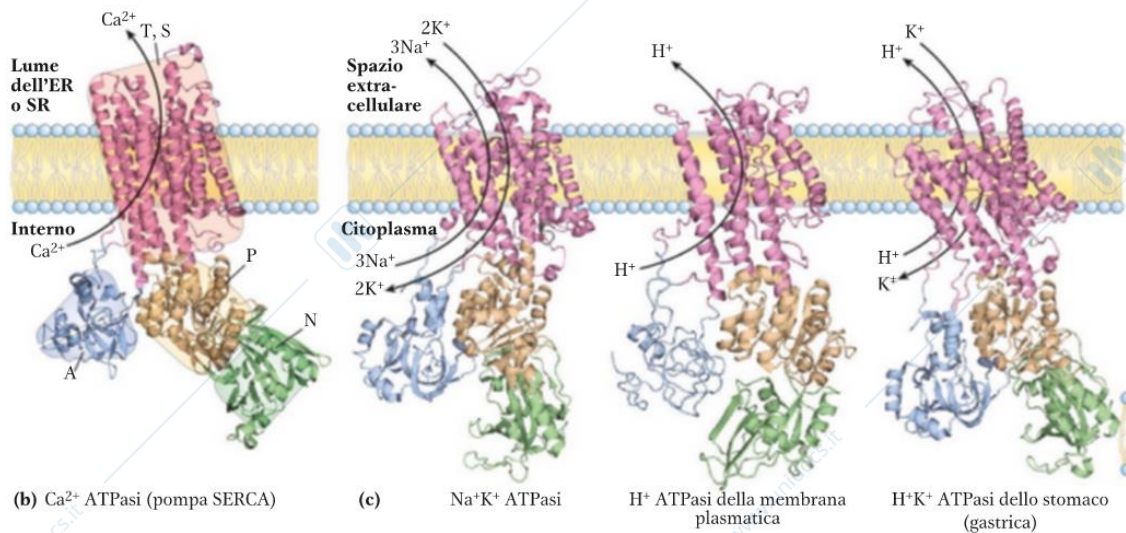
**Energia.** Il ruolo centrale della  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasi è dimostrato dal fatto che l'energia investita in questa singola reazione corrisponde a circa il 25% dell'energia consumata dal corpo umano a riposo.

→ Questo potenziale transmembrana richiede molta energia sia per essere creato che mantenuto, ma è molto importante perché permette, attraverso il gradiente ionico/elettrochimico, la realizzazione del trasporto di soluti e ioni che usano sistemi di trasporto secondario. Inoltre l'esistenza del potenziale elettrico è importante per processi come la generazione e la propagazione dell'impulso nervoso.

2.  **$\text{Ca}^{2+}$  ATPasi:** abbiamo sia la SERCA, la pompa ATPasi per il calcio del reticolo endoplasmatico e sarcoplasmatico, e la pompa  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi della membrana plasmatica.

**Funzione.** La funzione principale è quella di permettere l'omeostasi del calcio nella cellula, mantenendo la concentrazione citosolica del calcio nella cellula a un livello minore di  $1 \mu\text{M}$ .

Processi come la contrazione cellulare sono innescati da aumento della concentrazione dello ione calcio citosolico, che si realizza in risposta alla ricezione di uno stimolo elettrico. Il rilassamento si realizza solo se la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol scende e questo avviene grazie alle pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi che prelevano lo ione dal citosol e lo inseriscono o nel lume dei reticoli (SERCA) o nello spazio extracellulare.



**Struttura.** Nella  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi si distinguono domini funzionalmente importanti con competenze funzionali distinte:

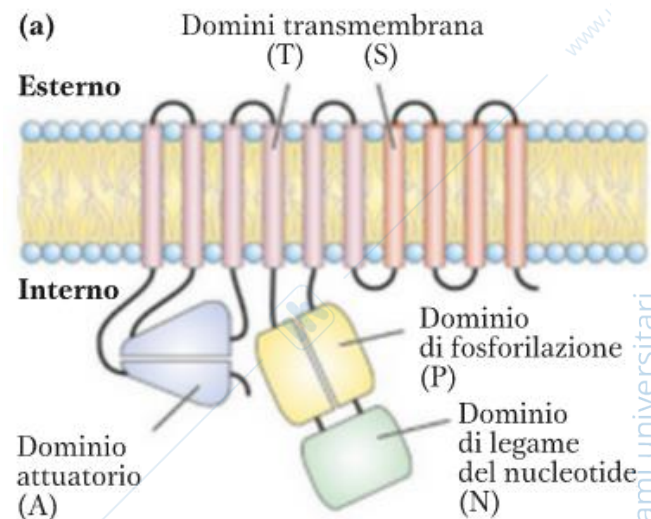
Tre domini sempre presenti a livello citosolico:

1. N: dominio nucleotide, lega l'ATP e il  $\text{Mg}^{2+}$  e possiede un'attività protein chinasi che fosforila, includendolo nel suo sito attivo, il residuo di Asp specifico che si trova nel dominio P (fosforilato) di tutte le ATPasi di tipo P.
2. P: dominio di cui fa parte un residuo di Asp che viene fosforilato grazie a un meccanismo di partecipazione covalente dell'ATP e quindi di un trasferimento del gruppo fosforico in posizione  $\beta$  dall'ATP al residuo di Asp.

3. A: dominio attuatore la cui funzione primaria è quella di trasmettere le modificazioni conformazionali dei domini citosolici ai domini transmembrana. La sua attività protein fosfatase rimuove il gruppo fosforico dal residuo di Asp a ogni ciclo catalitico della pompa.

Due domini sono presenti a livello transmembrana:

4. T: costituito da sei eliche, comprende la struttura di trasporto dello ione. Al centro del fascio di T c'è un dominio in cui si trova il sito di legame degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ .
5. S: quattro segmenti transmembrana la cui unica funzione è quella di supporto fisico e organizzazione spaziale delle eliche di T.



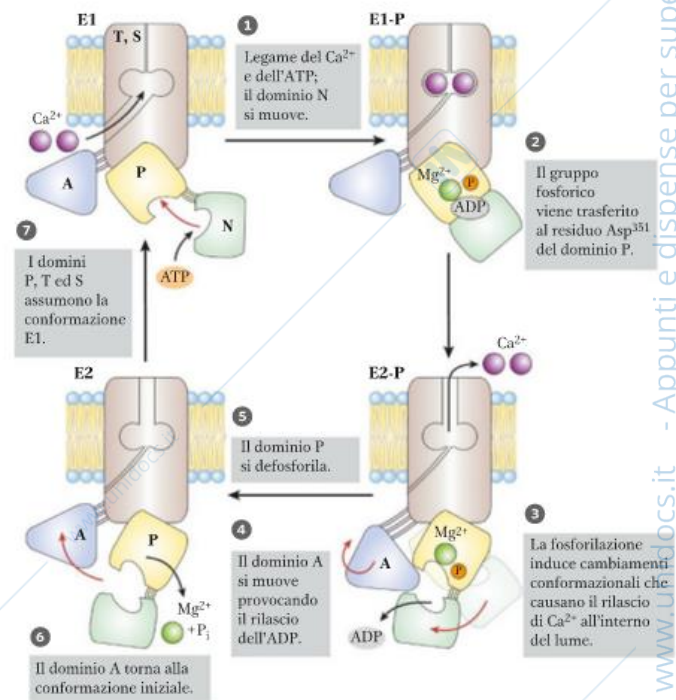
### MECCANISMO.

**Modalità.** Nelle pompe SERCA, ogni ciclo catalitico trasferisce due ioni  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso la membrana e converte un ATP in ADP e  $\text{P}_i$ . L'ATP ha due ruoli in questo meccanismo, uno catalitico e uno di modulazione.

**Conformazioni.** La calcio ATPasi può assumere 2 conformazioni (E1 e E2). Il legame dell'ATP e la fosforilazione dell'aspartato provocano una variazione conformazionale di E1 in E2

Il meccanismo che consente il trasferimento dello ione calcio dal citosol al lume del RE (o reticolo sarcoplasmatico) è costituito da quattro tappe:

1. Stato E1: SERCA ha il sito di legame per ioni calcio accessibile dal lato del citosol e con un'alta affinità per  $\text{Ca}^{2+}$ , quindi due ioni calcio vanno ad occupare subito il sito di legame → si forma il COMPLESSO TRASPORTATORE-SUBSTRATO
2. A livello del dominio N si realizza il legame dell'ATP e immediatamente i domini P e N vanno incontro ad un cambiamento conformazionale che permette al dominio N di fosforilare l'Asp → sono in uno stato conformazionale E1 con il residuo di Asp fosforilato e questo porta ad un **incremento del contenuto energetico** della molecola proteica che passa alla conformazione E2.
3. Nella conformazione E2 viene ridotta l'affinità verso lo ione  $\text{Ca}^{2+}$  del sito di legame e la nuova conformazione della proteina crea una via d'uscita per lo ione verso il lume del reticolo endoplasmatico/sarcoplasmatico



4. Il dominio A ha anche attività fosfatase e questo fa in modo che venga rilasciato ADP e fosfato tramite un'idrolasi tra il gruppo fosforico e il carbonio carbossilico dell'Asp → si ha un RITORNO ALLA CONFORMAZIONE E1 in quanto più stabile dato il minor contenuto di energia libera a E2.
- E1. Lo stato E1 è caratterizzato da un contenuto energetico minore di E2, siti di legame per il  $\text{Ca}^{2+}$  rivolti verso il citosol e alta affinità per gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ .
  - E2. Lo stato E2 è caratterizzato da un alto contenuto energetico, bassa affinità per lo ione  $\text{Ca}^{2+}$  e dalla possibilità degli ioni calcio di lasciare il sito catalitico ed essere trasferiti dal lato opposto della membrana.

**Strutture analoghe.** La  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi della membrana plasmatica ha una struttura molto simile alla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi e questo vale per tutte le ATPasi di tipo P che hanno strutture tridimensionali e organizzazioni secondarie analoghe. Questo meccanismo è lo stesso utilizzato dalla sodio/potassio ATPasi.

#### ATPasi DI TIPO V

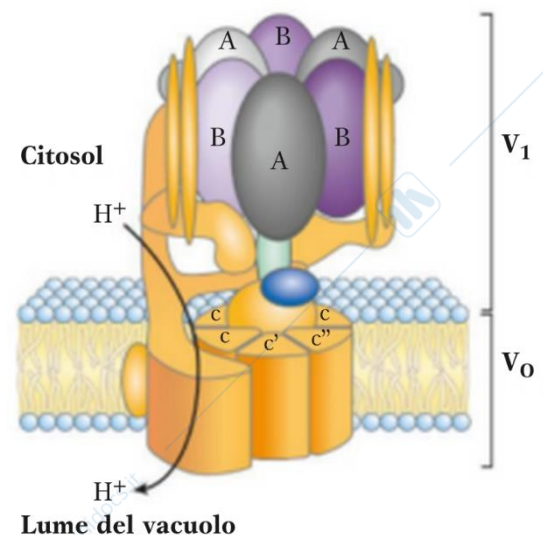
Sono chiamati "V" in quanto sono particolarmente abbondanti nei vacuoli di piante e funghi.

**Collocazione.** Sono trasportatori presenti su alcuni specifici tipi di membrane biologiche:

- Lisosomi.
- Endosomi: vescicole che si formano nel processo di endocitosi.
- Membrane plasmatiche delle vescicole secretorie prodotte dall'apparato di Golgi.

**Struttura.** Presentano una struttura complessa simile a quella delle F-ATPasi:

1. Un dominio idrofilico ( $V_1$ ) rivolto verso il citosol, che contiene il sito di legame per l'ATP su tre subunità B ed esprime l'attività ATPasica.
2. Un dominio transmembrana ( $V_0$ ) rivolto verso il lume della vescicola o dell'organulo, che si comporta come un canale per protoni formato da diverse subunità c identiche.

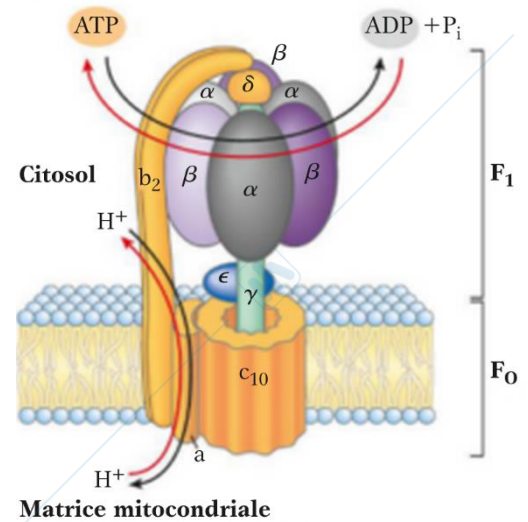


**Funzione.** Questi trasportatori catalizzano il trasferimento contro gradiente di protoni mediante l'utilizzo di ATP come fonte energetica. Quest'ultimo è idrolizzato a livello dei siti catalitici localizzati sulle subunità B e l'energia derivata dalla scissione idrolitica è utilizzata per guidare il trasporto dei protoni all'interno del lume del vacuolo. La loro funzione è quindi quella di **acidificare** compartimenti come quello lisosomiale in cui tutti gli enzimi necessari per realizzare la degradazione di molecole complesse lavorano ad un basso valore di pH. I trasportatori di tipo V hanno perciò il compito di creare e mantenere un ambiente acido affinché la velocità con cui si realizzano questi processi sia elevata.

## ATPasi DI TIPO F

**Funzione.** Sono dei trasportatori attivi che catalizzano il trasporto di protoni contro gradiente guidato dall'idrolisi dell'ATP. La denominazione di tipo 'F' deriva dall'identificazione di queste ATPasi come fattori di accoppiamento energetico.

**Struttura.** Sono dei trasportatori con caratteristiche strutturali simili a quelle delle V-ATPasi in cui le subunità del dominio idrofilico (rivolto verso il citosol) sono chiamate  $\alpha$  e  $\beta$  e sono presenti in tripla copia disposte in maniera alternata fra loro. Presentano due domini  $F_o$  (transmembrana) ed  $F_1$  (periferico) e catalizzano le loro reazioni in entrambe le direzioni.



**Collocazione.** Questi sono presenti sulle membrane di organismi batterici e permettono l'estrusione di protoni dall'esterno all'interno del batterio consentendo la regolazione del pH.

→ L'**ATP sintasi mitocondriale** deriva evolutivamente dalle F-ATPasi ma non è classificabile come trasportatore poiché il suo ruolo principale è quello di sintesi dell'ATP. È infatti fisiologicamente errato parlare di subunità  $F_1$  e  $F_o$  (come se stessimo parlando di un trasportatore): si parla propriamente di ATP sintasi.

L'ATP sintasi attua una **catalisi rotazionale** che prevede la conversione di energia conservata sotto forma di gradiente protonico in energia conformazionale: il passaggio di protoni induce la rotazione del rotore del complesso enzimatico portando alla catalisi della reazione di sintesi di ATP a livelli dei 3 siti catalitici  $\beta$  dell'interfaccia citosolica.

**Fisio-Patologia.** In condizioni fisiologiche il complesso  $F_1$ - $F_o$ -ATPasi è un complesso ATP sintasico che porta alla formazione del 90% circa dell'ATP prodotto nella cellula. Soltanto in condizioni patologiche questo complesso si comporta come F-ATPasi idrolizzando ATP per ricreare il gradiente protonico mitocondriale. Tali condizioni patologiche sono dovute a carenza di ossigeno come in casi di ischemia cardiaca/cerebrale o tumori in cui la proliferazione cellulare avviene più velocemente dello sviluppo della rete vascolare portando alla formazione di regioni poco o non affatto irrorate (*pseudoanossiche* o *anossiche*). In mancanza di ossigeno si ha una carenza di riducenti redox che blocca la catena respiratoria: ciò causa un collasso del potenziale transmembrana dovuto al fatto che i protoni, seppur lentamente, diffondono attraverso la membrana mitocondriale interna riducendo il gradiente elettrochimico. In assenza di quest'ultimo non è possibile attuare la sintesi di ATP. Questa particolare condizione porta l'ATP sintasi a invertire la propria funzione e ad idrolizzare ATP, riformando parzialmente il potenziale di membrana. Tale riformazione è necessaria per il mantenimento dell'**omeostasi ionica mitocondriale**, la cui variazione avrebbe effetti su diverse vie metaboliche.

**Regolazione.** L'idrolisi dell'ATP da parte dell'ATP sintasi in condizioni di mancanza di ossigeno è un processo controllato. L'ATP idrolizzato deriva dal citosol e se questa attività enzimatica non fosse regolata, la cellula andrebbe incontro a morte non per assenza di potenziale elettrico mitocondriale ma per assenza di riserve energetiche. Il controllo avviene grazie all'azione di una **proteina inibitrice endogena** che ha la capacità di legarsi al 50% circa delle molecole di ATP sintasi impedendole di consumare ATP necessario per la sopravvivenza cellulare. Se però la condizione di anossia fosse

prolungata nel tempo, la cellula consumerebbe tutte le sue riserve energetiche (fino alla morte cellulare) nonostante l'attivazione di glicogenolisi e gluconeogenesi.

## TRASPORTATORI ABC.

**Funzione.** I trasportatori ABC costituiscono una grande famiglia di trasportatori ATP-dipendenti che pompano contro un gradiente di concentrazione vari composti:

- Amminoacidi
- Piccole molecole proteiche
- Ioni metallici
- Sali biliari
- Molecole lipidiche: come le **floppasi** (trasportatori aspecifici di fosfolipidi) e il **colesterolo**
- Farmaci: nel caso di trasportatori ABC chiamati *Multidrug Resistance Protein* (in particolare MDR1)

**Struttura.** Sono trasportatori accomunati dalla presenza di due domini di legame per l'ATP (2 NBD) sul versante citosolico e di due fasci di eliche transmembrana (2 TBD). Essi presentano un'affinità variabile e in molti casi scarsa specificità per il proprio substrato. I domini NBD di tutte le proteine ABC hanno sequenze e presumibilmente anche strutture tridimensionali simili.

**Meccanismo.** Il loro meccanismo catalitico si pensa sia basato su un cambiamento conformazionale della proteina data dal legame e dalla successiva idrolisi di due molecole di ATP. La stechiometria delle pompe ABC è circa una molecola di ATP idrolizzato per ogni molecola di substrato trasportato, ma non sono ancora noti i meccanismi di accoppiamento e i siti di legame dei substrati.

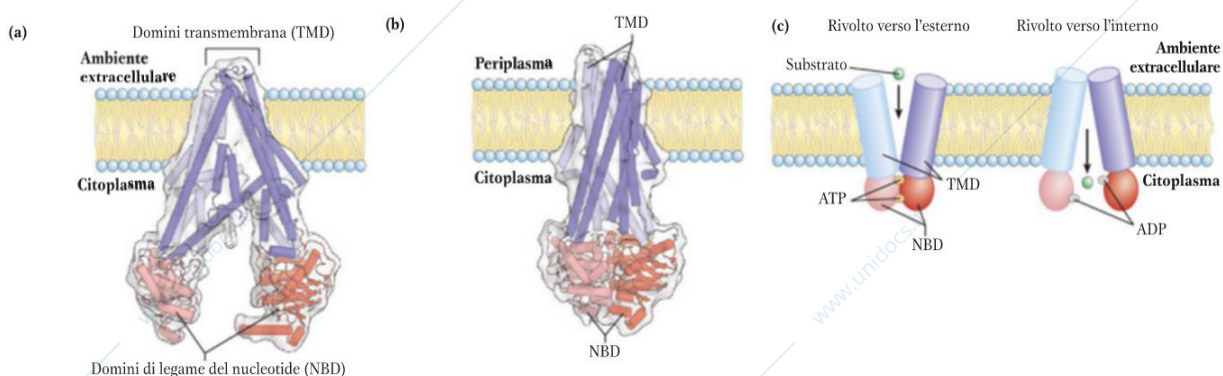
- Circa 50 geni del DNA umano codificano per proteine appartenenti a questa classe e molte patologie ereditarie sono dovute a mutazioni a carico di questi geni.

**Trasportatori.** I trasportatori ABC (*ATP Binding Cassette*) sono localizzati su membrane plasmatiche, mitocondriali, lisosomi e reticolo endoplasmatico. Sono trasportatori accomunati dalla presenza di due domini di legame per l'ATP sul versante citosolico e di due fasci di eliche transmembrana.

### 1. Trasporto di colesterolo

Il colesterolo in eccesso non utilizzato dai tessuti extraepatici per la sintesi di ormoni steroidei o per l'omeostasi della membrana può diffondere, grazie a questi trasportatori, ad un tipo di lipoproteina chiamata HDL (*High Density Lipoprotein*) riconosciuta da un recettore di membrana. Queste HDL rimuovono tutto il colesterolo in eccesso nelle cellule e nel sangue (dove si trova sotto forma di chilomicroni) reclutandolo attraverso una proteina ABC. Quest'ultima permette il trasferimento del colesterolo dall'ambiente intracellulare alla lipoproteina la quale si associa alla membrana cellulare.

### 2. Multidrug Resistance Protein (MDR 1)



Le Multidrug Resistance Protein sono una famiglia di trasportatori ABC, in cui è presente l'MDR1.

**Resistenza.** Questa è responsabile della resistenza di alcuni tumori ai chemioterapici (farmaci idrofobici utilizzati per la cura di tumori come quelli al *fegato, colon e rene*). L'orientamento dei trasportatori è tale da rivolgere il dominio di legame per il farmaco verso il citosol assieme a quello di legame per l'ATP. L'idrolisi dell'ATP induce un cambiamento conformazionale del trasportatore che consente al substrato legatosi a livello del suo sito di legame, di essere rivolto verso lo spazio extracellulare e di essere lì rilasciato. Si ha il passaggio da una conformazione a) energeticamente stabile ad una conformazione b) che presenta un'affinità minore per il suo substrato che viene liberato.

Queste proteine portano ad una costante espulsione del farmaco da parte delle cellule, il quale non raggiunge concentrazioni sufficientemente alte per indurre le cellule tumorali alla morte.

- La sovraespressione di MDR1 è spesso la causa del fallimento del trattamento terapeutico del cancro al fegato, rene e colon.
- Un trasportatore ABC ad esso correlato, l'ABCC1, è sovraespresso nelle cellule cancerose resistenti ai farmaci nei casi di cancro alla prostata, al polmone e al seno.
- Esistono trasportatori ABC che conferiscono resistenza agli antibiotici batteriostatici o battericidi nei microbi patogeni, generando un problema di salute pubblica e rendendo questi trasportatori potenziali bersagli per la progettazione di farmaci.

**Farmacologia.** Attualmente sono oggetto di studio per la progettazione di farmaci diversi inibitori altamente selettivi dei trasportatori multifarmaco che potrebbero aumentare l'efficacia dei farmaci anticancro, che altrimenti verrebbero espulsi dalle cellule cancerose.

**Conservazione.** Per quale motivo i trasportatori multifarmaco si sono così conservati durante l'evoluzione? L'MDR1 presente nella membrana placentale e nella barriera ematoencefalica tiene fuori i composti tossici che altrimenti danneggerebbero il feto o il cervello.

## FIBROSI CISTICA

**Distribuzione.** La fibrosi cistica è una malattia ereditaria dell'uomo relativamente comune, circa il 5% dei bianchi americani è portatore di questa patologia. Ha un'incidenza limitata poiché si manifesta in condizioni di omozigosi recessiva.

**Conseguenze.** Gli individui affetti presentano ostruzione del tratto gastrointestinale e del tratto respiratorio, che determina infezioni batteriche nelle vie aeree e la morte per insufficienza respiratoria prima dei 30 anni di età.

**Causa.** Essa è legata ad una mutazione di un gene che codifica per una **proteina regolatrice della conduttanza transmembrana della Fibrosi Cistica (CFTR)**. Questa evolutivamente deriva dai trasportatori ABC con cui condivide le caratteristiche strutturali (non quelle funzionali): presenta una componente transmembrana, formata da due segmenti ciascuno composto da sei eliche, e una componente citosolica, formata da tre domini funzionalmente significativi. NBD1 e NBD2 sono i domini che legano l'ATP, e un dominio regolatore R è il sito della fosforilazione catalizzata dalla chinasi cAMP-dipendente.

**Meccanismo.** Funzionalmente ha le caratteristiche di un canale e può presentare due conformazioni:

- Chiusa: non vi è passaggio di ioni.
- Aperta: consente il passaggio dello ione cloro dal citosol allo spazio extracellulare.

Fisiologicamente questa proteina passa alla conformazione aperta in seguito al legame e all'idrolisi di ATP che induce un cambiamento conformazionale. Affinché i domini NBD1 e NBD2 possano legare l'ATP è necessario che il dominio regolatore venga fosforilato da una proteina chinasi AMPc-dipendente su un residuo di serina. Quando il dominio R non è fosforilato, il canale del Cl<sup>-</sup> è chiuso. Quando l'ATP si lega, il canale si apre e rimane aperto fino a che l'ATP non viene idrolizzato. Il canale trasporta Cl<sup>-</sup> attraverso la membrana plasmatica quando entrambi i suoi NBD hanno legato l'ATP e si chiude quando l'ATP viene idrolizzato ad ADP e Pi in uno dei suoi NBD.

#### PHE

Nella fibrosi cistica si ha una mutazione di questo gene che consiste nella delezione di una fenilalanina (**Phe<sup>508</sup>**) su uno dei domini che lega l'ATP.

1. Tale delezione non interferisce con la capacità da parte del dominio di legare l'ATP (potrà infatti legarlo) ma con la distribuzione spaziale della proteina che non permette ai domini citosolici di interagire fra loro e di trasferire il segnale conformazionale corretto al dominio transmembrana. Si avrà pertanto una parziale apertura del canale che presenterà un diametro significativamente minore.
2. Inoltre, interferendo con il ripiegamento corretto della molecola, la delezione comporta una maggior degradazione della proteina, come nel caso di tutte le **unfold protein**. Si arriva quindi ad una diminuzione dei livelli della proteina all'interno della membrana.

#### ASP-GLY

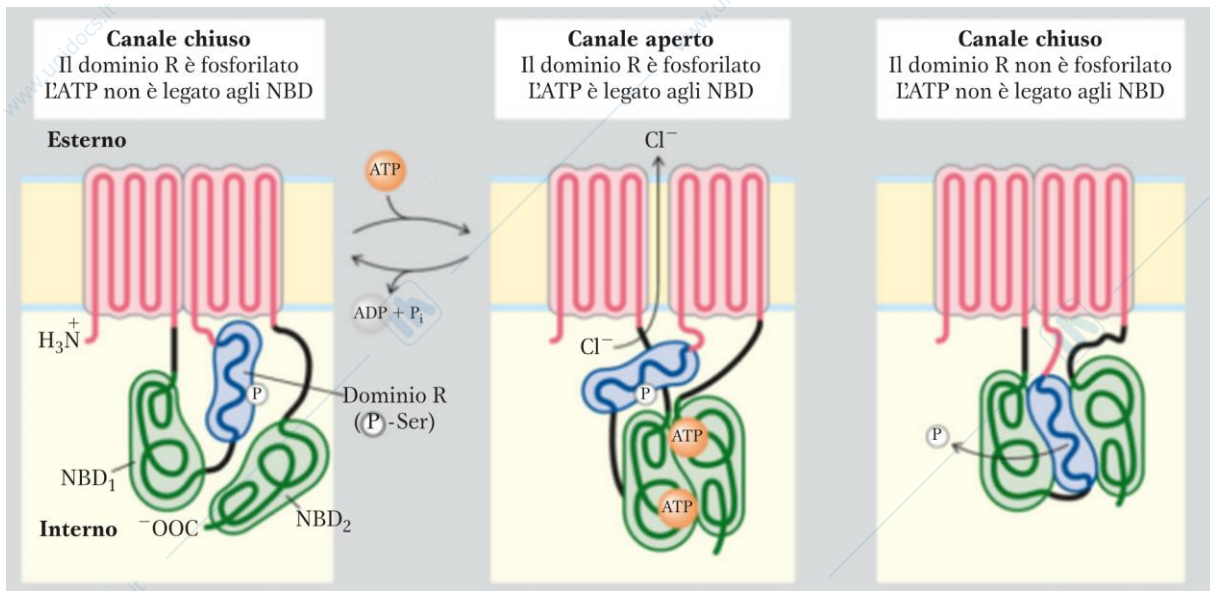
→ La fibrosi cistica non è sempre associata alla presenza di una delezione a livello delle fenilalanina, esistono difatti altri tipi di mutazioni più rare. Tra queste quella con maggiore incidenza è una mutazione che riguarda la sostituzione di un residuo di **Gly**, glicina (amminoacido idrofobico), sempre a livello di uno dei due domini di legame dell'ATP, con un residuo di **Asp**, aspartato (amminoacido polare carico negativamente).

1. La mutazione Gly-Asp ha come effetto la **riduzione del diametro** del canale per il cloro e conseguentemente va a limitarne la diffusione. Questa sostituzione causa dei danni funzionali importanti: è responsabile di un'incapacità da parte della proteina di assumere una conformazione che permetta un flusso fisiologico degli ioni Cl<sup>-</sup>. In condizioni normali il flusso fa sì che il muco, posto sulla superficie rivolta verso il lume delle cellule del tratto respiratorio, sia di densità corretta per le funzioni che deve svolgere.

Conseguenze. Gli effetti di questo trasportatore si hanno a livello intestinale e soprattutto del tratto aereo.

La ridotta estrusione di ioni cloro da parte delle cellule dell'epitelio polmonare che si affacciano sulle vie respiratorie provoca un ridotto trasferimento di molecole d'acqua dal citosol all'ambiente extracellulare. Perciò ad una scarsa esportazione di ioni cloro corrisponde una minore esportazione di acqua. Ciò ha come conseguenza la disidratazione del muco dell'epitelio che aumenta la sua viscosità. Tale ispessimento ha diversi effetti:

- Imbriglia i batteri che portano all'insorgenza di infezioni
- Non permette i corretti movimenti delle ciglia dell'epitelio grazie alle quali i batteri vengono espulsi
- Vi è una limitazione nella velocità di diffusione dell'ossigeno che porta a gravi insufficienze respiratorie (causa di morte)

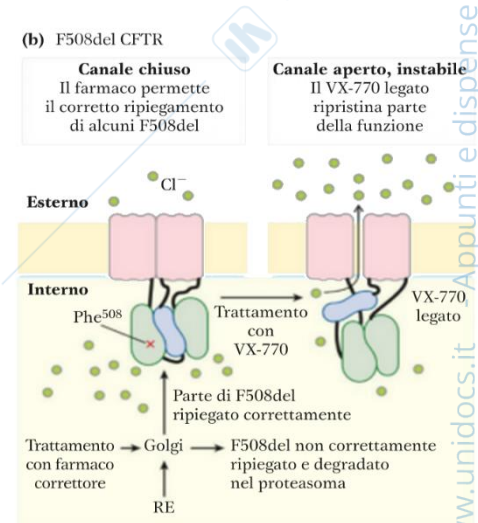


### TRATTAMENTO TERAPEUTICO

Il trattamento terapeutico di questa patologia è diverso a seconda della mutazione: si utilizza un farmaco che potenzia la capacità del canale mutato di diffondere il cloro (nel caso della mutazione Gly-Asp) ossia favorisce l'apertura del canale.

Nel caso della mutazione riguardante la Phe (che colpisce circa il 75% dei pazienti affetti) il trattamento applicato è doppio, ossia vengono somministrati:

- Un farmaco che favorisce ripiegamento corretta della proteina, aumentando i livelli proteici a livello della membrana. Si tenta di modulare il ripiegamento in modo da aumentare sia il livello della proteina sia la capacità di assumere lo stato aperto (e quindi permettere una certa esclusione del cloro).
- Un farmaco che potenzia ulteriormente l'apertura del canale.



## TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

Secondario. I gradienti ionici formati dal trasporto primario di  $\text{Na}^+$  o di  $\text{H}^+$  possono a loro volta essere usati come energia trainante per il cotrasporto di altri soluti. Il trasporto attivo secondario accoppia il flusso spontaneo nella direzione del gradiente di concentrazione contro il gradiente di altri ioni, zuccheri o amminoacidi.

**LATTOSIO PERMEASI.** Un tipico esempio di tale trasportatore nell'E. Coli è la **lattosio-permeasi**: consente il trasferimento di lattosio, combustibile batterico, dallo spazio extracellulare all'interno del microorganismo. Questa proteina è costituita da una singola catena polipeptidica che funziona in forma monomerica per trasporto simporto di un protone e di una molecola del lattosio nella cellula, con un accumulo netto di lattosio.

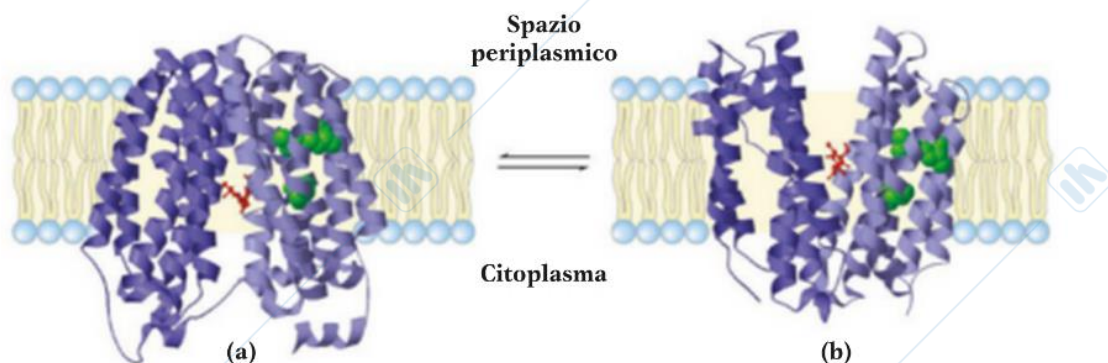
Struttura. La proteina ha 12 eliche transmembrana e ripiegamenti di connessione che sporgono nel citoplasma e nello spazio periplasmatico. Tutte le sei eliche aminoterminali e le sei carbossiterninali formano domini molto simili che producono una struttura con una simmetria quasi doppia. Nella forma cristallina le proteine hanno una grande cavità acquosa esposta sul lato citoplasmatico della membrana. Il sito di legame al substrato è in questa cavità, più o meno al centro della membrana.

Meccanismo. Il sistema sfrutta il potenziale chimico ed elettrico transmembrana degli ioni  $\text{H}^+$ , generato dalla presenza di una catena di trasporto degli elettroni che pompa protoni all'esterno.

Il trasportatore in condizioni fisiologiche presenta due conformazioni:

- Quando non vi è passaggio di lattosio: con ponti salini integri e con cavità rivolta verso il periplasma.
- Quando vi è passaggio di lattosio: i ponti salini sono rotti dalla protonazione di residui di  $\text{Glu}^{325}$  e  $\text{Arg}^{302}$  e la concavità è rivolta verso il citoplasma

→ Si pensa infatti che il trasporto fisiologico (non mutato) di lattosio dallo spazio periplasmatico a quello citoplasmatico sia dovuto ad episodi di protonazione di residui di  $\text{Glu}^{325}$  o  $\text{Arg}^{302}$  che rompono ponti salini (fra glutammato e catene laterali cariche positivamente e fra arginina e aspartato) presenti quando non vi è passaggio di lattosio. Il dominio di legame del substrato viene così esposto alternativamente verso il citoplasma e verso il periplasma, secondo un modello, chiamato 'banana che dondola' (*rocking banana*). Questo cambiamento conformazionale permetterebbe l'ingresso del substrato all'interno del batterio.

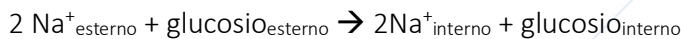




SIMPORTO  $\text{Na}^+$ -GLUCOSIO1. Epitelio intestinale

Microvilli. Le cellule epiteliali hanno una membrana basale e una apicale. Quest'ultima è caratterizzata da **microvilli** che ne aumentano la superficie, il che è importante ai fini di un sufficiente importo di nutrienti. Avere una superficie di membrana molto sviluppata determina l'assunzione di una quantità maggiore di nutrienti nell'unità di tempo.

Reazione. Nelle cellule epiteliali dell'intestino, il glucosio e alcuni amminoacidi vengono accumulati all'interno delle cellule mediante un simporto con l' $\text{Na}^+$ , usando il gradiente elettrochimico precedentemente creato dalla  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPasi. La stechiometria del trasporto è di due ioni sodio per unità di glucosio. L'importo del sodio attraverso le membrane comporta il rilascio di un'energia molto elevata che consente di trascinare termodinamicamente il glucosio all'interno cellule:

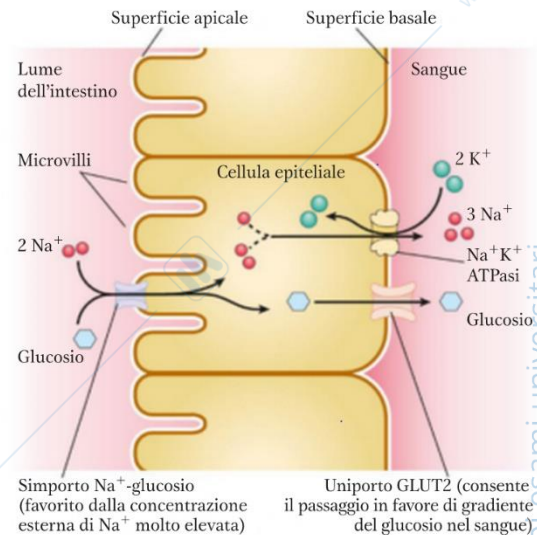


GLUT2. Una volta raggiunte alte concentrazioni, il glucosio viene trasferito negli spazi interstiziali e all'interno dei capillari sanguigni grazie alla presenza sulla membrana basale di un trasportatore di glucosio sui villi intestinali: il **GLUT 2**, isoforma con bassa affinità per il glucosio.

Gradiente. Il gradiente elettrochimico è generato dalla  **$\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi** a livello della membrana basale che porta continuamente fuori tre  $\text{Na}^+$  ed importa due  $\text{K}^+$ ; quindi l'energia liberata dal gradiente di sodio è in realtà a sua volta resa disponibile dalla pompa sodio potassio.

Il gradiente di sodio è in grado *in linea teorica* di permettere un importo tale da raggiungere un rapporto tra glucosio intra ed extracellulare di circa 6000. In altre parole, l'energia che questo gradiente di sodio è in grado di liberare, qualora il sistema raggiungesse una condizione di equilibrio, permetterebbe alla concentrazione del glucosio intracellulare di essere 6000 volte più elevata rispetto a quella presente a livello del lume intestinale.

Calcolo. Per il calcolo è sufficiente misurare la variazione di energia libera che accompagna l'importo del sodio, considerando anche l'effetto dello ione sodio sul potenziale elettrico transmembrana:



**ESERCIZIO SVOLTO 11.3****Energetica del simporto**

Calcolate il valore massimo raggiungibile del rapporto  $\frac{[\text{glucosio}]_{\text{interno}}}{[\text{glucosio}]_{\text{esterno}}}$  da parte di un trasportatore del glucosio dipendente dall' $\text{Na}^+$  delle cellule epiteliali, quando  $[\text{Na}^+]_{\text{interno}}$  è 12 mM,  $[\text{Na}^+]_{\text{esterno}}$  è 145 mM, il potenziale di membrana è  $-50$  mV (negativo all'interno), e la temperatura è di  $37^\circ\text{C}$ .

**Soluzione** Utilizzando l'Equazione 11.4 (p. 398) è possibile calcolare l'energia associata al gradiente elettrochimico di  $\text{Na}^+$ , cioè il costo energetico per il trasporto di uno ione  $\text{Na}^+$  contro gradiente:

$$\Delta G_i = RT \ln \frac{[\text{Na}]_{\text{esterno}}}{[\text{Na}]_{\text{interno}}} + Z \mathcal{F} \Delta \psi$$

Ora si sostituiscono i valori standard per  $R$ ,  $T$  e  $\mathcal{F}$ , nonché la concentrazione data per  $[\text{Na}^+]$  (espressa come concentrazione molare),  $+1$  per  $Z$  (in quanto  $\text{Na}^+$  ha carica positiva) e  $0,050$  V per  $\Delta \psi$ . Si noti che il potenziale di membrana è  $-50$  mV (negativo all'interno), quindi la variazione di potenziale quando uno ione si muove dall'interno all'esterno è di  $50$  mV.

$$\begin{aligned} \Delta G_i &= (8,315 \text{ J/mole} \cdot \text{K}) (310 \text{ K}) \ln \frac{1,45 \times 10^{-1}}{1,2 \times 10^{-2}} \\ &\quad + 1(96500 \text{ J/V} \cdot \text{mole})(0,050 \text{ V}) \\ &= 11,2 \text{ kJ/mole} \end{aligned}$$

Questo valore di  $\Delta G_i$  corrisponde all'energia potenziale disponibile per pompare il glucosio, per mole di  $\text{Na}^+$  nel gra-

diente di  $\text{Na}^+$ . Poiché sono due gli ioni  $\text{Na}^+$  che vengono trasportati secondo il gradiente elettrochimico all'interno della cellula per molecola di glucosio trasportata dal sistema simporto, l'energia disponibile per pompare 1 mole di glucosio è  $2 \times 11,2 \text{ kJ/mole} = 22,4 \text{ kJ/mole}$ . È possibile ora calcolare il valore del rapporto tra le concentrazioni di glucosio che deve essere raggiunto dalla pompa (dall'Equazione 11.3, p. 398):

$$\Delta G_i = RT \ln \frac{[\text{glucosio}]_{\text{interno}}}{[\text{glucosio}]_{\text{esterno}}}$$

Risolvendo, e sostituendo i valori di  $\Delta G_i$ ,  $R$  e  $T$ , si ottiene:

$$\begin{aligned} \ln \frac{[\text{glucosio}]_{\text{interno}}}{[\text{glucosio}]_{\text{esterno}}} &= \frac{\Delta G_i}{R, T} = \frac{22,4 \text{ kJ/mole}}{(8,315 \text{ J/mole} \cdot \text{K}) (310 \text{ K})} = 8,69 \\ \frac{[\text{glucosio}]_{\text{interno}}}{[\text{glucosio}]_{\text{esterno}}} &= e^{8,69} \\ &= 5,94 \times 10^3 \end{aligned}$$

Quindi il cotrasportatore può continuare a pompare glucosio all'interno della cellula, fino a che la concentrazione del glucosio all'interno della cellula epiteliale è 6000 volte più elevata di quella esterna.

**2. Assorbimento renale**

Una situazione analoga si ha a livello renale.

**Struttura.** Il glomerulo renale è deputato alla filtrazione del sangue e consta di diverse regioni: il tubulo contorto prossimale, tubulo contorto distale e il dotto collettore che fa confluire l'urina prodotta al termine di questo percorso a livello dell'uretere.

**Trasportatori.**

1. A livello delle cellule epiteliali renali del tubulo contorto prossimale, si ha un trasportatore che permette il **simporto** di  $\text{Na}^+$ -glucosio o di  $\text{Na}^+$ -amminoacidi. Attraverso questi sistemi si realizza così il recupero di glucosio e di amminoacidi che erano passati del flusso ematico alla pre-urina (prodotto iniziale della filtrazione del sangue).

2. Esiste anche un secondo tipo di trasporto attivo secondario, un **antiporto**: dal lume renale vengono assunti  $\text{Na}^+$  in scambio con dei **protoni** che vengono invece trasferiti dal citosol della cellula epiteliale renale all'interno del lume. A questo sistema è dovuta l'acidificazione dell'urina.

Questi processi sono importanti: (1) definiscono la composizione dell'urina e (2) conservano l'omeostasi del tessuto sanguigno.

**Pompa.** La forza trainante di questi trasporti è direttamente il gradiente sodico ed indirettamente l'attività la **pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$**  sulla membrana basale (che nelle cellule dell'epitelio renale viene detta sierosale), la quale permette il mantenimento del gradiente tra lume renale e citosol della cellula epiteliale che trascina poi l'importo di glucosio e/o di amminoacidi e l'esportazione di protoni.

## IONOFORI

**Definizione.** Esistono dei sistemi di trasporto di ioni, prevalentemente di cationi, che vengono utilizzati sperimentalmente, ma possono essere anche utilizzati in ambito medico nel trattamento di infezioni da agenti patogeni (es. batteri e funghi) con il fine di **annullare i gradienti elettrochimici transmembrana** e portare a morte l'agente patogeno.

**Motivo.** Questo perché a livello fisiologico e biochimico, i gradienti sono per gli agenti patogeni essenziali per sintetizzare ATP e importanti per importare all'interno della cellule diversi tipi di metaboliti utili per la biosintesi. Quindi danneggiare questo gradiente consente di alterare la funzionalità cellulare.

Si possono distinguere due categorie di ionofori:

### 1. Trasportatori mobili di ioni

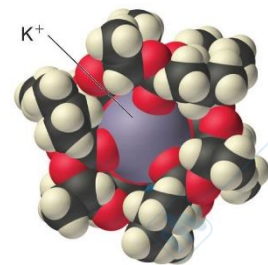
Sono molecole che diffondono attraverso la membrana; tra queste si ricorda la **valinomicina**, un dodecadepsipeptide ciclico (formato da L-Val, acido D-idrossi isovalerico, D-Val e acido lattico; unità costituita da quattro molecole legate covalentemente tra loro ripetuta tre volte). La valinomicina ha un'alta specificità per lo ione potassio. È caratterizzata da:

- una superficie idrofobica che le permette di attraversare la membrana plasmatica
- un nucleo polare al centro con gruppi chimici in grado di legare  $\text{K}^+$  attraverso legami di coordinazione e che permette di nascondere la carica dello ione.

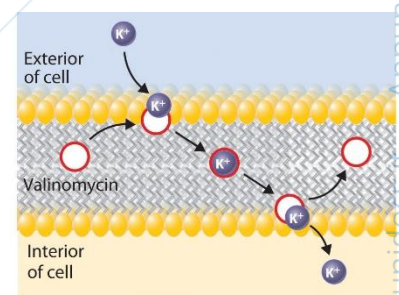
Se si sospendono delle cellule in terreno di coltura con un'alta concentrazione di  $\text{K}^+$  e si aggiunge valinomicina, questa trasporterà ioni potassio all'interno (secondo gradiente) fino al raggiungimento di un equilibrio transmembrana e quindi ad un annullamento del gradiente elettrico.

### 2. Canali

Trasportatori con strutture tali da creare dei **canali transmembrana specifici** per diversi tipi di cationi (ad es. la gramicidina A è specifica per  $\text{K}^+$ ). Annullando il potenziale elettrico transmembrana, permettono il trasferimento di uno specifico catione.

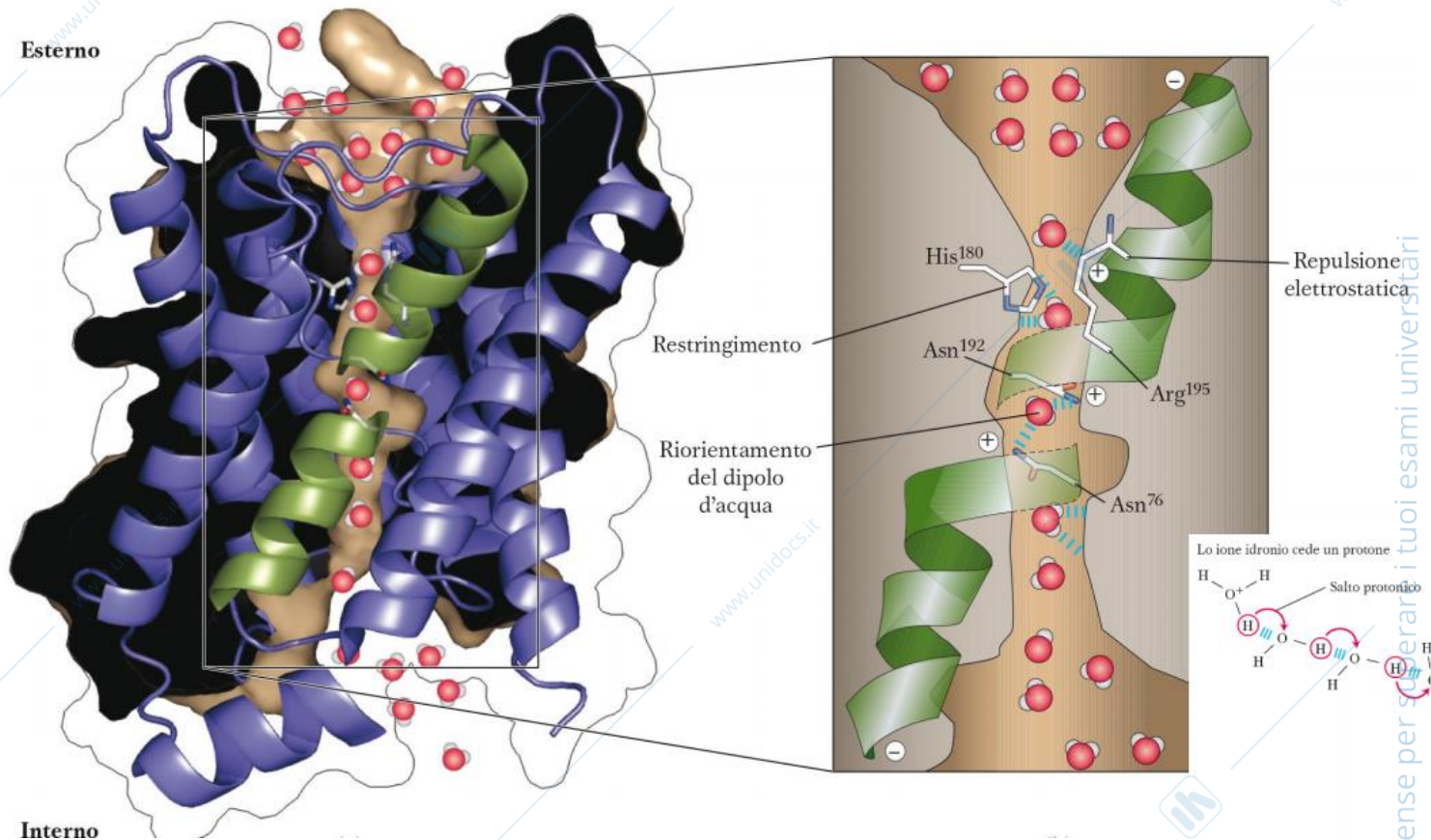


(a)  $\text{K}^+$ -valinomycin complex



(b) Transport of  $\text{K}^+$  across a membrane

## ACQUAPORINE



### GENERALITA' ACQUAPORINE

**AQP.** Le acquaporine AQP sono una famiglia di proteine integrali di membrana che permettono il passaggio dell'acqua attraverso la membrana plasmatica. Le acquaporine sono fundamentalmente caratterizzate da una struttura unica, altamente conservata, sia a livello delle varie isoforme dell'organismo umano, sia a livello delle stesse acquaporine di diversi organismi, anche di tipo vegetale come ad esempio lo spinacio. Si conoscono undici diverse acquaporine nei mammiferi, ciascuna con una specifica localizzazione e uno specifico ruolo. Le acquaporine sono localizzate principalmente sulle membrane plasmatiche. La distribuzione delle diverse isoforme è tessuto-specifica.

**Trasporto.** Al di là della specificità per il substrato che può variare, il primo soluto dei canali è l'**acqua** ma altre isoforme sono in grado di trasportare anche glicerolo ed urea.

### Collocazione.

1. I canali sono particolarmente abbondanti a livello delle **ghiandole** (es. sudoripare e lacrimali, entrambe caratterizzate da un secreto ricco di acqua). --L'isoforma 5 (AQP5) è quella tipica delle ghiandole.
2. Sono abbondantemente presenti anche negli **eritrociti**: le AQP sono essenziali per consentire al globulo rosso di adattarsi alle variazioni del volume e della concentrazione elettrolitica del plasma. Deve essere in grado di assorbire acqua per osmosi quando il volume del sangue diventa elevato (bassa concentrazione elettrolitica) e viceversa deve effettuare l'azione contraria quando la concentrazione elettrolitica tende ad aumentare. La modulazione dell'assorbimento di acqua da parte dell'eritrocita varia dipendentemente dal distretto tissutale in cui si trova e quindi a seconda dello stato funzionale del tessuto.  
-- L'isoforma 1 (AQP1) è quella tipica degli eritrociti.

3. Le acquaporine sono molto presenti anche a livello renale, nel **dotto collettore**. --L'isoforma 2 (AQP2) è tipica del tessuto renale. L'attività di questa acquaporina è modulata dalla vasopressina, l'ormone antidiuretico. L'ADH incrementa la capacità del dotto collettore di assorbire acqua (dove avviene la conversione da pre-urina ad urina): l'ormone induce un incremento dei livelli di AQP2 sulla membrana plasmatica, mobilizzando le molecole di AQP2 immagazzinate in vescicole all'interno delle cellule epiteliali e aumentando la capacità della membrana plasmatica di assorbire acqua.

**TABELLA 11.5** Caratteristiche di permeabilità e localizzazione prevalente delle acquaporine di mammifero note

Acquaporina	Permeante (permeabilità)	Distribuzione tissutale	Distribuzione subcellulare*
AQP-0	Acqua (bassa)	Cristallino	Membrana plasmatica
AQP-1	Acqua (elevata)	Eritrociti, reni, polmoni, endotelio vascolare, cervello, occhio	Membrana plasmatica
AQP-2	Acqua (elevata)	Reni, vasi deferenti	Membrana plasmatica apicale, vescicole intracellulari
AQP-3	Acqua (elevata), glicerolo (elevata), urea (moderata)	Reni, pelle, polmoni, occhio, colon	Membrana plasmatica basolaterale
AQP-4	Acqua (elevata)	Cervello, muscolo, reni, polmone, stomaco, intestino tenue	Membrana plasmatica basolaterale
AQP-5	Acqua (elevata)	Ghiandole salivari, ghiandole lacrimali, ghiandole sudoripare, polmone, cornea	Membrana plasmatica apicale
AQP-6	Acqua (bassa), anioni ( $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ )	Reni	Vescicole intracellulari
AQP-7	Acqua (elevata), glicerolo (elevata), urea (elevata), arsenito	Tessuto adiposo, reni, testicoli	Membrana plasmatica
AQP-8 <sup>f</sup>	Acqua (elevata)	Testicoli, reni, fegato, pancreas, intestino tenue, colon	Membrana plasmatica, vescicole intracellulari
AQP-9	Acqua (bassa), glicerolo (elevata), urea (elevata), arsenito	Fegato, leucociti, cervello, testicoli	Membrana plasmatica
AQP-10	Acqua (bassa), glicerolo (elevata), urea (elevata)	Intestino tenue	Vescicole intracellulari

Diabete mellito di tipo I. (Curiosità personale) Quando l'ingestione di sostanze nutrienti ricche di carboidrati determina un aumento della concentrazione del glucosio nel sangue al di sopra del valore normale (5 mM), l'eccesso di glucosio viene catturato dal muscolo cardiaco e dal muscolo scheletrico (sotto forma di glicogeno) e dagli adipociti (sotto forma di triacilgliceroli).

L'assunzione di glucosio da parte del muscolo cardiaco e degli adipociti è mediata dal trasportatore del glucosio GLUT4. Tra un pasto e l'altro nella membrana plasmatiche di queste cellule sono presenti solo poche copie di GLUT4, ma la maggior parte è sequestrata nelle membrane di piccole vescicole intracellulari. Quando l'insulina viene rilasciata dal pancreas in risposta a elevati livelli di glucosio, l'ormone innesca lo spostamento di queste vescicole verso la membrana plasmatica, con la quale si fondono, esponendo le molecole di GLUT4 sulla superficie esterna della cellula. Con più molecole di GLUT4 attive, la velocità di assunzione del glucosio aumenta di circa 15 volte. Quando i livelli di glucosio del sangue ritornano normali, l'insulina non viene più rilasciata e il GLUT4 viene rimosso dalla membrana e internalizzato in vescicole.

→ Nel diabete mellito di tipo I l'incapacità di rilasciare insulina determina una bassa velocità di assunzione del glucosio nel muscolo e nel tessuto adiposo. Una conseguenza della mancanza di insulina nel sangue dopo un pasto ricco di carboidrati è la concentrazione di glucosio che rimane invariabilmente alta.

Diabete insipido. Esiste una patologia, il **diabete insipido**, che è causata da una mutazione di AQP2. L'ormone antidiuretico (ADH) regola la ritenzione di acqua mobilizzando le molecole di AQP2 immagazzinate in vescicole all'interno delle cellule epiteliali. Quando le vescicole si fondono con la membrana plasmatica, la permeabilità all'acqua aumenta enormemente e dal dotto collettore viene

riassorbita più acqua, che poi torna nel sangue. Nei casi di diabete insipido nell'uomo, un difetto genetico di AQP2 porta a un difetto di assorbimento dell'acqua da parte del rene. Questa mutazione impedisce all'acquaporina di assorbire acqua dal lume renale, così portando i pazienti ad espellere grosse quantità di urina (**poliuria**). Considerando che non si hanno altre importanti alterazioni funzionali, la patologia può essere facilmente controllata introducendo una grossa quantità di acqua con la dieta.

- Il diabete mellito è caratterizzato sia da iperglicemia (alte concentrazioni di glucosio nel sangue) che da iperglicosuria (alte concentrazioni di glucosio nelle urine). Ciò che lo accomuna al diabete insipido è unicamente la poliuria.

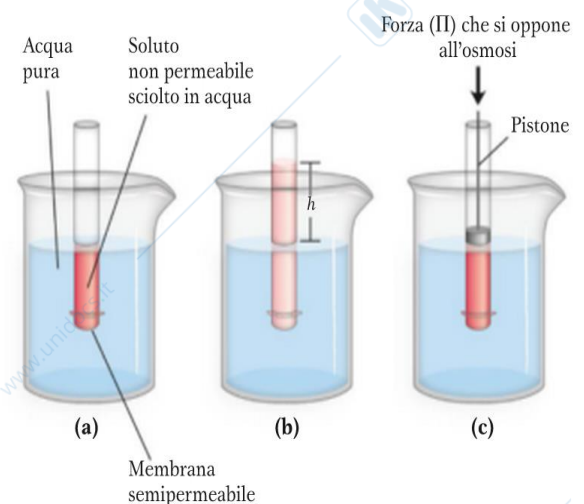
### OSMOLARITA' E PRESSIONE OSMOTICA

L'**osmolarità** è la tendenza di un ambiente acquoso ad assorbire l'acqua da un secondo compartimento da cui è separato tramite una membrana permeabile all'acqua. L'osmolarità è tanto più alta tanto più alte sono le concentrazioni dei soluti in essa disciolti, siano essi degli ioni.

L'osmolarità di un ambiente acquoso, come quello citosolico, viene quantizzata attraverso un parametro definito pressione osmotica, direttamente dipendente dalla concentrazione dei soluti.

La **pressione osmotica** ( $\pi$ ) è la pressione che si deve applicare ad un lato della membrana al fine di impedire il passaggio libero di acqua verso il compartimento in cui la concentrazione dei soluti è maggiore.

Questo meccanismo è facilmente osservabile: si consideri un tubo di vetro con all'interno una soluzione con degli ioni e una membrana permeabile all'acqua posta alla sua fine. Se si inserisce il tubo all'interno di un becher con una fase acquosa libera, quello che accade è che la presenza di un'elevata concentrazione di soluto idrofilico fa sì che si incrementi il numero delle molecole di acqua legate ai soluti, il che porta ad una diminuzione della concentrazione di molecole di acqua libera. La differenza di concentrazione di acqua libera induce le molecole di acqua nel becher ad entrare nel compartimento acquoso più concentrato e questo movimento continua fino a che l'acqua libera non raggiunge una situazione di equilibrio.



Le differenze di pressioni osmotiche sono **molto piccole** e fondamentali ai fini del mantenimento dell'**omeostasi**. Se le differenze fossero grandi si potrebbero verificare due condizioni estreme: un assorbimento così elevato da determinare un rigonfiamento del volume cellulare sino arrivare alla lisi (*soluzione ipotonica*), oppure viceversa qualora l'ambiente cellulare fosse *ipertonico* l'altro evento sarebbe dato da un raggrinzimento della cellula e conseguente profonda alterazione funzionale.

## ANALISI ACQUAPORINA AQP1

**Funzionalità.** L'AQP1 è altamente selettiva per l'acqua e permette il raggiungimento di una velocità molto elevata, il che significa che l'energia di attivazione che controlla la velocità del processo è estremamente bassa. Il meccanismo si realizza attraverso l'assunzione di stati conformazionali che sono quindi caratterizzati da una energia di attivazione molto bassa.

**Struttura.** L'organizzazione strutturale dell'AQP1 consiste di quattro monomeri associati in un tetramero. Ogni monomero forma un poro transmembrana con un diametro sufficiente a permettere il passaggio delle molecole di acqua in una fila singola. Ogni acquaporina quindi, essendo tetramerica, sarà caratterizzata da 4 canali, ognuno dei quali permette la diffusione di molecole di acqua. Ogni monomero è costituito da sei segmenti di elica transmembrana, a formare il canale, e da due corte eliche contenenti nelle anse terminali la sequenza Asn-Pro-Ala (NPA), che formano il poro per l'acqua.

Le due corte anse che contengono le sequenze NPA si estendono verso la parte centrale del doppio strato da lati opposti. Le regioni NPA si sovrappongono nella parte centrale della membrana per formare parte del filtro di specificità, la struttura che permette il passaggio solo dell'acqua. A questo livello infatti, il canale dell'acqua si restringe fino ad un diametro di 2,8 Å vicino al centro della membrana, riducendo considerevolmente la grandezza delle molecole in grado di attraversarlo. Al restringimento del canale partecipa anche un residuo di istidina (Hys).

**Selettività.** La selettività per le molecole d'acqua e la non permeabilità del canale allo ione idrossonio (catione più simile per dimensioni all'acqua) è legata alla presenza di gruppi carichi positivamente a livello del filtro. Due residui essenziali di Arg e His e i dipoli elettrici formati dalle corte eliche delle anse NPA forniscono cariche positive in posizioni strategiche, che respingono i protoni e impediscono la formazione di legami idrogeno tra le molecole di acqua adiacenti.

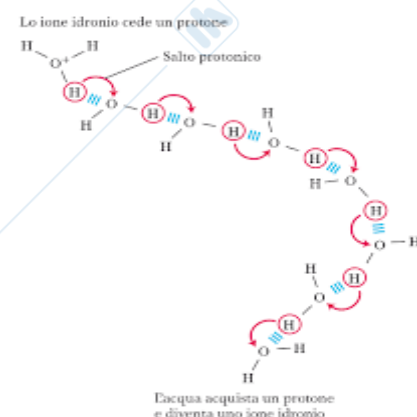
1. His<sup>180</sup> presenta l'anello imidazolico carico positivamente.
2. Arg<sup>195</sup>, un residuo di arginina altamente conservato impedisce il passaggio di cationi, come lo ione idrossonio H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. La carica positiva dell'Arg<sup>195</sup> respinge i cationi, compreso l'H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, impedendone il passaggio attraverso il poro.
3. Le anse terminali delle due piccole eliche che rivolgono verso questa regione il loro polo positivo, in modo da forzare una molecola d'acqua a riorientarsi, mentre passa, causando la rottura dei legami idrogeno tra le molecole d'acqua.

**Legami idrogeno.** La struttura del canale permette il passaggio molto veloce delle molecole d'acqua, ma non consente la formazione di catene di molecole di acqua sufficientemente vicine da permettere il salto di protoni. Ciò è dovuto:

1. Agli ossigeni carbonilici dei residui dello scheletro covalente che, proiettandosi nella parte più ristretta del canale, possono formare legami idrogeno con le singole molecole d'acqua, man mano che esse fluiscono nel canale.

2. A due residui di asparagina (Asn<sup>76</sup> e Asn<sup>192</sup>) delle anse NPA, che formano legami idrogeno con l'acqua.

→L'orientamento che le molecole assumono a seguito di queste interazioni non permette la formazione di legami a idrogeno tra le molecole d'acqua. È importante che non si formino queste catene perché qualora si potessero formare si avrebbe la possibilità che uno ione idronio trasferisca il suo protone alla prima delle molecole che costituiscono la catena, ognuna delle molecole trasferirebbe il protone alla molecola successiva fino all'ultima che rilascerebbe il protone alla molecola d'acqua libera all'interno della cellula che si



convertirebbe in ione idronio. Questo è definito meccanismo del "salto protonico" e di fatto determinerebbe il trasferimento dello ione idronio all'interno della cellula.

**Regolazione.** I meccanismi di regolazione sono abbastanza semplici poiché come tutti i canali essi dipendono solo da un determinato dominio proteico, il cui movimento non è ad oggi stato chiarito in base a cosa si verifichi. L'acquaporina dello spinacio, ad esempio, è risultata strettamente controllata: si apre quando due residui essenziali di serina situati in prossimità della porzione intracellulare del canale sono fosforilati, e si chiude quando sono defosforilati. Le due strutture della forma chiusa e aperta sono state determinate mediante cristallografia.

- La fosforilazione favorisce una conformazione che spinge due residui vicini di Leu e un residuo di His verso il canale, bloccando il passaggio dell'acqua oltre la strettoia e chiudendo il canale.

- La defosforilazione permette la riapertura del canale.

## CANALI IONICI

**Importanza.** I canali ionici selettivi rappresentano un'altra via di passaggio degli ioni attraverso la membrana. I canali ionici determinano una permeabilità della membrana plasmatica a ioni specifici. Sono estremamente importanti perché la loro apertura e chiusura modula le concentrazioni intracellulari di ioni attraverso i quali si espletano importanti processi fisiologici della cellula.

→ **Neuroni.** Nei neuroni, permettono la realizzazione del potenziale transmembrana che a sua volta permette la propagazione dell'impulso nervoso tra cellula nervosa pre-sinaptica e una post-sinaptica che può essere di natura nervosa, muscolare o secretoria

→ **Miociti.** Nella cellula muscolare, la propagazione dell'impulso nervoso provoca una depolarizzazione della membrana, che causa a sua volta un incremento della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico ed è questo che attiva lo scorrimento delle fibre di miosina su quelle di actina.

**Canali ionici e trasp. passivi.** I canali ionici si distinguono dai trasportatori di ioni per almeno tre diverse caratteristiche:

1. Primo, la velocità del flusso attraverso il canale può essere di alcuni ordini di grandezza superiore al numero di turnover di un trasportatore: da  $10^7$  a  $10^8$  ioni per secondo, molto vicino alla velocità massima teorica della diffusione non limitata.
2. Secondo, i canali ionici non sono saturabili; la loro velocità non tende mai a raggiungere un valore massimo anche a concentrazioni elevate di substrato.
3. Terzo, essi sono controllati, cioè aperti o chiusi in risposta a qualche evento cellulare.

**Apertura e chiusura.** Essi sono controllati, cioè aperti o chiusi in risposta a qualche evento cellulare:

- Nei canali ionici controllati da ligandi, il legame di piccole molecole proteiche che fungono da modulatori allosterici genera una transizione molecolare allosterica nella proteina che apre o chiude il canale.

- Nei canali ionici controllati da voltaggio, variazioni del potenziale transmembrana che vanno a provocare una modificazione conformazionale che porta dallo stato aperto a quello chiuso o viceversa.



→ Il tempo richiesto per la transizione da uno stato all'altro è inoltre un tempo estremamente breve: in una frazione di millisecondo il canale si apre, resta aperto per pochi millisecondi e subito si richiude. Sono quindi sistemi in grado di attivare un processo in tempi molto brevi. La velocità di apertura e chiusura rende questi macchinari biologici particolarmente idonei alla trasduzione di segnali nel sistema nervoso.

#### PATCH-CLAMP.

Necessità. Un singolo canale ionico resta aperto in media solo per pochi millisecondi, e questo è un tempo troppo breve per la maggior parte delle determinazioni biochimiche. I flussi ionici devono essere misurati elettricamente, sia come intensità di corrente che passa attraverso il canale quando si apre, sia come tempo che intercorre tra un'apertura e la successiva per trovare la frequenza dell'apertura del canale in un arco temporale.

Tecnica. Con la tecnica del patch-clamp (prelievo di frammento) si possono misurare correnti molto piccole attraverso una ristretta regione di membrana contenente una molecola di canale ionico.

1. Una pipetta con la punta molto sottile viene pressata sulla superficie di una cellula e, applicando una pressione negativa nella pipetta, si sigilla la sua punta con la membrana della cellula. Quando la pipetta viene tolta dalla superficie della cellula, essa porta via anche il frammento di membrana sulla sua punta con la membrana della cellula, contenente un canale ionico (altrimenti l'analisi sarebbe falsata dal comportamento plausibilmente asincrono dei molteplici canali).
2. Quando la pipetta e il frammento di membrana con canale sono posti in soluzione acquosa, l'attività del canale è misurata inserendo un elettrodo nella pipetta e uno all'interno della piastra in cui viene inserita la pipetta stessa.
3. Viene quindi generato un circuito a cui corrisponde un certo valore di potenziale transmembrana, e che misura la corrente necessaria per mantenere questo voltaggio. Con i rilevatori di corrente più sensibili si possono misurare i flussi di ioni attraverso un singolo canale, che determinano correnti dell'ordine del picoampere.

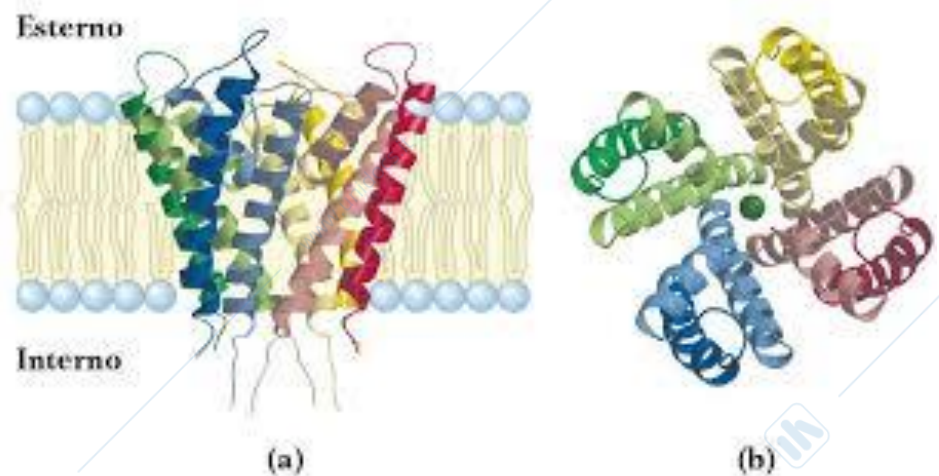
→ La traccia sul rilevatore mostra la variazione della corrente in funzione del tempo attraverso un singolo canale, e consente di stabilire **(1)** la sua frequenza di apertura e **(2)** per quanto tempo resta aperto. Impostando  $V_m$  diversi si può determinare l'effetto del potenziale di membrana su questi parametri di funzionalità del canale.

#### CANALE PER IL $K^+$ VOLTAGGIO-DIPENDENTE

La struttura del canale del potassio di un batterio *Streptomyces* ha una sequenza correlata a quella degli altri canali per il  $K^+$  noti, e quindi può servire come prototipo per lo studio di queste strutture, compreso il canale per il potassio dei neuroni controllato da voltaggio.

**Struttura.** Il canale per il  $K^+$  batterico è costituito da quattro subunità identiche che attraversano la membrana, ciascuna subunità è formata da due  $\alpha$ -eliche transmembrana, una rivolta verso la superficie idrofobica delle catene aciliche dei lipidi, l'altra più internamente a questa stessa catena.

Il posizionamento delle eliche di ogni subunità determina una struttura ad imbuto che ha una faccia esterna costituita da 4  $\alpha$ -eliche, dove ciascuna è una delle due eliche appartenente a un monomero dei quattro, e una faccia interna anch'essa fatta da 4 eliche interne, ognuna appartenente alla relativa subunità. Ogni subunità ha poi un'ulteriore  $\alpha$ -elica più corta che si dispone verso il centro del canale a definire la regione del filtro, la cui selettività ora però, trattando di canali ionici, non è detta sia sempre elevata, a differenza dei trasportatori passivi precedentemente visti. Nel caso del canale a attivazione dipendente per il  $K^+$  batterico e anche umano la specificità è elevata, ma ciò non vale per altri tipi di canali.



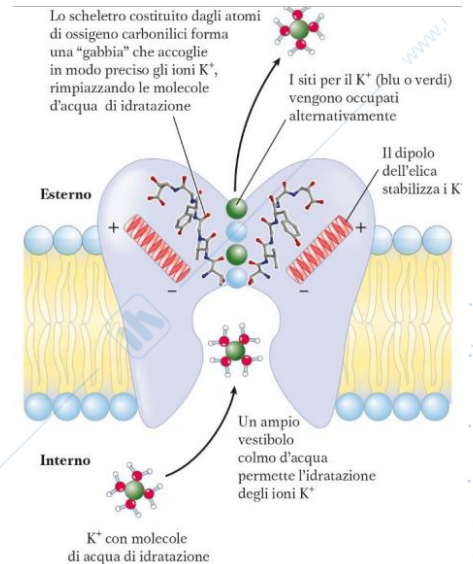
#### Specificità ionica e velocità.

Dalla struttura del canale si

possono comprendere la sua specificità ionica e l'alta velocità del passaggio di ioni al suo interno.

1. Il trasferimento del  $K$  avviene dal citosol allo spazio extracellulare. Sia la porzione verso lo spazio esterno che quella rivolta verso lo spazio interno sono arricchite in residui acidi, carichi negativamente; queste probabilmente servono ad aumentare la concentrazione locale di cationi come  $K^+$ .
2. La via che gli ioni percorrono attraverso la membrana inizia come una zona vestibolare ricca di acqua sulla superficie citosolica, per cui l'ingresso dello ione può avvenire sotto forma di ione idratato. Le corte catene ad  $\alpha$  elica presenti nella regione del poro/canale stabilizzano ulteriormente la struttura, in quanto il loro residuo carbossiterminale e la carica negativa associata a questo gruppo sono rivolti nella direzione dello ione  $K^+$  nel vestibolo.
3. Ai 2/3 del canale, lo ione raggiunge il filtro di selettività, dove il poro/canale si restringe, forzando lo ione a lasciare le sue molecole di acqua d'idratazione. Nella regione del filtro di selettività, la disidratazione di  $K^+$  è promossa:
  - dalla presenza del polo negativo delle corte catene ad  $\alpha$  elica di ogni subunità,
  - dalla presenza del gruppo carbossilico all'estremità carbossiterminale e la carica negativa associata a questo gruppo.
  - dalla capacità dello scheletro carbonioso delle eliche più corte di formare legami di coordinazione con lo ione  $K^+$  attraverso gli ossigeni dei gruppi carbonilici. Queste gabbie attorno allo ione  $K^+$  ne facilitano la disidratazione.

4. Questa interazione favorevole con il filtro non è possibile per lo ione  $\text{Na}^+$ , che ha dimensioni troppo piccole ( $0,95 \text{ \AA}$ ) per creare i contatti con gli atomi di ossigeno carbonilici. La stabilizzazione preferenziale per  $\text{K}^+$  (che ha un raggio di  $1,33 \text{ \AA}$ ) è alla base della selettività del filtro e della velocità di passaggio, che è circa  $10^8$  ioni al secondo, vicino al limite massimo teorico di diffusione libera. Il diametro dello ione è quindi un elemento limitante, non deve essere superiore a  $1,3 \text{ \AA}$  ma non deve neanche essere troppo piccolo: ciò comporterebbe una incapacità di interazione con i gruppi carbonilici, fondamentali per la disidratazione dello ione e per la sua entrata. Possiamo quindi dire che questo canale è altamente specifico, lo ione  $\text{Na}^+$ , ad esempio, può entrare ma la sua entrata è 10.000 volte più lenta, perché non interagisce al meglio con i gruppi carbonilici delle eliche corte.



5. Ci sono quattro potenziali siti di legame per il  $\text{K}^+$  lungo il filtro di selettività, ognuno composto da una gabbia di atomi di ossigeno che lega gli ioni  $\text{K}^+$ . Potenzialmente potremmo trovare 4 ioni  $\text{K}^+$ , ma ne troviamo solo 2. Essi non sono localizzati uno accanto all'altro, ma tra due siti ce n'è sempre uno libero: se fossero vicini si respingerebbero più di quanto i gruppi carbonilici siano in grado di trattenerli con i loro legami di coordinazione. Il movimento dei due ioni  $\text{K}^+$  è concertato: prima occupano le posizioni 1 e 3, poi saltano nelle posizioni 2 e 4.
6. La differenza energetica tra queste due conformazioni è molto piccola; da un punto di vista energetico, la selettività del poro non ha un andamento a picchi e valli, ma i suoi livelli sono pressoché costanti e ideali per il rapido movimento ionico attraverso il canale.

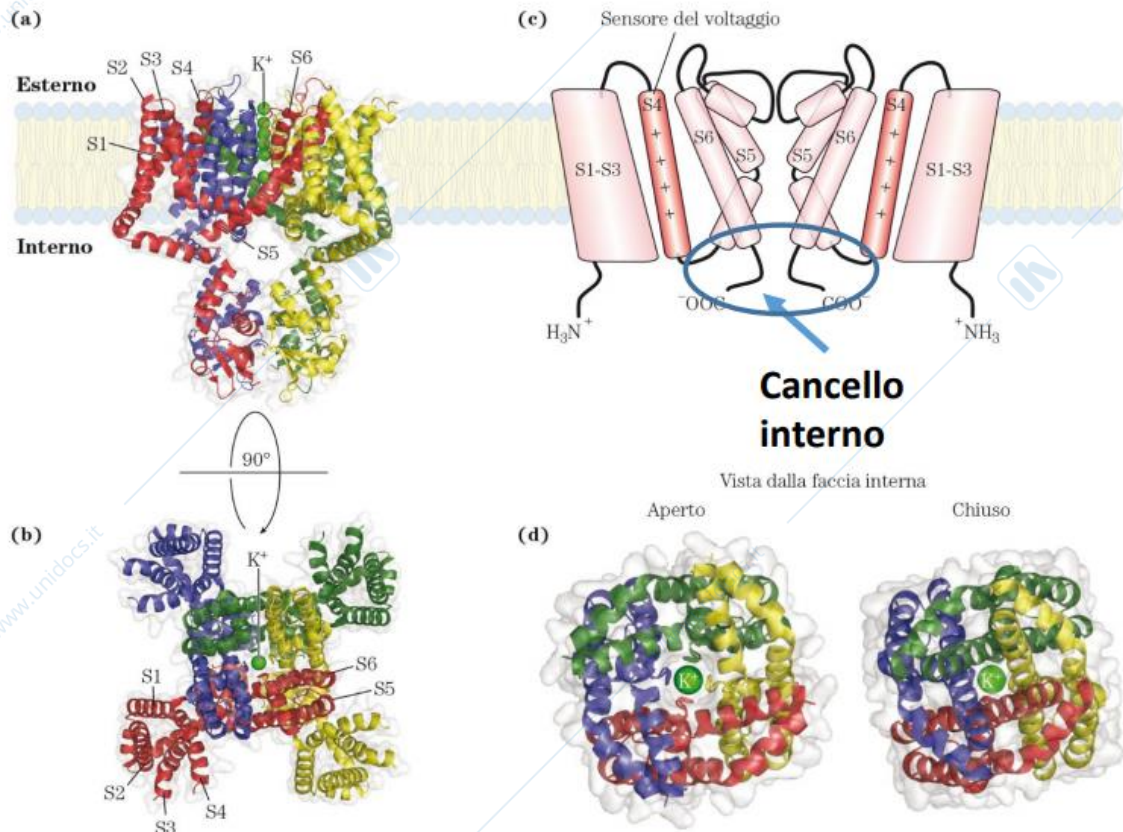
**CANALI  $\text{K}^+$  VOLTAGGIO-DIPENDENTI.** I canali  $\text{K}^+$  voltaggio-dipendenti (come quelli umani) hanno una struttura più complessa di quella batterica, ma sono pur sempre una variazione sul tema.

**Struttura.** I canali presenti a livello dei neuroni del ratto, ad esempio, presentano quattro subunità ma con un numero molto maggiore di domini proteici. Il canale presenta complessivamente 6 domini (S1-S6) che contribuiscono a definire la struttura complessiva:

1. S5 e S6 di ognuna delle quattro subunità formano il canale, e sono comparabili alle due eliche transmembrana di ciascuna subunità.
2. S1, S2 e S3 (e anche S4, se pur con una funzione diversa) sono eliche transmembrana. S1, S2, S3 stabilizzano la struttura del canale.
3. S4 è un segmento transmembrana contenente residui di Arg (**carichi positivamente**) altamente conservati e funge da sensore di voltaggio. Si pensa che sia la regione che si sposta maggiormente durante il meccanismo di risposta al voltaggio: è in grado di indurre in risposta a una modificazione del potenziale, una transizione del canale da uno stato chiuso a uno stato aperto.

**Funzione.** Quando il potenziale transmembrana è a riposo, **più positivo all'esterno rispetto all'interno**, il dominio sensore S4 è spostato verso il lato citosolico.

Quando abbiamo un'inversione di potenziale, il potenziale è **più positivo all'interno rispetto all'esterno**: ciò causa una repulsione elettrostatica sul dominio stesso che, spostandosi verso la matrice extracellulare, provoca l'apertura del canale facendo fuoriuscire ioni  $\text{K}^+$  secondo gradiente elettrochimico.



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

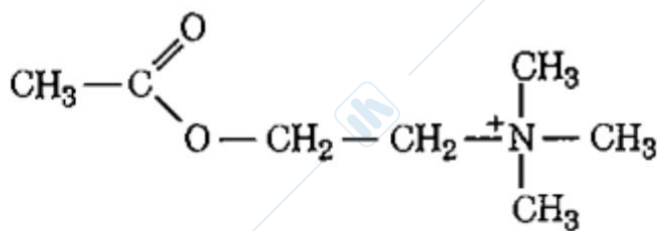
## CANALI IONICI E NEURONI

**Na<sup>+</sup>.** La **propagazione e trasmissione di impulsi nervosi**, che può avvenire con un altro neurone, una cellula muscolare o una ghiandola endocrina, si basa sulla **rapida apertura e chiusura di canali ionici** della membrana plasmatica. In questo processo di propagazione dell'impulso nervoso sono coinvolti ad esempio i canali ionici del Na<sup>+</sup> delle membrane plasmatiche dei neuroni, che similmente a quelli del K<sup>+</sup> sono voltaggio dipendenti ed hanno una elevata selettività.

**Dominio sensibile.** Questi canali presentano un dominio ricco di residui di arginina che funge da sensore del potenziale di membrana. Gli stessi canali sono chiusi nello stato di riposo, si aprono rapidamente in seguito ad una depolarizzazione della membrana plasmatica neuronale, restano nello stato aperto per pochi millisecondi e poi vanno incontro non a chiusura ma ad inattivazione per molti millisecondi. In stato di inattivazione, quindi non possono più traslocare ioni Na<sup>+</sup> né secondo gradiente elettrico, né secondo gradiente chimico. Questa transizione dei canali del Na<sup>+</sup> dallo stato attivo ad inattivo è alla base della trasmissione di segnali neuronali.

## RECCETTORE NICOTINICO PER L'ACETILCOLINA

La trasmissione del segnale elettrico da una cellula neuronale presinaptica ad una cellula postsinaptica è mediata da un recettore per uno specifico ligando posto sulla membrana postsinaptica: per esempio esistono sinapsi dove il mediatore chimico è l'acetilcolina.



Acetilcolina

L'acetilcolina rilasciata da un neurone motorio percorre uno spazio di pochi micrometri fino a raggiungere la membrana plasmatica di un miocita, dove si lega al suo recettore. Questo legame determina una modificazione conformazionale nel recettore, che causa l'apertura del canale ionico intrinseco al recettore stesso. Il movimento risultante di cariche positive verso l'interno della cellula depolarizza la membrana plasmatica innescando la contrazione.

**Specificità.** Il recettore dell'acetilcolina consente il passaggio di ioni Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> con la stessa facilità; invece altri cationi o anioni non sono in grado di attraversa il canale. Il movimento dello ione Na<sup>+</sup> attraverso il canale del recettore dell'acetilcolina non è saturabile (la sua velocità è proporzionale alla concentrazione extracellulare degli ioni Na<sup>+</sup>) ed è molto veloce 2x10<sup>7</sup> ioni/s in condizioni fisiologiche.

### Famiglia.

→ Questo recettore è il prototipo di molti altri canali ionici che producono o rispondono a segnali elettrici: ha un cancello che si apre in risposta alla stimolazione da parte di una molecola segnale (in questo caso acetilcolina) e un meccanismo a tempo intrinseco che chiude di nuovo il cancello in un tempo brevissimo.

Quindi il segnale dell'acetilcolina è transitorio; questa è una caratteristica essenziale per la conduzione del segnale elettrico.

Ligandi extracellulari - Basandosi sulle somiglianze tra le sequenze amminoacidiche di altri canali ionici controllati da ligandi e quella del recettore dell'acetilcolina, i recettori canale che rispondono ai segnali extracellulari dell'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA), della glicina e della serotonina sono classificati come membri della superfamiglia del recettore nicotinico dell'acetilcolina. Con molta probabilità tutti questi recettori hanno strutture tridimensionali e meccanismi d'azione simili tra loro. I recettori del GABA<sub>a</sub> e della glicina sono canali anionici specifici per il Cl<sup>-</sup> o per l'HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mentre il recettore della serotonina, come quello dell'acetilcolina, è un canale cationico.

Ligandi intracellulari - Un'altra classe di canali ionici controllati da ligandi risponde invece a ligandi intracellulari: la guanosina 3',5' monofosfato ciclico (cGMP) nell'occhio dei vertebrati, il cGMP e il cAMP nei neuroni dell'olfatto, e l'ATP e l'inositolo 1,4,5-trisfosfato in molti tipi di cellule. Questi canali sono composti da molte subunità, ognuna delle quali ha sei domini elicoidali transmembrana.

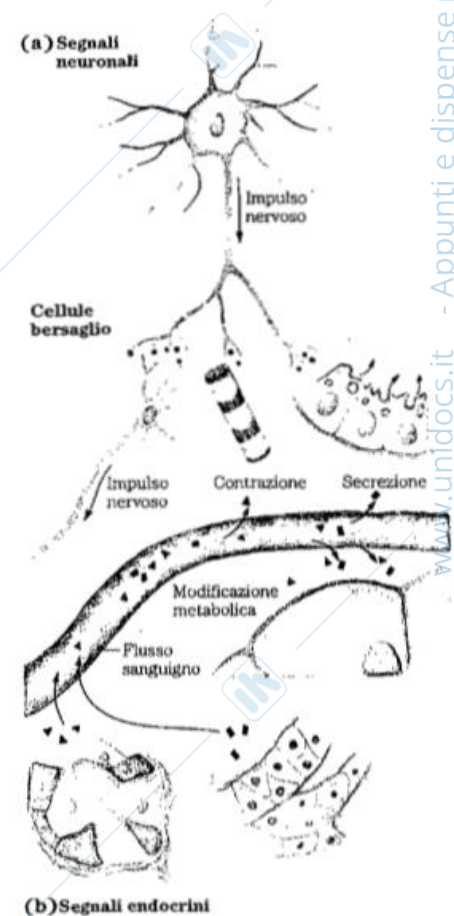
## ORMONI E REGOLAZIONE ORMONALE

Gli ormoni sono piccole molecole che vengono prodotte in un tessuto, sono rilasciate nel circolo sanguigno e trasportate ad altri tessuti dove agiscono attraverso specifici recettori, provocando modificazioni nelle attività cellulari. In questa discussione includeremo anche molecole di segnale a vita breve come NO; che agisce localmente o sulle cellule vicine.

Nei mammiferi e quindi anche nell'uomo gli ormoni, la classe più abbondante dei messaggeri chimici, coordinano e integrano le attività metaboliche (e quindi lo stato funzionale) dei diversi tessuti e consentono a livello ematico la distribuzione e l'utilizzo delle sostanze nutritive da parte dei tessuti per soddisfare le loro richieste energetiche. Qualunque processo complesso è il risultato della modulazione dello stato funzionale di diversi tessuti da parte di più ormoni contestualmente.

### CARATTERISTICHE DEGLI ORMONI

1. **Specificità.** Contraddistingue gli ormoni un'elevatissima specificità per determinati tessuti bersaglio, e precisamente per tessuti che possiedono molecole proteiche con la funzione di recettori (sia sulla membrana plasmatica sia intracellulari), in grado di riconoscere e legare gli ormoni in maniera molto selettiva. La specificità deriva dall'esatta complementarità strutturale tra le molecole di segnale e i recettori, a cui partecipa lo stesso tipo di interazioni deboli non covalenti che mediano le interazioni enzima-substrato.



**2. Affinità.** L'elevata selettività del recettore per l'ormone è espressa attraverso la costante di dissociazione ( $K_d$ ) del complesso ormone-recettore, che è estremamente bassa ed è un valore compreso tra  $10^{-9}$  e  $10^{-11}$ M. Questo significa che se consideriamo un valore intermedio il rapporto tra ormone libero e recettore libero rispetto al complesso ormone-recettore ha un valore pari a  $10^{-10}$ . Ciò significa che il recettore può identificare le molecole di segnalazione anche a concentrazioni picomolari. Questo fa sì che le concentrazioni fisiologiche degli ormoni che circolano nel nostro organismo a livello ematico siano estremamente piccole e per poter quantizzare la concentrazione anche dal punto di vista chimico bisogna utilizzare dei test diagnostici (radioimmunoassay (RIA), ELISA) basati sull'impiego di molecole anticorpali (che hanno quindi una specificità altissima per l'ormone) e attraverso la quantizzazione del complesso ormone-anticorpo è possibile risalire alla quantità dell'anticorpo stesso.

Il dosaggio radioimmunologico (RIA) ha rivoluzionato la ricerca sull'azione degli ormoni, rendendo possibile una misura quantitativa rapida di queste sostanze presenti in piccolissime quantità. Gli anticorpi specifici per gli ormoni rappresenta la base del dosaggio radioimmunologico e della sua più moderna alternativa, il dosaggio con enzimi legati a immunoassorbenti, ELISA. L'ormone purificato, iniettato in un coniglio o in un topo, induce la produzione di anticorpi che possono legare l'ormone con altissima specificità e affinità. Questi anticorpi possono essere purificati e marcati con radioisotopi (per il RIA) o coniugati a un enzima che genera nella reazione che catalizza un prodotto costituito da una sostanza colorata (per l'ELISA). Gli anticorpi marcati vengono poi fatti interagire con estratti contenenti l'ormone. La frazione di anticorpo che si è legata all'ormone presente nell'estratto viene quindi quantificata tramite il rilevamento della quantità di radiazione emessa o utilizzando metodi fotometrici per quantificare il colore sviluppato. Grazie all'elevata affinità all'anticorpo per l'ormone, questo tipo di dosaggio può essere reso sensibile a quantità di ormoni presenti nel campione nell'ordine di grandezza dei picogrammi.

Dato che l'interazione dell'ormone con il recettore è molto selettiva (ossia ligandi anche strutturalmente simili possono non riuscire a legarsi allo stesso recettore), quando le industrie farmaceutiche producono farmaci che devono fungere da agonisti (in grado di mimare l'azione di un ormone) o antagonisti (in grado di legarsi al recettore impedendo il legame dell'ormone) di specifici ormoni, si basano su test di affinità che hanno queste molecole per recettore.

## SISTEMA NEUROENDOCRINO

Nell'uomo, la coordinazione del metabolismo nei diversi organi è dovuta al **Sistema Neuroendocrino**. La risposta di adattamento del nostro organismo a una nuova situazione causata da modificazioni dell'ambiente sia interno (es. sbalzo della pressione sanguigna) che esterno (es. variazione della temperatura, variazione della concentrazione parziale dell'ossigeno, pericolo che causa uno stress emotivo) è data da questo complesso sistema.

- Tutte queste modificazioni vengono recepite a livello ipotalamico, da cui partono dei segnali (sistema neuroendocrino) che portano ad un adattamento dello stato funzionale dei tessuti e degli organi del nostro organismo. La risposta di adattamento si realizza rilasciando messaggeri chimici extracellulari che vengono trasferiti ad una cellula dello stesso o di un diverso tessuto dove si legano a recettori specifici e ne modificano lo stato funzionale.

**Messaggeri:** Esistono due tipi di grandi famiglie di messaggeri chimici extracellulari: i **neurotrasmettitori** e gli **ormoni**.

1. Neurotrasmettitori. La trasmissione di un segnale elettrico da parte di un neurone del sistema nervoso determina il rilascio di un *neurotrasmettitore*, messaggero chimico extracellulare che trasferisce l'informazione sempre a breve distanza (distanza tra il sito di rilascio del neurotrasmettitore e il sito di ricezione del messaggio extracellulare dell'ordine del  $\mu\text{m}$ ) nell'area presinaptica o ad un'altra cellula neuronale o ad un miocita o ad una cellula secretoria.
  2. Ormoni. I *segnali ormonali*, rilasciati dal sistema endocrino, a differenza dei neurotrasmettitori possono raggiungere tessuti bersaglio sia vicini che lontani (distanze dell'ordine dei cm o m) dal sito di produzione dell'ormone e quando ciò accade la modalità è l'immissione del messaggero chimico nel torrente ematico.
- ➔ Esistono anche le catecolammine, molecole che sono sia neurotrasmettitori (nel cervello e nei muscoli lisci) sia ormoni (nel tessuto adiposo, nel fegato, nel tessuto muscolare cardiaco e scheletrico) che modulano il meccanismo energetico, prodotte da cellule nervose o da ghiandole endocrine (midollare del surrene): rientrano in questo gruppo l'adrenalina (o epinefrina) e la noradrenalina (o norepinefrina).

Sia i neurotrasmettitori sia gli ormoni interagiscono attraverso specifici recettori presenti sulla superficie o all'interno delle cellule bersaglio, inducendo una risposta metabolica.

Selettività degli ormoni. Gli ormoni agiscono con elevata specificità e affinità. Gli ormoni agiscono anche in maniera selettiva: modulano lo stato funzionale soltanto di quei tessuti che possiedono recettori in grado di riconoscere e legare l'ormone, formando il complesso ormone-recettore. Esistono però diversi tipi di tessuti il cui stato funzionale è modulato diversamente a seconda delle caratteristiche specifiche del tessuto stesso, in primo luogo *dipendentemente dal corredo proteico ed enzimatico* che ha un determinato tipo di cellula (non dipende esclusivamente dalla presenza del recettore: naturalmente affinché un tessuto sia modulato da un ormone è necessario che possieda i recettori specifici per quell'ormone, ma la risposta funzionale all'ormone dipende in primo luogo dal corredo proteico ed enzimatico che il tessuto possiede).

Consideriamo l'azione del glucagone a livello epatico e a livello del tessuto adiposo.

In una condizione di ipoglicemia il fegato deve rendere disponibile nutrienti per gli altri tessuti dell'organismo attraverso l'attivazione della glicogenolisi e della gluconeogenesi, che incrementano la concentrazione di glucosio negli epatociti il quale viene rilasciato e viene usato da cellule del cervello e eritrociti il cui metabolismo energetico è fortemente dipendente dalla disponibilità di glucosio in quanto non possono utilizzare gli acidi grassi. Però per risparmiare glucosio, il glucagone agisce sul tessuto adiposo promuovendo la lipolisi: il glucagone ha la capacità attraverso la lipasi ormone-sensibile di accedere e di idrolizzare i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo che vengono immessi nel torrente circolatorio. Gli acidi grassi vengono utilizzati per soddisfare le richieste energetiche del cuore e del tessuto muscolare scheletrico, che in questo modo non consumano glucosio che resta disponibile per i tessuti che non sono in grado di utilizzare questi stessi come combustibili.

Questo è l'esempio di come l'azione di un ormone, riconosciuto da diversi tessuti, porti ad una modulazione metabolica completamente diversa. La specificità è quindi legata alla presenza del recettore, la risposta funzionale invece dipende fortemente dal corredo proteico ed enzimatico della cellula.

## RECETTORI DI MEMBRANA E RECETTORI INTERNI

Possiamo distinguere gli ormoni in due grosse classi:

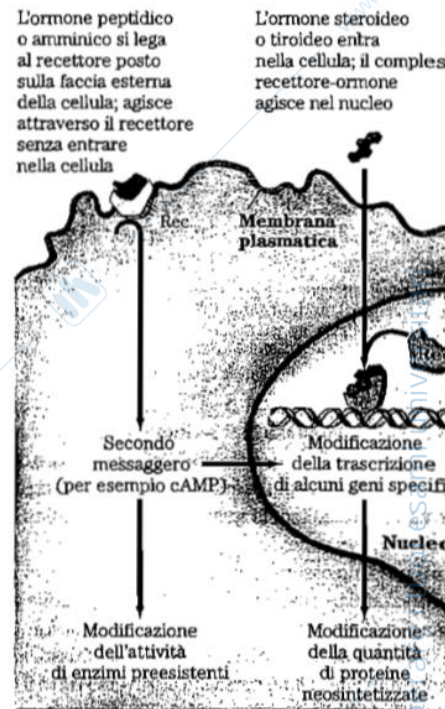
- 1 Ormoni che hanno i recettori localizzati sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio: (**ormoni idrosolubili**: amminici e peptidici).
  - 2 Ormoni che hanno recettori localizzati all'interno delle cellule sia a livello citosolico che nucleare (**ormoni non idrosolubili**: steroidei, tiroidei, retinoidei).
- La differenza sta nel meccanismo con cui viene trasferito il segnale ormonale all'interno delle cellule.

Gli ormoni amminici e peptidici solubili in acqua agiscono dall'esterno delle loro cellule bersaglio legandosi ai loro recettori che attraversano la membrana plasmatica. Dopo il legame dell'ormone al suo dominio extracellulare, il recettore va incontro a una modificazione conformazionale analoga a quella prodotta in un enzima allosterico dal legame di una molecola effettrice. I recettori localizzati sulla membrana, attivati a seguito del cambio conformazionale, sono in grado di trasdurre il segnale generando all'interno delle cellule un secondo messaggero (es. AMPc), in grado di portare alla risposta cellulare che è basata sulla modificazione dell'attività di un enzima o di una proteina. È un meccanismo di amplificazione del segnale: la risposta è amplificata rispetto al segnale iniziale. Una singola molecola di ormone, formando il complesso ormone-recettore, attiva un catalizzatore che produce molte molecole di un secondo messaggero; quindi il recettore serve sia come trasduttore di segnali sia come amplificatore di segnali. Frequentemente viene mutata l'attività di un enzima chiave attraverso il meccanismo di modificazione covalente, ma può essere anche una molecola proteica che modula l'espressione di specifici geni (azione a lungo termine). Questo meccanismo di trasduzione del segnale porta ad una risposta biochimica/fisiologica in tempi brevi (secondi).

- Con i recettori **metabotropici** il cambiamento conformazionale attiva o inibisce un enzima a valle del recettore, con i recettori **ionotropici**, si apre o si chiude un canale ionico di membrana, causando una variazione del potenziale di membrana ( $\Delta V_m$ ) o nella concentrazione di uno ione, come  $Ca^{2+}$ .

Gli ormoni non idrosolubili (steroidi, tiroidei, retinoidei) attraversano la membrana plasmatica delle loro cellule bersaglio e si legano a recettori intracellulari (citosol/nucleo). Il complesso ormone-recettore modula l'espressione di geni specifici e quindi determinano una modulazione dello stato funzionale attraverso una modulazione dell'espressione genica dello specifico enzima. Occorrono ore/giorni per la risposta biochimica/fisiologica.

Di conseguenza gli ormoni peptidici e gli ormoni amminici sono ad azione più rapida rispetto agli ormoni steroidei e tiroidei. In generale, gli ormoni a risposta rapida determinano la variazione dell'attività di uno o più enzimi preesistenti nella cellula mediante meccanismi allosterici o mediante la loro modificazione covalente. Gli ormoni a risposta lenta alterano invece l'espressione genica, incrementando o diminuendo la sintesi delle proteine regolate.



## CLASSIFICAZIONE ORMONI

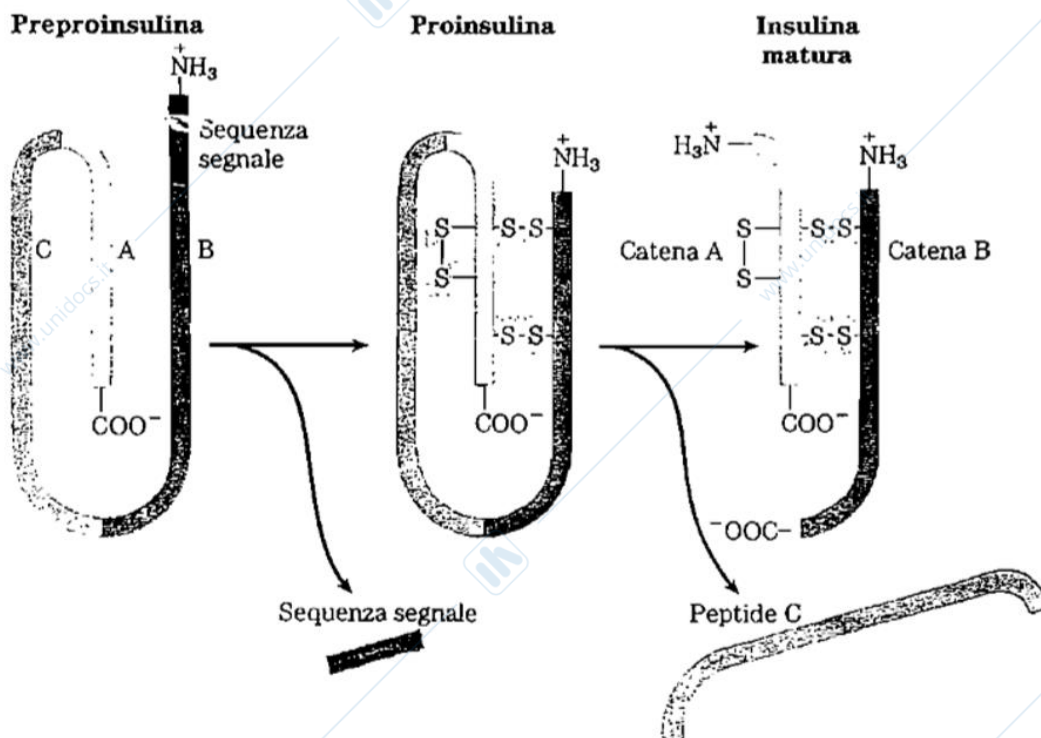
Gli ormoni possono essere classificati:

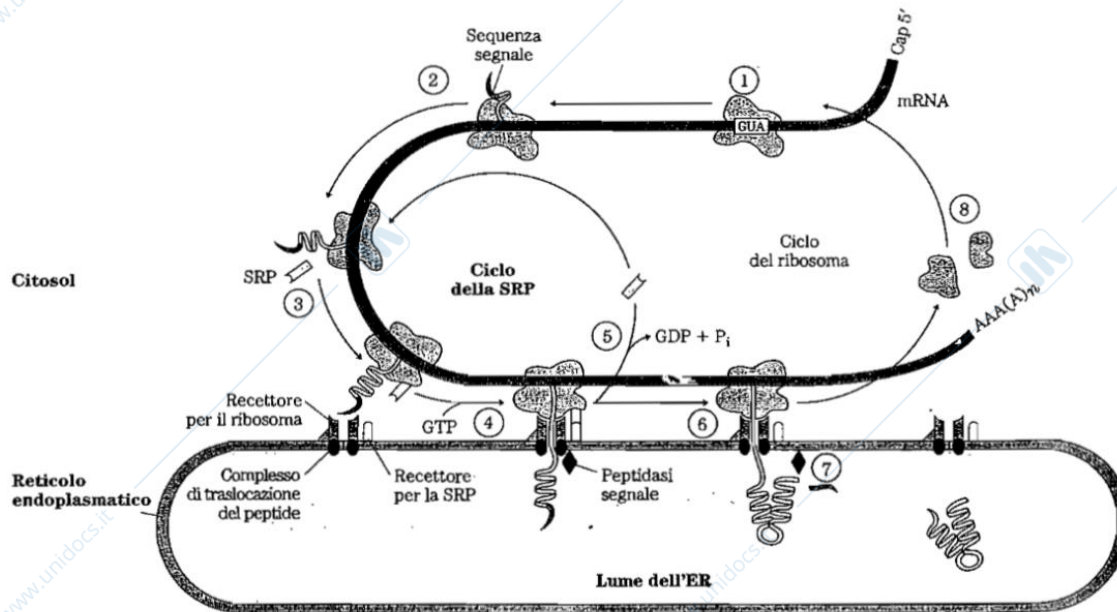
1. Sulla base della loro natura chimica (peptidica, eicosanoide, steroideo, retinoide...)
2. Sulla base del tipo di recettore che possiede e sul meccanismo di azione dell'enzima (da un lato peptidici, catecolaminici e eicosanoidi, dall'altro steroidei, tiroidei, retinoidi e vitamina D)
3. Sulla base della modalità con cui l'ormone raggiunge il tessuto bersaglio ed anche della sua distanza rispetto al sito di rilascio dell'ormone:
  - **Endocrini** (insulina, glucagone, ormoni steroidei): secreti nel flusso ematico (in forma libera se idrosolubili altrimenti complessati con proteine idrosolubili) e trasportati al tessuto bersaglio molto distante dal sito di produzione.
  - **Paracrini** (eicosanoidi): secreti nello spazio extracellulare diffondono alle cellule bersaglio (agiscono a breve distanza dal sito di rilascio dell'ormone ma su tipi cellulari diversi)
  - **Autocrini**: secreti nello spazio extracellulare si legano ai recettori dello stesso tipo cellulare che li ha prodotti modulandone lo stato funzionale.

### ORMONI PEPTIDICI

Gli ormoni peptidici possono avere da 3 a più di 200 residui amminoacidici. Comprendono gli ormoni pancreatici insulina, glucagone e somatostatina, l'ormone paratiroideo, la calcitonina e tutti gli ormoni dell'ipotalamo e dell'ipofisi.

-> Questi ormoni sono sintetizzati sui ribosomi sotto forma di precursori proteici più grandi (proormoni), che vengono concentrati in vescicole di secrezione e trasformati nella forma attiva mediante scissione proteolitica.



SINTESI DELL'INSULINA

L'insulina è una piccola proteina con due catene polipeptidiche, detta A e B, unite da due ponti disolfuro. Essa viene sintetizzata dalle cellule  $\beta$  del pancreas sotto forma di preproinsulina, provvista di una sequenza segnale amminoterminale che dirige il suo ingresso nelle vescicole di secrezione. La maggior parte delle proteine lisosomiali, di membrana o destinate alla secrezione possiede una sequenza segnale amminoterminale. Le proteine che possiedono la sequenza segnale vengono indirizzate al RE e sono sintetizzate sui ribosomi adesi al RE.

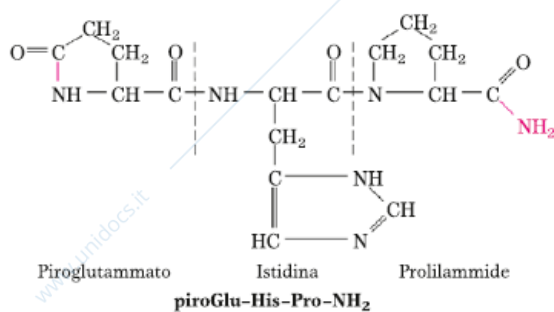
1. La sintesi inizia a partire dall'estremità amminoterminale: si forma un frammento di circa 70 residui amminoacidici, contenente la pre-sequenza amminoterminale di circa 20 amminoacidi. Appena è sintetizzata dal ribosoma, la sequenza è riconosciuta da un complesso proteico detto **particella di riconoscimento del segnale** (o **SRP**).
2. Il segnale viene riconosciuto e si lega alla SRP. Il legame del complesso proteico al ribosoma porta al blocco del processo di traduzione (quindi il legame della SRP blocca la sintesi) e la SRP-ribosoma lega anche GTP.
3. La SRP legata al GTP dirige il ribosoma (ancora legato all'mRNA) e il polipeptide incompleto verso un gruppo di recettori specifici per la SRP legata alla GTP sulla superficie citosolica dell'ER: i recettori mediano il legame del complesso formato da ribosoma e segmento amminoterminale della preproinsulina.
4. Successivamente il polipeptide nascente passa al complesso di traslocazione del peptide (traslocone) nell'ER, che può interagire direttamente con il ribosoma.
5. L'idrolisi di GTP, mediata da SRP e dal recettore di SRP, provoca la dissociazione della SRP stessa.
6. L'allungamento del polipeptide a questo punto riprende fino a che non viene sintetizzata la proteina completa. Il complesso di traslocazione introduce il polipeptide nascente all'interno del lume del RE con una reazione che utilizza l'energia dell'ATP.

7. La sequenza di segnale viene rimossa da una peptidasi specifica all'interno del lume dell'ER: la Pre-proinsulina va incontro al ripiegamento (conformazione dei ponti disolfuro) che porta alla formazione del Pro-ormone il quale viene rilasciato dal RE all'interno di vescicole.

8. La rimozione proteolitica della sequenza di segnale e la formazione di tre ponti disolfuro producono la proinsulina, che viene conservata in vescicole secretorie con densità di proormone tanto alta da portare alla formazione di granuli di secrezione delle cellule  $\beta$  del pancreas.

A seguito di stimoli specifici, i proormoni vengono convertiti mediante tagli proteolitici nella forma matura ed attiva (ormone) e rilasciati all'esterno a seguito di uno specifico stimolo. A seguito di un incremento del livello di glucosio ematico, la proinsulina viene convertita nell'ormone attivo da proteasi specifiche, che rompono un frammento peptidico C all'interno della stessa proinsulina. La rimozione del peptide C dalla pro insulina porta alla formazione di due catene, catena B e catena A, che sono unite covalentemente attraverso la formazione di due ponti disolfuro. Questi frammenti hanno effetti fisiologici: l'insulina stimola l'assunzione di glucosio e la sintesi di grassi e il peptide C agisce attraverso i recettori accoppiati a proteine G in vari tessuti per mitigare gli effetti della ridotta sintesi di insulina, come le neuropatie diabetiche.

9. Segue il rilascio dell'insulina stessa attraverso un processo di esocitosi. Una volta che l'insulina o in generale gli ormoni peptidici entrano nel flusso sanguigno grazie alla presenza nella ghiandola di capillari con pareti altamente permeabili (finestrati), questi sono trasportati al tessuto bersaglio. Si legano al recettore della membrana plasmatica e trasducono il segnale attraverso la produzione di un secondo messaggero che modifica indirettamente l'attività dello stato funzionale o i livelli di specifici enzimi intracellulari e quindi lo stato metabolico della cellula bersaglio.



**Figura 23.2** Struttura dell'ormone che rilascia la tirotropina (THR). Dopo la sua purificazione molto difficoltosa da estratti di ipotalamo, si è stabilito che il THR è un derivato del tripeptide Glu-His-Pro. Il gruppo carbossilico della catena laterale del residuo di Glu aminoterminale forma un'ammido (legame in rosso) con il gruppo amminico  $\alpha$  dello stesso residuo, producendo piroglutammato; il gruppo carbossilico del residuo di Pro carbossiterminale è convertito anch'esso in un'ammido ( $-\text{NH}_2$  in rosso). Queste modificazioni sono comuni tra gli ormoni peptidici di piccole dimensioni. In una tipica proteina con  $M_r$  di circa 50 000, la carica dei residui ammino- e carbossiterminali contribuisce molto poco alla carica complessiva della proteina, ma in un tripeptide queste cariche possono determinare le proprietà del peptide. La formazione di un'ammido annulla queste cariche.

Frequentemente, anche se non è nota la ragione funzionale, gli ormoni peptidici, in forma matura, hanno le estremità ammino e carbossi-terminali spesso modificate: un esempio è la tireotropina, ormone prodotto dall'ipofisi, di natura peptidica, che all'estremità ammino-terminale, invece del glutammato, presenta un piroglutammato, per la ciclizzazione della sua catena laterale dovuta alla formazione di un legame carbamidico tra C carbossilico terminale e gruppo ammidico legato al carbonio  $\alpha$ ; all'estremità carbossi-terminale, invece, si ha una prolina modificata per amminazione (definita prolinammide).

Le caratteristiche fondamentali viste in precedenza sono legate al tipo di recettore, alla conservazione e mantenimento degli ormoni, al tipo di tessuto, alla modalità con cui vengono rilasciati, al tipo di ormoni sono e alla modalità di funzionamento che hanno, se esiste un sito di produzione a notevole distanza e se agiscono sempre secondo messaggero.

## LE CATECOLAMMINE

**Ormoni e neurotrasmettitori.** Le catecolammine comprendono solo **adrenalina** e **noradrenalina** (o epinefrina e norepinefrina) e sono di derivazione aminoacidica. Sono sintetizzati a livello della midollare del surrene, a partire da un residuo di tirosina. Adrenalina e noradrenalina sono anche neurotrasmettitori secreti dai neuroni, sia a livello di sinapsi inter-neuroniche, sia a livello di sinapsi con muscolatura. Tuttavia, l'adrenalina e la noradrenalina sintetizzate e secrete dalla ghiandola surrenale si comportano come ormoni. Tra i neurotrasmettitori catecolamminici vi è anche la **dopamina**, la quale è solo un neurotrasmettitore.

**Sintesi.** Questi ormoni vengono prodotti a partire dalla tirosina:

- prima viene prodotta la L-Dopa per idrossilazione dell'anello aromatico della tirosina
- poi la dopamina, per decarbossilazione dell'amminoacido
- un'ulteriore idrossilazione del carbonio in posizione  $\beta$  permette la conversione della dopamina a noradrenalina
- infine, la noradrenalina viene convertita in adrenalina per metilazione del gruppo amminico in  $\alpha$  della tirosina.



### Secrezione e trasmissione.

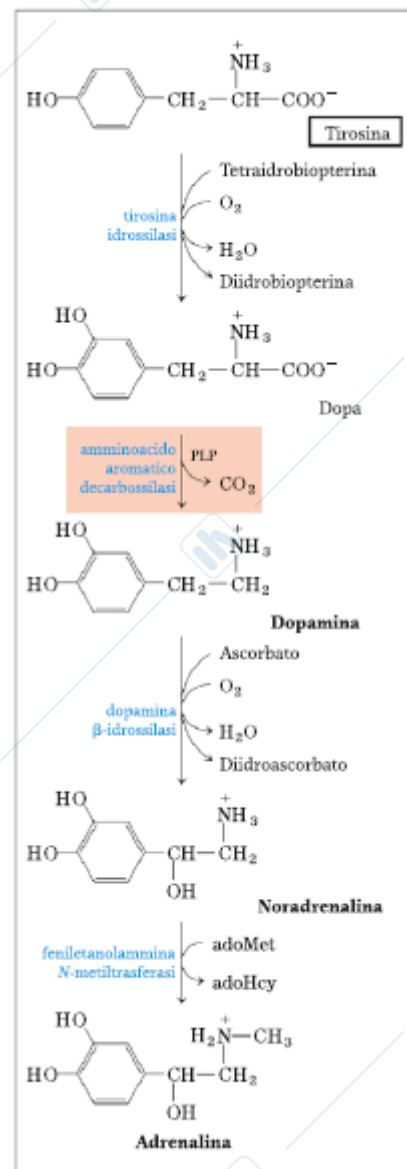
Adrenalina e Noradrenalina, come gli ormoni peptidici, vengono conservati in vescicole secretorie. Il rilascio delle catecolammine a livello della midollare si ha esclusivamente in seguito a uno stimolo, in questo caso si tratta di uno stimolo elettrico.

1. Il rilascio delle catecolammine si attiva in seguito alla trasmissione di un impulso nervoso che raggiunge il tessuto midollare e causa, a livello somatico, il rilascio di acetilcolina, la quale è il neurotrasmettitore delle sinapsi attraverso cui si realizza il passaggio dell'impulso nervoso.

2. L'arrivo dell'impulso nervoso determina l'apertura dei canali, l'entrata di ioni calcio, potassio e sodio nella cellula. La membrana va incontro a depolarizzazione e, in seguito ad altri fenomeni citosolici, aumenta la concentrazione degli ioni calcio nella cellula che favoriscono l'esocitosi delle vescicole contenenti catecolammine a livello ematico.

3. Le catecolammine sono ormoni endocrini e agiscono legandosi a recettori di membrana, con conseguente formazione di un messaggero secondario (vero responsabile della risposta funzionale del tessuto).

**Causa del rilascio.** L'azione di questi ormoni è mediata da uno stimolo stressogeno, dovuto ad attività fisica, stato emotivo o psichico (ansia, pericolo): tipico esempio è la presenza di un pericolo immediato (il fight or flee / combatti o fuggi), che porta a rilascio di tali ormoni, permettendo quindi all'organismo di reagire a tale



situazione in maniera immediata, causando un adattamento metabolico dei tessuti e permettendo la scelta tra la possibilità di affrontare il pericolo o scappare.

**Conseguenze fisiologiche.** Quando un animale viene a trovarsi in una situazione di stress che richiede una reazione immediata (fight or flee), i segnali neuronali generati dal cervello innescano il rilascio di adrenalina e di noradrenalina dalla midollare del surrene. Entrambi gli ormoni agiscono con:

1. Un incremento delle vie aeree, per facilitare l'assunzione di O<sub>2</sub>.
2. Aumento della pressione sanguigna.
3. Aumento della capacità della forza di contrazione del muscolo scheletrico
4. Aumento della frequenza cardiaca.
  - Si massimizza il rapporto di ossigeno attraverso la dilatazione delle vie aeree e la vasocostrizione dei tessuti non funzionalmente importanti per la risposta che deve dare l'organismo a una condizione stressante (come uno stress emotivo: si diventa pallidi perché a livello della cute l'adrenalina determina vasocostrizione). Tessuti funzionalmente importanti, come il cuore e i tessuti scheletrici vengono invece maggiormente irrorati, in quanto devono essere più attivi. La funzione fisiologica è dunque quella di aumentare l'apporto di flusso sanguigno e nutrimenti a tessuti che ne hanno forte bisogno.

**Bersagli metabolici.** Questi ormoni hanno 3 tessuti bersaglio: fegato, tessuto adiposo e muscolo (in particolare il muscolo scheletrico e cardiaco). Il meccanismo funzionale di adrenalina e noradrenalina, attraverso cui mettono l'organismo in condizioni di reagire, consiste primariamente nel mobilitare le riserve energetiche a livello di tessuto epatico e adiposo.

1. Fegato. L'adrenalina induce glicogenolisi e gluconeogenesi nel tessuto epatico, immettendo in circolo glucosio.
2. Tessuto adiposo. Nel tessuto adiposo, induce lipolisi e quindi degradazione dei triacilgliceroli mediante fosforilazione cAMP-dipendente della triacilglicerolo lipasi. Tale massiccio rilascio di combustibile energetico permette la reazione dell'organismo.
3. Muscolo scheletrico. Nel muscolo, inoltre, inducono la demolizione aerobica del glucogeno in lattato mediante fermentazione, stimolando la formazione glicolitica di ATP. Questo massimizza l'energia disponibile per il tessuto, per permettere la contrazione muscolare.
4. Infine, l'adrenalina stimola la secrezione di glucagone e inibisce la secrezione di insulina, rinforzando il suo effetto sulla mobilitazione dei combustibili metabolici e inibendone la conservazione.

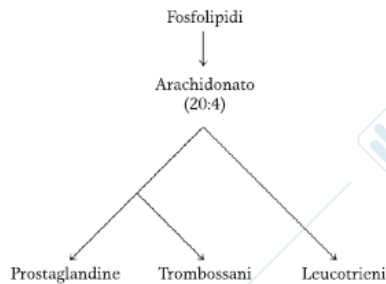
→ Il risultato che si ottiene è l'elevata disponibilità di nutrienti al cervello e ai tessuti che devono mediare la risposta (in quanto il fisico deve essere nella condizione migliore per superare lo stress).

## GLI EICOSANOIDI

**Funzionalità.** Fino a questo punto abbiamo trattato classi ormonali di natura endocrina che agiscono attraverso recettori di membrana che modulano lo stato funzionale con la formazione di un secondo messaggero, di natura endocrina.

Gli eicosanoidi agiscono su tessuti bersaglio grazie alla presenza di un recettore di membrana, ma sono caratterizzati dal fatto di non essere ormoni endocrini ma paracrini: agiscono su tessuti bersaglio nelle prossime vicinanze della cellule che li hanno rilasciati.

**Classificazione.** Principalmente possiamo dividere gli eicosanoidi in 3 classi di messaggeri extracellulari: prostaglandine, trombossani e leucotrieni.



## PROSTAGLANDINE E TROMBOSSANI

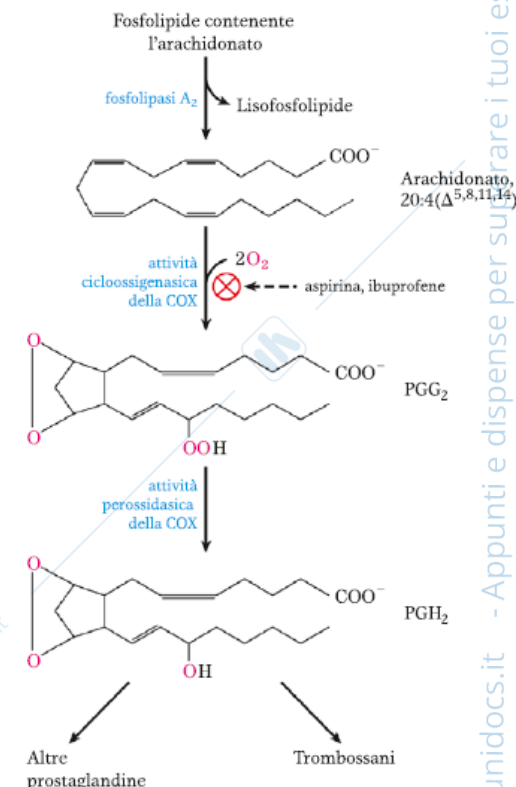
**Sintesi.** I trombossani hanno la parte iniziale del processo della loro biosintesi in comune con le prostaglandine. La maggior parte delle **prostaglandine** e dei **trombossani** vengono prodotti a partire dall'acido arachidonico. Vi sono anche altri acidi grassi poli-insaturi precursori di molecole facenti parte della famiglia degli eicosanoidi. A partire dall'acido arachidonico abbiamo prostaglandine e trombossani appartenenti alla classe 2, cioè presentano 2 doppi legami nella catena laterale dell'acido.

1. L'acido arachidonico viene rilasciato dalla scissione del legame estereo col carbonio in posizione 2 dei glicerofosfolipidi (i glicerofosfolipidi hanno sul C2 del glicerolo un acido grasso poli-insaturo a 18-20 atomi di carbonio e frequentemente nella posizione C2 troviamo l'acido arachidonico), reazione catalizzata dalla fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

2. La cicloossigenasi esistono due isoforme: COX-1 e COX-2, diversamente espresse in base ai tessuti. La COX-1 è responsabile della sintesi delle prostaglandine che regolano la secrezione della mucina gastrica, mentre la COX-2 è responsabile della sintesi delle prostaglandine che mediano l'infiammazione, il dolore e la febbre.

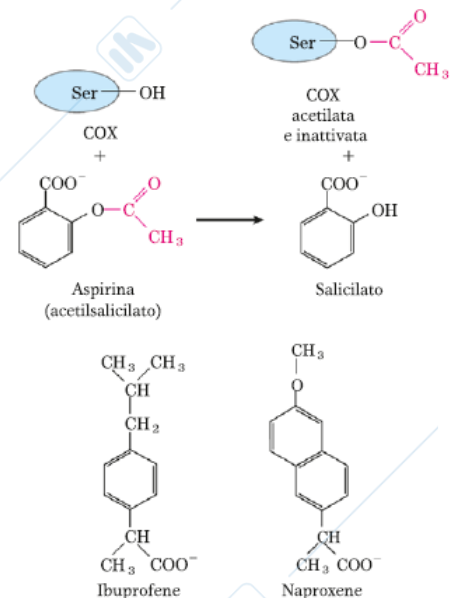
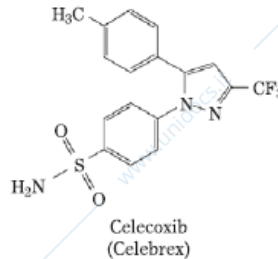
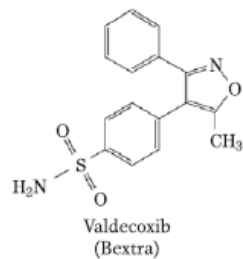
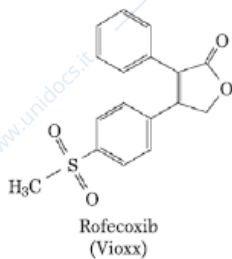
3. La cicloossigenasi catalizza due trasformazioni metaboliche: nella prima l'attività cicloossigenasica introduce due molecole di ossigeno nell'arachidonato e lo converte in PGG<sub>2</sub>, nella seconda tappa, l'attività perossidasi della COX converte la PGG<sub>2</sub> in PGH<sub>2</sub>.

→ Le reazioni portano alla formazione della prostaglandina PGH<sub>2</sub>, il capostipite di sia delle prostaglandine sia dei trombossani.



**Produzione.** Molti tessuti sono in grado di produrre eicosanoidi:

1. Le piastrine: producono trombossani che favoriscono la coagulazione e contemporaneamente sono vasocostrittori.
2. Le cellule della parete gastrica: stimolano la produzione di glicoproteina mucina che va a proteggere la parete dello stomaco.
3. Cellule del sistema immunitario: producono leucotrieni.



## AZIONI

**(1) Processo infiammatorio.** Cellule in grado di secernere eicosanoidi

sono distribuite in tutto l'organismo. Le azioni di questi ormoni sono diversificate e varie: particolarmente importante è l'azione svolta dal processo infiammatorio. Queste molecole sono principalmente mediatori della manifestazione dell'infiammazione e del dolore, rilasciate in un tessuto danneggiato o che è stato infettato, promuovendo il processo infiammatorio.

**(2) Prostacicline.** Un'altra azione fondamentale è data dalle **prostacicline** (sono una famiglia delle prostaglandine), e in particolare PGI<sub>2</sub>. Prodotta anch'essa dall'acido arachidonico, ha un ruolo fondamentale nel promuovere la vasodilatazione. Nel processo infiammatorio, a causa della vasodilatazione, il tessuto infiammato è arrossato, dolente e caratterizzato dal rigonfiamento, dovuto a una fuoriuscita di acqua dal vaso verso il tessuto. In questo le prostacicline hanno un'azione antagonista a quella dei trombossani, comportandosi come vasodilatatori, e impediscono la formazione del coagulo, inibendo l'aggregazione di piastrine.

**(3) Mucina.** Altre funzioni svolte dalle prostaglandine (quelle prodotte dove è presente l'isoforma COX-1) agiscono a livello della parete gastrica e stimolano la produzione della glicoproteina mucina che va a proteggere la parete dello stomaco.

**(4) Parto.** Altre prostaglandine hanno ruoli importanti in processi come ad esempio il parto, poiché stimolano la contrazione della muscolatura liscia uterina. Le funzioni svolte dalle prostaglandine sono veramente molteplici.

## INIBITORI.

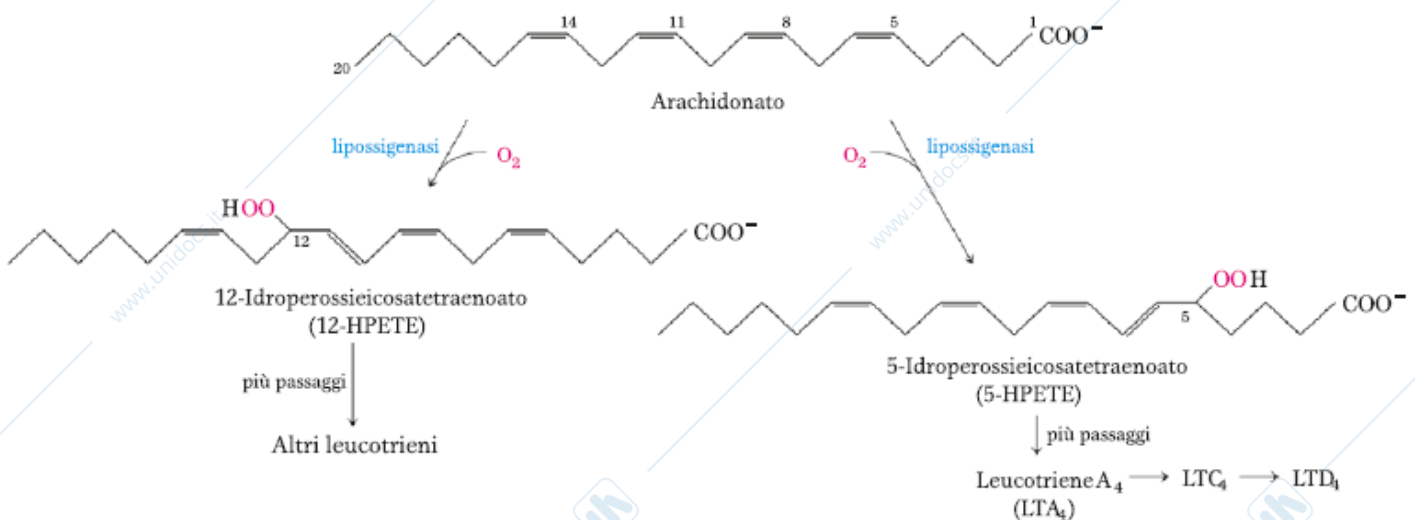
1 Il dolore si può alleviare inibendo la COX-2. Il primo farmaco reso disponibile sul mercato a questo scopo è l'aspirina. L'aspirina blocca irreversibilmente l'attività cicloossigenasica di ambedue gli isozimi COX, acetilando un residuo di serina, e bloccando i siti attivi di ambedue gli enzimi. Viene quindi inibita la sintesi delle prostaglandine e dei trombossani.

2. Dopo la risoluzione della struttura cristallina della COX-1 e della COX-2 sono stati sviluppati composti FANS (farmaci antinfiammatori non steroidei) dotati di maggior specificità per la COX-2 per la terapia del dolore. Tre di questi farmaci sono stati approvati: il rofecoxib (Vioxx), il valdecoxib (Bextra) e il celecoxib (Celebrex). I farmaci sono stati ritirati dal commercio in quanto vi è una certa correlazione tra l'uso di quei farmaci e il rischio di un attacco di cuore o un ictus cerebrale.

## I LEUCOTRIENI

I leucotrieni sono l'ultima classe di eicosanoidi. Sono strutturalmente differenti dagli altri, sono molecole a struttura lineare, non come i trombossani, che presentano in catena anche un anello a 6 atomi (5 carboni e un ossigeno) o le prostaglandine, con un anello a 5 atomi di carbonio. La via metabolica che dall'arachidonato porta alla loro sintesi è detta ciclica, per distinguerla da quella lineare, che dall'arachidonato porta alla sintesi dei leucotrieni, che sono invece composti lineari.

**Azione.** La loro azione primaria riguarda la promozione di reazioni allergiche promuovendo la contrazione della muscolatura, oltre ad avere un'azione specifica a livello della muscolatura liscia che determina il tratto aereo. Di conseguenza causano lo shock anafilattico.



**Figura 21.16** La via "lineare" dall'arachidonato ai leucotrieni.

## ORMONI STEROIDEI

Sono ormoni idrofobi che non agiscono tramite recettori di membrana, ma, entrando nel citosol attraverso recettori intracellulari e, frequentemente, nucleari, modulando così l'espressione genica.

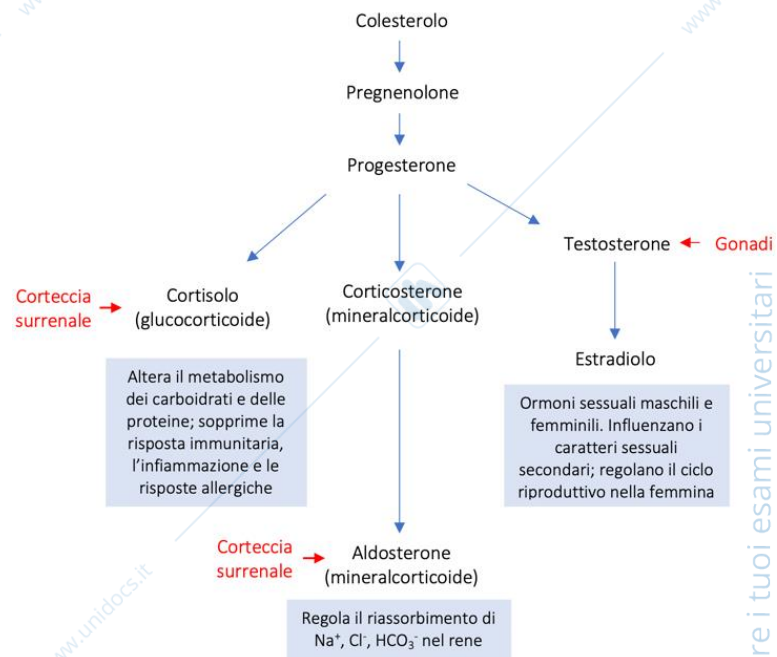
**Produzione.** Conservano la struttura base del **colesterolo**, caratterizzata dal nucleo steroideo, dato dalla condensazione di 3 strutture cicliche. Vengono sintetizzati dal colesterolo in 2 tessuti: la corteccia surrenale e le gonadi. Le ghiandole surrenali sono quindi importanti sia per la produzione delle catecolammine (a livello midollare) sia per quella degli ormoni steroidei (nella corteccia).

1. La corteccia surrenale in particolare produce due classi di ormoni steroidei:

- I **mineralcorticoidi** contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del sangue per quanto concerne la sua concentrazione elettrolitica. Il loro rappresentante più importante è l'aldosterone.
- I **glucocorticoidi** agiscono sul metabolismo glucidico dei tessuti, come quello epatico, adiposo e muscolare scheletrico e il loro massimo esponente è il cortisolo.

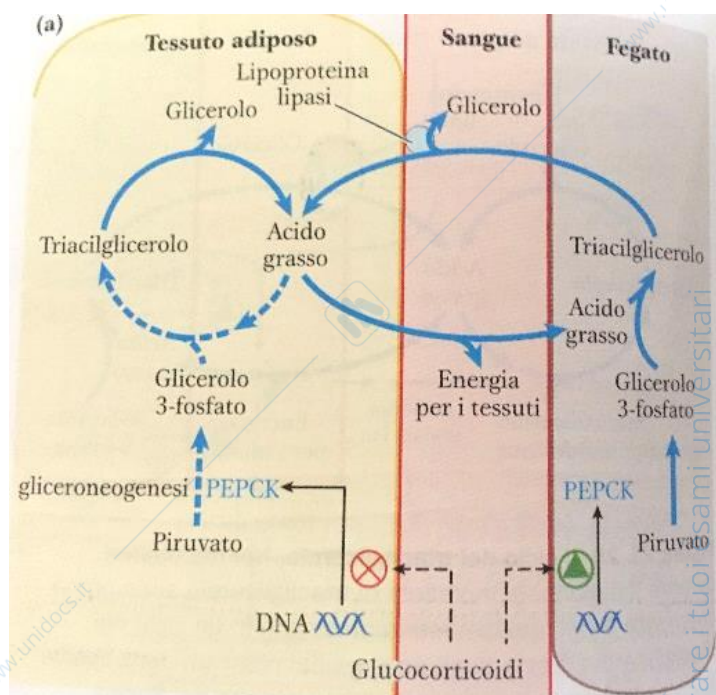
2. Le gonadi producono **ormoni androgeni** ed **estrogeni**, che sono responsabili dei caratteri sessuali secondari del maschio e della femmina. L'esponente principale degli androgeni è il testosterone, mentre il più importante degli estrogeni è il  $\beta$ -estradiolo.

**Sintesi.** Per quanto riguarda la sintesi, inizia dal colesterolo. Esso viene convertito nel **pregnenolone**, che può essere usato direttamente come precursore nella sintesi degli ormoni sessuali. Generalmente tuttavia dal pregnenolone viene sintetizzato il **progesterone** da cui derivano tutti gli altri ormoni della corticale del surrene e anche gli stessi ormoni sessuali.



## IL CORTISOLO

**Produzione.** Il cortisolo è un ormone importante quando si verificano condizioni di stress, quali uno stress emotivo o uno fisico, per tempi prolungati.



**Azione.** In queste condizioni il rilascio di cortisolo va a promuovere la disponibilità di nutrienti e agisce - a livello del fegato sul metabolismo dei carboidrati, stimolando la PEP carbossichinasi e promuovendo la gluconeogenesi.

- Nel tessuto adiposo invece il cortisolo diminuisce i livelli di PEP-carbossichinasi. Nel tessuto adiposo la PEPCK aiuta la gliceroneogenesi, partecipando alla sintesi del glicerolo 3-fosfato che, con gli acidi grassi forma i triacilgliceroli.

La riduzione di gliceroneogenesi, causata dal cortisolo, porta al rilascio nel sangue di acidi grassi liberi e glicerolo.

Questo glicerolo può essere utilizzato nel tessuto epatico, che lo converte tramite la glicerolo chinasi in glicerolo 3-fosfato. Il glicerolo 3-fosfato viene ossidato tramite la glicerol fosfato deidrogenasi, formando il diidrossiacetofosfato. Quest'ultimo prodotto può entrare nella gluconeogenesi.

- Altra azione del cortisolo è quella di demolire le proteine nel tessuto muscolare. Questa demolizione è promossa attraverso un incremento delle proteasi, deputate a catalizzare la demolizione delle molecole proteiche. Questo provoca un rilascio di amminoacidi sotto forma di glutamina e alanina, che, attraverso il torrente ematico, giungono nel tessuto epatico. Qui l'alanina viene convertita in piruvato e la glutamina è deaminata a glutammato, il quale tramite la transaminazione è convertito ad  $\alpha$ -chetoglutarato. Sia il piruvato sia l' $\alpha$ -chetoglutarato possono essere convertiti in ossalacetato, che tramite la PEP-carbossichinasi diventa fosfoenolpiruvato ed entra nella gluconeogenesi.

-Ha però un altro effetto: è estremamente importante per la sua azione antiinfiammatoria. L'infiammazione infatti è un processo mediato dagli eicosanoidi (prostaglandine) e il cortisolo inibisce il rilascio di acido arachidonico, capostipite degli eicosanoidi, da parte dei glicerofosfolipidi (azione regolata dalla fosfolipasi A2, la quale va a scindere il legame estere tra il C2 e l'acido grasso presente nel glicerofosfolipide che spesso è l'acido arachidonico).

Dopo che Simone mi ha detto che le sbobine di anno scorso sono uguali, di qui in avanti ho mantenuto il più possibile coincidente alle sue parole! Respira, non avere attacchi di panico 😊

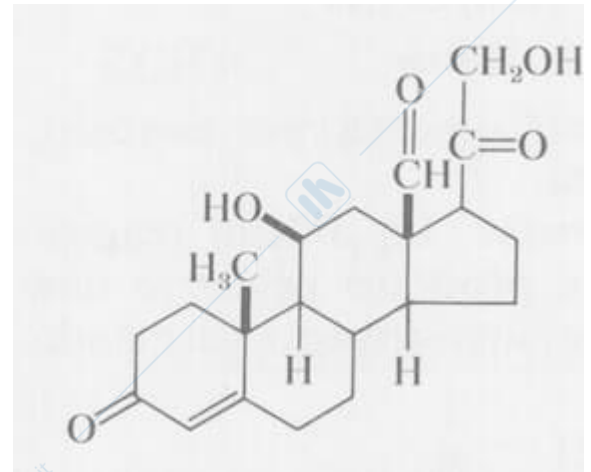
## ALDOSTERONE

I mineralcorticoidi sono prodotti dalla corteccia del surrene, il loro rappresentante principale è l'**aldosterone**, che agisce a livello renale.

La sua azione porta al riassorbimento sia di  $\text{Na}^+$  che di  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ , che avviene a livello del tubulo distale del nefrone; questa azione è importante per:

- il mantenimento dell'omeostasi elettrolitica del sangue
- il mantenimento della pressione sanguigna (il riassorbimento degli ioni determina infatti anche il riassorbimento di acqua, la quale aumenta inevitabilmente la pressione sanguigna).

L'azione dell'ormone, essendo un ormone steroideo, è sempre accoppiata alla modulazione di una molecola proteica; in questo caso c'è l'incremento dei livelli di una proteina canale la cui azione è favorita dal gradiente elettrochimico creato dalla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi.



## SINTESI ORMONI STEROIDEI (pag 892)

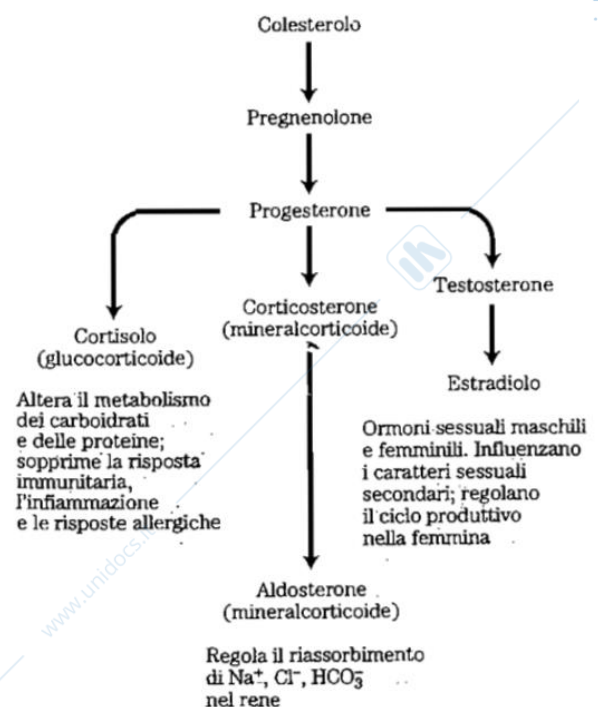
È un procedimento molto complesso ma le prime tappe devono essere note.

1. La sintesi necessita dell'importo nel mitocondrio del colesterolo, procedimento che coinvolge una proteina detta **STAR** (STeroidogenic Acute Regulatoryprotein), localizzata sulla membrana interna mitocondriale, che è attiva quando viene fosforilata.

- La sua fosforilazione è promossa dall'azione di due ormoni di natura peptidica che sono l'ACTH e l'LH (ormoni ipofisari, i quali hanno il compito di stimolare ghiandole endocrine a secernere specifici ormoni).
- a) Il meccanismo di azione dell'**ACTH** (adreno-corticotropo), che agisce a livello della corteccia surrenale, è del tipo del secondo messaggero che, in questo caso è il cAMP che agisce su una chinasi cAMP dipendente che va a fosforilare la proteina STAR attivandola.
- b) L'**LH** ha meccanismo simile ma a livello delle gonadi, andando a promuovere la sintesi e la secrezione di estrogeni e androgeni.

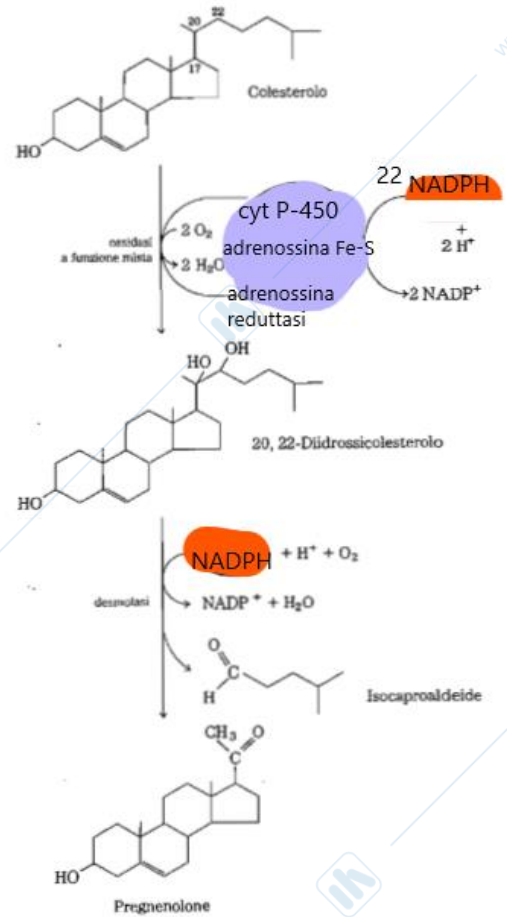
2. La proteina STAR, una volta fosforilata, opera il trasferimento all'interno del mitocondrio del colesterolo. A livello mitocondriale si svolgono due tappe metaboliche che portano alla sintesi del **pregnenolone**, precursore del progesterone. Una volta formato il pregnenolone questo viene trasferito a livello citosolico e continua la sintesi di ormoni steroidei:

- Cortisolo (glucocorticoide)
- Aldosterone (mineralcorticoide)
- Testosterone ed estradiolo

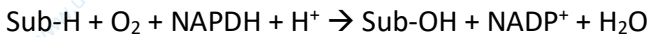


Il colesterolo va incontro a due reazioni, trasformazioni strutturali che portano alla rimozione di una porzione della catena laterale.

1) La **prima** si realizza attraverso l'inserimento nel colesterolo di 2 gruppi ossidrilici con formazione del **20,22-Diidrossicolesterolo**, reazione catalizzata dall'enzima **citocromo P-450**, una monoossigenasi. È una emoproteina che si trova sia a livello del reticolo endoplasmatico che della membrana mitocondriale interna ed è proprio a livello della membrana che è la responsabile della sintesi degli ormoni steroidei (quelle a livello del mitocondrio sono molto specifiche per il substrato, cosa che non accade a livello del reticolo endoplasmatico).



→ Il citocromo P450 è una monossigenasi che catalizza la reazione:



Controllo del metabolismo di sostanze endogene come il colesterolo e l'acido arachidonico e di sostanze esogene come farmaci e inquinanti ambientali.

Localizzazione d'organo: fegato, apparato gastrointestinale e ghiandola surrenale.

Localizzazione cellulare: mitocondrio, reticolo endoplasmatico.

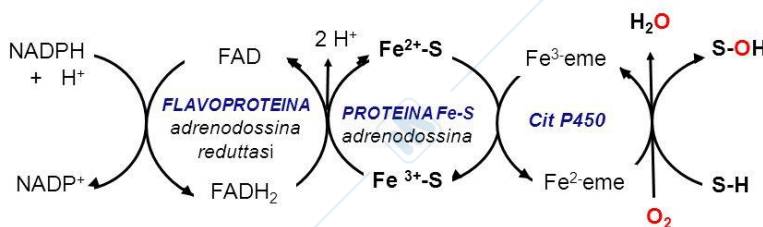
Differenza tra un'ossidasi a funzione mista e una monoossigenasi:

- **ossidasi a funzione mista:** enzima che catalizza contestualmente l'ossidazione di due substrati, uno principale e uno secondario. Il secondario deve partecipare alla reazione perché l'ossidazione del substrato principale porti alla riduzione di due molecole di ossigeno ad acqua per un totale di 4 elettroni (necessita un substrato secondario).

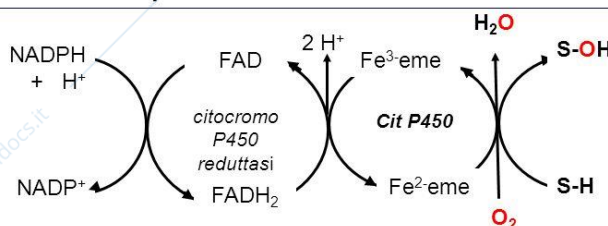
Esempio: l'Acetil-CoA desaturasi.

La differenza tra un'ossidasi a funzione mista e un'ossidasi normale è che quest'ultima necessita di un solo substrato per ridurre l'ossigeno ad acqua.

**sistema di trasporto coinvolge una flavoproteina ed una proteina Fe-S membrana mitocondriale interna**



**sistema di trasporto microsomiale del citocromo P450**



- **monoossigenasi:** a differenza delle di ossigenasi, classe di enzimi che ossidano un substrato inserendo all'interno di una molecola entrambi gli atomi di ossigeno della molecola biatomica, le monoossigenasi invece ossidano un substrato inserendo un atomo di ossigeno della molecola biatomica e poi, ossidando un secondo substrato, riducono l'altra molecola ad acqua. Ogni volta che c'è una monoossigenasi quindi si avrà un substrato principale, ossigeno e un secondo substrato donatore di elettroni.

Il risultato sarà (1) l'ossidazione del substrato principale attraverso l'inserimento di una molecola di ossigeno all'interno della molecola e la formazione di un gruppo ossidrilico, (2) l'ossidazione del coenzima che partecipa alla reazione e (3) la riduzione dell'altro atomo di ossigeno ad acqua.

Esempio: citocromo P-450, che ha come cofattore il NADPH.

Questa reazione di ossidazione si realizza attraverso un minisistema di trasporto degli elettroni che vede la partecipazione di una flavoproteina ( $\delta$ -adrenodossina riduttasi) che lega lo ione idruro e un protone dal NADPH e trasferisce gli elettroni al centro Fe-S di un'altra proteina (adrenodossina).

L'adrenodossina viene ossidata dal ferro emnico del citocromo P-450 che va contestualmente ad ossidare il colesterolo e a ridurre l'ossigeno con produzione di acqua.

Occorrono due cicli di ossidazione del colesterolo e quindi due catalisi da parte del citocromo P-450 per ottenere 20,22-diidrossicolesterolo.

La famiglia delle citocromo P-450 è estremamente ampia e spesso fanno parte di un **minisistema di trasporto degli elettroni** (es. nel reticolo endoplasmatico questa è più semplice perché la flavoproteina, essendo una citocromo P-450 riduttasi, trasferisce gli elettroni direttamente al citocromo P-450). Questi sistemi di trasporto degli elettroni, di cui le citocromo P-450 fanno parte, sono anche coinvolti nella detossificazione da farmaci di natura idrofobica poiché, rendendoli più polari (con l'aggiunta di gruppi ossidrilici) ne facilitano l'escrezione a livello renale (con questo meccanismo ci si detossifica anche da inquinanti ambientali tra cui il benzopirene).

- 2) La **seconda trasformazione** che subisce il colesterolo, ormai diventato 20,22-diidrossicolesterolo, avviene sempre all'interno del mitocondrio ed è catalizzata da una ossidasi a funzione mista detta **desmolasi**, che si occupa della rottura del legame covalente tra i due carboni. Questo porta alla trasformazione dei due gruppi ossidrilici in gruppi carbonilici e al rilascio di parte della catena laterale del colesterolo. Si forma in questo modo il **pregnenolone**.

Il pregnenolone arriva nel citosol e attraverso vie anaboliche differenti si formano ormoni surrenalici o delle gonadi. Tutte queste molecole derivanti dal colesterolo sono più ossidate e quindi più solubili di quest'ultimo; tuttavia non hanno una polarità sufficiente per essere trasferiti come tali nel circolo ematico e sono quindi sempre accompagnati da proteine trasportatrici.

#### ORMONI DERIVATI DALLA VITAMINA D

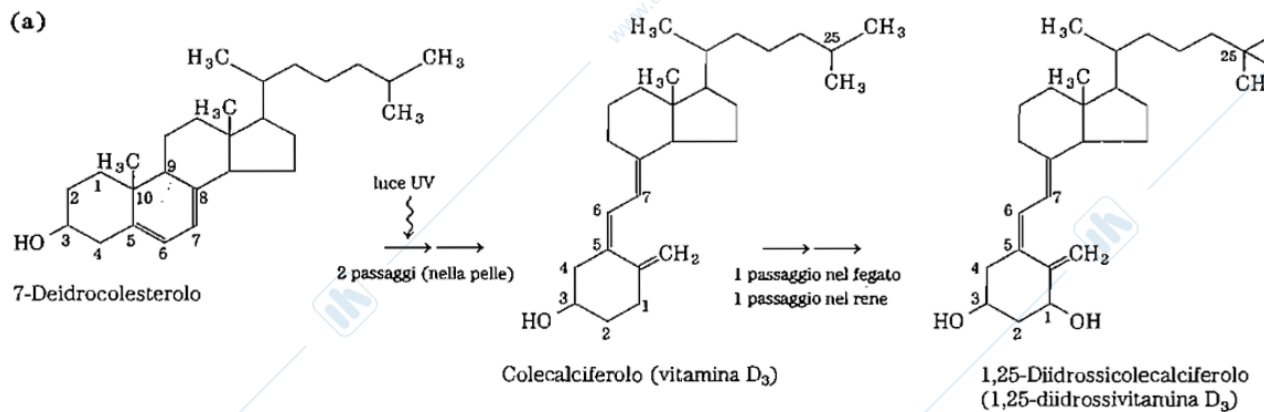
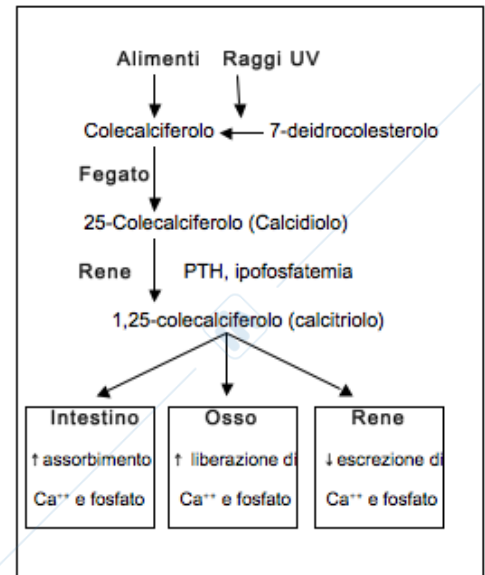
Il **calcitriolo** è una molecola ad azione ormonale, con recettori intracellulari, catalizzata a partire dalla **vitamina D**.

Il nostro organismo è in grado di produrre la vitamina D<sub>3</sub> (anche detta **colecalfiferolo**) esclusivamente a livello della pelle attraverso una reazione fotochimica a partire dal **7-Deidrocolesterolo**.

La sintesi del **calcitriolo (1,25-Diidrossicolecalciferolo)** avviene attraverso due tappe metaboliche di ossidazione: la prima a livello epatico sul C-25 e la seconda a livello renale sul C-1.

La quantità di vitamina D sintetizzata dal nostro organismo non è sufficiente per assolvere al ruolo funzionale che ha l'ormone, sintetizzato a partire dalla vitamina, all'interno dell'organismo; di qui la necessità di un apporto alimentare di vitamina D (che si trova in alimenti come latte e burro, nei quali viene addizionata). La vitamina D ha l'unico compito di formare calcitriolo.

→ La deficienza di vitamina D porta al **rachitismo**, patologia caratterizzata dalla malformazione e debolezza delle ossa. Il calcitriolo è un ormone che ha un ruolo nell'espressione dei livelli di una molecola proteica che si occupa a livello intestinale dell'assunzione del  $\text{Ca}^{2+}$ : si tratta di un simporto  $\text{Ca}^{2+}\text{-PO}_4^{3-}$ . La sua azione fisiologica è quella di contribuire alla regolazione dell'omeostasi ematica per quanto riguarda il calcio e interviene nella modulazione dell'equilibrio tra rimozione e deposito di calcio a livello del tessuto osseo.



Unitamente alla regolazione della calcemia contribuiscono altri due ormoni:

- **Paratormone** (paratiroidi)
- **Calcitonina** (parafollicolari)

Questi sono degli ormoni peptidici che agiscono tramite un secondo messaggero e sono secreti rispettivamente dalle paratiroidi e dalle cellule parafollicolari della tiroide.

Il calcitriolo ha un'azione *coordinata* a quella del paratormone e *antagonista* a quella della calcitonina.

#### PARATORMONE

Quando a livello ematico si verifica un abbassamento della concentrazione di calcio (ipocalcemia), viene sentito a livello delle paratiroidi che secernono paratormone. Questo agisce incrementando il riassorbimento del calcio a livello renale e promuove la mobilitazione del calcio dal tessuto osseo attraverso diversi meccanismi:

- Promuovere l'escrezione di fosfato a livello renale, provocando una diminuzione del fosfato a livello ematico; questo determina un rilascio di fosfato dal tessuto osseo quale conseguenza dell'equilibrio tra fosfato ematico e fosfato presente sotto forma di idrossiapatite; liberando fosfato si libera anche calcio (presente nell'idrossiapatite) a livello ematico.
- Proliferazione osteoclasti.
- Inibizione a livello degli osteoblasti della sintesi di collagene, che ha come conseguenza una diminuzione del deposito di calcio sotto forma di idrossiapatite (i depositi di calcio si formano sulle fibre del collagene presenti nella matrice extracellulare).

Legame con calcitriolo. Il legame con il calcitriolo sta nel fatto che il paratormone a livello renale va a stimolare la **sintesi** di quest'ultimo (infatti la seconda tappa della sintesi del calcitriolo si svolge proprio a livello renale). L'aumento del calcitriolo porta ad un aumento della concentrazione di calcio e tramite un meccanismo a feedback negativo va a ridurre la secrezione di paratormone. Il calcitriolo, oltre alla overespressione della proteina trasportatrice di calcio a livello intestinale, agisce anche sulla demineralizzazione del tessuto osseo.

## CALCITONINA

Sintesi: Espressa in caso di ipercalcemia.

Ha un'azione a livello renale dove porta ad un incremento dell'escrezione del calcio, inoltre va a stimolare anche il deposito di calcio sotto forma di idrossiapatite.

## ORMONI TIROIDEI

### SINTESI E CARATTERISTICHE GENERALI

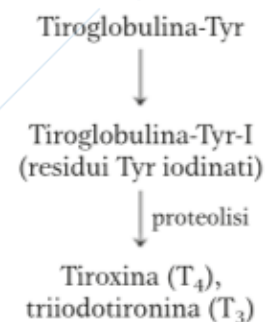
Gli ormoni tiroidei sono ormoni **a recettore intracellulare**.

Sono due: la triiodotironina (T3) e la tetraiodotironina (comunemente chiamata tiroxina o T4).

Analogamente agli ormoni catecolaminici sono ormoni di derivazione amminoacidica e vengono sintetizzati a partire dal precursore proteico **tireoglobulina**, una glicoproteina prodotta dalle cellule follicolari (cioè dalle cellule epiteliali dei follicoli tiroidei, anche chiamati tireociti) e accumulata a livello della matrice colloidale che si trova all'interno dei follicoli.

La sintesi di T3 e T4 si realizza a seguito di un processo di **iodinazione** di residui tirosinici (massimo 20) della tireoglobulina, dove lo iodio viene trasferito ai residui tirosinici dal flusso ematico sotto forma di ioduro.

- Il sistema di trasporto coinvolto è di tipo attivo: si tratta di un simporto promosso dal gradiente Na<sup>+</sup> che esiste tra parte interstiziale e citosol, per cui si ha una concentrazione 40 mM all'esterno e circa 4 mM all'interno. Questo sistema è estremamente efficiente e determina un importo di iodio tale, che la concentrazione all'interno del citosol diviene **circa 100 volte superiore** rispetto a quella a livello ematico.
- Nel citosol, poi, lo ioduro viene trasferito a livello della matrice colloidale attraverso un sistema di trasporto per ora sconosciuto.



Nella matrice colloidale avvengono reazioni di iodinazione dei residui tirosinici che portano alla formazione di residui di:

- monoiodotirosina ;
- diiodotirosina.

Una volta avvenuta la iodinazione di questi residui, attraverso reazione di condensazioni si formano:

1. **triiodotirosina** (che risulta dalla condensazione di una monoiodotirosina e di una diiodotirosina);
2. la **tiroxina** (che si forma dalla condensazione di due diiodotirosine).

Questi ormoni sono, però, presenti all'interno della tireoglobulina sotto forma di precursori. La condensazione di Tyr mono- e diiodinate danno origine ai precursori degli ormoni tiroidei T3 e T4. Una volta prodotti tali precursori non sono liberi, ma rimangono parte integrante del complesso del più complesso peptide tireoglobulinico.

La secrezione della tireoglobulina, la iodinazione dei residui tirosinici, la secrezione degli ormoni tiroidei sono sotto controllo di un ormone tropico, cioè prodotto a livello dell'ipofisi anteriore, l'ormone **tireotropo**. L'ipofisi anteriore rilascia infatti fattori tropici (come anche l'adrenocorticotropo e il luteotropo nella pt1) che vanno poi a stimolare la secrezione di quelle che sono le **vere** molecole ad azione ormonale, cioè che vanno ad agire a livello di diversi tessuti bersaglio dell'organismo producendo la modulazione dello stato funzionale dello stesso.

L'ormone tireotropo è un ormone **peptidico** che, interagendo con diversi tipi di recettori, induce l'incremento della concentrazione di secondi messaggeri a livello intracellulare:

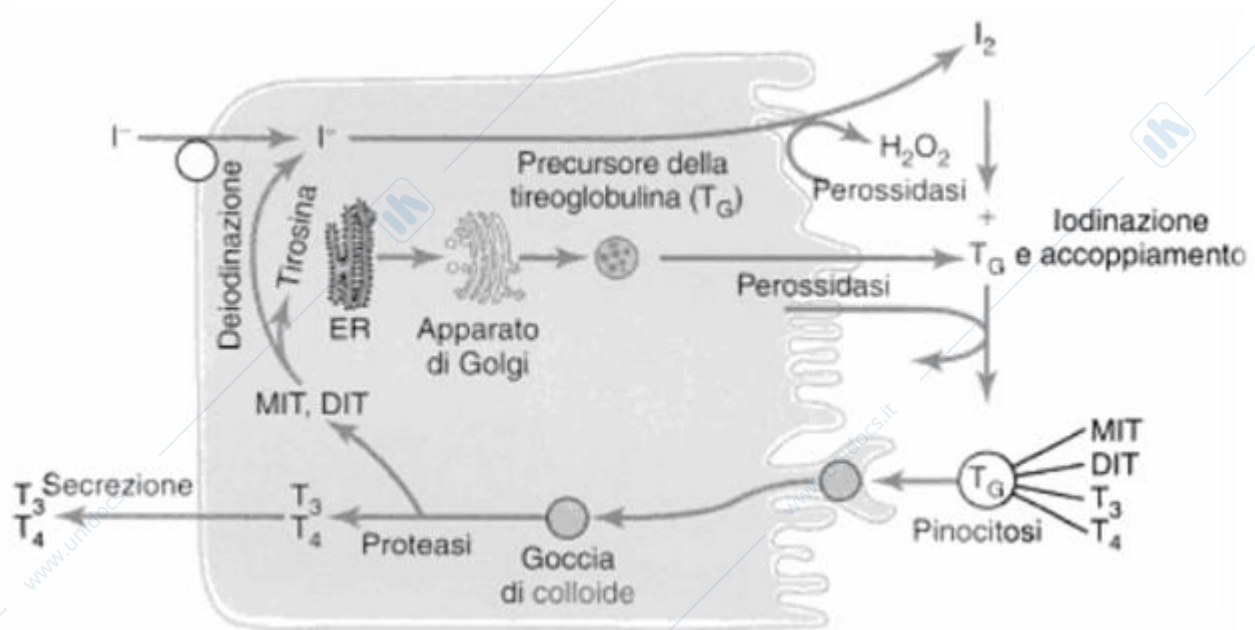
- l'AMPc;
- il diacilglicerolo;
- l'inositolo trifosfato.

L'azione di questi è strettamente connessa con l'aumento dei livelli di calcio citosolico.

Il **TSH** (ormone tireotropo) agisce sulla membrana plasmatica dei tireociti e promuove:

- a) la sintesi di tireoglobulina;
- b) la iodinazione della tireoglobulina;
- c) la secrezione degli ormoni tiroidei.

## LA SECREZIONE



La secrezione avviene con un meccanismo cellulare abbastanza complesso (schematizzato nell'immagine a lato) i cui aspetti molecolari non si conoscono esattamente.

1. L'azione del tireotropo promuove la secrezione attraverso l'attivazione di un **processo di pinocitosi**, per cui la tireoglobulina della matrice colloidale viene fagocitata a livello del citosol con formazione di una vescicola contenente la tireoglobulina.
2. Questa si fonde con dei lisosomi e grazie all'azione degli enzimi litici si verifica la **proteolisi della tireoglobulina**, portando al rilascio di  $T_3$ ,  $T_4$ , ovviamente di tutti gli altri amminoacidi da cui è composta la tireoglobulina e contemporaneamente dello iodio derivato dai residui iodinati che avevano prodotto la formazione di  $T_3$  e  $T_4$ . Questo materiale può essere riutilizzato a livello citosolico nel tireocita per risintetizzare tireoglobulina portata a livello della matrice colloidale dove, grazie alla presenza di iodio, ripartirà il processo di iodinazione.
3. Gli ormoni secreti,  $T_3$  e  $T_4$ , non hanno un'elevata solubilità, per cui vengono trasferiti come ormoni endocrini attraverso il flusso ematico coniugati ad una proteina detta **TBP** (thyroxine-binding protein).
4. La secrezione da parte dei tireociti dei follicoli è, di fatto, costituita **prevalentemente da  $T_4$** .

In relazione al processo di secrezione degli ormoni steroidei, si considera il meccanismo comune di regolazione a **feedback**: quando i livelli ematici degli ormoni raggiungono concentrazioni sufficientemente elevate, questi vanno ad inibire a monte il meccanismo che porta alla loro secrezione di altri ormoni steroidei. Questo si realizza sia andando ad inibire:

- a livello dell'**ipofisi anteriore**, il rilascio di ormone tireotropo;
- a livello dei **neuroni ipotalamici**, il rilascio di thyrotropin releasing **hormone TRH**, il fattore che stimola il rilascio dell'ormone tireotropo.

#### AZIONE

Gli ormoni tiroidei sono importantissimi nella regolazione del **metabolismo nel suo complesso** e particolarmente importante è la stimolazione nei confronti dei **processi catabolici**, soprattutto dei carboidrati e dei lipidi.

L'azione degli ormoni tiroidei si esplica:

- a livello del **fegato**, del **muscolo**, del **tessuto adiposo**, dove favoriscono i processi ossidativi.
- nel **tessuto adiposo bruno**, dove favorisce inoltre la produzione di calore **incrementando i livelli della UCP**;
- a livello del **pancreas**, dove gli ormoni tiroidei sono anche in grado di stimolare il rilascio di **insulina**, favorendo l'utilizzo di glucosio come combustibile, al fine poi di ripristinarne l'assunzione e le riserve di glicogeno;
- In particolare, nel muscolo scheletrico, in presenza di insulina, viene favorita e promossa la glicolisi.

#### PATOLOGIE ASSOCIATE ALL'ITER DI PRODUZIONE DEGLI ORMONI TIROIDEI

Si fa riferimento a due patologie:

- l'**ipertiroidismo**, associato a magrezza ed iperattività, strettamente connesse alla stimolazione dell'utilizzo di combustibile a scopo energetico.
- l'**ipotiroidismo** caratterizzata da obesità e letargia (spossatezza e stanchezza).

#### GLI ORMONI RETINOIDI

##### ACIDO RETINOICO : CARATTERISTICHE E FUNZIONI

L'unico ormone retinoide è l'**acido retinoico**, prodotto a partire dal retinolo (vit. A) attraverso due tappe ossidative.

La **vitamina A**, come la D, è un **pro-ormone**, ovvero una molecola che, in seguito a modificazioni chimiche, si traduce in un ormone: il calcitriolo nel caso della vitamina D, acido retinoico per la vitamina A.

La vitamina A deve essere necessariamente assunta con la dieta, ricchi di vitamina A sono alimenti come: latte, burro, uova, alimenti di origine vegetale come la carota e soprattutto zucchine. In particolare, le carote e le zucchine sono ricche di  **$\beta$ -carotene**, una che il nostro organismo trasforma in retinolo.

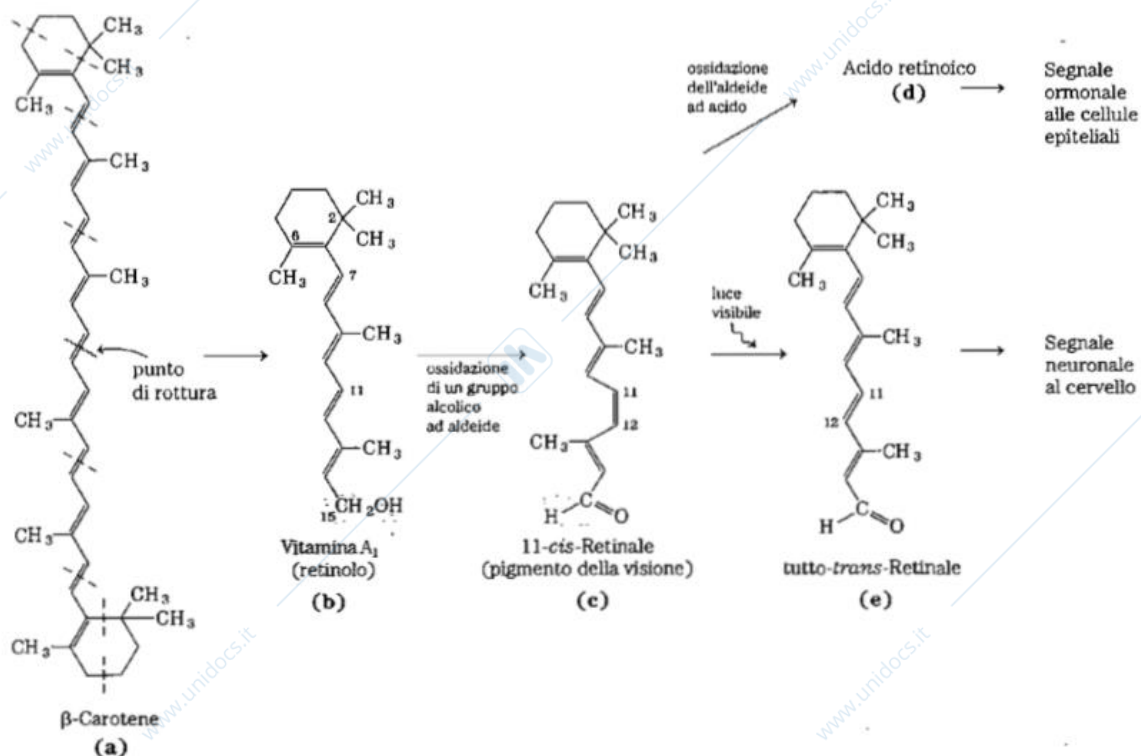
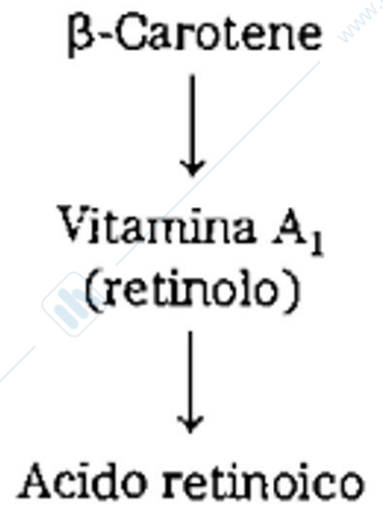
Il retinolo è importante perché:

1. da questo viene sintetizzato l'acido retinoico;
2. è indispensabile per il normale sviluppo e crescita dell'organismo, per la proliferazione e per il differenziamento cellulare;
3. da esso si ottiene, nel fegato, l'**11'cis-retinale**, il pigmento visivo che, legato covalentemente alla componente proteica, l'**opsina**, costituisce la **rodopsina**.

**DIGRESSIONE** : La **rodopsina** è una proteina canale presente a livello dei fotorecettori della retina, permette la diffusione di due ioni  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  in quanto entrambi presenti in concentrazione maggiore nello spazio extracellulare. La rodopsina è importante nella percezione dello stimolo visivo che porta, poi, alla visione. Al buio questa molecola ha come prostetico l'**11'cis-retinale**. In seguito dell'esposizione alla luce questo va incontro ad un cambiamento conformazionale in **11'trans-retinale**, causando un ulteriore cambiamento conformazione del canale della rodopsina e determinandone, quindi, la chiusura. Conseguentemente, quello che accade è che l'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi e della  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi, che prima contribuivano alla direzione del potenziale elettrico, diventano ora gli **unici regolatori**.

Quando l'esposizione alla luce porta alla chiusura del canale, quello che si realizza a livello membrana plasmatica di questi fotorecettori è l'incremento del potenziale elettrico transmembrana, l'**iperpolarizzazione**, che rappresenta il segnale elettrico trasmesso al cervello come punto di partenza del processo della visione.

Quindi, il segnale molecolare è dato dal cambiamento conformazionale della rodopsina quando questa viene colpita dalla luce, stimolando la chiusura dei canali, l'iperpolarizzazione e la trasmissione del segnale elettrico a livello cerebrale.



L'acido retinoico, questa molecola ad azione ormonale è necessaria per lo sviluppo e la crescita dell'organismo. Esistono recettori per questo ormone in tutti i tessuti, soprattutto a livello epiteliale, della cute, del polmone, della trachea ma anche delle cellule immunitarie. I recettori sono localizzati a livello del nucleo delle cellule bersaglio, per cui **deficit di vitamina A portano ad alterato sviluppo e crescita di un individuo.**

## IL MONOSSIDO DI AZOTO (NO<sup>•</sup>)

### CARATTERISTICHE

Il monossido di azoto è una **specie radicalica**, con un elettrone spaiato localizzata sull'atomo di N, gli altri due, su tre, sono impiegati nel con l'ossigeno.

È una **specie gassosa** sufficientemente **apolare**, in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana, ma l'elevata reattività, propria di tutte le specie radicaliche, fa sì che i tessuti bersaglio siano localizzati sempre in siti prossimi al sito di produzione della specie radicale, altrimenti il suo cammino verrebbe un processo di infiammazione immediatamente interrotto a seguito della reazione chimica con altre molecole.

### IL NO<sup>•</sup> PUO' ESSERE NOCIVO

Il NO<sup>•</sup> è una specie chimica che in condizioni fisiologiche svolge azioni importanti, ma diventa tossica quando:

- ◆ i **livelli** di questa specie chimica si **innalzano**;
- ◆ **reagisce con °O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>** portando alla formazione di specie altamente reattive dell'azoto (RNOS) e dell'ossigeno (ROS) come, per esempio, i **perossinitriti** e anche i loro derivati. Questi sono in grado di nitrare la guanosina presente a livello sia del DNA che di RNA, oltre che residui amminoacidici di proteine come la tirosina. La nitratura della guanosina determina mutazione del DNA e quindi alterazioni *permanenti* delle cellule.

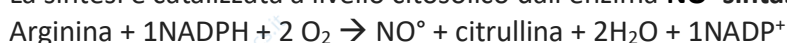
### AZIONE

Il rilascio di NO<sup>•</sup> ha diversi effetti, in alcuni casi questi effetti agisce con un meccanismo simile a quello di un ormone, in altri casi simile ad un neurotrasmettitore.

- Simile all'azione ormonale è il meccanismo attraverso il quale **promuove vasodilatazione**. Di fatto, il monossido di carbonio si lega all'**adenil ciclasi citosolica** del tessuto bersaglio, un enzima che catalizza la conversione della GMP in **GMP-5'3'ciclico**, un nucleotide ciclico come l'AMPc. Infatti, similmente agli effetti dell'aumento dell'AMPc, il GMPc attiva una **chinasi GMPc dipendente**. Questa agisce a livello della muscolatura liscia dei vasi fosforilando **tropomiosina**, molecola proteica che, associata alla troponina, è parte del sistema deputato all'attivazione del processo di contrazione. La fosforilazione va ad inibire l'attività contrattile, determinando il rilassamento della muscolatura liscia dei vasi.
- L'attivazione dell'enzima deputato alla produzione del monossido di azoto permette ai **macrofagi** di promuovere la **morte degli agenti patogeni**. Quello che avviene a seguito di un'infezione è **l'incremento dei livelli di NO<sup>•</sup> sintasi**, quindi di NO<sup>•</sup> e di radicali tossici, di specie altamente reattive, che vanno a danneggiare (in questo caso) i batteri. Perciò la produzione di perossinitriti è un meccanismo che permette ai macrofagi di **causare la morte di agenti patogeni**.

### SINTESI

La sintesi è catalizzata a livello citosolico dall'enzima **NO<sup>•</sup> sintasi**.

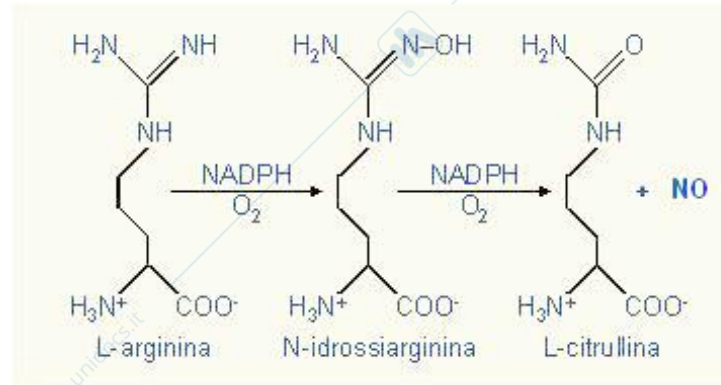


Il monossido di azoto viene prodotto durante il processo di conversione dell'arginina in citrullina attraverso una reazione redox. (Non ricordare il meccanismo)

Esistono diversi tipi di NO<sup>•</sup> sintasi.

- In alcuni tipi cellulari è un enzima **costitutivamente espresso**: i livelli vengono mantenuti sufficientemente alti e costanti. A livello **neuronale** e a livello delle cellule **endoteliali** dei vasi, NO<sup>•</sup> è espresso e va a modulare l'attività delle cellule muscolari lisce che delimitano il vaso. In queste cellule la NO<sup>•</sup> sintasi è regolata dalla variazione del livello di Ca<sup>2+</sup> citosolico, precisamente attraverso variazioni di un complesso calcio/proteina quale calcio/calmodulina. Le variazioni di calcio promuovono variazioni nell'attività della NO<sup>•</sup> sintasi determinando variazioni delle concentrazioni di NO<sup>•</sup>.

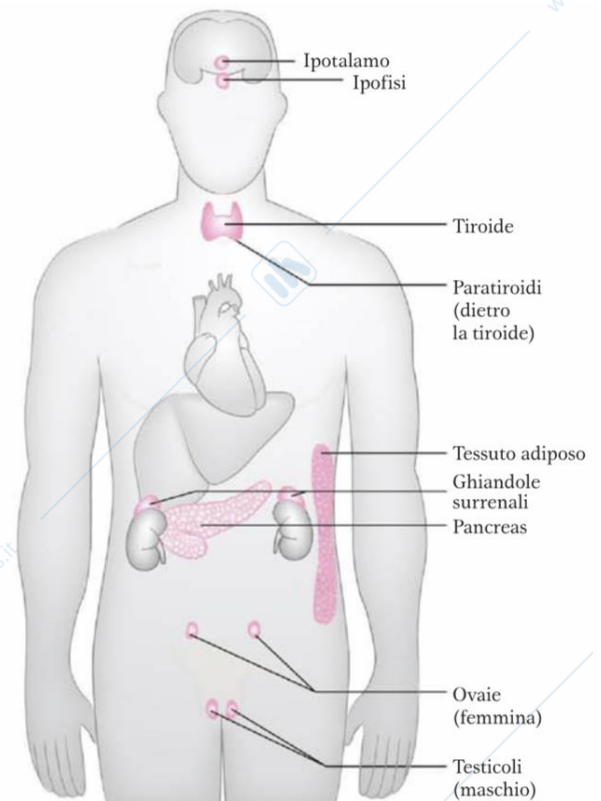
- Nel caso dei macrofagi non presentano NO<sup>•</sup> sintasi costitutiva, ma **inducibile**, per cui i livelli dell'enzima vengono modulati in risposta a variazioni dello stato funzionale del macrofago, per esempio un processo di **infiammazione** incrementa l'espressione di questo.



## SINTESI DEI TESSUTI CON ATTIVITÀ ENDOCRINA

Si consideri il panorama globale dei tessuti endocrini dell'organismo e i rispettivi ormoni secreti:

- **Tiroide e paratiroidi** → *ormoni tiroidei e paratiroidi*;
- **pancreas endocrino**;
- **ghiandole surrenaliche**;
- centri secernenti dell'**ovaio e del testicolo**;
- **ipofisi** → *ormoni trofici* (di natura peptidica);
- **ipotalamo** → *fattori di rilascio o ormoni regolatori* (di natura peptidica);
- **tessuto adiposo** → *adipochine*, tra cui *leptina* che informa il cervello sulla disponibilità energetica a livello adiposo inibendo il senso di appetito;
- **Timo** → cellule nutrici della corticale secernenti *citochine* (interleuchine) per promuovere la proliferazione e il differenziamento di linfociti prodotti dal midollo osseo;
- **epifisi** (o ghiandola pineale) → localizzata a livello dell'ipotalamo, rilascia la *melatonina*, che interviene nella regolazione del ciclo sonno-veglia e dunque favorisce il riposo notturno.



Anche a livello del **tessuto gastrointestinale** sono prodotti ormoni: questi sono secreti nella maggior parte dall'intestino tenue (*secretina, colecistochinina*) e dallo stomaco (*gastrina*) e sono deputati principalmente alla digestione dei cibi.

Di rilievo è la secrezione del **peptide inibitore gastrico** in risposta alla presenza di glucosio a livello dell'intestino tenue. Tale messaggero esplica una doppia azione:

- blocca la motilità gastrica e lo svuotamento dello stomaco;
- stimola la secrezione di insulina in seguito all'aumento delle quantità di glucosio provocato dall'arrivo di alimenti parzialmente digeriti a livello dell'intestino tenue. Dunque, il rilascio dell'insulina a livello ematico si verifica in risposta non solo ad iperglicemia, ma anche al segnale inviato dall'ormone peptide inibitore.

## ORGANIZZAZIONE GERARCHICA DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO

Il sistema neuroendocrino presenta un'**organizzazione gerarchica** e un alto grado di complessità. È composto dall'ipotalamo, dall'ipofisi e da una serie di ghiandole e tessuti endocrini.

Questo sistema si basa sulla capacità delle cellule dell'ipotalamo di recepire, elaborare ed integrare tra loro segnali elettrici provenienti dal SN. L'ipotalamo **orchestra**, in seguito, una risposta complessa che porta alla modulazione dello stato funzionale e metabolico dell'organismo attraverso il rilascio di ormoni regolatori.

Si tratta di un sistema di tipo gerarchico poiché la modulazione dello stato funzionale viene primariamente realizzata dall'ipotalamo attraverso tre modalità:

1. la secrezione di fattori di rilascio che agiscono sull'attività dell'**ipofisi anteriore (adenipofisi)** stimolando la secrezione di *tropine*: mediante la circolazione sanguigna, questi peptidi attivano a loro volta un altro gruppo di ghiandole endocrine, come la corteccia surrenale, la tiroide o le gonadi.
2. il rilascio diretto di ormoni a livello dell'**ipofisi posteriore (neuroipofisi)**. Questa contiene infatti le terminazioni assoniche di molti neuroni il cui corpo cellulare è situato nell'ipotalamo. Questi neuroni producono gli ormoni peptidici *ossitocina* e *vasopressina* che sono immagazzinati nell'ipofisi posteriore sotto forma di granuli di secrezione in attesa di un segnale per il loro rilascio.

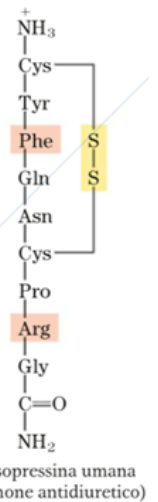


➤ La **vasopressina** (o antidiuretico) ha un doppio effetto:

- incrementando le acquaporine della membrana plasmatica dell'epitelio del dotto collettore dei nefroni renali, stimola il riassorbimento renale di H<sub>2</sub>O dal filtrato glomerulare. Questo processo è mediato da cAMP.

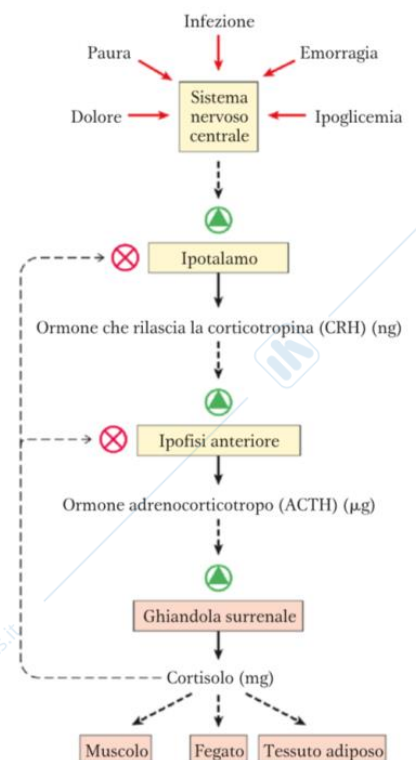
**NB:** L'incremento delle acquaporine non è risultato dell'aumento dell'espressione del loro gene, ma è dovuto all'aumento di cAMP, che promuovono esocitosi di vescicole intracellulari contenenti tali canali a livello della membrana plasmatica

- induce vasocostrizione aumento la pressione sanguigna. Questo processo è mediato da IP<sub>3</sub> e DAG, che portano il segnale a livello della muscolatura liscia dei vasi sanguigni.



### CARATTERISTICHE DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO

- la [ormone] rilasciata da una ghiandola endocrina controlla il rilascio di ormoni regolatori (ipotalamo) e di ormoni tropici (adenoipofisi) grazie ad un **meccanismo a feedback**. Questo meccanismo ha lo stesso scopo di quanto visto per la vie biosintetiche da regolazione allosterica retroattiva del prodotto finale: evitare sprechi di substrati ed energia. In figura si presenta il caso del cortisolo che inibisce il rilascio di ACTH a livello adenoipofisario.
- La produzione di ormoni da parte delle ghiandole endocrine si realizza attraverso un **meccanismo a cascata** che porta ad una profonda amplificazione del segnale. Conseguentemente, piccole variazioni nel rilascio di ormoni regolatori (ipotalamo) si traducono in variazioni di molti ordini di grandezza della [ormone] rilasciata dalla ghiandola endocrina e, quindi, in una modificazione profonda dello stato funzionale del tessuto. Questa elevatissima sensibilità del sistema permette di modulare lo stato dell'organismo in risposta a singoli stimoli (condizione di pericolo o ipoglicemia ad esempio).



### SISTEMI DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

**Definizione.** Si considerino ora i **sistemi di trasduzione del segnale**. Essi sono definibili come i meccanismi molecolari attraverso cui si realizza la conversione del segnale extracellulare nella risposta cellulare. La capacità delle cellule di ricevere e di rispondere a segnali che arrivano dall'esterno della membrana plasmatica è un processo fondamentale per la vita. In questi casi il segnale rappresenta l'informazione, che viene rilevata da recettori specifici e convertita in una risposta cellulare che implica sempre un processo chimico. Questa conversione dell'informazione in una modificazione chimica, la trasduzione del segnale, è una proprietà universale delle cellule viventi.

Le modalità di trasduzione del segnale dipendono principalmente dalla **presenza** e dal **tipo di recettore** sulla membrana plasmatica o all'interno della cellula: a seconda del recettore infatti corrisponde una diversa via di trasduzione del segnale che modula lo stato funzionale della cellula in risposta all'ormone. Per esempio, il *glucagone* nel fegato attiva la glicogenolisi e gluconeogenesi (metabolismo glucidico) mentre nel tessuto adiposo determina una risposta lipolitica.

I sistemi di trasduzione del segnale presentano tali caratteristiche:

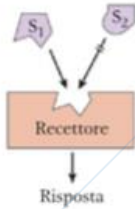
1. **Elevata specificità:** le vie di trasduzione si attivano solo in seguito alla formazione del complesso ormone-recettore e quindi la specificità deriva dall'esatta complementarietà geometrica e chimica tra le molecole segnale e i recettori.
2. **Elevata sensibilità:** il legame tra un singolo ormone e un recettore è in grado di scatenare la modulazione dello stato funzionale della cellula. Questa sensibilità dipende dal fatto che piccole variazioni di concentrazione di ormone a livello ematico:
  - sono sufficienti perché questo si legni al recettore
  - sono in grado di amplificare a cascata il segnale all'interno delle cellule (come visto per il sistema neuroendocrino). L'affinità tra il segnale e il suo recettore può essere espressa dalla costante di dissociazione  $K_d$ , molto spesso con valori intorno a  $10^{-10}$  M o anche meno; ciò significa che il recettore può identificare le molecole di segnalazione anche a concentrazioni picomolari.
3. **Cooperatività:** cooperatività nelle interazioni ligando-recettore che determina una grande variazione nello stato di attivazione del recettore in risposta a una piccola variazione di concentrazione del ligando (si ricordi l'effetto della cooperatività dell'ossigeno all'emoglobina).
4. **Amplificazione:** l'amplificazione inizia con l'attivazione di un singolo enzima associato al recettore del segnale, che a sua volta catalizza l'attivazione di molte molecole di un secondo enzima, ognuna delle quali determina poi l'attivazione di un terzo enzima e così via, in quella che viene chiamata una *cascata enzimatica*. Con queste cascate si possono ottenere amplificazioni di diversi ordini di grandezza in pochi millisecondi.
5. **Modularità:** è essenziale, nella trasduzione del segnale, la partecipazione di molecole con domini in grado di reagire con più proteine partner e quindi la formazione di complessi multiproteici e multifunzionali. Tra queste proteine polivalenti, alcune sono definite *scaffold* e hanno capacità di legarsi a specifiche molecole proteiche e localizzare la risposta della cellula in uno specifico compartimento. Queste proteine contribuiscono alla specificità della risposta cellulare a uno stimolo extracellulare;
6. **Desensibilizzazione:** le vie di trasduzione possono essere inattivate grazie all'attivazione di processi di desensibilizzazione. La modulazione dello stato funzionale da parte di un qualunque messaggero cellulare deve essere una modulazione che porta ad un cambiamento dello stato funzionale che deve durare per un tempo relativamente breve e poi ritornare nel suo stato basale. Se un segnale extracellulare, come la concentrazione di un ormone, permane elevata rispetto a quello che è il livello basale per un tempo lungo, il complesso ormone-recettore e quindi la trasduzione del segnale, permane a lungo. Questo provocherebbe un'alterazione della funzionalità della cellula.  
In questo caso si attivano quindi dei meccanismi di desensibilizzazione del recettore per bloccare la continua modulazione dello stato funzionale. Il ritorno rapido allo stato basale è essenziale perché permette alla cellula di ricevere altri stimoli e di rispondere modulando il proprio stato funzionale ad altri stimoli esterni ed interni recepiti dall'organismo.
7. **Integrazione:** la modulazione dello stato funzionale di una cellula è il risultato dell'integrazione di più segnali.

I sistemi di trasduzione del segnale si differenziano primariamente per l'innescò del segnale, ovvero per la fase iniziale della trasduzione del segnale.

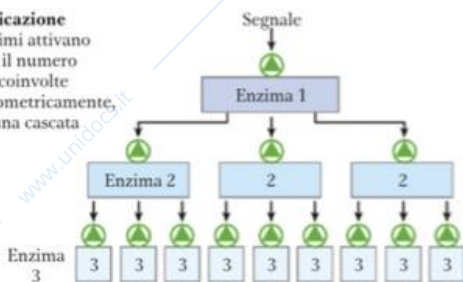
La trasduzione di un segnale si realizza sempre attraverso la formazione di un complesso ormone - recettore (HR) che porta all'attivazione del recettore. Questo si riflette sulla produzione di un secondo segnale/messaggero (oppure vi è una modulazione dei livelli) che porterà alla modificazione dell'attività di una proteina intracellulare, la quale può essere:

- **bersaglio** (artefice della risposta funzionale del tessuto): in molti meccanismi ha un'attività enzimatica, ma non necessariamente;
- **non bersaglio**: qualora il secondo messaggero vada a modulare i livelli di una proteina che non è la proteina bersaglio la modulazione dell'attività di questa proteina si riflette in una modulazione dei livelli di quella che è di fatto la proteina bersaglio finale.

(a) **Specificità**  
Alcune molecole segnale si legano a un sito complementare sul recettore; altre non possono invece adattarsi al sito.



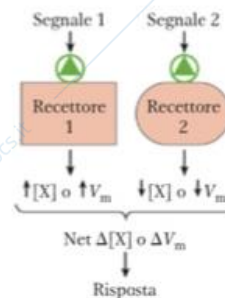
(b) **Amplificazione**  
Quando enzimi attivano altri enzimi, il numero di molecole coinvolte aumenta geometricamente, generando una cascata enzimatica.



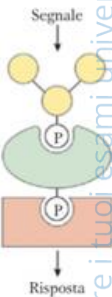
(d) **Desensibilizzazione/adattamento**  
L'attivazione del recettore innesca un circuito retroattivo che spegne il recettore o lo rimuove dalla superficie cellulare.



(e) **Integrazione**  
Quando due segnali hanno effetti opposti sulla stessa caratteristica metabolica, come la concentrazione di un secondo messaggero X o il potenziale di membrana  $V_m$ , la regolazione finale è il risultato di un segnale integrato proveniente da entrambi i recettori.



(c) **Modularità**  
Le proteine con affinità polivalenti formano diversi complessi di segnalazione a partire da moduli tra loro intercambiabili.



## TIPOLOGIE DI RECETTORI

Le vie di trasduzione del segnale sono differenti dipendentemente dal tipo di recettore. Esistono diverse classi di recettori:

1) Recettori accoppiati a **proteine G**. Sono recettori di membrana in grado di trasferire il messaggio extracellulare all'interno della cellula grazie all'azione combinata con una proteina G. Il legame di un ligando al recettore comporta l'attivazione della proteina G, che a sua volta porta all'attivazione di un enzima localizzato sempre a livello della membrana plasmatica. Quest'ultima attivazione porta all'incremento della concentrazione intracellulare del secondo messaggero.

2) Recettori che presentano un'attività **enzimatica** a livello del dominio citosolico

a) Recettori con attività tirosina chinasi.

L'attivazione del dominio tirosin chinasi a seguito del legame con il ligando, porta ad una cascata chinasi, che promuove una risposta funzionale:

- modulando l'attività di specifiche molecole proteiche ed enzimatiche
- in certi casi, può promuovere la trascrizione di geni nucleari, attraverso la fosforilazione di una proteina specifica, e quindi modulare i livelli di specifiche molecole proteiche. Questa modulazione dei livelli porta all'attivazione di specifici processi biologici come la proliferazione. Esempio: Insulina, porta ad un segnale di tipo proliferativo.

b) Recettori con attività guanilato ciclasica, che trasducono il segnale attraverso un incremento della concentrazione di GMP ciclico, il secondo messaggero di questa via di trasduzione. La cGMP attiva una protein chinasi citosolica, che fosforila proteine endocellulari, modulandone l'attività.

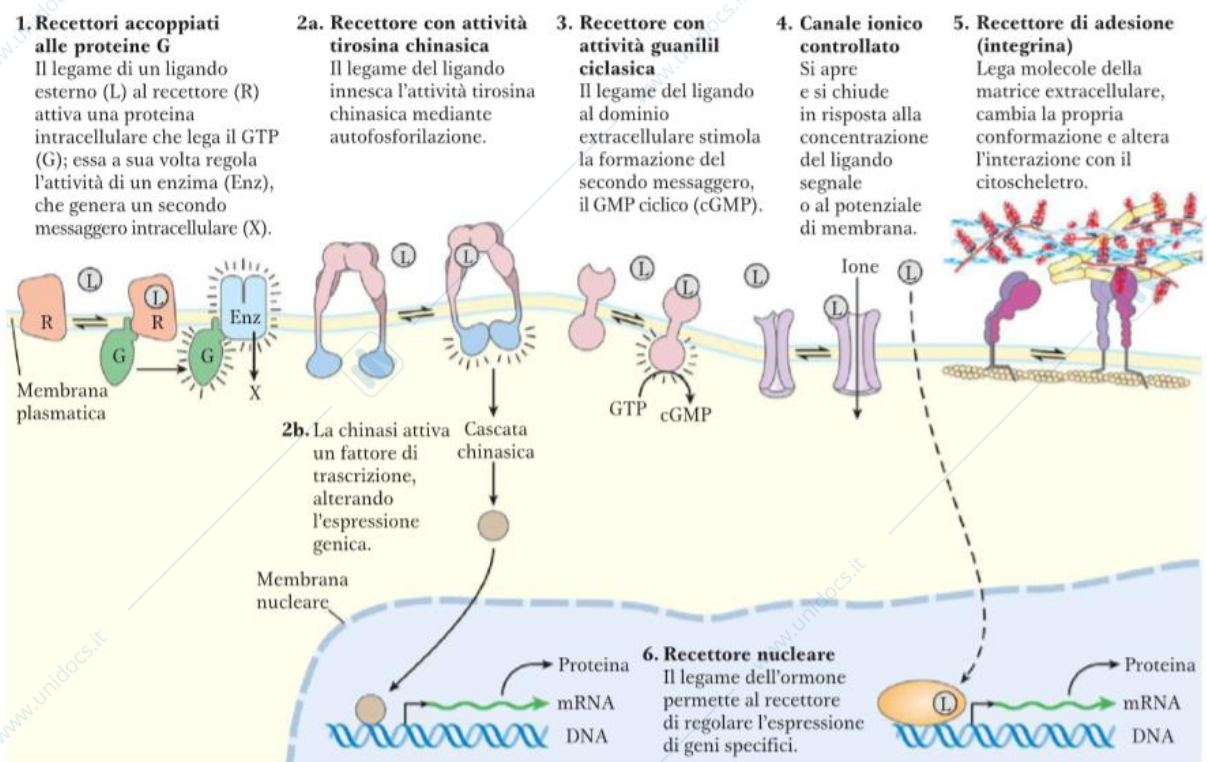
**3) Recettori canale.** I recettori canale della membrana plasmatica si aprono e si chiudono in risposta al legame di un ligando o a variazioni di potenziale transmembrana. Il canale ionico dell'acetilcolina è un esempio di canale ionico controllato. Questi sono coinvolti nella propagazione del segnale nervoso.

**4) Recettore di adesione.** Recettori che hanno un ruolo importante nei processi di adesione alla matrice extracellulare e di interazioni tra cellule (nei processi di coagulazione e nella risposta cellulo-mediata del sistema immunitario).

### 5) Recettori intracellulari

Mediano il segnale portato da ormoni quali: ormoni steroidei, tiroidei, la vitamina D e l'acido retinoico

- Recettori a priori citosolici
- Recettori localizzati a livello nucleare. Si legano a specifici ligandi e alterano la velocità con cui geni specifici vengono trascritti e tradotti in proteine cellulari.



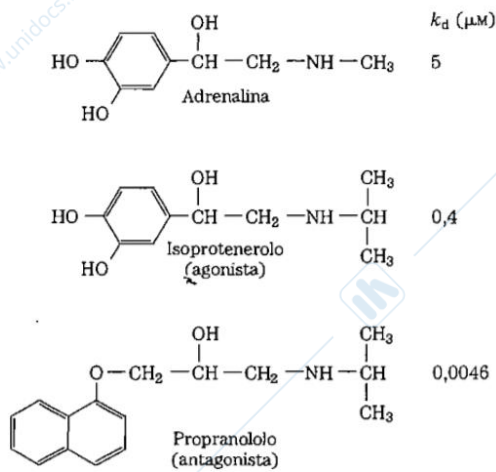
### RECETTORI ACCOPPIATI A PROTEINE G (GPCR)

I recettori accoppiati alle proteine G sono recettori strettamente associati a un membro della famiglia della proteina che lega i nucleotidi guanosilici.

**Struttura del recettore.** I GPCR sono proteine integrali di membrana, con sette regioni idrofobiche di 20-28 residui amminoacidici che attraversano 7 volte la membrana: hanno tutti una struttura caratteristica definita "a serpentina".

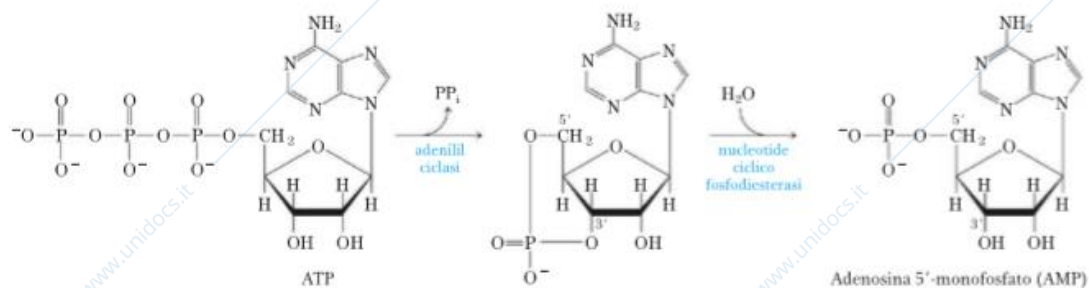
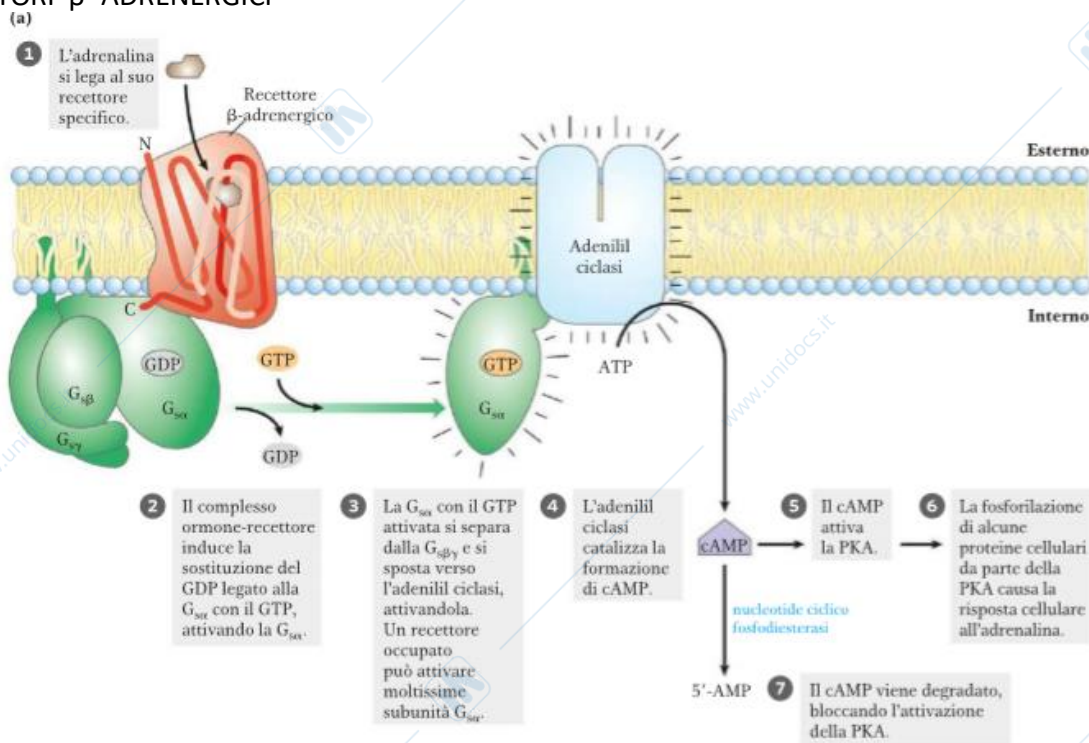
**INNESCO.** La trasduzione del segnale tramite i GPCR ha tre componenti essenziali: un recettore localizzato sulla membrana plasmatica provvisto di sette eliche transmembrana, una proteina G che passa ciclicamente dalla forma attiva (con il GTP legato) alla forma inattiva (con il GDP legato) e un enzima effettore.

Una volta stimolata dal recettore attivato, la proteina G scambia il suo GDP con GTP, si dissocia dal recettore e si lega a una proteina enzimatica effettore localizzata nelle vicinanze, modulandone l'attività. L'enzima attivato genera quindi un secondo messaggero intracellulare, che a sua volta andrà a influenzare bersagli a valle.



**Struttura della G.** La proteina G è eterotrimerica, quindi composta da tre diverse subunità proteiche:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Questo tipo di proteine è quindi conosciuto come proteina G trimerica. La subunità che lega il GDP o il GTP e che trasmette il segnale dal recettore attivato alla proteina effettrice è la subunità  $\alpha$ . La proteina G è ancorata alla membrana tramite due ancore: l'ancoraggio è mediato da molecole di acido palmitico a cui la proteina G si lega tramite legame tioestere, tra gruppo sulfidrilico di un residuo cisteinico e il gruppo carbossilico dell'acido palmitico.

### RECCETTORI $\beta$ -ADRENERGICI



**Definizione.** L'adrenalina dà il segnale d'allarme quando, di fronte a un pericolo, l'organismo mette in moto i propri sistemi che generano energia; essa segnala la condizione di 'combatti o fuggi'. La sua azione ha inizio quando si lega a un recettore proteico della membrana plasmatica di una cellula sensibile all'adrenalina, presentante i recettori adrenergici.

**Tipologie.** I recettori adrenergici sono di quattro tipo -  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , e in  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (ma esiste anche  $\beta 3$ , nel tessuto adiposo) – definiti sulla base dell'affinità per molecole sintetiche che sono agoniste o antagoniste dell'adrenalina stessa. Gli agonisti sono analoghi strutturali che si legano ai recettori e simulano gli effetti del ligando naturale. Gli antagonisti sono analoghi che si legano ai recettori senza provocare alcun effetto, quindi bloccano l'effetto degli agonisti, ivi inclusi quelli del ligando naturale. Si distinguono in recettori  $\alpha$ -adrenergici e in  $\beta$ -adrenergici dipendentemente dai meccanismi attraverso cui si realizza la trasduzione del segnale.

**Collocazione.** Li troviamo a livello del muscolo **cardiaco**, della muscolatura **liscia dei vasi**, a livello del **fegato** e del tessuto **adiposo**.

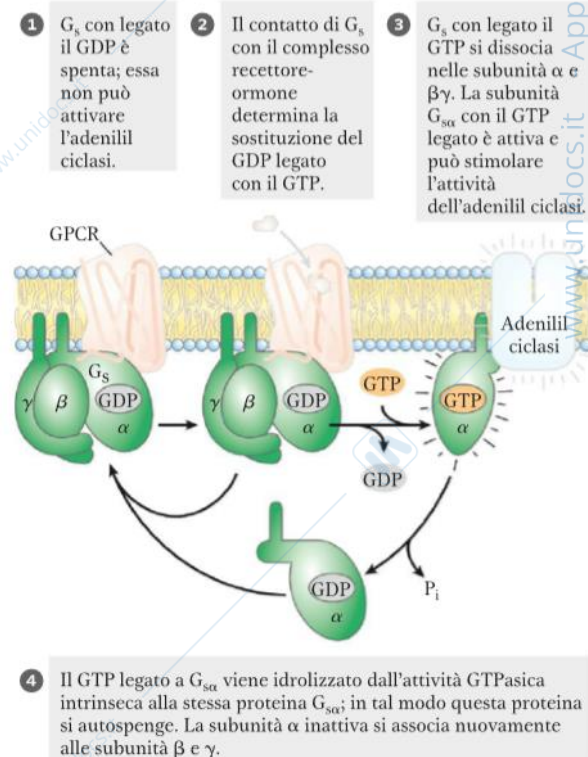
### Trasduzione.

1. Il legame dell'adrenalina al recettore  $\beta$ -adrenergico promuove un cambiamento conformazionale nel dominio intracellulare che si ripercuote sulla proteina G associata, favorendo la dissociazione del GDP e il legame del GTP. Questo cambiamento conformazionale viene trasmesso dalla porzione carbossi-terminale del recettore alla subunità  $\alpha$  della proteina G, che promuove il rilascio di GDP (tramite una riduzione di affinità per GDP) e determina il legame con GTP alla subunità  $\alpha$ .

2. La subunità che lega il GDP o il GTP e che trasmette il segnale dal recettore attivato alla proteina effettrice è la subunità  $\alpha$ . Quando la proteina G attiva il suo effettrice, viene chiamata proteina G stimolatoria  $G_s$ .

Funziona come un interruttore biologico: quando il sito di legame del nucleotide della  $G_s$  è occupato dal GTP, la  $G_s$  viene attivata, e a sua volta la sua proteina effettrice; quando invece il sito è occupato dal GDP, la  $G_s$  è disattivata.

3. Nella forma attivata, le subunità  $\beta$  e  $\gamma$  della  $G_s$  si dissociano dalla subunità  $\alpha$  sotto forma di dimeri  $\beta\gamma$ , e la  $G_{s\alpha}$ , con il GTP legato, si sposta lungo il piano della membrana dal recettore fino a una molecola vicina di adenilato ciclasi. La  $G_{s\alpha}$  viene mantenuta legata alla membrana da un gruppo palmitilico legato covalentemente. 4 La  $G_{s\alpha}$  interagisce con l'adenilato ciclasi, inducendo un cambiamento conformazionale sull'enzima, che ne incrementa l'attività. L'adenilato ciclasi catalizza la conversione dell'ATP in adenosina 3',5' – monofosfato, con liberazione di pirofosfato. La reazione vede un attacco nucleofilo da parte dell'ossigeno ossidrilico legato al carbonio in posizione 3 dell'ATP sull'atomo di fosforo del gruppo fosforico in posizione  $\alpha$  dell'ATP; questo porta alla ciclizzazione tramite un legame fosfodiesterico. → Conseguentemente aumentano i livelli di AMP ciclico, il secondo messaggero di questa via di trasduzione del segnale.



5. L'interazione tra la  $G_{s\alpha}$  e l'adenilil ciclasi è possibile solo se la  $G_{s\alpha}$  è legata a GTP. La stimolazione da parte della  $G_{s\alpha}$  è limitata nel tempo; *la  $G_{s\alpha}$  ha anche attività intrinseca GTPasica che inattiva se stessa*, convertendo il GTP legato in GDP. La  $G_{s\alpha}$  ora inattiva si dissocia dall'adenilil ciclasi, rendendo la ciclasi inattiva. La  $G_{s\alpha}$  si riassocia con il dimero  $\beta\gamma$  e la  $G_s$  inattiva è di nuovo disponibile per interagire con un recettore legato all'ormone.

6. La modulazione dello stato funzionale di una cellula in risposta al segnale adrenalinico avviene conseguentemente all'attivazione, da parte dell'AMP ciclico, di una proteina chinasi AMPciclico-dipendente PKA.

→ La PKA catalizza la fosforilazione di specifici residui di Ser o Thr presenti sulle proteine bersaglio. Il sito di legame dell'ATP di ogni subunità catalitica posiziona perfettamente l'ATP per il trasferimento del suo gruppo fosforico terminale  $\gamma$  al gruppo -OH presente sulla catena laterale di un residuo di Ser o Thr.

Esempi di proteine bersaglio:

- enzima bifunzionale (nell'epatocita): regola contestualmente glicolisi e gluconeogenesi, e in condizioni di ipoglicemia viene fosforilato a seguito dell'attivazione di una proteina chinasi A.

- perilipina (nell'adipocita): proteina presente sulla superficie delle gocce lipidiche, in seguito al segnale adrenalinico, viene fosforilata dalla proteina chinasi A e va quindi incontro a cambiamenti conformazionali che consentono alle lipasi di andare a degradare i triacilgliceroli. La proteina chinasi A va a fosforilare anche la lipasi ormone-sensibile, incrementandone l'attività catalitica. Aumenta quindi la lipolisi.

La modulazione dello stato funzionale è il risultato della modificazione covalente (fosforilazione) di proteine bersaglio.

## 7 PKA.

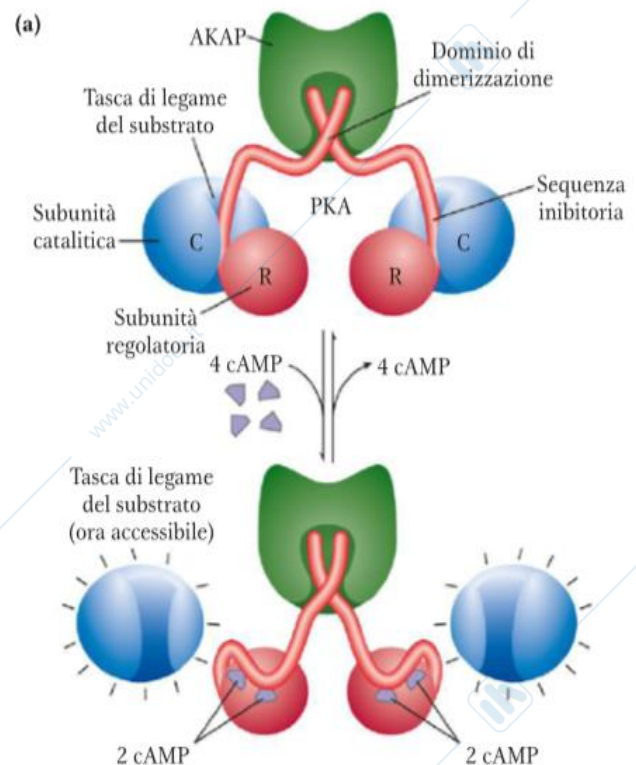
**Struttura:** la forma inattiva della PKA contiene due subunità catalitiche identiche C e due subunità regolatrici identiche R. Il complesso tetramerico  $R_2C_2$  è cataliticamente inattivo, in quanto un dominio di autoinibizione di ciascuna subunità R occupa il sito di legame del substrato di ciascuna delle due subunità C.

**cAMP:** Quando il cAMP, come effettore allosterico, si lega alle subunità R, queste vanno incontro a una modificazione conformazionale che sposta il dominio autoinibitore di R fuori dal dominio catalitico C: il complesso  $R_2C_2$  si dissocia, liberando le due subunità C ora attive. La struttura del sito che lega il substrato della PKA è il prototipo per tutte le altre proteine chinasi conosciute. Ora la subunità catalitica è in grado di legare il suo substrato.

Il meccanismo allosterico, per cui la PKA viene attivata dal legame dell'AMPc, viene definito **meccanismo dello spiazzamento** del dominio auto-inibitore.

**Sequenza consenso.** La struttura del sito che lega il substrato della PKA è il prototipo per tutte le altre proteina chinasi conosciute. Alcuni residui nel sito attivo sono identici nei siti attivi delle oltre 1000 proteina chinasi conosciute. Il sito di legame dell'ATP di ogni subunità catalitica posiziona perfettamente l'ATP per il trasferimento del suo gruppo fosforico terminale  $\gamma$  al gruppo -OH presente sulla catena laterale di un residuo di Ser o Thr.

- La PKA regola molti enzimi a valle della via di segnalazione. Anche se i bersagli a valle hanno diverse funzioni, essi hanno in comune una sequenza vicino al residuo di Ser o Thr che viene fosforilato, sequenza che li rende suscettibili di regolazione da parte della PKA. Il sito attivo della PKA riconosce queste sequenze e ne fosforila i residui di Serina o Treonina. Il confronto delle sequenze di diverse proteine substrato della



PKA ha condotto alla definizione di **sequenza consenso**, cioè della collocazione dei residui che hanno la funzione di marcare la serina o la treonina che devono essere fosforilate.

**PROTEINE G: INTERRUITORI BINARI IN CONDIZIONI NORMALI E PATOLOGICI.** (inserisci foto pag 456)

Le proteine G sono una classe di molecole proteiche che hanno la capacità di legare nucleotidi guanosinici, GDP e GTP, in una vasta gamma di processi cellulari.

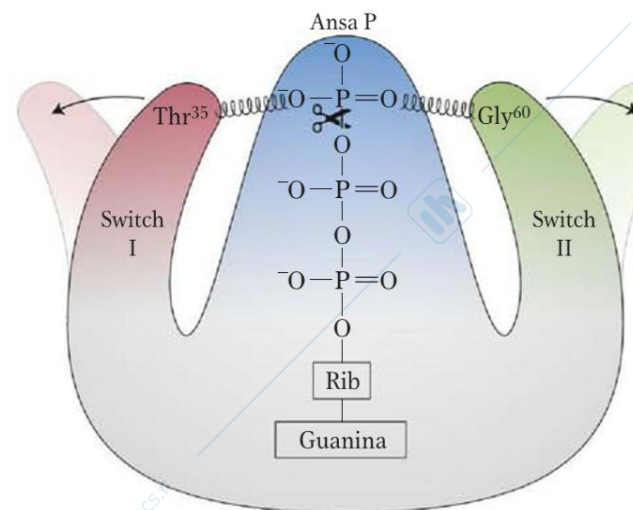
Temporizzatore. Le proteine G hanno tutte un temporizzatore interno: un sistema di disattivazione. Tutte le proteine G hanno la stessa struttura centrale e usano uno stesso meccanismo per passare da una forma inattiva, favorita dal legame al GDP, a una forma attiva, favorita dal legame al GTP.

Il temporizzatore è dato dalla presenza di un dominio con attività GTPasica sulla subunità  $\alpha$ . A seguito dell'attivazione, questa subunità idrolizza GTP a GDP, con il rilascio di fosfato inorganico.

Useremo la proteina Ras come *prototipo* di tutte le proteine di questa superfamiglia.

Switch. Nella conformazione che assume quando il GTP è legato, la proteina G espone regioni prima nascoste, chiamate **interruttore I e interruttore II** (switch I e switch II), che interagiscono con proteine a valle nella via di segnalazione, fino a che la proteina G inattiva se stessa, idrolizzando il GTP a GDP.

Ansa P. Il residuo più importante, che determina la conformazione della proteina G, è il fosfato  $\gamma$  del GTP, che interagisce con una regione denominata ansa P. Nella proteina Ras, il fosfato  $\gamma$  del GTP si lega a un residuo di Lys nell'ansa P e a due residui essenziali, la Thr<sup>35</sup> nel switch I e la Gly<sup>60</sup> nel switch II che formano legami idrogeno con gli ossigeni del fosfato  $\gamma$  del GTP. Questi legami idrogeno agiscono come due molle, che mantengono la proteina nella sua conformazione attiva.



Cambio conformazionale. L'idrolisi di GTP in GDP causa un cambiamento conformazionale: i legami idrogeno si rompono, la proteina si rilassa e assume la sua conformazione inattiva, nascondendo i siti che nella sua forma attiva interagivano con altri partner. Il cambio conformazionale induce la dissociazione della subunità  $\alpha$  dalla proteina effettore e conseguentemente lo spegnimento della via di trasduzione del segnale. L'Ala<sup>146</sup> forma legami idrogeno con gli ossigeni della guanina, permettendo al GTP, non all'ATP di legarsi.

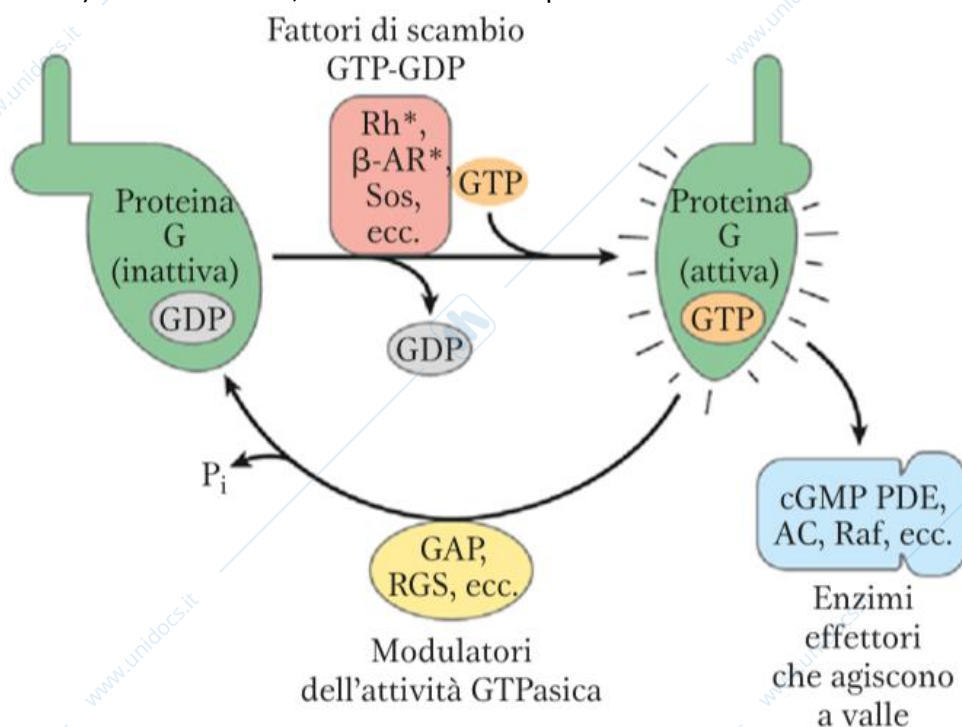
Le proteine G sono quindi dei veri e propri interruttori biologici: vengono attivate dal legame del ligando al recettore ma dopo un certo tempo vanno incontro a spegnimento automatico dovuto alla loro attività GTPasica.

Le proteine G si differenziano per:

- la localizzazione a livello intracellulare
- il numero di subunità: a volte una singola subunità, come la proteina RAS, altre da più subunità, come la proteina G trimerica
- per la funzione che svolgono: proteine G trimeriche coinvolte nella segnalazione adrenergica, piccole proteine G come quella coinvolta nella segnalazione insulinica (Ras), nel traffico di vescicole (ARF e Rab), nel trasporto nel nucleo e fuori dal nucleo (Ran), nel timing del ciclo cellulare (Rho), nella sintesi proteica (IF2, EF-Tu ed EF-G).

L'equilibrio tra forma attiva e inattiva è regolato e controllato da due famiglie di molecole proteiche:

- 1) GAP (GTPase activating protein = proteine attivatrici della GTPasi): sono in grado di incrementare l'attività GTPasica e quindi promuovono lo spegnimento della trasduzione del segnale. Nel caso delle proteine G trimeriche si parla di RGS (regolatori delle proteine G segnale), ma agiscono con lo stesso meccanismo:
  - interagiscono con la proteina G attivata (legata a GTP) e portano quindi un loro residuo di arginina in prossimità del gruppo fosforico in posizione  $\gamma$  del GTP. La carica positiva dell'arginina interagisce con le cariche negative degli ossigeni del gruppo fosforico. Questo provoca una maggior tendenza degli atomi di ossigeno ad attrarre su di sé gli elettroni di legame ed aumenta quindi il carattere elettrofilo dell'atomo di fosforo in posizione  $\gamma$ , promuovendo l'attacco nucleofilo dell'ossigeno della molecola d'acqua (cioè l'idrolisi del legame fosfoanidridico tra gruppo fosforico in posizione  $\gamma$  e quello in posizione  $\beta$ ).
- 2) GEF (guanosine nucleotides exchanging factors = fattori di scambio dei nucleotidi guanosilici): promuovono lo scambio tra GDP e GTP a livello della proteina G, e quindi la transizione dalla forma inattiva alla forma attiva. Fattori di scambio GEF possono essere:
  - a) Recettori di membrana accoppiati a proteine G: il cambiamento conformazionale a seguito del legame ligando-recettore viene trasferito a livello della proteina G e promuove il rilascio di GDP e il legame di GTP
    - Recettori  $\beta$ -adrenergici
    - Rodopsina: recettore canale che, una volta recepito lo stimolo luminoso, promuove direttamente l'attivazione di una proteina G, detta **trasducina**, che va ad agire su un enzima di membrana (fosfodiesterasi specifica per il nucleotide GMP ciclico). Questa fosfodiesterasi idrolizza il legame tra gruppo fosforico e carbonio in posizione 3, riformando quindi il nucleotide 5'-monofosfato. L'abbassamento della concentrazione di GMP ciclico (secondo messaggero) determina la chiusura dei canali cGMP-dipendenti che trasportano passivamente all'interno della cellula  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo porta ad un'iperpolarizzazione della membrana, che innesca la trasmissione dell'impulso nervoso sino al cervello.
  - b) Fattori solubili, non di membrana: proteine Sos



## PATOLOGIE LEGATE ALLE PROTEINE G

Molte patologie sono causate da alterazioni della struttura e della funzione delle proteine G.

1. Il 25% dei tumori umani è associato ad una proteina Ras mutata: mutazioni puntiformi che colpiscono il gene che codifica per il dominio GTPasico ne impediscono l'attività regolare, di norma affligge uno dei residui cruciali intorno al sito di legame del GTP nell'ansa P. La mutazione implica che la proteina rimanga sempre complessata con il GTP nella forma attiva e promuova una proliferazione incontrollata delle cellule e la crescita del tumore.

2. Una situazione simile si realizza a causa di mutazioni nel gene NF1, che codifica per una proteina GAP di Ras, aumentandone la sua attività GTPasica. Le mutazioni inattivano la GAP e poiché l'attività GTPasica basale di Ras è molto bassa, Ras rimane attiva a lungo determinando uno stimolo proliferativo.

3. Anche le proteine G eterotrimeriche difettose possono provocare malattie. Una mutazione del gene che codifica la subunità  $\alpha$  della  $G_s$  (che media le variazioni di [cAMP] in risposta a stimoli ormonali) può produrre una  $G_\alpha$  permanentemente attiva o permanentemente inattiva.

- Attivazione: mutazioni che conducono ad attivazione generalmente avvengono in residui cruciali per l'attività GTPasica e conducono ad un aumento permanente di [cAMP], con conseguenze significative a valle, ivi inclusa una abnorme proliferazione cellulare. Per esempio, tali mutazioni si trovano in circa il 40% dei tumori dell'ipofisi (adenomi).

- Disattivazione: i soggetti con una mutazione 'inattivante' in  $G_\alpha$  non rispondono agli ormoni (come l'ormone tiroideo) che agiscono attraverso il cAMP. Le mutazioni nel gene per la subunità  $\alpha$  della trasducina ( $T_\alpha$ ), che è coinvolto nel processo di segnalazione della vista, portano a un tipo di cecità notturna, apparentemente dovuta all'interazione tra la subunità  $T_\alpha$  e la fosfodiesterasi dei bastoncelli del segmento esterno

Patogenesi del Colera. Anche nel caso della patogenesi del colera troviamo coinvolte le proteine G.

1. Il batterio *Vibrio Cholerae* infetta l'intestino rilasciando la tossina del colera, proteina esamerica con 5 subunità di tipo B e 1 subunità di tipo A.

2. Le subunità B riconoscono e si legano ad un ganglioside specifico (recettore glicolipidico) sulla superficie esterna della membrana delle cellule epiteliali intestinali consentendo l'internalizzazione del polipeptide della subunità A, probabilmente attraverso endosomi.

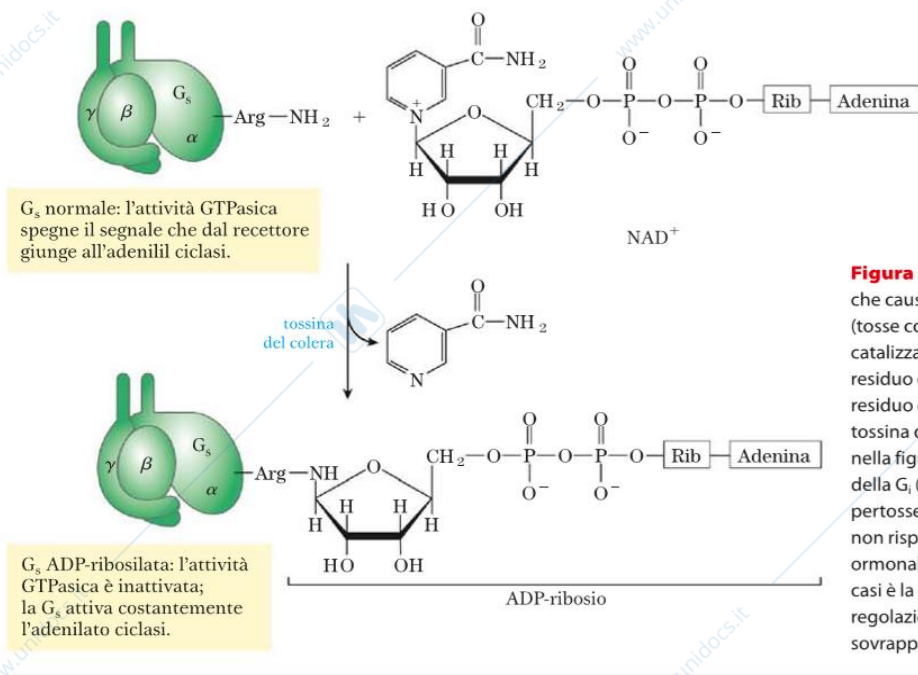
3. Una volta che la subunità A è entrata nel citosol, va incontro a proteolisi in A1 e A2, di cui il peptide attivo è l'A1.

4. A1 si associa con una piccola proteina G solubile in forma attiva (con legato il GTP), ARF6, e questa associazione attiva A1 che catalizza il trasferimento di ADP-ribosio da NAD<sup>+</sup> ad un residuo di arginina della subunità  $\alpha$  di una proteina G eterotrimerica, modificandola quindi covalentemente e bloccandone l'attività GTPasica.

5. Lo stato di permanente attività della proteina G e dell'adenilato ciclastasi portano ad alti livelli di AMPc e a uno stato di attivazione permanente della PKA, che fosforila il canale CFTR del Cl<sup>-</sup> e lo scambiatore Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>. Il conseguente efflusso di NaCl provoca una massiva perdita di acqua attraverso l'intestino come risposta allo squilibrio osmotico. La disidratazione e la perdita di elettroliti che caratterizzano la patologia del colera possono essere fatali se il paziente non viene prontamente reidratato.

Tossina della pertosse. La tossina della pertosse, prodotta da *Bordetella pertussis*, catalizza l'ADP-ribosilazione della subunità  $\alpha$  della  $G_i$ , impedendo in questo caso lo scambio GDP-GTP e bloccando l'inibizione dell'adenilato ciclastasi da parte della  $G_i$ .

Il batterio infetta le vie respiratorie, dove distrugge le cellule epiteliali ciliate che servono a eliminare il muco. Senza l'azione delle ciglia, solo una forte tosse può permettere di eliminare i batteri.



**Figura 5** Le tossine batteriche che causano il colera e la pertosse (tosse convulsa) sono enzimi che catalizzano il trasferimento del residuo di ADP-ribosio del NAD<sup>+</sup> a un residuo di Arg della G<sub>s</sub> (nel caso della tossina del colera, come mostrato nella figura) o a un residuo di Cys della G<sub>i</sub> (nel caso della tossina della pertosse). Le proteine G modificate non rispondono più ai normali stimoli ormonali. La patologia in entrambi i casi è la conseguenza di una difettosa regolazione dell'adenilil ciclasi e della sovrapproduzione di cAMP.

### AMPLIFICAZIONE DEL SEGNALE

**Amplificazione.** Affinchè le vie di segnalazione possano portare alla modulazione dello stato funzionale di una cellula, il segnale extracellulare viene amplificato. Questa amplificazione è caratteristica di tutte le vie di trasduzione del segnale e in molti casi è dovuta alla partecipazione di proteine.

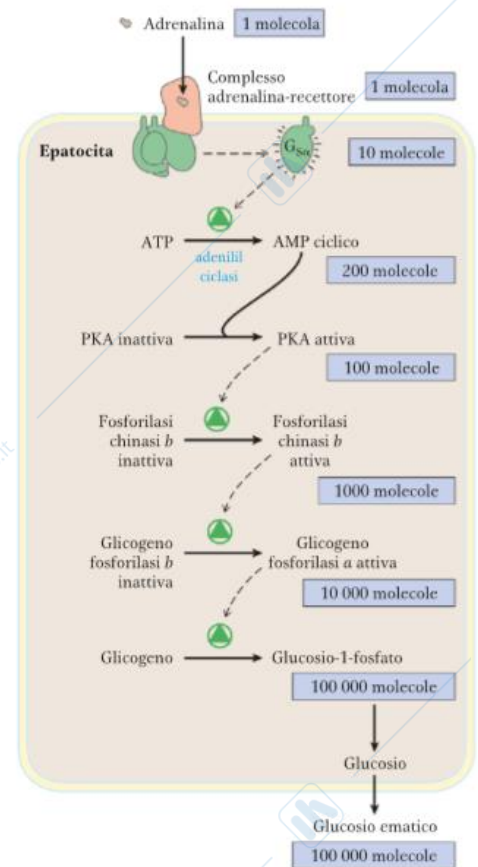
**Meccanismo.** Una singola molecola di ormone attiva una decina di molecole (sono numeri molto ipotetici) di proteine G attivate in grado a loro volta di attivare l'adenilato ciclasi. L'attivazione di quest'ultima incrementa ulteriormente le molecole che partecipano alla via di trasduzione del segnale perché anche solo 10 molecole di adenilato ciclasi attivato portano ad un aumento di 20 volte delle molecole di AMPc. Infatti l'adenilato ciclasi è un enzima e l'attivazione di ognuna di questa molecole è in grado di attivare n molecole di AMPc.

L'AMP ciclico va ad attivare la PKA e in questo caso non si ha un aumento del numero di molecole che partecipano alla via di trasduzione del segnale poiché ci vogliono 2 molecole di AMPc per attivare una sola PKA. Quindi a questo livello non vi è amplificazione del segnale.

La PKA attivata promuove l'attivazione della fosforilasi chinasi b e ogni molecola di PKA attiverà decine di molecole di fosforilasi chinasi b poiché quest'ultima è substrato dell'enzima PKA. Questa tappa rappresenta un'ulteriore amplificazione del segnale.

L'ultima tappa di amplificazione consiste nell'attivazione della glicogeno fosforilasi b che catalizza il processo di glicogenolisi convertendo il glicogeno in centinaia di migliaia di molecole di glucosio 1-fosfato, a sua volta poi convertito in glucosio 6-fosfato e infine in glucosio che verrà rilasciato nel torrente ematico.

→ il meccanismo attraverso cui si realizza la trasduzione del segnale è un meccanismo a cascata che porta ad un'amplificazione del segnale perché a partire da un singolo segnale extracellulare vengono modificate un enorme numero di proteine bersaglio che sono le vere responsabili della risposta funzionale.



## TERMINAZIONE DELLA RISPOSTA DEL RECETTORE $\beta$ -ADRENERGICO.

Per essere utili, i sistemi di trasduzione del segnale devono *spegnersi* dopo che lo stimolo è terminato. I meccanismi che spengono il segnale sono intrinseci a tutti i sistemi di segnalazione.

Usiamo il sistema  $\beta$  adrenergico per illustrare i meccanismi.

**1.  $K_d$**  La diminuzione dei livelli dell'ormone stesso è il primo meccanismo di interruzione della trasduzione del segnale. Quando il rapporto tra ormone libero e recettore libero con complesso ormone-recettore diventa inferiore alla costante di dissociazione  $K_d$ , il sistema si sposta verso l'equilibrio e il complesso si scinde in ormone libero e recettore libero.

Non è necessariamente questo l'evento che cinematicamente promuove lo spegnimento del segnale. Il fatto che i meccanismi di spegnimento si realizzano con questa modalità o altre dipende dagli aspetti cinetici di questi processi, quindi quali di questi possibili meccanismi si realizza più velocemente. La velocità dipende dalla specificità del segnale e dalla via di trasduzione del segnale.

**2.  $G_\alpha$**  Un secondo meccanismo che pone fine alla risposta alla stimolazione del recettore  $\beta$  adrenergico è l'idrolisi del GTP legato alla subunità  $G_\alpha$ , catalizzata dalla attività GTPasica intrinseca della proteina G. La conversione del GTP legato in GDP favorisce il ritorno della subunità  $G_\alpha$  alla conformazione con cui può legarsi alle subunità  $G_{\beta\gamma}$ , incapace però di stimolare l'adenilato ciclasi. Questo determina la fine della produzione di cAMP, che porta ad una diminuzione dei livelli di PKA attivo. Poiché il PKA è una proteina chinasi che agisce fosforilando proteine bersaglio come diminuisce la sua attività l'equilibrio si sposta da forma fosforilata a forma defosforilata della proteina bersaglio e questo si traduce in uno spegnimento del segnale.

La velocità di inattivazione di  $G_s$  dipende dall'attività GTPasica, che è molto bassa nella  $G_\alpha$  libera. Però, le proteine attivatrici della GTPasi (GAP) stimolano molto questa attività idrolitica, accelerando l'inattivazione della proteina G. Anche le GAP possono essere regolate da alcuni fattori, generando così una modulazione molto efficace della risposta  $\beta$  adrenergica.

**3. Fosfodiesterasi.** Le variazioni della concentrazione di AMPc possono essere promosse dall'azione di **fosfodiesterasi dei nucleotidi ciclici** che scindono il legame estere tra gruppo fosforico e carbonio 3' dello zucchero. Le fosfodiesterasi idrolizzano il legame estere tra il carbonio 3' e il gruppo fosforico convertendo l'AMPc in 5'adenosina monofosfato (5'-AMP).

Quindi possono avere uno spegnimento del segnale per un'inattivazione della proteina G che si traduce in un abbassamento dei livelli di AMPc oppure perché nella cellula aumenta l'attività fosfodiesterasica rispetto all'attività dell'adenilato ciclasi.

**4. Pi/de-Pi.** L'equilibrio tra forma fosforilata e non fosforilata delle proteine bersaglio non dipende soltanto dallo stato di attivazione della PKA ma anche dall'azione delle fosfoproteine fosfatasi. L'equilibrio tra forma fosforilata e defosforilata può quindi essere spostato verso la forma defosforilata a seguito di

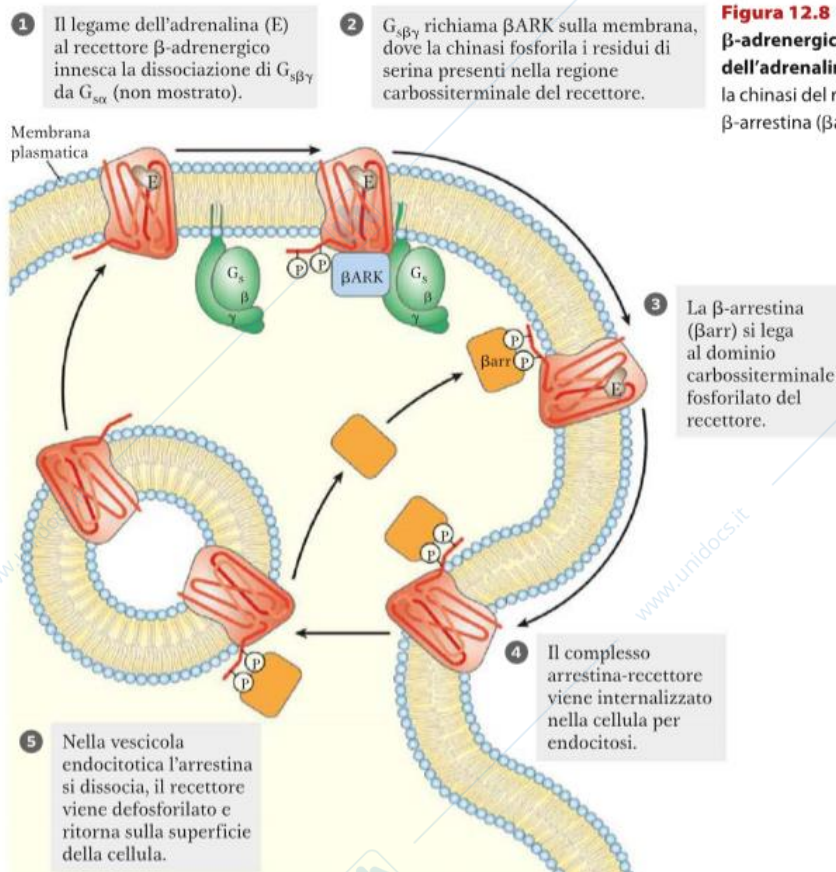
- Un'inattivazione della proteina chinasi A

- Un'attivazione delle fosfoproteine fosfatasi.

→ Le fosfoproteine fosfatasi idrolizzano i gruppi fosforici legati a residui di Ser, Thr o Tyr, rilasciando fosfato inorganico (Pi). Alcune di queste sono a loro volta regolate da altri meccanismi, come le fosfodiesterasi, e sono quelle responsabili dello spegnimento del segnale, mentre altre non vengono regolate.

Questi diversi meccanismi possono entrare in gioco dipendentemente dalle caratteristiche della via di regolazione e quando il segnale ormonale permane per un tempo limitato.

IL RECETTORE  $\beta$ -ADRENERGICO VIENE DESENSIBILIZZATO MEDIANTE FOSFORILAZIONE E ASSOCIAZIONE ALL'ARRESTINA.



**Figura 12.8** Desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico per effetto della presenza prolungata dell'adrenalina. Questo processo richiede due proteine: la chinasi del recettore  $\beta$ -adrenergico ( $\beta$ ARK) e la  $\beta$ -arrestina ( $\beta$ arr, nota anche come arrestina 2).

I meccanismi di spegnimento del segnale sopra descritti entrano in azione quando lo stimolo viene a mancare. Un meccanismo differenti, la **desensibilizzazione**, diminuisce l'intensità della risposta anche quando *il segnale perdura nel tempo*.

1. La **chinasi  $\beta$ -adrenergica** ( $\beta$ ARK), che fa parte della famiglia delle chinasi di recettori accoppiati a proteine G (GRK), catalizza la desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico attraverso la fosforilazione di **2 residui di Ser** del dominio citoplasmatico del recettore stesso. In particolare, vengono fosforilati 2 residui di Ser a livello dell'estremità carbossiterminale. Le  $\beta$ ARK sono normalmente localizzate nel citosol.

2. Le  $\beta$ ARK sono normalmente localizzate nel citosol ma possono essere richiamate da  $G_s\beta\gamma$  sulla membrana plasmatica: sono presenti recettori complessati con il proprio ormone associati alle 2 subunità restanti della proteina eterotrimerica  $G_s\beta\gamma$  e a  $\beta$ ARK.

-- Il complesso impedisce l'associazione di una proteina  $G_s$  eterotrimerica (con la subunità  $\alpha$ ), che potrebbe teoricamente essere attivata.

-- La fosforilazione di questi residui, inoltre, determina la formazione di un sito di legame a livello delle regioni carbossiterminali per la  **$\beta$ -arrestina** ( $\beta$ arr). L'ancoraggio della  $\beta$ -arrestina a questi residui **impedisce** di fatto l'associazione del recettore alla proteina **G**.

3. La formazione del complesso arrestina-recettore induce cambiamenti conformazionali nel recettore, determinando da un lato la **dissociazione** dell'ormone e dall'altro l'**invaginazione** della membrana e l'inclusione sottoforma di endosomi del complesso. Quest'ultimo effetto avviene contestualmente al richiamo da parte del complesso stesso di due proteine necessarie alla invaginazione della membrana: **clatrina** e **AP2**. In questo stato, i recettori sono *inaccessibili* all'adrenalina e, quindi, *inattivi*.

4. All'internalizzazione del recettore complessato con la  $\beta$ -arrestina seguono processi di *dissociazione della  $\beta$ -arrestina* e *defosforilazione della regione carbossiterminale del recettore*. Successivamente, il recettore, tramite esocitosi, viene riportato a livello della membrana plasmatica, pronto a ricevere nuovamente un eventuale stimolo di tipo catecolaminico.

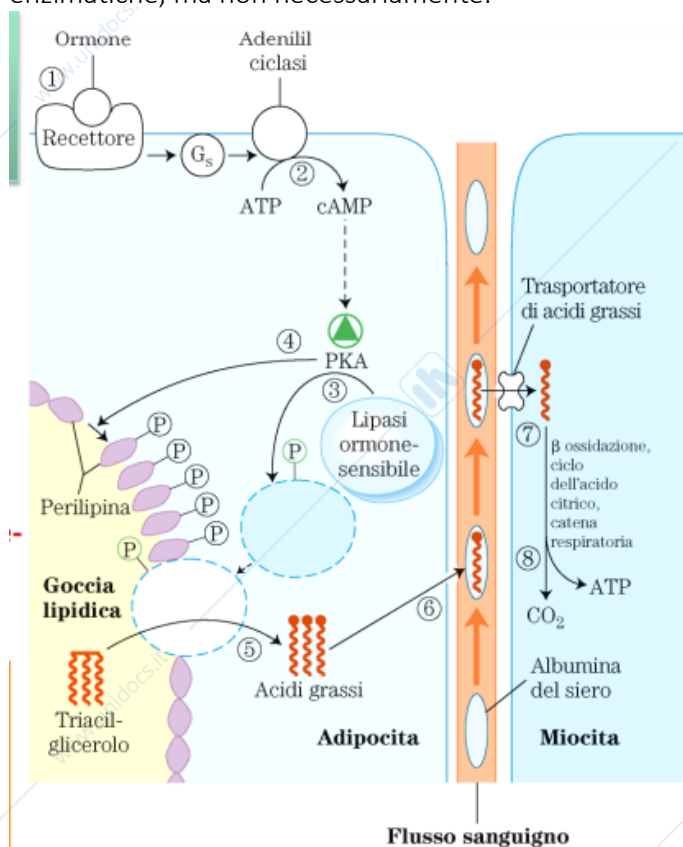
- Questo meccanismo permette, dunque, di **controllare il tempo di risposta** della cellula a un ormone che agisce mediante un recettore accoppiato a proteine G quando il segnale ormonale permane troppo a lungo nel tempo.

L'AMP CICLICO AGISCE DA SECONDO MESSAGGERO PER MOLTE MOLECOLE REGOLATRICI

Sono molti gli ormoni che agiscono variando la [cAMP].

1. **Adrenalina**: modula il metabolismo glucidico e ha 3 tessuti bersaglio: muscolo, fegato (regola la gluconeogenesi) e tessuto adiposo (modula la lipolisi).
2. **Glucagone**: agisce a livello epatico e del tessuto adiposo.
3. **ACTH**: stimola la corticale della ghiandola surrenale a produrre glucocorticoidi, mineralcorticoidi, steroidi.

L'adrenalina è quindi solo uno dei molti ormoni, fattori di crescita e altre molecole regolatrici che agiscono variando la [cAMP] intracellulare e quindi l'attività delle PKA. La risposta in questa via di trasduzione è sempre determinata dalla fosforilazione, da parte di una proteina chinasi A (**PKA**) attivata da un aumento della [cAMP] intracellulare, di proteine bersaglio, che nella maggior parte dei casi sono proteine enzimatiche, ma non necessariamente.



**Perilipina.** Un esempio di come la modulazione avvenga a livello di una proteina non enzimatica è rappresentato dal caso della **perilipina**.

A livello del tessuto adiposo, *adrenalina* e *glucagone* agiscono attraverso recettori associati alle proteine G, attivando l'adenilato ciclasi, che media l'aumento di concentrazione di AMPc. L'aumento di [cAMP] stimola l'attivazione delle PKA.

La PKA agisce primariamente a livello delle perilipine le quali formano uno strato attorno alle gocce lipidiche. Grazie alla fosforilazione di queste proteine succedono due eventi:

1. Il primo è la dissociazione di una subunità proteica dalla perilipina, che va ad associarsi a un enzima, il **TAG lipasi**, che può provvedere alla degradazione dei TAG a livello degli adipociti;
2. Contestualmente, la fosforilazione permette alla **lipasi ormone-sensibile** di attivarsi. La lipasi ormone-sensibile è una diacilglicerolo lipasi, che converte i diacilgliceroli, prodotti dal precedente evento lipolitico catalizzato dalla TAG lipasi, a monoacil gliceroli.

Questo è un esempio di come le PKA portino alla modulazione dello stato metabolico di un tessuto, non necessariamente attraverso la modificazione dello stato funzionale di un enzima indotta dalla sua fosforilazione, ma possono coinvolgere anche molecole proteiche di altra natura.

Una volta che gli acidi grassi son stati rilasciati, una quota viene immediatamente riconvertita in TAG a livello del tessuto adiposo, viene trasferita a livello ematico e questi interagiscono mediante l'instaurazione di legami deboli con i residui amminoacidici dell'albumina. Una volta complessati all'albumina, vengono trasportati tramite il flusso ematico a livello dei tessuti e utilizzati come combustibili in primis dal tessuto muscolare, scheletrico e cardiaco.

Proteina CREB. Non sempre però la risposta a ormoni come il glucagone e l'adrenalina si realizza in tempi brevi. Esiste anche la possibilità di una risposta in tempi più lunghi (ore, ma anche una intera giornata). In alcuni tipi di tessuto, la subunità catalitica della PKA entra a livello nucleare e fosforila una proteina detta **CREB** (proteina che lega gli elementi di risposta all'AMPc).

1. La fosforilazione attiva la proteina CREB, un fattore trascrizionale che si lega agli elementi di risposta all'AMPc e a quei geni che sono modulati a seguito della variazione dei livelli di AMPc nelle cellule, promuovendone l'espressione.

2. Questa promozione riguarda, per quanto concerne l'azione del glucagone negli epatociti, i geni che codificano per enzimi chiave regolatori del processo gluconeogenico. Ad esempio, ciò porta a una *over espressione* e a un incremento dei livelli cellulari di PEP-CK e di glucosio-6-fosfatasi.

→ Vi è una sinergia tra meccanismo di risposta a breve termine e a lungo termine:

1. *Breve*: la modificazione covalente per fosforilazione dell'enzima bifunzionale portano a una risposta immediata per quanto concerne la modulazione della gluconeogenesi.
2. *Lungo*: è coinvolta la PKA, che negli epatociti modifica una proteina nucleare, la quale, una volta fosforilata, modula la trascrizione di geni che codificano per enzimi che regolano il processo gluconeogenico.

La velocità di un processo dipende sia dallo stato funzionale di un enzima, che può essere modulato regolando i livelli di un effettore allosterico sia attraverso variazioni della concentrazione degli enzimi.

Per cui, i segnali ormonali che agiscono su recettori di membrana hanno la capacità di modulare lo stato funzionale di un tessuto mediante **meccanismi a breve termine** (modificazioni covalenti di enzimi o proteine non enzimatiche), ma agiscono anche attraverso **meccanismi a lungo termine** (andando a modulare l'espressione di geni che codificano enzimi che hanno ruoli chiave nella regolazione del processo metabolico).

Proteine G inibitorie. Le proteine G di cui si è discusso fino ad ora facendo riferimento ai recettori di tipo  $\beta$ -adrenergico hanno un'azione di tipo stimolatorio, poiché di fatto, interagendo con l'adenilato ciclasi, attivano l'enzima effettore della fase di innesco.

Alcune trasduzione del segnale agiscono attraverso proteine G inibitorie.

1. Il legame di questi ormoni ai recettori provoca l'attivazione di una **proteina G inibitoria**, che provoca l'inattivazione dell'adenilil ciclasi.
2. La diminuzione dei livelli del cAMP si riflette in una diminuzione dei livelli di PKA attiva e, conseguentemente, in una riduzione dei livelli fosforilati di una proteina bersaglio.

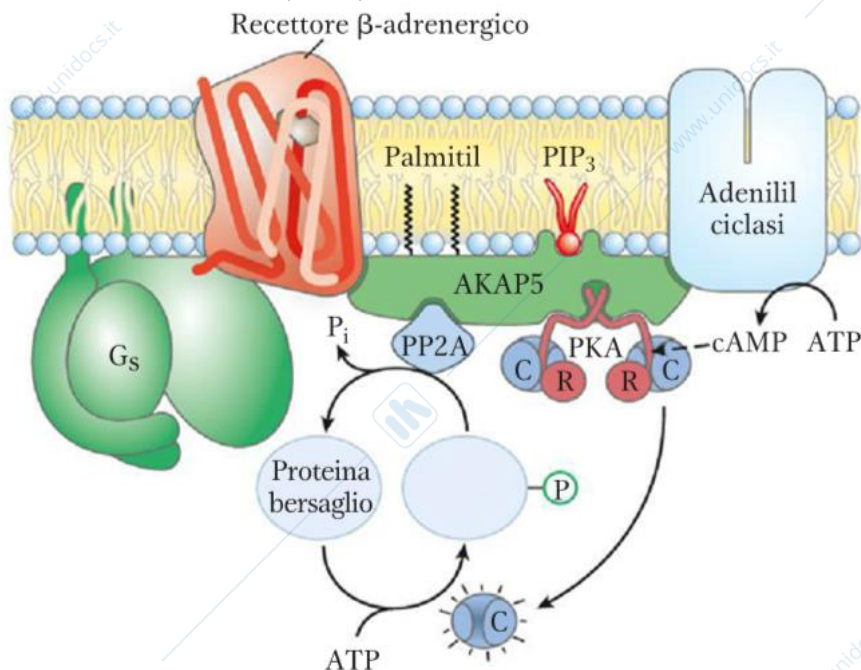
Nei tessuti con recettori  $\alpha_2$ -adrenergici, accoppiati a proteine G inibitorie, l'adrenalina abbassa la [cAMP]. Questi recettori si ritrovano a livello di cellule neuronali: l'attivazione dei recettori comporta una induzione della secrezione di neurotrasmettitori, interferendo con la segnalazione di stimoli nervosi.

**Specificità.** La specificità della risposta di un tessuto a uno stimolo extracellulare dipende da:

- Tipo di recettore
- Tipo di proteina G
- Corredo proteico ed enzimatico specifico di quella cellula e, quindi, dalle proteine bersaglio della PKA che si ritrovano in un determinato citotipo. Il corredo proteico varia dal punto di vista qualitativo e quantitativo: i geni sono continuamente regolati e quindi i livelli proteici nella cellula sono costantemente modulati in risposta alla modulazione dello stato funzionale.

La risposta a un segnale extracellulare non è facilmente prevedibile, poiché non dipende solamente dall'attivazione di una determinata via di trasduzione del segnale all'interno di quel determinato citotipo, ma dipende anche da altri segnali extracellulari che convergono contestualmente su quel determinato tipo cellulare. Ad esempio, la risposta a uno stimolo come l'adrenalina risente di altri messaggeri che insistono sui livelli di AMPc.

#### PROTEINE ADATTATRICI (AKAP)



**Funzione.** Un'altra componente che contribuisce alla specificità della risposta tissutale è data dall'esistenza nelle cellule di proteine **adattatrici** con carattere polivalente: hanno la capacità di interagire con più partner proteici. Il loro ruolo primario è contribuire alla specificità della risposta del tessuto a un segnale attraverso il confinamento di molecole proteiche che devono agire in concerto in una determinata localizzazione nella cellula.

Esse sono dette AKAP (*A-kinase anchor proteins*) e posseggono alcuni siti di legame:

1. Un sito di legame per la subunità R della PKA.
  2. Un sito di legame per una specifica struttura della cellula, confinando in tal modo la chinasi in una determinata localizzazione della cellula.
- 1 → Specifiche AKAP legano determinate strutture cellulari (filamenti del citoscheletro) o organuli (i mitocondri) o il nucleo. Le proteine AKAP non possiedono attività catalitica: il loro ruolo consiste nel confinare in una specifica regione la risposta funzionale del tessuto. In questo modo, la proteina PKA andrà a fosforilare la proteina bersaglio che si trova vicina alla sede di ancoraggio.

2 → In certi casi una AKAP connette la PKA con l'enzima che provoca la sua attivazione o che ne arresta l'attività.

AKAP5 è una proteina adattatrice localizzata sulla superficie citoplasmatica attraverso due gruppi palmitilici legati covalentemente e un sito che lega il fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Presenta siti di legame

per il recettore  $\beta$ -adrenergico, per l'adenilato ciclasi, per la PKA e per una fosfoproteina fosfatasi (PP2A). In questo modo viene resa particolarmente rapida la risposta cellulare al messaggero extracellulare, poiché spazialmente le componenti coinvolte nella risposta funzionale sono vicine.

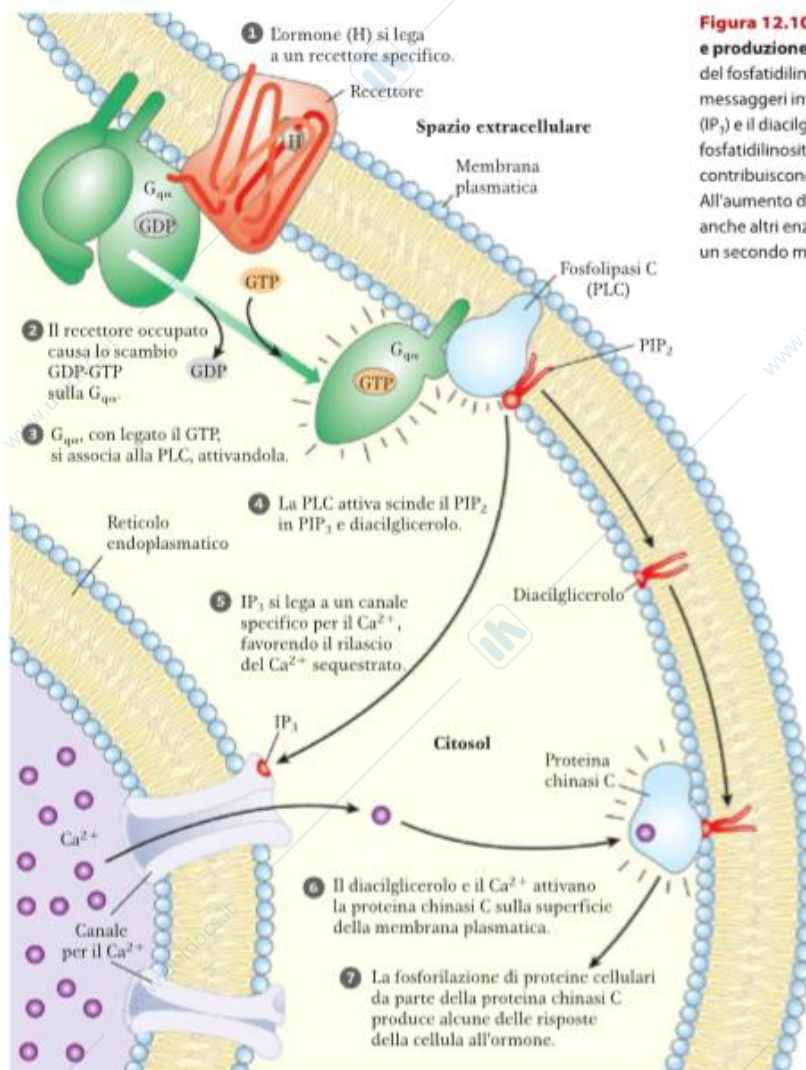
Questo tipo di proteine adattatrici funzionalmente complesse si occupano quindi di rendere *rapida e localizzata* la risposta cellulare, proprio perché spazialmente possono avvicinare le componenti della fase di innesco che danno origine alla modulazione dello stato funzionale della cellula.

La vicinanza mediata dalla presenza di AKAP5 e dal recettore per l'adenilato ciclasi permette una rapida attivazione del recettore complessato con l'ormone dell'effettore allosterico e, contestualmente, la vicinanza dell'adenilato ciclasi alla PKA porta a una rapida attivazione della PKA. Infatti, se la PKA fosse libera nel citosol, occorrerebbe una attività prolungata dell'adenilato ciclasi e una concentrazione di AMPc sufficientemente elevata per poter indurre un incremento della concentrazione di AMPc anche a lunga distanza, in modo da essere percepito dalla PKA. La vicinanza dell'adenilato ciclasi alla PKA fa sì che immediatamente le concentrazioni di AMPc raggiungano un livello sufficientemente elevato da essere avvertito dalle PKA, promuovendo la sua attivazione e quindi la fosforilazione della proteina bersaglio, che si traduce nella risposta funzionale del tessuto. Questo tipo di proteine di ancoraggio (PKA) sono in grado di permettere la risposta della cellula avvenga in un arco temporale estremamente piccolo.

Importanza delle AKAP:

1. Specificità della risposta funzionale tissutale, confinando il processo di segnalazione in un determinato distretto intracellulare.
2. Modulazione rapida dello stato funzionale e ritorno veloce allo stato basale.

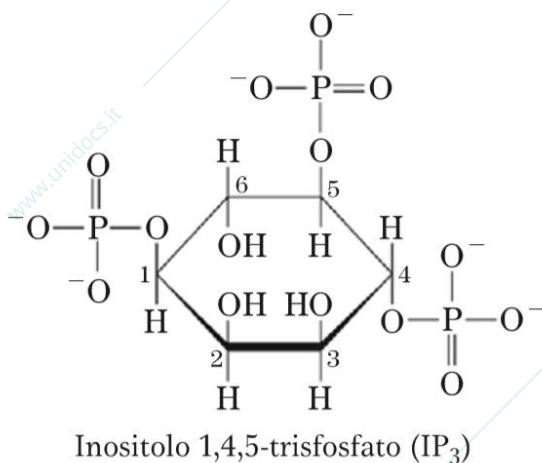
PROTEINA  $G_q$



**Figura 12.10 Fosfolipasi C attivata dall'ormone e produzione dell' $IP_3$ .** Nel sistema ormone-sensibile del fosfatidilinositolo vengono prodotti due secondi messaggeri intracellulari: l'inositolo 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) e il diacilglicerolo, formati dalla scissione del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ). Entrambi contribuiscono all'attivazione della proteina chinasi C. All'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$  attiva anche altri enzimi calcio-dipendenti e quindi il  $Ca^{2+}$  è un secondo messaggero.

**Definizione.** Una seconda classe di GPCR molto numerosa comprende recettori accoppiati attraverso una proteina Gq alla fosfolipasi C (PLC). La proteina Gq fa parte delle proteine G e, come queste, è eterotrimerica.

1. Il complesso ormone-recettore catalizza lo scambio GTP-GDP sulla subunità  $\alpha$  della proteina Gq.
2. La  $G_{q\alpha}$ -GTP si associa ed attiva la PLC: agisce idrolizzando i legami estere a livello di glicerofosfolipidi. La fosfolipasi C è specifica per il fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato (**PIP<sub>2</sub>**), in cui la testa polare è rappresentata dal fosfoinositolo. Agisce scindendo il legame estere tra il carbonio in posizione 3 (C3) del fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato e il gruppo fosforico, a cui segue il rilascio dei prodotti diacilglicerolo, che resta a livello della membrana plasmatica, e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), ovvero la testa polare del glicerofosfolipide, rilasciato nel citosol. I due prodotti sono secondi messaggeri.



3. L'inositolo trifosfato diffonde dalla membrana plasmatica al RE, dove si lega a specifici **canali ionici per il Ca<sup>2+</sup>**, determinandone l'apertura. L'inositolo trifosfato è il ligando per il canale ligando-dipendente del calcio: con un meccanismo di tipo allosterico induce l'apertura del canale ionico.
4. La pompa SERCA del reticolo sarcoplasmatico mantiene la concentrazione di calcio basale nel citosol a 0.1  $\mu$ M, inferiore rispetto alla concentrazione di questo catione nel lume del reticolo sarcoplasmatico e rispetto allo spazio extracellulare (dove è dell'ordine dei mM).  
Il legame dell'IP<sub>3</sub> a questo canale per il Ca<sup>2+</sup> (trasportatore passivo) determina il trasferimento di calcio dal lume al citosol, dove i livelli possono raggiungere un valore massimo di 1  $\mu$ M.
5. L'aumento della [Ca<sup>2+</sup>] e il diacilglicerolo, in quanto effettori allosterici, cooperano nell'attivazione di una proteina chinasi C **PKC**.  
Essa è costituita da una sola subunità, ma presenta un dominio che, in assenza del legame con gli effettori allosterici, occupa il sito di legame della chinasi per il substrato proteico. Gli effettori allosterici inducono un cambiamento conformazionale che determina uno spiazzamento del **dominio dello pseudo-substrato** dal sito di legame del substrato reale di questa chinasi.
6. A seguito dell'attivazione, la proteina chinasi C lega e fosforila proteine citosoliche e nucleari con una sequenza consenso costituita da una specifica sequenza contenente un residuo Ser o Thr (treonina).  
Essa modula molti processi funzionali:
  - la funzionalità neuronale
  - la risposta immunitaria
  - la contrazione della muscolatura liscia dei vasi e dei visceri
  - l'attività secretoria dell'adenoipofisi.

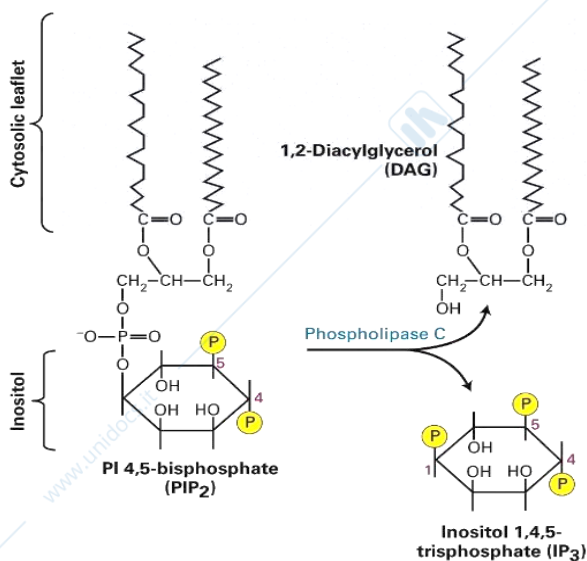
→ Le proteine bersaglio della proteina chinasi C non sono solo citosoliche, ma anche nucleari, le quali agiscono come fattori trascrizionali, modulando l'espressione di geni che, se espressi, promuovono la proliferazione cellulare. Alcune proteine nucleari possono anche favorire l'insorgenza di neoplasie: gli esteri del *forbolo* (derivato isoprenoide) sono agenti cancerogeni, poiché sono in grado di mimare l'azione allosterica del diacilglicerolo. Diversamente da questo, non vengono degradati metabolicamente in maniera rapida. Permanendo a lungo, fanno sì che la proteina C rimanga nello stato attivo e ostacolano la regolazione del ciclo cellulare (*attivazione allosterica permanente delle PKC*).

Neurotrasmettitori. I secondi messaggeri di questa via sono quindi rappresentati dal diacil glicerolo, dall'IP<sub>3</sub> e dal calcio.

I segnali che agiscono attraverso questa via comprendono molti neurotrasmettitori (come acetilcolina, glutammato, serotonina, istamina), perciò messaggeri chimici rilasciati da cellule neuronali. Non sempre un neurotrasmettitore agisce producendo una modulazione del potenziale di membrana della cellula post-sinaptica. Alcuni agiscono tramite altri tipi di vie: in questo caso, il recettore del neurotrasmettitore è **metabotropico**.

Perciò un neurotrasmettitore può agire attraverso due tipi di recettori:

1. **Recettori ionotropici:** che determinano, sulla cellula post-sinaptica, una depolarizzazione di membrana dovuto dal passaggio di uno ione da un lato di membrana all'altro.
2. **Recettori metabotropici:** il neurotrasmettitore modula lo stato funzionale della cellula, legandosi a un tipo di recettore, la cui attivazione porta a modulazioni intracellulari di un secondo messaggero.



Segnali che agiscono attraverso la fosfolipasi C, l'IP<sub>3</sub> e il Ca<sup>2+</sup>:

Acetilcolina:

Recettore ionotropico. A livello delle fibre del muscolo scheletrico, l'*acetilcolina* è in grado di indurre la contrazione del muscolo scheletrico, legandosi a un recettore-canale che, una volta aperto, permette l'ingresso di cationi nella cellula muscolare. Ciò provoca una modulazione del potenziale elettrico transmembrana della fibra muscolare.

Recettore metabotropico. Su citotipi di tessuti diversi dal muscolo scheletrico può agire attraverso un recettore metabotropico, producendo la modulazione di un secondo messaggero.

Ciò vale per una serie di neurotrasmettitori. Il recettore ionotropico dell'acetilcolina è detto *nicotino*, poiché presenta elevata affinità per la nicotina, mentre il suo recettore metabotropico è detto *muscarinico*, perché sensibile alla muscarina (prodotto tossico dei funghi). Il recettore muscarinico agisce attraverso fosfolipasi C, IP<sub>3</sub> e Ca<sup>2+</sup>.

Ormoni catecolaminici:

Gli ormoni catecolaminici agiscono attraverso questa via di trasduzione del segnale quando le cellule presentano recettori di tipo  $\alpha_1$ -adrenergici (i recettori  $\beta$  agiscono attraverso la trasduzione del segnale dove il ruolo centrale è ricoperto dall'adenilato ciclasi, che provoca un incremento dei livelli di AMPc e dove la proteina G è di tipo stimolatorio; i recettori di tipo  $\alpha_2$  agiscono attraverso la stessa via, ma la proteina G è di tipo inibitorio), via completamente diversa rispetto a quella seguita dagli altri recettori analizzati.

Questi recettori sensibili agli ormoni catecolaminici si trovano a livello della membrana plasmatica della muscolatura liscia che circonda i vasi sanguigni. L'azione svolta porta alla contrazione della muscolatura liscia e, quindi, alla vasocostrizione.

Fattori di rilascio dell'Ipotalamo:

I fattori di rilascio ipotalamici di natura peptidica modulano l'attività dell'adenoipofisi, ad esempio inducendo il rilascio di gonadotropine o della tireotropina, secrete a livello adenoipofisario. Agiscono quindi attraverso questa via su recettori associati alle fosfolipasi C attraverso le proteine Gq a livello di cellule specifiche dell'adenoipofisi, ghiandola endocrina di cui ne modulano l'attività.

Vasopressina e ossitocina:

Vasopressina e ossitocina vengono secreti nei corpi cellulari, localizzati nell'ipotalamo, per poi essere trasferiti a livello della neuroipofisi, dove restano presenti sotto forma di granuli. Vengono rilasciati solo a seguito di specifici segnali, recepiti a livello ipotalamico. Sono entrambi in grado di promuovere la contrazione della muscolatura liscia, sebbene con delle differenze: se l'ossitocina agisce sulla muscolatura liscia dei visceri (es. intestino crasso, vescica, colecisti, utero, ma anche ghiandola mammaria), la vasopressina promuove la contrazione della muscolatura liscia dei vasi (aumento pressorio).

## CALCIO COME SECONDO MESSAGGERO

### 1. RUOLO

L'incremento dei livelli di  $IP_3$  induce un aumento della concentrazione del calcio, a cui va attribuito a priori un ruolo centrale nei processi biologici, indipendentemente da questa via di trasduzione del segnale.

La modulazione dei livelli di calcio citoplasmatico è realizzata sia attraverso questa via di trasduzione del segnale, sia attraverso altri meccanismi, come il processo tramite cui si realizza la contrazione del tessuto muscolare scheletrico e cardiaco.

Le variazioni di calcio citosolico, sono in grado di scatenare una risposta funzionale, perché esistono delle proteine che fungendo da sensori del calcio, interagiscono e modulano l'attività di proteine bersaglio.

### 2. TRASDUZIONE.

Limite. L'attività di secondo messaggero del  $Ca^{2+}$ , come quella del cAMP, è spazialmente limitata: dopo il suo rilascio, che innesca la risposta, il  $Ca^{2+}$  è subito rimosso, prima che possa diffondere in settori cellulari più lontani.

Azione. In molti tipi di cellule che rispondono a segnali extracellulari, il calcio si comporta da secondo messaggero, innescando risposte cellulari come l'esocitosi di neuroni, la contrazione muscolare, la riorganizzazione del citoscheletro durante i movimenti ameboidi.

Innesco della risposta. Nelle cellule non stimulate la concentrazione del calcio è mantenuta piuttosto bassa grazie all'esistenza di pompe  $Ca^{2+}$ -ATPasi a livello della membrana plasmatica, del RE, dei mitocondri. Stimoli ormonali, neuronali o di altra natura causano un afflusso di ioni  $Ca^{2+}$ , che ne aumenta la concentrazione citosolica: questo incremento funge da innesco per la risposta cellulare.

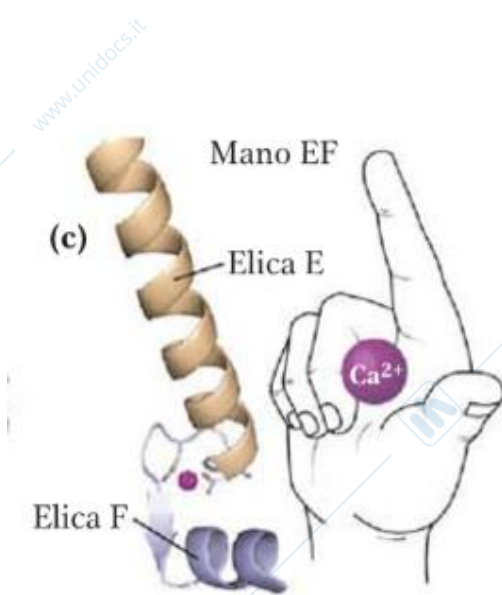
**Tabella 12.5** Alcune proteine regolate dal  $Ca^{2+}$  e dalla calmodulina

Adenilil ciclasi (cervello)
$Ca^{2+}$ ATPasi della membrana plasmatica (pompa del $Ca^{2+}$ )
Calcineurina (fosfoproteina fosfatasi 2B)
cAMP fosfodiesterasi
Canali del $Ca^{2+}$ del reticolo sarcoplasmatico
Canali dell' $Na^+$ dipendenti dal $Ca^{2+}$ ( <i>Paramecium</i> )
Canali dell' $Na^+$ e del $Ca^{2+}$ controllati dal cGMP (coni e bastoncelli)
Canali olfattivi controllati dal cAMP
Chinasi per le catene leggere della miosina
Fosfoinositide 3-chinasi
Glutammato decarbossilasi
NAD <sup>+</sup> chinasi
NO sintasi
Proteina chinasi $Ca^{2+}$ /calmodulina dipendenti (CaM chinasi I-IV)
RNA elicasi (p68)

**Muscolo scheletrico.** Per quanto riguarda il muscolo scheletrico, la contrazione muscolare è generata dalla propagazione da parte da parte di un neurone motore di uno stimolo elettrico. L'eccitazione di un neurone pre-sinaptico porta a una modulazione del potenziale transmembrana di una cellula post-sinaptica. La depolarizzazione a livello della cellula muscolare si diffonde dalla membrana plasmatica al reticolo sarcoplasmatico (poiché sono in continuità), inducendo l'apertura dei canali per il calcio, che portano a un incremento della concentrazione citosolica del catione.

Le variazioni di concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$  vengono avvertite da *proteine che legano il  $\text{Ca}^{2+}$*  e che regolano enzimi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti. Le proteine appartenenti a questa famiglia hanno in comune una caratteristica struttura, a livello dei siti che legano il  $\text{Ca}^{2+}$ , detta *EF hand* (motivo EF).

La proteina che avverte l'aumento della concentrazione del calcio a livello citosolico è la **troponina**. Affinchè avvenga la contrazione, il calcio lega un sistema proteico associato ai filamenti di actina (sistema troponina-tropomiosina). A seguito del legame del calcio alla troponina, si realizza un cambiamento conformazionale, che permette l'accessibilità da parte della miosina di siti specifici sulle molecole di actina. Il risultato è l'accorciamento della fibra muscolare e, perciò, la contrazione. La contrazione della fibra muscolare scheletrica è indotta dallo scivolamento dei filamenti di actina su quelli di miosina.



← Ognuno dei quattro siti di legame al  $\text{Ca}^{2+}$  è un motivo elica-ansa-elica chiamato *EF hand*, presente anche in altre proteine che legano il  $\text{Ca}^{2+}$ .

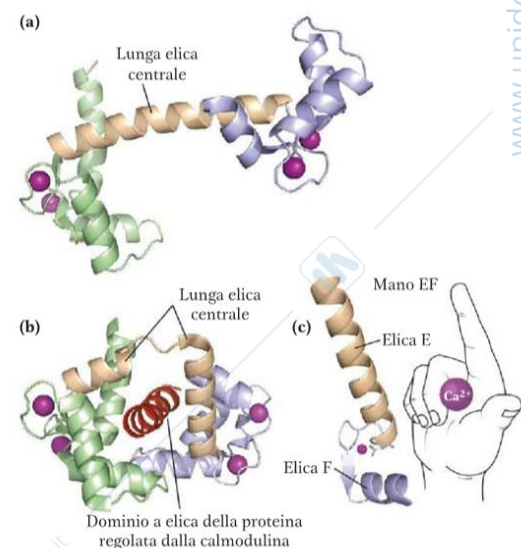
**Calmodulina.** Alla famiglia "sensori del calcio", di cui fa parte la troponina, comprende anche la **calmodulina** (*CaM*).

Struttura. La calmodulina presenta il motivo EF hand, tipico delle proteine in grado di legare il  $\text{Ca}^{2+}$ . Presenta quattro siti di legame per il  $\text{Ca}^{2+}$ , con una notevole affinità per esso: è in grado di legarlo quando le sue concentrazioni citosoliche raggiungono valori compresi tra 0.1 e 1  $\mu\text{M}$ .

Azione.

1. Alcune proteine vengono modulate a seguito del legame alla calmodulina del complesso  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, che determina una modificazione conformazionale, che porta l'attivazione di proteine bersaglio.

2. La calmodulina è anche subunità integrale delle **proteina chinasi  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina dipendenti**. (CaM chinasi, tipi da I a IV). Quando la concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare aumenta in risposta a uno stimolo, la calmodulina lega il  $\text{Ca}^{2+}$  e va incontro a variazione conformazionale. La CaM chinasi viene attivata fosforilando e regolando l'attività di proteine bersaglio.



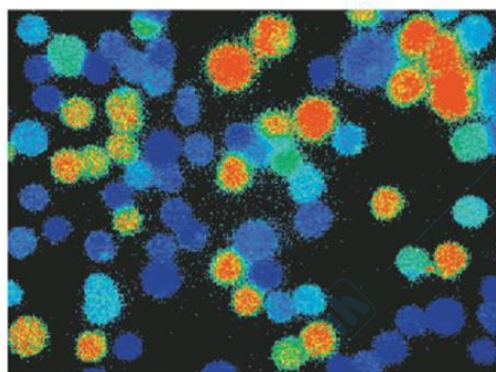
3. Alcuni enzimi contengono al loro interno la calmodulina, che funge da subunità regolatrice dell'attività del complesso enzimatico (regolazione si realizza tramite il legame del calcio alla calmodulina).

La calmodulina è subunità regolatrice della glicogeno fosforilasi B chinasi del muscolo.

A differenza della fosforilasi chinasi B epatica, l'isozima muscolare non è modulato solo dalla fosforilazione attuata della PKA, ma anche dalla variazione della concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , agente come effettore allosterico.

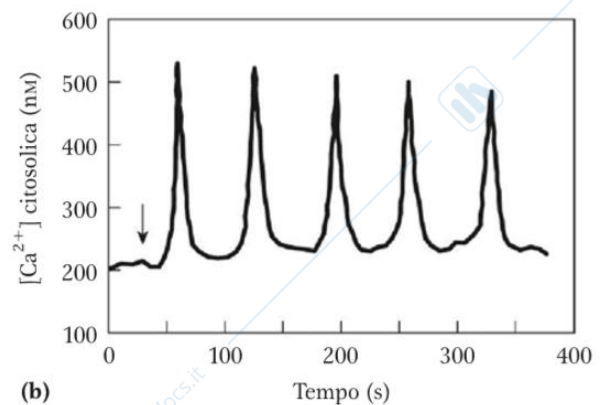
- ➔ Perciò, la fosforilasi chinasi B del muscolo non è sensibile esclusivamente a ormoni che agiscono attraverso la modulazione dei livelli di AMPc e, quindi, tramite l'attivazione della PKA (ciò accade per fosforilasi chinasi B del fegato), ma anche direttamente e alternativamente dalla concentrazione di un effettore allosterico, che è il  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ➔ Nel muscolo scheletrico, il calcio riveste un doppio ruolo: attivare la contrazione, legandosi alla troponina e attivare la glicogeno fosforilasi B chinasi, che attiverà a sua volta la glicogeno fosforilasi B, promuovendo la glicogenolisi. La demolizione del glicogeno è essenziale: rende disponibile glucosio da utilizzare come combustibile energetico per la produzione di ATP e sostiene la contrazione muscolare.

### 3. OSCILLAZIONE DEL CALCIO



(a)

$[\text{Ca}^{2+}]$  ( $\mu\text{M}$ )



(b)

Tempo (s)

**Oscilla.** In realtà, il livello del  $\text{Ca}^{2+}$  non aumenta e diminuisce semplicemente, ma oscilla velocemente entro periodi di pochi secondi, anche quando la concentrazione extracellulare dell'ormone rimane costante. Il meccanismo alla base di queste oscillazioni forse risiede nella regolazione a feedback esercitata dal  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Dimostrazione.** Un fluoroforo, la cui fluorescenza varia quando lega il calcio, viene lasciato diffondere nella cellula e la sua emissione istantanea di luce viene misurata con un microscopio a fluorescenza. L'intensità della fluorescenza è rappresentata dal colore. La scala del colore correla l'intensità del colore alla concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , consentendo di valutare la  $[\text{Ca}^{2+}]$  assoluta. In questo caso alcuni timociti sono stati stimolati con ATP extracellulare, che produce un aumento della concentrazione interna di  $\text{Ca}^{2+}$ . Le cellule danno risposte eterogenee: alcune presentano un aumento considerevole della  $[\text{Ca}^{2+}]$  (colore rosso), altre molto meno (colore blu).

**Grafico.** Quando questo composto viene usato per misurare la  $[\text{Ca}^{2+}]$  in un singolo epatocita, si può osservare che l'agonista noradrenalina determina oscillazioni nella  $[\text{Ca}^{2+}]$  da 200 a 500 nM. Oscillazioni simili sono indotte in altri tipi di cellule da altri segnali.

**Spikes.** Qualunque sia il meccanismo, un tipo di segnale (per esempio la concentrazione ormonale) viene convertito in un altro, cioè la frequenza e l'ampiezza delle oscillazioni (spikes) della  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracellulare. Il segnale del  $\text{Ca}^{2+}$  diminuisce quando il  $\text{Ca}^{2+}$  si allontana dalla sorgente iniziale, viene sequestrato nell'ER o pompato all'esterno della cellula.

#### 4. CROSS TALK

- Esiste un significativo "interscambio di informazioni" tra i sistemi di segnalazione mediati dal  $\text{Ca}^{2+}$  e quelli mediati dal cAMP.

In alcuni tessuti, sia l'enzima che produce il cAMP (l'adenilil ciclasi) sia l'enzima che degrada il cAMP (la fosfodiesterasi) sono stimolati da  $\text{Ca}^{2+}$ . Variazioni temporali e spaziali della  $[\text{Ca}^{2+}]$  possono quindi produrre variazioni transitorie e localizzate della [cAMP]. Abbiamo già visto che la PKA, l'enzima che risponde al cAMP, fa spesso parte di un complesso sopramolecolare ben localizzato nella cellula, tenuto unito da altre proteine di supporto come la AKAP. La localizzazione subcellulare degli enzimi bersaglio e le variazioni temporali e spaziali dei gradienti di  $[\text{Ca}^{2+}]$  e di [cAMP] permettono alle cellule di rispondere a uno o a diversi segnali con piccole variazioni metaboliche, ben localizzate nello spazio e nel tempo.

#### MECCANISMI DI CONTROLLO A LIVELLO MUSCOLARE ED EPATICO

**MUSCOLO.** Nella condizione non di stress, il processo di glicogenolisi viene attivato dipendentemente dallo stato funzionale del muscolo.

In una situazione di attività muscolare, la glicogenolisi viene promossa attraverso meccanismi di tipo allosterico:

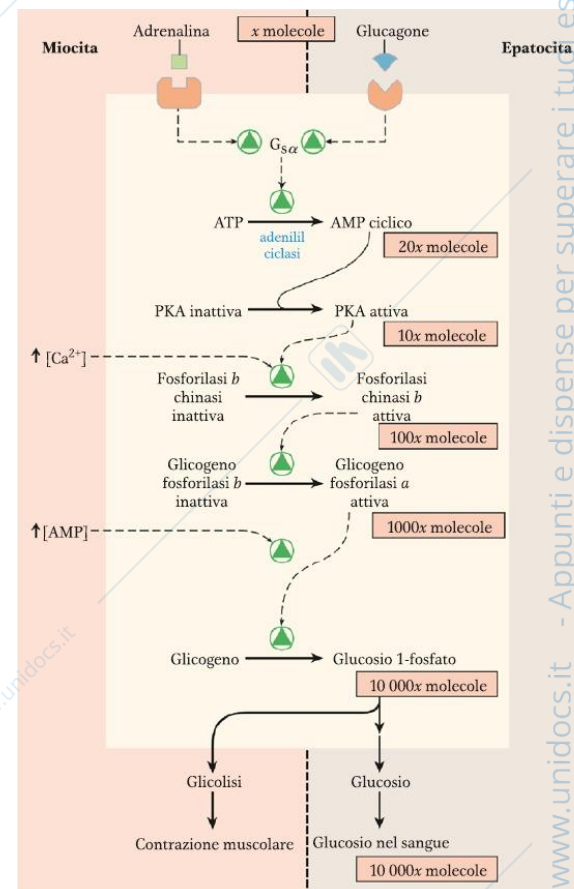
$\text{Ca}^{2+}$  effettore positivo della fosforilasi chinasi b e

AMP effettore allosterico positivo della glicogeno fosforilasi b.

L'azione congiunta di questi due effettori promuove la glicogenolisi e quindi incrementa, attraverso l'aumento della disponibilità di glucosio all'interno dell'epatocita, la possibilità di produrre energia.

L'azione di questi effettori allosterici ha lo **scopo** di soddisfare la richiesta energetica del muscolo quando passa da uno stato di riposo a uno stato di attività.

Questa via è quindi controllata dallo stato **funzionale** della fibra muscolare, mentre la via che si basa sull'attivazione della **PKA** viene attivata solo in condizioni di **stress** quando viene rilasciata nel sangue l'adrenalina dalla midollare del surrene.



**FEGATO.** A livello epatico, la glicogenolisi, sia nel caso in cui sia mediata dalla secrezione e quindi dall'aumento del glucagone a livello ematico, sia che sia indotta in condizioni di stress dall'aumento dell'adrenalina, è sempre mediata dall'**attivazione della PKA**, indotta dalla produzione di segnali ormonali che agiscono tutti attraverso un recettore accoppiato alla proteina G che determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi e quindi l'aumento di un secondo messaggero che è l'AMP ciclico.

## RECETTORI TIROSIN-CHINASICI

Struttura generale. I **recettori tirosin chinasi (RTK)** fanno parte di una classe caratterizzata da attività enzimatica. Gli RTK hanno un dominio sulla faccia extracellulare della membrana plasmatica che lega il ligando e un sito attivo enzimatico sulla faccia citoplasmatica con attività tirosin chinasi; i due domini sono interconnessi da un singolo segmento transmembrana. Sono caratterizzati sempre dalla presenza a livello citosolico di un dominio che esplica attività tirosin chinasi.

Esempio. Tra questi vi è il recettore dell'insulina, presente su: fegato, muscolo e tessuto adiposo (tessuto bersaglio dell'insulina).

Struttura. Il **recettore** tirosin chinasi dell'**insulina** è a priori un recettore dimerico. È formato da 2 protomeri, ognuno dei quali è costituito dall'associazione di una subunità  $\alpha$  e una subunità  $\beta$ .

- La subunità  $\alpha$  è localizzata esclusivamente nello spazio extracellulare, quindi fa parte di quel dominio che protrude la membrana e si affaccia a livello della matrice extracellulare.

- La subunità  $\beta$  di ognuno dei protomeri è formata da: un dominio extracellulare, un segmento transmembrana costituito esclusivamente da un segmento ad  $\alpha$ -elica e da un dominio citosolico.

Dal momento che questo recettore ha una struttura dimerica, nel complesso sono presenti 2 domini citosolici con attività tirosin chinasi, ognuno appartenente ad una subunità  $\beta$ .

La subunità  $\alpha$  di un protomero unitamente alla subunità  $\beta$  dell'altro definiscono il sito di legame dell'insulina. Vi sono dunque 2 siti di legame su ogni recettore insulinico.

### TRASDUZIONE N.1

1. Autofosforilazione. Il legame dell'insulina al recettore induce cambiamenti conformazionali che vengono trasmessi dalla porzione extracellulare fino al dominio citosolico di una subunità  $\beta$ , innescando l'attività chinasi. *Ciascuna subunità  $\beta$  fosforila tre residui essenziali di Tyr vicino all'estremità carbossiterminale dell'altra subunità  $\beta$ .*

2. Attivazione sito attivo. Questa autofosforilazione determina lo spiazzamento di un segmento peptidico a livello del sito con attività tirosin chinasi. Tale spiazzamento, indotto da repulsioni elettrostatiche che si vengono a creare in seguito all'inserimento di 3 gruppi fosforici su questi residui di Tyr, rende attivo il dominio tirosin chinasi: lo rende accessibile alle proteine riconosciute dal dominio tirosin chinasi, che verranno a loro volta fosforilate.

Quindi questo meccanismo è analogo a quello visto nel caso di altre proteine chinasi: l'attivazione della proteina chinasi A, della proteina chinasi C e del dominio tirosin chinasi del recettore dell'insulina avvengono tutte grazie a cambiamenti conformazionali, indotti o da legami allosterici o da eventi di fosforilazione, che portano allo spiazzamento di un dominio inibitorio che va ad occupare il sito di legame della proteina substrato.

3. IRS-1. All'attivazione, segue la fosforilazione di proteine substrato. La proteina substrato del recettore dell'insulina è una proteina identificata con l'acronimo **IRS-1** (Insuline Receptor substrate-1; substrato 1 del recettore insulinico). Questa proteina subisce 3 eventi di fosforilazione con conversione di residui tirosinici in residui di fosfotirosina.

-> Ciò rappresenta già una tappa di amplificazione del segnale, poiché i domini tirosin chinasi del recettore fosforileranno n molecole di IRS-1.

4. Grb2. L'IRS-1 fosforilato può essere riconosciuto dalla proteina **Grb-2**, appartenente alle proteine adattatrici. Esse hanno la capacità di riconoscere attraverso diversi domini più di una proteina partner e che quindi permettono la formazione di aggregati sovramolecolari attraverso cui si realizza la trasduzione del segnale.

Moltissime proteine coinvolte nei processi di trasduzione del segnale, ognuna con una propria specificità, possiedono domini SH2 con specifiche caratteristiche strutturali che permettono il riconoscimento di

residui di fosfotirosina. Grb2, grazie al dominio SH2 (SH2 è l'abbreviazione di *Src homology 2*, perché la sequenza dell'SH2 è simile a quella di un dominio della proteina Src, un'altra tirosina chinasi) è in grado di interagire con IRS-1, di cui riconosce uno dei residui di fosfotirosina.

5. SOS. Il complesso IRS-1-Grb-2 lega attraverso un dominio SH3 una regione ricca di proline di una proteina GEF, la **SOS**, inserendo questa proteina nel complesso proteico che si sta formando.

6. Ras. Quando è legata a Grb2, la proteina SOS agisce da fattore di scambio dei nucleotidi (GEF) e catalizza la sostituzione del GDP con GTP sulla proteina Ras, una proteina G. SOS è una GEF in grado di attivare **Ras**. Il legame con GTP induce in Ras cambiamenti conformazionali che determinano la sua attivazione.

7. MAPK. L'attivazione di Ras si esplica attivando il suo effettore, ovvero **Raf-1**, proteina con attività chinasi. Precisamente l'attivazione di Ras, attraverso interazione diretta con Raf-1, porta alla **cascata enzimatica delle MAPK** (proteine chinasiche attivate da mitogeni, ovvero segnali extracellulari che promuovono la proliferazione cellulare). A quest'ampia classe di chinasi appartengono:

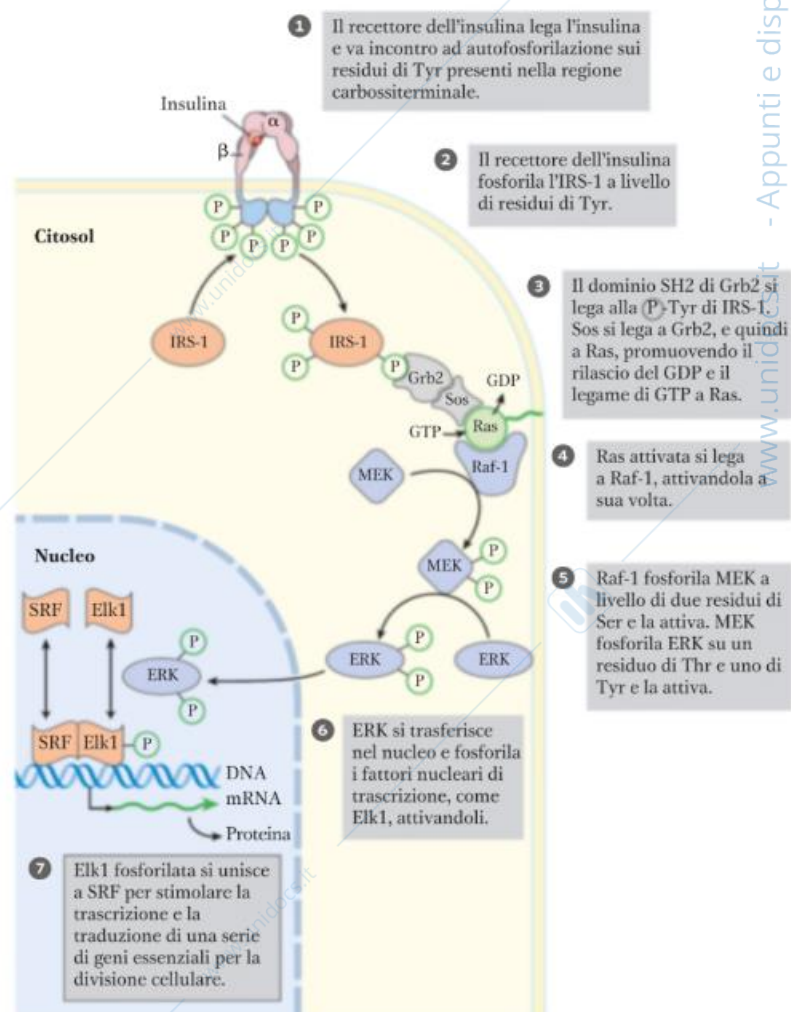
- **ERK**, proteina MAPK che attraverso la fosforilazione di una proteina bersaglio promuove la proliferazione cellulare: è la chinasi vera e propria.
- **MEK**, è una MAPKK, ovvero una proteina chinasi che va ad attivare mediante fosforilazione la chinasi che è ERK.
- **Raf-1** è una MAPKKK, cioè va ad attivare la chinasi che attiva la vera chinasi.

Raf-1 fosforila MEK a livello di serina e treonina. MEK attiva e fosforila **ERK** a livello dei residui di treonina e tirosina.

8. Elk.1. ERK, dopo essere stata fosforilata e quindi attivata, entra nel nucleo andando ad attivare **Elk 1**, fattore trascrizionale che formerà con altre componenti proteiche un complesso trascrizionalmente attivo. Tale complesso andrà a promuovere l'espressione di un 100 geni, tutti codificanti per proteine coinvolte nel processo di divisione cellulare.

A caratterizzare questa via di trasduzione del segnale vi sono:

1. fosforilazione di IRS-1 (evento scatenante) indotta dall'attivazione del dominio tirosin chinasi.
2. formazione di un complesso sovramolecolare grazie alla partecipazione di componenti proteiche polivalenti.
- 3 attivazione della cascata delle MAPK, che porta a un'amplificazione del segnale, determinante al fine della modulazione dello stato funzionale del tipo cellulare.



## TRASDUZIONE N.2

La via di trasduzione del segnale che si attiva in seguito alla formazione complesso insulina-recettore dipende dallo stato funzionale della cellula bersaglio e dal tipo cellulare (che definisce il corredo proteico della cellula) Esiste una seconda via, importante per la modulazione dello stato metabolico dei tessuti bersaglio dell'insulina, in cui la parte iniziale della trasduzione del segnale è la stessa, ossia la fosforilazione di IRS-1 (evento comune). Qualora però questa fosforilazione venga riconosciuta da una diversa proteina partner, la modulazione dello stato funzionale indotto dalla trasduzione del segnale è completamente diversa: la via di segnalazione dell'insulina si **biforca** a livello dell'IRS-1.

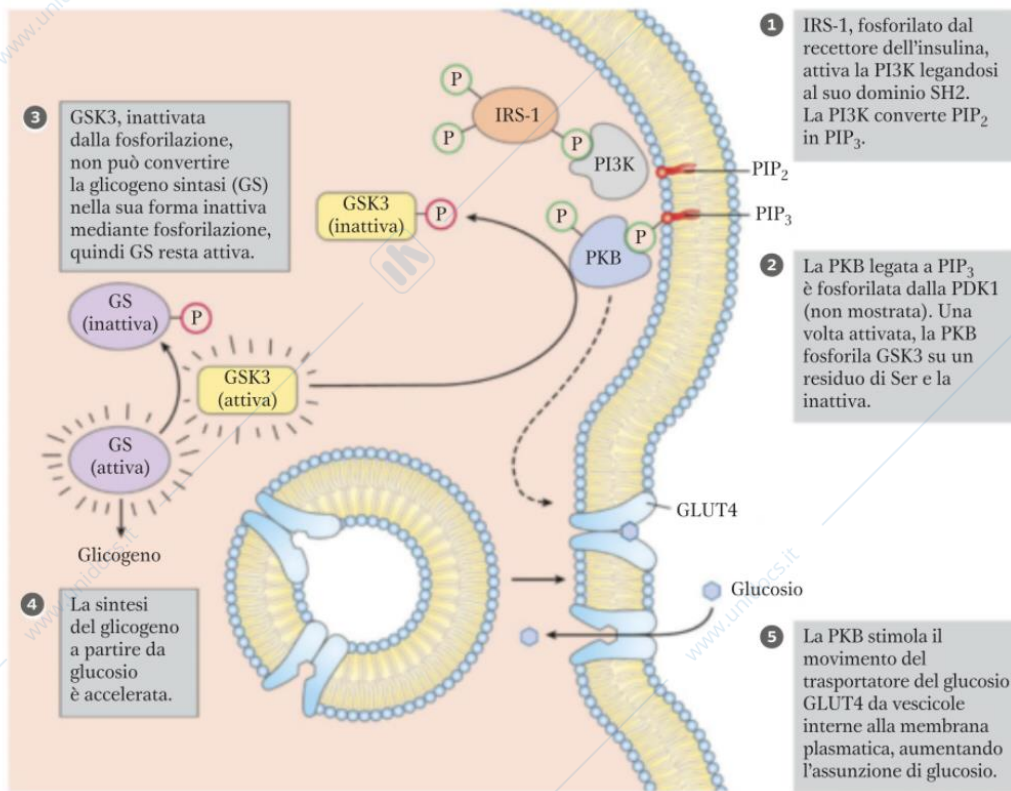
1. L'enzima fosfoinositide 3-chinasi **PI3K** (detta anche fosfatidil inositolo 3 chinasi) si lega a IRS-1 tramite il dominio SH2. Catalizza l'introduzione di un terzo gruppo fosforico sul carbonio in posizione 3 del fosfatidilinositolo 4,5 bisfosfato (PIP2), convertendolo in fosfatidil inositolo 3,4,5 trifosfato (**PIP3**).
2. La testa di PIP<sub>3</sub>, che è dotata di cariche e sporge sulla faccia citoplasmatica della membrana plasmatica, è il punto di partenza per una seconda via di segnalazione, che coinvolge un altro sistema di cascata enzimatica, sempre catalizzata da proteina chinasi. Si assiste alla costruzione a livello della membrana plasmatica di una proteina chinasi detta **PKB** (o AKT), che si configura come un sito di ancoraggio.
3. Essenziale è l'ancoraggio sul PIP<sub>3</sub> affinché la proteina chinasi B nella forma inattiva venga riconosciuta e attivata grazie a un evento di fosforilazione su un residuo di treonina, promosso dall'azione di una chinasi detta **PDK** (chinasi dipendente da fosfoinositide 3 fosfato). Questa riconosce PKB, soltanto quando è legata a fosfatidil inositolo 3 fosfato. La fosforilazione di PKB porta a una serie di effetti funzionali che si traducono nella modulazione del metabolismo glucidico a livello del tessuto: epatico, muscolare (scheletrico e cardiaco) e adiposo.

→ 4.1 A livello **epatico e muscolare**, l'effetto della cascata enzimatica è **l'inattivazione della GSK3**, attraverso la sua fosforilazione ad opera della PKB. La GSK3 è un enzima che, da attivo, determina la fosforilazione di 3 residui di serina della glicogeno sintasi, contribuendo alla regolazione dell'equilibrio tra la forma defosforilata attiva della glicogeno sintasi e la forma fosforilata inattiva. L'inattivazione della GSK3 fa sì che l'equilibrio tra forma fosforilata e defosforilata si sposti verso la forma defosforilata attiva. Quindi l'inattivazione della GSK3 si traduce nell'attivazione della **GS** (Glicogeno sintasi) che promuove la sintesi di glicogeno da glucosio.

→ 4.2 Nel **tessuto muscolare e adiposo**, la PKB promuove l'esocitosi di vescicole ricche di trasportatori di glucosio, precisamente dell'isoforma GLUT4 (che ha un'affinità intermedia per il glucosio poiché la sua Km è all'incirca pari alla glicemia in condizioni fisiologiche). Questi vengono posizionati sulle membrane plasmatiche, incrementando l'uptake di glucosio dal sangue e determinando quindi un incremento della disponibilità di glucosio che può essere usato come combustibile.

Di fatto, tessuto muscolare e adiposo usano glucosio come combustibile solo in condizioni di normoglicemia, proprio perché provvisti di GLUT4, che avendo un'affinità relativamente bassa per il glucosio, non è in grado di permetterne l'uptake in condizioni di ipoglicemia.

Quindi il metabolismo glucidico di questi tessuti viene modulato anche attraverso l'attivazione di questo processo di esocitosi, che non riguarda invece il fegato, dove vi è GLUT2, trasportatore bidirezionale, in grado di far sì che in condizioni di iperglicemia, la concentrazione intracellulare di glucosio negli epatociti sia pari a quella presente a livello del sangue.



### SPEGNIMENTO VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

Lo spegnimento di questa via di trasduzione del segnale è dovuto all'attività di una proteina fosfatasi, detta **PTEN**, che agisce a livello del fosfatidil inositolo 3 fosfato, rimuovendo il gruppo fosforico in posizione 3, e riconvertendolo in fosfatidil inositolo bisfosfato: PIP<sub>3</sub> → PIP<sub>2</sub> che non lega PKB.

Quindi lo spegnimento della via si realizza attraverso il decremento della concentrazione di PIP<sub>3</sub> a livello della membrana plasmatica.

PTEN è una fosfatasi codificata da un gene oncosoppressore. Le mutazioni a carico di tale gene sono associate a diversi tumori, poiché l'inattivazione prodotta dalle mutazioni permette, a livello di questi tessuti, il mantenimento di alte concentrazioni di PIP<sub>3</sub> che portano alla presenza di una PKB che è permanentemente attivata (stimolando la proliferazione cellulare), perchè viene continuamente fosforilata dalla PDK1.

### PATOLOGIA

In molti tumori si riscontra la presenza di PTEN mutato, il gene che codifica per questa proteina è definito come oncosoppressore, cioè: uno di quei geni che codificano per proteine che promuovono il differenziamento e la morte cellulare per apoptosi, ossia che promuovono la morte cellulare di cellule che non sono più normalmente funzionanti. Sono, invece, definiti oncogeni quei geni che codificano per prodotti proteici che hanno un effetto positivo, cioè promuovono la proliferazione cellulare e, quando vengono overespressi o iperattivati a seguito di mutazione, danno luogo ad un processo non più regolato che porta alla formazione di un tumore.

**PKB** è una *chinasi* implicata in vari tipi di trasduzione del segnale, in particolare nella via del segnale insulinico che porta a modificazioni dello stato metabolico della cellula. Il suo meccanismo di azione prevede la fosforilazione di residui di treonina e serina.

Quando è attivata, la PKB è in grado di promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, partecipando a vie di trasduzione del segnale che portano, a loro volta, all'attivazione di fattori come, per esempio, **mTOR** - *mammalian target of rapamycin*, la rapamicina è un farmaco antitumorale-. Il fattore è anch'esso una *serina-treonina chinasi*, la quale induce, in primis, la sintesi proteica, l'effetto più importante della sua azione, poi, globalmente, uno stimolo proliferativo a livello cellulare. Ulteriore via che stimola la proliferazione cellulare è quella che coinvolge la *cascata delle MAP chinasi*.

Inoltre, l'attività della PKB rende le cellule meno propense ad andare incontro a morte cellulare programmata inattivando *fattori proapoptotici*, i quali promuovono, appunto, l'apoptosi quando la cellula subisce alterazioni funzionali. Per questo motivo, se la PKB rimane attiva per un tempo eccessivo, è in grado di promuovere la tumorigenesi e la loro crescita.

Droghe come la marijuana e l'hashish agiscono a livello delle cellule nervose stimolando i recettori cannabinoidi, recettori fisiologicamente attivati dagli endocannabinoidi (la cui azione viene, appunto, mimata da hashish e marijuana), e questa azione promuove diversi effetti, come aumento dell'appetito, ma non solo, agiscono, infatti, anche come regolatori dell'attività neuronale. Per quest'ultimo motivo venivano utilizzati ampiamente in passato per limitare le crisi epilettiche, che insorgono per ragioni di alterazione strutturale e funzionale dell'encefalo solitamente a seguito di ictus. Quest'ultimo molte volte, anche nel caso in cui rientri, può lasciare conseguenze molto gravi date, appunto, da crisi epilettiche a cui va regolarmente incontro un paziente che ha subito un ictus. Gli endocannabinoidi hanno un'azione nel regolare l'attività neuronale, ma, in seguito ad un ictus, il sistema subisce delle alterazioni funzionali per cui l'azione fisiologica degli endocannabinoidi non è più sufficiente e per questo vengono utilizzati farmaci. Hashish e marijuana, oltre a questo effetto positivo appena descritto, ne presentano numerosi negativi, infatti, a lungo termine promuovono grosse difficoltà sia di tipo comportamentale sia come capacità di memorizzare.

#### ALTRI RTK

##### Caratteristiche strutturali:

Esistono altri recettori tirosin chinasi specifici per segnali extracellulari che promuovono la proliferazione di determinati tessuti:

- **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor, recettore del fattore che promuove la crescita dell'epidermide)
- **PDGFR** (Platelet-derived Growth Factor receptor, recettore la cui attivazione porta alla stimolazione della proliferazione di tipi cellulari e tessuti di origine mesenchimale).

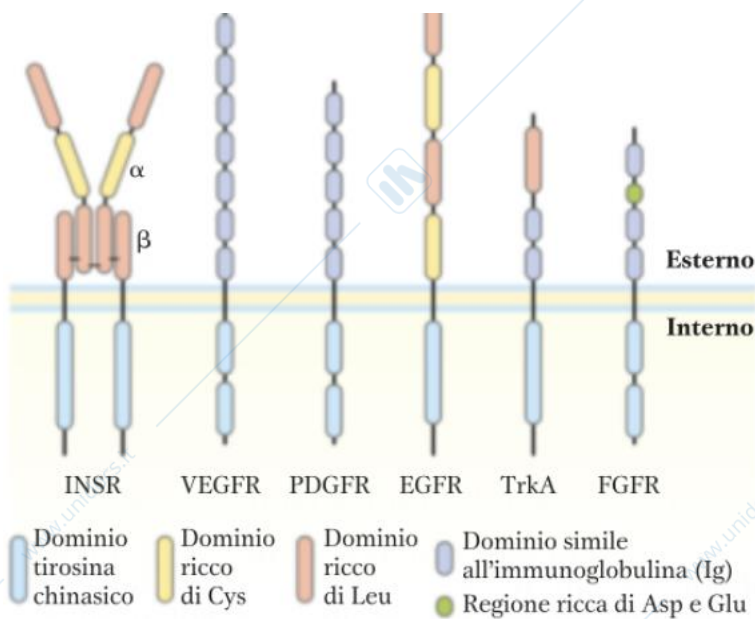
Questi fattori agiscono attraverso recettori tirosin chinasi, i quali hanno diversi gradi di omologia strutturale con il recettore insulinico, ma possiedono tutti come caratteristica fondamentale un elevato grado di omologia strutturale a livello del dominio tirosin chinasi (citosolico). Frequentemente, dopo che questi recettori hanno legato il proprio segnale extracellulare, vanno incontro a dimerizzazione (a differenza del recettore dell'insulina che è un dimero a priori).

##### Trasduzione del segnale:

1. Alcuni di questi fattori di crescita che si legano ad alcuni recettori trasducono il loro segnale andando a fosforilare **IRS-1**, che si configura quindi come un punto su cui possono convergere più vie di trasduzione del segnale, portando a una risposta cellulare che sarà specifica dipendentemente dal tipo cellulare su cui agiscono.

2. il loro spegnimento può essere indotto dall'azione di fosfatasi che hanno un recettore simile a livello delle membrane plasmatiche e che vanno direttamente a inattivare recettori tirosin chinasi, che sono stati attivati a seguito del legame di un segnale extracellulare. Queste fosfatasi sarebbero in grado di controllare

la trasduzione del segnale mediata da recettori tirosin chinasi andando a interferire con la loro attività, producendo la rimozione di gruppi fosforici fondamentali a livello del dominio tirosin chinasi del recettore ai fine della trasduzione del segnale.



#### SISTEMA JAK-STAT

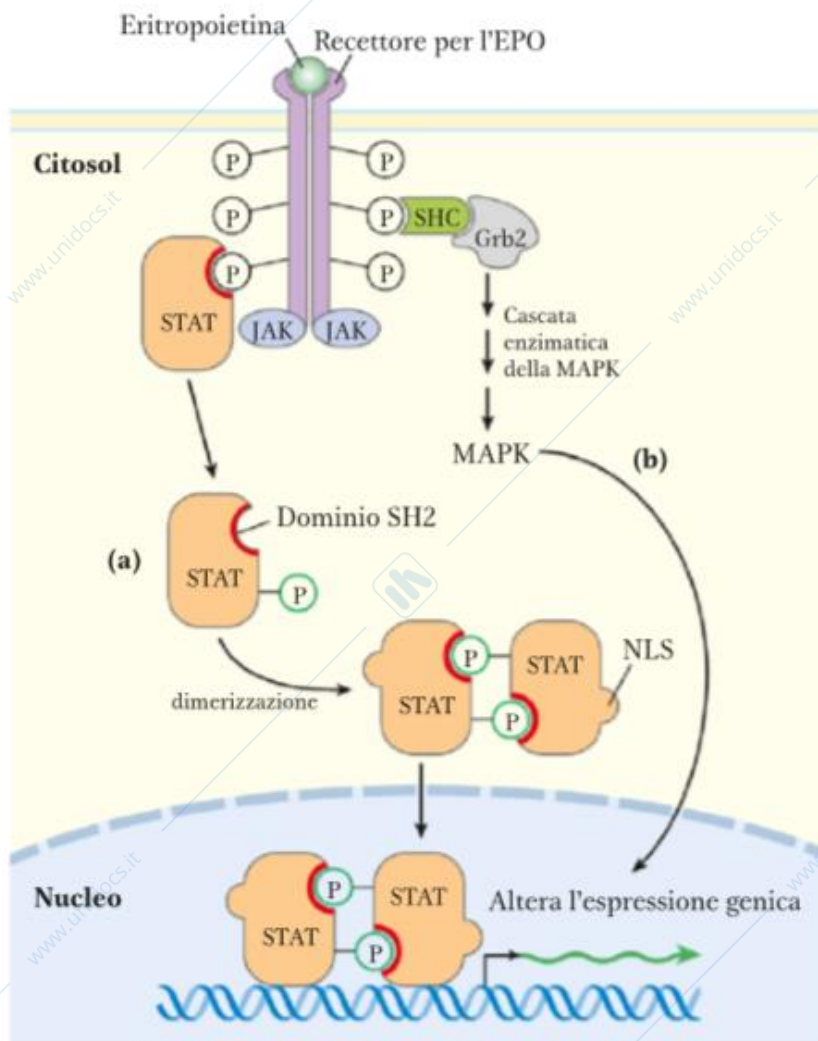
Tra i recettori tirosin chinasi, possono essere inseriti anche quei recettori che non lo sono a priori, ovvero recettori che acquisiscono attività tirosin chinasi in seguito al legame del segnale extracellulare, tra cui il **sistema JAK STAT** (ne parleremo con la Pignatti a proposito del segnale mediato da leptina, adipochina secreta dal tessuto adiposo e che ha come bersaglio il cervello.)

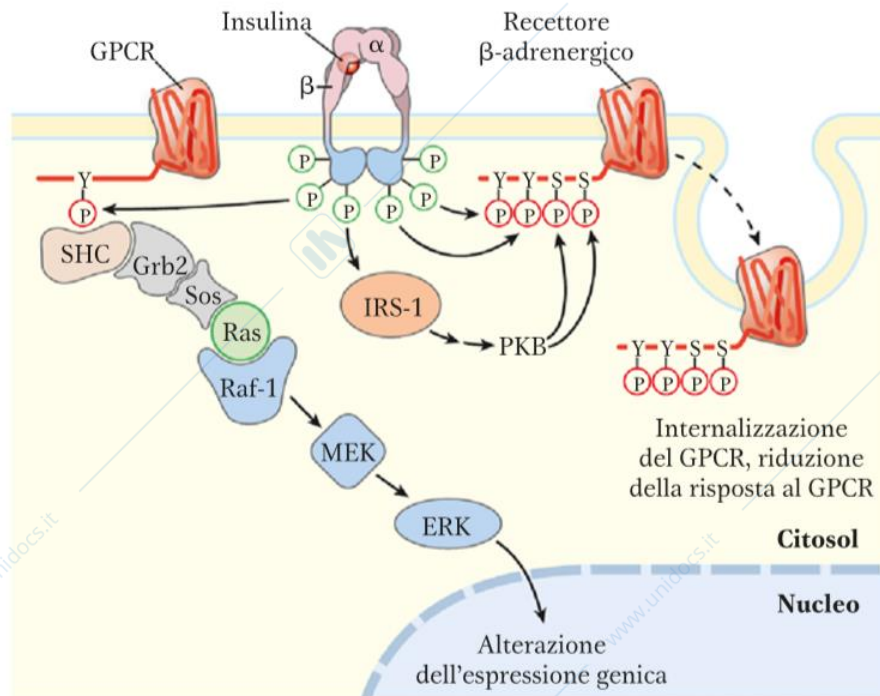
Il sistema JAK STAT può essere considerato in relazione alle **citochine**, sostanze in grado di promuovere proliferazione, differenziamento, maturazione di determinati tipi cellulari, tra cui vi è l'**eritropoietina**, un segnale che regola la formazione degli eritrociti nei mammiferi. Si tratta di un messaggero extracellulare sintetizzato a livello del **rene**, che agisce sugli eritrociti che a livello del midollo osseo vanno incontro a maturazione e proliferazione (questa sostanza è in grado di promuovere la loro proliferazione).

- 1. Quando l'eritropoietina si lega al suo recettore di membrana, la trasduzione del segnale si realizza grazie alla dimerizzazione del recettore.
2. Tale dimerizzazione porta a livello citosolico alla presenza di un sito di legame per una tirosina chinasi citosolica solubile detta **JAK** (Janus kinase).
3. Il legame con JAK porta alla fosforilazione di diversi residui di tirosina a livello del recettore: vengono a crearsi siti di riconoscimento da parte di proteine appartenenti alla famiglia delle **STAT** (signal transducer and activator of transcription). Alla classe stati appartengono molecole proteiche che intervengono promuovendo la trasduzione del segnale e attivando la trascrizione.
4. Le proteine STAT legano i residui di Tyr fosforilata nel recettore dell'EPO attraverso il dominio SH2, analoghi a quelli di Grb2.
5. Il legame di STAT al recettore EPO provoca la loro fosforilazione da parte di JAK, creando residui di fosfotirosina. La presenza di un dominio SH2 e di un residuo di tirosina fosforilato, permette la formazione da parte delle proteine STAT fosforilate di un **aggregato dimerico**, il quale possiede caratteristiche strutturali tali da permetterne il trasferimento a livello nucleare. In seguito alla dimerizzazione infatti, viene esposto su STAT un dominio che è una sequenza che promuove l'importo attraverso la membrana nucleare.
6. Il dimero STAT realizza la modulazione e l'attivazione di un processo funzionale che porta alla maturazione degli eritrociti.

→ La dimerizzazione del recettore e il legame della JAK può attivare una risposta di tipo proliferativo. In questo caso alla trasduzione del segnale non partecipano le proteine STAT, ma partecipa una proteina che ha anch'essa il dominio SH2.

1. La proteina adattatrice SHC attraverso il dominio SH2 si lega a Tyr-P del recettore e con un altro dominio lega Grb-2.
2. Il legame con Grb2 innesca la via di trasduzione del segnale caratterizzata dalla **cascata enzimatica delle MAPK**, che porta alla proliferazione degli eritrociti.



CROSS TALK TRA RECETTORI  $\beta$ -ADRENERGICI ED INSULINICI

Anche se per semplicità abbiamo trattato le vie di trasduzione del segnale come sequenze separate di eventi, ciascuna delle quali ha conseguenze metaboliche ben precise, di fatto esiste un'estesa rete di interconnessione (cross talk) tra i diversi sistemi di segnalazione.

Nelle cellule le vie di trasduzione attivate da segnali diversi, si possono influenzare reciprocamente. Questo è il caso di cellule che posseggono sia **recettori  $\beta$ -adrenergici** (che vengono attivati dal legame tra adrenalina e recettore), sia **recettori insulinici** (attivati dall'insulina). Quando si realizza una situazione di questo tipo, la trasduzione del segnale mediata dal recettore dell'insulina, influisce sulla possibilità che ha il segnale adrenergico, di promuovere la risposta funzionale da parte della cellula al segnale adrenergico stesso. Esistono due possibili vie in cui la trasduzione del segnale adrenergico e la trasduzione del segnale attivata dall'insulina possono influenzarsi reciprocamente:

**Internalizzazione del GPCR** → L'INSR chinasi fosforila direttamente due residui di tirosina del dominio carbossiterminale del recettore  $\beta$ -adrenergico e la PKB, attivata dall'insulina, fosforila due residui di serina nella stessa regione. Questi residui possono essere fosforilati anche dalla chinasi che promuove la desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico, quando lo stimolo ormonale resta presente per un lungo periodo di tempo a livello cellulare.

La fosforilazione dei quattro residui (Y-Y-S-S), innesca un meccanismo di desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico e lo spegnimento del segnale adrenalinico. La fosforilazione di questi quattro residui innesca l'internalizzazione del recettore  $\beta_2$ -adrenergico, attivandolo e abbassando la risposta cellulare all'adrenalina.

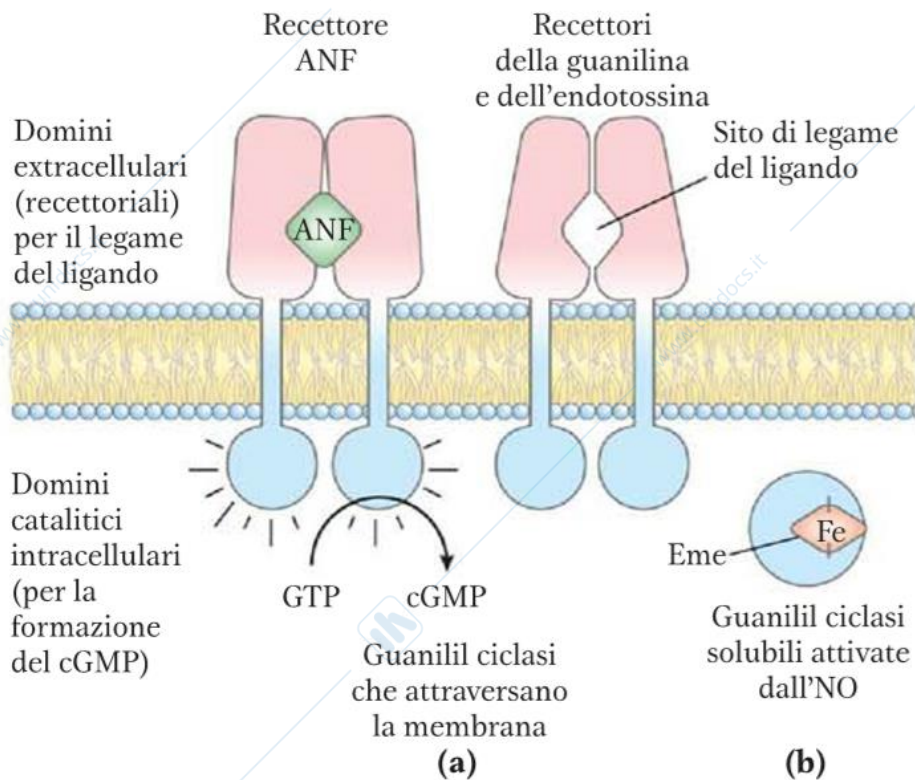
**Nucleazione di SH2** → INSR può catalizzare la fosforilazione di un GPCR su un residuo di Tyr della regione carbossiterminale. In questo modo, il residuo di fosfotirosina viene riconosciuto da una proteina SHC e dà inizio alla nucleazione di proteine che contengono il dominio SH2, come GRB2. Questo meccanismo è lo sfruttamento del recettore  $\beta$ -adrenergico per incrementare la produzione del segnale portato dall'insulina e accrescere la risposta tissutale. L'attivazione della MAPK ERK da parte dell'insulina è 5-10 volte più elevata in presenza del recettore  $\beta_2$ -adrenergico, forse a causa di questo scambio di informazioni.

In sintesi la trasduzione del segnale insulinico, quando sono presenti i recettori  $\beta$ -adrenergici, può agire contestualmente, o silenziando la via di trasduzione mediata dal recettore

$\beta$ -adrenergico o sfruttando il recettore  $\beta$ -adrenergico per attivare una risposta al segnale insulinico, che porta sia a una modificazione dello stato metabolico della cellula, attraverso l'attivazione di PKB, ma anche a uno stimolo proliferativo.

Tutto dipende dal tipo di recettori e dal numero di segnali che entrano in gioco. I segnali possono essere sia di attivazione, che di inattivazione, come quando un recettore fosforilante va a defosforilare il dominio tirosin-chinasico di un secondo recettore.

### I RECETTORI CON ATTIVITA' GUANILIL CICLASICA, il cGMP e la proteina chinasi G



**Struttura.** Possiamo analizzare le strutture di due tipologie di guanilil ciclasidi che partecipano alla trasduzione del segnale:

1. Il recettore del peptide natriuretico atriale (ANF) è un omodimero, presentante ciascuno un dominio extracellulare che legano la molecola segnale (l'ormone), un singolo segmento transmembrana che attraversa il doppio strato fosfolipidico e un dominio citosolico che possiede attività guanilato ciclasica: sono in grado di convertire una molecola di GTP in una molecola di guanosina 3',5'-monofosfato ciclico (GMPc).
2. Il secondo tipo, il recettore per l'ossido nitrico NO, è un enzima solubile contenente un gruppo eme che viene attivato dall'ossido nitrico intracellulare; questa forma si trova in molti tessuti, come il muscolo liscio del cuore e dei vasi sanguigni.

#### 1.ANF

L'ANF è una molecola di natura proteica che ha azione ormonale: viene prodotta nell'atrio destro del cuore in risposta a un'iperestensione dell'atrio destro. L'iperestensione è causata dall'aumento del volume ematico e della pressione sanguigna. L'iperestensione atriale, innesca, da parte di miociti specializzati, il rilascio di ANF, che entra nel circolo sanguigno e arriva nel nefrone renale, dove svolge la sua funzione, legandosi ai recettori con attività guanilato ciclasica, che sono localizzati nella membrana apicale dell'epitelio renale.

#### Trasduzione.

1. Il legame tra ANF e recettore, provoca un cambiamento conformazionale nel recettore e promuove l'attivazione del dominio citosolico, con attività guanilil ciclasica. Il dominio citosolico attivato, porta a un

aumento della [cGMP].

2. L'aumento dei livelli di GMPc promuove, attraverso un meccanismo allosterico, l'attivazione di **proteina chinasi G (PKG)**. La PKG possiede una singola catena polipeptidica su cui si trovano sia i domini regolatori che quelli catalitici. Parte del dominio di regolazione si inserisce nel sito di legame per il substrato: il legame con GMPc spiazza il dominio regolatorio dal sito di legame per il substrato e rende il sito attivo disponibile per il legame con una proteina bersaglio.

3. La PKG fosforila ora una proteina bersaglio. ANF, in particolare, fosforila un canale per il sodio, inattivandolo. L'inattivazione del canale  $\text{Na}^+$  provoca un aumento dell'escrezione renale dello ione e un rilascio di maggiori quantità d'acqua per osmosi. Infatti il sodio non viene più recuperato e aumenta la sua quantità nella preurina: una maggiore quantità d'acqua viene rilasciata e come conseguenza si ha una diminuzione del volume sanguigno e anche una diminuzione della pressione sanguigna.

4. La perdita di acqua, riducendo il volume ematico, diminuisce lo stimolo che inizialmente aveva condotto alla secrezione dell'ANF.

**Muscolatura vasi.** I recettori con attività guanilato ciclasica sono presenti anche a livello della muscolatura liscia dei vasi sanguigni: l'azione del fattore ANF, tramite eventi di fosforilazione, inattiva le proteine contrattili e promuove il rilassamento dei vasi. Anche in questo caso il risultato finale è una diminuzione della pressione sanguigna.

**Doppia azione:** Si può affermare che il fattore ANF abbia una doppia azione: una a livello renale e una sulla muscolatura liscia dei vasi, che portano entrambe a una *diminuzione* del volume e della *pressione sanguigna*.

**Calo di pressione:** L'azione di questo fattore è antagonista a quella dell'aldosterone, che è un ormone steroideo che agisce sul canale del  $\text{Na}^+$  nell'epitelio renale facendo aumentare la quantità di sodio nelle cellule epiteliali e riducendo la quantità d'acqua escreta con le urine.

**Incremento di pressione:** quando si innesca un incremento pressorio causato da un aumento del volume del sangue, che provoca il rilascio di un fattore ANF, si inibisce il recupero di sodio e di acqua a livello renale.

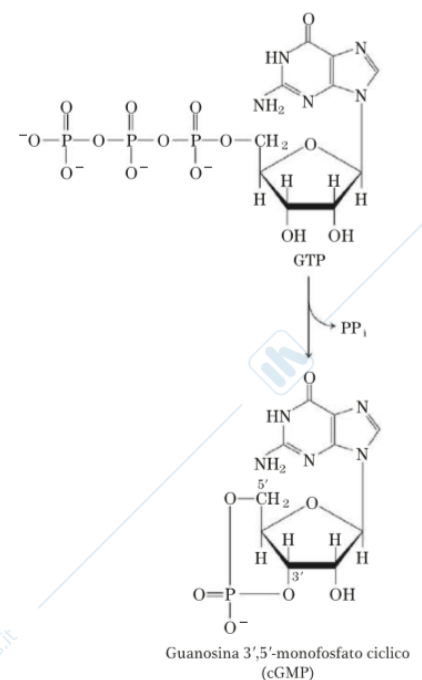
## 2. GUANILINA

Un recettore simile con attività guanilato ciclasica, localizzato nella membrana plasmatica delle cellule intestinali, è attivato dal peptide guanilina.

La guanilina è un peptide intestinale: aumenta la secrezione del cloro e diminuisce il riassorbimento dell'acqua. E' simile quindi ai fattori di cui abbiamo parlato, ma cambia il luogo in cui agisce.

Questo recettore è anche il bersaglio di un'endotossina termostabile prodotta da *E. coli* e da altri batteri gram-negativi.

L'aumento della [cGMP] causato dall'endotossina determina la secrezione del  $\text{Cl}^-$  e come conseguenza diminuisce il riassorbimento dell'acqua da parte dell'epitelio intestinale, determinando una condizione di diarrea.



## PROTEINE ADATTATRICI POLIVALENTI

CONSIDERAZIONI GENERALI SUI RESIDUI FOSFORILATI DI TYR, SER O THR

I residui fosforilati vengono creati attraverso l'azione di recettori tirosin-chinasici o tramite proteine chinasi. Ci sono due conseguenze dirette agli eventi di fosforilazione:

1. Le proteine chinasi che fosforilano i residui di Tyr, Ser o Thr sono fondamentali nella biosegnalazione, influenzando direttamente, tramite fosforilazione, le attività di un gran numero di proteine substrato.
2. La seconda riguarda la creazione di siti di ancoraggio per altre proteine, funzione svolta soprattutto dai residui di fosfotirosina. Le interazioni proteina-proteina, indotte dalla fosforilazione reversibile dei residui di Tyr, Ser e Thr nelle proteine segnale, creano dei *siti di ancoraggio* per altre proteine e producono effetti *indiretti* su proteine più a valle nella via di segnalazione. Molte proteine di segnalazione sono *polivalenti*: esse possono interagire contemporaneamente con diverse proteine formando complessi multiproteici.

→ In questa sezione presenteremo alcuni esempi che illustrano i principi generali delle interazioni fosforilazione-dipendenti fra proteine appartenenti alle vie di segnalazione.

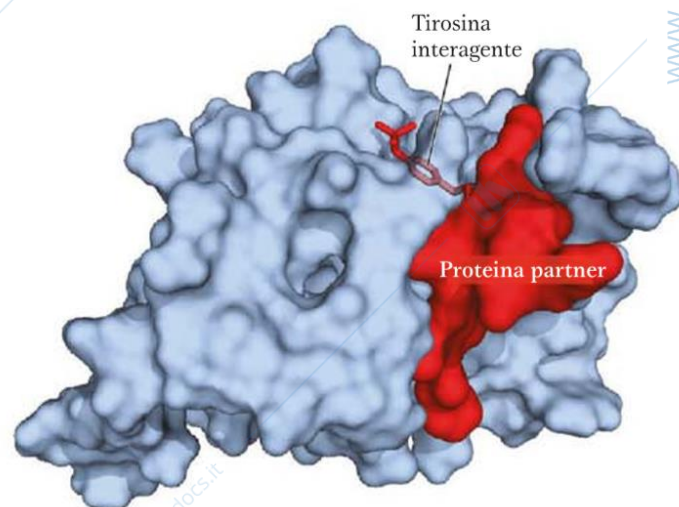
**Grb2.** Nella via di segnalazione dell'insulina, la proteina Grb2 si lega tramite il suo dominio SH2 ad altre proteine che espongono residui di P-Tyr. Il genoma umano codifica almeno 87 proteine contenenti domini SH2, molte delle quali già identificate come proteine coinvolte in processi di trasduzione del segnale. Interazioni. Il residuo P-Tyr si lega in una profonda tasca del dominio SH2, con tutti gli atomi di ossigeno del gruppo fosforico impegnate in legami idrogeno o interazioni elettrostatiche. Le cariche positive di due residui di Arg partecipano a queste interazioni. Piccole differenze nella struttura del dominio SH2 spiegano la specificità di interazioni di queste proteine nei riguardi delle proteine contenenti residui di P-Tyr.

Specificità. Il dominio SH2 solitamente interagisce con un residuo di P-Tyr (a cui si assegna la posizione 0) e con i tre successivi residui verso l'estremità carbossilica (a cui si assegnano le posizioni +1, +2, +3).

Alcuni domini SH2 (Src, Fyn, Hck, Nck) preferiscono residui carichi negativamente nelle posizioni +1 e +2. Altri domini (PLCγ1, SHP2) hanno una lunga scanalatura idrofobica che lega specificamente i residui alifatici nelle posizioni comprese tra +1 e +5.

Queste differenze definiscono le varie sottoclassi di domini SH2 con differenti specificità.

**PTB.** I domini di legame della fosfotirosina (domini pTB) costituiscono un altro partner per le proteine P-Tyr, ma le loro sequenze e strutture tridimensionali sono distinte da quelle dei domini SH2. Il genoma umano codifica 24 proteine che contengono domini PTB, come IRS-1, già prese in considerazione per il loro ruolo di proteine adattatrici nella trasduzione del segnale insulinico. I siti di legame per i domini SH2 e PTB delle proteine partner vengono creati dalle Tyr chinasi ed eliminati da tirosina fosfatasi (PTPasi). Il residuo di P-Tyr si proietta nella tasca di legame del dominio PTB, dove viene trattenuto saldamente legato da molteplici interazioni non covalenti.



**MAPK.** La proteina bersaglio può essere il diretto artefice della risposta funzionale, ma la risposta può avvenire in seguito anche alla creazione di complessi proteici. Un esempio di proteina bersaglio che causa direttamente la risposta funzionale si ha nella cascata delle MAPK, in cui la fosforilazione dei residui di Serina e Treonina di ERK, porta alla sua migrazione nel nucleo e alla modulazione della sua azione. Non sempre è così, in quanto possono essere fosforilate proteine che possono costituire siti di ancoraggio per complessi proteici che danno origine a una risposta funzionale e quindi non sempre la trasduzione del segnale finisce con l'evento di fosforilazione di una proteina bersaglio.

**PIP<sub>3</sub>.** Oltre ai residui di treonina, serina e tirosina, c'è una quarta struttura che contribuisce al processo di nucleazione che poi conduce alla formazione di complessi sopramolecolari di proteine di segnalazione: il gruppo fosforilato della testa dei fosfatidilinositoli. Molte proteine di segnalazione contengono domini, come l'SH3 e il PH (dominio di omologia della plextrina) che si legano saldamente a molecole di PIP<sub>3</sub>, che sporgono dal foglietto interno della membrana plasmatica. Tutte le volte che l'enzima PI3K produce il segnale PIP<sub>3</sub> fosforilando la testa del fosfatidilinositolo PIP<sub>2</sub>, le proteine che riconoscono questo segnale si aggregano sulla superficie della membrana interna. La creazione di questo lipide permette l'ancoraggio di PKB e della phosphoinositide3-dependent protein kinase. In questo caso, un elemento di natura lipidica permette l'ancoraggio di due proteine.

→ Tirando le fila, sia la creazione dei residui fosforilati che la creazione dei lipidi, quali PIP<sub>3</sub>, ha la stessa importanza perché fungono da siti di nucleazione per i complessi multiproteici.

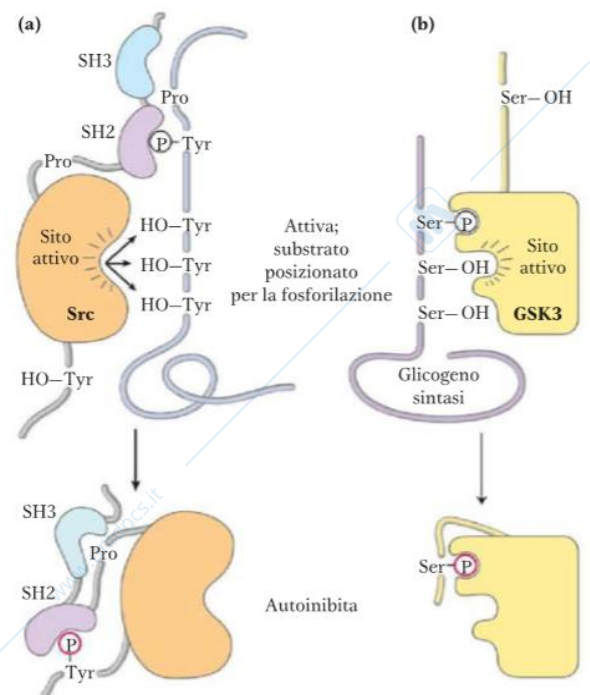
**Terzo significato: orientamento.** I residui fosforilati possono avere anche un terzo significato, oltre alla (1) modulazione dello stato funzionale della proteina e alla (2) creazione di complessi multiproteici. Infatti alcuni enzimi sono in grado di riconoscere il proprio substrato e di (3) orientarlo perfettamente rispetto al loro sito catalitico, grazie alla presenza di residui di serina e tirosina fosforilati sulla proteina bersaglio.

### Src

Funzione dominio. La tirosina chinasi Src ha un dominio SH2, che le permette di riconoscere la proteina bersaglio e di orientarla correttamente rispetto al suo sito catalitico, in questo modo l'enzima può catalizzare la fosforilazione di uno o più residui di tirosina.

Autoinibizione. Src possiede un meccanismo di autoinibizione e partecipa alla trasduzione del segnale per la proliferazione dei tessuti.

- Nello stato attivo della Tyr chinasi Src, un dominio SH2 lega una P-Tyr della proteina substrato, e un dominio SH3 lega una regione ricca di residui di prolina, sempre nel substrato, allineando il sito attivo della chinasi con diversi residui bersaglio di Tyr nel substrato.
- La disattivazione avviene attraverso la fosforilazione di uno specifico residuo di Tyr carbossiterminale interno all'enzima Src tirosina chinasi: la fosforilazione induce un cambiamento conformazionale e il dominio SH2 riconosce il proprio residuo di tirosina fosforilato piuttosto che quello del substrato e il dominio SH3 si lega ad una regione interna ricca di prolina, provocando l'**autoinibizione**.
- Riattivazione: naturalmente affinché una tirosina chinasi possa tornare nella forma attiva deve essere a sua volta defosforilata per azione dell'attivazione di una fosfatasi specifica.



**GSK3.**

La glicogeno sintasi chinasi 3 è una proteina che possiede dei siti di riconoscimento per i residui di serina fosforilati.

1. Presenta vicino al sito catalitico un sito di priming: esso riconosce un residuo di serina fosforilato del suo substrato, (la glicogeno sintasi) che è stato creato per effetto di un enzima: “**la creatina chinasi II**”. La creatina chinasi II va a fosforilare, alcuni residui di serina, modificando la glicogeno sintasi, in modo tale che i suoi residui di serina possano essere orientati correttamente, rispetto al sito catalitico della glicogeno chinasi sintasi 3.
2. Anche questo enzima ha un meccanismo di autoinibizione perché possiede un residuo di serina che può andare incontro a fosforilazione. Questo porta a un cambiamento conformazionale nella proteina, che va ad adagiare il residuo di serina fosforilato nel sito di priming. A questo punto finisce l'interazione con la glicogeno sintasi.

→ Per concludere possiamo dire che i residui di serina, treonina e tirosina fosforilati hanno tutti almeno 3 significati e tutti importanti per la trasduzione del segnale. ←

**REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DA PARTE DELL'INSULINA TRAMITE LA CASCATA MAP CHINASICA**  
Quando un segnale iniziale porta alla fosforilazione di un recettore o di una proteina bersaglio, si innesca la costruzione di complessi proteici di grandi dimensioni, uniti da un'impalcatura formata da proteine adattatrici dotate di capacità di legami **polivalenti**. Alcuni di questi complessi contengono diverse proteina chinasi che si attivano a vicenda, producendo una cascata di fosforilazioni e quindi una notevole amplificazione del segnale.

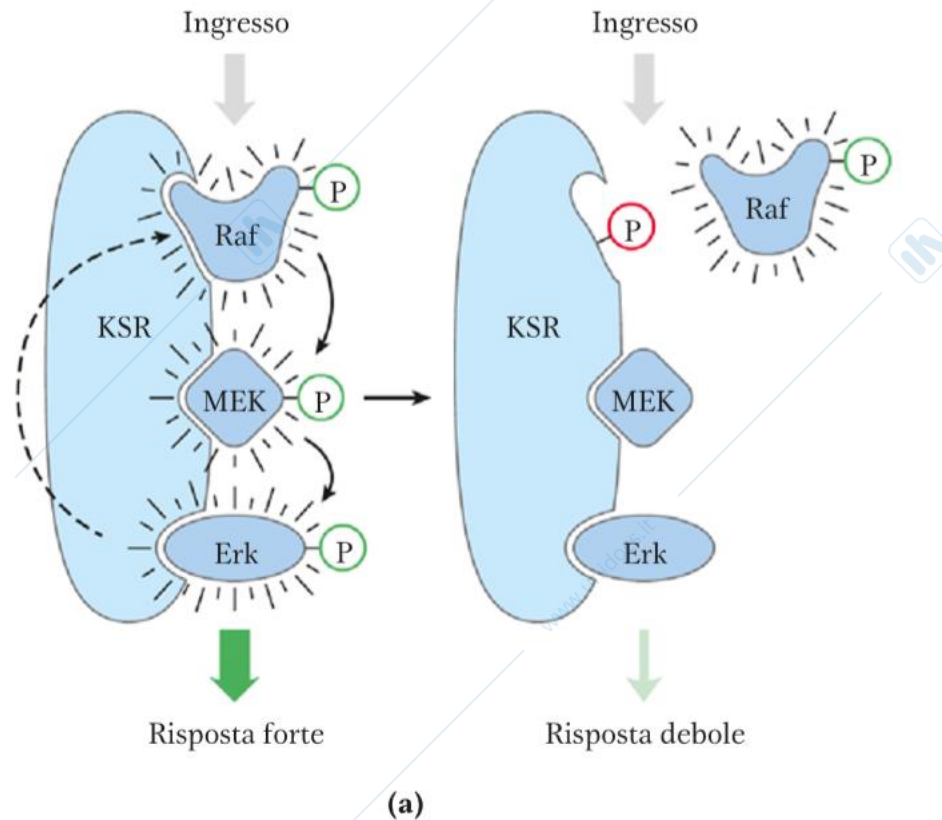
Ultimo aspetto che riguarda la trasduzione del segnale dell'insulina è collegata alla cascata enzimatica delle MAPK.

**KSR.** Le tre chinasi non sono libere nel citosol, ma sono legate a una proteina adattatrice KSR, che le orienta perfettamente l'una rispetto all'altra, e fa sì che la trasduzione del segnale insulinico avvenga molto più velocemente. Se le 3 chinasi non fossero associate ogni chinasi dovrebbe diffondere nel citosol per incontrare la chinasi che è suo substrato e tutto questo avrebbe delle implicazioni temporali e ridurrebbe l'efficienza di questo sistema. Tutto ciò rende la fosforilazione in serie di proteine un processo sensibile anche a stimoli deboli. Anche questo insieme KSR con le 3 MAPK costituisce un complesso multiproteico.

**Trasduzione.** Si attiva la trasduzione del segnale insulinico, si forma un complesso multiproteico che va da IRS-1 a Ras, Ras ha un dominio di riconoscimento per KSR, infatti è indifferente impiegare Raf-1 libera e Raf-1 legata a KSR e il segnale viene trasmesso molto rapidamente. Per cui, di fatto, soltanto a livello di ERK si ha un meccanismo di amplificazione del segnale, perché ERK, una volta che viene fosforilato viene liberato nel nucleo e fosforila un fattore di trascrizione: Elk-1.

**Spegnimento.**

1. L'associazione con una proteina adattatrice KSR ha anche un altro significato. Quando ERK viene fosforilato da MEK, ERK viene attivato, ed è in grado, prima di dissociarsi, di fosforilare il dominio su KSR di legame per Raf-1 e questa fosforilazione, spazza via Raf-1 interrompendo la trasduzione del segnale. Quindi l'associazione delle MAPK a KSR costituisce anche un meccanismo di tipo allosterico di spegnimento del segnale.
2. Lo spegnimento del segnale può essere dato anche da fosfatasi citosoliche: le *fosfotirosina fosfatasi* rimuovono il gruppo fosforico dai residui di P-Tyr, annullando così l'effetto delle fosforilazioni. Alcune di queste proteine sono simili ai recettori, probabilmente controllate da fattori extracellulari non ancora identificati. Altre sono invece proteine solubili contenenti domini SH2. Le cellule animali contengono inoltre P-Thr e P-Ser fosfatasi, che annullano gli effetti di specifiche Thr- e Ser- proteina chinasi.



### CANALI IONICI CONTROLLATI pag 478

I CANALI IONICI DELLE CELLULE ECCITABILI PRODUCONO SEGNALE ELETTRICO

Definizione. Le cellule eccitabili sono tutte le cellule in grado di recepire il messaggio esterno e di convertirlo in un stimolo elettrico. Sono eccitabili tutte le cellule sensoriali, quelle nervose, i neuroni e quelle di alcuni miociti.

Eccitabilità. L'eccitabilità è data dalla presenza di canali nella membrana plasmatica che possono andare incontro ad apertura e chiusura a seconda dello stimolo: sono trasduttori del segnale che regolano il trasporto attraverso la membrana plasmatica di ioni inorganici, come  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ . Questi canali permettono il traffico di ioni tra cui sodio, potassio, cloro e calcio. Tutte queste cellule possiedono un potenziale elettrico transmembrana dovuto all'esistenza di pompe primarie e secondarie e che mediamente varia da -50 a -70 millivolt. L'ATPasi  $\text{Na}^+ \text{K}^-$  dipendente è elettrogenica, poiché crea uno sbilanciamento delle cariche attraverso la membrana, trasportando a ogni ciclo 3 ioni  $\text{Na}^+$  fuori dalla cellula e 2 ioni  $\text{K}^+$  all'interno. L'interno diventa così **più negativo** e l'esterno **più positivo**, e la membrana viene detta 'polarizzata'.

Canali. L'eccitabilità è data per l'appunto dall'apertura dei canali, che possono essere regolati dai ligandi o dal voltaggio e possono essere **cationici o anionici**. Dato che i canali ionici permettono il passaggio di anioni o di cationi, ma mai di entrambi, il flusso ionico attraverso un canale causa sempre una redistribuzione delle cariche ai due lati della membrana, modificando il valore della  $V_m$ .

Polarizzazione e depolarizzazione. L'apertura di questi canali può portare dipendentemente dalla spontaneità del flusso degli ioni ad eventi di polarizzazione o depolarizzazione.

- *Depolarizzazione.* L'afflusso di uno ione carico positivamente, come lo ione  $\text{Na}^+$ , oppure l'efflusso di uno ione carico negativamente, come il  $\text{Cl}^-$ , depolarizza la membrana e avvicina il valore di  $V_m$  a 0.

- *Iperpolarizzazione.* Il flusso verso l'esterno di ioni positivi  $\text{K}^+$  invece iperpolarizza la membrana, e il valore di  $V_m$  diventa più negativo.

Direzione del flusso. La direzione del flusso spontaneo attraverso una membrana polarizzata è determinata dal potenziale elettrochimico dello ione attraverso la membrana, che ha due componenti:

- La differenza di concentrazione dello ione sui due lati della membrana
- La differenza del potenziale elettrico, di norma espressa in mV.

La forza  $\Delta G$  che causa il passaggio spontaneo di un catione (per esempio  $\text{Na}^+$ ) attraverso un canale ionico dipende dal rapporto tra le sue concentrazioni ai due lati della membrana ( $C_{\text{interno}}/C_{\text{esterno}}$ ) e dalla differenza di potenziale elettrico ( $\Delta\psi$  o  $V_m$ ):

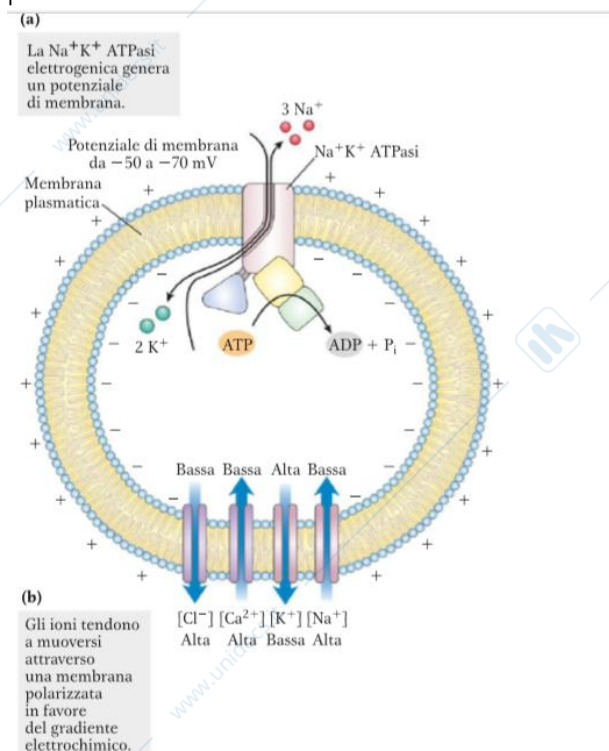
$$\Delta G = RT \ln(C_{\text{interno}}/C_{\text{esterno}}) + ZFV_m$$

### Spontaneità.

$\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ : in base alla relazione mostrata, l'apertura di un canale per il  $\text{Na}^+$  e per il  $\text{Ca}^{2+}$  porterà a un ingresso spontaneo dello ione  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e a una depolarizzazione. Lo ione sodio ha una concentrazione 55 mM esterna, mentre una 12 mM interna. Il calcio ha una concentrazione 2 mM esterna, mentre una concentrazione 0,1 mM interna.

$\text{Cl}^-$ : il cloro si muove spontaneamente dallo spazio citosolico a quello extracellulare. La spontaneità di questo flusso ha ragioni elettriche. Il cloro è molto più concentrato nella fase extracellulare rispetto a quella citosolica.

$\text{K}^+$ : L'apertura del canale del  $\text{K}^+$  porta invece a una iperpolarizzazione della membrana. Il potassio è più concentrato all'interno della cellula e poiché lo spostamento di questo ione avviene dal citosol allo spazio extracellulare, il suo trasporto è verso gradiente chimico, ma contro gradiente elettrico, quindi il suo movimento provoca un incremento della differenza di potenziale elettrico all'interno della membrana plasmatica.



Equilibrio. Una data specie ionica continua a fluire attraverso il canale fintanto che la combinazione di gradiente di concentrazione e di potenziale elettrico fornisce una forza trainante per il sistema. Per esempio, se il flusso di  $\text{Na}^+$  è in favore del suo gradiente di concentrazione, esso depolarizza progressivamente la membrana. Quando il potenziale raggiunge un valore di +70 mV, l'effetto di questo potenziale di membrana diventa esattamente uguale all'effetto del gradiente di concentrazione dell' $\text{Na}^+$ . A questo potenziale di equilibrio (E) la forza trainante che favorisce questo movimento ionico ( $\Delta G$ ) è uguale a 0. Il potenziale di equilibrio è diverso per ogni specie ioniche poiché il gradiente di concentrazione è diverso per ogni ione.

Stato stazionario. Quando si aprono i canali di sodio, del potassio e del cloro, poiché la concentrazione degli ioni spostati da un lato all'altro, che provocano un cambiamento del potenziale elettrico è molto piccolo rispetto alle concentrazioni citosoliche reali degli ioni (dell'ordine del millimolare), non si può dire che l'apertura dei canali porti a una variazione delle concentrazioni citosoliche. Diversa è la situazione per il calcio che provoca un' invece una variazione della sua concentrazione citosolica, (dato che è presente nel citosol a concentrazioni estremamente basse, circa  $10^{-7}$  M). Questo è molto importante per la propagazione dell'impulso nervoso mediato da neurotrasmettitore tra una cellula presinaptica a una postsinaptica, infatti il rilascio del neurotrasmettitore dipende dalla concentrazione citosolica del calcio.

$\text{K}^+$ . Il potenziale di membrana di una data cellula in un dato momento dipende dal tipo e dal numero di canali ionici chiusi aperti in quell'istante. Nella maggior parte delle cellule a riposo (cellule non stimolate) sono aperti molti più canali per il  $\text{K}^+$  che per gli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Ca}^{2+}$  e quindi il potenziale a riposo ha un valore molto più vicino al potenziale di equilibrio E per il  $\text{K}^+$  (-98 mV) rispetto a quello di qualsiasi altro ione. Quando i canali per gli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  o  $\text{Ca}^{2+}$  sono aperti, il potenziale di membrana si sposta verso il valore del potenziale E dello ione che sta entrando.

#### I CANALI IONICI CONTROLLATI DAL VOLTAGGIO PRODUCONO POTENZIALI D'AZIONE NEI NEURONI

Segnalazione. La segnalazione nel sistema nervoso avviene attraverso una rete complessa di neuroni, cellule specializzate che trasportano un impulso elettrico (il potenziale d'azione) a partire da un'estremità della cellula (corpo cellulare) attraverso una lunga estensione del citoplasma (l'assone). Il segnale elettrico innesca il rilascio di molecole di un neurotrasmettitore a livello della sinapsi, in modo da trasmettere un messaggio alla cellula successiva del circuito.

Canali importanti. In questo meccanismo di segnalazione sono essenziali tra tipi di canali ionici controllati dal voltaggio.

1. **Canali per l' $\text{Na}^+$**  controllati da voltaggio: sono allo stato di riposo quando la membrana ha un potenziale transmembrana  $V_m$  di -60mV, e si aprono quando la membrana si depolarizza localmente, in risposta all'acetilcolina oppure a un altro neurotrasmettitore.
2. **Canali per il  $\text{K}^+$**  controllati da voltaggio: si aprono una frazione di secondo più tardi della depolarizzazione provocata dall'apertura dei canali per l' $\text{Na}^+$ . Il flusso depolarizzante di  $\text{Na}^+$  all'interno dell'assone (afflusso) viene quindi rapidamente controbilanciato da un flusso polarizzante di  $\text{K}^+$  all'esterno dell'assone (efflusso).
- 3 **Canali per il  $\text{Ca}^{2+}$**  controllati da voltaggio: si aprono quando arriva l'onda di depolarizzazione e ripolarizzazione causata dall'attività dei canali per l' $\text{Na}^+$  e per il  $\text{K}^+$ .

#### Trasmissione del potenziale d'azione.

1. La cellula presinaptica converte il segnale ricevuto in un segnale elettrico, ossia in una variazione di potenziale elettrico transmembrana. L'inversione della polarità del potenziale è indotta dal superamento di un potenziale **soglia**, una depolarizzazione locale che porta la differenza di potenziale tra l'interno della membrana e l'esterno da -60 mV (in media) a circa **40 mV**.

2. Il superamento del valore soglia determina l'apertura dei canali per l' $\text{Na}^+$  controllati da voltaggio. L'apertura si realizza in frazioni di millisecondo: essi sentono la diminuzione della differenza di potenziale transmembrana, si aprono e ognuno determina l'ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  che vanno spontaneamente nel citosol

per gradiente elettrochimico. I canali dell' $\text{Na}^+$  controllati da voltaggio sono molto selettivi per l' $\text{Na}^+$  rispetto ad altri cationi e hanno un flusso molto elevato ( $>10^7$  ioni/s). Dopo essere stati aperti, i canali dell' $\text{Na}^+$  trasferiscono decine di migliaia di ioni per secondo per una decina di frazione di millisecondo, determinando un'inversione di polarità a **+30 mV**. Il potenziale elettrico sul lato citosolico della membrana ad un valore maggiore rispetto al versante extracellulare, esattamente l'opposto di ciò che si verifica quando la cellula è nello stato di riposo.

Vanno incontro a una rapidissima inattivazione: nel giro di millisecondi il canale si chiude e rimane inattivo per molti millisecondi.

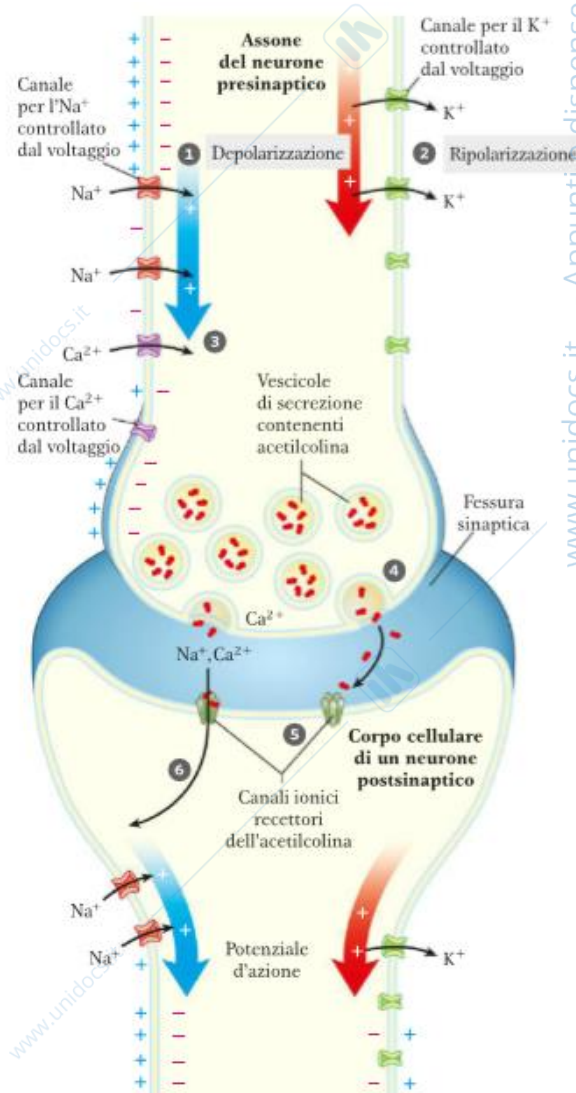
3. Una volta realizzato l'ingresso del sodio, il canale del  $\text{Na}^+$  va subito incontro ad inattivazione definendo il periodo refrattario: un intervallo di tempo in cui la membrana plasmatica non è più eccitabile perché il canale del  $\text{Na}^+$  non è in grado di rispondere a eventuale depolarizzazione. Il canale resta inattivo non potendo più permettere efflusso di ioni: importante in quanto impedisce che stimoli diversi possano promuovere eccitazioni che potrebbero sommarsi a livello della membrana plasmatica. Gli stimoli ricevuti dalla cellula presinaptica vengono sempre trasferiti e si propagano singolarmente dal corpo cellulare lungo l'assone.

4. La depolarizzazione della membrana plasmatica provoca l'apertura dei canali del  $\text{Na}^+$  adiacenti: depolarizzazioni locali determinano l'apertura di un canale del  $\text{Na}^+$  che si trova nelle immediate vicinanze e l'onda di depolarizzazione si propaga lungo la membrana plasmatica.

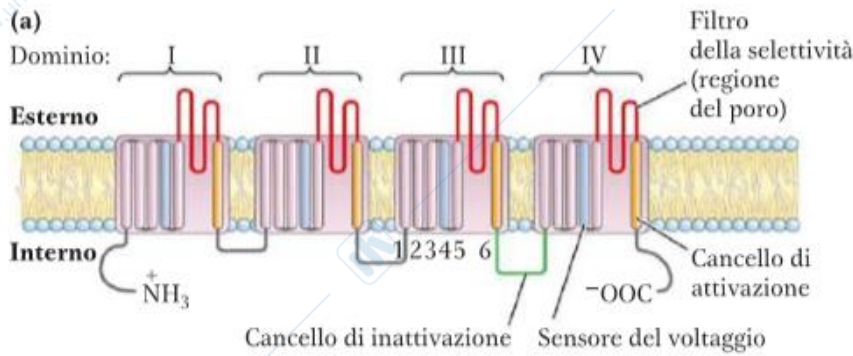
5. Immediatamente dopo il passaggio del potenziale d'azione sull'assone, i canali per il  $\text{K}^+$  controllati dal voltaggio si aprono, permettendo l'uscita del  $\text{K}^+$  che causa la ripolarizzazione della membrana, rendendola pronta per il prossimo potenziale d'azione. Abbiamo un'onda di depolarizzazione seguita da un'onda di ripolarizzazione della membrana plasmatica.

6. Quando l'onda di depolarizzazione giunge a livello della terminazione assonica determina l'apertura di canali del  $\text{Ca}^{2+}$ , numerosi in questa regione e voltaggio dipendenti come i precedenti. L'apertura di questi canali provoca l'ingresso del calcio (spinto da gradiente sia chimico che elettrico), il quale promuove l'esocitosi di vescicole contenenti i neurotrasmettitori, in questo caso acetilcolina, che viene rilasciata nello spazio sinaptico.

7. Nella sinapsi chimica, è presente un recettore per l'acetilcolina sulla membrana postsinaptica che è un recettore ionotropico: recettore presentante canale interno la cui apertura è determinata dal legame dell'acetilcolina stessa. Questo recettore ha scarsissima specificità: permette il passaggio di specie ioniche quali sodio, potassio e calcio. L'ingresso di ioni calcio e sodio è maggiore rispetto all'efflusso di potassio (che va in senso opposto) e questo comporta che l'apertura del canale generi una limitata depolarizzazione locale della membrana (limitata perché questo ingresso di ioni determina una depolarizzazione che in termini quantitativi è molto inferiore rispetto a quella prodotta dalla apertura dello ione  $\text{Na}^+$ ).



## 1. CANALE DEL SODIO

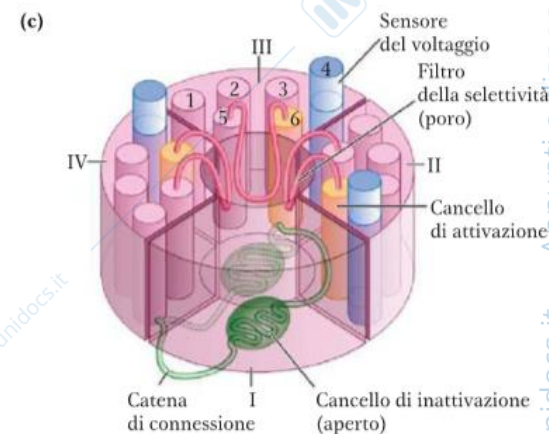


**Struttura.** I canali per il sodio di vari tessuti e organismi sono costituiti da diversi tipi di subunità, ma soltanto la subunità principale ( $\alpha$ ) è essenziale. Essa consta di quattro domini di cui ognuno costituito da sei eliche transmembrana.

1. Ha un **loop** rivolto verso lo spazio extracellulare che collega le eliche 5 e 6 transmembrana andando a definire il filtro del poro, la regione che definisce la selettività di un canale per uno o più ioni: in questo caso si tratta di un filtro a scarsa specificità.

2. L'elica 4 di ogni dominio è il sensore del voltaggio. Esse sono in prossimità delle eliche 6 che sono coinvolte nell'apertura del canale: i movimenti di questi sensori del voltaggio portano a cambiamenti conformazionali che sono responsabili dell'assunzione da parte del canale di diversi stati regolando la transizione da stato aperto (attivo) a stato chiuso. I sensori sono composti da molti residui basici tra cui l'**arginina**.

**Sensore del voltaggio.** Il meccanismo che rileva il voltaggio è dato dal movimento dell'elica 4 perpendicolare la piano della membrana, in risposta a una variazione del potenziale di membrana. Le cariche positive sull'elica 4 consentono lo spostamento verso l'interno. La depolarizzazione diminuisce questa attrazione e l'elica 4 può spostarsi in direzione opposta. Questo movimento determina variazioni conformazionali che portano ad un allontanamento dei segmenti 6 transmembrana di ognuno dei domini, i quali definiscono la superficie proteica del canale. L'allontanamento della porzione centrale del poro verso l'esterno è un movimento centrifugo.

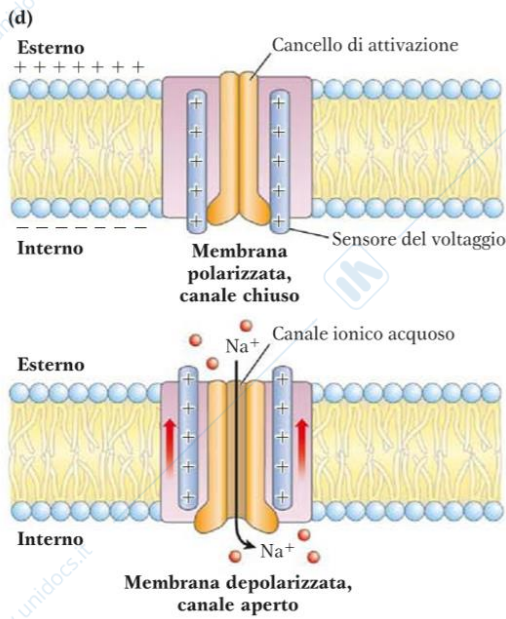


**Inattivazione.** Il canale del  $\text{Na}^+$  ha la caratteristica di aprirsi per pochi millisecondi, trasferire ioni  $\text{Na}^+$  e poi andare incontro ad inattivazione senza cui il canale non potrebbe chiudersi: se il potenziale non eguaglia il valore di quello di riposo non è in grado di assumere la conformazione chiusa. L'inattivazione permette che diversi stimoli eccitatori non vadano a sommarsi e ad essere congiuntamente trasmessi come onda di depolarizzazione lungo la membrana neuronale.

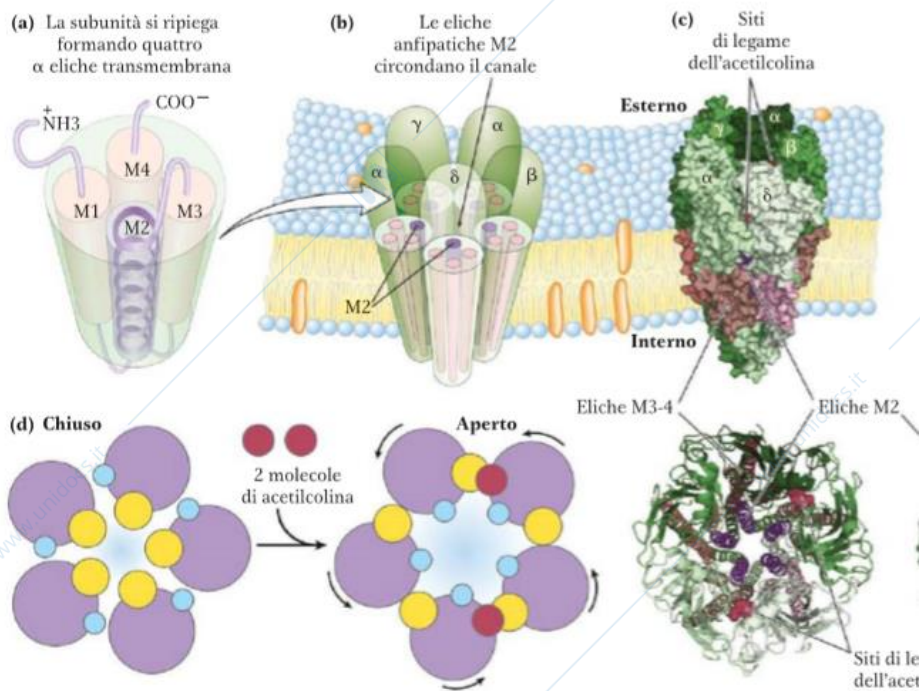
**Meccanismo.** Si ritiene che l'inattivazione avvenga mediante un meccanismo a 'palla e catena'.

L'inattivazione è dovuta alla presenza nel canale di un dominio citosolico **globulare** associato tramite due brevi segmenti peptidici al **segmento 6** del **3° dominio** e al **segmento 1** del **4° dominio**, formando un loop che congiunge segmenti appartenenti a due domini adiacenti.

Il segmento peptidico che contiene il dominio globulare è estremamente corto e nel momento in cui le eliche 6 si allontanano per promuovere apertura del canale, permettono l'esposizione di un dominio del canale stesso che può riconoscere il dominio globulare. Quindi i segmenti 6 di ogni dominio provocano una distensione del segmento peptidico definito *palla e catena* promuovendo l'avvicinamento del dominio globulare alla superficie proteica con cui esso può interagire e andando così a chiudere il poro dalla parte che esso rivolge al dominio citosolico.



## 2. CANALE DELL'ACETILCOLINA.



**Nicotinico e muscarinico.** I recettori nicotinici dell'acetilcolina venivano distinti dai recettori muscarinici dell'acetilcolina in base alla loro diversa sensibilità alla nicotina oppure all'alcaloide muscarina dei funghi. A differenza del recettore colinergico nicotinico (nAChR) che è un recettore-canale, il recettore colinergico muscarinico (mAChR) è accoppiato a proteine G, quindi è un recettore metabotropico. È così chiamato perché ha elevata affinità per la muscarina, media per l'acetilcolina (ACh) e bassa per la nicotina.

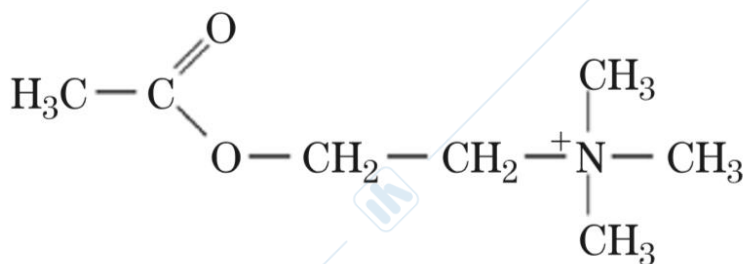
**Struttura.** Il recettore nicotinico dell'acetilcolina ha cinque subunità ( $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ), ciascuno con quattro eliche transmembrana (M1, M2, M3, M4). Le cinque subunità hanno sequenza e struttura terziaria correlate. Esse circondano un poro centrale che è in contatto con le loro eliche M2. Il poro ha un diametro di circa 20 Å nelle due parti del canale in prossimità del citoplasma e della superficie esterna della membrana, ma si restringe nella porzione che si trova immersa nel doppio strato lipidico. In questa regione vi è un anello formato da voluminose catene laterali idrofobiche di residui di leucina delle eliche M2, che creano un ostacolo al passaggio degli ioni attraverso il canale. Il legame dell'acetilcolina ai siti presenti su ciascuna

subunità costringe tutte le eliche M2 a ruotare leggermente, spostando da una parte i voluminosi residui di Leu e rimpiazzandoli con residui polari più piccoli. L'allargamento del poro permette il passaggio degli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Funzione.** Il recettore nicotino dell'acetilcolina media il passaggio di un segnale da un neurone elettricamente eccitato in alcuni tipi di sinapsi e nelle giunzioni neuromuscolari (tra un neurone e una fibra muscolare), innescando la contrazione muscolare.

**Azione.** L'acetilcolina rilasciata dai neuroni presinaptici o dai neuroni motori diffonde per pochi micrometri verso la membrana plasmatica del neurone postsinaptico o verso il miocita, dove si lega a un recettore. La conseguente modificazione conformazionale dei recettori porta all'apertura dei canali ionici. Il trasporto dei cationi all'interno della cellula depolarizza la membrana e nella fibra muscolare questo processo innesca la contrazione. Il recettore dell'acetilcolina permette il passaggio degli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ .

**Degradazione.** L'acetilcolina che viene rilasciata a livello della sinapsi in parte viene letta dai recettori canale localizzati sulla membrana postsinaptica e in parte viene invece degradata ad opera di esterasi specifiche, le acetilcolinaesterasi (poiché la molecola contiene un legame estere) e i prodotti della degradazione (acetile e colina) vengono riassorbiti a livello della membrana presinaptica che utilizza queste componenti per ri-sintetizzare acetilcolina.



Acetilcolina

### INTEGRINE (accenno)

Le integrine sono recettori eterodimerici costituiti da subunità  $\alpha$  e  $\beta$ , con componente extracellulare e componente transmembrana, e sono ancorate al citoscheletro.

Questi tipi di recettori regolano processi quali l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare e quindi sono coinvolti nella migrazione cellulare e nelle interazioni cellula-cellula: la loro attività va dallo sviluppo embrionale al differenziamento, alla formazione del coagulo, alla risposta immunitaria.

Ci sono molte patologie dovute a mutazioni di geni che codificano per le integrine e per i loro recettori (hanno 4 tipi di recettori) e molte riguardano appunto alterazioni del sistema immunitario o dei processi di coagulazione che possono essere sia eccessivamente promossi sia inibiti, il che significa patologie rispettivamente di tipo emorragico o di ipercoagulazione con conseguente occlusione di vasi, infarti e ictus. Inoltre le integrine sono coinvolte nei processi di tumorigenesi e soprattutto di metastatizzazione: le cellule tumorali migrano attraverso il flusso ematico dal sito del tumore stesso ad altri distretti dell'organismo; man mano che la massa cresce richiede una rete vascolare che permetta di ricevere nutrienti e ossigeno e le integrine sono coinvolte anche nei processi di angiogenesi.

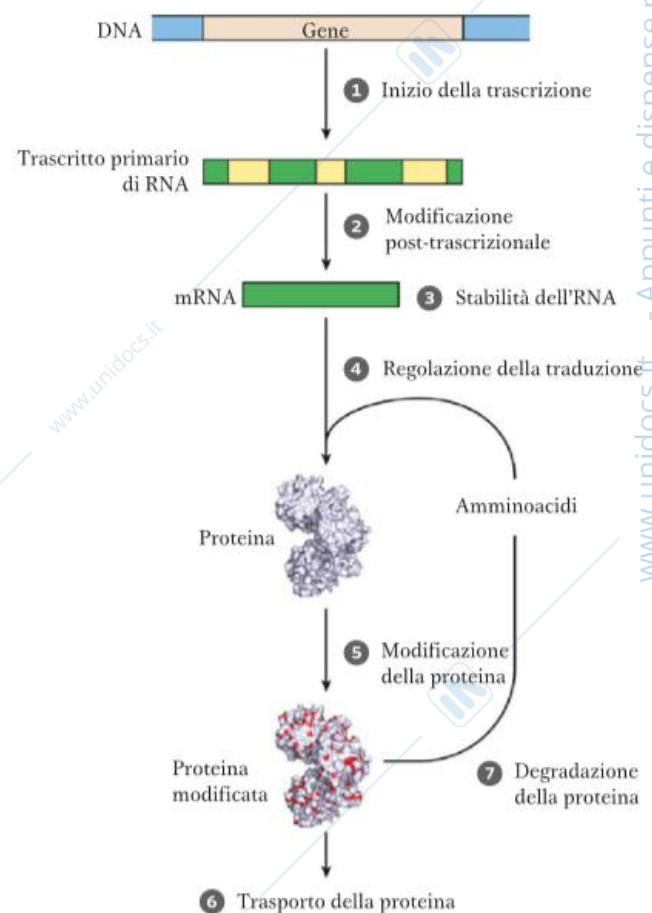
## REGOLAZIONE DELLA TRASCRIZIONE DA PARTE DI ORMONI STEROIDEI

Ormoni quali gli steroidei, i tiroidei, il calcitriolo e l'acido retinoico, non agiscono attraverso recettori di membrana bensì tramite recettori intracellulari, e la loro azione porta sempre ad una modulazione nella trascrizione di specifici geni.

**Trasporto.** Gli ormoni che agiscono tramite ormoni intracellulari sono ormoni di natura idrofobica che quindi vengono trasferiti dal sito di produzione sotto forma di complessi con molecole di natura proteica; sono rilasciati a livello dei tessuti bersagli e poiché idrofobici sono in grado di diffondere attraverso la membrana plasmatica, entrare nella cellula bersaglio, legarsi al recettore e modulare la trascrizione di geni specifici.

**Omeostasi proteina.** Affinché la modulazione della trascrizione di uno specifico gene da parte di un ormone abbia un effetto metabolico deve promuovere una variazione dei livelli intracellulari della proteina che è codificata da quel determinato gene, quindi l'azione di questi ormoni si esplica sempre attraverso modulazione dei livelli intracellulari di specifiche proteine. Il controllo dei livelli proteici non è necessariamente dovuto alla regolazione della fase trascrizionale: per modulare i livelli di una proteina bisogna agire sull'omeostasi e quindi alterare lo stato stazionario a cui portano la velocità di sintesi e la velocità di degradazione di una certa proteina. Se la velocità di questi processi non viene modificata i livelli della proteina non possono cambiare e gli ormoni vanno ad agire regolando la trascrizione: la trascrizione va ad incidere sulla velocità con cui una proteina viene sintetizzata producendo quindi un aumento dei livelli della proteina.

→ Non necessariamente la modulazione della fase trascrizionale si riflette in una modulazione dei livelli proteici perché la sintesi di una proteina si realizza in una serie di tappe quali la trascrizione, le modificazioni post-trascrizionali, la quantità di mRNA prodotto, regolazione del meccanismo traduzionale, processi post-tradizionali ed eventualmente anche processi di trasporto nel caso in cui non si tratti di una proteina citosolica. Quindi gli ormoni sono in grado di regolare i livelli di una proteina regolando la trascrizione solo se la trascrizione rappresenta la tappa limitante del processo di sintesi.



Cromatina. Quando la cellula eucariote esce da una fase di divisione cellulare a seguito del completamento di una mitosi ha due possibilità: o va incontro a differenziamento ed esce dal ciclo cellulare o va incontro al periodo di interfase, e quindi va in fase G1, poi S e poi G2, essendo l'interfase una fase preparatoria per la realizzazione di una seconda mitosi.

Sia che rimanga nel ciclo cellulare sia che ve ne esca e vada incontro a differenziamento, i cromosomi assumono le caratteristiche della cromatina: insieme nucleo-proteico caratterizzato dalla presenza di nucleosomi, domini sovramolecolari che risultano dall'avvolgimento di parte del DNA attorno al nucleo istonico.

Trascrizione. La cromatina si trova prevalentemente in stato decondensato, (e viene definita eucromatina o eterocromatina in base a ciò) eppure nella cellula eucariote l'attività trascrizionale dei geni presenti nel nostro genoma è estremamente bassa. La causa è che le caratteristiche strutturali dell'eucromatina rendono i siti promotori inaccessibili all'apparato trascrizionale, il quale è dato dalla RNA polimerasi DNA dipendente (RNA pol II) e dalla partecipazione di fattori trascrizionali. Quindi l'eucromatina è poco attiva dal punto di vista trascrizionale sia perché non è accessibile per i componenti dell'apparato trascrizionale sia perché l'affinità che il promotore ha per la RNA polimerasi è spesso molto bassa e quindi non si lega.

Promotori. L'RNA polimerasi si lega al DNA e inizia la trascrizione a livello dei promotori, siti che generalmente si trovano vicino ai punti dove inizia la sintesi dell'RNA mediata da uno stampo di DNA. La regolazione dell'inizio della trascrizione spesso si basa su variazioni nell'interazione dell'RNA polimerasi con il promotore. La trascrizione dei geni è innescata dall'azione di proteine che hanno un'azione primariamente di tipo attivatorio, le quali si legano

1. In siti molto vicino al sito d'inizio della trascrizione
2. A sequenze specifiche di quello che è il dominio promotore (che può essere costituito anche da migliaia di basi), andando a legarsi a sequenze enhancer che promuovono la trascrizione di un gene.

Attivatori e repressori. Generalmente esistono sia attivatori che repressori:

1. Alcuni geni vengono definiti **costitutivi**: hanno una trascrizione basale costante, non modulata da segnali molecolari. Rappresentano la minoranza dei geni presenti nel nostro genoma.
2. La maggior parte sono regolati attraverso primariamente l'azione di attivatori (geni **inducibili**). Questi attivatori agiscono naturalmente legando specifiche sequenze al sito promotore promuovendo la trascrizione. I repressori impediscono l'accesso dell'RNA polimerasi al promotore. Gli attivatori favoriscono l'interazione dell'RNA polimerasi al promotore.

Sequenza enhancer. Gli attivatori si legano al DNA e aumentano l'attività dell'RNA polimerasi a livello del promotore; questa è una regolazione positiva. Gli attivatori eucariotici si legano al DNA in siti detti enhancer. Essi sono relativamente distanti dal promotore. Questi attivatori influenzano l'efficienza della trascrizione anche a distanza di migliaia di basi. Alcuni attivatori sono legati al DNA e attivano la trascrizione fino a che non si dissocia dal DNA in seguito all'arrivo di una molecola segnale.

Modulazione attivatori e repressori. Attivatori e repressori sono modulati continuamente dall'azione di molecole segnale (ormoni) che possono avere una doppia azione, considerando l'azione di un attivatore

1. Causare la dissociazione dell'attivatore e quindi andare a reprimere la trascrizione.
2. Promuovere la trascrizione poiché interagendo con l'attivatore ne inducono un cambiamento conformazionale che ne promuove l'associazione a livello del sito promotore.

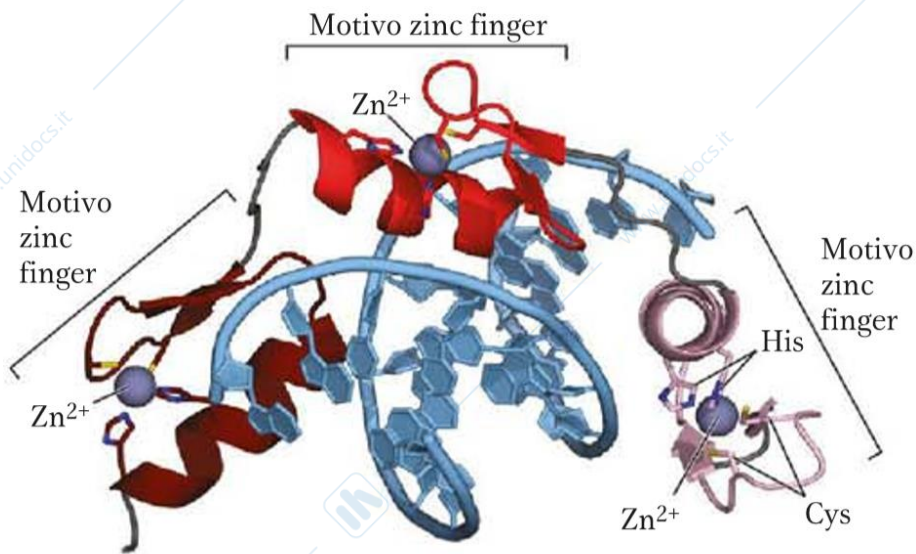
### Analisi strutturale

Attivatori e repressori sono entrambi regolati da segnali molecolari. Questa introduzione riguardo le proteine regolatrici è stata fatta perché gli ormoni agiscono andando a modulare l'azione di proteine regolatrici che sono i recettori. Gli ormoni steroidei, tiroidei, acido retinoico e calcitriolo sono ormoni che

hanno recettori intracellulari, proteine regolatrici con le caratteristiche proprie di queste proteine.

**Struttura.** Le proteine regolatrici (recettori ormonali intracellulari nel nostro caso) hanno dei piccoli domini (costituiti da 50-100 residui amminoacidici) grazie ai quali sono in grado di riconoscere e di legare sequenze specifiche del DNA localizzate al sito promotore di specifici geni. Per interagire con le basi della scanalatura maggiore una proteina deve avere una sottostruttura relativamente piccola, che deve stabilmente protrudere dalla superficie della proteina stessa. Questi domini hanno la caratteristica di contenere motivi strutturali: nelle cellule eucariotiche il motivo più comune è lo **Zinc Finger** mentre nei batteri troviamo il motivo  **$\alpha$  elica, ripiegamento  $\beta$ ,  $\alpha$  elica**.

### Zinc Finger.



In uno zinc finger, circa 30 residui amminoacidici formano una lunga ansa tenuta insieme alla base da un singolo ione  $Zn^{2+}$ , coordinato con quattro residui (quattro Cys, o due Cys e due His). Lo ione zinco non interagisce direttamente con il DNA; la coordinazione dello zinco con i residui amminoacidici serve invece a stabilizzare questo piccolo motivo strutturale. La struttura è circondata da diversi residui idrofobici, che conferiscono ulteriore stabilità.

In ogni recettore (proteina regolatrice) troviamo la presenza di 2 motivi zinc finger a livello del dominio che riconosce una specifica sequenza enhancer e che è in grado di indurre poi attraverso il legame a questa sequenza la modulazione della trascrizione di uno specifico gene.

**Legame al DNA.** Per legarsi a specifiche sequenze di DNA, le proteine regolatrici devono riconoscere le caratteristiche della superficie del DNA. La maggior parte dei gruppi chimici che caratterizzano le singole basi e che consentono di distinguerle è rappresentata da donatori e da accettori di legami idrogeno, localizzati nella scanalatura maggiore del DNA. I contatti tra proteine e DNA che determinano la specificità sono per la maggior parte legami idrogeno. Nelle proteine regolatrici i residui amminoacidici le cui catene laterali si legano più frequentemente alle basi del DNA per mezzo di legami idrogeno sono Asn, Gln, Glu, Lys e Arg.

Le interazioni si realizzano specificatamente tra catene laterali di amminoacidi polari e gruppi chimici localizzati sulle basi azotate, in grado di formare **legami a idrogeno**.

Tra i residui che instaurano legami a idrogeno abbiamo frequentemente:

- **amminoacidi polari neutri**, come l'asparagina e la glutammina
- **amminoacidi acidi**, come il glutammato
- **amminoacidi basici**, come l'arginina e la lisina.

Sequenza consenso. Ogni dominio di una proteina regolatrice riconosce una specifica sequenza enhancer di uno specifico gene, che possiede una sequenza consenso. La sequenza consenso è il sito di legame del DNA per le proteine regolatrici: è composta di 2 brevi sequenze solitamente costituite da 6 nucleotidi, queste sequenze possono essere identiche e ripetute oppure possono essere delle sequenze palindrome. Le 2 sequenze possono essere contigue o separate da pochi nucleotidi.

### Meccanismi alla base della funzione di attivatori nei recettori

La molecola recettore/proteina regolatrice si lega alla sequenza consenso di una sequenza enhancer. Se parliamo di recettori, la sequenza enhancer viene definita "elemento di risposta all'ormone" ("hormone response element").

Il recettore di un ormone steroide possiede 3 domini di primaria importanza:

1. Un dominio per il riconoscimento ed il legame con la sequenza enhancer sul DNA, con i motivi Zinc Finger
2. Un dominio all'estremità C-terminale responsabile per il riconoscimento dell'ormone
3. Un dominio implicato nell'attivazione della trascrizione.

Mutazioni. Naturalmente mutazioni a livello del dominio C-terminale di questi recettori causano l'instaurarsi di moltissime patologie determinate dall'insensibilità dell'organismo all'azione di un ormone. Tale mutazione impedisce il legame dell'ormone al recettore ed è proprio il complesso ormone-recettore che modula poi la trascrizione.

Alcuni recettori ormonali hanno capacità sia di attivatori che di repressori: quando sono in forma libera sono in grado di legarsi alla sequenza enhancer e di andare a reprimere le fasi iniziali della trascrizione, ma in seguito al legame dell'ormone al recettore vanno incontro a cambiamento conformazionale che determina la transizione funzionale da un'azione repressoria a un'azione attivatoria.

Meccanismo. Ci sono sostanzialmente 2 meccanismi di azione:

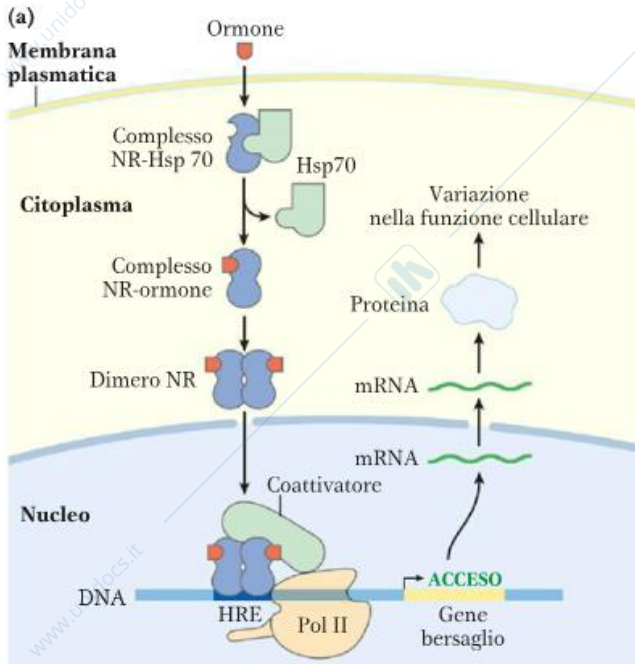
*(N.d.S. la professoressa Baracca sottolinea come il Lehninger si riferisca impropriamente solo alla presenza di recettori nucleari nella trattazione dell'azione degli ormoni tiroidei, steroidei, dell'acido retinoico e del calcitriolo, mentre questi hanno recettori intracellulari che possono essere sia citosolici che nucleari).*

I meccanismi alla base della funzione di attivatori degli ormoni steroidei, tiroidei, dell'acido retinoico e del calcitriolo sono due, mediati da due differenti tipi di recettori:

- **recettori citosolici** per gli ormoni steroidei
- **recettori nucleari** per gli ormoni tiroidei, per l'acido retinoico e il calcitriolo

### MECCANISMO 1

1. Gli ormoni steroidei (estrogeni, androgeni) agiscono attraverso il legame a un recettore **NR** che si trova libero nel **citosol**, complessato con un'altra proteina **HSP70** (Heat shock protein). Questa modula la struttura tridimensionale con la formazione del complesso ormone-recettore.
2. Il cambiamento conformazionale prodotto dal legame a livello del recettore promuove la dimerizzazione di questo complesso la quale determina l'esposizione di domini, analogamente a quanto visto parlando dei fattori d'inizio, che mediano la traslocazione del dimero all'interno del nucleo.
3. Arrivato nel nucleo, il complesso ormone-recettore è in grado di legarsi, grazie al dominio di legame, alle sequenze consenso di una sequenza enhancer (elemento di risposta all'ormone). Ogni recettore ha 2 motivi Zinc Finger e entrambi questi motivi ZF sono necessari per il riconoscimento di una di quelle 2 brevi sequenze che complessivamente formano la sequenza consenso.
4. Vengono chiamati dei coattivatori (il più comune è detto **mediatore**) e questi promuovono la trascrizione di specifici geni. Il Mediatore è costituito da 20-30 polipeptidi presenti in un complesso proteico. Il Mediatore si lega saldamente al dominio carbossiterminale (CTD) della subunità maggiore della Pol II. Il complesso del Mediatore è essenziale sia per la trascrizione basale, sia per quella regolata a livello dei promotori usati dalla Pol II.

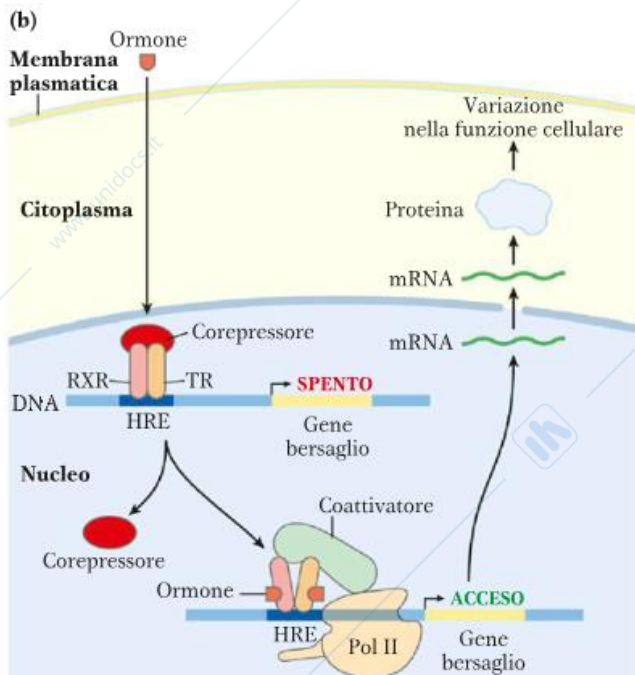


### MECCANISMO 2 – Recettori intracellulari nucleari

Il secondo meccanismo è impiegato da ormoni tiroidei e acido retinoico: non prevede il recettore libero a livello citosolico nella modulazione della trascrizione.

1. L'ormone raggiunge il recettore, che si trova già in forma dimerica. Molte volte si tratta di un recettore eterodimerico formato da recettori che riconoscono ormoni diversi: un esempio è il recettore per ormoni tiroidei e un recettore per acido retinoico.

2. Il complesso ormone recettore spiazza un corepressore, inducendo un cambiamento conformazionale che promuove la trascrizione di un gene eventualmente sotto l'azione coadiuvante di un coattivatore. Se in forma libera e dunque in mancanza di un segnale ormonale, tale recettore promuove la repressione della trascrizione genica.



Sono meccanismi diversi: il secondo ha un recettore già in forma dimerica con una sequenza enhancer che in assenza dell'ormone agisce da repressore. Tutti gli ormoni che agiscono secondo questo meccanismo agiscono con proteine recettoriali che possono promuovere l'attivazione di un gene solo avvenuti i cambiamenti conformazionali dovuti al legame con l'ormone e quindi possono svolgere l'attività di proteine regolatrici attivatrici solo in presenza dell'ormone.

## REGOLAZIONE TRAMITE ORMONI CON RECETTORI DI MEMBRANA

La modulazione dell'espressione genica è estremamente complessa, poiché la regolazione della trascrizione dei geni inducibili che codificano per prodotti proteici è dovuta all'azione contemporanea di  $n$  fattori trascrizionali e ogni fattore è a sua volta in grado di influenzare in maniera coordinata il metabolismo, dal momento che agisce su più geni.

Inoltre, non soltanto gli ormoni con recettori intracellulari sono in grado di effettuare tale modulazione, ma anche **adrenalina** e **glucagone**. In alcuni tessuti, come il fegato, la subunità catalitica è in grado di entrare nel nucleo e modulare lo stato funzionale di un fattore trascrizionale e promuovere quindi la trascrizione di specifici geni che nell'epatocita determinano l'aumento dei livelli di enzimi chiave per i processi della gluconeogenesi.

Anche l'**insulina** è in grado di modulare e promuovere l'espressione di centinaia di geni.

Tutti i meccanismi che promuovono la regolazione metabolica sono dovuti, nella maggior parte dei casi, all'azione di ormoni. Tra le tipologie di **regolazione modulate da ormoni** troviamo:

- modificazioni covalenti  
Glucagone e insulina modulano, ad esempio, l'enzima bifunzionale, rispettivamente inducendo una fosforilazione o una defosforilazione di tale enzima, in modo da regolare i livelli intracellulari del fruttosio 2,6 bifosfato, un effettore allosterico delle fosfofruttochinasi 1.
- modulazione del flusso metabolico tramite regolazione dei livelli intracellulari di enzimi chiave  
I livelli intracellulari vengono modulati da ormoni che agiscono attraverso recettori di membrana e ormoni che agiscono attraverso recettori intracellulari, questi ultimi attraverso la formazione del complesso ormone-recettore e l'espressione di specifici geni. Insulina, glucagone e adrenalina:
  - possono modificare lo stato funzionale di un fattore di trascrizione e questo può modulare poi l'espressione di un gene che codifica per un enzima chiave.
  - possono modulare lo stato funzionale di un fattore trascrizionale che può promuovere la trascrizione di un gene che a sua volta produce un altro fattore trascrizionale.
- meccanismi di regolazione allosterica

## ESEMPIO DI FATTORE TRASCRIZIONALE PER LA REGOLAZIONE DEL FLUSSO METABOLICO

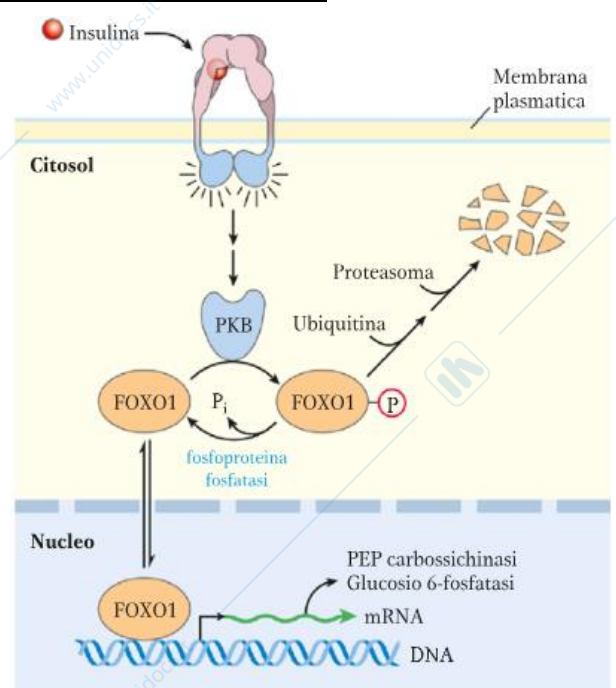
Un fattore che modula lo stato metabolico del fegato è **FOXO-1**, il cui stato funzionale è determinato mediante modificazione covalente.

- Grazie all'azione dell'**insulina**, che agisce tramite attivazione della PKB, FOXO-1 viene fosforilato e va di conseguenza incontro a degradazione attraverso il sistema del **proteasoma**.

- Tramite l'intervento del **glucagone** invece FOXO-1 viene defosforilato, poiché l'ormone va ad attivare una fosfoproteina fosfatasi.

Il fattore di trascrizione, che ad una condizione di ipoglicemia prevale nella sua forma defosforilata, va a legarsi a sequenze specifiche del DNA, attivando una serie di geni che codificano per enzimi chiave nel processo della gluconeogenesi, come la fosfoenolpiruvato carbossichinasi, e il trasportatore per il glucosio-6-fosfato del reticolo endoplasmatico.

Contestualmente va ad inattivare i geni che codificano per enzimi chiave nella glicolisi, nella via del pentoso fosfato e nella sintesi degli acidi grassi, modulando i livelli di esochinasi IV, di fosfofruttochinasi 1 e di piruvato chinasi per quanto riguarda la glicolisi, di acetil-CoA carbossilasi e FAS1 per quanto riguarda la

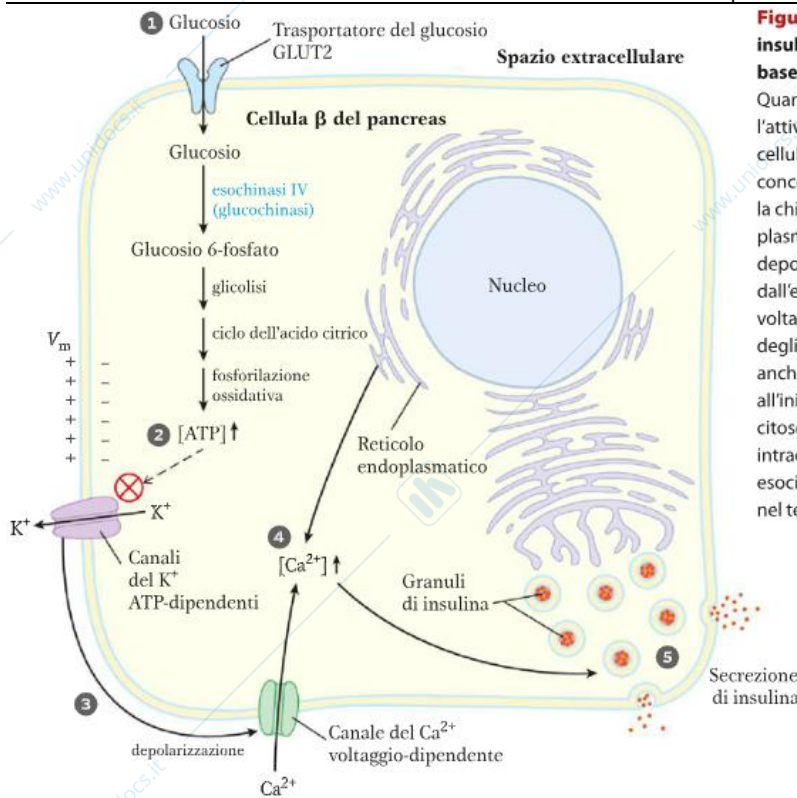


sintesi di acidi grassi.

- Questa modulazione viene invertita in condizione di iperglicemia: l'insulina, attraverso la fosforilazione di FOXO-1, determina la sua rimozione dal nucleo. In questo caso viene depressa la gluconeogenesi, mentre invece viene incrementata l'attività dei geni che codificano per gli enzimi chiave della glicolisi, della via del pentoso fosfato e della sintesi degli acidi grassi, quindi in primo luogo glucosio-6-fosfato deidrogenasi, 6-fosfogluconato deidrogenasi, acetil-CoA carbossilasi e FAS1.

La regolazione dell'espressione genica come meccanismo proprio di ormoni con recettori intracellulari e ormoni con recettori di membrana si realizza quindi sia attraverso **meccanismi a breve termine** sia attraverso **meccanismi a lungo termine**.

### MECCANISMO DI RILASCIO DELL'INSULINA DALLE CELLULE $\beta$ DEL PANCREAS



**Figura 23.27** Regolazione della secrezione di insulina da parte delle cellule  $\beta$  del pancreas in base alla concentrazione di glucosio nel sangue.

Quando i livelli di glucosio nel sangue sono alti, l'attivazione del metabolismo del glucosio nelle cellule  $\beta$  del pancreas porta all'incremento della concentrazione intracellulare di ATP, che provoca la chiusura dei canali del  $K^+$  nella membrana plasmatica, depolarizzandola. In risposta alla depolarizzazione della membrana innescata dall'elevata [ATP], si aprono i canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti, consentendo l'ingresso degli ioni calcio nella cellula. (Il  $Ca^{2+}$  viene rilasciato anche dal reticolo endoplasmatico, in risposta all'iniziale aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel citosol.) L'aumento della concentrazione del calcio intracellulare porta alla liberazione dell'insulina per esositosi. I numeri si riferiscono ai processi discussi nel testo.

Il meccanismo primario per il rilascio di insulina è determinato dall'**incremento dei livelli di glucosio**.

Le cellule  $\beta$  del pancreas presentano il trasportatore GLUT2 e l'esochinasi IV, ovvero una glucochinasi, e hanno quindi le stesse caratteristiche degli epatociti. Quando la concentrazione di glucosio ematico aumenta, il trasportatore GLUT2 ne determina un immediato importo all'interno del citosol delle cellule  $\beta$ , avendo GLUT2 una bassa affinità per il glucosio, ma un'elevata efficienza.

Conseguentemente a questo, le cellule del pancreas incrementano fortemente la concentrazione di glucosio-6-fosfato a livello citosolico, poiché la **glucochinasi** presenta due caratteristiche fondamentali:

1. è in grado di **percepire l'aumento della concentrazione di glucosio intracellulare** in quanto presenta una  $K_m$  estremamente elevata, circa 10mM. Ciò significa quindi che possiede una scarsa affinità per il glucosio, che a livelli basali è presente in concentrazioni pari a 5mM (al picco glicemico la glicemia è 10mM, oltre 12mM parliamo di condizioni patologiche come il diabete)
2. a differenza delle altre isoforme dell'esochinasi, la glucochinasi **non viene inibita dal prodotto glucosio-6-fosfato**

1. L'incremento della concentrazione del glucosio ematico determina quindi, in base alle caratteristiche descritte, un aumento del flusso glicolitico ed un successivo picco nei livelli di ATP intracellulare.
2. L'ATP provoca l'inibizione e la chiusura di un **canale per il potassio ATP-dipendente**, che risulta aperto in condizioni di potenziale di membrana a riposo e permette la libera uscita di ioni potassio che iperpolarizzano la membrana.
3. Una volta chiuso per l'interazione con l'ATP, si determina una depolarizzazione della membrana che provoca la successiva apertura di un **canale del calcio voltaggio-dipendente** localizzato sulla membrana plasmatica della cellula  $\beta$ , che permette l'ingresso di ioni calcio secondo gradiente chimico.
4. L'aumento della concentrazione di calcio intracellulare determina contestualmente l'apertura di un altro **canale del calcio**, questa volta **regolato da ligando**, presente a livello della membrana del reticolo endoplasmatico.

→ La concentrazione del calcio citosolico raggiunge un valore tale da promuovere la maturazione dell'insulina a partire dalla **proinsulina** contenuta all'interno delle vescicole localizzate nel lume del reticolo endoplasmatico. Una volta avvenuta la maturazione, il calcio stimola anche il meccanismo di esocitosi delle stesse vescicole all'interno del citosol. Il rilascio dell'insulina va a stimolare l'uptake di glucosio da parte di tessuti quali il tessuto adiposo, il muscolo cardiaco e il muscolo scheletrico, che presentano il trasportatore GLUT4.

Dopo il pasto. Dopo circa due ore dall'ultimo pasto, i livelli di glucosio tornano alla **normoglicemia**, sopprimendo il rilascio dell'insulina a livello delle cellule  $\beta$  del pancreas. Il rallentamento del processo glicolitico determina infatti un abbassamento dei livelli di ATP intracellulari e una riapertura del canale del potassio; ciò determina la ripolarizzazione della membrana plasmatica e l'interruzione del rilascio ormonale da parte delle vescicole del reticolo endoplasmatico.

(N.d.S. la professoressa è stata particolarmente rapida nella trattazione di queste patologie, si integra quindi brevemente dal Lehninger)

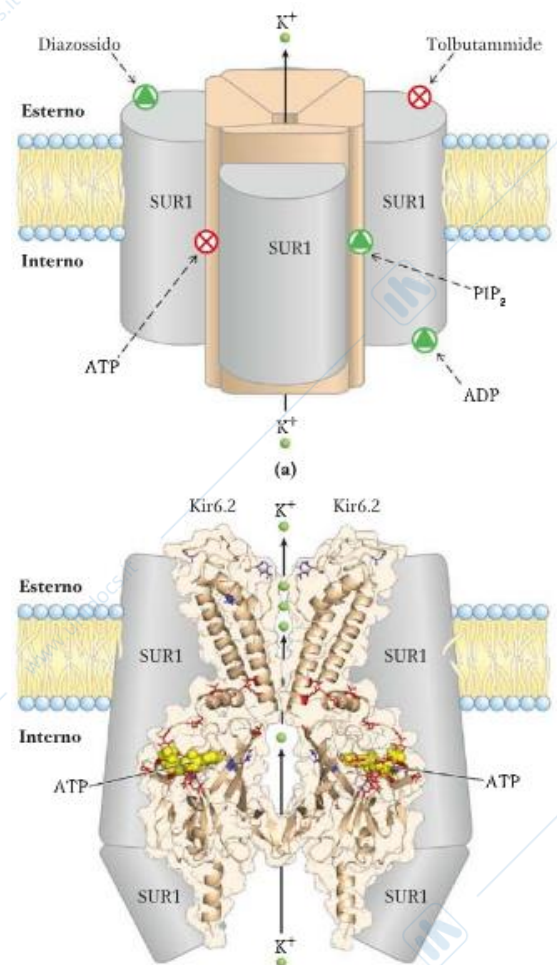
Vi sono due gravi patologie associate ad **alterazioni dei geni codificanti per le quattro subunità Kir6.2**, che delimitano il canale del potassio e contengono i siti di legame per l'ATP:

- **Diabete mellito neonatale**

Il canale del potassio può permanere nel suo stato aperto, non consentendo la secrezione di insulina. I pazienti affetti da questa patologia congenita sono caratterizzati da uno stato di **perenne iperglicemia** e devono essere immediatamente trattati. I residui aminoacidici che risultano mutati in questa patologia sono rappresentati in rosso nella figura.

- **Iperinsulinemia infantile**

Si presenta quando il canale del potassio permane nel suo stato chiuso, il che porta ad una **continua secrezione di insulina**. Questi pazienti devono essere trattati immediatamente, poiché il sintomo più grave è una profonda ipoglicemia che può provocare danni cerebrali irreversibili. Il trattamento consiste in un intervento chirurgico che comporta l'asportazione di gran parte del pancreas. I residui aminoacidici che risultano mutati sono riportati in blu.



**Canale del potassio ATP-dipendente**