

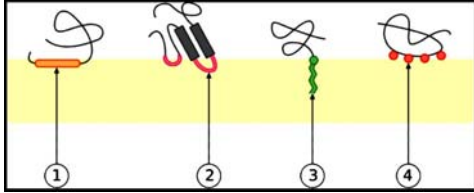


## Lipidi e membrana

3<sup>a</sup> parte

Laurea Magistrale  
Biologia Sperimentale e Applicata

### Proteine periferiche di membrana- 1



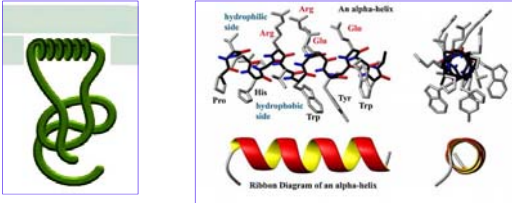
**Rappresentazione schematica dei diversi tipi di interazione tra proteine di membrana monotopiche e la membrana cellulare:**

1. Interazione mediante una  $\alpha$ -elica parallela al piano della membrana («in-plane membrane helix»).
2. Interazione mediante un «loop» idrofobico.
3. Interazione mediante un lipide di membrana legato covalentemente («ancora lipidica»).
4. Interazioni elettrostatiche con lipidi di membrana (ad es. mediante ioni Calcio).

[https://en.wikipedia.org/wiki/Peripheral\\_membrane\\_protein](https://en.wikipedia.org/wiki/Peripheral_membrane_protein)

### Proteine periferiche - 2

⚡ Alcune proteine di membrana sono localizzate **totalmente nel citosol** e sono **collegate al monostrato citosolico** del doppio strato lipidico da una  **$\alpha$ -elica anfifilica** (un lato è predominantemente **polare** mentre l'altro è chiaramente **idrofobico**) esposta sulla superficie della proteina e parallela al piano della membrana.



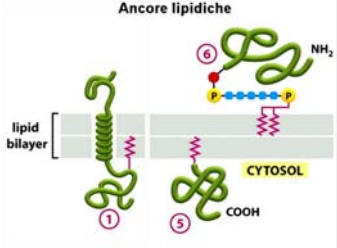
Alberts et al., 5<sup>a</sup> o 6<sup>a</sup> ed

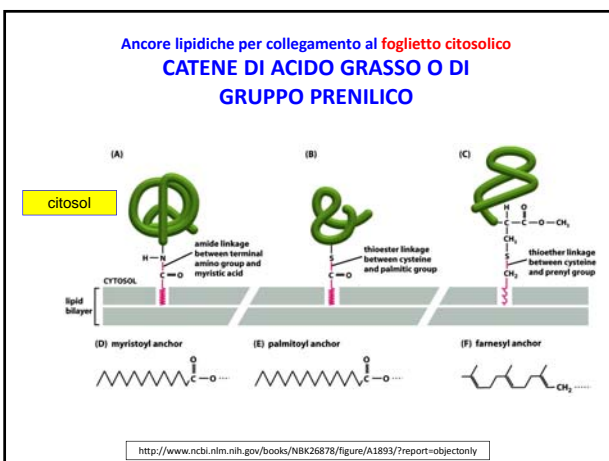
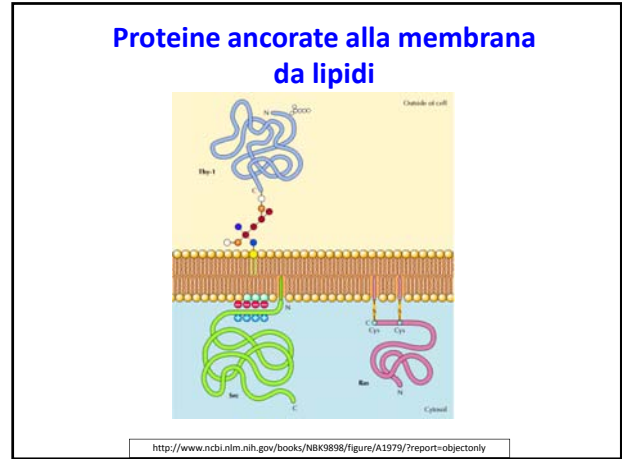
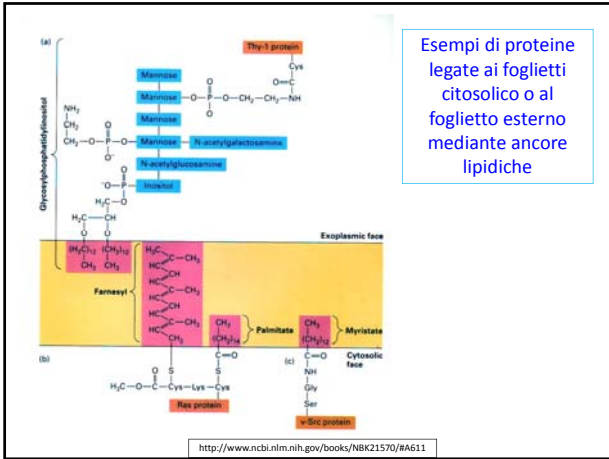
<http://en.citizendium.org/images/thumb/2/26/AlphaHelixByDEVolk.jpg/500px-AlphaHelixByDEVolk.jpg>

### Proteine periferiche - 3

⚡ Altre proteine di membrana sono collegate al **monostrato citosolico** da una o più **catene lipidiche** collegate covalentemente.

⚡ Altre proteine sono esposte interamente sulla **superficie esterna** dato che sono collegate al doppio strato lipidico soltanto mediante un legame covalente (mediato da un oligosaccaride) ad **un'ancora lipidica** che si inserisce sul monostrato esterno della membrana plasmatica.





### Ancore lipidiche catene di acidi grassi o gruppi prenilici

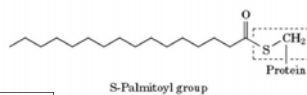
#### Acido miristico

- Acido grasso saturo con 14 atomi di carbonio.
- Viene aggiunto al gruppo amminico N-terminale di una proteina durante la sua sintesi nel ribosoma.
- Tutti i membri della **famiglia Src** di proteina tirosina chinasi citoplasmatiche sono miristoilati.
- Tuttavia, poiché il **collegamento alla membrana tramite una sola ancora lipidica non è molto forte** viene spesso aggiunto un **secondo gruppo lipidico** che permette un ancoraggio più forte.

[http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2011/05/tmp493\\_thumb.jpg](http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2011/05/tmp493_thumb.jpg)

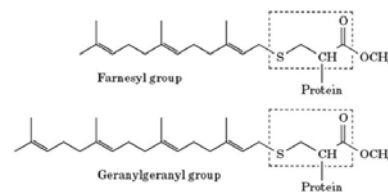
**Ancore lipidiche**  
catene di acidi grassi o gruppi prenilici  
**Acido palmitico**

- ✚ Per la maggior parte delle *Src chinasi* la seconda modificazione lipidica consiste nel **collegamento di acido palmitico, acido grasso saturo con 16 atomi di carbonio**, ad una **catena laterale di cisteina della proteina**.
- ✚ Questa modificazione, **reversibile**, avviene in risposta ad un segnale extracellulare, ed **aiuta a reclutare la chinasi verso la membrana plasmatica**.
- ✚ Quando la via di segnalazione non è più attiva, l'acido palmitico viene rimosso permettendo alla chinasi di ritornare allo stato di soluzione nel citosol.



<http://what-when-how.com/molecular-biology/palmitoylation-molecular-biology/>

**Ancore lipidiche**  
catene di acidi grassi o gruppi prenilici  
**Gruppi prenilici**



- ✚ La **prenilazione** o l'**isoprenilazione** è un processo post-traduzionale in cui **residui di cisteina vicini al C-terminale** di alcune proteine eucariotiche sono modificate mediante aggiunta di un gruppo isoprenoide: il **gruppo farnesilico** con 15 atomi di carbonio o il **gruppo geranylgeranil** con 20 atomi di carbonio.

<http://what-when-how.com/molecular-biology/prenylation-molecular-biology/>

**Ancore lipidiche**  
catene di acidi grassi o gruppi prenilici

- ✚ Alcune proteine di segnalamento, quali la **famiglia Ras** delle **piccole proteine G monomeriche**, usano una combinazione di **collegamento con un gruppo prenilico** e un **acido palmitico** per reclutare la proteina alla membrana plasmatica.
- ✚ Le proteine che si legano al foglietto citosolico mediante aggiunta di un acido grasso o gruppo prenilico sono prodotte come proteine solubili nel citosol e vengono successivamente ancorate alla membrana mediante il collegamento covalente di un'ancora lipidica.

**Ancora di GPI - 1**

- ✚ I **glicosilfosfatidil inositoli (GPI)** sono glicolipidi complessi che si legano ad alcune **proteine presenti sulla superficie esterna della membrana plasmatica**. Il loro legame è sotto-indicato, ma la composizione dell'**oligosaccaride** può **variare**:  
Proteina (C-terminale) - fosfoetanolamina - mannosio - mannosio - mannosio - N-acetilglucosamina - inositolo (componente di fosfatidilinositolo inserito nella membrana)
- ✚ La proteina è **ancorata ad una certa distanza all'esterno della membrana dalla lunga catena oligosaccaridica**.
- ✚ Le proteine legate a GPI possono essere rilasciate da **fosfolipasi**.
- ✚ Esempi di proteine ancorate a glicosilfosfatidilinositolo (GPI): fosfatasi alcalina, 5'-nucleotidasi, un'isoforma dell'acetilcolinesterasi e un'isoforma della N-CAM.

Foglietto esoplasmico

### Coda di Glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI) - 2

- ⚡ Le **proteine associate al foglietto esoplasmico che hanno una coda di GPI**, sono sintetizzate come proteine di membrana a singolo passo, nel reticolo endoplasmatico.
- ⚡ Ancora quando sono nel RE il **segmento transmembrana viene rimosso** e viene **aggiunta una coda di glicosilfosfatidilinositolo (GPI)**.
- ⚡ In questo modo la proteina rimane legata alla superficie non-citosolica dell'ER soltanto tramite questa ancora.

### Glicosilfosfatidil inositolo (GPI)

Biosynthetic Pathway of GPI-anchor

ER lumen      Cytosol

P = phosphate  
inos = inositol  
GlcN = glucosamine  
man = mannose  
etn = ethanolamine

<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/GPIanchor/figure1.png>  
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/media/Projects/gpisyntesis.jpg>

### Associazione proteine con lipidi di membrana

- ⚡ Alcune **proteine citosoliche** hanno **domini che si legano** transitoriamente alle **teste polari di lipidi**.
- ⚡ Gli **enzimi che creano o degradano questi lipidi** sono soggetti a regolazione mediata da segnali, fornendo un meccanismo per modulare l'affinità di una proteina verso la superficie di una membrana:
  - Ad es. i domini **"pleckstrin homology"**, (PH) sono in grado di **legare il fosfatidilinositolo**.
  - Alcuni domini PH si legano al PIP<sub>2</sub> (PI-4,5-P<sub>2</sub>).
  - Altri domini PH riconoscono e si legano a derivati del fosfatidilinositolo con gruppi P<sub>i</sub> esterificati con il gruppo 3'-OH dell'inositolo.
    - ◆ ES: PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub>, e PI-3,4,5-P<sub>3</sub>.

<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molebiochem/MBWeb/mb1/part2/lipid.htm#animat1>

### Le associazioni alla membrana possono aver luogo mediante legame selettivo delle proteine con gruppi polari della testa dei lipidi

- ⚡ Un esempio è la **spettrina**, che si lega al fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato rivolto verso il citoplasma mediante un dominio **"pleckstrin homology" (PH)**.
- ⚡ **Diversi enzimi e proteine strutturali si legano alla membrana in seguito ad attivazione da Ca<sup>2+</sup>**. Es: proteina chinasi C (PKC), fosfolipasi A<sub>2</sub> e sinaptotagmina.
- ⚡ Una regolazione allosterica dell'idrofobicità delle superficie di legame delle proteine ha spesso luogo. Uno dei casi meglio noti è il legame Ca<sup>2+</sup>-dipendente della calmodulina ad altre proteine.
  - ◆ Le **annexine** sono una famiglia di proteine che formano **associazioni Ca<sup>2+</sup>-dipendenti con la membrana cellulare** mediante interazione diretta con fosfolipidi; viceversa, le interazioni con i fosfolipidi aumentano la loro affinità verso il Ca<sup>2+</sup>.

**spettrina**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28193/>  
[http://www.geneticaebiologia.unito.it/membrana/globulo\\_rosso.jpg](http://www.geneticaebiologia.unito.it/membrana/globulo_rosso.jpg)

### Movimento di proteine-G attivate nell'ambito del foglietto citosolico

**Disassemblaggio di una proteina G attivata in due componenti di segnalamento**

(A) Nello stato non stimolato, il recettore e la proteina G sono entrambi inattivi. Nonostante qui siano illustrati come entità separate, in alcuni casi sono associati in un complesso preformato. (B) Il legame di un segnale extracellulare al recettore cambia la conformazione del recettore, che a sua volta altera la conformazione della proteina G legata al recettore. (C) L'alterazione della subunità  $\alpha$  della proteina G le permette di scambiare il suo GDP con GTP. Ciò provoca la decomposizione della proteina G in due componenti attivi – una subunità  $\alpha$  e un complesso  $\beta\gamma$ , entrambi dei quali possono regolare l'attività di protein bersaglio sulla membrana plasmatica. Il recettore rimane attivo finché il segnale esterno rimane legato e quindi può catalizzare l'attivazione di molte molecole di proteina G.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26912/figure/A2798/?report=objectonly>

**Nature's lessons in design: nanomachines to scaffold, remodel and shape membrane compartments**  
 Paul A. Beales,<sup>1\*</sup> Barbara Cianj<sup>1,2</sup> and Alexa J. Cleasby<sup>2,3</sup>  
 Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 15489

Themed issue: Chemical compartmentalisation by membranes

### Proteine «scaffold» - 1

**Le proteine «scaffold»** possono avere almeno quattro funzioni: **assemblare** i componenti delle vie di segnalamento, **localizzare** i componenti di una via di segnalamento in un specifico compartimento intracellulare o localizzazione, **regolare** segnali positivi o negativi di “feedback” e **proteggere** le proteine intermedie di segnalamento attive dalla inattivazione mediata da fosfatasi.

Shaw AS, Fibbert EL. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jan;9(1):47-56.

### Proteine «scaffold» - 2

Le “A-kinase anchoring proteins; AKAPs” sono un’importante famiglia di molecole “scaffold” coinvolte **nell’organizzazione dei complessi multiproteici** di segnalamento mediato da proteina G. Esempio illustrato: AKAP gravin (nota anche come AKAP250), che si associa reversibilmente con la membrana plasmatica in risposta all’attivazione della proteina chinasi (PKA) e fosforilazione della gravina e del recettore accoppiato alla proteina G (GPCR; in questo caso il recettore beta2-adrenergico) nella coda C-terminale. Il “scaffold” funziona come “scatola degli attrezzi” per le molecole interagenti che influenza il segnalamento complessivo basato sulle proteina G.

Malbon CC. G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Sep;6(9):689-701.

The diagram illustrates four mechanisms by which proteins induce membrane curvature in a lipid bilayer:

- Protein insertion:** Shows red, mushroom-shaped proteins with hydrophobic domains inserted asymmetrically into the lipid bilayer, causing it to curve.
- Protein crowding:** Shows a high density of red proteins on one side of the membrane, leading to deformation due to steric hindrance.
- Protein shape:** Shows a protein with a curved shape (labeled 'negative' and 'positive' regions) that induces curvature as it binds to the membrane.
- Protein scaffolding:** Shows a protein scaffold (green and red) that provides a structural framework for the membrane to curve.

**LE PROTEINE CHE RIMODELLANO LA MEMBRANA ADOPERANO DIVERSI METODI PER GENERARE CURVATURA.**

- ⚡ Durante l'inserimento delle proteine, domini idrofobici inseriti asimmetricamente nel bilayer lipidico generano curvature di membrane. ...
- ⚡ Nei processi di **affollamento di proteine** ("protein crowding") si presume che l'energia per la deformazione della membrana sia generata da collisioni fra proteine in stretta vicinanza della superficie ...
- ⚡ Il termine "**protein shape**" riguarda un meccanismo in cui il piegamento della membrana è generato da proteine di forma curva con domini di legame a ligandi, quali i rivestimenti di clatrina o di COPI. (Regioni di curvature positive e negative sono rappresentate in azzurro.
- ⚡ Infine, nel caso di "**protein scaffolding**", la curvatura della membrana è generata da un scaffold proteico organizzato. La deformazione della membrana può avere luogo laddove i componenti dello scaffold sono ancorati alla membrana mediante interazioni proteina-lipidi oppure mediante proteine adattatrici (verde); questo metodo è usato dalle proteine "ESCORT" [lezione sulle microvescole]

Beales PA, Cianì B, Cleasby AJ. Nature's lessons in design: nanomachines to scaffold, remodel and shape membrane compartments. *Phys Chem Chem Phys*. 2015 Jun 28;17(24):15489-507.