

## Rafts di membrana

2° parte

### What are Lipid Rafts ?

“Lipid rafts are small (10-200nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes”

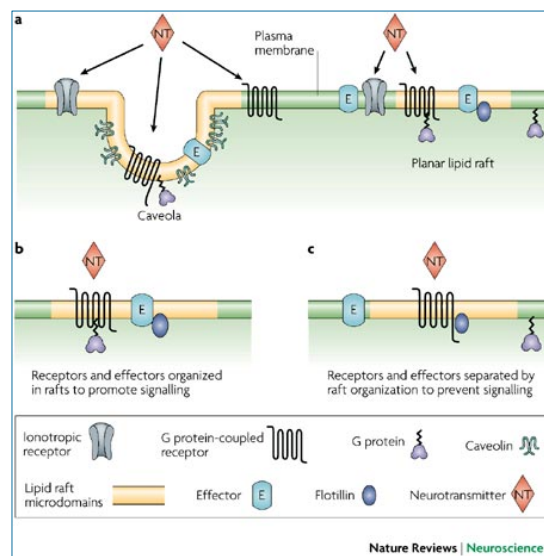


<http://image.slidesharecdn.com/lipidraftsinsignaltransduction-131115010117-phpapp01/95/lipid-rafts-in-signal-transduction-4-638.jpg?cb=1384478390>

## Tipi di rafts lipidici

1

- ✦ **CAVEOLAE:** Piccole invaginazioni a forma di fiasco. arricchite di caveolina.
- ✦ **RAFTS LIPIDICI PLANARI:** si trovano nei neuroni e sono arricchiti di flotillina.
- ✦ Sia la caveolina che la flotillina reclutano proteine di segnalamento.
- ✦ Nei rafts il segnalamento può essere promosso oppure ostacolato.



Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. Nat Rev Neurosci. 2007 Feb;8(2):128-40.

## Tipi comuni di rafts lipidici - 2

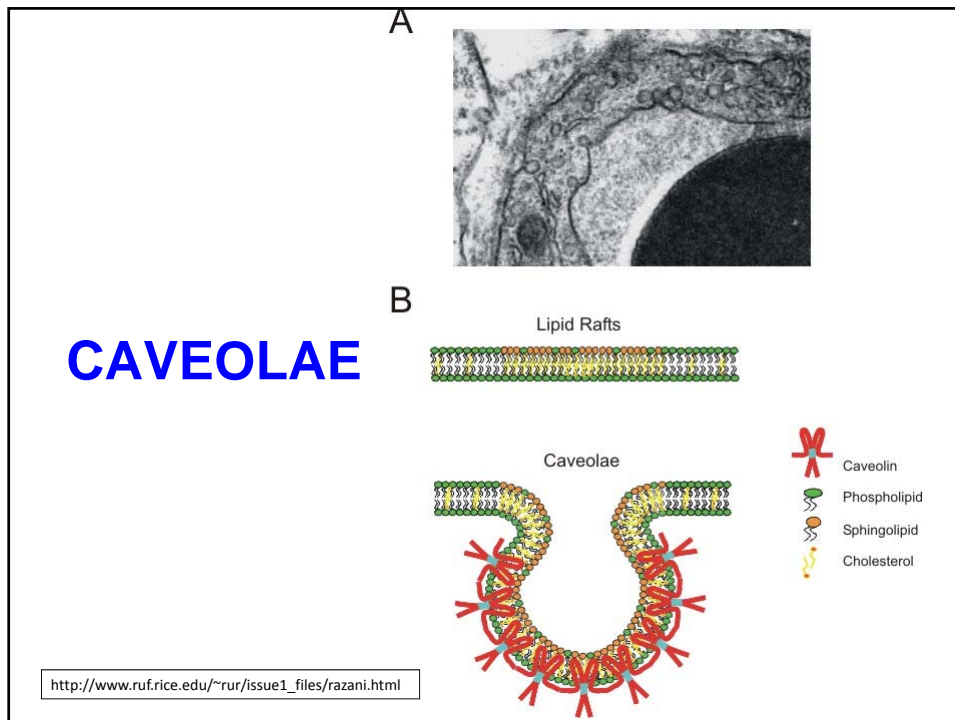
- ✚ Le **caveoline** sono ampiamente espresse nel cervello, microvasi del sistema nervoso, cellule endoteliali, astrociti, oligodendrociti, cellule di Schwann, radici dorsali di gangli e neuroni dell'ippocampo.
- ✚ **Rafts planari**, contenenti proteine della famiglia delle flotilline, sono stati riscontrati in neuroni in cui le caveolae sono assenti
- ✚ Entrambi i tipi di rafts hanno composizione lipidica simile (arricchiti in colesterolo e sfingolipidi).
- ✚ Le flotilline e le caveoline hanno la capacità di reclutare molecole di segnalamento verso i rafts e perciò giocano un ruolo estremamente importante nella trasduzione di segnali indotta dai neurotrasmettitori.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_raft](http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft)

## Tipi comuni di rafts lipidici - 2

- ✚ E' stato ipotizzato che questi microdomini **organizzino spazialmente le molecole di segnalamento** promuovendo interazioni cineticamente favorevoli necessarie per la trasduzione del segnale.
- ✚ Vice-versa, tali microdomini potrebbero anche **separare le molecole di segnalamento**, inibendo interazioni e smorzando le risposte.

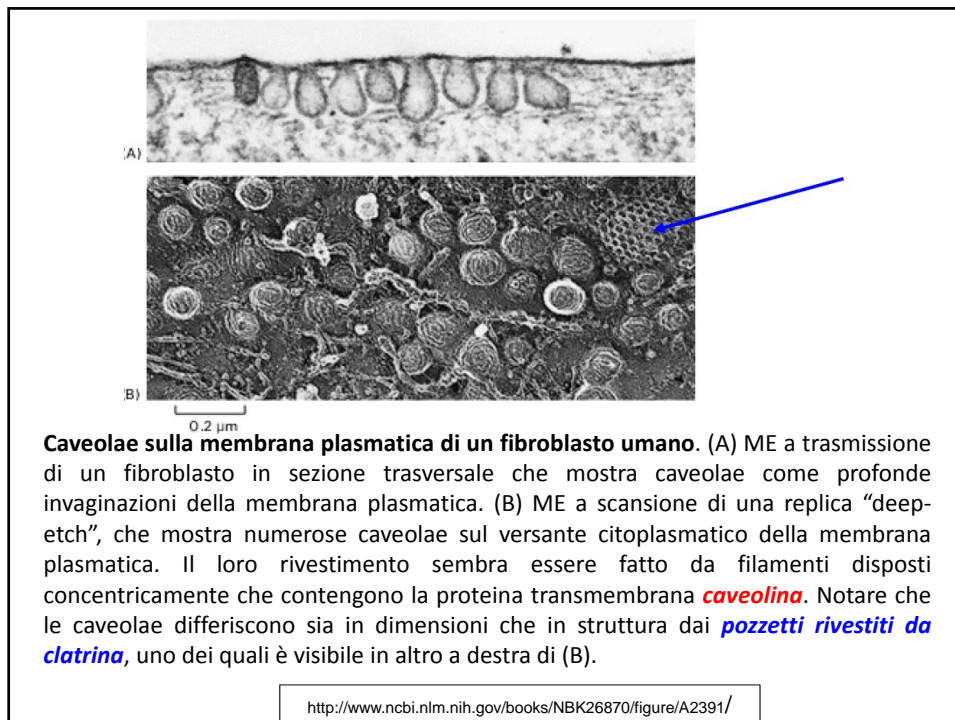
[http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_raft](http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft)



## CAVEOLAE (1)

- ✚ Le **caveolae** sono **rafts lipidici specializzati che svolgono diverse funzioni di segnalamento.**
- ✚ Sono state identificate per prima mediante esame con microscopia elettronica a metà degli anni 50 da due ricercatori (Palade, 1953; Yamada, 1955), come invaginazioni a forma di fiaschette di 50-100 nm della membrana plasmatica:

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smacer/Cyto-Topics/caveolae.htm>



## CAVEOLAE (2)

- ✚ Nelle caveolae sono particolarmente concentrate molte proteine e lipidi; tuttavia, la marcatura delle cellule con un marcatore del dominio “**Pleckstrin Homology, PH**” **specifico per il PIP<sub>2</sub>** indica che questo lipide **non** è presente nelle caveolae.
- ✚ Il principale marcatore delle caveolae è la proteina *caveolina*.

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Cyto-Topics/caveolae.htm>

## Caveolae & caveoline

Parton RG, Simons K. **The multiple faces of caveolae.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Mar;8(3):185-94.

## Caveolina-1

### CAVEOLE

Al microscopio elettronico :  
Fiasche (50-100 nm) profondamente invaginate

A. Caveolin-1 Monomer

**CAVEOLINE:**

- PM= 23 Kda
- Struttura a forcina con :
  - N- e C-terminale citoplasmatico
  - Dominio di oligomerizzazione
  - Domino transmembrana
- Interagiscono con il colesterolo

**Funzioni:**

- Modulano l'attività delle proteine G trimeriche
- Coinvolti nelle vie di trasduzione del Ca<sup>++</sup> e dell'insulina

Parton RG. **Caveolae and caveolins.** Curr Opin Cell Biol. 1996 Aug;8(4):542-8.

Constituent	Function
Arachidonic acid	A signalling fatty acid
Caveolin	A principle protein of caveolae.
Cholesterol	
Dystrophin associated glycoprotein complex	DAG is known to be associated with caveolin-3 in muscle cell membrane.
EGF receptor	A growth factor receptor that auto-phosphorylates itself upon binding EGF and dimerisation. The presence of EGF in caveolae is contentious
Flotillin	
Fyn	
G-proteins monomeric	
GPI-linked enzymes	
Glycosingolipid	
Integrins	Adhesion and signalling proteins
Insulin receptor	
PDGF receptors	A growth factor receptor
Striatin, SG2NA, zinedin	A family of calmodulin-dependent scaffolding protein
Plasmenylethanolamine	
PrP <sup>c</sup>	Infectious proteinaceous agent of prion diseases BSE and CJD.
NGF receptor	A growth factor receptor

Table 1

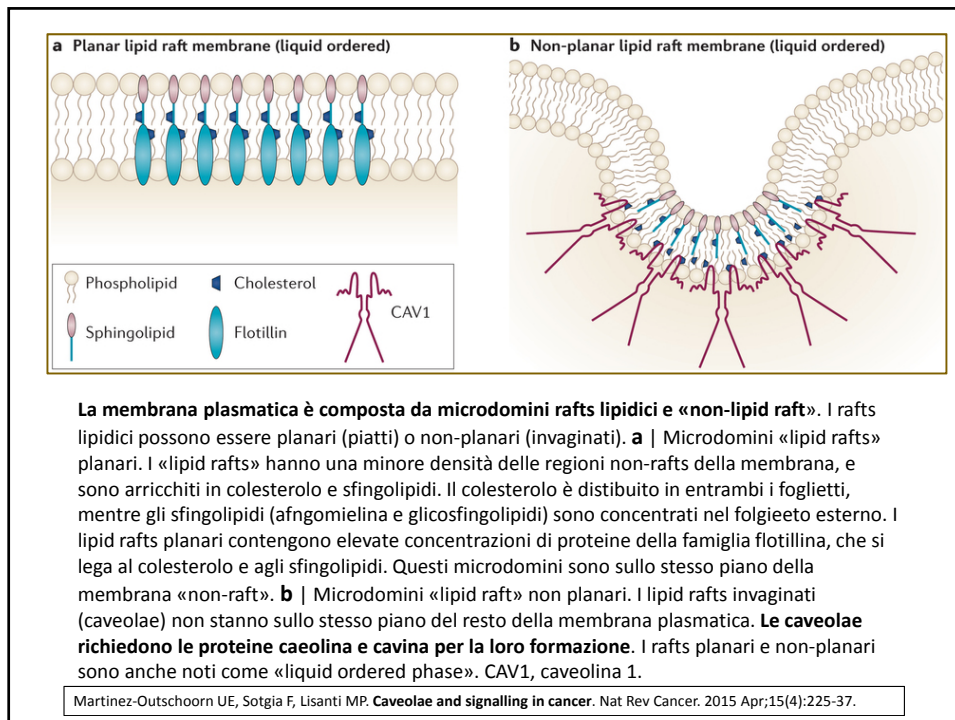
## Proteine e lipidi concentrati nelle caveolae

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Cyto-Topics/caveolae.htm>

**EGFR:** epidermal growth factor receptor; **IGFR,** insulin growth factor receptor; **PDGFR,** platelet derived growth factor receptor; **VEGFR,** vascular endothelial growth factor receptor; **AC,** adenylyl cyclase; **PKA,** protein kinase A; **PKC,** protein kinase C; **eNOS,** endothelial nitric oxide synthase; **SFK,** Src family kinases; **MAPK,** mitogen activated protein kinases).

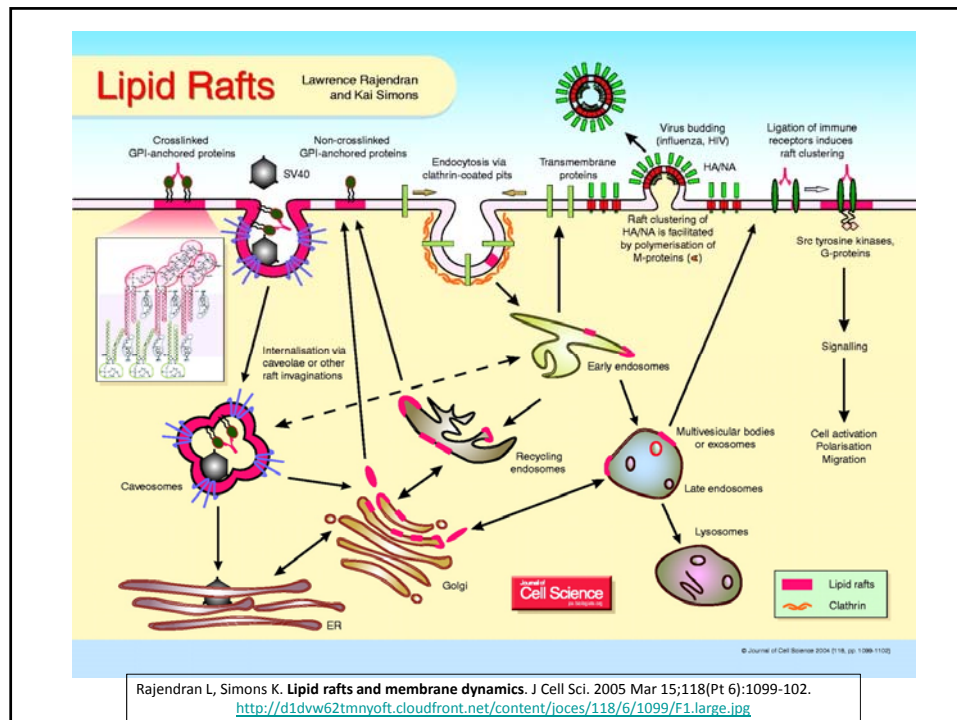
**Le caveolae sono invaginazioni della membrana plasmatica osservabili al microscopio elettronico (A) che giocano un ruolo critico nel segnalamento di pro-sopravvivenza e proliferazione-** La formazione e stabilizzazione delle caveolae dipendono dal **colesterolo** e dalla proteina strutturale **caveolina** e servono per localizzare spazialmente recettori di segnale (B) incluso «receptor tyrosine kinases; (RTKs)» e «G-protein coupled receptors; (GPCRs)». I monomeri di caveolina © contengono un ancora di palmitato che serve per stabilizzare la proteina all'interno della membrana cellulare, e un dominio tipo «scaffold» che è il sito di legame per molte molecole che inducono la sopravvivenza o la crescita.

Stary CM, Tsutsumi YM, Patel PM, Head BP, Patel HH, Roth DM. Caveolins: targeting pro-survival signaling in the heart and brain. Front Physiol. 2012 Oct 5;3:393.



Diseases in which lipid rafts are involved
Alzheimer's disease
Parkinson's disease
Atherosclerosis
Diabetes
Pulmonary hypertension
Systemic lupus erythematosus
Asthma
Niemann-Pick disease
Gaucher, Fabry and Tay-Sachs diseases
Muscular dystrophy
Neoplasia
Viral infections
Enveloped viruses
Influenza virus, HIV-1, Herpes simplex virus 1,
Marburg virus, Epstein-Barr virus, Ebola virus
Non-enveloped viruses
SV-40, Rotavirus, Echovirus type 1, Enterovirus
Bacterial infections
<i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> ,
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Clostridium tetani</i> ,
<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Other pathogens
Pore-forming toxins (Cholesterol-binding
cytolysins, Lysenin, Aerolysin),
Cholera toxin, Shiga toxin
Lipopolysaccharide
Prion (Creutzfeldt-Jakob disease)
<i>Trypanosoma</i> , <i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>

Ohno-Iwashita et al. Geriatr Gerontol Int. 2010 Jul;10 Suppl 1:S41-52



**Effetto tipo chaperone molecolare per modellare la struttura di alcune proteine**

[VERRÀ APPROFONDITO NEL SEMINARIO:  
**«RAFTS & AGENTI PATOGENI»**]



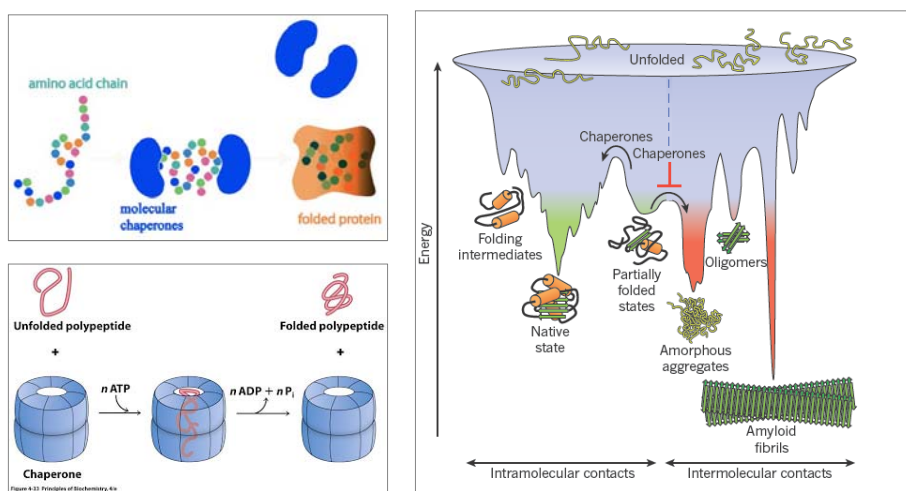
## How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains

J. Fantini

CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 60 (2003) 1027–1032

**Abstract.** Understanding the molecular mechanisms controlling the association of proteins with lipid rafts is a central issue in cell biology and medicine. A structurally conserved motif (the 'sphingolipid binding domain') has been characterized in unrelated cellular and microbial proteins targeted to lipid rafts. I propose that the structuration of a sphingolipid shell around the sphingolipid binding domain not only extracts the protein from the liquid-disordered phase of the plasma membrane, and ensures its delivery to lipid rafts, but also influences its conformation. The chaperone activity of sphingolipids in shells and rafts may play an important role in infectious and conformational diseases (human immunodeficiency virus-1, prions, Alzheimer).

## Reazioni competitive nei processi di ripiegamento e aggregazione delle proteine.



<http://biosocialmethods.jsr.umich.edu/epigenetics-tutorial/epigenetics-tutorial-gene-expression-from-dna-to-protein/>  
<http://sandwalk.blogspot.it/2007/02/heat-shock-and-molecular-chaperones.html>

Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Annu Rev Biochem. 2013;82:323-55.

## Motivi strutturali coinvolti nell'interazione di proteine con sfingolipidi e colesterolo (1)

- Uno dei primi passi per l'identificazione di tale motivo è stato fatto negli studi su proteine del virus 1 dell'immunodeficienza umana (HIV-1) e sulle **proteine amiloidi** che subiscono significative **transizioni conformazionali** in seguito al **legame** con **sfingolipidi**.
- Il legame dell'involucro dell'HIV-1 al galattosilceramide (GalCer) è mediato da un **dominio legato mediante ponti S-S (loop V3)** della glicoproteina gp120 dell'involucro dell'HIV.
- Questo ha motivato gli studi sull'eventuale presenza di un dominio simile nella **proteina prionica** (PrP), che è un'altra proteina che si lega al GalCer.
- Tale **dominio è risultato essere presente non solo nella PrP ma anche nel peptide  $\beta$ -amiloide che provoca l'Alzheimer**.

Fantini J. How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. Cell Mol Life Sci. 2003 Jun;60(6):1027-32.

## Motivo V3

- Questo motivo, noto anche come «**sphingolipid-binding domain**» (**SBD**), è una struttura a forcina (« $\alpha$ -helix-turn- $\alpha$ -helix» oppure a « $\beta$ -strand-turn- $\alpha$ -helix») con un incurvamento che contiene **almeno un residuo aromatico**.
- I **residui aromatici** di Phe20 della gp120 e i residui Phe30 e Trp34 della tossina sono fondamentali per l'interazione con la componente glucidica degli glicosfingolipidi di superficie (GalCer, Gb3).

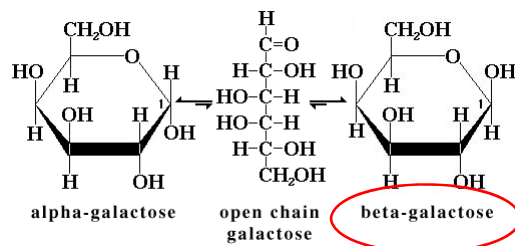
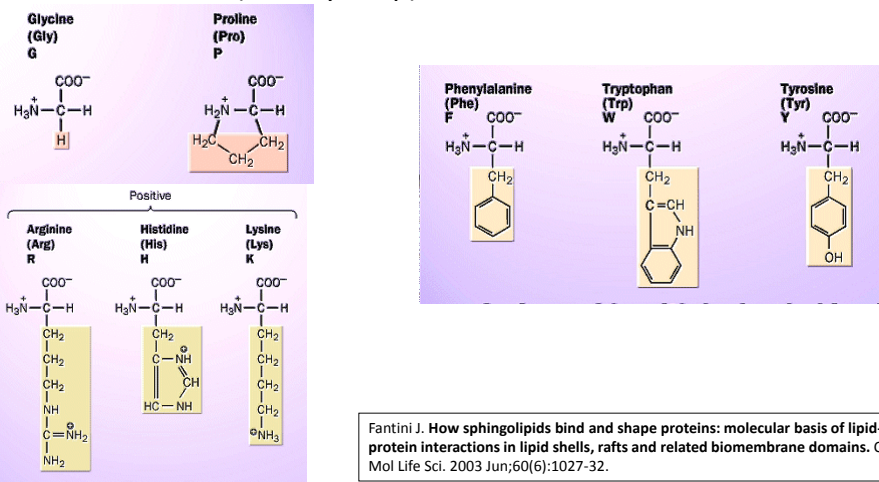
**Esempi tipici di SBDs: loop V3 della gp120 dell'HIV-1 e il sito di legame con il recettore della tossina batterica tipo Shiga:**



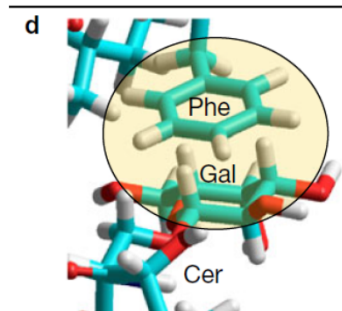
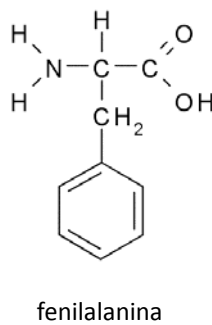
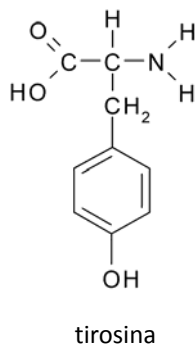
Fantini J. How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains. Cell Mol Life Sci. 2003 Jun;60(6):1027-32.

## SBD: Dominio di legame a glicosfingolipidi

- ✚ Dominio flessibile che contiene residui aminoacidici che **inducono cambi di direzione** (Gly, Pro), **basici** (Arg, Lys, His) e **aromatici** (Phe, Tyr, Trp).

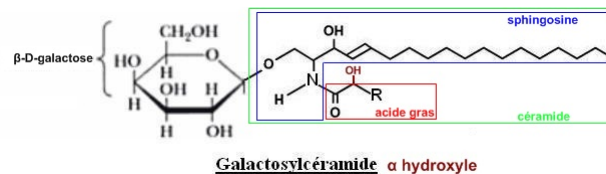


### CH-π stacking

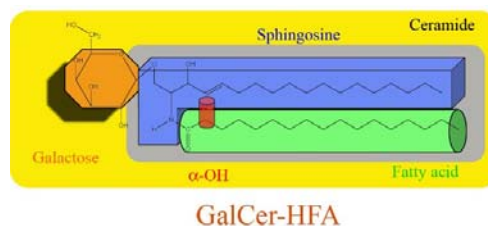


## Motivi strutturali coinvolti nell'interazione di proteine con sfingolipidi e colesterolo (2)

- Le **interazioni proteina-carboidrati** coinvolgono **residui aromatici** che **sono esposti al solvente** e che **sono in grado di accatastarsi sopra gli anelli degli zuccheri**.
- Questo accatamento è tipico di molte **interazioni proteina-zuccheri** e specialmente per **l'anomero  $\beta$**  dei residui di **galattosio** (ciò a causa della particolare stereochimica di questo zucchero).
- Da un punto di vista chimico, tale interazione è **promossa dalla prossimità fra i protoni alifatici (non aromatici) dell'anello dello zucchero, che portano una carica parziale positiva, e la nube di elettroni  $\pi$  dell'anello aromatico** (caso inusuale di legame di idrogeno: "**interazione CH- $\pi$** ").
- Le interazioni **CH- $\pi$**  possono inoltre avere luogo fra tossina batteriche non correlate chimicamente e i loro recettori GSLs.
- La **presenza di residui aromatici nel loop V3 della gp120 e nella regione SBD della proteina prionica PrP è consistente con la possibilità di stabilire interazioni CH- $\pi$  con la testa glucidiche degli GSLs dei rafts**.

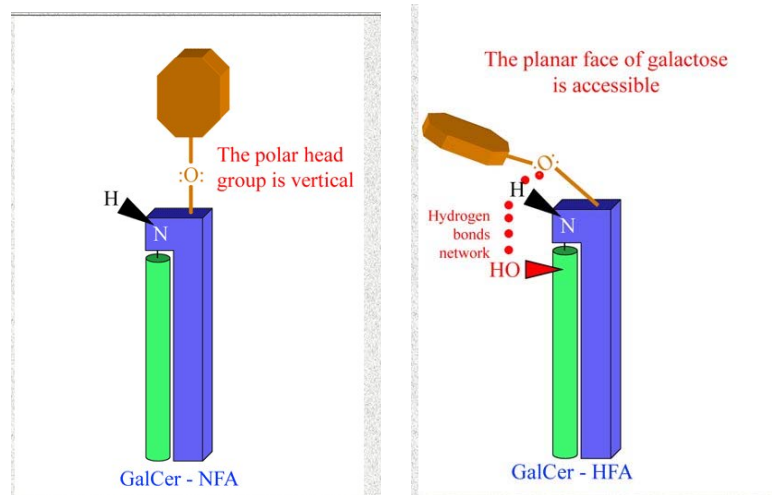


- L'acido grasso di un glicosfingolipide può avere **un gruppo OH legato al carbonio in posizione  $\alpha$  rispetto al gruppo carbonilico (C=O) della catena di acido grasso**.
- In questo caso, il GalCer viene chiamato  **$\alpha$ -OH GalCer** o **GalCer-HFA** («**hydroxy fatty acid**»).



## Ruolo dell'idrossilazione dell'acido grasso del GalCer

- La presenza del gruppo  $\alpha$ -OH nella catena acilica dell'impalcatura di ceramide del GalCer permette la formazione un legame di idrogeno che orienta l'anello di galattosio del GalCer in modo tale che la molecola adotta una struttura tipica a forma di L o di una zappa.
- In conseguenza di ciò, **la testa di zucchero del glicosfingolipide è disponibile per un processo di accatastamento con ligandi esogeni.**
- Viceversa, l'anello di galattosio dei GalCer che contengono una catena di acido grasso **non** idrossilata protrudono di  $180^\circ$  rispetto al piano della membrana.
- Per questa ragione, **le adesine microbiche a/o altri agenti patogeni e tossine spesso riconoscono preferenzialmente i glicosfingolipidi  $\alpha$ -idrossilati rispetto a quelli non idrossilati.** Es: la glicoproteina gp120 dell'involucro superficiale dell'HIV 1, i bastoncelli infettivi prionici e le adesine di Helicobacter pylori. [trattato Seminario Rafts & Agenti patogeni]



GalCer con acido grasso **non** idrossilato

GalCer con acido grasso idrossilato

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/galcer/3oh.htm>

## GalCer come recettore per patogeni

- I glicosfingolipidi come il GalCer sono usati come **portali cellulari** da una gran varietà di patogeni, incluso virus, batteri e parassiti.
- In particolare il **GalCer** è **riconosciuto** da: **HIV-1**, **prioni**, ***Borrelia burgdorferi*** (l'agente patogeno della malattia di Lyme, trasmessa all'uomo dalla puntura di zecche che infettano i cervi).
- Oltre a fornire una gran varietà di motivi glucidici accessibili, **i glicosfingolipidi dei rafts lipidici vengono endocitati mediante vie specifiche**. Infatti i ligandi legati ai rafts vengono internalizzati e traslocati a diversi compartimenti cellulari (reticolo endoplasmatico, nucleo, membrana plasmatica apicale o basolaterale), ma non ai lisosomi. Perciò, **scegliendo i rafts come portali di ingresso, i microbi evitano la potenziale degradazione nei lisosomi**.
- Ossia: **i rafts lipidici possono essere visti come navette indirizzate agli organelli cellulari che imbarcano i patogeni sulla superficie cellulare e li conducono ad una nicchia intracellulare protetta**.

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/galcer/6receptor.htm>

### Protein

FcεRI receptor

T-cell receptor

B-cell receptor

EGF receptor

Insulin receptor

EphrinB1 receptor

Neurotrophin

GDNF

Hedgehog

H-Ras

Integrins

eNOS

## Trasduzione di segnale & rafts

Simons K, Toomre D. **Lipid rafts and signal transduction**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Oct;1(1):31-9.

## Rafts lipidici e trasduzione dei segnali (a)

- ✚ La **specificità** e **fedeltà** della **trasduzione dei segnali** sono essenziali per che le cellule rispondano efficacemente a modificazioni nel loro microambiente.
- ✚ Ciò si ottiene in parte mediante **localizzazione differenziale delle proteine** che partecipano alle vie di segnalazione.
- ✚ Nella membrana plasmatica, una delle possibili modalità di compartimentazione utilizza i **rafts lipidici**.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_raft](http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_raft)

## Rafts lipidici e trasduzione dei segnali (b)

- ✚ I piccoli **rafts lipidici** possono formare **piattaforme di concentrazione** dopo l'**attivazione** dei **singoli recettori** mediante **legame con i ligandi**.
- ✚ Se l'attivazione dei recettori si svolge in un **raft lipidico** il **complesso di segnalamento è protetto da enzimi non presenti nei rafts** come le **fosfatasi di membrana**.
- ✚ Complessivamente, il legame nei rafts **recluta proteine ad un nuovo microambiente** in modo che **lo stato fosforilativo possa essere modificato da chinasi e fosfatasi locali** per originare un segnalamento a valle.

## Rafts lipidici e trasduzione dei segnali (c)

### + Segnalamento associato a rafts lipidici:

- ◆ da immunoglobuline E
- ◆ da B cell antigen receptor
- ◆ da "T cell antigen receptor"
- ◆ da EGF receptor
- ◆ da insulin receptor
- ◆ ecc.

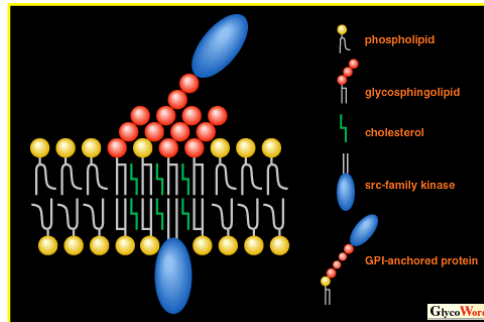
## GLICOLIPIDI E TRASDUZIONE DI SEGNALE

Kohji Kasahara (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

- + Hakomori et al. hanno dimostrato che i glicosfingolipidi (GSLs) sono **modulatori della trasduzione di segnale**.
- + L'aggregazione dinamica di GSLs e colesterolo sembra dare origine a **microdomini nell'ambito del bilayer lipidico** e all'associazione di una gran varietà di molecole di segnalamento con questo dominio.
- + **I GSLs sono relativamente ricchi di acidi grassi con catene aciliche sature, che permettono uno stretto impaccettamento e conferiscono temperature di fusione alte.** Viceversa, i **fosfolipidi derivati dal glicerolo sono relativamente ricchi di acidi grassi con catene aciliche cis-insature (stutture a gomito), che impediscono l'impacchettamento stretto, e conferiscono temperature di fusione basse.**

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycolipid/GLB04E.html>



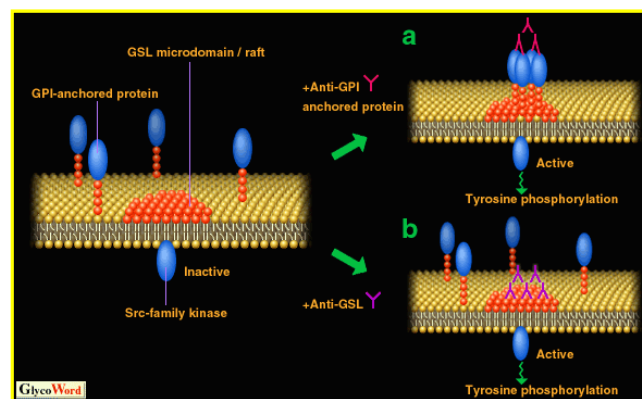


✚ **Proteine ancorate tramite GPI, proteine acilate** (con coda di acido grasso) come la **famiglia src delle tirosina chinasi** e le **proteine trimerica G**, sono associate ai microdomini di GSLs.

✚ Le **proteine ancorate a GPI** hanno di solito **catene aciliche sature** che probabilmente si inseriscono preferenzialmente nei microdomini GSLs. I membri della **famiglia Src delle proteina chinasi** vengono modificate da lipidi a catena satura (palmitoilazione e miristilazione) che probabilmente si inseriscono preferenzialmente nei microdomini ricchi in GSLs.

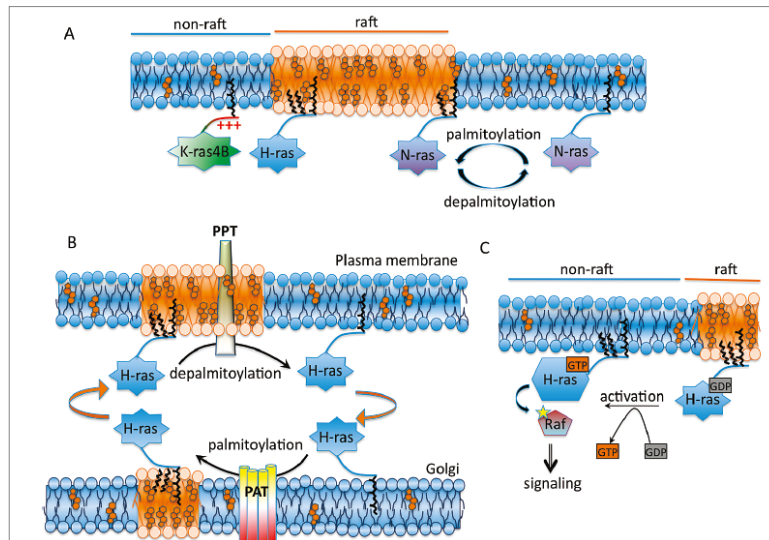
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycolipid/GLB04E.html>

✚ Il **cross-linking mediato da anticorpi** (o da **ligandi**) **delle proteine GPI-ancorate** induce l'**attivazione della famiglia delle src-chinasi** e un transiente aumento della fosforilazione a livello della tirosina di diversi substrati (Fig. 2a). Anche il **cross-linking degli GSLs mediato da anticorpi** induce l'attivazione della **famiglia src delle proteina chinasi** e un transitorio aumento di fosforilazione della tirosina (Fig.2b).



<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycolipid/GLB04E.html>

## Ruolo della palmitoilazione della proteina Ras nel suo traffico e attività



Levental I, Grzybek M, Simons K. **Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts.** *Biochemistry.* 2010 Aug 3;49(30):6305-16.

## Ruolo della palmitoilazione della proteina Ras nel suo traffico e attività: *Didascalia della figura di Levental et al.*

(A) Nonostante le **proteine Ras** siano prenilate, questa modificazione non è sufficiente per la loro associazione con la membrana plasmatica. La K-Ras4B contiene un segmento polibasico di aminoacidi nel suo C-terminale, e questa isoforma sembra essere esclusivamente presente in domini non-raft della membrana plasmatica. **H-Ras doppiamente palmitoilata** può partizionarsi nei lipid rafts mentre **N-RAS singolarmente palmitoilata** è stata osservata nelle zone di confine tra domini; per entrambe le forme la localizzazione è dipendente dalla palmitoilazione.

(B) Quando depalmitoilate da enzimi PPT, la H- e la N-Ras sono riciclate verso le membrane del Golgi dove sono repalmitoilate da enzimi PAT residenti nel Golgi. La palmitoilazione porta al riciclo verso la membrana plasmatica.

(C) L'attivazione di H-Ras porta allo scambio di GDP con GTP e ad un cambiamento conformazionale nel dominio prossimale alla membrana di H-Ras, conducendolo fuori dai rafts di membrana e all'attivazione delle sue proteine effettrici a valle (ad es. Raf).

Levental I, Grzybek M, Simons K. **Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts.** *Biochemistry.* 2010 Aug 3;49(30):6305-16.

Seminario

## Proteina Chinasi Src (1)



Figure 3-67. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- ✦ La proteina **Src** fu la prima **tirosina chinasi** ad essere scoperta; ora si sa che appartiene ad una sottofamiglia di nove proteine chinasi molto simili, che si trovano solo negli animali multicellulari.
- ✦ La proteina **Src** e i suoi omologhi contengono una **corta regione N-terminale che si lega covalentemente ad un acido grasso fortemente idrofobico, che trattiene la chinasi nella faccia citoplasmatica della membrana plasmatica**. Dopo ci sono due moduli di legame a peptidi (dominio **Src di omologia 3** ("Src homology 3"; **SH3**) e dominio **SH2** che **riconosce la tirosina fosforilata**), seguiti da un **dominio catalitico** ad attività chinasica.
- ✦ Queste chinasi normalmente esistono in una **conformazione inattiva**, nella quale una **tirosina fosforilata** vicino al C-terminale è legata al dominio SH2, e il dominio SH3 è legato ad un peptide interno in un modo che distorce il sito attivo dell'enzima ed aiuta a renderlo inattivo.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=src,kinase&rid=mboc4.section.452#507>

Seminario

## Proteina Chinasi Src (2)

- ✦ Per attivare le chinasi Src ci vogliono **due input specifici**: (1) **rimozione del gruppo fosfato del fosfato C-terminale**; e (2) **legame del dominio SH3 ad una proteina specifica**.

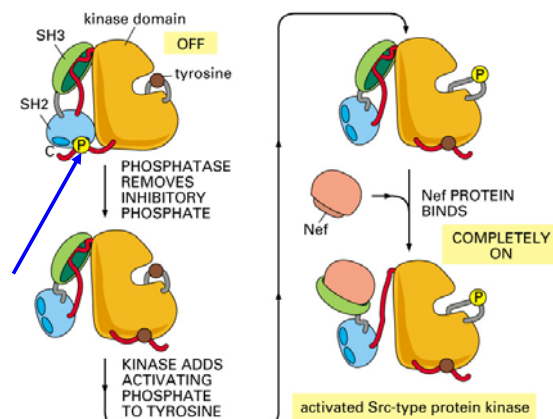


Figure 3-68. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/figure/A510/?report=objectonly>

**Seminario**

## Proteina Chinasi Src (3)

**INPUTS**

has this phosphate been removed?    has this binding been disrupted?    has this phosphate been added?

Src-type protein kinase activity turns on fully only if the answers to all of the above questions are yes

**OUTPUT**

- L'attivazione della SRC chinasi segnala che un determinato insieme di eventi a monte è stato completato.
- Perciò la famiglia **Src** funge da **integratore di segnali specifici** che aiuta a **generare una complessa rete di eventi di informazione** e processamento che permettono alla cellula di calcolare le risposte logiche ad un complesso insieme di eventi.

Figure 3-69. Molecular Biology of The Cell, 4th Edition.

**Seminario**

## Le chinasi della famiglia Src sono associate a recettori per l'antigene e fosforilano tirosine nelle sequenze ITAMs

Phosphorylation of ITAMs on B-cell receptor tails by Src-family kinases

Blk, Fyn or Lyn

- Le chinasi della famiglia Src, Fyn, Blk e Lyn si associano con il "**B-cell antigen receptor**" mediante legame a **motivi ITAM**, sia mediante i loro domini N-terminali che mediante legame con una singola tirosina fosforilata tramite i loro domini SH2. Dopo il legame con il ligando e l'aggregazione dei recettori, esse fosforilano le tirosine negli ITAMs presenti nelle code citoplasmatiche delle Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ .

**"Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif" (ITAM)**: sequenza conservata di quattro aminoacidi che è ripetuta due volte nelle code citoplasmatiche di alcune proteine della superficie cellulare delle cellule del sistema immunitario.

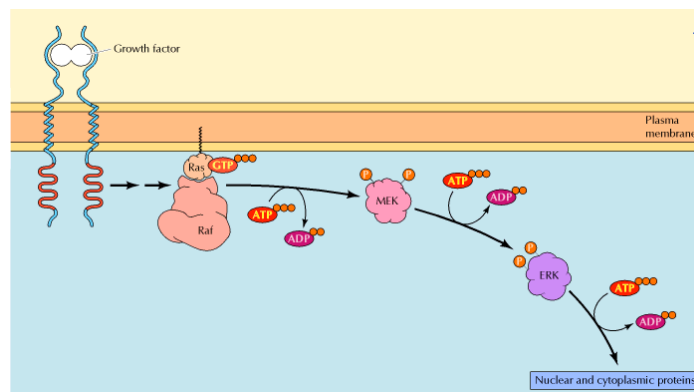
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27130/figure/A692/?report=objectonly>

Seminario

✦ **I microdomini GSL (“rafts”) sono coinvolti nel segnalamento mediato da immunorecettori e recettori dei fattori di crescita.**

Un’attivazione efficiente delle cellule T richiede un primo segnale da un **“T-cell antigen receptor”** e un secondo segnale da una **molecola co-stimolatoria**. La co-stimolazione porta al **reclutamento di microdomini GSL verso il sito di contatto cellula-cellula** fra la cellula T e la cellula che presenta l’antigene. La concentrazione di chinasi della famiglia *src* e di molecole “downstream”, e l’esclusione della tirosina fosfatasi CD45, permette una forte e prolungata fosforilazione di diversi substrati.

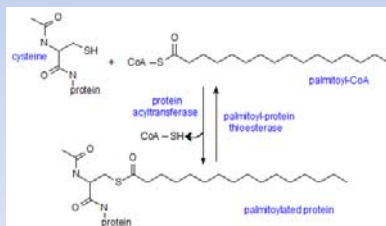
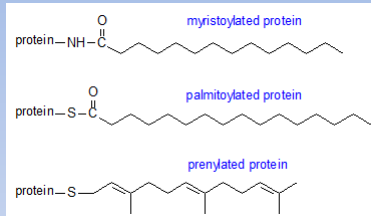
✦ Inoltre, i **recettore per l’“Epidermal Growth Factor, EGF”** e **Ras** sono presenti nei microdomini GSL e il trattamento con EGF induce la traslocazione di Raf-1 e MAPKK chinasi dal citosol ai microdomini GSL. Ciò suggerisce **che i microdomini GSL possono essere siti di inizio per la cascata delle MAP chinasi**.



Seminario

**Attivazione delle ERK MAP chinasi.** La stimolazione dei recettori dei fattori di crescita porta all’attivazione della piccola proteina che lega il GTP, Ras, che interagisce con la proteina chinasi Raf. A sua volta Raf fosforila e attiva MEK, una proteina chinasi a doppia specificità che attiva ERK mediante fosforilazione di residui sia di treonina che di tirosina (Thr-183 and Tyr-185). La ERK quindi fosforila una gran varietà di proteine bersaglio nucleari e citoplasmatiche.

## ACILAZIONE DELLE PROTEINE G



Nelle cellule di Mammifero la palmitoilazione, la miristilazione e la prenilazione mediano l'associazione delle subunità della proteina G alla membrana.

La mancanza di queste modificazioni porta alla solubilizzazione delle proteine (Wedegaertner et al., 1995).

<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/protlip/index.htm>

Covini, Dott 2013

## In particolare...

La palmitoilazione ha un ruolo nell'indirizzare le proteine G-alfa alla membrana, ed in particolare, a specifici sub-domini (rafts).

(Huang et al., 1997)

Infatti la mancanza di palmitato causa una errata localizzazione delle proteine G-alfa nelle membrane intracellulari.

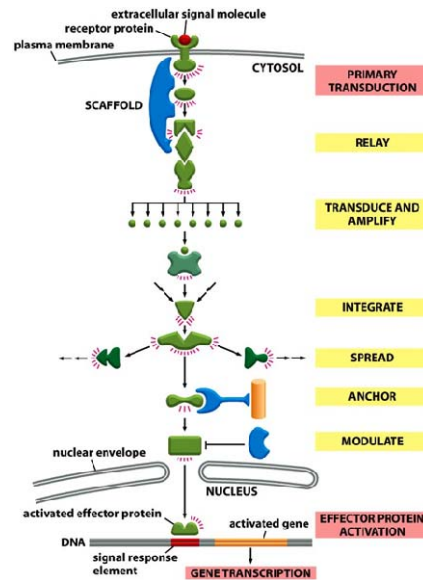
(Huang et al., 1999; Morales et al., 1999)

Covini, Dott 2013

Seminario

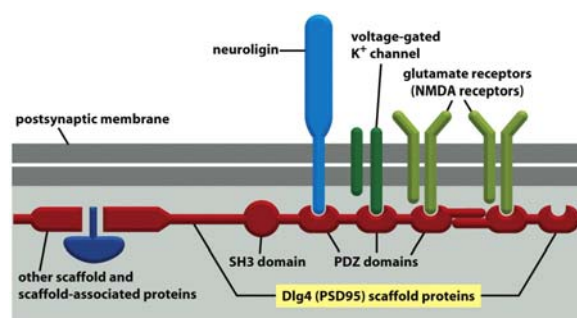
## Proteine «scaffold» (impalcatura) (1)

- ✦ Sono proteine che avvicinano diverse altre proteine in una via di segnalamento e permettono la loro interazione.
- ✦ Reclutano effettori a valle in una via ed aumentano la specificità del segnale.



Seminario

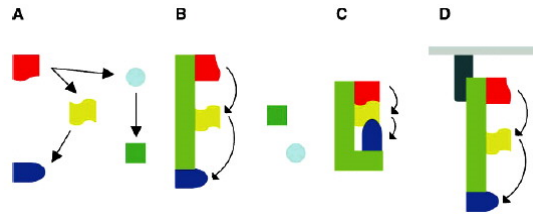
## Proteine «scaffold» (impalcatura) (2)



Il diagramma illustra la struttura a domini di Dlg4, un omologo umano della proteina di *Drosophila*, Discs-large, insieme ad alcuni dei suoi partners proteici. La Dlg4 è concentrata sotto la membrana post-sinaptica nelle sinapsi, e viene anche nota come "Post-Synaptic Density protein 95", PSD95. Con i suoi molteplici domini di legame con proteine, essa può collegare diverse componenti della sinapsi. Una molecola di Dlg4 può legarsi anche ad un'altra o a molecole "scaffold" di altri tipi, creando in questo modo una estesa rete di collegamento fra le componenti della sinapsi. Le proteine "scaffold" giocano anche ruoli importanti in altri tipi di giunzioni cellulari.

Seminario

## Proteine «scaffold» (impalcatura) (3)



Funzioni delle **proteine scaffold** nel **segnalamento cellulare**. (A) In assenza di una proteina scaffold, la diffusione libera permette alle chinasi e ai loro substrati di interagire, portando ad una **attivazione casuale e non-specifica** dei substrati e **scarsa efficienza di segnalazione**. (B): Il **legame** di una chinasi e dei substrati **ad una proteina scaffold** (verde) facilita l'attivazione dei substrati e permette l'incanalamento del segnale verso una cascata specifica. (C) La proteina scaffold potrebbe orientare o attivare allostericamente le sue chinasi associate, **augmentando** così l'**efficacia** di **segnalazione**. (D): L'interazione della proteina scaffold con un adattatore locale (grigio scuro) restringe l'attivazione della via di segnalazione a regioni subcellulari specifiche (grigio chiaro).

Dard N, Peter M. **Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms**. Bioessays. 28:146-156, 2006.