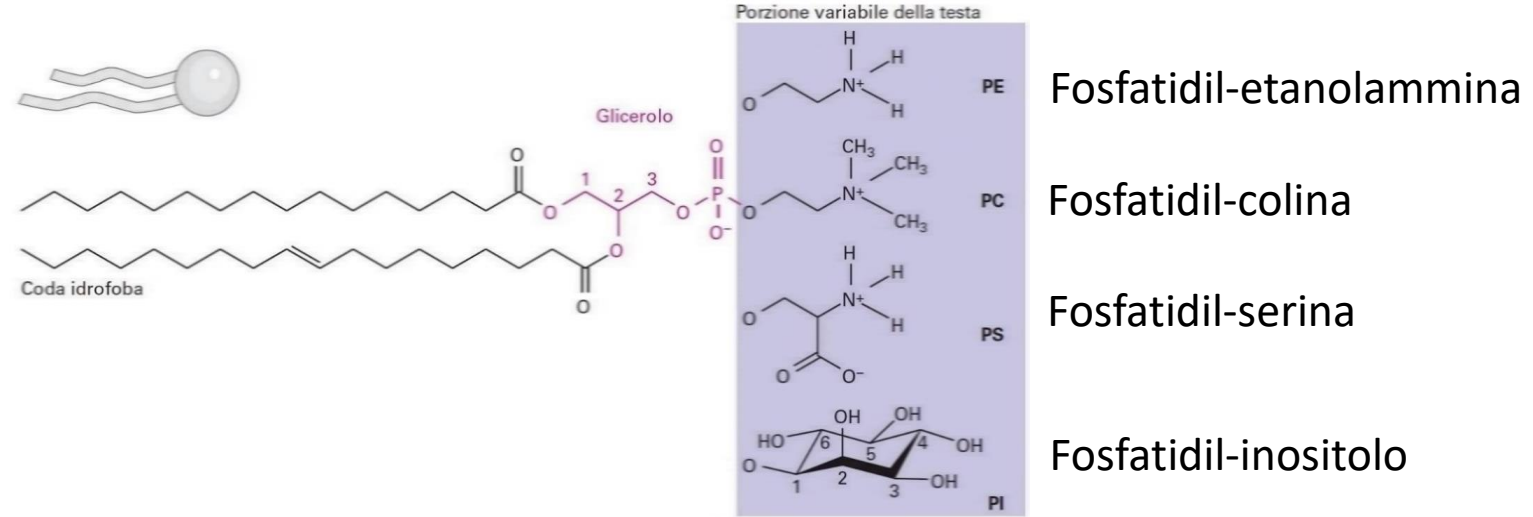


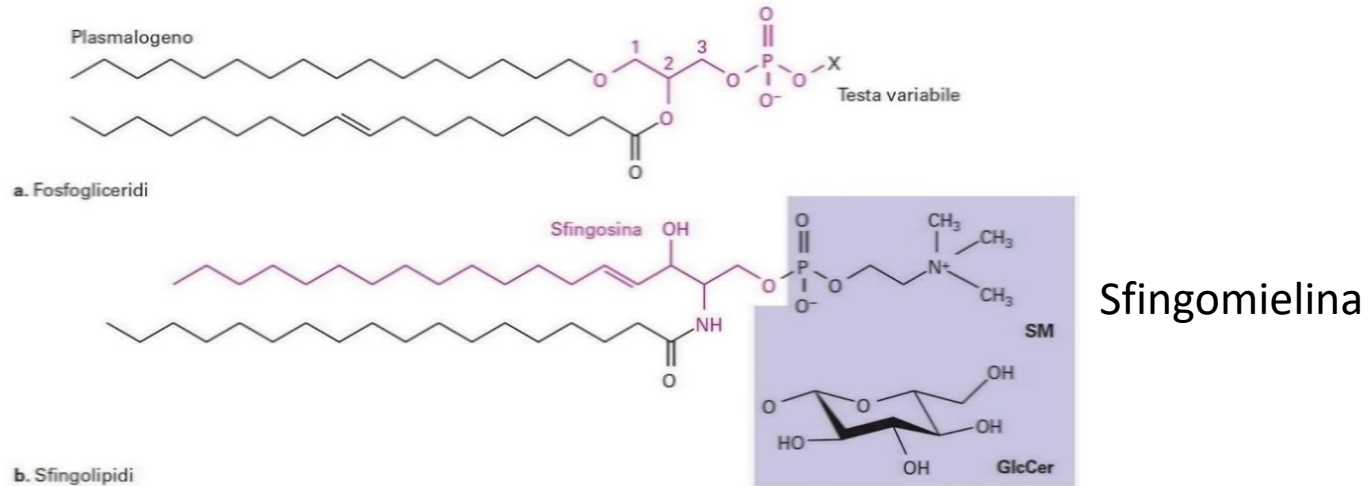
# Lipid Rafts

# 3 classi di lipidi nelle membrane biologiche

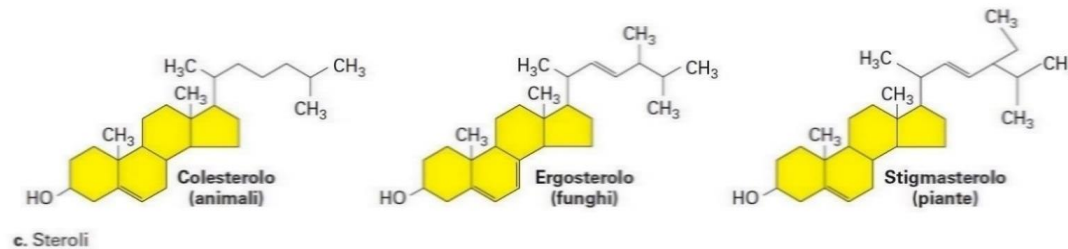
## fosfolipidi



## sfingolipidi



## steroli



# L'abbondanza relativa dei diversi lipidi varia nelle diverse membrane

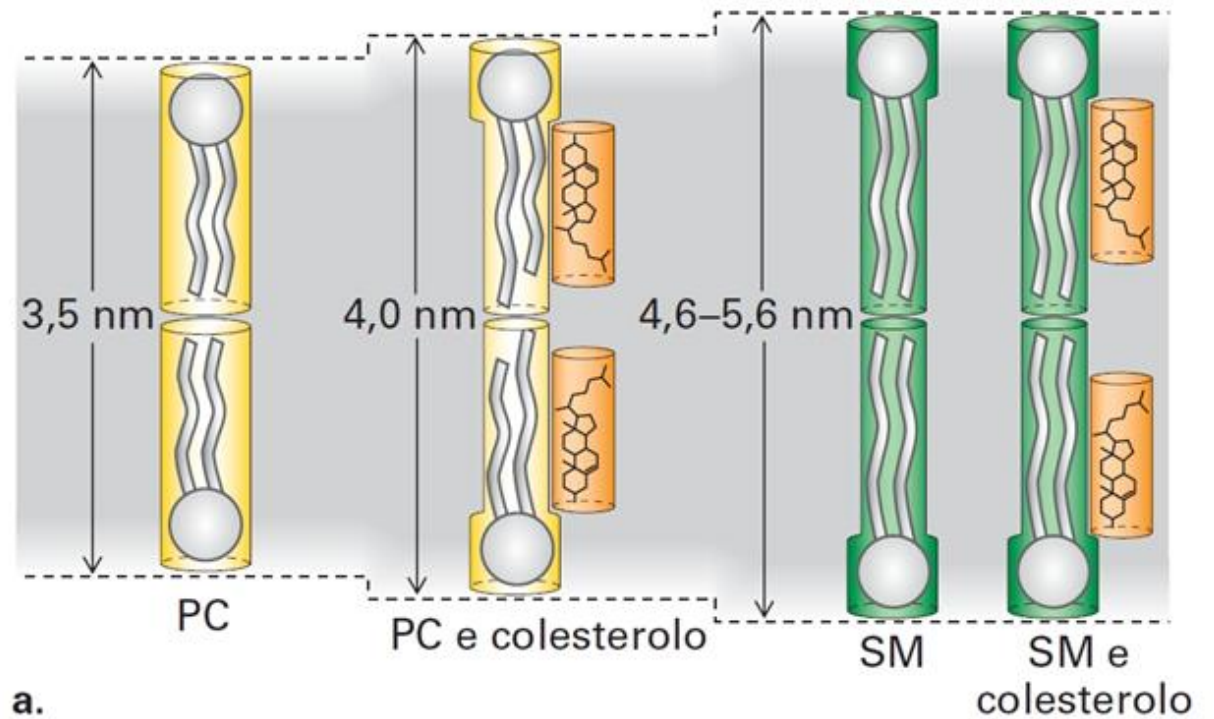
**Tabella 10.1** Principali componenti lipidici di alcune membrane biologiche.

| Sorgente/Localizzazione                      | Composizione (mol %) |            |               |             |
|--|----------------------|------------|---------------|-------------|
|  | PC                   | PE + PS    | SM            | Colesterolo |
| Membrana plasmatica (eritrociti umani)       | 21                   | 29         | 21            | 26          |
| Membrana mielinica (neuroni umani)           | 16                   | 37         | 13            | 34          |
| Membrana plasmatica (fagiolo verde)          | 47                   | 43         | 0             | 0           |
| Membrana mitocondriale interna (cavolfiore)  | 42                   | 38         | 0             | 0           |
| Membrana mitocondriale esterna (cavolfiore)  | 47                   | 27         | 0             | 0           |
| Membrana plasmatica ( <i>E. coli</i> )       | 0                    | 85         | 0             | 0           |
| Membrana del reticolo endoplasmatico (ratto) | 60                   | 25         | 3             | 7           |
| Membrana dell'apparato di Golgi (ratto)      | 51                   | 26         | 8             | 13          |
| Membrana mitocondriale interna (ratto)       | 40                   | 37         | 2             | 7           |
| Membrana mitocondriale esterna (ratto)       | 54                   | 31         | 2             | 11          |
| Principale foglietto di localizzazione       | Esoplasmatico        | Citosolico | Esoplasmatico | Entrambi    |

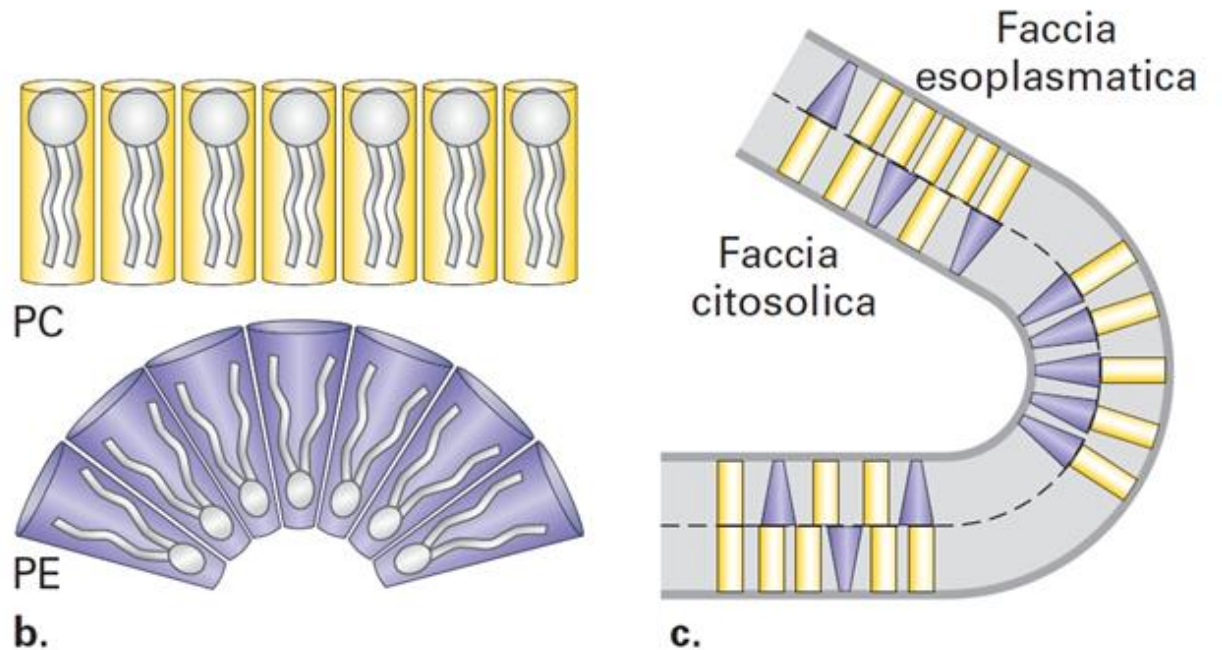
PC = fosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina; PS = fosfatidilserina; SM = sfingomieline.

Le membrane sono asimmetriche → foglietto citosolico e foglietto esoplasmatico non sono uguali

I diversi lipidi che costituiscono le membrane hanno caratteristiche differenti, in termini di lunghezza e geometria.



a.

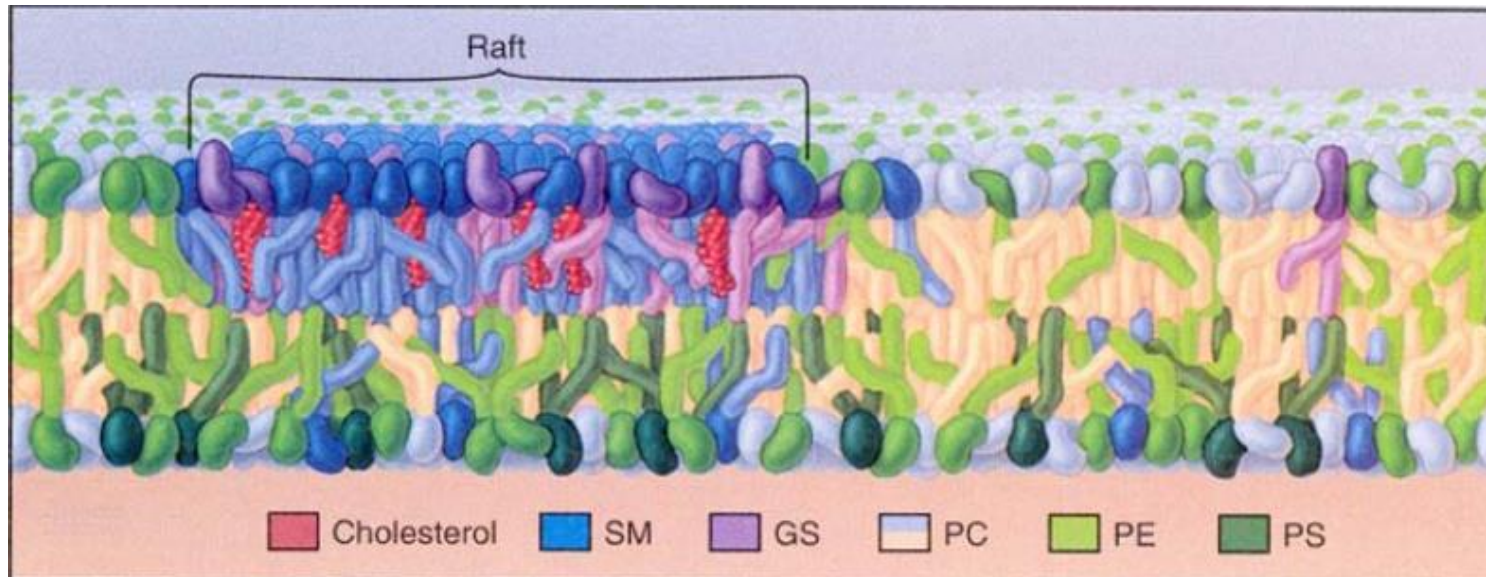


b.

c.

# Lipid rafts o zattere lipidiche

- I lipidi nelle membrane non sono organizzati in maniera casuale.
- I *lipid rafts* o zattere lipidiche si formano nella membrana plasmatica quando **gli sfingolipidi e il colesterolo** si associano, creando zone «specializzate» della membrana
- Sono strutture ordinate e dinamiche di piccole dimensioni (10-200nm)
- A lungo ci sono stati dubbi sulla loro reale esistenza



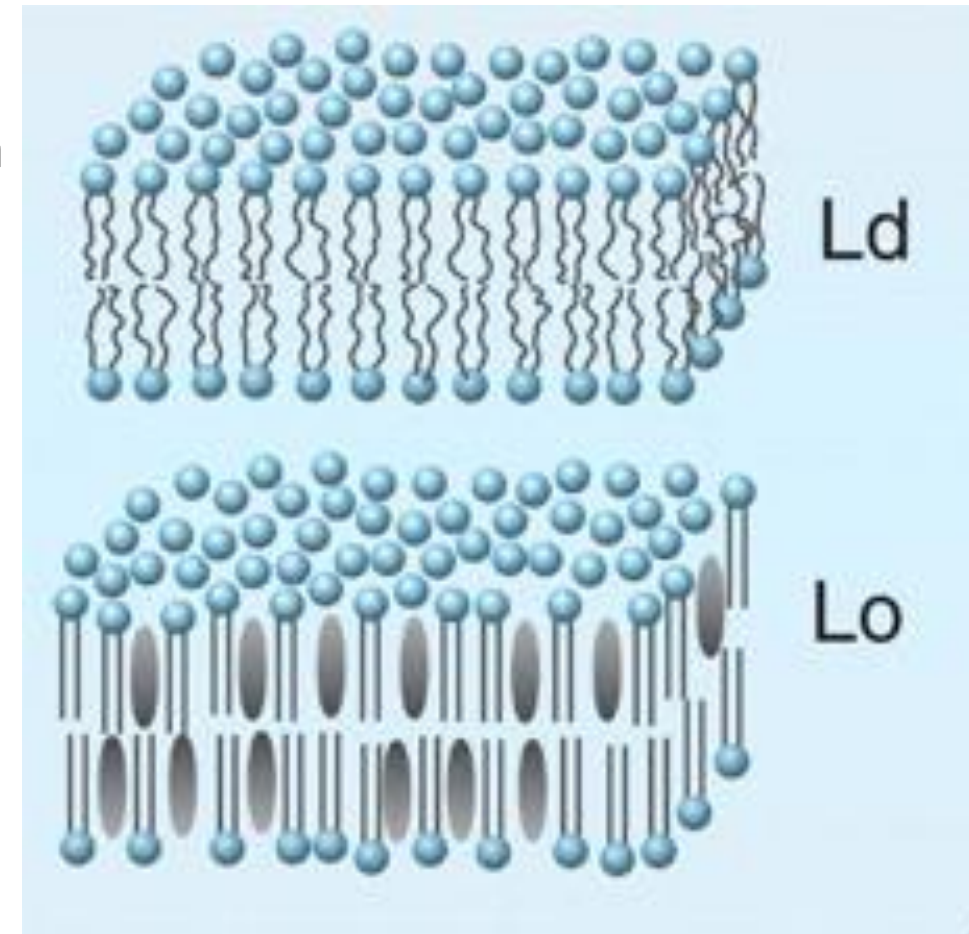


Negli anni 1970s si osservò la diversa solubilità di lipidi e proteine ai detergenti, scoprendo che esistono frazioni di membrana solubili ai detergenti e frazioni resistenti ai detergenti. Le zone resistenti ai detergenti erano ricche di sfingolipidi, colesterolo e proteine con ancora GPI. Queste tecniche (uso di detergenti) non è però il metodo migliore per studiare i lipid rafts *in vivo*.

Si scoprì poi che *in vitro* i lipidi si possono assemblare in due modi:

- **Ld= liquid-disordered**, meno ordinata, lipidi non saturi.
- **Lo = liquid-ordered**, organizzazione ordinata, presenta lipidi saturi e colesterolo.

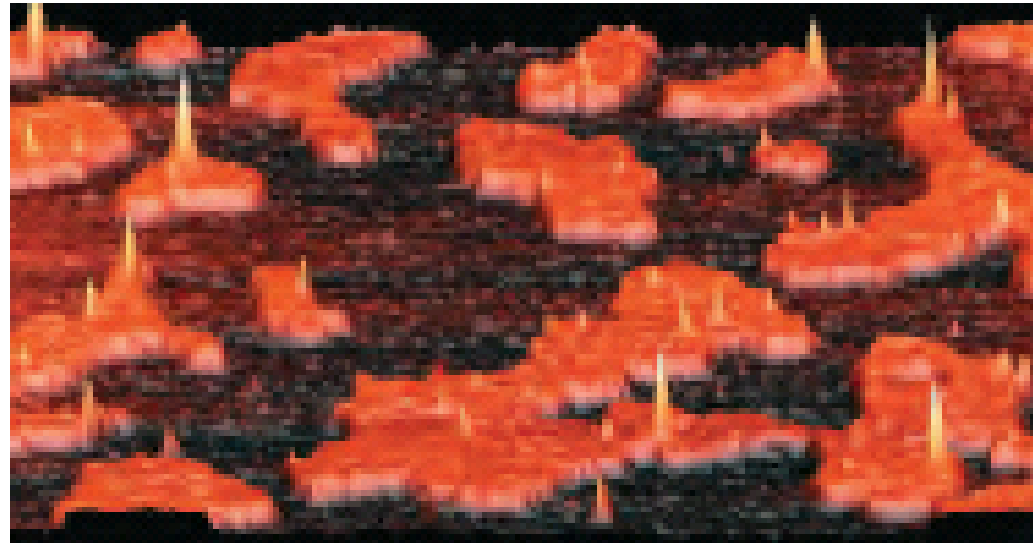
Lo è considerato un modello delle zattere lipidiche, ma è privo di proteine (che costituiscono il 25% delle membrane), quindi non è un modello accurato di quanto accade *in vivo*.



Questa immagine di una membrana modello contenente diversi tipi di lipidi di membrana (glicerofosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo) è stata ottenuta con il **microscopio a forza atomica** (*atomic force microscope* – AFM).

I lipid rafts sono più spessi e si muovono in un mare più sottile di glicerofosfolipidi. Le strutture a punta gialle evidenziate dall'AFM sono ectoenzimi (proteine ancorate al foglietto esterno della membrana plasmatica con ancora di GPI).

Il maggiore spessore dei lipid rafts è legato alla loro composizione lipidica. Gli sfingolipidi contengono acidi grassi saturi a lunga catena e la loro testa polare può formare una rete di legami deboli che contribuiscono all'aggregazione.



# Lipid Rafts

Proteine residenti:

**Caveoline**

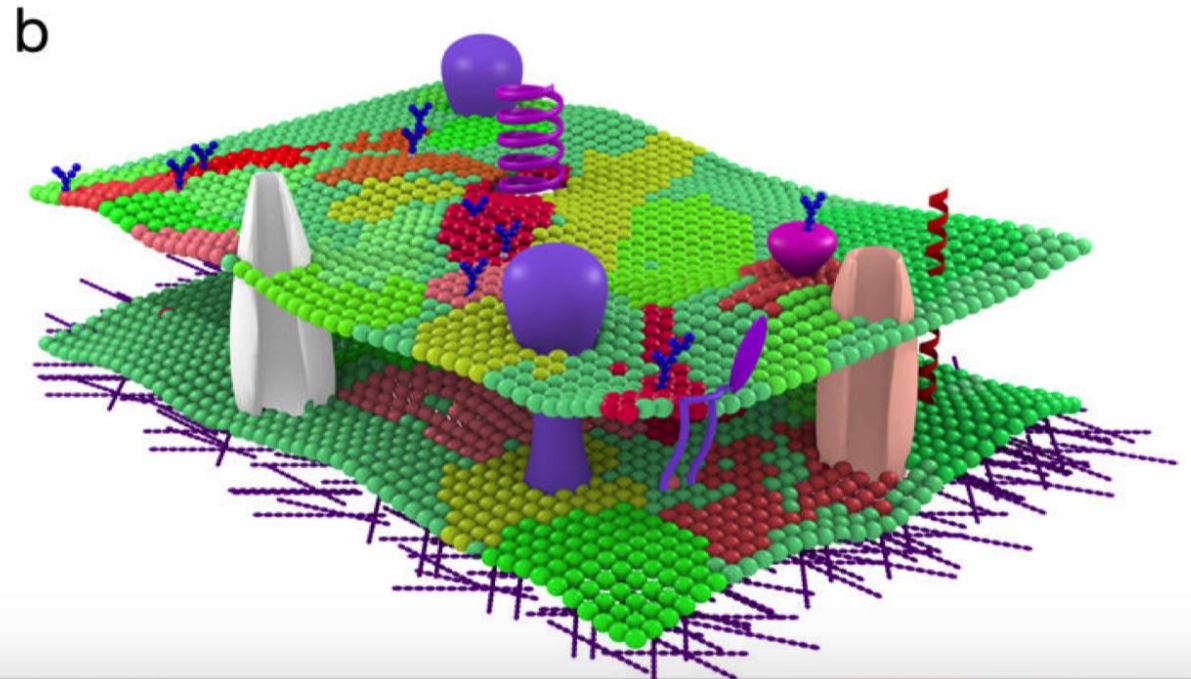
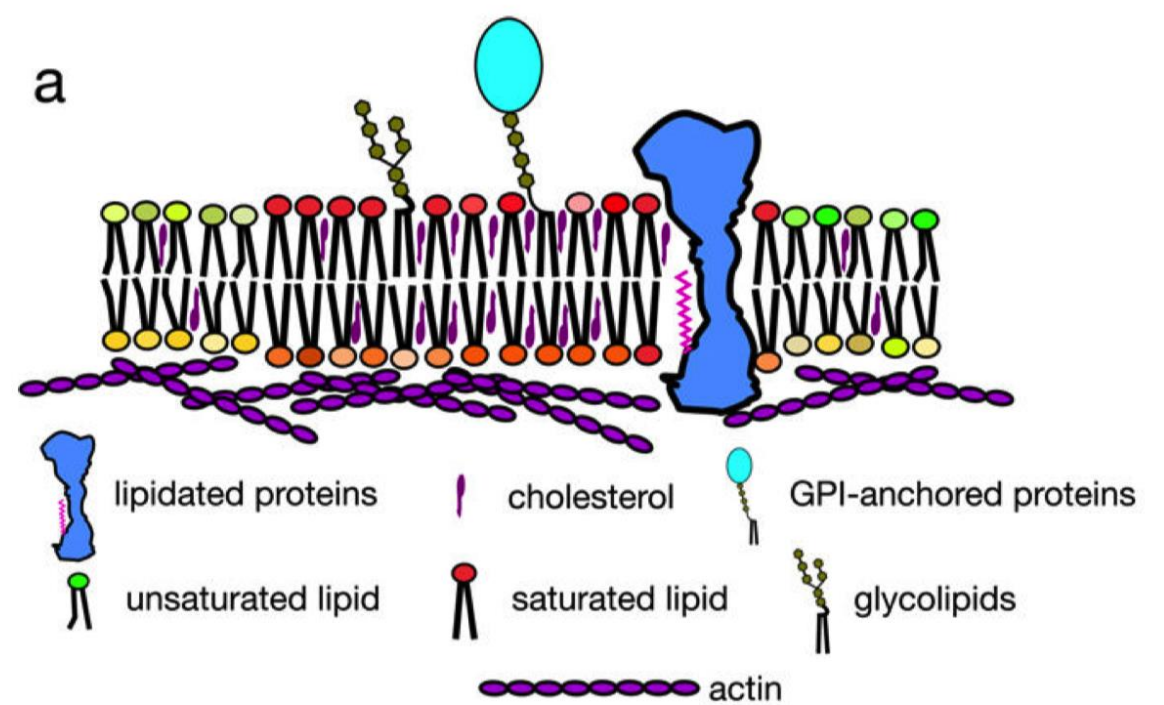
**Flotillina**

**Marcatori dei rafts**

Proteine GPI-anchored, proteine legate a lipidi (ad esempio proteine palmitoilate).

Queste reclutano proteine del signaling: G-proteins, chinasi (fosfatasi escluse dai rafts)

Proteine del citoscheletro: actina, miosina, vinculina, cofilina, ezrina, caderine



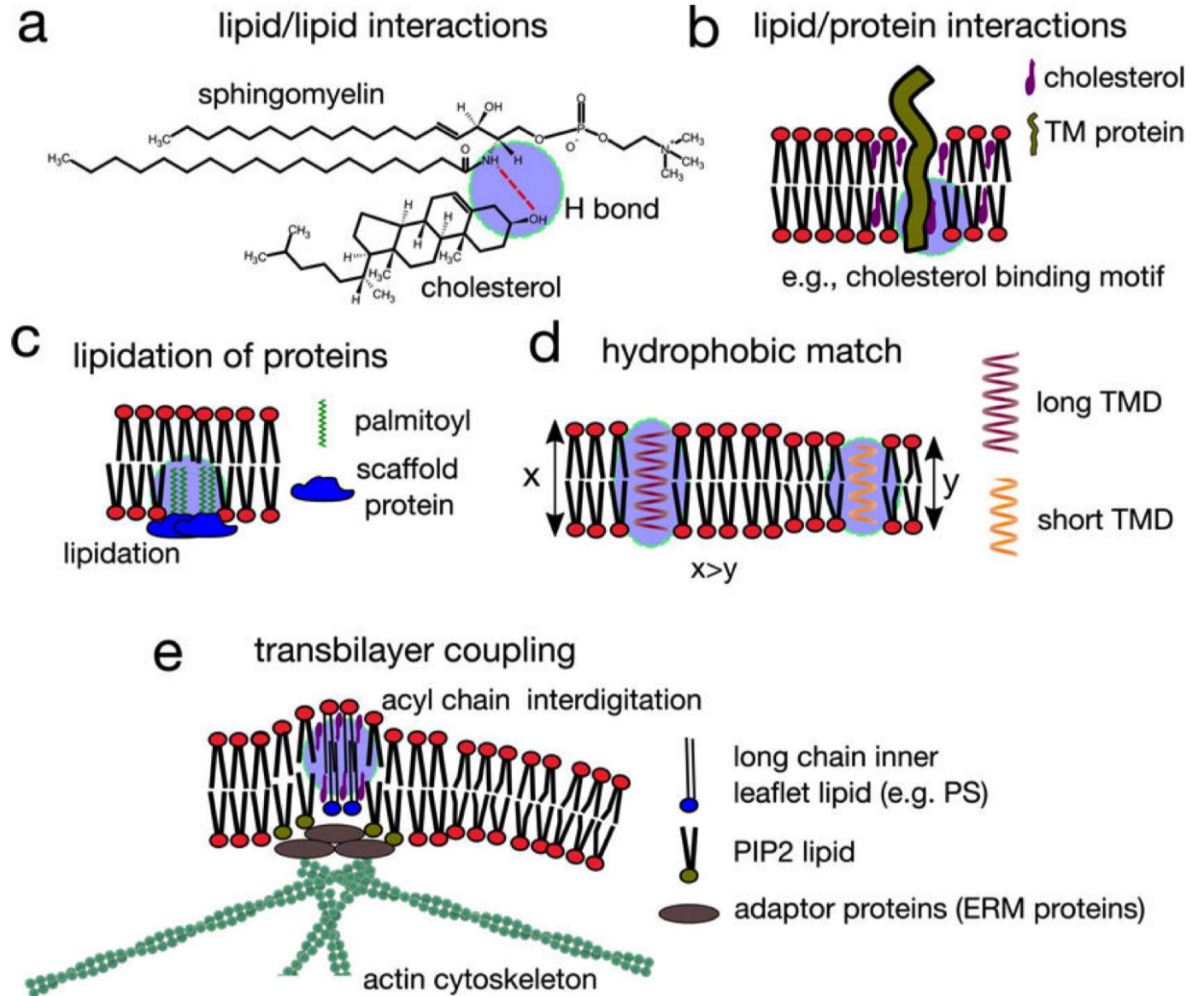


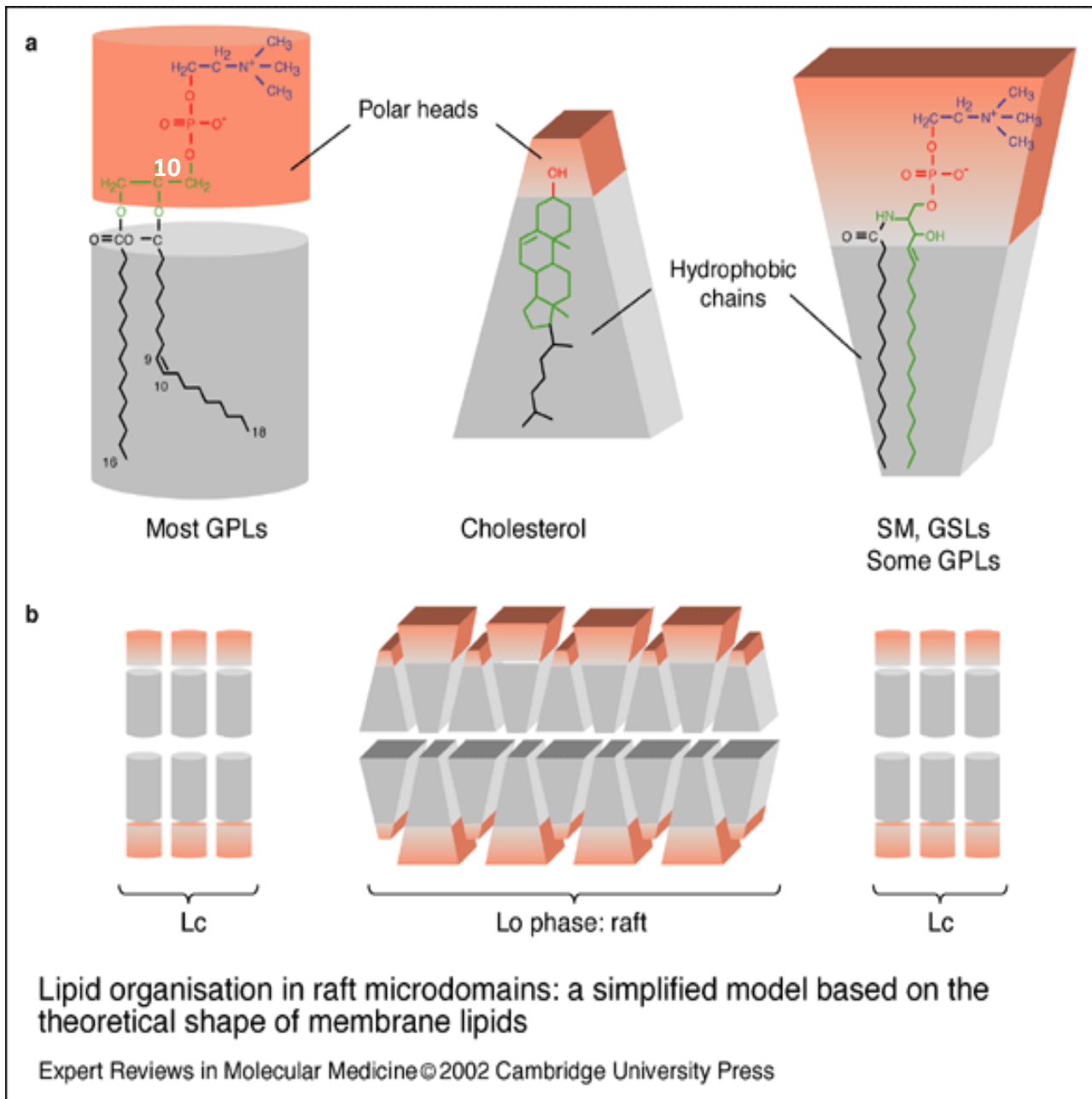
Il colesterolo favorisce la separazione in fasi dei lipidi di membrana, forse è all'origine della formazione dei lipid rafts, perché **naturalmente il colesterolo si associa agli sfingolipidi.**

Le interazioni tra lipidi nei rafts diminuiscono la fluidità della membrana. Quindi le zattere lipidiche sono più rigide.

Le proteine TM dei rafts devono avere tratti TM più lunghi.

L'**actina** stabilizza i rafts mediante interazioni con i lipidi del lato interno e permette l'interazione con le ancore GPI.

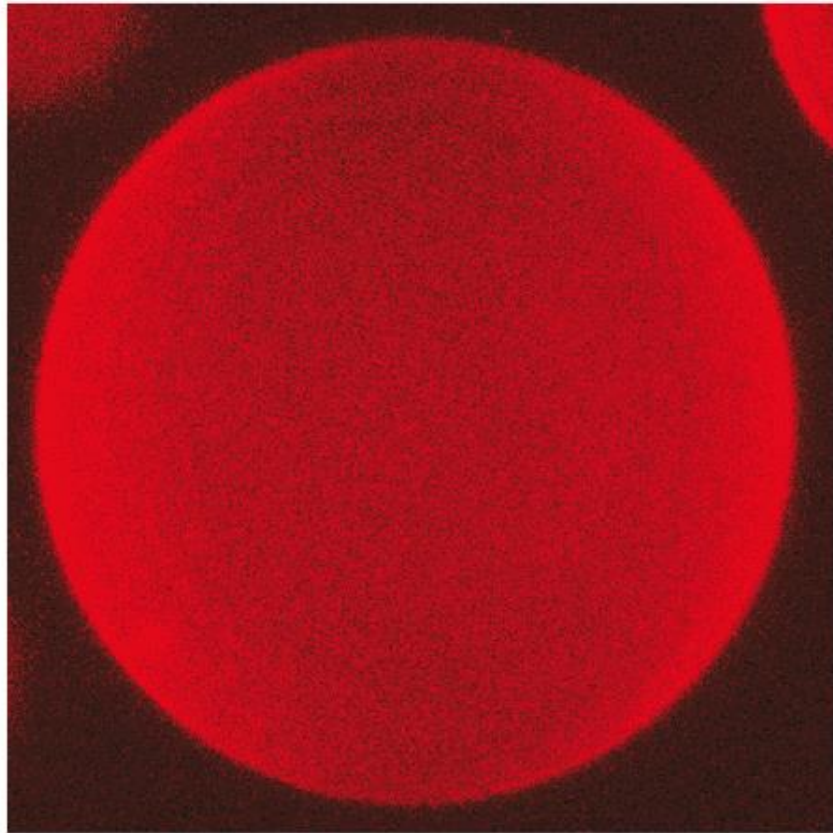




**La geometria dei diversi lipidi**  
 Colesterolo e sfingolipidi non sono cilindrici ma conici, quindi si associano bene insieme.

Il colesterolo è una colla dinamica che tiene insieme il raft. Quando viene rimosso la maggior parte delle proteine si dissocia e i lipidi rafts non sono più separabili.

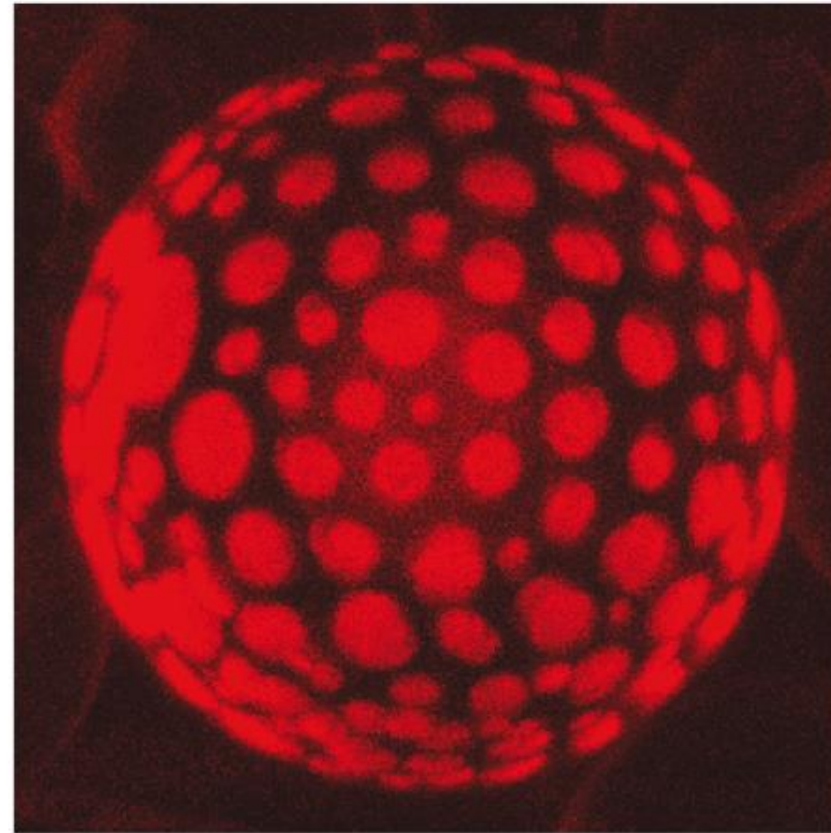
Il 25% del colesterolo totale si trova nel cervello.



(A)

10  $\mu\text{m}$

Liposomi prodotti da una miscela 1:1 di fosfatidilcolina e sfingomieline



(B)

5  $\mu\text{m}$

Liposomi prodotti da una miscela 1:1:1 di fosfatidilcolina, sfingomieline e colesterolo  $\rightarrow$  separazione in due fasi separate

## Proteine nei lipid rafts

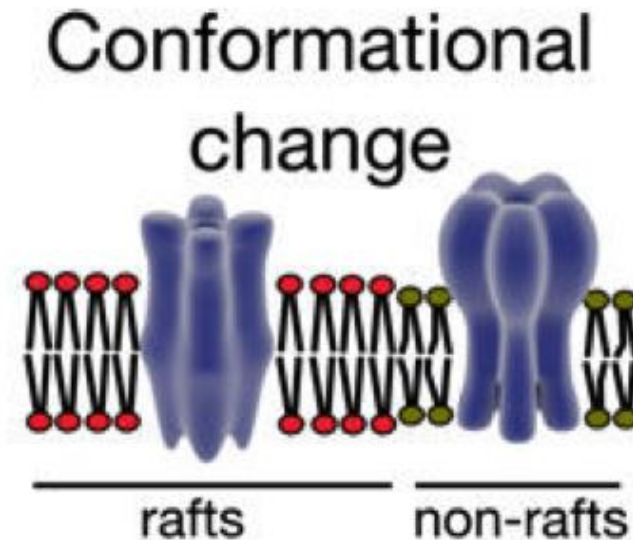
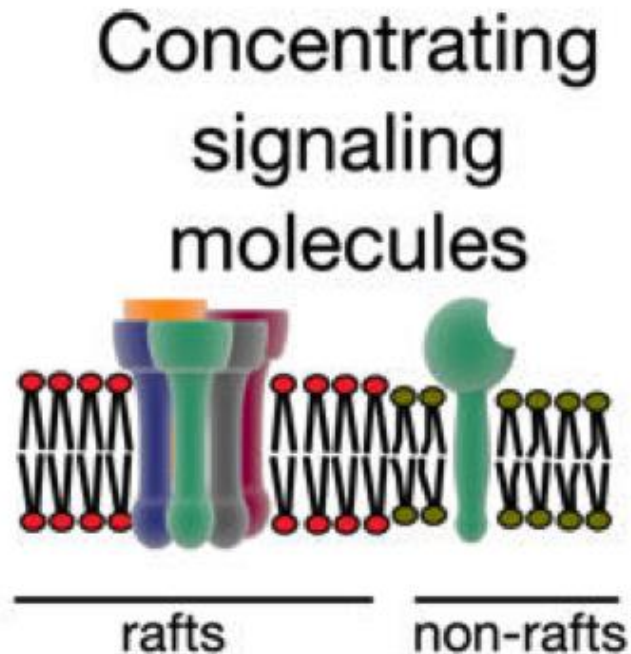
Non è ancora del tutto chiaro come avvenga l'incorporazione selettiva delle proteine nelle zattere lipidiche.

- Per le proteine con ancore lipidiche vale la regola dei lipidi nei lipid rafts: **àncore sature come GPI o gruppi palmitici favoriscono l'incorporazione nelle zattere lipidiche**, mentre ancore non sature indirizzano le proteine preferenzialmente a zone della membrana diverse dai rafts.
- Anche proteine non lipidate si localizzano nei lipid rafts (1/3 delle proteine dei rafts non possiedono ancore lipidiche). Sembra che una **maggior lunghezza del tratto transmembrana** renda le proteine «raftophilic».



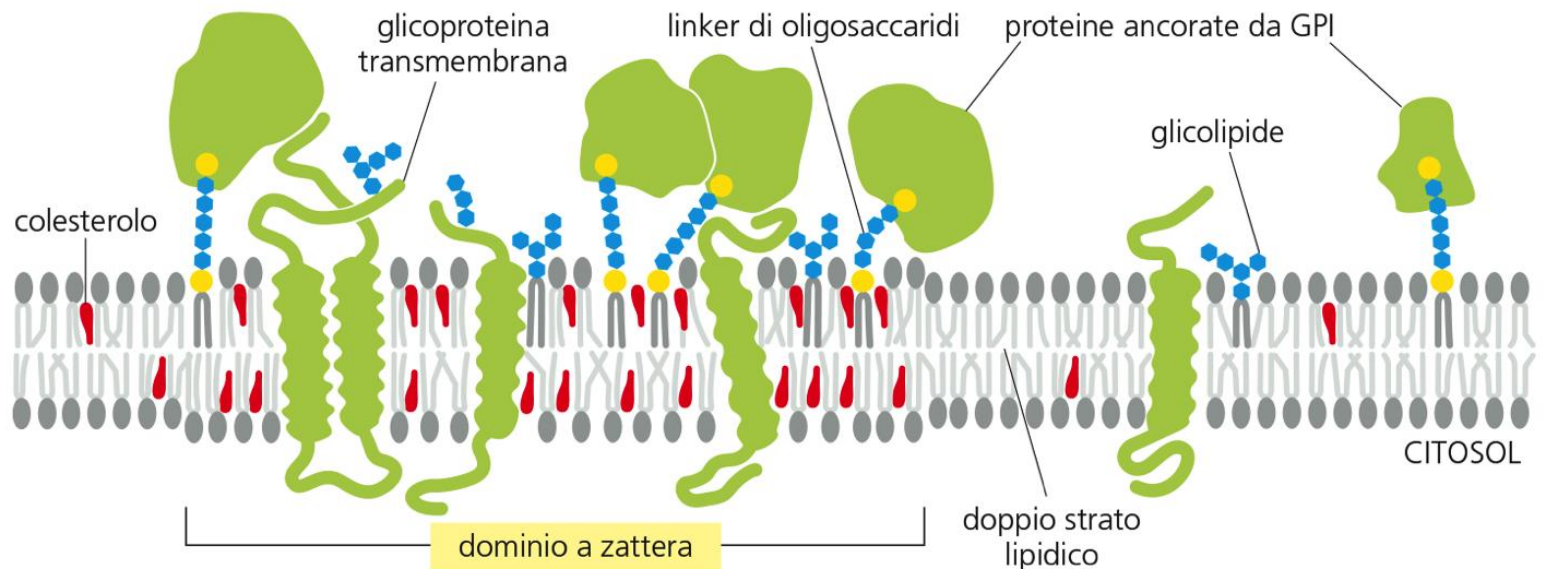
# Funzioni generali dei lipid rafts

- I lipid rafts consentono di segregare specifici elementi per regolarne l'interazione e quindi l'attività.
- Inoltre l'interazione con i lipidi dei rafts può indurre cambiamenti conformazionali e quindi modulare l'attività delle proteine.

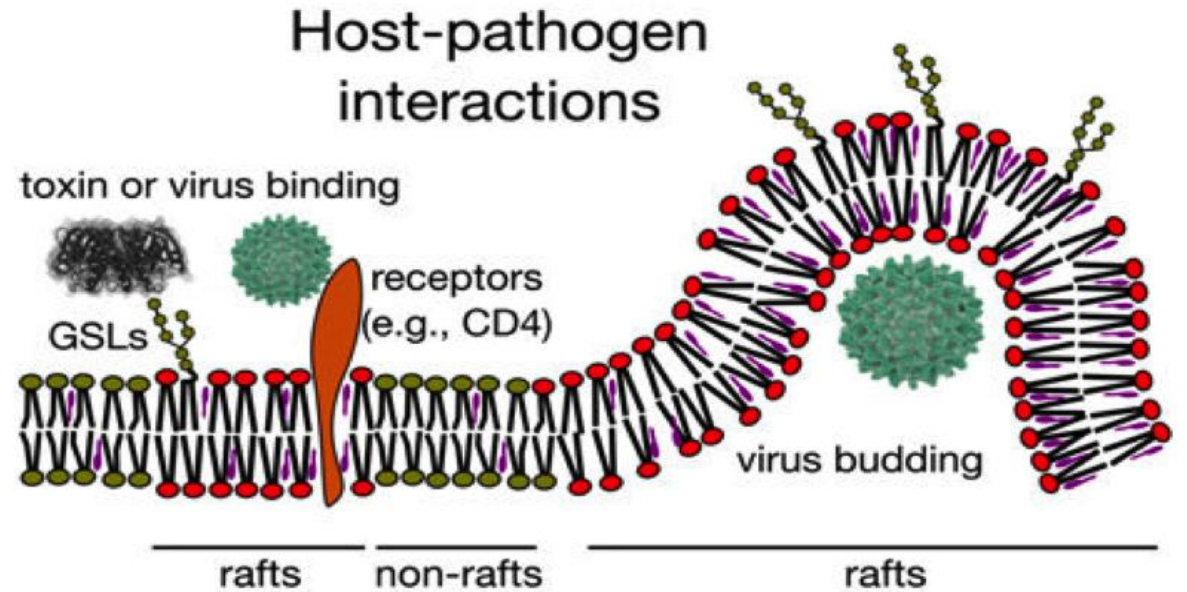
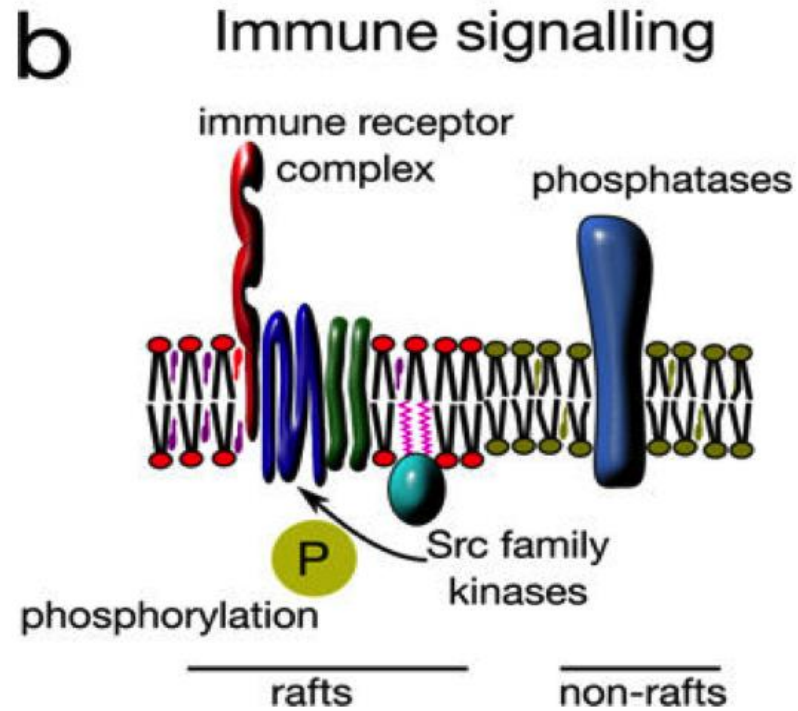


# Funzioni dei lipid rafts

- Negli eucarioti i rafts sono centri organizzativi per la trasduzione del segnale (che può essere amplificata o smorzata) ex. EGFR si trova nelle zattere lipidiche
- Influenzano la fluidità della membrana
- Sono coinvolti nel traffico delle proteine di membrana, in particolare in quello dei recettori dei neurotrasmettitori (neurotrofina), e nella neurotrasmissione
- Sono coinvolti anche nella difesa immunitaria e nella difesa contro i patogeni (recettori nei rafts)
- Coinvolti nella cancerogenesi



# Esempi di funzioni fisiologiche associate ai lipid rafts



Le chinasi della famiglia SRC sono spesso associate ai rafts (sono palmitoilate), mentre le fosfatasi risiedono fuori dai rafts. Questa segregazione è importante per il signaling a valle di vari recettori importanti per il sistema immunitario.

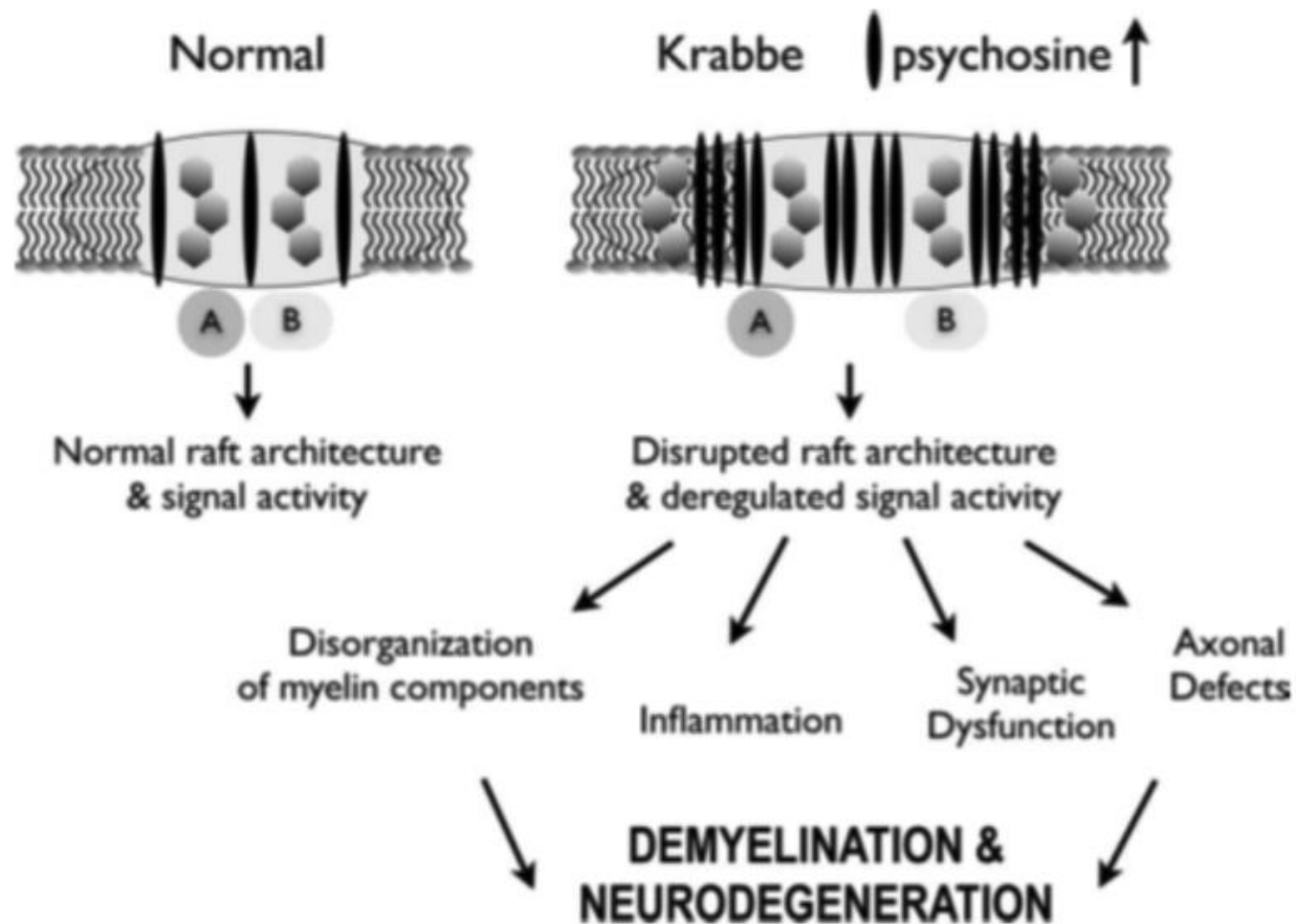
Molti patogeni o loro prodotti (es. tossine) si legano ai rafts per la presenza dei loro recettori. Anche la gemmazione dei virus spesso avviene nelle regioni dei rafts.



## Malattia di Krabbe, malattia da accumulo lisosomiale

Malattia rara, comporta ritardo mentale grave.

E' dovuta a mutazioni nella **galattocerebrosidasi**, induce accumulo dello sfingolipide galattocerebroside e di un suo metabolita, la galattosilfosfingosina, detta anche **psicosina**, che normalmente sta nei lipid rafts ma in questa patologia si accumula. Un eccesso di psicosina impedisce le interazioni tra proteine dei rafts.



**Figure 9.** Proposed model of deregulation of various raft-modulated cell functions in Krabbe disease. The illustration proposes a working model where the preferential accumulation of psychosine in the raft domain, consequent to the deficiency of GALC activity, leads to deregulation of raft-associated signals in Krabbe disease. In this hypothetical model, under normal sphingolipid metabolism, two hypothetical partners (A, B) are spatially accommodated to provide functional interaction and hence, normal signal activity. In Krabbe disease, the raft domain increases in size because of the accumulation of psychosine and other components of the raft, leading to the spatial separation of the two partner molecules A and B, disrupting the function of the associated signal. The consequent deregulation in signal activity can influence different dependent cellular processes according to the cell type where this occurs. The proposed model does not illustrate other possible raft alterations such as fragmentation of abnormal rafts and impairment of signaling by spatial separation of raft components.



## Lipid rafts e patologie

Molte patologie sono legate ai lipid rafts, quindi si sta pensando di usare i rafts come bersaglio a scopi terapeutici. Molte patologie legate ai rafts dipendono da un eccesso di zattere e/o una loro maggior stabilità.

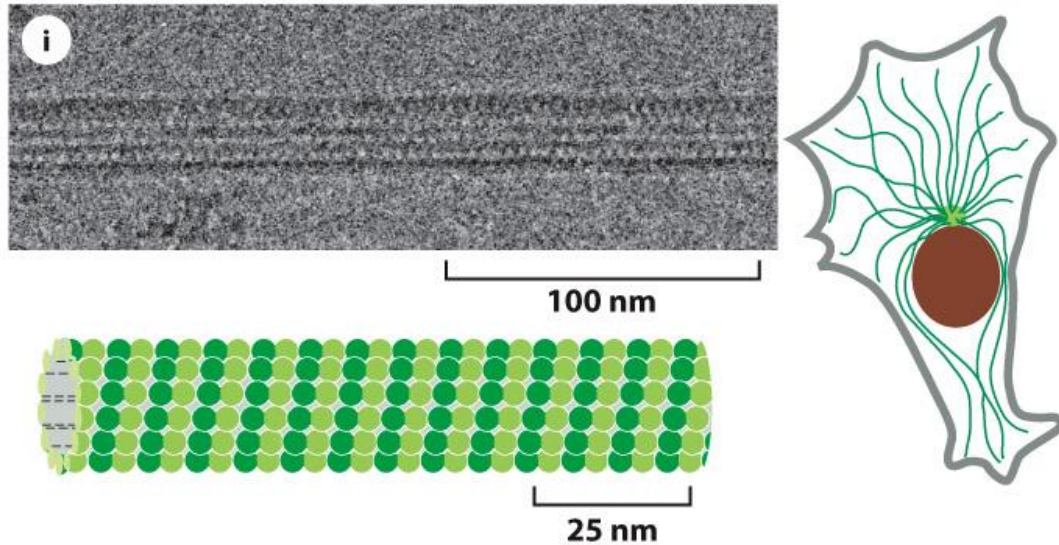
- **Inflammarafts**: grossi rafts che ospitano recettori attivati e molecole che mediano la risposta infiammatoria
- **CASMER** (cluster of apoptotic signaling molecule-enriched rafts): rafts che mediano i segnali apoptotici

Le  $\beta$ -ciclodestrine sottraggono colesterolo e quindi distruggono i rafts (ma ad alte concentrazioni diventano tossiche!). Oppure si può agire sulla composizione lipidica (ex. Statine che inibiscono HMG-CoA reduttasi) o sul citoscheletro di actina (che stabilizza i rafts).

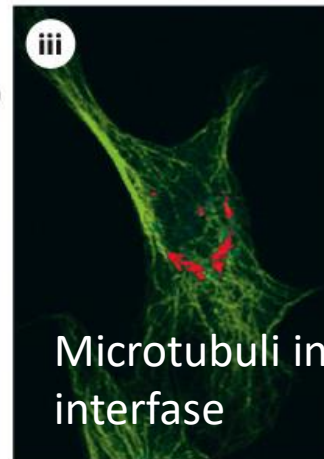
# Microtubuli

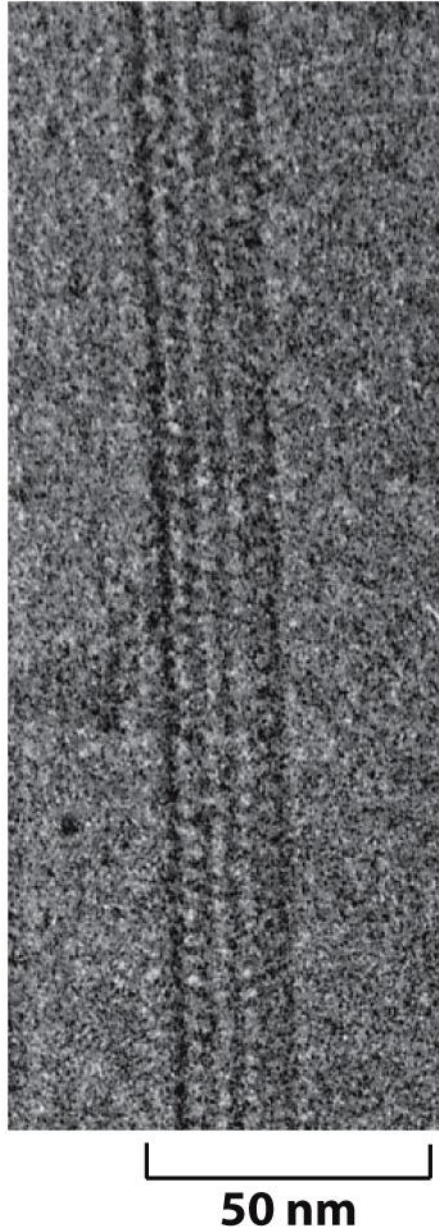
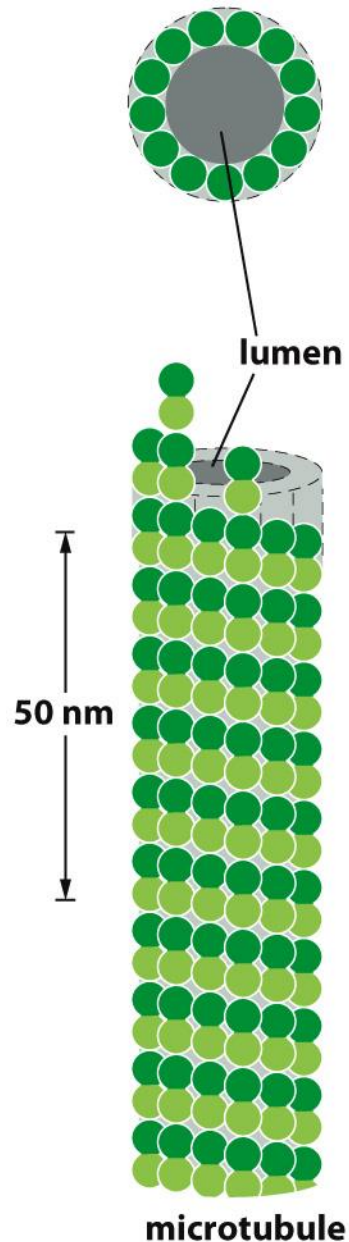
# I microtubuli

## MICROTUBULES



I microtubuli sono costituiti di tubulina e sono organizzati a partire da un centro organizzatore dei microtubuli (MTOC) chiamato anche centrosoma.





I microtubuli sono strutture cilindriche cave costituite da **13 protofilamenti**.

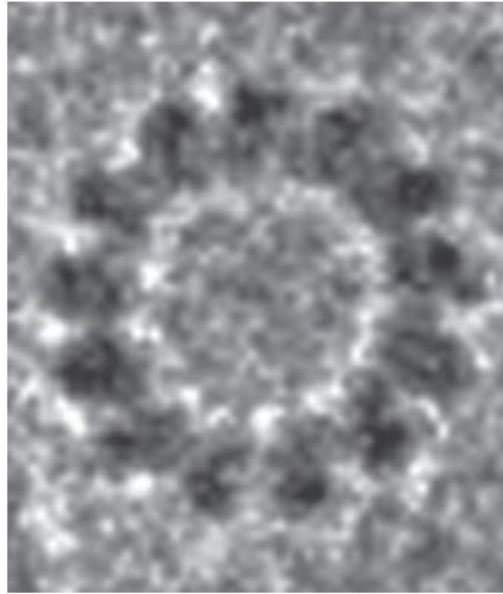
Oltre all'interazione tra i monomeri nel dimero di tubulina  $\alpha\beta$ , ci sono interazioni laterali, tra monomeri dello stesso tipo. Un leggero sfasamento dei contatti laterali dà origine alla struttura elicoidale.

**L'aggiunta e la perdita di subunità avvengono solo alle estremità.**

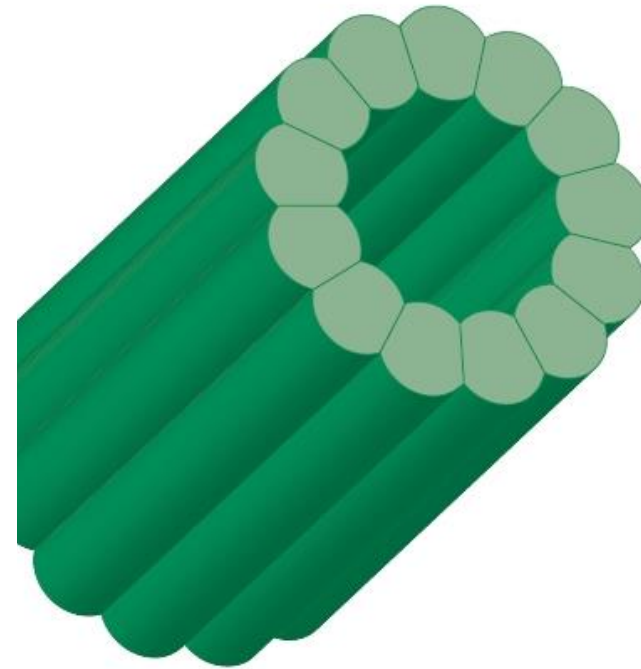
I microtubuli hanno una **polarità** con l' $\alpha$ -tubulina all'estremità meno e la  $\beta$ -tubulina all'estremità più.

Esiste poi una  $\gamma$ -tubulina coinvolta nell'assemblaggio dei microtubuli.





10 nm



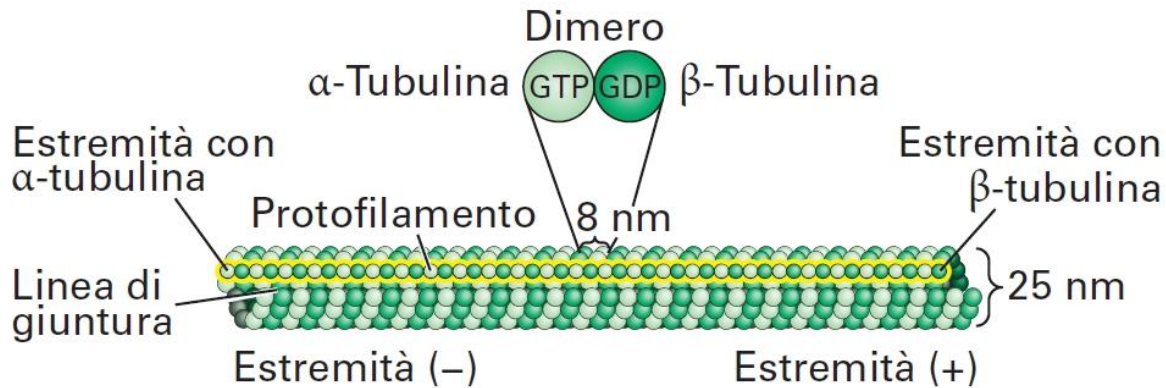
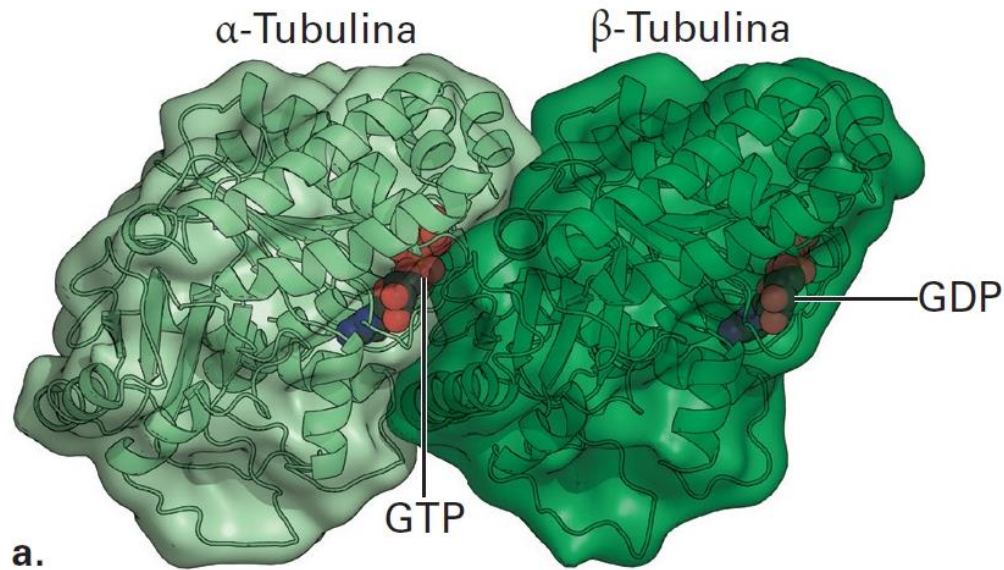
### **Sezione di microtubulo con i 13 protofilamenti.**

Esistono diverse isoforme di  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina con funzioni leggermente diverse nei diversi tessuti.

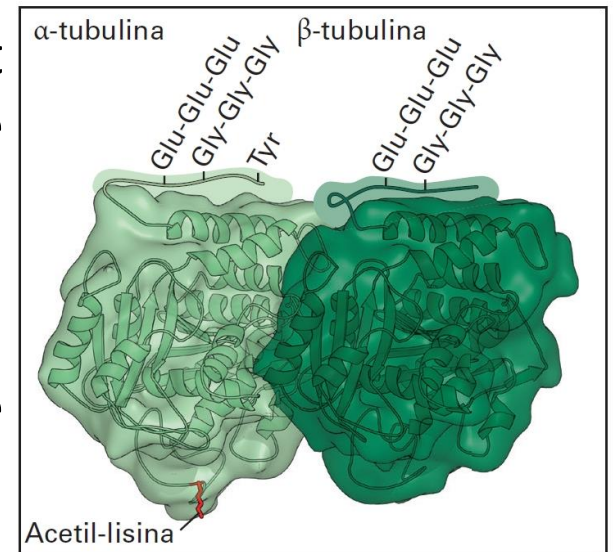
Molte malattie neurologiche correlate a demenza sono correlate a mutazioni della tubulina.

# Dimero di tubulina

Il dimero  $\alpha\beta$  rappresenta l'unità base.  
L'estremità  $-$  presenta  $\alpha$ -tubulina, l'estremità  $+$  presenta  $\beta$ -tubulina.  
Entrambi i monomeri possono legare il nucleotide GTP, ma solo uno ( $\beta$ ) può idrolizzarlo.



Modifiche post traduzionali delle tubuline (acetilazione, detirosilazione, poliglutammazione, poliglicilazione) ne regolano le dinamiche.



- I microtubuli sono filamenti dinamici
- Ciascuna subunità lega 1 molecola di GTP: quello della  $\alpha$  tubulina è all'interfaccia e non viene mai idrolizzato (perché la subunità  $\beta$  non fornisce i residui che completano il ciclo catalitico).
- Quello della  $\beta$  tubulina può essere GTP o GDP.

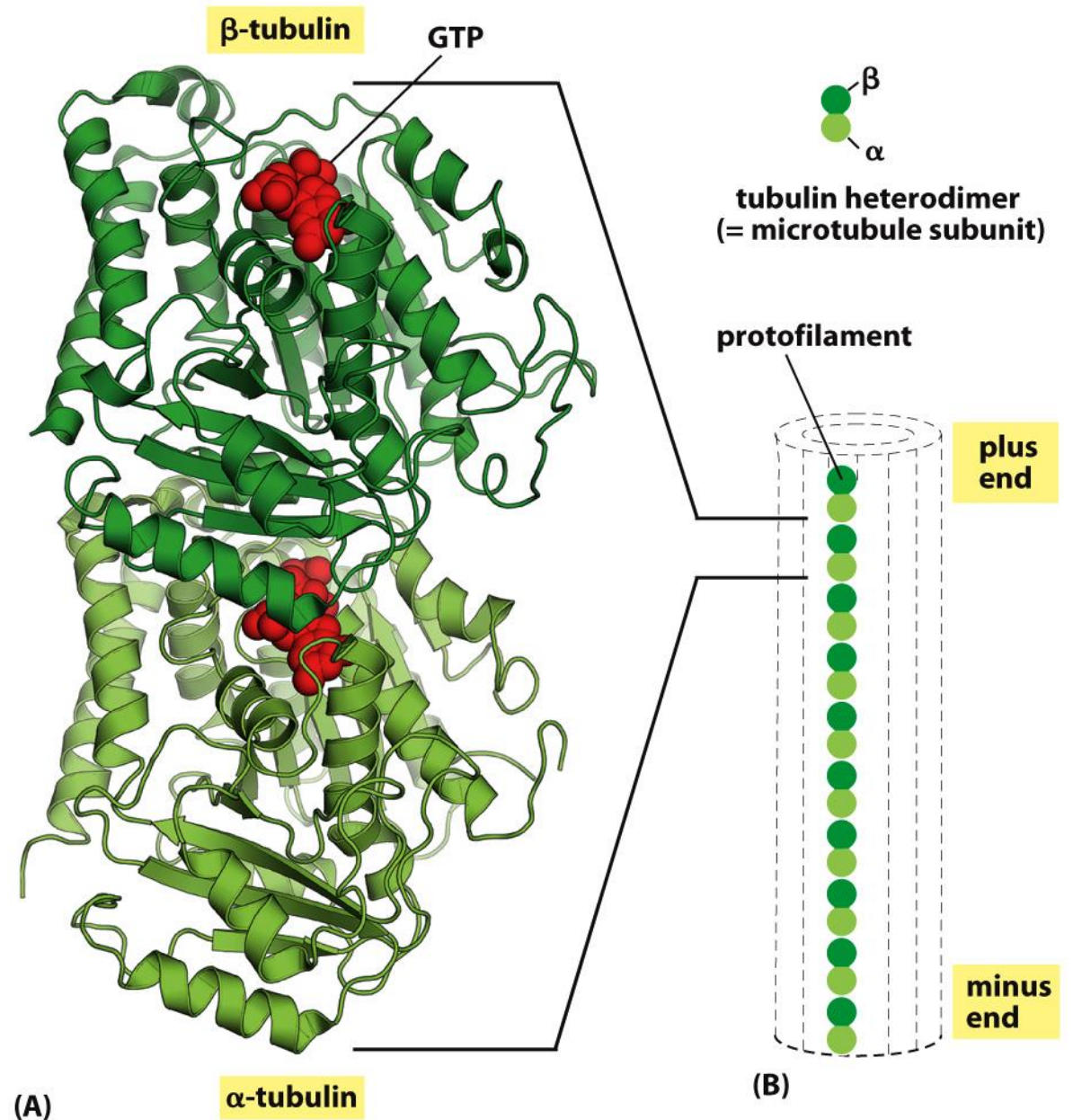


Figure 16-42ab Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



# Instabilità dinamica

L'idrolisi di GTP è accelerata nei microtubuli, rispetto ai dimeri.

Si ha:

**Forma T – legata al GTP**

**Forma D – legata al GDP**

**La GTP-tubulina polimerizza**

**La GDP-tubulina depolimerizza**

Il fatto che l'estremità di un filamento si trovi in forma T o D dipende dalle velocità relative di idrolisi di GTP e aggiunta di tubulina.

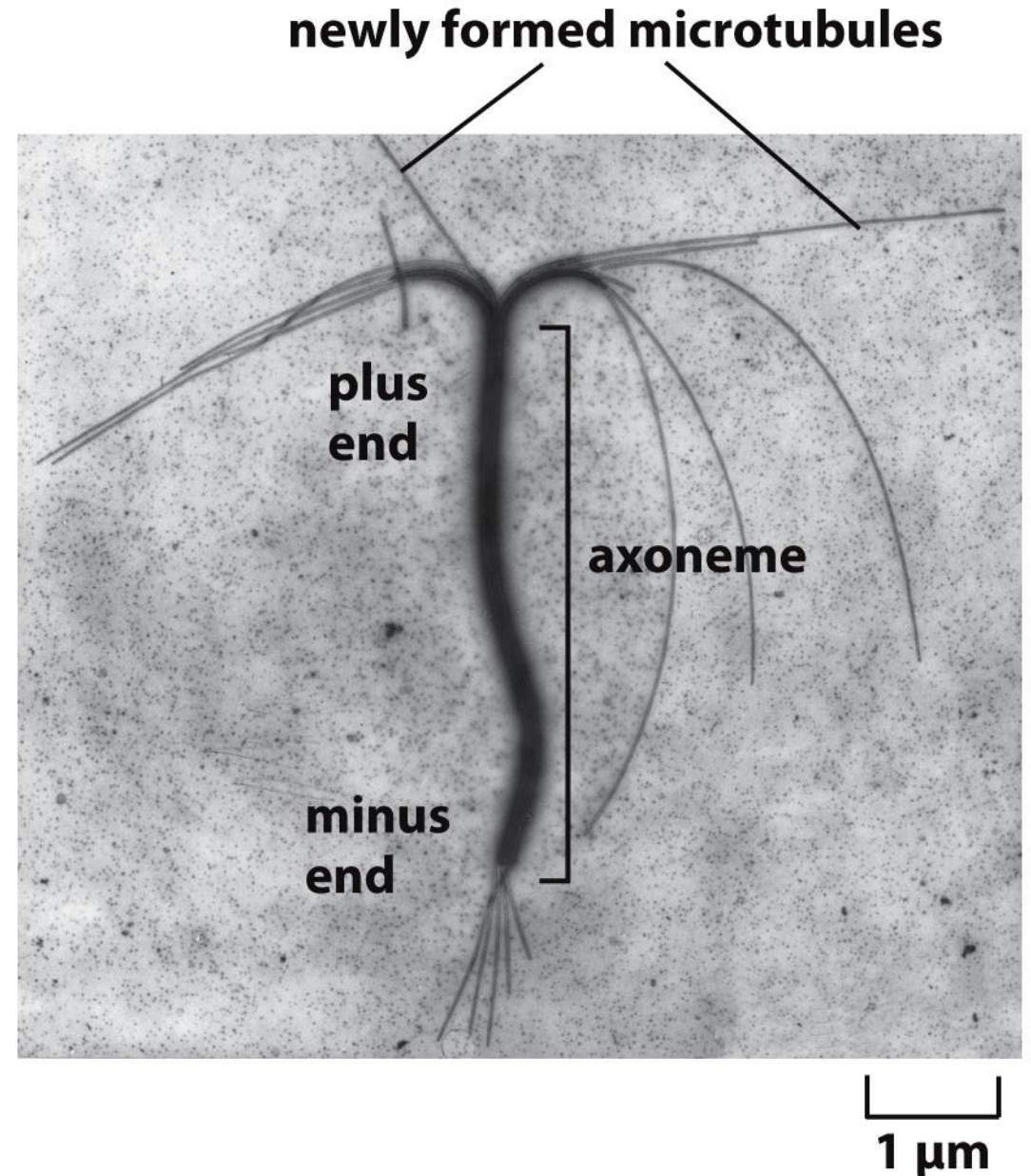
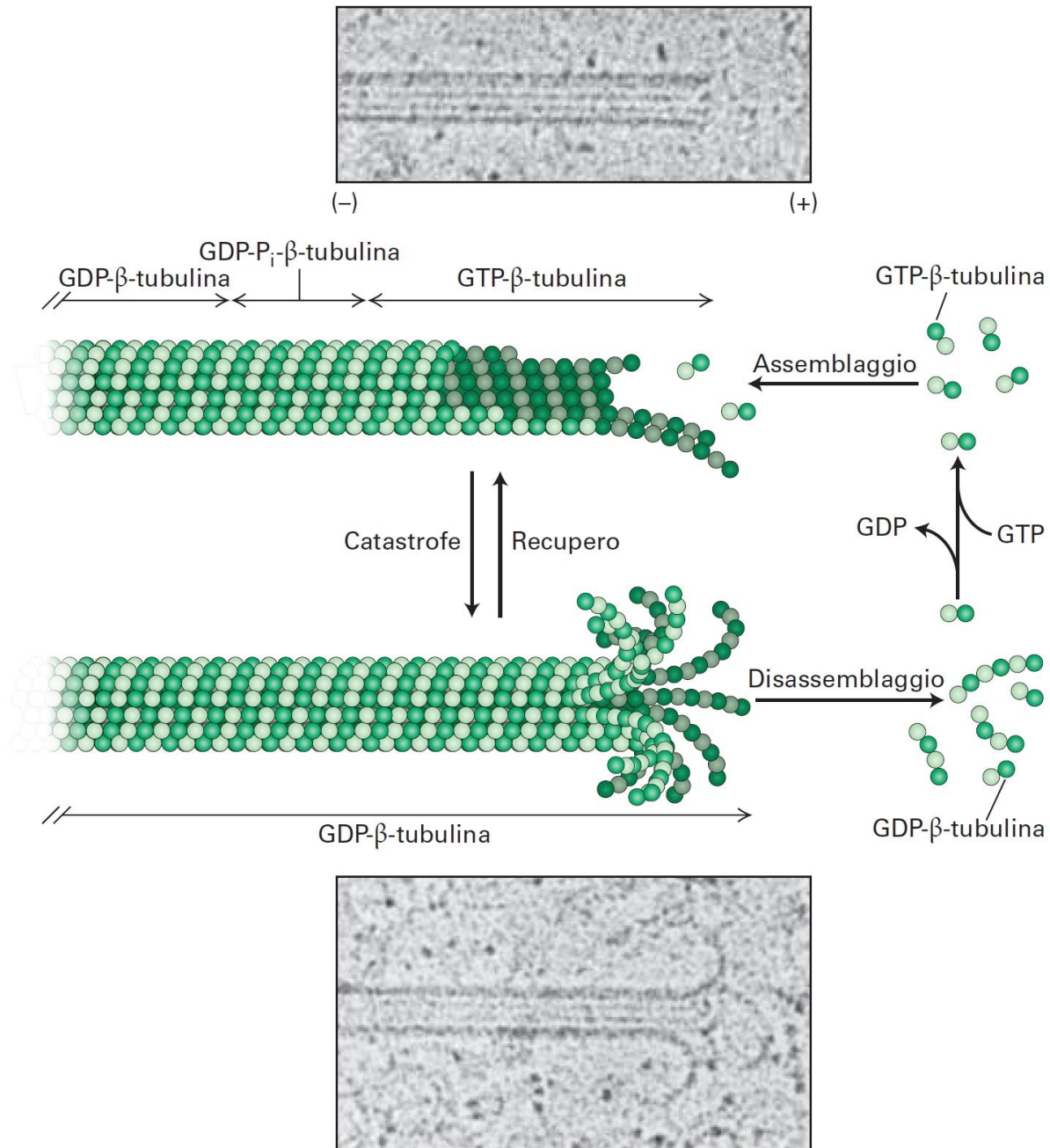


Figure 16-43 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)





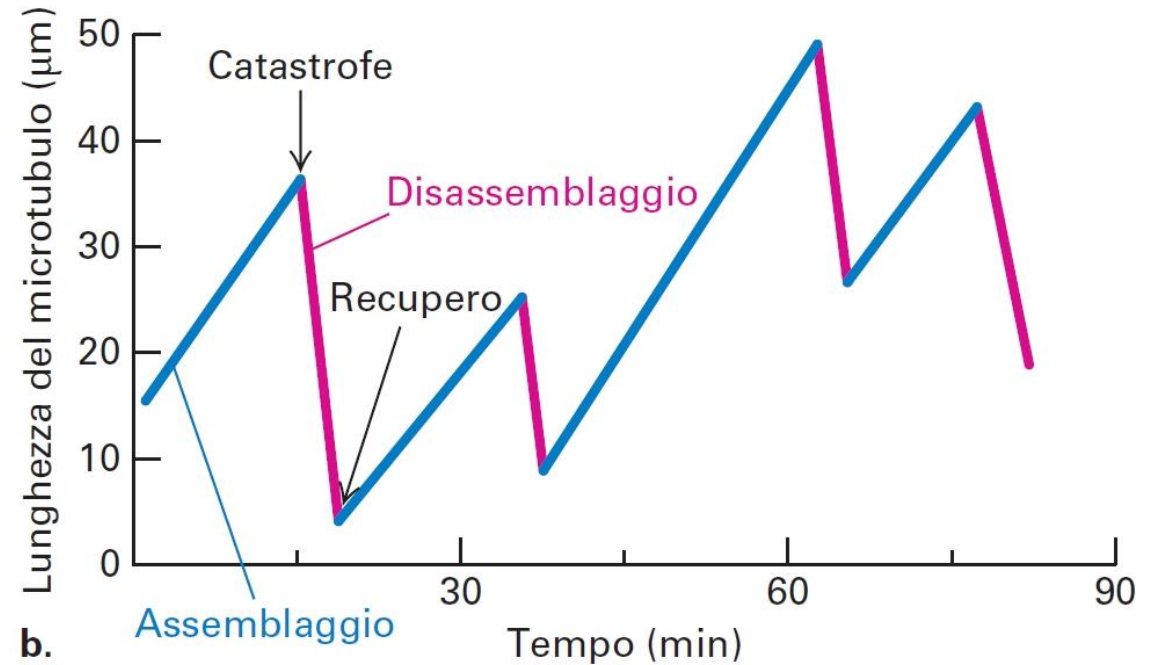
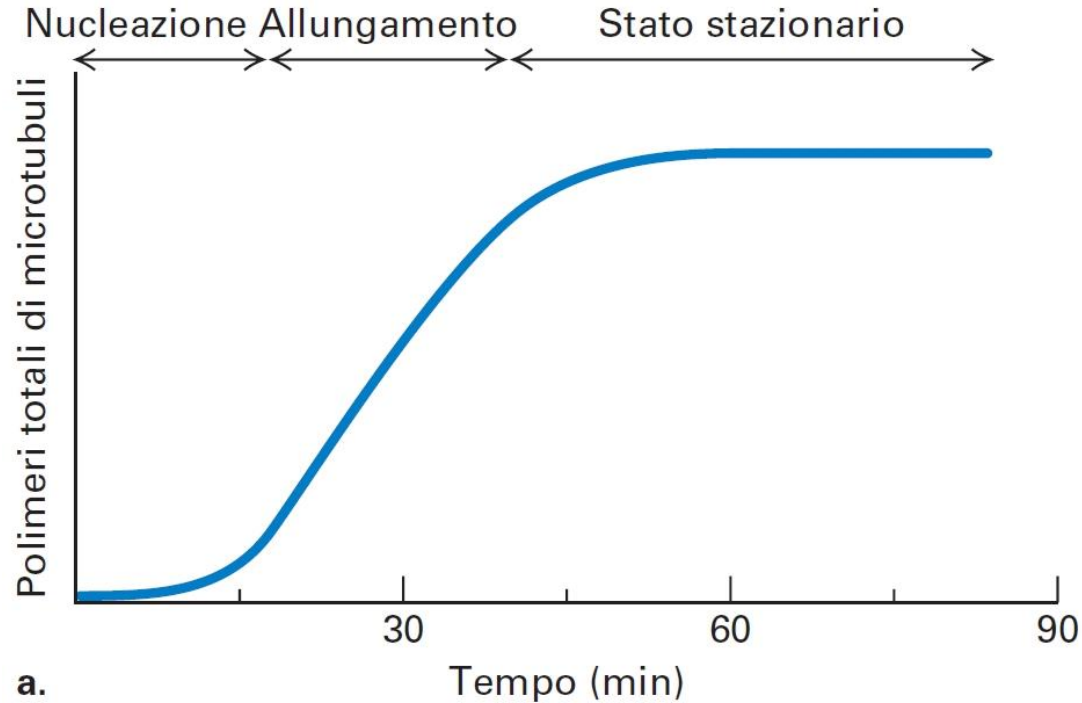
La rapida interconversione tra lo stato di crescita e quello di accorciamento è definita **instabilità dinamica**.

Il passaggio dalla crescita all'accorciamento è definito **catastrofe**.

Il passaggio dall'accorciamento alla crescita **salvataggio o recupero**.

Il cappuccio di GTP limita la curvatura dei protofilamenti, quando manca i filamenti si curvano e si dissociano.

# Velocità di polimerizzazione della tubulina in vitro



Crescita e accorciamento avvengono in un processo dinamico. Però hanno velocità diversa: l'accorciamento di un microtubulo è molto più rapido dell'allungamento ( $7 \mu\text{m}/\text{min}$  vs  $1 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

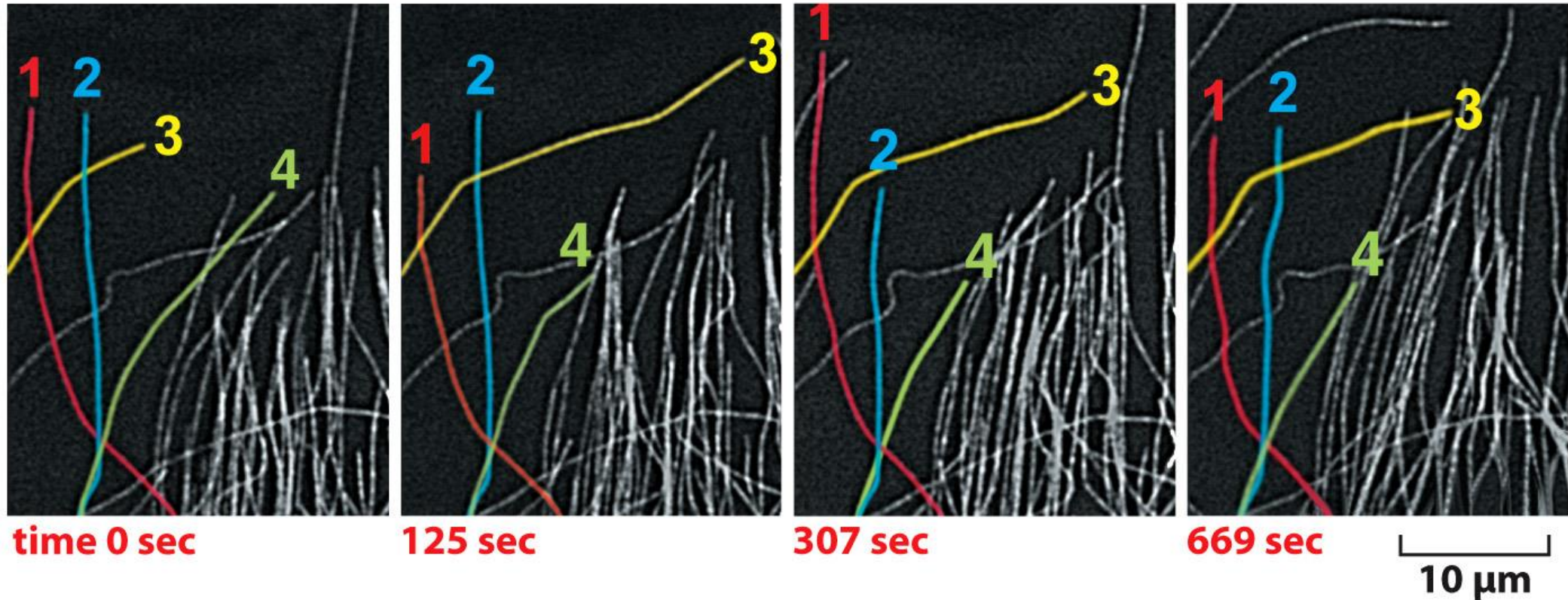


Figure 16-45 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

L'instabilità dinamica permette all'estremità + dei microtubuli di esplorare il citoplasma alla ricerca di possibili bersagli (cromosomi, vescicole, GTPasi Rho, chinasi ecc.).

In questo processo di «ricerca e cattura», i microtubuli che incontrano un organello o una vescicola verranno stabilizzati e protetti dalle catastrofi.

# Composti che alterano le dinamiche dei microtubuli

Sono noti molti composti che inibiscono la polimerizzazione dei microtubuli, come la colchicina, il nocodazolo, le combretastatine.

La **colchicina** è stata a lungo usata per il trattamento della gotta, perché alleviava l'infiammazione acuta alle articolazioni agendo sui microtubuli dei globuli bianchi del sangue, rendendoli incapaci di migrare al sito di infiammazione.

Altri composti, come il taxolo, al contrario stabilizzano i microtubuli inibendone la depolimerizzazione.

Il **taxolo** è stato usato come farmaco antitumorale per il suo effetto sui microtubuli del fuso mitotico, che porta di fatto al blocco della mitosi nelle cellule tumorali.



# $\gamma$ -tubulina

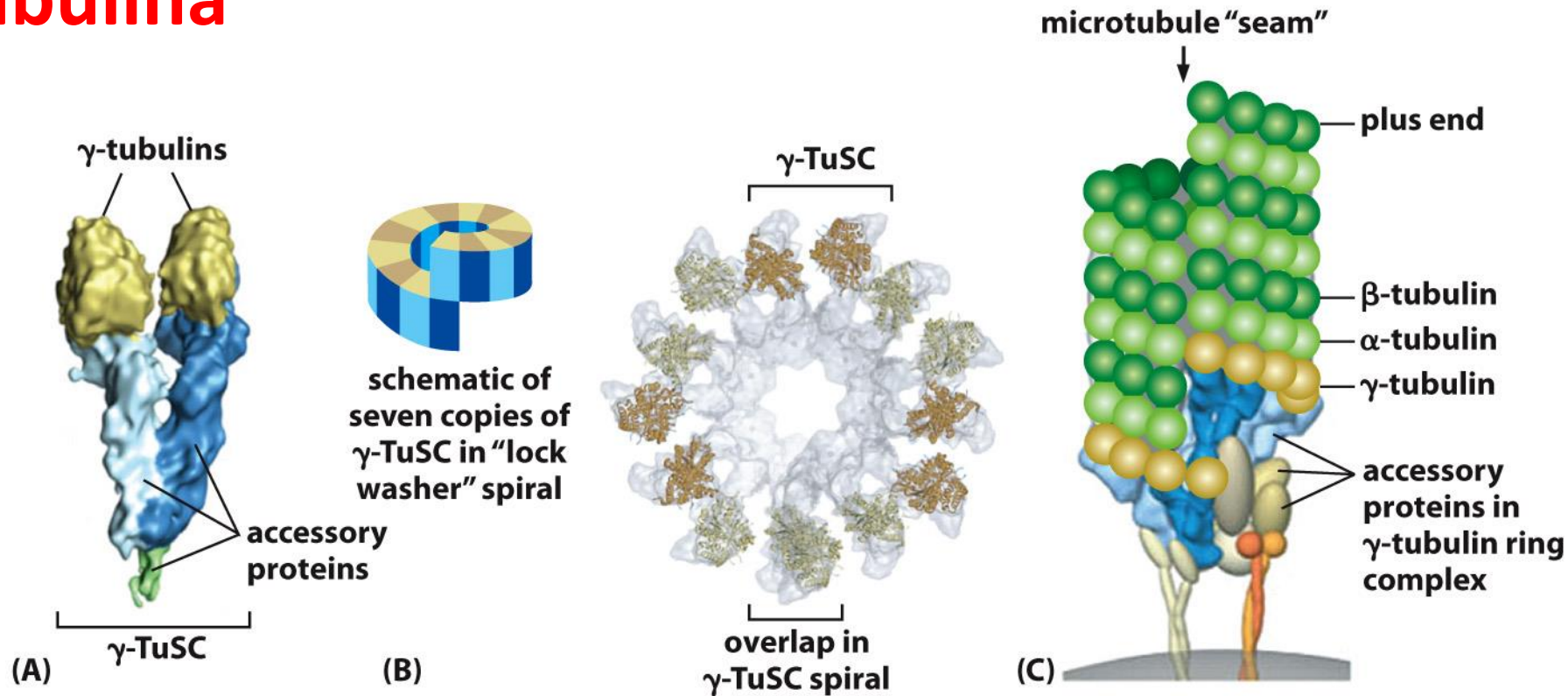


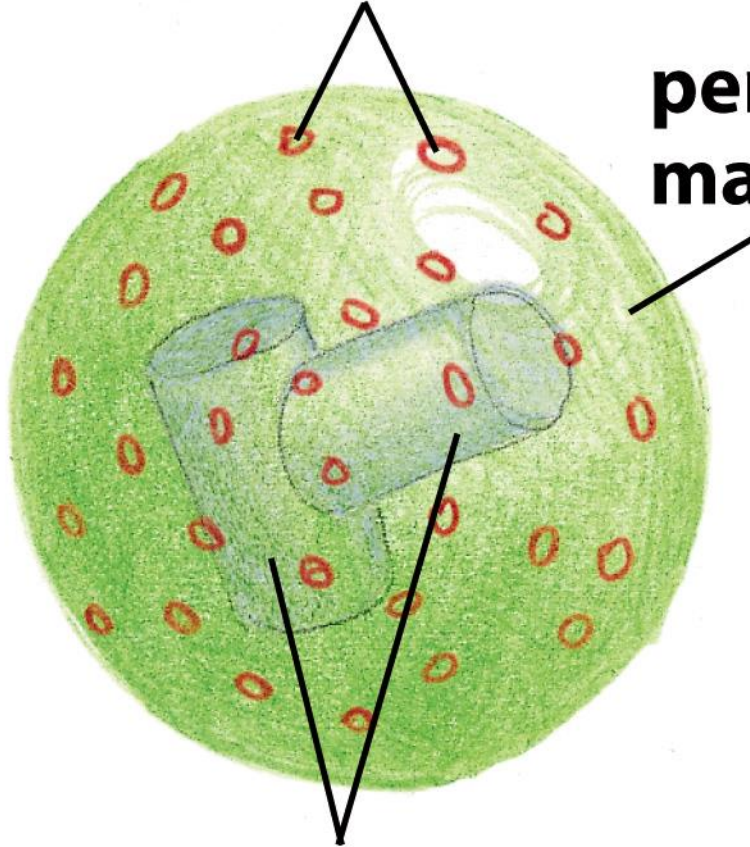
Figure 16-46 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Per la **nucleazione dei microtubuli** sono richieste alte concentrazioni di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina e anche la  $\gamma$  tubulina.

La nucleazione avviene sul centro organizzatore dei microtubuli (MTOC) e dipende dal complesso ad anello della  $\gamma$ -tubulina ( $\gamma$ -TURC,  $\gamma$ -tubulin ring complex).

**nucleating sites  
( $\gamma$ -tubulin ring complexes)**

**pericentriolar  
material**



**pair of  
centrioles**

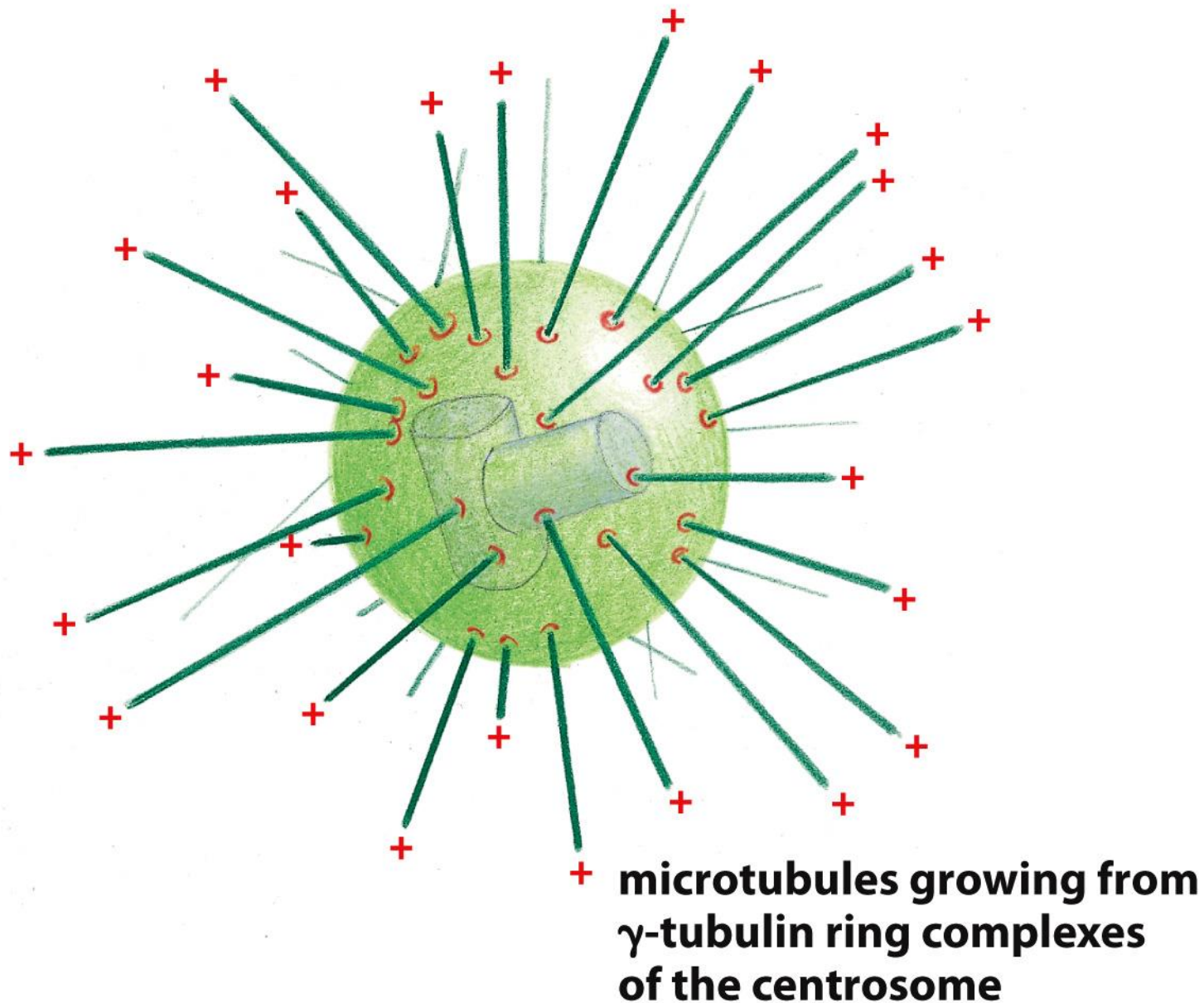
**MTOC (microtubule organizing  
center)**

E' chiamato **centrosoma** nelle cellule animali.

Molte cellule animali hanno un singolo MTOC vicino al nucleo.

Recluta l' anello della  $\gamma$ -tubulina e i microtubuli sono nucleati alle estremità meno.

Immersi nel centrosoma ci sono i centrioli, che insieme a proteine accessorie, organizzano il materiale pericentriolare.



I microtubuli che si irradiano dal centrosoma puntano alla periferia cellulare.

Questo costituisce un dispositivo per trovare il centro della cellula.

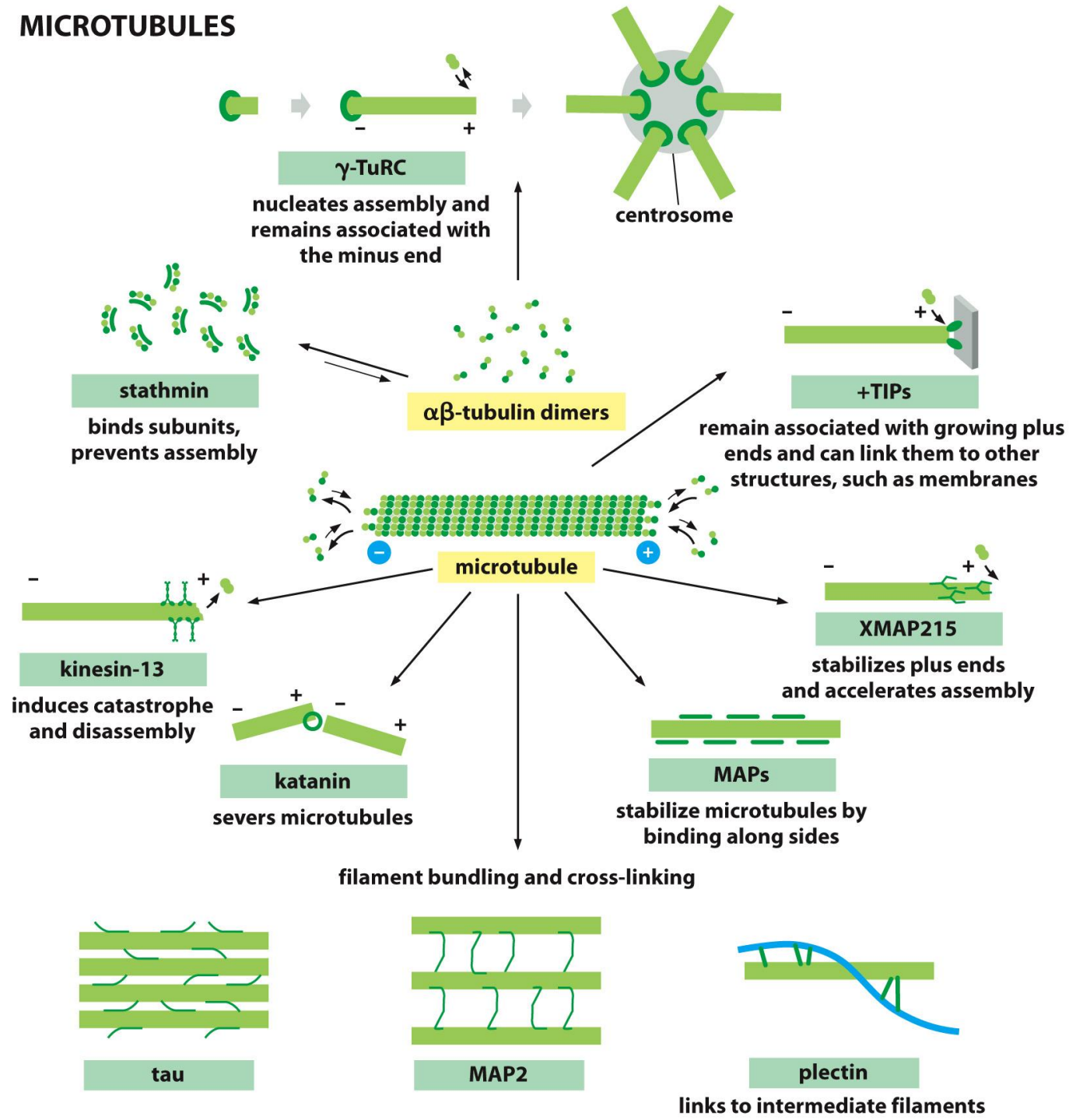
Questo stabilisce le coordinate per il posizionamento degli organelli.



# Proteine associate ai microtubuli (MAP)

La dinamica dei microtubuli nelle cellule è regolata da diverse proteine, dette **MAP (microtubule associated proteins)**. Alcune stabilizzano i microtubuli, altre ne regolano la polimerizzazione o le interazioni con altre componenti cellulari..

Le MAP hanno un dominio che si lega ai microtubuli e un dominio che sporge all'esterno. Sono bersaglio delle MAP chinasi.



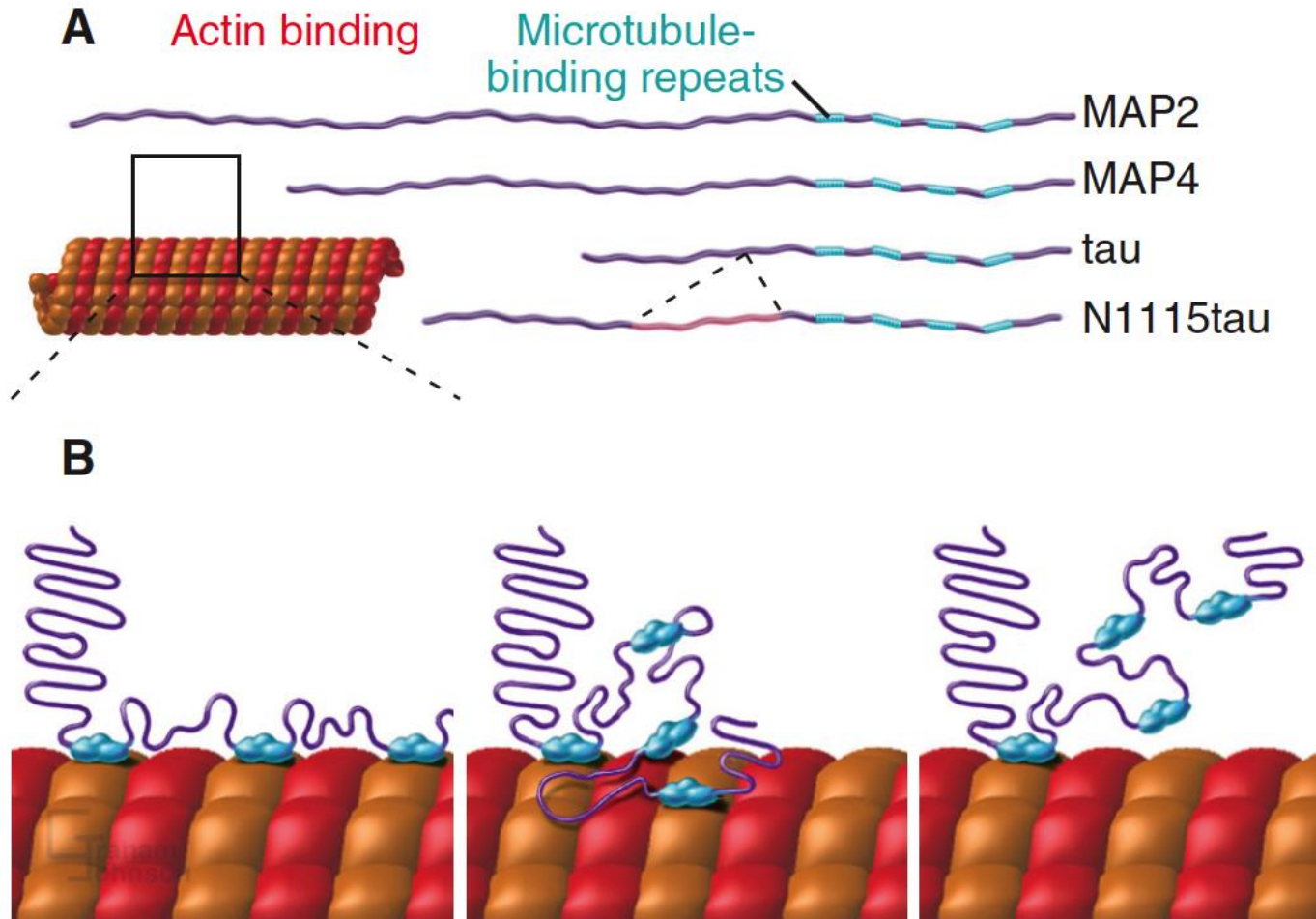


**Tabella 18.1** Proteine associate ai microtubuli (MAP) descritte in questo paragrafo.

| Nome            | Funzione                                       |
|-----------------|--|
| Map2, Map4, tau | Stabilizzano i microtubuli                     |
| EB1             | +TIP, aumenta le catastrofi                    |
| XMAP215         | +TIP, promuove la crescita all'estremità (+)   |
| CLASP           | +TIP, sopprime le catastrofi all'estremità (+) |
| Chinesina 13    | Promuove il disassemblaggio alle estremità     |
| Op18/statmina   | Promuove il disassemblaggio all'estremità (+)  |
| Catanina        | ATPasi AAA, taglia i microtubuli               |

Esistono molte MAP con funzioni diverse. Alcune stabilizzano i microtubuli (come Map2,4 e tau), altre ne regolano la polimerizzazione promuovendo/inibendo la crescita o le catastrofi. Molte di queste proteine MAP si legano all'estremità +.

# Proteine MAP della famiglia tau



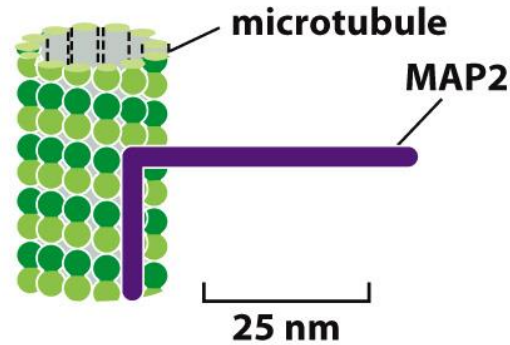
L'estremità N-terminale delle proteine che legano i microtubuli è proiettata all'esterno della superficie dei microtubuli.

La **proteina tau** iperfosforilata nella malattia di Alzheimer, forma aggregati amiloidi tossici.

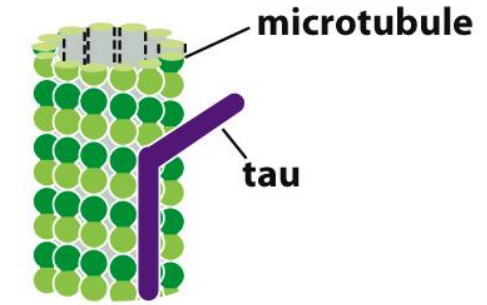
Il dominio N-terminale regola la distanza tra i microtubuli.

MAP2 che possiede un dominio lungo forma fasci stabili lontani tra di loro.

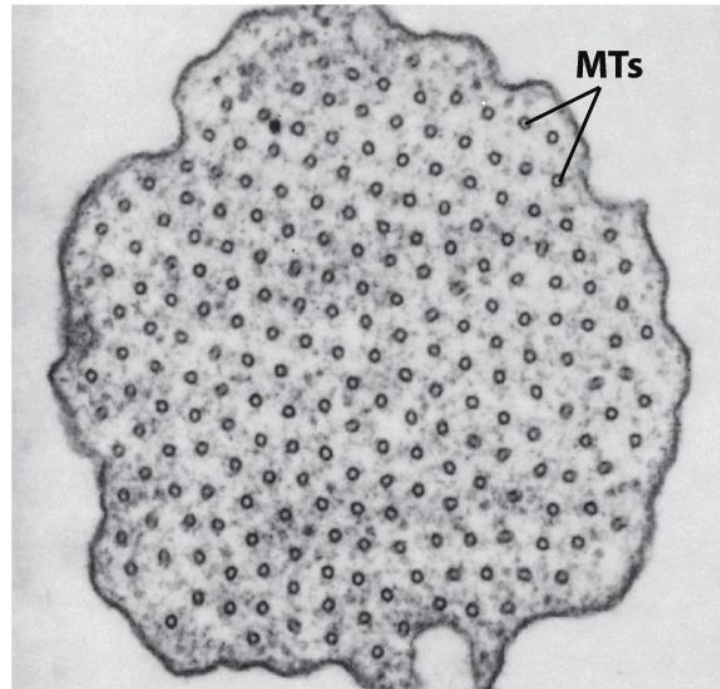
Tau, che ha un dominio più corto, forma fasci molto compatti.



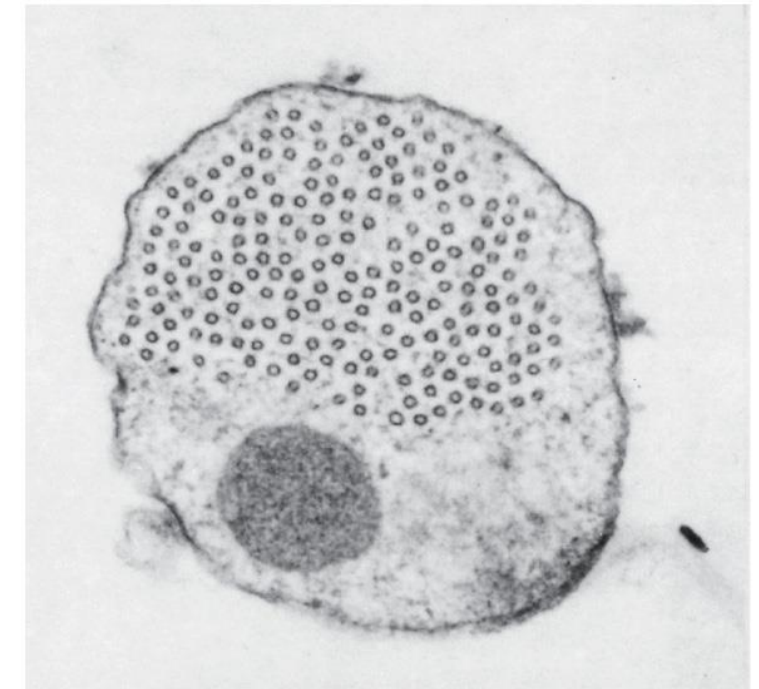
(A)



(B)



(C)



(D)

300 nm



Le proteine che legano le estremità dei microtubuli ne influenzano la dinamica. Sono spesso regolate tramite fosforilazione.

I **fattori di catastrofe** (chinesina-13) si legano alle estremità dei microtubuli e separano i protofilamenti.

La proteina Nezha o Patronina protegge le estremità meno dai fattori di catastrofe.

Molte proteine legano le estremità più. **XMAP125** lega la tubulina libera e la porta all'estremità più: è inibita mediante fosforilazione.

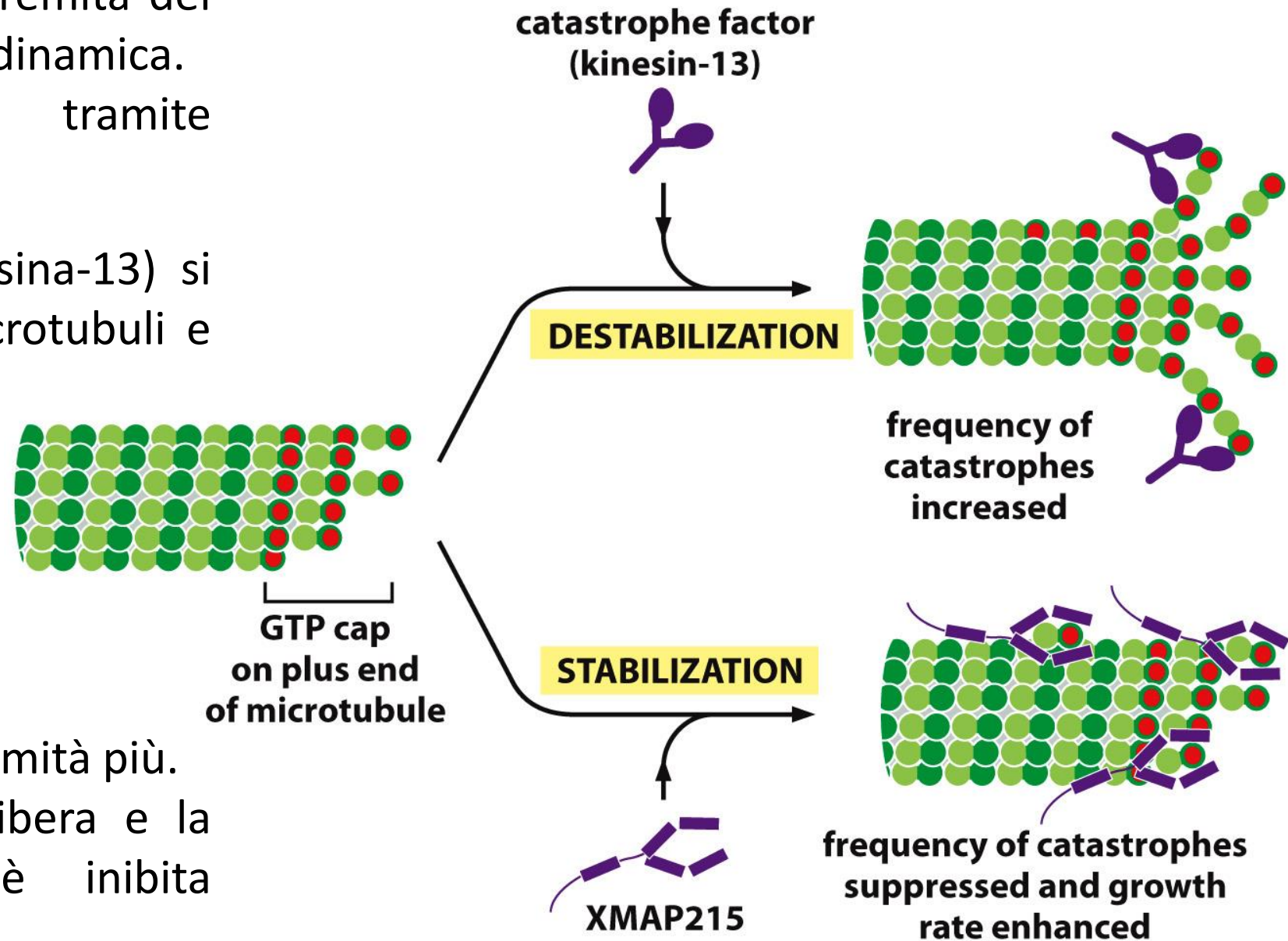


Figure 16-52 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



La **statmina** si lega a due dimeri di tubulina, diminuendo la concentrazione di tubulina libera per la polimerizzazione (così come il farmaco colchicina). La statmina è inibita mediante fosforilazione.

Il taglio dei microtubuli è un altro meccanismo che li destabilizza.

La **katanina** (dal nome della spada dei samurai) stacca i microtubuli da un MTOC utilizzando ATP.

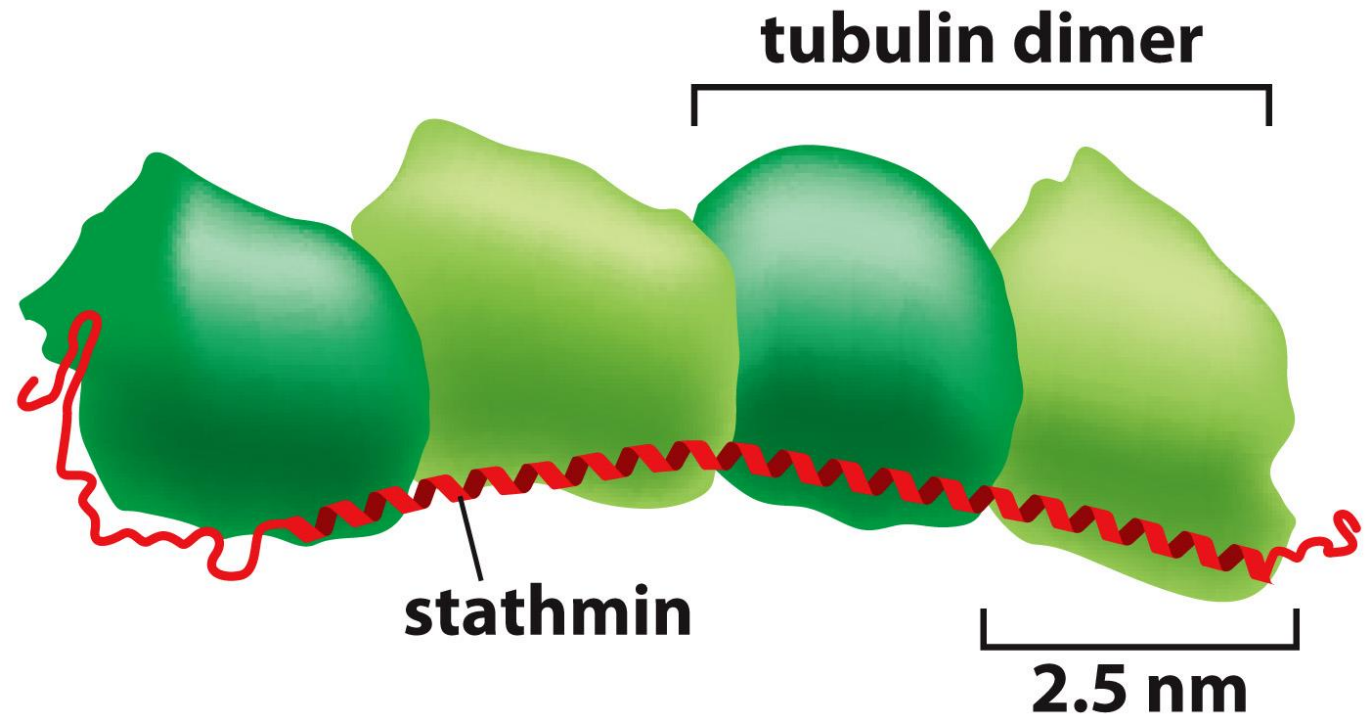


Figure 16-54 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

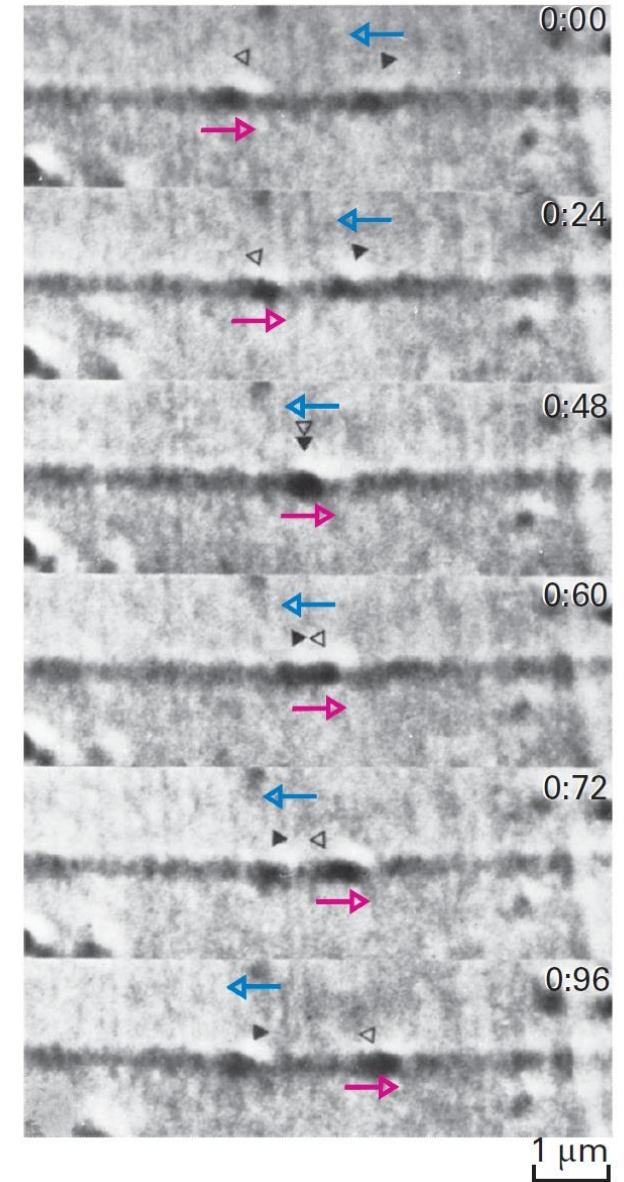
# Proteine motrici

I microtubuli agiscono come corsie per il trasporto di organelli e vescicole, grazie alla presenza delle proteine motrici, alimentate dall'idrolisi dell'ATP. Questo consente velocità, direzionalità e specificità dei trasporti.

Ci sono due tipi di proteine che si muovono lungo i microtubuli:

- **chinesine**
- **dineine**

Molti studi sui movimenti lungo i microtubuli sono stati condotti usando l'assone gigante di calamaro.



Organuli in movimento nelle due direzioni opposte in frazioni di secondo

# Proteine motrici: le chinesine

La chinesina 1 è la prima identificata nell'assone di calamaro, trasporta organelli lungo l'assone e si muove verso l'estremità più del microtubulo. Movimento anterogrado.

Quella delle chinesine è una superfamiglia che comprende molte famiglie.

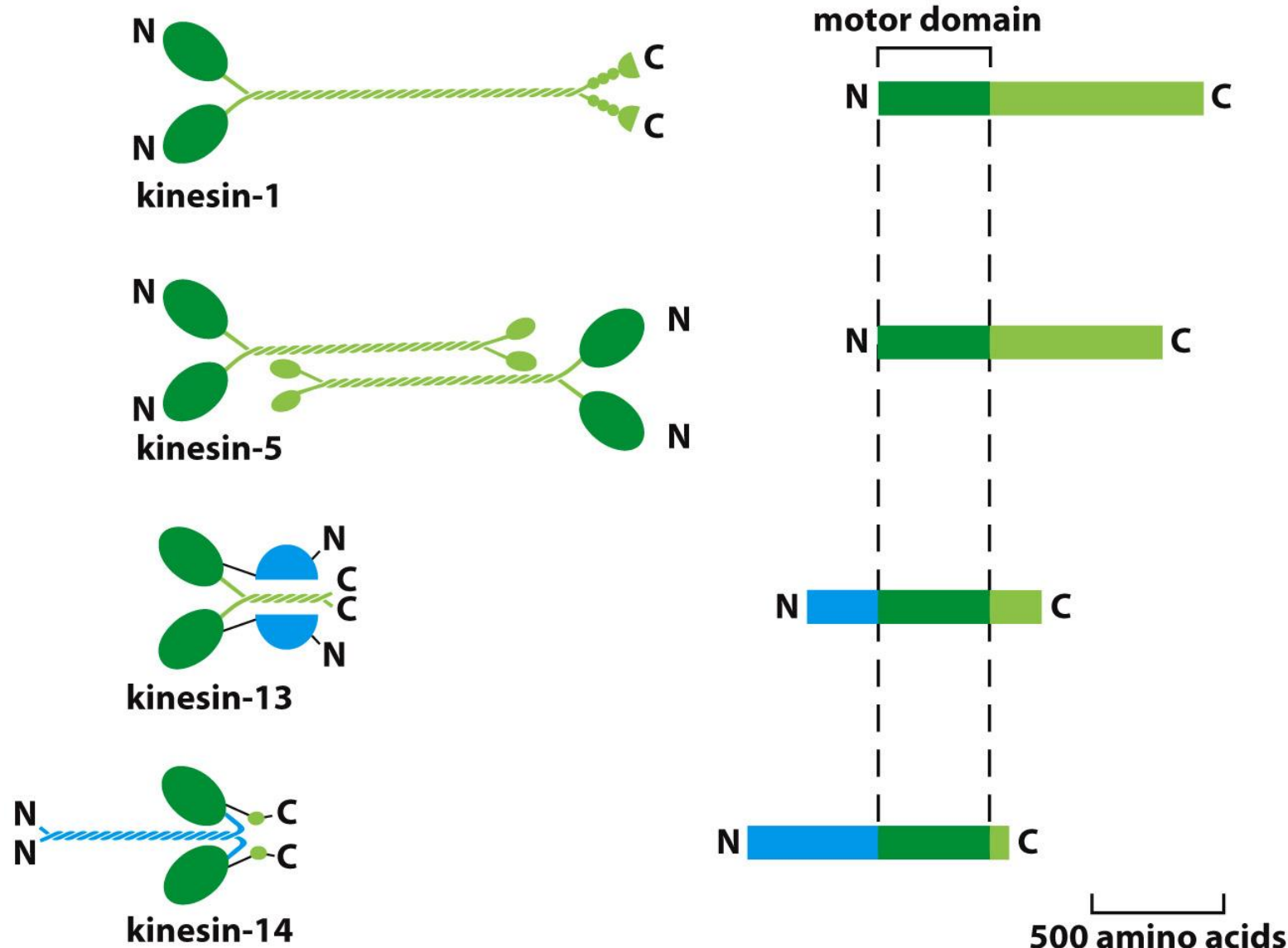
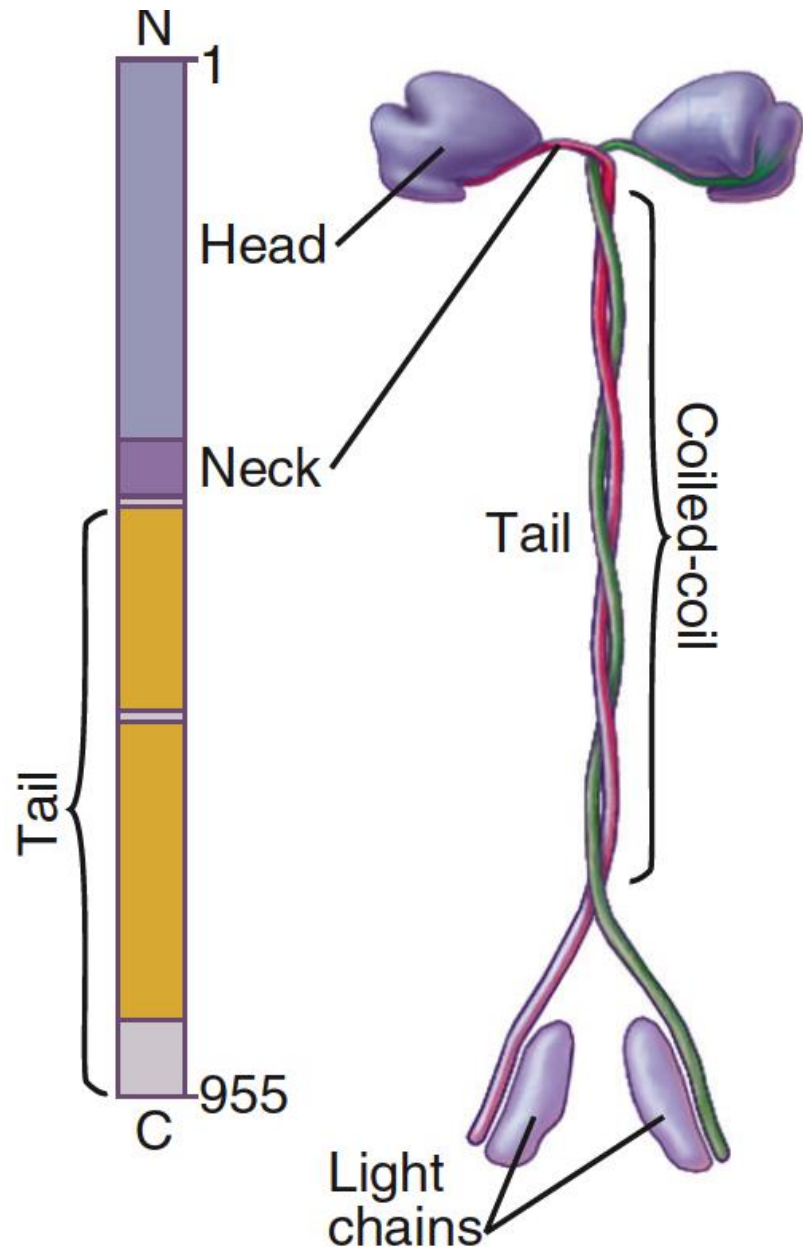


Figure 16-56 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



## Struttura della chinesina 1

E' formata da 2 catene pesanti globulari tenute assieme da una coda a spirale, e 2 code con legate due catene leggere che legano il carico.

La testa globulare ha **attività ATPasica**, lega i microtubuli ed ha un'origine evolutiva comune con la miosina e le Ras GTPasi.

La coda lega recettori presenti sulle vescicole o gli organelli da trasportare.



Le teste legano e idrolizzano l'ATP.

I cicli di idrolisi delle 2 teste sono coordinati e l'attacco e stacco delle teste permette al motore di muoversi un passo dopo l'altro lungo il microtubulo.

Ogni «passo» percorre uno spazio di 8 nm in 10 msec.

<https://www.youtube.com/watch?v=xIPDEpimzB8>

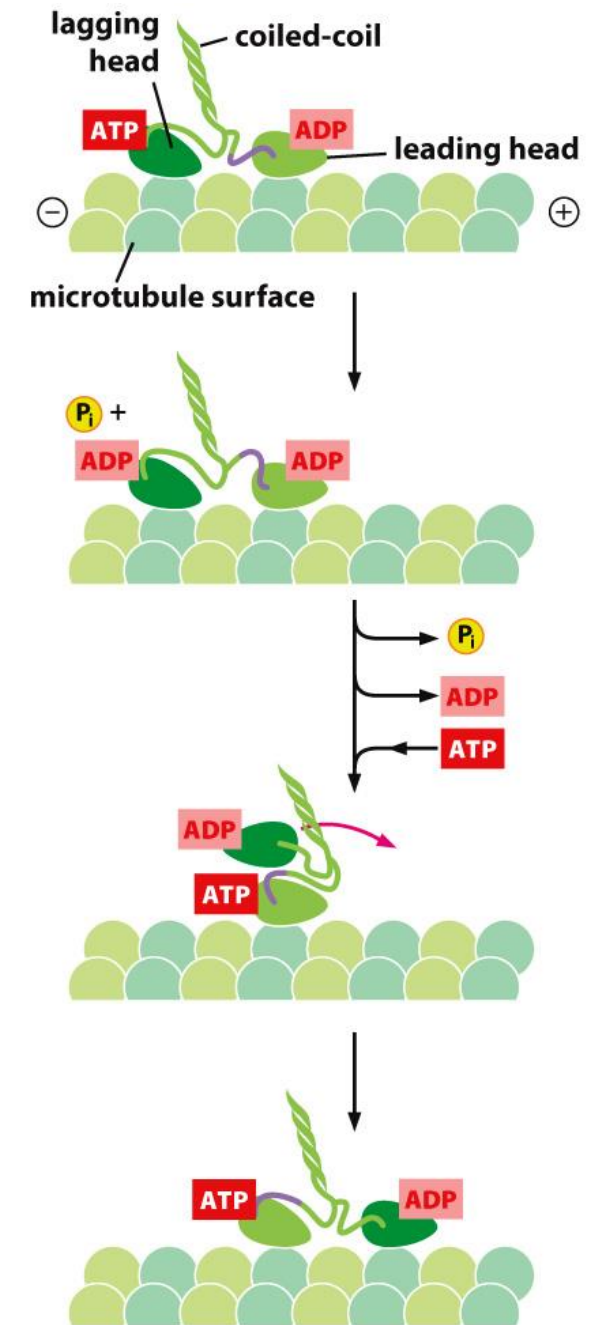
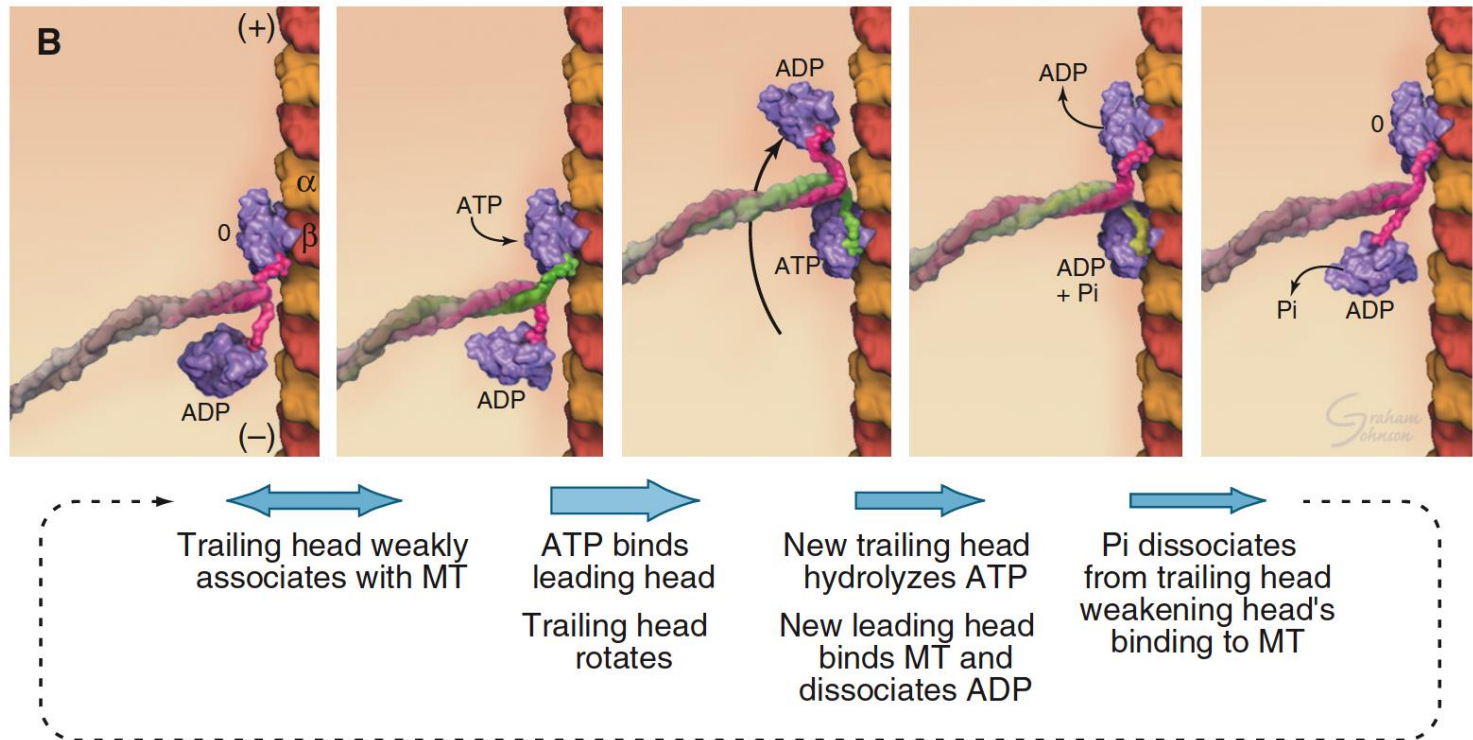
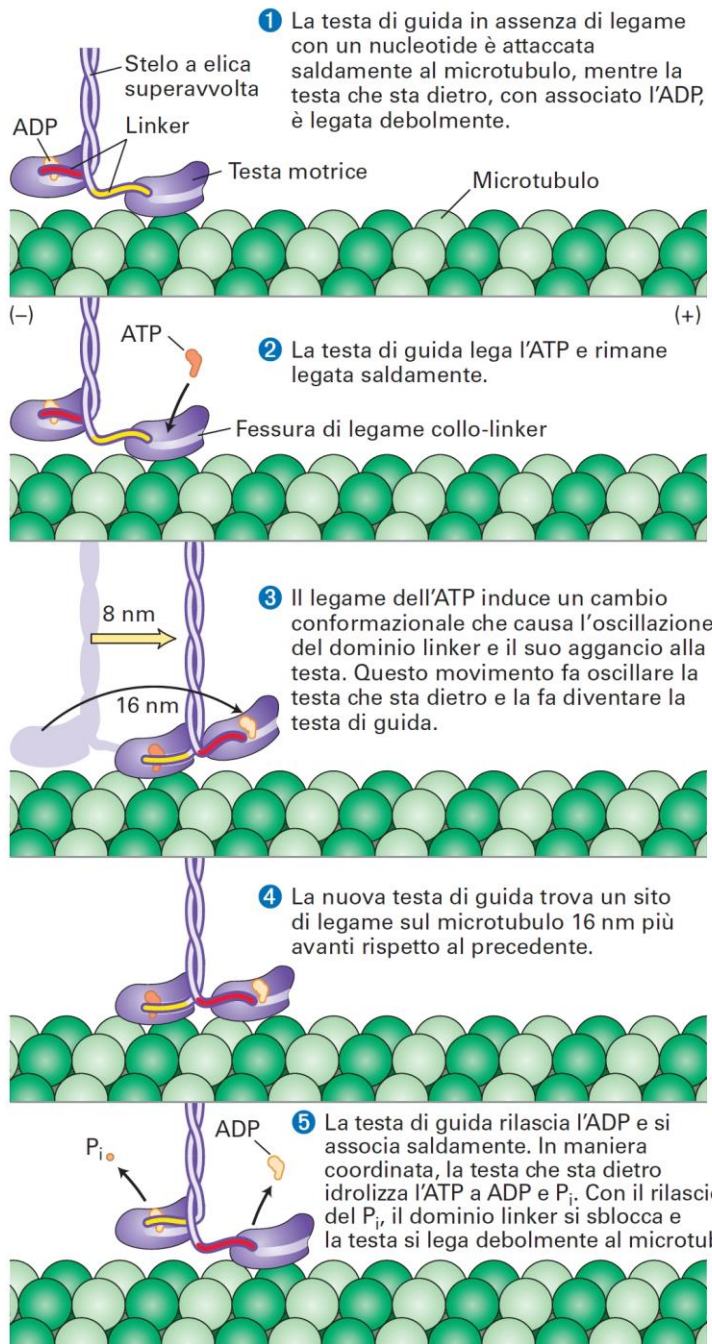
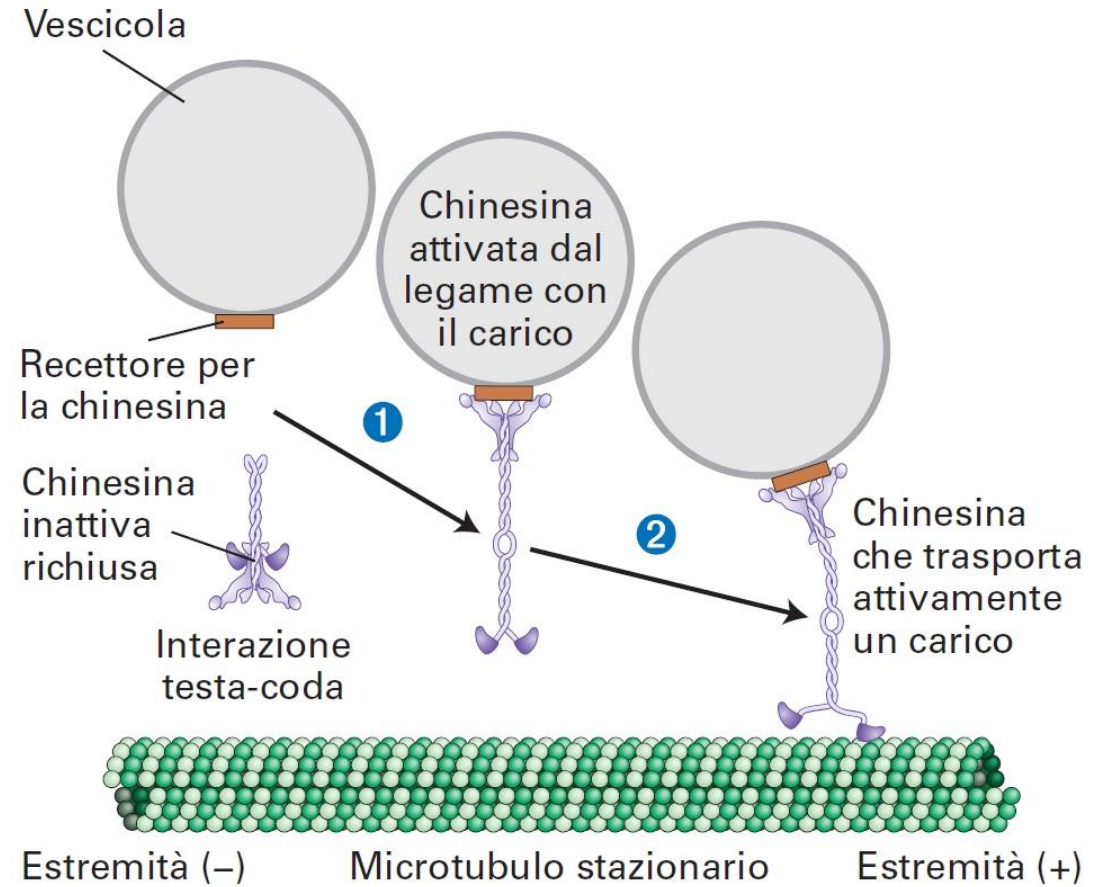


Figure 16-57 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Il legame della chinesina ai microtubuli è forte quando porta legato ATP oppure nulla, mentre è debole quando porta legato ADP



Il dominio della testa viene esposto quando la coda lega il carico.



# Proteine motrici: le dineine

Le **dineine** sono motori diretti verso l'estremità meno.

Sono grandi complessi costituiti da 1, 2 o 3 catene pesanti e un numero di catene intermedie, intermedie-leggere e leggere.

La famiglia comprende:  
-le dineine citoplasmatiche  
-le dineine ciliari

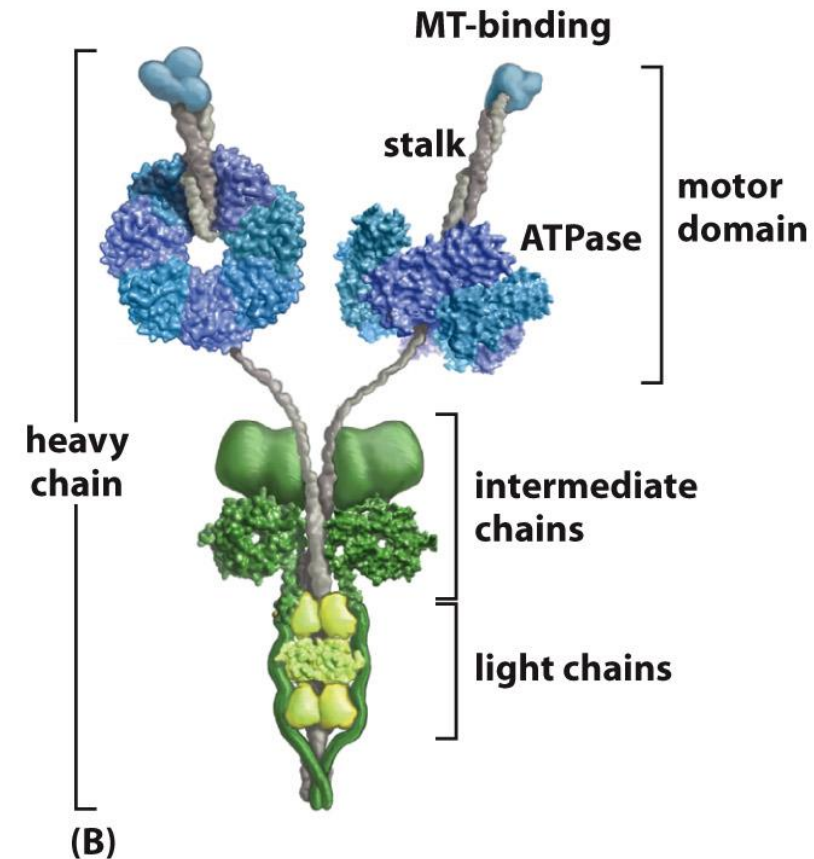
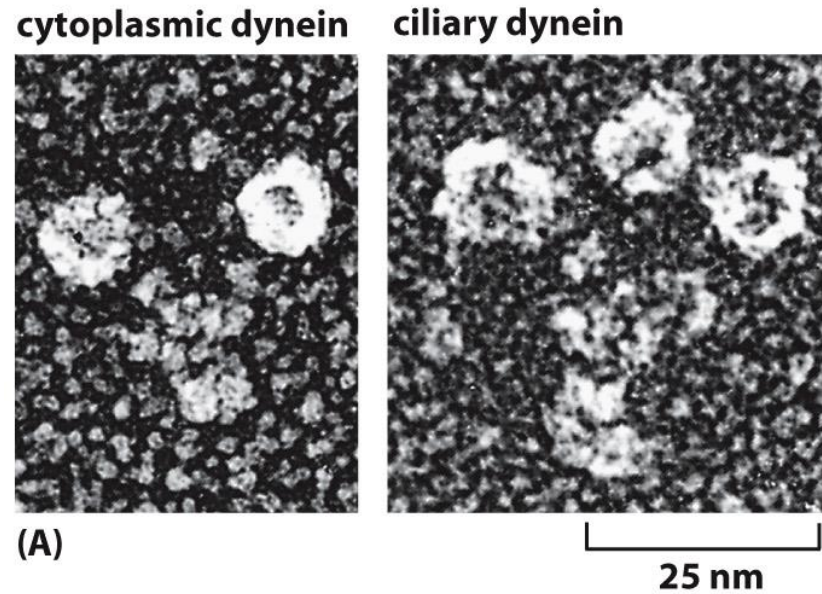
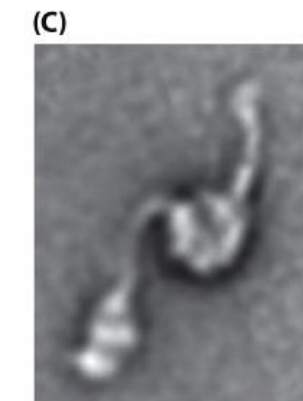
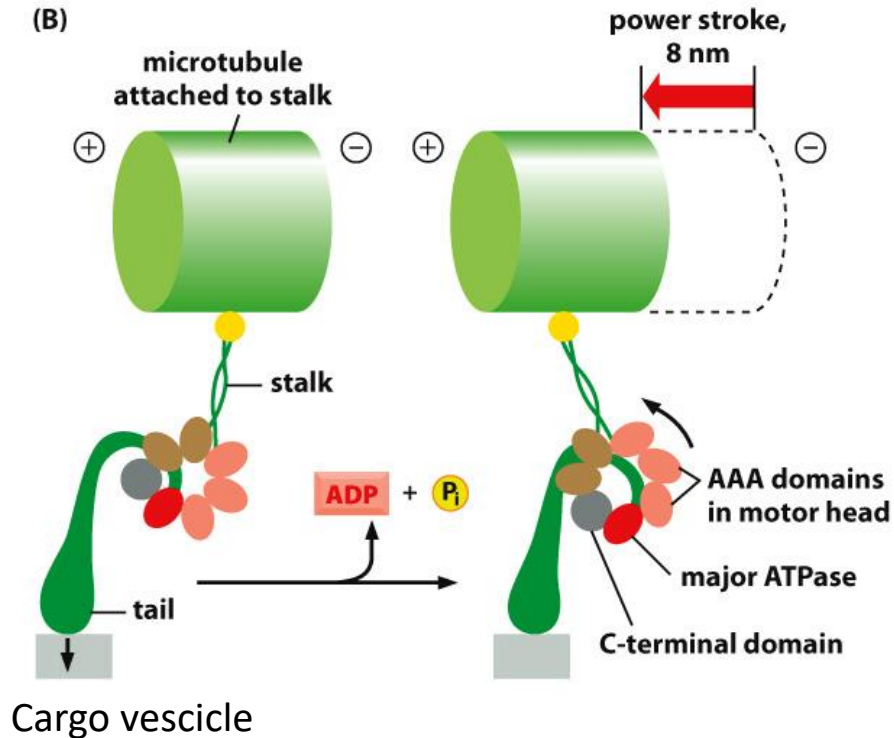
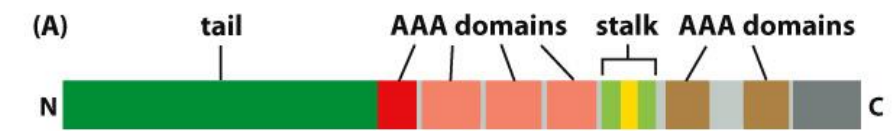


Figure 16-58 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Le dineine citoplasmatiche sono utilizzate per il traffico di organelli e RNA e durante la mitosi e la meiosi. La **dinactina** prende contatto con i carichi.



15 nm

La dineina è un polipeptide di quasi 4000 aa, il numero delle teste motrici coincide con il numero delle catene pesanti.

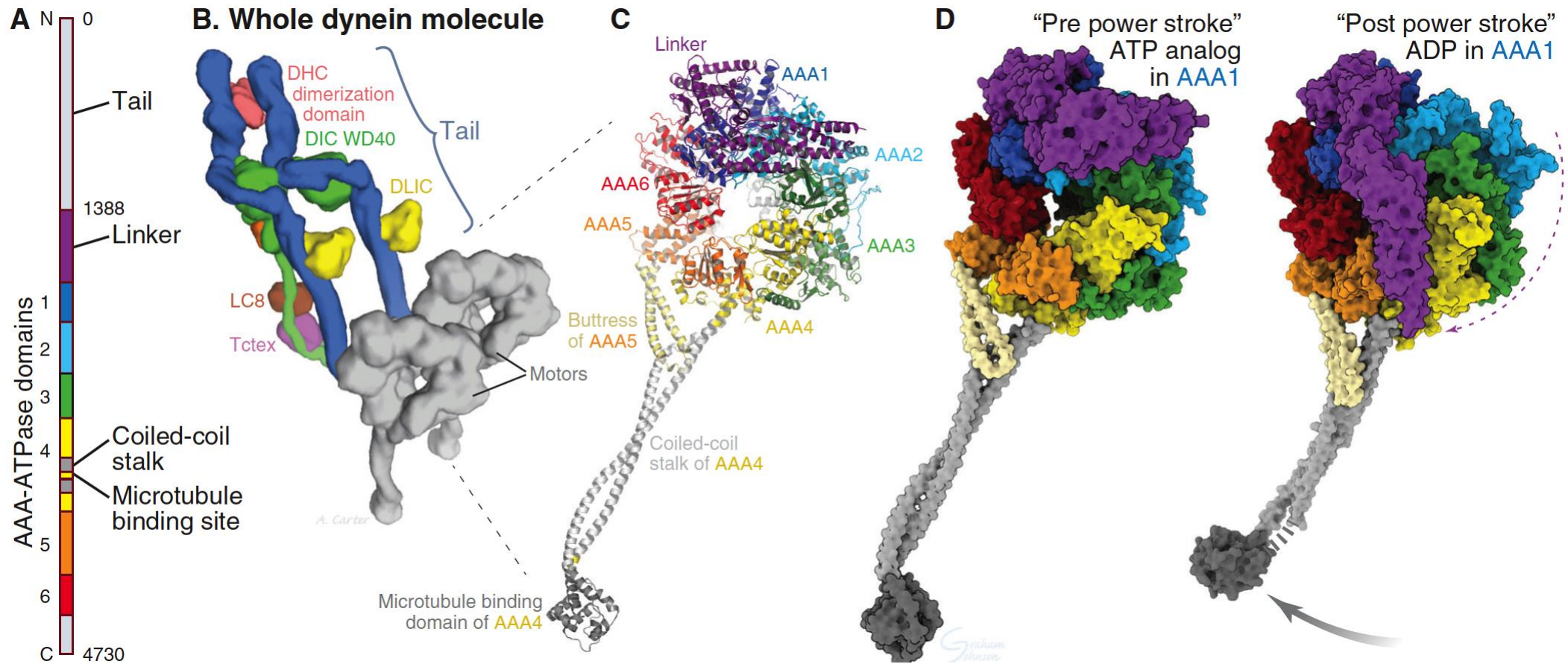
Dalla testa con dominio ATPasico si estende uno stelo a spirale che ha sulla punta un sito che lega il microtubulo e una coda che lega il carico.

- Quando lega ATP non è legata al microtubulo.
- L'idrolisi dell'ATP causa l'attacco al microtubulo.
- Il rilascio dell'ADP dà il «colpo di potenza» che causa la rotazione della testa e dello stelo rispetto alla coda.

Un colpo di potenza sposta il carico di 8 nm.



# Struttura delle dineine



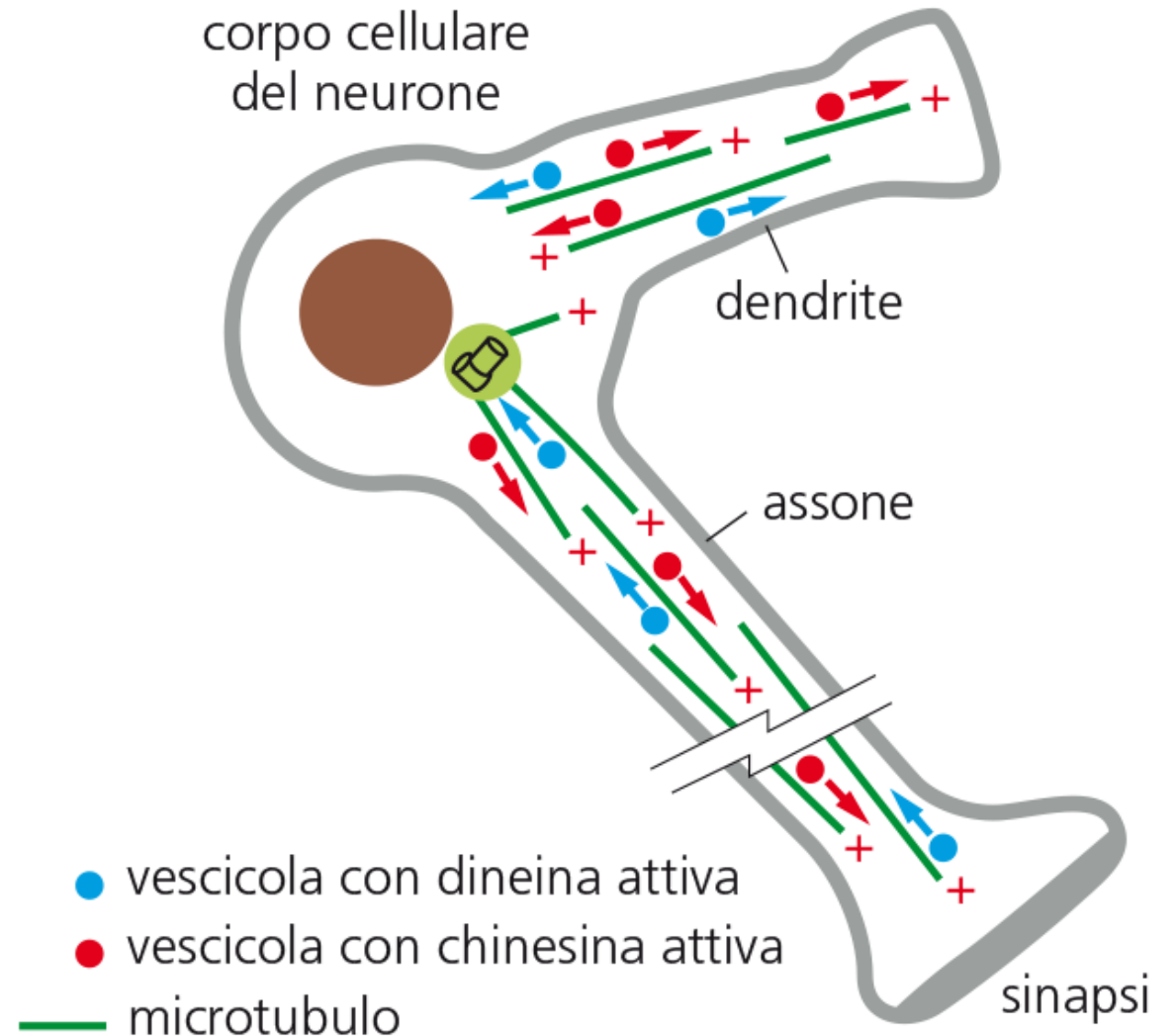
Come per le chinesine, il movimento è guidato da cicli di idrolisi dell'ATP. I domini motori di chinesine e dineine non sono strutturalmente correlati.

<https://www.youtube.com/watch?v=-7AQVbrmzFw>

## Le proteine motorie trasportano organelli

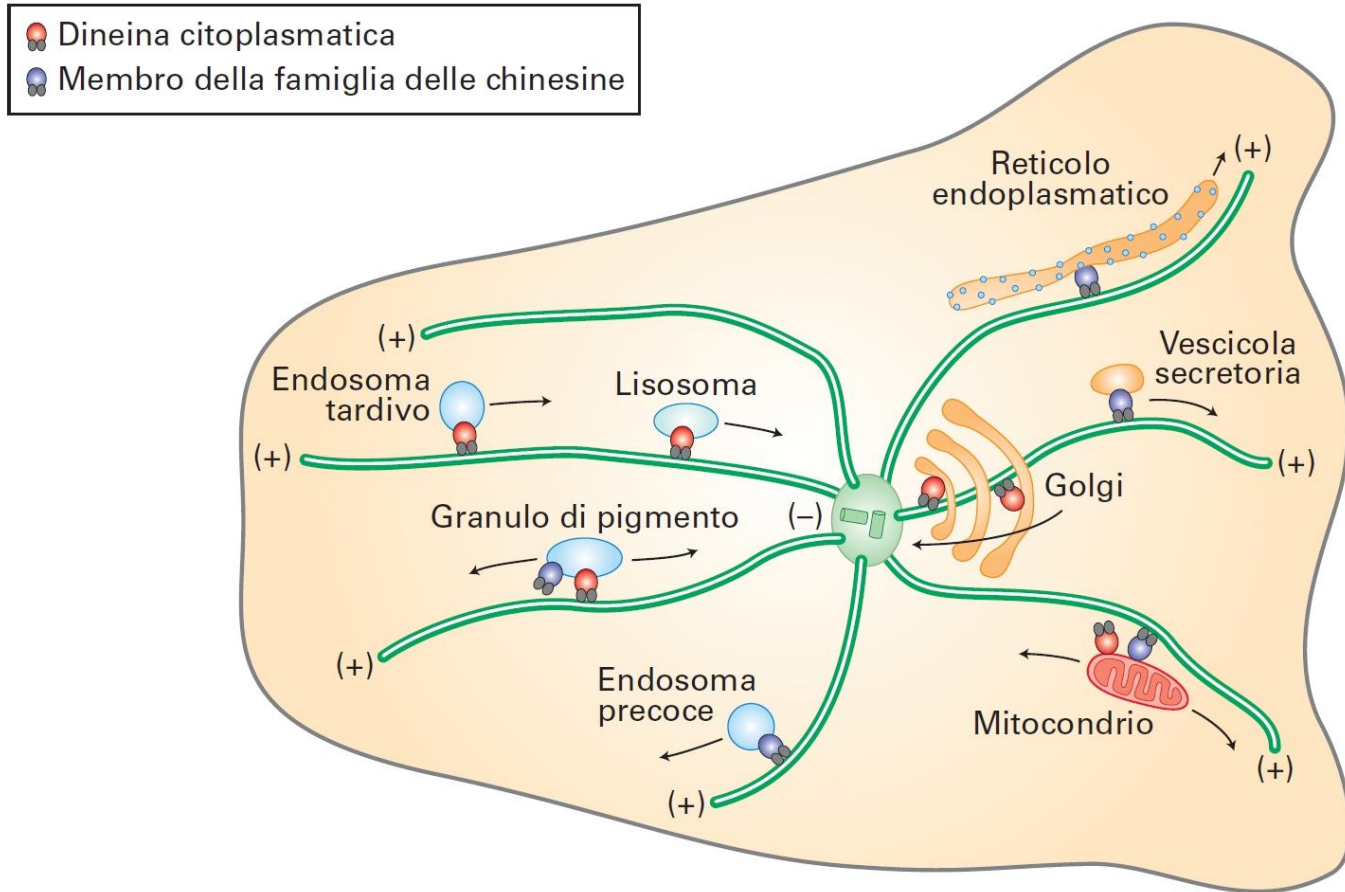
Nei neuroni, la chinesina è responsabile del trasporto anterogrado e la dineina del trasporto retrogrado.

Nelle altre cellule la dineina media il trasporto verso l'estremità meno e 15 diverse chinesine il trasporto verso l'estremità più.



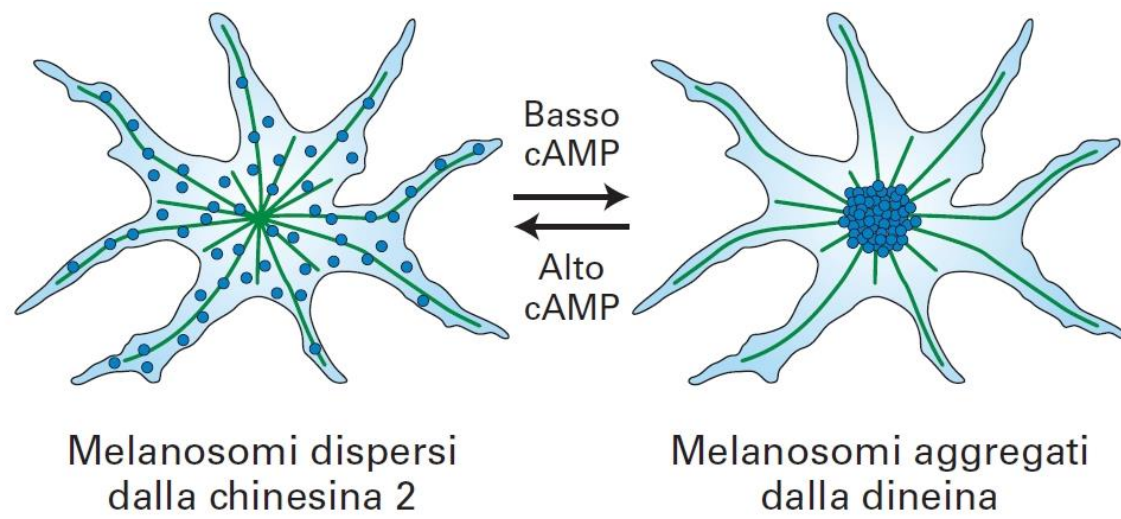
NEURONE

# Dineine e chinesine cooperano per il trasporto

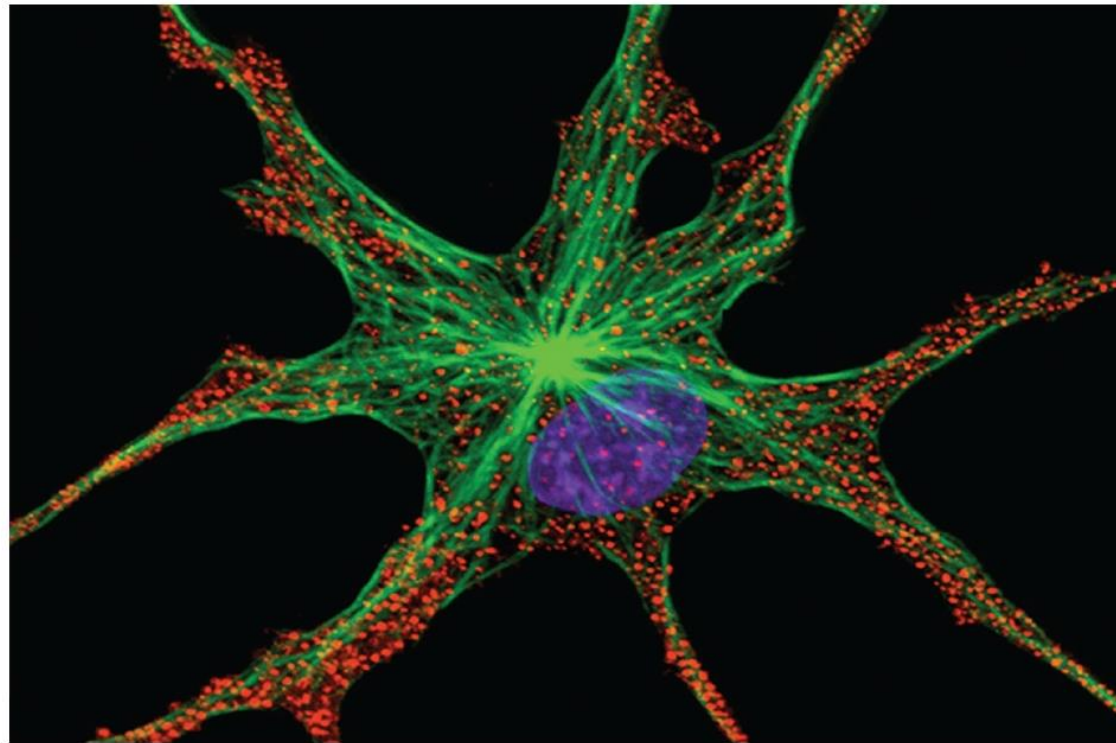


Il Golgi sta vicino al MTOC (quindi verso il polo – dei MT), trasportato dalla dineina. Anche il trasporto degli endosomi dipende dalla dineina.

Le chinesine trasportano i mitocondri e le vescicole secretorie ad esempio.



a.



b.

Molti studi sulla dinamica dei microtubuli sono stati effettuati nei melanofori di pesce. I **melanofori** sono cellule della pelle che contengono melanosomi, granuli di melanina. I granuli di melanina possono essere dispersi rendendo più scuro il colore della pelle dell'animale, oppure aggregati al centro, schiarendo la pelle. Queste variazioni sono dovute a cambiamenti nei livelli di cAMP e sono importanti per il mimetismo ad esempio.