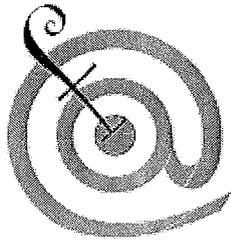


foc@1 point medicina

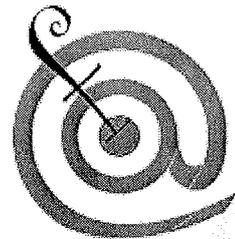


FISIOLOGIA

(Prof. RODA)

2010/2011

foc@1 point medicina





Complementi sul contenuto di informazione e sui meccanismi di riconoscimento delle proteine (1)

(revisione 2009, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Struttura

Com'è noto, le proteine sono eteropolimeri lineari formati dalla polimerizzazione di monomeri (gli amminoacidi) tramite la formazione di un legame noto come legame peptidico. Gli amminoacidi costituenti le proteine sono presenti nell'organismo in poco più di venti tipi che differiscono tra loro per la struttura delle così dette catene laterali, ossia i gruppi sostituenti che non fanno parte della catena principale (vedi § 1.1.1). È proprio la specificità chimica delle catene laterali a conferire agli amminoacidi le loro caratteristiche di reattività, mentre la possibilità di formare tra i singoli amminoacidi di una proteina legami diversi da quello peptidico rende possibile quell'organizzazione a più livelli che è tipica di queste molecole e ne determina molti aspetti funzionali.

1.1. Livelli di organizzazione

Nelle proteine si possono distinguere diversi livelli strutturali. Molto sinteticamente, la catena di amminoacidi, la successione dei quali costituisce la struttura primaria (§ 1.1.1), si ripiega variamente su se stessa, dando luogo sia alla struttura secondaria (§ 1.1.2.) — locale — che alla struttura terziaria (§ 1.1.3.), che è invece globale. Inoltre, diverse catene amminoacidiche (subunità) possono aggregarsi fra loro dando luogo alla struttura quaternaria.

1.1.1. Struttura primaria. Come ricordato, la struttura primaria di una proteina è formata da una successione lineare di amminoacidi che polimerizzano per la formazione di specifici legami, i legami peptidici. Data la struttura degli amminoacidi ($\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$), la catena principale di una proteina è formata dalla successione degli atomi di azoto, dei carboni α (quelli che portano il gruppo sostituito R, ossia la catena laterale) e dei carboni carbossilici. Il legame peptidico si forma tra i carboni carbossilici di un amminoacido e gli atomi di azoto (gli azoti amminici) di un altro amminoacido; siccome la formazione di questo legame comporta formalmente la perdita di una molecola d'acqua, gli amminoacidi che fanno parte della catena si sogliono chiamare "residui di amminoacido" o "residui". Per la distribuzione del suo orbitale, il legame peptidico ha quello che si suole definire un parziale carattere di doppio legame: ciò vuol dire che è più corto dei normali legami C - C e, quello che è più conta, che non vi è libertà rotazionale attorno al legame. Vi è invece libertà rotazionale attorno ai legami C - C della catena principale (cioè tra i C α ed i C carbossilici) e tra C α e gli azoti amminici, come anche — in generale e a parte gli impedimenti sterici — attorno ai legami delle catene laterali. Inoltre, anche gli angoli tra i singoli atomi e le lunghezze dei legami possono essere alterati, sia pur entro limiti ristretti. L'esistenza di questi gradi di libertà conferisce alle catene polipeptidiche una flessibilità che è limitata per catene formate da pochi residui ma diventa rilevante quando il numero di residui è elevato (varie centinaia in una proteina tipica) ed è già significativa per peptidi di una decina di residui. Tale flessibilità consente il ripiegamento delle catene polipeptidiche che forma la struttura secondaria e terziaria, entrambe determinate da interazioni deboli tra le catene laterali dei residui che compongono la proteina.

Oltre ai residui di amminoacido, fanno parte della struttura primaria anche le eventuali porzioni non peptidiche legate covalentemente agli amminoacidi, tra cui vanno ricordati i glucidi, tipicamente localizzati nella porzione extracellulare di proteine integrali di membrana ed in proteine associate al foglietto esterno della membrana plasmatica. Data la loro idrofilicità, questi contribuiscono a mantenere la giacitura della proteina, "tirando" verso l'esterno la parte alla quale sono legati. Una funzione concettualmente opposta è invece svolta dalle catene alifatiche che possono essere associate a proteine di membrana, tipicamente in posizione terminale; prendendo contatti con le code alifatiche del fosfolipide, queste ancorano la molecola alla membrana stessa, analogamente alle α eliche idrofobiche descritte oltre.

1.1.2. Struttura secondaria. Si definisce come struttura secondaria la conformazione tridimensionale che deriva dalla formazione di legami idrogeno tra gli ossigeni carbonilici e gli idrogeni ammidici dei residui di amminoacido della stessa catena polipeptidica. Esistono due tipi principali di strutture secondarie: quelle elicoidali e quelle β .

1.1.2.1. Strutture elicoidali. Le strutture elicoidali si formano quando si possono creare legami idrogeno tra atomi di O ed N appartenenti residui vicini ma non contigui equispaziati fra loro, formando strutture subcilindriche (sarebbe più esatto "strutture che possono essere contenute in un cilindro ideale") con un asse ideale circa parallelo ai legami idrogeno avente le catene laterali dei residui di amminoacido rivolte verso l'esterno e spaziate regolarmente. A seconda che il numero di residui interposti tra quelli tra i quali si forma il legame idrogeno sia di due, tre o quattro si formano rispettivamente eliche 3_{10} , α eliche e π eliche. Tuttavia, le occorrenze delle eliche 3_{10} e delle π eliche sono decisamente rare e le α eliche sono le strutture elicoidali di gran lunga più importanti e le uniche descritte oltre. Nelle α eliche, l'angolo tra due amminoacidi successivi è di 100° e lo spostamento "verticale" (cioè in direzione parallela all'asse dell'elica) è di 1.5 Å; in conseguenza, vi sono 3.6 residui (360 diviso 100) per ogni giro dell'elica, che ha un passo di 5.4 Å (1.5 moltiplicato 3.6, Figura 1).

Dato che i singoli legami idrogeno hanno una loro lunghezza e che distorsioni dell'asse delle α eliche ne comporterebbero una variazione, gli assi delle α eliche sono di norma quasi rettilinei e le α eliche presentano scarsa flessibilità. In casi rilevanti, alcuni dei residui che formano l'elica (in genere uno ogni tre o quattro) hanno idrofilicità opposta a quella di tutti gli altri (α eliche anfipatiche). Dato che il numero di residui per ogni giro dell'elica (3.6) non è intero, questa disposizione comporta che le catene laterali di questi residui vengano a formare una striscia che non è rettilinea rispetto al cilindroide formato dall' α elica, ma che descrive su questo una spirale allungata. Questa disposizione, che è spesso riscontrabile in interfacce tra ambienti di differente polarità, permette di rivolgere le catene laterali dei residui che fanno parte dell'elica verso un intorno di polarità analoga, così minimizzando l'energia libera del sistema. Ancora, data la presenza di residui apolari, α eliche anfipatiche idrofile (prevalentemente polari) sono poco stabili in un ambiente polare come il citoplasma: pertanto, quando due di queste strutture vengono a contatto reciproco, le due striscie di residui non polari (che, come riportato, non sono rettilinee) tendono a formare legami fra loro con la conseguenza che le due α eliche si avvolgono l'una sull'altra formando una superelica molto stabile, una "coiled coil".

1.1.2.2. Strutture β . Esistono due tipi fondamentali di strutture β , i " β turns" e i piani β . I primi si formano quando un singolo legame idrogeno si stabilisce tra due residui fra i quali ne sono interposti altri due non coinvolti nel legame. La formazione di questo legame fa piegare la catena polipeptidica, avvicinando tra loro i carboni α dei residui coinvolti: quindi, la presenza di β turns determina cambiamenti di direzione della catena stessa.

Nei casi precedenti, i legami idrogeno si formano tra residui vicini tra loro. Al contrario, lo stabilirsi di legami idrogeno tra gruppi di residui lontani fra loro nella sequenza conduce alla formazione dei piani β . Questi si formano quando la catena polipeptidica si ripiega in modo che due o più sezioni di essa vengono a trovarsi circa parallele fra loro e sufficientemente vicine da consentire la formazione di legami idrogeno circa perpendicolari alla direzione della catena polipeptidica (vedi Figura 2a). I piani β sono definiti come paralleli o antiparalleli a seconda che il verso della catena principale (convenzionalmente, dall'N al C-terminale) in ogni sezione di sequenza interessata alla formazione del piano sia eguale oppure contrario rispetto a quello delle sezioni vicine. In altri termini, si hanno piani paralleli se le porzioni di catena che formano il piano sono tutte orientate nello stesso verso (in alto in Figura 2b), mentre sono antiparalleli se le porzioni di catena sono orientate in versi alternativamente opposti (in basso in Figura 2b). Ciò comporta che i piani β antiparalleli (che, incidentalmente, sono leggermente più stabili di quelli paralleli) si possano formare in zone di sequenza contigue fra loro, mentre per la formazione dei piani paralleli è necessaria l'interposizione di altre porzioni di sequenza che permettono le necessarie inversioni di senso. Va ancora notato che, essendo spazialmente estesi, i piani β sono spesso piuttosto distorti (vedi Figura 4a). Tale distorsione è spesso percettibile anche in proteine a struttura prevalentemente β ed è particolarmente evidente, spesso al limite della riconoscibilità, nel caso in cui i piani β costituiscono una frazione limitata della struttura secondaria.

Dato che le catene laterali dei residui polari tendono a formare legami energeticamente favorevoli con il solvente, le strutture secondarie, segnatamente i piani β , tendono a formarsi prevalentemente tra residui idrofobi che sono localizzati all'interno della molecola, oppure a contatto con un intorno idrofobo. Nelle proteine globulari, cioè quelle che si trovano normalmente in soluzione, la porzione interna è tipicamente costituita da struttura secondaria, spesso piani β o gruppi di α eliche circa parallele fra loro, mentre la superficie a contatto col solvente può comprendere α eliche anfipatiche (idrofobe all'interno e idrofile all'esterno). Inoltre, dato che per la formazione dei piani β è necessaria una massa minima di residui non polari, i piani β sono di solito localizzati nelle zone interne delle proteine.

Va anche notato che la catena polipeptidica non è tutta interessata alla formazione di struttura secondaria: al

contrario, interposte a queste ve ne sono altre cui non è possibile assegnare una struttura riconoscibile. Per considerazioni analoghe, ma di segno opposto, a quelle avanzate sopra a proposito della localizzazione delle strutture secondarie, queste zone sono in genere rivolte verso l'esterno della proteina. Tuttavia, dati i vincoli esistenti all'interno di ogni proteina, è inesatto considerare tali zone come non strutturate, ma è piuttosto il caso di parlare di zone di struttura non specificamente definita, ma non casuale.

1.1.3. Struttura terziaria. Si definisce struttura terziaria la conformazione spaziale globale della catena polipeptidica, cioè il ripiegamento che comprende anche la struttura secondaria (vedi Figura 3a). Controllando i rapporti spaziali tra i gruppi funzionali costituiti dalle catene laterali accessibili all'esterno, la struttura terziaria viene anche a determinare la reattività della proteina. Questo ripiegamento è determinato dalle interazioni che si possono stabilire tra residui di amminoacido in grado di reagire fra loro che, entro limiti permessi dalla flessibilità della catena (vedi § 1.1.1) polipeptidica, possono anche essere lontani tra loro in termini di sequenza (Figura 3b). Inoltre, dato che le interazioni con l'intorno (il solvente, altre proteine, lipidi) sono circa isoenergetiche rispetto alle interazioni che si possono formare nella catena amminoacidica, anche queste fanno parte dell'equilibrio energetico che mantiene la struttura terziaria. Ciò vuol dire che il ripiegamento della proteina sarà determinato dall'equilibrio totale tra i legami all'interno della catena e quelli all'esterno di questa. Eccetto nel caso dei legami disolfuro, i legami che mantengono questa struttura sono deboli (da qualche Kcal per mole per i legami idrogeno a frazioni di Kcal per mole per i legami di Wan der Waals); tuttavia, il loro numero è sufficientemente elevato da garantirle un elevato grado di stabilità. Come descritto più oltre, le catene laterali tendono a formare legami con altre catene laterali che siano in qualche modo complementari, stabilendo quelle interazioni che sono termodinamicamente più favorevoli (ma vedi § 1.2). Ciò vale anche per i casi in cui il ripiegamento sia completato da proteine "chaperon" che, a quanto si ritiene, hanno il compito di aggiustare, ma non di determinare completamente, il ripiegamento; in altri termini, la presenza di queste proteine dovrebbe indurre conformazioni solo modestamente differenti da a quelle che si avrebbero in loro assenza. Va anche osservato come lo stabilirsi della struttura terziaria comporti distorsioni della struttura secondaria che, soprattutto nel caso dei piani β , possono anche essere rilevanti.

1.1.4. Altri livelli di organizzazione. Oltre a quelli appena descritti ed alla struttura quaternaria (§ 1.1.5), nelle molecole proteiche si riconoscono livelli di organizzazione noti come segmenti e domini. I segmenti sono definiti come zone della molecola relativamente omogenee rispetto ad un singolo carattere strutturale. Un esempio è costituito dalle α eliche idrofobe e/o anfipatiche che si trovano in molte proteine di membrana ("segmenti α -elicoidali", "recettori a sette segmenti"). I domini sono stati in origine definiti come unità stabili di una proteina in grado di ripiegarsi in modo autonomo. Una definizione alternativa, molto generale ma piuttosto astratta, può essere quella di blocchi, o elementi, strutturali riconoscibili; un esempio, come la piruvato chinasi in Figura 4a, può forse chiarire meglio il concetto. Con un significato leggermente diverso, si parla di domini anche quando blocchi strutturali analoghi si trovano in differenti proteine, come nel caso dei domini immunoglobulinici, costituiti due foglietti β antiparalleli giustapposti con andamento incrociato (Figura 4b), più copie dei quali si trovano nelle immunoglobuline ma anche in alcuni recettori con attività enzimatica. Un caso analogo è costituito dai siti calcio-leganti, le "chele E-F", caratteristici di proteine come la calmodulina (vedi Figura 1 delle "Note sui messaggeri intracellulari"). In un'accezione ancora diversa, si definiscono come domini tratti di struttura primaria che si ripetono nella stessa proteina — e che si ritiene origino da duplicazione genica — come i quattro domini dei canali a controllo di potenziale per Na^+ e per il Ca^{2+} (vedi Figura 3a e 3b delle "Note su canali ionici").

1.1.5. Struttura quaternaria e superfici di interazione. Molte proteine esistono come aggregati di una o più catene polipeptidiche (subunità), che di norma interagiscono tramite legami deboli, analoghi a quelli che mantengono la struttura terziaria (esistono però subunità unite da legami disolfuro, che sono covalenti). Naturalmente le subunità che formano una proteina devono essere a contatto reciproco. Tale contatto avviene in zone determinate, le superfici di interazione, che possono essere più d'una per subunità. Queste superfici consistono in zone in cui sono localizzati gruppi reattivi complementari costituiti, come sempre, da catene laterali di residui di amminoacido. In effetti, è essenzialmente il numero e la posizione delle superfici di interazione sulle singole subunità a determinare il tipo di aggregazione — e conseguentemente la struttura subunitaria — dell'intera proteina. Eccetto il caso di legami covalenti, la quantità di energia impegnata per mantenere la struttura quaternaria è in genere abbastanza modesta, dato che è modesto il numero di gruppi interagenti; in conseguenza, la struttura quaternaria è in genere più labile di quella terziaria. Tuttavia, i due livelli strutturali si influenzano a vicenda: cambiamenti conformazionali (cioè di struttura terziaria) possono modificare la composizione subunitaria; per converso, anche variazioni della composizione subunitaria inducono normalmente cambiamenti conformazionali. Ad esempio, molti enzimi posseggono subunità dette regolatrici, che in genere inibiscono l'attività della (o delle) subunità catalitica. A seguito di un evento esterno (tipicamente di legame), le subunità regolatrici cambiano conformazione, così cambiando la

conformazione delle loro superfici di interazione con le subunità catalitiche. Le subunità regolatrici si staccano da quelle catalitiche e nelle superfici di interazione di queste ultime i legami proteina - proteina vengono sostituiti da legami proteina - solvente, inducendo la subunità catalitica ad assumere la conformazione nella quale il sito enzimatico è attivo.

Le superfici di interazione possono essere visualizzate come "macchie" di di residui di amminoacido localizzate sulla superficie esterna delle proteine. Nelle interazioni proteina-proteina e proteina-ligando sono anche importanti le interazioni con il solvente: infatti, in condizioni fisiologiche questo è costituito essenzialmente da acqua, che è in grado di formare sia legami idrogeno con i residui polari che legami elettrostatici con i residui che portano carica netta. Inoltre, eventuali residui idrofobici presenti sulla "superficie" esterna della proteina formano interazioni idrofobiche che aumentano la struttura locale delle molecole d'acqua. L'acqua viene quindi a riempire le cavità superficiali e riveste la superficie esterna delle proteine globulari con uno strato essenzialmente mono, o al massimo bimolecolare, che richiede energia per essere rimosso e del quale è necessario tenere conto nelle interazioni delle proteine con altre specie.

1.2. Aspetti energetici

Nell'assumere la loro struttura tridimensionale le proteine tendono a minimizzare il contenuto energetico dell'intero sistema (in pratica, la molecola proteica e il suo intorno: citoplasma, lipidi di membrana, altre proteine...). In altri termini, viene assunta una conformazione tale rendere minima la somma dell'energia libera relativa a tutte le interazioni (interne ed esterne), anche se il contenuto energetico di singoli legami può essere maggiore di quello relativo alla struttura non ripiegata. La maggior parte dei legami coinvolti nel mantenimento della conformazione sono deboli; tuttavia, dato che il loro numero è elevato, l'energia totale non è trascurabile (indicativamente, nell'ordine delle decine di Kcal/mole). Inoltre, come accennato, nel bilancio energetico totale giocano un ruolo importante anche le interazioni con l'ambiente circostante. Infatti, il numero totale dei legami con il solvente non è in linea di massima molto minore di quello dei legami interni alla catena polipeptidica; in più, nel caso di un intorno acquoso come il citoplasma, il contenuto energetico dei primi può essere maggiore di quello dei secondi: in conseguenza, l'energia totale relativa alle interazioni con l'intorno costituisce una frazione apprezzabile del totale.

Ovviamente il fattore che consente di assumere (e quindi mantenere) la struttura è costituito dalla differenza tra il contenuto energetico della proteina strutturata e quello della proteina non strutturata. In proposito bisogna notare che, da un punto di vista termodinamico, la formazione di una struttura definita comporta uno svantaggio energetico (entropico) derivante al maggiore ordine relativo allo stato strutturato rispetto a quello non strutturato. Questo svantaggio è in parte superato da un altro termine entropico relativo al così detto effetto idrofobico; questo consiste nella perdita di ordine di quella frazione di solvente che era coordinato da porzioni della proteina che, nella struttura ripiegata non sono più a contatto con il solvente. La stabilità conformazionale delle proteine è anche funzione di un secondo termine favorevole (entalpico), relativo alla formazione di legami all'interno della molecola. Dato che la somma dei due termini favorevoli è di poco maggiore del termine sfavorevole, la quantità di energia totale relativa alla formazione della struttura tridimensionale è modesta: quindi, la struttura risultante non ha una stabilità intrinseca elevata ed è modificabile con un apporto energetico modesto.

Le considerazioni appena esposte hanno infatti come importante conseguenza funzionale che la conformazione di una proteina può essere modificata con un apporto energetico limitato, quale quello fornibile dall'ambiente (essenzialmente l'energia cinetica degli urti molecolari). Infatti il funzionamento delle proteine dipende dalla loro capacità di assumere conformazioni diverse, che dipende a sua volta dalla modestia dell'apporto energetico necessario. Questo fattore è funzionalmente importante perché il contenuto energetico dei legami che mantengono la struttura della proteina è dello stesso ordine di grandezza dell'energia relativa al moto termico (cioè all'energia cinetica delle particelle) corrispondente alla temperatura considerata. Infatti, l'apporto energetico medio del moto termico, a 37°, è di circa 4 Kcal/mole. I legami forti — la cui energia di legame è nell'ordine di varie decine di Kcal/mole — non possono essere modificati da quest'apporto energetico (nell'organismo, vengono infatti modificati da reazioni enzimatiche). Al contrario, l'energia dei legami deboli va da frazioni di KCal/mole ad alcune KCal/mole; quindi, alla temperatura di riferimento, questi valori sono minori, o dello stesso ordine di grandezza, dell'energia fornibile dall'ambiente, che è quindi sufficiente a romperli. Dato però che il numero dei legami interessati è elevato e che solo alcuni di questi possono essere rotti in un dato istante, la struttura delle proteine presenta una stabilità significativa. Queste considerazioni comportano anche che la struttura di una molecola proteica non sia rigida, ma fluttui intorno ad una struttura media, che viene assunta come tipica (la "conformazione nativa"). In altri termini,

esiste una famiglia di conformazioni quasi isoenergetiche tra le quali le proteine passano continuamente (anche in assenza di specifiche interazioni, vedi oltre). Quindi, il concetto di conformazione di una proteina è valido in termini essenzialmente statistici: dato il continuo rompersi e riformarsi di legami, quella che si definisce come conformazione è lo stato conformazionale più probabile, più correttamente quello nel quale si trova in ogni istante il maggior numero di molecole (in linguaggio statistico, la moda della distribuzione).

In fine, le considerazioni appena espresse partono dal presupposto che gli stati conformazionali più popolati siano effettivamente quelli termodinamicamente più stabili. In effetti, ciò è vero nella maggior parte dei casi, ma non sempre: infatti esistono proteine che, una volta espresse, assumono una conformazione che corrisponde ad un massimo energetico relativo nel quale rimangono bloccate (si trovano in quello che si definisce un equilibrio metastabile). In questi casi, il riarrangiamento conformazionale è così lento da permettere alla proteina di mantenersi per un lasso di tempi significativo (anche per la sua intera vita) nello stato di massimo energetico relativo in cui era stata espressa.

2. Contenuto di informazione

Considerando le proteine sotto l'aspetto del passaggio di informazione, questo si sostanzia nella loro capacità sia di riconoscere altre molecole che di modificare la loro conformazione in funzione di tale riconoscimento. Questi due aspetti sono strettamente collegati, dato che le interazioni che permettono il riconoscimento inducono i cambiamenti conformazionali che ne costituiscono l'effetto. Il riconoscimento avviene stabilendo interazioni tra specifici gruppi funzionali di amminoacidi della accessibili dall'esterno proteina e gruppi funzionali della molecola da riconoscere che siano in qualche modo complementari ai primi (vedi "Note sui recettori", § 1.2.).

2.1. Interazioni e cambiamenti conformazionali

Una conseguenza funzionalmente rilevante dell'esistenza degli equilibri energetici ricordati sopra è che le interazioni con altre sostanze, comprese altre proteine, alterano la conformazione della proteina. Infatti, come già ricordato, la conformazione di una molecola proteica cambia continuamente, sia per l'apporto energetico dell'ambiente, sia in risposta alle variazioni del suo intorno, comprese le interazioni con i ligandi. Inoltre, dato che il contenuto energetico dei legami "con l'interno" e dei legami "con l'esterno" è simile, rotture e formazioni di legami con l'esterno della molecola modificano anche i legami interni che ne mantengono la conformazione. In conseguenza, le interazioni con specie in grado di legarsi alla proteina ne modificano la struttura tridimensionale. Dato, inoltre, che alla formazione di diversi legami esterni dovrà corrispondere un differente rimaneggiamento dei legami interni, tali modifiche saranno diverse a seconda dei siti di interazione interessati, nonché del numero e del contenuto energetico di legami neoformati. In effetti, sulla base di considerazioni del tipo di quelle qui accennate, è possibile razionalizzare come interazioni con ligandi differenti inducano effetti differenti, come avviene, ad esempio, nel caso di molti recettori.

Inoltre, dato che la conformazione di una proteina è un fattore globale, soltanto cambiamenti conformazionali di entità limitata sono ristretti a pochi residui. Al contrario, i cambiamenti conformazionali importanti avvengono generalmente per movimento reciproco di blocchi, segmenti o domini, che si spostano reciprocamente senza rilevanti modifiche della conformazione dei blocchi. Esempi possono essere forniti dalla rotazione della testa di mioglobine rispetto alla loro coda, dai recettori per gli ormoni idrofobici in presenza di ligando, o dalle modifiche conformazionali dell'esochinasi (un enzima coinvolto nella glicolisi) in presenza di glucosio mostrate in Figura 5.

2.1.1. Aspetti energetici delle interazioni

Le considerazioni sul rapporto tra l'energia fornibile dal sistema e quella relativa ai legami che mantengono la struttura tridimensionale delle proteine sono rilevanti anche per quanto riguarda i cambiamenti conformazionali indotti da ligandi. Si suole affermare, ed è stato anche riportato sopra, che l'energia fornita dalla specie interagente induce il cambiamento conformazionale della proteina. In effetti ciò non è del tutto corretto: infatti, è vero che le differenti conformazioni di una molecola proteica sono circa isoenergetiche, di modo che il modesto apporto di energia che può essere fornito dai legami deboli che si rompono e si formano nel corso delle interazioni è, in linea di principio, sufficiente a coprire la differenza energetica tra i due stati. Tuttavia, il numero di legami che una proteina deve rompere e riformare per passare da una

conformazione ad un'altra é tale da comportare una richiesta energetica superiore a quella che può, sempre in linea di massima, essere fornita dalle interazioni con un'altra molecola. In altri termini, anche se i diversi stati conformazionali di una proteina sono circa isoenergetici, la barriera energetica esistente tra questi é relativamente importante. Va anche tenuto conto del fatto che hanno rilevanza conformazionale non soltanto i legami tra le due specie interagenti, ma anche quelli con il solvente. Infatti, dato che ligandi e proteine sono entrambi idratati, quando le due specie interagiscono, i legami con il solvente delle catene laterali degli amminoacidi che costituiscono le superfici di interazione vengono sostituiti da legami con la specie interagente. Il contrario avviene, ovviamente, quando le due specie si separano. Vengono quindi a proposito considerazioni analoghe a quelle avanzate in precedenza circa la formazione della struttura tridimensionale (§ 1.2), ivi compreso l'effetto della perdita — o guadagno — di ordine sia del solvente che della proteina (l'effetto idrofobico). Ancora, come già riportato, le molecole proteiche non sono bloccate in uno stato conformazionale rigido ma "occupano" una famiglia di conformazioni (§ 1.2). In questi termini, l'apporto energetico relativo al formarsi (o al rompersi) delle interazioni tra le due specie stabilizza la proteina in uno, o alcuni, degli stati conformazionali che sono assunti spontaneamente. In un altro linguaggio, lo stato conformazionale relativo risulta maggiormente popolato, ossia é assunto da una frazione delle molecole maggiore che non in precedenza.

2.1.2. Effetti sulla struttura quaternaria

Dato quanto riportato al paragrafo 1.1.5 sulle forze che mantengono struttura quaternaria e terziaria consegue che gli effetti delle interazioni con i ligandi siano evidenti anche a livello di composizione subunitaria. Ad esempio, enzimi che — come molte chinasi — sono composti da subunità regolatrici e subunità catalitiche, sono normalmente inattivi quando le subunità regolatrici sono legate alle subunità catalitiche e si attivano quando le subunità regolatrici si staccano da quelle catalitiche. Ciò quasi sempre avviene a seguito dell'occupazione di siti di interazione delle subunità regolatrici, ciò che le stabilizza in una conformazione nella quale le interazioni con le subunità catalitiche sono ridotte (un tipico effetto allosterico, vedi sotto). A sua volta, il sito catalitico si attiva perché le subunità catalitiche (anche quelle regolatrici, ma ciò non é in genere rilevante), assumono conformazioni differenti in presenza ed in assenza di interazioni con le altre subunità o, più correttamente, quando le interazioni proteina - proteina delle superfici di interazione tra le subunità sono sostituite da interazioni proteina - solvente.

2.2. Effetti allosterici

Per come sono stati descritti originariamente, gli effetti allosterici consistono nella coesistenza in una singola molecola proteica di un sito effetore (ad esempio, il sito attivo di un enzima) ed un secondo sito detto regolatore, tra i quali esista accoppiamento conformazionale. Ciò vuol dire che un cambiamento conformazionale del sito regolatore deve potere indurre un cambiamento conformazionale del sito effetore. Dato che — come detto in precedenza — la conformazione di una proteina é un parametro globale, in linea di principio qualsiasi variazione, anche locale, dei fattori che la controllano si dovrebbe ripercuotere su tutta la molecola. Nella realtà, l'esistenza (o la rilevanza) di effetti allosterici dipende da vari parametri, il principale dei quali — oltre alla distanza tra i due siti — consiste nei vincoli conformazionali della proteina. L'uso corrente del termine é però più estensivo di questa definizione, e indica l'induzione di cambiamenti conformazionali locali a seguito di interazioni con siti distinti da quello in esame. Come esempio può essere citata la famiglia di proteine regolatrici GTP-leganti che vanno incontro a cambiamenti conformazionali allosterici quando il sito di legame é occupato dal GTP oppure dal GDP. Analogamente, ATPasi possono andare incontro a cambiamenti conformazionali allosterici che permettono alle proteine il loro funzionamento (regolazione, trasporti transmembrana per le proteine di trasporto, spostamento di organelli per le proteine motrici...). Anche i fenomeni di cooperatività di legame (come, ad esempio, tra proteine G e recettori a sette segmenti transmembrana) sono di tipo allosterico. Interazioni allosteriche sono importanti anche in campo farmacologico, ove possono essere utilizzate per modulare l'attività di ligandi fisiologici. Ad esempio, le benzodiazepine non si legano al sito di legame per il GABA dei recettori GABA_A (il sito ortosterico), ma ad un altro sito (allosterico), aumentando l'azione del ligando fisiologico (il GABA) al sito ortosterico.

In effetti, il ruolo fondamentale che giocano le proteine nei fenomeni biologici si deve soprattutto alla capacità di queste molecole di andare incontro a cambiamenti conformazionali anche importanti in un ambiente molto costante come quello dell'interno della cellula. In effetti, il funzionamento delle cellule é essenzialmente dovuto all'impiego coordinato di una serie di "macchinette" molecolari costituite appunto da proteine o da complessi proteici, mentre il ruolo degli organelli é fondamentalmente quello di mantenere in rapporti spaziali

definiti una serie di proteine funzionalmente collegate.

3. Specificità

Nelle interazioni delle proteine con altre specie è richiesto un certo grado di specificità. In altre parole, le interazioni che comportano determinati effetti (che inducono una specifica conformazione) devono potere avvenire solo tra determinate specie.

3.1. Siti di interazione

È noto che alle molecole proteiche si lega con elevata affinità (cioè con costanti di dissociazione numericamente piccole) una varietà di ligandi endogeni ed esogeni. Nel caso specifico dei recettori, i siti ove si stabiliscono queste interazioni sono noti come siti recettoriali. Quello dei siti recettoriali è, tuttavia, un caso specifico di un fenomeno più generale: infatti, in tutti i casi in cui una proteina interagisce con un'altra molecola le interazioni sono localizzate in specifiche zone della proteina nelle quali si possono stabilire legami deboli tra gruppi funzionali della proteina e gruppi funzionali del ligando che abbiano un qualche tipo di complementarità con ai primi. I gruppi funzionali della proteina sono costituiti dalle catene laterali di residui di amminoacido che — nell'arrangiamento spaziale che definisce la conformazione della proteina stessa — si vengono a trovare in rapporti posizionali corrispondenti alle posizioni dei complementari gruppi funzionali del ligando. Nel ligando i gruppi funzionali sono costituiti da determinanti della molecola che siano in grado di reagire con i gruppi funzionali presenti sulle proteine. Ad esempio, interazioni proteina - ligando si possono stabilire tramite legami tra cariche di segno opposto (amminoacidi acidi con amminoacidi basici oppure con cariche positive come quelle dei gruppi amminici), reazioni di impilamento ("stacking") di anelli aromatici, interazioni tra residui polari ma non carichi (ad esempio le catene laterali delle serine con ossidrili), e ancora per formazione dei deboli legami dipolo indotto - dipolo indotto (i legami di Wan der Waals). Inoltre, sia l'affinità del legame che la precisione del riconoscimento dipendono dallo stabilirsi di interazioni multiple: è peraltro evidente che queste, coinvolgendo più gruppi funzionali di entrambe le specie interagenti, possono aver luogo soltanto quando nelle due molecole i rapporti spaziali tra i gruppi in grado di interagire sono tali da permettere i contatti reciproci senza generare eccessive distorsioni della struttura. Ciò è particolarmente vero nel caso di piccoli ligandi, che non posseggono la flessibilità strutturale propria di molecole più grandi, come quelle peptidiche. Per converso, è proprio la flessibilità strutturale dei ligandi peptidici ad essere in larga misura responsabile delle elevate affinità che questi mostrano per i loro recettori (vedi "Note sui recettori", § 1.2).

3.1. Specificità e precisione del riconoscimento

Sulla base di considerazioni quali quelle appena esposte si può razionalizzare la specificità degli enzimi per i loro substrati e di recettori per i loro ligandi, il montaggio di strutture sopramolecolari come quelle che si riscontrano in molte proteine strutturali nonché — sia pur in termini leggermente diversi — l'attività di sostanze farmacologicamente attive che si legano a recettori. Va però notato che, nel caso di macromolecole, il riconoscimento comporta necessariamente un certo grado di imprecisione. Semplificando al massimo concetti per i quali esiste più di un modello, come già sottolineato i legami che determinano le interazioni proteina-ligando sono circa isoenergetici rispetto a quelli che mantengono la struttura della proteina: quindi, le interazioni con l'esterno modificano l'equilibrio delle interazioni con l'interno, cioè anche la conformazione della proteina (o di entrambe, nel caso di interazioni proteina - proteina). Un cambiamento conformazionale è per altro, per così dire, lo scopo dell'interazione stessa. È infatti proprio il cambiamento conformazionale successivo all'interazione con il ligando che modifica lo stato di attività delle proteine effettrici. Allo stesso tempo proprio queste modalità di interazione limitano la precisione del riconoscimento: infatti, per quanto appena detto, durante l'interazione la proteina riarrangia i legami che ne mantengono la struttura: quindi, può esistere un certo grado di aggiustamento del sito recettoriale rispetto al ligando. Tale fenomeno, proprio perchè esclude la necessità di una perfetta complementarità delle porzioni interagenti, ovviamente riduce la precisione del riconoscimento. Per converso, possono venire riconosciute anche superfici non perfettamente complementari. Portando al limite le considerazioni sulle possibilità di aggiustamento reciproco delle superfici interagenti, in condizioni opportune questi meccanismi dovrebbero rendere possibile "evocare" siti di interazione sulla superficie di una proteina. In effetti, l'esistenza di siti recettoriali multipli a bassa affinità in specifiche zone delle molecole recettoriali supporta a questa ipotesi.

Appendice: polimorfismo

Molte proteine funzionalmente attive possono essere suddivise in famiglie a seconda delle loro caratteristiche strutturali (e, ove possibile, evolutive). Nell'ambito di queste famiglie si possono, ovviamente, riconoscere singoli membri, ossia le specifiche proteine. Tuttavia, anche per quella che viene considerata un'unica proteina possono esistere varianti — anche molteplici — dette isoforme, che differiscono tra loro per minori dettagli di sequenza. Isoforme funzionalmente differenti sono note, ad esempio, per enzimi, trasportatori di membrana, recettori, canali ionici e proteine motrici. L'esistenza di isoforme non è, per altro, l'unico caso di polimorfismo: un caso estremo (che non è tuttavia classificabile tra le isoforme) si ha nel sistema immunitario, dove l'espressione di molte proteine come gli anticorpi o le proteine del sistema maggiore di istocompatibilità (le proteine MHC) è soggetta ad una serie di processamenti che ne permettono una straordinaria variabilità, responsabile a sua volta del riconoscimento di agli antigeni estranei di struttura arbitrari. Per quanto riguarda le isoforme propriamente dette, queste possono sia essere codificate da geni diversi, come anche derivare da trascritti di un singolo gene che differiscono per il processamento. A seconda delle loro funzioni, isoforme diverse possono essere espresse in differenti momenti dello sviluppo o sotto differenti condizioni ambientali, essere localizzate in differenti tessuti o in differenti organelli dello stesso tessuto, o anche coesistere con differenze funzionali relativamente modeste, regolando in modo fine la funzione delle proteine a seconda delle specifiche esigenze.

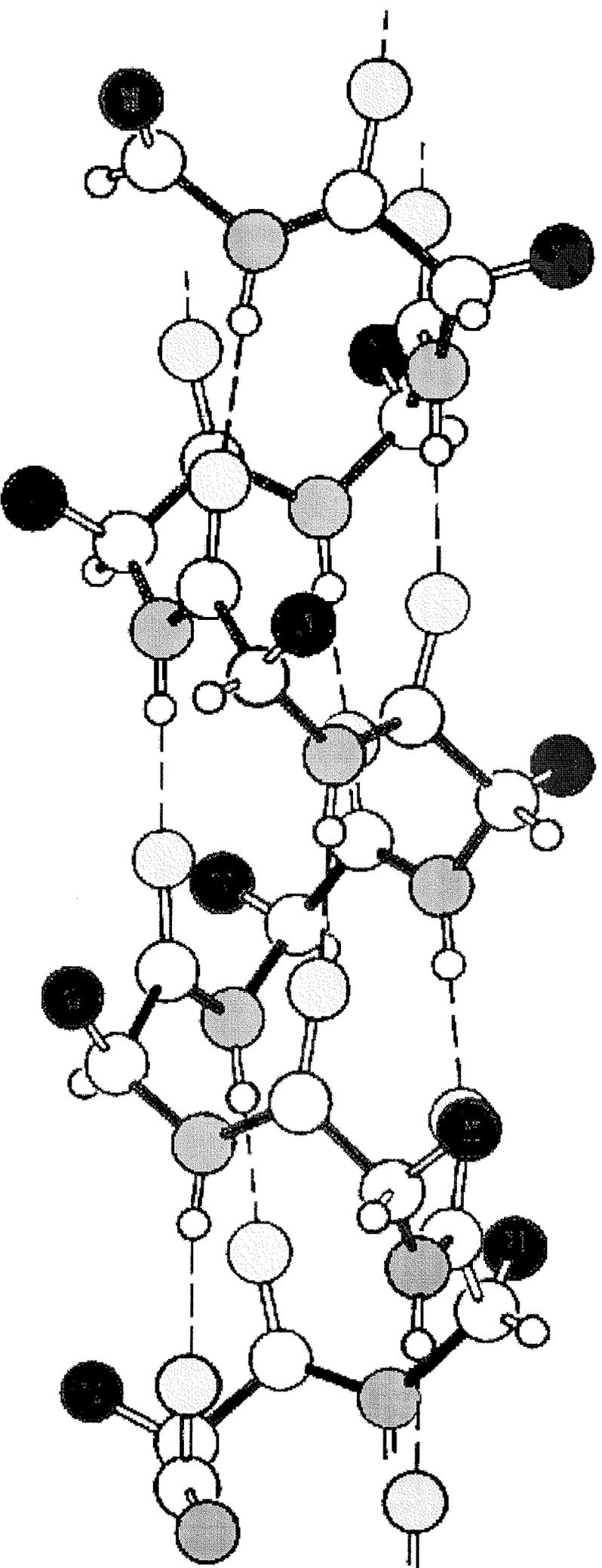


Figura 1. Modello di α elica sinistrorsa. Le sfere bianche rappresentano gli atomi di carbonio, quelle grigio chiare gli atomi di ossigeno, quelle grigio scure gli atomi di azoto, quelle nere le catene laterali, le sfere bianche piccole rappresentano gli atomi di idrogeno. I legami della catena principale sono rappresentati in nero, gli altri legami covalenti in bianco, i legami idrogeno sono tratteggiati.

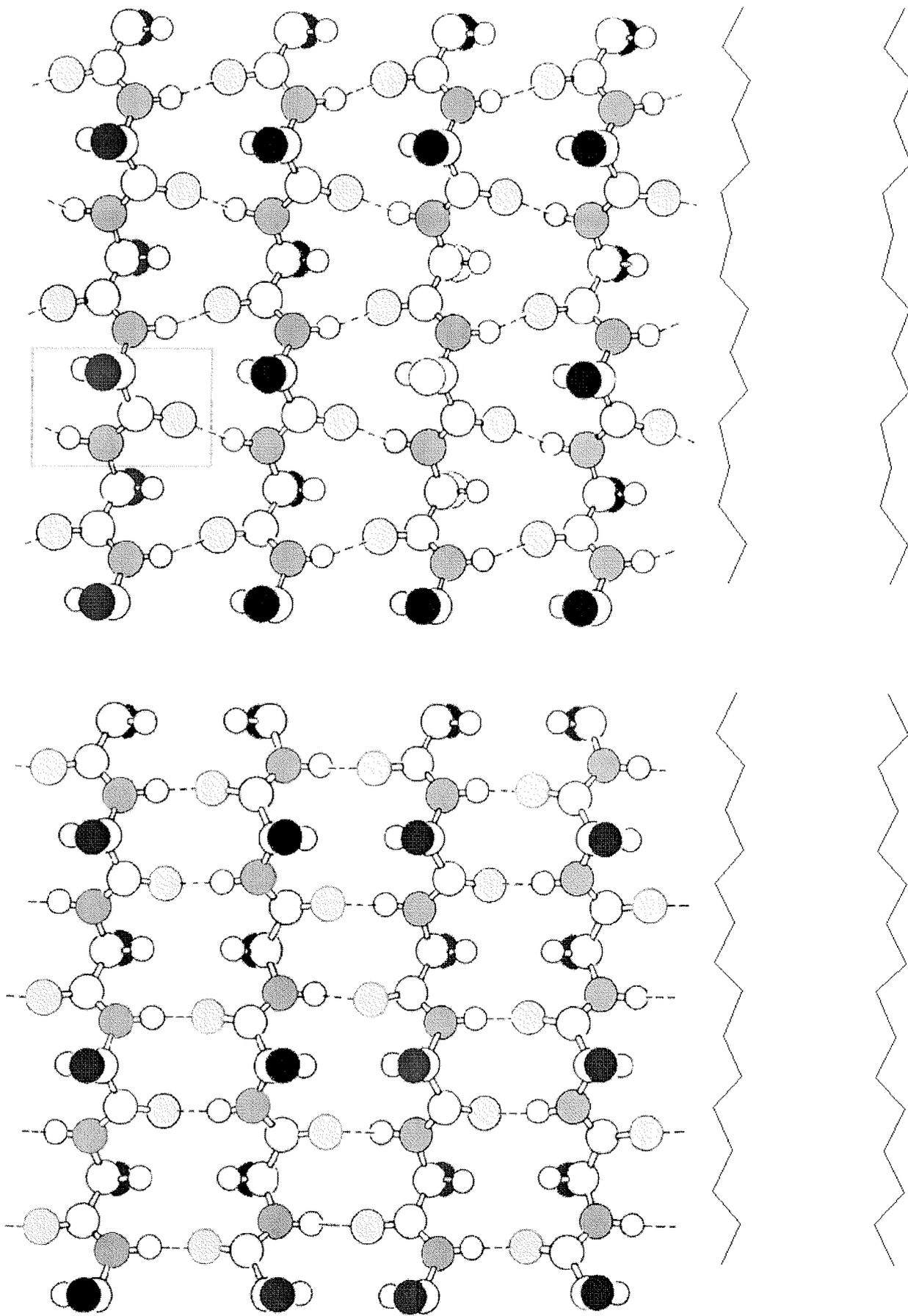


Figura 2a. Modello di una porzione di piano β , parallelo (in alto) e antiparallelo (in basso). I cerchi bianchi indicano gli atomi di carbonio, i cerchi grigio chiari gli atomi di ossigeno, i cerchi grigio scuri gli atomi di azoto, i cerchi piccoli gli atomi di idrogeno e i cerchi neri le catene laterali. Le linee tratteggiate indicano i legami idrogeno. A destra é rappresentato l'andamento dei legami della catena principale nei due tipi di piano, legami che sono paralleli fra loro, o alternativamente convergenti e divergenti. Il rettangolo grigio identifica un singolo residuo di amminocido.

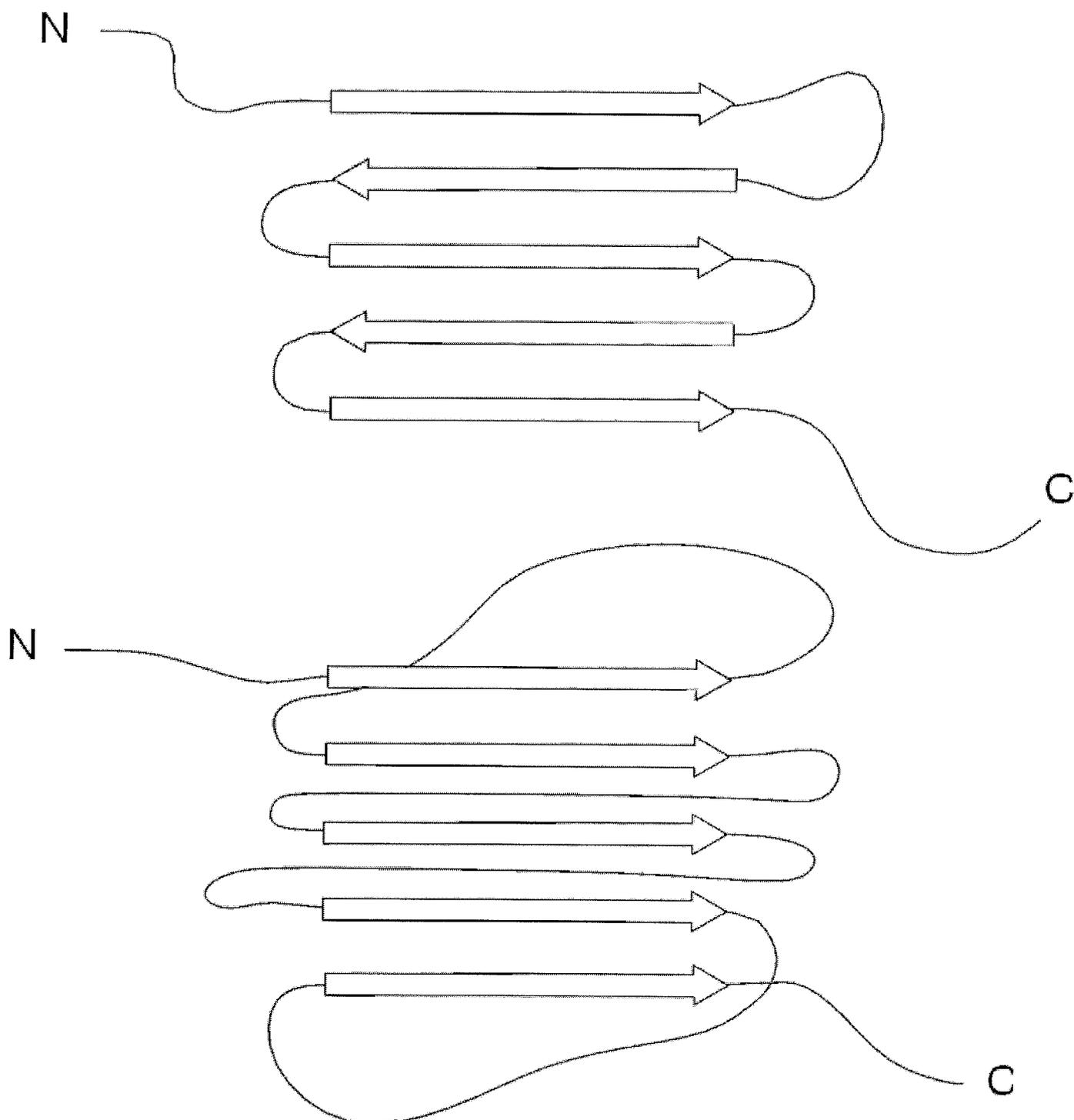


Figura 2b. Schema di un piano β antiparallelo (in alto) e parallelo (in basso). Si può notare come i piani antiparalleli sono in grado di formarsi anche quando i segmenti non strutturati (linee) interposti tra quelli interessati alla formazione del piano β (frecce) sono molto corti; pertanto, i piani antiparalleli possono formarsi in zone omogenee in termini di sequenza. Nel caso dei piani paralleli è invece necessario che i segmenti interposti siano abbastanza lunghi da permettere due inversioni del verso della catena polipeptidica tra due segmenti consecutivi interessati alla formazione del piano. Quindi, questi piani si formano con il coinvolgimento di porzioni anche distanti in termini di sequenza. Le lettere N e C identificano rispettivamente l'N ed il C terminale della catena, le frecce indicano la direzione della catena.

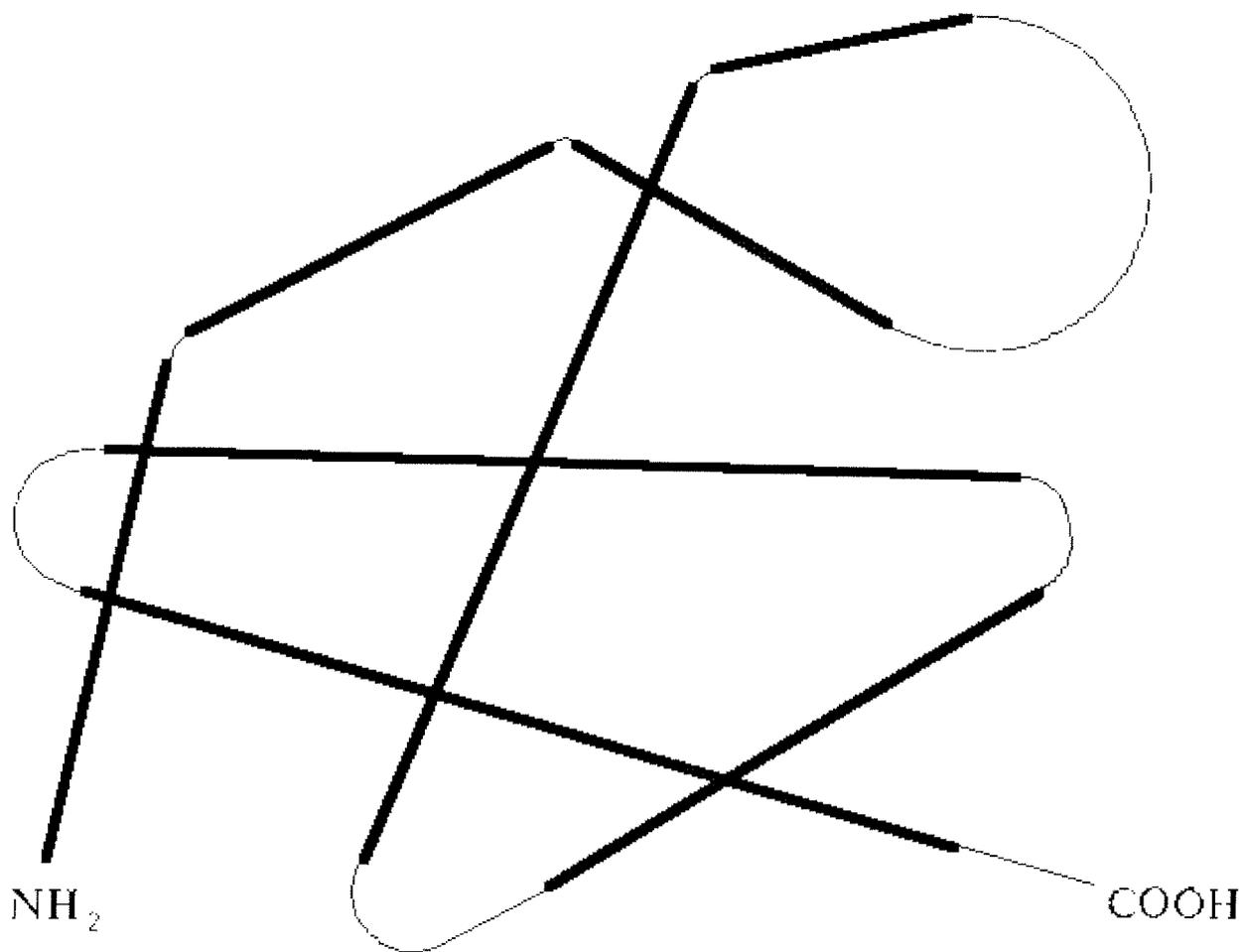


Figura 3a. Schema del ripiegamento di una molecola di mioglobina. Questa proteina, composta da 153 residui di amminoacido per un peso molecolare di 17500 Daltons, é caratterizzata da un contenuto in α elica particolarmente elevato (77%). Le linee spesse identificano appunto gli otto segmenti ad α elica, le linee sottili identificano segmenti a struttura non definita. Si vede come la catena polipeptidica cambi direzione solo in corrispondenza di questi ultimi: infatti, le α eliche sono normalmente rettilinee e loro cambiamenti di direzione, pur possibili, sono infrequenti.

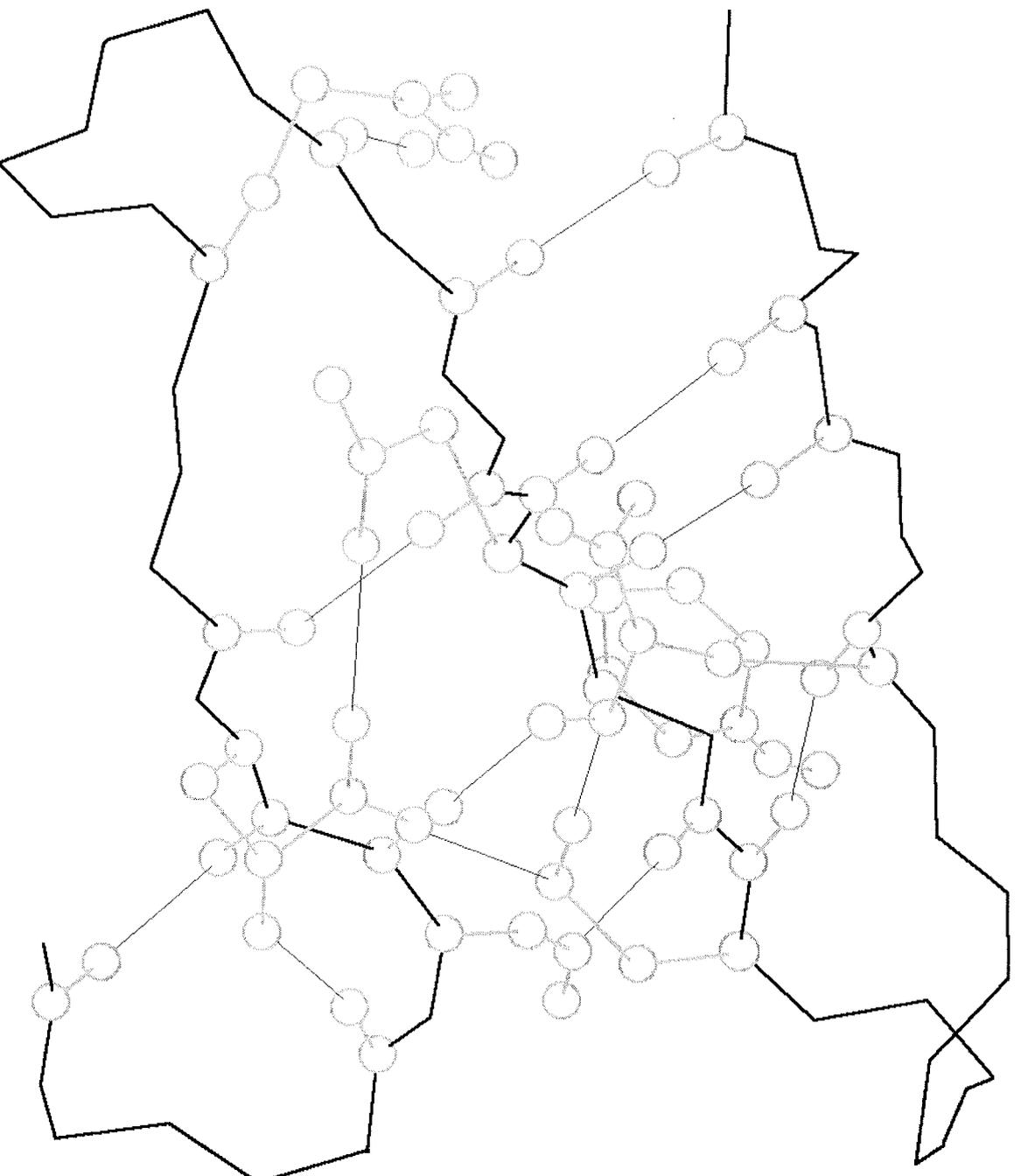


Figura 3b. Legami idrogeno che mantengono la struttura terziaria in una molecola di lisozima, una piccola proteina di circa 13500 Dalton, solo metà della quale è rappresentata in figura. Le linee nere spesse indicano i legami della catena principale, le linee nere sottili i legami idrogeno intramolecolari, le linee grigie altri legami tra gli atomi (sfere) interessati ai legami idrogeno, i soli rappresentati.

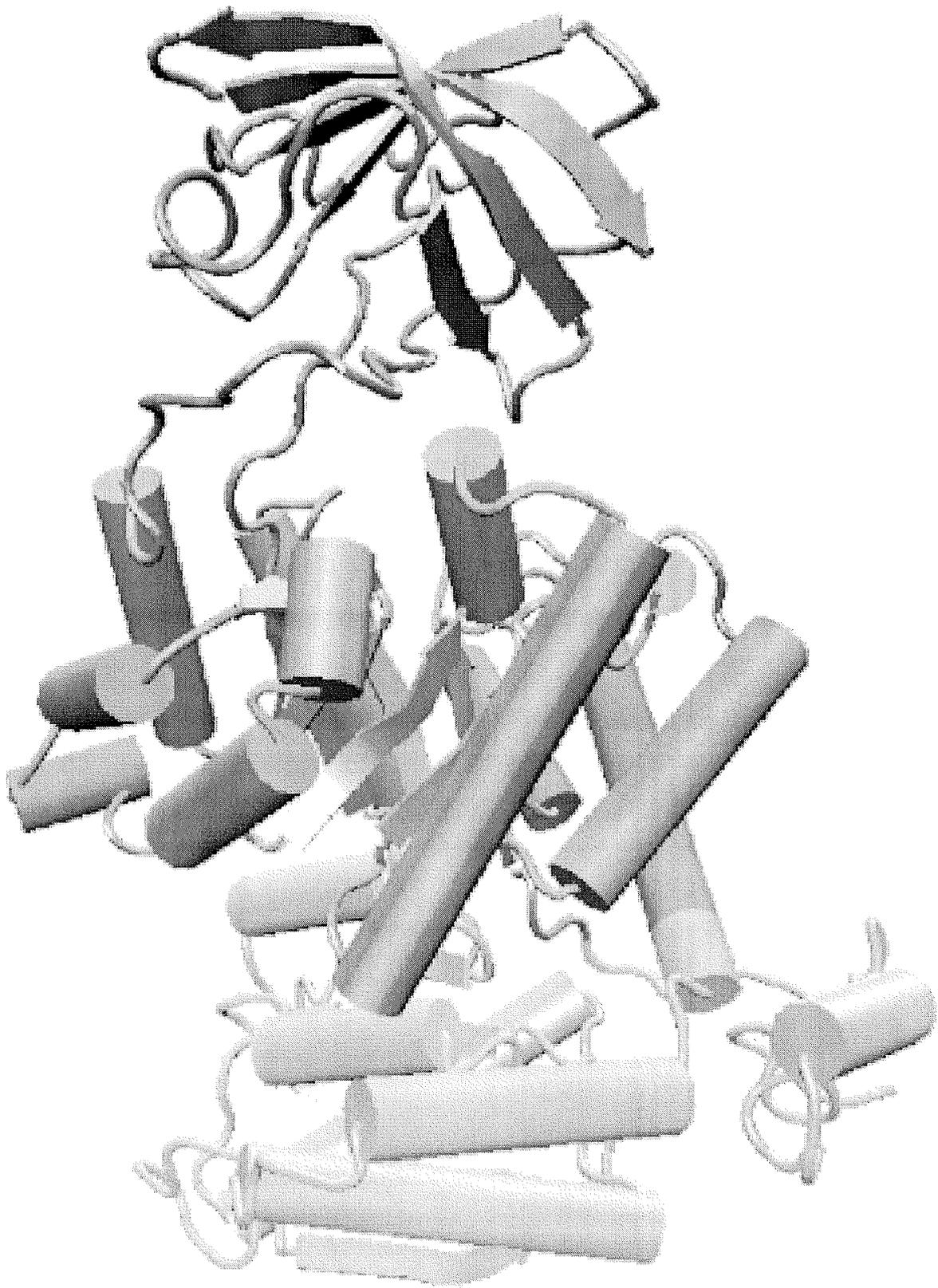


Figura 4a. Modello della piruvato chinasi che mette in evidenza i tre domini (uno costituito da un foglietto β antiparallelo e due costituiti da α eliche che circondano porzioni di piani β). Le frecce identificano porzioni di piano β , i cilindri α eliche, i tondini zone a struttura non riconoscibile.

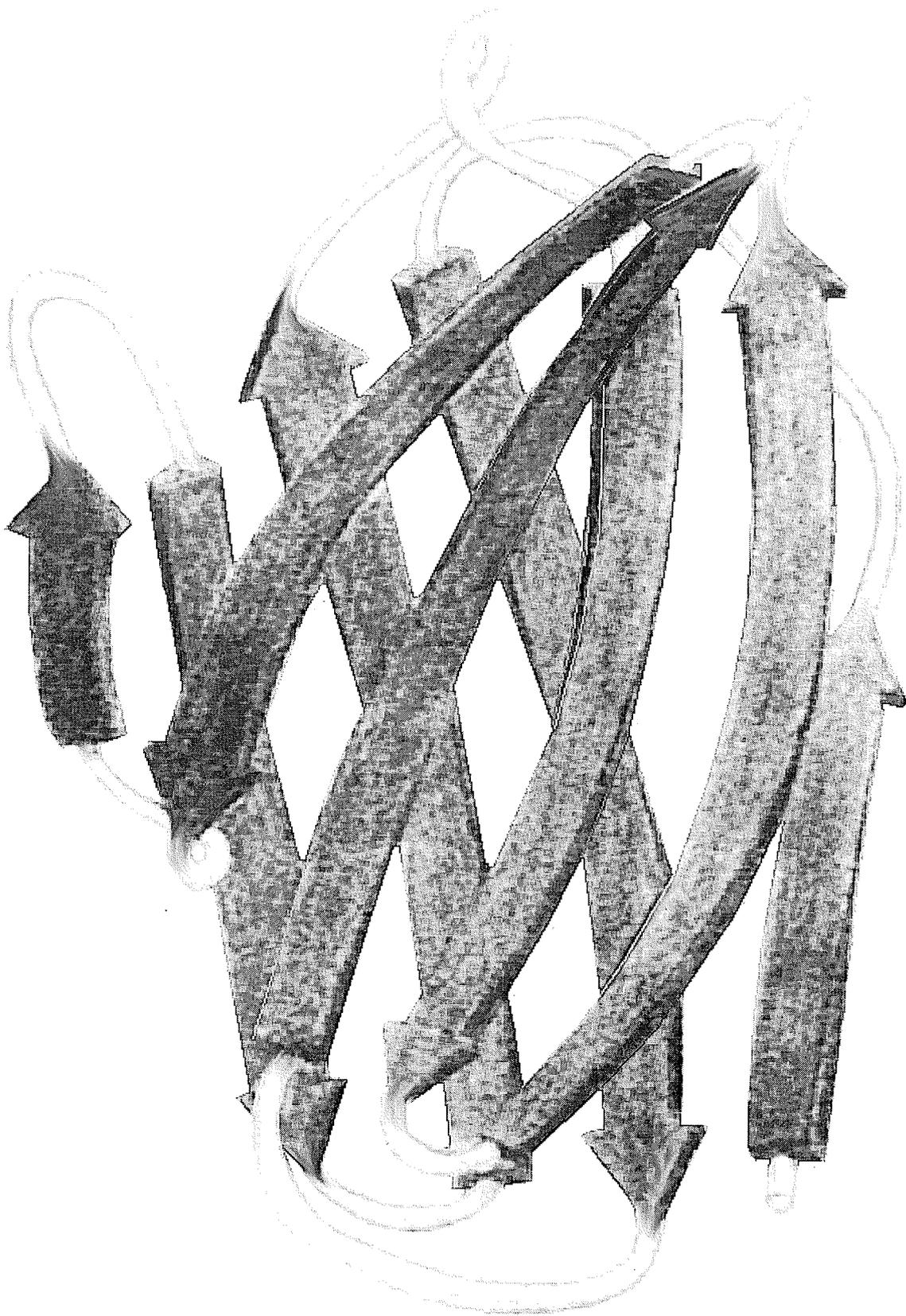


Figura 4b. Modello di un dominio immunoglobulinico (il dominio variabile di una catena leggera di immunoglobulina umana). I domini immunoglobulinici sono costituiti da due piani β antiparalleli, quello in primo piano leggermente distorto. Le frecce rappresentano porzioni β , i tondini rappresentano zone a struttura non definita, disposte in posizione periferica e in corrispondenza delle quali si osservano i cambiamenti di direzione della catena polipeptidica.

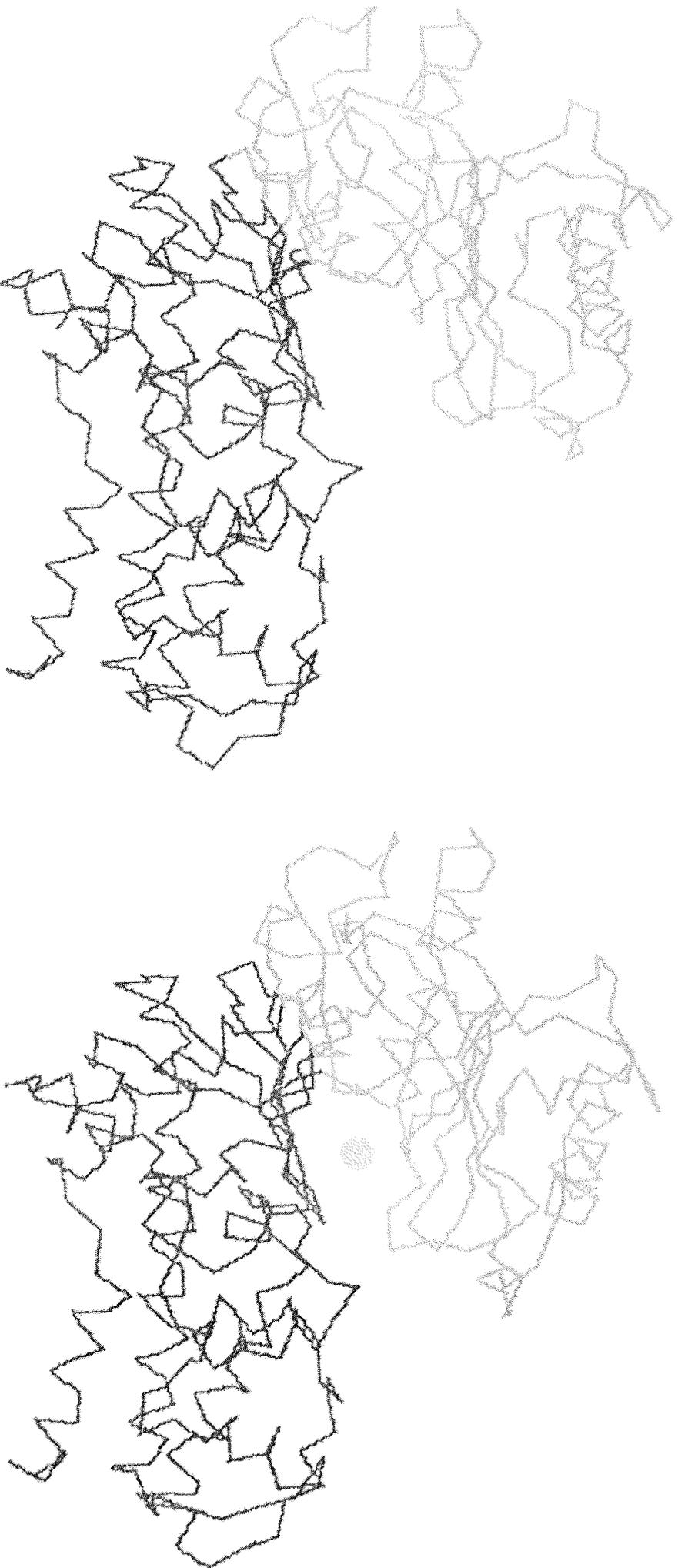


Figura 5. Movimento a blocchi rigidi di una molecola di esochinasi in assenza (a sinistra) ed in presenza (a destra) di glucosio (cerchio grigio). La presenza di questo ligando in un sito posto tra i due domini della proteina induce la loro reciproca rotazione (nell'immagine, del dominio in alto rispetto a quello in basso rappresentato come stazionario) intorno ad una cerniera, mentre altre variazioni conformazionali risultano estremamente modeste. Le linee rappresentano l'andamento della catena principale della proteina, i due domini sono rappresentati in differenti toni di grigio.

Note sulla trasmissione delle informazioni (2) *(revisione 2009, distribuzione AA 2010 - 2011)*

1. Dati introduttivi

Data la divisione delle funzioni metaboliche dell'organismo umano tra un grandissimo numero di cellule diversamente specializzate, per garantire il necessario coordinamento funzionale queste debbono poter comunicare fra loro. Come quelle di tutti gli altri organismi pluricellulari, le cellule umane sono dotate di specifici meccanismi di comunicazione, che si sono evoluti da altri esistenti (in genere con differenti funzioni) negli organismi unicellulari. Infatti, modalità di trasmissione dell'informazione molto simili a quelle esistenti nell'organismo umano sono riscontrabili in molti organismi unicellulari, nei quali i relativi meccanismi garantiscono lo scambio di informazione tra la cellula e il suo esterno. Ciò, sia come scambio di segnali tra cellule omologhe, sia con funzioni di percezione dell'ambiente esterno, come quella di luce o di soluti.

2. Sistemi di trasmissione dell'informazione extracellulare

Negli organismi pluricellulari i sistemi di trasmissione dell'informazione garantiscono il coordinamento funzionale tra le cellule necessario al funzionamento dell'organismo; tuttavia, comunicazioni tra le cellule sono anche indispensabili nel corso dello sviluppo, per il mantenimento delle condizioni morfologiche e fisiologiche e per una corretta rigenerazione dei tessuti danneggiati. Ancora, le relazioni con l'esterno — sotto le quali possono essere comprese le funzioni di organi di senso, ma anche quelle motorie — sono fortemente dipendenti dall'invio di segnali a distanza, verso e dal sistema nervoso. In organismi pluricellulari complessi come quello umano, le funzioni di comunicazione vengono assolte sia dallo scambio di segnali a livello locale che dall'esistenza di sistemi di comunicazione specializzati: il sistema nervoso e quello endocrino (§ 5.2.2.3.2. e § 5.2.2.3.1.). Inoltre, anche il funzionamento del sistema immunitario è fortemente dipendente da informazioni che vengono sia trasmesse nell'ambito del sistema immune stesso, sia scambiate con il resto dell'organismo.

Con l'eccezione di quelli che passano attraverso le giunzioni comunicanti, tutti i segnali dell'organismo vengono trasmessi tra cellula e cellula, esclusivamente sotto forma di molecole appositamente sintetizzate nelle cellule origine e raccolte da strutture specializzate, localizzate sulle cellule bersaglio. Pertanto, le molecole informative, espresse dalle cellule origine, sono veicolate per una distanza ampiamente variabile (nulla nel caso dei segnali di contatto, § 5.2.1.) da liquidi extracellulari e si vanno a legare a molecole proteiche delle cellule bersaglio destinate a riceverle (i recettori). L'interazione delle molecole informative con i recettori induce in questi ultimi cambiamenti conformazionali in grado di indurre, in modo più o meno diretto, specifiche modifiche degli effettori intracellulari delle cellule bersaglio.

3. Eventi nella cellula origine

Ovviamente, le cellule che danno origine al segnale devono essere in grado di sintetizzare le molecole informative, che in alcuni casi (come nel caso dei precursori proteici delle molecole informative peptidiche) possono essere sottoposte a processamenti post-trasduzionali. Le sostanze informative vengono quindi confinate in vescicole di secrezione, che sono veicolate da meccanismi di trasporto ai siti di rilascio. Qui le vescicole vengono fatte fondere con la membrana cellulare da appositi meccanismi, in modo da riversare il loro contenuto nel liquido extracellulare. Meccanismi di secrezione sono assenti nel solo caso dei segnali di contatto, in cui le molecole informative rimangono inserite nella membrana della cellula origine, alla quale si ancorano con apposite porzioni idrofobe.

4. Eventi nella cellula bersaglio

Quando le molecole segnale vengono a contatto con una delle loro cellule bersaglio, si legano ai loro recettori; in effetti, è in primo luogo la presenza dei recettori a definire quali cellule possano essere bersaglio di una specifica sostanza informativa. I recettori sono costituiti da molecole proteiche, tipicamente (ma non obbligatoriamente, vedi oltre) inserite nella membrana plasmatica ed accessibili dall'esterno della

cellula. A seguito dell'interazione con la molecola segnale (ligando), i recettori vanno incontro a specifici cambiamenti conformazionali che danno, più o meno direttamente, origine alle opportune modifiche della cellula bersaglio. Nella maggior parte dei casi, le molecole segnale non entrano nella cellula bersaglio ma — dato che il legame ligando - recettore è reversibile — dopo un periodo di tempo in genere molto breve si staccano dal recettore. In assenza di ulteriore rilascio di ligando, le concentrazioni locali di questo vengono ridotte da differenti meccanismi (vedi § 7), mettendo così fine alla segnalazione. Infine, anche i cambiamenti indotti nella cellula bersaglio sono in genere reversibili, se pur con cinetiche molto diverse da caso a caso.

5. Criteri di classificazione

La comunicazione tra le cellule viene normalmente classificata sulla base o delle caratteristiche chimiche delle molecole segnale oppure della distanza tra cellula origine e la cellula bersaglio.

5.1. Caratteristiche chimiche delle molecole segnale

La struttura chimica delle molecole informazionali determina le loro interazioni sia con il mezzo ambiente che con la membrana cellulare. Riguardo al primo, la polarità delle molecole segnale ne determina la solubilità in solvente polare e, quindi, sia nel liquido extracellulare che nel citoplasma, entrambi molto polari. Pertanto, le molecole informazionali polari, una volta rilasciate dalla cellula origine, vanno in soluzione nel liquido extracellulare (periplasma o torrente ematico) per arrivare ai loro recettori. Al contrario, il trasporto di molecole poco polari (e, quindi, scarsamente solubili in ambiente acquoso) è in genere assicurato da specifiche proteine di trasporto, come le lipoproteine che operano il trasporto ematico degli acidi grassi o, nel caso di molecole informazionali, i trasportatori degli ormoni idrofobici. Va però osservato che, almeno nel secondo caso, la solubilità limite in acqua è in effetti maggiore delle concentrazioni ematiche riscontrabili *in vivo*. In altri termini, alle loro concentrazioni attive, gli ormoni idrofobici sono solubili anche in assenza di trasportatori. Sembra quindi verosimile che il ruolo fisiologico delle proteine di trasporto sia da mettere in relazione a fattori diversi dalla solubilità (vedi § 7.). Va anche osservato che la solubilità nella membrana ha interesse solo per quanto riguarda le cellule bersaglio: infatti, indipendentemente dalla loro polarità, le sostanze secrete dalle cellule origine sono sempre contenute in vescicole di secrezione e attraversano la membrana plasmatica a seguito della fusione delle vescicole con la membrana stessa (vedi: "Note sui meccanismi di passaggio transmembrana", § 6).

Nell'organismo, le considerazioni appena riportate si sostanziano in una netta suddivisione delle molecole informazionali in idrofile ed idrofobe. Le prime, che costituiscono la larga maggioranza delle molecole che portano segnali extracellulari, vanno facilmente in soluzione nel citoplasma ma non sono in grado di attraversare le membrane cellulari. Queste sostanze non entrano nella cellula bersaglio, ma vanno ad interagire con recettori costituiti da proteine integrali di membrana, che trasmettono in sede intracellulare l'informazione circa la presenza delle molecole segnale. Le molecole segnale idrofobe sono invece veicolate nel citoplasma da proteine di trasporto ma, appunto perché idrofobe, sono in grado di attraversare la membrana delle cellule bersaglio nelle quali entrano, andando a legarsi a recettori intracellulari consistenti in proteine solubili citoplasmatiche.

5.2. Distanza percorsa dal segnale

Rispetto a questo criterio, si possono distinguere due classi di ineguale significato funzionale: segnali di contatto e segnali secreti. Nel primo caso, assai meno frequente, le molecole segnale, anziché essere rilasciate nel mezzo ambiente, rimangono inserite nella membrana della cellula origine; nella generalità dei casi, le molecole segnale sono invece rilasciate nel mezzo liquido circostante, mediando quelle che si suole distinguere in trasmissione autocrina, paracrina ed endocrina, nonché quella sinaptica. In realtà queste categorie sono in parte artificiali, sia per fattori di sovrapposizione funzionale che per molteplicità di ruoli che caratterizza molte sostanze informazionali.

5.2.1. Segnali di contatto. Solo in questo caso, i segnali sono portati da molecole che — a causa della presenza di porzioni idrofobe — restano inserite nella membrana delle cellule dalla quale vengono espresse. In conseguenza, le cellule origine devono venire a contatto fisico con le cellule bersaglio. Pertanto, dato che le molecole informazionali fanno parte della membrana della cellula origine, non sono presenti i meccanismi di rilascio tramite vescicole caratteristici delle molecole segnale solubili. Ad esempio, molte cellule — anche

in coltura — crescono soltanto fino a confluenza, cioè fino al punto in cui le cellule si toccano, per l'intervento di segnali di arresto, forniti da strutture presenti sulla superficie delle cellule interagenti. Fattori di contatto giocano un ruolo rilevante nello sviluppo embrionale e nella proliferazione e rigenerazione tissutale. Ben noto — oltre che di notevole rilevanza funzionale e — è il caso del sistema immune, relativamente a citochine, chemochine nonché al legame degli antigeni (più esattamente, degli epitopi) legati alle proteine del maggior complesso di istocompatibilità (le proteine MHC) con i recettori delle cellule T.

5.2.2. Segnali secreti. Al contrario di quelle che mediano segnali di contatto, tutte le altre molecole informative sono secrete, sono cioè liberate in forma solubile per esocitosi dalle cellule di origine. Una volta rilasciate, queste sostanze vanno ad interagire con recettori delle cellule bersaglio, localizzati ad una distanza ampiamente variabile dalle cellule origine.

5.2.2.1. Segnali locali. Possono essere considerati locali tutti i segnali trasmessi da molecole secrete che non sono veicolate da appositi sistemi ed hanno, quindi, una diffusione fisica ristretta. Infatti, sia nel corso dell'embriogenesi come anche nel normale funzionamento dell'organismo, numerosissimi segnali forniscono alle cellule informazioni relative allo stato dei tessuti circostanti, permettendo così il corretto funzionamento delle entità sopracellulari. In altri termini, le cellule debbono essere in grado di modificare il loro stato funzionale in rapporto alle condizioni del loro ambiente, che sono segnalate da appositi segnali. È in larga misura l'esistenza di questi segnali che permette ai tessuti di mantenere la loro specifica identità e il loro stato funzionale. Quindi, questi fattori sono — ovviamente in parte — controllati da segnali esterni, forniti soprattutto dalle cellule circostanti. Ad esempio, lo sviluppo e il mantenimento degli organi è controllato da segnali che possono essere schematicamente distinti in due classi: quelli che indirizzano lo sviluppo delle cellule neofornate verso condizioni morfologiche simili a quelle delle cellule circostanti (non obbligatoriamente identiche: ad esempio, le cellule della mucosa gastrica non sono tutte uguali) e quelli che controllano la struttura dell'intero organo (ad esempio, il fatto che lo stomaco mantenga la sua forma caratteristica, che il piloro sia localizzato in contiguità con l'intestino e così via). Infatti, gli organi hanno — tra l'altro — una forma specifica, il mantenimento della quale è affidato all'esistenza di gradienti dei segnali multipli che controllano la proliferazione cellulare. Questi segnali agiscono sia in positivo che in negativo, nel senso che la presenza di opportuni segnali è assunta come indice del corretto stato dell'organo, mentre la loro assenza, anche parziale, induce il rilascio di altri segnali destinati al recupero morfologico o funzionale. In fine, fattori di compartimentazione contribuiscono a limitare il "disturbo" reciproco dei segnali relativi a tessuti od organi vicini (vedi sotto).

5.2.2.1.1. Trasmissione paracrina. La segnalazione paracrina, che costituisce la tipica trasmissione locale, riveste una grandissima importanza fisiologica nel coordinare l'attività metabolica di organi e sistemi, nell'accrescimento e nella rigenerazione tissutale. Si definisce come paracrina la segnalazione che è trasmessa da molecole la cui "estensione fisiologica" è solo locale, nei termini espressi sopra. Ossia, quando i meccanismi che limitano la diffusione del segnale operano in modo da contenerla entro l'organo o tessuto da cui proviene. La limitazione della diffusione dei segnali avviene per fattori di compartimentazione, sia fisica che funzionale. La prima è relativa alla localizzazione anatomica dei recettori in grado di raccogliere il segnale e alle barriere, appunto fisiche, che si oppongono alla diffusione delle molecole segnale. La seconda consiste nell'azione dei meccanismi di inattivazione delle molecole informative descritti oltre (§ 7).

5.2.2.1.2. Trasmissione autocrina. Nel caso della così detta trasmissione autocrina — che può essere considerata un caso speciale di trasmissione paracrina — l'origine ed il bersaglio del segnale sono localizzati in cellule omologhe, appartenenti cioè alla stessa popolazione cellulare. Le molecole informative vanno quindi ad interagire con recettori posti su cellule uguali a quelle dalle quali sono state liberate (al limite, anche sull'identica cellula origine). Meccanismi di questo tipo esercitano un controllo a retroazione sulla secrezione, sulla differenziazione cellulare (cellule che raggiungono uno specifico stadio differenziativo possono emettere segnali che inducono lo stesso stadio differenziativo anche nelle cellule vicine), sulla proliferazione cellulare e — nel caso delle citochine — sul funzionamento del sistema immune: regolazione autocrina si ha ad esempio nella proliferazione dei linfociti T mediata dalla produzione di fattori di crescita (come l'IL-2) prodotti dai linfociti T stessi. È stata proposta una regolazione autocrina anche nel caso del rilascio degli eicosanoidi e di fattori di crescita propriamente detti (ad esempio, l'EGF, epidermal growth factor o l'NGF, nervous growth factor) nonché dell'insulina, evolutivamente collegata con questi.

5.2.2.2. Trasmissione a distanza. Infine, nella trasmissione endocrina e sinaptica nonché nel sistema immunitario i segnali sono trasmessi ad una distanza variabile, anche rilevante in relazione alle dimensioni dell'organismo, ma sempre al di fuori dell'ambito locale come definito sopra. Nel sistema endocrino le molecole segnale sono riversate nel torrente ematico, che le veicola fino agli organi bersaglio. In questo caso

il segnale può quindi coprire una distanza relativamente grande in un tempo relativamente breve. Sono veicolate dal sangue moltissime sostanze con valore informativo: ormoni in senso stretto (cioè le molecole informative secrete dalle ghiandole endocrine), modulatori, fattori di crescita, la maggior parte delle citochine, e così via. Nel caso del sistema nervoso, il segnale compie la massima parte del suo percorso all'interno della cellula origine, specificamente all'interno di prolungamenti della cellula stessa (gli assoni), viene trasformato in segnale chimico a livello delle sinapsi, passa come tale attraverso lo spazio sinaptico e viene trasdotto dai recettori sulla cellula bersaglio. In entrambi i casi, vengono utilizzati i meccanismi generali dei segnali secreti: le molecole informative sono sintetizzate all'interno della cellula origine, trasportate fino alla membrana plasmatica e rilasciate in un mezzo liquido e raccolte da specifici recettori. Anche nel sistema immunitario, le sostanze informative che sono veicolate dal plasma e dalla linfa possono diffondere in tutto l'organismo.

5.2.2.2.1. Trasmissione endocrina. I mediatori endocrini, ossia gli ormoni, a seconda della loro struttura chimica si possono classificare in due classi, che ne determinano le modalità di trasporto, di passaggio transmembrana e di trasduzione del segnale nelle cellule bersaglio: quella degli ormoni idrofili e quella degli ormoni idrofobi.

La classe quantitativamente più importante è quella degli ormoni idrofili, la cui caratteristica comune è di essere costituiti da molecole polari o, più correttamente, da molecole di polarità sufficiente da garantire una buona solubilità in acqua (e, quindi, sia nel citoplasma che nei liquidi extracellulari). In conseguenza, come descritto sopra, questi ormoni non possono attraversare la membrana cellulare e l'informazione relativa è passata all'interno della cellula per interposizione di recettori di membrana. Polarità a parte, gli ormoni idrofili non presentano omogeneità strutturali. Possono essere ricordati gli ormoni peptidici che, come indica il loro nome, sono polipeptidi con lunghezza di catena variabile da pochi residui fino alle dimensioni di piccole proteine; gli ormoni glicoproteici, che sono (ovviamente) glicopeptidi, ad esempio, le gonadotropine ipofisarie. Altri ormoni idrofili sono classificati — in termini piuttosto generici — come fenolici (in genere, derivati fenolici degli amminoacidi) come le catecolammine, la tiroxina e la tiramina.

Al contrario di quelli idrofili, gli ormoni idrofobi sono costituiti dalle due classi molto omogenee degli ormoni steroidei e tiroidei. Gli ormoni steroidei, formalmente derivabili dal colesterolo che ne costituisce anche il più importante precursore, presentano un caratteristico scheletro con 17 atomi di carbonio riuniti in 4 anelli condensati. Gli ormoni tiroidei sono formalmente derivabili dalla iodinazione di amminoacidi aromatici (tirosina e tironina). Come accennato in precedenza (§ 2.1), gli ormoni di queste due famiglie sono veicolati da appositi trasportatori proteici la cui presenza ne condiziona varie caratteristiche funzionali (soprattutto clearance e velocità di passaggio transmembrana). Data la loro scarsa polarità, questi ormoni sono in grado di attraversare la membrana plasmatica e quindi di interagire con i loro recettori citoplasmatici.

5.2.2.2.2. Trasmissione sinaptica. L'altro fondamentale meccanismo di trasmissione a distanza è quello sinaptico, specifico del sistema nervoso. Va di nuovo sottolineato che le peculiarità della trasmissione sinaptica sono essenzialmente anatomiche, dato che la cellula origine si prolunga fisicamente fino ad una distanza di poche decine di micron dalla cellula bersaglio. Tuttavia, le molecole informative (i mediatori sinaptici), sintetizzate all'interno della cellula origine, sono trasportate fino alla membrana sinaptica, vengono liberate per esocitosi, diffondono nel liquido extracellulare (nel caso specifico, lo spazio sinaptico) e vengono raccolte da specifici recettori come tutte le altre molecole informative. Le peculiarità anatomiche del sistema nervoso consentono però di selezionare le cellule bersaglio con estrema precisione, permettendo di limitare la trasmissione del segnale a singole cellule, o anche a una zona ristretta di una singola cellula, ciò che non sarebbe possibile in assenza di questa specifica organizzazione. In più, la velocità di trasmissione dei segnali — che viaggiano per la massima parte del loro percorso all'interno dei neuroni — è molto maggiore (fino a circa 100 m/sec negli assoni mielinici) di quella possibile per i segnali trasmessi per diffusione o anche di quelli trasportati dal flusso ematico. Come contropartita, la complessità anatomica ed il costo metabolico della trasmissione nervosa sono relativamente elevati. Infine, i segnali nervosi, oltre che trasmessi rapidamente, sono anche rapidamente inattivati da meccanismi molto efficienti di degradazione e di ricaptazione dei mediatori (nel secondo caso, anche di loro prodotti di trasformazione).

6. Limitazione dell'attività del segnale

In tutti i casi di trasmissione a distanza esistono meccanismi, spesso multipli, che permettono di limitare l'azione dei segnali a bersagli più o meno spazialmente circoscritti. Nel caso della trasmissione nervosa questo risultato viene raggiunto dalla combinazione dell'organizzazione micro-anatomica e di efficienti

meccanismi di inattivazione (§ 7). Negli altri casi l'estensione funzionale del segnale è fondamentalmente limitata da tre fattori: in primo luogo i recettori in grado di legare determinate molecole segnale sono espressi solo da popolazioni cellulari selezionate; quindi, indipendentemente dalla loro accessibilità, soltanto le cellule che posseggono i recettori per specifiche sostanze informative sono in grado di rispondere alla loro presenza. Inoltre, le sostanze informative possono essere compartimentate dall'esistenza di barriere fisiche che ne limitano la diffusione, così restringendone il raggio d'azione. In fine, l'esistenza di meccanismi di inattivazione descritti oltre limita "l'estensione temporale" delle molecole informative. Tutti questi meccanismi limitano l'effetto delle molecole informative in modo che dipende dal rapporto tra la loro efficienza e la velocità di rilascio.

7. Meccanismi di inattivazione del segnale

Caratteristica comune a tutti i sistemi di trasmissione delle informazioni è la presenza di meccanismi destinati a limitare nel tempo l'azione delle sostanze informative. Infatti, le risposte fisiologiche dell'organismo adulto devono essere modulabili anche nel caso di effetti duraturi. Va anche osservato che non è normalmente sufficiente porre fine all'azione delle sole molecole informative ma, in genere, devono essere disattivati anche i meccanismi attivati da queste. Quindi, i meccanismi di inattivazione extracellulari brevemente descritti qui, devono coesistere con meccanismi intracellulari (vedi: "Note sui secondi messaggeri", § 4). Nell'intorno immediato dei recettori, le concentrazioni delle sostanze informative sono riportate verso livelli di base sia dalla diffusione — che costituisce un meccanismo ovviamente aspecifico — che da meccanismi specifici. Questi ultimi sono costituiti da reazioni enzimatiche (idrolisi idrossilazione, decarbossilazione, metilazione...) che trasformano la sostanza attiva in metaboliti inattivi, dalla ricaptazione (ossia trasporto attivo del trasmettitore oppure di suoi metaboliti in sede intracellulare: le concentrazioni effettive sono quelle periplasmatiche) e dall'escrezione prevalentemente — ma non esclusivamente — renale e in minor misura biliare. Alcuni di questi meccanismi sono quelli cui si è accennato in precedenza a proposito della limitazione dell'azione delle molecole segnale, visti in un'ottica funzionale diversa.

Un esempio tipico è costituito dalle colinesterasi che idrolizzano l'acetilcolina nello spazio sinaptico. Dato che le sinapsi colinergiche sono utilizzate nel caso di segnali che richiedono un'elevata focalizzazione temporale, l'efficienza del relativo sistema di degradazione è particolarmente elevata, e l'emivita dell'acetilcolina nello spazio sinaptico di soli 200 μ sec. Un altro caso significativo è quello delle proteasi che controllano le concentrazioni dei peptidi informativi veicolati dal plasma. La presenza di questi enzimi limita, anche molto drasticamente, la durata della vita attiva di questi peptidi: ad esempio, nell'uomo le enkefaline (i più piccoli peptidi oppioidi) hanno emivite di poche centinaia di secondi. Queste emivite contrastano con quelle di molti ormoni idrofobici, che sono degradati in sede epatica, emivite che possono arrivare ai 6-7 giorni nel caso della tiroxina. Va anche notata l'esistenza nel plasma di inibitori delle proteolisi, che esercitano un controllo negativo sull'attività di questi enzimi. Pertanto molti dei peptidi liberati nel plasma sono soggetti ad un doppio controllo: sul loro rilascio e sulla loro degradazione. Quest'ultima è a sua volta regolata secondo il classico meccanismo omeostatico positivo-negativo (in questo caso idrolisi ed inibizione dell'idrolisi). Ancora, l'efficienza di molte delle reazioni che avvengono nel plasma in alcuni casi è ridotta dal legame con proteine plasmatiche. Infatti, per motivi sterici, solo le molecole libere (che possono anche essere una percentuale assai piccola del totale) possono avere accesso ai siti attivi degli enzimi (o possono essere oggetto di trasporto attivo o altrimenti processate).

8. Molteplicità funzionale

La gran parte dei trasmettitori conosciuti ha funzioni multiple: per citare alcuni esempi, la noradrenalina agisce come mediatore sinaptico, sia centrale che periferico, ma anche come ormone, liberato dalla midollare del surrene. I peptidi oppioidi hanno ruolo di modulatori centrali, sono secreti come ormoni dalla midollare del surrene e sono presenti nell'apparato digerente — dove controllano la motilità gastrica — nel sistema immunitario, ed in numerosi altri tessuti. Ancora, la gastrina controlla la secrezione gastrica (da cui il nome) ma è anche un mediatore centrale. La polivalenza funzionale delle molecole segnale va tenuta in evidenza per un corretto inquadramento dei loro ruoli funzionali, che in moltissimi casi corrispondono solo parzialmente a quelli tradizionalmente attribuiti loro.

Un caso particolarmente rilevante di polivalenza funzionale è costituito dal ruolo di regolazione della crescita e della plasticità neuronale svolto nel tessuto nervoso dai neurotrasmettitori. In estrema sintesi, il rilascio di neurotrasmettitori e l'attività elettrica associata, hanno azione di controllo sulla crescita neuritica. Ciò

comporta che il rilascio di neurotrasmettitore moduli, in positivo ed in negativo, lo sviluppo dei circuiti neuronali. Ad esempio, è noto che il glutammato controlla la plasticità dei neuroni piramidali dell'ippocampo, e si suppone che questi effetti possano essere coinvolti sia nella formazione dei circuiti neuronali durante lo sviluppo che nel loro mantenimento e modifica nell'adulto. Si suppone che l'esistenza di questo controllo possa contribuire a fenomeni di fondamentale importanza come la memoria a lungo termine e le sue modifiche in funzione dell'esperienza (l'apprendimento). Va anche osservato che questo tipo di fenomeni non è limitato al sistema nervoso, ma che la sopravvivenza della maggior parte delle cellule è condizionata dalla loro possibilità di ricevere segnali, la mancanza o un eccesso dei quali può indurre fenomeni di apoptosi.

9. Interazioni tra sistemi di trasmissione dell'informazione

Data la sostanziale omogeneità funzionale esistente tra i sistemi di trasmissione dell'informazione, non dovrebbe destare meraviglia il fatto che questi interagiscano fra loro. In realtà, l'esistenza di interazioni tra i vari sistemi non è sempre ovvia. Ad esempio, è nozione corrente che il sistema endocrino agisce sotto il controllo del sistema nervoso centrale tramite l'ipotalamo e la neuroipofisi. Al contrario, le basi biochimiche delle interazioni bidirezionali tra il sistema nervoso e quello immune sono state accertate soltanto in tempi relativamente recenti. In generale, la possibilità di interazioni tra differenti sistemi di comunicazione dipende dall'esistenza di sostanze informazionali, e dei loro recettori, in comune ai due sistemi, nonché dall'accessibilità fisica dei recettori alle sostanze informazionali (vedi § 6). In altre parole, ciò significa che possono stabilirsi interazioni quando due sistemi hanno molecole informazionali in comune e quando le sostanze rilasciate da un sistema possono fisicamente raggiungere l'altro, come avviene appunto nel caso delle interazioni neuroimmuni. In questo caso, infatti, recettori per vari neuropeptidi sono inseriti nella membrana di cellule immunocompetenti, e recettori per un certo numero di citochine (mediatori del sistema immune) sono presenti in cellule nervose. Inoltre, sostanze informazionali relative ad entrambi i sistemi sono rilasciate nel plasma. Pertanto alcune citochine — che passano la barriera ematoencefalica — sono in grado di modulare differenziamento, attività e sopravvivenza di cellule nervose, mentre neuropeptidi di origine centrale modulano l'attività del sistema immunitario.

Note sui meccanismi di passaggio transmembrana (3)

(revisione 2010, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Argomento

Sono qui esaminate le modalità di passaggio transmembrana di molecole e ioni, con speciale riferimento ai meccanismi connessi con la trasmissione dell'informazione extracellulare. Al contrario del passaggio di sola informazione operato dai recettori e descritto altrove, questi meccanismi comportano un trasferimento fisico da una parte all'altra di una membrana. In generale, molecole di bassa polarità possono attraversare le membrane formando legami deboli con il lipide, mentre molecole abbastanza piccole possono sfruttare l'esistenza di transienti irregolarità della compagine lipidica. Quando carica e/o massa molecolare rendono impossibili questi processi, il passaggio avviene tramite specifiche proteine di membrana, ossia canali idrofili e proteine trasportatrici. In fine, macromolecole e porzioni di liquido sono veicolati tramite vescicole. Pertanto, si possono schematicamente distinguere le seguenti modalità: 1. passaggio diretto; 2. passaggio tramite irregolarità della membrana; 3. passaggio passivo tramite canali idrofili; 4. passaggio (attivo o passivo) tramite trasportatori proteici; 4. passaggio mediato da vescicole.

2. Passaggio diretto e tramite irregolarità della membrana

Il passaggio diretto attraverso le membrane è controllato da due fattori: polarità e massa molecolare. La polarità delle particelle determina le loro possibilità di interagire con i lipidi di membrana (più correttamente, data l'anfipaticità dei fosfolipidi che ne costituiscono la maggior componente, con le loro catene alifatiche). Quindi, molecole poco polari tendono a passare attraverso le membrane, mentre quelle polari non le attraversano con velocità significativa. Per quanto concerne la massa molecolare, questo parametro è essenzialmente correlato alla distorsione della compagine della membrana indotta dal passaggio della particella. Dato che questo processo comporta rottura e riformazione dei legami che mantengono la compagine lipidica, l'energia richiesta per il processo risulterà tanto maggiore quanto maggiore sarà il numero di questi legami e, quindi, la dimensione della molecola che deve attraversare la membrana. Siccome le probabilità di ottenere dall'ambiente l'energia necessaria per qualsiasi processo decrescono all'aumentare dell'energia richiesta, a maggiore richiesta energetica corrisponde minore probabilità che questa possa essere fornita in un determinato intervallo di tempo: nel caso specifico, le minori probabilità si sostanziano, quindi, come ridotta velocità di passaggio. Pertanto, in prima approssimazione la velocità di passaggio diretto è funzione inversa sia della polarità che della massa molecolare.

Nelle membrane lipidiche opera un secondo meccanismo, causato dall'esistenza di irregolarità nell'impaccamento delle catene alifatiche dei fosfolipidi. Queste irregolarità originano da rotture casuali — indotte dall'energia termica — dei legami deboli che tengono unite le catene alifatiche. Alcune di queste irregolarità sono in grado di formare micro cavità di un diametro medio intorno agli 8 Å; inoltre, il rapporto tra la dimensione delle cavità e lo spessore delle membrane lipidiche (20 - 25 Å) è tale da rendere possibile che queste possano propagarsi attraverso tutto lo spessore della membrana. Le cavità che si formano in corrispondenza di una delle due facce della membrana e che si propagano fino all'altra faccia possono veicolare specie di dimensioni tali da potere essere alloggiate nella cavità stessa. Siccome le molecole dimensionalmente in grado rimanere intrappolate nelle cavità in formazione vengono veicolate in modo poco selettivo, l'efficienza di questo meccanismo dipende in prima istanza da fattori statistici, ossia dall'ammontare relativo dalle due parti della membrana delle popolazioni molecolari interessate. Specificamente, dato che l'acqua è di gran lunga la specie più rappresentata su entrambi i versanti delle membrane, questo meccanismo porta un contributo molto più significativo al trasporto di acqua che non delle altre specie di dimensioni molecolari comparabili. L'efficacia di questo meccanismo dipende anche dalla quantità relativa di fosfolipide nella specifica membrana (variabile in membrane differenti) che è normalmente intorno al 50%.

La velocità di passaggio transmembrana si suole esprimere mediante il cosiddetto coefficiente di permeabilità lineare. Questo indica il tempo in secondi impiegato da una particella ad percorrere 1 cm, ed ha quindi la dimensione di cm/sec o, con una notazione più sofisticata, di $\text{cm} \times \text{sec}^{-1}$.

2.1. Sostanze di elevata polarità

Come accennato, eccetto che nel caso dell'acqua, le velocità di passaggio diretto delle specie polari e degli ioni non sono fisiologicamente significative. Infatti, le specie polari sono in grado di formare con il solvente, ossia l'acqua citoplasmatica o extracellulare, legami energeticamente molto più favorevoli (di almeno un ordine di grandezza) di quelli che potrebbero formare con il lipide. Quindi, uno spostamento dalla fase polare alla fase non polare sarebbe energeticamente sfavorevole, ciò che si traduce in velocità di passaggio assai basse: ad esempio, le velocità di attraversamento della membrana di cationi come gli ioni Na^+ (gli anioni hanno velocità di passaggio misurabilmente più alte dei cationi, un fatto di spiegabilità tuttora problematica) è intorno ad 1×10^{-12} cm/sec; nel caso del glucosio (una specie polare del peso molecolare di 180 daltons) questo valore è circa 3×10^{-11} cm/sec. Dato che queste velocità non sono funzionalmente significative (una molecola di glucosio impiegherebbe 2 ore per passare attraverso una membrana di 20 Å), il passaggio di specie polari deve essere garantito dai meccanismi (canali idrofili e proteine di trasporto) descritti oltre.

2.2. Sostanze di media polarità

Secondo quanto detto sopra, il passaggio transmembrana delle sostanze di media polarità è approssimativamente proporzionale all'inverso delle dimensioni molecolari e del momento dipolare. Il coefficiente di permeabilità per molecole di medio momento dipolare varia tra 1×10^{-2} cm/sec per un peso molecolare intorno ai 20 daltons fino a circa 1×10^{-7} cm/sec per un peso molecolare di 200 daltons, valore questo corrispondente ad una velocità di passaggio transmembrana funzionalmente trascurabile. Va di nuovo osservato che, non ostante la sua elevata costante dielettrica, l'acqua passa molto velocemente attraverso le membrane cellulari. In membrane artificiali (cioè in assenza di canali idrofili e di proteine di trasporto) nelle quali il meccanismo di passaggio principale dovrebbe essere costituito da microcavità, il coefficiente di permeabilità dell'acqua è infatti di circa 3×10^{-3} cm/sec. *In vivo*, tuttavia, l'acqua passa prevalentemente attraverso diversi canali idrofili, ed il suo coefficiente di permeabilità è molto maggiore del valore appena riportato. Infatti, non solo esistono canali specifici per il passaggio dell'acqua (le acquaporine), ma tutte le specie che passano tramite canali idrofili e proteine di trasporto sono idratate e ciò comporta che ogni particella trasportata si porti dietro varie molecole d'acqua.

2.3. Sostanze di bassa polarità

Per motivi inversi a quelli descritti sopra le molecole poco polari, anche di dimensioni relativamente grandi, passano facilmente attraverso le membrane. Come già riportato, non essendo in grado di formare legami energeticamente favorevoli con la fase polare, queste sostanze tendono infatti formare legami deboli con le catene alifatiche dei fosfolipidi. Queste specie tendono, quindi, ad essere escluse dalla fase acquosa ma ad essere molto solubili nella parte centrale della membrana. In conseguenza, si verifica un trasferimento dalla fase acquosa alla membrana, che si sostanzia in un'elevata velocità di passaggio. Ad esempio, i coefficienti di permeabilità degli ormoni steroidei sono significativi, non ostante il loro peso molecolare (intorno a 300 daltons).

2.4. Sostanze gassose

Tanto l'ossido nitrico che l'ossido di carbonio (vedi "Note sui messaggeri intracellulari", § 8) mediano sia segnali extracellulari locali che segnali intracellulari. Questi gas diffondono molto liberamente sia nell'interno delle cellule di origine che fuori di queste e, per quanto interessa qui, attraverso le membrane. Pertanto, queste sostanze possono essere classificate sia tra i mediatori extra- che tra quelli intracellulari.

3. Trasporto mediato da proteine

Tutti gli ioni e le molecole non in grado di attraversare la membrana con i meccanismi appena descritti sono trasportate da apposite strutture proteiche. Tale trasporto può avvenire senza consumo di energia (trasporto passivo), quando il passaggio avviene secondo un gradiente di concentrazione o di campo elettrico, oppure consumando energia (trasporto attivo), quando il passaggio avviene contro gradiente e l'energia necessaria deve essere ottenuta da una fonte esterna. Dal punto di vista delle strutture coinvolte, il trasporto passivo avviene tramite canali idrofili o tramite proteine di trasporto che funzionano senza dispendio energetico diretto, operando la così detta diffusione facilitata, mentre il trasporto attivo avviene solo tramite proteine di trasporto.

3.1. Canali idrofili

Le strutture di trasporto passivo concettualmente più semplici sono costituite dai così detti canali idrofili. Questi sono proteine di membrana che determinano un canale fisico circa normale al piano della membrana che ne attraversa l'intero spessore e che, mettendo in comunicazione i due compartimenti liquidi separati dalla membrana, permette un passaggio passivo di particelle. L'energia necessaria per effettuare il passaggio è fornita dalla differenza di concentrazione e, se applicabile, di carica tra le due facce della membrana. Il trasporto è quindi passivo nel senso che non esiste una sorgente di energia direttamente accoppiata alla struttura che effettua il trasporto; tuttavia, deve venire sfruttata indirettamente l'energia spesa per creare il gradiente, energia che deve comunque essere consumata per ripristinarlo. Di queste strutture, qui sono descritte acquaporine e connessioni, mentre i canali ionici sono descritti altrove. Va peraltro notato che quelle descritte non sono tutte le strutture di questo genere in atto conosciute: ad esempio anche le porine, proteine essenzialmente batteriche ma presenti anche nella membrana di alcuni organelli (nell'uomo, nei mitocondri), controllano la diffusione di ioni e metaboliti.

3.1.1. Acquaporine

Molte cellule, segnatamente cellule epiteliali con funzioni di trasporto come quelle renali o del tratto gastrointestinale, possono essere esposte a significativi cambiamenti di osmolarità. Inoltre, cellule metabolicamente attive, ad esempio gli epatociti, possono generare composti osmoticamente attivi da precursori inattivi, o viceversa. Dato che le membrane cellulari hanno una resistenza estremamente limitata alla trazione (e, quindi, al rigonfiamento), è necessario che l'equilibrio osmotico tra l'interno e l'esterno della cellula sia mantenuto entro limiti ristretti. Il riequilibrio osmotico può essere effettuato trasportando sia acqua che specie osmoticamente attive. In effetti, esistono canali ionici — come quelli per il cloro — che svolgono questa seconda funzione; tuttavia, il maggior contributo al riequilibrio osmotico è ottenuto con il passaggio di acqua. Questo può avvenire in modo aspecifico tramite le microcavità descritte sopra (§ 2.) e come acqua di idratazione delle specie trasportate attraverso i canali idrofili e le proteine di trasporto. La maggior parte dell'acqua passa però in modo specifico, tramite appositi canali, nell'uomo essenzialmente le acquaporine. Queste proteine, ampiamente espresse in varie cellule epiteliali ed endoteliali, rendono infatti conto di una percentuale della permeabilità all'acqua che, in cellule come le emazie in cui è particolarmente elevata, può arrivare fino al 90% del totale.

Le acquaporine costituiscono una famiglia di proteine di membrana, tutti i membri della quale sono formati da omotetrameri di una catena polipeptidica del peso molecolare di circa 30 kdaltons. Le porzioni N- e C-terminali dei monomeri presentano una struttura primaria che si ripete (nel senso ABCABC, le due porzioni sono poi ruotate di 180°) rispetto ad un punto equidistante dai due terminali (Figura 1a), un dato che fa supporre la loro origine da duplicazione genica; in conseguenza, i singoli monomeri sono quasi-simmetrici rispetto ad un piano perpendicolare alla membrana e passante per il canale (vedi Figura 1c). Facendo riferimento alle acquaporine delle emazie e dei tubuli prossimali AQP1, la struttura secondaria (Figura 1a) comporta sei α eliche transmembrana e due altre inserite nella membrana; le α eliche transmembrana sono ovviamente interspaziate da (5) segmenti idrofili privi di struttura secondaria riconoscibile. Tuttavia due di questi hanno tratti idrofobi che si ripiegano nell'interno della membrana, formando le due α eliche completamente comprese nella membrana; inoltre, questi segmenti portano anche i filtri ar/R e i motivi NPA (vedi oltre). Le α eliche transmembrana sono disposte intorno ad un asse centrale ideale, circa parallele tra loro e piuttosto inclinate rispetto al piano della membrana (Figura 1b), determinando il canale fisico. In fine, come accennato, quattro monomeri si assemblano in un tetramero molto stabile (si formano, tra l'altro, coiled coils fra eliche di subunità adiacenti), che comprende quattro canali fisici indipendenti (Figura 1c).

Almeno nelle AQP1, il canale fisico consiste in due porzioni circa coniche, extra- ed intracellulari, del diametro massimo (alle estremità) di circa 15 Å, connesse da un canale lungo (20 Å) e stretto (4 Å, 3 nel punto più stretto). Molto insolitamente, questo è in larga misura idrofobo, ma caratterizzato dalla presenza di residui carichi, con le catene laterali dei quali le molecole d'acqua formano legami idrogeno. Dato che il diametro equivalente minimo del canale è appena maggiore di una singola molecola d'acqua (dimensione massima 2,5 Å), le molecole d'acqua che impegnano contemporaneamente il canale si dispongono in singola fila, formando, come accennato, legami idrogeno con le catene laterali dei residui carichi presenti nel canale. È stato ipotizzato che la presenza di residui idrofili in un canale sostanzialmente idrofobo possa essere responsabile dell'elevata permeabilità all'acqua: infatti, in queste condizioni il numero di reazioni di legame con il canale è ridotto rispetto a quello che si avrebbe in un canale completamente idrofilo, ed è

conseguentemente ridotto il tempo necessario per effettuarle, con effetto favorevole sulla permeabilità. Oltre che di acqua, alcune acquaporine consentono anche il passaggio di piccole molecole come glicerolo o urea. Tuttavia, quello della selettività è un problema tutt'ora aperto, sia per la presenza di strutture cui si attribuisce un ruolo di controllo sul passaggio dell'acqua, ma la cui funzione non è stata ancora chiarita: il così detto "filtro ar/R" (aromatico-arginina, R è il codice a una lettera dell'arginina) localizzato nella regione più stretta del canale e un motivo noto come NPA (dai codici a una lettera di asparagina, prolina e alanina), anche questo localizzato nella porzione centrale del canale. È noto che, in corrispondenza del motivo npa le molecole d'acqua impegnate nel canale cambiano orientamento: queste, infatti, lo imboccano con l'ossigeno in direzione opposta a quelle del movimento, ma dopo il motivo npa l'ossigeno è rivolto nella direzione del movimento. Al contrario, la completa esclusione degli ioni fisiologicamente rilevanti è soprattutto funzione di fattori sterici: infatti — compreso il loro involucro di idratazione, sempre presente — anche i cationi monovalenti risultano più grandi del lume del canale.

Lo stato di pervietà del canale fisico è determinato dallo spostamento di un singolo gruppo funzionale verso il centro del canale fisico, che viene quindi bloccato per effetto sterico. È noto che la posizione di questo gruppo funzionale (e, ovviamente, la conformazione globale delle acquaporine) dipende da parametri esterni quali la concentrazione calciche e il pH. Tuttavia, molto poco è attualmente noto circa questi meccanismi, sia rispetto agli elementi strutturali della proteina che rispondono a questi parametri (i "sensori", che non sono stati identificati) sia rispetto alla loro connessione con lo stato osmotico della cellula che, oltre a fornire l'energia per il passaggio, dovrebbe controllare lo stato di pervietà del canale fisico. Meno oscuro è invece il ruolo di due fattori che operano una regolazione a lungo termine: il controllo dell'espressione genica, che agisce in termini di ore o giorni e la redistribuzione fisica nella membrana delle acquaporine già espresse. In questo secondo caso, fenomeni di endo- ed esocitosi regolata effettuano una redistribuzione delle acquaporine o da e verso specifici compartimenti cellulari, fornendo così una regolazione che può risultare efficace a tempi relativamente brevi (minuti).

3.2. Giunzioni comunicanti

Le giunzioni comunicanti ("gap junctions") sono strutture proteiche che attraversano le membrane di due cellule adiacenti, determinando un canale idrofilo in grado di lasciare passare ioni e piccole molecole, garantendo un accoppiamento sia metabolico che elettrico tra le due cellule interessate. Queste strutture si trovano raramente isolate ma sono, in genere, riunite in campi (Figura 2a), costituiti da un numero di elementi molto variabile.

3.2.1. Connessoni. Le unità funzionali sono costituite da strutture proteiche, appunto le giunzioni comunicanti, ognuna delle quali è formata da due metà, dette connessoni, che sono sintetizzate indipendentemente dalle due cellule interessate. I connessoni sono costituiti da sei molecole, uguali o meno, di proteine chiamate connessine, che si dispongono in cerchio attorno ad un asse ideale perpendicolare al piano della membrana cellulare, formando così un canale idrofilo. Le numerose (almeno 20) differenti connessine note (secondo alcuni si tratta di isoforme di una singola proteina) sono quasi tutte in grado di formare legami le une con le altre tramite coppie di superfici di interazione esistenti sulle loro facce laterali. In conseguenza, i connessoni possono essere formati secondo moltissime combinazioni, sia omologhe che eterologhe. Anche se non tutte le combinazioni sono funzionali, e molte non vengono espresse, l'esistenza di questa molteplicità determina ampie variazioni dei parametri funzionali. I connessoni vengono montati nel Golgi e quindi trasportati fino alla membrana plasmatica. Qui il moto casuale permesso dalla fluidità della membrana — ed il contributo di proteine quali le caderine — permette loro di venire a contatto con quelli espressi dalla cellula adiacente; l'esistenza di ulteriori superfici di interazione all'estremità extracellulare delle connessine consente loro disporsi a registro, formando la giunzione funzionale. Sembra, tuttavia, che i connessoni possano formare un canale pervio anche quando non sono accoppiati tra loro, mettendo in comunicazione il citoplasma con l'esterno della cellula, anziché con il citoplasma della cellula adiacente. La descrizione che segue fa però riferimento soltanto alla funzione di passaggio tra due cellule accoppiate.

Le connessine sono costituite da una singola catena polipeptidica di peso molecolare variabile tra i 23 e i 62 kdaltons, la cui struttura secondaria consiste in quattro α eliche transmembrana, ovviamente connesse da porzioni meno strutturate (Figura 2b). Una delle α eliche è anfipatica e dovrebbe formare le pareti del canale (Figura 2c). Nella sua conformazione generale, la molecola si presenta come una struttura molto allungata, con un diametro massimo di circa 25 Å ed una lunghezza di circa 70 Å, 15-20 dei quali sono in posizione extracellulare. Pertanto, una volta a contatto, i due connessoni tengono le due membrane leggermente staccate fra loro, determinando uno spazio (tra 20 Å e 40 Å) che ha dato origine al nome di "gap junctions".

L'arrangiamento delle connessine determina un canale subcircolare, del diametro di circa 20 Å in corrispondenza della faccia citoplasmatica, che rappresenta la bocca del canale. Dato che sia le connessine che le α eliche che delimitano il canale (Figura 2c) sono leggermente inclinate rispetto all'asse di questo, il suo diametro non è uniforme, ma si restringe fino a circa 15 Å in corrispondenza dell'unione dei due connessioni (in posizione extracellulare, tra le due membrane).

3.2.2. Meccanismi di apertura del canale. Come la massima parte delle strutture che permettono il passaggio transmembrana, anche le giunzioni comunicanti possono trovarsi in uno dei due stati corrispondenti a canale aperto oppure chiuso. La relativa transizione è controllata da numerosi fattori, alcuni dei quali di non facile interpretazione funzionale. Fra questi, la condizione a canale chiuso è favorita sia da bassi valori intracellulari di pH e forza ionica che da elevate concentrazioni di ioni Ca^{2+} . La chiusura del canale fisico è anche indotta da variazioni di potenziale delle due cellule affacciate, nel senso di una diminuzione delle probabilità di apertura del canale all'aumentare della differenza di potenziale tra le due cellule. Circa la rilevanza funzionale di questi fattori, dato che la forza ionica intracellulare è mantenuta entro intervalli molto ristretti, non è chiaro quale ruolo possano avere le sue variazioni; al contrario, sia la concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} che la differenza di potenziale tra le due cellule connesse possono variare entro limiti ampi, mentre l'elevata dipendenza dell'apertura del canale dal pH intracellulare comporta che anche le modeste variazioni riscontrabili in vivo (qualche decimo di unità) possano avere effetti significativi. Anche a causa dell'attuale ignoranza sui meccanismi molecolari che sono alla base della percezione di questi fenomeni (cioè quali strutture agiscano da sensori di pH e di voltaggio e quali siano i siti calcio-leganti), l'effettivo ruolo fisiologico di questi parametri risulta di difficile razionalizzare. Di meno difficile interpretazione è invece il ruolo delle modifiche covalenti. Infatti, le connessine hanno numerosi siti intracellulari di fosforilazione; questa reazione, spesso mediata da afferenze esogene tramite secondi messaggeri, è in grado di regolare l'apertura del canale sia direttamente che indirettamente, ossia agendo sull'espressione, sull'assemblaggio e sul "turnover" dei connessioni. In fine, i connessioni sono caratterizzati da vite estremamente brevi, nell'ordine delle ore. Si può pertanto supporre che il controllo della loro espressione genica abbia un efficace ruolo regolativo.

Sotto un punto di vista meccanicistico, lo stato di apertura del canale è controllato dalle interazioni tra le connessine che formano il singolo connessione. Si ritiene, infatti, che l'apertura e la chiusura del canale avvengano per scivolamento reciproco delle connessine che si comportano come blocchi rigidi, indotto da modifiche conformazionali delle superfici di interazione localizzate sulle facce laterali delle connessine. A sua volta, la conformazione delle superfici di interazione dovrebbe essere controllata dai parametri riportati sopra. Infatti le connessine sono vincolate alla loro base (cioè all'estremità extracellulare) dalle interazioni con l'altro connessione che forma la giunzione; dato tale vincolo, lo scivolamento reciproco delle connessine si traduce in una rotazione delle estremità citoplasmatiche (l'imbocco del canale), circa come avverrebbe ruotando un mazzetto di matite tenuto fermo ad un'estremità (Figura 2d). Ciò viene a determinare una riduzione del lume di tutto il canale (vedi Figura 2a), e non soltanto di una sua porzione, come avviene nei canali ionici e nelle acquaporine.

3.2.3. Dati funzionali. L'esistenza di una connessione fisica tra le cellule adiacenti comporta che tra queste si stabilisca un accoppiamento sia elettrico che metabolico. L'accoppiamento elettrico comporta che le variazioni del potenziale intracellulare di una cellula si trasmettano a tutte le cellule tra cui esiste comunicazione, costituendo quelle che sono note come sinapsi elettriche. In queste, al contrario di quanto avviene nelle sinapsi chimiche, la trasmissione dell'impulso è bidirezionale e il ritardo sinaptico (che nelle sinapsi chimiche è di circa 150 μsec) teoricamente nullo; inoltre, il diametro equivalente del canale fisico (10 - 15 Å) comporta una conduttanza unitaria elevata, fino a 300 pS per connessione. Tuttavia, come notato oltre, la superficie complessiva di membrana interessata è modesta: pertanto, la resistenza elettrica totale (cioè dell'intera membrana che connette le cellule adiacenti) rimane elevata ciò che — al contrario di quanto avviene nelle le sinapsi chimiche — comporta una perdita di segnale. Ancora, la dipendenza dello stato di apertura del canale fisico dalla differenza di potenziale riportata sopra comporta che la conducibilità delle giunzioni non sia lineare ("non ohmmica", cioè che non segue la legge di ohm), mostrando variazioni positive dalle linearità.

L'accoppiamento elettrico stabilito dai connessioni ha importanza funzionale in tessuti quali il muscolo liscio e quello cardiaco. Nel primo, la presenza dei connessioni contribuisce a sincronizzare i movimenti peristaltici, come indicato dalla sincronizzazione delle contrazioni spontanee di cellule muscolari lisce in coltura che si osserva a seguito della formazione di giunzioni comunicanti. Nel tessuto cardiaco queste contribuiscono ad indurire il tipico carattere di sincizio funzionale, cioè la capacità di contrarsi in toto a seguito di uno stimolo localizzato. In più, dato che in questo tessuto le giunzioni sono più frequenti alle estremità delle cellule che

sulle superfici laterali, la propagazione dell'impulso è direzionale, ossia più veloce in direzione dell'asse delle cellule che non perpendicolarmente a questo. La presenza di sinapsi elettriche è anche nota in specifiche zone del sistema nervoso centrale: tuttavia, la diffusa espressione nel neurasse di una connessina neurospecifica (la cx36 secondo la nomenclatura corrente) farebbe supporre che le sinapsi elettriche siano assai più comuni nel tessuto nervoso di quanto non sia attualmente riconosciuto.

La possibilità di passaggio di sostanze quali ioni, amminoacidi e piccoli peptidi, nucleotidi, segnatamente tutti i secondi messaggeri noti permessa dal relativamente elevato diametro utile del canale comporta che le giunzioni comunicanti permettano anche un collegamento metabolico tra le cellule, accoppiamento che si suppone abbia particolare importanza nel corso dello sviluppo. Infatti, nelle fasi embrionali precoci, la maggior parte delle cellule sono accoppiate da giunzioni comunicanti. Con il differenziamento, le giunzioni tra tessuti eterologhi tendono a scomparire, mentre spesso si mantengono tre cellule differenziate nello stesso senso. In linea di massima, il passaggio di sostanze non avviene in modo del tutto aspecifico: tuttavia, l'eventuale selettività nei riguardi delle sostanze che passano attraverso il canale dipende da quali connessine formano la specifica giunzione e non è quindi generalizzabile. Va ancora notato che, come osservato sopra, la superficie totale di scambio è limitata ad una frazione assai modesta dell'intera superficie di contatto fra le due cellule. Inoltre, a quanto è noto, la frazione di connessioni aperte in un dato istante è piuttosto modesta, ciò che ovviamente riduce ulteriormente le cinetiche di scambio.

4. Proteine vettrici

Quando non sussistono le condizioni per un passaggio diretto o tramite canali idrofili, le particelle (molecole o ioni) sono trasportate dalle così dette proteine vettrici, o proteine di trasporto, che possono veicolare molecole polari o ioni sia contro che secondo il loro gradiente. Queste proteine mantengono le differenze di concentrazioni ioniche (e quindi di potenziale) tra l'esterno e l'interno delle cellule, regolano il pH intracellulare (con scambiatori come $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ e $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$), mantengono le basse concentrazioni calciche citoplasmatiche necessarie al funzionamento delle cellule, provvedono ai sistemi di trasporto di amminoacidi e glucidi, al riassorbimento tubulare e così via. Inoltre, mantengono la cospicua differenza di potenziale esistente tra l'interno dei mitocondri ed il citoplasma (sono, in questo caso, "elettrogeniche"). Al contrario dei canali idrofili, in cui i cambiamenti conformazionali avvengono prima e dopo, ma non durante il passaggio, il trasporto tramite proteine vettrici avviene nel corso di cambiamenti conformazionali il cui effetto è appunto quello di traslocare la specie da trasportare (il substrato) da una faccia della membrana a quella opposta. Ovviamente, una volta effettuato il trasporto, la proteina deve ritornare nella conformazione di partenza: quindi, i cambiamenti conformazionali devono essere ciclici. Almeno in termini molecolari, il tempo necessario a completare un ciclo non è trascurabile e ciò comporta che la capacità di trasporto delle proteine vettrici sia vari ordini di grandezza inferiore a quella dei canali idrofili: indicativamente, circa 1×10^2 contro 1×10^6 particelle al secondo.

A seconda del modo in cui viene ricavata l'energia per i cambiamenti conformazionali del trasportatore, questi si distinguono in attivi, attivi indiretti o secondari e passivi. I primi ricavano l'energia da una sorgente energetica primaria (nell'uomo, esclusivamente l'idrolisi di ATP, ma in altri organismi l'energia può essere ricavata da fonti come l'assorbimento di fotoni o un flusso elettronico). I secondi la ricavano dal trasporto secondo gradiente di altre particelle il cui gradiente di concentrazione è opposto a quello del substrato; ossia, utilizzano una parte dell'energia libera accumulata in un gradiente preesistente per pilotare i cambiamenti conformazionali che operano la traslocazione, energeticamente sfavorevole, del substrato. Infine, i meccanismi di trasporto passivo riguardano sostanze, come amminoacidi e zuccheri, che devono attraversare la membrana seguendo il loro gradiente di concentrazione, ma per le quali non esistono strutture in grado di garantire un trasporto passivo. Dal punto di vista energetico, il caso è identico al precedente, con la differenza che l'energia per i cambiamenti conformazionali è fornita dal gradiente della specie trasportata e non di un'altra.

In molti casi queste proteine agiscono come scambiatori, ossia vengono trasportati in direzioni opposte due differenti particelle: ad esempio, l'ATPasi $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dipendente descritta oltre scambia tre ioni Na^+ intracellulari con due ioni K^+ extracellulari, mantenendo lo sbilanciamento ionico necessario al funzionamento delle cellule eccitabili. Trasportatori calcici possono scambiare ioni Ca^{2+} con protoni e così via. In proposito, si trovano utilizzate le dizioni di uniporto, simporto e antiporto quando il trasporto avviene, rispettivamente: senza scambio, con scambio ma nelle due direzioni, con scambio e in direzioni opposte.

In termini molto generali, e trascurando per semplicità gli scambiatori, indipendentemente dal meccanismo

dal quale ricavano energia tutte le proteine di trasporto, devono potere assumere un minimo di due stati conformazionali: in uno il trasportatore deve essere accessibile al substrato da un lato della membrana ("di carico"), mentre nell'altro deve essere accessibile dal lato opposto ("di rilascio"). Il trasportatore deve anche possedere siti di legame per il substrato la cui affinità (per il substrato) deve essere maggiore nella conformazione accessibile dal sito di carico che non nella conformazione accessibile dal lato di rilascio. In fine, la liberazione del substrato al lato di rilascio deve comportare il ritorno del trasportatore alla sua conformazione iniziale, in modo da determinare un ciclo chiuso. Come sempre quando è richiesta una serie ordinata di cambiamenti conformazionali, la loro corretta successione viene garantita dall'esistenza di un accoppiamento conformazionale tra ogni evento e l'evento successivo (vedi i trasportatori ABC, § 4.1.1.).

4.1. Trasporto attivo

Si parla di trasporto attivo quando questo avviene in opposizione a un gradiente (di concentrazione, elettrico o elettrochimico) e l'energia per i cambiamenti conformazionali della proteina vettrice viene fornita dall'idrolisi dell'ATP, catalizzata dalla proteina vettrice stessa. I trasportatori attivi si distinguono in varie classi, le principali delle quali sono note come trasportatori ABC e di tipo P. Non ostante la loro grandissima importanza metabolica (si stima che più del 30% di tutto l'ATP prodotto nell'organismo venga demolito per fornire energia a trasportatori), i dettagli funzionali di molti di questi sono poco chiari e di molti sono del tutto sconosciuti. In queste condizioni, il modello riportato per i trasportatori ABC può essere considerato abbastanza attendibile, mentre quello delle ATPasi di tipo P è più tentativo.

4.1.1. I trasportatori ABC. Il nome di trasportatori ABC (ABC: "Adenosine triphosphate Binding Cassette") deriva dall'esistenza di domini ATPasici, che forniscono l'energia necessaria al trasporto. Questi trasportatori (Figura 3a) sono generalmente (non sempre) costituiti da un omodimero che forma una singola via di trasporto. Facendo riferimento a questa struttura, le due subunità sono formate da due domini nettamente distinti: uno transmembrana, tipicamente composto da 6 α eliche ed uno localizzato dal lato di carico, che porta un sito catalitico in grado di legare e idrolizzare una molecola di ATP. Le 12 α eliche totali sono inclinate rispetto al piano della membrana in modo da determinare una cavità idrofila circa conica (Figura 3c e 3d) all'interno della quale esiste il sito (o i siti) di legame per substrato che, come nel caso dei peptidi, può anche essere ingombrante. La cavità è sempre aperta verso uno dei due lati della membrana e chiusa dall'altro: pertanto, non esiste mai una comunicazione continua tra le due facce della membrana, come avviene nei canali ionici.

Per questi trasportatori, il semplice schema a due stati conformazionali principali descritto sopra è stato in buona misura verificato dai dati di diffrazione: in sommario, in assenza di ATP il trasportatore si trova in una conformazione nella quale la cavità è aperta verso il lato di carico e chiusa verso il lato di rilascio e il sito di legame presenta un'elevata affinità per il substrato. Il legame di una (o più d'una) particella di substrato induce un cambiamento conformazionale allosterico del dominio ATPasico a seguito del quale aumenta la sua affinità per l'ATP. Il conseguente legame di una molecola di ATP (quindi, di due molecole di ATP per dimero) induce un ulteriore cambiamento conformazionale che comporta un importante riarrangiamento delle α eliche che determinano la cavità, a seguito del quale questa si chiude verso il lato di carico, si apre verso quello di rilascio (Figura 3d) e il legame del substrato è indebolito abbastanza da consentirne il rilascio. In fine, il rilascio del substrato comporta un cambiamento verso una conformazione nella quale il sito ATPasico è attivo e può quindi idrolizzare la molecola di ATP legata fornendo alla proteina l'energia necessaria a riassumere lo stato conformazionale iniziale. Schematicamente: i. nello stato con entrambi i siti (ATPasico e per il substrato) non occupati, il trasportatore si trova nella conformazione a cavità aperta verso il lato di carico e il sito per il substrato si trova nella conformazione ad elevata affinità, ciò che permette (ii) il legame del substrato. iii. Ciò induce una nuova conformazione nella quale il sito ATPasico presenta elevata affinità per questa molecole, ed è in grado di legarla. iv. Il legame con l'ATP (non la sua idrolisi) comporta una conformazione in cui la cavità è aperta verso il lato di rilascio, chiusa verso il lato di carico e il sito per il substrato presenta bassa affinità per questo, che (v) viene rilasciato, effettuando il trasporto. vi. Il rilascio del substrato comporta una conformazione nella quale il sito ATPasico è attivo e l'ATP legato viene idrolizzato, facendo passare la proteina nel suo stato di massimo energetico. vii. In queste condizioni viene riassunta la conformazione nella quale la cavità è aperta verso il lato di carico (che è, quindi, quella corrispondente al massimo energetico) e il sito per il substrato presenta elevata affinità, consentendo così l'inizio di un nuovo ciclo.

4.1.2. ATPasi di tipo P. Le ATPasi di tipo P costituiscono un'importante famiglia di proteine di trasporto di cui

fanno parte, tra gli altri, le ATPasi Na^+ - K^+ -dipendenti — le così dette pompe del sodio —, i trasportatori calcici del reticolo sarcoplasmatico — che riportano le concentrazioni calciche citoplasmatiche ai loro valori basali dopo la contrazione muscolare — e gli scambiatori K^+ - protoni della mucosa gastrica. Non ostante l'esistenza di dati di diffrazione ad alta risoluzione di più d'uno di questi trasportatori, la sequenza di eventi tramite i quali gli ioni sono trasportati (e molto spesso scambiati) attraverso la membrana non è del tutto chiara ed è, quindi, descritta solo schematicamente. Nei casi conosciuti, la struttura di queste proteine (Figura 3b) consiste in una singola catena polipeptidica nella quale si distinguono quattro domini: uno α elicoidale, formato da 10 α eliche transmembrana circa parallele fra loro e tre globulari, posti sul lato di carico e chiamati nucleotide-legante, di fosforilazione e attuatore. Il percorso ionico — che è determinato da sei delle dieci α eliche del dominio α elicoidale — può trovarsi in tre conformazioni: aperto verso l'uno dei due lati, aperto verso l'altro lato, oppure chiuso da entrambi, con le specie da trasportare bloccate nei loro siti di legame posti nella parte centrale delle α eliche.

In termini generali, lo schema a due stati conformazionali principali descritto sopra (§ 4.) si può ritenere valido anche per questi trasportatori. Ciò nel senso che, quando il percorso ionico è aperto dal lato di carico, i siti di legame hanno elevata affinità per le specie da trasportare, che si legano; quando il percorso ionico è aperto dal lato di rilascio, l'affinità per le specie da trasportare è bassa, e queste vengono rilasciate. Nel caso (frequentissimo) di scambiatori, le affinità per le due specie sono opposte, ossia sono basse per l'una quando sono alte per l'altra e vice versa, così permettendone lo scambio. Il verso di apertura — o l'occlusione — del percorso ionico, e lo stato dei siti di legame, dipendono da movimenti reciproci di quattro delle α eliche che lo determinano. Questi movimenti sono direttamente controllati dal dominio attuatore, a sua volta controllato da cambiamenti conformazionali e di posizione reciproca dei domini nucleotide-legante e di fosforilazione, che si possono associare o dissociare. Nella fattispecie, la posizione reciproca di questi domini dipende da due fattori: nel dominio nucleotide-legante, dall'occupazione del sito ATPasico; nel dominio di fosforilazione, dal suo stato, appunto, di fosforilazione da parte del fosforo risultante dall'idrolisi dell'ATP. Lo stato di associazione di questi domini modifica la posizione del dominio attuatore, che può ruotare (di circa 110°) su di un asse quasi parallelo al percorso ionico. Dati i vincoli tra questo dominio e quattro delle sei α eliche che formano il percorso ionico, la sua rotazione modifica direttamente (ossia esercitando un'azione meccanica di trazione e spinta, non per effetti allosterici) lo stato del percorso ionico e dei siti di legame per le specie da trasportare, passando dall'uno all'altro degli stati conformazionali di cui sopra.

4.2. Trasporto attivo indiretto o secondario

Vari sistemi di trasporto che operano contro gradiente di concentrazione ricavano energia dal trasporto secondo gradiente elettrochimico di una o più particelle, spesso ioni Na^+ ma anche protoni. Questi trasportatori hanno siti di legame accessibili dalle due parti della membrana, uno per le specie che forniscono energia ed uno per il substrato. L'energia accumulata in questo gradiente viene utilizzata per indurre un cambiamento conformazionale localizzato ai siti di legame per le particelle che si spostano secondo gradiente. Questo cambiamento conformazionale è poi in grado di pilotare il cambiamento conformazionale dell'intera proteina verso il suo massimo energetico in modo concettualmente non molto dissimile, ad esempio, da quello dei sensori di campo elettrico dei canali a controllo di potenziale (vedi: "Note sui canali ionici", § 3.1.3.). Dalla conformazione di massimo energetico, il trasportatore decade nel suo stato energetico di base tramite una serie ordinata di cambiamenti conformazionali, come descritto sopra per il trasporto attivo. Naturalmente, per potere mantenere lo sbilanciamento ionico necessario per il corretto metabolismo cellulare, e perché lo scambiatore possa continuare a funzionare, le particelle trasportate secondo gradiente devono essere riportate nella collocazione originaria, così consumando quell'energia che non era stata consumata nel trasporto.

Meccanismi di questo tipo sono coinvolti, ad esempio, nel trasporto di carboidrati, di amminoacidi sia neutri (i così detti sistemi A e ASC) che acidi nonché di ioni Ca^{2+} . Ad esempio, la membrana delle cellule dei tubuli renali e dell'epitelio intestinale comprende numerosi sistemi di trasporto indiretto, spinti dal gradiente di ioni Na^+ e di protoni, ciascuno dei quali è specializzato nel trasporto di un piccolo gruppo di carboidrati o di amminoacidi. Ancora, sistemi di trasporto indiretto sono utilizzati per mantenere il valore di pH intracellulare al suo normale valore di circa 7.2, utilizzando il gradiente di ioni Na^+ per trasportare in direzione extracellulare ioni H_3O^+ , o per scambiare ioni Cl^- intracellulari con ioni HCO_2^- .

4.3. Diffusione facilitata

Le proteine vettrici mediano anche la così detta diffusione facilitata. In questo caso, che interessa soltanto specie non ioniche (per le quali non esistono canali), il trasporto avviene seguendo il gradiente di concentrazione. Questi meccanismi permettono, quindi, il passaggio transmembrana di specie, come amminoacidi o glucidi, che non possono essere veicolate altrimenti, ma il cui gradiente di concentrazione è favorevole al trasporto. Quindi, l'energia necessaria a pilotare i cambiamenti conformazionali della proteina vettrice viene fornita dal gradiente della specie da trasportare, in modo, forse anche evolutivamente, analogo a quanto avviene nel caso del trasporto attivo indiretto, ma con la differenza che un'unica specie, e non due distinte, fornisce l'energia per il trasporto e viene trasportata. Naturalmente, anche in questo caso è richiesto che il gradiente di concentrazione sia mantenuto da fattori esterni. Ad esempio, nel trasporto di amminoacidi attraverso la membrana dei villi intestinali, gli amminoacidi liberi presenti nel lume intestinale provengono dalla demolizione enzimatica delle proteine assunte come alimenti, amminoacidi che le cellule intestinali riversano continuamente nel torrente ematico: pertanto, nel corso dei fenomeni digestivi esiste uno sbilanciamento tra le concentrazioni del lume intestinale e le concentrazioni citoplasmatiche in grado di pilotare il trasporto.

5. Passaggio di sola informazione

Nella generalità — anche se non nella totalità — dei casi riguardanti molecole informazionali, queste non passano attraverso la membrana, ma viene trasferita all'interno della cellula soltanto l'informazione, mentre le molecole informazionali vengono raccolte da specifiche strutture proteiche di membrana, i recettori, rimanendo fuori dalla cellula. Pertanto, i recettori agiscono da trasduttori, nel senso che trasformano l'informazione esterna in un cambiamento conformazionale del recettore stesso. Come dettagliato altrove ("vedi: Note sui recettori"), questo cambiamento conformazionale modifica, direttamente o indirettamente, i parametri intracellulari desiderati.

6. Passaggio tramite vescicole

I meccanismi descritti in precedenza sono limitati al trasporto di ioni e di molecole di dimensione media e piccola. Macromolecole, sostanze particolate e porzioni di liquido sono invece trasportate da vescicole, come tramite vescicole avviene la secrezione delle sostanze informazionali, come di tutti i secreti cellulari. A seconda della direzione del trasporto, le vescicole vengono avviate in direzione della membrana plasmatica (esocitosi) o dell'interno della cellula (endocitosi). Nell'esocitosi, le vescicole confluiscono verso specifiche zone della membrana — le zone attive — dove vanno incontro ad una serie ordinata di fenomeni complessi e chiariti solo in parte che portano al rilascio del contenuto delle vescicole. Nell'endocitosi, le vescicole si formano in corrispondenza della membrana cellulare e sono trasportate verso le loro destinazioni intracellulari dove vengono degradate e il materiale contenuto avviato a destinazione. In entrambi i casi il lipide che forma le vescicole viene riutilizzato: se il trasporto avviene verso l'interno della cellula, partecipa ai processi di formazione della membrana; se il trasporto avviene verso l'esterno, le vescicole si fondono con la membrana, aumentandone la massa. Soprattutto in questo caso, la quantità di sostanza coinvolta può essere molto elevata: ad esempio, in cellule secernenti la massa di lipide interessata al processo può corrispondere a varie centinaia di volte la massa totale di membrana per ora. L'esistenza di meccanismi che recuperano il lipide permette, quindi, di mantenere stabile la massa di membrana e di recuperare il materiale delle vescicole.

6.1. Formazione delle vescicole

Quale che sia la direzione di trasporto, formazione e movimento delle vescicole sono controllati da una molteplicità di proteine e comportano dispendio energetico. La breve descrizione che segue è relativa alla formazione delle così dette vescicole rivestite, specificamente di quelle rivestite di clatrina (sono note vescicole non rivestite e vescicole rivestite di coatomero). Le vescicole rivestite sono coinvolte nei processi di endocitosi mediata da recettori e prendono il loro nome dalla proteina che ne pilota direttamente la formazione, appunto la clatrina. Queste vescicole si formano da zone localizzate di membrana tramite successivi stadi di invaginazione, gemmazione e distacco. I relativi processi sono indotti dai cambiamenti conformazionali coordinati di una serie di proteine, solo alcune delle quali sono attualmente note e meno ancora sono citate qui. Tra queste il ruolo principale è svolto dalla clatrina che, polimerizzando in una maglia tridimensionale poliedrica, ingloba porzioni di membrana e le chiude su se stesse formando così le vescicole.

La clatrina è un eterodimero composto da due catene, una detta pesante (180 kdaltons) ed una leggera (25-29 kdaltons). Nelle catene pesanti si distinguono tre domini: uno N-terminale globulare a struttura β , uno C-terminale coinvolto nella formazione dei trisceli (vedi oltre) e uno centrale, che rappresenta circa il 60% della molecola, formato da numerose ripetizioni di α eliche anfipatiche interspaziate da segmenti meno strutturati. Le α eliche si dispongono in due serie (a in Figura 4) formando una superelica la cui notevole stabilità viene attribuita all'interdigitazione delle α eliche, che lascia libera una striscia continua di residui idrofobici. Le interazioni dei domini C-terminali delle catene pesanti inducono l'associazione di tre catene pesanti e tre leggere e la formazione di complessi dalla caratteristica forma a tre braccia, i trisceli (b in Figura 4). Nelle opportune condizioni, le strisce idrofobiche delle supereliche delle catene pesanti possono poi interagire fra loro, portando all'associazione dei trisceli in più strati (c in Figura 4) e alla formazione di poliedri, che racchiudono porzioni sferoidali di lipide (d ed e in Figura 4). La formazione dei poliedri è controllata negativamente dalle catene leggere, l'inibizione delle quali è rimossa dall'incremento delle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} , che si legano a siti calcio-leganti (chele E-F) delle catene leggere.

La formazione delle vescicole inizia quando l'incremento delle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} ne permette il legame ai siti calcio-leganti delle catene leggere, inducendo in queste catene un cambiamento conformazionale che, a sua volta, induce un cambiamento conformazionale allosterico nelle catene pesanti; in questa conformazione le catene pesanti possono polimerizzare formando una struttura poliedrica chiusa. Come accennato, questi processi sono regolati da numerose altre proteine, alcune delle quali hanno siti di legame sulle catene leggere. Altre proteine prendono invece contatto sia con il poliedro di clatrina che con il lipide, unendo i due: si viene così a formare una struttura sferoidale a tre strati, i due esterni proteici e quello interno lipidico. Queste strutture si staccano quindi dalla membrana per l'azione concertata di altre proteine, tra le quali il ruolo principale è svolto dalle dinamine. In presenza di GTP queste proteine tendono a polimerizzare, formando una spirale intorno al collo della vescicola. L'idrolisi del GTP, catalizzata dalle stesse dinamine, induce in queste un cambiamento conformazionale che comporta un restringimento della spirale, così strozzando il "collo" lipidico che ancora unisce la vescicola in formazione alla membrana. Assieme all'azione di due miosine in grado di spostarsi in direzioni opposte sui filamenti di actina, questo processo dovrebbe separare la vescicola dal resto del lipide. A questo punto, il rivestimento proteico viene rimosso, nel caso della clatrina a seguito delle interazioni con le catene leggere di una delle così dette proteine di shock termico, la hsp70, il legame con la quale induce nella clatrina un cambiamento conformazionale che ne provoca la depolimerizzazione; questa è una reazione endoenergetica (la polimerizzazione avviene, invece, spontaneamente) che richiede idrolisi di ATP e, quindi, l'intervento di ATPasi. Presumibilmente tramite proteine motrici, la clatrina depolimerizzata viene quindi riportata a contatto con la membrana, dove può essere reimpiegata, mentre altre proteine motrici trasportano le vescicole ai loro siti di impiego.

6.2. Esocitosi: trasporto e fusione con la membrana cellulare

Tramite esocitosi vengono rilasciate tutte le sostanze informazionali, così come i secreti in generale; tuttavia, il caso meglio conosciuto è quello relativo alla trasmissione sinaptica, cui principalmente si farà riferimento. Prendendo come modello le vescicole che contengono mediatori peptidici, queste vengono formate nel reticolo trans del Golgi, dove vengono caricate con il mediatore, il loro contenuto viene concentrato e i precursori proteici sono soggetti al taglio enzimatico che dà origine ai mediatori stessi. Le vescicole vengono poi trasportate da proteine vettrici fino alla membrana sinaptica. Nel caso di altri mediatori, come acetilcolina o catecolammine, la sintesi dei trasmettitori ed il caricamento delle vescicole avvengono in parte a livello sinaptico, anche riutilizzando i trasmettitori (o parte di essi) ricaptati da appositi trasportatori. In ogni caso, per riversare il loro contenuto nello spazio sinaptico, le vescicole devono fondersi con la membrana presinaptica. Perché questo processo possa avvenire è necessario sormontare una barriera energetica non trascurabile, dovuta sia alla presenza degli involucri di idratazione che alla repulsione causata dalla carica negativa di entrambe le membrane. La fusione delle due membrane avviene a seguito di una serie di reazioni di adesione che coinvolgono varie proteine, le cui funzioni e interazioni reciproche sono note solo imperfettamente. In termini estremamente generali, sia nella membrana cellulare che in quella delle vescicole sono inserite proteine preposte alla fusione, come anche inibitori di questo processo. La fusione è indotta dai cambiamenti conformazionali di un gruppo di proteine in conseguenza dei quali le due membrane sono portate ad una distanza sufficientemente piccola da vincere le barriere energetiche di cui sopra. A questo punto, almeno secondo il modello descritto qui, un secondo gruppo di proteine deforma la membrana abbastanza da romperne i legami, consentendone la fusione.

Nell'analisi dei fenomeni di esocitosi va tenuto conto di almeno due fattori: da un lato, che questi fenomeni sono molto verosimilmente differenti da cellula a cellula e che sono stati studiati solo su modelli cellulari

specifici, soprattutto sinaptici; dall'altro, che si tratta di fenomeni complessi, che coinvolgono un gran numero di proteine interagenti, i ruoli delle quali sono noti solo in parte. Ancora, che un modello ragionevole di questi fenomeni si ha solo da pochissimo tempo. Quindi, quanto esposto qui costituisce una sintesi estremamente semplificata, probabilmente non accettabile da tutti e che andrà certo rivista assai presto.

Facendo sempre riferimento alla secrezione sinaptica, l'esocitosi delle sostanze informative comporta diverse fasi: dopo che le vescicole contenenti il mediatore sono state trasportate fino alla sinapsi, vengono dapprima intrappolate da filamenti proteici ai quali si legano tramite una proteina, la sinapsina. Queste vescicole fungono da riserva per quelle di pronto impiego, che sono localizzate nella zona attiva, (vedi oltre). Il legame con la sinapsina è scisso dalla sua fosforilazione da parte di una proteina chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente (CaMKII): pertanto, l'apertura dei canali calcici a controllo di potenziale, verosimilmente localizzati nella parte superiore della clava sinaptica, induce un aumento locale di ioni Ca^{2+} che si legano alla calmodulina (vedi "Note sui secondi messaggeri", § 3.1) la quale si lega all'enzima, attivandolo e permettendo quindi la mobilitazione delle vescicole. A questo punto proteine motrici, anche queste attivate dagli ioni Ca^{2+} , possono trasportare le vescicole fino alla suola sinaptica lungo i filamenti proteici. Questi terminano nelle cosiddette zone attive, che si trovano a registro con le zone postsinaptiche dove sono addensati i recettori. Naturalmente, un arrangiamento di questo genere non è presente nelle cellule secernenti generiche. Vicino alla zona attiva sono localizzate le vescicole di pronto impiego, che si possono schematicamente distinguere in tre insiemi: quello più lontano dalla membrana è alimentato dalle vescicole liberate dalla CaMKII ed è vincolato ad una maglia citoscheletrica. Questo rifornisce le vescicole dell'insieme successivo che vanno incontro ad un processo di "maturazione", con ogni evidenza consistente nell'incorporazione di specifiche proteine (vedi oltre). In fine, l'insieme più vicino alla membrana presinaptica è costituito dalle vescicole pronte per il rilascio, la cui fusione con la membrana sinaptica è indotta con minima latenza dall'aumento delle concentrazioni calciche locali che segue all'apertura dei canali selettivi per questi ioni localizzati nella parte basale della clava sinaptica. Questi sono canali a controllo di potenziale nel caso delle sinapsi, mentre in cellule secernenti generiche l'apertura dei canali calcici può essere indotta da segnali sia nervosi che chimici; in questo secondo caso sono coinvolti canali a controllo di ligando.

Il sistema minimo in grado di rendere conto dei processi di fusione è formato da due complessi: lo SNARE e la sinaptotagmina, cui vanno aggiunte le proteine necessarie per la depolimerizzazione del complesso SNARE. Il complesso proteico noto come SNARE (Figura 5a) è formato da tre proteine principali: sintassina 1, sinaptobrevina 2 e SNAP-25. Tutte queste proteine comprendono un dominio (due nel caso di SNAP-25) strutturato in α eliche anfipatiche, noto come dominio SNARE. Inoltre, sintassina 1 e sinaptobrevina 2 comprendono ognuna una sequenza C-terminale idrofoba strutturata in una (presunta) α elica che si inserisce nella membrana, rispettivamente della cellula e della vescicola. Nel citoplasma, le α eliche anfipatiche dei domini SNARE, due a due, tendono a formare coiled coils dando luogo alla formazione del complesso costituito da un sandwich delle tre proteine in cui i segmenti idrofobi C-terminali sia della sintassina 1 che della sinaptobrevina 2 sono inseriti nelle rispettive membrane, ancorandovi la proteina. In condizioni di base, la sintassina 1 è legata ad una proteina, la muc18, e la sinaptobrevina 2 ad un'altra proteina, forse la sinaptofisina, la cui presenza (presumibilmente per effetto sterico) inibisce il processo di fusione; pertanto, in queste condizioni il complesso SNARE non si può formare. L'avvicinamento delle due membrane inizia con la dissociazione della muc18 dalla sintassina 1, ciò che permette a questa di passare dalla conformazione aperta a quella chiusa, con un movimento che, iniziando ad un'estremità, prosegue verso l'estremità opposta, (è stato paragonato a quello di una chiusura lampo). Un processo analogo avviene, presumibilmente, anche nel caso della sinaptobrevina 2. In questo modo, i complessi SNARE (quasi sicuramente, più d'uno per vescicola, disposti ad anello, vedi Figura 5b) sono in grado di avvicinare le vescicole alla membrana abbastanza da iniziare il processo di fusione. Questo è completato da una proteina calcio-legante, la sinaptotagmina 1 (1 perché le sinaptotagmine sono una famiglia di proteine); la sinaptotagmina 1 è formata da un dominio idrofobico che si lega alle vescicole e da due domini calcio-leganti molto simili, ognuno fondamentalmente costituito da due foglietti β antiparalleli. A basse concentrazioni calciche, cioè a siti calcio-leganti non occupati, la sinaptotagmina 1 è associata con il complesso SNARE, ma non ha legami con la membrana. L'aumento delle concentrazioni calciche locali, permettendo l'occupazione dei siti calcici della sinaptotagmina, induce un cambiamento conformazionale a seguito del quale le regioni della proteina in cui sono localizzati i siti calcio-leganti sono in grado di interagire con il lipide (data la localizzazione della proteina, con il lipide della membrana sinaptica). Appare poi probabile (ma in atto ipotetico) che il cambiamento di polarità relativo al suo inserimento nella membrana sinaptica induca nella sinaptotagmina 1 un ulteriore cambiamento conformazionale, che si traduce in un ripiegamento dell'intera proteina. Dato che, in queste condizioni, le sinaptotagmine 1 sono vicinate sia ai complessi SNARE che alla membrana sinaptica, il loro ripiegamento deforma verso il periplasma le porzioni di membrana comprese nell'anello formato dai complessi SNARE, aumentandone la curvatura (d in Figura 5b).

Secondo questo modello, si pensa che la distorsione così indotta nei legami (deboli) tra le catene alifatiche del lipide sia sufficiente a romperli, scompaginandone la disposizione e così permettendo la fusione delle due membrane e l'apertura di un poro dal quale può fluire il mediatore sinaptico verso il periplasma. In questo modello tutti i fenomeni avvengono spontaneamente, cioè non richiedono apporto energetico esterno. In effetti, i complessi SNARE si assemblano spontaneamente e sono estremamente stabili, al punto da non essere in grado di disassemblarsi; al contrario, un apporto energetico è necessario per il disassemblaggio del complesso. L'energia per questo processo dovrebbe essere fornita dall'idrolisi dell'ATP catalizzata da un'ATPasi, la NSF, che agisce assieme ad un'altra proteina, la SNAP (nessuna correlazione con la SNAP-25, sfortunatamente sono stati utilizzati due acronimi quasi identici per proteine differenti). Quando la SNAP si lega al complesso SNARE (legame che, presumibilmente, può avvenire solo nella conformazione assunta dalle proteine del complesso dopo la formazione del poro), si porta in una conformazione in cui è in grado di interagire con la NSF, inducendone un cambiamento conformazionale a seguito del quale il sito ATPasico passa in conformazione attiva e può quindi idrolizzare una molecola di ATP. In un modo non ancora chiarito, il relativo apporto energetico viene trasferito al complesso SNARE, permettendone il disassemblaggio endoenergetico, e la possibilità di dare inizio ad un nuovo ciclo.

Il modello minimo appena descritto è funzionale in vitro, e fornisce una spiegazione per quanto possibile semplice dei fenomeni di esocitosi. Tuttavia, non rende conto di tutti i dati conosciuti: infatti, molte proteine la presenza delle quali è dimostratamente necessaria per l'esocitosi in vivo, non trovano posto in questo modello, che può essere assunto soltanto come una (sperabilmente ragionevole) base di partenza per la razionalizzazione di fenomeni la cui comprensione è ancora molto parziale.

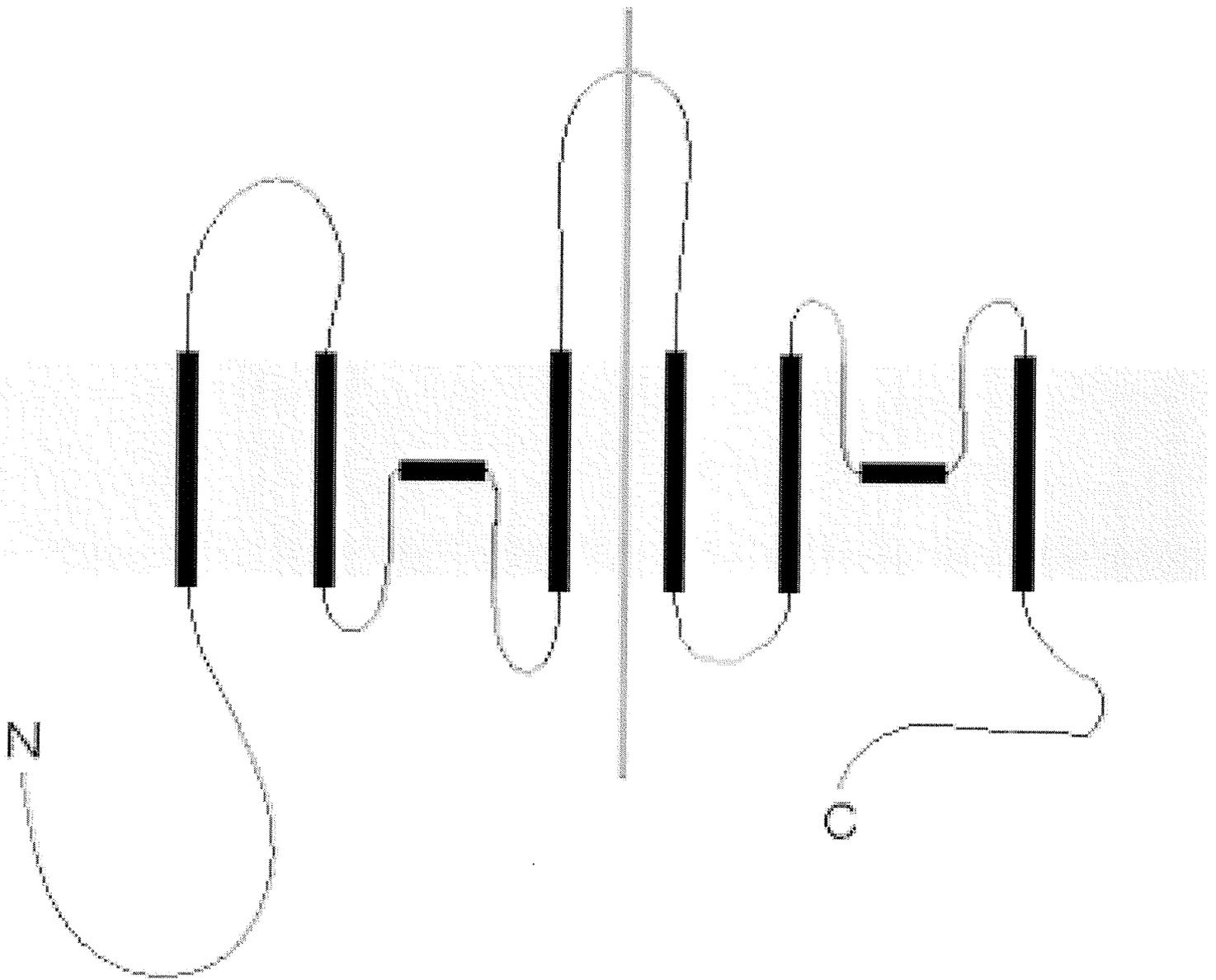


Figura 1a. Modello topologico di un'acquaporina. La molecola consiste in 6 α eliche transmembrana e 2 inserti nella membrana (tratti spessi), connesse da segmenti a struttura non definita (tratti sottili); di questi, i due che connettono la seconda con la terza e la quinta con la sesta α elica transmembrana si ripiegano nella membrana, partecipano alla formazione del canale idrofilo e portano i filtri ar/r e i motivi npa. La banda grigia rappresenta la membrana, la riga verticale identifica il piano di quasi-simmetria della molecola, le lettere N e C indicano i due terminali. Citoplasma in basso e periplasma in alto.

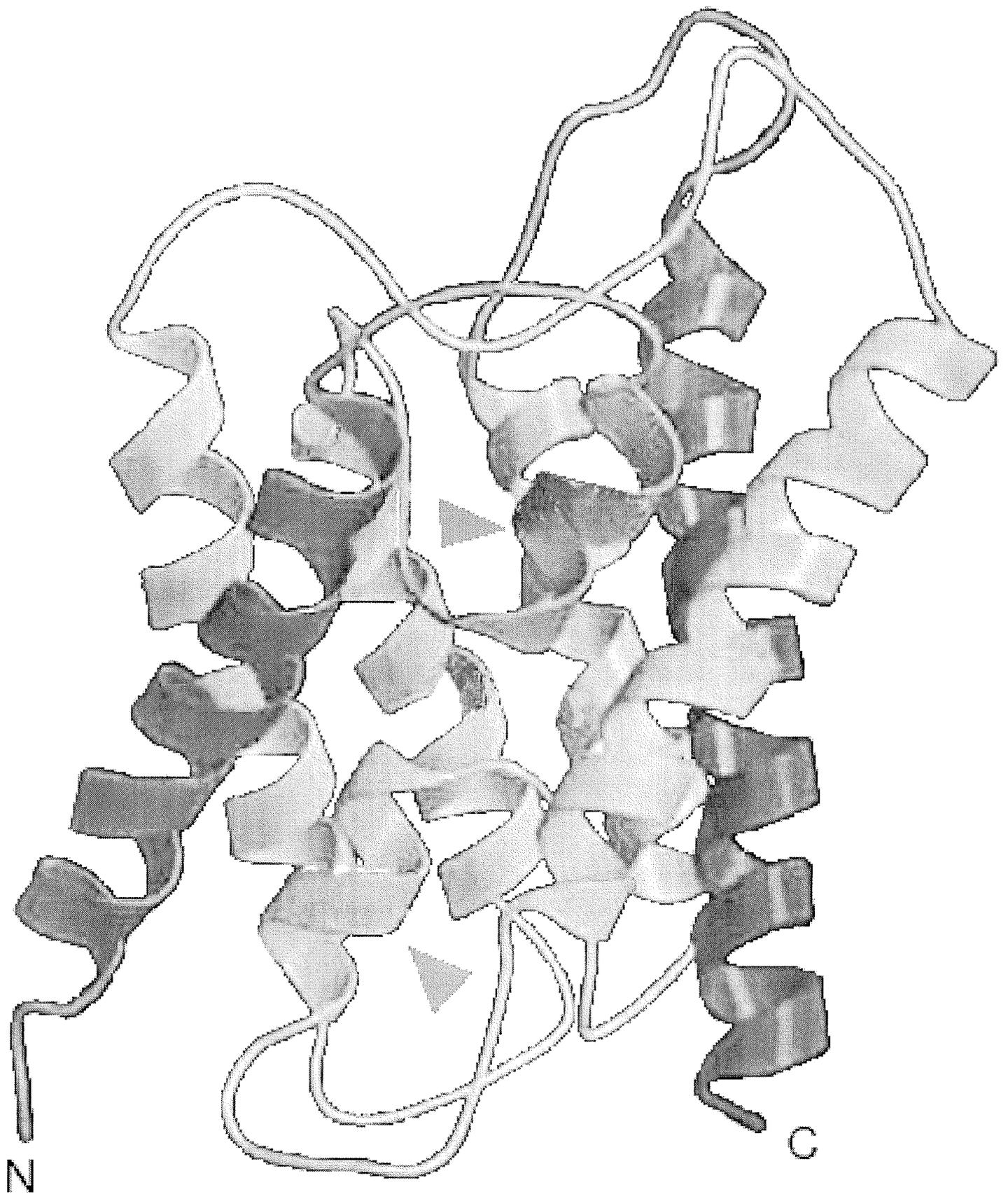


Figura 1b. Modello a nastri di un'acquaporina, la AQP1, che mostra la posizione reciproca delle 6 α eliche transmembrana, di quelle di membrana (freccie) e dei loops extra- ed intracellulari. Le lettere N e C identificano i terminali; citoplasma in basso e periplasma in alto.

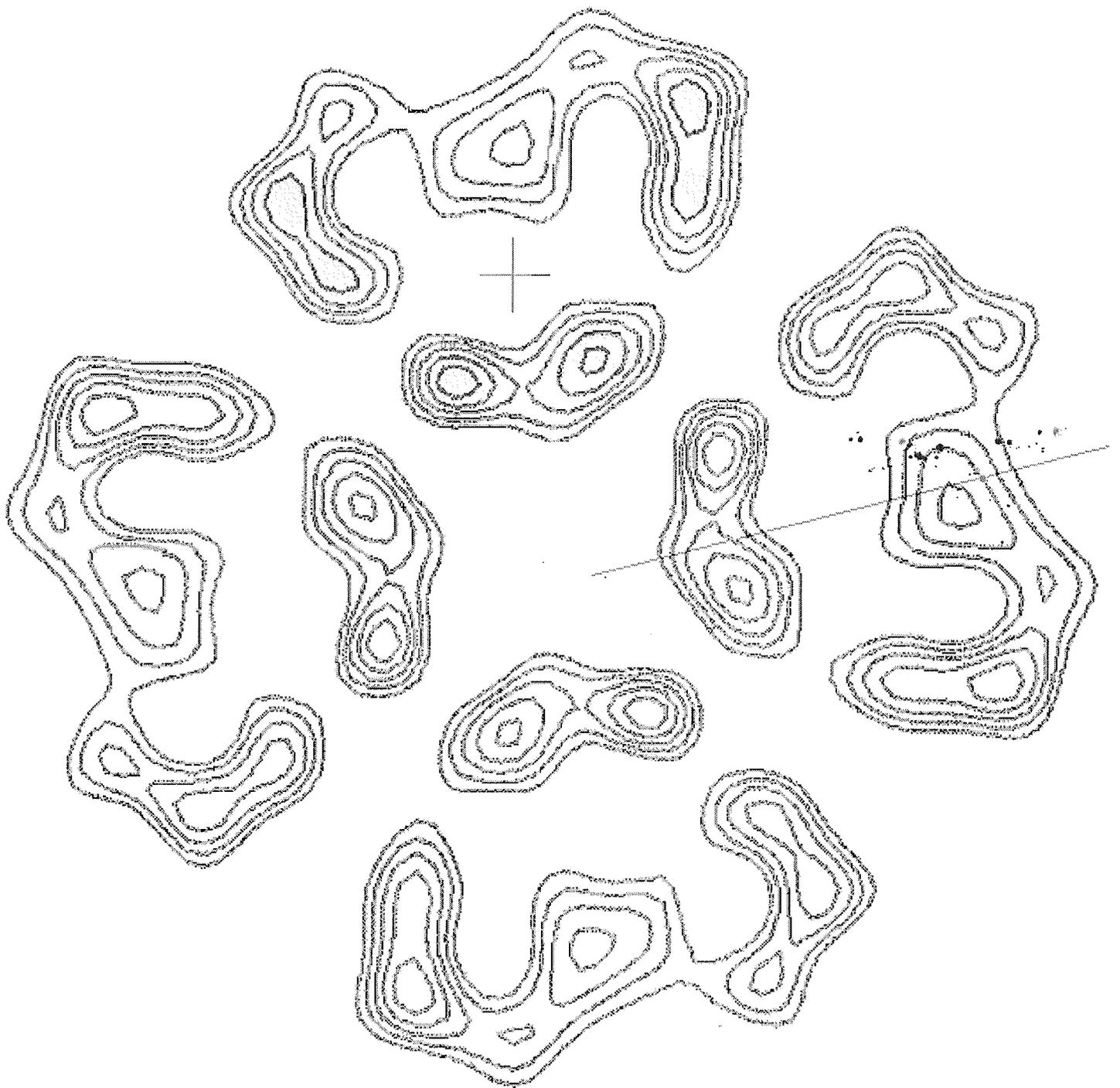


Figura 1c. Mappa di densità elettronica del tetramero di un'acquaporina, la AQP1 degli eritrociti umani, in un piano circa parallelo alla membrana. Nel monomero in alto, i cerchi grigi indicano la posizione delle α eliche, la croce il centro del canale fisico, la linea in quello a destra identifica il piano di quasi-simmetria della molecola.

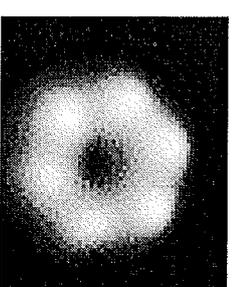
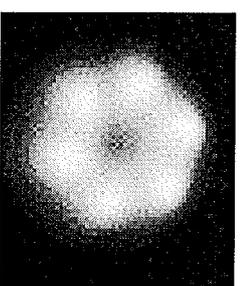
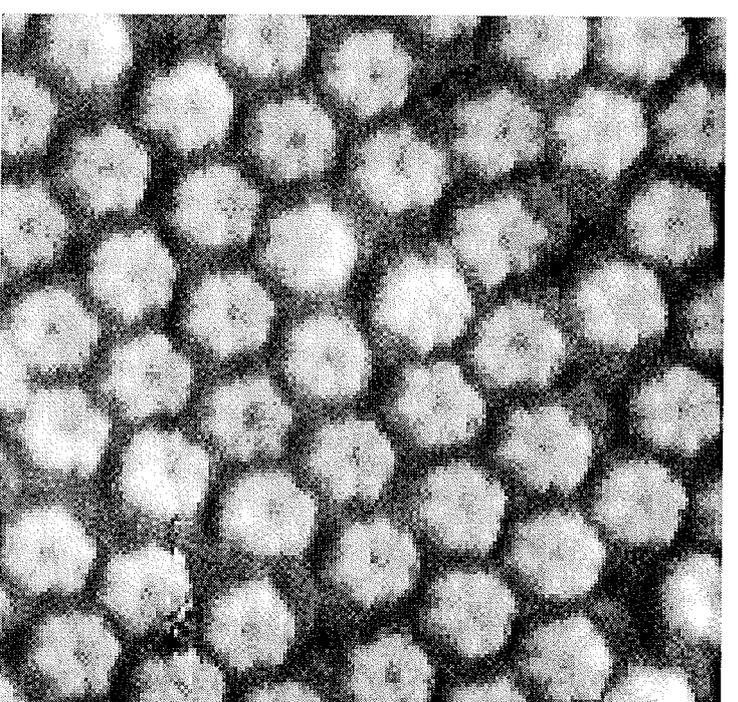
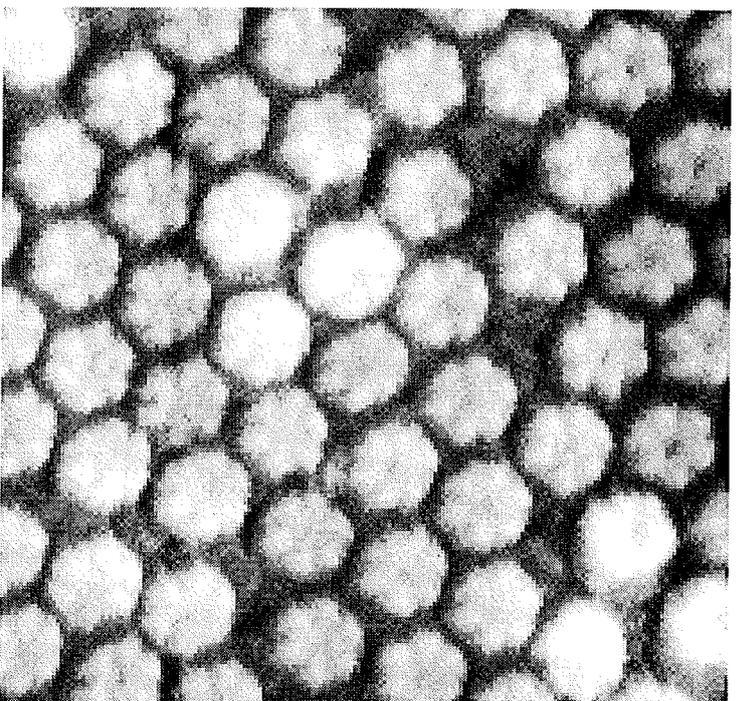


Figura 2a. Immagini ottenute al microscopio elettronico a scansione di parte di una giunzione comunicante i cui connessori sono in gran parte chiusi (a sinistra) e aperti (a destra). Gli inserti mostrano un singolo connettore nelle due condizioni. È possibile notare l'arrangiamento esagonale, non molto regolare, dei connettori (ogni connettore è circondato da altri sei).

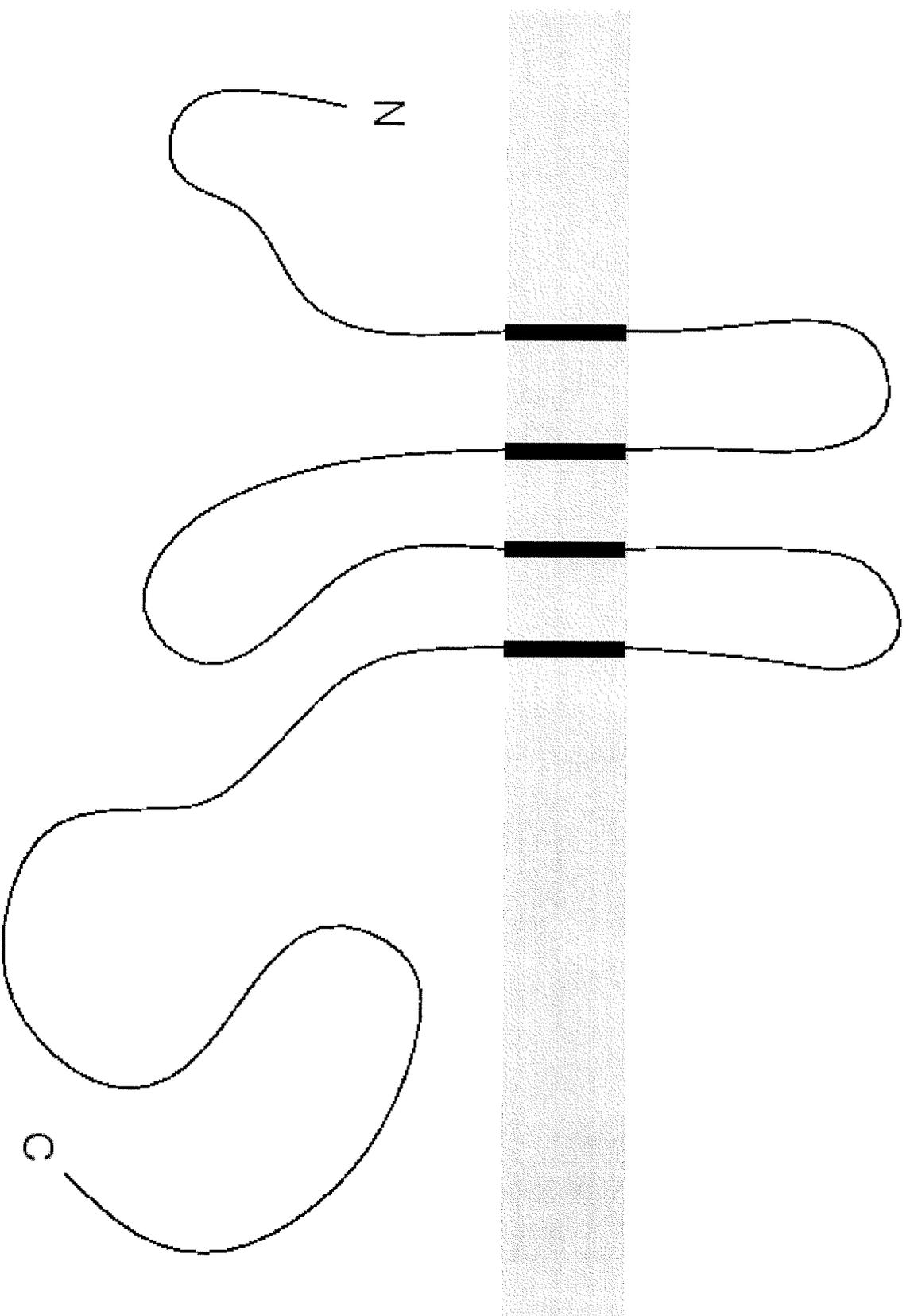


Figura 2b. Topografia di membrana di una connessina. Le barre scure verticali rappresentano le 4 α eliche transmembrana, le linee sottili i segmenti idrofili immaginati in conformazione estesa. In effetti, tuttavia, ai segmenti periplasmatici viene attribuita una conformazione β non mostrata in figura. Le lunghezze delle α eliche e quella totale dei segmenti idrofili sono in scala per una Cx26, una connessina di 26 KDaltons. I segmenti transmembrana e quelli periplasmatici sono molto conservati tra varie connessine; al contrario, l'ansa citoplasmatica ed il segmento C terminale presentano ampie variazioni di sequenza e lunghezza. La fascia orizzontale grigia rappresenta la membrana. Le lettere N e C indicano i due terminali della molecola. Periplasma in alto, citoplasma in basso.

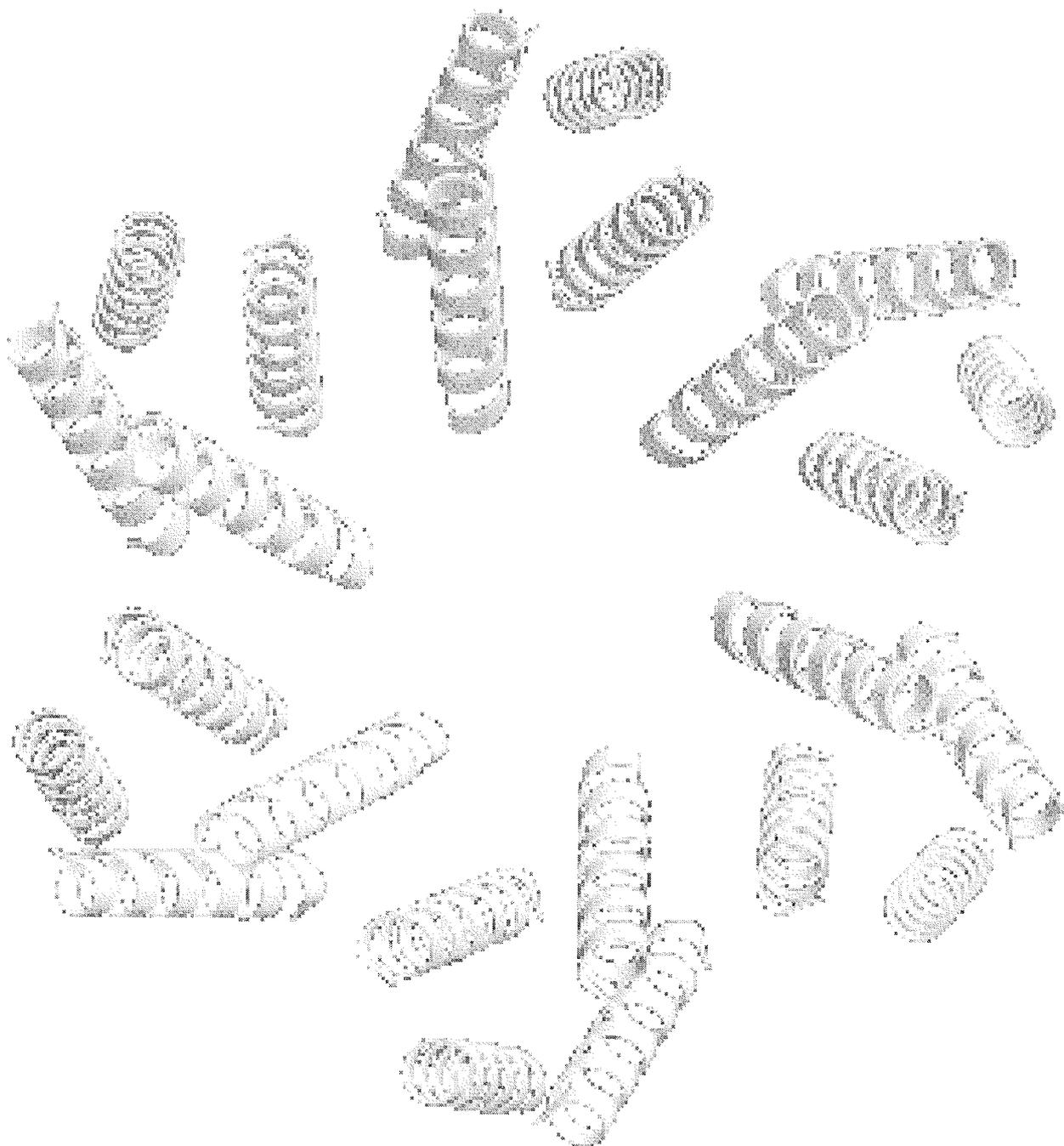


Figura 2c. Arrangiamento tridimensionale delle α eliche delle sei connessine che compongono un connessone, immaginato visto dall'interno della cellula nella configurazione a canale aperto. Il canale è delimitato dalle α eliche anfipatiche (le più interne), la cui inclinazione rispetto all'asse del canale lo restringe in direzione del connessone corrispondente (cioè dello spazio tra le due cellule). Le porzioni di sequenza non interessate alla formazione delle α eliche non sono mostrate.

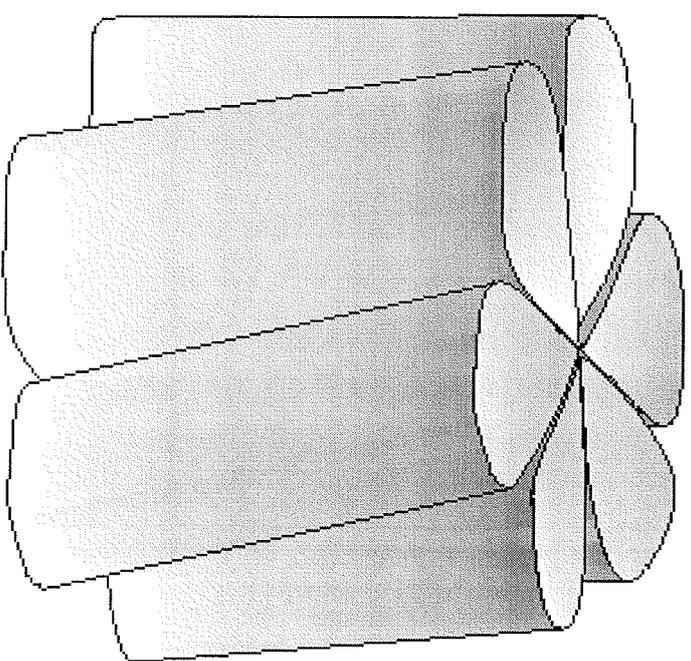
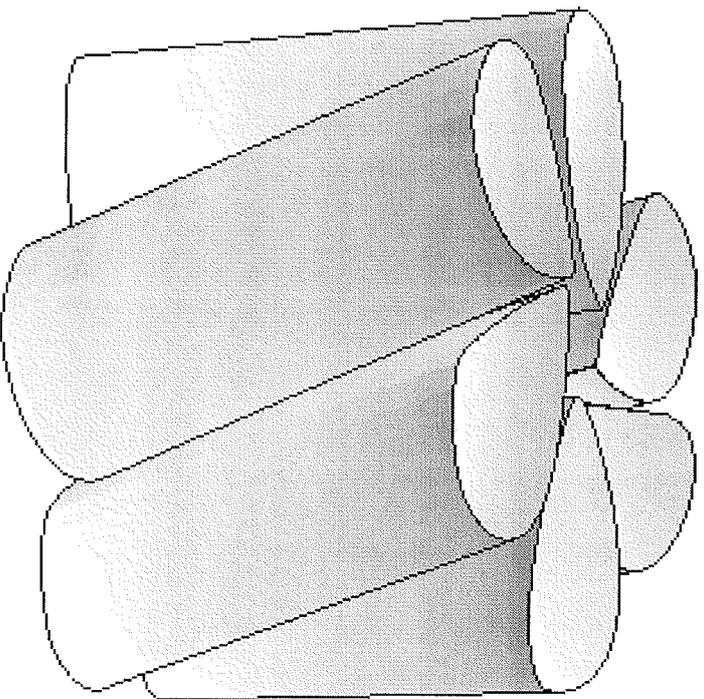


Figura 2d. Schema del movimento reciproco delle connessine nel processo di apertura e chiusura di un connessione secondo il modello a scivolamento di unità rigide. Il pannello di sinistra rappresenta il connesone nella configurazione a canale aperto, quello di destra nella configurazione a canale chiuso. Il passaggio dall'una all'altra configurazione dovrebbe avvenire per una rotazione (di circa 28° , corrispondenti ad uno spostamento di 11 \AA) della porzione a contatto con il connesone corrispondente (quella extracellulare, in basso), lasciando sostanzialmente invariata la posizione delle estremità citoplasmatiche (in alto). In accordo con i dati sperimentali, nel corso del movimento varia l'inclinazione delle connessine rispetto all'asse del canale. L'estremità citoplasmatica è rappresentata in alto, quella periplasmatica in basso.

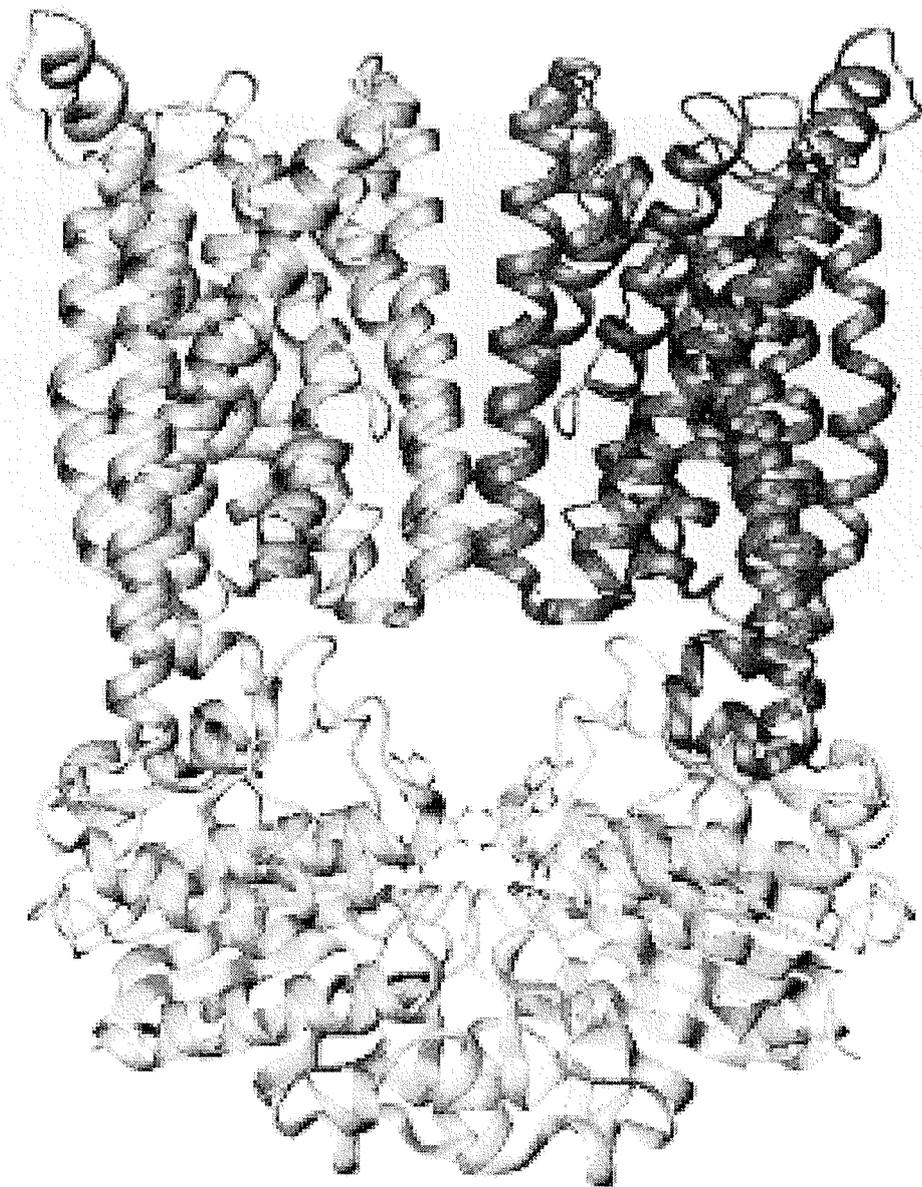


Figura 3a. Modello a nastri di un trasportatore ABC, il BtuCD di *E. coli*, che trasporta vitamina B₁₂ all'interno della cellula. La proteina è formata da quattro domini eguali due a due: due citoplasmici con attività ATPasica (in basso) e due transmembrana (in alto), rappresentate nella conformazione aperta verso il periplasma con il sito vitamina B₁₂-legante nella conformazione ad alta affinità. La banda grigia orizzontale rappresenta la membrana; citoplasma in basso, periplasma in alto.



Figura 3b. Modello a nastri e spazio pieno (contorno in grigio chiaro) di un'ATPasi tipo P_2 lo scambiatore Ca^{2+} - protoni del reticolo sarcoplasmatico (SERCA1) nella conformazione di rilascio degli ioni Ca^{2+} . Il dominio α elicoidale è a sinistra, il dominio nucleotide-legante al centro, quello di fosforilazione in alto a destra, l'attuatore in basso. La banda grigia verticale rappresenta la membrana, il citoplasma è a destra, l'interno del reticolo sarcoplasmatico a sinistra.

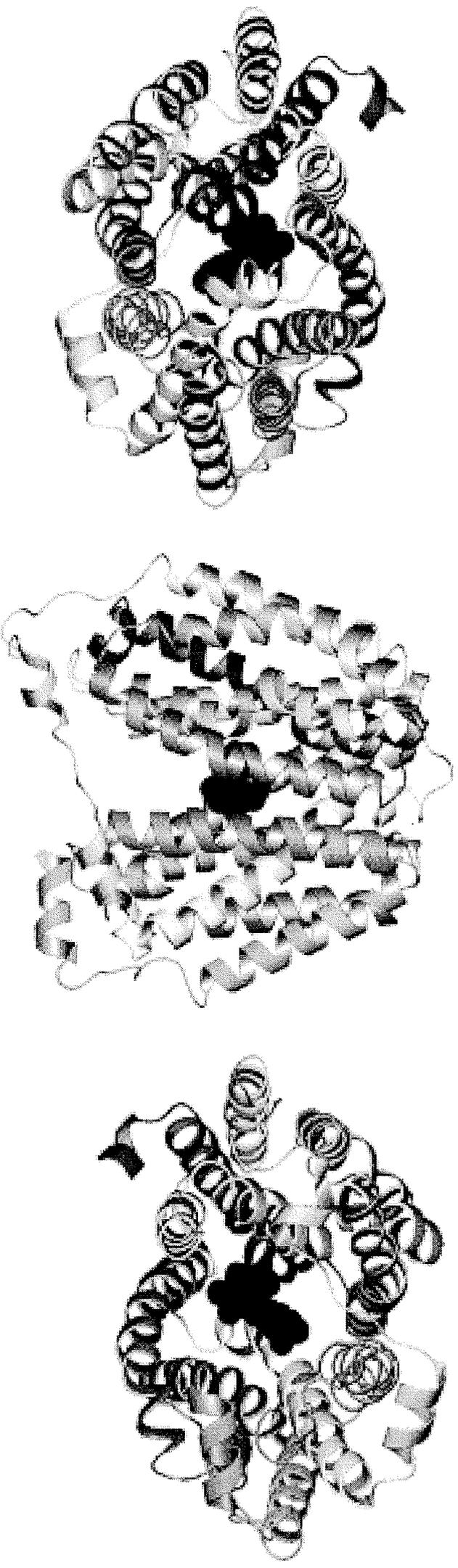


Figura 3c. Modello a nastri di un trasportatore attivo indiretto, la lattosio permeasi di *E. coli*, che trasporta galattosidi dall'interno all'esterno della cellula, ricavando l'energia necessaria dal trasporto secondo gradiente di un protone. La proteina è rappresentata nella conformazione in cui il sito per il galattoside è occupato e la cavità idrofila determinata dalle α eliche è aperta verso il citoplasma. A sinistra la proteina è vista dall'esterno della cellula, al centro dal piano della membrana, identificata dalla banda grigia, a destra dall'interno della cellula. I nastri rappresentano α eliche, i tondini segmenti a struttura non definita. Una molecola di lattosio legata è rappresentata a spazio pieno. Periplasma in alto e citoplasma in basso.

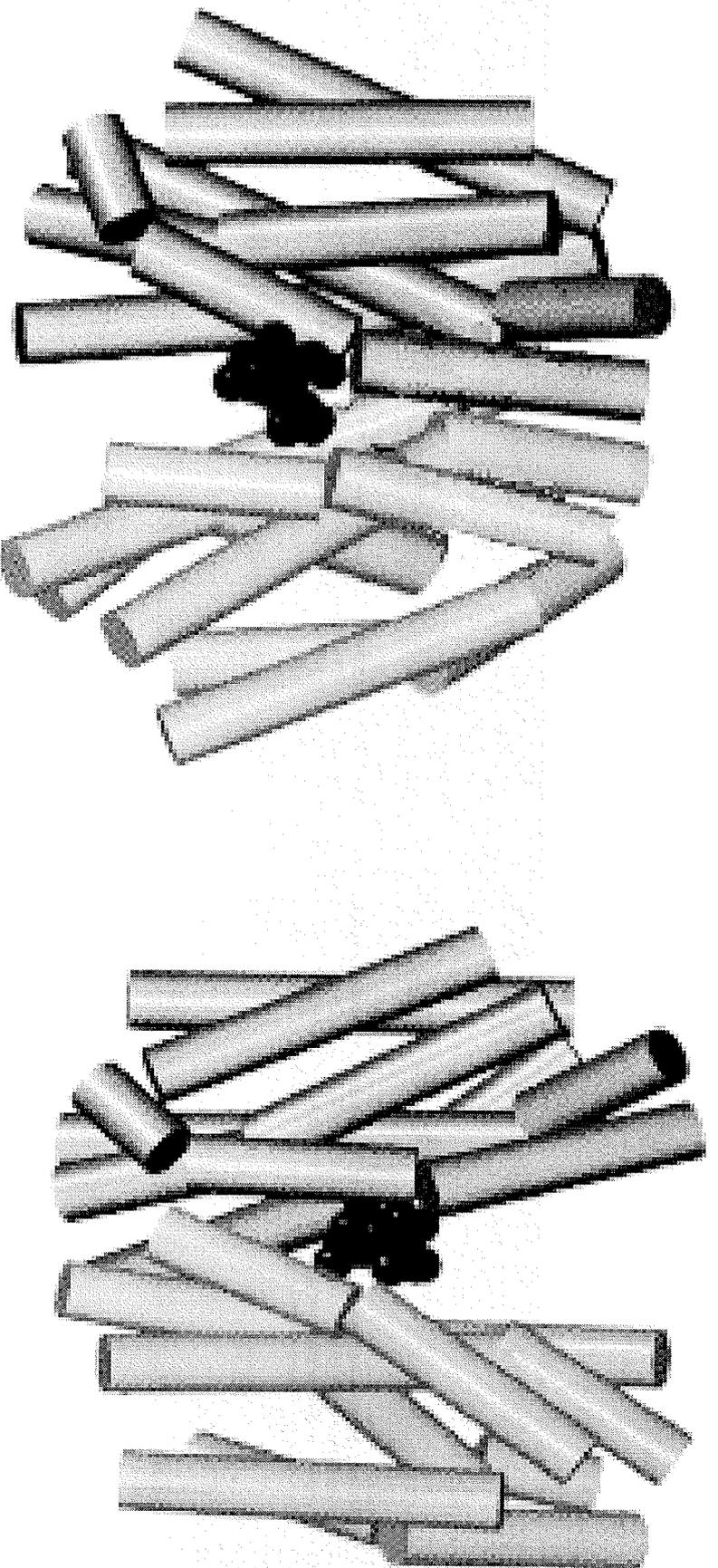


Figura 3d. Presunti cambiamenti conformazionali di un trasportatore attivo indiretto, la lattosio permeasi di *E. coli* nel passaggio tra lo stato in cui la cavità è aperta verso il citoplasma ed il lattosio è legato al suo sito (a sinistra) e quella in cui la cavità è aperta verso il periplasma, l'affinità per il lattosio è ridotta e questo viene rilasciato all'esterno della cellula (a destra). La struttura a sinistra si basa su dati cristallografici, quella di destra è ipotetica. I cilindri rappresentano α eliche, il lattosio è rappresentato in nero a spazio pieno, la banda grigia rappresenta la membrana. I segmenti interposti tra le α eliche non sono riportati. Citoplasma in basso e periplasma in alto.

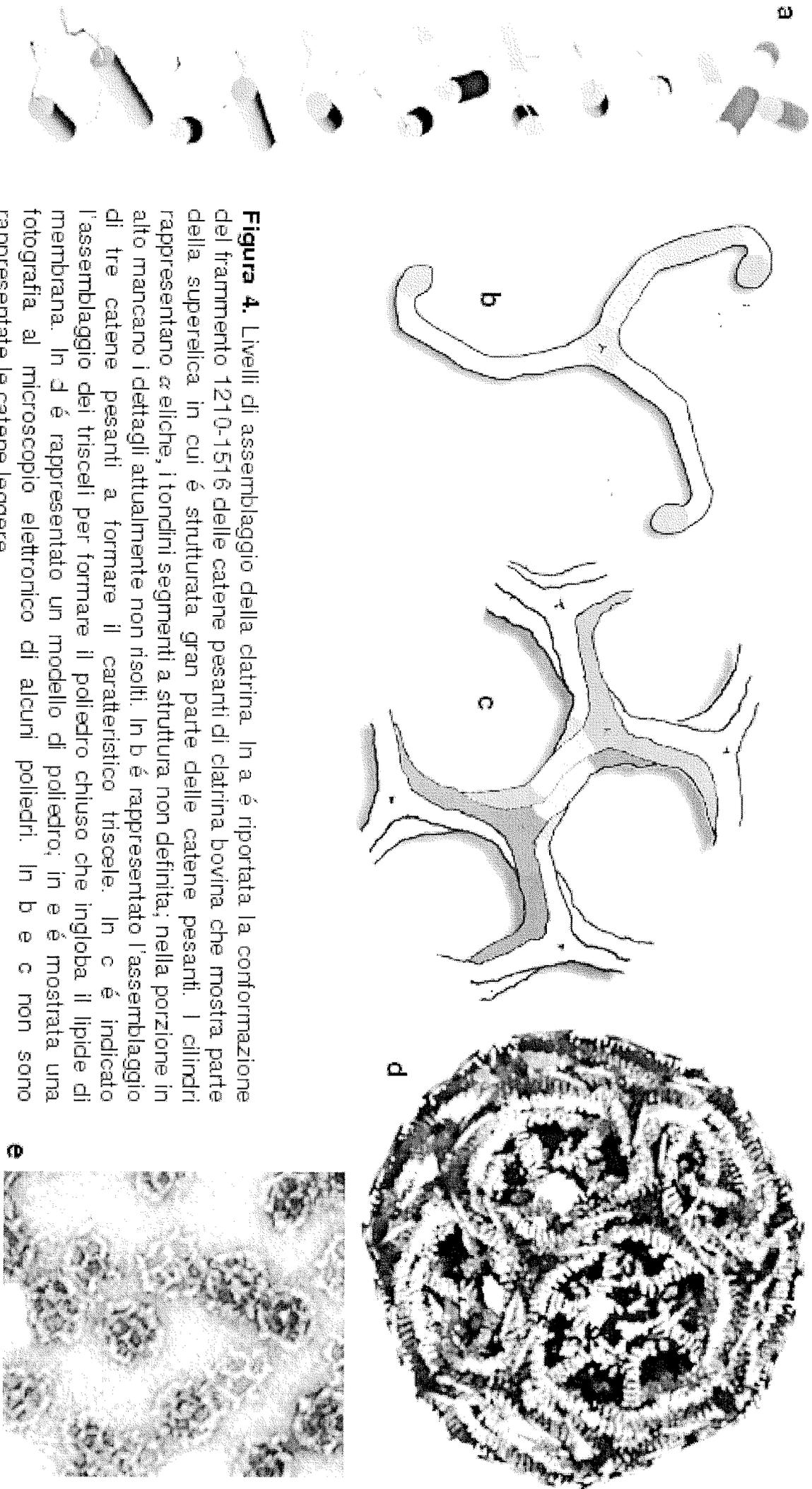


Figura 4. Livelli di assemblaggio della clatrina. In a è riportata la conformazione del frammento 1210-1516 delle catene pesanti di clatrina bovina che mostra parte della superelica in cui è strutturata gran parte delle catene pesanti. I cilindri rappresentano α eliche, i tondini segmenti a struttura non definita; nella porzione in alto mancano i dettagli attualmente non risolti. In b è rappresentato l'assemblaggio di tre catene pesanti a formare il caratteristico triscelo. In c è indicato l'assemblaggio dei trisceli per formare il poliedro chiuso che ingloba il lipide di membrana. In d è rappresentato un modello di poliedro; in e è mostrata una fotografia al microscopio elettronico di alcuni poliedri. In b e c non sono rappresentate le catene leggere.

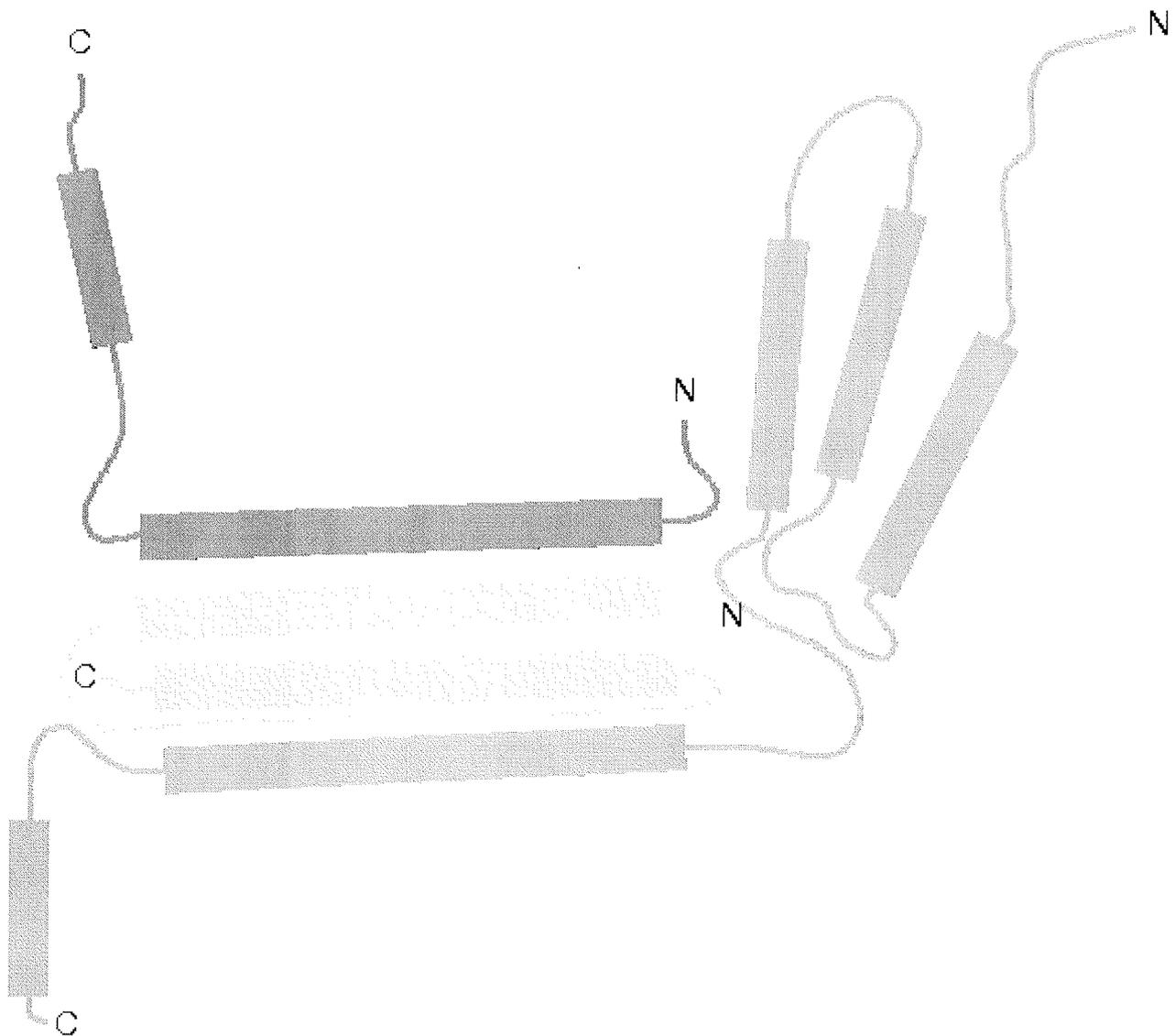


Figura 5a. Modello schematico di un complesso SNARE. La sintassina 1 (grigio medio) e la sinaptobrevina (grigio scuro) sono inserite nella membrana sinaptica (banda grigia in basso) e della vescicola (banda grigia curva in alto), rispettivamente; entrambe le proteine sono mostrate inserite nelle membrane tramite le (presunte) α eliche idrofobe C-terminali. La SNAP-25 (grigio chiaro) é disposta tra le prime due. In realtà le 4 α eliche dei domini SNARE formano coiled coils due e due e sono, quindi, disposte a spirale allungata. I tratti spessi rappresentano le α eliche, i tratti sottili porzioni a struttura non definita, C e N indicano i rispettivi terminali.

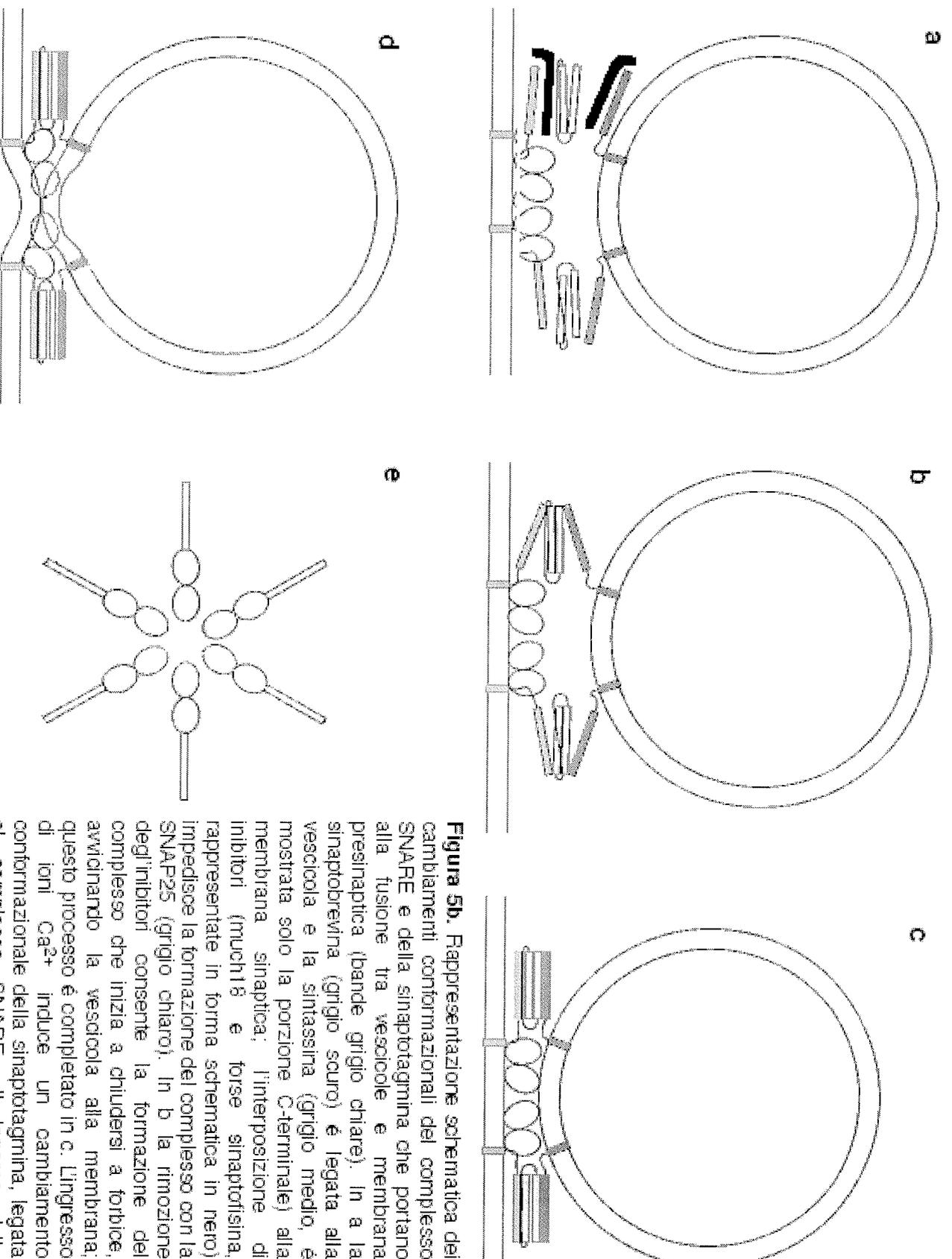


Figura 5b. Rappresentazione schematica dei cambiamenti conformazionali del complesso SNARE e della sinaptotagmina che portano alla fusione tra vescicole e membrana presinaptica (bande grigie chiare). In a la sinaptobrevina (grigio scuro) è legata alla vescicola e la sintassina (grigio medio, è mostrata solo la porzione C-terminale) alla membrana sinaptica; l'interposizione di inibitori (muchi8 e forse sinaptofisina, rappresentate in forma schematica in nero) impedisce la formazione del complesso con la SNAP25 (grigio chiaro). In b la rimozione degli inibitori consente la formazione del complesso che inizia a chiudersi a forbice, avvicinando la vescicola alla membrana; questo processo è completato in c. L'ingresso di ioni Ca^{2+} induce un cambiamento conformazionale della sinaptotagmina, legata al complesso SNARE. Il legame della sinaptotagmina alla membrana presinaptica incurva questa in direzione intracellulare, distorcendo i legami lipide-lipide (d) fino a romperli, così permettendo che le due membrane si fondano tra loro. In e è mostrato uno dei possibili, tutti ipotetici, arrangiamenti dei complessi SNARE e delle sinaptotagmine in una vista perpendicolare al piano della membrana.

Note sui recettori (4)

(Revisione 2007, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Caratteristiche comuni

1.1. Funzioni

Nella maggior parte, anche se non nella totalità dei casi, le molecole che portano l'informazione in sede extracellulare non passano attraverso la membrana plasmatica, ma ciò che viene trasferito attraverso la membrana è solo l'informazione associata a queste molecole, che rimangono fuori dalla cellula. Tipicamente, le molecole informative si legano a specifiche strutture proteiche di membrana, i recettori, che convertono l'informazione esterna — costituita da una variazione delle concentrazioni della molecola informazionale nell'immediata prossimità della cellula recettrice — in una forma riconoscibile in sede intracellulare. Questa trasduzione dell'informazione esterna avviene tramite un cambiamento conformazionale del recettore, cambiamento conformazionale favorito dal legame della molecola informazionale (ligando) a specifiche zone del recettore, i siti recettoriali, legame che avviene stabilendo interazioni deboli multiple. Dato che, nel caso tipico, i recettori sono proteine di membrana che ne attraversano l'intero spessore e che hanno porzioni sia extra- che intra-cellulari, il cambiamento conformazionale del recettore indotto (o meglio, stabilizzato, vedi oltre) dal legame con la molecola informazionale extracellulare si può trasmettere all'interno della cellula ed indurre — in modo più o meno diretto — la modifica dei parametri intracellulari desiderati.

1.2. Siti recettoriali

I siti recettoriali consistono in zone definite della molecola del recettore, accessibili dall'esterno di questa, che presentano un arrangiamento spaziale dei gruppi funzionali (ossia, delle catene laterali dei residui di amminoacido della proteina) tale che questi possano reagire con gruppi funzionali complementari presenti sulla molecola del ligando (vedi "Complementi sul contenuto di informazione e sui meccanismi di riconoscimento delle proteine, § 3.). Il tipo dei gruppi funzionali in grado di reagire con il ligando, ed i rapporti spaziali fra questi, sono in prima istanza responsabili delle specificità delle interazioni ligando- recettore: infatti, relativamente poche molecole possono prendere con il sito recettoriale rapporti tali da comportare la creazione di interazioni che stabilizzano il recettore nella conformazione attiva (vedi oltre). Inoltre, l'affinità dei recettori per i loro ligandi deve essere molto elevata (ciò che è indicato da valori molto piccoli delle costanti di dissociazione). In prima istanza, l'affinità ligando-recettore è tanto maggiore quando più è elevata ed energeticamente favorevoli sono le interazioni tra le due specie. Ad esempio, le costanti di dissociazione dei recettori per gli ormoni idrofobici, costituiti da molecole di media dimensione e conformazionalmente rigide sono nell'ordine di 1×10^{-8} - 1×10^{-9} M. I ligandi peptidici sono invece conformazionalmente molto flessibili, ciò che permette un certo adattamento al sito recettoriale; assieme al numero spesso elevato di gruppi funzionali coinvolti nel legame, la flessibilità della molecola comporta interazioni caratterizzate da affinità molto elevate, espresse da costanti di dissociazione nell'ordine di 1×10^{-12} - 1×10^{-13} M. In sostanza, ciò comporta che i ligandi funzionalmente efficaci siano costituiti solo da quelle sostanze in grado di rispondere ai requisiti esposti: legarsi con elevata affinità e stabilizzare il recettore nella conformazione corretta.

Dalla definizione di sito recettoriale utilizzata risulta come, almeno in teoria, varie molecole potrebbero essere in grado di interagire con un singolo sito recettoriale; per converso, potrebbero anche esistere più siti recettoriali in grado di legare un singolo ligando. Ciò, a condizione che, in entrambi i casi, gruppi funzionali opportuni siano disposti nei corretti rapporti spaziali. Anche se queste considerazioni sono teoricamente sostenibili (ed in parte verificate, vedi oltre), in condizioni fisiologiche non solo il numero di possibili ligandi endogeni è limitato, ma vi sono anche limiti all'accessibilità dei recettori, limiti imposti da fattori di compartimentazione e dalle velocità di diffusione e di degradazione o di ricattura dei ligandi. Il caso dell'occupazione dello stesso sito recettoriale da parte di più ligandi ha quindi modesta rilevanza fisiologica, mentre ha maggiore rilevanza il caso di un singolo ligando che si lega a più recettori distinti. Al contrario, la molteplicità dei ligandi è importante in condizioni patologiche, come in relazione a sindromi autoimmuni, ma soprattutto in campo farmacologico. Infatti, la gran parte delle interazioni di interesse farmacologico e tossicologico riguardano molecole esogene in grado di occupare specifici siti recettoriali esistenti nell'organismo, competendo con i ligandi endogeni. In fine, va notato a questo proposito che le molecole

esogene non si legano obbligatoriamente a siti con cui interagiscono ligandi endogeni. Infatti, possono coesistere sullo stesso recettore differenti siti in grado di interagire con differenti sostanze ciò che, in condizioni fisiologiche, è alla base della modulazione dell'effetto di un ligando primario da parte di ligandi secondari.

I concetti appena esposti valgono anche nel caso di antagonisti. Si possono, infatti, dare le seguenti ipotesi alternative: i. l'occupazione reversibile del (o dei) sito recettoriale da parte di una molecola stabilizza una conformazione cui corrisponde lo stato attivo del recettore (ad esempio, canale ionico aperto, sito enzimatico attivo...); è questo il caso degli agonisti. ii. I siti recettoriali sono occupati in modo reversibile da molecole in grado di legarsi ai siti stessi, ma non in grado di stabilizzare l'opportuno cambiamento conformazionale (in realtà, molecole che stabilizzano un diverso cambiamento conformazionale), i così detti inibitori competitivi; ciò si traduce in un'inibizione dell'effetto degli agonisti che — dato che il legame dell'antagonista è reversibile — può essere sormontato aumentando la concentrazione dell'agonista. iii. Se il sito recettoriale (il sito per l'agonista) è occupato da molecole che non in grado di stabilizzare la conformazione cui corrisponde il recettore attivo, ed il legame è irreversibile, si parla di inibizione non competitiva; ciò perché, dato che il legame dell'inibitore non è reversibile, l'effetto dell'agonista non può essere ripristinato aumentandone la concentrazione. iv. L'inibizione è definita non competitiva anche quando sostanze in grado di indurre nella proteina un cambiamento conformazionale che o impedisce il legame con il ligando oppure impedisce che — anche a sito recettoriale occupato — possa essere assunta la conformazione relativa allo stato attivato. Questi antagonisti si legano a siti distinti dal sito per l'agonista con un meccanismo chiamato cooperatività negativa; anche in questo caso, l'inibizione non può essere superata aumentando la concentrazione dell'agonista ed è quindi definita non competitiva. Va in proposito notato che siti di quest'ultimo tipo possono anche essere più di uno per molecola e che la specificità dei ligandi per questi siti è in genere minore di quella degli agonisti. Infatti, un agonista, proprio in quanto tale, deve stabilizzare un cambiamento conformazionale ben definito del recettore, stabilizzarlo, cioè, nella sua conformazione attiva. Al contrario, un inibitore non competitivo comporta un cambiamento conformazionale che soltanto impedisce alla molecola di assumere la sua conformazione attiva: dato che ciò può avvenire stabilizzando qualsiasi conformazione eccetto quella attiva, i criteri da soddisfare sono meno stringenti; pertanto, un certo numero di molecole diverse potrebbero legarsi a siti differenti, producendo effetti che — diversi come conformazione — inducono comunque inibizione.

1.3. Cambiamenti conformazionali

Come accennato sopra, a seguito dell'interazione con gli opportuni ligandi, i recettori vanno incontro ad un cambiamento conformazionale che li porta in una conformazione attiva. Pur senza entrare nei dettagli del problema, va notato come quest'affermazione sia molto semplificativa. Infatti, l'ipotesi che il cambiamento conformazionale del recettore sia indotto direttamente dall'interazione con il ligando non è in grado di rendere conto di tutti i dati sperimentali. È in effetti vero che, a sito recettoriale occupato, le molecole dei recettori si vengono normalmente a trovare in uno stato caratterizzato da un contenuto energetico differente da quello relativo al sito non occupato. Dato inoltre che le differenti conformazioni di una molecola proteica sono circa isoenergetiche, il modesto apporto energetico che può essere fornito dall'interazione con il ligando è in genere sufficiente a rendere conto della differenza di energia tra i due stati. Tuttavia, per passare da una conformazione ad un'altra una proteina deve rompere e riformare un elevato numero di legami, con una richiesta energetica superiore a quella che può essere fornita dalle interazioni con i ligandi. In termini un poco più formali, la differenza di energia libera tra le due conformazioni è piccola, mentre non è piccola l'energia di attivazione della reazione di conversione tra le due conformazioni. Dato però che le molecole proteiche cambiano spontaneamente conformazione a seguito del continuo rompersi e riformarsi dei legami deboli che mantengono la struttura terziaria, l'energia fornita dalla presenza del ligando può stabilizzare la proteina in una delle conformazioni assunte spontaneamente. In altri termini, mentre la presenza del ligando aumenta la probabilità che in un dato istante una proteina si trovi nella conformazione attiva, questa conformazione è assunta (ma non mantenuta) anche a sito recettoriale non occupato. In alcuni casi, questi fenomeni possono essere verificati direttamente. Ad esempio, misure fisiche che possono essere effettuate in tempo reale indicano come canali ionici a controllo di ligando si possano aprire — e rapidamente richiudere — anche in assenza di ligando. E' quindi la probabilità di trovare la proteina nello stato conformazionale corrispondente al canale aperto che viene fortemente aumentata dalla presenza del ligando al suo sito recettoriale.

2. Classi

Come già detto, il cambiamento conformazionale del recettore attiva una funzione effettrice nell'interno della cellula. A seconda del tipo di funzione attivata si distingue tra recettori metabotropi, che hanno effetti metabolici e recettori ionotropi, nei quali l'attivazione del recettore induce una variazione di permeabilità ionica (recettori canale). Inoltre, la funzione effettrice può essere attivata direttamente dalla stessa molecola recettoriale, oppure indirettamente, da una molecola distinta dal recettore ma funzionalmente accoppiata a questo. Nel primo caso i recettori sono chiamati di tipo uno, nel secondo caso di tipo due. In questo secondo caso, tra il recettore e l'effettore esiste una cascata più o meno lunga di eventi intermedi. Inoltre, l'attivazione di recettori metabotropi può produrre i suoi effetti o modificando il metabolismo (in genere, alterando l'attività di enzimi) o modificando la sintesi proteica (cioè agendo sul genoma). Tuttavia, in molti casi, anche l'attivazione del genoma passa tramite l'attivazione di enzimi.

Indipendentemente da queste classificazioni funzionali, i recettori sono ordinati in famiglie (o superfamiglie), i cui membri dovrebbero essere (ma spesso non sono) evolutivamente correlati. Più correttamente: le similitudini strutturali riscontrabili tra alcuni gruppi di recettori hanno dato luogo all'ipotesi che questi possano essersi evoluti da un numero limitato di progenitori comuni. Le classi di recettori descritte qui e sotto le "Note sui canali ionici" sono le seguenti: 1. Recettori accoppiati alle proteine G (o a 7 segmenti transmembrana); si tratta di recettori metabotropi, i cui effetti intracellulari sono tipicamente mediati dai così detti secondi messaggeri tramite una famiglia di GTPasi trimeriche note come proteine G. 2. Recettori con attività enzimatica: sono recettori l'occupazione del sito recettoriale dei quali, con un meccanismo tipicamente indiretto, dà inizio ad un'attività enzimatica intracellulare. Si tratta di recettori disomogenei sia sotto un aspetto evolutivo sia sotto un aspetto strutturale, che vengono riuniti solo per semplicità di classificazione. 3. Canali a controllo di ligandi extracellulari: si tratta di proteine che formano un canale fisico che attraversa l'intero spessore della membrana, lo stato di apertura o chiusura del quale — controllato dall'occupazione del sito recettoriale — induce variazioni della conduttanza ionica della membrana cellulare. 4. Canali controllati dai nucleotidi ciclici: si tratta, anche in questo caso, di proteine che formano un canale fisico che attraversa la membrana plasmatica, che permette un passaggio ionico selettivo il cui stato di apertura è controllato dal legame con un nucleotide ciclico; in questo caso il ligando è intra-, non extracellulare. 5. Canali calcici intracellulari, ossia i recettori per l' IP_3 e per la rianodina. Si tratta di canali Ca^{2+} -selettivi inseriti nella membrana di organelli di deposito calcico che mediano una frazione consistente dell'aumento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche che danno origine alla contrazione muscolare. 6. Recettori intracellulari per molecole idrofobe: ormoni steroidei e tiroidei, acido retinoico e così via. Si tratta di recettori che modificano la sintesi proteica agendo direttamente sul genoma che, al contrario di tutti gli altri casi, si trovano liberi nel citoplasma.

2.1. Recettori accoppiati alle proteine G

Come recettori accoppiati alle proteine G, o recettori a sette segmenti transmembrana, si identifica una famiglia di recettori metabotropi che modificano specifici parametri cellulari, tipicamente attivando effettori intermedi per il tramite di proteine G. Più esplicitamente, l'occupazione del sito recettoriale induce la dissociazione delle proteine G associate, i cui frammenti possono regolare l'attività di numerosi effettori intracellulari (e.g., adenilciclasa, fosfolipasi, fosfodiesterasi, canali ionici); eccetto che per i canali ionici, questi sono effettori intermedi che attivano, a loro volta, cascate di segnali che danno origine ad effetti regolativi (metabolici in senso stretto o di controllo sul ciclo cellulare). Riveste particolare rilevanza funzionale il caso in cui gli effettori intermedi sono costituiti da enzimi che modificano la sintesi di mediatori intracellulari, i secondi messaggeri. Inoltre, come accennato, dato che i meccanismi intracellulari comportano di norma complesse cascate di eventi, gli effettori intracellulari attivati assai di rado costituiscono l'effettore finale, ma danno in genere inizio ad una (o più) cascate di eventi interconnessi.

Per la loro diffusione nell'organismo (si stima che quasi il 5% del genoma umano codifichi per qualcosa come 5000 differenti proteine) e ancor di più per l'importanza delle interazioni mediate, i recettori di questa classe rivestono una particolare rilevanza funzionale. L'esistenza di una cascata di reazioni intermedie tra l'occupazione del sito recettoriale e l'attivazione della funzione metabolica finale comporta un'elevata amplificazione del segnale che, apparentemente, risulta in molti casi funzionalmente vantaggiosa. Probabilmente anche in relazione alla flessibilità del sito recettoriale (vedi oltre), i ligandi attivi su questi recettori vanno da ioni, piccole molecole, lipidi fino a peptidi e proteine. Dato che fanno parte di questa famiglia le proteine retiniche preposte alla trasduzione dei segnali luminosi, questi recettori sono attivati anche dai fotoni, anche se questi non possono essere considerati ligandi in senso proprio (vedi "Note sui secondi messaggeri", § A.2.). Inoltre, le molteplici interazioni con sostanze farmacologicamente attive conferiscono a questi recettori una particolare importanza farmacologica. Ciò anche perchè la conoscenza

dei dettagli del sito recettoriale di molti recettori di questa classe ha permesso la sintesi mirata di molecole capaci di interagire con specifici isotipi recettoriali, permettendo così un'elevata specificità d'azione. Tali sostanze possono quindi consentire di selezionare finemente gli organi bersaglio e, conseguentemente, di ridurre gli effetti secondari e avversi.

Questi recettori sono tutti formati da una singola catena polipeptidica del peso molecolare di 45 - 55 KDaltons con struttura secondaria e terziaria omogenea, caratterizzata dalla presenza di sette α eliche parzialmente idrofobe, ciascuna di una lunghezza tra 20 e 28 residui, unite da segmenti idrofili di lunghezza variabile (Figura 1a). Come generalmente avviene nelle proteine di membrana, gli assi di queste α eliche sono circa perpendicolari al piano della membrana e, data la loro lunghezza, la attraversano completamente. La topografia di membrana di queste molecole (Figura 1b) consiste in: 1. una sequenza idrofila N-terminale extracellulare di lunghezza assai variabile; 2. sette segmenti idrofobi a struttura secondaria α e, interposte a questi, sei segmenti idrofili, meno strutturati e di lunghezza ampiamente variabile, localizzati in posizione alternativamente citoplasmatica ed extracellulare. 3. Una lunga sequenza idrofila C-terminale citoplasmatica (dato che l'N-terminale si trova sulla faccia extracellulare della membrana ed il numero di segmenti transmembrana è dispari, il C-terminale si deve trovare dal lato citoplasmatico). Nel segmento C-terminale è anche localizzato un'ottava α elica: questa è tuttavia, corta, idrofila e disposta nel citoplasma, circa parallelamente alla membrana (Figura 1a). Infine, la regione C-terminale è sede di reazioni di fosforilazione con funzione regolativa, relative sia a desensitizzazione dei recettori che a processi di internalizzazione. Come mostrato in Figura 1c, i sette segmenti ad α elica sono disposti in un arrangiamento che, in una vista perpendicolare al piano della membrana, è descrivibile come due C affacciate parzialmente sfalsate, con gli assi delle α eliche circa paralleli fra loro e circa perpendicolari al piano della membrana. Questo arrangiamento viene a determinare una cavità aperta dal lato extracellulare che, sempre vista perpendicolarmente alla membrana, ha la forma di una S (più esattamente, di una S se vista da posizione citoplasmatica e di una Z arrotondata se vista da posizione extracellulare come in Figura 1c) Inoltre, alcune delle α eliche sono leggermente inclinate rispetto al piano della membrana; in più, in alcune α eliche sono presenti residui di prolina. Le proline fanno raramente parte di strutture α , dato che l'ingombro dell'anello pirrolico tende a disordinare le α eliche: in effetti, la presenza delle proline distorce le α eliche, il cui asse è, appunto, piegato in corrispondenza di questi residui. Assieme all'inclinazione delle α eliche, ciò contribuisce a restringere la cavità verso il fondo (ossia verso la parte intracellulare). In molti casi questa cavità costituisce almeno una parte del sito recettoriale. In questo caso il sito recettoriale è localizzato nello spessore della membrana, dato che lo sono i residui (più correttamente: le catene laterali dei residui) cui si lega il ligando. In molti casi partecipano alle interazioni con i ligandi anche le anse idrofile extracellulari della molecola, come avviene nel caso di — fisiologicamente rilevante — di ligandi peptidici, la lunghezza e flessibilità dei quali ne permettono un adattamento a siti recettoriali estesi. Inoltre, il sito recettoriale è in posizione completamente extracellulare (è costituito dal segmento N-terminale del recettore) nei recettori, detti di classe C, che comprendono, tra gli altri, i recettori metabotropi per glutammato e per il GABA;

Nella larghissima maggioranza dei casi, i recettori a sette segmenti agiscono tramite proteine G; quindi, i cambiamenti conformazionali del recettore che sono stabilizzati dalla presenza del ligando devono indurre nella proteina G associata un cambiamento conformazionale che ne induce la dissociazione nei due frammenti attivi. I dettagli di queste interazioni sono in parte noti: molto schematicamente, a seguito dell'occupazione del sito recettoriale il sesto segmento transmembrana subisce una rotazione sul suo asse; dato che questo segmento, contenendo una prolina, è leggermente piegato, nella rotazione la sua estremità citoplasmatica si sposta verso la membrana. È stato anche proposto (ma quest'ipotesi è in contrasto con lo spostamento in direzione della membrana appena citato) che si possa anche verificare un raddrizzamento dell' α elica. L'effetto di questi cambiamenti conformazionali è quello di uno spostamento reciproco del sesto segmento rispetto al terzo, spostamento che potrebbe generare una superficie di interazione con la proteina G. Tuttavia, questa è solo una parte (la sola conosciuta) della storia: infatti — per motivi tecnici — tutte le misure relative sono state eseguite in assenza di proteina G, il legame con la quale è notoriamente cooperativo rispetto a quello con i ligandi (vedi "Note sulle proteine G", § 4.1.1.): quindi, la presenza delle proteine G necessariamente deve modificare la conformazione del recettore ciò che ovviamente riduce la validità di quanto appena esposto.

Come già osservato, le proteine G costituiscono il tramite di gran lunga più importante per l'azione di questa classe di recettori. Questi, tuttavia, possono esercitare i loro effetti anche con meccanismi indipendenti dalle proteine G. Ad esempio, nel tessuto cardiaco, recettori per l'angiotensina II sono in grado di indurre cascate enzimatiche intracellulari che iniziano con l'attivazione diretta (ossia, senza il coinvolgimento di proteine G) di una tirosina chinasi, la Src. In linea di principio, si può supporre che l'attivazione del recettore possa comportare una conformazione tale da evocare una superficie di interazione con l'enzima tale da portare

quest'ultimo nella sua conformazione attiva, come avviene nel caso dei recettori con attività enzimatica. Attualmente, tuttavia, quanto è noto su questi meccanismi è poco più della loro esistenza.

È ancora necessario notare che quanto fin'ora riportato fa riferimento a recettori singoli; esistono, tuttavia, dati indicanti la presenza di forme dimere o oligomere, funzionalmente attive (cioè, in grado di legare i ligandi e interagire con le proteine G). Per quanto è noto, i dimeri dovrebbero essere una forma costitutiva, nel senso che le proteine dovrebbero dimerizzare nel reticolo endoplasmico e venire trasportate come tali fino alla membrana. Sotto un aspetto funzionale, alcuni dimeri sono certamente pienamente funzionali, mentre esistono dati a favore del ruolo funzionale anche di polimeri maggiori. Tuttavia, questi recettori sono certamente attivi in forma monomera e sembra probabile la coesistenza di forme monomere e oligomere. Tuttavia, dato che la polimerizzazione induce obbligatoriamente una conformazione diversa da quella relativa ai monomeri singoli, si deve supporre che la polimerizzazione possa comportare differenze funzionali, verosimilmente relative, quanto meno, alle interazioni con i ligandi. L'argomento è ulteriormente complicato dalla presenza di eterodimeri funzionali (ad esempio tra recettori β adrenergici e recettori oppioidi), le cui caratteristiche non corrispondono a quelle di nessuno dei due dimeri. Senza cercare di entrare nei dettagli di un argomento che è attualmente oggetto anche di polemica, si può ipotizzare che le forme monomere e forme variamente aggregate possano coesistere, senza però che sia ancora possibile definire i ruoli e l'importanza relativa di queste forme.

2.2. Recettori con attività enzimatica

Molti recettori metabotropici di grande importanza funzionale agiscono attivando un sito enzimaticamente attivo posto nella porzione intracellulare della molecola (sono quindi recettori di tipo 1), oppure attivando un enzima accoppiato alla molecola recettoriale ma che non fa parte di questa (di tipo 2). Meccanismi di questo tipo sono utilizzati da molti gruppi di recettori per i quali non esistono indicazioni di correlazione evolutiva e che vengono riuniti essenzialmente per semplicità classificativa, riandendoli in cinque gruppi più o meno artificiali secondo l'attività enzimatica: tirosina chinasi (due gruppi, uno di tipo 1 e uno di tipo 2), tirosina fosfatasi, guanilato ciclasi, serina/treonina chinasi.

Molto in generale questi recettori mediano segnali portati da ligandi costituiti da peptidi o piccole proteine che spesso modificano la sintesi proteica (il bersaglio finale è, in questo caso, il genoma) come i fattori di crescita, le neurotropine e le interleuchine ed altri mediatori immunitari. Sempre in generale questi recettori sono costituiti da una — a volte da più d'una — catene polipeptidiche di modesta lunghezza (ad esempio il recettore per l'EGF, il fattore di crescita dell'epidermide, ha un peso molecolare di circa 12000 Daltons) che attraversano una sola volta la membrana plasmatica ed in cui si distinguono tre domini: uno N-terminale extracellulare, su cui è localizzato il sito recettoriale; uno transmembrana, costituito da una singola α elica idrofoba che ancora la molecola alla membrana; uno intracellulare C-terminale, su cui è localizzato il sito enzimaticamente attivo (attività enzimatica recettoriale), o il sito in grado di interagire con l'enzima se questo è distinto dal recettore (attività enzimatica non recettoriale). Al contrario di quanto avviene per la maggior parte dei recettori, il legame con la molecola informazionale non è in grado di pilotare un cambiamento conformazionale tale da attivare il sito enzimaticamente attivo. Infatti, dato che il sito recettoriale e quello enzimaticamente attivo sono connessi da una singola α elica transmembrana, il cambiamento conformazionale del dominio extracellulare indotto dal ligando non può propagarsi al dominio intracellulare. Ciò perché l' α elica che, come tutte le α eliche, è conformazionalmente poco flessibile, viene ulteriormente bloccata dalle interazioni con il lipide di membrana delle sue catene laterali idrofobe. Tra i domini intra- ed extracellulare esiste quindi un grado di indipendenza conformazionale insolitamente elevato. In conseguenza, l'attivazione di questi recettori avviene tramite un cambiamento di struttura quaternaria. Schematicamente, le interazioni con il ligando inducono un cambiamento conformazionale nel dominio extracellulare a seguito del quale vengono indotte superfici di interazione che permettono a due domini extracellulari di due distinte molecole di recettore, entrambe a sito recettoriale occupato, di interagire fra loro. In queste condizioni, anche i domini intracellulari vengono ad essere abbastanza vicini da potere interagire fra loro, ed è appunto il cambiamento conformazionale dei domini intracellulari susseguente a questa interazione che — spesso tramite fosforilazioni reciproche, vedi oltre — attiva il sito enzimaticamente attivo (o il sito di interazione con l'enzima). Inoltre, il sito enzimaticamente attivo può essere localizzato su di una catena polipeptidica identica a quella su cui si trova il sito recettoriale, oppure in una strutturalmente diversa: nel primo caso i recettori funzionalmente attivi sono costituiti da omodimeri, nel secondo caso da eterodimeri o da aggregati più grandi, tipicamente tetrameri le cui quattro catene polipeptidiche sono uguali due a due (vedi Figura 2). In fine, sono anche conosciuti casi in cui questi recettori agiscono anche, ma non esclusivamente, tramite proteine G (vedi § 4.3. delle "Note sulle proteine G").

2.2.1. Recettori con attività tirosina chinasi. La classe funzionalmente più importante di recettori con attività enzimatica è costituita da quella, particolarmente disomogenea, dei recettori a tirosina chinasi. Hanno quest'attività molti recettori per peptidi o piccole proteine che mediano segnali proliferativi o differenziali, come i recettori per fattori di crescita (ad esempio, l'EGF o il fattore di crescita degli epatociti, HGF), per neurotrofine come l'NGF (nerve growth factor) e il recettore per l'insulina, evolutivamente collegato con i precedenti, nonché i recettori per molte interleuchine. L'attività enzimatica può essere associata alla molecola recettoriale, oppure ad una molecola distinta da questa (i recettori possono, cioè, essere di tipo 1 o di tipo 2). In ogni caso, la dimerizzazione favorita dall'occupazione del sito recettoriale comporta un cambiamento conformazionale a seguito del quale viene incrementata la capacità di fosforilare specifici residui di tirosina (rispettivamente, autofosforilazione o fosforilazione da parte dell'enzima associato) localizzati nel dominio citoplasmatico. Varie proteine di segnalazione intracellulare (vedi oltre) si possono così legare alle tirosine fosforilate, cambiando conformazione, spesso venendo fosforilate a loro volta ed iniziando una catena di reazioni che comporta l'attivazione di proteina chinasi e termina a livello del genoma, oppure induce la sintesi di secondi messaggeri (tipicamente, di inositolo fosfati tramite la fosfolipasi C- γ). La maggior parte delle proteine associate a questi recettori sono caratterizzate dalla presenza di domini noti come SH2 e SH3, i primi dei quali legano sia un residuo di tirosina fosforilata che un altro amminoacido vicino a questa nella sequenza del recettore. In questo modo differenti proteine si legano a differenti residui di tirosina del recettore, ciò che permette di selezionare le proteine che vengono attivate dal legame con uno specifico recettore. La sequenza di eventi che termina nell'attivazione del genoma è in genere molto complessa, coinvolgendo spesso specifiche GTPasi monomeriche (le Ras) e chinasi note come MAP-chinasi (chinasi attivate da mitogeni). Nel caso più semplice, domini SH2 possono essere localizzati sulle proteine regolatrici del genoma che, in questo caso, interagiscono direttamente con i recettori.

In conseguenza della loro disomogeneità strutturale, esistono diverse modalità di attivazione di questi recettori: pertanto, vengono riportati solo alcuni esempi, scelti fra i meno complessi. I recettori per l'EGF costituiscono uno dei casi più semplici: sono infatti costituiti da due subunità eguali, entrambe comprendenti un sito recettoriale ed un sito enzimaticamente attivo. A sito recettoriale libero, le subunità si trovano in una conformazione in cui il sito enzimatico è inattivo. L'occupazione dei siti recettoriali induce un cambiamento conformazionale dei domini extracellulari a seguito del quale si generano superfici di interazione complementari e le due subunità (entrambe con il sito recettoriale occupato) tendono a dimerizzare. La formazione dei dimeri porta a stretta vicinanza anche i domini citoplasmatici: le interazioni tra i due domini citoplasmatici inducono un ulteriore cambiamento conformazionale. Nella conformazione così indotta, i siti enzimatici sono attivi e i due monomeri si fosforilano a vicenda. I residui di tirosina così fosforilati si possono quindi legare ai domini SH2 di proteine con funzione di segnalazione intracellulare (come detto sopra, proteine differenti si legano a tirosine poste in posizioni differenti nella sequenza). Queste proteine cambiano conformazione, iniziando una cascata di eventi che termina a livello del genoma e determina gli effetti mitogenici del ligando. Anche recettori come quelli per il fattore di crescita piastrinico (PDGF) o per l'NGF sono composti (nel loro stato funzionale) da due subunità eguali, cui ovviamente si legano due molecole di ligando. Dato, però, che sia l'NGF che il PDGF (entrambi piccole proteine) si trovano in soluzione come dimeri (Figura 3), il legame di un dimero di ligando ai siti recettoriali di due molecole di recettore può avvenire solo quando la distanza tra i due monomeri è sufficientemente piccola. In questo caso, è quindi il ligando ad indurre la dimerizzazione delle due catene polipeptidiche del recettore, con le conseguenti attivazione dei siti enzimaticamente attivi secondo lo schema riportato sopra. Una variazione di questo tema si riscontra nel caso dell'ormone della crescita (GH, un ormone peptidico), che attiva tirosina chinasi non recettoriali (di cui sono conosciute due famiglie note come Src e Janus). In questo caso però un'unica molecola di ormone si lega a due distinte molecole di recettore, anche in questo caso inducendone la dimerizzazione; quest'evento stabilizza la conformazione nella quale sono permesse le interazioni con la molecola dell'enzima associato, che viene quindi attivato. Dato, però, che il ligando è monomero, ciò comporta che le due molecole di recettore (ovviamente identiche) debbano riconoscere porzioni differenti della molecola di ligando, facendo supporre l'esistenza di due siti recettoriali distinti, uno per ognuna delle due estremità dell'ormone. Ancora, i recettori per le interleuchine (le interleuchine sono piccole proteine con funzioni di mediatori immunitari) della famiglia dell'IL-6 sono composti da due molecole distinte, su una delle quali (chiamata IL-6R) esiste sito recettoriale, mentre il sito enzimaticamente attivo è localizzato sull'altra (la gp130). Con modalità analoghe a quelle descritte sopra, il legame del ligando (l'IL-6) al recettore (l'IL-6R) stabilizza un cambiamento conformazionale del recettore tale da favorire il legame con la seconda molecola recettoriale (la gp130), risultando nell'assemblaggio di un eterodimero ancora funzionalmente inattivo. Tuttavia, nel dimero le due molecole di gp130 legate all'IL-6R tendono a interagire fra loro, portando alla formazione di un tetramero composto da due IL-6R e due gp130 (vedi E in Figura 2). In fine, il cambiamento conformazionale indotto dalla formazione del tetramero attiva le relative tirosina chinasi non recettoriali,

iniziando la trasduzione del segnale.

2.2.2. Recettori con attività tirosina fosfataseica. La defosforilazione di residui di tirosina previamente fosforilati dalle tirosina chinasi può avvenire in continuo, ad opera delle fosfatasi citoplasmatiche, ma anche in modo regolato. Ad esempio, la glicoproteina nota come CD45 (una molecola di superficie linfocitaria essenziale nell'attivazione dei linfociti sia T che B) è costituita dalla tipica catena polipeptidica singola che attraversa una sola volta la membrana plasmatica. Si pensa che all'occupazione del sito recettoriale da parte di ligandi ancora sconosciuti faccia seguito la dimerizzazione di due molecole di CD45, e che quest'evento abbia sulla cellula un effetto regolatorio positivo, rimuovendo la fosforilazione inibitoria di molecole ad attività fosfotirosina chinasi, soprattutto le Lck, permettendo a queste di fosforilare altre proteine con l'effetto di attivare i linfociti sia T che B.

2.2.3. Recettori con attività serina/treonina chinasi. Anche questi recettori sono costituiti da una singola catena polipeptidica il cui sito enzimaticamente attivo fosforila le catene laterali di serina e di treonina delle proteine bersaglio. I ligandi di questi recettori sono costituiti da proteine della superfamiglia delle TGF- β (i fattori di crescita trasformanti) che regolano la proliferazione e il differenziamento di molte cellule (ad esempio, agiscono sulla formazione di matrice extracellulare), nonché da altri ligandi proteici collegati con le TGF- β , come le attivine (importanti nello sviluppo dei tessuti mesodermici) o le proteine morfogenetiche dell'osso (che, come indica il nome, stimolano lo sviluppo del tessuto osseo).

2.2.4. Recettori con attività guanilato ciclasica. I componenti meglio conosciuti di questa piccola famiglia di recettori sono quelli per i peptidi atriali natriuretici (ANP). Questi sono mediatori peptidici secreti dalle cellule atriali a seguito di un innalzamento della pressione arteriosa. In maniera atipica per recettori con attività enzimatica, l'attivazione di questi recettori induce la sintesi di un secondo messaggero, il GMP ciclico (cGMP). A differenza di quanto avviene nel caso dei recettori accoppiati alle proteine G, il controllo della sintesi del secondo messaggero avviene, però, direttamente, ossia senza l'interposizione di una proteina G: l'occupazione del sito recettoriale extracellulare induce la dimerizzazione di due molecole di recettore, che induce a sua volta il cambiamento conformazionale della porzione C-terminale (intracellulare) del recettore che permette l'interazione con una guanilato ciclasi non recettoriale (sono, quindi, recettori di tipo 2). A seguito di questa interazione la guanilato ciclasi passa in uno stato conformazionale attivo, e catalizza la sintesi di cGMP. Questo diffonde nella cellula e va ad interagire con una proteina chinasi intracellulare, la chinasi G. La chinasi G attivata può così fosforilare gli effettori intracellulari, modificandone l'attività. Data la prevalente localizzazione dei recettori per gli ANP nelle cellule renali (in queste, gli effettori finali sono trasportatori di membrana, che vengono attivati) e nella muscolatura liscia dei vasi, l'aumento delle concentrazioni degli ANP induce eliminazione renale di Na⁺ ed acqua ed rilassamento della muscolatura vasale, con effetto ipotensivo.

2.4. Recettori intracellulari per sostanze non polari

Alcune sostanze di bassa polarità (tra cui ormoni steroidei, gluco- e mineralcorticoidi, ormoni tiroidei, retinoidi, vitamina D, qualche acido grasso) agiscono da fattori di trascrizione genica legandosi a recettori intracellulari che interagiscono con il genoma così modificando la sintesi proteica. Questi recettori sono gli unici noti in grado di interagire con il genoma direttamente, ciò che li distingue da altri recettori con effetto proliferativo, come molti con attività enzimatica, la cui azione sul genoma è invece indiretta. Va anche tenuto conto del fatto che le stesse sostanze idrofobe inducono anche altri effetti (non proliferativi) mediati da recettori di membrana, qui non ulteriormente descritti, recettori che sono stati identificati solo parzialmente e incompletamente caratterizzati.

Come tutte le sostanze di ridotta polarità, anche gli ormoni idrofobici sono rilasciati e quindi veicolati fino alle cellule bersaglio da trasportatori costituiti da proteine anfipatiche che si aggregano in strutture sferoidali, in cui la porzione polare è a contatto con il solvente e quella apolare, rivolta verso l'interno, coordina un certo numero di molecole di ormone. Una volta arrivate alle cellule bersaglio e liberate dai trasportatori, data la loro bassa polarità queste sostanze attraversano rapidamente la membrana plasmatica e si legano a recettori intracellulari in soluzione nel citoplasma. A sito recettoriale occupato questi recettori vanno incontro a cambiamenti conformazionali e di stato di aggregazione che li mettono in grado di riconoscere specifiche sequenze di DNA e di modificare la sintesi proteica.

Alcuni di questi recettori (detti di tipo I), nella loro forma inattiva sono legati ad un complesso inibitorio che comprende proteine di shock termico; in queste condizioni i recettori sono localizzati nel citoplasma e non possono attraversare la membrana nucleare. Altri (di tipo II) non hanno complessi inibitori e possono trovarsi nel nucleo anche quando inattivi. Entrambi i tipi di recettore consistono di una singola catena polipeptidica di lunghezza ampiamente variabile. La forma monomerica di queste proteine è inattiva, mentre la forma attiva è costituita da un dimerico che si forma a seguito dell'interazione con il ligando e, in quelli di tipo I, anche del distacco del complesso inibitorio. La sintetica descrizione seguente descrive il classico modello relativo ai recettori di tipo I (ad esempio, quelli per gli steroidi). Naturalmente, le modalità di attivazione dei recettori di tipo II (che non hanno complessi inibitori) sono leggermente differenti da quanto riportato.

Nei recettori di tipo I vengono identificati quattro domini. Il dominio C-terminale è tipicamente costituito da 12 α eliche (Figura 4) disposte in due strati. In questo dominio si trovano il sito recettoriale, la superficie di interazione principale per il complesso inibitorio, il sito di legame per il co-attivatore e uno dei due siti di attivazione per il genoma. Il dominio centrale — di circa 70 residui — effettua il riconoscimento del DNA e comprende la seconda superficie di interazione per il complesso inibitorio. Tra il dominio C-terminale e quello DNA-legante è localizzato un dominio cerniera la cui flessibilità permette la reciproca rotazione del dominio C-terminale e di quello DNA-legante, conseguente al cambiamento conformazionale indotto dalla presenza del ligando. Sul dominio N-terminale, molto variabile sia come numero di residui sia per quanto riguarda la struttura primaria, si trova il secondo sito di attivazione per il genoma; al contrario di quello esistente nel dominio C-terminale, questo sito è attivo anche in assenza di ligando. Sempre in assenza di ligando, questi recettori sono associati ad un complesso inibitorio che comprende una (o più) proteine da shock termico, soprattutto Hsp90; dato che in queste condizioni i recettori non possono attraversare la membrana nucleare, rimangono localizzati nel citoplasma. Il recettore che, come accennata, lega il complesso inibitorio tramite le due superfici di interazione poste una sul dominio C-terminale ed una sul dominio DNA-legante, a causa dei vincoli imposti da queste interazioni e per la flessibilità della regione cerniera è ripiegato attorno al complesso inibitorio. La presenza del ligando nel sito recettoriale, costituito da una tasca prevalentemente idrofoba del dominio C-terminale, induce un profondo riarrangiamento delle α eliche che ne costituiscono la maggior parte della struttura secondaria (vedi Figura 4). Ciò comporta la formazione di una superficie di interazione per un co-attivatore, un complesso proteico (ne esistono vari) che si lega al recettore la cui azione — non del tutto chiarita — è probabilmente relativa all'attivazione di una o più delle varie funzioni enzimatiche necessarie per attivare la trascrizione genica. Il riarrangiamento del dominio C-terminale indotto dalla presenza del ligando comporta anche il passaggio alla sua conformazione attiva del sito di attivazione per il genoma presente su questo dominio, nonché un cambiamento dell'orientamento reciproco delle α eliche che costituiscono la principale delle due superfici di interazione con il complesso inibitorio (come detto, l'altra è localizzata sul dominio DNA-legante). Ciò è sufficiente per causare il distacco (probabilmente in due stadi) di queste dal recettore. A sua volta ciò induce i due domini C-terminale e DNA-legante a ruotare intorno alla regione cerniera, facendo assumere alla proteina una conformazione circa rettilinea. In questa conformazione una molecola di recettore può interagire con un'altra (anche questa attivata), dando luogo alla formazione del dimerico che è in grado di attraversare i pori della membrana nucleare. Una volta nel nucleo, il dominio DNA-legante è in grado di legarsi a specifiche zone del genoma, selezionando così i determinanti da modificare. In fine, i due domini di attivazione possono modificare la trascrizione genica.

In ogni caso l'effetto della presenza del ligando è quello di modificare l'espressione di proteine, in genere in senso positivo ma in alcuni casi anche negativo. Ciò vuol dire che l'attività dei geni bersaglio è normalmente incrementata, ma che alcuni di questi recettori, come quelli per gli ormoni tiroidei e per l'acido retinoico, possono agire come repressori della trascrizione, sia in assenza dei loro agonisti che in presenza di antagonisti. Inoltre, le risposte indotte possono essere dirette (risposte primarie) o indirette (risposte secondarie). Mentre le prime costituiscono la risposta all'attivazione del recettore, le seconde sono invece risposte a proteine attive sul genoma, la cui trascrizione era stata modificata dal recettore. Va anche osservato che, agendo sulla sintesi proteica, l'azione dei ligandi idrofobici tende ad essere lenta sia nella fase di induzione che in quella di disinduzione e che la durata temporale della loro azione è generalmente lunga. Ciò anche perché molto spesso mancano i meccanismi locali (vedi "Note sulla trasmissione delle informazioni", § 7) che hanno tempi di intervento generalmente rapidi, mentre la degradazione di molti ormoni idrofobici è principalmente epatica. Come risultato, le emivite di molti (ma non tutti) di questi ormoni possono essere assai lunghe, ad esempio 6-7 giorni per la tiroxina.

Non ostante la loro (relativa) semplicità di azione, nell'organismo in toto questi ormoni possono modificare fenomeni complessi come i parametri comportamentali, ad esempio l'aggressività o la libido. A titolo di esempio, può essere ricordato che la ricettività sessuale delle femmine dei mammiferi è controllata

dall'azione dell'ossitocina sui neuroni del nucleo ventromediale. Tale azione é a sua volta regolata dall'azione combinata dell'estradiolo, che aumenta la sintesi sia dell'ossitocina che dei recettori per questa sostanza — dei quali modifica anche la distribuzione — e del progesterone che modula le caratteristiche dei recettori per l'ossitocina già espressi. In proposito é stato proposto (ma non dimostrato) che le differenze tra i criceti monogami e quelli poligami siano causate dalla differenza nella distribuzione dei recettori per l'ossitocina nel sistema nervoso centrale, che é effettivamente molto evidente nelle due varietà.

Appendice: recettori delle cellule immunocompetenti

NOTA: Quest'argomento non fa parte del programma; le informazioni seguenti sono riportate solo per completezza di esposizione e come eventuale riferimento.

I recettori specifici delle cellule immunocompetenti si legano a sostanze riconosciute estranee all'organismo e danno inizio alla risposta immune. A questa definizione corrispondono due classi distinte di recettori: quelli delle cellule B e quelli delle cellule T. In entrambi i casi (B e T) si tratta di complessi recettoriali costituiti da più proteine, in cui il legame con l'antigene, la trasduzione del segnale in sede intracellulare e la stimolazione della sintesi dei secondi messaggeri avvengono su componenti proteiche distinte. Ancora, è necessario sottolineare che l'occupazione di siti recettoriali non è, nelle cellule immunocompetenti, sufficiente per elicitarne la risposta specifica: è invece necessaria la copresenza di più segnali, con modalità che esulano dagli scopi di queste dispense. Va osservato che esistono altri recettori per sostanze prodotte dal sistema immune che non rientrano nella definizione precedente: specificamente, i recettori per le chitochine sono recettori con attività enzimatica, mentre quelli per le chemochine sono recettori accoppiati alle proteine G.

A.1. Recettori delle cellule B

In questo caso il complesso recettoriale è formato dalla molecola che lega l'antigene e da quattro proteine transmembrana associate due a due (Ig- α + Ig- β). Le molecole che legano l'antigene sono molecole anticorpali, nel senso che i primi anticorpi prodotti da una cellula B immatura non vengono secreti, ma sono inglobati nella membrana della cellula stessa, dove funzionano come recettori per l'antigene. Queste molecole hanno pertanto la tipica struttura composta da quattro catene polipeptidiche eguali due a due, chiamate catene leggere (in due varietà, circa 220 residui ciascuna) e catene pesanti (in cinque varietà, circa 440 residui). Entrambe le catene sono costituite dalla ripetizione di domini simili — dodici in tutta la proteina — composti ognuno da circa 110 residui, formati da due foglietti β antiparalleli, la cui conformazione è stabilizzata da un legame S-S. Le estremità N-terminali di ciascuna catena costituiscono quelle che vengono chiamate regioni ipervariabili. In queste regioni, un numero abbastanza limitato (intorno a 25) di residui amminoacido cambia a seguito di specifici meccanismi genetici, in modo da ottenere l'enorme varietà di molecole distinte (nell'uomo, si stima circa 1×10^{15}) che sono in grado di reagire con una corrispondente varietà di molecole estranee. Naturalmente, ogni clone B (ma anche T) è caratterizzato da una struttura unica del suo sito recettoriale. Come norma nella superfamiglia (si dice infatti che tutte queste proteine fanno parte della superfamiglia delle Ig), esiste poi un segmento transmembrana a struttura α , ed una coda citoplasmatica, in questo caso brevissima (tre residui). Sia Ig- α che Ig- β sono costituite da un singolo dominio extracellulare del tipo Ig, da una porzione transmembrana a struttura alfa elicoidale e da una coda C-terminale citoplasmatica; questa porta due o tre residui di tirosina che sono substrato della fosforilazione. Nessuna delle due comprende regioni variabili e le coppie sono unite da un legame S-S che — come di norma — è localizzato in posizione extracellulare, a ridosso della membrana.

L'occupazione dei siti recettoriali sulle IgM o IgD induce un cambiamento conformazionale che viene trasmesso anche ai dimeri Ig- α + Ig- β . Questo cambiamento conformazionale rende i residui di tirosina localizzati nella porzione citoplasmatica suscettibili di fosforilazione da parte di una tirosina chinasi. Come descritto più oltre a proposito delle cellule T, la fosforilazione di queste catene attiva un enzima intermedio e quindi la sintesi di un secondo messaggero, dando così inizio alla catena di eventi che induce la specifica risposta immune, ossia sintesi e rilascio di anticorpi.

A2. Recettori delle cellule T

I complessi recettoriali delle cellule T sono formati da un eterodimero che lega l'antigene (di tipo Ig, noto come TCR "T cell receptor"), da tre catene transmembrana non associate, anche queste di tipo Ig (Ig-gamma, Ig-delta e Ig-epsilon); queste costituiscono l'antigene di superficie CD3 ed infine da un omodimero transmembrana ma prevalentemente intracellulare, formato da due catene csI (in alcuni casi eta) unite da un legame S-S. Le molecole che legano l'antigene comprendono due catene polipeptidiche diverse (in genere α e β , in casi specifici gamma e delta) di circa 280 residui ciascuna. Entrambe le catene sono costituite da una porzione extracellulare N-terminale, strutturata in due domini di tipo Ig, da una porzione transmembrana a prevalente struttura α ed una brevissima porzione citoplasmatica. Le due catene sono unite covalentemente tramite un legame S-S, anche in questo caso localizzato in prossimità della faccia extracellulare della membrana. Entrambi i domini N-terminali portano i siti di legame, entrambi i quali legano sia l'antigene

processato dalle apposite cellule che una proteina del maggior complesso di istocompatibilità (MHC). Anche qui i siti recettoriali sono formati da regioni ipervariabili, la cui sintesi avviene con meccanismi di ricombinazione genica analoghi a quelli utilizzati per gli anticorpi ed i recettori delle cellule B.

Il cambiamento conformazionale che segue all'occupazione dei siti recettoriali del TCR induce un cambiamento conformazionale anche nelle catene del CD3 e ζ . In questa conformazione, i residui di tirosina localizzati nella porzione citoplasmatica di queste catene polipeptidiche divengono accessibili alla fosforilazione da parte di una PTK (fosfotirosina chinasi). Nella loro forma fosforilata, queste catene legano una specifica fosfolipasi C (fosfatidilinositolo fosfolipasi C- γ 1). Nella conformazione indotta dal legame, anche la fosfolipasi può essere fosforilata. L'ulteriore cambiamento conformazionale indotto dalla fosforilazione attiva l'enzima che, come descritto altrove, può così catalizzare la conversione del fosfatidilinositolo 4,5 difosfato nei secondi messaggeri diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3). Quest'ultimo, aprendo i canali calcici di membrana ed i recettori per l' IP_3 del reticolo endoplasmatico, induce un incremento dei livelli calcici intracellulari che — con modalità che non è il caso di esaminare qui — induce modifiche nell'espressione genica che si traducono nell'attivazione dei linfociti T. Nel caso dei T helper, questi rilasciano citochine (soprattutto IL2 ma anche IL4) ed esprimono recettori per queste stesse citochine, dando quindi origine a segnali tipicamente autocrini; nel caso dei linfociti T citotossici (CTL), si attivano invece le capacità di lisi tipiche di queste cellule.

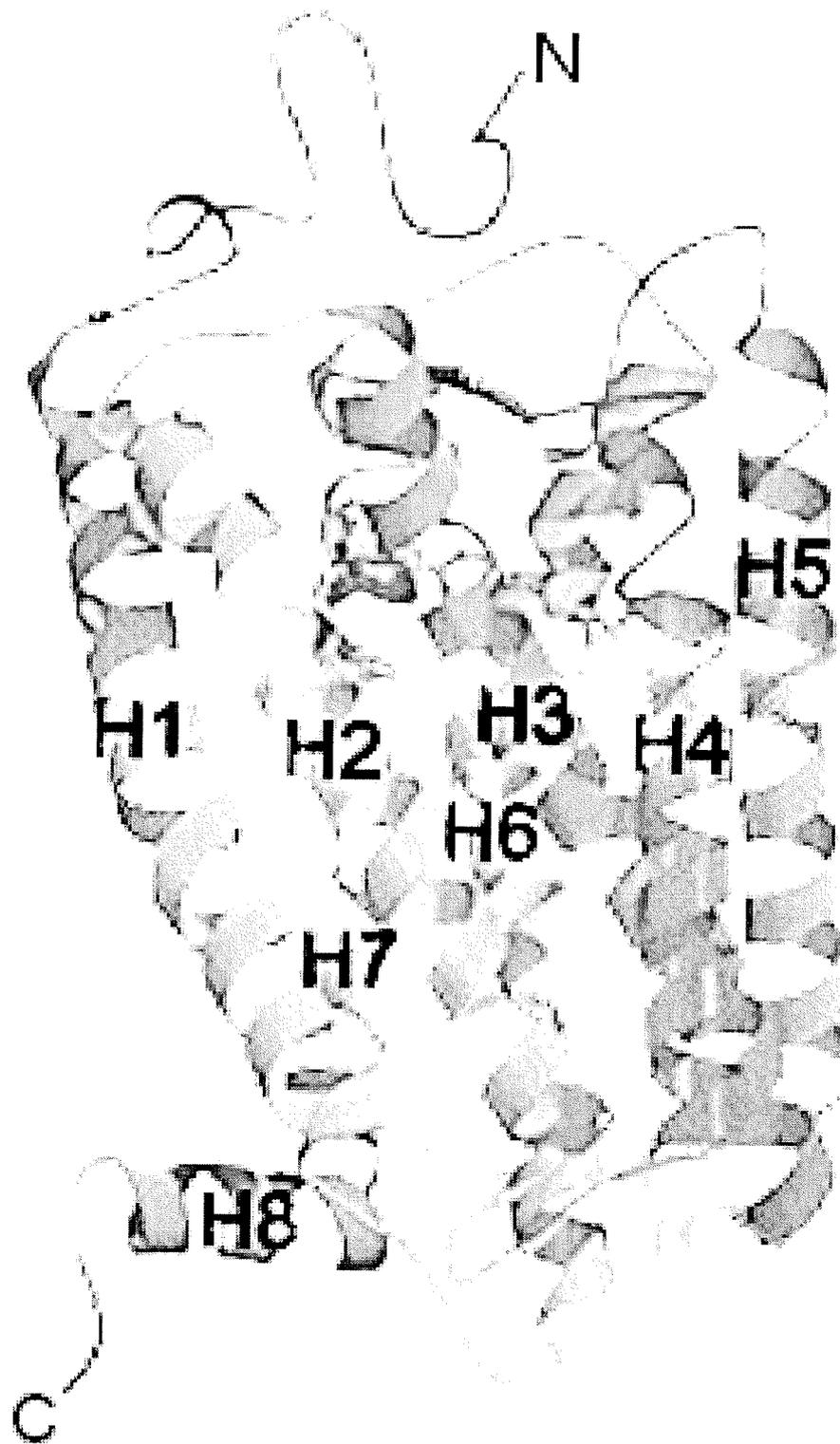


Figura 1a. Modello a nastri di un recettore accoppiato alle proteine G (rodopsina bovina) che mette in evidenza le sette α eliche transmembrana (da H1 ad H7), l'ottava α elica citoplasmatica (H8) e le porzioni a struttura secondaria non definita (tondini). La membrana é rappresentata dalla banda grigia orizzontale. Le lettere N e C indicano i due terminali dalla molecola. Citoplasma in basso e periplasma in alto.

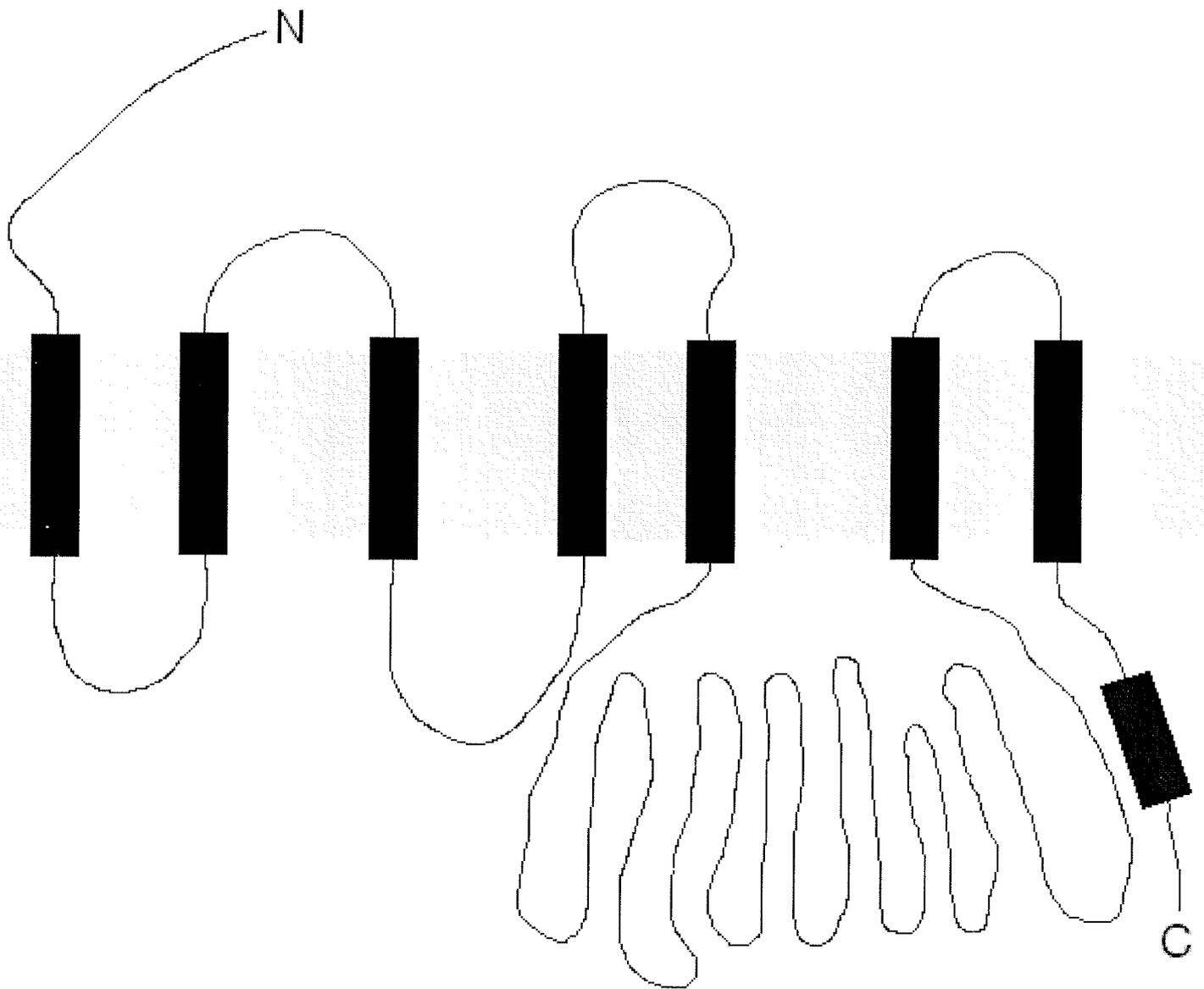


Figura 1b. Schema topologico di un recettore accoppiato alle proteine G, che ne mette in evidenza la giacitura rispetto alla membrana, rappresentata dalla banda grigia orizzontale. I tratti spessi rappresentano le α eliche, i tratti sottili — la cui lunghezza è proporzionale al numero di residui di amminoacido che li compongono e che sono corretti per un recettore (α adrenergico) — rappresentano segmenti a struttura non definita. Le lettere N e C indicano i due terminali della molecola; citoplasma in basso e periplasma in alto.

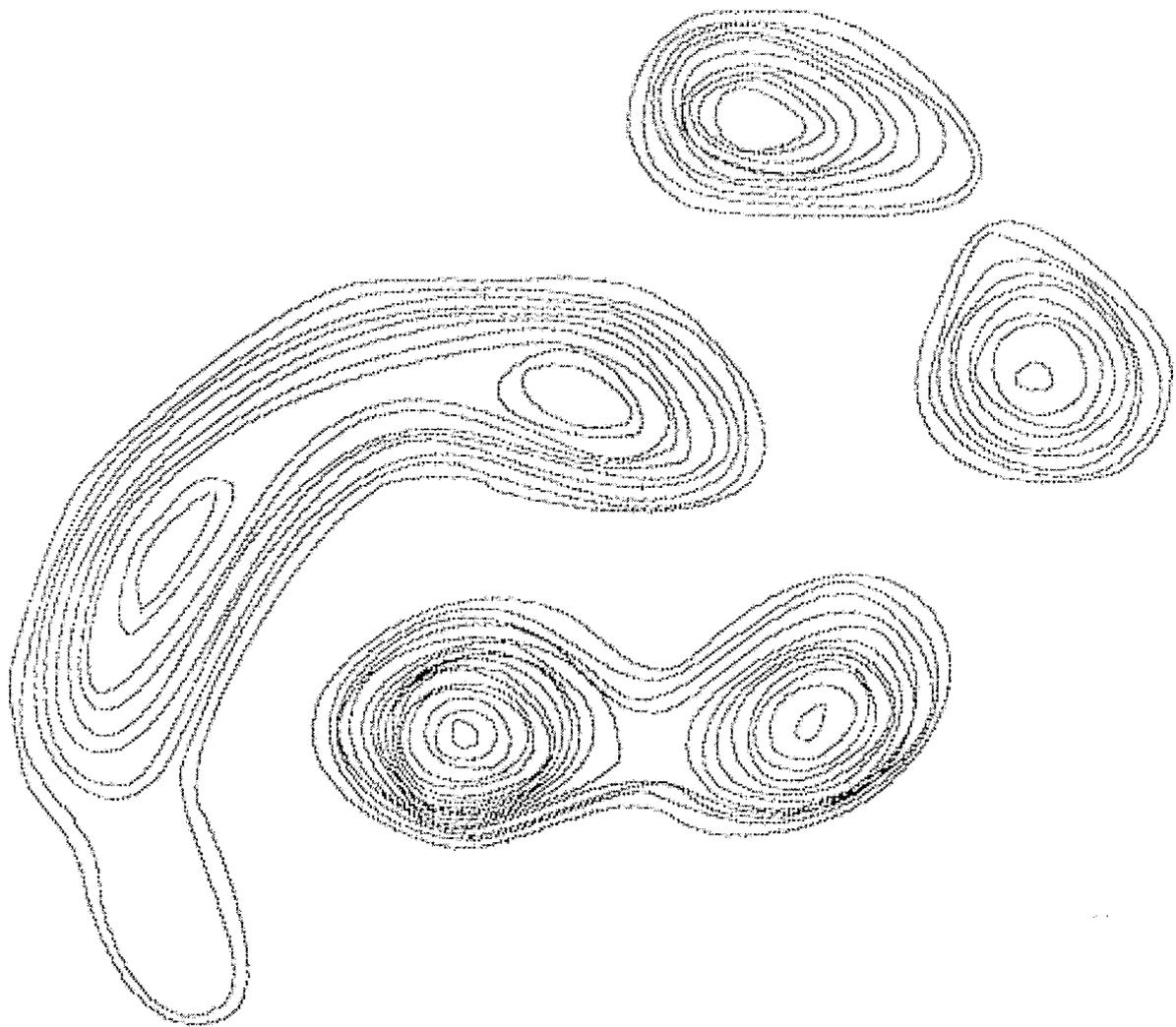


Figura 1c. Mappa di densità elettronica di un recettore a sette segmenti transmembrana (rodopsina bovina) nel piano della membrana. Le α eliche disposte circa perpendicolarmente alla membrana si evidenziano come linee concentriche circolari, che diventano tanto più allungate quanto maggiore è l'inclinazione dell'asse dell'elica rispetto alla membrana.

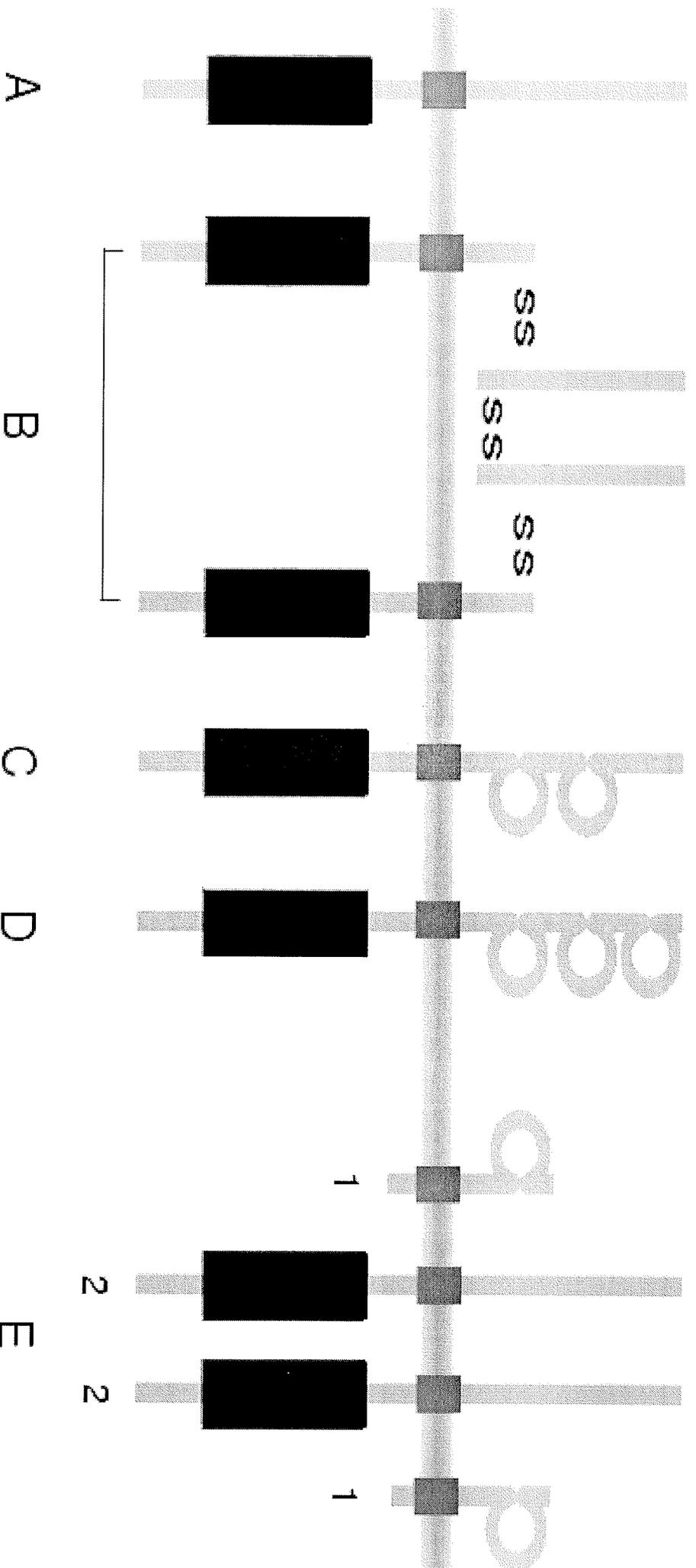


Figura 2. Schema di alcuni recettori con attività tirosina chinasi. A: EGF, B: insulina, C: NGF (monomero), D: FGF, E: IL-6. Quest'ultimo rappresenta il complesso funzionale, costituito da due IL-6R (1) e due gp130 (2). Le anse rappresentano domini di tipo immunoglobulinico, le SS identificano ponti disolfuro, i rettangoli in nero i domini catalitici, i rettangoli in grigio scuro le α eliche transmembrana; la barra orizzontale rappresenta la membrana plasmatica.



Figura 3. Modello a nastri di un dimer del fattore di crescita piastrinico (PDGF). Il PDGF è un fattore di crescita rilasciato dalle piastrine, soprattutto quando queste sono inglobate nei coaguli, che si ritiene contribuisca alla proliferazione tissutale nel corso della cicatrizzazione. Il PDGF dimerizza spontaneamente in ambiente polare, come tale si lega a due molecole del suo recettore. Ciò favorisce la dimerizzazione del recettore che attiva i siti enzimatici intracellulari. L'interazione del PDGF con i siti recettoriali avviene in corrispondenza delle tre anse con struttura secondaria non definita ai due lati della molecola (tordini) che uniscono i piccoli piani β antiparalleli (due per monomero, trece). I due dimeri sono identificati con diversi toni di grigio.

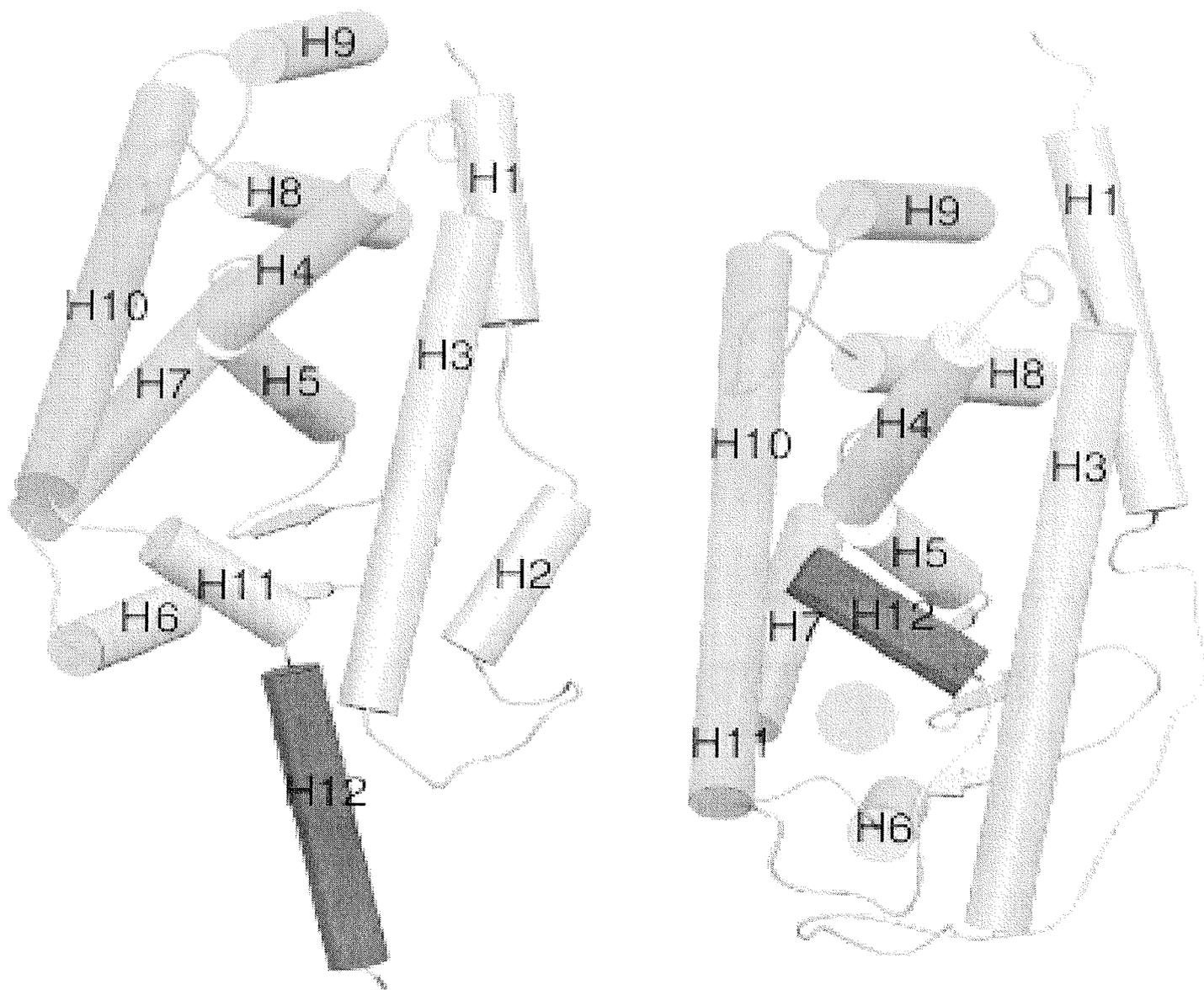


Figura 4. Rappresentazione del dominio C-terminale di un recettore di tipo X per l'acido retinoico in assenza (a sinistra) ed in presenza (a destra) del ligando. Le α eliche H7, H9 e H10 formano la superficie di interazione per la dimerizzazione, le H4 e H5 il sito di legame per il co-attivatore. La posizione dell'acido retinoico legato è indicata dal cerchio grigio nella figura di destra. I cilindri rappresentano α eliche, le frecce strutture β , i tondini porzioni a struttura non definita.

Note sui canali ionici (5)

(revisione 2010, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Caratteristiche generali

Il controllo di fondamentali funzioni cellulari ad opera di alcuni ioni inorganici (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) comporta la necessità di regolarne la concentrazione citoplasmatica. Dato che gli ioni non possono essere prodotti dalle cellule, le loro concentrazioni sono controllate da meccanismi di passaggio regolato attraverso le membrane; a causa dell'esistenza di organelli di deposito, queste possono consistere o nella membrana plasmatica o in quelle di organelli. A seconda che il movimento debba avvenire contro, o secondo, gradiente, gli ioni sono trasportati attivamente da proteine vettrici (vedi: "Note sui meccanismi di passaggio transmembrana", § 4.), oppure in modo passivo attraverso pori idratati, i canali ionici.

I canali ionici sono proteine di membrana che determinano un poro (il canale fisico) che attraversa lo spessore della membrana, tramite il quale gli ioni in grado di impegnarlo passano sotto la spinta di forze esterne. La maggior parte dei canali ionici ha la capacità sia di controllare lo stato di apertura del canale fisico che di selezionare gli ioni che possono passare attraverso questo; alcuni possono anche andare incontro ad inattivazione (vedi oltre). Pertanto, sono quasi sempre presenti (quasi, dato che esistono canali sempre aperti) meccanismi che controllano la pervietà del canale fisico, permettendo il passaggio solo nelle circostanze opportune. Altri meccanismi (sempre presenti: non si conoscono canali ionici del tutto aspecifici) sono in grado di discriminare in modo più o meno selettivo gli ioni cui deve essere consentito il passaggio. In fine, in alcuni canali esistono meccanismi che controllano la pervietà del canale fisico in modo indipendente dai precedenti; questi meccanismi intervengono normalmente a canale fisico aperto, impedendo il passaggio ionico, e sono noti come meccanismi di inattivazione.

Data l'assenza di cambiamenti conformazionali nel corso del passaggio, i canali ionici consentono flussi molto più elevati di quelli riscontrabili nel caso dei trasportatori attivi. Inoltre, il passaggio non comporta un dispendio energetico diretto: tuttavia, energia deve venire consumata indirettamente, per ripristinare il gradiente elettrochimico che permette il passaggio.

1.1. Controllo della pervietà del canale fisico.

Lo stato di pervietà del canale fisico può essere controllato da differenti fattori tra i quali sono particolarmente rilevanti l'occupazione di siti recettoriali da parte dei loro ligandi (canali a controllo di ligando o recettori-canale), il valore del potenziale intracellulare (canali a controllo di potenziale) e stimoli meccanici (come nei canali che agiscono da trasduttori per molti segnali sensoriali). Molti canali rispondono a fattori multipli e, come accennato, esistono anche canali sempre aperti. Eccetto che in quest'ultimo caso, il canale può assumere due stati conformazionali fondamentali, corrispondenti a canale fisico chiuso ed aperto, rispettivamente. In generale, l'energia libera corrispondente alla conformazione a canale fisico aperto è maggiore di quella corrispondente al canale fisico chiuso e l'energia necessaria al relativo cambiamento conformazionale viene fornita dall'esterno, di norma come energia termica (non, però, nei canali a controllo meccanico, § 5.), mentre la conformazione corrispondente è stabilizzata dal parametro, o dai parametri, di controllo (vedi "Complementi sul contenuto di informazione e sui meccanismi di riconoscimento delle proteine", § 2.1.1.). Sempre in generale, il canale passa invece spontaneamente dallo stato aperto a quello chiuso (o, se del caso, a quello inattivato), caratterizzati da un contenuto energetico minore di quello dello stato aperto.

Nella gran parte dei casi esistono dispositivi in grado di agire da sensori per gli specifici parametri che controllano lo stato di pervietà del canale fisico: nei canali a controllo di ligando, questi sono costituiti dallo stato di occupazione dai siti recettoriali, mentre nel caso dei canali a controllo di potenziale è nota l'esistenza, e in vari casi anche il funzionamento, di elementi che agiscono da sensori di voltaggio (vedi § 3.1.3.). Ovviamente, queste strutture non esistono nei canali a controllo meccanico (§ 5.) ed in quelli sempre aperti.

Il ruolo dei sensori di cui sopra è quello di pilotare un cambiamento conformazionale del canale verso la conformazione cui corrisponda la capacità di fare passare gli ioni. In canali cationici in cui i dettagli di questo meccanismo sono conosciuti, lo stato di pervietà del canale fisico viene controllato in modo indiretto: il canale non viene chiuso fisicamente, ma viene interrotta la continuità dello strato di acqua di idratazione

(ossia della "colonnina" d'acqua che lo occupa). Infatti, il canale fisico è sempre delimitato da residui di amminoacido in maggioranza polari ed è, quindi, idratato. Inoltre, il rapporto tra le dimensioni trasversali minime del canale fisico aperto (normalmente una decina di Å, tutti i canali noti hanno sezione variabile, in genere a doppio cono con la parte più stretta all'interno, vedi Figura 2) e quelle delle molecole d'acqua (2.5 Å come dimensione massima) è tale da permettere solo a poche di queste di impegnare contemporaneamente il lume nel senso della larghezza: quindi, tutte queste molecole d'acqua interagiscono con il canale. L'interruzione della continuità dell'acqua di idratazione avviene avvicinando al centro del canale fisico le catene laterali di "anelli" (in genere due) di residui idrofobici e viene ripristinata allontanandole da questa posizione. In questo modo viene modificato il diametro equivalente (ovviamente, la sezione del canale fisico non è circolare) del canale ma questo non viene totalmente chiuso, come invece avviene nei canali anionici. Data l'idrofobicità dei residui interessati, questo avvicinamento reciproco è sufficiente ad interrompere la continuità dell'acqua di idratazione, così impedendo il passaggio degli ioni (che sono, ovviamente, idratati). Ad esempio, nei recettori nicotinici per l'acetilcolina, nel suo punto più stretto il canale fisico ha un diametro equivalente di circa 9 Ångstrom nello stato aperto e di 6 in quello chiuso, mentre il diametro idratato dei cationi monovalenti fisiologicamente rilevanti (Na^+ e K^+) è di poco più di 3 Å. Nei (pochi) casi conosciuti in qualche dettaglio, lo spostamento dei residui idrofobici avviene per movimento rigido dei segmenti (α eliche) nei quali sono inseriti (vedi § 2.1.1.). Ciò contrasta sia con le ipotesi alternative di modifiche della struttura secondaria, che richiederebbero un elevato impegno energetico, o di uno spostamento reciproco di domini, o subunità, come nei connessioni. Nei canali anionici (o meglio, nel solo caso in cui il meccanismo è conosciuto, i canali CLC, vedi § 4.) il canale fisico viene, invece, bloccato fisicamente dalla catena laterale di un residuo carico, che si sposta verso il centro del canale fisico nel suo punto più stretto.

1.2. Selettività ionica

Tutti i canali sono in grado di consentire il passaggio di alcuni ioni, escludendone altri con un grado di selettività ampiamente variabile. Al minimo, vengono selezionati anioni oppure cationi, ma in alcuni casi ioni simili possono essere discriminati con selettività molto elevata. In ogni caso, la discriminazione è garantita dalla possibilità di stabilire interazioni tra gli ioni che hanno impegnato il canale fisico e gruppi funzionali polari localizzati in uno o più "anelli" del canale fisico stesso. Quando tali interazioni sono repulsive gli ioni vengono esclusi dal canale, quando sono attrattive gli ioni vengono selezionati per il passaggio.

In canali non particolarmente selettivi, le interazioni con gli ioni sono spesso mantenute dalle catene laterali di residui polari localizzati all'imbocco del canale fisico, dove formano una sorta di anello. In canali dotati di elevata selettività può esistere un secondo anello di residui polari localizzato nella porzione interna del canale. Ovviamente, le catene laterali dei residui polari (spesso con carica netta) respingono gli ioni carichi del loro stesso segno, ma tendono a trattenere ioni di segno opposto: dato che gli ioni devono passare attraverso il canale, e non esservi trattenuti, esistono meccanismi che indeboliscono queste interazioni, in modo che il canale non si blocchi. Senza entrare nei dettagli di fenomeni complessi e non ben chiariti, più ioni impegnano contemporaneamente il canale, competendo per il legame con lo stesso gruppo. L'indebolimento risultante da tale competizione si somma alla repulsione elettrostatica tra gli ioni che occupano il canale e, in vari casi, allo scambio dell'acqua di idratazione (un processo che richiede energia). La somma di questi fattori indebolisce le interazioni tra ioni e canale abbastanza perché queste possano essere sormontate dal potenziale elettrochimico degli ioni. Tuttavia, questi processi inevitabilmente rallentano il passaggio ionico: infatti, a parità di condizioni, canali poco selettivi presentano in genere conduttanze più elevate di canali dotati di alta selettività ionica.

1.3. Inattivazione

Alcuni canali cationici vanno incontro a processi di autoinattivazione, che sono particolarmente importanti nelle cellule eccitabili. I canali in grado di inattivarsi si possono trovare in uno di (almeno) tre stati conformazionali distinti: chiuso, aperto e inattivato, l'ultimo dei quali comporta la temporanea impossibilità di passare allo stato aperto anche sotto le condizioni opportune. In questi canali esiste, infatti, un doppio meccanismo di chiusura: oltre al meccanismo principale descritto sopra, ne esiste un secondo, indipendente dal precedente. In queste condizioni, il passaggio ionico può avvenire solo quando entrambi i meccanismi lo consentono. Questi canali passano dallo stato chiuso a quello aperto per effetto dei fattori esterni che li controllano (vedi § 1.1.) e passano spontaneamente (il processo è energeticamente favorevole) dallo stato aperto a quello inattivato; al contrario, il passaggio dallo stato inattivato a quello chiuso richiede energia che

deve essere fornita dall'ambiente. Quindi, il processo richiede un certo lasso di tempo medio, circa proporzionale alla richiesta energetica. Nei casi noti, il meccanismo di inattivazione è fornito da un blocco meccanico del canale fisico da parte di porzioni mobili della proteina localizzate ad un'estremità del canale fisico: ad esempio, in alcuni canali potassici l'inattivazione è determinata da una ventina di residui N-terminali di ciascuna subunità che, nello stato inattivato, si spostano in modo da bloccare fisicamente l'uscita del canale. Analogamente, nei canali a controllo di potenziale per il sodio l'inattivazione è dovuta allo spostamento del segmento intracellulare interposto tra il III ed il IV dominio, tre residui idrofobi contigui del quale vanno ad ostruire l'imbocco del canale, ciò che avviene entro pochi millisecondi dalla sua apertura.

In sommaro, e sempre escludendo i canali a controllo meccanico, il passaggio tra le conformazioni a canale fisico chiuso e aperto avviene ricavando l'energia necessaria dall'ambiente ed è stabilizzata dai parametri di controllo. La conformazione corrispondente allo stato inattivato (se esistente) — cui compete un'energia libera minore di quella dello stato aperto — viene assunta spontaneamente, e la proteina vi rimane fino a che un apporto energetico esterno non le permetta di passare nello stato chiuso, dal quale potrà passare a quello aperto. Da un punto di vista funzionale, l'inattivazione determina il "periodo refrattario" di cellule eccitabili; inoltre, in cellule nelle quali i meccanismi di trasporto sono in grado di fare recuperare le concentrazioni ioniche basali con molta rapidità, l'inattivazione dei canali che generano il potenziale d'azione può da sola essere sufficiente a riportare il potenziale intracellulare ai valori di riposo. Tuttavia, come accennato in Appendice, nella maggior parte delle cellule eccitabili il ripristino dello stato basale è un fenomeno attivo, dipendente da altri canali (in genere potassici).

2. Canali a controllo di ligando

I canali a controllo di ligando, o recettori-canale, sono recettori di tipo 1 che formano un canale idrofilo transmembrana il cui stato di apertura è controllato dalla presenza di un ligando nel sito (o siti) recettoriale. Tra questi, sono descritti qui alcuni canali con afferenze extracellulari, quelli attivati da nucleotidi ciclici ed i recettori per l' IP_3 ed la rianodina.

2.1. Canali con afferenze extracellulari.

Sono note tre superfamiglie di recettori-canale attivati da ligandi extracellulari: i canali a struttura pentamera, le diverse varietà di recettori per il glutammato e i meno ben conosciuti — e qui non descritti — recettori PX_2 , che si ritiene siano attivati dall'ATP. Inducendo variazioni della conduttanza ionica di membrana che dipendono da segnali extracellulari, questi canali controllano direttamente il funzionamento delle cellule eccitabili.

2.1.1. Canali a struttura pentamera

Appartengono a questa famiglia sia canali cationici (con ruolo eccitatorio) che canali anionici (inibitori). Tra i primi vanno ricordati i recettori nicotinici per l'acetilcolina (i recettori muscarinici sono invece recettori a sette segmenti transmembrana), che mediano la trasmissione del segnale a livello della placca motrice ed i recettori per la 5-idrossitriptamina. Tra i canali anionici sono particolarmente rilevanti i recettori per la glicina e per il GABA ($GABA_A$ e $GABA_C$, i $GABA_B$ sono recettori a sette segmenti transmembrana) che costituiscono i principali recettori inibitori del sistema nervoso centrale. L'apertura di questi canali determina un rapido aumento della conduttanza a cationi monovalenti (Na^+ , K^+) o bivalenti (Ca^{2+}) oppure ad anioni monovalenti (Cl^-), inducendo variazioni del potenziale intracellulare, rispettivamente positive o negative, con effetto de- o iperpolarizzante e con funzione eccitatoria ed inibitoria. La presenza di questi canali permette di modulare il potenziale intracellulare in funzione della sommatoria dei segnali che giungono alla cellula stessa. Nelle cellule eccitabili questi canali sono responsabili delle variazioni graduali del potenziale intracellulare che permettono l'insorgere dei potenziali d'azione, come descritto brevemente in Appendice. Oltre alla loro rilevanza fisiologica, i canali a struttura pentamera hanno anche importanza farmacologica: infatti, numerose sostanze farmacologicamente attive che esercitano un effetto generale depressivo sul sistema nervoso centrale si legano a loro siti recettoriali (ortosterici ed allosterici). Specificamente, sia le benzodiazepine che i barbiturici e i neurosteroidi si legano a siti allosterici dei recettori $GABA_A$, siti diversi fra loro (e, ovviamente, diversi dal sito ortosterico).

I membri di questa famiglia sono costituiti da cinque subunità: due copie della subunità α , che porta il sito

recettoriale, e una di ognuna delle altre. Tutte le subunità sono molto simili fra loro, composte 430-500 residui ciascuna, nettamente anisodiametriche (con un rapporto tra asse longitudinale ed asse trasversale medio di circa 1:2) e disposte quasi parallele fra loro, con l'asse maggiore circa perpendicolare al piano della membrana in un arrangiamento anulare (Figura 1a) che determina, al loro interno, il canale fisico.

2.1.1.1. Recettori nicotinici per l'acetilcolina. In questi recettori, tutte le subunità comportano quattro α eliche transmembrana, ovviamente connesse tra loro da porzioni idrofile. Le porzioni extracellulari, che formano l'imbocco molto allargato del canale, sono in gran parte formate da due foglietti β affacciati; a questi elementi, va aggiunta una quinta α elica idrofila, completamente citoplasmatica (Figura 1a). Il canale fisico è delimitato da cinque α eliche anfipatiche, una per subunità, disposte con leggera inclinazione rispetto all'asse del canale. Nello stato chiuso, o meglio non pervio, questo è parzialmente ostruito da due anelli di residui idrofobici (valine e leucine) che fanno parte delle α eliche anfipatiche. Come descritto al paragrafo 1.1, nello stato non pervio (quindi, a sito recettoriale non occupato), la presenza nel lume del canale fisico delle catene laterali idrofobe di questi residui viene ad interrompere la continuità dell'acqua di idratazione, impedendo il passaggio ionico. Il cambiamento conformazionale stabilizzato dalla presenza del ligando (due molecole di acetilcolina che si legano ai siti recettoriali delle subunità α) comporta una rotazione di circa 15° delle α eliche anfipatiche, rotazione che a sua volta comporta un allontanamento dall'asse del canale delle catene laterali dei residui di valina e leucina. La differenza tra i due stati conformazionali è abbastanza modesta: infatti il canale fisico dovrebbe passare da un diametro equivalente di circa 6 Å nello stato non pervio ad uno di 9 nello stato pervio (Figura 1b). Tuttavia, lo spostamento dei residui idrofobici rende il canale fisico completamente idrofilo, permettendo il ristabilirsi della continuità dell'acqua di idratazione e, quindi, il passaggio degli ioni.

I movimenti appena descritti avvengono in tempi tali da consentire che l'intera molecola passi tra lo stato a canale chiuso a quello a canale aperto in circa 3 μ sec, mentre il canale rimane aperto per circa 1 msec: tale rapidità di risposta comporta che i canali a struttura pentamera controllino funzioni nelle quali questo parametro è rilevante, nel caso specifico la contrazione del muscolo scheletrico. Per converso, l'esistenza di due siti recettoriali per molecola comporta che il rapporto segnale : risposta sia di 2 : 1 (in altri termini, mediamente si verifica un singolo evento di apertura del canale fisico per ogni due molecole di ligando giunte al recettore). Per confronto la risposta avviene in un lasso di tempo che, considerando tutta la cascata di reazioni coinvolta, è circa 1/10.000 di quella dei recettori accoppiati alle proteine G; in questi, tuttavia, il rapporto segnale : risposta è nell'ordine di 1 : 1000 - 1 : 10.000.

2.1.2. Recettori per il glutammato

Le varie forme di recettori ionotrofici per il glutammato (AMPA, kainato, NMDA e delta) costituiscono i principali recettori eccitatori del sistema nervoso centrale. Dati i fenomeni di potenziamento a lungo termine cui sono soggetti, si ritiene che questi canali siano coinvolti nei fenomeni dell'apprendimento e della memoria. Sfortunatamente, non ostante la disponibilità di dati di diffrazione, le informazioni strutturali si sono tradotte in una comprensione solo parziale dei loro meccanismi funzionali, che appaiono di inusuale complessità. Tale complessità è anche dovuta alla loro possibilità di modulazione da parte di una varietà di sostanze che si legano a diversi siti allosterici, come anche da variazioni dello stato fisico della cellula, probabilmente mediate da interazioni con proteine citoscheletriche. Non ostante la loro parentela evolutiva con i canali potassici a controllo di potenziale, i recettori per il glutammato sono costruiti secondo un modello peculiare, che mostra una certa somiglianza, soltanto concettuale, con le ATPasi di tipo P. Dato che la nostra conoscenza di queste strutture può essere definita come ancora piuttosto rudimentale, la descrizione seguente è parziale e particolarmente schematica.

Il recettore funzionale consiste in un eterotetramero, le cui subunità, diverse ma molto simili fra loro, nel piano della membrana sono disposte in un arrangiamento rettangolare a formare un singolo canale fisico centrale. In ogni subunità si distinguono quattro domini: un dominio N-terminale periplasmatico cui vengono attribuiti ruoli modulatori da parte di fattori extracellulari, un dominio di legame nel quale è localizzato il sito recettoriale, un dominio transmembrana che forma il canale fisico e un dominio C-terminale completamente citoplasmatico che medierebbe le regolazioni indotte da fattori intracellulari. Il dominio di legame è costituito da due porzioni separate da una fenditura nella quale è localizzato il sito recettoriale ed è direttamente connesso alle α eliche transmembrana da brevi segmenti a struttura non definita. Il dominio transmembrana è costituito da tre α eliche — appunto transmembrana — e da una porzione citoplasmatica rientrante nella membrana e parzialmente α elicoidale; in ogni subunità, due delle α eliche transmembrana e quella rientrante fanno parte del canale fisico. Da un punto di vista funzionale si suppone (la gran parte dei dettagli

è ancora ipotetica) che il legame di una molecola di agonista a ognuno dei quattro siti recettoriali comporti un cambiamento conformazionale per il quale le due parti dei domini di legame ruotino di circa 25° intorno ad una cerniera, chiudendosi sul sito recettoriale occupato. Questa rotazione dovrebbe allontanare di circa 20 \AA le due estremità più distanti dal sito recettoriale, esercitando una trazione sulle α eliche che formano il canale fisico tramite i segmenti a struttura indefinita che li uniscono. In conseguenza, le α eliche transmembrana — che sono leggermente piegate — ruoterebbero sulla loro porzione extracellulare, così allontanando la porzione intracellulare dall'asse del canale, rendendolo pervio. Questo modello comporta che la dipendenza del cambiamento conformazionale del canale fisico da quello causato dall'occupazione del sito recettoriale non sia dovuta, come normalmente, a fattori allosterici, ma ad un'azione meccanica diretta (la trazione dei segmenti non strutturati), analogamente a quanto si suppone avvenga nel caso delle ATPasi di tipo P.

2.1.3. Canali attivati da nucleotidi ciclici.

I nucleotidi ciclici sono normalmente considerati come secondi messaggeri che, tipicamente, attivano un enzima che dà inizio ad una cascata di reazioni intracellulari. In casi specifici, segnatamente in quelli dei segnali visivi e olfattivi, nucleotidi ciclici possono però interagire con il sito recettoriale intracellulare di specifici canali a controllo di ligando, inducendo direttamente variazioni della conduttanza ionica di membrana (vedi l'Appendice delle "Note sui messaggeri intracellulari").

I canali attivati da nucleotidi ciclici sono costituiti da eterotetrameri le cui subunità, di due o tre tipi differenti, sono formate da 650-700 residui, corrispondenti ad un peso molecolare di 70-80 KDalton (circa 300 KDalton per l'intera molecola). La topografia di membrana dovrebbe consistere in 6 segmenti idrofobi transmembrana a presunta (non esistono dati di diffrazione) struttura α , separati da segmenti idrofili alternativamente extra- ed intra-cellulari. La struttura tetramera, la presenza di sei segmenti transmembrana e le notevoli omologie di sequenza (compresi gli elementi voltaggio-sensibili, i segmenti S4, § 3.1.2.), fanno ritenere che questi canali siano evolutivamente correlati con quelli a controllo di potenziale, segnatamente con i canali potassici. Come in questi, il canale fisico è formato al centro delle quattro subunità, presumibilmente (di nuovo, per mancanza di dati diffrattometrici) con il coinvolgimento di un' α elica per subunità, mentre il sito di legame con i nucleotidi ciclici è localizzato nella prima porzione del segmento idrofilo C-terminale, ovviamente intracellulare.

Dato che la sintesi dei nucleotidi ciclici è controllata da afferenza esterne tramite recettori a sette segmenti transmembrana, questi canali forniscono un accoppiamento tra l'occupazione dei recettori e le variazioni del potenziale cellulare. Sia nel caso delle cellule fotorecetriche che di quelle olfattorie le variazioni di conduttanza indotte da questi canali sono relative a fenomeni sensoriali per i quali sembrano vantaggiosi elevati livelli di amplificazione, che non possono essere ottenuti dall'attivazione diretta di canali ionici.

2.3.1. Recettori per l' IP_3 e per la rianodina

I recettori per l' IP_3 e quelli per la rianodina sono canali calcici strettamente correlati fra loro, che determinano un rapido afflusso di questi ioni dagli organelli di deposito verso il citoplasma. Entrambi questi canali sono proteine di peso molecolare molto elevato, circa 1.5 e 2.0 milioni di Dalton i recettori per l' IP_3 e la rianodina, rispettivamente, composte da quattro subunità eguali — arrangiate simmetricamente intorno ad un asse centrale perpendicolare alla membrana — che definiscono un canale scarsamente selettivo per i cationi. Entrambi questi recettori sono localizzati nella membrana di organelli di deposito calcico: la loro apertura causa quindi un incremento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche anche in assenza di apporto esterno. Inoltre, dato che negli organelli sono contenuti solo ioni Ca^{2+} , la loro scarsa selettività non ha rilevanza fisiologica, mentre contribuisce (vedi § 1.2.) all'elevata conduttanza che li caratterizza (tra gli 80 e i 180 pSiemens). Data la mancanza di dati diffrattometrici, le informazioni strutturali esistenti derivano da ricostruzioni di immagini, che definiscono solo la forma generale della molecola (Figura 2), ma non la posizione dei singoli atomi: in conseguenza, non sono noti i determinanti strutturali responsabili dei meccanismi funzionali.

Nei recettori per l' IP_3 , il passaggio è controllato dal legame con l'inositolo 1,4,5 trifosfato (appunto, l' IP_3), che è un secondo messaggero (vedi: "Note sui secondi messaggeri, § 5). Pertanto, l'incremento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche è funzione delle concentrazioni extracellulari di molecole informative in grado di interagire con recettori metabotropi e, quindi, dell'arrivo di afferenze esterne a recettori accoppiati alle proteine G, la cui occupazione stimola la sintesi dell' IP_3 . Nel caso dei recettori per la

rianodina, (RyR; la rianodina è un alcaloide vegetale, ovviamente non presente nell'organismo; il nome deriva dalla capacità di questi recettori di legare questo composto) che sono localizzati nel reticolo sarcoplasmatico e sono responsabili dell'incremento della concentrazione calcica che induce la contrazione del muscolo striato, l'apertura del canale ionico può essere controllato da fattori quali l'incremento dei livelli calcici intracellulari, mediato dalla calmodulina (sono, infatti, canali calcici calcio-dipendenti) o il legame con l'ADP ribosio ciclico (cADPR), che potrebbe agire come modulatore o come agonista allosterico. Si pensa però che il fattore principale sia l'accoppiamento meccanico con i così detti recettori per la diidropiridina, proteine voltaggio-sensibili strettamente associate al canale che sono localizzate nel reticolo sarcoplasmatico del muscolo striato e che dovrebbero essere direttamente responsabili dell'accoppiamento tra il potenziale d'azione della fibrocellula muscolare e l'evento contrattile (vedi: "Note sulle proteine motrici", § 2.4.1.3.).

3. Canali a controllo di potenziale

I canali a controllo di potenziale sono canali ionici in cui la pervietà del canale fisico è controllata principalmente dal valore del potenziale intracellulare che viene rilevato da apposite strutture, i sensori di voltaggio. Va anche notato che il voltaggio intracellulare è spesso compreso tra i fattori di controllo di canali ionici (ed anche dei connessioni) in cui la pervietà del canale fisico è controllata da fattori multipli.

3.1. Canali cationici

3.1.1. Funzioni. Nelle cellule eccitabili i canali cationici a controllo di potenziale molto, poco o anche per nulla selettivi per specifici cationi ma sempre in grado di discriminare questi dagli anioni, costituiscono le strutture responsabili dell'insorgenza dei potenziali d'azione. In altre cellule voltaggio-dipendenti, come cellule endocrine e oociti, hanno invece funzioni di regolazione metabolica. Canali a controllo di potenziale sono anche presenti in popolazioni cellulari non voltaggio-dipendenti, nelle quali la loro funzione è spesso poco, o nulla, conosciuta.

3.1.2. Struttura. I canali cationici a controllo di potenziale costituiscono una famiglia omogenea, in cui il canale fisico è formato da una singola subunità (la α), costituita da quattro domini molto simili nei canali Na^+ -e Ca^{2+} -selettivi, oppure da quattro subunità uguali nei canali potassici. In entrambi i casi la struttura primaria e secondaria dei quattro elementi ripetuti (rispettivamente, domini o subunit'a) è simile; in ogni caso esiste un totale di 24 segmenti transmembrana (4 x 6, vedi oltre) accompagnati da 4 anse idrofobe che si ripiegano nella membrane e partecipano alla formazione del canale fisico. In tutti i casi, la quarta α elica transmembrana comprende numerosi residui carichi positivamente che costituiscono i sensori di voltaggio.

3.1.2.1. I canali a controllo di potenziale selettivi per Na^+ e Ca^{2+} sono costituiti da glicoproteine di membrana il cui canale fisico è formato da una singola subunità (la α), accompagnata da un numero variabile di altre subunità cui vengono attribuite funzioni modulatorie. La subunità α è costituita da una catena polipeptidica di 1800-2000 residui per un peso molecolare totale, ossia comprendente la frazione glicidica, di circa 260.000 Daltons. Nella sequenza sono identificabili quattro domini (Figura 3a) di 210-270 residui ciascuno, non identici ma omologhi tra loro, nonché alle subunità dei canali potassici. Tale simmetria strutturale comporta l'arrangiamento quasi-simmetrico dell'intera subunità evidenziato dalle ricostruzioni di immagini (Figura 3b). Ognuno dei quattro domini comprende sei α eliche prevalentemente idrofobe (24 in totale), disposte circa perpendicolarmente al piano della membrana, ovviamente connesse da tratti meno strutturati, alternativamente extracellulari e citoplasmatici (entrambi i terminali sono intracellulari). Come in tutti i canali cationici a controllo di potenziale, esiste un motivo strutturale costituito da un'ansa parzialmente idrofoba localizzata tra il quinto ed il sesto segmento α -elicoidale che si ripiega nella membrana, il così detto "P-loop" (Figura 3a). Assieme alla sesta α elica, il P loop forma il canale fisico; inoltre, vi sono localizzati i residui polari (diversi nei canali per il sodio da in quelli per il calcio) che determinano la selettività ionica.

Per questi canali non sono disponibili dati di diffrazione, ma solo ricostruzioni di immagini al microscopio elettronico che indicano una struttura che, nel piano della membrana, si presenta rotondeggiante e simmetrica rispetto al canale fisico; nel piano del canale fisico, si presenta invece a campana, di circa 100 x 100 x 160 Å, con la base più ampia in posizione citoplasmatica, e caratterizzata da quattro lobi, forse corrispondenti ai quattro domini (Figura 3b). Data la bassa risoluzione (20 Å) di questi dati è riconoscibile solo la forma generale della molecola, mentre i dettagli visibili non sono correlabili con le caratteristiche strutturali determinate con altre tecniche. Nei canali per il sodio la subunità α è accompagnata da due altre

subunità, $\beta 1$ e $\beta 2$, costituite da una catena polipeptidica di 33 e 36 KDaltons, rispettivamente. Nei canali calcici in numero delle subunità che accompagnano la α è relativamente elevato, nonché variabile a seconda di parametri come la localizzazione anatomica.

3.1.2.2. Canali potassici. Come accennato, questi canali sono formati da quattro subunità identiche, di peso molecolare poco superiore a 10000 Daltons ciascuna, la cui sequenza presenta riconoscibili omologie con quella della subunità α dei canali calcici e sodici. Negli eucarioti, e quindi nell'uomo, queste subunità sono formate da sei α eliche transmembrana, una delle quali (quattro in totale) determina il canale fisico. In molti procarioti (dati cristallografici esistono solo per questi organismi, Figura 4) le subunità comprendono solo due α eliche transmembrana; queste, tuttavia, presentano elevata omologia di sequenza con le corrispondenti degli eucarioti (in sostanza, nei procarioti mancano le prime quattro α eliche). Nei procarioti, le α eliche N-terminali si trovano all'esterno della molecola, prendono contatto con la membrana e interagiscono fra loro, mantenendo la struttura quaternaria. Il canale fisico è invece delimitato dalle α eliche C-terminali, inclinate di circa 25° rispetto all'asse della molecola e leggermente piegate; quindi, come di consueto, il suo massimo diametro si riscontra all'imbocco (extracellulare) e il minimo in posizione circa centrale, in corrispondenza con il P loop. Questo è formato da amminoacidi prevalentemente polari ma non carichi (vedi oltre); a questo livello, la dimensione trasversale minima del canale fisico è così ridotta da non consentire il passaggio degli ioni con il loro involucro di idratazione, che deve essere rimosso per consentire il passaggio. Come in altri casi, l'imboccatura del canale è caratterizzata da un addensamento di amminoacidi con carica netta negativa (vedi § 1.2.), che dovrebbero operare una prima selezione ionica.

3.1.3. Pervietà del canale fisico. Facendo riferimento ai canali sodici, la correlazione tra voltaggio intracellulare e stato di apertura del canale fisico è determinata dallo spostamento delle catene laterali di residui carichi. Infatti, come accennato, nella quarta α elica si trovano residui carichi positivamente (istidina e arginina), intercalati ad altri non polari. L'inclusione di queste α eliche nel lipide di membrana (che ha una costante dielettrica assai bassa) comporta che, in assenza di interazioni polari, le catene laterali di questi residui possano agire come sensori del campo elettrico intracellulare: in condizioni basali (cioè interno negativo) queste catene laterali sono attratte verso l'interno della cellula dal suo campo negativo e le forze che mantengono la struttura terziaria della proteina sono, ovviamente, tali da compensare questa forza attrattiva. Quando la cellula comincia a depolarizzarsi (ossia, quando il potenziale di membrana si sposta verso valori meno negativi), la forza che si esercita sulle catene laterali diminuisce e le forze che agivano per compensarla non sono più bilanciate. Pertanto si determina un nuovo equilibrio energetico e, quindi, una nuova conformazione. Specificamente, dati i vincoli dell' α elica sulla quale sono localizzati i residui interessati, questa conformazione viene assunta tramite uno spostamento ed una rotazione dell'intera α elica, che comporta la pervietà del canale fisico.

3.1.4. Selettività. Nei canali sodici e calcici la sesta α elica transmembrana (secondo altri anche la quinta) e l'ansa idrofoba interposta (il P loop) formano le pareti del canale: specificamente, la porzione interna, più ampia, è formata dalla sesta α elica, mentre l'ansa idrofoba forma la porzione più esterna (periplasmatica): questa è più stretta della precedente e comprende tre residui di glutammico per ogni dominio, ossia 12 in tutto. Si suppone che sia appunto il legame degli ioni idratati con le catene laterali cariche negativamente di questi residui a determinare la selettività del canale, secondo quanto descritto al paragrafo 1.2.

Nei canali potassici, la coesistenza dell'anello esterno di cariche negative, di un P loop polare ma non carico con la necessità degli ioni in transito di perdere l'involucro di idratazione dovrebbero essere responsabili di quelle che sono le due maggiori peculiarità di queste strutture, e cioè la loro elevata (circa 10000 : 1) selettività per gli ioni K^+ rispetto agli ioni Na^+ (che hanno la stessa carica ed un raggio ionico non molto minore, 0.95 contro 1.33 Å), nonché gli elevati flussi ionici (intorno ai 10^8 ioni/sec), due caratteristiche normalmente in contrasto fra loro (vedi § 1.2). Si pensa che proprio l'esigenza di perdere l'acqua di idratazione possa avere importanza nel determinare il primo fattore: infatti, il piccolo raggio ionico degli ioni Na^+ comporta una forte intensità di campo e, quindi, un involucro di idratazione molto adeso: la maggiore difficoltà di perderlo potrebbe, quindi, rendere conto della ridotta permeabilità del canale per questi ioni. A sostegno di ciò vi è il fatto che cationi monovalenti non fisiologicamente rilevanti (Rb^+ , Cs^+) che hanno raggi ionici più grandi del K^+ hanno circa la stessa permeabilità di questo. È infine probabile che la selettività dipenda da più fattori, rendendone la razionalizzazione più difficile.

4. Canali anionici

Permettendo il passaggio di ioni Cl^- — gli unici anioni fisiologicamente rilevanti — i canali anionici a controllo

di potenziale regolano la composizione ionica del citoplasma; assieme ai canali potassici, controllano il volume cellulare, consentendo un passaggio salino netto; inoltre, fornendo la massima parte della conduttanza ionica della membrana delle fibrocellule muscolari e di alcuni neuroni, ne controllano il valore del potenziale di riposo. In particolare, nell'epitelio renale questi canali permettono agli ioni cloro di lasciare le cellule dell'ansa di Henle nelle quali si accumulano per azione di specifici trasportatori.

I canali Cl⁻-selettivi, noti come CLC, costituiscono una famiglia caratterizzata da un modello strutturale peculiare e privo di omologie con altri canali ionici; in effetti, molte delle proteine che fanno parte di questa famiglia funzionano non come canali ionici ma come trasportatori. I canali CLC sono costituiti da omodimeri, i cui monomeri sono caratterizzati da una struttura secondaria che comprende un gran numero di α eliche (17 negli eucarioti, 18 in *E. coli* per cui esistono dati diffrattometrici). Queste sono quasi tutte transmembrana ma, in modo assai peculiare, sono di lunghezza ampiamente variabile ed orientate per lo più obliquamente rispetto alla membrana, formando quello che è stato — non a torto — definito come un "dedalo" di α eliche (Figura 5). Le due subunità, subtriangolari in una vista perpendicolare alla membrana, si associano a formare un dimero che, sempre nella stessa vista, si presenta romboidale, con un asse maggiore di circa 100 Å, ed uno minore di 55 (c in Figura 5); dato che ha uno spessore di circa 35 Å, la proteina sporge di poco dalle due parti della membrana. Ognuna delle due subunità forma un canale fisico, quindi due per molecola, indipendenti fra loro. La selettività ionica, peraltro assai modesta, è dovuta alla presenza di siti di legame (tre, carichi positivamente) per gli ioni che impegnano il canale fisico, localizzati nel punto più stretto di questo. Quanto al controllo della pervietà del canale, si suppone che questa sia determinata dalla conformazione di un singolo residuo di glutammico (Glu₁₄₈ in *E. coli*) il cui gruppo carbossilico, sporgendo nel canale fisico, dovrebbe esser in grado di bloccarlo per effetto sterico, analogamente a quanto avviene nelle acquaporine. Ancora, data la capacità dei canali CLC di rispondere a più fattori (oltre che al voltaggio intracellulare, alla concentrazione degli stessi ioni Cl⁻ e al pH), si potrebbe supporre che tutti questi fattori debbano pilotare cambiamenti conformazionali molto simili, se non identici, verso conformazioni della proteina corrispondenti al canale fisico pervio (o bloccato). Tuttavia — al contrario di quanto è noto per i canali cationici nei quali il cambiamento conformazionale riguarda tutta l' α elica che porta i residui idrofobici interessati (vedi § 1.1) — nei canali CLC le variazioni di conformazione globali della proteina appaiono estremamente limitate. Inoltre, non è stato possibile identificare dettagli strutturali in grado di agire da sensori per fattori che controllano lo stato del canale fisico (specificamente, non sono stati identificati elementi sensibili al voltaggio, funzionalmente analoghi ai P loops dei canali cationici).

In fine, l'esistenza di due canali fisici per molecola dà origine peculiari modalità di apertura. Specificamente, è stata osservata una modalità di apertura indipendente, che si estende su tempi nell'ordine del millisecondo, ed una in cui lo stato di apertura dei due canali è sincronizzato, i cui tempi di evoluzione sono, per una molecola, eccezionalmente lunghi, nell'ordine dell'intero secondo. Tuttavia, sui meccanismi e sulle loro implicazioni fisiologiche si sa ancora assai poco.

5. Canali a controllo meccanico

5.1. Dati generali

Tutti i segnali sensoriali, sia esterni che interni, debbono essere inviati al sistema nervoso centrale come segnali elettrici centripeti. Dato che i canali ionici, modificando le concentrazioni ioniche, modificano il potenziale intracellulare, variazioni del loro stato di apertura possono generare direttamente i segnali richiesti. Molto spesso, vengono infatti utilizzati a questo scopo canali il cui stato conformazionale dipende dai parametri che devono essere trasdotti. Altri segnali, come quelli olfattivi ma anche quelli visivi, sono invece trasdotti da chemocettori e il segnale efferente viene generata da canali ionici accoppiati ai recettori stessi (vedi l'appendice delle "Note sui secondi messaggeri").

In casi fisiologicamente rilevanti, lo stato di pervietà del canale fisico che genera la corrente centripeta è controllato da segnali meccanici che, tramite dispositivi variabili in differenti organi di senso, inducono una distorsione della membrana plasmatica in cui i canali sono inseriti. Questa distorsione può essere trasmessa alla proteina-canale sia direttamente, tramite interazioni idrofobiche proteina-lipide, che tramite l'ancoraggio ad altre proteine, che possono o essere di membrana, come le integrine, oppure far parte del citoscheletro. Canali di questo tipo agiscono da meccanotrasduttori e generano i segnali relativi, tra gli altri, a pressione, stiramento, postura e accelerazione, nonché i segnali uditivi. Non ostante la loro rilevanza fisiologica, i dettagli funzionali dei meccanotrasduttori sono noti solo imperfettamente: ciò sia per la loro disomogeneità (si pensa che ne esistano varie famiglie, evolutivamente non collegate), sia per l'obiettivo difficoltà di

identificare le caratteristiche strutturali responsabili di quelle funzionali (vedi oltre). In effetti, il problema del controllo dello stato di apertura dei canali a controllo meccanico è parzialmente indefinito. Ciò perché qualsiasi modifica della conformazione di una proteina, indotta da qualsiasi causa, necessariamente ne modifica lo stato funzionale; pertanto, dato che tutti i canali ionici sono costituiti da proteine transmembrana, modifiche meccaniche della membrana dovrebbero essere sempre, in via di principio, in grado di alterarne la conformazione e, quindi, lo stato di apertura. Tuttavia, la peculiarità dei canali che agiscono da meccanotrasduttori è che le forze esercitate sulla membrana sono in grado di alterare in modo definito (cioè controllando il passaggio canale fisico aperto - chiuso) anziché scompaginare casualmente la struttura della proteina. In queste condizioni non ci si dovrebbe attendere di trovare zone localizzate della molecola in grado di pilotarne i cambiamenti conformazionali che determinano lo stato del canale fisico. Al contrario, anche se in termini piuttosto speculativi, si può ipotizzare che la proteina sia in grado di assumere due stati conformazionali principali, uno a canale fisico chiuso ed uno a canale fisico aperto; che la seconda conformazione sia energeticamente sfavorita e, quindi, instabile; in fine, che l'energia necessaria per assumere la conformazione a canale fisico aperto (energia che, dai dati esistenti, non è trascurabile) venga fornita come energia meccanica dalla membrana, mentre la conformazione a canale fisico chiuso venga riassunta spontaneamente al cessare di quest'apporto energetico.

Per completezza, va anche osservato che le risposte a stimoli meccanici costituiscono un fenomeno di portata più generale dei fenomeni sensoriali, e che non tutte le risposte a stimoli meccanici sono mediate da canali ionici. Infatti, segnali meccanici, assieme a segnali di contatto mediati da recettori, sono coinvolti in fenomeni come l'adesione delle cellule sia fra loro che alla matrice extracellulare, nel rimaneggiamento di tessuti direzionalmente caratterizzati, come la cartilagine e l'osso, nella localizzazione delle adesioni focali delle cellule e nell'assemblaggio di elementi intracellulari con funzioni strutturali come il citoscheletro e la corteccia cellulare. In tutti questi fenomeni è coinvolta una molteplicità di proteine — come le integrine e le caderine — e di strutture di membrana e intracellulari il cui operare concertato è in atto oggetto quasi solo di ipotesi.

5.2. I canali MscL di *Mycobacterium tuberculosis*

L'unico canale sensibile a segnali meccanici del quale esistano attualmente dati di diffrazione è il canale di *M. tuberculosis* noto come MscL (Figura 6). Questo non è un canale ionico, ma ha la funzione di regolare il volume di acqua intracellulare a seguito di variazioni osmotiche, analogamente alle acquaporine degli eucarioti. Naturalmente, in questo caso mancano i meccanismi responsabili della selettività ionica, che devono essere presenti nei meccanotrasduttori e che, in linea di principio, dovrebbero essere analoghi a quelli degli altri canali ionici (§ 1.2); tuttavia, si suppone che sia la struttura che le caratteristiche di meccanotrasduzione del canale MscL siano sostanzialmente analoghe a quelle dei meccanotrasduttori degli eucarioti.

Gli MscL sono costituiti da relativamente piccole proteine transmembrana subcilindriche che, nella loro conformazione a canale chiuso, hanno diametro di circa 50 Å e un'altezza di 85. La proteina è costituita da cinque subunità identiche di circa 15 kDa ognuna (75 kDa totali), disposte intorno ad un asse ideale circa perpendicolare al piano della membrana e coincidente con il canale idrofilo. Ognuna delle cinque subunità comprende due α eliche transmembrana ed una citoplasmatica, cui vanno aggiunte altre due corte sezioni α elicoidali; una in posizione periplasmatica ed una localizzata in corrispondenza del punto più stretto del canale fisico, nonché un piccolo piano β antiparallelo periplasmatico (Figura 6). Nella conformazione chiusa, le α eliche transmembrana sono inclinate di 28° e quelle citoplasmatiche di 15° rispetto all'asse del canale fisico. Questo è delimitato dalle α eliche transmembrana interne (M1 in Figura 6) e da quelle citoplasmatiche; come di norma, queste α eliche sono anfipatiche, di modo che i residui che si affacciano nel lume del canale sono prevalentemente polari. Il canale fisico ha un diametro di circa 18 Å all'imboccatura extracellulare e si restringe fino a soli 2 Å nella sua parte più stretta (quella citoplasmatica), definita dai soli residui idrofobi (isoleucine e valine) presenti nel suo lume.

La conformazione a canale aperto viene assunta in seguito ad un cambiamento conformazionale pilotato dalla distorsione della membrana interna (è una proteina batterica) indotta da un aumento di turgore della cellula. Data l'assenza di interazioni con altre proteine di membrana o del citoscheletro, la trazione sulla proteina deriva da interazioni dirette lipide-proteina. Infatti, le α eliche transmembrana esterne (M2 in Figura 6) sono molto idrofobe, con un'elevato contenuto in residui aromatici che fornisce un buon ancoraggio al lipide. Secondo il modello corrente, la transizione tra conformazione chiusa (a sinistra in Figura 6) e quella aperta (a destra in Figura 6) comporta un notevole aumento (di quasi 40°) dell'inclinazione rispetto all'asse del

canale delle α eliche transmembrana, ed uno ancor più notevole delle α eliche citoplasmatiche a seguito del quale entrambi i gruppi di α eliche, da quasi perpendicolari vengono ad essere quasi parallele al piano della membrana. Questi spostamenti comportano un cospicuo appiattimento, ed un corrispondente allargamento, dell'intera molecola (la variazione di entrambi i parametri è vicina a un fattore di 2), cui corrisponde un aumento di diametro della porzione più stretta del canale fisico a circa 10 Å; il conseguente allontanamento dei residui idrofobi dall'asse del canale fisico, come in altri casi (vedi § 1.1), permette di stabilire la continuità dello strato di idratazione, consentendone il passaggio dell'acqua, ma il canale non è bloccato fisicamente come nelle acquaporine. Nell'ipotesi di cui sopra, la proteina si dovrebbe riportare spontaneamente nella conformazione a canale chiuso (energeticamente favorita) al cessare della trazione esercitata dalla distorsione della membrana.

Appendice. Interazioni tra canali a controllo di potenziale e canali a controllo di ligando nelle cellule eccitabili

Nelle cellule eccitabili, l'insorgenza dei potenziali d'azione dipende soprattutto dalla coesistenza di canali a controllo di ligando che rispondono ai segnali afferenti, e di canali cationici a controllo di potenziale, che intervengono a seguito delle variazioni indotte dai primi. Molto schematicamente — dato che in differenti popolazioni cellulari esistono differenti distribuzioni di recettori e di canali ionici — la presenza di afferenze eccitatorie, ossia di sufficienti concentrazioni di mediatore chimico in grado di legarsi a canali a controllo di ligando specifici per il sodio e/o per il calcio, causa uno spostamento graduale del potenziale intracellulare verso valori positivi. Nei neuroni (nel muscolo scheletrico la situazione è parzialmente diversa), l'azione dei segnali eccitatori può però essere contrastata da quella di segnali inibitori e, in ogni caso, dall'attività dei trasportatori di membrana che tendono a mantenere lo sbilanciamento ionico tra esterno ed interno della cellula. I neuroni operano quindi un'integrazione in funzione del tempo di questi fattori, facendo conseguentemente variare il potenziale cellulare. Se il potenziale della cellula giunge ad un valore in corrispondenza del quale cominciano ad aprirsi i canali cationici a controllo di potenziale (valore che costituisce il "potenziale di soglia"), il risultante aumento della conduttanza di membrana per gli ioni in questione (molto spesso ioni Na^+ , in alcune cellule anche Ca^{2+}) tende a spostare il potenziale intracellulare verso il valore di equilibrio per questi ioni, cioè verso un'ulteriore positività (circa +60 mV per gli ioni Na^+). Ciò fa aprire altri canali dello stesso tipo, e così via secondo un processo che, avendo effetto (depolarizzazione) sulle proprie cause (apertura dei canali cationici), si autoamplifica. La risultante di questi processi è il brusco innalzamento del voltaggio intracellulare che costituisce il potenziale d'azione. Infine, quando il potenziale intracellulare raggiunge valori sufficientemente positivi iniziano ad aprirsi i canali a controllo di potenziale selettivi per gli ioni potassio, il cui valore di soglia si colloca a valori positivi. Il conseguente aumento della conduttanza per gli ioni K^+ tende a spostare il potenziale cellulare verso il potenziale di equilibrio di questi ioni (intorno ai -100 mV). Contemporaneamente, la spontanea inattivazione (§ 1.3) dei canali sodici riduce la conduttanza della membrana a questi ioni. La somma di questi processi — che avvengono in presenza di trasportatori sempre attivi — tende a riportare il potenziale cellulare verso il suo valore di riposo, dando luogo alla fase discendente del potenziale d'azione.

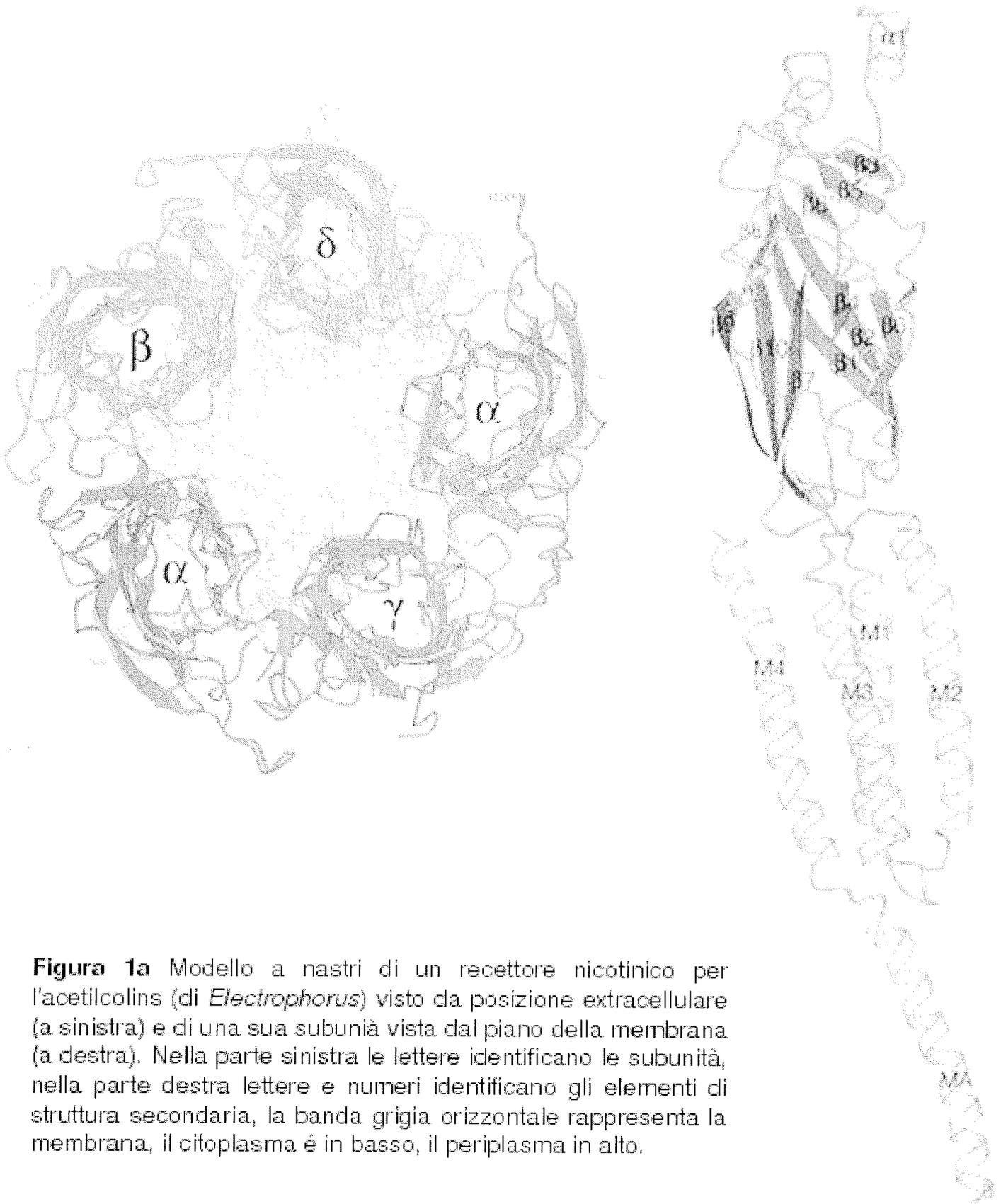


Figura 1a Modello a nastri di un recettore nicotinico per l'acetilcolina (di *Electrophorus*) visto da posizione extracellulare (a sinistra) e di una sua subunità vista dal piano della membrana (a destra). Nella parte sinistra le lettere identificano le subunità, nella parte destra lettere e numeri identificano gli elementi di struttura secondaria, la banda grigia orizzontale rappresenta la membrana, il citoplasma è in basso, il periplasma in alto.

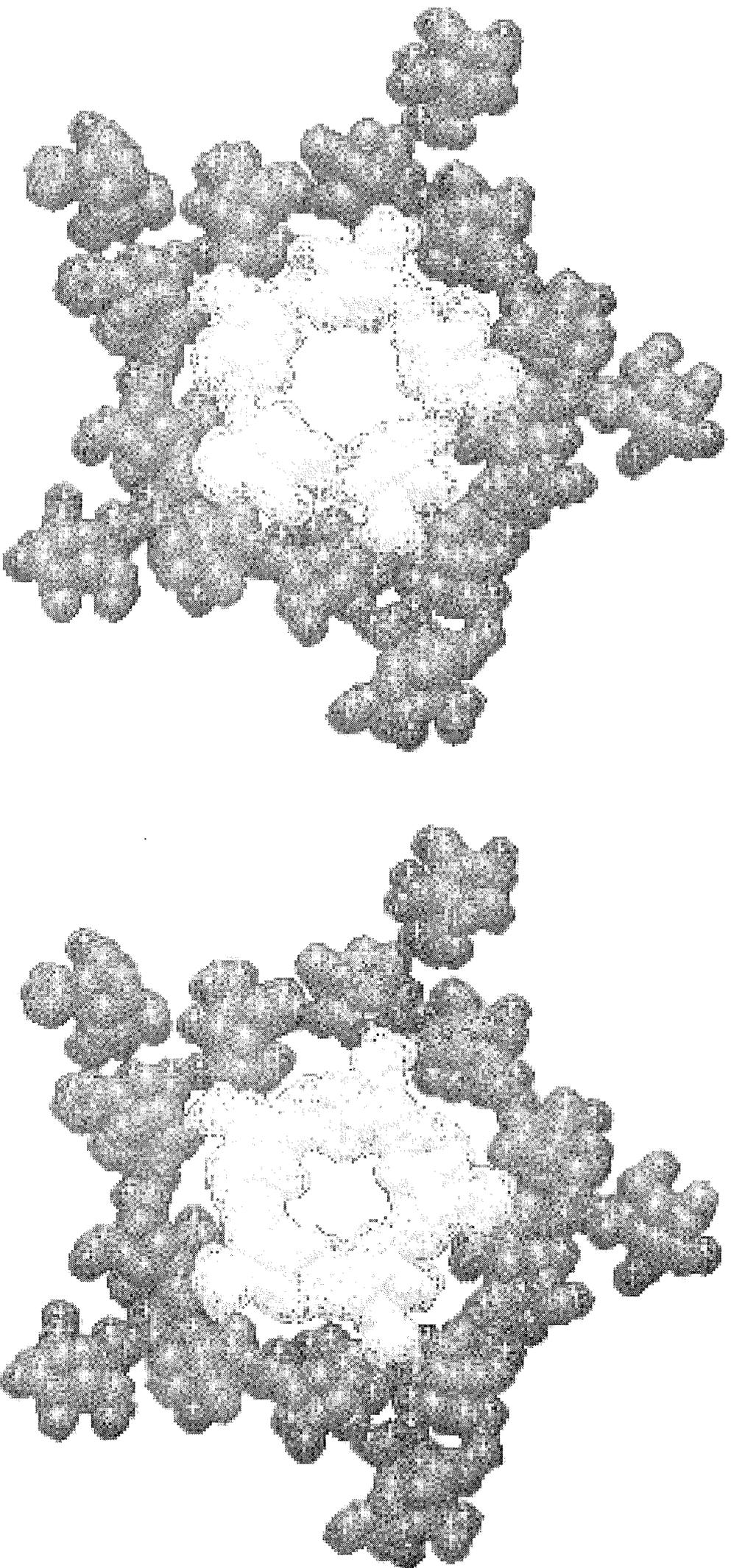


Figura 1b. Modello a spazio pieno di un recettore nicotinico per l'acetilcolina nel punto più stretto del canale fisico. Le superfici di van der Waals degli atomi interessati sono mostrate nella configurazione a canale fisico aperto (a sinistral) e chiuso (a destral). Il relativo cambiamento conformazionale comporta una rotazione di 159° in senso orario della α eliche in grigio chiaro che delimitano il canale fisico. La differenza tra le due conformazioni è di 3 Å, da 9 a 6 Å di diametro minimo.

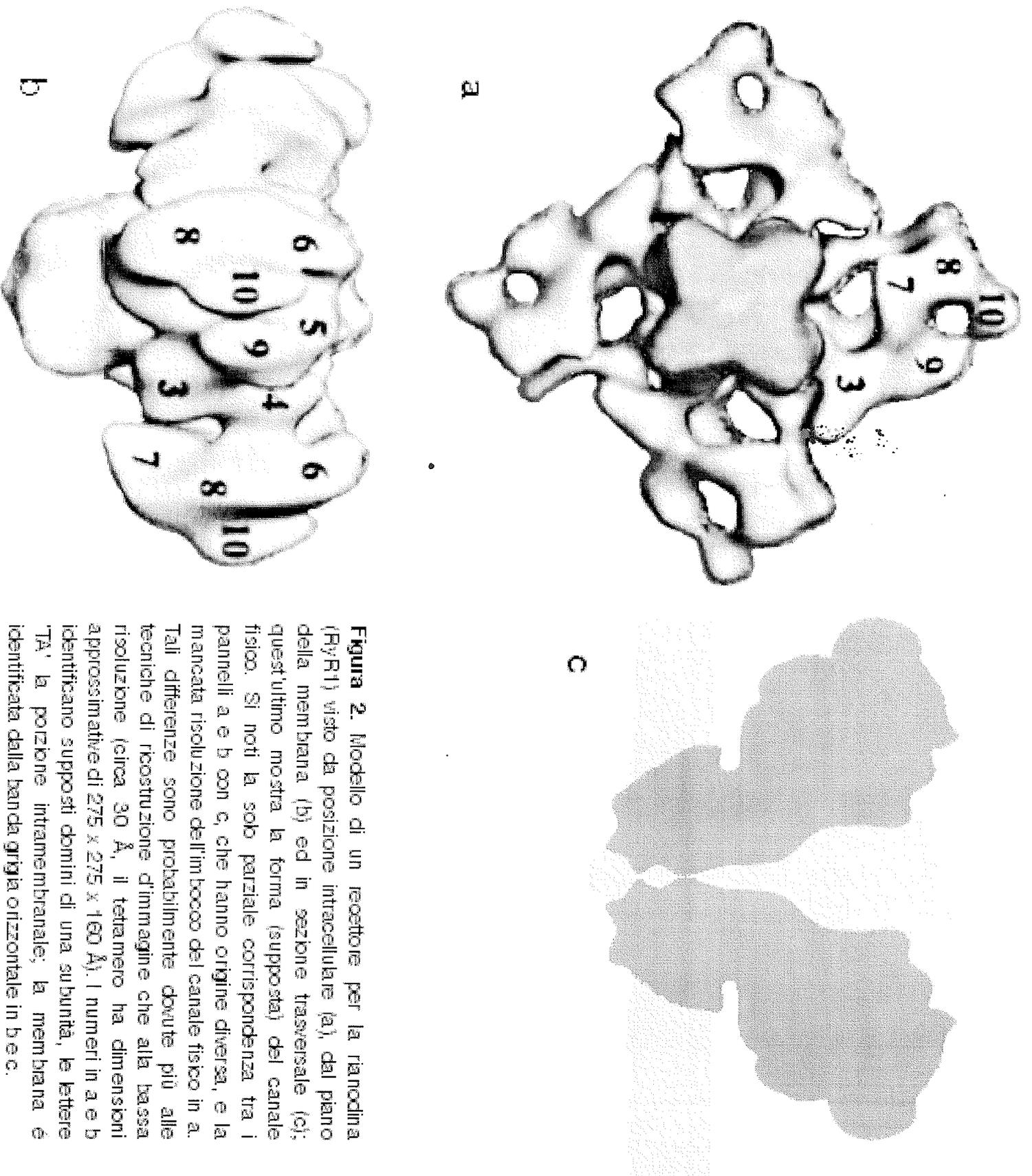


Figura 2. Modello di un recettore per la rianodina (RyR1) visto da posizione intracellulare (a), dal piano della membrana (b) ed in sezione trasversale (c); quest'ultimo mostra la forma (sopposta) del canale fisico. Si noti la sola parziale corrispondenza tra i pannelli a e b con c, che hanno origine diversa, e la mancata risoluzione dell'imbocco del canale fisico in a. Tali differenze sono probabilmente dovute più alle tecniche di ricostruzione d'immagine che alla bassa risoluzione (circa 30 Å, il tetramero ha dimensioni approssimative di 275 x 275 x 160 Å). I numeri in a e b identificano supposti domini di una subunità, le lettere "A" la porzione intramembranale; la membrana è identificata dalla banda grigia orizzontale in b e c.

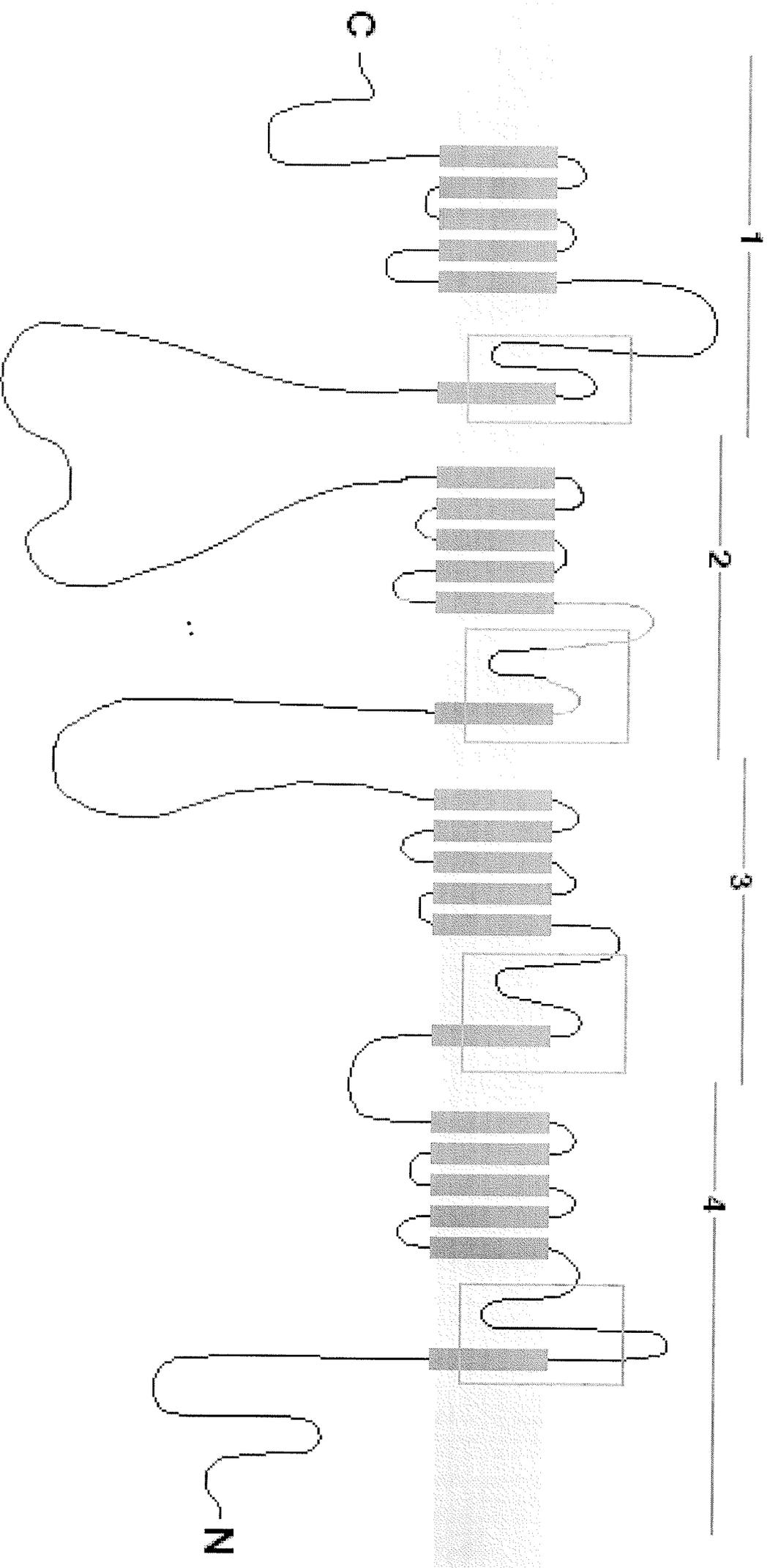


Figura 3a. Schema topologico della subunità α di un canale a controllo di potenziale selettivo per gli ioni sodio di cervello di ratto. I tratti spessi rappresentano α eliche transmembrana, i tratti sottili rappresentano segmenti a struttura non definita. Le cornici evidenziano le quattro anse rientranti nella membrana ("P-loops") nelle quali sono localizzati residui responsabili della selettività ionica. Le porzioni di catena che non fanno parte dei segmenti transmembrana sono rappresentate in forma estesa, in modo non corrispondente alla realtà; tuttavia, la loro lunghezza è proporzionale al numero di residui. Le linee orizzontali numerate identificano i quattro domini omologhi, la banda grigia orizzontale rappresenta la membrana; periplasma in alto e citoplasma in basso.

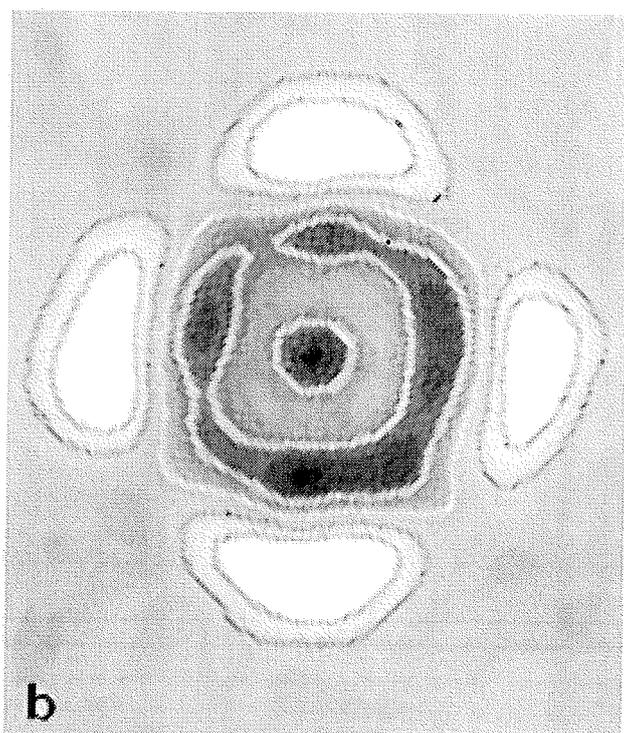
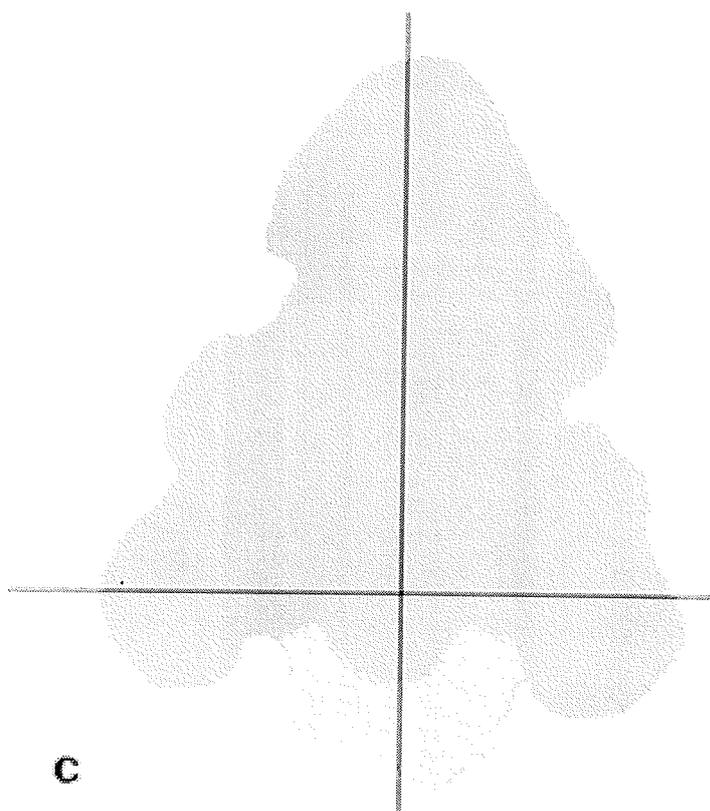
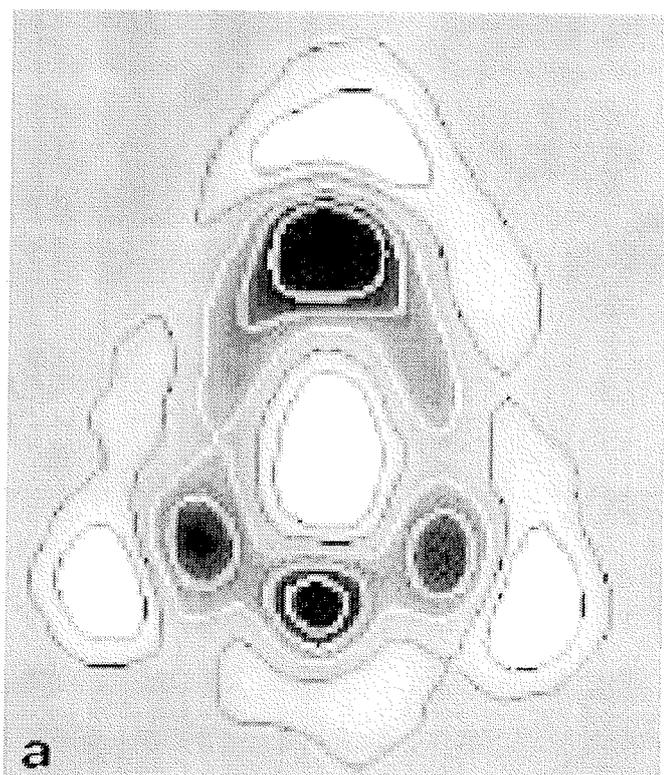


Figura 3b. Mappa di densità elettronica della subunità α del canale a controllo di potenziale selettivo per gli ioni sodio di *Electrophorus electricus* in sezione assiale (a) e trasversale (b), nella posizione indicata dalla linea orizzontale in c; il tono più chiaro indica maggiori densità elettroniche. La bassa risoluzione (circa 20 Å) ha consentito di ricostruire solo la forma generale della proteina: specificamente, non è risolto il canale fisico, che altri dati indicano localizzato in corrispondenza dell'asse verticale della subunità, dove l'immagine riporta invece due massimi di densità elettronica. In c la subunità è immaginata sezionata da un piano corrispondente alla presunta posizione del canale fisico, indicata dalla linea verticale; la parte sezionata è rappresentata in tono più scuro. La banda grigia orizzontale in c indica la posizione della membrana.

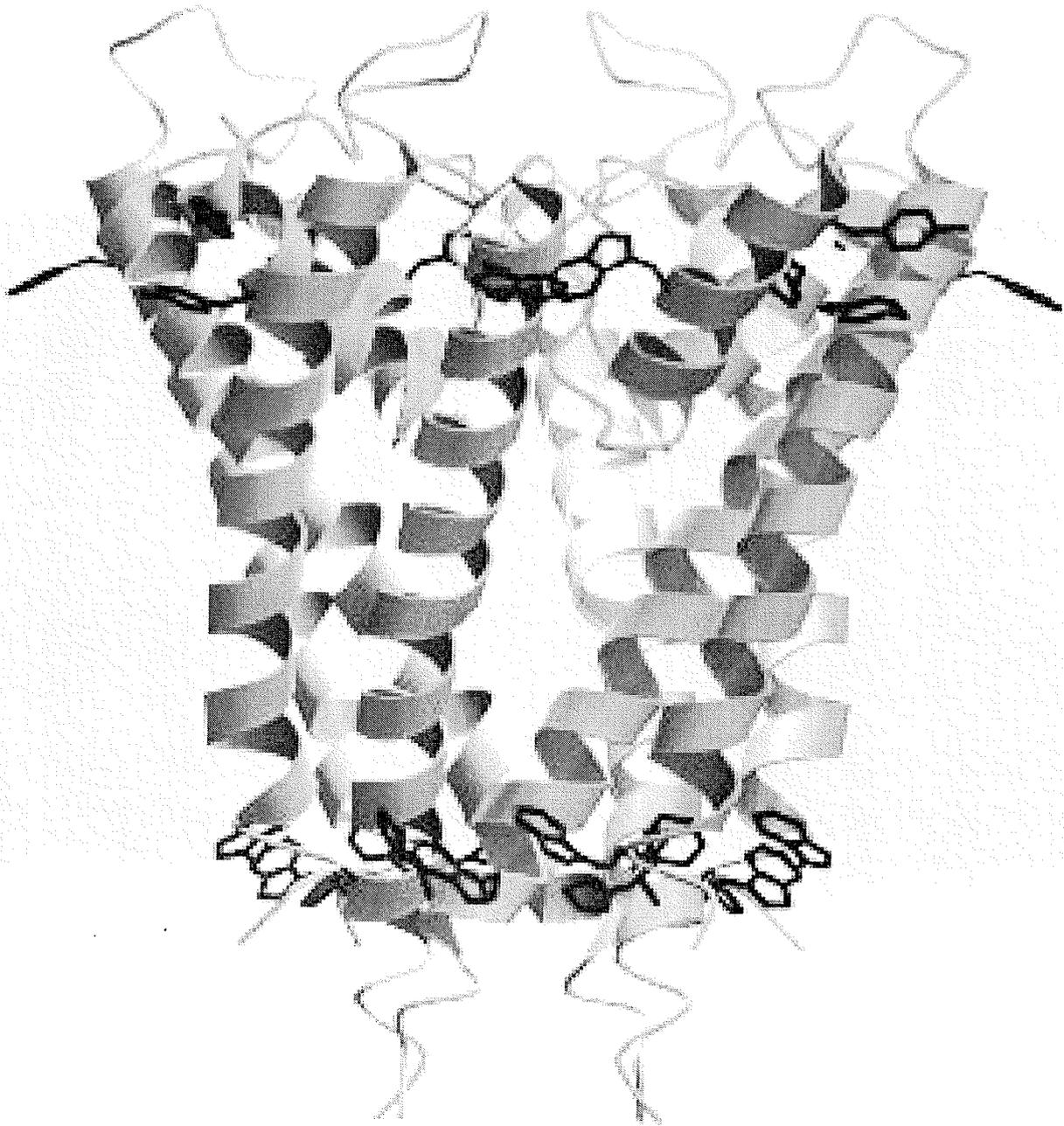


Figura 4. Modello a nastri di un canale cationico a controllo di potenziale, il canale per il K⁺ di *Streptomyces lividans*. Come in molti procarioti, le sue quattro subunità sono formate da due, anziché sei, α eliche transmembrana; tuttavia, esiste un'elevata omologia di sequenza con i canali degli eucarioti, e si suppone siano simili anche i dati funzionali. Dato che le α eliche formano un angolo di circa 25° con l'asse della proteina e sono leggermente piegate, il canale ha sezione ad imbuto, più larga in posizione periplasmatica. I nastri rappresentano α eliche, i tondini le porzioni intra ed extramembranali a struttura non definita; la banda grigia orizzontale rappresenta la membrana.

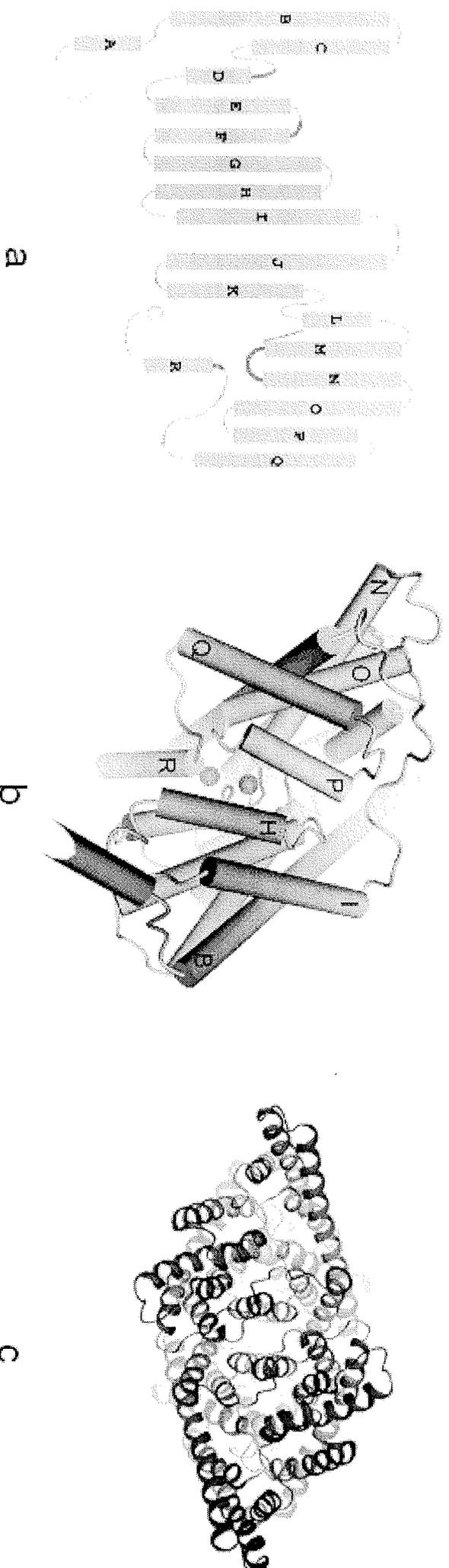


Figura 5. Modelli di un canale anionico a controllo di potenziale, il canale ClC di *Escherichia coli*. In a è riportata la topografia di membrana di una delle due subunità identiche, caratterizzate da 18 α eliche (barre), identificate con le lettere da A a R, connesse da brevi sequenze meno strutturate (fratti); le lettere N e C identificano i due terminali. In b una singola subunità è rappresentata come vista dal piano della membrana; alcune delle α eliche sono identificate con le stesse lettere del pannello a. La banda grigia orizzontale identifica la membrana, le due sfere in posizione circa centrale rappresentano ioni Cl⁻ impegnati nel canale fisico. In c il dimero funzionale è rappresentato da un modello a nastri, immaginato come visto dall'esterno della cellula. Le sfere rappresentano ioni Cl⁻ impegnati nei due canali fisici.

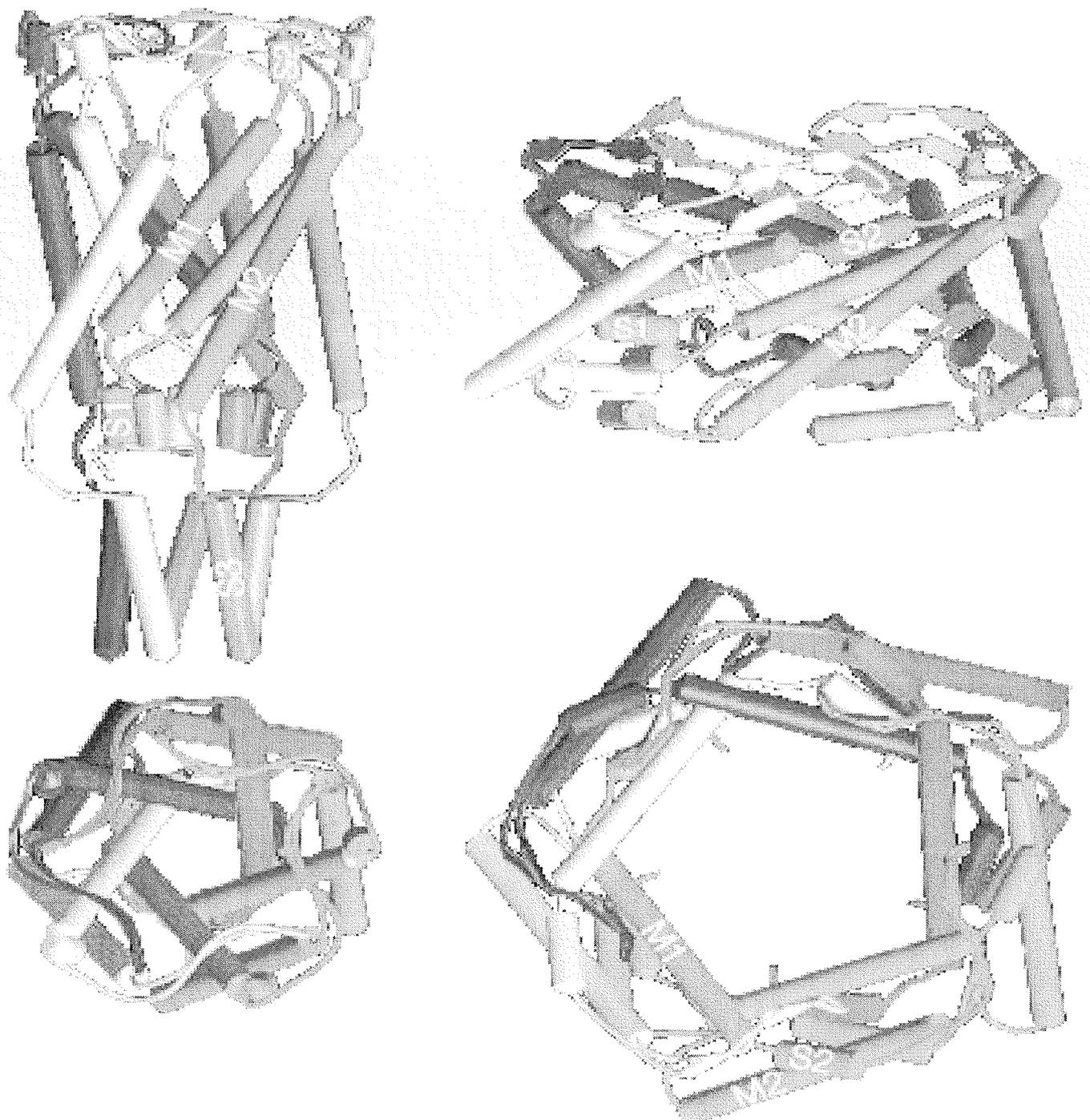


Figura 6. Modello di un canale a controllo meccanico (MscL di *Mycobacterium tuberculosis*) mostrato in conformazione a canale fisico chiuso (a sinistra) e aperto (a destra), visto dal piano della membrana (in alto) e da posizione extracellulare (in basso). Il canale é composto da cinque subunità a struttura prevalentemente α elicoidale (cilindri), piú un piano β antiparallelo formato da quattro corte strisce (frece) unite da brevi tratti a struttura secondaria non definita (tondini). Il canale fisico passa da un diametro di circa 2 ad uno di 10 Å quando la proteina si espande per effetto del turgore cellulare. Nella parte superiore della figura, la banda grigia orizzontale rappresenta la membrana, il periplasma é in alto e il citoplasma in basso.

Note sulle proteine G (6)

(revisione 2009, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Le proteine che legano nucleotidi guaninici

Due famiglie di proteine regolatrici di processi endocellulari, evolutivamente correlate fra loro, legano nucleotidi guaninici fosforilati: guanosin difosfato e guanosin trifosfato, rispettivamente GDP e GTP. Entrambe le famiglie hanno attività GTPasica e sono, quindi, in grado di catalizzare l'idrolisi del trifosfato a difosfato; data la loro struttura quaternaria, sono note come GTPasi monomeriche e GTPasi trimeriche. In entrambe le famiglie, lo stato conformazionale, e quindi di attività, è controllato dal quale dei due ligandi occupi il suo sito.

La singola subunità che costituisce le GTPasi monomeriche corrisponde ad uno dei domini della subunità α delle proteine trimeriche; le GTPasi monomeriche sono soprattutto coinvolte nel traffico intracellulare di vescicole e nel controllo dello stato di aggregazione del citoscheletro, segnatamente nei processi di chemiotassi. Le GTPasi trimeriche, le sole trattate qui, sono — ovviamente — costituite da tre subunità e agiscono da intermedi tra recettori di membrana ed effettori intracellulari.

1.1. Le GTPasi trimeriche

Le GTPasi trimeriche, cui si fa in genere riferimento con il nome di proteine G (le monomeriche sono note come RAS) agiscono principalmente da tramite tra recettori a sette segmenti transmembrana e i loro primi effettori intracellulari, in modo rilevante gli enzimi che sintetizzano secondi messaggeri. La rete di segnali che si viene così a creare controlla processi quali trascrizione genica, secrezione e motilità cellulare. Indipendentemente dalla loro azione, la loro attività è modulata da due classi di proteine intracellulari, le RGS e le AGS.

In sommario, la serie di reazioni che coinvolgono le proteine G è la seguente: il cambiamento conformazionale del recettore stabilizzato dalla presenza del ligando (vedi "Note sui recettori", § 2.1.) induce un cambiamento conformazionale nel sito di legame per i nucleotidi guaninici della proteina G tale per cui il GDP legato viene scambiato con il GTP. Questo scambio induce un ulteriore cambiamento conformazionale, a causa del quale il trimero si scinde in due componenti, la subunità α e un complesso costituito dalle restanti due subunità (β e γ). Mantenendosi aderenti alla membrana plasmatica, entrambe queste componenti (oppure una sola) attivano gli effettori cellulari interessati. Questi possono essere effettori intermedi quali adenilciclasti, fosfolipasi, fosfodiesterasi, ma anche effettori finali (canali ionici). Una volta attivati, gli effettori intermedi — non, ovviamente, quelli finali — danno inizio a cascate di segnali che attivano specifiche funzioni cellulari. La successiva interruzione della catena di segnalazione dipende da un processo di autoinattivazione delle proteine G, che sono in grado di catalizzare l'idrolisi del GTP a GDP, la cui presenza nel sito di legame induce la ricostituzione del trimero inattivo e la possibilità di interagire nuovamente con i recettori. In generale, ma esistono eccezioni, gli effettori coinvolti sono localizzati nella membrana plasmatica. Infatti, entrambe le componenti delle proteine G, una volta separate, rimangono vincolate alla membrana, nella quale si spostano grazie alla sua fluidità. Tuttavia, proteine G possono essere messe in evidenza anche in membrane intracellulari, dove si pensa siano trasportate da fenomeni di endocitosi. Ad esempio, in *Saccaromices cerevisiae* è noto che le subunità α di proteine G vengono trasportate in sede endosomica, dove attivano una fosfatidilinositolo chinasi che catalizza la sintesi di l'IP₃. Anche se questi fenomeni sono attualmente conosciuti soltanto nei procarioti, si ritiene possibile che meccanismi analoghi siano attivi anche nelle cellule umane.

2. Struttura

Sono note molteplici forme di tutte e tre le subunità (α , β e γ) dalle quali sono costituite le proteine G (Figura 1a e 1b), forme tra le quali l'omologia di sequenza è estremamente elevata, a volte superiore all'80%. In effetti, quest'elevata omogeneità rende difficile correlare le differenze funzionali tra vari tipi di proteine G a dati strutturali. Si ritiene, che la specificità funzionale sia soprattutto indotta da differenze nella struttura terziaria che, limitate, ma apparentemente sufficienti a operare la selezione sia dei recettori che degli effettori.

2.1. Subunità α . In queste subunità, che hanno un peso molecolare variabile tra 39 e 52 KDaltons, si distinguono tre domini (Figura 2): α -elicoidale, GTPasico e N-terminale. Il dominio α elicoidale consiste in una lunga α elica centrale circondata da 5 α eliche più corte. Il dominio GTPasico, detto anche "tipo Ras" per la sua omologia strutturale con le GTPasi monomeriche Ras, è composto da sei α eliche che circondano un piano β piuttosto distorto, formato da 6 strisce parallele. Il dominio N-terminale è costituito da una singola α elica che (forse, il dato è stato messo in dubbio) porta inserzioni alifatiche; se presenti, queste si inseriscono nella membrana plasmatica, ancorandovi la subunità; assieme alle inserzioni alifatiche della subunità γ , queste inserzioni ancorano l'intera proteina alla faccia intracellulare della membrana. In questa subunità sono localizzate le superfici di interazione con il recettore, due superfici di interazione con la subunità β (vedi oltre) e il sito di legame per i nucleotidi guaninici, localizzato nella fenditura che si determina dalla giustapposizione dei domini α elicoidale e GTPasico. In questo sito si riscontrano ripetizioni di residui di amminoacido ("motivi") comuni ad altre proteine capaci di legare nucleotidi, due dei quali sono coinvolti nel legame con il GDP/GTP. La conformazione di questo sito si modifica a seguito delle interazioni della proteina G con i recettori, permettendo la sua occupazione da parte o del GDP oppure del GTP (uno dei due ligandi è sempre presente). Inoltre, in questa subunità esistono tre regioni note come "switch" (letteralmente, interruttori) nelle quali il cambiamento conformazionale indotto dalla sostituzione GDP - GTP è particolarmente evidente e che costituiscono almeno parte delle presunte superfici di interazione con gli effettori e con la subunità β .

2.1.2. Subunità β . In queste subunità, che hanno un peso molecolare di circa 35 KD, si distinguono nettamente due domini: l'N-terminale è costituito da una singola α elica anfipatica che interagisce con la subunità γ , mentre il molto più esteso dominio C-terminale comprende sette ripetizioni di circa 43 amminoacidi ciascuna, organizzate in piani β antiparalleli, ognuno formato da quattro segmenti. Nella struttura terziaria, questi piani si vengono a disporre intorno ad una cavità centrale idrofila, formando una sorta di canestro, o imbuto, (Figura 3) sulla parte superiore e su di un lato del quale sono localizzate le superfici di interazione con la subunità α .

2.1.3. Subunità γ . Le piccole (peso molecolare tra 6000 e 8400 Daltons) subunità γ , nelle quali non è riconoscibile struttura terziaria, sono formate da due α eliche separate da un segmento a struttura non definita e seguite da un altro segmento non strutturato. Questo è modificato con un'inserzione alifatica, in genere un gruppo prenile, che si inserisce nella compagine lipidica della membrana (vedi Figura 1a). Le due α eliche, soprattutto quella N-terminale, interagiscono con l' α elica della subunità β formando una "coiled coil", mentre altre interazioni legano il resto della subunità con il dominio C-terminale della subunità β . Queste interazioni (soprattutto le coiled coils che, in ambiente polare, non si dissociano spontaneamente) rendono molto stabile il legame tra le due subunità e, quindi, il loro complesso.

2.1.4. L'eterotrimerico. La struttura quaternaria della molecola è mantenuta da interazioni fra la subunità α e la β e tra la β e la γ , mentre non esistono interazioni tra α e γ . Sulle subunità α e β esistono, infatti, due superfici di interazione in cui si stabiliscono numerosi legami, soprattutto idrofobi. Nella subunità α , la più estesa (circa il doppio dell'altra) di queste due superfici è localizzata in prossimità della regione switch II e comprende due strisce di piano β e un' α elica del dominio GTPasico che interagiscono con la parte superiore del dominio a canestro, interessando cinque dei sette piani β che lo formano. La seconda è costituita dall' α elica N-terminale della subunità α che interagisce con un lato del dominio a canestro della subunità β . Come già rilevato, la sostituzione GDP - GTP modifica queste interazioni; specificamente, la presenza del terzo atomo di fosforo del GTP permette lo stabilirsi di legami polari. Il nuovo equilibrio energetico indotto dall'esistenza di questi legami comporta una nuova conformazione della subunità α nella quale le interazioni $\alpha\beta$ sono indebolite, inducendo la dissociazione del trimero. Inoltre, dato che lo stato conformazionale del sito di legame per i nucleotidi non può modificare i legami β - γ , il trimero si dissocia nelle due componenti α e $\beta + \gamma$.

3. Classi

Le proteine G sono tradizionalmente distinte in classi, solo alcune delle quali sono strutturalmente omogenee. Tra queste, le G_s attivano l'adenilato ciclasi e, quindi, la sintesi di AMP ciclico (cAMP), le G_i inibiscono l'adenilato ciclasi mentre le G_q attivano la fosfolipasi C e, quindi, la produzione di inositolo fosfati. Va anche notato che G_s e G_i , che mediano funzioni rispettivamente stimolatorie ed inibitorie, spesso coesistono nella stessa cellula: in questo caso, vie metaboliche attivate da recettori con valenza funzionale opposta hanno come tramite o le une o le altre di queste proteine. Ad esempio, le due principali classi di recettori adrenergici, α e β sono spesso contemporaneamente presenti nella stessa cellula. In questi casi,

l'occupazione del sito recettoriale dei recettori β attiva le G_s e ha effetto stimolatorio; al contrario i recettori α , che agiscono tramite G_i , hanno effetto inibitorio. Specificamente, negli adipociti l'attivazione di recettori β adrenergici quali quelli per adrenalina, ACTH, glucagone e TSH induce la demolizione dei trigliceridi utilizzando vie metaboliche la cui attivazione è iniziata dalle G_s . Al contrario, l'occupazione dei recettori α adrenergici inibisce la demolizione dei trigliceridi tramite l'attivazione delle G_i .

4. Aspetti funzionali

4.1. Recettori a sette segmenti transmembrana

4.1.1. Attivazione. In condizioni di base, la conformazione del sito di legame per i nucleotidi guaninici è tale per cui l'affinità per il GDP è maggiore di quella per il GTP: il sito è quindi prevalentemente occupato dal GDP e la subunità α si trova in una conformazione nella quale i legami con la subunità β garantiscono la stabilità del trimero. Nella loro forma trimerica, le proteine G possono, o meno, essere accoppiate ad una molecola di recettore; nel caso dei recettori a sette segmenti, questo legame aumenta l'affinità del recettore per il suo ligando (vi è, come si dice, cooperatività tra i due legami). Viceversa, in altri casi può essere l'affinità recettore - proteina G ad essere aumentata dalla presenza di ligando (anche in questo caso, i due legami sono cooperativi). In ogni caso, quando il suo sito recettoriale è occupato dal ligando, il recettore passa nello stato conformazionale attivato (vedi "Note sui recettori, § 2.1."). In questa conformazione, le interazioni con la proteina G sono diverse da quelle che esistono quando il recettore è nel suo stato inattivo, inducendo un cambiamento conformazionale della proteina G, specificamente del sito per i nucleotidi guaninici. Nella conformazione così assunta, l'affinità di questo sito è maggiore per il GTP che per il GDP, aumentando le probabilità che sia occupato dal GTP. Come accennato, la presenza del GTP anziché GDP comporta per la proteina la possibilità di stabilire interazioni polari con il terzo atomo di fosforo del nucleotide, la presenza delle quali induce cambiamenti conformazionali che sono soprattutto evidenti nelle tre regioni "switch". In questa conformazione quasi tutti i legami formati dalla superficie di interazione principale (§ 2.1.4.) vengono scissi, e la subunità α tende a staccarsi dalla β . Dato che questi processi non modificano le interazioni tra le subunità β e γ , la proteina tende a dissociarsi in α e nel complesso $\beta + \gamma$. Entrambe le porzioni della molecola originale (o una sola di esse) possono quindi interagire con i rispettivi effettori, enzimi ma anche canali ionici, regolandone l'attività. Nel caso delle subunità α , le interazioni con gli effettori sono sempre (almeno per quanto è noto) localizzate nella fenditura idrofoba formata tra le eliche 2 e 3 del dominio α elicoidale. Nel caso del complesso $\beta + \gamma$, i siti di interazione con gli effettori corrispondono alle superfici di interazione con le subunità α , soprattutto a quella che interagisce con la regione switch II, che vengono smascherati dalla separazione dalle α . Va ancora tenuto presente che non in tutti i casi entrambe le componenti (α e $\beta + \gamma$) hanno rilevanza funzionale: ad esempio, nelle G_i sono attive sia le subunità α che $\beta + \gamma$, mentre nelle G_s sono attive solo le α .

4.1.2. Disattivazione. I meccanismi di disattivazione devono essere differenti a seconda dei differenti meccanismi di attivazione. Specificamente, dato che l'attivazione degli enzimi intermedi che catalizzano la sintesi di secondi messaggeri avviene in più stadi, è necessario che tutte le specie che intervengono in questi stadi vengano inattivate separatamente.

4.1.2.1. Recettori: i recettori rimangono nello stato conformazionale attivato fin quando il loro sito recettoriale è occupato dal relativo ligando. Dato che le interazioni ligando-recettore sono tipicamente reversibili, le probabilità che il sito recettoriale sia occupato si riducono quando si riduce la concentrazione extracellulare del ligando; in queste condizioni, il recettore tende a tornare nello stato conformazionale di base in cui le probabilità di attivare le proteine G sono basse. Specificamente, data l'elevata velocità delle cinetiche del legame ligando-recettore, la velocità di disattivazione dei recettori è controllata dalle (molto più lente) cinetiche di diminuzione della concentrazione extracellulare dei ligandi. Queste, a loro volta, dipendono principalmente dall'esistenza e — se questi esistono — dall'efficienza di meccanismi di degradazione o ricaptazione (vedi § 7 delle "Note sulla trasmissione delle informazioni").

4.1.2.2. Proteine G: queste decadono nel loro stato fondamentale trimerico solo quando le subunità α — che hanno attività GTPasica — catalizzano l'idrolisi a GDP del GTP legato. La presenza del GDP nel sito di legame comporta un cambiamento conformazionale nelle subunità α , opposto a quello descritto al paragrafo 2.1.4., soprattutto avvertibile nei tre siti "switch", che riporta queste subunità nella conformazione nella quale può interagire con la subunità β (vedi § 2.1.4.). In queste condizioni le subunità α e il complesso $\beta + \gamma$ tendono a riassociarsi, permettendo il ricostituirsi del trimero inattivo. L'idrolisi del GTP avviene spontaneamente, ossia è termodinamicamente favorevole. Tuttavia, la sua cinetica è insolitamente lenta,

spesso nell'ordine di centinaia di millisecondi, a causa di un'energia di attivazione insolitamente elevata (quindi, la probabilità che possa essere assunta dall'ambiente la quantità di energia necessaria a superare la barriera energetica relativa allo stato attivato è bassa). L'eccezionalmente lunga durata dello stato attivato delle proteine G costituisce il fattore quantitativamente più rilevante nell'amplificazione dei segnali intracellulari, come descritto oltre.

4.1.2.3. Effettori: in generale, questi ritornano al loro stato non attivo — ossia la loro conformazione decade a quella fondamentale — perdendo energia tramite i normali processi di scambio con l'ambiente. Questi processi avvengono con cinetiche normali per reazioni coinvolgenti macromolecole (normalmente da decine a centinaia di microsecondi). Tuttavia, nei casi — funzionalmente rilevanti — in cui le reazioni di attivazione non sono reversibili, oppure quando la durata degli effetti intracellulari deve essere particolarmente breve, l'azione degli effettori (nel caso in esame, enzimi intermedi) è contrastata da altri enzimi che catalizzano la reazione inversa. Ad esempio, l'effetto della chinasi A attivata dal cAMP è contrastato da fosfoproteina fosfatasi, che defosforilano i residui di treonina e serina degli effettori fosforilati dalla chinasi A.

4.1.3. Amplificazione del segnale. La serie di reazioni che portano all'attivazione degli effettori comporta un'amplificazione dei segnali extracellulari che può anche essere molto rilevante. In primo luogo, un recettore attivato può interagire con più molecole di proteina G: infatti, una volta separatisi nelle sue due componenti, la proteina G perde contatto con il recettore, il quale resta libero di attivarne altre. Il numero di queste molecole attivabili da un singolo recettore, che è funzione del tempo in cui il recettore si mantiene nello stato attivato, è in genere nell'ordine della decina. Inoltre, come già riportato (§ 4.1.2.2.), la vita dello stato attivato delle proteine G è eccezionalmente lunga. Ciò comporta che, prima di ritornare nel suo stato inattivo, ogni molecola di proteina G sia in grado di attivare molte molecole effettrici, ciò che rappresenta il fattore di amplificazione più rilevante. In fine, gli effettori dotati di attività enzimatica, prima di decadere nello stato inattivo catalizzano la conversione di un numero di molecole di substrato variabile da enzima ad enzima. Il risultato finale di questa catena di reazioni è quello di fornire un'amplificazione del segnale esterno che può anche essere molto notevole e che è soprattutto funzione della sua lunghezza. Nei casi più favorevoli si calcola che una singola molecola informazionale possa attivare un numero di singoli processi intracellulari compreso tra 1000 e 10.000. Nel caso meno favorevole (canali ionici modulati direttamente dalle proteine G, vedi oltre) il rapporto tra segnale esterno e funzioni attivate dipende soprattutto dal numero di proteine G che possono essere attivate dal recettore.

4.2. Modulazione di canali ionici

Come accennato, lo stato di pervietà di alcuni canali ionici può essere modulato dalle proteine G. Questi fenomeni si collocano nel quadro generale della modulazione funzionale di canali, il cui esempio più tipico è fornito dalle reazioni di fosforilazione. Naturalmente, questi fenomeni hanno effetto su di una scala di tempi (da minuti in su) molti ordini di grandezza maggiore rispetto a quella dei meccanismi intrinseci ai canali stessi (microsecondi). Va anche osservato che la nostra comprensione degli effettivi ruoli di questo tipo di regolazione nel funzionamento dell'organismo è ancora solo parziale (vedi "Note sui meccanismi di passaggio transmembrana", § 7.).

La modulazione da parte delle proteine G può essere indiretta oppure diretta. Il primo caso, che non richiede ulteriori dettagli, costituisce un normale fenomeno regolativo di effettori cellulari in cui le proteine G agiscono da tramite tra recettori a sette segmenti ed effettori intermedi, nel caso specifico proteina chinasi che catalizzano reazioni di fosforilazione regolativa. Nel secondo caso, i complessi $\beta + \gamma$ delle proteine G (il ruolo delle α non è chiaro) agiscono invece legandosi direttamente a canali ionici. Effetti di questo tipo sono noti soprattutto nel tessuto cardiaco ed in quello nervoso, nel caso di canali potassici "inward rectifying" e di alcuni canali calcici. In ogni caso, questi fenomeni hanno valenza solo modulatoria e lo stato di pervietà del canale fisico è sempre determinato dal potenziale cellulare (non sono noti casi di regolazione di canali a controllo di ligando da parte di proteine G): l'esistenza di queste interazioni comporta, quindi, che le probabilità che il canale fisico si trovi aperto o chiuso possano essere modificate da afferenze extracellulari di tipo metabolico.

I canali potassici noti come "inward rectifying" (canali non ohmici, ossia canali in cui la corrente in un senso è molto maggiore della corrente nel senso opposto) sono modulati positivamente dal legame dei complessi $\beta + \gamma$. In questo caso, l'attivazione di recettori muscarinici (quindi, metabotropi) induce la separazione della proteina G associata nei consueti due frammenti e una copia del complesso $\beta + \gamma$ (sembra vi siano anche interazioni con la subunità α , ma ben poco è attualmente noto in proposito) si lega ad ognuna delle quattro

subunità α del canale. Il cambiamento conformazionale così indotto ha effetto positivo sulle probabilità di apertura del canale fisico. Un effetto regolativo opposto è noto nel caso dei canali calcici attivati ad alto voltaggio, alcuni tipi dei quali sono inibiti dall'interazione con il complesso $\beta + \gamma$. Le proteine G coinvolte sono accoppiate a recettori per (tra gli altri) peptidi oppioidi, dopamina, noradrenalina, 5-idrossitriptamina e GABA. Quindi, si tratta anche in questo caso di effetti dipendenti dall'attivazione di recettori metabotropi. In fine, a livello molecolare, i dettagli funzionali di questi fenomeni sono attualmente conosciuti solo in parte. Facendo riferimento ai canali calcici, si suppone che il legame con il complesso $\beta + \gamma$ stabilizzi una conformazione nella quale è ristretta la libertà di movimento del segmento S4 della subunità che forma il canale fisico, il movimento del quale dà inizio al cambiamento conformazionale dell'intera subunità che si traduce nell'apertura del canale fisico (vedi "Note sui meccanismi di passaggio transmembrana", § 3.1.2.1.1).

4.3. Interazioni con recettori ad attività enzimatica

Tipicamente, i recettori con attività enzimatica danno inizio a cascate di segnali intracellulari inducendo una modifica covalente di effettori intermedi (vedi: "Note sui recettori, § 2.2."). Tuttavia, in casi specifici, questi recettori possono anche (non esclusivamente) agire per mezzo di proteine G. Ciò avviene, ad esempio, nel caso dei recettori per l'insulina e per fattori di crescita collegati (che attivano l'adenilciclastasi con meccanismi brevemente descritti oltre), nelle vie aeree per i recettori per il PDGF (fattore di crescita piastrinico) e per altri recettori le cui interazioni con le proteine G sono meno note, tra cui vale la pena di citare quelli delle cellule T. Non ostante che questi effetti siano conosciuti da tempo, i relativi meccanismi sono noti solo in modo frammentario: quindi, verranno riportati solo due esempi relativi al recettore per l'EGF. Negli epatociti, la presenza di EGF (fattore di crescita epidermico) induce un aumento dell'attività della fosfolipasi C, e quindi la produzione di IP_3 e diacilglicerolo, tramite l'attivazione di proteine G. In questo caso, il frammento attivo è costituito dal complesso $\beta + \gamma$ di G_i o di G_o . Nel tessuto cardiaco (ma effetti simili sono noti anche in altri tessuti), l'EGF aumenta la forza ed il ritmo di contrazione incrementando le concentrazioni di cAMP. In questo caso (come di norma), l'adenilciclastasi è attivata dal legame con la subunità α di una G_s . Almeno nel caso delle G_s , il meccanismo d'azione di questi effetti è noto: infatti, nel dominio intracellulare del recettore per l'EGF esiste una regione di 13 amminoacidi, omologa ad una corrispondente regione dei recettori β_2 adrenergici, che — nello stato conformazionale successivo alla dimerizzazione del recettore — è in grado di legarsi alla subunità α delle G_s , inducendo lo scambio GDP - GTP e, quindi, la scissione della proteina G.

Da un punto di vista funzionale, si può ipotizzare che la possibilità di modulare i segnali intracellulari con diversi meccanismi possa permettere alla cellula di modulare finemente l'azione dei recettori con attività enzimatica. È però opportuno osservare nuovamente che il ruolo funzionale di molti fattori di regolazione intracellulare è tuttora in larga misura al di là della nostra possibilità di essere correttamente razionalizzato.

4.4. Meccanismi di regolazione: le proteine RGS e AGS

Il ruolo delle proteine G di mediatori dei segnali trasdotti dai recettori di membrana potrebbero fare supporre l'esistenza di un rapporto univoco tra attivazione del recettore e modifica delle funzioni intracellulari interessate; in altri termini, che le proteine G trasmettano fedelmente (linearmente) i segnali esterni agli effettori intracellulari. Al contrario, l'attività delle proteine G può essere modificata da proteine intracellulari che agiscono come regolatori, modificandone parametri funzionali (idrolisi del GTP e riassociazione dei complessi α e $\beta + \gamma$) così introducendo fattori di non linearità nella risposta. Tuttavia, l'effettivo ruolo fisiologico di queste proteine rimane ad oggi abbastanza incerto.

La classe meglio conosciuta di queste proteine è quella delle RGS che agiscono da regolatori negativi aumentando la velocità dell'idrolisi del GTP catalizzata dalla subunità α . Le RGS costituiscono una classe piuttosto omogenea di piccole proteine (circa 25 kDaltons) che si legano alle subunità α , inducendo un cambiamento conformazionale particolarmente evidente nelle regioni di "switch" cui corrisponde una riduzione dell'energia di attivazione della reazione di idrolisi del GTP (vedi § 4.3.2.). Dato che la vita dello stato attivato delle proteine G è, appunto, funzione dell'elevata energia di attivazione della reazione di idrolisi del GTP, la riduzione dell'energia di attivazione indotta dalle RGS ha l'effetto di ridurre la durata dello stato attivato della proteina G, e, quindi, l'amplificazione del segnale.

Meno conosciute sono le proteine AGS che hanno, invece, un effetto positivo sull'attività delle proteine G. Al contrario delle RGS, che costituiscono una classe omogenea, queste proteine sono eterogenee e vengono

riunite solo per il loro effetto positivo sull'attività delle proteine G. L'effetto delle AGS si esplica o velocizzando le cinetiche di scambio GDP - GTP, oppure modificando in vario modo le interazioni tra le subunità α e β , in modo da ridurre la loro capacità di riformare il trimero inattivo.

5. Interazioni con proteine batteriche

Data la loro localizzazione intracellulare, le proteine G sono sede di interazioni relativamente limitate con agenti esterni, sia patogeni che farmacologicamente attivi. Queste proteine sono tuttavia bersaglio di specifiche tossine batteriche, segnatamente di *Vibrio cholerae* (le G_s) e di *Burditella pertussis* (le G_i e G_o), nonché di altre specie batteriche come le salmonelle. Il funzionamento dell'endotossina di *V. cholerae* è brevemente descritto come modello di un meccanismo di tossicità particolarmente raffinato.

L'endotossina colerica è una proteina composta da otto subunità, sei delle quali eguali fra loro. La subunità attiva è costituita da una catena polipeptidica relativamente breve e fortemente idrofoba, in grado di legarsi alla subunità α delle proteine G e di catalizzarvi una reazione di d-ribosilazione. Dato che i batteri — e quindi anche la tossina — sono localizzati nel lume intestinale, perché la tossina possa raggiungere le proteine G sono necessari specifici meccanismi. Le sei subunità uguali della tossina colerica, anfipatiche e nettamente anisodiametriche, sono disposte attorno alle altre due in una struttura che ricorda gli spicchi di un'arancia; inoltre, su ciascuna di queste sei subunità esiste un sito in grado di riconoscere e legare specifici lipidi di membrana (i monosialogangliosidi GM_1). Infine, la struttura quaternaria della molecola è tale che le sei subunità uguali formano un involucro circa globulare con una superficie esterna idrofila, che racchiude al suo interno le due rimanenti subunità, idrofobe e unite fra loro da un legame S-S. Quando la proteina viene a contatto con la membrana delle cellule della mucosa intestinale, le subunità dell'involucro si legano ai gangliosidi alla membrana cellulare, ovviamente orientandosi con i siti di legame per il ganglioside a contatto con la membrana. Dato che le superfici interne idrofobe delle sei subunità tendono ad avere il massimo contatto possibile con il lipide, la struttura della proteina tende ad aprirsi sulla membrana cellulare, portando a contatto con questa le due subunità idrofobe che, proprio perché idrofobe, possono attraversarla esponendosi alla sua faccia intracellulare. Nelle condizioni relativamente riducenti dell'interno della cellula, il legame S-S viene scisso e la subunità attiva è così libera di interagire con le G_α , vincolate alla faccia intracellulare della membrana. La reazione di d-ribosilazione catalizzata da questa subunità stabilizza la conformazione della subunità α della proteina G, impedendo la catalisi della reazione di defosforilazione del GTP a GDP. In queste condizioni, i complessi α e $\beta + \gamma$ della proteina G non possono riassociarsi, e la proteina G rimane indefinitamente nel suo stato attivato. La conseguente sostenuta attivazione dell'adenilciclasa delle cellule della mucosa intestinale (dove si localizza il *V. cholerae*) è causa dell'enorme (nell'ordine delle decine di litri nelle 24 ore) efflusso di liquido nel lume intestinale che costituisce il dato patologico fondamentale dell'infezione colerica.

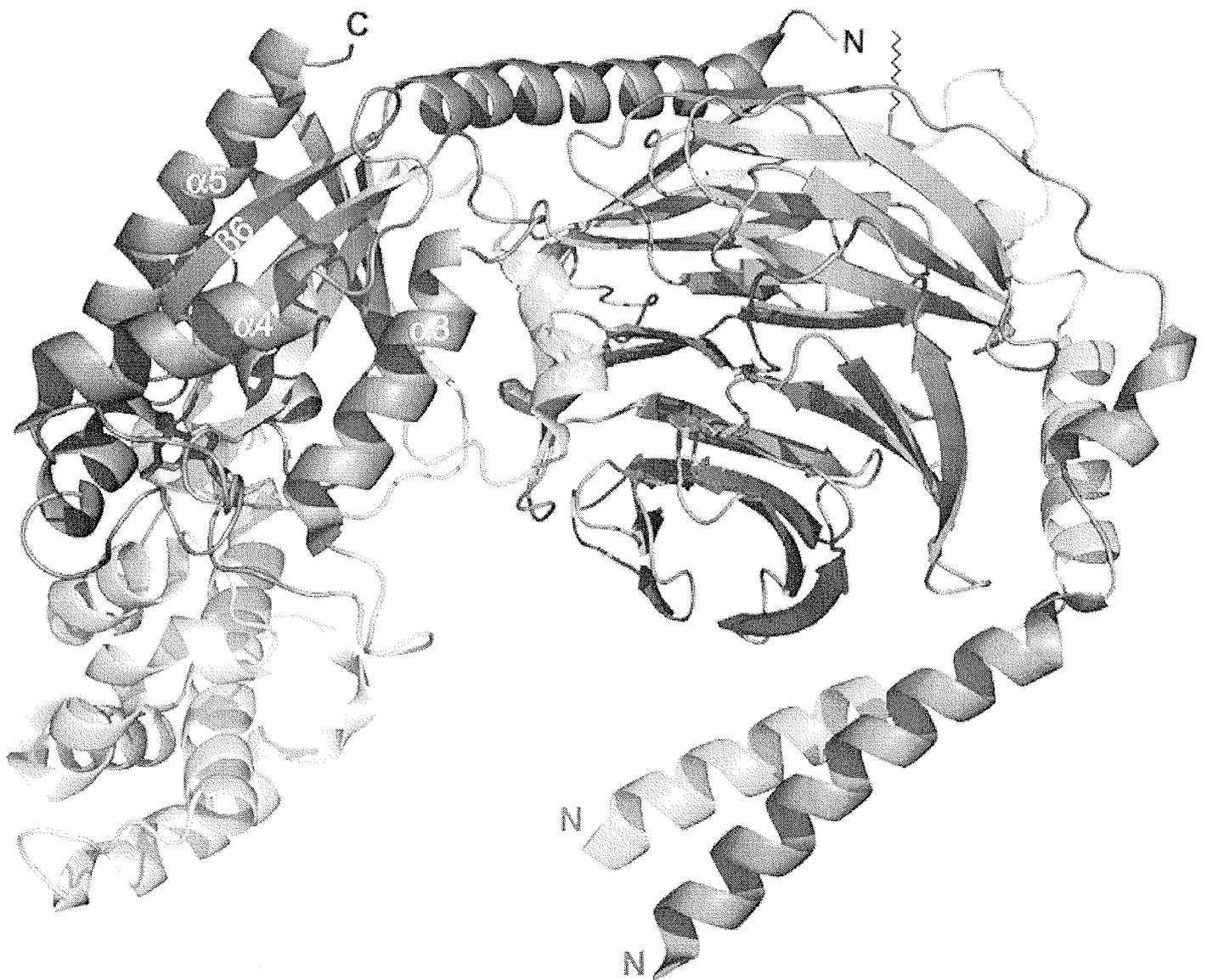


Figura 1a. Modello a nastri di una proteina G (una G₁₁) in una vista parallela al piano della membrana, supposta nella parte superiore della in Figura. La subunità α è rappresentata a sinistra, con il dominio GTPasico (più scuro) in alto e il dominio α elicoidale (più chiaro) in basso. Le subunità β e γ sono rappresentate nella parte destra della Figura, la γ in grigio più chiaro, con la catena alifatica C-terminale che la ancora alla membrana in alto (struttura seghettata); non è invece rappresentata la catena alifatica forse associata al C-terminale della subunità α . I terminali delle tre catene sono indicati con C ed N maiuscole, una molecola di GDP legata è rappresentata in corrispondenza della cerniera dei due domini della subunità α (vedi Figura 2).



Figura 1b. Modello a nastri di una proteina G in una vista perpendicolare al piano della membrana, ossia ruotata di 90° rispetto a Figura 1a. La subunità α è rappresentata nella parte superiore della figura, la subunità β è costituita dai piani β a disposizione circa anulare al centro, la subunità γ è in basso in grigio più scuro.

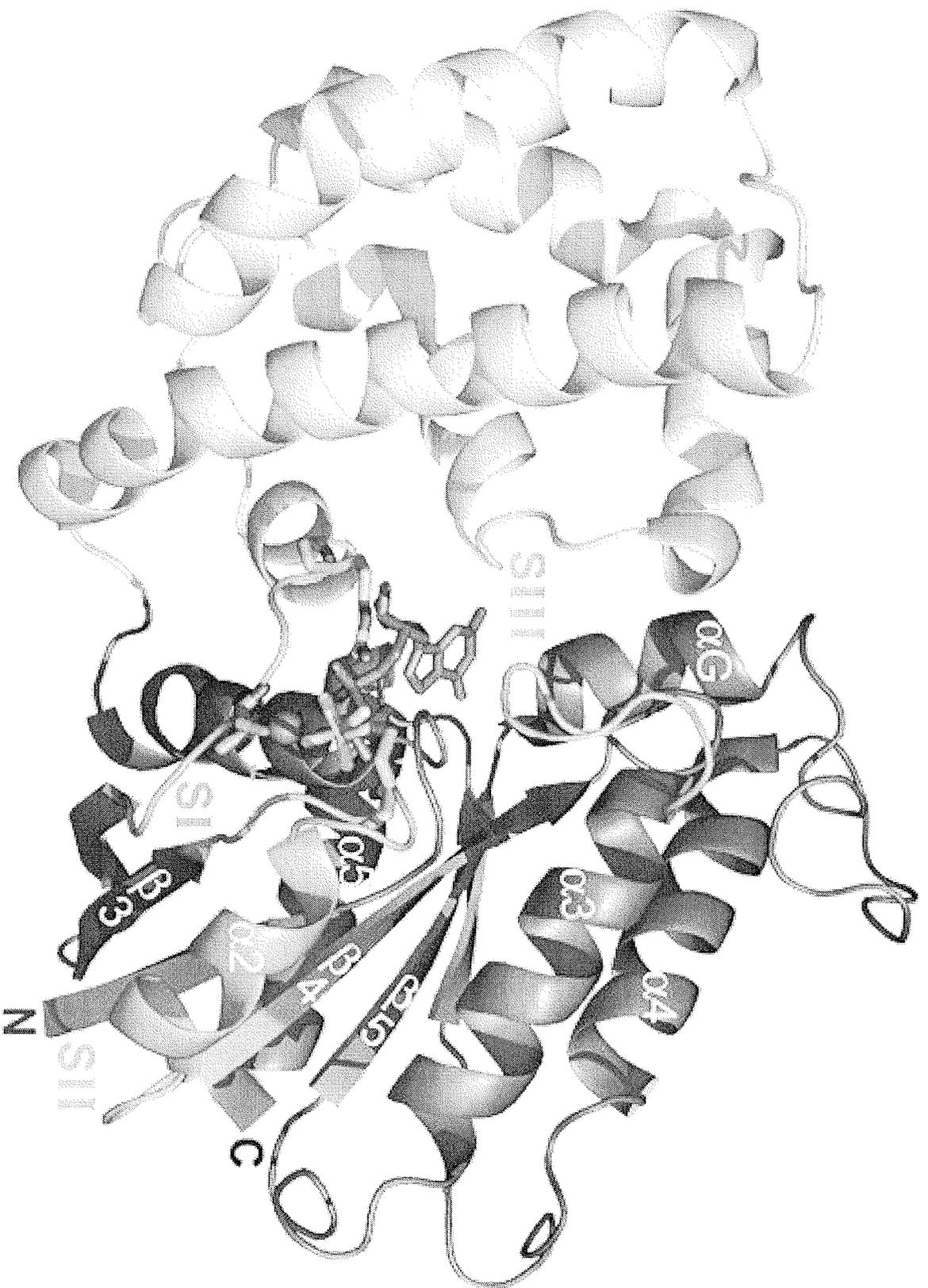


Figura 2. Modello a nastri della subunità α della proteina G di Figura 1a. Il dominio α elicoidale è rappresentato sulla sinistra, quello GTPasico (tipo Ras) sulla destra. Nella fenditura tra i due domini è rappresentata una molecola di GDP legata. I due terminali sono identificati con N e C maiuscole, nel dominio GTPasico sono identificate le tre regioni switch (S1, S11 e S111) e alcune delle α eliche e strisce β .



Figura 3. Modello a nastri della subunità β di una proteina G in una vista simile a quella di Figura 1b. Il dominio N-terminale della subunità (a sinistra in figura) comprende due α eliche, di cui quella terminale, anfipatica, forma una "coiled coil" con la corrispondente α elica della subunità γ (vedi Figura 1). Il dominio C-terminale (a destra in figura) è costituito da 7 piani β , ognuno formato da 4 foglietti antiparalleli disposti ad imbuto intorno ad una cavità centrale idrofila.

Note sui messaggeri intracellulari (7)

(revisione 2009, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Dati introduttivi

In termini molto generali, tra l'occupazione del sito recettoriale di recettori metabotropi e le conseguenti modifiche dei parametri cellulari interessati sono normalmente interposti molteplici fattori intracellulari che formano reti di trasmissione che sono spesso assai complesse per la loro lunghezza e per la presenza di interazioni tra sistemi multipli. La maggior parte delle proteine che fanno parte di queste reti hanno due principali modi di attivazione e disattivazione: fosforilazione e defosforilazione e scambio del GTP con GDP e vice versa. Dei due meccanismi citati, la fosforilazione di effettori intermedi è tipica dei recettori con attività enzimatica, mentre lo scambio di nucleotidi guaninici caratterizza le GTPasi monomeriche (le Ras) e trimeriche (le proteine G). In entrambi i casi, possono far parte della catena di trasmissione del segnale messaggeri intracellulari, i secondi messaggeri che, a causa del loro basso peso molecolare, sono in grado di diffondere nella cellula molto più velocemente di quanto non possano fare le proteine. I secondi messaggeri costituiscono un intermedio (quasi) obbligato per i recettori a sette segmenti transmembrana, mentre costituiscono solo una tra le possibili modalità di trasmissione del segnale mediato dai recettori con attività enzimatica. In ogni caso, l'aumento delle concentrazioni intracellulari dei secondi messaggeri avviene ad opera di enzimi (gli enzimi intermedi) che ne catalizzano la sintesi a partire da precursori inattivi. In sostanza, il segnale chimico portato dalle molecole extracellulari e convertito in un cambiamento conformazionale del recettore, viene riconvertito in un ulteriore segnale chimico riconoscibile dai meccanismi intracellulari che debbono essere modificati.

2. Considerazioni generali

2.1. Schema comune

La successione degli eventi connessi con l'attivazione di un effettore intracellulare ad opera di secondi messaggeri può essere schematizzata come segue: 1. il segnale extracellulare giunge ad un recettore, inducendovi un cambiamento conformazionale. 2. Nella sua conformazione attiva, il recettore interagisce, attivandolo, con un enzima in grado di catalizzare la sintesi del secondo messaggero. Nel caso, funzionalmente più rilevante, dei recettori a sette segmenti transmembrana, l'attivazione dell'enzima intermedia avviene tramite una proteina G, mentre avviene direttamente per i recettori con attività guanilato ciclasica e per alcuni recettori con attività tirosina chinasi (vedi: "Note sui recettori", rispettivamente § 2.2.4. e § 2.2.1.). 3. L'interazione con i frammenti della proteina G o, rispettivamente, con il recettore attivato, modifica la conformazione dell'enzima intermedio, portandolo nella conformazione in cui il sito catalitico è attivo. 4. L'enzima intermedio catalizza la trasformazione di un precursore inattivo nel secondo messaggero; 5. Il secondo messaggero diffonde nel citoplasma fino a legarsi ad un primo effettore dando inizio ad una cascata di reazioni che termina quando (6) l'ultimo effettore intermedio interagisce sull'effettore finale. Va anche osservato che gli ioni Ca^{2+} fanno spesso parte della catena di reazioni. Infatti, questi ioni possono interagire con specifiche proteine Ca^{2+} -leganti negli ultimi stadi della catena di reazioni, dando così inizio agli eventi intracellulari finali.

Come riportato oltre, questo schema può coincidere con i casi specifici in modo più o meno completo: nella fattispecie, in casi funzionalmente rilevanti, gli effettori finali possono essere attivati direttamente o dalle proteine G o dai secondi messaggeri, come ad esempio per i canali ionici controllati dai nucleotidi ciclici. Inoltre, il Ca^{2+} intracellulare può essere mobilitato dalle sue riserve non mitocondriali tramite specifici canali a controllo di ligando, i meglio noti dei quali sono recettori per l' IP_3 (un secondo messaggero) e i così detti recettori per la rianodina. In fine, alcuni recettori — segnatamente recettori con attività enzimatica — attivano direttamente l'enzima intermedio, ossia senza l'intervento di una proteina G.

2.2. Valenza funzionale

L'attivazione dei secondi messaggeri comporta una serie di eventi metabolici che necessariamente inducono un ritardo più o meno rilevante tra l'interazione del ligando con il sito recettoriale e l'attivazione dell'effettore finale. Al tempo stesso, proprio l'esistenza di reazioni intermedie può comportare un'amplificazione — a volte

molto cospicua — del segnale originale. Ciò significa che, a seguito dell'occupazione di un singolo sito recettoriale extracellulare, può essere attivato un gran numero di reazioni intracellulari, anche nell'ordine delle migliaia. Pertanto, i secondi messaggeri trasmettono normalmente segnali per i quali un ritardo nella trasmissione non è un fattore limitante, ma l'amplificazione costituisce un effetto positivo. Per fare qualche esempio, i recettori nicotinici dell'acetilcolina — ad azione rapida — sono di tipo 1 (recettori-canale), mentre quelli muscarinici, che mediano effetti metabolici a più lungo termine, agiscono tramite secondi messaggeri. Al contrario, i recettori adrenergici, le cui azioni sono sempre di tipo metabolico (e.g. degradazione del glicogeno, degradazione dei lipidi, secrezione e riassorbimento di liquidi ...) agiscono solo tramite secondi messaggeri. Va però notato come la trasduzione del segnale avvenga tramite secondi messaggeri anche nel caso dei segnali visivi e di quelli olfattori. Si può supporre che, in questi casi, il vantaggio funzionale derivante dall'amplificazione del segnale sia maggiore dello svantaggio causato dal ritardo nella trasmissione. Questo è relativamente ridotto perché la catena metabolica è particolarmente breve. Tuttavia, nel caso dei fotorecettori, la durata del tempo di trasduzione del segnale si evidenzia in mancanza di nitidezza nella percezione degli oggetti in movimento veloce e nella persistenza delle immagini retiniche.

Paragonato al grandissimo numero di molecole informative extracellulari conosciute, il numero di secondi messaggeri noti è molto limitato: infatti, all'esterno della cellula i segnali sono veicolati da varie centinaia di differenti molecole (e il numero di quelle note continua ad aumentare); al contrario, la trasmissione dell'informazione intracellulare è affidata ad un numero molto limitato (nell'ordine delle unità) di molecole. In più, le vie dei secondi messaggeri sono estesamente incrociate, di modo che l'attivazione di una comporta in genere anche l'attivazione di altre. Tale organizzazione funzionale è sorprendente solo in parte. Infatti, le cellule degli organismi animali tendono ad essere molto specializzate; inoltre, le funzioni cellulari attivabili dall'esterno dipendono sostanzialmente dalla specificità dei recettori presenti nella membrana. In questi termini, i segnali esterni attivano, o inibiscono, le funzioni proprie della specifica cellula, anziché selezionare una funzione entro un gran numero di funzioni potenzialmente attivabili. Dato che ogni singola classe cellulare è dotata di un numero limitato di differenti tipi di recettori, la selezione tra i segnali che giungono alla cellula viene effettuata da questi. Ciò vuol dire che vengono recepiti da ogni cellula solo quei segnali che sono portati da molecole informative per i quali la cellula stessa esprime recettori. Quindi, le funzioni che vengono attivate sono funzione sia del tipo di recettori presenti che del tipo di risposta che la specifica cellula è programmata a fornire. Ad esempio, l'acetilcolina stimola la contrazione del muscolo scheletrico legandosi ai recettori nicotinici della placca motrice, ma riduce le caratteristiche di contrazione del cuore legandosi ai recettori muscarinici delle cellule muscolari cardiache. Com'è noto, i primi sono canali cationici con azione depolarizzante; i secondi sono recettori di tipo 2 che attivano (tramite proteine G) i canali potassici di tipo M, la cui apertura determina iperpolarizzazione. Sempre l'acetilcolina — legandosi a recettori muscarinici — stimola la secrezione di cellule secernenti. La differenza nella risposta cellulare è quindi funzione del tipo di risposta per la quale la cellula è programmata: le cellule muscolari danno una risposta contrattile, positiva o negativa, le cellule secernenti una risposta secretoria; naturalmente, differenti classi di cellule secernenti rispondono con risposte secretorie differenti. Pertanto, i segnali extracellulari che giungono ai recettori vengono in genere integrati in una risposta cellulare normalmente limitata. Nei termini qui sintetizzati, al limite due soli secondi messaggeri, uno con ruolo eccitatorio ed uno inibitorio, potrebbero essere sufficienti a coprire le necessità della cellula. Com'è ovvio, la realtà è assai più complessa; tuttavia, la rappresentazione fornita da questo schema concettuale sembra in ragionevole accordo con la maggior parte dei dati noti. Va ancora notato che la mancata identificazione del secondo messaggero relativo ad alcuni recettori fa supporre che possano esistere vie di trasmissione intracellulare ancora sconosciute. Nulla tuttavia induce oggi a pensare che si possa assistere in futuro ad una cospicua proliferazione del numero dei secondi messaggeri, così come è avvenuto — ed ancora in parte avviene — nel caso delle molecole informative extracellulari.

Quanto appena riportato, e quanto descritto oltre va interpretato come un modello particolarmente riduttivo di quelli che sono, almeno per quanto è attualmente noto, gli eventi intracellulari. Infatti, lo studio delle vie di segnalazione intracellulare ha tipicamente cercato di mettere in evidenza cascate di interazioni che possano rendere conto di una trasmissione causale dell'informazione tra le strutture di membrana e gli eventi intracellulari indotti da queste. Tuttavia, i dati esistenti non supportano questo ottimistico panorama, ma tendono a fornire l'immagine di una così elevata interconnessione tra differenti "moduli" informativi e di una rete di segnalazione così estesa ed intricata da risultare spesso, come è stato scritto, "troppo complessa perché la mente umana la possa comprendere ed analizzare". Forse questa è una valutazione eccessivamente riduttiva delle capacità della mente umana: tuttavia, la complessità delle reti di segnalazione intracellulare è in effetti tale da renderne la comprensione non solo assai difficile, ma anche in qualche modo sterile, dato che è troppo spesso impossibile razionalizzare in qual modo specifiche interazioni vadano a modificare determinati effetti. Pertanto, i dati e gli esempi riportati in seguito sulla trasmissione

dell'informazione intracellulare non hanno nessuna pretesa di completezza, ma fanno riferimento a solo una parte dei dati noti, che presumibilmente rappresentano solo una piccolissima parte degli eventi intracellulari.

2.3. Classi

Sono oggi conosciute varie vie di trasmissione intracellulare che utilizzano differenti secondi messaggeri. Questi sono: 1. gli inositolo fosfati; questa via, che utilizza come messaggero finale gli ioni Ca^{2+} , agisce tramite i due messaggeri intermedi inositolo(1,4,5)-trifosfato (IP_3) e inositolo (1,3,4,5)-tetrafosfato (IP_4), polari, nonché il diacilglicerolo (DAG), apolare. 2. L'AMP ciclico (cAMP), anche esso spesso coinvolto nella liberazione di ioni Ca^{2+} ; 3. Il guanosin monofosfato ciclico (cGMP) che ha funzioni di secondo messaggero, sia autonome che in relazione alla liberazione di ioni Ca^{2+} . Hanno funzioni di secondi messaggeri anche (4) l'acido arachidonico e alcuni suoi metaboliti, prodotti da fosfolipasi attivate da proteine G che utilizzano come substrato vari fosfolipidi e (5) l'ossido nitrico, o anidride nitrica, NO (e probabilmente anche l'ossido di carbonio, CO) che agiscono come secondi messaggeri e come trasmettitori, soprattutto nell'ambito del sistema nervoso centrale. Infine (6) gli ioni Ca^{2+} giocano un ruolo fondamentale nella trasmissione intracellulare delle informazioni, sia in modo autonomo che in qualità di messaggeri finali di eventi intracellulari ("secondi secondi messaggeri"), come descritto sotto.

3. Ioni Ca^{2+}

Le concentrazioni intracellulari degli ioni Ca^{2+} (o di altri ioni) non possono, ovviamente, essere modificate per sintesi e demolizione, com'è il caso degli altri secondi messaggeri; al contrario, vengono attivati diversi meccanismi di trasporto verso e dal citoplasma. In generale, le concentrazioni calciche citoplasmatiche vengono tenute molto più basse (a circa 1×10^{-7} M) di quelle extracellulari dall'azione di numerose proteine di trasporto che operano in direzione extracitoplasmatica, mentre aumentano a seguito dell'apertura di canali che permettono il passaggio seguendo il ripido gradiente elettrochimico di questi ioni. Questi meccanismi trasportano gli ioni Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica, dentro e fuori la cellula, e attraverso le membrane interne da e verso organelli intracellulari (soprattutto reticolo sarcoplasmatico, calcisomi e mitocondri). A seguito dell'apertura dei canali calcici, le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} possono aumentare anche di 100 volte, fornendo il segnale finale che induce funzioni cellulari come la contrazione muscolare, la secrezione, la liberazione di neurotrasmettitori. Infine, moltissimi degli effetti intracellulari di questi ioni sono mediati dalla fosforilazione di proteine, catalizzata da una famiglia di proteina chinasi calcio-calmodulina dipendenti (chinasi CaM), attive solo in presenza di opportune concentrazioni calciche. Infatti, quando le concentrazioni calciche citoplasmatiche aumentano, gli ioni Ca^{2+} si possono legare alla calmodulina (vedi oltre); a siti calcici occupati, questa cambia conformazione e diventa in grado di legarsi alla chinasi M che, a sua volta, cambia conformazione assumendo la conformazione nella quale il sito catalitico è attivo.

Data l'importanza e l'ubiquità degli ioni Ca^{2+} i meccanismi di trasporto coinvolti sono moltissimi, ed una loro descrizione è del tutto al di fuori dei fini presenti. In termini molto generici, come già detto, gli aumenti delle concentrazioni citoplasmatiche di ioni Ca^{2+} sono determinati dall'apertura dei canali calcici della membrana cellulare e degli organelli di deposito calcico, mentre la riduzione della concentrazione calcica citoplasmatica avviene mediante meccanismi di trasporto attivo. Spesso il trasporto è operato inizialmente da trasportatori a bassa affinità ed alta capacità di trasporto; quando le concentrazioni si sono ridotte tanto che i trasportatori a bassa affinità non legano più una quantità significativa di ioni, entrano in gioco i trasportatori ad elevata affinità ma a bassa capacità di trasporto. In questo modo, le concentrazioni calciche citoplasmatiche possono essere mantenute ai bassi livelli necessari, mentre il recupero delle concentrazioni basali può avvenire con la rapidità richiesta dalle esigenze metaboliche.

3.1. Meccanismi d'azione

Gli ioni Ca^{2+} esercitano la loro azione legandosi a specifiche proteine endocellulari che presentano in genere domini calcio-leganti di struttura caratteristica, noti sotto il nome di "chele E-F", la più diffusa delle quali è la calmodulina. La calmodulina, che è largamente presente in tutte le cellule animali (costituisce, in media, circa l'1% della massa proteica totale), si trova sia libera che come subunità regolatrice di alcuni enzimi, ad esempio della chinasi A attivata dall'cAMP, o della fosforilasi-chinasi che attiva la glicogeno sintetasi nel muscolo scheletrico. Questa proteina (Figura 1) è formata da due domini calcio-leganti strutturalmente simili

ma dotati di differente affinità per gli ioni Ca^{2+} , ognuno dei quali può legare due ioni (4 in totale). Questi domini sono formati da due anse di 12 amminoacidi in cui le catene laterali cariche negativamente di residui di aspartico e glutammico legano uno ione Ca^{2+} ciascuna; le due anse sono separati da un'α elica idrofila che, molto verosimilmente, è coinvolta nelle interazioni con almeno alcune delle proteine effettrici calmodulina-dipendenti. L'occupazione dei siti Ca^{2+} -leganti induce nella molecola cambiamenti conformazionali, presumibilmente multipli, a seguito dei quali la calmodulina può interagire con gli effettori. Inoltre, dato che — come detto sopra — la concentrazione intracellulare basale degli ioni Ca^{2+} viene mantenuta a livelli molto bassi, le molecole di calmodulina presenti nel citoplasma dovrebbero essere in grado di assorbire parte delle variazioni delle concentrazioni di ioni Ca^{2+} conseguenti all'apertura dei canali calcici (sia della membrana plasmatica che intracellulari), contribuendo a mantenere costanti le concentrazioni citoplasmatiche di questi ioni. In effetti, eccetto casi specifici come il muscolo scheletrico, la massima parte degli effetti metabolici degli ioni Ca^{2+} è mediata da proteine chinasi calcio - calmodulina-dipendenti (chinasi CaM) che sono attivate dal legame della calmodulina, che si stabilisce solo quando i siti calcio-leganti della calmodulina sono occupati. Chinasi CaM a specificità ristretta sono, ad esempio, la chinasi delle catene leggere della miosina che regola la contrazione del muscolo liscio o la chinasi CaM II, un enzima a bassa specificità coinvolto nell'esocitosi delle vescicole sinaptiche.

3.2. Trasporto in direzione citoplasmatica

Come detto, il trasporto passivo di ioni Ca^{2+} verso il citoplasma avviene di regola tramite canali ionici. In proposito, va osservato che in quasi tutte le cellule esiste uno sbilanciamento di potenziale transmembrana con interno negativo, che facilita l'ingresso di ioni Ca^{2+} . Ad esempio nel muscolo scheletrico, ove gli organelli di deposito calcico hanno un ruolo particolarmente importante, la massima parte degli ioni Ca^{2+} necessari alla contrazione passano dal reticolo sarcoplasmatico al citoplasma tramite i così detti recettori per l' IP_3 e, soprattutto, per la rianodina (Vedi "Note sui canali ionici", § 2.3.1.). Invece, in tessuti eccitabili poveri di organelli di deposito calcico, gli ioni Ca^{2+} entrano nella cellula prevalentemente dal periplasma, tramite i canali a controllo di potenziale presenti nella membrana plasmatica. Lo stesso avviene nelle sinapsi, ove il rilascio del trasmettitore è controllata da afflussi di ioni Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica. In vece, nelle cellule di tessuti non eccitabili, questo ruolo è giocato dai canali a controllo di ligando oppure di potenziale, a seconda del tipo delle afferenze principali.

3.3. Trasporto in direzione extracitoplasmatica

Data l'esigenza di mantenere una molto bassa concentrazione basale citoplasmatica di ioni Ca^{2+} , e quindi di trasportare gli ioni contro gradiente, questa deve essere ripristinata dall'azione di proteine vettrici. È nota l'esistenza di meccanismi che trasportano il calcio dal citoplasma in direzione extracellulare, e di altri che lo trasportano verso gli organelli di deposito. In cellule in cui gli afflussi calcici sono massivi, esistono scambiatori $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ dotati di elevata capacità di trasporto ma a relativamente ridotta affinità e, quindi, in grado operare solo in presenza di concentrazioni calciche intracellulari relativamente elevate (circa un ordine di grandezza sopra le concentrazioni basali). In tutte le cellule esistono poi ATPasi Ca^{2+} -dipendenti che operano a relativamente bassa capacità di trasporto ma con alta affinità, ossia sono in grado di effettuare il trasporto in presenza di basse concentrazioni di ioni Ca^{2+} . Come accennato (§ 3), si suppone che — dove sono presenti entrambi — gli scambiatori $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ compensino massicci ingressi di ioni $-\text{Ca}^{2+}$, mentre le ATPasi operino una regolazione fine della concentrazione di questi ioni. In ogni caso, verosimilmente a causa della loro rilevanza funzionale, i meccanismi di trasporto degli ioni Ca^{2+} sono dotati di un elevato grado di ridondanza. Inoltre, in molti organi e tessuti esistono specifici trasportatori calcici, e specifiche isoforme di questi, cui si può attribuire la funzione di adeguare la regolazione del Ca^{2+} intracellulare alle esigenze dello specifico tessuto.

3.4. Trasporto verso gli organelli

Un'altra serie di trasportatori sposta ioni Ca^{2+} dal citoplasma agli organelli intracellulari con la doppia funzione di mantenere l'integrità dei depositi calcici e di ripristinare i bassi livelli citoplasmatici di questi ioni che si riscontrano in condizioni di riposo. Date le quantità di ioni Ca^{2+} necessarie alla contrazione muscolare, queste ATPasi sono particolarmente abbondanti nel muscolo striato, dove sono presenti varie isoforme, che differiscono tra loro per distribuzione tissutale, turnover ed affinità per il calcio. Anche i mitocondri rappresentano un importante deposito, in questo caso a lungo termine, di questi ioni. A causa

dell'elevata differenza di potenziale (circa -140 mV) esistente tra l'interno dei mitocondri ed il citoplasma, in questi organelli sono attivi meccanismi di trasporto specifici, che sfruttano la differenza di potenziale per effettuare un trasporto attivo indiretto dal citoplasma verso l'interno dei mitocondri, scambiando uno ione Ca^{2+} contro due elettroni. In più, il potenziale interno negativo riduce fortemente la mobilità degli ioni Ca^{2+} verso l'esterno dell'organello: probabilmente in ragione di ciò, e anche del fatto che il calcio nei mitocondri è in buona parte immobilizzato, il trasporto dai mitocondri al citoplasma non avviene tramite canali, ma per mezzo di ulteriore meccanismo di trasporto attivo indiretto, consistente in uno scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ elettricamente neutro che scambia uno ione Ca^{2+} contro due ioni Na^+ .

4. AMP ciclico

Il primo scoperto, ed ancor'oggi il meglio conosciuto dei secondi messaggeri, è l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), la cui sintesi a partire dall'ATP, è catalizzata da un enzima di membrana, l'adenil ciclasi (o adenilato ciclasi), che è attivato a seguito all'attivazione di una varietà di recettori i quali agiscono tipicamente tramite proteine G. Le vie che si servono di questo secondo messaggero sono spesso sotto il controllo di recettori distinti, eccitatori ed inibitori, presenti nella stessa cellula, che mediano eventi cellulari con significato funzionale opposto tramite differenti proteine G (rispettivamente G_s e G_i). Ad esempio, negli adipociti l'occupazione di recettori β adrenergici da parte di quattro diversi mediatori (adrenalina, ACTH, glucagone, TSH) aumenta la velocità di degradazione dei lipidi, mentre nelle stesse cellule l'attivazione dei recettori α_2 adrenergici dà inizio ad una sequenza di eventi che si traduce in una diminuzione della velocità di degradazione dei lipidi.

Come accennato, la sintesi di cAMP è catalizzata dall'adenilciclasi, un enzima di membrana dotato di (probabilmente) due siti catalitici. Quando le proteine G si legano a quest'enzima e lo attivano, le concentrazioni intracellulari di cAMP aumentano in pochi secondi di circa cinque volte rispetto al valore di riposo di circa 1×10^{-7} M e il cAMP può interagire con i suoi siti di legame sulle subunità regolatrici della chinasi A. Infatti, eccetto che nel caso dei neuroni olfattori (descritto sotto A.1.), gli effetti del cAMP sono sempre mediati da una famiglia di proteina chinasi cAMP-dipendenti, appunto le chinasi A. Queste sono proteine tetrameriche, con due subunità catalitiche e due regolatrici; quando due molecole di cAMP si legano ad ognuna delle due subunità regolatrici dell'enzima (in totale quattro), viene indotto un cambiamento conformazionale tale da indebolire il legame tra le componenti regolatrici e quelle catalitiche e le subunità regolatrici si staccano da quelle catalitiche; l'ulteriore cambiamento conformazionale indotto dalla sostituzione delle interazioni proteina - proteina con quelle proteina - solvente attiva i siti enzimaticamente attivi delle subunità catalitiche, che possono fosforilare i loro effettori. Il cambiamento conformazionale indotto dalla fosforilazione mette gli effettori in grado di esprimere la funzione cellulare che deve essere modificata; più comunemente, la prima di una serie di reazioni che conducono all'attivazione di differenti funzioni cellulari (vedi § 2.2.). Il segnale intracellulare viene poi disattivato come segue: 1. l'adenilciclasi, in assenza di attivazione da parte della proteina G, riassume la sua conformazione inattiva. Questa inattivazione è funzione della dinamica degli scambi energetici tra la molecola di enzima e l'ambiente esterno ed è quindi molto veloce; 2. le concentrazioni intracellulari di cAMP vengono riportate ai livelli basali da due processi fondamentali: idrolisi del cAMP a AMP ad opera delle fosfodiesterasi presenti nella cellula; trasporto del cAMP in direzione extracellulare. La diminuzione delle concentrazioni di secondo messaggero così indotta determina la riassociazione delle chinasi A; 3. infine, gli effettori che erano stati fosforilati da questi enzimi devono essere defosforilati ad opera di una delle proteina fosfatasi citoplasmatiche (soprattutto le fosfatasi I, IIA e IIB).

Molto spesso l'aumento delle concentrazioni di cAMP induce un aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di ioni Ca^{2+} , che possono provenire sia da depositi intracellulari che da sede extracellulare. L'interazione del cAMP con gli ioni Ca^{2+} avviene con varie modalità: nel caso più semplice, nei neuroni olfattori, il cAMP stimola direttamente l'apertura di canali calcici a controllo di nucleotidi ciclici; in questo caso il cAMP agisce come un ligando intracellulare per canali calcici il cui sito recettoriale è intracellulare. Alternativamente, la chinasi A può fosforilare trasportatori calcici, modificandone l'attività, oppure fosforilare canali calcici con un effetto regolatorio positivo. In tutti questi casi, il risultato è un aumento citoplasmatico di ioni Ca^{2+} , che si legano alle specifiche proteine calcio-leganti che attiveranno le funzioni cellulari. Inoltre, gli enzimi che degradano il cAMP possono essere regolati dalla calmodulina. Ancora, enzimi regolati indipendentemente dagli ioni Ca^{2+} e dal cAMP possono interagire fra loro, o avere effetti sulle stesse molecole bersaglio, interagendo in senso positivo o negativo.

Per riportare un esempio eccezionalmente semplice, l'azione dell'adrenalina sul muscolo scheletrico è

mediata da recettori β adrenergici, l'occupazione dei siti recettoriali dei quali induce aumento delle concentrazioni di cAMP e attivazione della chinasi A. In questo tessuto, la chinasi A ha come substrato due distinti enzimi: il primo è la fosforilasi chinasi che, quando fosforilata dalla chinasi A, fosforila a sua volta la glicogeno fosforilasi, enzima che catalizza il rilascio dal glicogeno di glucosio 1-fosfato, che può così essere avviato alla glicolisi; il secondo enzima fosforilato dalla chinasi A è la glicogeno sintetasi; l'attività di questo enzima è inibita nello stato conformazionale che viene assunto a seguito della fosforilazione. Pertanto, il risultato di queste interazioni è un aumento della quantità di glucosio 1-fosfato disponibile per la contrazione muscolare.

5. Fosfoinositidi

Come accennato, la via dei fosfoinositidi condivide con quella del cAMP i primi due eventi: 1. l'attivazione del recettore determina quella di una proteina G e (2) questa attiva un enzima, in questo caso una fosfodiesterasi, la fosfoinositidasi C oppure la fosfolipasi C- β . Quest'ultima è specifica per il fosfatidilinositolo (4,5)-difosfato (PIP_2), che viene scisso in inositolo (1,4,5)-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo. Inoltre, sembra molto probabile che agisca da secondo messaggero anche un altro prodotto del metabolismo del PIP_2 , l'inositolo (1,3,4,5)-tetrafosfato (IP_4) che deriva dalla fosforilazione dell' IP_3 . Dopo la loro formazione, questi prodotti seguono un differente destino: il diacilglicerolo, che è pochissimo polare, rimane confinato nella membrana, vi si diffonde e va ad attivare un enzima, in genere la chinasi C, o PCK. Una volta attivato, quest'enzima si diffonde nel citoplasma dove fosforila proteine bersaglio che sono diverse in diverse cellule. Ad esempio, riportando in modo estremamente sintetico solo una delle molte vie note, la chinasi C può fosforilare (attivandola) una seconda chinasi (MAP-chinasi), che a sua volta fosforila ed attiva una proteina regolatrice dei geni. L' IP_3 (e probabilmente anche l' IP_4), polari, si diffondono invece nel citoplasma e stimolano il rilascio di ioni Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Almeno una parte di questo rilascio avviene tramite specifici canali calcici localizzati nella membrana degli organelli di deposito calcico, i recettori per l' IP_3 (vedi "Note sui recettori", § 2.3.3.). Gli ioni Ca^{2+} così liberati agiscono come messaggeri finali per stimolare le proteine effettrici, come descritto sopra (§ 4.). Malgrado che il ruolo dell' IP_4 sia ancora poco chiaro, in vari tessuti è stato notato sinergismo di azione tra IP_3 e IP_4 . Ciò vuol dire che — almeno in determinati casi — la presenza di entrambi i fosfoinositidi sembra necessaria per la mobilitazione degli ioni Ca^{2+} . In effetti, mentre l' IP_3 è in grado di agire in modo autonomo, l' IP_4 , almeno apparentemente, richiede la presenza di IP_3 . Va infine notato che sono stati identificati inositoli più altamente fosforilati (IP_5 e IP_6), la cui funzione è ancora da chiarire.

In fine, la relativa importanza di questi meccanismi è verosimilmente diversa in diversi tessuti. Ad esempio, nel muscolo scheletrico la maggior parte del rilascio di ioni calcio avviene tramite l'accoppiamento recettori per la diidropiridina - recettori per la rianodina del reticolo sarcoplasmatico, mentre nel muscolo liscio avviene tramite canali calcici della membrana plasmatica, canali che sono sia a controllo di potenziale che a controllo di ligando. Questi meccanismi non operano in cellule non eccitabili, nelle quali la gran parte del calcio dovrebbe essere mobilitata tramite i recettori per l' IP_3 e nei quali il ruolo dei fosfoinositidi dovrebbe quindi essere comparativamente più rilevante.

Anche in questo caso, esistono ovviamente meccanismi per mettere termine alla risposta cellulare: in primo luogo l' IP_3 è defosforilato piuttosto velocemente da una specifica fosfatasi; inoltre, gli ioni Ca^{2+} che sono entrati in risposta all'elevarsi delle concentrazioni di IP_3 sono riportati in direzione periplasmatica ad opera dei meccanismi descritti al paragrafo 3.3. e 3.4.

6. GMP ciclico

Il GMP ciclico (cGMP) è una molecola di segnalazione intracellulare la cui sintesi è catalizzata da due differenti classi di guanilato ciclasasi: di membrana e solubili. Le prime sono costituite dai recettori con attività appunto guanilato ciclasica, i meglio conosciuti dei quali sono quelli per i peptidi atriali natriuretici (vedi "Note sui recettori", § 2.2.4.); le guanilato ciclasasi solubili (sGC) sono invece proteine dimeriche che contengono un gruppo eme e che sono bersaglio intracellulare dell'ossido nitrico (vedi § 8.). Una volta sintetizzato da questi enzimi, all'interno della cellula il cGMP ha tre bersagli (almeno, tre sono quelli noti): i. in varie cellule modifica l'attività di fosfodiesterasi cAMP-specifiche, così modulando le concentrazioni dell'AMP ciclico e, quindi, l'attività di questo secondo messaggero. ii. Nella retina (vedi A. 2.) agisce da ligando intracellulare per canali cationici che danno origine al segnale sensoriale centripeto. iii. In fine, attiva almeno tre proteine chinasi cGMP-dipendenti i cui principali (ma non unici) bersagli identificati sono una miosina fosfatasi e un canale potassico attivato dagli ioni Ca^{2+} , la cui fosforilazione regolativa induce

rilassamento della muscolatura liscia vasale e, quindi, effetti ipotensivi (vedi § 8). L'azione del cGMP è terminata da varie fosfodiesterasi che ne catalizzano l'idrolisi. Inibitori di una di queste fosfodiesterasi (specificamente, della 5) sono utilizzati nelle disfunzioni dell'erezione, che è sottoposta ad un controllo negativo.

7. Acido arachidonico

Tra gli acidi grassi dall'esterificazione dei quali derivano i fosfolipidi di membrana ha particolare importanza un acido grasso poliinsaturo, l'acido arachidonico. Infatti, i suoi quattro doppi legami cis gli conferiscono una viscosità particolarmente bassa, che lo rende un fattore particolarmente importante nel determinare la fluidità delle membrane. Come tutti gli acidi grassi, l'acido arachidonico può essere rilasciato dai fosfolipidi dei quali è costituente dall'azione di fosfolipasi, in questo caso della fosfolipasi A2. Nella cellula, l'acido arachidonico costituisce il principale precursore per la sintesi di eicosanoidi come prostglandine, trombossani e leucotrieni. È stato però anche suggerito un ruolo dell'acido libero come messaggero intracellulare, specificamente come modulatore di canali ionici, nonché il suo coinvolgimento nei fenomeni di apoptosi. Tuttavia, l'attività di quest composto come messaggero intracellulare rimane tutt'ora non evidente. Infatti, la sua ubiquitaria presenza nella membrana plasmatica, unita alle comparativamente elevate (per un messaggero: non meno di 1×10^{-6} M) concentrazioni necessarie per evocarne gli effetti, hanno sollevato dubbi sulla reale fisiologicità degli effetti descritti. Sembra, quindi, ragionevole concludere che, fino a quando non sarà possibile misurare con ragionevole precisione i livelli di questo composto in differenti compartimenti cellulari, il suo effettivo ruolo di mediatore intracellulare non è certo.

8. Gas: ossido di azoto e ossido di carbonio

Entrambe queste molecole mediano sia segnali extracellulari (solo locali: dato che reagiscono spontaneamente per dare prodotti inattivi, la loro emivita è molto breve, nell'ordine di secondi) che segnali intracellulari. Infatti, una volta liberati, entrambi questi gas diffondono liberamente sia dentro che fuori delle cellule di origine, di modo che le loro funzioni di segnalazione extracellulari sono difficilmente distinguibili da quelle intracellulari.

L'ossido di azoto (NO), prodotto dalla deaminazione dell'arginina da parte di varie NO sintetasi (NOS), diffonde fino ad incontrare i suoi bersagli, il meglio noto (ma non l'unico) dei quali è costituito dall'atomo di ferro dell'eme delle guanilato ciclastasi solubili (vedi § 6.), con effetto positivo sulla sintesi di GMP ciclico. Questo può attivare le proteina chinasi cGMP-dipendenti (cGKs), che fosforilano sia una miosina fosfatasi che un canale potassico Ca^{2+} -dipendente, determinando un effetto finale di rilasciamento della muscolatura liscia vasale e conseguenti effetti ipotensivi (è, infatti, il meccanismo d'azione della nitroglicerina, che rilascia NO). Nella muscolatura vasale e nel sistema nervoso centrale la NO sintetasi richiede come cofattore la calmodulina, nella sua forma calcio-legata: quindi la sintesi di NO è stimolata dagli agonisti glutamminergici come i recettori per l'NMDH che permettono l'ingresso di ioni Ca^{2+} .

Appendice: trasduzione dei segnali olfattori e visivi

La trasduzione dei segnali olfattori, come di quelli visivi, dipende dall'esistenza di canali ionici regolati da nucleotidi ciclici che agiscono come ligandi intracellulari per canali il cui sito recettoriale è, appunto, intracellulare e che generano il segnale elettrico che viene inviato al sistema nervoso centrale (vedi "Note sui canali ionici", § 5). Tuttavia, in questi due casi, la modifica delle concentrazioni ioniche è indotta indirettamente dall'occupazione di recettori accoppiati alle proteine G (che sono per se chemiocettori), ciò che consente un elevato livello di amplificazione. L'esistenza di canali con analogo tipo di controllo è stata anche descritta nel tessuto cardiaco e renale, dove la loro funzione è tutt'ora solo oggetto di ipotesi.

A.1. Olfatto

Le cellule olfattorie consistono in neuroni bipolari periferici localizzati in un'area specializzata della mucosa nasale — la mucosa olfattiva — che nell'uomo ha una superficie molto ridotta, tanto che si suppone che il numero totale di cellule olfattorie non superi, a seconda delle stime, i 10 - 40 milioni. Questi neuroni, che hanno l'inusuale caratteristica di essere continuamente rinnovati per divisione delle cellule basali, sono dotati

di cilia modificate che si estendono verso la cavità nasale, nella membrana delle quali sono localizzati specifici recettori accoppiati alle proteine G. Le sostanze trasportate dall'aria inspirata vanno in soluzione nel muco che ricopre l'epitelio, dove si legano ad una proteina vettore che le trasporta fino alla membrana delle cilia. Nonostante che le modalità di trasduzione dei segnali olfattivi siano note imperfettamente, si può assumere la presenza di varie centinaia di diversi recettori a sette segmenti transmembrana di specificità presumibilmente modesta, ognuno dei quali localizzato in una diversa cellula; ossia, la popolazione recettoriale di ogni cellula è omogenea. Si può anche ipotizzare che, data la loro scarsa specificità, la maggior parte delle sostanze possano legarsi a più recettori e che il riconoscimento dell'odore specifico dipenda dall'integrazione centrale dei vari segnali trasmessi.

Con le modalità consuete per i recettori accoppiati alle proteine G, l'occupazione del sito recettoriale stabilizza il cambiamento conformazionale in grado di indurre la dissociazione di una specifica proteina G, nota come G_{off} . Questa attiva l'adenilciclasi, inducendo un aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di cAMP che si lega al sito recettoriale di canali cationici cAMP-dipendenti (vedi "Note sui canali ionici", § 2.1.3.). Il legame con l'cAMP ne stabilizza la conformazione a canale fisico pervio, con conseguente aumento della conduttanza di membrana essenzialmente per gli ioni Ca^{2+} e, in parte, Na^+ . Tale aumento è insufficiente per generare una depolarizzazione significativa; basta, tuttavia, perché una sufficiente quantità di questi ioni possa occupare i siti recettoriali di canali per il cloro Ca^{2+} -dipendenti, rendendone così pervio il canale fisico. Il conseguente efflusso di Cl^- induce una depolarizzazione sufficiente a generare un potenziale d'azione e, quindi, il rilascio di mediatore sinaptico verso il secondo neurone della via olfattiva. Come di norma, il segnale si mantiene fino a quando le concentrazioni extracellulari di ligando rimangono abbastanza elevate, mentre le concentrazioni intracellulari di cAMP sono riportate ai valori basali da fosfodiesterasi (sia specifiche che aspecifiche). Nelle cellule olfattorie esiste anche una calmodulina che, a siti calcio-leganti occupati, è in grado di modulare negativamente il legame del cAMP ai canali cAMP-dipendenti determinando una risposta adattativa (cioè, una diminuzione dell'intensità del segnale a seguito di stimoli prolungati). Va in fine osservato che sono stati anche descritti recettori olfattivi che agiscono tramite la via dell'inositolo trifosfato: in questo caso, i canali calcici dovrebbero, quindi, essere IP_3 -dipendenti.

A.2. Visione

Canali ionici con sito recettoriale intracellulare regolati da un nucleotide ciclico (il cGMP) e controllati da recettori accoppiati alle proteine G sono coinvolti anche nel meccanismo della visione. Tuttavia nei fotorecettori (anche in questo caso neuroni periferici) il segnale elettrico efferente origina da un'iperpolarizzazione, non da una depolarizzazione, delle cellule recettrici, ed il meccanismo è quindi parzialmente diverso da quello descritto sopra. Infatti, al contrario di quanto avviene di norma, in assenza di segnale esterno — ossia, in assenza di luce — le cellule fotorecettrici sono parzialmente depolarizzate, ad un potenziale di circa -40 mV. Ciò perché nella membrana plasmatica del segmento esterno (Figura 2) esistono canali cationici a controllo di ligando scarsamente specifici (vedi "Note sui canali ionici", § 2.1.3.) il cui sito recettoriale intracellulare lega il cGMP. In condizioni basali, l'azione della guanilato ciclasi citoplasmatica (vedi oltre) mantiene le concentrazioni di questo nucleotide abbastanza elevate perché una frazione significativa dei siti recettoriali dei canali cGMP-dipendenti sia occupata: quindi il canale fisico ad essere aperto e — sempre in assenza di luce — si stabilisce un flusso ionico (prevalentemente sodico ma anche calcico) in direzione intracellulare noto come corrente di buio. Ciò nonostante, le concentrazioni sodiche citoplasmatiche vengono mantenute circa costanti, ad un livello corrispondente a circa -40 mV, dall'azione di trasportatori attivi non regolati, soprattutto di uno scambiatore $Na - K$. Essendo depolarizzate, le cellule fotorecettrici rilasciano mediatore (glutammato) verso le cellule bipolari e orizzontali con cui fanno sinapsi, che inoltrano il segnale in sede centrale.

La trasduzione di un segnale luminoso ha inizio con l'arrivo di un fotone al complesso recettoriale inserito nella membrana dei dischi, la rodopsina. Questo complesso è costituito da un recettore accoppiato alle proteine G, l'opsina (o, meglio, un'opsina, dato che le opsine costituiscono una piccola famiglia), e da una molecola, il retinale, legata covalentemente all'opsina e localizzata nella cavità formata dalle α eliche (Figura 3). Il retinale è un derivato della vitamina A formato da un anello esamero (ma non aromatico, ha un singolo doppio legame) cui è legata una catena alifatica dotata di doppi legami coniugati, che assorbono nel visibile. In condizioni basali i legami C-C della catena alifatica sono tutti in configurazione trans, eccetto quello tra C_{11} e C_{12} che è in configurazione cis; in conseguenza, la catena alifatica non è rettilinea, ma è piegata su questo legame. L'energia relativa al fotone è in grado di indurre l'isomerizzazione del legame 11 - 12 alla configurazione trans, in cui i legami C-C sono allineati e la catena è rettilinea. Dato che il retinale è legato covalentemente all'opsina, la conseguente distorsione dei legami dell'opsina induce in questa un

cambiamento conformazionale in grado di pilotare la dissociazione della specifica proteina G (trasducina o G_T). La subunità α della trasducina può quindi interagire con una cGMP-fosfodiesterasi presente nei dischi, inducendo il distacco della sua subunità regolatrice, la γ , e attivando la funzione enzimatica. Dato che questa consiste nel catalizzare l'idrolisi del cGMP, la concentrazione intracellulare di questo nucleotide si abbassa. Al diminuire delle concentrazioni di ligando, le probabilità che i siti recettoriali dei canali cationici possano essere occupati diminuiscono e questi tendono a trovarsi prevalentemente nella conformazione corrispondente al canale fisico chiuso, facendo cessare la corrente di buio. L'esistenza di canali potassici cronicamente aperti e l'attività degli scambiatori Na - K comportano che la membrana si iperpolarizzi e, quindi, cessi la liberazione di mediatore chimico verso le cellule bipolari e orizzontali. Ciò costituisce il segnale che, opportunamente integrato, viene avviato in sede centrale. Naturalmente, come di norma per i recettori accoppiati a proteine G, il segnale afferente (anche un singolo fotone può fornire un segnale percettibile) viene notevolmente amplificato a livello sia della trasducina che della fosfodiesterasi.

Lo stato di apertura dei canali cationici del segmento esterno ha effetto regolativo anche sulla sintesi del cGMP: infatti, la guanilato ciclastasi che lo sintetizza è indirettamente Ca^{2+} -dipendente: data la modesta specificità dei canali a controllo di cGMP, come riportato sopra, la corrente di buio, oltre che sodica è anche calcica. Quando la concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} aumenta, questi possono legarsi ad una specifica proteina calcio-legante (la recoverina, una forma di calmodulina) che, in modo del tutto atipico per una calmodulina, è inattiva quando i suoi siti per il calcio sono occupati ed è invece attiva a siti non occupati e, quindi, a bassi livelli calcici. Nelle cellule fotorecetriche la presenza di luce, ossia l'assenza della corrente di buio corrisponde a basse concentrazioni calciche. In queste condizioni la recoverina si lega alla guanilato ciclastasi attivandola e permettendo la sintesi di cGMP. Pertanto i canali cationici possono aprirsi appena cessa il segnale luminoso, ristabilendo rapidamente la corrente di buio. Siccome gli effetti della luce sulla sintesi di GMP ciclico sono opposti a quelli sulla sua degradazione (la sintesi viene aumentata quando la degradazione viene diminuita), si crea una condizione di instabilità che (probabilmente) aumenta la velocità di risposta alle variazioni di intensità luminosa.

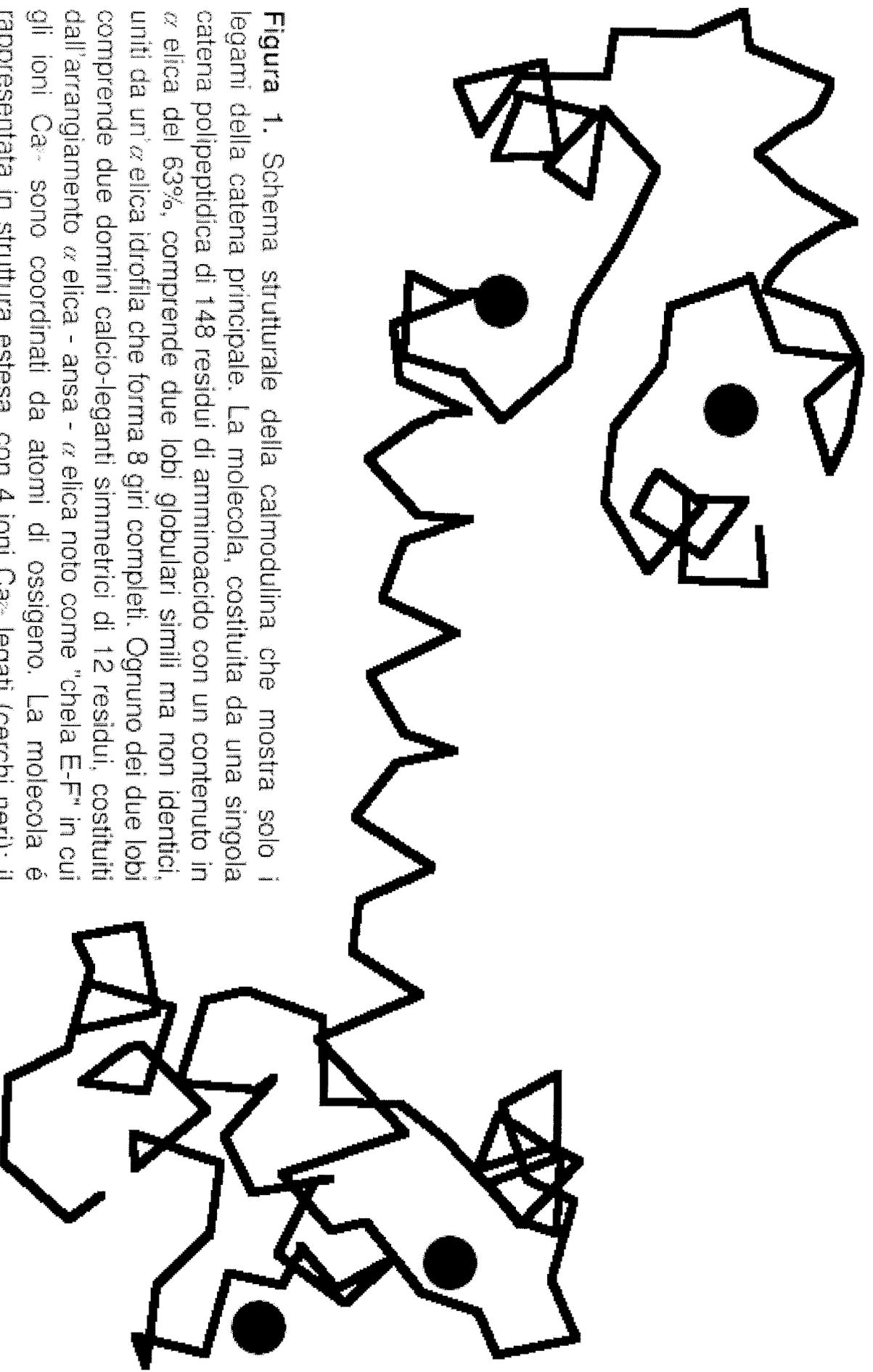


Figura 1. Schema strutturale della calmodulina che mostra solo i legami della catena principale. La molecola, costituita da una singola catena polipeptidica di 148 residui di amminoacido con un contenuto in α elica del 63%, comprende due lobi globulari simili ma non identici, uniti da un' α elica idrofila che forma 8 giri completi. Ognuno dei due lobi comprende due domini calcio-leganti simmetrici di 12 residui, costituiti dall'arrangiamento α elica - ansa - α elica noto come "chela E-F" in cui gli ioni Ca^{2+} sono coordinati da atomi di ossigeno. La molecola è rappresentata in struttura estesa, con 4 ioni Ca^{2+} legati (cerchi neri); il legame con il calcio induce infatti cambiamenti conformazionali che permettono le interazioni tra la calmodulina e le molecole effettrici nelle quali è molto probabilmente coinvolta l' α elica centrale.

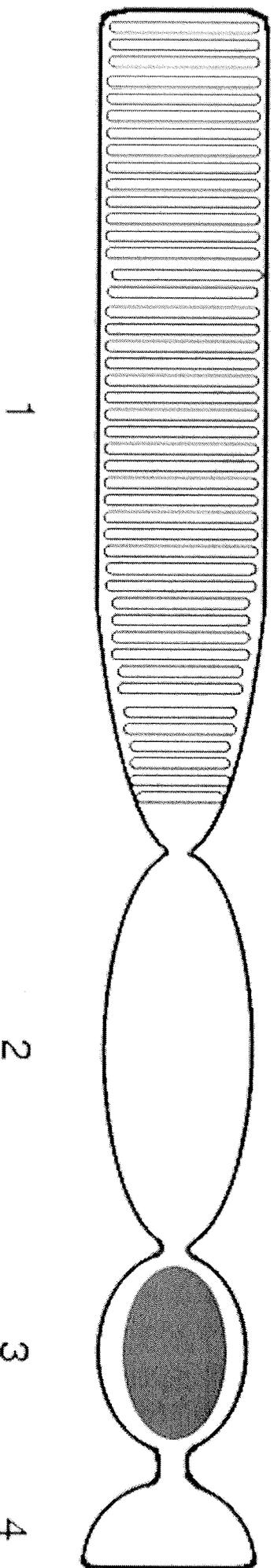


Figura 2. Rappresentazione schematica di un bastoncello. I numeri indicano: 1. segmento esterno: questo, parzialmente inserito nell'epitelio pigmentato, contiene la pila dei dischi nella membrana dei quali è localizzata la rodopsina; 2. segmento interno, che contiene la maggior parte degli organelli; 3. regione nucleare; 4. regione sinaptica, che fa sinapsi con le cellule bipolari. I dischi (circa 1000 per cellula), vengono formati continuamente (3 o 4 ogni ora) e si spostano verso l'estremità distale della cellula dove i più vecchi sono fagocitati dalle cellule dell'epitelio pigmentato. La direzione della luce è dalla regione sinaptica verso il segmento esterno (da destra verso sinistra).

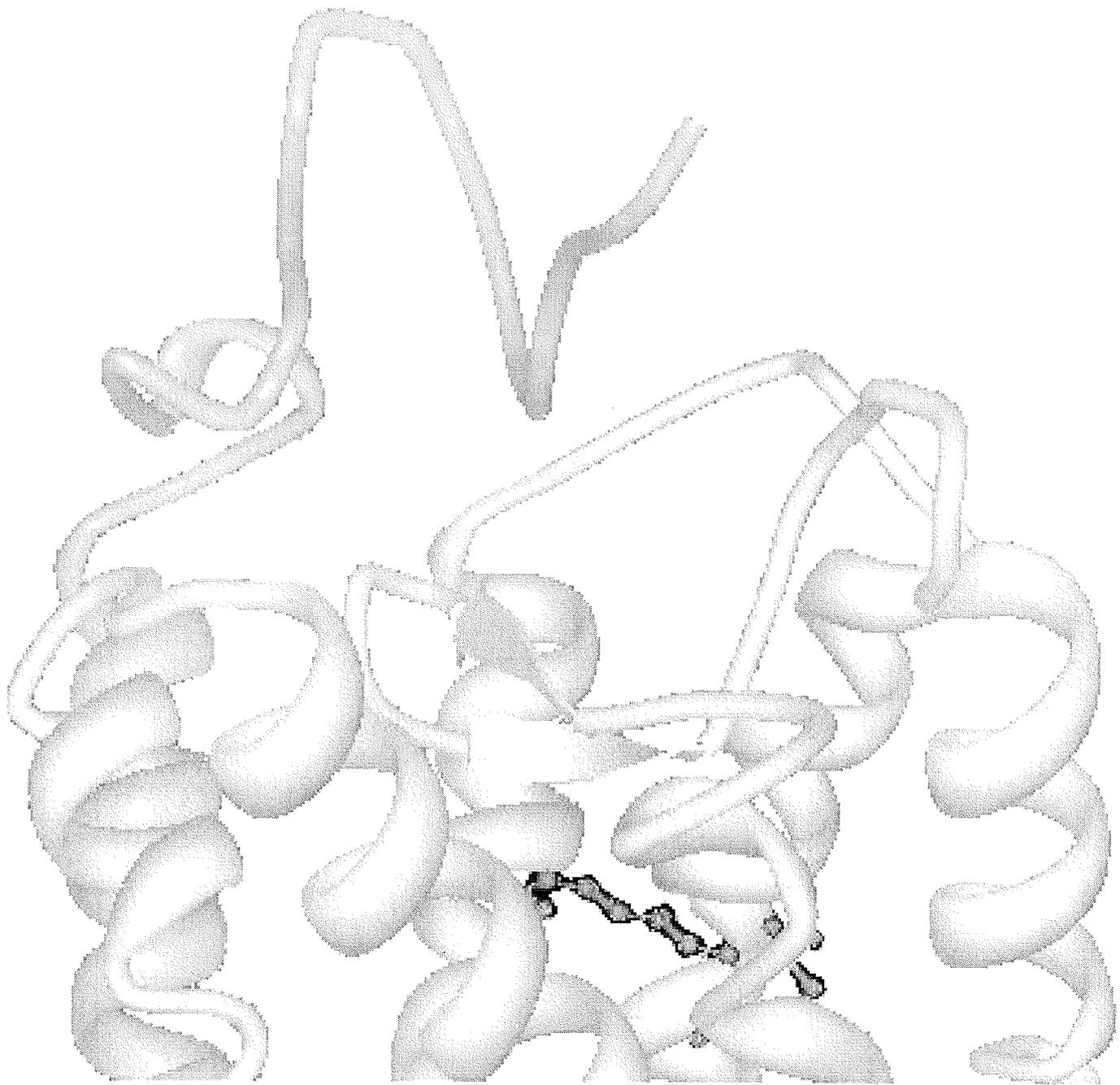


Figura 3. Vista parziale di una rodopsina (grigio chiaro) con la molecola di retinale associata (grigio scuro). Dato che la rodopsina è inserita nella membrana dei dischi (immaginata in basso in figura), l'N-terminale — che nei recettori a sette segmenti generici è extracellulare — si trova al di fuori di questa membrana, ma all'interno della membrana plasmatica (vedi Figura 2).

Note sulle proteine motrici (8)

(revisione 2008, distribuzione AA 2010 - 2011)

1. Le funzioni motorie

Tutti gli organismi, anche quelli unicellulari, nonché singole cellule degli organismi pluricellulari, hanno necessità di operare spostamenti sia interni alla cellula che rivolti verso l'esterno; negli organismi pluricellulari, questi ultimi possono anche rappresentare movimenti di singole cellule all'interno dell'organismo. Esempi del primo caso sono costituiti dal trasporto di organelli e dei fenomeni della divisione cellulare. Nel secondo caso, organismi unicellulari e cellule isolate ed si spostano nell'ambiente utilizzando movimenti ameboidi oppure il battito di cilia o di flagelli; inoltre, gli organismi pluricellulari utilizzano la contrazione di tessuti specializzati, i tessuti muscolari. La contrazione muscolare costituisce, tuttavia, soltanto una modalità particolarmente specializzata di un impiego coordinato di proteine motrici e filamenti proteici che ha ampia diffusione nell'organismo. Infatti, proteine simili o analoghe a quelle che sono alla base della contrazione muscolare si trovano in quasi tutte le cellule animali: specificamente queste proteine — appunto le proteine motrici — forniscono le funzioni contrattili che sono responsabili di una parte assai importante degli spostamenti che avvengono all'interno delle cellule. Per completezza, va anche osservato che spostamenti intracellulari sono operati anche da proteine non specializzate per questa funzione, come ad esempio DNA e RNA polimerasi o actina, come accennato oltre.

1.1. Movimenti cellulari

Cellule isolate dell'organismo e gli eucarioti unicellulari capaci di movimento autonomo hanno due modi fondamentali di spostamento: l'emissione di pseudopodi, nei quali viene a confluire l'intera cellula (movimento ameboide) e il battito di cilia o flagelli. Nell'organismo umano i movimenti ameboidi sono tipici di cellule capaci di fagocitosi quali molte cellule immunocompetenti; questi movimenti sono dovuti a polimerizzazione e depolimerizzazione controllata di complessi di actina della corteccia cellulare, la rete di filamenti proteici posta immediatamente al di sotto della membrana plasmatica. Dato che variazioni della corteccia cellulare sono in grado di controllare la forma della cellula, modifiche dell'aggregazione dell'actina corticale — determinate da meccanismi in atto poco conosciuti — possono comportare l'emissione di pseudopodi, fluendo nei quali la cellula è in grado di muoversi e con i quali può fagocitare particelle estranee. L'altro tipo di locomozione si basa invece sull'esistenza di appendici allungate permanenti, appunto cilia e flagelli, il cui ondeggiamento è indotto da proteine motrici (negli eucarioti; nei procarioti il moto ciliare ha basi molecolari del tutto differenti). Le interazioni viscoso con il liquido circostante permettono alle cellule libere spostarsi o a cellule stazionarie di muovere il liquido circostante. Tra le cellule umane si spostano in questo modo gli spermatozoi, ma è più frequente il caso di cellule stazionarie che muovono liquido, come le cellule degli epiteli respiratori che tengono in moto lo strato di muco che li riveste.

Basi molecolari analoghe a quelle del movimento ciliare (ossia proteine motrici) hanno molti movimenti endocellulari, forse il più vistoso dei quali è costituito dal traffico vescicolare. In un caso estremo, vescicole sinaptiche possono essere trasportate da proteine motrici mediante trasporto assoplasmico veloce (veloce in opposizione a quello lento, rispettivamente circa 400 e 8 mm al giorno), viaggiando lungo gli assoni fino a raggiungere le terminazioni sinaptiche, effettuando un percorso che, nell'uomo, può essere lungo anche più di un metro e richiedere più giorni per essere completato.

1.2. Aggregati molecolari con funzioni motorie

Qui di seguito sono descritte le interazioni delle proteine motrici, direttamente responsabili del movimento, con i filamenti proteici lungo i quali queste si muovono.

1.2.1. Filamenti proteici

Nelle cellule umane esistono tre principali tipi di filamenti proteici: i filamenti di actina, i filamenti intermedi e i microtubuli (Figura 1). Indipendentemente dalle loro interazioni con le proteine motrici, questi filamenti hanno funzioni meccaniche, fornendo rigidità alle strutture cellulari e controllandone la posizione. Tutti e tre sono formati per polimerizzazione di monomeri le cui superfici di interazione sono disposte in modo da consentire o una polimerizzazione a catena lineare come l'actina, oppure in strutture tubulari allungate, come i

microtubuli e i filamenti intermedi. Le proteine fondamentali sono spesso accompagnate da altre, che collegano i filamenti fra loro e con altre strutture cellulari, dando a volte origine ad un elevato grado di organizzazione.

I filamenti intermedi (a in Figura 1) hanno ruolo esclusivamente strutturale, ossia non interagiscono con proteine motrici: costituiscono, ad esempio, la lamina nucleare, i filamenti di irrigidimento degli epitelii e danno rigidità alle cellule muscolari. Sono composti da diverse proteine lineari come le lamine e le α -cheratine, che si associano formando coiled coils le quali danno, a loro volta, origine a strutture anche abbastanza complesse. Al contrario, sia i filamenti di actina che i microtubuli (rispettivamente b e c in Figura 1) sono coinvolti nelle interazioni con proteine motrici; specificamente, determinano la direzione e il senso di moto di queste, funzionando come binari lungo i quali le proteine motrici si spostano in un solo verso. Infatti, a causa dell'asimmetria dei loro monomeri, sia i filamenti di actina che i microtubuli (non i filamenti intermedi) sono strutture polarizzate, le cui due estremità hanno caratteristiche differenti: all'estremità detta "più" avviene l'accrescimento per addizione di ulteriori monomeri; l'estremità opposta, detta "meno", può tendere a disaggregare se non viene stabilizzata da apposite strutture (i centrosomi) nel caso dei microtubuli, oppure essere caratterizzata da un accrescimento più lento dell'altra, come nel caso dell'actina. Ancora, dato che nel citoplasma esiste una riserva di monomeri liberi sia di actina che di tubuline, queste proteine sono in equilibrio tra stato monomero e polimerico, equilibrio che può essere spostato da vari fattori intracellulari. Ciò permette le rapide variazioni della quantità di filamenti proteici che si possono osservare *in vivo* e che sono responsabili di alcune caratteristiche funzionali di queste strutture (vedi, ad esempio, § 1.1.).

1.2.1.1. Filamenti di actina. I filamenti di actina sono omopolimeri formati dalla polimerizzazione di monomeri di una delle varie actine, nel caso del tessuto muscolare l' α actina. Questa (actina globulare o actina G) è costituita da una catena polipeptidica di 42 kDa di peso molecolare, la cui struttura terziaria consiste in due domini simili che legano una molecola di ATP al loro centro (Figura 2a), determinando una molecola quadrangolare appiattita i cui lati maggiori misurano entrambi 55 Å. Dato che l'actina ha attività autocatalitica, l'ATP legato viene idrolizzato ad ADP, che rimane intrappolato al centro del monomero. La presenza di ADP anziché ATP induce nell'actina un cambiamento conformazionale a seguito del quale le superfici di interazione possono, appunto, interagire, permettendo la polimerizzazione dei monomeri e la formazione dei filamenti. Il numero e la disposizione delle superfici di interazione sono tali da indurre la formazione di un doppio filamento avvolto a spirale, spesso circa 80 Å e con un passo di 370 Å (sette monomeri) nel quale si determinano due docce, anche queste con andamento a spirale (Figura 2b e 2c). Come descritto oltre (§ 2.3.), nell'actina muscolare in queste docce si localizzano alcune proteine con funzioni di controllo della contrazione.

1.2.1.2. Microtubuli. I microtubuli sono eteropolimeri formati dalla polimerizzazione di quantità equimolari di α e β tubulina, due proteine molto simili tra loro, entrambe di 55 kDa di peso molecolare. Oltre che supporto per il trasporto assonale, come descritto oltre (§ 1.3.3.), i microtubuli forniscono sostegno meccanico e di moto a cilia e flagelli. Entrambe le tubuline legano una molecola di GTP e polimerizzano con modalità simili a quelle cui si è accennato per actina e ATP. Le superfici di interazione di entrambe le tubuline (quattro per monomero, a circa 90 gradi l'una dall'altra) sono tali da indurre la formazione di strutture tubulari (Figura 3) di circa 250 Å di diametro esterno, i microtubuli, nei quali ogni monomero di ognuna delle due tubuline prende contatto con quattro monomeri dell'altra, una disposizione geometrica che comporta l'esistenza di spazi vuoti (vedi Figura 3). Nel caso dei microtubuli la direzione del movimento è funzione sia della proteina motrice che dell'orientamento dei microtubuli nella cellula. Infatti, in generale, i microtubuli sono orientati in modo radiale, con le estremità "più" verso la periferia della cellula. Tuttavia, in alcune cellule ciò non si verifica: ad esempio nei neuroni, questo arrangiamento è valido per gli assoni ma non per i dendriti, nei quali i microtubuli sono orientati in entrambe le direzioni, permettendo (almeno teoricamente) un trasporto bidirezionale ad opera di una singola proteina motrice.

1.3. Proteine motrici. Definendo le proteine motrici come proteine che impiegano l'energia fornita dall'idrolisi di ATP per produrre uno spostamento (sono state date definizioni molto più ampie), queste possono essere distinte in tre classi: miosine, chinesine e dineine. Miosine e chinesine sono evolutivamente correlate tra loro (e con le proteine G), mentre le dineine seguono un modello assai diverso. Ciò non ostante, tutte sono caratterizzate da modalità di funzionamento simili: tutte hanno attività ATPasica e in tutte almeno una parte della molecola è in grado di interagire con un filamento proteico; in tutte, un cambiamento conformazionale pilotato dall'idrolisi dell'ATP si traduce in una variazione angolare tra la parte associata al filamento e il resto della molecola, mentre l'esistenza di una zona flessibile interposta consente che la variazione angolare si traduca in uno spostamento della molecola rispetto al filamento (vedi oltre).

Tipicamente, le parti che interagiscono con il filamento proteico sono due, che si alternano in questo cambiamento conformazionale e le proteine sono così in grado di "camminare" lungo il filamento, oppure di esercitare su di esso una trazione. In effetti, lo spostamento può interessare: i. la proteina motrice che si sposta con il suo carico lungo il filamento proteico, come avviene nei meccanismi di trasporto; ii. il filamento proteico che si sposta rispetto alla proteina motrice che rimane stazionaria, come avviene nelle strutture contrattili temporanee e nei tessuti muscolari; iii. un filamento proteico mobile rispetto ad un altro stazionario, come nel caso di cila e flagelli.

Per spostare il carico, le proteine motrici devono generare una forza. Anche se questa non è identica nelle diverse proteine motrici, dato che l'energia necessaria deriva dall'idrolisi di una singola molecola di ATP per ciclo, il suo ordine di grandezza è sempre di qualche pNewton (1 N corrisponde alla forza esercitata dal campo gravitazionale terrestre standard su di una massa di 102 g).

1.3.1. Miosine. Le miosine sono le proteine motrici responsabili sia dei trasporti endocellulari lungo i filamenti di actina che del funzionamento delle strutture contrattili organizzate, comprese quelle muscolari. Le miosine sono costituite da una subunità effettrice (chiamate catena pesante) e da due subunità regolatrici (catene leggere), per un peso molecolare totale di circa 250.000 Daltons nel caso delle miosine II muscolari (Figura 4a). È stato ipotizzato che alcune miosine, come le relativamente piccole miosine I, possano funzionare in forma singola, ma la massima parte delle miosine forma aggregati bimolecolari che costituiscono l'unità motrice elementare di trasporto dei carichi lungo i filamenti di actina. Nelle strutture contrattili organizzate si formano aggregati assai più grandi, costituiti da una ventina di molecole negli anelli contrattili (§ 1.4) e da varie centinaia nei tessuti muscolari (§ 2.3.).

Nelle catene pesanti di tutte le miosine conosciute (attualmente 17 classi), si possono distinguere: un dominio globulare motore (testa), uno lineare (coda) e un dominio interposto tra questi (cerniera) la cui flessibilità permette la rotazione reciproca tra la testa e la coda. Il dominio motore delle catene pesanti è in grado di legarsi a un filamento di actina, nonché di legare l'ATP e di catalizzarne l'idrolisi. Il dominio lineare, un' α elica anfipatica, consente la formazione di coiled coils che mantengono gli aggregati funzionali di cui sopra. In alcune miosine come le V — le principali proteine di trasporto lungo i filamenti di actina — all'estremità opposta del dominio α elicoidale rispetto alla testa esistono domini globulari che legano il carico; in altri casi, il carico si lega direttamente all' α elica. Le catene leggere, legate al dominio cerniera, sono costituite da proteine calcio-leganti affini alla calmodulina, che forniscono un accoppiamento tra concentrazioni calciche e cambiamenti conformazionali. Specificamente, nelle miosine che trasportano carichi, le catene leggere attivano i cambiamenti conformazionali che permettono il movimento, mentre nelle miosine muscolari hanno funzioni regolatorie.

Le miosine avanzano lungo il filamento associato, spostandosi in direzione "più" (quasi tutte, specificamente le II e le V) o "meno" (le VI), tramite una rotazione reciproca del dominio di testa rispetto a quello di coda, rotazione permessa dalla flessibilità del dominio cerniera, come dettagliato oltre (§ 1.3.4. e Figura 4d). Tuttavia, sembra probabile che, in differenti miosine, questi cambiamenti conformazionali si traducano in modalità di spostamento differenti. Nella fattispecie, nel caso delle miosine II per le quali le nostre conoscenze sono piuttosto dettagliate, i cambiamenti conformazionali avvengono certamente in modo alternato tra le due molecole che formano l'aggregato. In altri termini, l'avanzamento di una delle due teste avviene mentre l'altra rimane stazionaria perché legata all'actina e la testa stazionaria e quella che avanza si alternano con un'andatura "bipede" come una persona che cammini (sono possibili, e sono state ipotizzate, anche altre modalità di spostamento). Al contrario, si suppone (ma quest'ipotesi è stata messa in dubbio) che le forme funzionali delle miosine I siano monomeriche e che si spostino "saltando" da un sito di legame sul filamento di actina e il successivo (vedi § 1.2.1), come chi camminasse saltellando su una gamba sola. Dato che le miosine si spostano lungo i filamenti di actina, lo spostamento per ogni ciclo (il "passo") è pari alla distanza tra due monomeri (più correttamente, alla distanza tra le superfici di interazione per la miosina esistenti su due monomeri consecutivi), cioè 55 Å.

1.3.2. Chinesine. Le chinesine (Figura 4b) spostano vescicole lungo i microtubuli e sono coinvolte nei movimenti relativi a meiosi e mitosi, ad esempio nella segregazione dei cromosomi. Anche queste proteine — strutturalmente ed evolutivamente collegate con le mioglobine — comprendono un dominio motore con attività ATPasica sul quale si trovano i siti di legame per filamento proteico associato (e, ovviamente, per l'ATP), ed un dominio lineare formato da un' α elica anfipatica; tra questi due domini è interposto un dominio con un elevato grado di flessibilità i cui cambiamenti conformazionali permettono il moto della proteina. Nelle chinesine, all'estremità opposta del dominio lineare rispetto al dominio motore esiste un secondo dominio globulare cui si lega il carico e cui sono associate le catene leggere che, anche in questo caso, hanno

funzioni modulatorie. Come le mioglobine, in genere due molecole di chinesina si associano fra loro tramite una coiled coil delle code, dando luogo all'aggregato funzionale. Queste proteine si spostano verso l'estremità "più" dei microtubuli (ne è conosciuta solo una che si sposta in direzione "meno") mediante moti alternati dei due domini globulari, circa — anche se non esattamente — come le miosine, con un passo di 83 Å (corrispondente a due monomeri del microtubulo) ad una velocità massima misurata di 2 μ m al secondo. Sempre come nel caso delle miosine, sono conosciute (poche) chinesine monomere, per le quali è stato proposto un movimento "a salti" come accennato per le miosine I; tuttavia, anche in questo caso, quest'ipotesi è stata messa in dubbio.

1.3.3. Dineine. Le dineine sono responsabili dei trasporti in direzione "meno" lungo i microtubuli (trasporto assonale retrogrado, le dineine citoplasmatiche), del movimento di cilia e flagelli (le dineine ciliari), nonché del movimento dei cromosomi nel corso della mitosi. Queste proteine possono agire singolarmente, o formare aggregati di due o tre molecole, ognuna delle quali è composta da una subunità principale di circa 500 KDa che comprende un anello di sei moduli ATPasici e due "peduncoli" allungati, uno dei quali si lega ai microtubuli mentre l'altro lega il carico (o un altro microtubulo); all'estremità di questo peduncolo sono legate varie subunità regolatrici. Il moto di queste proteine si effettua per un cambiamento conformazionale che comporta una riduzione dell'angolo tra i due peduncoli che si chiudono a compasso. Seguendo uno dei modelli che sono stati proposti (i relativi meccanismi sono conosciuti solo imperfettamente), riferito a dineine ciliari (Figura 4c), una rotazione dell'anello di subunità ATPasiche e del peduncolo legato al microtubulo (ossia della maggior parte della proteina) rispetto al peduncolo che lega il carico (in questo caso, un altro microtubulo) permetterebbe una riduzione dell'angolo formato dai due peduncoli. Questa variazione angolare sarebbe consentita dalla flessibilità della porzione vincolata all'anello di ATPasi del peduncolo che lega il carico, la cui conformazione a spirale e dovrebbe permettere di assorbire la relativa deformazione. Le dineine sono in grado di generare una forza comparativamente limitata (circa 1 pN), ma sono in grado di spostarsi con un passo variabile, ovviamente in multipli dei circa 80 Å che corrispondono a due monomeri di tubulina: a seconda del carico, sono stati infatti misurati spostamenti di 80, 160, 240 e 320 nm (i maggiori spostamenti con carichi minori).

Nelle dineine ciliari (le meglio studiate), in cui entrambi i peduncoli sono legati a due microtubuli paralleli, disposti lungo l'asse del flagello (in realtà, i microtubuli sono organizzati in una struttura definita chiamata assonema), la variazione dell'angolo tra i due peduncoli comporta che uno dei due microtubuli venga tirato rispetto all'altro, così facendo incurvare il flagello. Naturalmente è necessario che questi movimenti siano coordinati sia in senso trasversale (solo le dineine di una metà del flagello si devono contrarre) che longitudinale (le oscillazioni si devono propagare regolarmente lungo il flagello), con meccanismi che restano in atto sconosciuti. Nelle dineine citoplasmatiche, il moto così prodotto causa, invece, lo spostamento lineare del carico. Si suppone che il meccanismo interessato sia uguale, o simile, a quello delle dineine ciliari, ma i dati in proposito sono ancora carenti.

1.3.4. Aspetti funzionali. Come accennato, le proteine motrici si spostano lungo i filamenti proteici associati con un ciclo di cambiamenti conformazionali che comportano la rotazione di una parte della molecola rispetto ad un'altra. L'energia necessaria ad ogni ciclo è fornita dall'idrolisi di una molecola di ATP, catalizzata dall'attività ATPasica della proteina motrice stessa. Gli aggregati bimolecolari di miosine e chinesine (ma vedi § 1.3.1. e 1.3.2.) sono così in grado di "camminare" lungo il filamento, alternando i cambiamenti conformazionali relativi tra i due membri dell'aggregato, mentre le dineine possono svolgere questa funzione anche in forma monomolecolare. In questo modo può essere spostato un carico, oppure possono essere mossi apparati contrattili. Il ciclo di cambiamenti conformazionali di una proteina motrice è descritto in dettaglio nel caso della miosina II muscolare (§ 2.3.); qui di seguito, questi fenomeni sono invece descritti in termini quanto possibile generali.

In tutti i casi, l'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP induce un cambiamento conformazionale che comporta una modifica di 40° - 45° dell'angolo formato tra due porzioni della proteina (testa e coda in miosine e chinesine, i due peduncoli per le dineine). Facendo riferimento allo spostamento lungo un filamento, questo cambiamento conformazionale avviene quando la proteina è legata al filamento, così spostando di alcune decine di Å il carico lungo il filamento stesso (vedi Figura 4d). Naturalmente, al termine di ogni ciclo la proteina deve riassumere la conformazione iniziale e ciò deve avvenire quando non è associata al filamento (altrimenti si risposterebbe all'indietro). Pertanto, si ha la seguente sequenza: associazione con il filamento, legame dell'ATP, idrolisi dell'ATP, variazione angolare, distacco dal filamento, riassunzione della conformazione iniziale, associazione con il filamento e così via. Inoltre, perché il moto sia effettivo, occorre che ad ogni ciclo la proteina si leghi al filamento più avanti, nella direzione del moto, del sito precedente. Ciò è, in genere, assicurato dall'aggregazione in complessi composti da due molecole, tre per alcune dineine; le

proteine che fanno parte del complesso sono invece decine o centinaia per le strutture contrattili organizzate descritte oltre. Facendo infatti riferimento ad un aggregato bimolecolare, le due componenti si alternano nei cicli dei cambiamenti conformazionali in modo che una si trovi legata al filamento quando l'altra è libera. Ogn'uno di questi cambiamenti conformazionali sposta la proteina di un "passo", cioè dello spazio esistente sul filamento tra un sito di legame per la proteina motrice ed il successivo ossia 83 Å per i microtubuli e 55 Å per i filamenti di actina. Inoltre, la polarizzazione dei filamenti, assieme all'asimmetria delle superfici di interazione, comporta che la direzione dello spostamento sia obbligata, dato che in caso di inversione di senso, le superfici di interazione della proteina motrice non corrisponderebbero a quelle del filamento proteico. In fine, ogni singola proteina motrice è in grado di completare un numero limitato (nell'ordine del centinaio) di cicli: pertanto, un numero di molecole variabile a seconda della distanza da coprire coopera allo spostamento dei carichi, in una sorta di staffetta lungo il filamento.

2. Strutture contrattili organizzate

2.1. Fasci contrattili

Oltre a spostare carichi all'interno delle cellule, le proteine motrici possono formare fasci contrattili non permanenti, composti da filamenti di actina e di miosina II, che si dissociano una volta esaurita la loro funzione.

Ad esempio, nella divisione cellulare la separazione delle due cellule figlie (citochinesi) è resa possibile dalla creazione, durante la fase M del ciclo cellulare, di un "anello contrattile" localizzato subito al di sotto della membrana cellulare, cui è tenuto adeso da complessi proteici. Dopo la divisione nucleare e la segregazione dei nuovi nuclei, la contrazione di quest'anello fa restringere la cellula in divisione fino a separarla nelle due cellule figlie. Una volta che queste si sono separate, le componenti dell'anello contrattile vengono disperse.

Un altro esempio è dato dalle così dette "fibre da stress" dei fibroblasti che, si suppone, orientano la matrice di collagene nei processi di cicatrizzazione. Queste strutture sono formate dalla polimerizzazione di 15 - 20 complessi bimolecolari di miosina II in aggregati formati da due metà in cui le code sono a parzialmente sovrapposte, mentre le teste guardano in direzione opposta. Gli aggregati sono disposti al centro di un mazzetto di filamenti di actina, paralleli e orientati in senso opposto (cioè con le estremità "più" a 180° l'una dall'altra e rivolte verso l'esterno). Dato che ogni complesso di miosina è in contatto con filamenti di actina di orientamento opposto, i cambiamenti conformazionali delle miosine fanno sì che queste, esercitando forza in entrambi i sensi, non possano spostarsi verso le estremità "più" dei filamenti di actina ma facciano scivolare le estremità "meno" dei filamenti verso il centro dell'aggregato di miosina, come avviene nel tessuto muscolare cui — si suppone — queste strutture sono evolutivamente collegate.

2.2. Il tessuto muscolare

2.2.1. Cenni sull'organizzazione cellulare

I quattro tipi di tessuto muscolare dell'organismo umano (muscolo scheletrico, cardiaco, liscio e cellule mioepiteliali) presentano una diversa struttura ed un diverso grado di organizzazione, che è particolarmente elevato nel muscolo striato (ossia cardiaco e scheletrico).

2.2.1.1. Il muscolo striato è costituito da sincizi polinucleati, le fibrocellule, nei quali sono densamente stipate (costituiscono i due terzi circa della massa cellulare totale) strutture contrattili permanenti, le miofibrille. Le fibrocellule sono anche dotate di un esteso reticolo sarcoplasmatico, una forma modificata di reticolo endoplasmatico, che avvolge le miofibrille e dal quale proviene la massima parte degli ioni Ca^{2+} necessari alla contrazione (vedi § 2.4). Funzionalmente associata al reticolo sarcoplasmatico ma distinta anatomicamente da questo, è una seconda rete di membrane tubulari ramificate, i tubuli T o tubuli trasversi. Questi sono in continuità con la membrana plasmatica della fibrocellula: costituiscono, cioè, invaginazioni della membrana plasmatica che si spingono fino all'interno della fibrocellula, la cui parte esterna è, quindi, in comunicazione con il liquido extracellulare.

Le miofibrille sono strutture subcilindriche del diametro di 1-2 μm e di una lunghezza pari a quella dell'intera fibrocellula, ossia anche vari centimetri. Ciascuna miofibrilla comprende una catena lineare di molte migliaia di unità contrattili elementari, i sarcomeri, che risultano da una disposizione ordinata di filamenti di actina e

proteine associate e di filamenti di miosina. Infatti, come si nota dalle sezioni longitudinali (Figura 5a), i sarcomeri sono formati da due tipi di filamenti paralleli e parzialmente sovrapposti, noti come filamenti sottili e filamenti spessi. I filamenti di actina e proteine associate (filamenti sottili) si estendono per quasi tutta la lunghezza del sarcomero (circa 2.2 μm) e sono ancorati con la loro estremità "più" a strutture trasversali del citoscheletro note come dischi Z. Nella zona centrale del sarcomero i filamenti sottili si sovrappongono ai polimeri di miosina II (detti filamenti spessi, vedi oltre), che sono mantenuti in posizione da una proteina detta titina; questa, con un peso molecolare di 3 milioni di Daltons, costituisce la più grande catena polipeptidica finora identificata. La titina ha una struttura terziaria tale da conferirle una forma di molla; dato che le molecole di titina tengono uniti i filamenti di miosina ai dischi Z, si pensa mantengano i filamenti di miosina allineati e centrati nel sarcomero. Sezioni trasversali al microscopio elettronico di questa regione (Figura 5b) indicano che entrambi i tipi di filamenti sono interspaziati in un reticolo regolare nel quale ogni polimero di miosina è a contatto con sei filamenti di actina, e ogni filamento sottile con due polimeri di miosina.

2.2.1.2. Il muscolo liscio è formato da cellule distinte, unite le une alle altre meccanicamente da giunzioni aderenti ed elettricamente da connessioni. Nelle cellule del muscolo liscio l'arrangiamento spaziale di actina e miosina è coordinato da proteine del citoscheletro (vimentina e desmina) organizzate in filamenti intermedi. I filamenti sottili — in cui le proteine associate all'actina sono in parte diverse da quelle del muscolo striato — sono molto lunghi, collegati alla membrana cellulare da placche di adesione e ad altri filamenti di actina da corpi densi, che svolgono la stessa funzione delle linee Z del muscolo striato.

2.2.2. Filamenti spessi

Le proteine motrici muscolari sono le miosine II, formate da una catena pesante di circa 220.000 Daltons e due catene leggere regolatrici diverse fra loro, entrambe di peso molecolare compreso tra 15.000 e 22.000 Daltons. Le catene pesanti comprendono un dominio globulare N-terminale (testa), un dominio lineare C-terminale (coda) particolarmente lungo e, tra questi due, un dominio flessibile (cerniera) cui sono legate le catene leggere. Nelle teste delle miosine II esiste un sito di legame per l'ATP in grado di catalizzarne l'idrolisi, che si presenta come una larga fenditura della testa, e un sito in grado di legare l'actina, localizzato nella porzione distale della testa. Le α eliche che costituiscono le code delle catene pesanti tendono ad interagire due a due, formando gli aggregati bimolecolari tipici delle proteine di trasporto, aggregati che si possono ulteriormente associare dando luogo a strutture polimolecolari formate da un numero di molecole che va da una ventina nelle fibre da stress a circa 300 nel muscolo scheletrico (i filamenti spessi di cui sopra). In fine, dato che, in queste miosine l'asse delle teste è circa perpendicolare a quello delle code, nei polimeri le teste vengono a sporgere sulla loro "superficie", con un arrangiamento diverso nel muscolo scheletrico ed in quello liscio. Infatti, nel muscolo scheletrico la maggior parte del polimero è ricoperta dalle teste di miosina, spaziate regolarmente sia rispetto alla circonferenza che alla lunghezza (Figura 6). In questo caso gli aggregati di miosina sono nudi al centro e le teste si trovano alle estremità, intervallate regolarmente e ruotate l'una rispetto all'altra (B in Figura 6), appunto lasciando una zona centrale scoperta. L'arrangiamento del muscolo liscio non è molto differente: tuttavia, i filamenti spessi non sono nudi al centro e le teste della miosina possono o essere orientate in versi opposti, come nel muscolo striato, oppure tutte nello stesso verso. Naturalmente, a queste due disposizioni corrispondono anche differenti orientamenti dei filamenti sottili, cui corrispondono differenze nelle modalità di contrazione.

2.3. Filamenti sottili

Anche i filamenti sottili sono organizzati diversamente nel muscolo striato ed in quello liscio e sono soprattutto queste differenze ad rendere conto delle diverse modalità sia di contrazione che dei meccanismi di controllo nei due tipi di muscolo.

I filamenti sottili del muscolo striato sono composti dal doppio filamento di actina e da quattro proteine che sono alloggiare in entrambe le docce dell'actina: la tropomiosina e le tre troponine. La tropomiosina umana comprende 284 paia di residui di amminoacido, che formano due α eliche riunite in una coiled coil della lunghezza di 400 Å circa, ognuna delle quali — disposta nelle docce del filamento di actina — ricoprirebbe poco più di sette monomeri di actina G (che hanno una lunghezza di 55 Å). Dato, però, che ogni molecola di tropomiosina prende contatto C- N-terminale con altre due con leggera sovrapposizione, si formano catene continue che occupano entrambe le docce dei filamenti di actina, ricoprendone sette monomeri. Le troponine, non ostante l'identità del nome, sono tre proteine distinte, espresse indipendentemente l'una

dall'altra, chiamate T, I e C (T di legame con la tropomiosina, I inibitoria, C calcio-legante). Le troponine C e I formano un ammasso globulare, mentre la T, allungata, forma una sorta di coda. La troponina C è una forma muscolo-specifica di calmodulina (vedi "Note sui messaggeri intracellulari", § 3.1) che, come le altre calmoduline, ha quattro siti di legame per gli ioni Ca^{2+} ; inoltre, ha superfici di interazione per le troponine I e T. La troponina T che si lega alla tropomiosina e determina la posizione del complesso sul filamento di actina, mentre la I forma un legame instabile con l'actina. Come descritto oltre (§ 2.4), queste proteine consentono, o impediscono, le interazioni actina-miosina che determinano la contrazione muscolare. In fine, i filamenti sottili sono tenuti alla corretta distanza reciproca (35 nm, vedi Figura 5b) da molecole di α -actinina che, disposte perpendicolarmente ai filamenti di actina, li uniscono due a due.

Nel muscolo liscio i filamenti sottili sono simili a quelli appena descritti ma sono assai più lunghi che non nel muscolo striato, ciò che consente l'elevato grado di accorciamento che caratterizza questo tessuto. Inoltre, mancano le tre troponine: infatti, come riportato oltre (§ 2.4.2.1.), la contrazione del muscolo liscio è principalmente controllata dall'attività ATPasica della miosina. Sul filamento sono, invece, presenti due proteine (caldesmone e calponina) che agiscono come modulatori negativi.

2.3. Meccanismo della contrazione muscolare

In ogni polimero di miosina II muscolare (ossia in ogni filamento spesso) vi sono una ventina di teste per parte allineate lungo una generatrice (vedi Figura 6), che sono in grado di interagire (non contemporaneamente) con lo stesso filamento di actina. La contrazione avviene per scivolamento dei filamenti sottili su quelli spessi, inducendo un accorciamento di circa 5 nm (un monomero di actina) per ciclo.

Nel corso delle interazioni fra la miosina II e filamenti di actina, ogni monomero di miosina idrolizza una molecola di ATP per ciclo: l'energia così ottenuta porta la molecola in una conformazione dalla quale ritorna a quella di partenza tramite una serie ordinata di cambiamenti conformazionali che risultano nella conversione in movimento di parte dell'energia liberata dall'idrolisi dell'ATP. In questo modo, ogni filamento di miosina tenderebbe a spostarsi verso l'estremità "più" del filamento di actina. In effetti (vedi § 2.1.), la trazione esercitata dalle teste che si trovano dalle due parti del filamento e che sono orientate in senso opposto, comporta che i filamenti di miosina rimangano stazionari. Dato che le miosine non possono spostarsi, e posto che la forza esercitata dal muscolo sia maggiore della resistenza che si oppone al movimento, sono i filamenti di actina a spostarsi verso il centro del sarcomero; siccome questi filamenti sono inseriti sui dischi Z, il risultato finale è l'avvicinamento dei dischi Z, ossia l'accorciamento del sarcomero. Inoltre, quando una singola testa di miosina si stacca dal filamento di actina, questo continua a venire spostato dall'azione di altre teste dello stesso filamento spesso, la cui elasticità permette che le teste possano trovare il loro sito di legame sull'actina anche in presenza di piccole imprecisioni di allineamento.

Distinguendo gli eventi con numeri arabi e le conformazioni della miosina con numeri romani minuscoli e prendendo come inizio lo stato in cui la miosina è legata all'actina e il sito di legame per l'ATP non è occupato (conformazione i, detta di "rigor" perché corrispondente allo stato di *rigor mortis*), i cambiamenti conformazionali della miosina avvengono come segue: 1. una molecola di ATP si lega al suo sito di interazione sulla testa della miosina: l'equilibrio energetico della miosina a sito ATPasico occupato è ovviamente diverso da quello a sito non occupato: l'occupazione del sito per l'ATP induce quindi nella miosina un cambiamento conformazionale, portandola nella conformazione ii; per un effetto tipicamente allosterico, cambia anche la conformazione della superficie di interazione che mantiene il legame con l'actina: le interazioni con l'actina si riducono e 2. la miosina tende a dissociarsi dall'actina. Per considerazioni analoghe a quelle avanzate sopra, la conformazione della miosina dissociata dall'actina è differente da quella corrispondente allo stato associato: in questa nuova conformazione (conformazione iii), sempre per effetto allosterico, il sito catalitico viene a trovarsi nella sua conformazione attiva e può 3. catalizzare l'idrolisi dell'ATP legato. L'energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP porta la miosina in una conformazione corrispondente ad un massimo energetico (conformazione iv), in cui la miosina è nuovamente in grado di legarsi all'actina (4), ma i prodotti di idrolisi dell'ATP rimangono legati alla miosina. Questa, tuttavia, non si lega con il monomero di actina cui era legata ad inizio ciclo ma — dato che il filamento sottile è stato spostato verso il centro del sarcomero — si lega con un monomero di actina più vicino all'estremità "più" del filamento. Le interazioni con l'actina inducono un ulteriore cambiamento conformazionale della miosina: nella nuova conformazione (conformazione v), sempre per effetto allosterico, cambia anche la conformazione del sito di legame per l'ATP; in questa conformazione le interazioni con i prodotti di idrolisi dell'ATP sono ridotte e (5) questi tendono a dissociarsi dal loro sito di legame. Di nuovo, a sito di legame per l'ATP libero corrisponde una differente conformazione della miosina (conformazione vi),

che viene assunta tramite un cambiamento conformazionale (6) che comporta una rotazione di circa 40° della testa della miosina rispetto alla coda. Siccome la miosina è legata all'actina, questa rotazione tende a spostare i due filamenti l'uno rispetto all'altro. Come già accennato, la forza che tenderebbe a spostare una metà del filamento spesso in un verso è controbilanciata dalla forza che tenderebbe a spostare l'altra metà nel verso opposto e, quindi, sono i filamenti sottili a venire spostati verso il centro del sarcomero (ma vedi sotto). A questo punto del ciclo le condizioni (teste di miosina legate all'actina e sito di legame per l'ATP non occupato) sono di nuovo quelle di rigor (ossia, la conformazione 6 e la conformazione 1 sono identiche) e può ricominciare un nuovo ciclo. Come risultato, ad ogni ciclo (in condizioni di contrazione isotonica, vedi oltre), si ha uno scivolamento di circa 50 Å dei filamenti di actina verso il centro del sarcomero. Va tuttavia osservato che le molecole di miosina non agiscono singolarmente, ma assieme ad altre nell'organizzazione tridimensionale del sarcomero: infatti, come già riportato, ogni polimero di miosina è coordinato da sei filamenti di actina (Figure 6). Data la lunghezza dei filamenti spessi, in ogni sarcomero il numero di teste di miosina contemporaneamente in contatto con ogni filamento di actina è stimato a circa quaranta, con proporzionale aumento della forza della contrazione rispetto a quanto fornibile da una singola miosina.

È stato riportato sopra che, nel corso della contrazione, i filamenti sottili vengono spostati verso il centro del sarcomero. In effetti, ciò non è necessariamente vero, ma sono possibili le seguenti alternative: o uno dei filamenti interagenti si strappa, o le coppie di filamenti di actina interessati scorrono verso il centro del filamento spesso riducendo la lunghezza del sarcomero, oppure la lunghezza del sarcomero non varia. Il primo evento non si verifica perché il contenuto energetico dei legami che tengono associate le proteine che costituiscono entrambi i tipi di filamento è maggiore dell'energia totale che può essere fornita dai cambiamenti conformazionali contemporanei delle teste di miosina. Gli altri due eventi si verificano entrambi in proporzioni variabili. Se la forza generata dalle miosine è molto maggiore della resistenza, i sarcomeri si accorciano (quasi) liberamente, in quelle che si definiscono contrazioni isotoniche, cioè a forza costante. Se, al contrario, la resistenza è molto maggiore della forza generata dalle miosine, si genera una forza senza variazione della lunghezza dei sarcomeri (contrazioni isometriche, ossia senza variazione di lunghezza). Nella realtà, entrambi questi tipi di contrazione coesistono in proporzioni variabili a seconda del rapporto tra forza e resistenza. Inoltre, al contrario di quanto avviene nel muscolo liscio, caratterizzato da filamenti sottili molto lunghi che possono scorrere sui filamenti spessi con scarse limitazioni meccaniche, l'accorciamento del muscolo scheletrico è limitato dall'organizzazione in sarcomeri, soprattutto perché una sovrapposizione dei filamenti sottili altererebbe la disposizione ordinata dei filamenti (vedi Figura 5b). Il limitato accorciamento dei sarcomeri è tuttavia in grado di generare il necessario accorciamento dell'intero muscolo a causa dell'elevato numero di sarcomeri (nell'ordine delle decine di migliaia) che compongono le miofibrille, nonché e del numero di fibrocellule allineate nel senso della lunghezza del muscolo.

2.4. Il controllo della contrazione

In linea di principio, le interazioni fra miosina ed actina potrebbero proseguire senza interrompersi finché vi fosse ATP disponibile. In realtà la contrazione deve, ovviamente, essere controllata e ciò avviene in modo diverso nel muscolo striato ed in quello liscio.

2.4.1. Muscolo striato

2.4.1.1 Inizio. Nel muscolo striato la contrazione è controllata dall'inibizione delle interazioni actina - miosina operata da proteine che fanno parte dei filamenti sottili, ossia dalla tropomiosina e dalle troponine (vedi § 2.3.). Alle concentrazioni calciche basali, i siti di legame per il calcio della troponina C non sono occupati, le tre troponine e la tropomiosina sono legate fra loro e all'actina e la tropomiosina occupa parzialmente i siti dell'actina ai quali si legerebbe la miosina, inibendo queste interazioni per effetto sterico. Quando le concentrazioni calciche citoplasmatiche aumentano abbastanza perché una frazione significativa dei siti Ca^{2+} -leganti delle troponine C sia occupata, queste cambiano conformazione. A seguito di tale cambiamento conformazionale si modifica anche la conformazione delle superfici di interazione con la troponina I e T, inducendo un cambiamento conformazionale di queste ultime e, conseguentemente, anche della tropomiosina (che interagisce con la troponina T). La conformazione così assunta comporta un riarrangiamento dei siti di legame per l'actina della tropomiosina che cambia posizione sul filamento di actina, non bloccando più i siti per la miosina. Quindi, il ciclo di contrazione descritto al § 2.3. può aver luogo solo in presenza di concentrazioni calciche sufficientemente elevate. Nel muscolo striato le catene leggere della miosina non sono coinvolte nella regolazione della contrazione; tuttavia, la loro fosforilazione da parte di specifiche chinasi (chinasi delle catene leggere della miosina o MLCK) — a loro volta attivate dalla

calmodulina e, quindi, dall'aumento delle concentrazioni calciche — è in grado di modulare la forza di contrazione.

2.4.1.2. Fine. Dato quanto descritto, perché la contrazione abbia termine gli ioni Ca^{2+} devono essere rimossi dal citoplasma. Ciò avviene ad opera di varie proteine di trasporto, tra le quali il ruolo quantitativamente più importante è giocato da un' ATPasi calcio-dipendente della membrana del reticolo sarcoplasmatico (un'ATPasi di tipo P). In genere, la concentrazione citoplasmatica di ioni Ca^{2+} viene riportata ai livelli di base in 30 millisecondi circa. Pertanto, quando depolarizzazioni successive si susseguono con intervalli minori di quest'intervallo di tempo si determina l'insorgere del tetano, che costituisce il meccanismo fisiologico di contrazione del muscolo scheletrico.

2.4.1.3. Il controllo della forza di contrazione. In una fibrocellula muscolare scheletrica il potenziale di placca è sempre in grado di generare un potenziale d'azione e l'aumento delle concentrazioni calciche che ne consegue induce tutte le miofibrille a contrarsi quasi contemporaneamente. Pertanto, la contrazione della singola fibrocellula non può essere graduata (come avviene, invece, nel muscolo liscio), ma questa si contrae sempre al massimo delle sue possibilità e la regolazione principale avviene sull'intero muscolo, variando il numero di fibrocellule che si contraggono. Tuttavia, dato che un singolo motoneurone innerva sempre più di una fibrocellula (l'insieme del motoneurone e delle fibrocellule innervate da questo si chiama unità motoria), questo "reclutamento" (come viene classicamente definito) può solo avvenire coinvolgendo un numero discreto di unità motorie, con modalità differenti a seconda dello sforzo richiesto, i cui dettagli esulano dallo scopo di queste dispense. Va però osservato che un ulteriore elemento di controllo è fornito dalla fosforilazione delle catene leggere riportata sopra (§ 4.1.1.).

2.4.1.4. Un quadro integrato. Nell'organismo, l'ingresso di ioni Ca^{2+} nel citoplasma della fibrocellula del muscolo striato è indotto da un segnale che origina dal relativo motoneurone e arriva alla sinapsi liberando acetilcolina. Questa si lega ai suoi recettori (i recettori nicotinici), stabilizzandone la conformazione a canale aperto e, quindi, aumentando la permeabilità della membrana sostanzialmente agli ioni Na^+ e generando un potenziale locale. Questo induce l'apertura di canali sodici a controllo di potenziale dando inizio ad un fenomeno autosostenuto (lo spostamento verso la positività del potenziale intracellulare fa aprire altri canali e così via) che si sotanzia in un potenziale d'azione. La relativa depolarizzazione (cioè una positività interna) si propaga rapidamente ai tubuli T che si estendono verso l'interno dalla membrana plasmatica della fibrocellula e viene trasmessa al reticolo sarcoplasmatico. Infatti, nella regione giunzionale esiste un complesso funzionale costituito da canali calcici ad alta conduttanza, i così detti recettori per la rianodina (RyR, vedi: "Note sui canali ionici, § 2.3.1) e dai (sempre così detti) recettori per la diidropiridina. I primi sono inseriti nella membrana del reticolo sarcoplasmatico, i secondi nella membrana dei tubuli T. La depolarizzazione dei tubuli T induce un cambiamento conformazionale nei recettori per la diidropiridina, la cui conformazione è voltaggio-dipendente, e questo cambiamento conformazionale induce l'apertura dei recettori per la rianodina. Ciò, presumibilmente, avviene tramite un accoppiamento meccanico tra le due molecole che sono inserite in membrane differenti, ma a stretto contatto tra loro. Va tuttavia osservato che l'accoppiamento meccanico tra DHPR e RyR, proposto fin dal 1973, non è ancora stato dimostrato sperimentalmente. I recettori per la rianodina sono canali calcici calcio-dipendenti (il loro stato di apertura è controllato sia dall'accoppiamento con i recettori per la diidropiridina che dalle concentrazioni calciche) caratterizzati da flussi ionici estremamente elevati, flussi che si autoamplificano a causa della calcio-dipendenza del canale. Gli ioni Ca^{2+} , seguendo il loro potenziale elettrochimico, escono dal reticolo sarcoplasmatico e provocano l'apertura di altri canali calcici, altri recettori per la rianodina compresi, così innalzando bruscamente le concentrazioni calciche citoplasmatiche e permettendo la contrazione, come descritto (§ 2.4.1.1). Inoltre, la presenza dei tubuli T comporta che il segnale elettrico si trasmetta molto rapidamente (in pochi millisecondi) nella fibrocellula. Dato che questo lasso di tempo è piccolo rispetto alla durata della contrazione (il potenziale d'azione delle fibrocellule striate ha una durata media di 30 millisecondi), le differenze dell'istante di inizio della contrazione delle varie miofibrille di una fibrocellula risulta fisiologicamente trascurabile.

2.4.2. Muscolo liscio

2.4.2.1. Contrazione. Anche nel muscolo liscio il segnale intracellulare finale è costituito da un aumento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche e le interazioni molecolari che determinano la contrazione sono identiche a quelle descritte sopra per il muscolo striato. Sono, al contrario, specifici di questo tessuto i meccanismi di controllo della contrazione, come anche la sua capacità di rispondere a molteplici parametri. Infatti — oltre che a seguito della depolarizzazione causata dalle afferenze nervose — la contrazione può

essere indotta da segnali ormonali e paracrini. I recettori di questi ultimi sono costituiti o da canali calcici a controllo di ligando, la cui apertura induce direttamente un aumento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche, o da recettori accoppiati alle proteine G che inducono l'apertura di canali calcici, spesso tramite fosforilazione dei canali stessi. Come accennato oltre, recettori accoppiati alle proteine G possono anche agire come modulatori, attivando gli enzimi (MLCP) che catalizzano la defosforilazione delle catene leggere della miosina. Ancora, per la presenza di canali calcici cronicamente aperti, alcune cellule muscolari lisce possono contrarsi in modo autonomo (ossia indipendente da segnali esterni), mentre la presenza di canali a controllo meccanico permette di generare una contrazione autonoma (ossia, anche in questo caso, indipendente da segnali esterni) a seguito di stiramento della cellula.

Per quanto concerne il controllo della contrazione, nel muscolo liscio i siti ATPasici della catena pesante della miosina sono normalmente inattivi, ed è appunto la loro attivazione Ca^{2+} -dipendente che permette l'inizio della contrazione. Eccetto che in presenza di automatismo, la contrazione ha inizio quando una delle varie afferenze cui si è accennato sopra induce l'apertura di canali calcici, in questo caso localizzati soprattutto nella membrana plasmatica in corrispondenza della caveole (nel muscolo liscio il contributo del reticolo sarcoplasmatico è modesto). L'aumento della concentrazione citoplasmatica di ioni Ca^{2+} permette che questi ioni si leghino alla calmodulina libera nel citoplasma, facendole assumere una conformazione nella quale è in grado di legarsi ad un enzima, la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK), attivandolo. Quando le concentrazioni calciche citoplasmatiche sono abbastanza elevate perché i siti calcio-leganti di una quantità significativa di molecole di calmodulina sia occupata, una quantità corrispondente di molecole di MLCK può catalizzare la fosforilazione di una delle due catene leggere della miosina (la catena P): l'aggiunta di gruppi fosforici ai residui interessati (soprattutto Thr_{18} e Ser_{19}) induce un cambiamento conformazionale della catena P; il conseguente cambiamento della conformazione delle superfici di interazione con la catena pesante induce un cambiamento della conformazione del sito ATPasico di questa, attivandolo e, quindi, permettendo l'idrolisi dell'ATP e l'inizio di un ciclo di interazioni con l'actina. Date queste modalità, l'attivazione della contrazione risulta proporzionale alle concentrazioni calciche, anziché "tutto o nulla" come nel muscolo scheletrico. La fosforilazione delle catene leggere avviene molto lentamente, così che una contrazione massimale può essere raggiunta dopo molte centinaia di millisecondi. Inoltre, l'idrolisi dell'ATP catalizzata dalle isoforme di miosina presenti nel muscolo liscio è circa un ordine di grandezza più lenta che nel muscolo scheletrico. Questi due fattori sono, quindi, responsabili della lentezza della contrazione che si riscontra nel muscolo liscio. Pertanto, non solo la possibilità, ma anche l'intensità della contrazione risultano funzione della concentrazione calcica intracellulare: infatti, all'aumentare di questa aumenta anche il numero molecole di calmodulina che possono interagire con le molecole di MLCK e, quindi, la quantità di ATP che può venire idrolizzata.

La fosforilazione della miosina da parte della MLCK Ca^{2+} /calmodulina-dipendente costituisce il meccanismo di regolazione primario del muscolo liscio. Tuttavia, come nel muscolo scheletrico, esistono altri meccanismi — direttamente o indirettamente Ca^{2+} -dipendenti — che svolgono un ruolo essenzialmente modulatorio. Due proteine associate ai filamenti di actina, il caldesmone e la calponina, sono, entrambe, in grado di inibire in modo Ca^{2+} -dipendente (tramite la calmodulina) le interazioni miosina-actina in modo circa analogo all'azione della tropomiosina nel muscolo scheletrico, agendo così da inibitori della contrazione. La contrazione del muscolo liscio è anche modulata da recettori metabotopici (a sette segmenti transmembrana) i cui effettori finali sono le fosfatasi della catena leggera della miosina (MLCP), ossia gli enzimi responsabili dei fenomeni di rilascio (vedi sotto).

2.4.2.1.2. Rilasciamento. Le modalità di attivazione descritte sopra comportano che il rilascio delle cellule muscolari lisce sia un processo polifasico: infatti, il Ca^{2+} dev'essere rimosso dal citoplasma per azione di trasportatori, i più importanti dei quali sono un'ATPasi Ca^{2+} -dipendente ed uno scambiatore sodio-calcio. Tuttavia, dato che la fosforilazione induce nelle catene leggere una modifica covalente, e quindi non reversibile, l'abbassamento delle concentrazioni calciche citoplasmatiche non è sufficiente ad indurre il rilascio. Perché ciò avvenga, le catene leggere della miosina devono essere defosforilate da una specifica fosfatasi, appunto la MLCP. In effetti, il ruolo di quest'enzima è anche più complesso. Come accennato sopra, queste fosfatasi sono infatti controllate anche da afferenze extracellulari mediate da recettori a sette segmenti: il loro stato di attivazione può, quindi, modulare la contrazione in opposizione alle MLCK in modo teoricamente indipendente dai livelli calcici intracellulari. In fine, va notato che la defosforilazione della miosina non provoca necessariamente il rilascio: infatti, il legame actina - miosina è controllato dallo stato del sito ATPasico (vedi § 2.3): quindi, la miosina — anche defosforilata — può rimanere legata all'actina in uno stato noto come stato bloccato. Questa condizione può mantenere la contrazione della cellula muscolare senza consumare ATP, e costituisce un fattore presumibilmente importante nel determinare la capacità del muscolo liscio di mantenere una contrazione sostenuta senza

andare incontro a fatica.

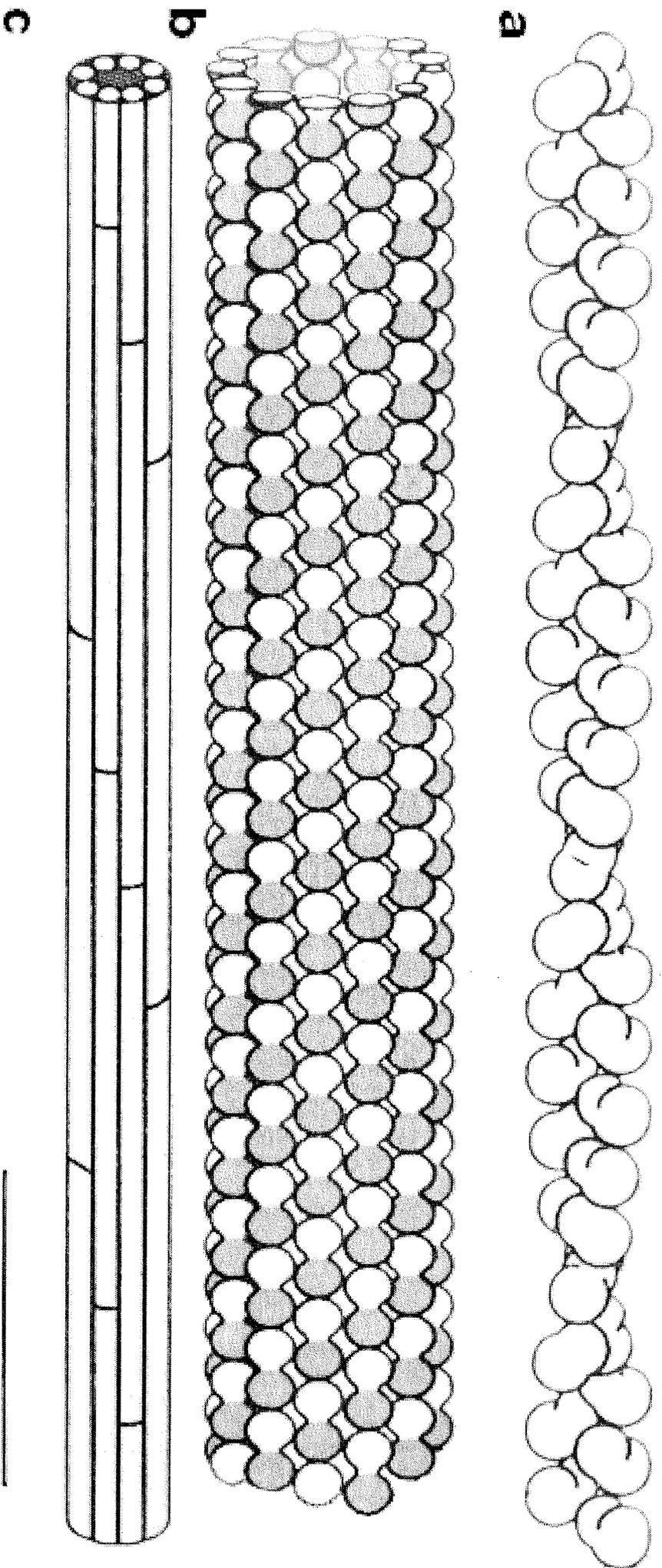


Figura 1. I tre tipi di filamenti endocellulari. Schema tridimensionale di: un filamento di actina (a), un microtubulo (b), un filamento intermedio (c). I filamenti di actina sono formati da monomeri globulari uguali fra loro, i microtubuli da monomeri, anch'essi globulari, ma diversi fra loro (tubulina α e tubulina β , schematizzati da due toni di grigio, i filamenti intermedi da monomeri lineari assemblati in tetrameri che costituiscono le unità riportate nello schema. La barra orizzontale equivale a 25 μm .



Figura 2a. Modello a nastri di un monomero di α actina. Le spirali rappresentano α eliche, le frecce piani β , i tondini porzioni a struttura secondaria non definita. Al centro é rappresentata una molecola di ATP. Dalle due parti della fenditura centrale (in alto) sono identificabili i due domini, simili ma non identici.



Figura 2b. Schema della disposizione dei monomeri di actina (actina G) in un filamento di actina (actina F). Le linee spesse indicano i monomeri in primo piano, le linee sottili i monomeri sottostanti. I tre monomeri centrali sono rappresentati anche come modello a nastri.

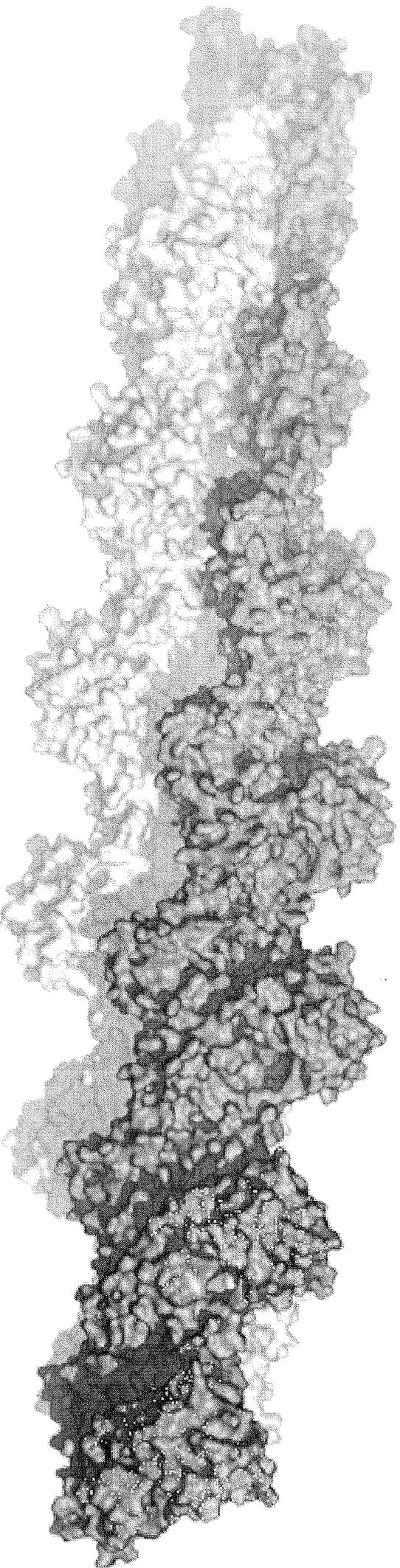


Figura 2c. Modello a spazio pieno di una sezione di un filamento di actina. I monomeri delle due file sono rappresentati in differenti toni di grigio.

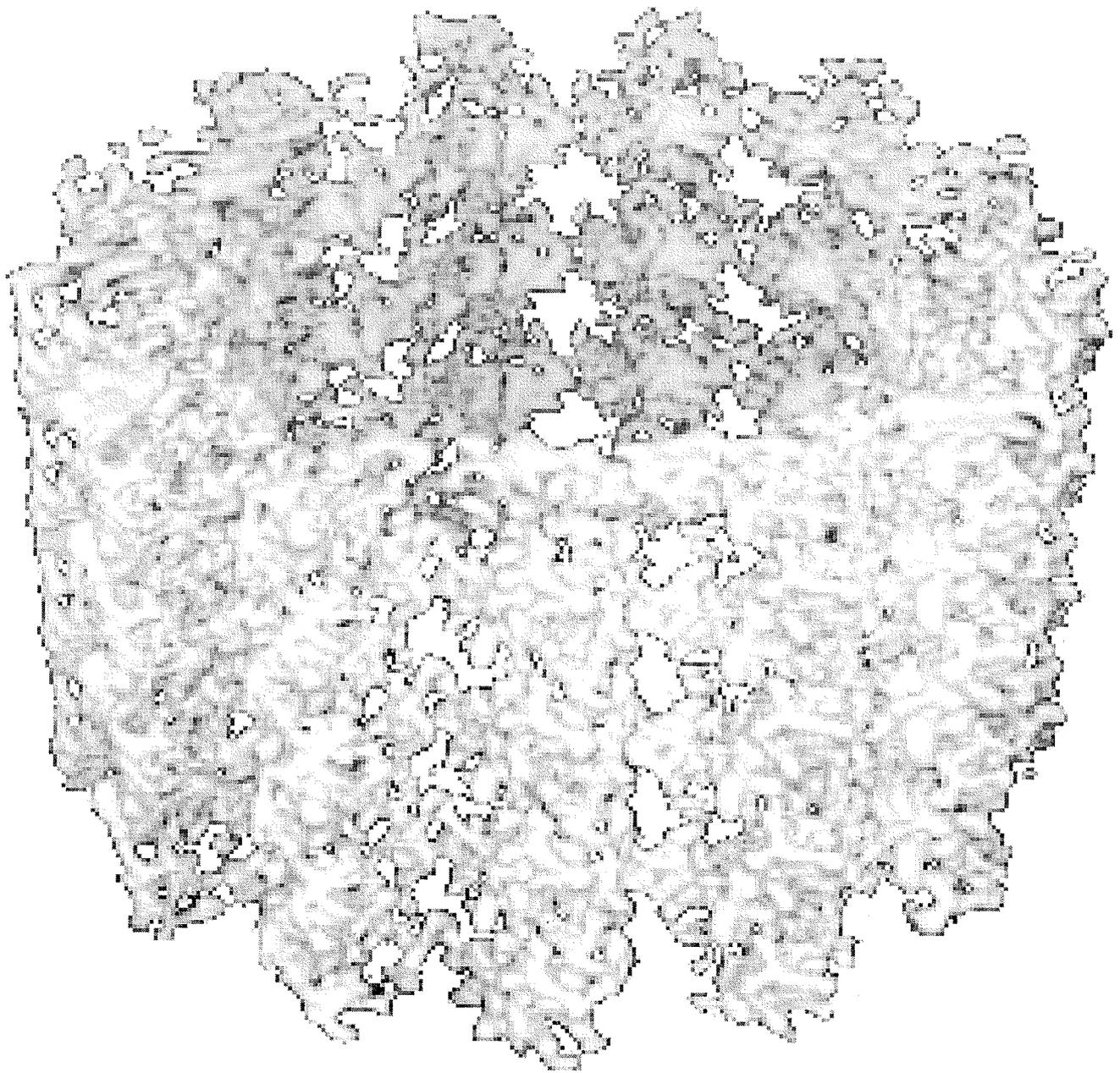


Figura 3. Modello a spazio pieno di una sezione di un microtubulo. Risulta evidente come i monomeri di α e β tubulina (non distinti fra loro) lascino spazi vuoti nella formazione del microtubulo.

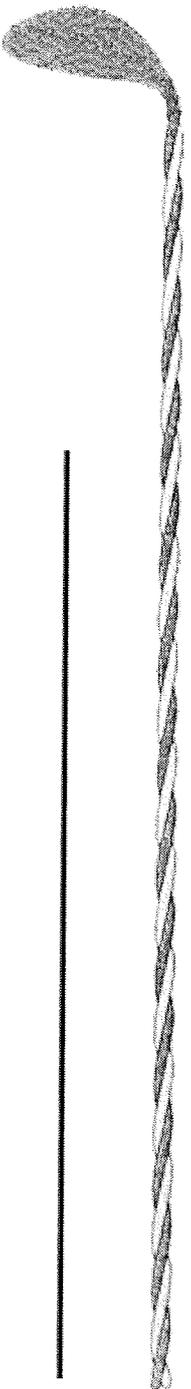
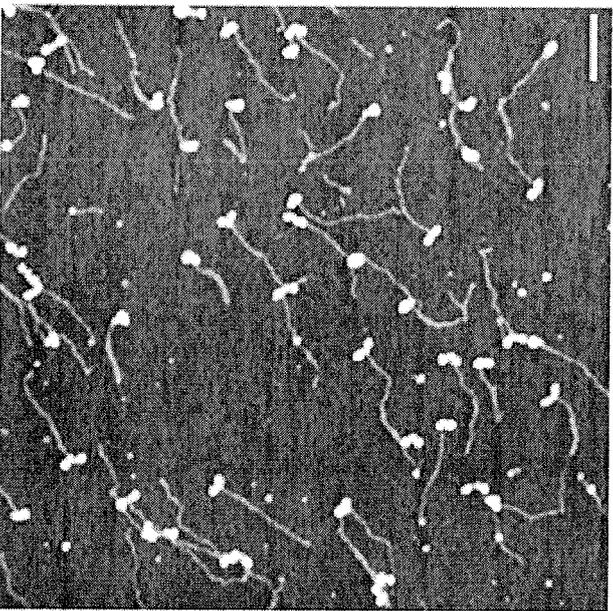


Figura 4a Immagini al microscopio elettronico (a sinistra) e schema (a destra) di miosina II. Nello schema le due molecole, unite dalla "coiled coil" formata dai domini lineari, sono rappresentate con differenti livelli di grigio. In entrambi i casi i segmenti equivalgono a 100 μm .

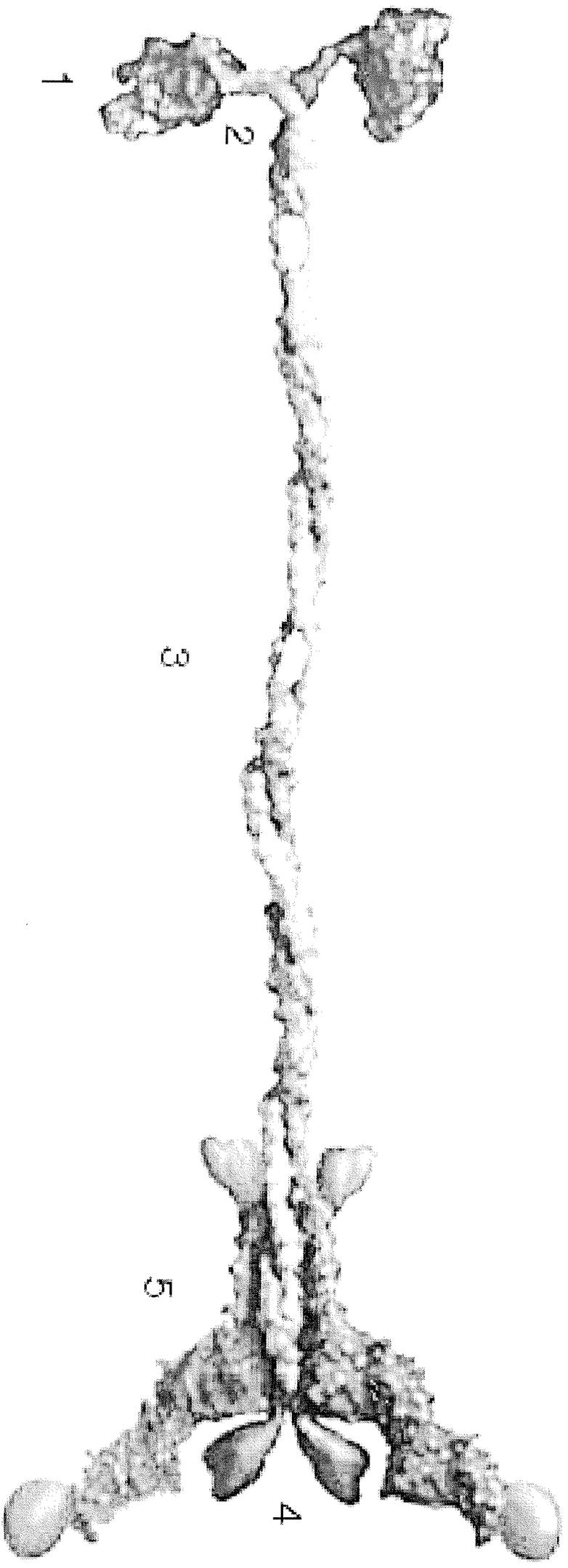


Figura 4b Rappresentazione a spazio pieno di un dimerico di chinesina. I numeri identificano: 1 dominio motore, 2 dominio flessibile, 3 dominio α elicoidale, 4 dominio di coda, 5 catene leggere. I domini α elicoidali sono uniti a formare una "coiled coil", i domini di coda legano il carico mentre le catene leggere modulano l'affinità del legame con il carico.

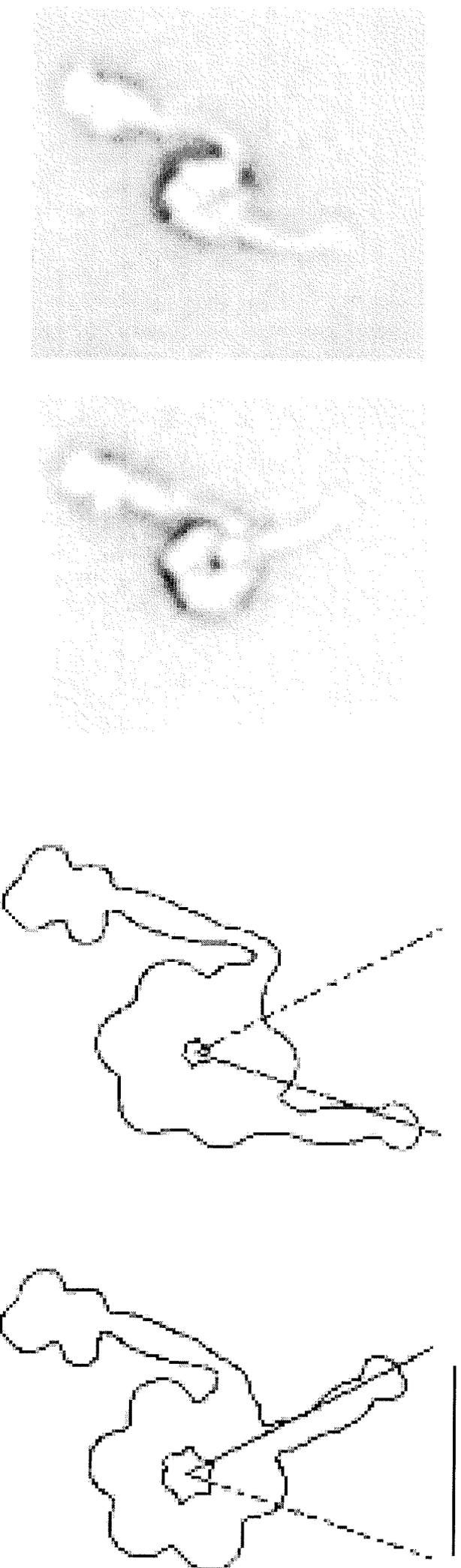


Figura 4c. Immagini al microscopio elettronico (a sinistra) e relativi schemi (a destra) dell' dineina ciliare di *Chlamydomonas reinhardtii* visualizzati in due (supporti) differenti stati conformazionali. Sono visibili: al centro l'anello costituito da 6 moduli ATP-asiici AAA; in basso il peduncolo cui si lega il carico, composto da varie subunità; in alto il peduncolo che si lega ai microtubuli. La rotazione dell'anello di ATPasi indotta dall'idrolisi di una molecola di ATP dovrebbe permettere una variazione di circa 45° dell'angolo formato dai due peduncoli (dalla conformazione a sinistra a quella a destra) dovrebbe generare uno spostamento di 16 nm verso sinistra, indicato dalla barra in alto. Trattandosi di una dineina ciliare, lo spostamento riguarda un microtubulo rispetto ad un altro; il funzionamento delle dineine citoplasmatiche potrebbe essere differente.

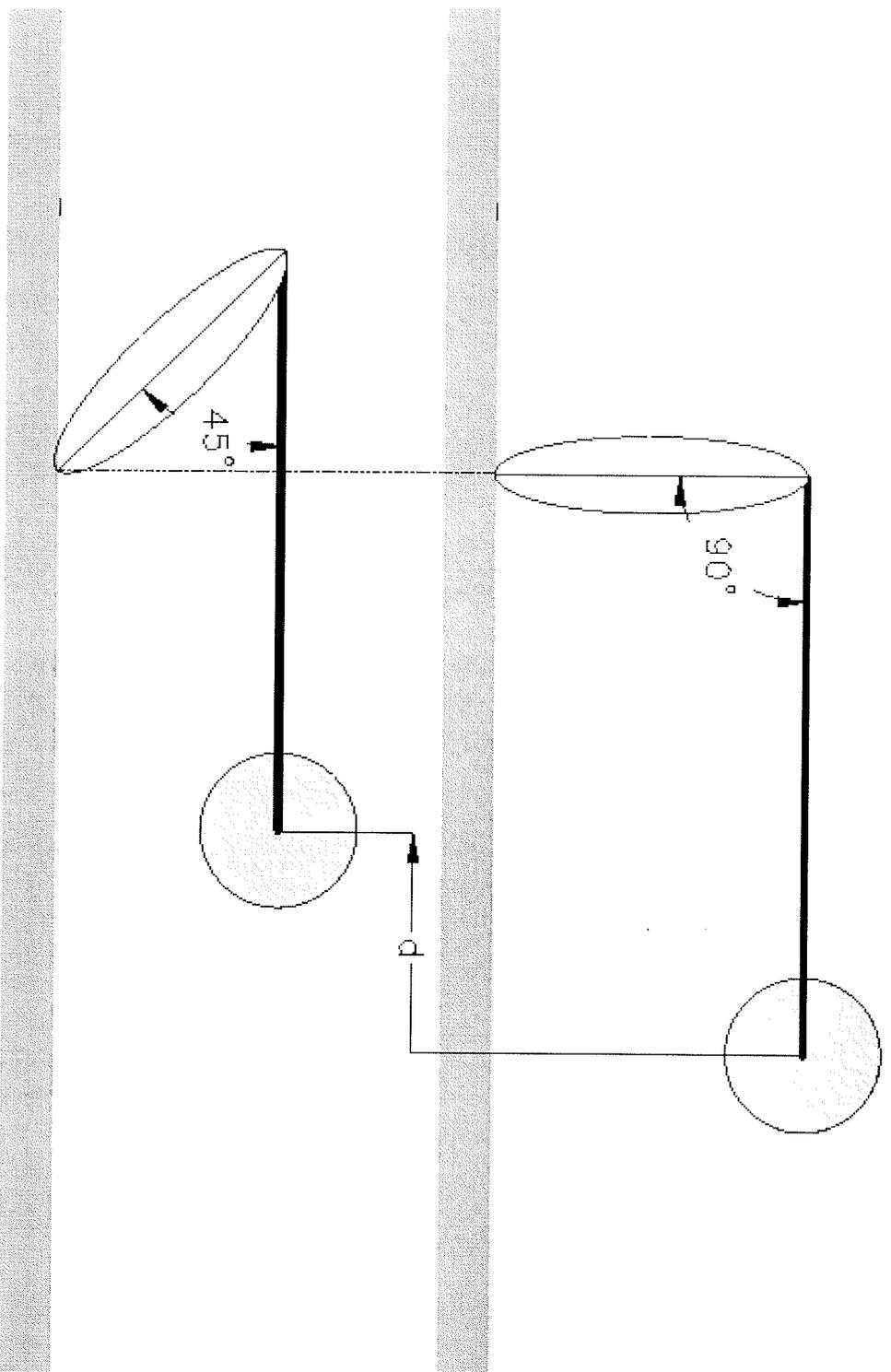


Figura 4d. Schema del movimento di un monomero di miosina o chinesina. Dato che la testa rimane stazionaria sul filamento proteico, la riduzione dell'angolo formato tra la testa (ellisse) e la coda (barra scura) comporta uno spostamento verso sinistra della coda, e quindi, del carico (cerchio grigio) pari a "d". La banda grigia orizzontale rappresenta il filamento associato. È rappresentata solo la metà di un passo, che sarebbe completato dall'altra metà del complesso (non mostrata).

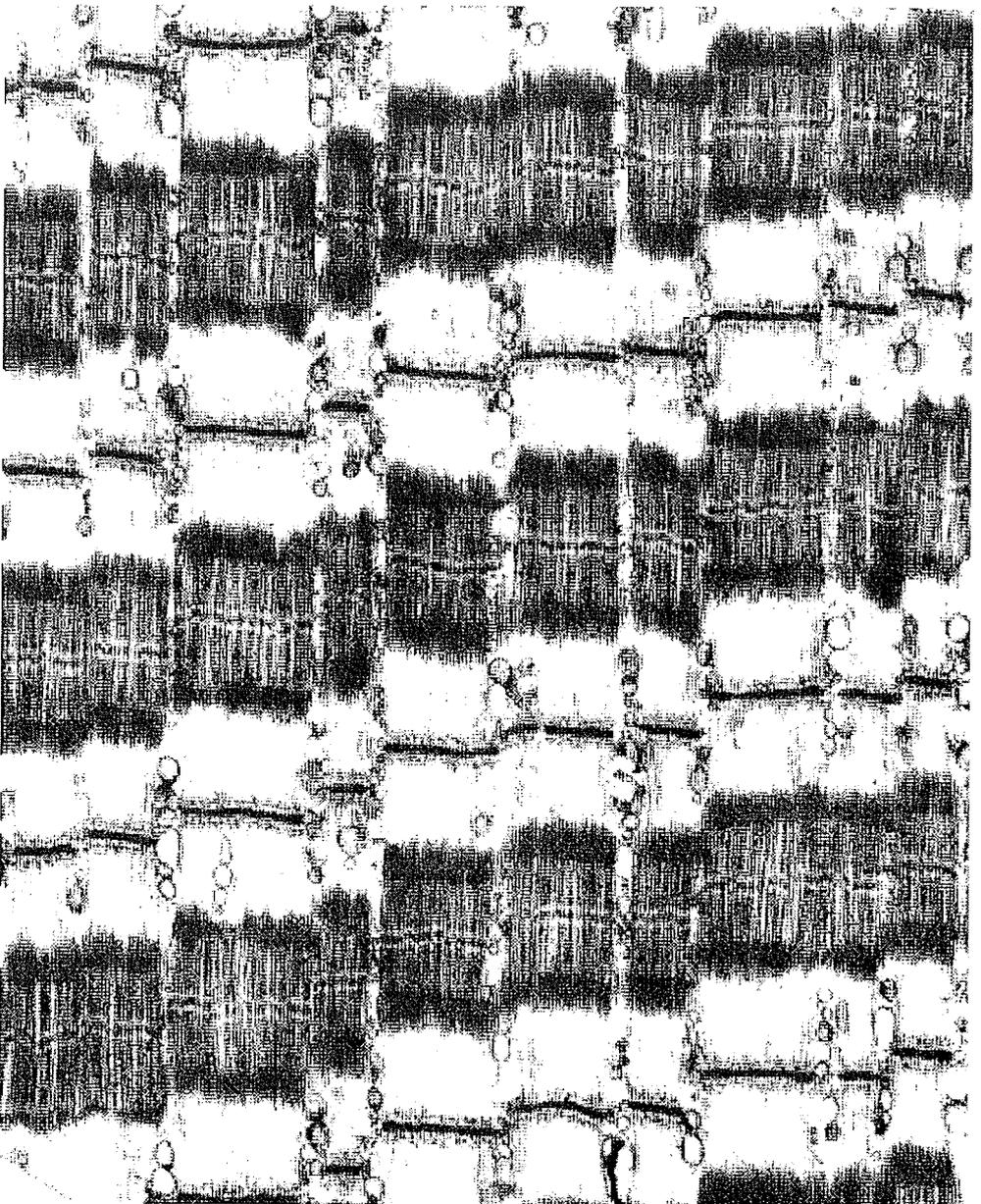
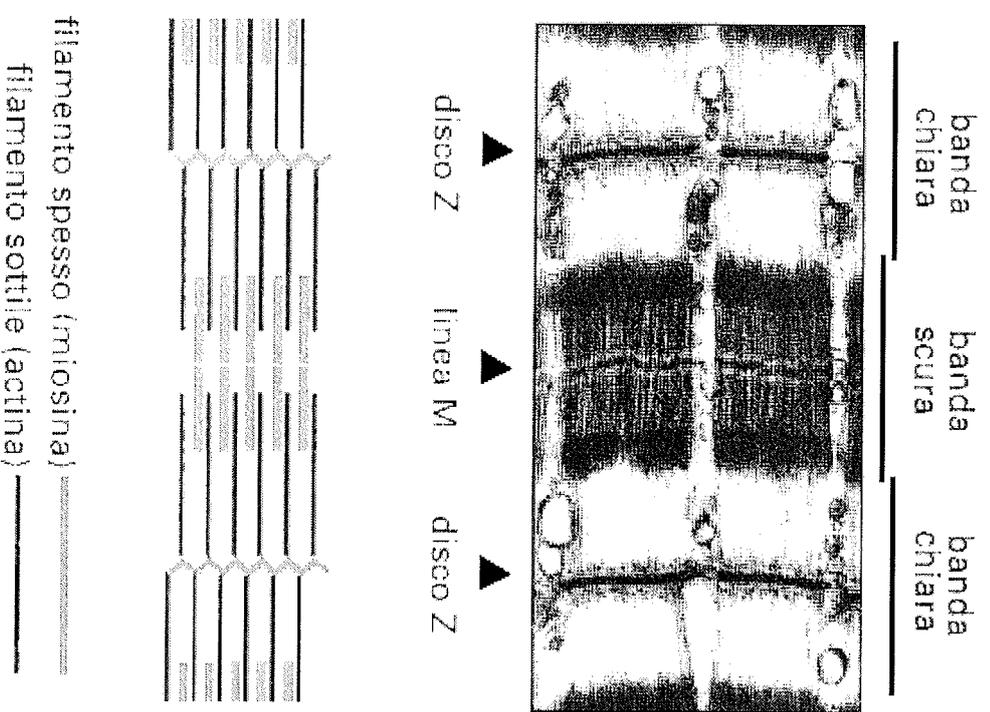


Figura 5a. Miofibrille viste al microscopio elettronico in sezione longitudinale. L'immagine a sinistra mostra alcune miofibrille sovrapposte in una fibrocellula. A destra in alto è rappresentato un dettaglio di due sarcomeri sovrapposti, a destra in basso lo schema di un singolo sarcomero.



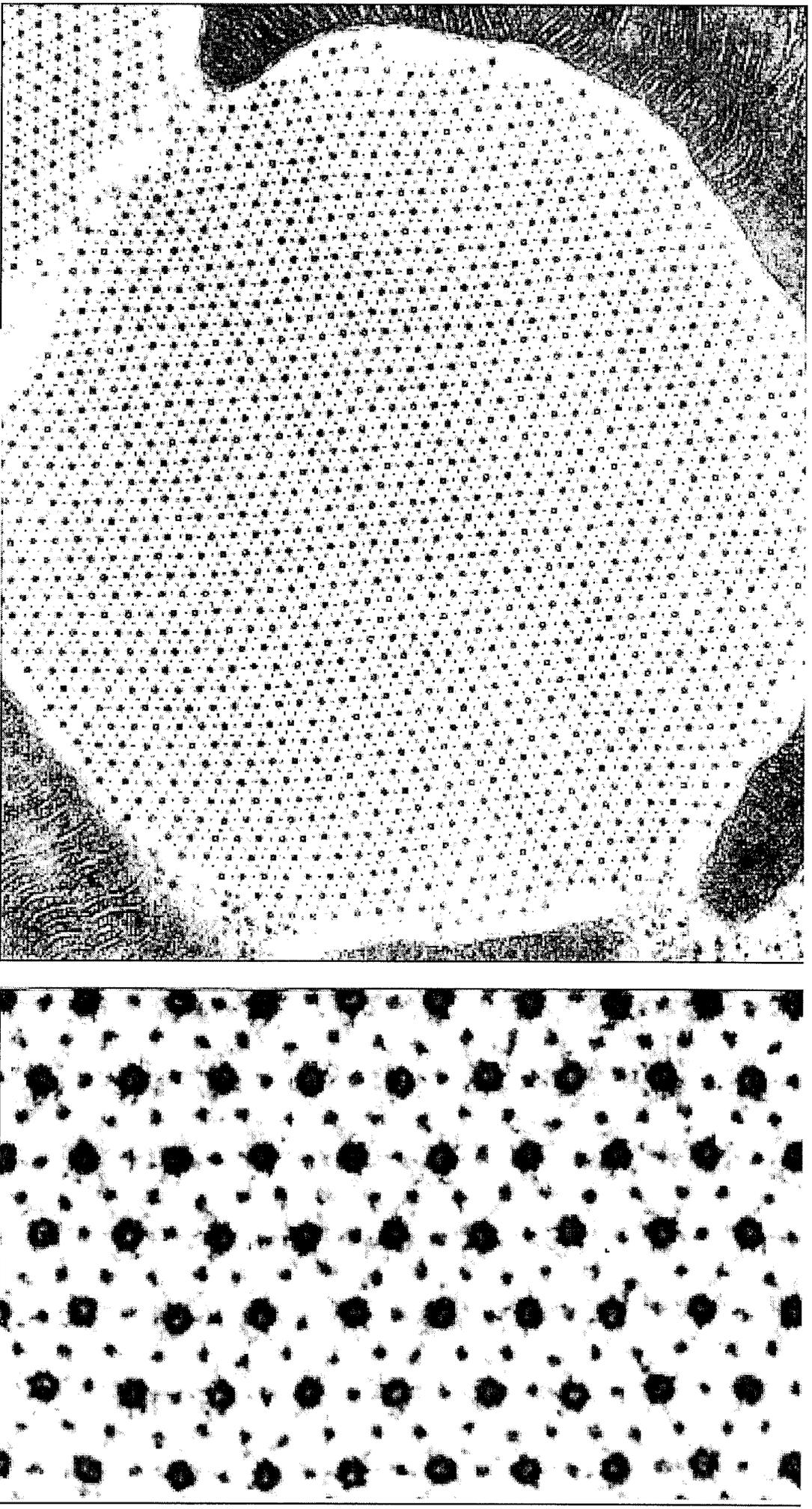
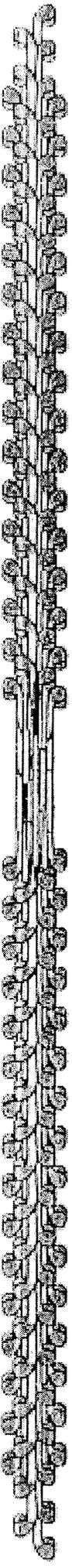
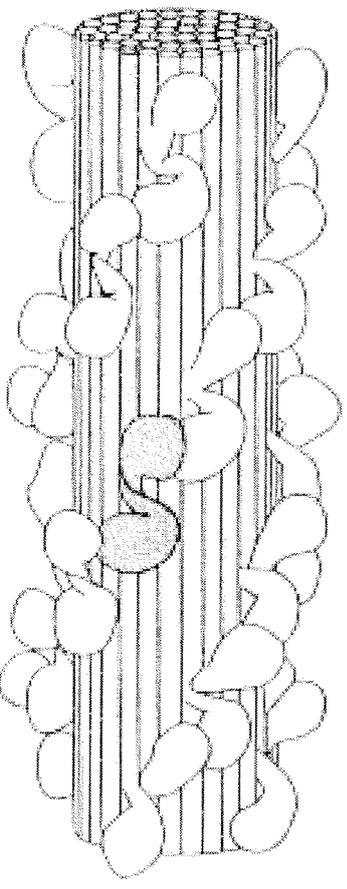


Figura 5b. Sezioni trasversali di una miofibrilla vista al microscopio elettronico. L'immagine a sinistra mostra la sezione di un'intera miofibrilla, quella a destra un dettaglio ingrandito. Si può notare come ogni filamento di miosina (spesso) sia circondato da 6 filamenti di actina (sottili), e come ogni filamento di actina sia in contatto con 2 filamenti di miosina.



A

Figura 6. Rappresentazione schematica di un filamento spesso di muscolo striato. In **A** è rappresentato il filamento, con le teste orientate in direzione opposta dalle due parti della zona nuda centrale e sfalsate fra loro rispetto sia alla lunghezza che alla circonferenza del filamento. In **B** è rappresentato un dettaglio che mostra le coppie di teste dei singoli aggregati, uno dei quali evidenziato in grigio.



10 nm

B