

Membrane biologiche

- Caratteristiche generali
- Struttura della membrana: modello a mosaico fluido
- Distribuzione dei lipidi di membrana
- Proteine di membrana
- Meccanismo di secrezione
- Endocitosi mediata da recettore
- Trasporto attraverso le membrane

Francesca Anna Scaramuzzo, PhD

Dipartimento di Scienze di Base e Applicate per l'Ingegneria - Centro di Nanotecnologie Applicate all'Ingegneria

francesca.scaramuzzo@uniroma1.it

Generalità

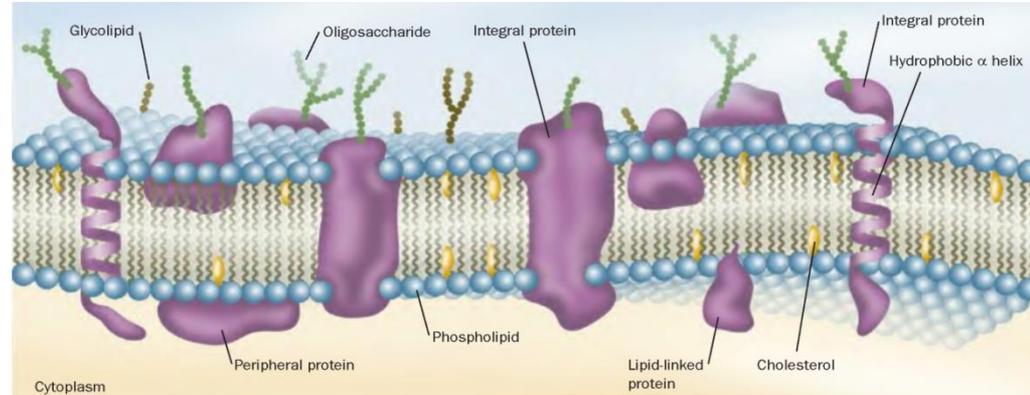
- Separano le cellule dall'ambiente extra-cellulare
- Delimitano gli organelli delle cellule eucariotiche
- Permettono marcate differenze di concentrazione dei soluti in compartimenti vicini
- Contengono sia lipidi sia proteine
- Sono asimmetriche

Le proteine di membrana: generalità

- Varie per forma e grandezza
- Integrali o periferiche
- Proteine legate ai lipidi
- Rapporto proteine/lipidi variabile a seconda delle membrane

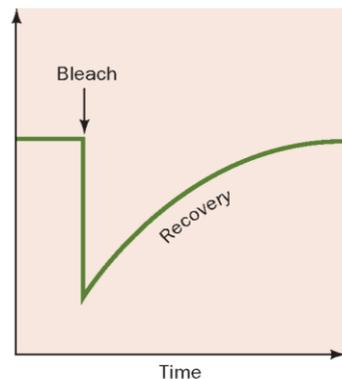
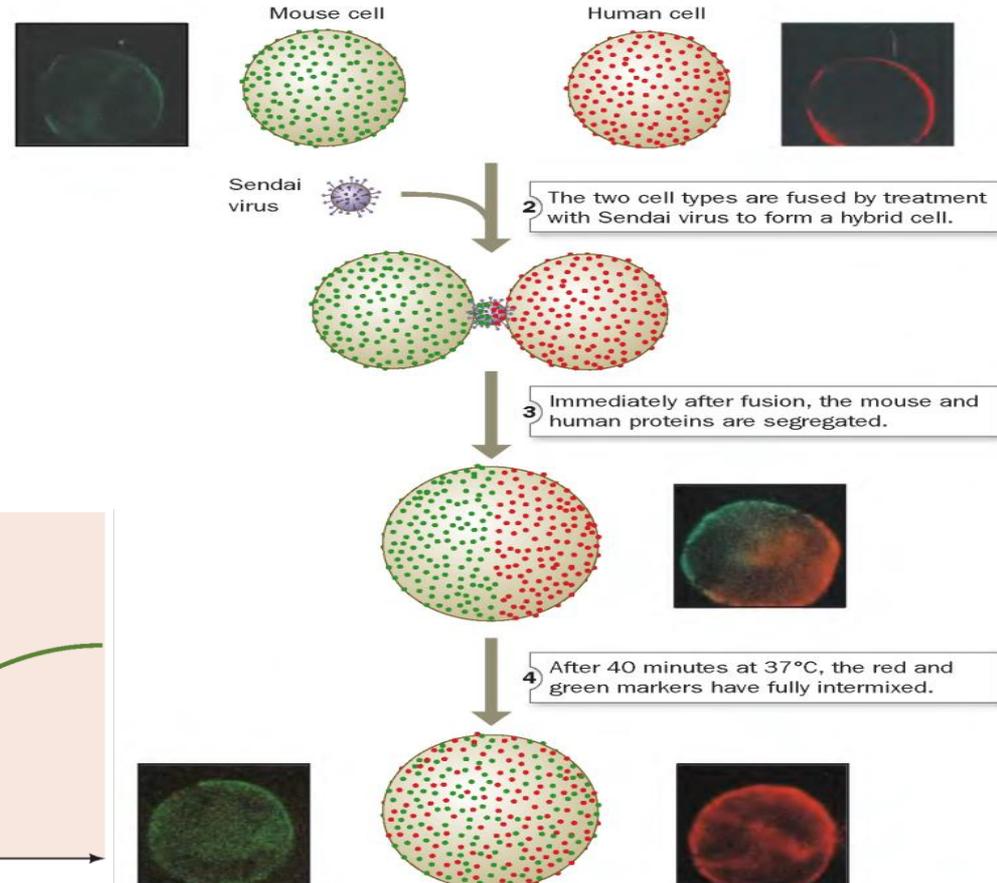
Struttura della membrana

- Comportamento simile a quello dei doppi strati lipidici artificiali
- **Modello a mosaico fluido** (Singer, Nicolson, 1972)
- Le proteine integrali si muovono come iceberg nel mare lipidico bidimensionale



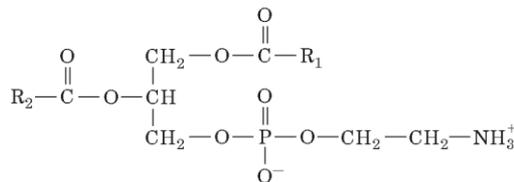
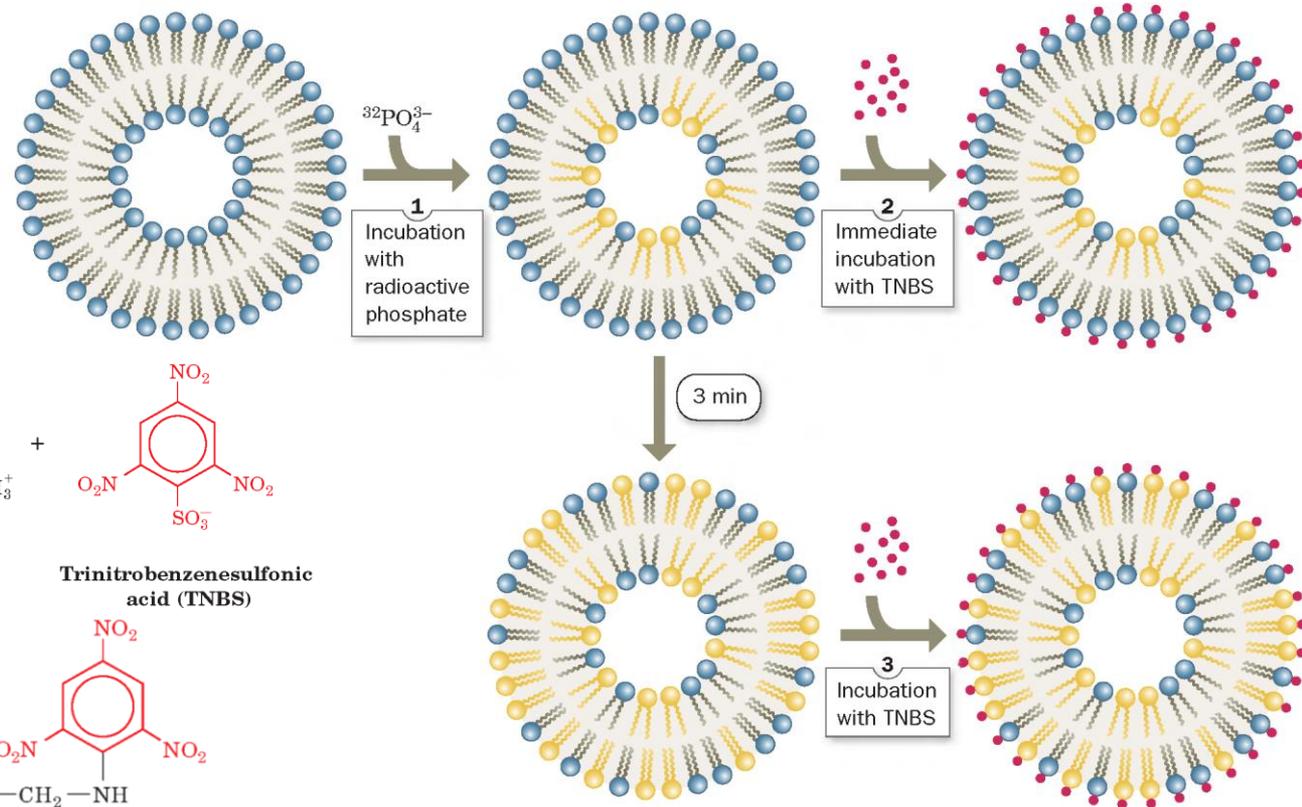
Aspetti sperimentali

- Freeze-fracture (freeze-etching): membrana congelata in azoto liquido e fratturata
- Analisi al microscopio elettronico: la faccia interna della membrana è ricca di proteine di membrana, la faccia esterna è più liscia
- Recupero della fluorescenza inattivata dalla luce
- Fusione di cellule in coltura

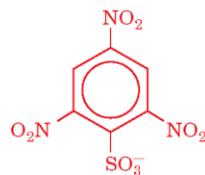


Distribuzione dei lipidi di membrana

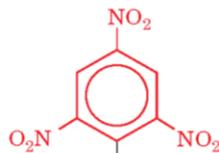
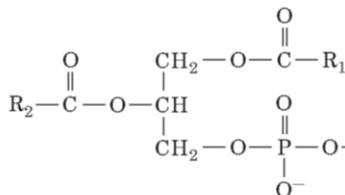
- I componenti della membrana sono orientati
- I due lati della membrana differiscono per composizione e funzione
- Glicolipidi e glicoproteine rivolgono i carboidrati verso l'esterno
- I lipidi sono distribuiti in modo asimmetrico
- I lipidi sono sintetizzati dalla parte della faccia citosolica
- Il flip-flop nella membrana batterica è 10^5 volte più rapido di quello in semplice doppio strato lipidico (flipasi per diffusione facilitata e fosfolipidi translocasi per trasporto attivo)
- Nuove membrane generate dall'espansione di membrane esistenti



Phosphatidylethanolamine (PE)

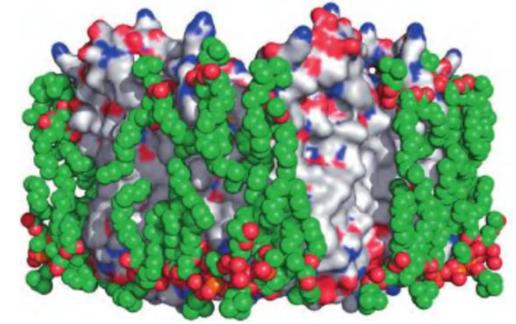


Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)



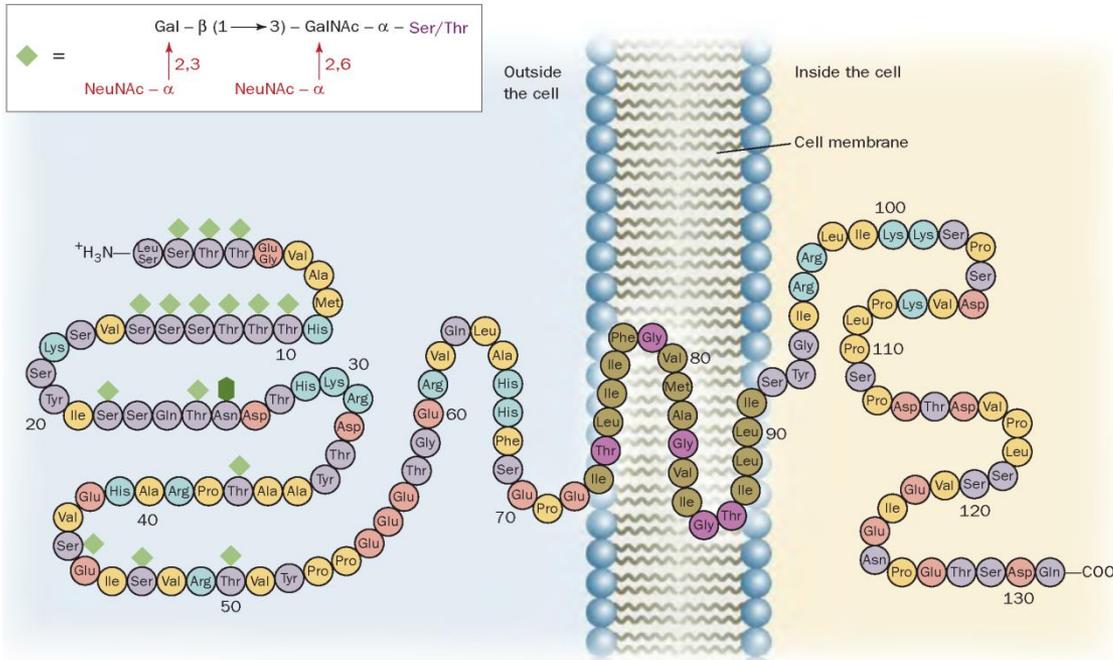
Proteine integrali di membrana

- Legate alla membrana da interazioni idrofobiche
- Separabili tramite detergenti o in condizioni denaturanti
- Si aggregano e precipitano in soluzione acquosa
- Sono anfifiliche



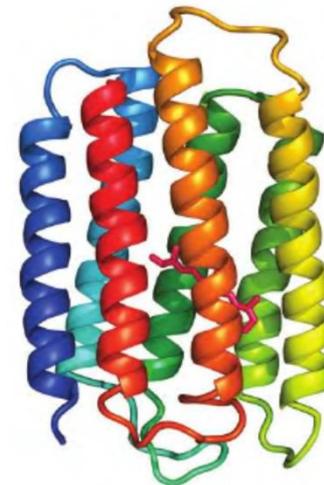
Glicoforina A

- Proteina transmembrana della membrana eritrocitaria
- Elica transmembrana



Batteriorodopsina

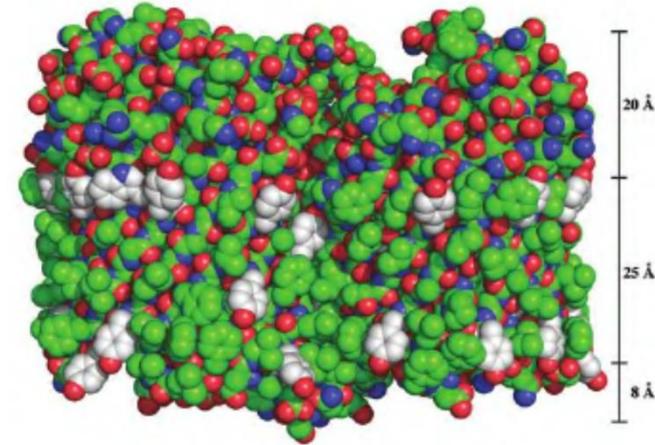
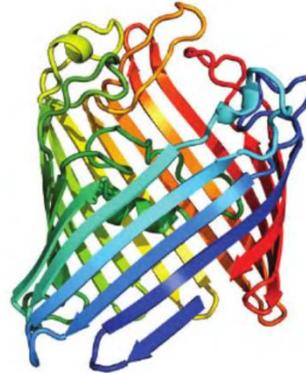
- 247 residui
- Pompa protonica alimentata dalla luce
- Lys 216 è legata a **retinale**
- Proteina a 7 tratti transmembrana
- α eliche antiparallele perpendicolari al piano della membrana



Proteine integrali di membrana

Porine

- Formano canali nella membrana esterna dei batteri gram-negativi
- Hanno struttura a barile β
- Permettono il passaggio di piccole molecole



Proteine periferiche di membrana (estrinseche)

- Separabili dalla membrana per variazioni di pH o forza ionica
- Non si legano ai lipidi
- Sono idrosolubili
- Si legano alla superficie della membrana e/o a proteine integrali tramite interazioni elettrostatiche e legami idrogeno

Esempio: **Citocromo c**

Proteine legate a lipidi

- Legate covalentemente a lipidi per l'ancoraggio alla membrana
- Il lipide media le interazioni proteina-proteina
- I lipidi più comuni sono acidi grassi, fosfatidilinositolo, lipidi con unità isopreniche

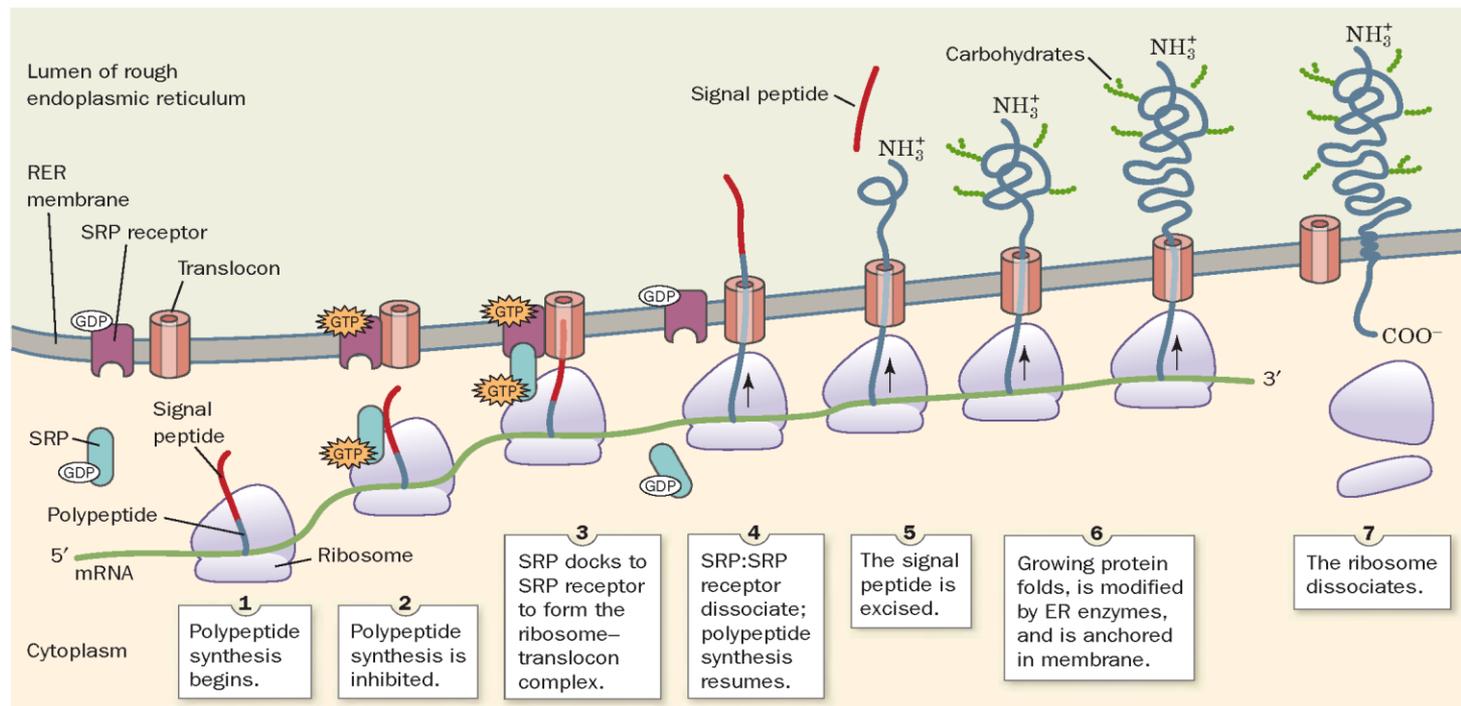
Meccanismo di secrezione

- Le proteine di membrana non cambiano il loro orientamento
- Proteine transmembrana e da incorporare nei lisosomi sono sintetizzate da ribosomi legati a reticolo endoplasmatico ruvido (RER)
- La catena si allunga da N-terminale a C-terminale

Ipotesi del segnale

- Si sintetizza prima un peptide segnale di 13-36 aa
- Un complesso polipeptide-RNA (particella di riconoscimento del segnale SRP) si lega al peptide, ne inibisce la crescita e diffonde verso il RER
- Il complesso si lega al recettore per SRP e il peptide passa nel lume del RER attraverso una proteina transmembrana e si riattiva la sintesi

- SRP si dissocia dal suo recettore
- Il peptide segnale viene rimosso
- La sintesi del peptide termina
- Le proteine transmembrana restano immerse nelle membrana del RE con C-terminale verso il citosol



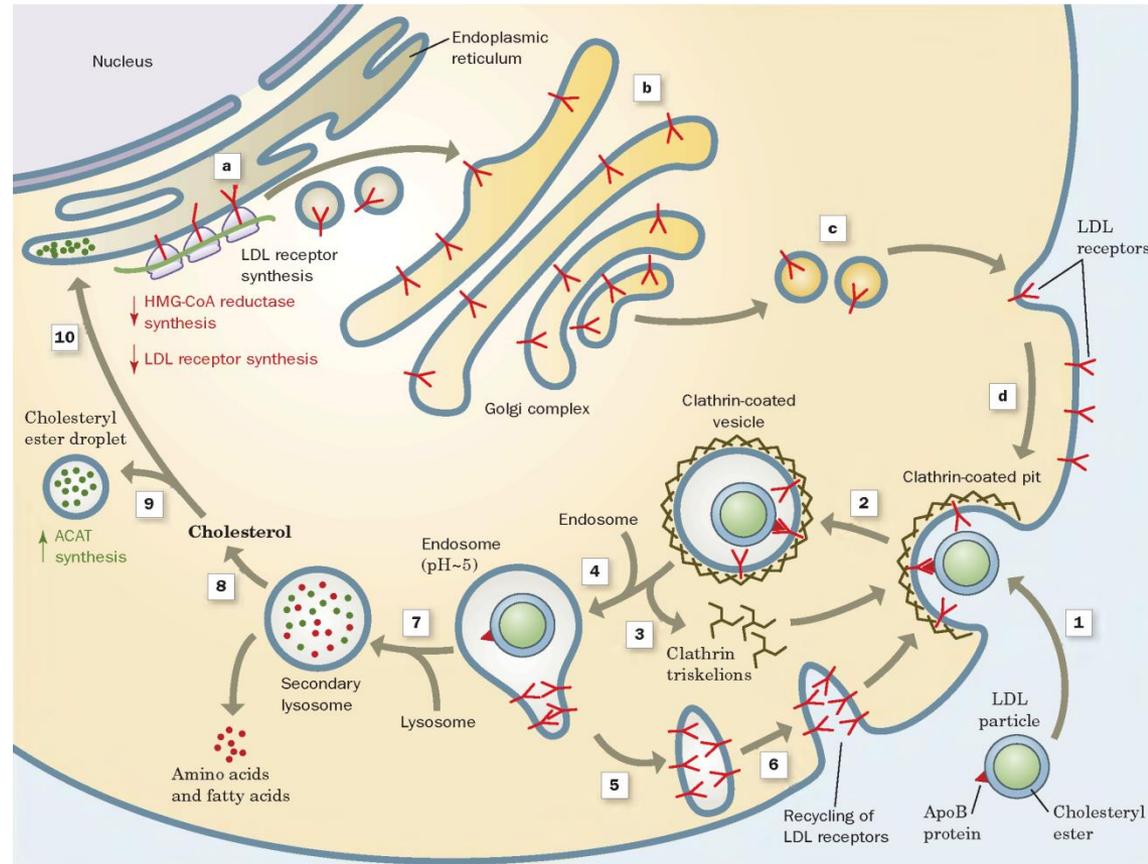
Endocitosi mediata da recettore

Esempio: **assunzione di colesterolo esogeno**

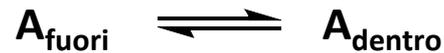
Lipoproteine

- Particelle globulari tipo micelle con nucleo apolare di triacilgliceroli ed esteri del colesterolo ed esterno anfifilico di proteine, fosfolipidi e colesterolo (es. LDL, HDL)

- LDL si associano ai loro recettori sulla membrana
- La membrana cellulare con i recettori si ripiega su se stessa
- Si formano vescicole rivestite di clatrina che si fondono con gli endosomi
- Il pH degli endosomi induce il rilascio delle LDL da parte dei recettori
- L'endosoma si fonde con un lisosoma, in cui LDL viene degradato per ottenere il colesterolo



Trasporto attraverso le membrane



Si può trattare come un equilibrio chimico

$$\bar{G}_A - \bar{G}_A^\circ = RT \ln[A]$$

- \bar{G}_A = potenziale chimico di A (energia libera molare parziale)
- \bar{G}_A° = potenziale chimico dello stato standard

$$\Delta\bar{G}_A = \bar{G}_{A_{\text{dentro}}} - \bar{G}_{A_{\text{fuori}}} = RT \ln \frac{[A]_{\text{dentro}}}{[A]_{\text{fuori}}}$$

- Se $[A]_{\text{fuori}} > [A]_{\text{dentro}}$, $\Delta\bar{G}_A < 0$ e A fluisce spontaneamente dall'esterno all'interno
- Se $[A]_{\text{fuori}} < [A]_{\text{dentro}}$, $\Delta\bar{G}_A > 0$ e A può fluire verso l'interno solo in presenza di un processo esoergonico (es. idrolisi ATP)

Nel caso di ioni, al trasporto di massa è associato un trasporto di carica

$$\Delta\Psi = \Psi_{\text{dentro}} - \Psi_{\text{fuori}}$$

- $\Delta\Psi$ = potenziale di membrana

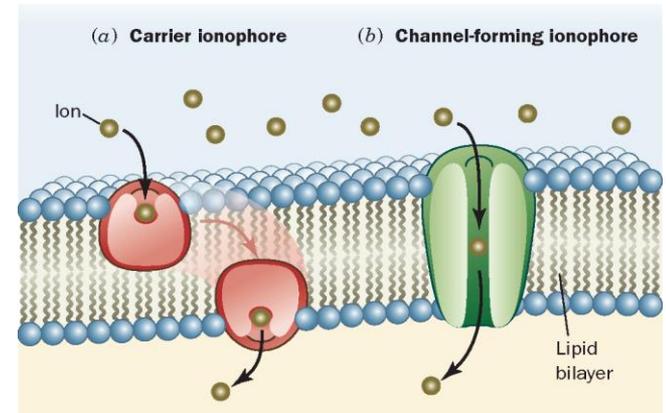
$$\Delta\bar{G}_A = RT \ln \frac{[A]_{\text{dentro}}}{[A]_{\text{fuori}}} + Z_A \mathfrak{F} \Delta\Psi$$

- Z_A = carica ionica di A
- \mathfrak{F} = costante di Faraday = 96485 C mol^{-1}
- \bar{G}_A = potenziale elettrochimico

- Trasporto non mediato: avviene per diffusione secondo gradiente di potenziale chimico
- Trasporto passivo mediato (diffusione facilitata): secondo gradiente di potenziale chimico
- Trasporto attivo: avviene contro gradiente di potenziale chimico. È endoergonico e va accoppiato a processo esoergonico

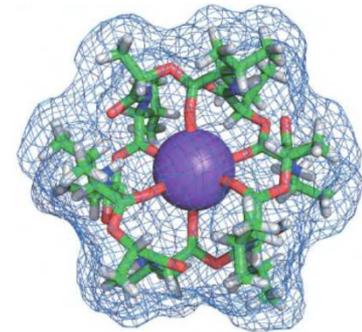
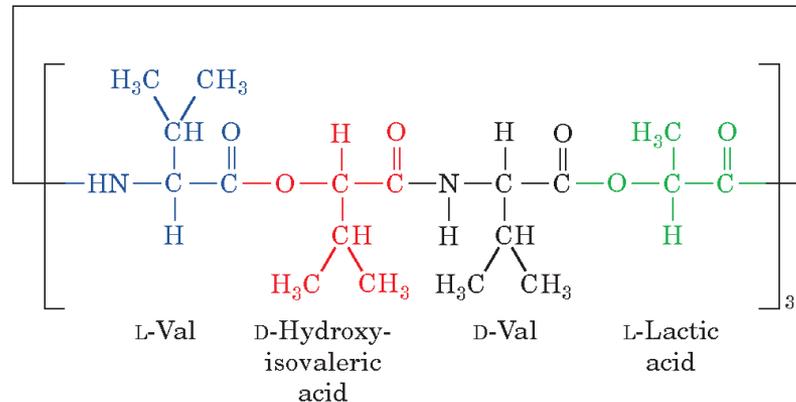
Trasporto passivo mediato

- Ionofori: Molecole che aumentano la permeabilità delle membrane agli ioni
- Ionofori Trasportatori: legano ione all'esterno, attraversano la membrana e lo rilasciano all'interno. I loro complessi ionici sono solubili in solventi non polari
- Ionofori formatori di canali: formano pori o canali transmembrana



Valinomicina

- Si lega specificamente a K^+
- Coordinazione ottaedrica da 6 Val
- Esterno idrofobico
- Trasferisce $10^4 K^+/s$



Gramicidina A

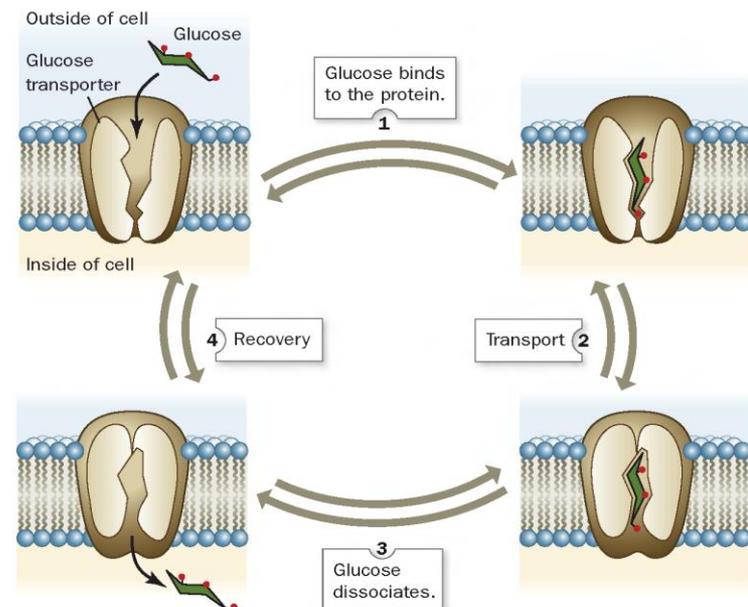
- Alterna L e D aa idrofobici
- Forma eliche unite testa-testa a formare un canale transmembrana
- Trasferisce $10^7 K^+/s$

Trasporto passivo mediato

- L'orientazione definita delle proteine integrali di membrana non le rende adatte al trasporto per diffusione

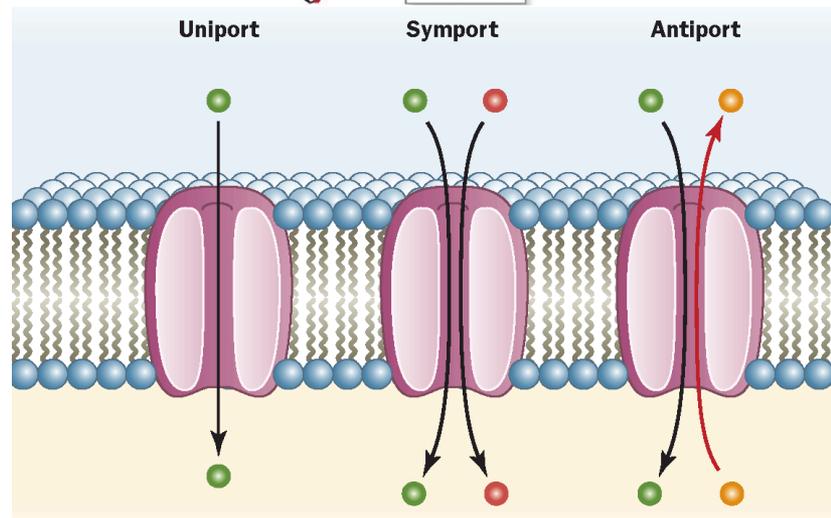
Trasportatore di glucosio degli eritrociti

- 55 kDa
- 12 eliche transmembrana
- Cilindro idrofilico circondato da cilindro idrofobico
- Siti di legame per il glucosio su entrambi i lati della membrana
- Due conformazioni possibili
- Trasporto del glucosio in entrambe le direzioni



Tipi di trasporto mediato

- Uniporto: una sola molecola per volta
- Simporto: due molecole simultaneamente nella stessa direzione
- Antiporto: due molecole contemporaneamente ma in direzioni opposte



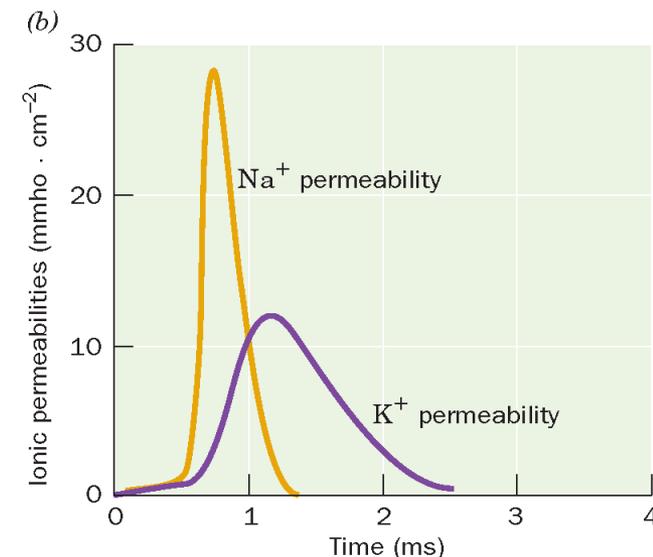
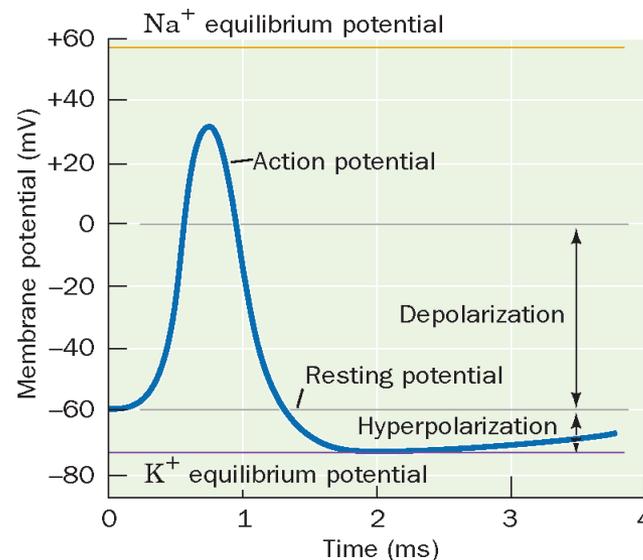
Canali ionici

- Contenuti in tutte le cellule
- Permettono il passaggio di anioni e cationi
- Nelle cellule dei mammiferi la distribuzione di carica non è omogenea
- Si aprono a seguito di stimoli specifici (e.g. stress meccanici, neurotrasmettitori, legame con ioni, variazione potenziale di membrana)

Ione	$C_{\text{citoplasma}} / \text{mM}$	$C_{\text{extracell}} / \text{mM}$	Permeabilità ($\text{cm s}^{-1} 10^9$)
K^+	140	4	500
Na^+	12	150	5
Cl^-	4	116	10

Canali ionici voltaggio dipendenti

- Contenuti in tutte le cellule eccitabili elettricamente
- Uno stimolo determina apertura canali Na^+ che entra nella cellula con depolarizzazione della membrana
- Di conseguenza, si aprono canali K^+ che esce dalla cellula con iperpolarizzazione della membrana



Trasporto attivo guidato da ATP

- Trasporto attivo primario: trasporto attivo di cationi (contro gradiente)
- Trasporto attivo secondario: una pompa ionica genera un gradiente elettrochimico e l'energia così ottenuta viene utilizzata per trasportare una molecola neutra contro gradiente

(Na⁺-K⁺)-ATPasi

- Nella membrana plasmatica degli eucarioti superiori
- Modello trasporto attivo

Ca²⁺-ATPasi

- Ca²⁺ attiva il metabolismo ossidativo
- [Ca²⁺] influenza contrazione muscolare, rilascio neurotrasmettitori, demolizione glicogeno
- [Ca²⁺]_{citosol} = 0.1 μM; [Ca²⁺]_{ext} = 1500 μM
- La pompa del Ca²⁺ mantiene il gradiente con idrolisi di ATP

(H⁺-K⁺)-ATPasi

- Nella mucosa gastrica, pH = 0.8; pH_{citosol} = 7.4

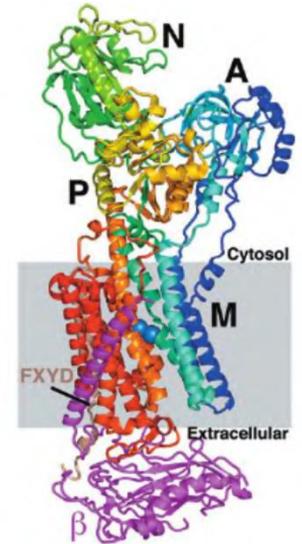


- H⁺ sono pompati fuori, K⁺ entrano nella cellula

Pompa Na⁺-K⁺

Pompa gli ioni Na⁺ verso l'esterno e gli ioni K⁺ all'interno con idrolisi di ATP intracellulare

- Subunità α non glicosilata di 110 kDa con attività catalitica e siti che legano gli ioni
- Subunità β (glicoproteina) di circa 55kDa facilita l'inserimento di α nella membrana
- α ha 8 eliche transmembrana e due domini citoplasmatici
- β ha 1 elica transmembrana e un dominio extracellulare



- Agisce come antiporto
- Genera separazione di carica attraverso la membrana
- Consente alle cellule animali di controllare osmoticamente il loro contenuto di acqua
- Genera un gradiente elettrochimico responsabile dell'eccitabilità elettrica delle cellule nervose
- Ha due stati conformazionali E_1 e E_2
- ATP fosforila la proteina (Asp) in presenza di ioni Na⁺, l'Asp-fosforilato viene idrolizzato in presenza di K⁺

Pompa Na⁺-K⁺

Pompa gli ioni Na⁺ verso l'esterno e gli ioni K⁺ all'interno con idrolisi di ATP intracellulare



- La proteina in E₁ lega 3Na⁺ e ATP
- L'idrolisi di ATP forma un intermedio aspartil fosfato
- L'intermedio passa alla conformazione a bassa energia E₂ rilasciando 3Na⁺ fuori dalla cellula
- Il complesso E₂ -P lega 2K⁺
- Il gruppo fosforico viene idrolizzato
- E₂ cambia conformazione e rilascia 2K⁺ all'interno della cellula

