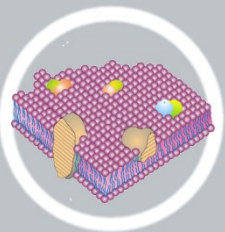


Modulo A2

Le membrane biologiche e i processi di membrana

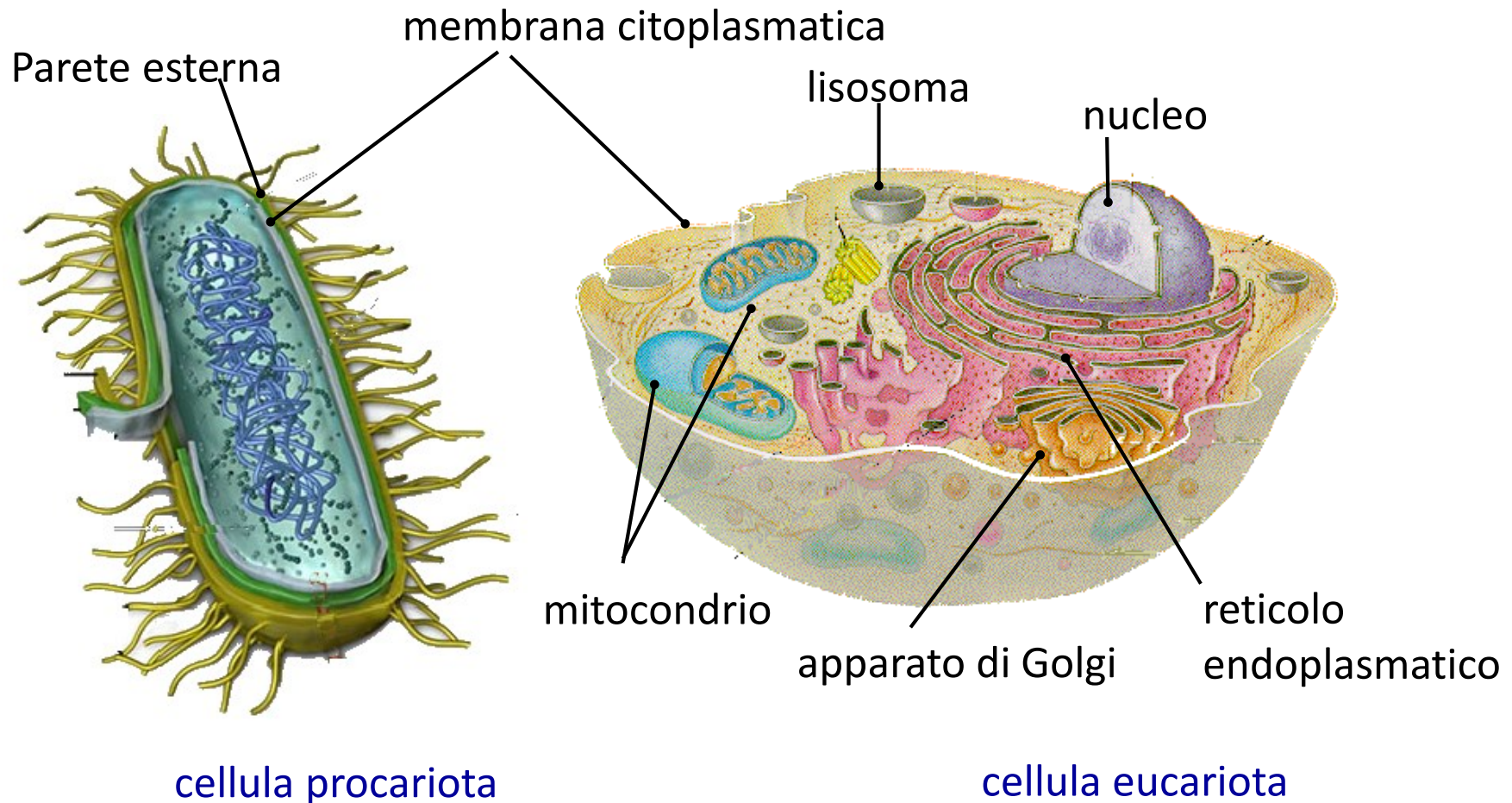


Modulo A2_A Le membrane biologiche

2023-24

Le membrane biologiche - Ripasso

- Le membrane biologiche sono una componente fondamentale delle pareti cellulari :
 - nelle cellule eucariotiche delimitano anche i compartimenti intracellulari (nucleo, reticolo endoplasmatico, mitocondri, ecc.)



Funzioni delle membrane biologiche

► Le membrane biologiche hanno diverse importanti funzioni:

1) Permeabilità Selettiva

- **separano il citosol dall'ambiente esterno** e lo proteggono da sostanze tossiche
- **permettono l'accumulo di nutrienti cellulari e ioni**, evitando la dispersione di metaboliti
- **permettono la formazione di gradienti chimici ed elettrochimici** (potenziali elettrici)
- **separano i compartimenti interni**

2) Comunicazione intercellulare

- sistemi proteici associati alla membrana permettono la **trasduzione e la generazione di segnali chimici**

3) Conversione Di Energia

- sistemi proteici associati alla membrana (plasmatica nei procarioti, mitocondriale negli eucarioti) producono **gradienti protonici transmembrana** usati da altri complessi proteici **per produrre ATP**

4) Locomozione Cellulare

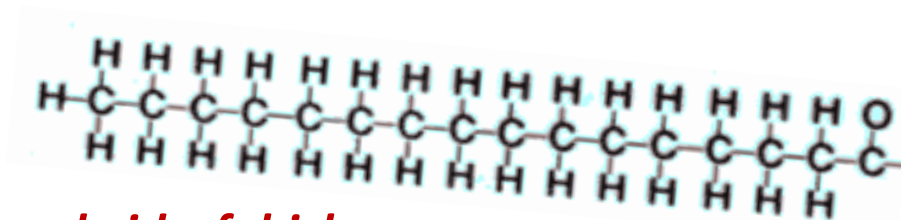
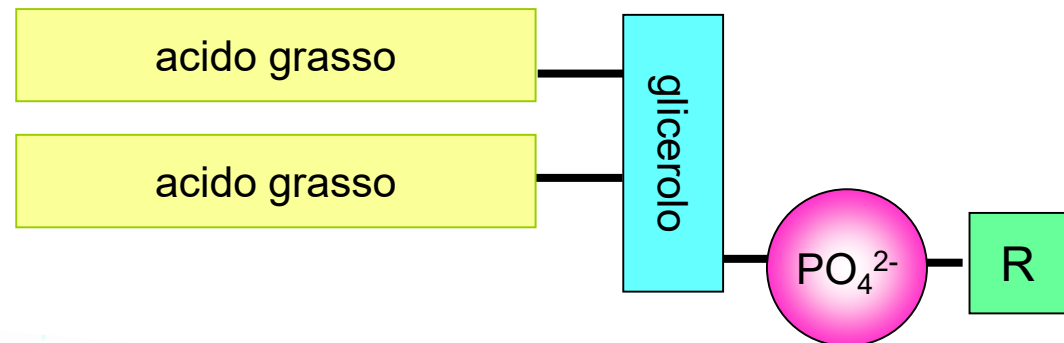
- le membrane di alcune cellule sono dotate di sistemi proteici che **convertono energia (ATP) in movimento**

Componenti lipidici delle membrane: i fosfolipidi

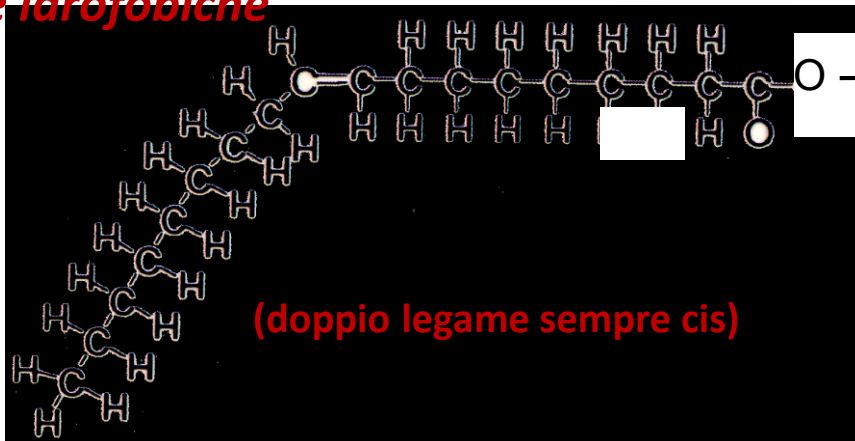
► Molecole anfipatiche formate da due 'code' idrofobiche e una 'testa' polare fosforilata legate ad una molecola di glicerolo

- le **code idrofobiche** sono **acidi grassi** saturi o insaturi
- la **testa polare** può essere serina colina, etanolamina, inositolo o glicerolo

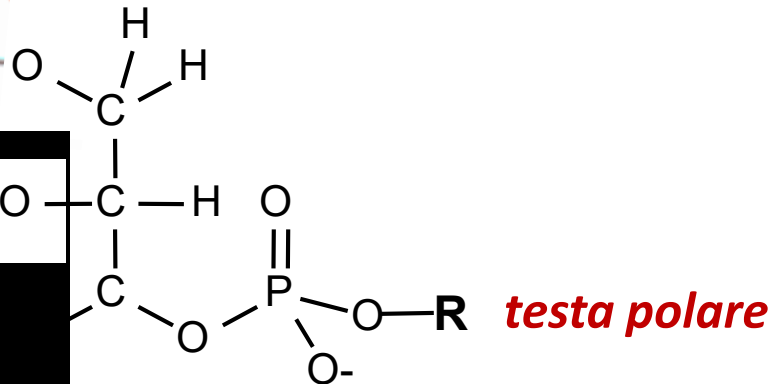
STRUTTURA
GENERALE



code idrofobiche

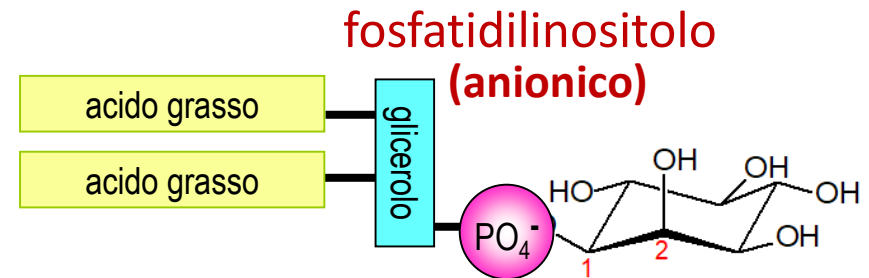
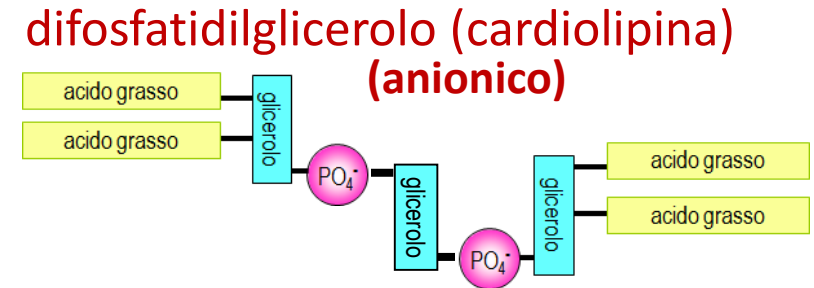
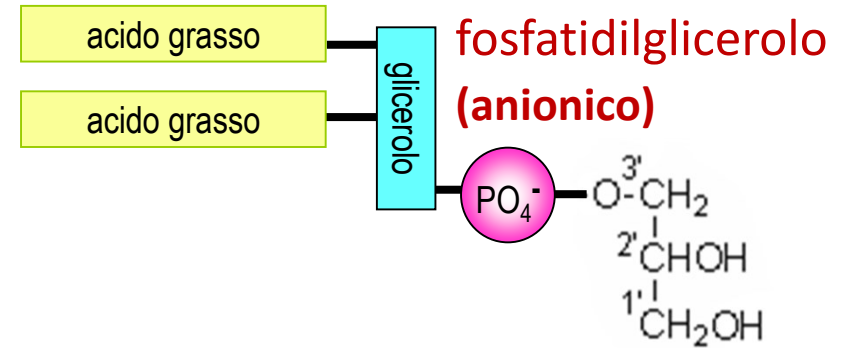
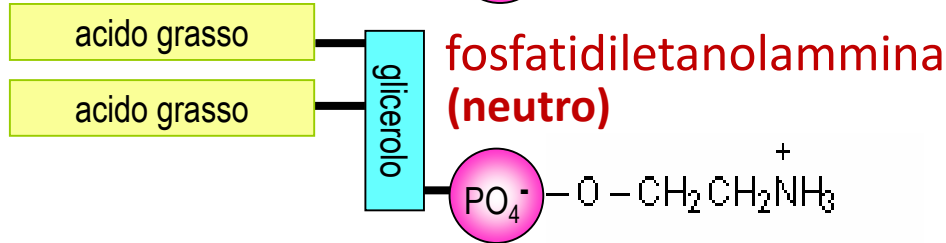
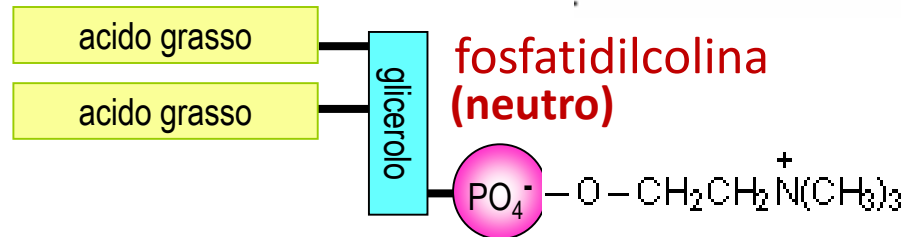
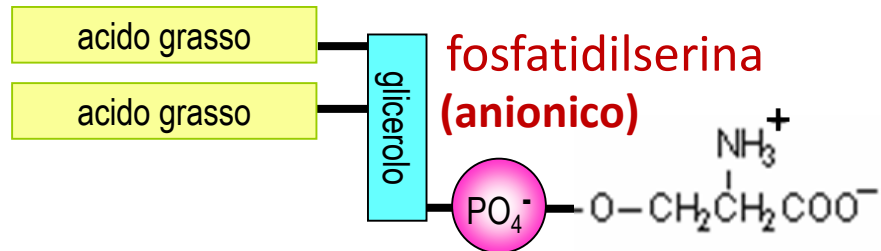
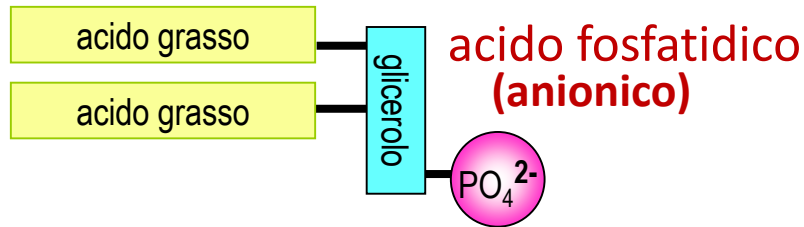
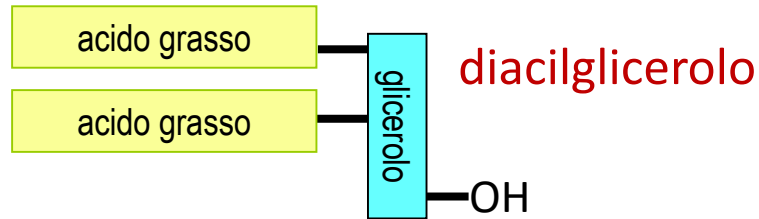


(doppio legame sempre cis)



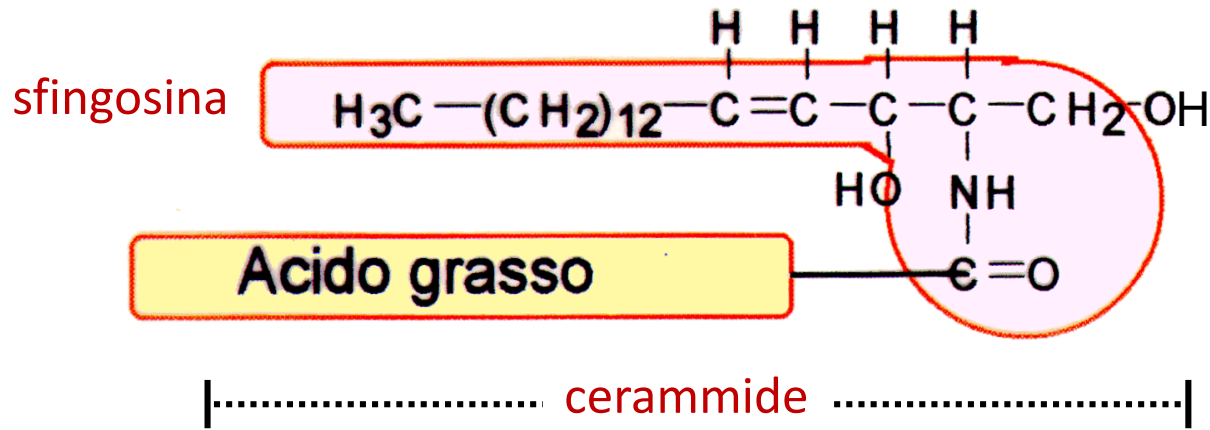
Diversi tipi di fosfolipidi

- L'unità costitutiva del fosfolipide è l'acido fosfatidico (poco abbondante) al quale è connessa la testa da un legame fosfodiester



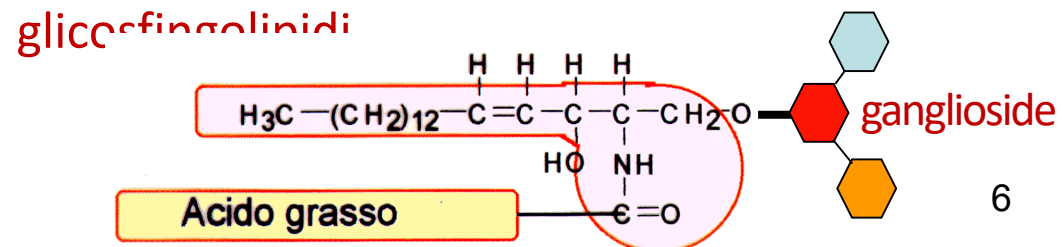
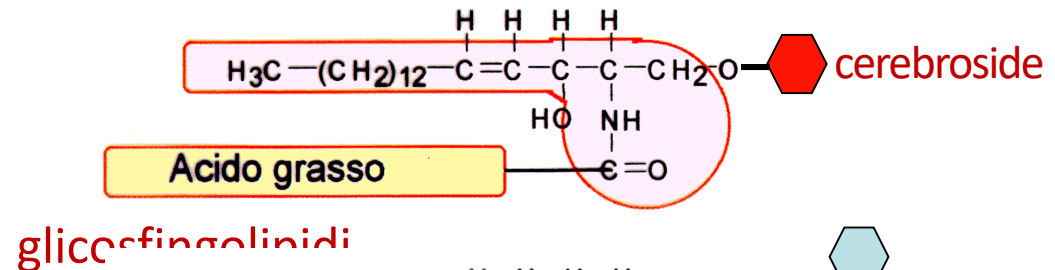
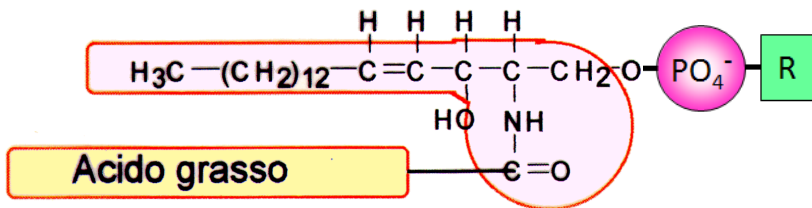
Componenti lipidici delle membrane: glicolipidi e sfingolipidi

- Molecole anfipatiche con una coda lipidica formata da acido grasso legato alla sfingosina
 - l'acido grasso e sfingosina sono legati da un legame ammidico per formare il ceramide



- Il ceramide può formare un legame fosfodiester con colina o etanolamina (sfingomieline) oppure forma un legame glicosidico con uno zucchero o oligosaccaride (glicosfingolipidi)

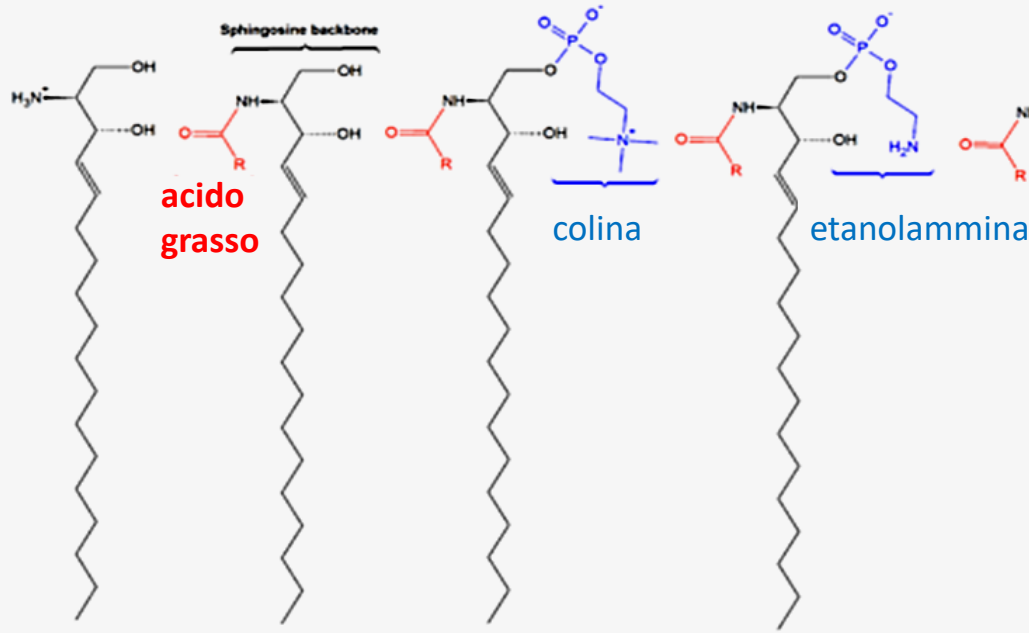
sfingomielina (R = colina, etanolamina)



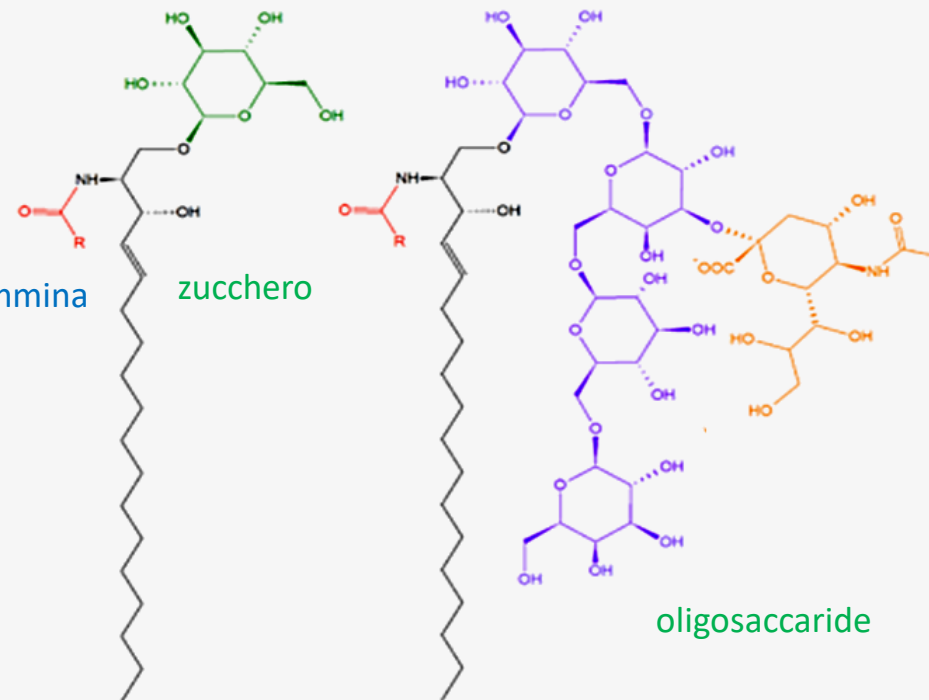
Componenti lipidici delle membrane: glicolipidi e sfingolipidi

- ▶ Gli sfingolipidi hanno ruoli importanti nella trasduzione del segnale e riconoscimento cellulare.
 - aumentano la stabilità del foglietto esterno e **partecipano nella formazione di domini di membrana (zattere lipidiche)**. Sono importanti nelle membrane delle cellule neuronali.

fosfosfingolipidi



glicosfingolipidi



sfingosina ceramide

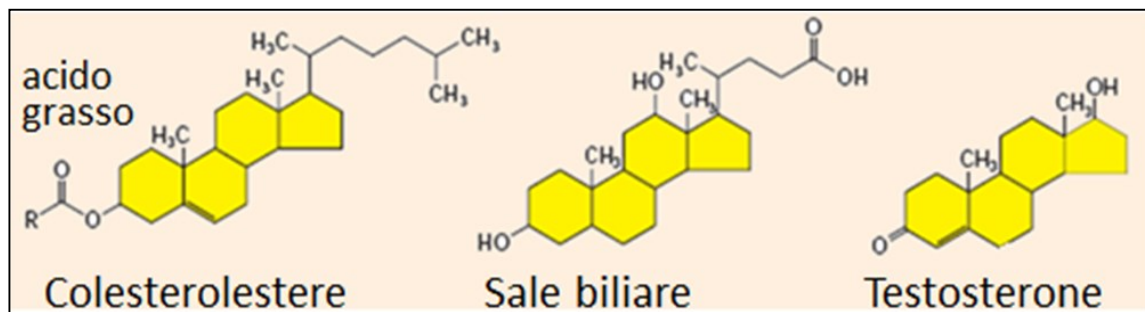
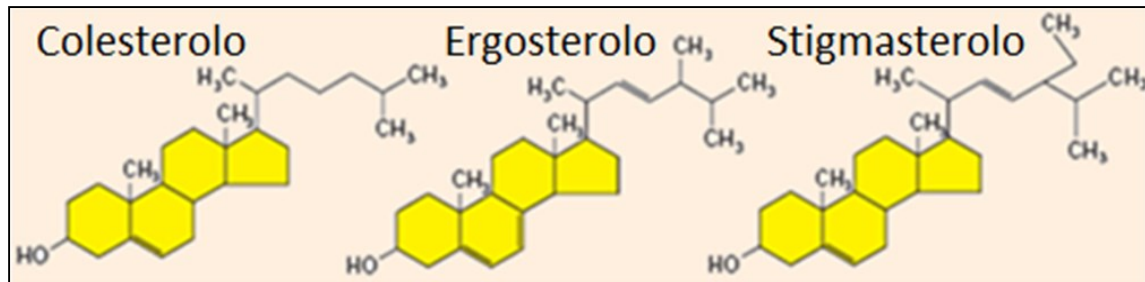
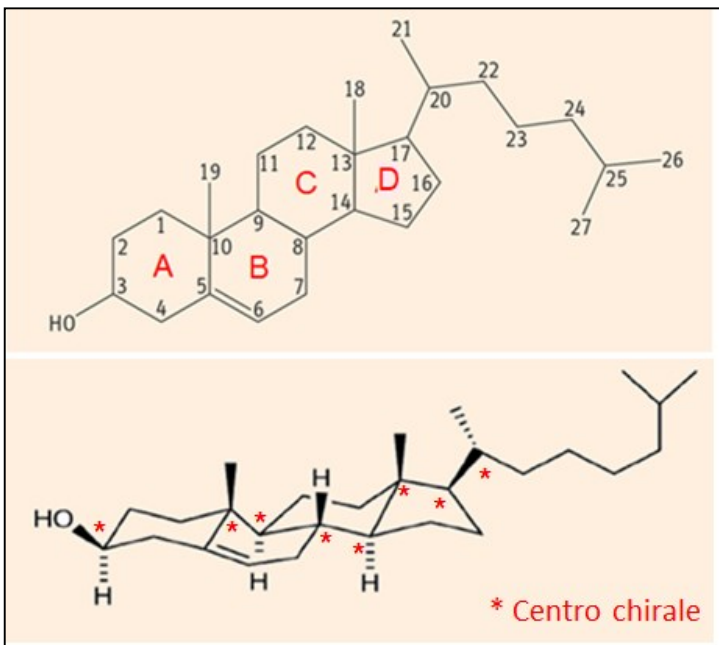
sfingomieline

ganglioside

cerebroside

Componenti lipidici delle membrane: colesterolo

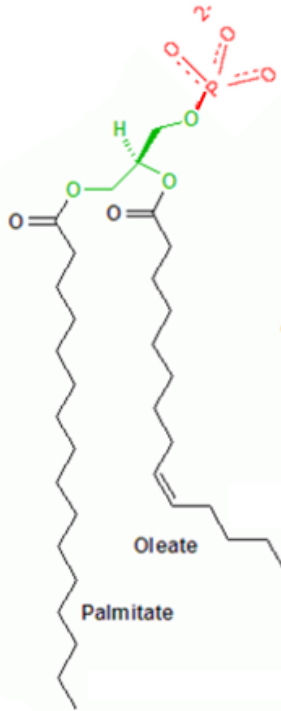
- ▶ Il colesterolo è una molecola idrofobica formata da 27 C disposti in 4 anelli, con un solo gruppo polare (OH). La struttura ha numerosi centri chirali e non è planare
- modula la struttura delle membrane biologiche in molteplici modi (modificando la sua fluidità, lo spessore, la compressibilità, e la curvatura)
- molecole simili sono presenti in piante (stigmasterolo) e funghi (ergosterolo)
- è convertito in **colesterolestere (CLE)**, legandolo ad un acido grasso, per il trasporto
- oltre al ruolo nelle membrane, dal colesterolo derivano anche i **sali biliari**, diversi **ormoni steroidei** (es.testosterone), i **glucocorticoidi** e la **vitamina D**



Componenti lipidici delle membrane: scheda riassuntiva

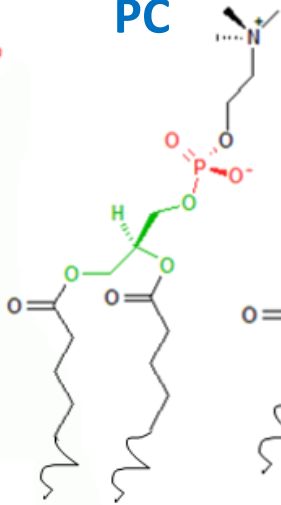
fosfolipidi

acido fosfatidico



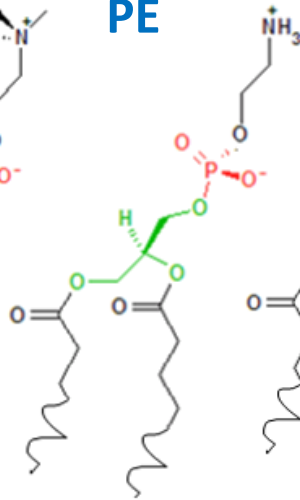
fosfatidilcolina

PC



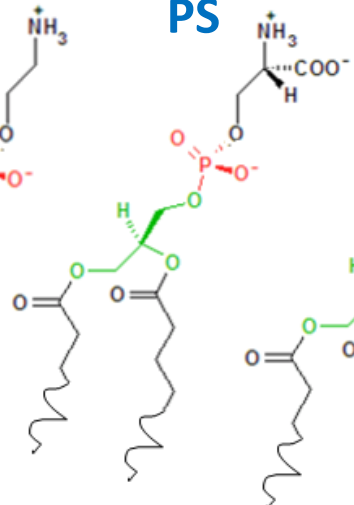
fosfatidiletanolamina

PE



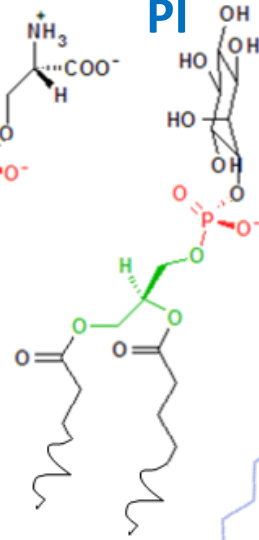
fosfatidilserina

PS



fosfatidilinositolo

PI

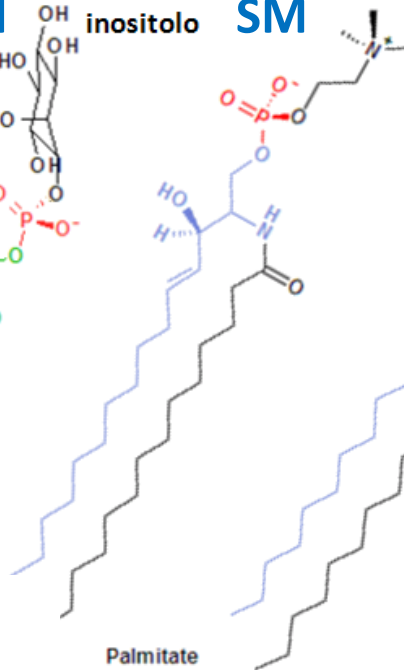


inositolo

sfingolipidi

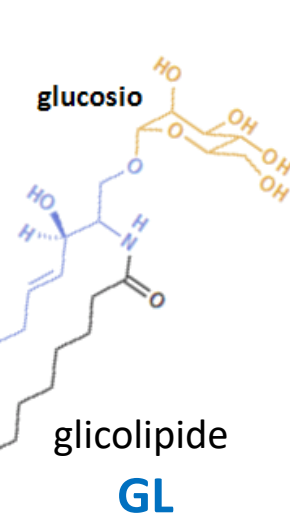
sfingomieline

SM



glucosilcerebroside

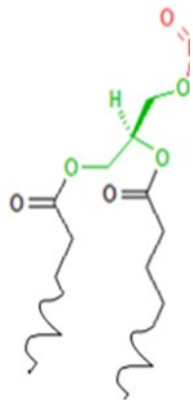
glucosio



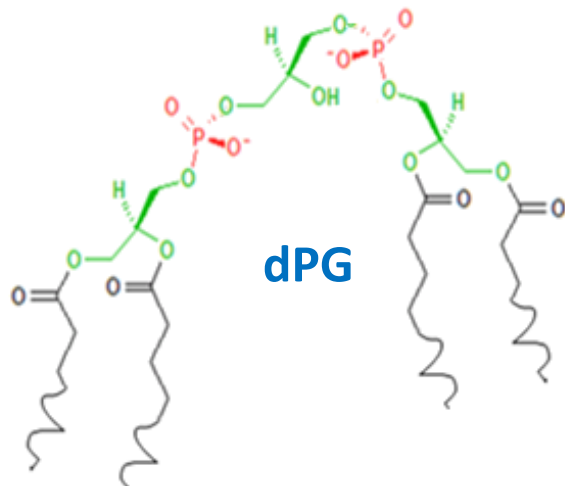
glicolipide

GL

PG

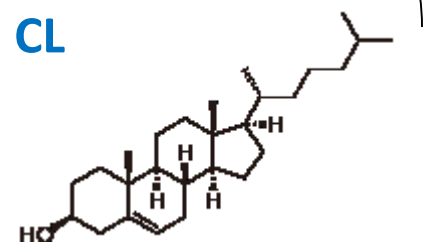


dPG



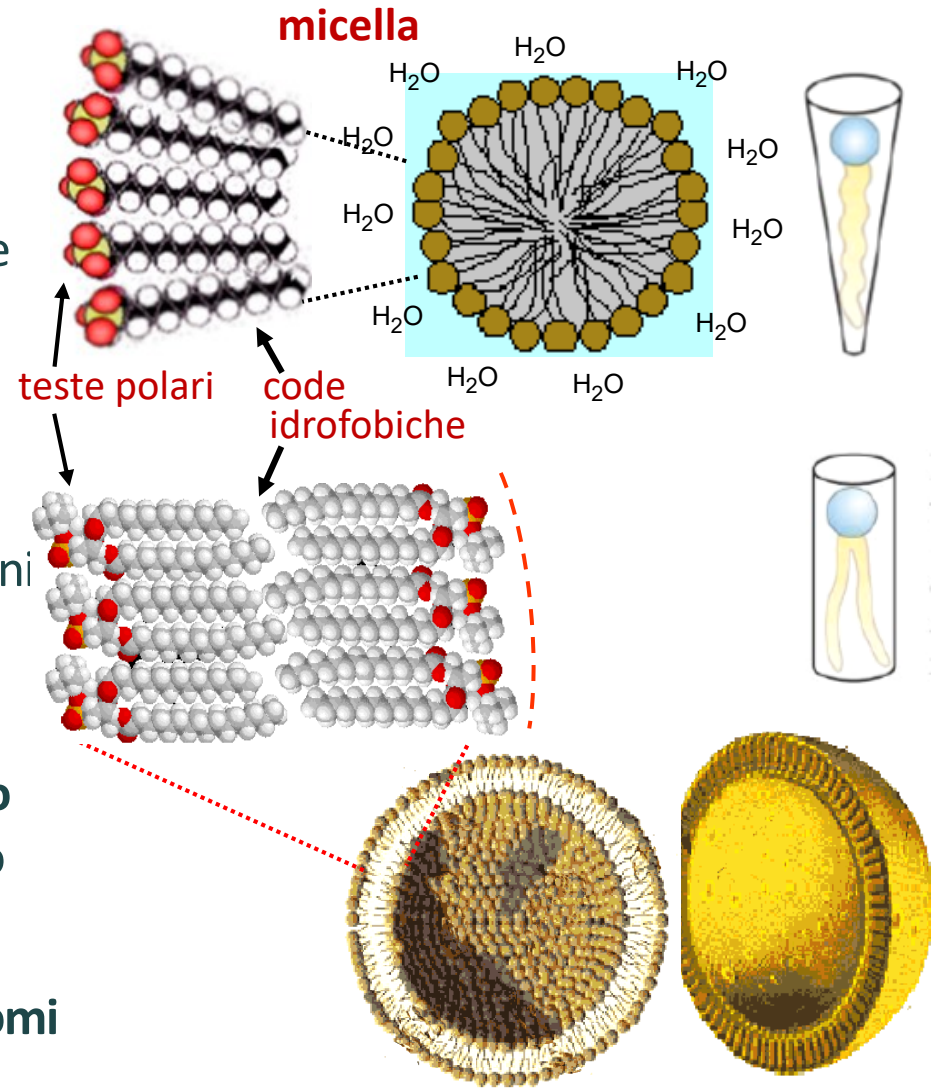
colesterolo

CL



STRUTTURA DELLE MEMBRANE

- ▶ Le membrane si formano per associazione spontanea delle molecole fosfolipidiche anfipatiche in un doppio strato lipidico (*phospholipid bilayer*)
 - si formano a causa di **interazioni non-covalenti** (idrofobiche e di VDW per le code, legami H ed elettrostatici per le teste).
 - le **micelle** formate dal **dodecil solfato** (SDS, lauril solfato), sono un semplice modello di associazione spontanea di molecole lipidiche
 - La micella ha una **superficie polare** (SO_4^{2-}) e un **nucleo (core) idrofobico** (catena C12)
 - I fosfolipidi non possono formare le superfici altamente ricurve come le micelle) per ragioni steriche; avrebbero un nucleo con H_2O a contatto catene le C12 (non ammesso)
 - Per questa ragione si forma un **doppio strato lipidico**, con una superficie polare all'esterno (teste polari) e un'altra all'interno.
 - I fosfolipidi formano spontaneamente **liposomi**

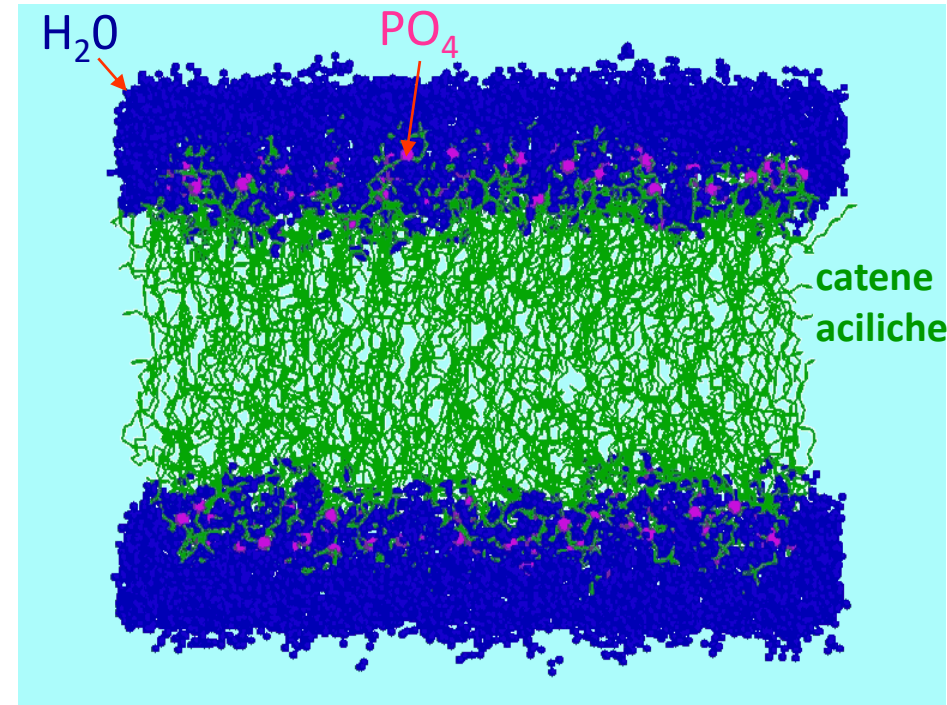
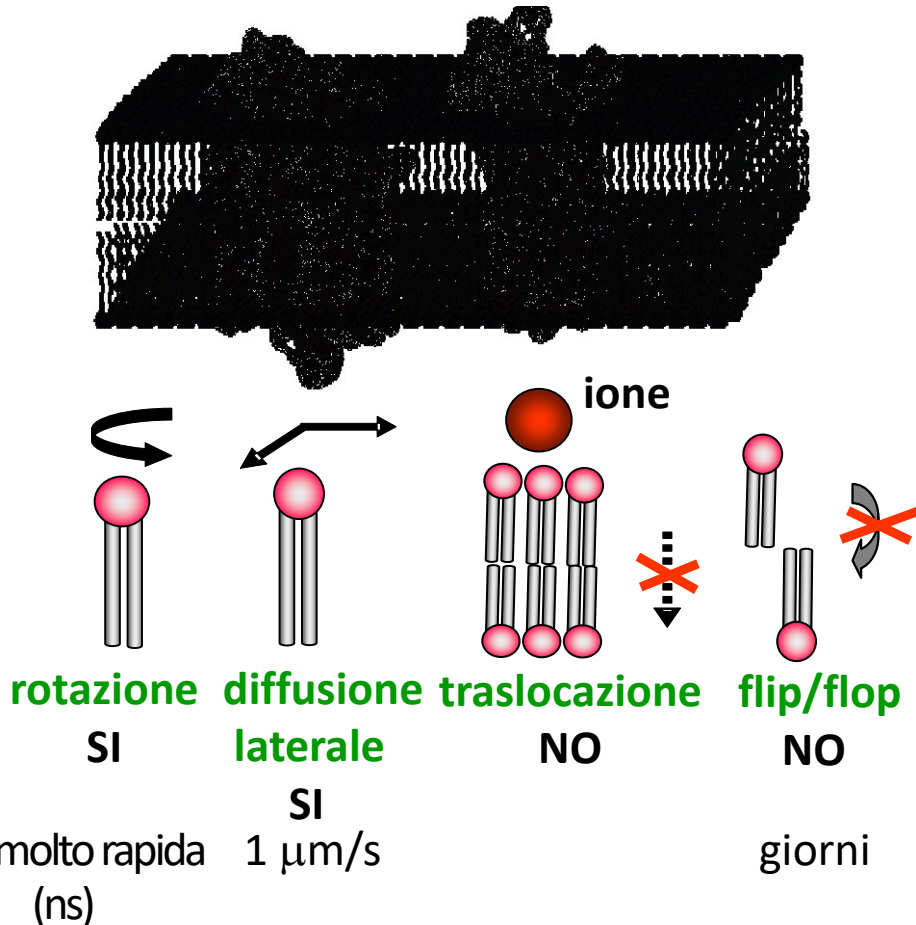


Struttura delle membrane: modello a Mosaico Fluido

► Nel 1972 Singer e Nicholson proposero che le membrane non fossero strutture statiche:

“Le membrane biologiche sono soluzioni bidimensionali di lipidi e proteine globulari orientati”

- le molecole lipidiche sono **libere di muoversi** (ruotare su se stesse o migrare lateralmente) come anche le proteine (più lentamente), ma **non possono passare da un lato all'altro** del doppio strato lipidico (sono orientate) perché le parti polari non possono entrare nello strato lipidico



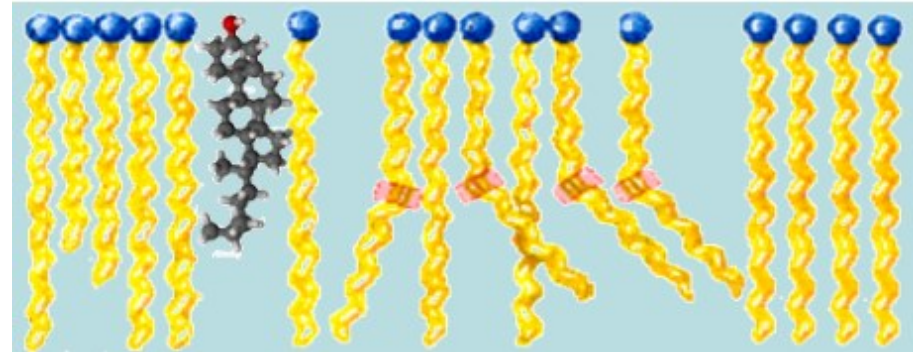
La struttura delle membrane è DINAMICA, non statica

Caratteristiche delle membrane biologiche

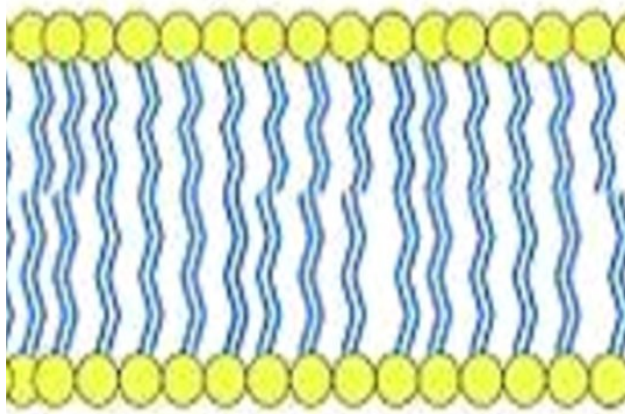
► Le membrane biologiche sono strutture fluide

- la fluidità (Φ) dipende da:

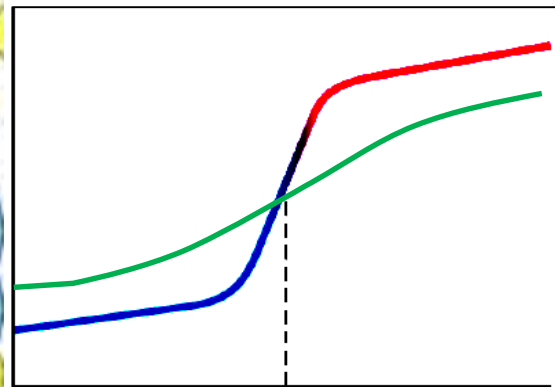
- 1) Lunghezza delle catene aciliche ($l \uparrow \Phi \downarrow$)
- 2) Grado di insaturazione ($\text{—//—} \uparrow \Phi \uparrow$)
- 3) Temperatura ($T \uparrow \Phi \downarrow$)
- 4) Colesterolo ($CL \uparrow \Phi \leftrightarrow$)



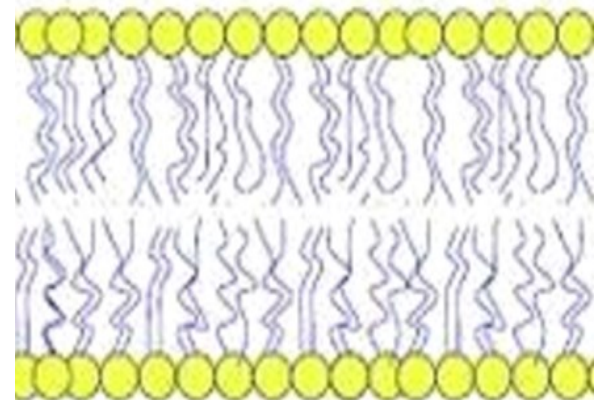
► La fluidità della membrana è riflessa nella sua temperatura di fusione (*melting T* o T_M)



FASE CRISTALLINA (GEL)



T_M (°C)

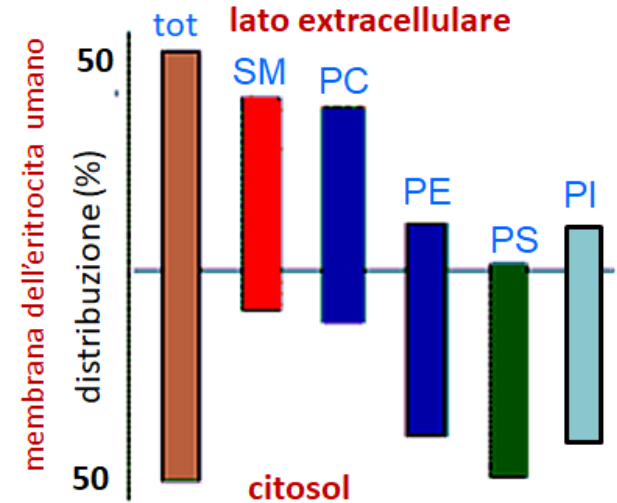


FASE LIQUIDO-CRISTALLINA

Caratteristiche delle membrane biologiche

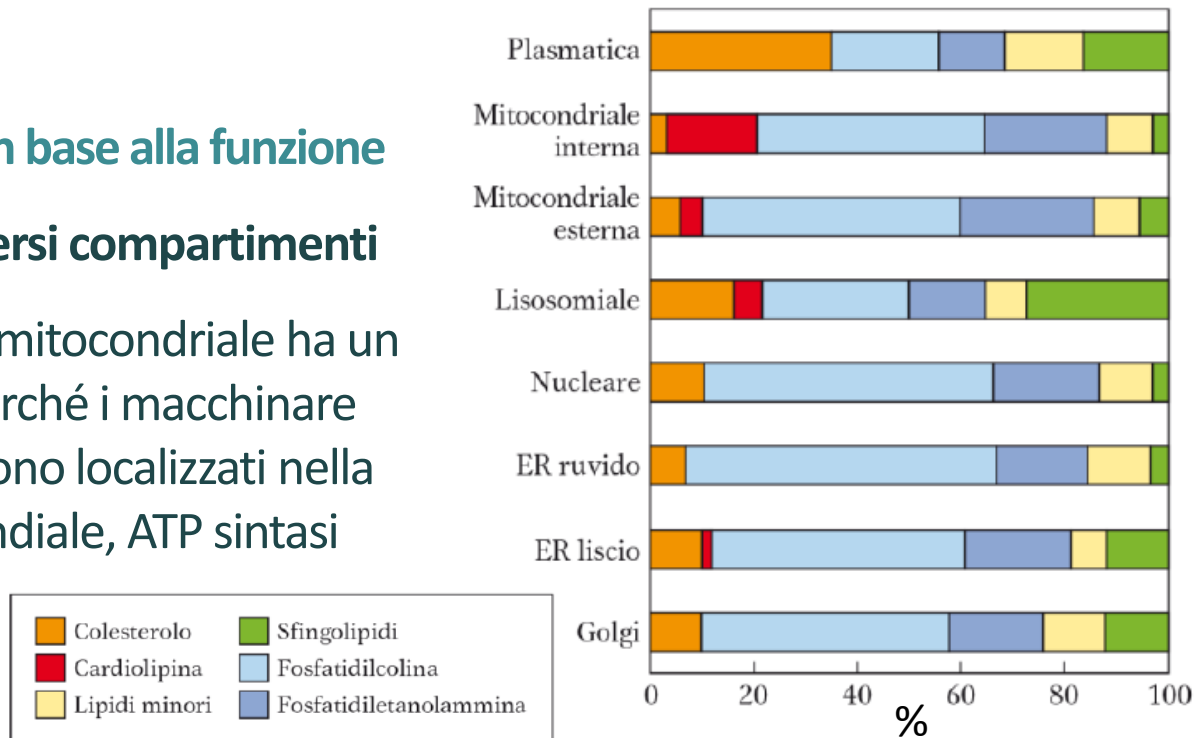
► Le membrane biologiche hanno strutture ASIMMETRICHE

- proteine e glicolipidi hanno un **orientamento assoluto** (oligosaccaridi sempre esterni)
- anche i **fosfolipidi** tendono ad essere **disposti in maniera asimmetrica**
- le membrane sono biosintetizzate **aggiungendo componenti a membrane preesistenti** e ne **mantengono l'asimmetria**



► La composizione lipidica varia in base alla funzione

- La composizione **varia nei diversi compartimenti**
- per es. La membrana interna mitocondriale ha un elevato contenuto proteico perché i macchinari per la produzione di energia sono localizzati nella membrana (flusso e^- mitocondriale, ATP sintasi sistemi di trasporto)



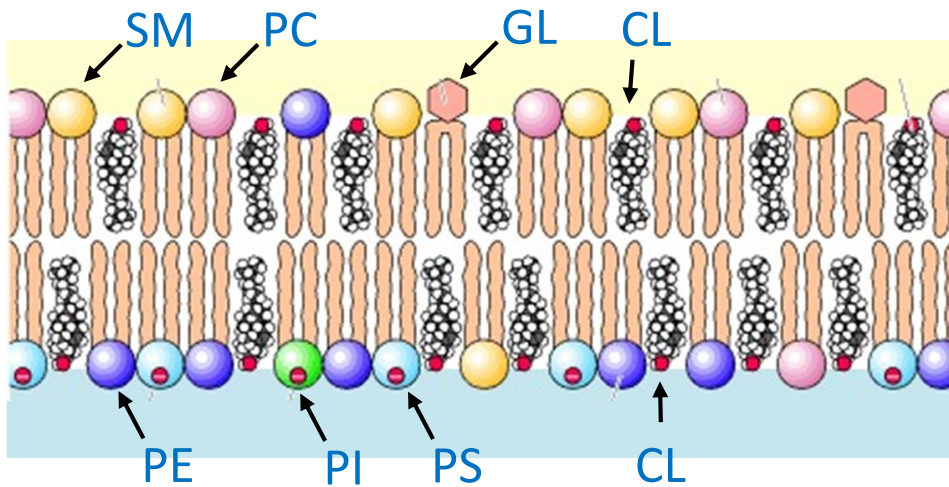
Caratteristiche delle membrane biologiche (cont.)

► Il foglietto esterno della membrana ha una composizione diversa dal foglietto interno

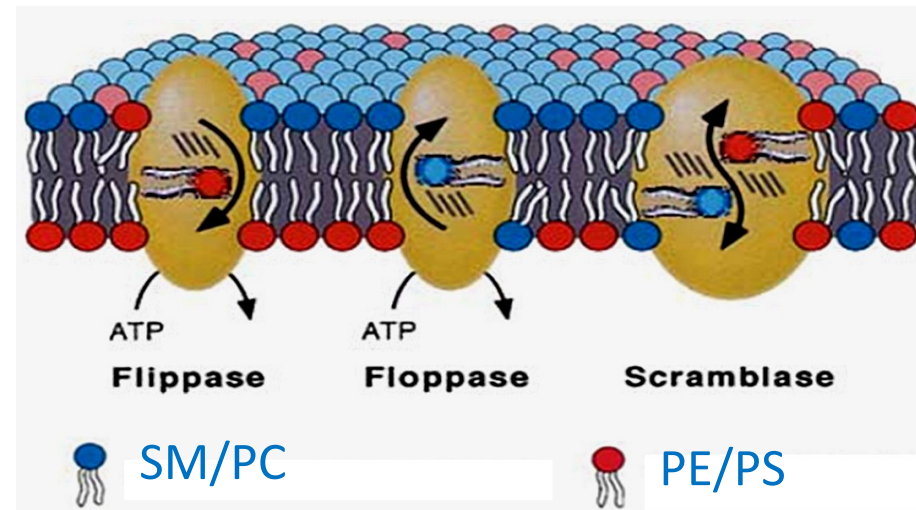
- Queste diverse composizioni sono **necessarie per le funzioni della membrana**; l'integrità e composizione della membrana è mantenuta nel tempo, a meno di lesioni
- **lesioni alla membrana** (es rottura) sono causa primaria di **morte cellulare** (necrosi)
- eventi come un flusso eccessivo di Ca^{2+} verso il citoplasma ($> 5 \text{ mM}$) attiva lo «**scrambling**» di fosfolipidi, che **contribuisce all'apoptosi**
- specifici **enzimi mediano la traslocazione di fosfolipidi** da un foglietto all'altro della membrana

Corretta asimmetria

extracell



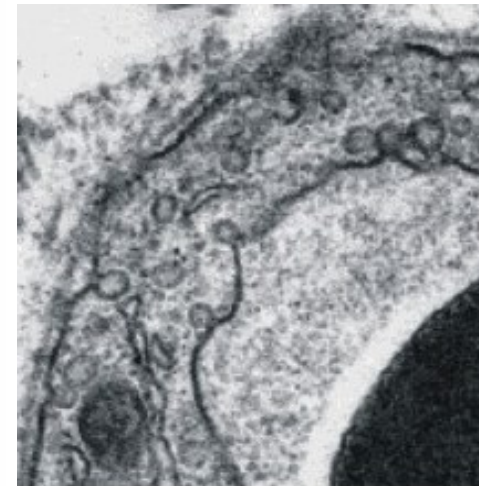
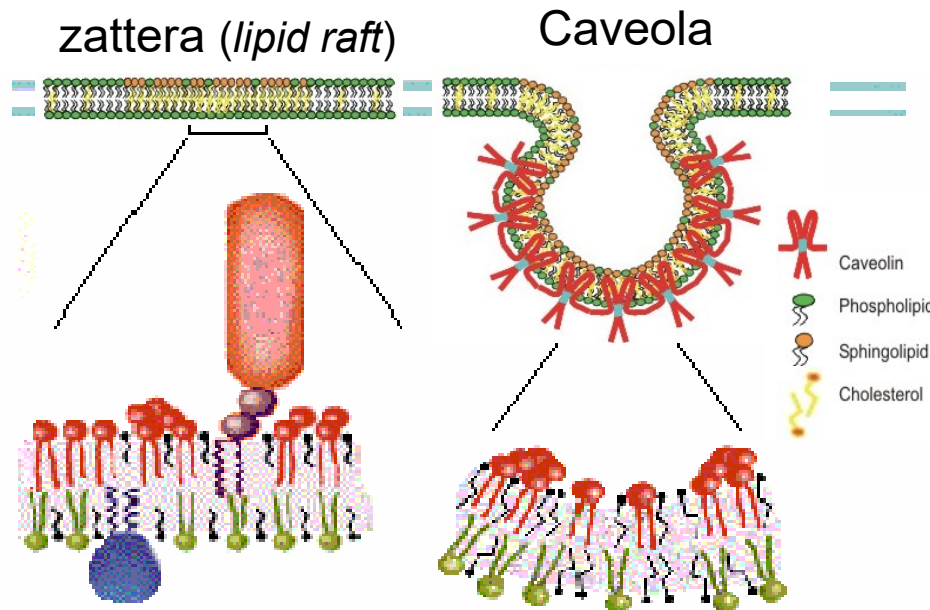
citoplasma



Caratteristiche delle membrane biologiche (cont.)

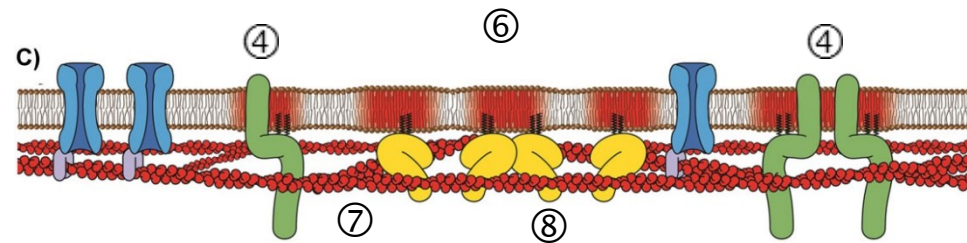
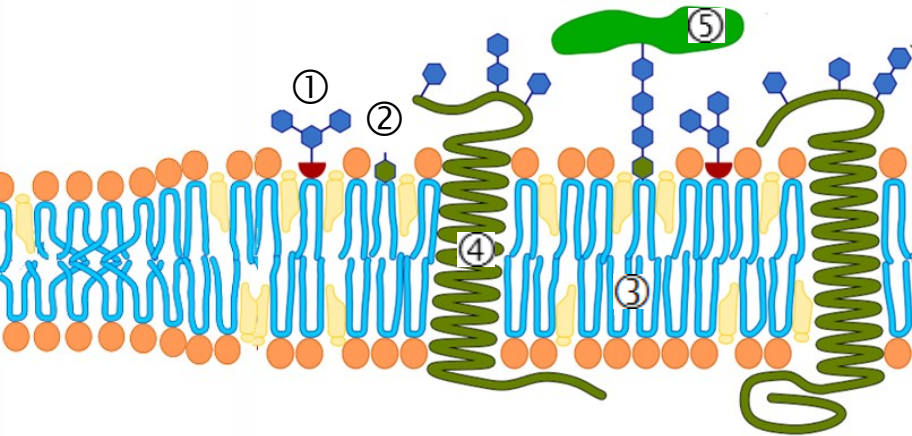
► Anche se fluide, nelle membrane si formano micro-domini lipidici

- questi **micro-domini** hanno concentrazioni localmente elevate di alcuni tipi di molecole lipidiche (es. sfingoglycosfingolipidi e colesterolo sul lato esterno)
- esistono due principali tipi di microdomini: **zattere lipidiche** (lipid rafts) e **caveole**
- le zattere hanno **struttura piatta**, mentre la caveola è una **struttura invaginata**
- sono zone di piccole dimensioni e sono **punti di ancoraggio per proteine** di membrana (es. recettori) e svolgono ruoli importanti nel **signalling** (zattere) e nell'**importazione di materiale** all'interno della cellula (caveole)



Caratteristiche delle membrane biologiche (cont.)

- Il colesterolo è coinvolto nella formazione delle zattere lipidiche, che sono zone della membrana con un'associazione **più compatta** dei lipidi.



- La struttura e ruolo biologico delle zattere lipidiche sono tuttora controversi. Sono arricchite in **glicosfingoglicolipidi** ① e **glicosilphosphatidilinositolo (GPI)** (vedi **scheda 19**) ②, con catene aciliche sature che possono associarsi in modo più compatto fra di loro e con il CL ③. Alcuni tipi di recettore sembra le preferiscano ④. GPL sono punti di ancoraggio per altre proteine ⑤.
- Le dimensioni stimate per le zattere lipidiche sono 10-200 nm e sembra si associno in «**lipid raft domains**» più ampi ⑥ in modo dinamico e **mediato dai filamenti di actina del citoscheletro** ⑦. Sul lato citoplasmatico sono associate proteine con ancora lipidica (es. proteine G) ⑧.

Le membrane biologiche separano ambienti chimici

► Le concentrazioni di ioni all'esterno delle cellule sono diverse da quelle all'interno

- Si formano gradienti chimici e potenziali elettrochimici che sono molto importanti per diverse funzioni cellulari (sono sfruttabili come forma di energia)
- Le membrane sono quindi elettricamente polarizzate (potenziale elettrico di membrana misurato in mV)

Ione	Fluido extracellulare	Fluido intracellulare	rapporto
Na⁺	140 mM	10 mM	14
K⁺	4 mM	140 mM	1/35
Ca⁺⁺	2.5 mM	0.1 μM	25000
Cl⁻	100 mM	4 mM	1/25

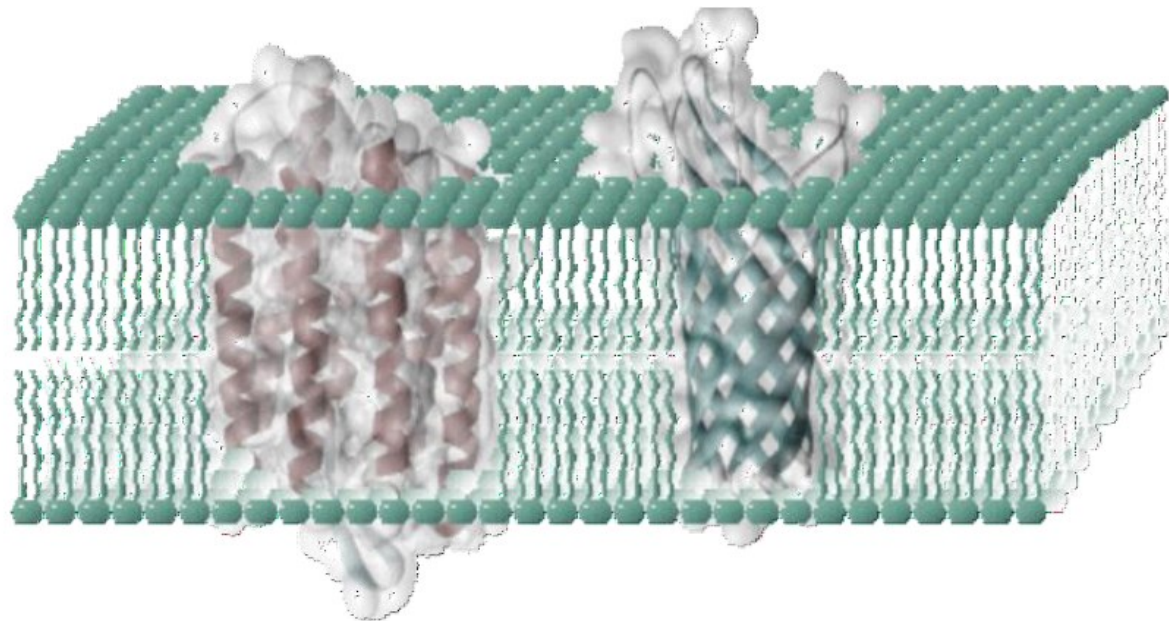
PROTEINE DI MEMBRANA: componenti fondamentali delle membrane

► Le proteine sono un componente fondamentale delle membrane e svolgono diversi importanti ruoli biologici:

trasporto transmembrana, comunicazione (signalling), produzione di energia, movimento

- le membrane sono paragonate a un **liquido bidimensionale** nel quale le proteine “galleggiano” o al quale sono associate

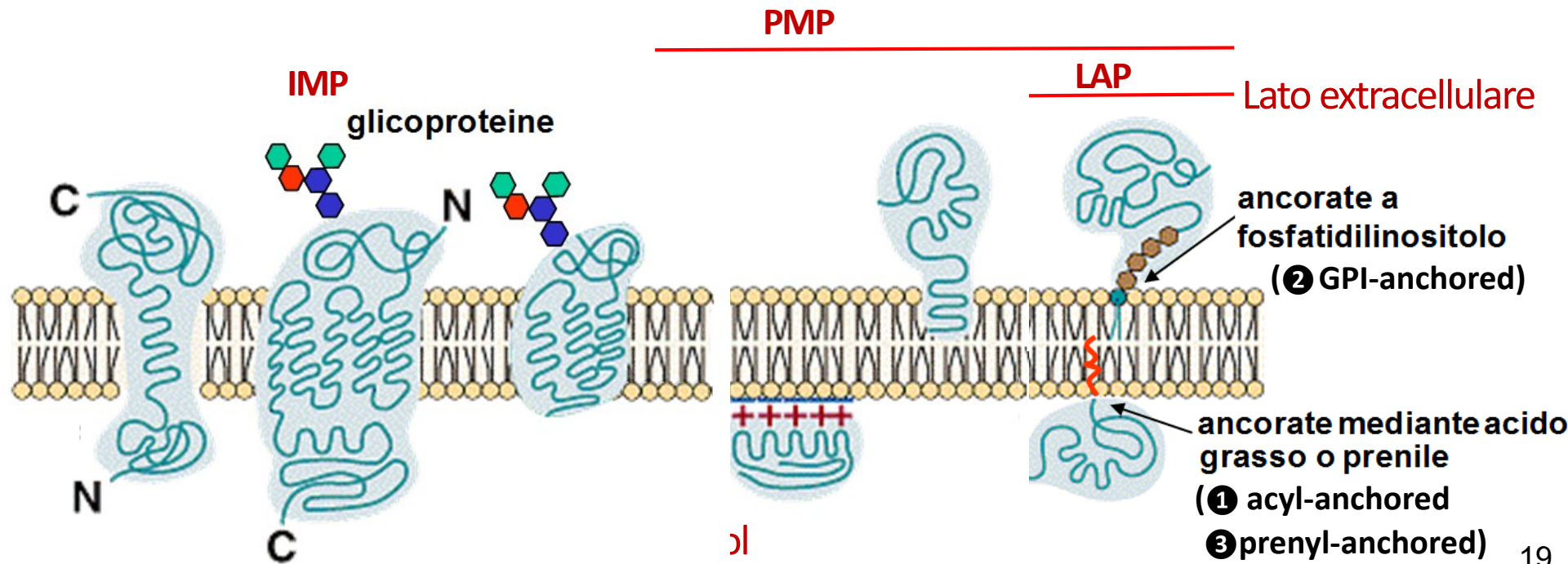
- ci sono diversi tipi di **proteine di membrana** (membrane protein o MP)



PROTEINE DI MEMBRANA: diversi tipi

► le MP sono classificate in base al tipo di interazione che hanno con la membrana

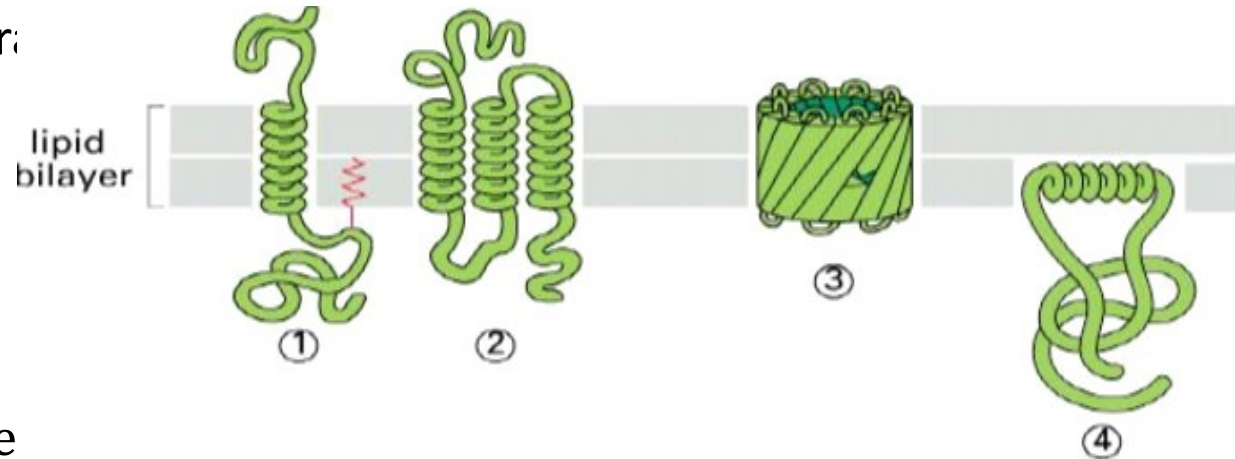
- 1) **MP integrali** (IMP, note anche come **MP intrinseche**) hanno un dominio immerso nello strato lipidico che spesso lo oltrepassa (**dominio transmembrana o TM**)
- 2) **MP periferiche** (PMP note anche come **PM estrinseche**) sono debolmente associate con IMP e/o con la superficie della membrana (rimosse da trattamento con sali), oppure....
- 3) **Lipid-anchored proteins (LAP)** legate covalentemente a molecole lipidiche inserite nella membrana (ancore); diversi tipi con es. legame tioestere al palmitato o legame ammidico al miristato ❶, o legame glicosidico al fosfatidilinositolo ❷, o legame al prenile (un poliisoprene) ❸



PROTEINE DI MEMBRANA: integrali e periferiche

► Le proteine integrali di membrana (PIM) attraversano strato lipidico formando interazioni idrofobiche con i lipidi

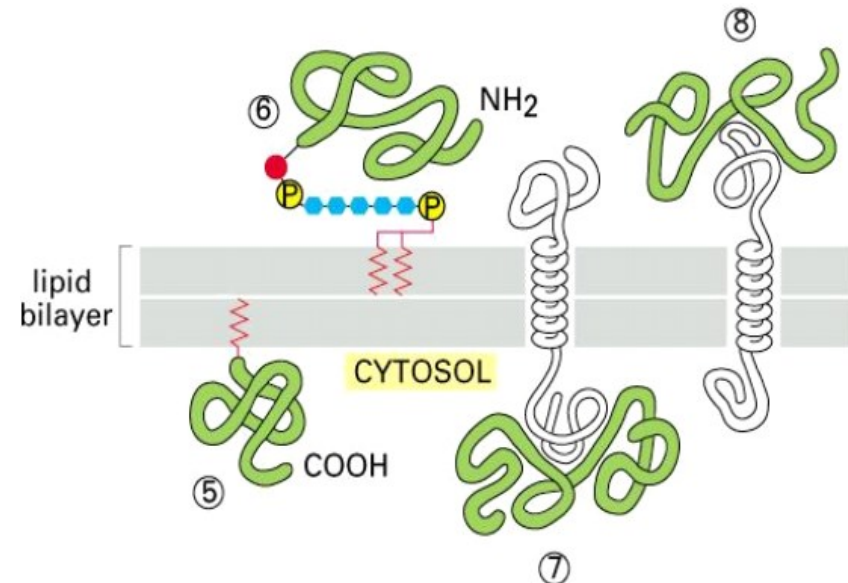
- possono oltrepassare il doppio strato lipidico una o più volte, o essere inserito in un lato a l'altro della membrana



① elica monopasso, ② eliche

► Le proteine periferiche sono associate alle membrane attraverso interazione con PIM o per ancoraggio

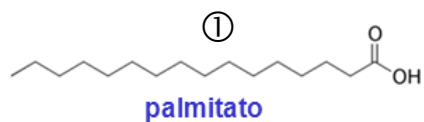
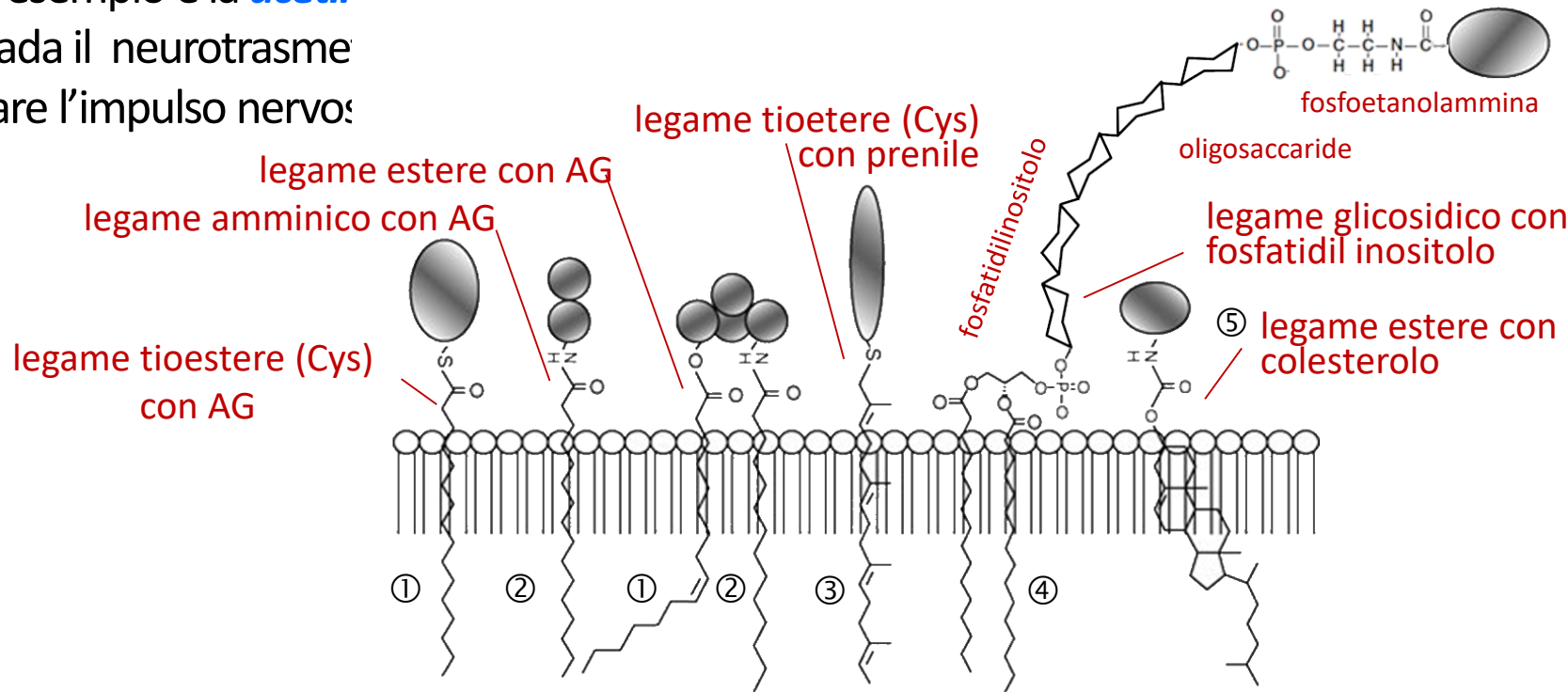
⑤ ancorata ad AG, ⑥ ancorata a PL (es. all'inositolo nelle GPI), ⑦ interazione con PIM



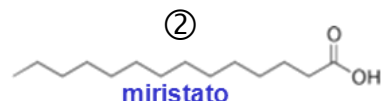
PROTEINE DI MEMBRANA: ancorate

► Le proteine ancorate sono molto libere di muoversi nella membrana

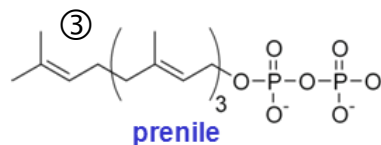
- diversi tipi di **ancore lipidiche** si inseriscono nel doppio strato lipidico della membrana
- Enzimi ancorati in questo modo si muovono in modo bidimensionale sulla superficie della membrana, che 'pattugliano' efficientemente i cerca di substrato
- Un buon esempio è la **acetil** che degrada il neurotrasme per limitare l'impulso nervoso



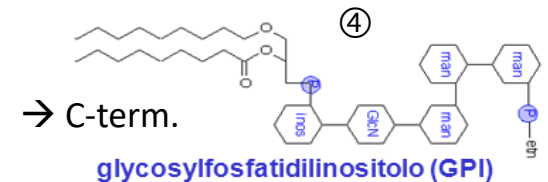
→ HO-Ser, HS-Cys



→ $\text{H}_2\text{N}_\alpha\text{-Gly(N-term)}$



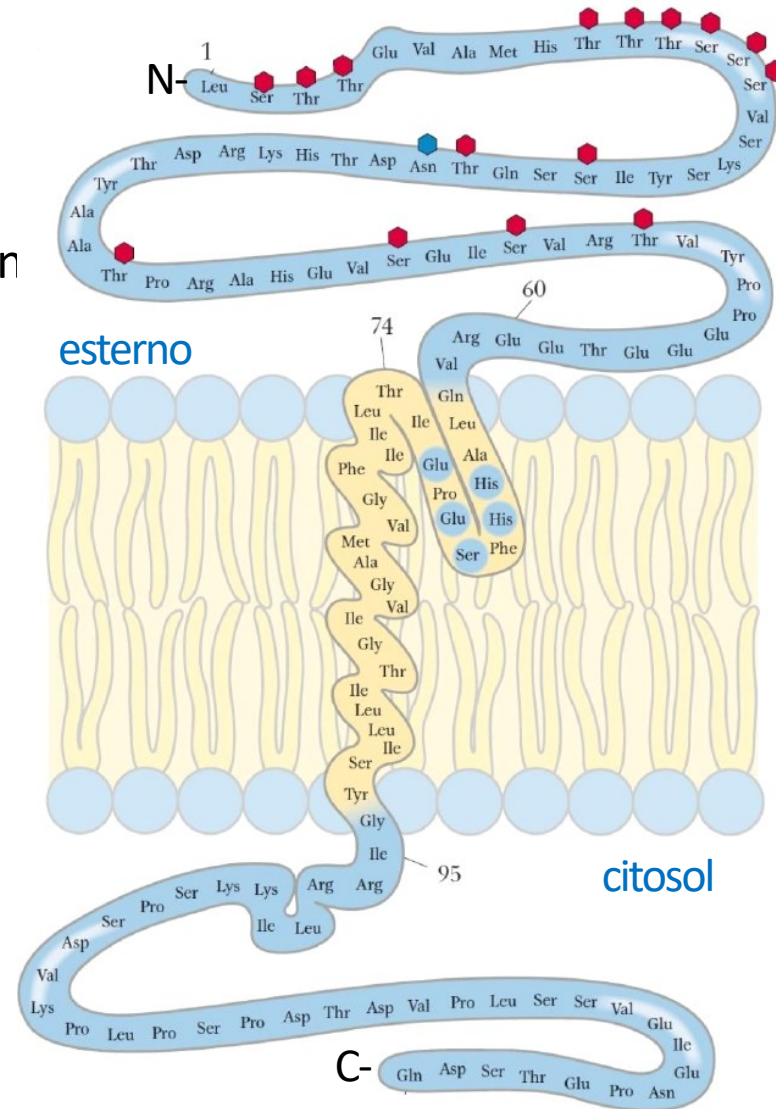
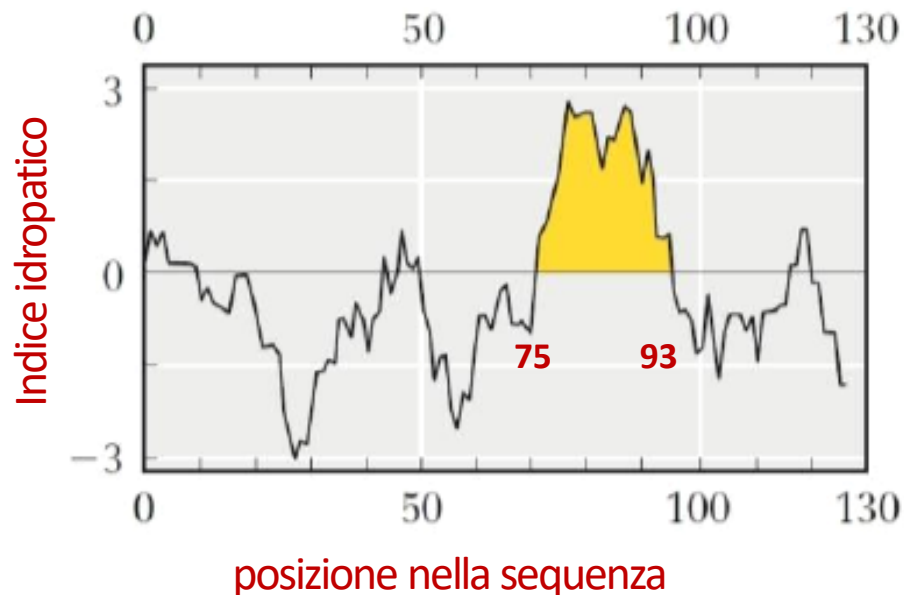
→ (C-term) HS-Cys



PROTEINE DI MEMBRANA: predizione dei diversi domini

► È possibile predire la disposizione dei vari domini in una proteina integrale di membrana (PIM) dalle caratteristiche della sua sequenza

- I profili di idrofobicità o polarità dei residui permettono di individuare il dominio transmembrana (TM) (indice idropatico:
idrofili = valore - idrofobici = valore +
- I domini ricchi in residui glicosilati sono sempre sul lato extracellulare

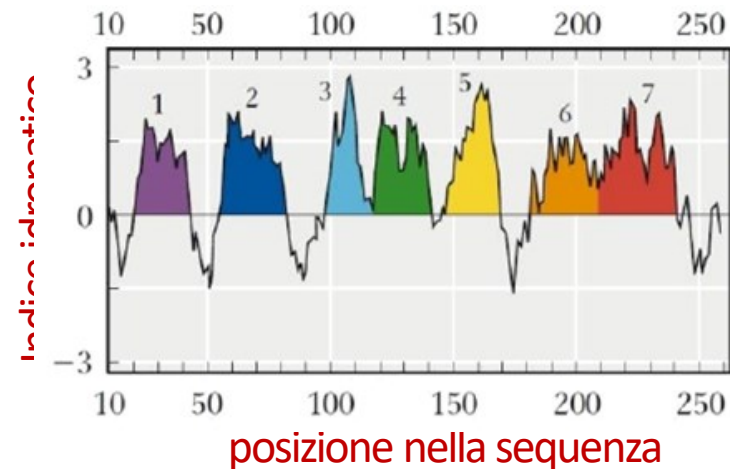
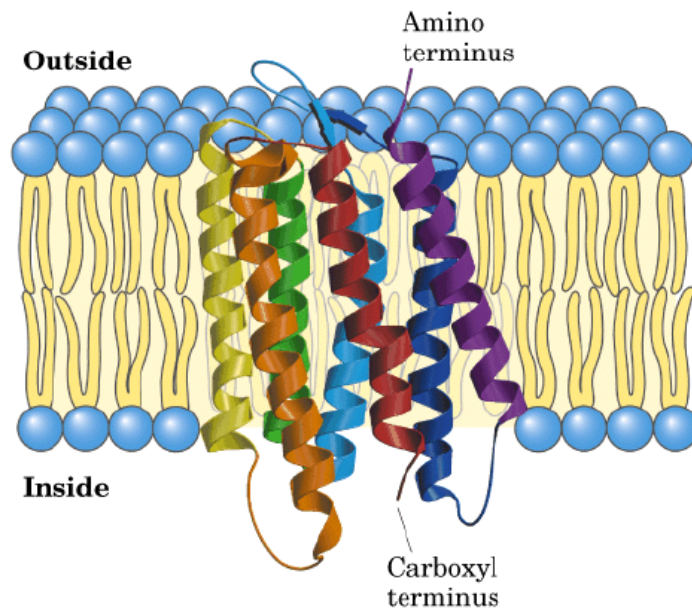


band 3, una delle principali PIM negli eritrociti

PROTEINE DI MEMBRANA: predizione dei diversi domini (cont.)

► Le PIM multipasso attraversano la membrana con diversi segmenti

- il doppio strato lipidico ha una larghezza di ca. 3nm (30 Å) e può essere attraversato da un segmento ad α -elica di ca. 30 residui, con elevato contenuto di AA idrofobici
- molte PM hanno domini TM formati da segmenti multipli ad α -elica idrofobica; alcuni trasportatori hanno 12 segmenti, la più grande classe di recettori ne ha 7 (7TM receptors)
- i 7 segmenti TM possono essere individuati analizzando la sequenza aa (indice idropatico)

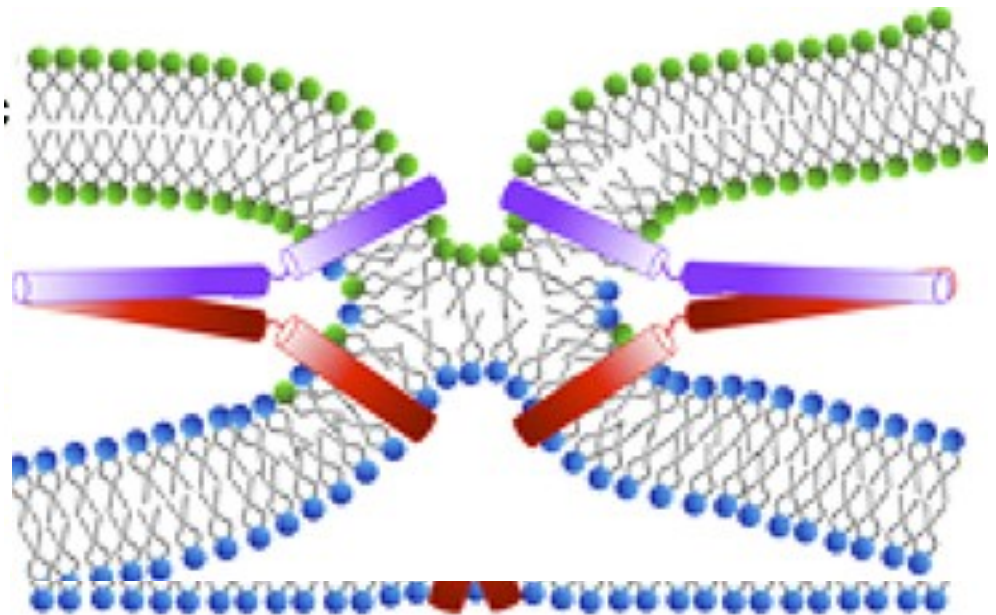
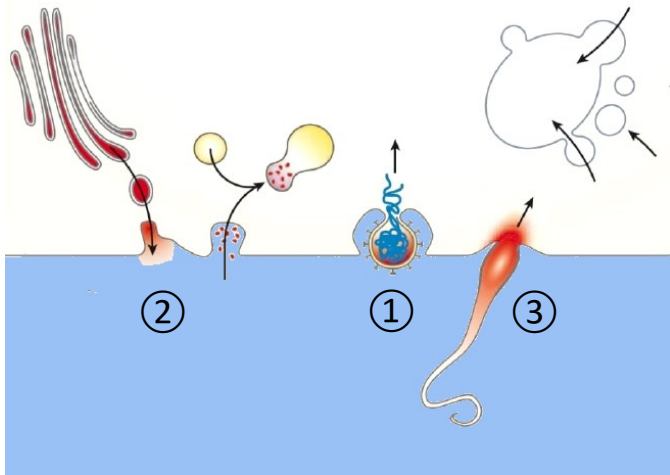
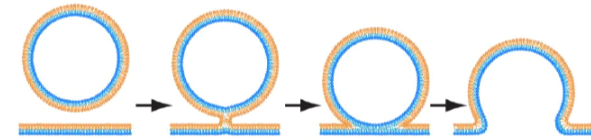


AQITGRPEWIWLA LGTALMGLGTL YFLV KGMGVS D P DAKK FYA ITTLVPA
IAFTMYLSML LGYGLTMVPFGG EQNP IYWARYADWLF TTP LLLLD LAL LV
DADQGTILALVGADGIMIGTGLVGALT K VYSYR FVWWA ISTAAML Y ILYV
LFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVT VVLWSAYVVVWL I GSE GAGIVPL
NIETLLFMVLDVSAKVGFG L I L LRSRAIFGEAEAPEPSADGAAATS

Fusione delle membrane

► Le curvature e la fusione della membrana sono fondamentali in molti processi biologici

- le membrane hanno la capacità di fondersi con membrane diverse senza perdere continuità.
- i diversi compartimenti cellulari rivestiti da membrane si scambiano materiale per mezzo di **vescicole** che si formano su una membrana (donatrice) e si fondono con un'altra (accettrice)
- Questo processo coinvolge le membrane del ER, apparato di Golgi e membrana citoplasmatica
- l'**esocitosi (1)**, l'**endocitosi (2)**, la **fusione** dello spermatozoo con la cellula uovo **(3)**, la **divisione** cellulare avvengono tutti attraverso la **fusione di membrane**, un processo **mediato dal Ca^{++}**



Meccanismo SNARE - processo mediato da Ca^{2+}

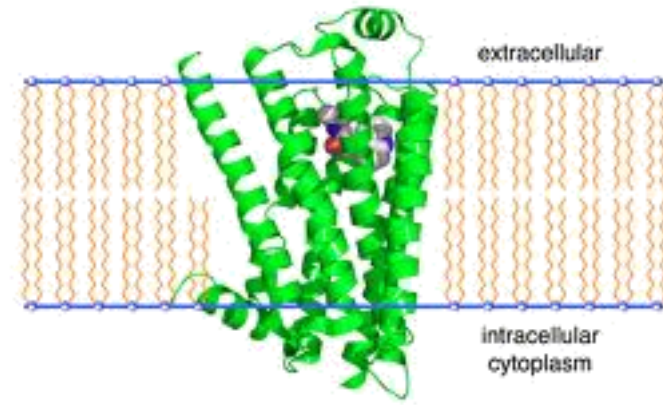
Metodi per studiare la struttura delle PM – X-ray crystallography

► Ottenere cristalli di PM (es. recettori a 7TMH) è resa difficile

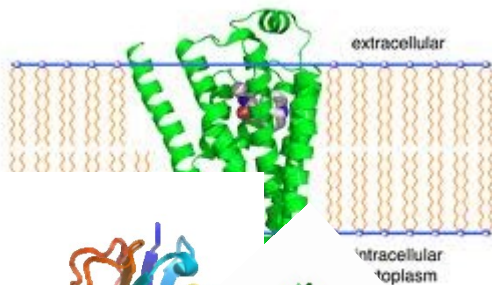
- a) gran parte della proteina è lipofila e quindi richiede un ambiente lipofilo per la cristallizzazione;
- b) hanno superfici polari limitate, necessarie per interazioni intermolecolari nel cristallo;
- c) scarsa termostabilità

- Soluzioni per questi problemi:

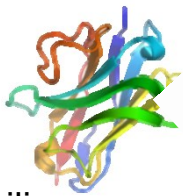
- a) utilizzo di metodi *in surfo*, di mesofasi lipidiche o di bicelle;
- b) aumentare stabilità e superficie polare (con inserti o utilizza
- c) *mutagenesi* per stabilizzare la struttura



stabilità/superficie polare



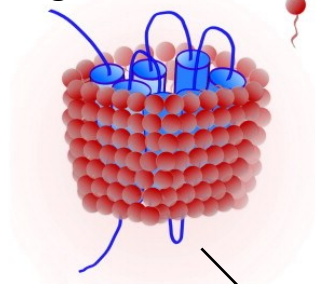
stabilizzare con nanobody



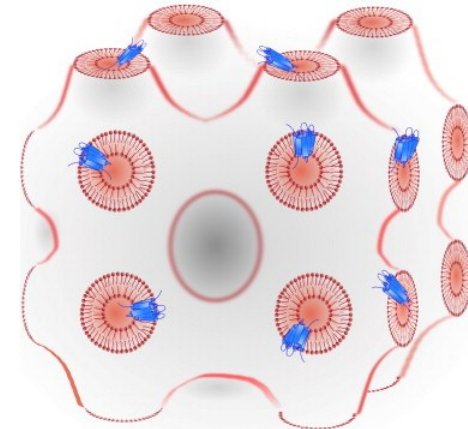
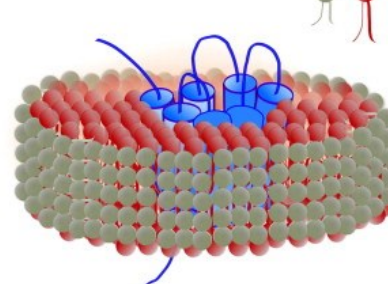
Inserto (lisozima T4)



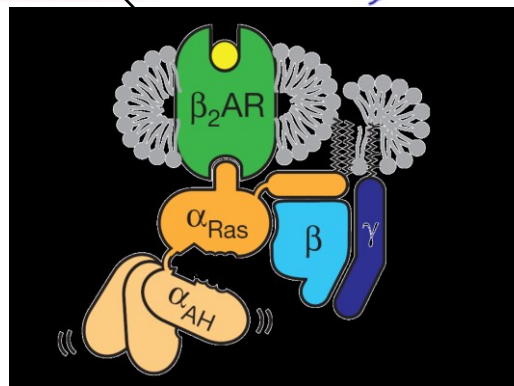
micella di detergente



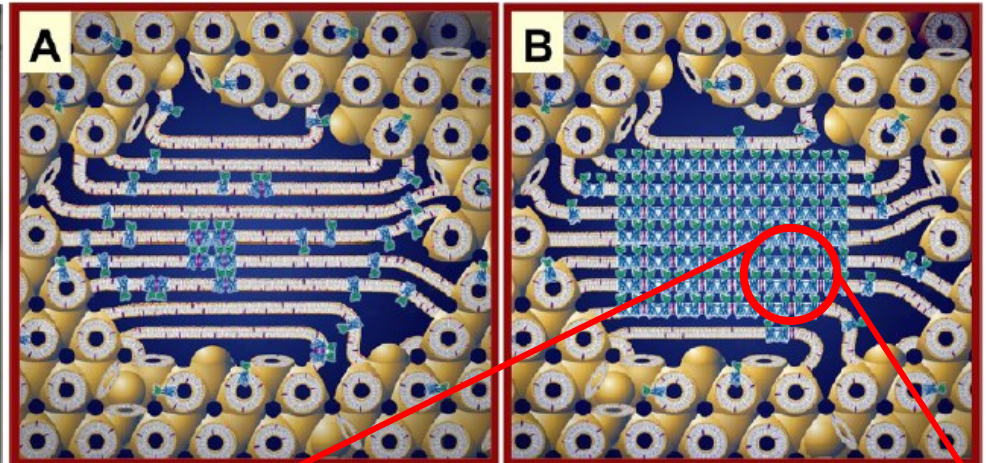
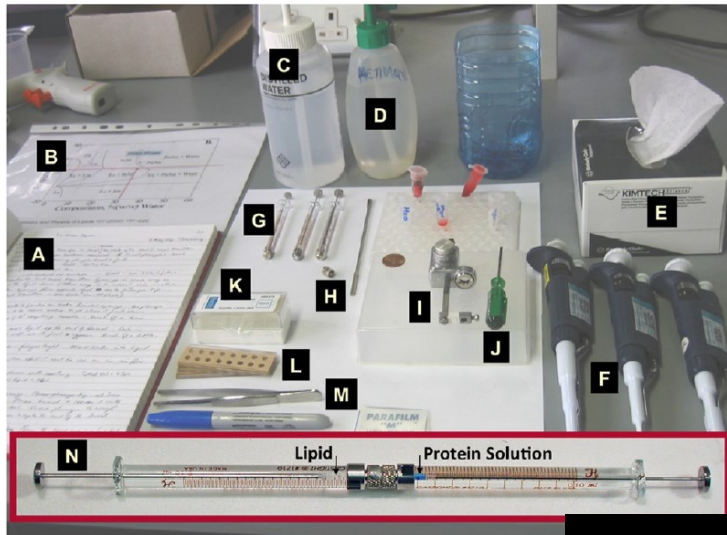
Bicella/nanodisco formato da lipidi a coda lunga e coda corta o HDLP



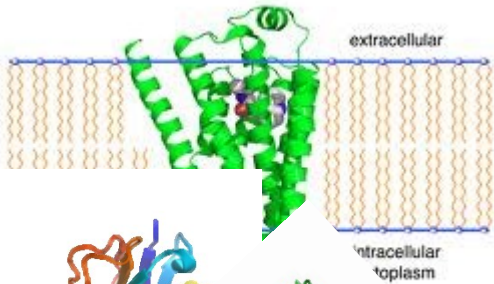
mesofase lipidica



Metodi per studiare la struttura delle PM – XRC (cont.)

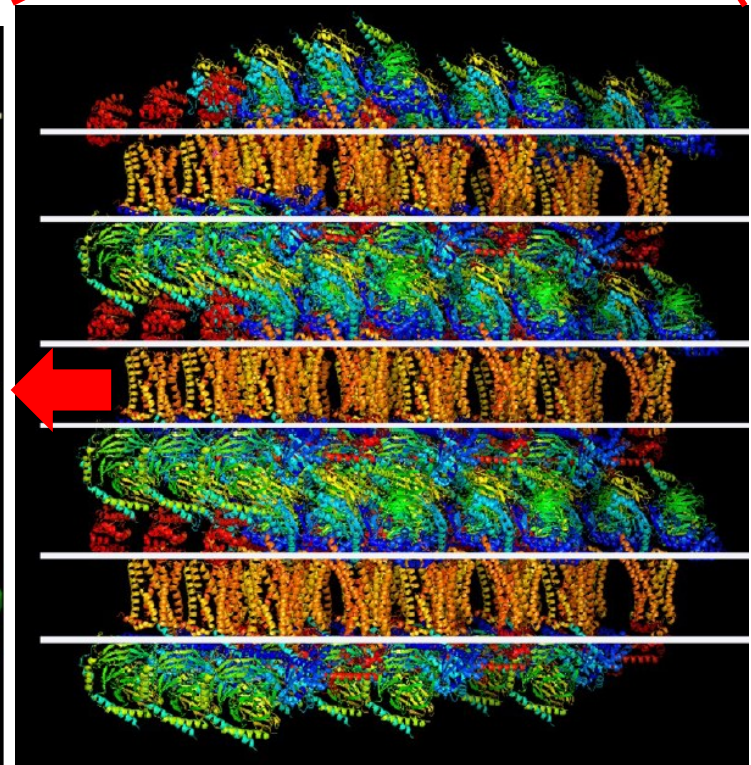
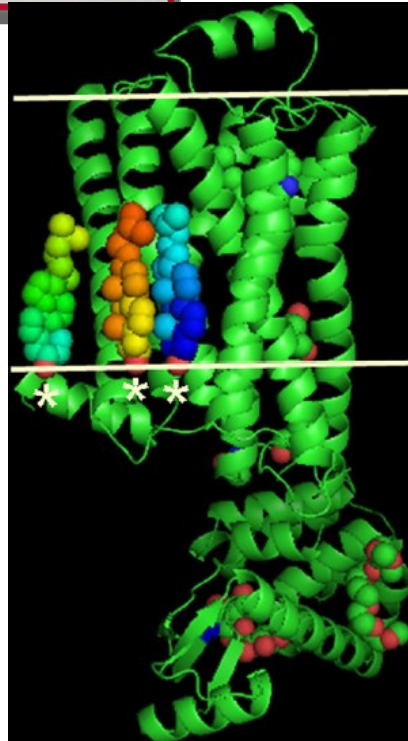


stabilità/superficie polare



stabilizzare con
nanobody

Inserto
(lisozima T4)



Metodi per studiare la struttura delle PM – Cryo-EM

► Single-particle Cryo-EM è una nuova tecnica molto utilizzata per ottenere le strutture delle PM

Sample preparation

