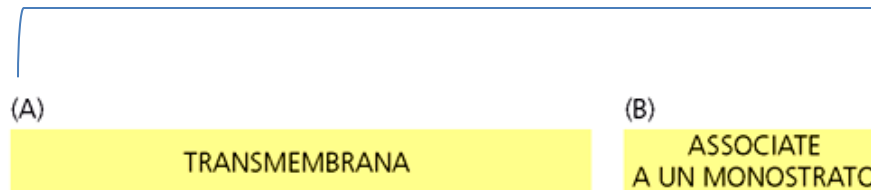
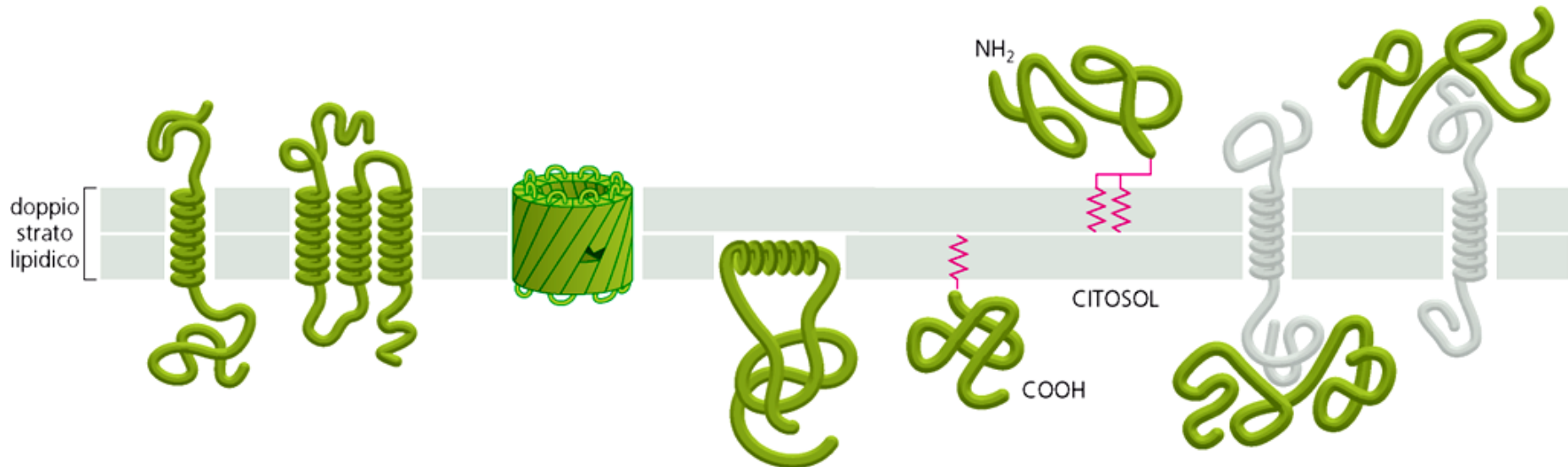
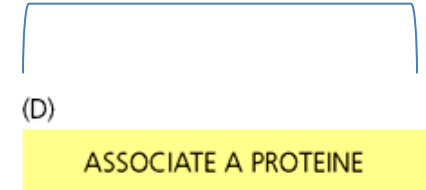


Le proteine si membrana si possono associare al doppio strato lipidico con modalità differenti

Proteine integrali di membrana



Proteine periferiche di membrana



Le **proteine integrali** di membrana possono essere estratte ricorrendo all'uso di **detergenti** quali l'**SDS** (ionico, solubilizza e denatura le proteine) e **TRITON X-100** (non ionico, solubilizza le proteine senza modificarne la struttura).

Estrazione con
detergenti
↓
Separazione con
elettroforesi

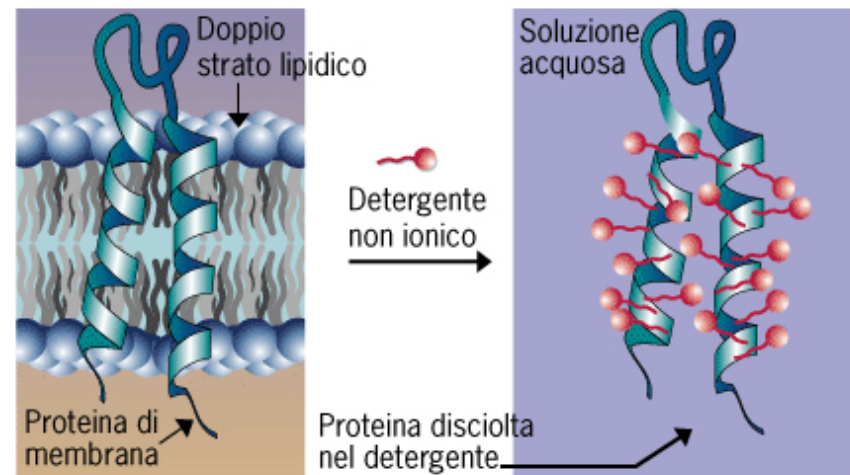
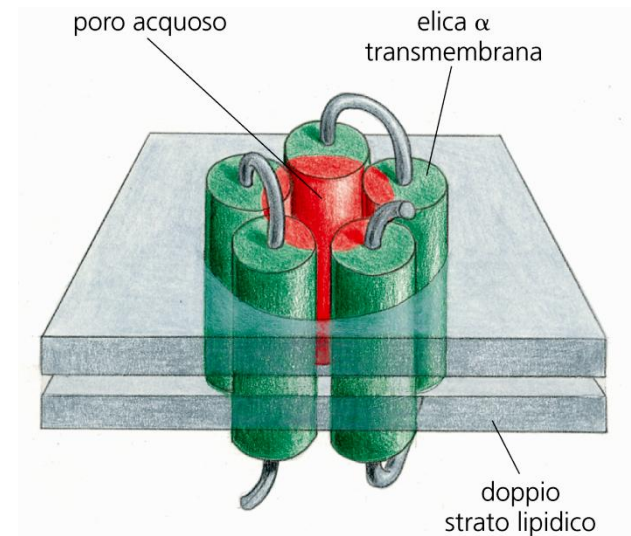


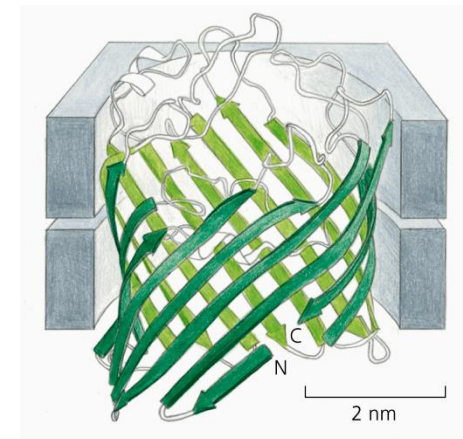
FIGURA 4.16 Solubilizzazione delle proteine di membrana per mezzo di detergenti. Le estremità apolari delle molecole di detergente si associano con i residui non polari della proteina, che precedentemente erano in contatto con le catene di acidi grassi del doppio strato lipidico. Le estremità polari delle molecole di detergente, invece, interagiscono con le molecole di acqua circostanti, mantenendo la proteina in soluzione. I detergenti non ionici, come è mostrato qui, portano in soluzione (solubilizzano) le proteine di membrana senza distruggerne la struttura.

Le proteine integrali possono formare dei pori idrofili che attraversano la membrana e permettono il passaggio di piccole molecole idrosolubili

Un poro idrofilo (**CANALE**) può essere formato dall'associazione di più α -eliche. Sul lato esterno di ciascuna elica si trovano le catene laterali degli aminoacidi **idrofobi** (verde), mentre sul versante interno (lume del poro, rosso) le catene laterali degli aminoacidi **idrofili** formano un poro idrofilo per il passaggio di ioni.



Alcune proteine transmembrana (es.: **PORINE**) attraversano la membrana come foglietti β piegati in modo da formare un cilindro detto **barile β** . Anche in questo caso gli aminoacidi rivolti verso l'interno del cilindro sono per lo più idrofili, quelli esterni idrofobi.



Proteine di membrana ancorate ad un lipide

Le proteine legate a lipidi che si trovano sulla superficie interna della membrana sono di solito ancorate mediante un **acido grasso** (a) o un **gruppo prenil** (b).

Sulla superficie esterna della membrana (c) l'ancora lipidica più frequente è il **glicosil fosfatidilinositolo (GPI)**.

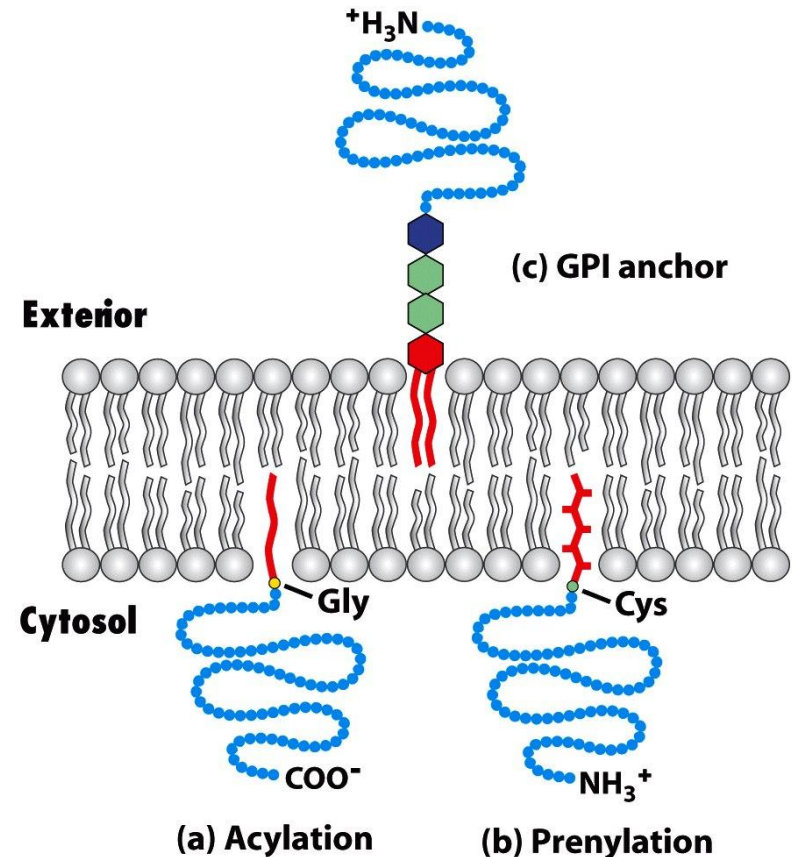


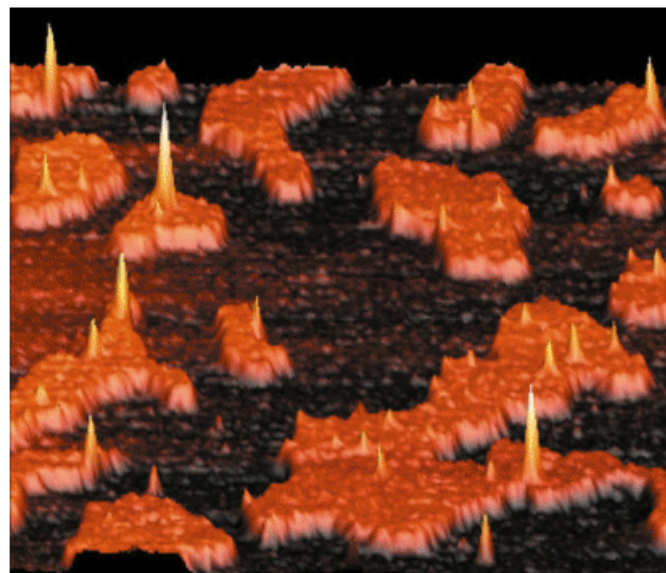
Figure 10-19
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



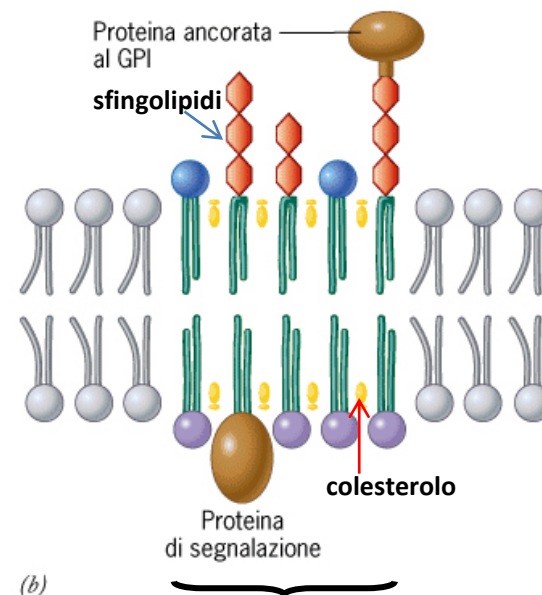
Nella membrana esistono determinate regioni ricche in **sfingolipidi**, **colesterolo** e **proteine ancorate ai lipidi** che formano dei domini ordinati, denominati "**zattere lipidiche**" (**lipid rafts**) per il fatto che "nuotano" in un "mare" di fosfolipidi. A tali particolari regioni della membrana sono, in genere, associate specifiche proteine coinvolte nella comunicazione cellulare.

FIGURA 4.24 Zattere (raft) lipidiche.

(a) Immagine della superficie superiore di un doppio strato lipidico artificiale contenente fosfatidilcolina, che appare come una superficie nera e molecole di sfingomielina, che si organizzano spontaneamente nelle "zattere" colorate in arancione. I picchi gialli mostrano le posizioni di una proteina ancorata al GPI, che è quasi esclusivamente associata alle "zattere" lipidiche. Questa immagine è stata ottenuta con un microscopio a forza atomica, che misura l'altezza di diverse parti del campione a livello molecolare. (b) Modello schematico di una "zattera" lipidica all'interno di una cellula.



(a)



(b)

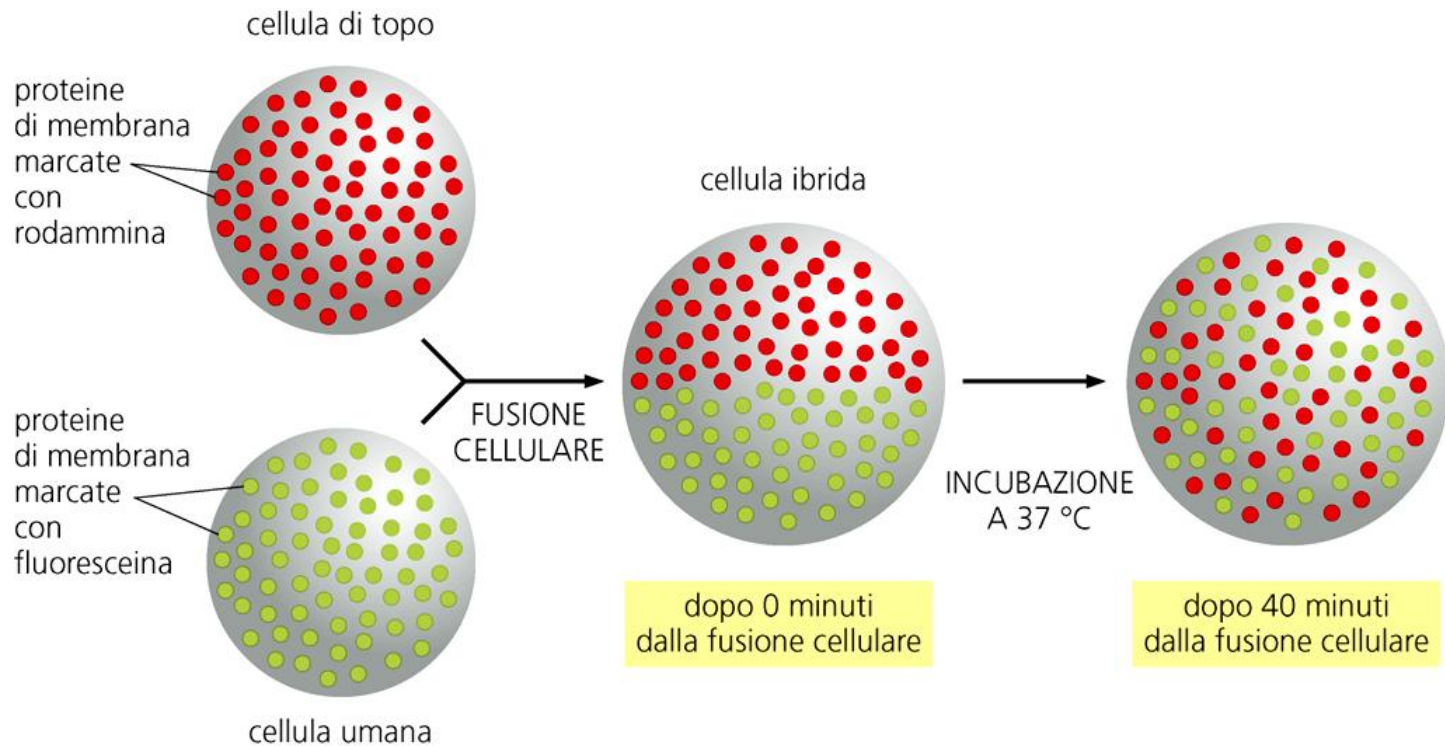
Zattera lipidica

Il foglietto esterno della zattera è costituito principalmente di colesterolo (in giallo) e sfingolipidi (teste in rosso). Anche le molecole di fosfatidilcolina (teste in blu) con lunghe catene di acidi grassi saturi tendono a concentrarsi in questa regione. Si pensa che le proteine ancorate al GPI si concentrino proprio a livello delle "zattere" lipidiche. I lipidi del foglietto esterno della zattera hanno un effetto organizzativo sui lipidi del foglietto interno. Come risultato, i lipidi

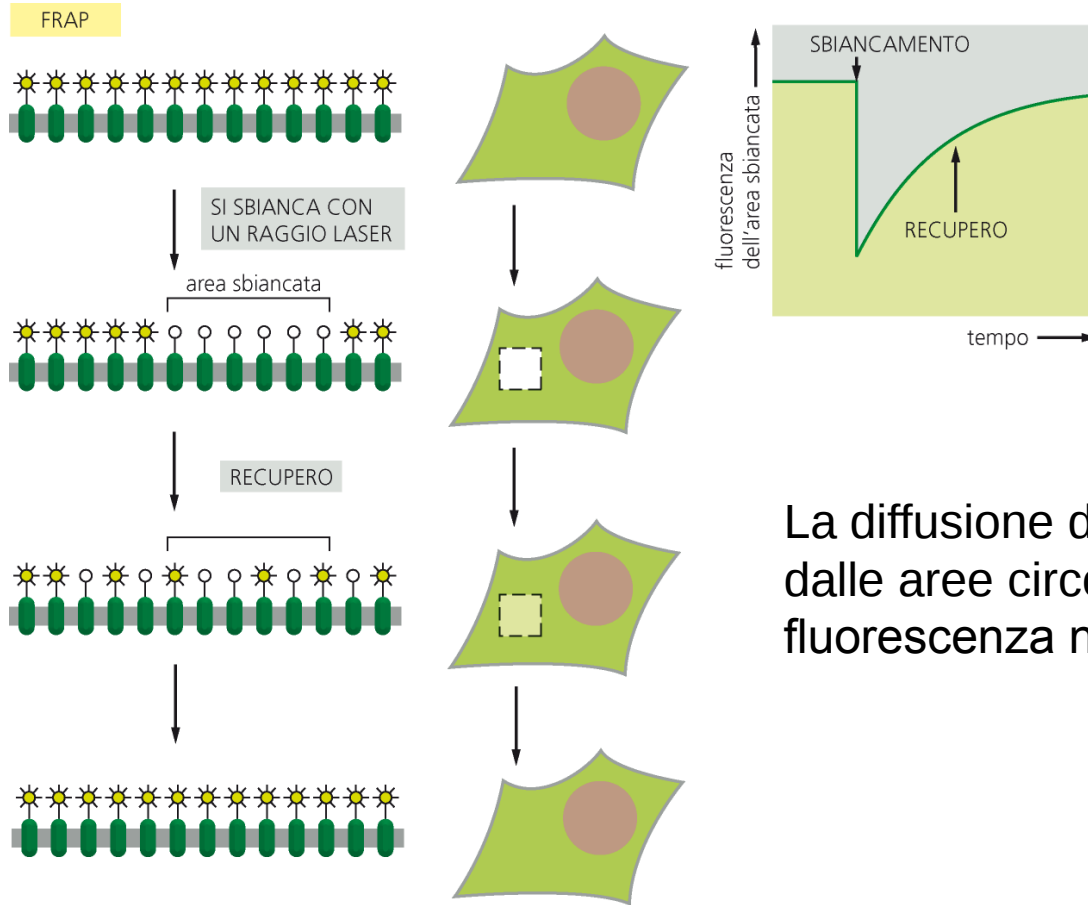
del foglietto interno della zattera sono formati principalmente di colesterolo e glicerofosfolipidi con lunghe code di acidi grassi saturi. Il foglietto interno tende a concentrare le proteine ancorate ai lipidi, come la chinasi Src, coinvolte nella segnalazione cellulare. (Il dibattito relativo all'esistenza delle "zattere" lipidiche è discusso in *Nature Cell Biol.* 9:7, 2007.) (A: DA D. E. SASLOWSKY, ET AL., J. BIOL. CHEM. 277, COVER OF #30, 2002; PER GENT. CONC. DI J. MICHAEL EDWARDSON).

Come si può evidenziare la fluidità delle membrane cellulari?

In seguito a fusione di due cellule diverse, le proteine di membrana si rimescolano rapidamente per diffusione



FRAP = Fluorescence Recovery After Photobleaching

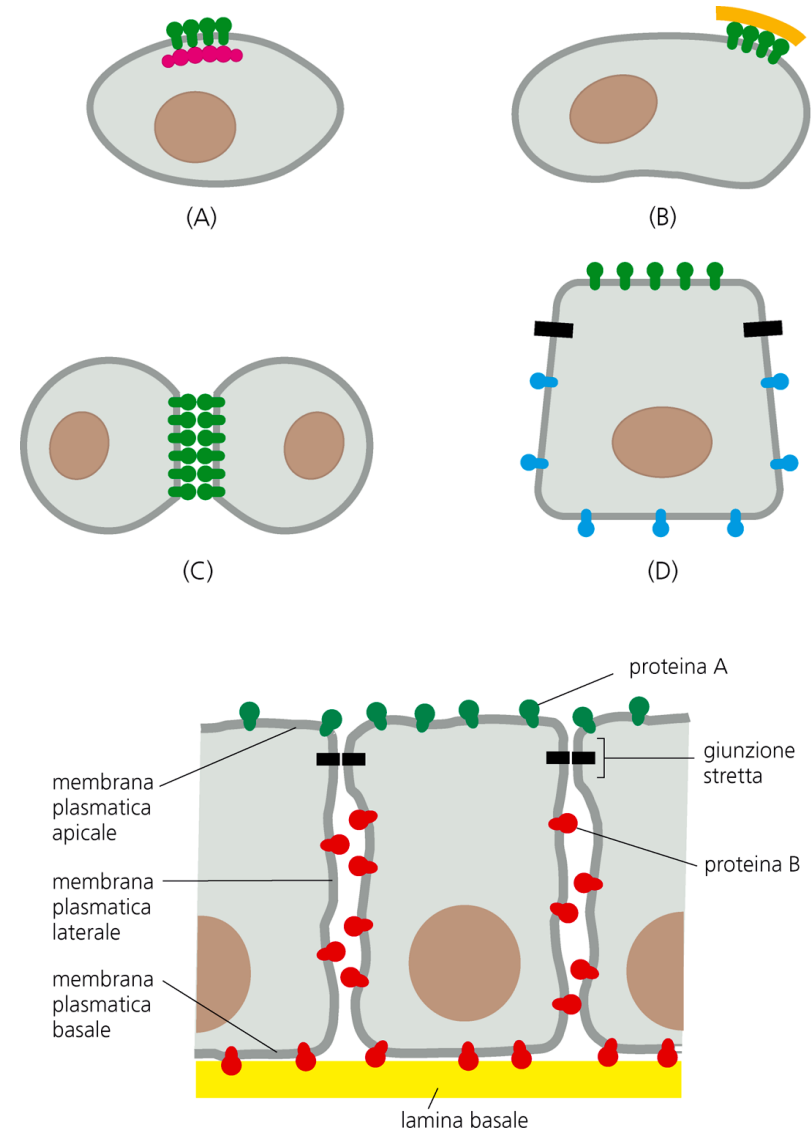


La diffusione di molecole fluorescenti dalle aree circostanti ripristina la fluorescenza nell'area sbiancata

Limitazioni alla mobilità laterale delle proteine

Ci sono vari modi per limitare la mobilità laterale delle proteine della membrana plasmatica:

- A. Ancoraggio al cortex cellulare
- B. Ancoraggio a molecole della matrice extracellulare
- C. Ancoraggio alle proteine della superficie di un'altra cellula
- D. Confinamento ad un particolare dominio di membrana da barriere di diffusione (es.: giunzioni strette delle cellule dell'epitelio intestinale)



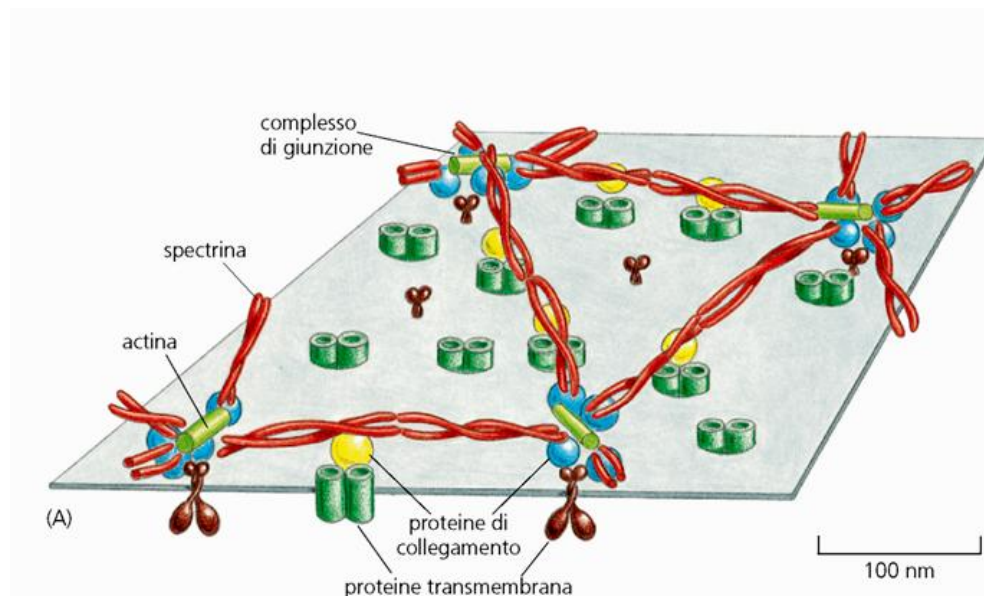
L'ancoraggio reciproco di proteine di membrana e i legami con il citoscheletro possono limitare la mobilità



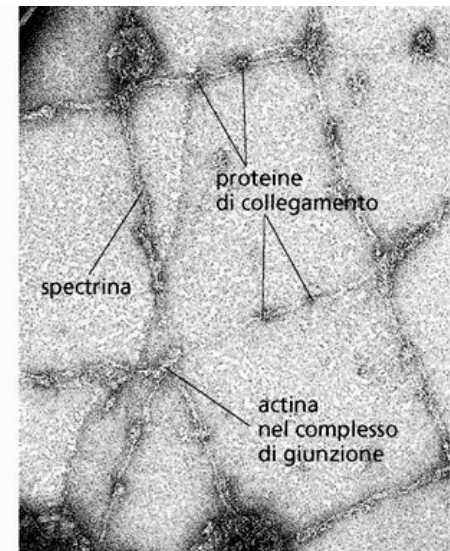
(a)

5 μm

Il complesso di proteine che ricopre la faccia citoplasmatica della membrana del globulo rosso costituisce il **CORTEX CELLULARE**: una regione periferica del citoplasma, a ridosso della membrana, che contribuisce a irrobustire la membrana e a dare ancoraggio alle proteine. In altre cellule il cortex può essere più spesso e complesso.



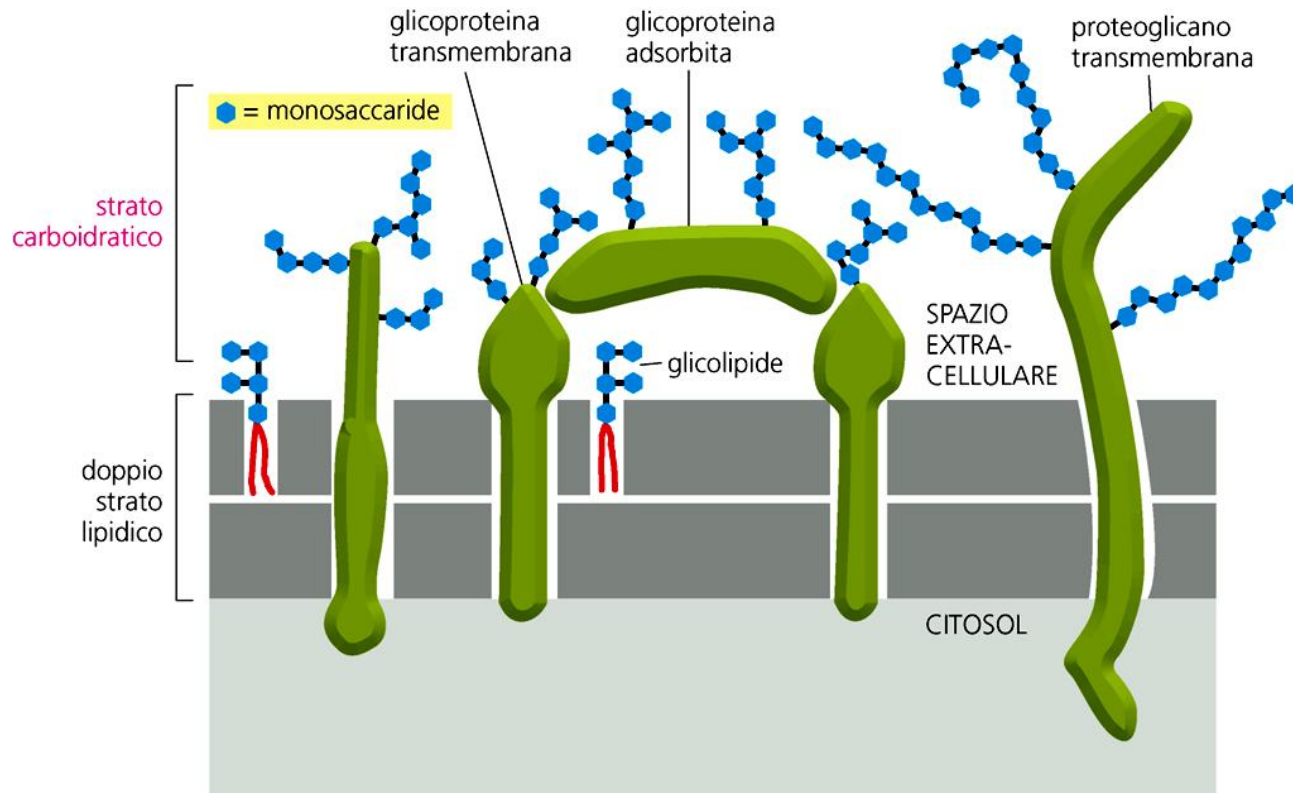
(A)

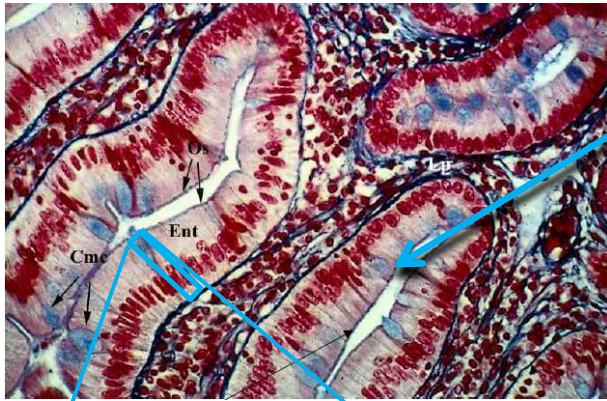


(B)

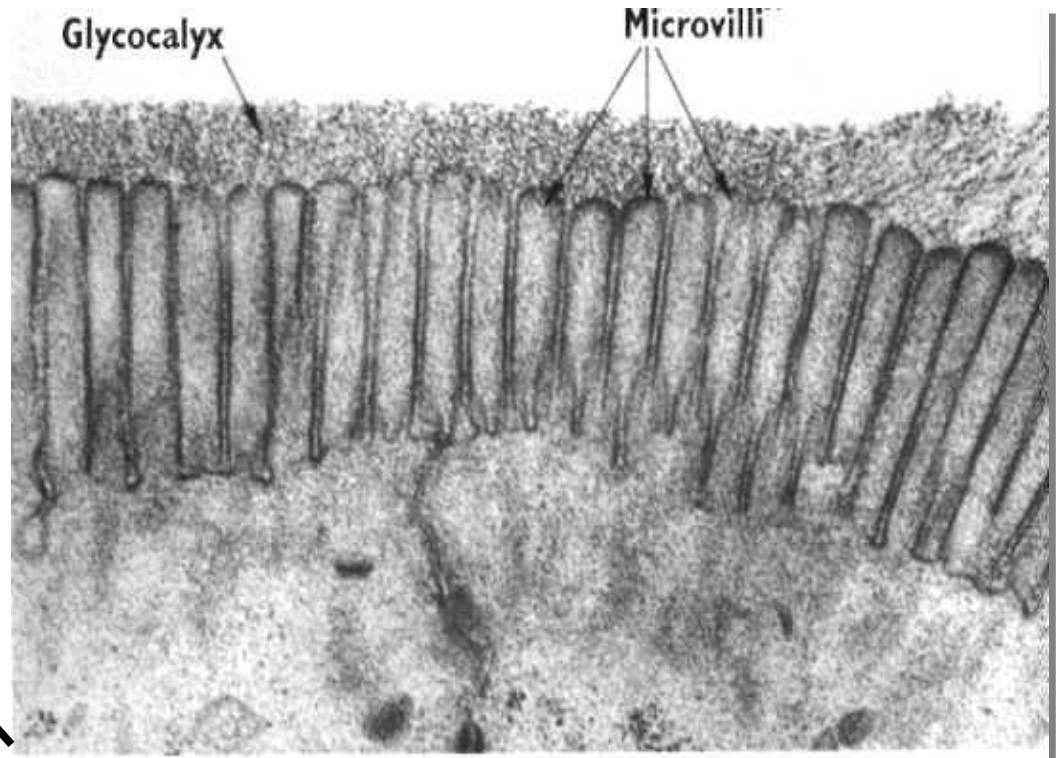
La componente glucidica delle membrane

E' presente esclusivamente nel versante esterno. Gli zuccheri possono essere legati alle proteine (glicoproteine) o ai lipidi (glicolipidi). I carboidrati di superficie hanno un ruolo importante nel **riconoscimento tra cellule** e **nell'adesione cellulare**. In alcuni tipi cellulari la componente glucidica delle proteine e dei lipidi è molto abbondante e forma uno spesso strato esterno, definito "**Glicocalice**" dai ricercatori che per la prima volta lo descrissero.

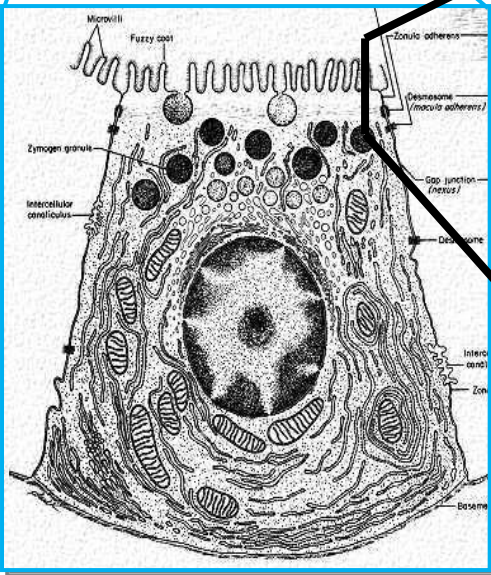




Il **glicocalice** protegge la superficie cellulare da danni meccanici e chimici e, dal momento che assorbe acqua, rende scivolosa la superficie cellulare.



Microfotografia al ME di una cellula dell'epitelio intestinale i cui microvilli sono ricoperti da glicocalice

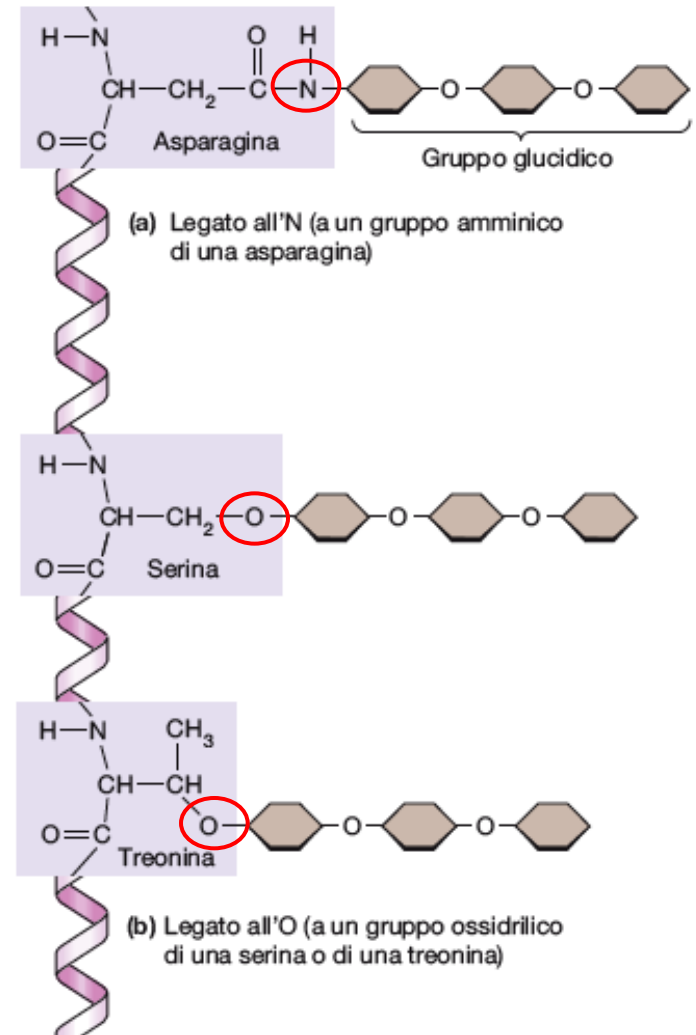


L'aggiunta di una catena laterale glucidica a una proteina attraverso un legame covalente è chiamata **glicosilazione**.

I carboidrati più frequenti nelle glicoproteine sono il **galattosio**, il **mannosio**, l'**N-acetilglucosamina** e l'**acido sialico**.

La glicosilazione può avvenire o su un atomo di azoto (**glicosilazione legata a N**) o ad un atomo di ossigeno (**glicosilazione legata ad O**).

La composizione esatta dei carboidrati è specifica per i diversi tipi cellulari e può variare in funzione dello stadio di maturazione o in risposta a specifici segnali.



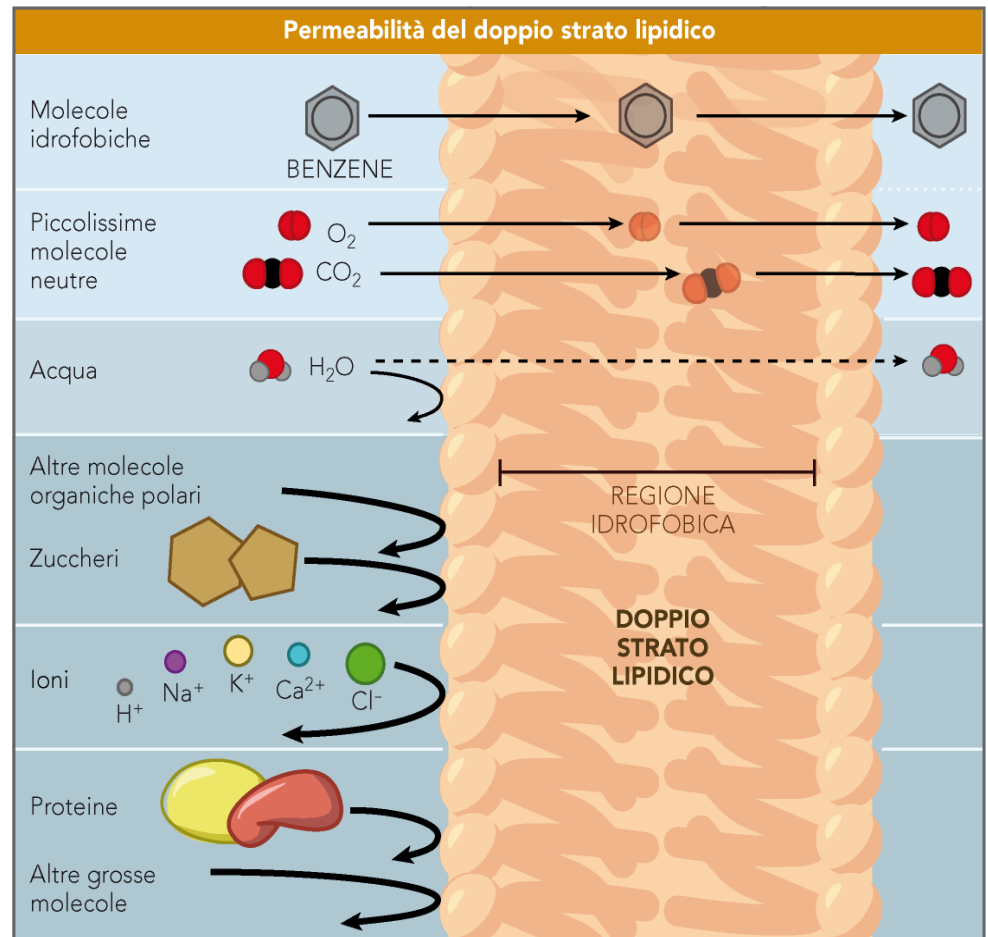
Il trasporto attraverso la membrana plasmatica

La cellula deve essere in grado di scambiare materiali con l'ambiente che la circonda. Questo processo è controllato dalla membrana plasmatica. In che modo?

Per capirlo immaginiamo di avere a che fare con una membrana costituita unicamente dal doppio strato lipidico, senza proteine.

La velocità di diffusione di una molecola attraverso un doppio strato lipidico sintetico dipende dalle sue **dimensioni** e dalla sua **solubilità** di membrana.

Gli ioni e molte molecole che la cellula utilizza come nutrienti non diffondono direttamente o perché sono cariche o sono troppo grandi per poter attraversare un doppio strato lipidico puro.

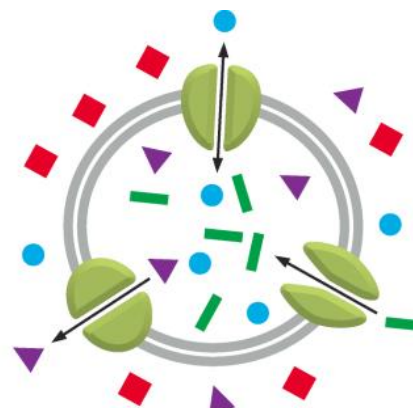


Come possono molecole cariche e/o di grosse dimensioni superare la barriera fosfolipidica?



(A) doppio strato lipidico
artificiale privo di proteine

I doppi strati lipidici artificiali sono impermeabili alla maggior parte delle molecole idrosolubili



(B) membrana cellulare

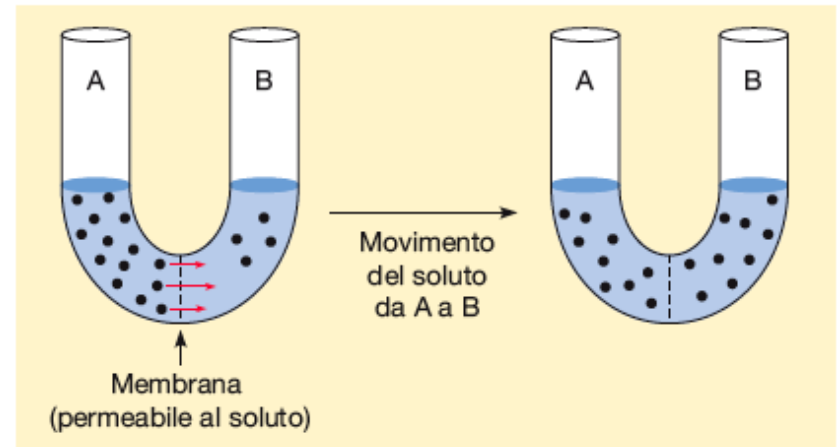
Le membrane cellulari possono essere attraversate dalle molecole idrosolubili grazie alla presenza di PROTEINE DI TRASPORTO

Cosa regola la direzione del trasferimento di molecole attraverso la membrana plasmatica?

Concetti di base:

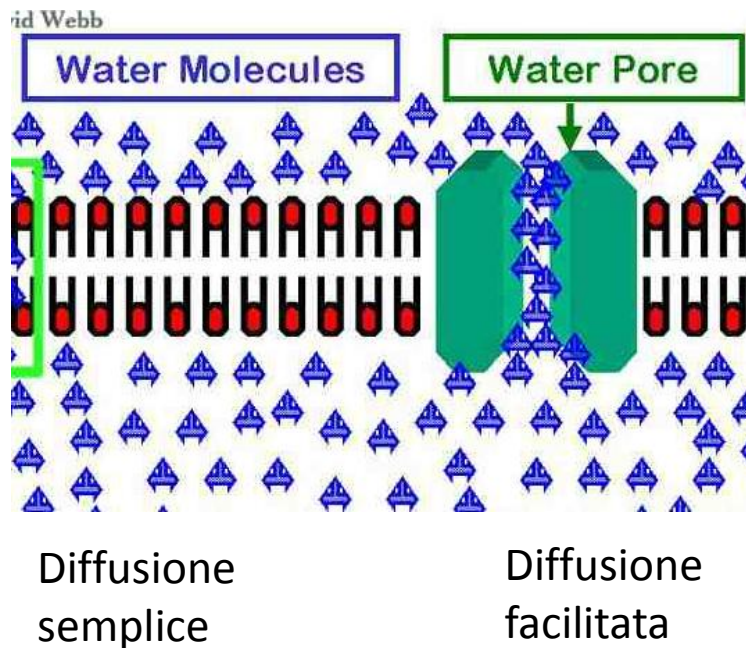
- **DIFFUSIONE** = tendenza delle molecole a distribuirsi uniformemente nello spazio disponibile.
- Se la distribuzione di una popolazione di molecole non è omogenea attraverso due compartimenti separati da una membrana permeabile, le molecole diffonderanno maggiormente dal compartimento a maggiore concentrazione, fino a raggiungere un **equilibrio dinamico** (numero di molecole che si sposta in una direzione = numero molecole che si sposta nella direzione opposta)

(a) La **diffusione semplice** avviene quando la membrana che separa le camere A e B è permeabile alle molecole del soluto disciolto, rappresentate dai punti neri. Un passaggio netto di molecole di soluto attraverso la membrana avviene dalla camera A a quella B (dalla concentrazione maggiore alla minore). L'equilibrio viene raggiunto quando la concentrazione del soluto è la stessa in entrambe le camere.

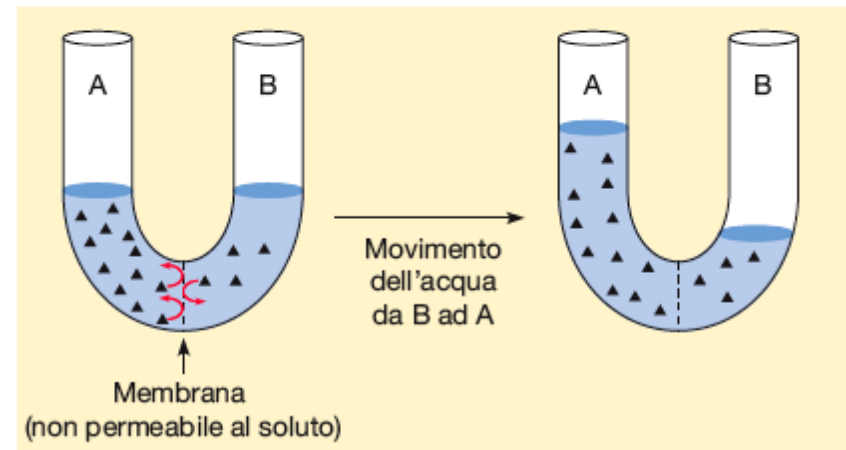


La membrana plasmatica, grazie alle sue caratteristiche strutturali, è una barriera altamente selettiva, cioè permette la DIFFUSIONE SEMPLICE solo di pochissime molecole (gas, **acqua**, piccole molecole non polari).

Come fa l'acqua ad attraversare le membrane cellulari? Cosa determina la direzione di diffusione delle molecole d'acqua?



(b) L'osmosi avviene quando la membrana posta tra le due camere non è permeabile al soluto disciolto, rappresentato dai triangoli neri. Poiché il soluto non può attraversare la membrana, l'acqua diffonde dalla camera B in cui la concentrazione del soluto è più bassa alla camera A in cui la concentrazione del soluto è più alta. All'equilibrio, la concentrazione del soluto sarà uguale da entrambi i lati della membrana.



L'acqua diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica in risposta alla **pressione osmotica**: movimento netto di molecole di acqua verso il compartimento a maggior concentrazione di ioni e molecole organiche (tendenza ad annullare il **gradiente di concentrazione**)

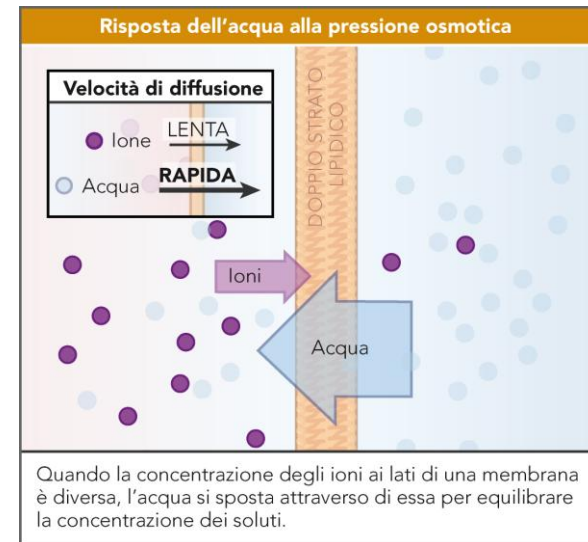
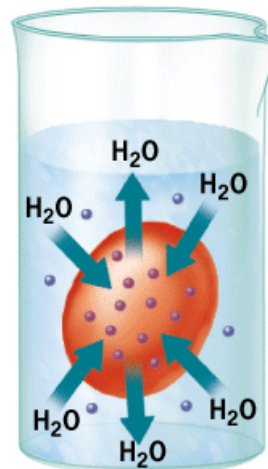


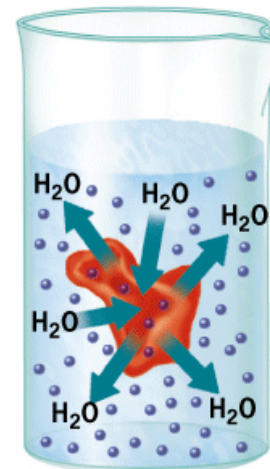
FIGURA 4.35 Gli effetti dovuti alle differenze nella concentrazione di soluti sui lati opposti della membrana plasmatica. (a) Una cellula posta in una soluzione ipotonica (ossia con una concentrazione di soluti inferiore a quella del citoplasma cellulare) si gonfia a causa di un ingresso netto di acqua per osmosi. (b) Una cellula posta in una soluzione ipertonica si restringe a causa di una perdita netta di acqua per osmosi. (c) Una cellula posta in una soluzione isotonica mantiene un volume costante perché il flusso di acqua che entra per osmosi è uguale a quello dell'acqua che esce.

(a) Soluzione ipotonica



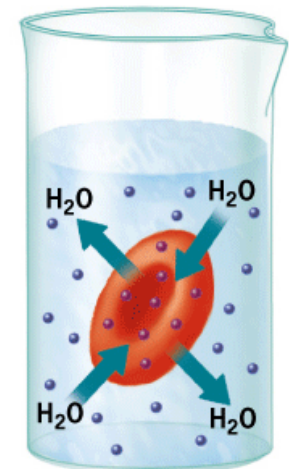
Guadagno netto di acqua
La cellula si gonfia

(b) Soluzione ipertonica



Perdita di acqua
La cellula si raggrinzisce

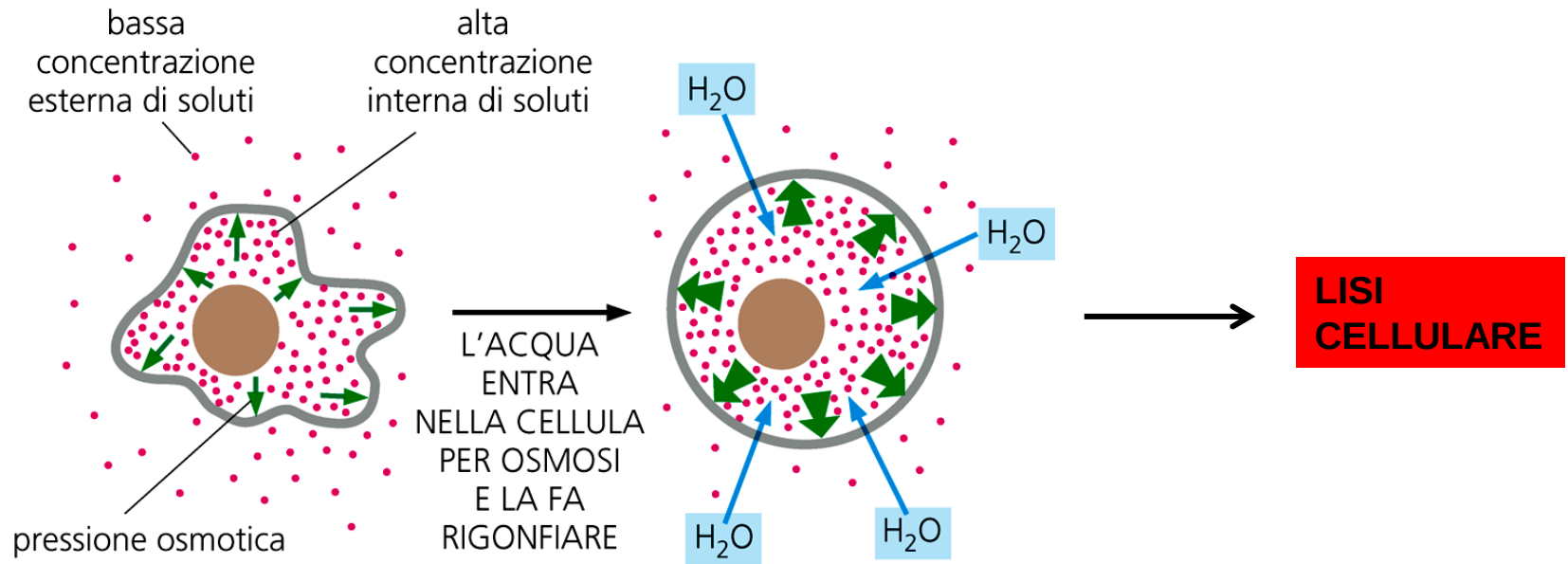
(c) Soluzione isotonica



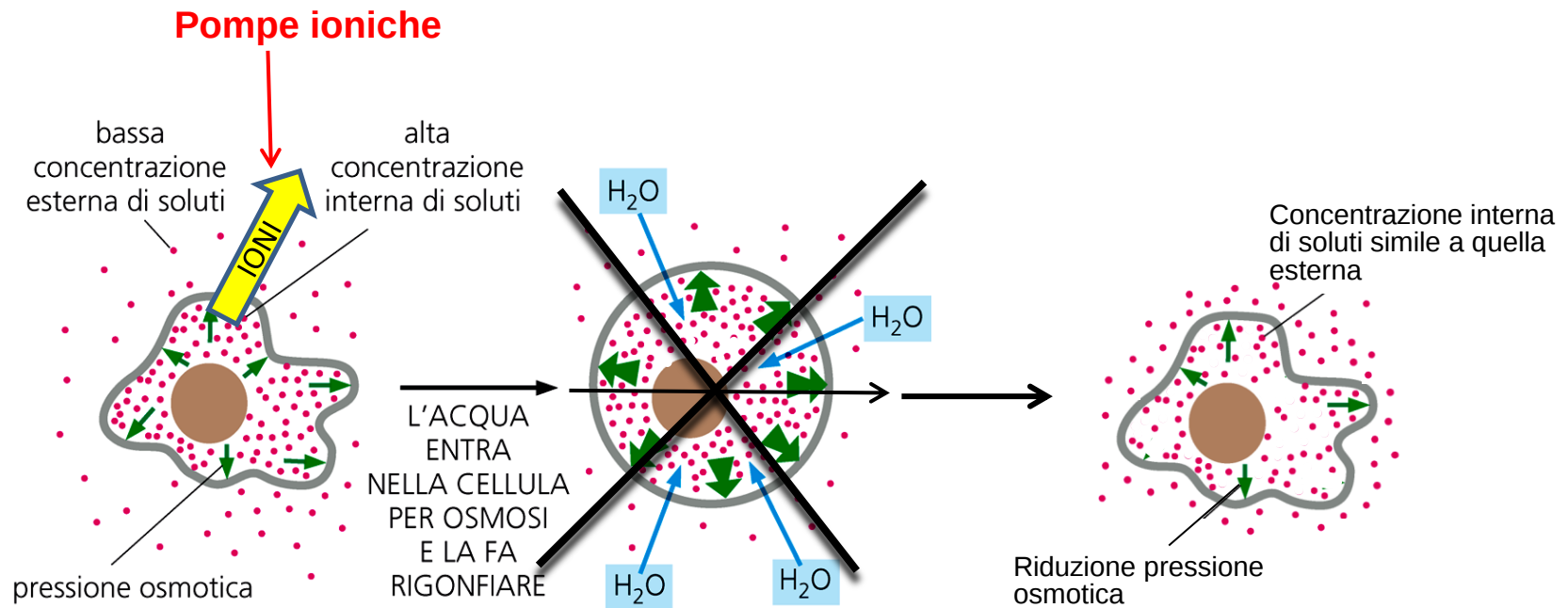
Né guadagno, né perdita

DANGER!!!

L'interno della cellula è ricco di macromolecole organiche, soprattutto proteine, prevalentemente cariche. Sono anche abbondanti piccole molecole organiche cariche, come aminoacidi e nucleotidi. La cariche di queste molecole attirano i rispettivi controioni extracellulari (soprattutto Na^+ e Cl^-). Tutto questo porterebbe l'interno della cellula ad essere iperosmotico rispetto all'esterno, con conseguente richiamo di acqua e rigonfiamento e rottura della cellula



Come risolve la cellula questo potenziale problema?



Le cellule animali pompano ioni contro il loro gradiente di concentrazione, espellendo quindi gli ioni penetrati in eccesso ed annullandone gli effetti osmotici. Questa attività è svolta principalmente dalle **POMPE IONICHE**, un tipo di trasportatore di membrana che utilizza energia per muovere ioni contro il loro gradiente di concentrazione

Le concentrazioni ioniche interne alla cellula differiscono molto da quelle esterne. Tale differenza è fondamentale per il buon funzionamento della cellula

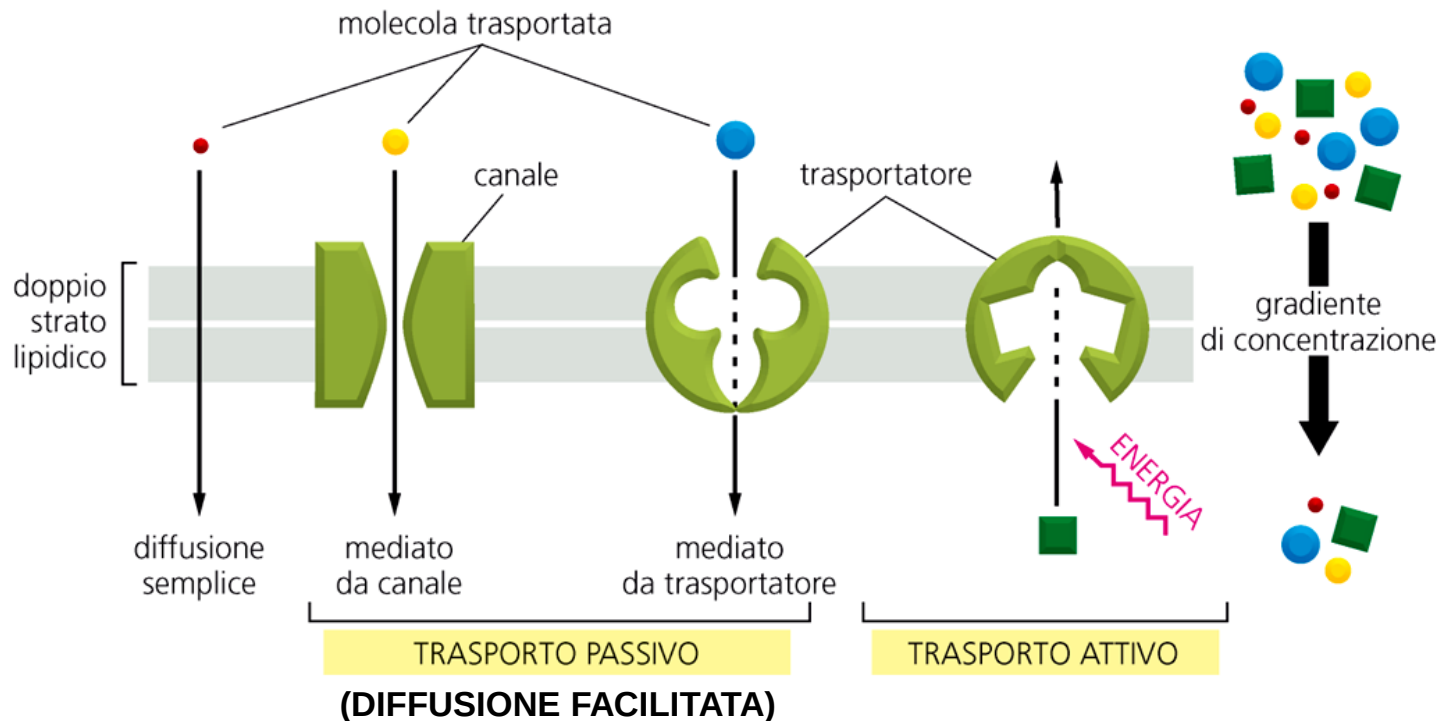
Concentrazioni ioniche all'interno e all'esterno di una cellula animale				
	● Na ⁺	○ K ⁺	● Ca ²⁺	● Cl ⁻
Concentrazione extracellulare (mM)	145	4	1,5	123
Concentrazione intracellulare (mM)	12	155	10 ⁻⁴	4,2

Da cosa dipende il fatto che le molecole trasportate da canali o trasportatori entrino o escano dalla cellula?

In teoria dovrebbe dipendere dalle concentrazioni relative del soluto.

Se le molecole sono in grado di attraversare la membrana, dovrebbero fluire spontaneamente “verso valle”, cioè dal lato dove la concentrazione è più alta al lato dove la concentrazione è più bassa. Questo spostamento è detto **PASSIVO**, perché non necessita di energia aggiuntiva, è sufficiente il gradiente di concentrazione.

A volte è necessario spostare un soluto contro il suo gradiente di concentrazione, questa attività richiede energia: TRASPORTO **ATTIVO**



Caratteristiche del trasporto facilitato (mediato da carrier):

- **SATURABILITA'**: il meccanismo è simile a quello degli enzimi
- **SPECIFICITA'**: ciascun trasportatore è specifico per una determinata sostanza

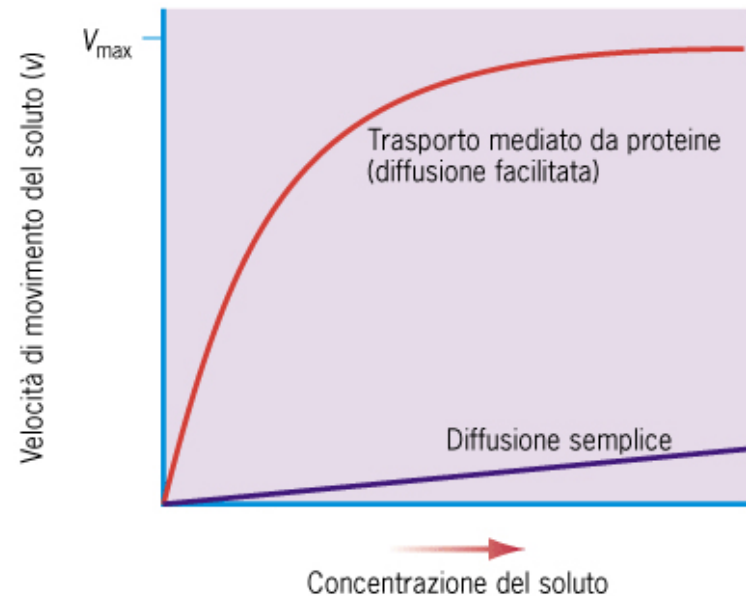


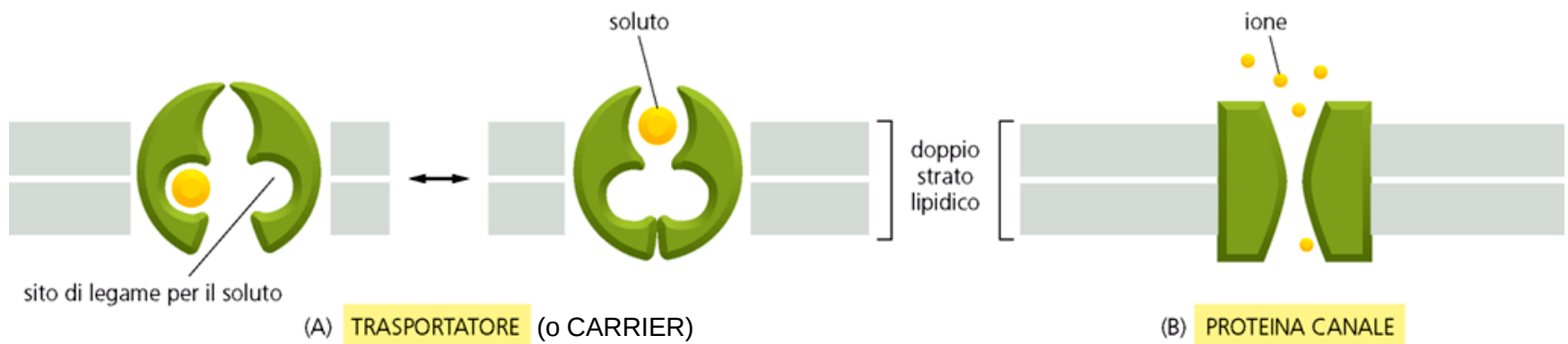
FIGURA 4.45 Le cinetiche della diffusione facilitata e della diffusione semplice a confronto.



Gerald Karp - IV Edizione
Biologia Cellulare e Molecolare
EdiSES

Il trasporto di molecole idrosolubili attraverso la membrana plasmatica è realizzato mediante due classi di proteine di trasporto di membrana:

- **TRASPORTATORI:** sono altamente specifici; dopo aver legato il soluto, modificano la propria conformazione, trasferendolo dall'altro lato della membrana
- **CANALI:** sono dei pori idrofili attraverso i quali diffondono principalmente ioni inorganici; selezionano i soluti in base alla carica e alla dimensione (meno specifici dei trasportatori); in molti canali la conformazione chiusa o aperta è regolata da uno stimolo esterno o interno alla cellula. Il trasferimento attraverso i canali è molto più veloce che attraverso i trasportatori



Porta “girevole”

Porta “aperta”

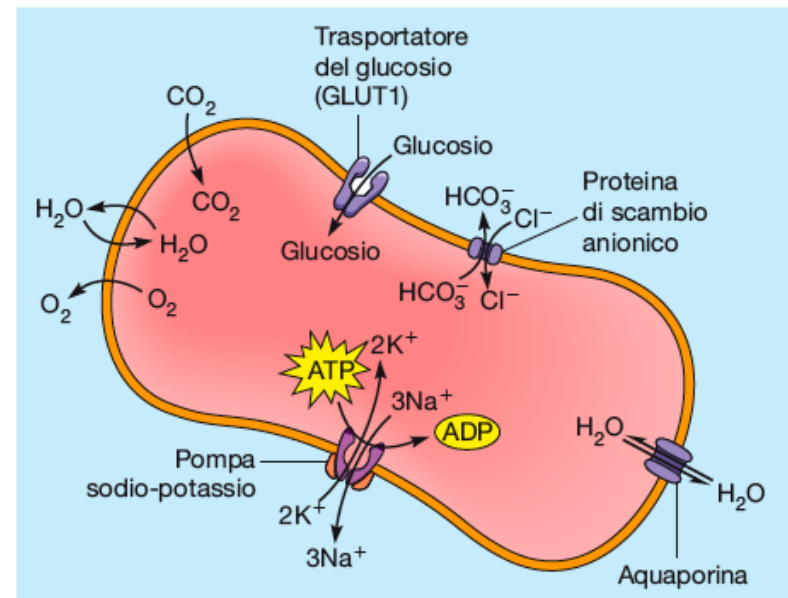
Esempi di trasporto attraverso la membrana plasmatica dell'eritrocita

(a) Diffusione semplice.

L'ossigeno e l'anidride carbonica diffondono attraverso la membrana plasmatica in risposta alle loro concentrazioni relative interne ed esterne alla cellula.

(b) Diffusione facilitata mediata da proteine carrier.

Il movimento del glucosio attraverso la membrana plasmatica è facilitato da uno specifico trasportatore del glucosio chiamato GLUT1. Una proteina a scambio anionico facilita il trasporto reciproco degli ioni cloruro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-).



(d) Trasporto attivo. Attivata dall'idrolisi dell'ATP, la pompa Na^+/K^+ trasporta tre ioni sodio all'esterno e due ioni potassio all'interno, stabilendo in tal modo un potenziale elettrochimico a ridosso della membrana plasmatica per entrambi gli ioni.

(c) Diffusione facilitata mediata da proteine canale. Le proteine canale acquaporine possono facilitare il rapido passaggio delle molecole di acqua all'interno o all'esterno.