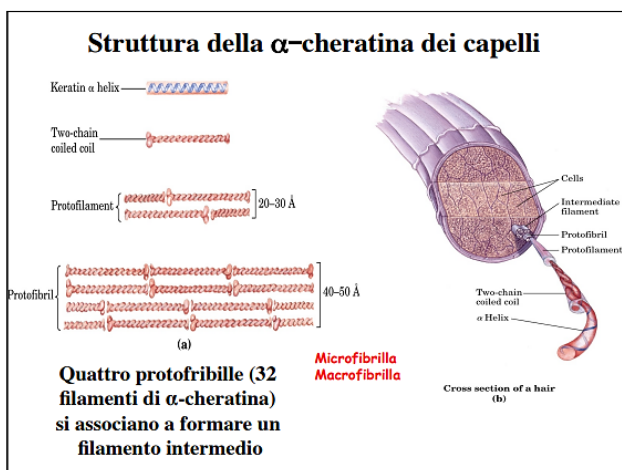


LEZIONE 3 (sbobinatori: Federica Galluccio, Flavia Ricco)

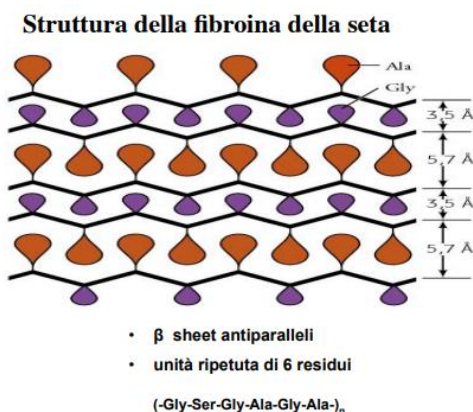
ARGOMENTI: le proteine, il trasporto di membrana

Le proteine presenti in cellula possono essere divise in due grandi raggruppamenti: proteine **globulari** e proteine **fibrose**. Le proteine globulari sono quelle che assumono un aspetto appunto **globulare**, a differenza delle proteine fibrose che assumono un aspetto **lineare**. Sostanzialmente questo tipo di proteine svolgono due funzioni diverse. Le proteine generalmente più abbondanti sono le proteine globulari, quelle fibrose sono meno utilizzate. In genere le proteine fibrose hanno a differenza delle proteine globulari, un **unico tipo** di struttura secondaria che le rende molto più stabili strutturalmente rispetto alle altre; mentre le globulari hanno **più tipi** di strutture secondarie (ad esempio la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi presenta strutture secondarie sia ad α -elica che a foglietto β). In genere le proteine fibrose, poi, sono poco solubili nell'ambiente acquoso a differenza di quelle globulari che sono più solubili (il citoplasma possiamo considerarlo come ambiente acquoso). Le fibrose hanno legami crociati, le globulari hanno una forma tridimensionale caratteristica e tutta una serie di legami. Mentre le fibrose sono delle proteine il cui ruolo ricopre solo un aspetto strutturale in cellula, le globulari possono avere numerosi tipi di funzioni.



In genere le proteine fibrose sono caratterizzate dalla ripetizione continua dello stesso tipo di struttura secondaria, che può essere sia il foglietto β che l' α -elica. Per esempio, la **cheratina** dei capelli, che è una proteina fibrosa, ha una struttura costituita da un segmento di α -elica che si ripete continuamente; e che partendo dall' α -elica singola, da luogo prima a sovrastrutture con l'incrocio di due α -eliche (che danno il cosiddetto "two-chain coiled coil").

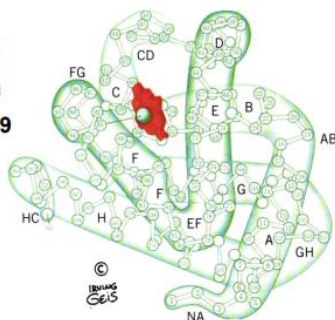
Via via queste strutture si riassociano per dare il protofilamento, le protofibrille e quindi la struttura della cheratina dei capelli.



L'altro esempio di proteina strutturale è la **fibroina** della seta, formata da ripetizioni di foglietti β antiparalleli in cui un'unità di 6 amminoacidi si ripete continuamente.

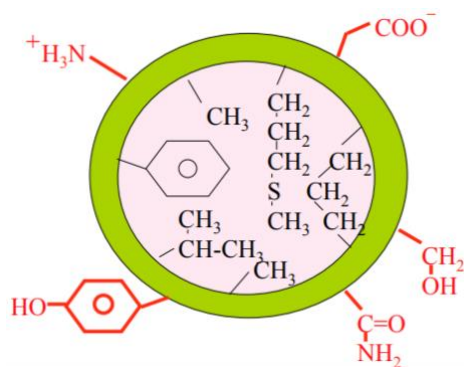
Mioglobina

- 153 residui amminoacidici
- Peso molecolare 16700 Da
- Struttura 3D ai raggi X 1959
- otto α -eliche
- Contiene un gruppo eme
 - un atomo di Fe^{2+}
 - un anello porfirinico



Questa è la rappresentazione grafica di una proteina globulare costituita da α -eliche, avvolta in una struttura tridimensionale più raccolta al cui interno è presente un anello porfirinico che lega un atomo di ferro. Si tratta della **mioglobina**, formata da 8 α -eliche, è una singola subunità che svolge la sua funzione fisiologica; perciò, non ha la struttura detta quaternaria.

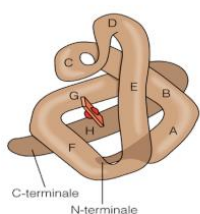
Una caratteristica delle proteine globulari, dovendo essere solubili in ambiente acquoso, è che in linea di massima le catene laterali idrofiliche vengono rivolte verso l'**esterno** della proteina, mentre le catene idrofobiche sono nel cuore della proteina quindi schermate dall'ambiente idrofilico.



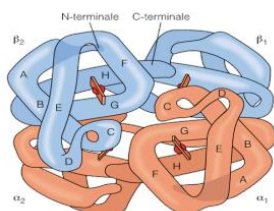
In questa rappresentazione vediamo le catene idrofiliche (quindi gli amminoacidi polari) posti all'esterno della proteina (verso l'ambiente acquoso); mentre le catene idrofobiche sono poste all'interno dell'ambiente acquoso.

Non tutte le proteine hanno solo la struttura terziaria, ma alcune per essere funzionanti devono assumere una struttura quaternaria; dove per struttura quaternaria si intende l'unione di almeno due subunità proteiche che interagiscono tra di loro. Le subunità proteiche che compongono questo tipo di proteina possono essere uguali tra loro, diverse o variamente distribuite. Ad esempio, le proteine fibrose hanno sempre lo stesso tipo di subunità di struttura primaria; mentre generalmente le proteine globulari hanno vari tipi di subunità che le costituiscono.

MIOGLOBINA



EMOGLOBINA



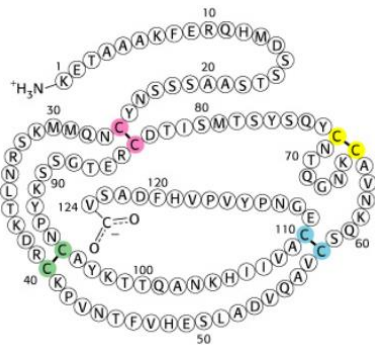
Una delle proteine ad avere struttura quaternaria, pur essendo molto simile nelle sue subunità principali alla mioglobina, è l'**emoglobina** costituita da 4 catene polipeptidiche a due a due uguali tra di loro. Quindi, mioglobina ed emoglobina hanno questa caratteristica: la subunità principale è uguale, eppure svolgono funzioni fisiologiche molto diverse.

Quando devono essere studiate le proteine, queste devono essere isolate dal sistema nelle quali si trovano, dalla cellula in generale; e quindi devono essere sottoposte ad una serie di estrazioni che si effettuano con una serie di solventi che tendono a far perdere la struttura tridimensionale della proteina. Ciò che interessa ottenere dall'estrazione della proteina è misurarne la sua attività. Le azioni che vengono eseguite sulle proteine sono:

- Calore, che rompe le interazioni deboli

- Variazione di pH, che va a rompere il legame idrogeno
- Estrazioni con solventi (acetone, alcol), che rompono le interazioni idrofobiche
- Altri tipi di solventi (detergenti, urea), che rompono le interazioni idrofobiche.

Quello che si ottiene dall'estrazione della proteina dalla componente cellulare è in primo luogo la rottura dei ponti disolfuro che crea il problema più grosso per la rinaturazione delle proteine. Il processo di estrazione di una proteina da una cellula, porta ad una proteina abbastanza denaturata che poi deve subire un processo di rinaturazione di modo che la proteina riacquisisca la sua struttura tridimensionale. I ponti disolfuro sono quelli che hanno il problema più grosso quando si effettua la pratica di rinaturazione.



Se prendiamo una proteina che ha più residui di cisteina nella sua struttura legati da ponti disolfuro, una volta che la proteina è estratta abbiamo rotto i ponti disolfuro. Quindi, se il processo di rinaturazione non si svolge entro certi limiti, noi potremo ottenere la costituzione di ponti disolfuro che non corrispondono a quelli nativi. Poiché questi sono i legami a più alto contenuto energetico, chiaramente la struttura tridimensionale della proteina ne risente. Per far riacquistare la vera struttura tridimensionale alla proteina, le pratiche di rinaturazione della proteina devono essere molto lente.

Pratica comune per la risoluzione del problema della riacquisizione della struttura tridimensionale e la formazione dei ponti disolfuro, è quella di mantenere in queste soluzioni tracce di agenti che possono rompere i ponti disolfuro (ad esempio β -mercaptoetanolo, ditioeitololo e ditiotreitolo). Mantenendo queste tracce di agenti riducenti all'interno della soluzione, la proteina lentamente (ma non sempre) può arrivare alla completa rinaturazione.

BREVE CENNO AL TRASPORTO DI MEMBRANA E ALLA STRUTTURA DELLE MEMBRANE BIOLOGICHE

Le membrane biologiche sono:

- Formate da un doppio strato lipidico, che separa l'ambiente intracellulare da quello extracellulare.
- Resistenti ma flessibili (basti pensare alla crescita o agli organismi di tipo ameboidi).
- Autosigillanti (esocitosi, endocitosi con formazione di vescicole).
- Selettivamente permeabili al trasporto di soluti attraverso di esse.

Ogni membrana biologica che costituisce la membrana plasmatica, il reticolo endoplasmatico, e quant'altro; ha delle caratteristiche particolari nella sua composizione in lipidi e proteine. La composizione delle membrane biologiche varia a seconda del compartimento cellulare che stiamo osservando. Una delle caratteristiche che contraddistingue i vari componenti cellulari è la presenza di particolari tipi di lipidi. Ad esempio, il colesterolo è componente più abbondante nella membrana plasmatica rispetto a quanto è osservabile nelle altre membrane; mentre la membrana mitocondriale interna vede una grande presenza del fosfolipide chiamato cardiolipina, che ne caratterizza appunto la composizione. Altri tipi di membrane, ad esempio lisosomiali, sono particolarmente ricche di sfingolipidi. Per poter studiare l'attività biologica delle proteine di membrane, dobbiamo conoscere la diversa composizione delle membrane biologiche. Il modello

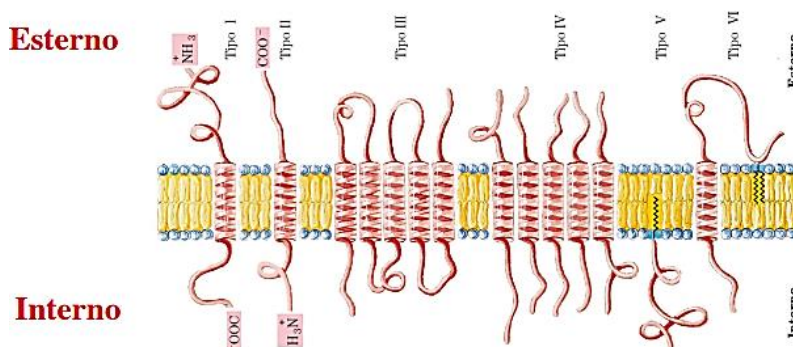
caratteristico delle membrane è un modello a mosaico fluido, composto dal doppio strato fosfolipidico in cui le code degli idrocarburi sono faccia a faccia creando un ambiente idrofobico, mentre le teste polari dei fosfolipidi si rivolgono verso il citoplasma. Una serie di proteine sono legate al doppio strato fosfolipidico, e potranno essere legate alle membrane in maniera diversa:

- Proteine integrali di membrana, ossia proteine che attraversano completamente la membrana da parte a parte.
- Proteine periferiche, che prendono rapporti con la membrana ma non la attraversano.
- Proteine anfitropiche, che si trovano nel citosol e che a volte si associano alle membrane.

Quando dobbiamo estrarre proteine da una cellula, le proteine che più difficilmente si riescono ad estrarre ed a rinaturare sono le proteine di membrana poiché interamente calate nel doppio strato lipidico; è quindi necessario in questo caso l'utilizzo di detergenti in maniera passiva, la rinaturazione sarà piuttosto complicata. Quando si studiano le proteine, una volta conosciuta la struttura primaria, possiamo conoscere ed interpretare attraverso programmi informatici l'ipotetica struttura della proteina.

Rivolgiamo una maggiore attenzione verso le proteine di membrana, per lo studio del metabolismo biochimico.

Il 99% delle proteine di membrana attraversano la membrana biologica formando nel tratto in cui la attraversano una struttura secondaria a α -elica. Un esempio di eccezione è rappresentato dalla porina, dove la membrana biologica viene attraversata da strutture a foglietto β .



Avremo quindi proteine che attraversano una volta sola la membrana biologica, o che la attraversano più volte sempre sotto forma di α -elica.

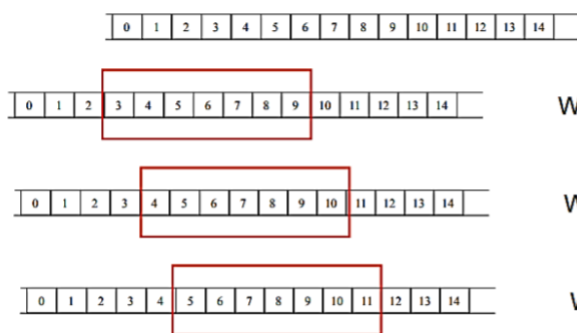
Il passaggio di più α -eliche attraverso la membrana biologica è caratteristico, ad esempio, delle

proteine di trasporto. Le proteine di trasporto attraversano la membrana biologica 6-12 volte (dipende dalle proteine). Ci sono poi proteine che si associano a più subunità per attraversare la membrana biologica, sempre sotto forma di α -elica; altre che attraversano la membrana e poi vengono legate alla membrana biologica. Una volta ottenuta la struttura primaria della proteina, quindi la sequenza amminoacidica, utilizzando particolari programmi informatici, possiamo ipotizzare ed ottenere una struttura ipotetica, ma abbastanza reale, della proteina. Per conoscere la topologia di una proteina di membrana è necessario misurare l'indice idrobativo degli amminoacidi. L'indice idrobativo degli amminoacidi rappresenta le proprietà idrofobiche e idrofiliche delle catene laterali di ciascun amminoacido. L'indice idrobativo viene determinato misurando la variazione di energia libera che accompagna il passaggio dell'amminoacido da un solvente idrofobico ad uno idrofilico (esempio l'acqua). In generale gli amminoacidi polari (idrofilici) hanno indice idrobativo negativo, mentre gli amminoacidi aromatici (o non polari) hanno indice idrobativo positivo. Chiaramente maggiore è il valore dell'indice idrobativo, più sarà idrofobico l'amminoacido; più piccolo sarà il numero più idrofilico sarà l'amminoacido.

Immaginiamo ora di avere una sequenza primaria di una proteina e di voler capire se questa presenta regioni che possono o meno attraversare la membrana biologica; per poter attraversare la membrana biologica queste regioni devono:

- essere regioni apolari idrofobiche;
- si devono poter organizzare sotto forma di α -elica;
- devono essere costituite da almeno 19-21 residui amminoacidici, per poter avere l'altezza sufficiente ad attraversare una membrana biologica (la membrana biologica di fatto ha uno spessore).

I programmi per scansionare la nostra sequenza proteica, e quindi individuare se esistono regioni che sono presenti nella nostra membrana biologica e possono formare α -eliche e quindi attraversare la membrana biologica, si basano sul principio della sliding window.



Window 1

Window 2

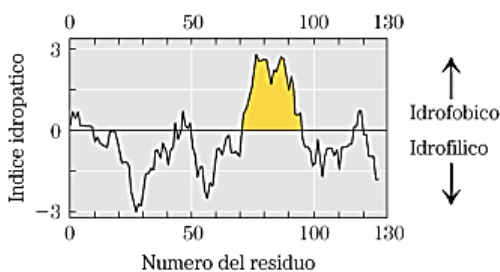
Window 3

La sliding window funziona in maniera piuttosto semplice:

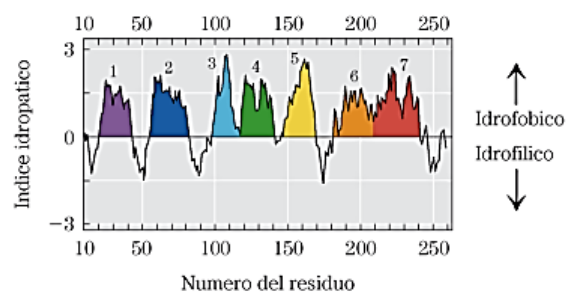
1. numeriamo da 0 a 14 la nostra sequenza amminoacidica (casualmente);
2. decidiamo la dimensione della finestra che vogliamo scandagliare (dovrà essere di 19-21)
3. una volta stabilita la finestra, questa

scandaglia la zona procedendo un blocchetto per uno, fino a terminare la sequenza.

Otterremo un grafico di idropaticità in cui avremo i residui rispetto alla finestra utilizzata.



(a) Glicoforina



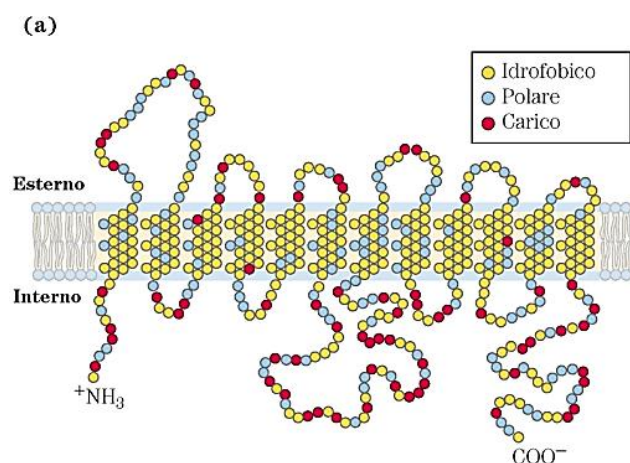
(b) Batteriorodopsina

In questo caso che vediamo a sx, la finestra è stata

scandagliata per strutture ad α -elica che potessero attraversare la membrana, il grafico allo zero separa i residui idrofobici (posti al di sopra dello zero) dai residui idrofilici (al di sotto dello zero), e quindi individua una regione continua di residui idrofobici che probabilmente formano una α -elica con le caratteristiche idrofobiche tali da poter attraversare la membrana biologica. Nell'immagine (a) possiamo osservare l'analisi della proteina glicoforina, che in effetti ha una α -elica ed attraversa una volta sola la membrana biologica. Nell'immagine (b) abbiamo invece l'indice idrofobico del batteriorodopsina quasi completamente composto da α -eliche e che attraversa la membrana biologica ben 7 volte (è infatti composta da 7 α -eliche che attraversano ripetutamente la membrana biologica).

Tra le proteine di trasporto, che danno l'idea di come la struttura terziaria di una proteina non sia immediata, sono le proteine che appartengono alla famiglia dei trasportatori del glucosio (GluT).

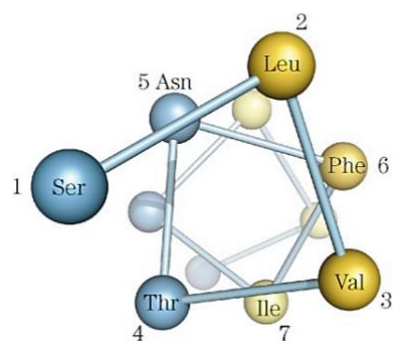
Queste proteine trasportano glucosio nei vari organi, in tutti gli organi esistono trasportatori per il glucosio in quanto il glucosio è il primo substrato che le cellule devono acquisire per estrarre energia. I trasportatori del glucosio costituiscono una famiglia poiché hanno una stessa struttura, sequenze altamente omologhe tra loro, ma hanno caratteristiche cinetiche e quindi funzioni diverse a seconda dell'organo che stiamo considerando. Ad esempio, queste proteine prendono il glucosio, ad esempio, dal citoplasma e lo trasportano nel fegato, o viceversa riversando nel sangue il glucosio che è stato sintetizzato nel fegato; e sono proteine di trasporto di membrana, e quindi sono costituite da α -eliche. Tra le caratteristiche di questa famiglia proteica abbiamo che sono monomeri, perciò un'unica sequenza costituita da 12 diversi segmenti transmembrana che attraversano la membrana biologica dodici volte.



Quando facciamo la scansione della nostra proteina con il metodo sliding window, notiamo che le 12 α -eliche (rappresentate dai pallini) non sono tutte costituite prevalentemente da amminoacidi idrofobici, ma sono presenti anche amminoacidi con una certa consistenza polari. Come fa allora questa proteina a trasportare glucosio, quando il glucosio è idrofilico? In qualche modo questa proteina per legare il glucosio, e poi trasportarlo, deve creare un ambiente idrofilico; d'altra parte, ha il problema

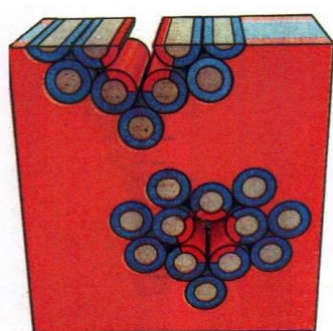
di dover attraversare la membrana biologica. Quindi da una parte deve creare un ambiente idrofobico per entrare completamente nella membrana biologica, dall'altra parte ha il problema

—Ser—Leu—Val—Thr—Asn—Phe—Ile—



che il substrato che deve trasportare è idrofilico. Il problema viene risolto in questo modo:

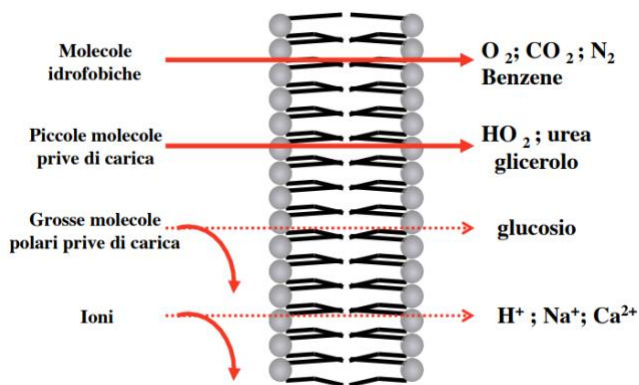
se noi osserviamo dall'alto alcune delle α -eliche che costituiscono la struttura della famiglia del trasporto del glucosio (GLUT), possiamo notare i residui idrofilici (in giallo) e i residui idrofobici (in blu). Notiamo che l' α -elica presenta due facce, una idrofila ed una idrofoba. Questo è proprio il "trucco" che i GLUT (ma non sono gli unici) utilizzano per trasportare il loro substrato.



Questa è una sezione vista dall'alto delle 12 α -eliche che costituiscono la famiglia di trasporto del glucosio; è evidente che le varie α -eliche che costituiscono questa proteina, si associano in maniera tale che quelle che hanno la doppia faccia idrofoba/idrofila vanno a costituire un ambiente idrofilico nel quale si può solubilizzare il glucosio; e all'esterno, per attraversare la membrana biologica, costituiscono un ambiente idrofobico.

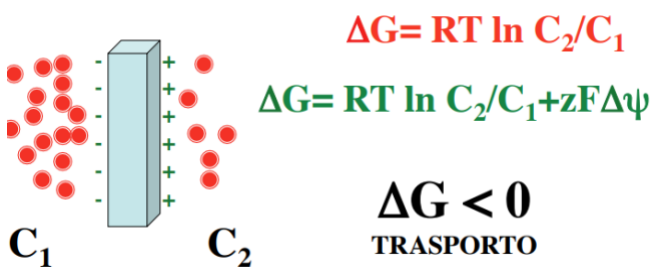
(in azzurro sono i residui idrofobici e in rosso i residui idrofilici)

Una qualunque sostanza può attraversare la membrana biologica? Sì, il problema è dato dalla direzione con cui questa sostanza attraverserà la membrana biologica ed il tempo impiegato. Il problema dell'attraversamento delle membrane biologiche è risolto dalla presenza delle proteine di membrana (per alcuni substrati); le quali appunto risolvono la direzione e il tempo di attraversamento.



Ci sono delle molecole idrofobiche, come l'ossigeno, l'anidride carbonica e il benzene che attraversano spontaneamente le membrane biologiche; man mano che una molecola aumenta di dimensioni, seppur priva di carica, comincia ad avere problemi nell'attraversare la membrana. Il tutto si complica ancora di più quando la molecola ha una carica. L'attraversamento attraverso una membrana biologica, essendo un

attraversamento, richiede energia; perciò dovremo misurare una variazione di energia libera, la quale dovrà essere negativa.



Immaginiamo di avere una sostanza C₁ ed una sostanza C₂, chiaramente il passaggio si avrà da un'ambiente a concentrazione maggiore verso un'ambiente a concentrazione minore. La variazione di energia libera sarà allora data dalla formula in rosso. Se si parla di un trasporto di una sostanza dove sono assenti

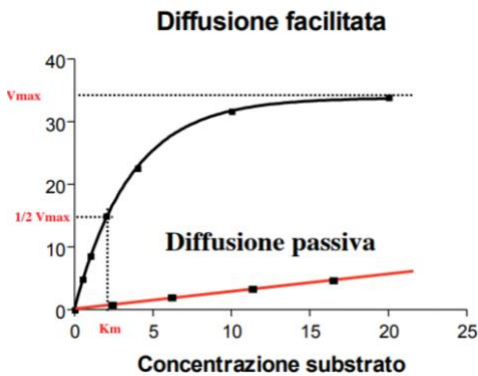
legami chimici, il ΔG^0 può essere considerato pari a zero e quindi trascurabile; per cui la variazione di energia libera di una sostanza attraverso una membrana per differenza di concentrazione viene misurata come nella formula in rosso. Ma le membrane biologiche hanno un'altra caratteristica: sono polarizzate, cioè hanno una separazione di cariche a cavallo della membrana tanto che è definito un voltaggio di membrana ΔV . La separazione di cariche a cavallo della membrana deve essere presa in considerazione nel momento in cui affrontiamo il trasporto di ioni. Se ad esempio il nostro ione fosse il sodio (positivo), il trasporto sarebbe svantaggiato; viceversa nel caso in cui avessimo un anione, il suo trasporto sarebbe avvantaggiato. Il problema viene risolto misurando la variazione dell'energia libera non solo in rapporto della concentrazione C_2/C_1 , ma anche tenendo conto del potenziale di membrana $\Delta\psi$ (formula in verde, dove z è la carica dello ione, ed F è la costante di Faraday). Anche in quest'ultimo caso analizzato, è chiaro che la ΔG dovrà avere valore minore di 0; ricordiamo infatti che affinché possa avvenire il trasporto ΔG deve essere minore di 0.

Ora distinguiamo i vari tipi di trasporto. Avremo:

- Diffusione passiva
- Diffusione facilitata
- Trasporto attivo primario
- Trasporto attivo secondario

Nei primi due casi il trasporto avviene secondo gradiente, grazie alla differenza di concentrazione, da C_1 a C_2 (con $C_1 > C_2$), negli ultimi due, invece, è necessario l'ATP in quanto il trasporto è contro gradiente di concentrazione, da C_2 a C_1 (con $C_1 > C_2$).

Si fa poi un distinguo tra la **diffusione passiva** (molecole idrofobiche: O_2 , CO_2 , N_2 , benzene; piccole



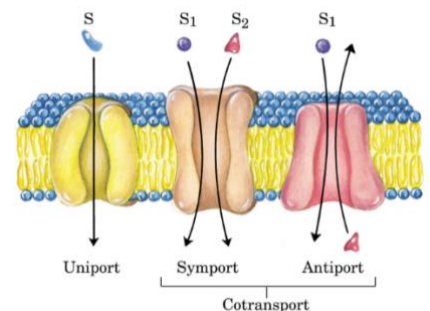
molecole prive di carica: urea, glicerolo) e la **diffusione facilitata** (grosse molecole polari prive di carica: glucosio; ioni: H^+ , Na^+) per la presenza, in quest'ultima, di proteine di trasporto, che riducono la barriera energetica da superare affinché la diffusione si verifichi.

Un'ulteriore differenza è data dal grafico della **velocità di diffusione** che, nella passiva, appare come un incremento lineare mentre, nella facilitata, è rappresentato da un andamento iperbolico (cinetica di saturazione), tipico degli

enzimi. Inoltre, si può notare come nel grafico della diffusione facilitata, raggiunta una determinata soglia di concentrazione di substrato non vi sia un rispettivo aumento della concentrazione, in quanto, essendoci un numero limitato di proteine di trasporto, queste risulteranno tutte occupate.

Possono effettuare trasporto di tipo passivo le proteine canale, come le porine (membrana esterna dei mitocondri) ed i canali ionici, e le cosiddette proteine di trasporto dette carrier, traslocasi o permeasi. Queste proteine hanno caratteristiche particolari:

- Sono proteine intrinseche di membrana, prevalentemente con conformazione ad α - elica
- Effettuano il trasporto secondo gradiente
- 3 tipi di trasporto: uniporto, simporto, antiporto
- Numero di turnover, ossia la quantità di substrato trasportata per unità di tempo



Ora vediamo alcune differenze tra canali ionici e proteine di trasporto.

Canali ionici

- Uniporti ($\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + zF\Delta\psi$)
- Selettività ionica (trasportano solo il substrato per i quali sono costituiti)
- Alto turnover
- Regolati: meccanicamente (variazione di pressione), dal voltaggio (variazione del potenziale di membrana), da ligandi, mediante fosforilazione/defosforilazione dovuta alla cascata enzimatica

Proteine di trasporto

- Trasporti neutri (privi di carica) o elettrogenici (con carica)
- Uniporti ($\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + zF\Delta\psi$)
- Simporti e antiporti (somma dei $\Delta G < 0$)
- Selettivi

- Basso turnover
- Meccanismi di trasporto: ping-pong, sequenziale

Ping-pong: il primo substrato A si lega, diventando P, seguito dal legame del secondo substrato B che porta al rilascio di Q.

Sequenziale: *ordinato* → vi è il legame di entrambi i substrati A e B, secondo un ordine predefinito, con la proteina e successivamente il rilascio dei prodotti P e Q

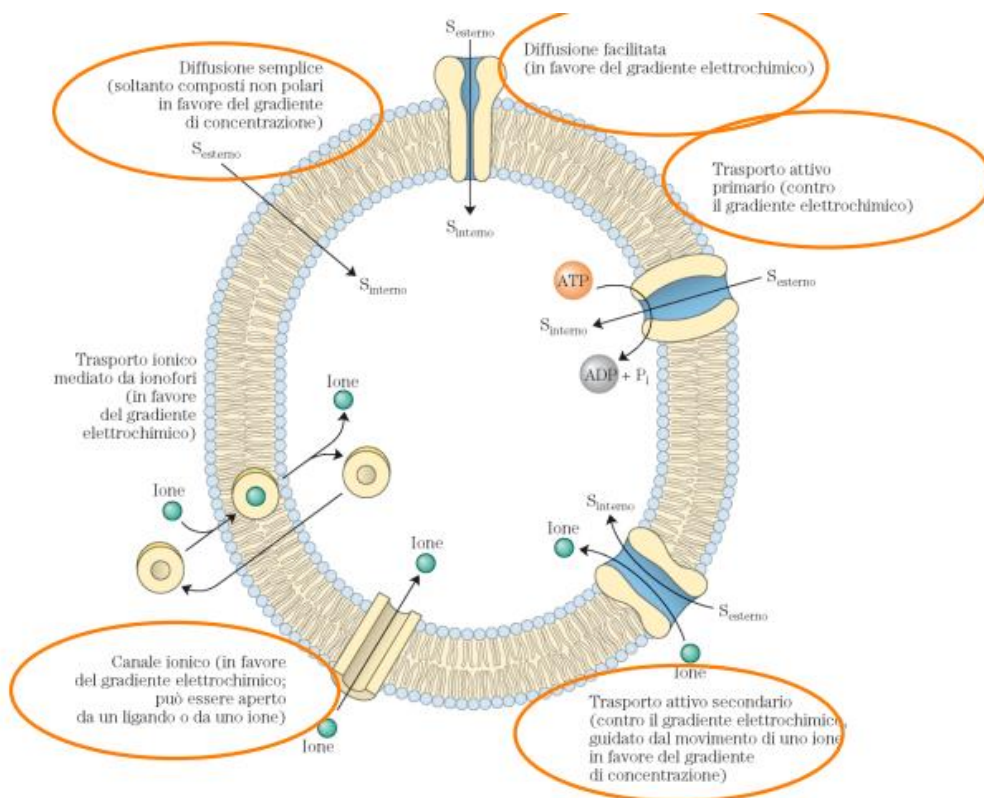
random → vi è il legame di entrambi i substrati A e B, secondo un ordine casuale, con la proteina e successivamente il rilascio dei prodotti P e Q

Trasporto attivo

- Proteine intrinseche di membrana
- Uniporto, simporto, antiporto
- Selettivo
- Basso turnover
- Trasporto contro gradiente di concentrazione ($\Delta G_{TOT} < 0$)

Si distinguono un **trasporto attivo primario** ed uno **secondario**. Nel primo la reazione principale viene accoppiata generalmente con l'idrolisi dell'ATP, nel secondo, invece, la reazione principale (contro gradiente) viene accoppiata ad un trasporto secondo gradiente.

Il trasporto attivo secondario può effettuare esclusivamente simporto ed antiporto ed il principale ione cotrasportato è il Na^+ , che abbonda all'esterno della cellula proprio grazie ad un trasporto attivo primario (sodio-potassio ATPasi)



Schema riassuntivo delle modalità di trasporto