

Membranas: propriedades e funções biológicas (parte 2)

Rafael H.F. Valverde

valverde@nano.ufrj.br

Laboratório de Biomembranas G-37

Biologia Celular para Nanotecnologia
IBCCF^o UFRJ



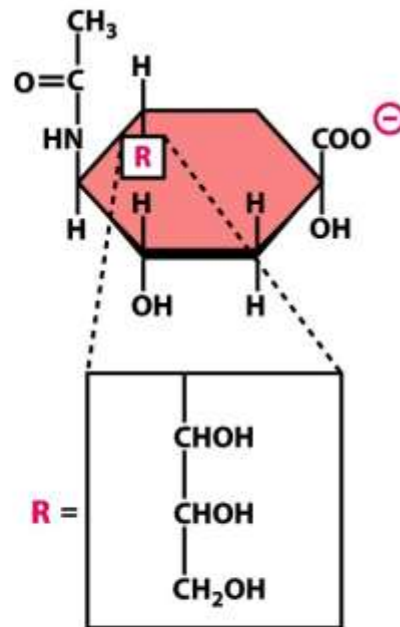
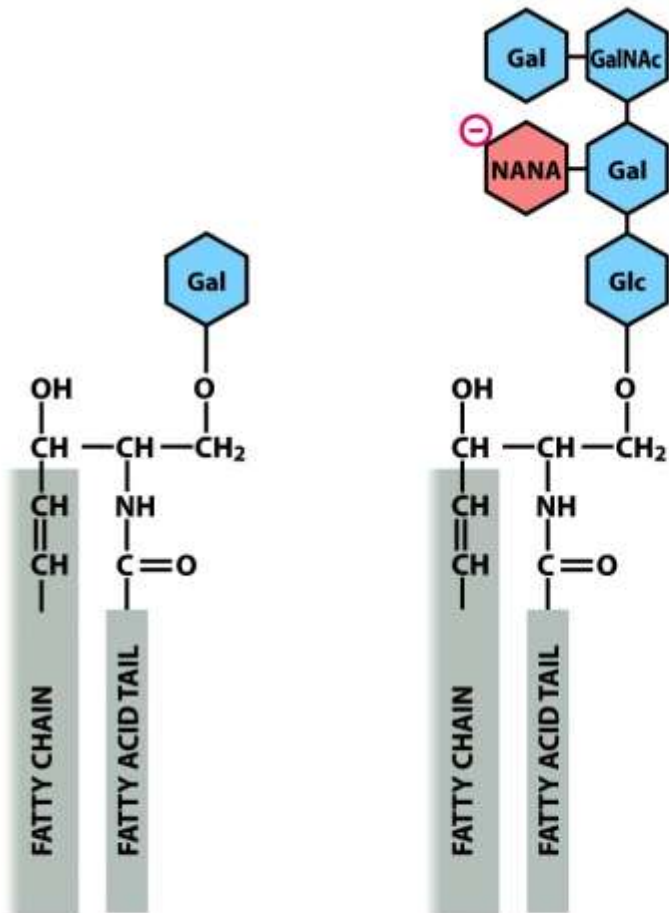
Maio – 2022

Glicolipídios

glicolipídios são **esfingosinas** com açúcares ligados a sua cabeça polar durante sua passagem pelo **Golgi**

encontrados na **monocamada externa** da **membrana plasmática** (abundantes em **rafts**!)

gangliosídios possuem **ácido siálico** (confere carga negativa) (papel importante na regulação da concentração de íons)



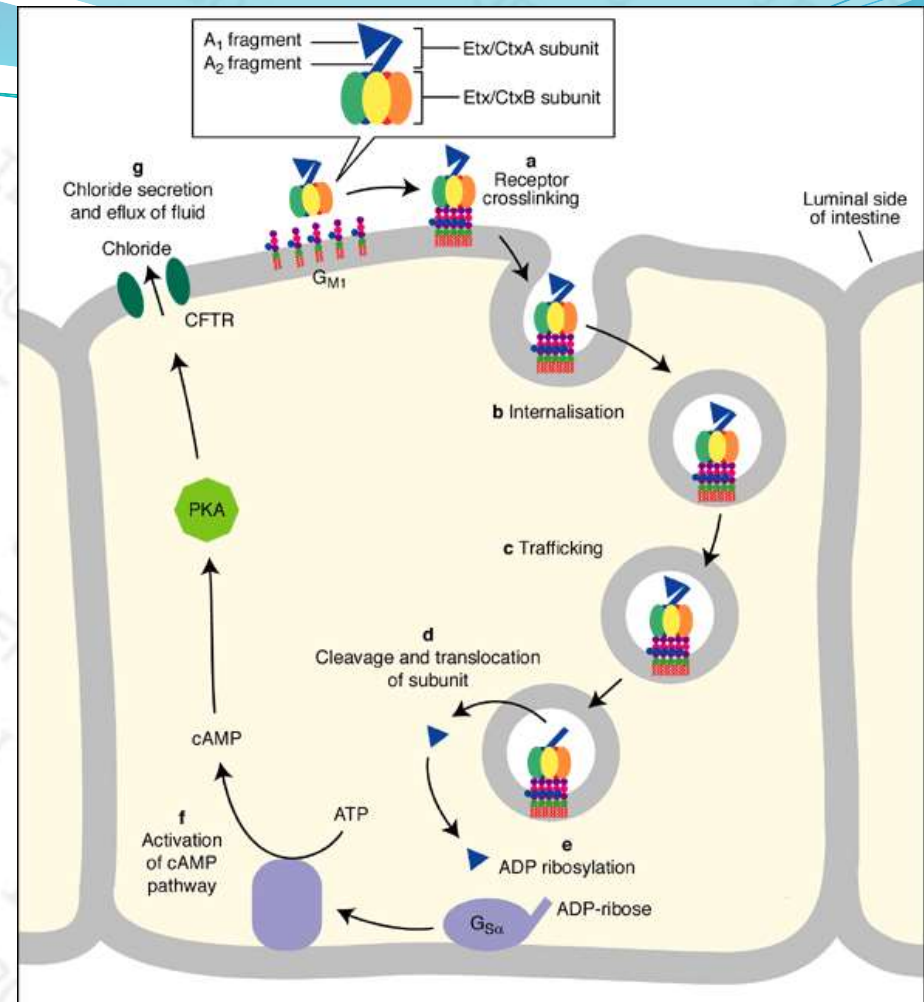
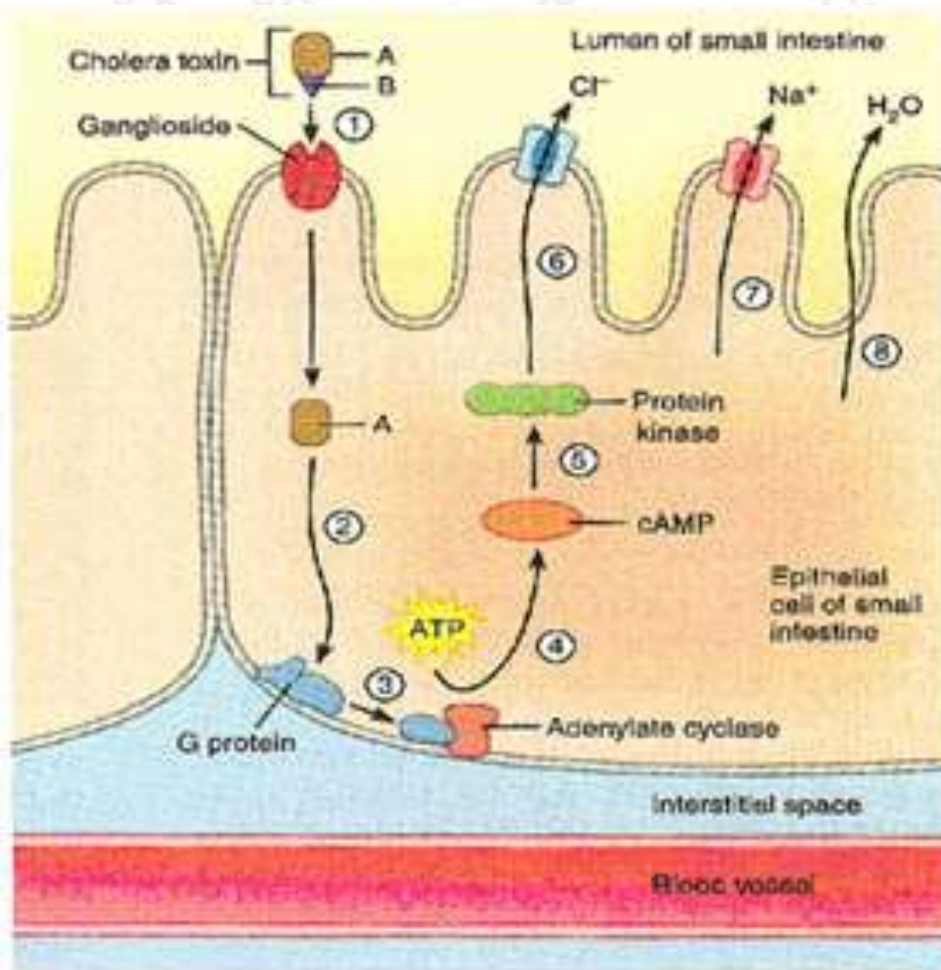
importantes na interação da célula com seu entorno e com outras células

(A) galactocerebroside

(B) G_{M1} ganglioside

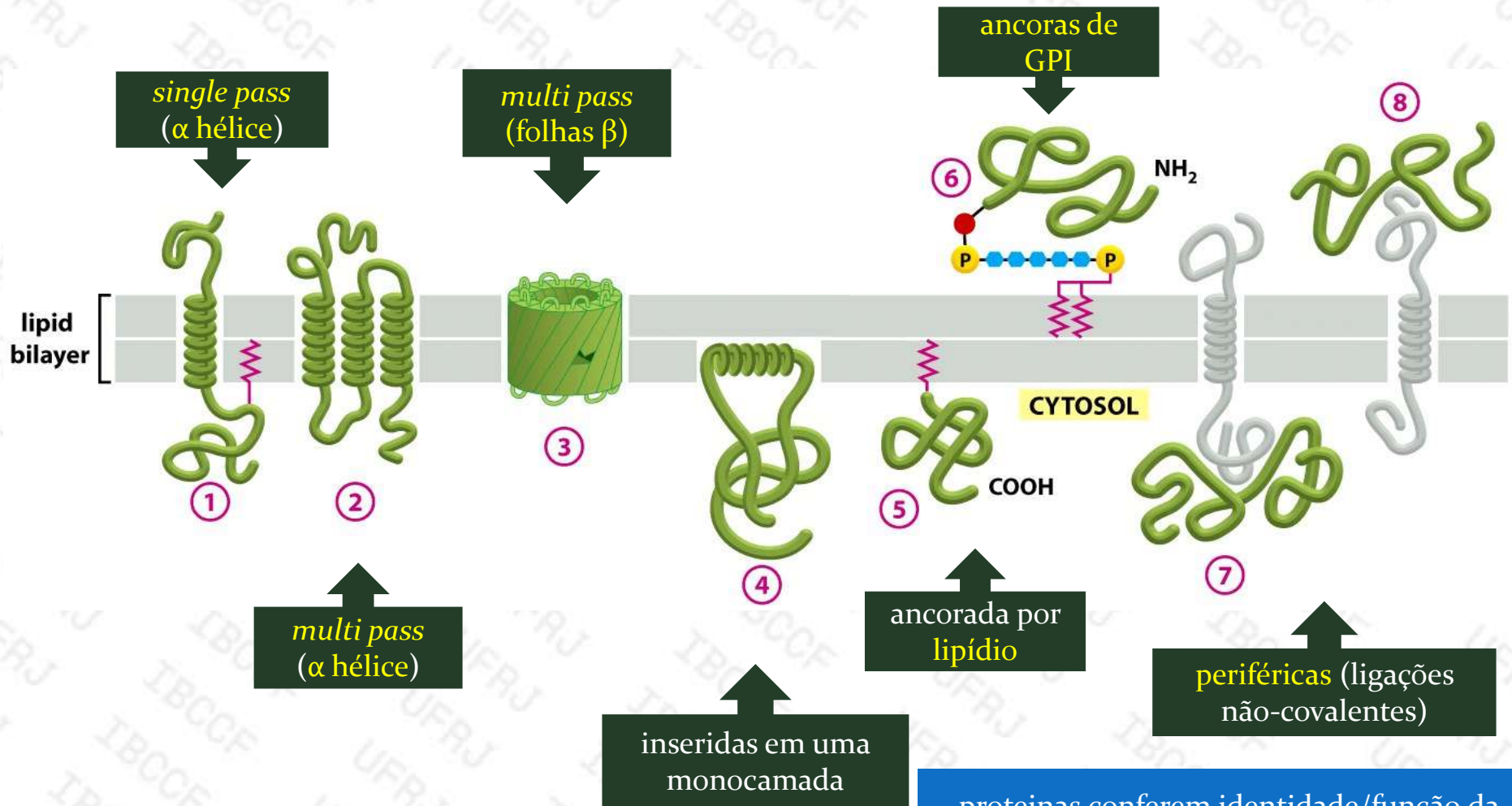
(C) sialic acid (NANA)

Gangliosídeo M₁ serve de Porta de Entrada para a Toxina da Cólera



gangliosídeos M₁ atuam como receptores que permitem a entrada da toxina da cólera que ativa via de sinalização intracelular

Proteínas se Associam a Membrana de Diferentes Formas



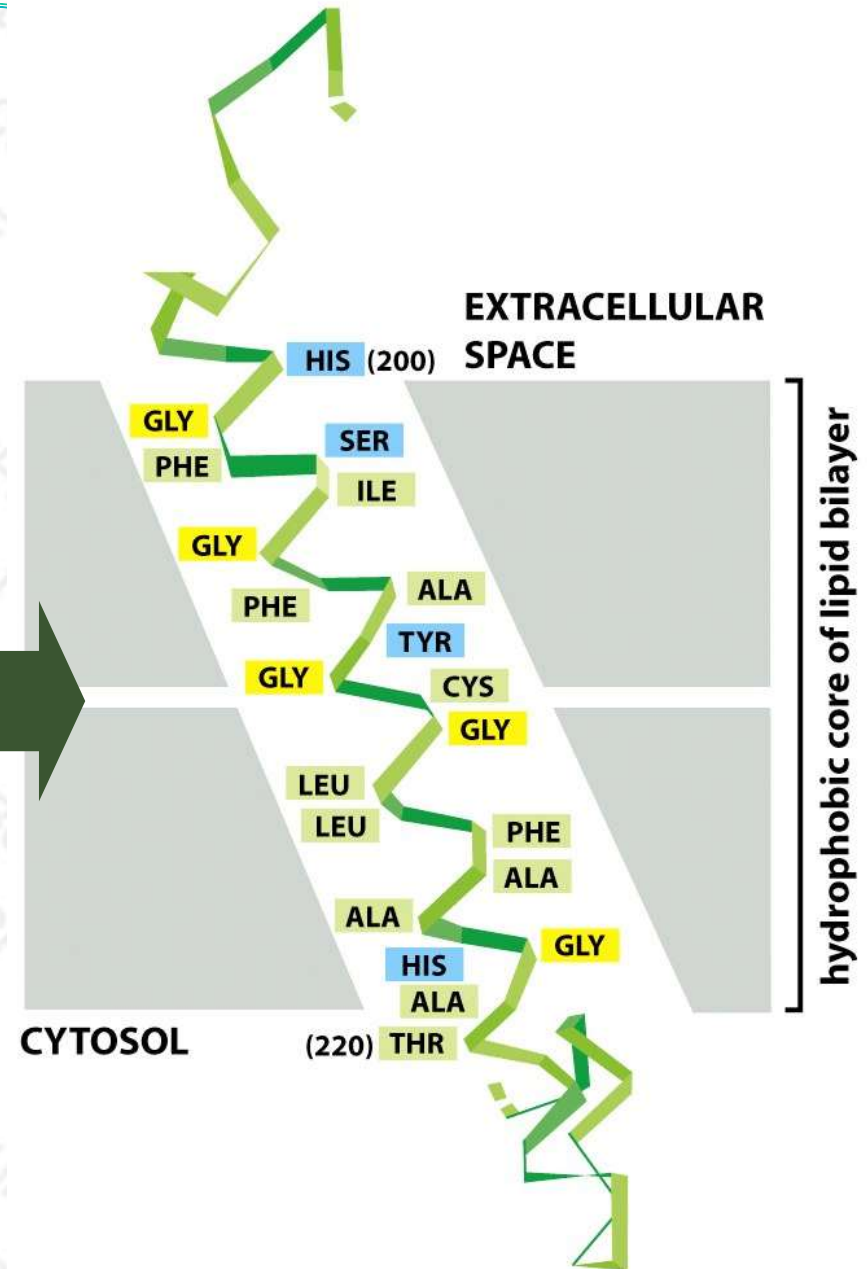
proteínas conferem identidade/função da membrana (**bainha de mielina** tem 25% de proteína, membrana interna da **mitocôndria** é 75% proteica)

Maioria das Proteínas Transmembrana Atravessa A Bicamada como α -Hélice

proteínas **transmembrana** tem formas distintas de se inserir numa **bicamada** (orientação determinada no RE)

domínios transmembrana das proteínas são ricos em **aa** com cadeias laterais apolares

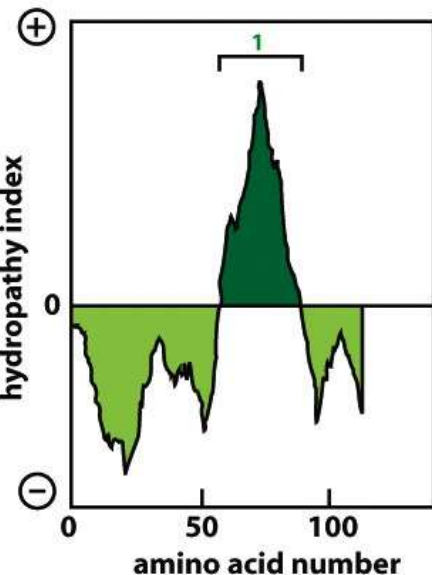
formação de **pontes de hidrogênio** regulares na α -hélice (permite maior número de interações deste tipo)



Plot de Hidropatia

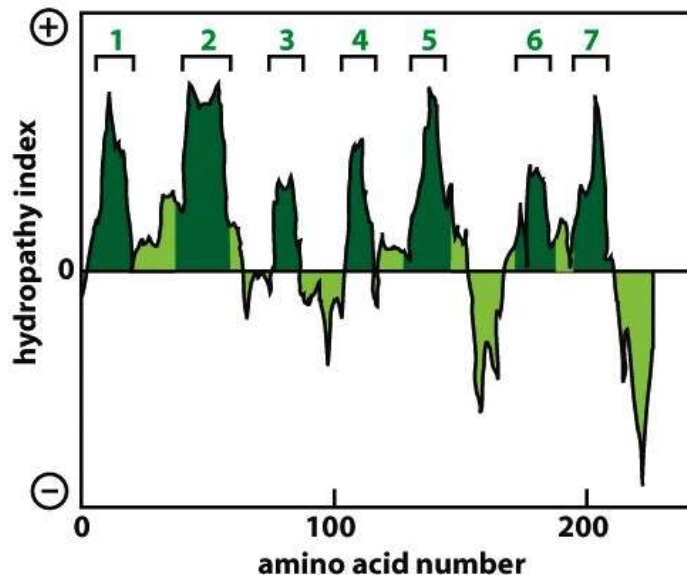
(A) GLYCOPHORIN

H₂N ————— COOH



(B) BACTERIORHODOPSIN

H₂N ————— COOH



análise da **estrutura 3D** de cristais confirma que é possível prever domínios transmembrana a partir da **estrutura primária!!**

segmentos com 20-30 **aa** hidrofóbicos (longos o suficiente para atravessar uma **bicamada** em **α -hélice**)

20% das proteínas de um organismo tem pelo menos um **domínio transmembrana**

dificuldade em detectar **folhas β** : 10 **aa** ou menos já são capazes de atravessar a **bicamada**

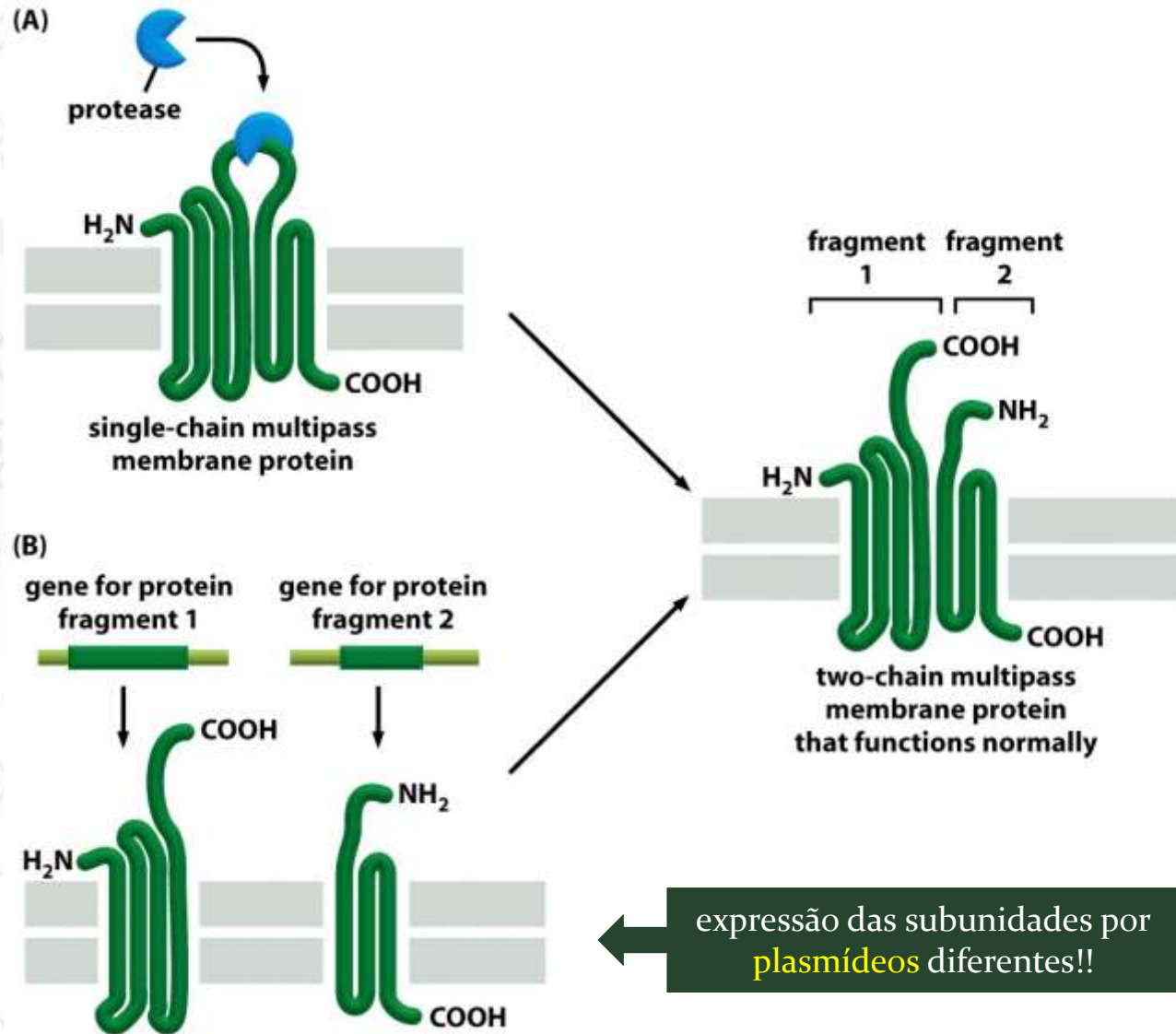
α -hélices Transmembrana Integram umas com as Outras

proteínas *single-pass*
frequentemente formam
homeodímeros (**receptores!!**)
(interação entre suas **hélices**)

seqüências **hidrofóbicas** contêm
informação para interações
específicas

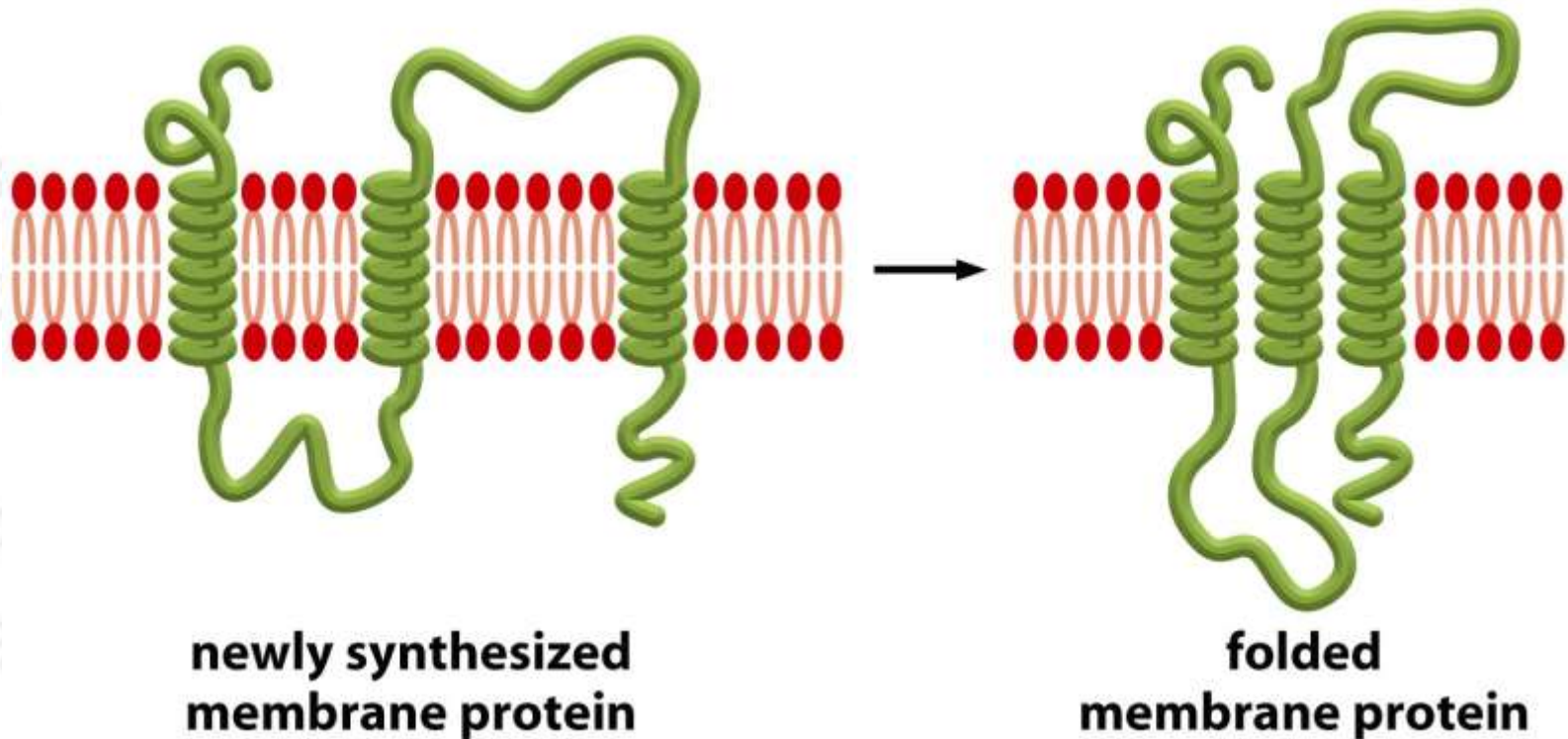
hélices transmembrana de
proteínas *multipass* ocupam
posições específicas na **estrutura**
3D da proteína

loops clivados por **proteases**:
reassociação



expressão das subunidades por
plasmídeos diferentes!!

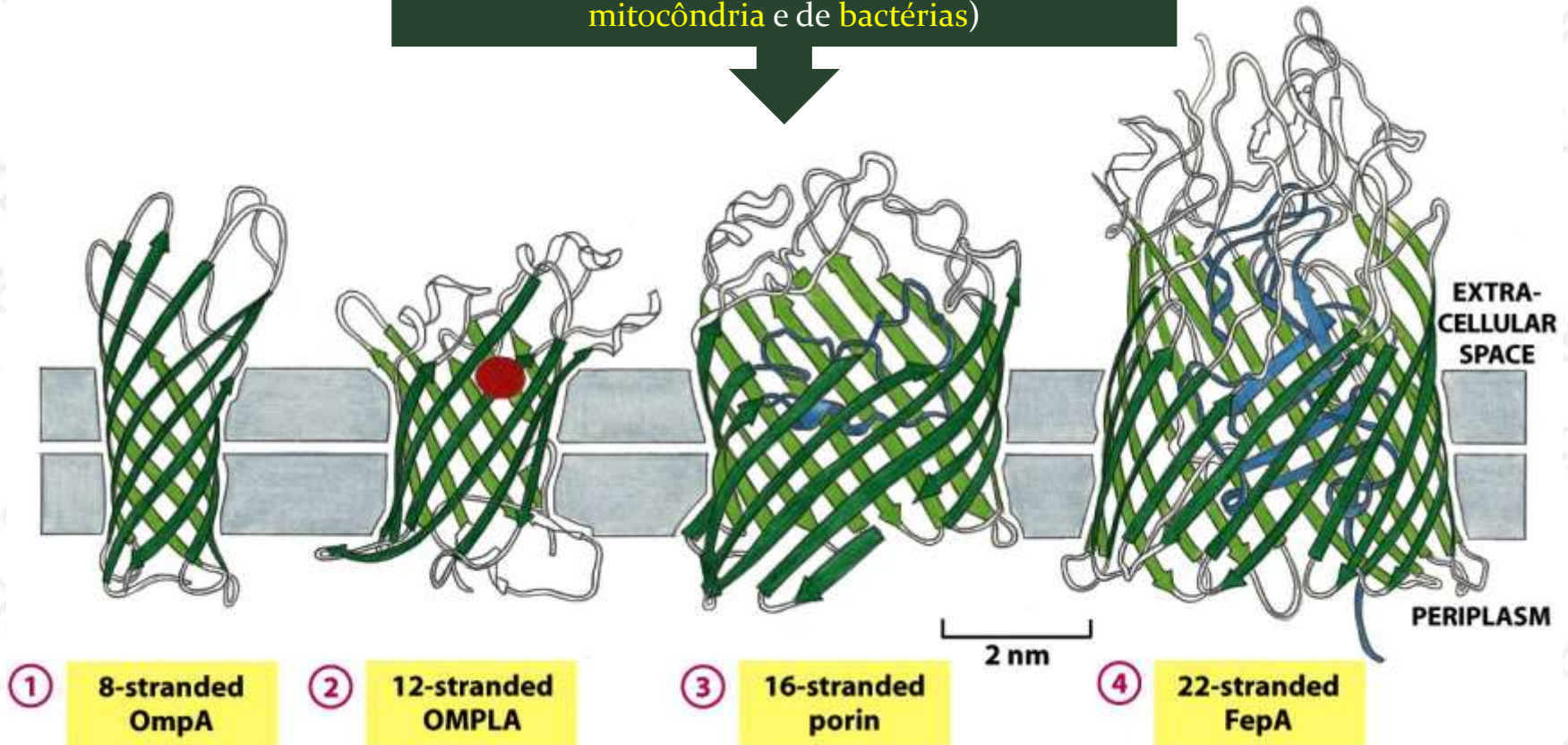
por que mesmo os domínios protéicos protegidos
do contato com a parte interna da membrana
podem ser **hidrofóbicos**?



inicialmente estes domínios são inseridos em contato com o
ambiente **hidrofóbico** da **membrana**!!
reconhecimento do posicionamento correto só ocorre depois

Proteínas com folhas β Formam Grandes Canais

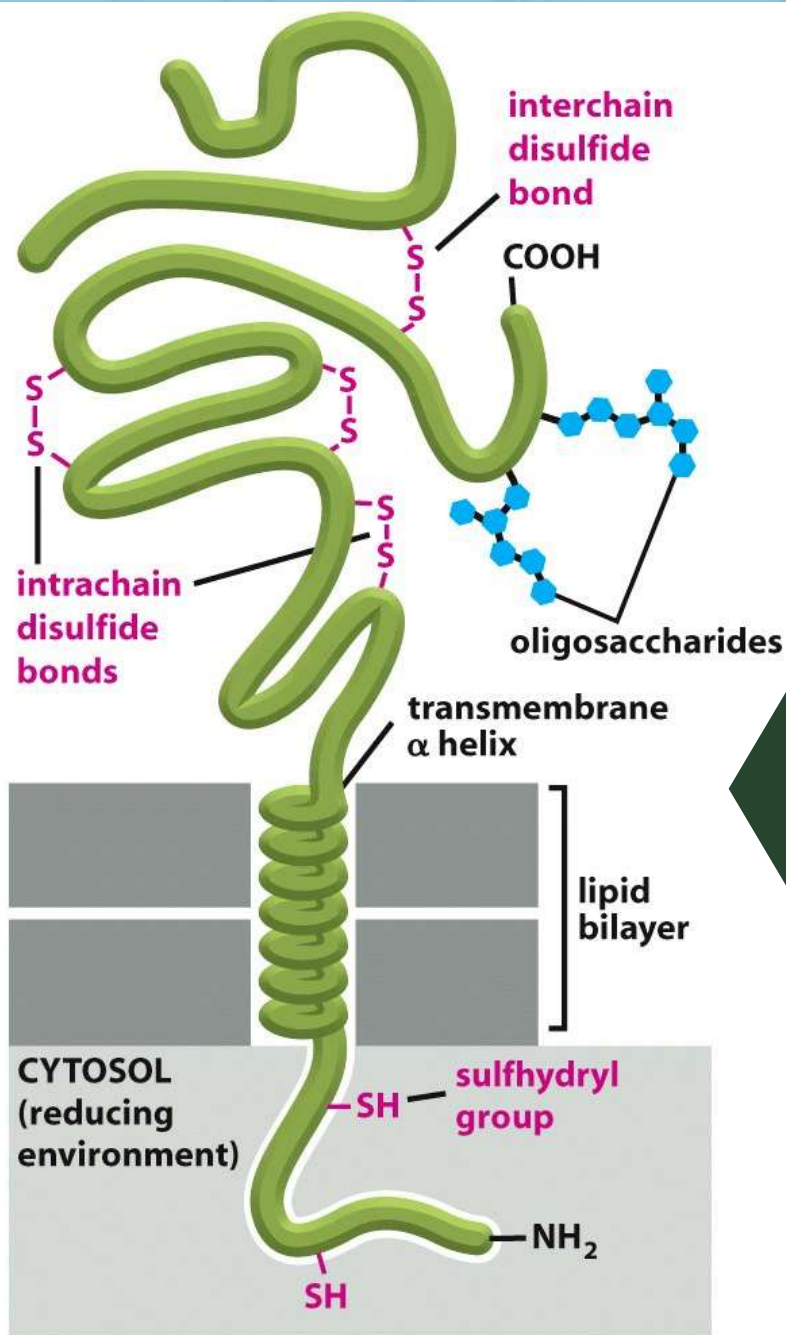
proteínas transmembrana arranjadas em **folhas β**
formam grandes poros (membrana ext. da
mitocôndria e de **bactérias**)



em eucariotos a maioria das proteínas **multi-pass** são construídas com **α -hélices** (mudanças conformacionais de deslizamento entre as **hélices**)

folhas β : **pontes de hidrogênio** entre domínios diferentes tornam a estrutura rígida (pouca mudança conformacional)

Diversas Proteínas de Membrana são Glicosiladas



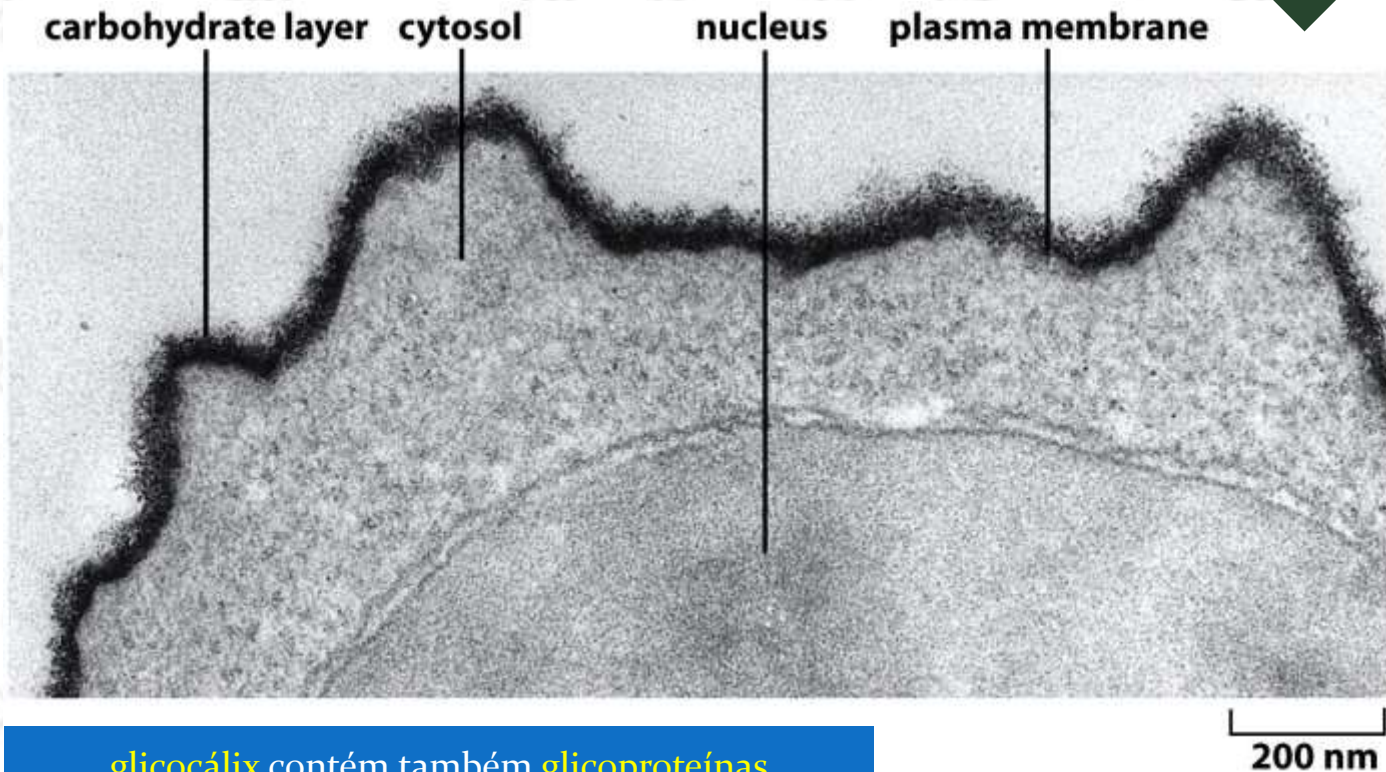
proteínas transmembrana eucarióticas são frequentemente **glicosiladas** (porção não-citosólica)

açúcares adicionados no lúmen do **RE** e do **Golgi**

ambiente extracelular é menos redutor (preserva **pontes dissulfeto**, estabiliza a estrutura protéica e ajuda a associação com proteínas extracelulares)

Várias Proteínas são Glicosiladas

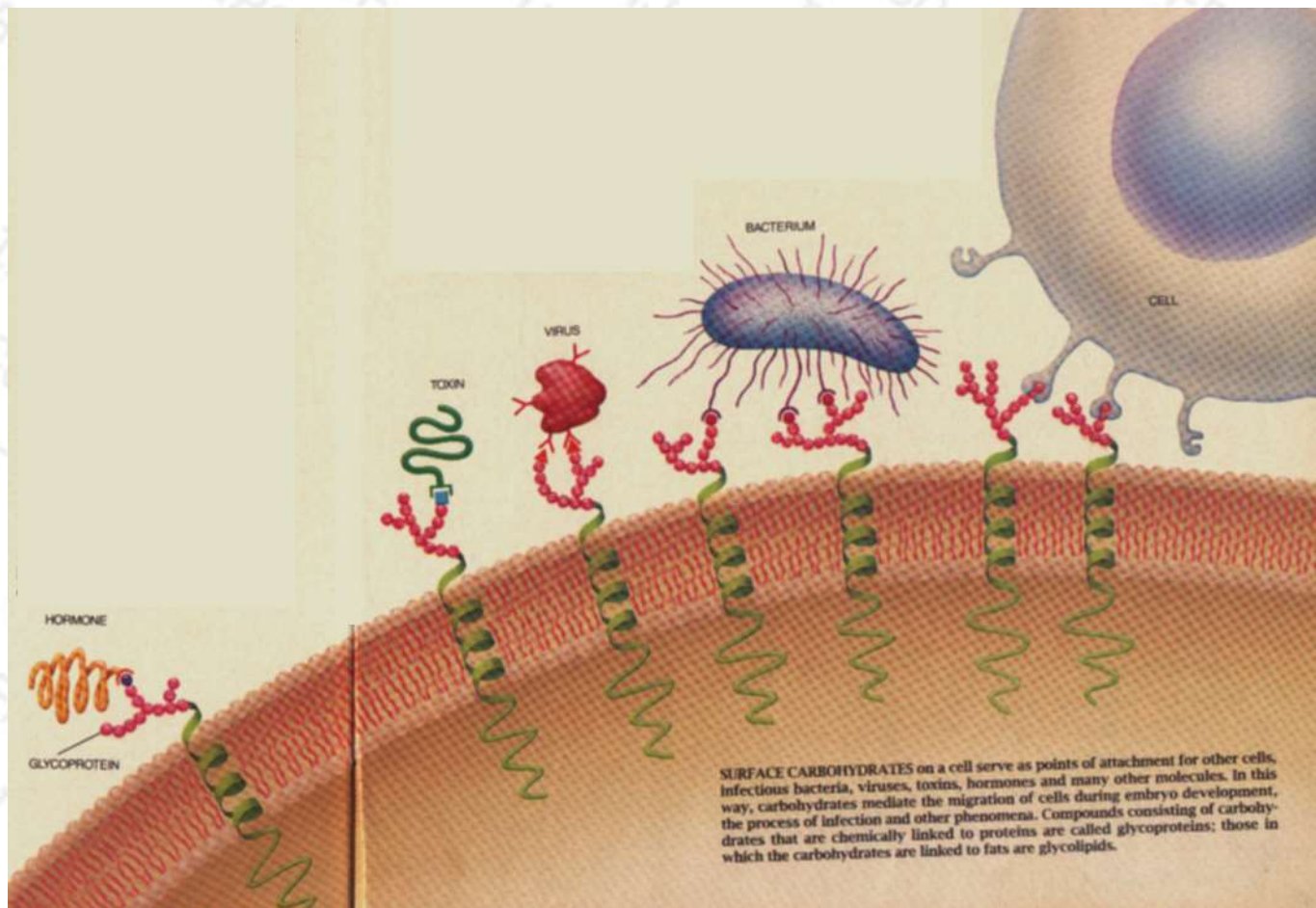
como proteínas e lipídios são glicosilados, eucariotos possuem um revestimento de carboidratos (glicocálix)



glicocálix contém também glicoproteínas secretadas, adsorvidas na monocamada externa (diversas destas proteínas compõem a matriz extracelular)

fronteira entre membrana plasmática e matriz extracelular é pouco definida

As Funções do Glicocálix



proteção contra lesões
(químicas e mecânicas) na
superfície celular

reconhecimento celular

previne contato célula-
célula não desejado

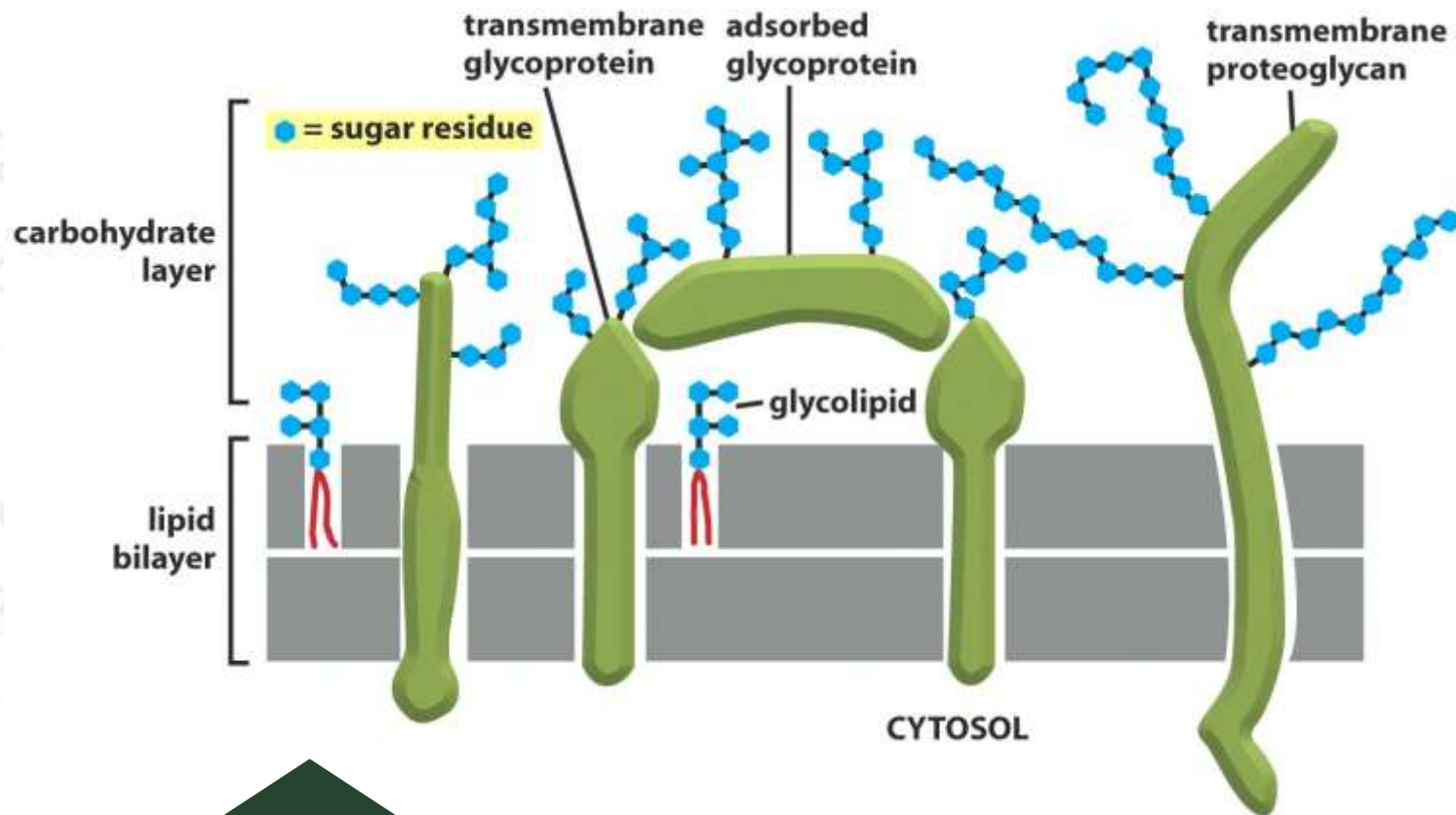
adesão celular

resposta inflamatória
(reconhecimento
de agentes patogênicos)

receptores

controle de íons no
entorno da célula

A Camada de Carboidratos na Superfície Celular



cadeias de **oligossacarídeos** são diversificadas em seus arranjos (< 15 açúcares mas com ramificações)

diversidade e posição dos **oligossacarídeos** os tornam adequados para atuar no **reconhecimento celular**

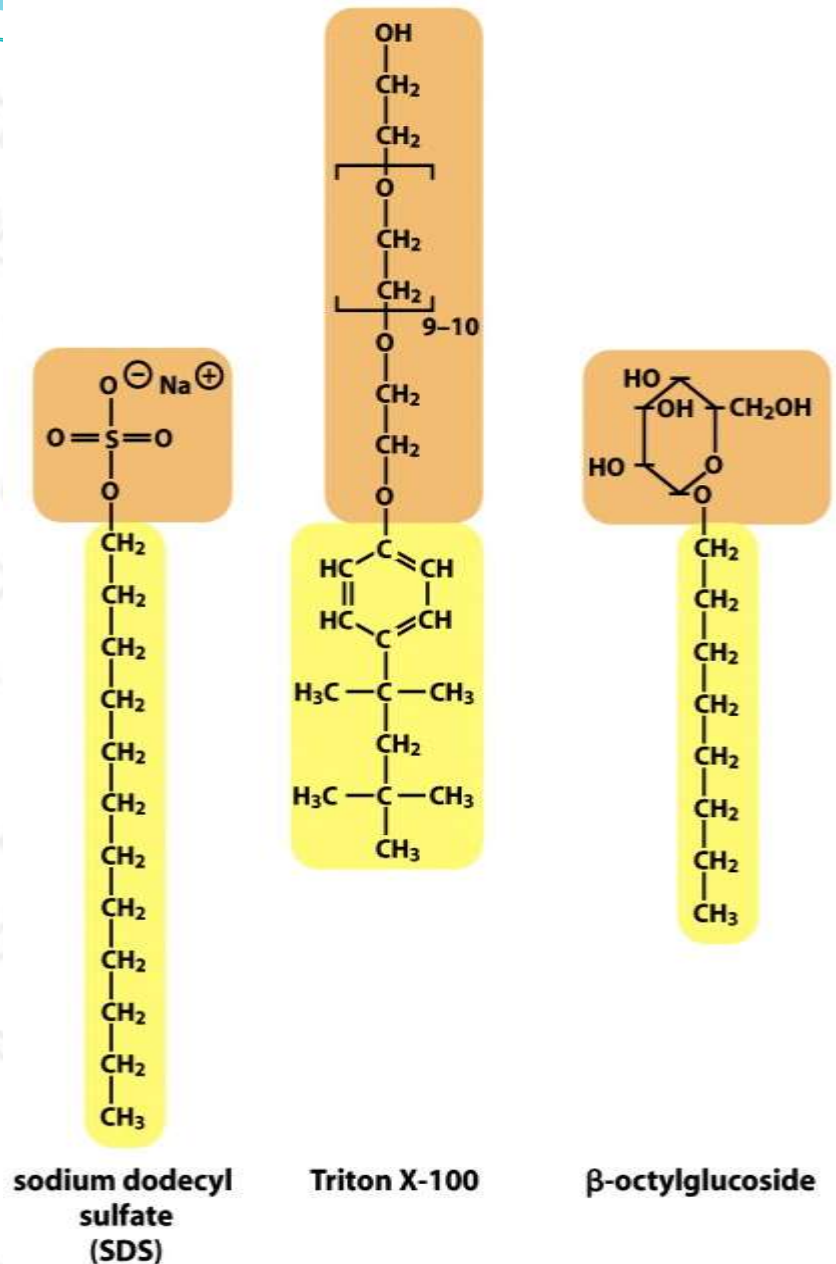
lecitinas: proteínas da membrana plasmática que reconhecem oligossacarídeos da superfície celular (interação **espermatozóide-óvulo**, resposta inflamatória, etc)

Detergentes Solubilizam Proteínas Membranares

agentes que rompem interações hidrofóbicas destroem a **bicamada** e solubilizam **proteínas transmembrana**

detergentes: pequenas moléculas anfifílicas de estrutura variável mais solúveis em H_2O do que os **lipídios**

suas extremidades polares podem ser **carregadas** (ex: **SDS**) ou **não carregadas** (ex: **Triton**)



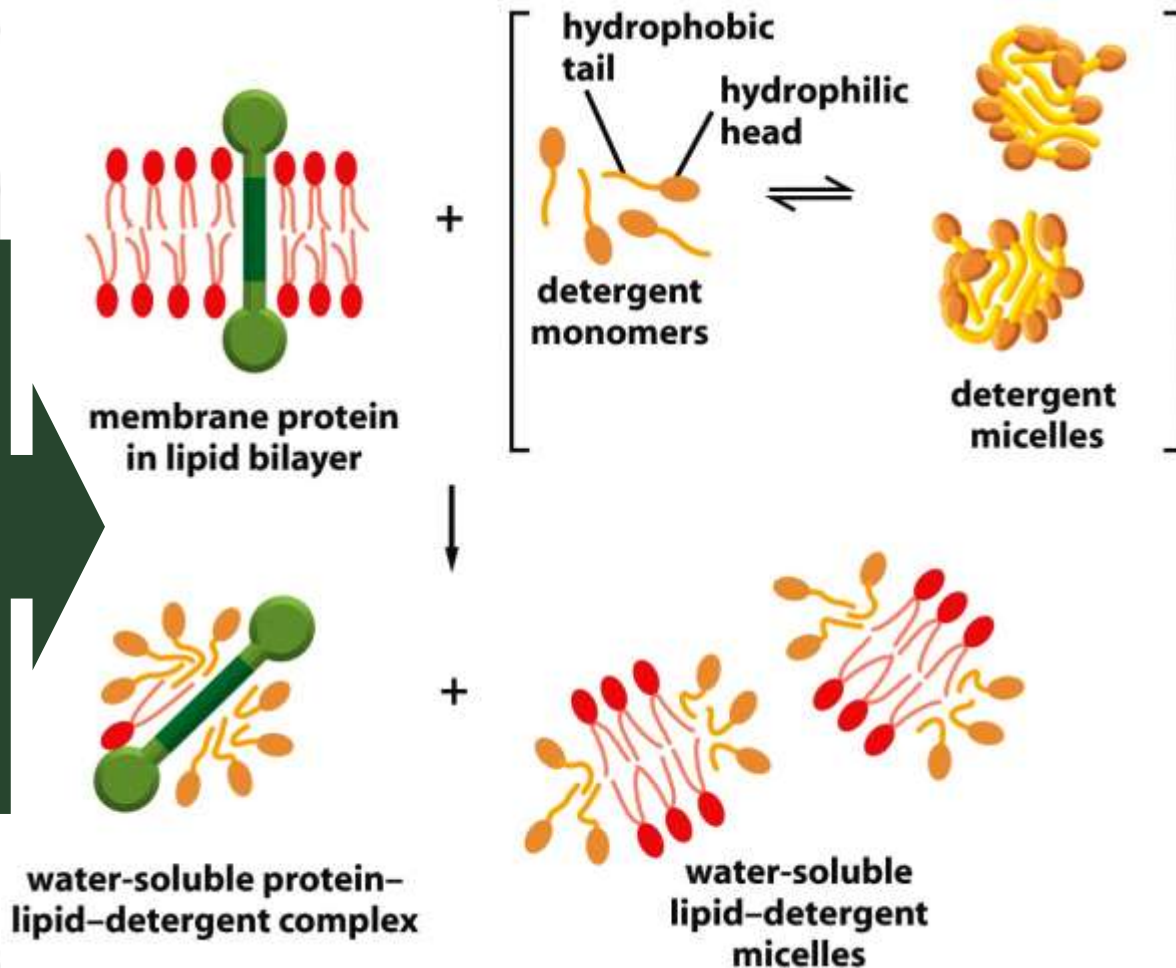
Solubilizando uma Membrana com um Detergente

detergentes se ligam nas porções hidrofóbicas das proteínas (envolvidas por **detergente**)

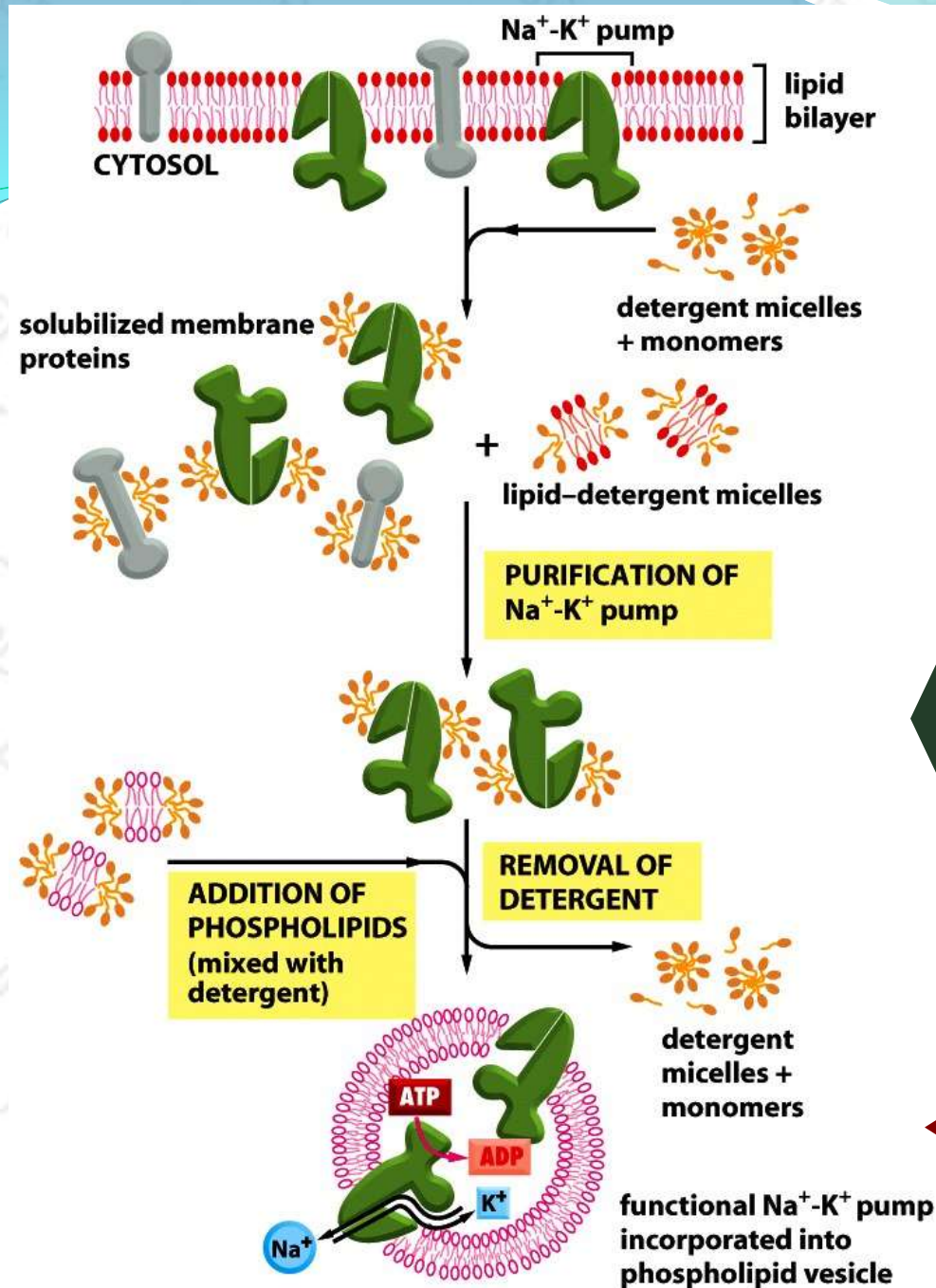
solubilizam proteínas de membrana

SDS (iônico e forte) solubiliza proteínas altamente hidrofóbicas (mas desnaturam!!)

se ligam nos **centros catalíticos** da proteína (perda de atividade!!)



Solubilizando uma Membrana com um Detergente Não-iônico



detergentes não-iônicos podem purificar proteínas em estado ativo (não desnaturam a proteína)

ao diminuir a concentração de **detergente** (diluição) as proteínas solubilizadas podem ser inseridas em **lipossomas**

reconstituição permite dosar as atividades de **transportadores** e **canais**

para medir: vesículas devem estar “*inside out*”

A Atividade da PMCA em Cavéolas

Ca²⁺ATPase de da membrana plasmática (PMCA) de túbulos proximais se localiza exclusivamente em **cavéolas**!

gradiente de sacarose seguido de eletroforese e western blotting (detecção de PMCA e caveolina)

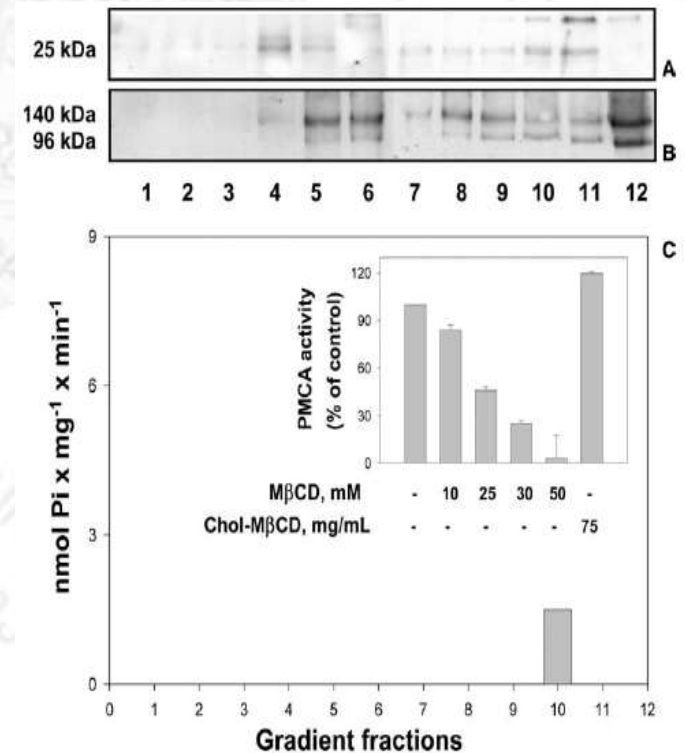
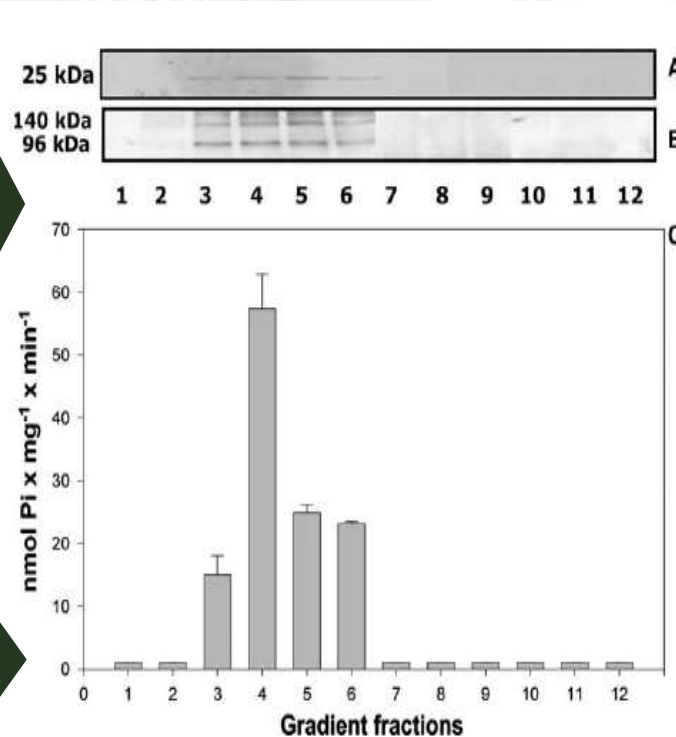
ensaio da atividade de PMCA nas frações do gradiente

The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae

Giovane G. Tortelote^a, Rafael H.F. Valverde^a, Thiago Lemos^a, Adílson Guilherme^b, Marcelo Einicker-Lamas^a, Adalberto Vieyra^{a,*}

^aLaboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón-Voloch, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil

^bProgram in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

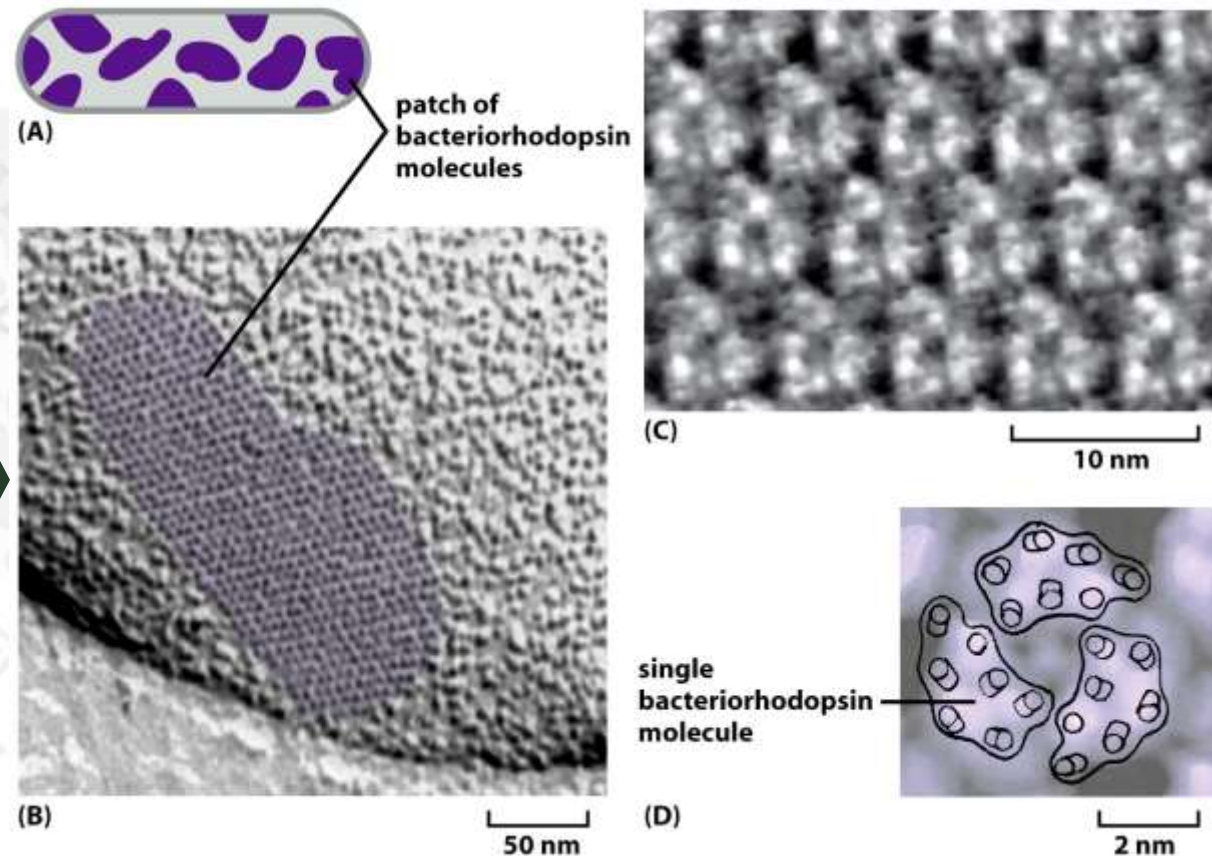


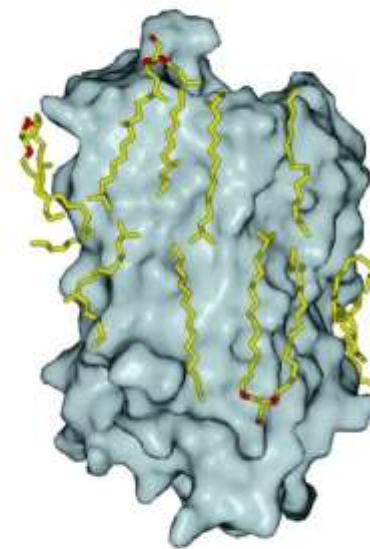
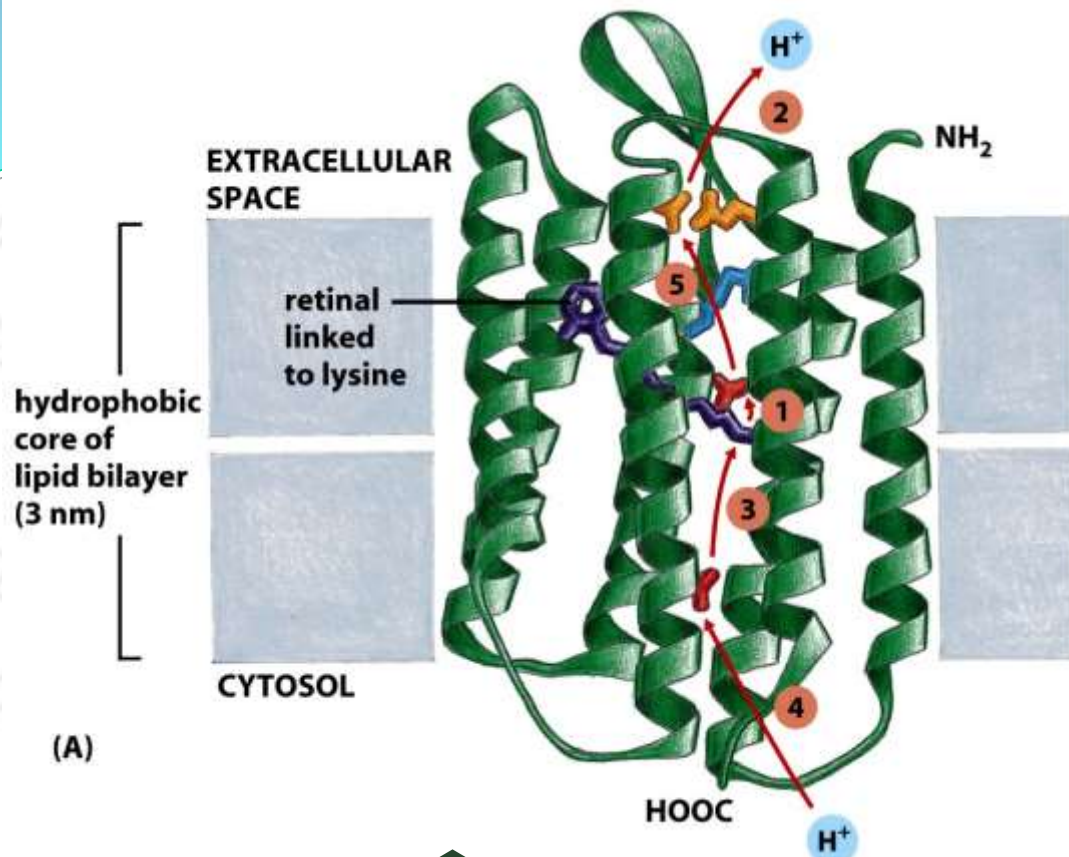
Bacteriorhodopsina é uma Bomba de H^+ multipass movida a luz

compreensão de como um **transportador** funciona requer informação sobre a **estrutura 3D** destas proteínas

a “**membrana púrpura**” de *H. Salinarium*: trecho de membrana contendo apenas a proteína **bacteriorrodopsina**

cada **bacteriorrodopsina** possui um **chromóforo** (retinal) capaz de absorver luz (dá a cor púrpura)





fóton ativa um **cromóforo** e muda sua forma: a proteína sofre **mudanças conformacionais** e transfere **H⁺** de dentro para fora da célula!!

sob a luz clara a **bacteriorrodopsina** pode bombear centenas de **H⁺** por segundo!!

criação de um **gradiente de H⁺** através da **membrana plasmática** possibilita a síntese de ATP por outra proteína de membrana

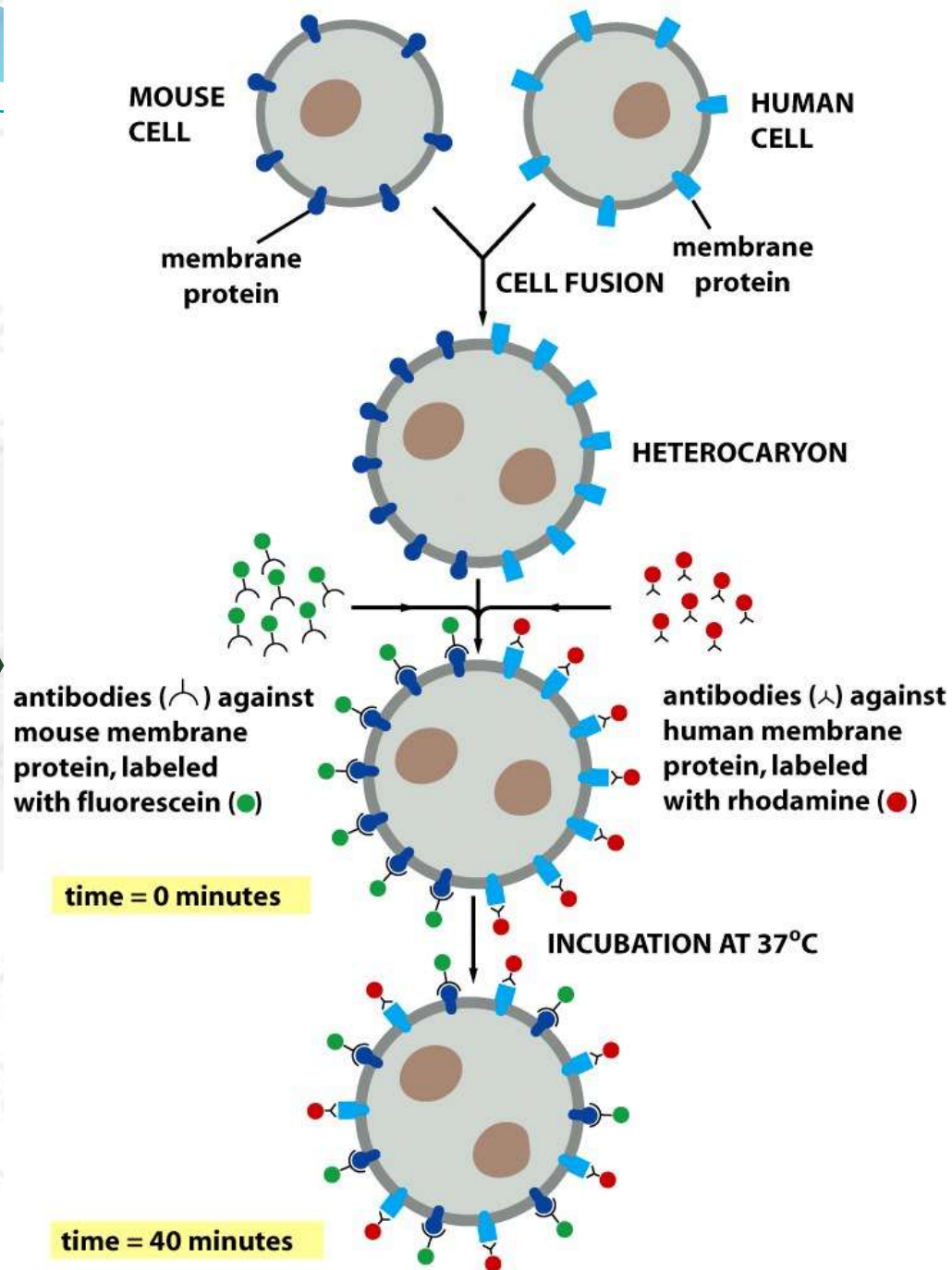
desta forma a **bacteriorrodopsina** converte energia solar em **gradiente de H⁺** o que permite armazenar energia química

Diversas Proteínas de Membrana se Difundem Lateralmente

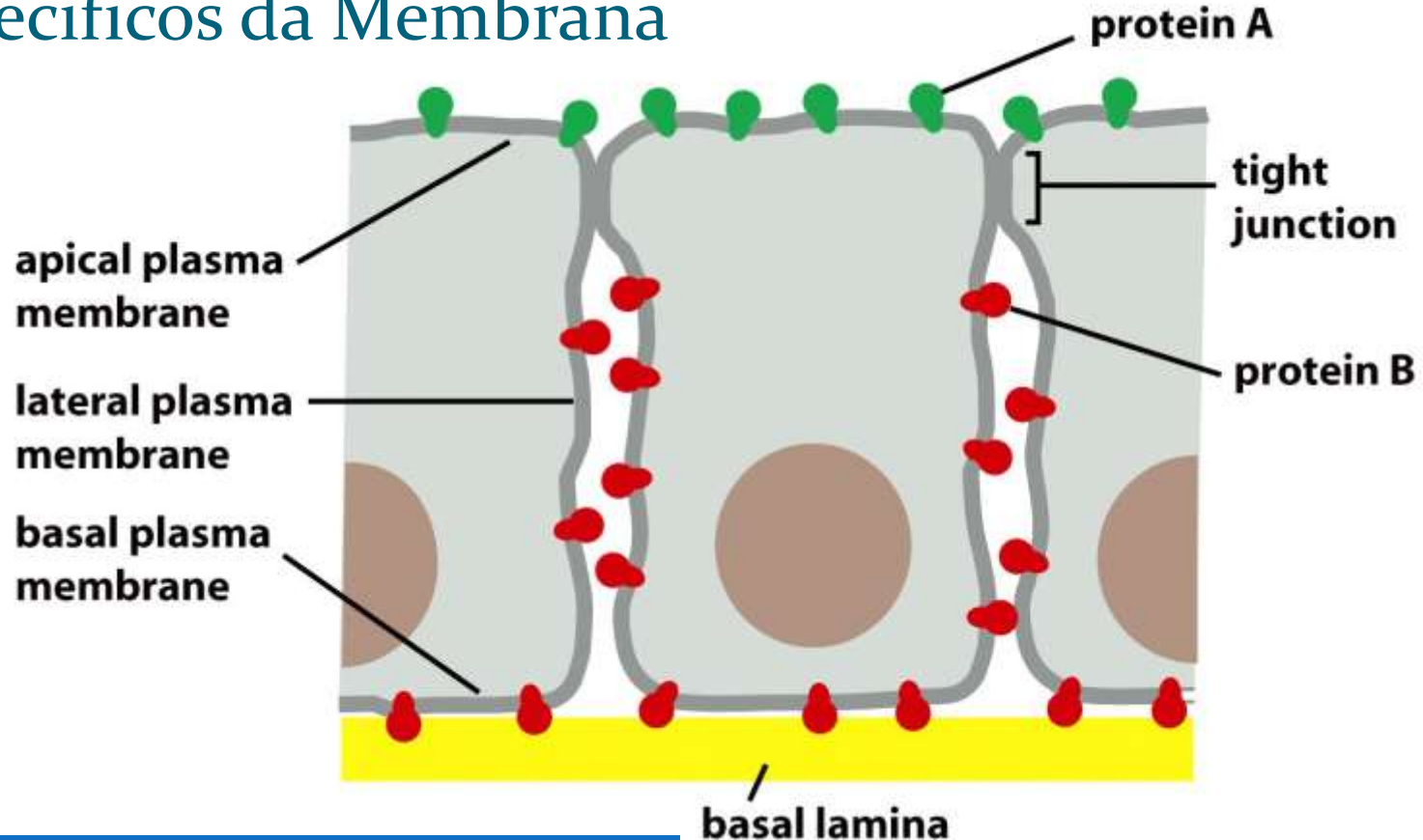
proteínas não realizam **flip-flop** mas se difundem na membrana em torno do próprio eixo (**difusão rotatória**) e lateralmente (**difusão lateral**)

experimento de fusão de células humanas e murinas (**heterocárions**)

após uma hora: espalhamento da localização das proteínas oriundas de cada organismo



Células podem confinar Proteínas e Lipídios a Domínios Específicos da Membrana

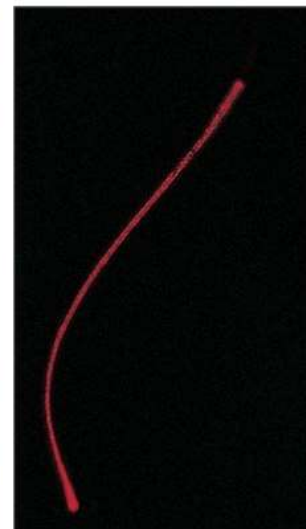
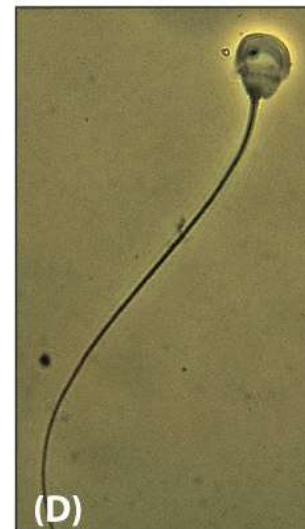
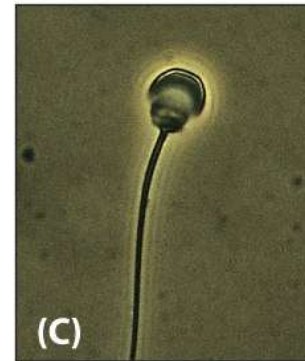
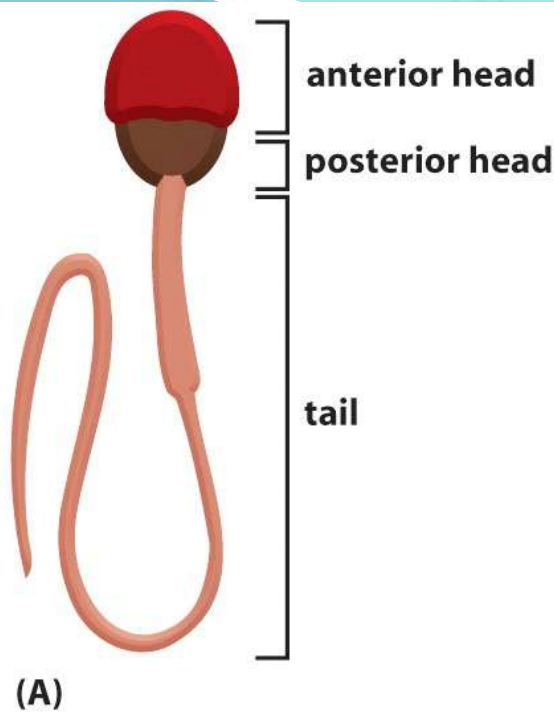


células epiteliais (ex: renais e intestinais) confinam algumas enzimas de transporte e lipídios na **membrana apical** ou **basolateral**

distribuição essencial para o funcionamento do epitélio

polarização da membrana é garantida por **junções tight** entre as células epiteliais (proteínas que não se difundem lateralmente e comunicam uma célula a vizinha)

Três Domínios da Membrana Plasmática do Espermatozóide



domínios de membrana podem existir sem **junções intercelulares**

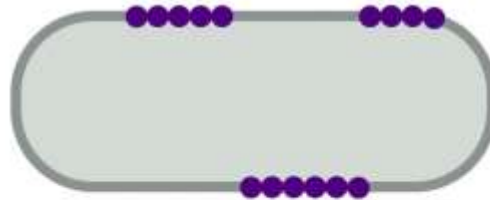
natureza molecular e mecanística da **barreira** que impede livre difusão é desconhecida (outro ex: **neurônios**)

espermatozóide é coberto por uma mesma **membrana plasmática** mas possui três domínios com papéis estruturais e funcionais diferentes

proteínas se difundem apenas nos domínios em que se encontram originalmente

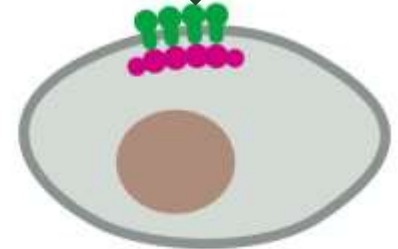
Quatro Formas de Restringir o Movimento Lateral de Proteínas na Membrana

grandes agregados como os de bacteriorrodopsina da **membrana púrpura**



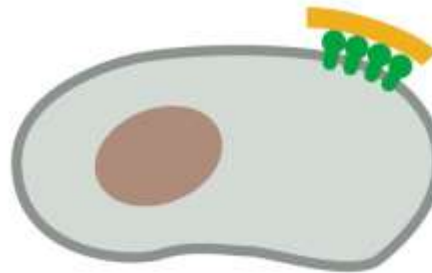
(A)

associando-se a complexos macromoleculares no meio intracelular



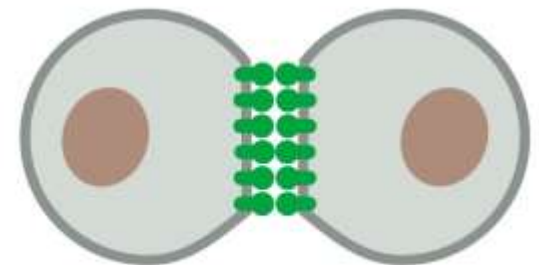
(C)

forma comum de restringir a **difusão lateral** é associar proteínas a complexos macromoleculares em um dos lados da membrana



(B)

associando-se a complexos macromoleculares no meio extracelular

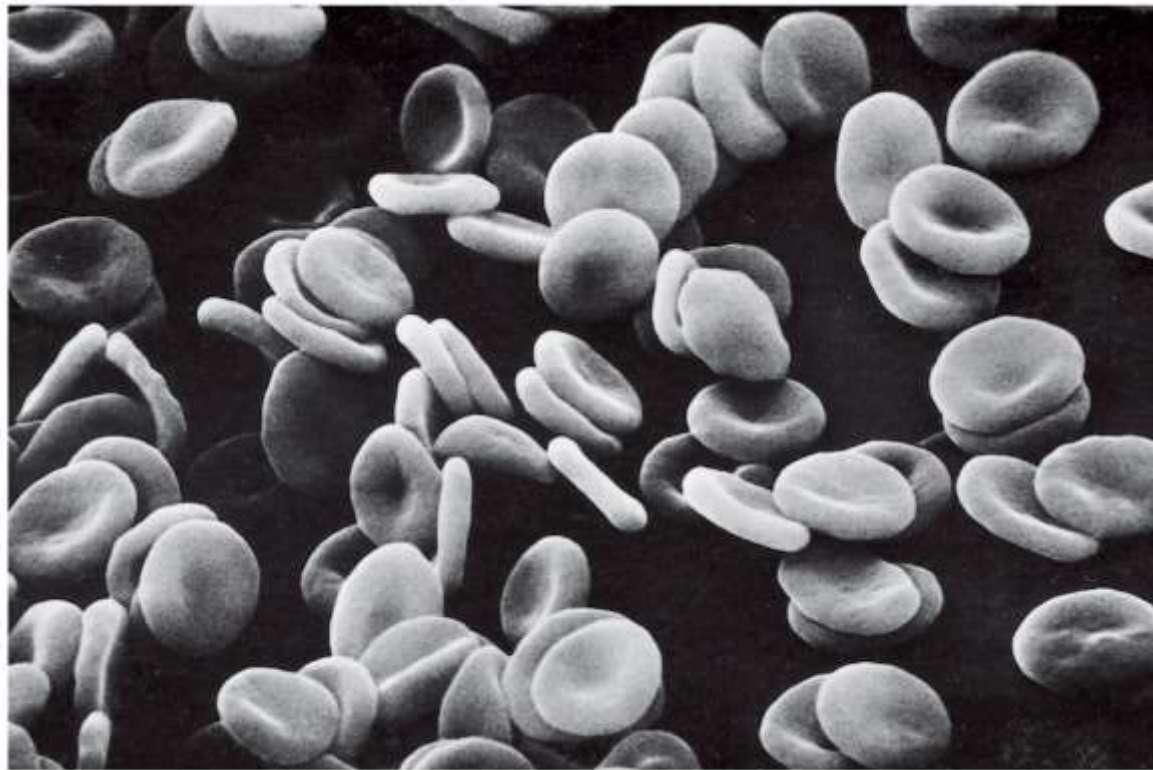


(D)

Interagindo com proteínas de outra célula

A Forma de uma Hemácia

a forma bicôncava característica das **hemácias** se deve a associação de proteínas de membrana com o **citoesqueleto** na superfície intracelular (**espectrinas!**)



5 μm

microscopia eletrônica da
superfície interna da **membrana**
plasmática de hemácias

