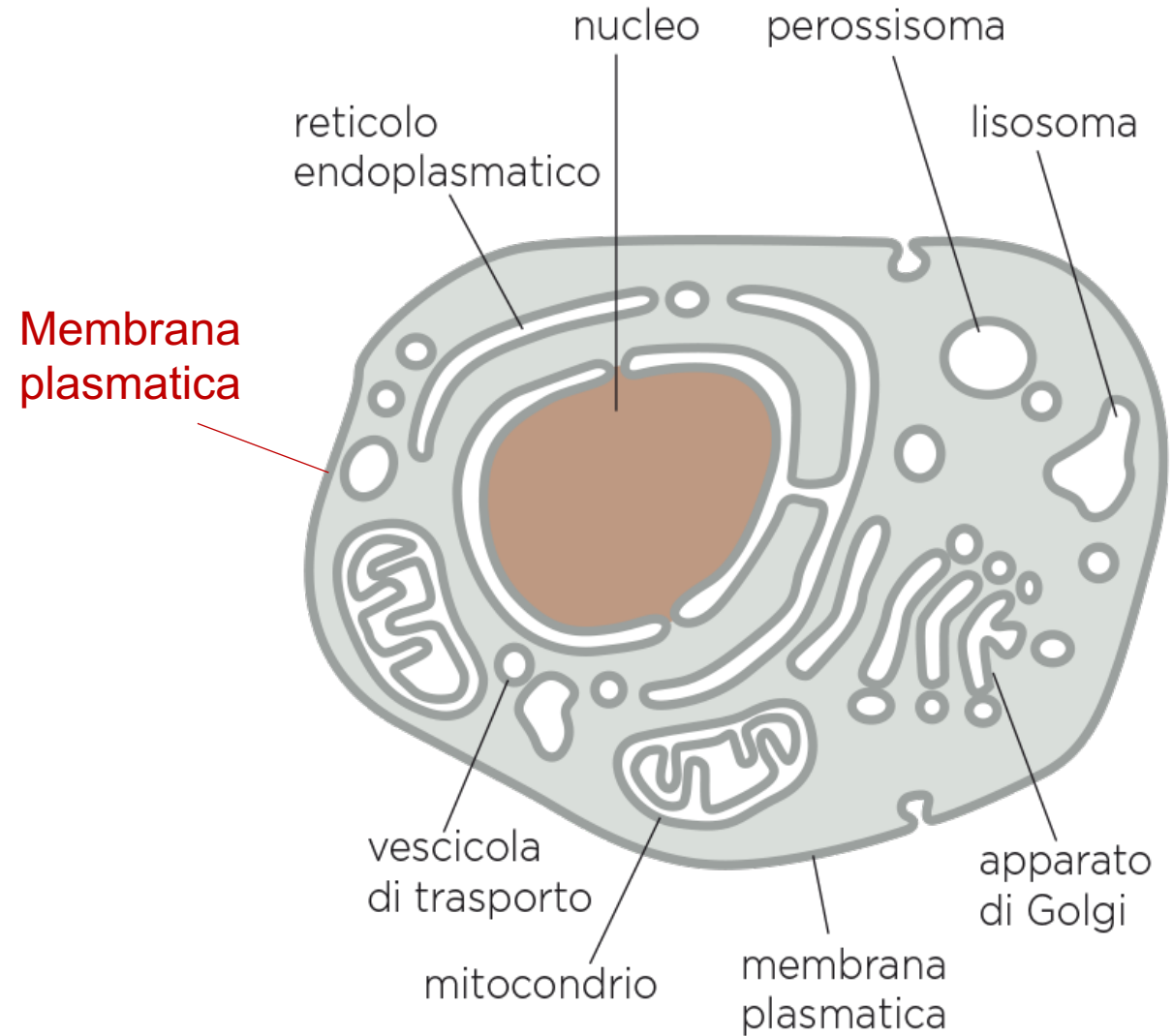
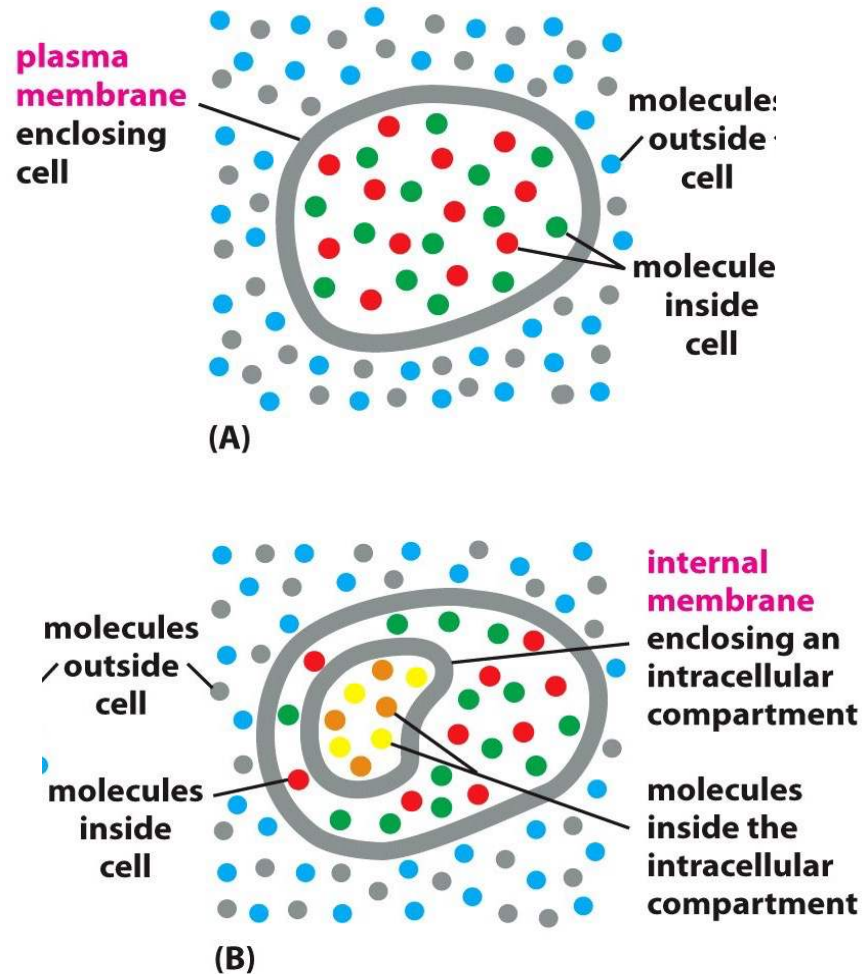


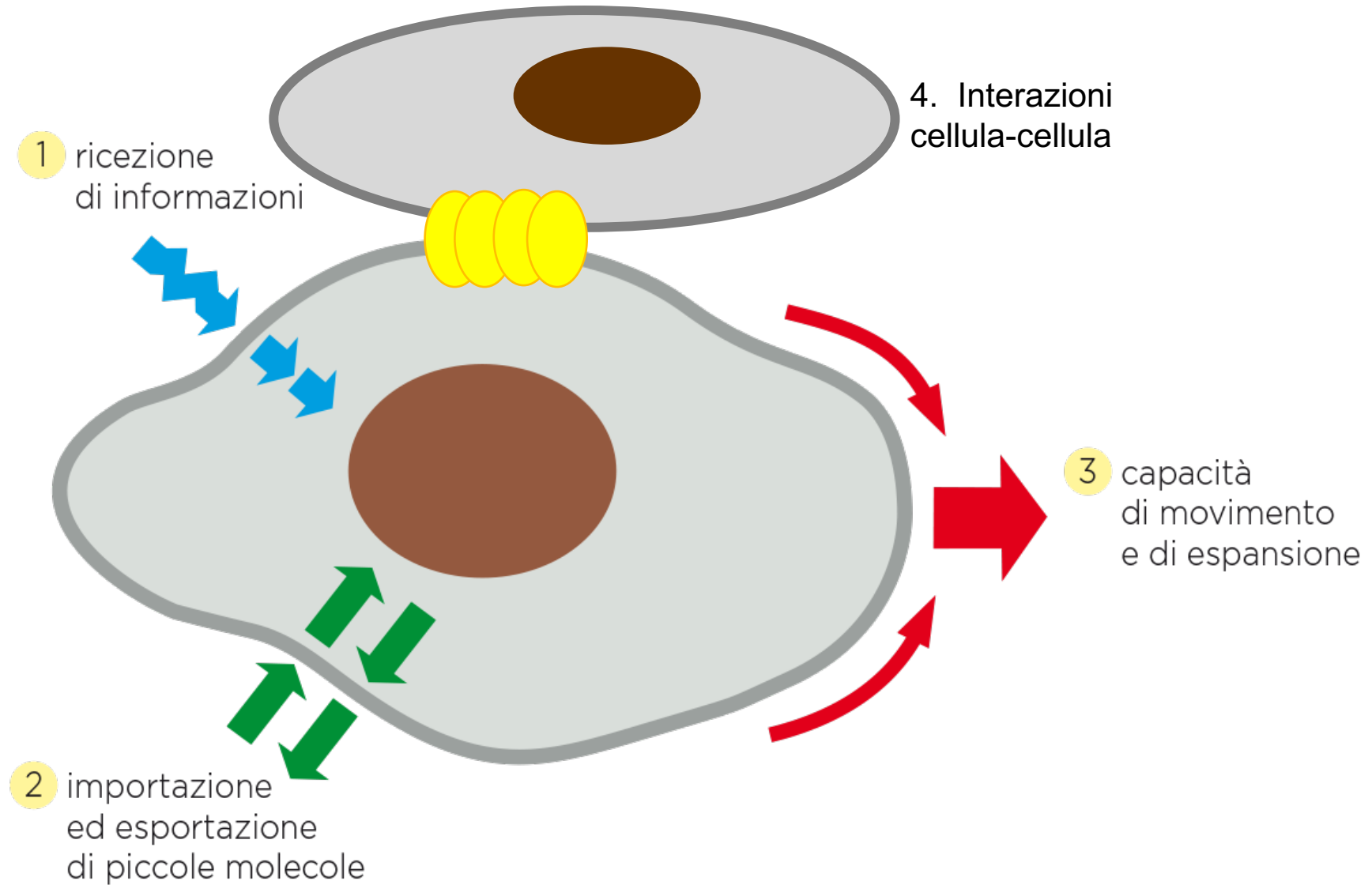
Le membrane biologiche

MEMBRANA PLASMATICA

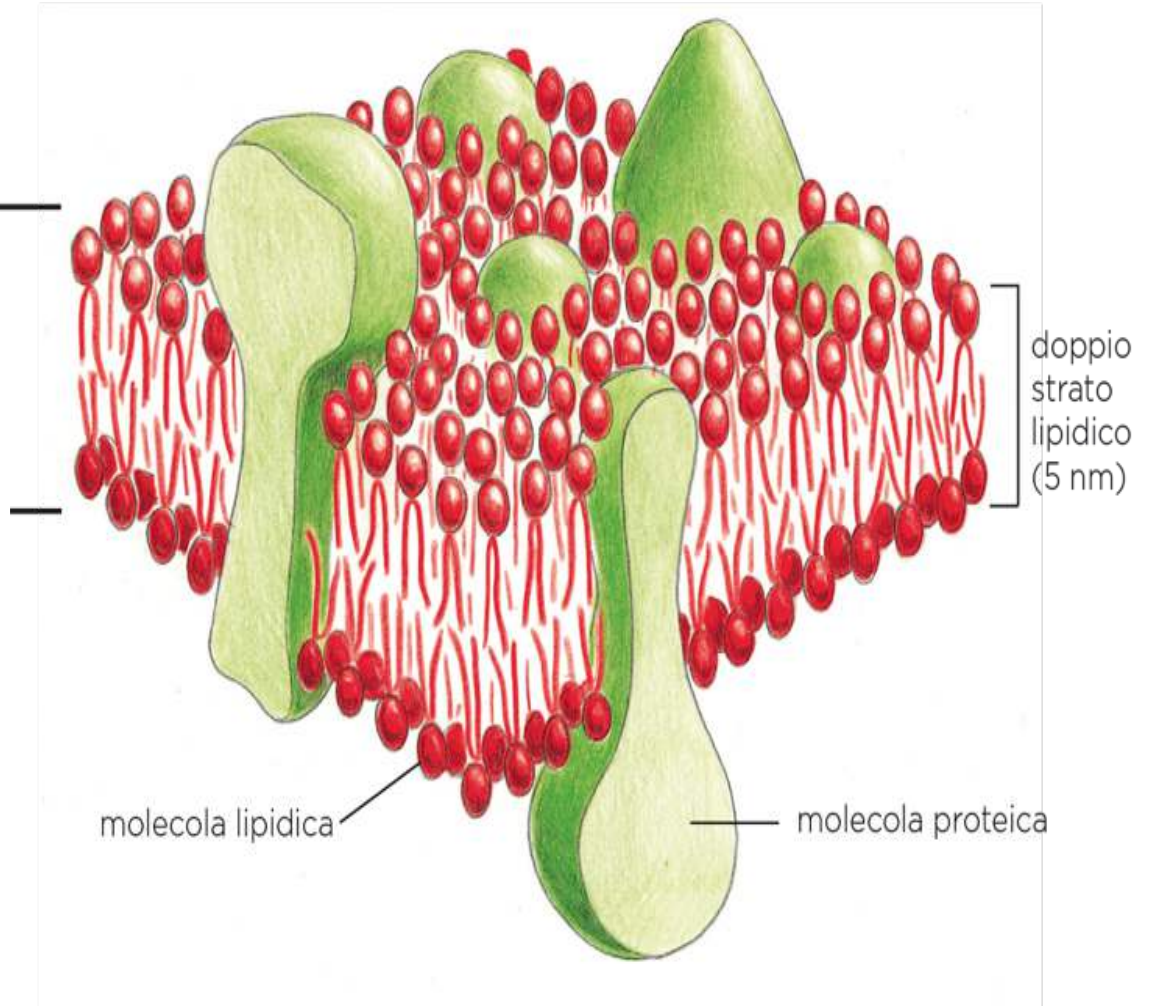
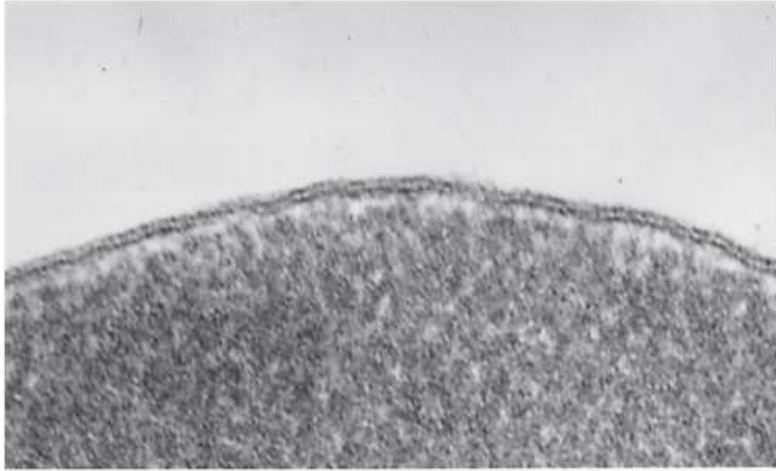
Le membrane cellulari sono **barriere selettive** che definiscono i compartimenti interni di una cellula eucariote



Funzioni della membrana plasmatica



Modello a mosaico fluido



Il modello di Singer e Nicolson presenta le membrane biologiche come un doppio strato fluido di lipidi con un mosaico di proteine associate.

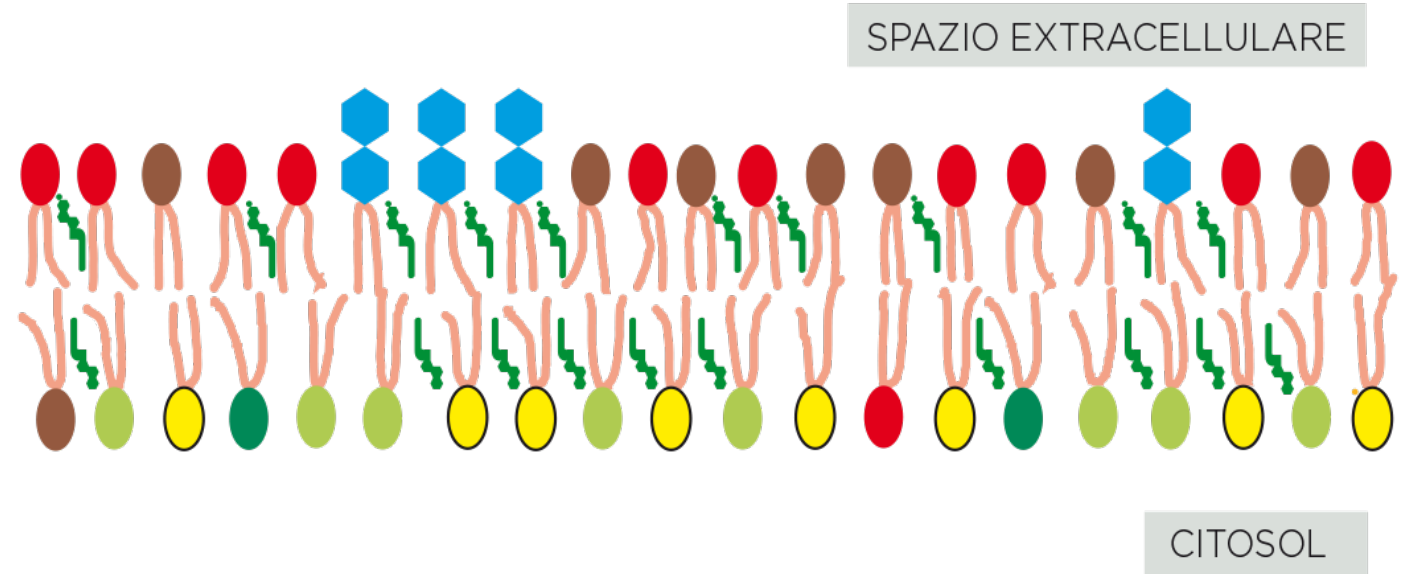
Lipidi di membrana

I lipidi costituiscono circa il 50% della massa della membrana plasmatica.

Fosfolipidi = 60-70% del peso lipidico totale.

Colesterolo = 30-40%.

Glicolipidi = 2-5%.

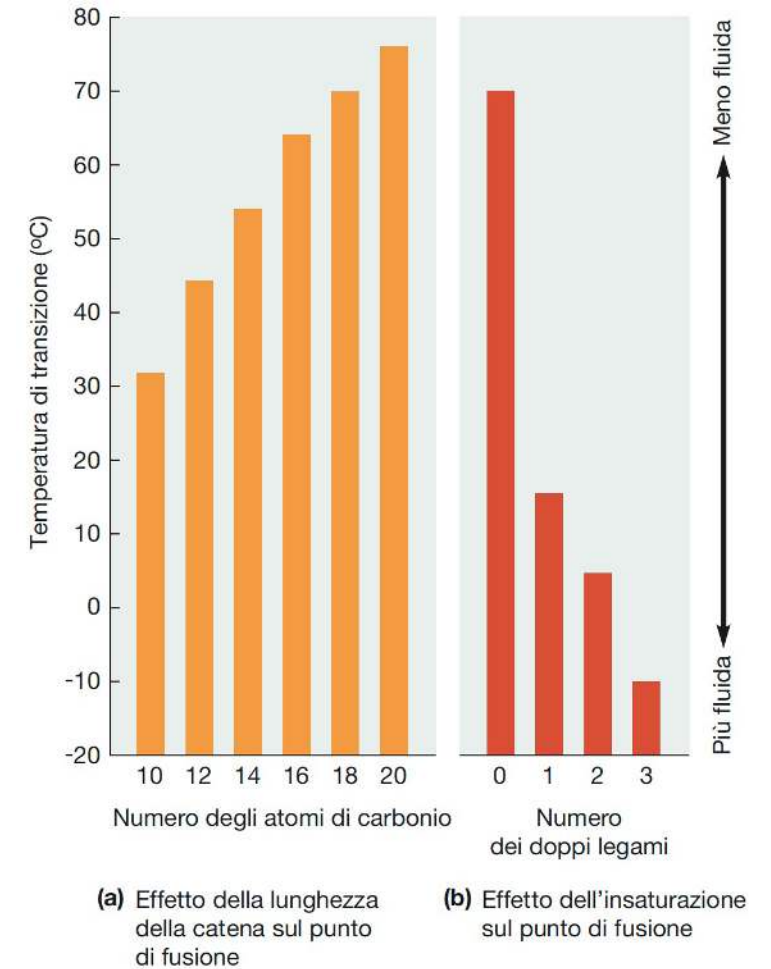
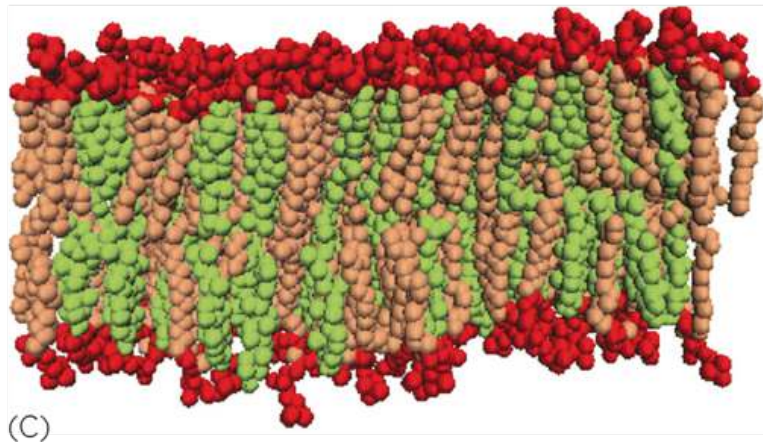


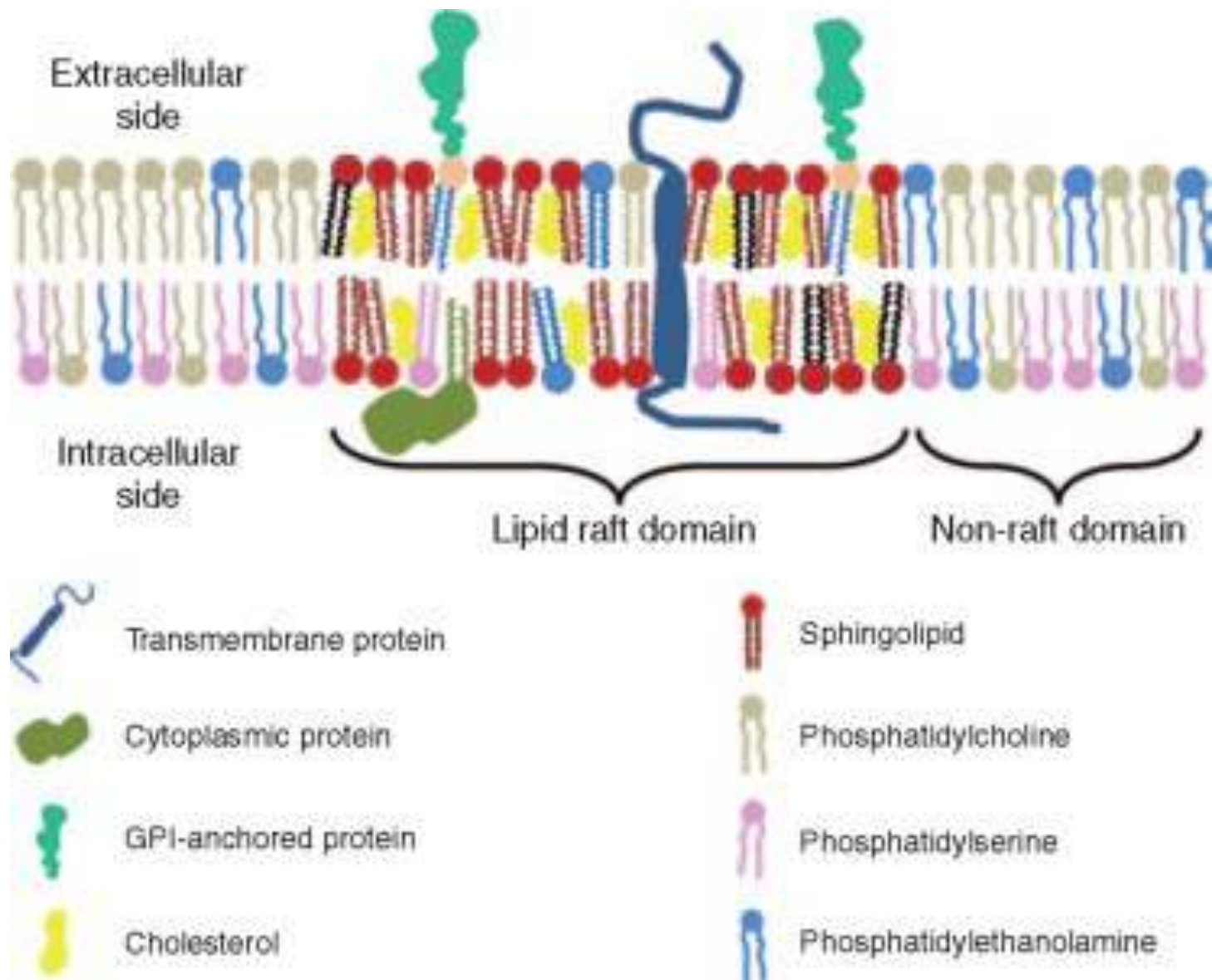
- Asimmetria di membrana
- Fluidità di membrana
- Movimenti dei lipidi di membrana
- Flessibilità

Le membrane funzionano in modo corretto solo allo stato fluido

Parametri che influenzano la fluidità di membrana:

- Temperatura
- Lunghezza delle catene idrocarburiche
- Grado di saturazione
- Presenza di molecole di colesterolo

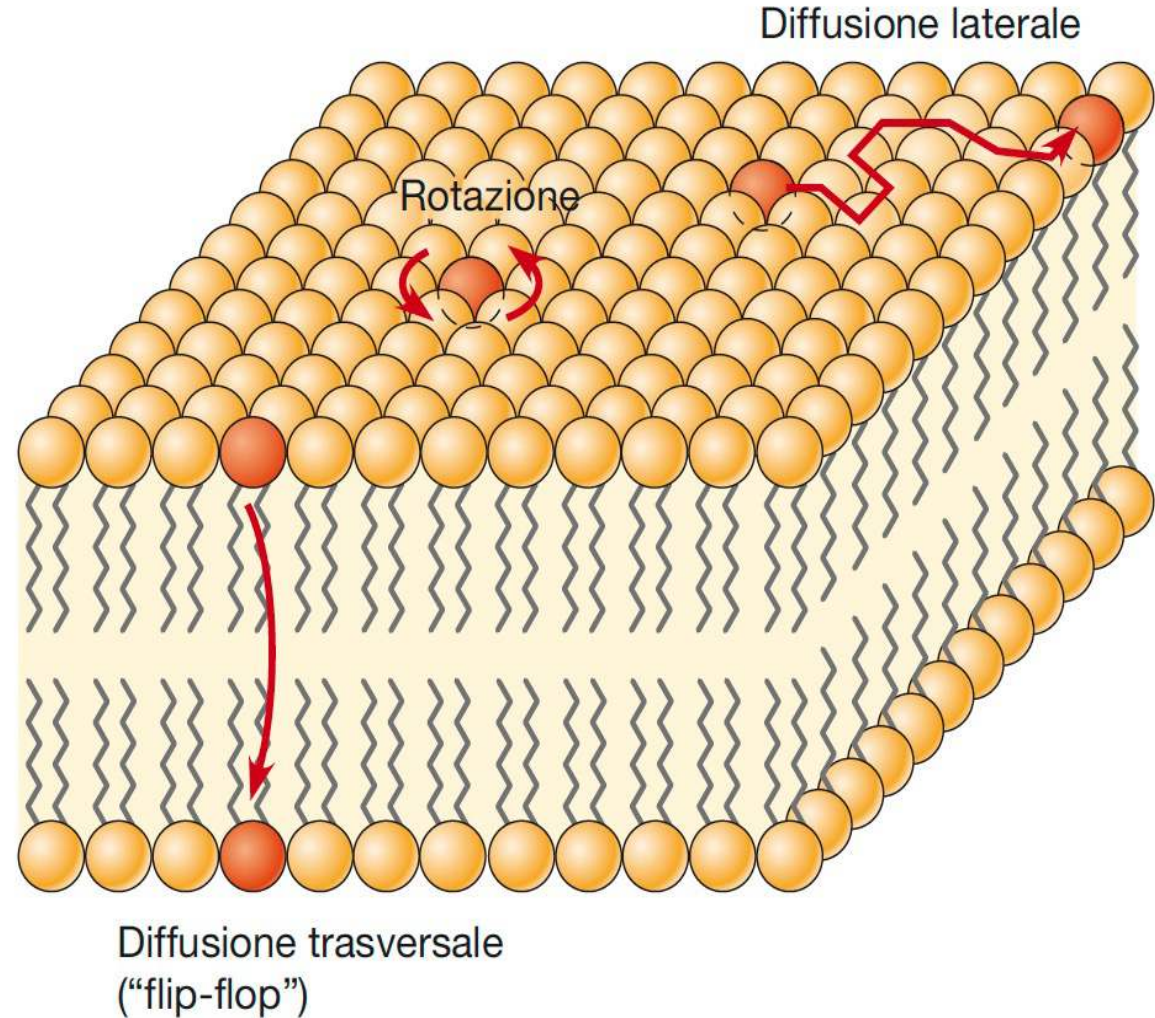




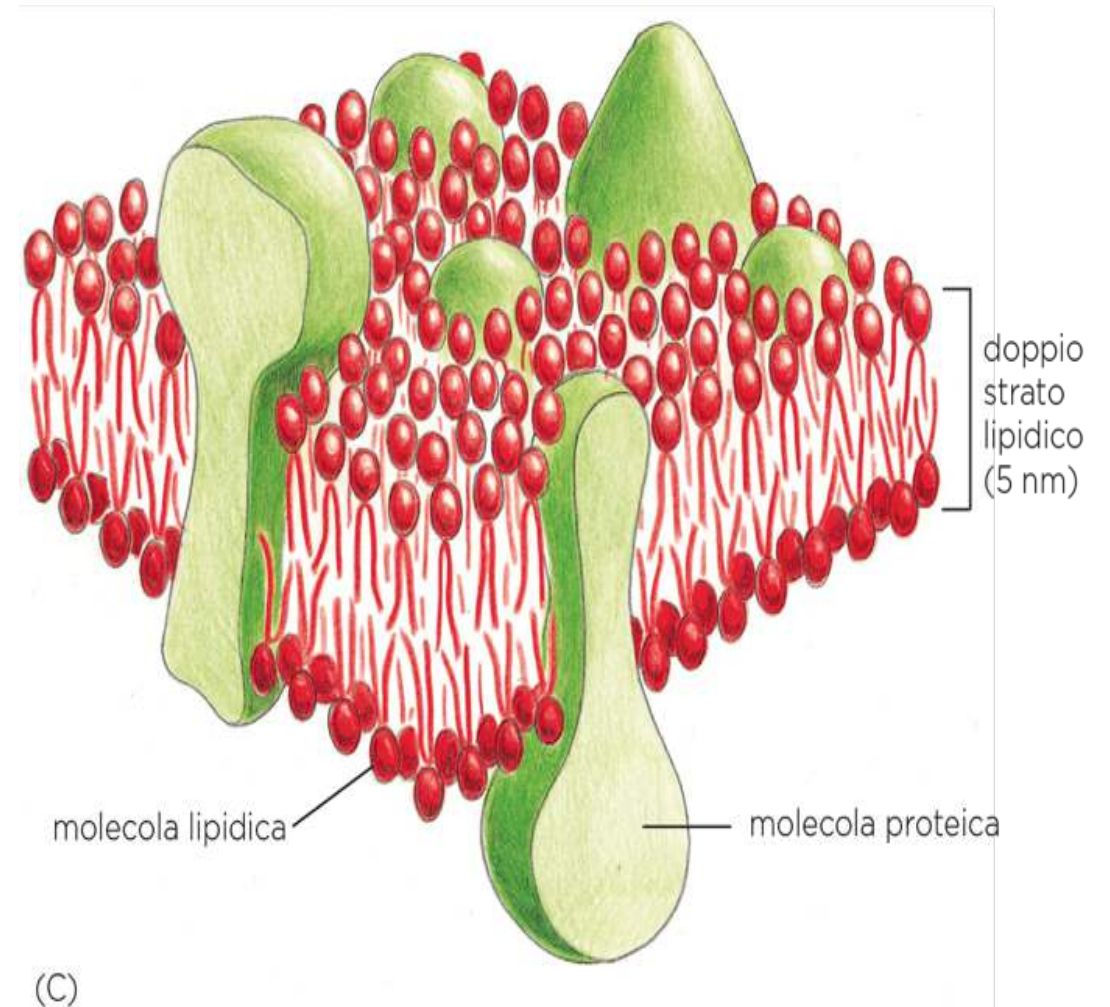
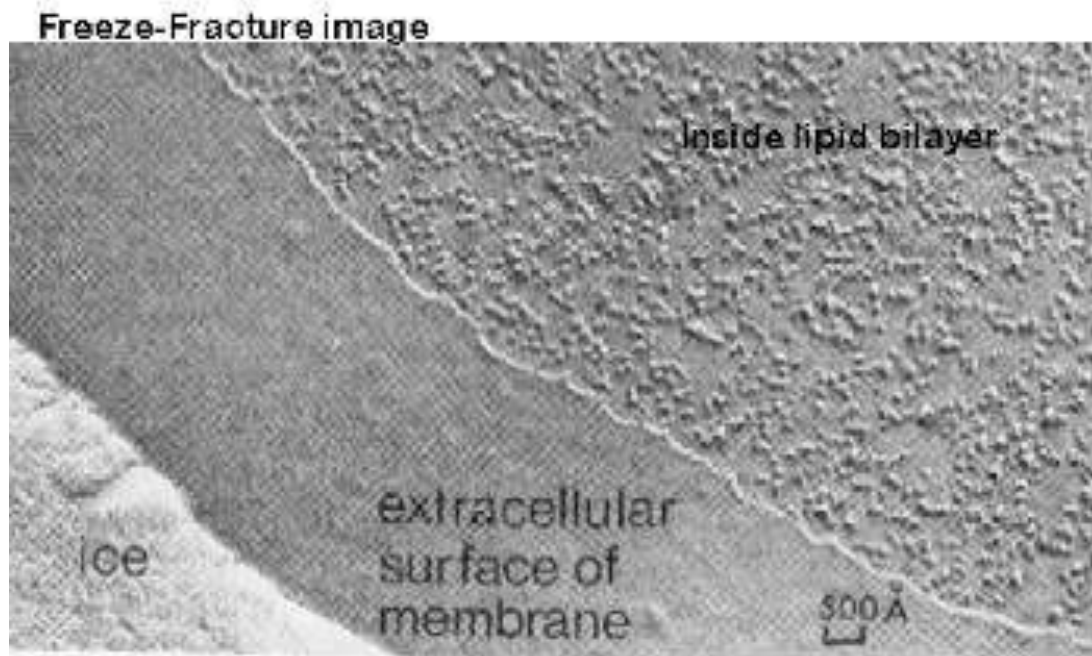
Invece di diffondere liberamente, colesterolo e sfingolipidi tendono a raggrupparsi in zone semisolide (zattere lipidiche o lipid rafts) che sequestrano determinate proteine.

Movimenti dei lipidi di membrana

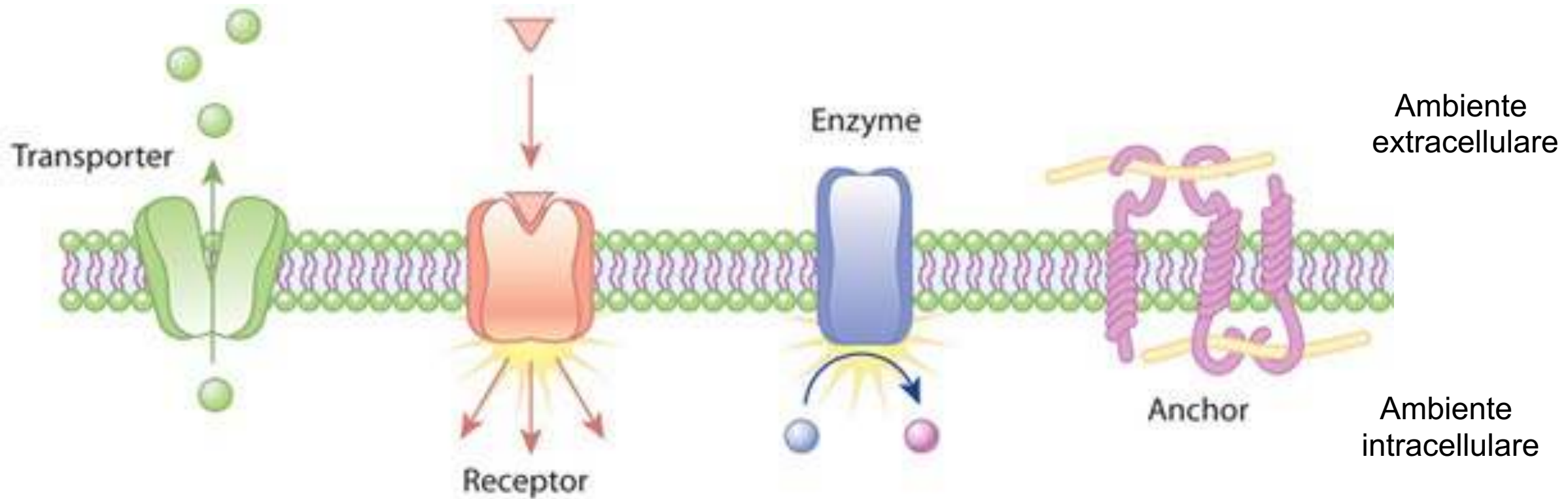
1. Rotazione intorno al proprio asse.
2. Diffusione laterale all'interno dello stesso emistrato.
3. Movimento flip-flop: diffusione trasversale da uno strato all'altro. E' raro e termodinamicamente sfavorito e necessita quindi dell'enzima **flippasi**.



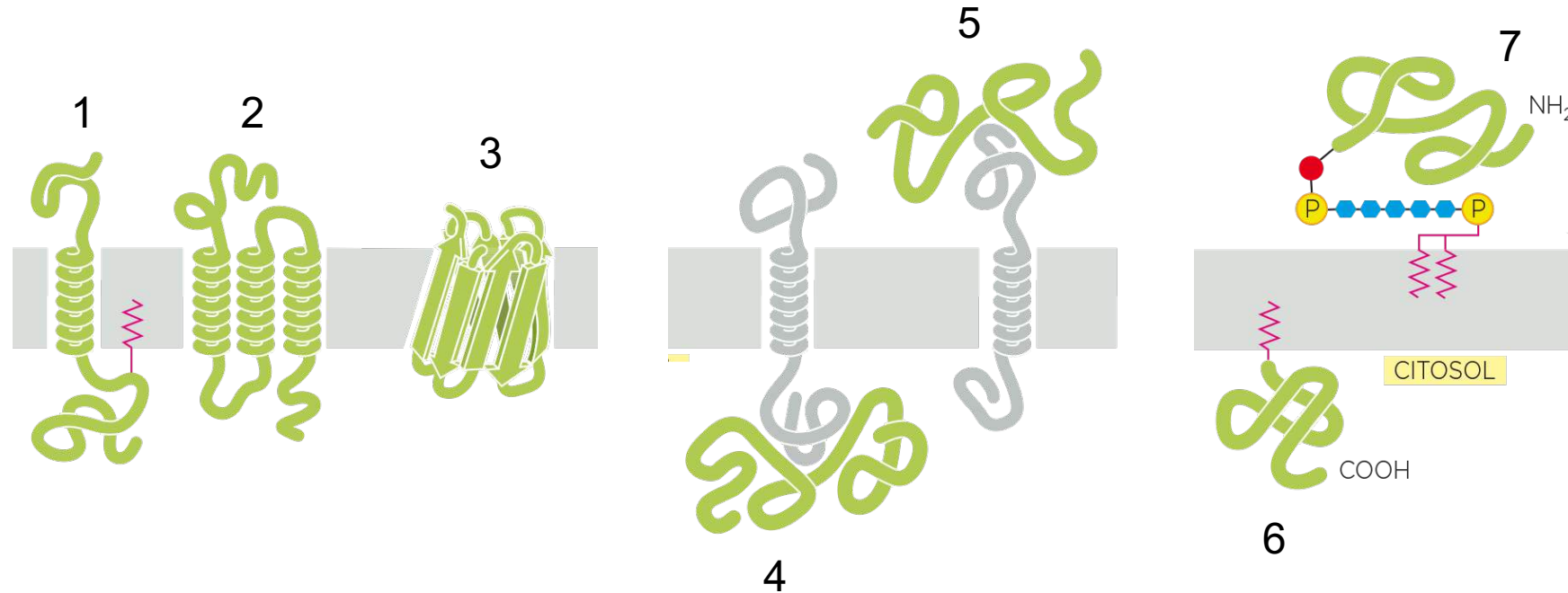
Proteine di membrana



Principali funzioni delle proteine di membrana



Le proteine di membrana possono associarsi in vari modi al doppio strato lipidico.

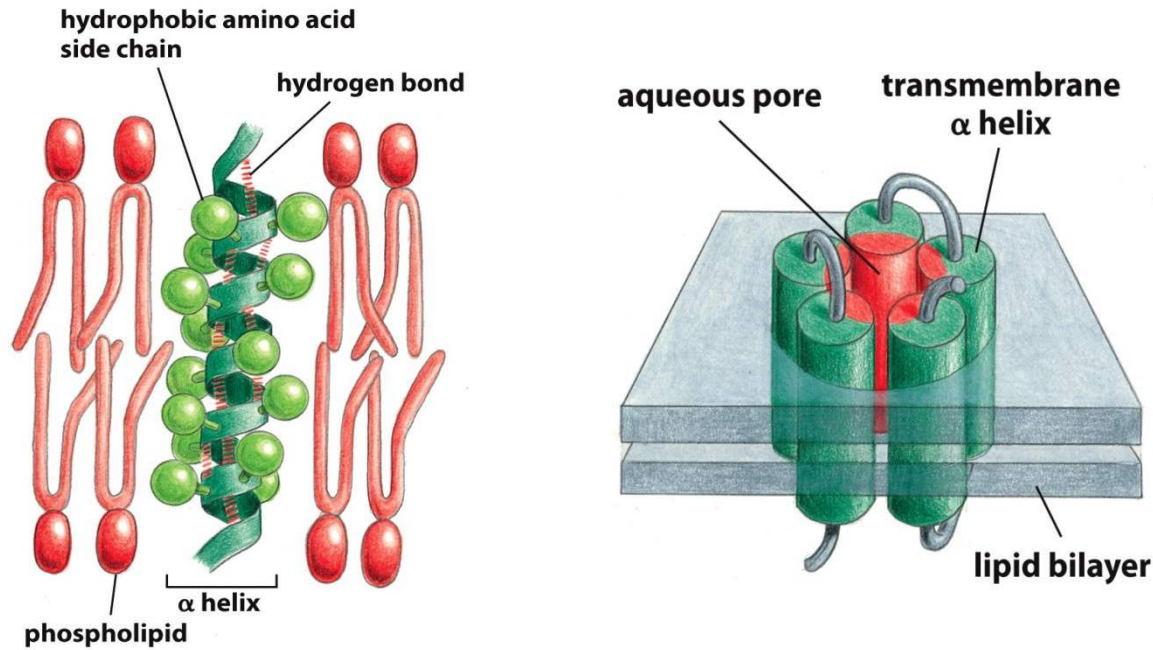


1,2,3 = proteine integrali

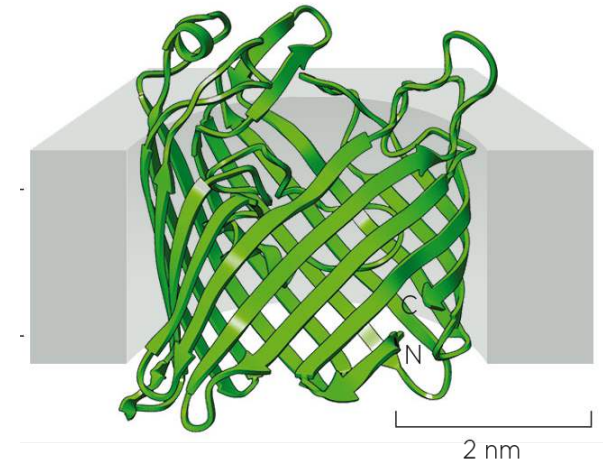
4,5 = proteine legate con legami non covalenti ad altre proteine di membrana

6,7 = proteine ancorate ai lipidi

proteine periferiche

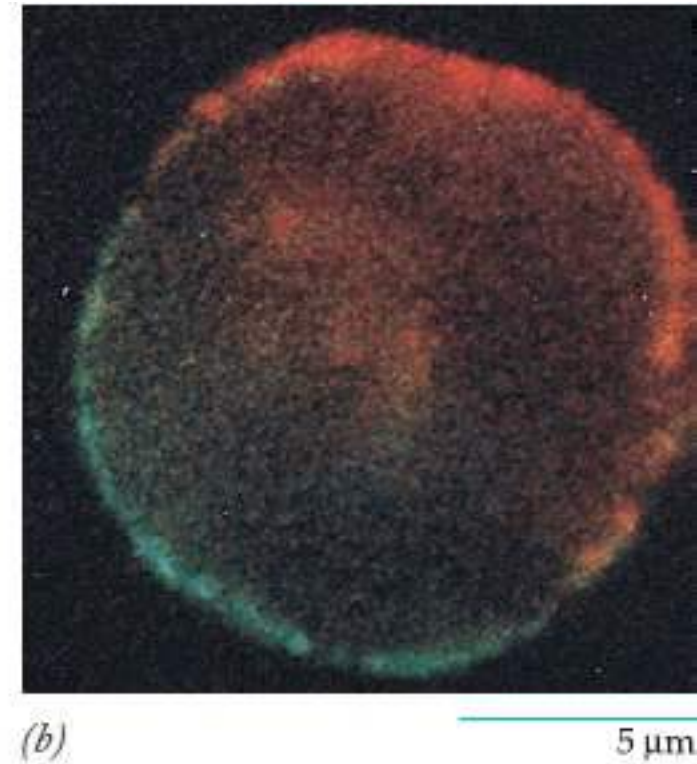
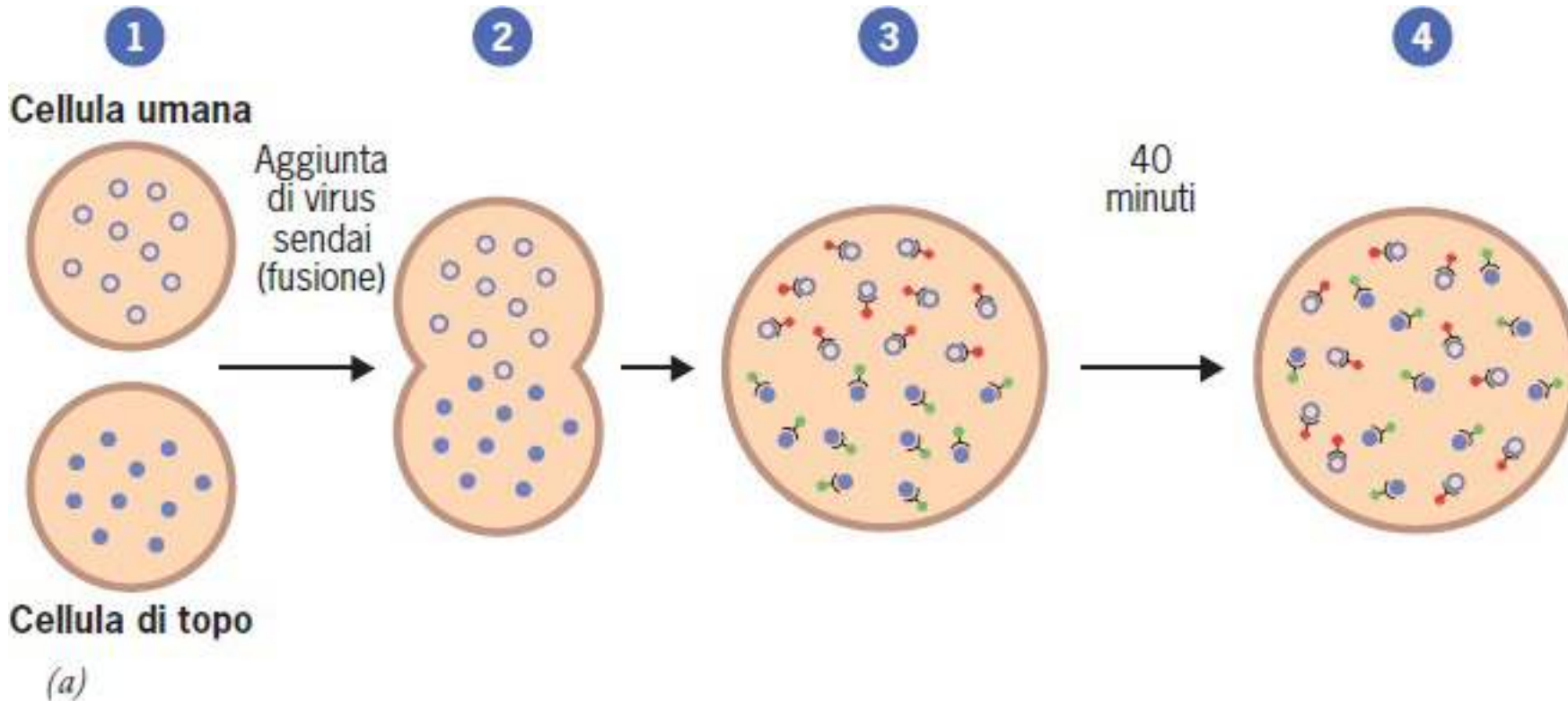


Le porzioni di proteina che attraversano la membrana sono generalmente **α -eliche** costituite da **20-25 aminoacidi**. Più segmenti possono attraversare il doppio strato lipidico (es. nei pori acquosi). Sul lato di ciascuna elica le catene laterali idrofobe entrano in contatto con le code lipidiche mentre le catene laterali idrofile sono poste all'interno della struttura.



Le porzioni di proteina che attraversano la membrana possono essere costituite da **foglietti β** , piegati per formare una struttura a manicotto: barile β . Proteine di questo tipo sono abbondanti nella membrana esterna di batteri, mitocondri e cloroplasti (porine).

Movimenti delle proteine di membrana



1 Cellule di topo e uomo con proteine di membrana topo-specifiche (m) e uomo-specifiche (h)

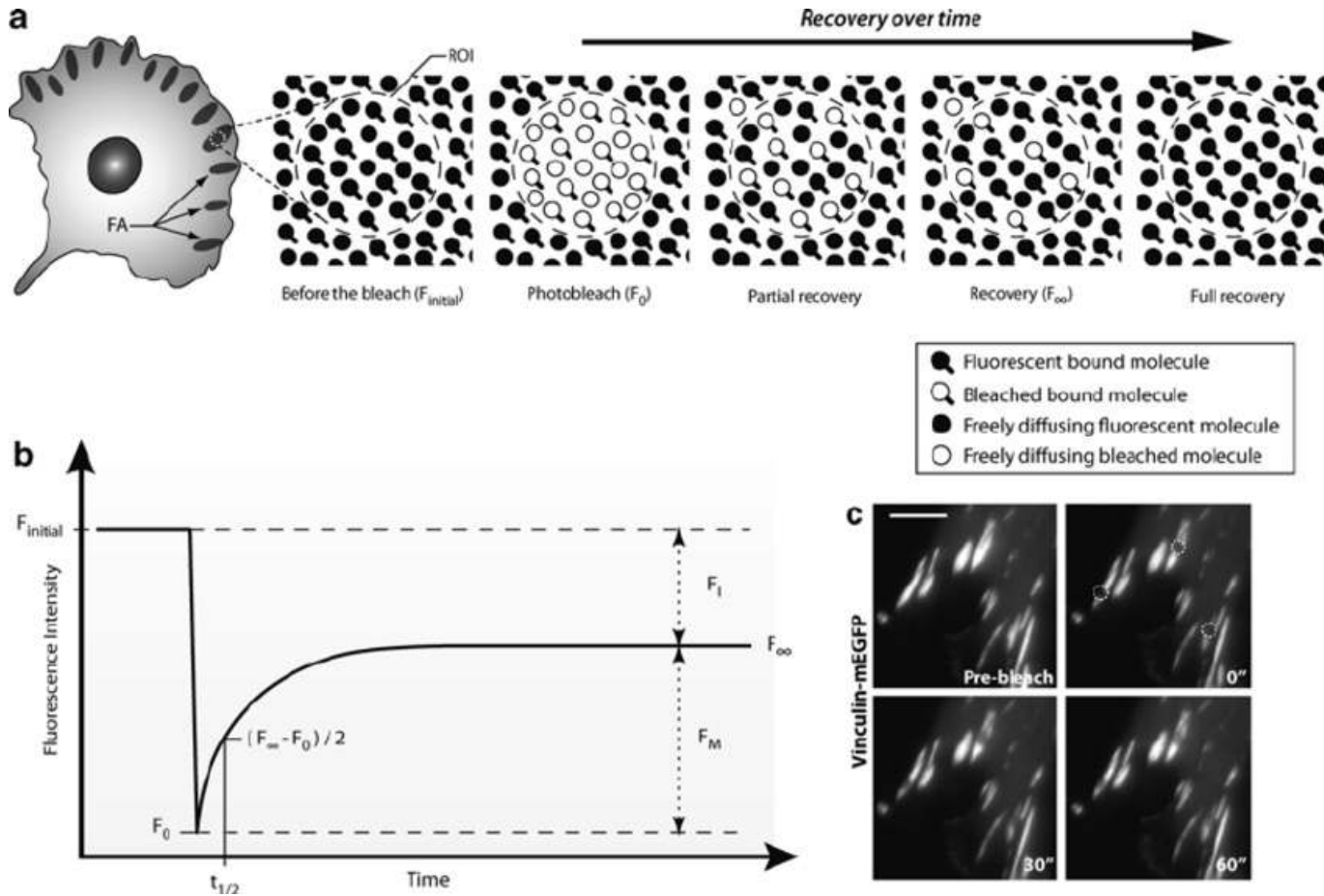
2 Cellule ibride prodotte dalla fusione indotta da virus

3 Proteine di membrana marcate con specifici anticorpi fluorescenti

4 Le proteine marcate cominciano a mescolarsi entro pochi minuti

5 Le proteine marcate sono completamente mescolate dopo 40 minuti

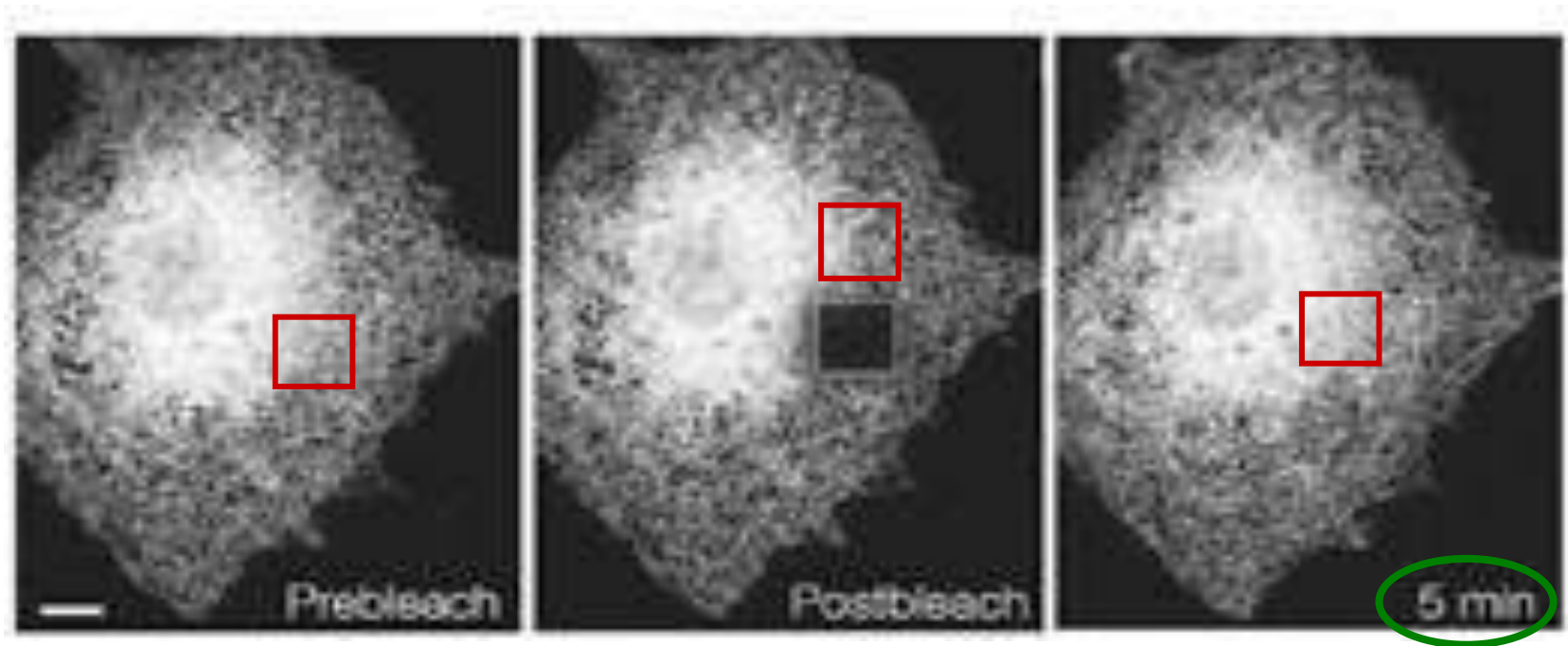
Analisi della mobilità di proteine in real-time mediante FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)



La FRAP è una metodica utilizzata in generale per misurare cinetiche di diffusione in tessuti/cellule.

Esperimenti di FRAP combinata a GFP visualizzano la mobilità e la dinamica di proteine in cellule vive mediante microscopia confocale abbinata ad un protocollo per l'analisi del "photobleaching" ovvero lo spegnimento irreversibile di fluorofori mediante un laser ad alta energia.

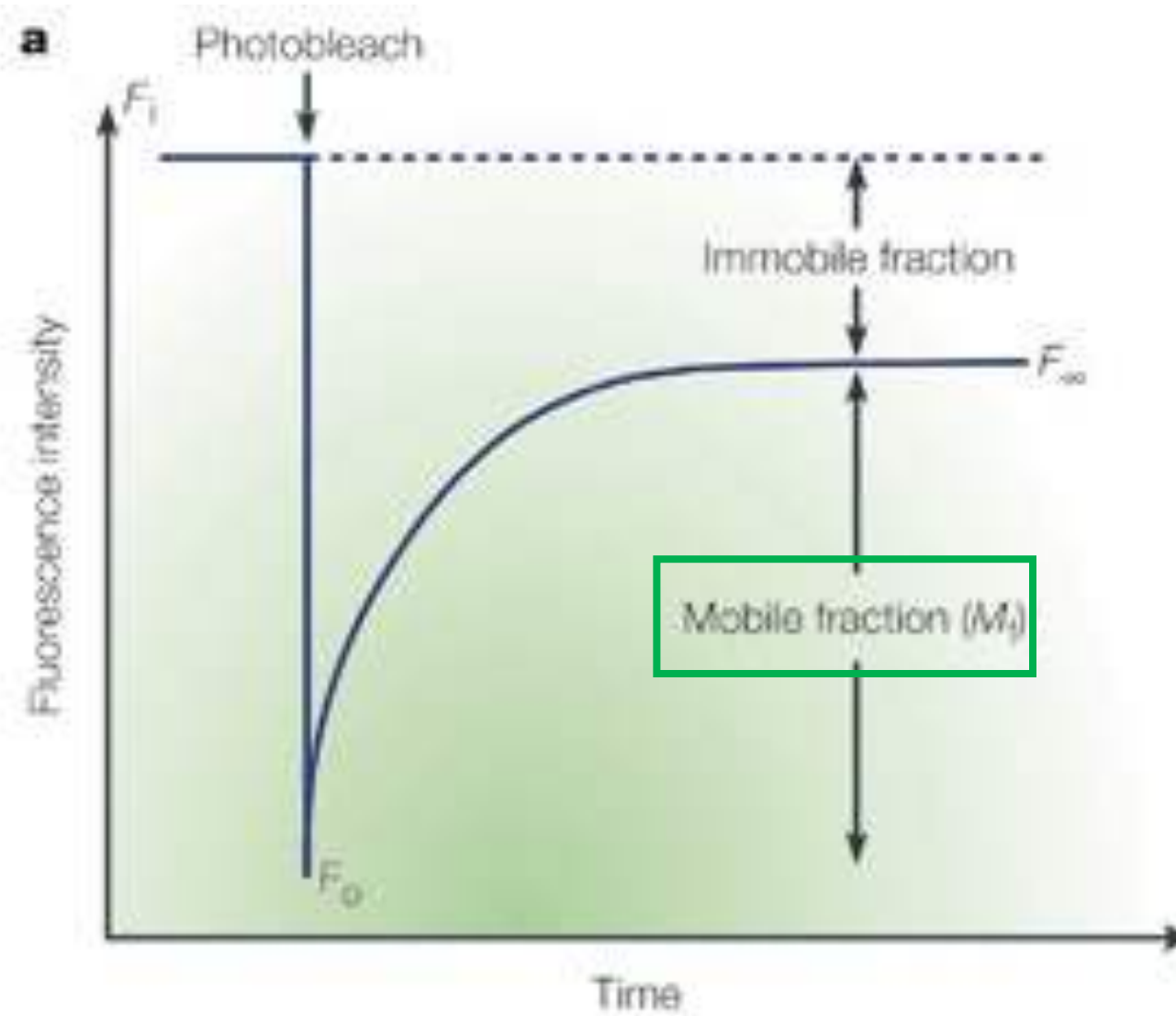
Analisi della mobilità di proteine in real-time mediante FRAP



Durante gli esperimenti di FRAP viene determinata:

- quanta fluorescenza è recuperata rispetto a quella misurata prima del bleaching (*Recovery*)
- quanto velocemente le molecole migrano nell'area di bleaching
- quante molecole migrano nell'area di bleaching (*Mobile Fraction, Mf*)

Analisi della mobilità di proteine in real-time mediante FRAP

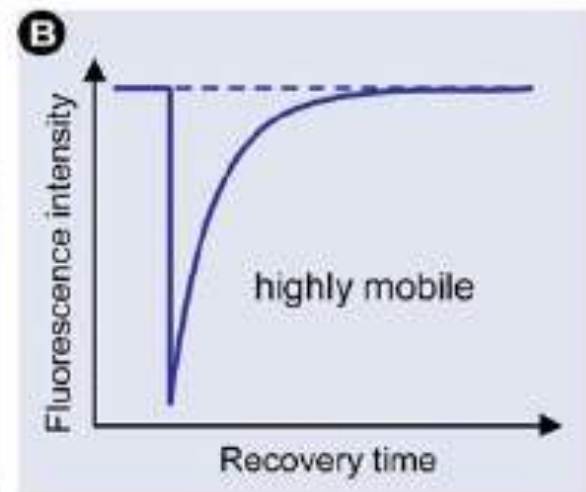
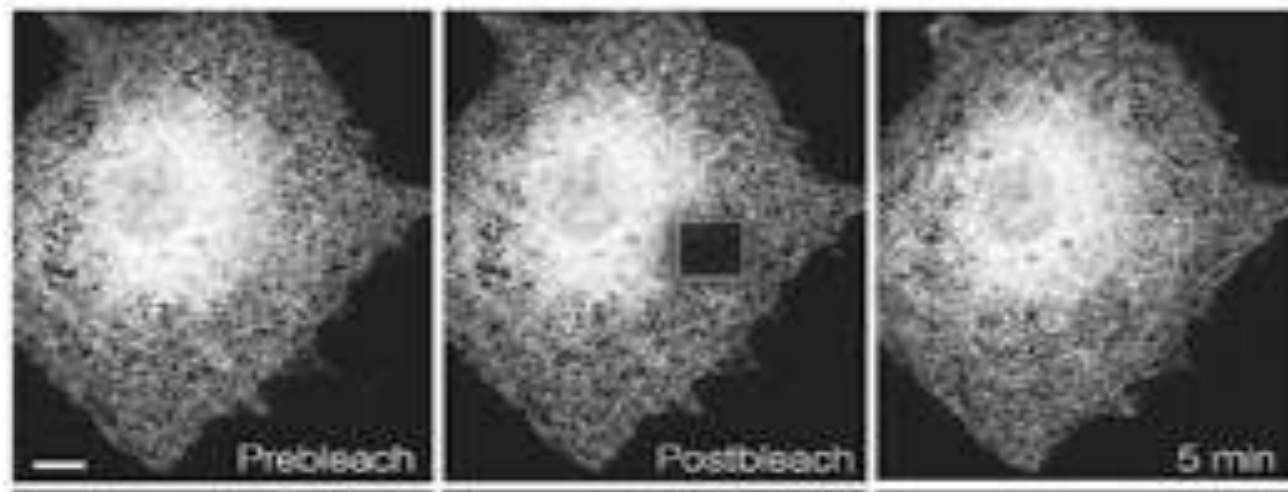


Frazione mobile (M_f)

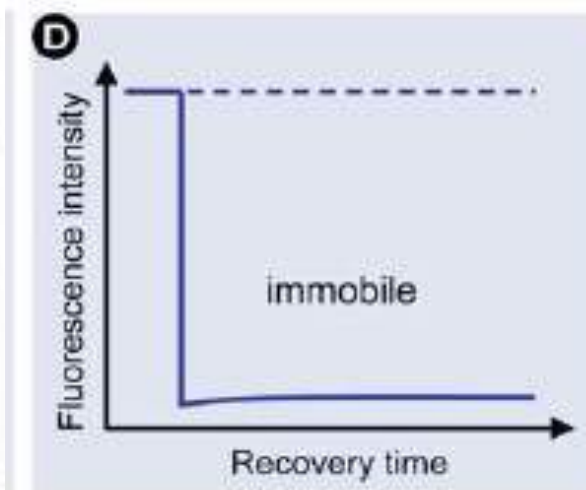
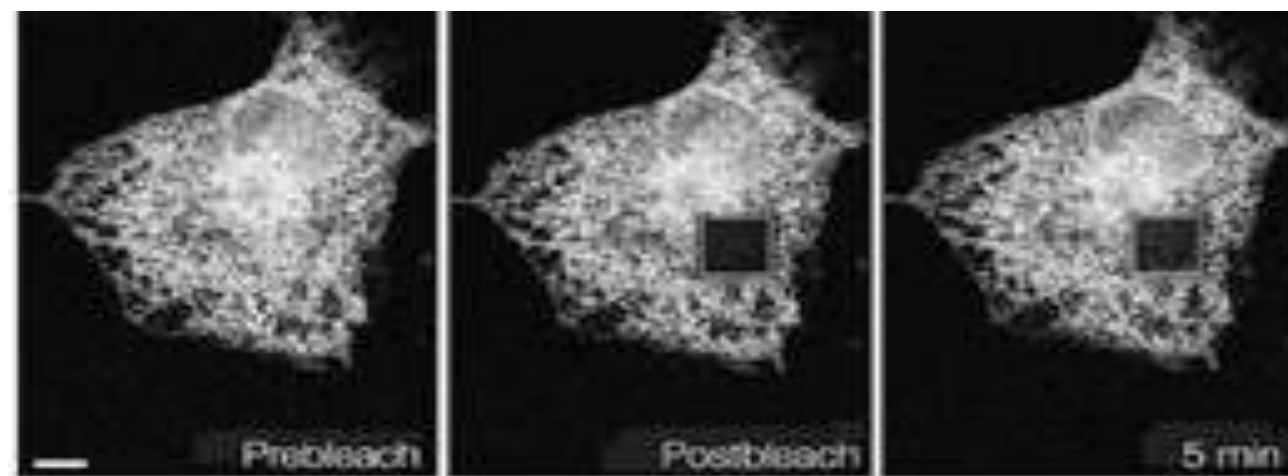
La M_f è la frazione di proteine fluorescenti che diffondono nella regione "bleached"

$$M_f = (F_{\infty} - F_0) / F_i - F_0$$

La M_f indica quanto una molecola può muoversi all'interno di una cellula

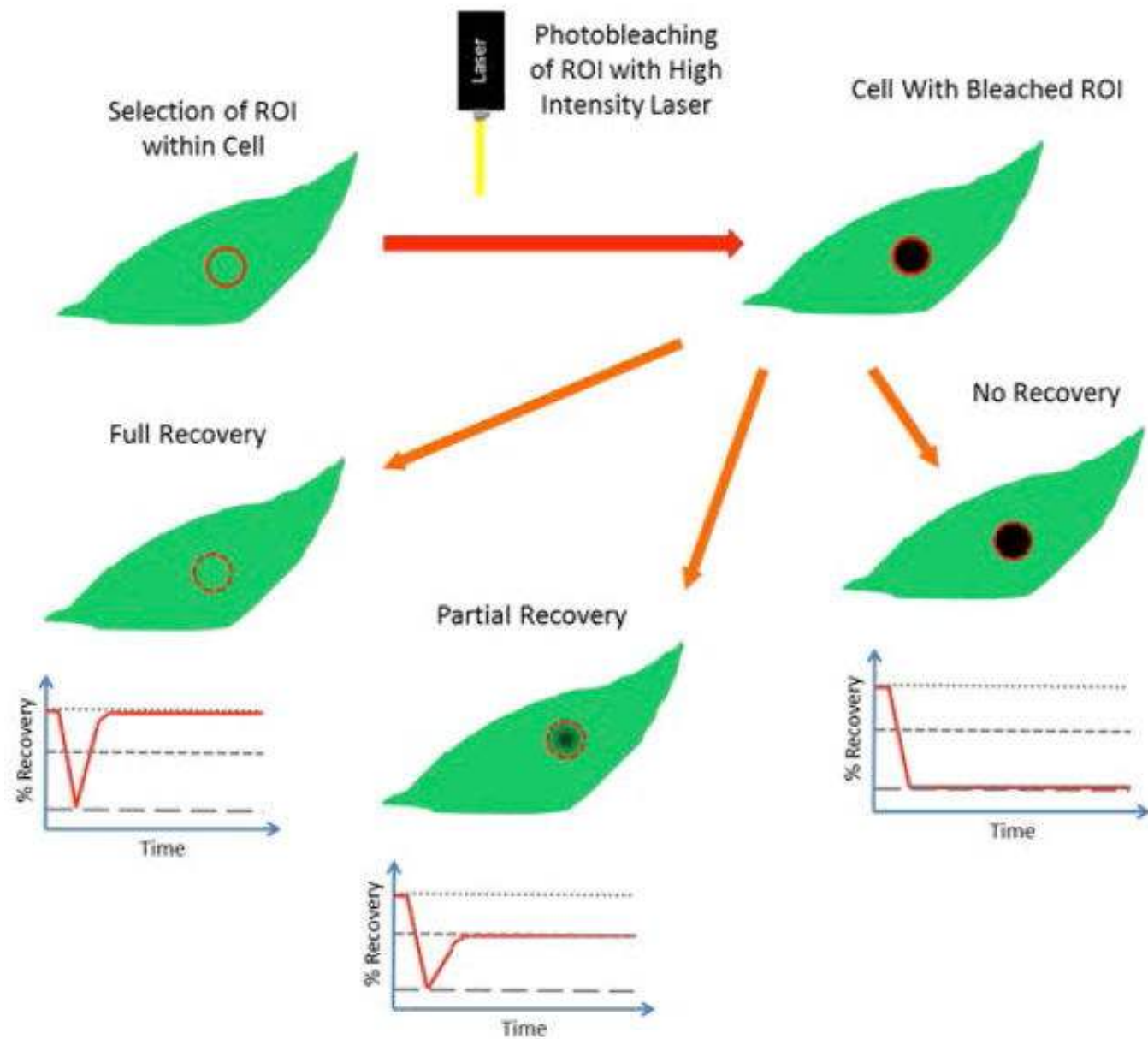


$M_f = 100\% \rightarrow$ la proteina diffonde liberamente



$M_f = 0\% \rightarrow$ la proteina è immobile

Fluorescence Recovery After Photobleaching



Costante di diffusione

La costante di diffusione (D) è la misura della velocità di movimento della proteina in assenza di flusso o trasporto attivo.

La D di una proteina è legata alla sua forma e all'ambiente cellulare in cui si trova.

$$D = kT / 6\pi\eta R$$

T = temperatura

k = costante di Boltzmann

η = viscosità della soluzione

R = raggio idrodinamico della particella

Diffusione effettiva: velocità con cui viene recuperata la fluorescenza

Aumento della D → non diffusione, ma movimento diretto da un flusso (proteine motrici) oppure diminuzione della viscosità dell'ambiente

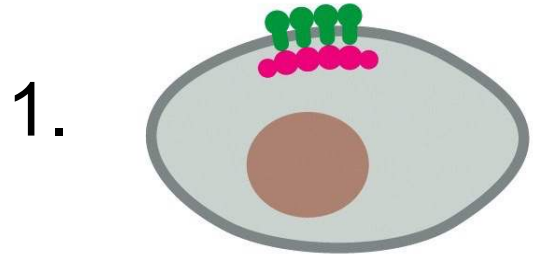
Diminuzione della D → formazione di aggregati/complessi oppure aumento della viscosità oppure interazioni con molecole fissate

Table 1 | **Diffusion rates of GFP and GFP chimaeras using FRAP**

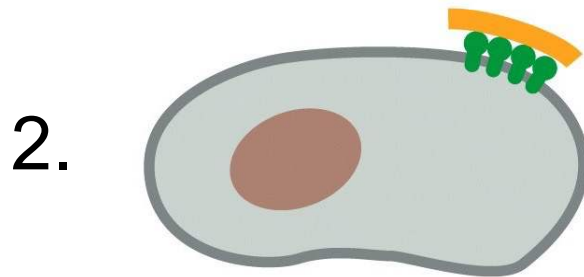
Molecule	D ($\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
GFP in water ⁴	87
GFP in cytoplasm ⁴	25
GFP in the endoplasmic-reticulum (ER) lumen ²⁰	5–10
GFP in the mitochondrial matrix ¹⁷	20–30
<i>ER membrane</i>	
VSVG tsO45–GFP (in ER+BFA 32 °C) ³²	0.49
VSVG tsO45–GFP (in ER 40 °C) ³²	0.45
Signal recognition particle β -subunit–GFP ³²	0.26
<i>Golgi apparatus membrane</i>	
Galactosyltransferase–GFP (in Golgi) ¹⁵	0.54
<i>Nucleoplasm</i>	
GFP–fibrillarin ²¹	0.53
GFP–ERCC1/XPF ²⁵	15
<i>Plasma membrane</i>	
E-cadherin–GFP ³¹	0.03–0.04

VSVG, vesicular stomatitis virus G protein; BFA, brefeldin A.

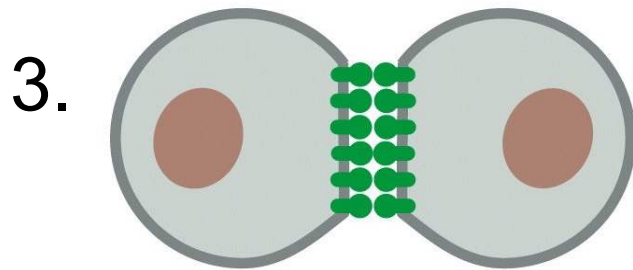
La mobilità laterale delle proteine di membrana plasmatica può essere limitata in vari modi:



Proteine ancorate al
cortex cellulare

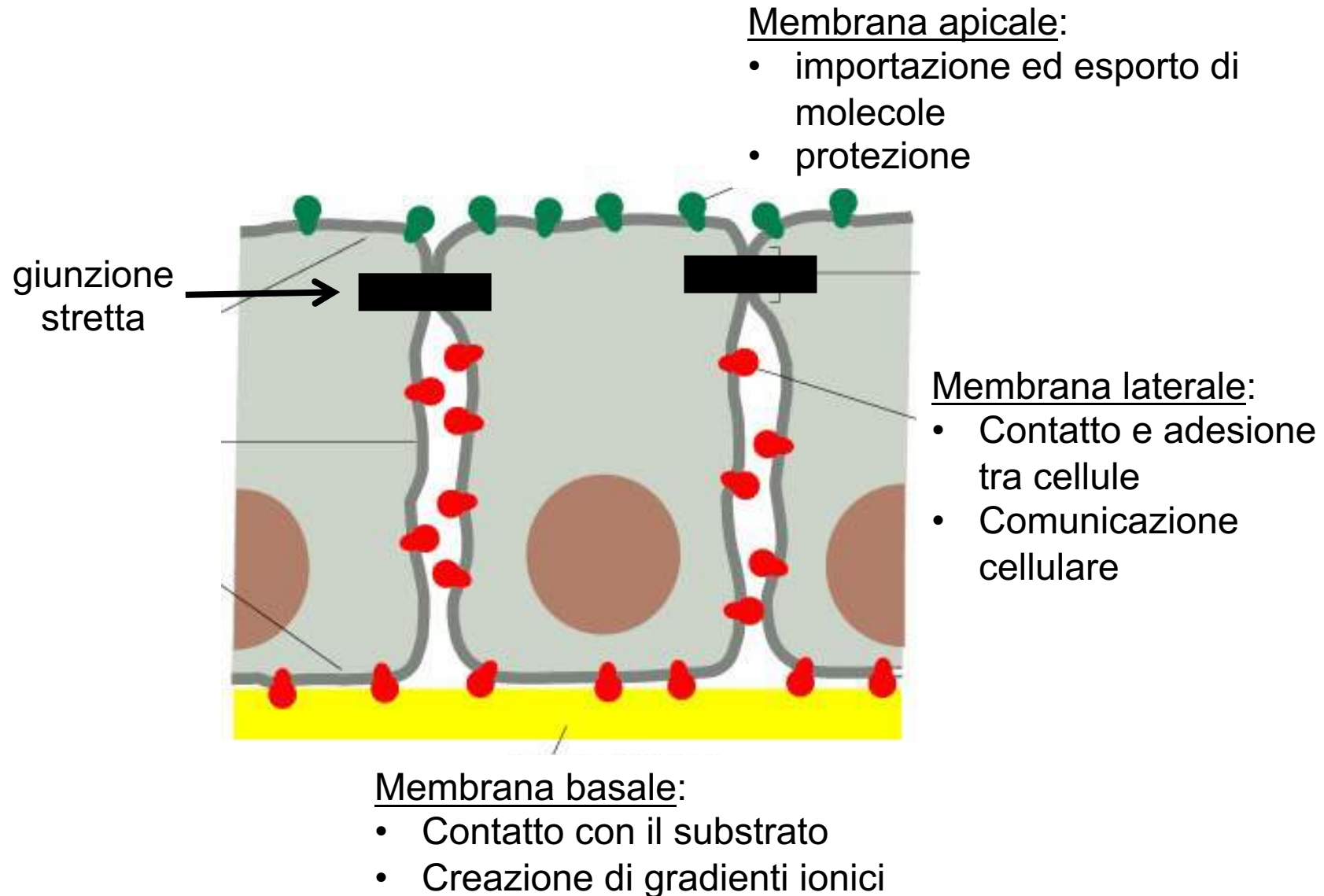


Proteine ancorate a
molecole della matrice
extracellulare

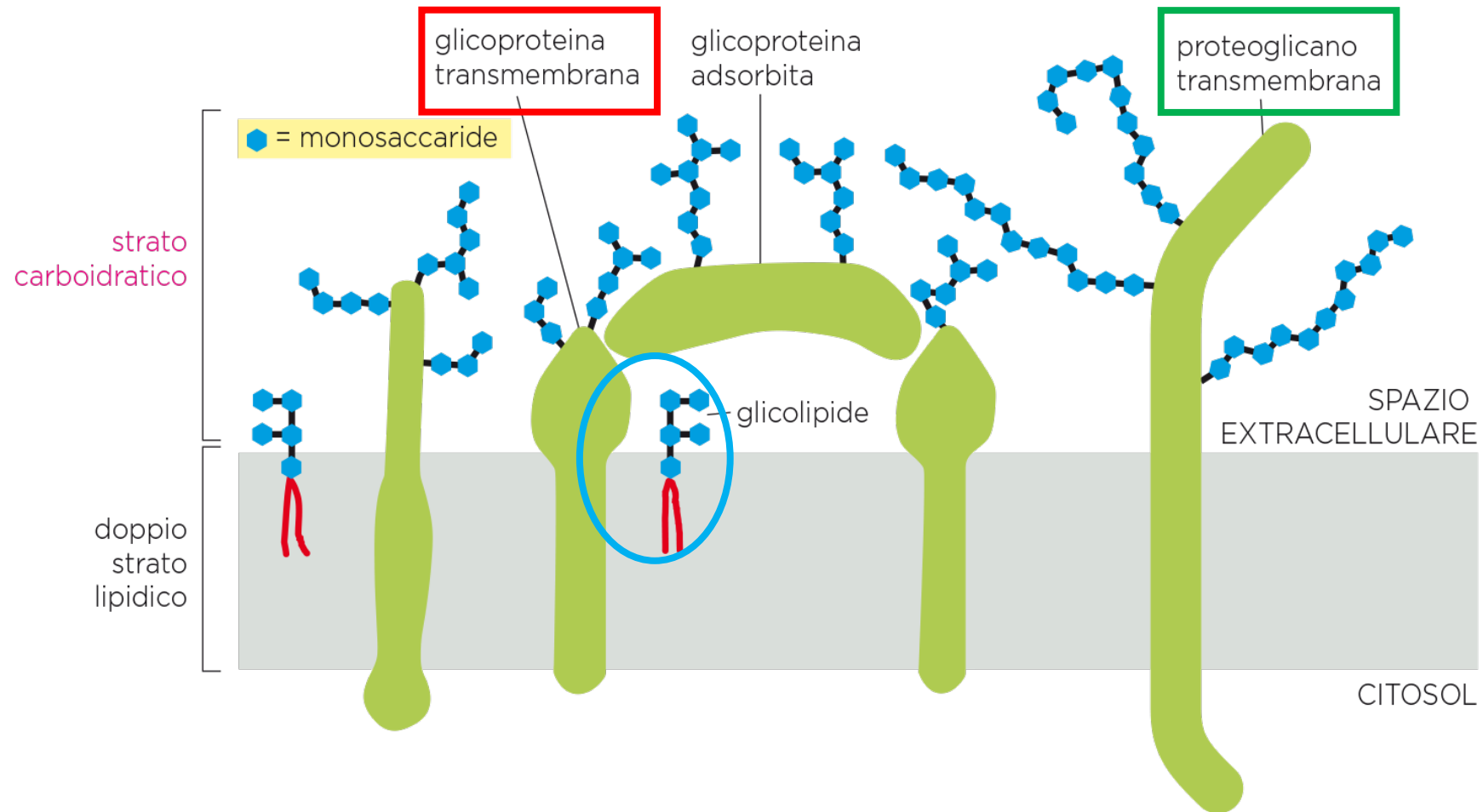


Proteine ancorate a
proteine della superficie di
un'altra cellula

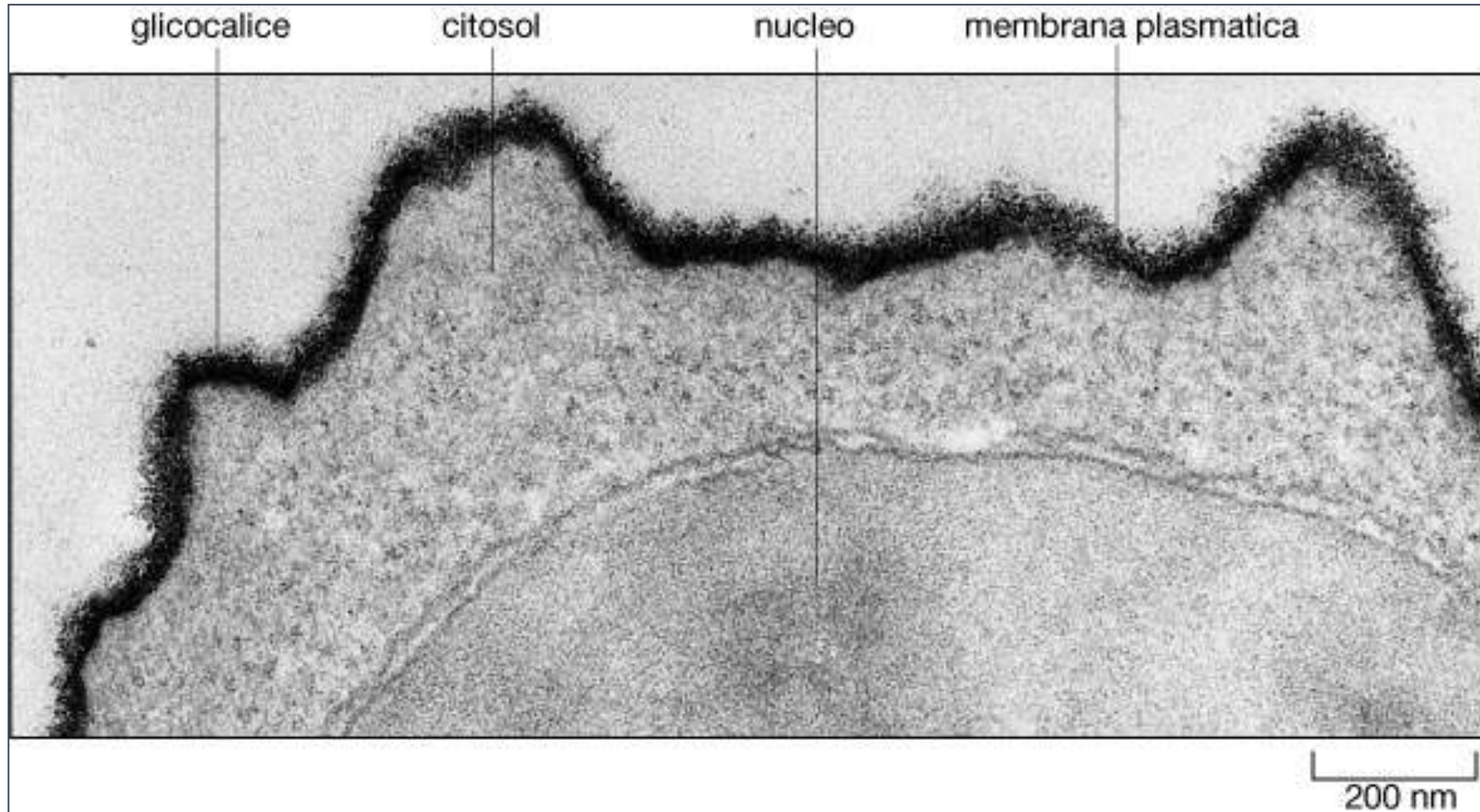
Le proteine possono essere confinate in uno specifico dominio.



La componente glucidica rappresenta dal 2 al 10% della massa delle membrane, di cui il 90% è associata a proteine. Si trova esclusivamente sul lato esterno della membrana.



Rivestimento cellulare: il glicocalice



- Ha una funzione di *protezione* (stress meccanici, barriera per l'entrata dei microrganismi, lubrificazione)
- Ha un ruolo nel *riconoscimento* e nell'*adesione* cellulare.

Il riconoscimento dei carboidrati presenti sulla superficie dei neutrofili è l'evento iniziale della migrazione all'esterno dei vasi sanguigni nella sede dell'infezione.

