

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA**

**CORSO INTEGRATO: FISICA, CHIMICA
E PROPEDEUTICA BIOCHIMICA (10 CFU)**

**MODULO:
PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE (4 CFU)**

Roberto Giacomini Stuffer

IL MODULO

**"PROPEDEUTICA BIOCHIMICA ED ELEMENTI DI
BIOLOGIA MOLECOLARE" (4 CFU)**

È SUDDIVISO IN DUE UNITÀ DIDATTICHE:

A) UNITÀ DIDATTICA

"PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" (2 CFU)

B) UNITÀ DIDATTICA

"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

L'UNITÀ DIDATTICA "PROPEDEUTICA ALLA BIOCHIMICA" COMPRENDE:

- 1) I LIPIDI
- 2) I CARBOIDRATI
- 3) GLI AMMINOACIDI E LE PROTEINE
- 4) LE PROTEINE DEL CONNETTIVO
- 5) LA MIOGLOBINA E L'EMOGLOBINA

L'UNITÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE" COMPRENDE:

- 6) LE MEMBRANE BIOLOGICHE
- 7) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (A)
- 8) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEI PROCARIOTI (B)
- 9) LA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI EUCARIOTI
- 10) LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

UNITÀ DIDATTICA
"BIOLOGIA MOLECOLARE" (2 CFU)

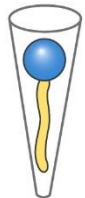
VET.
UNITÀ DIDATTICA "BIOLOGIA MOLECOLARE"

LE MEMBRANE BIOLOGICHE

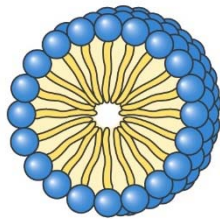
Roberto Giacomini Stuffer

I LIPIDI DI MEMBRANA

I lipidi polari possono formare:
le micelle

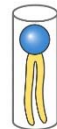


Individual units are wedge-shaped (cross-section of head greater than that of side chain)

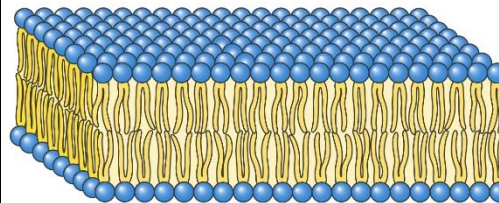


Micelle
(a)

i doppi strati

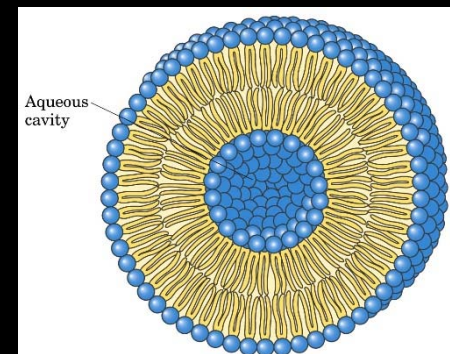


Individual units are cylindrical (cross-section of head equals that of side chain)



Bilayer
(b)

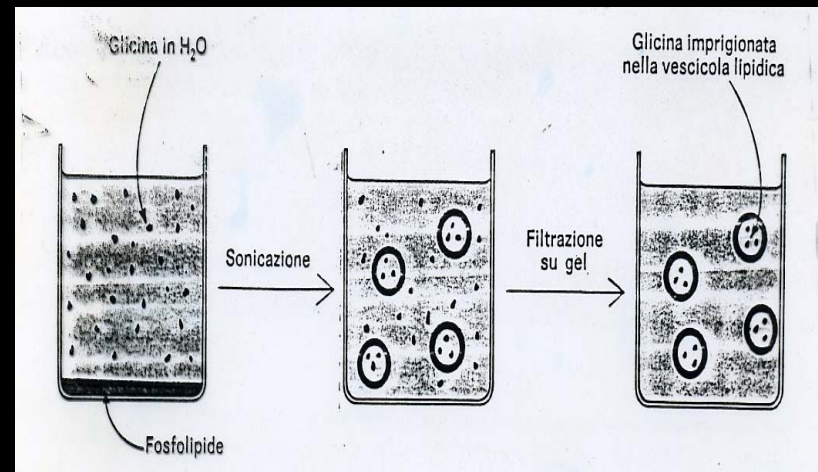
i liposomi



Liposome
(c)

LA PREPARAZIONE DI UNA SOSPENSIONE DI VESCICOLE LIPIDICHE CONTENENTI MOLECOLE DI GLICINA

- Si mescola rapidamente una soluzione di un lipide in un solvente organico (es. etanolo) con l'acqua.



LE MEMBRANE BIOLOGICHE

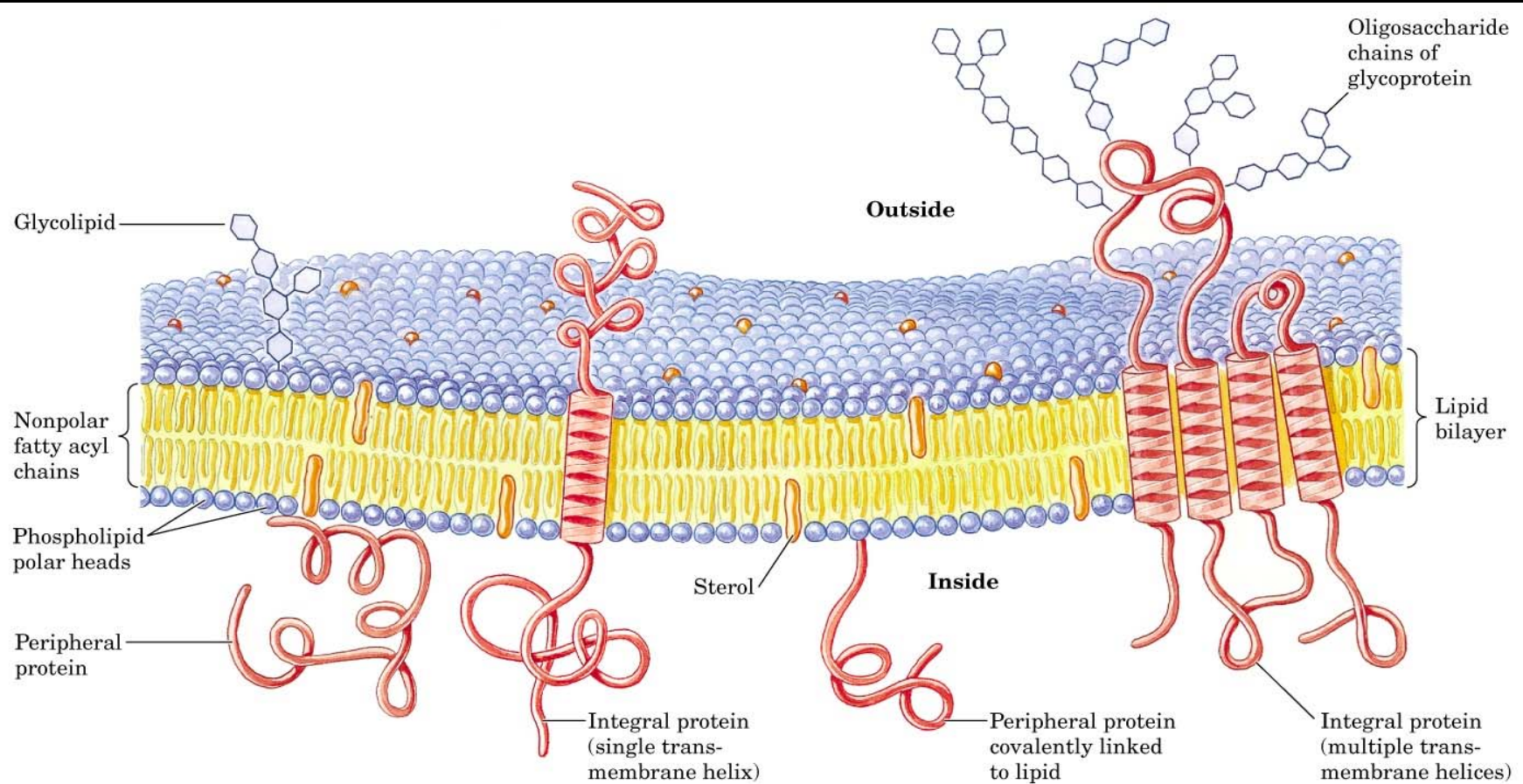
Esse formano delle barriere tra compartimenti con diversa composizione,

hanno uno spessore di 6-10 nm,

sono strutture fluide e asimmetriche,

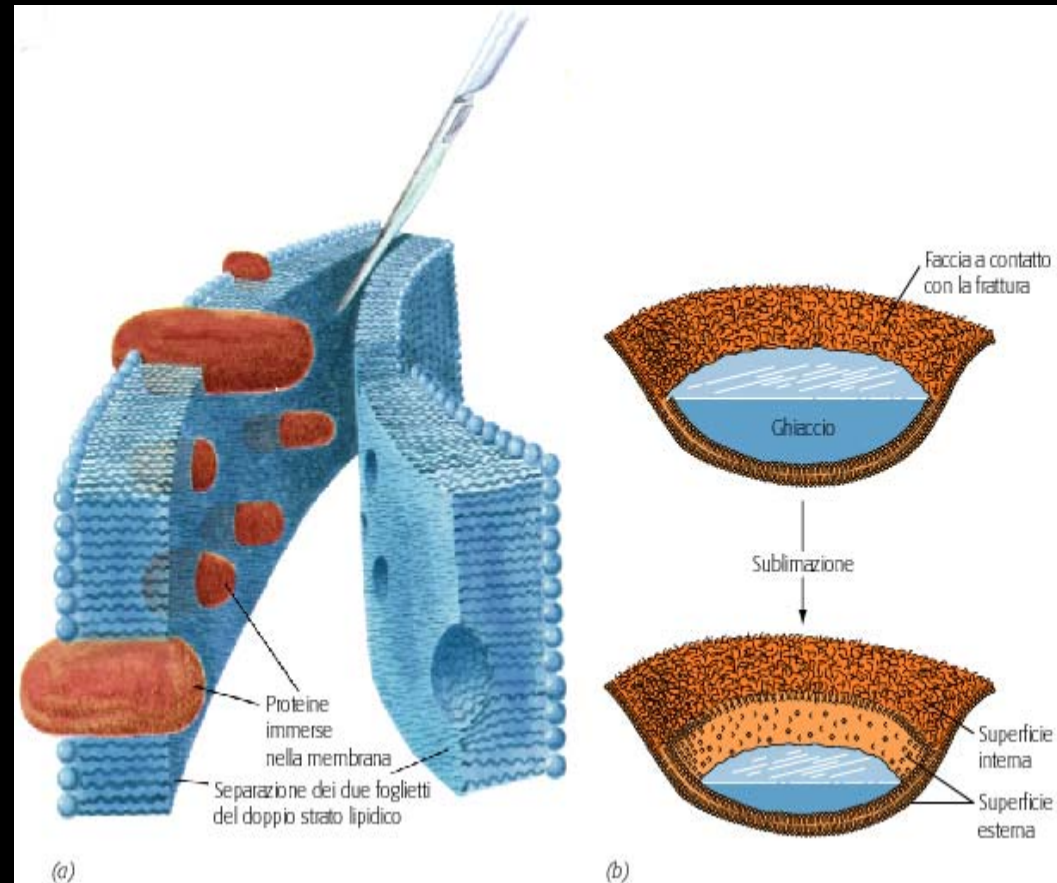
sono costituite principalmente da lipidi e proteine unite da interazioni cooperative non covalenti.

LE MEMBRANE BIOLOGICHE

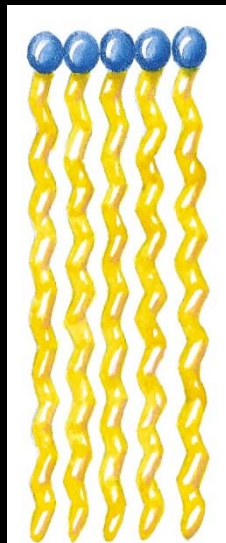


I LIPIDI DI MEMBRANA

- I doppi strati lipidici formano delle barriere al flusso delle molecole polari.



I LIPIDI DI MEMBRANA

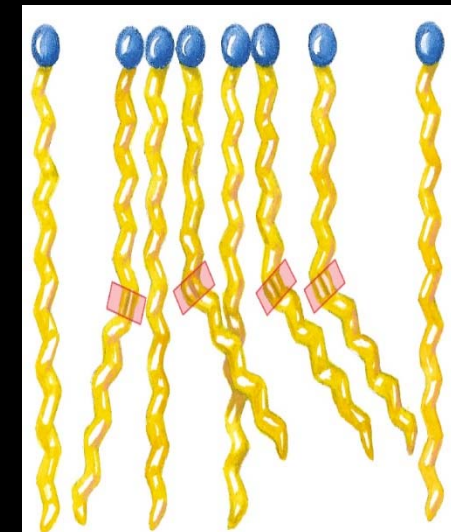


Saturated
fatty acids

(c)

I lipidi preservano
l'individualità della cellula,
separandola dall'ambiente
circostante e costituiscono i
compartimenti cellulari;

essi creano una permeabilità
altamente selettiva.

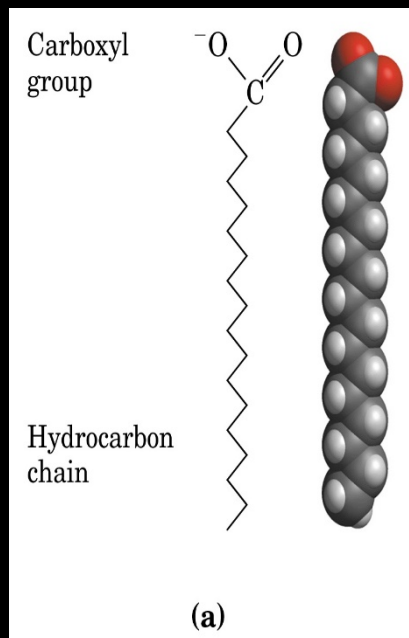


Mixture of saturated and
unsaturated fatty acids

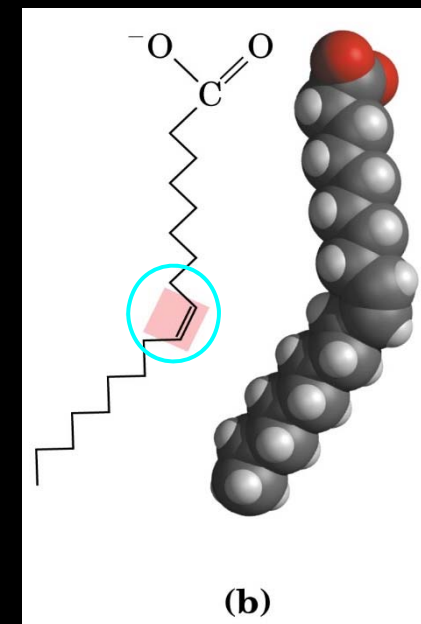
(d)

I LIPIDI DI MEMBRANA

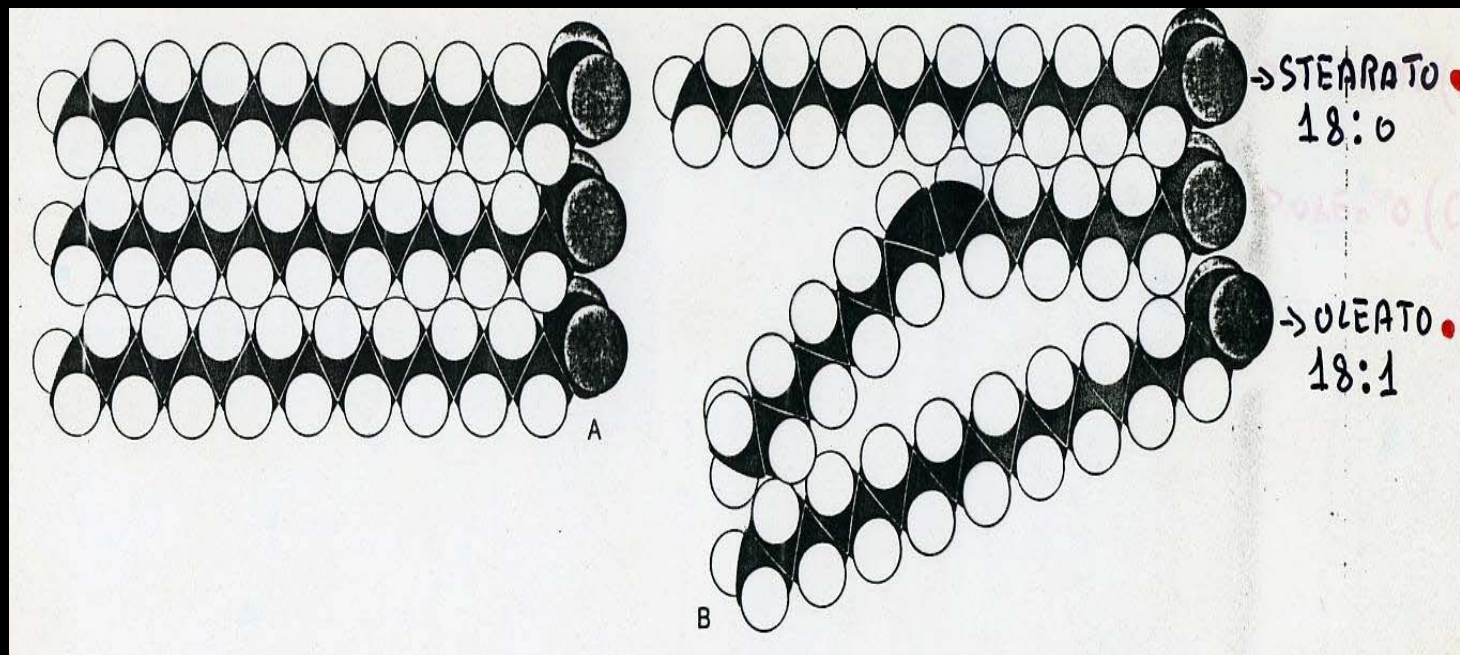
L'organizzazione molto ordinata degli acidi grassi viene alterata dalla presenza di doppi legami cis ($< T_m$).



Le catene degli acidi grassi, nei doppi strati, possono esistere in uno stato ordinato e rigido, oppure in uno stato disordinato e fluido.

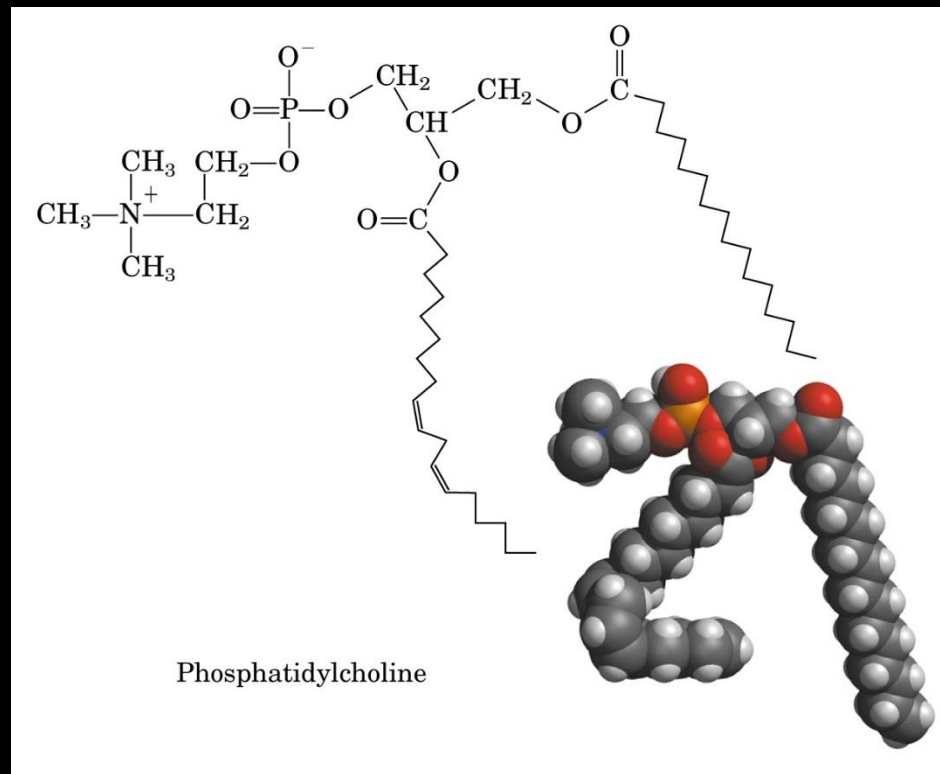


I LIPIDI DI MEMBRANA



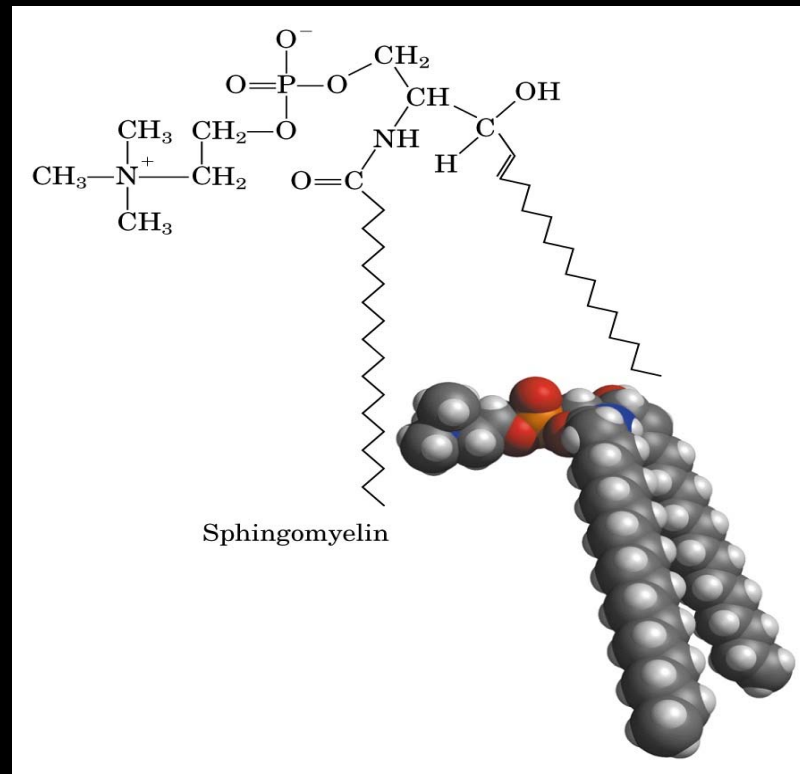
I LIPIDI DI MEMBRANA

Un glicerofosfolipide: *la fosfatidilcolina*

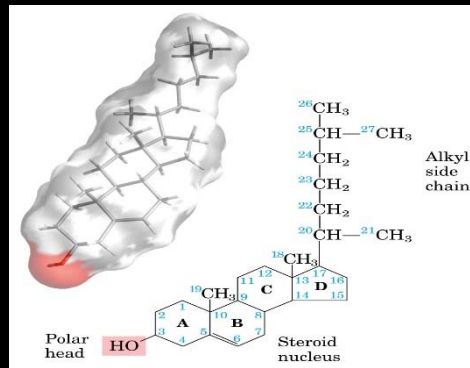


I LIPIDI DI MEMBRANA

Uno sfingolipide: la sfingomieline



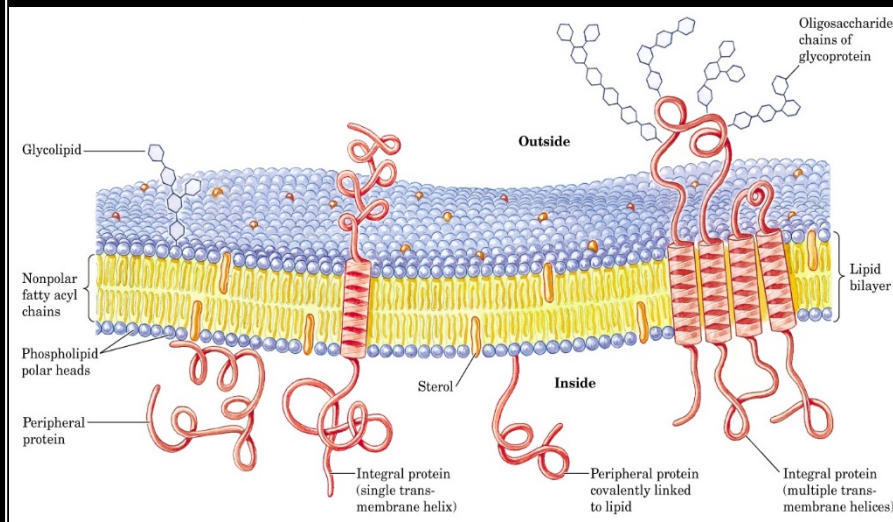
I LIPIDI DI MEMBRANA



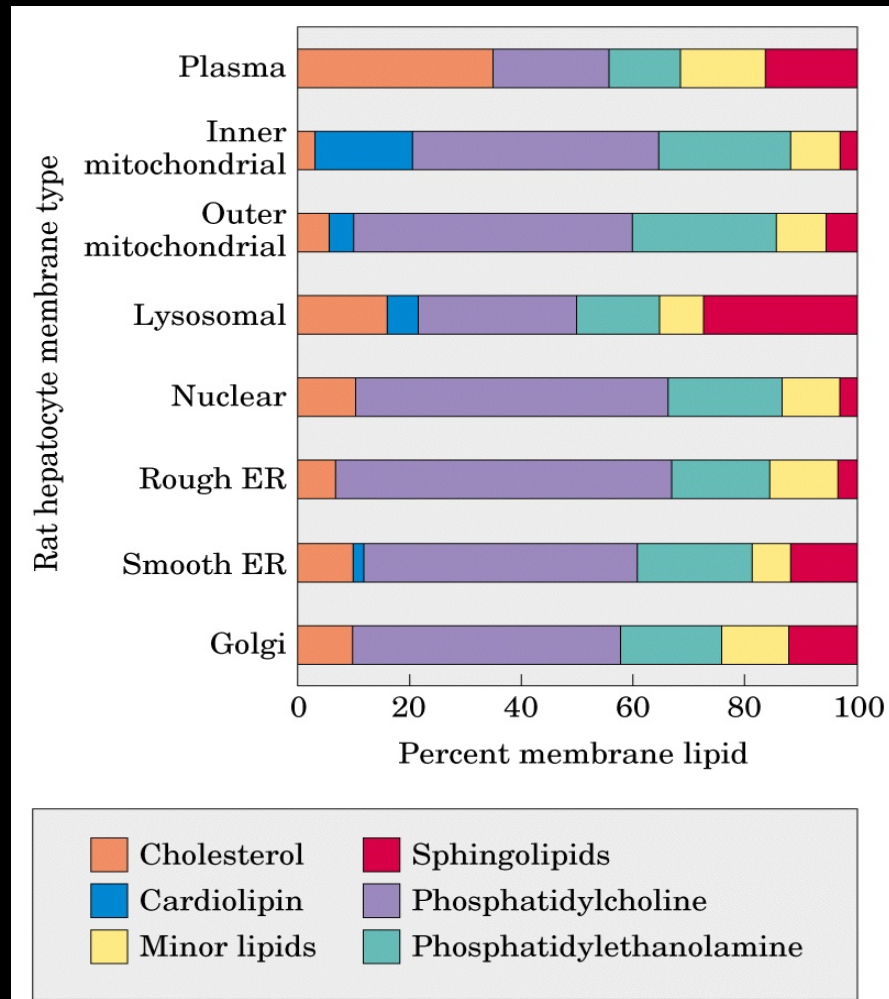
IL COLESTEROLO

Si inserisce nel doppio strato lipidico con i suoi 4 anelli rigidi;

esso impedisce stericamente la grande mobilità delle catene idrocarburiche, riducendo la fluidità di membrana.



I LIPIDI DI MEMBRANA

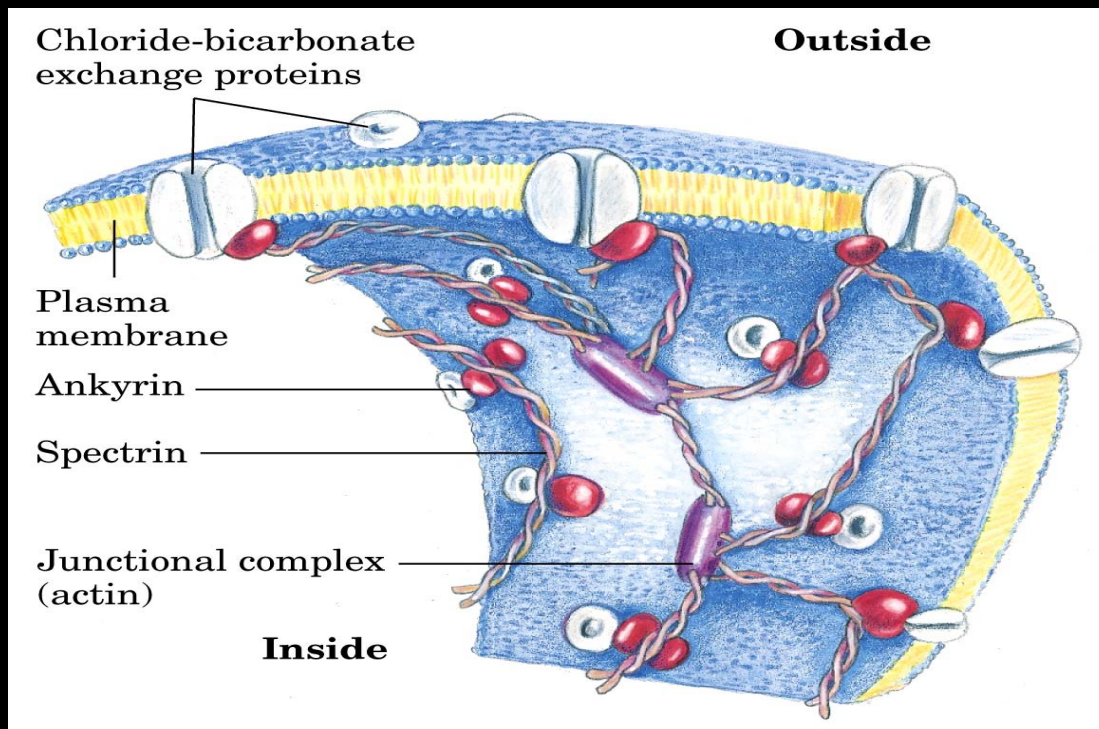


La composizione lipidica della membrana plasmatica e delle membrane degli organelli di una cellula di fegato di ratto.

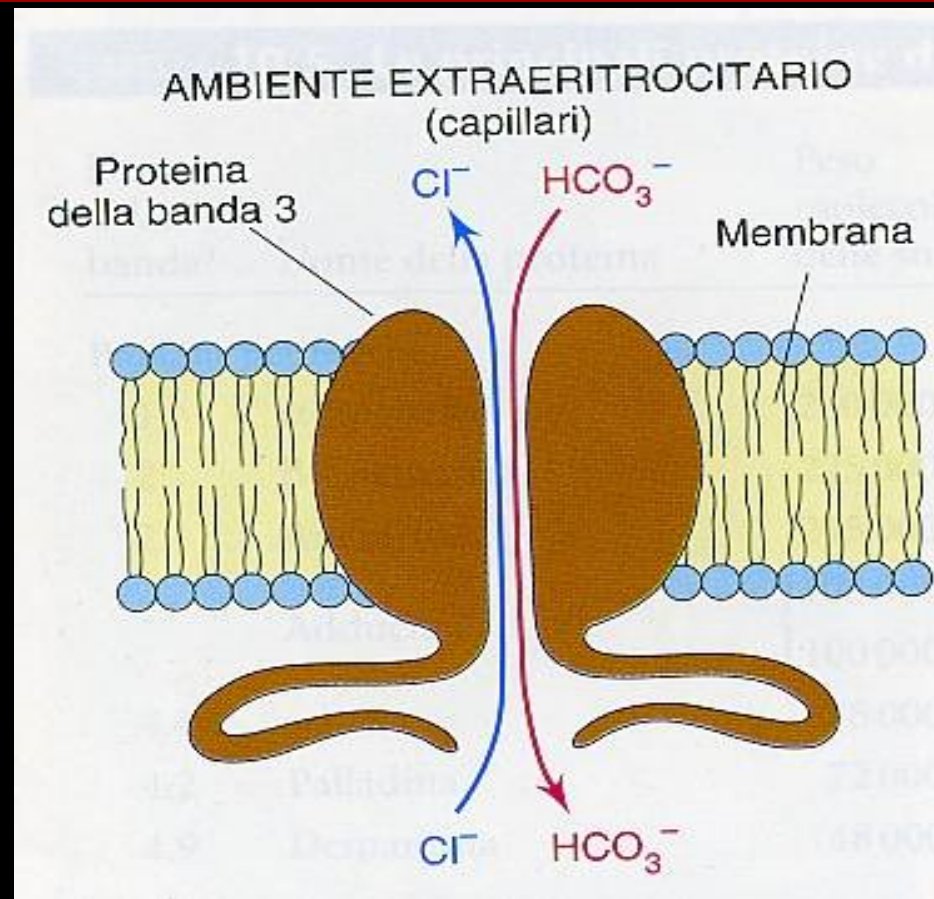
LE PROTEINE DI MEMBRANA

Le proteine svolgono tutte le funzioni dinamiche espletate dalle membrane:

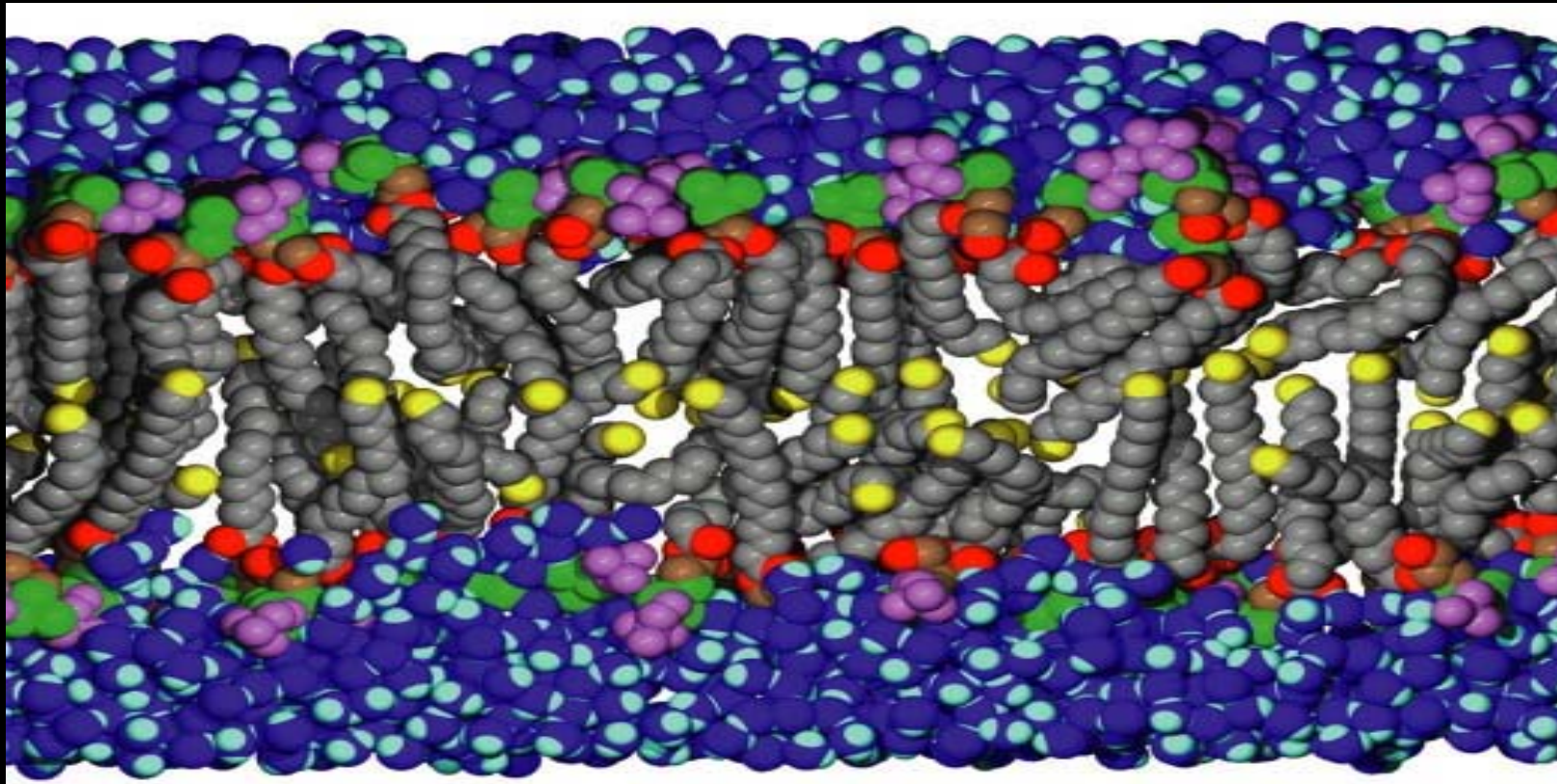
pompe,
canali,
recettori,
enzimi, ecc.



LA PROTEINA TRASPORTATRICE DEGLI ANIONI NELL'ERITROCITA

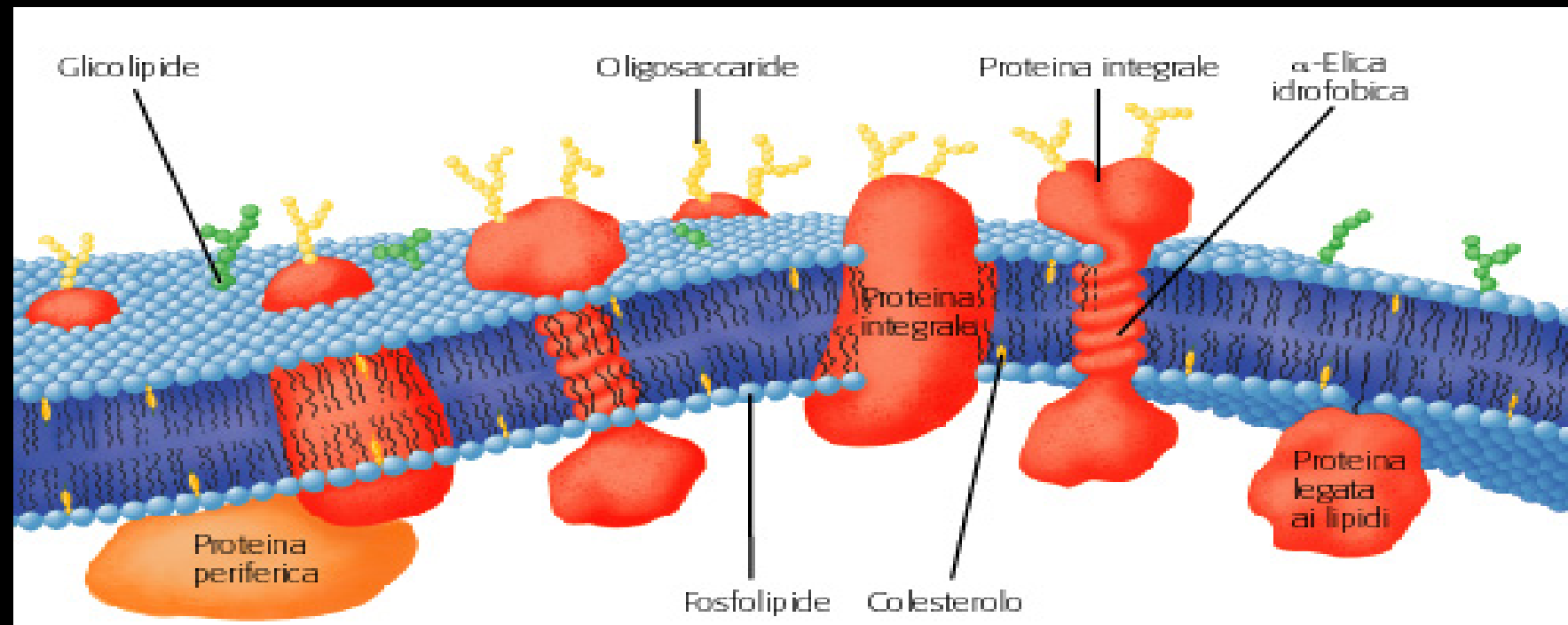


LA MEMBRANA PLASMATICA



IL MODELLO A MOSAICO FLUIDO (SINGER NICOLSON-1972)

La membrana é una miscela fluida di proteine e lipidi che si organizzano in un doppio strato lipidico; si formano interazioni lipidi-proteine, con le proteine integrali che possono diffondere lateralmente.



LE MEMBRANE DIFFERISCONO NELLA COMPOSIZIONE PROTEICA

Es. nella m. plasmatica esse rappresentano il 50% del totale, nella mielina (18% del tot.) danno l'isolamento elettrico, nella m. mitocondriale (75% del tot.) sono i trasduttori d'energia.

table 12-1

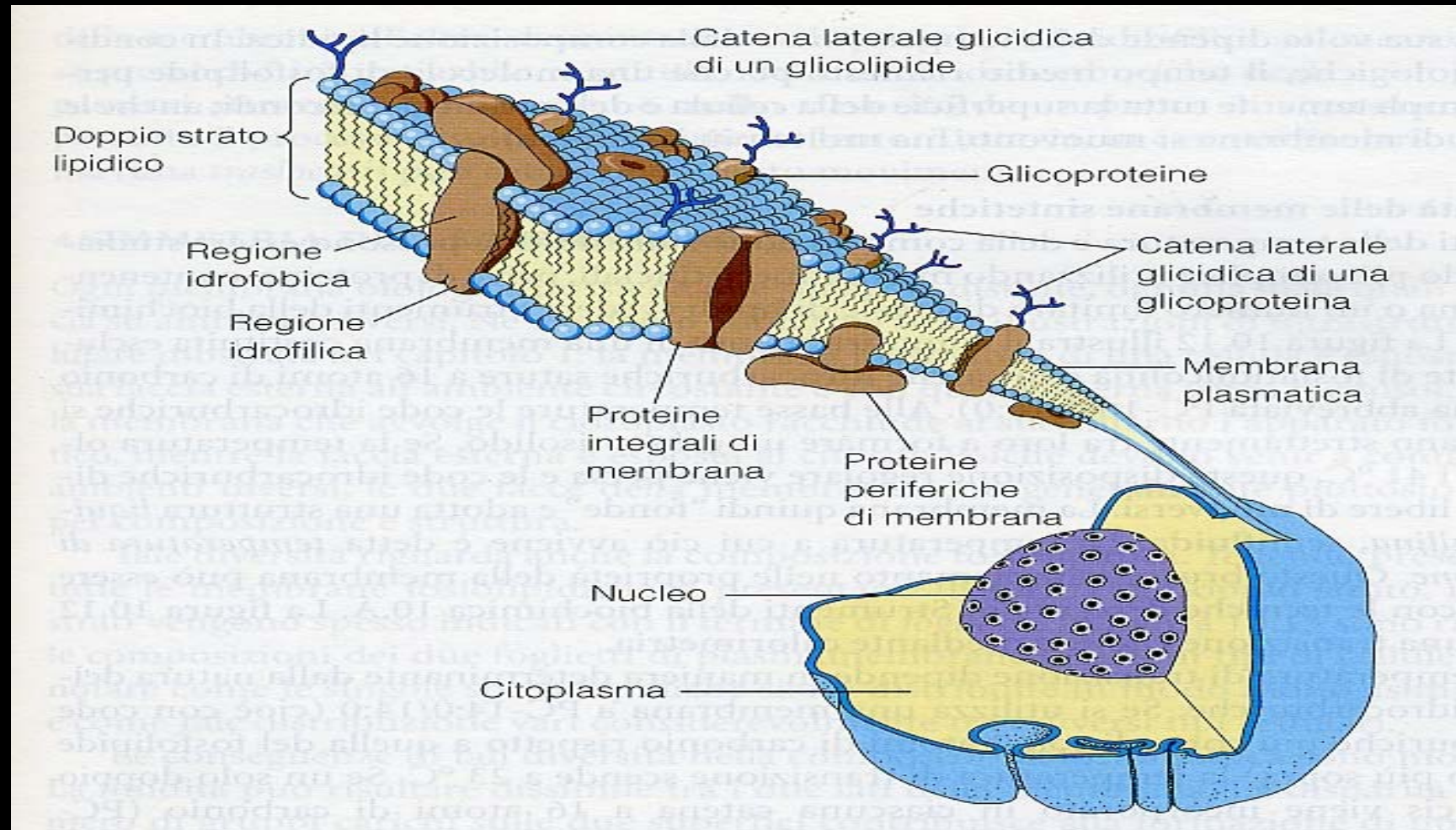
Major Components of Plasma Membranes in Various Organisms

	Components (% by weight)				
	Protein	Phospholipid	Sterol	Sterol type	Other lipids
Human myelin sheath	30	30	19	Cholesterol	Galactolipids, plasmalogens
Mouse liver	45	27	25	Cholesterol	—
Maize leaf	47	26	7	Sitosterol	Galactolipids
Yeast	52	7	4	Ergosterol	Triacylglycerols, steryl esters
<i>Paramecium</i> (ciliated protist)	56	40	4	Stigmasterol	—
<i>E. coli</i>	75	25	0	—	—

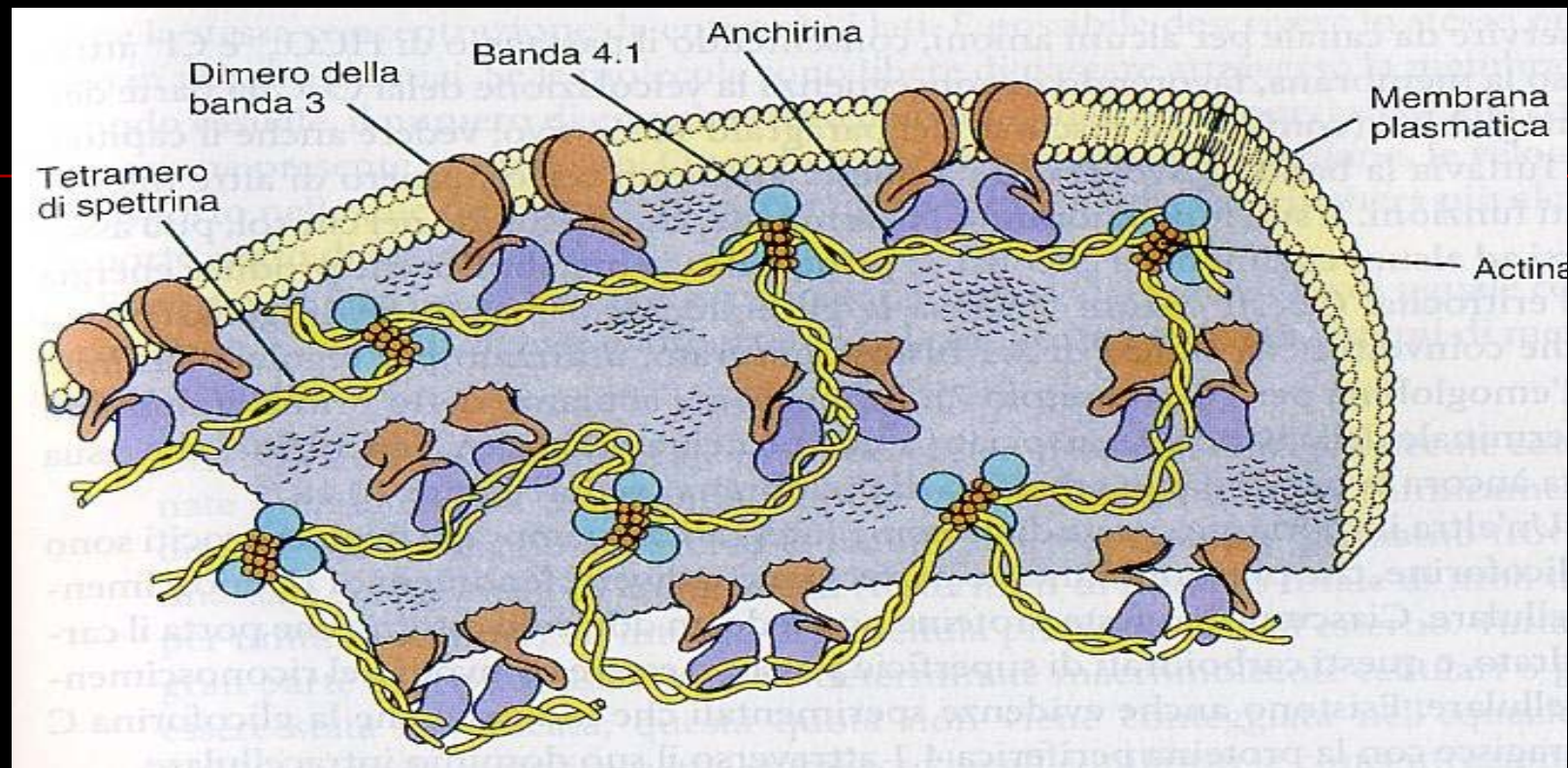
IL CONTENUTO IN PROTEINE, LIPIDI E CARBOIDRATI DI ALCUNE MEMBRANE

Membrana	Percentuale in peso		
	Proteine	Lipidi	Carboidrati
Mielina	18	79	3
Eritrocita umano (plasmamembrana)	49	43	8
Bastoncello di retina di bue	51	49	0
Mitocondri (membrana esterna)	52	48	0
Ameba (plasmamembrana)	54	42	4
Reticolo sarcoplasmatico (miocita)	67	33	0
Lamelle dei cloroplasti	70	30	0
Batteri Gram-positivi	75	25	0
Mitocondri (membrana interna)	76	24	0

LA MEMBRANA DI UNA CELLULA EUCARIOTICA



LA MEMBRANA ERITROCITARIA



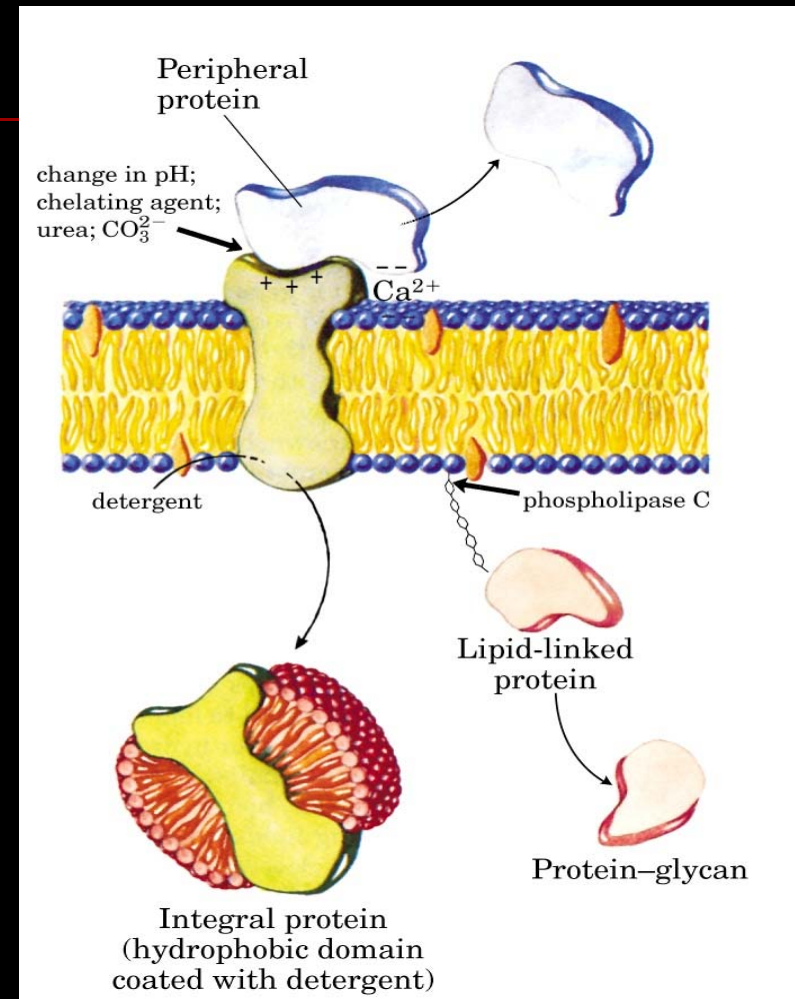
- L'eritrocita, come molte altre cellule, possiede un complesso "scheletro" di proteine, esse si trovano al di sotto della membrana plasmatica e sono attaccate ad essa;
- esso serve a mantenere la forma dell'eritrocita.

LE PROTEINE DI MEMBRANA

Le proteine di membrana possono essere distinte in:

proteine integrali,
proteine periferiche,

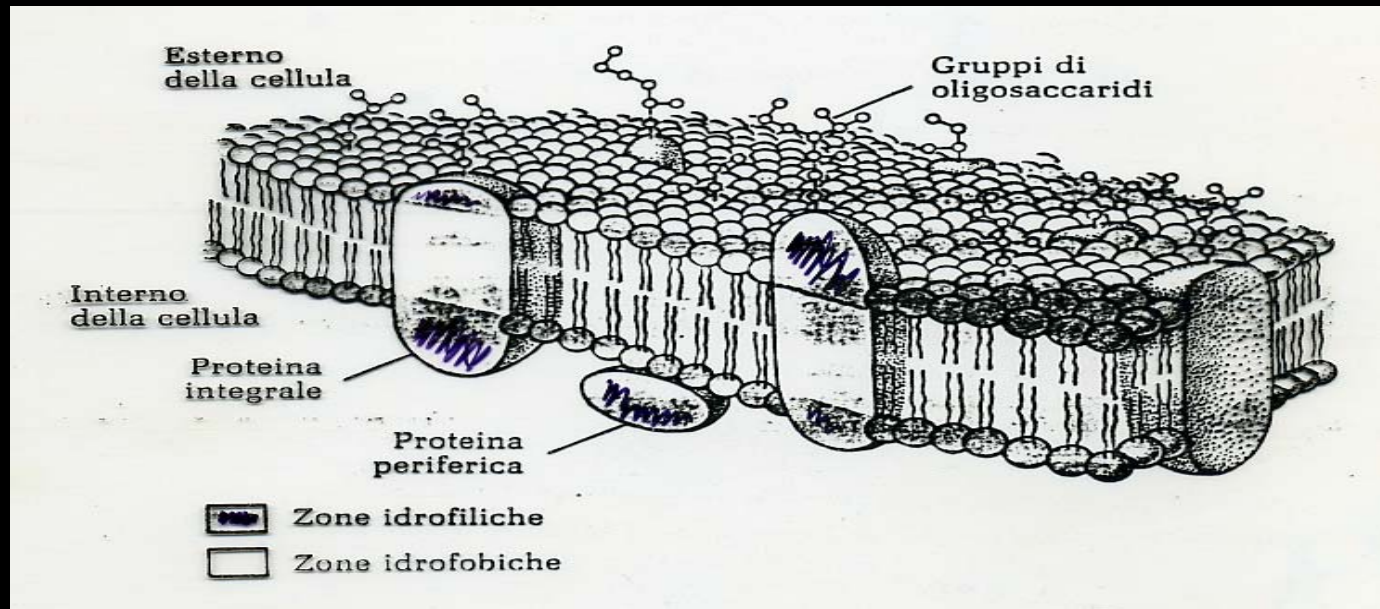
sulla base del trattamento richiesto
per la loro dissociazione
dallo strato lipidico.



LE PROTEINE PERIFERICHE

Le proteine periferiche (estrinseche) sono attaccate labilmente alla superficie della membrana, attraverso legami deboli (legami H, ...).

Esse sono facilmente estraibili dalla struttura della membrana, attraverso l'aggiunta di sali, la variazione del pH, ...

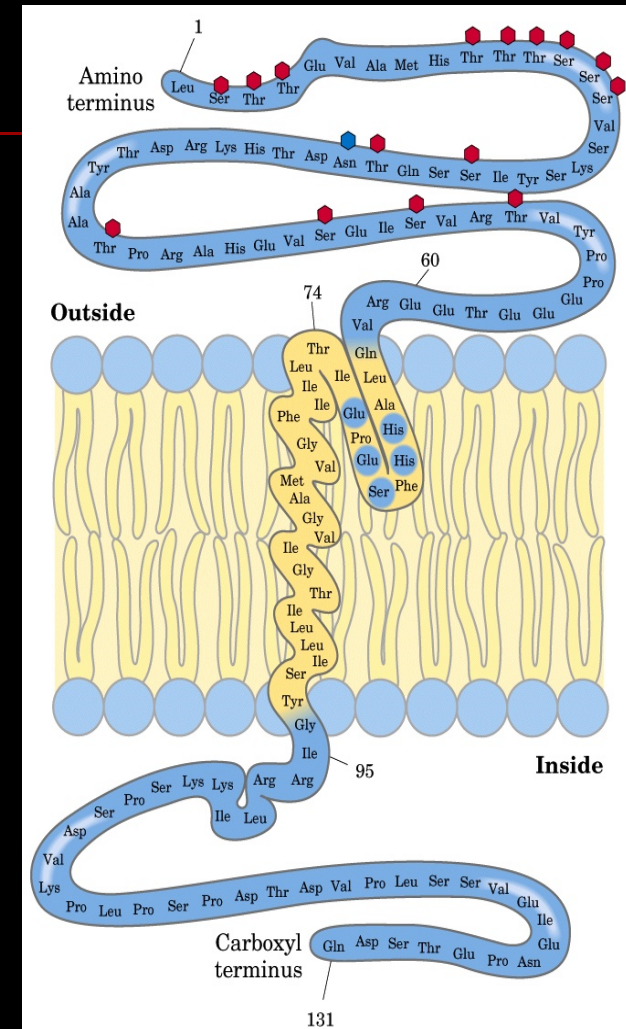


LE PROTEINE INTEGRALI

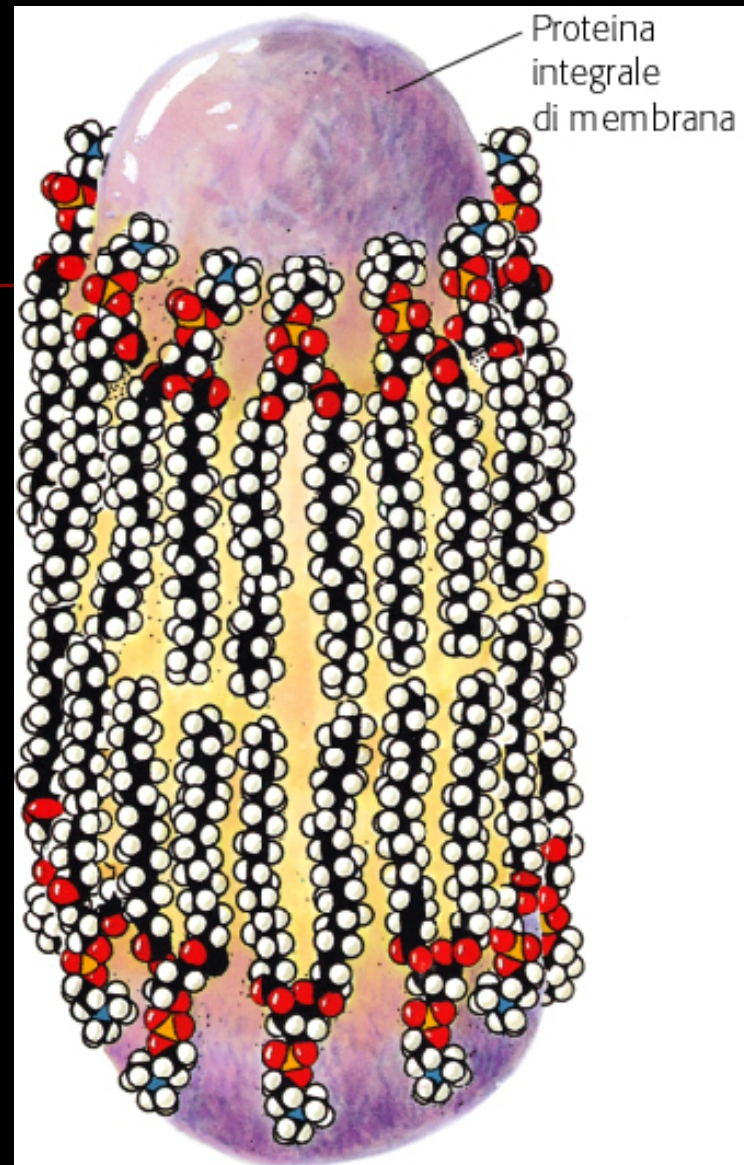
Le proteine integrali (intrinseche) sono immerse nella struttura della membrana e possono anche estendersi completamente nel suo spessore,

difficilmente possono essere estratte in soluzione acquosa,

possono essere rimosse solo con detergenti organici.



ESEMPIO DI PROTEINA INTEGRALE



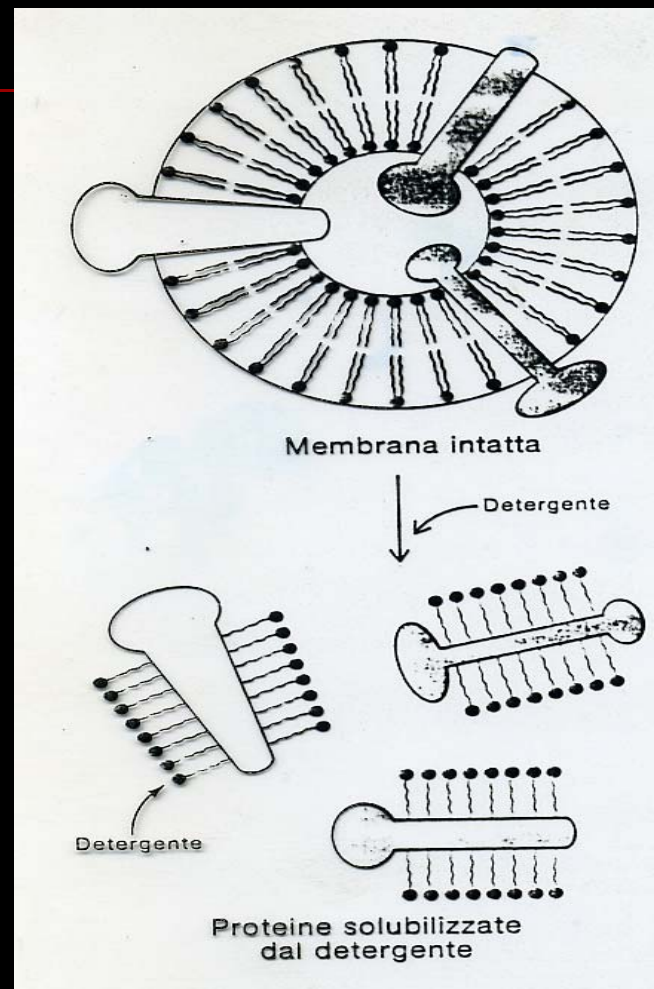
LA SOLUBILIZZAZIONE DELLE PROTEINE INTEGRALI CON L'AGGIUNTA DI UN DETERGENTE

Le caratteristiche di un buon detergente:

deve dissociare la proteina dagli altri componenti,

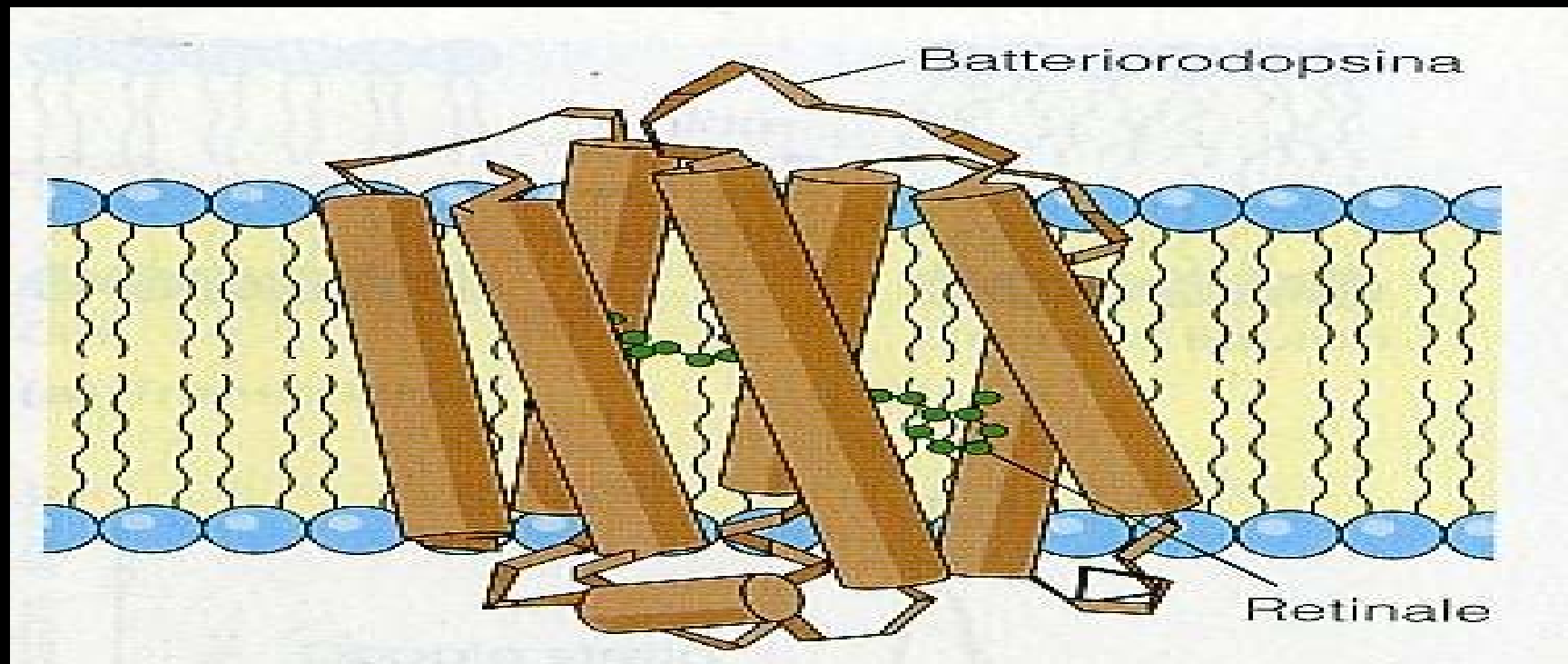
non deve modificare la struttura tridimensionale della proteina,

deve essere facilmente rimovibile durante le successive tappe di purificazione.

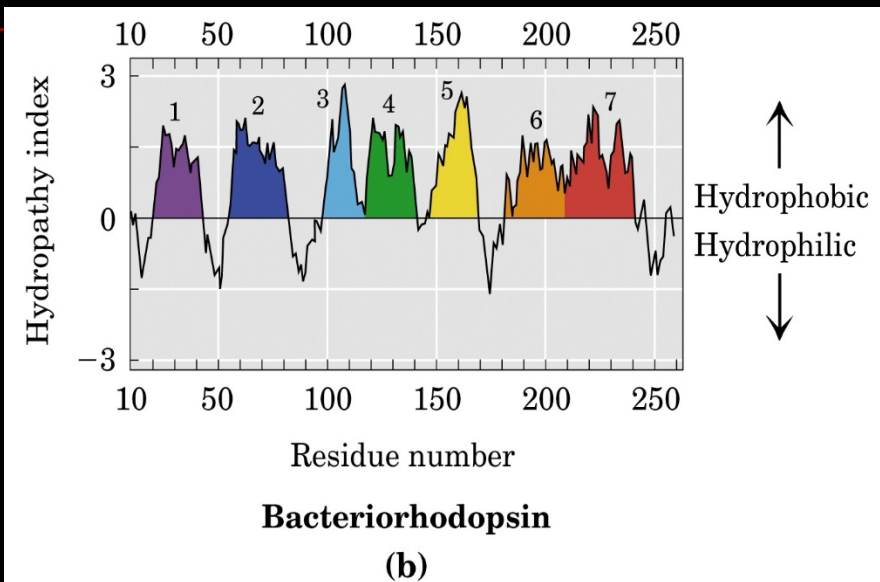
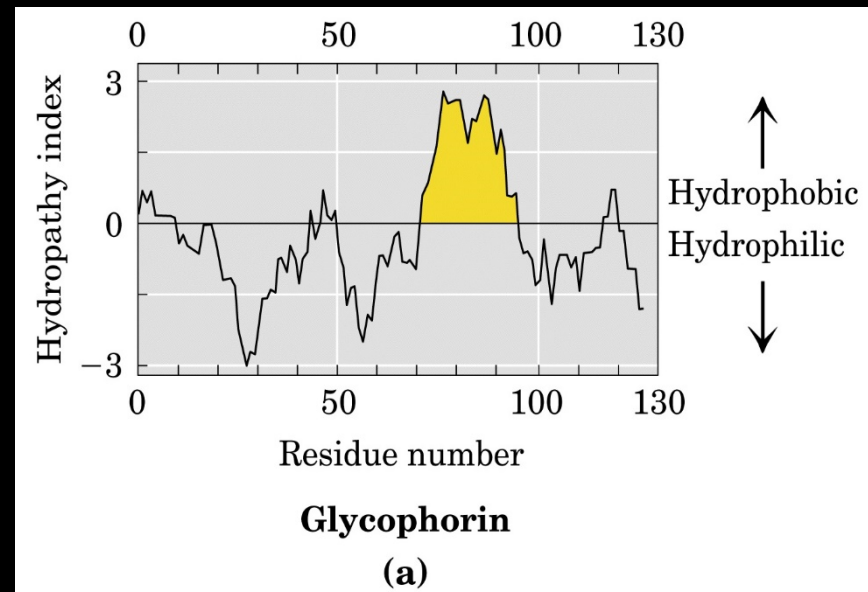


LA BATTERIORODOPSINA (PROTEINA INTEGRALE) É UNA POMPA PROTONICA ALIMENTATA DA ENERGIA LUMINOSA, PRESENTE IN ALCUNI BATTERI.

- Essa possiede diverse α -eliche idrofobiche, soprattutto nella porzione della molecola che si trova immersa nella membrana.



I GRAFICI DI IDROFOBICITÀ DELLA GLICOFORINA E DELLA BATTERIORODOPSINA (PROTEINE INTEGRALI)



Essi rappresentano dei massimi a livello delle regioni della sequenza che corrispondono alle eliche transmembrana.

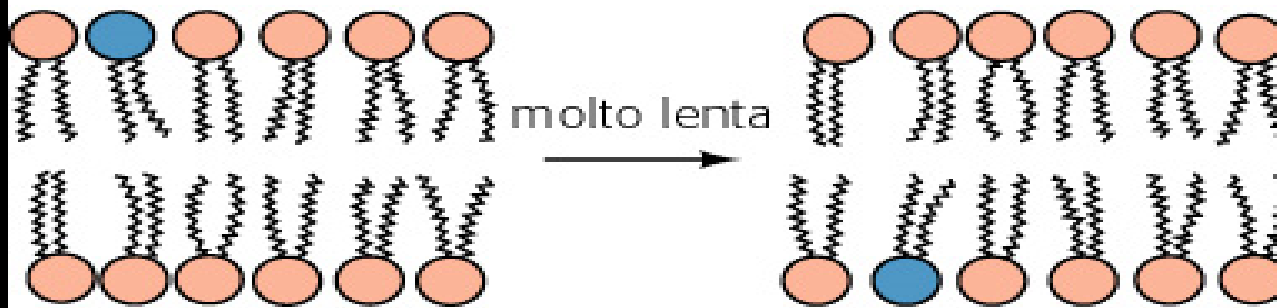
Spesso, le proteine integrali di membrana possiedono diverse α -eliche idrofobiche che costituiscono i loro domini transmembrana.

LE PRINCIPALI PROTEINE DI MEMBRANA DEGLI ERITROCITI UMANI

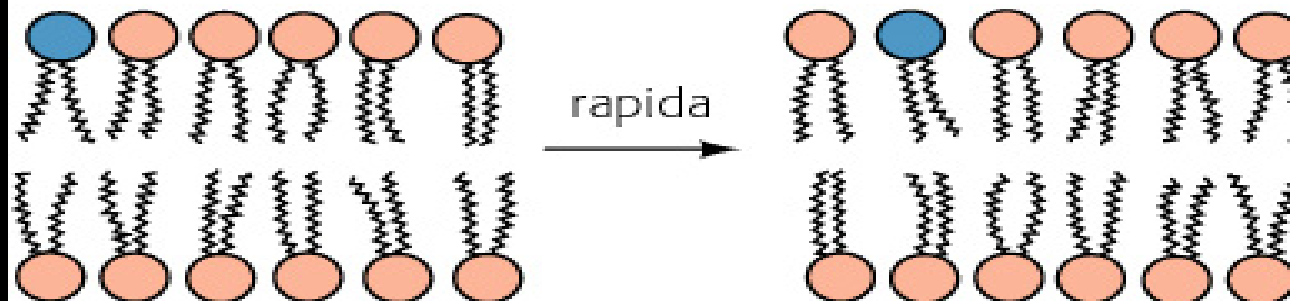
Numero della banda ^a	Nome della proteina	Peso molecolare delle subunità	Probabile stato di assemblaggio	Numero di copie per cellula	Funzione
Proteine periferiche					
1	α -Spettrina	260 000	Tetramero $\alpha_2\beta_2$	10^5 tetrameri	Scheletro di membrana
2	β -Spettrina	225 000			
2.1	Anchirina	215 000	Monomero	10^5	Àncora lo scheletro alla banda 3
*	Adducina	{ 105 000 100 000 }	Eterodimero	3×10^4	
4.1	—	78 000	Monomero	2×10^5	Coinvolta in legami con la spettrina
4.2	Palladina	72 000	?	2×10^5	?
4.9	Demantina	48 000	Trimeri?	5×10^4	Coinvolta nella interazione spettrina-actina
5	Actina	43 000	Oligomeri di 12-17 unità	5×10^5	Coinvolta nelle giunzioni della spettrina
*	Proteina legante la tropomiosina	43 000	Monomero	3×10^4	Lega la tropomiosina
6	Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi	35 000	Tetramero	5×10^5	Enzima della glicolisi
*	Tropomiosina	{ 29 000 27 000 }	Eterodimero	7×10^4	Lega l'actina
7	—	29 000	?	5×10^5	?
8	—	23 000	?	10^5	?
Proteine integrali					
3	—	89 000	Dimero	10^6	Canale ionico
4.5	—	55 000	?	1.5×10^6	Trasporto di glucosio
	Glicoforina A	31 000	Dimero	4×10^5	Riconoscimento cellulare
	Glicoforina B	23 000	?	$\sim 10^5$	Riconoscimento cellulare
	Glicoforina C	29 000	?	$\sim 10^5$	Collegamento alla 4.1?

LA MOBILITÀ DEI LIPIDI

(a) Diffusione trasversale (flip-flop)



(b) Diffusione laterale

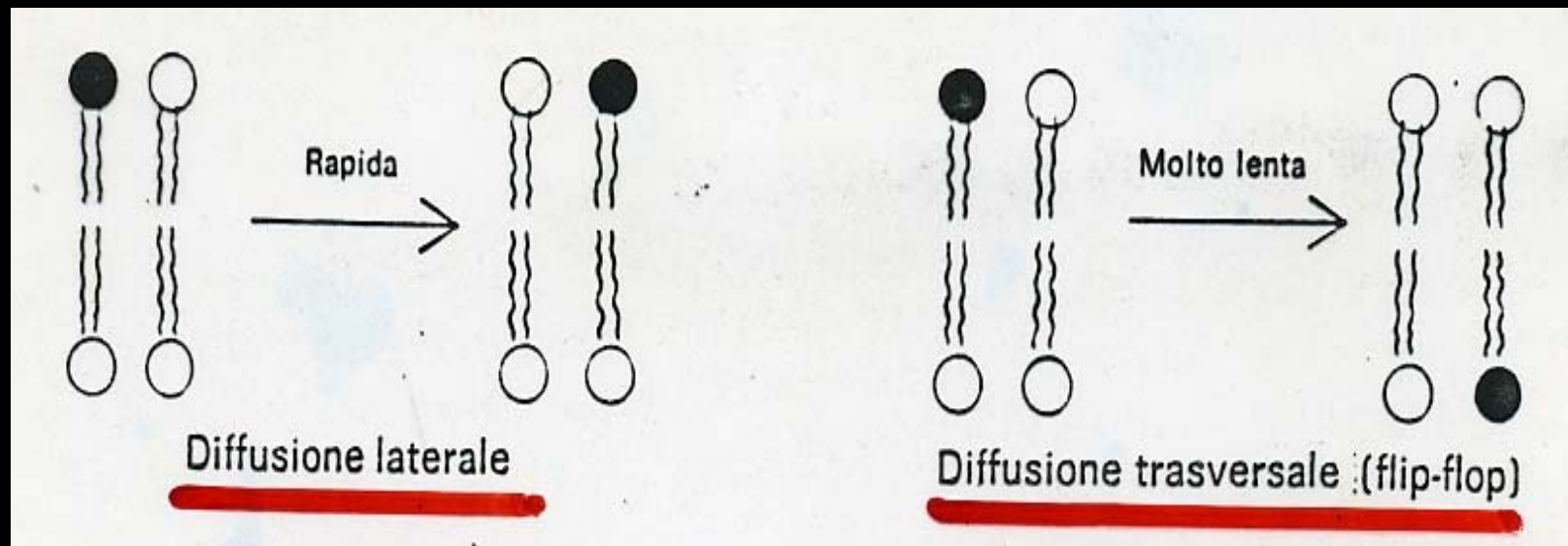


LA FLUIDITÀ DI MEMBRANA

Le molecole lipidiche polari possono muoversi lateralmente nel piano della membrana,

solo raramente un lipide "si ribalta" da un lato all'altro;

anche le proteine si muovono lateralmente, ma più lentamente.

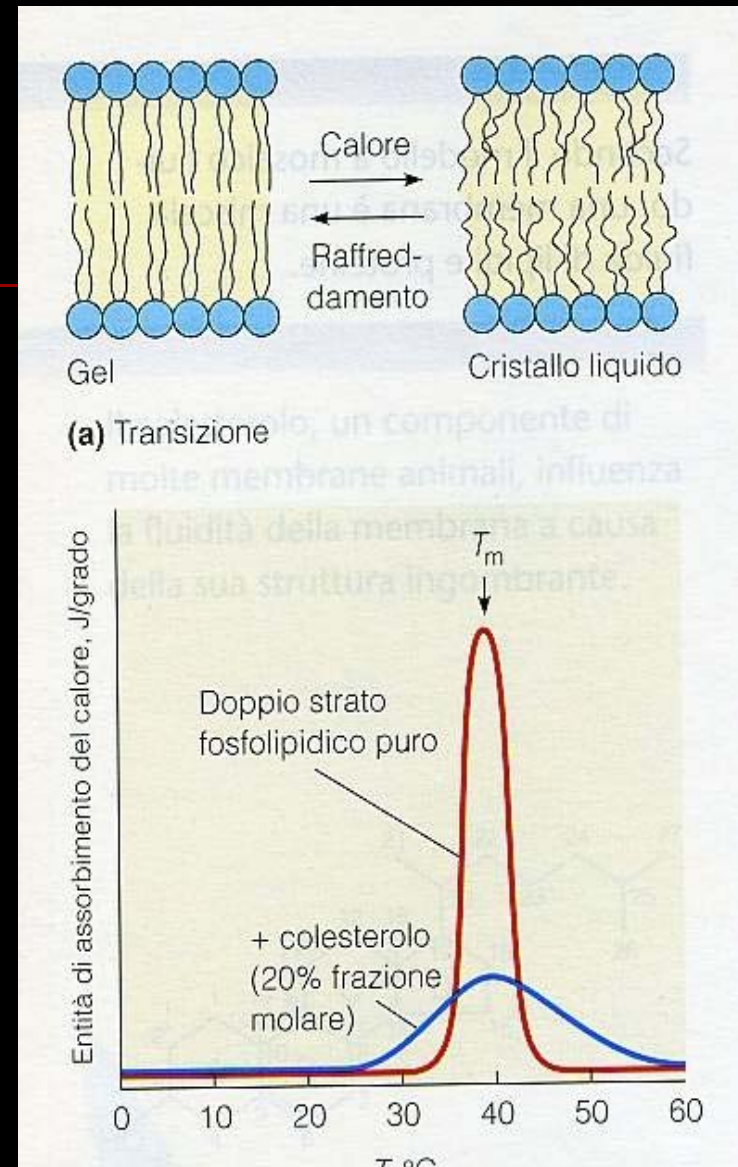


LA FLUIDITÀ DI MEMBRANA

La rapidità della diffusione lipidica laterale dipende dalla fluidità della membrana, la quale é dovuta alla temperatura e alla composizione lipidica.

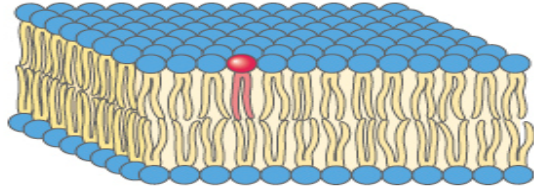
GLI EFFETTI DELLA TEMPERATURA E DELLA COMPOSIZIONE SULLA FLUIDITÀ

- La transizione gel-liquido cristallino di un doppio strato lipidico sintetico.



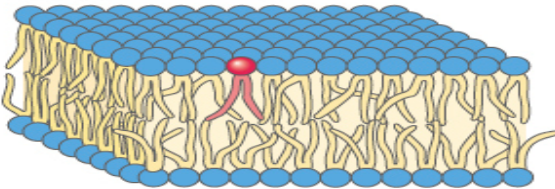
LA FLUIDITÀ DI MEMBRANA

**Paracrystalline
state (solid)**

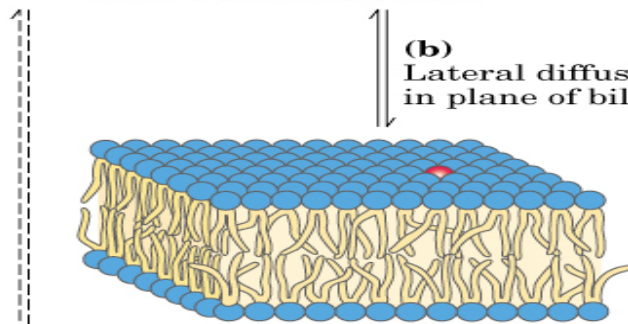


(a)
Heat produces thermal
motion of acyl side chains
(solid → fluid transition)

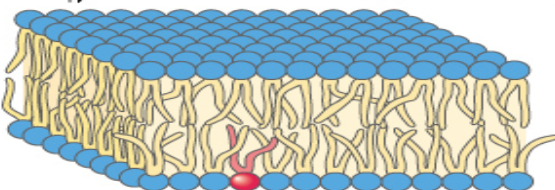
**Fluid
state**



(b)
Lateral diffusion
in plane of bilayer



(c)
Transbilayer diffusion ("flip flop")
 $t_{1/2}$ = hours to days (uncatalyzed)
= seconds (flippase catalyzed)

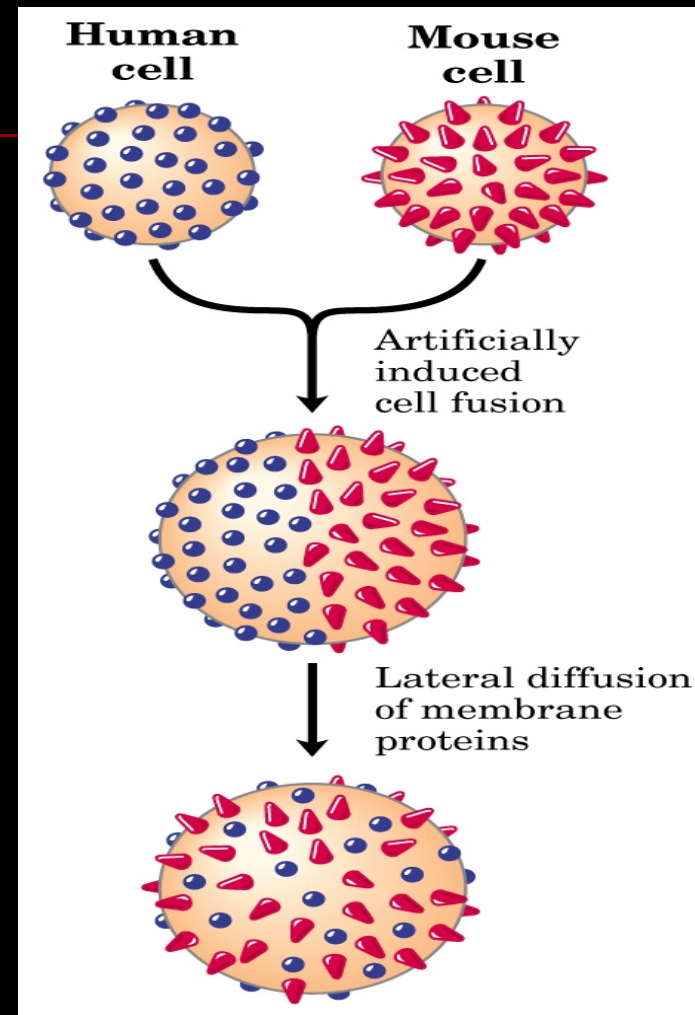


Il movimento dei lipidi di membrana in funzione della temperatura.

LA FLUIDITÀ DI MEMBRANA

Una cellula umana può fondersi con una cellula di topo.

Questo esperimento dimostra che una proteina di membrana può spostarsi lateralmente, ma non può passare da una faccia all'altra, a causa di impedimenti energetici molto elevati (regioni polari molto grandi).



LA ASIMMETRIA DI MEMBRANA

Le membrane sono strutturalmente e funzionalmente asimmetriche, perché hanno componenti diversi ed attività enzimatiche distinte,

l'asimmetria è mantenuta durante la vita della cellula;

l'asimmetria dei lipidi non è assoluta, tranne che per i glicolipidi,

in entrambi i foglietti sono presenti grandi quantità di colesterolo.

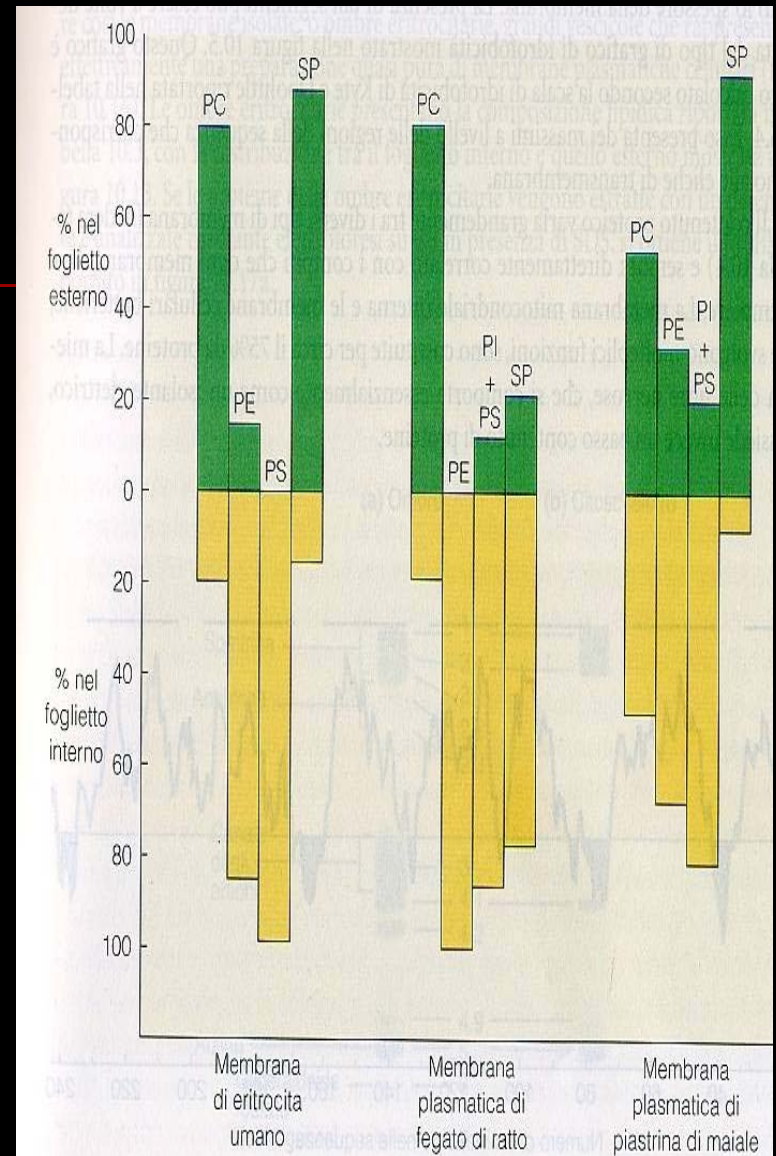
PC = fosfatidilcolina

PE = fosfatidiletanolamina

PS = fosfatidilserina

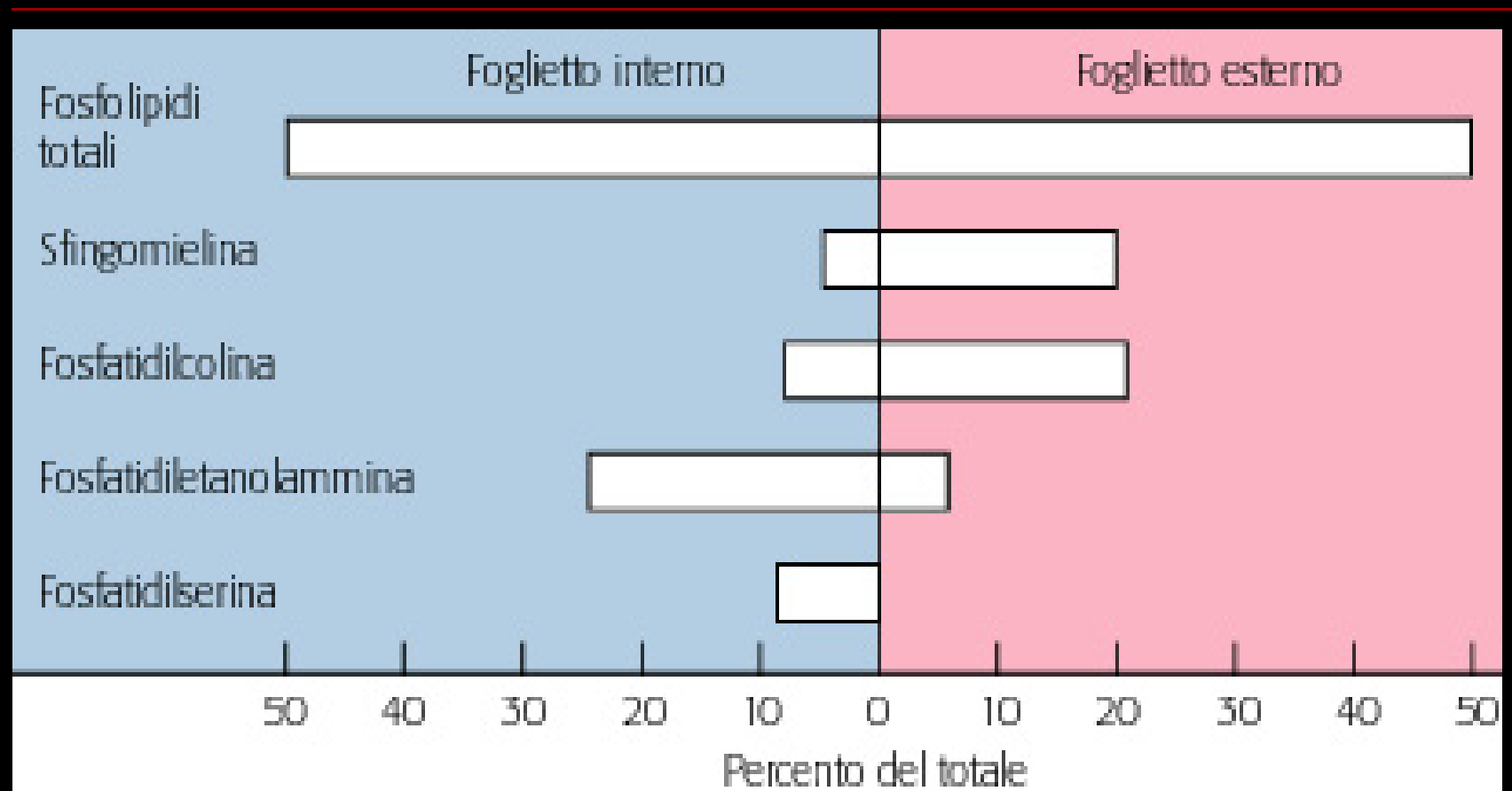
PI = fosfatidilinositolo

SP = sfingomieline



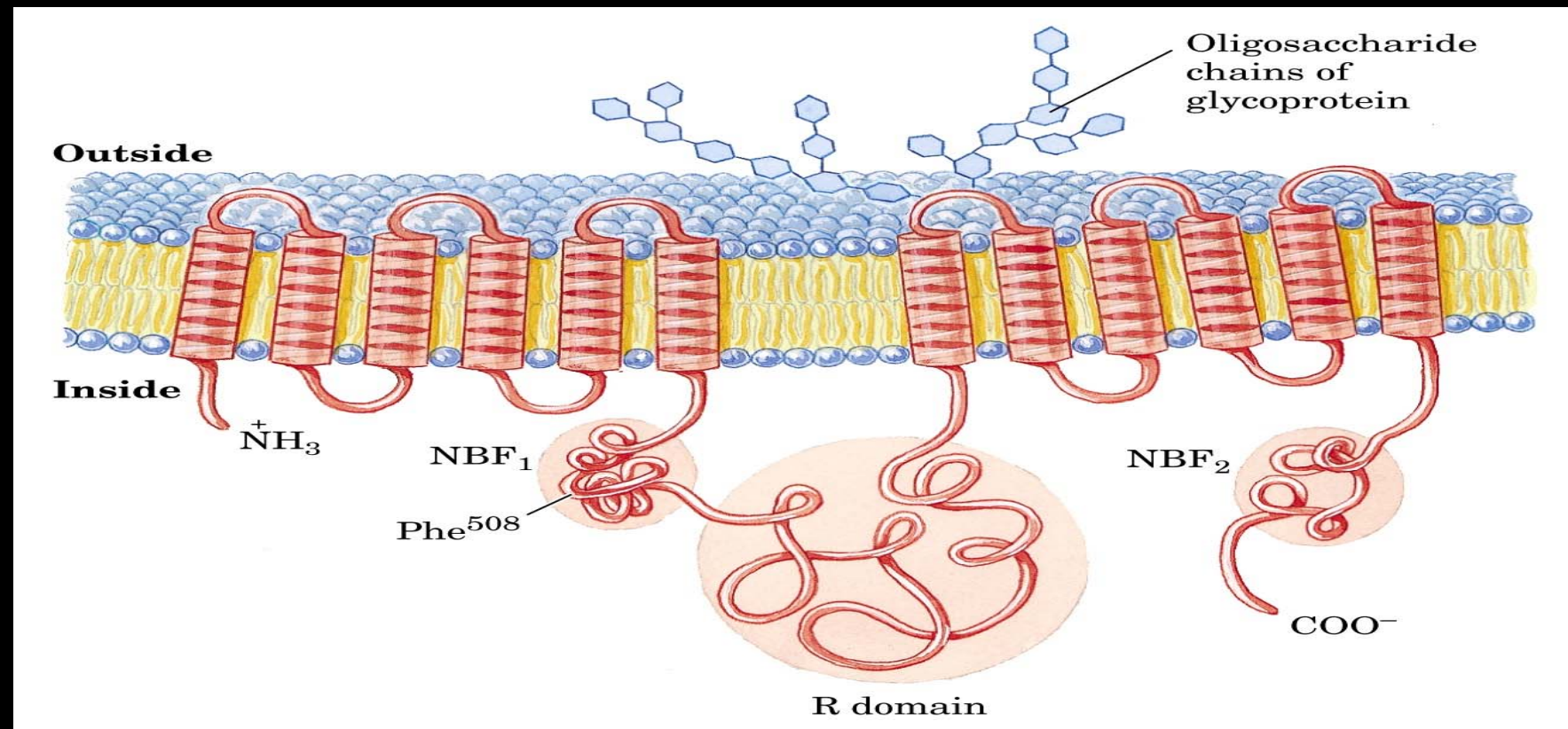
LA DISTRIBUZIONE ASIMMETRICA DEI FOSFOLIPIDI

Solitamente, i due foglietti di una membrana differiscono nella composizione lipidica.

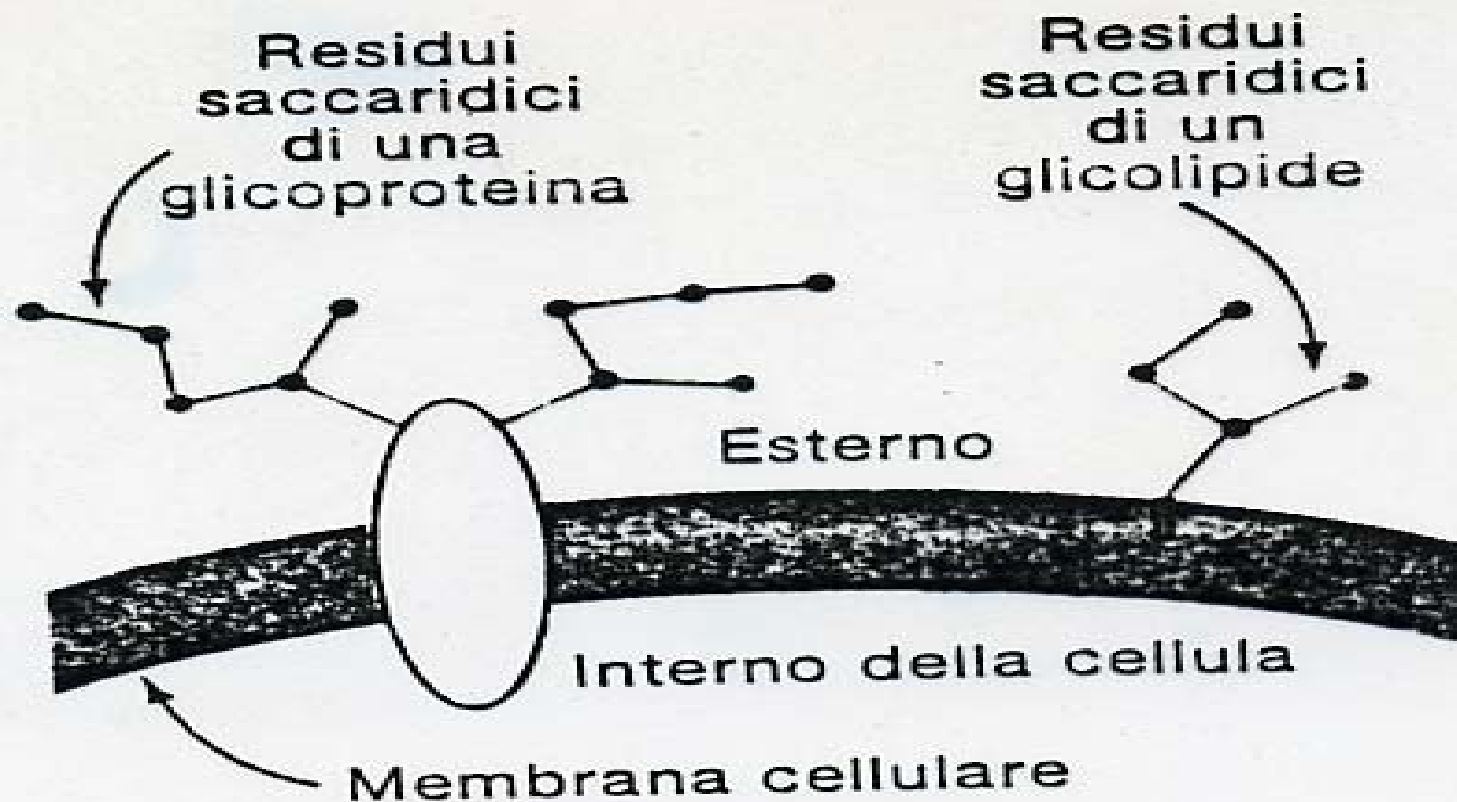


ESEMPI DI ASIMMETRIA DI MEMBRANA

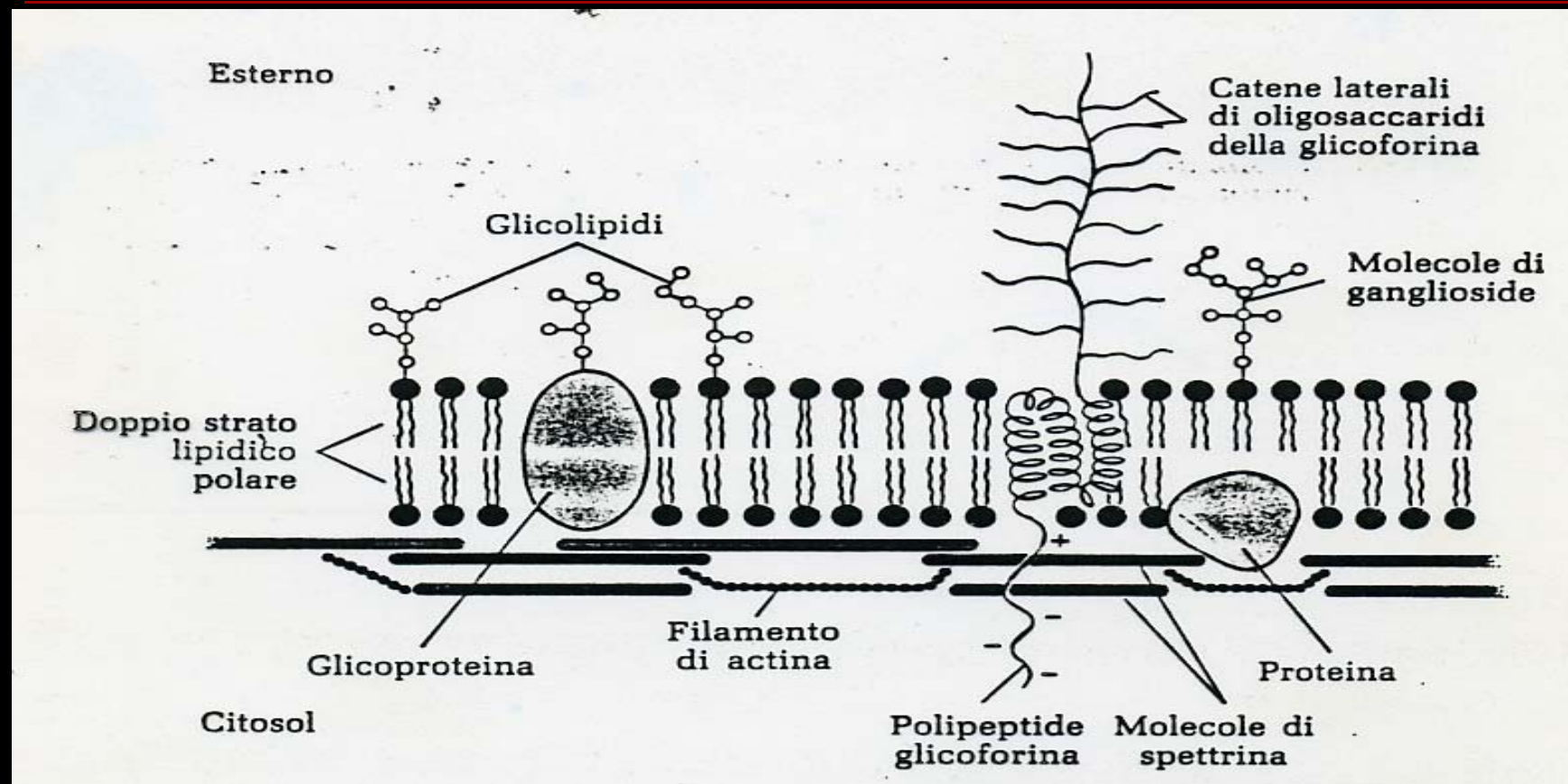
Le unità saccaridiche sono localizzate sulla superficie extracellulare della membrana plasmatica.



ESEMPI DI ASIMMETRIA DI MEMBRANA



ESEMPI DI ASIMMETRIA DI MEMBRANA



IL TRASPORTO ATTRAVERSO LE MEMBRANE BIOLOGICHE

Esso si divide in:

trasporto passivo (diffusione),

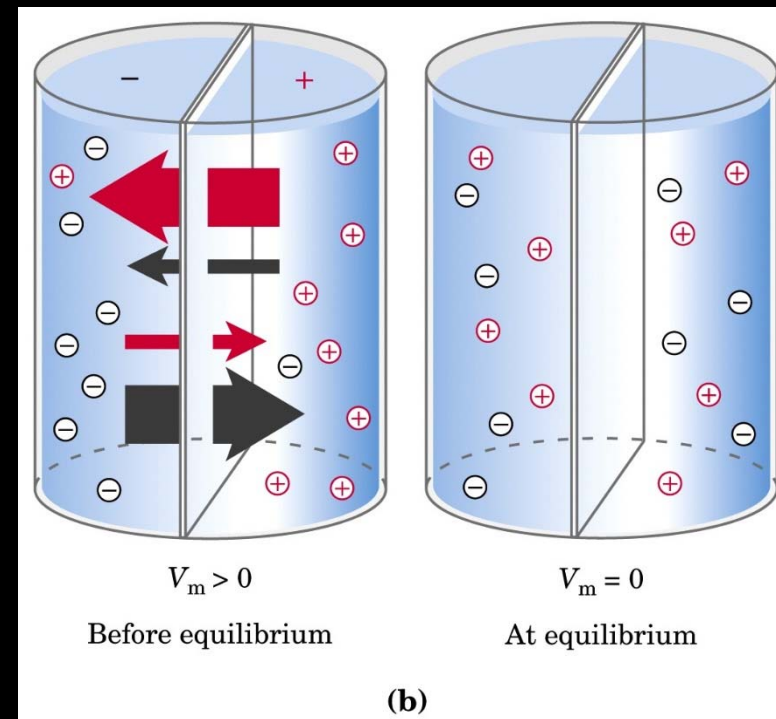
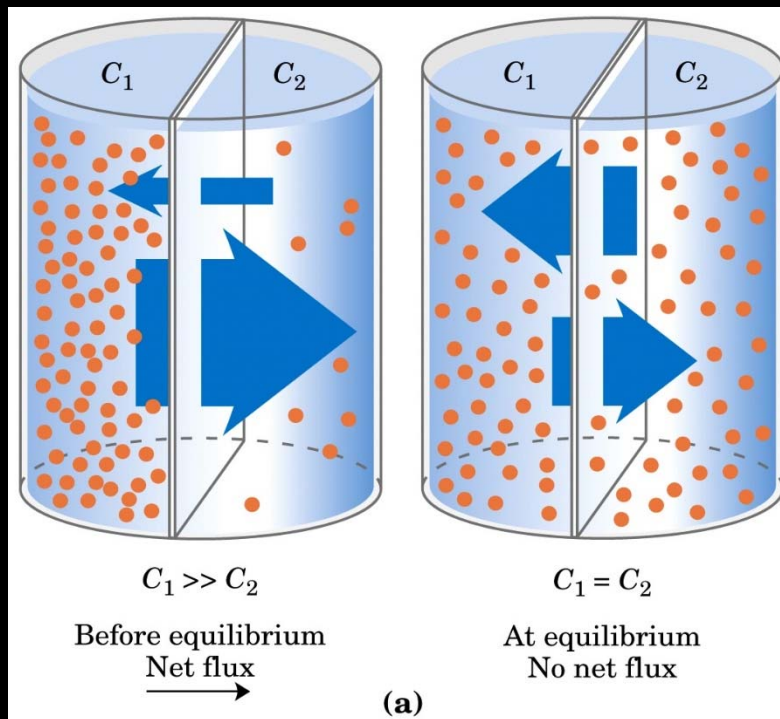
trasporto facilitato,

trasporto attivo.

IL TRASPORTO PASSIVO (DIFFUSIONE)

Esso viene prodotto dal movimento casuale di molecole attraverso le membrane.

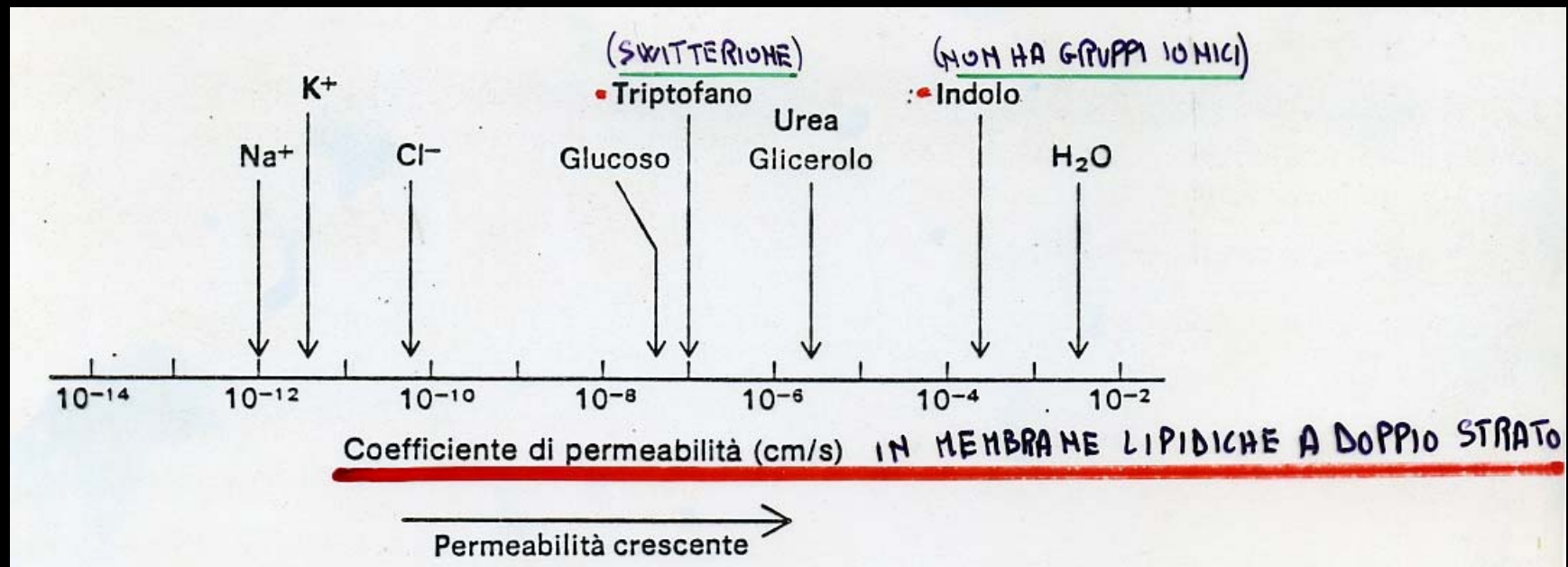
La velocità è proporzionale alla diffusione e inversamente proporzionale allo spessore di membrana.



IL TRASPORTO PASSIVO

- Esso avviene per diffusione semplice e la sostanza diffonde nella direzione che annulla il suo gradiente di concentrazione, con una velocità che dipende sia dalla sua solubilità nel nucleo non polare della membrana, sia dalla grandezza del suo gradiente.

I DOPPI STRATI LIPIDICI SONO IMPERMEABILI AGLI IONI E ALLA MAGGIOR PARTE DELLE MOLECOLE POLARI



I COEFFICIENTI DI PERMEABILITÀ PER ALCUNI IONI E MOLECOLE ATTRAVERSO LE MEMBRANE

Coefficienti di permeabilità (cm/s) per	Membrana	
	Fosfatidilserina	Eritrocita umano
K ⁺	$<9 \times 10^{-13}$	2.4×10^{-10}
Na ⁺	$<1.6 \times 10^{-13}$	10^{-10}
Cl ⁻	1.5×10^{-11}	$1.4 \times 10^{-4*}$
Glucosio	4×10^{-10}	$2 \times 10^{-5*}$
Acqua	5×10^{-3}	5×10^{-3}

Fonte: Dati ottenuti M.K. Jain and R.C. Wagner, *Introduction to Biological Membranes* (New York: Wiley, 1980).

*Trasporto facilitato. Si noti che ogniqualvolta si incontra un trasporto facilitato il coefficiente di permeabilità aumenta sensibilmente.

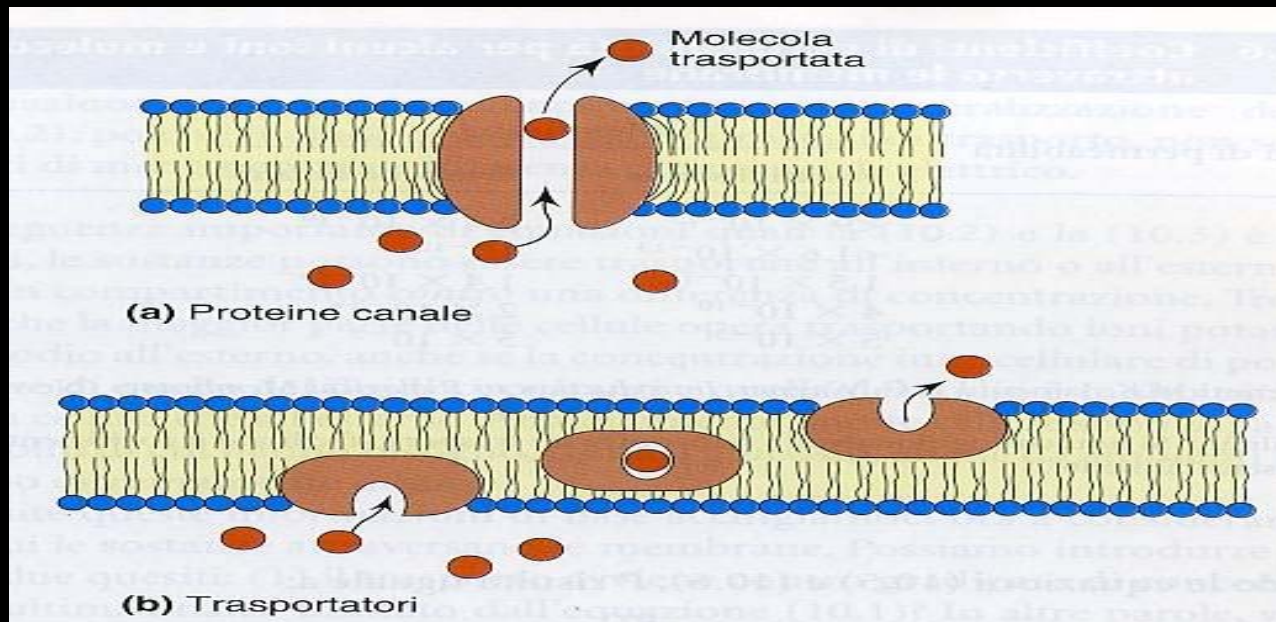
IL TRASPORTO FACILITATO

Esso é anche chiamato "diffusione facilitata".

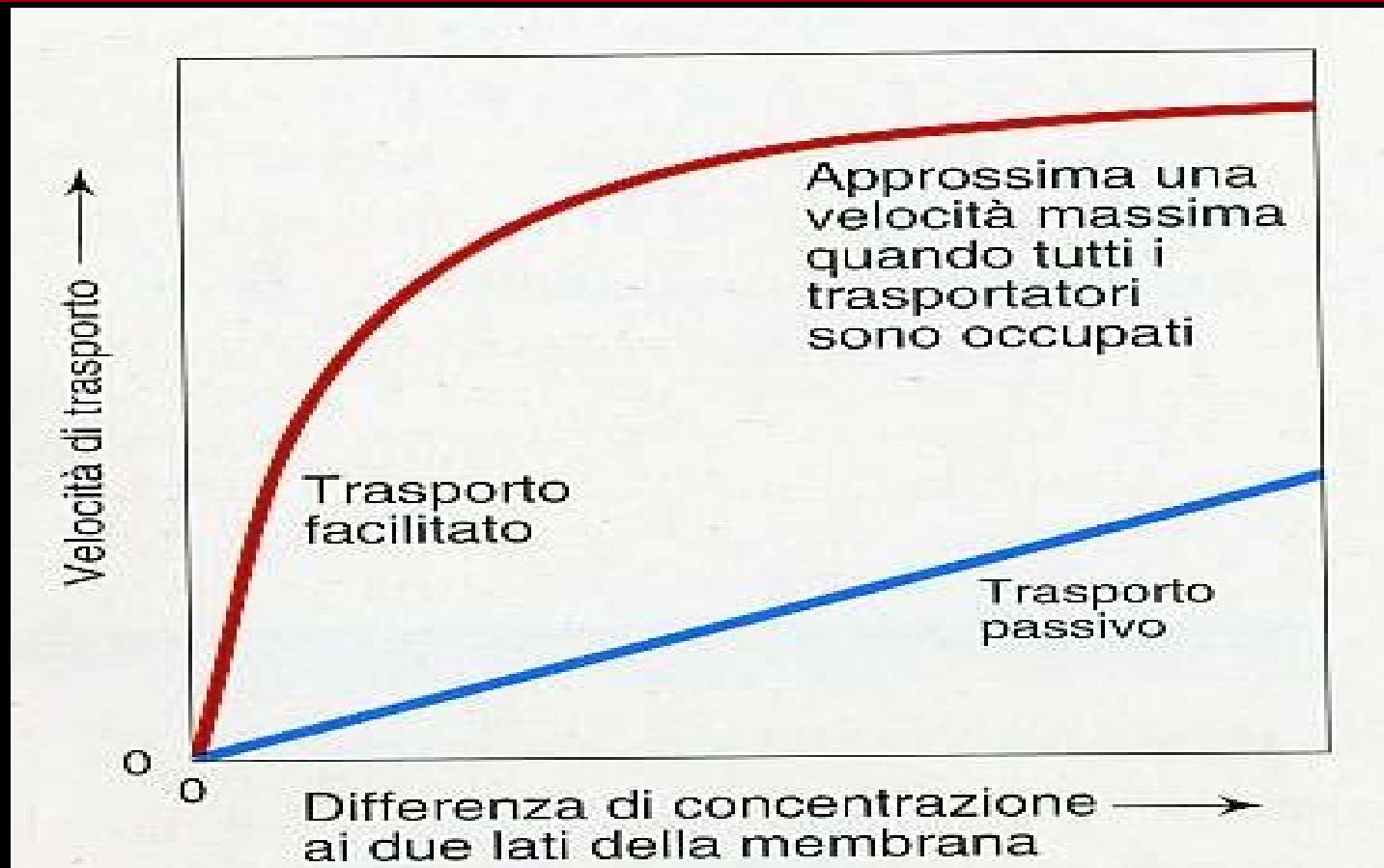
Una specifica molecola viene trasportata da una zona ad alta concentrazione a una a bassa concentrazione, tramite canali o trasportatori.

IL TRASPORTO FACILITATO

Il trasporto attraverso canali o trasportatori può aumentare la velocità di diffusione attraverso la membrana di molti ordini di grandezza.

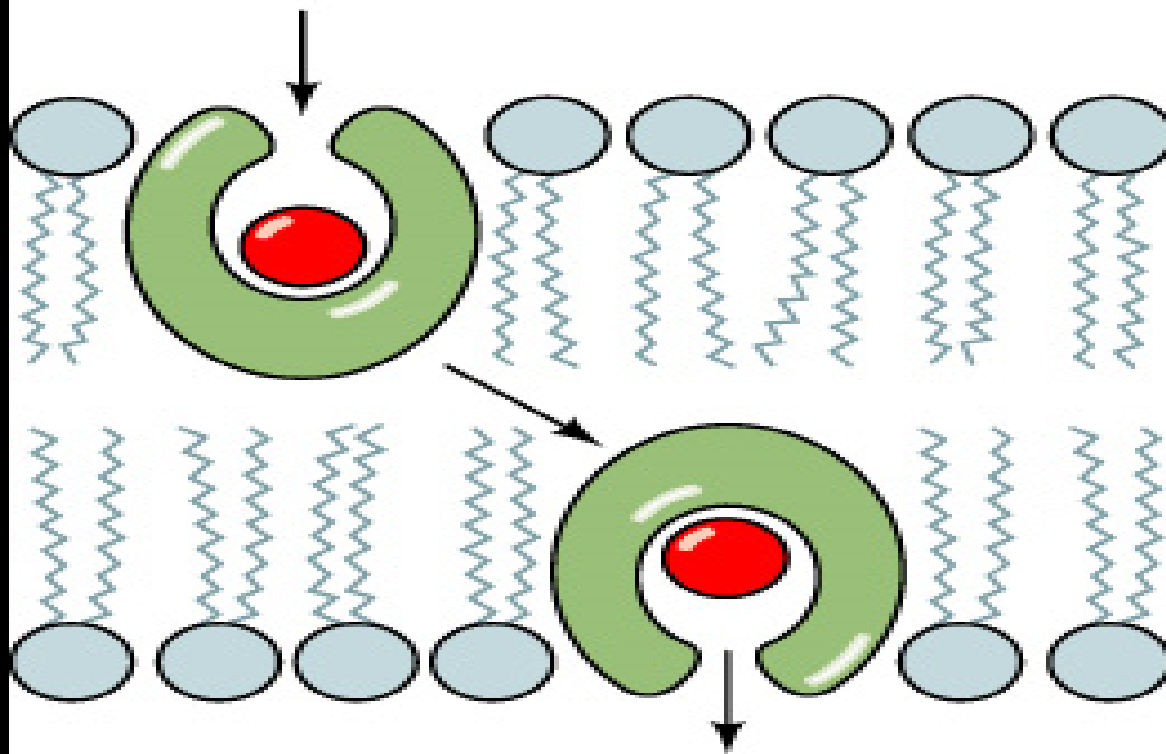


IL TRASPORTO FACILITATO PUÒ ESSERE DISTINTO DAL TRASPORTO PASSIVO, PERCHÉ IL PRIMO HA UNA VELOCITÀ GENERALMENTE MOLTO PIÙ ELEVATA E UN SISTEMA SATURABILE

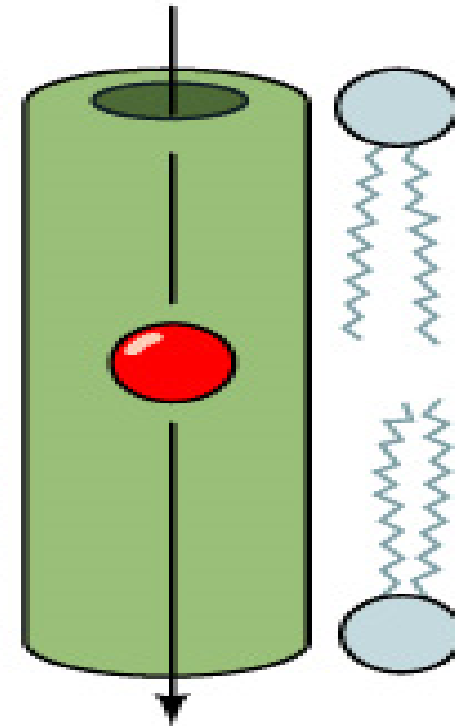


IL TRASPORTO FACILITATO

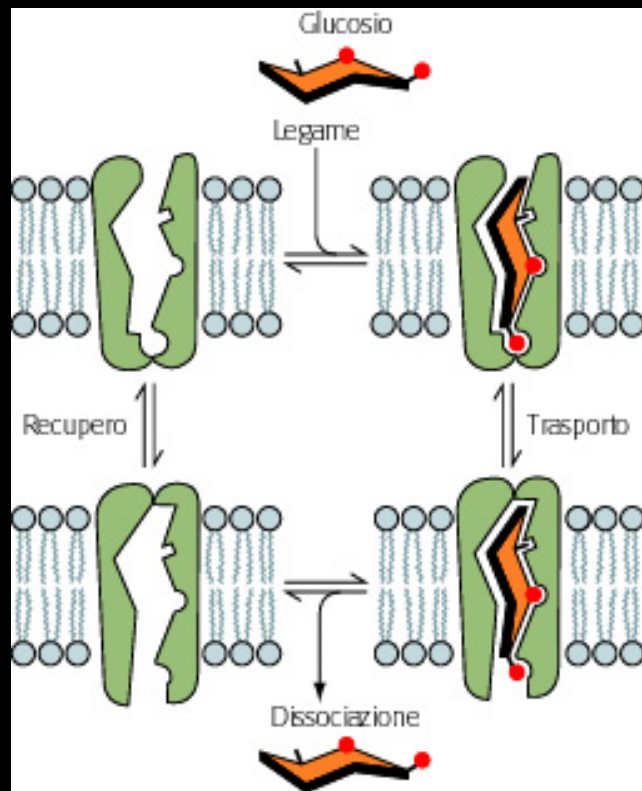
(a) Ionoforo trasportatore



(b) Ionoforo formatore di canali



LE PROTEINE TRASPORTATRICI



Esse sono proteine transmembrana, disposte in modo asimmetrico, che possono assumere due diversi stati conformazionali, in cui i siti di legame vengono alternativamente esposti ai due lati opposti della membrana.

LE PROTEINE TRASPORTATRICI

Alcune proteine trasportatrici spostano più di una sostanza per volta,

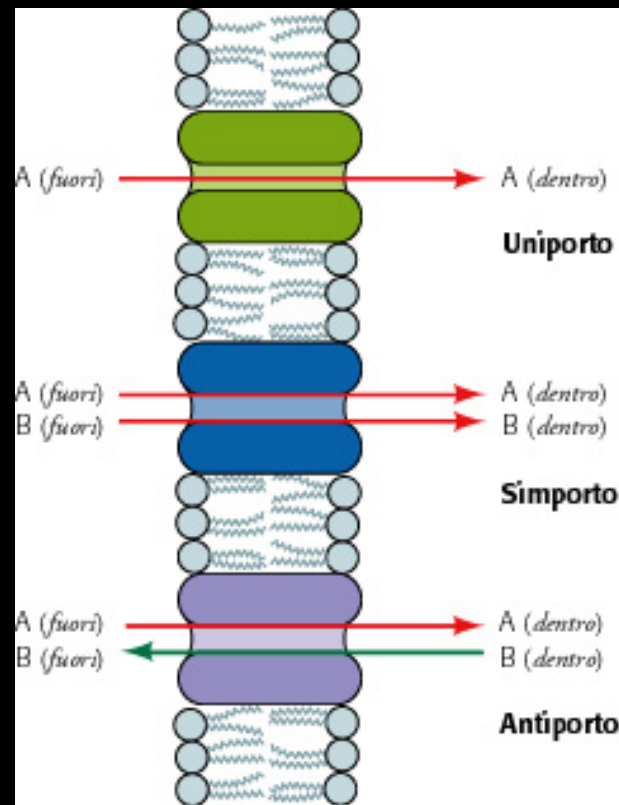
a seconda della stechiometria del processo di trasporto, si ha la seguente suddivisione:

un uniporto

un simporto

un antiporto.

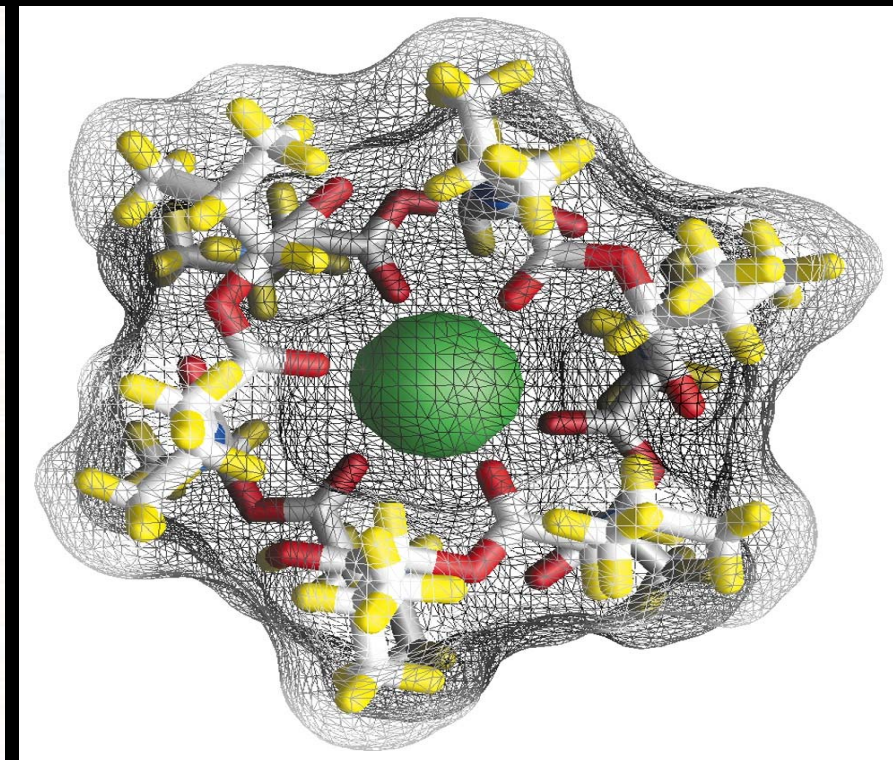
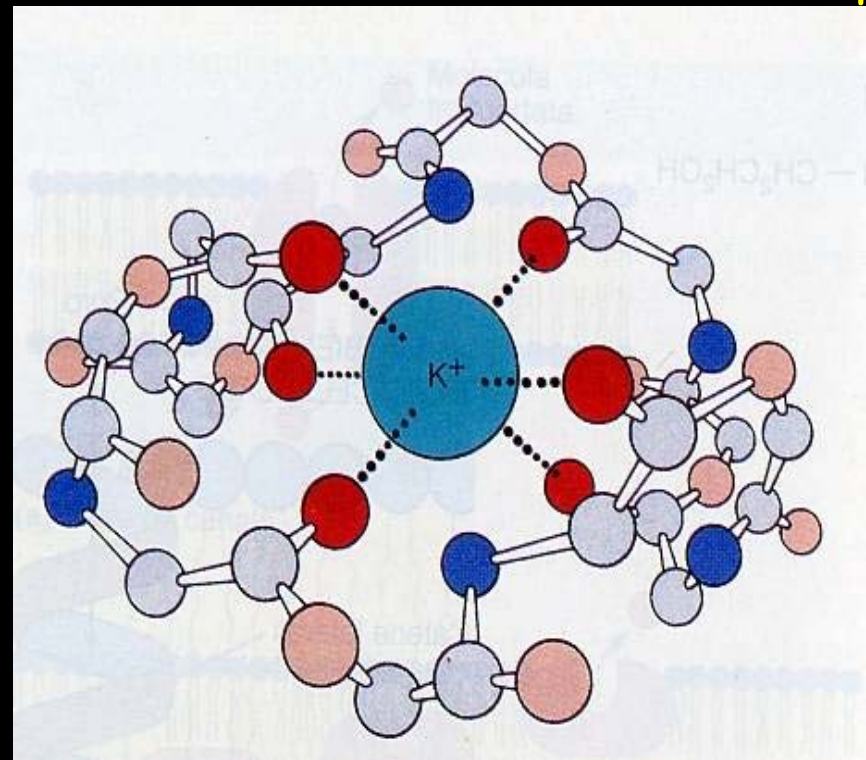
LE PROTEINE TRASPORTATRICI



- 1) Un **uniporto** é caratterizzato dallo spostamento di una sola molecola per volta (es. il glucosio negli eritrociti),
- 2) un **simporto** trasporta simultaneamente due diverse molecole nella stessa direzione,
- 3) un **antiporto** trasporta contemporaneamente due diverse molecole in direzioni opposte.

LA VALINOMICINA (PROTEINA TRASPORTATRICE)

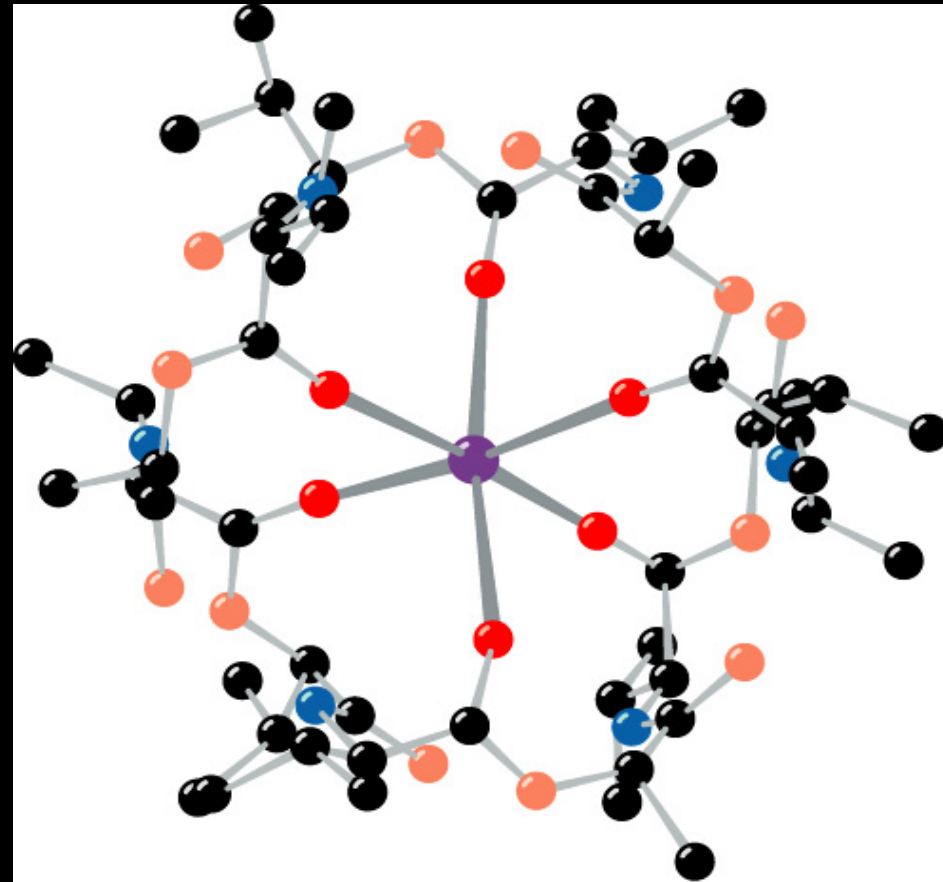
Molti organismi sintetizzano sostanze antibiotiche ed un numero considerevole di queste sono ionofori.



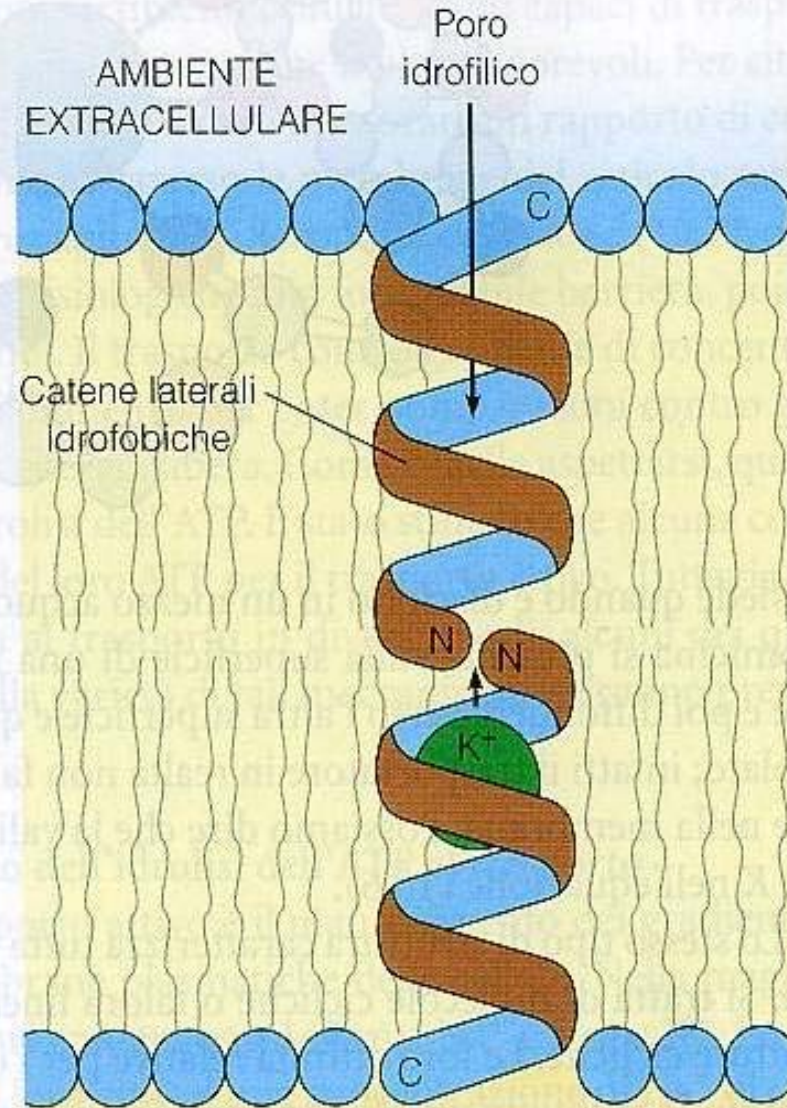
LA STRUTTURA AI RAGGI X DELLA VALINOMICINA COMPLESSATA CON UNO IONE K^+

Sei atomi di ossigeno (in rosso) coordinano lo ione K^+ (in blu).

Gli antibiotici ionofori rappresentano il miglior esempio conosciuto di trasporto facilitato, mediato da trasportatori.

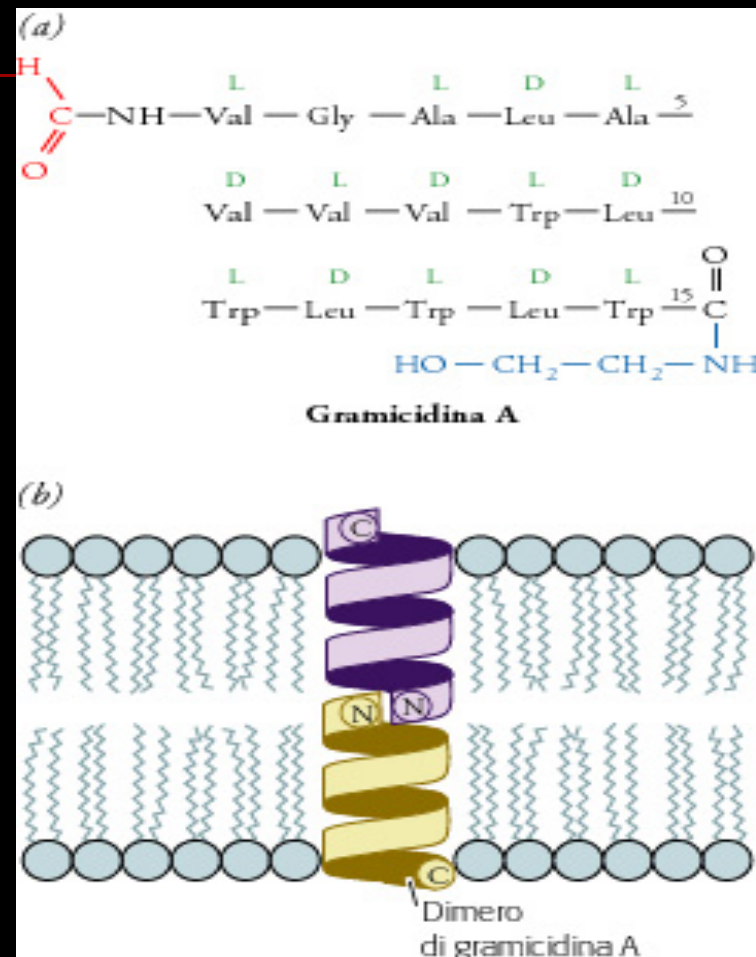


LA GRAMICIDINA A (proteina trasportatrice)



LA GRAMICIDINA A FUNZIONA COME UN CANALE IONICO

Due molecole di gramicidina A formano un poro nello spessore della membrana.



IL TRASPORTO ATTIVO

Esso avviene quando una specifica molecola viene trasportata da una zona a **bassa** concentrazione a una ad **alta** concentrazione, cioè **contro** il suo gradiente di concentrazione,

questo processo **endoergonico** deve essere accoppiato a un processo sufficientemente **esoergonico**, da renderlo favorevole (cioè , $\Delta G < 0$);

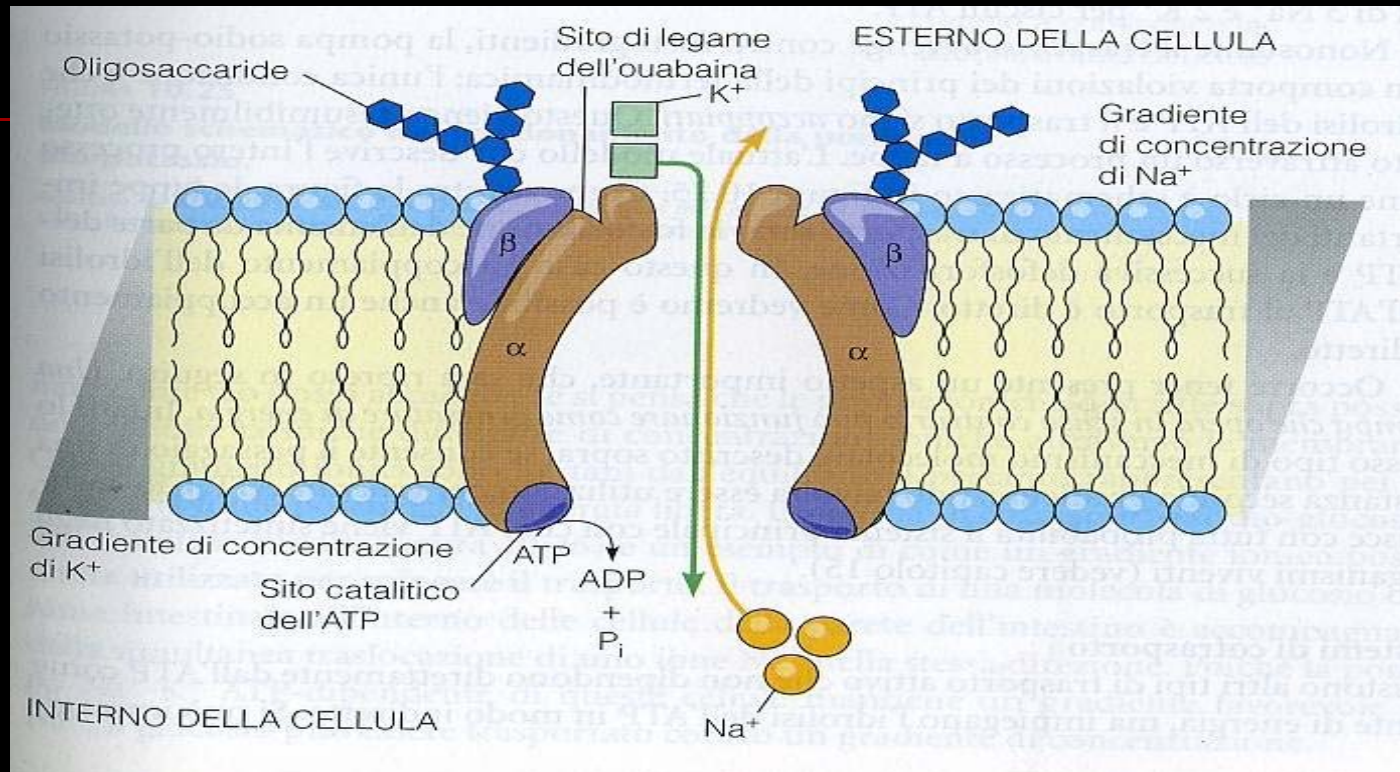
esso si divide in trasporto attivo **primario** ed attivo **secondario**.

IL TRASPORTO ATTIVO PRIMARIO

Esso avviene quando il trasporto endoergonico (contro gradiente di concentrazione) di un soluto è accoppiato a una reazione esoergonica (es. la conversione di ATP in ADP + P_i).

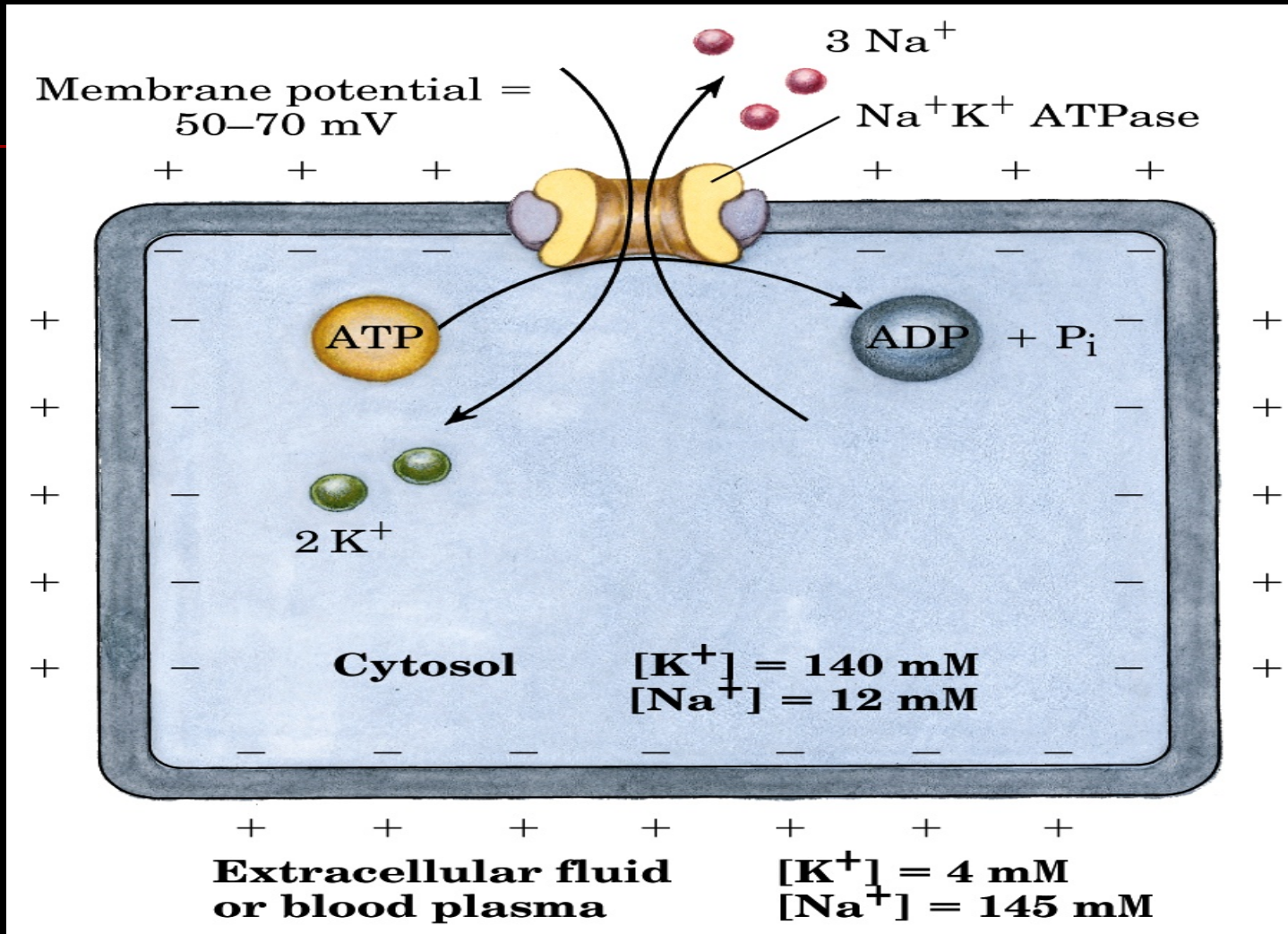
IL TRASPORTO ATTIVO PRIMARIO

es. le ATPasi, legate alle membrane, che trasportano i cationi.

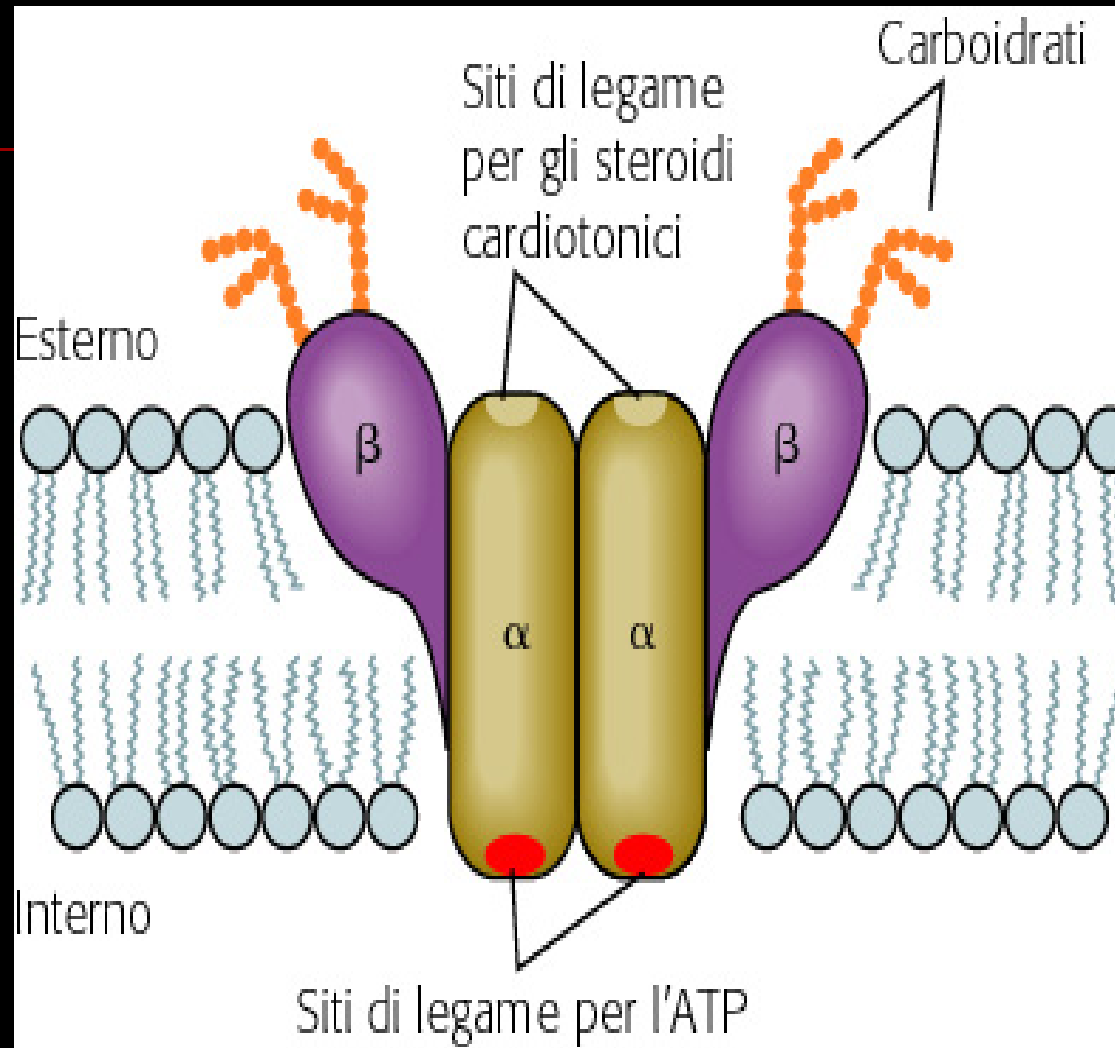


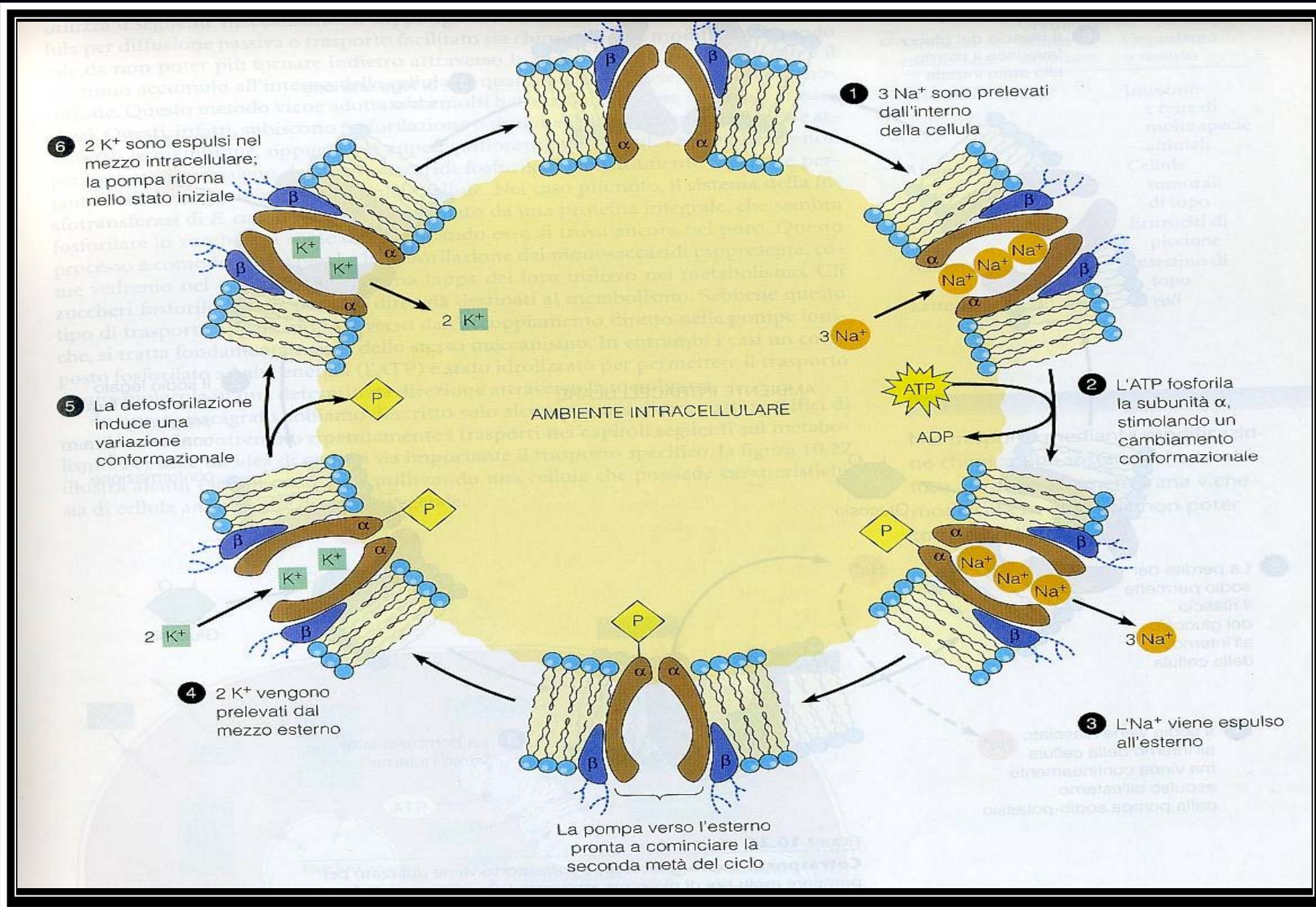
- La pompa Na⁺-K⁺ agisce in tutte le cellule, in modo che le concentrazioni di K⁺ siano maggiori all'interno e quelle di Na⁺ siano maggiori all'esterno.

LA POMPA $\text{Na}^+ - \text{K}^+$



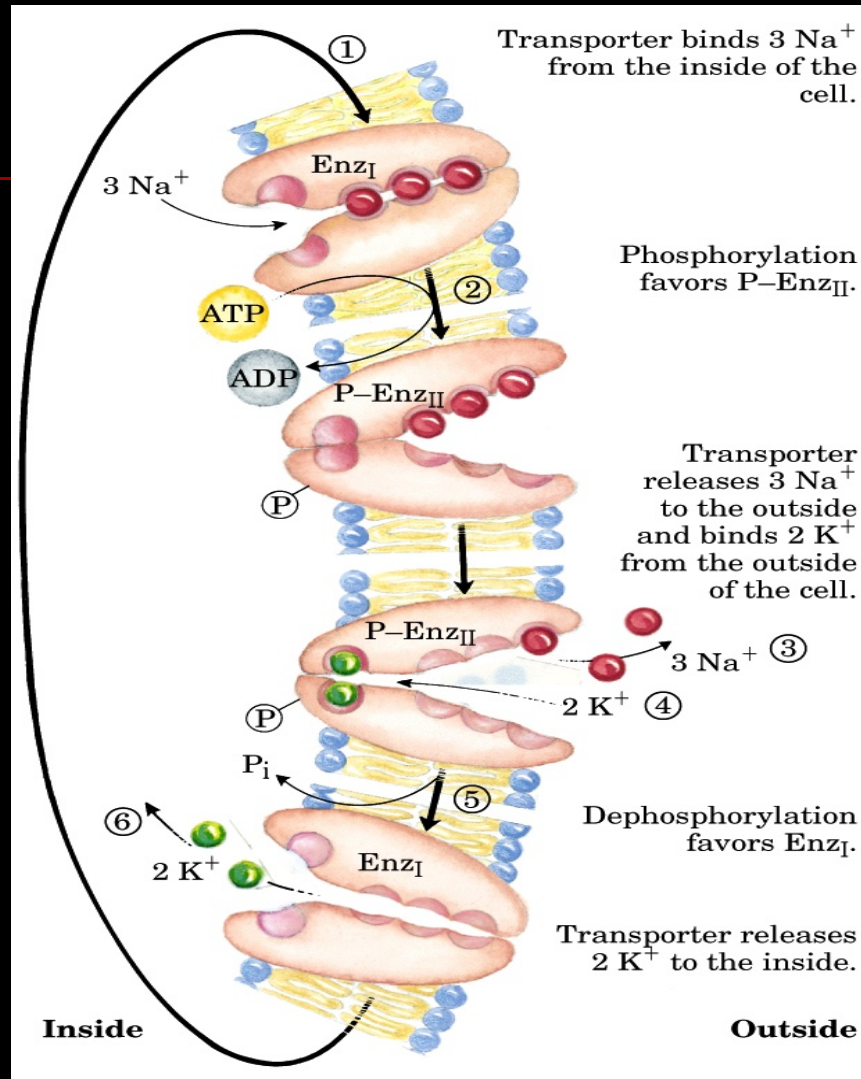
LA POMPA $\text{Na}^+ - \text{K}^+$



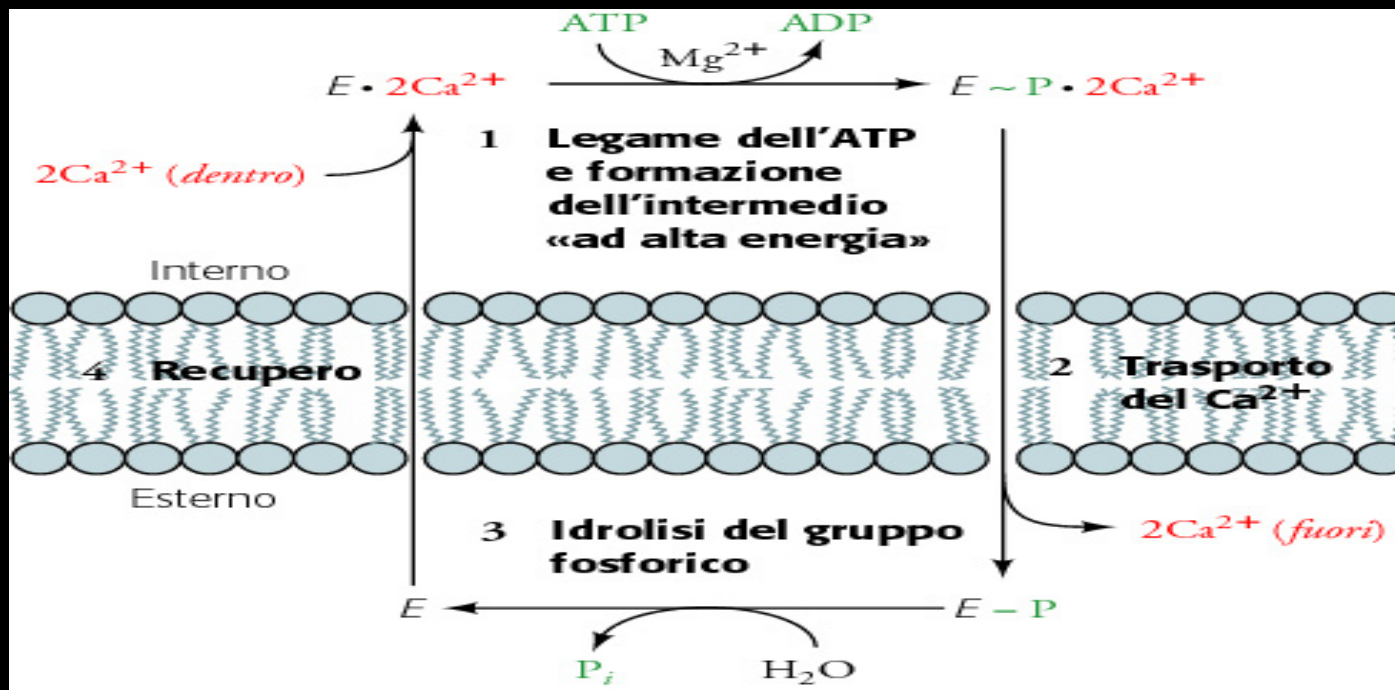


LA POMPA Na⁺-K⁺

LA POMPA $\text{Na}^+ - \text{K}^+$



LA POMPA Ca^{2+} -ATPasi

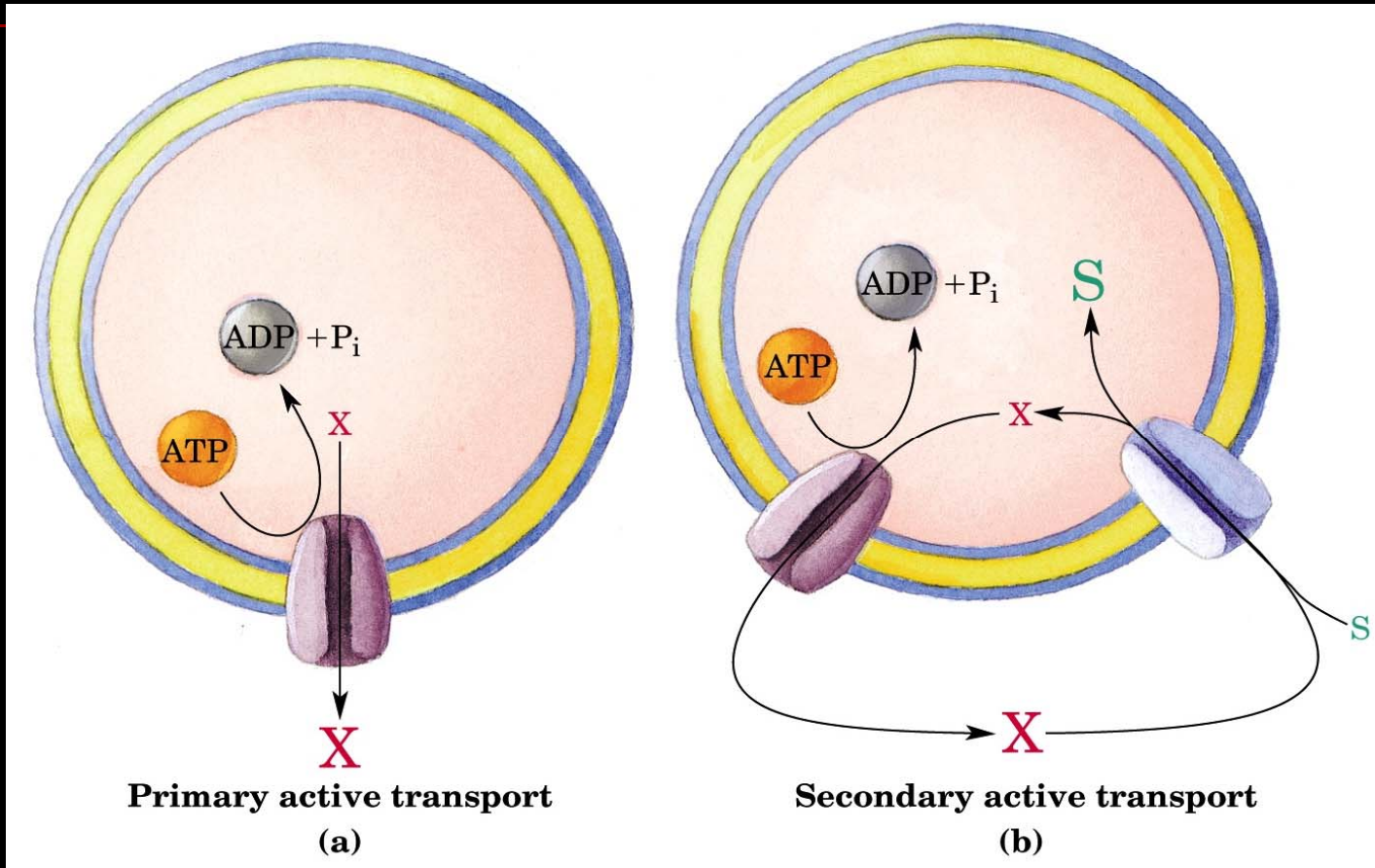


- Schema per il trasporto attivo del Ca^{2+} da parte della Ca^{2+} -ATPasi.

IL TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

Esso avviene quando il trasporto endoergonico (contro gradiente di concentrazione) di un soluto è accoppiato a un flusso esoergonico (nella direzione del gradiente) di un soluto diverso, che era stato precedentemente accumulato da un trasporto attivo primario su un lato della membrana.

I DUE TIPI DI TRASPORTO ATTIVO



IL TRASPORTO DI MEMBRANA

Le classi dei sistemi di trasporto

