

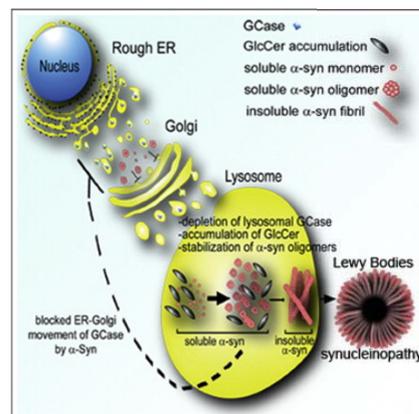
Lipidi di membrana 2° parte

Laurea Magistrale

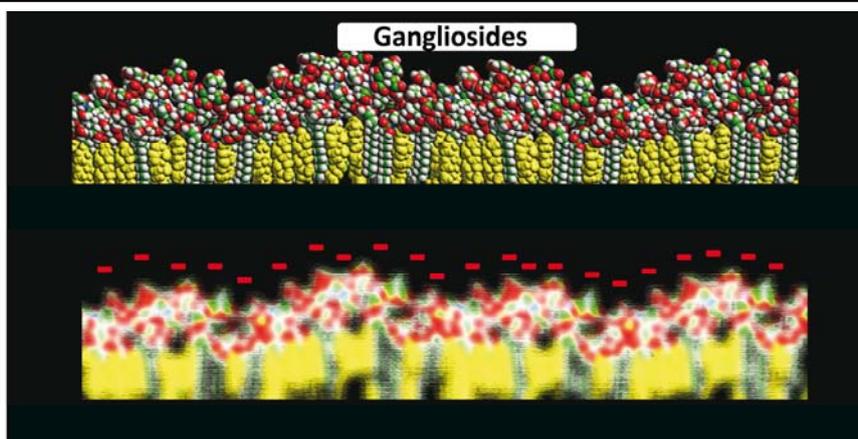
Biologia Sperimentale e Applicata

Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies

Parkinson's disease (PD), an adult neurodegenerative disorder, has been clinically linked to the lysosomal storage disorder Gaucher disease (GD), but the mechanistic connection is not known. Here, we show that functional loss of GD-linked glucocerebrosidase (GCase) in primary cultures or human iPS neurons compromises lysosomal protein degradation, causes accumulation of α -synuclein (α -syn), and results in neurotoxicity through aggregation-dependent mechanisms. Glucosylceramide (GlcCer), the GCase substrate, directly influenced amyloid formation of purified α -syn by stabilizing soluble oligomeric intermediates. We further demonstrate that α -syn inhibits the lysosomal activity of normal GCase in neurons and idiopathic PD brain, suggesting that GCase depletion contributes to the pathogenesis of sporadic synucleinopathies. These findings suggest that the bidirectional effect of α -syn and GCase forms a positive feedback loop that may lead to a self-propagating disease. Therefore, improved targeting of GCase to lysosomes may represent a specific therapeutic approach for PD and other synucleinopathies.



Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. Cell. 2011 Jul 8;146(1):37-52.



Modello molecolare della membrana plasmatica neuronale.

Pannello superiore: I gangliosidi (GM1, GD1a, GD1b e GT1b) sono rappresentati da atomi colorati (ossigeno in rosso, azoto in blu, carbonio in verde, idrogeno in bianco); il colesterolo è giallo.

Pannello inferiore: I gangliosidi, che sono carichi negativamente a pH fisiologico, formano uno **schermo di cariche negative alla superficie del neurone**. Ciò ha importanti conseguenze per le funzioni sinaptiche e per la formazione del poro di amiloide nelle malattie neurodegenerative.

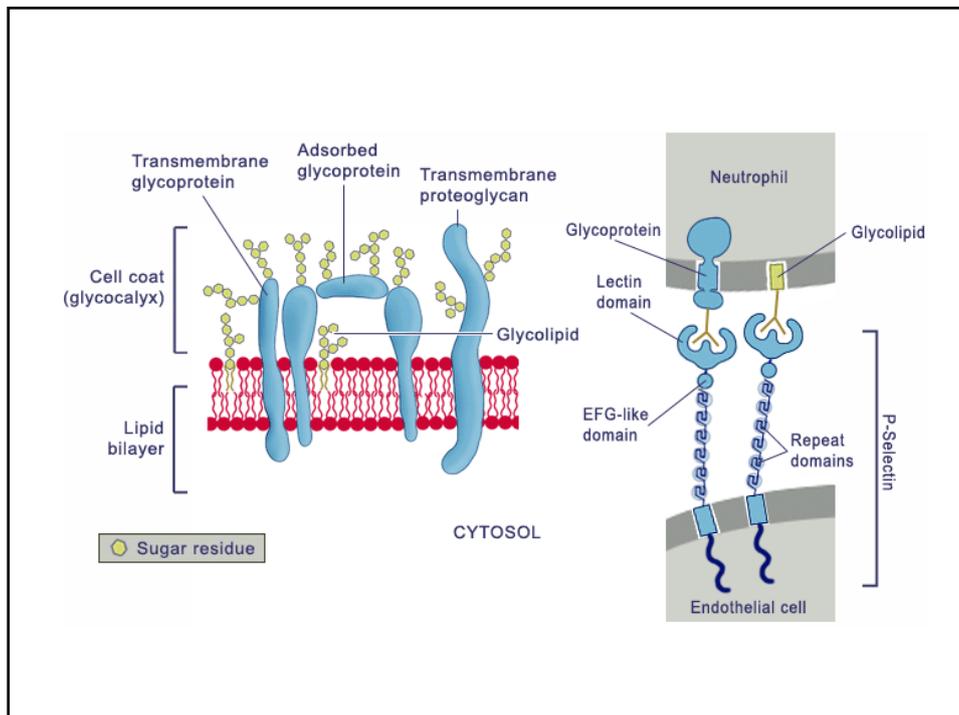
Principali classi di glicosfingolipidi (2)

- ✚ **Globosidi:** sono **ceramide oligosaccaridi neutri**, in cui gli zuccheri sono di solito galattosio, glucosio o N-acetilgalattosamina. Un globoside importante è il ceramide trisossido che si accumula nel rene di pazienti con la **malattia di Fabry** a causa di mancanza dell'enzima lisosomiale galattosidasi A.
- ✚ **Gangliosidi:** sono glicosfingolipidi **acidi** e contengono **acido N-acetilneuramico** (noto anche come **acido sialico** o NANA). Sono concentrati nelle estremità nervose e costituiscono fino a 5-10% della massa lipidica totale delle cellule nervose. I gangliosidi più comuni sono G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b} . Il G_{M1} è un componente delle cellule della mucosa intestinale e si può legare alla subunità β della tossina del colera, provocando un aumento dell' cAMP, del trasporto degli ioni cloro, e una grave diarrea. Il G_{M2} aumenta nella **malattia di Tay Sachs** a causa di una carenza della β -hexosaminidase A.

Ruolo degli sfingolipidi

- ✚ **Protettivo:** ad es. sulla superficie apicale delle cellule epiteliali per proteggerle dal basso pH o dalla digestione enzimatica.
- ✚ **Trasmissione elettrica:** in particolare i gangliosidi che acquisiscono cariche elettriche dopo una campo elettrico nella cellula nervosa.
- ✚ **Isolanti elettrici**
- ✚ **Riconoscimento cellula-cellula:** ad es. recettori di tipo sfingolipidi sui neutrofili si legano alla P-selettina sulle cellule endoteliali.

http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_4/L-31%20Complex%20Lipids.xml



SPHINGOLIPIDOSES

DISEASE

- GM₁ gangliosidosis
- Tay-Sachs diseases
- Fabry's disease
- Gaucher's disease
- Niemann-Pick disease
- Metachromatic leukodystrophy
- Krabbe's disease
- Farber's disease

ENZYME DEFECT

- β -galactosidase
- β -hexosaminidase A
- Hexosaminidase A & B
- α -galactosidase
- β -glucosidase
- Sphingomyelinase
- Arylsulfatase A
- β -Galactosidase
- Ceraminidase

<http://howmed.net/wp-content/uploads/2010/09/sphingolipids.bmp>

EXAMPLES OF SPHINGOLIPIDOSES

Disease	Enzyme Defect	Lipid Accumulating	Clinical Symptoms
Fucosidosis	α -Fucosidase	Cer-Glc-Gal-GalNAc-Gal-Fuc H-Isoantigen	Cerebral degeneration, muscle spasticity, thick skin
Generalized gangliosidosis	GM ₁ β -galactosidase	Cer-Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-Gal GM ₁ Ganglioside	Mental retardation, liver enlargement, skeletal deformation
Tay-sachs disease	Hexosaminidase A	Cer-Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc GM ₂ Ganglioside	Mental retardation, blindness, muscular weakness
Tay-Sachs variant or Sandhoff's disease	Hexosaminidase A and B	Cer-Glc-Gal-Gal-GalNAc Globoside-plus-GM ₂ ganglioside	Same as Tay-Sachs, but progressing more rapidly
Fabry's disease	α -Galactosidase	Cer-Glc-Gal-Gal Globotriaosylceramide	Skin rash, kidney failure (full symptoms only in males; X-linked recessive)
Ceramide lactoside lipidoses	Ceramide lactosidase (β -galactosidase)	Cer-Glc-Gal Ceramide lactoside	Progressing brain damage, liver and spleen enlargement

<http://howmed.net/biochemistry/lipid-chemistry/>

Del Solar V, Lizardo DY, Li N, Hurst JJ, Brais CJ, Atilla-Gokcumen GE.
Differential Regulation of Specific Sphingolipids in Colon Cancer Cells during Staurosporine-Induced Apoptosis. Chem Biol. 2015 Dec 17;22(12):1662-70.

SUMMARY

Apoptosis is accompanied by distinct morphological changes at the plasma and organelle membrane level. Involvement of certain lipids in apoptosis has been established; however, we have limited understanding of the specific lipid structures that participate in this process. We used untargeted comparative lipidomics to study the changes in lipid composition during staurosporine-induced apoptosis in HCT-116. Our results revealed that **ceramides, dihydroceramides, and sphingomyelins, with defined acyl chains, constitute the majority of changes in the lipidome.** Expression levels and activities of enzymes responsible for the biosynthesis of lipids that change suggest that de novo synthesis causes these specific changes. Further analysis of the lipidome during apoptosis in other cancer and non-cancer cell lines suggested that accumulation of ceramides and dihydroceramides is specific to cancer cells. Taken together, **our data propose that these molecules are regulated at the lipid-specific level during apoptosis and that this regulation differs between cancer and non-cancer cells.**

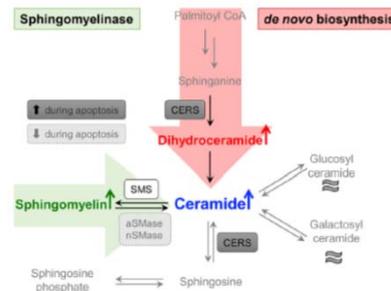
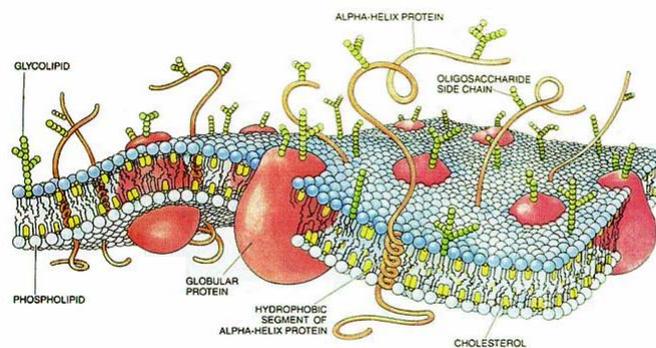


Figure 3. Simplified Scheme of Sphingolipid Biosynthesis
 The scheme is modified from Wennekes et al. (2008). De novo ceramide biosynthetic and sphingomyelin hydrolysis pathways are shown in red and green, respectively. Lipids that accumulate during staurosporine-induced apoptosis in HCT-116 are shown in red (dihydroceramides), blue (ceramides), and green (sphingomyelins). The expression levels of CERSs are higher in apoptotic cells. The activities of SMS are lower, whereas the activity of SphK does not change during apoptosis.

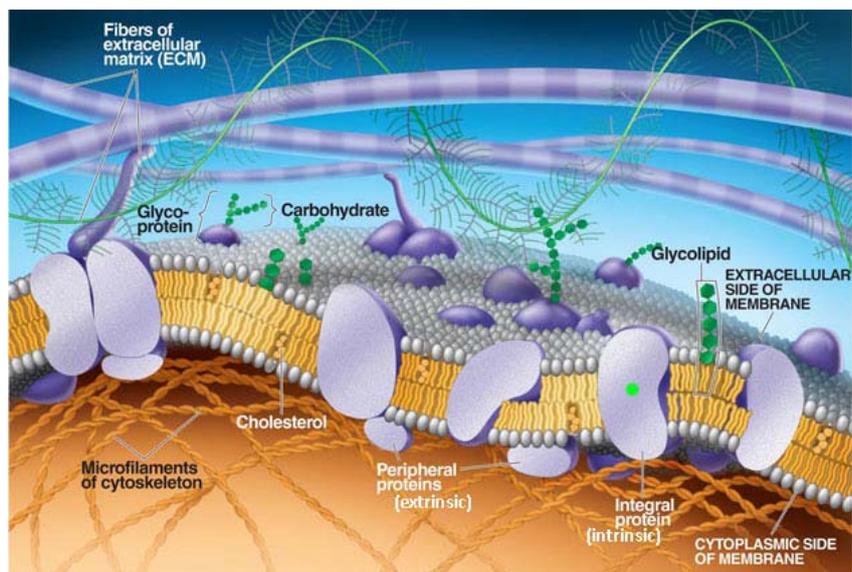


Struttura delle membrane

http://en.wikibooks.org/wiki/Biochemistry/Lipids_And_The_Plasma_Membrane

Unità di misura per riferimento

- ✚ **Metro** – m
- ✚ **Milimetro** – mm = 10^{-3} m
- ✚ **Micron** - μm : 10^{-6} m
- ✚ **Nanometro** – nm: 10^{-9} m = 10^{-3} μm [millimicron, obsoleto]
- ✚ **Ångstrom** – Å = 10^{-10} m = 10^{-1} nm
 - **Ångstrom**: Unità spesso usata in Scienze Naturali e tecnologia per esprimere le dimensioni di atomi, molecole, e strutture biologiche microscopiche, le dimensioni dei legami chimici, la disposizione degli atomi nei cristalli, la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica e le dimensioni dei componenti dei circuiti integrati (elettronica).



Spessore della membrana: 5-8 nm (50-80 Å)

The diagram illustrates the fluid mosaic model of a cell membrane. It shows a cross-section of a lipid bilayer with phospholipids represented as orange spheres with wavy tails. Three types of movement are highlighted: **Lateral diffusion** (lipids moving within the same leaflet), **Rotation** (lipids spinning around their own axis), and **Transverse diffusion ("flip-flop")** (lipids moving between the two leaflets).

- Nell'ambito di ogni foglietto, i lipidi hanno libertà di movimento.
- Il movimento da un foglietto all'altro («flip-flop») è difficoltato dal carattere anfipatico del lipide e quindi ha bassa probabilità di avvenire.
- Può tuttavia essere facilitato da appositi enzimi («flippasi»).

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-07-08/07_10.jpg

Nella membrana plasmatica la distribuzione dei lipidi è asimmetrica

Exoplasmic

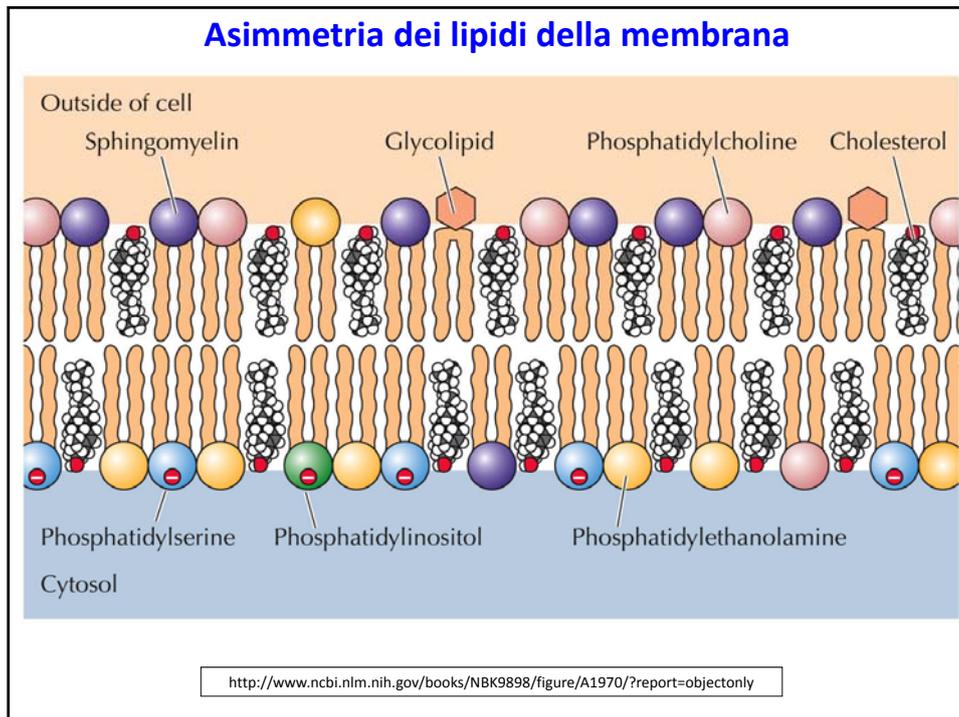
Cytosolic

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

(a)

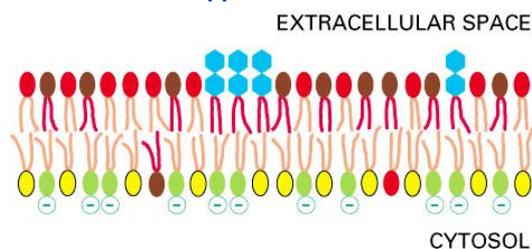
The bar chart shows the percentage of total membrane lipids for six types: SM, PC, PS, PE, PI, and CI. The y-axis ranges from 25% in the cytosolic leaflet (downward) to 25% in the exoplasmic leaflet (upward). SM and PC are primarily in the exoplasmic leaflet, while PS, PE, PI, and CI are primarily in the cytosolic leaflet.

The chemical structure diagram (a) shows a cross-section of the bilayer with various lipids labeled: Diacyl phosphatidic acid, Phosphatidic acid, Phosphatidylcholine (lecithin), Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine (cephalin), Phosphatidylinositol, and Diphasphatidylglycerol (cardiolipin). The diagram illustrates how these lipids are asymmetrically distributed between the two leaflets.



IMPORTANZA BIOLOGICA DELL'ASSIMMETRIA DEI LIPIDI DELLE MEMBRANE (1)

- ✦ Le composizioni dei due monostrati del bilayer lipidico sono marcatamente diverse.
 - Es: nella membrana degli eritrociti umani, quasi tutte le molecole lipidiche che hanno la **colina** $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ nel loro gruppo di testa (fosfatidilcolina e sfingomieline) si trovano nel **foglietto esterno**, mentre quasi tutte le molecole di fosfolipidi che contengono un **aminogruppo terminale primario (fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina)** si trovano nel **monostrato interno**. Poiché la **fosfatidilserina, carica negativamente, è localizzata nel monostrato interno, vi è una significativa differenza di cariche fra le due metà del doppio strato:**



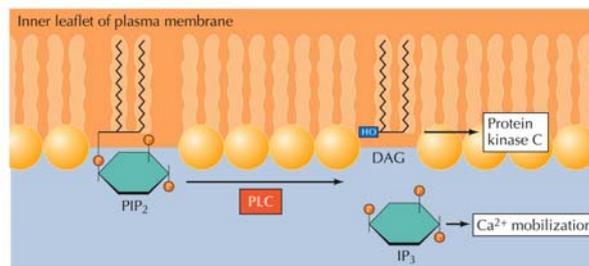
Importanza dell'asimmetria dei lipidi (2)

✚ **L'asimmetria dei lipidi è funzionalmente importante.**

- ✳ Molte **proteine del citosol** si legano a specifici **gruppi di testa** di lipidi del **monostrato citosolico** del bilayer lipidico:
 - ✳ Ad es., l'enzima proteina chinasi C (PKC) viene attivata in risposta a diversi segnali extracellulari. **La PKC si lega alla faccia citosolica della membrana plasmatica, dove è concentrata la fosfatidilserina, e richiede questo fosfolipide carico negativamente per la sua attività.**

Importanza dell'asimmetria (3)

- ✚ In altri casi, il **gruppo di testa dei lipidi** deve essere prima **modificato** in modo da creare siti di **aggancio** per le **proteine** in una posizione e momento determinati.
 - Ad esempio, il **fosfatidilinositolo**, che è un fosfolipide poco rappresentato, è concentrato nel **monostrato citosolico** delle membrane cellulari. Diversi enzimi detti **chinasi dei lipidi** possono **legare gruppi fosfato** in posizioni distinte dell'anello di inositolo. Gli inositolo-fosfolipidi fosforilati fungono da **siti di legame che reclutano proteine specifiche dal citosol fino alla membrana.**



Importanza dell'assimmetria (4)

- ✚ Un importante esempio di chinasi dei lipidi è la **fosfatidilinositolo chinasi (PI₃-chinasi)**, che è attivata in risposta a segnali extracellulari ed **aiuta a reclutare specifiche proteine di segnalamento fino alla faccia citosolica** della membrana plasmatica.
- ✚ Proteina chinasi simili fosforilano gli inositolfosfolipidi delle **membrane intracellulari** e quindi aiutano a reclutare proteine che guidano il traffico di vescicole.

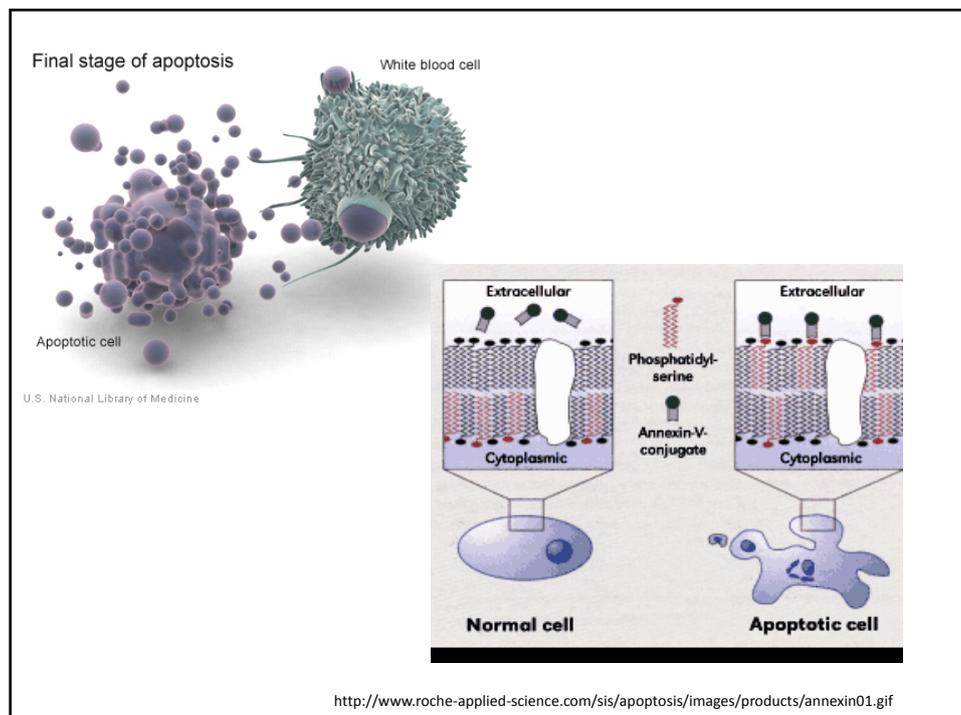
Importanza dell'assimmetria (5)

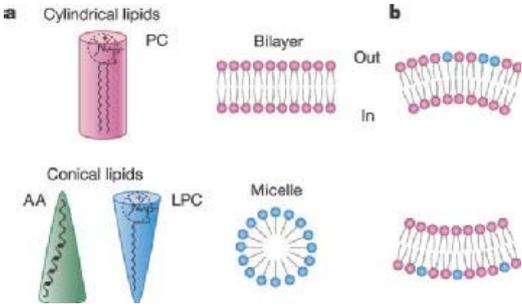
- ✚ I fosfolipidi della membrana plasmatica sono usati anche in un altro modo nella risposta ai segnali extracellulari.
- ✚ La membrana plasmatica contiene diversi enzimi detti **fosfolipasi** che sono attivate da segnali extracellulari per **scindere molecole di fosfolipidi specifiche**, generando **frammenti** di queste molecole che fungono da **mediatori intracellulari a corta vita**.
 - Ad esempio, la fosfolipasi C, scinde un inositolo fosfolipide del **monostrato citosolico** della membrana plasmatica per generare **due** frammenti, uno dei quali rimane nella membrana ed aiuta ad attivare la proteina chinasi C (DAG), mentre l'altro è rilasciato nel citosol dove stimola il rilascio di Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico (IP₃).

Importanza dell'assimmetria (6)

✚ Gli animali sfruttano l'assimmetria dei fosfolipidi delle membrane plasmatiche per **distinguere** le **cellule vive** dalle **cellule morte**. Quando una cellula animale subisce la morte cellulare programmata, o **apoptosi**, **la fosfatidilserina, che normalmente è confinata nel monostrato citosolico della membrana plasmatica, viene rapidamente traslocata al monostrato extracellulare**. **La fosfatidilserina esposta sulla superficie cellulare serve di segnale per indurre le cellule vicine, come ad esempio i macrofagi, a fagocitare la cellula morta e a digerirla**. La traslocazione della fosfatidilserina nelle cellule apoptotiche ha luogo mediante due meccanismi:

- Il traslocatore di fosfolipidi che normalmente trasporta i lipidi dal monostrato non citosolico al monostrato citosolico («flippase») viene **inattivato**.
- Una “**scramblase**” che trasferisce i fosfolipidi aspecificamente in entrambe le direzioni fra i due monostrati viene **attivata**.



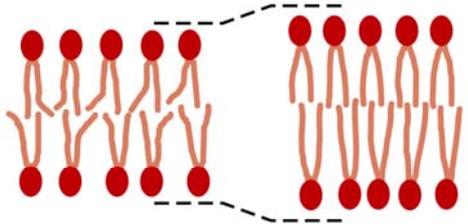


Membrane

INFLUENZA DELLA FORMA MOLECOLARE DEI LIPIDI SULLA CURVATURA E SPESSORE DELLE MEMBRANE

<https://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/arodger/arodgergroup/people/angeliki/>

Influenza dei legami doppi in posizione *cis* delle catene idrocarburiche



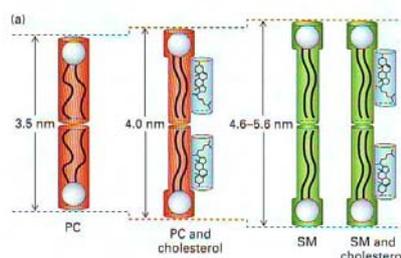
unsaturated hydrocarbon chains with *cis*-double bonds

saturated hydrocarbon chains

Figure 10-12 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

- ✚ I legami doppi rendono più difficile il compattamento reciproco delle catene, così rendendo più difficile il congelamento del "bilayer" lipidico.
- ✚ Inoltre, dato che le catene degli acidi grassi dei lipidi insaturi sono più sparpagliate, ***i bilayers lipidici che contengono lipidi insaturi sono più sottili dei "bilayers" formati esclusivamente dai lipidi saturi.***

Effetto della composizione lipidica sullo spessore del bilayer



a) Un bilayer puro di **sfigomiolina** (SM) è **più spesso** di uno formato da un fosfogliceride tipo **fosfatidilcolina** (PC). Il colesterolo promuove l'ordine sui bilayers di fosfogliceridi, ma non influenza lo spessore del bilayer più ordinato di SM.

http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n7/fig_tab/nrm0701_504a_F3.html#figure-title

Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):504-13.

La forma molecolare dei lipidi -1

- ✚ L'ingombro spaziale dei gruppi di **testa polari** e delle **code apolari** dei lipidi di membrana hanno un effetto rilevante sulla geometria complessiva del lipide.
- ✚ Israelachvili ha creato un parametro di impacchettamento specifico, P:

$$P = \frac{v}{a \cdot l}$$

v: volume specifico occupato dalla coda apolare (idrocarburica)

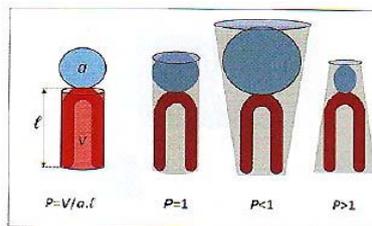
a: area della gruppo di testa polare

l: lunghezza effettiva della coda

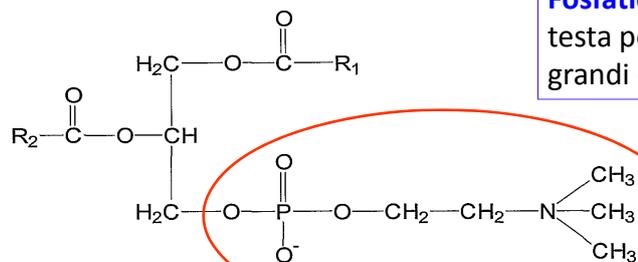
Fantini & Yahi: **Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease. Clues to Innovative Therapeutic Strategies for Brain Disorders**, Academic Press, 2015

La forma molecolare dei lipidi -2

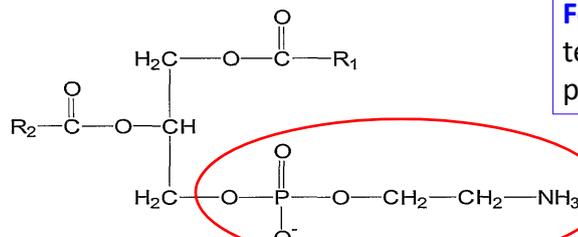
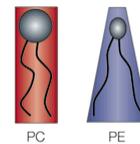
- Una **forma cilindrica** è caratterizzata di un valore di P vicino ad 1.
- Se **P<1** il lipide ha la forma di un **cono invertito** a causa del sovradimensionamento del gruppo polare di testa rispetto al dominio apolare.
- Se **P>1** il lipide adotta una forma a **cono**, con una piccola testa e una grande dominio apolare.



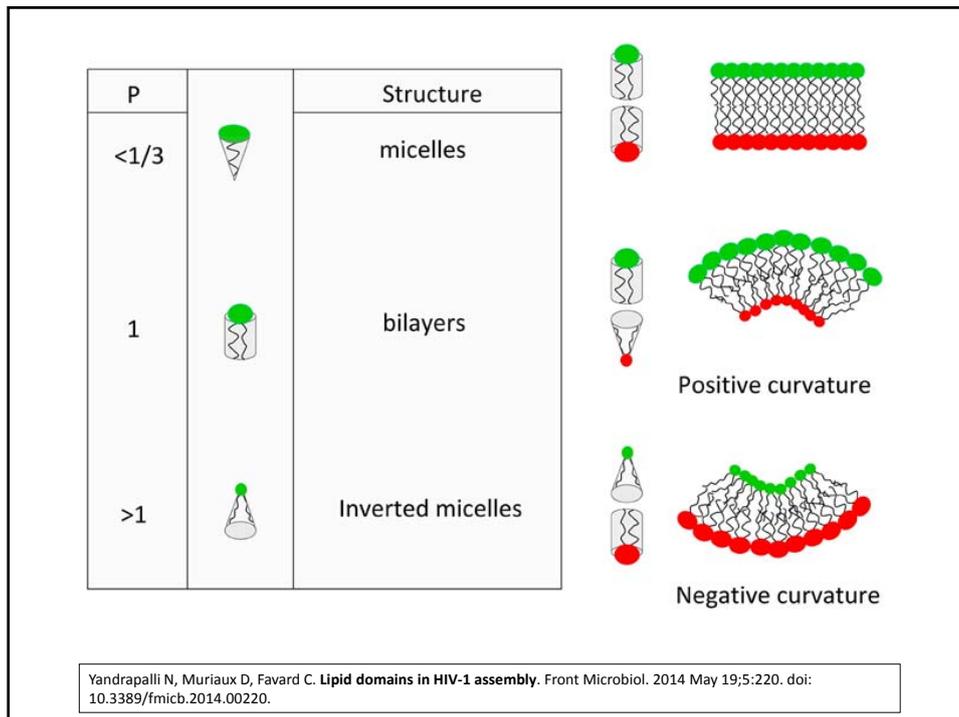
Fantini & Yahi: *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease. Clues to Innovative Therapeutic Strategies for Brain Disorders*, 2015



Fosfatidilcolina:
testa polare di grandi dimensioni

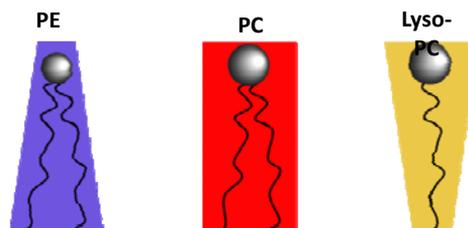


Fosfatidiletanolamina:
testa polare più piccola



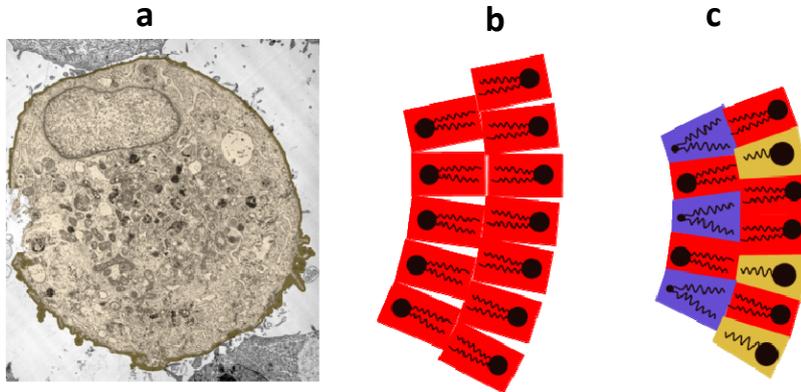
Curvatura nelle membrane - 1

- ✚ La **curvatura delle membrane** è provocata da lipidi con **forme** diverse.
- ✚ La fosfatidiletanolamina (PE) è detta di “tipo II” e induce una curvatura negativa.
- ✚ La fosfatidilcolina (PC) è cilindrica ed è detta di “tipo 0” dato che non induce curvature.
- ✚ La liso-fosfatidilcolina, “tipo I”, conferisce una curvatura positiva alle membrane.



<http://www.samueelfurse.com/2011/12/curvy-biology/>

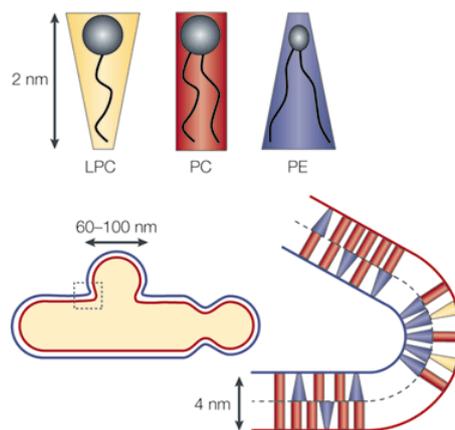
Curvatura nelle membrane - 2



Curvatura nelle membrane. (a) Cellula di carcinoma prostatico illustrando la normale curvatura di tutte le membrane. (b) Doppio strato solo di **fosfatidilcolina**, mostrando che questo lipide non può formare una superficie curva dato che questo comporterebbe la presenza di **spazi vuoti** tra i lipidi. (c) L'inserimento di lipidi a forma conica in un bilayer di PC permette che i due strati producano una superficie curva senza la presenza di zone vuote.

<http://www.samuelefurse.com/2011/12/curvy-biology/>

La conformazione molecolare dei lipidi determina le proprietà fisiche delle membrane (1)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

http://www.nature.com/nrm/journal/v2/n7/images/nrm0701_504a_f5.gif

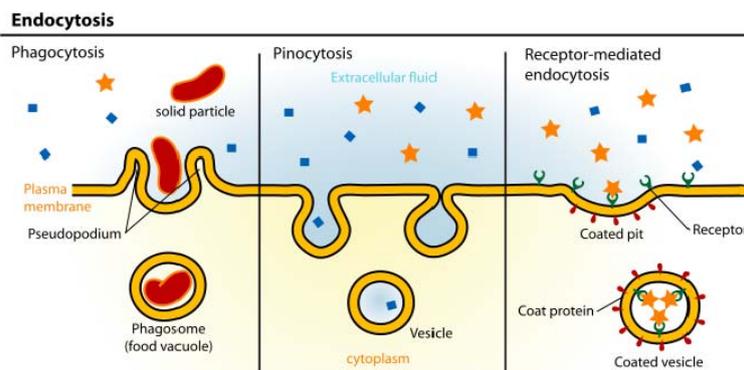
Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. **How proteins move lipids and lipids move proteins.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):504-13.

La conformazione molecolare dei lipidi determina le proprietà fisiche delle membrane (2)

- La forma dei lipidi di membrane dipende dalle **dimensioni relative delle loro teste polari e delle code apolari**. Quando il gruppo di testa e l'impalcatura lipidica hanno **aree delle sezioni trasversali simili**, la molecola ha una **forma cilindrica** (PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina).
- I lipidi con **gruppi di testa piccoli**, come la fosfatidiletanolamina (PE) hanno **forma conica**.
- Viceversa, **quando la componente idrofobica occupa un'area superficiale relativamente piccola**, la molecola ha la forma di un **cono invertito** (LPC: lisofosfatidilcolina e in minor parte anche la sfingomieline).
- Questo **polimorfismo lipidico** probabilmente ha un ruolo fisiologico nella generazione di **curvature**, come avviene nella formazione di vescicole lipidiche o durante la fusione di membrane.

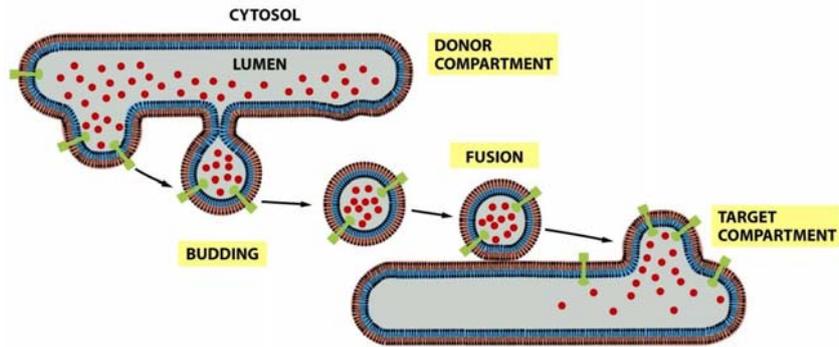
Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. **How proteins move lipids and lipids move proteins**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):504-13.

Esempi di formazione di vescicole Endocitosi



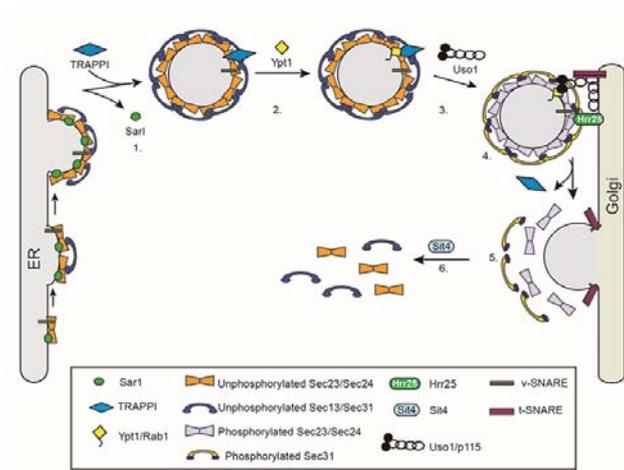
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1a/Endocytosis_types.svg/672px-Endocytosis_types.svg.png

Esempi di formazione di vescicole Traffico di vescicole nel Golgi (1)



<https://s3.amazonaws.com/classconnection/315/flashcards/5907315/jpg/top-14A372A2EB665A80B5D.jpg>

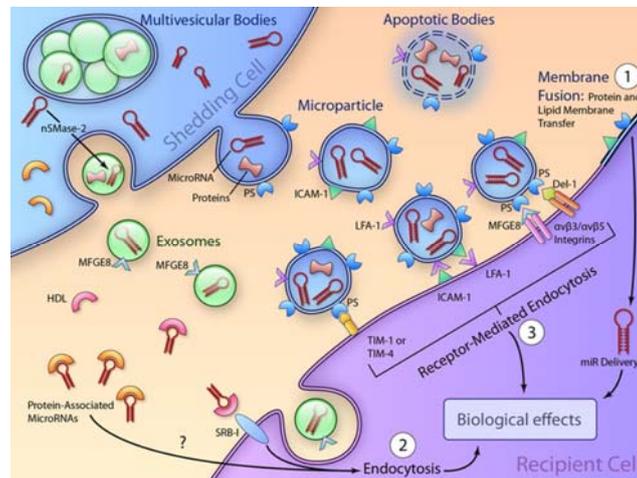
Esempi di formazione di vescicole Traffico di vescicole nel Golgi (2)



<http://www.hhmi.org/sites/default/files/Our%20Scientists/Investigators/FerroNovick-fig2.jpg>

Esempi di formazione di vescicole Microvescicole extracellulari

[trattato capitolo microvescicole]

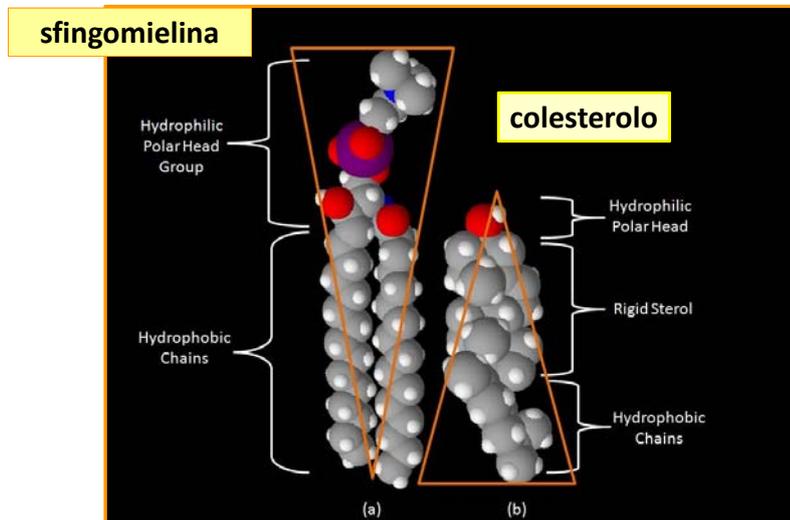


<http://circres.ahajournals.org/content/114/2/345/F1.large.jpg>

La conformazione molecolare dei lipidi determina le proprietà fisiche delle membrane (3)

- ✚ La **superficie citosolica** della membrane plasmatica contiene **40% di fosfatidiletanolamina (PE)**, **60% di fosfatidilserina più fosfatidilcolina (PS+PC)** mentre il **foglietto rivolto verso l'ambiente esterno** contiene **60% di PC**, **30% di SM** e **10% di PE**. La PE, di per se adotta una fase esagonale, e questa tendenza probabilmente favorisce l'invaginazione della membrana.
- ✚ La gemmazione in direzione opposta, verso il lume degli endosomi, può richiedere **acido lisobisfosfatidico**, un cono invertito, sulla superficie luminale, e fosfatidilinositolo-3-fosfato.
- ✚ Il colesterolo è richiesto per la gemmazione delle vescicole sinaptiche che hanno un'elevata curvatura (40-50 nm di diametro).
- ✚ Il colesterolo insieme alla sfingomieline sono inoltre importanti per stabilizzare le membrane durante la fusione, e la fosfatidiletanolamina stimola moltissimo l'efficienza di fusione.

Modelli “space-filling” della sfingomieline (a) e del colesterolo (b)



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Space-filling_Model_Sphingomyelin_and_Cholesterol.jpg

Domini lipidici

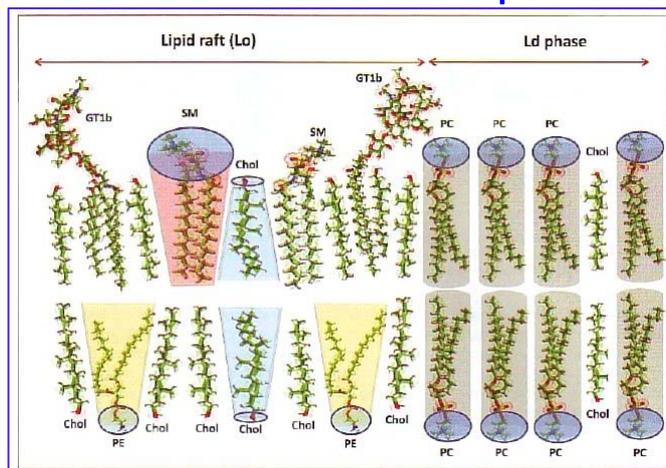
- ✚ In una miscela di sfingolipidi e di glicerofosfolipidi, il colesterolo può **indurre immiscibilità fluido-fluido** che provoca una segregazione laterale in due o più fasi fluide.
- ✚ Il colesterolo interagisce con gli sfingolipidi del foglietto esterno e con la **fosfatidilserina disatura** nel foglietto citoplasmatico.
- ✚ Le **fasi arricchite in colesterolo** hanno una struttura più ordinata e sono designate “**liquido ordinato**” (l_o) in opposizione a “liquido disordinato”.
- ✚ Due domini di composizioni differenti possono essere distanziati da $1 \mu\text{m}$, oppure un dominio può essere sovrapposto all’altro, oppure formare un cerchio attorno ad esso.

Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. **How proteins move lipids and lipids move proteins**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):504-13.

Colesterolo & curvatura delle membrane

- Il **colesterolo** è stato paragonato alla malta cementizia che **mantiene in posizione verticale i lipidi conici**, che altrimenti indurrebbero una forte curvatura nella membrana che provocherebbe la formazione di micelle.
- La presenza di colesterolo inoltre **impedisce agli sfingolipidi di formare una struttura di tipo gel**, stabilizzata da interazioni di van der Waals fra le loro catene apolari.
- La **struttura di tipo gel degli sfingolipidi viene descritta come $L\beta$** , ma in presenza di colesterolo questa fase $L\beta$ si trasforma in una fase molto più fluida detta fase «**liquid-ordered**» (**Lo**).
- Viceversa, le regioni ricche in fosfatidilcolina PC della gran massa di lipidi formano, in presenza di piccole quantità di colesterolo, una fase **liquida** «**crystalline-disordered**» (**Ld**).
- Quindi, **la fase Ld contiene meno colesterolo della fase Lo**.

Schema di domini ricchi o poveri in colesterolo della membrana plasmatica



N.B. Diverse conformazioni del colesterolo nei due tipi di domini

Organizzazione dei lipidi nella membrana plasmatica: modello semplificato basato sulla forma teorica dei lipidi di membrana.

Fantini & Yahi, 2015

Domini di tipo «lipid rafts» - 1

[approfonditi capitolo «rafts»]

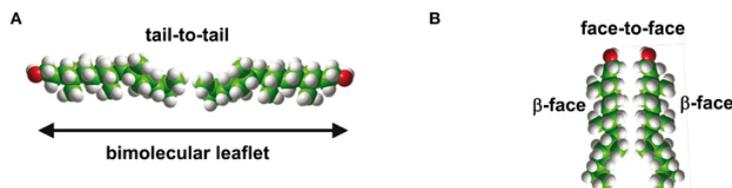
- ✚ Nel foglietto rivolto verso l'esterno della cellula i domini «rafts» contengono un elevato livello di colesterolo insieme sfingolipidi (sfingomieline + glicosfingolipidi).
- ✚ Tali sfingolipidi non si trovano nel foglietto citoplasmatico.
- ✚ Ciò nonostante, il foglietto citoplasmatico è molto ricco in fosfatidiletanolamina (PE) che, come il colesterolo, ha una forma rastremata.
- ✚ Probabilmente nel foglietto citosolico il colesterolo riempie gli spazi fra le molecole di PE.

Fantini & Yahi, 2015

Domini di tipo «lipid rafts» - 2

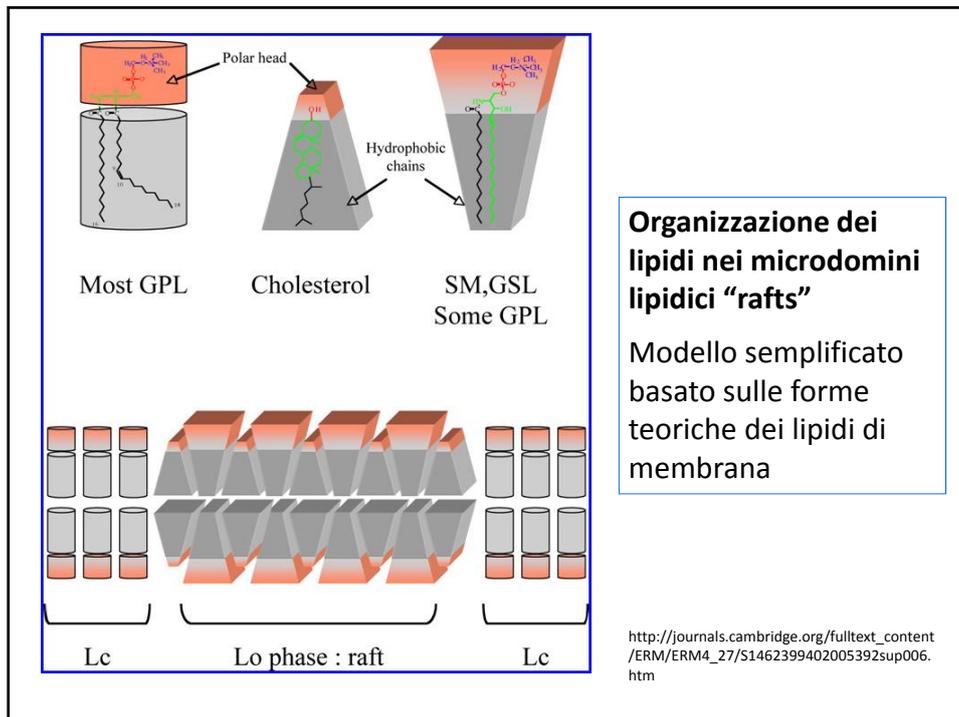
[approfonditi lezioni successive]

- ✚ **Dimeri transmembrana** coda-verso-coda di **colesterolo** sono stati osservati in modelli di membrana.
- ✚ Probabilmente tali dimeri transmembrana di colesterolo sono presenti anche nelle membrane naturali, collaborando a stabilizzare gli assemblamenti di «rafts» lipidici.
- ✚ Alla **periferia dei «rafts»** la presenza di colesterolo potrebbe smorzare la transizione tra le fasi Lo e Ld, evitando il contatto diretto tra gli sfingolipidi e le molecole di PC.



<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2013.00031/full>

Fantini & Yahi, 2015



Modello del mosaico fluido

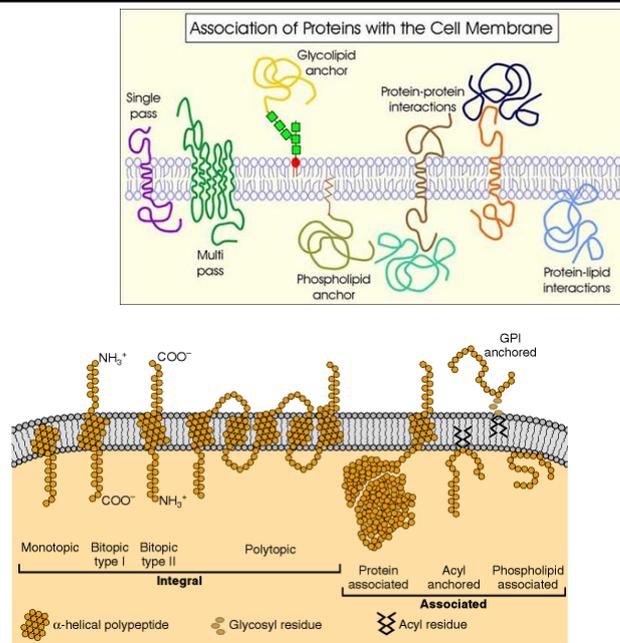
- ✚ Le molecole biologiche consistono di proteine inserite in un doppio strato lipidico.
- ✚ Le **proteine integrali di membrana** sono inserite nella membrana, di solito tramite regioni ad α -elica con 20-25 aminoacidi idrofobici.
- ✚ Alcune proteine transmembrana **attraversano la membrana solo una volta**, altre hanno **diverse regioni che attraversano la membrana**.
- ✚ Altre proteine sono **ancorate alla membrana** mediante lipidi che sono legati covalentemente alla catena polipeptidica.
 - Queste proteine della membrana plasmatica possono essere ancorate alla **faccia extracellulare** mediante **glicolipidi** e alla **faccia citosolica** mediante **acidi grassi** o **gruppi prenili**.
- ✚ Le **proteine periferiche** non sono inserite nella membrana ma sono collegate mediante interazioni con proteine integrali di membrana.

Versione aggiornata del modello del mosaico fluido - 1

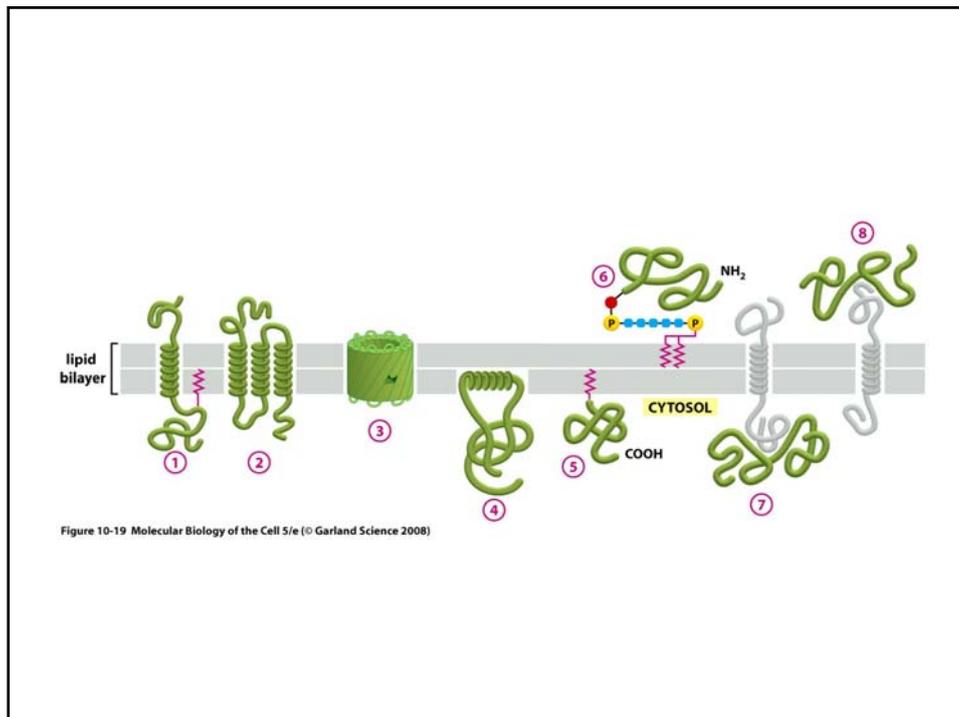
1. Elevata densità di proteine associate all'impalcatura lipidica.
2. Interazioni proteina-membrana che vanno da molto forti a molto deboli.
3. Eterogeneità laterale tra lipidi e proteine.
4. Lipidi in grado di attraversare il bilayer.
5. Proteine integrali che hanno soltanto un piccolo segmento inserito nel bilayer.
6. Proteine di membrana che interagiscono con altre proteine di membrana.
7. Spessore del bilayer in costante fluttuazione.
8. Alcune proteine integrali che fortemente favoriscono certi lipidi come "lipidi di collegamento" rispetto ad altri.

Krause MR, Regen SL. **The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts.** *Acc Chem Res.* 2014 Dec 16;47(12):3512-21.

Proteine di membrana



<http://www.nfcdsystems.com/w3bio315/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28193/figure/A105/2report-objectonly>

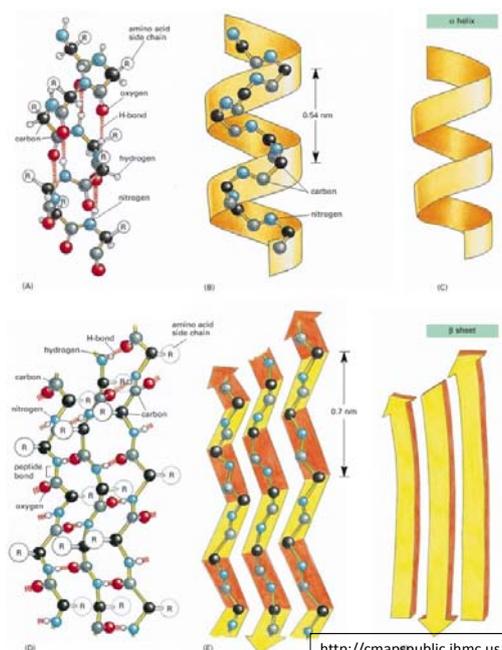


Le proteine interagiscono con le membrane in tre modi diversi

- ✚ In base alla loro posizione rispetto alla membrana:
 - Integrali
 - Ancorate a lipidi
 - Periferiche

Nella maggior parte delle proteine transmembrana la catena polipeptidica attraversa il doppio strato lipidico in conformazione ad α -elica (1)

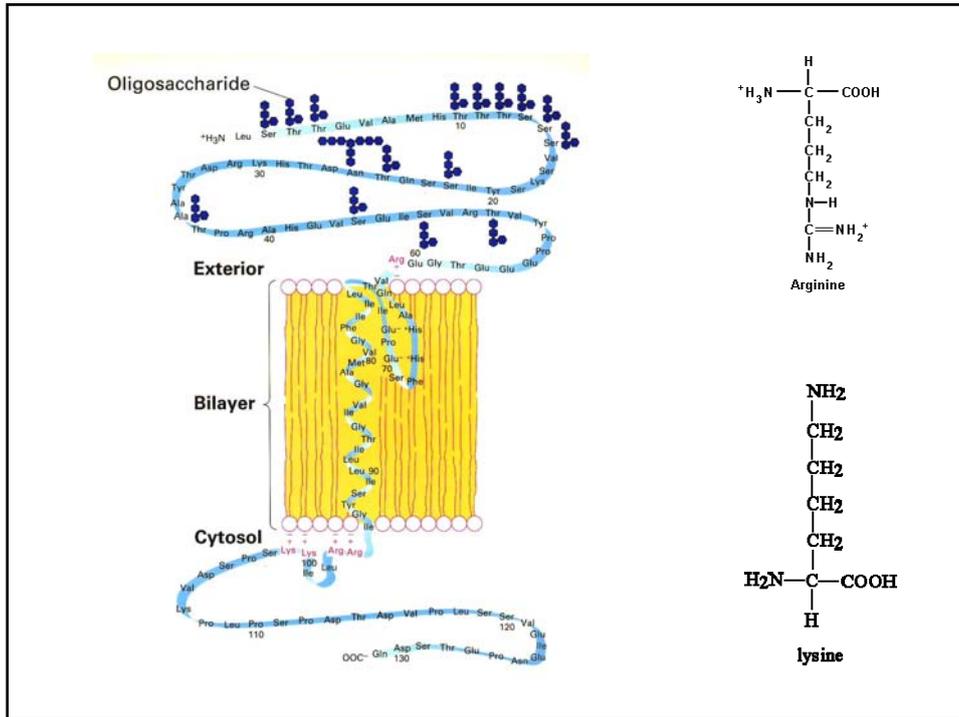
- Una proteina transmembrana ha sempre un orientamento caratteristico nella membrana.
- Questo riflette il **modo** asimmetrico con cui è **sintetizzata** ed **inserita nel doppio strato** nel **Reticolo Endoplasmatico ruvido** e le **diverse funzioni dei suoi domini citosolici e non-citosolici**.
- Questi **domini** sono separati da **segmenti della catena polipeptidica che attraversano la membrana**, che sono in contatto con l'ambiente idrofobico del doppio strato lipidico e **sono composti in gran parte di residui di aminoacidi con catene laterali non polari**.



Le **α -eliche** e i **β -foglietti** della struttura secondaria delle proteine sono basati sulla **formazione di legami di idrogeno fra gli atomi del legame peptidico** che è **polare**.

Se sono coinvolti nella formazione di **legami di idrogeno** gli atomi dei legami peptidici coinvolti nei legami non sono più in grado di interagire con l'acqua, ossia **diventano molto meno polari**, e sono quindi compatibili con l'ambiente idrofobico delle membrane.

http://cmapspublic.ihmc.us/rid=1L6GWCOFZ-1KXJ2GP-1X4G/struttura_secondaria.jpg



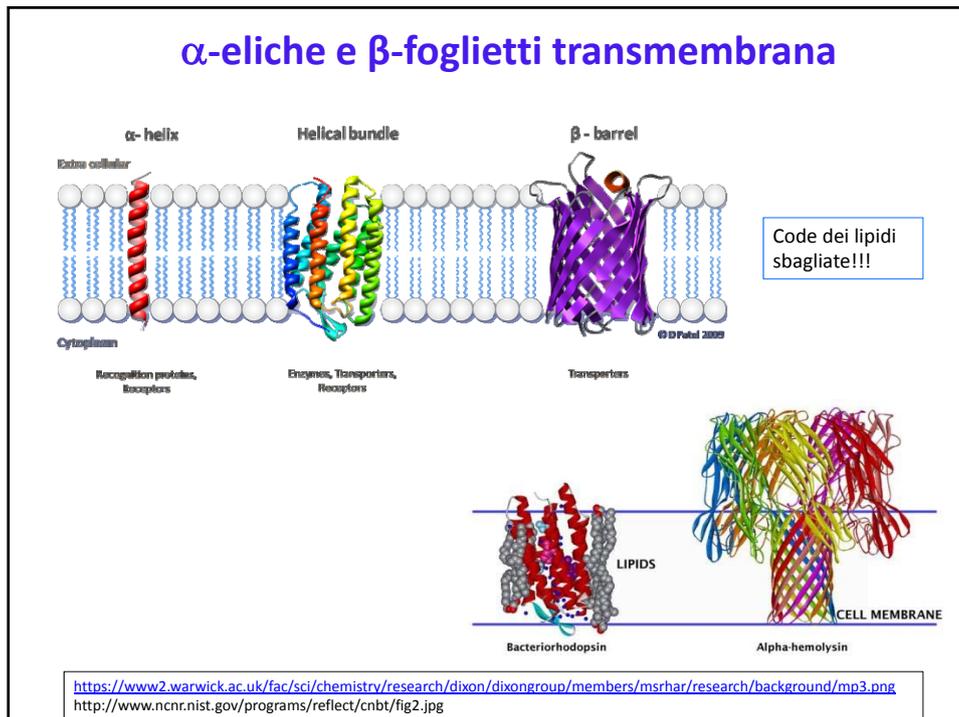
... ma anche i β -foglietti si adattano all'attraversamento della membrana

The image shows several structural models of beta-barrel proteins embedded in a lipid bilayer. The proteins are labeled as PhoE, ScrY, BtuB, FhuA, OmpA, OmpT, NalP, OmPIA, and FadL. Each model shows the protein's beta-barrel structure spanning the membrane. A legend on the left indicates the orientation of the protein, with a diamond shape representing the N-terminus and a circle representing the C-terminus. The proteins are shown in various orientations, demonstrating their ability to adapt to the membrane environment.

I β -foglietti possono formare β -barili

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fb/Sucrose_porin_1a0s.png

http://www.membranproteine.de/Betabarrels2004_100dpi.gif



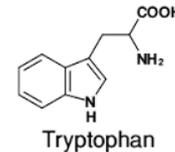
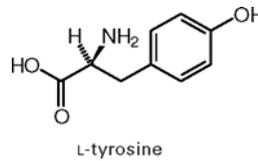
Proteine integrali di membrana - 1

- ✚ I domini transmembrana attraversano il bilayer lipidico assicurando l'inserimento di un sottoinsieme di residui di aminoacidi all'interno della membrana.
- ✚ Fondamentalmente, il **dominio transmembrana** è un segmento ad α-elica con circa **20-25 residui aminoacidici apolari** affiancati da **residui più polari** che «galleggiano» nelle interfacce lipide-acqua della membrana e quindi stabilizzano l'elica nella membrana.

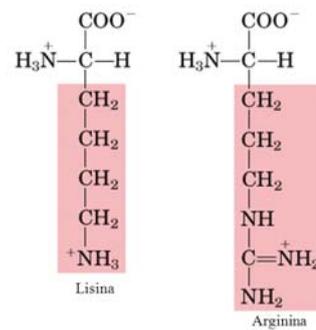
Fantini J, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. Front Physiol. 2013 Feb 28;4:31.

Proteine integrali di membrana - 2

- I residui aminoacidici dell'**interfaccia** devono gestire la **transizione fra un ambiente apolare e un ambiente polare**.



- Per questa ragione, si trovano frequentemente residui di **lisina** (Lys), **arginina** (Arg), **tirosina** (Tyr), e **triptofano** (Trp) in queste regioni di transizione.



Fantini J, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. Front Physiol. 2013 Feb 28;4:31.



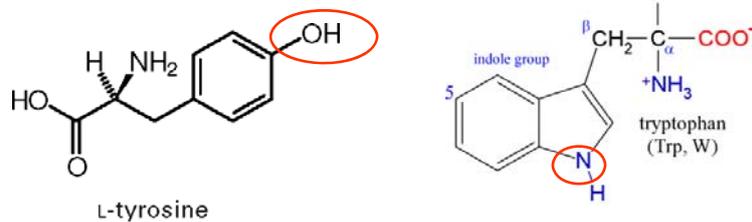
Proteine integrali di membrana - 3

- La **lisina** e l'**arginina** hanno una **lunga catena apolare sepolta nella sezione apolare della membrana** e **un gruppo basico polare che «respira» alla superficie della membrana**.
- Questa topologia unica e il suo riscontro funzionale sono descritti metaforicamente come effetto **«snorkeling»**.

Fantini J, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. Front Physiol. 2013 Feb 28;4:31.

Proteine integrali di membrana - 4

- Per lo stesso motivo, il **triptofano** e la **tirosina** hanno una **struttura aromatica compatibile con la regione apolare della membrana** ma contengono un **gruppo –OH** (tirosina) o un **atomo di N** (triptofano) in grado di formare **legami di idrogeno con i gruppi polari**.

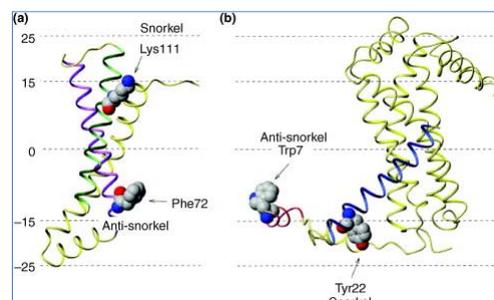


Fantini J, Barrantes FJ. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front Physiol.* 2013 Feb 28;4:31.

- I residui come la lisina, arginina, triptofano e tirosina nelle eliche transmembrana (TM) spesso estendono le loro catene laterali perpendicolarmente al bilayer della membrana: “**snorkeling effect**”.
- Viceversa, la **fenilalanina** delle regioni TM tende a piegarsi all’indietro, in modo tale che l’anello aromatico si inserisca nella regione idrofobica della membrana: “**anti-snorkeling effect**”.
- Tuttavia, nella regione dell’interfaccia membrana-acqua, le catene laterali del triptofano e della tirosina hanno un orientamento opposto e tendono a puntare verso l’interno della membrana, in questo modo **cambiando il “snorkeling” in “anti-snorkeling”**.



«Snorkeling» e «antisnorkeling» nelle proteine di membrana



Liang J, Adamian L, Jackups R Jr. The membrane-water interface region of membrane proteins: structural bias and the anti-snorkeling effect. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jul;30(7):355-7