

# Estructura y propiedades de las membranas



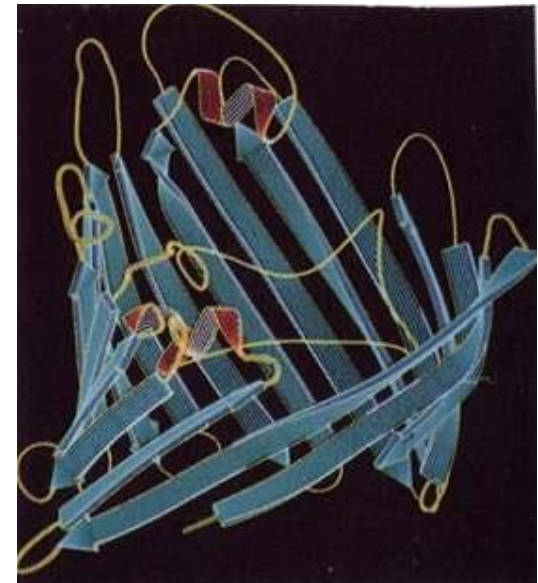
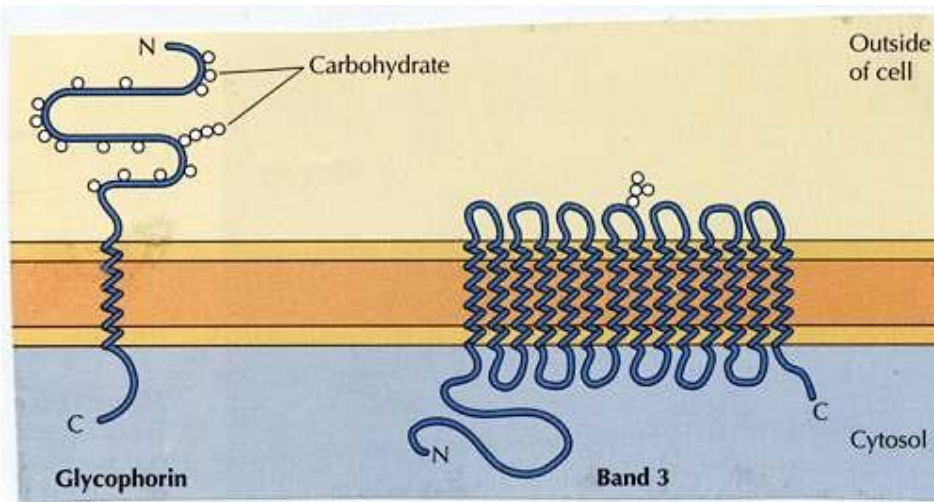
---

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

- Continuación componentes de membrana: proteínas (perfil de hidropatía)
- Modelos de membrana
- Propiedades de la membrana:
  - A) Fluída
  - B) Asimétrica
- Solubilización de proteínas de membrana

# Proteínas de membrana

Pero también pueden formar barriles con hojas beta. Los aminoácidos polares se encuentran en la zona central del canal, mientras que los no polares se encuentran expuestos hacia la región no polar de los lípidos de la bicapa.



**Porin monomer**

## Localización de la hélice transmembranal:

# Gráfico de hidropatía.

- Se puede tener una predicción del número de hélices transmembranales de una proteína.
- Se necesitan al menos 20 residuos de aminoácidos para hacer una hélice que cruce la parte hidrofóbica de la membrana.
- No predice si la proteínas que se encuentran embebidas en la membrana formando hojas  $\beta$ -plegadas.
- Ayuda a conocer cuáles son las zonas antigénicas de una proteína (**zonas discretas hidrofílicas**)



# TMH (“transmembrane helices”)

---

- Características distintivas de las regiones hidrofóbicas y polares de la proteína:
  1. TMH son predominantemente apolares y entre 12 a 35 residuos de largo.
  2. Las regiones globulares entre las TMH son típicamente pequeñas no más de 60 residuos.
  3. Muchas de las TMH tienen una distribución específica: *regla positivo adentro*.

# Positive inside rule

Los componentes membranales se encuentran preferentemente cargados **positivamente** en el lado citoplásmico y son ligeramente más negativos en la cara que ve al exterior celular.

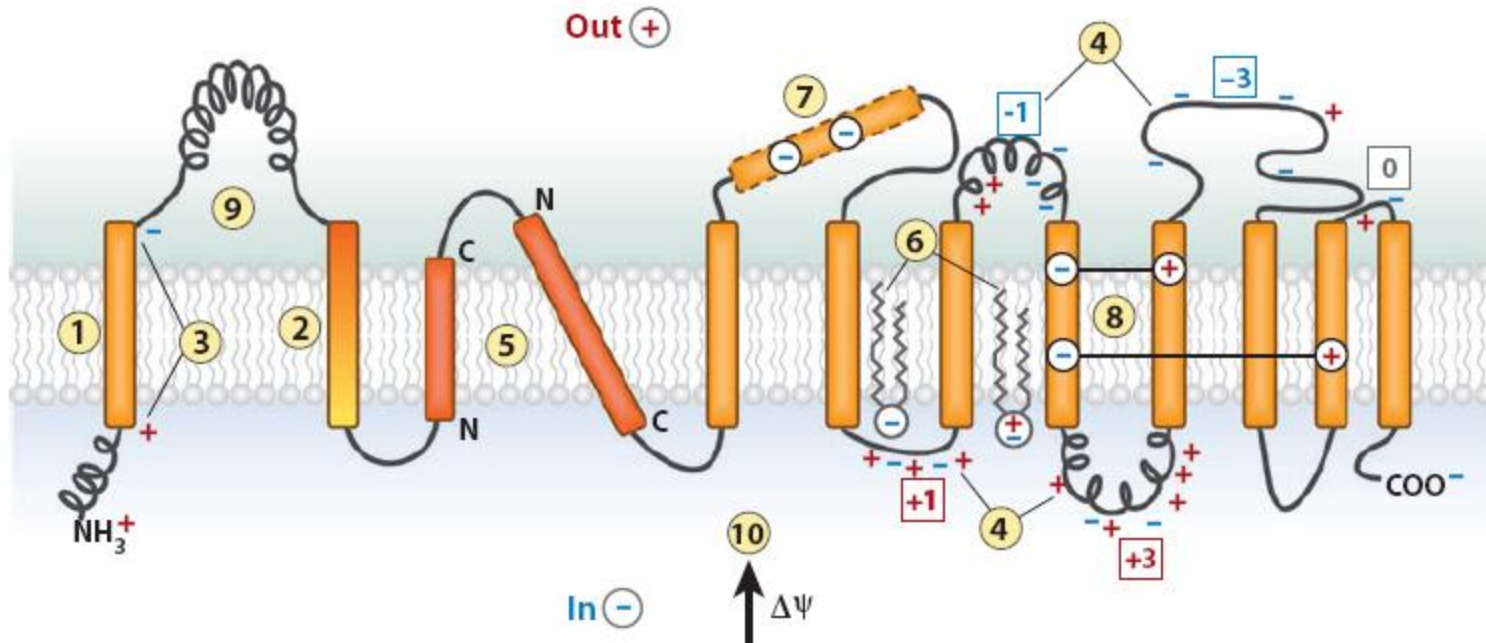
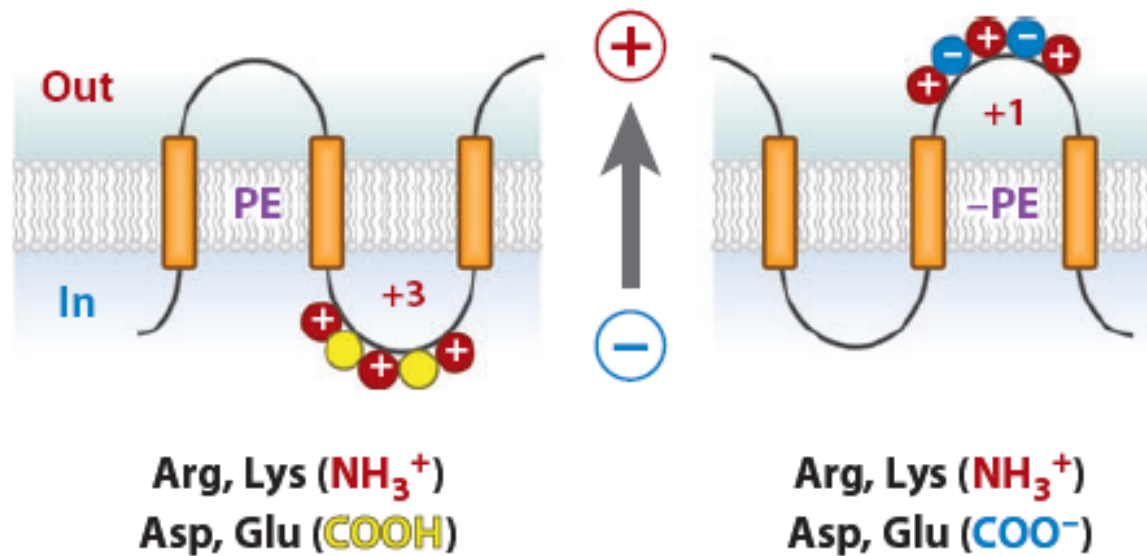


Figure 2

The features of polytopic membrane proteins and biological membranes that determine folding and final transmembrane domain (TM) topology. TM integration is driven by (1) the hydrophobicity of TMs, and initial orientation is influenced by (2) the hydrophobic gradient (highest outward) along a TM, (3) the charge difference or (4) the positive-inside rule, (5) preferential orientation of highly hydrophobic TMs with the C terminus out if short and the N terminus out if long. After exit from the translocon, (6) final topology is influenced by lipid headgroup-protein charge interactions. During protein folding, interactions between TMs can stabilize (7) a domain containing charged residues as (8) a TM by compensating salt bridges. (9) A rapidly folding extramembrane domain can prevent reorientation of TMs during late folding events. (10) The positive outward membrane potential favors translocation of net negative domains and retention of net positive domains.



**Figure 6**

Phosphatidylethanolamine (PE) and the positive-inside rule. (*left*) A cytoplasmic domain is shown containing a mixture of negative and positive amino acids. PE is shown to suppress or neutralize the presence of negative residues (*yellow*), which increases the effective positive charge potential, thus favoring retention on the cytoplasmic side of the membrane. (*right*) In the absence of PE, negative residues exert their full potential and result in translocation of a domain that exhibits a lower effective net positive charge. The proton motive force (*arrow*) positive outward determines domain directional movement depending on the domain effective charge. Postassembly addition of PE changes the effective net charge of these domains and favors reorientation.



# Continúa...

---

4. Regiones globulares mayores de 60 residuos difieren en su composición de aquellas regiones globulares que siguen la regla “inside positive”.



# Predicción de hidropatía

---

- Representación numérica de la tendencia de cada residuo de aminoácido para entrar en un ambiente no- polar. Una secuencia de una proteína se explora de manera lineal, aminoácido por aminoácido pero tomando una ventana o intervalo de 9 aminoácidos.
- El promedio de los valores de hidropatía de cada ventana se analiza y se obtienen las regiones con una mayor tendencia a encontrarse en un ambiente no polar.

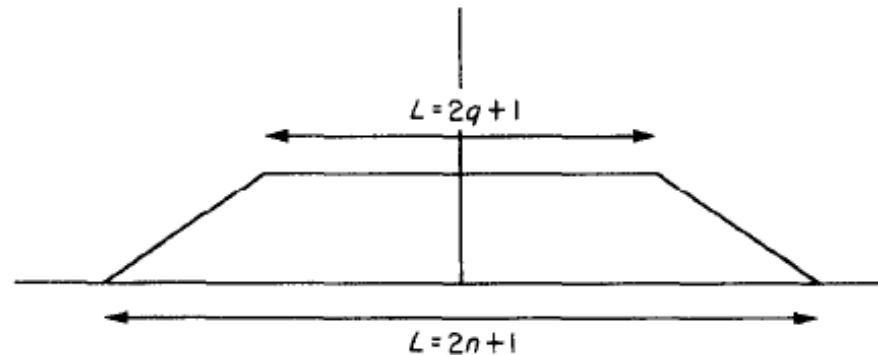
**J. Kyte & R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157, 105-132 (1982).**



## Membrane Protein Structure Prediction

### Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule

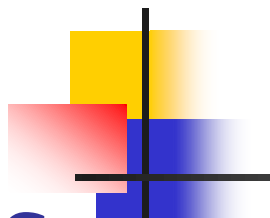
Gunnar von Heijne



**Figure 1.** Sliding window used in the hydrophobicity analysis. For a given window-position, the hydrophobicity value  $h_i$  for each residue in the window is multiplied by the corresponding window-weight,  $w_i$ , and the sum over the window is taken.  $w_i$  is given by  $w_i = \{i/S$  for  $1 \leq i \leq n - q + 1$ ;  $(n - q + 1)/S$  for  $(n - q + 1) < i < (n + q + 1)$ ;  $(2n + 2 - i)/S$  for  $(n + q + 1) \leq i \leq 2n + 1\}$ , where  $S = (1 + n)^2 - q^2$  is a normalization factor to make.

$$\sum_{i=1}^{2n+1} w_i = 1$$

In the calculations reported here,  $n = 10$  and  $q = 5$ .



Se puede predecir  
a partir de la  
secuencia de aa las  
hélices  
transmembranales

| <b>Amino acid</b> | <b>Hydrophobicity</b> |
|-------------------|-----------------------|
| Isoleucine        | 3.46                  |
| Leucine           | 2.56                  |
| Valine            | 2.46                  |
| Alanine           | 1.73                  |
| Phenylalanine     | 1.48                  |
| Glycine           | 1.27                  |
| Methionine        | 0.86                  |
| Cysteine          | 0.84                  |
| Tryptophan        | 0.74                  |
| Tyrosine          | 0.59                  |
| Threonine         | 0.59                  |
| Serine            | 0.49                  |
| Proline           | 0.18                  |
| Histidine         | 0.06                  |
| Glutamate         | 0.03                  |
| Glutamine         | 0.03                  |
| Aspartate         | 0.03                  |
| Asparagine        | 0.01                  |
| Lysine            | 0.01                  |
| Arginine          | 0.0                   |

Amino acids are ranked according to their fold enrichment in single-span transmembrane segments relative to the amino acid composition of the same population of membrane proteins. The most preferred residues are at the top, the least preferred are at the bottom. A value of 1.00 indicates no enrichment

MPEXFile MPEXView MPEXToolBox MPEXTotalizer MPEXWindow MPEXHelp

**Membrane Protein Explorer**

List Buffers Save to Buffer 0 saved buffers Load # Delete # Comment #

Move Cursor With Mouse OR Arrow Keys. Cursor is at:

Hydropathy Analysis |  $\beta$ -Barrel Analysis | Buffer Overlays

Sequence Description: Loaded from buffer: 0

Hydropathy (kcal/mol)

Residue Number

Legend:  
Hydropathy  
Smoothed Hydropathy  
Predicted Segments  
Known TM Segments

### Hydropathy Plot Parameters

Scale:  
Partitioning:  
Residue at Cursor:  
 $\Delta G$  for Window:

Send Cursor To:

Select Wimley-White Scale:  
 Interfacial (IF)  Octanol (Oct)  
 Oct-IF

Plot Visibility  
 HF Moment

Select Mode:  
 Locate  Scan

Set Window Length:

Residues in Window:

Send To Totalizer

Set Salt Bridges

Change Charge:

Change Residue To:

Restore Changed Residues



# Diversos métodos pueden ser empleados

---

*J. Nilsson et al./FEBS Letters 486 (2000) 267–269*

Table 1

Fraction of correctly predicted topologies over the test set of 60 proteins for the five methods used in this study

| Method  | Fraction correct predictions |
|---------|------------------------------|
| TMHMM   | 0.72                         |
| HMMTOP  | 0.73                         |
| MEMSAT  | 0.67                         |
| TOPPRED | 0.60                         |
| PHD     | 0.48                         |

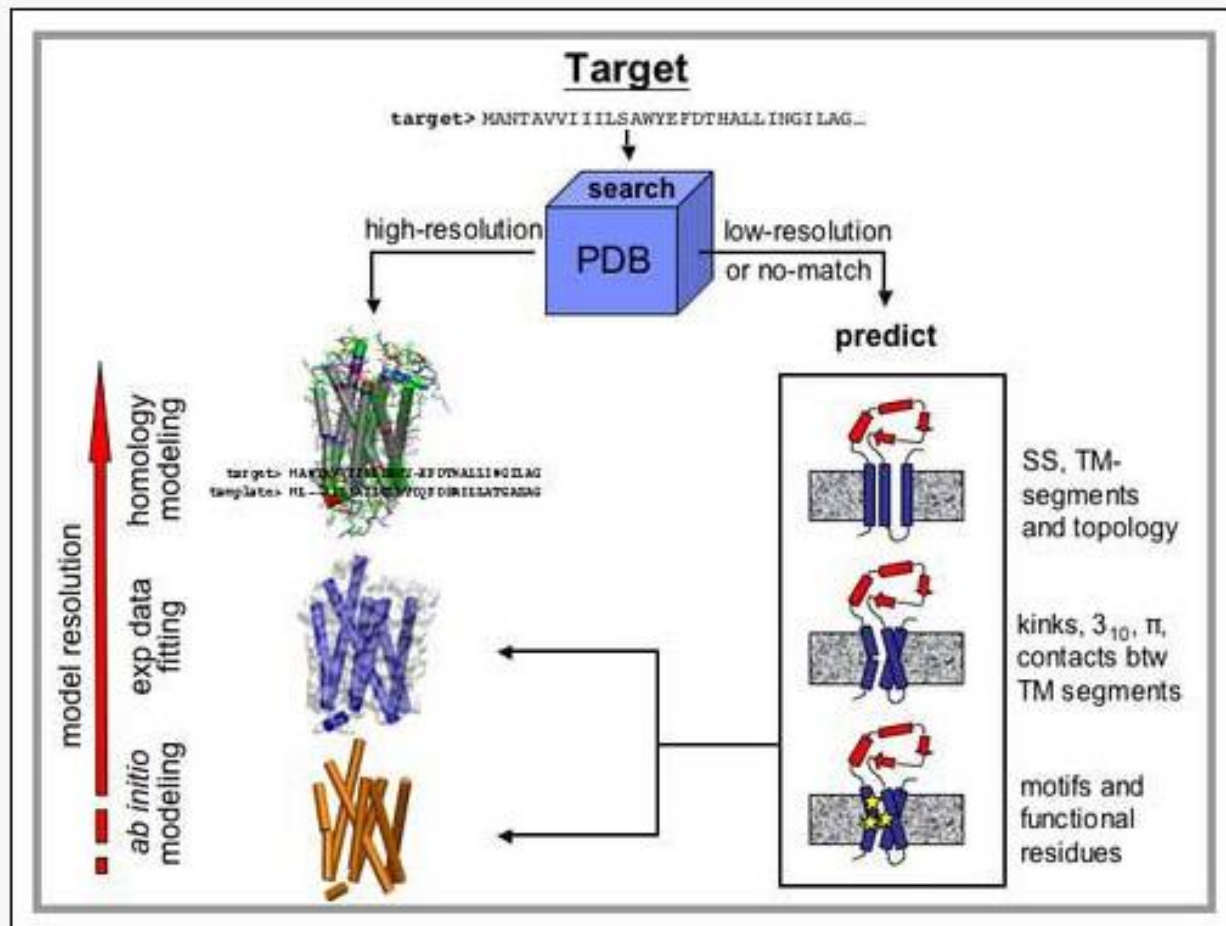


Fig. 1 Predicting structure and function for a protein experimentally known to be an IMP.

**Table 1**

Membrane proteins databases.

| Database                                  | Description/URL   |
|---|---|
| <i>GPCRDB (29), KchannelDB and others</i> | Several receptor databases <a href="http://www.receptors.org">http://www.receptors.org</a>  |
| <i>OPM (26)</i>                           | Database reporting predictions for the orientation of IMPs within the membrane <a href="http://opm.phar.umich.edu/">http://opm.phar.umich.edu/</a>                            |
| <i>PDB_TM (94)</i>                        | Database of known membrane protein structures <a href="http://pdbtm.enzim.hu/">http://pdbtm.enzim.hu/</a>   |
| <i>MPtopo (24)</i>                        | Database of experimentally-determined protein topologies <a href="http://blanco.biomol.uci.edu/mptopo/">http://blanco.biomol.uci.edu/mptopo/</a>                              |
| <i>Stephen White's database</i>           | Database of known membrane protein structures <a href="http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html">http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html</a> |
| <i>PRNDS (30)</i>                         | Database of porins <a href="http://gene.tn.nic.in/PRNDS">http://gene.tn.nic.in/PRNDS</a>  |
| <i>TCDB (28)</i>                          | Transport classification database <a href="http://www.tcdb.org/">http://www.tcdb.org/</a>   |
| <i>TMDET (27)</i>                         | Web server for predicting the orientation of a query membrane protein structure <a href="http://www.enzim.hu/TMDET">http://www.enzim.hu/TMDET</a>                             |

\*Methods in this and in the following Tables are listed in alphabetical order.

Methods. Author manuscript; available in PMC 2007 July 30.

Published in final edited form as:

[Methods. 2007 April; 41\(4\): 460–474.](#)

Recommended TMH prediction methods.\*

| Method                   | URL   | Service           |
|--------------------------|---|-------------------|
| <i>DAS-TMfilter</i> (82) | <a href="http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html">http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html</a>   | PR2, WP           |
| <i>HMMTOP 2.0</i> (86)   | <a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/">http://www.enzim.hu/hmmtop/</a>   | PR3               |
| <i>MEMSAT3</i> (151)     | <a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>   | PR3               |
| <i>MINNOU</i> (152)      | <a href="http://minnou.cchmc.org/">http://minnou.cchmc.org/</a>   | PR2               |
| <i>OrienTM</i> (153)     | <a href="http://o2.biol.uoa.gr/orienTM/">http://o2.biol.uoa.gr/orienTM/</a>   | PR3               |
| <i>PHDhtm</i> (87)       | <a href="http://roslab.org/predictprotein/submit_adv.html">http://roslab.org/predictprotein/submit_adv.html</a>   | PR3, WP           |
| <i>Phobius</i> (101)     | <a href="http://phobius.cgb.ki.se/">http://phobius.cgb.ki.se/</a>   | PR3 + SP          |
| <i>SOSUI</i> (83)        | <a href="http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html">http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html</a>   | PR2               |
| <i>Split4</i> (88)       | <a href="http://split.pmfst.hr/split/4/">http://split.pmfst.hr/split/4/</a>   | PR2               |
| <i>THUMBU</i>            | <a href="http://phvyz4.med.buffalo.edu/service.htm">http://phvyz4.med.buffalo.edu/service.htm</a>   | PR2, WP           |
| <i>TMAP</i> (90)         | <a href="http://bioinfo.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html">http://bioinfo.limbo.ifm.liu.se/tmap/index.html</a>   | PR3               |
| <i>TMHMM</i> (84)        | <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a> , <a href="http://www.sbc.su.se/~erikgr/tmhmm/index.html">http://www.sbc.su.se/~erikgr/tmhmm/index.html</a> | PR3, WP, Database |
| <i>TOP-PRED</i> (154)    | <a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html</a>   | PR3               |

The methods in this Table are recommended either because they stood out in independent assessments or because otherwise interesting. PR2: two-state, TM/non-TM per-residue prediction. PR3: three-state TM/inside/outside per-residue prediction, i.e. implicitly a topology prediction. SP: N-terminal signal peptide prediction. WP: suitable for whole-proteome screening. Results are returned in seconds or minutes by most servers.

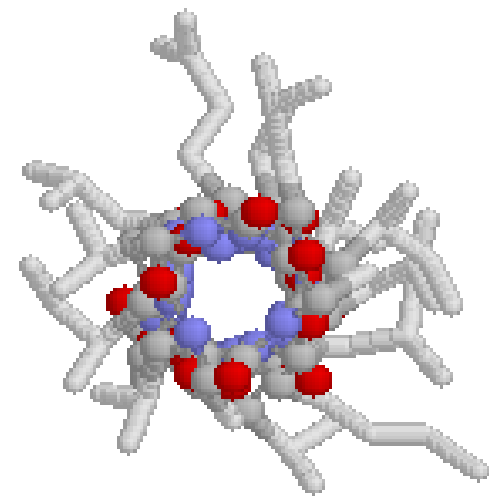
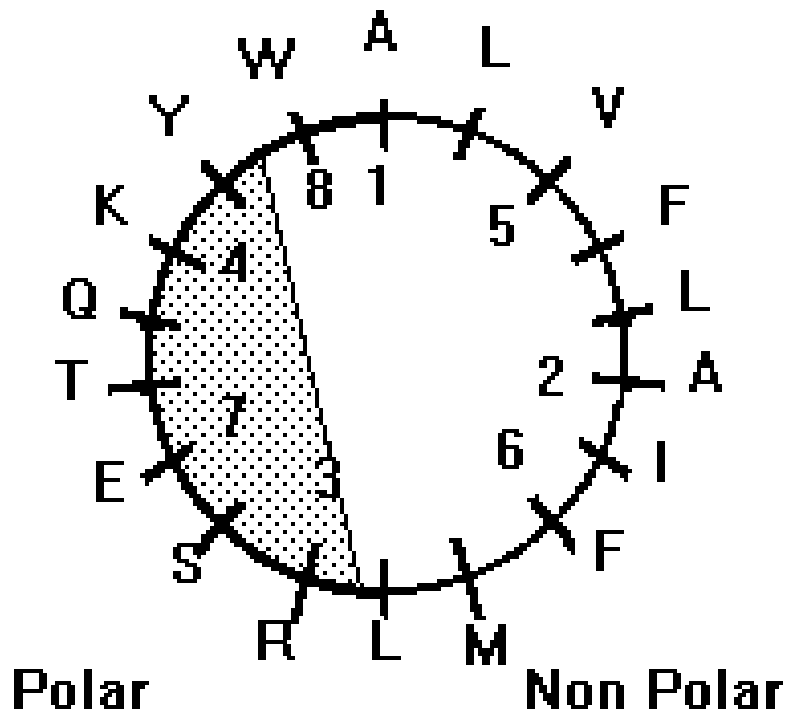
Methods. Author manuscript; available in PMC 2007 July 30.

Published in final edited form as:



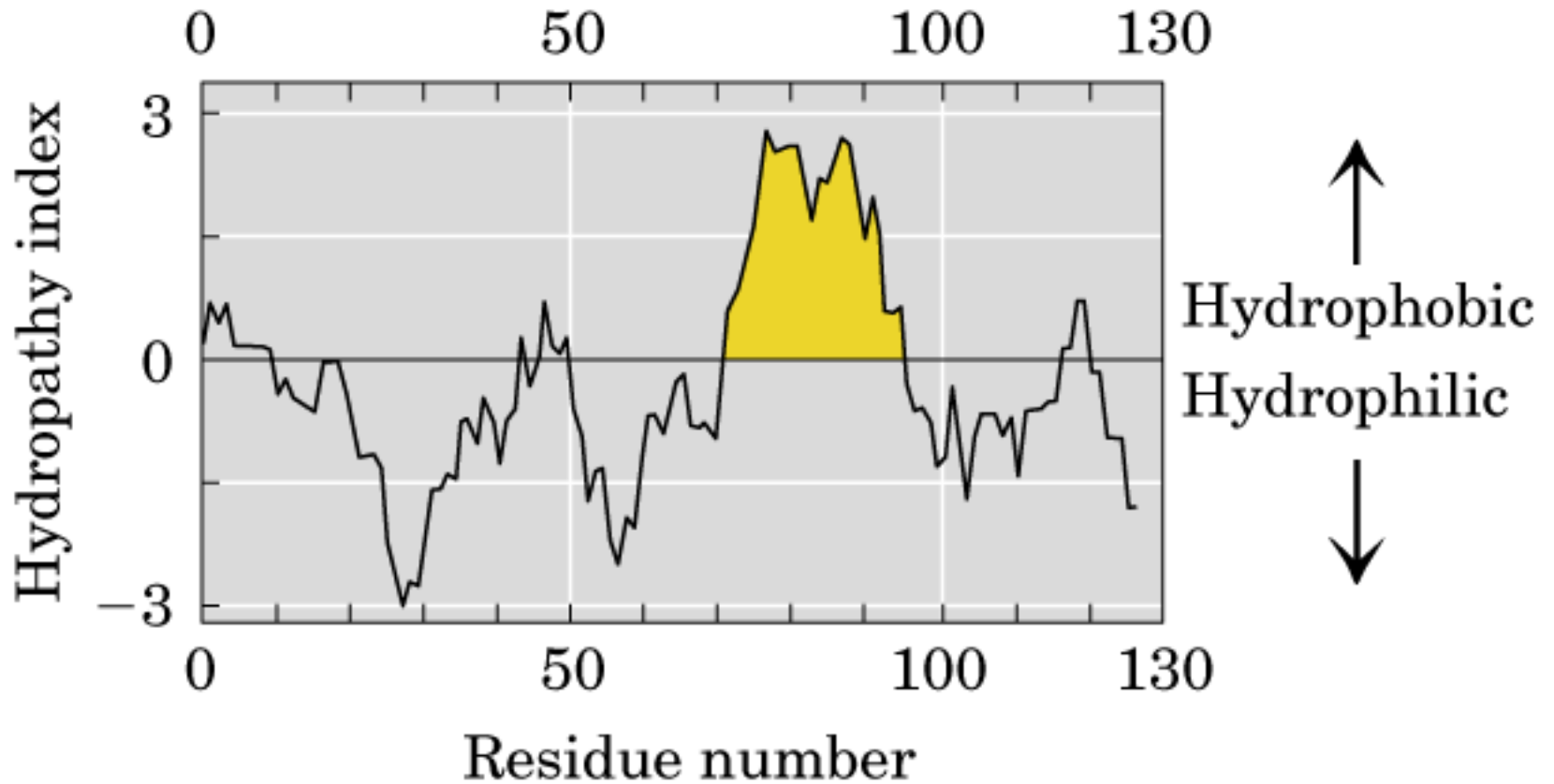
## Bacteriorhodopsin as a model polytopic protein.

---





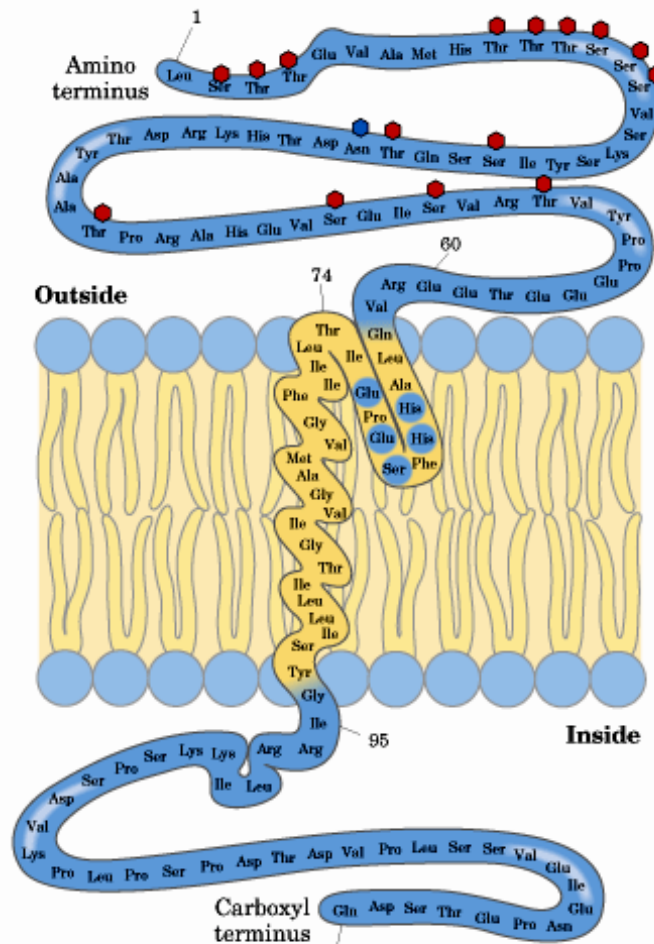
# Gráfico de hidropatía

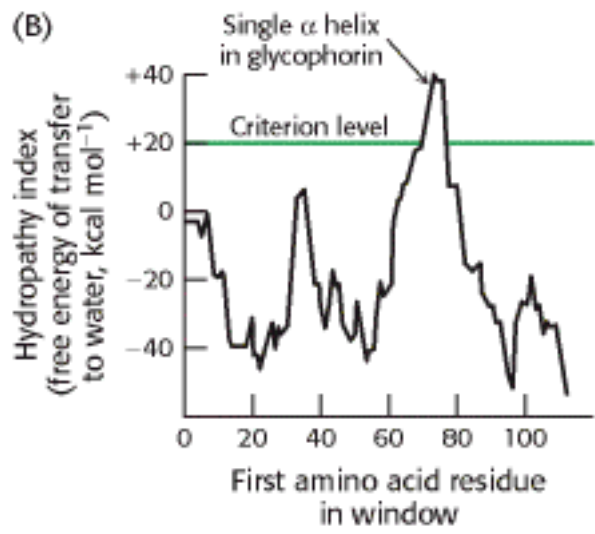
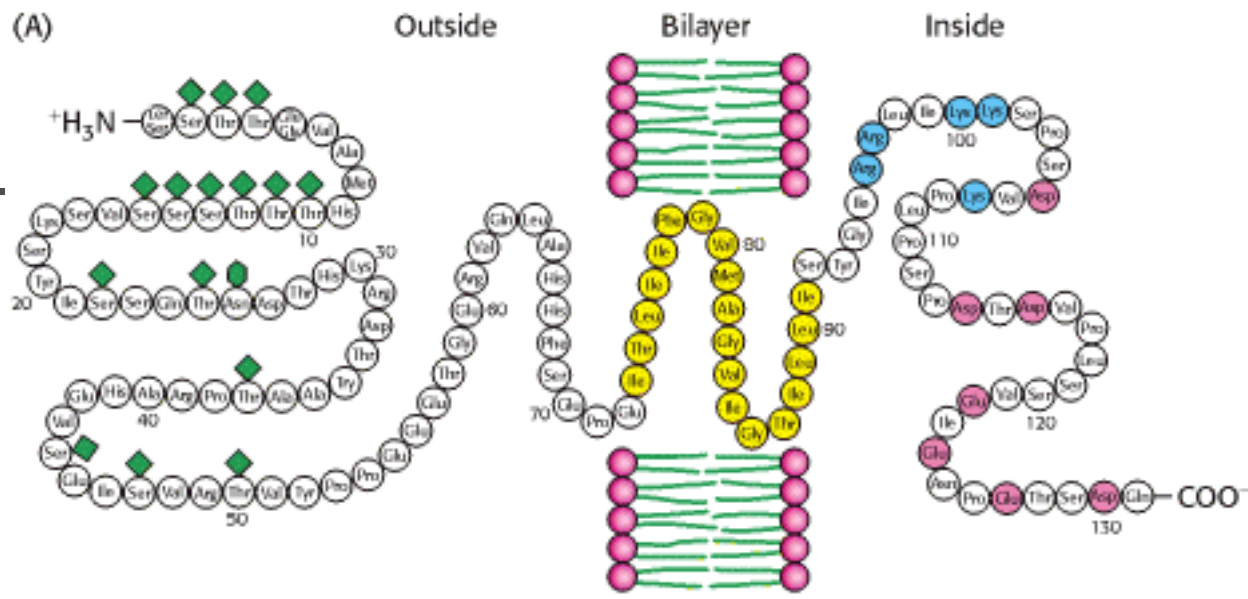
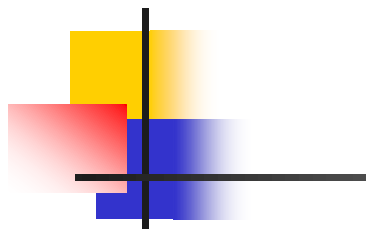


**Glycophorin**

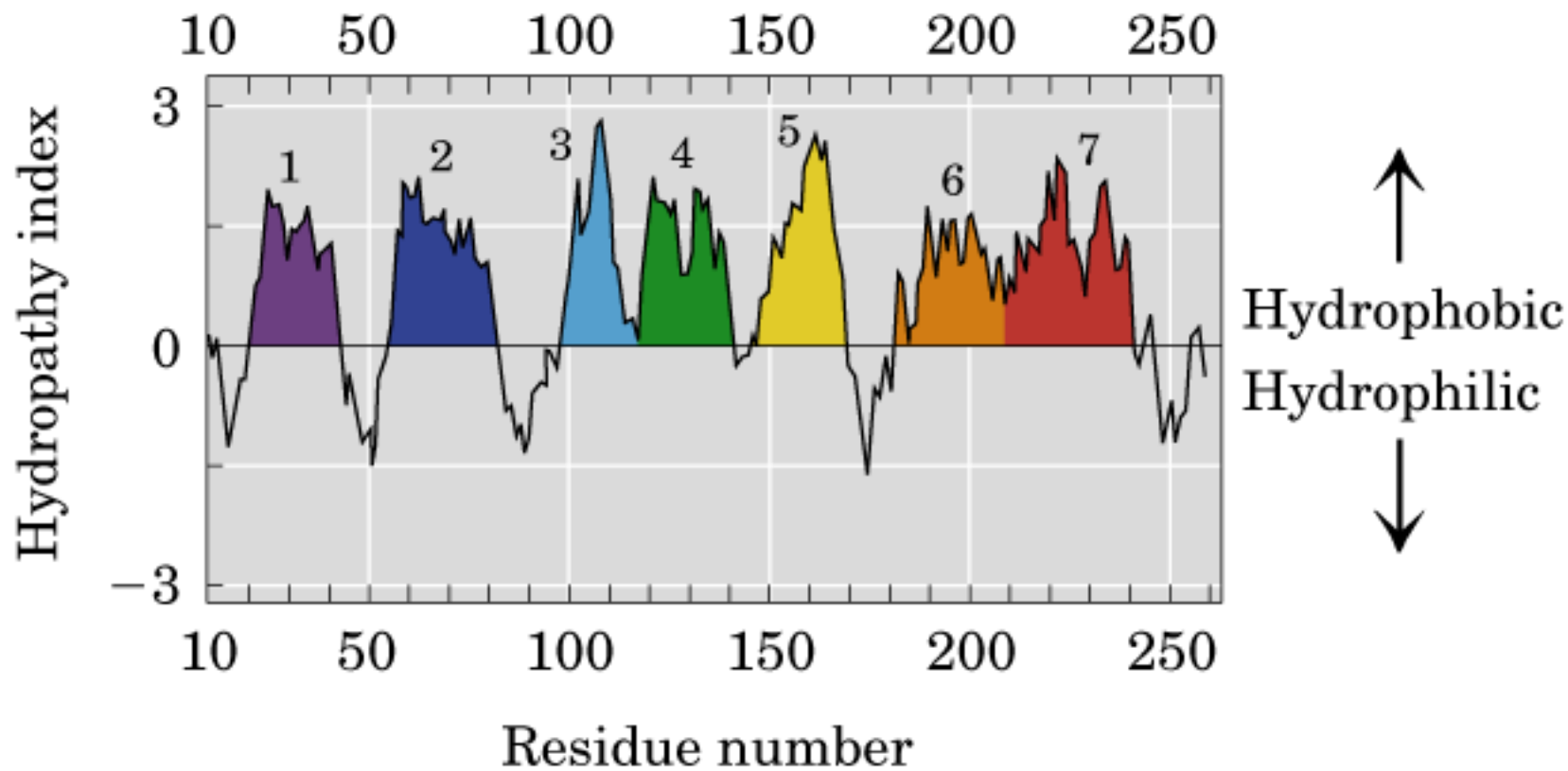
**(a)**

# Estructura terciaria de la glicoforina





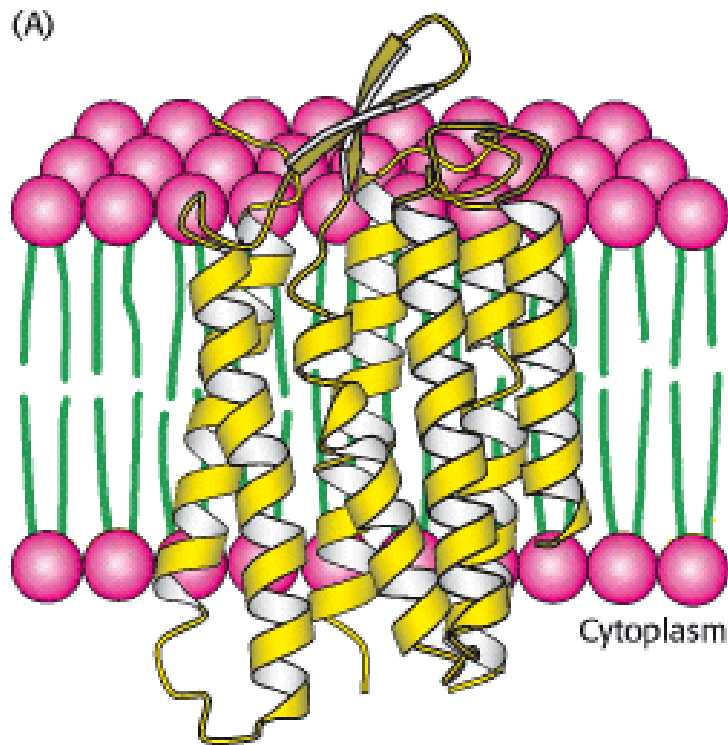
Glicoforina



**Bacteriorhodopsin**

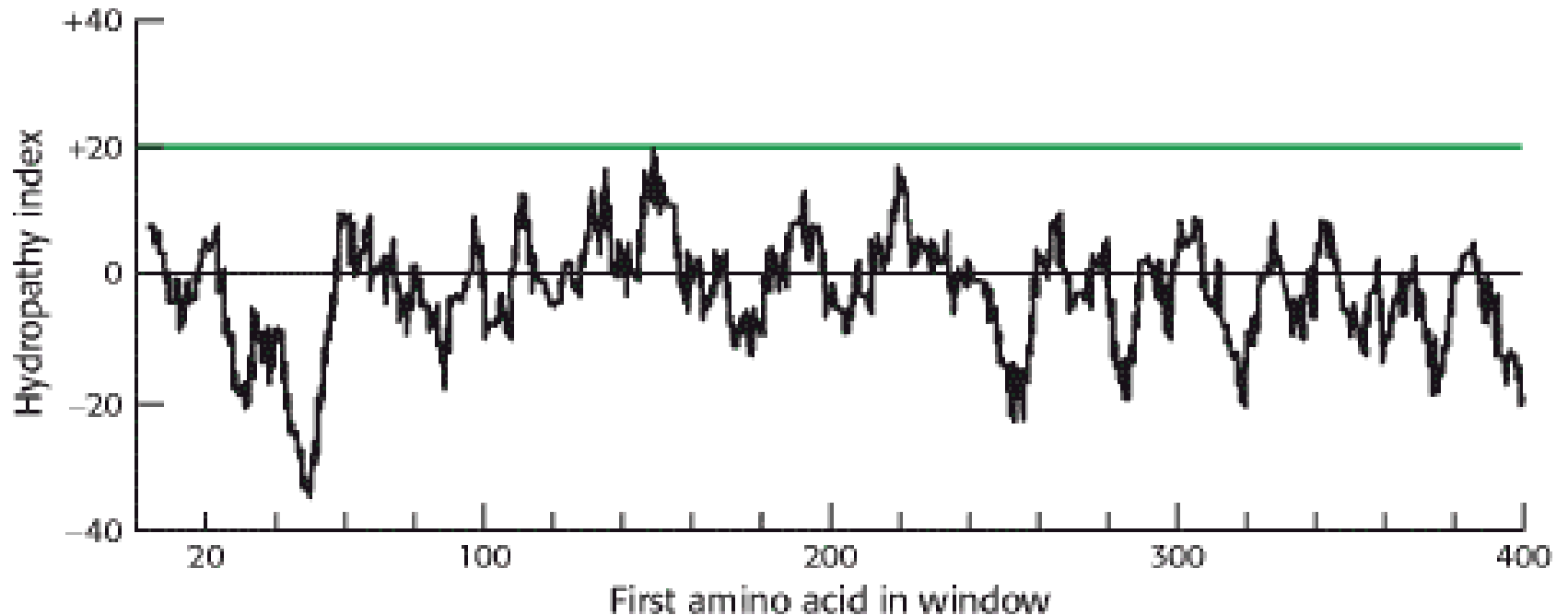
**(b)**

# Estructura de la bacteriorodopsina

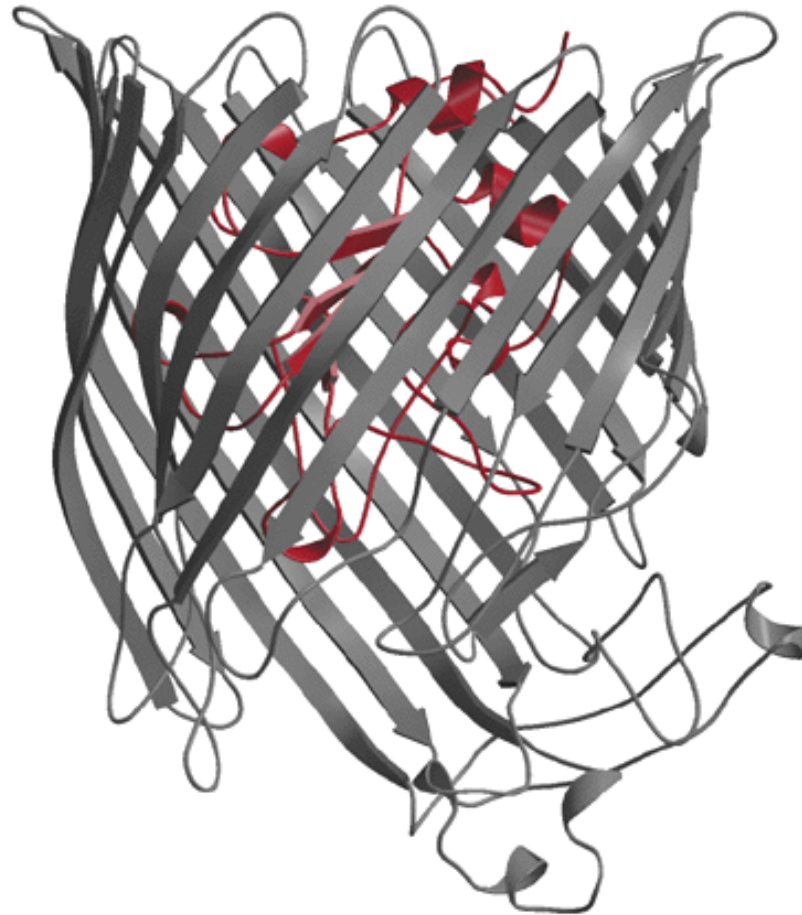




# Perfil hidropático de la porina



# Estructura terciaria de la porina



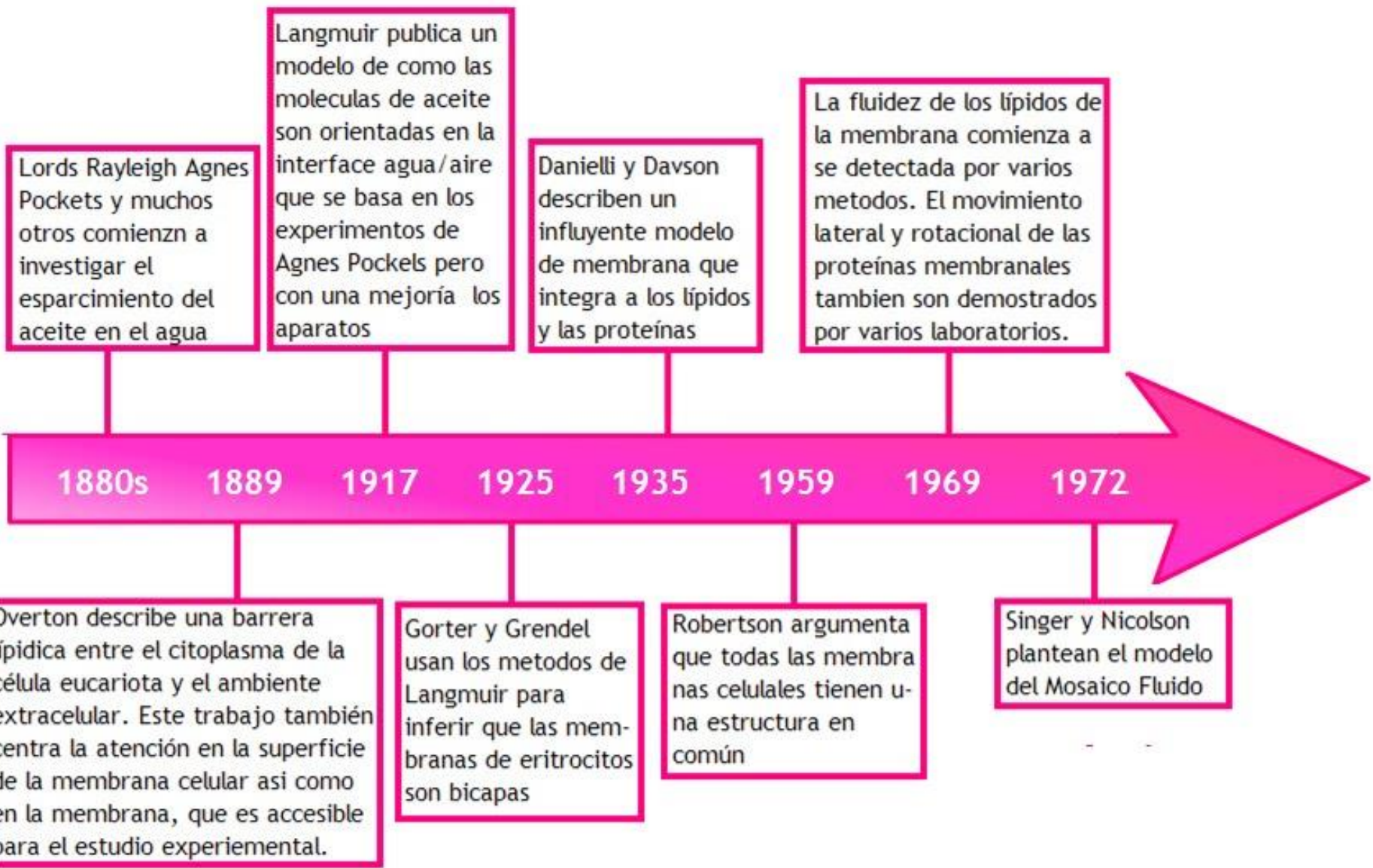




# Modelos de membrana

---

1. Gorter y Grendel (1925), bicapa
2. Danielli y Davson, modelo de sandwich
3. Robertson, membrana unitaria
4. Singer y Nicholson (1975), mosaico fluido
5. Descubren los "lipid rafts" y ...



Lords Rayleigh Agnes Pockets y muchos otros comienzan a investigar el esparcimiento del aceite en el agua

Langmuir publica un modelo de como las moleculas de aceite son orientadas en la interface agua/aire que se basa en los experimentos de Agnes Pockels pero con una mejoría los aparatos

Danielli y Davson describen un influyente modelo de membrana que integra a los lípidos y las proteínas

La fluidez de los lípidos de la membrana comienza a se detectada por varios metodos. El movimiento lateral y rotacional de las proteínas membranales tambien son demostrados por varios laboratorios.

1880s

1889

1917

1925

1935

1959

1969

1972

Overton describe una barrera lípidica entre el citoplasma de la célula eucariota y el ambiente extracelular. Este trabajo también centra la atención en la superficie de la membrana celular así como en la membrana, que es accesible para el estudio experimental.

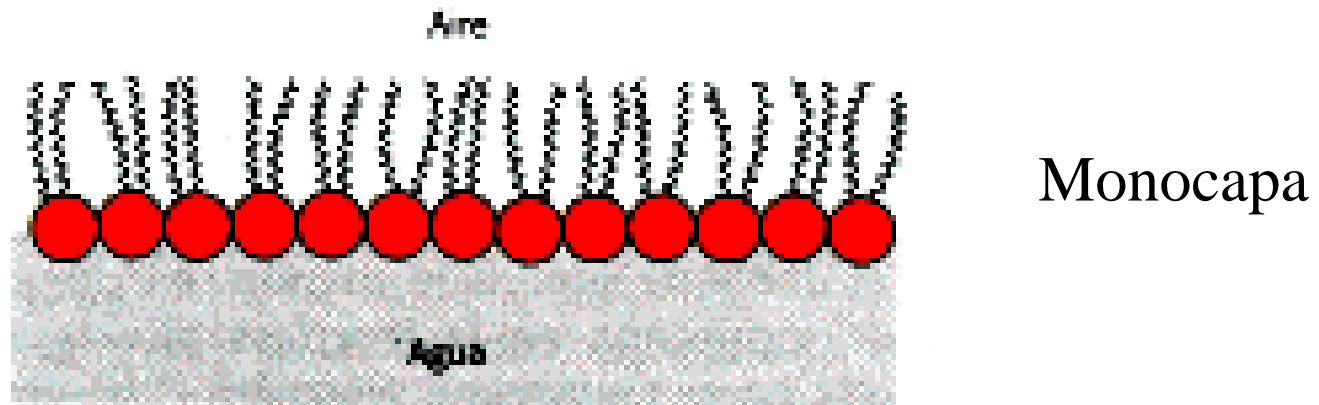
Gorter y Grendel usan los metodos de Langmuir para inferir que las membranas de eritrocitos son bicapas

Robertson argumenta que todas las membranas celulares tienen una estructura en común

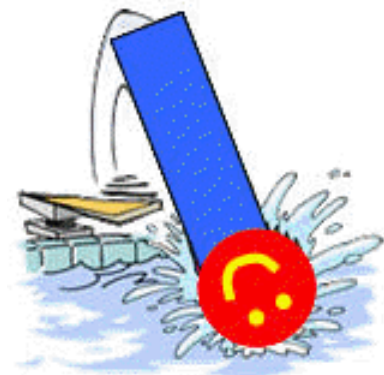
Singer y Nicolson plantean el modelo del Mosaico Fluido

# Los lípidos tienen a ser excluidos del agua.

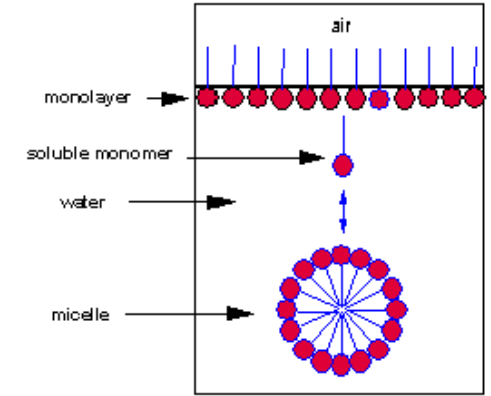
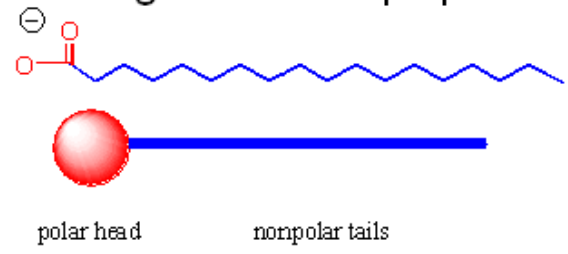
- Lípido



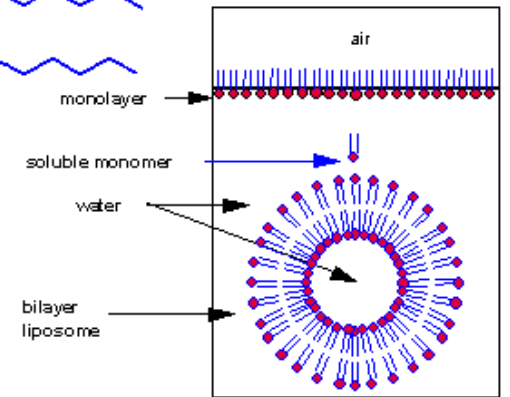
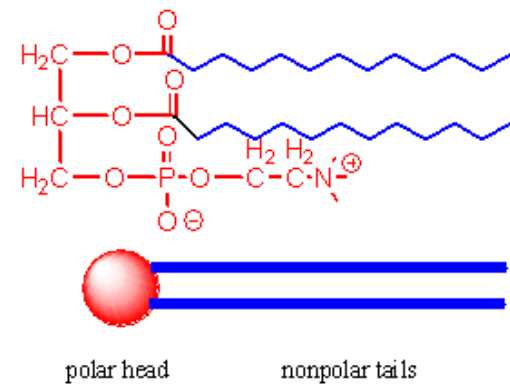
- El aceite tiende a repelerse del agua. La **cohesión** (atracción entre moléculas que mantiene unidas las partículas de una sustancia) de las moléculas de aceite es muy baja en comparación con la del agua, sin embargo el aceite es capaz de bajar la tensión superficial para formar la monocapa de lípidos.



### single chain amphiphiles

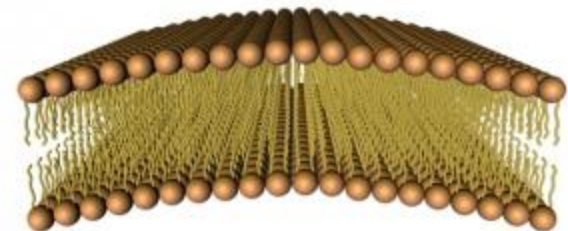


### double chain amphiphiles

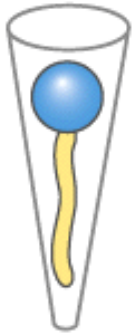


Los fosfolípidos tienen en el agua a **agregarse espontáneamente** de manera ordenada.

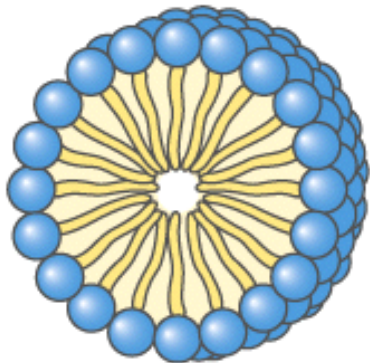
- Anfifilos o anfipáticos.
- El agua va a tender a hidratar o establecer puentes de hidrógeno con las porciones polares, excluyendo la porción hidrofóbica
- Se forman agregados llamados micelas.
- Las interacciones que estabilizan a una micela o una bicapa se llaman fuerzas hidrofóbicas o interacciones hidrofóbicas



Cadenas alifáticas pequeñas y porciones polares grandes se pueden aglomerar formando micelas.

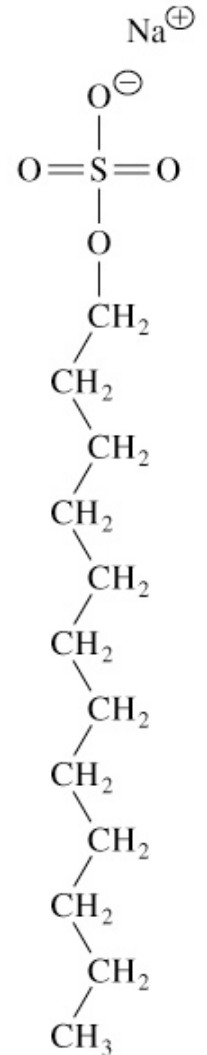


Individual units are wedge-shaped (cross-section of head greater than that of side chain)



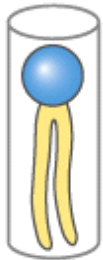
**Micelle**  
(a)

Diámetro menor a 20 nm o 200Å

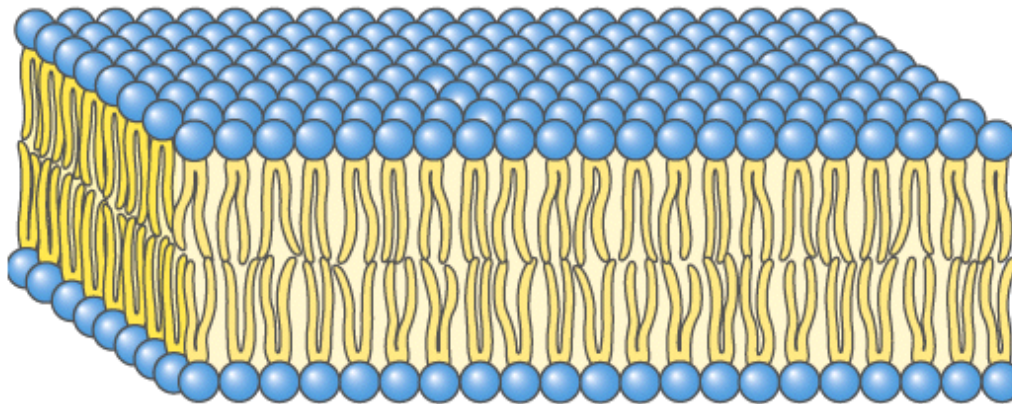


**SDS**

# Estructuras cooperativas



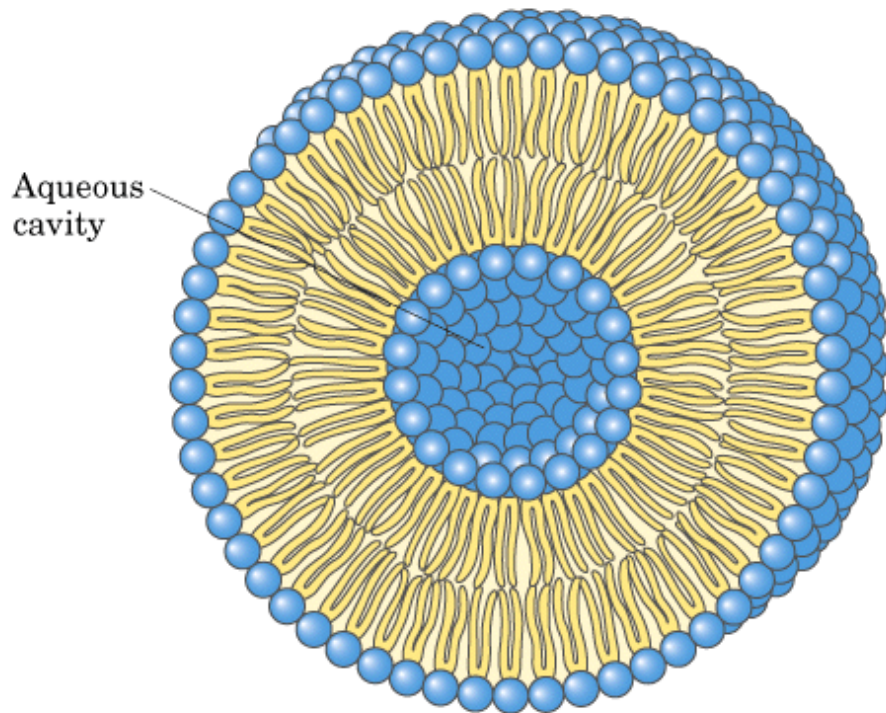
Individual units are cylindrical (cross-section of head equals that of side chain)



**Bilayer**  
**(b)**

$10^6 \text{ \AA} \text{ } \delta \text{ } 10^7 \text{ \AA}$

# Los liposomas son arreglos de bicapa de lípidos



**Liposome**  
(c)

Los liposomas se pueden formar usando soluciones etanólicas de lípidos en mezcla con agua o disolviendo los fosfolípidos en detergente y sometiéndolos a agitación vibratoria ultrasónica (sonicación). Pueden llegar a medir aprox 500Å



Lords Rayleigh Agnes Pockets y muchos otros comienzn a investigar el esparcimiento del aceite en el agua

Langmuir publica un modelo de como las moleculas de aceite son orientadas en la interface agua/aire que se basa en los experimentos de Agnes Pockels pero con una mejoría los aparatos

Danielli y Davson describen un influyente modelo de membrana que integra a los lípidos y las proteínas

La fluidez de los lípidos de la membrana comienza a se detectada por varios metodos. El movimiento lateral y rotacional de las proteínas membranales tambien son demostrados por varios laboratorios.

1880s

1889

1917

1925

1935

1959

1969

1972

Overton describe una barrera lípidica entre el citoplasma de la célula eucariota y el ambiente extracelular. Este trabajo también centra la atención en la superficie de la membrana celular así como en la membrana, que es accesible para el estudio experiemntal.

Gorter y Grendel usan los metodos de Langmuir para inferir que las membranas de eritrocitos son bicapas

Robertson argumenta que todas las membranas celulares tienen una estructura en común

Singer y Nicolson plantean el modelo del Mosaico Fluido



# Modelos de Membrana

## A. Las primeras Observaciones

---

1. Desde hace una centuria, los investigadores notaron que las moléculas solubles en lípidos podrían entrar a las células más rápidamente que las moléculas solubles en agua. Sugiriendo que los lípidos eran componente en la membrana plasmática.



# Evidencias...

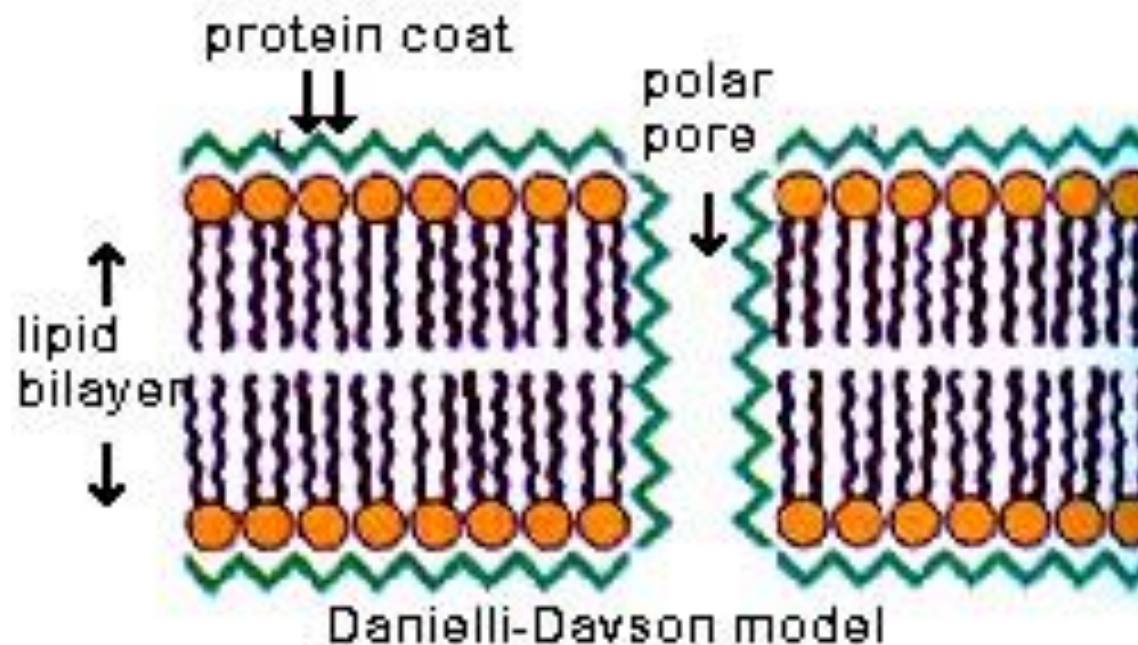
---

2. Después se descubrieron a los fosfolípidos en las membranas plasmáticas
3. **Gorter y Grendel** (1925) sacaron los lípidos de la membrana de los eritrocitos y al extenderlos sobre agua vieron que ocupaban una superficie dos veces mayor a la superficie del eritrocito, deduciendo que la membrana estaba formada por una bicapa lipídica.

# Primer modelo de la membrana



4. Modelo del sandwich, fosfolípidos colocados entre capas de proteínas

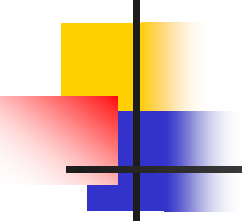




# Segundo modelo. La membrana unitaria

---

- formuló el concepto de unidad de membrana, que sugiere que todas las membranas son iguales, tanto las plasmáticas como las citoplasmáticas.
- Aunque hay componentes singulares en las diferentes membranas.

- 
- 
- Con la ayuda de las observaciones en el microscopio. Robertson propuso que las proteínas se encontraban también embebidas en la membrana.
  - Sin embargo se comprobó que las proteínas generalmente se encontraban en forma globular y ya estos radios de la proteína incrementaban las distancias medidas de las membranas por lo que el modelo no se ajustaba a la situación real.



# Freeze-Fracture

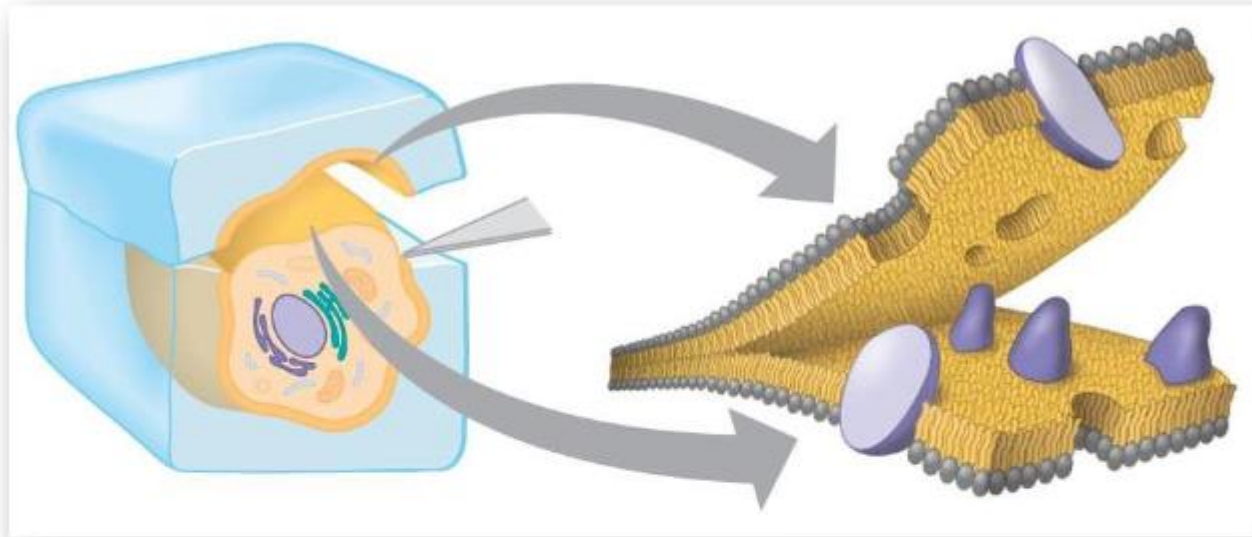
Specialized preparation technique

Splits membrane b/w bilayer

Confirmed fluid mosaic model



# Técnica de criofractura



- Se congela a la célula y se corta la membrana transversalmente.
- Se le da un baño con un metal y se observa al microscopio







## En 1972, Singer y Nicolson introdujeron el modelo del mosaico fluido de la membrana.

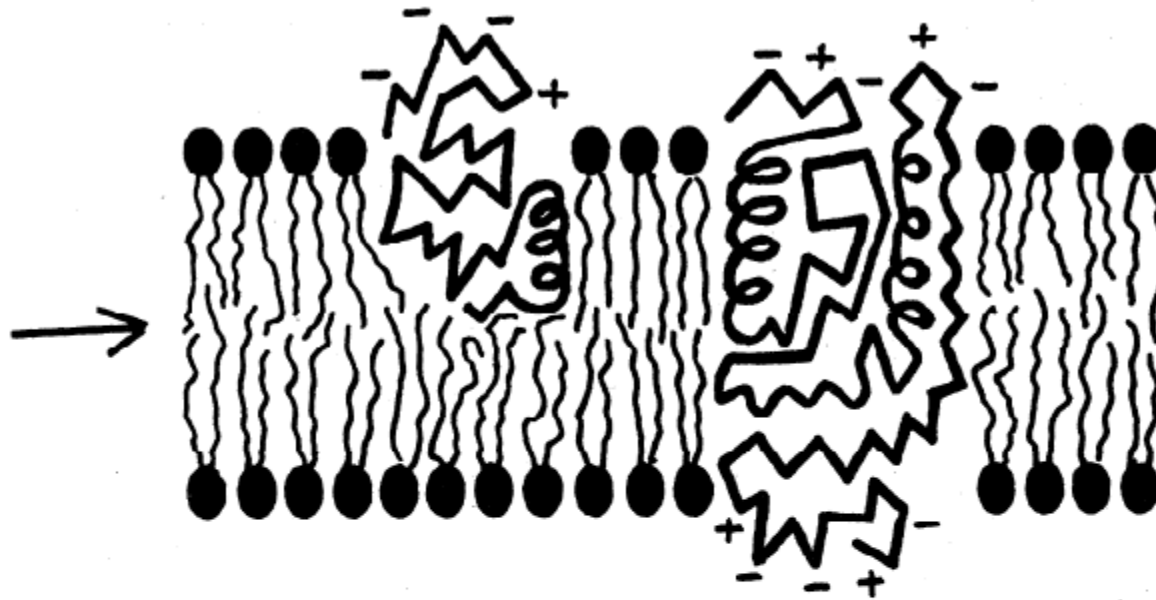
---

1. La membrana plasmática compuesta de fosfolípidos en donde las proteínas pueden o no estar totalmente embebidas en la membrana.
2. Las proteínas se encuentran distribuidas de manera irregular a través de la membrana y varían las proteínas dependiendo de la membrana.
3. Micrografías electrónicas de membranas tratadas por criofractura soportan el modelo

# The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids.

S. J. Singer and Garth L. Nicolson



Unusual high  
alpha helices  
on  
membrane  
proteins

Fig. 2. The lipid-globular protein mosaic model of membrane structure: schematic cross-sectional view. The phospholipids are depicted as in Fig. 1, and are arranged as a discontinuous bilayer with their ionic and polar heads in contact with water. Some lipid may be structurally differentiated from the bulk of the lipid (see text), but this is not explicitly shown in the figure. The integral proteins, with the heavy lines representing the folded polypeptide chains, are shown as globular molecules partially embedded in, and partially protruding from, the membrane. The protruding parts have on their surfaces the ionic residues ( $-$  and  $+$ ) of the protein, while the nonpolar residues are largely in the embedded parts; accordingly, the protein molecules are amphipathic. The degree to which the integral proteins are embedded and, in particular, whether they span the entire membrane thickness depend on the size and structure of the molecules. The arrow marks the plane of cleavage to be expected in freeze-etching experiments (see text). [From Lenard and Singer (3) and Singer (1)]



# Membrane Fluidity

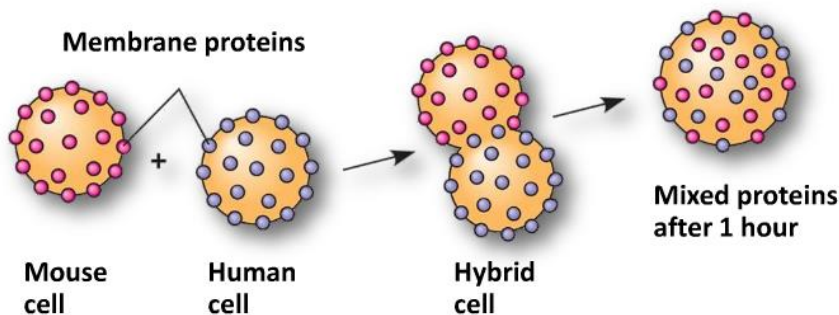
Essential for proper functioning

Colder temp. →  
*viscous*

**Unsaturated fatty acids** = more fluid

**Saturated fatty acids** = less fluid

# Explaining unexplaining experiments of Frye & Edidin



A rough estimate may be made of the average effective diffusion constant required of the membrane components to account for the kinetics of intermixing in the Frye-Edidin experiments. Taking the average distance of migration,  $x$ , to have been about 5 micrometers in a time,  $t$ , of 40 minutes gives an apparent diffusion constant,  $D = x^2 / 2t$ , of  $5 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sec}$ . For comparison, the diffusion constant of hemoglobin in aqueous solutions is about  $7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ . The apparent effective viscosity of the membrane fluid phase is therefore about  $10^3$  to  $10^4$  times that of water.

The Frye-Edidin experiments can be rationalized by the fluid mosaic model of membrane structure as being the result of the free diffusion and intermixing of the lipids and the proteins (or lipoproteins) within the fluid lipid matrix.

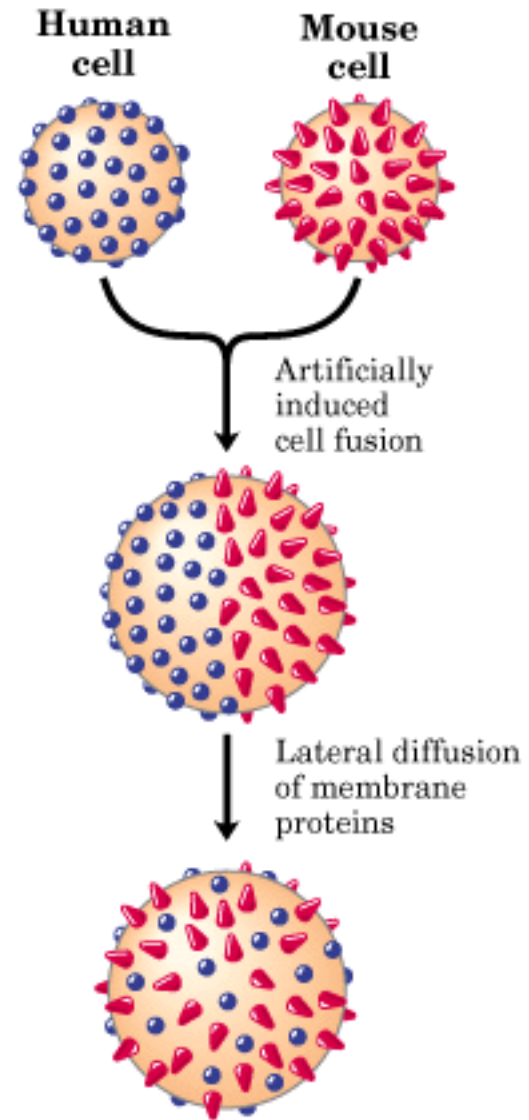
# Experimento para observar difusión lateral de proteínas

Michael Edidin

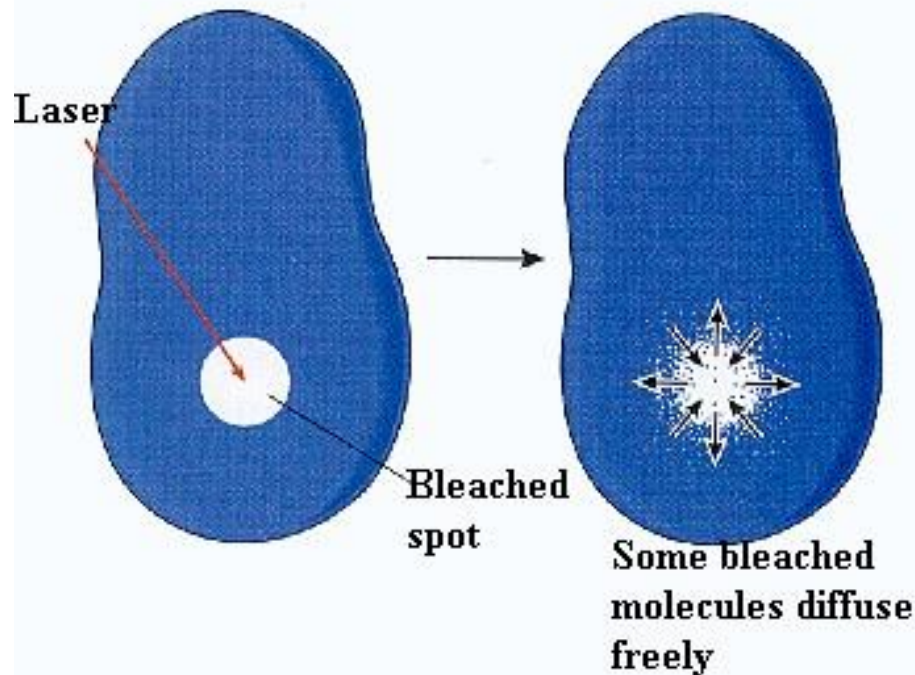
30-90% de las proteínas se tardan  
10-60 min para difundir 20 $\mu$ m.

Rodopsina  $0.4\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$

Fibronectina  $10^{-4}\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$

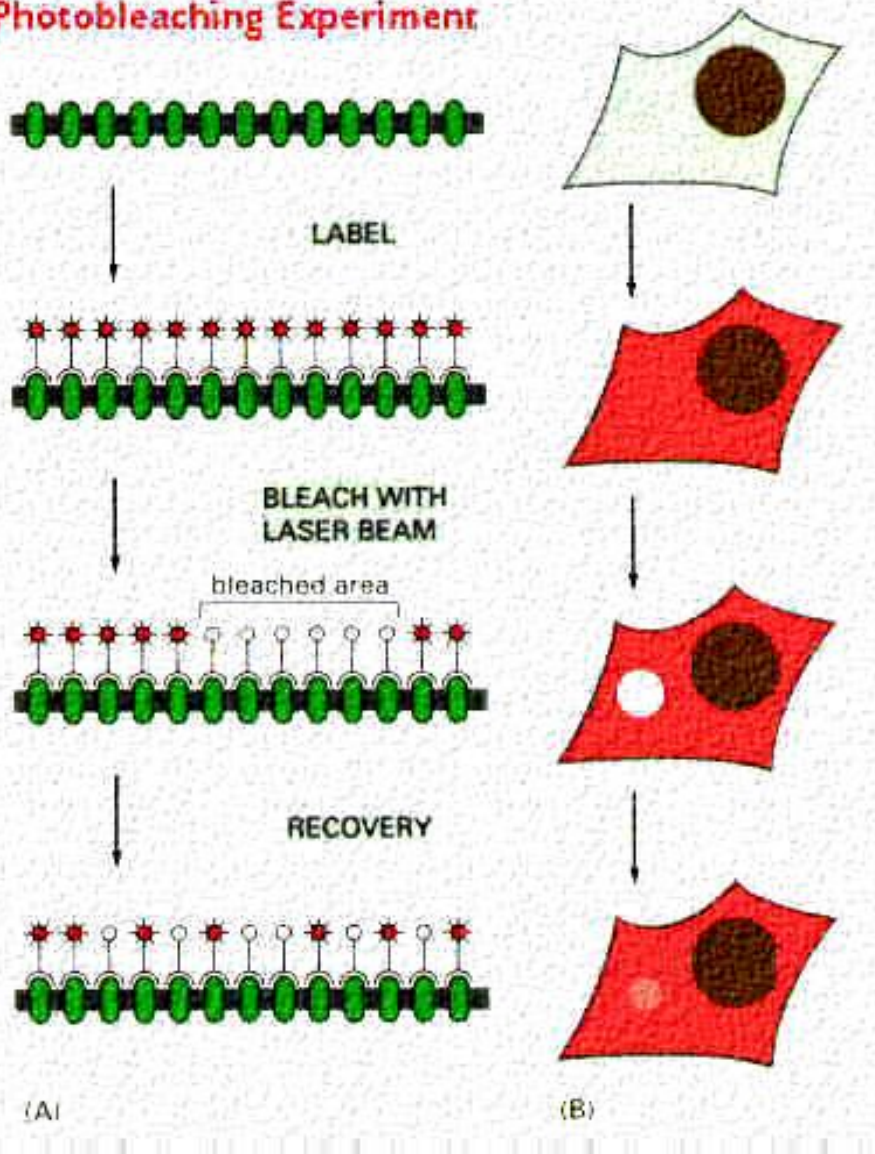


# Experimento para cuantificar la velocidad de difusión de los lípidos en la membrana



- La difusión lateral de los lípidos o proteínas de membrana se puede determinar con técnicas como el **FRAP** (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching).

## Photobleaching Experiment

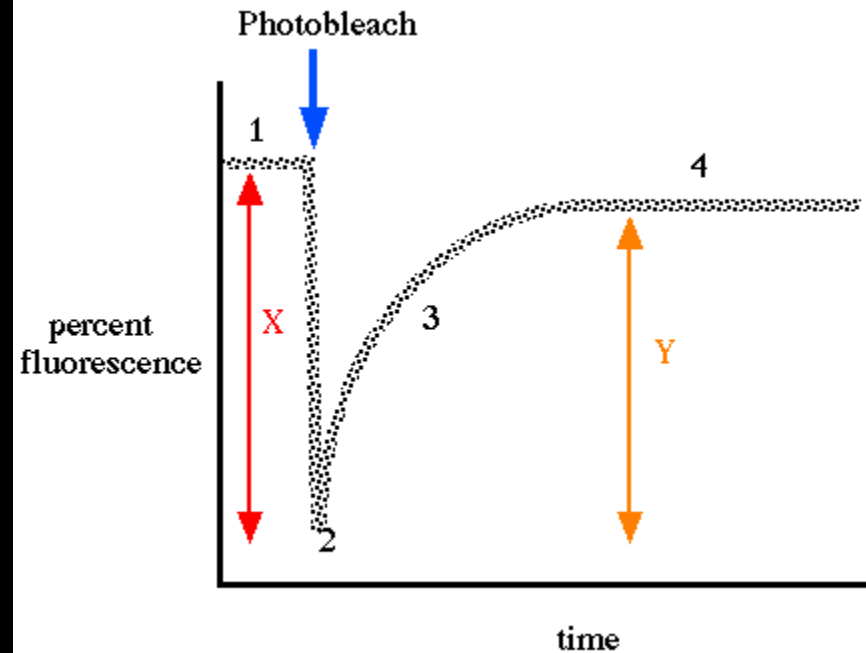
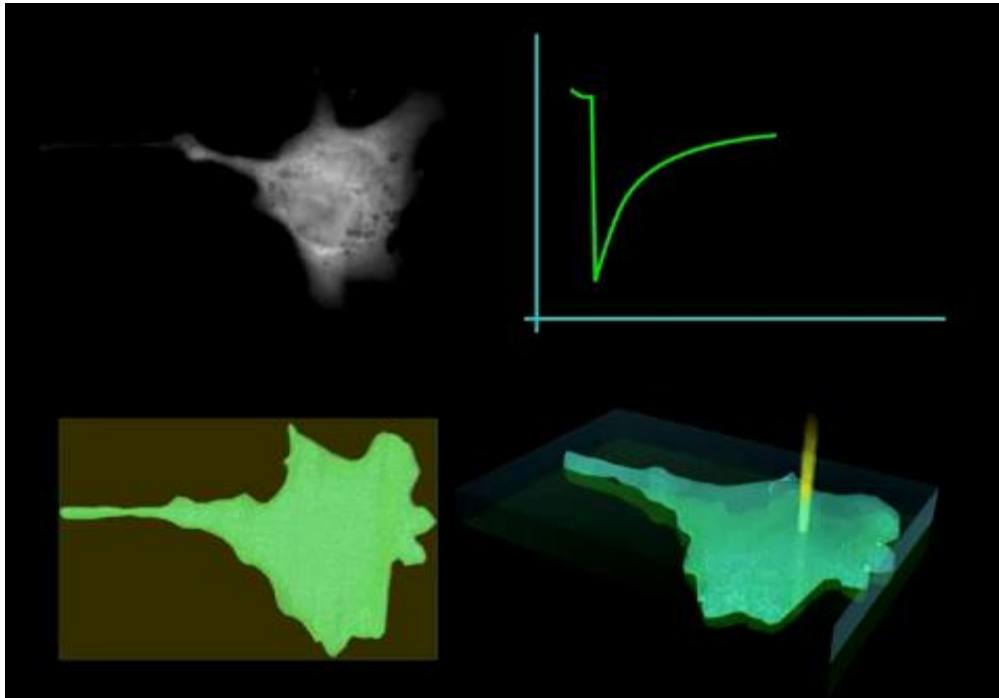


La velocidad de recuperación del nivel de fluorescencia depende de la movilidad lateral del componente marcado y está dado por la sig. Fórmula:

$$S = (4Dt)^{1/2}$$

**Lípido se mueve**  
 **$1\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$**

# Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).



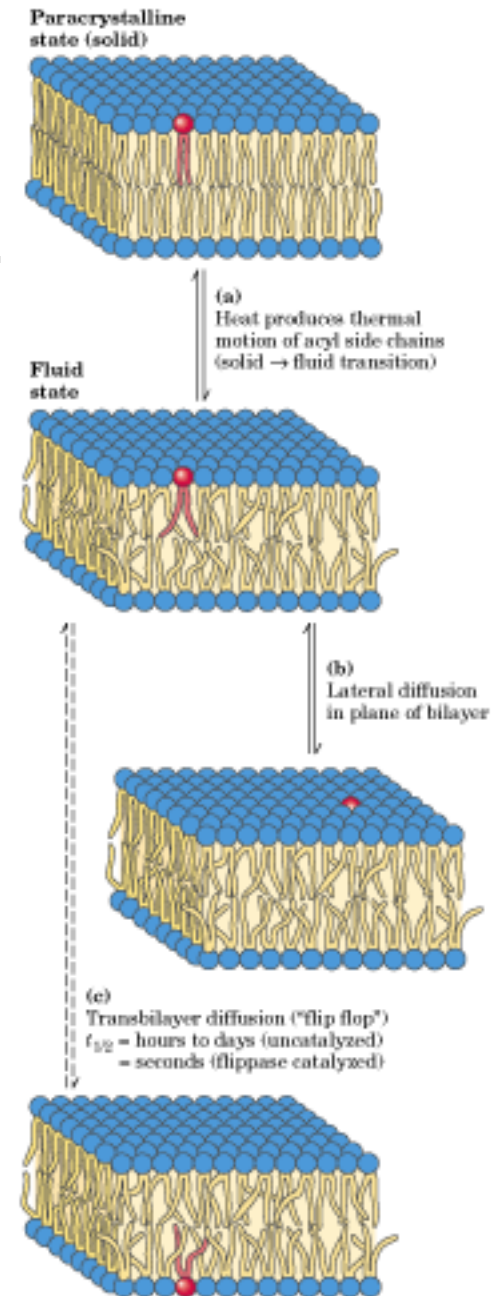


# Las bicapas lipídicas son fluidos en dos dimensiones

**Difusión lateral** de los lípidos.

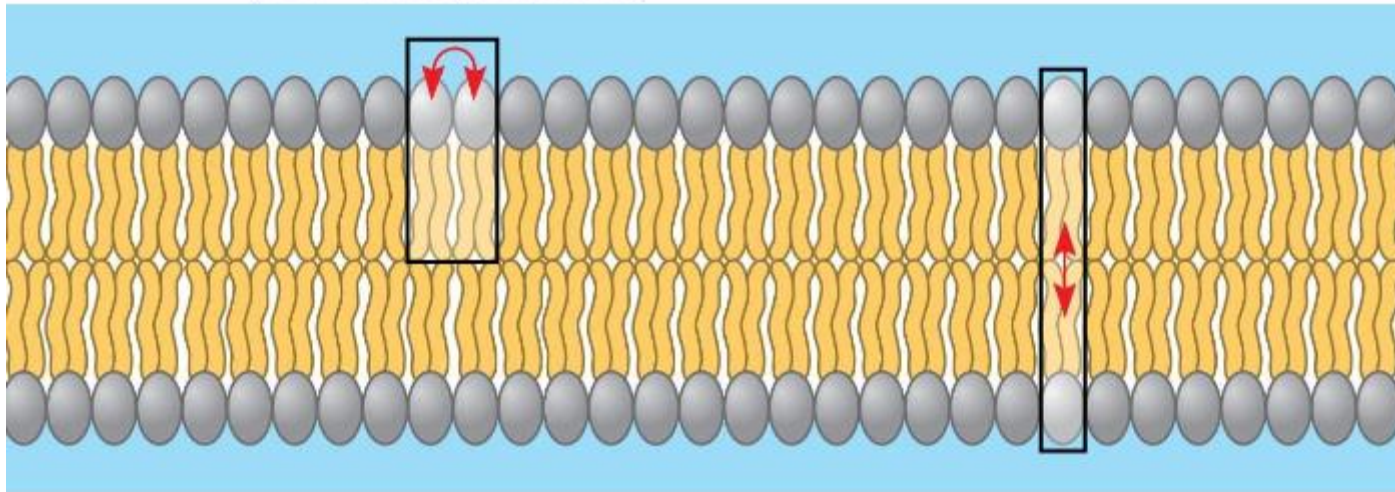
Movimiento en el mismo plano de la bicapa, movimiento continuo, en donde puede ocurrir la rotación del lípido y el movimiento a zonas alejadas ( $1\mu\text{m/s}$ ).

**Difusión transversal o flip-flop.** Es rara y consiste en la transferencia de un fosfolípido de una capa de la bicapa a otra.



# Fluidez membranal

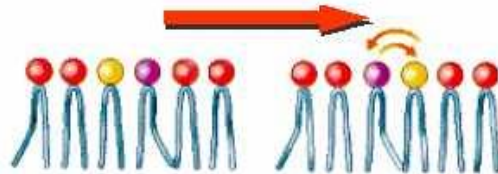
**Lateral movement**  
( $\sim 10^7$  times per second)



**Flip-flop**  
( $\sim$  once per month)

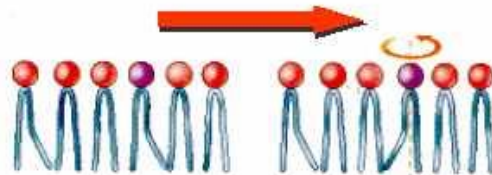
# Fosfolípidos: movimientos

## Difusión lateral



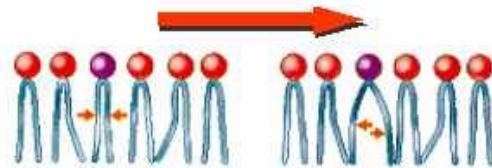
Un fosfolípido intercambia su posición con otro situado en la misma monocapa, desplazándose lateralmente.

## Rotación



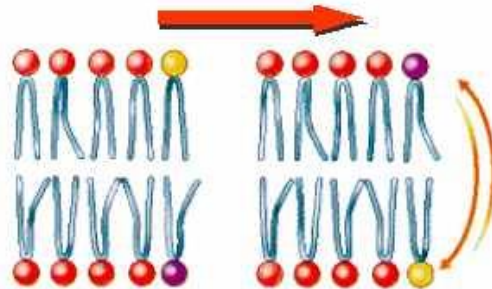
Las moléculas giran alrededor de su eje longitudinal sin desplazarse del sitio.

## Flexión



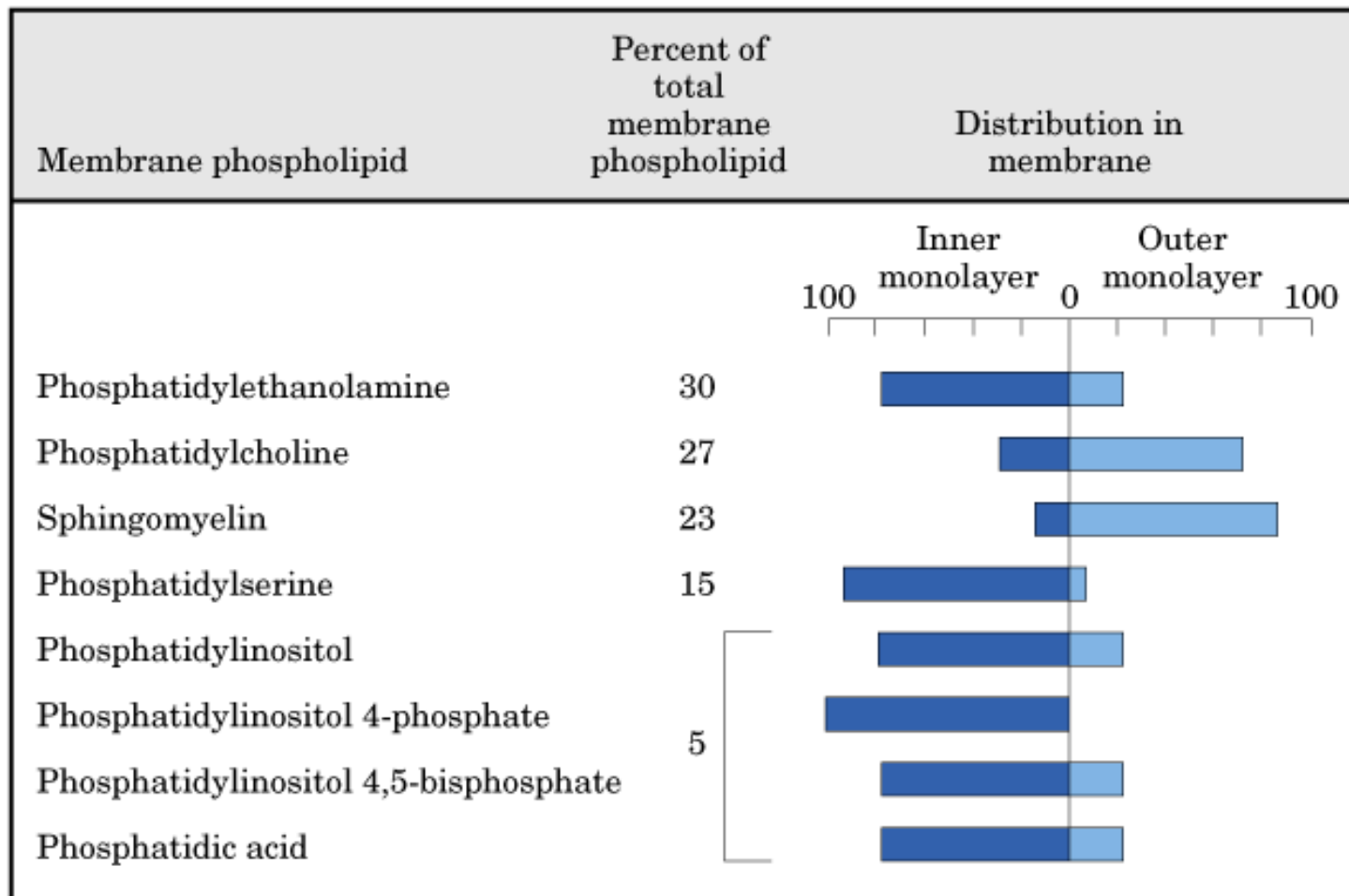
Los fosfolípidos aumentan o disminuyen el grado de separación de las colas hidrocarbonadas.

## Flip-flop



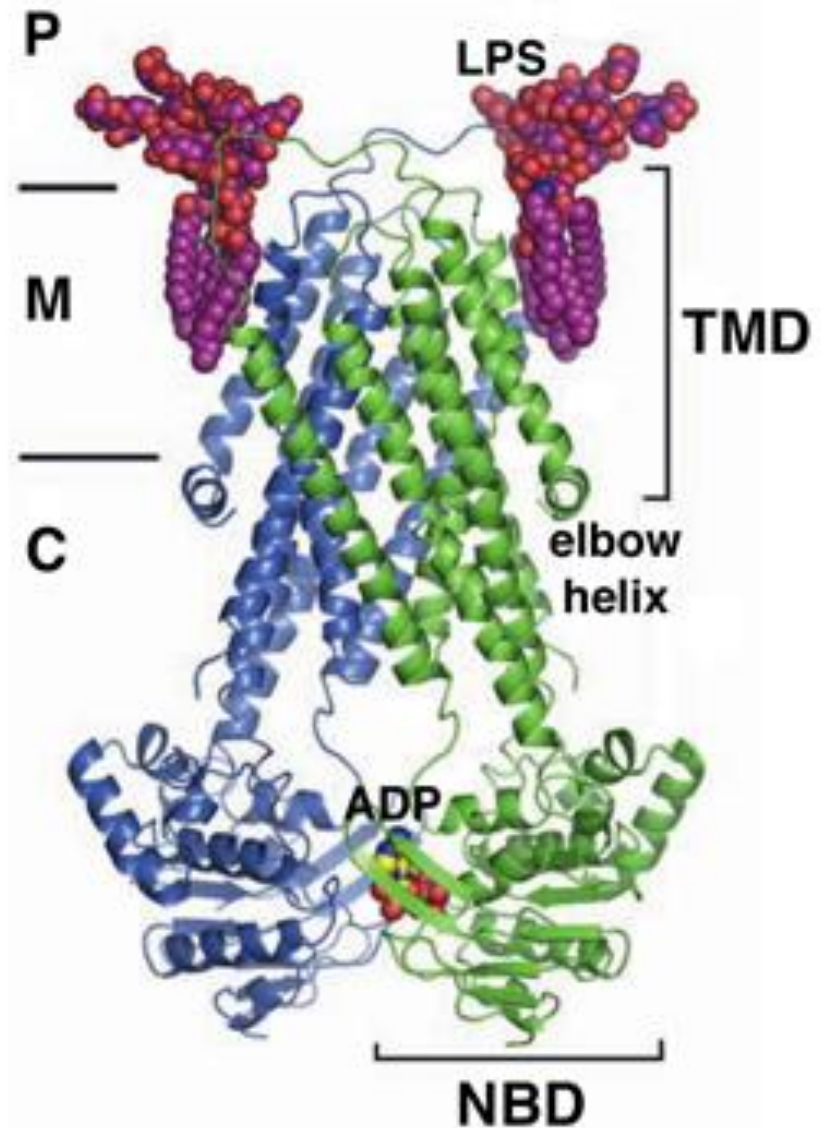
Un fosfolípido se desplaza verticalmente y ocupa un lugar en la monocapa opuesta. Es muy poco frecuente.

# Composición de lípidos diferente en ambas capas de la membrana

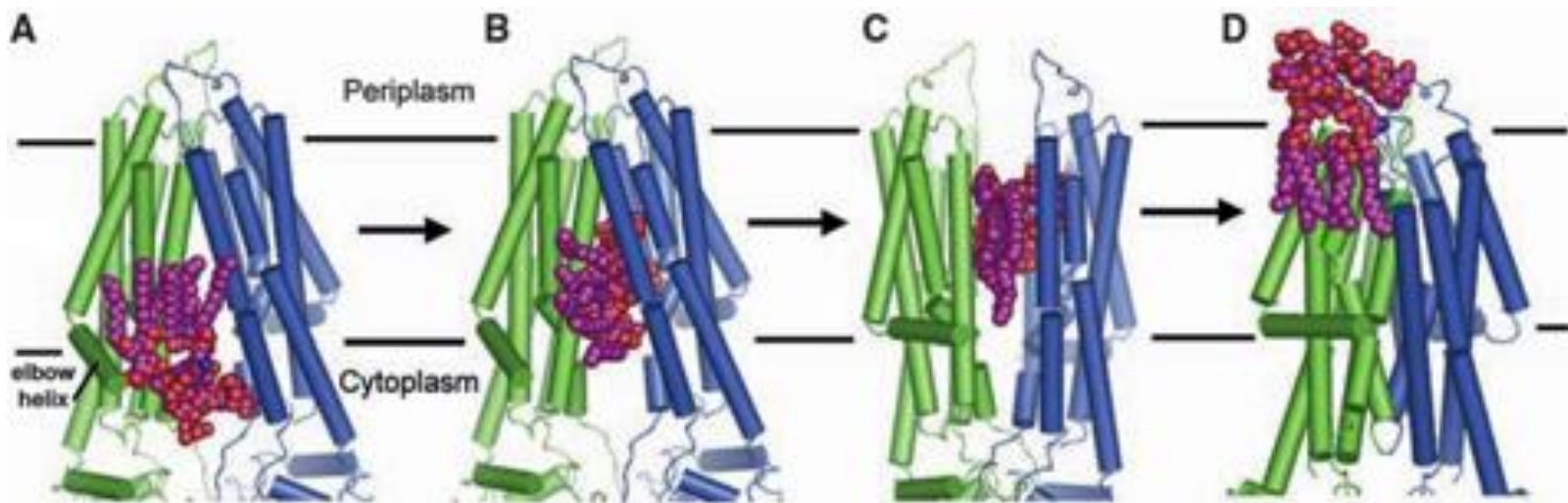


# Flipasas

- Sitios de unión a lípidos
- Sitio de unión a ATP
- Cruza la membrana



# Modelo propuesto para mover lípidos de una cara de la membrana a otra



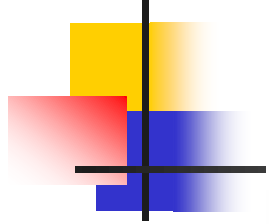
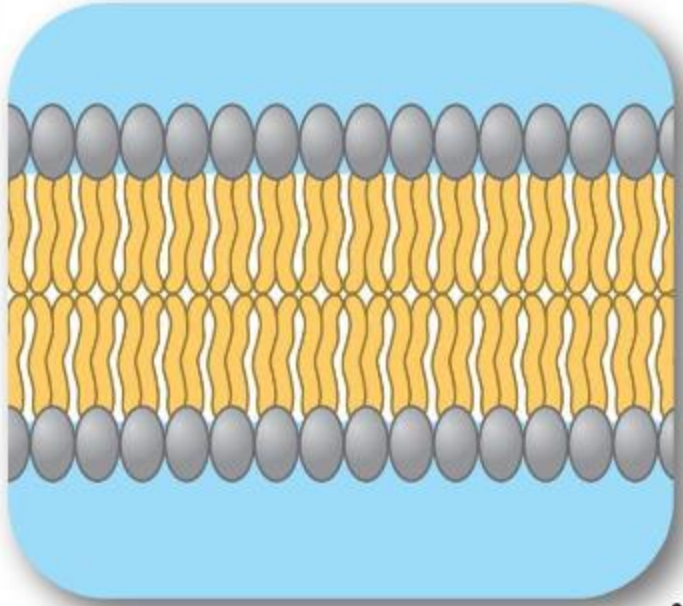
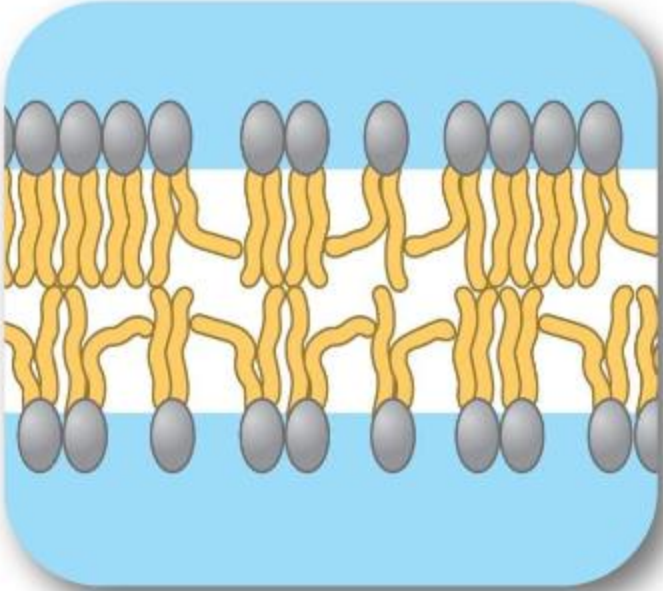
- (A) Closed MsbA with modeled initial LPS binding. (B) Closed MsbA with modeled sequestered LPS. (C) Proposed ATP transition state with modeled MsbA and LPS (sequestered LPS flipped 180°). (D) Observed post-hydrolysis conformation of MsbA with LPS.



# Fosfolípidos moléculas mesomórficas

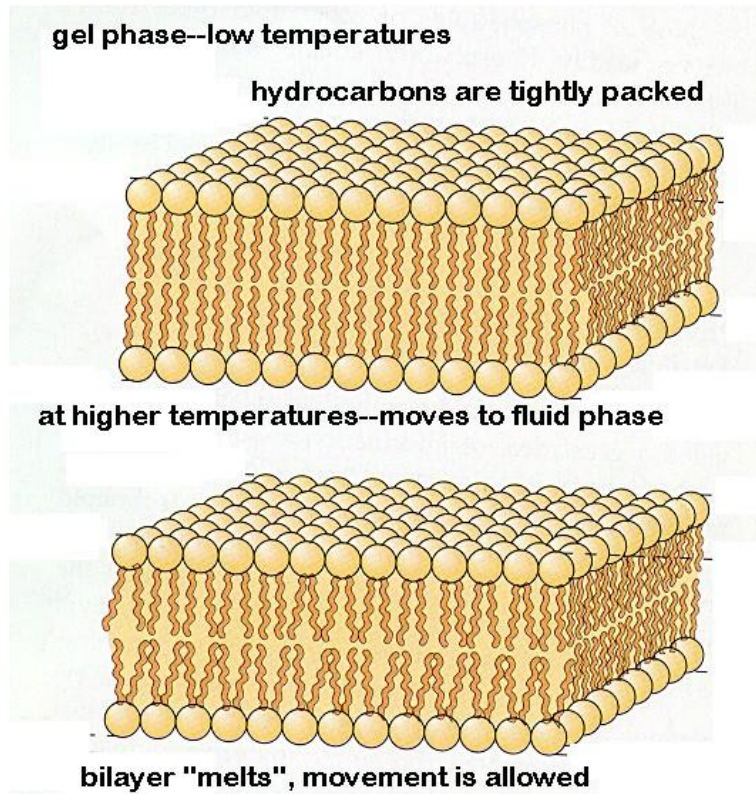
---

- Existen en diferentes formas físicas, las frecuentes:
  - a) Fase gel o líquida cristalina ( $L\alpha$ ), estructura lamelar o forma más líquida y desordenada.
  - b) Fase cristalina ( $L_o$ ), estructura más estática, ordenada e inmóvil, arreglos hexagonales





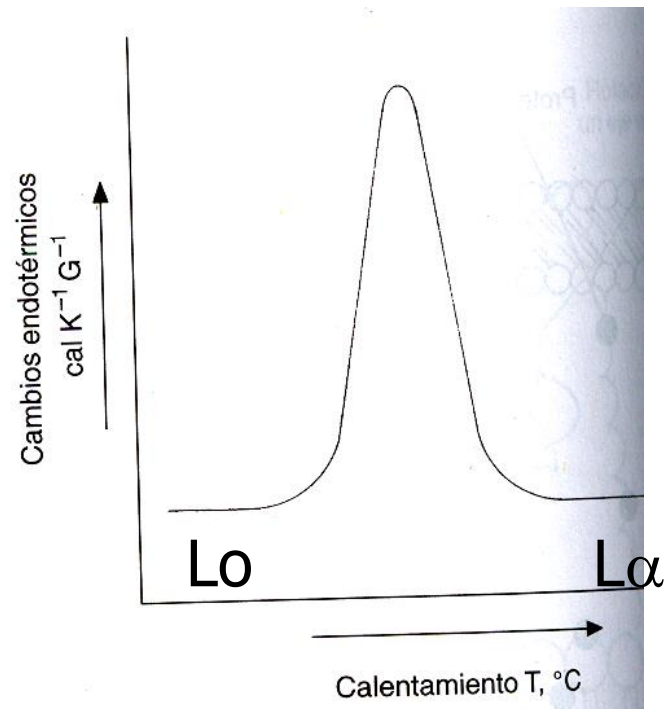
# Cambios de fase de la membrana



- La bicapa de lípidos proporciona a la membrana sus características fluidas.
- El comportamiento de empaquetamiento cristalino a bajas temperaturas y
- De tipo líquido a temperatura corporal permite el movimiento de los otros componentes membranales.

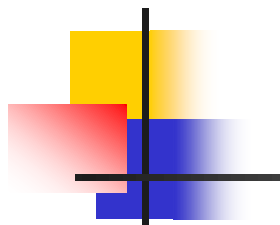
# Transiciones de fase.

- El paso de la forma cristalina a la líquida es una reacción endotérmica

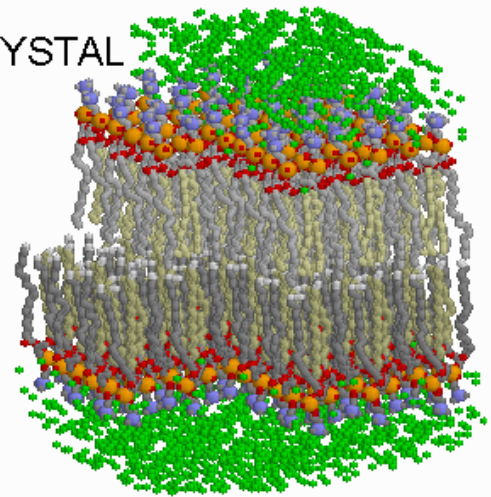


Líquida

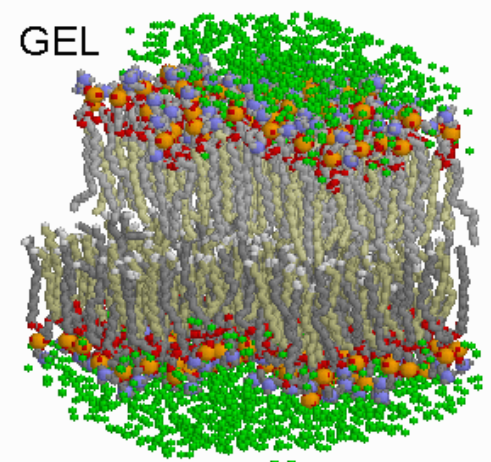
cristalina  
o gel



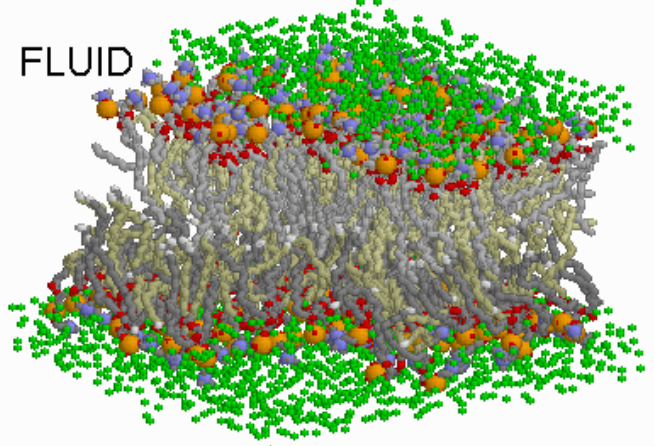
CRYSTAL



GEL



FLUID



Molecular Dynamics Simulation  
of Phosphatidyl Choline Bilayer

Carbon/Palmitic **Water** **Oxygens**  
**Nitrogen** **Oleic** **Phosphorus**  
**Oxygen**

H Heller, M Schaefer, K Schulten,  
J Phys Chem 97:8343, 1993.  
RasMol Image by E Martz

# Propiedades físicas de los ácidos grasos

## Ácidos grasos biológicos comunes

| Símbolo <sup>a</sup>  | Nombre común               | Nombre sistemático                  | Estructura  | pf (°C) |
|---|----------------------------|-------------------------------------|---|---------|
| <i>Ácidos grasos saturados</i>                                      |                            |                                     |   |         |
| 12:0  | Ácido láurico              | Ácido dodecanoico                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$  | 44,2    |
| 14:0  | Ácido mirístico            | Ácido tetradecanoico                | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$  | 52      |
| 16:0  | Ácido palmítico            | Ácido hexadecanoico                 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$  | 63,1    |
| 18:0  | Ácido esteárico            | Ácido octadecanoico                 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$  | 69,6    |
| 20:0  | Ácido araquídico           | Ácido eicosanoico                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$  | 75,4    |
| 22:0  | Ácido behénico             | Ácido docosanoico                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$  | 81      |
| 24:0  | Ácido lignocérico          | Ácido tetracosanoico                | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$  | 84,2    |
| <i>Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)</i> |                            |                                     |   |         |
| 16:1  | Ácido palmitoleico         | Ácido 9-hexadecenoico               | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$         | -0,5    |
| 18:1  | Ácido oleico               | Ácido 9-octadecenoico               | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$         | 13,4    |
| 18:2  | Ácido linoleico            | Ácido 9,12-octadecadienoico         | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ | -9      |
| 18:3  | Ácido $\alpha$ -linolénico | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico     | $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$     | -17     |
| 18:3  | Ácido $\gamma$ -linolénico | Ácido 6,9,12-octadecatrienoico      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ | -17     |
| 20:4  | Ácido araquidónico         | Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ | -49,5   |
| 20:5  | EPA                        | Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico | $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$     | -54     |
| 24:1  | Ácido nervónico            | Ácido 15-tetracosenoico             | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$      | 39      |

<sup>a</sup> Número de átomos de carbono: número de dobles enlaces.

- Incremento** en masa (número de carbonos) **incremento** en el punto de fusión, debido a un aumento en la interacción de Van der Waals.
- Incremento** en grado de insaturaciones **disminuye** el punto de fusión (menor número de enlaces de Van der Waals)

# La fluidez de la membrana

- Se regula variando el número de dobles enlaces y la longitud de la cadena.
- En los animales el **colesterol** es el principal regulador de la fluidez. Puede hacer a las membranas menos fluidas y también menos dispuestas a la transición de fases.

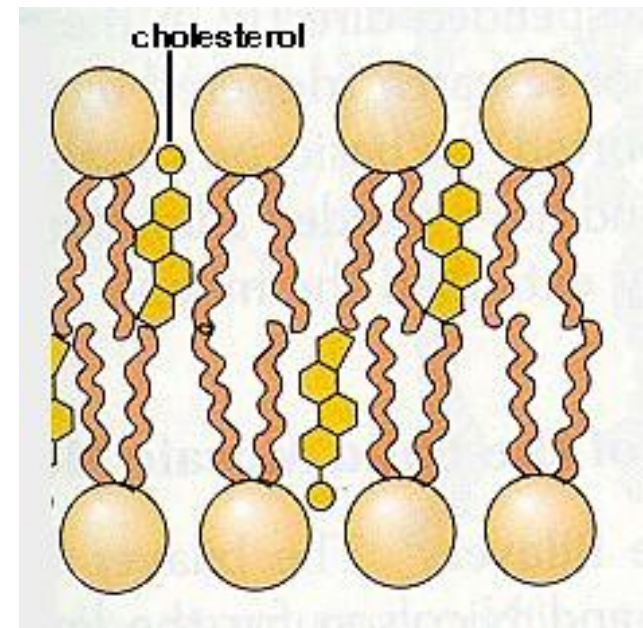


table 12-2

### Fatty Acid Composition of *E. coli* Cells Cultured at Different Temperatures

|  | Percentage of total fatty acids* |       |       |       |
|--|----------------------------------|-------|-------|-------|
|  | 10 °C                            | 20 °C | 30 °C | 40 °C |
| Myristic acid (14:0)                           | 4                                | 4     | 4     | 8     |
| Palmitic acid (16:0)                           | 18                               | 25    | 29    | 48    |
| Palmitoleic acid (16:1)                        | 26                               | 24    | 23    | 9     |
| Oleic acid (18:1)                              | 38                               | 34    | 30    | 12    |
| Hydroxymyristic acid                           | 13                               | 10    | 10    | 8     |
| Ratio of unsaturated to saturated <sup>†</sup> | 2.9                              | 2.0   | 1.6   | 0.38  |

**Source:** Data from Marr, A.G. & Ingraham, J.L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260.

\*The exact fatty acid composition depends not only on growth temperature but on growth stage and growth medium composition.

<sup>†</sup>Calculated as the total percentage of 16:1 plus 18:1 divided by the total percentage of 14:0 plus 16:0. Hydroxymyristic acid was omitted from this calculation.

# Modelo Singer & Nicolson

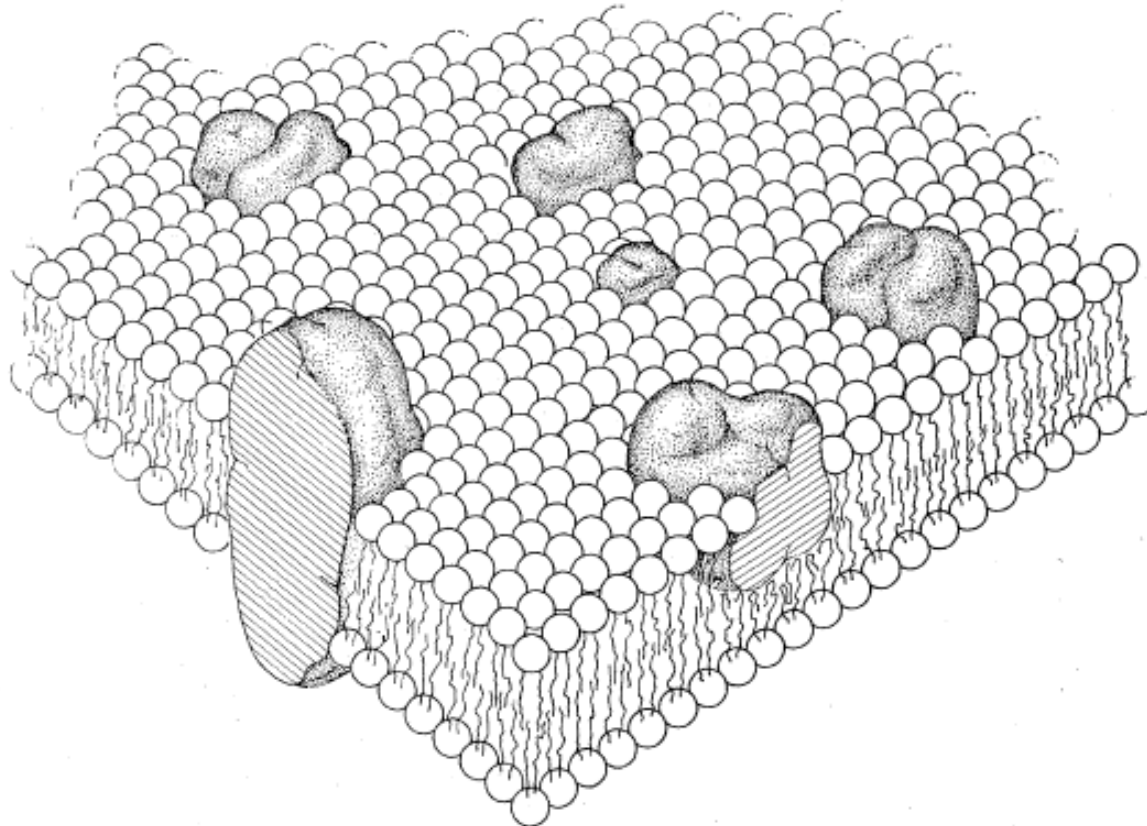


Fig. 3. The lipid-globular protein mosaic model with a lipid matrix (the fluid mosaic model); schematic three-dimensional and cross-sectional views. The solid bodies with stippled surfaces represent the globular integral proteins, which at long range are randomly distributed in the plane of the membrane. At short range, some may form specific aggregates, as shown. In cross section and in other details, the legend of Fig. 2 applies.

# Modelo actual

- a. Modelo de Singer y Nicholson.
- b. La visión de Engelman, 2006. "The membranes are more mosaic than fluid".

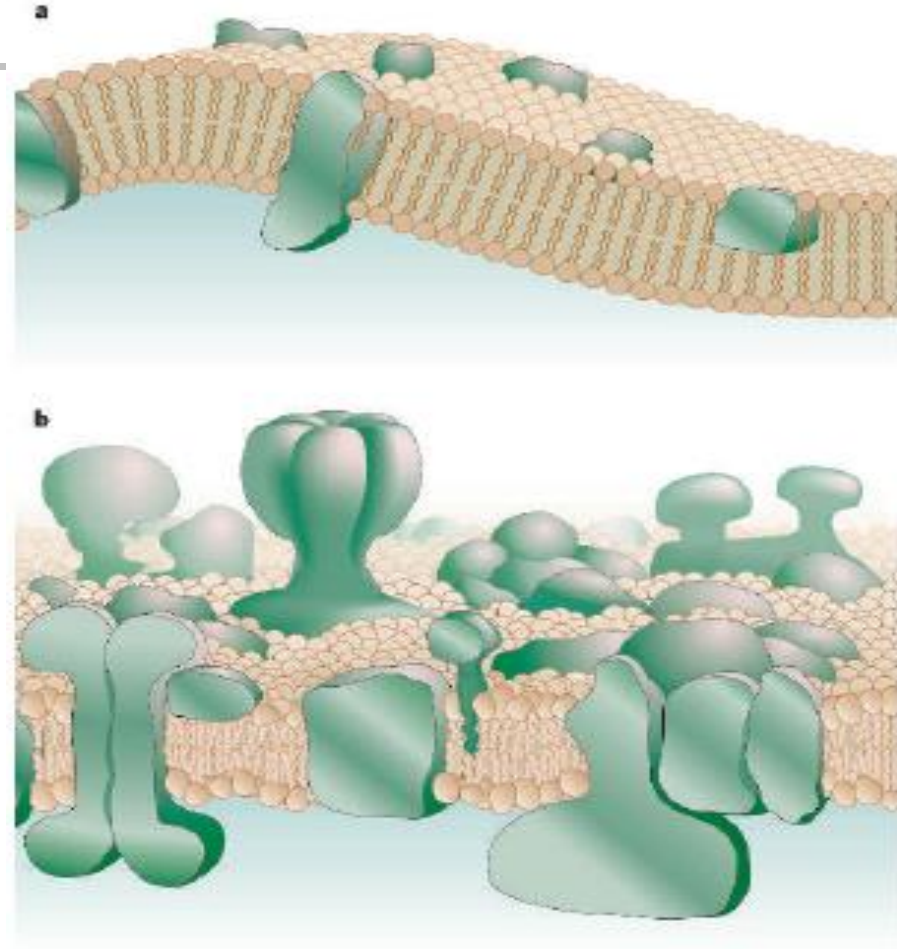
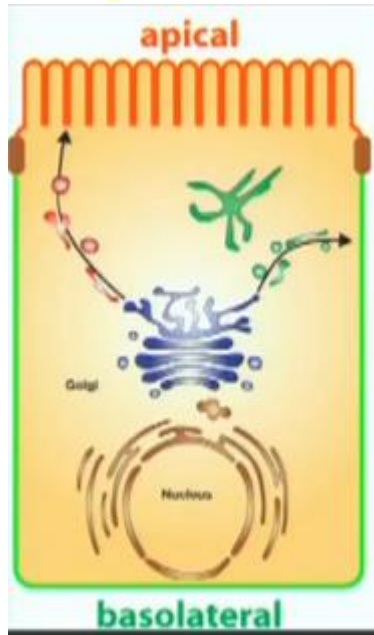
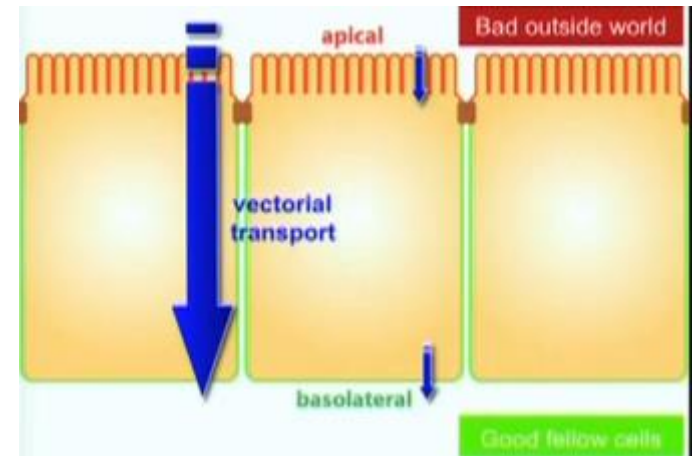
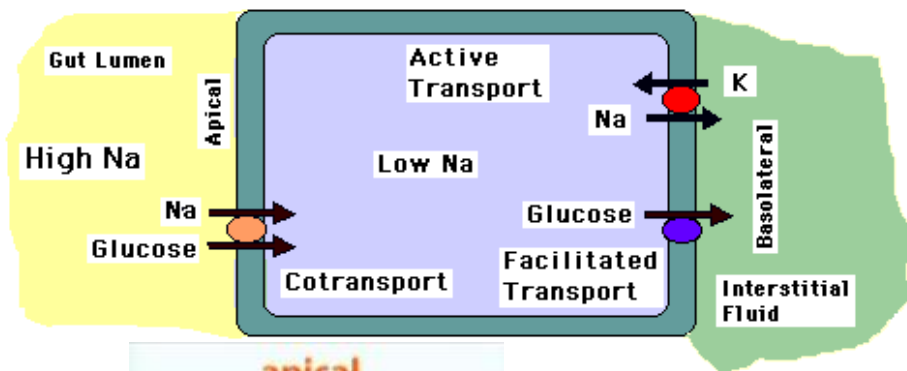


Figure 1 | General models for membrane structure. a, The Singer-Nicholson 'fluid mosaic model' (ref. 1). b, An amended and updated version.

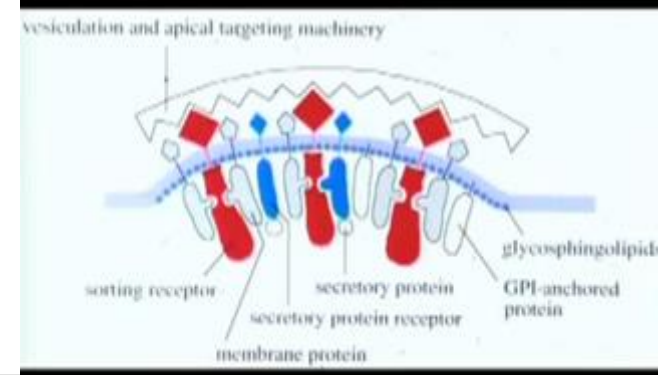


# Específica distribución de proteínas en una misma membrana celular



- **Microdominios** pueden ser considerados una unidad funcional que involucra a diferentes tipos de proteínas, enzimas etc

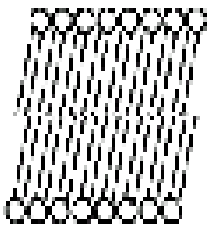
# Balsas de lípidos o rafts



- No todos los lípidos y proteínas se mueven solos de manera libre.
- Hay asociaciones específicas que permiten explicar la polaridad de las células, la señalización en sitios de función única.
- **Balsas de lípidos.** Los esfingolípidos en la membrana plasmática en la cara externa de la membrana pueden separarse de los glicerofosfolípidos y co-localizan con el colesterol en la membrana en **microdominios (lipid rafts).**

# Diferentes fases de la membrana

## B Membrane phases



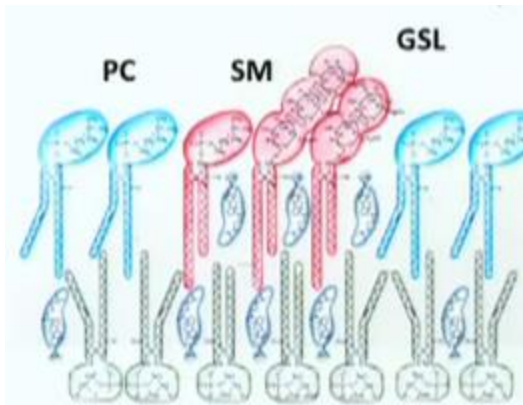
gel



liquid disordered (l<sub>d</sub>)

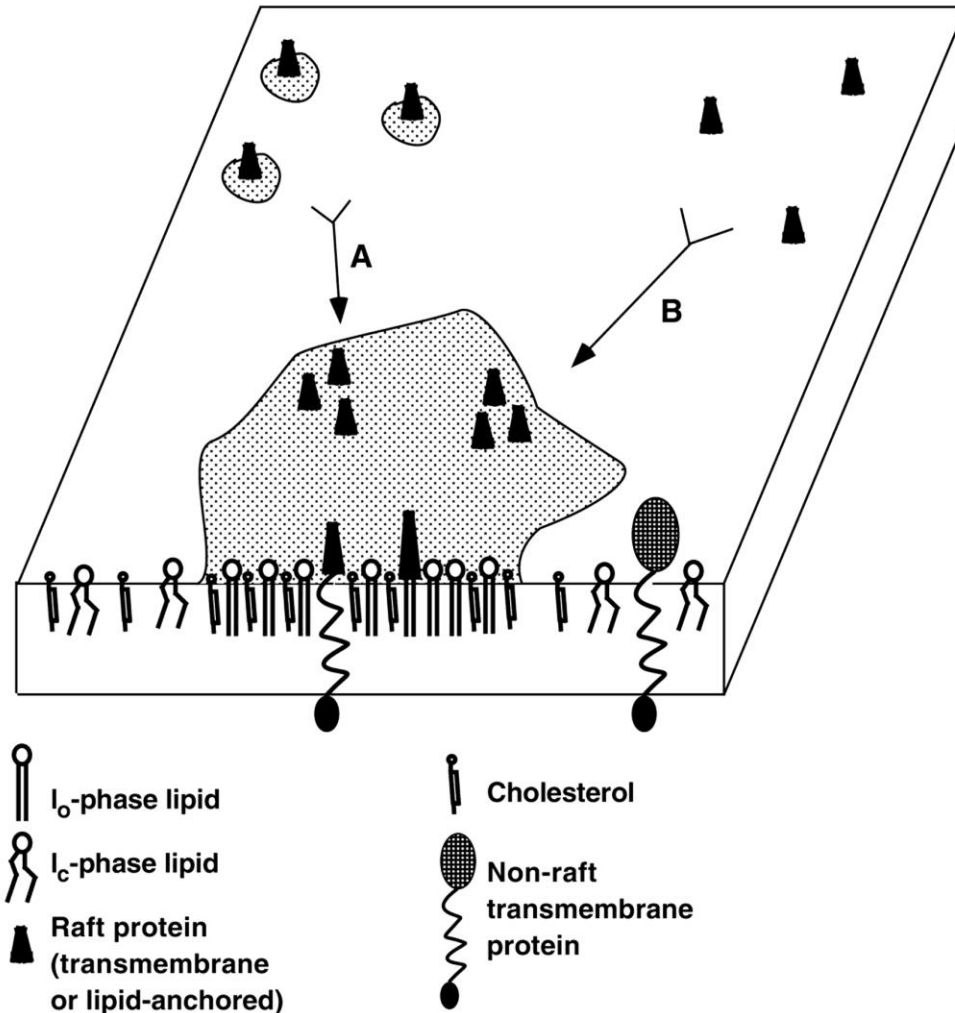


liquid ordered (l<sub>o</sub>)



- ¿Cómo explicar que colesterol y los esfingolípidos tiendan a formar microdominios?
- Temperaturas de fusión muy altas y muy parecidas entre los lípidos en microdominios.

# Model of raft organization

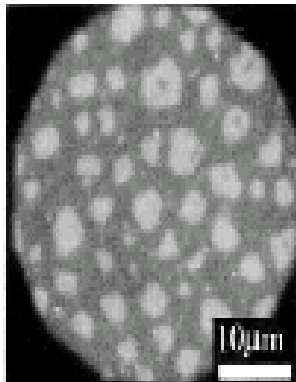


# Artefactos por el uso de detergentes?

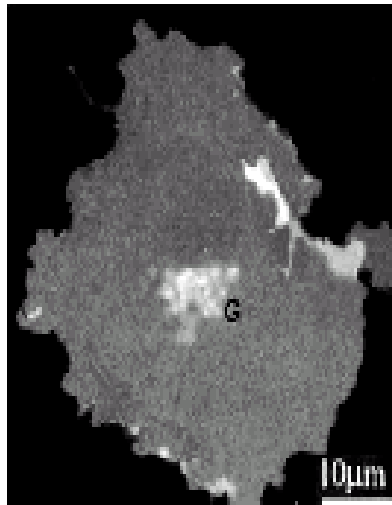
- Son resistentes a la solubilización con detergentes, lo que ha facilitado su aislamiento y caracterización.

A GPI-anchored proteins

model membrane



live cell



## Box 4 | Common tools to disrupt rafts

### Cholesterol sequestration

- Antibiotics:  
Filipin | Nystatin | Amphotericin
- Pore-forming agents:  
Saponin | Digitonin | Streptolysin O

### Cholesterol depletion

- Methyl- $\beta$ -cyclodextrin

### Inhibition of cholesterol biosynthesis

- Lovastatin

### Perturbation of raft stability

- Exogenous cholesterol
- Exogenous gangliosides
- Exogenous polyunsaturated fatty acids



# Nomenclatura de los Rafts

Table 2 | **Raft nomenclature**

## *Present raft nomenclature\**

Rafts | DRMs | DIGs | DICs | GPI domains | Glycosphingolipid signalling domains | Caveolae-like domains | Microdomains | LDM | Liquid-ordered domains | DIM | GEMs | TIFF

## *Suggested raft nomenclature*

|                   | <b>I. Rafts</b>   | <b>II. Clustered rafts</b>   | <b>III. DRMs</b>   | <b>IV. Caveolae</b>   |
|-------------------|---|--|--|---|
| <b>Components</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glycosphingolipids</li> <li>• Cholesterol</li> <li>• Lipid-modified proteins containing saturated acyl chains:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– GPI-anchored proteins</li> <li>– Doubly acylated Src-type kinases</li> </ul> </li> <li>• Transmembrane proteins</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rafts clustered by:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Antibody</li> <li>– Lectin</li> <li>– Adjacent cell proteins</li> <li>– Physiological crosslinking proteins</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rafts remaining insoluble after treatment on ice with detergent‡§: Triton X-100 (most popular), Brij-58, CHAPS, NP-40</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Raft proteins and lipids</li> <li>• Caveolins</li> </ul>               |
| <b>Properties</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 nanometres in diameter</li> <li>• Mobile (<math>\sim 10^{-8} \text{ cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}</math>)</li> <li>• Liquid-ordered phase</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Large, often hundreds of nanometres to micrometres in size</li> <li>• Often bound to cytoskeleton</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Float to low density in sucrose or Optiprep™ density gradients</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphological 'cave-like' invaginations on the cell surface</li> </ul> |
| <b>Comments</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Native rafts are only detected in living cells</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clustering is used both artificially and physiologically to trigger signalling cascades</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-native (aggregated) raft</li> <li>• Variable effects depending on:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Detergent type</li> <li>– Detergent:lipid ratio</li> <li>– Cell type</li> </ul> </li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Raft subcategory</li> <li>• Highly specialized</li> </ul>              |

\* DRM, detergent-resistant membrane; DIG, detergent-insoluble glycolipid-rich domain; DIC, detergent-insoluble complex; LDM, low-density membrane; DIM, detergent-insoluble material; GEM, glycolipid-enriched membrane; TIFF, Triton X-100 insoluble floating fraction.

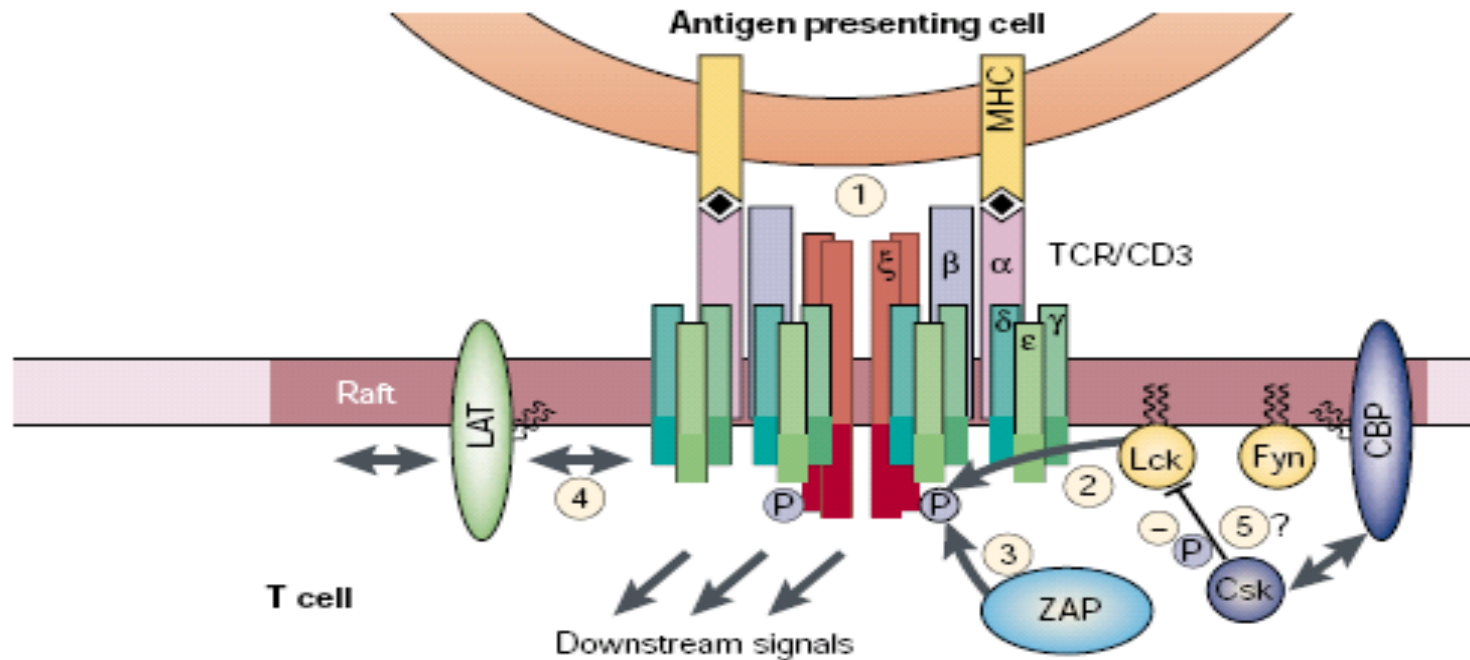
‡Care should be taken when choosing solubilization conditions for co-immunoprecipitation experiments, as these popular detergents do not solubilize rafts on ice.

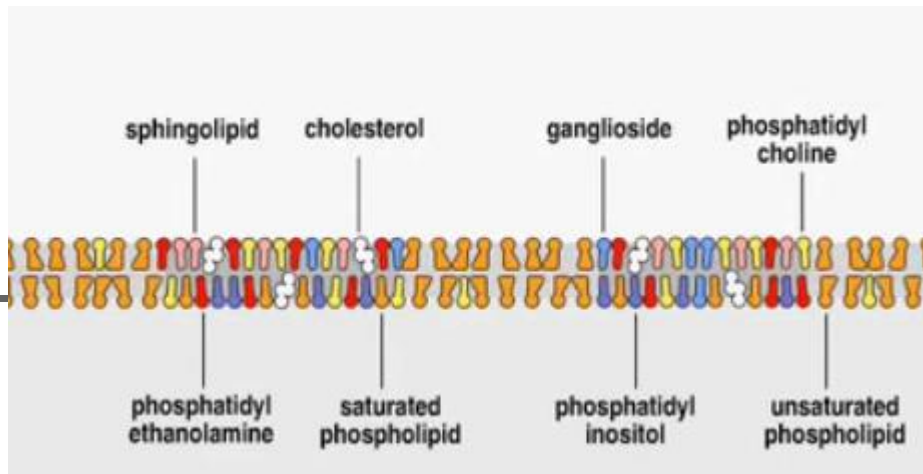
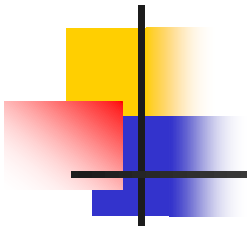
§Co-localization of proteins in rafts or DRMs could be mistaken for direct protein-protein interactions if rafts are not completely solubilized.

§Rafts can be solubilized in octyl glucoside or in the detergents listed above at raised temperatures.

# Eventos tempranos de la señalización en rafts

## b TCR signalling

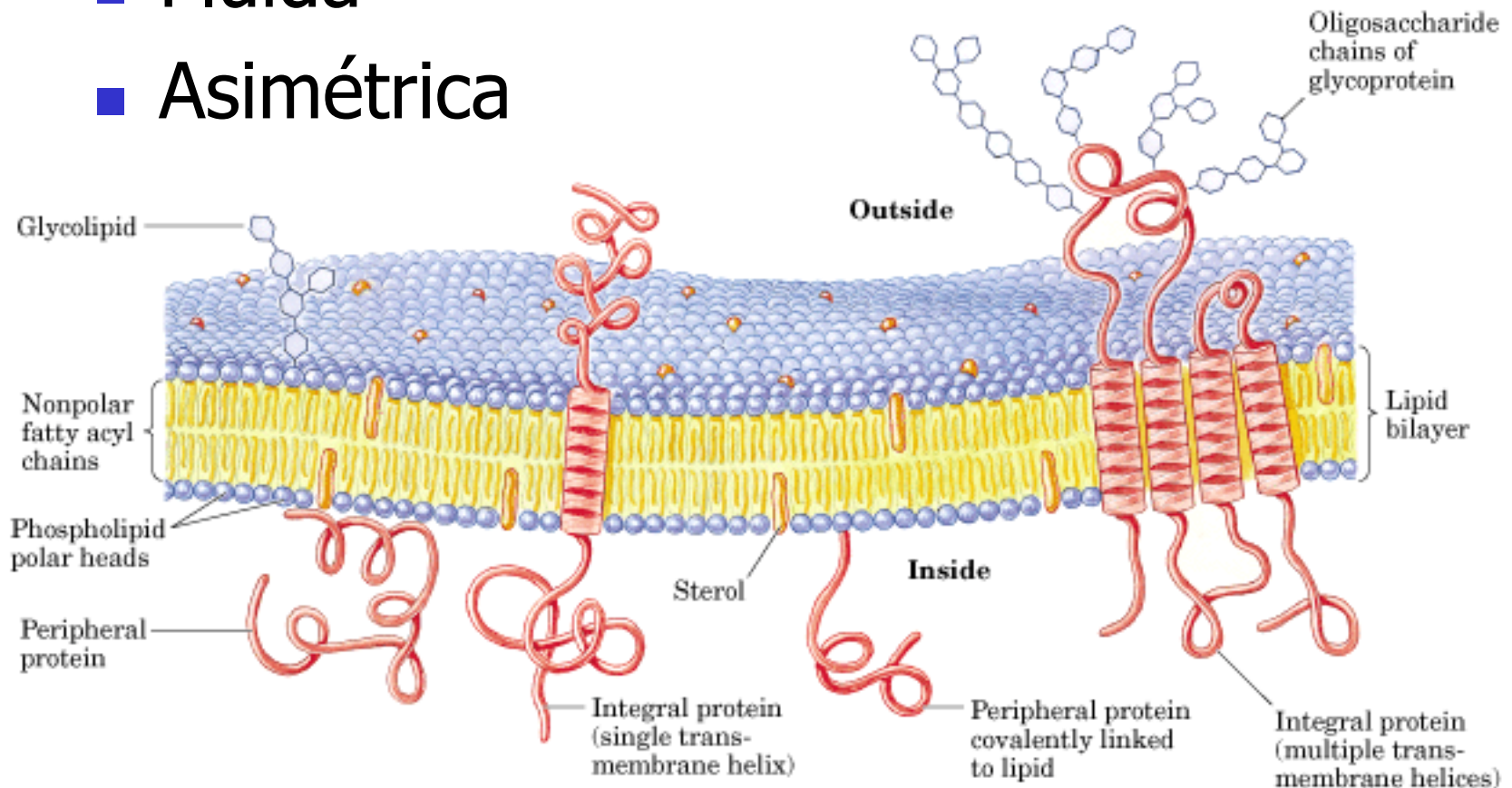


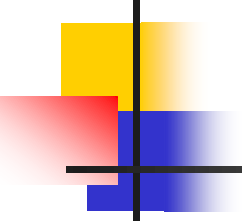




# Propiedades de la membrana

- Fluída
- Asimétrica





---

# Como estudiar a las proteínas de membrana?

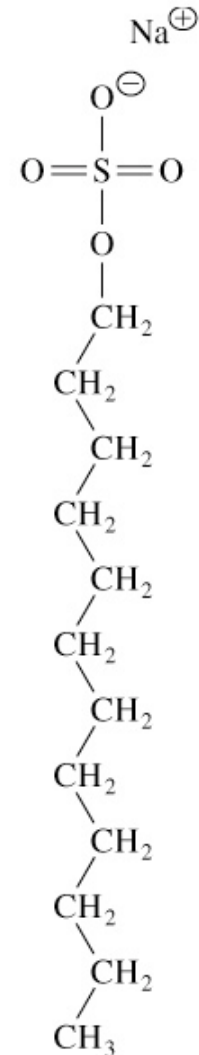
Purificación

Reconstitución

Medición de actividad

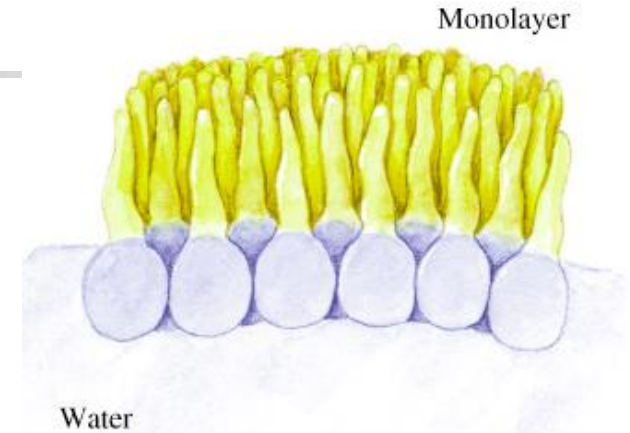
# Sodium dodecyl sulfate (SDS)

- Detergente sintético
- Con un tallo de 12-carbonos
- Grupo Polar sulfato

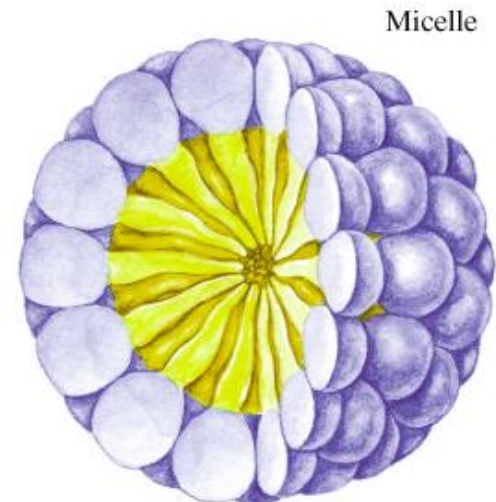


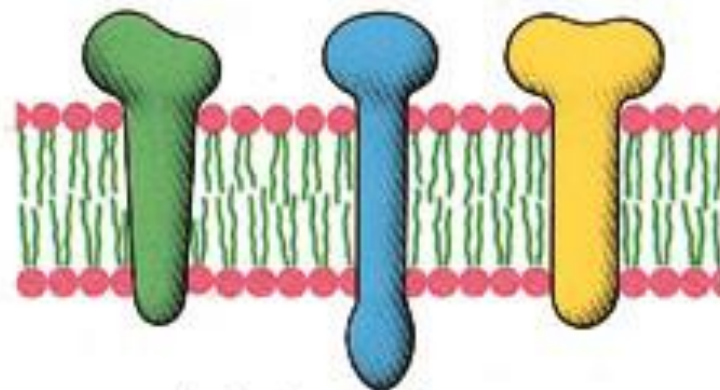
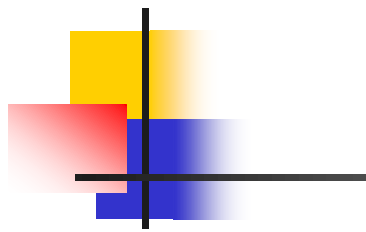
# Detergentes en agua

- Se forman en la superficie Monocapas.



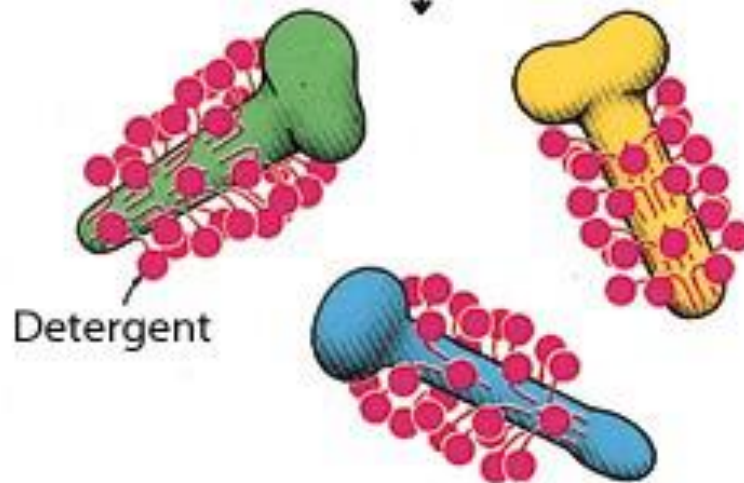
- A concentraciones altas de detergentes se forman **micelas**.



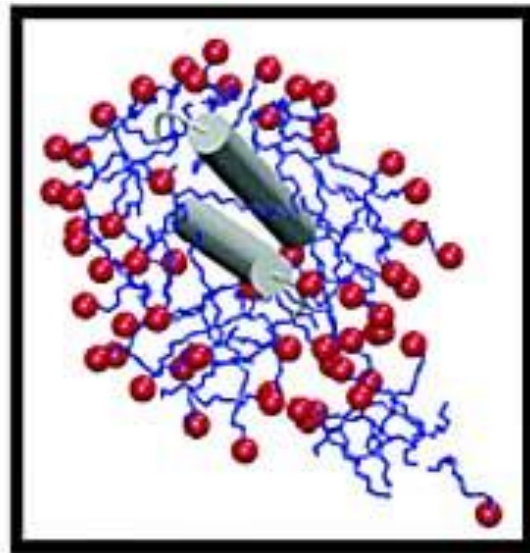
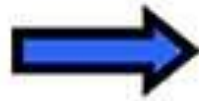
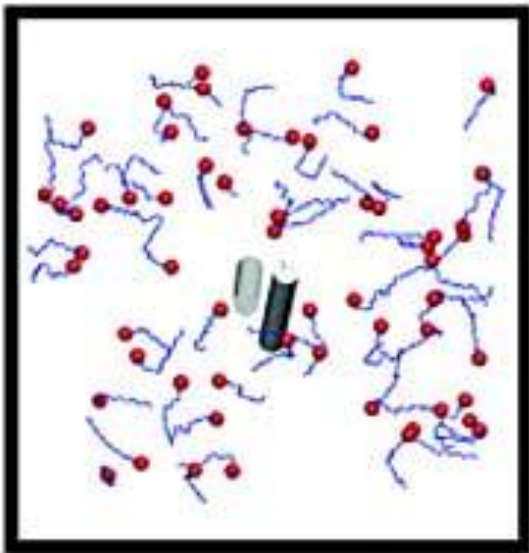
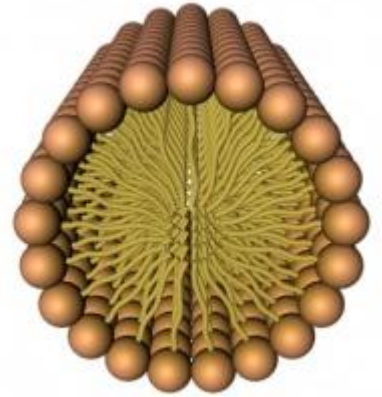
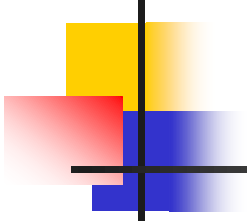


**Intact membrane**

↓ Detergent



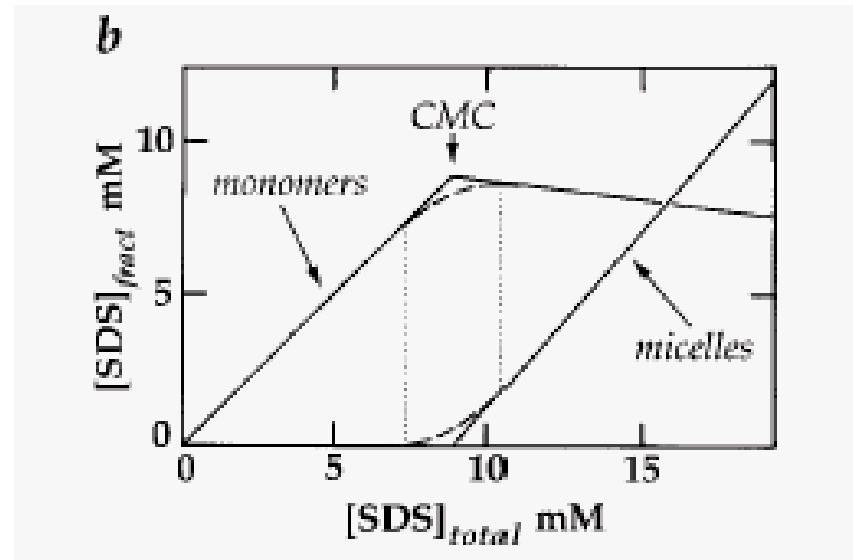
**Detergent-solubilized proteins**



# Concentración micelar crítica

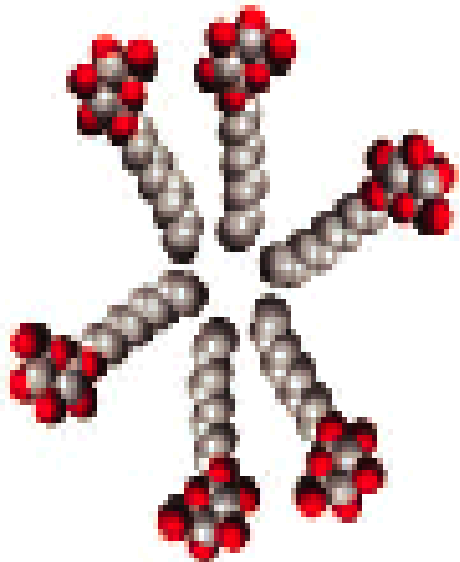
- ❑ Concentración a la cual un anfifilo es capaz de formar micelas es aquella que está cercana a su concentración micelar crítica (CMC).
- ❑ Dependerá del tipo de anfifilo y de las condiciones de la solución.

Ejemplo SDS presenta una CMC de aprox 1mM; Mientras que la mayoría de los lípidos biológicos presentan generalmente CMC menores de  $10^{-6}\text{M}$

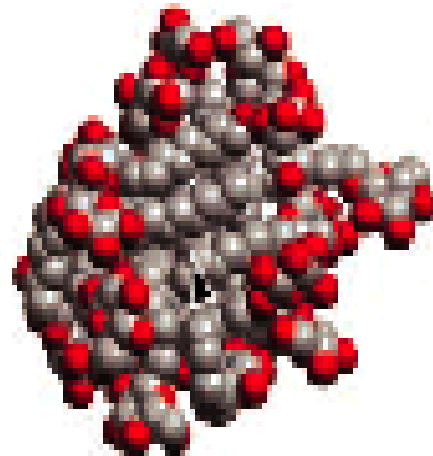


# Micelas de $\beta$ -octilglucósido

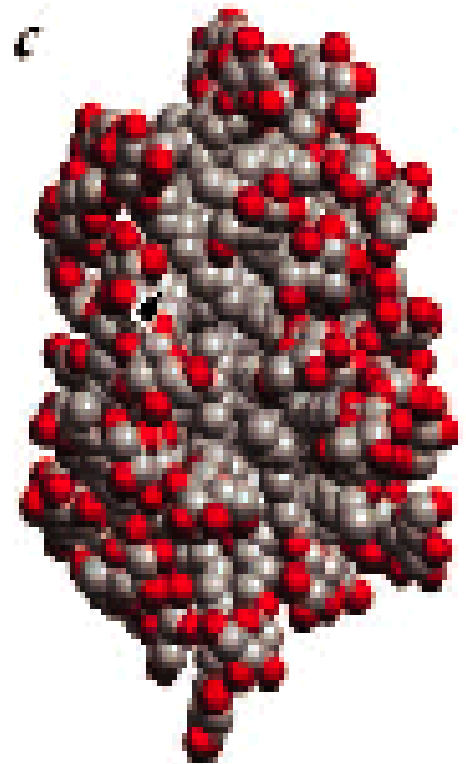
a



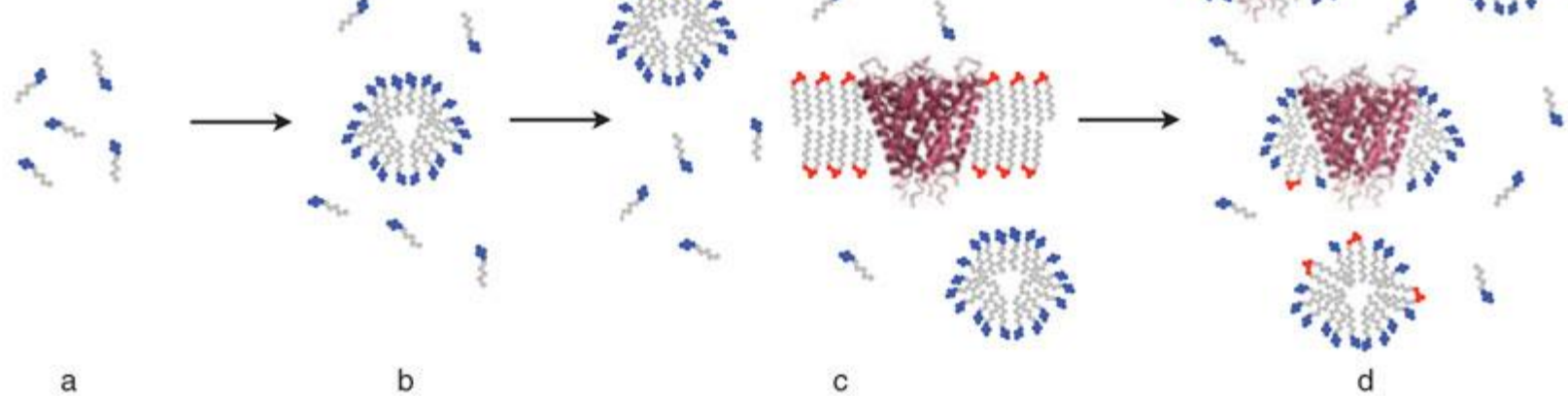
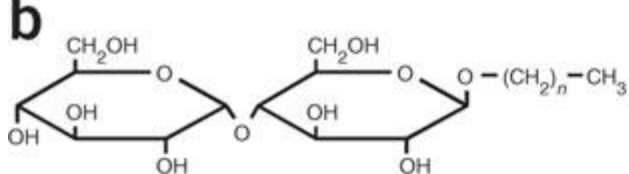
b



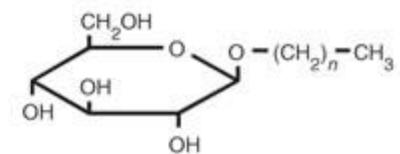
c



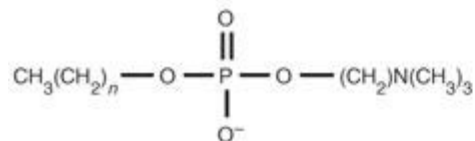


**a****b**

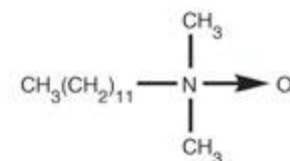
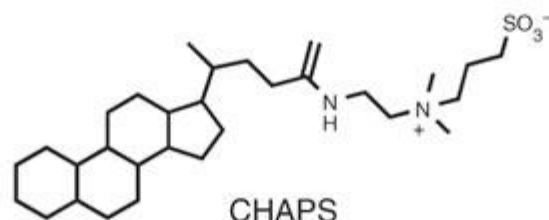
$n = 9$ , decyl- $\beta$ -D-maltopyranoside  
 $n = 10$ , undecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside  
 $n = 11$ , dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside



$n = 6$ , octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside  
 $n = 7$ , nonyl- $\beta$ -D-glucopyranoside



$n = 11$ , FOS-CHOLINE-12  
 $n = 12$ , FOS-CHOLINE-13  
 $n = 13$ , FOS-CHOLINE-14



LDAO

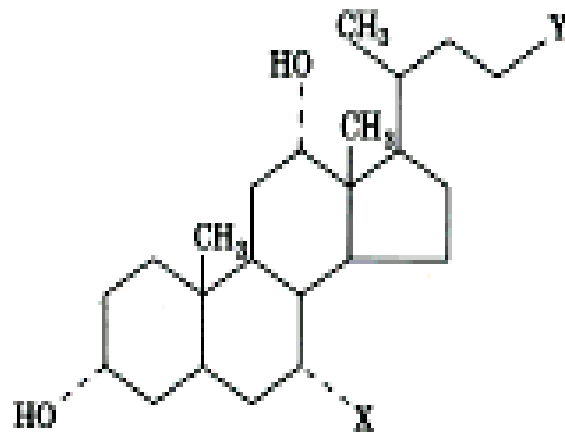
**c**

YiaA                      YagU  
bs   as                      bs   as

# Herramienta útil para el estudio de la membrana: Detergentes



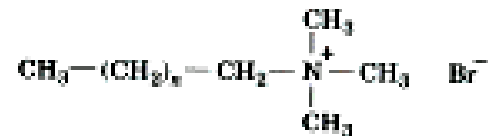
**Dodecil sulfato sódico (SDS)**



X = H, Y = COO<sup>-</sup> Na<sup>+</sup> **Desoxicólico sódico**

X = OH, Y = COO<sup>-</sup> Na<sup>+</sup> **Colato sódico**

X = OH, Y = CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> **CHAPS**



n = 10 **Bromuro de dodeciltrietilamonio (DTAB)**

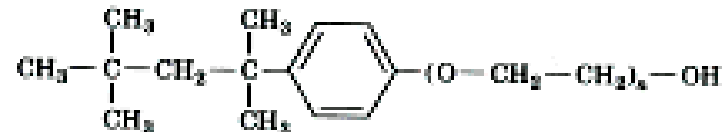
n = 15 **Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)**



**Polióxietilenoauril éter**

n = 4 **Brij 30**

n = 25 **Brij 35**



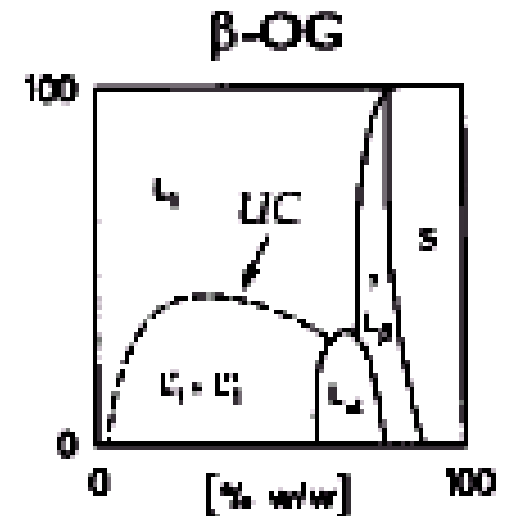
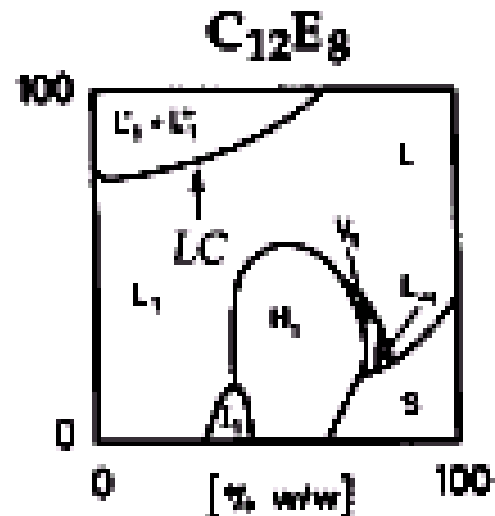
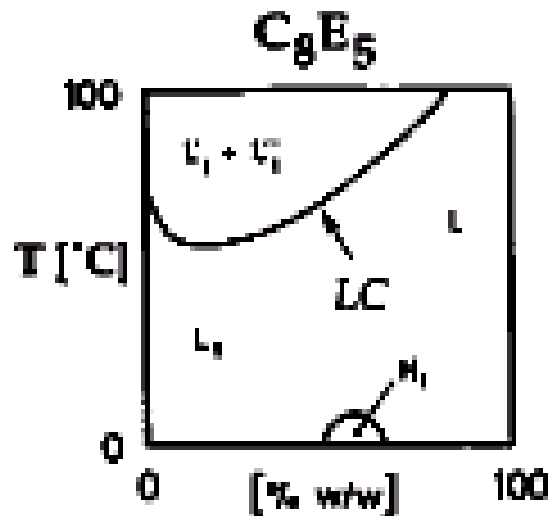
**Polióxietileno-p-isoctilfenil éter**

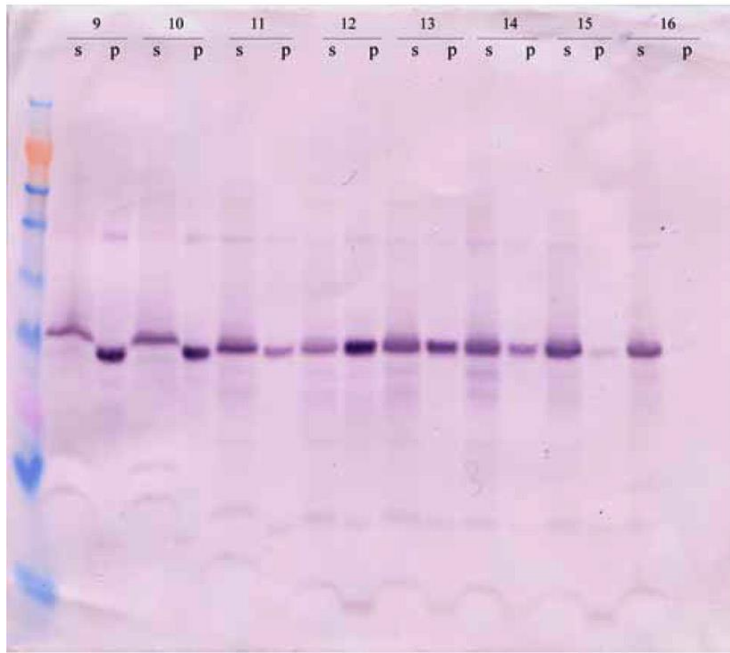
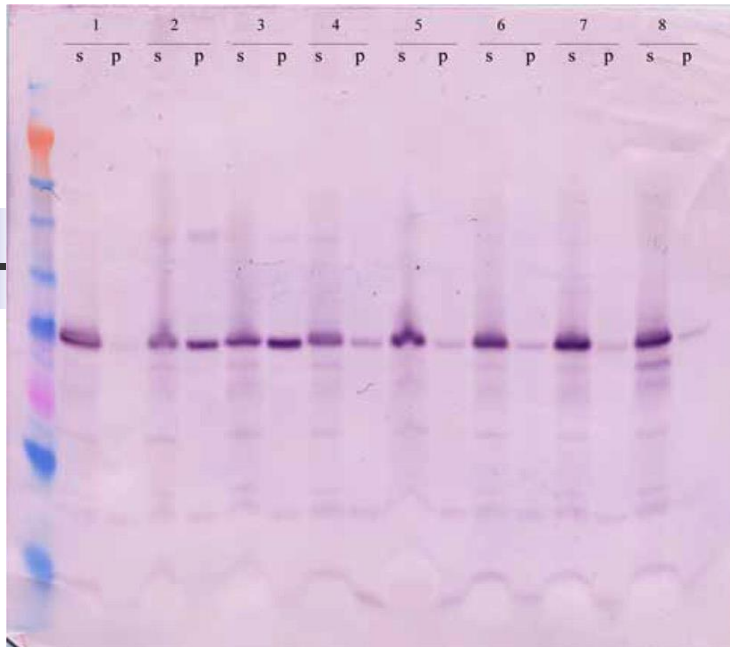
n = 5 **Triton X-30**

n = 10 **Triton X-100**

Las propiedades de formar diferentes estructuras micelares o lamelares de los detergentes pueden ayudar al :

- Aislamiento de proteínas.
- Reconstitución
- Cristalización





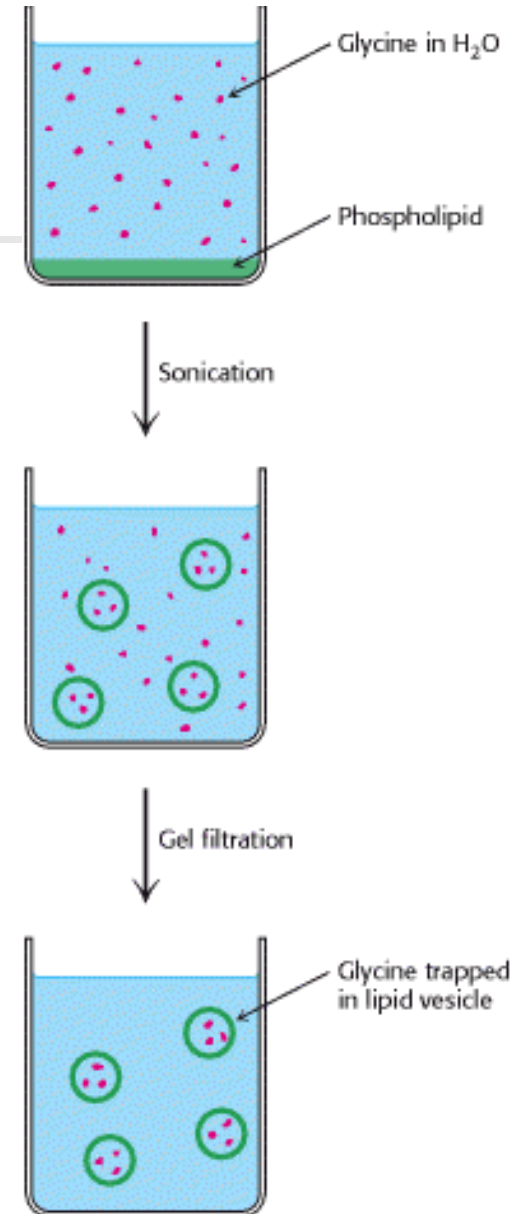
|    | <u>Detergent</u>              | <u>Solubility</u> |
|----|-------------------------------|-------------------|
| 1  | SDS                           | ++                |
| 2  | APO-10                        | +                 |
| 3  | C <sub>8</sub> E <sub>4</sub> | +                 |
| 4  | DAO-12                        | +                 |
| 5  | DDMAB                         | ++                |
| 6  | DMG-12                        | ++                |
| 7  | FOS-CHOLINE-12                | ++                |
| 8  | FOS-MEA-10                    | ++                |
| 9  | Glucoside-8                   | +                 |
| 10 | Hecameg                       | +                 |
| 11 | HEGA-10                       | +                 |
| 12 | LysoPC-12                     | +                 |
| 13 | DM                            | +                 |
| 14 | PC-7                          | +                 |
| 15 | Sucrose-10                    | ++                |
| 16 | Zwittergent 3-12              | ++                |

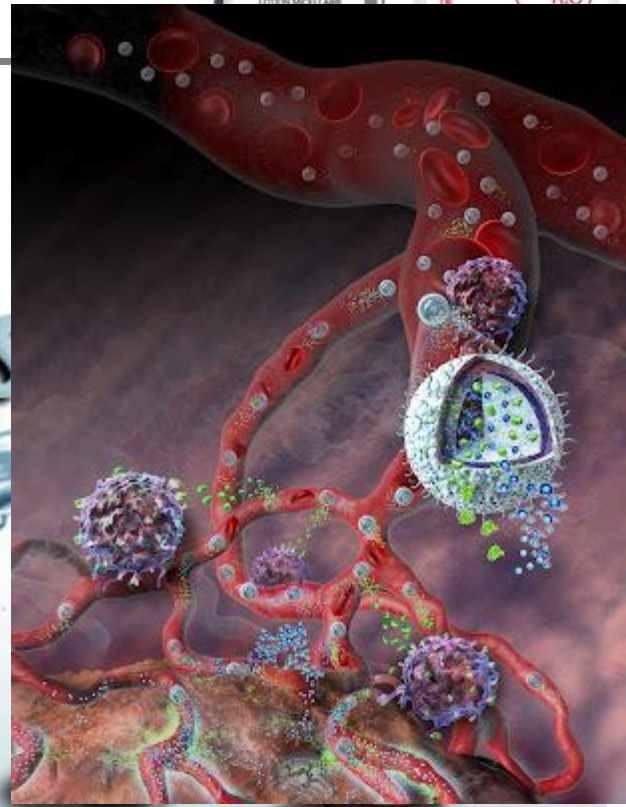
**Fig. 1. An example of solubilization screening.** s and p denote supernatant and pellet following solubilization with the detergents indicated in the table. This solubilization screen was performed on the *Mycobacterium tuberculosis* protein Rv0936.

# Preparation of Glycine-Containing Liposome

Liposomas:

**En la industria y medicina,** vehículo para fármacos, vitaminas, antioxidantes, transferencia de genes. **En investigación,** para estudiar transporte de compuestos a través de proteínas insertadas en ellos. Reconstitución





# LIPOSOMAS



**Colágeno y Vitaminas: A, C y E**