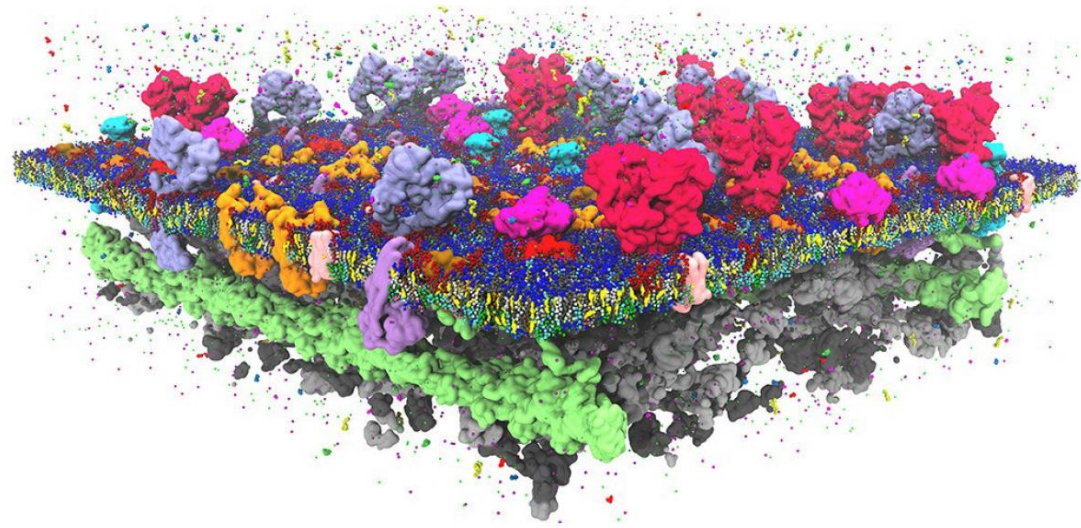
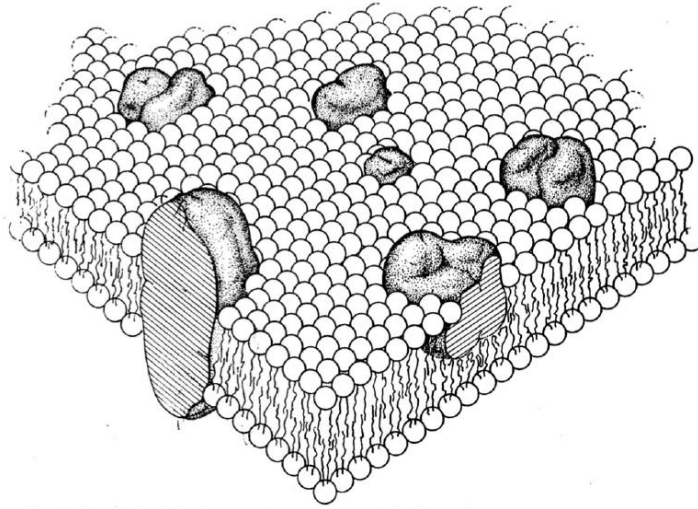


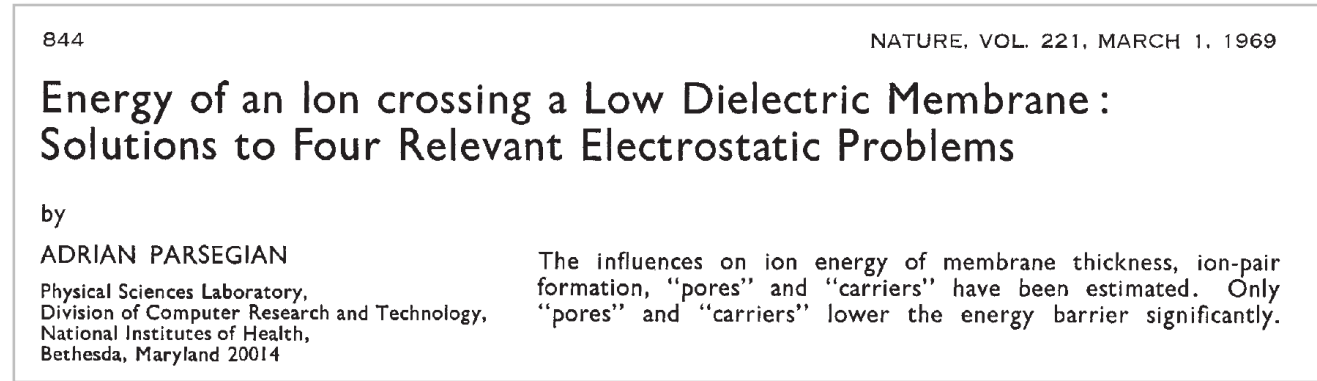
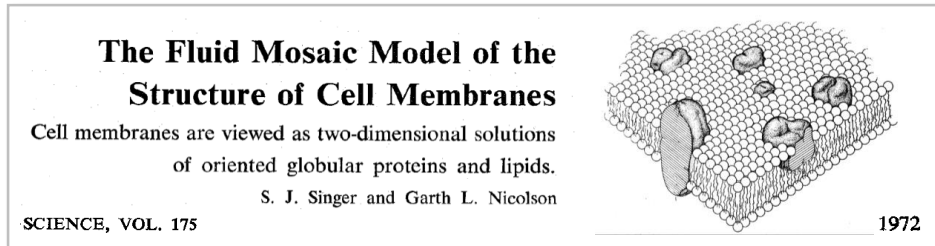
Matinal de Biomembranas



De la estructura a la función de las proteínas de membrana

María Queralt Martín, Universitat Jaume I

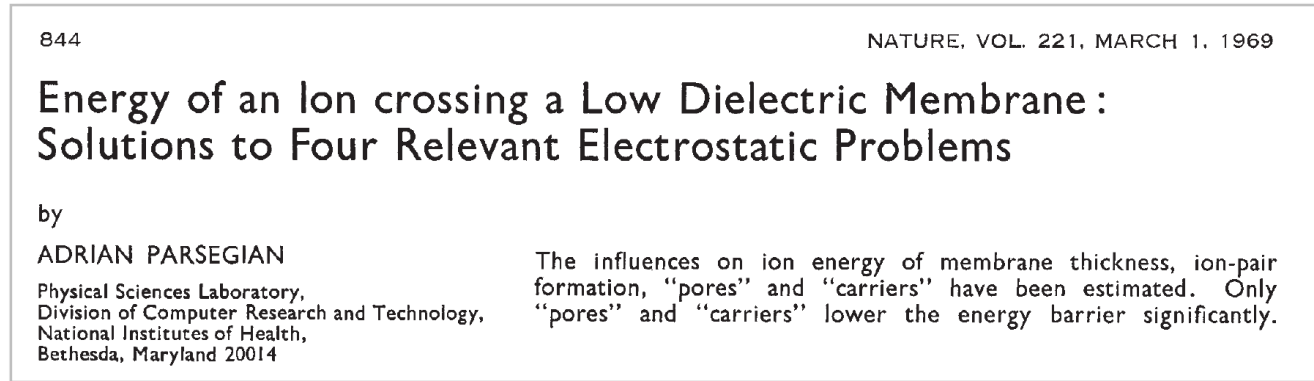
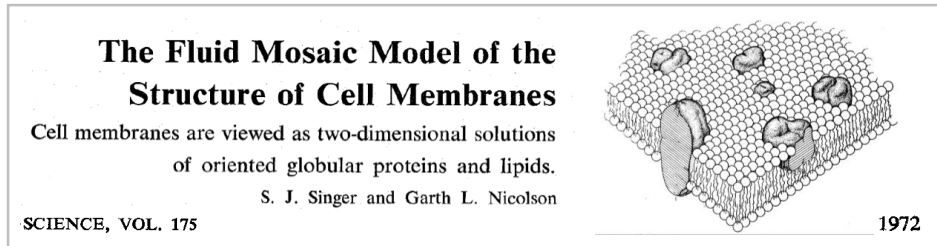
El modelo de la membrana biológica



Desde un punto de vista físico

- La membrana es un medio hidrofóbico → Baja polarizabilidad → Baja constante dieléctrica ϵ

El modelo de la membrana biológica



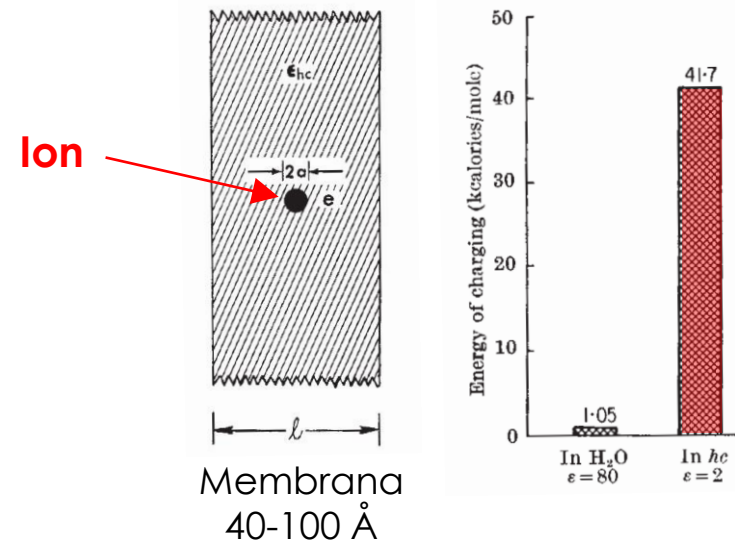
Desde un punto de vista físico

- La membrana es un medio hidrofóbico → Baja polarizabilidad → Baja constante dieléctrica ϵ
- La energía para poner un ion dentro de este medio es **demasiado alta**

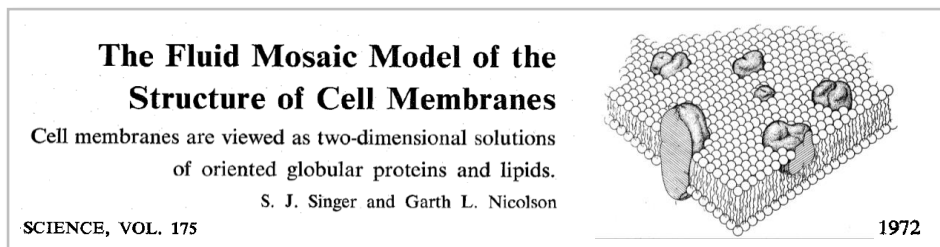
$$E \approx \frac{e^2}{2\epsilon a}$$

Agua: $\epsilon_w \approx 80$
Membrana: $\epsilon_{hc} \approx 2$

- Factores que pueden alterar este valor:
- Membrana finita
 - Otros iones en la vecindad



El modelo de la membrana biológica



844

NATURE, VOL. 221, MARCH 1, 1969

Energy of an Ion crossing a Low Dielectric Membrane: Solutions to Four Relevant Electrostatic Problems

by

ADRIAN PARSEKIAN

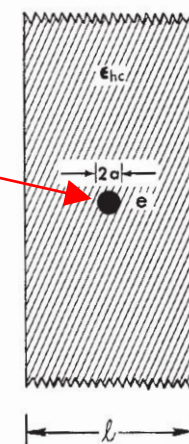
Physical Sciences Laboratory,
Division of Computer Research and Technology,
National Institutes of Health,
Bethesda, Maryland 20014

The influences on ion energy of membrane thickness, ion-pair formation, "pores" and "carriers" have been estimated. Only "pores" and "carriers" lower the energy barrier significantly.

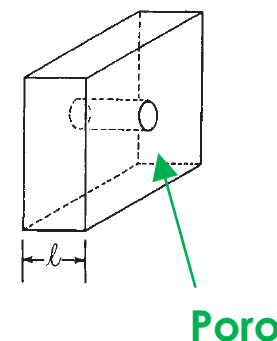
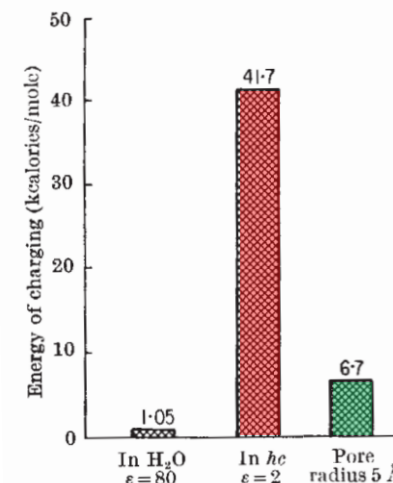
Desde un punto de vista físico

- La membrana es un medio hidrofóbico → Baja polarizabilidad → Baja constante dieléctrica ϵ
- La energía para poner un ion dentro de este medio es **demasiado alta**
- La existencia de un "poro" con mayor ϵ sí reduciría esta energía a niveles más razonables

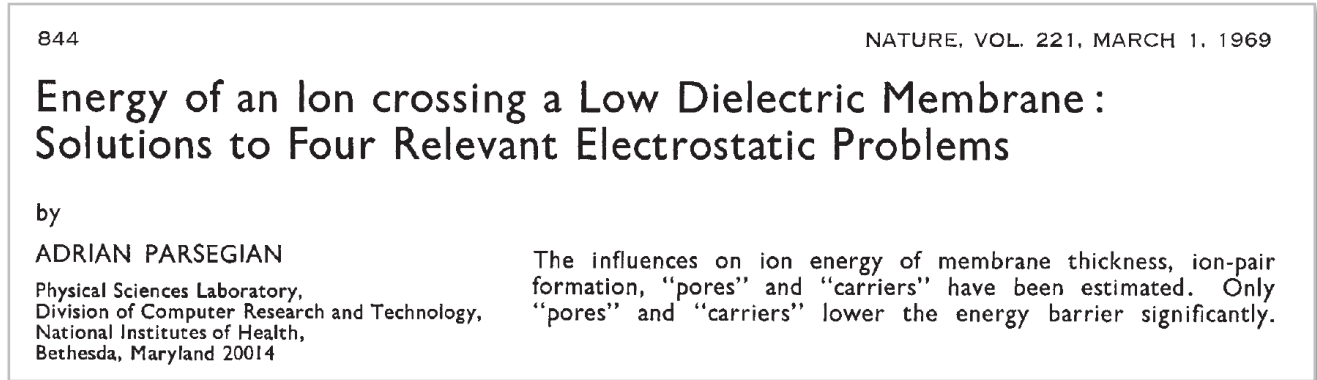
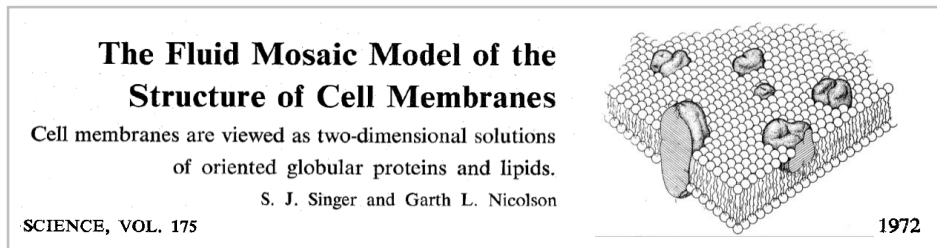
Ion



Membrana
40-100 Å



El modelo de la membrana biológica

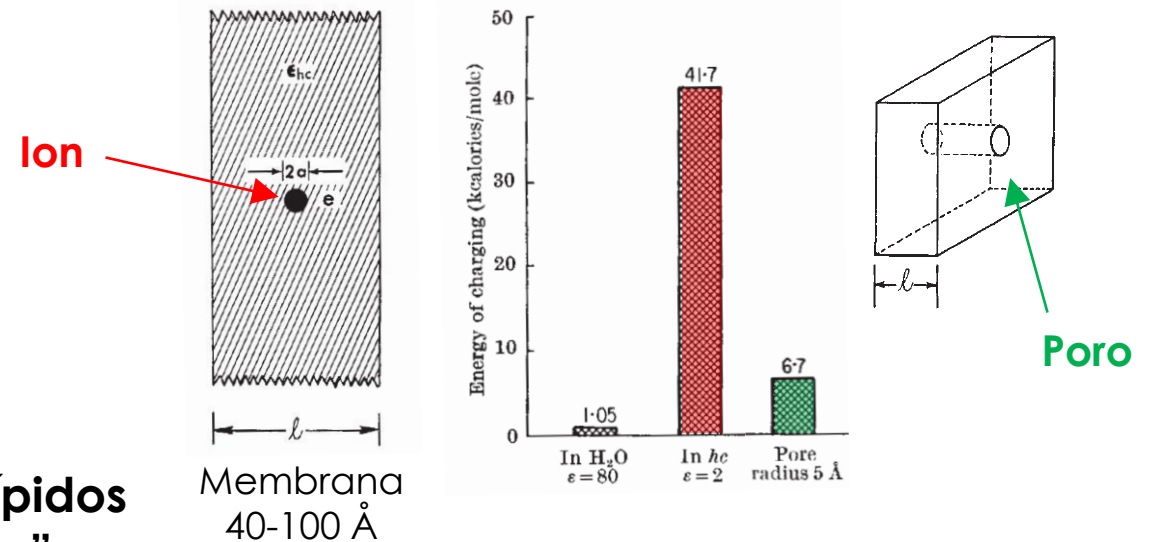


Desde un punto de vista físico

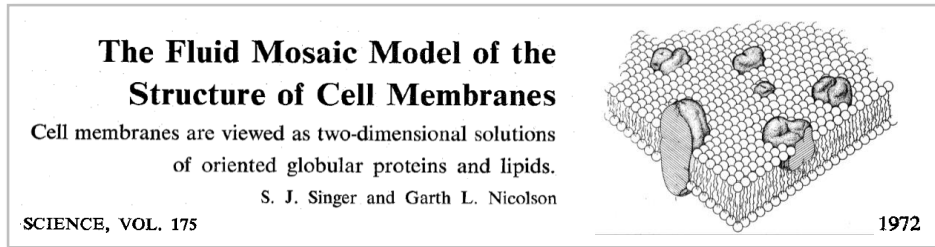
- La membrana es un medio hidrofóbico → Baja polarizabilidad → Baja constante dieléctrica ϵ
- La energía para poner un ion dentro de este medio es **demasiado alta**
- La existencia de un "**poro**" con mayor ϵ sí reduciría esta energía a niveles más razonables



Estimaciones compatibles con una bicapa de fosfolípidos con proteínas insertadas que actúan como "poros"



Las proteínas de membrana en el modelo del mosaico fluido



Dos tipos de proteínas:

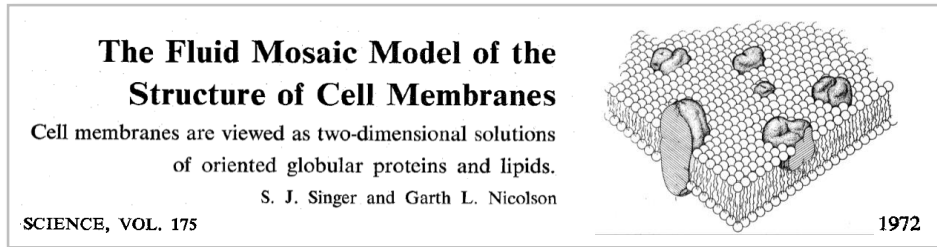
Integrales

- Difíciles de disociar de la membrana
- Permanecen asociadas a lípidos al aislarlas
- Son altamente insolubles o se agregan en medios acuosos

Periféricas

- Se disocian con tratamientos suaves
- No permanecen asociadas a moléculas de lípido
- Son altamente solubles en medios acuosos

Las proteínas de membrana en el modelo del mosaico fluido

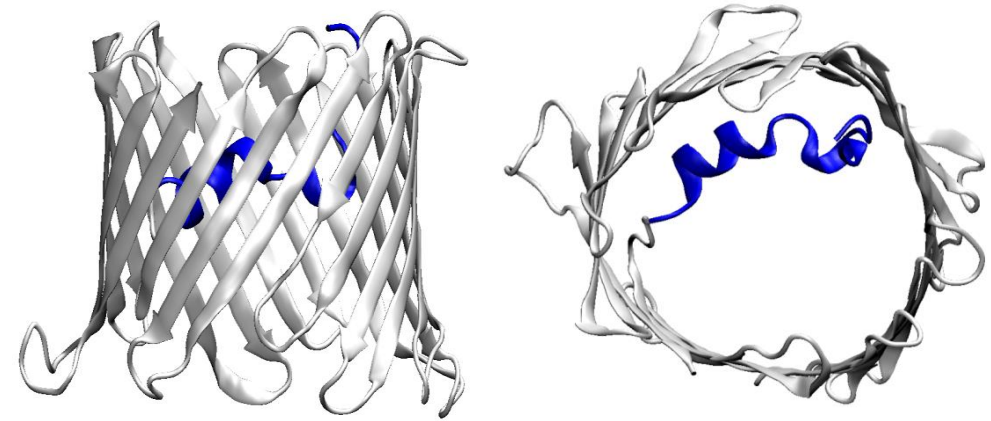


Dos tipos de proteínas:

Integrales

- Difíciles de disociar de la membrana
- Permanecen asociadas a lípidos al aislarlas
- Son altamente insolubles o se agregan en medios acuosos

Proteína integral que actúa como “poro”

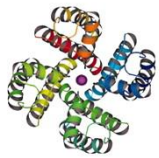


Voltage Dependent Anion Channel (VDAC)

- Permite el transporte **pasivo** de iones y moléculas
- Interacciona con otras **proteínas**
- Interacciona con el **lípid**o, que regula su función

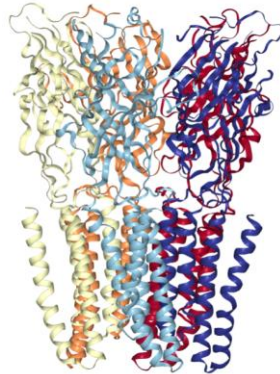
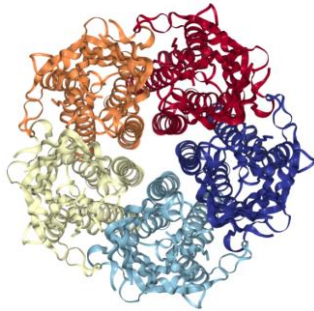
Muchos otros canales *habitan* las membranas celulares

Canal K⁺

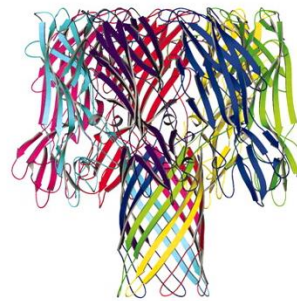
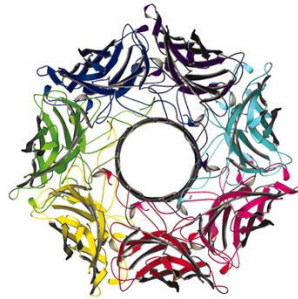


Transmisión
sináptica

GLIC pentameric
ligand-gated
ion channel



Hemolisina α de
Staphylococcus
aureus

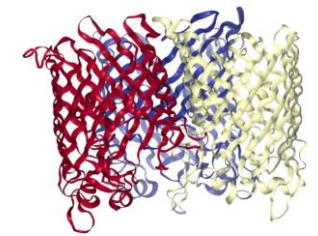
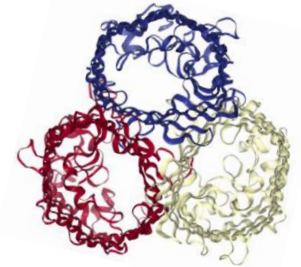


Formación de poros que
alteran la homeostasis

Canal PA₆₃ de la
toxina de ántrax
(*Bacillus anthracis*)



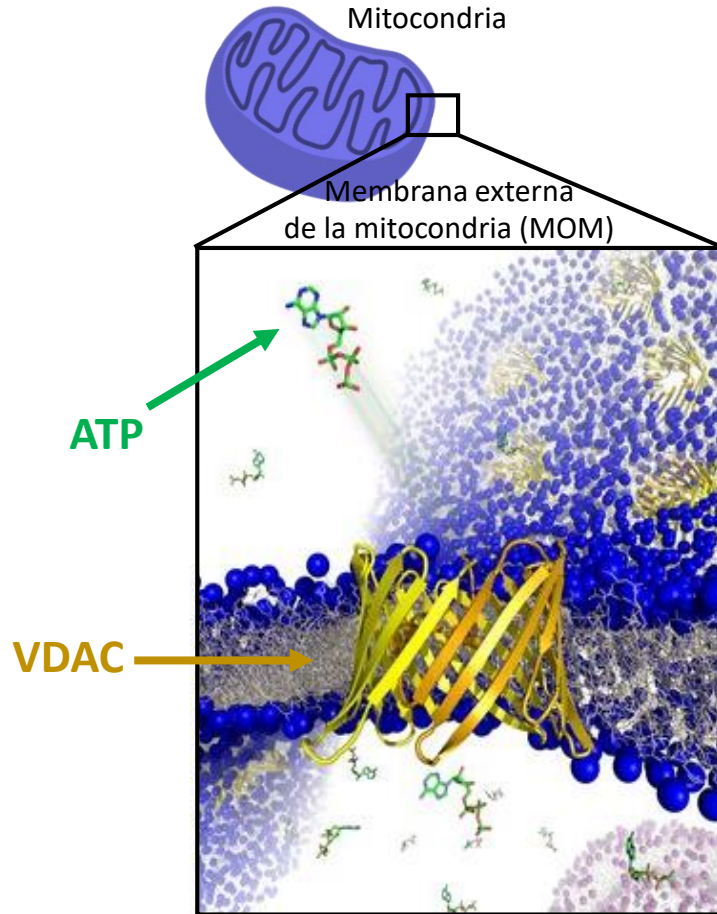
Porina bacterial
OmpF
(*Escherichia coli*)



Transporte de
antibióticos

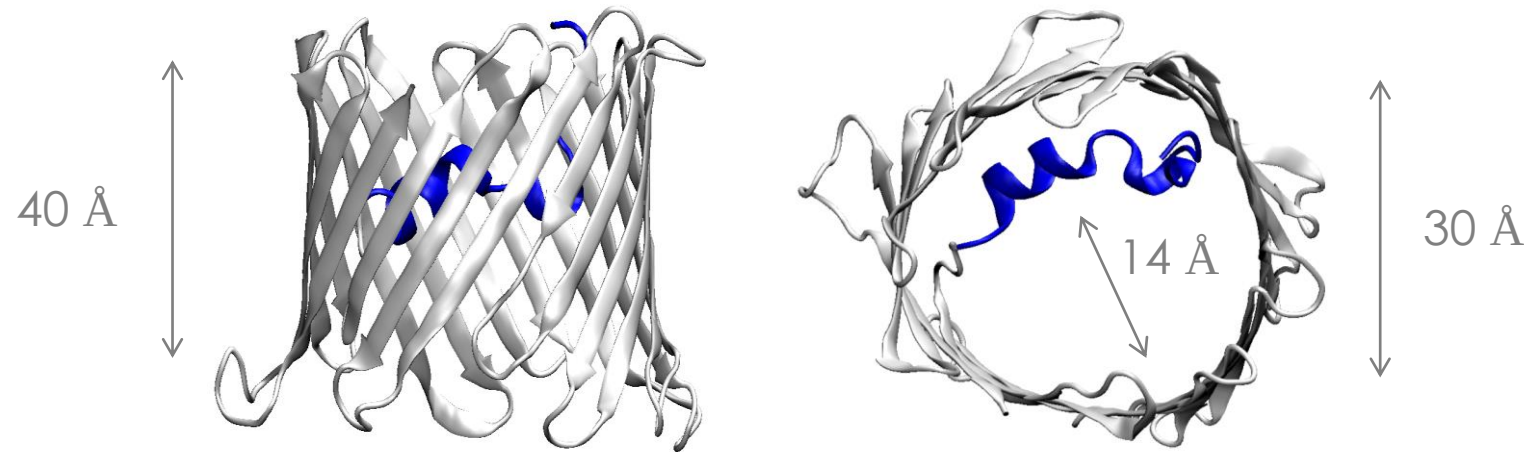
5 nm

VDAC: un canal en la membrana externa de la mitocondria



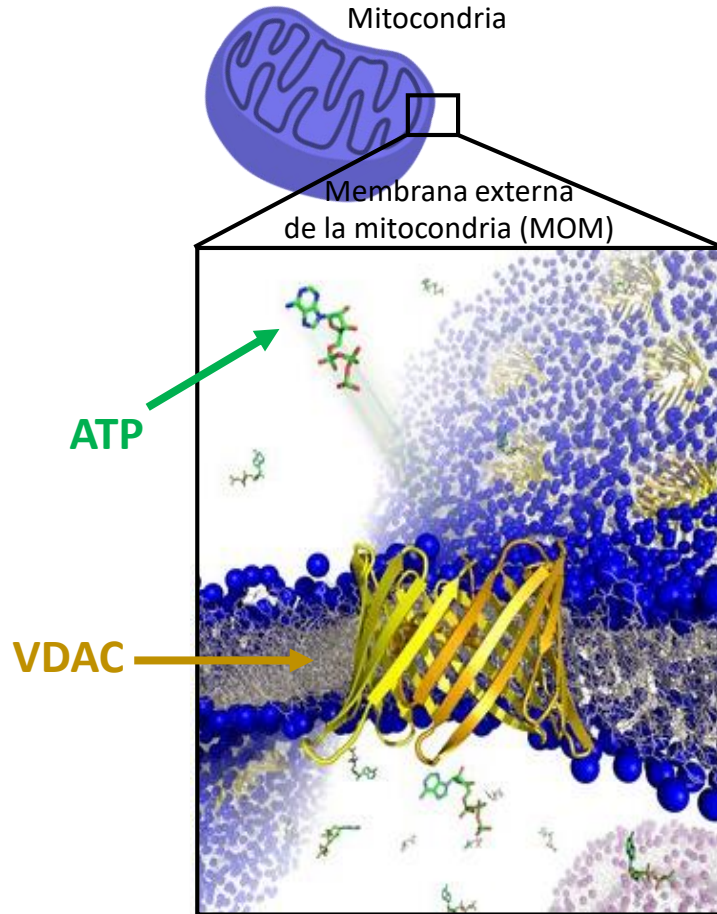
Ujwal et al., *PNAS* 2008

- Canal barril β relativamente grande
- Permite la difusión pasiva de iones y pequeños metabolitos (tamaño < 2 kDa)
- Carácter multiiónico, iones hidratados



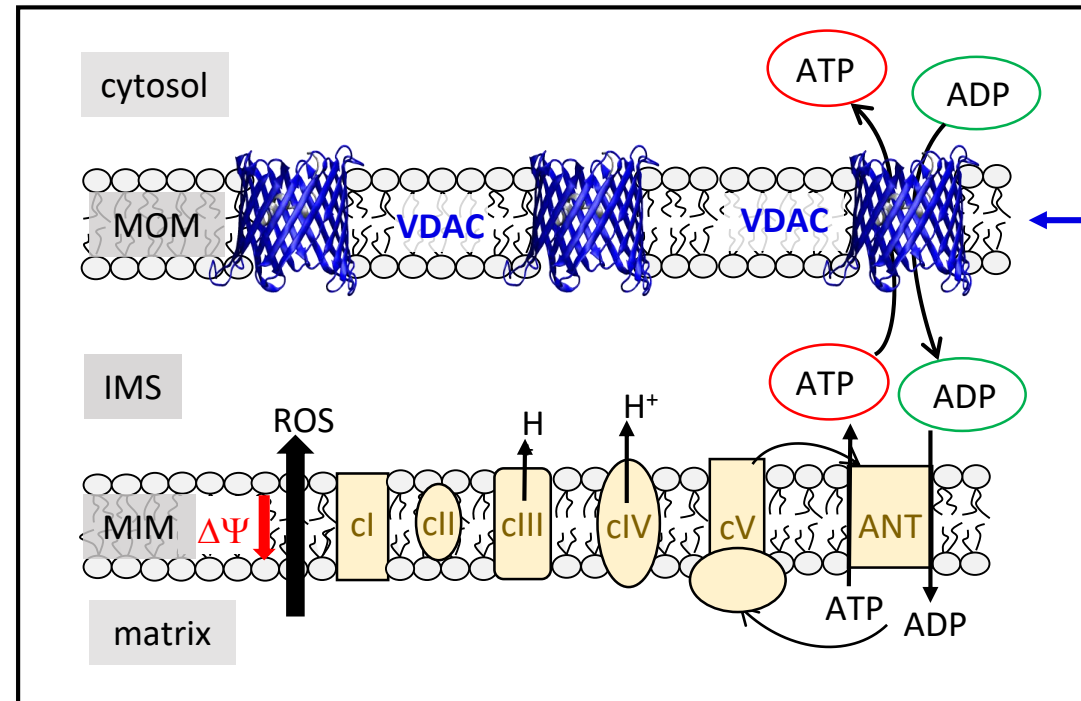
Proteína de 33 kDa, barril β de 19 láminas

VDAC: un canal en la membrana externa de la mitocondria



Ujwal et al., *PNAS* 2008

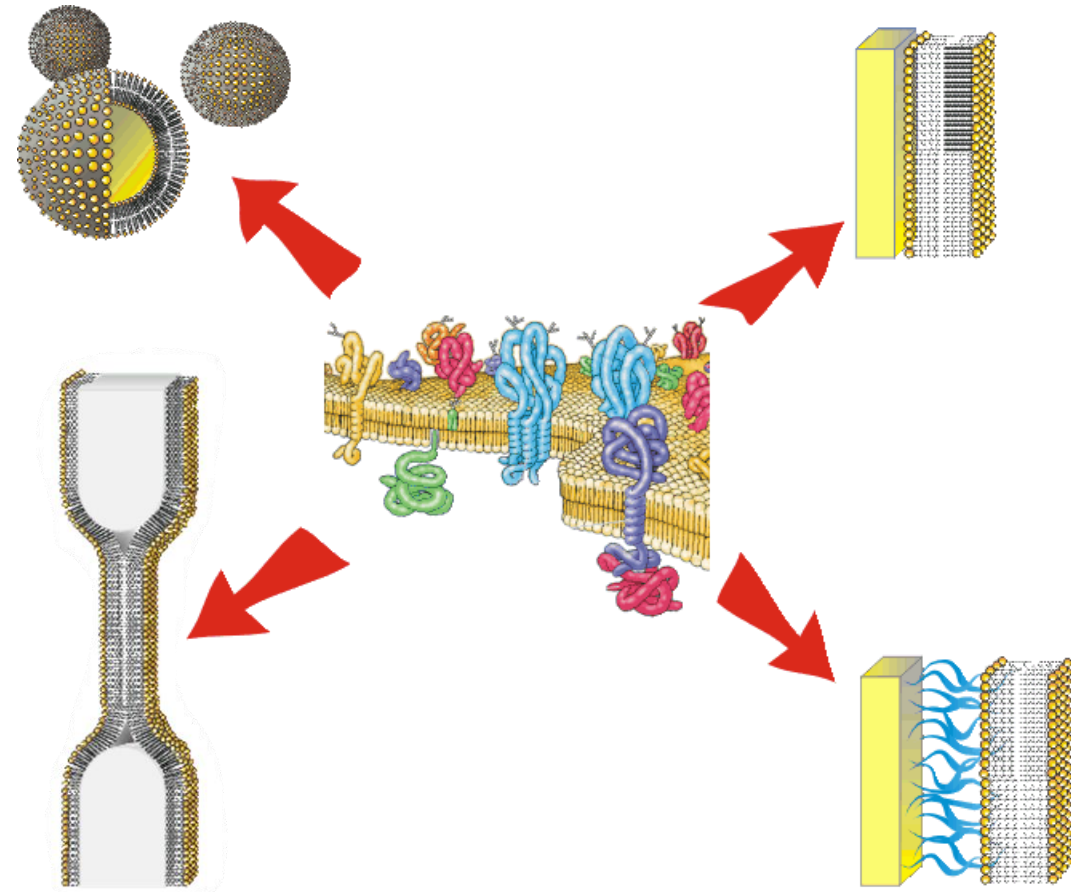
Localización única en la interfase entre la mitocondria y el citosol



Vía principal de paso para las moléculas hidrofílicas

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

- Método que nos permita estudiar las proteínas integrales que forman los “poros” de manera aislada
- Que tengamos control sobre los componentes hidrofóbicos de la membrana → Sobre las moléculas de lípido
- Que tengamos suficiente resolución temporal para estudiar la función en tiempo real

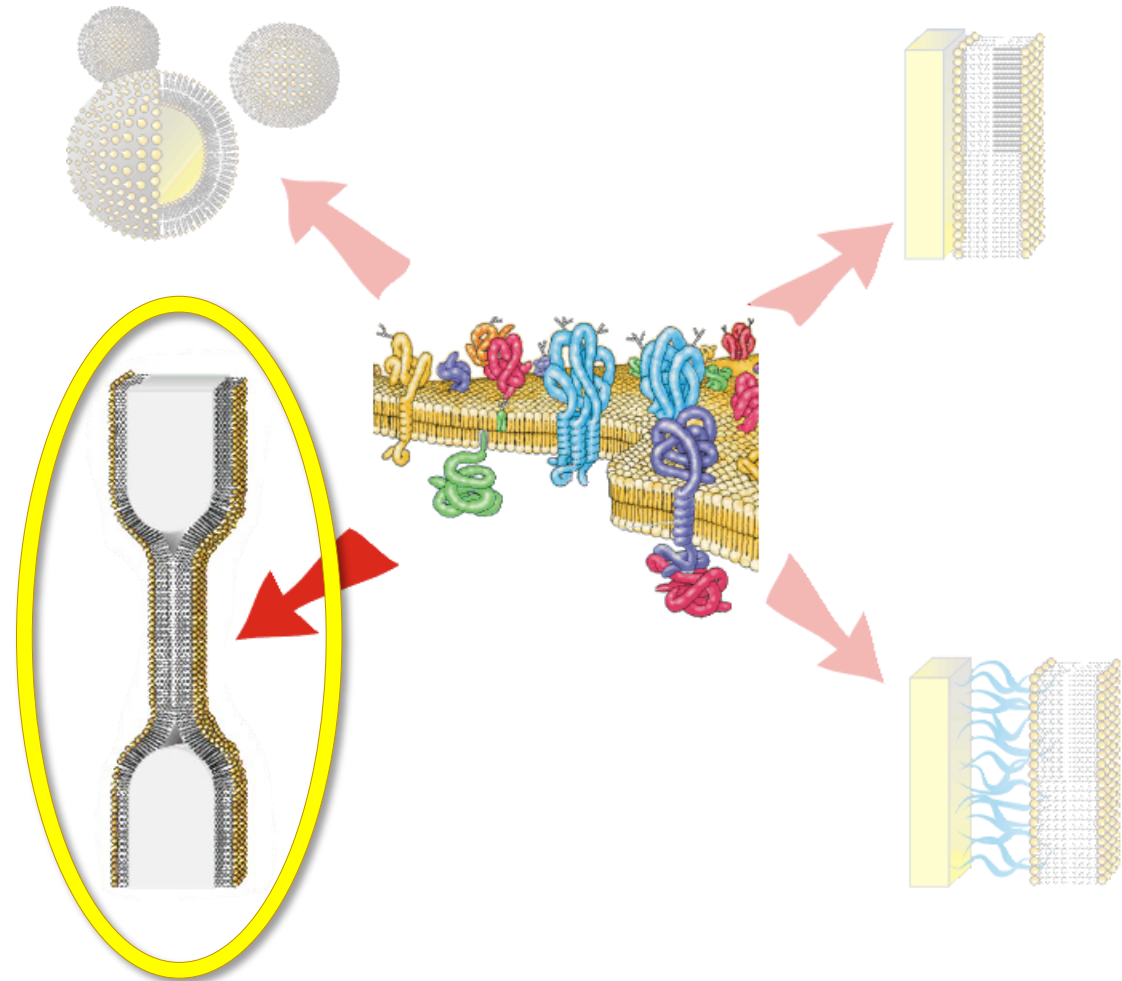


Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

- Método que nos permita estudiar las proteínas integrales que forman los “poros” de manera aislada
- Que tengamos control sobre los componentes hidrofóbicos de la membrana → Sobre las moléculas de lípido
- Que tengamos suficiente resolución temporal para estudiar la función en tiempo real



Electrofisiología de membranas planas

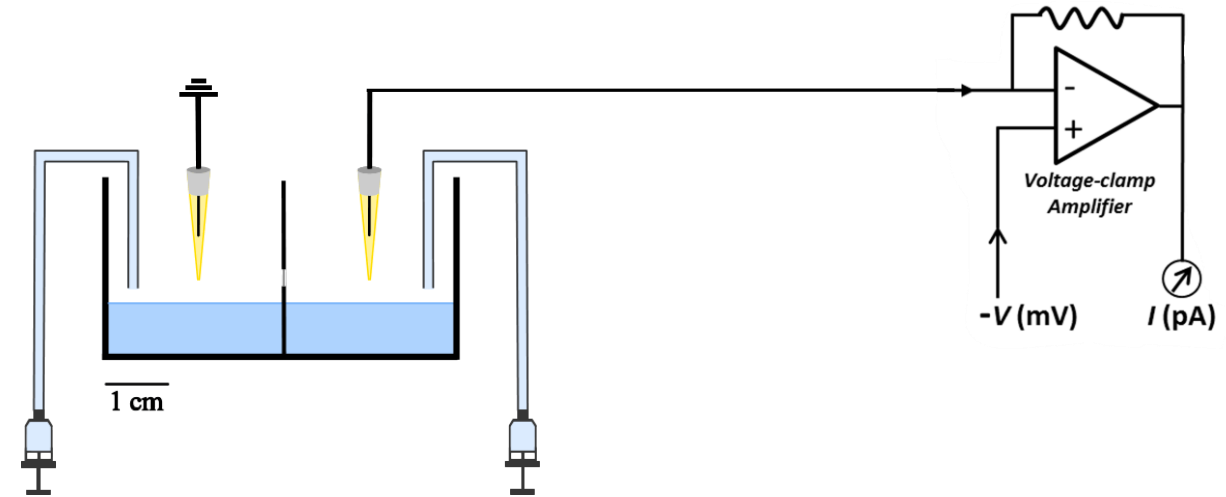


Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

- Método que nos permita estudiar las proteínas integrales que forman los “poros” de manera aislada
- Que tengamos control sobre los componentes hidrofóbicos de la membrana → Sobre las moléculas de lípido
- Que tengamos suficiente resolución temporal para estudiar la función en tiempo real



Electrofisiología de membranas planas



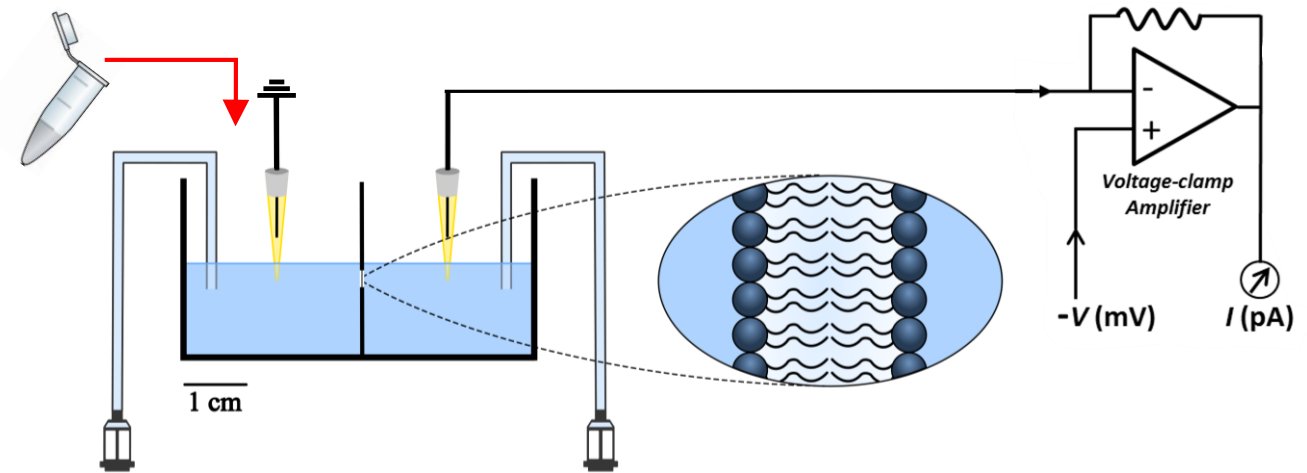
- ✓ Formación de una membrana in vitro a partir de monocapas de lípido

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

- Método que nos permita estudiar las proteínas integrales que forman los “poros” de manera aislada
- Que tengamos control sobre los componentes hidrofóbicos de la membrana → Sobre las moléculas de lípido
- Que tengamos suficiente resolución temporal para estudiar la función en tiempo real



Electrofisiología de membranas planas



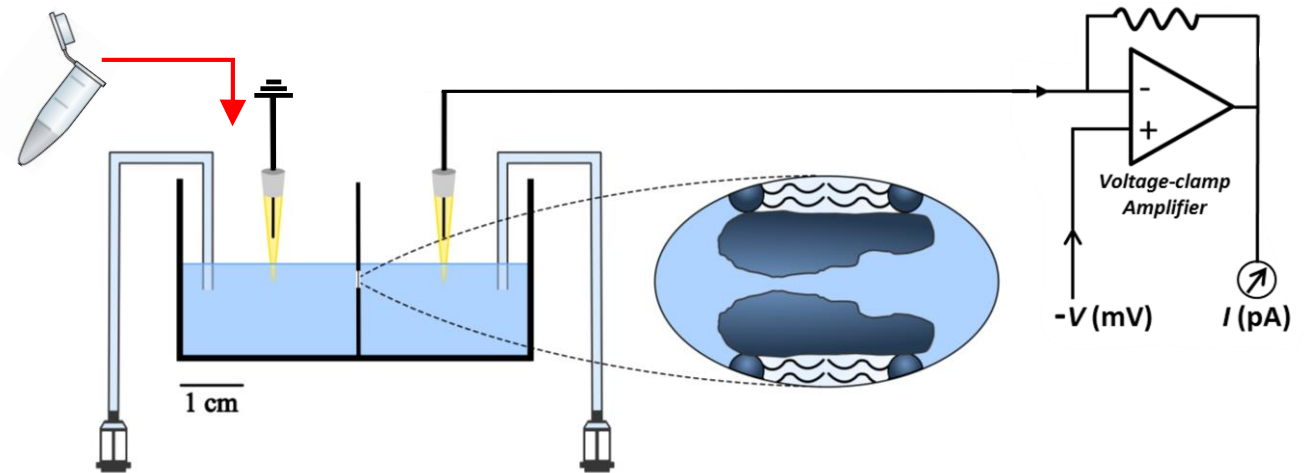
- ✓ Formación de una membrana in vitro a partir de monocapas de lípido
- ✓ Adición de la proteína integral

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

- Método que nos permita estudiar las proteínas integrales que forman los “poros” de manera aislada
- Que tengamos control sobre los componentes hidrofóbicos de la membrana → Sobre las moléculas de lípido
- Que tengamos suficiente resolución temporal para estudiar la función en tiempo real



Electrofisiología de membranas planas

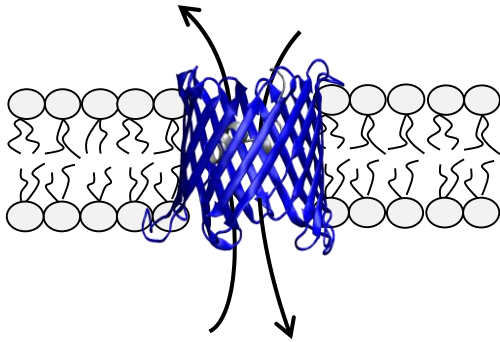


Corrientes del orden de pA, cambios en ms

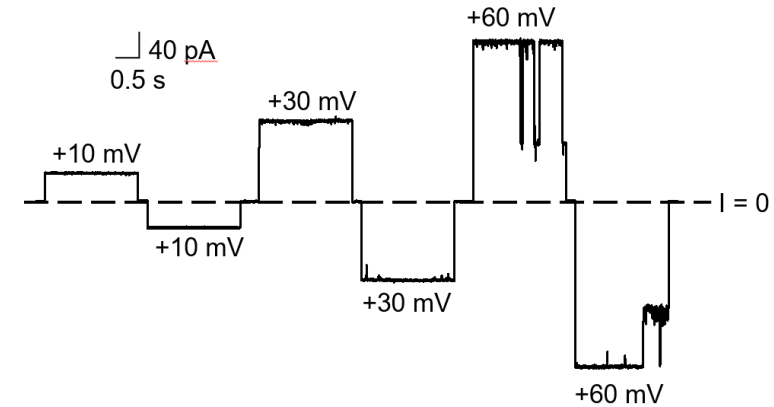
- ✓ Formación de una membrana in vitro a partir de monocapas de lípido
- ✓ Adición de la proteína integral
- ✓ Detección de la corriente generada por la inserción de una única molécula

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

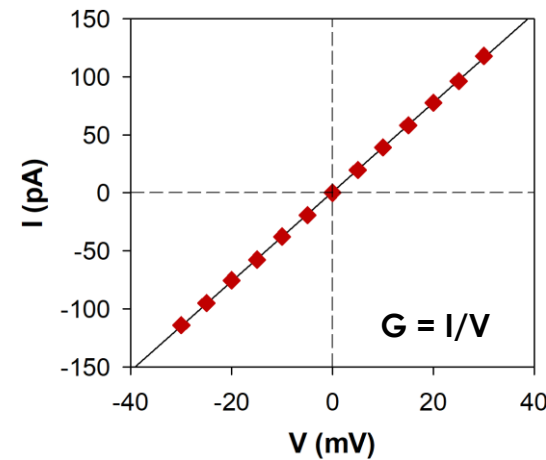
Caracterización de la función básica de VDAC:



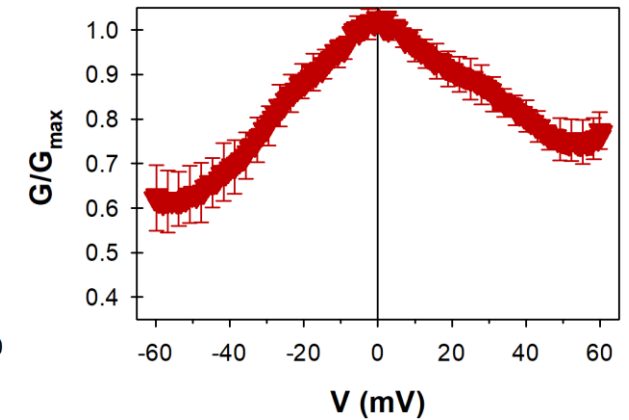
- Permite el paso de corrientes de decenas de pA $\rightarrow 10^7$ - 10^8 iones por segundo
- Voltajes relativamente altos provocan el cierre parcial del canal
- Ligera selectividad aniónica ($\text{Cl}^-/\text{K}^+ \sim 2$)



Comportamiento óhmico



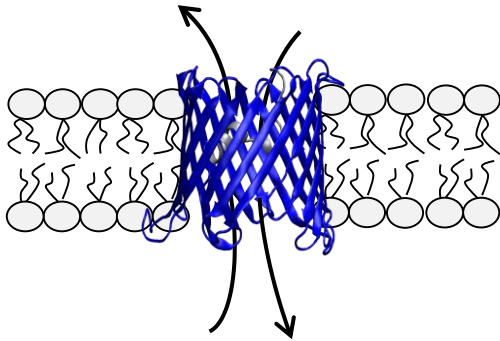
Regulación por voltaje



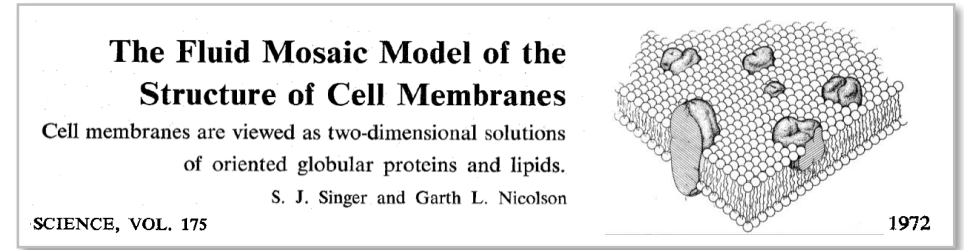
1 M KCl + 5 mM HEPES pH 7.4
DOPC/DOPE/2DOPG

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

Caracterización de la función básica de VDAC:



- Permite el paso de corrientes de decenas de pA $\rightarrow 10^7$ - 10^8 iones por segundo
- Voltajes relativamente altos provocan el cierre parcial del canal
- Ligera selectividad aniónica ($\text{Cl}^-/\text{K}^+ \sim 2$)



Dos tipos de proteínas:

Integrales

- Difíciles de disociar de la membrana
- Permanecen asociadas a lípidos al aislarlas
- Son altamente insolubles o se agregan en medios acuosos

Periféricas

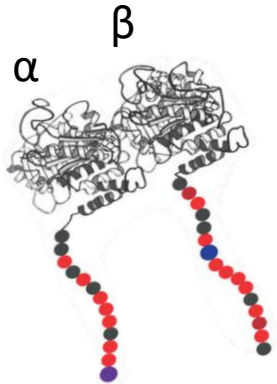
- Se disocian con tratamientos suaves
- No permanecen asociadas a moléculas de lípido
- Son altamente solubles en medios acuosos

Electrofisiología para el estudio del transporte iónico

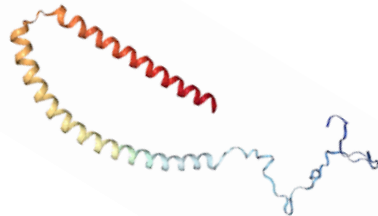
Proteínas que se asocian a la membrana de forma transitoria

- Solubles en el citosol
- Pueden sufrir o no cambios conformacionales cuando se asocian a membranas celulares

Tubulina



Sinucleína

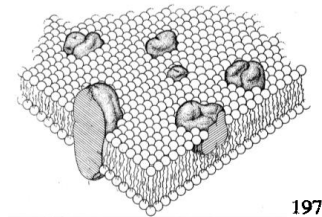


The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

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

S. J. Singer and Garth L. Nicolson

SCIENCE, VOL. 175



1972

Dos tipos de proteínas:

Integrales

- Difíciles de disociar de la membrana
- Permanecen asociadas a lípidos al aislarlas
- Son altamente insolubles o se agregan en medios acuosos

Periféricas

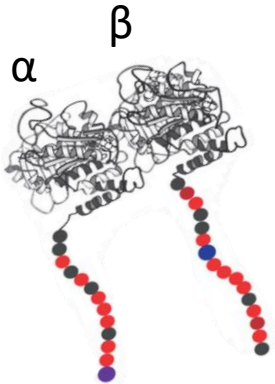
- Se disocian con tratamientos suaves
- No permanecen asociadas a moléculas de lípido
- Son altamente solubles en medios acuosos

Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

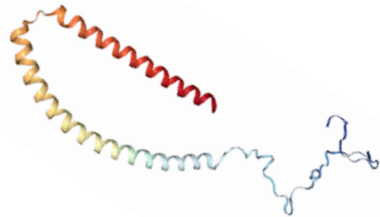
Proteínas que se asocian a la membrana de forma transitoria

- Solubles en el citosol
- Pueden sufrir o no cambios conformacionales cuando se asocian a membranas celulares

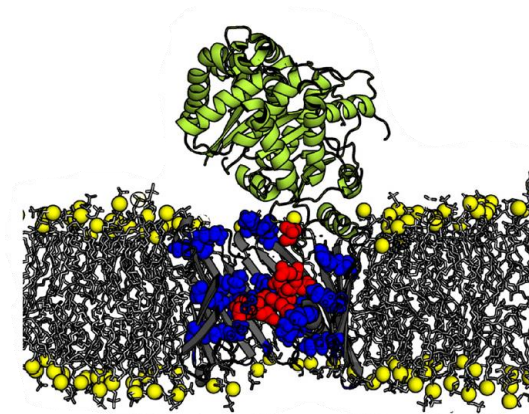
Tubulina



Sinucleína

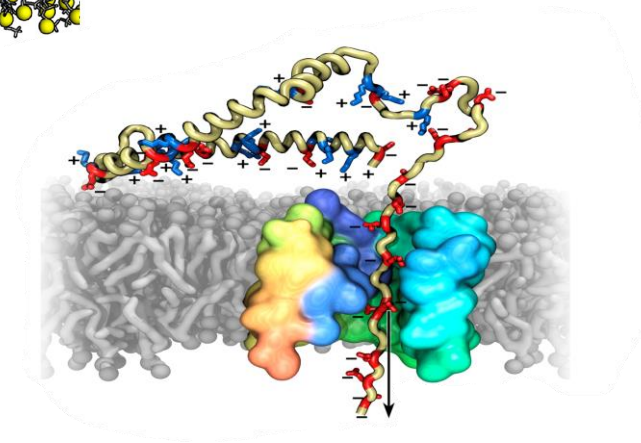


Pueden interaccionar con proteínas integrales



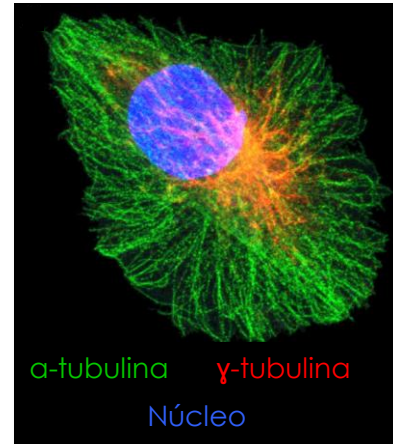
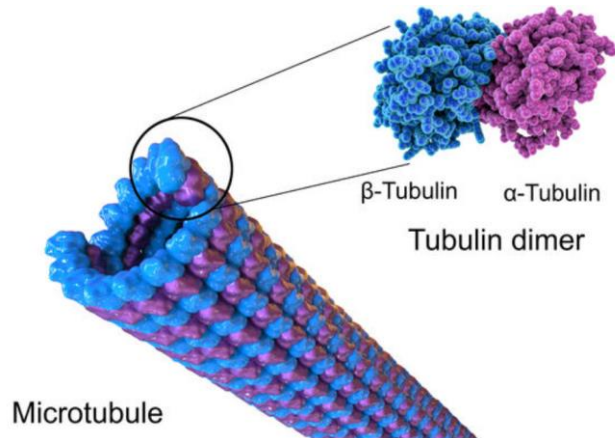
VDAC-tubulina

VDAC-sinucleína

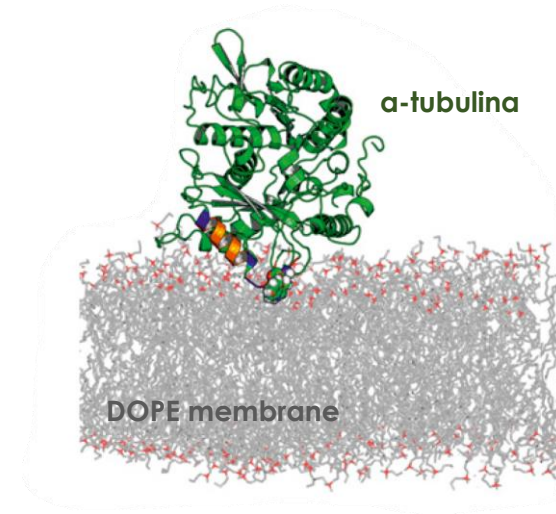


Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

Heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina

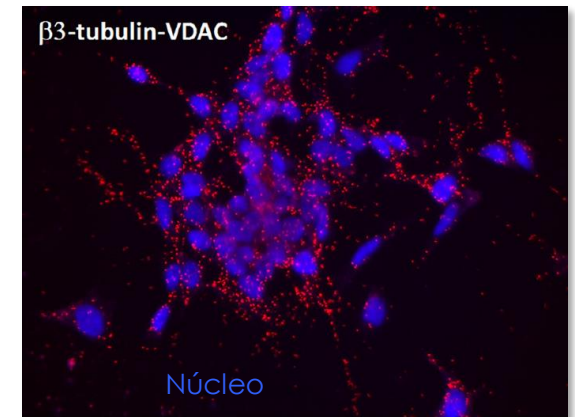


Proteína globular que forma los microtúbulos



Se asocia con membranas, en concreto con la MOM

Interacciona con VDAC

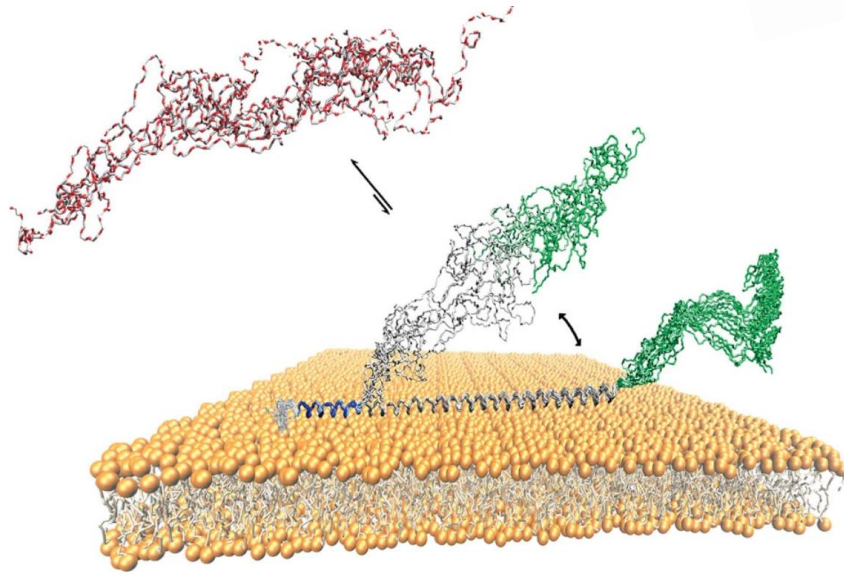


PLA in human neuroblastoma cells

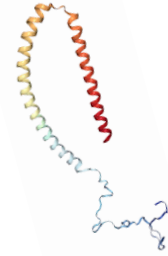
Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

α -Sinucleína

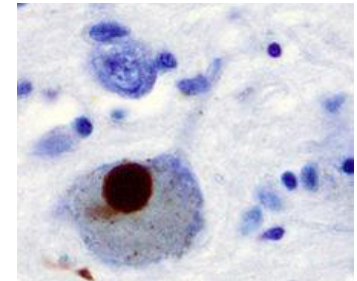
Proteína intrínsecamente desordenada



El N-terminal adopta estructura helicoidal en contacto con membranas

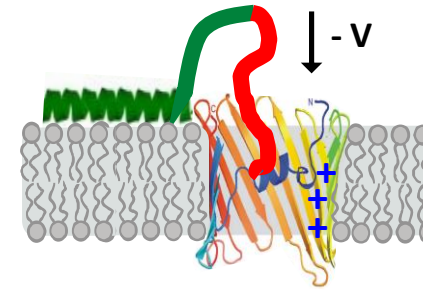


Relacionada con la patología de la enfermedad del **Parkinson**

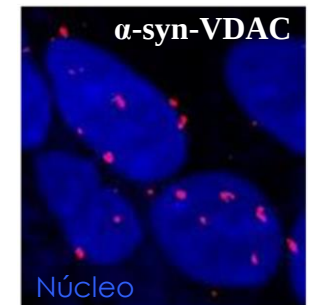


Cuerpos de Lewis

Interacciona con VDAC

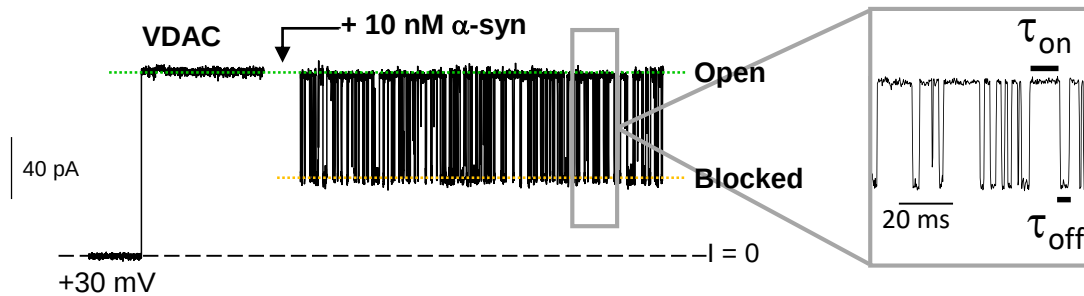


PLA in human neuroblastoma cells



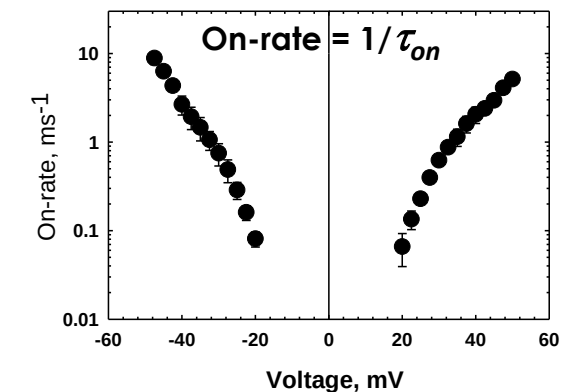
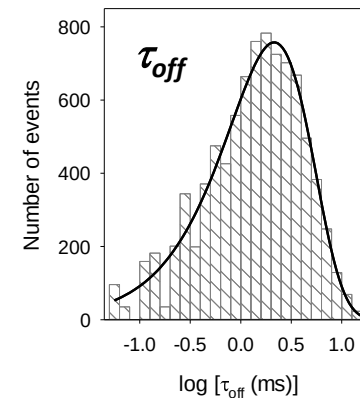
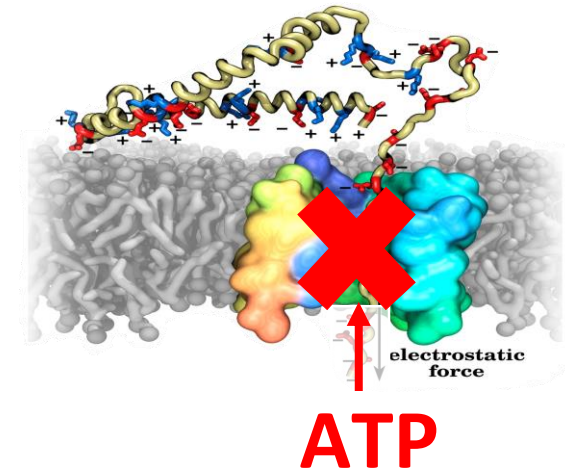
Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

Evidencia de interacción VDAC-sinucleína mediante electrofisiología



Alpha-sinucleína bloquea de forma reversible los canales VDAC

- Eficiencia nanomolar
- Interrumpe el transporte de ATP

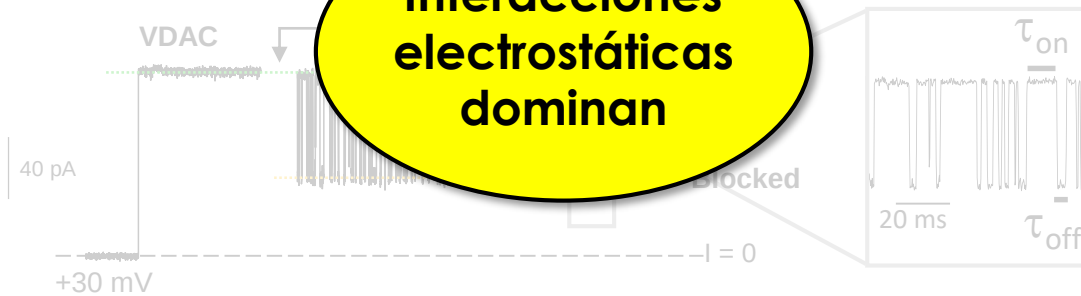


Gran dependencia con el voltaje

Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

Evidencia de interacción VDAC-sinucleína mediante electrofisiología

Interacciones electrostáticas dominan

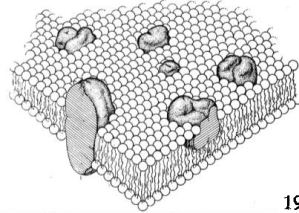


The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

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

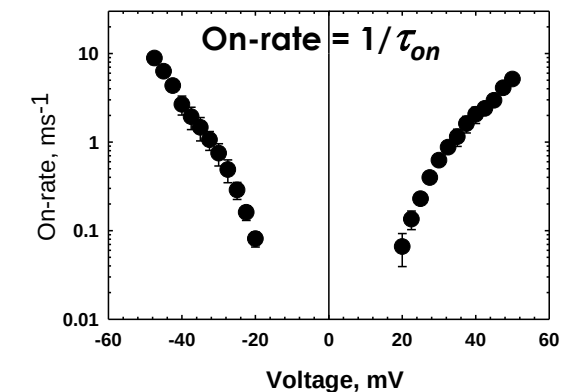
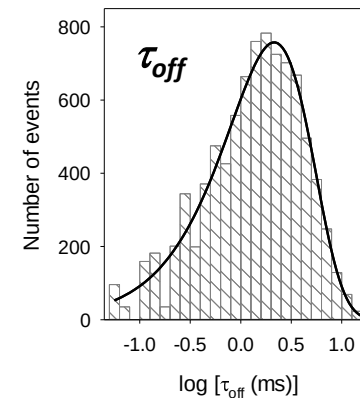
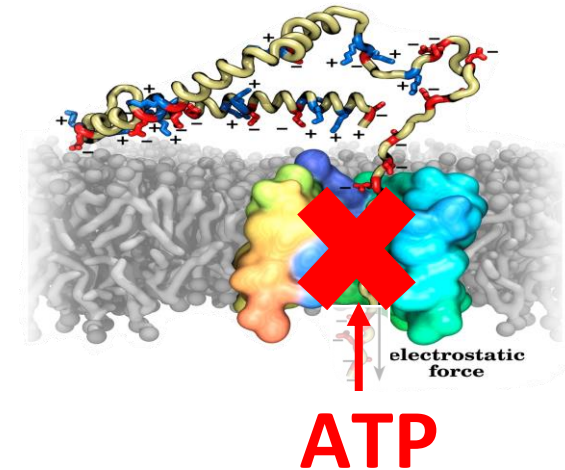
S. J. Singer and Garth L. Nicolson

SCIENCE, VOL. 175



1972

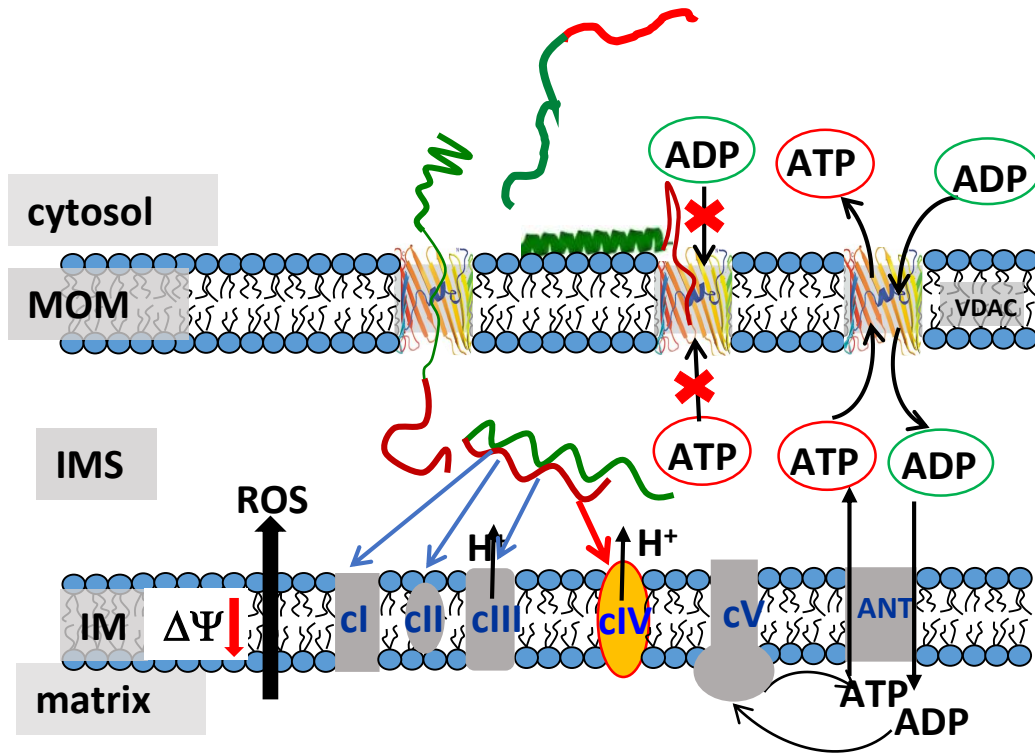
- Eficiencia nanomolar
- Interrumpe el transporte de ATP



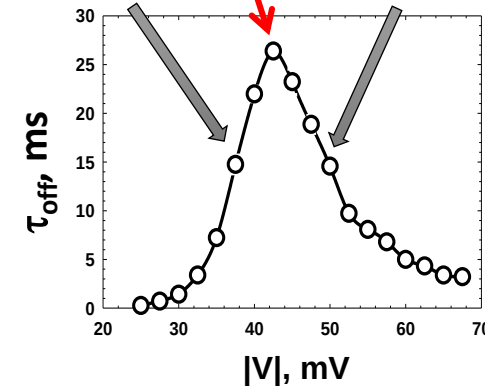
Gran dependencia con el voltaje

Interacción entre proteínas integrales y citosólicas

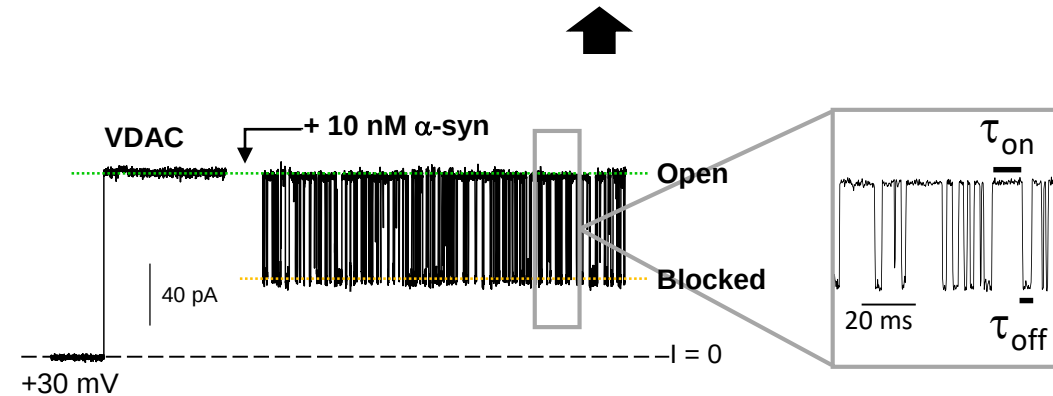
VDAC podría ser la vía de acceso de **sinucleína** a la mitocondria, donde ejercería una **acción patógena**



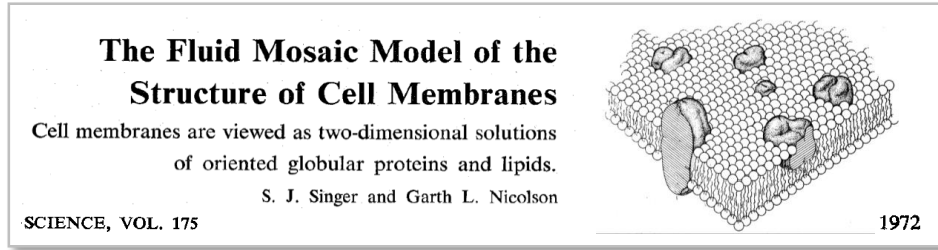
BLOCKAGE V^* **TRANSLOCATION**



Evidencia de translocación



Los lípidos modulan la función de canal

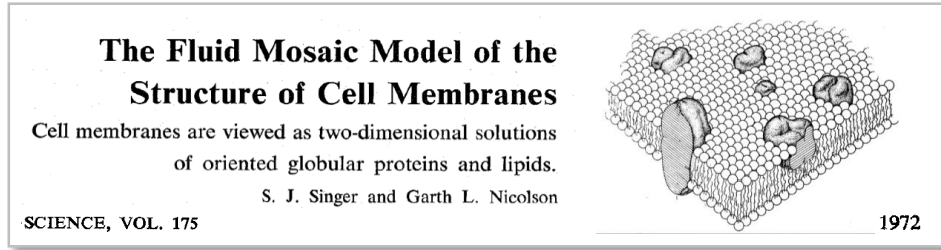


Los lípidos son en algunos casos un mero soporte, una matriz poblada por diferentes proteínas



En otros escenarios, los lípidos pueden interaccionar fuertemente con las proteínas

Los lípidos modulan la función de canal

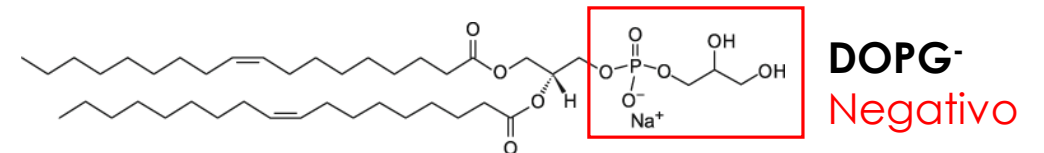
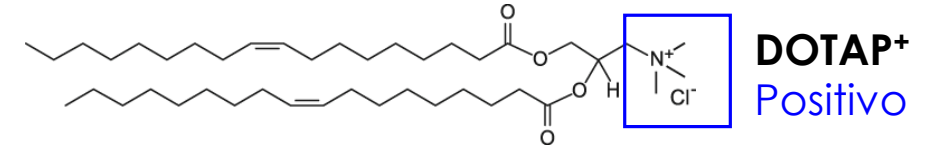
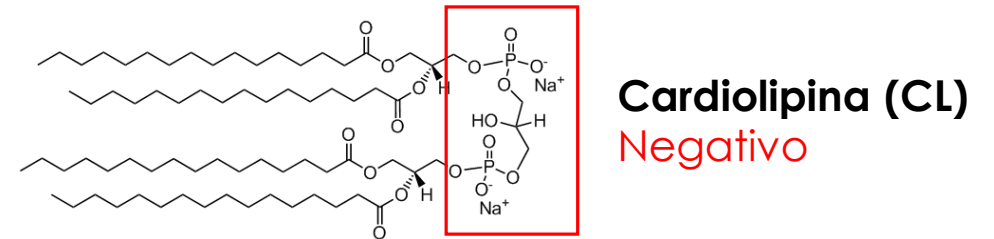
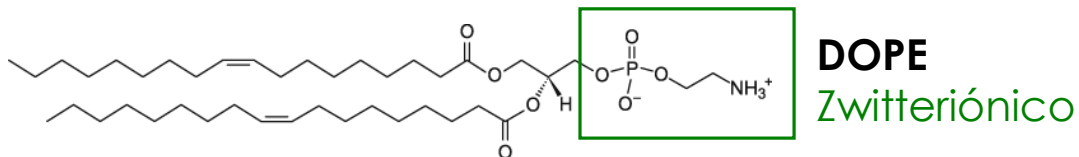
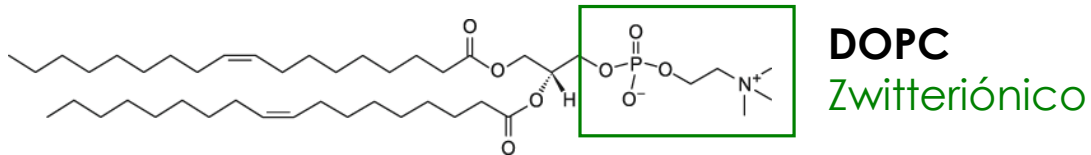


Los lípidos son en algunos casos un mero soporte, una matriz poblada por diferentes proteínas

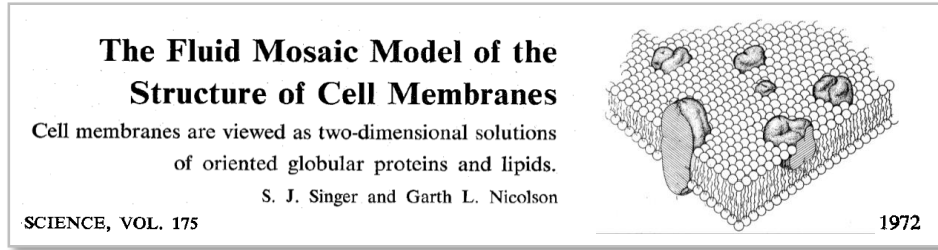
En otros escenarios, los lípidos pueden interaccionar fuertemente con las proteínas

En el canal VDAC:

Experimentos usando membranas con diferentes composiciones



Los lípidos modulan la función de canal

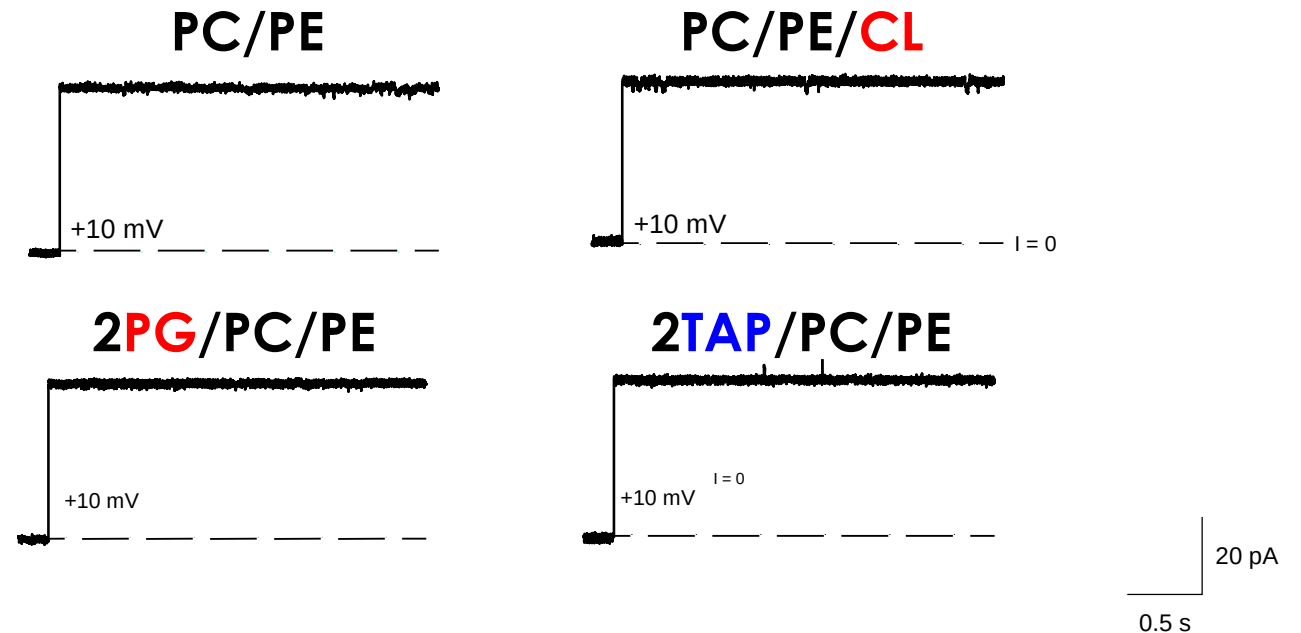


Los lípidos son en algunos casos un mero soporte, una matriz poblada por diferentes proteínas

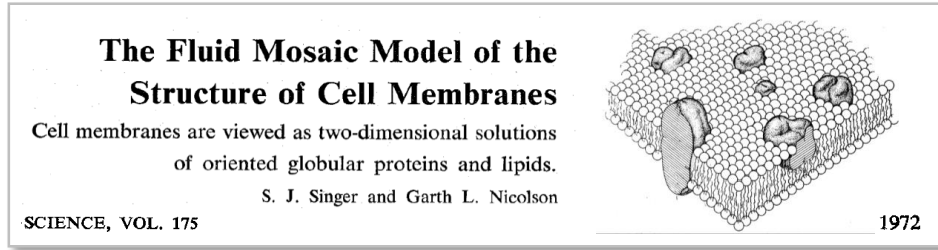
En otros escenarios, los lípidos pueden interaccionar fuertemente con las proteínas

En el canal VDAC:

- Función de canal básica esencialmente independiente de la composición lipídica
- Regulación del cierre por voltaje
- Regulación de la interacción con proteínas citosólicas



Los lípidos modulan la función de canal

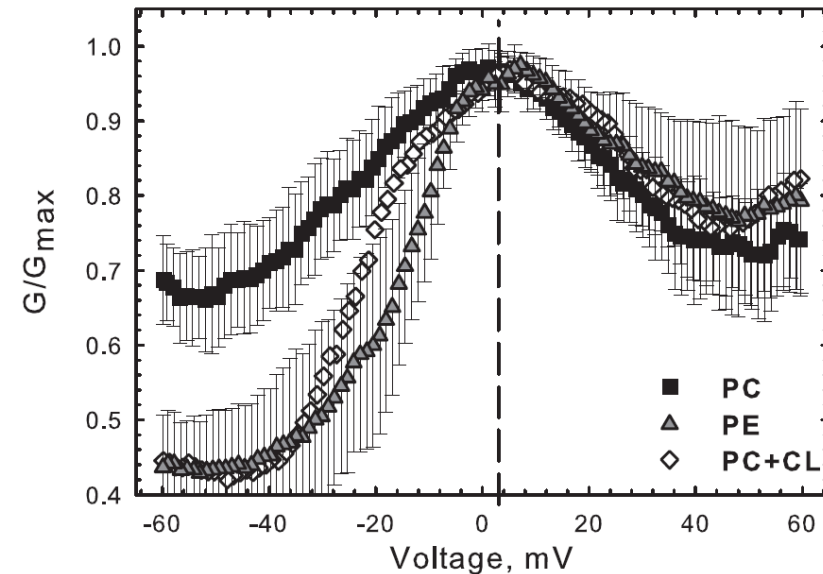


Los lípidos son en algunos casos un mero soporte, una matriz poblada por diferentes proteínas

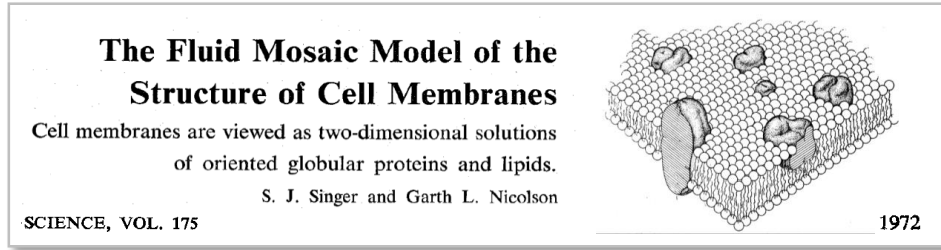
En otros escenarios, los lípidos pueden interaccionar fuertemente con las proteínas

En el canal VDAC:

- Función de canal básica esencialmente independiente de la composición lipídica
- Regulación del cierre por voltaje
- Regulación de la interacción con proteínas citosólicas



Los lípidos modulan la función de canal



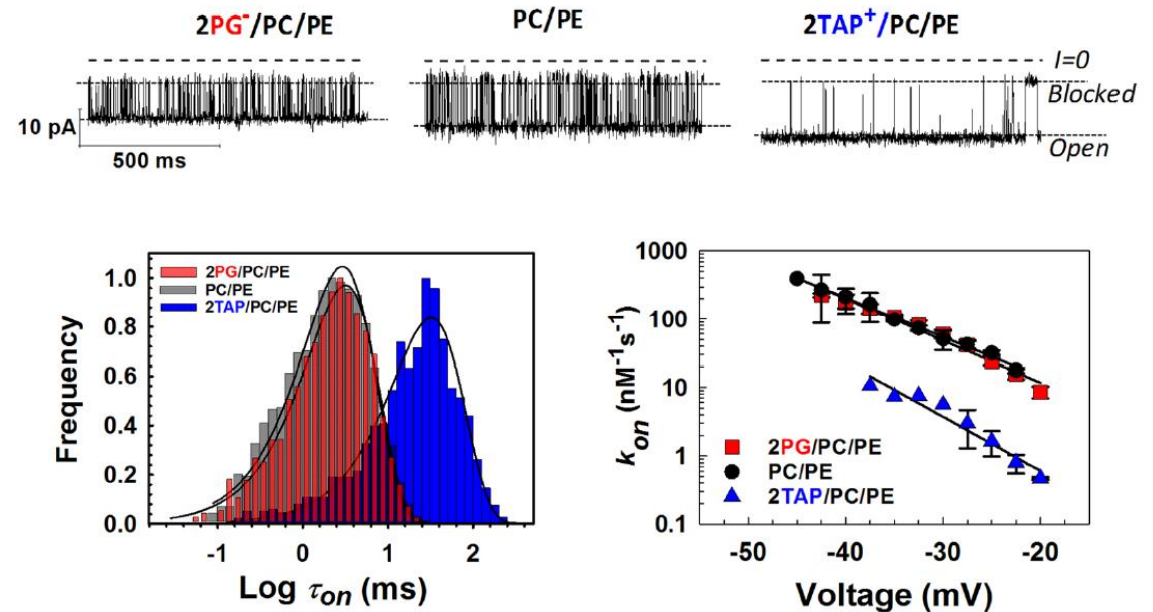
Los lípidos son en algunos casos un mero soporte, una matriz poblada por diferentes proteínas

En otros escenarios, los lípidos pueden interaccionar fuertemente con las proteínas

En el canal VDAC:

- Función de canal básica esencialmente independiente de la composición lipídica
- Regulación del cierre por voltaje
- Regulación de la interacción con proteínas citosólicas

VDAC-sinucleína

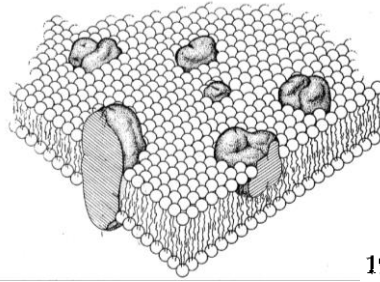


The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes

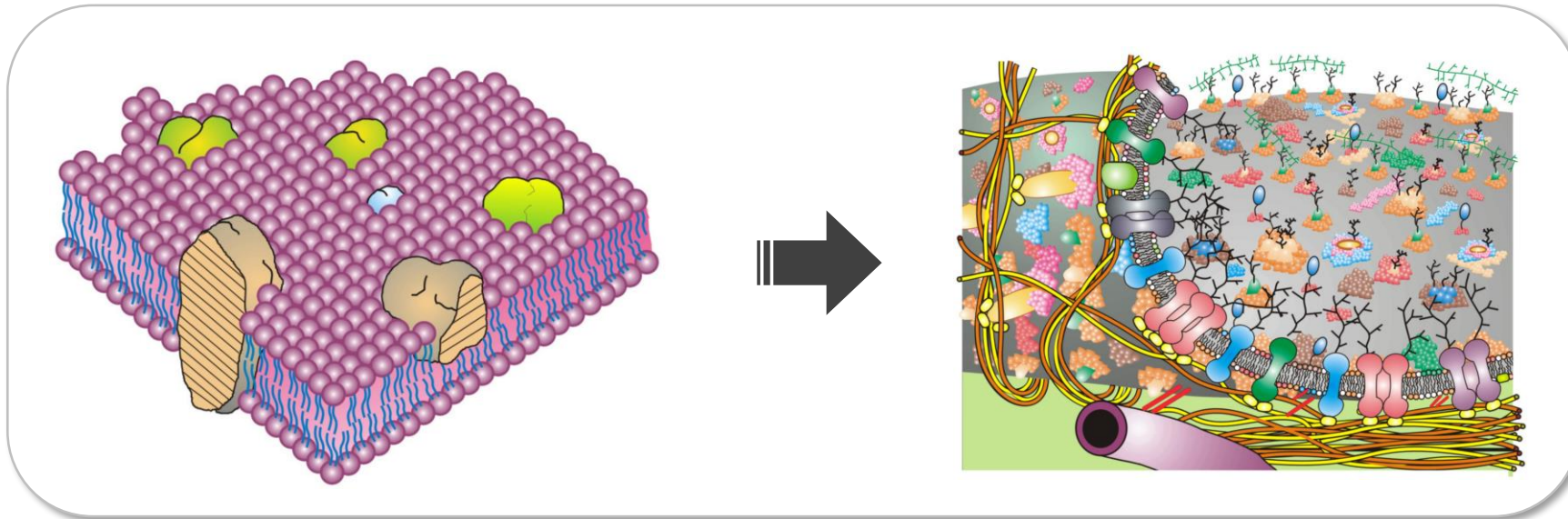
Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids.

S. J. Singer and Garth L. Nicolson

SCIENCE, VOL. 175



... un modelo vigente después de 50 años.



¡Gracias!