

Aula de Lipídeos - Parte 2

Profa. Sayuri Miyamoto

Departamento de Bioquímica
Instituto de Química-USP

Aula de Lipídeos

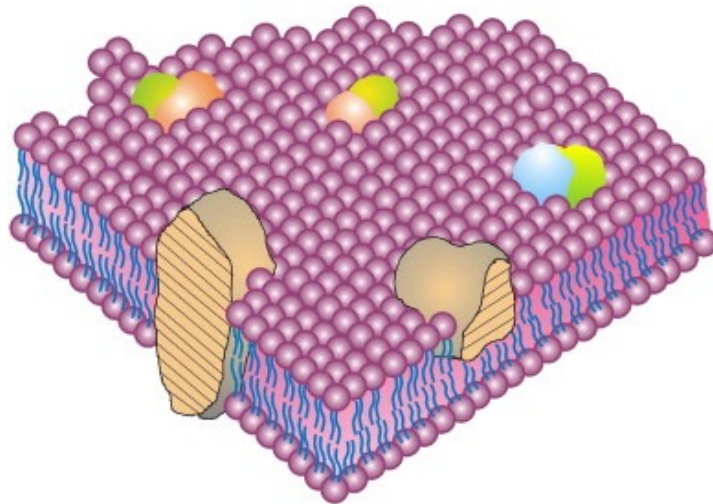
Profa. Sayuri Miyamoto

Tópicos:

- **Estrutura de Lipídeos** (Cap. 12 Voet e Cap. 10 Lenhinger)
- **Membranas** (Profa Iolanda)
- **Proteínas de Membrana** (Cap. 12 Voet e Cap.11 Lenhinger)
- **Lipoproteínas** (Cap. 12 Voet item 5)

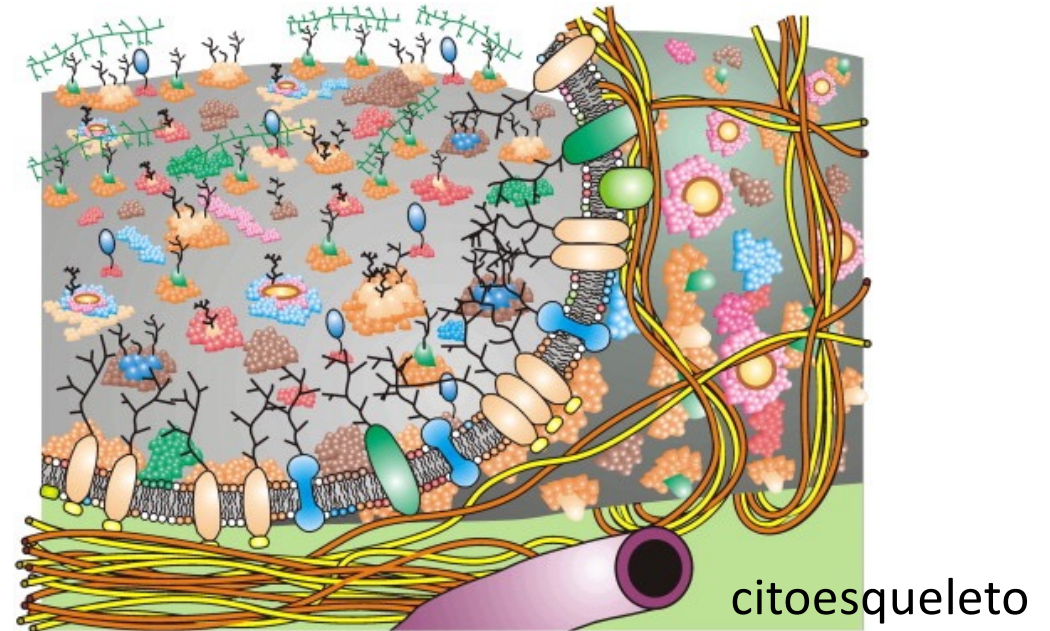
Membrana contem uma diversidade de Proteínas

Singer&Nicolson 1972



The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Singer, S. J. & Nicolson, G. L. *Science* 175, 720–731 (1972).

Nicolson 2014



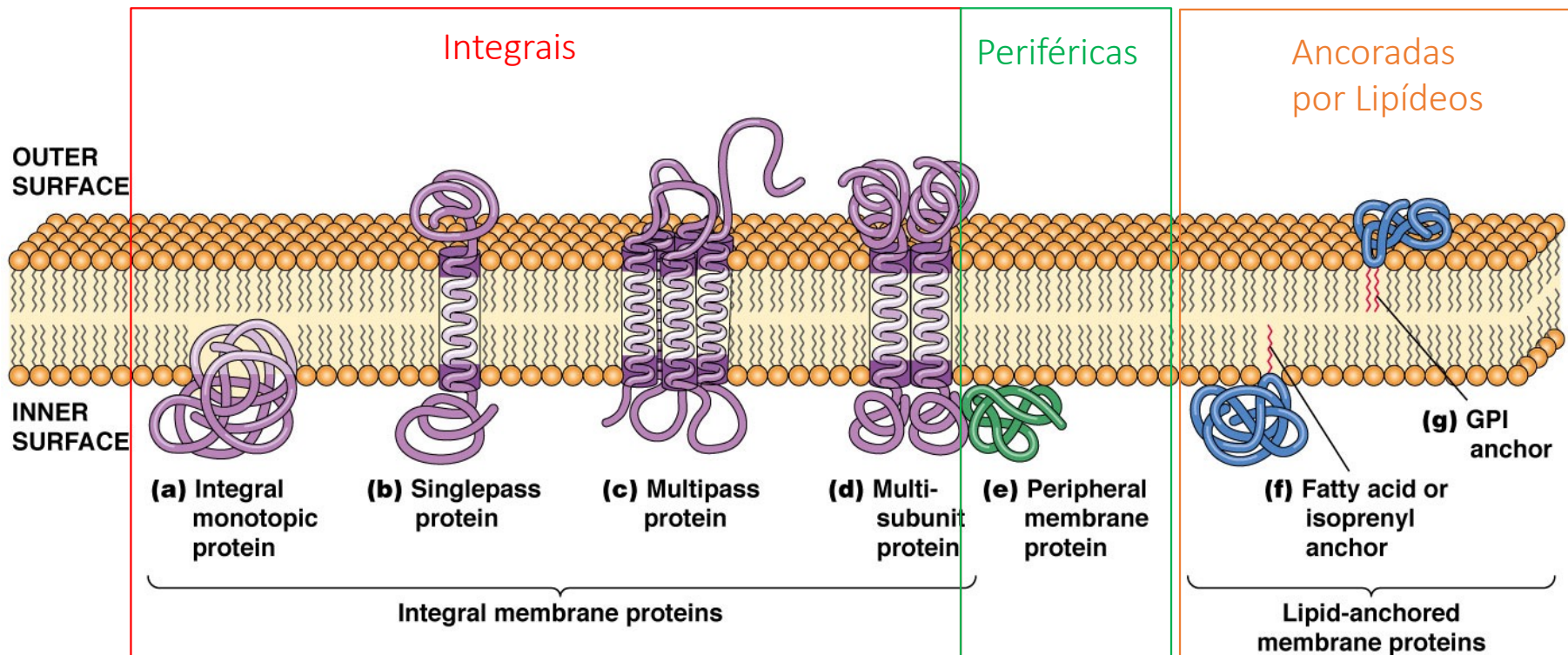
The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years.
Nicolson 2014 *Biochim. Biophys. Acta* (2014)

- Proteínas estão imersas em um “mar” fluido de lipídeos
- Estrutura e dinâmica de proteína de mb são influenciadas pela fluidez da membrana e por componentes da matriz extra- e intra-celular (citoesqueleto)
- Alta “Mosaicidade” (variabilidade) em termos de diversidade na composição lipídica, proteica, carboidratos acompanhado da formação de nanodomínios

Proteínas de Membrana

1/3 de todas as proteínas codificadas pelo genoma são proteínas de membrana

Proteínas de membrana podem ser classificadas em: integrais, periféricas e ancoradas



Regiões Transmembrana das proteínas integrais podem ser constituídos de α -helices ou folhas β

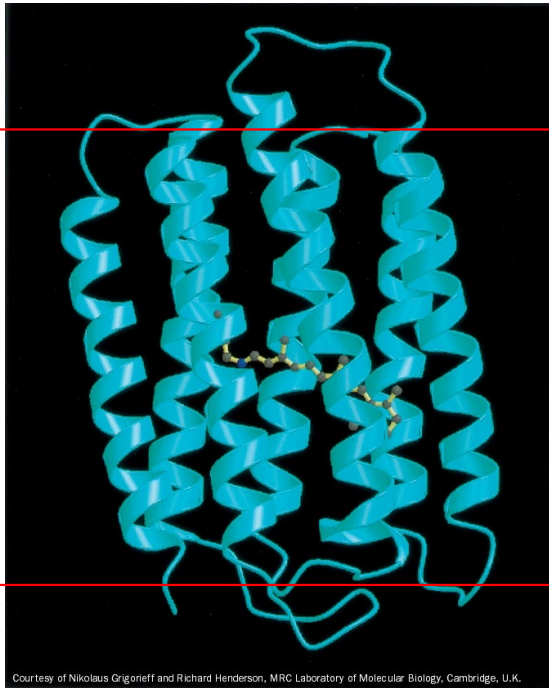


Figure 12-25a Structure of bacteriorhodopsin. (a) The electron crystallography–based structure.

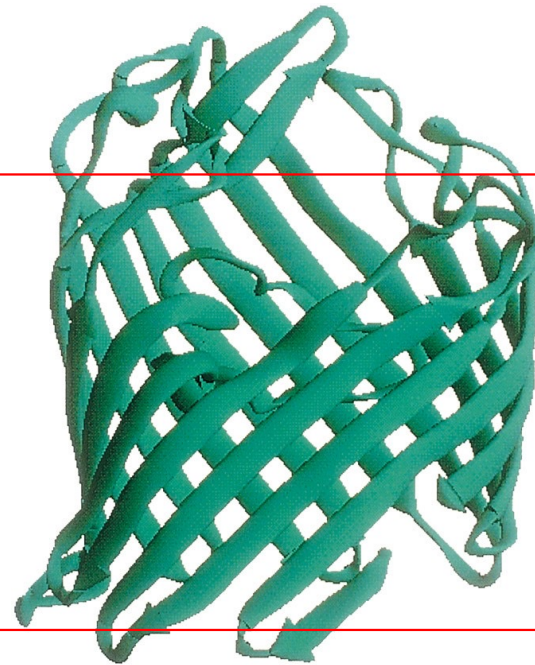
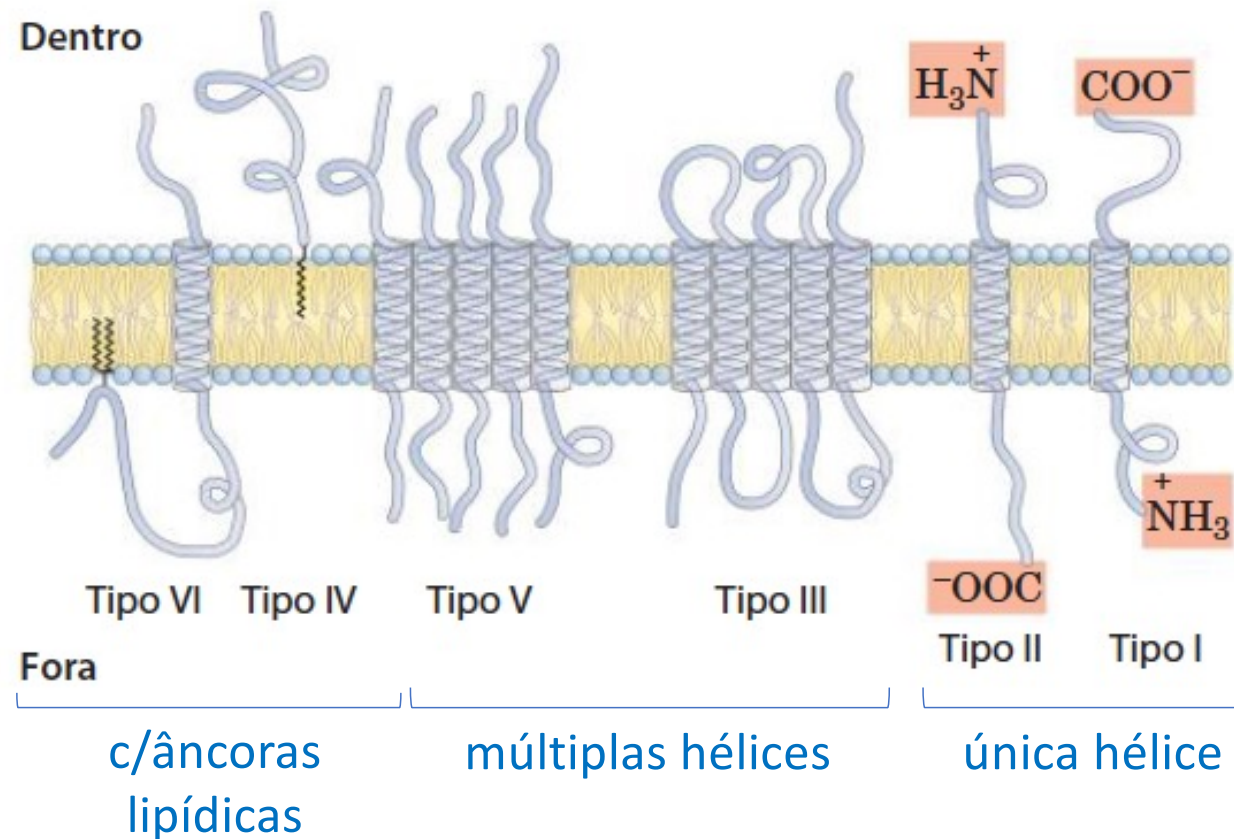
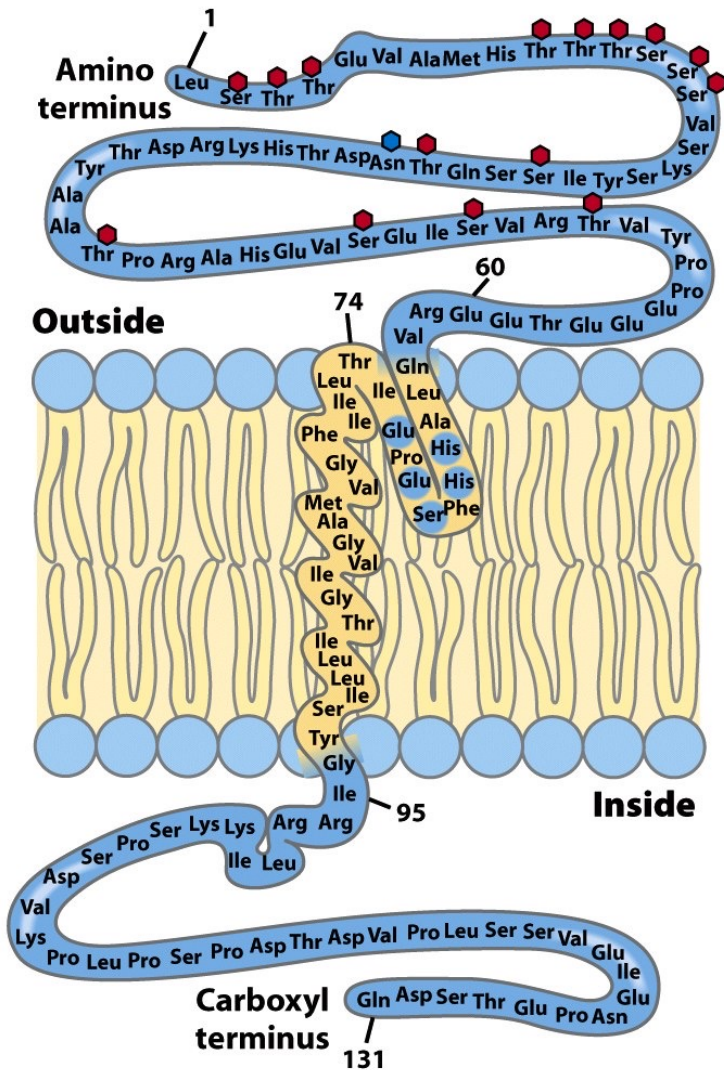


Figure 12-27a X-Ray crystal structure of the *E. coli* OmpF porin. (a) A ribbon diagram of the monomer.

Possuem distribuição assimétrica na membrana
São classificadas em 6 categorias de acordo com as
relações espaciais dos seus domínios



Proteínas integrais de membrana são anfifílicas



Polar

N-terminal **polar** com múltiplos resíduos glicosilados voltados para fora

Apolar

Segmento transmembrana com 19 resíduos apolares (resíduos 75-93)

Polar

C-terminal **polar** projeta-se para o interior aquoso da célula

Figure 11-7

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company

Glicoforina A de Eritrócitos.

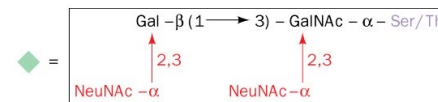
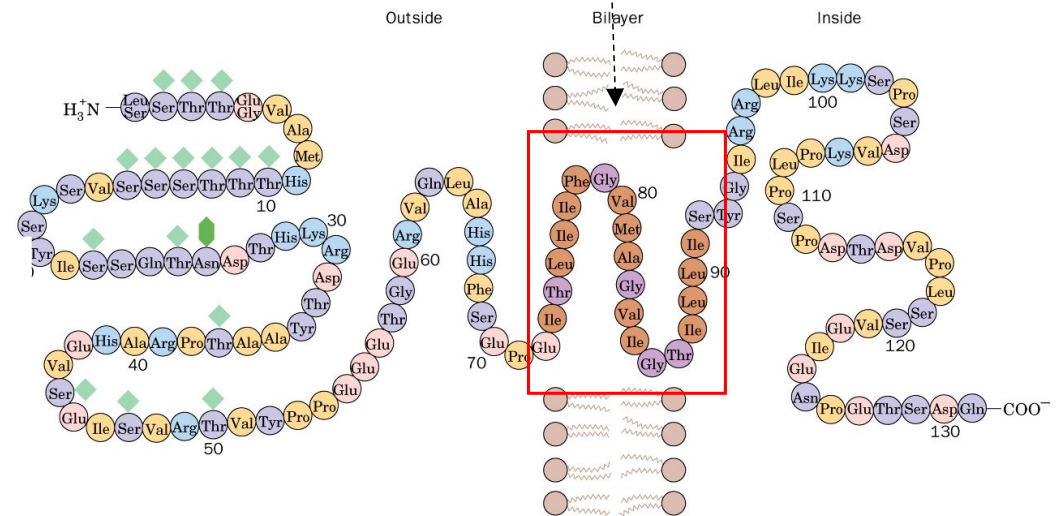
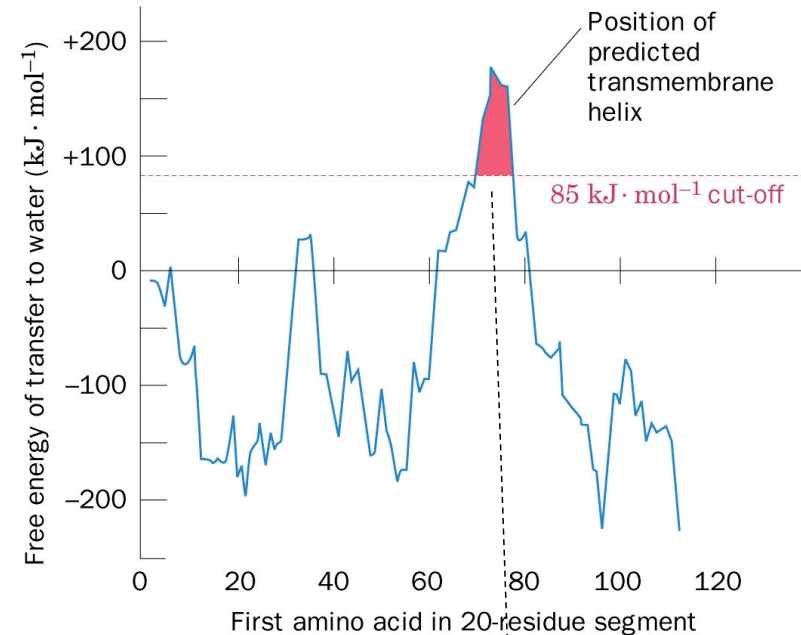
Topologia de uma proteína integral de membrana pode ser prevista através da sequência de aminoácidos

- Gráficos de hidropatia permitem prever segmento hidrofóbicos

(Soma das energia livre de transferência de janelas de sequências de aminoácidos)

Inicialmente proposto por [Kyte e Doolittle em 1982](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

- Segmentos transmembrana
 α -Hélices: ~ 20-25 aa
 Folhas β : ~ 7-9 resíduos



Glicoforina

Table 1: Web-based applications useful for predicting hydropathy

Location	Experimental	Default window size
http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/EMBOSS application pepwindow	Kyte and Doolittle ¹	7
http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/EMBOSS application pepinfo	Kyte and Doolittle ¹ Sweet and Eisenberg ⁷ Eisenberg <i>et al.</i> ³	9
http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/EMBOSS application octanol	White and Whimley ⁶	19
http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/Software/EMBOSS/EMBOSS application hmoment	Eisenberg <i>et al.</i> ³	10
GCG application PepPlot ²⁴	Kyte and Doolittle ¹ Eisenberg <i>et al.</i> ³ Engelman <i>et al.</i> ⁵	9;6;20
http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/plot_hydroph.html	Kyte and Doolittle ¹ Hopp and Woods ⁸	17
http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/grease.htm	Kyte and Doolittle ¹	9
http://www.bio.davidson.edu/courses/compbio/flc/home.html	Kyte and Doolittle ¹	User-defined
http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl?1/	Abraham and Leo ⁹	9

Gráfico de hidropatia para Bacteriorodopsina

- Bacteriorodopsina possui 7 segmentos transmembrana (Tipo III)
- Gráfico de hidropatia mostra 7 segmentos de 20 resíduos de aa

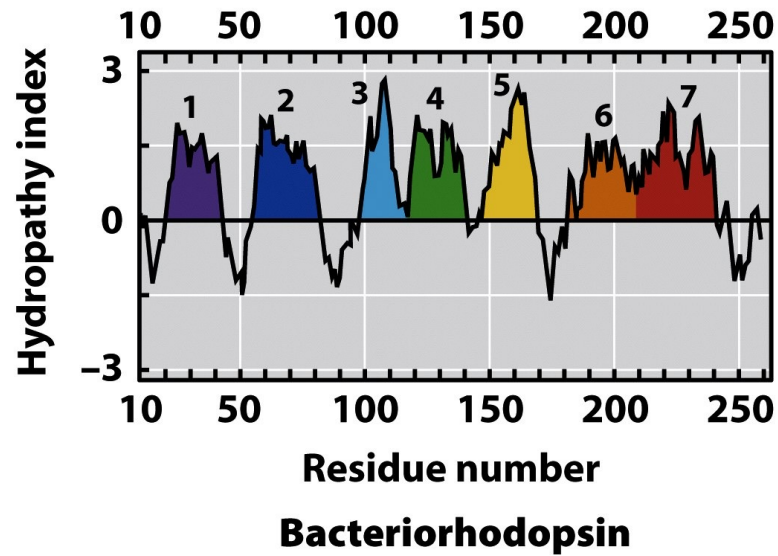


Figure 11-11b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

↑
Hydrophobic
↓
Hydrophilic

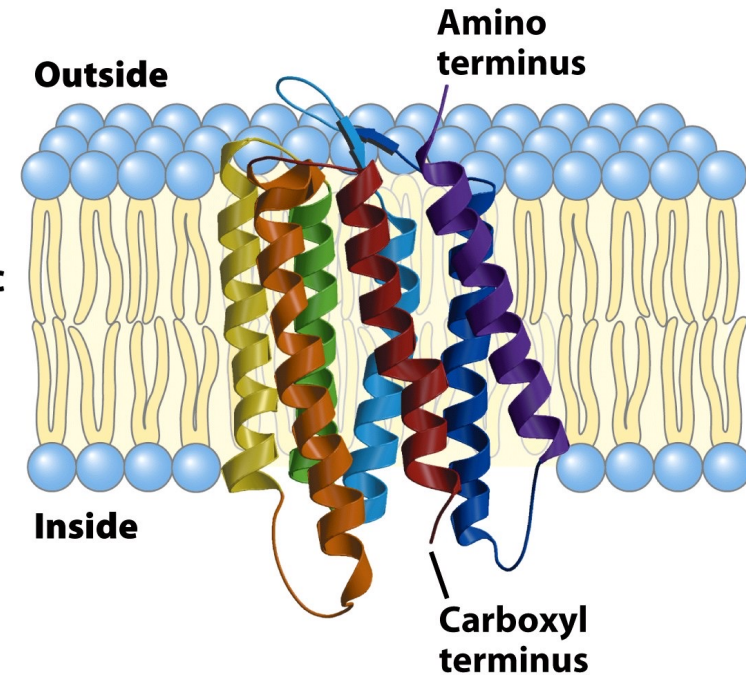
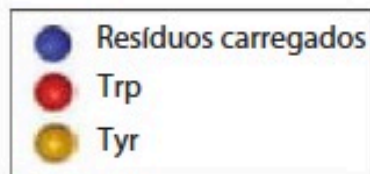


Figure 11-9
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

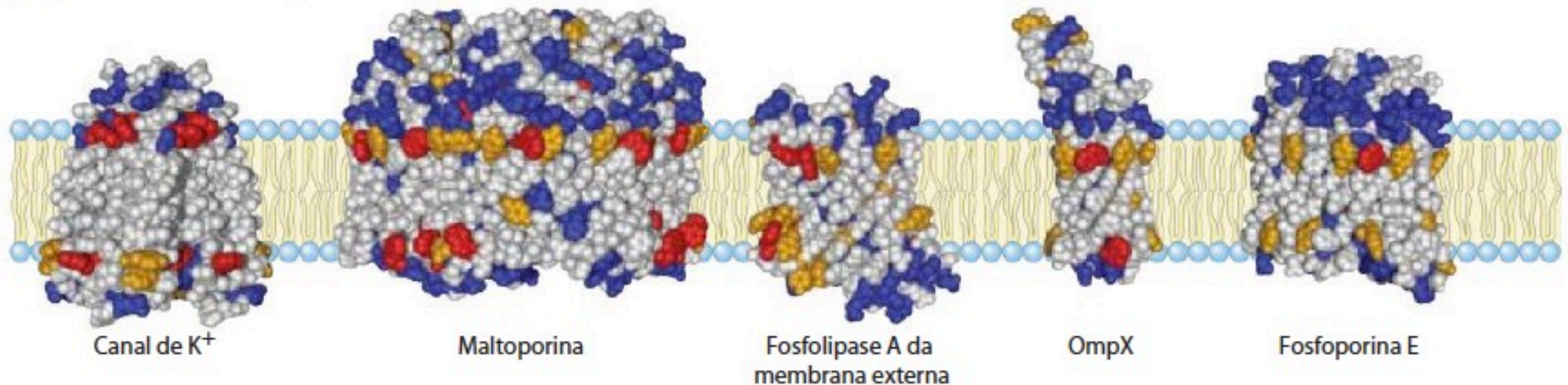
Localização dos aminoácidos em proteínas integrais

- Região transmembrana: **Ala, Ile, Leu, Val, Phe** (apolares)
- Região de interface (lipídeo/água): **Trp, Tyr** (“anfipáticos”)*
- Região em contato com a água: **Lys, His, Arg, Glu, Asp** (polares com carga)**

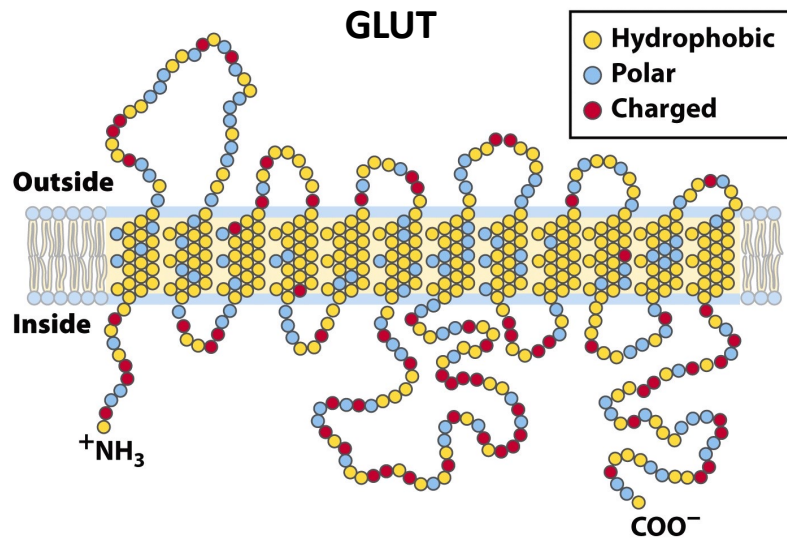


*cadeias laterais dos aminoácidos Trp e Tyr atuam como âncoras na interface da mb

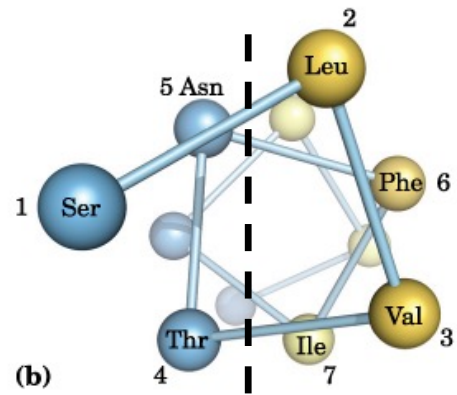
**regra do positivo dentro (Heijne 1989, <https://doi.org/10.1038/341456a0>): resíduos carregados positivamente (Lys, Arg) ocorrem mais frequentemente na face citoplasmática da membrana



Associação de segmentos transmembrana de α -hélices anfipáticas formam canais



–Ser–Leu–Val–Thr–Asn–Phe–Ile–



polar Hélice apolar
Anfipática

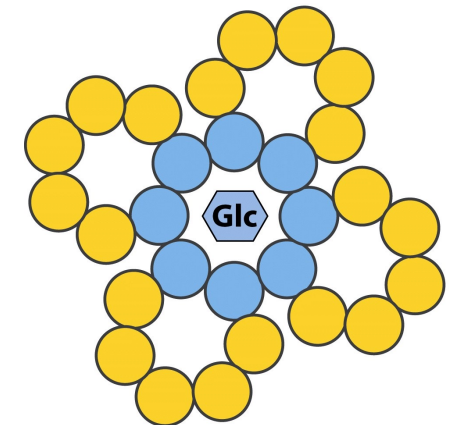
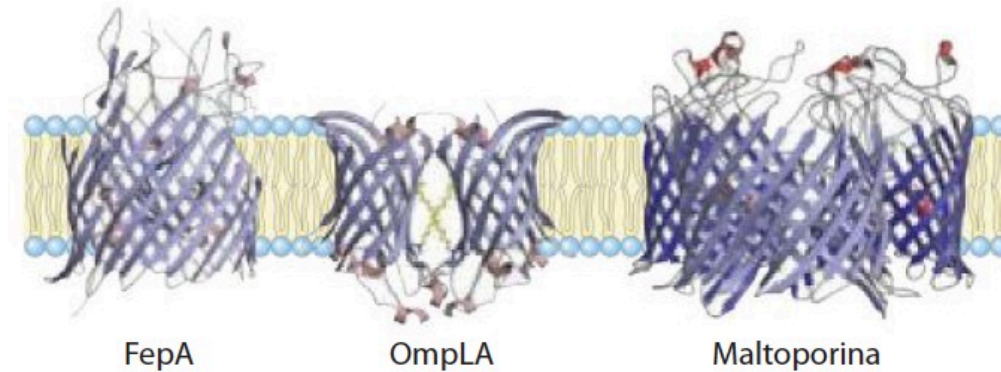


Figure 11-29c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

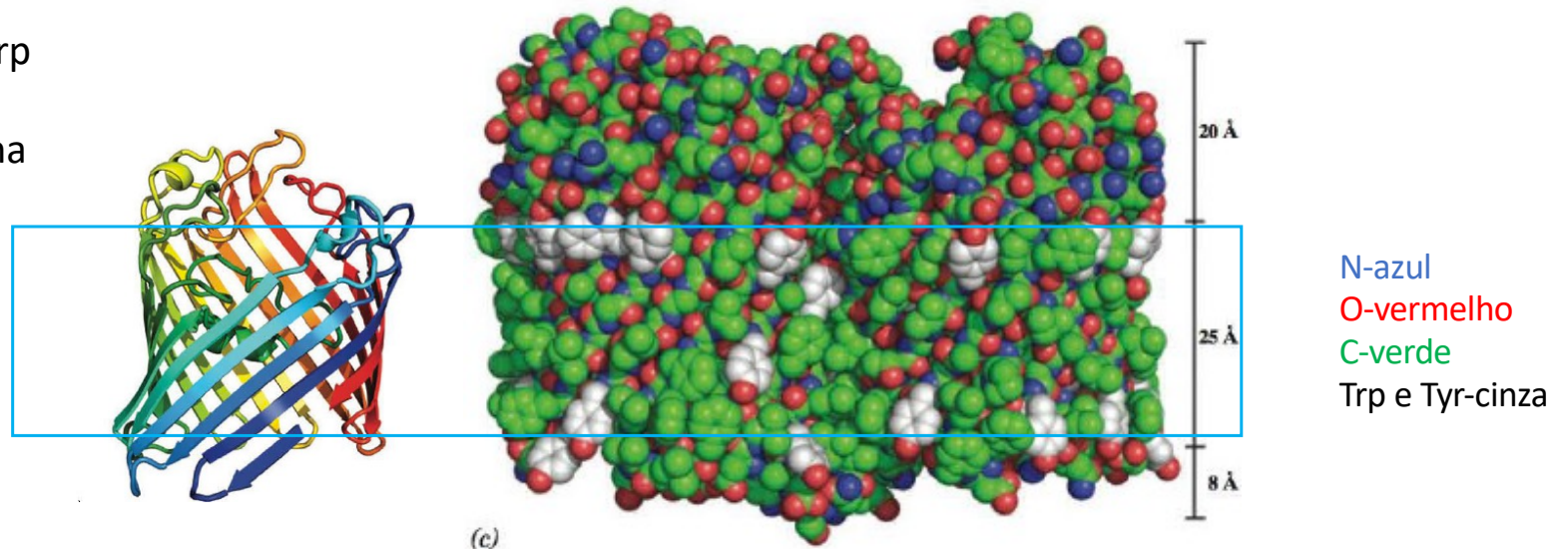
Figure 11-29a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Associação de segmentos transmembrana em folha β formam canais

- Folhas beta transmembranares possuem um padrão onde todo segundo aminoácido é hidrofóbico

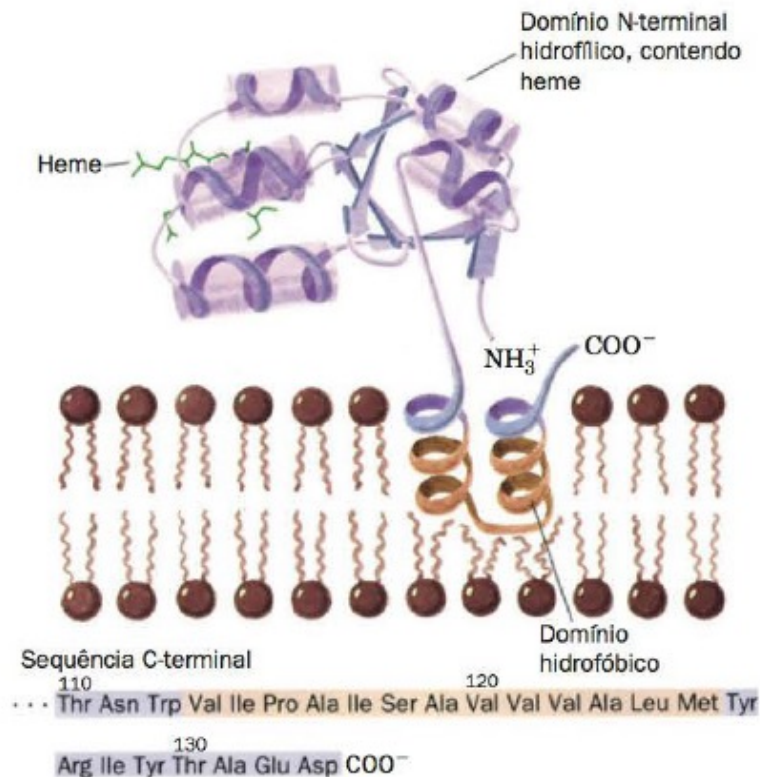


- Folhas beta normalmente contem Trp e Tyr nas regiões conectoras localizadas na interface da membrana



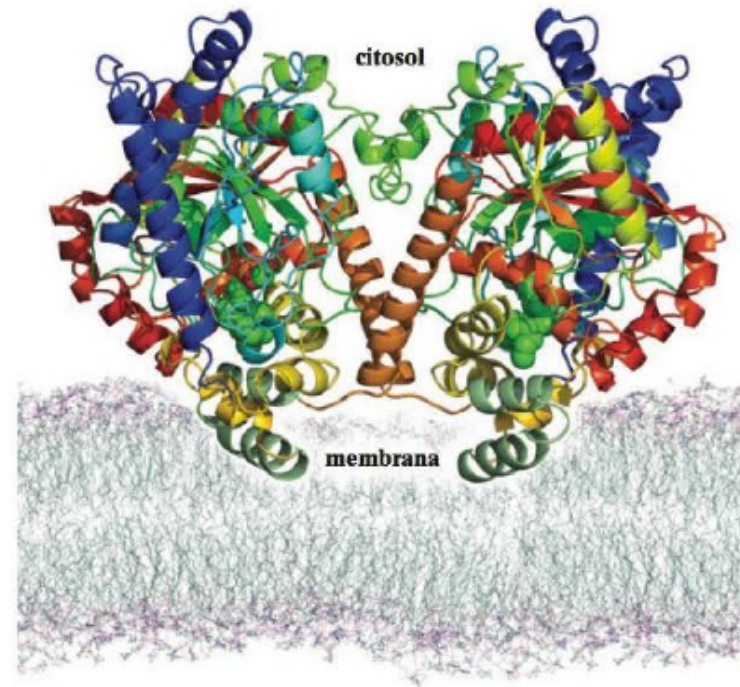
Proteínas Integrais de Membrana - Monotópicas

Interagem com uma das faces da membrana



Citocromo b5 hepático

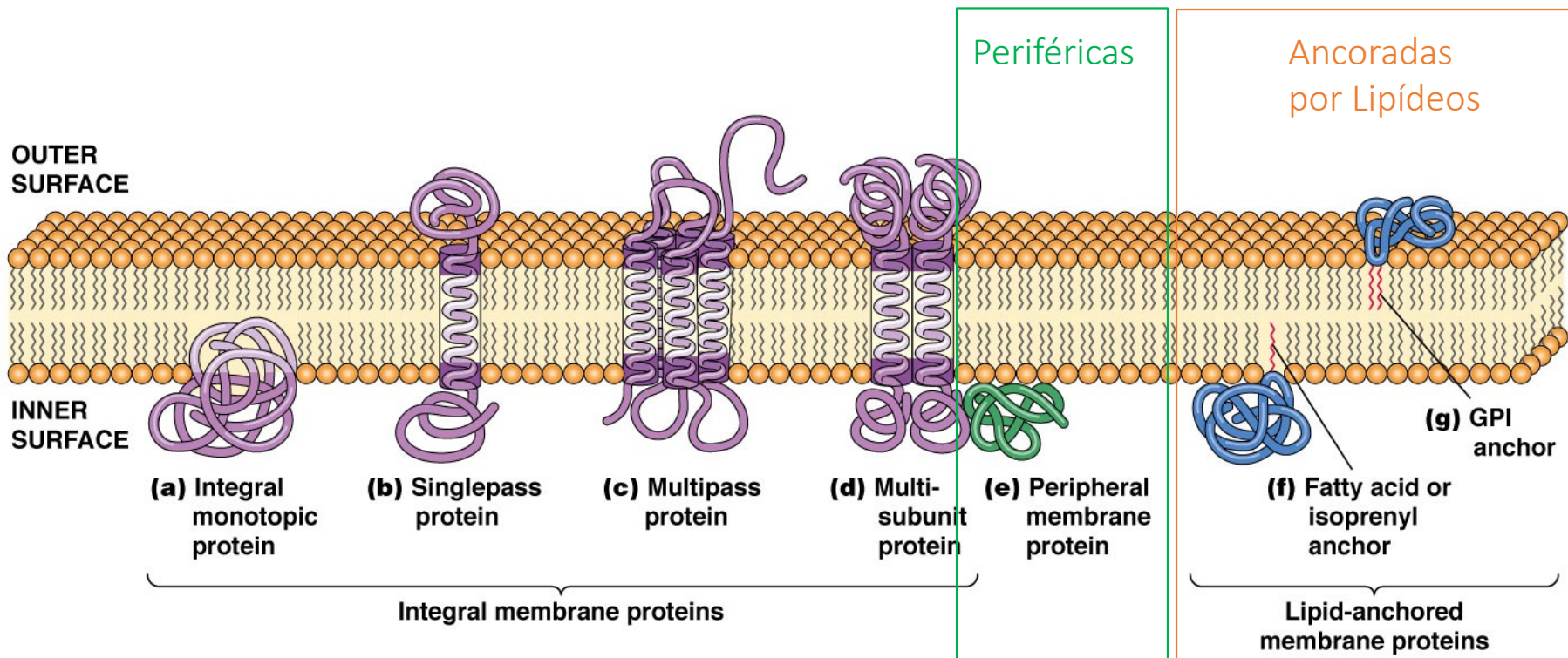
Ancorado na membrana por um segmento C-terminal hidrofóbico



Estrutura de raio X da Hidrolase de ácidos graxos hepático

Ancorado na membrana por um segmento C-terminal hidrofóbico

Proteínas Periféricas e Ancoradas por Lipídeos



Proteínas periféricas ancoradas por lipídeos

Fosfolípídeo Glicosilado (âncoras de GPI)
Ancoram proteínas na Face Externa

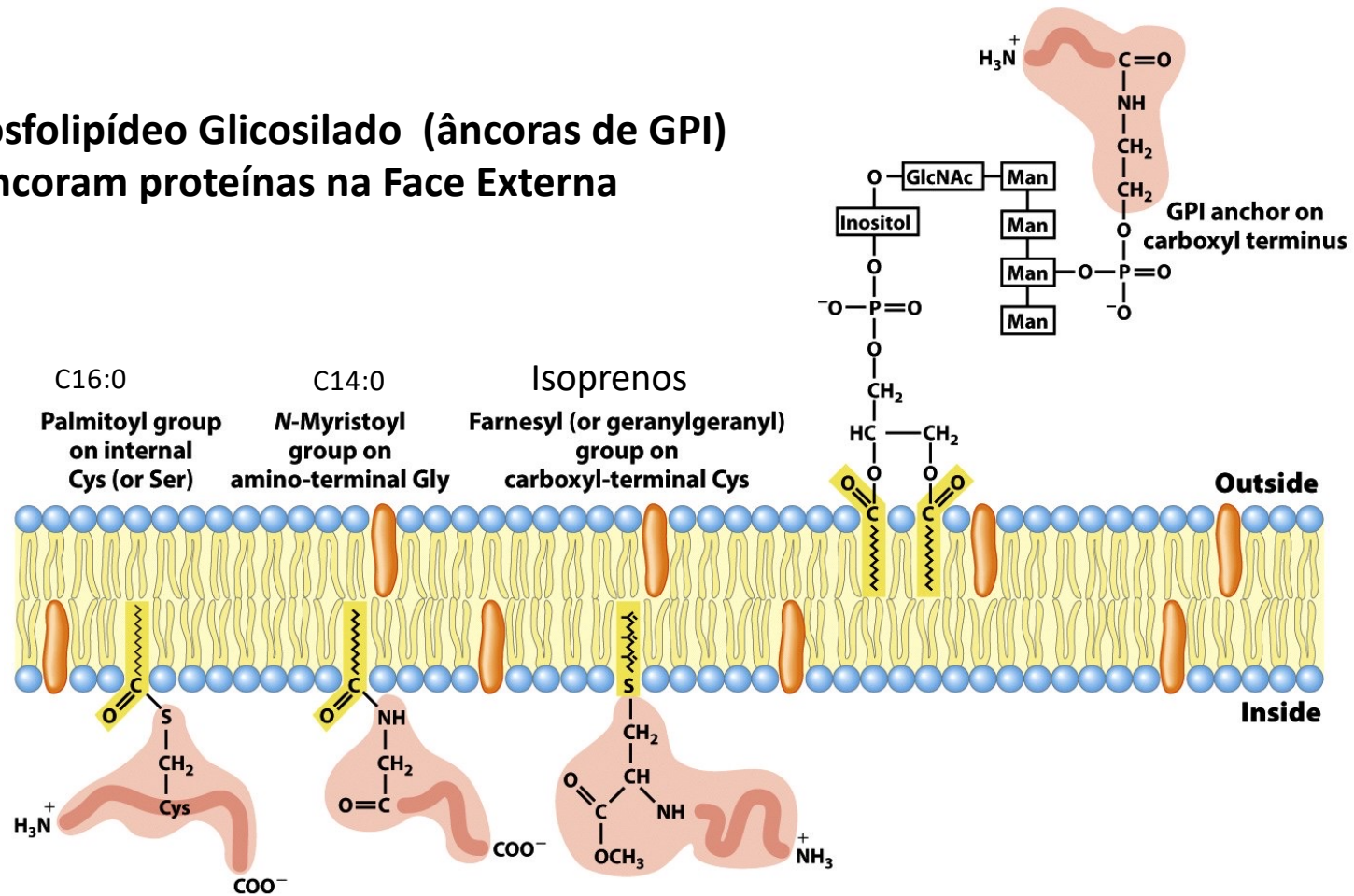
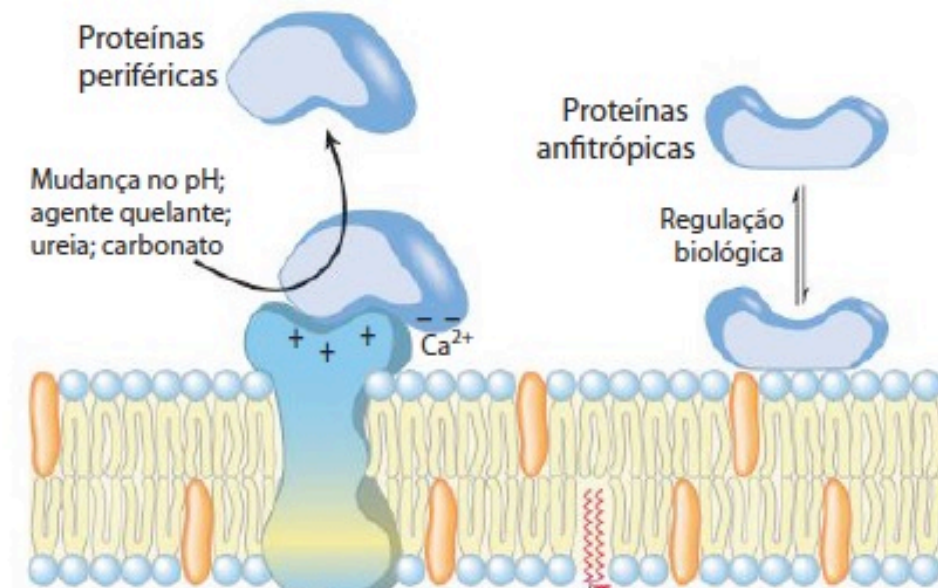


Figure 11-14
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Ácidos Graxos e Isoprenos ancoram proteínas na Face Interna

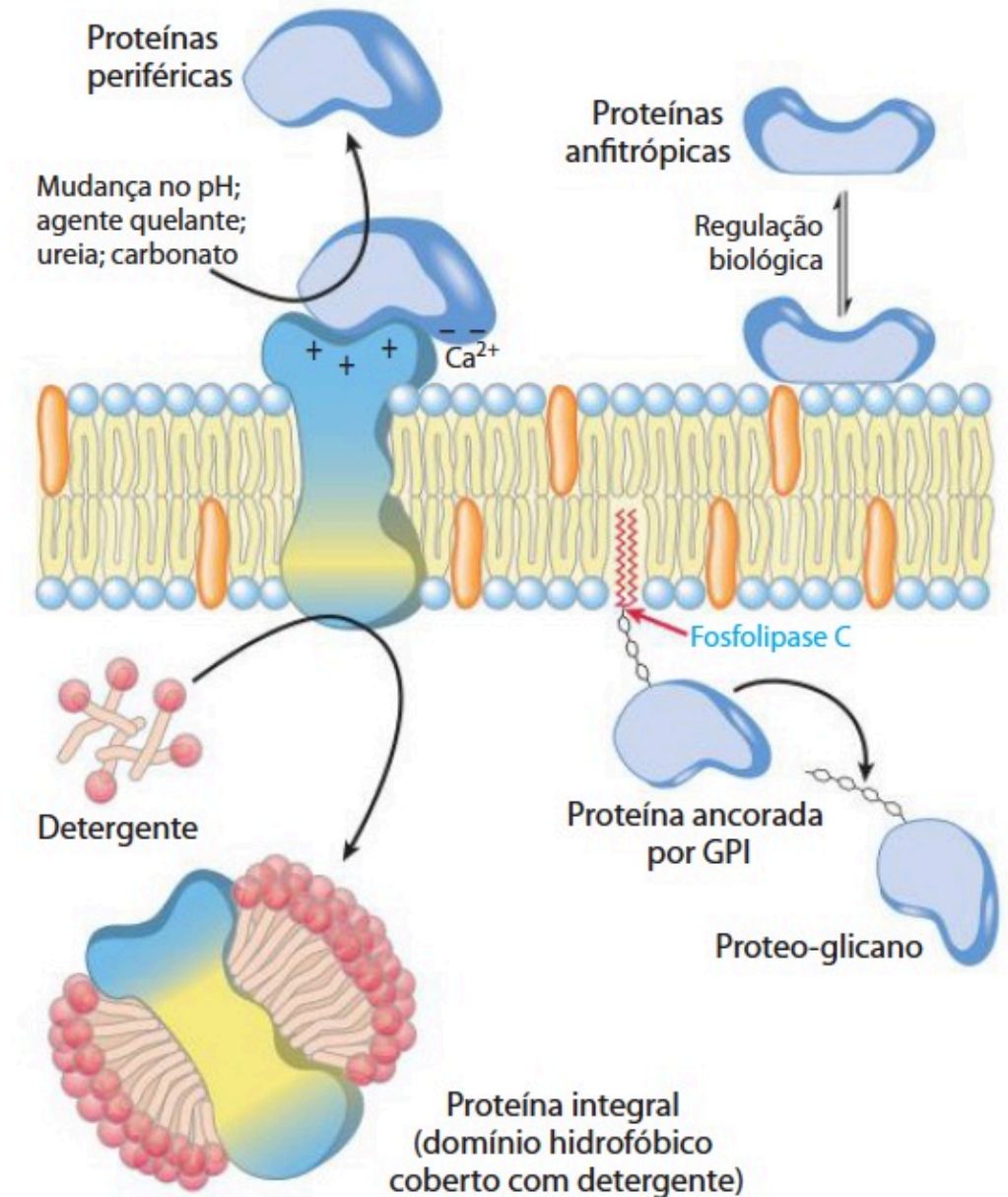
Proteínas periféricas associadas eletrostaticamente

- Associam-se à membrana por meio de interações eletrostáticas e/ou pontes de hidrogênio com proteínas ou com as cabeças polares dos lipídeos
- Podem ser liberados por tratamentos brandos, aumentando-se a força iônica do meio (KCl, NaCl) ou o pH
- São facilmente solúveis em meio aquoso

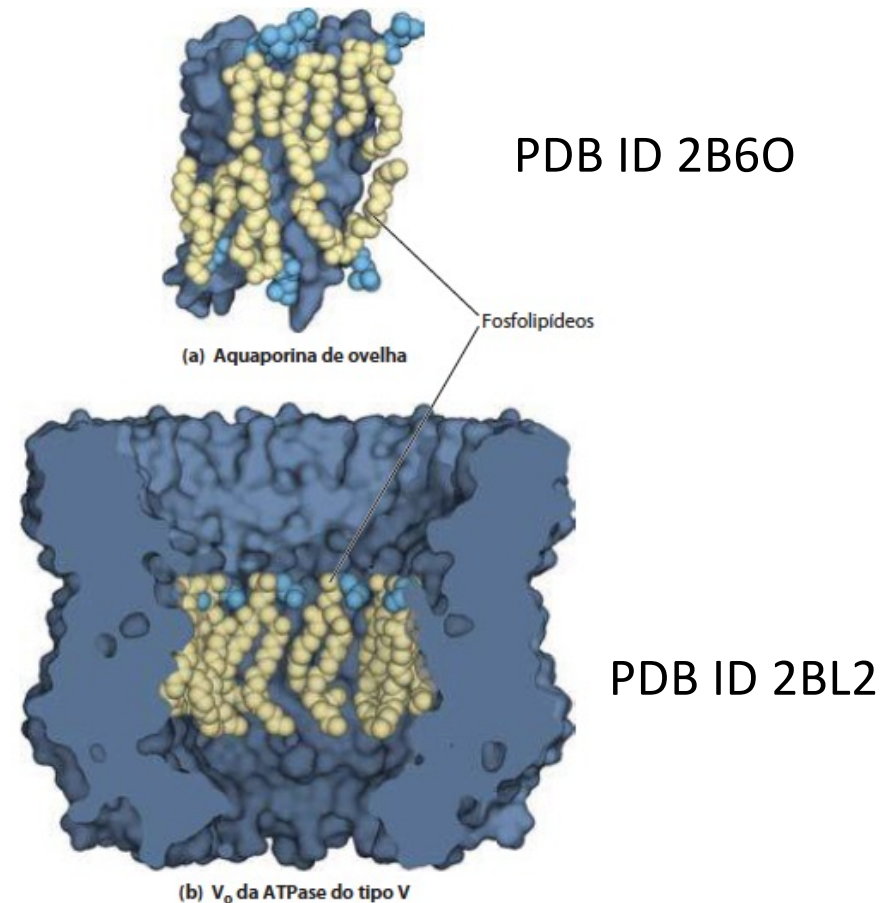
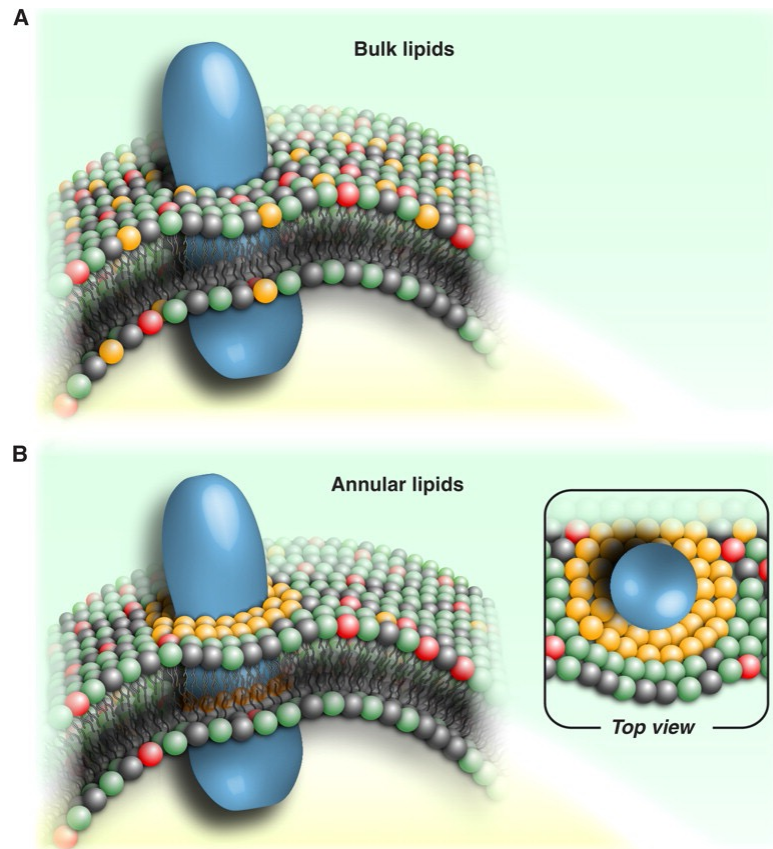


Condições usadas para isolar proteínas ajudam a revelar o tipo de associação com a membrana

- Proteínas integrais de membrana requerem uso de detergentes pois estão firmemente associadas às regiões hidrofóbicas da membrana
- Proteínas ancoradas requerem uso de fosfolipases



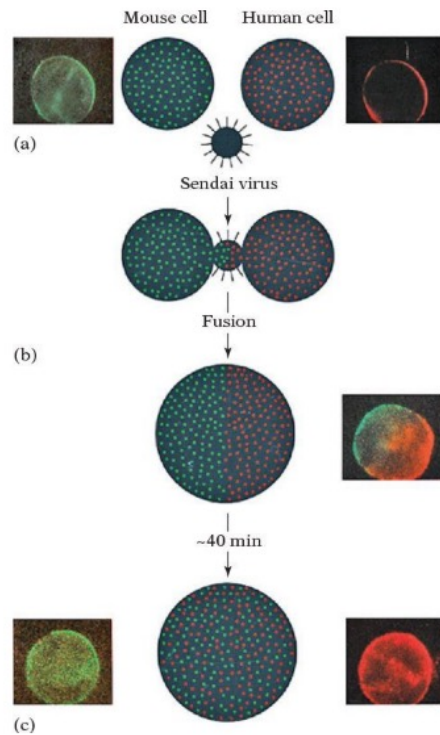
Estrutura por raio X de proteínas revelam lipídeos firmemente associados à proteína: “lipídeos anelares”



Dinâmica das Proteínas na Membrana

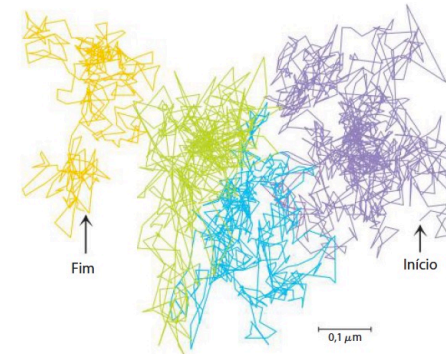
Rastreamento de proteínas na membrana

Proteínas marcadas com anticorpos específicos ligados a probes fluorescentes

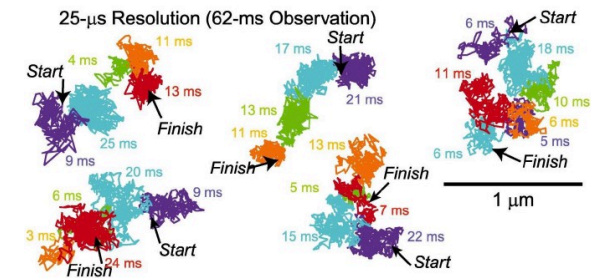


Rastreamento de lipídeos na membrana

Lipídeos ligados a probes fluorescentes



PE (18:0/18:0) marcado com ouro coloidal

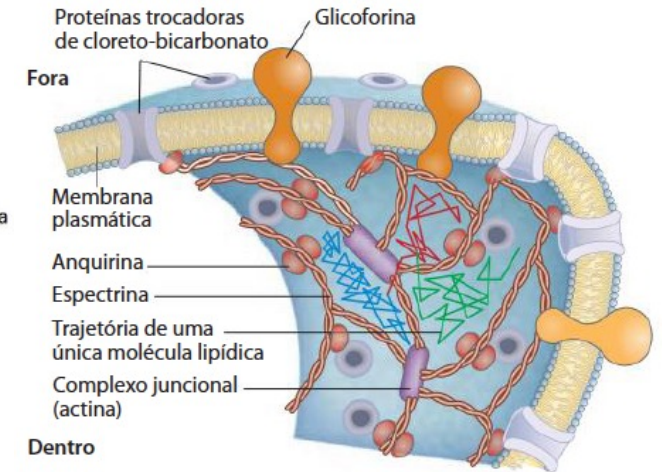
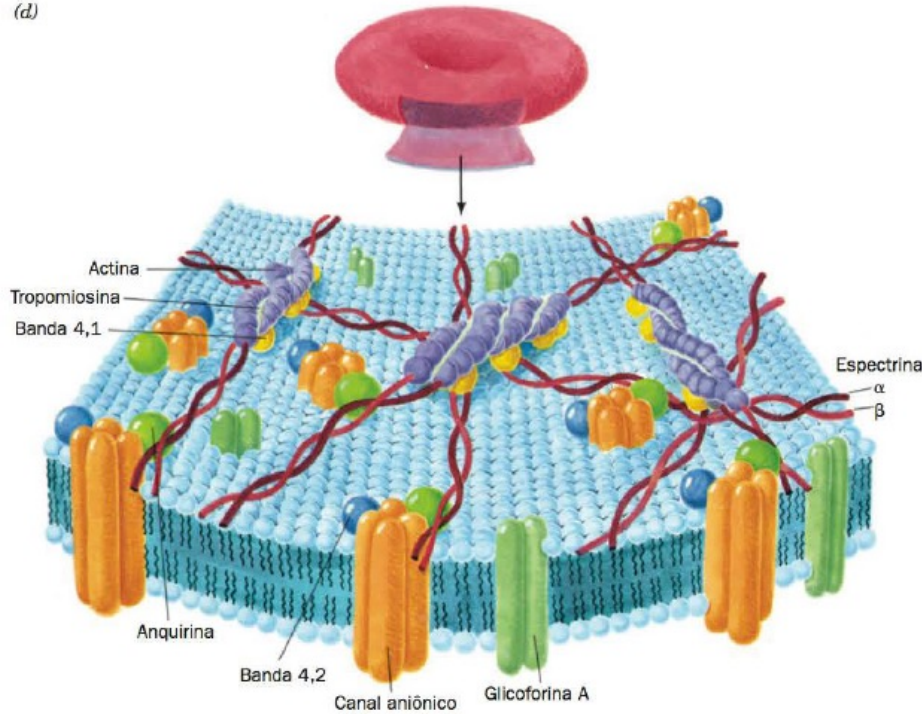
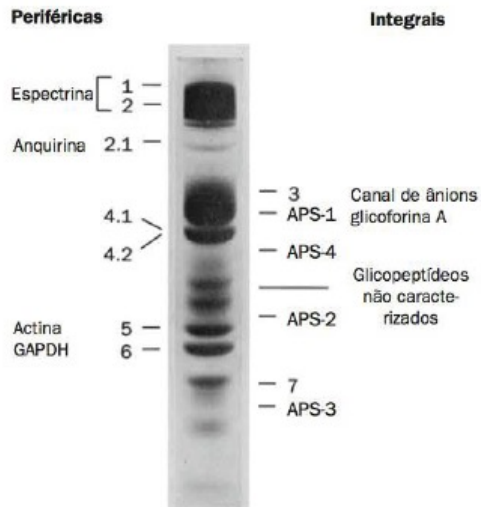


Ambos os experimentos mostram que tanto as proteínas quanto os lipídeos são difusíveis na membrana

Movimentos restritos devido a ligações com o citoesqueleto

Proteínas da Membrana do Eritrócito

(d)



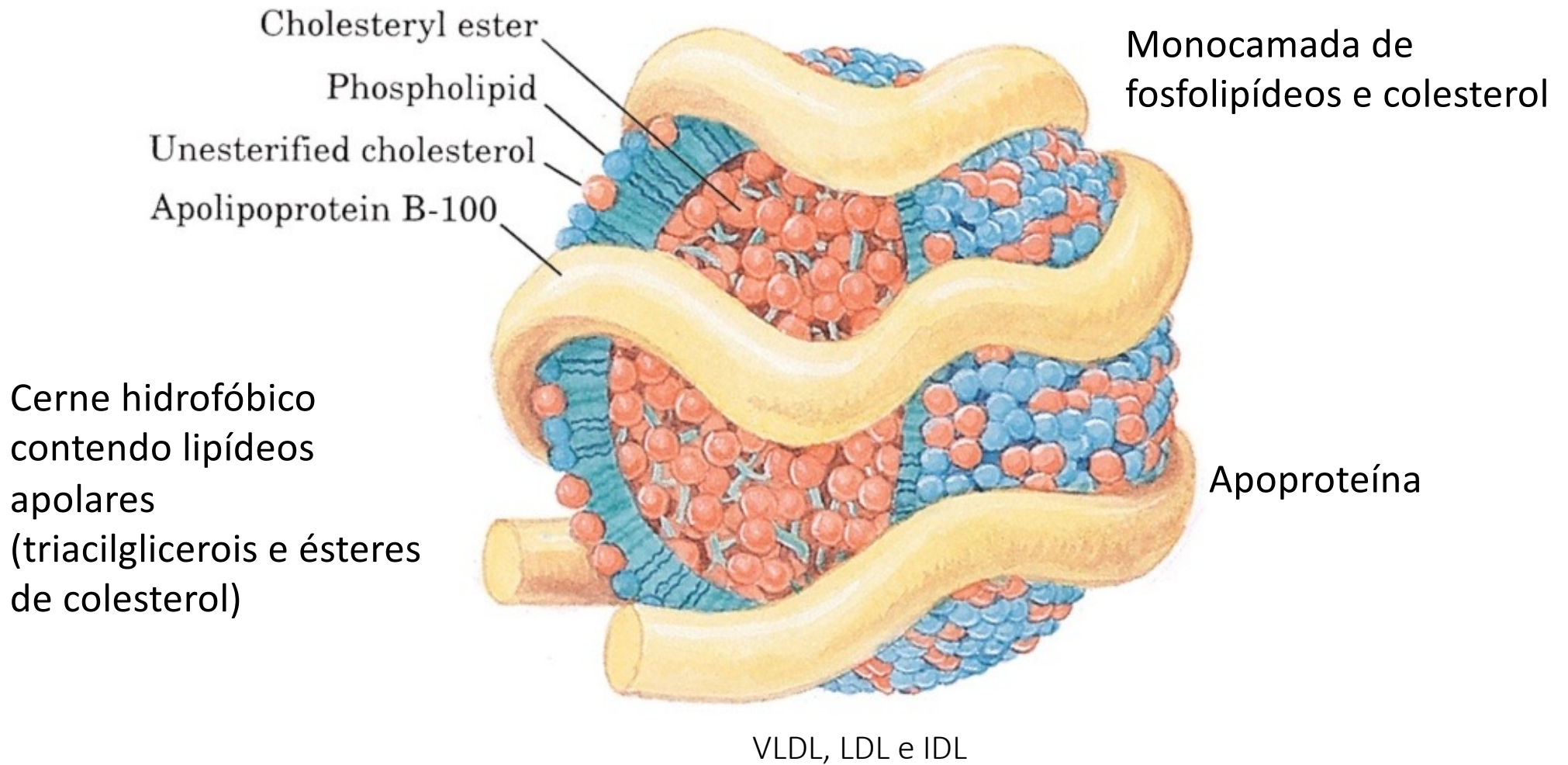
Espectrina interconectado por junções contendo Actina/Tropomiosina/Banda 4,1

Lipoproteínas

Voet Cap 12 Item 5

Lenhinger Cap 21

Estrutura Geral de Lipoproteínas



Apoproteína é uma proteína anfipática

Anel tetramérico de alfa-hélices anfipáticas recobrem a partícula

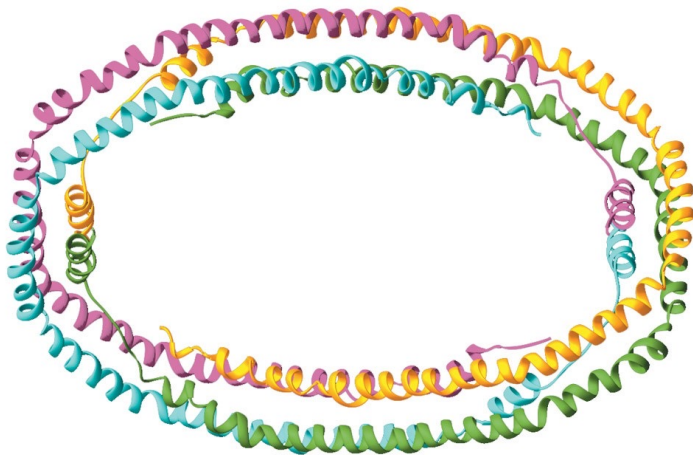


Figure 12-73a X-Ray structure of human apo $\Delta(1-43)$ A-I.

Alfa-hélice Anfipática

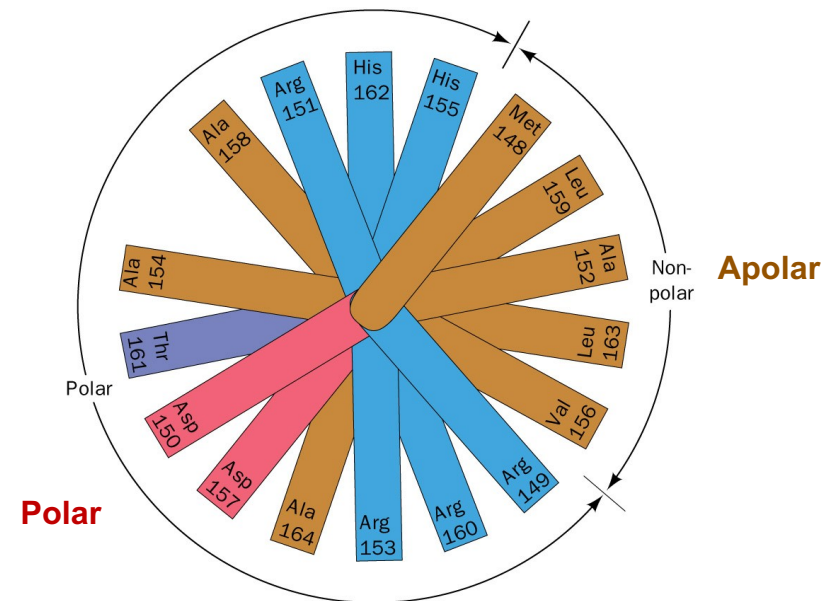


Figure 12-72 A helical wheel projection of the amphipathic α helix constituting residues 148 to 164 of apolipoprotein A-I.

Lipoproteínas – Captação mediada por Receptores

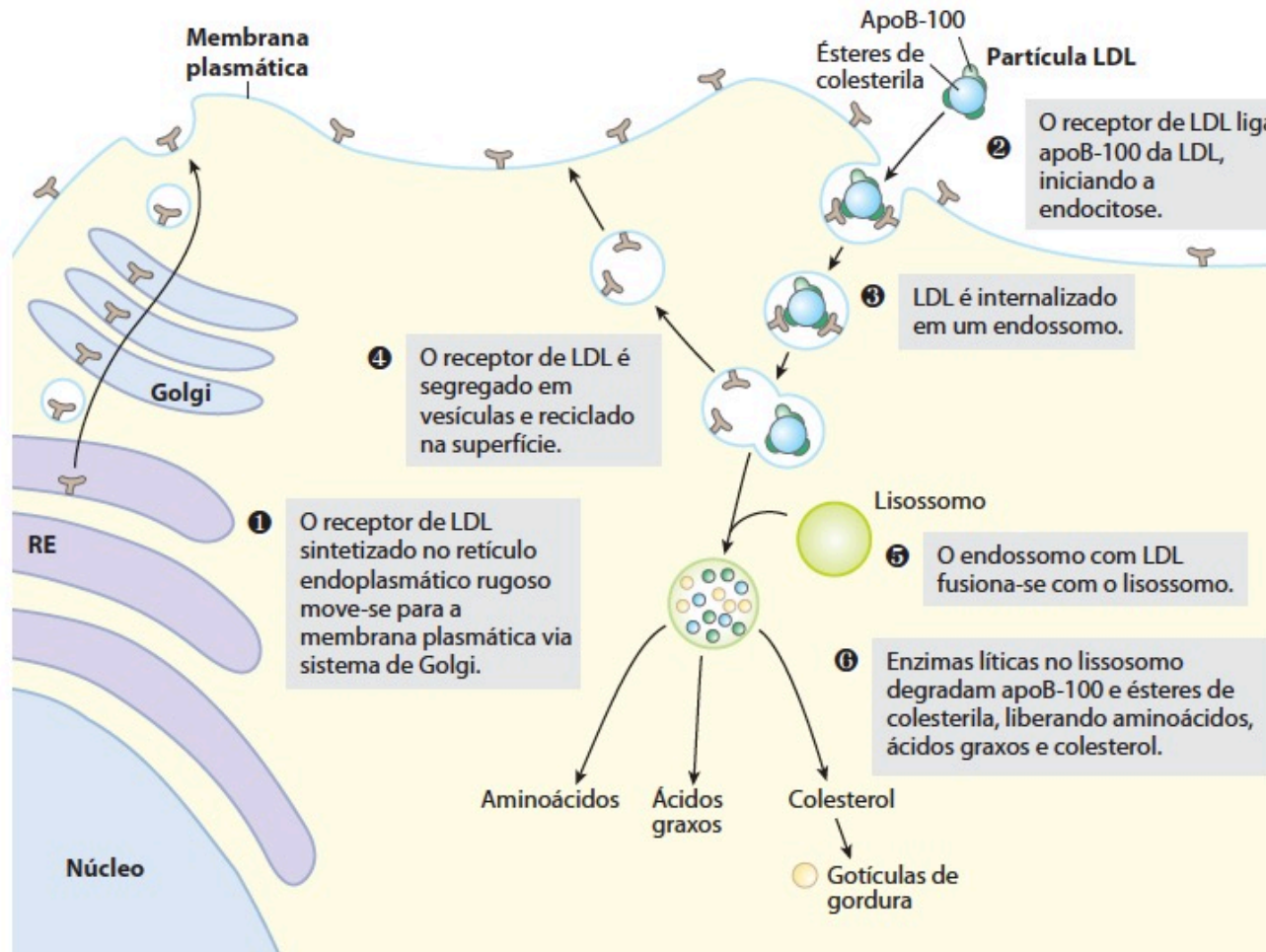
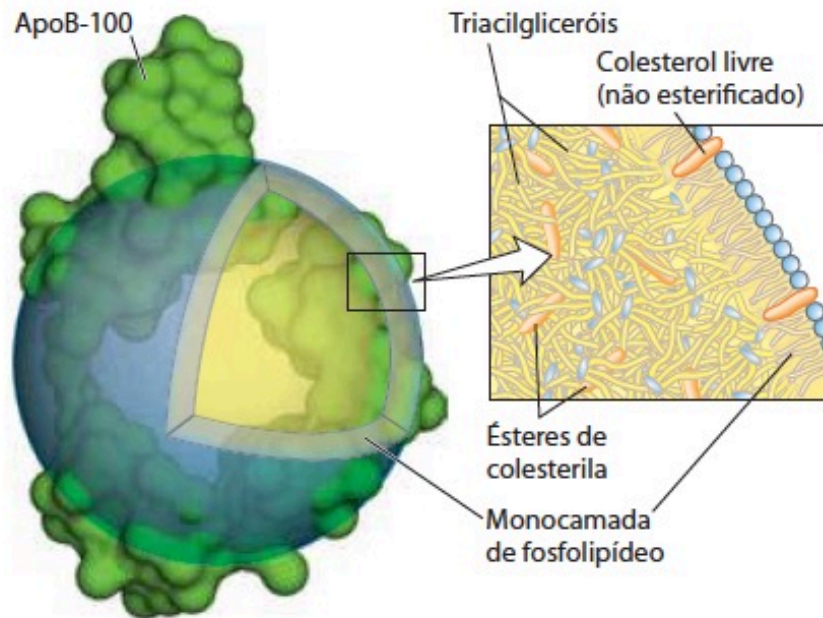
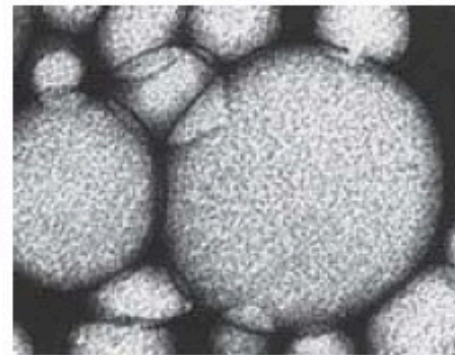


FIGURA 21-41 Captação do colesterol por endocitose mediada por receptor.

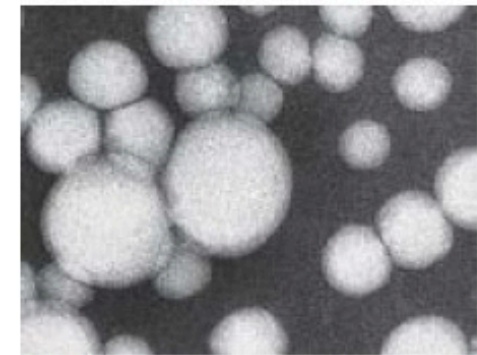
Tipos de Lipoproteínas do Plasma Sanguíneo



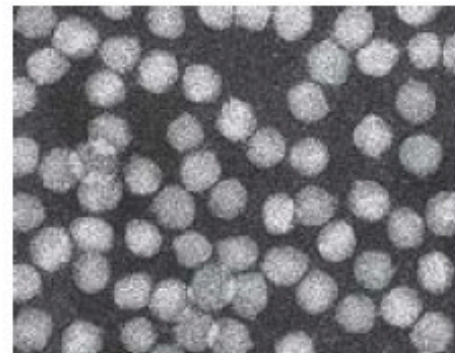
(a)



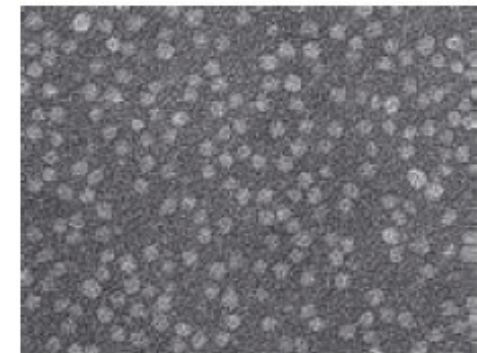
Quilomícrons ($\times 60.000$)



VLDL ($\times 180.000$)




LDL ($\times 180.000$)



HDL ($\times 180.000$)

(b)

Lipoproteínas são classificadas com base na densidade relativa,
densidade depende do conteúdo relativo de lipídios / proteínas



	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL
Density ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)	<0.95	<1.006	1.006–1.019	1.019–1.063	1.063–1.210
Particle diameter (Å)	750–12,000	300–800	250–350	180–250	50–120
Particle mass (kD)	400,000	10,000–80,000	5000–10,000	2300	175–360
% Protein ^a	1.5–2.5	5–10	15–20	20–25	40–55
% Phospholipids ^a	7–9	15–20	22	15–20	20–35
% Free cholesterol ^a	1–3	5–10	8	7–10	3–4
% Triacylglycerols ^b	84–89	50–65	22	7–10	3–5
% Cholesteryl esters ^b	3–5	10–15	30	35–40	12
Major apolipoproteins	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

^aSurface components.

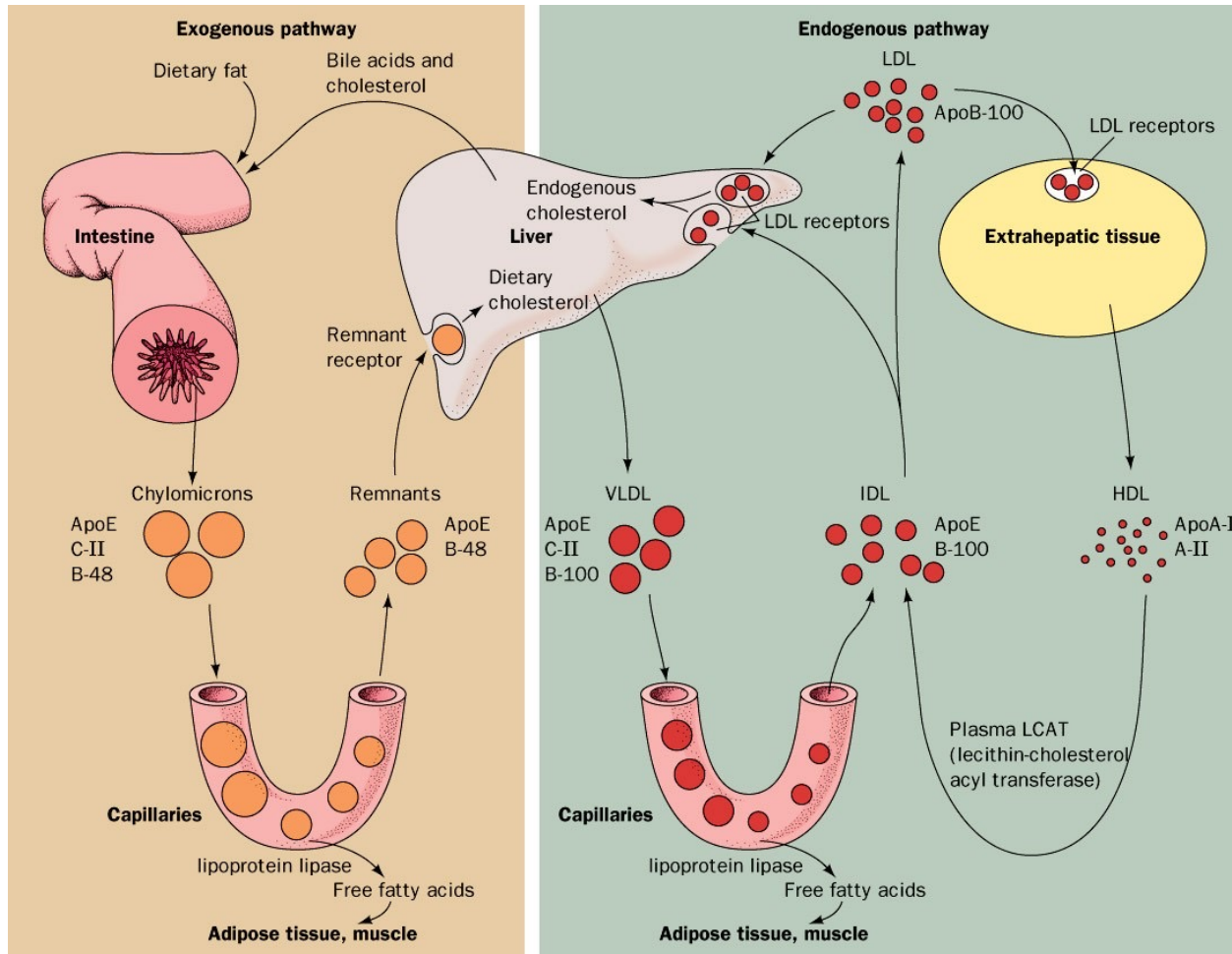
^bCore lipids.

Ricos em TAG

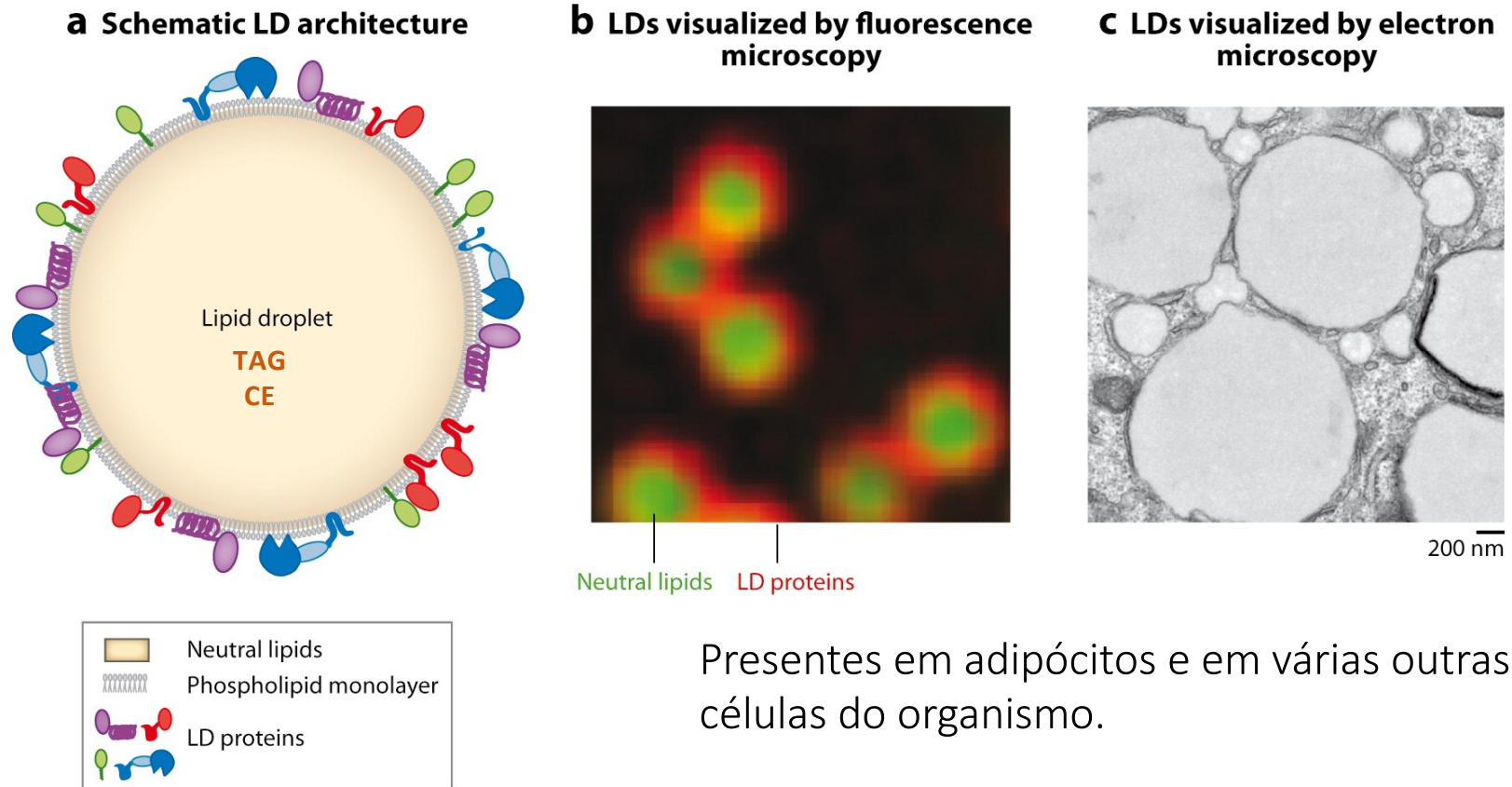
Ricos em CE

CE:TAG (~4:1)

Transporte de Colesterol e Triacilglicerol no Plasma Humano



Corpúsculos Lipídicos (lipid droplets = LD)



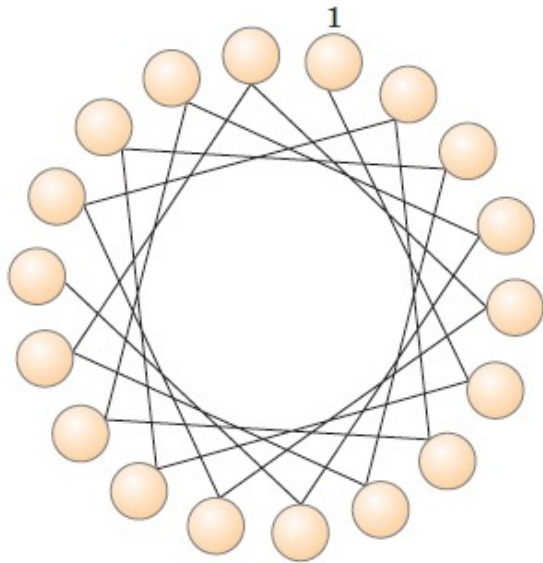
AR Walther TC, Farese RV Jr. 2012.
Annu. Rev. Biochem. 81:687–714

Presentes em adipócitos e em várias outras células do organismo.

São recobertos por monocamada de fosfolipídeos, colesterol e proteínas (ex. proteínas da família das perilipinas)

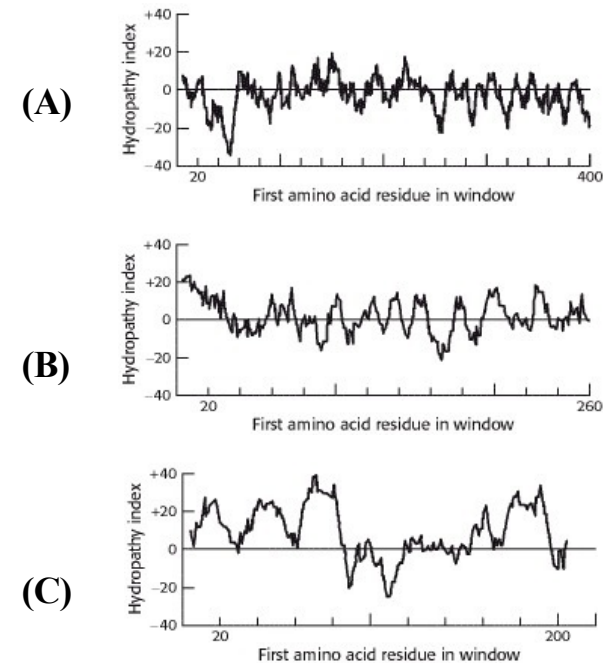
Exercícios

22. Uso do diagrama da roda helicoidal. Uma roda helicoidal é uma representação em duas dimensões de uma hélice, uma visão ao longo de seu eixo central (ver Figura 11-30b; ver também a Figura 4-4d). Use o diagrama da roda helicoidal mostrado aqui para determinar a distribuição de resíduos de aminoácidos em um segmento de hélice com a sequência -Val-Asp-Arg-Val-Phe-Ser-Asn-Val-Cys-Thr-His-Leu-Lys-Thr-Leu-Gln-Asp-Lys-



O que você pode dizer sobre as propriedades da superfície dessa hélice? Que orientação da hélice você esperaria na estrutura terciária da proteína integral de membrana?

On the basis of the following hydropathy plots for three proteins, predict which would be membrane proteins. What are the ambiguities with respect to using such plots to determine if a protein is a membrane protein?



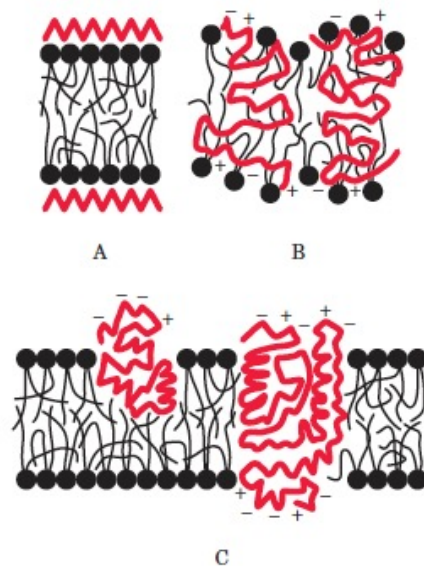
Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22504/>

* Para responder esta questão reveja os dados de espessura de membrana e tamanho da cadeia polipeptídica necessária para a atravessar a membrana

Leitura de exercício resolvido (a resposta se encontra no slide seguinte)

Problema de análise de dados

25. O modelo do mosaico fluido da estrutura da membrana biológica. A Figura 11-3 mostra o modelo de mosaico fluido da estrutura da membrana biológica, aceito atualmente. Esse modelo foi apresentado em detalhe em um artigo de revisão por S. J. Singer em 1971. No artigo, Singer apresentou os três modelos da estrutura de membrana que foram propostos naquela época:



A. O Modelo de Davson-Danielli-Robertson. Esse era o modelo mais amplamente aceito em 1971, quando a revisão de Singer foi publicada. Nesse modelo, os fosfolipídeos estão arranjados como uma bicamada. Proteínas são encontradas em ambas as superfícies da bicamada, ligadas a ela por interações iônicas entre grupos polares carregados dos fosfolipídeos e grupos carregados das proteínas. Não há proteínas no interior da bicamada.

B. O Modelo da Subunidade Lipoproteica de Benson. Aqui, as proteínas são globulares, e a membrana é uma mistura de proteína e lipídeo. As caudas hidrofóbicas dos lipídeos estão embebidas nas partes hidrofóbicas das proteínas. Os grupos polares lipídicos estão expostos ao solvente. Não há bicamada lipídica.

C. O Modelo do Mosaico da Proteína Globular-Lipídeo. Esse é o modelo mostrado na Figura 11-3. Os lipídeos formam uma bicamada e as proteínas estão embebidas nela, algumas se estendendo através da bicamada e outras não. As proteínas estão ancoradas na bicamada por interações hidrofóbicas entre as

caudas hidrofóbicas dos lipídeos e as porções hidrofóbicas da proteína.

Considerando os dados disponíveis a seguir, considere como cada parte de informação se encaixa com cada um dos três modelos da estrutura da membrana. Qual(is) modelo(s) é(são) mantido(s), quais não são, e que restrições você tem sobre os dados ou suas interpretações? Explique seu raciocínio.

(a) Quando as células foram fixadas, coradas com tetróxido de ósmio e examinadas sob microscopia eletrônica, as membranas mostram uma aparência de “via férrea”, com duas linhas escuras separadas por um espaço claro.

(b) O valor encontrado para a espessura das membranas das células fixadas e coradas da mesma forma foi de 5 a 9 nm. A espessura de uma bicamada fosfolipídica “nua”, sem proteínas, foi de 4 a 4,5 nm. A espessura de uma única monocamada de proteínas era de cerca de 1 nm.

(c) Singer escreveu em seu artigo: “A composição média de aminoácidos das proteínas de membrana não é distinguível daquela das proteínas solúveis. Em particular, uma fração substancial de resíduos é hidrofóbica” (p. 165).

(d) Como descrito nos Problemas 1 e 2 deste capítulo, pesquisadores extraíram membranas de células, extraíram os lipídeos e compararam a área da monocamada lipídica com a área da membrana da célula original. A interpretação dos resultados tornou-se complicada pela questão ilustrada no gráfico do Problema 1: a área da monocamada dependia da força usada para pressioná-la. Com pressões muito leves, a razão entre a área da monocamada e a área da membrana estava em torno de 2,0. Com pressões mais altas – supostamente como as encontradas em células – a razão era substancialmente mais baixa.

(e) Espectroscopia de dicroísmo circular utiliza mudanças na polarização da luz UV para fazer inferências quanto à estrutura secundária da proteína (ver Figura 4-10). Em média, essa técnica mostrou que as proteínas de membrana têm uma grande quantidade de hélices α e pouca ou nenhuma folha β . Esse achado foi consistente com a maioria das proteínas de membrana que possuíam estrutura globular.

(f) A fosfolipase C é uma enzima que remove o grupo polar (incluindo o fosfato) de fosfolipídeos. Em vários estudos, o tratamento de membranas intactas com fosfolipase C removeu cerca de 70% dos grupos polares sem interromper a estrutura de “via férrea” da membrana.

(g) Singer descreveu em seu artigo um estudo no qual “a glicoproteína com massa molecular aproximada de 31.000 em membranas de células sanguíneas vermelhas era hidrolisada em glicopeptídeos solúveis com massa molecular aproximada de 10.000, após tratamento triptico de membranas, enquanto as demais porções eram bastante hidrofóbicas” (p. 199). O tratamento com tripsina não causou mudanças grosseiras nas membranas, que permaneceram intactas.

A revisão de Singer também incluiu muitos outros estudos nessa área. No final, entretanto, os dados disponíveis em 1971 não provavam conclusivamente que o Modelo C estava correto. À medida que mais dados foram se acumulando, esse modelo da estrutura da membrana foi sendo aceito pela comunidade científica.

Resposta do ex. 25

25. (a) *Modelo A*: mantido. As duas linhas escuras são ou as camadas de proteína ou os grupos polares dos fosfolípidos, e o espaço claro é ou a bicamada ou o núcleo hidrofóbico, respectivamente. *Modelo B*: não mantido. Esse modelo requer uma banda corada mais ou menos uniformemente circundando a célula. *Modelo C*: mantido, com restrição. As duas linhas escuras são os grupos polares dos fosfolípidos; as zonas claras são suas caudas. Assume-se que as proteínas da membrana não são visíveis, porque não se coram com ósmio ou não se encontram nas regiões vistas. (b) *Modelo A*: mantido. Uma bicamada “nua” (4,5 nm) + duas camadas de proteínas (2 nm) somam 6,5 nm, que está dentro do limite de espessura observado. *Modelo B*: nem um nem outro. Esse modelo não mantido faz previsões sobre a espessura da membrana. *Modelo C*: obscuro. É difícil conciliar o resultado com esse modelo, o qual prediz que a membrana é tão espessa quanto ou ligeiramente mais espessa (em virtude das extremidades das proteínas inseridas, que se projetam) do que a bicamada “nua”. O modelo é mantido somente se uma quantidade substancial de proteína se projetar da bicamada. (c) *Modelo A*: obscuro. É difícil conciliar o resultado com este modelo. Se as proteínas estão ligadas à membrana por interações iônicas, o modelo prediz que elas contêm alta proporção de aminoácidos carregados, ao contrário do que foi observado. Também, uma vez que a camada proteica deve ser muito fina [ver (b)], não deve ter muito espaço para um núcleo proteico hidrofóbico, de forma que os resíduos hidrofóbicos estariam expos-

tos ao solvente. *Modelo B*: mantido. As proteínas têm uma mistura de resíduos hidrofóbicos (que interagem com os lipídeos) e de resíduos carregados (que interagem com a água). *Modelo C*: mantido. As proteínas têm uma mistura de resíduos hidrofóbicos (ancorados na membrana) e de resíduos carregados (que interagem com a água). (d) *Modelo A*: obscuro. É difícil conciliar o resultado com este modelo, que prediz uma proporção exata de 2,0; isso pode ser difícil de alcançar sob condições de pressão fisiologicamente relevantes. *Modelo B*: nem um nem outro. Esse modelo não faz previsões sobre a quantidade de lipídeos na membrana. *Modelo C*: mantido. Alguma área de superfície da membrana está ocupada por proteínas, de forma que a proporção deve ser menos de 2,0, conforme foi observado sob condições fisiologicamente mais relevantes. (e) *Modelo A*: obscuro. O modelo prediz proteínas em conformação estendida e não globular, portanto mantido somente se for aceito que as proteínas posicionadas na superfície incluam segmentos helicoidais. *Modelo B*: mantido. O modelo prediz principalmente proteínas globulares (contendo alguns segmentos helicoidais). *Modelo C*: mantido. O modelo prediz principalmente proteínas globulares. (f) *Modelo A*: obscuro. Os grupos polares fosforilamina estão protegidos pela camada proteica, mas os fosfolípidos somente estarão completamente protegidos da fosfolipase se as proteínas cobrirem totalmente a superfície. *Modelo B*: mantido. A maioria dos grupos polares está acessível à fosfolipase. *Modelo C*: mantido. Todos os grupos polares estão acessíveis à fosfolipase. (g) *Modelo A*: não mantido. As proteínas estão totalmente acessíveis à digestão por tripsina, e praticamente todas sofrerão múltipla hidrólise, sem segmentos hidrofóbicos protegidos. *Modelo B*: não mantido. Praticamente todas as proteínas estão na bicamada e inacessíveis à tripsina. *Modelo C*: mantido. Os segmentos de proteína que penetram ou que atravessam a bicamada estão protegidos da tripsina; aqueles expostos na superfície serão hidrolisados. As porções resistentes à tripsina têm alta proporção de resíduos hidrofóbicos.