Proteínas membranares

•As células e organelos celulares são confinadas por membranas, camadas extremamente finas (~45 A) de lípidos e moléculas de proteína. Os lípidos estão organizados numa dupla camada que é hidrofílica no seu lado exterior e hidrofóbica no interior.

• As moléculas de proteína estão embebidas nesta camada, estando no caso mais simples organizadas em 3 regiões: um segmento hidrofóbico transmembranar, e duas regiões hidrofílicas, uma de cada lado da membrana.

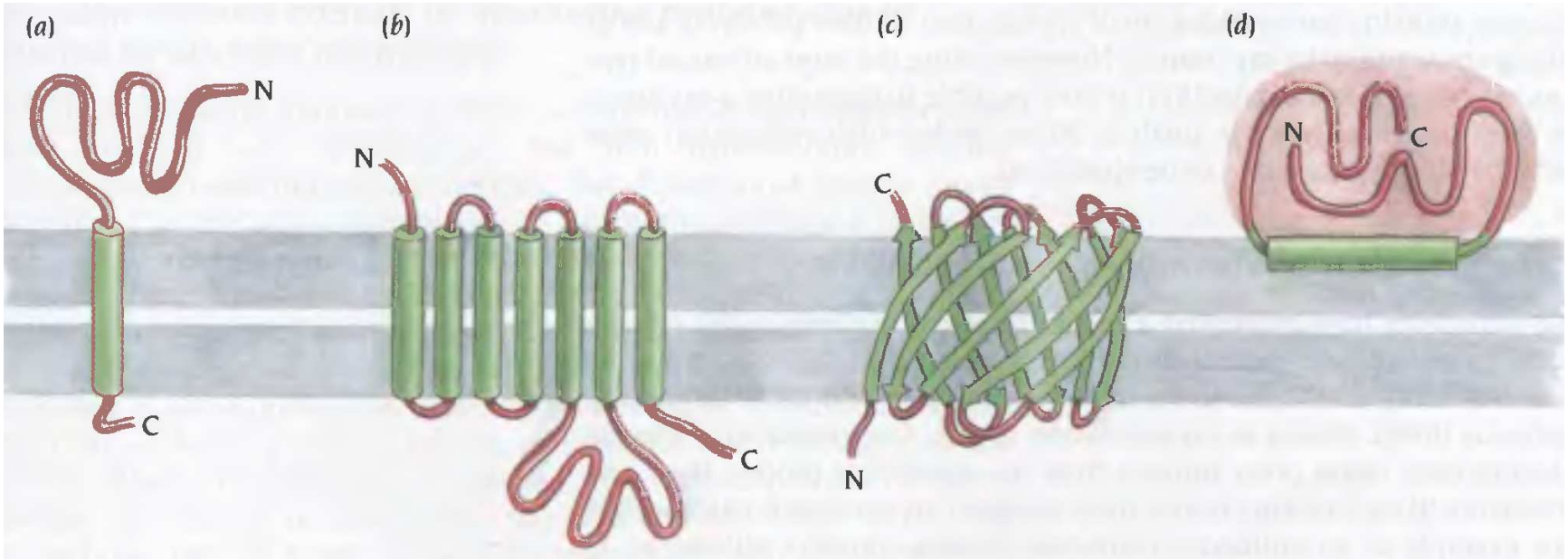
• O meio em que as proteínas membranares se encontram imersas é bem distinto do meio aquoso, dando origem a preferências estruturais bem distintas das proteínas globulares

• As regiões terminais das proteínas membranares são frequentemente domínios globulares em contacto com o citoplasma ou meio extracelular, que pode ser clivados libertando-os da membrana.

• As proteínas membranares são muitas vezes formadas por uma ou mais hélices α transmembranares, mas também podem apresentar estrutura β

• Algumas funções típicas: receptores e transdutores de sinais extracelulares, transporte activo de iões através de membranas, transporte de electrões, conversão de gradientes químicos ou energia solar em ATP,...

Modos de ligação de proteínas a membranas



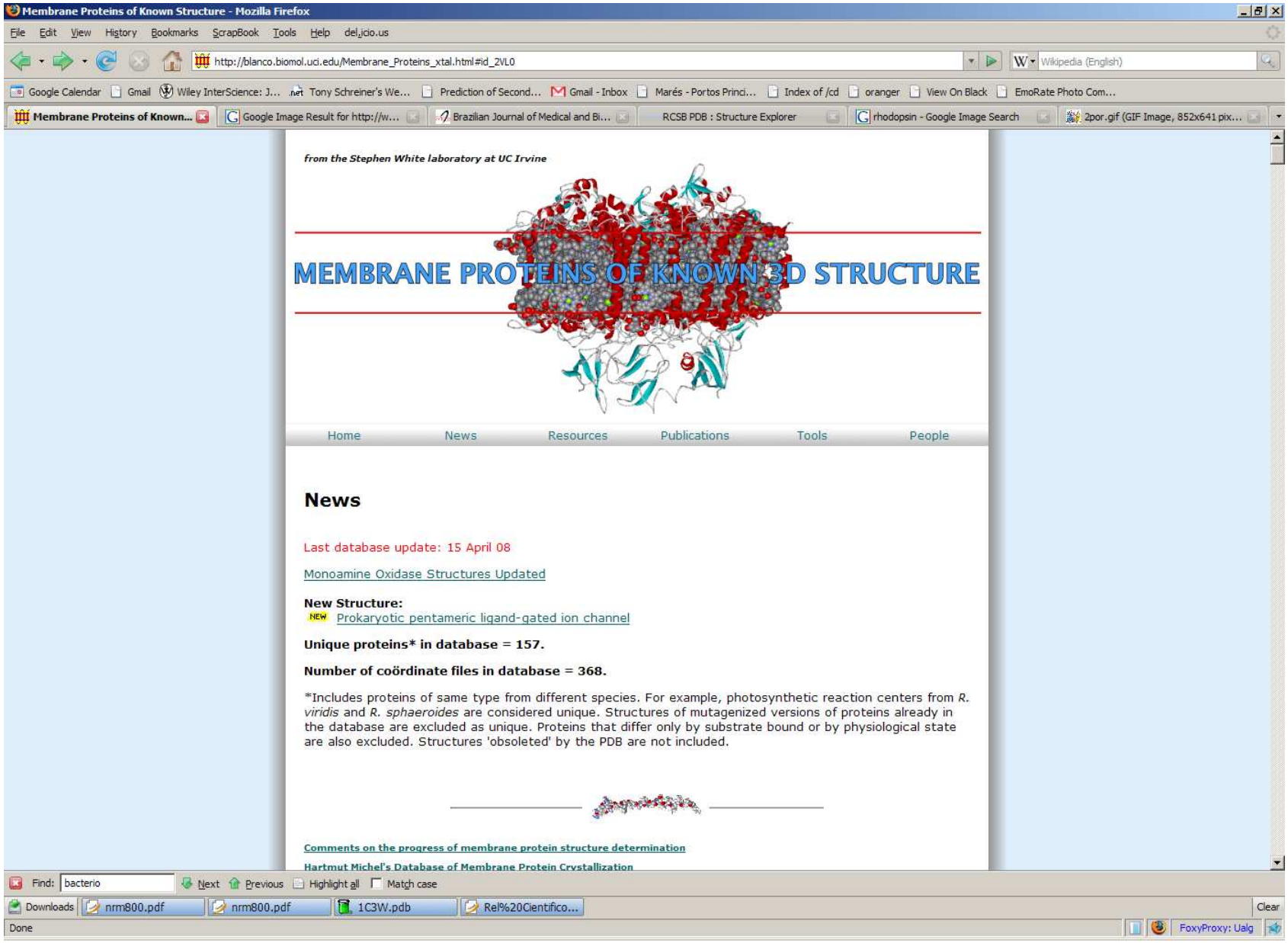
Hélices transmembranares

Barril beta

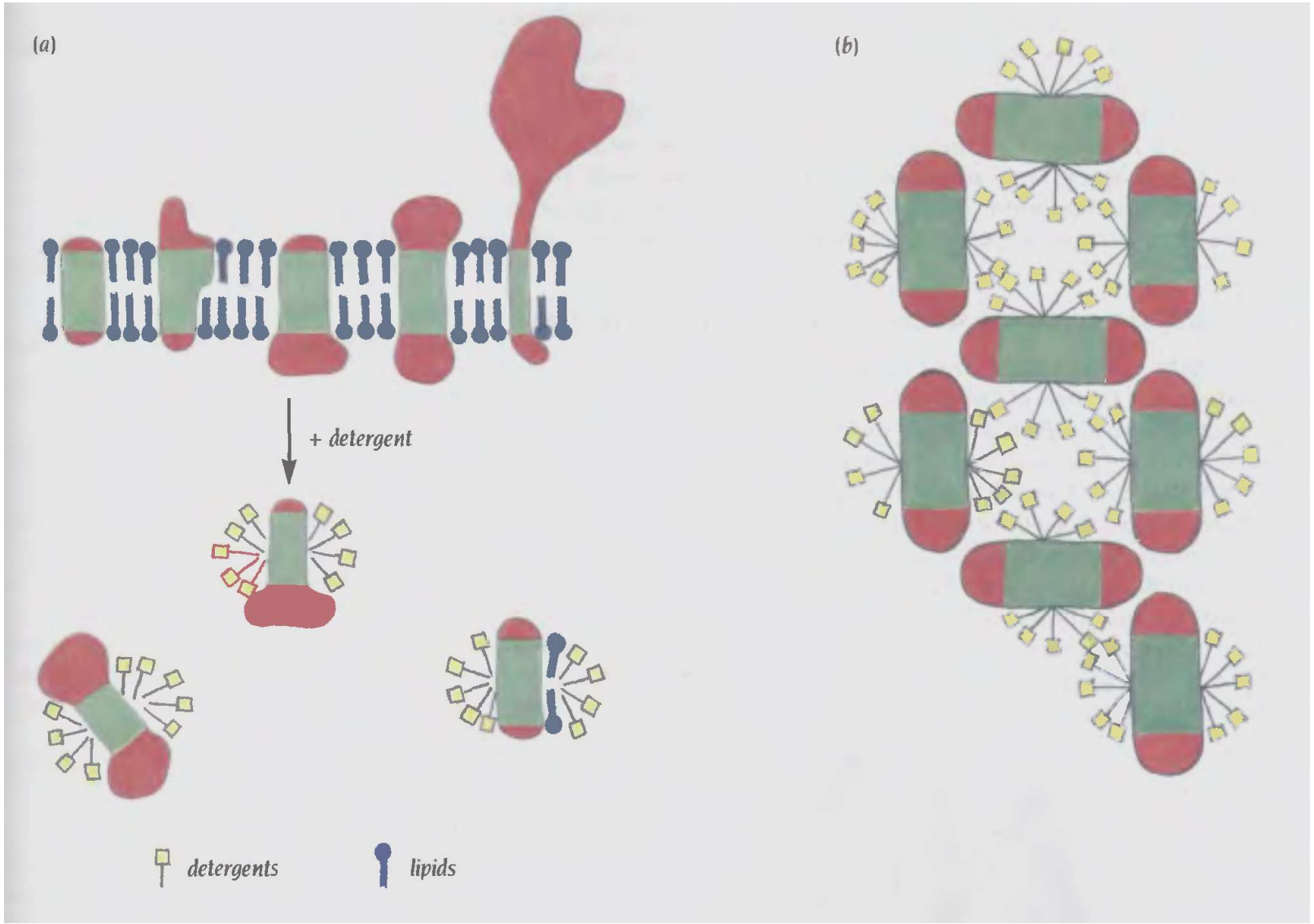
Dificuldade de cristalização das proteínas membranares

- As proteínas membranares tem extensas regiões hidrofóbicas e não são solúveis em água
- A solubilização pode ser conseguida em soluções aquosas contendo detergentes
- Os complexos proteína-detergente são o ponto de partida para a cristalização e subsequente determinação da estruturas por cristalografia de raios X. Os cristais obtidos são geralmente pequenos tornando mais difícil a determinação.
- Apesar dos avanços recentes nas técnicas de cristalização, são conhecidas até à data apenas 368 estruturas de proteínas de membrana (dados de Abril 2008), num total de 50830 estruturas no Protein Data Bank

Membrane proteins of known structure
(http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_proteins_xtal.html)



Cristalização de proteínas membranares

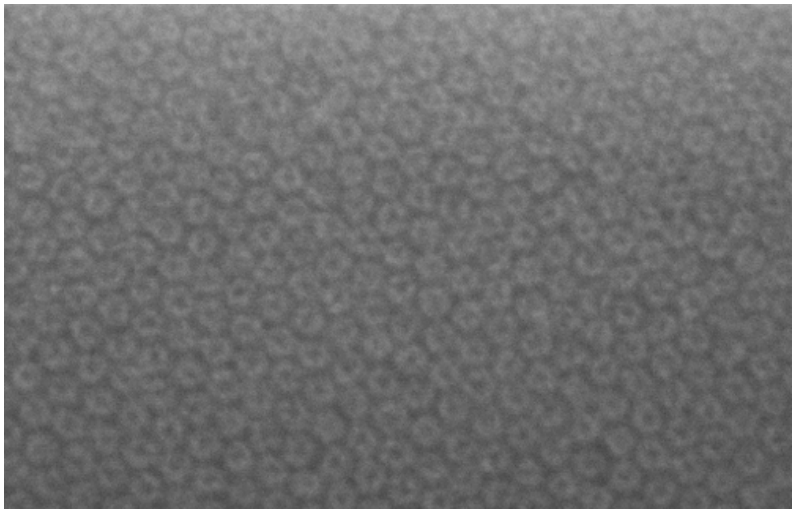


Reconstrução da estrutura de proteínas membranares por microscopia electrónica

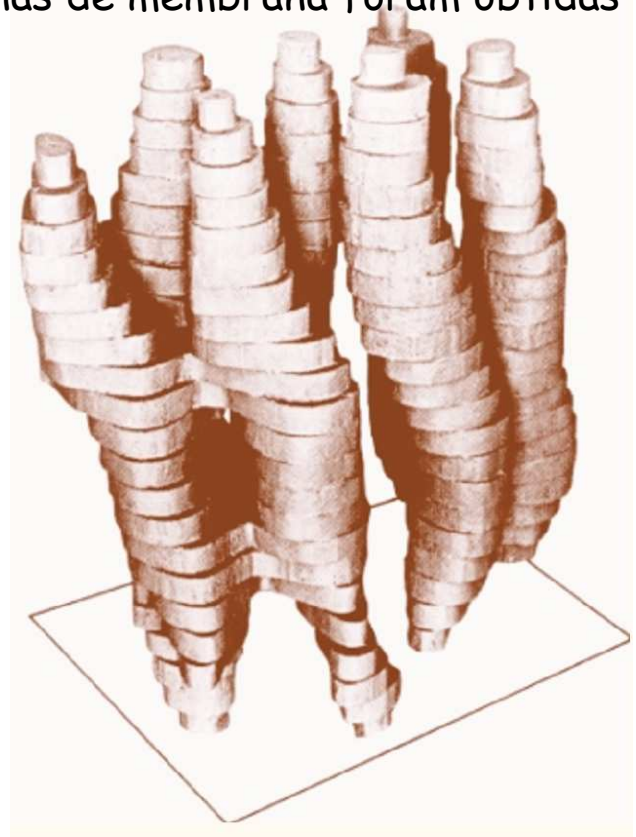
• Produção espontânea ou artificial de camadas ordenadas de proteínas membranares (cristais bi-dimensionais)

• Microfotografia electrónica dos cristais 2D segundo diferentes ângulos permite a resconstrução da densidade electrónica

• As primeiras informações estruturais sobre proteínas de membrana foram obtidas por este processo



Cristal bi-dimensional de proteína



Densidade electrónica da bacteriorodopsina

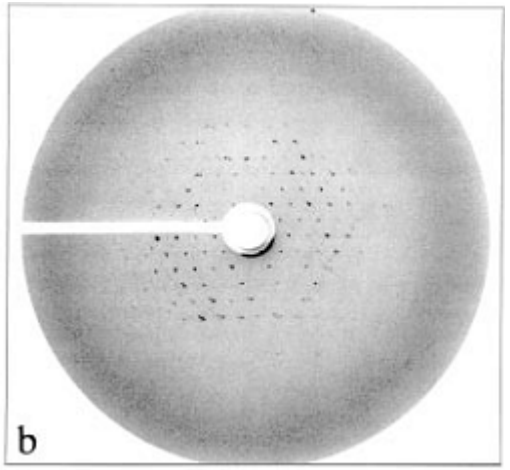
Cristalização em fases cúbicas de lípidos

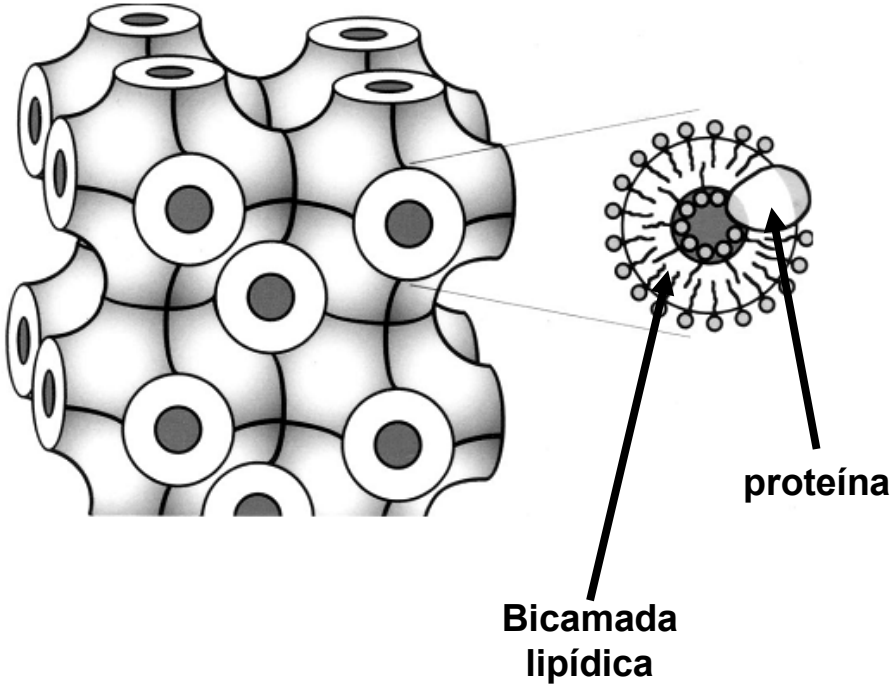
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 93, pp. 14532–14535, December 1996
Biophysics

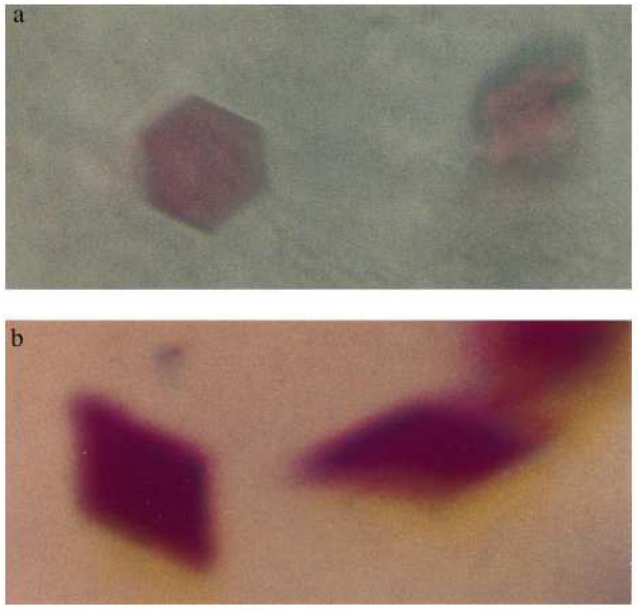
Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins

(bacteriorhodopsin structure/bicontinuous phases/lipidic matrices/x-ray crystallography)

EHUD M. LANDAU AND JÜRG P. ROSENBUSCH



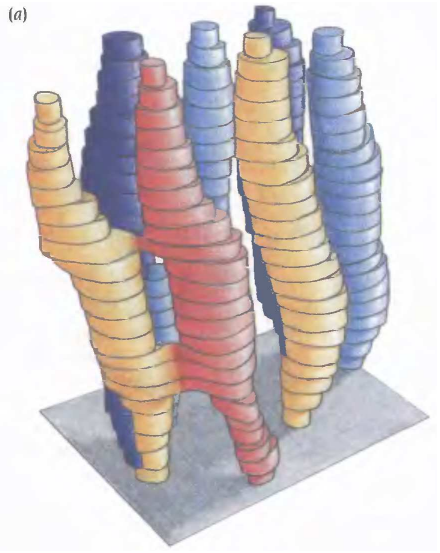




Cristais de bacteriorodopsina numa fase cúbica lipídica

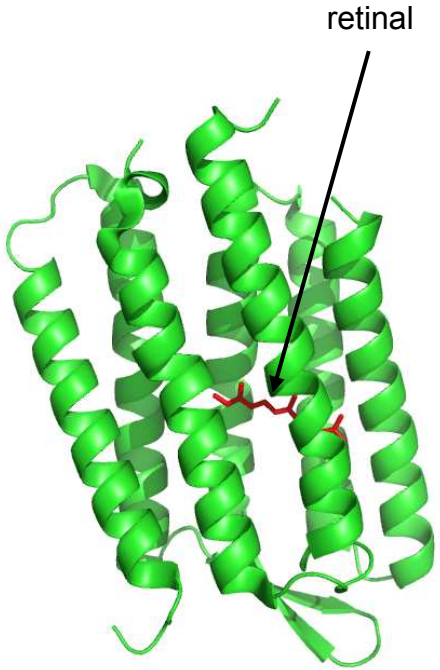
Estrutura da bacteriorodopsina

- A estrutura de baixa resolução foi obtida por Henderson em 1975, por microfotografia electrónica de cristais 2D
- Em 1990 a estrutura foi resolvida com 3 A de resolução, confirmando os dados anteriores
- A proteína apresenta 7 hélices trans-membranares



Densidade electrónica

Estrutura na membrana



Estrutura de alta resolução

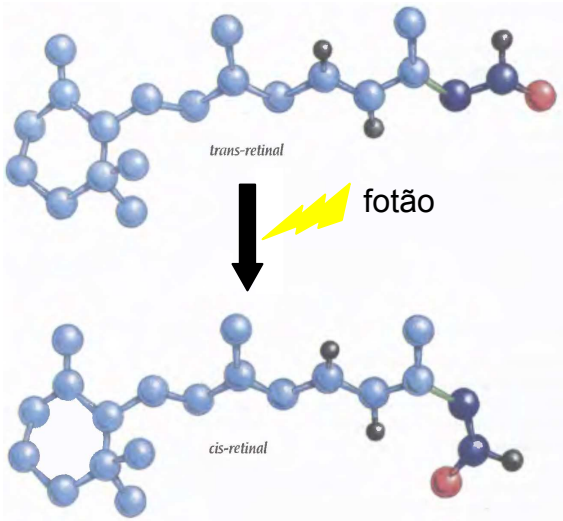
Bacteriorodopsina: uma bomba de protões activada pela luz

• As bactérias do género *Halobacter* possuem o mais simples sistema conhecido para a conversão de energia luminosa em energia química

• Em condições de intensa iluminação e baixa pressão de oxigénio estas bactérias sintetizam bacteriorodopsina

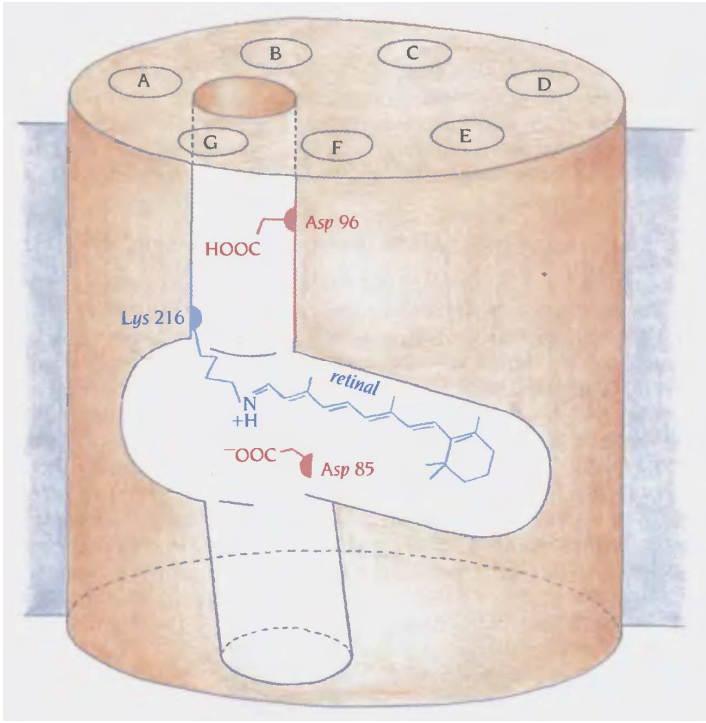
• O retinal ligado à BR sofre uma transição conformaciona *cis* -> *trans* por absorção de um fotão, e como consequência a proteína bombeia protõs do citoplasma para o espaço extracelular, criando um gradiente protónico que é usado para sintetizar ATP.

trans-retinal

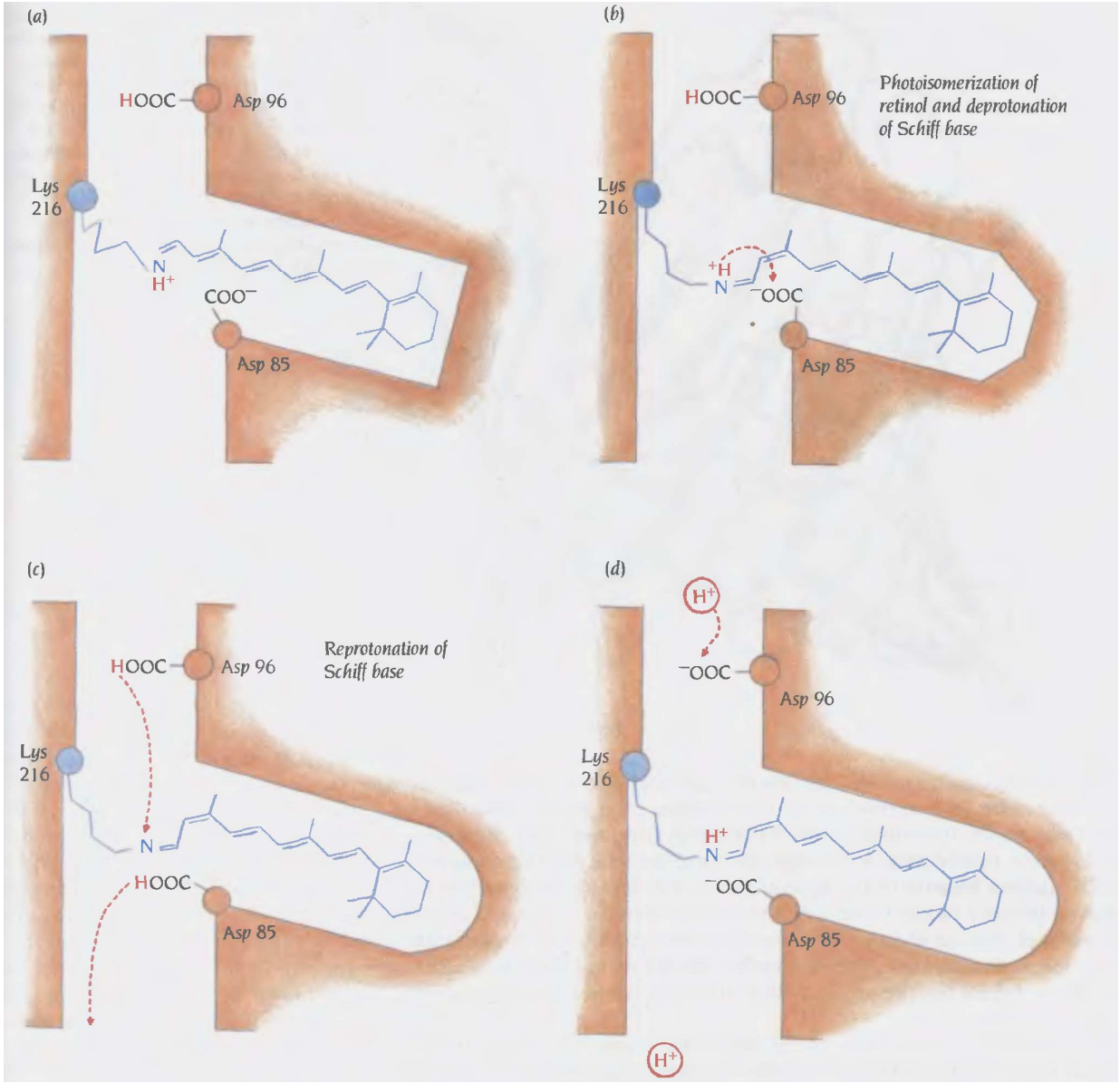


cis-retinal

citoplasma



Mecanismo da bacteriorodopsina

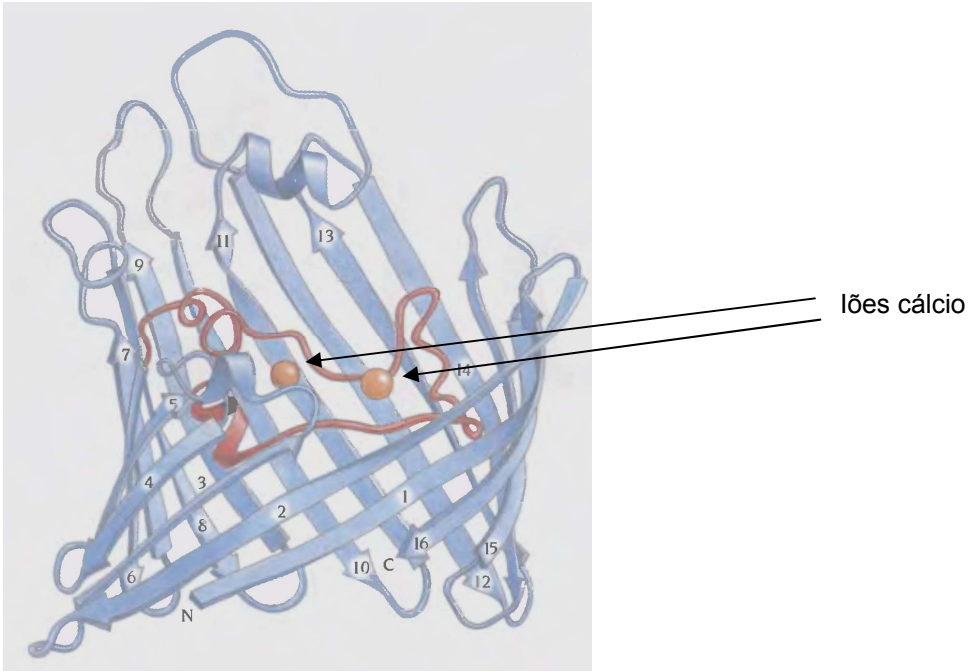


Porinas

• As bactérias gram-negativas possuem duas membranas, uma membrana plasmática interna e uma membrana externa, separadas por um espaço periplásmico

• As proteínas da membrana interna possuem o padrão de hidrofobicidade característico de hélices transmembranares (sequências contínuas de cerca de 20 resíduos hidrofóbicos). As maioria das proteínas da membrana externa não possuem este padrão.

• A resolução da estrutura da primeira proteína de membrana externa em 1990, a **porina**, explicou a ausência do padrão característico: as regiões transmembranares são cadeias betas e não hélices alfa!

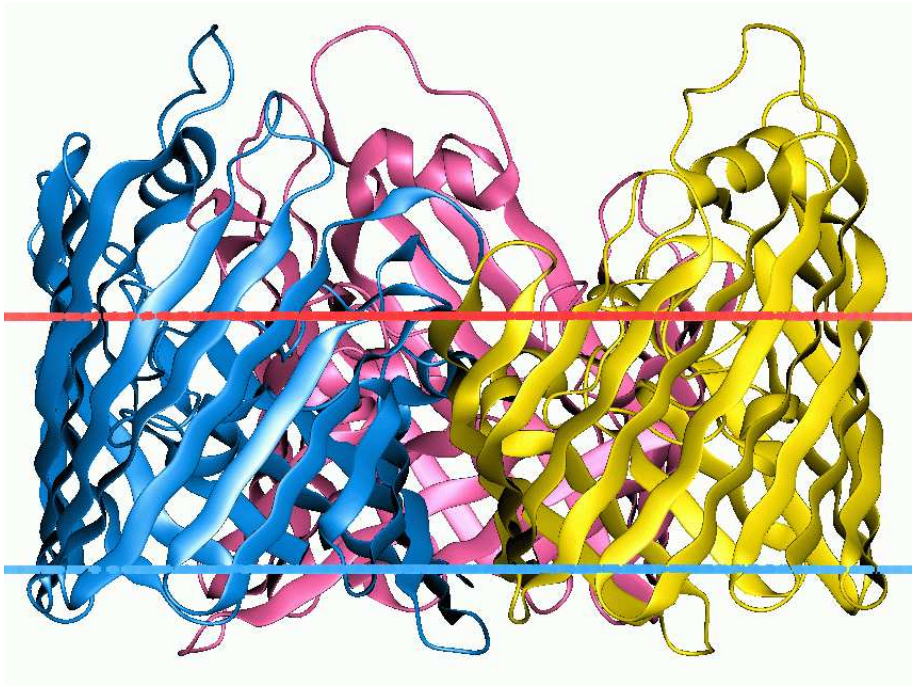


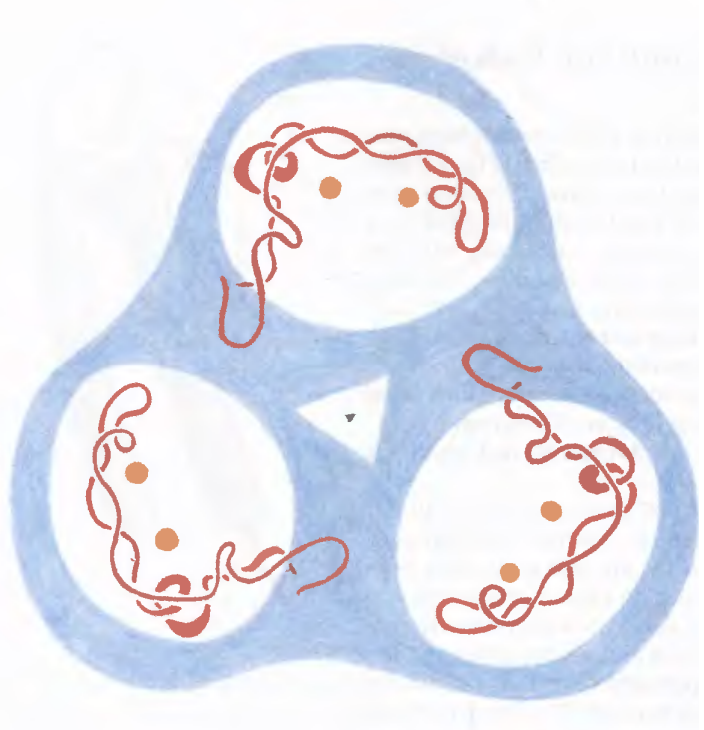
Porinas

• Três barris beta "up-and-down" de 16 cadeias associam-se para formar o trímero funcional de porina

• O barril tem uma cavidade central que permite a passagem de moléculas, mas tem uma região central estrangulada por um loop ("eyelet region"), que possibilita selectividade no transporte

• A região do eyelet possui uma acentuada assimetria de cargas que aumenta a selectividade do canal



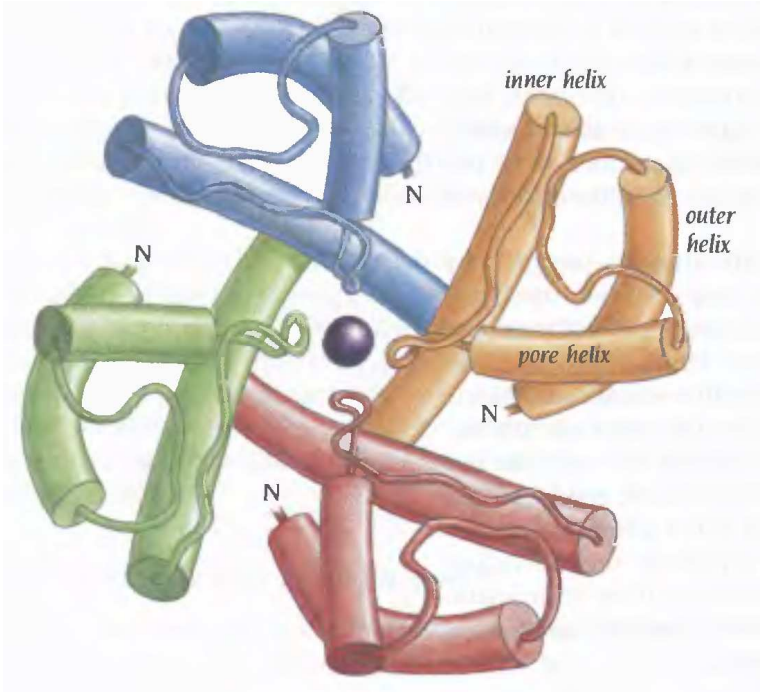


Canais iónicos

• Os canais iónicos da membrana plasmática necessitam de uma selectividade muito superior à dos porinas

• São proteínas de membrana com um canal estreito e selectivo para diferente iões tais como K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-

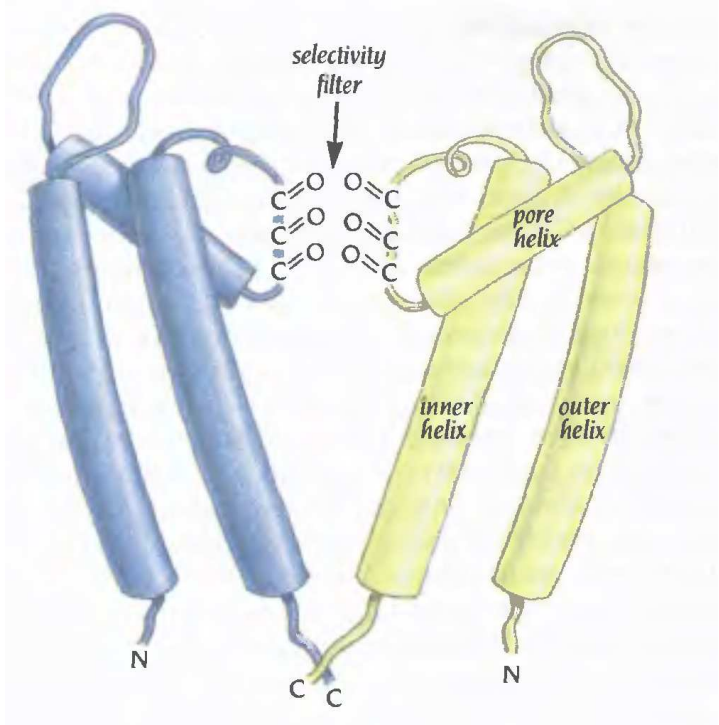
• Possibilitam a difusão rápida de iões através da membrana, de modo compensar diferenças de potencial electroquímico resultantes do transporte activo de cargas.



Canal de potássio (K^+ channel)

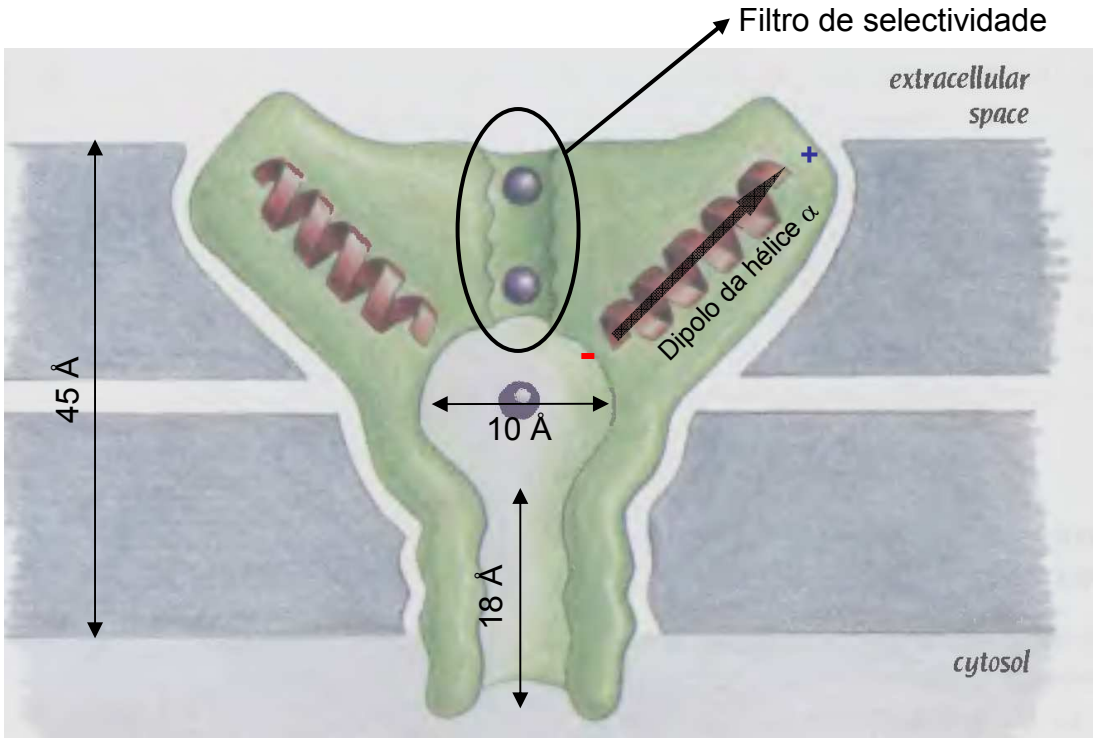
Canais K^+

- Permitem a livre passagem de iões potássio (K^+) através da membrana plasmática
- Têm uma afinidade para o K^+ 10000 vezes superior à do Na^+ !
- Qual a base molecular para a selectividade, quando os iões K^+ e Na^+ são tão semelhantes (raios: Na^+ - 0.95 Å K^+ - 1.35 Å)
- Como podem os canais ser tão selectivos e simultaneamente permitir um fluxo de 10^8 iões por segundo, muito próximo do limite difusional ?

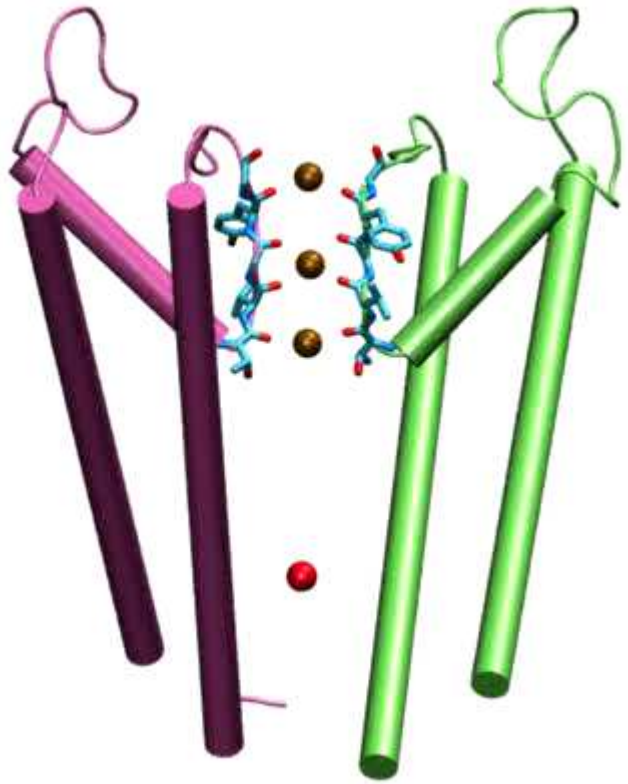


Canais K^+

- Presença de cargas negativas nos dois extremos do poro
- O filtro de selectividade possui 6 grupos carbonilo da cadeia principal em posições fixas com o espaçamento exacto para coordenar um ião K^+
- A desolvatação dos iões K^+ ao entrar no poro é compensada pela estreita interacção com os grupos carbonilo do filtro de selectividade
- Os iões Na^+ são demasiado pequenos para interagir com os grupos carbonilo de ambos os lados do filtro, não podendo compensar o custo da desolvatação.



Simulação da dinâmica molecular de um canal K^+



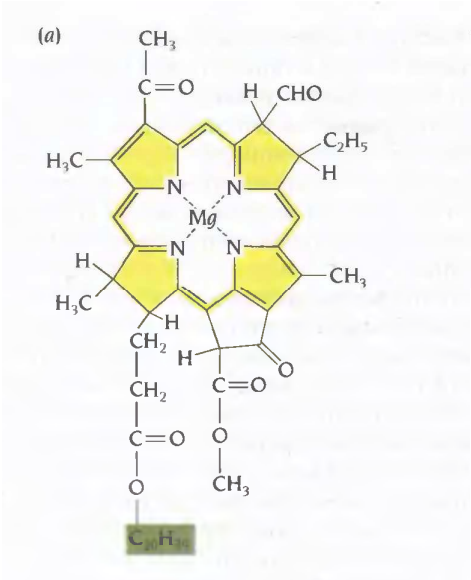
Estrutura de um centro de reacção fotossintético

• O centro fotossintético da bactéria *Rhodopseudomonas viridis* foi a primeira proteína de membrana a ser resolvida em alta resolução, em 1982 (Michel, Deisenhofer & Huber).

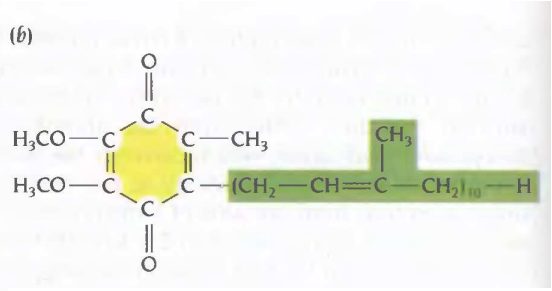
• O centro converte a energia solar em potencial químico e electrostático bombeando protões através da membrana plasmática.

• A estrutura contem 4 cadeias (L, H, M e citocromo) e uma variedade de pigmentos: 4 moléculas de bacterioclorofila, 2 moléculas de quinona, 2 moléculas de bacteriofitina, 1 caroteno ide e um átomo de ferro. A subunidade citocromo tem também 4 grupos hémicos ligados.

• A estrutura cristalográfica mostra como as cadeidas polipeptídicas ligam este pigmentos numa unidade funcional que permite o fluxo de electrões entre as duas faces da membrana.

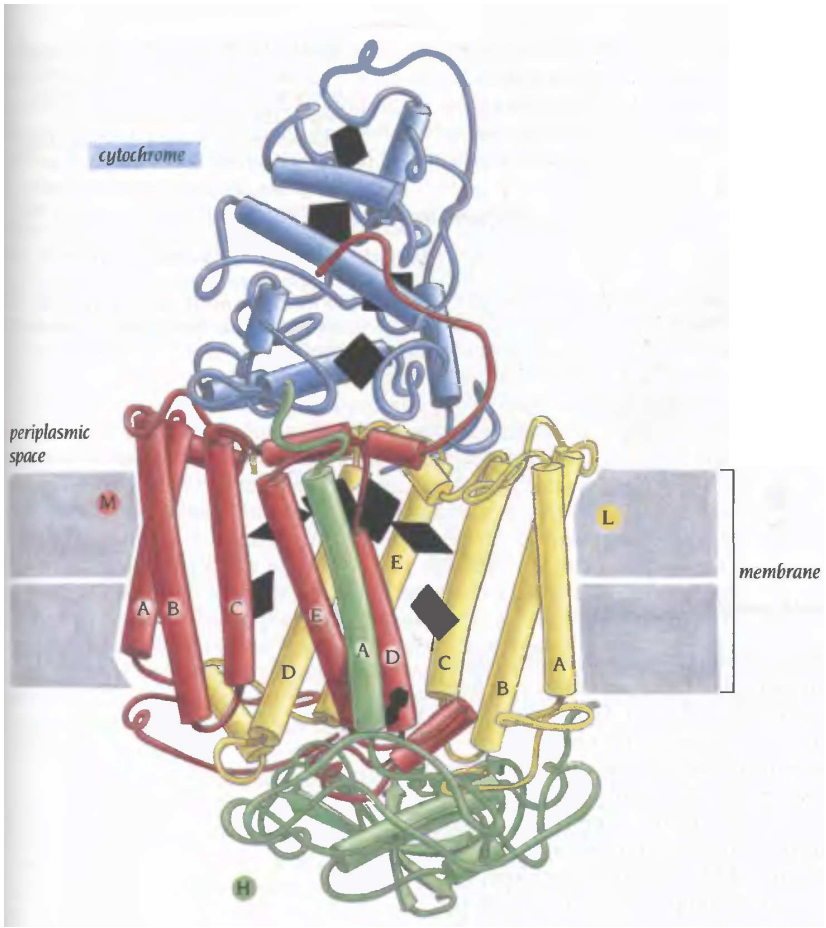


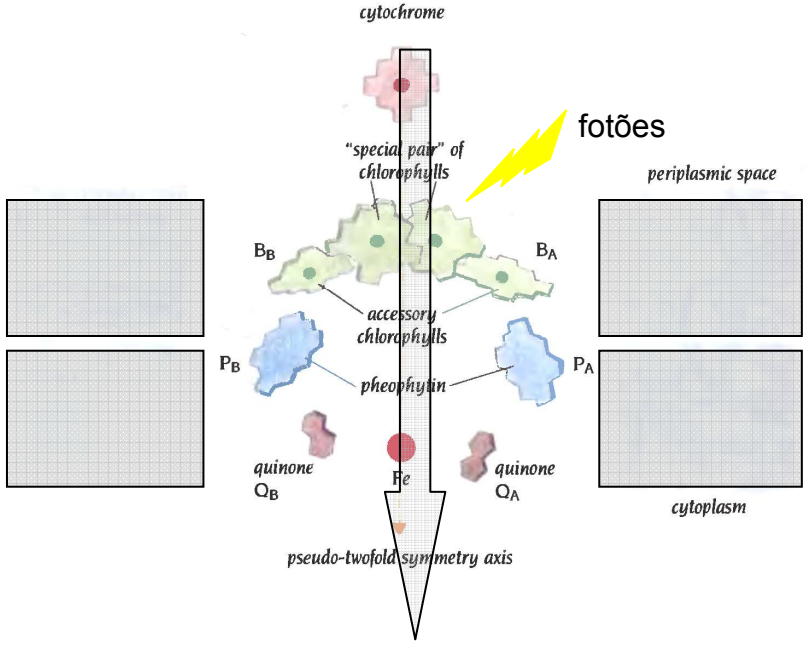
Bacterioclorofila



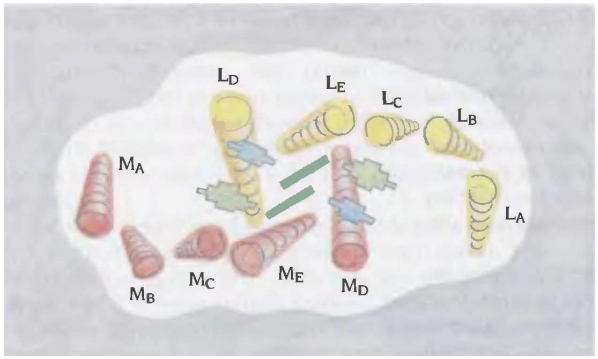
Quinona

Funcionamento do centro fotossintético





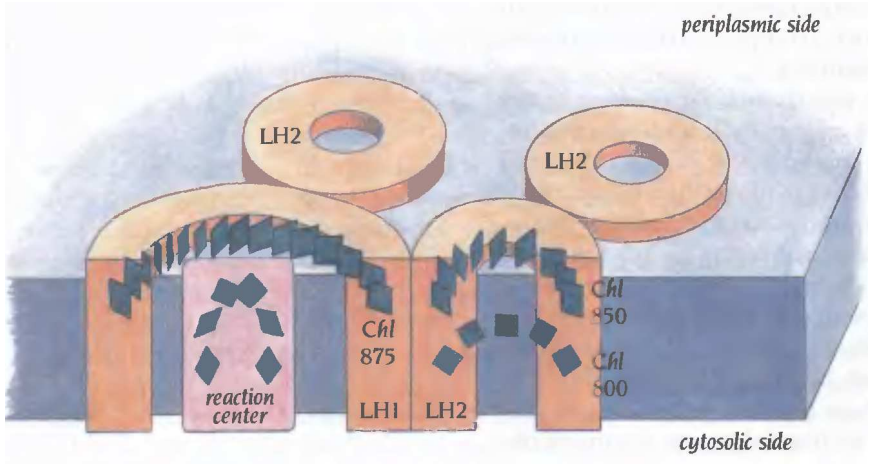
Fluxo de electrões

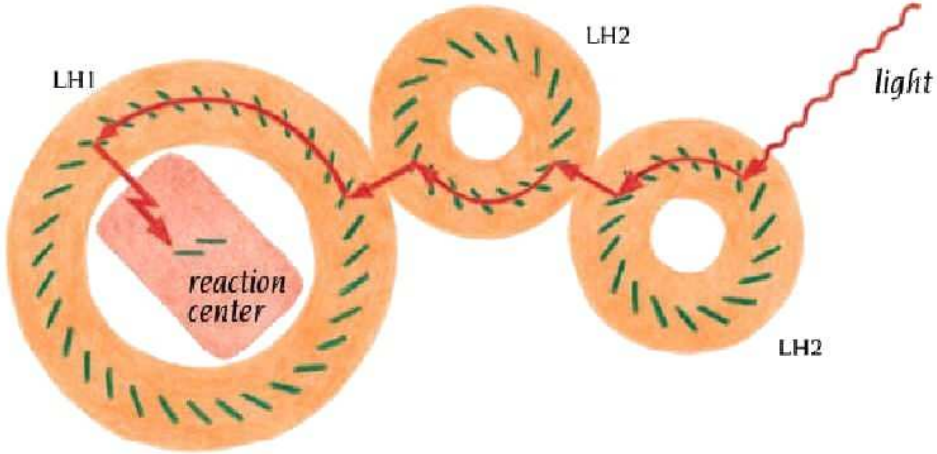


Complexos de "Light-harvesting"

• Se o par de clorofilas fosse o único a receber luz, estaria a ser desperdiçada a quase totalidade da luz solar incidente.

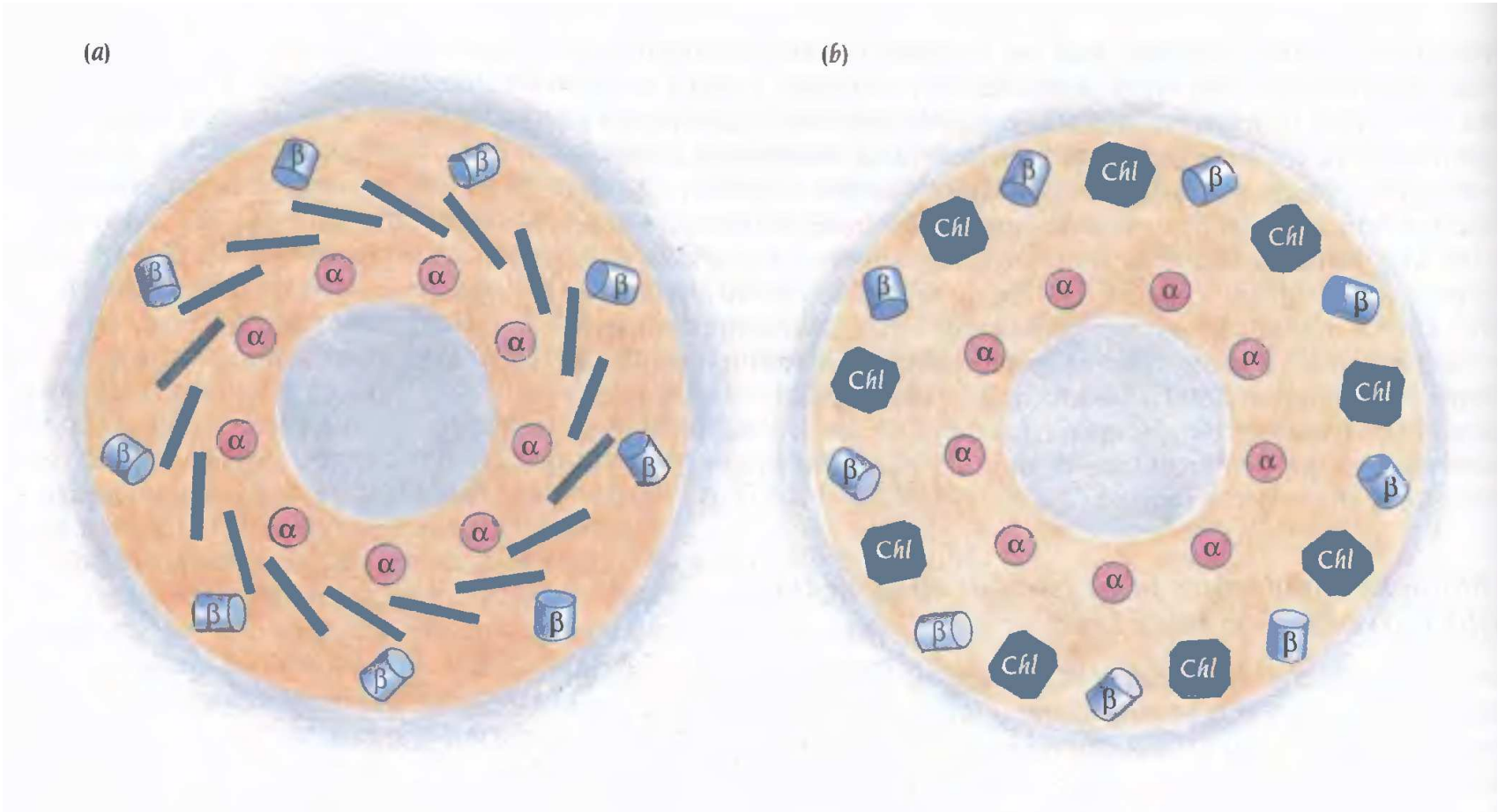
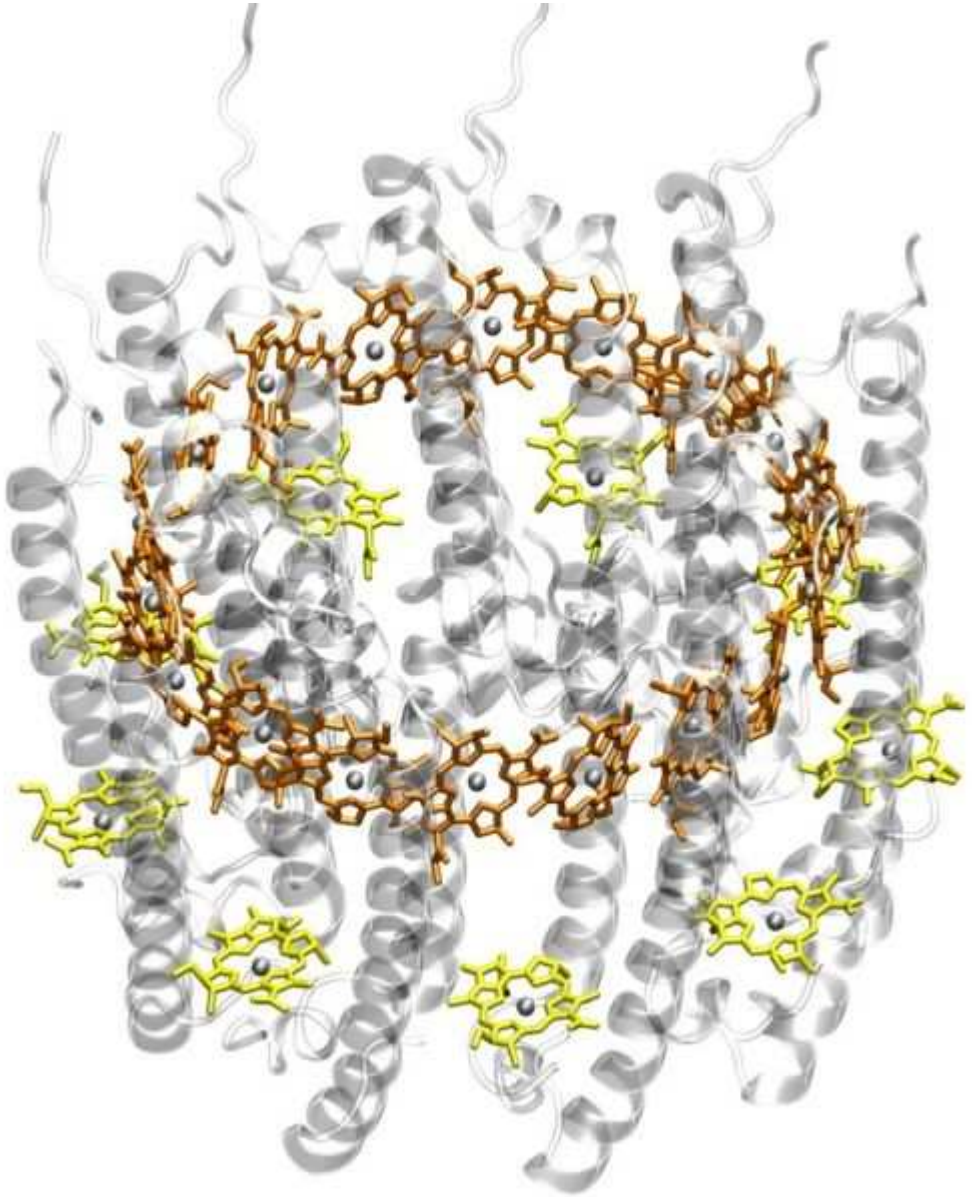
• Todos os organismos fotossintéticos desenvolveram um conjunto de complexos de recolha de luz que circundam o centro fotossintético.





Transferência de energia até ao centro reaccional

Estrutura do complexo LH2



Estrutura do complexo LH2