

## CITOLOGIA 4-5

**Procarioti:** si identificano anche come batteri, non hanno compartimenti membranosi intracellulari e pertanto tutti gli organuli si trovano nel citosol compreso il DNA. Sono dotati di un flagello per la propulsione e hanno una parete cellulare, la quale è formata da peptidoglicani chiamati mureine perché sono formati da n- acetilglucosamina (che si trova anche negli eucarioti) e acido n- acetilmuramico ( che è caratteristico solo dei batteri); il tutto viene assemblato grazie alla presenza di ponti trasversali dati da dei piccoli polipeptidi.

Non tutti i batteri tuttavia hanno la parete cellulare (che è esterna rispetto alla membrana):

- i batteri gram positivi sono batteri che si colorano con il colorante di gram di un colore blu violetto; questo colorante di gram reagisce con i peptidoglicani della parete cellulare, dunque i batteri gram positivi sono dotati di pareti cellulari;
- i batteri gram negativi invece non si colorano con il colorante di gram e sono dunque privi di parete cellulare. Tuttavia all'esterno della membrana cellulare hanno uno strato di circa 3-8 nanometri chiamata membrana esterna e formata da fosfolipidi e proteine con catene oligosaccaridiche...

I procarioti hanno un metabolismo anaerobico, una membrana plasmatica priva di colesterolo, un solo cromosoma circolare e geni di solito privi di introni; sono assenti i compartimenti interni membranosi, i cosiddetti organuli citoplasmatici, non c'è il citoscheletro, non c'è l'involucro nucleare, non c'è il nucleolo e non hanno gli istoni, che sono delle proteine che si associano al DNA negli eucarioti.

Introni: in una cellula eucariote il DNA oppure anche il trascritto presenta l'introne, che è una parte di gene che non porta sequenza di basi codificanti; questa caratteristica può essere trasferita al trascritto primario ma gli introni durante la maturazione degli RNA vengono eliminati e quindi quando gli RNA verranno trasferiti nel citosol non avranno più tracce di questi introni. Quindi nei procarioti gli introni non sono presenti perché mentre gli eucarioti hanno il nucleo dove tutto può avvenire i procarioti no, quindi il trascritto primario deve essere immediatamente disponibile perché poi va in giro per il citosol.

Gli esoni invece sono quei tratti di DNA o di trascritto primario che portano le basi che codificano e che ovviamente saranno inclusi negli RNA maturi anche dopo lo splicing, ovvero la maturazione.

Nei procarioti ci sono quasi tutti esoni mentre negli eucarioti ci sono introni ed esoni.

I virus non hanno un metabolismo proprio e la capacità di duplicarsi perché i essi se non entrano in parassitosi con una cellula procariote o eucariote non fanno nulla.

Tutti i virus hanno un involucro esterno detto capsida, che è formato da un insieme di tante unità che si chiamano capsomeri e questo capsida può essere di forma varia, ad esempio cilindrica, circolare... dentro al capsida poi c'è il materiale genetico del virus. Ci sono virus che contengono il DNA e quindi si chiamano virus a DNA oppure ci sono virus che contengono l'RNA e sono dunque detti virus a RNA. O uno o l'altro, mai tutti e due.

Esempi su come i virus intaccano la cellula per poi replicarsi: il batteriofago T4 ha un capsido formato da una testa, un collo, una coda e una placca terminale dalla quale emergono delle spine; nella testa è presente il materiale genetico, ovvero il DNA, perché i batteriofagi sono dei virus a DNA mentre la coda è formata da una parte esterna, che è una guaina spiralata, e una struttura interna capillare molto sottile. Il batteriofago T4 si angola lateralmente sulla parete del battere con le spine e si appoggia; da quel capillare sottile vengono espulsi degli enzimi che sono in grado di cominciare a creare un canale scavando nella parete cellulare del battere; in questo modo, l'asse centrale molto sottile della coda penetra nei canali prima scavati dagli enzimi e, perforando la membrana plasmatica, si ritrovano nel citoplasma. Il DNA del virus viene iniettato direttamente all'interno della cellula e una volta entrato esso infetta senza problemi la cellula procariote perché esse sono programmate per contenere il DNA sulla (solo a?) livello nucleare; quando si accorgono che c'è del DNA nel citosol non stanno a badare quale DNA è ma automaticamente aprono i canali del Riposo nucleare e se lo portano dentro rapidamente. Quando il DNA entra all'interno della cellula, automaticamente prende il sopravvento rispetto al DNA cellulare e dirige l'attività della cellula proprio come fosse sua, quindi avrà inizialmente un'abbondante replicazione del DNA virale, poi questo DNA virale produrrà l'RNA messaggero e tutto quello che occorre per dividere la sintesi proteica per andare a costruire tutte le varie parti del capsido. Quando tutte le varie parti sono state costruite c'è la fase di assemblaggio: ogni molecola del DNA entra nella testa, si assembla tutto il resto ed ecco che si formano dei virus che escono dalla cellula per rottura della membrana plasmatica.

Virus dell' HIV: tutto intorno hanno delle proteine segnale e hanno un capsido avvolto da una membrana che è formata da un doppio strato fosfolipidico in cui ci sono delle proteine che sono le proteine segnale, quindi c'è un doppio rivestimento. Si tratta di virus a RNA ed ogni molecola di RNA presente deve avere associato a un enzima, che si chiama trascrittasi inversa. Il primo fenomeno che deve avvenire è il riconoscimento tra una parte di proteine e la cellula ospite; una volta avvenuto questo, la membrana esterna del virus è molto simile a quella della membrana plasmatica della cellula e quindi automaticamente le membrane si fondono e il capsido con l'RNA all'interno entra tranquillo. Dopodiché il capsido si dissocia e libera ogni molecola di RNA virale con attaccato la trascrittasi inversa perché non si può utilizzare quella RNAMa deve utilizzare l'interno della cellula DNA quindi la trascrittasi inversa trascrive filamento di RNA in un filamento di DNA e ho così un ibrido a doppia elica RNA-DNA; il filamento neoformato di DNA si duplica a sua volta e così si ha un filamento a doppia elica di DNA. La cellula vedendo il DNA al di fuori del nucleo lo porta al suo interno; questo DNA virale va dunque ad incorporarsi nel genoma della cellula ospite e da lì in avanti lavora solo a favore del DNA virale. Il DNA virale non fa altro che trascrivere dei filamenti di RNA messaggero che viene trasferito nel citosol e qui nel citosol si ha la sintesi proteica, diretta a produrre tutto quello che serve per il virus, quindi tutte le molecole proteiche per costruire il capsido, tutte le molecole proteiche per formare la cosiddetta corona ed anche le trascrittasi inverse. Dopodiché queste parti vengono assemblate: le proteine che saranno destinate alla membrana esterna sono state inviate alla membrana della cellula e lì incorporate. Per cui il virus come fa uscire dalla cellula? Esso comincia a fare ernia contro la membrana plasmatica, la quale ha già

incorporato le proteine di superficie, e a forza di fare ernia gemmerà un virus completo. Questo ovviamente viene fatto per tutti quei capsidi che sono stati prodotti.

## EUCARIOTI

Le cellule eucariote possono essere unicellulari (protozoi e protofiti) o pluricellulari (metazoi e metafiti). Eucariote significa essere dotato di compartimenti membranosi intracellulari.

**CLASSIFICAZIONE DEL BIZZOZZERO** (Molto importante per la Franceschini, la chiede spesso quando si parla di cellule.) Bizzozzero è uno studioso pavese che ha classificato le cellule in ragione della capacità di duplicarsi. Si distinguono quindi in 3 categorie:

- Cellule labili → cellule indifferenziate, quindi embrionali o staminali; esse sono in grado di dividersi con un ritmo mitotico abbastanza sostenuto e molto costante. (Le cellule staminali sostituiscono costantemente le cellule differenziate)
- Cellule stabili → Al termine dell'accrescimento corporeo cessano di dividersi ma conservano la capacità proliferativa che può riprendere solo in particolari circostanze (cellule secernenti, fibrocellule, cellule muscolari lisce, epatociti, cellule endoteliali)
- Cellule perenni → cellule talmente differenziate e specializzate che non si possono più dividere (neuroni, fibre muscolari striate) e quindi hanno perso la capacità proliferativa.

## RAPPORTO NUCLEOPLASMATICO

$$NP = \text{Volume del nucleo } (V_n) / \text{Volume del citoplasma } (V_{\text{cellula}} - V_n)$$

Il volume del nucleo non muta mai per tutta la durata della vita della cellula, cambia però il volume del citoplasma perchè con il metabolismo si accrescono le varie componenti della cellula (ad esempio accrescono i mitocondri, il numero degli apparati del Golgi, la quantità di materiale presente nel citosol); ogni tipo di cellula ha però un proprio valore limite di rapporto di nucleo plasmatico oltre il quale non va. È un valore che può essere più basso ma non può essere superato, questo perché il nucleo altrimenti non riesce più a controllare tutto quello che è contenuto nella cellula.

## RELAZIONE SUPERFICIE/VOLUME

Il volume aumenta al cubo mentre la superficie al quadrato; più la cellula si ingrandisce più il rapporto è sfavorevole. Come riporto a un buon valore questo rapporto? Divido la superficie maggiore in tante superfici minori che quindi aumentano la superficie totale ripristinando il giusto rapporto. La superficie aumenta ma il volume rimane costante; se le cellule riescono a dividersi diminuiscono il proprio volume a favore della superficie mentre se non possono dividersi modificano la propria superficie: estroflessioni, invaginazioni etc.

## DIMENSIONE DELLE CELLULE

Posso avere delle cellule individuabili in cm e altre che raggiungono le dimensioni dei nm. Anche all'interno di uno stesso individuo posso avere cellule di tante dimensioni diverse.

## LEGGE DI DRIESCH

Cellule omologhe di individui della stessa specie o di specie affini hanno grandezze pressoché costanti. Con specie affini si intende umano-primati, gatto-felini etc.

## ENTITÀ POLINUCLEATE:

- SINCIZIO: enorme massa citoplasmatica con tanti nuclei all'interno (i nuclei non sono condivisi). Deriva dalla fusione durante lo sviluppo embrionale di cellule singole che hanno condiviso il loro citoplasma, si parla quindi di un'organizzazione polinucleata; un esempio può essere quello degli osteoclasti.
- PLASMODIO: si verifica nel momento in cui inizia un processo di segmentazione, si ha quindi una divisione cellulare che non porta a una citodieresi. Ho un'entità con anche una crescita del citoplasma di ogni nucleo.

## FORMA DELLE CELLULE

Cellule indifferenziate o ematociti in coltura hanno una forma più o meno sferica; ma se metto gli ematociti nel flusso ematico cambiano la forma in base a quante cellule hanno attorno o con quante entrano in contatto.

Poligono a tante facce: faccia perfetta tetradodecaedro

Cellule differenziate, che quindi hanno una forma propria, assumono forme in base alle proprie funzioni. Il neurone, ad esempio, ha un citoscheletro molto abbondante e una forma molto specifica; anche se messo in coltura, infatti, non cambia la sua forma. Più c'è citoscheletro più la forma è immutabile.

Le cellule vegetali hanno una forma estremamente geometrica (data dalla parete cellulare) e sono generalmente più grandi delle cellule animali.

## COMPONENTI PRINCIPALI CELLULARI

- Nucleo: è avvolto dall'involucro nucleare il quale è formato da due membrane concentriche l'una rispetto all'altra e sulla sua superficie presenta dei pori nucleari, che sono l'unica via attraverso cui il materiale dal citosol entra nel nucleo ma non sono l'unica via d'uscita; il numero dei pori nucleari è direttamente proporzionale all'intensità del metabolismo, più una cellula ha un metabolismo elevato più pori nucleari ci sono. All'interno dell'involucro nucleare c'è una zona elettrondensa di una certa dimensione che è il nucleolo; non è uniforme ma ha delle zone più scure e più chiare. Il nucleolo non ha nulla attorno, quindi non ci sono membrane, involucri, ma è un addensamento di materiale e all'interno del nucleolo, ma anche all'interno del nucleo, si notano delle zone dove c'è del materiale più addensato che è addossato alla parte interna dell'involucro e delle altre zone dove invece questo materiale è più finemente disperso. In entrambi i casi sto vedendo la cromatina, la quale può essere di due tipi ed è per questo che ci sono parti più disperse e parti più addensate.
- Reticolo endoplasmatico: è quello che per primo è nato nel momento in cui la membrana plasmatica ha incominciato a invaginarsi per creare i compartimenti interni durante l'evoluzione delle cellule da procariote a eucariote. E' altamente sviluppato ed è di due tipi: reticolo endoplasmatico ruvido e reticolo endoplasmatico liscio. Il

termine ruvido nasce dal fatto che sulla parete esterna della membrana sono attaccati i ribosomi, assenti invece nel reticolo endoplasmatico liscio. Il ruvido è formato da cisterne appiattite parallele l'una all'altra che si vedono bene al microscopio mentre il reticolo endoplasmatico liscio è formato da tubuli anatomizzati tra loro e pertanto al microscopio non è facile identificarlo. Reticolo ruvido e liscio sono in continuità e il ruvido è in continuità anche con l'involucro nucleare.

- Ribosomi: sono le associazioni tra i vari tipi di RNA con proteine. Sono formati da due subunità e sono la sede fisica nella quale avviene la sintesi proteica. Le due subunità si associano solo quando c'è sintesi proteica e solo quando bisogna produrre certi tipi di proteine i ribosomi andranno ad associarsi con le membrane del reticolo ruvido.
- Apparato del Golgi: compartimento intermembranoso presente sia nelle cellule animali che vegetali; è un apparato molto particolare perché è formato da cisterne appiattite impilate l'una sull'altra e tre tipologie di vescicole associate ed è per questo che si chiama complesso del Golgi. Il complesso di Golgi è più o meno sviluppabile in ragione dell'attività metabolica della cellula; tuttavia una grande attività metabolica non corrisponde ad un aumento delle cisterne impilate ma ad un aumento del Golgi, arrivando ad ottenere addirittura una quantità di apparato di Golgi che circonda completamente il nucleo. Non si aumentano quindi le cisterne ma i distretti che compongono l'apparato di Golgi. L'apparato di Golgi è direttamente coinvolto nel processare le proteine.
- Mitocondri: nascono per simbiosi e sono presenti tanto nelle cellule animali quanto nelle cellule vegetali e il loro compito è quello di produrre l'energia sotto forma di molecole di ATP. Esternamente ci sono due membrane: una membrana esterna e una interna che però non sono concentriche come nel nucleo e quella interna sviluppa delle creste. Infine la matrice all'interno del mitocondrio, a testimonianza della simbiosi che c'è stata, presenta del DNA, del materiale genetico, così come trovo i ribosomi, per tanto il mitocondrio può svolgere una sua autonoma sintesi proteica che però non lo rende un organo indipendente. Il numero dei mitocondri può variare in ragione dell'attività metabolica della cellula; se una cellula ha bisogno di più energia allora si possono duplicare i mitocondri.

La cellula animale e la cellula vegetale differiscono per vari motivi: innanzitutto la forma della cellula vegetale è fortemente geometrica dovuta alla presenza della parete cellulare che sta all'esterno rispetto alla membrana; poi anche le dimensioni sono diverse, infatti le cellule vegetali sono più grandi volumicamente di una cellula animale. Un'altra differenza è data dai plastidi; i più conosciuti sono i cloroplasti che si trovano solo nelle parti verdi delle piante. Anche i cloroplasti sono nati da una simbiosi e anche loro hanno una membrana esterna e una membrana interna, dove la membrana interna forma delle strutture laminari su cui ci sono gli enzimi che servono per la fotosintesi clorofilliana. Nel citoplasma della cellula vegetale si possono notare sferette di amido, infatti il cloroplasto con la sua attività fotosintetica produce glucidi che deve trasferire nel citoplasma della cellula, la quale poi li dovrà distribuire altrove. Durante il giorno, quando l'attività fotosintetica è molto elevata, la produzione è maggiore rispetto al trasferimento e il glucosio non può rimanere come tale nella cellula perché è una molecola osmoticamente attiva e allora il cloroplasto lo trasforma in amido primario;

durante la notte, invece, la fotosintesi clorofilliana cessa quindi l'amido primario viene demolito e le molecole di glucosio vengono trasferite immediatamente nel citosol.

## MEMBRANA PLASMATICA

Superficie non perfetta, ha qualche anfratto, invaginazione etc. Circonda il citosol e i compartimenti intermembranosi.

La membrana plasmatica o plasmalemma è la prima parte della cellula a partire dall'esterno e questa struttura non solo definisce i limiti cellulari ma ha anche altre importanti funzioni come per esempio controllare il movimento di sostanze in entrata e in uscita e captare dei segnali dall'ambiente esterno; poi ci sono delle proteine che prendono rapporti con la parte interna della membrana plasmatica che poi andranno a svolgere delle funzioni particolari.

Frazionamento cellulare: (Metodo impiegato per separare varie componenti cellulari. Il tessuto o le cellule vengono omogeneizzati e l'omogenato viene centrifugato per separare le particelle, in base alla densità o alla velocità di sedimentazione.). Consiste nel fare un omogenato di cellule e sottoporre questo omogenato a una forza centrifuga; se la centrifugata è lieve (800 giri al minuto) si può notare che si riescono a separare i nuclei perché sono la parte più pesante della cellula e si prende ciò che rimane, ovvero il surnatante e si rinvia con le centrifugazioni. Aumentando la velocità (20000-30000) nel sedimento si troveranno poi i mitocondri, i cloroplasti, i lisosomi e i perossisomi; si riprende il surnatante e lo si centrifuga ancora a velocità più alte (50000-80000) e si ottiene, nel sedimento, il reticolo endoplasmatico ruvido. Intorno ai 100 mila invece si ottiene una frazione che non solo presenta la membrana plasmatica ma anche il reticolo endoplasmatico liscio e il Golgi. Infine, ad una velocità compresa tra i 150000 e i 300000 giri al minuto, si ottiene un sedimento con ribosomi e altre particelle virali.

Gli elementi costitutivi della membrana sono essenzialmente tre:

- componente lipidica
- componente proteica
- componente glucidica (frazione minoritaria sempre)

Per quello che riguarda i **lipidi** fondamentale i più importanti, nella membrana plasmatica, sono i fosfolipidi. Essi sono caratterizzati dalla molecola di glicerolo come base, che ha l'ultimo dei carboni esterificato con l'acido fosforico, a cui è attaccato il composto azotato; tutto questo rappresenta la testa polare che è idrofila. Il carbonio 1 e il carbonio 2 del glicerolo, invece, sono esterificati con due catene di acidi grassi che possono essere saturi o insaturi. Le due catene di acidi grassi vanno a costituire le code apolari che sono idrofobiche. Sicuramente i fosfolipidi sono, tra i lipidi, la componente lipidica più abbondante e va proprio a costituire la base della membrana.

Se si prende una bacinella con l'acqua e si buttano dentro i fosfolipidi essi si dispongono in un monolayer con le teste nell'acqua e le code in aria ma questa non è la condizione che si può osservare in un organismo vivente perché nella cellula c'è l'acqua sia fuori che dentro, quindi non è un compartimento aria-acqua ma acqua-acqua.

Quando invece si trovano immersi completamente in acqua, i fosfolipidi si dispongono a formare sospensioni di micelle e liposomi. Le micelle sono delle sfere che racchiudono all'interno le code idrofobiche ed espongono, nella superficie di contatto con l'acqua, le teste polari.

Nel bilayer ci sono due strati di fosfolipidi che si affrontano a livello delle code quindi le code apolari di uno strato sono a contatto con le code apolari dell'altro mentre le teste sono all'esterno. Gorter e Grendel fecero un esperimento costruendo una scatola di legno con all'interno delle pareti mobili e dell'acqua: essi presero delle membrane (una frazione membranaria), misurandole prima per sapere qual era la superficie, poi le hanno dissociate e collocati i fosfolipidi all'interno di questa cassetta; con la parete mobile hanno stretto fintanto che i fosfolipidi non erano uno di fianco all'altro. Facendo in questo modo e andando a misurare l'area che si otteneva, tutte le volte che facevano l'esperimento trovavano sempre un'area doppia rispetto a quella da cui erano partiti. Questo risultato è quello che ci dice che i fosfolipidi nella membrana sono disposti secondo un bilayer; pertanto nel 1925 hanno dimostrato che l'ipotesi di un doppio strato fosfolipidico era corretta.

Nel 1965 Bangham, Standish e Watkins in laboratorio costruirono un qualcosa che assomiglia a un liposoma (esso è molto importante perchè lo si può utilizzare come veicolo di farmaci.). Nei liposomi si forma una sfera cava delimitata da un doppio strato fosfolipidico che si interfaccia con l'acqua all'interno ed all'esterno. La struttura della membrana cellulare è quella di un grande liposoma al cui interno sono contenuti tutti gli organuli cellulari (nucleo, reticolo endoplasmatico ecc).

Un modo per studiare le membrane in modo da ottenere delle informazioni è utilizzare le emazie, che ci forniscono delle membrane plasmatiche praticamente pure. Infatti, i globuli rossi dei mammiferi prima di entrare nel circolo sanguigno eliminano il nucleo e tutti gli organuli interni.

Se si prendono le emazie e le si mettono in una soluzione ipotonica, esse continuano a portare dentro dei liquidi fino a scoppiare. Rimangono quindi i ghost, che sono le membrane plasmatiche svuotate di tutto il loro contenuto.

La composizione chimica della membrana plasmatica dell'emazia umana: 43% lipidi, 49% proteine, 8% carboidrati.

**Proteine:** sono suddivisibili in due grosse categorie: ci sono le proteine estrinseche al 25% e le intrinseche che sono il restante 75%. Le proteine estrinseche sono idrofiliche, quindi sono legate alla testa dei fosfolipidi e sono facilmente separabili mentre le proteine intrinseche hanno un rapporto intimo con il doppio strato fosfolipidico, sono polari (anfipatiche) e hanno una regione centrale idrofobica mentre i due estremi idrofilici.

### **MODELLO DI SINGER E NICOLSON 1973 - MODELLO A MOSAICO FLUIDO**

Sviluppato negli anni '70 da Singer e Nicholson, afferma che le proteine di membrana sono proteine globulari, localizzate in zone circoscritte del bilayer fosfolipidico associate o alle teste polari o più o meno ancorate alle code idrofobe.

**MOSAICO:** spiega come sono distribuite le proteine, ovvero sono disposte in maniera discontinua e disomogenea (esperimento di freeze-etching).

**FLUIDO:** vuol dire che una membrana, qualunque essa sia, è costituita da elementi liberi di muoversi; dunque sia la componente lipidica che quella proteica si possono muovere. (fluidità è modulata dal colesterolo) (in alcuni casi devo mettere dei vincoli)

La fluidità della membrana si gioca sulla componente lipidica (è garantita dalla tipologia di fosfolipidi che si utilizzano per il doppio strato); i fosfolipidi possono essere formati da (questa può essere formata da) catene sature o insature. Le catene sature (assenza di doppi legami) rendono la membrana più viscosa, mentre le catene insature (presenza di doppi legami) rendono la membrana più fluida.

La membrana non è un'entità inamovibile anzi la cellula continuamente modifica la composizione in fosfolipidi in ragione delle sue esigenze, quindi continuamente la cellula può modificare i fosfolipidi delle proprie membrane in ragione delle condizioni in cui si trova.

## **COLESTEROLO**

Il colesterolo funge da modulatore della fluidità. Ha una testa polare, una struttura ad anelli rigida e una coda idrocarburica apolare. Il colesterolo è situato nel doppio strato di fosfolipidi, con la porzione idrofila rivolta verso le teste dei fosfolipidi e la porzione idrofoba immersa tra le code. La struttura è diagonale e mettendosi di traverso riesce:

- Con catene sature a tenere separati i fosfolipidi
- Con catene insature a tenere uniti i fosfolipidi.

Le membrane cellulari vengono costantemente modificate per mantenere la fluidità in condizione fisiologica. Gli animali che vanno in letargo, per mantenere le funzioni vitali senza perdere troppe riserve, abbassano la propria temperatura corporea e assumono fosfolipidi e colesterolo per mantenere salda la viscosità e mantenere il funzionamento basale.

## **MOVIMENTI DI FOSFOLIPIDI**

Un fosfolipide può ruotare su sé stesso o flettere le code senza causare cambiamenti all'interno della membrana in vari modi:

- diffusione laterale → permette ai fosfolipidi di modificare le funzioni della membrana; è il movimento più frequente in tutti i tipi di membrana. I fosfolipidi si spostano da una parte all'altra del foglietto cui appartengono. È il più frequente perché il fosfolipide si sposta semplicemente lungo il proprio foglietto mantenendo la testa a contatto con le altre teste e le code a contatto con le altre code, quindi non nascono conflitti di nessun genere. Questo movimento è importante perché si può trasferire un fosfolipide da un punto all'altro della membrana in ragione di certe esigenze e non si consuma energia.
- Movimento flip-flop → un fosfolipide passa da un foglietto della membrana ad un altro. Questo movimento è termodinamicamente svantaggioso, ovvero a un certo punto la testa sarà a contatto con le code e le code con le teste e questo non è possibile; allora devo consumare energia per farlo avvenire. Il più delle volte si devono utilizzare anche delle proteine che agevolino questo movimento perciò questo movimento non avviene quasi mai ed è utilizzato quando proprio non si può fare nient'altro. Troppo energeticamente dispendioso. È però ampiamente utilizzato nelle membrane del REL perché è il luogo dove vengono prodotti i

fosfolipidi, però in questo caso ci sono dei meccanismi tali per cui questo movimento può avvenire senza consumo di energia.

I foglietti pur essendo appaiati a livello delle code sono asimmetrici, hanno una propria composizione, e questo venne scoperto nel 1980-1987 e definitivamente associato attraverso lo studio delle emazie.

Per tanto il doppio strato fosfolipidico è formato da due foglietti indipendenti che sono diversi per:

- Composizione fosfolipidica
- Proprietà fisiche e chimiche

### **RAFT LIPIDICI**

Sono zone ristrette di membrana che possono interessare anche solo uno dei due strati, possono essere presenti su qualunque tipo di membrana e possono essere formati da lipidi e proteine. Sono delle porzioni dove c'è una particolare concentrazione di fosfolipidi saturi e i fosfolipidi saturi comportano una certa viscosità in quella zona di membrana. Servono per creare delle aree dove si possono inserire ad esempio dei recettori, delle molecole segnale, delle molecole di una catena di reazione in modo tale che queste strutture non si spostino, creando un ambiente molto viscoso. Quindi è un compartimento della membrana dove stivo proteine che devono compiere azioni specifiche, come ad esempio proteine segnale. Se sono coinvolte reazioni di trasporto ho bisogno di proteine su entrambi i foglietti, ma con proteine segnale o per reazioni solo interne posso avere un raft solo su un foglietto. Ci sono due tipi di raft lipidici:

- raft piano: zona membranosa che rappresenta l'ispessimento di due foglietti dove si vanno ad incastonare proteine che devono svolgere la propria funzione in quel luogo. Lo spessore è maggiore, fino a 10 nm, ed è continuo con il resto della membrana.
- Caveola: inflessione della membrana plasmatica, invaginazione che avviene grazie al fatto che nella membrana interna ci sono le caveoline, che sono proteine essenziali per modificare la forma della membrana.

### **MOVIMENTI PROTEICI - ESPERIMENTO PER DIMOSTRARE IL MOVIMENTO**

Anche le proteine si muovono e i raft lipidici servono a tenerle collocate. Sappiamo che qualunque cellula di una specie è marcata da proteine caratteristiche: si possono identificare i set proteici con anticorpi marcati da marcatori fluorescenti. In seguito si prendono due patociti, uno di topo e uno umano, si hanno già gli anticorpi e si fondono le due cellule; si ottiene così un eterocarion, un ibrido cellulare, che dà la conferma che le cellule si sono fuse, infatti si ha metà cellula verde (perché gli anticorpi anti proteine del topo sono stati marcati con fluoresceina che è verde) e metà rossa (perché gli anticorpi anti proteine umane sono stati marcati con rodamina che è di colore rosso). Se queste strutture, gli eterocarion, vengono lasciati in incubazione a 37 gradi, dopo una quarantina di minuti si può notare come la cellula non sia più metà verde e metà rossa poiché i segnali verdi e rossi si sono mescolati; il mescolamento dei segnali dimostra che le proteine possono muoversi.

Un altro esempio è quello del capping, che è un movimento che avviene nei macrofagi, che sono cellule mobili che hanno dei recettori di membrana (proteine) per gli anticorpi

per cui sono dedicati; questi recettori di membrana (sono anche un po' distribuiti) quando vengono intercettati gli anticorpi si radunano tutti nella parte opposta rispetto alla direzione del movimento.

## **DIMOSTRAZIONE MOSAICO**

Freeze etching (per confermare il mosaico). Questa tecnica prevede che si prendano delle cellule e le si congelino molto rapidamente (più veloce è il congelamento meno grandi sono i cristalli di ghiaccio che dunque non riescono a rompere le membrane). Dopodiché si usa uno strumento, che prevede una campana di vetro perché il sistema deve essere a vuoto, formato da una base, su cui si poggia il campione congelato, e una specie di martelletto; quando la macchina viene azionata il martelletto colpisce il campione, creando un'onda di frattura che percorre le zone più deboli. L'onda di frattura nella membrana corre dove si incontrano le code dei fosfolipidi, ovvero la parte più morbida, quella che permette di far correre l'onda di frattura. Quando quest'onda di frattura incontra una proteina non la spezza in due perché le proteine sono più resistenti e dunque l'onda di frattura non può che scorrere lungo la periferia; le circumnaviga. In questo modo ci saranno delle proteine che rimangono attaccate alla faccia esterna e altre proteine che rimangono attaccate alla faccia interna, alla parte citoplasmatica; nel punto in cui la proteina era presente dall'altro lato ci sarà una specie di buco perché chiaramente la proteina si è sfilata dall'altro versante dal momento che l'onda di frattura le ha corso tutto intorno e l'ha sganciata dall'altro foglietto. A questo punto si prendono i due foglietti, che ormai sono separati, e con uno strumento, sempre a freddo e sottovuoto, si fa un'ombreggiatura metallica sul foglietto, quindi si fa un calco, una replica del foglietto. A questo punto non c'è più bisogno di lasciare la replica a freddo e sottovuoto e per tanto la si può osservare al microscopio elettronico. La replica mostrerà delle sporgenze e degli avvallamenti; la sporgenza sarà la proteina che era rimasta incastonata mentre l'avvallamento quella che si è sfilata. Dopo aver fatto ciò si analizzano i due foglietti: nel foglietto esterno si vedono delle protuberanze, che sarebbero le proteine, e il foglietto citoplasmatico. In entrambi i foglietti si può notare che ci sono degli spazi dove NON ci sono le proteine: quindi le proteine sono a mosaico. Questa è la dimostrazione che il modello a mosaico è giusto.

Le proteine estrinseche sono delle proteine idrofiliche che sono ancorate o a lipidi oppure possono essere ancorate anche alla testa idrofilica di una proteina transmembrana; in tutti i modi le proteine estrinseche, essendo idrofiliche, non possono che avere rapporti con le porzioni idrofiliche o dei fosfolipidi o di altre proteine.

Le proteine intrinseche invece possono essere di due tipi:

- Monotopiche: proteine associate ad un solo lato della membrana e che hanno un versante idrofobico e uno idrofilico; con quello idrofobico sono localizzate in uno dei due foglietti mentre la parte idrofilica può essere rivolta verso l'esterno o l'interno indifferentemente;
- Bitopiche: proteine che attraversano il doppio strato fosfolipidico una sola volta, proteine in cui la regione idrofobica è quella centrale, tra l'altro ad alfa elica (il segmento transmembrana sempre alfa-elica). Queste proteine vengono così chiamate perché sporgono da entrambi i lati, hanno due componenti idrofiliche con cui escono

dalla superficie della membrana;

- Poliotopiche: proteine che attraversano il doppio strato fosfolipidico più volte e che hanno diversi segmenti afa elica, quindi entrano nella membrana poi escono poi rientrano.

Mentre le proteine bitopiche in genere sono delle proteine recettoriali, le proteine poliotopiche invece sono delle proteine con cui si possono costruire canali lipidici; tutto dipende da come sono gli amminoacidi che costituiscono le catene alfa. Gli amminoacidi che formano la catena alfa transmembrana di una proteina bitopica sono tutti amminoacidi idrofobici mentre nelle proteine poliotopiche le catene alfa sono formate da ripetizioni di amminoacidi idrofobici e idrofilici, in quanto devono costruire un canale lipidico: quindi dentro deve essere idrofilico mentre fuori idrofobico, perché si è a contatto con le code; gli amminoacidi idrofili saranno da una parte della catena ad alfa elica mentre quelli idrofobi saranno dall'altra, quindi quelli idrofobi saranno a contatto con le code mentre quelli idrofili si guardano in tutte le catene.

**Componente glucidica:** nella membrana plasmatica la componente glucidica è presente solo sul versante esterno, il lato extracitoplasmatico, e va a formare il cosiddetto rivestimento cellulare o glicocalice. Nelle altre membrane la componente glucidica non ha la funzione del glicocalice e di solito sono distribuite in modo diverso. Il glicocalice è dato dai carboidrati che sono legati o a proteine formando le glicoproteine o ai lipidi formando i glicolipidi; sicuramente si lega di più a glicoproteine. I carboidrati più diffusi sono quattro: l'acetilglucosamina, l'acetilgalattosamina, il galattosio e l'acido sialico. Il glicocalice può essere particolarmente abbondante in certi particolari tipi di cellule come quelle tumorali perché una delle funzioni del glicocalice è quella del riconoscimento e adesione cellulare che è connesso all'invasività delle cellule tumorali.

In ogni tipo di cellula il glicocalice svolgerà SOLO UNA delle seguenti funzioni:

- protezione da insulti meccanici; un esempio è quello degli osteociti → essi sono delle cellule incastonate in una matrice ossea che è mineralizzata e se si muovono appena un pelo vanno a sbattere contro la matrice ossea che non è certamente liscia quindi ci possono essere degli insulti meccanici; in questo caso il glicocalice cerca di proteggere la cellula dai danni: non solo attutisce i colpi ma riempie i vuoti a favore della stabilità;
- riconoscimento e adesione che può essere:
  - tra cellule, in questo caso ci sono delle serie di proteine che si chiamano cam (cell adhesion molecules), che lavorano in assenza di ioni calcio al contrario di un'altra famiglia che è quella delle caderine che agiscono solo in presenza di ioni calcio.
  - tra cellule e matrice extracellulare e un esempio sono le proteine di membrana integrine che, con il loro dominio extracellulare, regolano i rapporti prendono i rapporti con i proteoglicani e la fibronectina, che sono componenti della matrice extracellulare.

- Filtro
- idrolitica, soprattutto negli epatociti
- proprietà antigenica, cioè le glicoproteine del glicolice sono fondamentali per definire il complesso di istocompatibilità e i glicolipidi per definire i gruppi sanguigni.
- Funzione recettoriale per ormoni, molti farmaci, virus

