

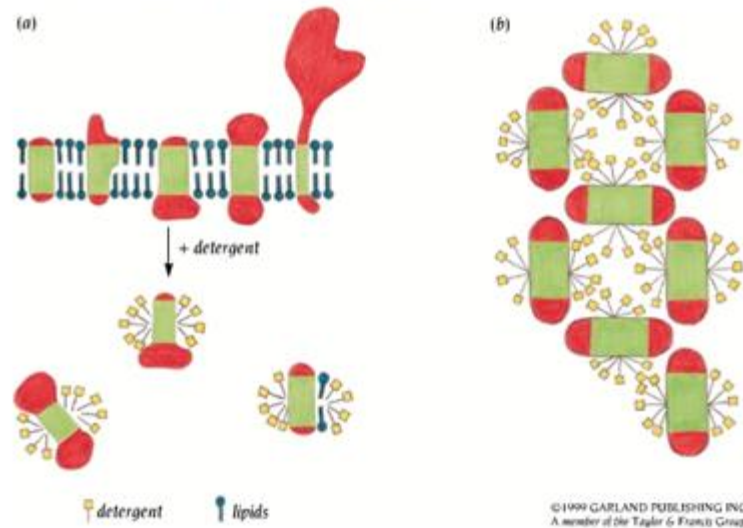
La funzione di ogni membrana biologica è determinata principalmente dall'insieme di proteine integrali incorporate e dalle proteine periferiche collegate alla superficie della membrana

L'attività di queste proteine, a sua volta è modulata dalla composizione dei fosfolipidi della membrana

La ricostituzione in membrane modello delle proteine di membrana permette lo studio di caratteristiche individuali e dell'attività di un dato componente della membrana cellulare.

L'attività della proteina ricostituita in membrana non viene sempre mantenuta, poiché la composizione del modello doppio strato fosfolipidico differisce da quella della membrana cellulare nativa

Proteine integrali di membrana



Le proteine sono considerate solubilizzate dalle membrane se sono presenti nel supernatante dopo il trattamento con il detergente e dopo una centrifugazione a 100,000g

Il processo di solubilizzazione di una proteina di membrana prevede

1 l'interazione con le membrane

2 la lisi cellulare

3 la formazione di complessi di lipidi/proteine/detergente

4 Un aumento ulteriore della concentrazione del detergente porta alla delipidazione e spesso all'inattivazione e della proteina

· Il tipo e la concentrazione ottimale di detergente sono selezionati sperimentalmente

- preparazione membrane alla concentrazione di 1 mg/ml
- . Aggiunta di diverse concentrazioni di detergente
- incubazione at 0–4C for 30–60 min
- centrifugazione at 105,000 g
- saggio di attività

Detergenti :Anionici, Cationici, Switterionici, Non ionici

Table 34.1 Common laboratory detergents and their properties

Detergent	Headgroup	Tail	CMC (mM) (at 25 °C)	Aggregation number	MW (Da)	Micellar weight (kDa)	Cloud point (°C) in low- salt buffers ^a	PubChem substance IDs ^b	Comments
<i>Nonionic detergents</i>									
Big CHAP	Gluconamidopropyl moieties (2×)	Cholesterol derivative	2.9–3.4	10	878.1	9	–	SID: 26758300	
Deoxy-Big CHAP	Gluconamidopropyl moieties (2×)	Cholesterol derivative	1.1–1.4	11	862.1	11	–	SID: 26758553	
Digitonin	Complex polysaccharide	Cholesterol derivative	–	60–70	1229.3	–	–	SID: 168187	Natural compound with high lot-to-lot variability
Brij-35 (C12E23)	Linear PEG (23×)	Linear hydrocarbon alcohol (C12)	0.09	40	1199.6	48	>100	SID: 24898176	
C12E8	Linear PEG (8×)	Linear hydrocarbon alcohol (C12)	0.11	123	538.8	66	74–79	SID: 24898996	
C10E4	Linear PEG (4×)	Linear hydrocarbon alcohol (C10)	0.64–0.81	54	334.5	18	20	SID: 3729667	
C10E6	Linear PEG (6×)	Linear hydrocarbon alcohol (C10)	–	74	422.6	31	–	SID: 24874132	
C8E4	Linear PEG (4×)	Linear hydrocarbon alcohol (C8)	6.5–8.5	–	306.4	26	35–40	SID: 24900138	
C8POE	Linear PEG	Linear hydrocarbon alcohol (C8)	6.6	–	330 (average)	–	58		Mixture of molecules with different headgroup lengths (<i>E</i> = 2–9)
Triton X-100	Linear PEG	<i>p</i> -(2,2,4,4- Tetramethylbutyl) phenol	0.17–0.3	100–150	630 (average)	80	64–65	SID: 7889640	Mixture of molecules with different headgroup lengths (average 9.6), strong UV absorption

Il numero di molecole di detergente in una micella è chiamato numero di aggregazione . Il parametro P packing parameter P è definito

$$P = \frac{v}{al}$$

Dove a area della testa , l la lunghezza della coda idrofobica e v il volume della catena del detergente

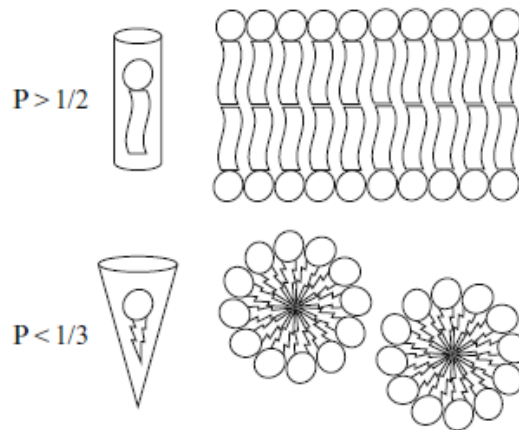
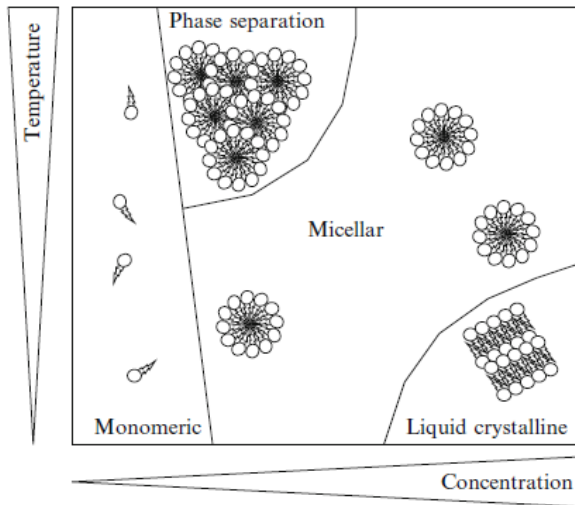


Figure 34.1 The formation of micelles depends on the molecular shape of the detergent. It is best described by the packing parameter P that is calculated by comparing the headgroup volume with the hydrophobic chain volume and length.

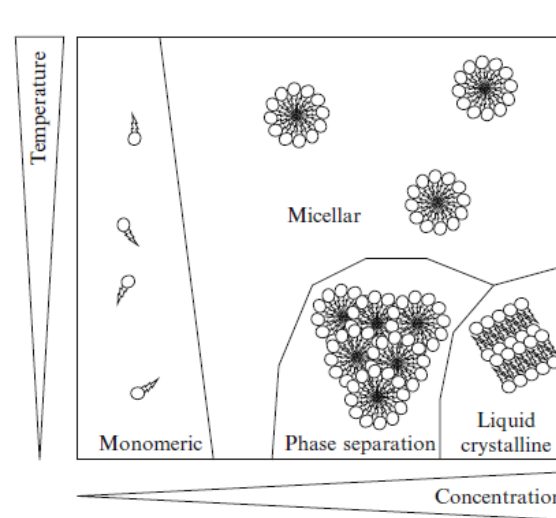
La formazioni di micelle è alla base della solubilizzazione delle membrane
I detergenti formano micelle ad una determinata concentrazione e temperatura

Un importante parametro è la CMC **concentrazione micellare critica** cioè la concentrazione al di sotto della quale il detergente è sotto forma di monomero e al di sopra della quale è sotto forma di micella ad una determinata temperatura

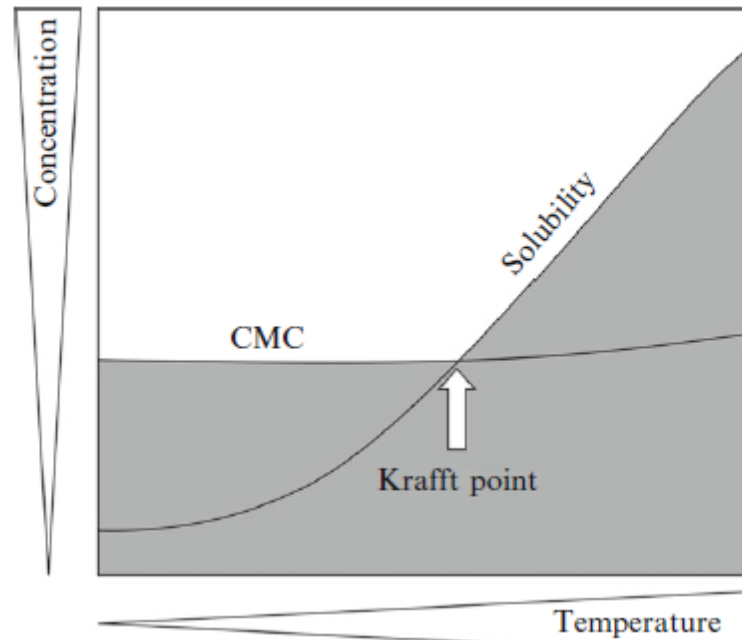
A



B



La CMC dipende dalla temperatura, dalla forza e dal pH Il punto di Kraft è la temperatura alla quale la solubilità del detergente aumenta al di sopra della CMC



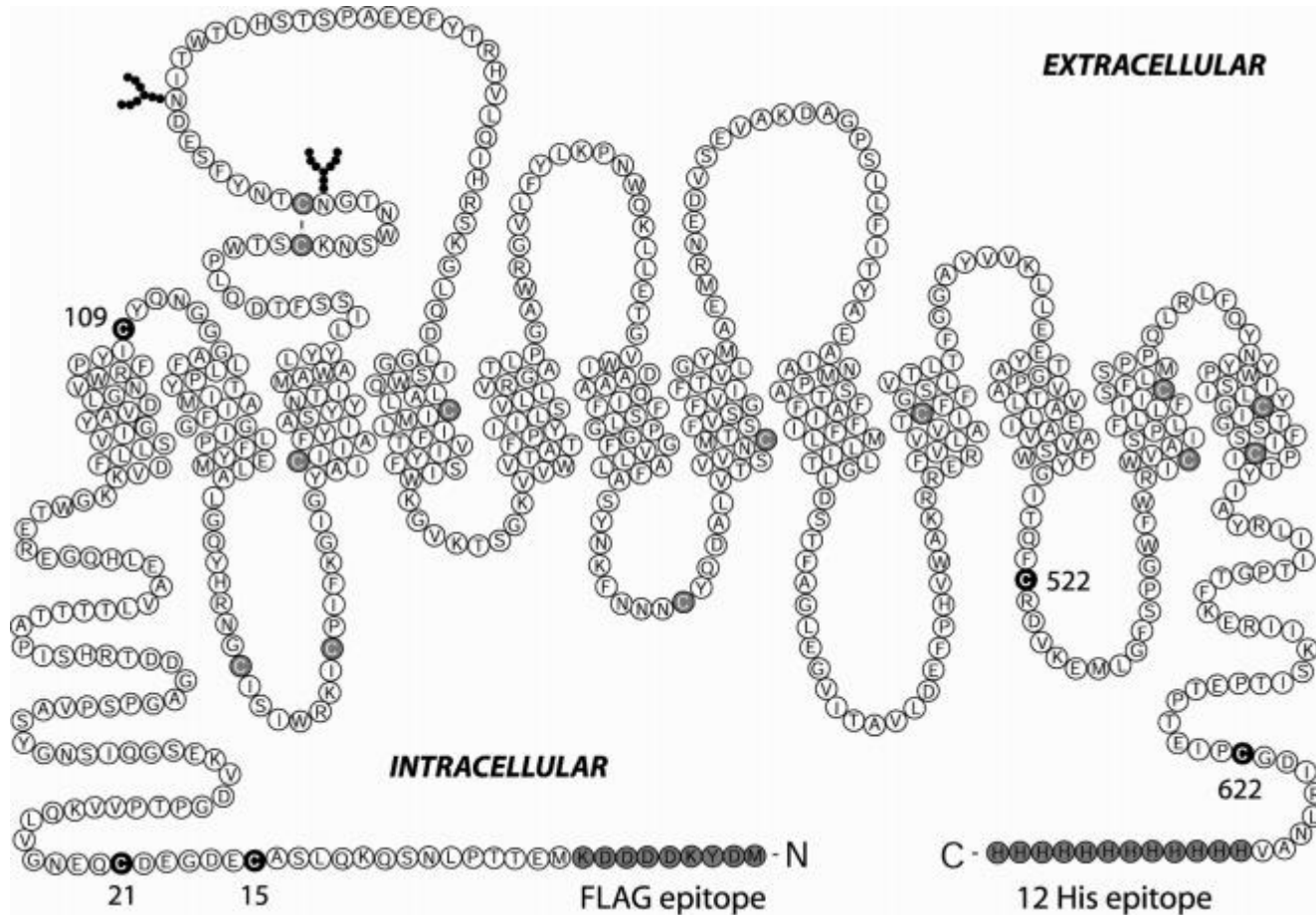
Rimozione del detergente

- Rimozione per diluizione
- Cromatografia ad esclusione molecolare
- Dialisi
- Resine idrofobiche

Detergenti che hanno una CMC (>1 mM come ad esempio il colato e l'ottilglucoside possono essere rimossi mediante dialisi o ultrafiltrazione

SERT è il trasportatore intracellulare di serotonina presente sulla superficie delle cellule del sistema nervoso centrale e periferico

SERT accoppia il trasporto del ligando a quello del sodio e del cloruro



Cellule di insetto lisate con 1% digitonina sono state purificate su NiNTA in presenza di 0.1% digitonina l'eluato è stato purificato su ConA affinitycolumn e marcato con Texas Red bromoacetammide o con IANBD N,N'-dimethyl-N-(iodoacetyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl)-ethylenediamide

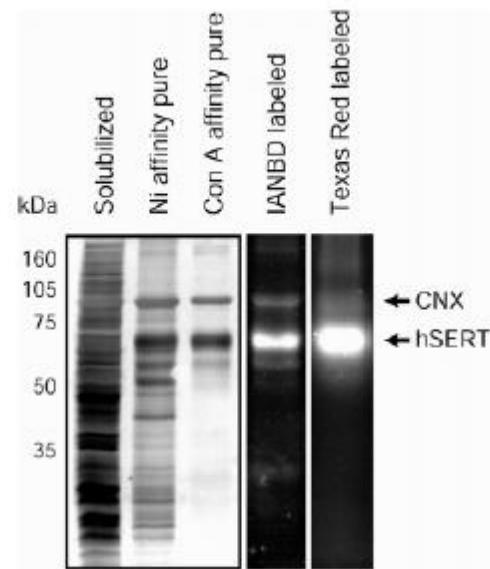


FIGURE 2: Purification and fluorescence labeling of hSERT. Samples at various stages of purification were separated on 10% SDS/polyacrylamide gel and silver stained (left panel) or imaged for fluorescence (the two right side panels). From left to right shows a sample of solubilized proteins from Sf9 cell membranes, a sample of the protein eluted from the nickel column, and a sample of protein eluted from the Con A resin. The solubilized protein in the SDS/polyacrylamide gel contains 20-fold less [¹²⁵I]RTI-55 binding activity than that loaded of the nickel and Con A pure protein. The fluorophore labeled hSERT was imaged in a Bio-Rad FluorS Imager using transilluminant UV light for excitation of the IANBD or Texas Red fluorophores. Emission was recorded using the 520 nm long pass filter settings.

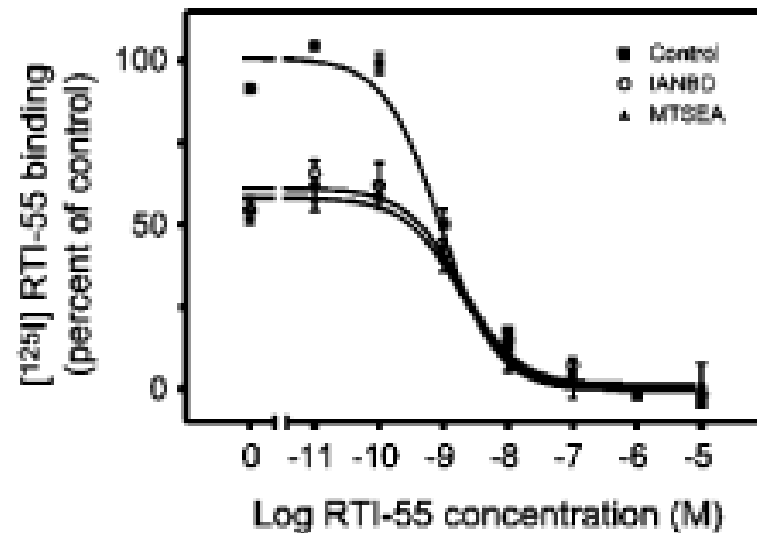
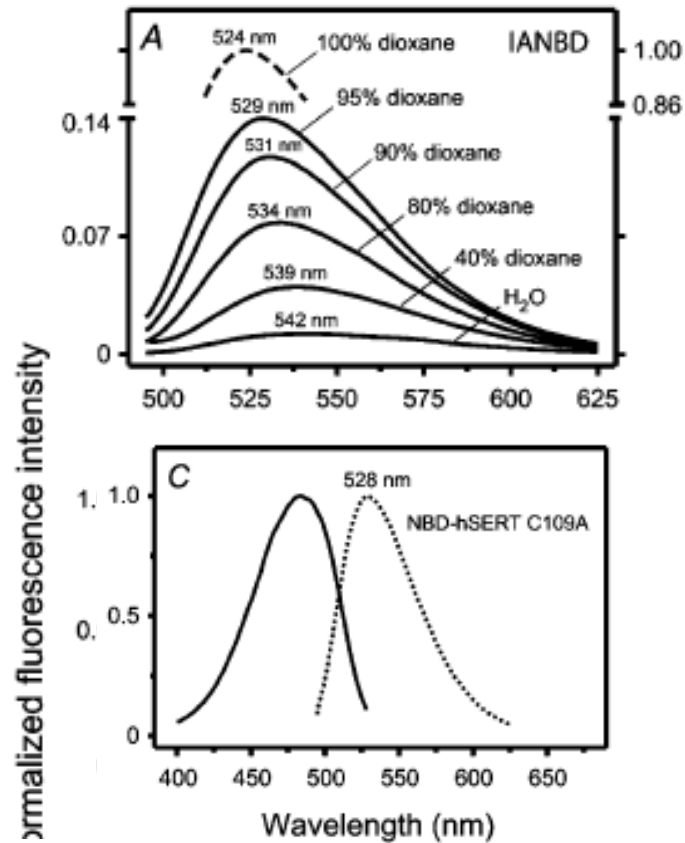


FIGURE 3: Effect of IANBD and MTSEA on hSERT. Sf9 membranes expressing hSERT were incubated in the absence (squares and triangles) or presence (open circles) of 500 μ M IANBD for 30 min at 4 $^{\circ}$ C followed by treatment in the presence (triangles) or absence (squares and open circles) of 2 mM MTSEA for 15 min at RT. The effects of the treatments were measured by homologous competition binding using 0.25 nM [125 I]RTI-55 as radioligand. The binding affinity of RTI-55 to the control (squares), the membranes treated with IANBD (open circles), and MTSEA (triangles) was calculated using the equation $K_i = IC_{50}/(1 + L/K_d)$ to be 0.6, 1.3, and 1.4 nM, respectively. B_{MAX} is estimated from the equation $B_{MAX} = B_0(1 + K_d/[radioligand])$.

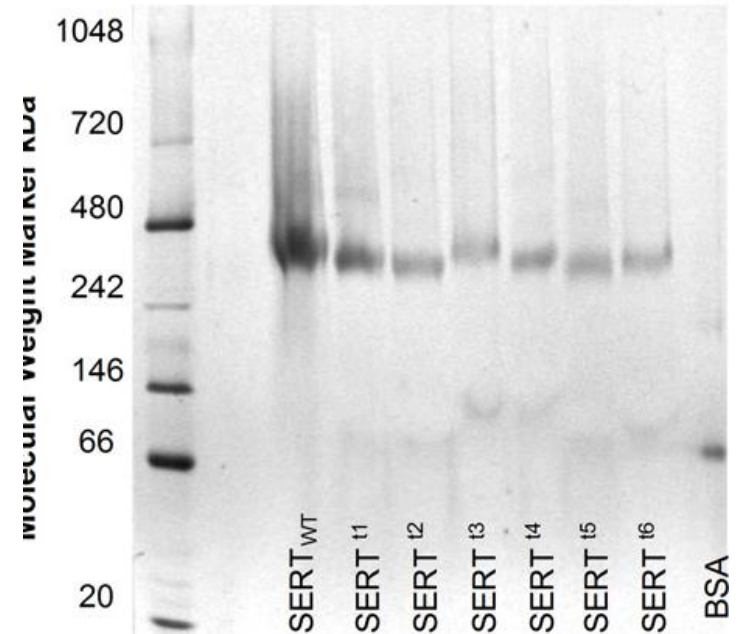
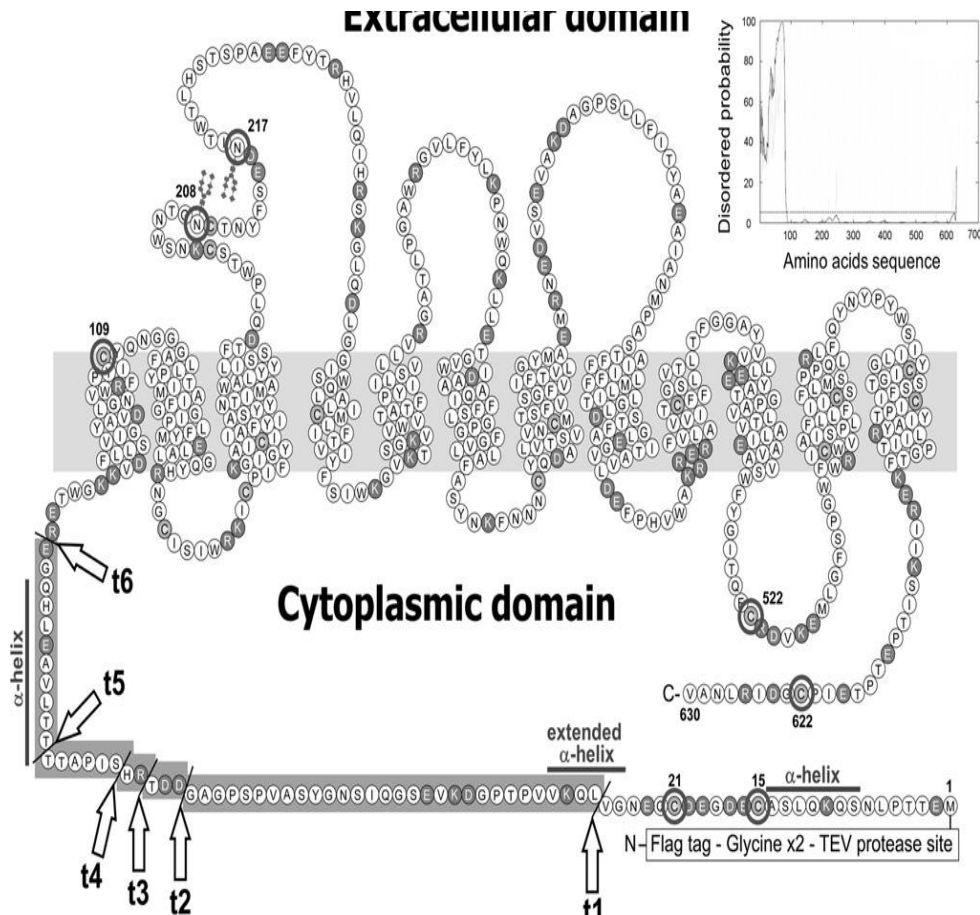
Spettri di fluorescenza di SERT marcata con IANBD dimostrano che la cys 109 è immersa in ambiente idrofobico



Functional expression of milligram quantities of the synthetic human serotonin transporter gene in a tetracycline-inducible HEK293 cell line

Hidehito Takayama, Shigetoshi Sugio*

R&D Strategy Department, Corporate Strategy Division, Mitsubishi Chemical Corporation, Yokohama, Japan
Biotechnology Laboratory, Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, Inc., Yokohama, Japan



Funzionalità di SERT

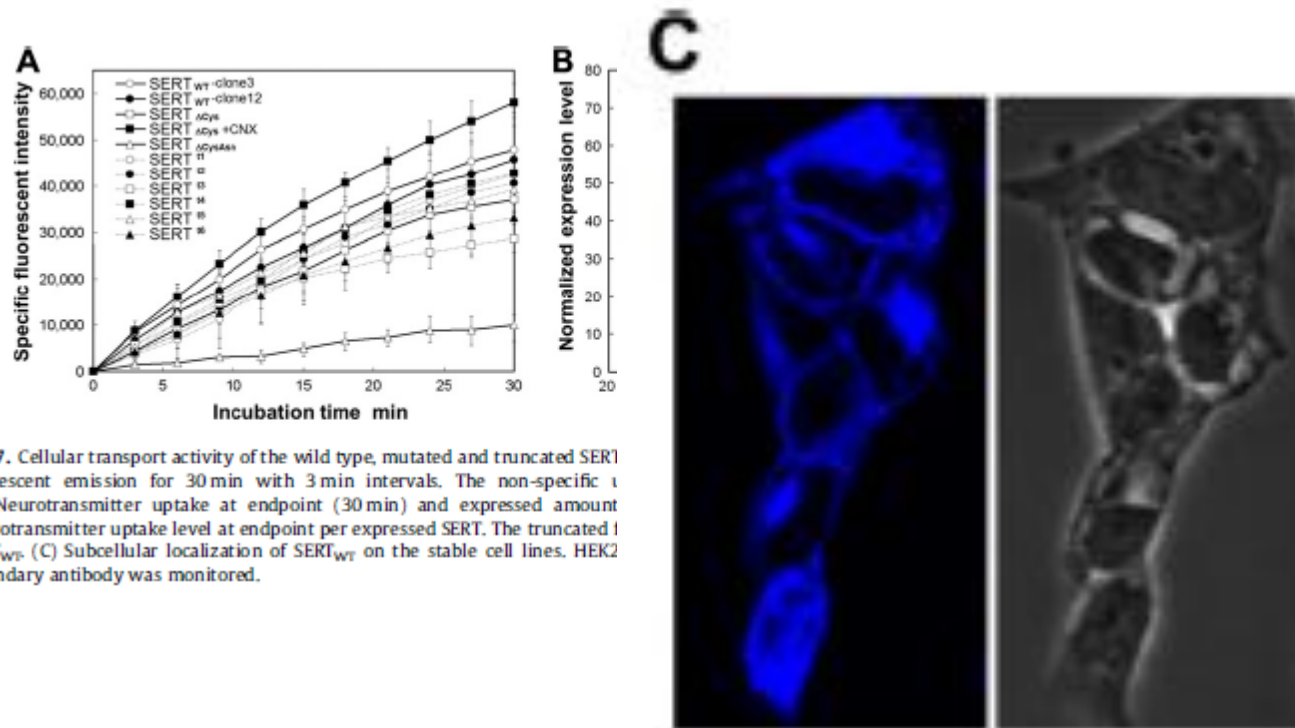
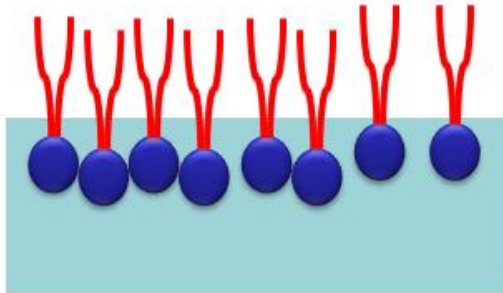


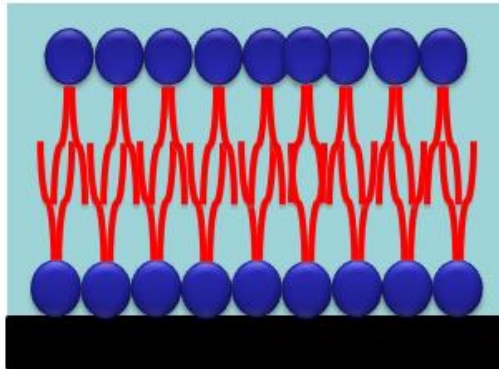
Fig. 7. Cellular transport activity of the wild type, mutated and truncated SERT fluorescent emission for 30 min with 3 min intervals. The non-specific (B) Neurotransmitter uptake at endpoint (30 min) and expressed amount Neurotransmitter uptake level at endpoint per expressed SERT. The truncated SERT_{WT}. (C) Subcellular localization of SERT_{WT} on the stable cell lines. HEK293T secondary antibody was monitored.

Ricostituzione di proteine di membrana in sistemi modello

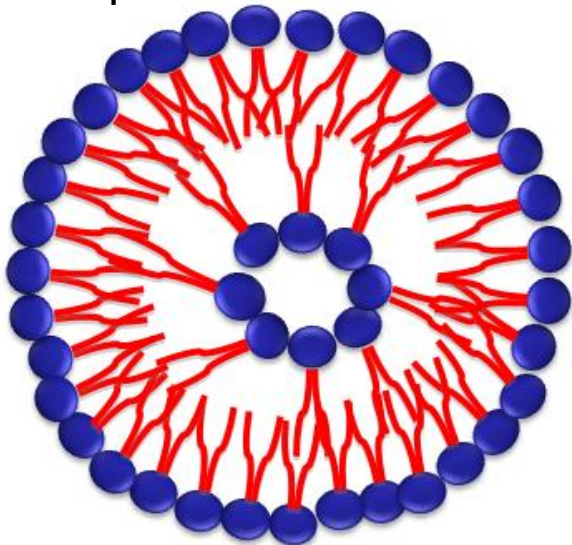
A. Monostrato lipidico



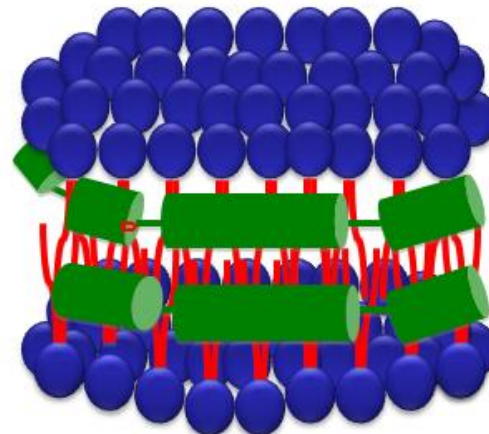
B. Doppiostrato lipidico



C. liposomi



D. nanodischi



Monostrato di Languir

Vantaggi: facilmente preparabili le caratteristiche del monostrato possono essere controllate

Svantaggi: l'elevata tensione superficiale dell'acqua può denaturare le proteine

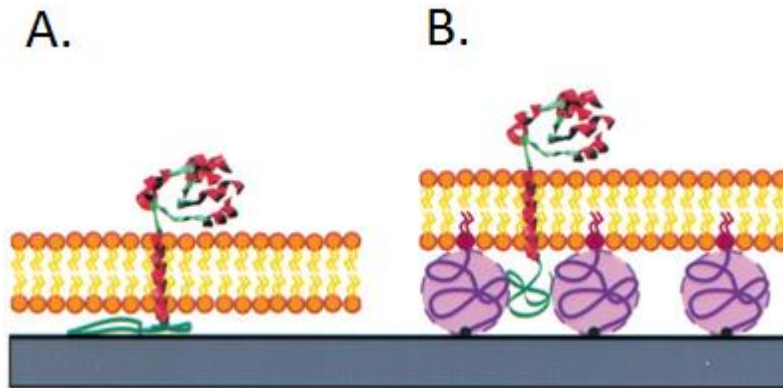
Batteriorodopsina , rodopsina e gramicidina

Il doppio strato lipidico supportato è preparato dalla fusione di piccole vescicole unilamellari su supporti solidi come SiO₂, vetro e superficie d'oro

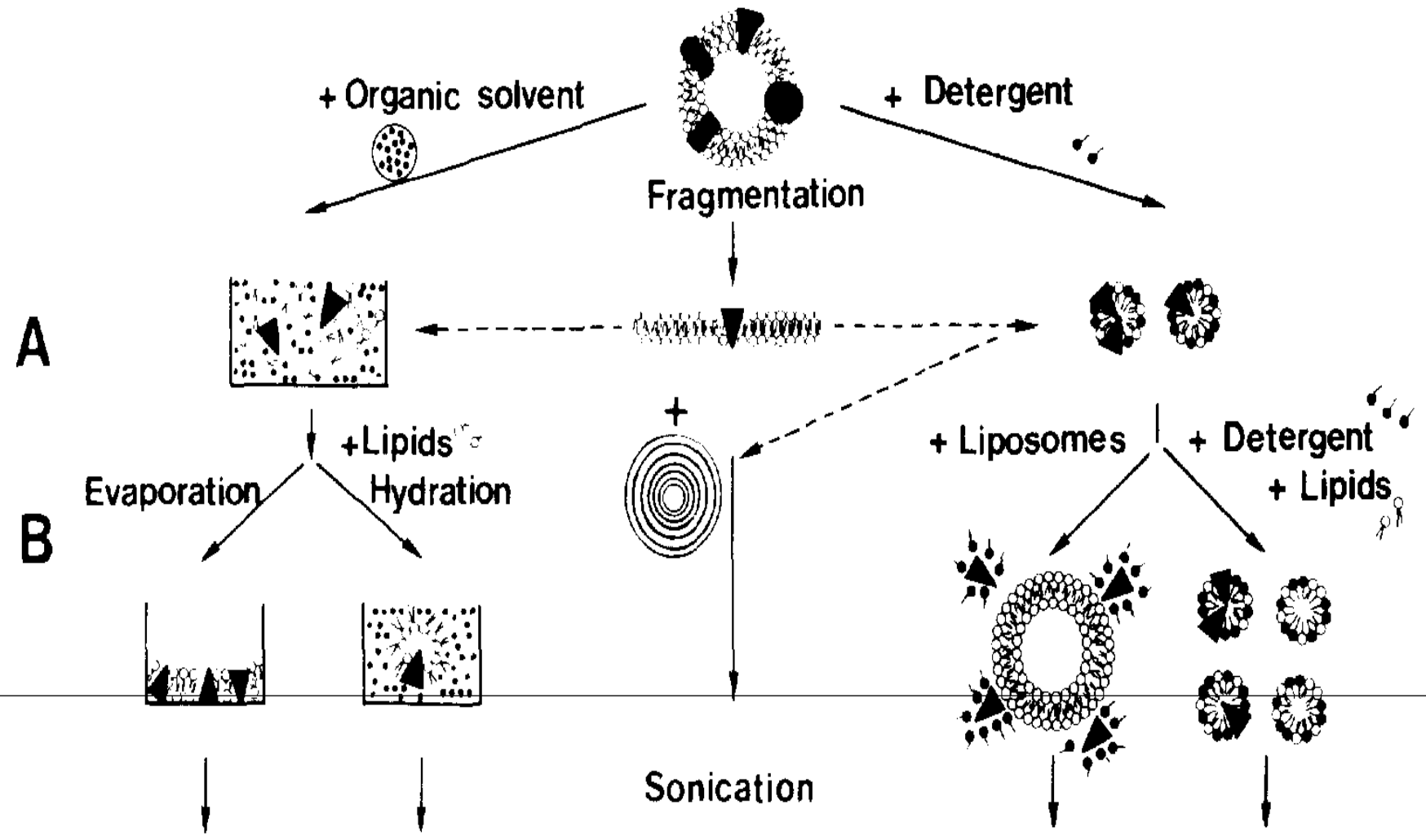
Il doppio strato lipidico supportato ha le teste idrofile polari che si affacciano nella frazione acquosa e due code idrofobe che si affacciano all'interno della membrana

Vantaggi struttura molto simile alla membrana naturale

Svantaggi. Tuttavia, le teste idrofile su uno dei due strati sono molto vicine al il supporto solido e questo può, in alcuni casi, influenzano la fluidità della membrana modello



CELLULAR MEMBRANE



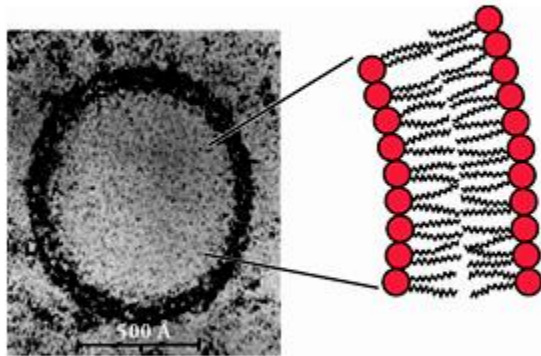
Liposomi

Si preparano semplicemente e possono essere utilizzati per studiare la funzionalità soprattutto di trasportatori

Sonicazione

Per dialisi per allontanare il detergente

Per diluizione



liposoma

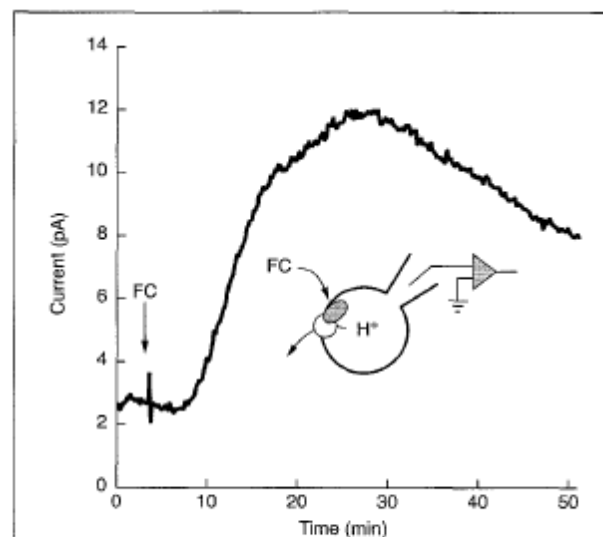
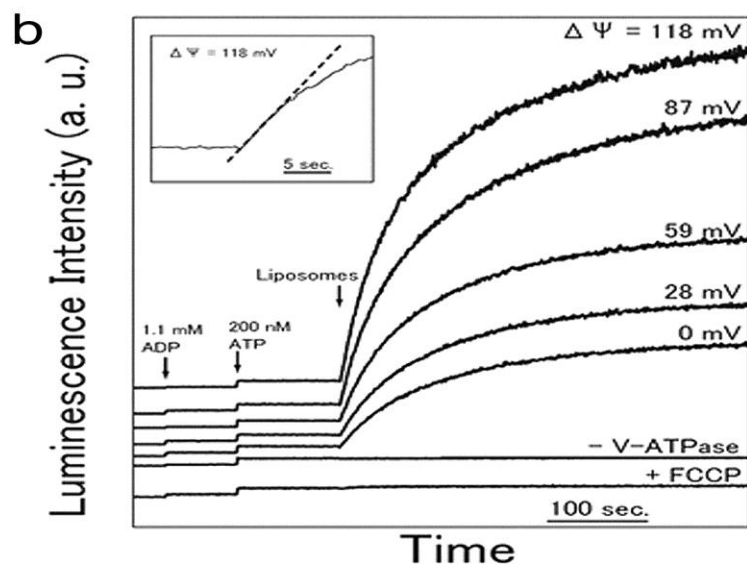
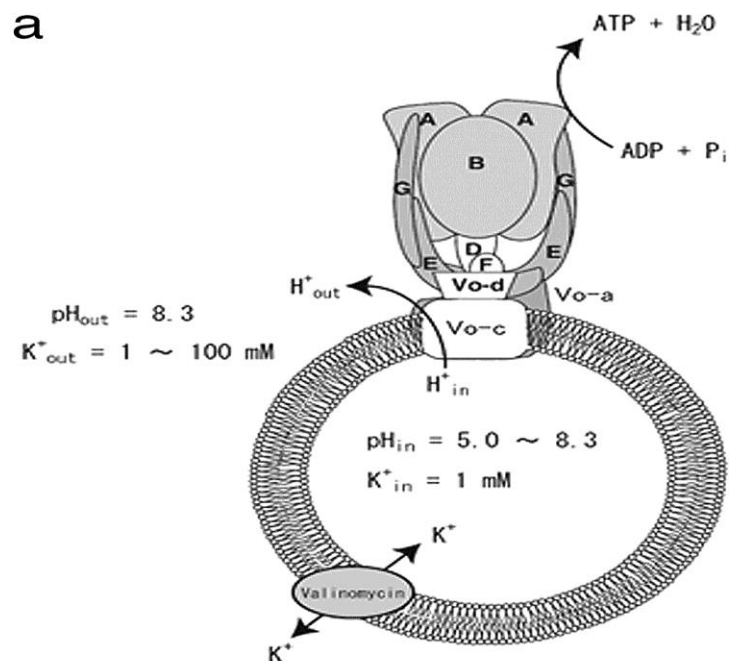


Fig. 3. Fusicoccin (10^{-5} M) induced proton pump current measured in a barley leaf protoplast, using the patch-clamp technique in the whole cell configuration. The voltage was clamped to 0 mV with symmetrical potassium chloride solutions at either side of the membrane; the pump was fueled with 5 mM MgATP. The inset diagram indicates how the patch-clamping system was set up. *Courtesy of S.A. Vogelzang.*

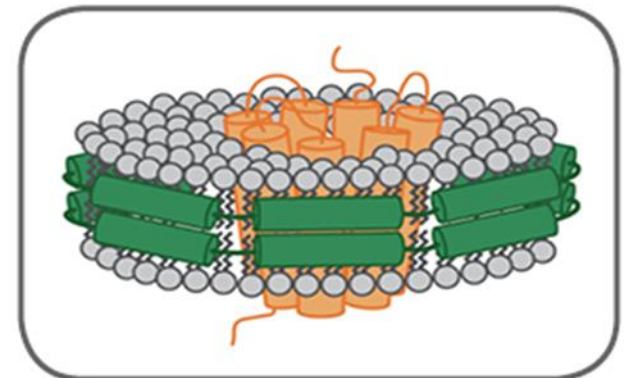
Nanodischi

Doppio strato di fosfolipidi tenuto insieme da proteine di membrana scaffold (MSP). MSP sono forme troncate di apolipoproteina (apo) A1 che avvolgono il doppio strato lipidico per formare una particella discoidale o nanodisco

Il colato, può essere utilizzato per solubilizzare fosfolipidi e proteine scaffold membrana insieme . In seguito viene rimosso il detergente per dialisi o adsorbimento.

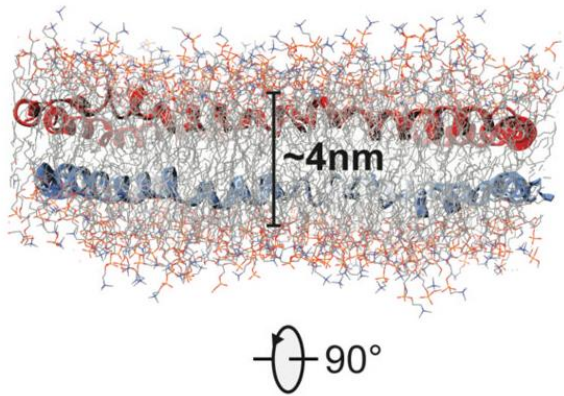
È possibile modificare il diametro del disco di doppio strato lipidico ingegnerizzando l'apolipoproteina A1

il diametro di un nanodisco è in genere di 9,8-17 nm

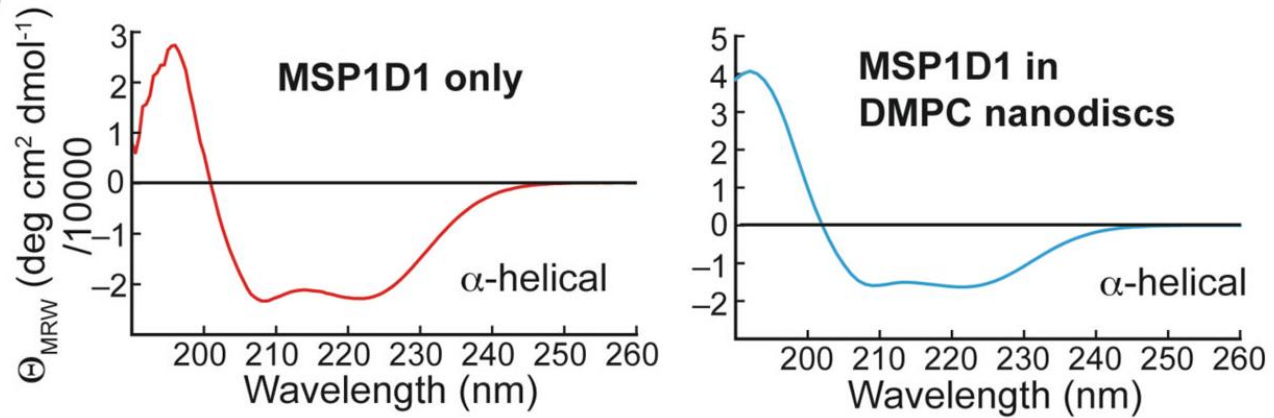


Ingegnerizzazione della proteina scaffold

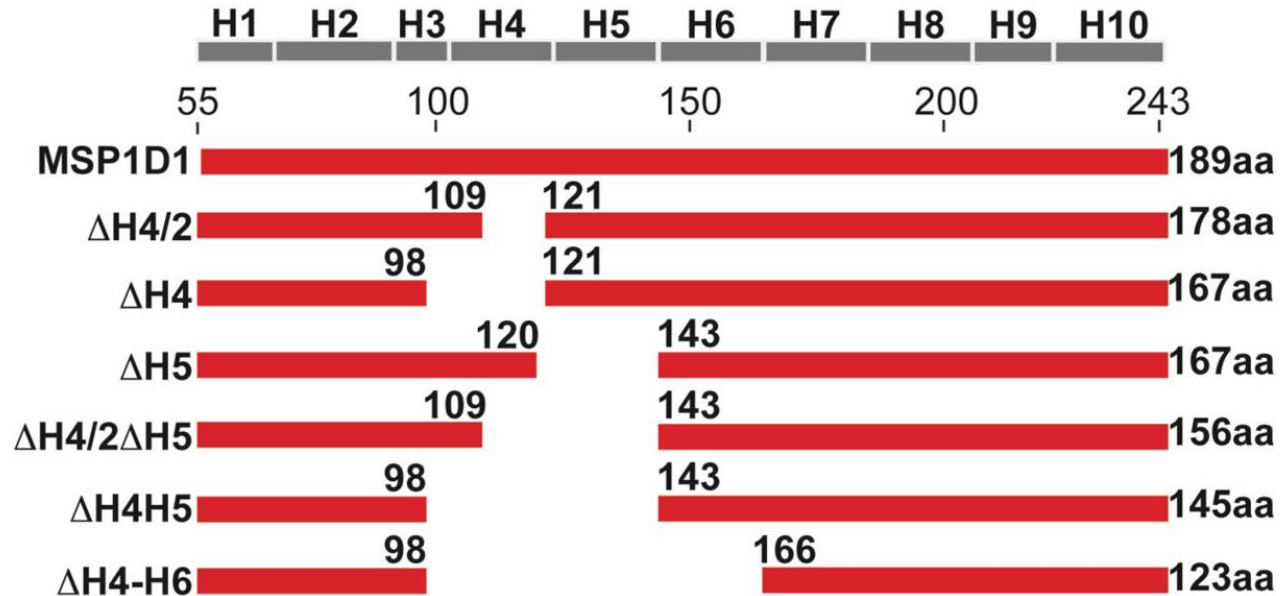
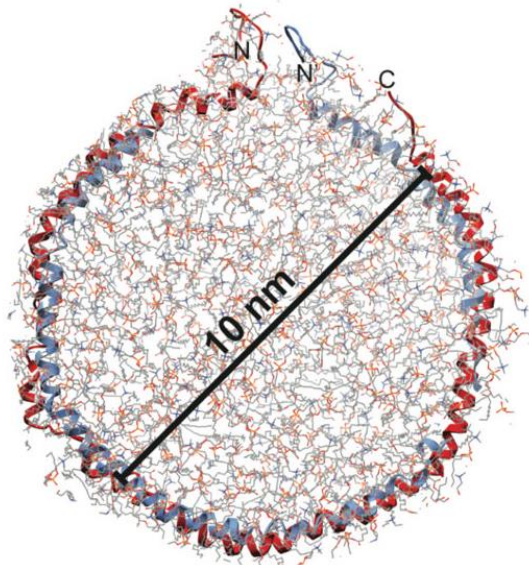
A



B



C



Preparazione di nanodischi più piccoli

