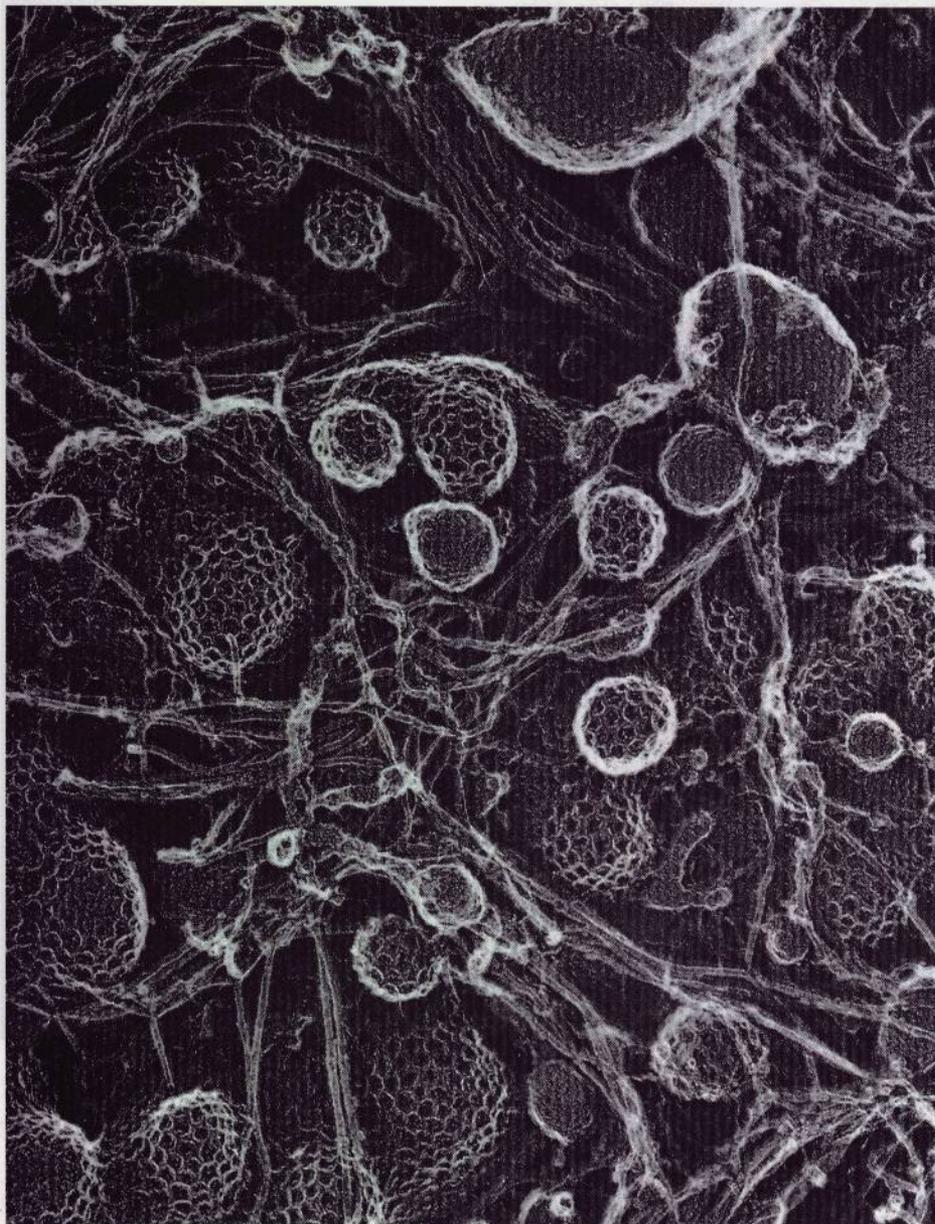


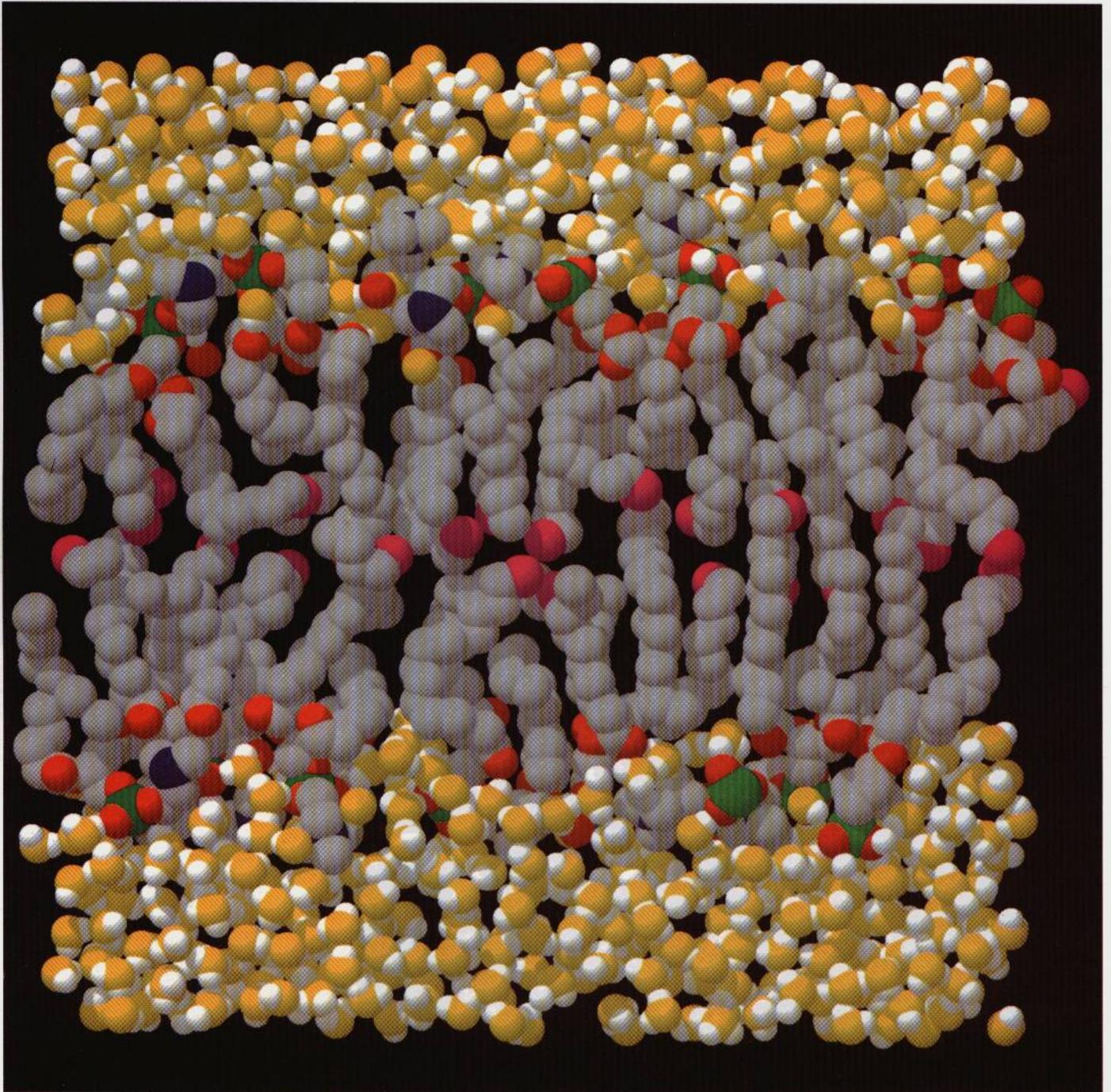
Organización interna de la célula

III

- 10 Estructura de la membrana
- 11 Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y base iónica de la excitabilidad de la membrana
- 12 Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas
- 13 Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica
- 14 Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos
- 15 Transmisión de señales entre células
- 16 El citoesqueleto
- 17 El ciclo de división celular
- 18 Los mecanismos de la división celular



Electronmicrografía de vesículas sencillas y recubiertas de la cara interna de la membrana plasmática de una célula hepática de ratón. También se pueden observar numerosos filamentos de queratina. (De N. Hirokawa y J. Heuser, *Cell* 30:395-406, 1982.)



Simulación por ordenador de una bicapa de fosfolípidos de 0,8 nm en el agua. Los átomos de fósforo se muestran en *verde*, los de nitrógeno en *azul oscuro*, los de oxígeno lipídico en *rojo*, los grupos terminales de las cadenas en *magenta* y otros átomos de carbono en *gris*; los átomos de hidrógeno del carbono se han omitido. Las moléculas de agua se muestran en *amarillo* (oxígeno) y *blanco* (hidrógeno). (De R.M. Venable, Y. Zhang, B.J. Hardy y R.W. Pastor, *Science* 262:223-228, 1993.)

Estructura de la membrana

10

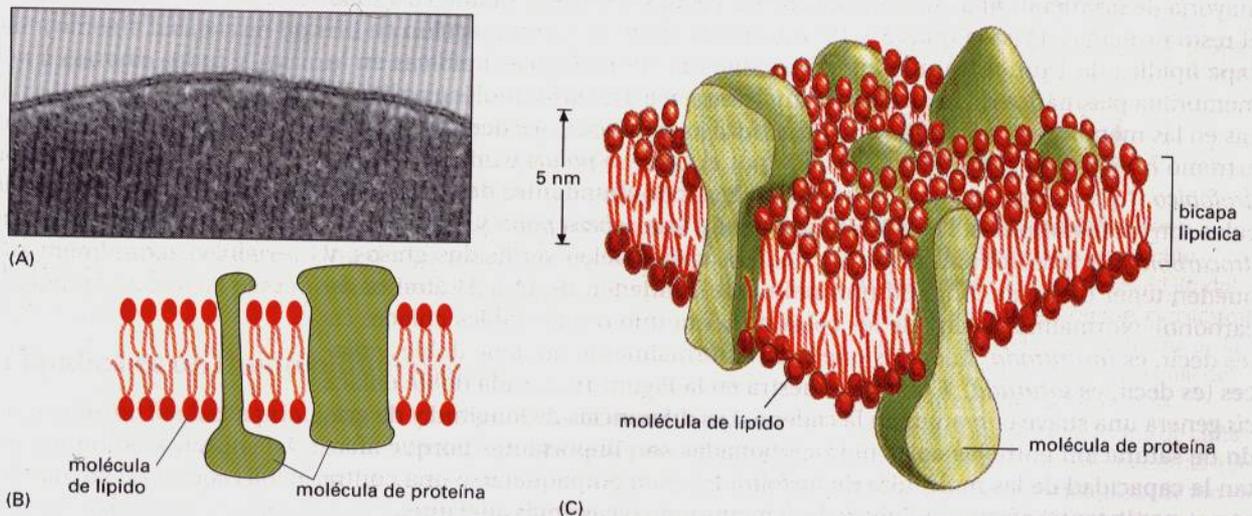
- La bicapa lipídica
- Proteínas de membrana

Las membranas celulares son cruciales para la vida celular. La **membrana plasmática** rodea a la célula, definiendo su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre el contenido de la célula y su entorno. Dentro de la célula eucariota, las membranas del retículo endoplásmico, del complejo de Golgi, de las mitocondrias y de otros orgánulos delimitados por membrana mantienen las diferencias características entre los contenidos de cada orgánulo y el citosol. Los gradientes iónicos que se establecen a través de las membranas, generados por la actividad de proteínas de membrana especializadas, pueden ser usados para sintetizar ATP, dirigir el movimiento transmembranoso de solutos seleccionados o, en células nerviosas y musculares, para producir y transmitir señales eléctricas. En todas las células, la membrana plasmática contiene también proteínas que actúan como sensores de señales externas, permitiendo que la célula cambie en respuesta a indicaciones ambientales; estas proteínas sensoras, o *receptores*, transfieren información, en lugar de iones o de moléculas, a través de la membrana.

Aunque realicen diferentes funciones, todas las membranas biológicas tienen una estructura básica común: una finísima capa de moléculas lipídicas y proteicas, que se mantienen unidas fundamentalmente por interacciones no covalentes. Las membranas celulares son estructuras dinámicas, fluidas y la mayoría de sus moléculas son capaces de desplazarse en el plano de la membrana.

Figura 10-1 Tres visiones de una membrana celular.

(A) Electronmicrografía de una membrana plasmática (de un eritrocito humano) en sección transversal. (B y C) Dibujos esquemáticos que muestran en dos y tres dimensiones la membrana celular. (A, por cortesía de Daniel S. Friend.)



Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua de unos 5 nm de grosor (Figura 10-1). Esta *bicapa lipídica* constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas proteicas, que normalmente se hallan “disueltas” en la bicapa lipídica, median la mayoría del resto de funciones de la membrana, por ejemplo transportando moléculas específicas a través de ella o catalizando reacciones asociadas a la membrana, como la síntesis de ATP. Algunas proteínas de membrana actúan de eslabones estructurales que relacionan la membrana plasmática con el citoesqueleto y/o con la matriz extracelular de las células adyacentes, mientras que otras proteínas actúan como receptores que reciben y transducen las señales químicas procedentes del entorno celular. Como podría esperarse, las membranas son estructuras asimétricas: la composición lipídica y proteica de sus caras interna y externa es diferente reflejando las diferentes funciones realizadas por ambas superficies.

En este capítulo consideraremos la estructura y la organización de los dos constituyentes principales de las membranas biológicas –los lípidos y las proteínas. Si bien prestaremos especial atención a la membrana plasmática, muchos de los conceptos son aplicables a las membranas internas. Las funciones de las membranas celulares se considerarán posteriormente. Su papel en la síntesis del ATP será discutido en el Capítulo 14; su papel en el transporte transmembranoso de pequeñas moléculas, en el Capítulo 11 y su papel en la transmisión celular de señales y en la adhesión celular, en los Capítulos 15 y 19. En los Capítulos 12 y 13 se discutirán las características de las membranas internas de la célula (endomembranas) y el tráfico de proteínas a través y entre ellas.

La bicapa lipídica¹

La **bicapa lipídica** ha sido establecida como la base universal de la estructura de la membrana celular. Es fácil de observar en una electronmicrografía convencional, aunque son necesarias técnicas especializadas, como difracción de rayos X y técnicas de criofractura, para revelar los detalles de su organización. La estructura en bicapa puede atribuirse a las propiedades especiales de las moléculas lipídicas, que hacen que dichas moléculas se ensamblen espontáneamente formando bicapas, incluso en sencillas condiciones artificiales.

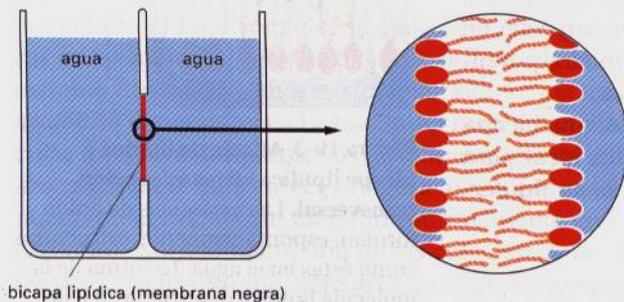
Los lípidos de las membranas son moléculas anfipáticas que espontáneamente forman bicapas¹

Las moléculas lipídicas son insolubles en agua pero se disuelven fácilmente en disolventes orgánicos. Constituyen aproximadamente un 50 % de la masa de la mayoría de las membranas plasmáticas de las células animales, siendo casi todo el resto proteínas. Existen unas 5×10^6 moléculas lipídicas en una sección de bicapa lipídica de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, o aproximadamente 10^9 moléculas lipídicas en la membrana plasmática de una célula animal pequeña. Todas las moléculas lipídicas en las membranas celulares son *anfipáticas* (o anfifílicas) –es decir, tienen un extremo *hidrofílico* (“que se siente atraído por el agua” o *polar*) y un extremo *hidrofóbico* (“que rehuye el agua” o *no polar*). Las más abundantes de estas moléculas son los **fosfolípidos**. Los fosfolípidos tienen una *cabeza polar* y dos *colas hidrocarbonadas* hidrofóbicas (Figura 10-2). Las colas suelen ser ácidos grasos, y pueden tener diferente longitud (normalmente contienen de 14 a 24 átomos de carbono). Normalmente una de las colas presenta uno o más dobles enlaces *cis* (es decir, es *insaturada*) mientras que la otra normalmente no tiene dobles enlaces (es decir, es *saturada*). Como se muestra en la Figura 10-2, cada doble enlace *cis* genera una suave curvatura en la cadena. Las diferencias de longitud y de grado de saturación entre las colas hidrocarbonadas son importantes porque afectan la capacidad de las moléculas de fosfolípidos para empaquetarse una contra otra y, por lo tanto, afectan la fluidez de la membrana (véase más adelante).

resultado muy útiles en los estudios experimentales: (1) bicapas producidas en forma de vesículas esféricas, denominadas **liposomas**, cuyo tamaño puede variar de 25 nm a 1 μm de diámetro según cual sea el sistema de preparación (Figura 10-4), y (2) bicapas planas, denominadas **membranas negras**, formadas a través de un agujero situado en una separación entre dos compartimientos acuosos (Figura 10-5).

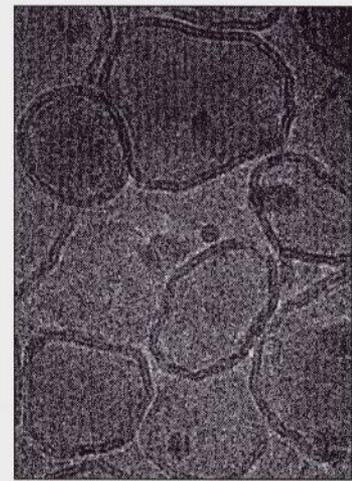
Se han utilizado diversas técnicas para medir el desplazamiento de las moléculas lipídicas y de sus diferentes regiones. Por ejemplo, se puede construir una molécula lipídica cuyo grupo de cabeza polar lleve una "marca de espín", tal como un grupo nitroxilo ($>\text{N}-\text{O}$), que contiene un electrón desapareado cuyo espín genera una señal paramagnética que se puede medir mediante espectroscopia de resonancia de espín electrónico (ESR, de Electron Spin Resonance'). (Los principios de esta técnica son similares a los de la resonancia magnética nuclear, que se discuten en el Capítulo 4). Mediante el espectro ESR se puede medir el movimiento y la orientación de un lípido marcado dentro de una bicapa. Estos estudios demuestran que las moléculas de fosfolípido de las bicapas artificiales raramente migran de un lado a otro de la monocapa. Este proceso, denominado "flip-flop", se produce menos de una vez al mes en cualquier molécula lipídica. Por otro lado, las moléculas lipídicas intercambian fácilmente su lugar con el de las moléculas vecinas *dentro* de una monocapa ($\sim 10^7$ veces por segundo). Ello da lugar a una rápida difusión lateral, con un coeficiente de difusión (D) de aproximadamente 10^{-8} $\text{cm}^2/\text{segundo}$, lo cual significa que una molécula lipídica promedio difunde la longitud de una gran célula bacteriana (~ 2 μm) en aproximadamente 1 segundo. Además, estos estudios indican que las moléculas lipídicas giran con gran rapidez alrededor de sus ejes longitudinales y que sus cadenas hidrocarbonadas son flexibles (Figura 10-6).

Unos estudios similares han sido realizados con moléculas lipídicas marcadas, en membranas biológicas aisladas y en células enteras relativamente sencillas como micoplasmas, bacterias y glóbulos rojos (eritrocitos) anucleados. En general, los resultados de estos estudios son los mismos que los que se obtienen con bicapas artificiales, y demuestran que el componente lipídico de las membranas biológicas es un líquido bidimensional en el que las moléculas constituyentes son libres de moverse lateralmente; al igual que en las bicapas sintéticas, las moléculas de fosfolípido se hallan restringidas a su propia monocapa. Este confinamiento crea un problema para su síntesis. Los fosfolípidos son sintetizados sólo en una de las monocapas de la membrana, la cual se sintetiza principalmente en la monocapa citosólica de la membrana del retículo endoplasmático (ER, de Endoplasmic Reticulum); si ninguna de estas moléculas recientemente formadas pudiera migrar hacia la otra mitad de la bicapa lipídica, no se podría formar más bicapa. Este problema se soluciona gracias a un tipo especial de enzimas unidas al ER llamadas *translocadoras de fosfolípidos*, que catalizan un rápido flip-flop de fosfolípidos específicos desde la monocapa donde han sido sintetizados hasta la monocapa opuesta, como se discute en el Capítulo 12.

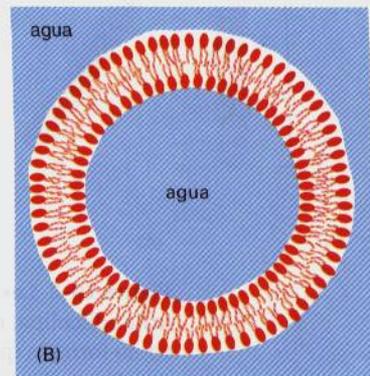


bicapa lipídica (membrana negra)

Figura 10-5 Representación en sección transversal de una bicapa lipídica sintética, denominada membrana negra. Esta bicapa planar se forma a través de un pequeño agujero en una pared que separa dos compartimientos acuosos. Las membranas negras se utilizan para medir las propiedades de permeabilidad de las membranas artificiales.



(A) 100 nm



(B) 25 nm

Figura 10-4 Liposomas.

(A) Electronmicrografía de vesículas de fosfolípidos (liposomas) en agua, sin fijar ni teñir. Nótese que la estructura bilaminar de las vesículas es claramente aparente. (B) Dibujo de un pequeño liposoma esférico visto en sección transversal. Normalmente los liposomas se utilizan como modelo de membrana en estudios experimentales. (A, por cortesía de Jean Lepault.)

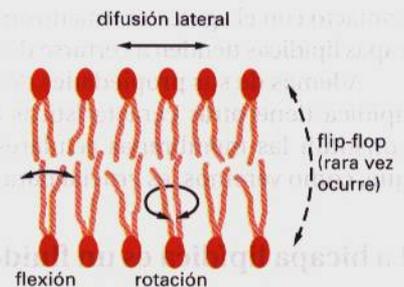


Figura 10-6 Movilidad de los fosfolípidos. Los tipos de movimientos posibles de las moléculas de fosfolípido en una bicapa lipídica.

La fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición³

La fluidez de las membranas celulares es biológicamente importante. Algunos procesos de transporte y algunas actividades enzimáticas, por ejemplo, pueden detenerse cuando la viscosidad de la bicapa se incrementa experimentalmente más allá de un nivel umbral. La fluidez de una bicapa lipídica depende tanto de su composición como de la temperatura, como ha sido demostrado por estudios en bicapas sintéticas. Una bicapa sintética, producida a partir de un único tipo de fosfolípido, pasa de un estado líquido a un estado cristalino rígido (o gel) en un punto de congelación característico. Este cambio de estado recibe el nombre de *transición de fase*, y la temperatura a la que se produce es más baja (es decir, la membrana resulta más difícil de congelar) si las cadenas hidrocarbonadas son cortas o tienen dobles enlaces *cis*. Una menor longitud de la cadena reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas a interaccionar entre sí, y los dobles enlaces *cis* producen pliegues en las cadenas hidrocarbonadas que dificultan su empaquetamiento, de forma que las membranas permanecen fluidas a temperaturas más bajas (Figura 10-7). Bacterias, levaduras y otros organismos cuyas temperaturas varían con la de su entorno, controlan la composición de los ácidos grasos de sus lípidos de membrana para mantener una fluidez relativamente constante; en caso de que la temperatura disminuya se sintetizan ácidos grasos con más dobles enlaces *cis*, de manera que evitan una pérdida de fluidez de la bicapa por efecto de la disminución de la temperatura.

Sin embargo, la bicapa lipídica de muchas membranas celulares no está compuesta exclusivamente por fosfolípidos; habitualmente contienen además, *colesterol* y *glucolípidos*. Las membranas plasmáticas de eucariotas contienen cantidades especialmente elevadas de **colesterol** (Figura 10-8) –hasta una proporción de más de una molécula de colesterol por cada molécula de fosfolípido. Las moléculas de colesterol refuerzan el carácter de barrera permeable de la bicapa lipídica. Se orientan en la bicapa con sus grupos hidroxilo próximos a las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos; sus anillos esteroides, planos y rígidos, interactúan con –y en parte inmovilizan– las regiones de las cadenas hidrocarbonadas que son más cercanas a los grupos polares de la cabeza, dejando el resto de la cadena más flexible (Figura 10-9). Al disminuir la movilidad de los primeros grupos CH₂ de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de fosfolípidos, el colesterol hace a la bicapa lipídica más rígida en esta región y de ese modo disminuye la permeabilidad de la bicapa a moléculas solubles pequeñas. Aunque de esta manera el colesterol tiende a hacer menos fluidas las bicapas lipídicas, a las altas concentraciones en que se presenta en la mayoría de las membranas plasmáticas de eucariotas también impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen. De esta manera, el colesterol inhibe posibles transiciones de fase.

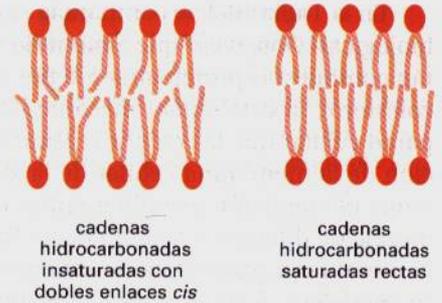
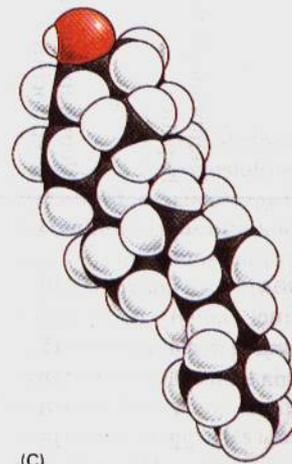
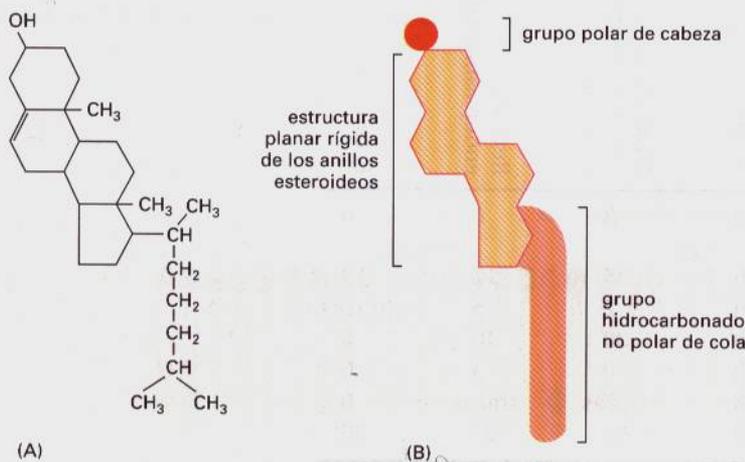


Figura 10-7 Influencia de los dobles enlaces *cis* en las cadenas hidrocarbonadas.

La presencia de dobles enlaces hace más difícil el empaquetamiento de las cadenas, lo cual hace que la bicapa lipídica sea más difícil de congelar.

Figura 10-8 Estructura del colesterol.

La molécula de colesterol, representada mediante su fórmula (A), mediante un esquema (B) y mediante un modelo espacial compacto (C).



En la Tabla 10-1 se compara la composición lipídica de distintas membranas biológicas. Obsérvese que a menudo las membranas plasmáticas bacterianas están compuestas principalmente por un único tipo de fosfolípido y no contienen colesterol; la estabilidad mecánica de estas membranas está asegurada por la pared celular que las recubre (véase Figura 11-14). Contrariamente, la composición de la membrana celular de la mayoría de las células eucariotas es más variada, conteniendo no sólo grandes cantidades de colesterol, sino también una mezcla de diferentes fosfolípidos. Cuatro grupos de fosfolípidos predominan en la membrana plasmática de muchas células de mamíferos: *fosfatidilcolina*, *esfingomielina*, *fosfatidilserina* y *fosfatidiletanolamina*. Las estructuras de estas moléculas se muestran en la Figura 10-10. Nótese que tan sólo la fosfatidilserina tiene una carga neta negativa, cuya importancia trataremos posteriormente; las otras tres moléculas son eléctricamente neutras a pH fisiológico, presentando una carga negativa y otra positiva. En conjunto, estos cuatro fosfolípidos constituyen más de la mitad de la masa de lípidos de la mayoría de las membranas (véase Tabla 10-1). Otros fosfolípidos, tales como los *fosfolípidos de inositol*, son funcionalmente importantes pero se hallan en cantidades relativamente pequeñas. En el Capítulo 15 se describe el papel crucial que desempeñan los fosfolípidos de inositol en las señalización celular.

Cabe preguntarse por qué la membrana plasmática eucariota contiene tal variedad de fosfolípidos, con grupos de cabeza que difieren en tamaño, forma y carga. Podemos empezar a comprender este porqué si pensamos en los lípidos de la membrana como en un disolvente bidimensional de las proteínas de la membrana, al igual que el agua constituye un disolvente tridimensional para las proteínas en una solución acuosa. Como veremos, ciertas proteínas de membrana únicamente puedan actuar en presencia de grupos de cabeza de determinados fosfolípidos, de la misma forma que muchas enzimas en solución acuosa requieren un ion determinado para presentar actividad.

La bicapa lipídica es asimétrica⁴

En las membranas plasmáticas que han sido analizadas, la composición lipídica de las dos mitades de la bicapa lipídica es marcadamente diferente. En la membrana del glóbulo rojo humano, la mayoría de las moléculas lipídicas que tienen colina $-(CH_2)_3N^+CH_2CH_2OH-$ en su grupo de cabeza (que es, fosfatidilcolina y es-

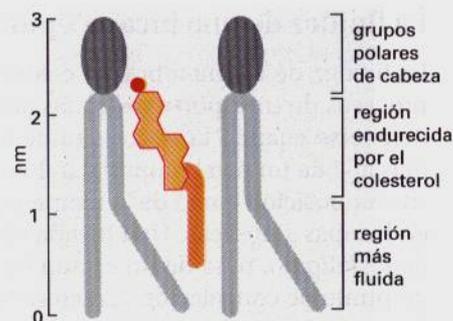


Figura 10-9 El colesterol en una bicapa lipídica. Dibujo esquemático de una molécula de colesterol interactuando con dos moléculas de fosfolípido en una de las láminas de una bicapa lipídica.

Tabla 10-1 Composición lipídica aproximada de diferentes membranas celulares

Lípido	Porcentaje de lípido total en peso					
	Membrana plasmática hepática	Membrana plasmática de eritrocitos	Mielina	Mitocondria (membranas interna y externa)	Retículo endoplasmático	<i>E. coli</i>
Colesterol	17	23	22	3	6	0
Fosfatidiletanolamina	7	18	15	35	17	70
Fosfatidilserina	4	7	9	2	5	trazas
Fosfatidilcolina	24	17	10	39	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glucolípidos	7	3	28	trazas	trazas	0
Otros	22	13	8	21	27	30

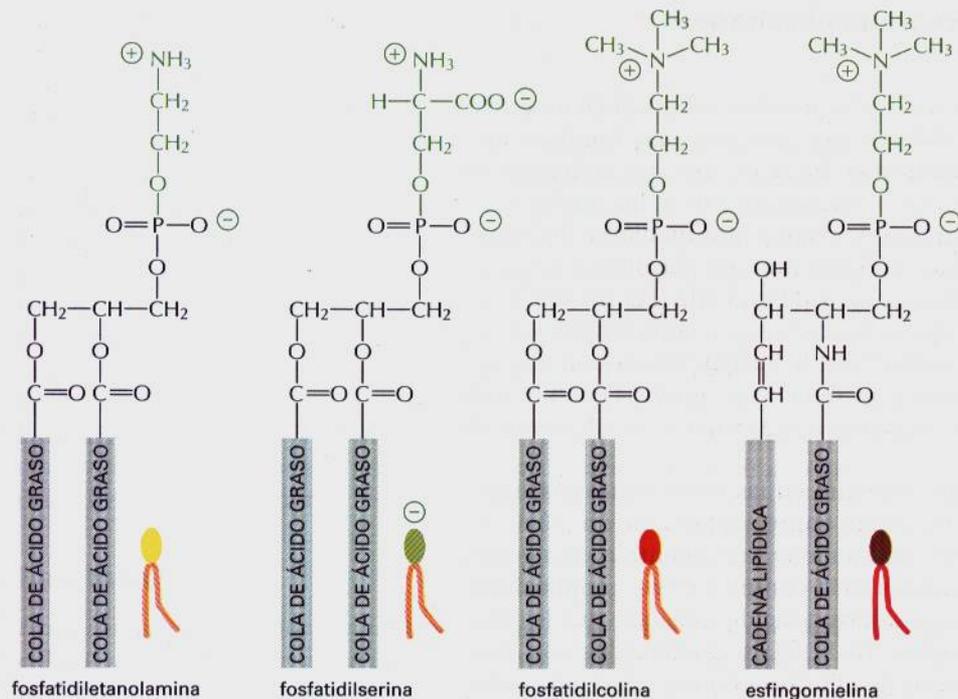


Figura 10-10 Cuatro de los principales fosfolípidos de las membranas plasmáticas de las células de mamífero. Obsérvese que tanto en esta figura como en las siguientes, los diferentes grupos de la cabeza se representan mediante símbolos diferentes. Todas las moléculas lipídicas que se presentan derivan del glicerol excepto la esfingomiolina que deriva de la serina.

fosfomiolina) se encuentran en la mitad exterior de la bicapa lipídica, mientras que la mayoría de moléculas de fosfolípido que contienen un grupo amino primario terminal (fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina) se hallan en la mitad interior (Figura 10-11). Dado que la fosfatidilserina, de carga negativa, está localizada en la monocapa interior, existe una importante diferencia de carga entre las dos monocapas.

La mayoría de las membranas de una célula eucariota, incluyendo la membrana plasmática, se sintetizan en el retículo endoplasmático (ER) y es allí donde se genera la asimetría de los fosfolípidos por translocadores que trasladan específicamente moléculas de fosfolípidos de una monocapa a otra (se discute en el Capítulo 12). Esta asimetría lipídica puede ser funcionalmente importante. La enzima *proteína quinasa C*, por ejemplo, se activa en respuesta a variadas señales extracelulares; se une a la cara citoplasmática de la membrana, donde se halla concentrada la fosfatidilserina, y requiere este fosfolípido cargado negativamente para actuar. De modo similar los fosfolípidos de inositol se concentran en la cara citoplasmática de la membrana plasmática de la célula eucariota. Estos fosfolípidos minoritarios son escindidos en dos fragmentos por enzimas específicas que son activadas por señales extracelulares. Ambos fragmentos actúan luego dentro de la célula como mensajeros solubles que permiten la difusión de la señal hacia el interior de la célula, como se discutirá en el Capítulo 15.

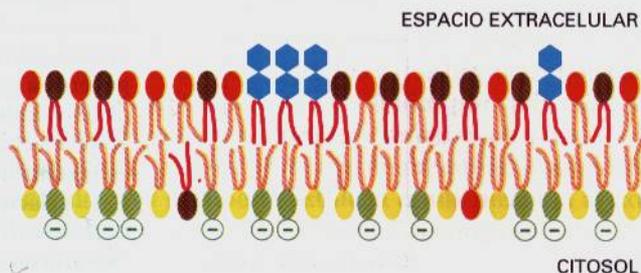


Figura 10-11 La distribución asimétrica de los fosfolípidos y de los glucolípidos en la bicapa lipídica de los glóbulos rojos humanos. Los símbolos utilizados para los fosfolípidos son los introducidos en la Figura 10-10. Además, los glucolípidos se han dibujado con grupos de cabeza polar de forma hexagonal (azul). Se cree que el colesterol (no dibujado) se distribuye casi a partes iguales en ambas monocapas.

En la superficie de todas las membrana plasmáticas hay glucolípidos⁵

Las moléculas lipídicas que presentan una asimetría más marcada en cuanto a su distribución en las membranas celulares son las moléculas lipídicas que contienen azúcares denominadas **glucolípidos**. Estas asombrosas moléculas se encuentran exclusivamente en la mitad no citoplasmática de la bicapa lipídica, donde al parecer se autoasocian formando microagregados mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre ellas. En la membrana plasmática sus grupos azúcar quedan al descubierto en la superficie de la célula (Figura 10-11), lo cual sugiere que deben desempeñar alguna función en las interacciones de la célula con su entorno. La distribución asimétrica de los glucolípidos en la bicapa resulta de la adición de grupos azúcar a las moléculas lipídicas en el lumen del complejo de Golgi, el cual es topográficamente equivalente al exterior de la célula (se discute en el Capítulo 13).

Los glucolípidos se presentan probablemente en las membranas plasmáticas de todas las células animales, constituyendo aproximadamente un 5% de las moléculas lipídicas de la monocapa exterior. Además se encuentran en algunas membranas intracelulares. Los glucolípidos más complejos, los **gangliósidos**, contienen oligosacáridos con uno o más residuos de ácido siálico, lo que les proporciona una carga neta negativa (Figura 10-12). Los gangliósidos son más abundantes en la membrana plasmática de las células nerviosas, en donde constituyen aproximadamente un 5-10% de la masa lipídica total, aunque también se encuentran en casi todos los tipos celulares en cantidades mucho más reducidas. Hasta el momento se han identificado más de 40 gangliósidos diferentes.

Por ahora no se dispone más que de indicios acerca de cuáles podrían ser las funciones de los glucolípidos. Una posible pista procede de su localización: en la membrana plasmática de las células epiteliales, por ejemplo, los glucolípidos se encuentran confinados en la superficie apical, donde podrían ayudar a proteger la membrana de las condiciones adversas que frecuentemente existen allí (como pH bajo y enzimas degradativas). Los glucolípidos con carga, como los gangliósidos, pueden tener importancia debido a sus efectos eléctricos: su presencia alteraría el campo eléctrico a través de la membrana y la concentración de iones —especialmente Ca^{2+} — en su superficie externa. Los glucolípidos pueden también

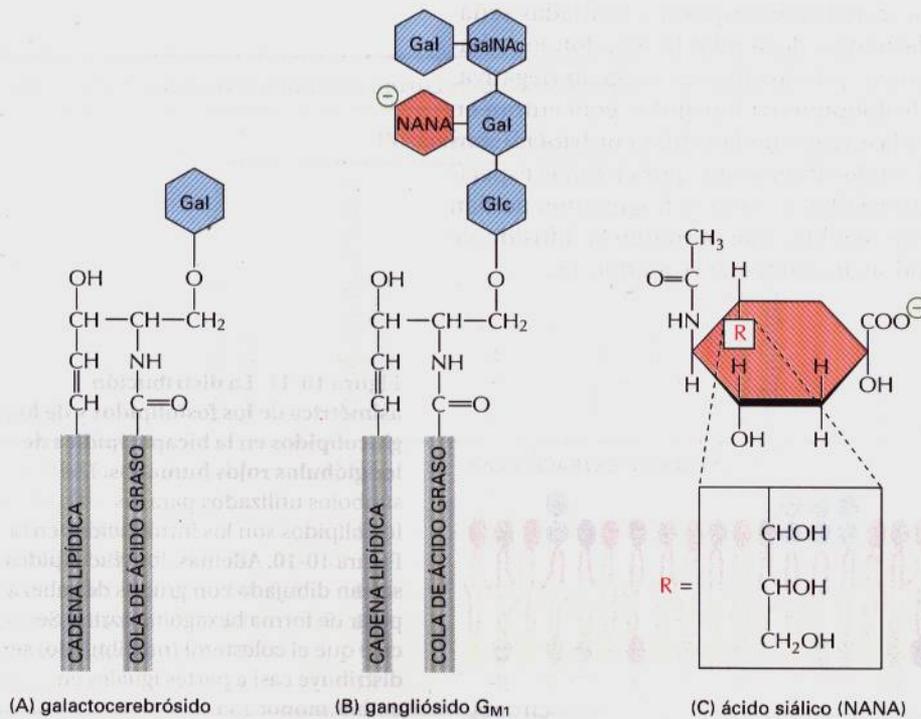


Figura 10-12 Moléculas de glucolípidos. Los galactocerebrósidos (A) son llamados *glucolípidos neutros* porque el azúcar que forma su grupo de cabeza no está cargado. Un gangliósido (B) siempre contiene uno o más residuos de ácido siálico (también llamado ácido *N*-acetilneuramínico o NANA) cargados negativamente, cuya estructura se muestra en (C). Mientras que en bacterias y en plantas casi todos los glucolípidos derivan del glicerol, como la mayoría de fosfolípidos, en las células animales casi siempre se generan a partir de esfingosina, un alcohol amino derivado de la *serina*, como en el caso del fosfolípido esfingomielina (véase Figura 10-10). Gal = galactosa; Glc = glucosa, GalNAc = *N*-acetil galactosamina; estos tres azúcares no están cargados.

desempeñar un papel en el aislamiento eléctrico, ya que se hallan en gran cantidad en la mitad no citoplasmática de la bicapa de la membrana miélnica, que aísla eléctricamente los axones de la célula nerviosa. Además se cree que desempeñan alguna función en los procesos de reconocimiento celular. El gangliósido G_{M1} (véase Figura 10-12), por ejemplo, actúa como receptor de superficie celular para la toxina bacteriana que provoca la diarrea debilitante del cólera. La toxina del cólera únicamente se fija y penetra en aquellas células que tienen G_{M1} en su superficie, incluidas las células del epitelio intestinal. Su ingreso en la célula provoca un incremento prolongado de la concentración intracelular de AMP cíclico (se discute en el Capítulo 15), la cual genera, en el intestino, un gran eflujo de Na^+ y de agua. Aunque la fijación de las toxinas bacterianas no puede ser la función *normal* de los gangliósidos, estas observaciones sugieren que estos glucolípidos también pueden actuar como receptores de moléculas extracelulares habituales. Esta suposición se apoya en la evidencia creciente de que los glucolípidos pueden ayudar a las células a unirse a la matriz extracelular y a otras células, como discutiremos más adelante.

Resumen

Las membranas biológicas están formadas por una doble capa continua de moléculas lipídicas, en la que están inmersas varias proteínas de membrana. Esta bicapa lipídica es fluida, y las distintas moléculas lipídicas pueden difundir rápidamente dentro de su propia monocapa. La mayoría de las moléculas lipídicas, sin embargo, casi nunca realizan de forma espontánea flip-flop de una monocapa a la otra. Las moléculas lipídicas de las membranas son anfipáticas y algunas de ellas (los fosfolípidos), cuando se colocan en agua, se unen espontáneamente entre sí formando bicapas; las bicapas forman compartimientos cerrados que tienen una gran tendencia a volverse a unir si se rompen. Existen tres clases principales de moléculas lipídicas de membrana –los fosfolípidos, el colesterol y los glucolípidos– y la composición lipídica de la monocapa externa es diferente a la de la interna, lo que refleja las diferentes funciones de las dos caras de una membrana celular. En las membranas plasmáticas de los diferentes tipos de células, al igual que en los diversos compartimientos membranosos internos de las células eucariotas, se presentan diferentes mezclas de lípidos. Algunas proteínas unidas a la membrana necesitan lípidos con grupos polares específicos para actuar, lo que al parecer explicaría, al menos en parte, por qué las membranas eucariotas contienen tipos tan diversos de moléculas lipídicas.

Proteínas de membrana⁶

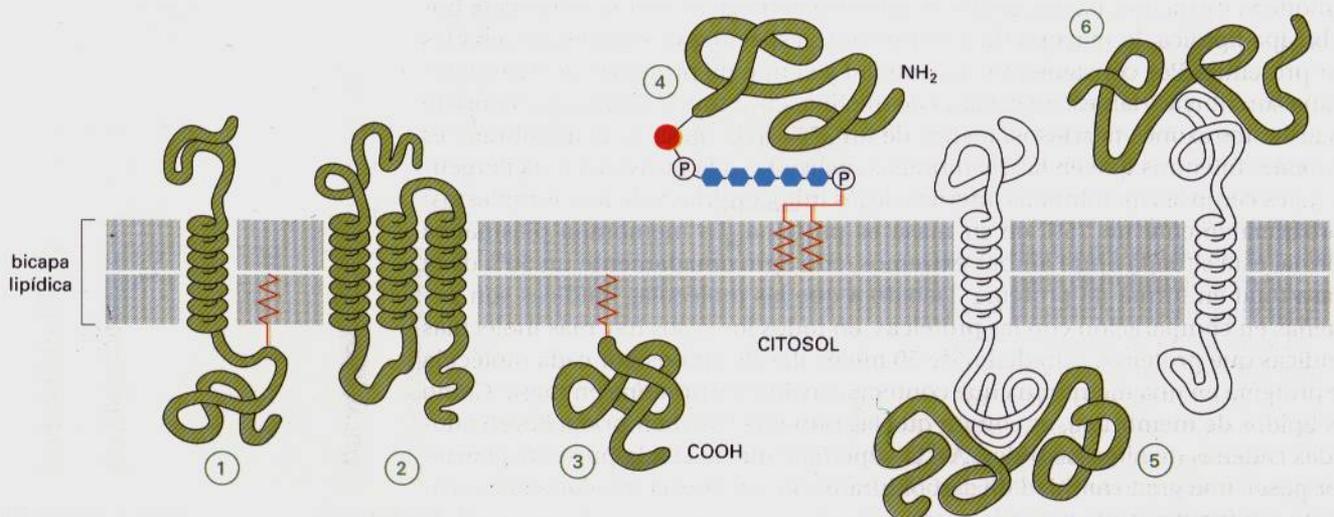
Aunque la estructura básica de las membranas biológicas está determinada por la bicapa lipídica, la mayoría de sus funciones específicas están desempeñadas por proteínas. Por consiguiente, la cantidad y el tipo de proteínas de una membrana son muy variables: en la vaina de mielina, cuya función principal consiste en aislar los axones nerviosos, menos de un 25% de la masa de la membrana es proteína, mientras que en las membranas dedicadas a la transducción energética (tales como las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos) aproximadamente un 75% de su masa es proteína. La membrana plasmática normal está situada entre ambos extremos, con aproximadamente un 50% de la masa total en forma de proteína. Debido a que las moléculas lipídicas son pequeñas en comparación con las proteicas, en todos los casos hay más moléculas lipídicas que proteicas –alrededor de 50 moléculas de lípidos por cada molécula de proteína en una membrana que contenga un 50% de proteína en masa. Como los lípidos de membrana, es común que las proteínas de membrana lleven adosadas cadenas de oligosacáridos. Así la superficie que la célula presenta al exterior posee una gran cantidad de carbohidratos, lo que forma un *glucocáliz* o *cutícula celular* (discutido más adelante).

Las proteínas de membrana pueden estar asociadas a la bicapa lipídica de varias maneras⁷

Las distintas proteínas de membrana están asociadas a las membranas de diferentes maneras, como se ilustra en la Figura 10-13. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica, de forma que parte de su masa se sitúa a cada lado de la membrana (ejemplos 1 y 2 de la Figura 10-13). Como sus vecinas lipídicas, estas **proteínas transmembrana** son anfipáticas, tienen regiones que son hidrofóbicas y regiones hidrofílicas. Las regiones hidrofóbicas se sitúan en el interior de la membrana y se relacionan con las colas hidrofóbicas de las moléculas lipídicas del interior de la bicapa. Las regiones hidrofílicas se hallan expuestas al medio acuoso de ambos lados de la membrana. El carácter hidrofóbico de algunas de estas proteínas aumenta por la unión covalente de una o más cadenas de ácido graso que se encuentran insertadas en la mitad citoplasmática de la bicapa (véase el ejemplo 1 de la Figura 10-13). Otras proteínas de membrana se localizan en el citosol y se asocian con la bicapa tan sólo a través de una o más cadenas de ácidos grasos a las que están unidas covalentemente, o por otro tipo de cadenas lipídicas llamadas *grupos prenil* (véase el ejemplo 3 de la Figura 10-13 y la Figura 10-14). Existen otras proteínas completamente expuestas a la superficie celular externa, ancladas a la bicapa únicamente por medio de una unión covalente (vía un oligosacárido específico) al fosfatidilinositol de la monocapa lipídica externa de la membrana plasmática (véase el ejemplo 4 de la Figura 10-13). Las proteínas unidas a lípidos del ejemplo 3 se han generado como proteínas solubles en el citosol y posteriormente se han trasladado directamente hacia las membranas uniéndolas covalentemente a un grupo lipídico (Figura 10-14). Las proteínas del ejemplo 4, sin embargo, se sintetizan como proteínas transmembrana de "paso único" en el ER; mientras permanecen en el ER, el segmento transmembranoso de la proteína se escinde y se le añade un **glucosilfosfatidilinositol (GPI)**, de glycosylphosphatidylinositol, de forma que la proteína queda unida a la superficie no citoplasmática de la membrana sólo por medio de este anclaje (véase Capítulo 12). Las proteínas que se unen a la membrana con un GPI de anclaje se distinguen fácilmente mediante el uso de la enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, que separa específicamente estas proteínas de sus anclajes, separándolas así de la membrana.

Algunas proteínas que no ocupan totalmente el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica están unidas a una u otra cara de la membrana mediante interacciones no covalentes con otras proteínas de membrana (véanse los ejemplos 5 y 6 de la Figura 10-13). Muchas de ellas pueden ser liberadas de la membrana mediante procedimientos de extracción relativamente suaves, como la exposición a

Figura 10-13 Seis sistemas de asociación de las proteínas con la membrana lipídica. Se cree que la mayoría de proteínas transmembrana atraviesan la bicapa como una hélice α única (1) o en forma de múltiples hélices α (2); algunas de estas proteínas de "paso único" y de "paso múltiple" están unidas covalentemente a cadenas de ácidos grasos insertados en la monocapa citoplasmática (1). Otras proteínas de membrana están unidas a la membrana únicamente a través de su unión covalente a un lípido, como una cadena de ácido graso o un grupo prenil de la monocapa citoplasmática (3) o bien, menos habitualmente, a través de un oligosacárido a un fosfolípido minoritario, el fosfatidilinositol, en la monocapa no citoplasmática (4). Finalmente, muchas proteínas están unidas a la membrana tan sólo mediante interacciones no covalentes con otras proteínas de membrana (5) y (6). En la Figura 10-14 se ilustra cómo se forma la estructura de (3). Los detalles de estos diversos sistemas a través de los cuales las proteínas de membrana se asocian con la bicapa lipídica, se discuten en el Capítulo 12.



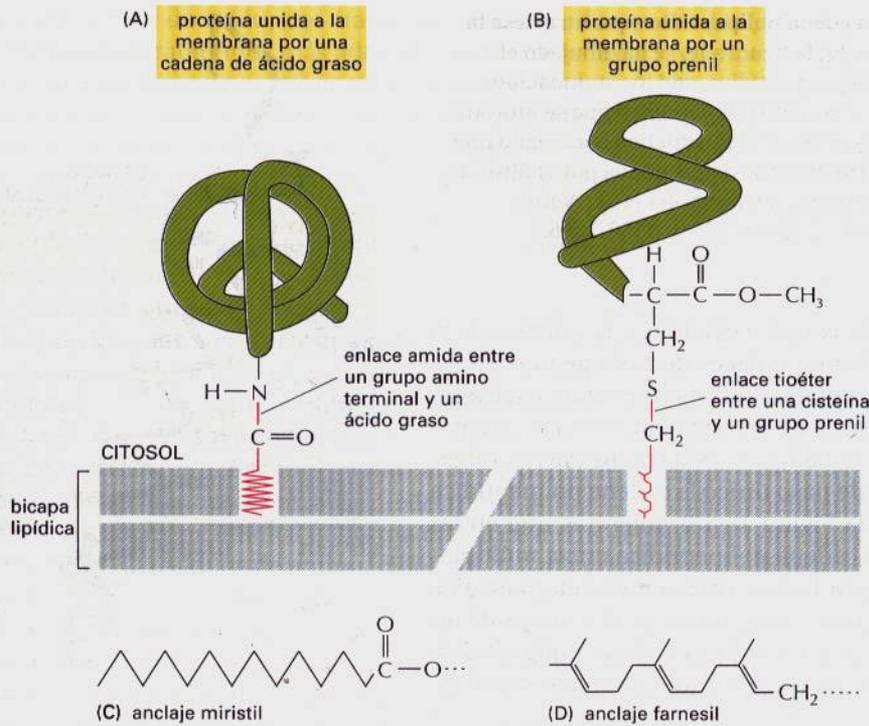


Figura 10-14 La unión covalente de cualquiera de los dos tipos de grupos lipídicos puede ayudar a localizar una proteína soluble dentro de una membrana, después de su síntesis en el citosol. (A) Una cadena de ácido graso (mirístico o palmítico) se une a un grupo amino terminal de una glicina por medio de un enlace amida. (B) Un grupo prenil (sea farnesil o un grupo geranilgeranil más largo –ambos relacionados con el colesterol) se halla unido, mediante un enlace tioéter, a un residuo cisteína situado a cuatro residuos del carboxilo terminal. Tras esta prenilación, los tres aminoácidos terminales son separados de la cadena y el nuevo carboxilo terminal se metila antes de ser insertado en la membrana. Las estructuras de los dos lípidos que sirven de anclaje, se ilustran en la parte inferior: (C) un anclaje miristil (una cadena de ácido graso saturado de 14 carbonos), y (D) un anclaje farnesil (una cadena hidrocarbonada insaturada de 15 carbonos).

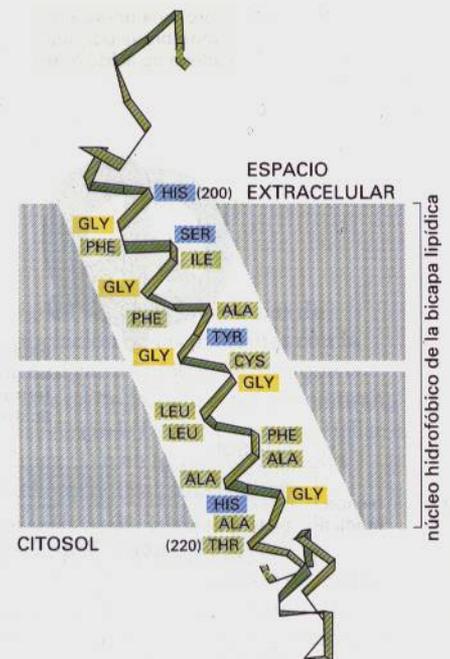
soluciones de muy alta o baja fuerza iónica o de pH extremo, que interfieren con las interacciones proteicas pero mantienen intacta la bicapa lipídica. De manera operacional a estas proteínas se les denomina **proteínas periféricas de membrana**. Por el contrario las proteínas transmembrana, varias proteínas unidas a la bicapa por cadenas de ácidos grasos y algunas otras proteínas íntimamente unidas a la membrana, no pueden ser liberadas por estos métodos, por lo que se les denomina **proteínas integrales de membrana**.

Habitualmente la manera en que una proteína se asocia a la bicapa lipídica es un indicativo de la función de la proteína. Así, sólo las proteínas transmembrana pueden actuar en ambos lados de la bicapa o transportar moléculas a través de ella. Algunos receptores celulares de superficie, por ejemplo, son proteínas transmembrana que se unen a las moléculas señal en el espacio extracelular y generan diferentes señales intracelulares en el lado opuesto de la membrana plasmática. Por el contrario, las proteínas que sólo actúan en un lado de la bicapa lipídica, generalmente están asociadas con la monocapa lipídica o con el dominio proteico de aquel lado de la membrana. Por ejemplo, un grupo de proteínas relacionadas con la señalización intracelular están unidas a la cara citosólica de la membrana plasmática por uno o más grupos lipídicos a los que están covalentemente unidas.

Se considera que, en la mayoría de proteínas transmembrana, las regiones de la cadena polipeptídica que cruzan la bicapa lipídica presentan una conformación en hélice α ^{6,8}

Una proteína transmembrana se orienta siempre en un único sentido dentro de la membrana. Este hecho refleja tanto la asimetría del sistema mediante el cual la proteína se ha sintetizado e insertado en la bicapa lipídica en el ER, como la diferencia entre las funciones que desempeñan los dominios citoplasmático y no citoplasmático de la proteína. Estos dominios están separados por segmentos de la cadena polipeptídica que atraviesan la membrana, se hallan en contacto con el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica y están compuestos, en gran parte, por residuos de aminoácidos de cadena lateral no polar. Debido a que las uniones peptídicas son en sí mismas polares y dado que el agua no está presente

Figura 10-15 Un segmento de una cadena polipeptídica que atraviesa la bicapa lipídica en forma de hélice α . En la figura sólo se ha dibujado el esqueleto del carbono α de la cadena polipeptídica, con los aminoácidos hidrofóbicos en verde y amarillo. El segmento polipeptídico que se muestra en la figura es una parte del centro de reacción fotosintético bacteriano que se ilustra en la Figura 10-33, cuya estructura fue determinada por análisis de difracción de rayos X. (Basado en datos de J. Deisenhofer et al., *Nature* 318:618-624, 1985, y de H. Michel et al., *EMBO J.* 5:1149-1158, 1986.)



en este ambiente, todas las uniones peptídicas pertenecientes a la porción de la cadena embebida en la bicapa tienden a formar enlaces de hidrógeno entre sí. Este tipo de uniones se maximiza si la cadena polipeptídica forma una hélice α regular al cruzar la bicapa; se cree que la mayoría de los segmentos de las cadenas polipeptídicas que atraviesan la membrana se hallan en esta conformación (Figura 10-15): en las **proteínas transmembrana de paso único** la cadena polipeptídica cruza una sola vez (véase el ejemplo 1 de la Figura 10-13), mientras que en las **proteínas transmembrana de multipaso** la cadena polipeptídica cruza múltiples veces la bicapa (véase el ejemplo 2 de la Figura 10-13). Una manera alternativa de que las uniones peptídicas puedan satisfacer sus requerimientos de enlaces de hidrógeno es que las múltiples hebras transmembrana de la cadena polipeptídica se dispongan en lámina β formando un "barril cerrado" (denominado *barril β*).

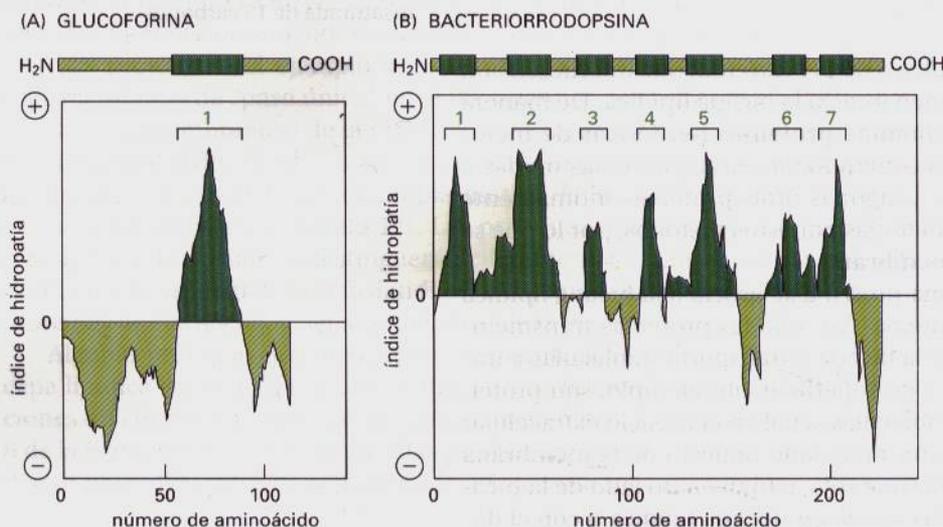


Figura 10-16 Localización en una cadena polipeptídica, mediante el uso de gráficos de hidropatía, de potenciales segmentos en hélice α que atraviesan la membrana. La energía libre necesaria para transferir segmentos sucesivos de una cadena polipeptídica de un solvente no polar al agua se calcula a partir de la composición aminoacídica de cada segmento usando los datos de un modelo de componentes. Estos cálculos se realizan para segmentos de un tamaño fijo, (usualmente alrededor de 10 residuos de aminoácidos), comenzando con cada aminoácido sucesivo de la cadena. El "índice de hidropatía" del segmento se esquematiza en el eje Y como función de su localización en la cadena. Un valor positivo indica que se necesita energía libre para la transferencia hacia el agua (es decir, que el segmento es hidrofóbico) y el valor asignado es un índice de la cantidad de energía que se necesita. Los picos del índice de hidropatía aparecen en la posición de los segmentos hidrofóbicos de la secuencia de aminoácidos. Se ilustran dos ejemplos de las proteínas de membrana que se discuten posteriormente en este capítulo: (A) la glucoforina tiene un único segmento que atraviesa la membrana en hélice α y un pico correspondiente en el test de hidropatía; (B) la bacteriorrodopsina tiene siete segmentos que atraviesan la membrana en hélice α y siete picos correspondientes en el gráfico de hidropatía. (Adaptado de D. Eisenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-624, 1984.)

Esta estructura de multipaso transmembrana se observa en las *porinas*, unas proteínas que trataremos más adelante. La fuerte tendencia a formar el máximo número de enlaces de hidrógeno en ausencia del agua también implica que probablemente la cadena polipeptídica que entra en la bicapa la atraviesa completamente antes de cambiar de dirección, ya que la curvatura de la cadena supondría una disminución de las interacciones regulares de enlaces de hidrógeno. Probablemente por esta razón es por lo que todavía no se ha establecido ningún ejemplo de una proteína de membrana cuya cadena polipeptídica atravesase tan sólo parcialmente la bicapa lipídica.

Como es muy difícil lograr que las proteínas transmembrana cristalicen, sólo unas cuantas han sido estudiadas en su totalidad por cristalografía de rayos X (discutida más adelante); pero de todas las demás proteínas transmembrana conocemos las estructuras tridimensionales plegadas. Las técnicas de clonaje y secuenciación del DNA, sin embargo, han revelado las secuencias de aminoácidos de muchas proteínas transmembrana, y a partir de un análisis de la secuencia proteica a menudo es posible predecir qué partes de la cadena polipeptídica atraviesan la bicapa lipídica en forma de hélice α . Los segmentos que contienen cerca de 20-30 residuos de aminoácidos con un alto grado de hidrofobicidad son bastante largos para atravesar la membrana de esta manera y a menudo pueden ser identificados por medio de un *test de hidropatía* (Figura 10-16). Como son suficientes 10 o menos residuos para atravesar una bicapa lipídica a modo de una hebra β extendida, la misma estrategia se usa para identificar los segmentos que atraviesan la membrana formando un barril β .

La gran mayoría de las proteínas transmembrana se hallan glucosiladas. En el caso de los glucolípidos, los residuos de azúcar se añaden en la luz del retículo endoplasmático y en la del complejo de Golgi (véanse Capítulos 12 y 13) por lo que las cadenas de oligosacárido se hallan siempre en el lado no citoplasmático de la membrana. Otro tipo de asimetría resulta del característico ambiente reductor del citosol, que impide la formación de enlaces disulfuro (S—S) inter o intracatenarios entre los residuos cisteína del dominio citosólico. Estos enlaces se forman en el lado no citosólico de la membrana, donde pueden tener un papel importante estabilizando la estructura plegada de la cadena polipeptídica (Figura 10-17) o bien asociando la cadena con otras cadenas polipeptídicas.

Las proteínas de membrana pueden solubilizarse y purificarse mediante detergentes⁹

En general, las proteínas transmembrana (y también algunas otras proteínas fuertemente unidas a la membrana) pueden ser solubilizadas únicamente por medio de agentes que rompan las asociaciones hidrofóbicas y destruyan la bicapa lipídica. De entre estos compuestos que alteran las propiedades bioquímicas de la membrana, los más útiles son los **detergentes**, pequeñas moléculas anfipáticas que tienden a formar micelas en el agua (Figura 10-18). Al mezclarlos con las membranas, los extremos hidrofóbicos de las moléculas de detergente se unen a las regiones hidrofóbicas de la zona externa de las proteínas de membrana, desplazando así las moléculas lipídicas. Puesto que el otro extremo de la molécula de detergente es polar, la unión detergente-proteína tiende a disolver en agua a las proteínas de membrana (a pesar de que algunas moléculas lipídicas intensamente asociadas a las proteínas quedan unidas a estos complejos; véase Figura 10-19). Los extremos polares (hidrofilicos) de los detergentes pueden estar cargados (ser iónicos) como en el caso del *dodecil sulfato sódico* (SDS, de Sodium Dodecyl Sulfate) o no cargados (ser no iónicos) como en el caso de los detergentes de tipo *Tritón*. En la Figura 10-20 se presenta la estructura de estos detergentes de uso común.

Con detergentes iónicos fuertes como el SDS, pueden solubilizarse incluso las proteínas de membrana más hidrofóbicas, lo cual permite su análisis mediante *electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS* (véase Capítulo 4), un procedimiento que ha revolucionado el estudio de las proteínas de membrana. Al

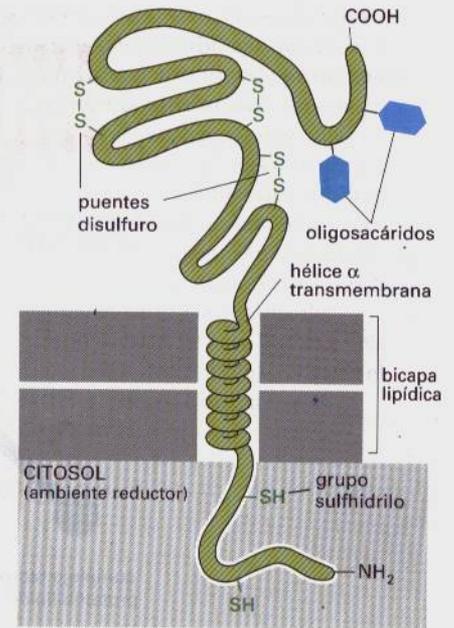


Figura 10-17 Una típica proteína transmembrana de "paso único". Nótese que la cadena polipeptídica atraviesa la bicapa lipídica en forma de hélice α dextrógira y que tanto las cadenas de oligosacárido como los enlaces disulfuro se hallan en la superficie no citosólica de la membrana. No se forman enlaces disulfuro entre los grupos sulfhidrilo localizados en el dominio citoplasmático de la proteína, debido a que el ambiente reductor del citosol mantiene estos grupos en su forma reducida (-SH).

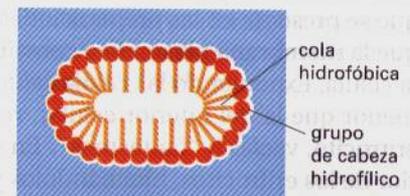


Figura 10-18 Micela de detergente en el agua, vista en sección transversal. Las moléculas de detergente son anfipáticas debido a que tienen un extremo polar y otro extremo no polar.

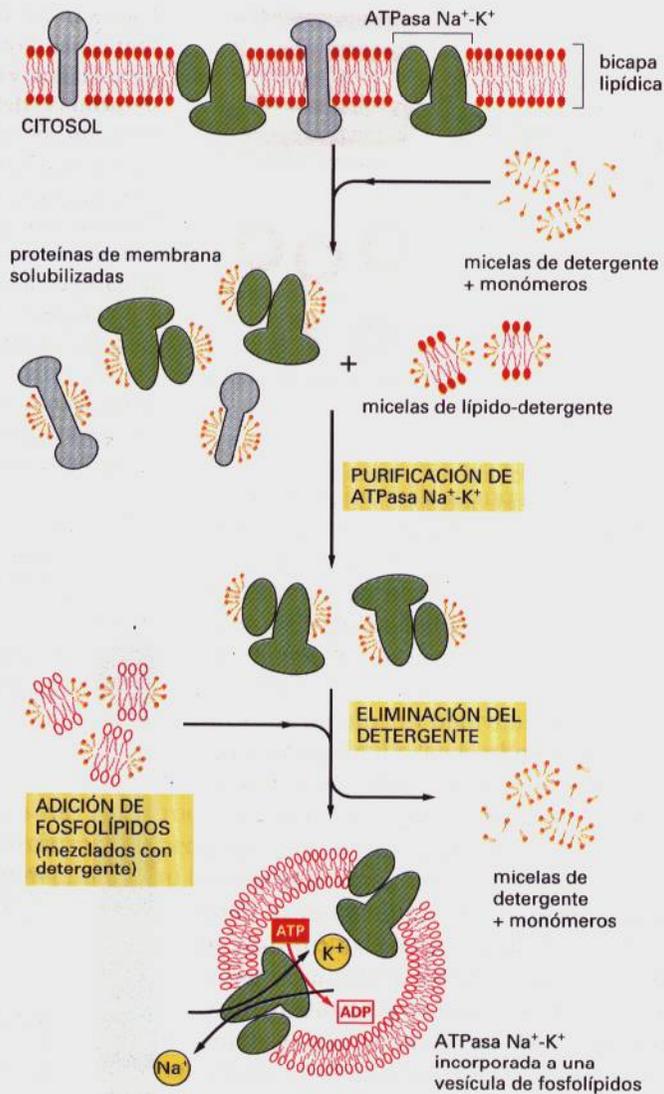


Figura 10-21 Uso de detergentes suaves para solubilizar, purificar y reconstituir sistemas de proteínas de membrana funcionales. En este ejemplo se purifican moléculas funcionales de la ATPasa Na⁺-K⁺ y se incorporan a vesículas de fosfolípidos. La ATPasa Na⁺-K⁺ es una bomba iónica que se halla presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células animales; utiliza la energía de hidrólisis del ATP para bombear Na⁺ hacia fuera de la célula y K⁺ hacia el interior, como se discute en el Capítulo 11.

das *invertidas* (Figura 10-23), es posible estudiar por separado los lados externo e interno (citoplasmático) de la membrana. El uso de los fantasmas de eritrocito soldados y no soldados hizo posible demostrar por primera vez que algunas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica (véase más adelante) y que la composición lipídica de las dos mitades de la bicapa es diferente. Estos hechos, al igual que muchos principios básicos demostrados inicialmente en membranas de eritrocito, se han generalizado a las membranas de las células nucleadas.



Figura 10-22 Electronmicrografía de barrido de eritrocitos humanos. Las células tienen una forma bicóncava y carecen de núcleo. (Por cortesía de Bernadette Chailley.)

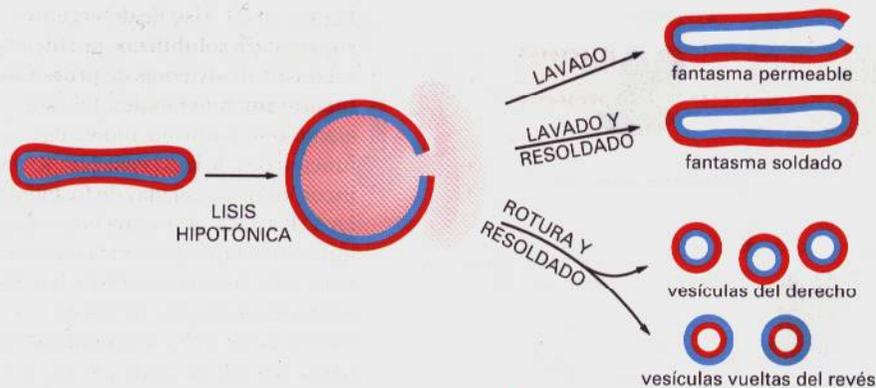


Figura 10-23 Preparación de fantasmas de eritrocito, soldados y no soldados, y de vesículas “del derecho” y “del revés”. Tal como se ha indicado, los eritrocitos se rompen en un único punto, produciendo fantasmas con un solo agujero. Las vesículas más pequeñas se producen rompiendo mecánicamente los fantasmas; la orientación de la membrana en estas vesículas puede ser tanto con la cara exterior original hacia el exterior o vuelta del revés, dependiendo de las condiciones iónicas utilizadas durante el procedimiento de rotura.

La “orientación” de una proteína de membrana puede determinarse de varias maneras. Una de ellas consiste en utilizar un reactivo marcador (por ejemplo, uno que contenga una marca radiactiva o fluorescente) que se una covalentemente, y que sea soluble en agua, es decir, que no pueda penetrar en la bicapa, por lo que sólo se unirá a grupos específicos del lado asequible de la membrana. A continuación, se solubilizan las membranas con un detergente, se separan las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Las proteínas marcadas se detectan ya sea por su radiactividad (mediante autorradiografía sobre gel) o por su fluorescencia (exponiendo el gel a luz ultravioleta). Utilizando este sistema de *marcaje vectorial* es posible determinar cómo se halla orientada una proteína de membrana en dicha membrana, detectada como una banda sobre el gel: por ejemplo, si se marca tanto desde el lado externo (cuando se marcan células intactas o fantasmas con la membrana soldada) como desde el lado interno (citoplasmático, cuando se marcan vesículas invertidas), debe tratarse de una proteína transmembrana. Una vía alternativa a ésta consiste en exponer tanto la superficie externa como la superficie interna a enzimas proteolíticas que no atraviesen la membrana: si una proteína queda parcialmente digerida por este tratamiento de ambas superficies, debe tratarse de una proteína transmembrana. Además, para determinar si una zona específica de una proteína transmembrana está expuesta a un lado u otro de la membrana, se pueden utilizar anticuerpos marcados que se unen únicamente a una determinada región de la proteína.

Al estudiar las proteínas de la membrana plasmática del glóbulo rojo humano mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se detectan aproximadamente 15 bandas proteicas principales, cuyos pesos moleculares oscilan entre 15 000 y 250 000. Tres de estas proteínas –la *espectrina*, la *glucoforina* y la *banda 3*– constituyen más del 60% (en peso) de la proteína total de la membrana (Figura 10-24). Cada una de estas tres proteínas está dispuesta en la membrana de diferente manera. Por ello las utilizaremos como ejemplo de las tres maneras principales conocidas en que las proteínas se asocian con las membranas, no sólo en los glóbulos rojos, sino también en otros tipos celulares.

La espectrina es una proteína del citoesqueleto asociada no covalentemente a la cara citoplasmática de la membrana del eritrocito¹¹

Muchas de las moléculas de proteína asociadas con la membrana del eritrocito humano son proteínas periféricas de membrana asociadas con el lado citoplasmático de la bicapa lipídica. La más abundante de estas proteínas es la **espectrina**, una barra larga, delgada y flexible, de aproximadamente 100 nm de longitud, que constituye aproximadamente el 25% de la masa total de las proteínas asociadas a la membrana (unas $2,5 \times 10^5$ copias por célula). Constituye el principal componente del entramado proteico (el *citoesqueleto*) que se extiende por el in-

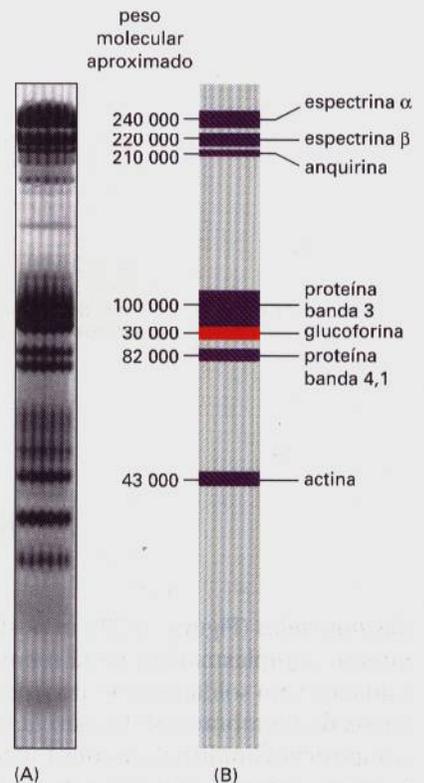
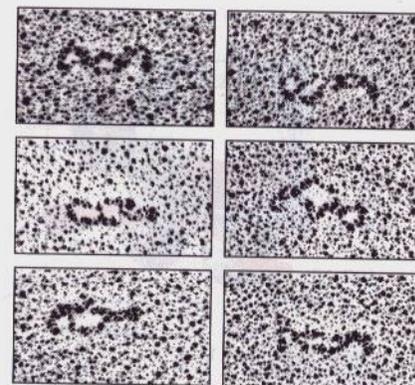
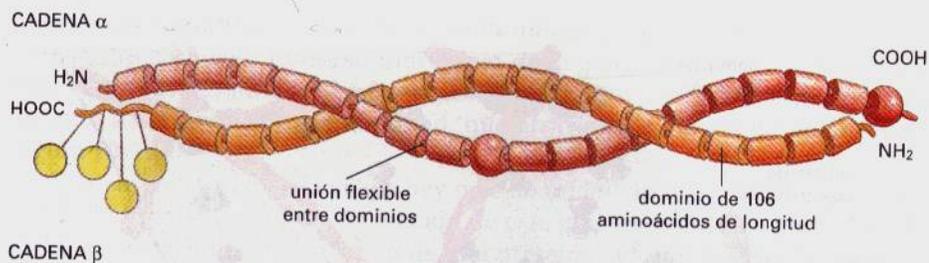


Figura 10-24 Patrón de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las proteínas de la membrana de glóbulos rojos humanos. El gel en (A) está teñido con azul de Coomassie. El dibujo (B) indica la posición en el gel de algunas de las proteínas mayoritarias; la glucoforina se muestra en color rojo para distinguirla de la proteína banda 3. En el dibujo se han omitido otras bandas del gel. La gran cantidad de carbohidratos de las moléculas de glucoforina retarda su migración, por lo que se desplazan casi tan lentamente como las moléculas de la proteína banda 3, que son mucho mayores. (A, por cortesía de Ted Steck.)



CADENA β

(A)

Figura 10-25 Moléculas de espectrina de eritrocitos humanos. La proteína está dibujada esquemáticamente en (A) y tal como se ve al microscopio electrónico en (B). Cada heterodímero de espectrina consiste en dos cadenas polipeptídicas antiparalelas, flexibles y ligeramente entrelazadas, llamadas α y β , que se unen entre sí mediante múltiples enlaces no covalentes que se presentan incluso en ambos extremos. A la izquierda está el extremo "cabeza" fosforilado, donde se asocian dos dímeros, formando un tetrámero. Tanto la cadena α como la cadena β están compuestas principalmente de dominios repetidos de 106 aminoácidos de longitud. En (B) las moléculas de espectrina se han sombreado con platino. (A, adaptado de D.W. Speicher y V.T. Marchesi, *Nature* 311:177-180, 1984; B, por cortesía de D.M. Shotton, con permiso de D.M. Shotton, B.E. Burke y D. Branton, *J. Mol. Biol.* 131:303-329, 1979, © Academic Press Inc. [London] Ltd.)

(B)

100 nm

terior de la membrana celular del eritrocito, manteniendo la integridad estructural y la forma bicóncava de su membrana (véase Figura 10-22): si se extrae el citoesqueleto de los fantasmas de eritrocito en soluciones de baja fuerza iónica, la membrana se fragmenta formando pequeñas vesículas.

La espectrina es un heterodímero formado por dos grandes subunidades estructuralmente similares (Figura 10-25). Los heterodímeros se autoasocian cabeza con cabeza, formando tetrámeros de 200 nm de largo. Las colas de cinco o seis tetrámeros se enlazan entre sí mediante su unión a filamentos cortos de actina y a otras proteínas citoesqueléticas (entre ellas, la *proteína banda 4,1*) formando un "complejo de unión". El resultado final es una red deformable que se extiende por toda la superficie citoplasmática de la membrana (véase Figura 10-26). Este citoesqueleto basado en la espectrina permite al eritrocito resistir el estrés que sufre su membrana a medida que es empujado a través de los estrechos capilares. R ratones y humanos que poseen anomalías genéticas en la espectrina, presentan anemia y sus glóbulos rojos son esféricos (en lugar de cóncavos) y anormalmente frágiles; la severidad de la anemia se incrementa con el grado de deficiencia de la espectrina.

La proteína que es la principal responsable de sujetar el citoesqueleto de espectrina a la membrana plasmática del eritrocito se identificó mediante la unión de espectrina marcada radiactivamente a membranas de glóbulos rojos de las que se habían retirado espectrina y otras proteínas periféricas. Estos experimentos demostraron que la unión de la espectrina depende de una gran proteína intracelular de unión llamada **anquirina**, que se une tanto a la espectrina como al dominio citoplasmático de la proteína transmembrana banda 3 (véase Figura 10-26). La anquirina conecta algunas moléculas de la proteína banda 3 a la espectrina, uniendo así la red de espectrina a la membrana; también reduce notablemente la velocidad de difusión de las moléculas de banda 3 en la bicapa lipídica. El citoesqueleto de espectrina también se une a la membrana a través de otro mecanismo que depende de la proteína banda 4,1 mencionada con anterioridad. Esta proteína, que se une a la espectrina y a la actina, también se une al dominio citoplasmático de la proteína banda 3 y a la *glucoforina*, la otra proteína transmembrana mayoritaria en los eritrocitos.

Por debajo de la membrana plasmática de las células nucleadas existe una red de citoesqueleto análoga a la descrita, pero mucho más elaborada y complicada. Esta red, que constituye la región cortical (o *córtex*) del citoplasma, es rica

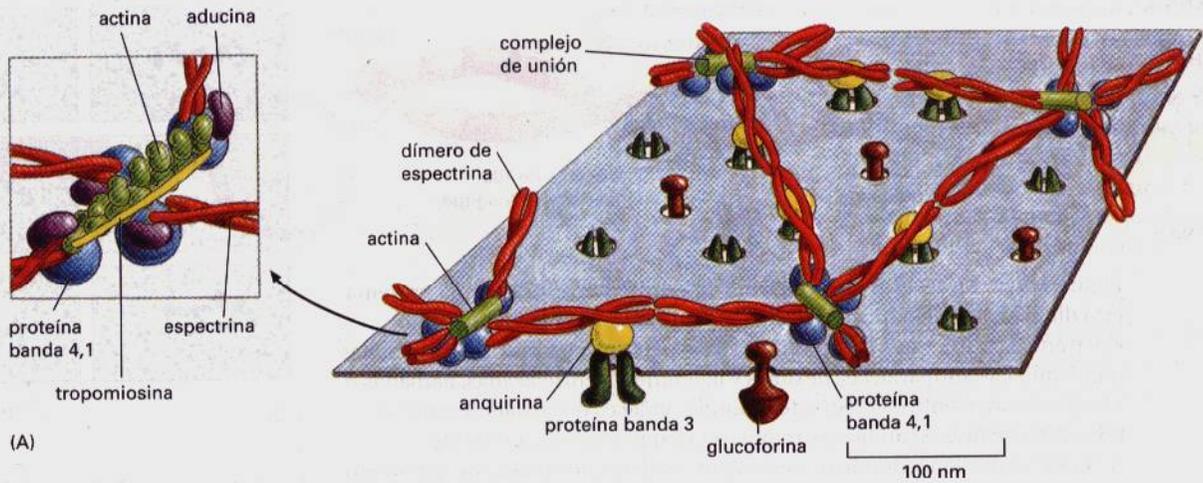
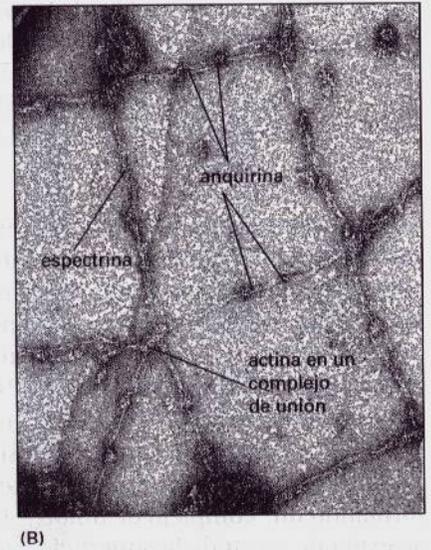


Figura 10-26 El citoesqueleto basado en la espectrina del lado citoplasmático de la membrana del eritrocito humano. Dibujo esquemático (A) y electronmicrografía (B). La disposición que se muestra en (A) se ha deducido principalmente a partir de estudios sobre las interacciones *in vitro* de proteínas purificadas. Los dímeros de espectrina asociados cabeza-con-cabeza forman tetrámeros que se hallan unidos formando una red por medio de complejos de unión compuestos de cortos filamentos de actina (que contienen unos 13 monómeros de actina), tropomiosina que probablemente determina la longitud de los filamentos de actina, proteína banda 4,1 y aducina (aumentado en la casilla de la izquierda). El citoesqueleto está unido a la membrana mediante la unión indirecta de los tetrámeros de espectrina a algunas proteínas banda 3, a través de moléculas de anquirina y también por medio de la unión de la proteína banda 4,1 a la glucoforina (no se muestra). La electronmicrografía de (B) muestra el citoesqueleto de la cara citoplasmática de la membrana del eritrocito después de su fijación y tinción negativa. La red de espectrina se ha estirado a propósito para permitir observar los detalles de su estructura; en la célula normal, la trama mostrada debe ocupar únicamente una décima parte de esta área. (B, por cortesía de T. Byers y D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6153-6157, 1985.)



en filamentos de actina que al parecer se unen a la membrana plasmática de numerosas maneras. En el córtex de células nucleadas también existen proteínas estructuralmente homólogas a la espectrina, a la anquirina y a la proteína banda 4,1, pero su organización y función no son tan conocidas como lo son en los eritrocitos. El citoesqueleto cortical de células nucleadas y su interacción con la membrana plasmática se discuten en el Capítulo 16.

La glucoforina atraviesa la bicapa lipídica del glóbulo rojo, formando una hélice α sencilla¹⁰

La **glucoforina** es una de las dos proteínas mayoritarias que se hallan expuestas en la superficie externa del glóbulo rojo humano y fue la primera proteína de membrana de la que se pudo determinar su secuencia completa de aminoácidos. Como la proteína modelo transmembrana de la Figura 10-17, la glucoforina es una pequeña glucoproteína transmembrana (131 residuos de aminoácido) de paso único que se halla colocada con la mayoría de su masa en la superficie externa de la membrana, donde se localiza su cola amino terminal hidrofílica. En esta zona de la proteína se hallan unidos todos los carbohidratos (aproximadamente unos 100 residuos de azúcar distribuidos en 16 cadenas laterales distintas de oligosacáridos), que representan el 60% de la masa total de la molécula. De hecho, la gran mayoría del total de carbohidratos de superficie del eritrocito (incluyendo más del 90% del ácido siálico, y por lo tanto la mayor parte de la carga

negativa de superficie de la célula) están unidos a moléculas de glucoforina. El extremo carboxilo terminal hidrofílico de la glucoforina está expuesto hacia el citoplasma, mientras que existe un segmento α -helicoidal hidrofóbico de unos 23 aminoácidos de longitud, que atraviesa la bicapa no polar (véase Figura 10-16A).

A pesar de que en cada célula hay más de un millón de moléculas de glucoforina, todavía se desconoce la función de esta glucoproteína. De hecho, los individuos cuyos eritrocitos carecen de esta proteína parecen estar perfectamente sanos. Aunque la glucoforina es exclusiva de los glóbulos rojos, su estructura es representativa de una clase frecuente de proteínas de membrana que atraviesan la bicapa lipídica en forma de hélice α . Por ejemplo, muchos receptores de superficie pertenecen a esta clase de proteínas.

La banda 3 de la membrana celular del eritrocito es una proteína de membrana multipaso que cataliza el cotransporte aniónico¹²

A diferencia de lo que sucede con la glucoforina, se sabe que la **proteína banda 3** desempeña un papel importante en la función de la célula. Su nombre deriva de la posición relativa que ocupa respecto a las otras proteínas de membrana en una electroforesis en gel de poliácridamida con SDS (véase Figura 10-24). Como la glucoforina, la banda 3 es una proteína transmembrana, pero de múltiple paso, que atraviesa la membrana en una conformación altamente plegada: al parecer la cadena polipeptídica (aproximadamente 930 residuos de aminoácido de longitud) atraviesa la bicapa hasta 14 veces. Cada glóbulo rojo contiene aproximadamente 10^6 cadenas polipeptídicas banda 3, que forman dímeros en la membrana.

La principal función de los glóbulos rojos es la de transportar O_2 desde los pulmones hasta los tejidos y ayudar al transporte de CO_2 desde los tejidos hasta los pulmones. La proteína banda 3 es de importancia crucial en la segunda de estas funciones. El CO_2 es sólo levemente soluble en agua y por ello es transportado por el plasma sanguíneo en forma de bicarbonato (HCO_3^-), que se forma y se rompe dentro de los glóbulos rojos por una enzima que cataliza la reacción $H_2O + CO_2 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$. La proteína banda 3 actúa como un *transportador de aniones*, que permite que el HCO_3^- cruce la membrana intercambiándose con Cl^- . Al hacer que la membrana del eritrocito sea libremente permeable al HCO_3^- , este transportador incrementa la cantidad de CO_2 que la sangre puede llevar hasta los pulmones.

Tras aplicar la técnica de la **criofractura** (por la cual las células son congeladas en nitrógeno líquido y el bloque resultante de hielo se fractura con una cuchilla) pueden verse al microscopio electrónico las proteínas banda 3 como *par-*

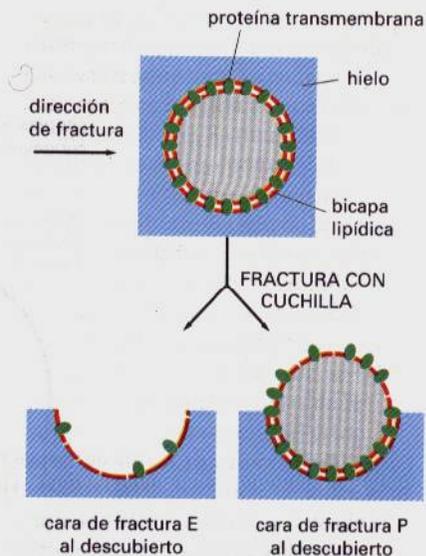


Figura 10-27 Electronmicrografía obtenida tras criofractura. El dibujo muestra cómo esta técnica ofrece imágenes del interior hidrofóbico de la mitad citoplasmática (o protoplasmática) de la bicapa (denominada cara P) y de la mitad externa de la bicapa (denominada cara E). Después del proceso de criofractura ilustrado aquí, las caras de fractura se metalizan con platino y carbón, por digestión se elimina el material orgánico y la réplica de platino resultante se observa al microscopio electrónico (véase también Figura 4-27).

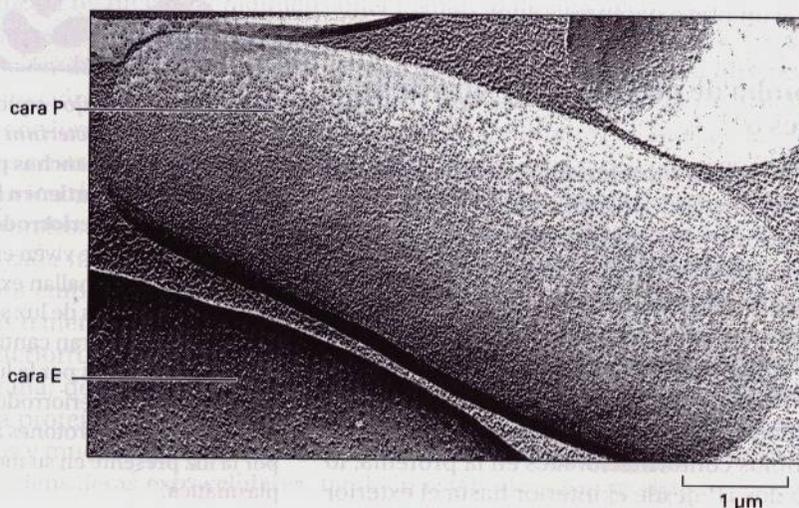


Figura 10-28 Electronmicrografía de criofractura de glóbulos rojos humanos. Obsérvese que la densidad de las partículas intramembrana es superior en la cara protoplasmática (P) que en la cara externa (E). (Por cortesía de L. Engstrom y D. Branton.)

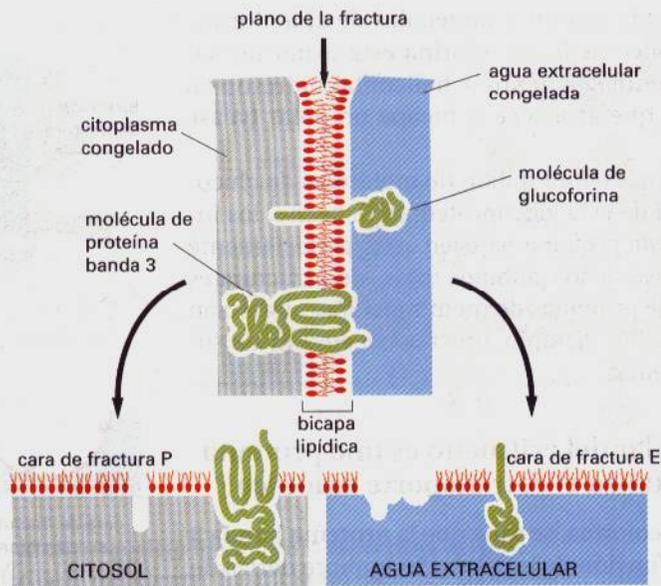


Figura 10-29 Probables destinos de las moléculas de glucoforina y de la proteína banda 3 de la membrana del eritrocito durante la criofractura.

Cuando la bicapa lipídica se parte, o la mitad interior o la mitad exterior de cada proteína transmembrana es extraída de la monocapa congelada a la que está asociada; la proteína tiende a permanecer en la monocapa en la que se halla la mayor parte de su volumen. Por esta razón, las moléculas de la proteína banda 3 normalmente quedan asociadas a la cara de fractura interna (P); puesto que tienen suficiente masa por encima del plano de fractura, pueden observarse como partículas intramembrana. Normalmente las moléculas de glucoforina permanecen unidas a la cara de fractura exterior (E), pero se cree que sus colas citoplasmáticas tienen una masa insuficiente para que sean vistas.

tículas intramembrana diferenciadas. El plano de la fractura tiende a pasar a través de la mitad hidrofóbica de los lípidos de la membrana, separando las membranas en sus dos monocapas (Figura 10-27). Las *caras de fractura* expuestas se metalizan con platino, y la réplica de platino resultante se observa al microscopio electrónico. Cuando se estudian de esta manera, las membranas celulares de los eritrocitos humanos aparecen salpicadas de partículas intermembrana de tamaño relativamente homogéneo (7,5 nm de diámetro) y distribuidas al azar (Figura 10-28). Se cree que estas partículas son principalmente moléculas de banda 3: cuando se reconstituyen bicapas lipídicas sintéticas con moléculas de proteína banda 3 y las bicapas se fracturan, se observan estas típicas partículas intermembrana de 7,5 nm. La Figura 10-29 ilustra la razón por la que por criofractura de membranas celulares de glóbulos rojos se observan las moléculas de banda 3 pero probablemente no las moléculas de glucoforina.

En el Capítulo 11 se considera cómo una proteína transmembrana como la banda 3 puede, en principio, permitir el transporte pasivo de moléculas polares a través de la bicapa no polar. Pero para un detallado conocimiento de cómo funciona realmente una proteína transportadora se necesita la información exacta sobre su disposición tridimensional en la bicapa. La primera proteína de transporte en la membrana plasmática de la que se conocieron estos detalles es una proteína denominada *bacteriorrodopsina*, que en la membrana plasmática de ciertas bacterias actúa como una bomba de protones (H^+) activada por la luz. La estructura de la bacteriorrodopsina es similar a la de muchas otras proteínas de membrana y merece que se le dedique un breve paréntesis aquí.

La bacteriorrodopsina es una bomba de protones que atraviesa la bicapa en forma de siete hélices α ¹³

La "membrana púrpura" de la bacteria *Halobacterium halobium* es una mancha especializada de la membrana plasmática que contiene un único tipo de molécula proteica, la **bacteriorrodopsina** (Figura 10-30). Cada molécula de bacteriorrodopsina contiene un único grupo que absorbe la luz, o cromóforo (denominado *retinal*), que da a la proteína su color púrpura; el retinal está relacionado con la vitamina A y es idéntico al cromóforo encontrado en la rodopsina del bastoncito retiniano de los vertebrados (se discute en el Capítulo 15). El retinal está unido covalentemente a un residuo de lisina de la proteína; cuando es activado por un fotón de luz, el cromóforo excitado cambia inmediatamente de forma provocando una serie de pequeños cambios conformacionales en la proteína, lo que da lugar a la transferencia de uno o dos H^+ desde el interior hasta el exterior



Figura 10-30 Dibujo esquemático de la bacteria *Halobacterium halobium* que muestra las manchas púrpura de membrana que contienen las moléculas de bacteriorrodopsina.

Estas bacterias, que viven en aguas salobres donde se hallan expuestas a grandes cantidades de luz solar, han desarrollado una gran cantidad de proteínas activadas por la luz, incluyendo la bacteriorrodopsina que es una bomba de protones activada por la luz presente en su membrana plasmática.

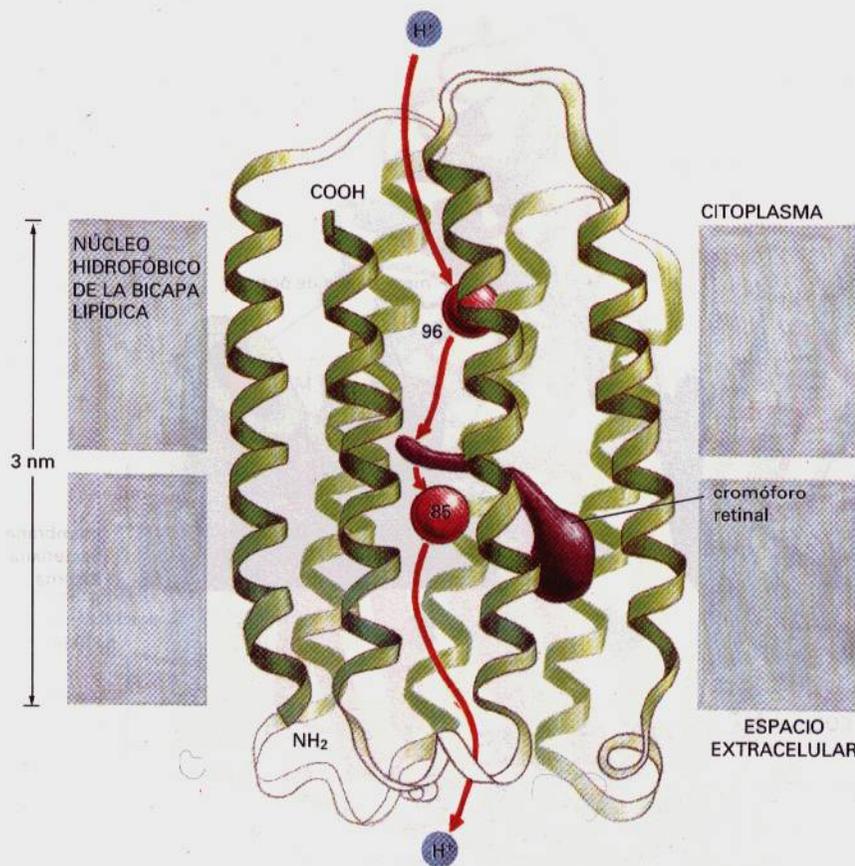
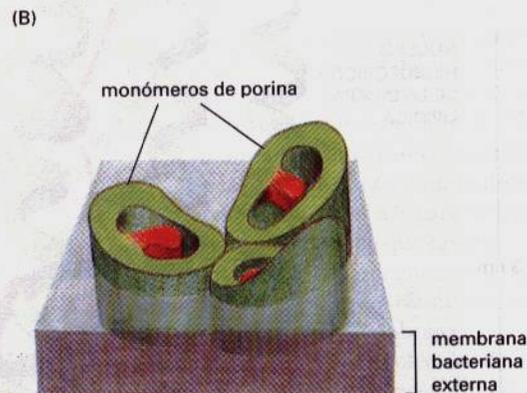
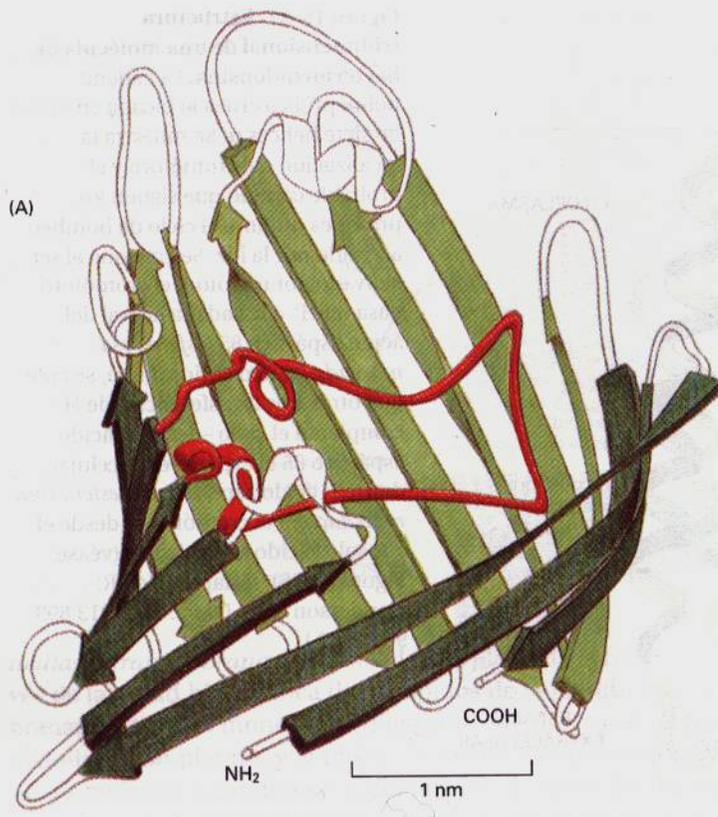


Figura 10-31 Estructura tridimensional de una molécula de bacteriorrodopsina. La cadena polipeptídica cruza la bicapa en forma de siete hélices α . Se muestra la localización del cromóforo y el probable camino que siguen los protones durante el ciclo de bombeo activado por la luz. Se cree que al ser activado por un fotón, el cromóforo pasa un H^+ a la cadena lateral del ácido aspártico 85 (*esfera rosa marcada 85*). Posteriormente, se cree que otras tres transferencias de H^+ completan el ciclo—desde el ácido aspártico 85 al espacio extracelular, desde el ácido aspártico 96 (*esfera rosa marcada 96*) al cromóforo y desde el citosol al ácido aspártico 96 (véase Figura 14-36). (Adaptado de R. Henderson et al. *J. Mol. Biol.* 213:899-929, 1990.)

de la célula (véase Figura 14-36). Bajo luz brillante cada molécula de bacteriorrodopsina puede bombear varios cientos de protones por segundo. La transferencia de protones impulsada por la luz establece un gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática, que a su vez impulsa la síntesis de ATP por una segunda proteína de la membrana plasmática de la célula. Así la bacteriorrodopsina es parte de un transductor de energía solar que provee a la célula bacteriana de energía.

Para poder comprender la función de una proteína transmembrana multipaso a nivel molecular, será necesario localizar con precisión cada uno de sus átomos, lo cual generalmente requiere estudios de difracción de rayos X de grandes cristales tridimensionales de la proteína. Dada su naturaleza anfipática, estas proteínas son extremadamente difíciles de cristalizar. Sin embargo, las numerosas moléculas de bacteriorrodopsina de la membrana púrpura están ordenadas en forma de un cristal bidimensional planar, lo que ha hecho posible determinar su estructura tridimensional y su orientación en la membrana, hasta una resolución de 0,3 nm, por medio de una aproximación alternativa que usa una combinación de microscopía electrónica y análisis de difracción electrónica. Este procedimiento (denominado *cristalografía electrónica*) es análogo al estudio de los cristales tridimensionales de proteínas solubles mediante el análisis de la difracción de rayos X, aunque por dicho método se obtienen menos detalles estructurales. Como se ilustra en la Figura 10-31, estos estudios han demostrado que cada molécula de bacteriorrodopsina está plegada en siete hélices α densamente empaquetadas (cada una de unos 25 aminoácidos) que pasan en ángulo más o menos recto a través de la bicapa lipídica.

La bacteriorrodopsina es un miembro de una gran superfamilia de proteínas de membrana, de estructuras similares pero con funciones diferentes. Así por ejemplo, la proteína receptora de luz, *rodopsina*, de los bastones de la retina de vertebrados y muchos receptores proteicos celulares de superficie que se unen a moléculas mensajeras extracelulares, también están plegados en siete hélices α



transmembrana. Estas proteínas no actúan como transportadores sino como transductores de señales; cada una responde a una señal extracelular activando otra proteína dentro de la célula, la cual genera una señal química en el citosol, como se discute en el Capítulo 15.

Las porinas son proteínas transmembrana formadoras de canales que cruzan la membrana en forma de un barril β ¹⁴

Como se discutió con anterioridad, algunas proteínas transmembrana multipaso no tienen sus segmentos transmembrana organizados en forma de hélices α sino de una lámina β cerrada (un barril β). Los ejemplos mejor estudiados de este tipo de proteínas son las porinas, que se encuentran en la membrana externa de muchas bacterias. Estas proteínas pertenecen a un pequeño grupo de proteínas transmembrana cuya estructura atómica ha sido determinada completamente mediante cristalografía de rayos X.

Muchas bacterias, entre ellas *E. coli*, tienen una *membrana externa* que rodea su membrana plasmática (véase Figura 11-14). La membrana externa está perforada por varias porinas formadoras de canales, lo que permite a determinados solutos hidrofílicos de hasta 600 daltons difundir a través de la bicapa lipídica externa. Las porinas (y las proteínas formadoras de canales relacionadas estructuralmente con ellas de la membrana de mitocondrias y cloroplastos) tienen una lámina β en lugar de una hélice α como estructura transmembranosa primordial.

La estructura atómica de una porina aislada de la membrana externa de una bacteria fotosintética se determinó mediante cristalografía de rayos X en 1990. Consiste de un trímero en el que cada monómero forma un barril β tubular, que atraviesa la bicapa lipídica y contiene un canal lleno de agua en su centro. El barril está formado a partir de 16 cadenas antiparalelas de lámina β , que se curvan lo suficiente como para formar una estructura cilíndrica (Figura 10-32). Cadenas polares laterales revisten el interior del canal acuoso, mientras que cadenas no polares se proyectan desde el exterior del barril interactuando con el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica.

Figura 10-32 Estructura tridimensional de un trímero de porina de *Rhodobacter capsulatus* determinado por cristalografía de rayos X. (A) Cada monómero consiste en un barril β de 16 cadenas antiparalelas que forman un canal transmembrana lleno de agua. (B) Los monómeros se asocian apretadamente formando trímeros, los cuales poseen tres canales separados para la difusión de solutos pequeños a través de la membrana bacteriana externa. Una larga espiral de la cadena polipeptídica (se muestra en rojo), que conecta dos cadenas β , se proyecta hacia el interior del lumen de cada canal, estrechándolo hasta formar una sección transversal de $0,6 \times 1$ nm. (Adaptado de M.S. Weiss et al., *FEBS Lett.* 280: 379-382, 1991.)

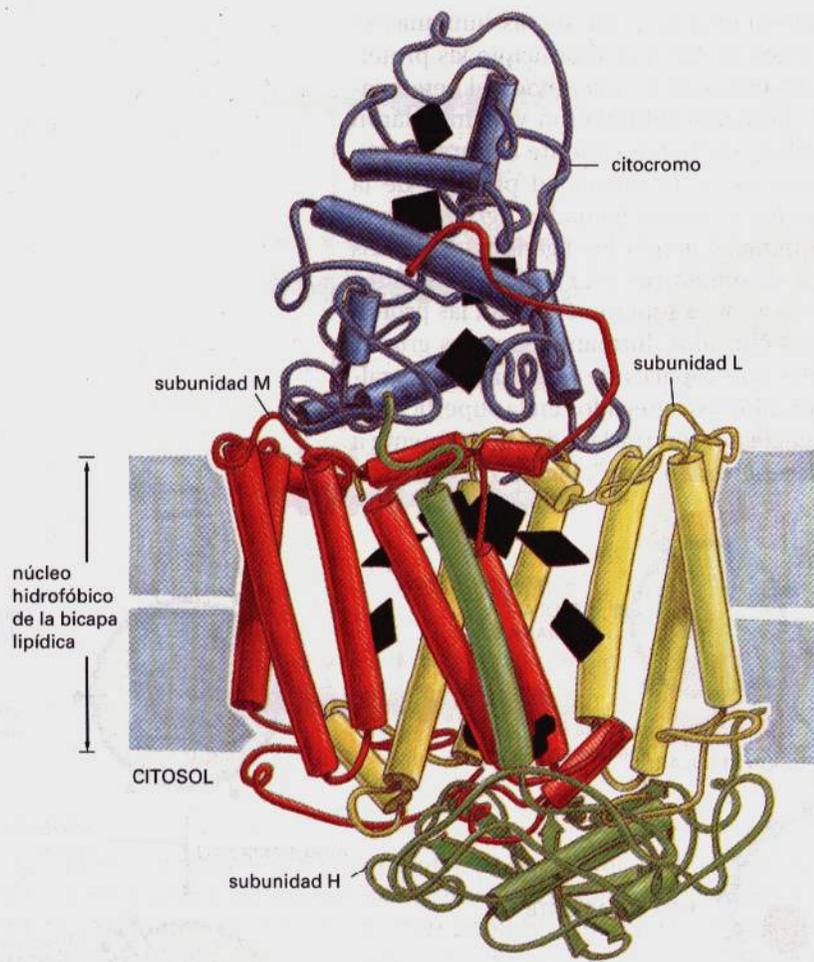


Figura 10-33 Estructura tridimensional del centro de reacción fotosintético de la bacteria *Rhodospseudomonas viridis*. La estructura se determinó por análisis de difracción de rayos X de cristales de este complejo proteico transmembrana. El complejo está formado por cuatro subunidades, L, M, H y un citocromo. Las subunidades L y M forman el núcleo del centro de reacción y cada una contiene cinco hélices α que atraviesan la bicapa lipídica. La localización de varias coenzimas transportadoras de electrones se muestra en negro. (Adaptado de un dibujo de J. Richardson, basado en datos de J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber y H. Michel, *Nature* 318:618-624, 1985.)

Las proteínas de membrana actúan a menudo como grandes complejos¹⁵

Hasta la fecha la más compleja estructura de una proteína transmembrana que jamás ha sido estudiada mediante cristalografía de rayos X es el *centro de reacción fotosintético* bacteriano, cuya estructura atómica se definió en 1985. Los resultados de este análisis fueron de importancia general en la biología de membranas porque demostraron por primera vez que múltiples polipéptidos pueden asociarse en una membrana formando una compleja maquinaria proteica (Figura 10-33). En el Capítulo 14 discutimos cómo actúan estos complejos fotosintéticos capturando la energía lumínica y usándola para bombear H^+ a través de la membrana. A menudo las proteínas de membrana están dispuestas formando grandes complejos, no sólo para captar varias formas de energía, sino también para transducir las señales extracelulares en intracelulares (lo cual se discute en el Capítulo 15).

Muchas proteínas de membrana difunden en el plano de la membrana¹⁶

Como ocurre con los lípidos de membrana, las proteínas no saltan (*flip-flop*) a través de la bicapa, sino que giran alrededor de un eje aproximadamente perpendicular al plano de la bicapa (*difusión rotacional*). Además, muchas proteínas de membrana son capaces de desplazarse lateralmente por la membrana (*difusión lateral*). La primera evidencia de que algunas proteínas de la membrana plasmática son móviles en el plano de la membrana fue obtenida en 1970 mediante un experimento en el que se fusionaron artificialmente células de ratón con células humanas, produciendo células híbridas (*heterocariontes*). Para

distinguir las proteínas de membrana plasmática de ratón de las humanas se utilizaron dos anticuerpos con distinto marcaje. Aunque al principio las proteínas de ratón y las humanas estaban confinadas a su propia mitad del heterocariote recién formado, las dos clases de proteínas difundieron y se mezclaron ocupando, a la media hora, toda la superficie del heterocariote (Figura 10-34). Poco después se obtuvieron otras evidencias de la movilidad proteica de la membrana gracias al descubrimiento de los procesos llamados *agrupamiento* (patching) y *formación de caperuza* (capping). Cuando los ligandos, como los anticuerpos, que tienen más de un lugar de unión (por ello llamados ligandos *multivalentes*) se unen a proteínas específicas de la superficie celular, las proteínas tienden a agregarse, mediante enlaces cruzados, formando grandes grupos (patches), lo cual indica que las proteínas son capaces de desplazarse lateralmente por la bicapa lipídica. Una vez formados los agregados en la superficie de una célula capaz de moverse, como un leucocito, son trasladados activamente a uno de los polos celulares, formando una caperuza (o "cap", Figura 10-35).

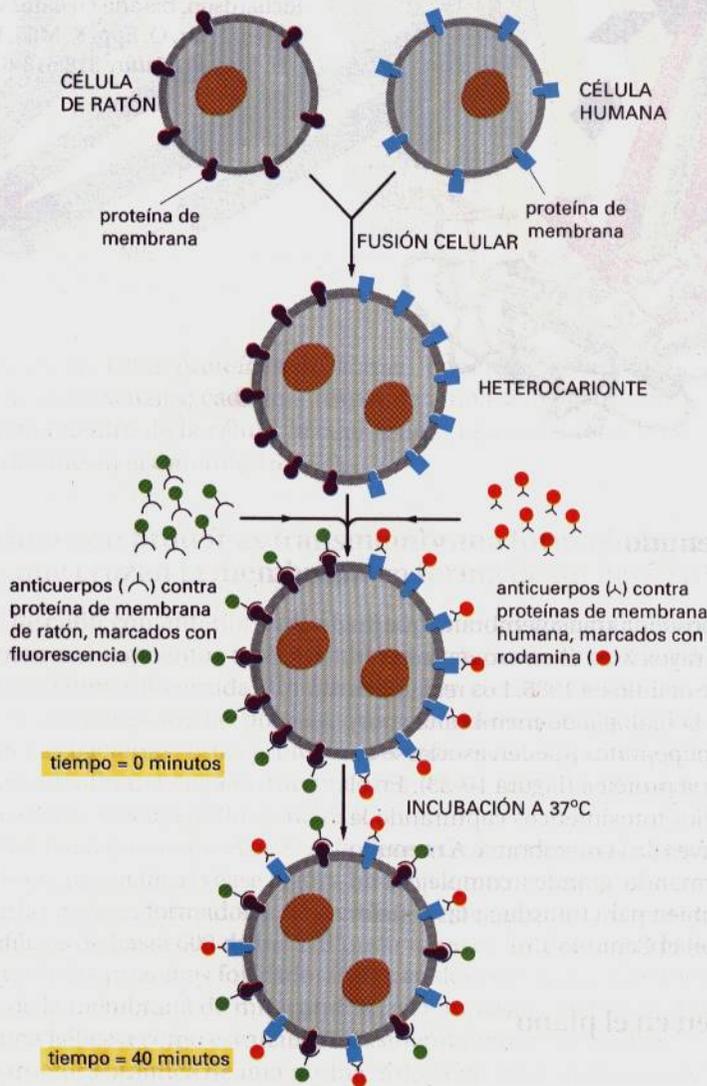


Figura 10-34 Experimento que muestra la mezcla de proteínas de membrana plasmática que se produce en células híbridas ratón-humanas. Inicialmente las proteínas de ratón y las proteínas humanas están confinadas a sus propias mitades de la membrana plasmática del heterocariote recién formado, pero se van entremezclando. Los dos anticuerpos que se usan para visualizar las proteínas se pueden distinguir en un microscopio de fluorescencia dado que la fluoresceína es verde y la rodamina es roja. (Basado en observaciones de L.D. Frye y M. Edidin, *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970, con la autorización de The Company of Biologists.)

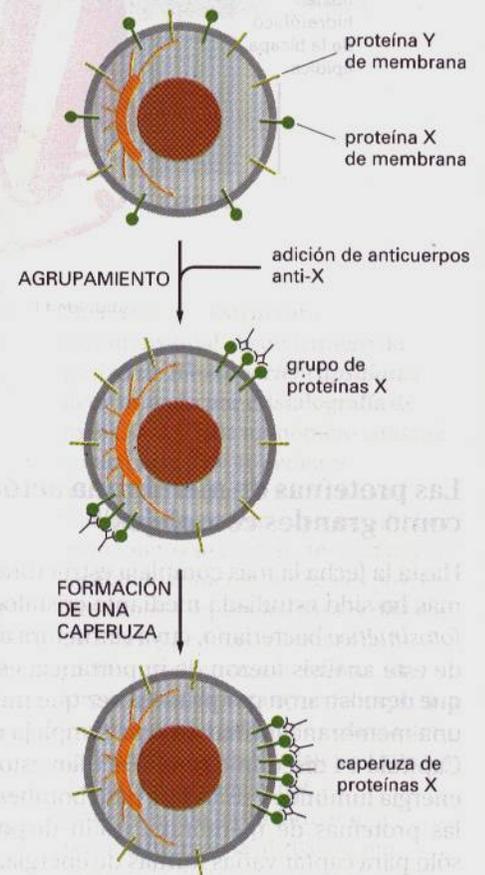


Figura 10-35 Agrupamiento y formación de una caperuza de una proteína de la superficie celular en un leucocito. Los anticuerpos bivalentes entrecruzan las moléculas proteicas a las que se unen. Esto hace que estas moléculas formen grandes grupos, los cuales son arrastrados activamente hacia el extremo posterior de la célula y forman una "caperuza." El centrosoma, que gobierna la polaridad antero-posterior de la célula, se muestra en naranja.

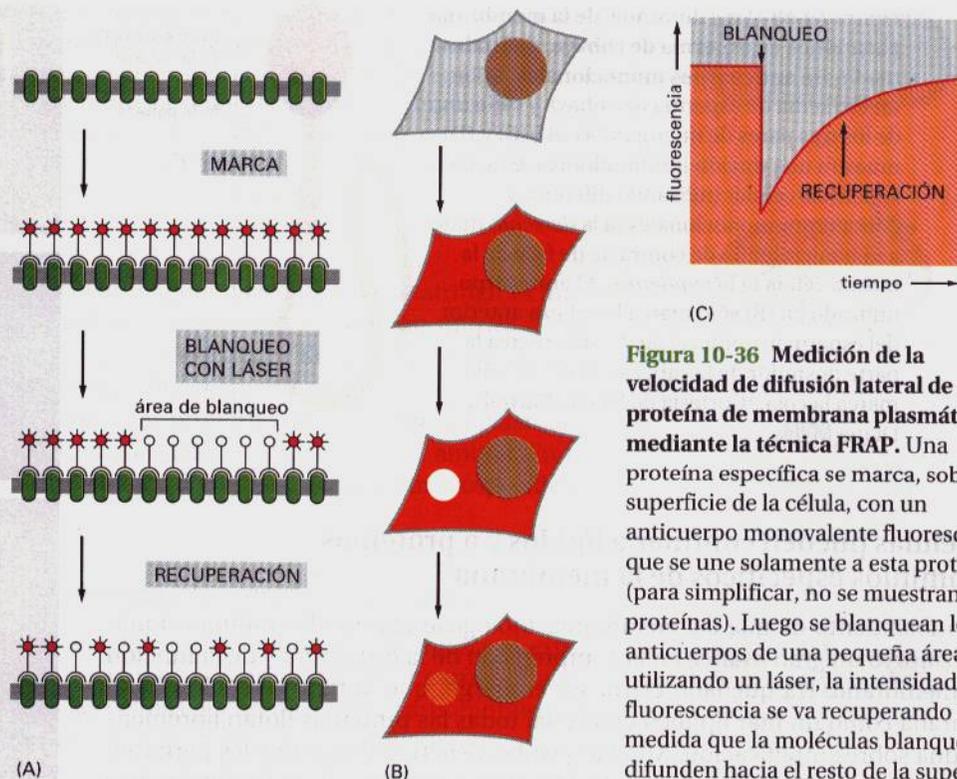


Figura 10-36 Medición de la velocidad de difusión lateral de una proteína de membrana plasmática, mediante la técnica FRAP. Una proteína específica se marca, sobre la superficie de la célula, con un anticuerpo monovalente fluorescente que se une solamente a esta proteína (para simplificar, no se muestran otras proteínas). Luego se blanquean los anticuerpos de una pequeña área utilizando un láser, la intensidad de la fluorescencia se va recuperando a medida que las moléculas blanqueadas difunden hacia el resto de la superficie celular y que las moléculas no blanqueadas difunden a la zona iluminada con el láser. (Vista lateral en A y superficial en B.) (C) Gráfico que muestra la velocidad de recuperación. Cuanto mayor es el coeficiente de difusión de la proteína de membrana, mayor es la velocidad de recuperación.

La velocidad de difusión lateral de las proteínas de membrana puede medirse utilizando la técnica de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP, de Fluorescence Recovery After Photobleaching). Habitualmente este método comporta el marcaje de la proteína de superficie que se pretende estudiar, con un ligando específico fluorescente, como un anticuerpo fluorescente. (Es importante que se utilicen los fragmentos monovalentes de los anticuerpos, que sólo poseen un lugar de unión al antígeno, para evitar la formación de enlaces cruzados entre moléculas vecinas.) Luego, el ligando fluorescente es blanqueado en una pequeña área mediante un rayo láser, y se mide el tiempo que tardan las proteínas de membrana adyacentes que transportan moléculas de anticuerpo fluorescente no blanqueadas, hasta difundir en el área blanqueada (Figura 10-36). A partir de estas mediciones se pueden calcular los coeficientes de difusión de la proteína de superficie celular que había sido marcada. Los valores de los coeficientes de difusión para las diferentes proteínas de membrana en células diferentes son muy variables, pero están típicamente comprendidos entre una décima o una centésima parte de los valores correspondientes para las moléculas de fosfolípidos de la misma membrana.

Figura 10-37 Diagrama de una célula epitelial en el que se muestra como una proteína de membrana plasmática se halla confinada en un dominio particular de la membrana. La proteína A (en la zona apical de la membrana) y la proteína B (en la zona basal y basolateral) pueden difundir lateralmente en sus dominios respectivos pero no pueden entrar en el otro, en parte debido a la unión celular especial denominada *unión estrecha* o *estanca*. Igualmente, las moléculas lipídicas de la monocapa exterior (no citoplasmática) de la membrana plasmática, tampoco pueden difundir entre ambos dominios, pero los lípidos de la monocapa interior (citoplasmática) sí pueden hacerlo (no se muestra).

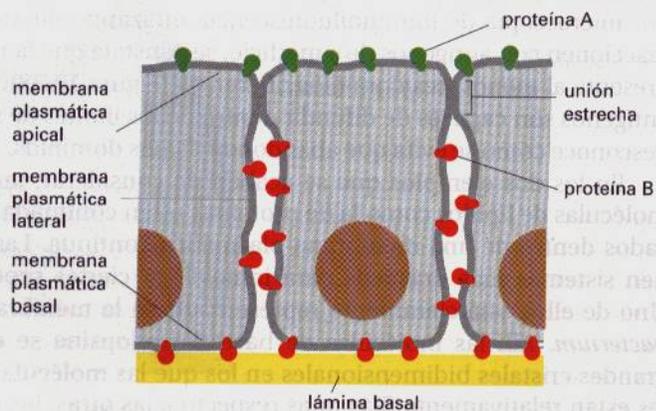
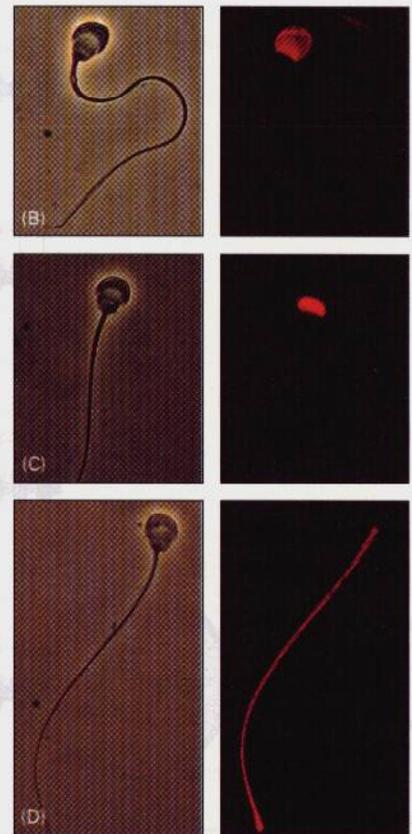
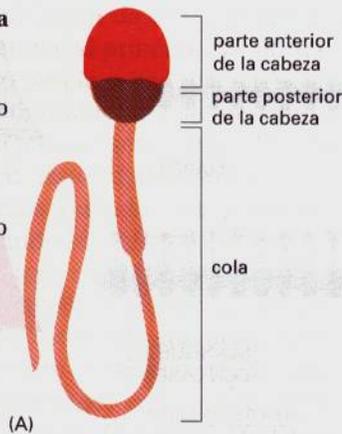


Figura 10-38 Tres dominios de la membrana plasmática de espermatozoide de cobaya, definidos mediante anticuerpos monoclonales. (A) es un esquema de espermatozoide de cobaya y cada uno de los tres pares de micrografías (B), (C) y (D) muestra una tinción inmunofluorescente de superficie celular utilizando diferentes anticuerpos monoclonales (a la derecha) junto a una micrografía de contraste de fase de la misma célula (a la izquierda). El anticuerpo utilizado en (B) sólo marca la cabeza anterior del espermatozoide, el de (C) sólo marca la parte posterior de la cabeza y el de (D) sólo marca la cola. (Cortesía de Selena Carroll y Diana Myles.)



Las células pueden confinar a lípidos y a proteínas en dominios específicos de la membrana¹⁷

El reconocimiento de que las membranas biológicas son fluidos bidimensionales constituyó un gran avance en la comprensión de la estructura y de la función de la membrana. Ha quedado claro, sin embargo, que la representación de la membrana como un mar lipídico en el cual todas las proteínas flotan libremente, es una sobresimplificación. Muchas células tienen sistemas que les permiten limitar sus proteínas de membrana en dominios específicos de la bicapa lipídica continua. Por ejemplo, en células epiteliales como las que revisten el intestino o los túbulos del riñón, ciertas enzimas de la membrana plasmática y algunas proteínas de transporte están limitadas a la superficie apical de la células mientras que otras proteínas se hallan confinadas a las superficies basal y lateral (Figura 10-37). Esta distribución asimétrica de las proteínas es a menudo esencial para la función del epitelio, como se discute en el Capítulo 11. La composición lipídica de estos dos dominios de membrana también es diferente, lo cual demuestra que las células epiteliales pueden evitar la difusión de las moléculas lipídicas y proteicas entre los dominios. Experimentos con lípidos marcados, no obstante, sugieren que sólo están confinadas de esta manera las moléculas lipídicas de la monocapa externa. Se cree que la separación tanto de moléculas de proteína como de moléculas lipídicas se mantiene, al menos en parte, por las barreras formadas por un tipo específico de uniones intercelulares (llamadas *uniones estrechas* o *estancas*, discutidas en el Capítulo 19). Está claro que las proteínas de membrana que forman estas uniones intercelulares no pueden difundir lateralmente entre las membranas que están interactuando.

Una célula también puede crear dominios de membrana sin utilizar uniones intercelulares. El espermatozoide de mamíferos, por ejemplo, es una célula aislada que presenta varias zonas estructural y funcionalmente distintas delimitadas por una membrana plasmática continua. Cuando se observa un espermatozoide por microscopía de inmunofluorescencia utilizando diferentes anticuerpos que reaccionen con antígenos de superficie, se constata que la membrana plasmática presenta al menos tres dominios diferentes (Figura 10-38). En algunos casos, los antígenos son capaces de difundir dentro de los límites de su propio dominio; se desconoce cómo se evita que abandonen dichos dominios.

En los dos ejemplos que se acaban de considerar, tanto la difusión de las moléculas de lípidos como la de proteínas están confinada a dominios especializados dentro de una membrana plasmática continua. Las células también tienen sistemas más drásticos para inmovilizar ciertas proteínas de membrana. Uno de ellos está claramente representado en la membrana púrpura de *Halo-bacterium*. Allí las moléculas de bacteriorrodopsina se ensamblan formando grandes cristales bidimensionales en los que las moléculas proteicas individuales están relativamente fijas unas respecto a las otras; los grandes agregados de

Figura 10-39 Cuatro sistemas mediante los cuales se puede restringir la movilidad lateral de determinadas proteínas de membrana plasmática.

Las proteínas pueden autoensamblarse formando grandes agregados (como en el caso de la bacteriorrodopsina en la membrana púrpura de *Halobacterium*) (A); pueden estar trabadas por interacciones con agregados macromoleculares del exterior (B) o del interior (C) de la célula, o pueden interactuar con proteínas de la superficie de otra célula (D).

este tipo difunden muy lentamente. Un sistema más común de restringir la movilidad lateral de proteínas de membrana específicas consiste en unirlas a ensamblajes macromoleculares del interior o del exterior de la célula. Hemos visto cómo algunas proteínas de la membrana del eritrocito están ancladas al citoesqueleto interior; en otros tipos celulares, las proteínas de la membrana plasmática pueden anclarse al citoesqueleto o a la matriz extracelular o a ambos. En la Figura 10-39 se resumen los cuatro sistemas de inmovilizar proteínas específicas de membrana.

La superficie celular está recubierta con residuos de azúcar¹⁸

Las proteínas de membrana, por regla general, no sobresalen desnudas al exterior celular, sino que están decoradas, cubiertas o escondidas por carbohidratos presentes en la superficie de todas las células eucariotas. Estos carbohidratos se encuentran en forma de cadenas de oligosacárido unidas covalentemente a las proteínas de membrana (glucoproteínas) y a lípidos (glucolípidos) y como cadenas de polisacáridos de moléculas *proteoglicanos integrales de membrana*. Los proteoglicanos, que consisten en largas cadenas de polisacáridos unidas covalentemente a un núcleo proteico, se encuentran principalmente en el exterior celular como parte de la matriz extracelular (discutida en el Capítulo 19); pero en el caso de los proteoglicanos integrales de membrana, el núcleo proteico se extiende a través de la bicapa lipídica o está anclado a la bicapa mediante un glucosilfosfatidilinositol (GPI).

El término *cubierta celular* o *glucocáliz* se utiliza a menudo para describir la zona de la superficie celular rica en carbohidratos. Esta zona puede ser visualizada por medio de diversos colorantes, como el rojo de rutenio (Figura 10-40), o también por su afinidad a proteínas que se unen a carbohidratos, llamadas **lectinas**, que pueden ser marcadas con una tinción fluorescente u otro marcador visible. A pesar de que la mayor parte de los carbohidratos están unidos a moléculas intrínsecas de la membrana plasmática, habitualmente el glucocáliz contiene además glucoproteínas y proteoglicanos que han sido secretados al espacio ex-

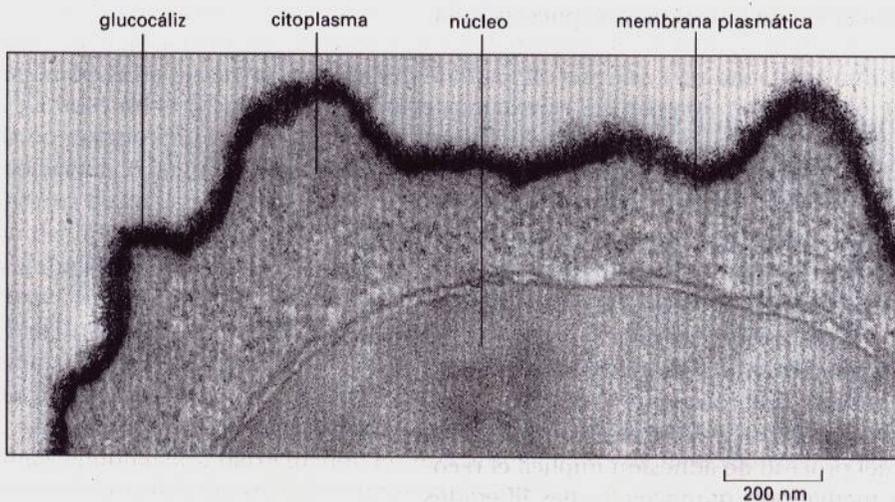
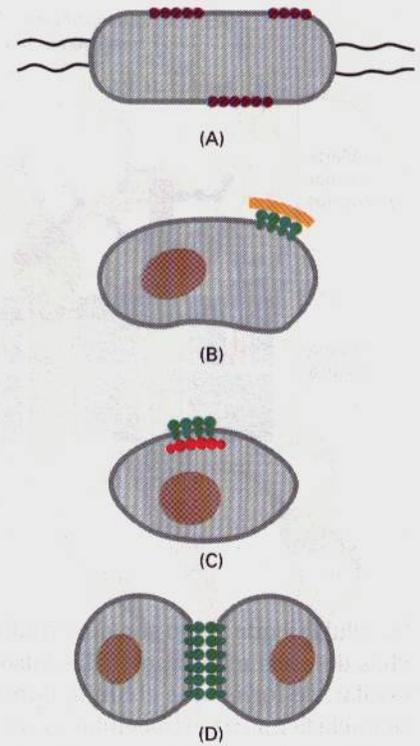


Figura 10-40 La cubierta celular, o glucocáliz. Electromicrografía de la superficie de un linfocito contrastado con rojo de rutenio para mostrar la cubierta celular. (Por cortesía de A. M. Glauert y G. M. W. Cook.)

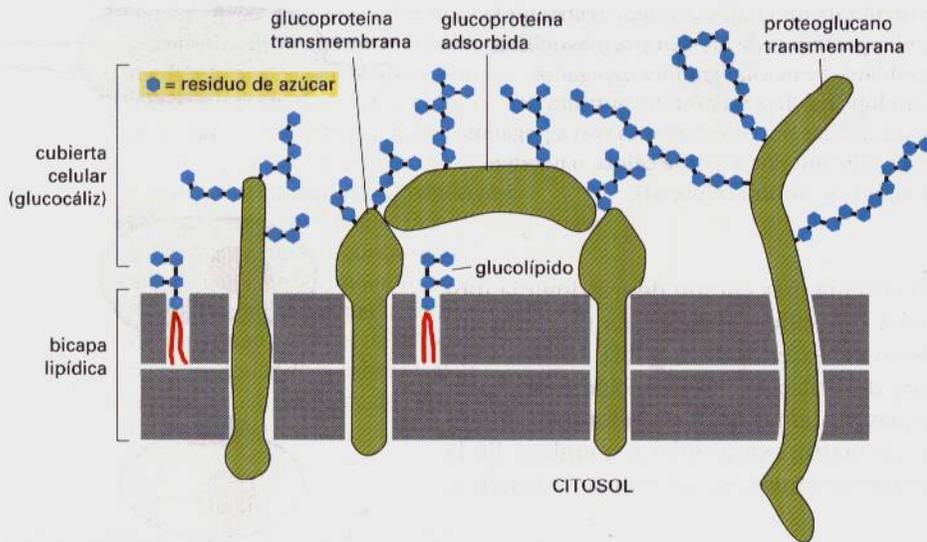


Figura 10-41 Diagrama simplificado de la cubierta celular (glucocáliz). La cubierta celular está formada por las cadenas laterales de oligosacáridos de los glucolípidos y de las glucoproteínas integrales de membrana y por cadenas de polisacáridos de proteoglicanos integrales de membrana. Además, en muchas células los proteoglicanos y glucoproteínas adsorbidos (no mostrados aquí) contribuyen a la formación del glucocáliz. Nótese que todos los carbohidratos se hallan en la superficie no citoplasmática de la membrana.

tracelular y que luego son adsorbidos en la superficie celular (Figura 10-41). Muchas de estas macromoléculas adsorbidas son componentes de la matriz extracelular, de forma que el límite donde termina la membrana plasmática y donde se inicia la matriz extracelular es sólo una cuestión semántica.

Las cadenas laterales de oligosacáridos de las glucoproteínas y de los glucolípidos son extremadamente diversas en cuanto a la organización de sus azúcares. A pesar de que habitualmente contienen menos de 15 residuos glucídicos, estos residuos están a menudo ramificados y los azúcares pueden estar unidos entre sí mediante diversos enlaces covalentes. Esta distribución es claramente diferente de la de los residuos de aminoácidos de una cadena polipeptídica, que están unidos por uniones peptídicas idénticas. Al unirse entre sí, tres residuos glucídicos pueden incluso formar cientos de trisacáridos diferentes. En principio la diversidad y la posición expuesta de estos polisacáridos en la superficie celular les hace especialmente indicados para tomar parte en procesos de reconocimiento celular, pero durante muchos años ha existido poca evidencia de esta presunta función. Parecía ser que el papel de la cubierta celular podía ser meramente de protección frente a daño mecánico y químico y de mantener objetos extraños y otras células a distancia, impidiendo indeseables interacciones proteína-proteína. De hecho, es probable que ésta sea una parte importante de su función. Recientemente, sin embargo, se ha determinado que las lectinas unidas a membrana plasmática reconocen oligosacáridos específicos de glucolípidos de la superficie celular, mediando así diversos procesos transitorios de adhesión célula-célula, entre los cuales se cuentan los que ocurren en las interacciones espermato-óvulo, coagulación sanguínea, recirculación de linfocitos y respuestas inflamatorias.

Las selectinas son proteínas de membrana que se unen a carbohidratos de la superficie celular y que median adhesiones celulares transitorias en el torrente sanguíneo¹⁹

Uno de los ejemplos mejor comprendidos del reconocimiento proteína-carbohidrato se da en las respuestas inflamatorias, cuando los linfocitos (de la clase denominada *neutrófilos*) son reclutados desde la sangre hacia una zona de inflamación en un tejido, usualmente para ayudar a combatir una infección local. Inicialmente, los neutrófilos se adhieren suavemente a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos de la zona y posteriormente se adhieren más fuertemente y migran fuera de los vasos sanguíneos, arrastrándose entre las células endoteliales adyacentes. El inicio del proceso de adhesión implica el reconocimiento proteína-carbohidrato. Los mediadores químicos locales liberados

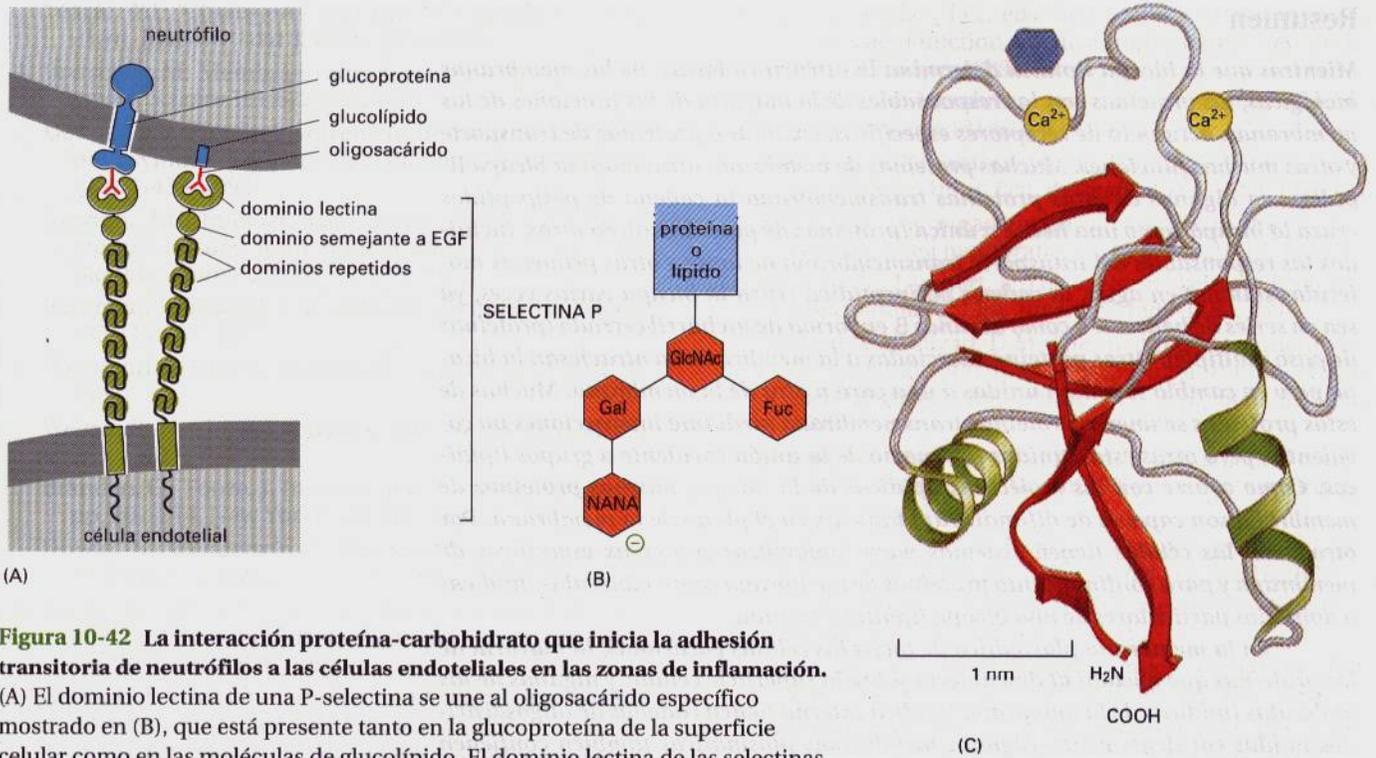


Figura 10-42 La interacción proteína-carbohidrato que inicia la adhesión transitoria de neutrófilos a las células endoteliales en las zonas de inflamación.

(A) El dominio lectina de una P-selectina se une al oligosacárido específico mostrado en (B), que está presente tanto en la glucoproteína de la superficie celular como en las moléculas de glucolípidio. El dominio lectina de las selectinas es homólogo a los dominios lectina encontrados en muchas otras proteínas animales que se unen a carbohidratos; dado que la unión a sus ligandos glucídicos requiere Ca^{2+} , se les llama *lectinas de tipo C*. En (C) se muestra la estructura tridimensional de uno de estos dominios lectina, determinado por cristalografía de rayos X; su enlace glucídico aparece de color azul. Gal = galactosa; GlcNAc = *N*-acetilglucosamina; Fuc = fucosa; NANA = ácido siálico.

por las células en el lugar de la inflamación señalizan a las células endoteliales de la región para que expresen una glucoproteína transmembrana denominada *P-selectina*, que pertenece a la familia de moléculas de adhesión célula-célula llamada **selectinas**. Las selectinas contienen un dominio lectina de unión a carbohidratos, en el extremo de un ensanchado "tallo" proteico que se extiende desde la superficie celular (Figura 10-42A). El dominio de lectina de la P-selectina reconoce el oligosacárido específico, como se muestra en la Figura 10-42B. Dado que este oligosacárido se expresa en las moléculas de glucolípidio y de glucoproteína de la superficie de los neutrófilos, éstos se adhieren específicamente a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos de la zona inflamada.

La unión de cada dominio de lectina a su oligosacárido específico es de relativamente baja actividad y al parecer tanto la asociación como la posterior disociación de dicha unión, ocurren rápidamente. Ello permite a las selectinas unir a las paredes de los capilares las células sanguíneas en tránsito, permitiendo al mismo tiempo que las células adheridas, impulsadas por el flujo sanguíneo, se desplacen a lo largo del endotelio hacia la zona inflamada. Este desplazamiento continúa hasta que otro mecanismo de adhesión célula-célula, mediado por un tipo distinto de proteínas transmembrana, denominadas *integrinas* (discutidas en el Capítulo 19), se activa y refuerza la adhesión, permitiendo a los neutrófilos detener sus movimiento y arrastrarse fuera de los capilares sanguíneos hacia el tejido. Cuando los linfocitos migran fuera del torrente sanguíneo hacia el nódulo linfático tiene lugar una secuencia de eventos de adhesión similar mediada por selectinas e integrinas (véase Figura 23-9).

Diversas selectinas se expresan en la superficie de los leucocitos, plaquetas y células endoteliales, participando en una amplia gama de interacciones transitorias célula-célula dentro del torrente sanguíneo.

Resumen

Mientras que la bicapa lipídica determina la estructura básica de las membranas biológicas, las proteínas son las responsables de la mayoría de las funciones de las membranas, actuando de receptores específicos, enzimas o proteínas de transporte y otras muchas funciones. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica: en algunas de estas proteínas transmembrana la cadena de polipéptidos cruza la bicapa como una hélice α única (proteínas de paso único); en otras, incluidas las responsables del transporte transmembrana de iones y otras pequeñas moléculas solubles en agua, la cadena polipeptídica cruza la bicapa varias veces, ya sea en series de hélices α o como láminas β en forma de un barril cerrado (proteínas de paso múltiple). Otras proteínas asociadas a la membrana no atraviesan la bicapa pero en cambio se hallan unidas a una cara u otra de la membrana. Muchas de estas proteínas se unen a proteínas transmembrana mediante interacciones no covalentes, pero otras están unidas por medio de la unión covalente a grupos lipídicos. Como ocurre con las moléculas lipídicas de la bicapa, muchas proteínas de membrana son capaces de difundir rápidamente en el plano de la membrana. Por otro lado, las células tienen sistemas para inmovilizar proteínas específicas de membrana y para confinar tanto proteínas de membrana como moléculas lipídicas a dominios particulares de una bicapa lipídica continua.

En la membrana plasmática de todas las células eucariotas, la mayoría de las proteínas que quedan al descubierto sobre la superficie celular y algunas de las moléculas lipídicas de la monocapa lipídica externa tienen cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Algunas membranas plasmáticas también contienen moléculas integrales de proteoglicanos con cadenas de polisacáridos expuestas a la superficie. Esta cubierta de azúcares ayuda a proteger la superficie celular del daño mecánico y químico, y algunas de las cadenas de oligosacáridos son reconocidas por proteínas que se unen a carbohidratos de la superficie celular (lectinas) que intervienen en procesos de adhesión célula-célula específicos y transitorios.

Bibliografía

General

- Bretscher, M.S. The molecules of the cell membrane. *Sci. Am.* 253(4):100-109, 1985.
- Gennis, R.B. Biomembranes: Molecular Structure and Function. New York: Springer-Verlag, 1989.
- Jain, M.K. Introduction to Biological Membranes, 2nd ed. New York: Wiley, 1988.
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731, 1972.

Citas

1. Ceve, G.; Marsh, D. Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models. New York: Wiley, 1987.
- Quinn, P.J.; Cherry, R.J., eds. Structural and Dynamic Properties of Lipids and Membranes. London: Portland Press, 1992.
- Tanford, C. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley, 1980.
- Vance, D.E.; Vance, J.E., eds. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, New Comprehensive Biochemistry, Vol. 20. New York: Elsevier, 1991.
- van Meer, G. Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:247-275, 1989.

2. Bangham, A.D. Models of cell membranes. In Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 24-34. New York: Hospital Practice, 1975.
- Devaux, P.F. Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:489-494, 1993.
- Eidin, M. Rotational and lateral diffusion of membrane proteins and lipids: phenomena and function. *Curr. Top. Membr. Transp.* 29:91-127, 1987.
- Kornberg, R.D.; McConnell, H.M. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2564-2568, 1971.
3. Bretscher, M.S.; Munro, S. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261:1280-1281, 1993.
- Chapman, D.; Benga, G. Biomembrane fluidity—studies of model and natural membranes. In Biological Membranes (D. Chapman, ed.), Vol. 5, pp. 1-56. London: Academic Press, 1984.
- de Kruijff, B., et al. Lipid polymorphism and membrane function. In The Enzymes of Biological Membranes, Vol 1, Membrane Structure and Dynamics, 2nd ed. (A.N. Martonosi, ed.), pp. 131-204. New York: Plenum, 1985.
- Kimelberg, H.K. The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. In Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 205-293. Amsterdam: Elsevier, 1977.

- Yeagle, P.L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822:267-287, 1985.
4. Bretscher, M. Membrane structure: some general principles. *Science* 181:622-629, 1973.
 - Devaux, P.F. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:417-439, 1992.
 - Newton, A.C. Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:1-25, 1993.
 - Rothman, J.; Lenard, J. Membrane asymmetry. *Science* 195:743-753, 1977.
 5. Hakomori, S. Glycosphingolipids. *Sci. Am.* 254(5):44-53, 1986.
 - Weigandt, H. The gangliosides. *Adv. Neurochem.* 4:149-223, 1982.
 6. Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure, pp. 202-214. New York: Garland, 1991.
 - Unwin, N.; Henderson, R. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250(2):78-94, 1984.
 7. Chow, M.; Der, C.J.; Buss, J.E. Structure and biological effects of lipid modifications on proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:629-636, 1992.
 - Cross, G.A. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:1-39, 1990.
 - Englund, P.T. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:121-138, 1993.
 - Jennings, M.L. Topography of membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:999-1027, 1989.
 - Singer, S.J. The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:247-296, 1990.
 8. Eisenberg, D. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-623, 1984.
 - Engelman, D.M.; Steitz, T.A.; Goldman, A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:321-353, 1986.
 - Fasman, G.D.; Gilbert, W.A. The prediction of transmembrane protein sequences and their conformation: an evaluation. *Trends Biochem. Sci.* 15:89-92, 1990.
 - Kyte, J.; Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132, 1982.
 - Popot, J.-L. Integral membranes protein structure: transmembrane α helices as autonomous folding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:512-540, 1993.
 9. Helenius, A.; Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79, 1975.
 - Montal, M. Functional reconstitution of membrane proteins in planar lipid bilayer membranes. In *Techniques of the Analysis of Membrane Proteins* (C.I. Ragan, R.J. Cherry, eds.), pp. 97-128, London: Chapman & Hall, 1986.
 - Racker, E. Reconstitution of Transporters, Receptors and Pathological States. Orlando, FL: Academic Press, 1985.
 - Silvius, J.R. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:323-348, 1992.
 10. Agre, P.; Parker, J.C., eds. Red Blood Cell Membranes: Structure, Function, Clinical Implications. New York: Marcel Dekker, 1989.
 - Bretscher, M. Membrane structure: some general principles. *Science* 181:622-629, 1973.
 - Marchesi, V.T.; Furthmayr, H.; Tomita, M. The red cell membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 45:667-698, 1976.
 - Steck, T.L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.* 62:1-19, 1974.
 11. Bennett, V.; Lambert, S. The spectrin skeleton: from red cells to brain. *J. Clin. Invest.* 87:1483-1489, 1991.
 - Bennett, V.; Gilligan, D.M. The spectrin-based membrane structure and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:27-66, 1993.
 - Branton, D.; Cohen, C.M.; Tyler, J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24:24-32, 1981.
 - Davies, K.A.; Lux, S.E. Heredity disorders of the red cell membrane skeleton. *Trends Genet.* 5:222-227, 1989.
 - Pumplin, D.W.; Bloch, R.J. The membrane skeleton. *Trends Cell Biol.* 3:113-117, 1993.
 12. Alper, S.L. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu. Rev. Physiol.* 53:549-564, 1991.
 - Jennings, M.L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18:397-430, 1989.
 - Kopito, R.R. Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123:177-199, 1990.
 - Reithmeier, R.A.F. The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:515-523, 1993.
 13. Henderson, R.; Baldwin, J.M.; Ceska, T.A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K.H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213:899-929, 1990.
 - Henderson, R.; Unwin, P.N.T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257:28-32, 1975.
 - Mathies, R.A.; Lin, S.W.; Ames, J.B.; Pollard, W.T. From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:491-518, 1991.
 - Stoeckenius, W. The rhodopsin-like pigments of halobacteria: light-energy and signal transducers in an archaebacterium. *Trends Biochem. Sci.* 10:483-486, 1985.
 14. Cowan, S.W. Bacterial porins: lessons from three high-resolution structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:501-507, 1993.
 - Shirmer, T.; Rosenbusch, J.P. Prokaryotic and eukaryotic porins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:539-545, 1991.
 - Schulz, G.E. Bacterial porins; structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:701-707, 1993.
 - Weiss, M.S.; Wacker, T.; Nestel, U.; et al. The structure of porin from *rhodobacter capsulatus* at 0.6 nm resolution. *FEBS Lett.* 256:143-146, 1989.
 15. Deisenhofer, J.; Epp, O.; Mili, K.; Huber, R.; Michel, H. The structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318:618-624, 1985.
 - Deisenhofer, J.; Michel, H. High-resolution structures of photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:247-266, 1991.

- Rees, D.C.; Komiya, H.; Yeates, T.O.; Allen, J.P.; Feher, G. The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:607-634, 1989.
16. de Petris, S.; Raff, M.C. Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. *Nature New Biol.* 241:257-259, 1973.
- Edidin, M. Molecular association and membrane domains. *Curr. Top. Membr. Transp.* 36:81-96, 1990.
- Frye, L.D.; Edidin, M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970.
- Jacobson, K.; Ishihara, A.; Inman, R. Lateral diffusion of proteins in membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 49:163-175, 1987.
- Sheetz, M.P. Glycoprotein mobility and dynamic domains in fluid plasma membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:417-431, 1993.
17. Gumbiner, B.; Louvard, D. Localized barriers in the plasma membrane: a common way to form domains. *Trends Biochem. Sci.* 10:435-438, 1985.
- Jacobson, K.; Vaz, W.L.C. Domains in biological membranes. *Comm. Mol. Cell Biophys.* 8:1-114, 1992.
- Myles, D.G.; Primakoff, P. Sperm surface domains. In *Hybridoma Technology in the biosciences and Medicine* (T.A. Springer, ed.), pp. 239-250. New York: Plenum, 1985.
- Simons, K.; van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27:6197-6202, 1988.
- Edidin, M. Patches, posts and fences: proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol.* 2:376-380, 1992.
18. Drickamer, K.; Taylor, M.E. Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:237-264, 1993.
- Dwek, R.A., et al. Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 6:65-100, 1993.
- Parech, R.B. Effects of glycosylation on protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:750-754, 1991.
- Paulson, J.C. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* 14:272-276, 1989.
- Sharon, N.; Lis, H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.* 268(1):82-89, 1993.
19. Bevilacqua, M.P.; Nelson, R.M. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91:379-387, 1993.
- Cummings, R.D.; Smith, D.F. The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssays* 14:849-856, 1992.
- Lasky, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258:964-969, 1992.
- Lawrence, M.B.; Springer, T.A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859-873, 1991.