

TRASPORTO DI MEMBRANA



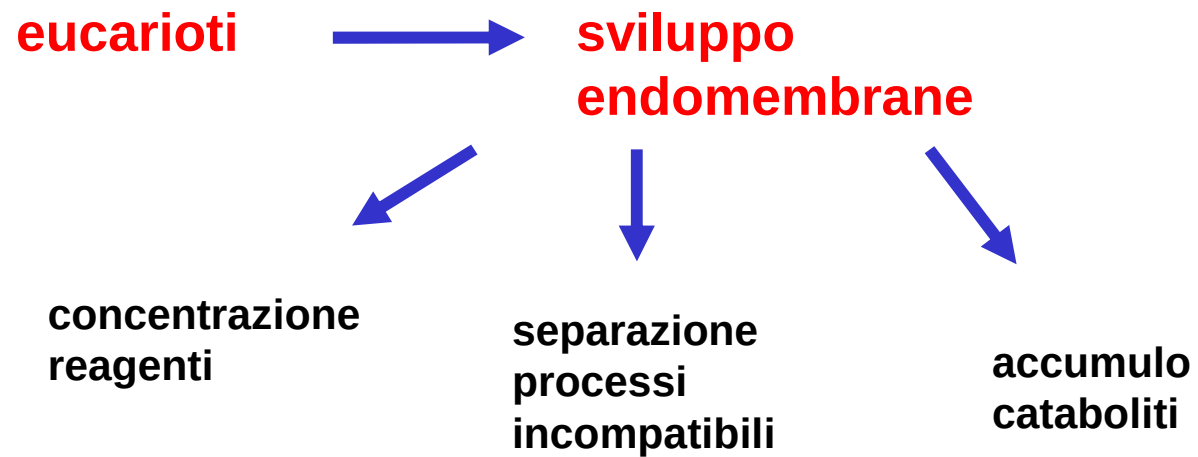
movimento di molecole e ioni tra i diversi
scomparti dei sistemi biologici

membrana cellulare



garantisce un ambiente fisico-chimico
altamente stabile

necessità di controllare la composizione dell'ambiente interno in
funzione di diverse condizioni ambientali



PIANTE

**il trasporto di membrana è alla
base di numerosi processi**

GENERAZIONE DEL TURGORE

La presenza della parete permette alle cellule di generare una pressione positiva

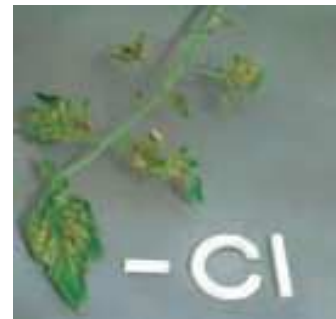


Accumulo di K^+ nel citoplasma e nel vacuolo



ACQUISIZIONE DI NUTRIENTI

Element	Chemical symbol
Obtained from water or carbon dioxide	
Hydrogen	H
Carbon	C
Oxygen	O
Obtained from the soil	
Macronutrients	
Nitrogen	N
Potassium	K
Calcium	Ca
Magnesium	Mg
Phosphorus	P
Sulfur	S
Silicon	Si
Micronutrients	
Chlorine	Cl
Iron	Fe
Boron	B
Manganese	Mn
Sodium	Na
Zinc	Zn
Copper	Cu
Nickel	Ni
Molybdenum	Mo



DISTRIBUZIONE DI METABOLITI

Ripartizione dei prodotti della fotosintesi dai
siti di sintesi a quelli di utilizzo e di accumulo

COMPARTIMENTALIZZAZIONE DEI METABOLITI

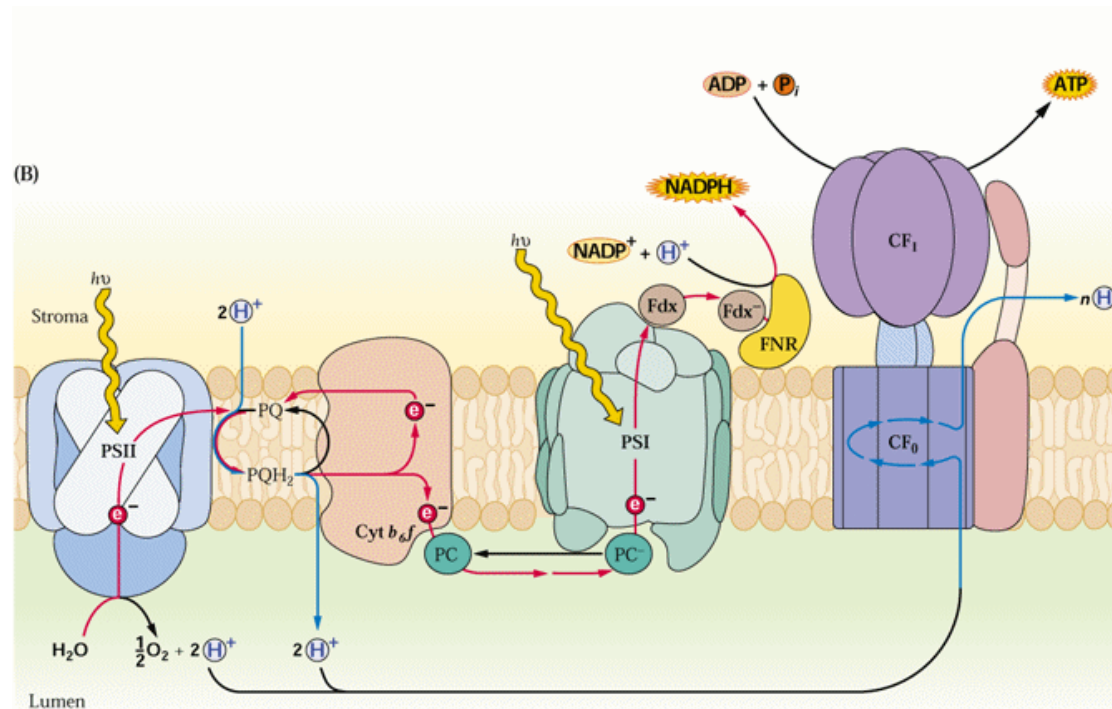
Alcuni processi biochimici sono incompatibili tra loro

→ necessità di evitare cicli futili

(sintesi amido e glicolisi)

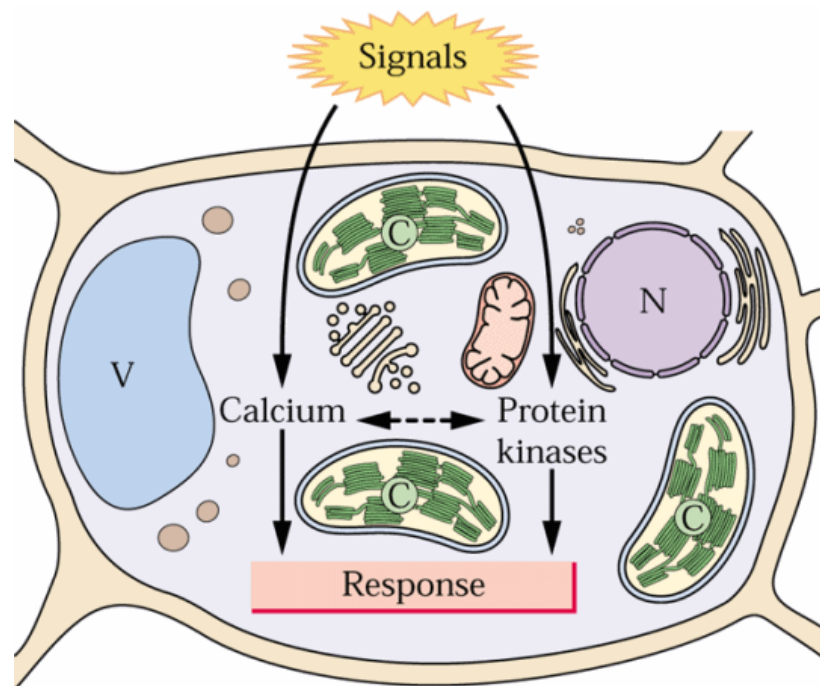
TRASFORMAZIONE DELL'ENERGIA

fotosintesi e respirazione



TRASDUZIONE DEL SEGNALE

stimolo ambientale $\rightarrow$ $[Ca^{2+}]$ $\rightarrow$ risposta fisiologica



Trasporto passivo e trasporto attivo

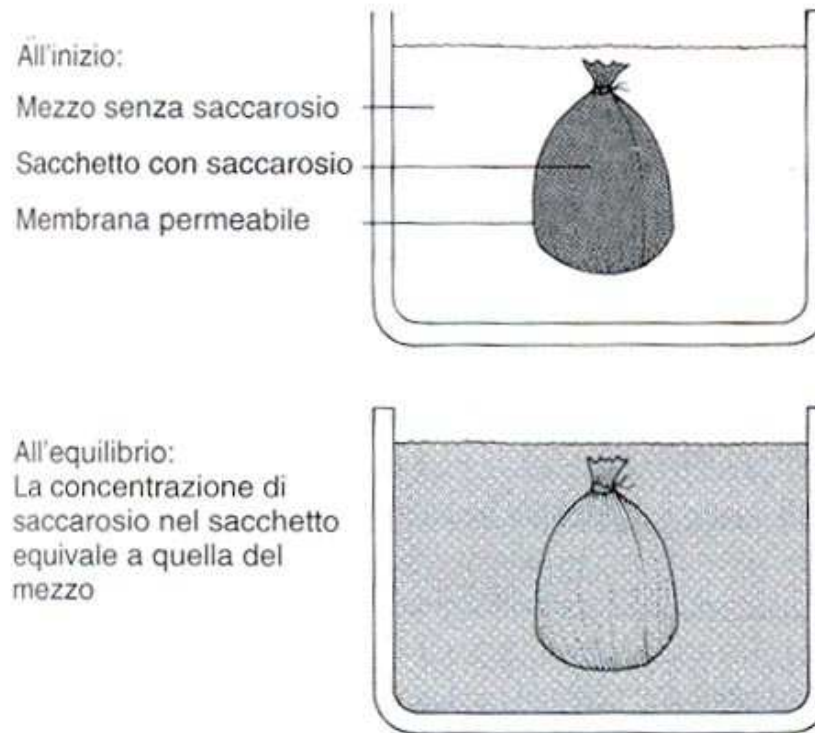
Trasporto passivo: movimento di molecole per **diffusione** secondo il gradiente di concentrazione (legge di Fick)
movimento spontaneo

Trasporto attivo: movimento di sostanze contro il loro gradiente di **potenziale chimico**, è richiesta energia (ATP)

Si può calcolare la forza motrice della diffusione o l'energia necessaria per il trasporto contro gradiente, considerando il potenziale chimico della sostanza trasportata

DIFFUSIONE

spostamento delle molecole secondo un gradiente di concentrazione dovuto ad agitazione termica casuale



$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$

↓
 potenziale chimico di j in
 condizioni standard

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$

componente della
concentrazione

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + \underset{\downarrow}{z_j FE} + \bar{V}_j P$$

componente della carica
elettrostatica

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$


componente della
pressione
idrostatica

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j FE + \bar{V}_j P$$

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j FE + \bar{V}_j P$$

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$

concentrazione di j

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + \underset{\downarrow}{z_j F E} + \bar{V}_j P$$

carica elettrostatica
di j

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j \textcolor{red}{F} E + \bar{V}_j P$$

**costante di
Faraday**

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F \mathbf{E} + \bar{V}_j P$$


potenziale elettrico
generale della
soluzione

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \bar{V}_j P$$

↓
volume parziale
molare j

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j FE + \bar{V}_j P$$

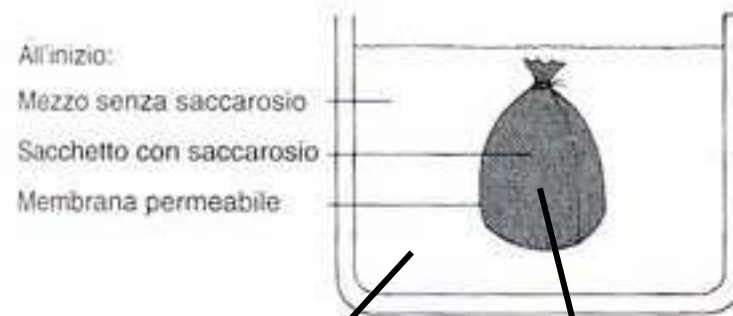

 pressione

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j FE + \cancel{v_j p}$$

significativo esclusivamente
nei movimenti osmotici
dell'acqua

Saccarosio

(non ha carica elettrica)



$$\bar{\mu}_s^i = \mu_s^* + RT \ln C_s^i$$

$$\bar{\mu}_s^o = \mu_s^* + RT \ln C_s^o$$

$$\Delta\mu_s = \mu_s^i - \mu_s^o =$$

$$= (\mu_s^* + RT \ln C_s^i) - (\mu_s^* + RT \ln C_s^o) =$$

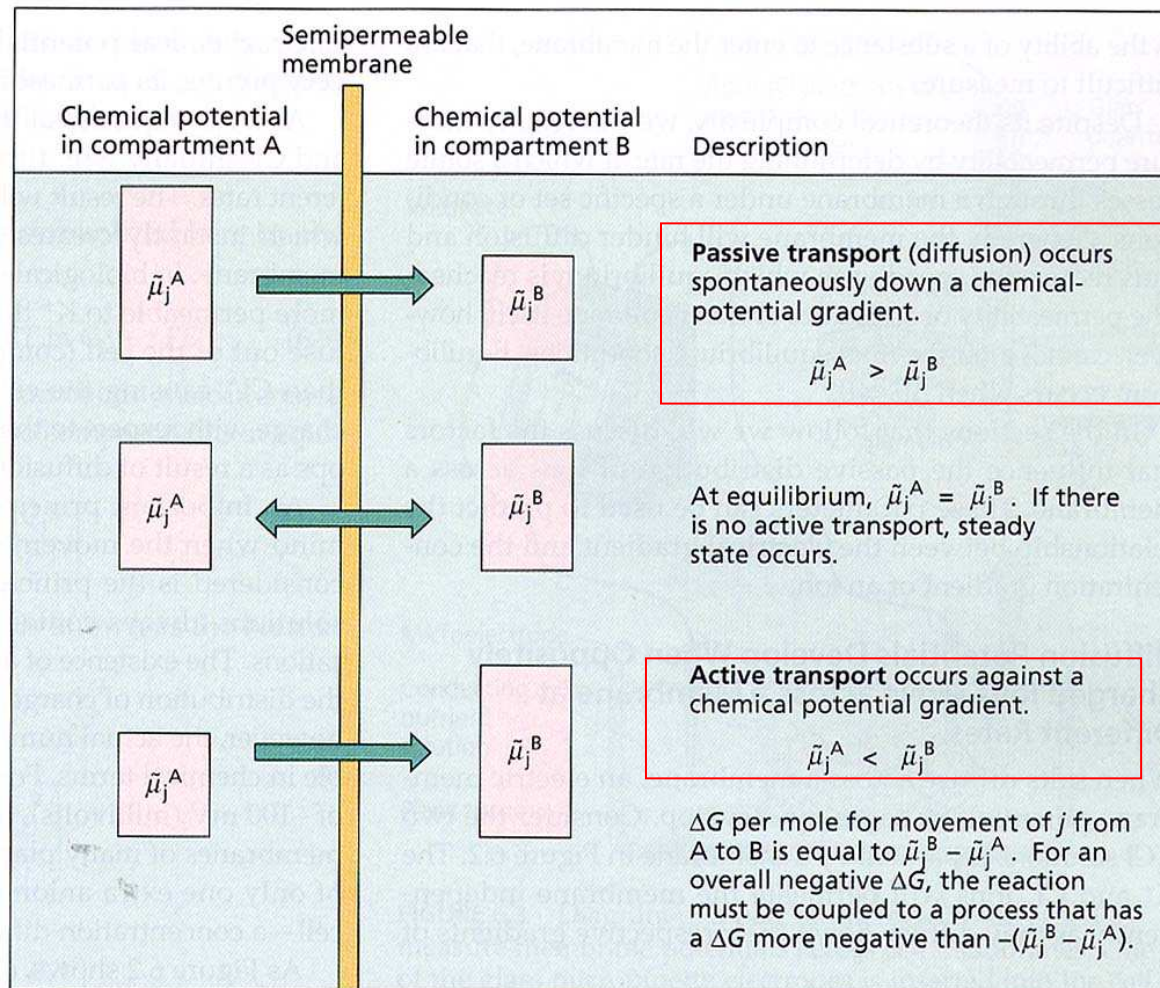
$$= RT(\ln C_s^i - \ln C_s^o) =$$

$$= RT \ln \frac{C_s^i}{C_s^o}$$

$$\Delta \bar{\mu}_s = RT \ln \frac{C_s^i}{C_s^o}$$

$\Delta \bar{\mu}_s$ è proporzionale al gradiente di
concentrazione

relazione tra il potenziale chimico $\bar{\mu}$ e il trasporto di molecole attraverso una membrana



ione K⁺

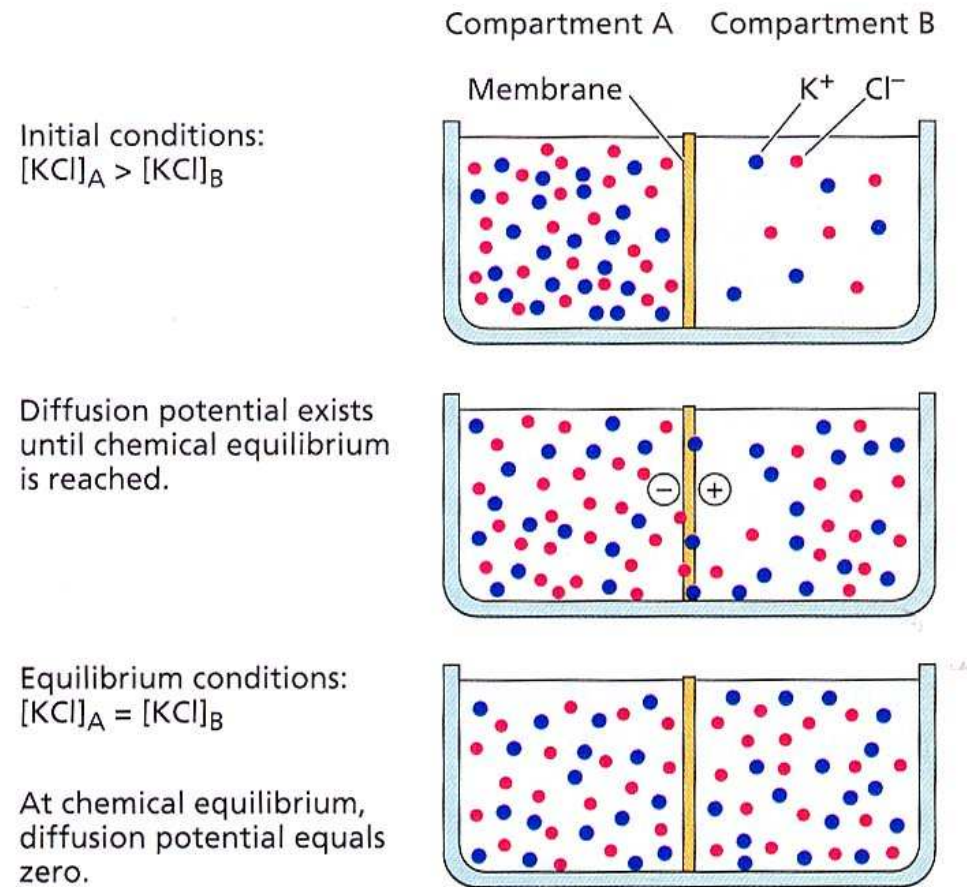
$$\Delta\bar{\mu}_K = RT \ln \frac{C_K^i}{C_K^o} + zF(E^i - E^o)$$

dato che z=+1

$$\Delta\bar{\mu}_K = RT \ln \frac{C_K^i}{C_K^o} + F(E^i - E^o)$$

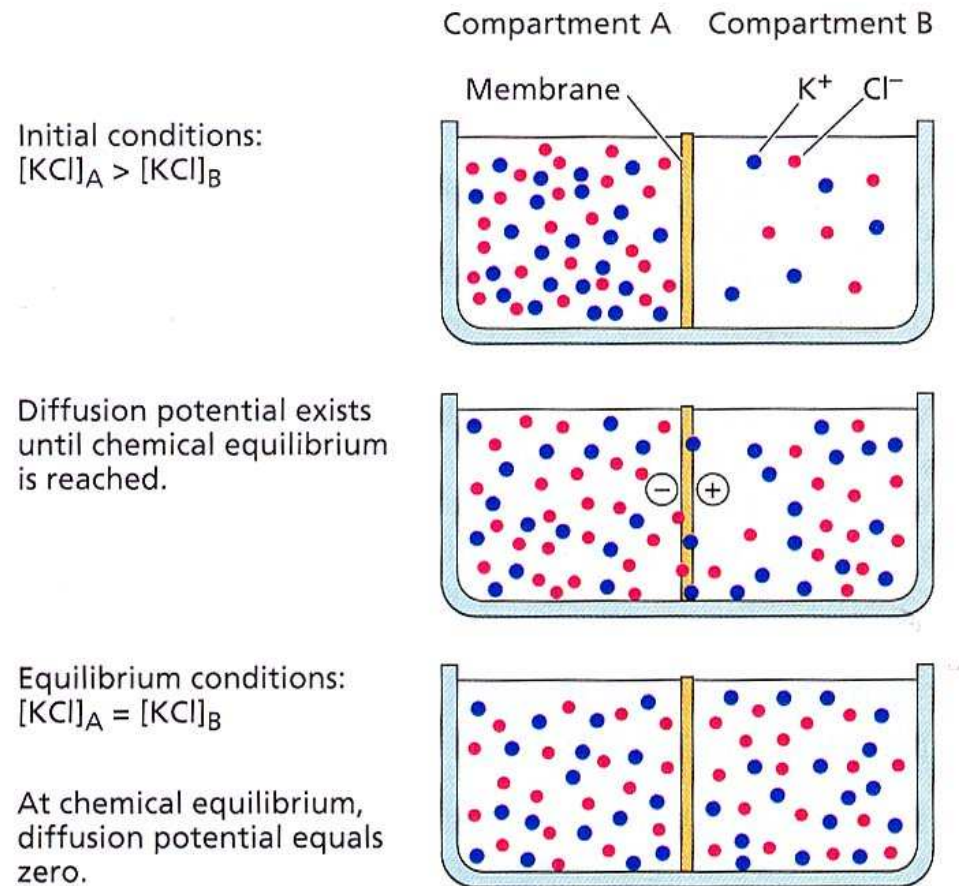
gli ioni diffondono sia in risposta a
gradienti di concentrazione che a
differenze di potenziale elettrico

POTENZIALE DI DIFFUSIONE



Le membrane sono diversamente permeabili alle varie molecole:
permeabilità di membrana (coefficiente di diffusione)

il potenziale di diffusione ritarda l'ingresso di K^+ e accelera quello di Cl^-



VELOCITA' DI DIFFUSIONE DIVERSE PER I VARI IONI
GENERANO POTENZIALI DI DIFFUSIONE ATTRAVERSO LE
MEMBRANE

(si può definire un coefficiente di diffusione della
sostanza attraverso la membrana)

PRINCIPIO DELL'ELETTRONEUTRALITÀ

una soluzione contiene sempre un numero uguale di anioni e cationi

la presenza di un potenziale di membrana indica una distribuzione disuguale degli ioni attraverso la membrana

trascurabile in termini chimici

-100 mV → un anione in più su 100.000

Il potenziale di membrana altera la distribuzione degli ioni

quando la distribuzione di un soluto attraverso la
membrana raggiunge l'equilibrio, il flusso passivo (J)
è lo stesso in entrambe le direzioni

$$J_{o \rightarrow i} = J_{i \rightarrow o}$$

$$J_{o \rightarrow i} = J_{i \rightarrow o}$$

$$\bar{\mu}_j^o = \bar{\mu}_j^i$$

quindi

$$\bar{\mu}_j^* + RT \ln C_j^o + z_j F E^o = \bar{\mu}_j^* + RT \ln C_j^i + z_j F E^i$$

ovvero

$$E_i - E_o = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{C_j^o}{C_j^i}$$

equazione di Nernst

$$\Delta E_n = E_i - E_o$$

potenziale di Nernst

$$\Delta E_n = \frac{2.3RT}{z_j F} \log \frac{C_j^o}{C_j^i}$$

per uno ione monovalente a 25°C

$$\Delta E_n = 59 \log \frac{C_j^o}{C_j^i} \quad (\text{mV})$$

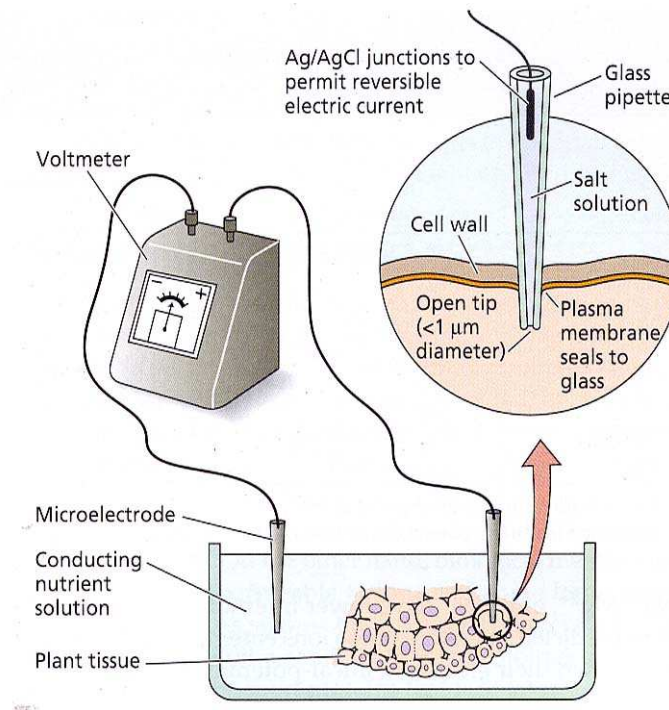
all'equilibrio, la differenza di concentrazione di uno ione tra due scomparti è bilanciata dalla differenza di campo elettrico tra gli scomparti

$$\Delta E_n = 59 \log \frac{C_j^o}{C_j^i}$$



stabilendo un ΔE di 59 mV si mantiene una differenza di concentrazione di 10 volte

tutte le cellule possiedono un potenziale di membrana,
dovuto alla distribuzione asimmetrica degli ioni tra
l'interno e l'esterno della cellula



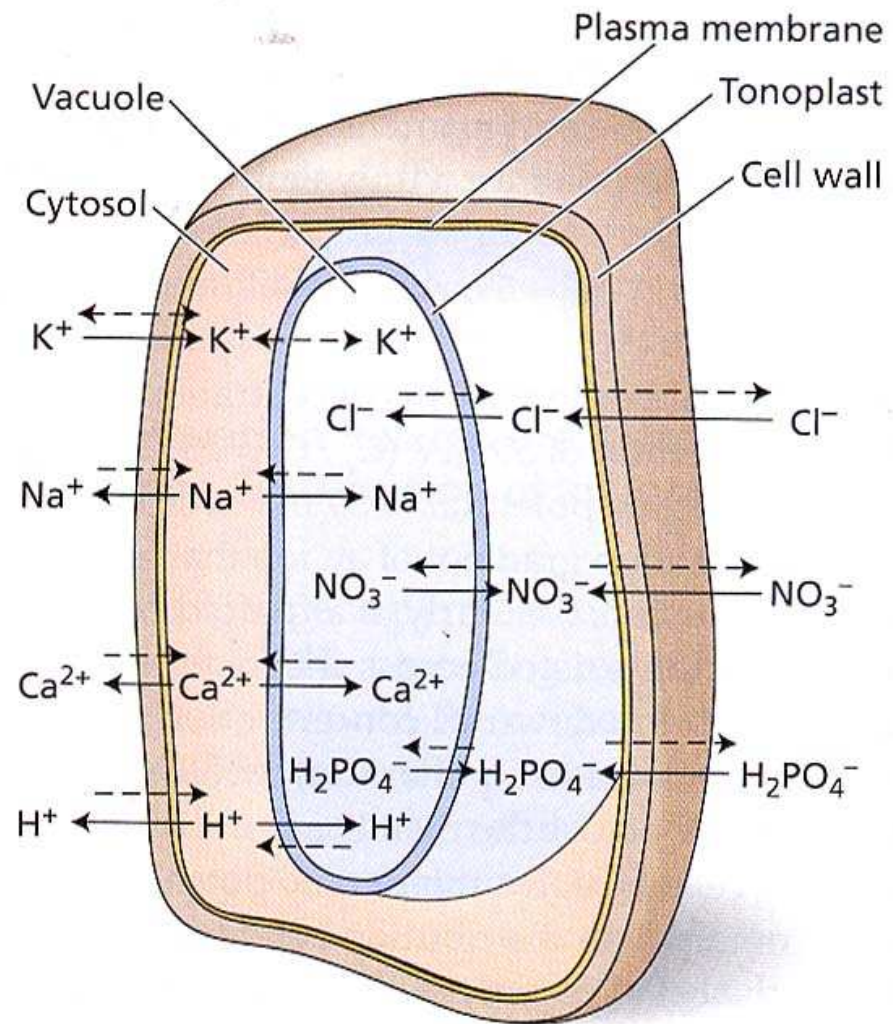
$$-240 \text{ mV} < \Delta E_n > -60 \text{ mV}$$

la misura della concentrazione dei vari ioni permette di distinguere tra trasporto attivo e passivo

TABLE 6.1
Comparison of observed and predicted ion concentrations in
pea root tissue **$\Delta E = -100 \text{ mV}$**

Ion	Concentration in external medium (mmol L ⁻¹)	Internal concentration (mmol L ⁻¹)	
		Predicted	Observed
K ⁺	1	74	75
Na ⁺	1	74	8
Mg ²⁺	0.25	1340	3
Ca ²⁺	1	5360	2
NO ₃ ⁻	2	0.0272	28
Cl ⁻	1	0.0136	7
H ₂ PO ₄ ⁻	1	0.0136	21
SO ₄ ²⁻	0.25	0.00005	19

questo esperimento non discrimina tra i vari scomparti cellulari



EQUAZIONE DI GOLDMAN

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \left(\ln \frac{P_{K^+} C_{K^+}^o + P_{Na^+} C_{Na^+}^o + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^i}{P_{K^+} C_{K^+}^i + P_{Na^+} C_{Na^+}^i + P_{Cl^-} C_{Cl^-}^o} \right)$$

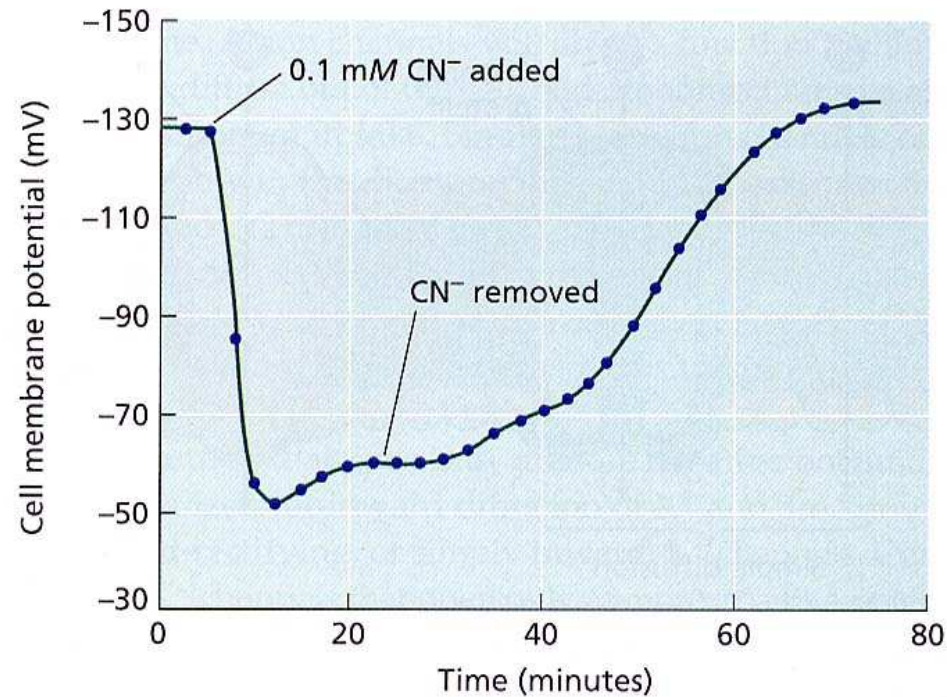
ΔE calcolato con
l'equazione di Goldman

= -50/-40 mV

misura sperimentale ΔE

= -240/-60 mV

qual è la componente aggiuntiva?



CN^- aumento pH apoplasto
diminuzione pH citosol



H^+ è lo ione
trasportato
elettrogenicamente

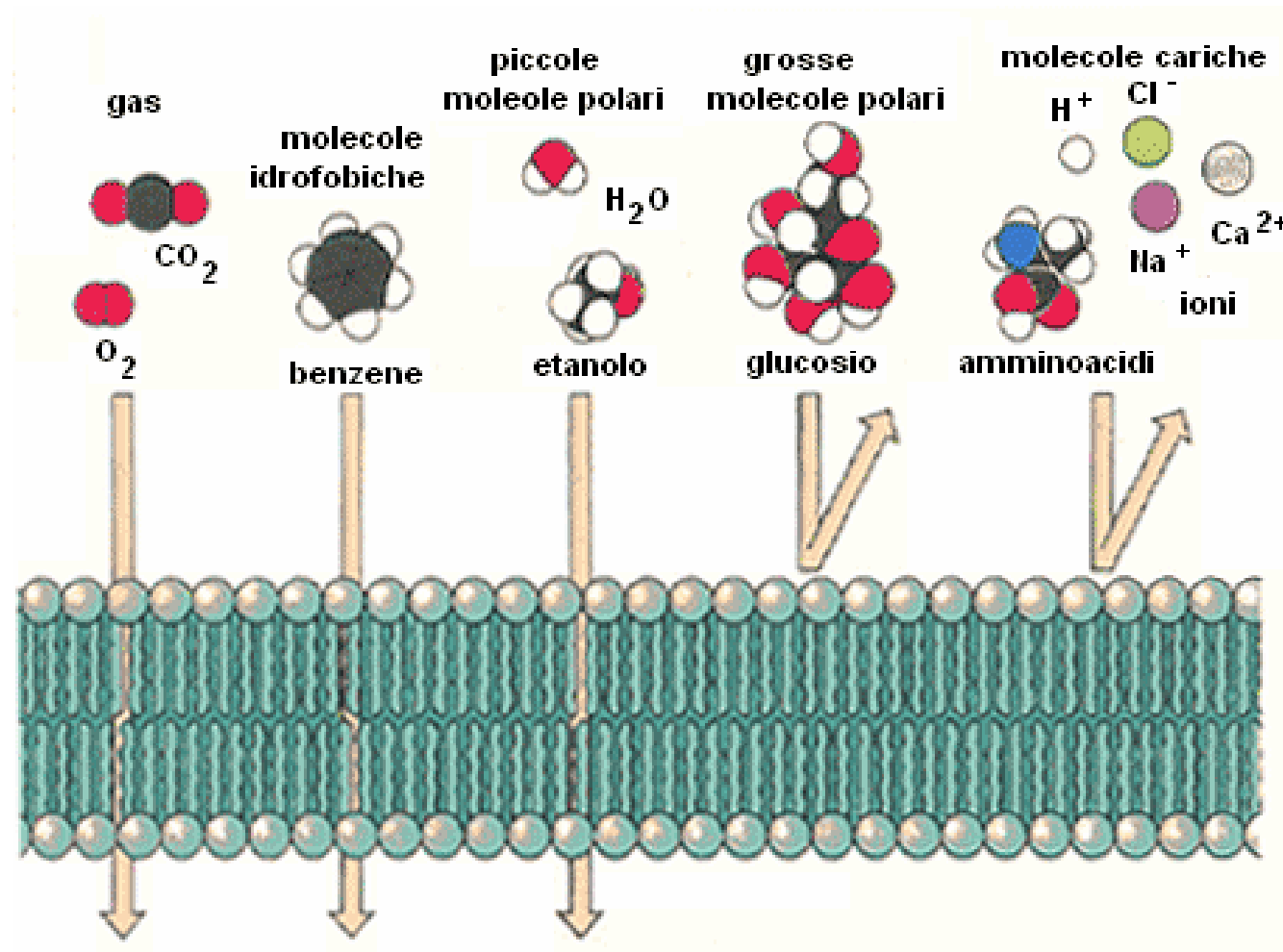
I potenziali di membrana delle cellule vegetali sono il risultato di due componenti

➤ Potenziale di diffusione

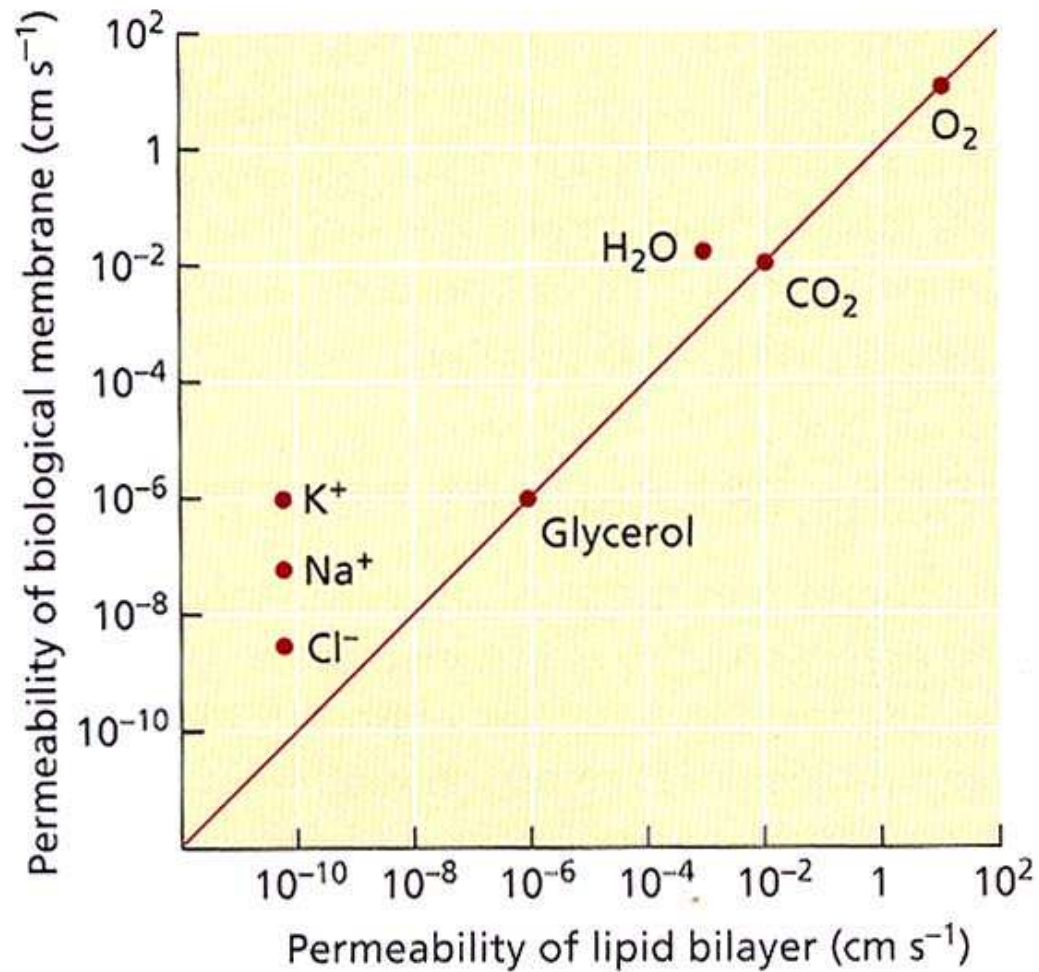
➤ Trasporto elettrogenico

PROCESSI DI TRASPORTO DI MEMBRANA

Permeabilità di doppi strati lipidici



Confronto dei valori di permeabilità (P) per diverse molecole tra membrane artificiali e biologiche



Le membrane biologiche sono in genere più permeabili di doppi strati lipidici artificiali a ioni, acqua e molecole polari

Proteine di trasporto:

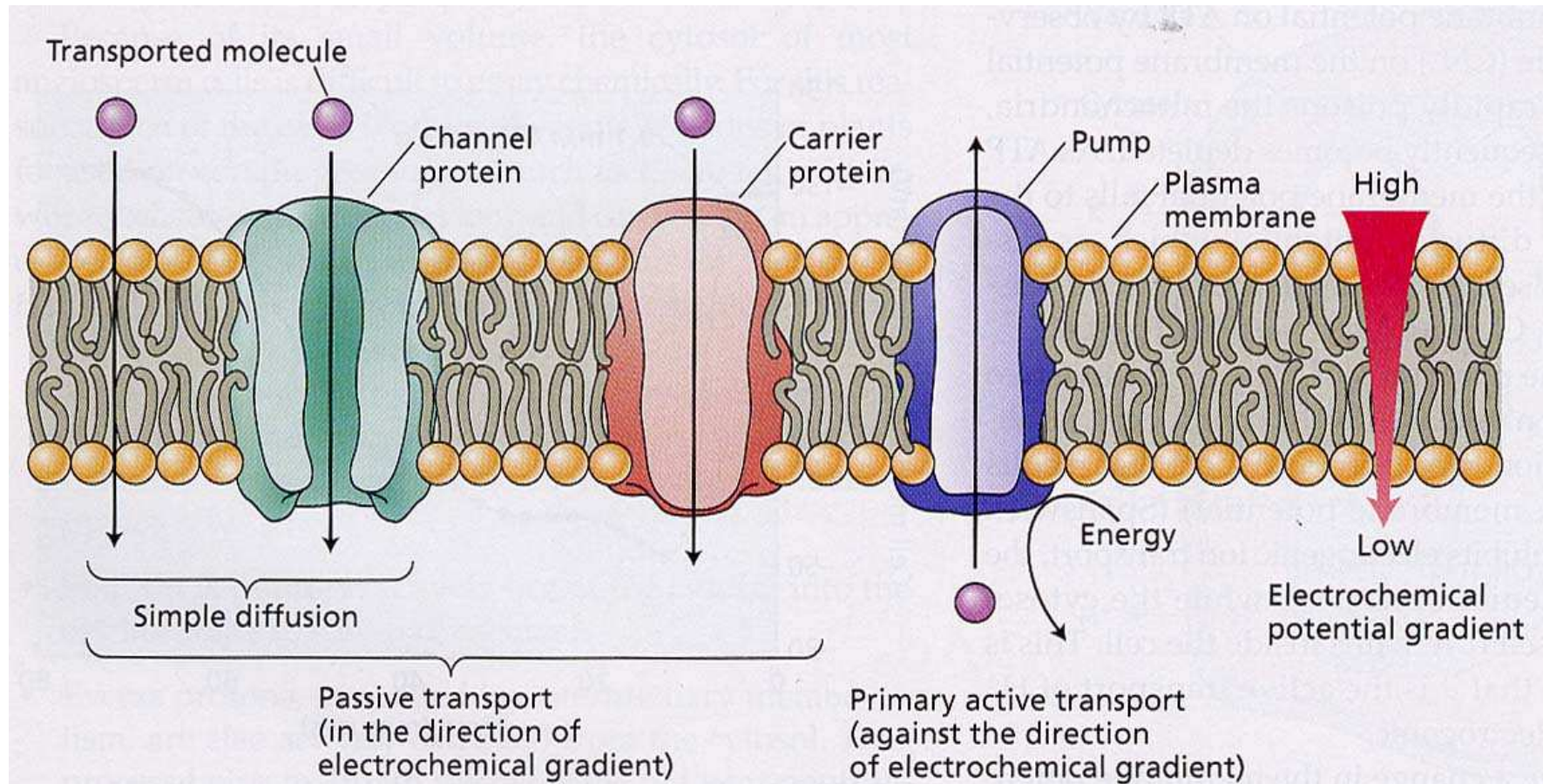
Canali

Carriers

Pompe

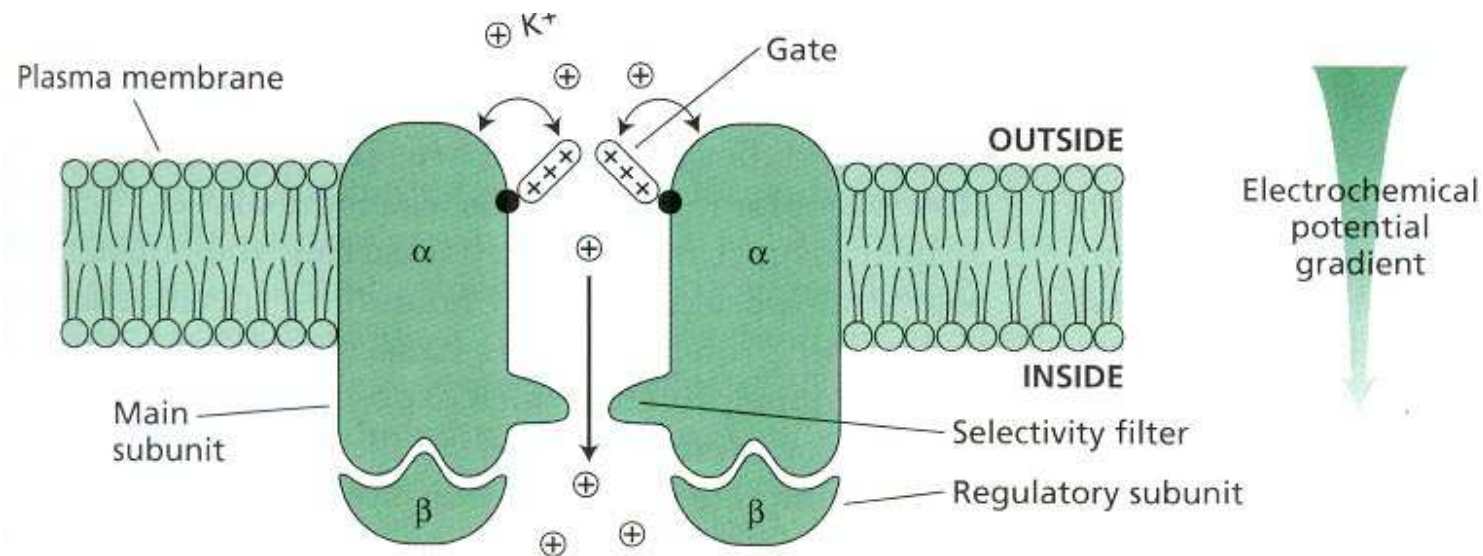
(In Arabidopsis su 25.800 proteine 1800 trasporto)

Proteine di trasporto



CANALI

due conformazioni: aperti/chiusi



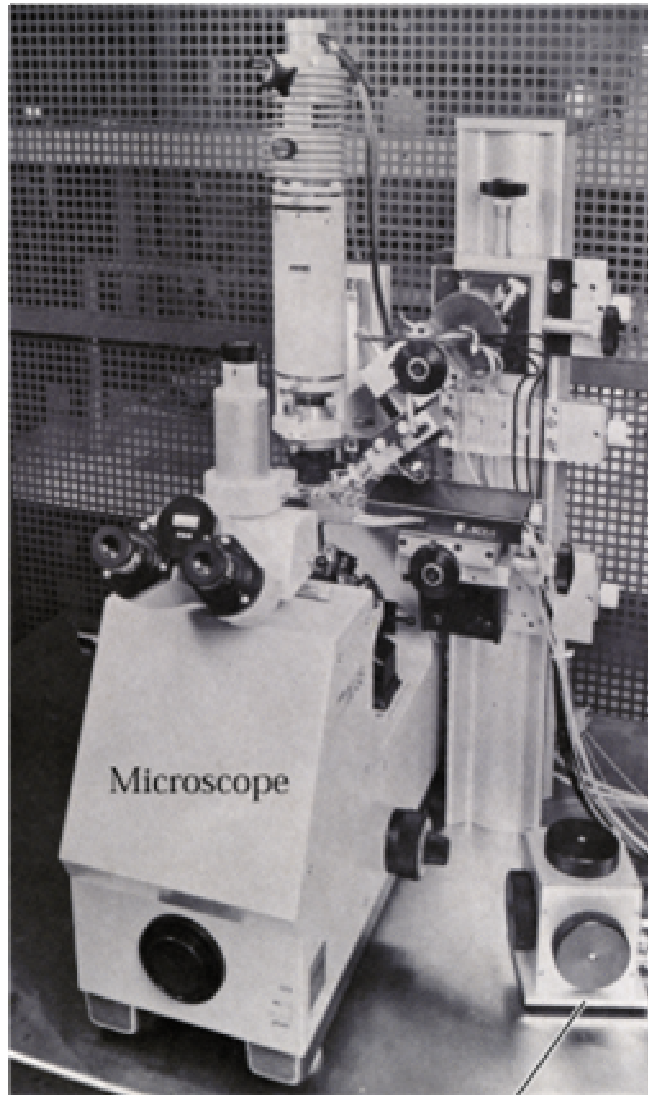
Ampiezza del poro e cariche di superficie = selettività

CANALI

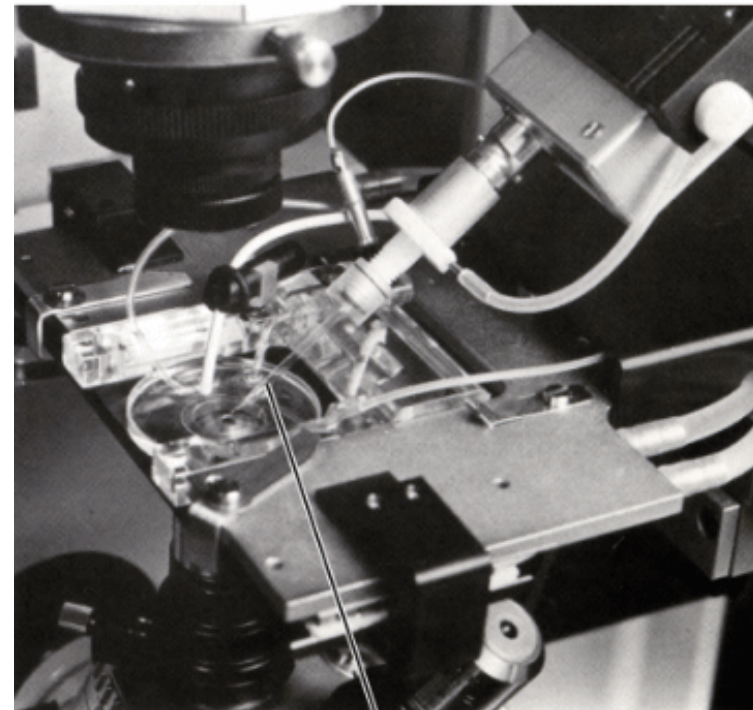
- Trasportano ioni
- Sono specifici per lo ione trasportato
- La selettività è data dall'ampiezza e da cariche di superficie all'interno del poro
- Sono regolati (voltaggio, ormoni, luce, fosforilazione)

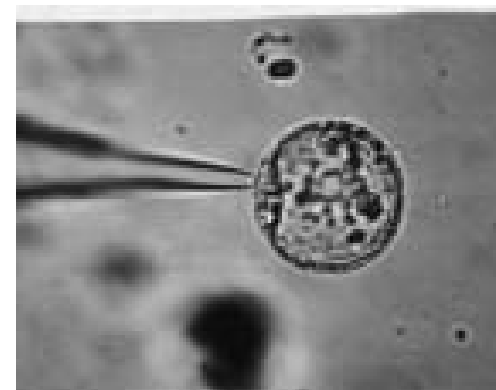
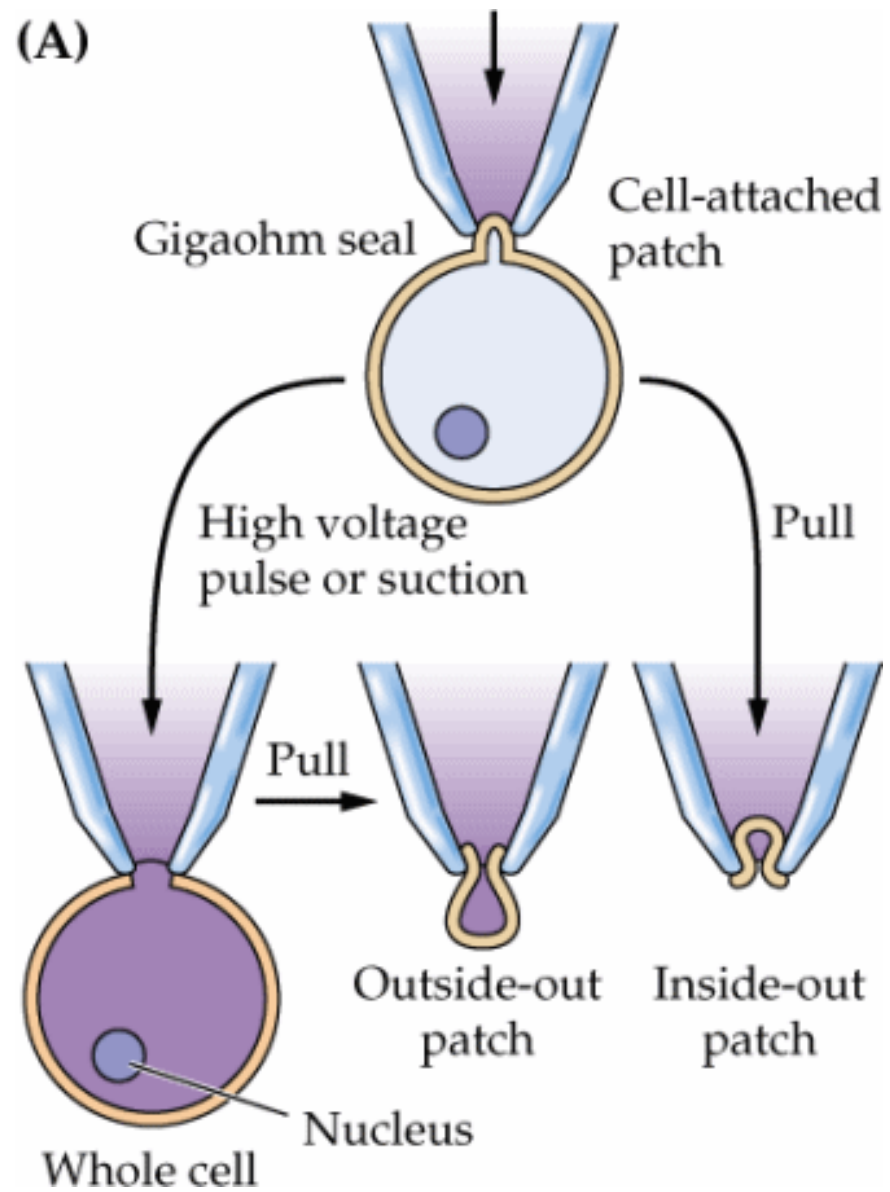
I canali si studiano con la tecnica del patch clamp

(B)

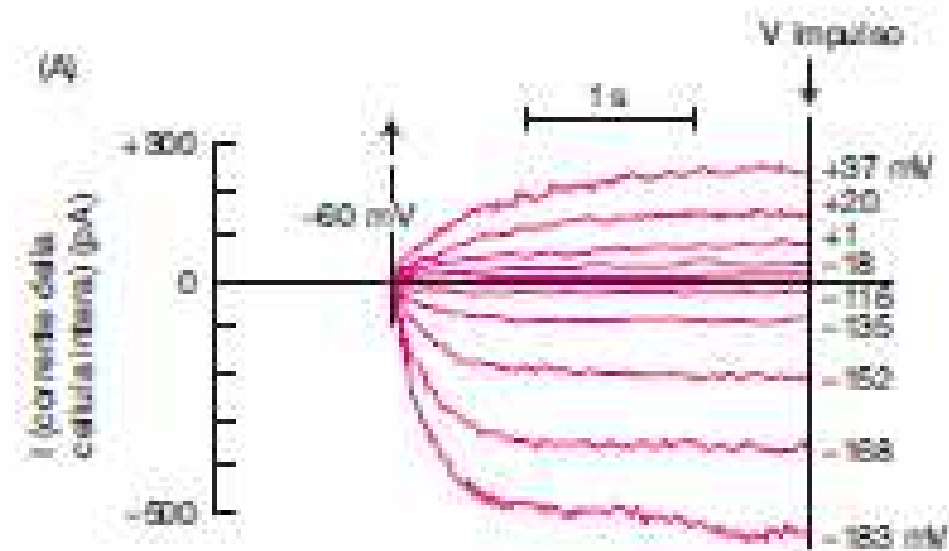


(C)



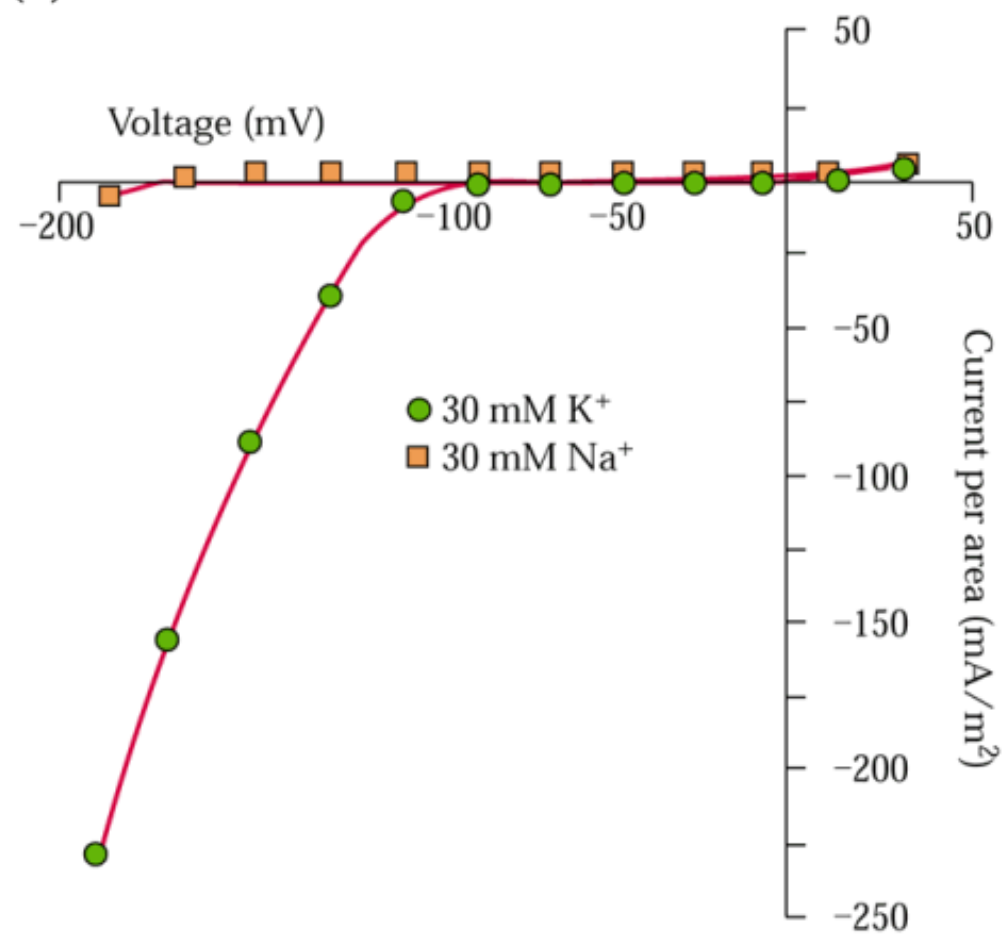


voltage-clamp

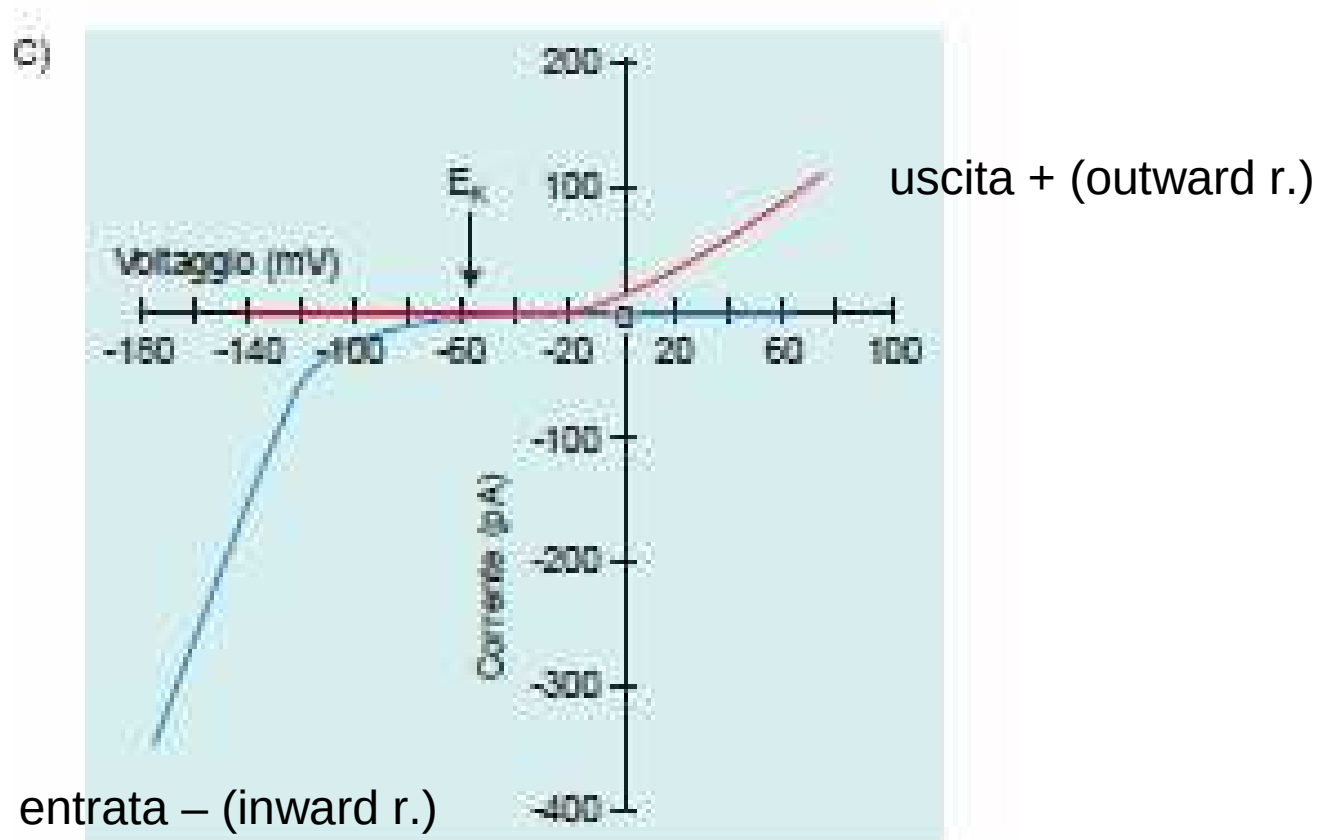


singolo canale

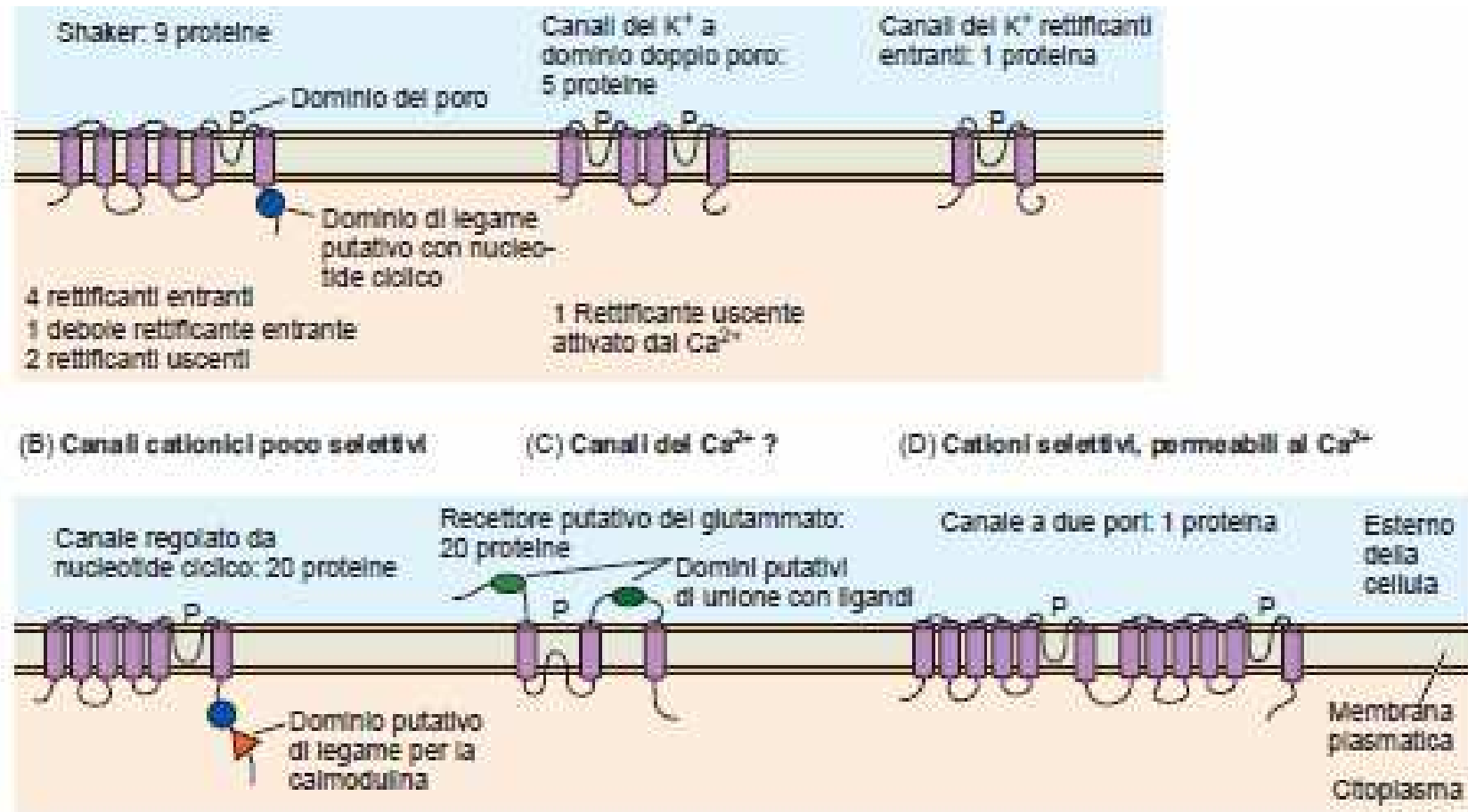
(B)



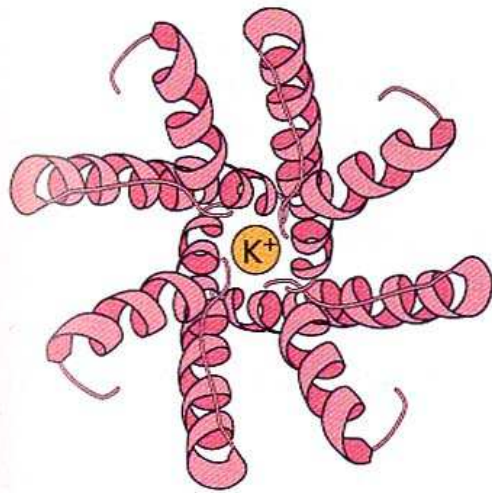
Esistono canali distinti di entrata ed uscita per il K^+



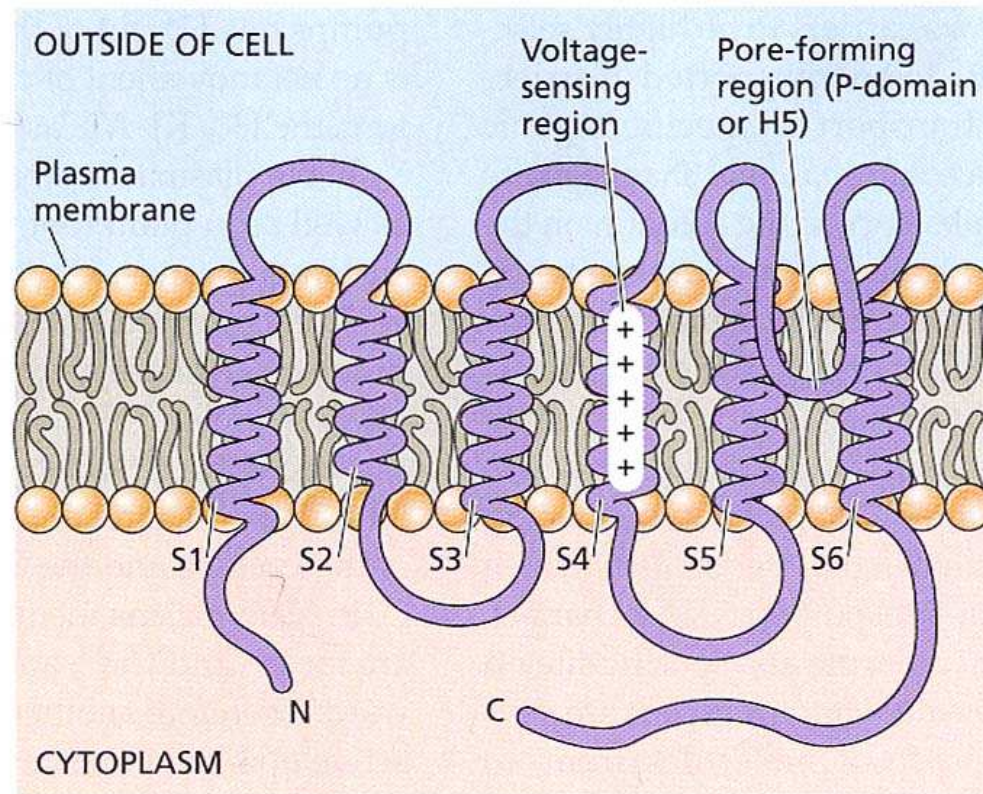
CANALI CATIONICI : 6 famiglie in arabidopsis



Modello per i canali del K^+ (**inward**) delle piante



4 subunità, dall'alto



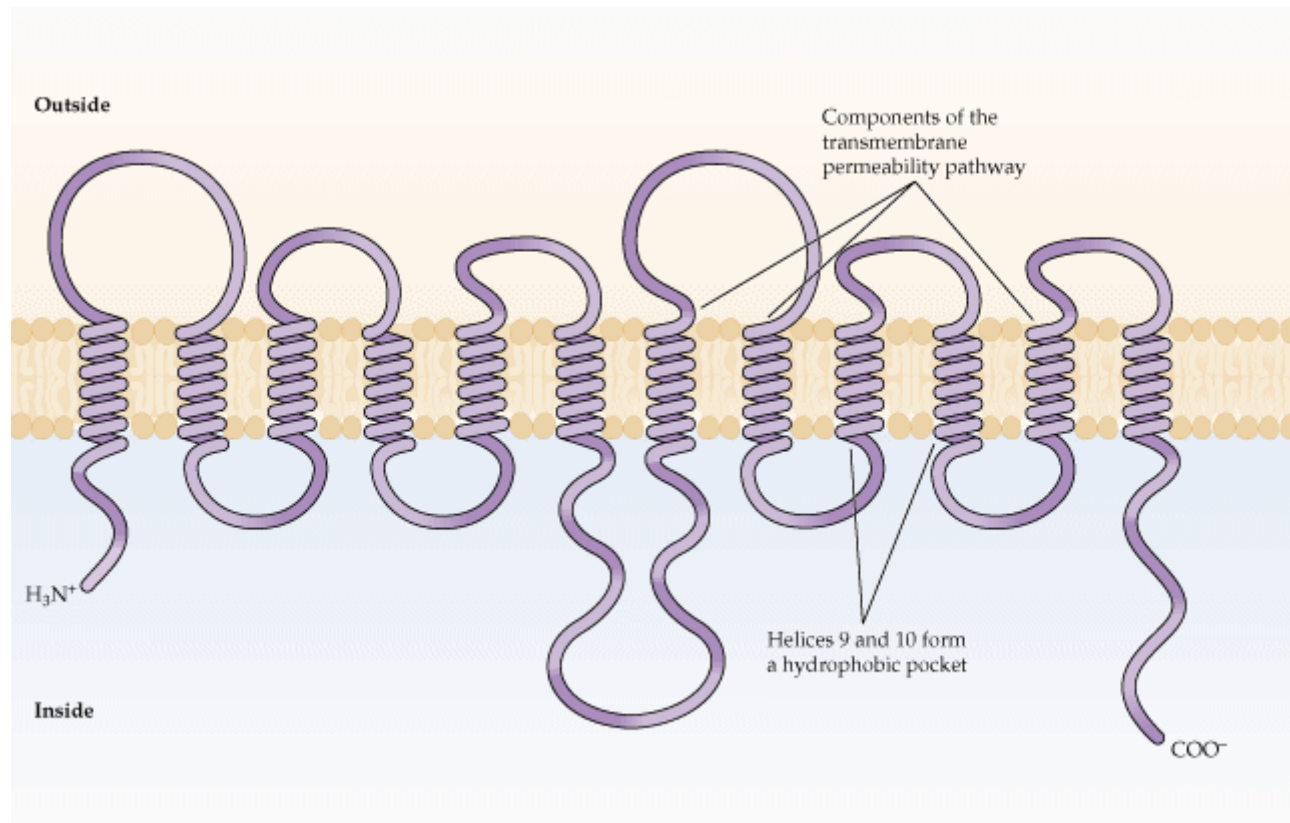
1 subunità vista lateralmente

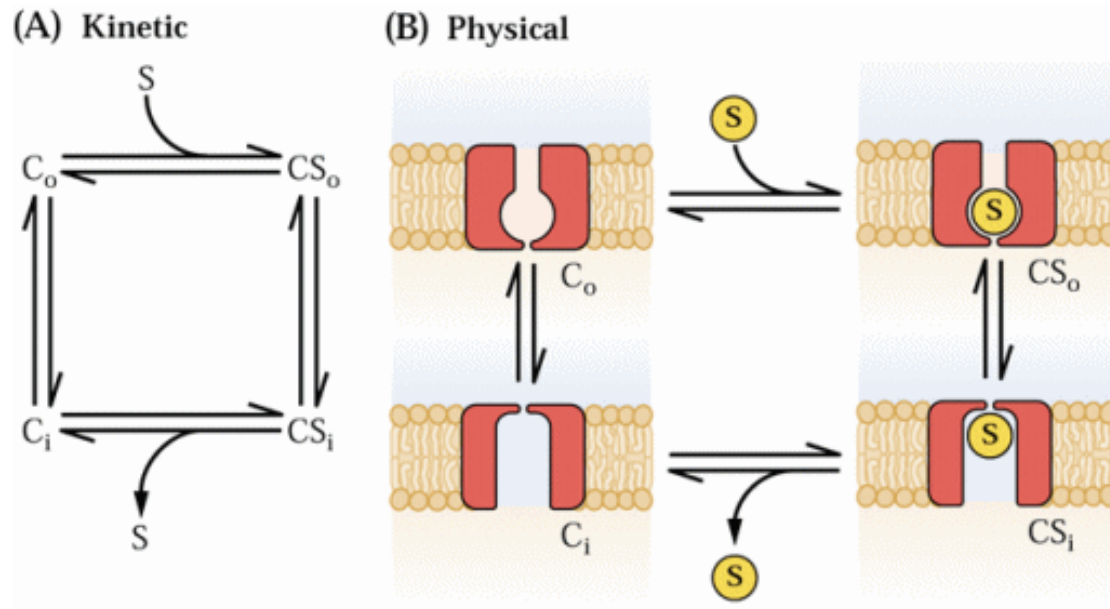
CANALI PER K^+ “SHAKER”

- Inward rectifying
- Outward rectifying
- Regolati da voltaggio
- Espressi in cellule di guardia (assorbimento o efflusso di K^+)
- Espressi nelle radici (assorbimento di K^+ dal suolo)

CARRIERS

trasporto passivo (diffusione facilitata)
trasporto vettoriale di ioni e soluti



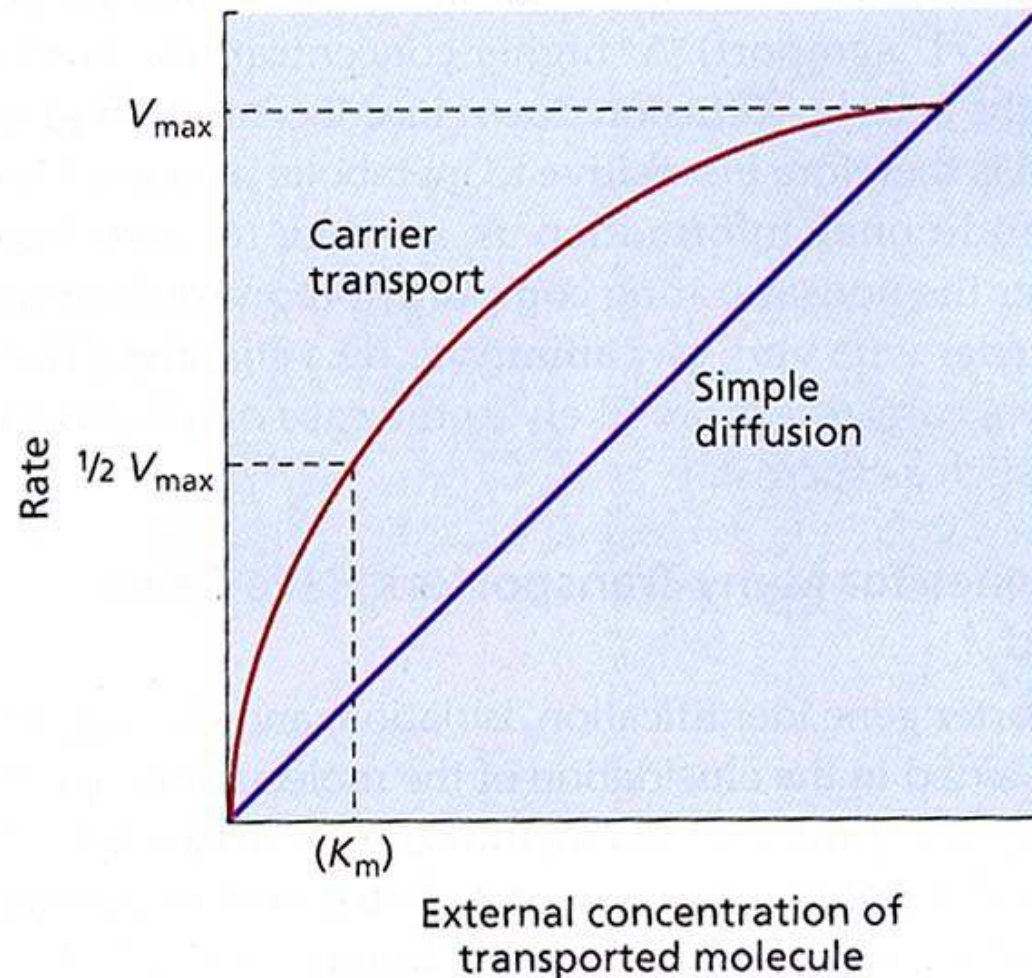
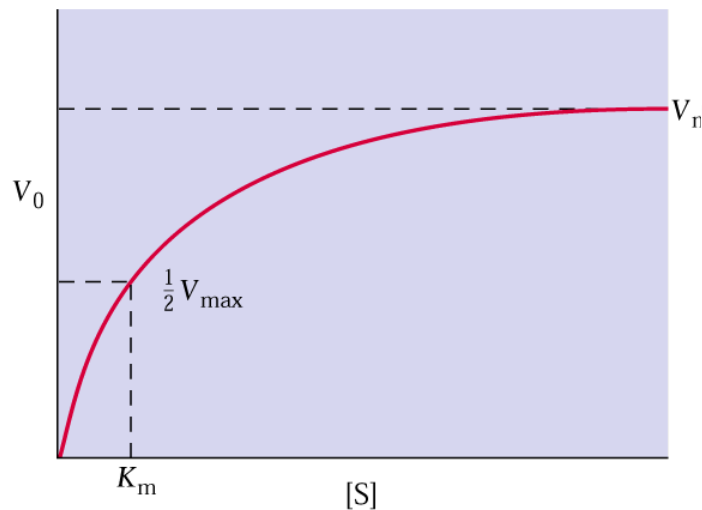


legano la molecola trasportata
 subiscono una modificazione conformazionale

la velocità di trasporto è più lenta rispetto ai canali

$$(V_{\text{canale}} = 10^6 V_{\text{carrier}})$$

**le cinetiche di attività dei carrier
sono descrivibili con l'equazione
di Michaelis-Menten**



TRASPORTO ATTIVO PRIMARIO

il trasporto è accoppiato a una fonte di energia metabolica

idrolisi di ATP
reazione di ossidoriduzione

POMPE

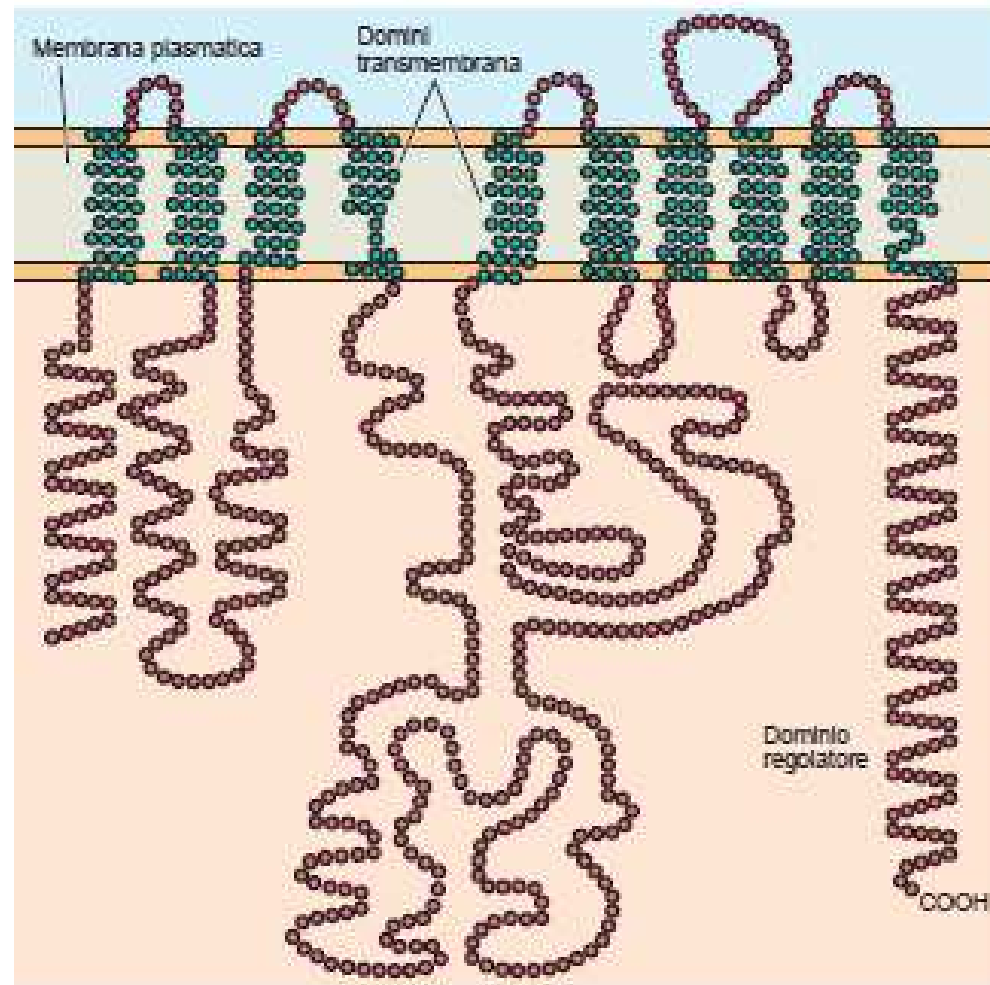
elettrogeniche → H^+ -ATPasi (piante , funghi)
 Na^+/K^+ -ATPasi (animali)

elettroneutre → H^+/K^+ -ATPasi (mucosa gastrica)

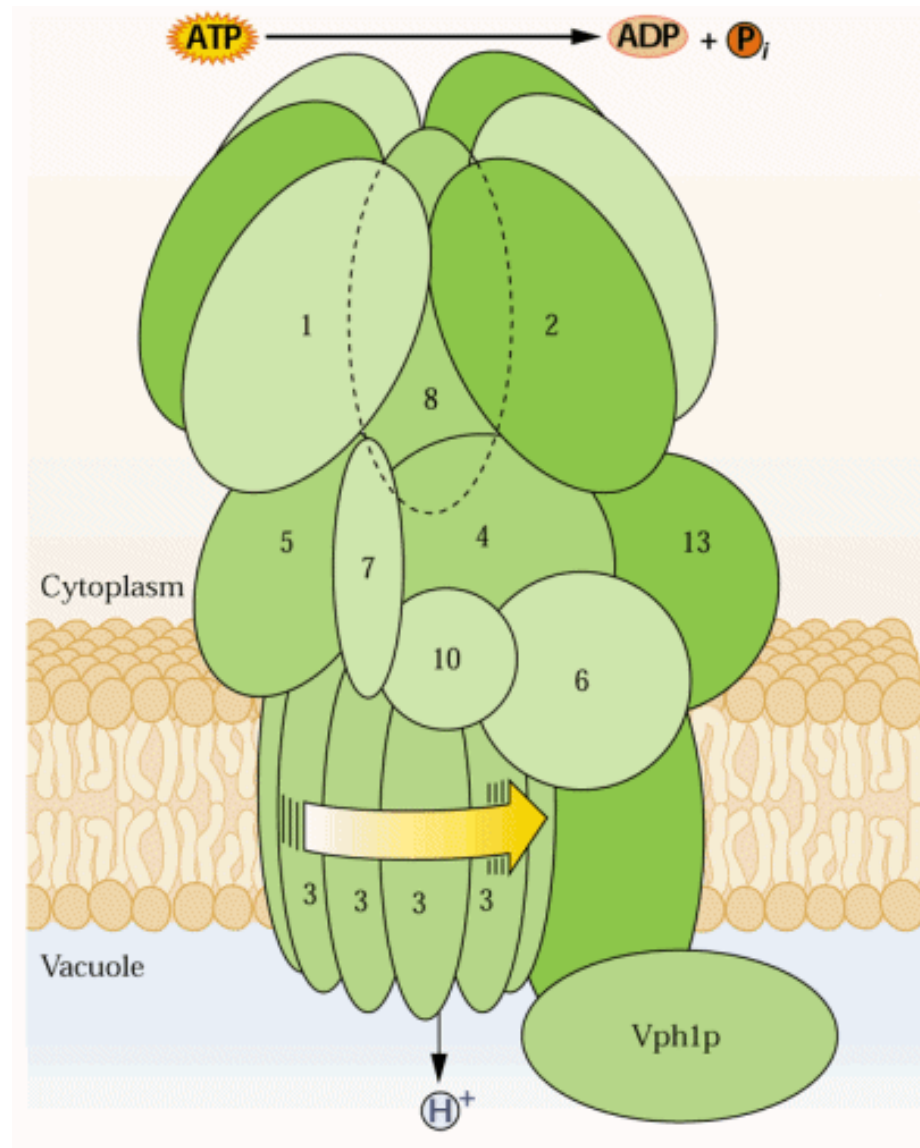
principali pompe elettrogeniche

- H^+ -ATPasi di plasmalemma
- H^+ -ATPasi vacuolare
- H^+ -pirofosfatasi (vacuolo, golgi)
- Ca^{++} ATPasi (*plasmalemma*)

H⁺-ATPasi di plasmalemma



H⁺-ATPasi vacuolare



estrusione attiva di H^+



**gradiente elettrochimico di protoni
(forza motrice protonica)**



ENERGIA LIBERA

il movimento di protoni secondo il loro gradiente elettrochimico può essere accoppiato al lavoro cellulare

$$\Delta \bar{\mu}_{H^+} = F\Delta E + 2.3RT \log \frac{[H^+]^i}{[H^+]^o}$$

$$\Delta p = \frac{\Delta \bar{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta E + \frac{2.3RT}{F} \log \frac{[H^+]^i}{[H^+]^o}$$

poiché $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$

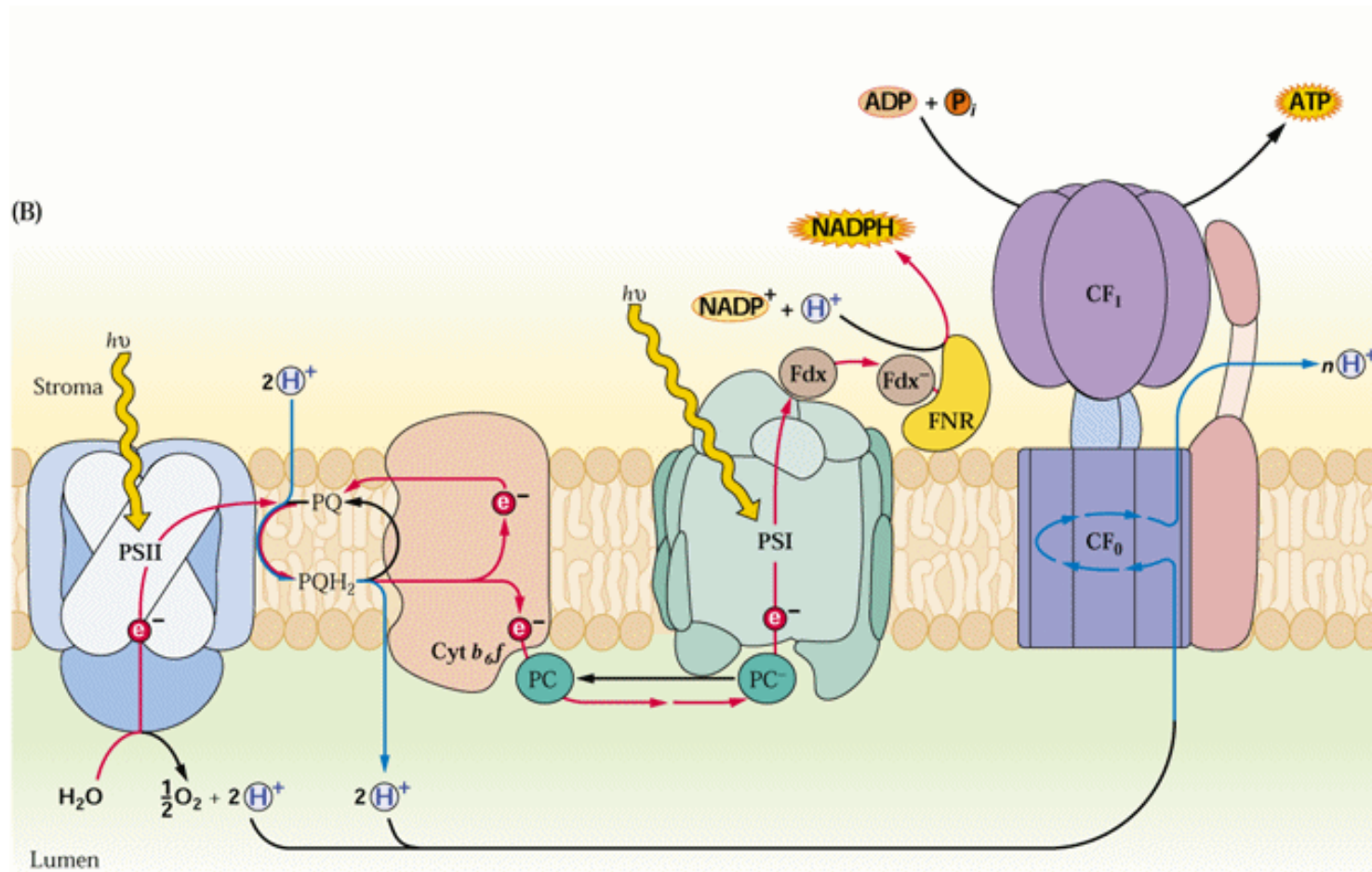
$$\log \frac{[\text{H}^+]^i}{[\text{H}^+]^o} = - (\text{pH}_i - \text{pH}_o) = \Delta\text{pH}$$

$$\Delta p = \Delta E - \frac{2.3RT}{F} \Delta\text{pH}$$

$$\Delta p = \Delta E - 59 \Delta\text{pH}$$

Forza protonmotrice

(B)



TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

la **forza proton motrice** può guidare il trasporto di altre sostanze contro il gradiente elettrochimico

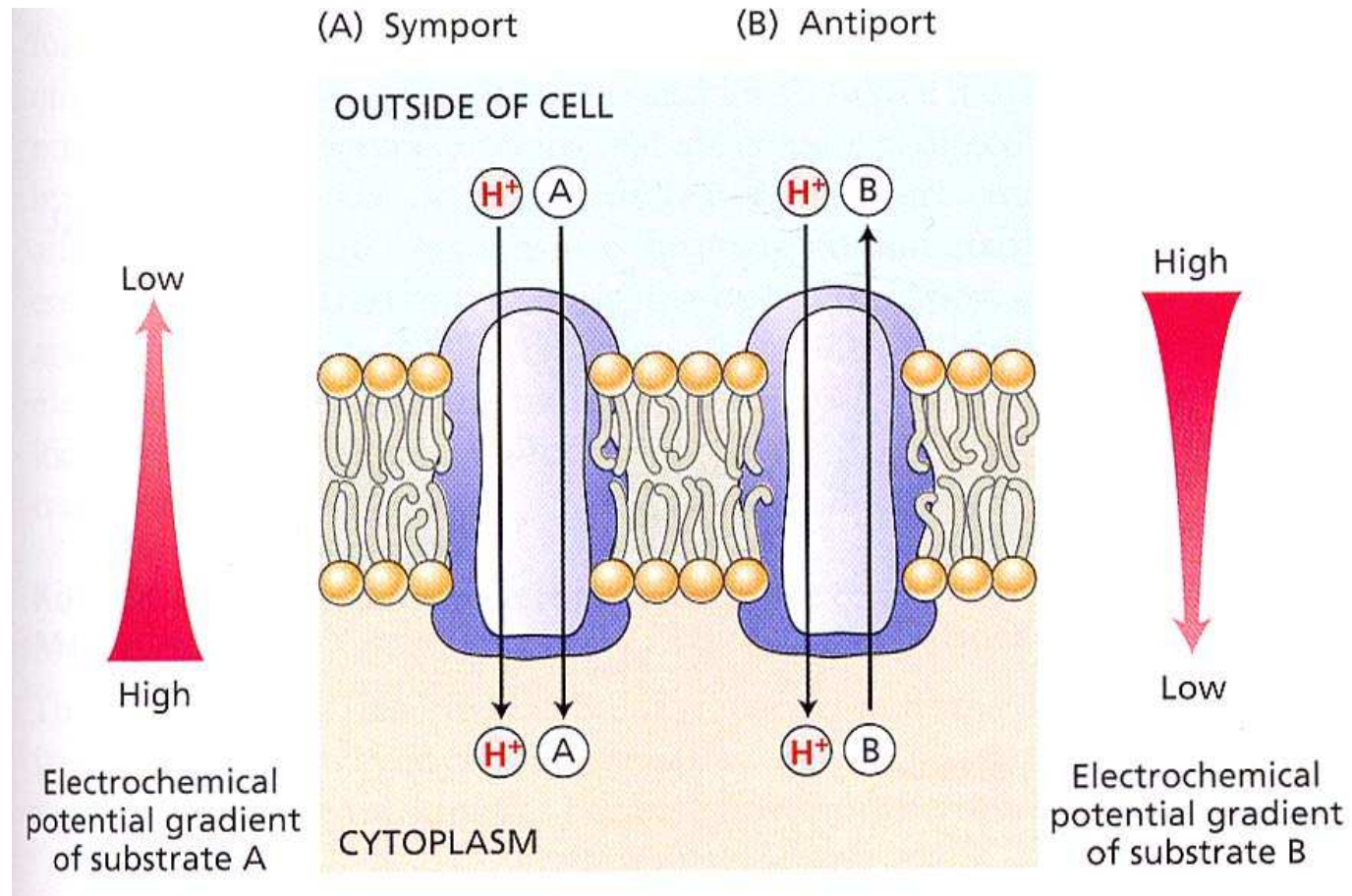
SIMPORTO

protone e molecola X si muovono nella stessa direzione

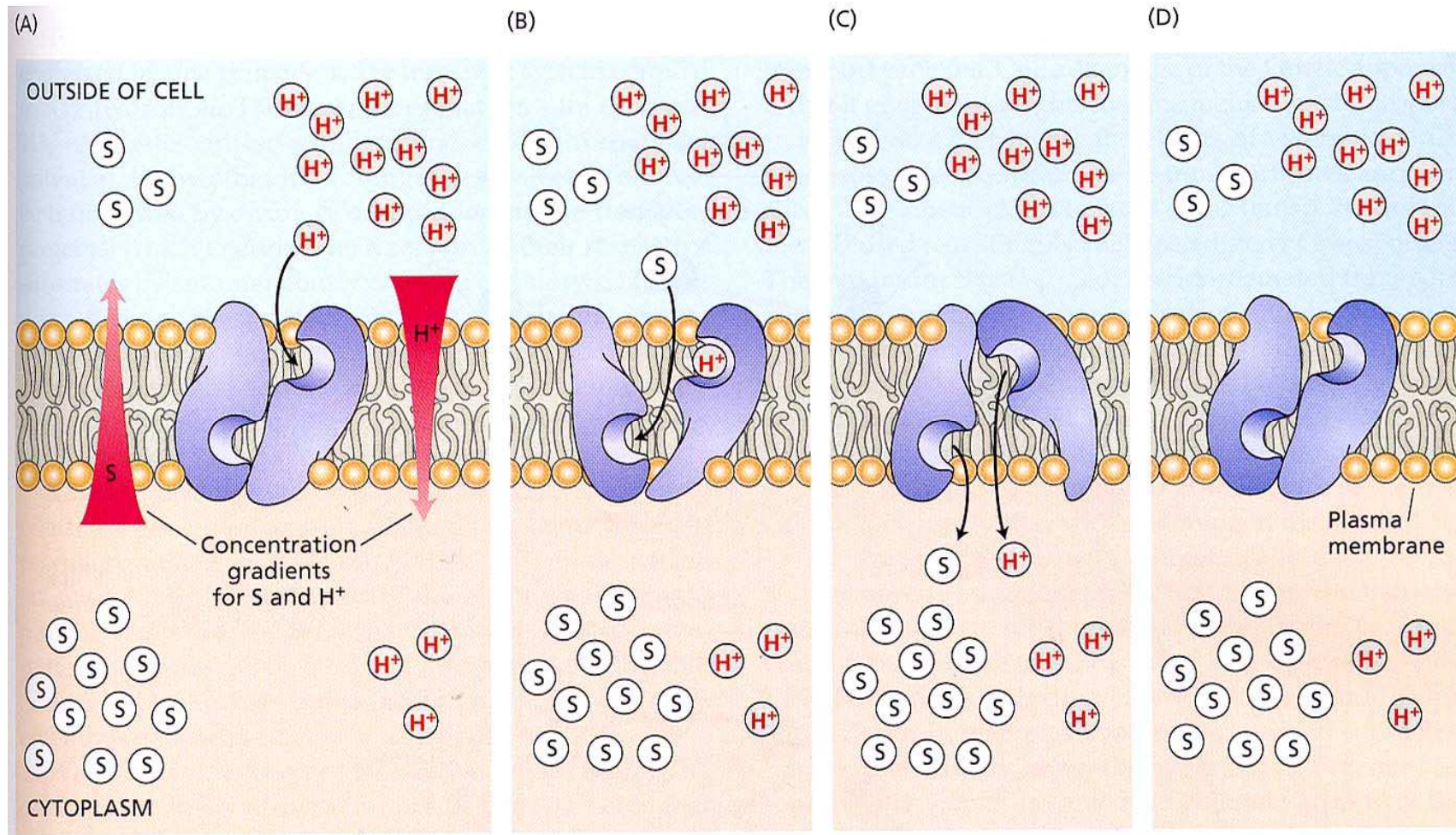
ANTIPORTO

protone e molecola X si muovono in direzioni opposte

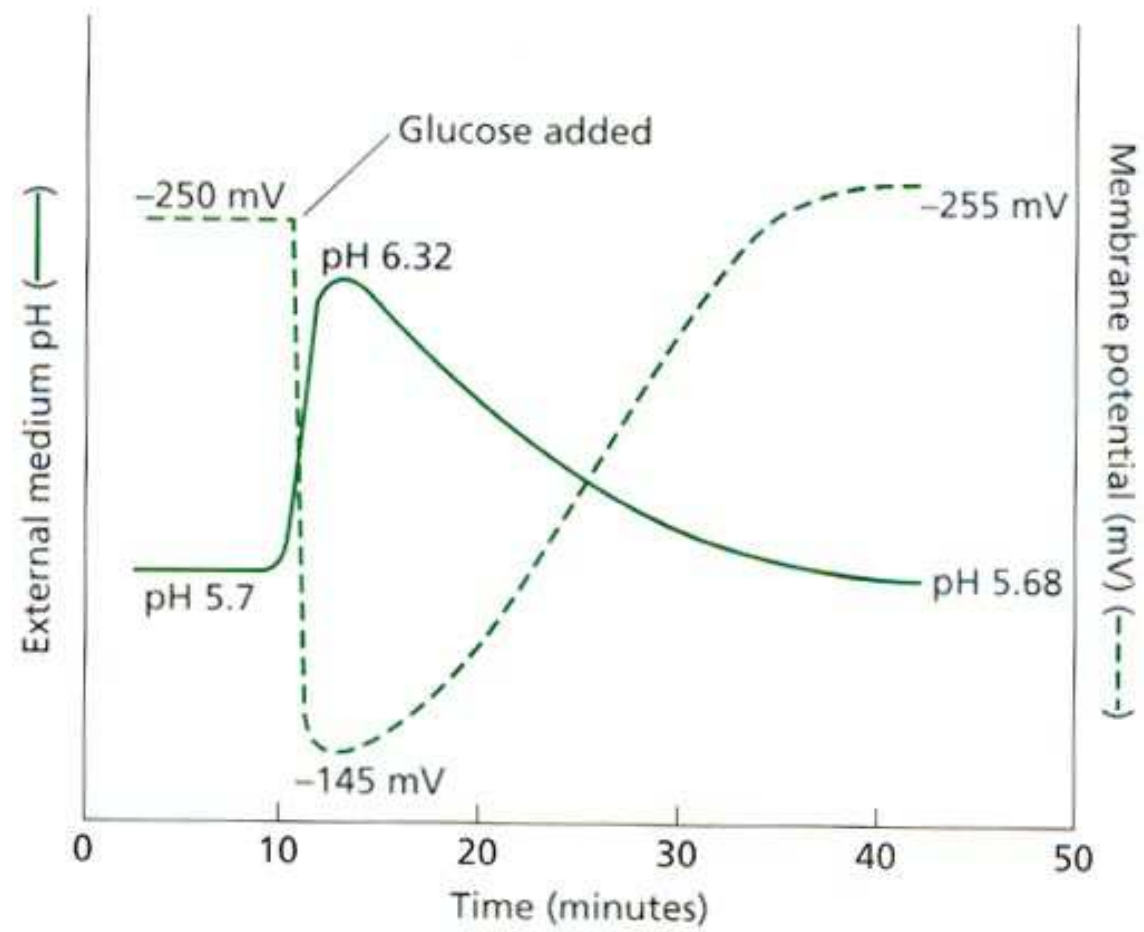
Trasporto attivo secondario



Trasporto attivo secondario



simporto glucosio- H^+



basse concentrazioni di saccarosio

saturabile

trasporto bloccato da CN^-



simporto H^+ -saccarosio

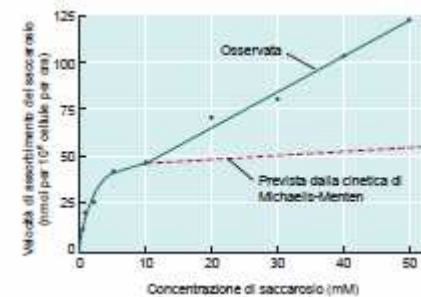
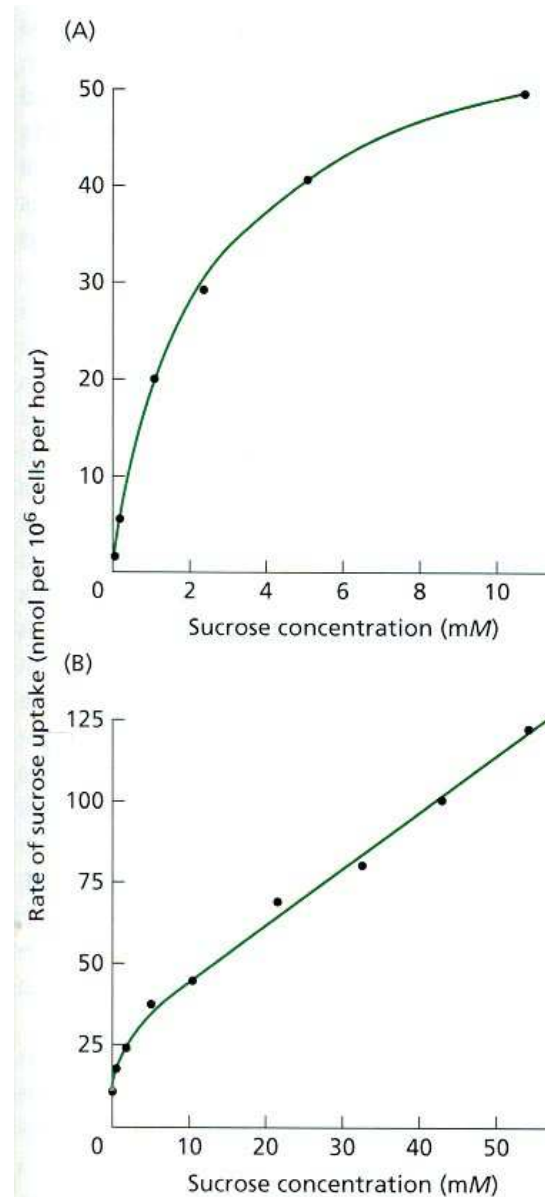
alte concentrazioni saccarosio

non saturabile

non bloccato da CN^-



trasporto passivo



PRINCIPALI IONI E SOLUTI TRASPORTATI DA CARRIER (trasporto attivo)

NO_3^- , PO_4^{2-} , SO_4^{2-} , zuccheri, amminoacidi, basi azotate

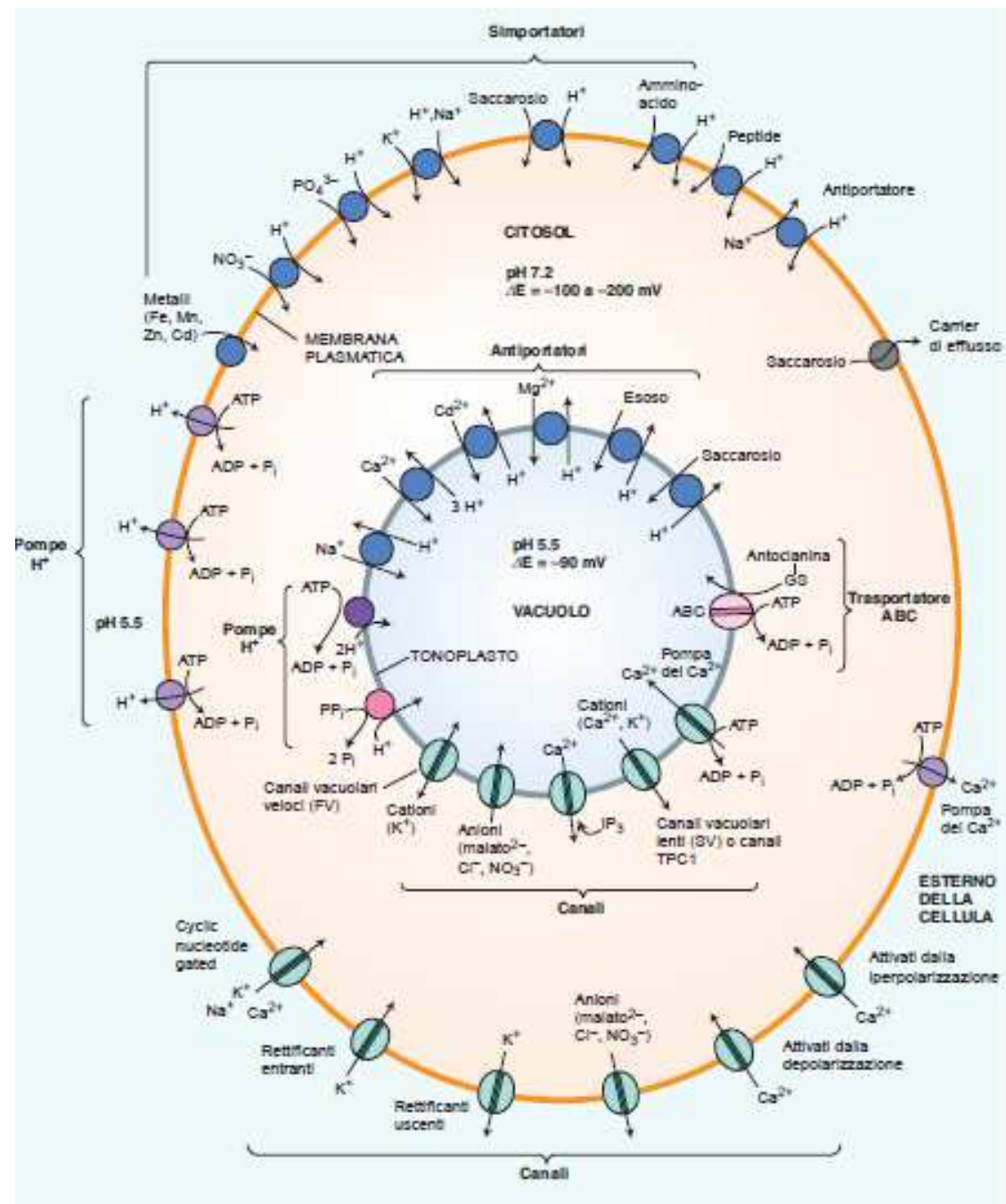
alta selettività per la molecola da trasportare

Antiportatore Na^+/H^+

Confinamento Na^+ nel vacuolo

Tolleranza alla salinità dei suoli: gene *AtNHX1*

Antiportatore $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$: vacuolo

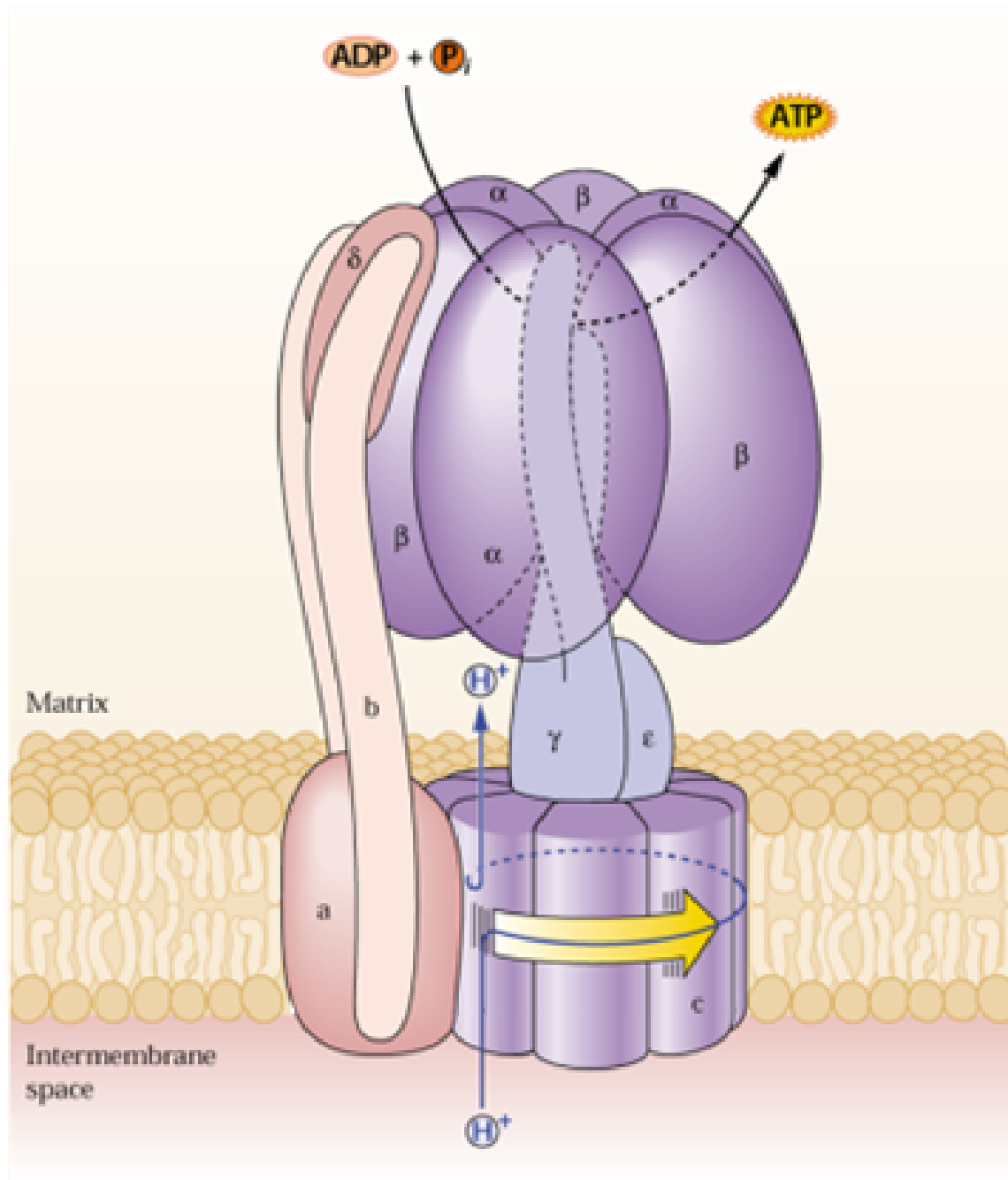


H⁺-ATPasi

F-ATPasi dei mitocondri e dei cloroplasti. Sfruttano il ΔpH per la sintesi di ATP

V-ATPasi, presente nel tonoplasto. Pompa i protoni all'interno del vacuolo, generando la forza motrice per diversi sistemi di trasporto

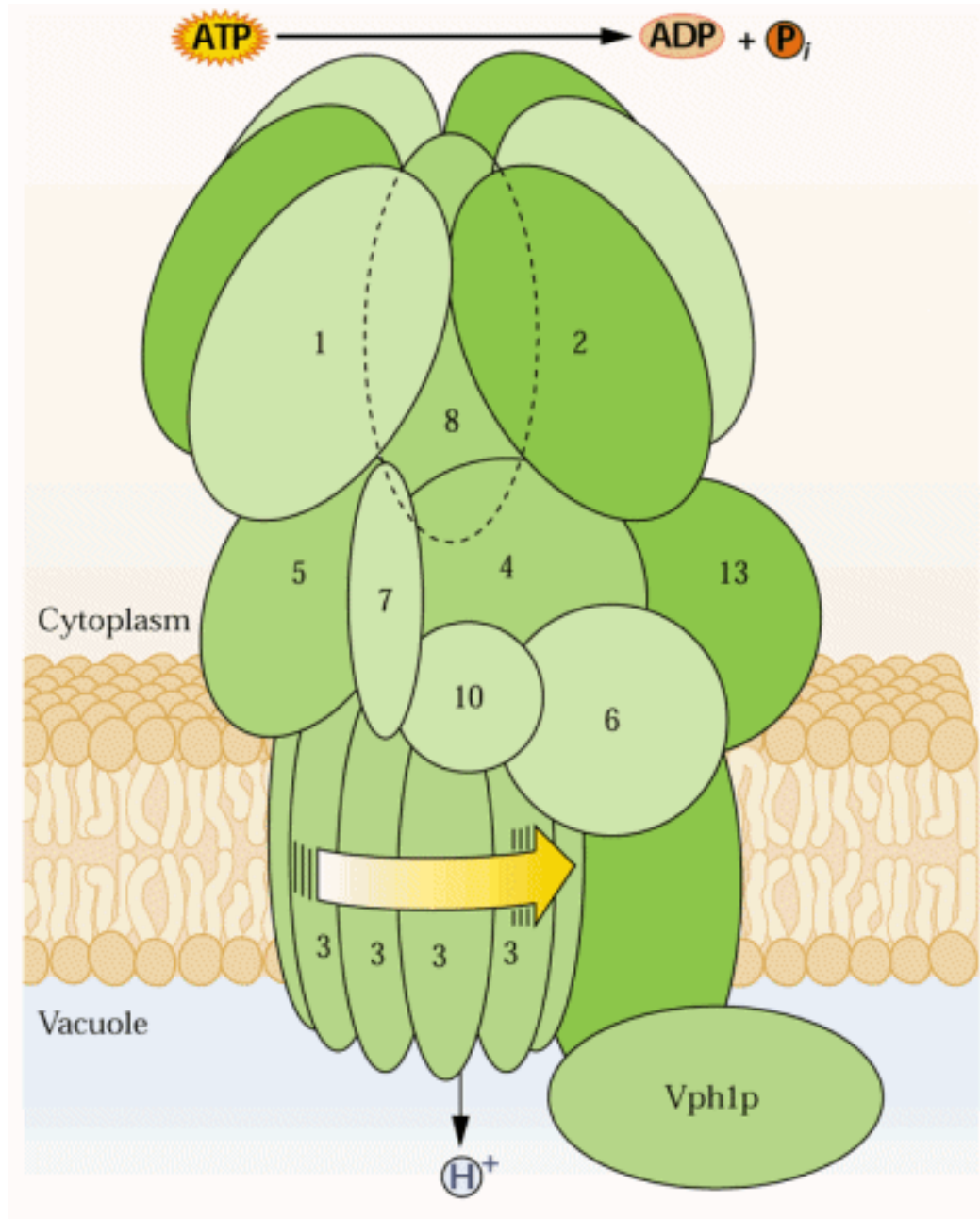
P-ATPasi, presente sulla membrana plasmatica



CF₁
 $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$

CF₀
 a, b, b', c_{12}

F-ATPase



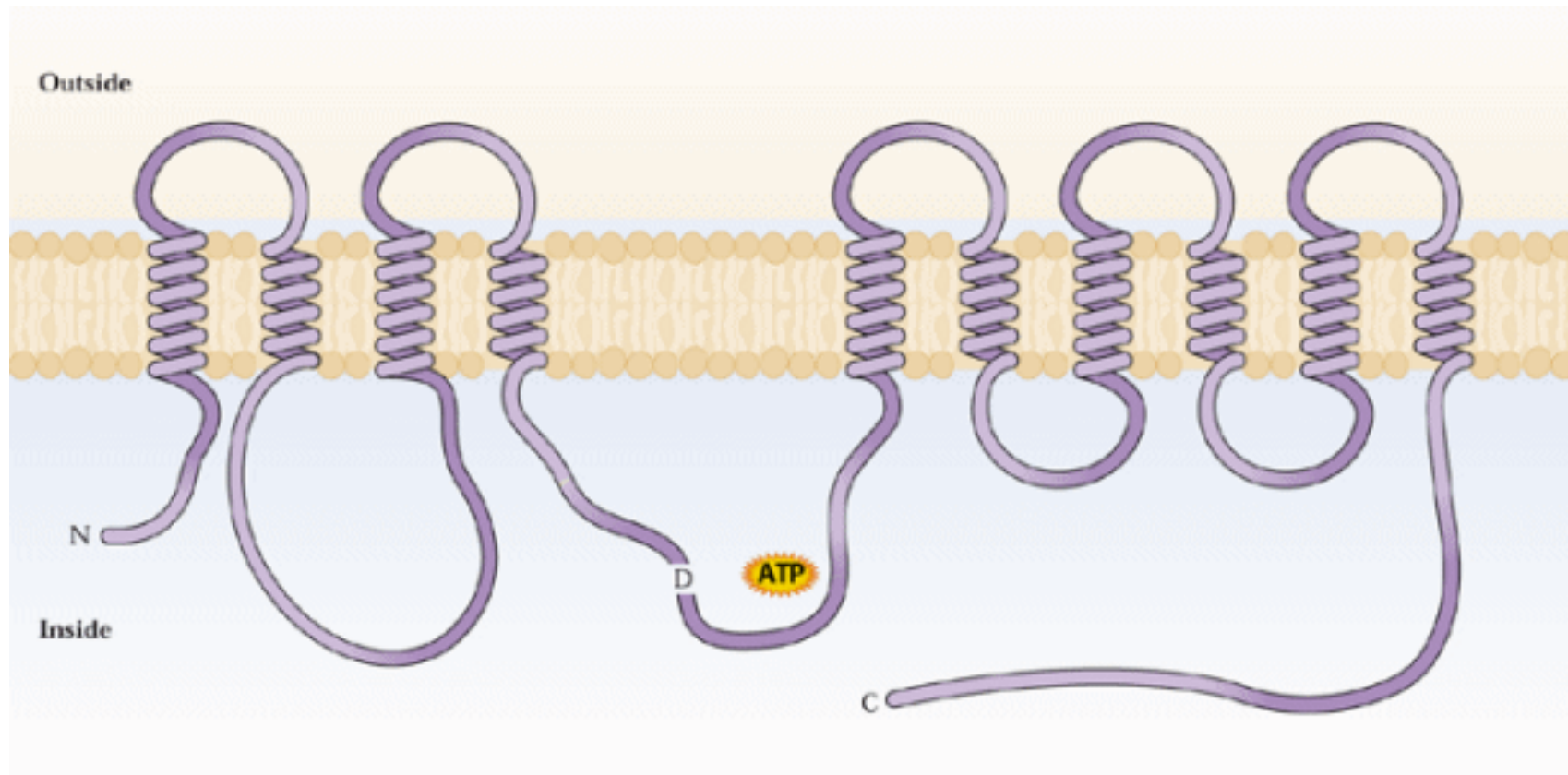
V ATPasi

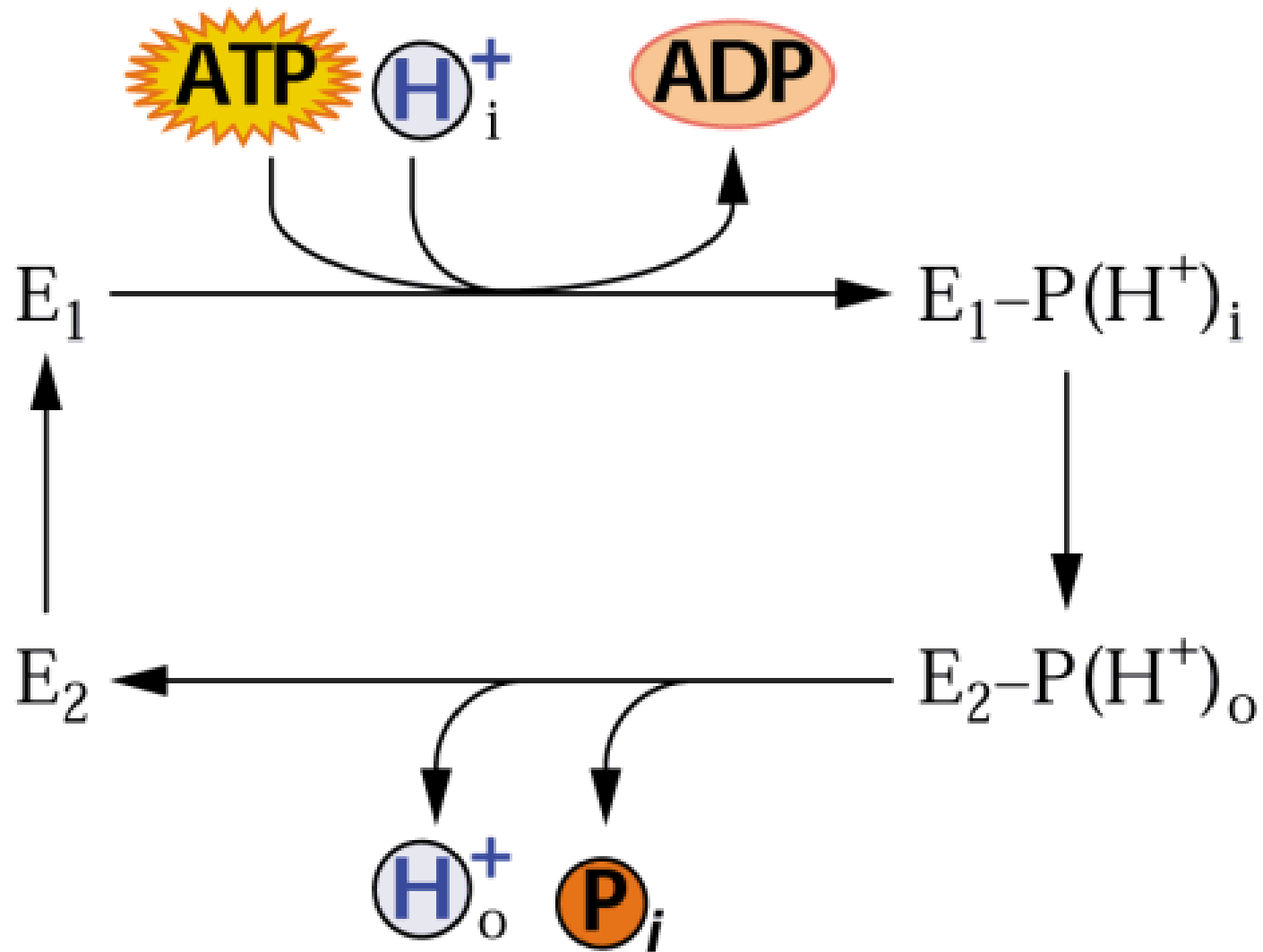
$1_6(\beta)$, $2_6(\alpha)$
+ altre 8 subunità

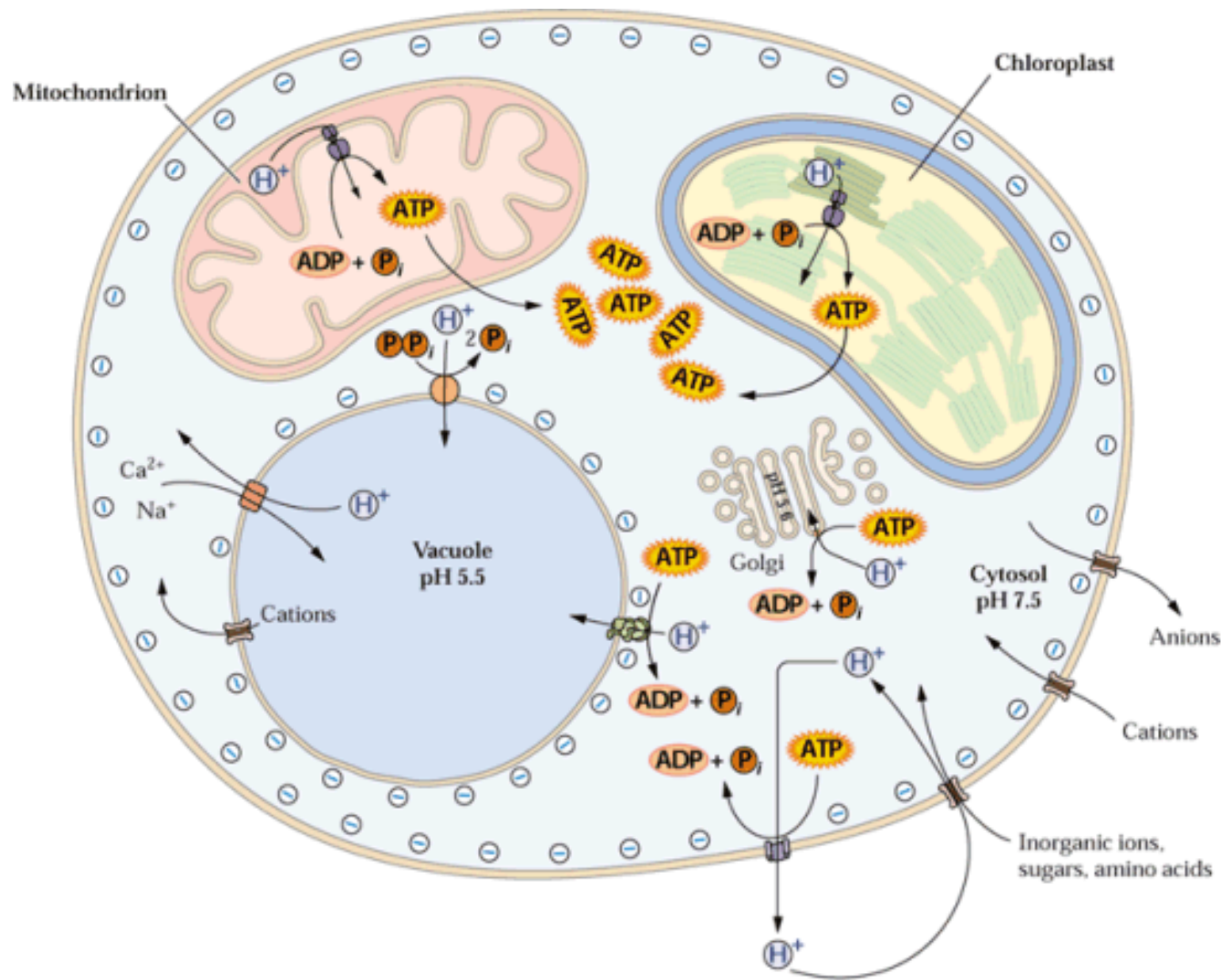
3 (16 kDa, =2 X 8 kDa subunità c
+ altre 4 subunità)

P_m vacuolo = +30 mV

H^+ -ATPasi di plasmalemma (P ATPasi)



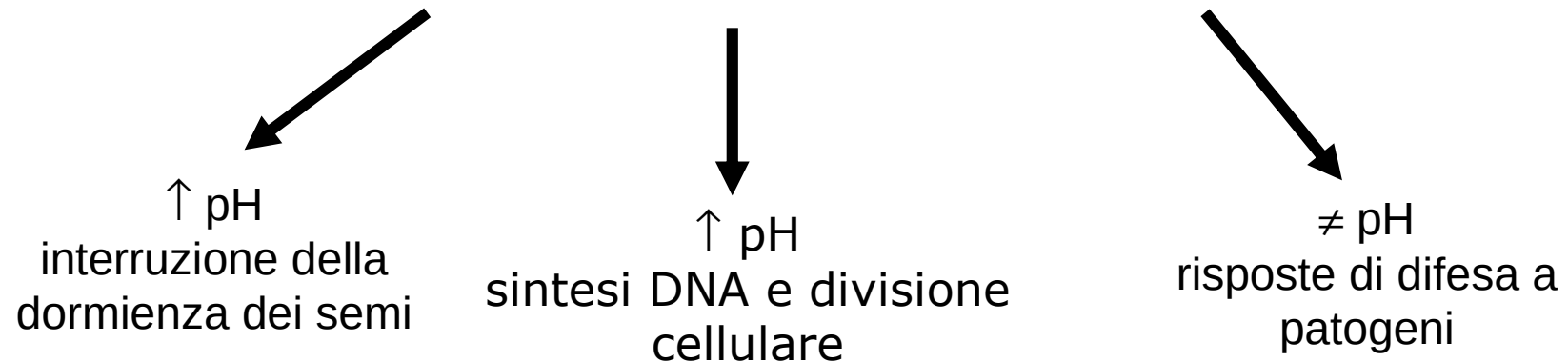




RUOLO FISILOGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMMMA

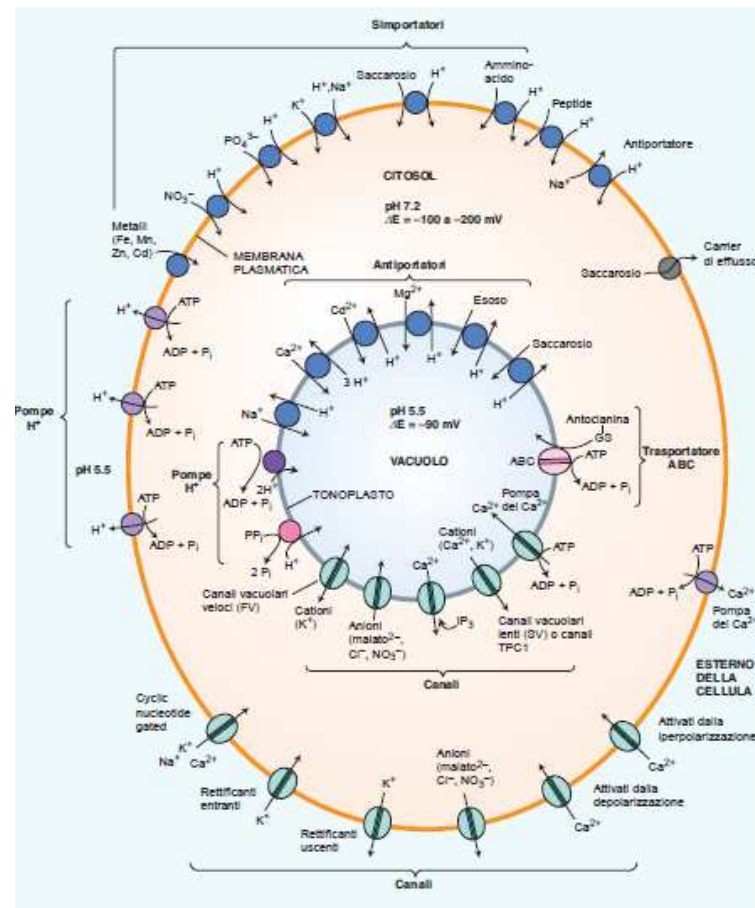
(famiglia multigenica: in Arabidopsis 10 isoforme)

mantenimento del pH del citoplasma



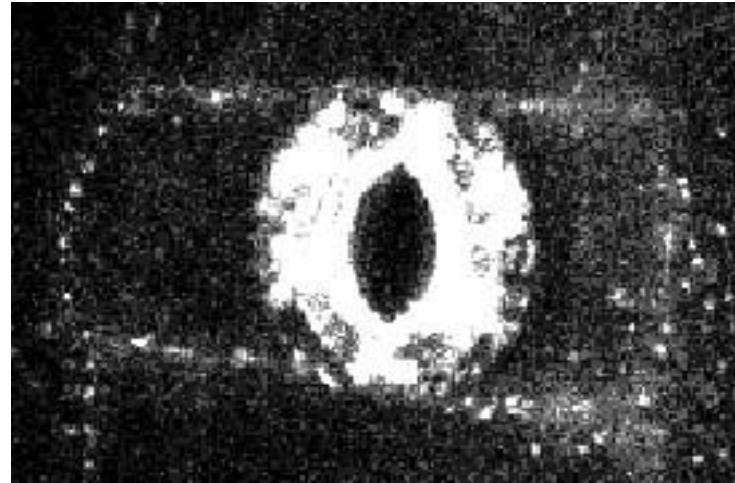
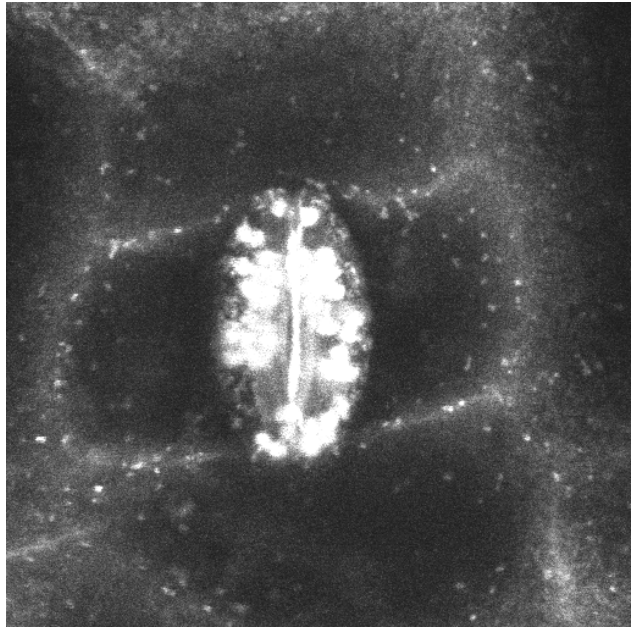
RUOLO FISILOGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMA

forza guida per sistemi di trasporto di ioni e nutrienti



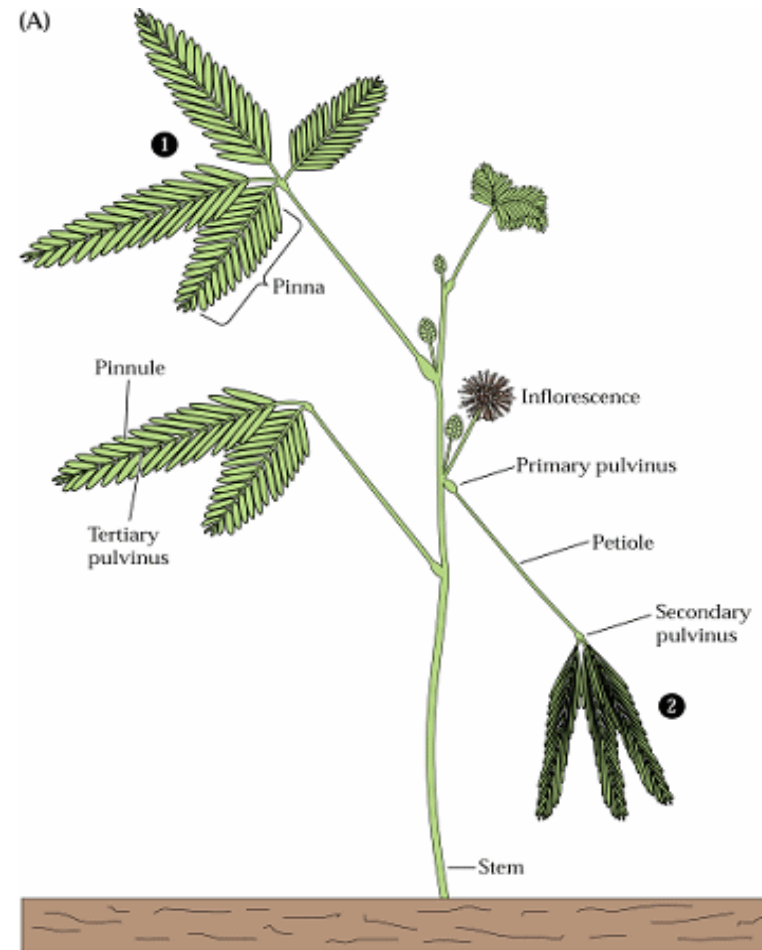
RUOLO FISIOLÓGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMA

apertura e chiusura degli stomi



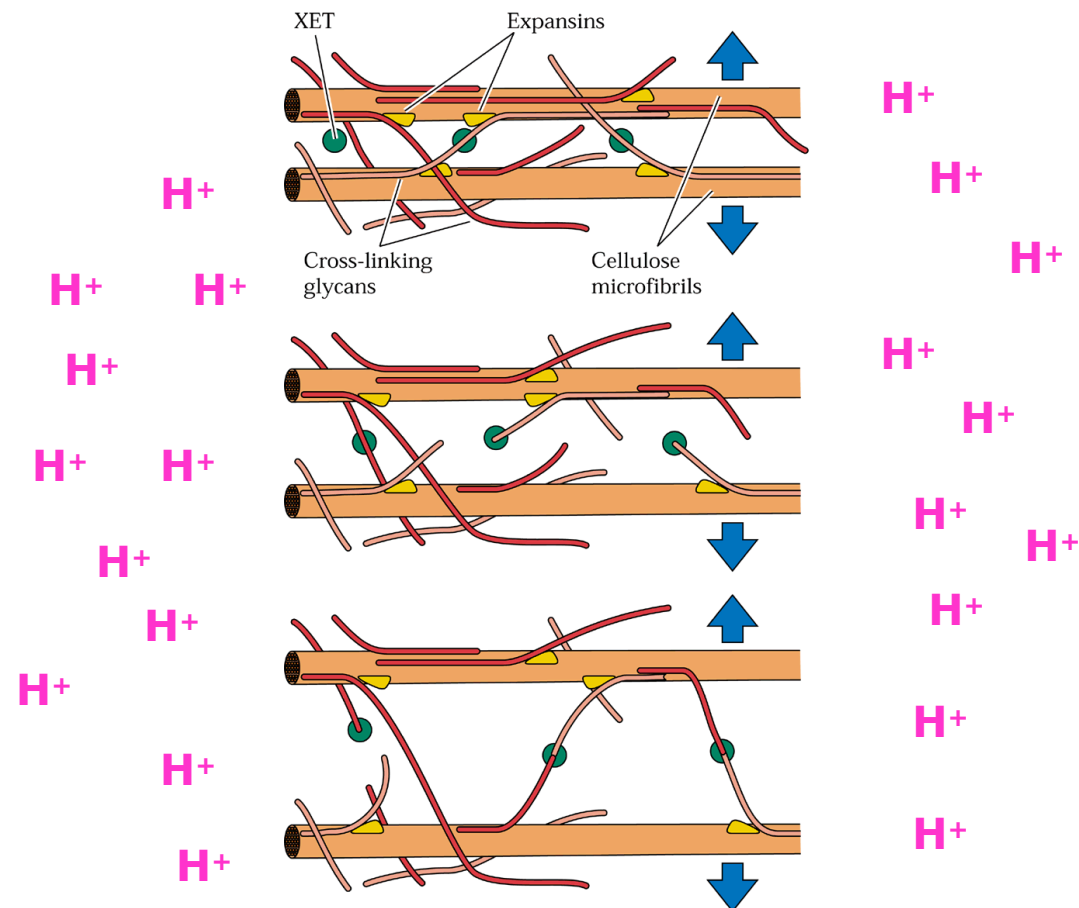
RUOLO FISIOLÓGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMA

movimenti pulvinici

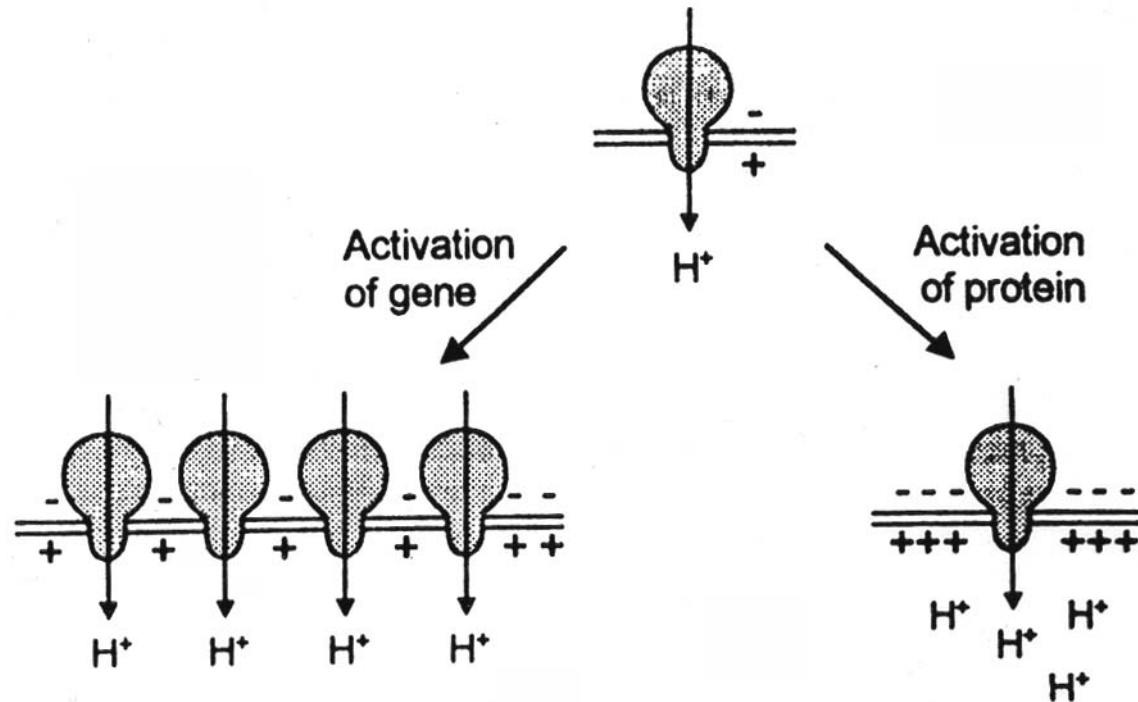


RUOLO FISIOLÓGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMA

crescita per distensione



possibili meccanismi che determinano un aumento di attività dell' H^+ -ATPasi

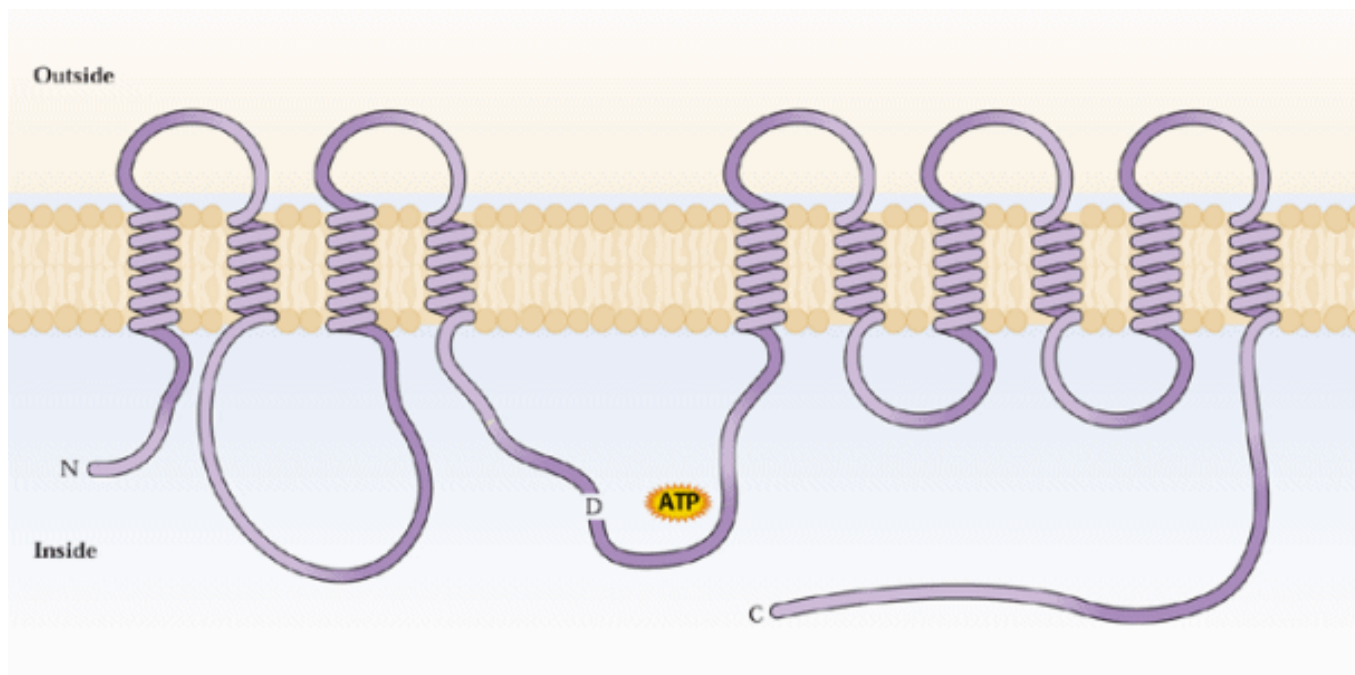


fattori che influenzano l'attività dell' H^+ -ATPasi

stress salino
auxina

luce
patogeni

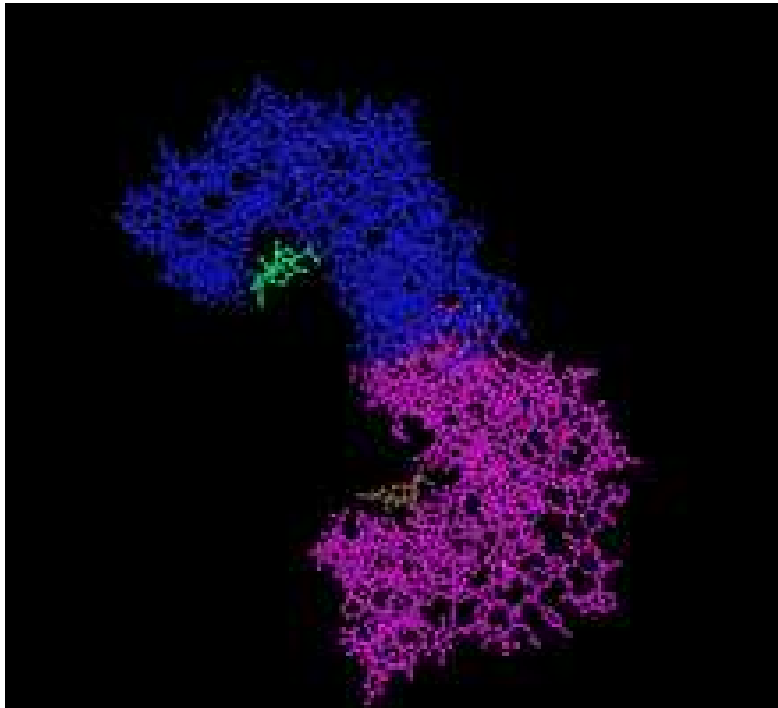
il dominio C-terminale regola l'attività dell'enzima



prove sperimentali

espressione H⁺-ATPasi senza C terminale
proteolisi controllata

PROTEINE 14-3-3



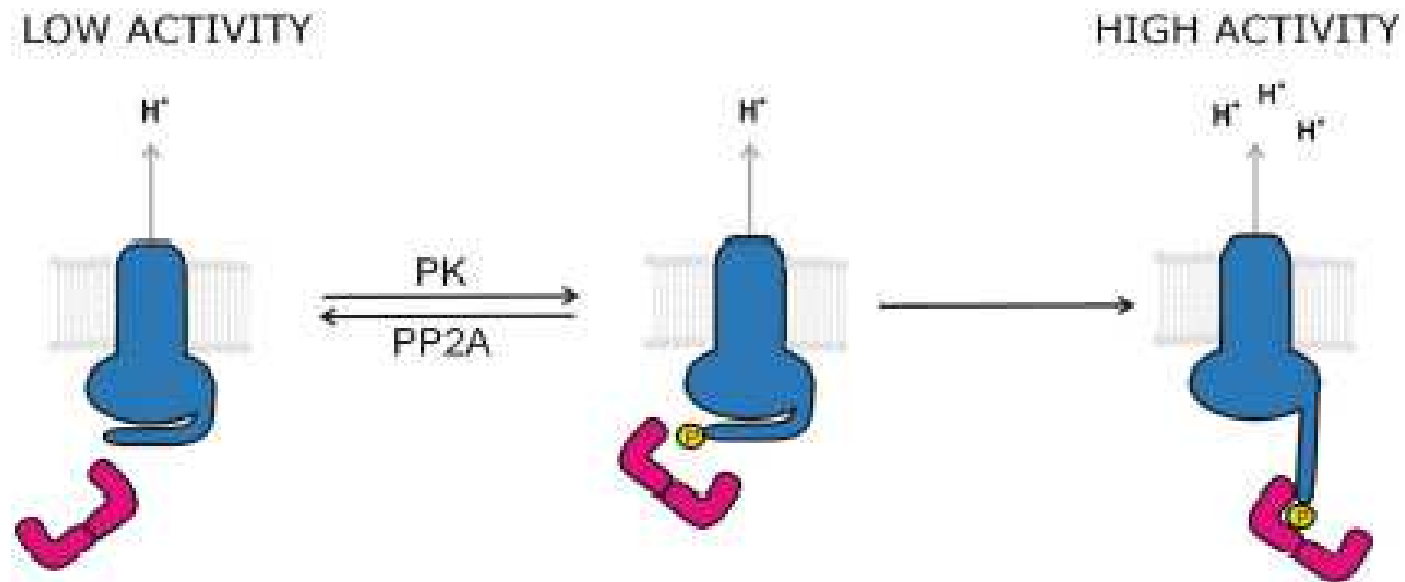
Classe di proteine regolatrici diffuse in tutti gli eucarioti

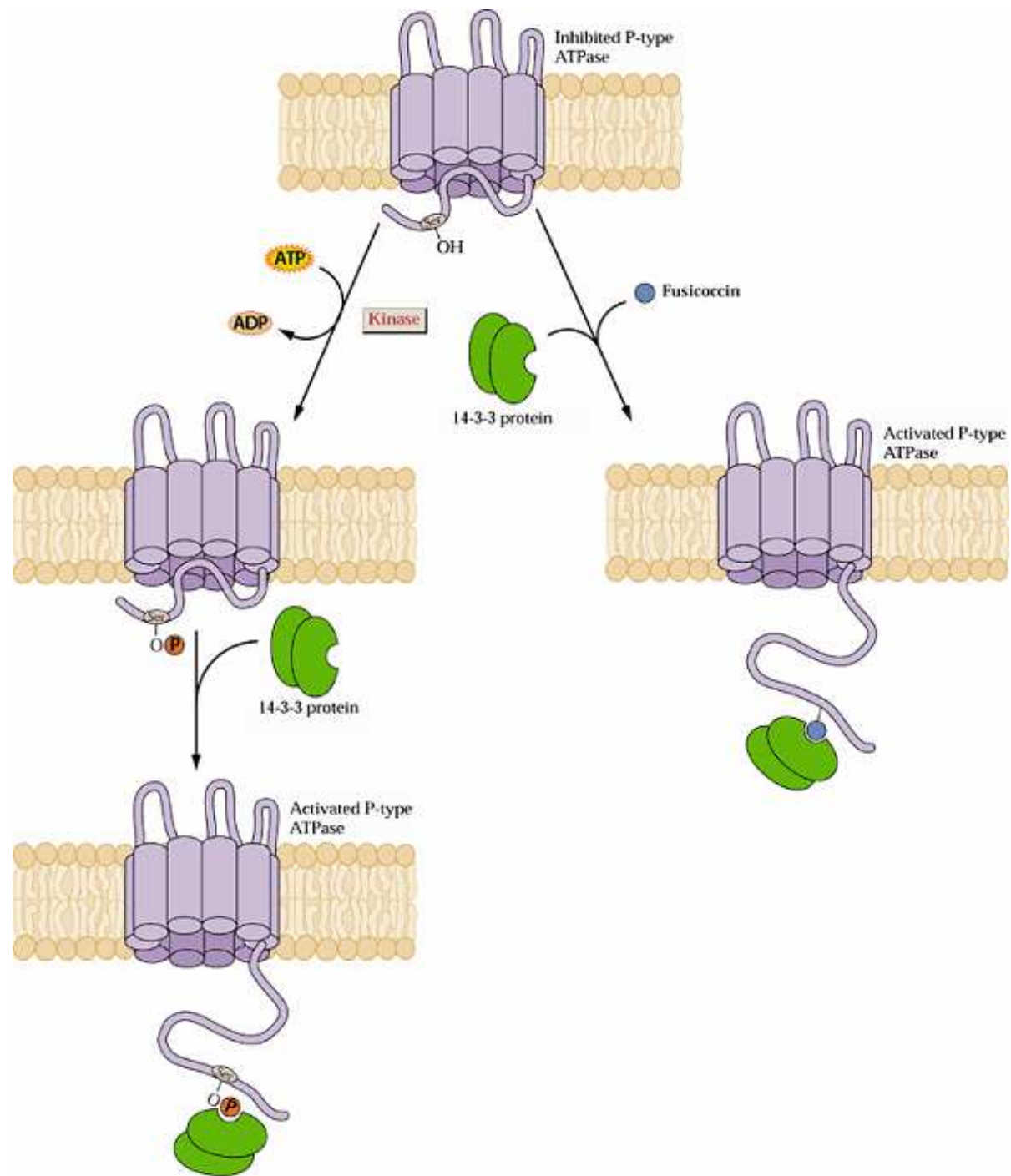
Proteine dimeriche. Ogni monomero ha un PM di circa 30 kDa

Interagiscono con numerose proteine bersaglio, tramite il riconoscimento di particolari sequenze fosforilate su residui di serina



In condizioni fisiologiche l'interazione reversibile tra H⁺-ATPasi e proteine 14-3-3 è mediata dalla fosforilazione di un residuo di treonina nel dominio C-terminale della pompa protonica

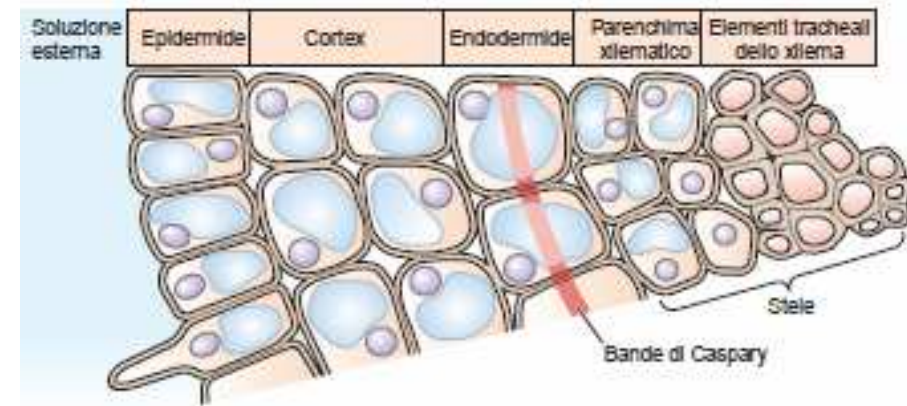
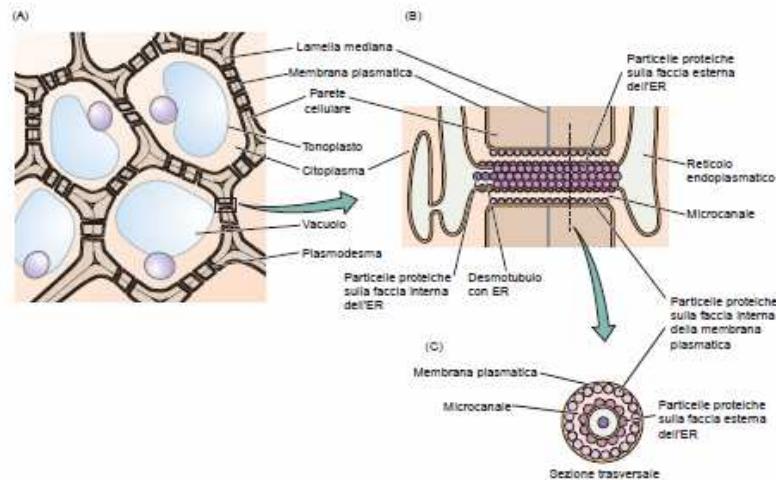




TRASPORTO DI IONI NELLE RADICI

via simplastica e via apoplastica (analogamente al movimento di H_2O)

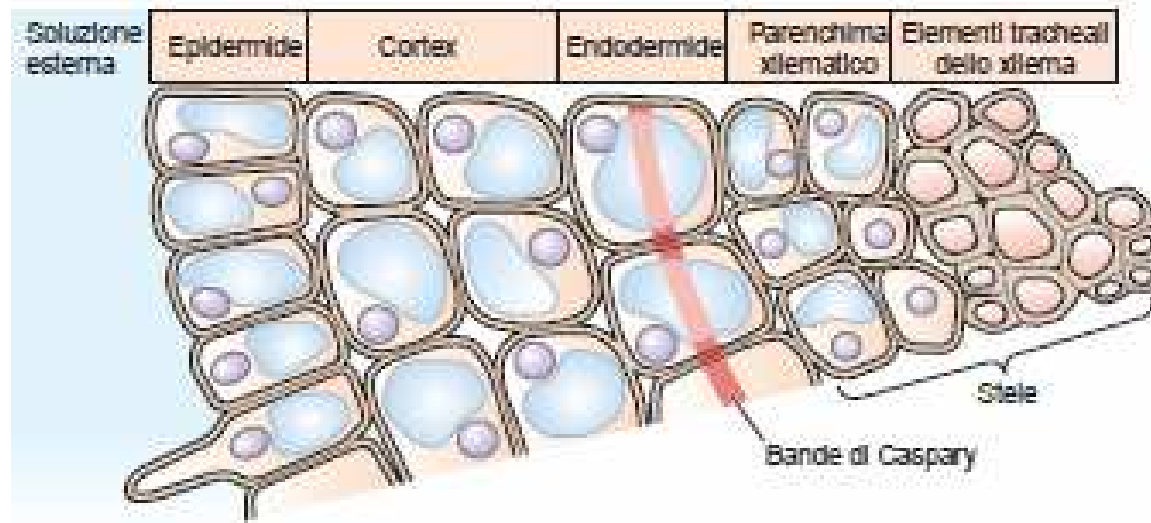
A livello della banda del Caspary via simplastica



Grazie alla banda del Caspary la pianta mantiene una concentrazione di ioni nello xilema superiore a quella dell'acqua del suolo

CARICAMENTO DELLO XILEMA

Gli ioni escono dal simplasto per entrare nello xilema costituito da cellule non vitali



Nelle cellule parenchimatiche tracheali: H^+ -ATPasi, canali e carriers

In Arabidopsis canali **SKOR**: canali di efflusso per K^+

Canali di scaricamento per Cl^- e NO_3^-