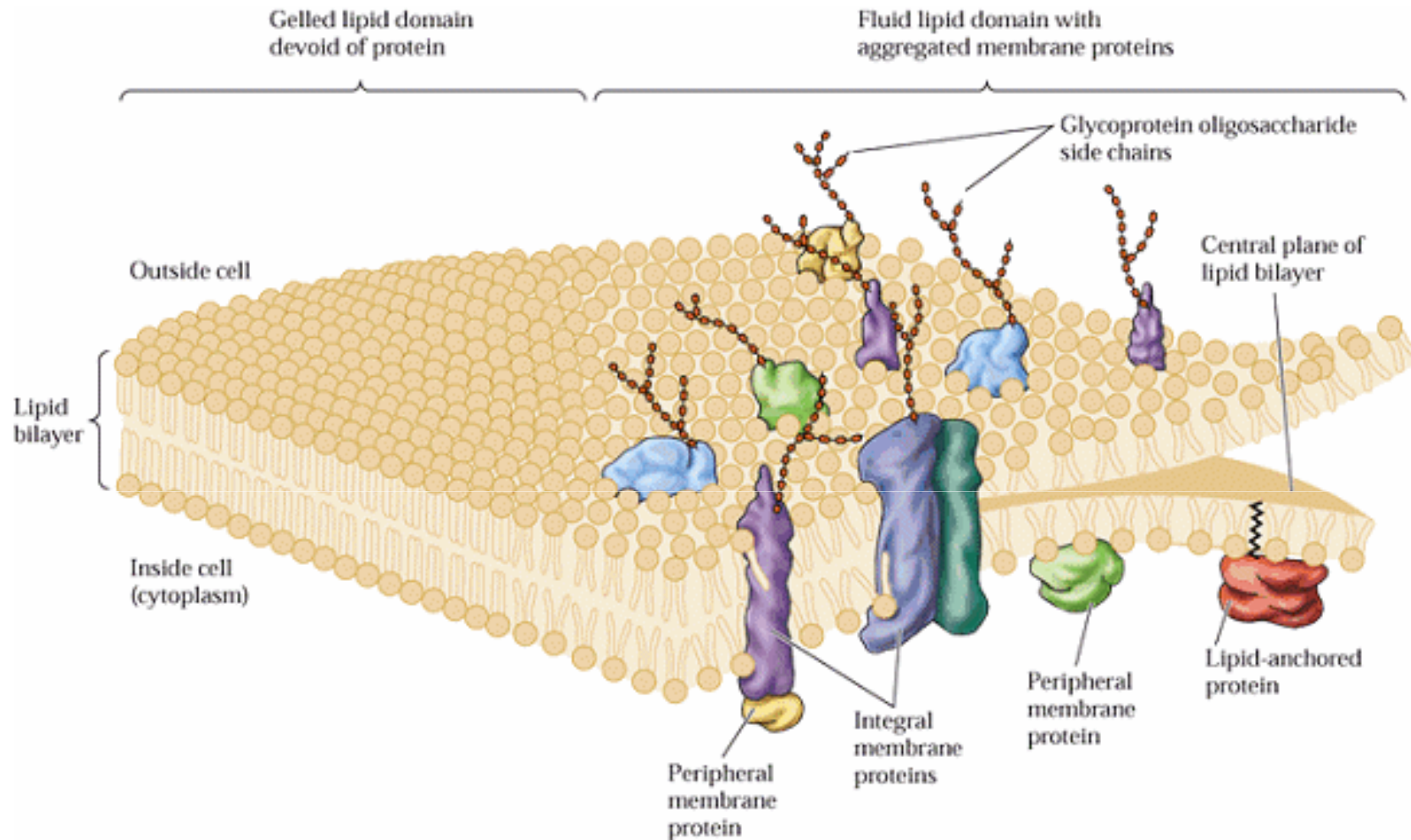


TRASPORTO DI MEMBRANA

TRASPORTO DI MEMBRANA

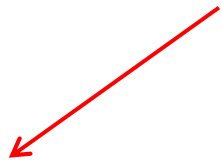


movimento di molecole e ioni tra i diversi scomparti dei sistemi biologici

membrana cellulare



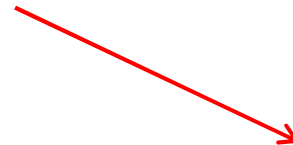
garantisce un ambiente fisico-chimico
altamente stabile



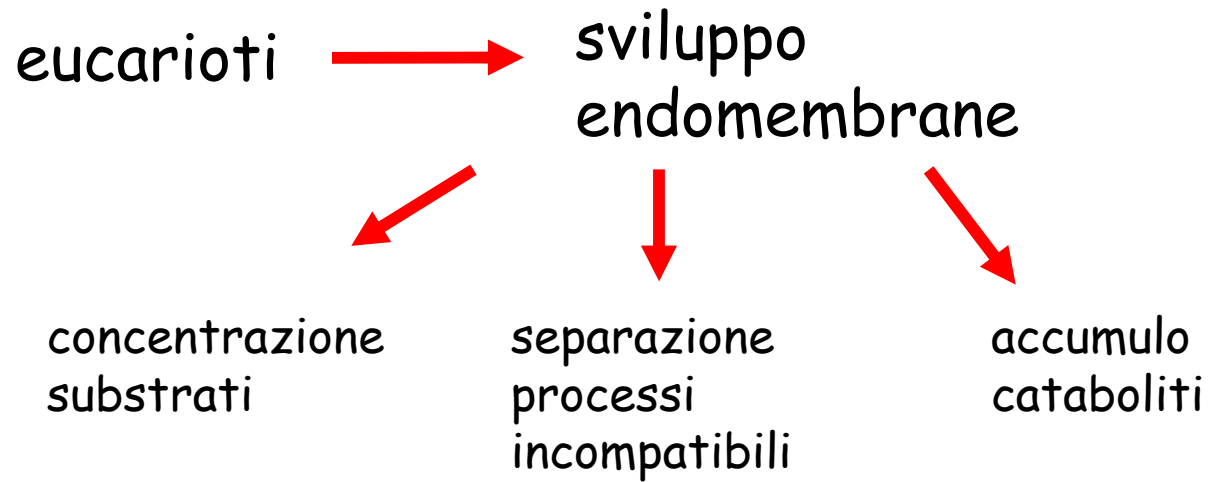
metabolismo



riproduzione



sviluppo



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

**IL TRASPORTO DI MEMBRANA E' ALLA BASE
DI MOLTI PROCESSI BIOLOGICI ESSENZIALI**

ACQUISIZIONE NUTRIENTI

Concentrazione di nutrienti minerali essenziali

Elemento	Simbolo chimico	Concentrazione peso secco ($\mu\text{g/g}$)	Concentrazione peso fresco
Azoto	N	15000	71,4 mM
Potassio	K	10000	17,0 mM
Calcio	Ca	5000	8,3 mM
Magnesio	Mg	2000	5,5 mM
Fosforo	P	2000	4,3 mM
Zolfo	S	1000	2,1 mM
Cloro	Cl	100	188 μM
Boro	B	20	123 μM
Ferro	Fe	100	120 μM
Manganese	Mn	50	61 μM
Zinco	Zn	20	20,4 μM
Rame	Cu	6	6,2 μM
Molibdeno	Mo	0,1	0,07 μM
Nichel	Ni	0,005	0,006 μM

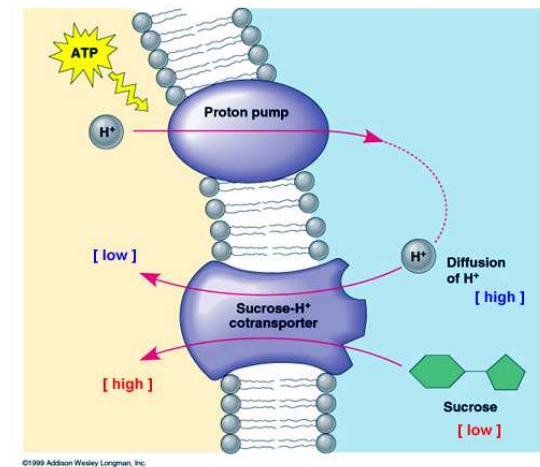
IL TRASPORTO DI MEMBRANA E' ALLA BASE DI
MOLTI PROCESSI BIOLOGICI ESSENZIALI

ESCREZIONE PRODOTTI DI SCARTO

L' H^+ è il principale prodotto generato dal
metabolismo

DISTRIBUZIONE METABOLITI

Gli zuccheri prodotti dalla fotosintesi vengono distribuiti dai siti di sintesi a quelli di accumulo secondo meccanismi che prevedono il trasporto di membrana



IL TRASPORTO DI MEMBRANA E' ALLA BASE DI
MOLTI PROCESSI BIOLOGICI ESSENZIALI

COMPARTIMENTALIZZAZIONE METABOLITI

Alcuni processi biochimici sono incompatibili tra loro

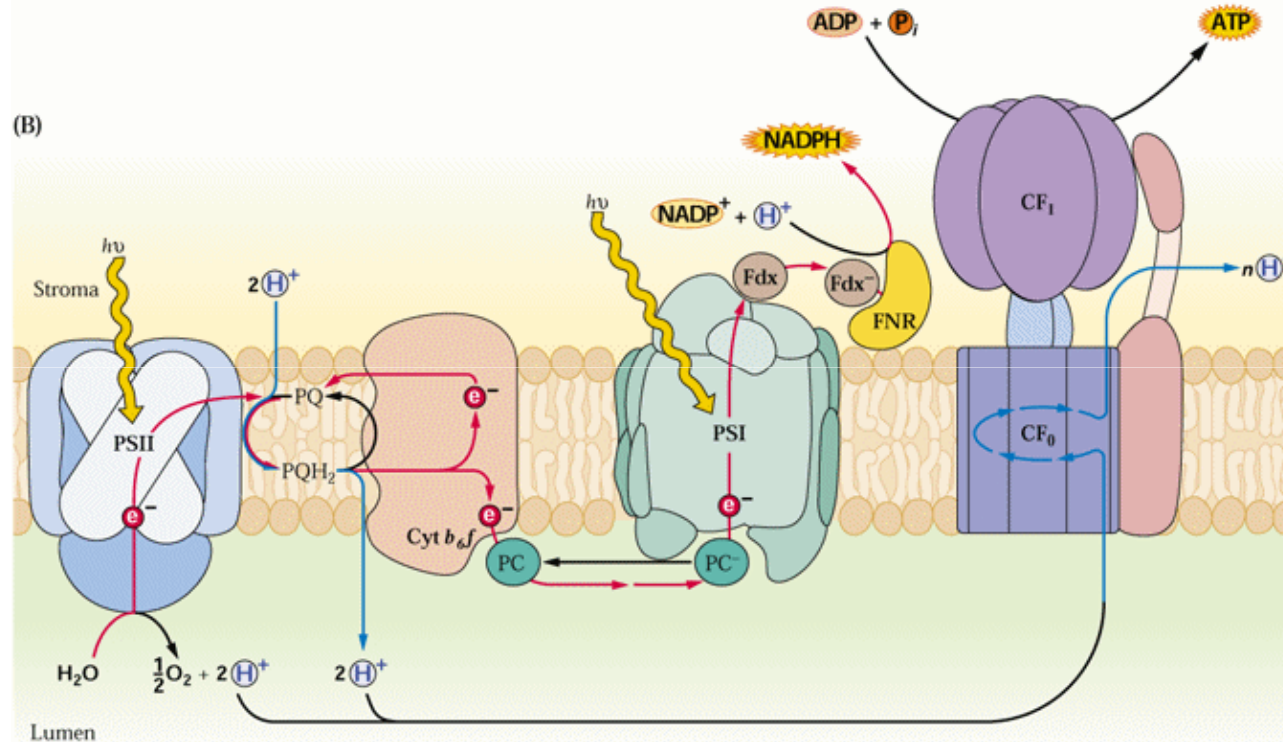
→ necessità di evitare cicli futili

(ex. **sintesi amido** e **glicolisi**)

IL TRASPORTO DI MEMBRANA E' ALLA BASE DI
MOLTI PROCESSI BIOLOGICI ESSENZIALI

TRASFORMAZIONE DELL'ENERGIA

fotosintesi e respirazione

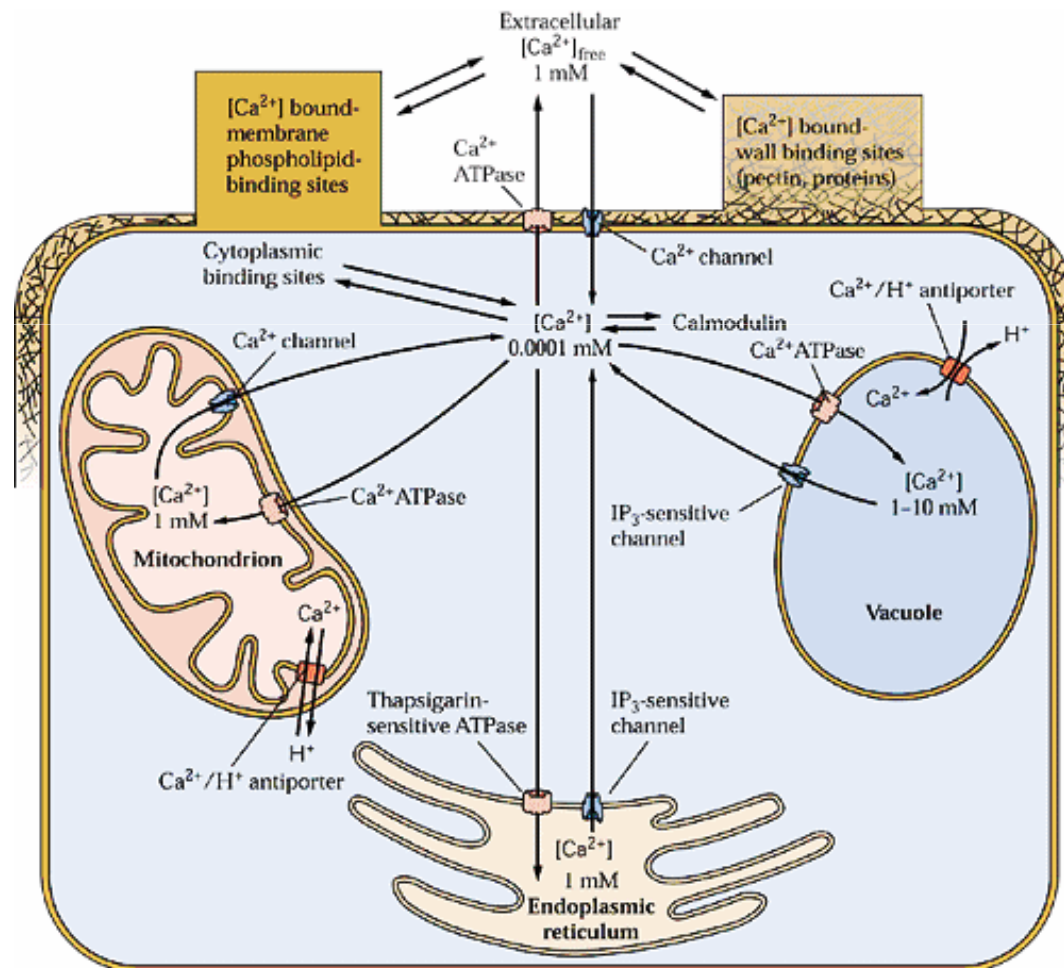


Il trasporto di membrana è al centro di processi che convertono l'energia libera in forme biologicamente utili

IL TRASPORTO DI MEMBRANA E' ALLA BASE DI
MOLTI PROCESSI BIOLOGICI ESSENZIALI

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

stimolo ambientale → variazione $[Ca^{2+}]$ → risposta fisiologica



POTENZIALE CHIMICO DI UNA SOSTANZA J

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

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

↓
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

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



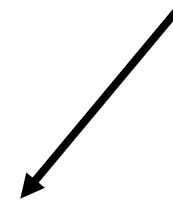
componente della
carica elettrostatica

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



componente della
pressione
idrostatica

$$\bar{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j F E + \cancel{V_j p}$$

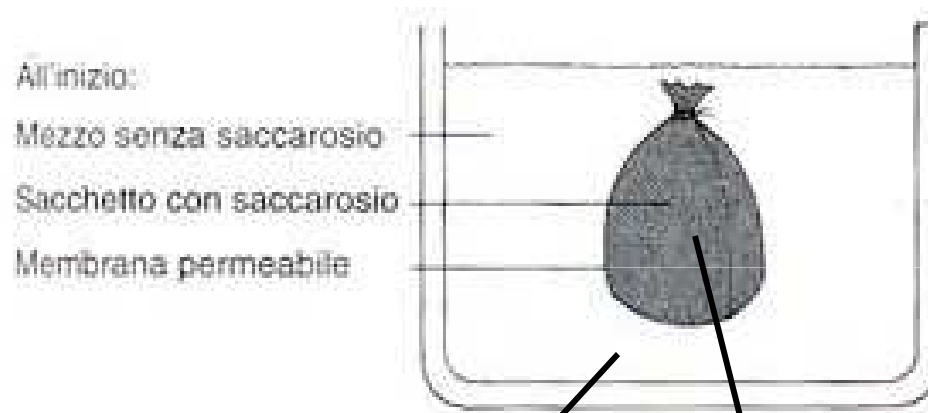


significativo esclusivamente
nei movimenti osmotici
dell'acqua

DIFFUSIONE

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

saccarosio



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

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

$$\Delta \bar{\mu}_s = \mu_s^i - \mu_s^o =$$

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

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

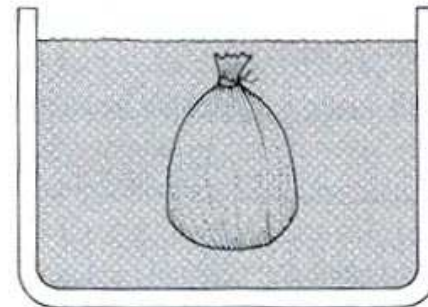
$$= RT \ln \frac{C_s^i}{C_s^o}$$

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

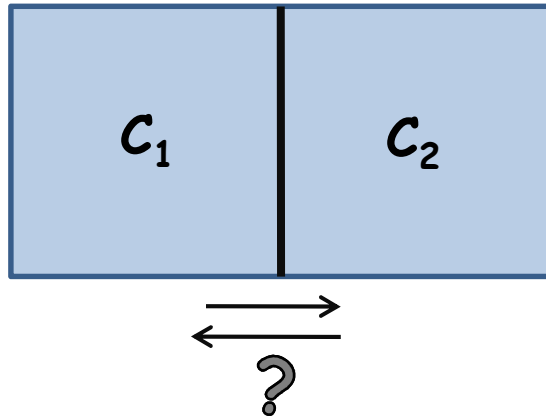
$\Delta \bar{\mu}_s$ è proporzionale al gradiente di concentrazione

All'equilibrio $\Delta \mu = 0$

All'equilibrio:
La concentrazione di
saccarosio nel sacchetto
equivale a quella del
mezzo



In generale per una sostanza x:



$$\mu_1 = \mu^* + RT \ln [X]_1$$

$$\mu_2 = \mu^* + RT \ln [X]_2$$

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1 = RT \ln \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

Se $[X]_2 < [X]_1 \quad \longrightarrow \quad \Delta\mu < 0 \quad X \text{ diffonde spontaneamente verso } C_2$

Se $[X]_2 > [X]_1 \quad \longrightarrow \quad \Delta\mu > 0 \quad X \text{ diffonde spontaneamente verso } C_1$

All'equilibrio $[X]_1 = [X]_2 \quad \Delta\mu = 0$

PER UNO IONE?

ione K^+

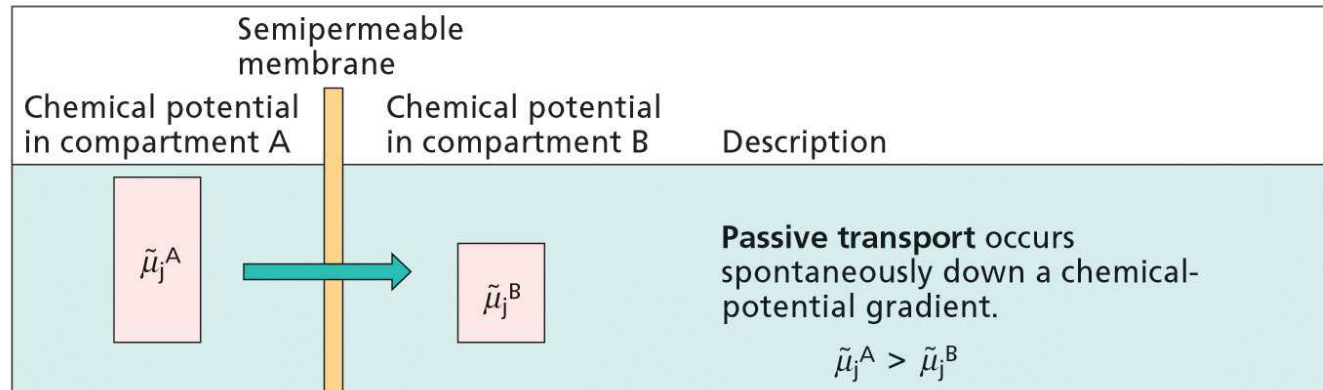
$$\mu_K^i = \mu^* + RT \ln C_K^i + zFE^i \quad \mu_K^o = \mu^* + RT \ln C_K^o + zFE^o$$

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

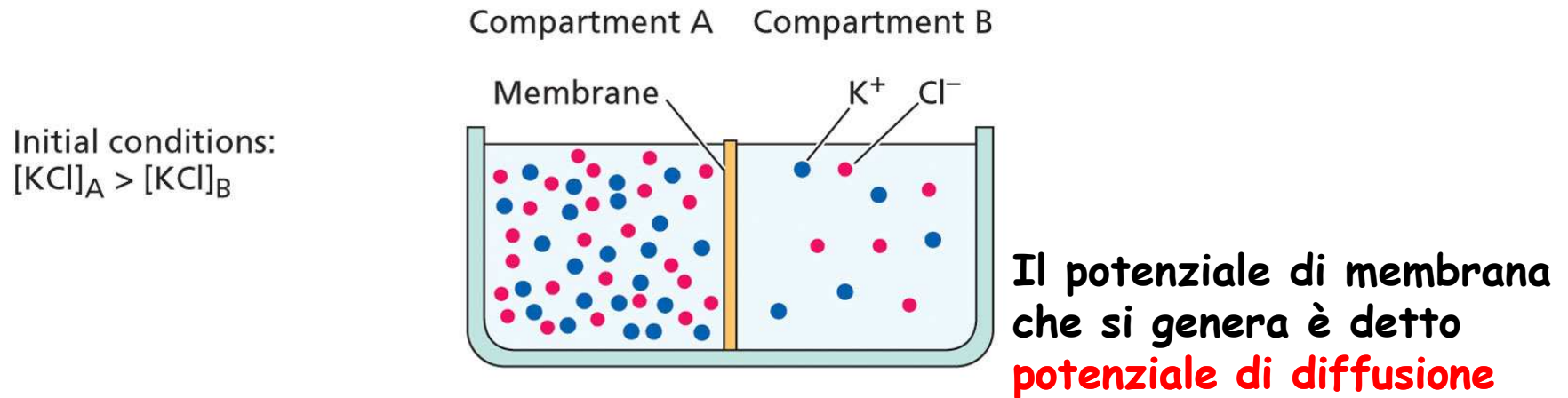
dato che $z=+1$

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

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



cosa succede se una membrana ha una permeabilità maggiore per il K^+ che per il Cl^- ?



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

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

-100 mV → un anione in più su 100.000

relazione tra il potenziale di membrana e la distribuzione di ioni

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

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

All'equilibrio per uno ione j



$$\mu_j^o = \mu_j^i$$

$$\mu_j^* + RT \ln C_j^o + z_j F E^o = \mu_j^* + RT \ln C_j^i + z_j F E^i$$



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



$$\Delta E = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{C_j^o}{C_j^i}$$

**EQUAZIONE
DI NERNST**

Per uno ione monovalente

$$\Delta E = 59 \text{ mV} \log \frac{C_j^o}{C_j^i}$$

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

se $\Delta E = 59 \text{ mV}$

catione monovalente

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

$$C_j^o = 10 C_j^i$$

catione bivalente

$$\Delta E = \frac{59}{2} \log \frac{C_j^o}{C_j^i}$$

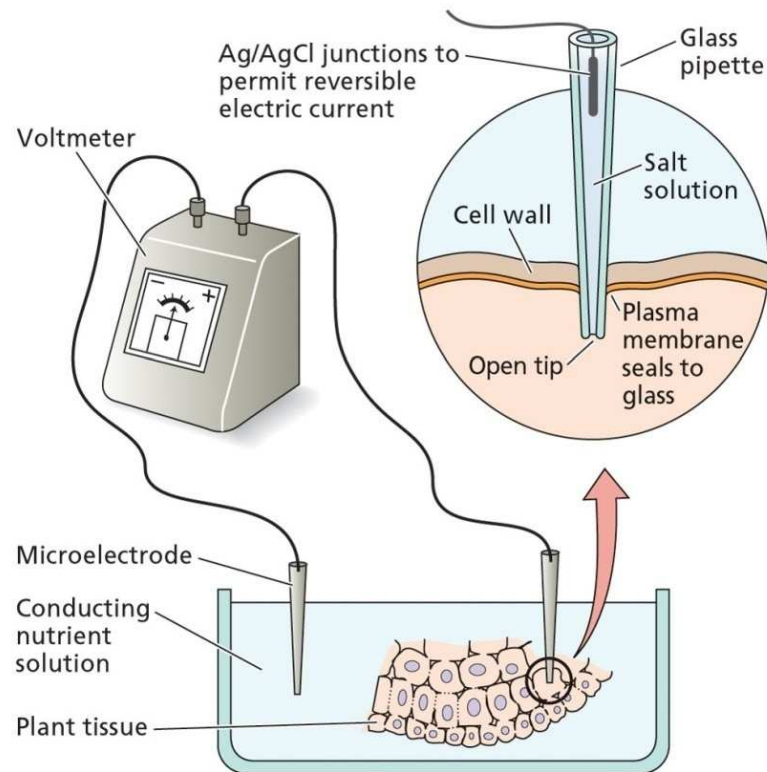
$$C_j^o = 100 C_j^i$$

anione monovalente

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

$$C_j^o = 0.1 C_j^i$$

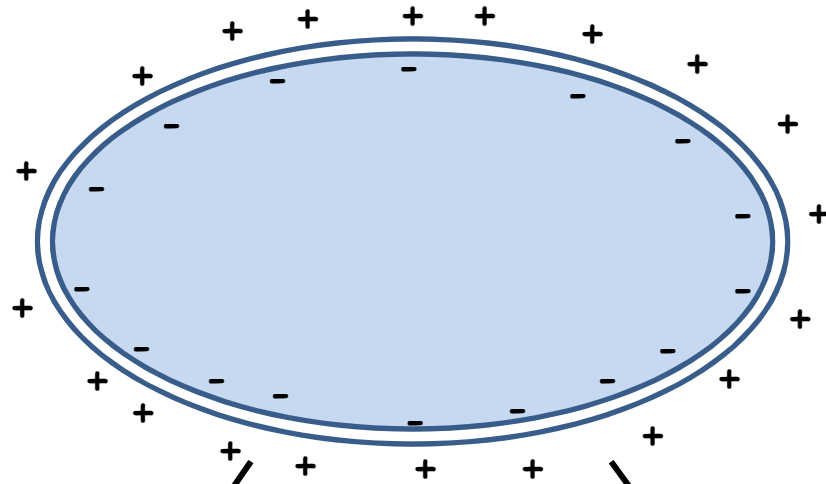
tutte le cellule possiedono un potenziale di membrana, dovuto alla distribuzione asimmetrica degli ioni tra l'interno e l'esterno della cellula



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 6.3 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

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

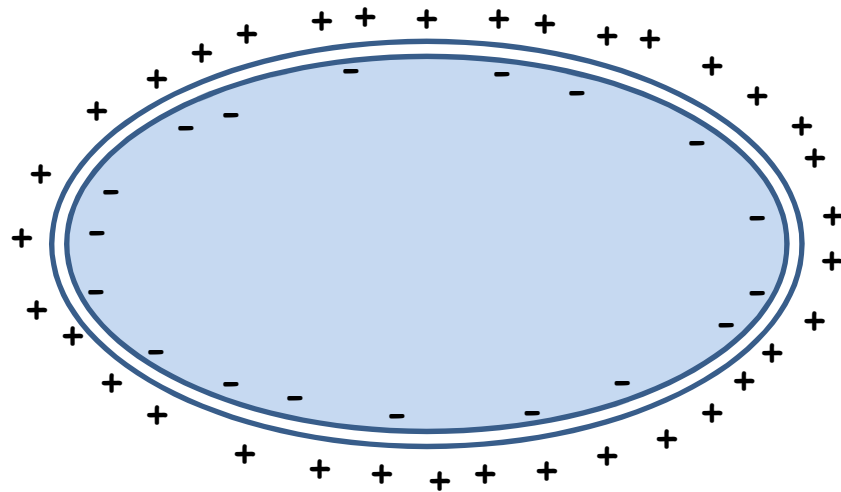
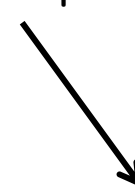
$$\Delta E = -120 \text{ mV}$$



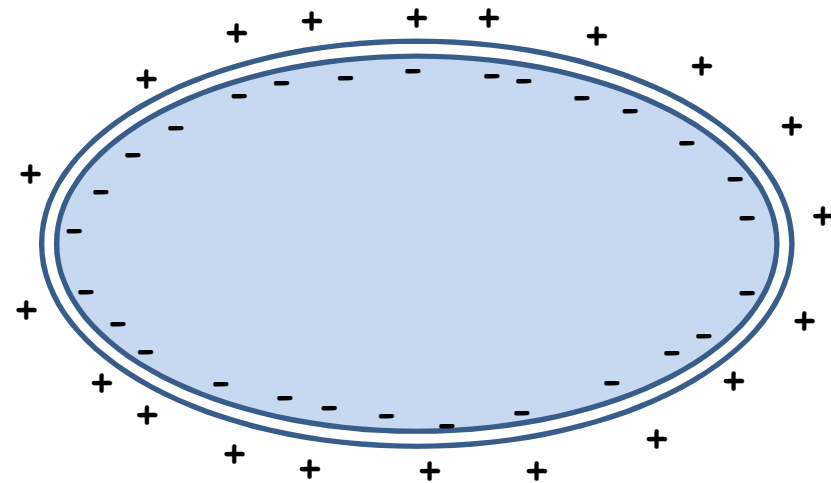
Iperpolarizzazione
della membrana



Depolarizzazione
della membrana



$$\Delta E = -180 \text{ mV}$$



$$\Delta E = -60 \text{ mV}$$

$$\Delta E = -110 \text{ mV}$$

TABLE 6.1

Comparison of observed and predicted ion concentrations in pea root tissue

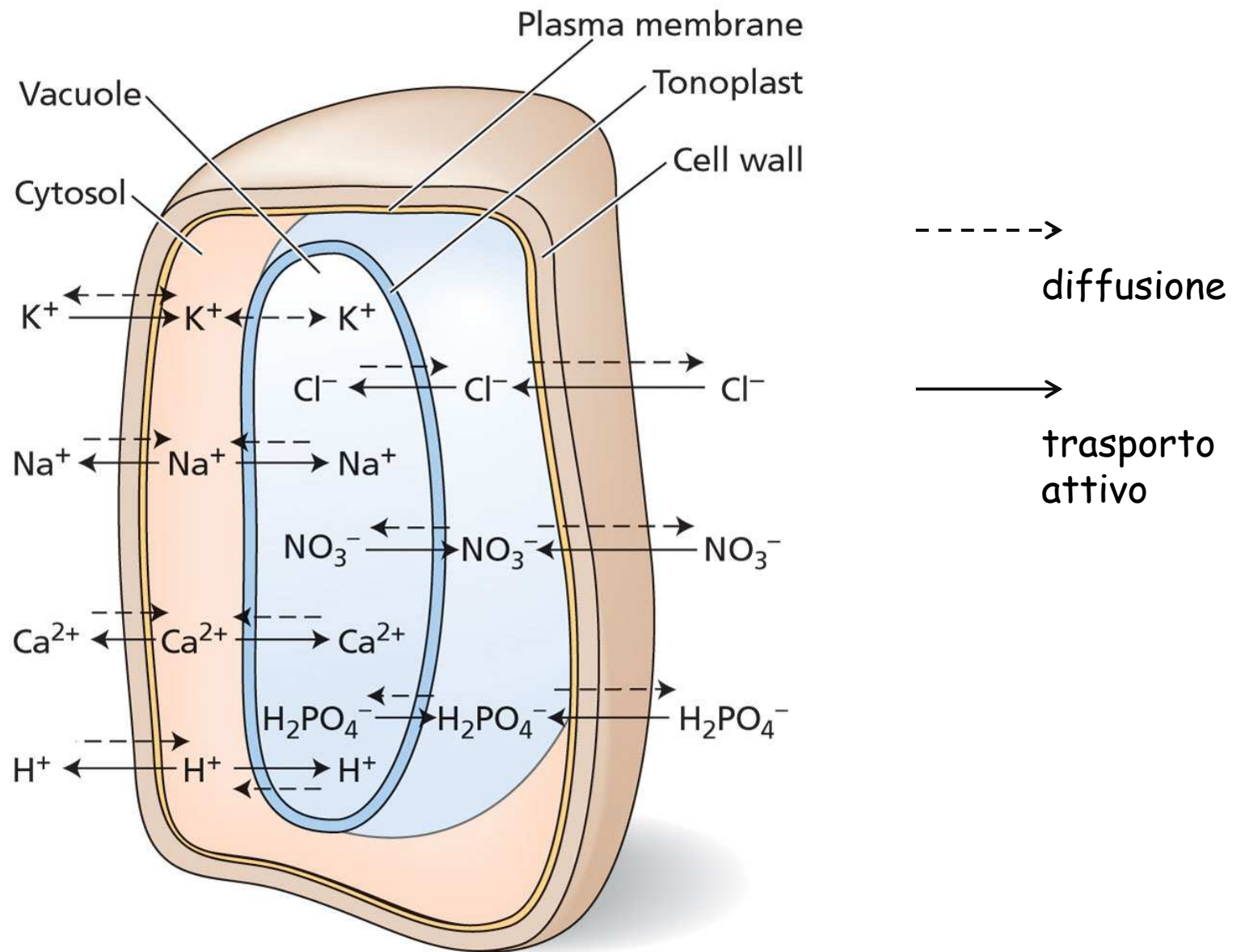
Ion	Concentration in external medium (mmol L ⁻¹)	Internal concentration (mmol L ⁻¹)	
		Predicted	Observed
K ⁺	1	74	75
Na ⁺	1	74	8
Mg ²⁺	0.25	1340	3
Ca ²⁺	1	5360	2
NO ₃ ⁻	2	0.0272	28
Cl ⁻	1	0.0136	7
H ₂ PO ₄ ⁻	1	0.0136	21
SO ₄ ²⁻	0.25	0.00005	19

Source: Data from Higinbotham et al. 1967.

Note: The membrane potential was measured as -110 mV.

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Table 6.1 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

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



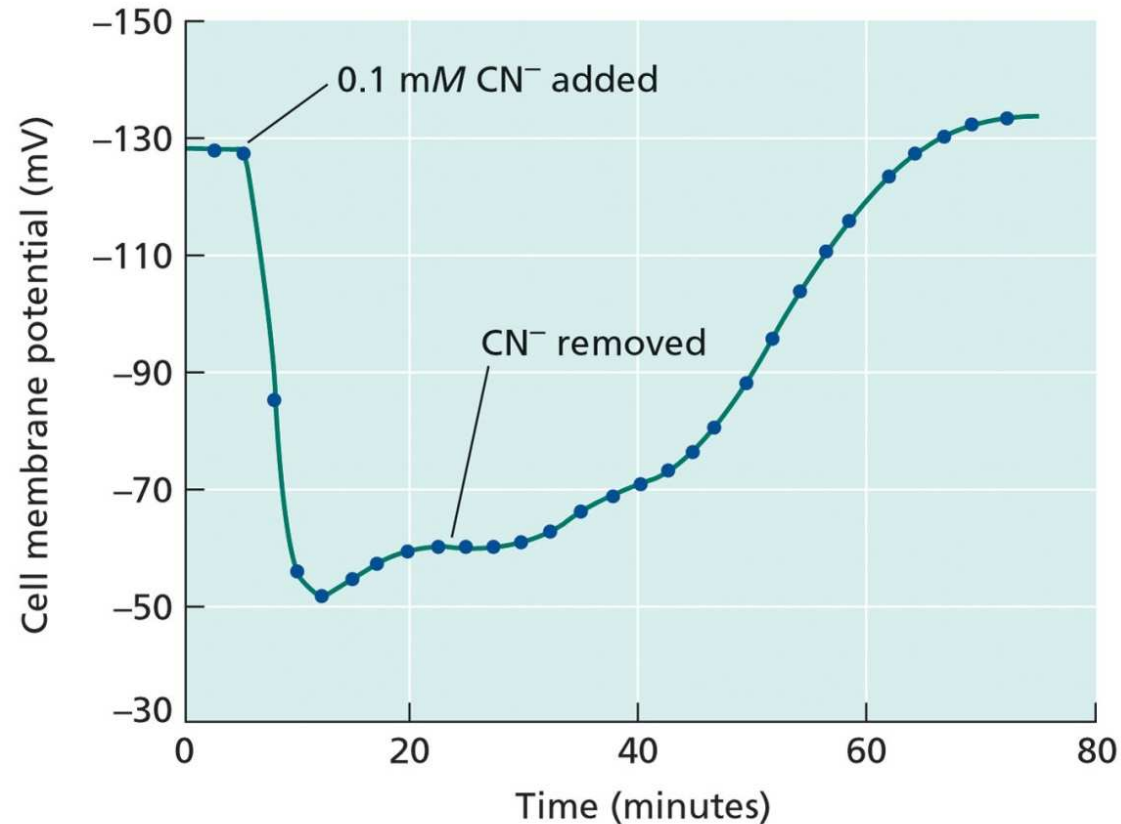
EQUAZIONE DI GOLDMAN

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

ΔE calcolato con l'equazione
di Goldman = -50/-40 mV

ΔE misurato sperimentalmente = -240/-60 mV

qual è la componente aggiuntiva?



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 6.5 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

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

TRASPORTO PASSIVO

$$\Delta\mu < 0$$

il trasporto avviene
spontaneamente senza
consumo di energia

TRASPORTO ATTIVO

$$\Delta\mu > 0$$

il trasporto non avviene
spontaneamente ma solo
con consumo di energia

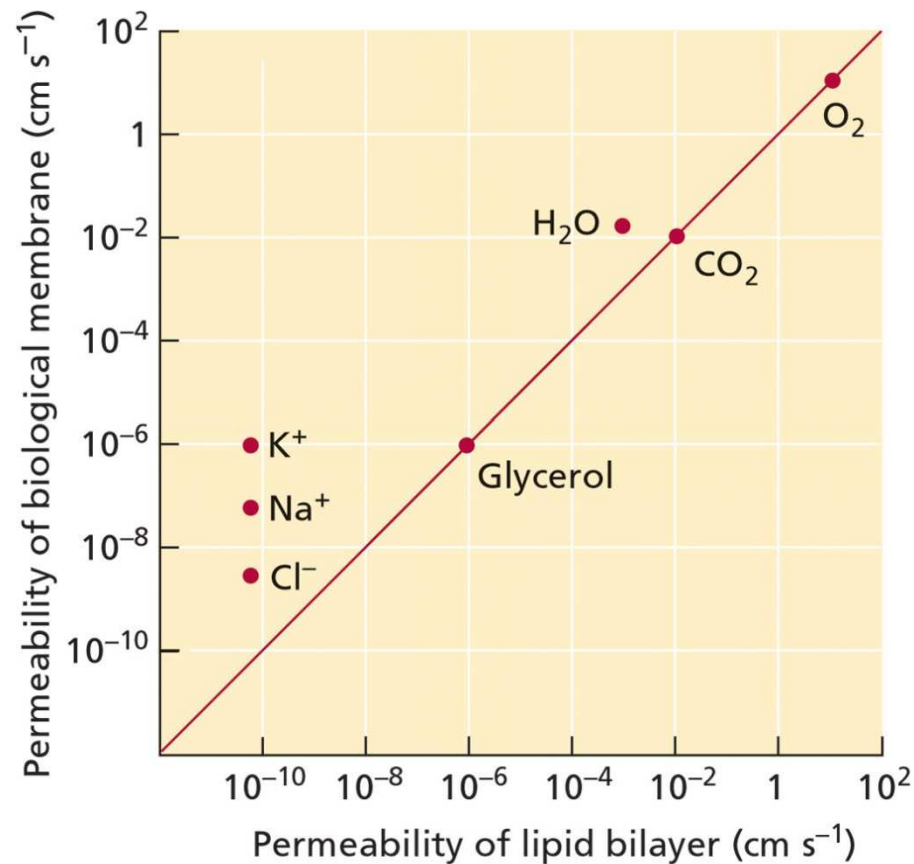
TRASPORTO PASSIVO

$$\Delta\bar{\mu}_j = RT \ln \frac{C_j^i}{C_j^o} + z_j F(E^i - E^o) < 0$$

Il trasporto avviene secondo **GRADIENTE ELETTROCHIMICO**

Per una molecola non carica ($z_j=0$) il trasporto dipende solo dal
GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE

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

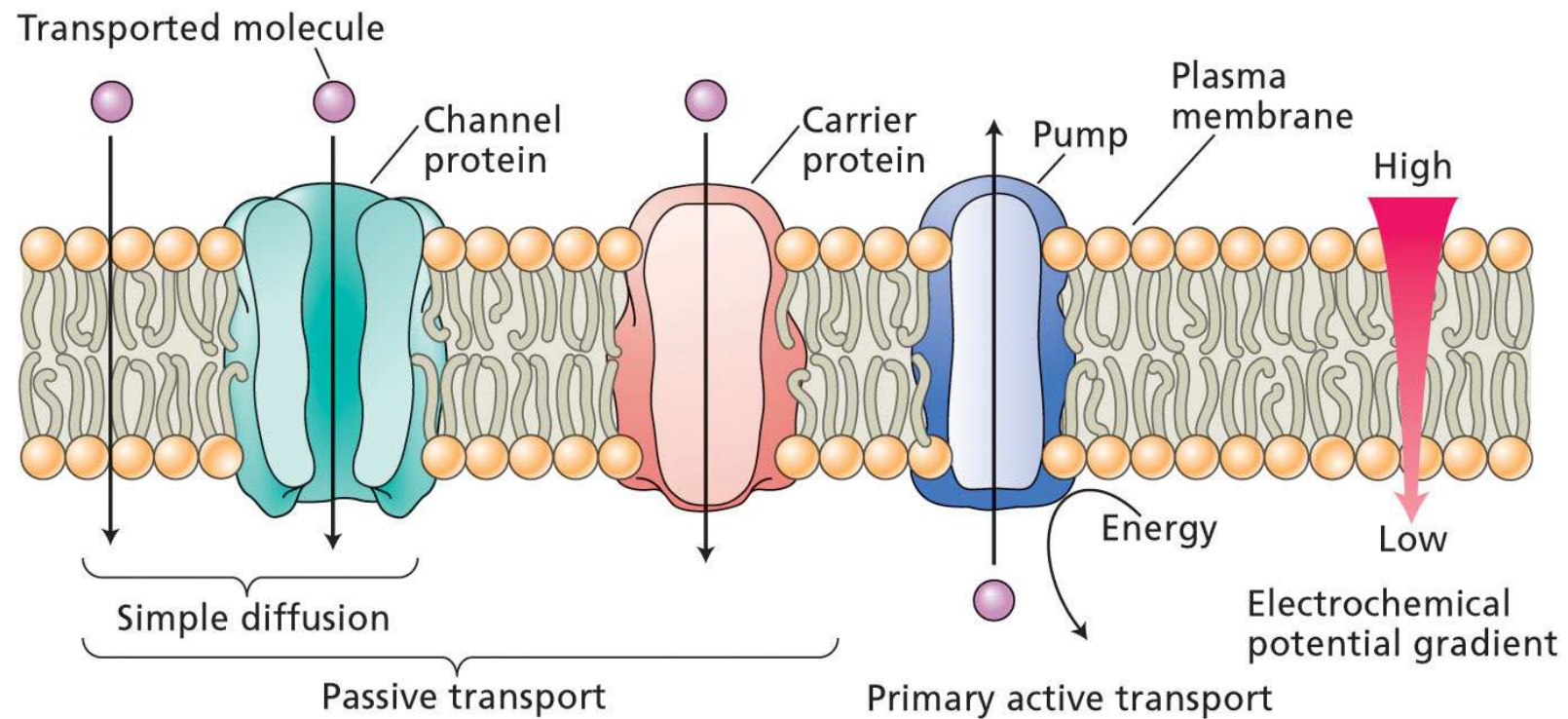


PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 6.6 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

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

PROTEINE DI TRASPORTO

CANALI CARRIER POMPE

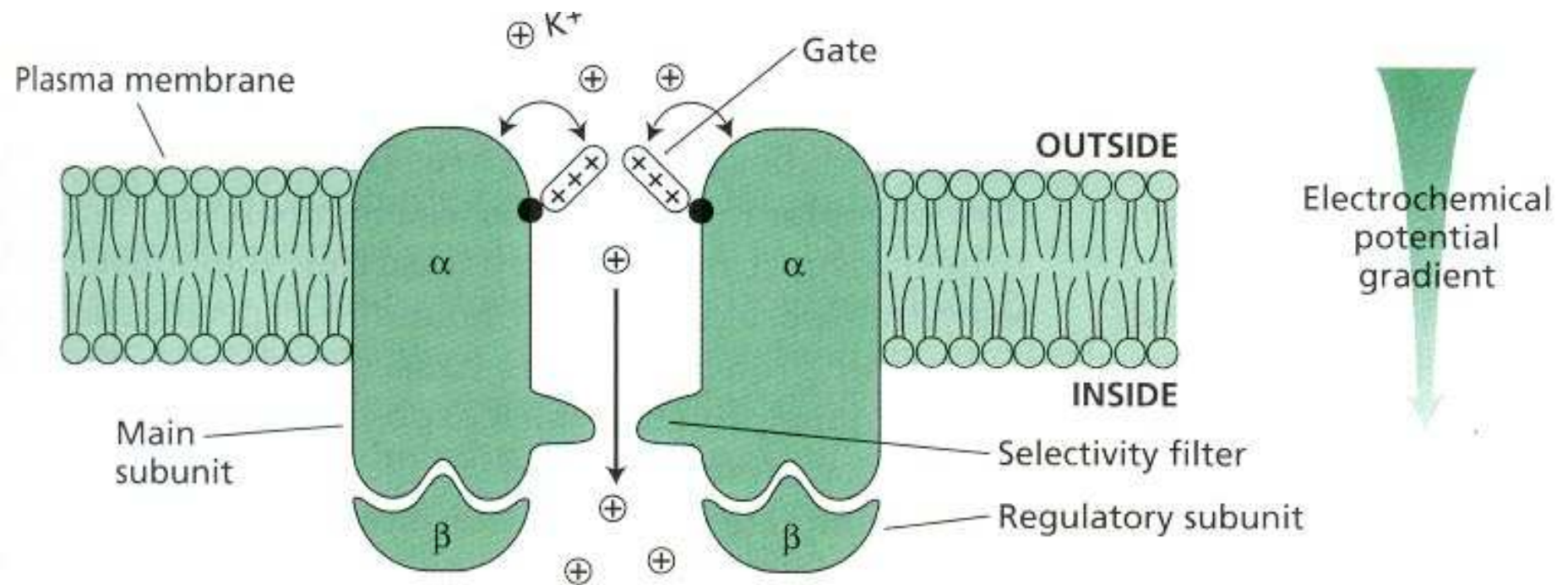


CANALI

- 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)

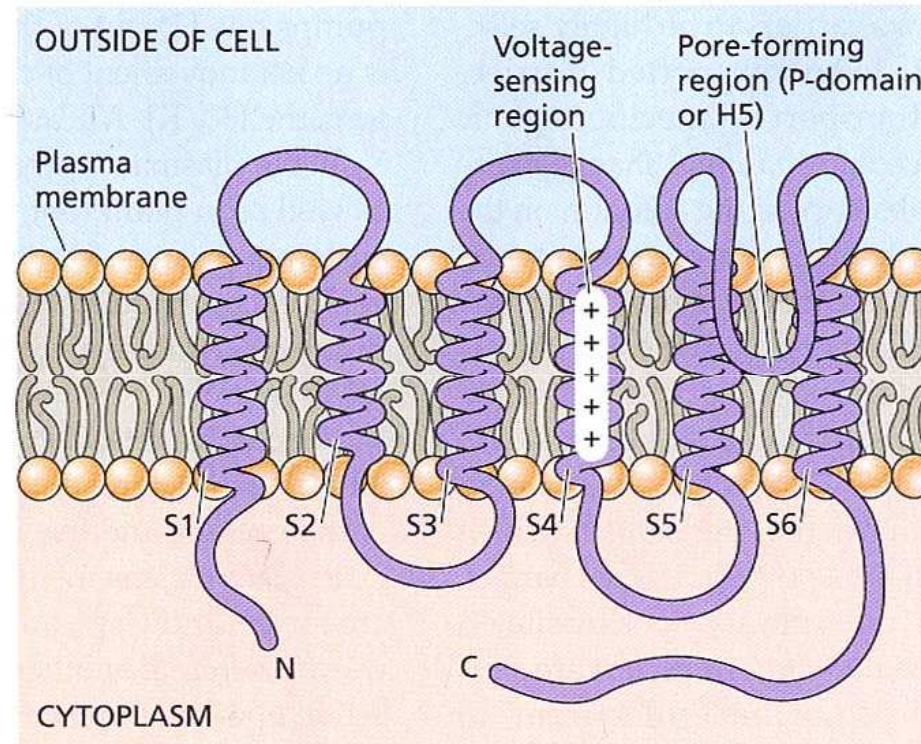
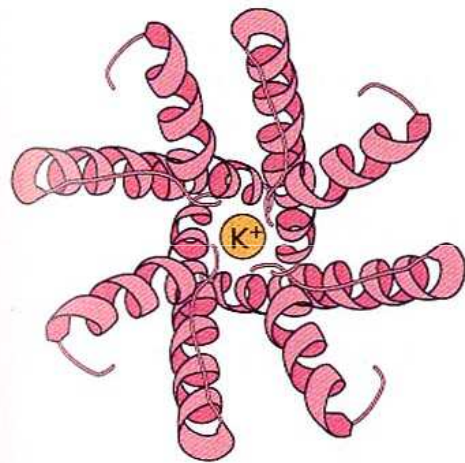
CANALI

due conformazioni: aperti/chiusi



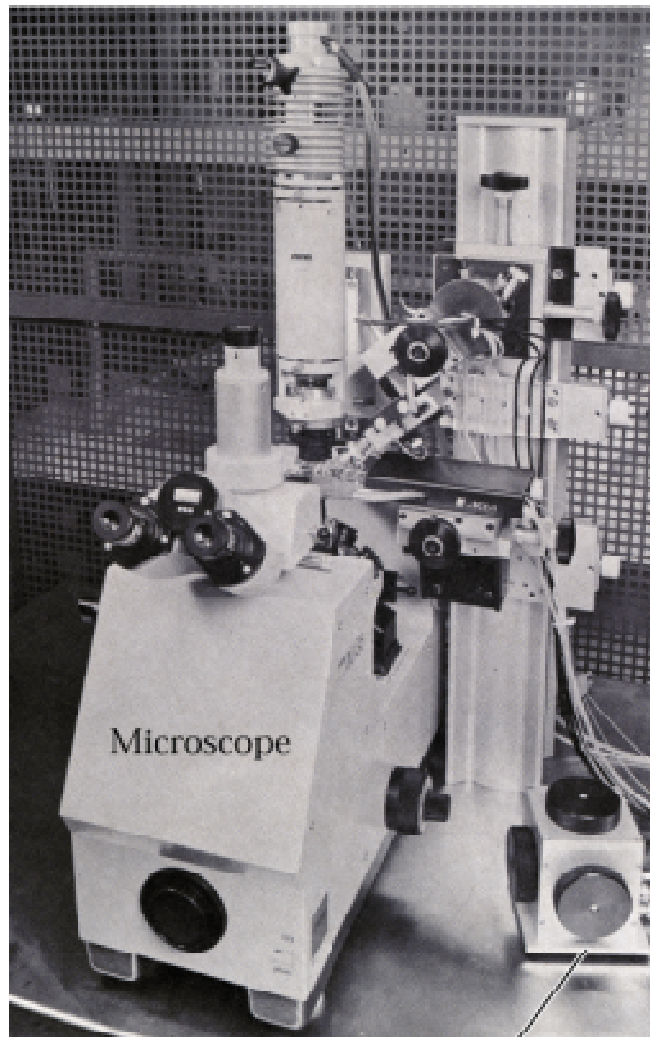
Ampiezza del poro e cariche di superficie = selettività

CANALI



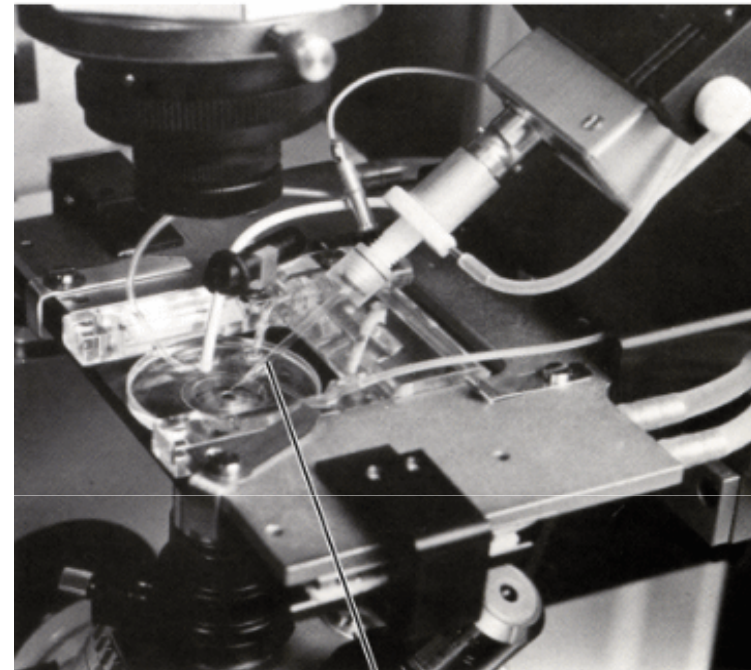
I canali si studiano con la tecnica del **PATCH CLAMP**

(B)

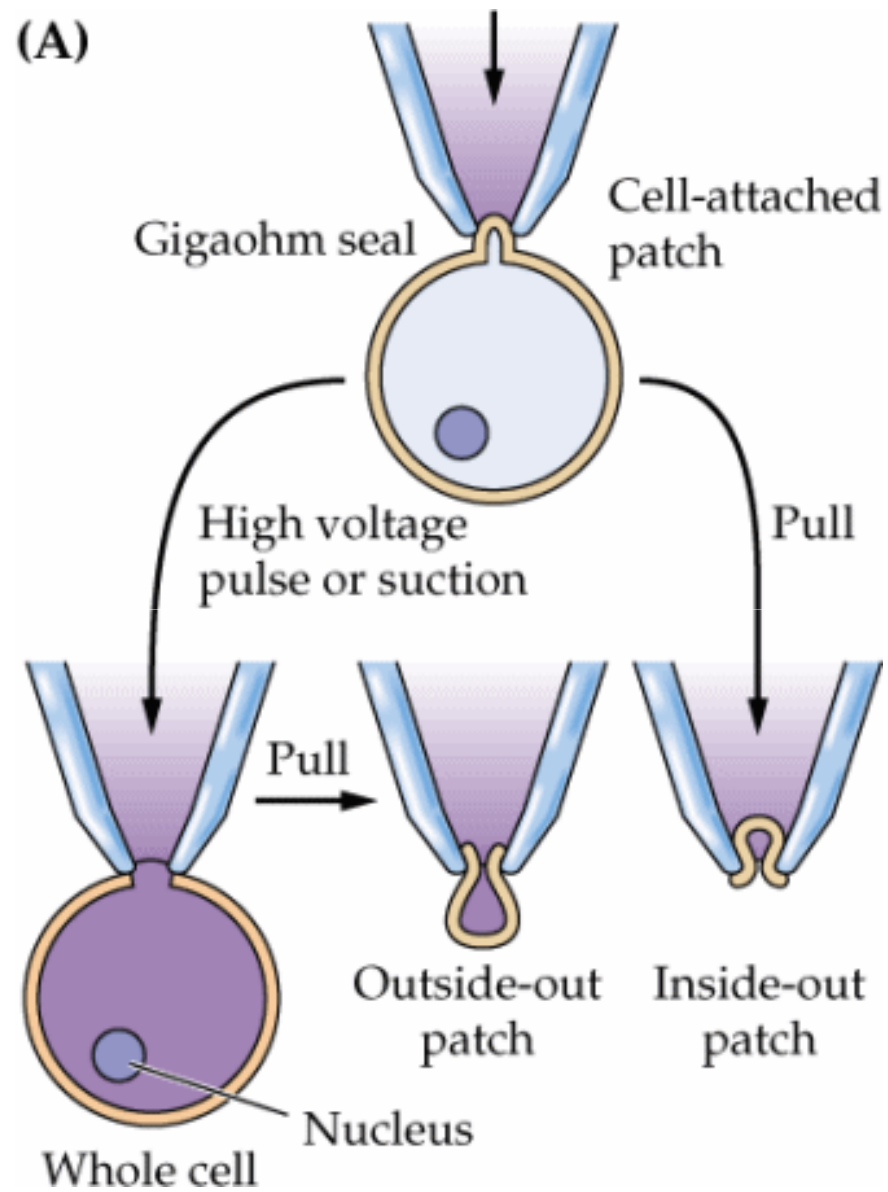
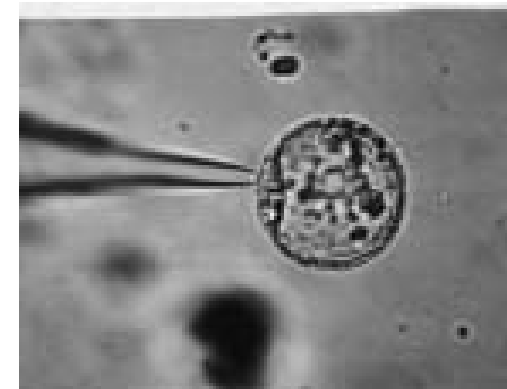


3-axis
micromanipulator

(C)

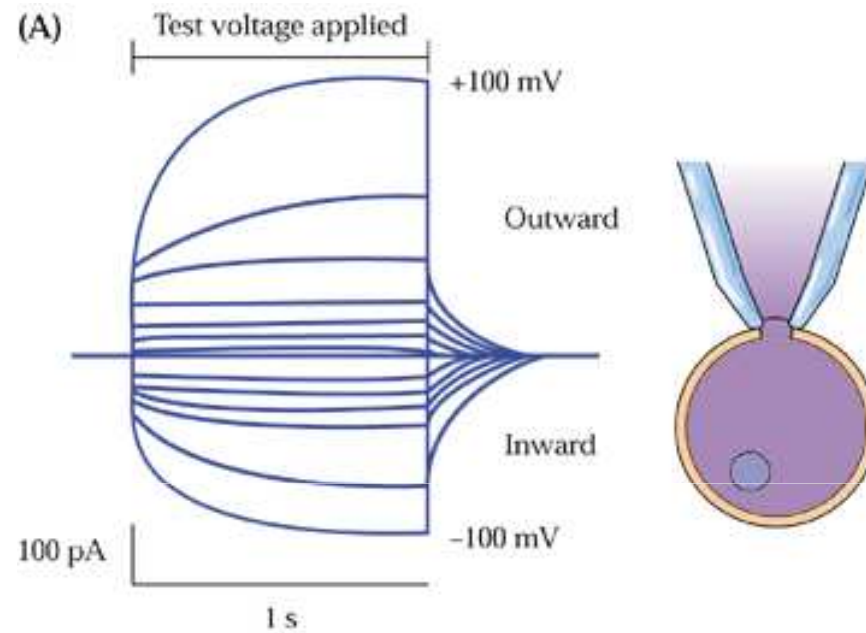


Pipette

**PATCH CLAMP**

PATCH CLAMP

CANALI



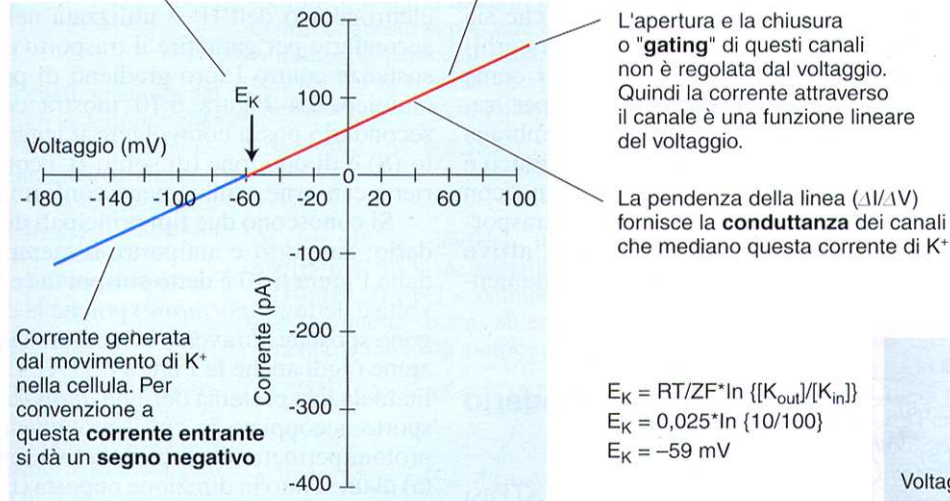
Le correnti dirette verso l'interno della cellula e quelle dirette verso l'esterno sono mediate da classi distinte di canali ionici

CANALI RETTIFICANTI

CANALI

Potenziale di equilibrio di Nernst per K^+ : per definizione nessun flusso di K^+ , quindi nessuna corrente

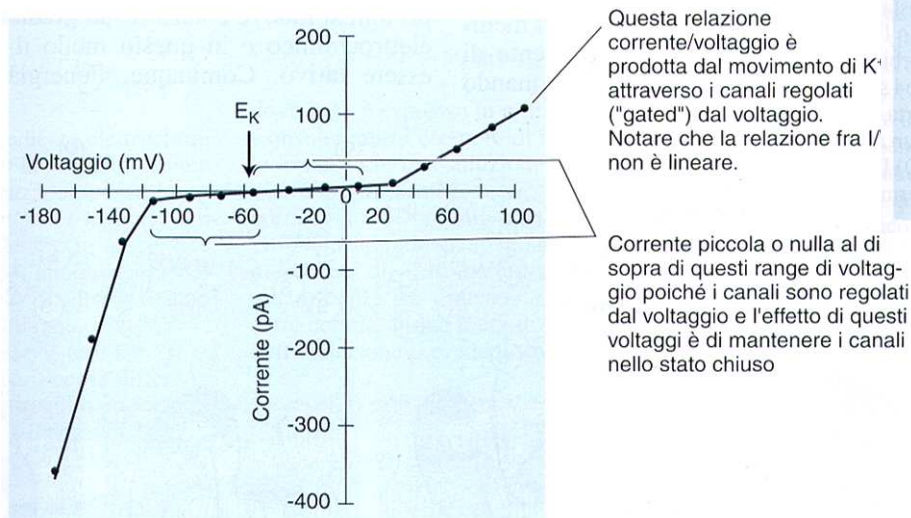
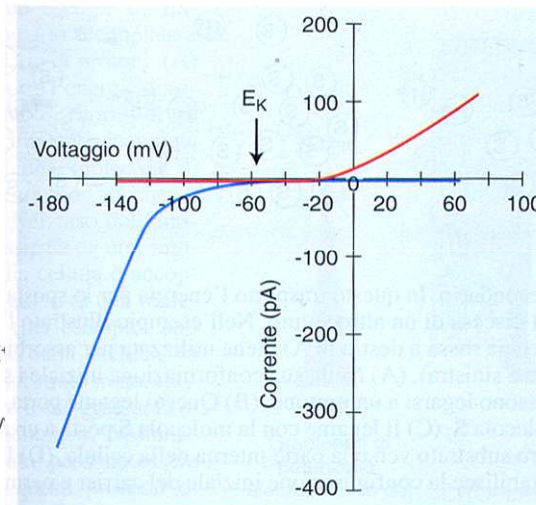
Corrente generata dal movimento di K^+ fuori dalla cellula. Per convenzione si dà un **segno positivo** a questa **corrente uscente**.



$$E_K = RT/ZF \ln \{ [K_{out}]/[K_{in}] \}$$

$$E_K = 0,025 \cdot \ln \{ 10/100 \}$$

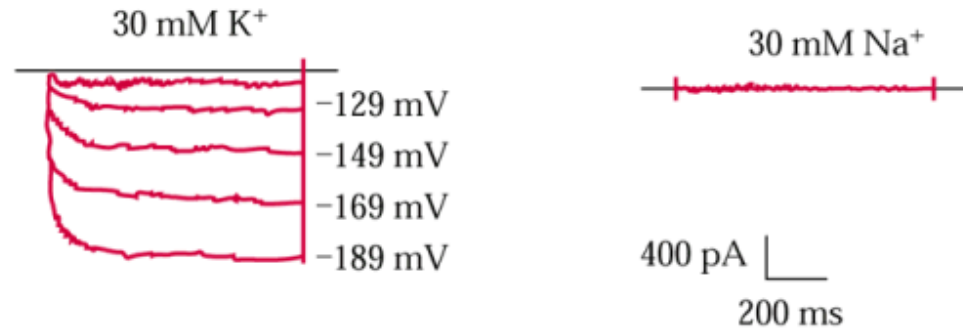
$$E_K = -59 \text{ mV}$$



I canali per il potassio sono estremamente selettivi

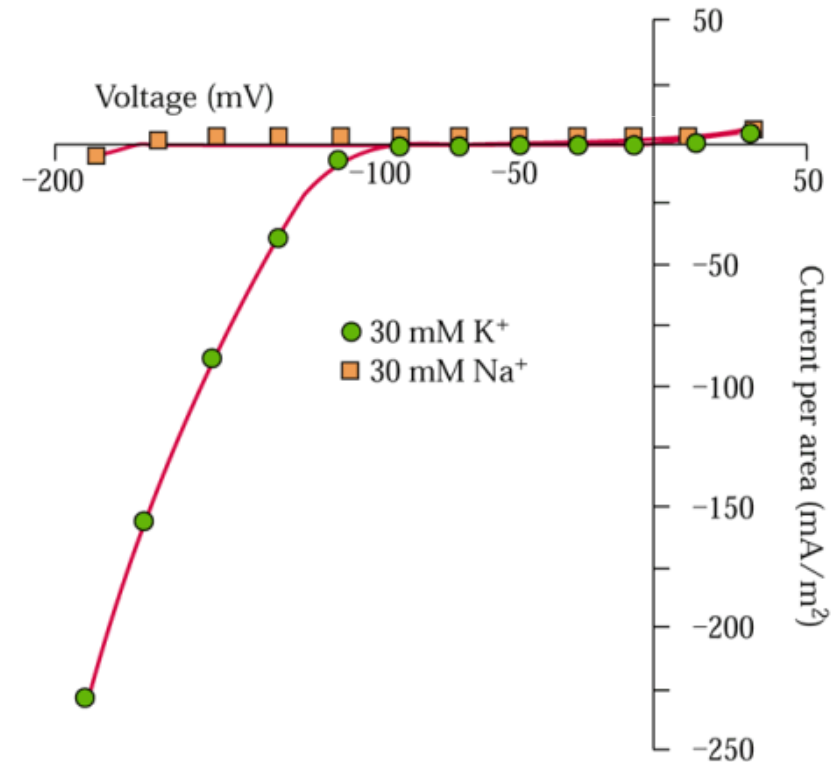
CANALI

(A)

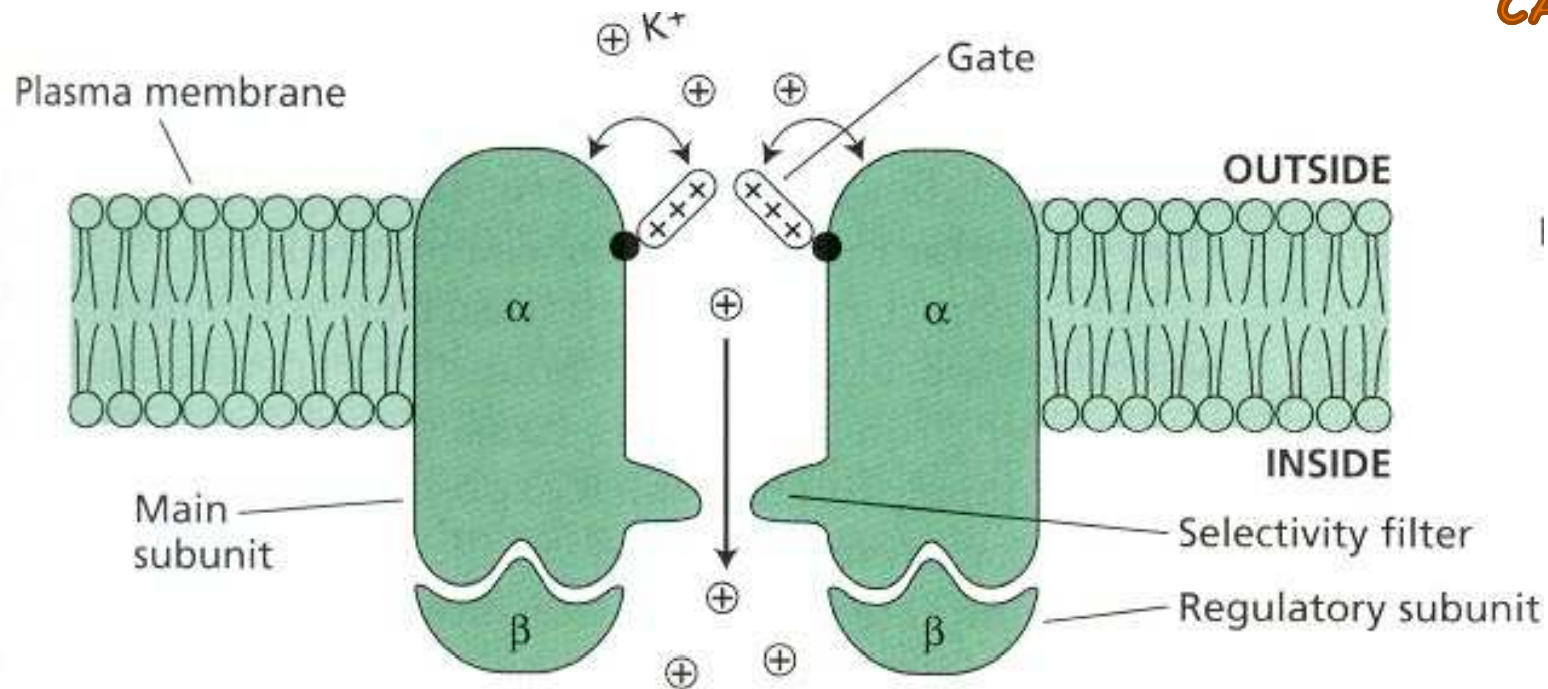


Correnti tempo-dipendenti attraverso canali rettificanti entranti per il K^+

Il Na^+ è molto meno permeabile

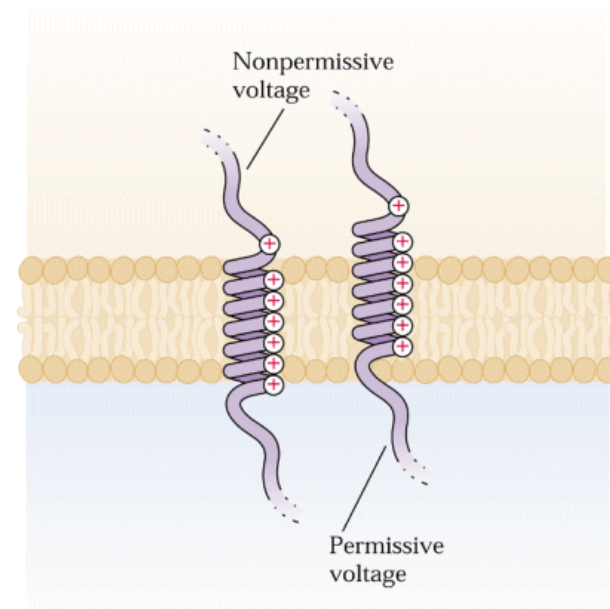


CANALI



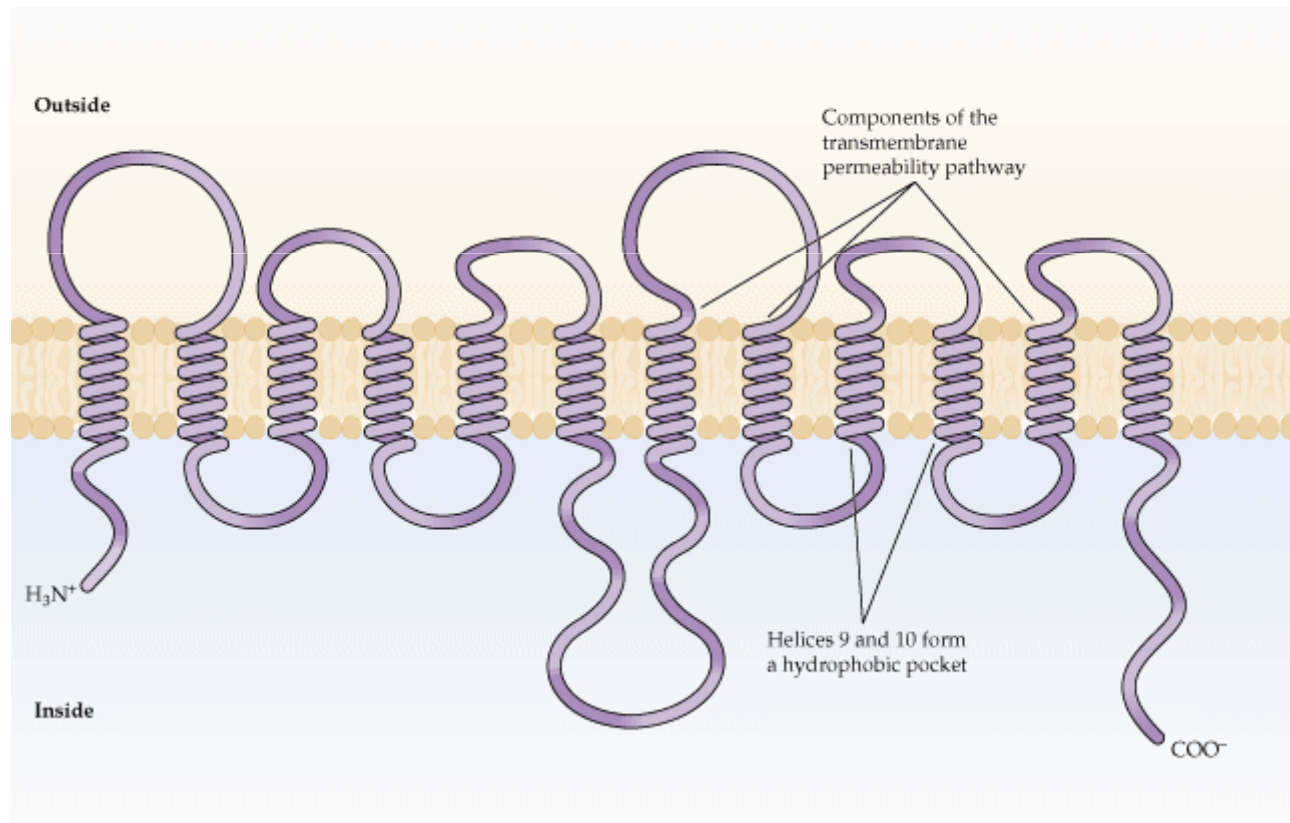
SENSORE DEL VOLTAGGIO

Canale K⁺ rettificante entrante
di tipo *Shaker*

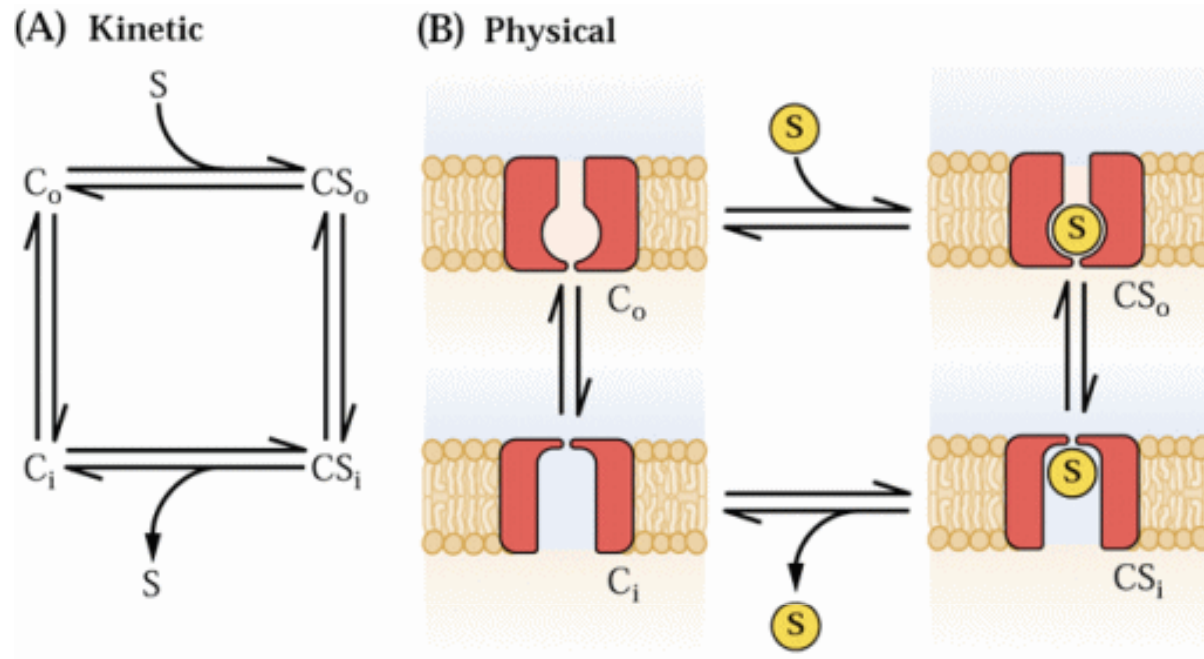


CARRIER

trasporto passivo (**diffusione facilitata**)
trasporto unidirezionale di **ioni** e **soluti**



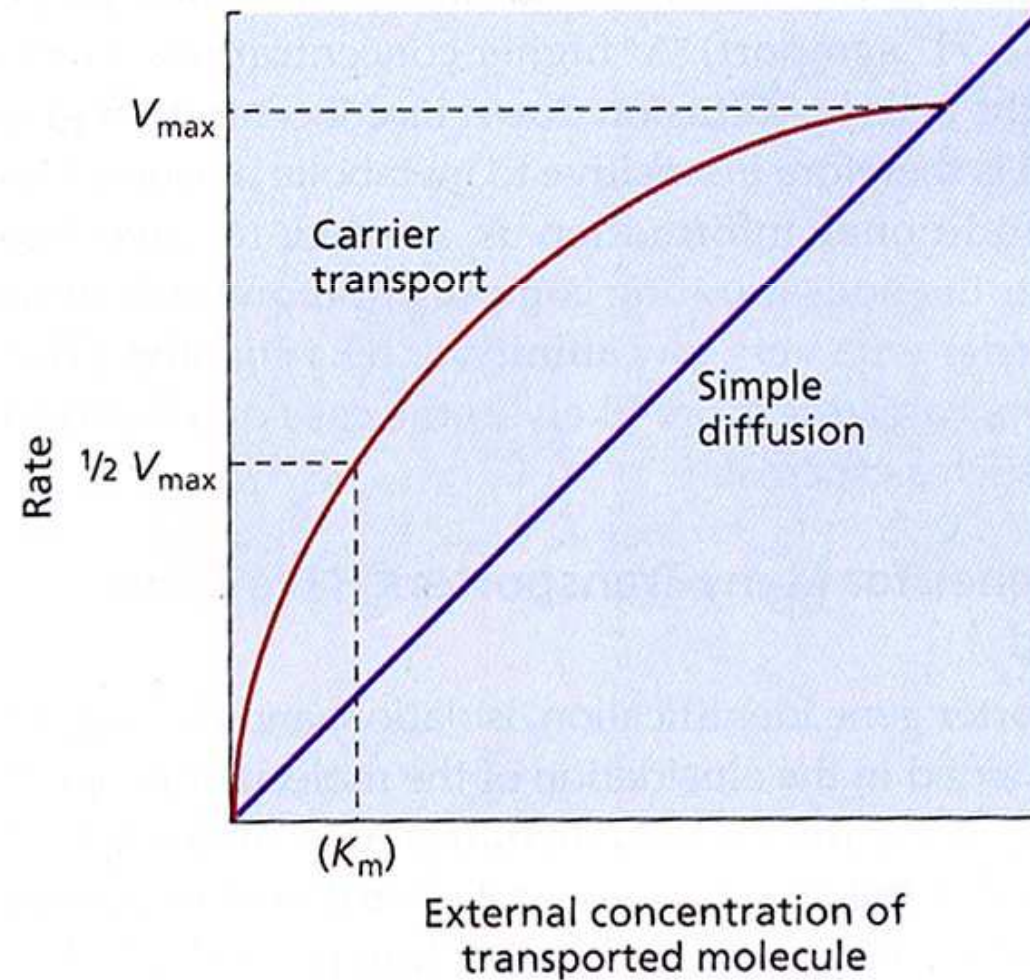
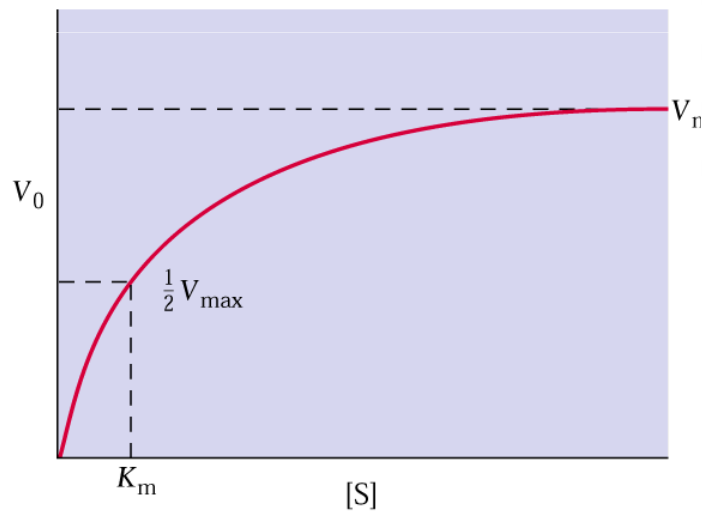
CARRIER



Il legame con la molecola da trasportare induce un cambiamento conformazionale e il conseguente rilascio della molecola dal lato opposto della membrana

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



PRINCIPALI IONI E SOLUTI TRASPORTATI DA CARRIER

NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , zuccheri,
amminoacidi, basi azotate

alta selettività per la molecola da trasportare

TRASPORTO ATTIVO

$$\Delta\bar{\mu}_j = RT \ln \frac{C_j^i}{C_j^o} + z_j F(E^i - E^o) > 0$$

Il trasporto avviene contro **GRADIENTE ELETTROCHIMICO**

E' necessaria energia

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)

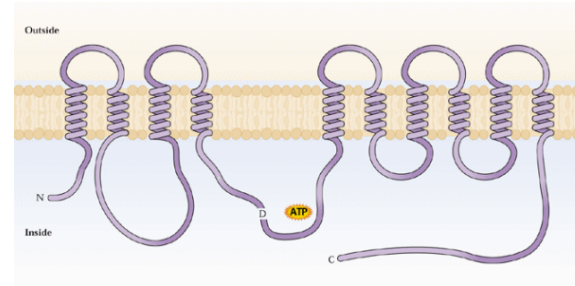
elettroneutre → H⁺/K⁺-ATPasi (mucosa gastrica)

principali pompe elettrogeniche

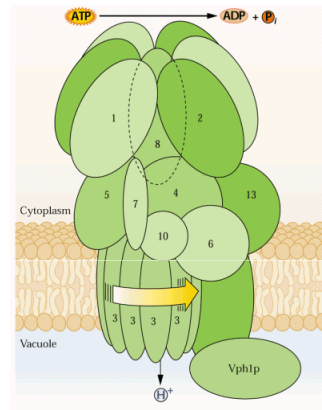
- H^+ -ATPasi di membrana plasmatica
- H^+ -ATPasi vacuolare
- H^+ -pirofosfatasi (vacuolo, golgi)
- Ca^{++} -ATPasi (membrana plasmatica)

pompe protoniche nelle piante

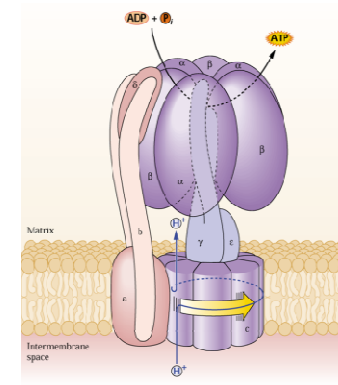
H^+ -ATPasi di plasmalemma



H^+ -ATPasi vacuolare



H^+ -ATPasi dei mitocondri e dei cloroplasti



H^+ -pirofosforilasi (vacuolo e golgi)

TRASPORTO ATTIVO DI H^+



Gradiente elettrochimico di H^+

FORZA MOTRICE PROTONICA



ENERGIA LIBERA

il movimento dei 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 $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$

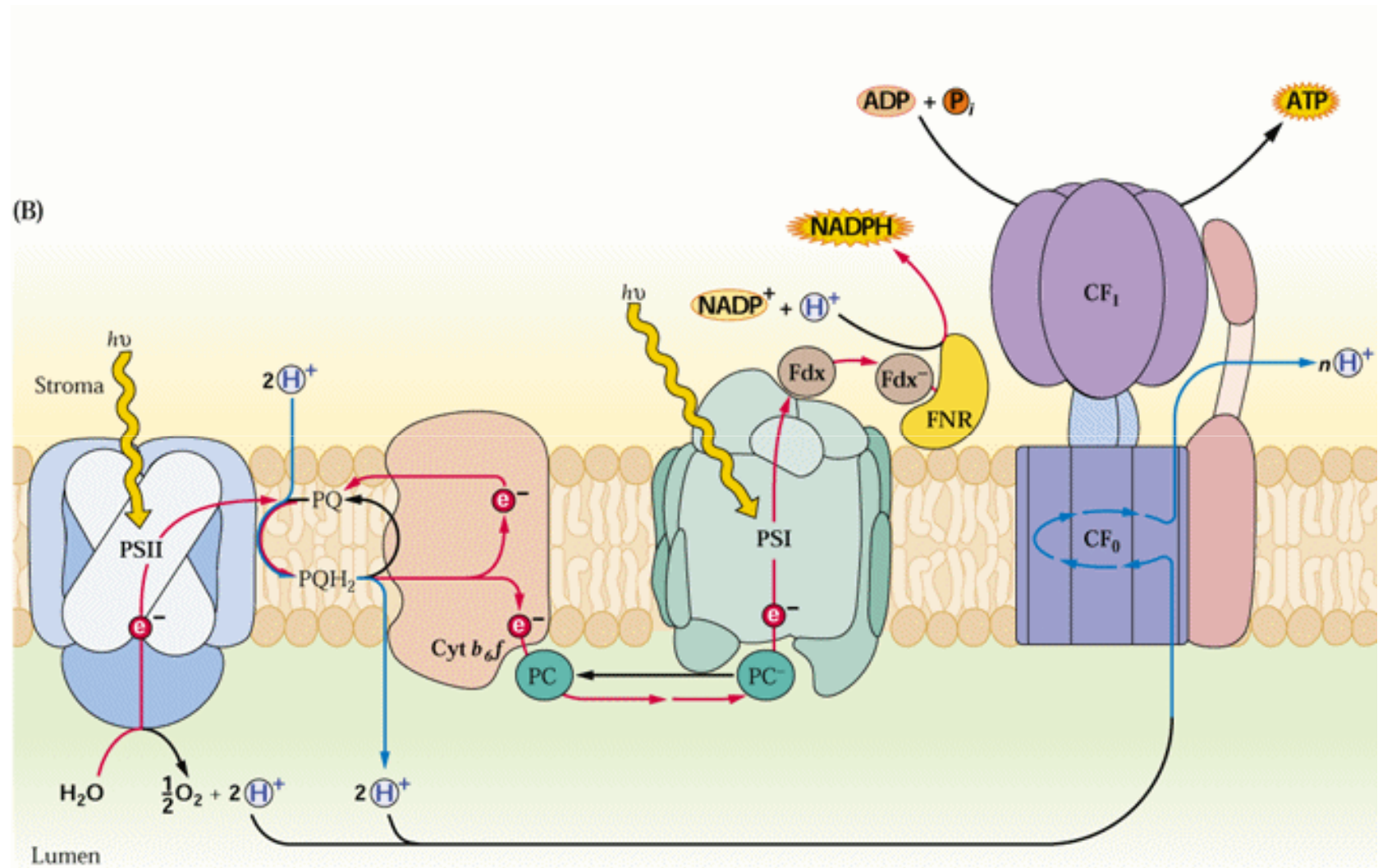
$$\log \frac{[\text{H}^+]^i}{[\text{H}^+]^o} = -(\text{pH}_i - \text{pH}_o) = \Delta\text{pH}$$

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

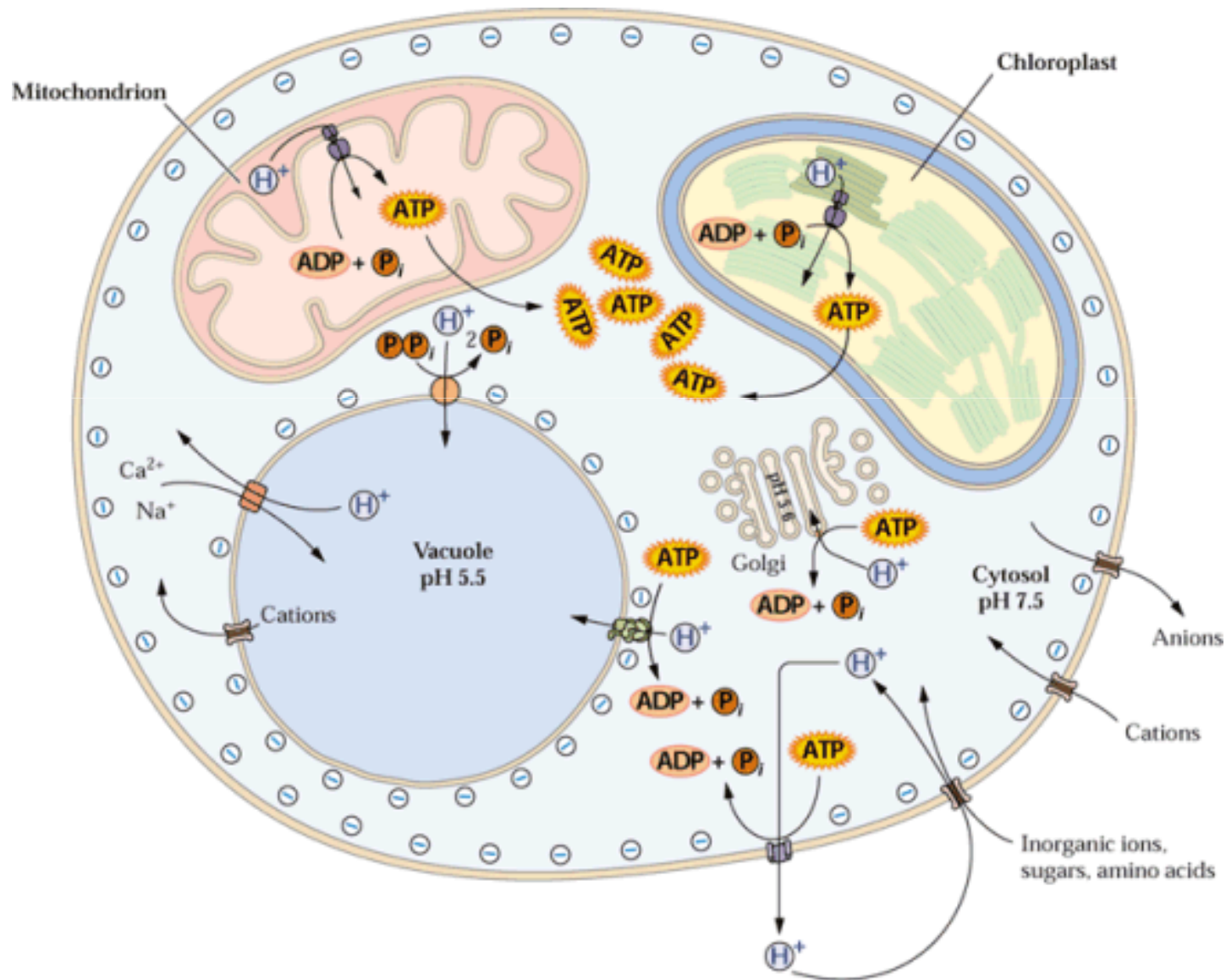
$$\Delta p = \Delta E - 59 \Delta\text{pH}$$

FORZA PROTON MOTRICE

(B)



Processi chemiosmotici



TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

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

SIMPORTO

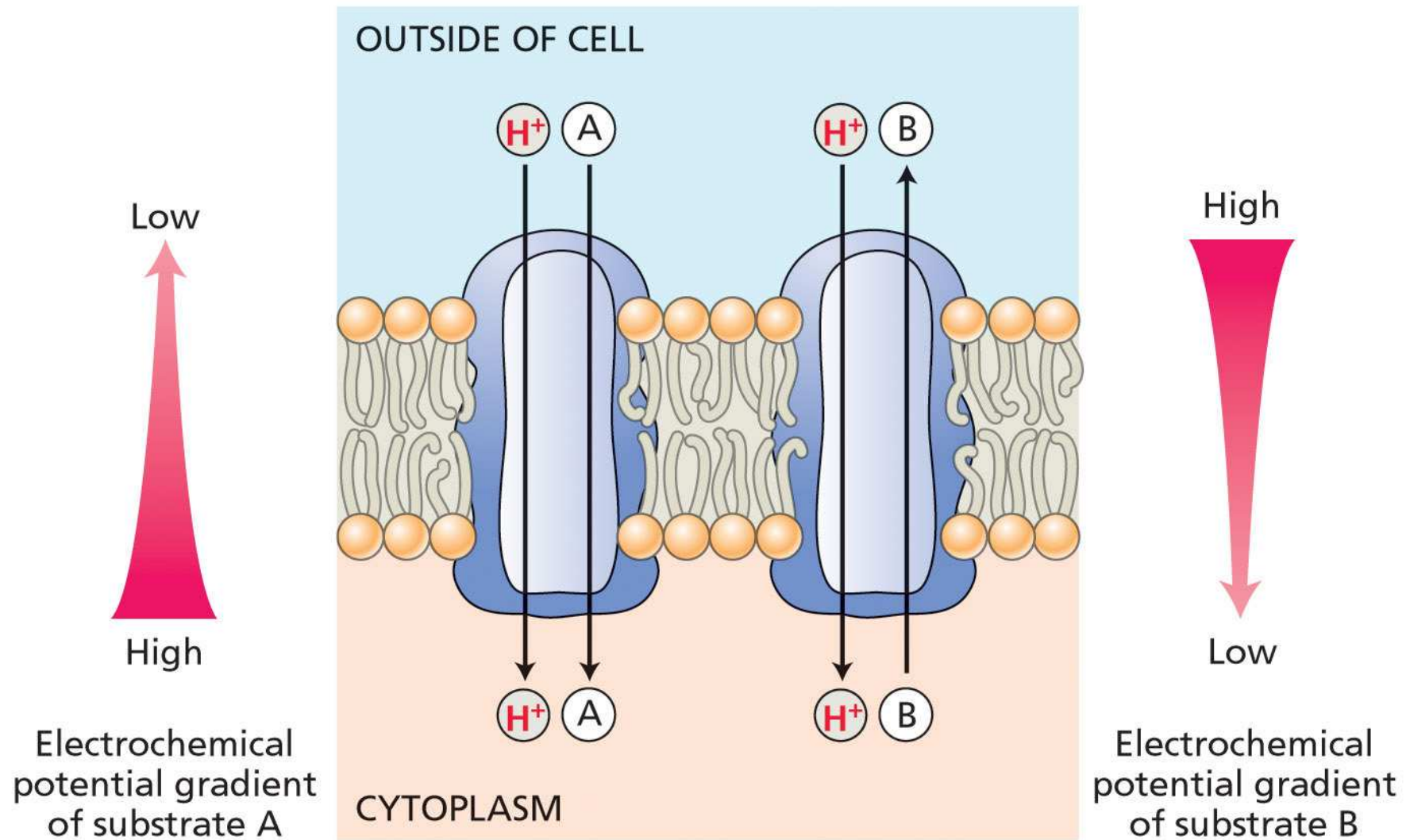
protone e molecola X si muovono nella stessa direzione

ANTIPORTO

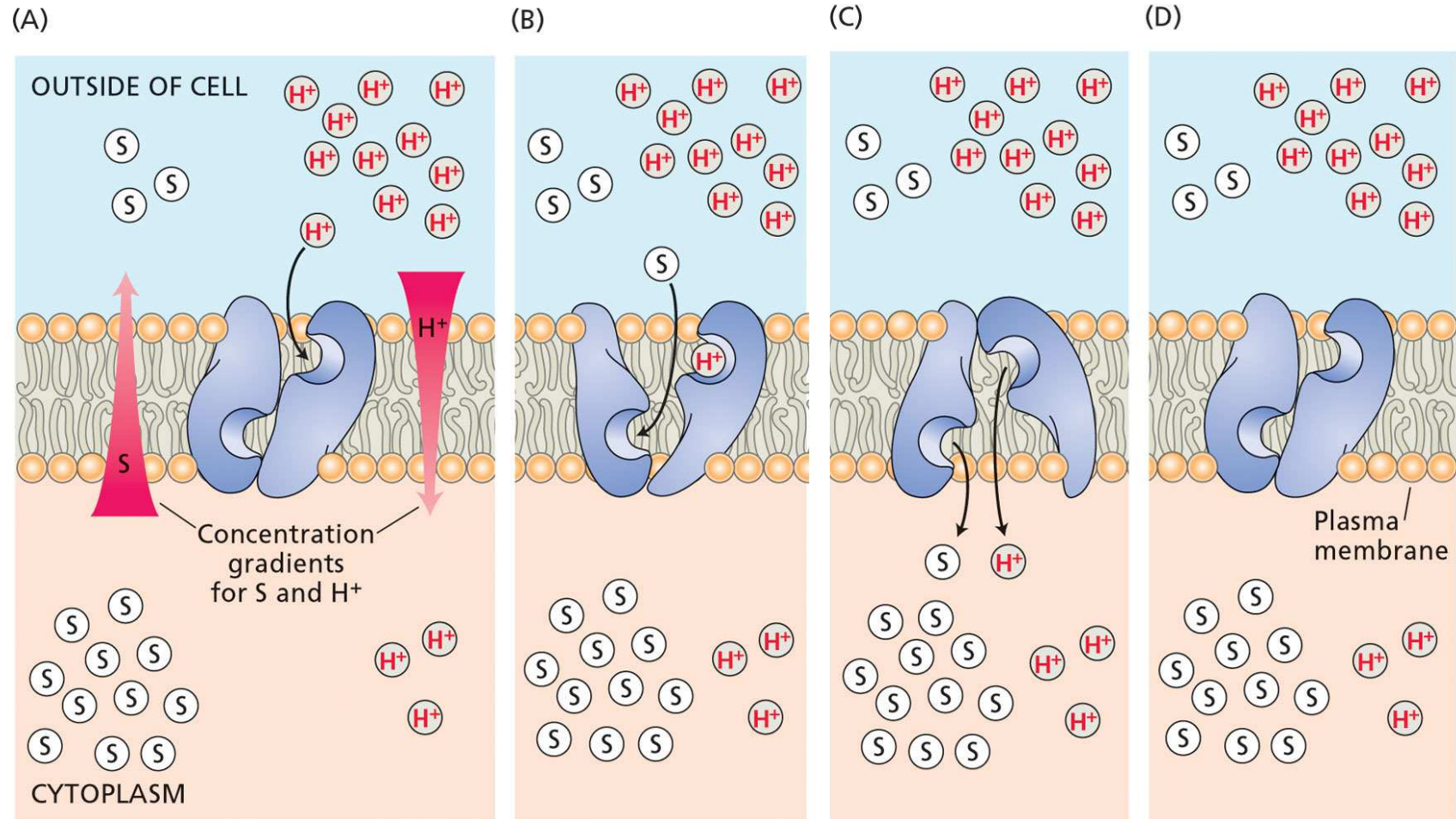
protone e molecola X si muovono in direzioni opposte

(A) Symport

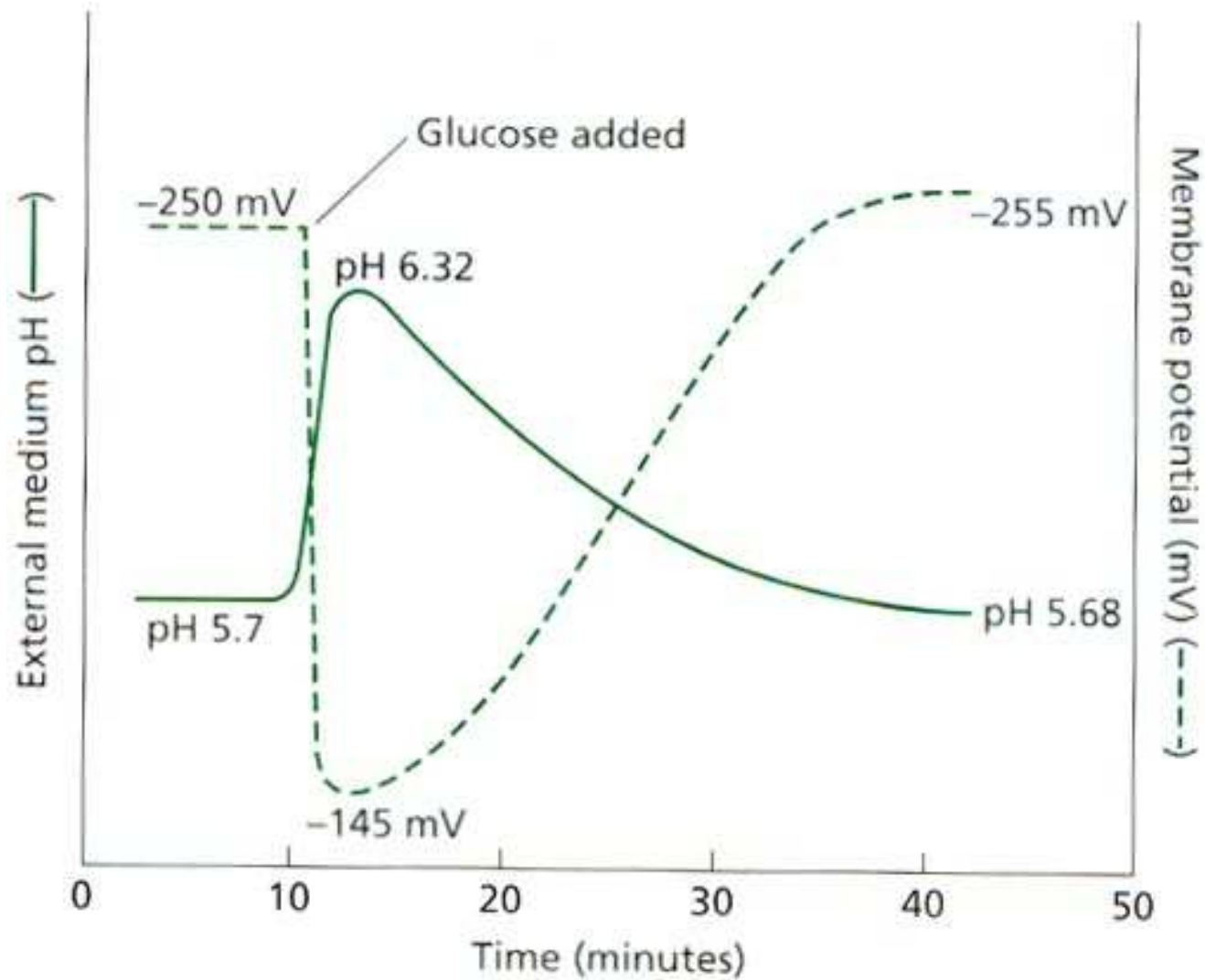
(B) Antiport



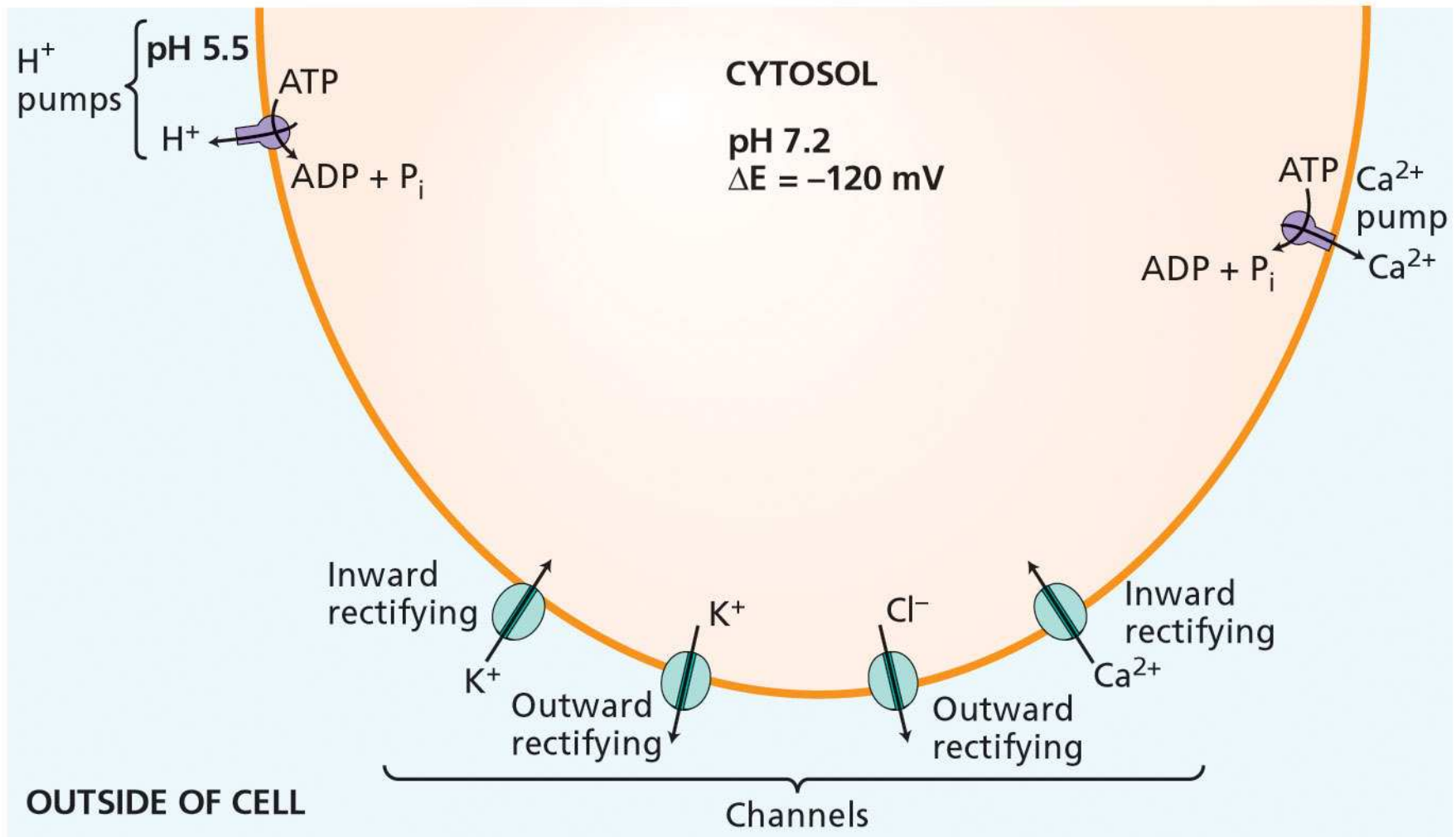
Ipotetico modello di funzionamento di un simportatore



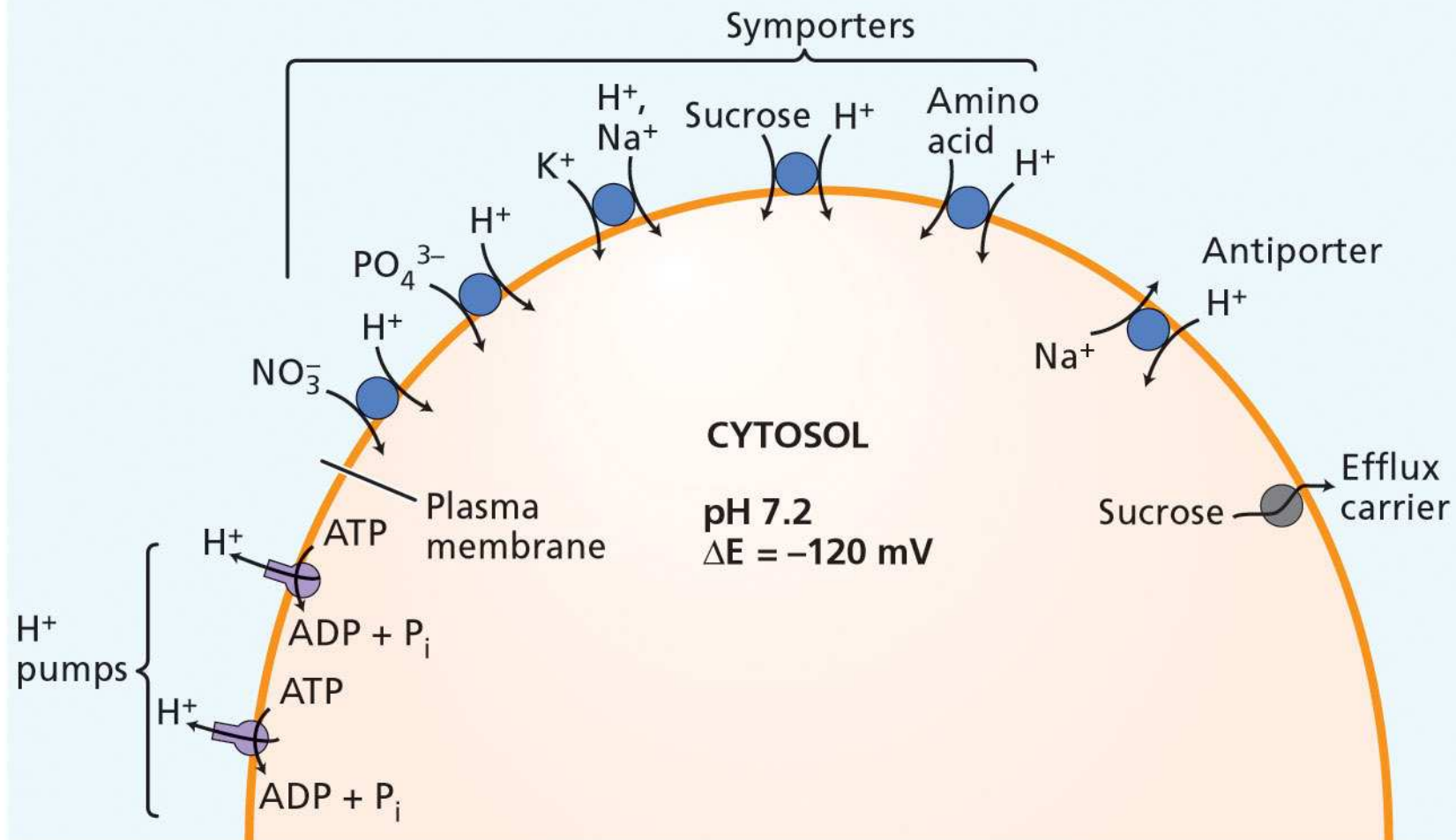
variazioni del pH e del ΔE in *Lemna gibba* in seguito all'aggiunta di glucosio

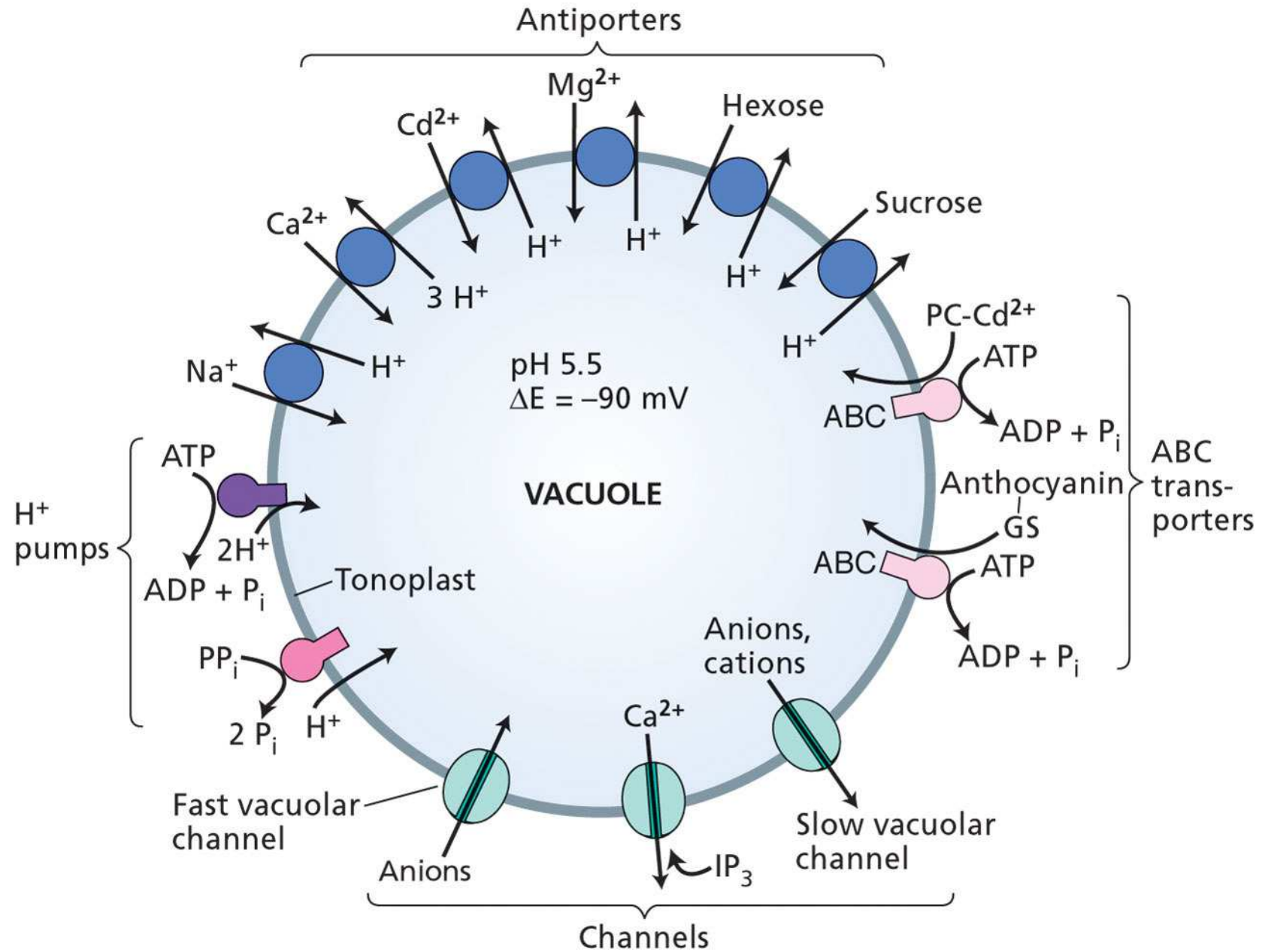


simporto glucosio- H^+

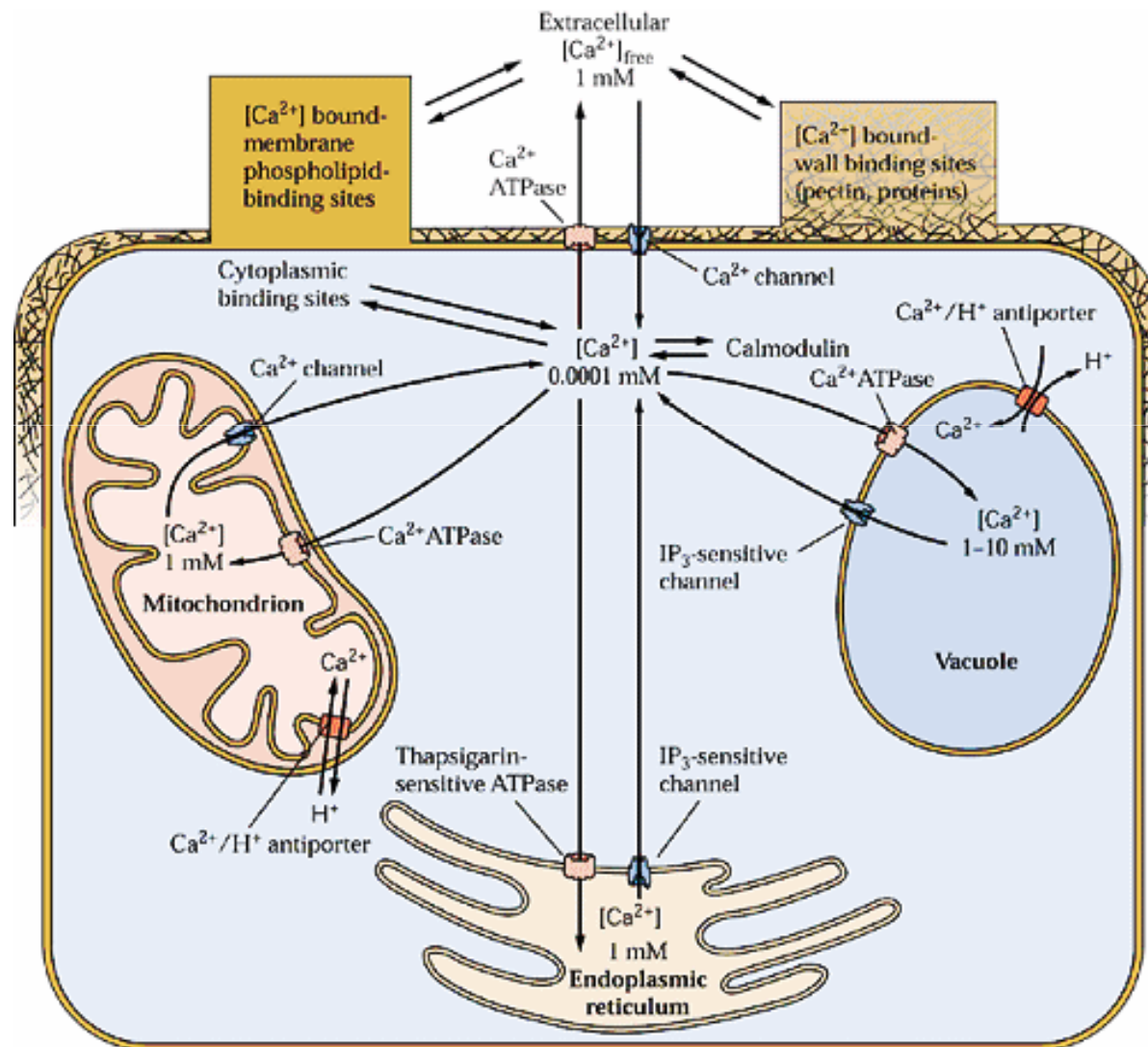


OUTSIDE OF CELL





flussi del Ca^{2+} nella cellula vegetale



H^+ -ATPasi

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

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

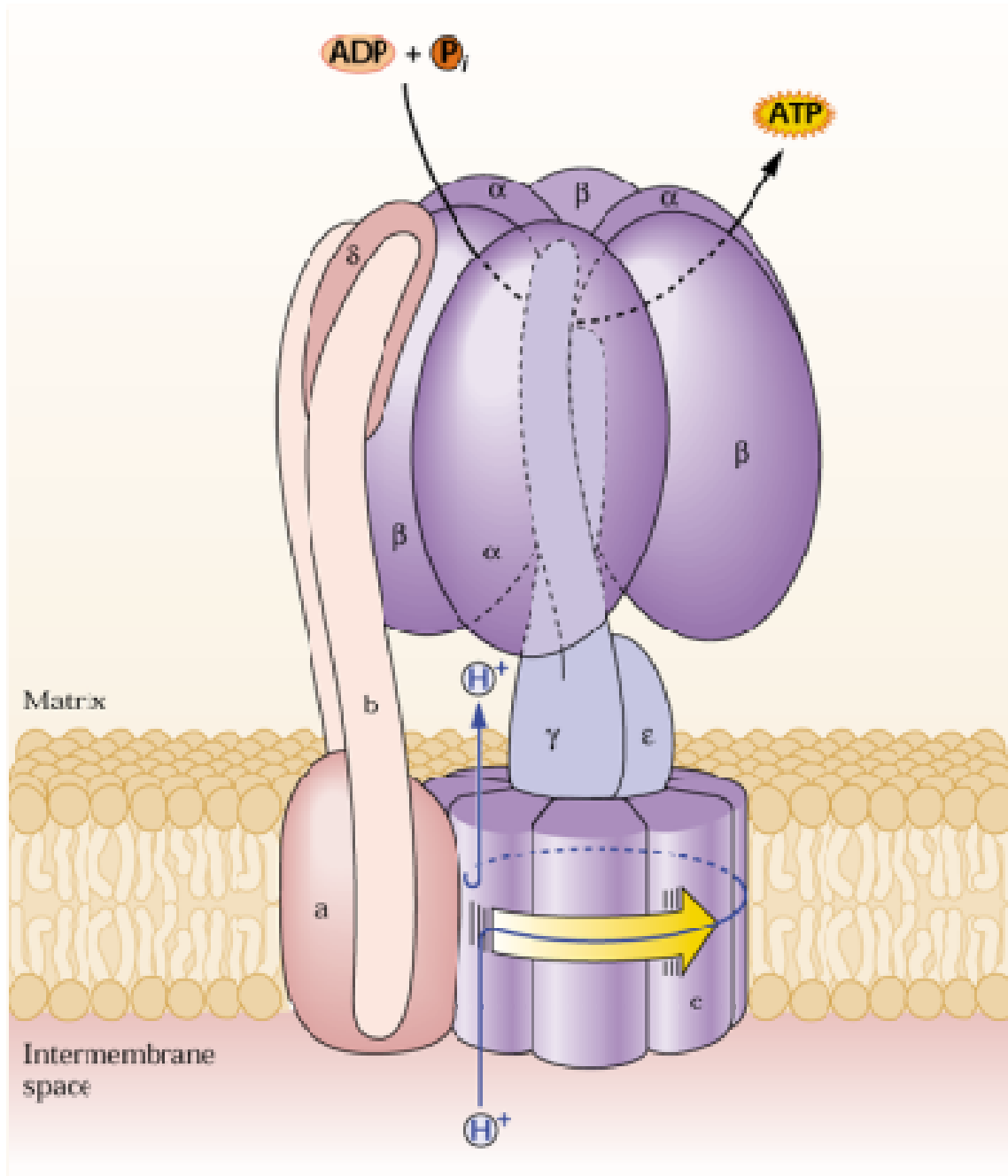
P-ATPasi, presente sulla **membrana plasmatica**

H^+ -ATPasi

F-ATPasi

CF_1
 $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$

CF_0
 a, b, b', c_{12}



H^+ -ATPasi

V-ATPasi

V_1

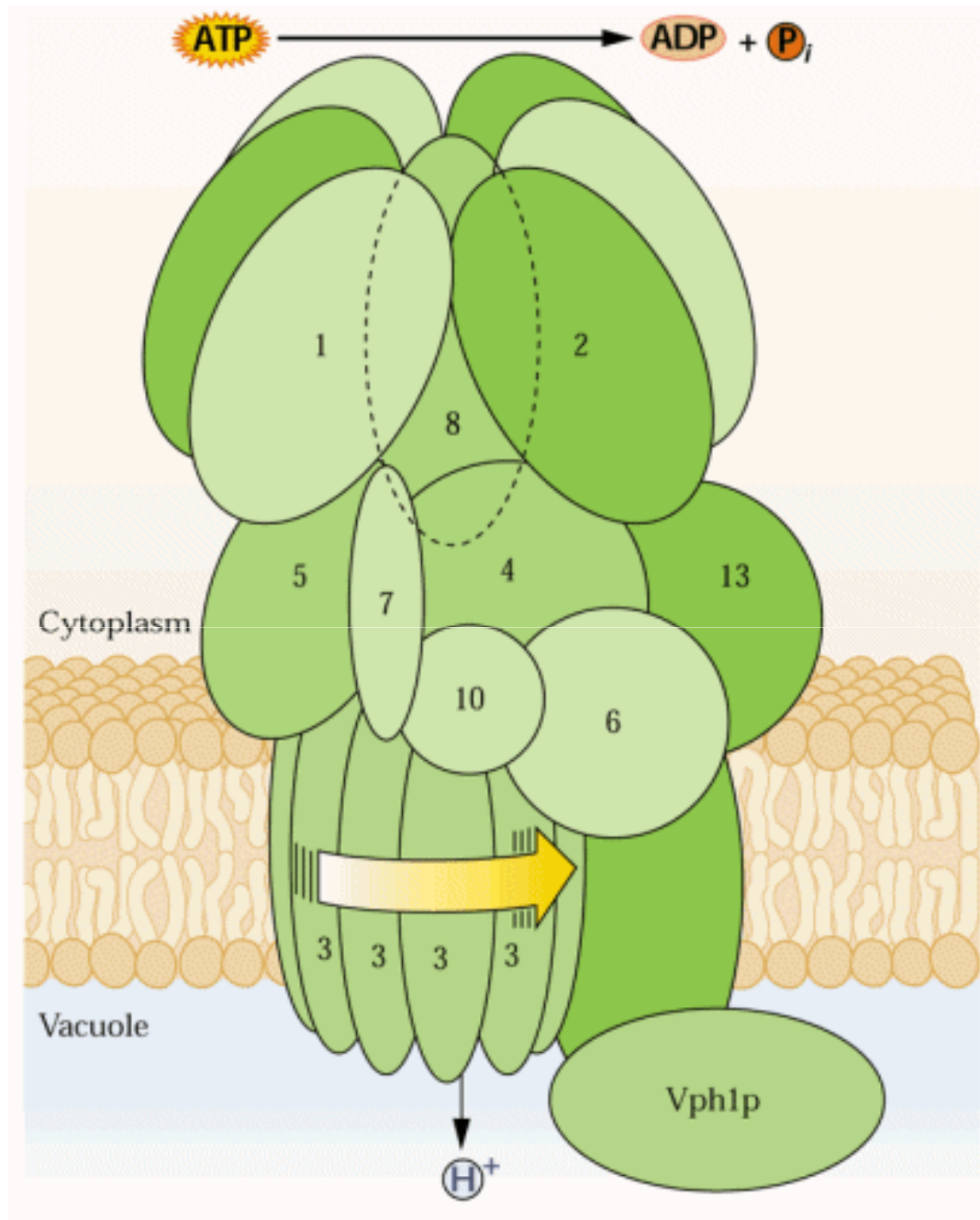
porzione solubile
sito catalitico

3 copie subunità 1 (β F-ATPasi)
3 copie subunità 2 (α F-ATPasi)
+ altre 8 subunità

V_o

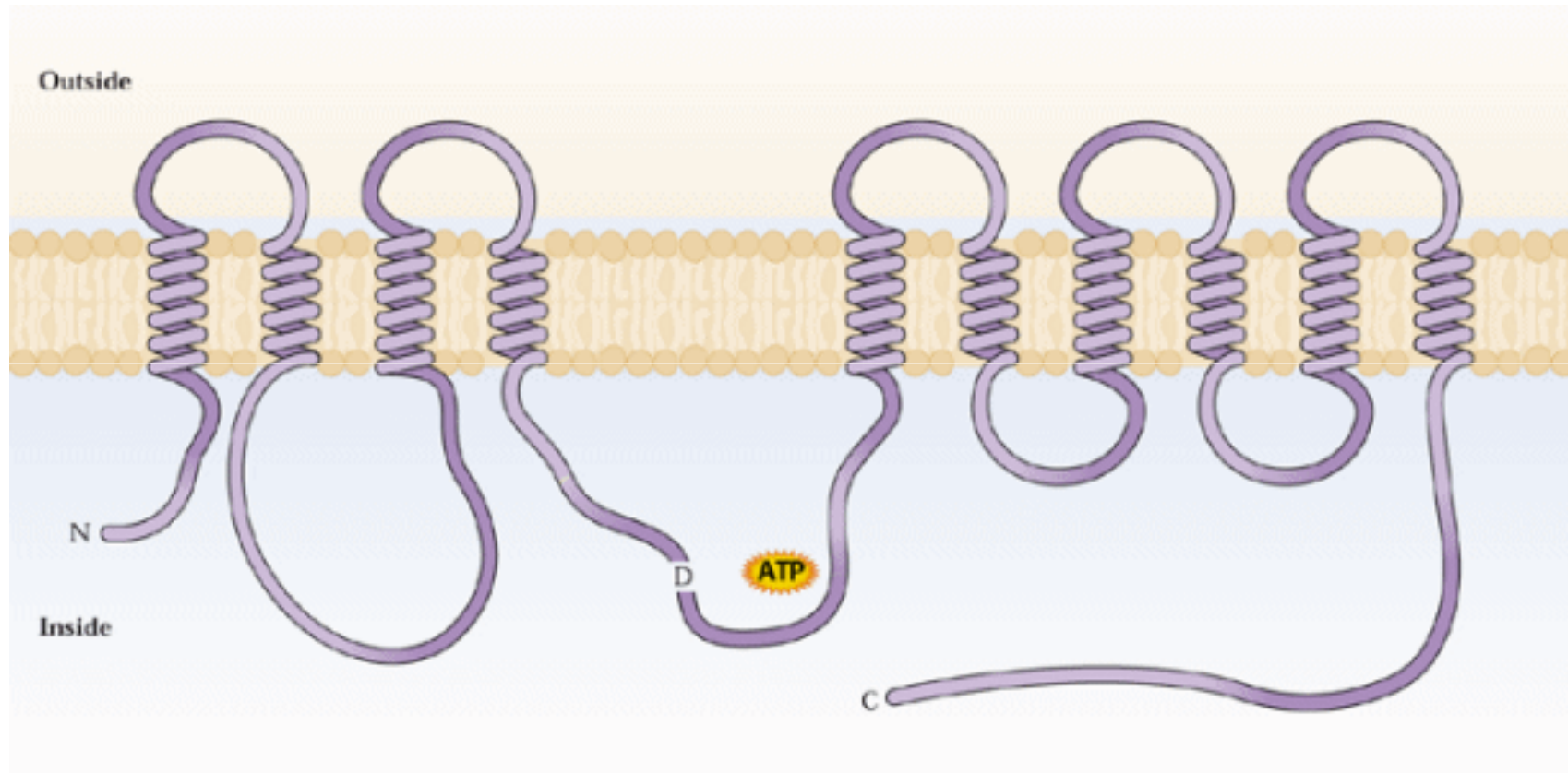
porzione integrale di membrana
canale per H^+

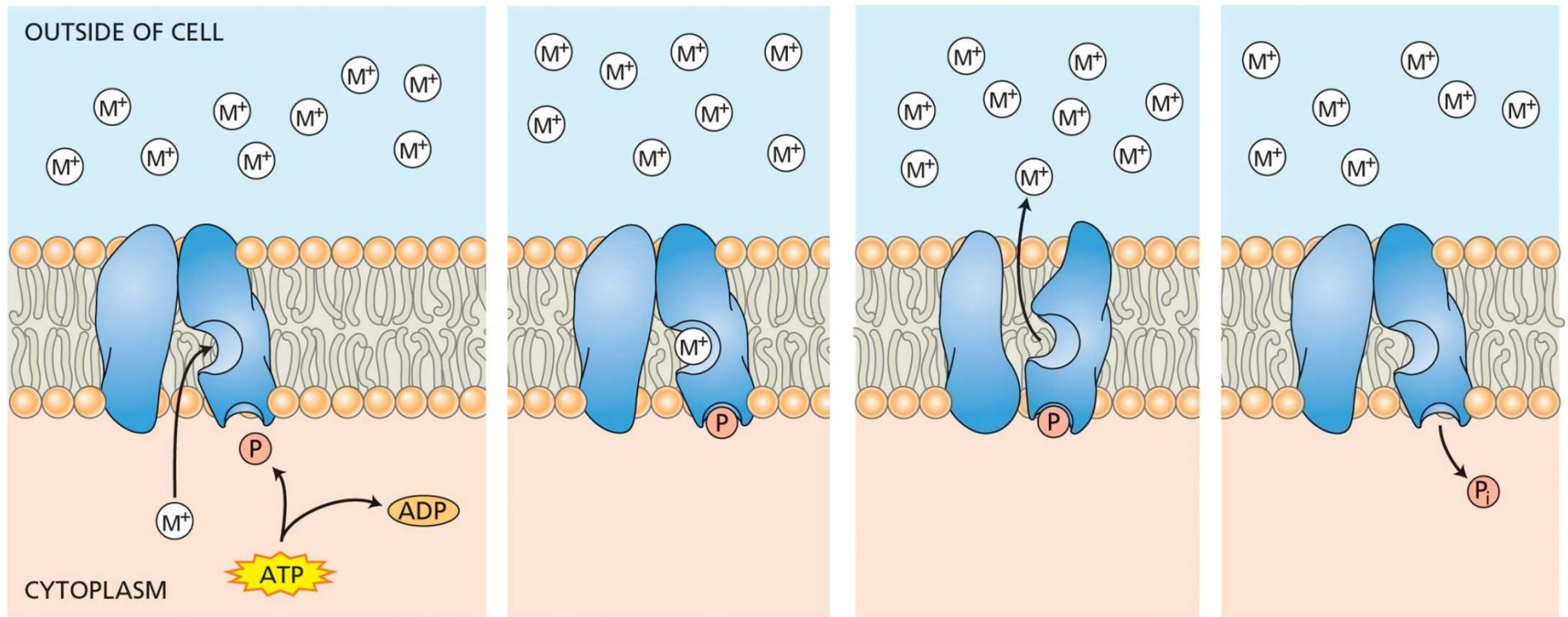
copie multiple subunità 3
(16 kDa, = 2 X 8 kDa subunità c)
+ altre 4 subunità



P-ATPasi

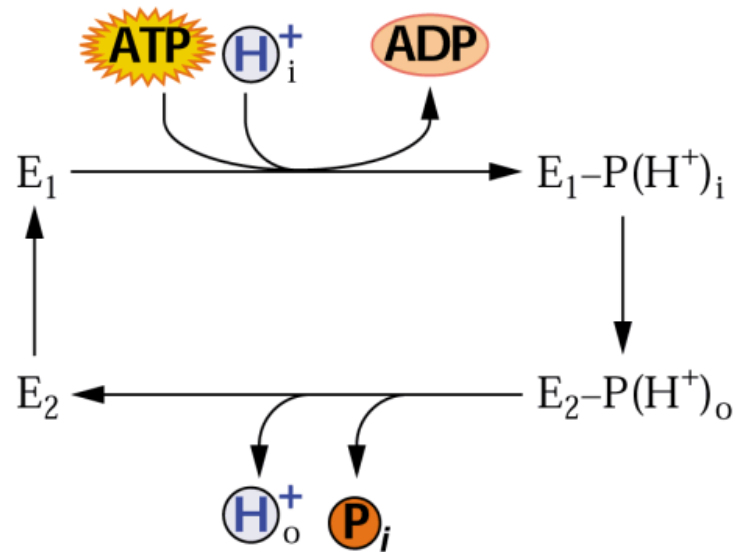
H^+ -ATPasi di plasmalemma





PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 6.14 (Part 1) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 6.14 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

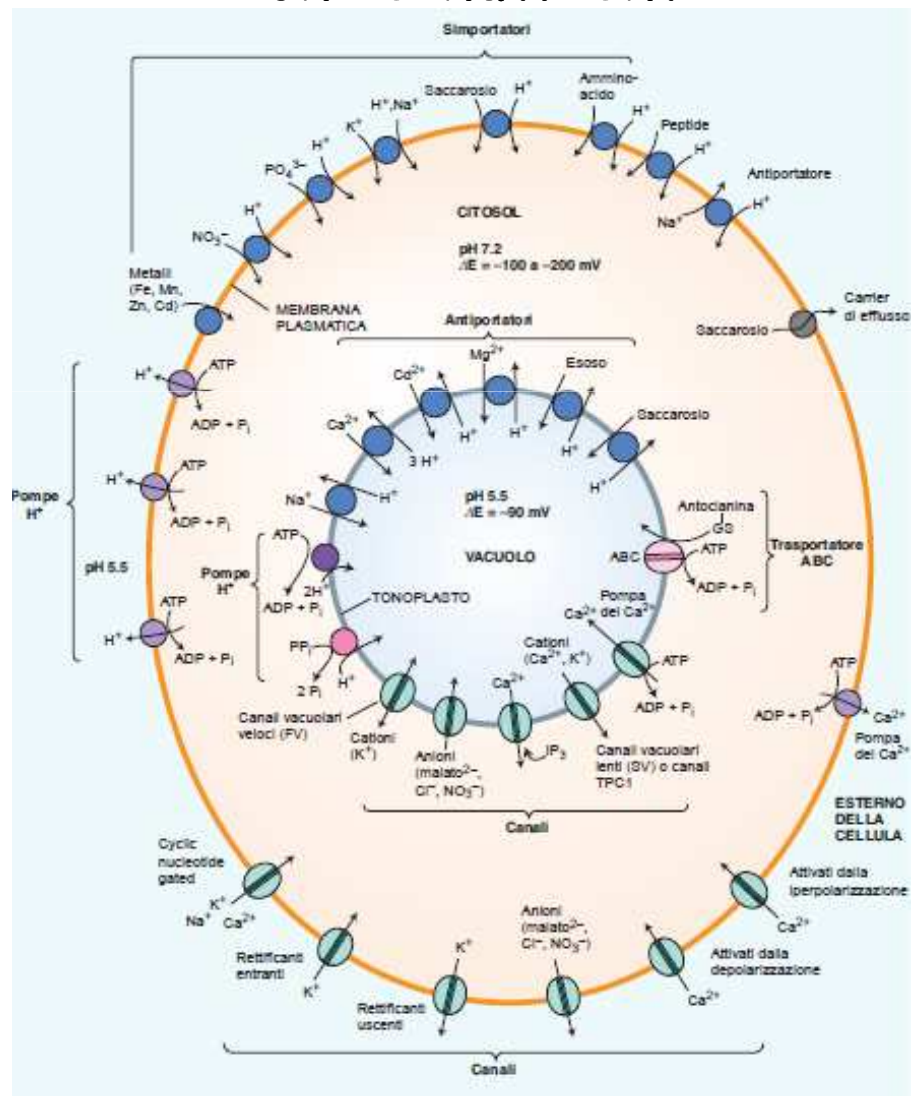


RUOLO FISIOLOGICO DELL'H⁺-ATPasi DI PLASMALEMMMA

mantenimento del pH del citoplasma

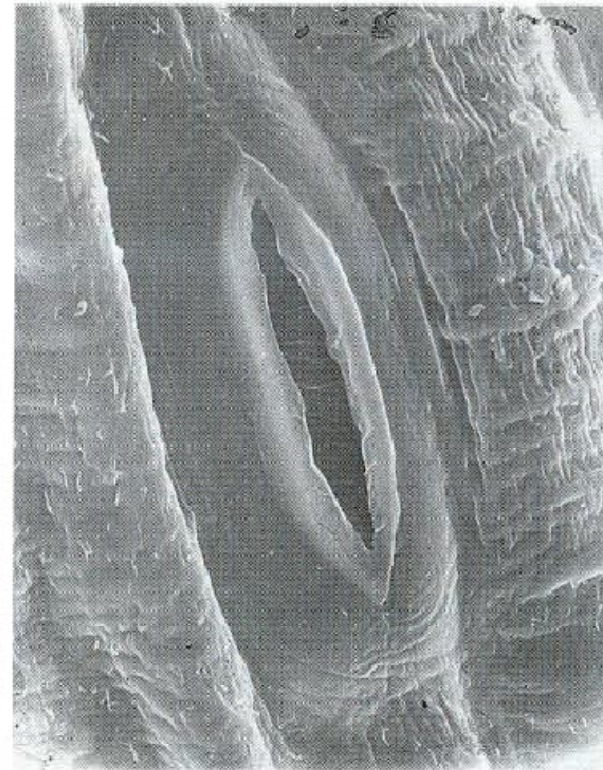
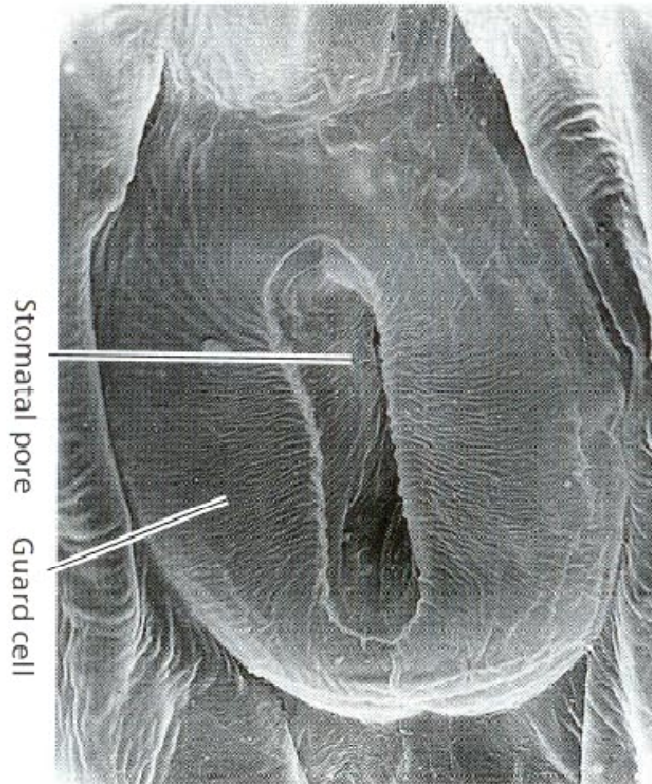
RUOLO FISILOGICO DELL' H^+ -ATPasi DI PLASMALEMMMA

forza guida per sistemi di trasporto di
ioni e nutrienti

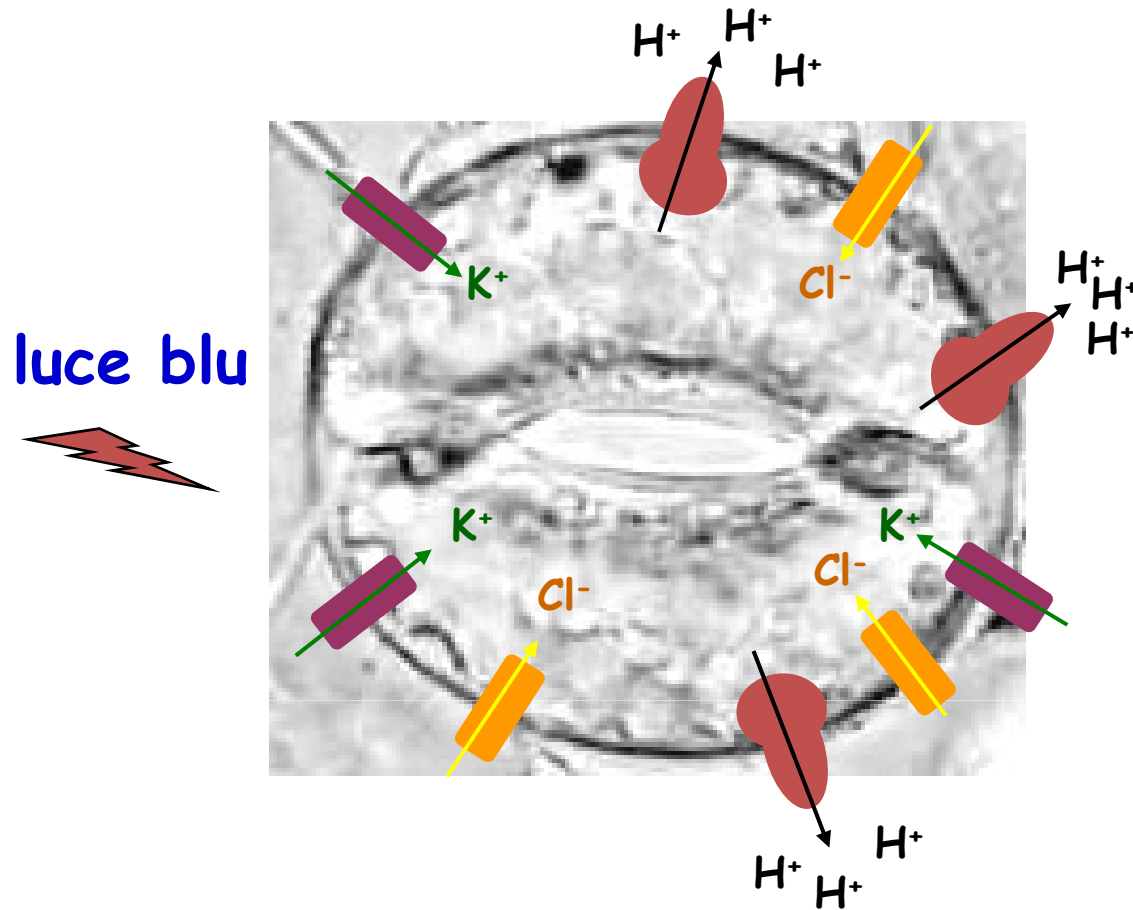


RUOLO FISILOGICO DELL' H^+ -ATPasi DI PLASMALEMMMA

Apertura e chiusura degli stomi



Apertura degli stomi



Iperpolarizzazione della
membrana



apertura canali del K^+



ingresso del Cl^-



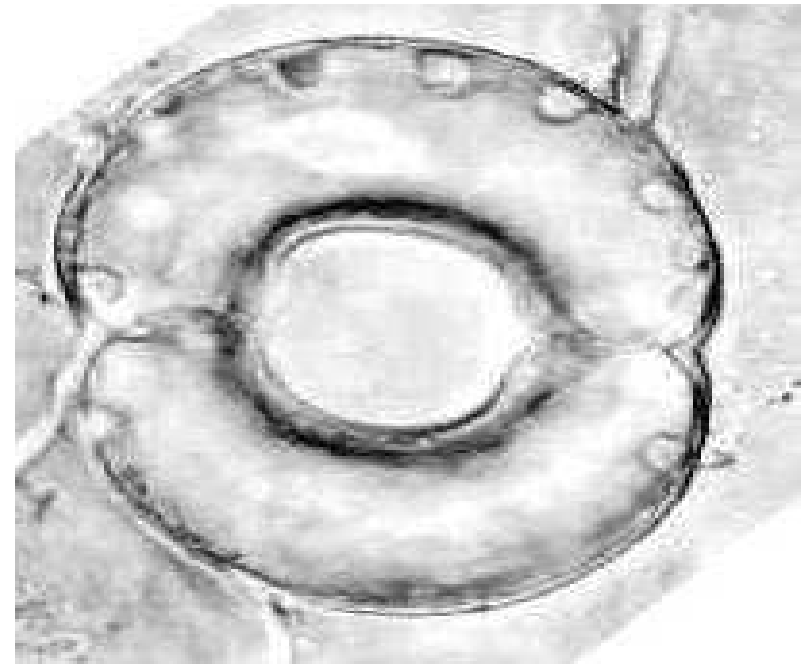
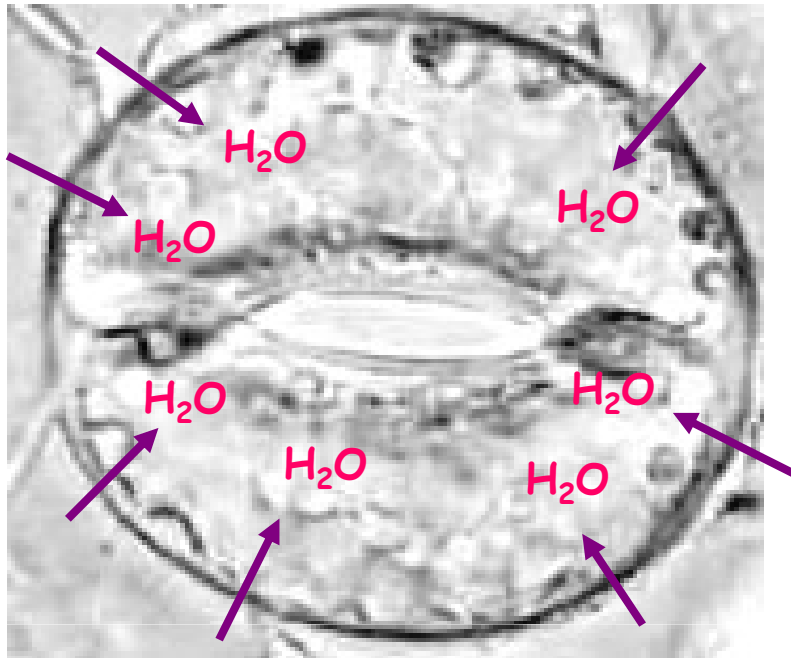
aumento della π



diminuzione di Ψ

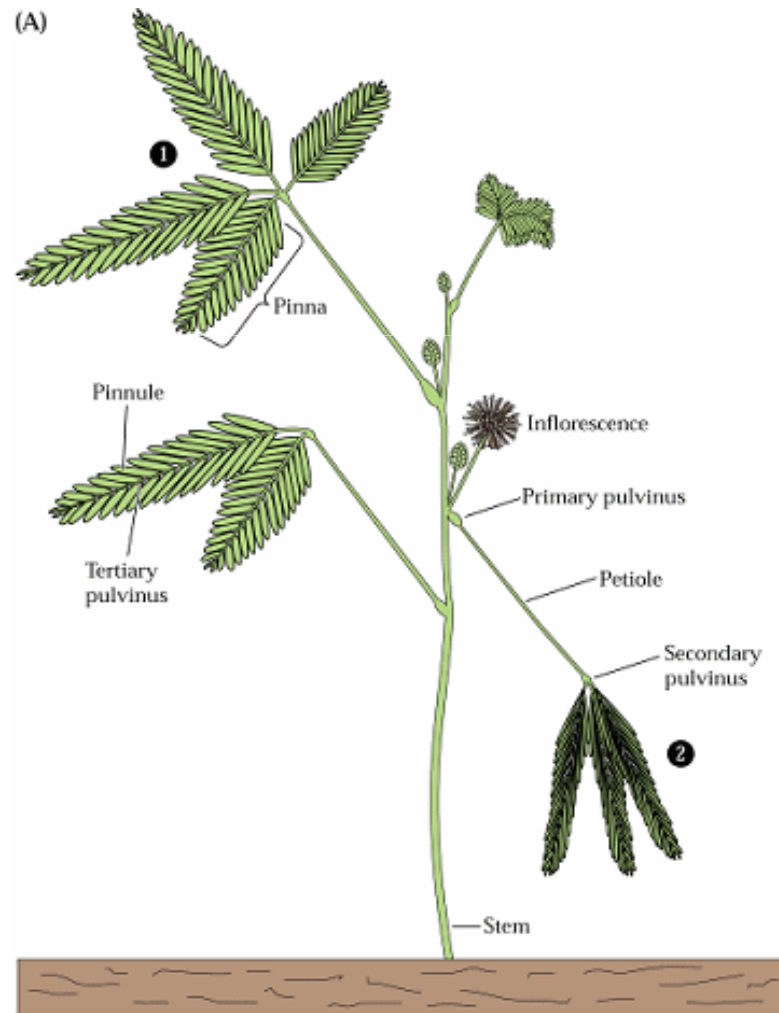
Apertura degli stomi

AUMENTO DELLA
PRESSIONE DI TURGORE



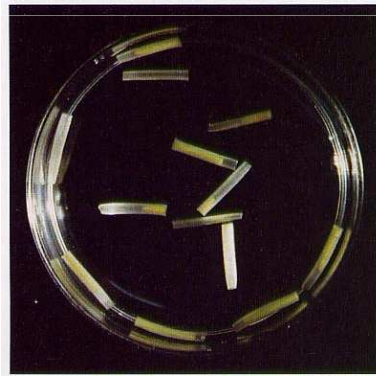
RUOLO FISIOLOGICO DELL' H^+ -ATPasi DI PLASMALEMA

movimenti pulvinici

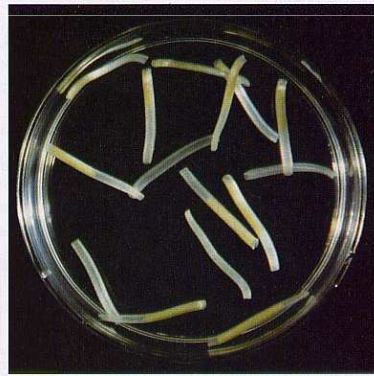


RUOLO FISIOLOGICO DELL' H^+ -ATPasi DI PLASMALEMMMA

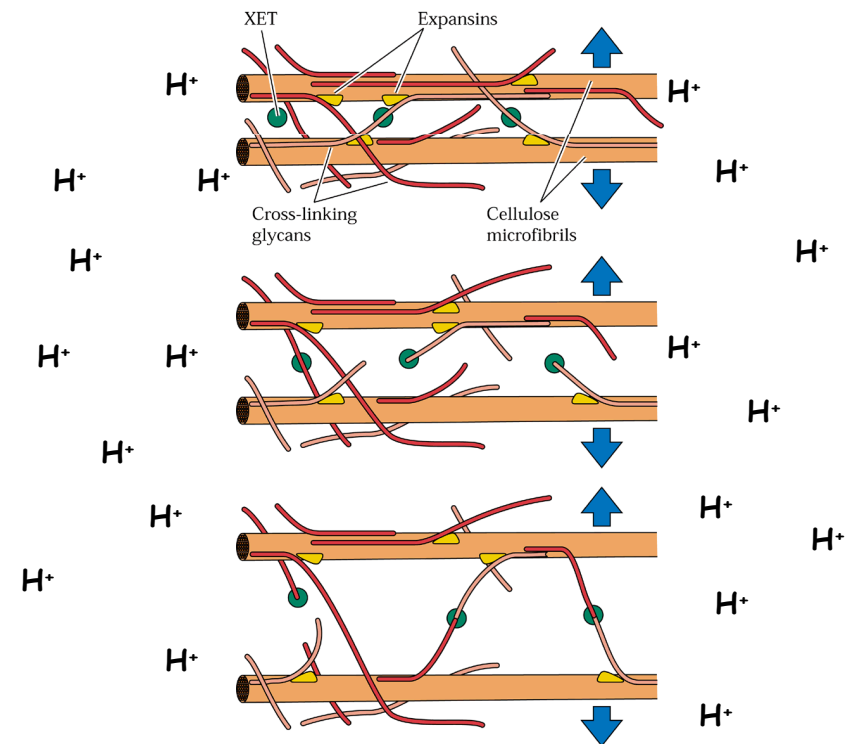
Crescita per distensione



C

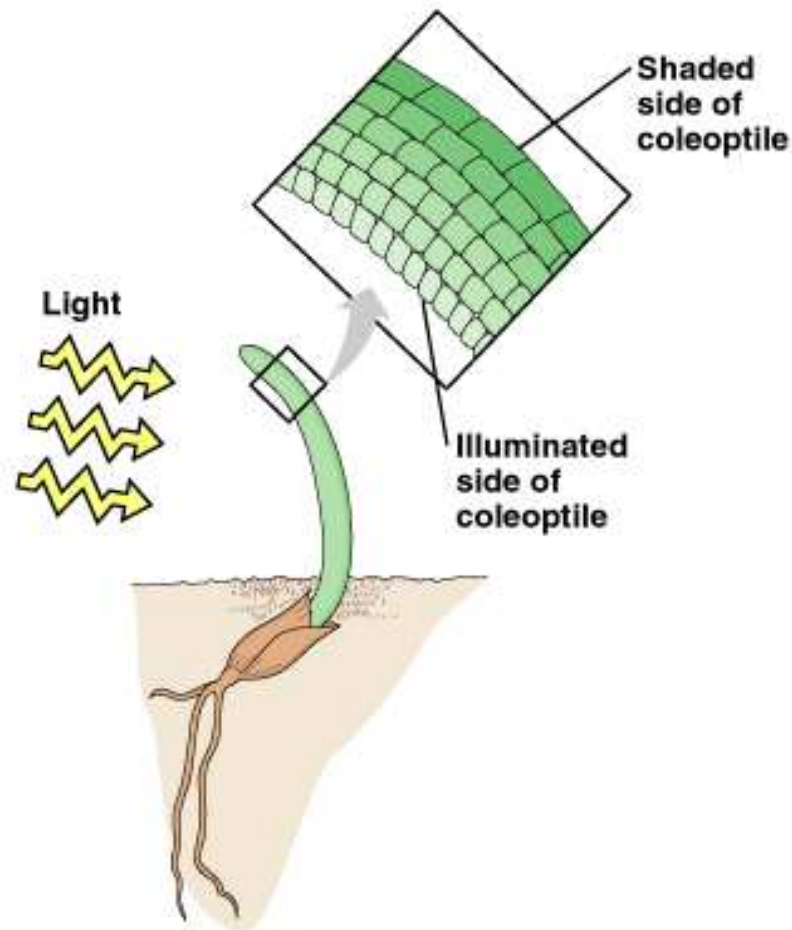


IAA

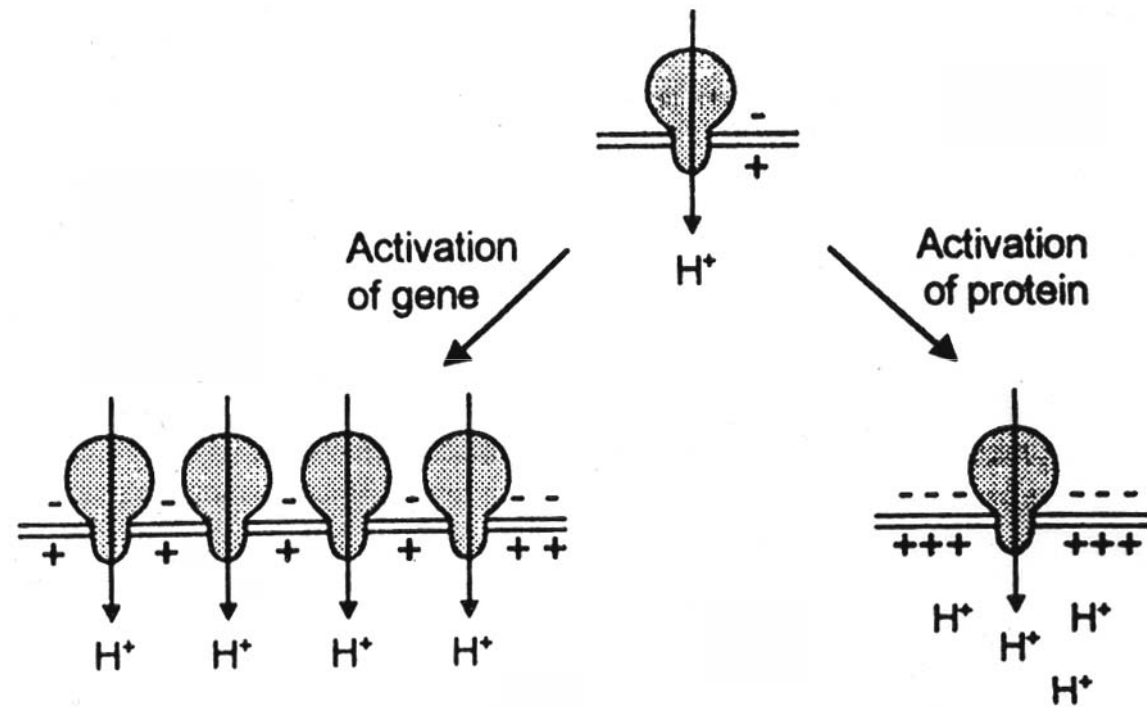


RUOLO FISIOLÓGICO DELL' H^+ -ATPasi DI PLASMALEMA

fototropismo



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

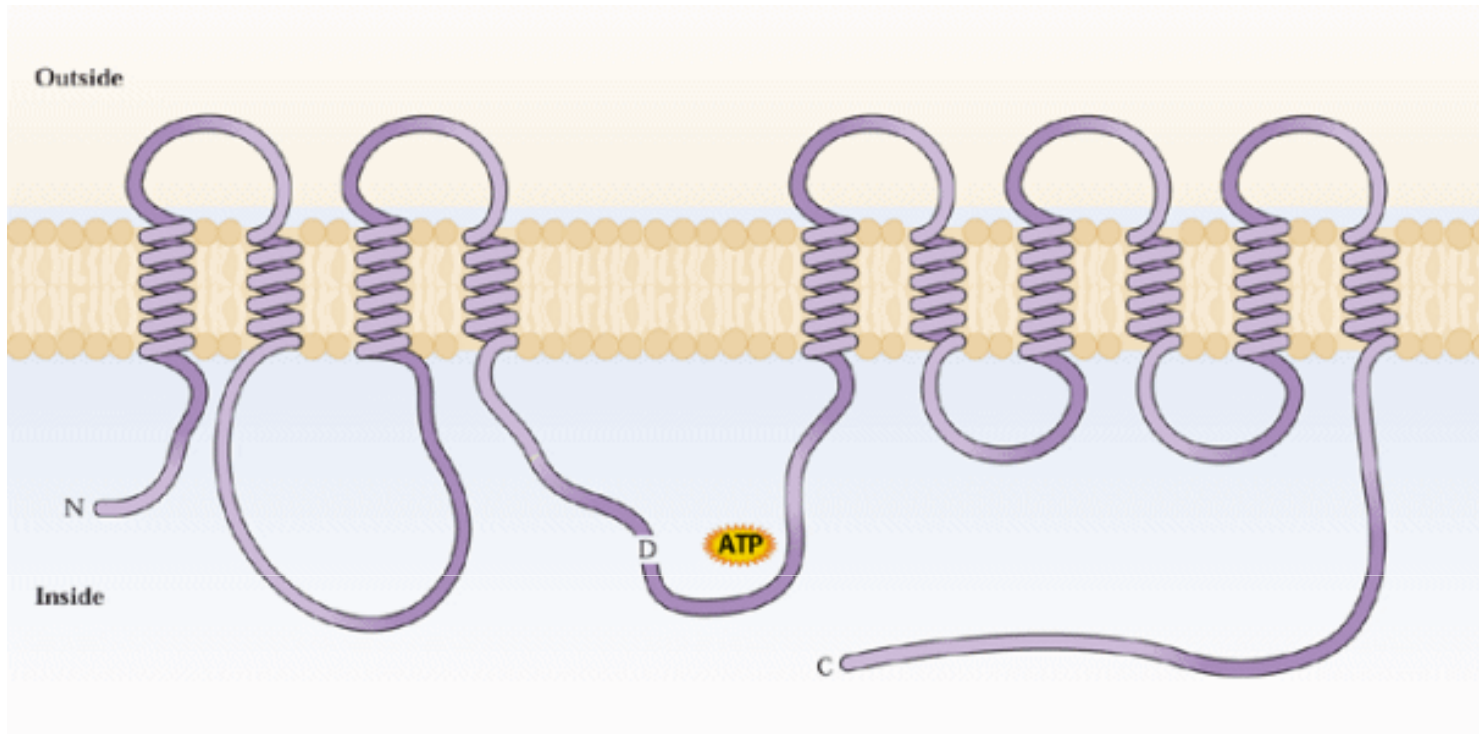


fattori che influenzano l'attività dell' H^+ -ATPasi

stress salino
auxina

luce
patogeni

il dominio C-terminale è autoinibitorio

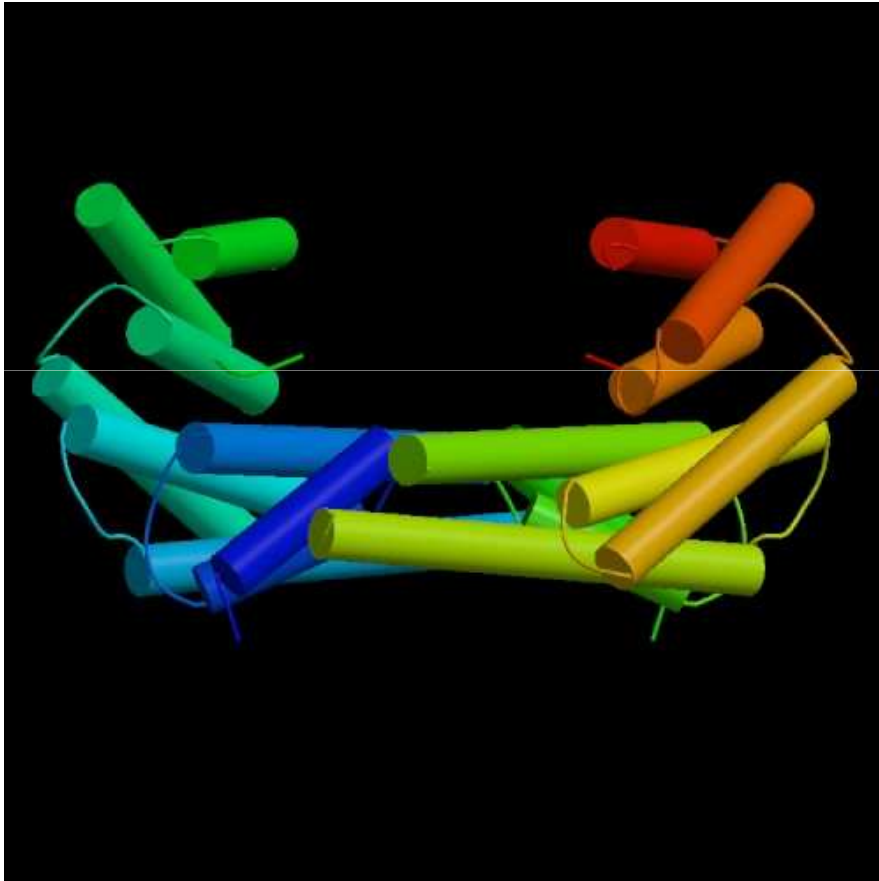


prove sperimentali

- mutanti H⁺-ATPasi senza la regione C-terminale
- proteolisi controllata: rimozione regione C-terminale

ENZIMA COSTITUTIVAMENTE ATTIVO

Le proteine 14-3-3 sono coinvolte nella regolazione dell'attività della H^+ -ATPasi

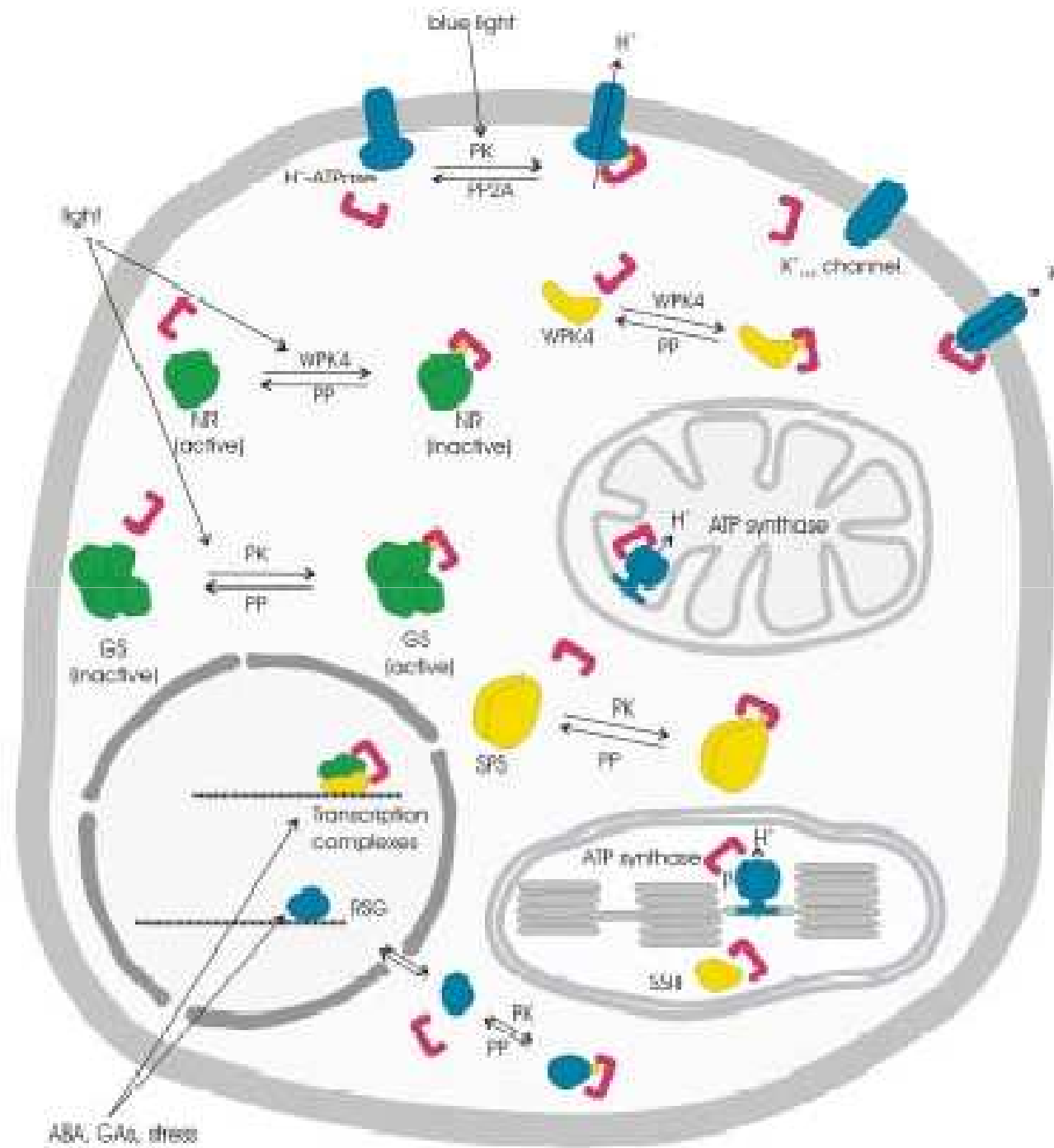


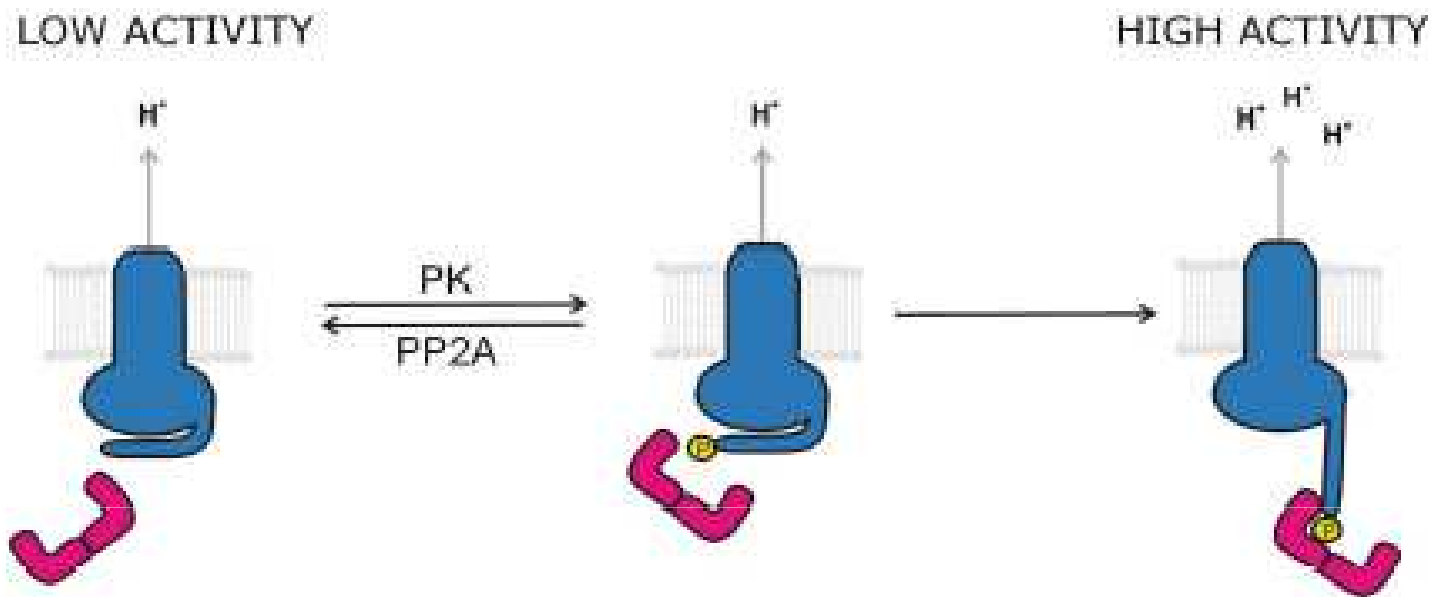
Proteine 14-3-3

Classe di proteine regolatrici diffuse in tutti gli eucarioti

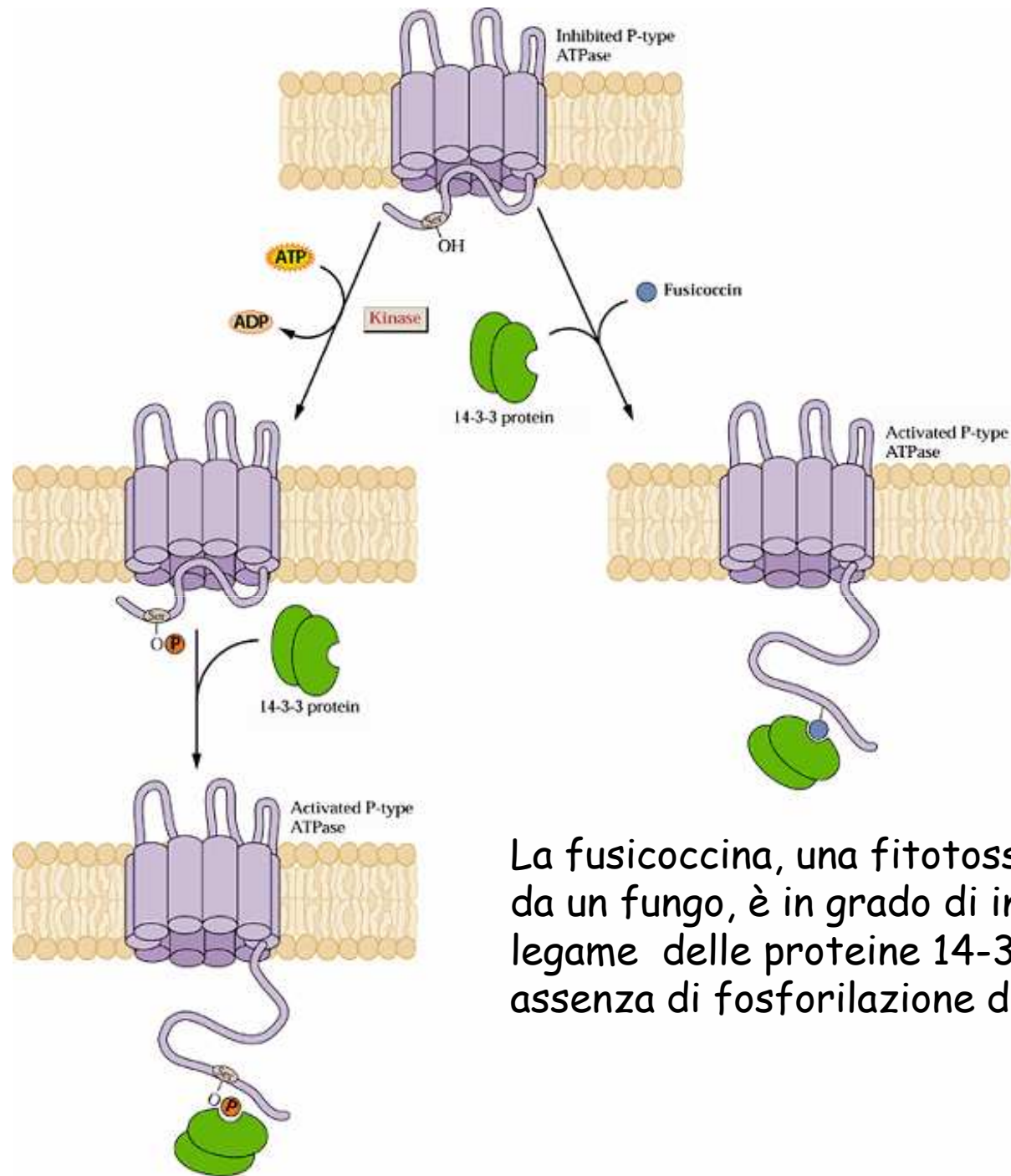
Proteine dimeriche. Ogni monomero ha un PM di circa 30 kDa

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





La H⁺-ATPasi è attivata dal legame delle proteine 14-3-3 in seguito alla fosforilazione di uno specifico residuo di treonina localizzato all'estremità C-terminale dell'enzima



La fusicoccina, una fitotossina prodotta da un fungo, è in grado di indurre il legame delle proteine 14-3-3 anche in assenza di fosforilazione dell'enzima