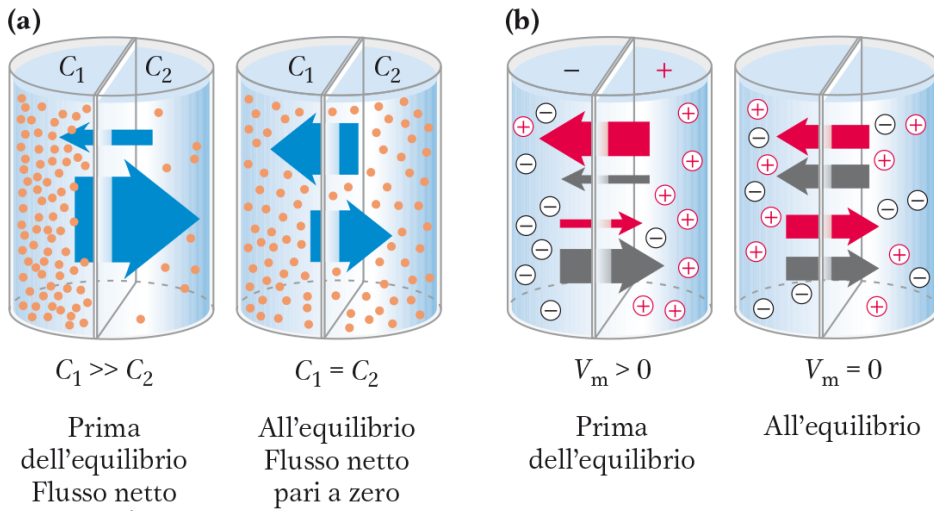


IL TRASPORTO DI MEMBRANA



$$\Delta G_t = RT \ln \frac{C_e}{C_i}$$

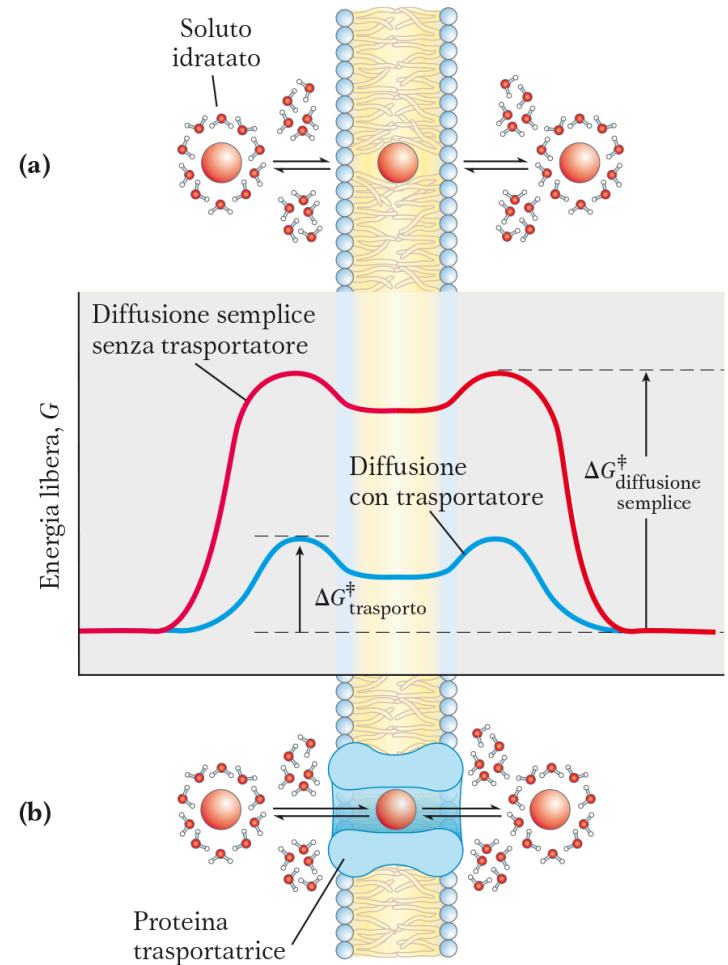
$$\Delta G_t = RT \ln \frac{C_e}{C_i} + ZF\Delta\Psi$$

Per passare attraverso un doppio strato lipidico, un soluto polare deve spogliarsi della sua acqua di idratazione.

Le proteine di membrana «traghettano» i soluti favorendo il loro passaggio attraverso la membrana: abbassano l'energia di attivazione.

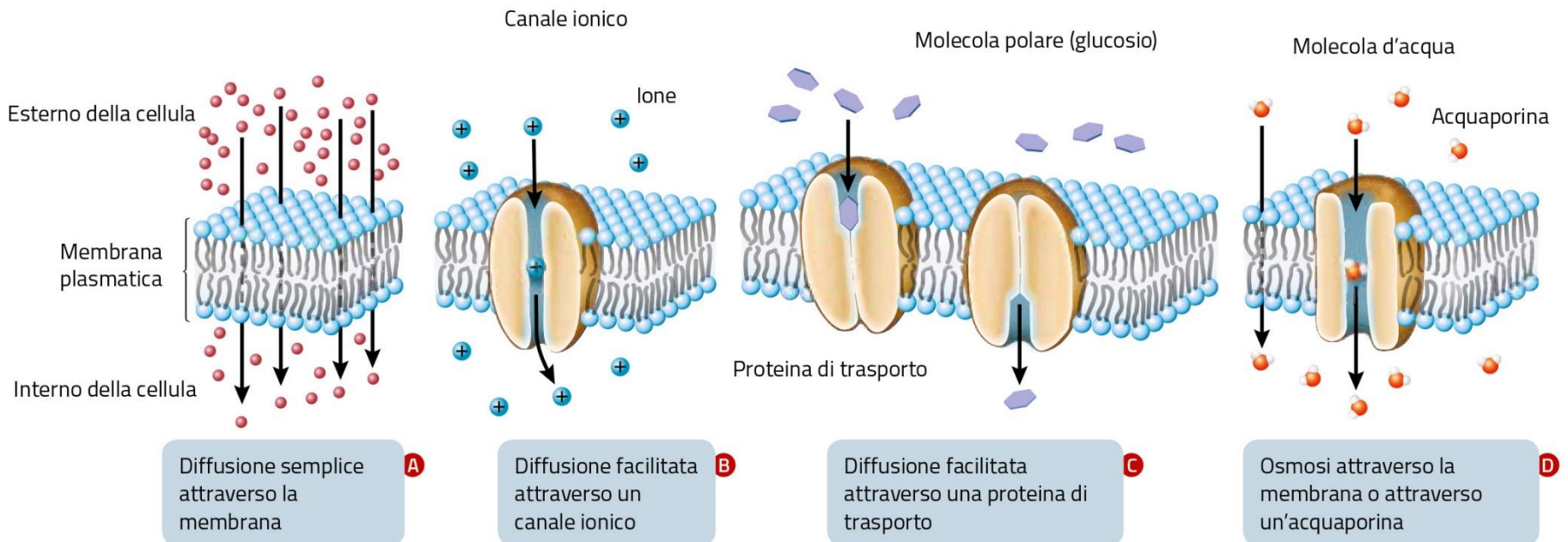
Aumentano la velocità di diffusione di diversi ordini di grandezza.

V_m = potenziale di membrana, determina una forza che si oppone ai movimenti ionici che tendono ad aumentare V_m



Si distinguono 2 tipi di trasporto principali:

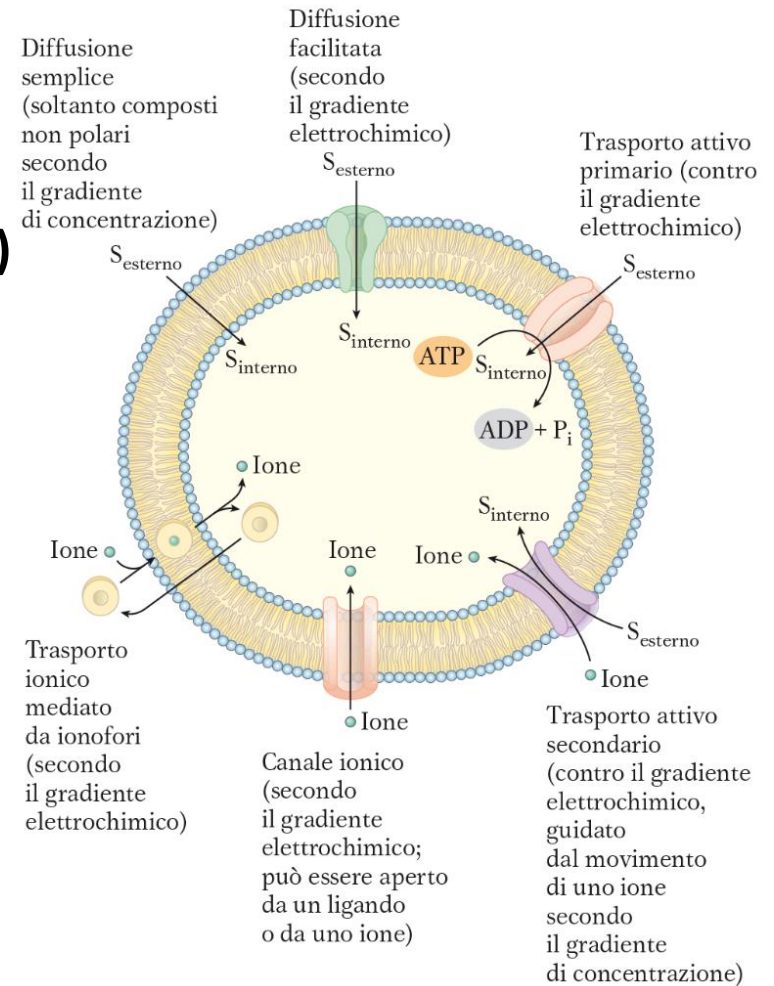
- **Non mediato, o diffusione semplice**
- **Mediato** → per azione di specifiche proteine.



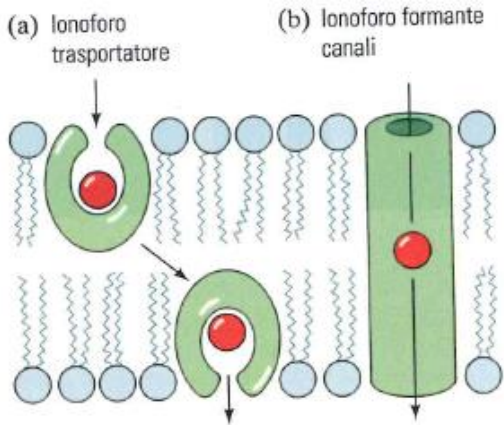
Il trasporto mediato si può suddividere ulteriormente in **trasporto passivo** e **trasporto attivo**.

ESEMPI DI TRASPORTO PASSIVO

- 1) Ionofori (es. valinomicina e gramicidina A)
- 2) Proteine di trasporto (GLUT1)
- 3) Porine (malto porina)
- 4) Acquaporine
- 5) Canali ionici (K^+)

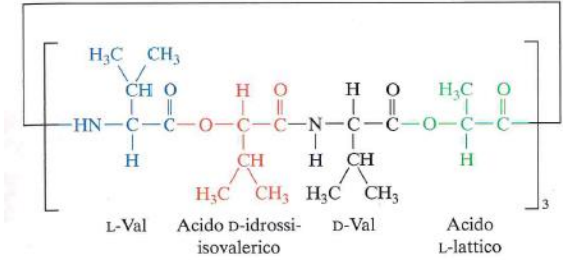


Ionofori: la valinomocina e la gramicidina A



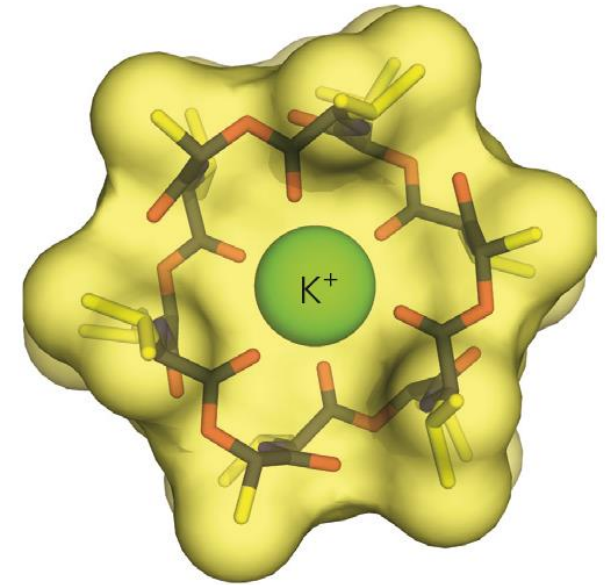
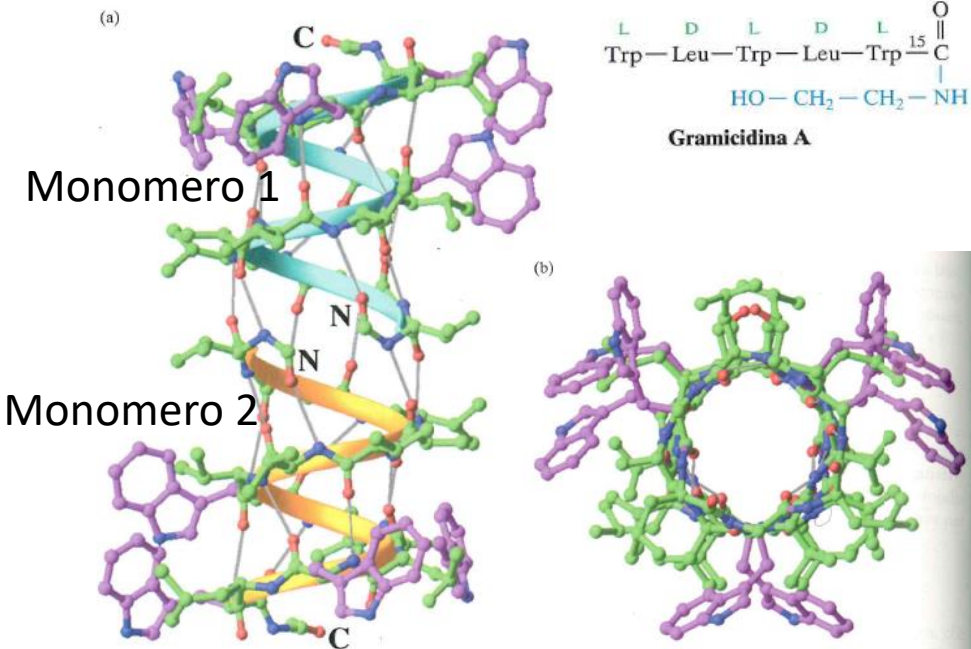
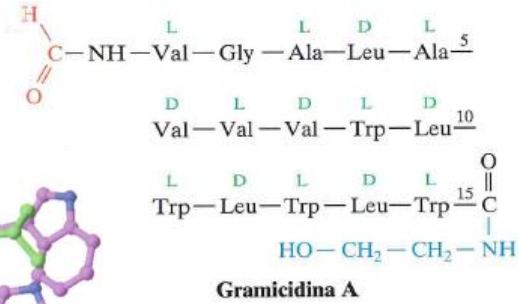
Molecole di origine batterica/fungina, incrementano la permeabilità di membrana «scaricando» i gradienti elettrochimici mantenuti attivamente dalla cellula bersaglio
 → **diffusione passiva**

$10^4 \text{ K}^+/\text{s}$



Valinomocina

$10^7 \text{ K}^+/\text{s}$

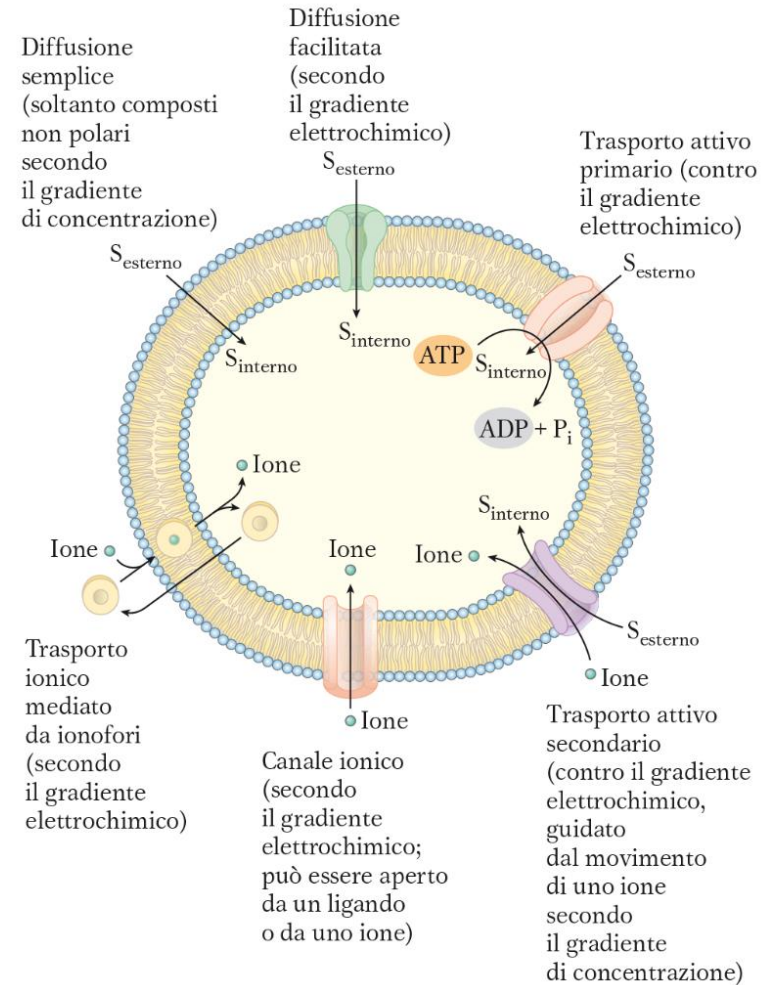


Specificità di ~ 10000 superiore per K^+ rispetto ad Na^+ .

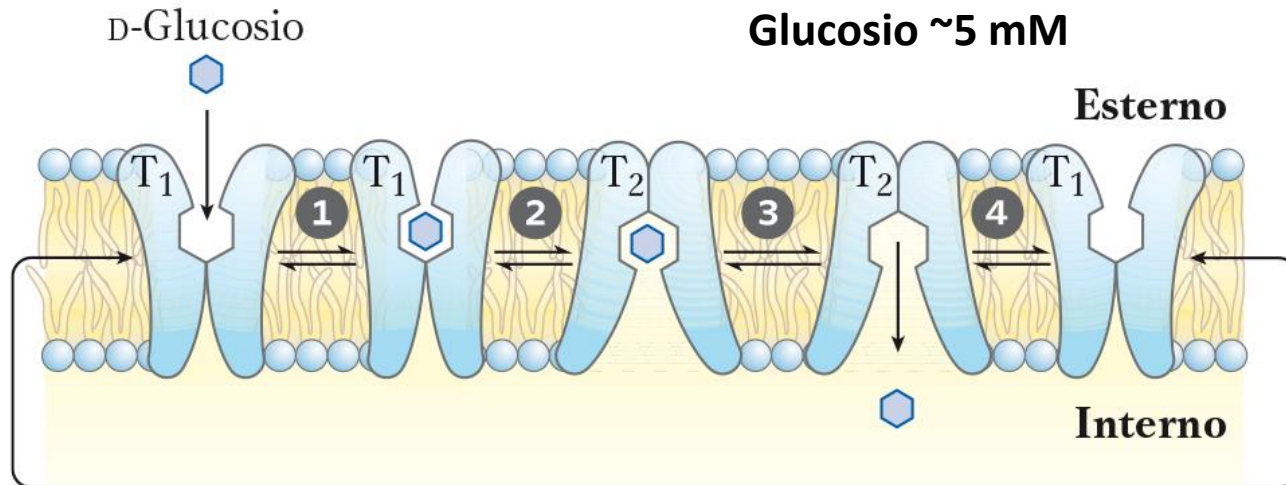
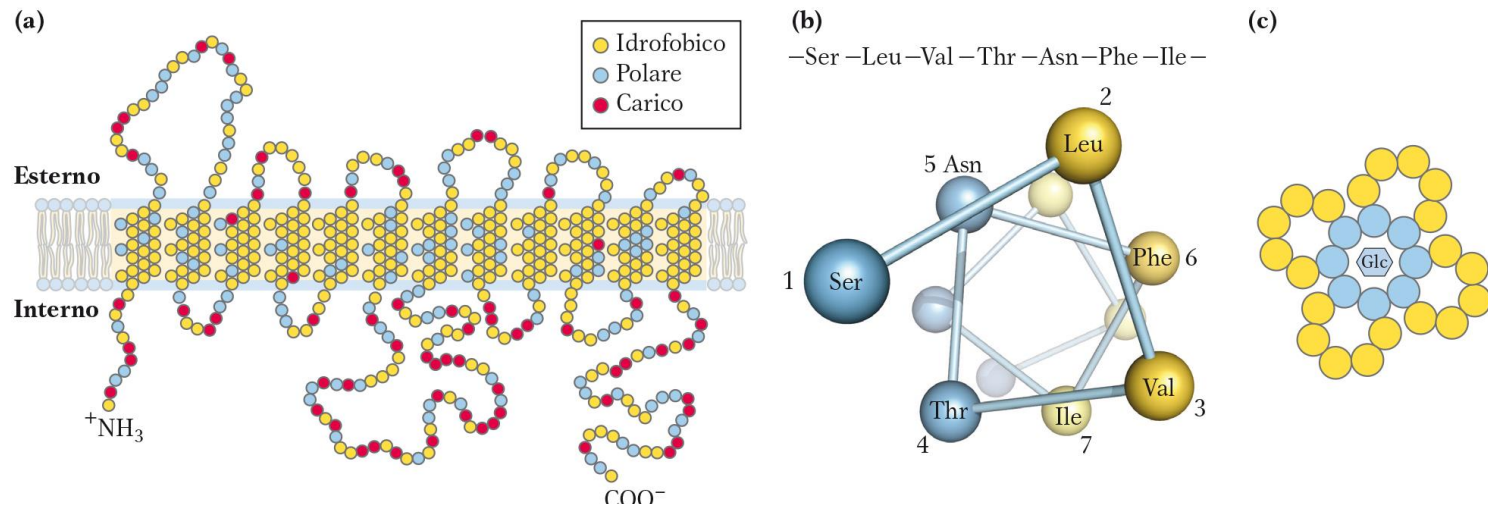
Il trasporto mediato si può suddividere ulteriormente in **trasporto passivo** e **trasporto attivo**.

ESEMPI DI TRASPORTO PASSIVO

- 1) Ionofori (es. valinomicina e gramicidina A)
- 2) **Proteine di trasporto (GLUT1)**
- 3) Porine (malto porina)
- 4) Acquaporine
- 5) Canali ionici (K^+)



Proteine di trasporto: i canali GLUT1 (trasporto passivo)



Il glucosio fluisce sempre verso l'interno della cellula (**secondo gradiente**) perché viene continuamente metabolizzato. Se le concentrazioni sono uguali, il processo si ferma.

SONO SATURABILI

Diversi trasportatori GLUT hanno una localizzazione tissutale differente, con diversa «affinità» per il glucosio

■ **Tabella 11.3** I trasportatori del glucosio negli esseri umani

Trasportatore	Tessuto(i) dove è espresso	K_t (mM) [*]	Ruolo [†]
GLUT1	Ubiquitario	3	Assunzione basale del glucosio
<u>GLUT2</u>	Fegato, isole del pancreas, intestino	<u>17</u>	Nel fegato e nei reni, rimozione dell'eccesso di glucosio dal sangue; nel pancreas, regolazione del rilascio di insulina
GLUT3	Cervello (neuronal), testicoli (liquido seminale)	1,4	Assunzione basale del glucosio
<u>GLUT4</u>	Muscolo, tessuto adiposo, cuore	5	<u>Attività incrementata dall'azione dell'insulina</u>
GLUT5	Intestino (principalmente), testicoli, rene	6 [†]	Trasporto primario del fruttosio
GLUT6	Milza, globuli bianchi (leucociti), cervello	>5	Probabilmente nessuna funzione di trasporto
GLUT7	Intestino tenue, colon	0,3	—
GLUT8	Testicoli	~2	—
GLUT9	Fegato, rene	0,6	—
GLUT10	Cuore, polmone, cervello, fegato, muscolo, pancreas, rene	0,3 [§]	—
GLUT11	Cuore, muscolo scheletrico, rene	0,16	—
GLUT12	Muscolo scheletrico, cuore, prostata, intestino tenue	—	—

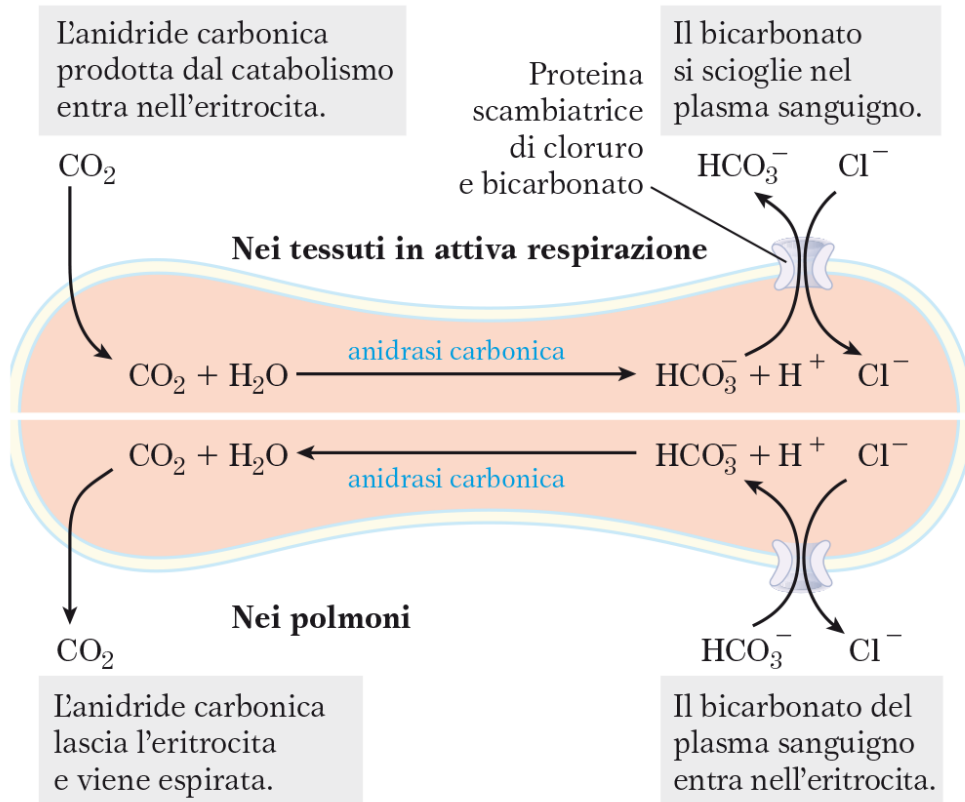
^{*} K_t del glucosio, eccetto dove indicato, tratta da Augustin, R. (2010) The protein family of glucose transport facilitators: it's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62, pp. 315-333.

[†]I trattini indicano ruoli incerti.

^{*} K_m del fruttosio.

[§] K_m del 2-deossiglucosio.

Lo scambiatore cloruro-bicarbonato (banda III) dell'eritrocita è elettroneutrale

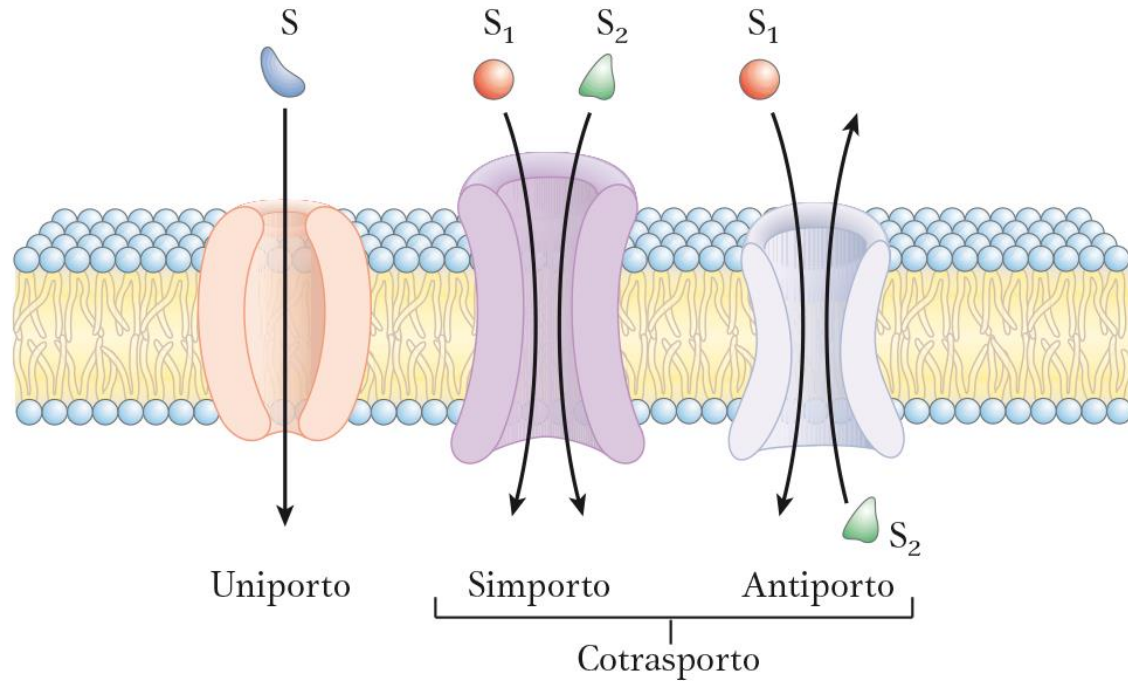


Perché il processo sia efficiente, il bicarbonato deve spostarsi velocemente dentro/fuori l'eritrocita.

E' un sistema di co-trasporto: per ogni HCO_3^- che si muove in una direzione, Cl^- si sposta nell'altra direzione → **antiporto**.

Alcune proteine di trasporto sono in grado di trasferire più di un composto contemporaneamente:

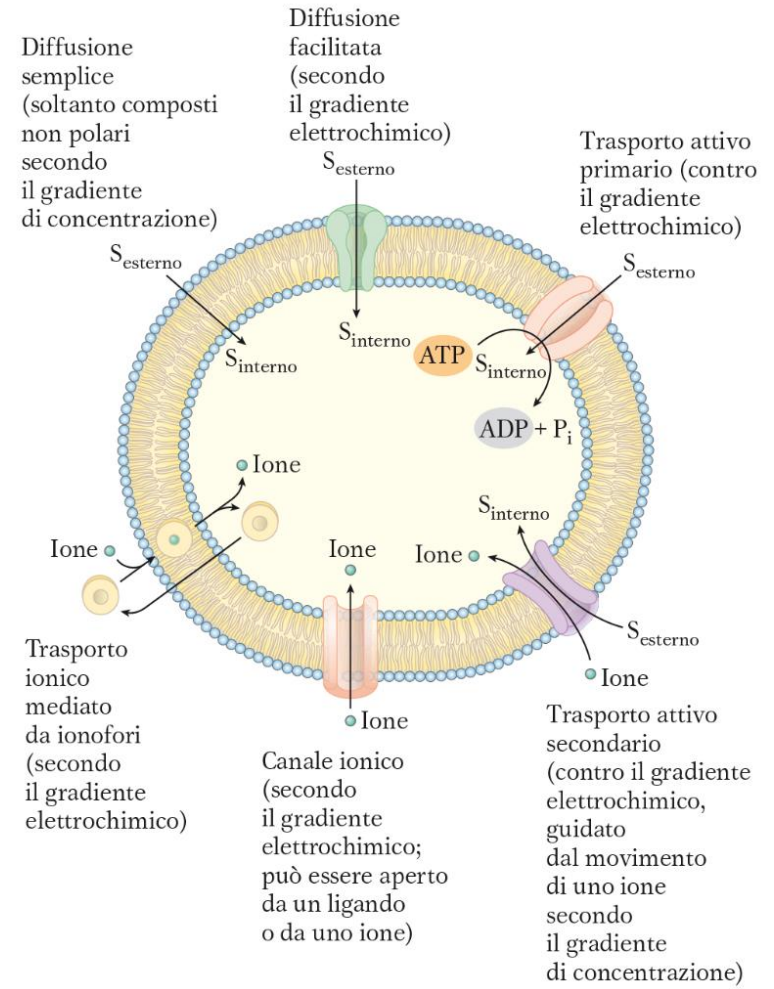
- 1) Uniporto
- 2) Simporto
- 3) Antiporto



Il trasporto mediato si può suddividere ulteriormente in **trasporto passivo** e **trasporto attivo**.

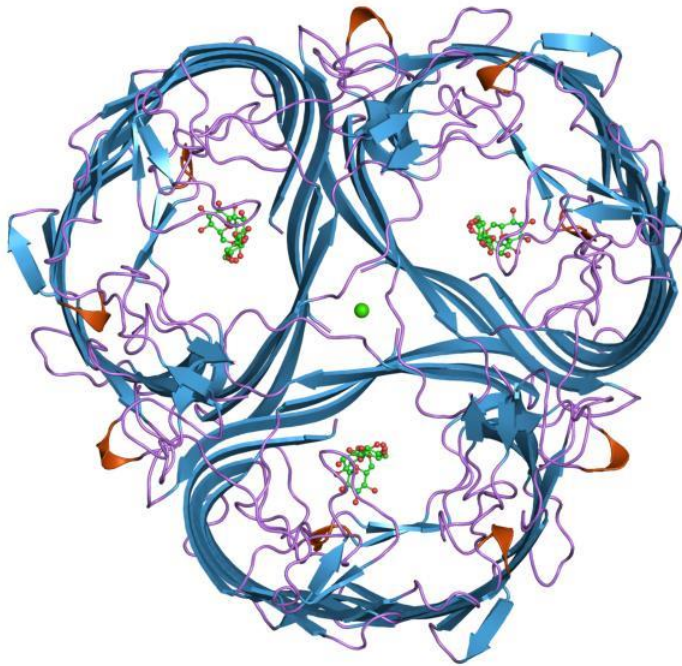
ESEMPI DI TRASPORTO PASSIVO

- 1) Ionofori (es. valinomicina e gramicidina A)
- 2) Proteine di trasporto (GLUT1)
- 3) **Porine (maltoporina)**
- 4) Acquaporine
- 5) Canali ionici (K^+)

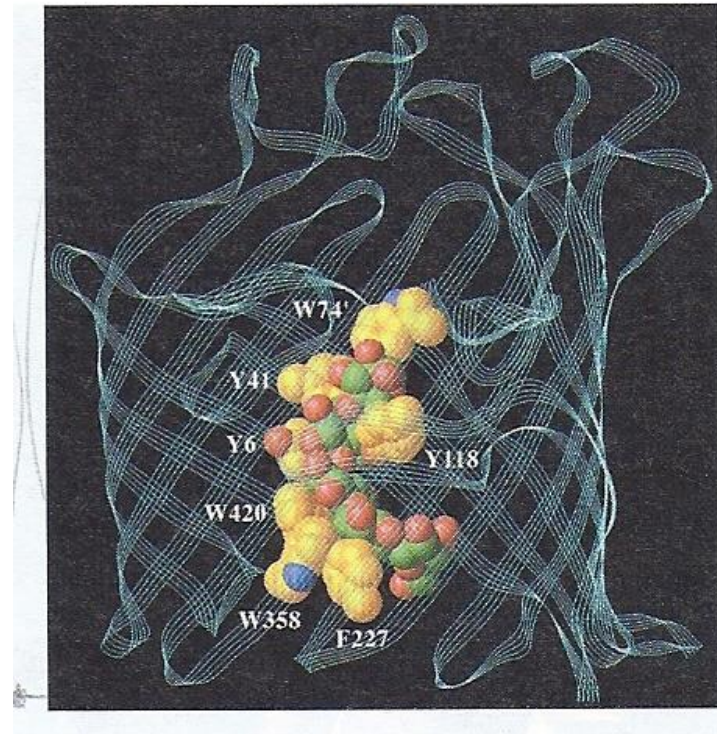


Porine (malto porina)

Struttura a barile β con un canale acquoso centrale. Un esempio di selettività dei canali è dato dalla malto porina dei batteri, che agevola la diffusione delle **maltodestrine**.



Struttura organizzata ad omotrimerico. Tre anse di ogni monomero entra nella parte interna conferendo al canale una struttura a clessidra (diametro $\sim 5 \text{ \AA}$).

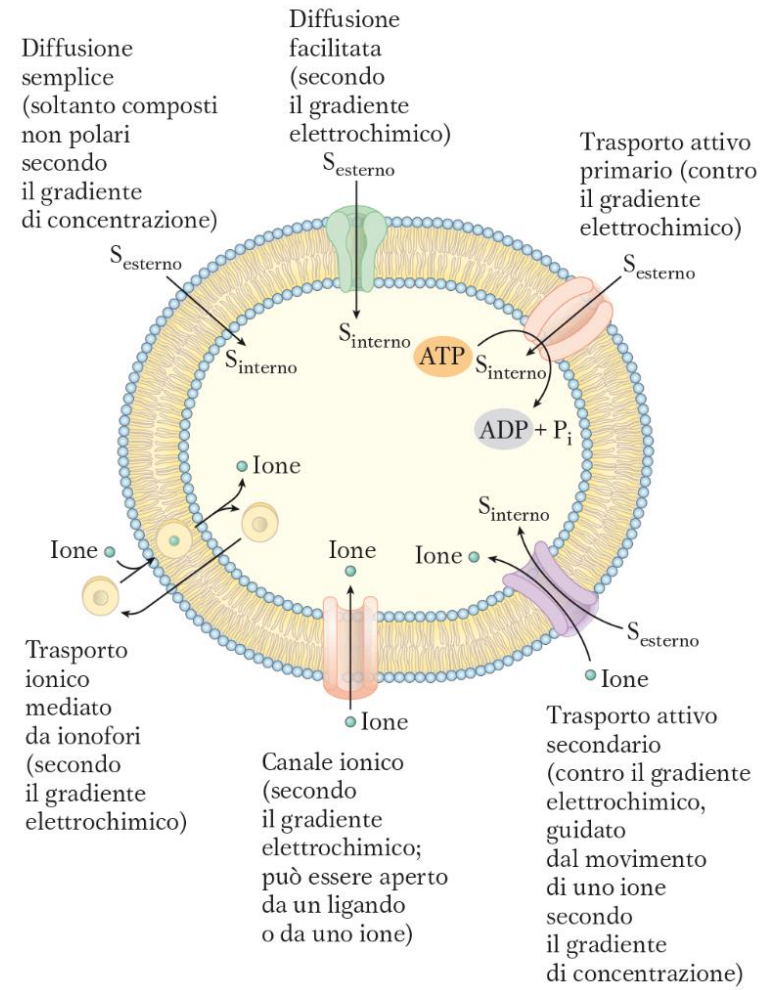


Il monomero possiede una serie di aminoacidi idrofobici (Tyr, Trp, Phe) disposti ad elica sinistrorsa come l'amido: «**piano scivoloso**».

Il trasporto mediato si può suddividere ulteriormente in **trasporto passivo** e **trasporto attivo**.

ESEMPI DI TRASPORTO PASSIVO

- 1) Ionofori (es. valinomicina e gramicidina A)
- 2) Proteine di trasporto (GLUT1)
- 3) Porine (malto porina)
- 4) **Acquaporine**
- 5) Canali ionici (K^+)



Acquaporine (AQP)

Proteine transmembrana che permettono il passaggio dell'acqua attraverso le membrane plasmatiche. Finora si conoscono 11 AQP nei mammiferi.

■ **Tabella 11.5** Caratteristiche di permeabilità e localizzazione prevalente delle acquaporine di mammifero conosciute

Acquaporina	Permeante (permeabilità)	Distribuzione tissutale	Distribuzione subcellulare*
AQP0	Acqua (bassa)	Cristallino	Membrana plasmatica
AQP1	Acqua (elevata)	Eritrociti, reni, polmoni, endotelio vascolare, cervello, occhio	Membrana plasmatica
AQP2	Acqua (elevata)	Reni, vasi deferenti	Membrana plasmatica apicale, vescicole intracellulari
AQP3	Acqua (elevata), glicerolo (elevata), urea (moderata)	Reni, pelle, polmoni, occhio, colon	Membrana plasmatica basolaterale
AQP4	Acqua (elevata)	Cervello, muscolo, reni, polmone, stomaco, intestino tenue	Membrana plasmatica basolaterale
AQP5	Acqua (elevata)	Ghiandole salivari, ghiandole lacrimali, ghiandole sudoripare, polmone, cornea	Membrana plasmatica apicale
AQP6	Acqua (bassa), anioni ($\text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$)	Reni	Vescicole intracellulari
AQP7	Acqua (elevata), glicerolo (elevata), urea (elevata)	Tessuto adiposo, reni, testicoli	Membrana plasmatica
AQP8 [†]	Acqua (elevata)	Testicoli, reni, fegato, pancreas, intestino tenue, colon	Membrana plasmatica, vescicole intracellulari
AQP9	Acqua (bassa), glicerolo (elevata), urea (elevata), arsenito	Fegato, leucociti, cervello, testicoli	Membrana plasmatica
AQP10	Acqua (bassa), glicerolo (elevata), urea (elevata)	Intestino tenue	Vescicole intracellulari

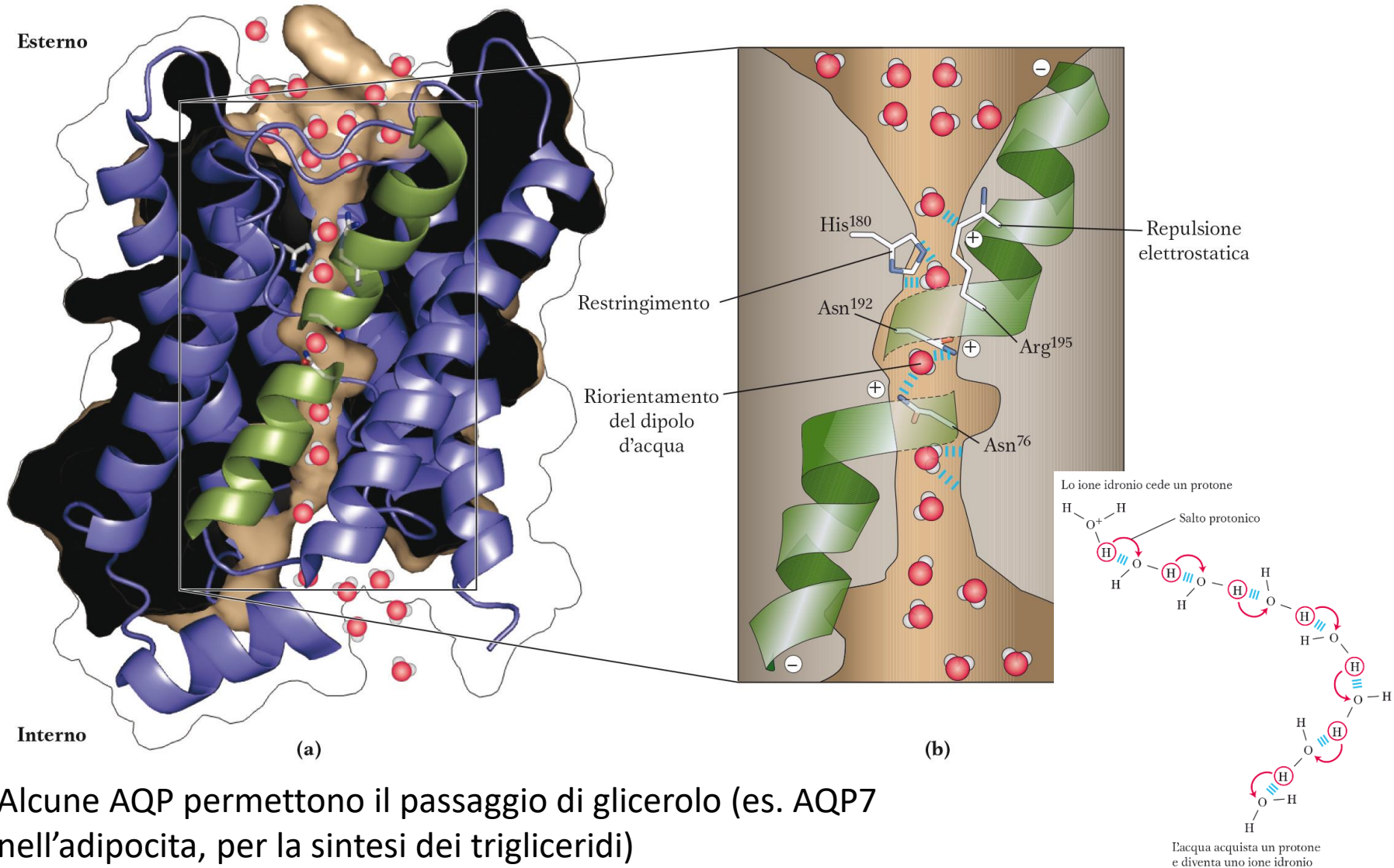
Fonte: dati tratti da King, L.S., Kozono, D., e Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 688.

*Le acquaporine presenti soprattutto nelle membrane apicali o basolaterali sono specificamente indicate come localizzate in uno di questi due tipi di membrana; quelle presenti in ambedue i tipi di membrane sono indicate come proteine della membrana plasmatica.

[†] L'AQP8 potrebbe anche essere permeabile all'urea.

L'acqua attraversa il canale AQP sempre secondo gradiente osmotico!!!

Velocità di trasporto attraverso AQP1: $10^9/s$ → suggerisce che le molecole di acqua attraversano il canale in fila in un flusso continuo. **NON PERMETTONO IL PASSAGGIO DELLO IONE IDRONIO (H_3O^+)**

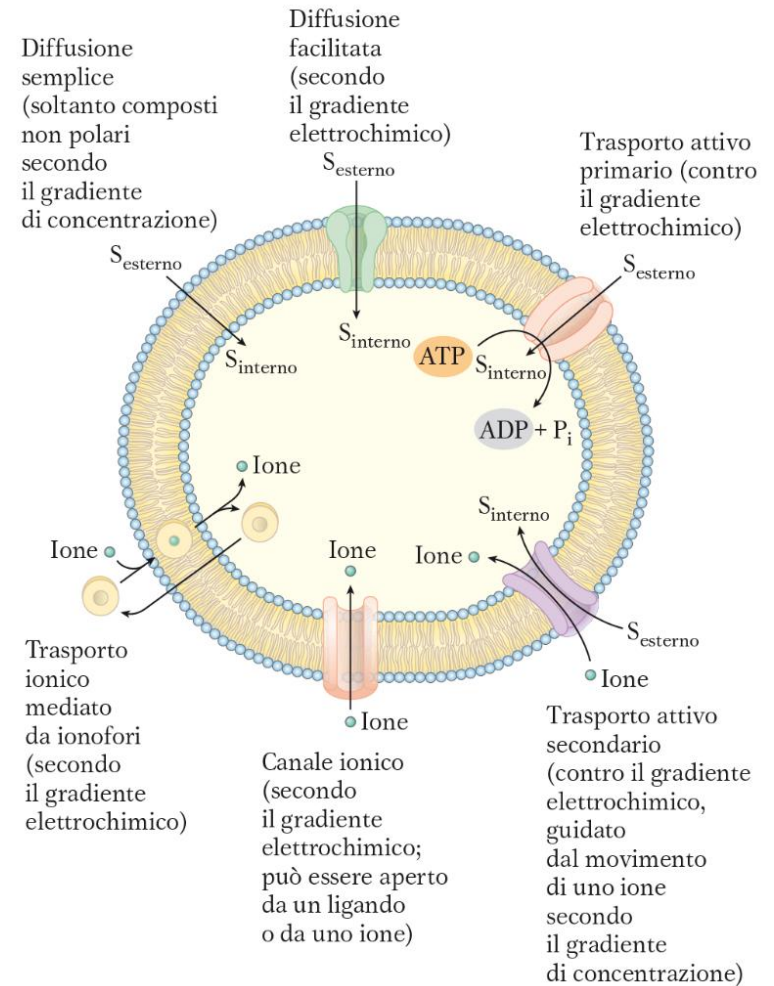


Alcune AQP permettono il passaggio di glicerolo (es. AQP7 nell'adipocita, per la sintesi dei trigliceridi)

Il trasporto mediato si può suddividere ulteriormente in **trasporto passivo** e **trasporto attivo**.

ESEMPI DI TRASPORTO PASSIVO

- 1) Ionofori (es. valinomicina e gramicidina A)
- 2) Proteine di trasporto (GLUT1)
- 3) Porine (malto porina)
- 4) Acquaporine
- 5) **Canali ionici (K^+)**



I canali ionici selettivi

Permette il passaggio di ioni selettivo attraverso la membrana; regolano la concentrazione degli ioni ed il potenziale di membrana.

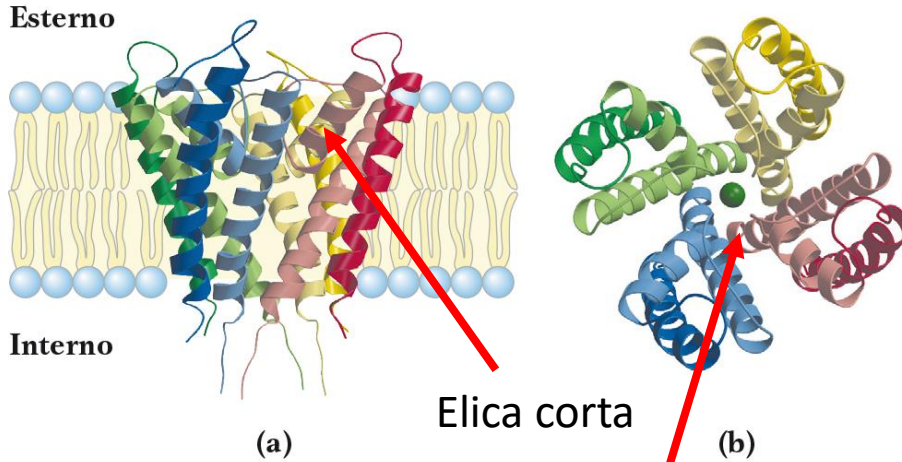
Si distinguono dai trasportatori per 3 motivi:

- 1) **Velocità del flusso elevato**, da 10^7 a 10^8 ioni al secondo, vicino alla diffusione non limitata (i trasportatori hanno numeri di turnover bassi).
- 2) **Non sono saturabili.**
- 3) **Sono controllati**, cioè aperti o chiusi in risposta a segnali cellulari.

Es. canali ionici controllati da ligandi, questi causano l'apertura del canale.

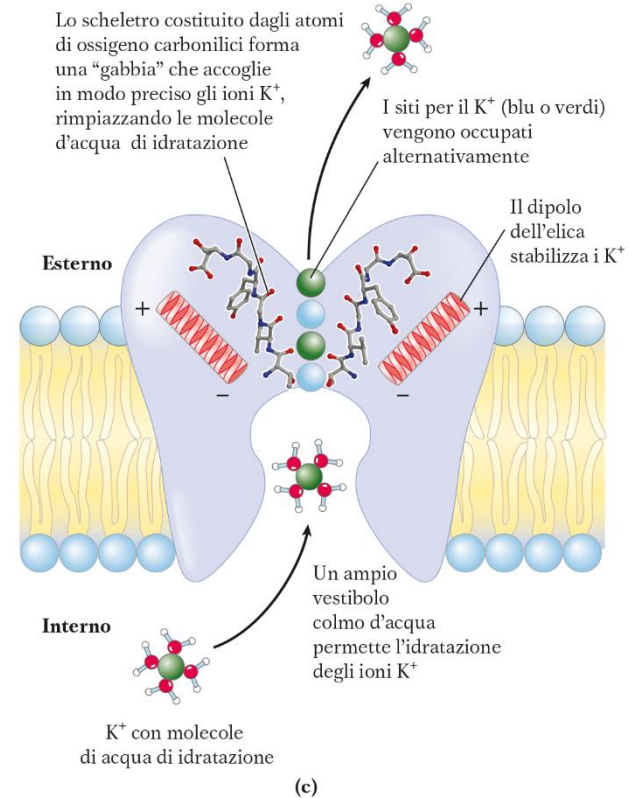
- a) Canale ionico del K^+
- b) Canale ionico del K^+ voltaggio dipendente

Canale ionico del K⁺

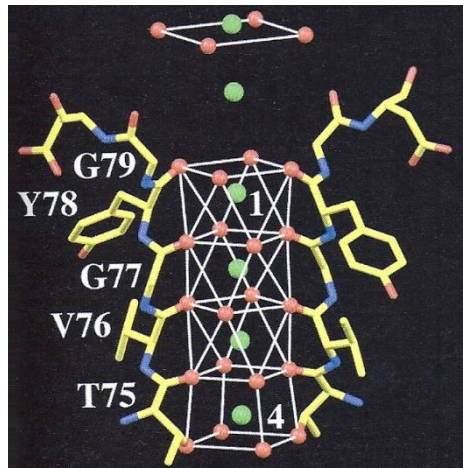


Il centro del canale è del diametro giusto per il K⁺ (1,33 Å).

Omotetramero con un canale a forma di cono, con la base posta nella parte esterna.



Filtro di selettività



La selettività dei canali dipende sia dalla dimensione del poro che dalla disposizione degli ossigeni che sostituiscono l'acqua di idratazione.

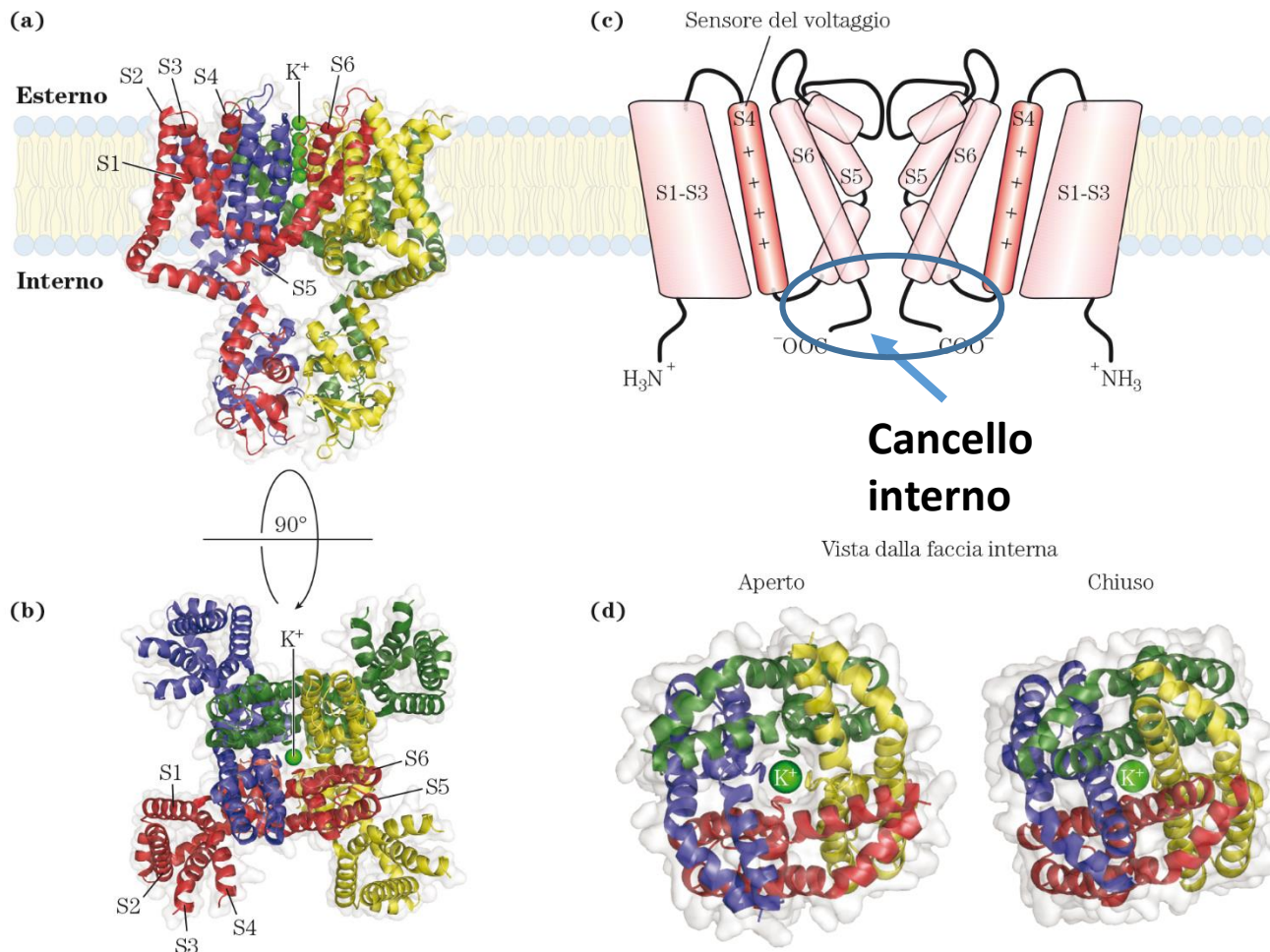
I canali ionici sono commutabili: la loro funzione non dipende solo dalla specificità e velocità di trasporto, ma anche dalla possibilità di essere aperti o chiusi «a comando» → fenomeno di **gating**.

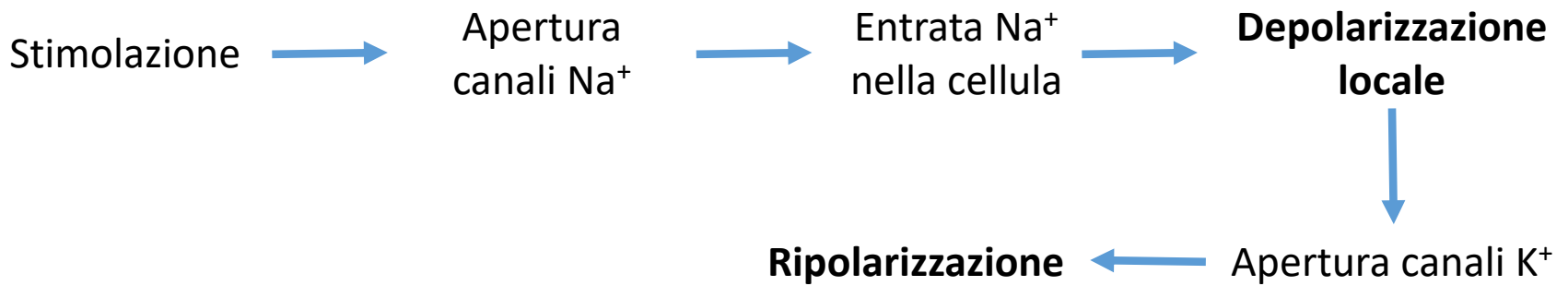
Diverso in base a vari stimoli:

- 1) Canali meccano-sensibili
- 2) Canali controllati dal ligando
- 3) Canali controllati dal segnale
- 4) **Canali controllati dal voltaggio**

Canale ionico del K⁺ voltaggio dipendente

La struttura è comparabile con gli altri canali del potassio; possiedono una elica TM (S4) che si sposta aprendo/chiedendo il canale in funzione del potenziale di membrana. Due cancelli: cancello interno e filtro di selettività.





Prima che la distribuzione degli ioni raggiunga l'equilibrio, i canali si chiudono. Perché?

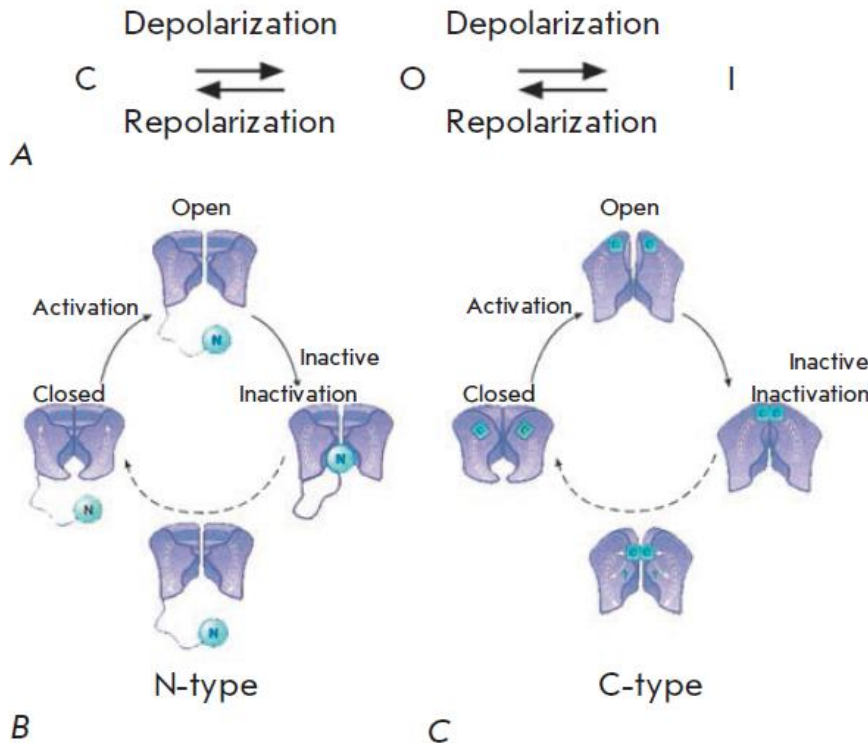
Il canale esiste in 3 stati:
Chiuso (C), Aperto (O), Inattivo (I).

Lo stato Inattivo è quello che impedisce il passaggio di ioni quando la membrana è depolarizzata a lungo.

I canali di tipo N (fast) hanno un peptide di inattivazione ripiegato a palla.

Nei canali di tipo C (slow) il filtro di selettività agisce da secondo cancello e chiude il canale.

I canali tornano allo stato chiuso quando la membrana si ripolarizza



Trasporto Attivo

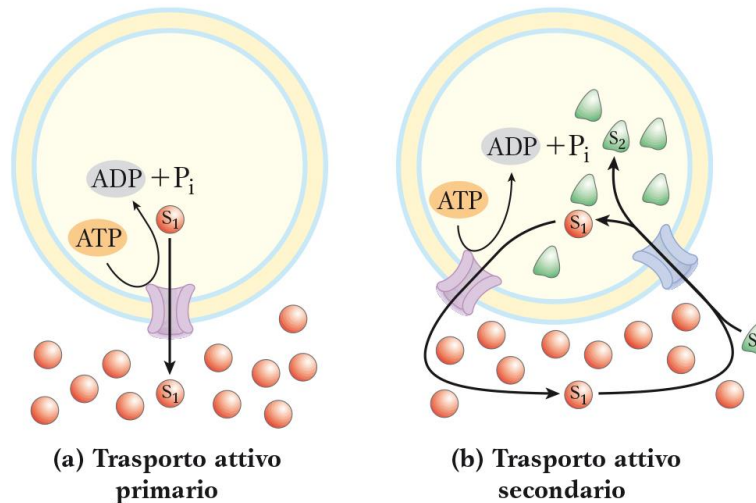
Nel trasporto passivo i soluti si muovono secondo gradiente elettrochimico fino al punto di equilibrio.

Il trasporto attivo accumula il soluto su un lato della membrana **oltre il punto di equilibrio**.

E' sfavorito termodinamicamente (endoergonico): funziona solo in presenza di energia (ATP) o movimento di una specie chimica secondo gradiente elettrochimico.

Due tipi:

- 1) **Trasporto attivo primario** → usa ATP
- 2) **Trasporto attivo secondario** → accoppiato ad un trasporto secondo gradiente



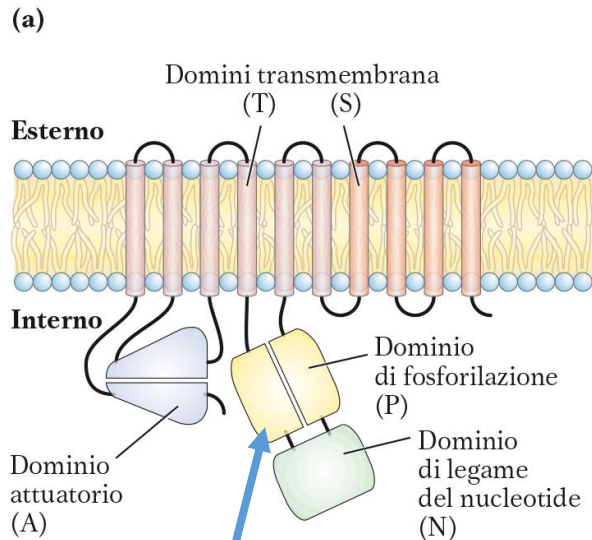
ATPasi: trasportatori/pompe che trasportano ioni contro gradiente elettrochimico usando l'energia di idrolisi dell'ATP.

Diversi tipi:

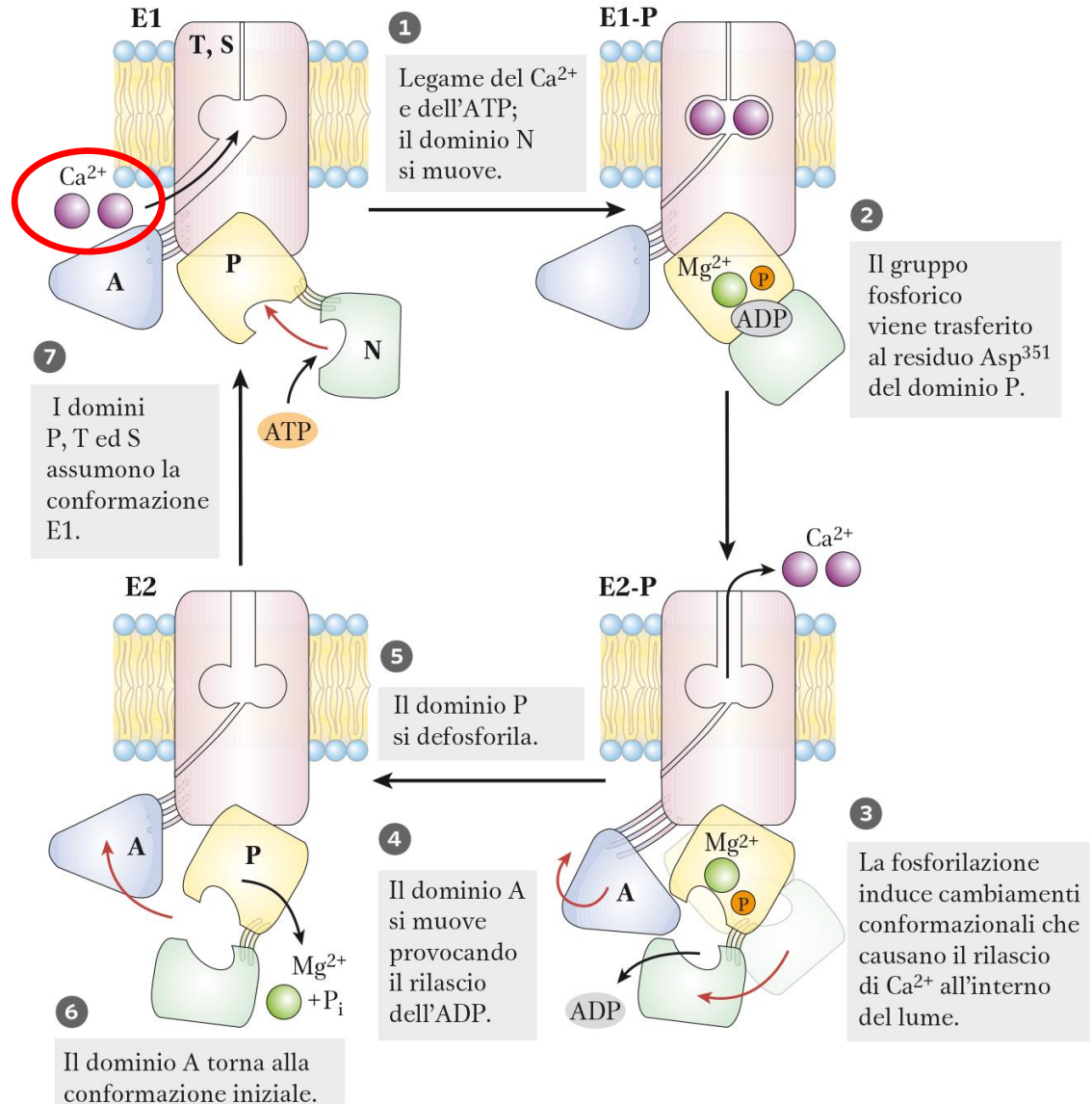
- 1) ATPasi P (pompe Ca^{2+} , Na^+/K^+ ATPasi)
- 2) ATPasi V (pompe protoniche)
- 3) ATPasi F (pompe protoniche per accoppiamento energetico)

ATPasi di tipo P: La Ca^{2+} ATPasi

Famiglia di trasportatori di cationi che vengono reversibilmente fosforilati.

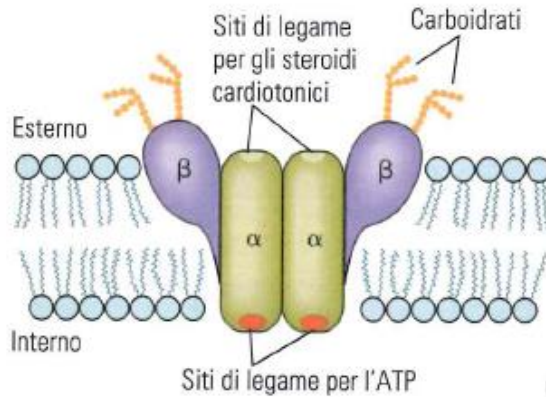


Contiene un **residuo di Asp** altamente conservato che viene fosforilato.

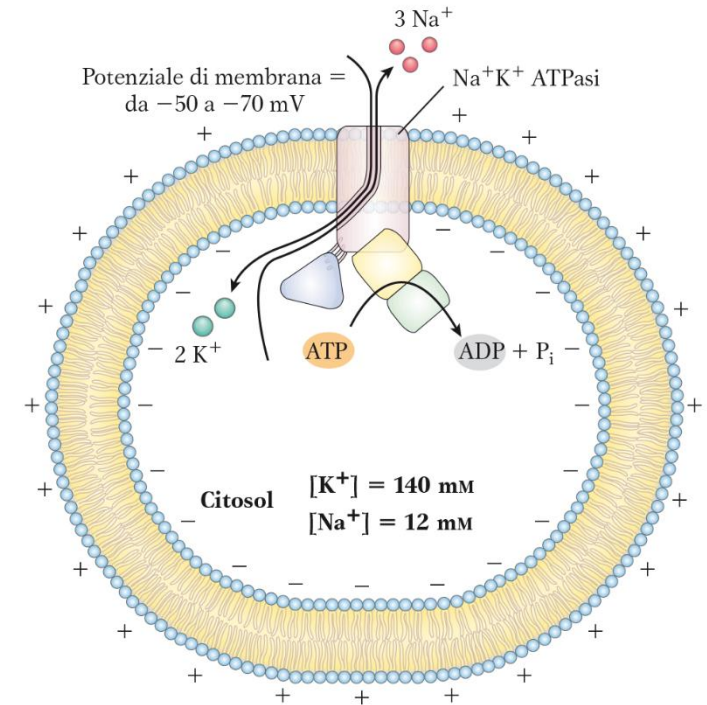


La Na⁺/K⁺ ATPasi

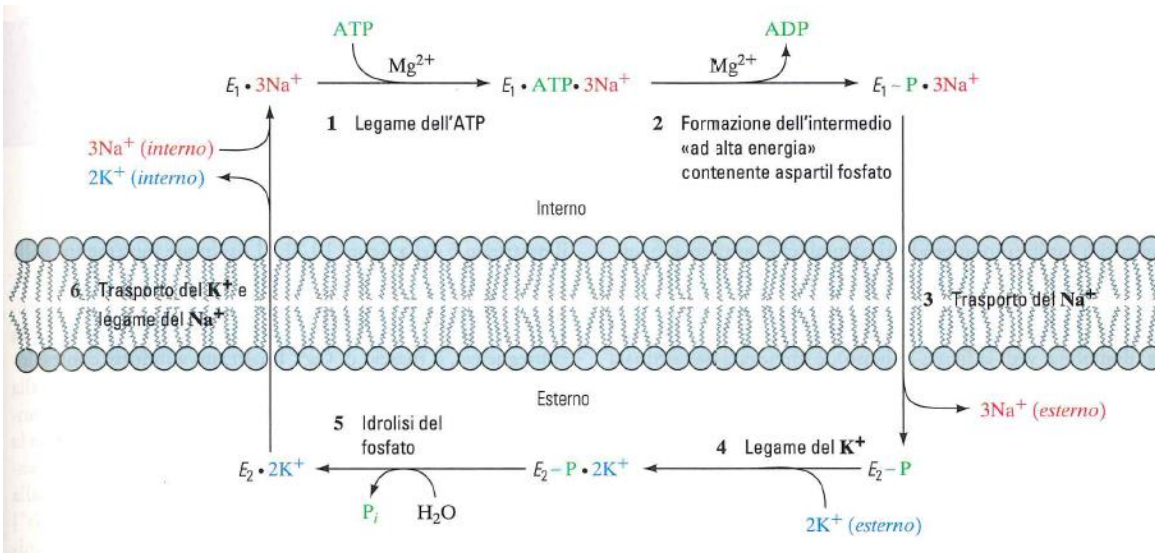
Trasportatore attivo (ATPasi di tipo P): utilizza ATP per trasportare Na⁺ e K⁺ contro loro gradiente.



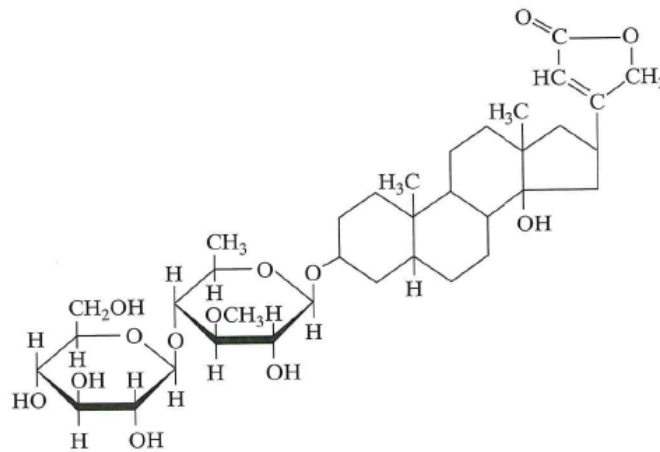
Responsabile del mantenimento di alte [K⁺] e basse [Na⁺] nel citosol.



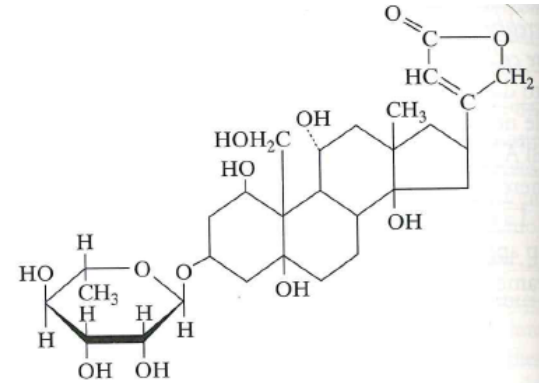
Liquido extracellulare o plasma sanguigno [K⁺] = 4 mM [Na⁺] = 145 mM



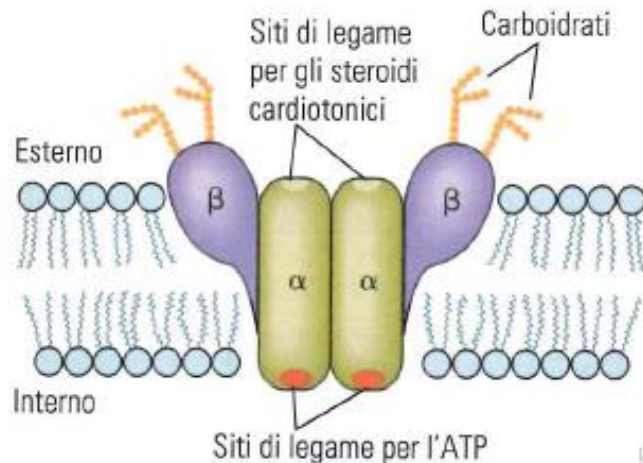
Gli steroidi cardiotonici inibiscono la Na^+/K^+ ATPasi



Digitossina (digitalina)



Ouabaina



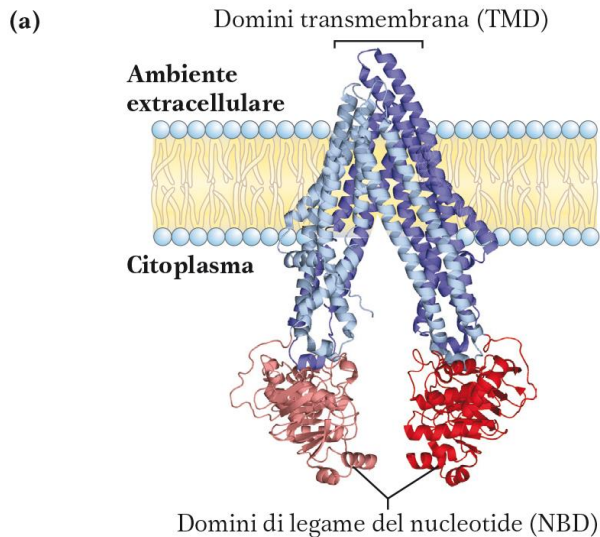
Sono steroidi che portano ad un aumento della contrazione del muscolo cardiaco.

Si legano a siti di legame sulle subunità alfa sul lato esterno, bloccando il ritorno dell'enzima allo stato iniziale.

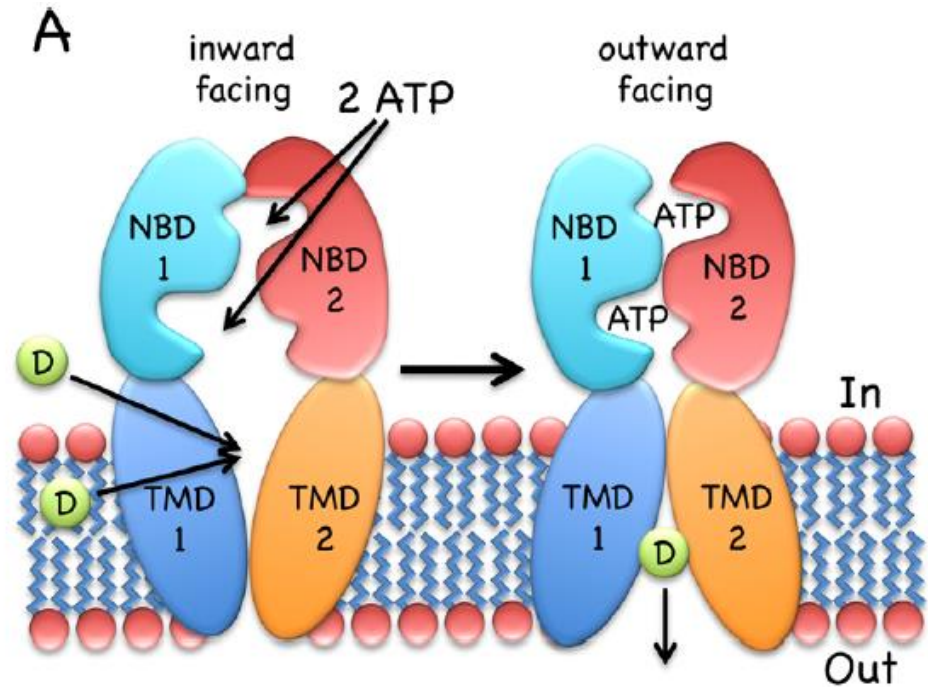
Aumento $[\text{Na}^+]_{\text{interno}} \rightarrow$ attivazione antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} \rightarrow$ aumento Ca^{2+} interno e RE \rightarrow intensificazione contrazione

I trasportatori ABC

Famiglia di trasportatori ATP-dipendenti che trasportano molte molecole (amminoacidi, peptidi, lipidi, farmaci ecc..) all'esterno della cellula contro gradiente di concentrazione.



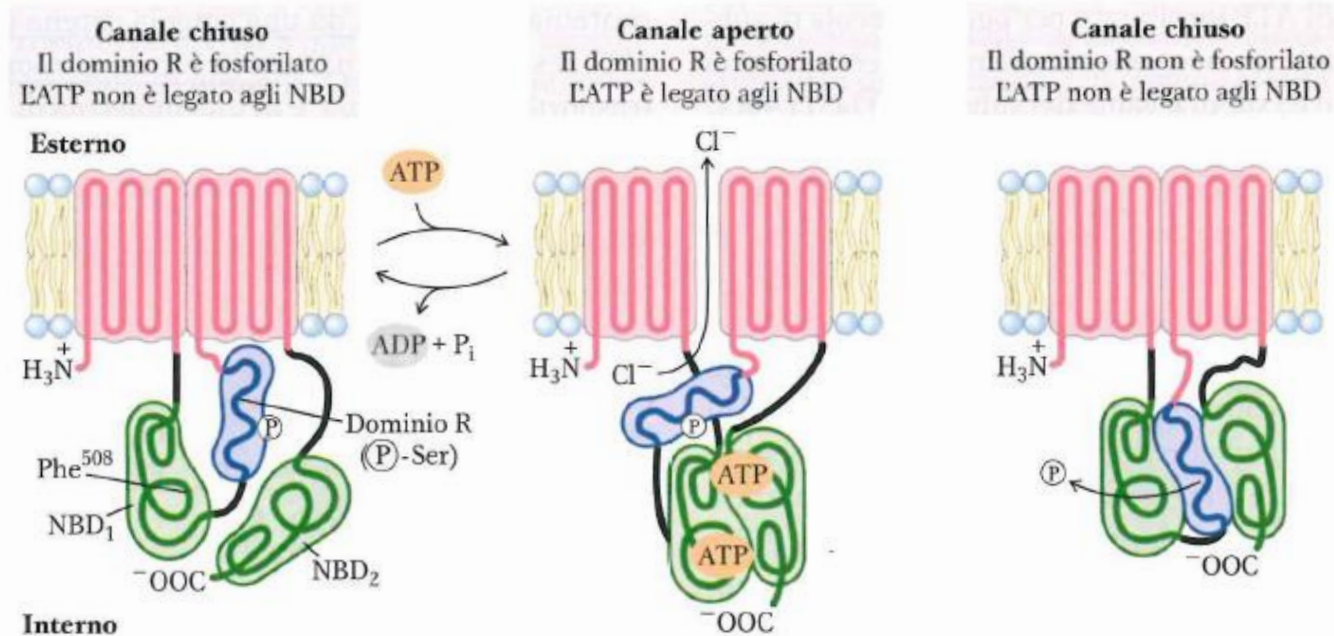
4 unità funzionali: 2 domini transmembrana (TMD) e 2 domini di legame al nucleotide (NBD)



- 1-Il substrato si lega al domino TMD (inward facing)
- 2-NBD lega 2 ATP-Mg²⁺ e dimerizza
- 3-Il dominio TMD cambia conformazione esponendo il substrato all'esterno (outward facing)
- 4-L'idrolisi di ATP causa la dissociazione di NBD ed il ritorno di TMDs alla condizione iniziale.

Un canale ionico difettoso causa la fibrosi cistica

Nei pazienti con fibrosi cistica (CF) lo strato di muco che ricopre la superficie interna dei polmoni è troppo spesso, ostruendo il passaggio dell'aria e favorendo la crescita di batteri.



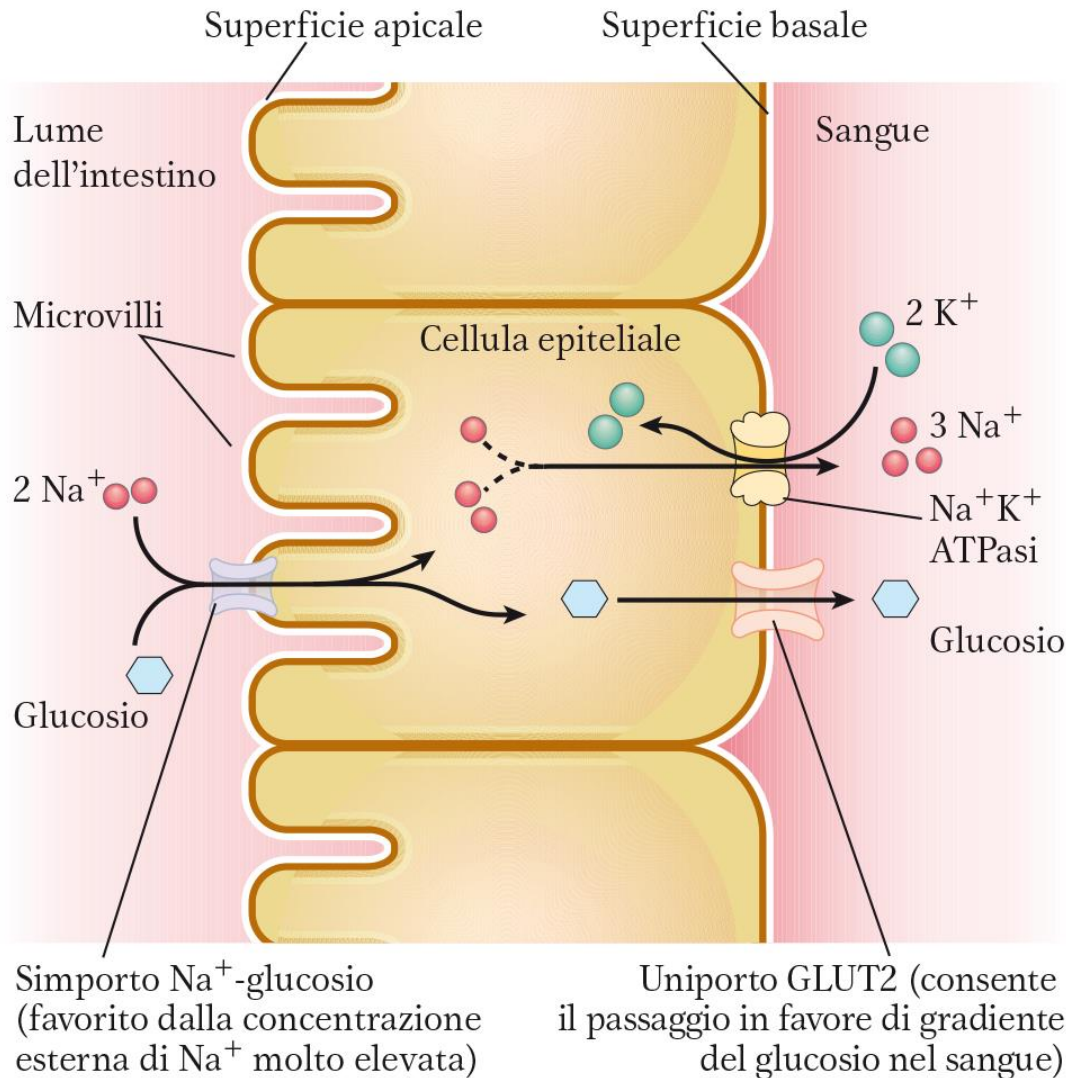
Costituito da 2 segmenti ognuno di 6 eliche TM che fanno il poro; 2 domini NBD (legano ATP) ed un dominio regolatore (R).

Mutazioni nella proteina provocano il mancato ripiegamento corretto con una esportazione di Cl^- all'esterno minore e quindi minor uscita di acqua dalla cellula, portando alla formazione di un muco spesso e disidratato e ai problemi visti prima.

Trasporto attivo secondario

I gradienti ionici H^+ o Na^+ generati tramite trasporto primario possono essere usati come energia trainante per il cotrasporto di altri soluti → **trasporto attivo secondario**.

In che modo?



Sul lato apicale delle cellule intestinali, il simporto Na^+ -glucosio viene usato per concentrare il glucosio all'interno della cellula

Esempio di energetica del co-trasporto

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{C_e}{C_i} + ZF\Delta\Psi$$

Na⁺ interno = 12 mM

Na⁺ esterno = 145 mM

Potenziale membrana = -50 mV

Temperatura = 37 °C

$$\Delta G_t = RT \ln \frac{C_e}{C_i}$$

$$\Delta G_t = [8,315 \text{ (J/mol}\cdot\text{K)} * 310 \text{ (K)} * \ln (0,145/0,012)] + 1 * 96500 \text{ (J/V}\cdot\text{mol)} * 0,050 \text{ (V)} =$$

11,2 kJ/mol

Quando uno ione Na⁺ rientra nella cellula, rilascia un potenziale elettrochimico di -11,2 kJ/mol → **energia potenziale per pompare glucosio all'interno della cellula**

L'energia per pompare 1 mole di glucosio sarà 2 * -11,2 = **-22,4 kJ/mol**

Il valore massimo del rapporto [glucosio]interno/[glucosio]esterno (si inverte per «colpa» del segno negativo) è:

$$\ln [\text{glucosio}]_{\text{interno}}/[\text{glucosio}]_{\text{esterno}} = \Delta G_t/RT = 22,4/(8,315 * 310) = 8,69 \rightarrow e^{8,69} = 5940$$

Il cotrasportatore può pompare glucosio all'interno della cellula fino ad una concentrazione intracellulare maggiore di 6000 volte rispetto quella esterna.

L'equilibrio non si raggiunge mai perché GLUT2 esporta glucosio nel sangue.