

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

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

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

All'equilibrio i flussi sono gli stessi

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

e quindi il potenziale elettrochimico sarà lo stesso

Quindi

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

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 un catione 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 compartimenti è bilanciata dalla differenza di campo elettrico tra i compartimenti

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

Stabilendo un  $\Delta E$  di 59 mV si mantiene una differenza di concentrazione di 10 volte (per uno ione monovalente)

Il potenziale di membrana altera la distribuzione degli ioni

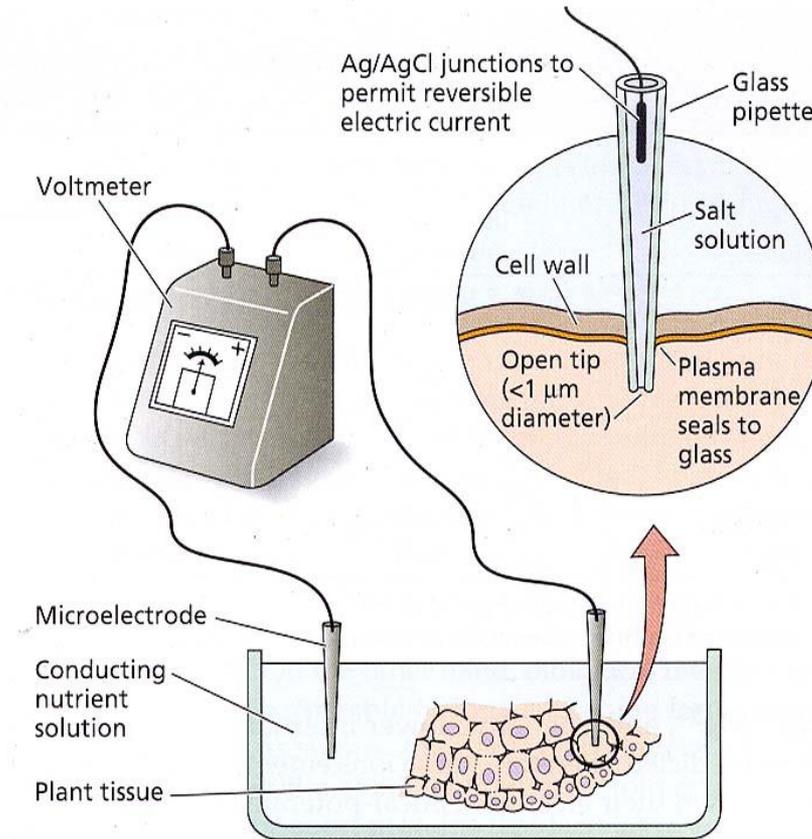
## Equazione di Goldman

Potenziale di diffusione  
di Goldman


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

Mette in relazione i gradienti ionici esistenti attraverso una membrana al potenziale di diffusione che si sviluppa

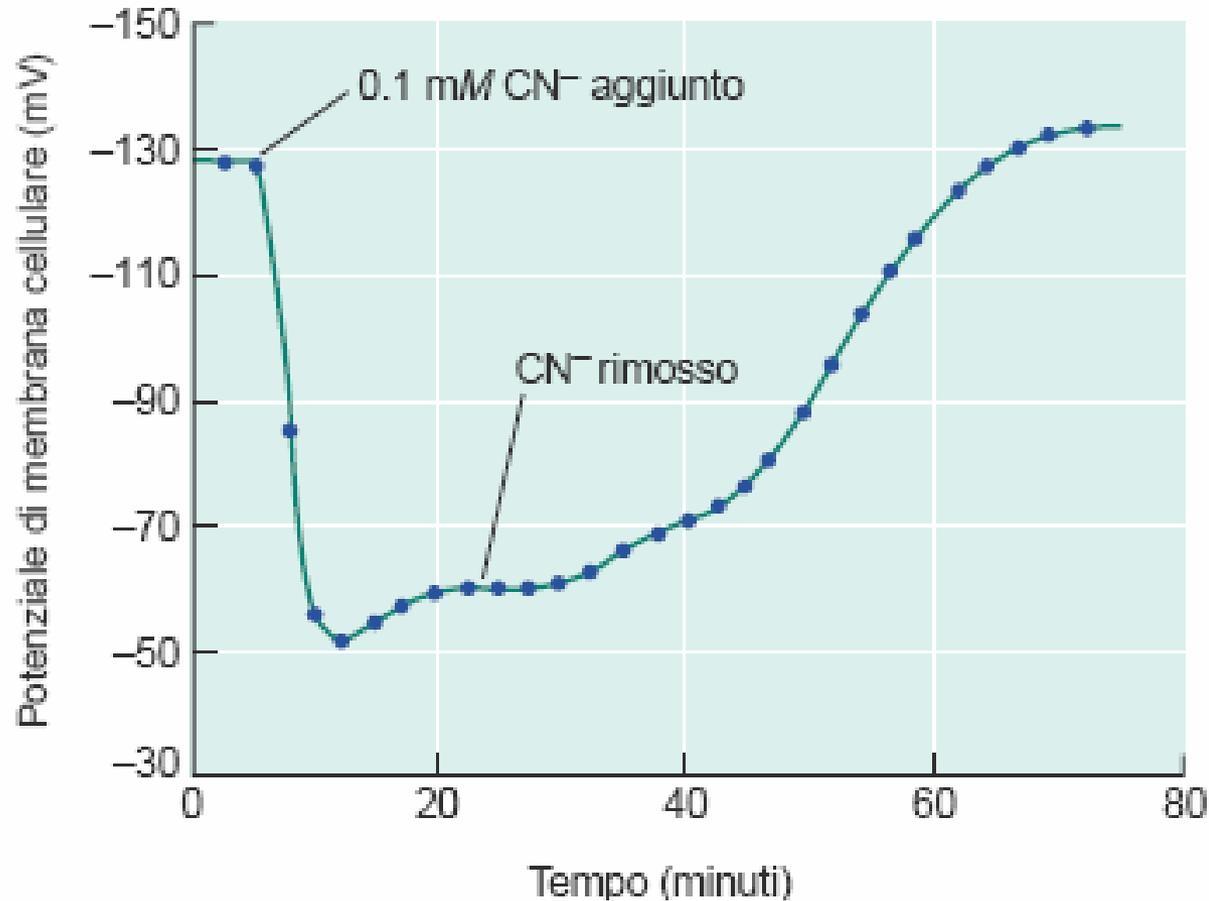
Tutte le cellule possiedono un potenziale di membrana, dovuto alla distribuzione asimmetrica degli ioni tra l'interno e l'esterno della cellula



$\Delta E$  calcolato con l'equazione di Goldman **da -50 a -40 mV**

Misura sperimentale  $\Delta E$  **da -240 a -60 mV**

Il trasporto attivo delle **pompe elettrogeniche** risulta in un movimento di carica elettrica netta e provoca un discostamento del valore del potenziale di membrana da quello predetto dall'equazione di Goldman



CN<sup>-</sup> inibisce  
la sintesi di  
ATP nei  
mitocondri

L'energia per il trasporto attivo è spesso fornita dall'idrolisi dell'ATP  
(es. nelle pompe elettrogeniche H<sup>+</sup>- ATPasi)

**TABELLA 6.1**  
**Confronto fra le concentrazioni osservate e quelle previste in tessuti radicali di pisello**

Ione	Concentrazione del mezzo esterno (mmol L <sup>-1</sup> )	Concentrazione interna (mmol L <sup>-1</sup> )	
		Concentrazione prevista	Concentrazione osservata
K <sup>+</sup>	1	74	75
Na <sup>+</sup>	1	74	8
Mg <sup>2+</sup>	0,25	1.340	3
Ca <sup>2+</sup>	1	10.700	2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2	0,0272	28
Cl <sup>-</sup>	1	0,0136	7
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	0,0136	21
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,25	0,00037	19

Fonte: Dati da Higinbotham et al., (1967)

Nota: Il potenziale di membrana misurato era di -110 mV

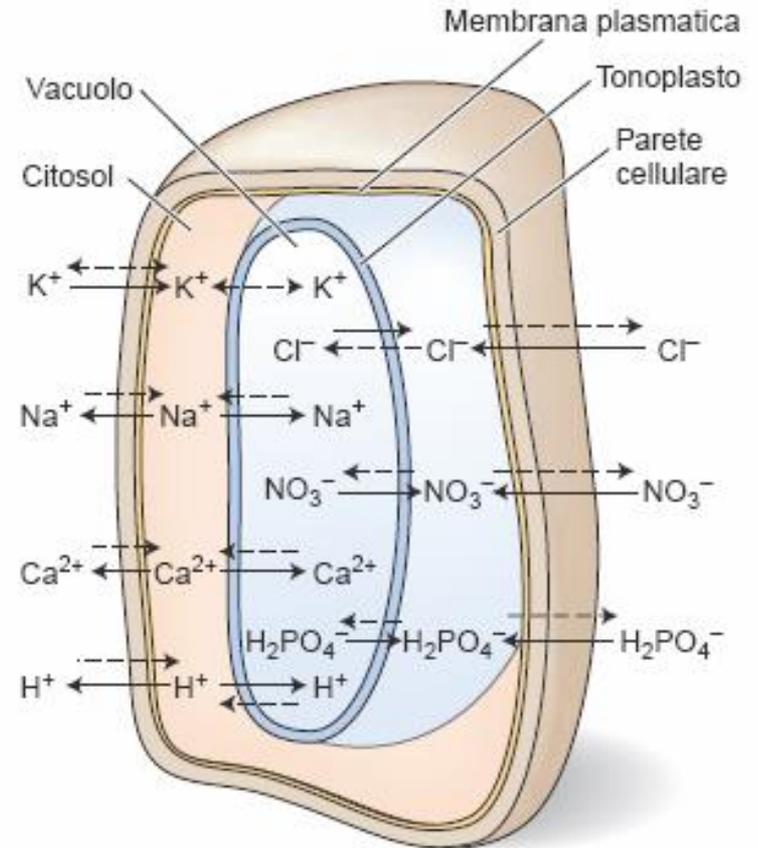
Valori previsti

Valori osservati

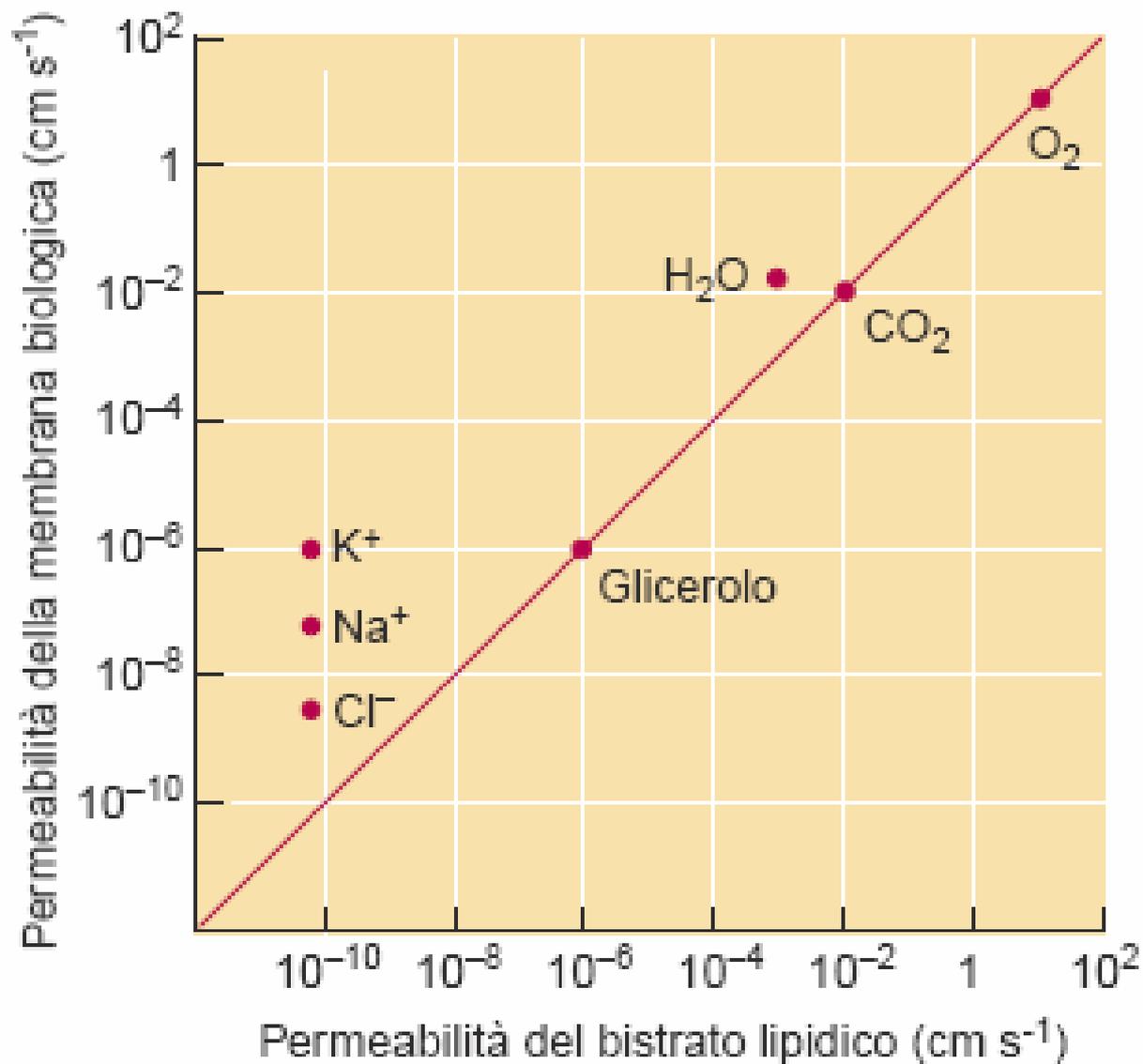
Solo ione potassio vicino all'equilibrio

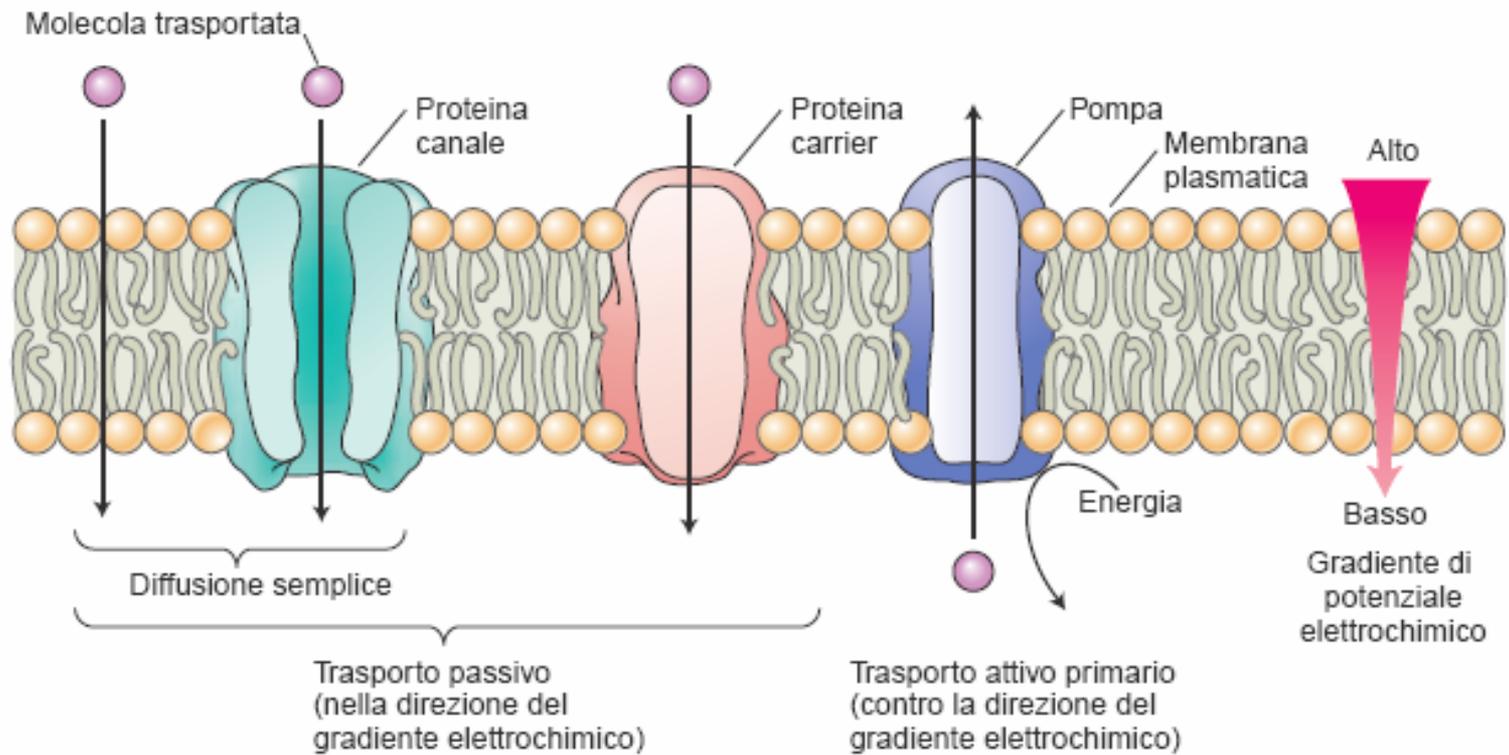
Anioni: concentrazioni più alte del previsto, prelievo attivo

Cationi: concentrazioni più basse del previsto, estrusione attiva



-----> Trasporto passivo  
 —————> Trasporto attivo





Specificità per il soluto trasportato.

In *Arabidopsis*, circa il 7% dei geni codifica proteine di trasporto!



# Principali sistemi di trasporto presenti nelle membrane biologiche

## Pompe

Numero di turnover:  $10^2$  ioni (o altre molecole)  $s^{-1}$

Abbondanza: da 100 a  $>1000$  per  $\mu m^2$

## Traslocatori/carrier

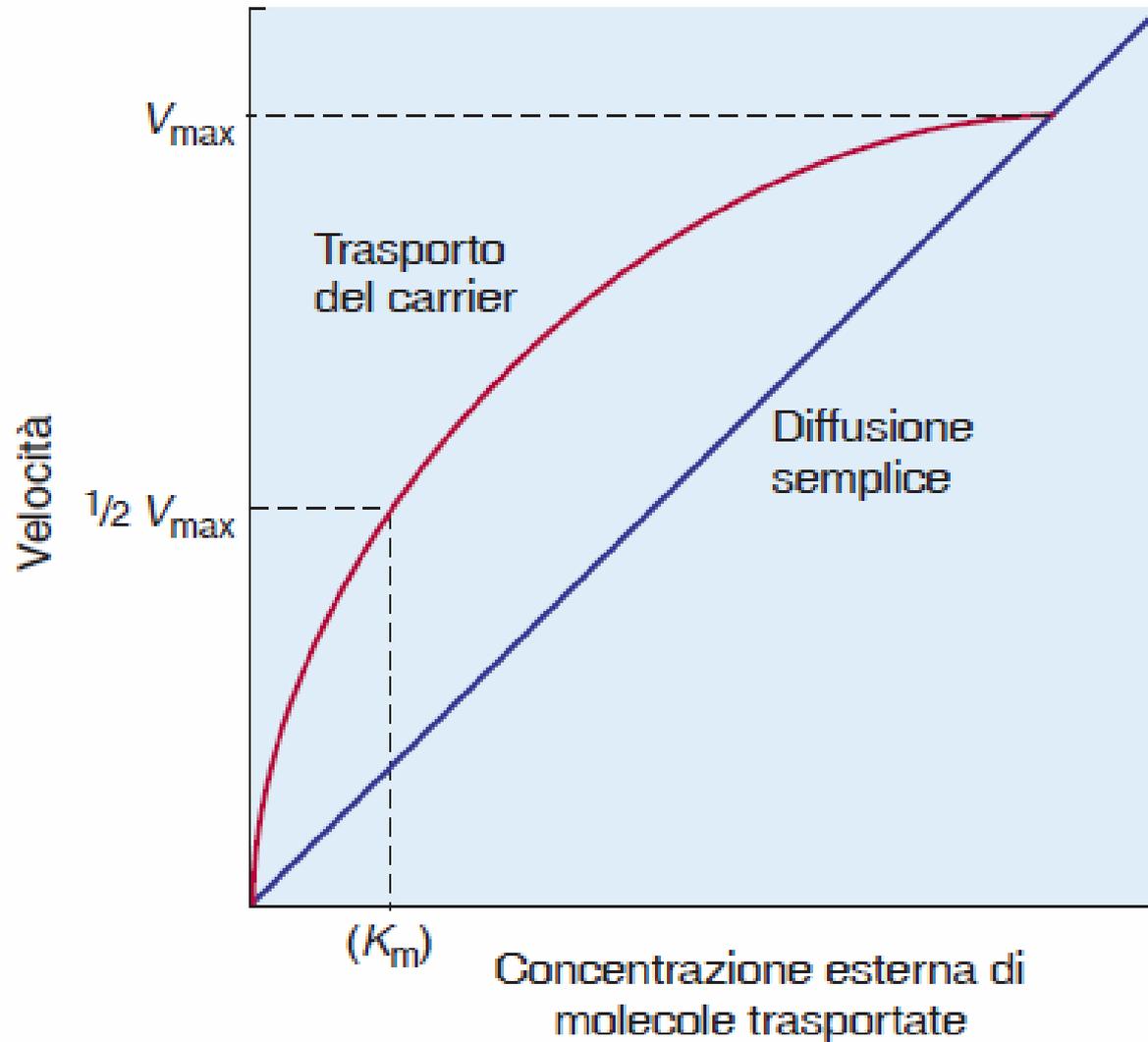
Numero di turnover:  $10^3$  ioni (o altre molecole)  $s^{-1}$

Abbondanza: da 10 a 100 per  $\mu m^2$

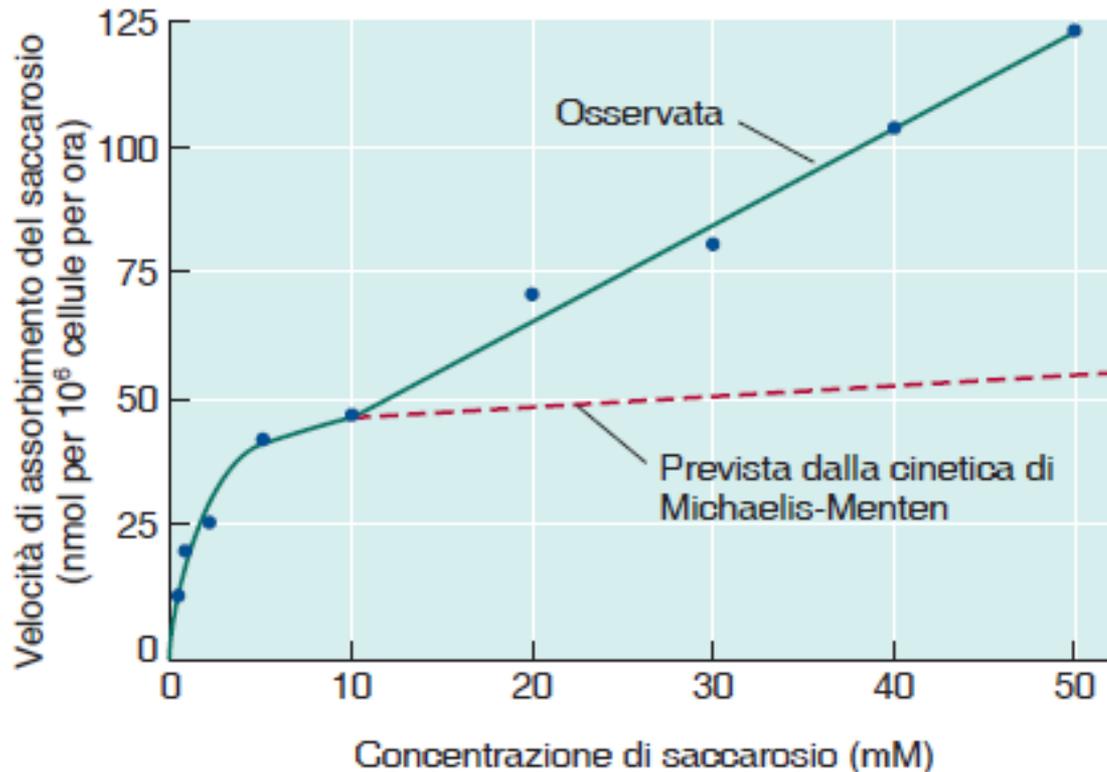
## Canali

Numero di turnover: da  $10^6$  a  $10^8$  ioni (o altre molecole)  $s^{-1}$

Abbondanza: da 1 a 10 per  $\mu m^2$



Nei carrier: siti attivi di legame con la specie chimica trasportata.  
Interazioni simili a quelle enzima-substrato: trasporto con cinetica  
simile a quella enzimatica



Protoplasti di soia:

- a basse concentrazioni, assorbimento da traslocatori (simportatori di H<sup>+</sup>-saccarosio, necessitano di energia)
- ad alte concentrazioni: solo diffusione facilitata (operata sempre da carrier)

**POMPE IONICHE:** UNA POMPA IONICA E' UN COMPLESSO ENZIMATICO CHE UTILIZZA L'ENERGIA DI IDROLISI DI LEGAMI AD ALTA ENERGIA (solitamente l'ATP ma anche PPI) PER TRASLOCARE ("POMPARE") IONI CONTRO GRADIENTE DI POTENZIALE ELETTROCHIMICO

## Principali pompe ioniche della cellula vegetale

### Plasmalemma:

Pompa protonica (P H<sup>+</sup>-ATPasi)

Pompa del Ca<sup>2+</sup>

### Tonoplasto:

2 pompe protoniche (V H<sup>+</sup>-ATPasi, H<sup>+</sup>-PPasi)

Pompa del Ca<sup>2+</sup>

### Creste mitocondriali e tilacoidi plastidiali:

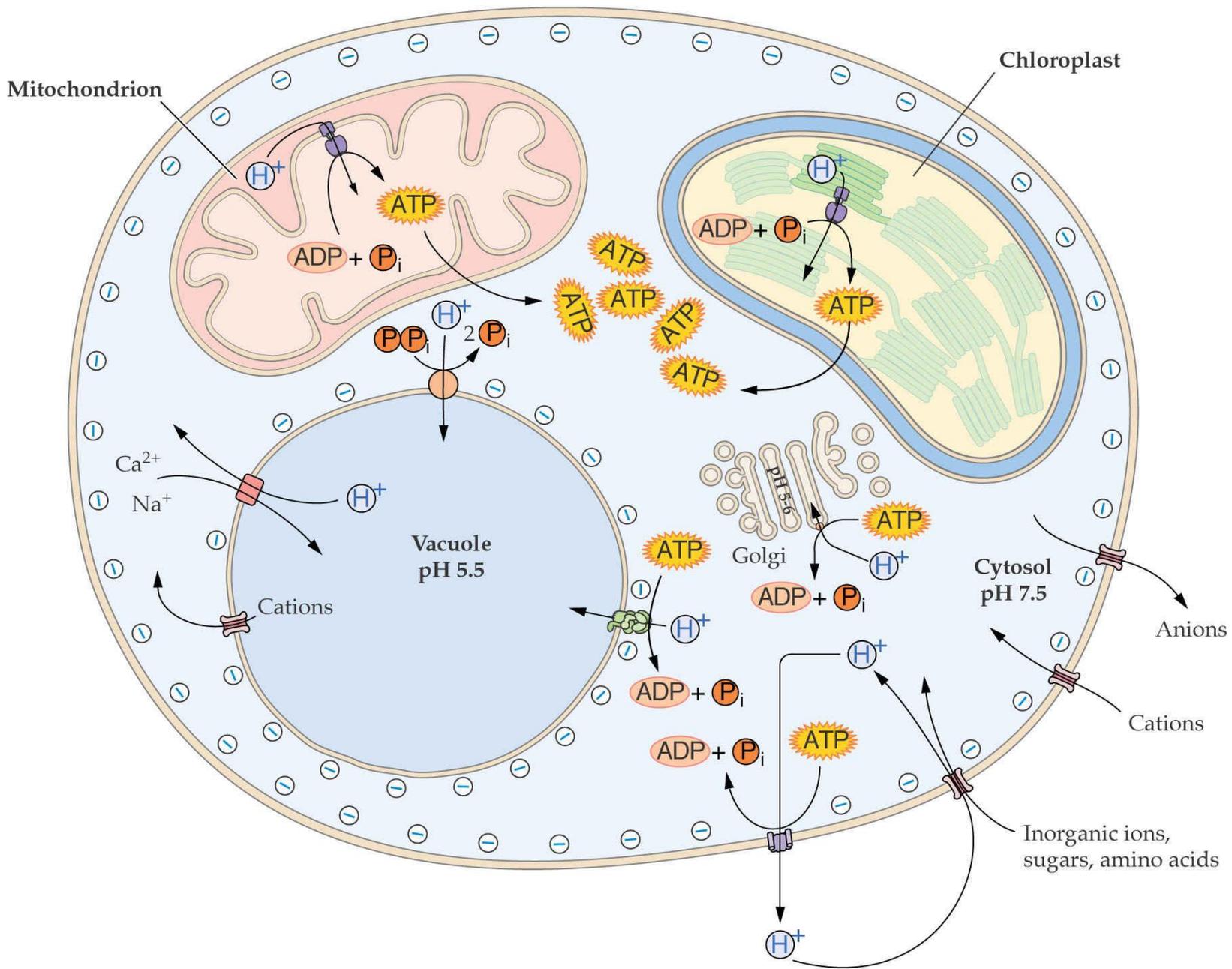
Pompa protonica (F H<sup>+</sup>-ATPasi o ATP sintasi)

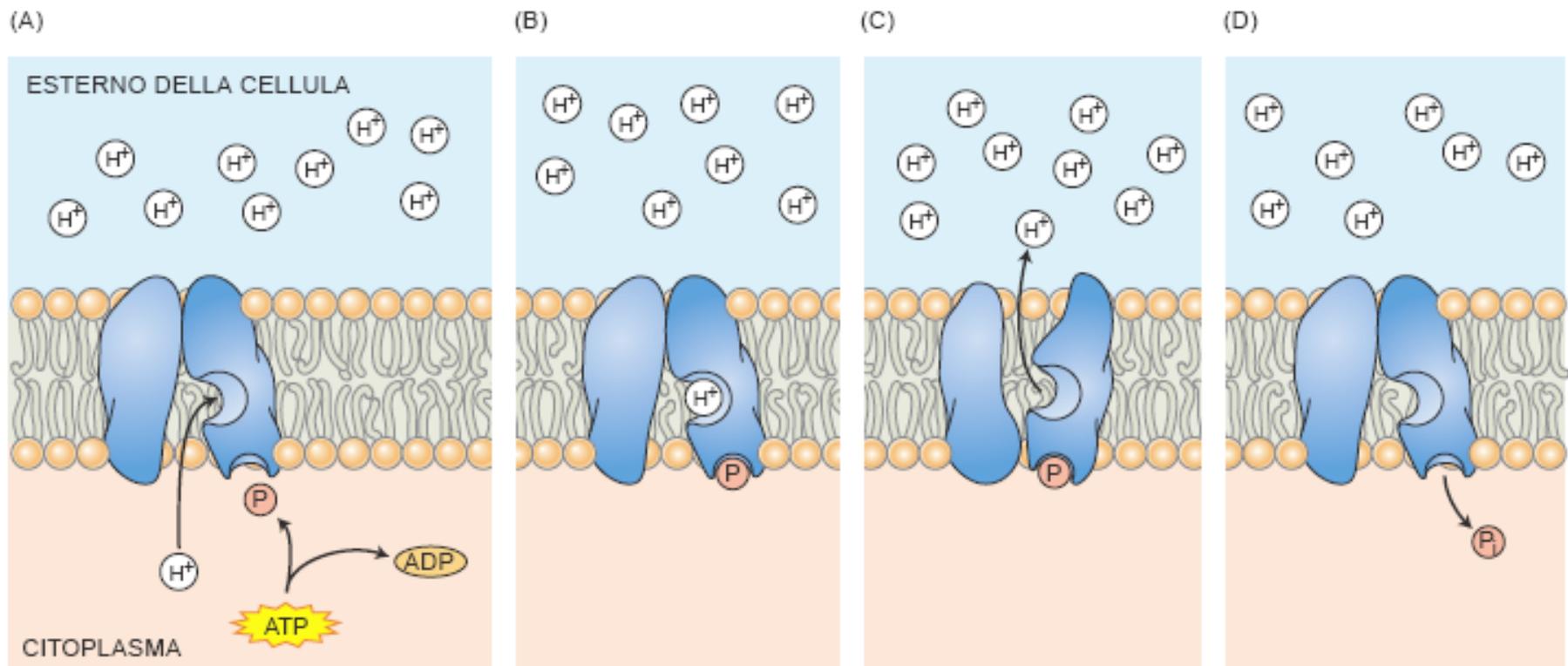
### Membrane mitocondriali, membrane plastidiali, reticolo endoplasmatico, etc...:

Pompe protoniche

Pompa del Ca<sup>2+</sup>

Nota: tutte queste pompe sono 'elettrogene', in quanto determinano un movimento netto di carica elettrica attraverso la membrana, con effetti sul potenziale di membrana.





**Figura 6.16** Fasi di un ipotetico trasporto operato da una pompa elettrogenica su un catione (come H<sup>+</sup>) contro il suo gradiente chimico. La proteina, inclusa nella membrana, si lega al catione dalla parte rivolta verso la cellula (A) e viene fosforilata dall'ATP (B). Tale fosforilazione porta a un cambiamento conformazionale che espone il catione alla parte esterna della cellula, rendendone possibile la diffusione (C). Il rilascio all'interno della cellula dello ione fosfato (P) dalla proteina all'interno della cellula (D) ristabilisce la configurazione iniziale della proteina di membrana e permette l'inizio di un nuovo ciclo di pompaggio.

## POMPE PROTONICHE

PERCHE' E' IMPORTANTE GENERARE UN GRADIENTE DI PROTONI?

- a) **variazioni della polarizzazione della membrana** causano l'apertura di alcuni tipi di canali ionici (ad es. del  $K^+$ ) e modificano i gradienti di potenziale elettrochimico influenzando il movimento di ioni attraverso la membrana
- b) **la fuoriuscita di  $H^+$**  favorisce il loro rientro passivo via traslocatori (ad es  $K^+/H^+$ , saccarosio/ $H^+$ , aminoacidi/ $H^+$ , anioni/ $H^+$ )
- c) **l'acidificazione del succo vacuolare** mantiene in funzione varie proteine vacuolari
- d) **l'acidificazione della parete** attiva numerosi enzimi responsabili dell'accrescimento cellulare per distensione

NUMEROSI PROCESSI COME L'APERTURA STOMATICA, LA NUTRIZIONE MINERALE E MOLTI ALTRI DIPENDONO DALLA FUNZIONALITA' DELLE POMPE PROTONICHE

**Estrusione attiva di H<sup>+</sup>**



**Gradiente elettrochimico di protoni ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ )**



**ENERGIA LIBERA**

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

Gradiente elettrochimico di protoni:

$$\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+} = F\Delta E + 2.3RT \left( \log \frac{[\text{H}^+]^i}{[\text{H}^+]^o} \right)$$

$\Delta E$  = potenziale di membrana

Forza motrice protonica (fmp in italiano, o pmf in inglese):

$$\Delta p = \frac{\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}}{F} = \Delta E + \frac{2.3RT}{F} \left( \log \frac{[\text{H}^+]^i}{[\text{H}^+]^o} \right)$$

$$\Delta p = \frac{\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}^+}}{F} = \Delta E + \frac{2.3RT}{F} \left( \log \frac{[\text{H}^+]^i}{[\text{H}^+]^o} \right)$$

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

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

$$\frac{\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}^+}}{F} = \Delta p = \Delta E - \frac{2.3RT}{F} \Delta \text{pH}$$

A 25 °C →  $\Delta p = \Delta E - 59 \text{mV} \Delta \text{pH}$

**Forza motrice protonica**

## Forza motrice protonica

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

Esempio:

Cellula immersa in una soluzione contenente  $\text{K}^+$  1 mM e Saccarosio 1 mM

L'attività della pompa protonica genera un  $\Delta E = -120 \text{ mV}$  e una differenza di pH tra interno ed esterno della cellula pari a 2 unità

Si ha quindi:  $\Delta p = -120\text{mV} - 59(2)\text{mV} = -238\text{mV}$

Quanto potassio può essere accumulato (tramite l'apertura dei canali del potassio) nella cellula sfruttando questa  $\Delta p$ ?

Il potassio è carico positivamente e il trasporto è guidato da  $\Delta E = -120$  mV

Secondo l'equazione di Nernst:

$$\Delta E = 59 \log(C^o/C^i)$$

da cui

$$\log(C^o/C^i) = \Delta E/59 = -120/59 = -2.03$$

quindi

$$C^o/C^i = 0.009 \quad \text{ovvero} \quad C^i/C^o = 107$$

Essendo  $[K^+]^o = 1$  mM, all'equilibrio avremo che  $[K^+]^i = 107$  mM

La forza motrice protonica può anche essere sfruttata per importare saccarosio all'interno della cellula tramite un **meccanismo di trasporto accoppiato di un protone e una molecola di saccarosio** (carrier simportatori). In questo caso, l'intera  $\Delta p = -238 \text{ mV}$  può essere teoricamente utilizzata.

Poiché  $\Delta p = \Delta \mu_{\text{H}}/F$  ed essendo  $F = 96.5 \text{ kJ V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

l'energia libera disponibile per il trasporto del saccarosio è pari a:

$$\Delta \mu_{\text{H}} = \Delta p \times F = (96.5 \text{ kJ V}^{-1} \text{ mol}^{-1}) \times (-0.238 \text{ V}) = -23 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Che differenza di concentrazione di saccarosio tra interno ed esterno della cellula può essere ottenuta sfruttando interamente tutta questa energia, cioè se  $\Delta \mu_{\text{s}} = \Delta \mu_{\text{H}}$  ?

$$\Delta \mu_{\text{s}} = RT \ln(C_{\text{s}}^{\circ}/C_{\text{s}}^{\text{i}}) \quad \text{cioè} \quad \ln(C_{\text{s}}^{\circ}/C_{\text{s}}^{\text{i}}) = \Delta \mu_{\text{s}}/RT$$

Dove  $R = 8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

A  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} = 298 \text{ K}$ , si ha che  $RT = 2.48 \text{ kJ mol}^{-1}$

$$\text{Quindi: } \ln(C_{\text{s}}^{\circ}/C_{\text{s}}^{\text{i}}) = (-23 \text{ kJ mol}^{-1})/(2.48 \text{ kJ mol}^{-1}) = -9.27$$

Da cui:  $C_{\text{s}}^{\circ}/C_{\text{s}}^{\text{i}} = 9.4 \times 10^{-5}$  cioè  $C_{\text{s}}^{\text{i}}/C_{\text{s}}^{\circ} = 10615$  ovvero  $C_{\text{s}}^{\text{i}} = 10615 C_{\text{s}}^{\circ}$

Dato  $C_{\text{s}}^{\circ} = 1 \text{ mM}$ , risulta che  $C_{\text{s}}^{\text{i}} = 10615 \text{ mM} = 10.6 \text{ M}$  !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Tuttavia, raggiunta una certa concentrazione, il simporto viene inibito per impedire un eccessivo accumulo

# **Pompe (protoniche, cationiche):**

**P-H<sup>+</sup> ATPasi**

**V-H<sup>+</sup> ATPasi**

**H<sup>+</sup> PPasi (anche V-PPasi)**

**F-H<sup>+</sup> ATPasi (cloroplasto e mitocondrio)**

**Ca<sup>2+</sup> ATPasi**

**ABC ATPasi (ABC = ATP Binding Cassette)**

## La P-H<sup>+</sup> ATPasi del plasmalemma

Assenti negli animali (che posseggono specifiche Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPasi)

Singolo polipeptide con massa molecolare di 110 kDa

Presente sulla membrana come dimeri o oligomeri

Inibitore specifico: ortovanadato (HVO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)

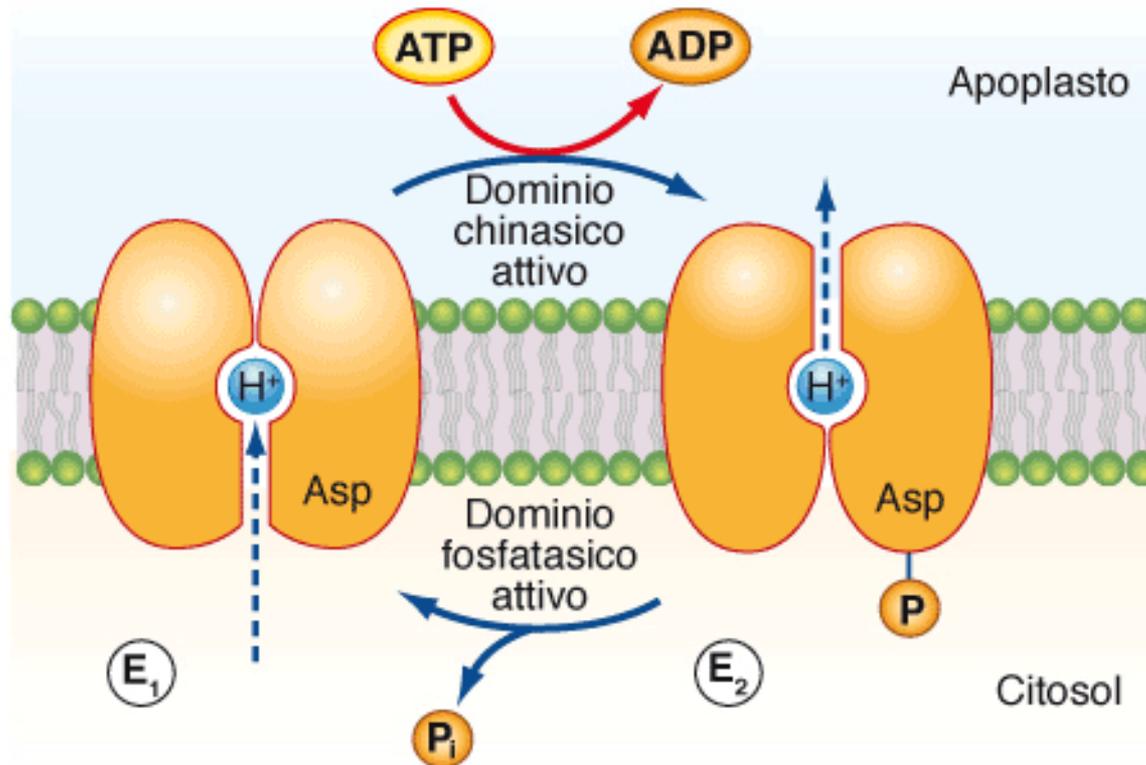
Nella frazione citosolica 3 domini con attività:  
chinasi, fosfatasi, autoinibitoria (nel dominio C-terminale)

In *Arabidopsis* 11 geni codificano per le isoforme di P H<sup>+</sup>-ATPasi

Funzione: pompa protoni verso l'apoplasto utilizzando l'energia derivante da idrolisi dell'ATP (-50 kJ mol<sup>-1</sup>)

Stechiometria di funzionamento: 1 H<sup>+</sup> per ogni ATP idrolizzato





La pompa protonica del plasmalemma è una pompa di tipo P → stato di transizione in cui viene legato covalentemente un gruppo fosfato.

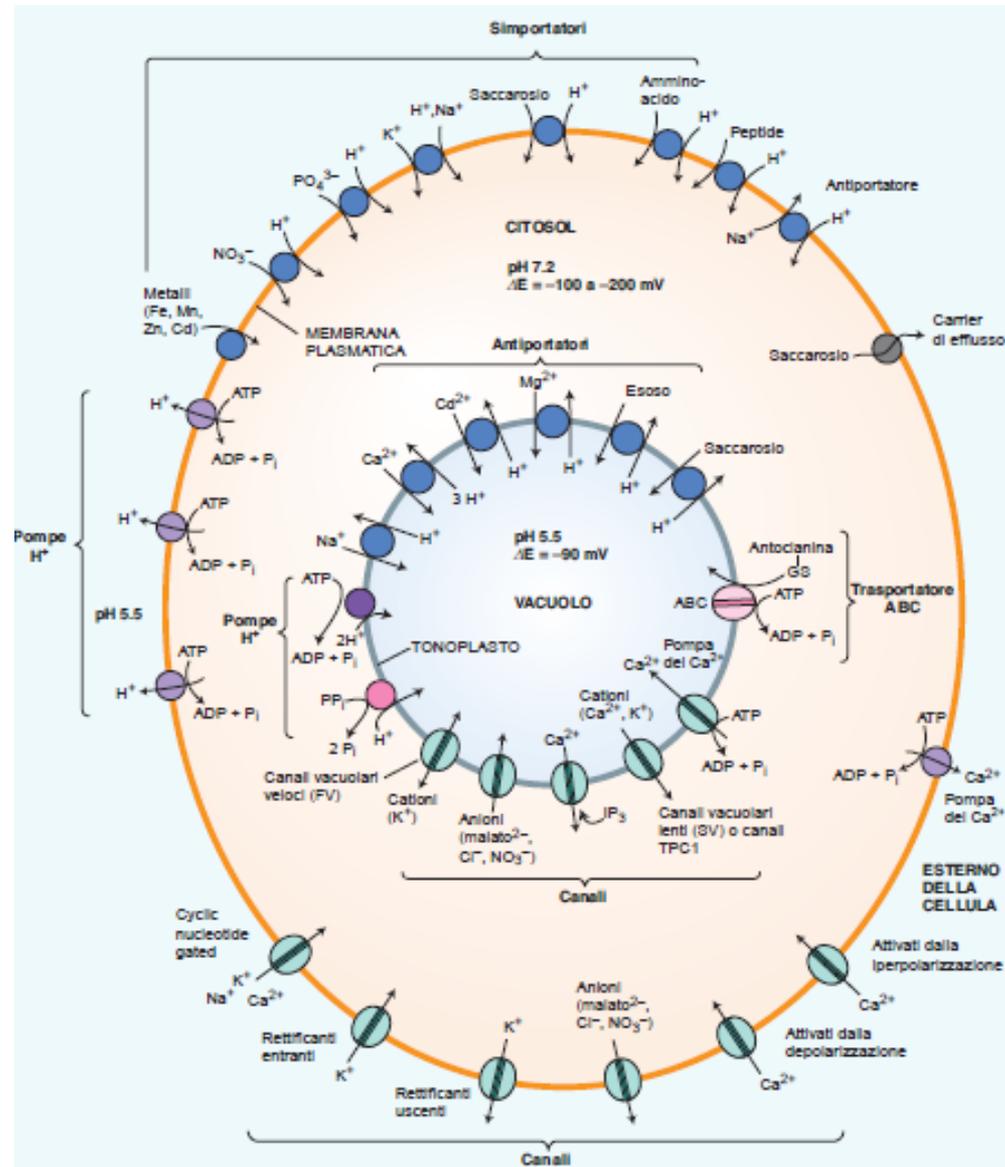
2 diverse conformazioni: E<sub>1</sub> (non fosforilata) e E<sub>2</sub> (fosforilata, v. figura)

Appartengono alla stessa superfamiglia (delle P-ATPasi):

H<sup>+</sup> ATPasi dei funghi, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi delle cellule animali, Ca<sup>2+</sup> ATPasi di cellule vegetali e animali, H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi della mucosa gastrica dei mammiferi

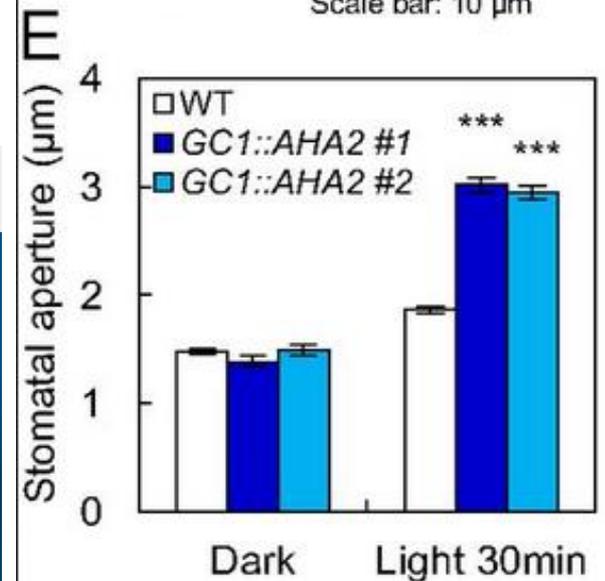
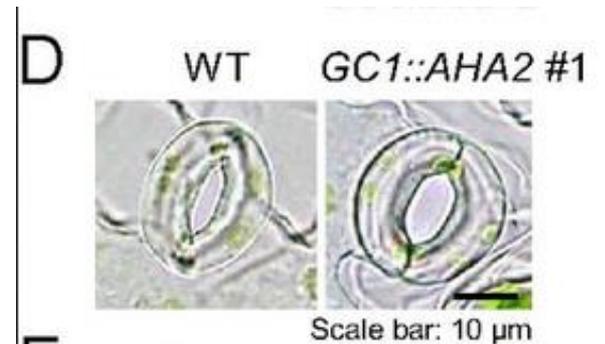
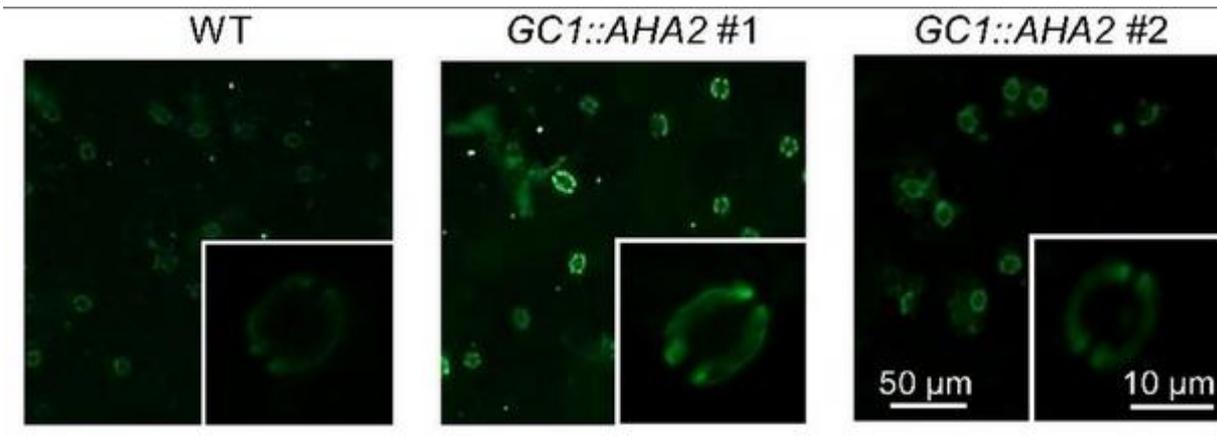
# RUOLO FISILOGICO DELLA H<sup>+</sup>-ATPasi DI PLASMALEMMMA

Energizza i sistemi di trasporto di ioni e nutrienti



# RUOLO FISILOGICO DELLA H<sup>+</sup>-ATPasi DEL PLASMALEMMMA

## Apertura degli stomi



Institution: Università di Trieste - DBBCM

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

CURRENT ISSUE // ARCHIVE // NEWS & MULTIMEDIA // AUTHORS // ABOUT // COLLECTED ARTICLES // BROWSE BY TOPIC // EARLY EDITION //

FRONT MATTER

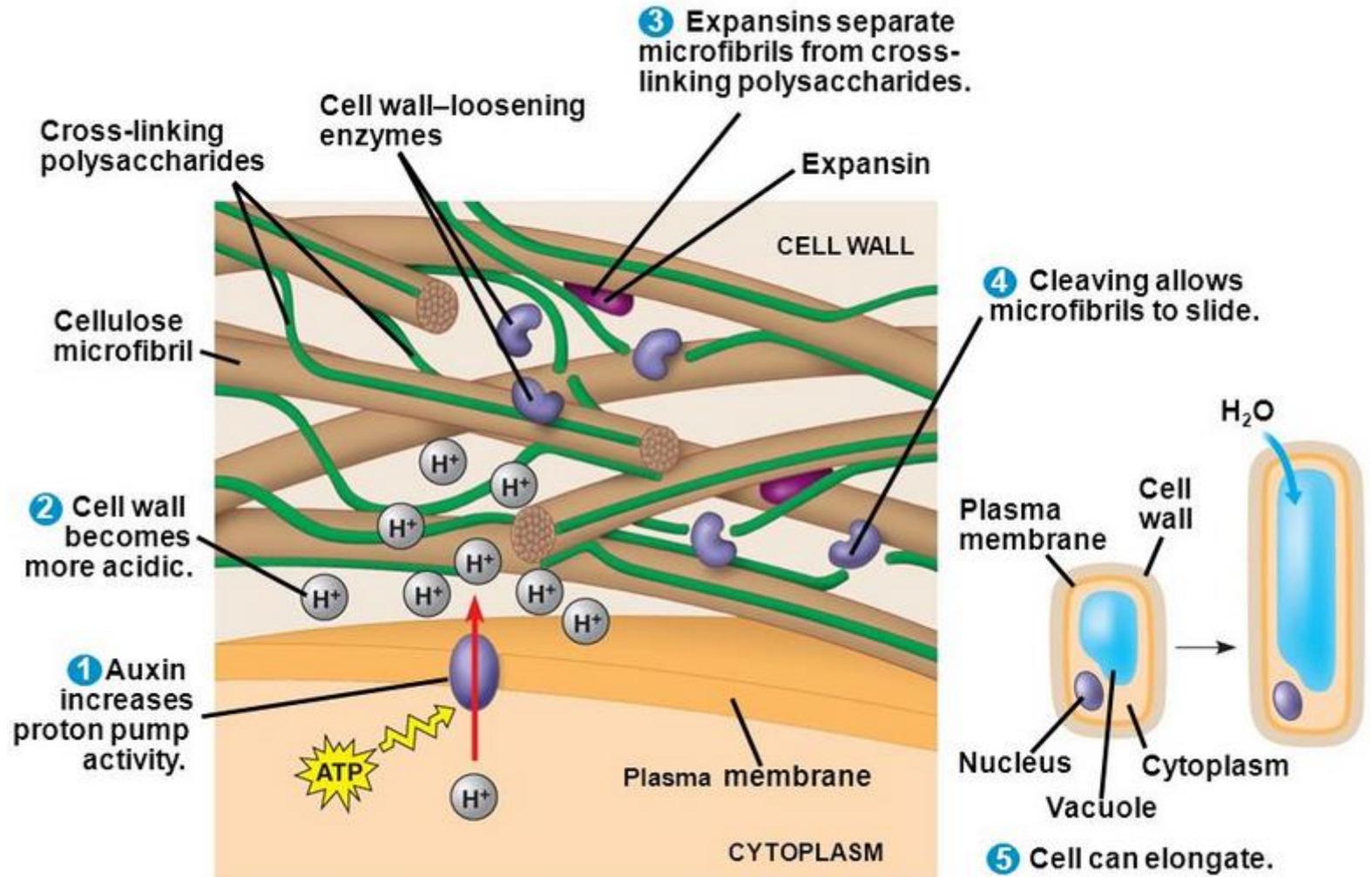
↑ > Current Issue > vol. 111 no. 1 > Yin Wang, 533–538, doi: 10.1073/pnas.1305438111



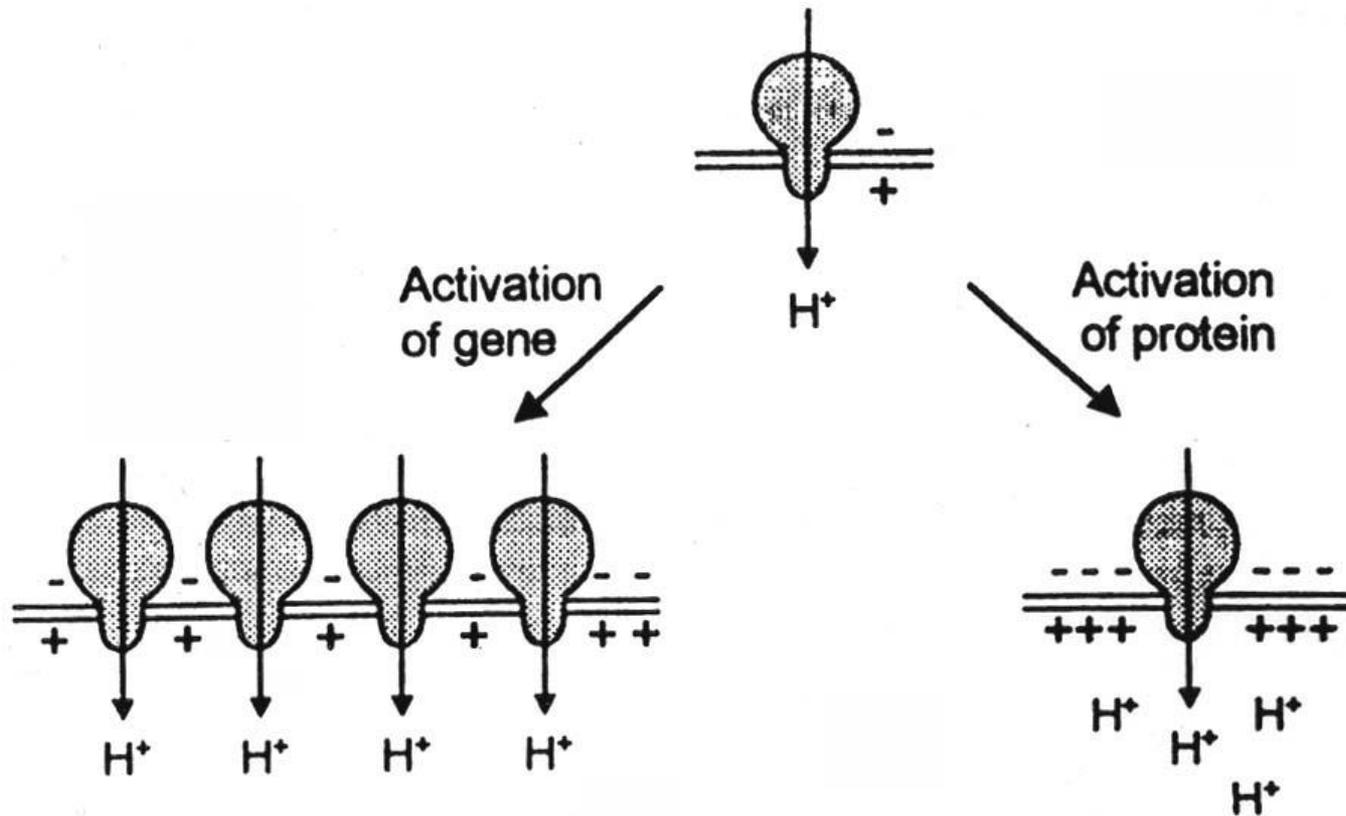
Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth

Yin Wang<sup>a</sup>, Ko Noguchi<sup>b</sup>, Natsuko Ono<sup>a</sup>, Shin-ichiro Inoue<sup>a</sup>, Ichiro Terashima<sup>b</sup>, and Toshinori Kinoshita<sup>a,c,1</sup>

# RUOLO FISIOLGICO DELL'H<sup>+</sup>-ATPasi DEL PLASMALEMMMA



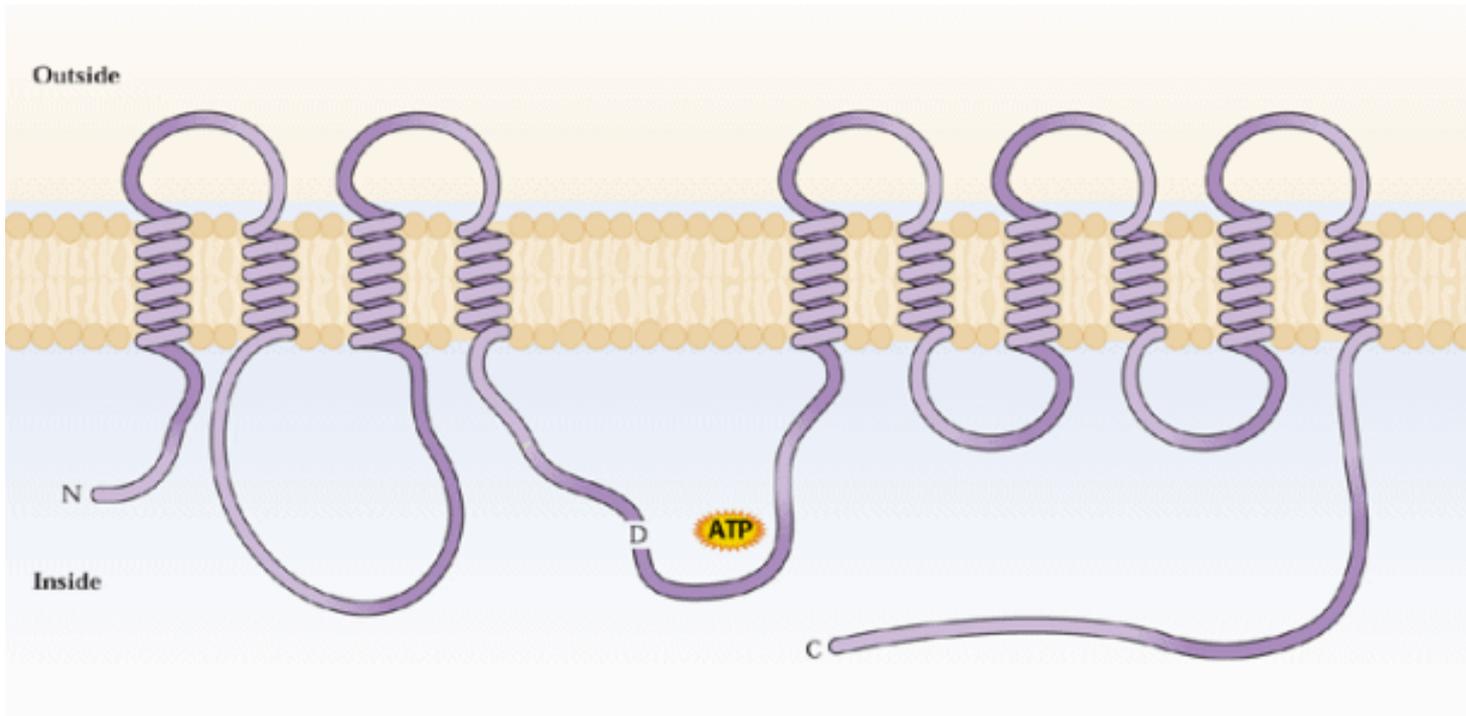
Possibili meccanismi che determinano un aumento di attività della H<sup>+</sup>-ATPasi



Fattori che influenzano l'attività della H<sup>+</sup>-ATPasi:

**stress, ormoni, luce, patogeni etc...**

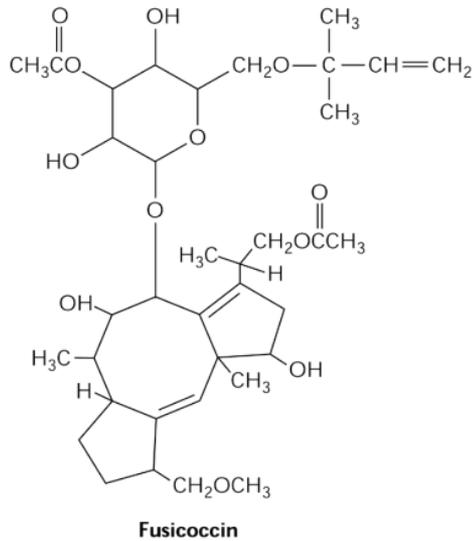
## Il dominio C-terminale regola l'attività dell'enzima



Prove sperimentali: incremento considerevole dell'attivazione dell'H<sup>+</sup>-ATPasi se:

- espressione H<sup>+</sup>-ATPasi senza dominio-C terminale
- proteolisi controllata

# LA FUSICOCCINA



Metabolita fitotossico prodotto dal fungo  
*Fusicoccum amygdali*

L'infezione provoca una attivazione irreversibile  
dell'H<sup>+</sup>-ATPasi delle cellule di guardia



Apertura incontrollata degli stomi



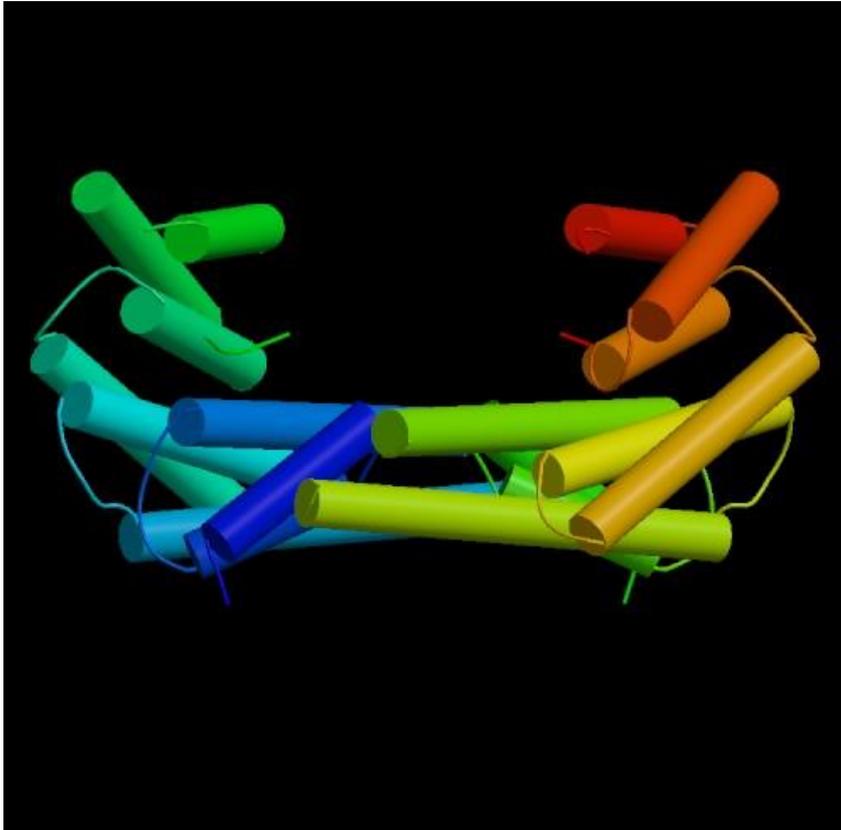
Morte per disidratazione



L'attivazione indotta da fusicoccina e quella indotta da rimozione sperimentale del C-terminale non sono additive.

Quindi la fusicoccina agisce rimuovendo l'autoinibizione imposta dal C-terminale

La fusicoccina stabilizza il legame di una proteina 14-3-3 sul dominio C-terminale della H<sup>+</sup>-ATPasi



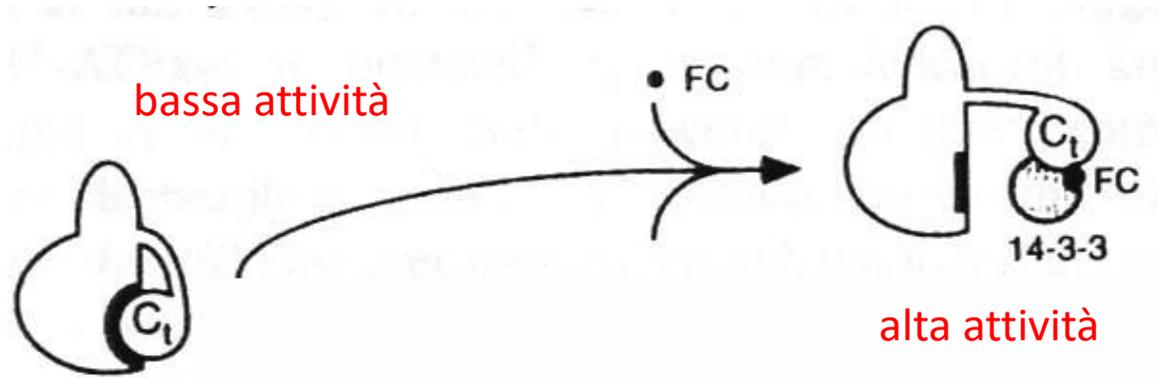
## Proteine 14-3-3

Classe di proteine regolatrici diffuse in tutti gli eucarioti

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

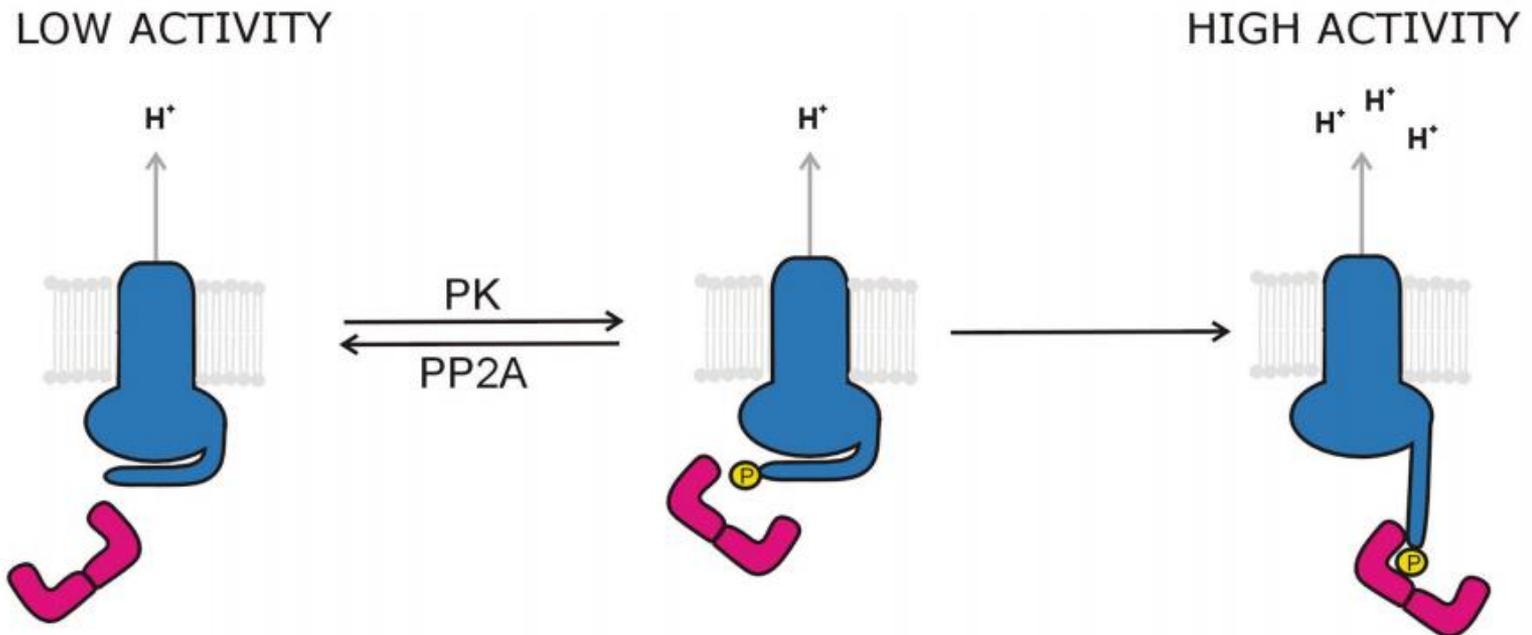
Interagiscono con numerose proteine bersaglio, tramite il riconoscimento di particolari sequenze fosforilate su residui di serina/treonina

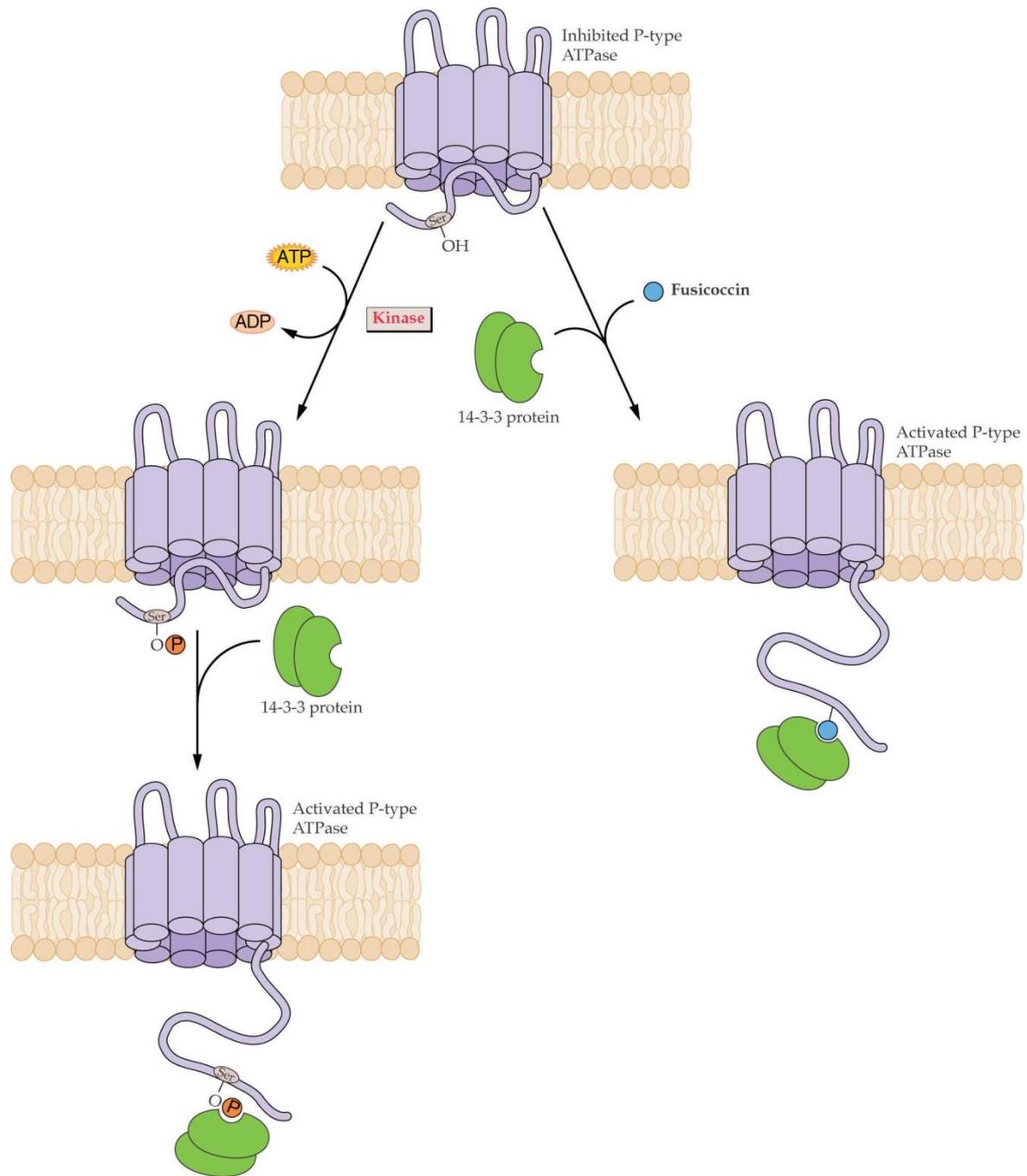
## Meccanismo di azione della fusicoccina



La fusicoccina promuove il legame irreversibile delle proteine 14-3-3 sul dominio C-terminale dell'H<sup>+</sup>-ATPasi

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





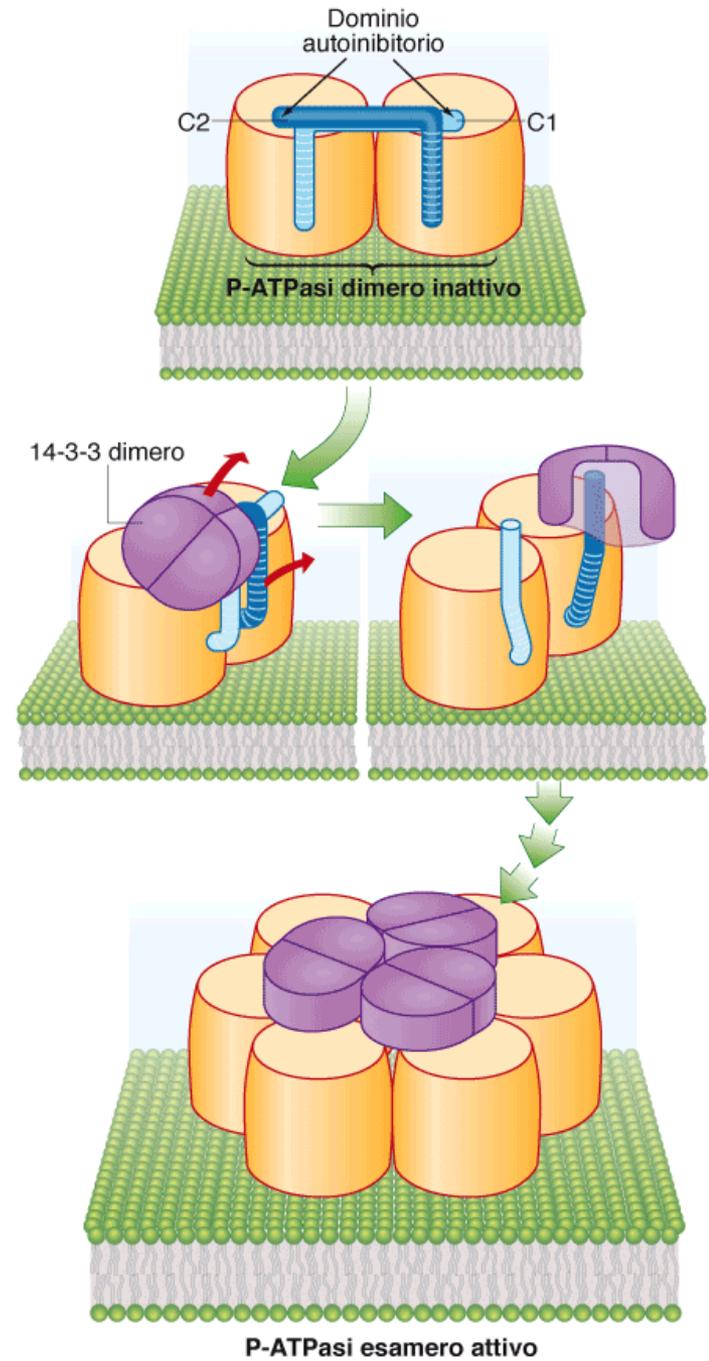
Attivazione della P-ATPasi tramite conversione di un dimero inattivo in esamero attivo:

1- fosforilazione del residuo di treonina (Thr947)

2- formazione di un complesso attivo tra la proteina attivante 14-3-3 e il dominio C-terminale

3- sequenziale associazione tra P-ATPasi e proteine 14-3-3 coinvolge altri dimeri:

esamero di P-ATPasi legato a 6 molecole di proteine 14-3-3-



## Le V-H<sup>+</sup> ATPasi del tonoplasto

### Some vacuolar pH values are acidic

Tissue	Species	pH
Fruits	Lime ( <i>Citrus aurantifolia</i> )	1.7
	Lemon ( <i>Citrus limonia</i> )	2.5
	Cherry ( <i>Prunus cerasus</i> )	2.5
	Grapefruit ( <i>Citrus paradisi</i> )	3.0
Leaves	Oxalis ( <i>Oxalis deppei</i> )	1.3
	Wax begonia ( <i>Begonia semperflorens</i> )	1.5
	Begonia 'Lucerna'	0.9-1.4
	Oxalis sp.	1.9-2.6
	Sorrel ( <i>Rumex</i> sp.)	2.6
	Prickly Pear at 6:45 AM	1.4
	<i>Opuntia phaeacantha</i> at 4:00 PM	5.5



Oxalis (acetosella)