

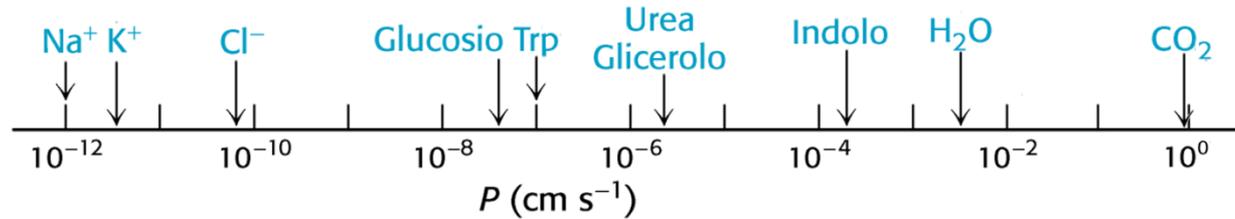
Modulo 6B

Trasporto Transmembrana

2022-23

TRASPORTO TRANSMEMBRANA

- ▶ La permeabilità di piccole molecole/ioni è correlata alla loro solubilità in ambiente apolare
- questo si riflette nei **coefficienti di permeabilità (P)** di soluti attraverso le membrane

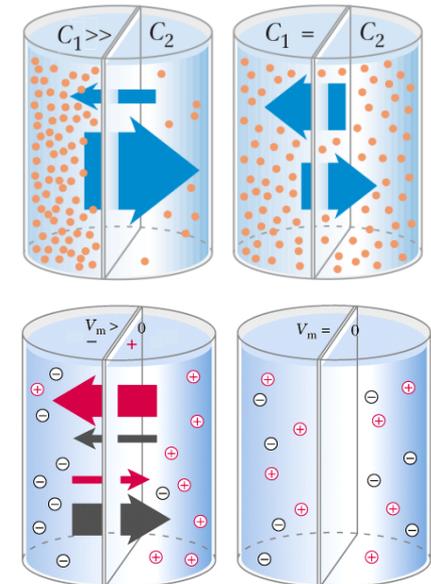


- gas, H_2O (*) e alcune sostanze lipofile (es. steroli) hanno sufficiente permeabilità e passano le membrane per **diffusione semplice**, da regioni di maggiore a minore concentrazione
- **molecole polari** o ioniche e ioni metallici hanno P di 10^9 volte inferiori a quello dell'acqua e **necessitano di sistemi proteici di transito o trasporto** attraverso le membrane.

▶ Il movimento di una molecola attraverso una membrana permeabile avviene in direzione della minor concentrazione

- si sposta in direzione del gradiente di concentrazione (gradiente chimico) fino a raggiungere l'equilibrio

- Il movimento di una molecola carica genera un gradiente elettrico transmembrana (potenziale di membrana V_M espresso in Volt o mV) e va in direzione del gradiente chimico ed elettrochimico (per diminuire il potenziale elettrico di membrana)



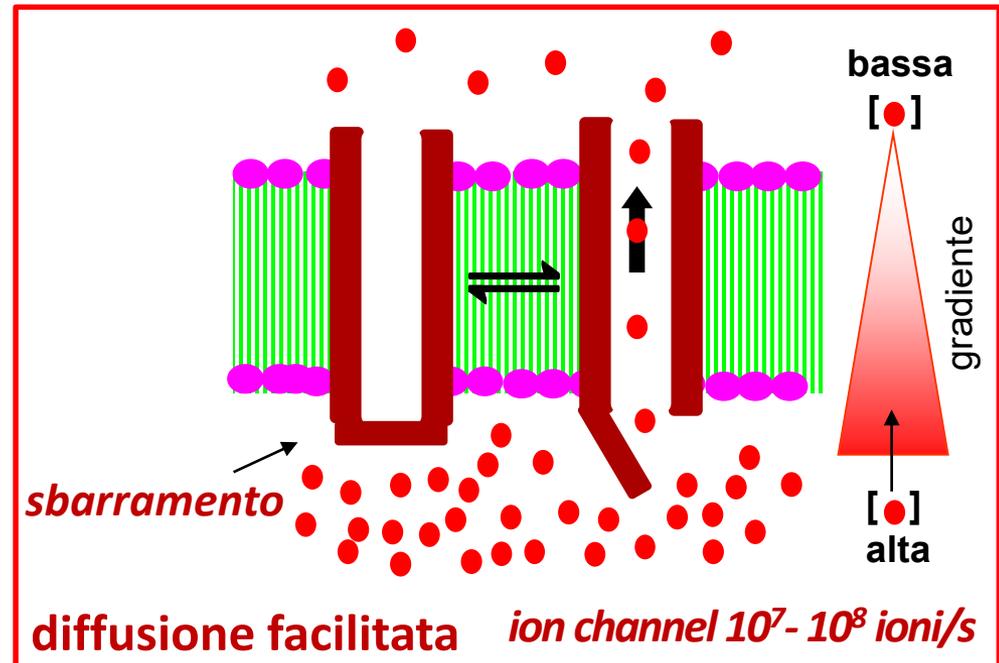
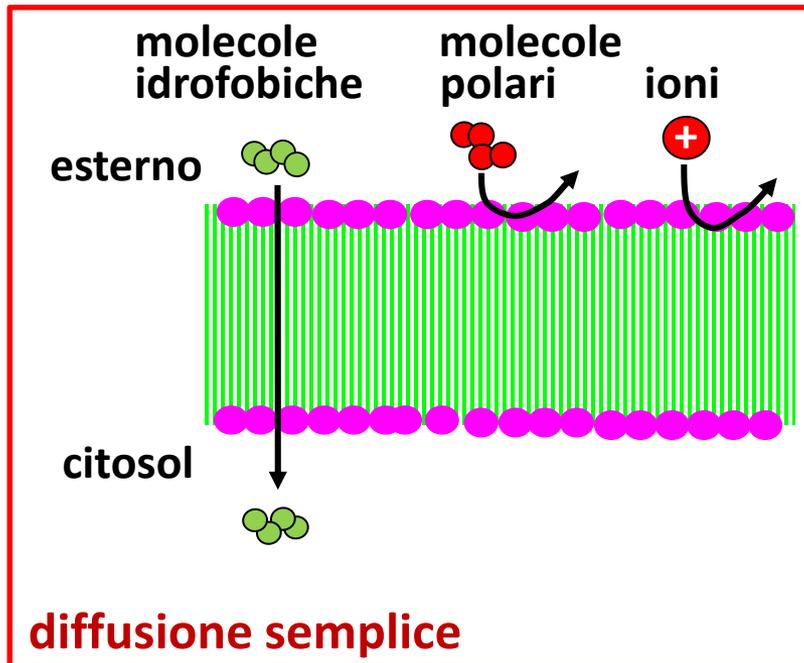
TRASPORTO TRANSMEMBRANA: DIFFUSIONE

- ▶ Le membrane biologiche sono impermeabili a molecole polari

Diffusione semplice: molecole idrofobiche e di gas le attraversano spontaneamente

Diffusione facilitata: gli ioni passano solo attraverso **canali** – complessi proteici integrali di membrana (PIM) che presentano un **poro con lume acquoso**

- i **canali per ioni** (*ion channels*) permettono il **transito selettivo di ioni** nella direzione del loro **gradiente di concentrazione** (da zone di più concentrazione a zone di meno)
- sono dotati **a)** di **sbarramenti** (*gated channels*) per un controllo preciso del flusso
- b)** di **filtri molecolari** che selezionano gli ioni che possono transitare



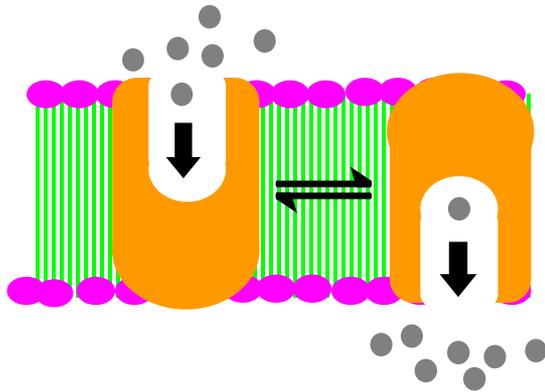
TRASPORTO TRANSMEMBRANA: TRASPORTATORI PROTEICI

- ▶ Molecole polare possono essere trasportate mediante un trasporto facilitato da parte di *trasportatori proteici* che possono agire in modo passivo o attivo

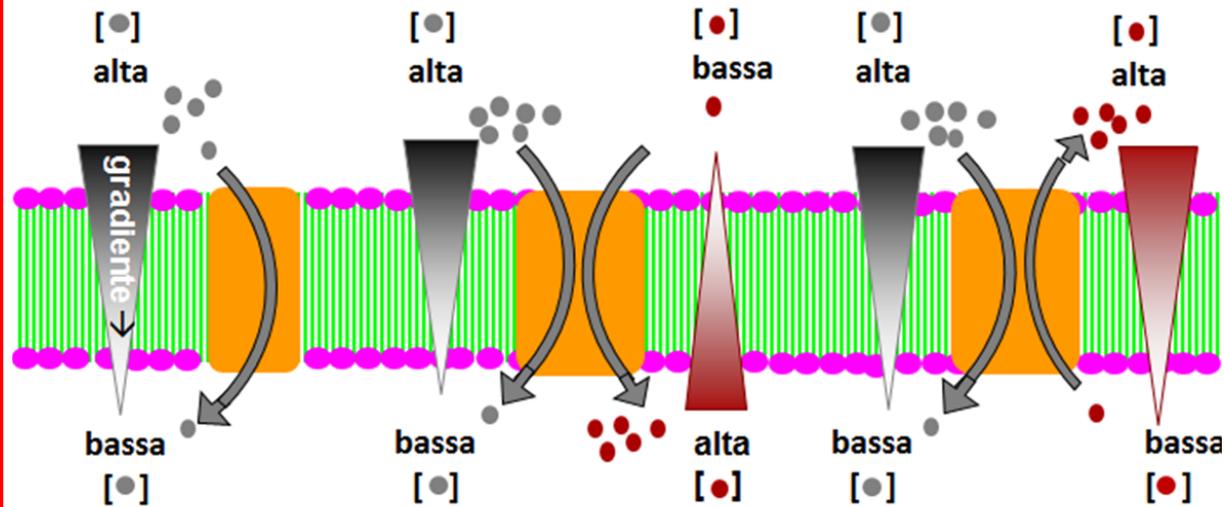
Trasportatori passivi: effettuano il trasporto di molecole in direzione del gradiente chimico

Trasportatori attivi: effettuano il trasporto in direzione opposta al gradiente chimico se questo è accoppiato con il trasporto di ioni o altre molecole in direzione del loro gradiente di concentrazione (che fornisce l'energia necessaria al trasporto contro gradiente)

Trasportatore
 $10^2 - 10^4$ molecole/s



Processo conformazionale di
inversione/eversione



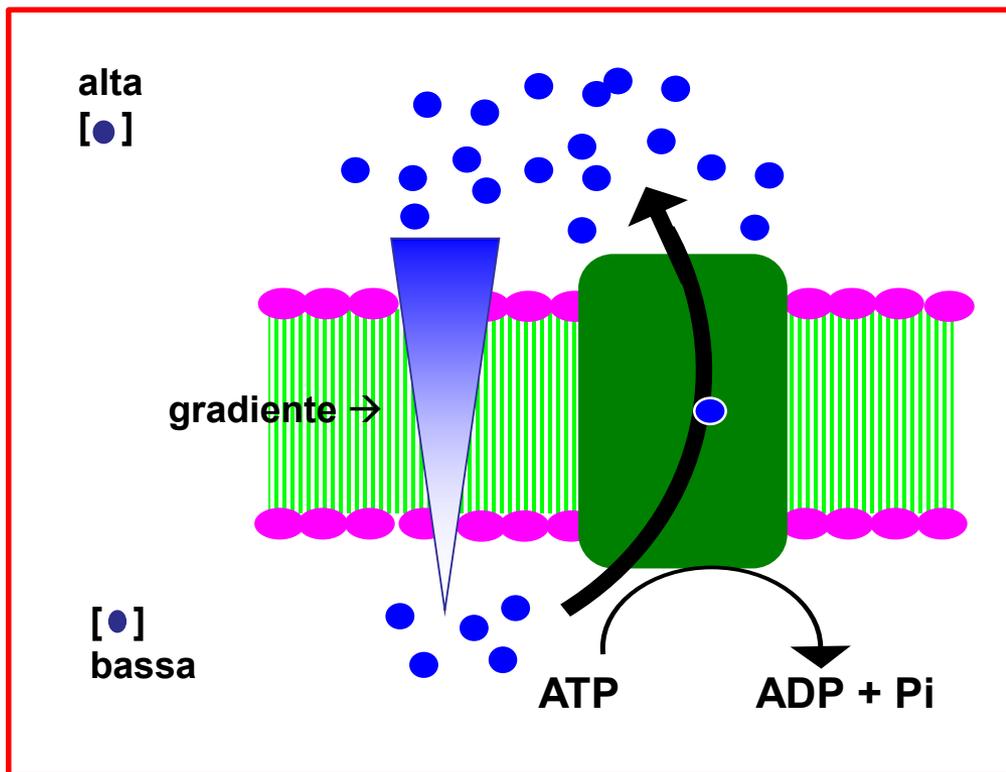
uniporto
trasporto passivo
(direzione del gradiente)

simporto |-----trasporto attivo-----|
antiporto
(contro gradiente)

TRASPORTO TRANSMEMBRANA: POMPE PROTEICHE

- ▶ Le pompe proteiche trasportano ioni contro il loro gradiente di concentrazione
- questo è un processo termodinamicamente sfavorevole che richiede energia
- Si ottiene:

- 1) dall'idrolisi di ATP
- 2) da energia elettromagnetica (fotoni)
- 3) dal potenziale di membrana chimico (gradienti di concentrazione) o elettrochimico (gradienti di carica)



**pompa ionica
(ATPasi di tipo P)**

1 – 10³ ioni/s

**Utilizza un processo di
inversione/eversione potenziato
dall'idrolisi di ATP**

TRASPORTO TRANSMEMBRANA: Ion Channels

- ▶ I canali per ioni sono proteine integrali di membrana (PIM) strutturate in modo da formare pori che permettono il flusso selettivo di ioni in direzione del loro gradiente chimico:

Na^+ extracellulare \rightarrow intracellular K^+ intracellulare \rightarrow extracellulare
 Ca^{2+} extracellulare \rightarrow intracellulare \leftarrow reticolo endoplasmatico

- i canali ionici si aprono in **maniera controllata** (*gated channels/canali con sbarramento*) e ci sono **tre tipi di controllo** sullo sbarramento:

Canale attivato da ligando (*ligand-gated channel*)

una molecola che si lega ad un sito recettoriale nel canale fa aprire lo sbarramento

Canale attivato meccanicamente (*mechanosensitive channel*)

il canale è attivato da stress meccanico che ne altera la conformazione

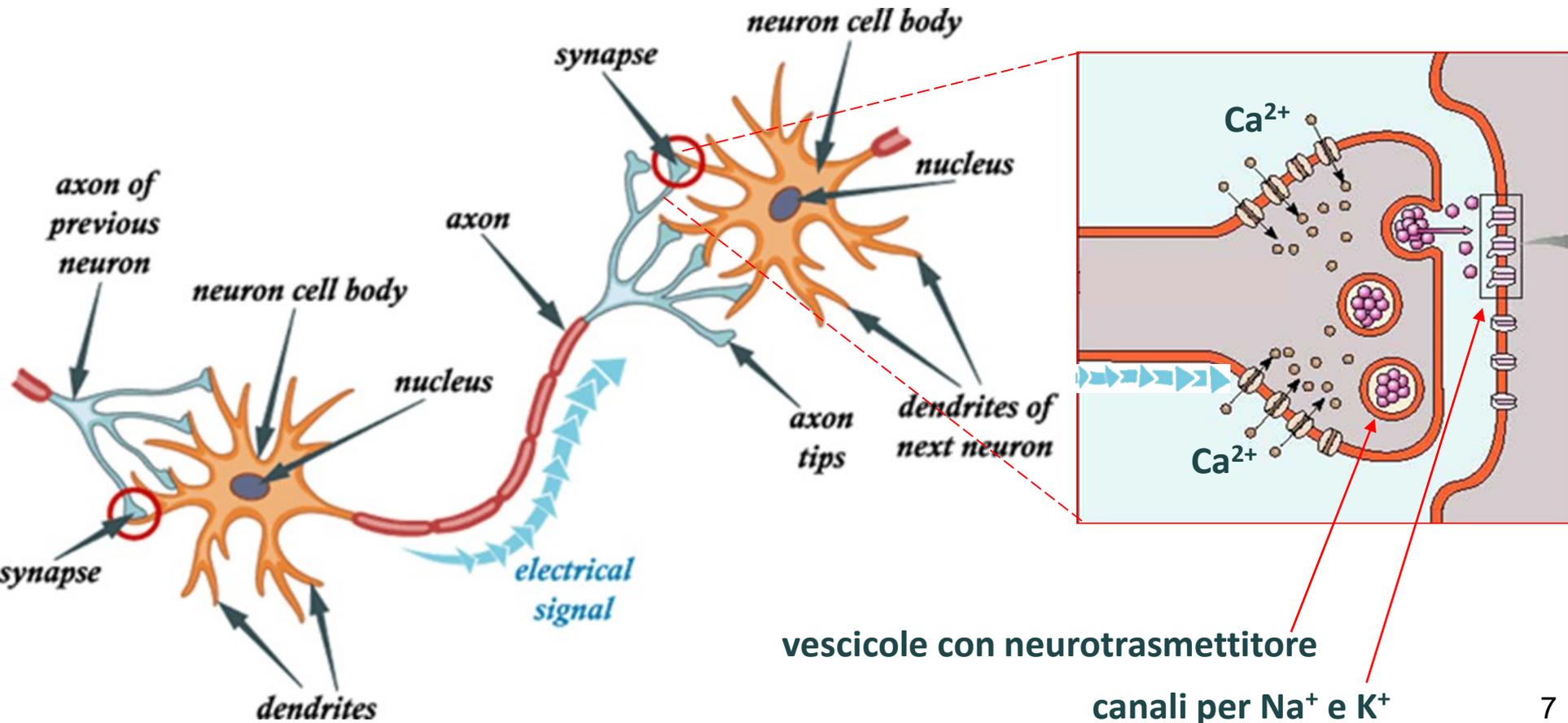
Canale attivato dal potenziale elettrico della membrana (*voltage-gated channel*)

la variazione del potenziale elettrico di membrana fa aprire lo sbarramento

- Per esempio, nella propagazione dell'**impulso nervoso**, il **potenziale d'azione** neuronale dipende dalla **variazione transitoria** del potenziale di membrana che si **propaga** lungo la membrana del neurone. È generata dalla **depolarizzazione/ripolarizzazione** locale della membrana mediante apertura/chiusura degli sbarramenti in canali *ligand-* o *voltage-gated* per Na^+ e per K^+ . **Udito, tatto ed equilibrio** dipendono da canali **meccanosensibili**.

LIGAND-GATED CHANNELS: l'impulso nervoso (cont.)

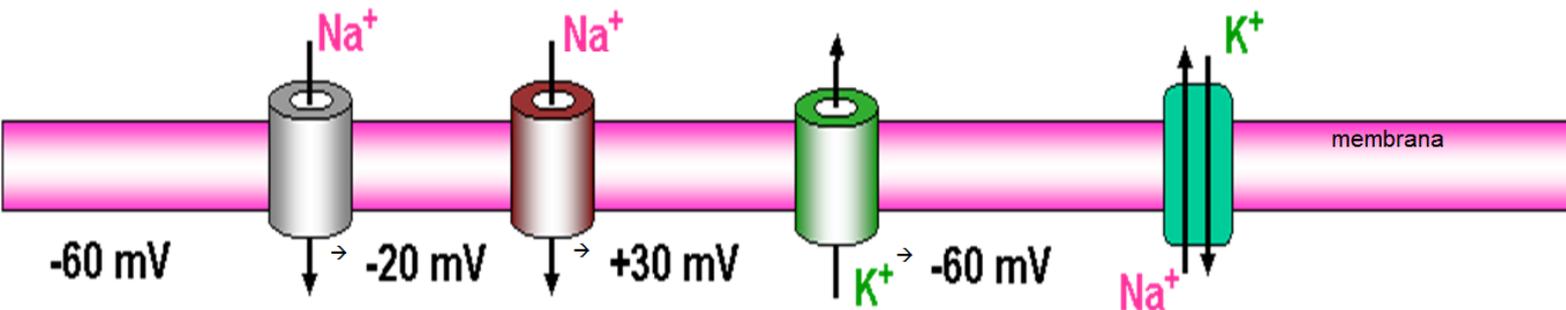
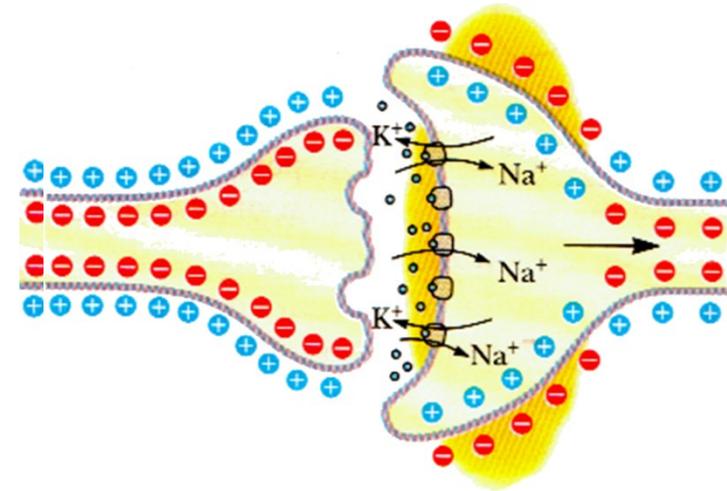
- ▶ L'impulso passa da un neurone ad un altro attraverso le sinapsi
 - dalla **sinapsi** di un neurone passa ai **dendriti** di un altro, e poi si **propaga lungo la membrana** assonale fino ad arrivare alla sinapsi del secondo neurone
 - qui causa il **rilascio di vescicole** che contengono il **neurotrasmettitore** che **trasmette il segnale** al successivo neurone, **attivando canali per il Na^+ e K^+**



LIGAND-GATED CHANNELS: l'impulso nervoso (cont.)

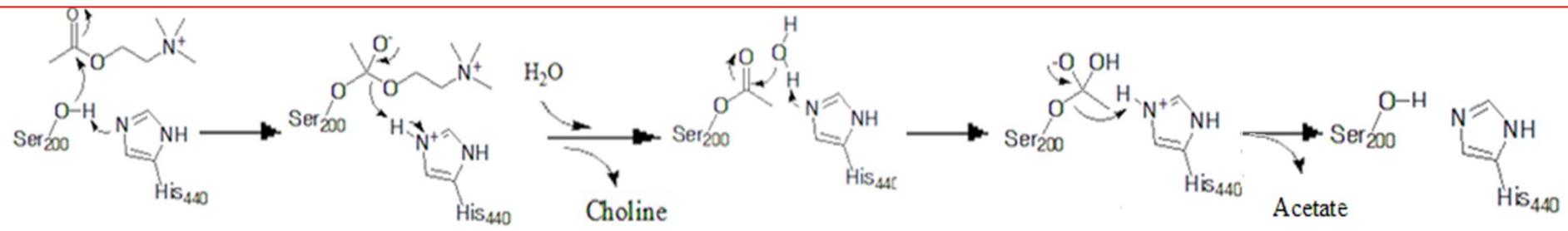
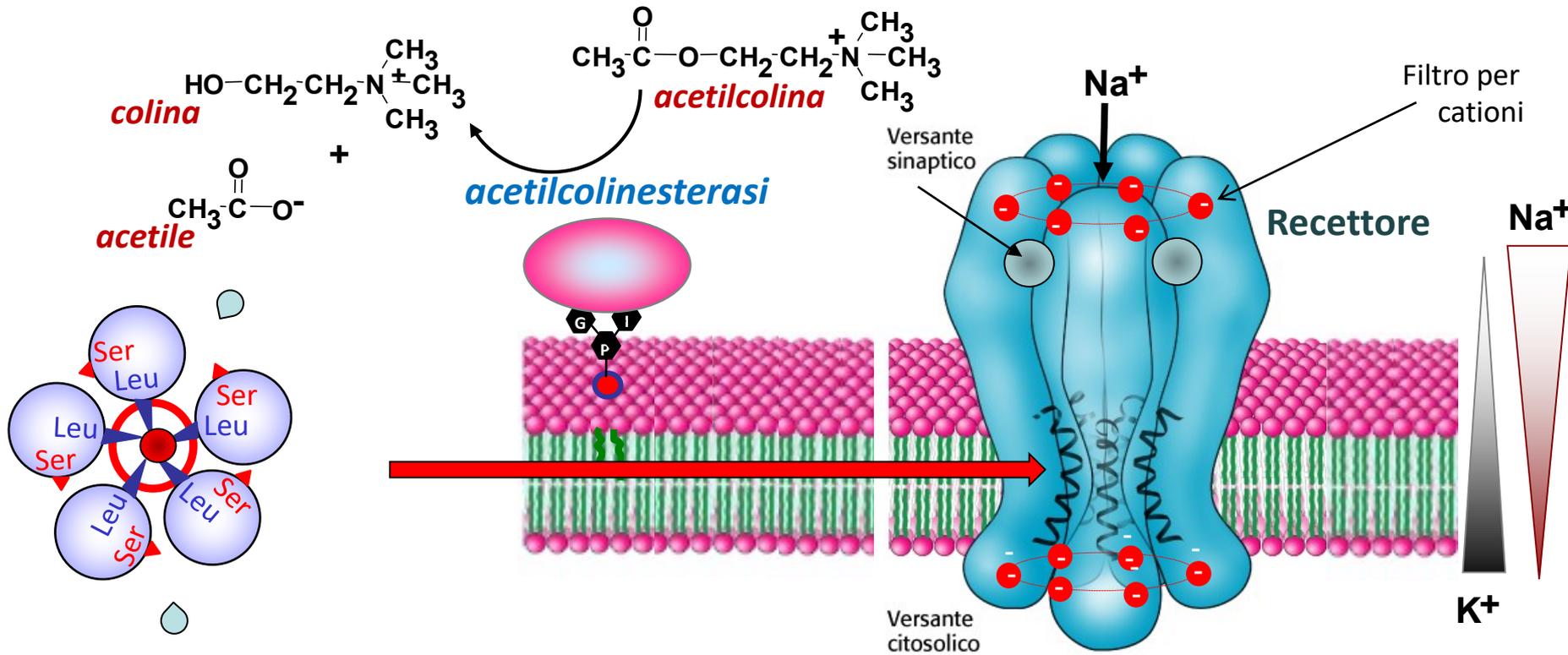
► Il neurotrasmettitore «acetilcolina» attiva un canale ligand-gated

- quando il **potenziale d'azione** giunge alla membrana pre-sinaptica di un neurone, causa l'**apertura di canali per il Ca^{2+}** che fluisce nella sinapsi e causa la **fusione di vescicole** contenenti AC con la membrana plasmatica, e suo rilascio nella fessura sinaptica
- ca. 300/400 vescicole fondono e **[AC] passa rapidamente da 10 nM ad oltre 500 μM** .
- sulla membrana post-sinaptica dell'altro neurone, e **attiva canali *ligand-gated* per Na^+**
- **la membrana si depolarizza** ($-60 \rightarrow -20 \text{ mV}$) che causa l'**apertura di canali *voltage-gated* per Na^+** ($-20 \rightarrow +30 \text{ mV}$), che a sua volta causa l'**apertura di canali *voltage-gated* per il K^+** ($+30 \rightarrow -60 \text{ mV}$)
- questo ripristina il potenziale elettrico e l'impulso si propaga ma poi deve anche essere ripristinato il gradiente di concentrazione di Na^+ e K^+ , ad opera della **pompa Na/K ATPasica**



ACETYLCHOLINE-GATED CHANNEL: Meccanismo d'azione

- ▶ Il recettore nicotino per l'acetilcolina è un canale *ligand-gated* attivato dall'AC
- Il legame di 2 molecole di acetilcolina attiva lo sbarramento, e la sua idrolisi da parte della *acetilcolinesterasi* lo disattiva



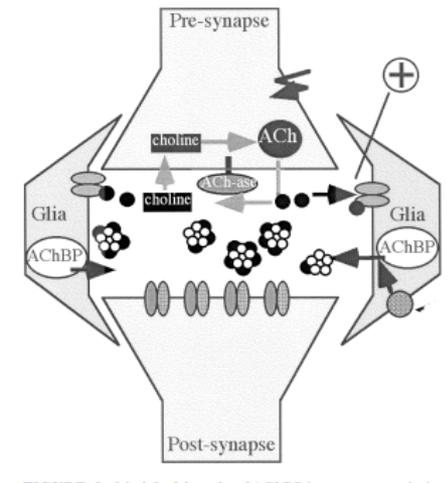
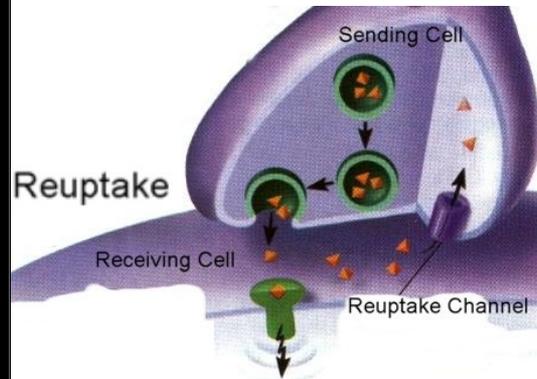
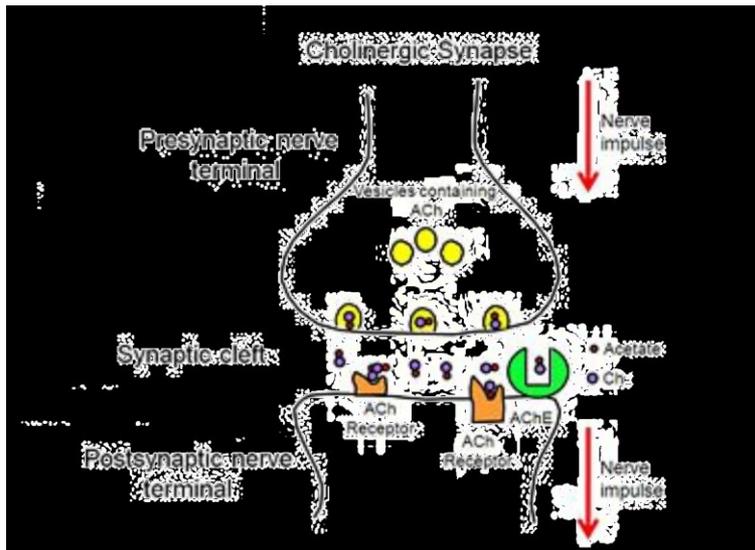
ACETYLCHOLINE-GATED CHANNEL: Meccanismi di disattivazione

► È importante che lo stimolo iniziae nell'impulso neroso sia rimosso rapidamente

1) **Via degradativa (idrolitica):**
un enzima idrolizza la
molecola segnale

2) **Ricaptazione (reuptake):**
trasportatori di membrana
allontanano diversi neuro_
trasmettitori dalla spazio
extracellulare

3) **Sequestro :**
Da parte di una proteina
solubile con sito di legame
simile a quello del sito
recettoriale



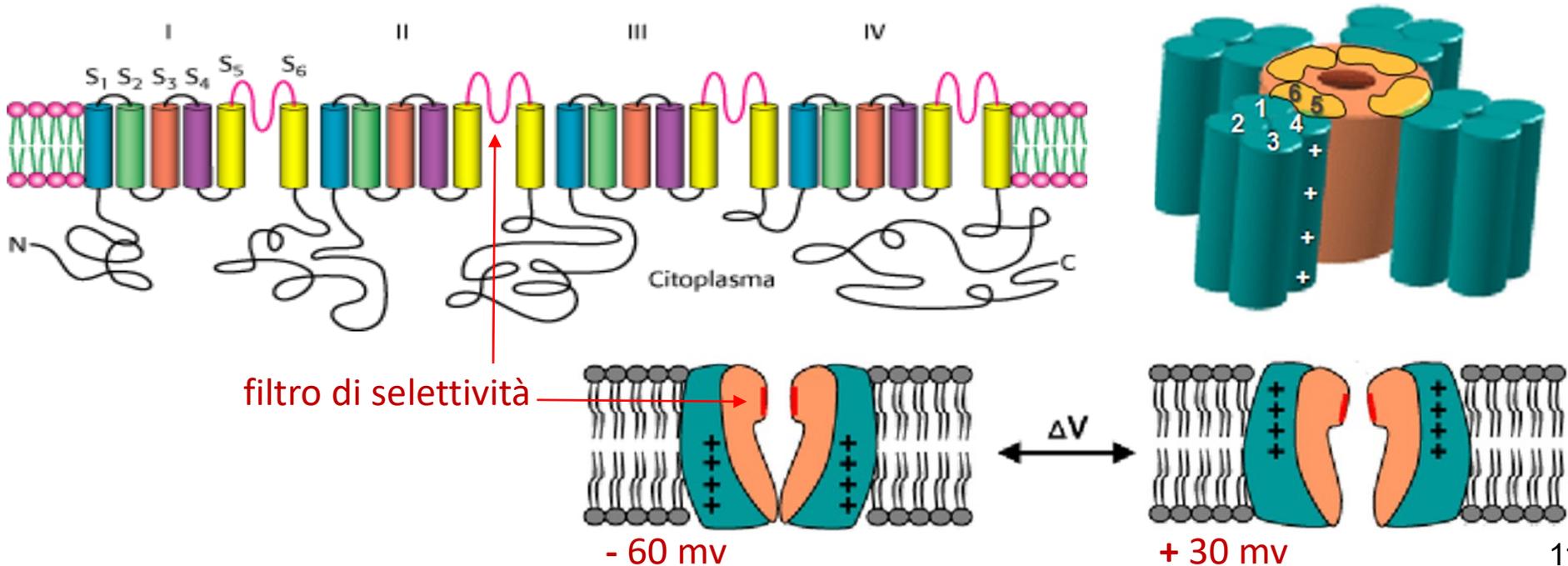
- la **acetilcolinesterasi** rimuove l'**acetilcolina** dalla superficie esterna della membrana post-sinaptica

- L'endocitosi ultrarapida permette di rimuovere molecole dallo spazio inter_sinaptico in meno di 100 ms

Le cellule gliali producono e rilasciano AcCh-binding protein nello spazio intersinampico

VOLTAGE-GATED CHANNELS

- ▶ I canali ionici attivati dal potenziale di membrana (*voltage-gated*) sono composti da più subunità identiche o diversi domini omologhi che si associano per formare il poro
 - I canali *voltage-gated* per Na^+ o K^+ sono composti da 4 subunità (o da 4 domini) transmembrana, ciascuna/o formata/o da 6 α -eliche TM, delle quali 5 sono costituite principalmente da residui idrofobici (situazione tipica per segmenti TM) mentre una (la S4) è ricca di residui cationici (Lys o Arg ogni tre residui – situazione inusuale per segmenti TM)
 - queste sequenze sono molto conservate nei canali presenti in diverse specie, indicando la loro importanza funzionale (sono i sensori per il potenziale) poiché i residui carichi inserite in un ambiente lipidico (costante dielettrica basso) risentono molto le variazioni di potenziale

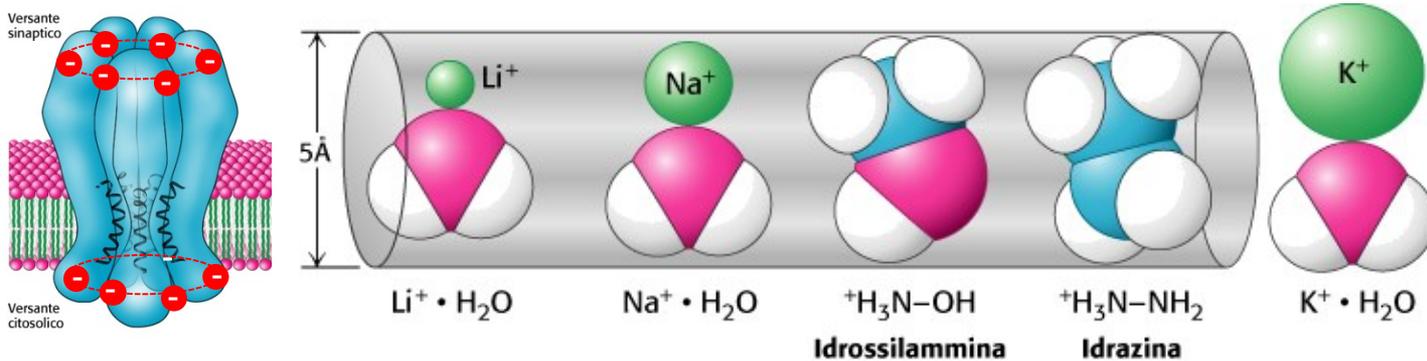


SELETTIVITÀ e DISATTIVAZIONE dei canali ionici

► Una volta attivato lo sbarramento i canali permettono il flusso di ioni in modo selettivo

- Il lume dei pori nei canali ionici è altamente selettivo:

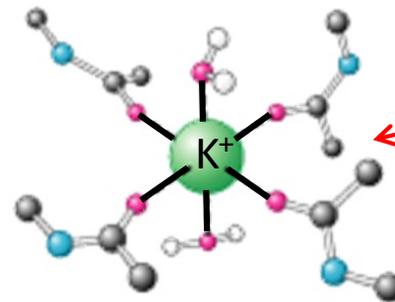
- 1) anelli di residui acidi (Glu, Asp) ai bordi del poro determinano la selettività per transito di cationi
- 2) fattori sterici (dimensioni del poro) determinano la selettività per il tipo di catione



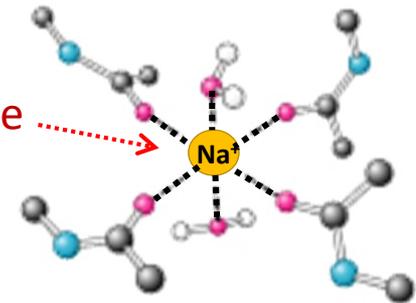
NB: le dimensioni dello ione sono quelle della **forma idratata**

- il canale per Na^+ ha le corrette dimensioni $\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ma non $\text{K} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (preferenza = 11).

- il canale per K^+ è **più stretto** e foderato con catene laterali polari che possono *transitoriamente* sostituire H_2O per K^+ ma non per Na^+ (le distanze non sono corrette)



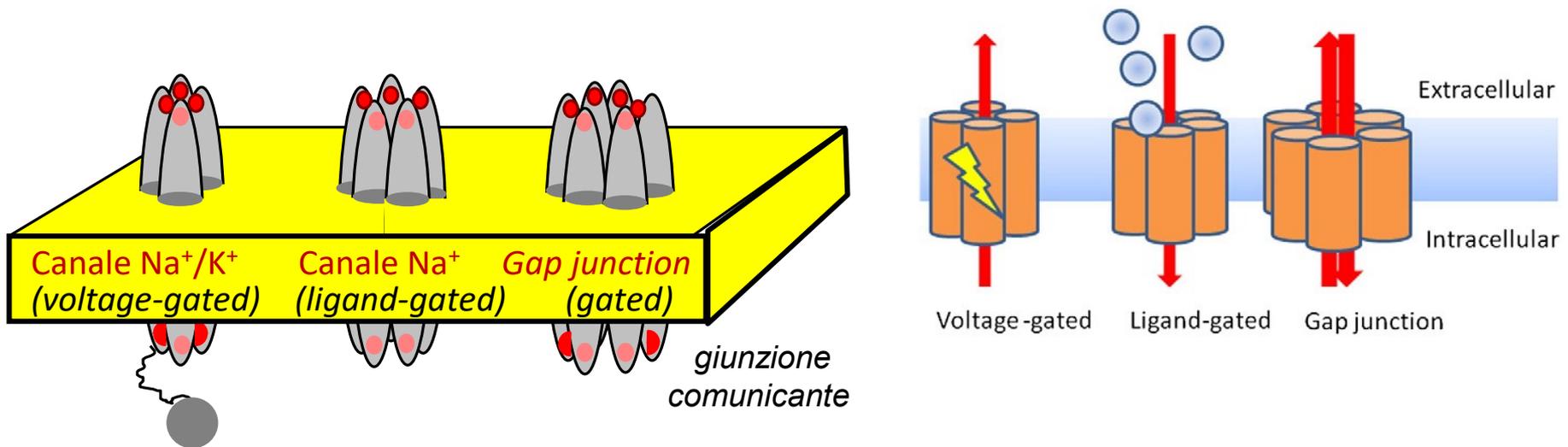
pseudoidratazione



I canali per ioni hanno strutture modulari

► Gli *ion-channels* mostrano motivi ricorrenti:

- sono costituiti da **subunità multiple** (es. canali per K) o da **domini omologhi multipli** (es. canali per Na o Ca)
- in genere sono formati da **4** (voltage gated), **5** (ligand gated) o **6** (ligand and voltage-gated) subunità o domini
- il **lume del poro** si colloca lungo l'asse di simmetria del canale ed è foderato da amino acidi provenienti dalle diverse subunità.
- La **selettività** è determinata da **anelli di residui carichi** attorno all'accesso e dal diametro della **parte più stretta del lume** (filtro di selettività); più unità formano il canale, meno selettivo è
- i canali sono generalmente **proteine allosteriche** controllate da fattori esterni quali il legame di effettori allosterici, il potenziale di membrana, effetti meccanici, oppure fosforilazione



POMPE IONICHE – ATPasi di tipo P

- ▶ Le pompe molecolari sono complessi proteici transmembrana che trasportano ioni contro il loro gradiente chimico (di concentrazione).
- il nome deriva dal fatto che **idrolizzano ATP (ATPasi)** e che sono **transitoriamente fosforilate (P)**
- la pompa Na/K ATPasi è vitale per i neuroni e altre cellule perché **ripristina i gradienti ionici** cellulari, **portando fuori 3 Na⁺ e dentro 2 K⁺** dalla cellula
- questo processo richiede da un sistema di **trasporto attivo**, con input di energia
- se gli ioni sono trasportati anche contro il potenziale elettrico, l'energia libera è data da:

gradiente chimico

gradiente elettrochimicocali

$$\Delta G = RT \ln \frac{[\text{ione}]^{\text{int}}}{[\text{ione}]^{\text{ext}}} + z\Delta V$$

F = cost. di Faraday (23 kcal/mol/V)

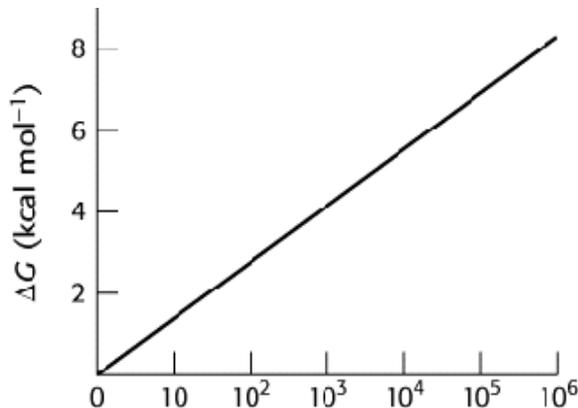
ΔV = potenziale transmembrana

z = carica

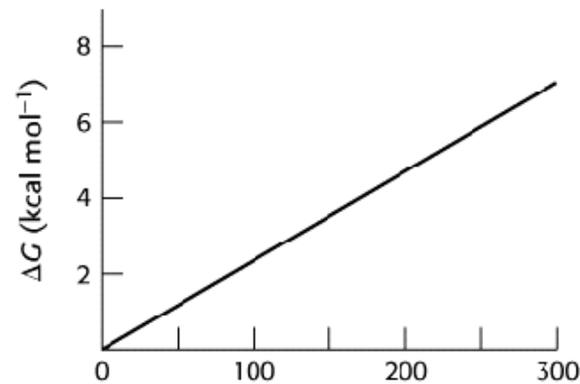
R = costante dei gas

T = temperatura (Kelvin)

- se ΔG è negativo il trasporto è per diffusione passiva
- se ΔG è positivo, il trasporto non spontaneo e avviene solo se accoppiato all'idrolisi di ATP



(A) Rapporto tra le concentrazioni (c_2/c_1)



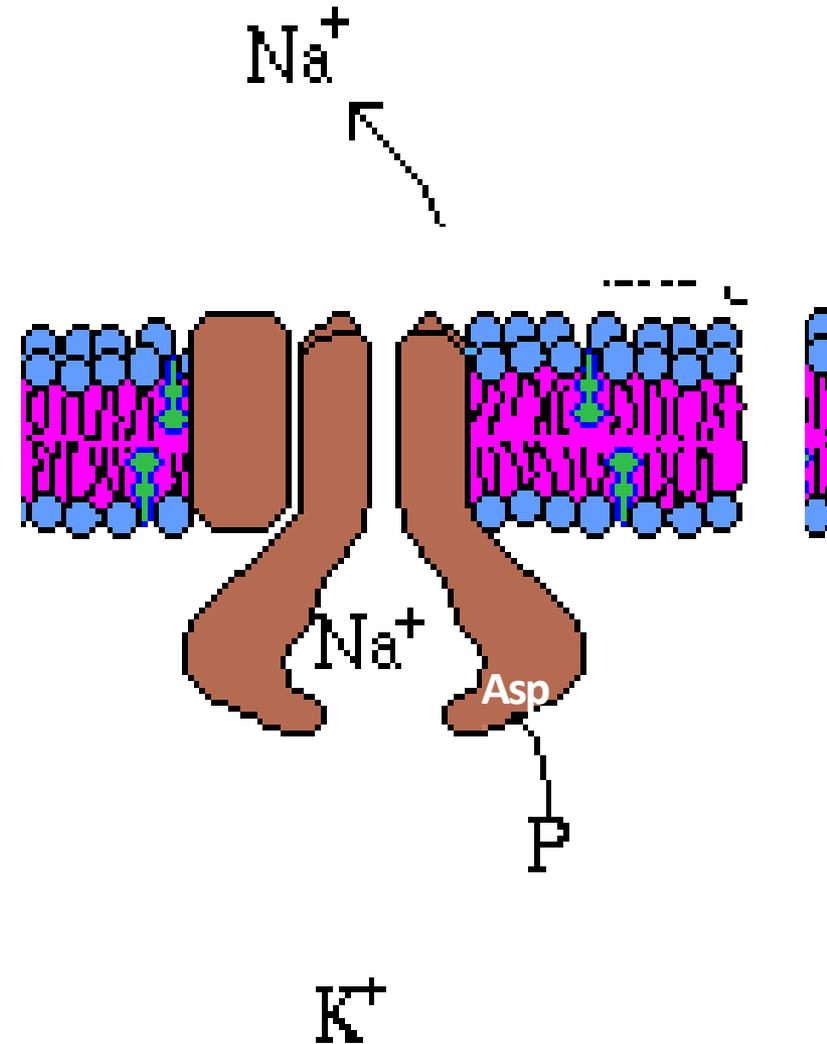
(B) Potenziale di membrana (mV)

POMPA Na/K ATPasi

► La pompa Na-K si trova è il più chiaro esempio di trasporto attivo primario di ioni attraverso la membrana plasmatica:

- complesso **omodimerico** (270 KDa) in grado di es
- ATP si lega solo se $[Na]^{int}$ è elevato ed utilizza il r
dell'*eversione/inversione*

- 1) Na^+ lega sul alto citoplasmatico della pompa (elevata affinità, che **favorisce il legame di ATP**
- 2) con l'intrinseca attività di *ATPasi* idrolizza ATP trasferendo un fosfato su un **residuo di Asp**
- 3) questo causa l'*eversione* dell'impalcatura prot che presenta Na^+ all'esterno, **perdendo affinità rilasciandolo** anche se $[Na]$ qui è elevata
- 4) la nuova conformazione ha un'**affinità elevata** che lega e questo **causa le defosforilazione** del Asp, portando all'**inversione dell'impalcatura pro**
- 5) la conformazione iniziale **perde affinità per K^+** e lo rilascianda anche se $[K]$ qui è elevata
- 6) Questo causa l'inversione, iniziando un nuovo ciclo



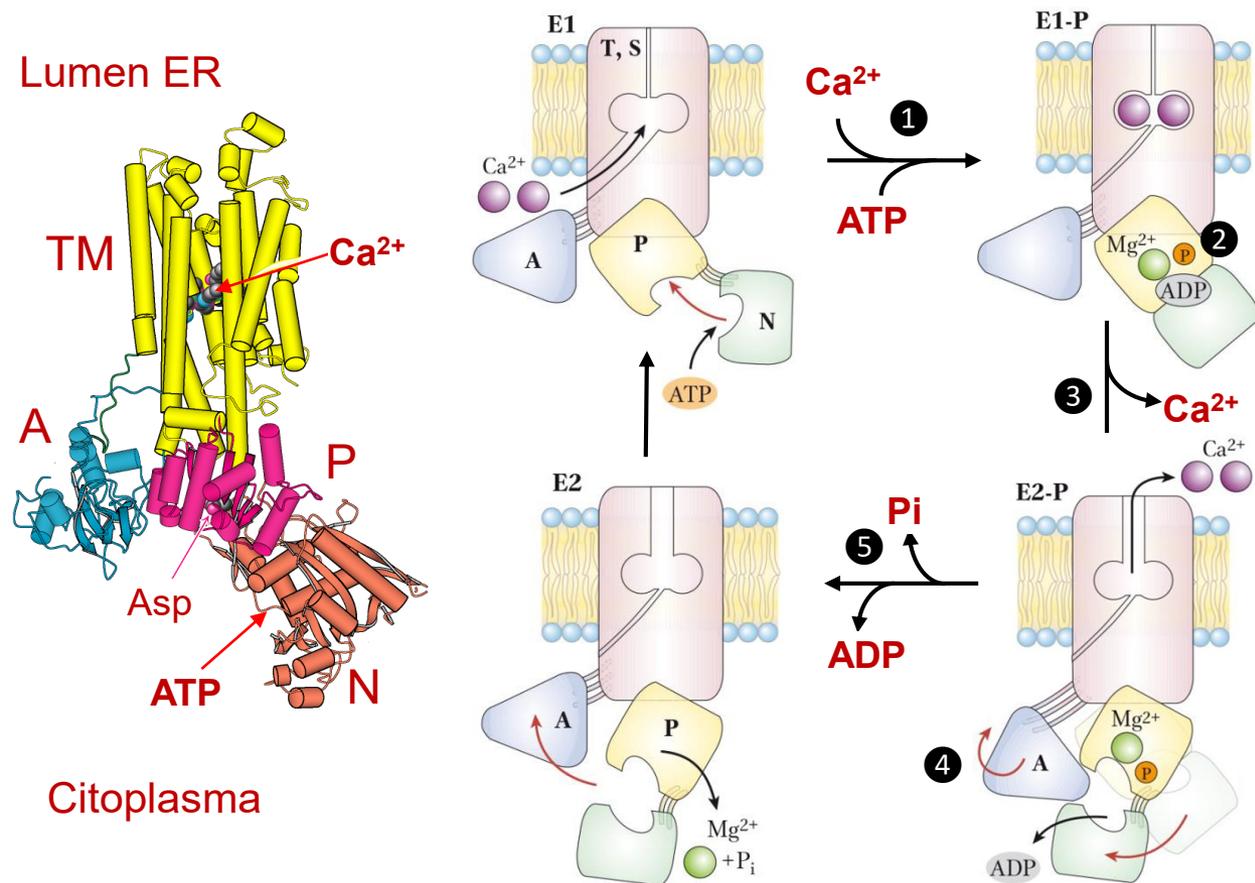
POMPA Ca^{2+} ATPasi

► La pompa per Ca^{2+} del reticolo sarco-endoplasmatico (SERCA) trasferisce rapidamente 2 Ca^{2+} dal citoplasma al reticolo sarcoplasmatico promuovendo il rilassamento muscolare

- complesso **omodimerico** (270 KDa) in grado di estromettere **2 Ca^{2+}** dal citoplasma

- è un'unica catena con 4 domini funzionali che adotta due diverse conformazioni E1 ed E2:

i) dominio TM dove lega il Ca^{2+} ; ii) dominio A citoplasmatico (adattatore); iii) dominio P (fosforilazione); iv) dominio N (legame nucleotide)



- 1 **E1**: alta affinità per Ca^{2+} , legano Ca^{2+} a **TM** e ATP al dominio **N** → **E1-P**
- 2 **E1-P**: idrolisi di ATP e fosforilazione di Asp nel dominio **P** → **E2-P**
- 3 **E2-P**: Esposizione dei siti del Ca^{2+} verso il lato esterno con affinità ridotta, Ca^{2+} si stacca
- 4 La perdita di Ca^{2+} promuove il movimento del dominio **A** che causa la perdita di ADP
- 5 Il dominio **P** si defosforila **EP-2** → **E2**
- 6 **E2**: il dominio A torna alla conformazione iniziale e la conformazione **TM** → **E1**

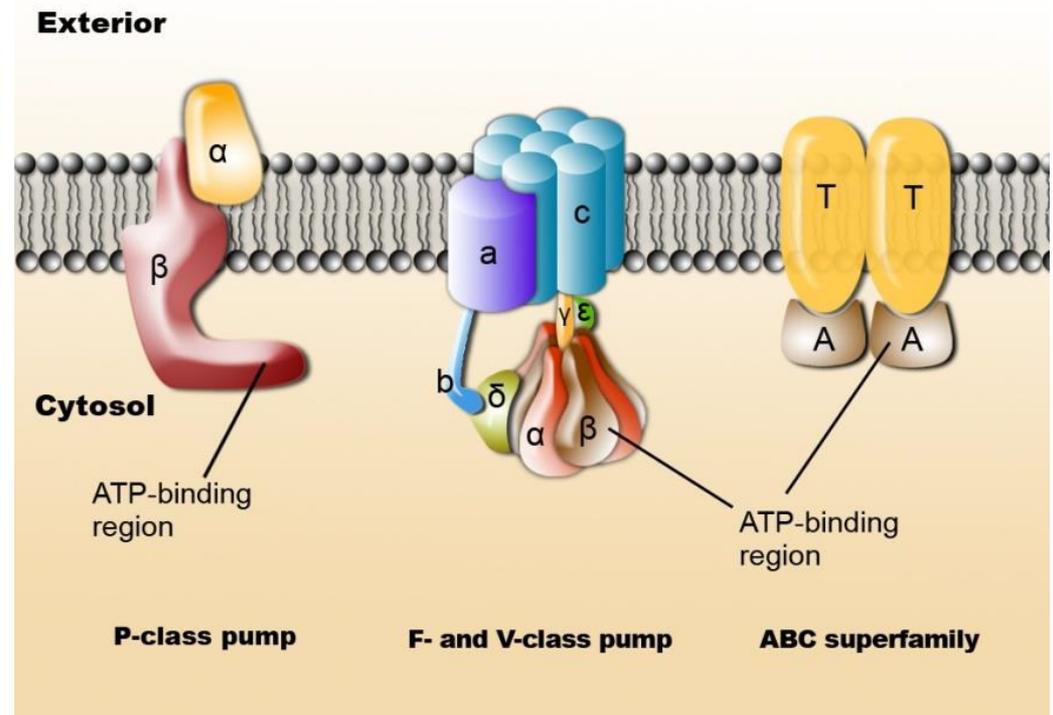
ALTRI TIPI DI TRASPORTATORI ATTIVI

► Altri trasportatori utilizzano l'idrolisi di ATP:

1) **ATPasi di tipo V (vacuolari):** trasportano protoni (H^+) e sono responsabili per acidificazione di compartimenti come i lisosomi e gli endosomi

2) **ATPasi di tipo F (ATP sintasi):** trasportano protoni (H^+) ma in genere funzionano al contrario, cioè come *ATP sintasi*. Un flusso di protoni in direzione opposta promuove la condensazione di ADP e Pi per formare ATP (processo della *fosforilazione ossidativa* e della *fotofosforilazione*).

3) **Trasportatori ABC:** trasportano attivamente e selettivamente molte sostanze: **amminoacidi, polipeptidi, ioni metallici, lipidi** e altre **sostanze idrofobiche** all'interno della cellula utilizzando l'ATP come fonte energetica (**ABC = ATP Binding Cassette**).

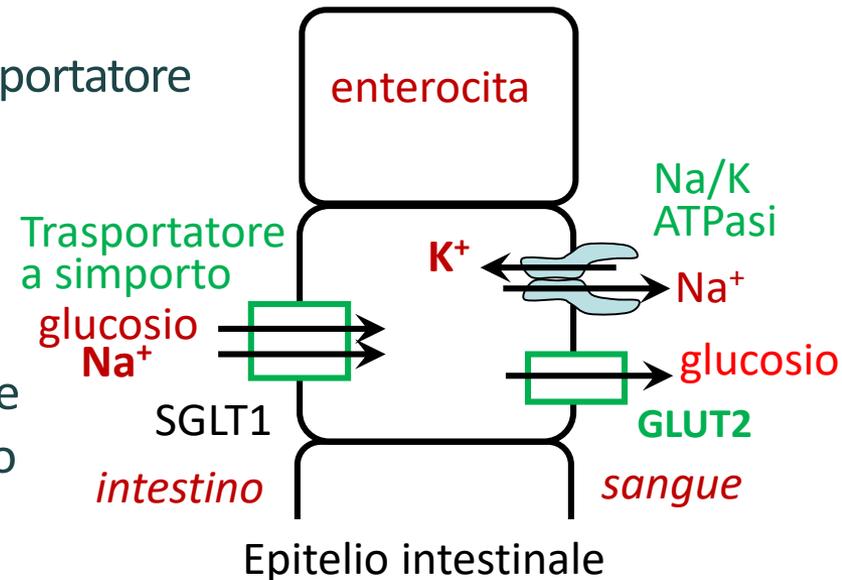


TRASPORTO DI METABOLITI: trasporto del glucosio

► Diversi trasportatori collaborano per il trasporto trans-membrana di metaboliti necessari per le cellule. La loro azione segue uno schema specifico:

- 1) riconoscimento specifico
- 2) traslocazione (secondo gradiente o potenziata)
- 3) rilascio nel citoplasma
- 4) ritorno alla condizione iniziale

Esempio 1: digestione del glucosio richiede un trasportatore a simporto per trasportare glucosio sfruttando il potenziale del Na^+ e poi utilizza un trasportatore a uniporto (GLUT2) per traslocarlo nel sangue



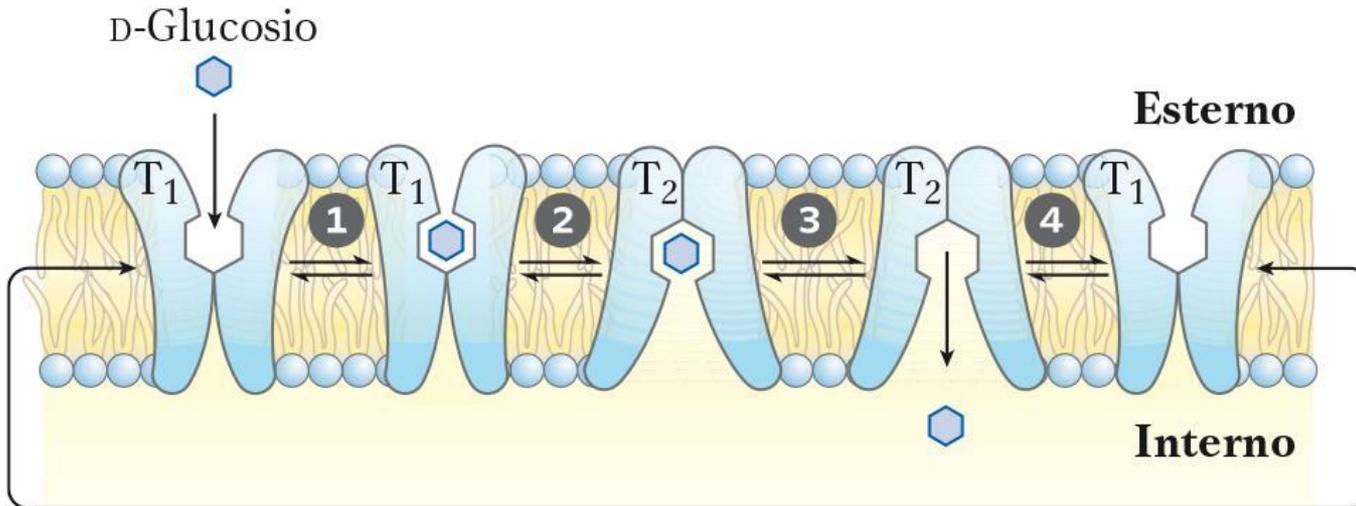
- i **GLUT** sono una famiglia di trasportatori a 12 eliche transmembrana che mediano la traslocazione dello zucchero in direzione del suo gradiente chimico

- **GLUT 1**: tutte le cellule ($K_t \sim 5 \text{ mM Gluc}$) captazione basale
- **GLUT 2**: fegato, pancreas e enterociti ($K_t 15\text{-}20 \text{ mM Gluc}$) captazione se abbondante
- **GLUT 3**: neuroni ($K_t < 2 \text{ mM Gluc}$) captazione anche in carenza
- **GLUT 4**: cellule muscolari e adipose ($K_t \sim 5 \text{ mM Gluc}$) varia con $[\text{Gluc}]$ (regolato dall'insulina)

Trasportatori GLUT: meccanismo d'azione

► Modello di trasporto del glucosio da parte dei GLUT

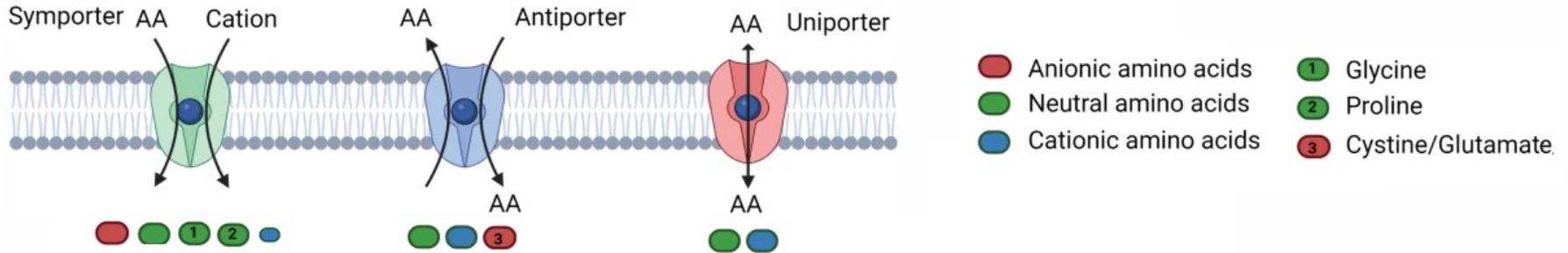
- ci sono **2 conformazioni alternative** T1 e T2; **T1 apre all'esterno, T2 apre all'interno** e si alternano mediante il meccanismo di inversione/eversione
- ognuna legare il glucosio con **siti di legame esposti sui diversi lati** della membrana
- il **trasporto avviene in entrambe le direzioni**; la direzione **dipende dal gradiente di concentrazione**
- l'**affinità è selettiva** e minore per altri zuccheri (~5 volte per epimeri, 1000 volte per L-glucosio)
- ci sono **12 isoforme di GLUT nell'uomo** con diversi K_t per la molecola da trasportare.



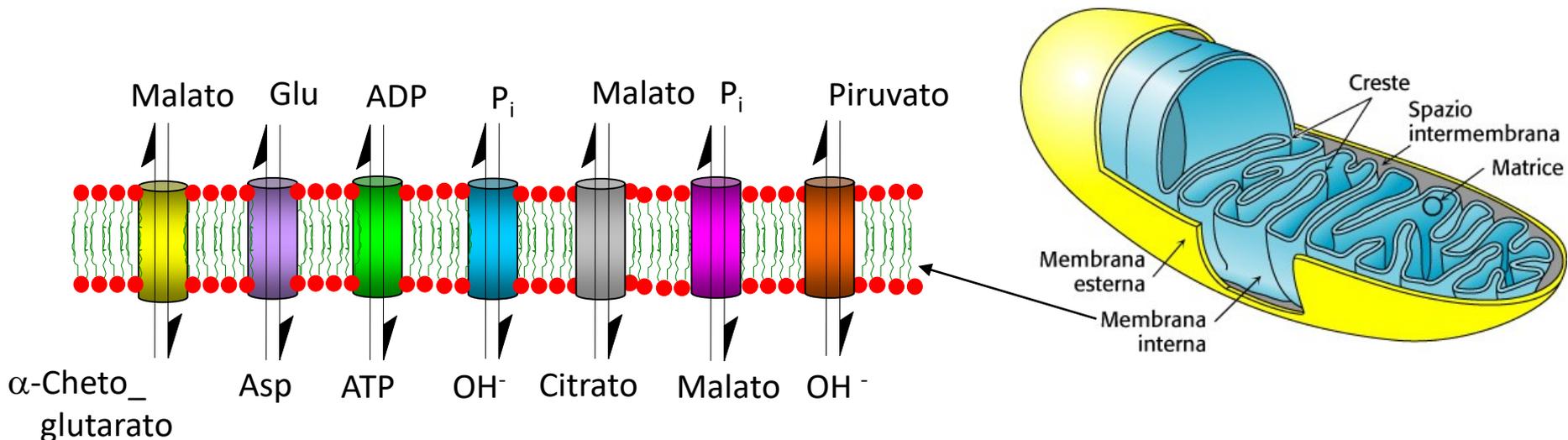
(glucosio non in scala rispetto a trasportatore e membrana)

Trasportatori per aminoacidi e mitocondriali

- ▶ **Trasportatori per aminoacidi:** ci sono > 60 diversi trasportatori per aminoacidi che permettono di concentrare gli AA assunti con la dieta nelle cellule
- Sono di 3 diversi tipi a seconda di se trasportano l'AA in direzione del loro gradiente (uniporto) o lo fanno potenziati dal gradiente di uno ione (es Na/AA transporter) o di un altro AA (antiporto)



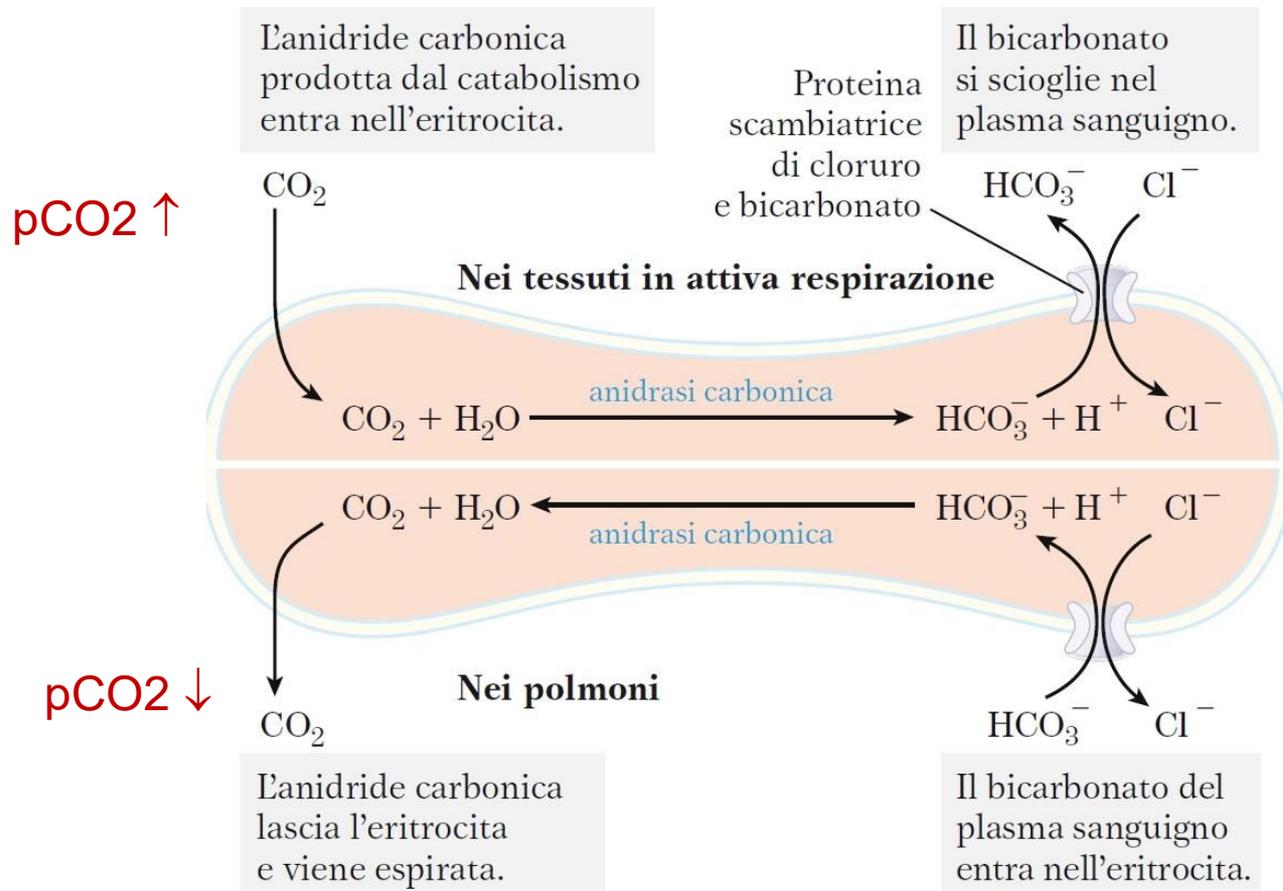
▶ I trasportatori mitocondriali trasportano metaboliti necessari per la sintesi di ATP



Trasportatori del bicarbonato negli eritrociti

► HCO_3^- è trasportato negli eritrociti da un sistema di antiporto con Cl^-

- lo scambiatore $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ nella membrana dell'eritrocita consente l'ingresso e l'uscita di HCO_3^- senza variare il potenziale elettrico della membrana, e permette di trasportare CO_2 nel sangue
- dipende da pCO_2 e lo scambio è **elettro-neutrale**; non c'è un netto spostamento di carica



SISTEMI DI TRASPORTO TRANSMEMBRANA (Riassunto)

Diffusione semplice

(molecole apolari secondo il gradiente di concentrazione)

Diffusione facilitata

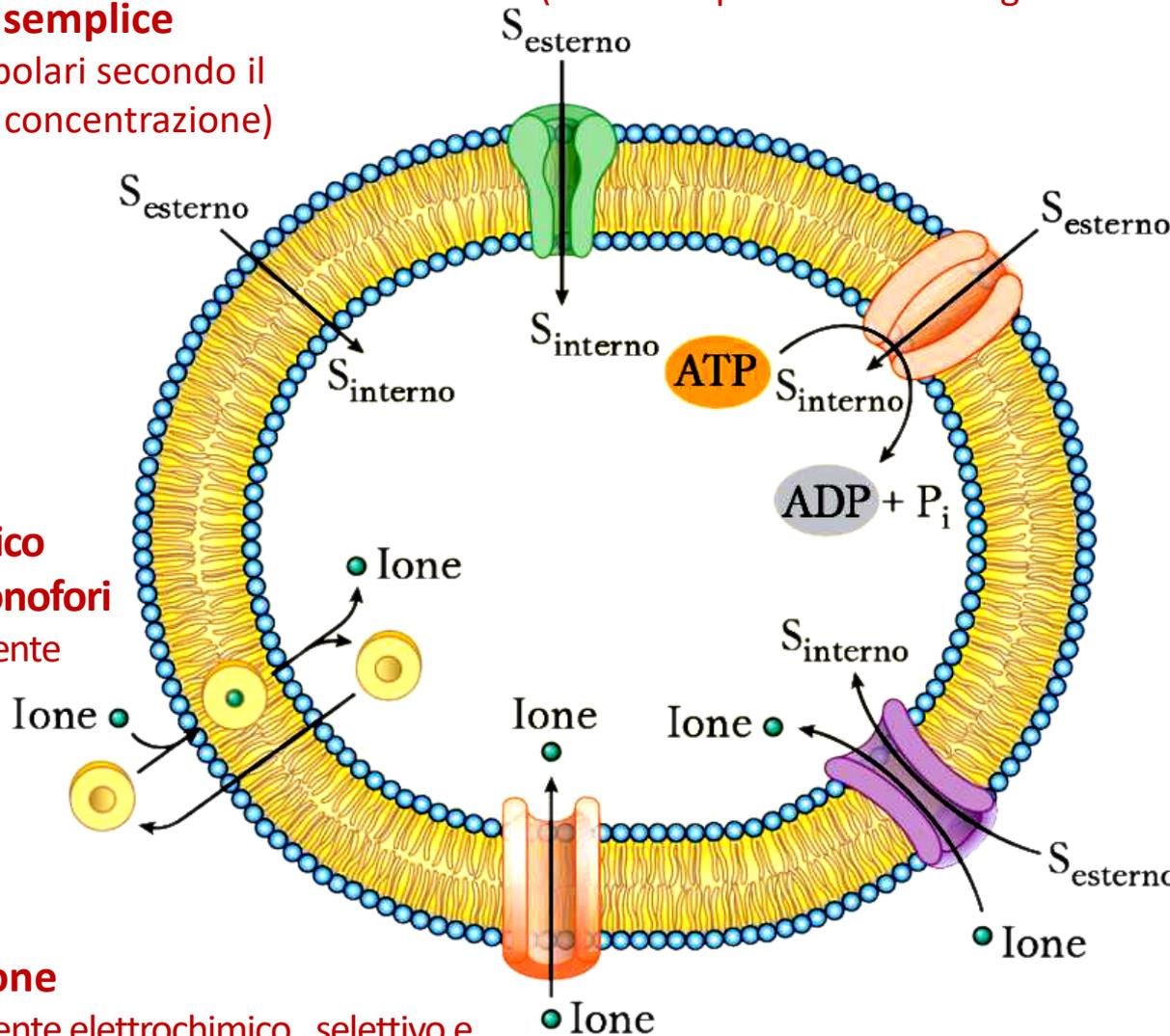
(molecole polari secondo il gradiente elettrochimico)

Trasporto attivo 1°

(contro gradiente elettrochimico con idrolisi di ATP)

Trasporto attivo 2°

(contro gradiente elettrochimico potenziato dal movimento di uno ione in direzione del proprio gradiente elettrochimico)



Trasporto ionico mediato da ionofori

(secondo gradiente elettrochimico)

Canale per ione

(secondo gradiente elettrochimico, selettivo e con sbarramento attivato da ligando, potenziale di membrana e meccanicamente)