

Trasporto di soluti attraverso membrane biologiche

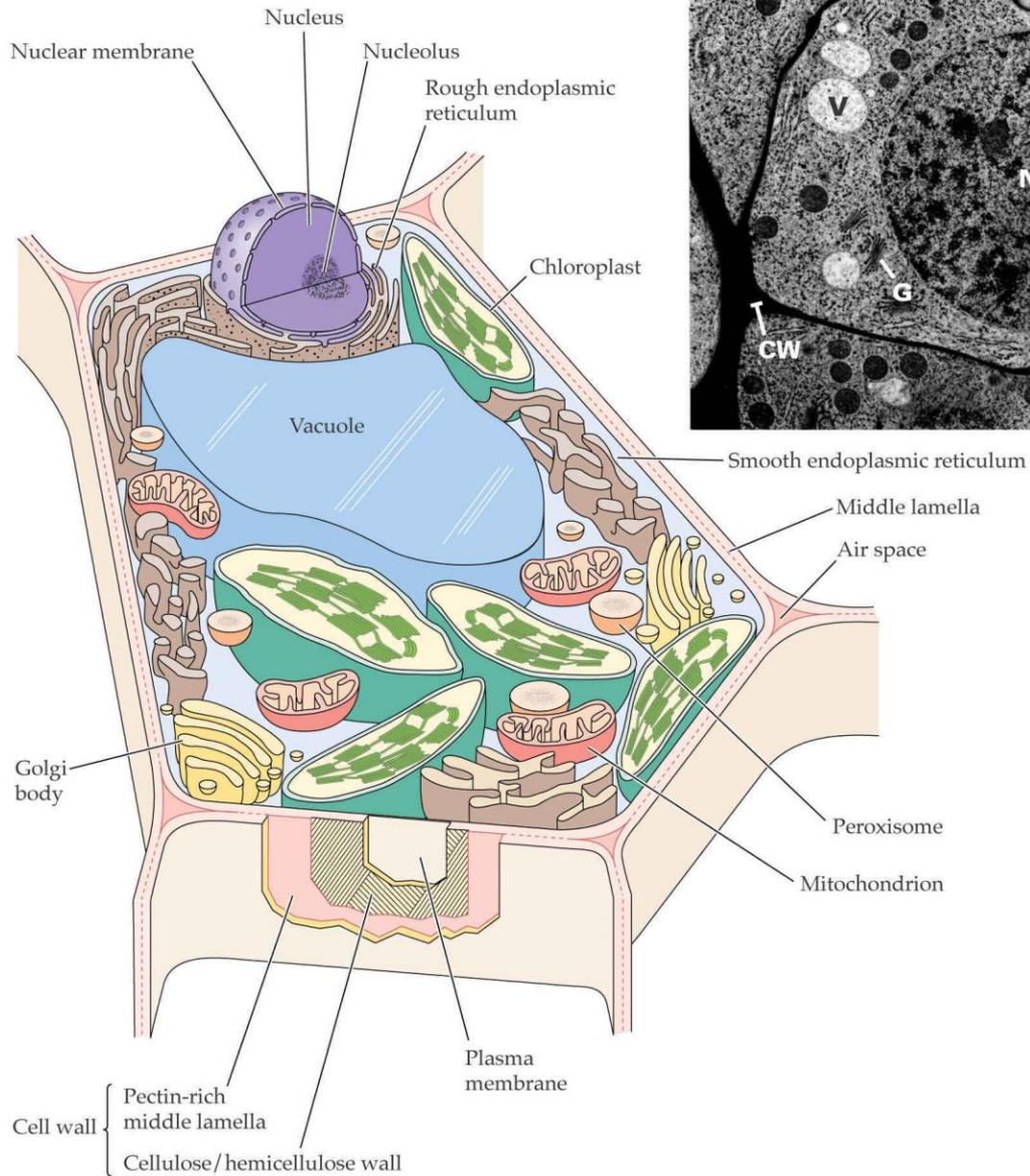
La possibilità di controllare la composizione dell'ambiente interno cellulare in funzione di diverse condizioni ambientali è fondamentale per la vita

Eucarioti → **Sviluppo endomembrane**

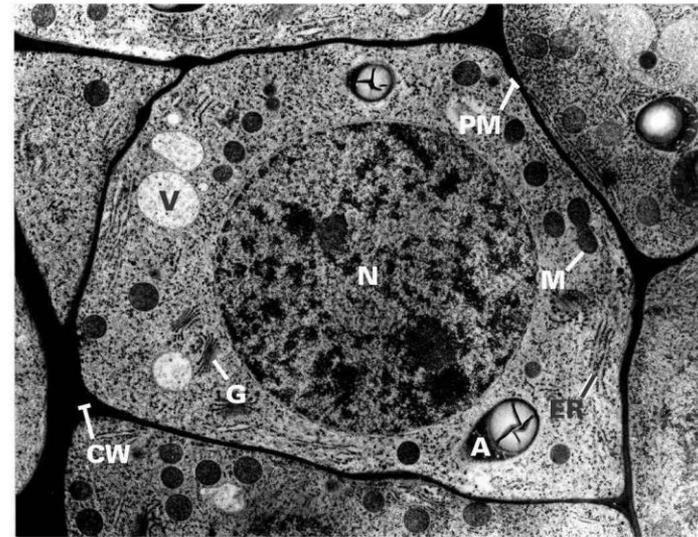
Il trasporto di membrana è fondamentale per numerosi processi:

- Generazione della pressione di turgore
- Accrescimento
- Acquisizione di nutrienti minerali
- Distribuzione dei metaboliti
- Compartimentazione dei metaboliti primari e secondari
- Trasformazione dell'energia luminosa in energia chimica
- Trasduzione dei segnali
- Trasporto molecole segnale (es: ormone auxina)

(A) Mesophyll



(B)

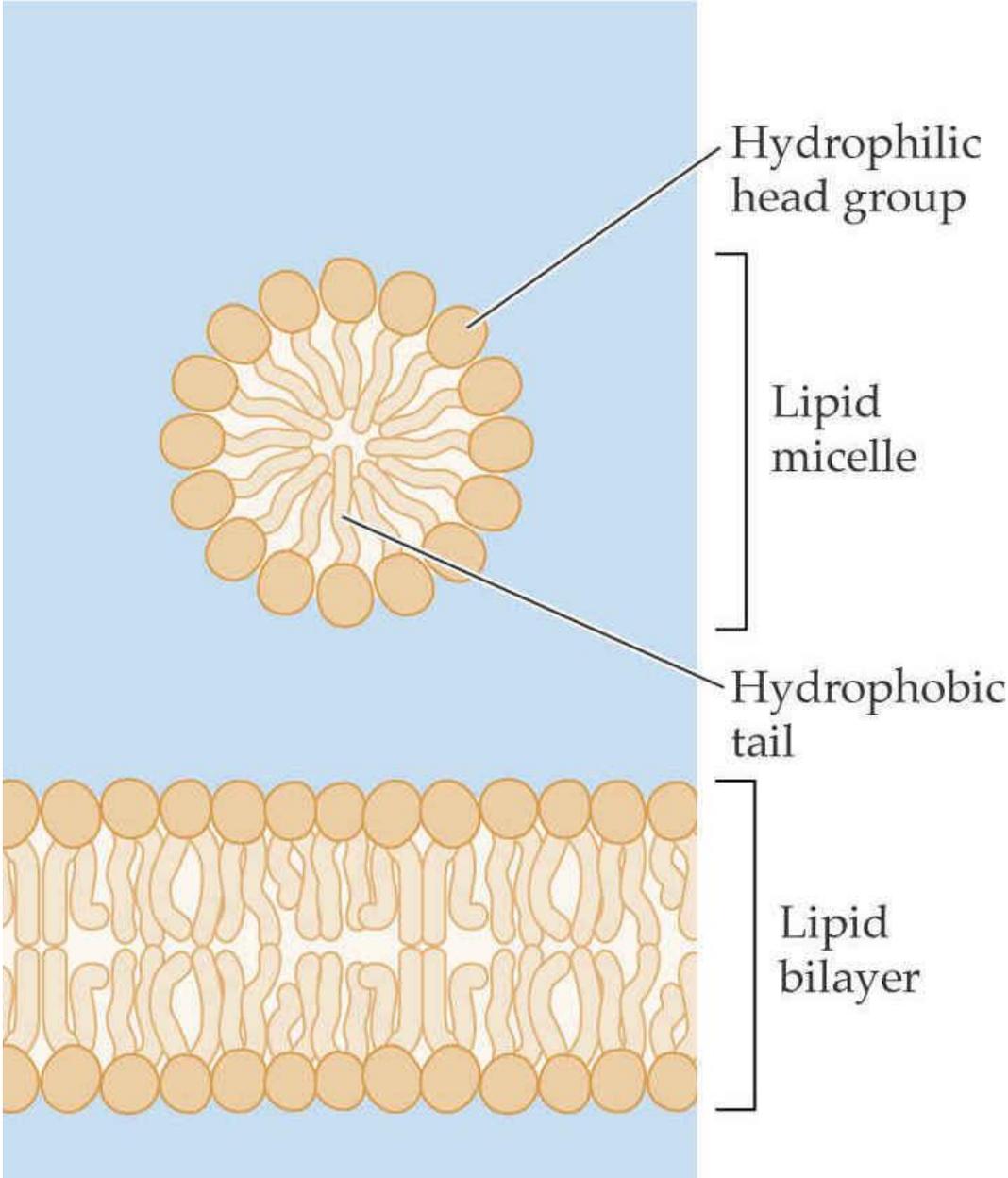


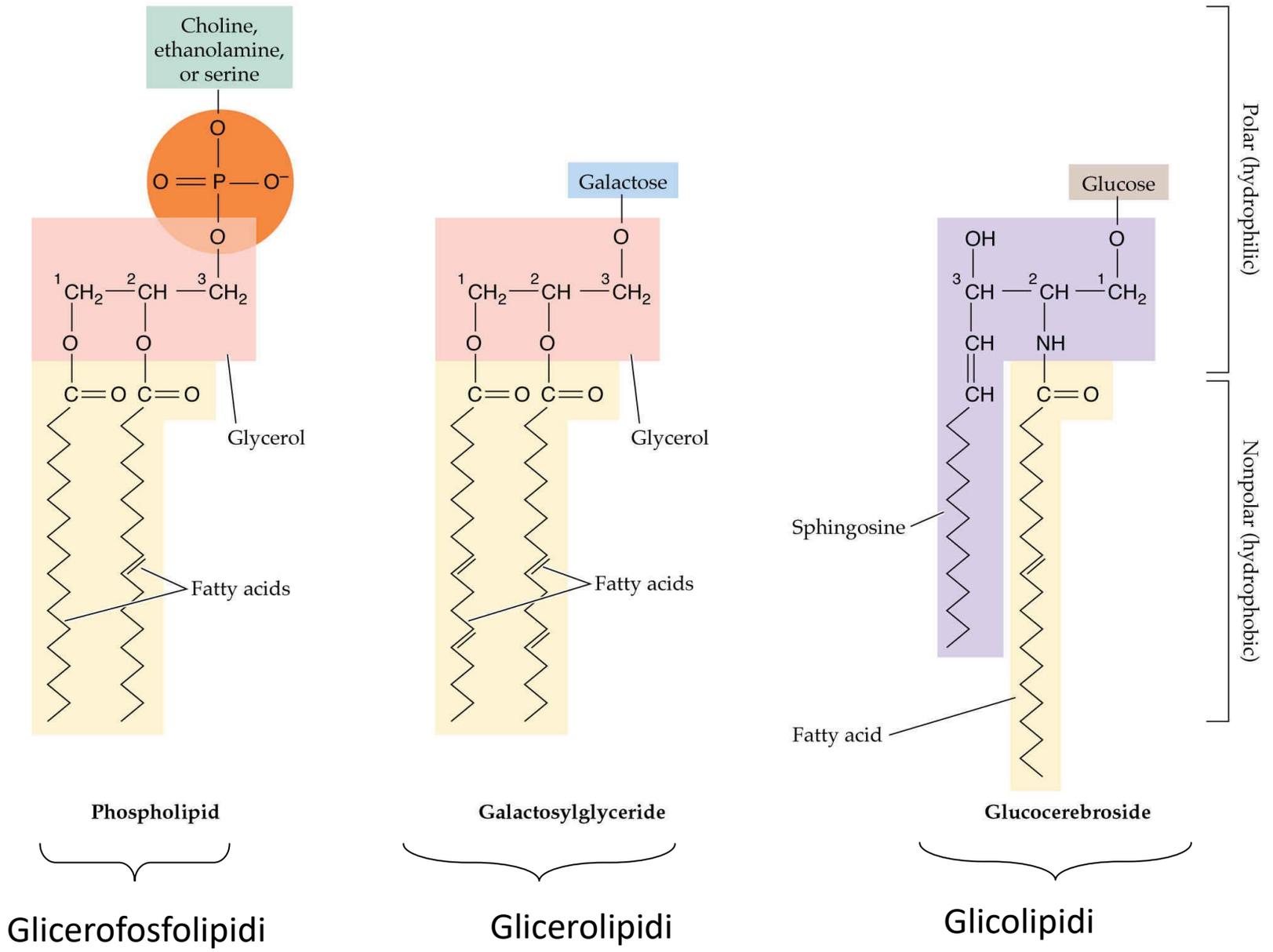
TRE CARATTERISTICHE FONDAMENTALI DELLE MEMBRANE BIOLOGICHE

1. **COMPOSIZIONE CHIMICA**: STRUTTURA LIPIDICA/PROTEICA DELLE MEMBRANE
2. **STATO FISICO**: STATO FLUIDO DELLE MEMBRANE
3. **PROPRIETA' FISIOLOGICHE**: PERMEABILITA' DELLE MEMBRANE ALL'ACQUA E AI SOLUTI

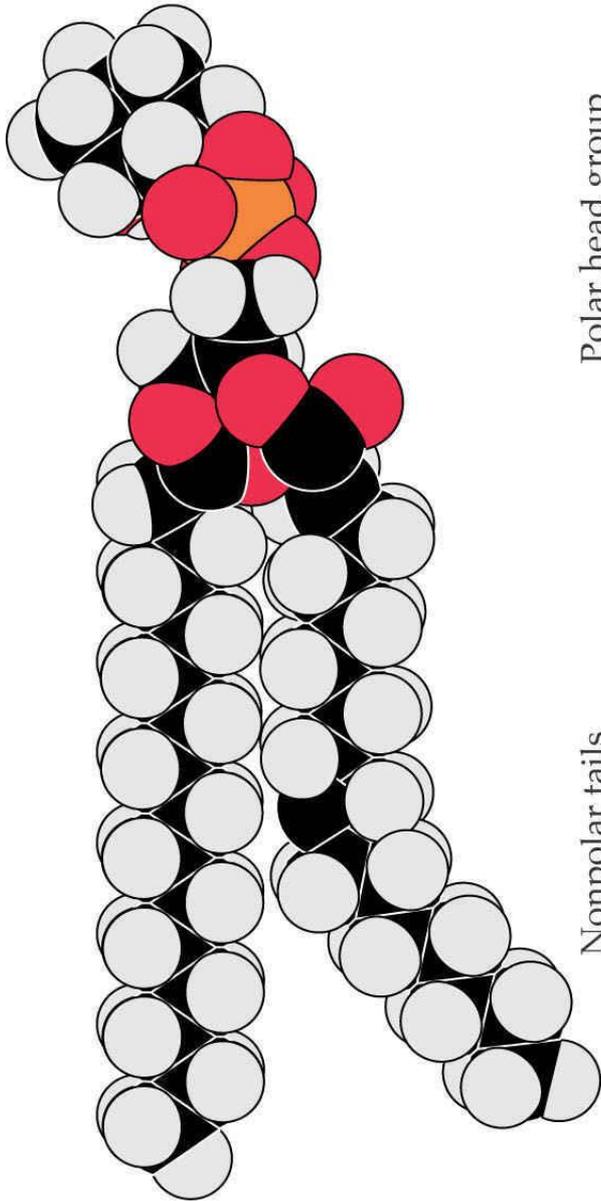
L'integrità strutturale e funzionale del sistema di membrane deve essere garantita nel passaggio da una generazione di cellule a quella successiva:

- a) Cellule figlie ereditano una serie completa di membrane dalla cellula madre
- b) Ciascuna potenziale cellula madre mantiene una serie completa di membrane
- c) Nuove membrane vengono prodotte solo mediante crescita e fissione di membrane esistenti

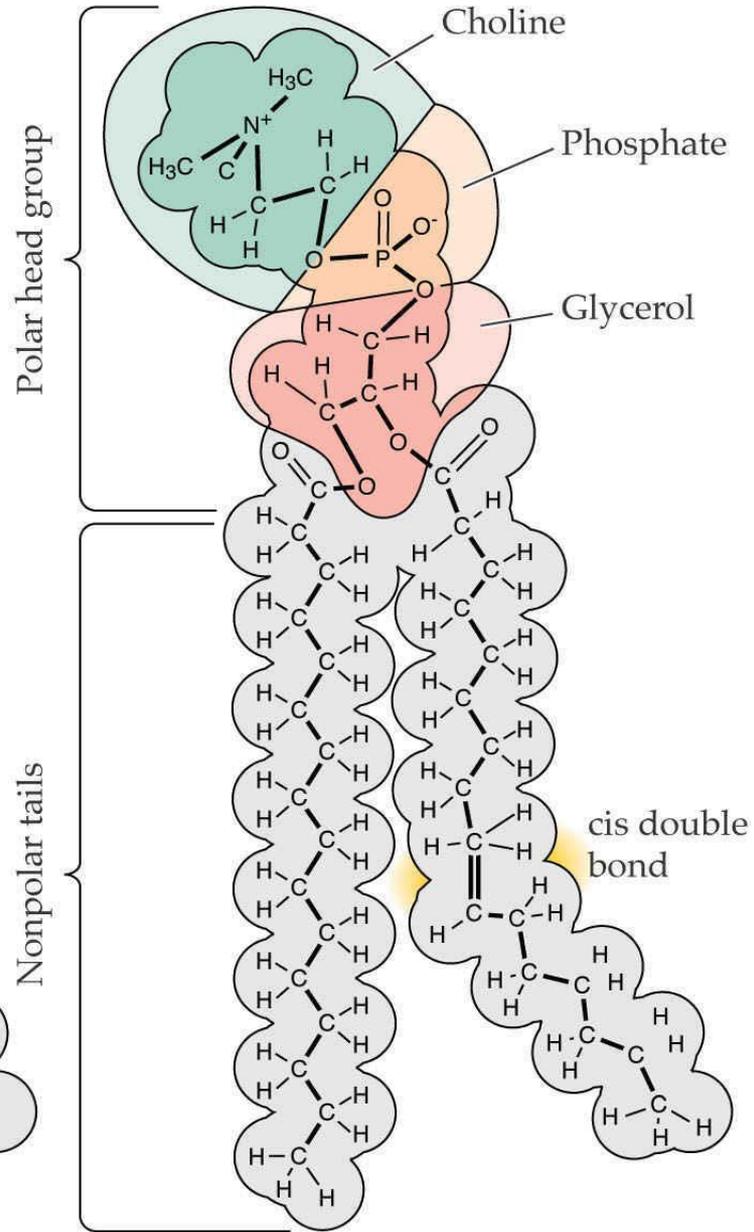




(A)



(B)



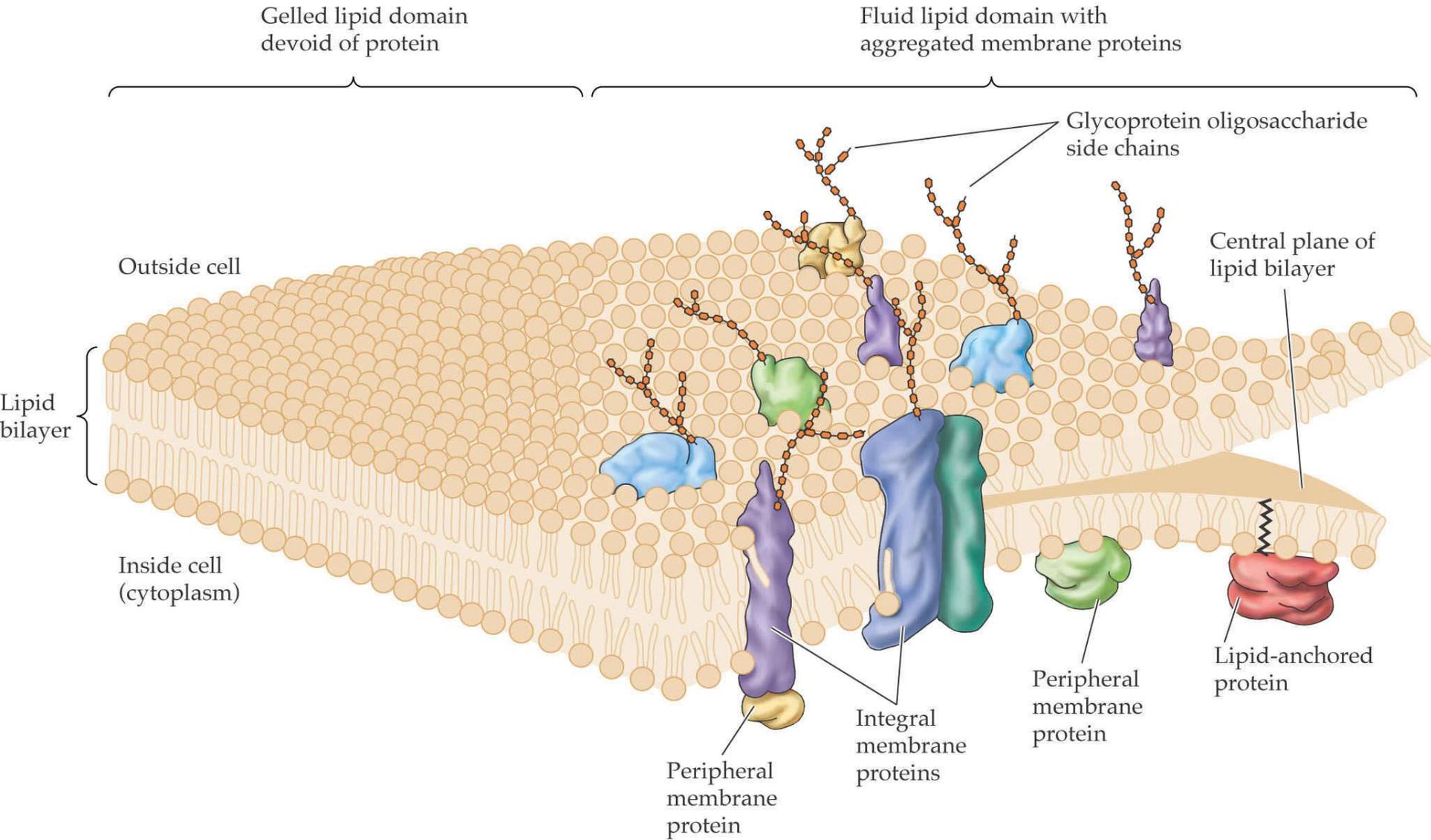
Box 1.3.1**Chemical structures and melting points of the fatty acids most commonly found in plant biomembranes**

Carbon skeleton	Structure	Common name	Melting point (°C)
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Palmitic acid	63.1
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Stearic acid	69.6
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Arachidic acid	76.5
16:1 (Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Palmitoleic acid	-0.5
18:1 (Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Oleic acid	13.4
18:2 ($\Delta^{9,12}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{=CHCH}_2)_7\text{COOH}$	α -Linoleic acid	-5.0
18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	α -Linolenic acid	-11
20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Arachidonic acid	-49.5

Gli acidi grassi insaturi solidificano a temperature più basse

Una maggior percentuale di acidi grassi insaturi nelle membrane delle cellule conferisce una maggiore resistenza al freddo nelle piante: strategia di acclimatazione!

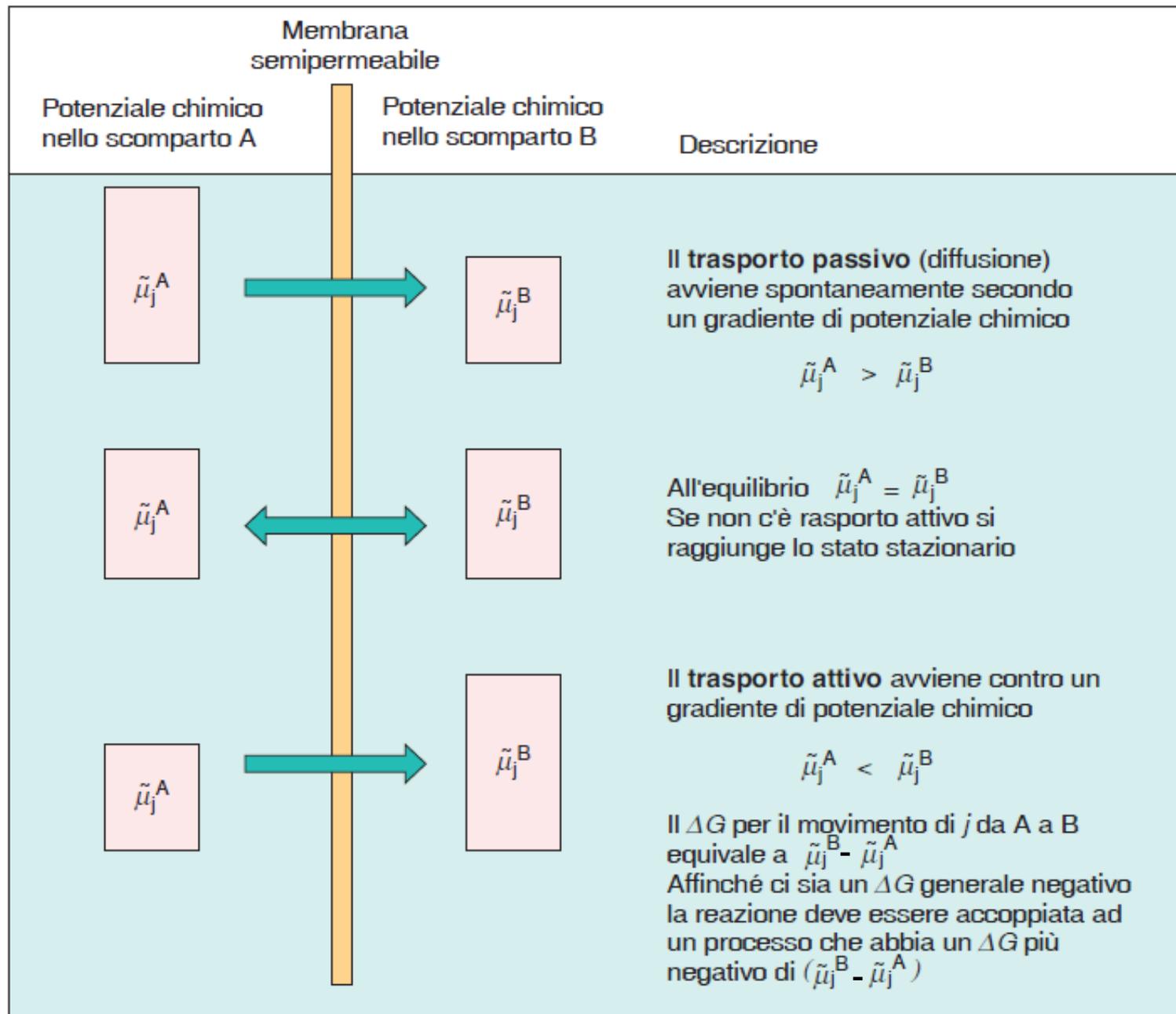
Modello del mosaico fluido



Trasporto passivo e trasporto attivo

Trasporto passivo: movimento di molecole per **diffusione** secondo il gradiente di potenziale chimico, movimento spontaneo

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

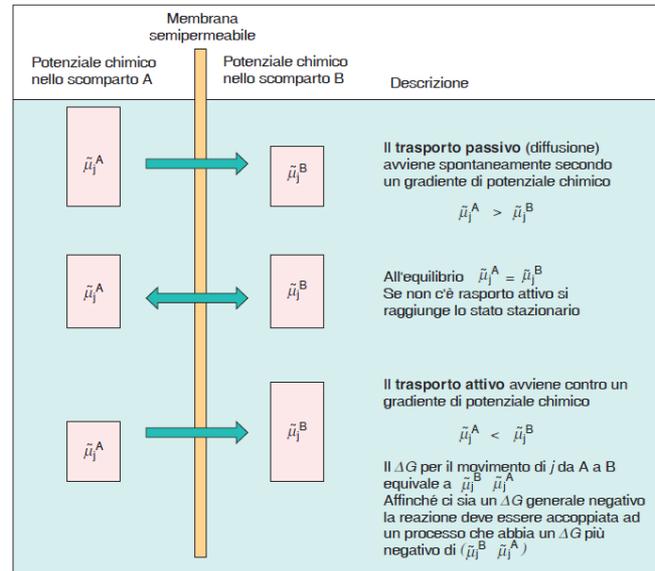


- Per un soluto non carico elettricamente (es. saccarosio)

$$\mu_s^A = \mu_s^* + RT \ln C_s^A$$

$$\mu_s^B = \mu_s^* + RT \ln C_s^B$$

$$\Delta\mu_s = (\mu_s^* + RT \ln C_s^A) - (\mu_s^* + RT \ln C_s^B) = RT \ln(C_s^A/C_s^B)$$



Differenza di potenziale elettrochimico

- Per un soluto carico elettricamente (es. ione potassio)

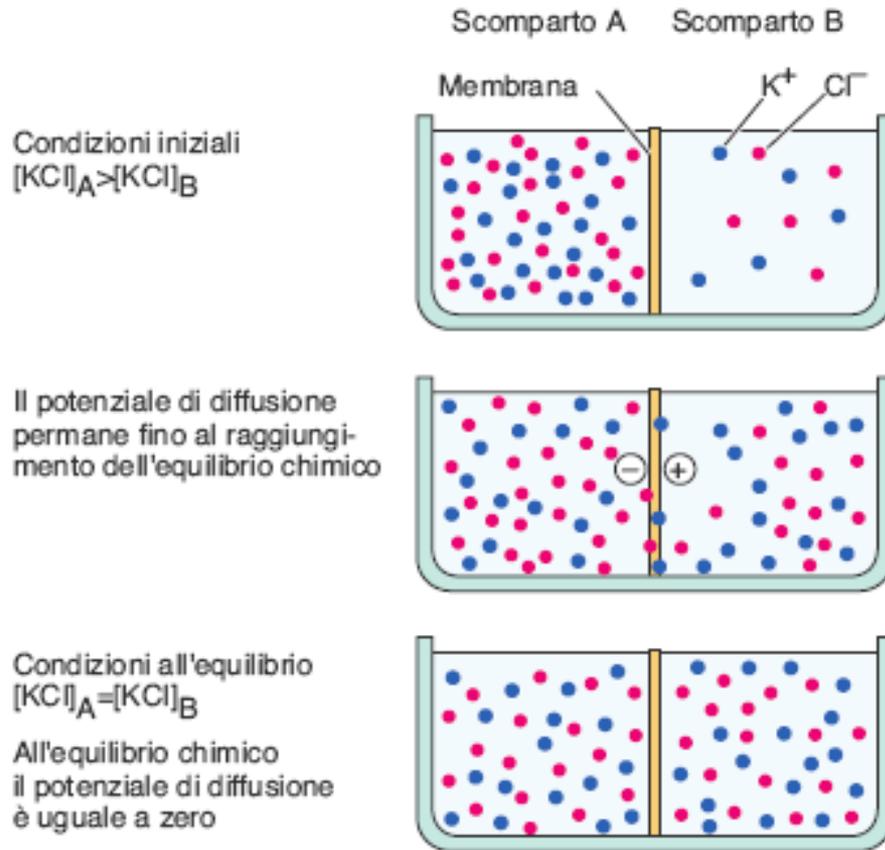
$$\mu_K^A = \mu_K^* + RT \ln C_K^A + zFE^A$$

$$\mu_K^B = \mu_K^* + RT \ln C_K^B + zFE^B$$

$$\Delta\mu_K = (\mu_K^* + RT \ln C_K^A + zFE^A) - (\mu_K^* + RT \ln C_K^B + zFE^B) = RT \ln(C_K^A/C_K^B) + zF(E^A - E^B)$$

= gli ioni diffondono sia in risposta al loro gradiente di concentrazione che alla differenza di potenziale elettrico ($E^A - E^B$) tra i due scomparti

Il potenziale di diffusione è il potenziale che si genera come risultato di un processo di diffusione



Separazione di carica: l'esistenza di un potenziale di membrana implica un'ineguale distribuzione di carica

Figura 6.2 Sviluppo di un potenziale di diffusione e di una separazione di carica fra due scomparti separati da una membrana che è preferibilmente permeabile al potassio. Se la concentrazione del cloruro di potassio è maggiore nello scomparto A ($[KCl]_A > [KCl]_B$), il potassio e il cloro diffonderanno a una velocità più alta nello scomparto B, stabilendo un potenziale di diffusione. Quando le membrane sono più permeabili al potassio che al cloro, gli ioni potassio diffondono più velocemente degli ioni cloro e si genera una separazione di carica (+ e -).

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

PRINCIPIO DELL'ELETTRONEUTRALITÀ

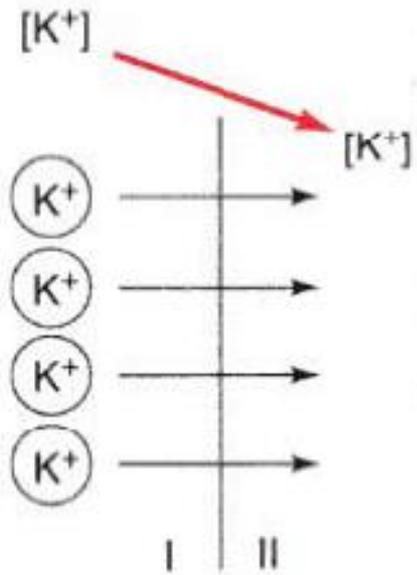
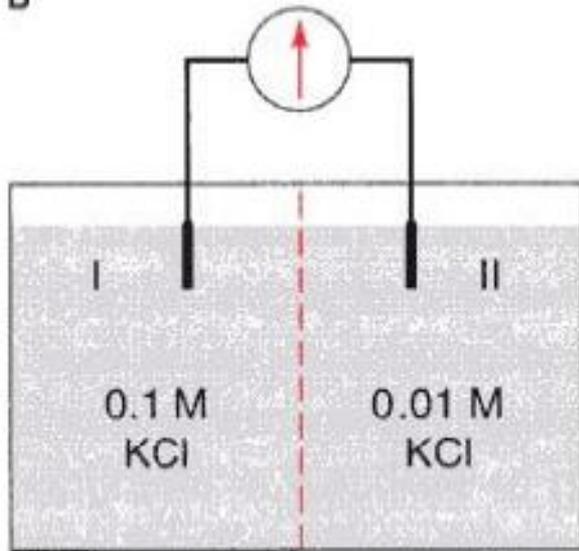
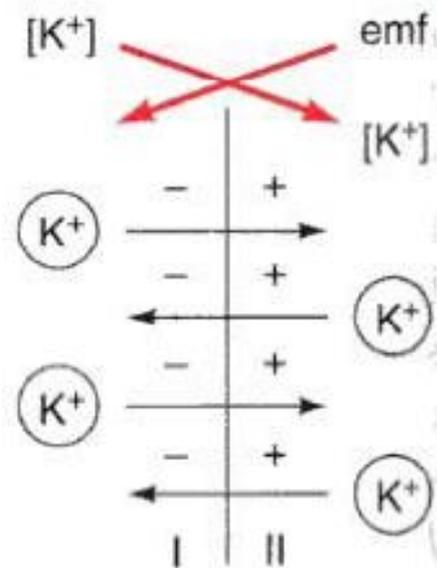
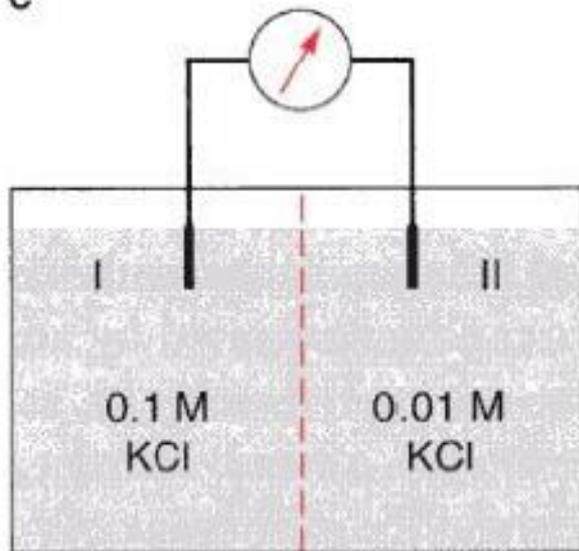
Una soluzione contiene sempre un numero uguale di anioni e cationi

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

in termini chimici, tale disequaglianza è trascurabile

-100 mV → un anione in più su 100.000

(differenza di concentrazione pari a 0.001%)

B**C**

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

Potenziale di Nernst

(=differenza di potenziale elettrico tra due scomparti): $\Delta E_n = E_i - E_o$

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

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

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 ΔE 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

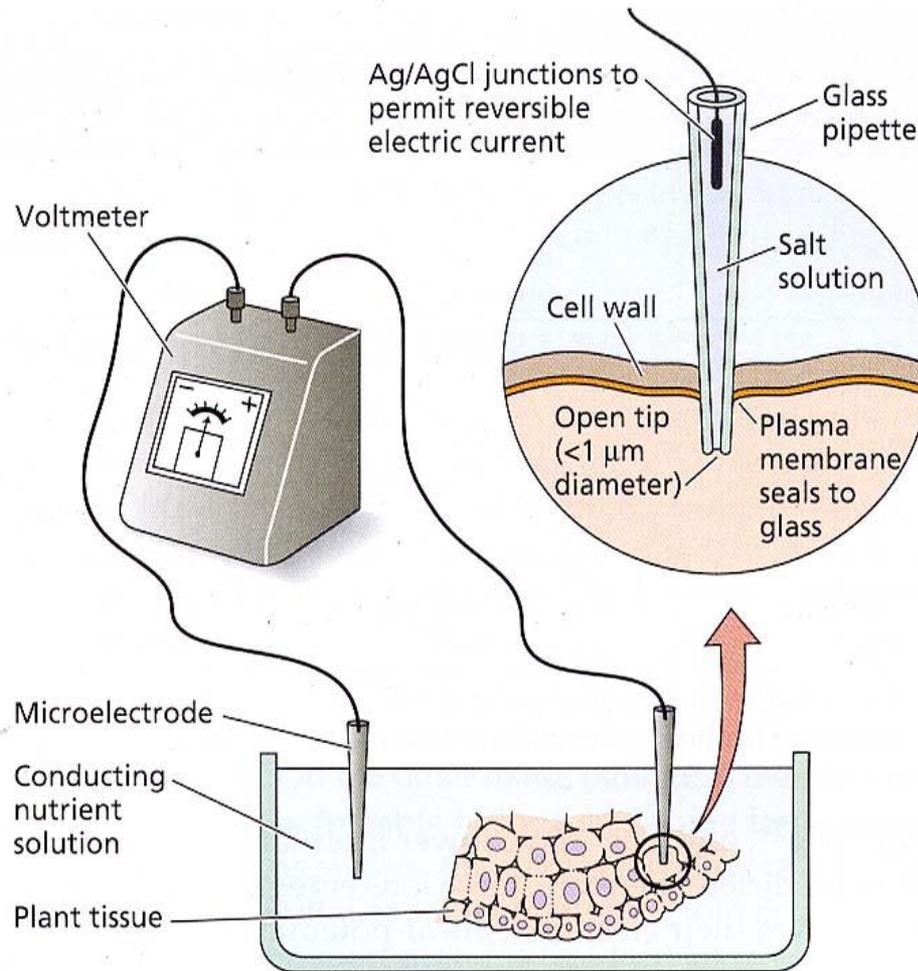
Equazione di Goldman

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

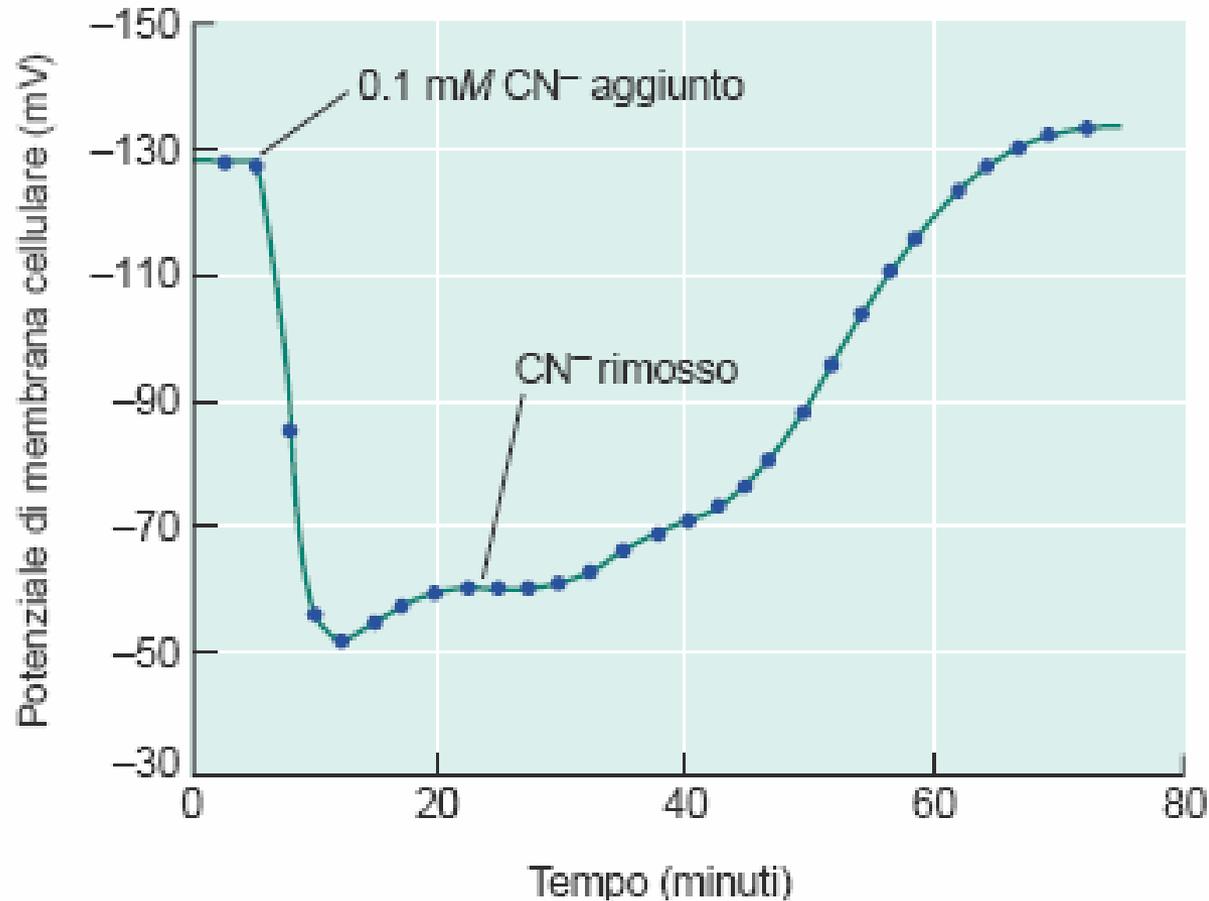
Tutte le cellule possiedono un potenziale di membrana, dovuto alla distribuzione asimmetrica degli ioni tra l'interno e l'esterno della cellula



ΔE calcolato con l'equazione di Goldman **da -50 a -40 mV**

Misura sperimentale ΔE **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⁻ 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⁺- ATPasi)

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

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

Fonte: Dati da Higinbotham et al, (1967)

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

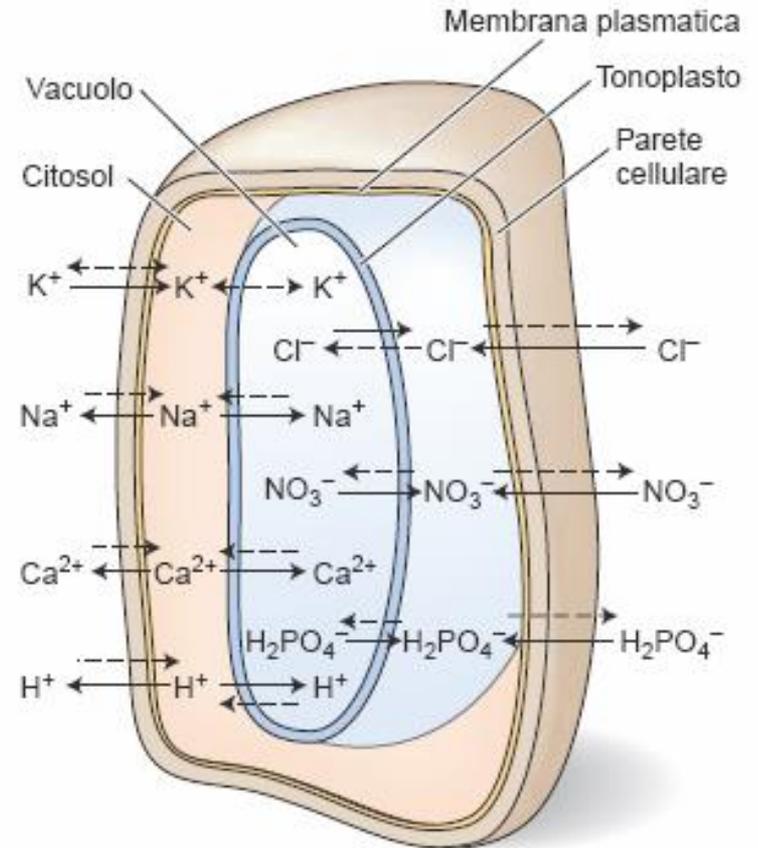
Valori previsti

Valori osservati

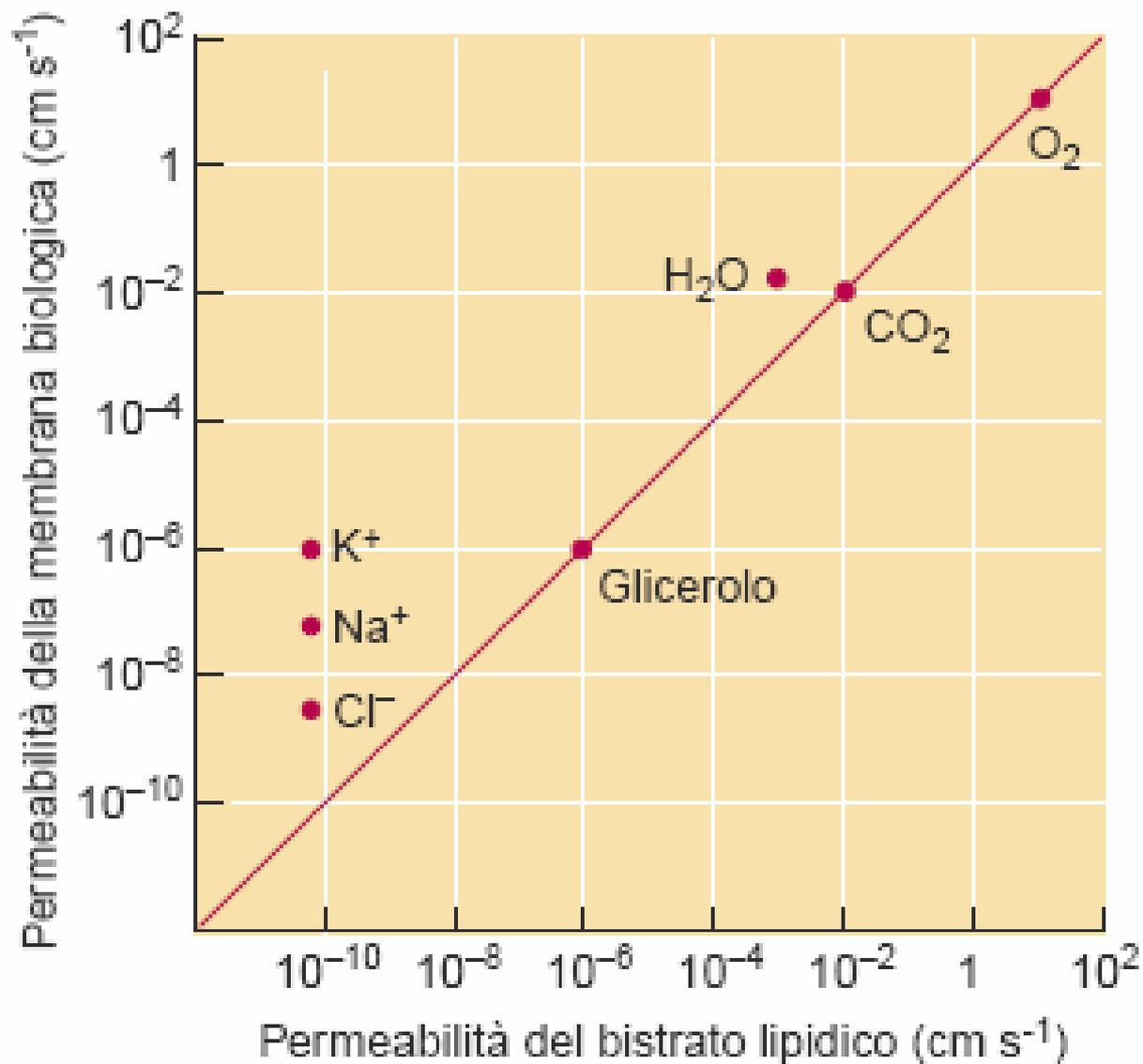
Solo ione potassio vicino all'equilibrio

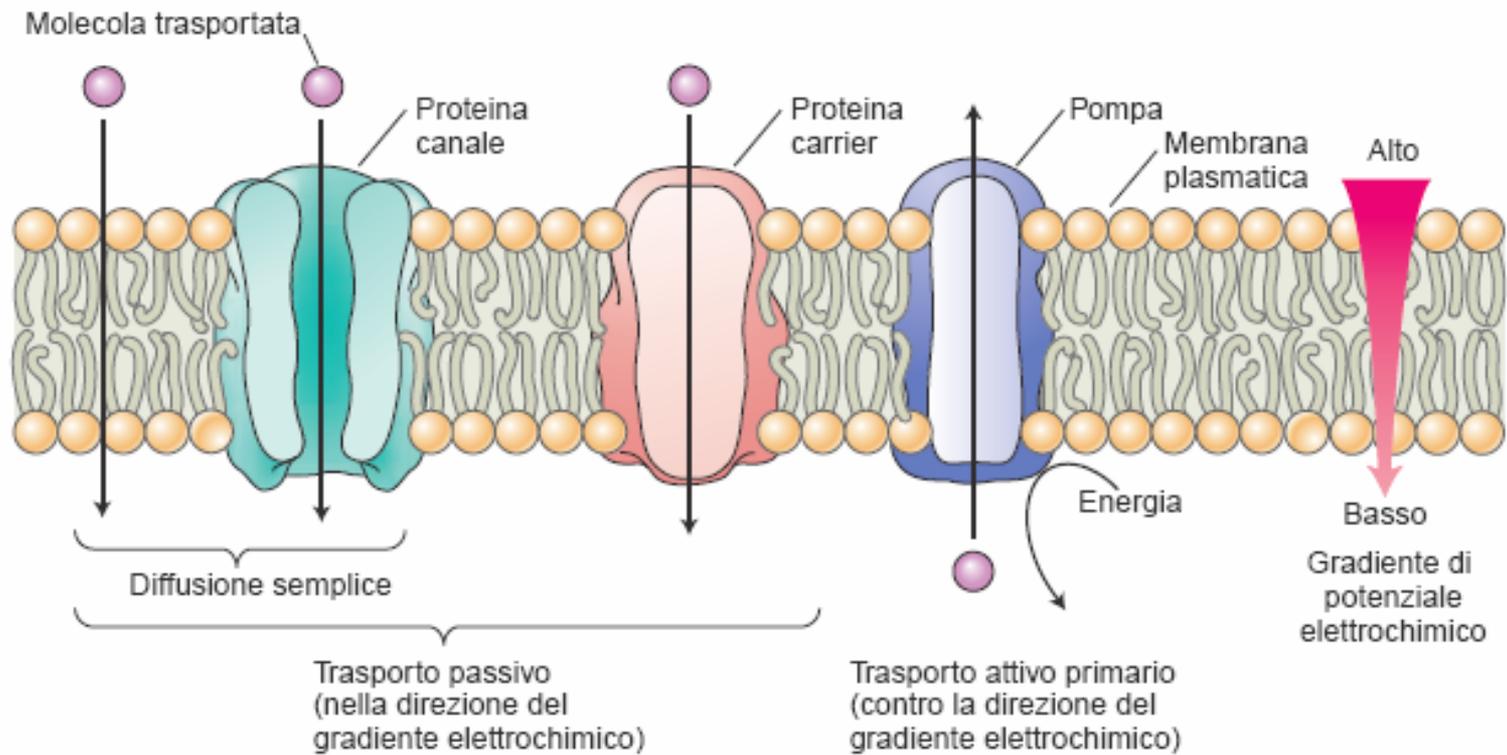
Anioni: concentrazioni più alte del previsto, prelievo attivo

Cationi: concentrazioni più basse del previsto, estrusione attiva



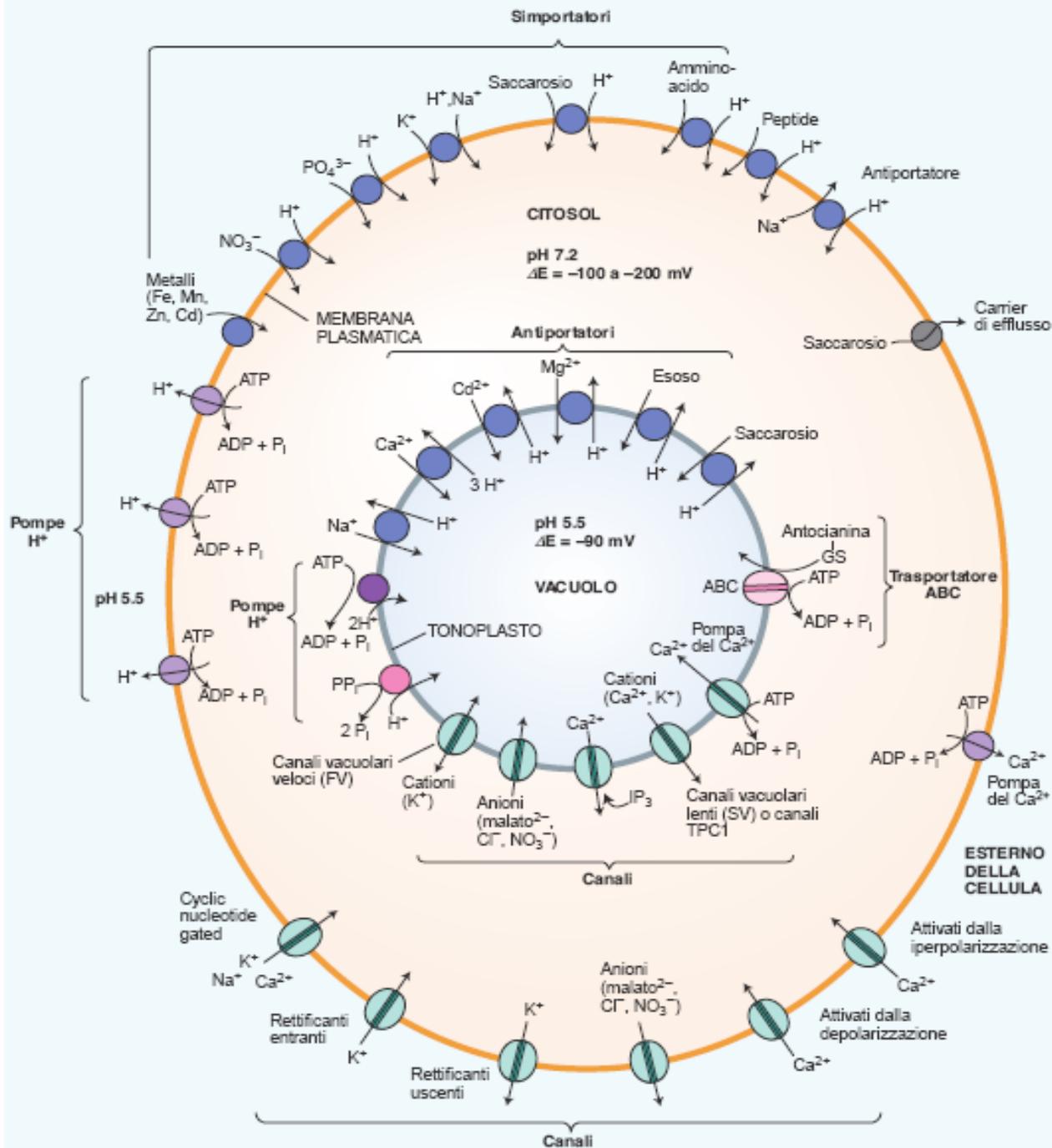
-----> Trasporto passivo
 —————> Trasporto attivo





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 μm^2

Traslocatori/carrier

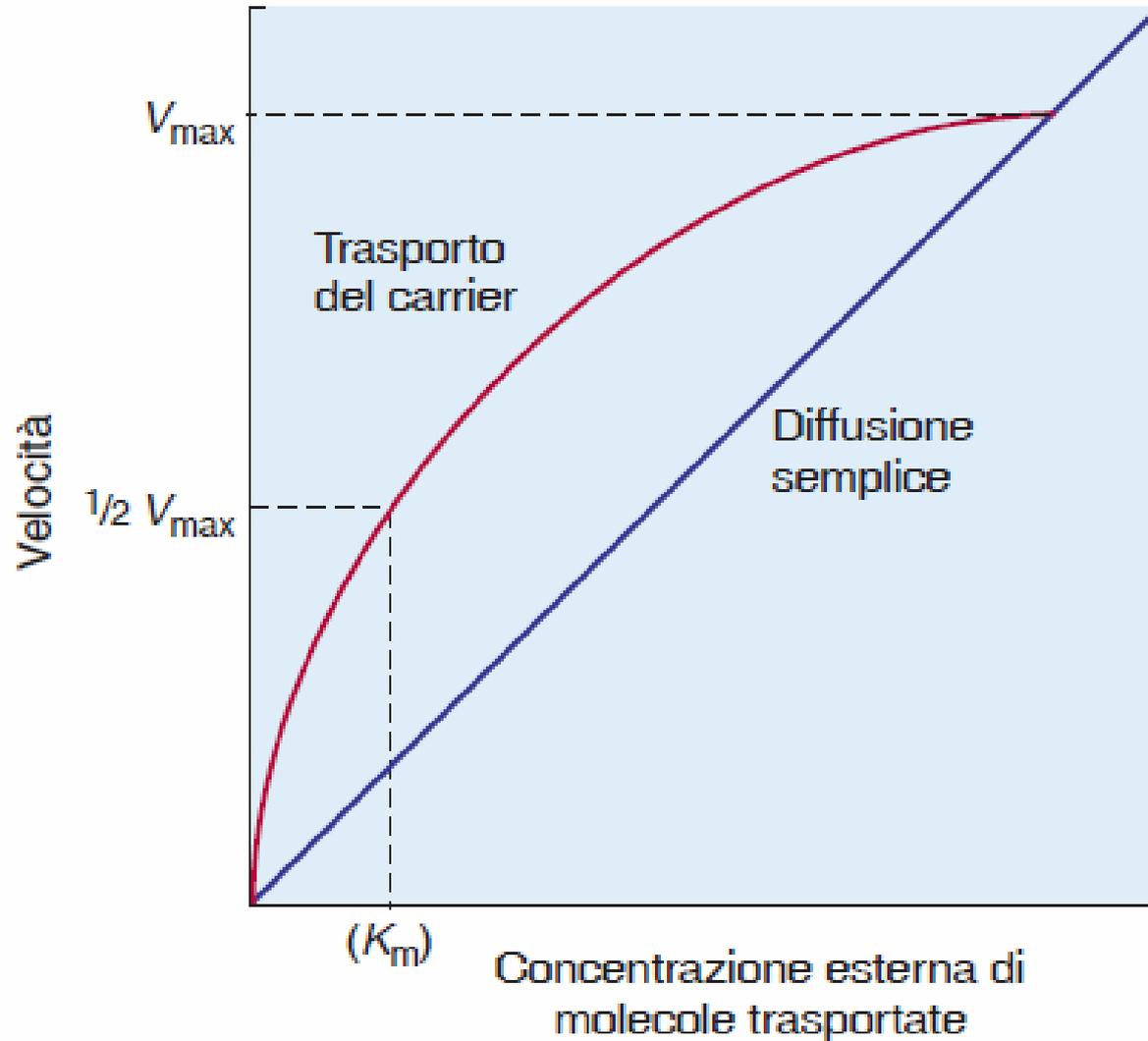
Numero di turnover: 10^3 ioni (o altre molecole) s^{-1}

Abbondanza: da 10 a 100 per μm^2

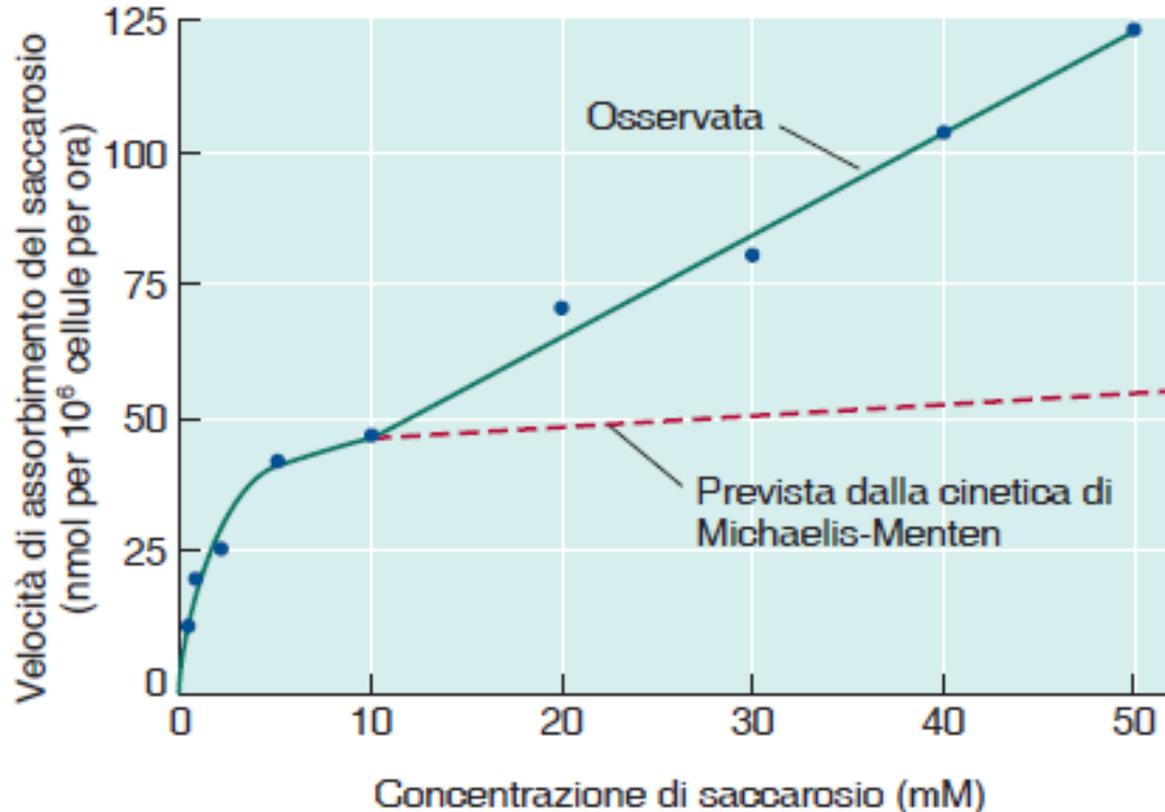
Canali

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

Abbondanza: da 1 a 10 per μm^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⁺-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 P_{Pi}) PER TRASLOCARE ("POMPARE") IONI CONTRO GRADIENTE DI POTENZIALE ELETTROCHIMICO

Principali pompe ioniche della cellula vegetale

Plasmalemma:

Pompa protonica (P H⁺-ATPasi)

Pompa del Ca²⁺

Tonoplasto:

2 pompe protoniche (V H⁺-ATPasi, H⁺-PPasi)

Pompa del Ca²⁺

Creste mitocondriali e tilacoidi plastidiali:

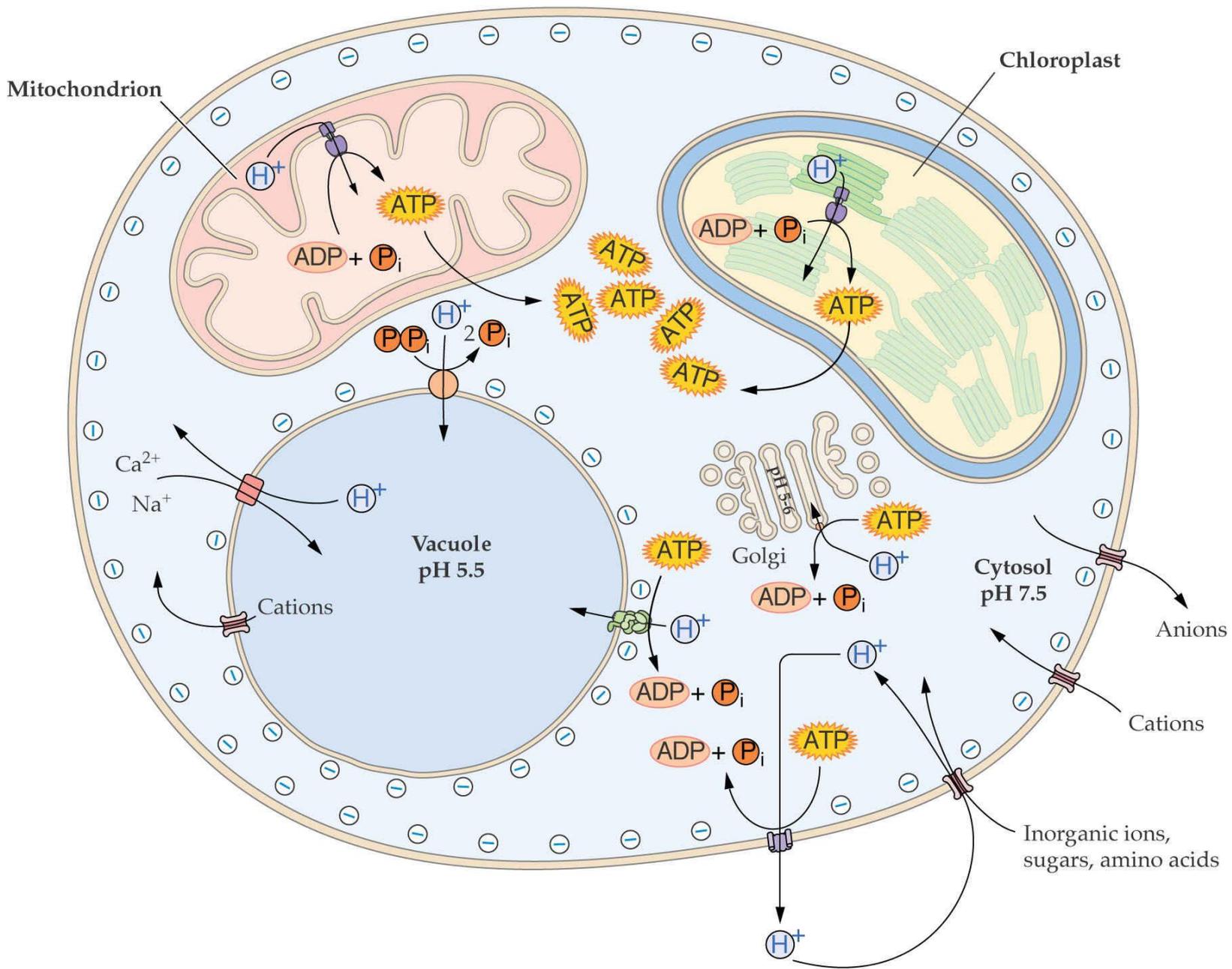
Pompa protonica (F H⁺-ATPasi o ATP sintasi)

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

Pompe protoniche

Pompa del Ca²⁺

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



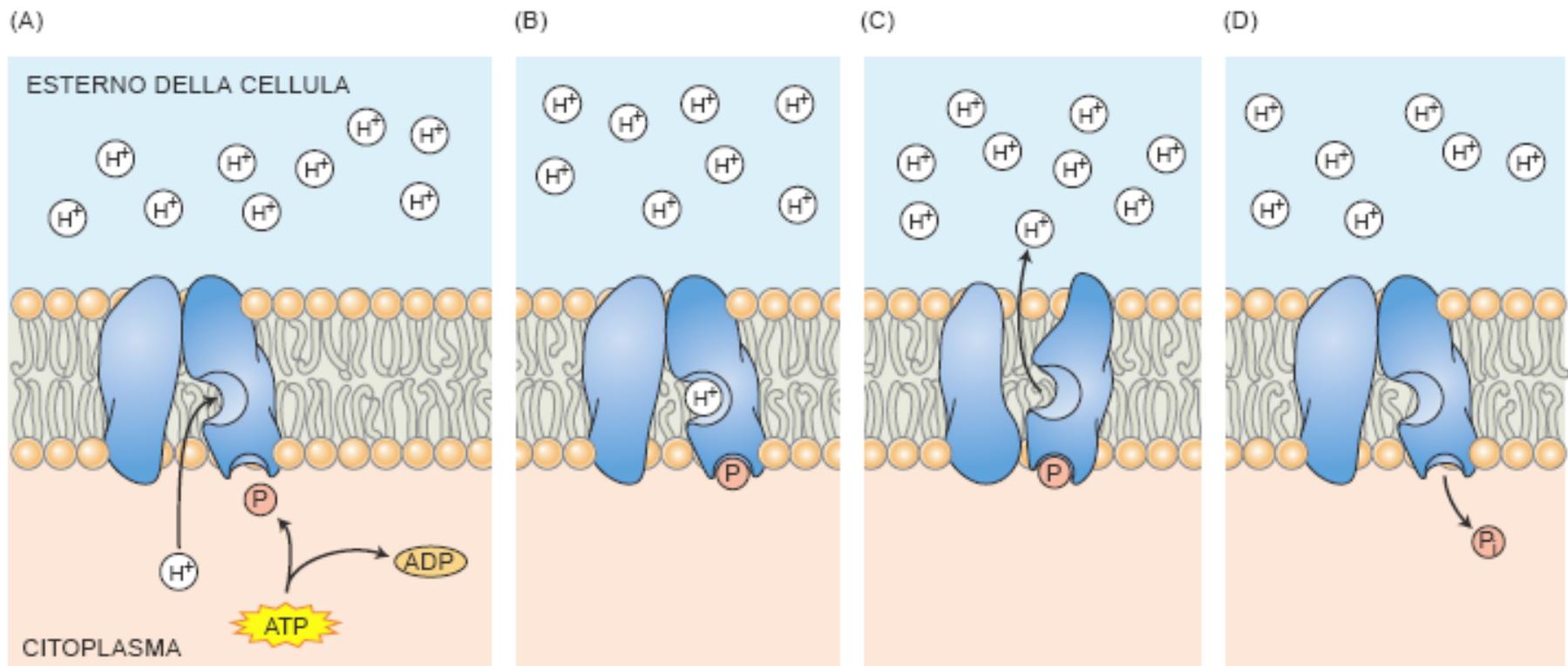


Figura 6.16 Fasi di un ipotetico trasporto operato da una pompa elettrogenica su un catione (come H⁺) contro il suo gradiente chimico. La proteina, inclusa nella membrana, si lega al catione dalla parte rivolta verso la cellula (A) e viene fosforilata dall'ATP (B). Tale fosforilazione porta a un cambiamento 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⁺



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 (teoria chemiosmotica di Mitchell)

Gradiente elettrochimico di protoni:

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

ΔE = differenza di potenziale elettrico

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 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 Δp ?

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