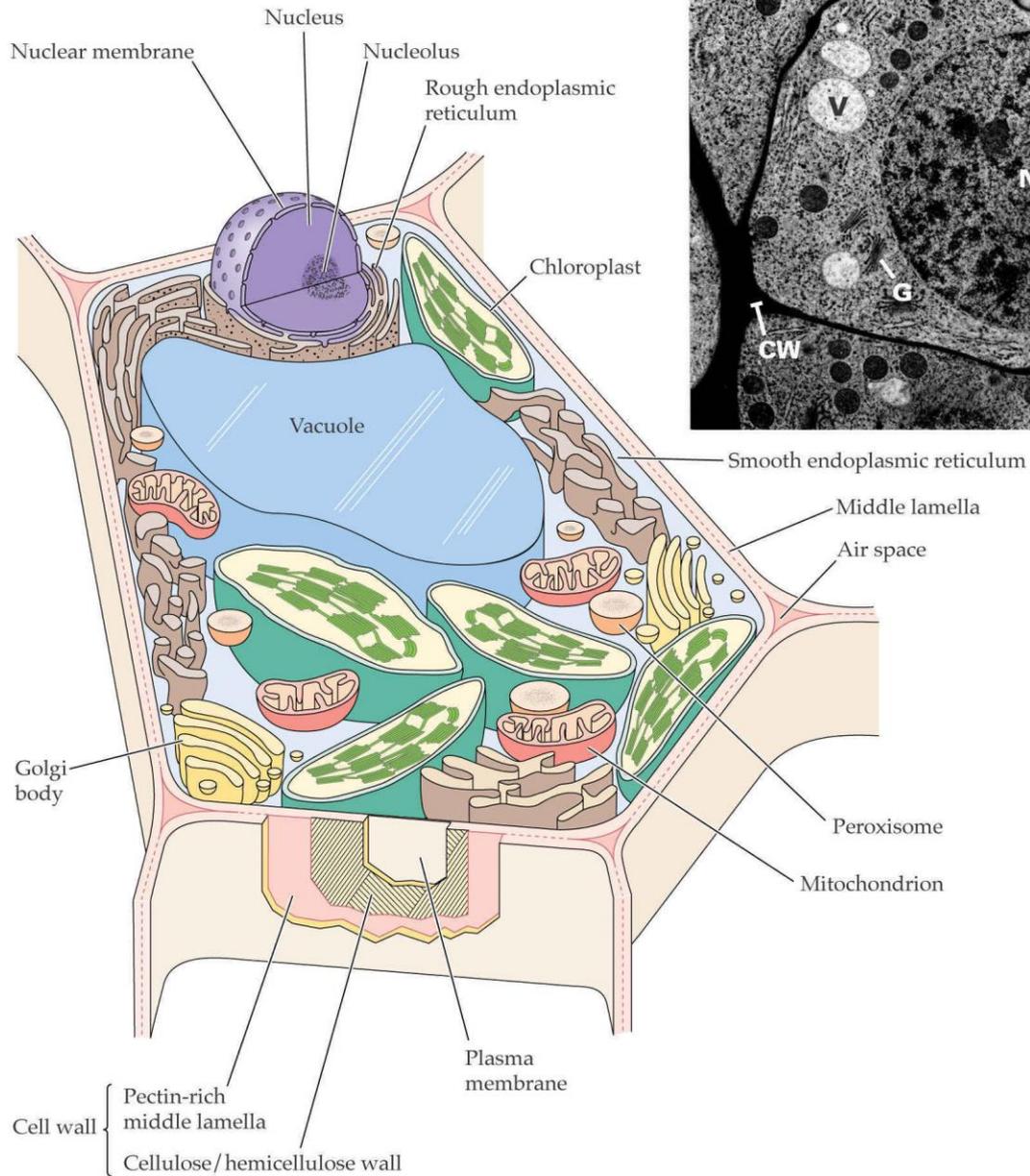


# **Trasporto di soluti attraverso membrane biologiche**

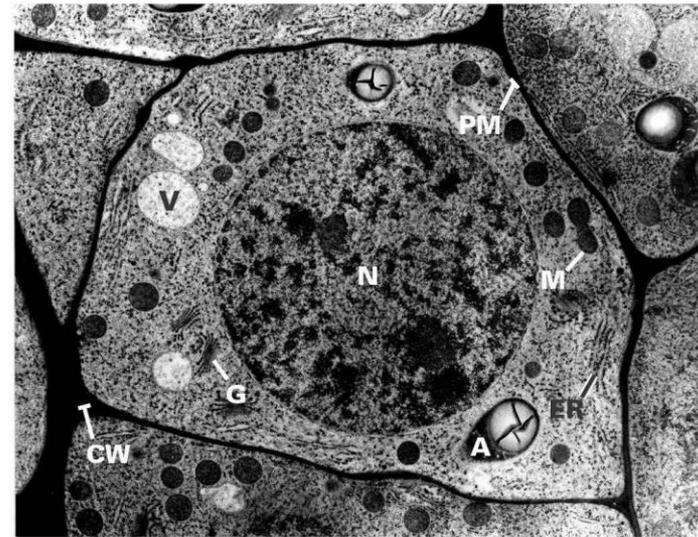
## Il trasporto di membrana è fondamentale per numerosi processi:

- 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

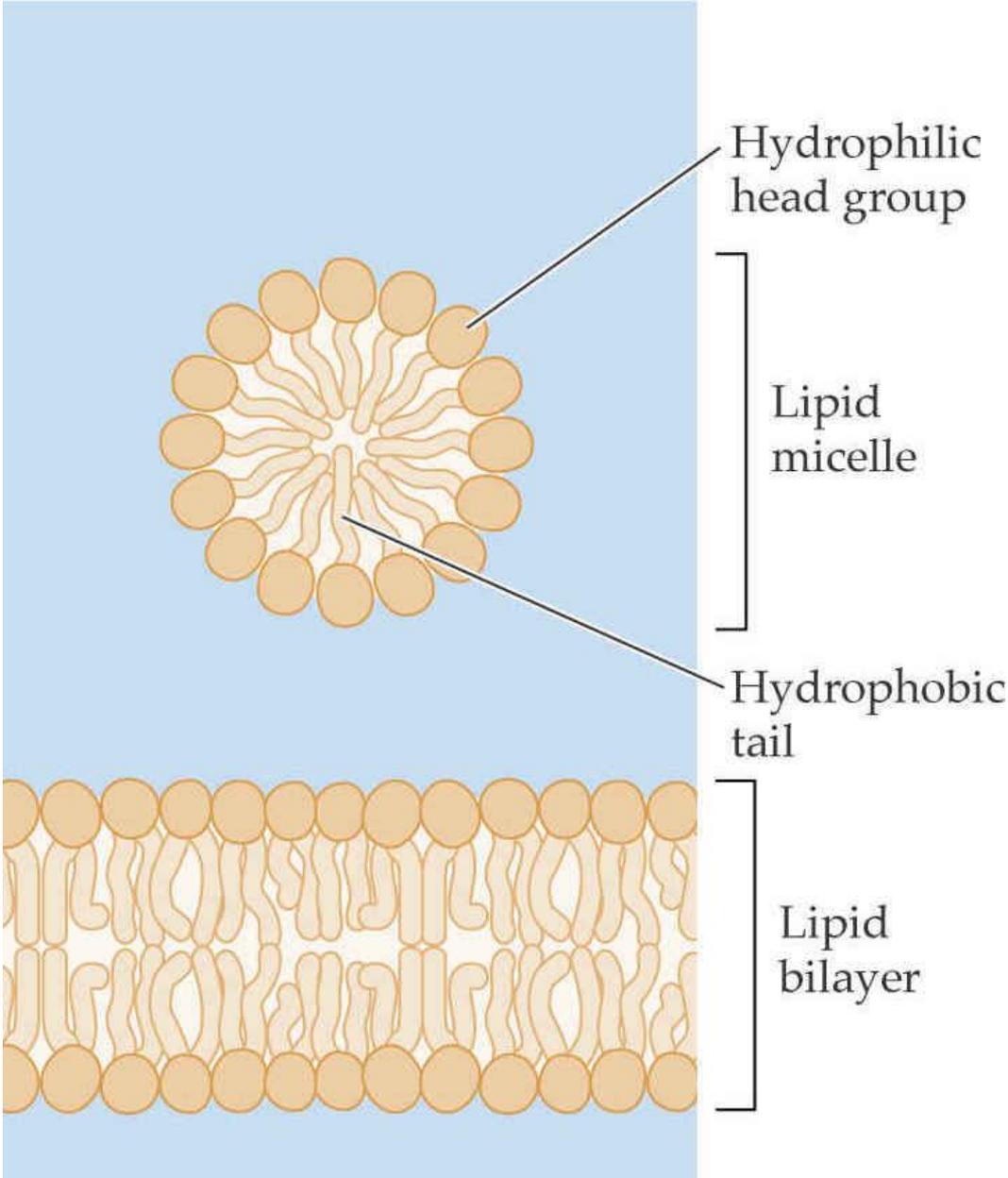


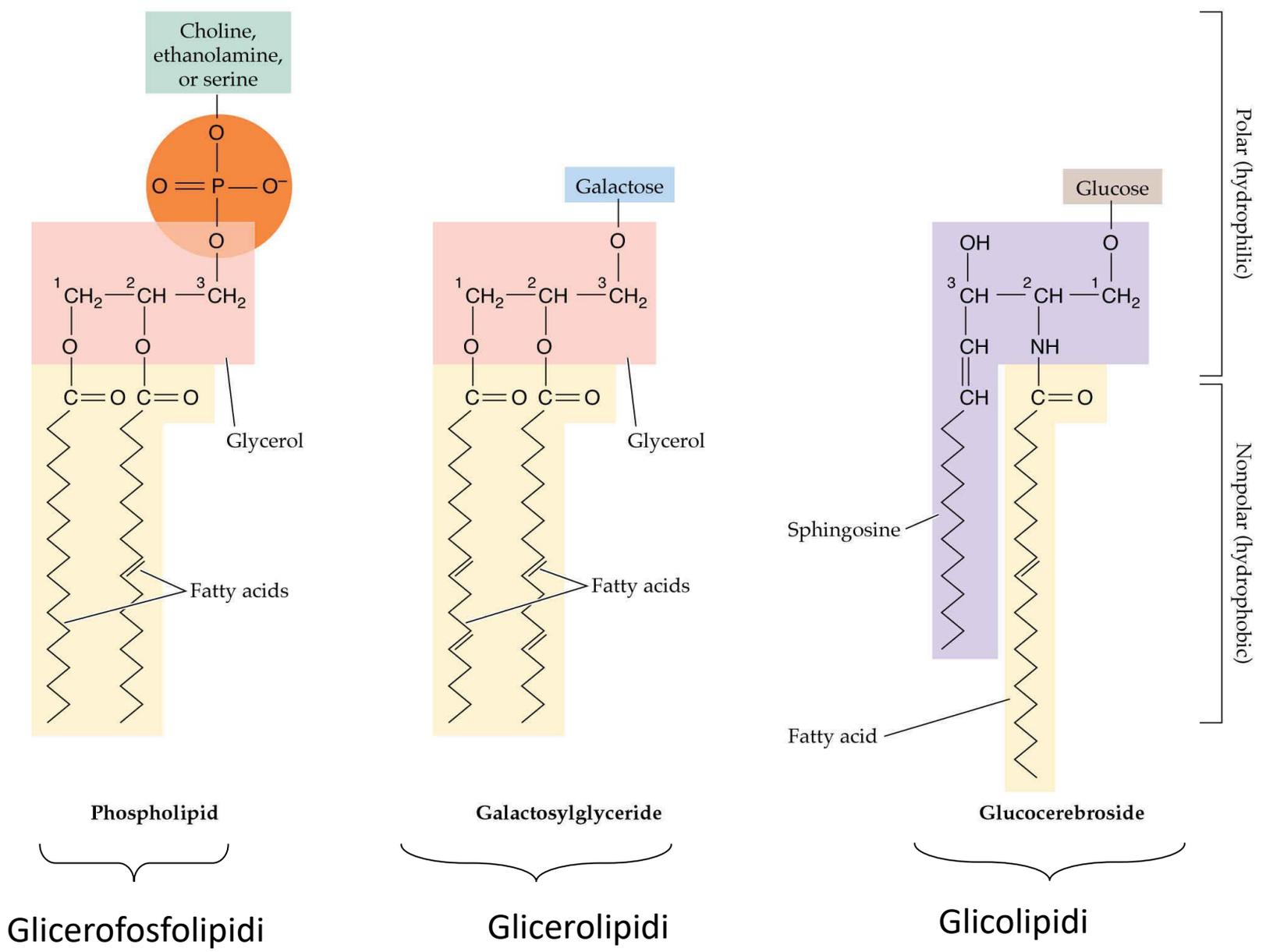
(B)



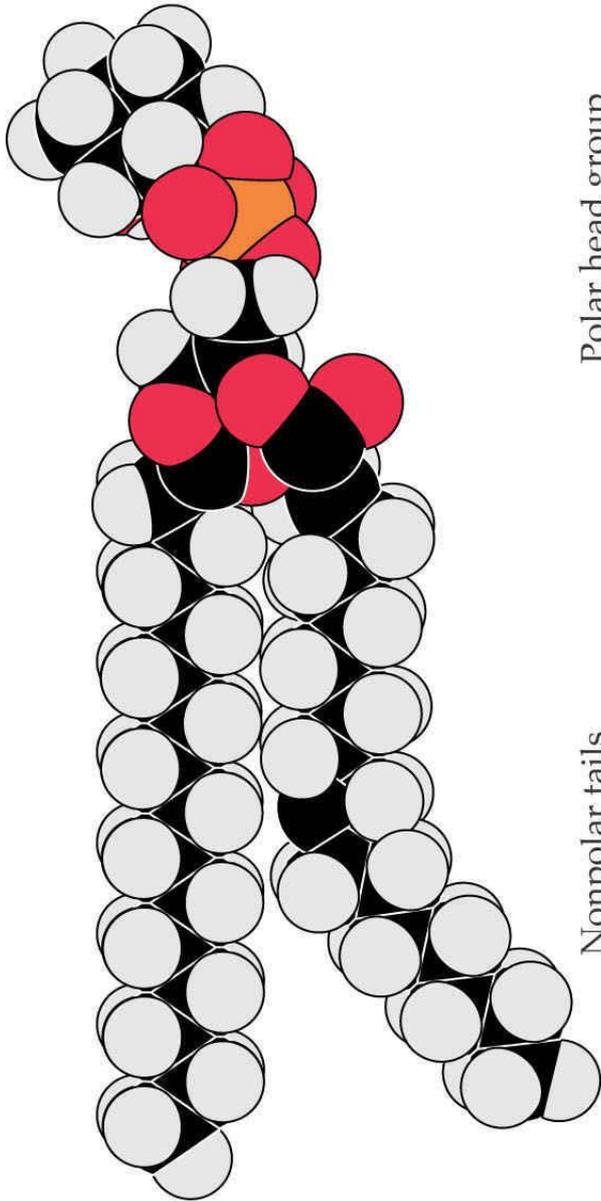
## TRE CARATTERISTICHE FONDAMENTALI DELLE MEMBRANE BIOLOGICHE

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

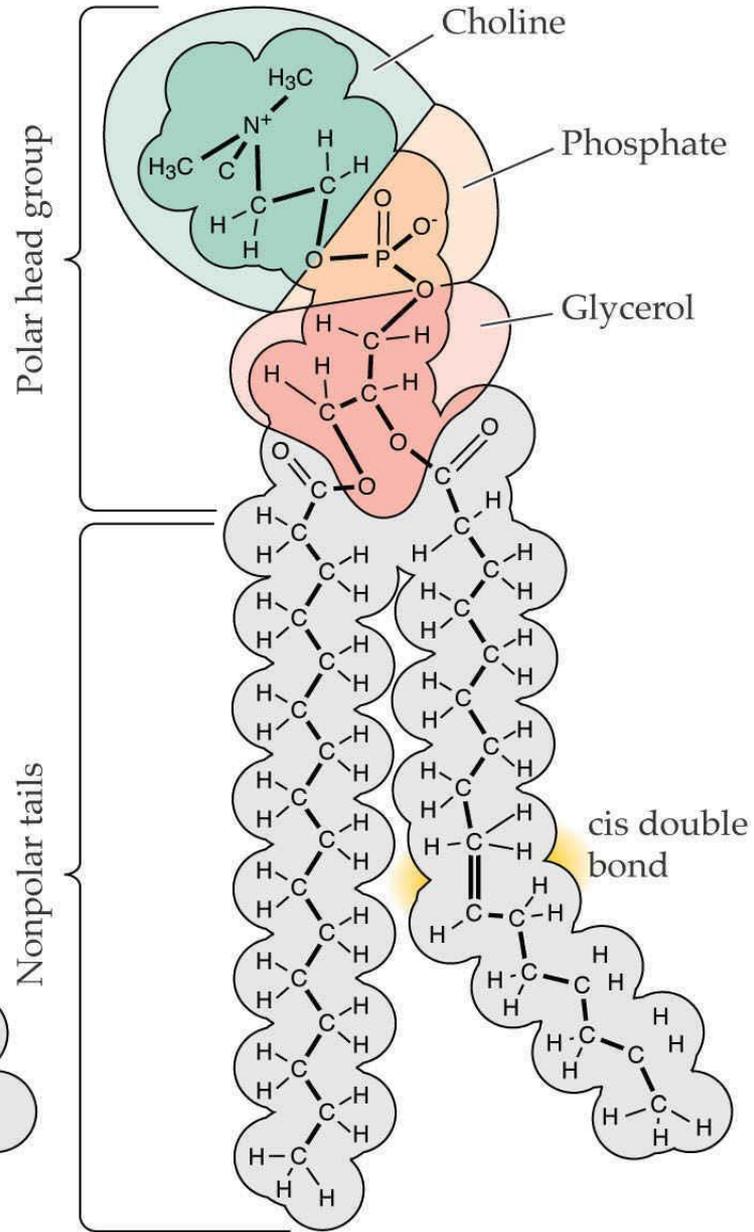




(A)



(B)



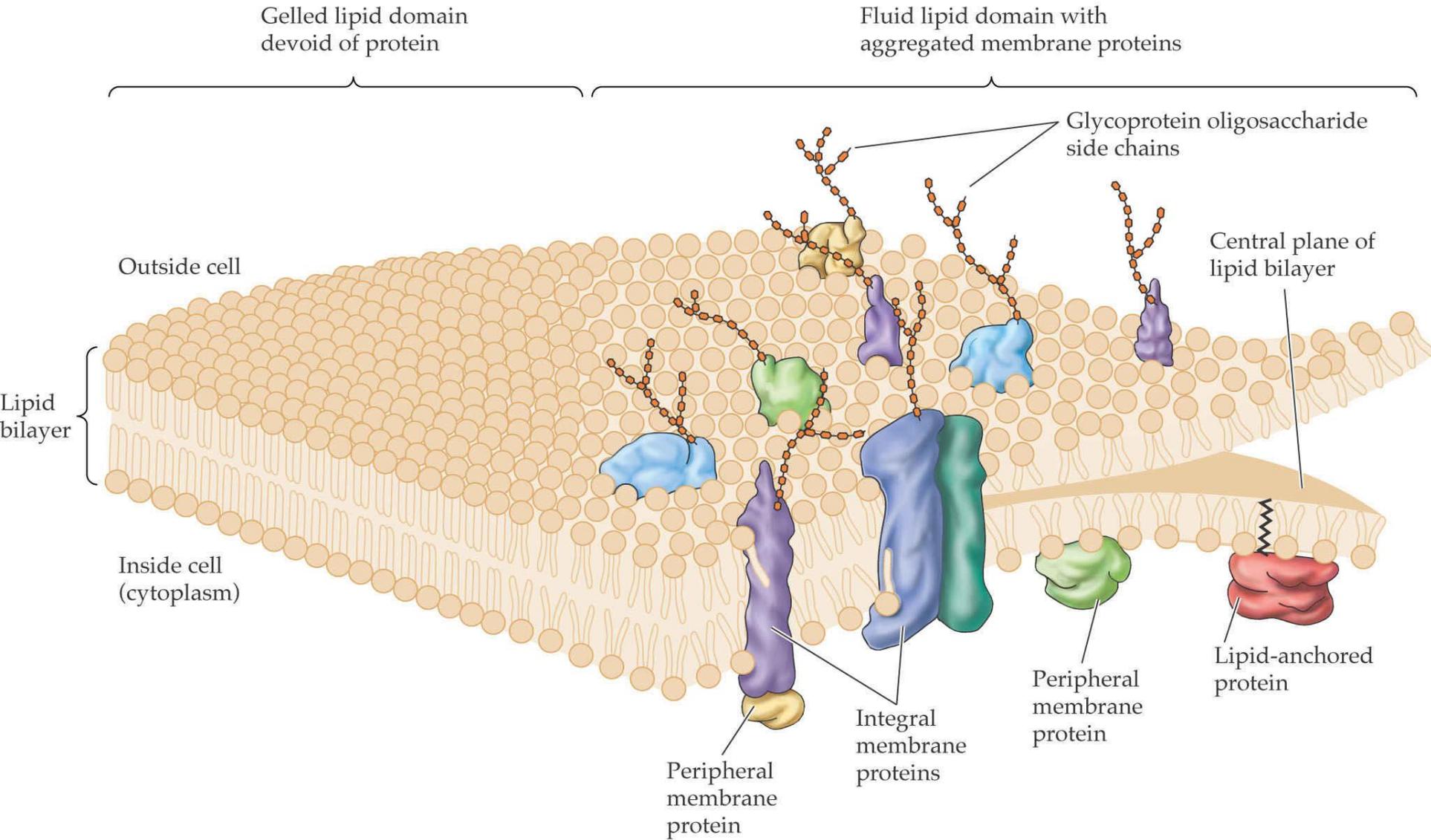
**Box 1.3.1****Chemical structures and melting points of the fatty acids most commonly found in plant biomembranes**

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 ( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Palmitoleic acid	-0.5
18:1 ( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Oleic acid	13.4
18:2 ( $\Delta^{9,12}$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{=CHCH}_2)_7\text{COOH}$	$\alpha$ -Linoleic acid	-5.0
18:3 ( $\Delta^{9,12,15}$ )	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	$\alpha$ -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!

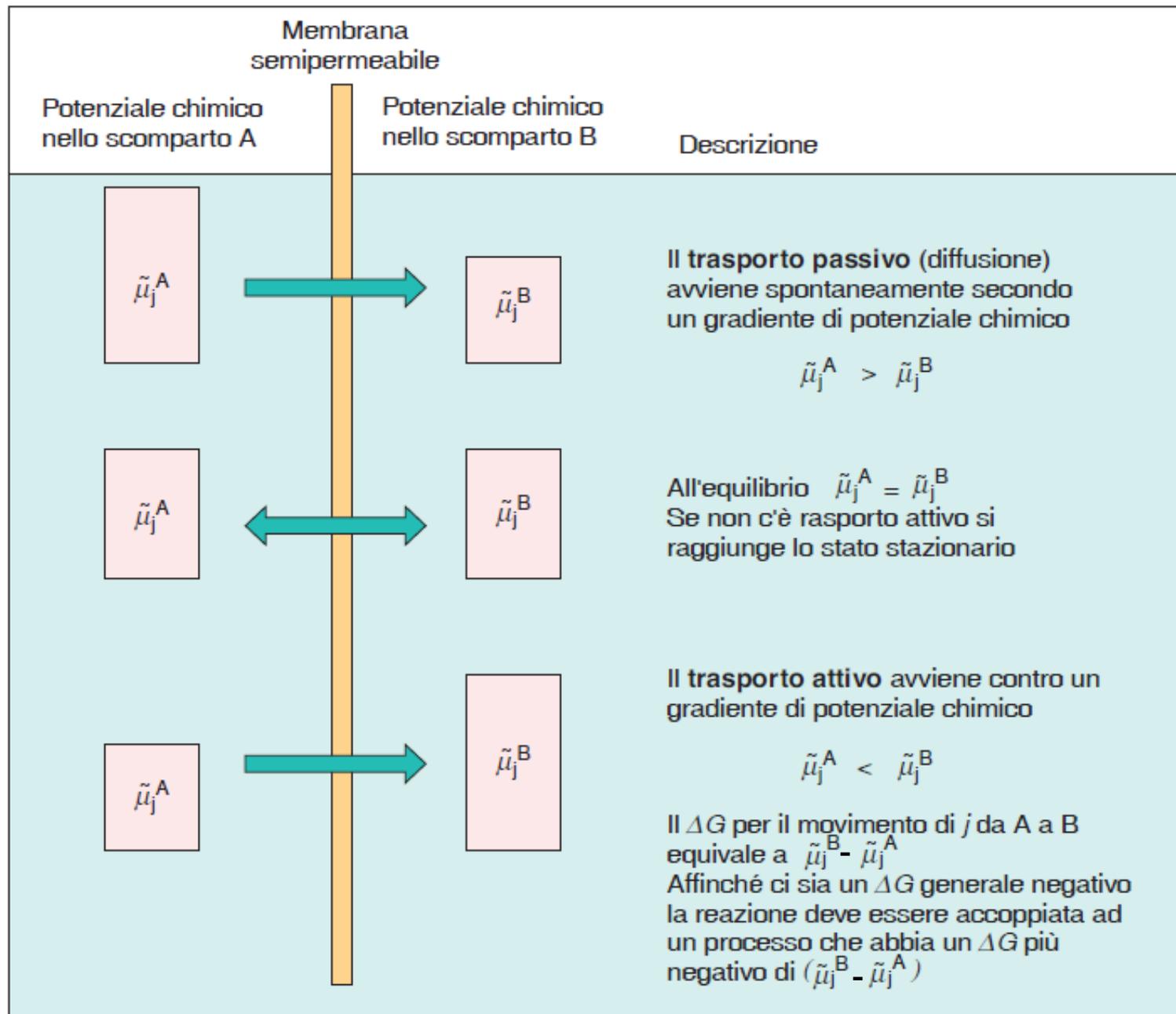
# Modello del mosaico fluido



## 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)

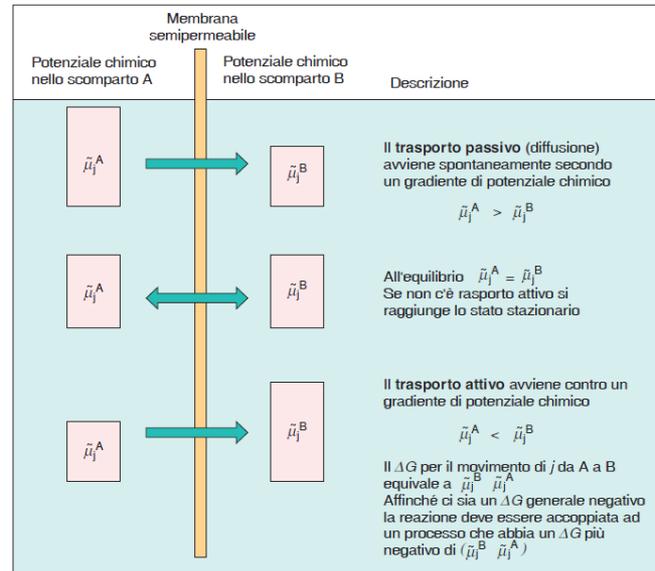


- Per un soluto non carico elettricamente (es. saccarosio)

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

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

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



Differenza di potenziale elettrochimico

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

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

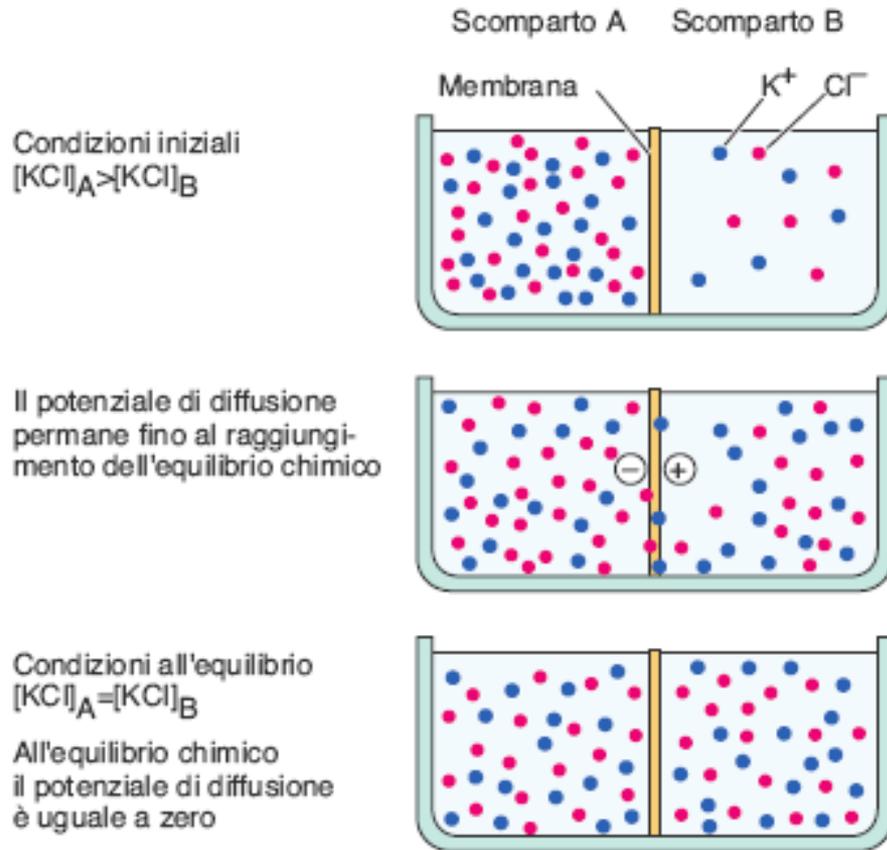
$$\mu_K^B = \mu_K^* + RT \ln C_K^B + zFE^B$$

↓

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

= 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 é 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

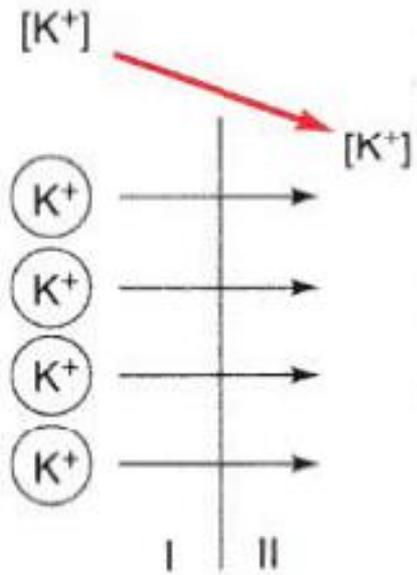
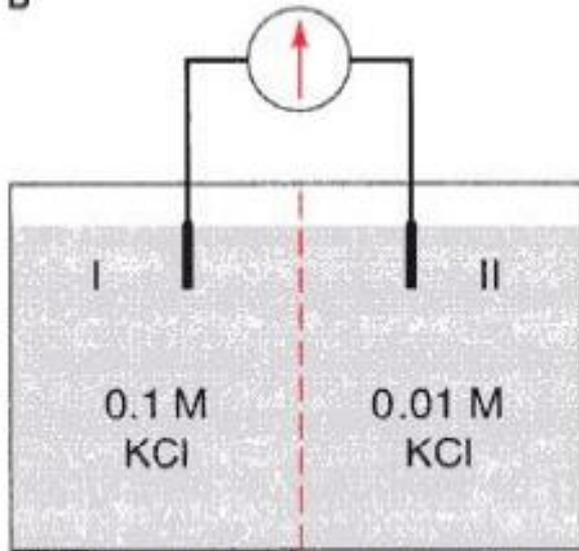
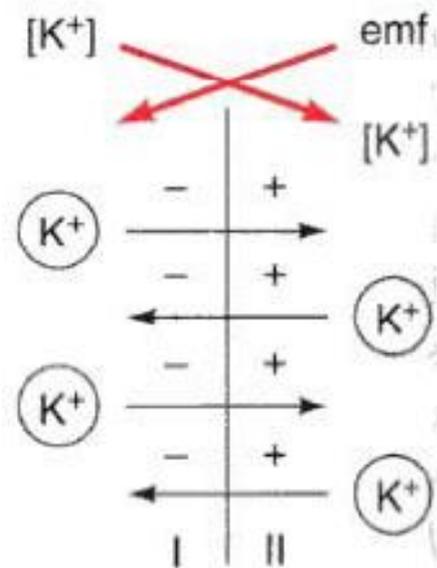
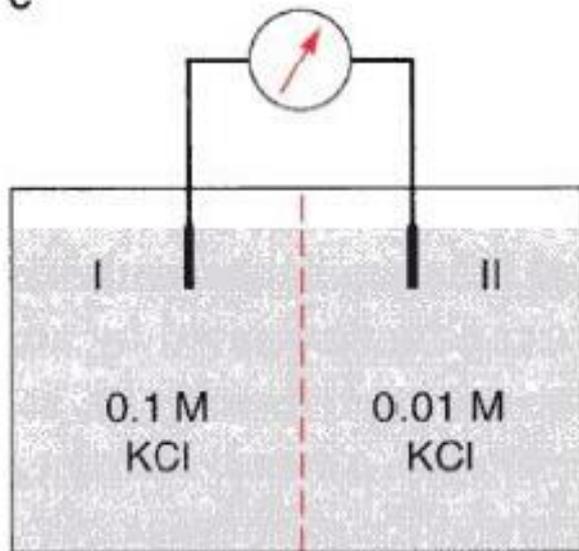
Una soluzione contiene sempre un numero uguale di anioni e cationi

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

in mV



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



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

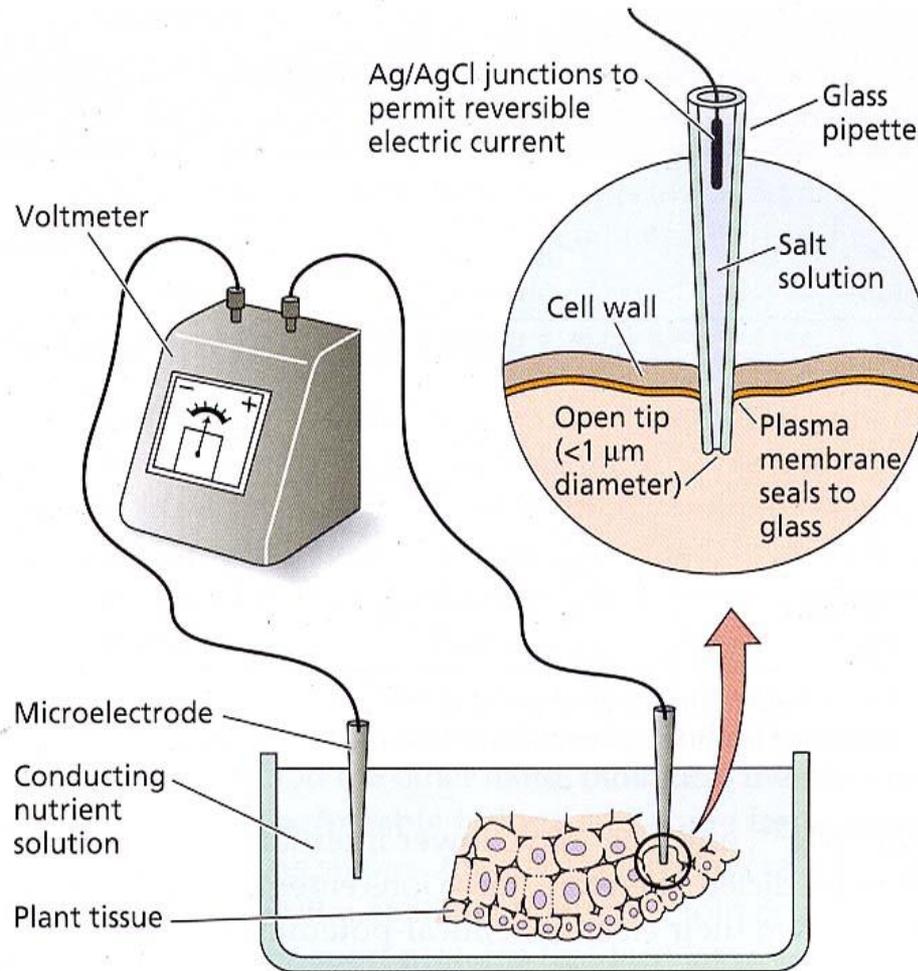
## Equazione di Goldman

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

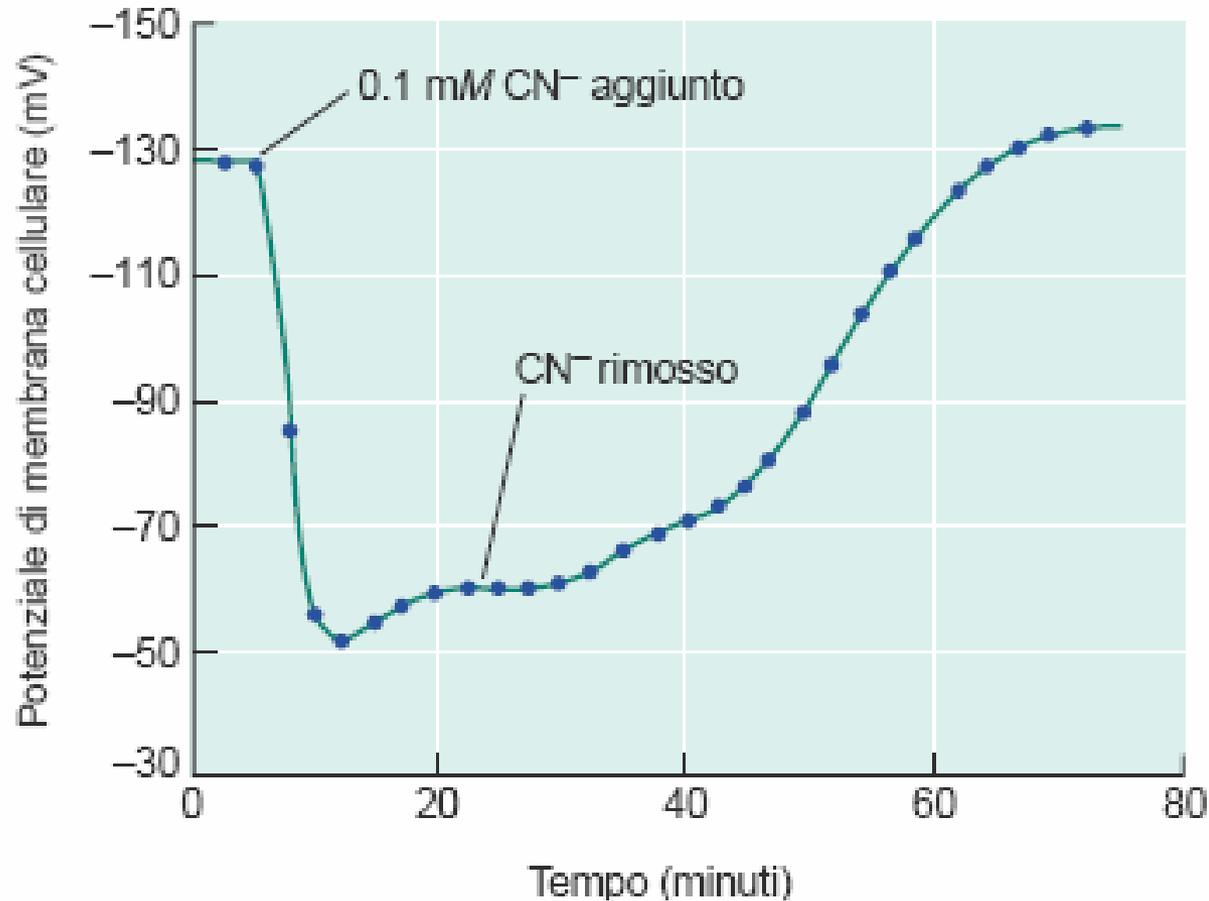
Tutte le cellule possiedono un potenziale di membrana, dovuto alla distribuzione asimmetrica degli ioni tra l'interno e l'esterno della cellula



$\Delta E$  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

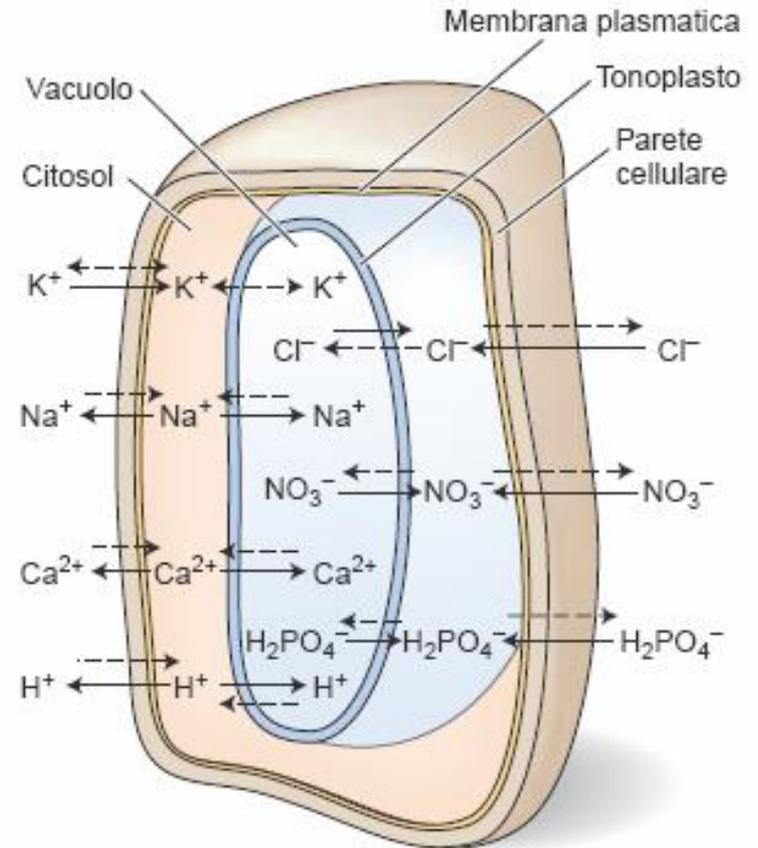
Valori previsti

Valori osservati

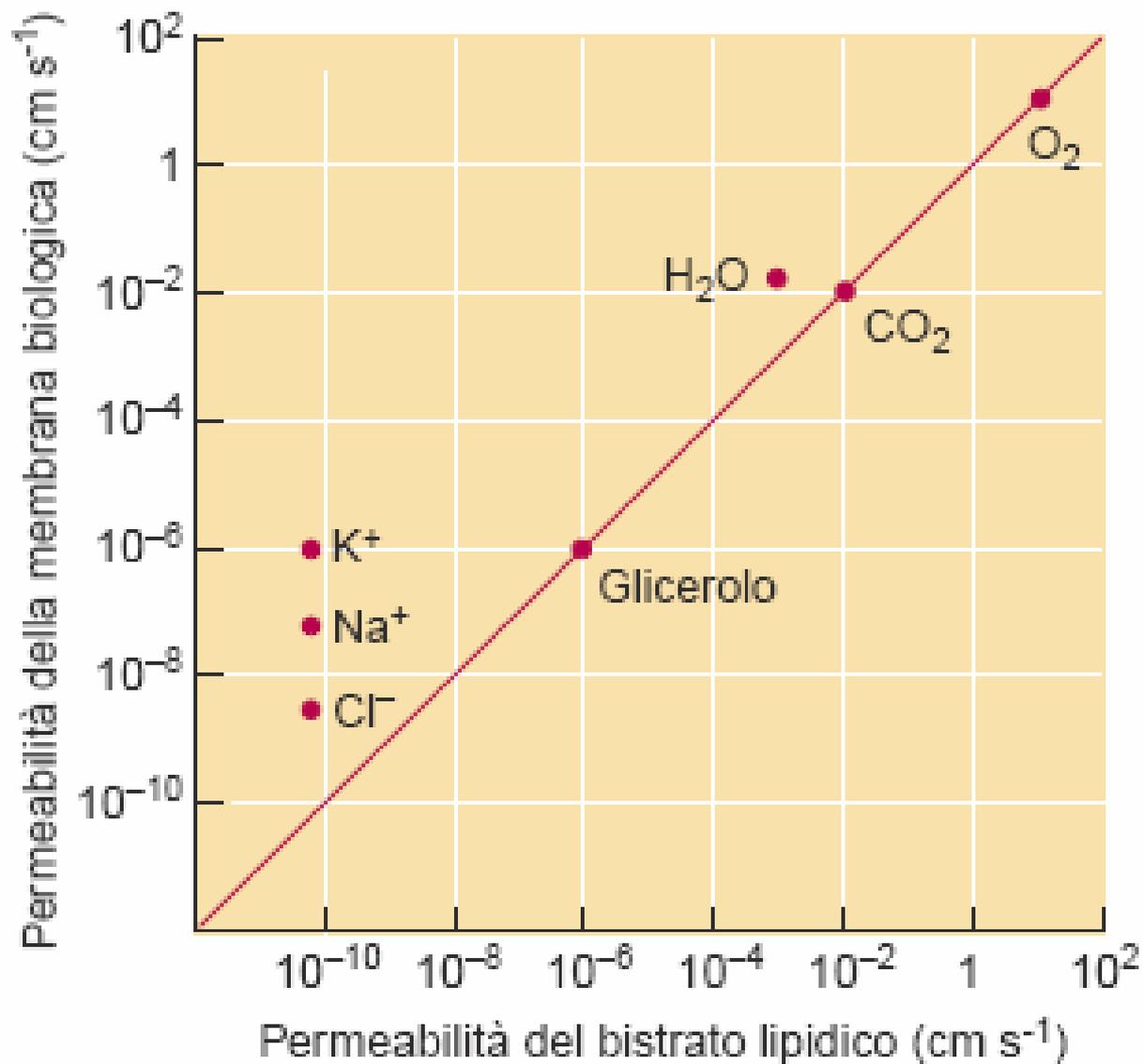
Solo ione potassio vicino all'equilibrio

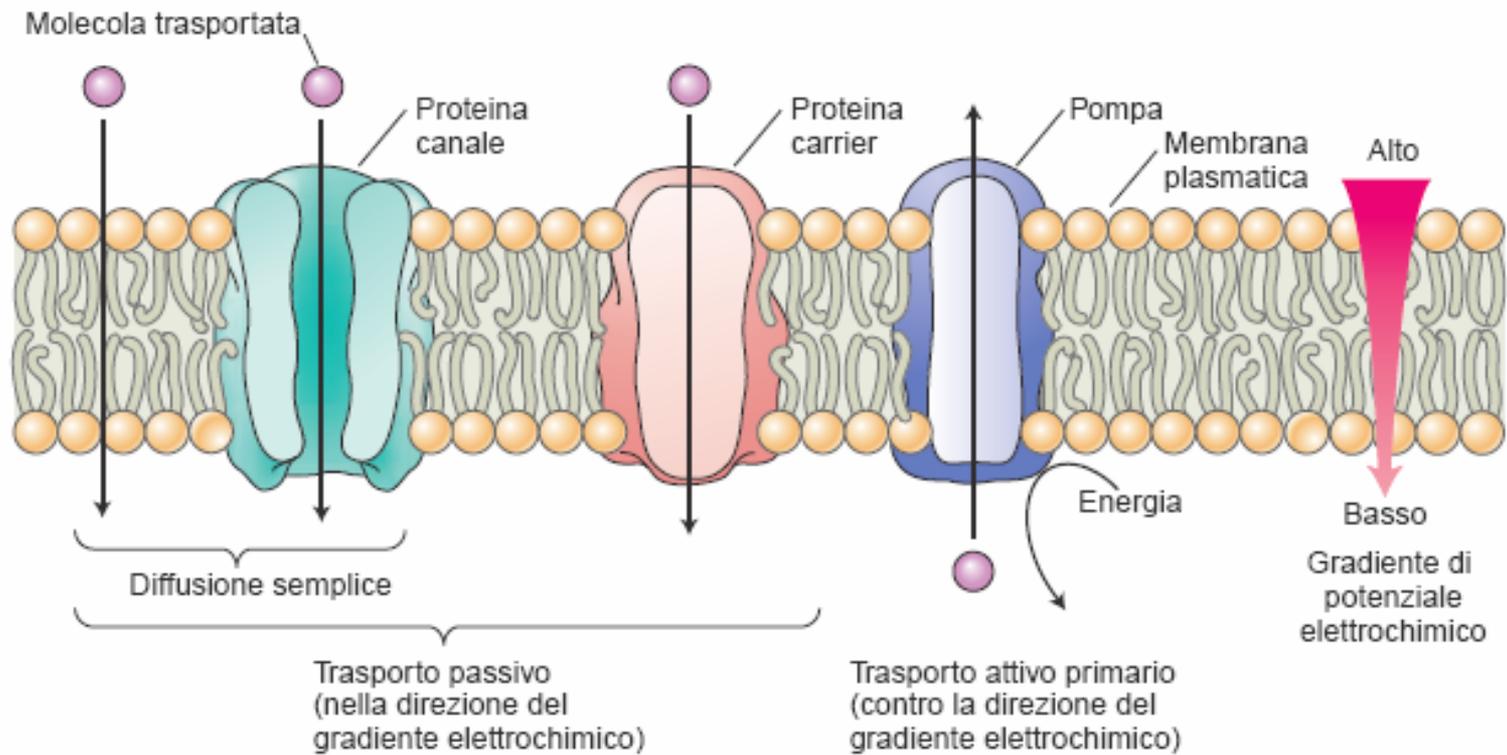
Anioni: concentrazioni più alte del previsto, prelievo attivo

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

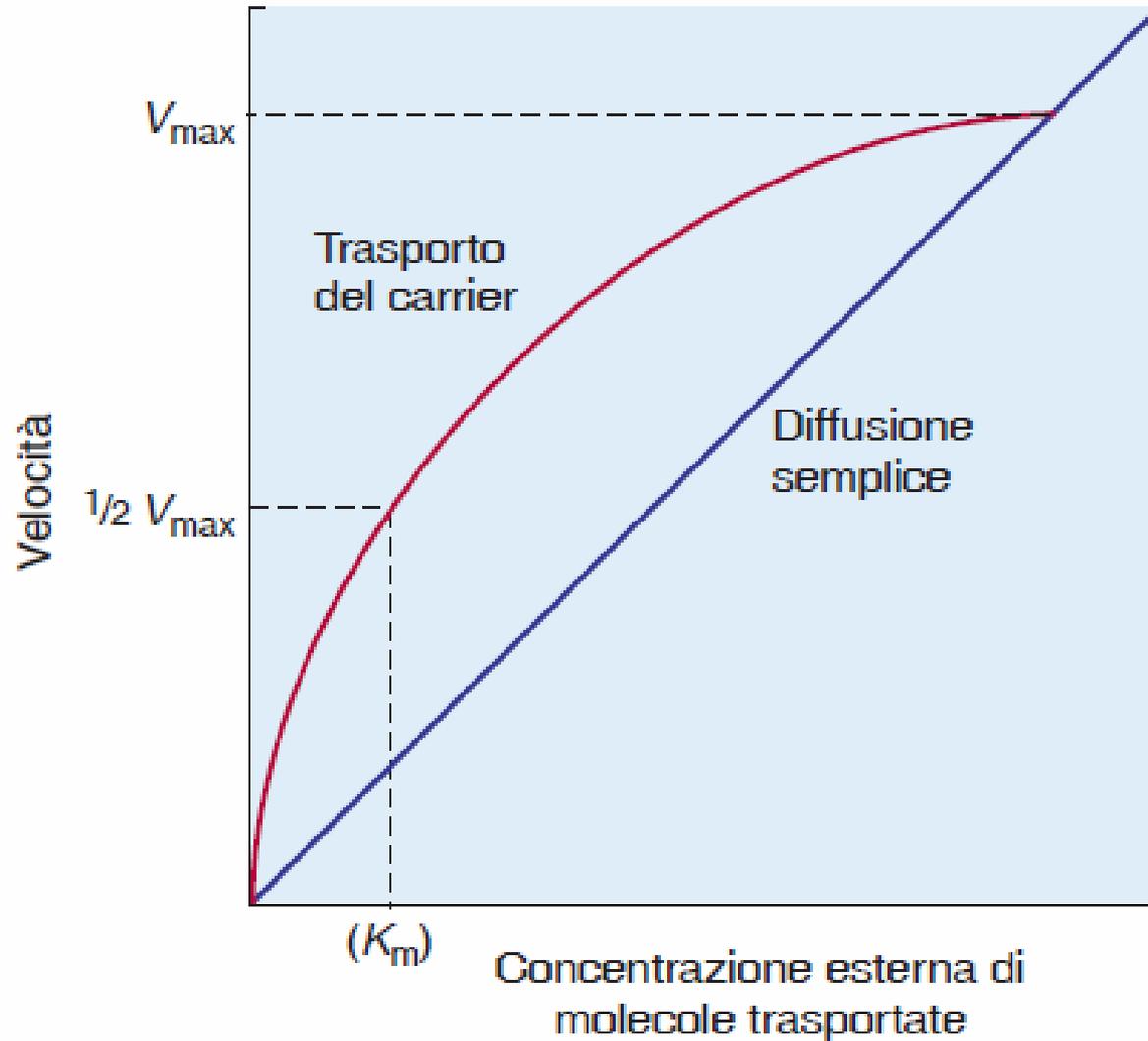
Numero di turnover:  $10^3$  ioni (o altre molecole)  $s^{-1}$

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

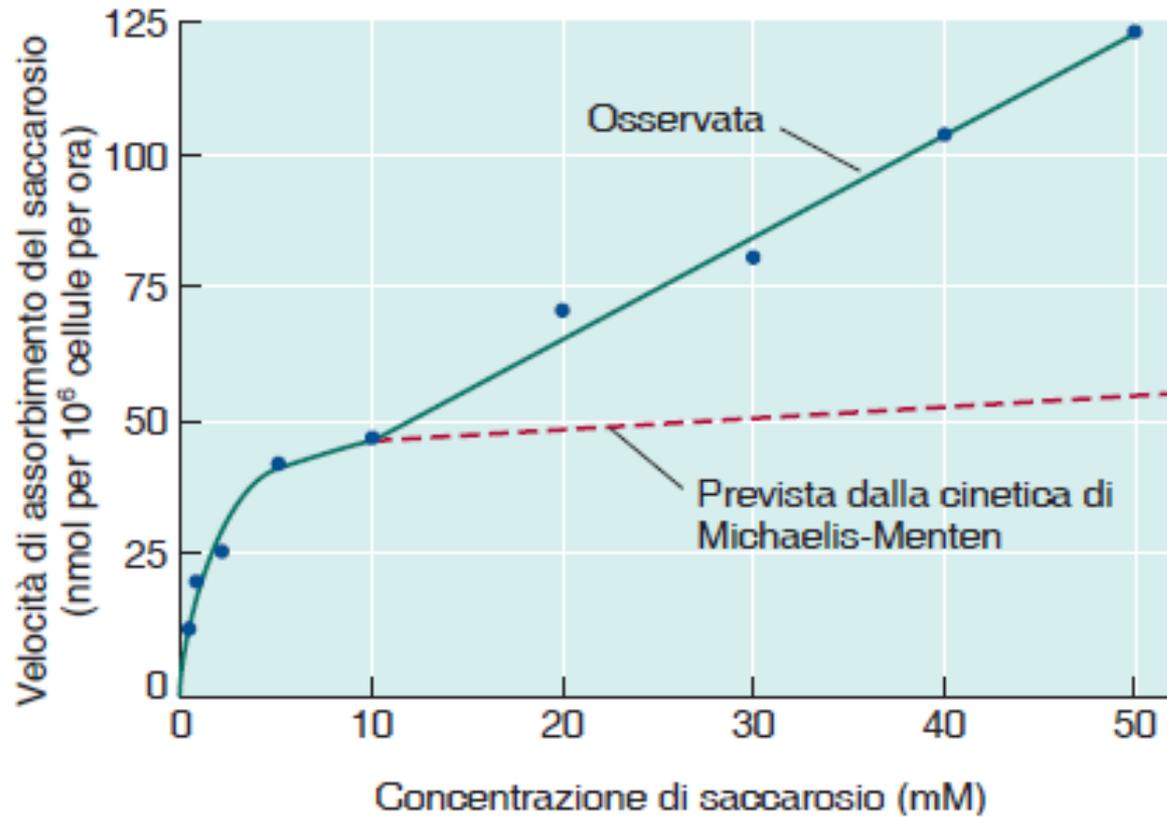
## Canali

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 P<sub>Pi</sub>) 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:

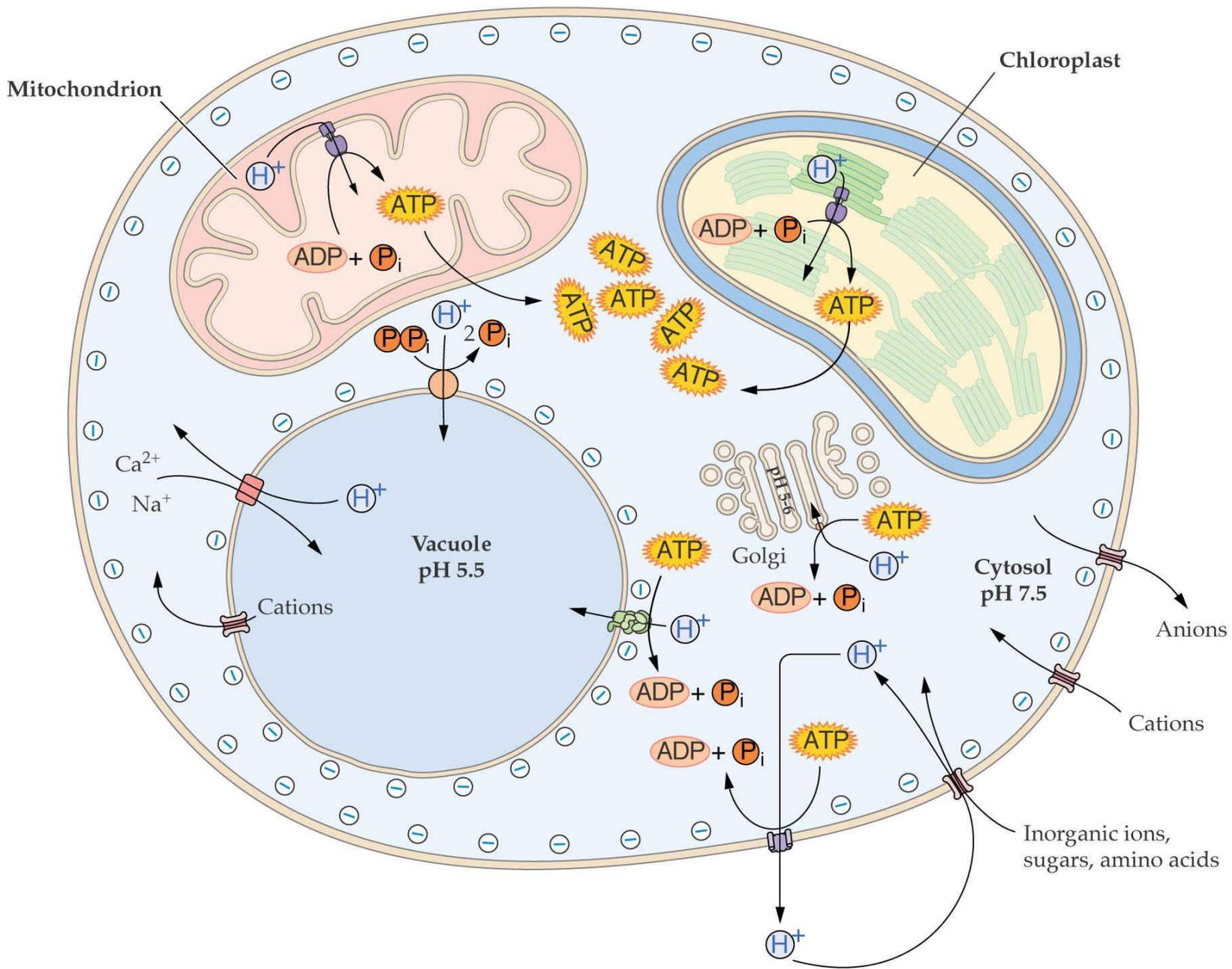
Pompa protonica (F H<sup>+</sup>-ATPasi o ATP sintasi)

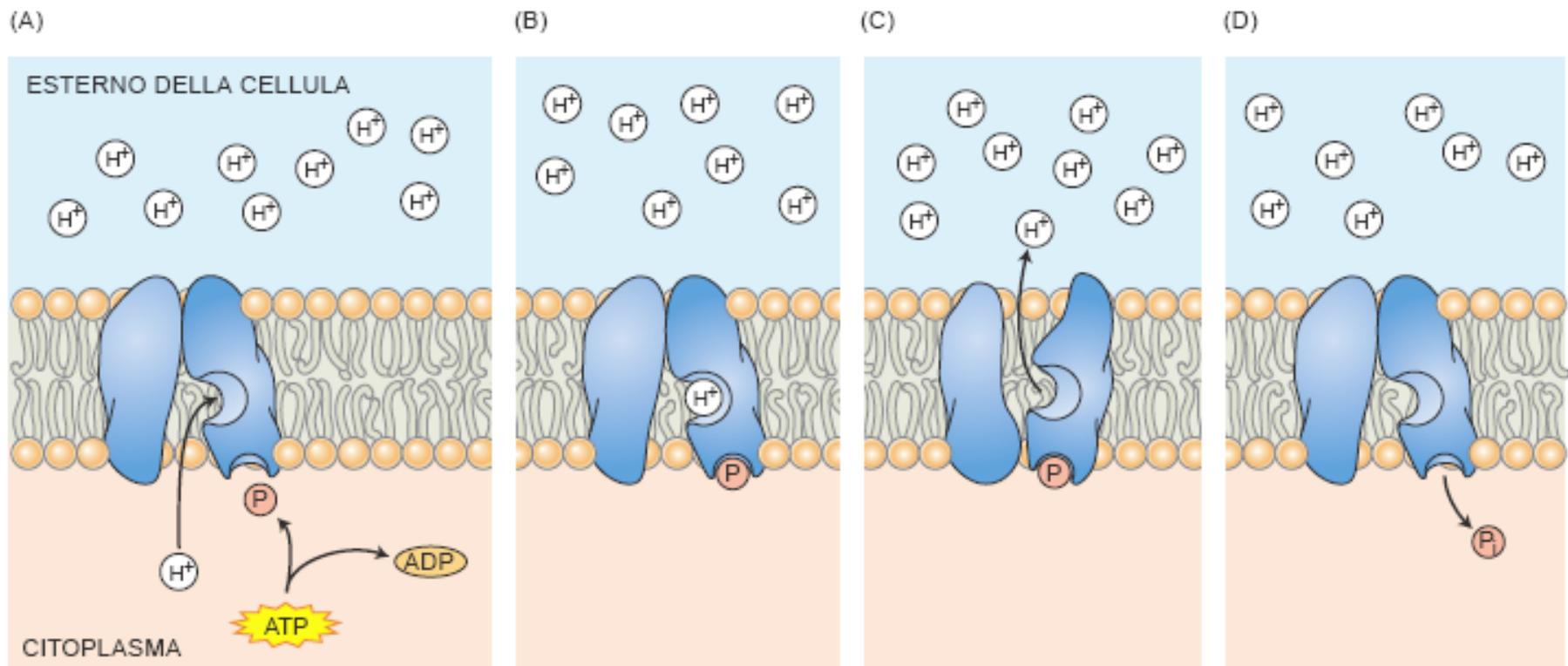
### Membrane mitocondriali, membrane plastidiali, reticolo endoplasmatico, etc...:

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  $H^+$ ) 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 NELLE PIANTE

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

# **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)= ATP sintasi**

**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 dimero o oligomero

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

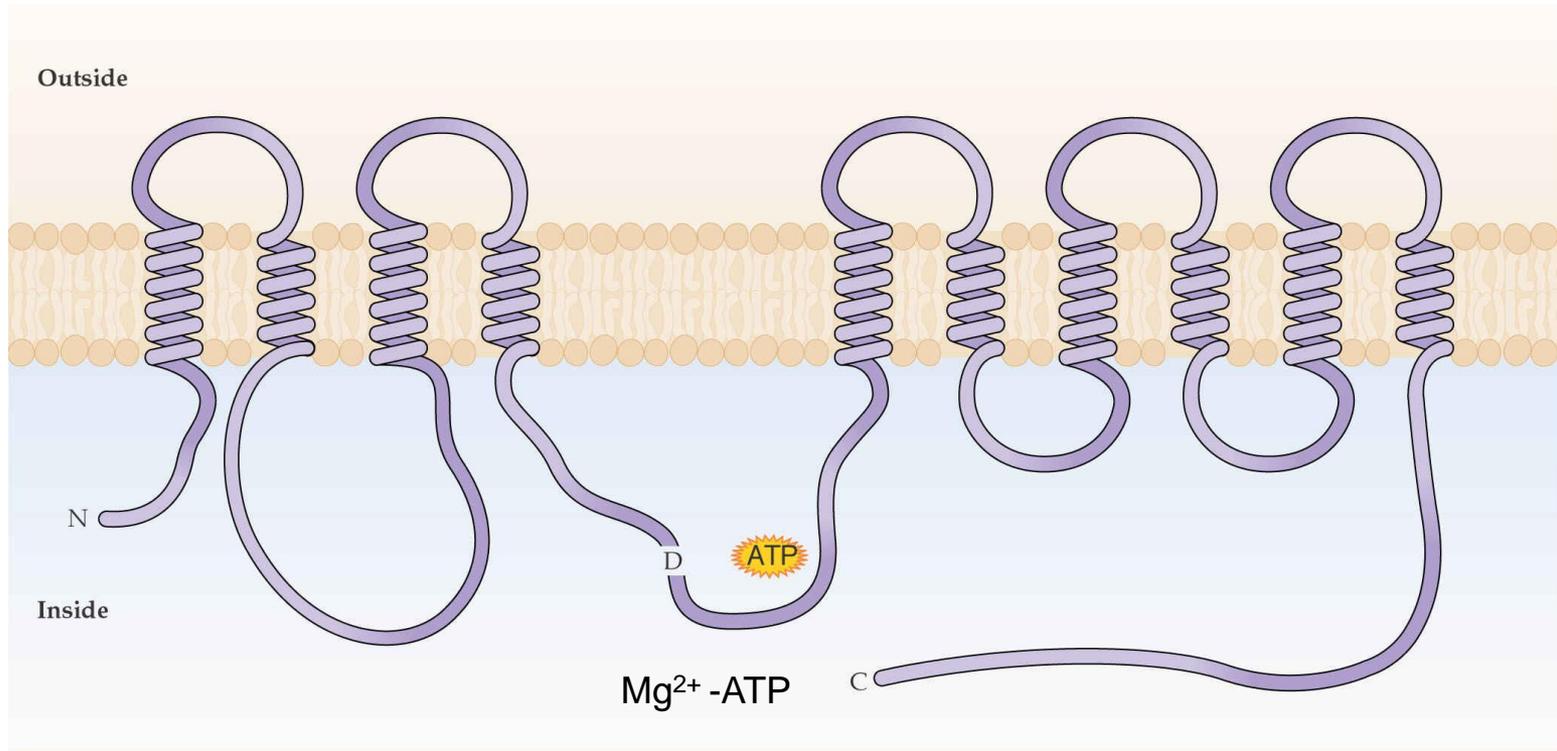
Funzione: pompa protoni verso l'apoplasto utilizzando l'energia derivante da idrolisi dell'ATP (-50 kJ mol<sup>-1</sup>)

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

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

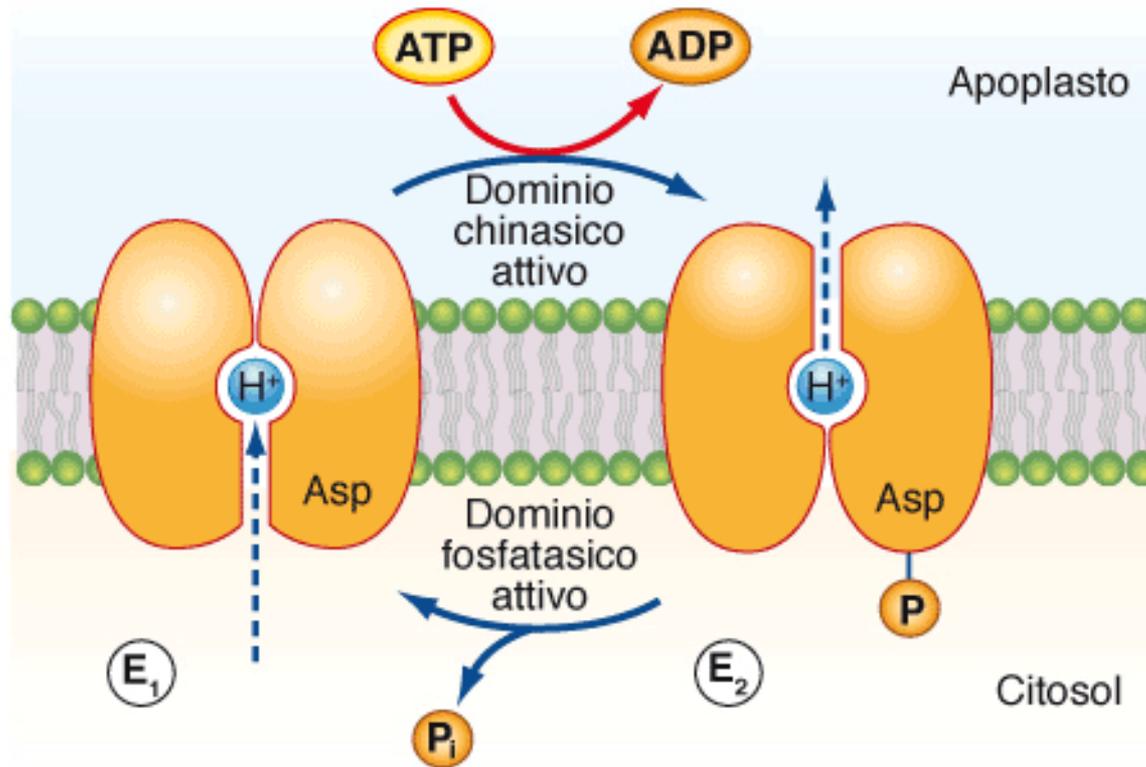
Nella frazione citosolica 3 domini con attività:  
chinasica, fosfatasica, autoinibitoria

# H<sup>+</sup>-ATPasi della membrana plasmatica



10 regioni transmembrana

- Tra la 6a e la 10a, sito a cui si lega il protone
- Regione idrofilica tra la 4a e la 5a (dominio chinasi, catalizza l'idrolisi dell'ATP), contenente un residuo di acido aspartico (auto-fosforilato durante la catalisi, regione conservata tra molte pompe ioniche)
- Ansa idrofilica tra la 3a e la 4a (dominio fosfatasi), partecipa alla defosforilazione del residuo di acido aspartico



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)

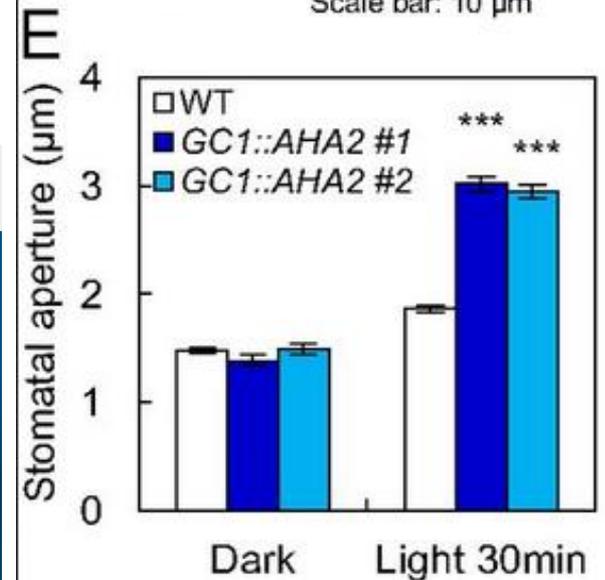
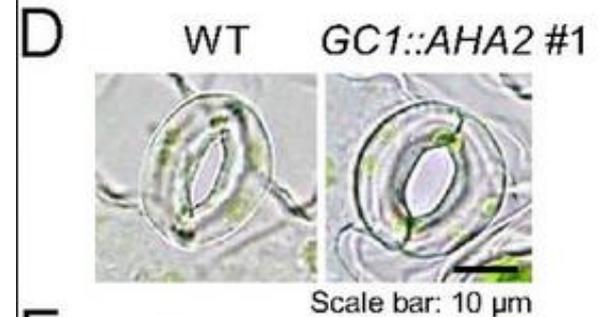
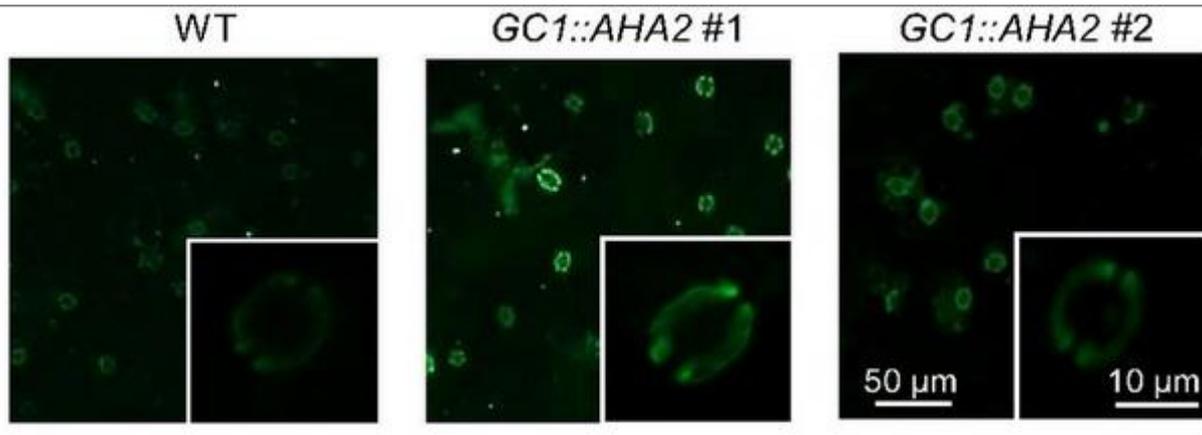
Appartengono alla stessa superfamiglia (delle P-ATPasi):

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 FISIOLÓGICO 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



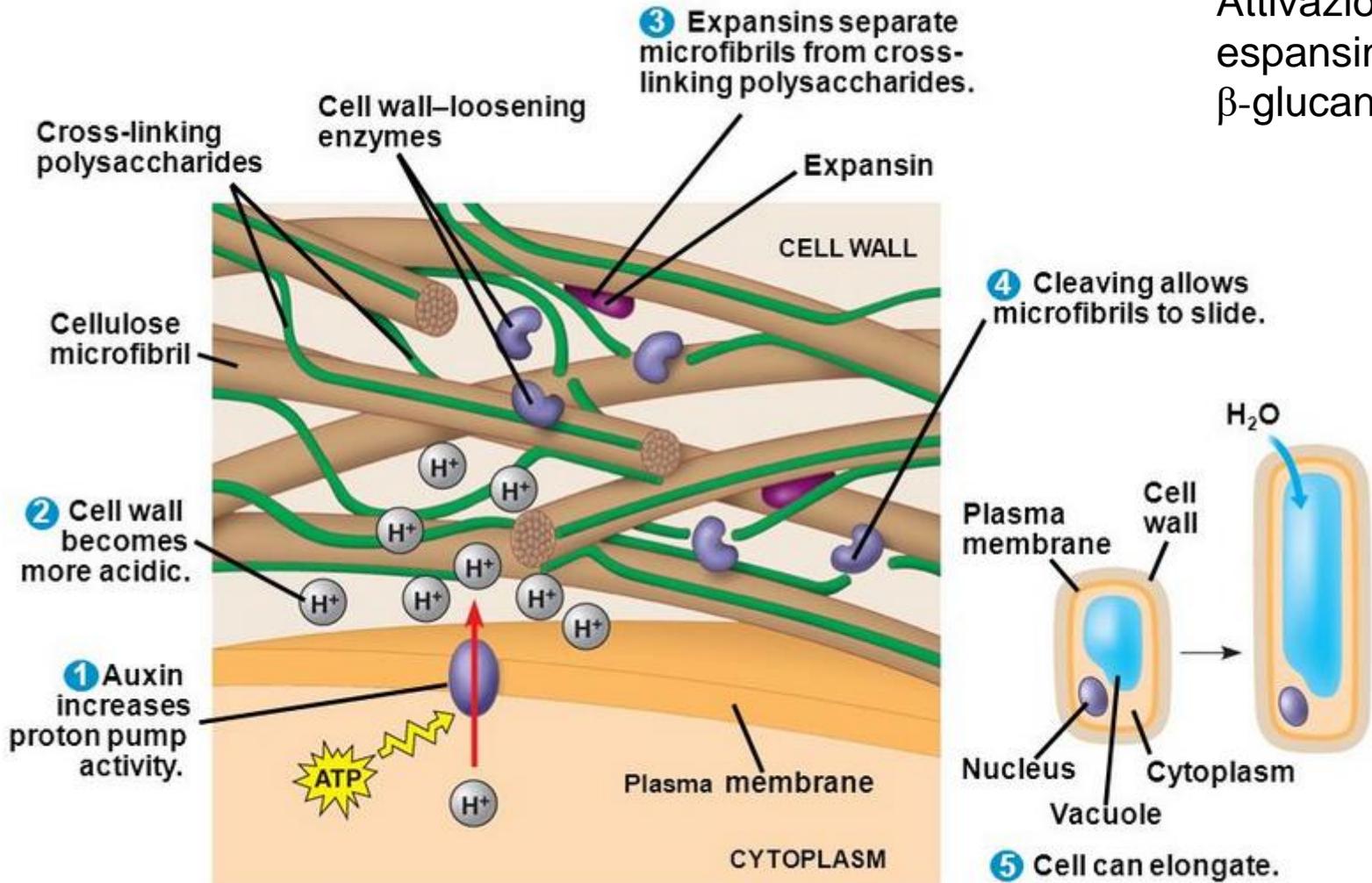
Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth

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>

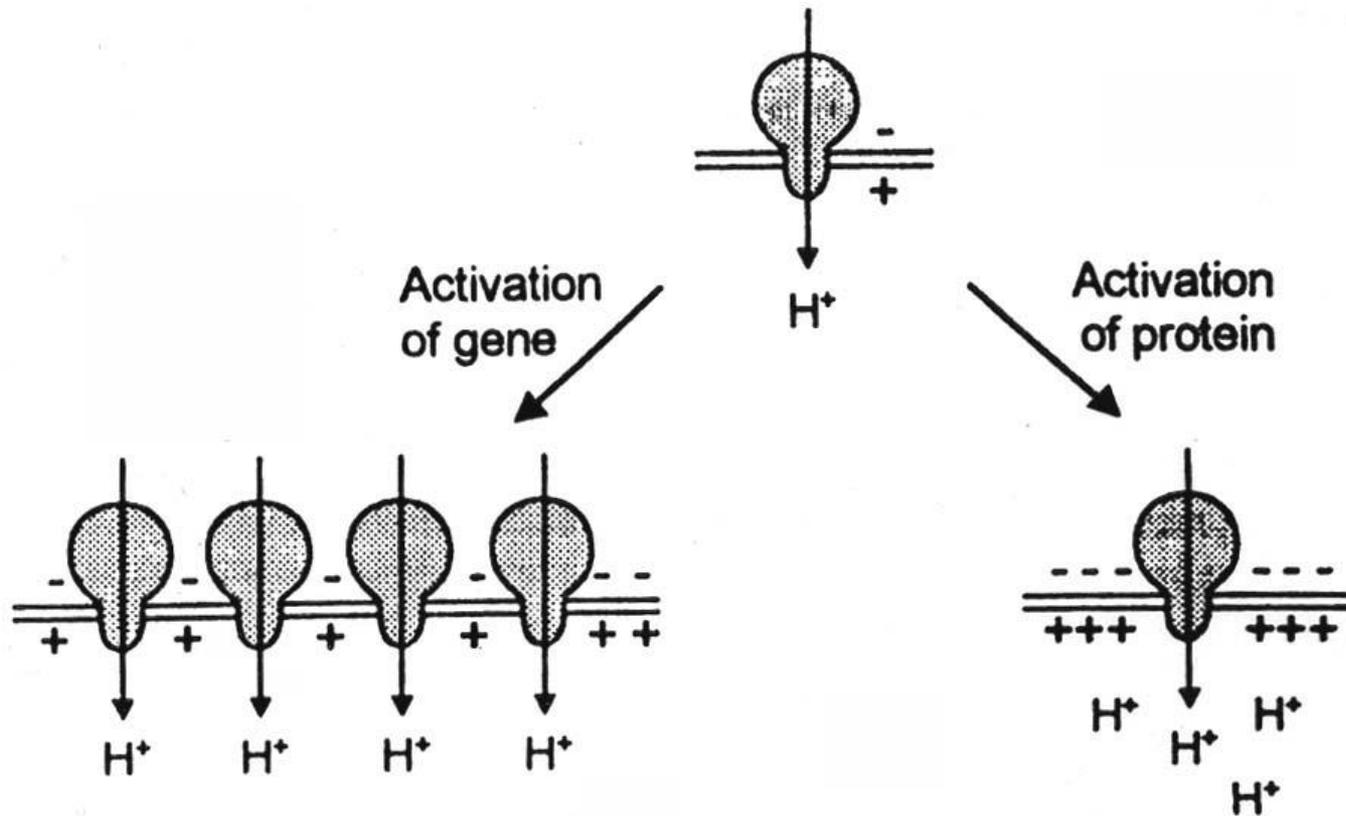
# RUOLO FISILOGICO DELL'H<sup>+</sup>-ATPasi DEL PLASMALEMMA

## Accrescimento per distensione

Attivazione di  
espansine e  
 $\beta$ -glucanasi



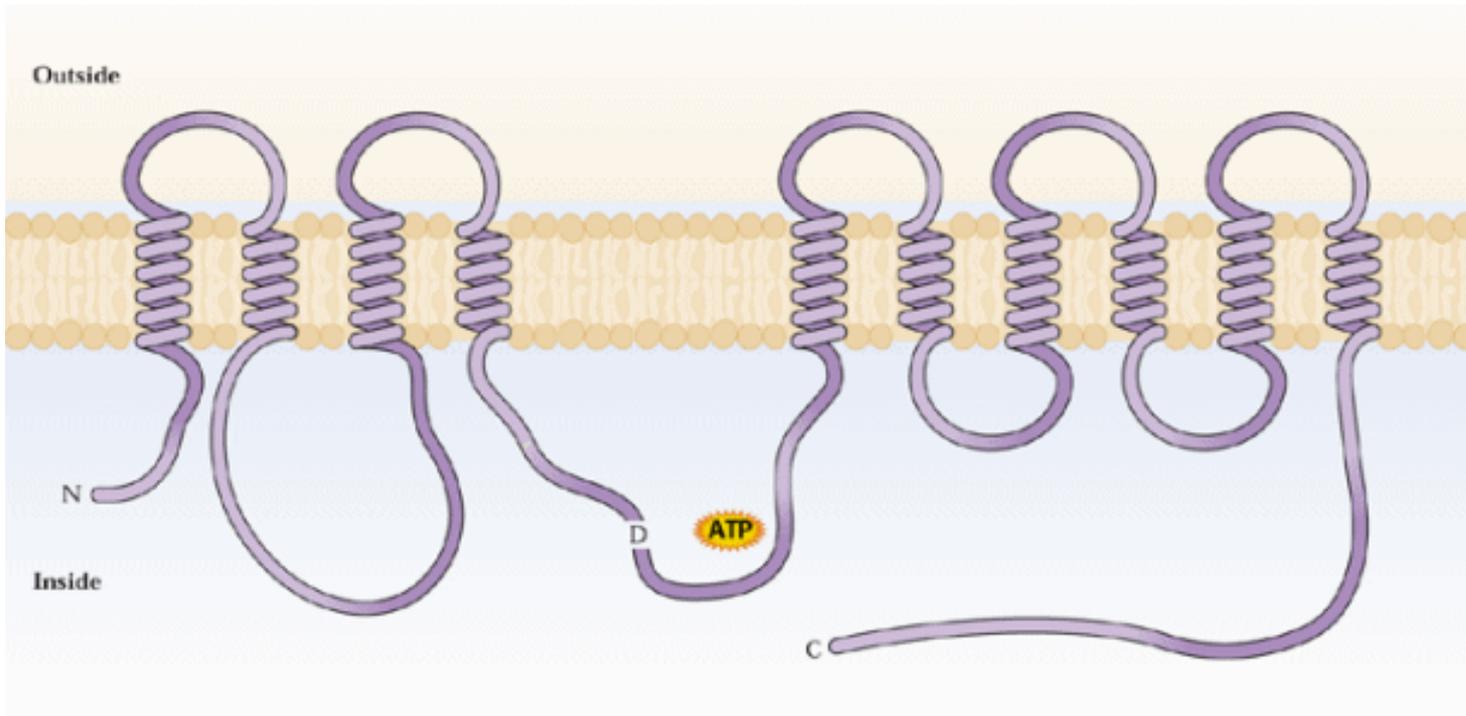
Possibili meccanismi che determinano un aumento di attività della H<sup>+</sup>-ATPasi



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

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

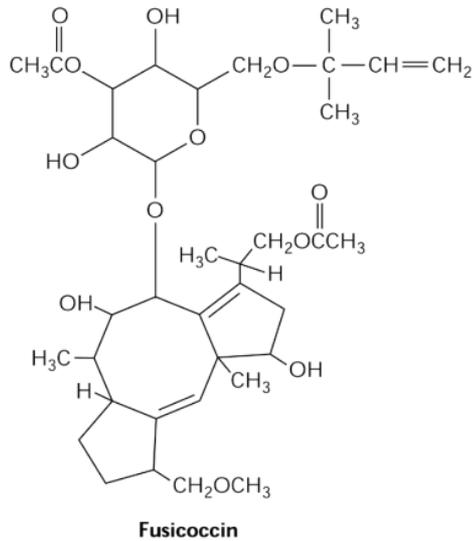
## Il dominio C-terminale regola l'attività dell'enzima



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



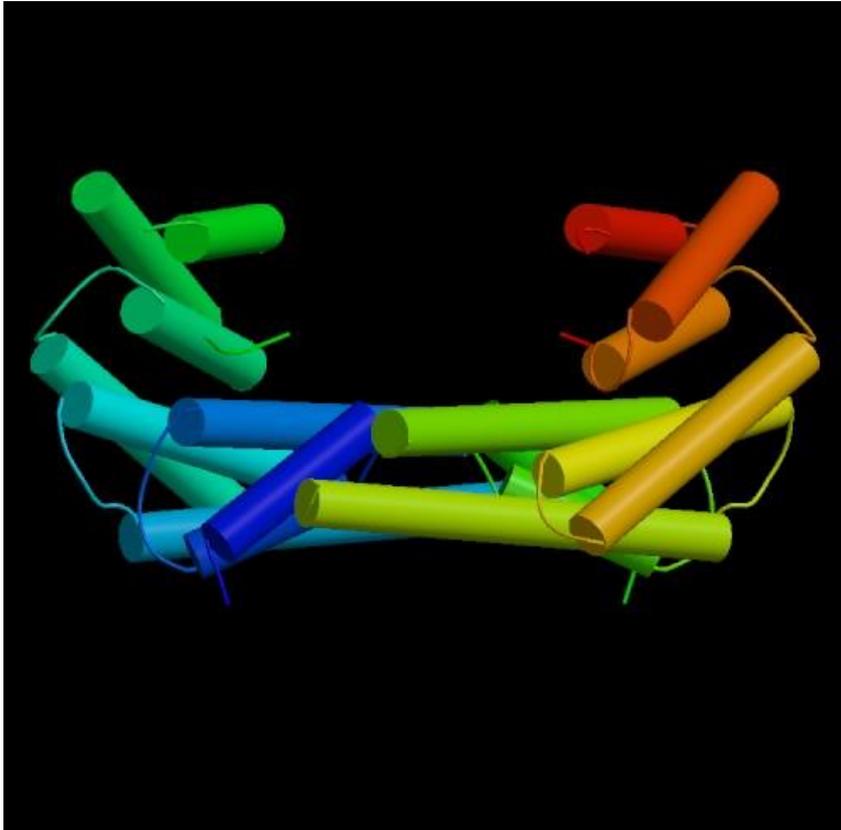
Morte per disidratazione



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



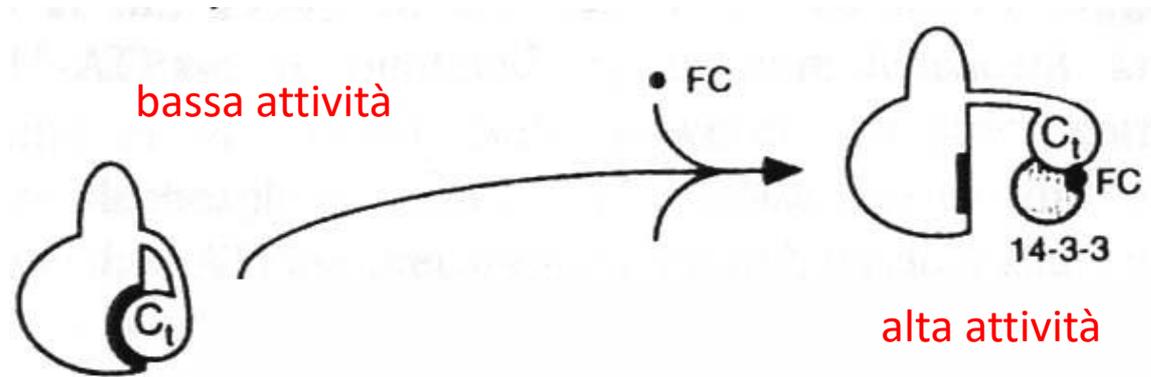
## Proteine 14-3-3

Classe di proteine regolatrici diffuse in tutti gli eucarioti

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

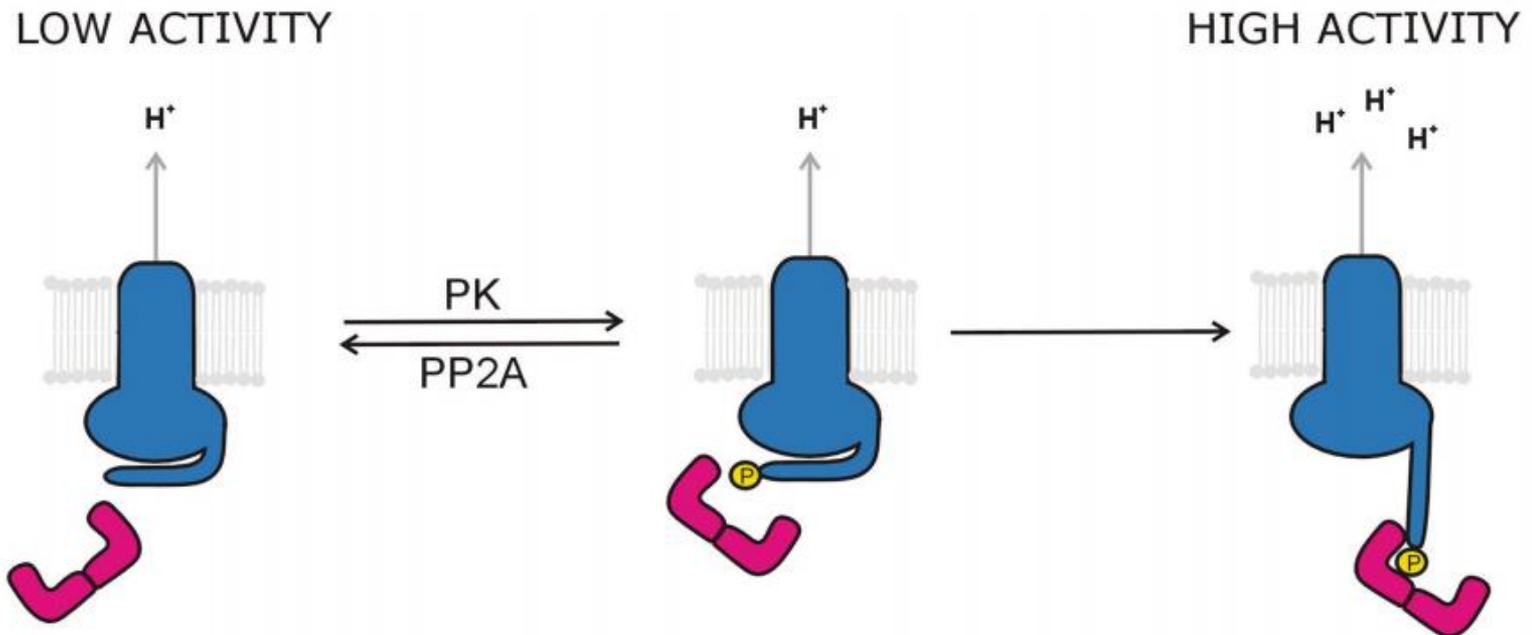
Interagiscono con numerose proteine bersaglio, tramite il riconoscimento di particolari sequenze fosforilate su residui di serina/treonina

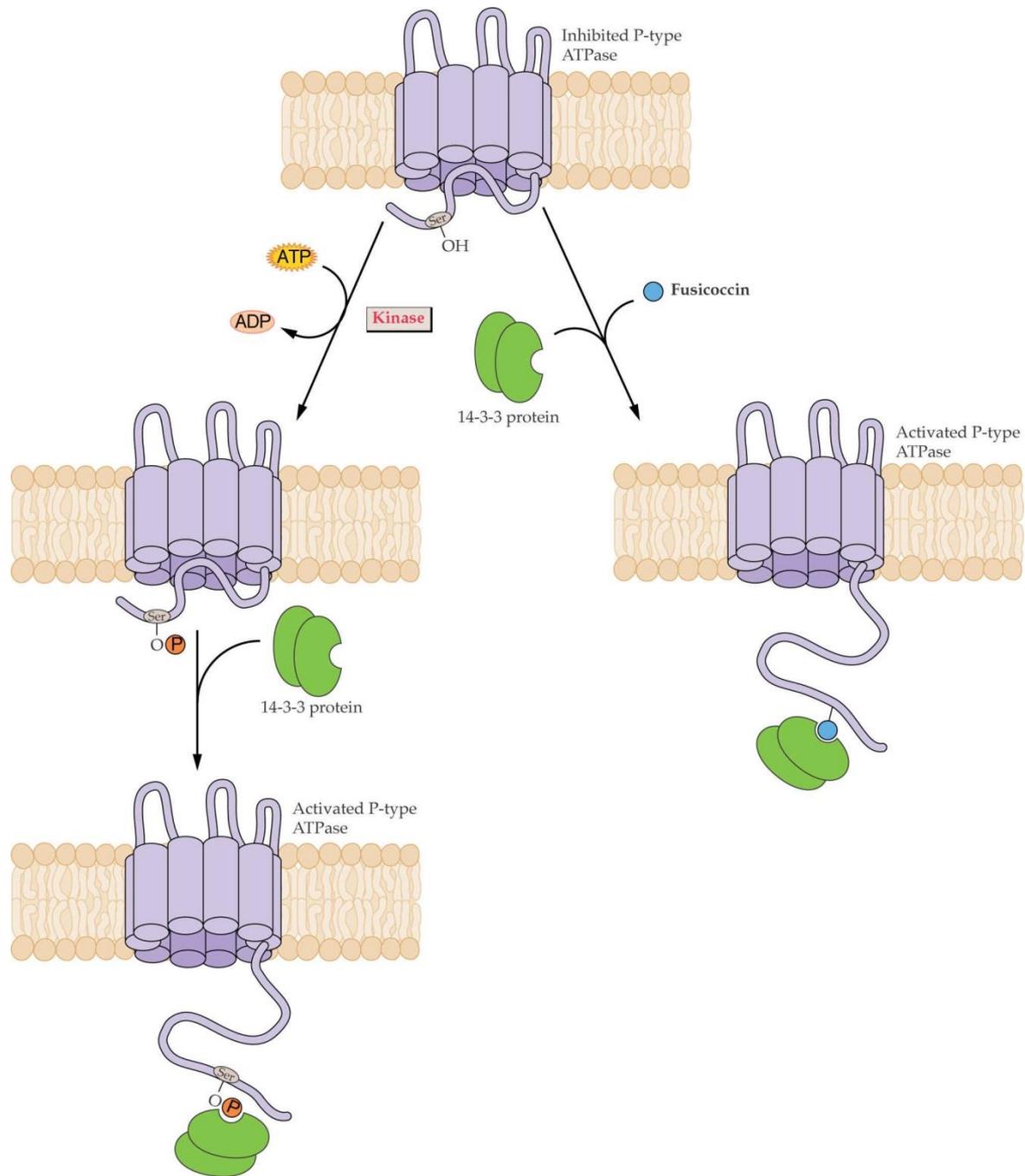
## Meccanismo di azione della fusicoccina



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





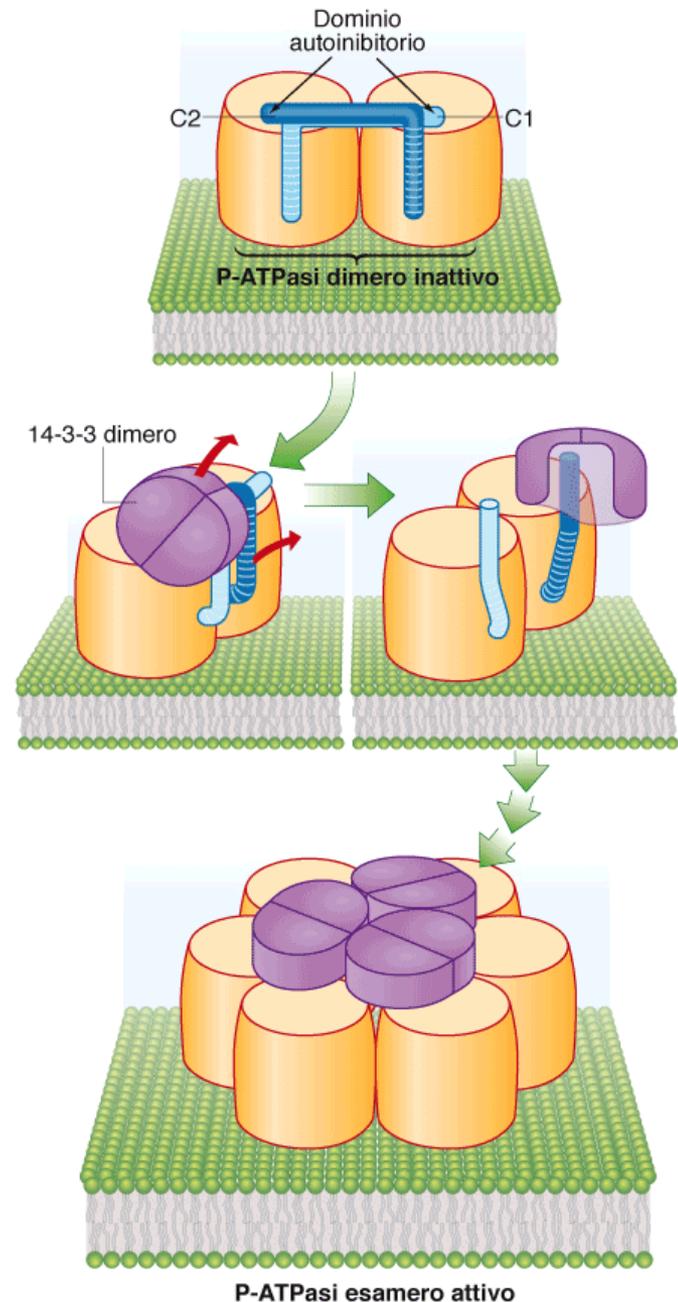
Attivazione della P-ATPasi tramite **conversione di un dimero inattivo in esamero attivo:**

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-



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

Famiglia delle V –ATPasi, ubiquitaria in piante e animali

Massa molecolare > 600 kDa

Complesso proteico costituito da molte subunità, divise in due sottocomplessi

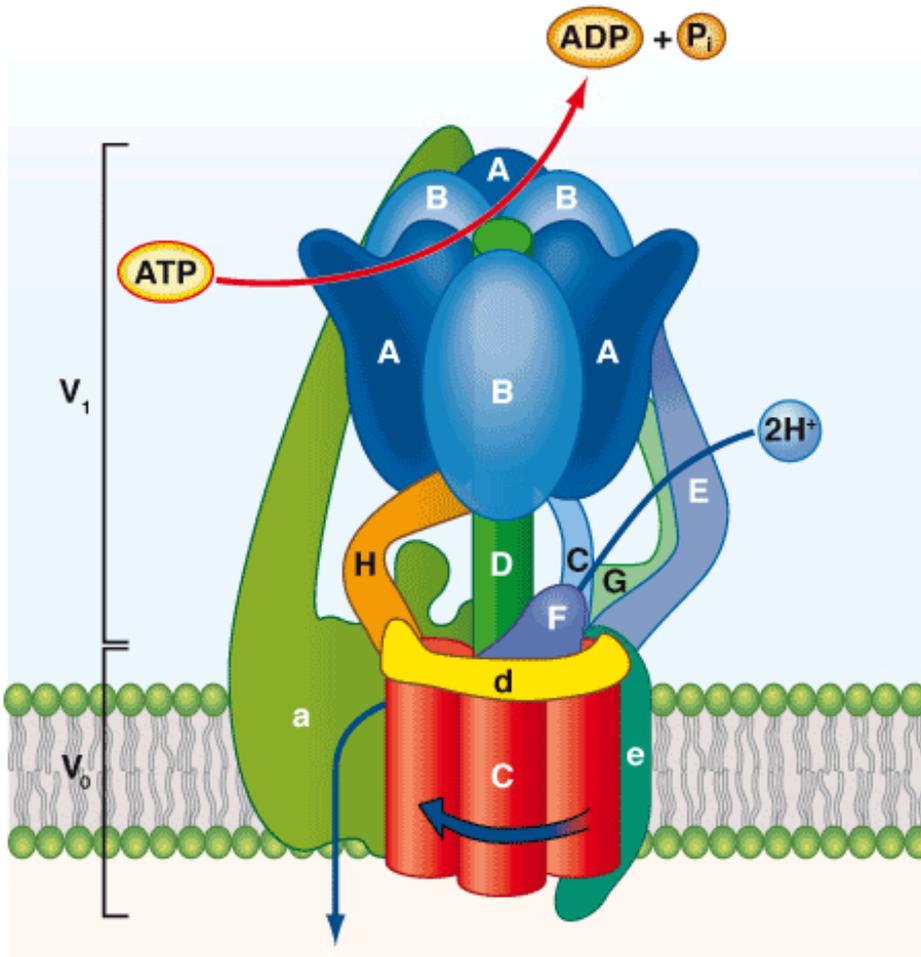
Stechiometria: 2 H<sup>+</sup> per 1 ATP

Pompa protoni all'interno del vacuolo

Importanza:

- Mantiene gradiente di protoni tra citosol e succo vacuolare
- Mantiene il potenziale di membrana trans-tonoplasto
- Mantiene basso il pH del succo vacuolare

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



Due sottocomplessi:

- **Porzione V<sub>1</sub>** (idrolisi dell'ATP)  
«Testa» (esamero A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>)  
+ altre 6 subunità

- **Porzione V<sub>0</sub>** (trasporto di H<sup>+</sup>)  
Anello c<sub>6</sub>  
(più altre sub-unità a, d, c', c'', e)

Le due porzioni sono collegate da altre sub-unità (C, E, G, H) che costituiscono l'**asse periferico**

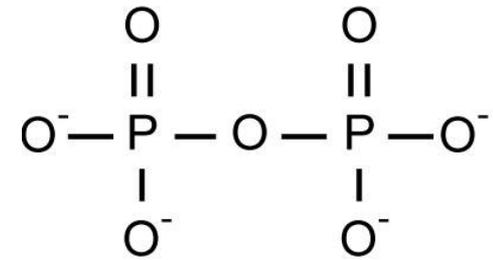
Le sub-unità D ed F formano l'**asse centrale**

Idrolisi di ATP a livello di A, rotazione dell'asse centrale che spinge l'anello di subunità c a ruotare rispetto alla sub-unità a, promuovendo il movimento vettoriale dei protoni attraverso V<sub>0</sub>.

Attività regolata da un meccanismo di ossidoriduzione che coinvolge residui di cisteina nelle subunità A ed E (inibizione tramite ossidazione di due gruppi tiolici a ponti disolfuro)

## H<sup>+</sup> PPasi

Pirofosfato: P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>



Indicate anche come V-PPasi

Ubiquitarie nelle piante superiori, presenti anche nelle alghe verdi, negli archeobatteri.  
Assenti in Animali e Funghi. In *Arabidopsis* 3 geni

Singolo polipeptide, massa molecolare: ca. 80 kDa

Stato funzionale: omodimero

Stechiometria: 1 H<sup>+</sup> per 1 PP<sub>i</sub> (l'idrolisi di PP<sub>i</sub> rilascia meno energia rispetto all'idrolisi di ATP)

Nelle piante, due tipi di V-PPasi filogeneticamente distinte

16-17 domini transmembrana, 5 loops citoplasmatici dove sono presenti i siti di legame e idrolisi di Mg<sup>2+</sup>-PPi

Presente soprattutto nel tonoplasto (vacuolo), ma rilevate anche nel plasmalemma e nel Golgi

Regolazione dell'attività mediata da ossido-riduzione di due residui di cisteina

Sovraespressione di geni per V-PPasi in *Arabidopsis* aumenta la tolleranza allo stress salino e allo stress idrico, dovuta a potenziamento antiporto Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> che sequestra ioni nel vacuolo e aumenta la capacità osmoregolatoria (= maggiore tolleranza allo stress idrico).

## F-H<sup>+</sup> ATPasi (cloroplasto e mitocondrio) o ATP sintasi

Complessi enzimatici molto conservati:

Procarioti: plasmalemma

Eucarioti: tilacoidi del cloroplasto (CF<sub>o</sub>-CF<sub>1</sub> ATP sintasi)

e creste mitocondriali (F<sub>o</sub>-F<sub>1</sub> ATP sintasi)

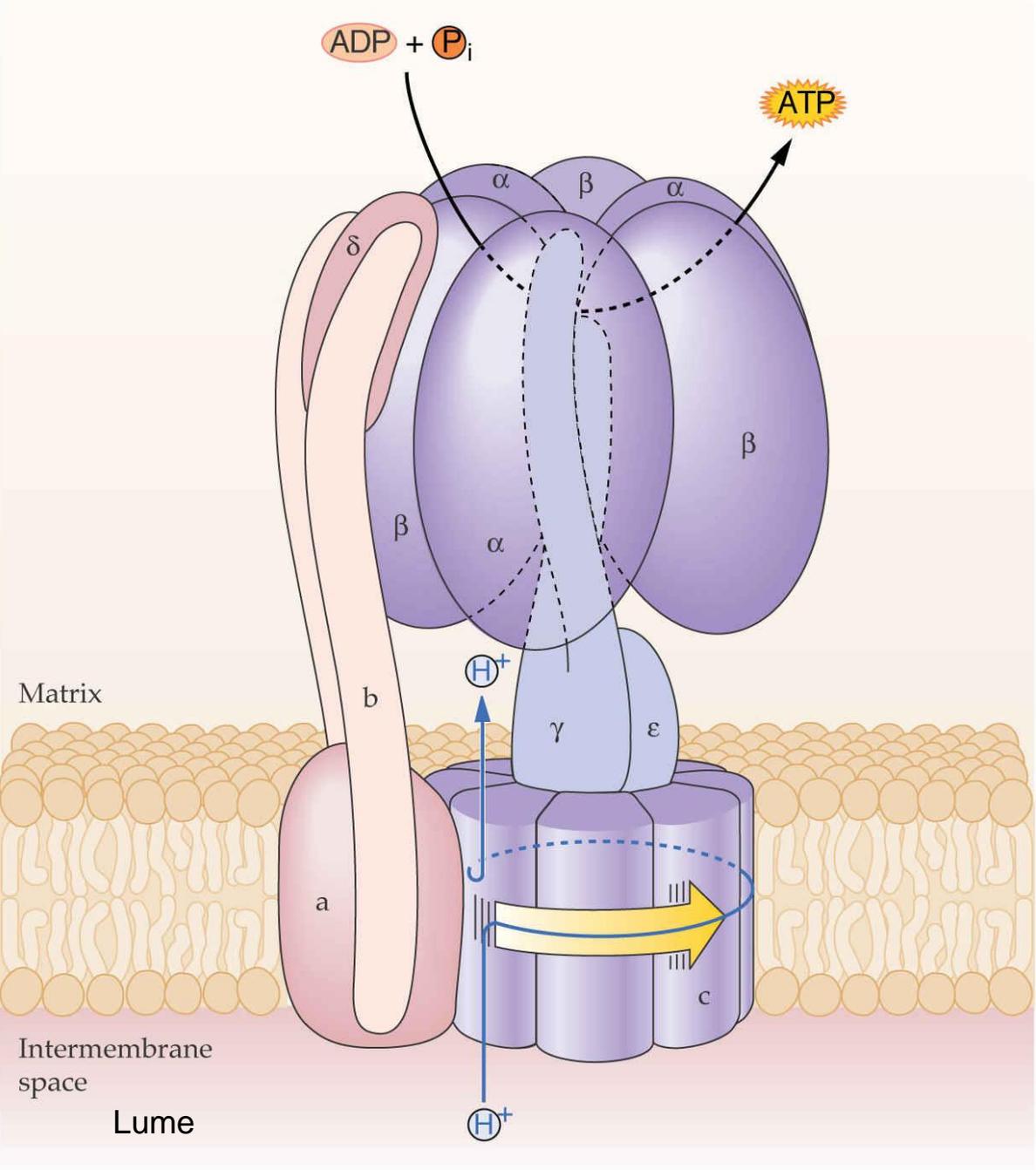
Massa molecolare: circa 400 kDa

Complesso proteico costituito da molte sub-unità (simile a quello delle V- H<sup>+</sup> ATPasi)

Omodimeri nei mitocondri, concentrati nelle creste; monomeri nei cloroplasti

Stechiometria: 3 H<sup>+</sup> per 1 ATP sintetizzato

Converte un gradiente di protoni in ATP



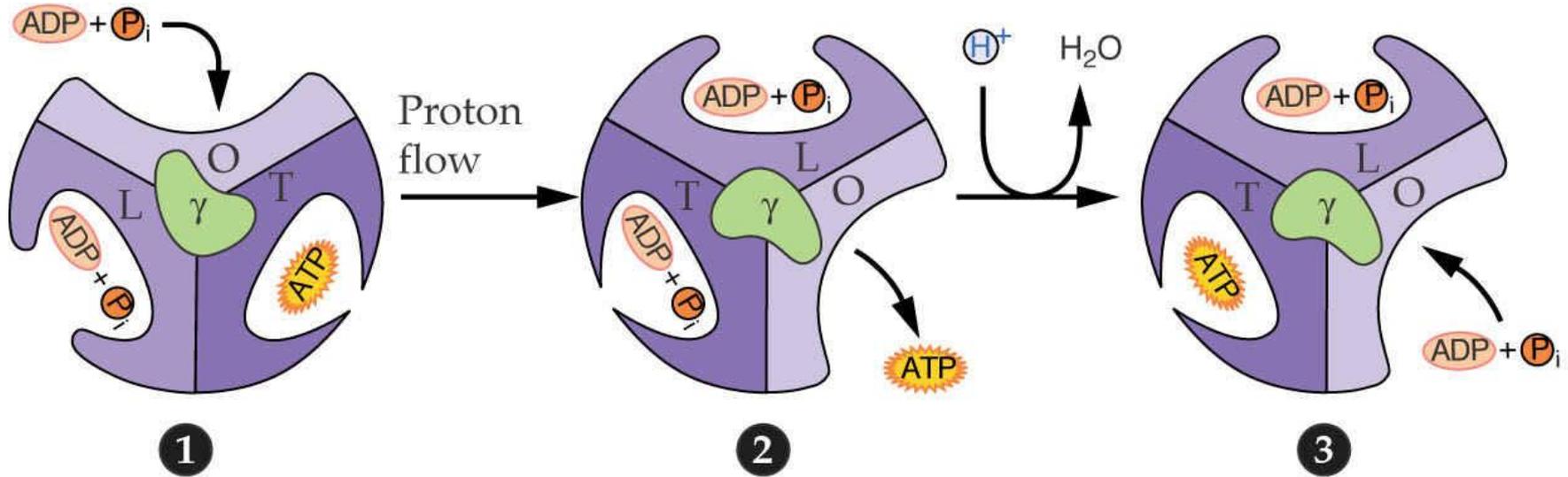
## F-ATPasi (mitocondriale)

2 sottocomplessi:

F<sub>1</sub>  
 $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$

F<sub>0</sub>  
 $a, b, b', c_n$

## Schema di sintesi dell'ATP: modello di catalisi rotazionale



Stati catalitici dei tre siti attivi presenti nelle subunità  $\beta$ :

O (open): senza nucleotidi

L (loose): lega debolmente ADP e P

T (tight) : lega fortemente ADP e P per sintetizzare ATP

Ad ogni rotazione completa, sintesi di 3 ATP

12-14 protoni necessari per una rotazione completa (uno per ogni subunità c dell'anello)

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

Appartengono alla famiglia delle P-ATPasi

Nelle cellule vegetali sono presenti nel plasmalemma, tonoplasto, reticolo endoplasmatico, mitocondri, cloroplasti (involucro interno)

Massa molecolare: 110-130 kDa

Stechiometria: 1 Ca<sup>2+</sup> per 1 ATP idrolizzato

Pompa Ca<sup>2+</sup> da citosol verso parete, vacuolo, ER, mitocondri

[Ca<sup>2+</sup>] nel citosol pari a circa 50-200 nM, nella parete o altri compartimenti pari a circa 2-5 mM (10.000 fino a 25.000 volte maggiore).

[Ca<sup>2+</sup>] importante regolatore dell'attività cellulare:

- forma un sale insolubile con il fosfato
- è uno ione segnale in molti processi

# Ca<sup>2+</sup>-ATPasi

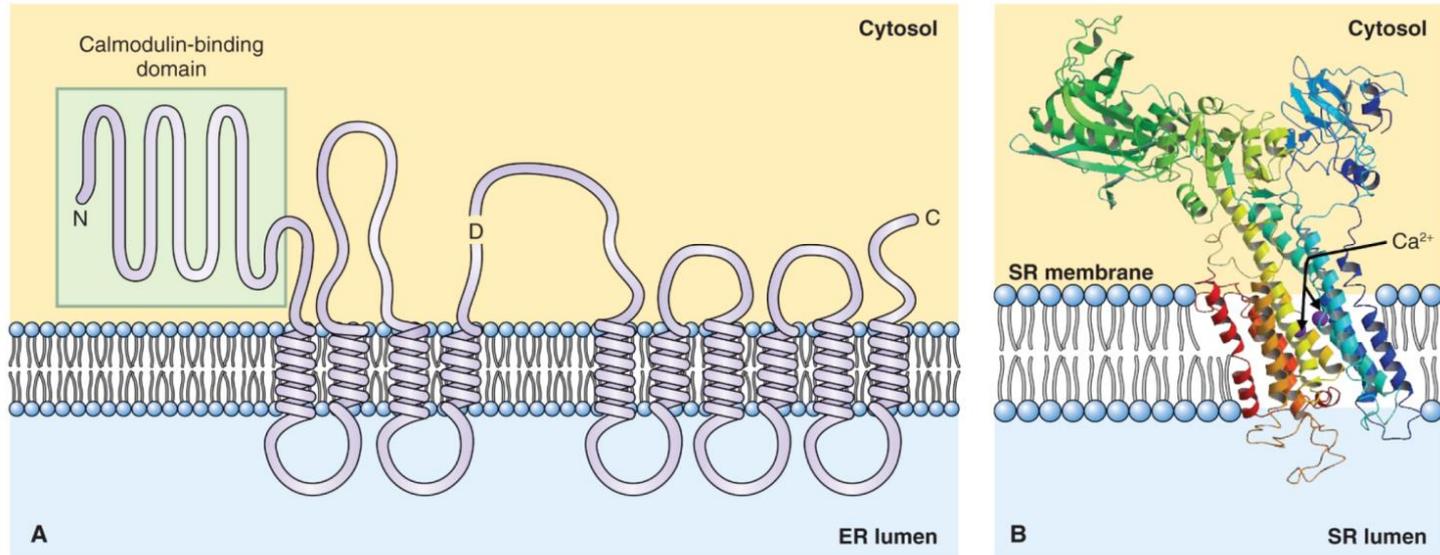


Figure 5.13

Configuration of membrane-associated Ca<sup>2+</sup>-ATPase. (A) Membrane disposition of the vacuolar Ca<sup>2+</sup>-ATPase showing ten transmembrane domains and an extended N-terminal calmodulin-binding domain. D, ATP-binding domain. (B) Ribbon diagram of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase based on X-ray crystallographic data, showing the ATP-hydrolyzing domain of a Ca<sup>2+</sup> pump from an animal sarcoplasmic reticulum (SR; equivalent to the endoplasmic reticulum (ER)) and probable route of Ca<sup>2+</sup> transport.

*The Molecular Life of Plants*, First Edition. Russell Jones, Howard Thomas, Helen Ougham and Susan Waaland. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.  
Published 2012 by John Wiley & Sons, Ltd.

10 regioni transmembrana

Nelle piante, due classi di Ca<sup>2+</sup> ·ATPasi, sulla base della capacità o meno di legarsi alla calmodulina:

Una classe di Ca<sup>2+</sup> ·ATPasi (di tipo P) presenta un dominio N-terminale esteso: quando la calmodulina si lega a tale dominio, la pompa viene inibita (funzione autoinibitoria)

L'altra classe è di tipo ER (non lega con la calmodulina)

## ABC ATPasi (ABC = ATP Binding Cassette)

Struttura: proteine oligomeriche costituite da sub-unità con domini idrofobici e domini periferici citoplasmatici che legano ATP

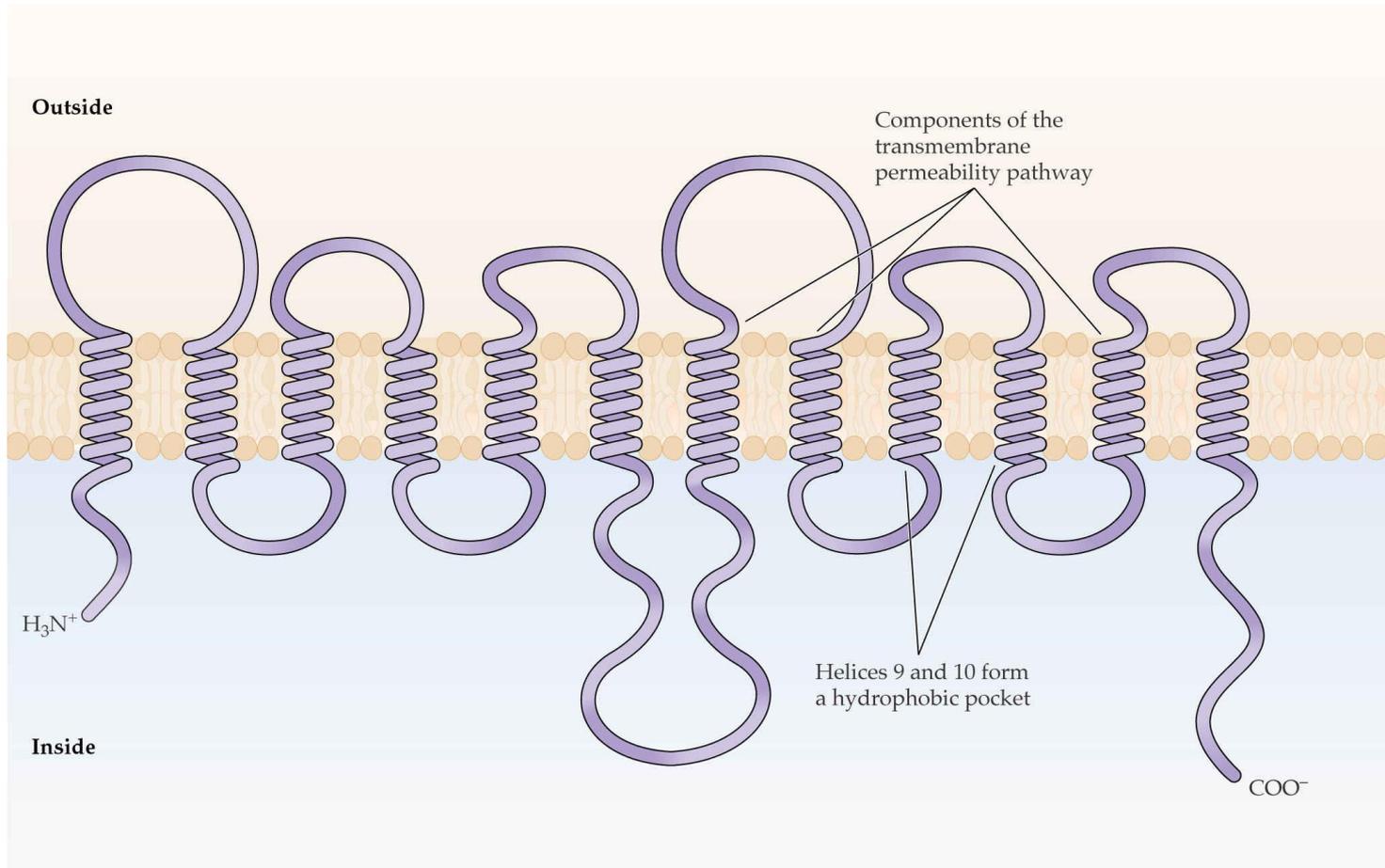
Presenza: in tutti gli organismi eucariotici, particolarmente abbondanti nelle piante (più di 120 geni in *Arabidopsis* e riso), dove sono presenti nel **plasmalemma** e nel **tonoplasto**

Funzione: trasportano peptidi, zuccheri, lipidi, xenobiotici (detossificazione), prodotti secondari del metabolismo, alcuni ormoni (es. Auxina), in forma di composti semplici o coniugati del GLUTATIONE (Cisteina-Glutammato-Glicina) tramite glutatione transferasi

Trasportano molecole non-cariche (= non sono pompe elettrogeniche!)

Traslocatori (o carriers)

## Modello di struttura generale dei traslocatori



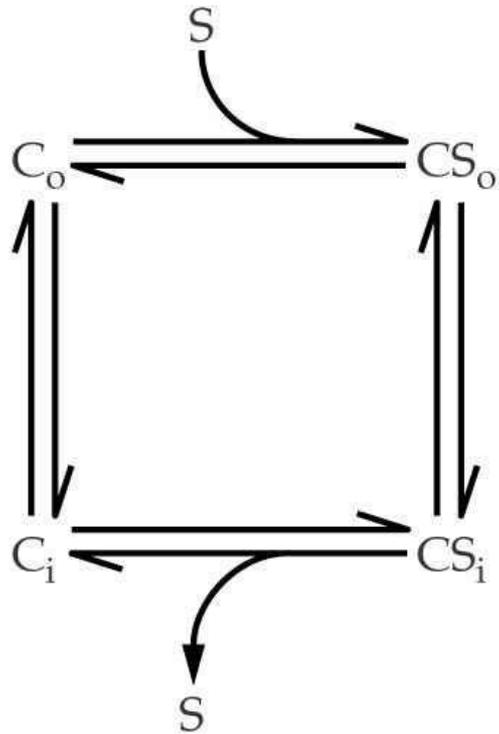
Proteine di 40-50 kDa, 12 regioni transmembrana, porzione idrofila tra 6a e 7a

Membri della famiglia MFS (Major Facilitator Superfamily)

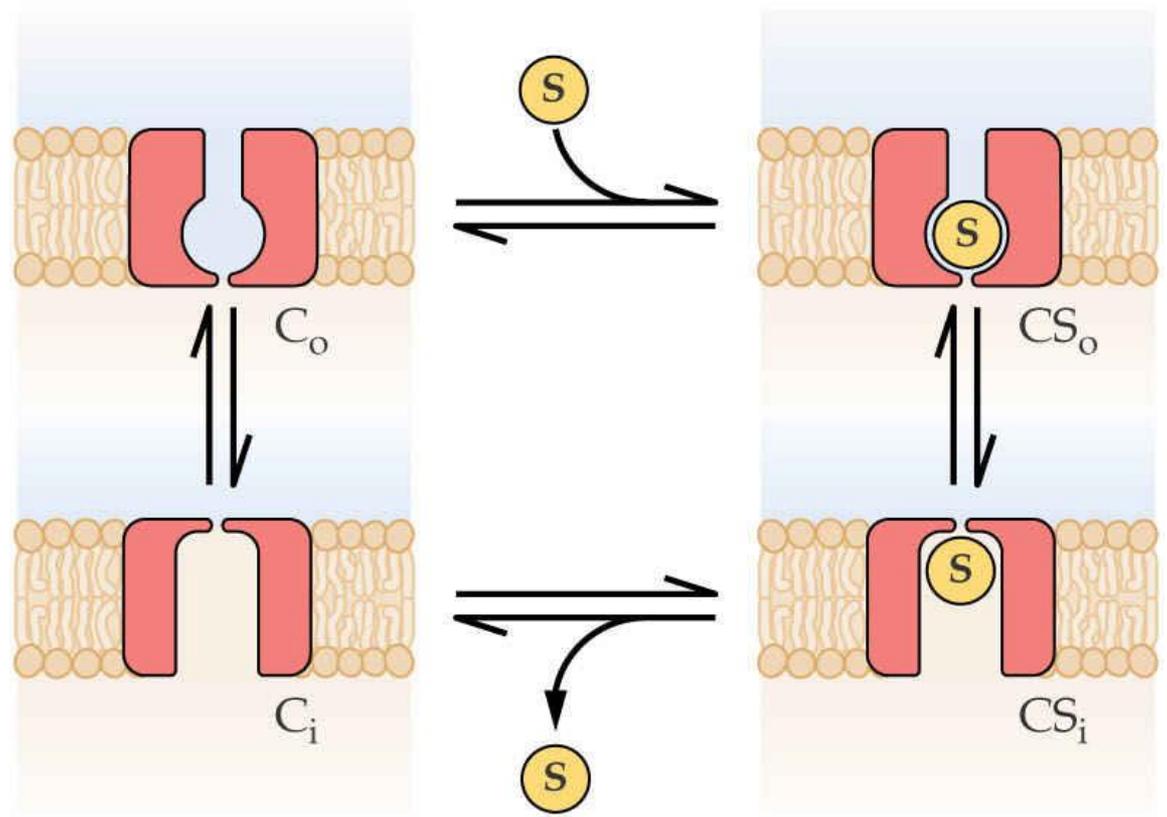
Controllo a livello trascrizionale e post-traduzionale

## Diffusione facilitata: uniporto

(A) Kinetic



(B) Physical



## TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO

La **forza motrice protonica** (generata dalle **pompe protoniche**) può energizzare il trasporto di altre sostanze contro il gradiente elettrochimico: **co-trasporto** (accoppiamento del trasporto di 1 protone e di un'altra specie chimica)

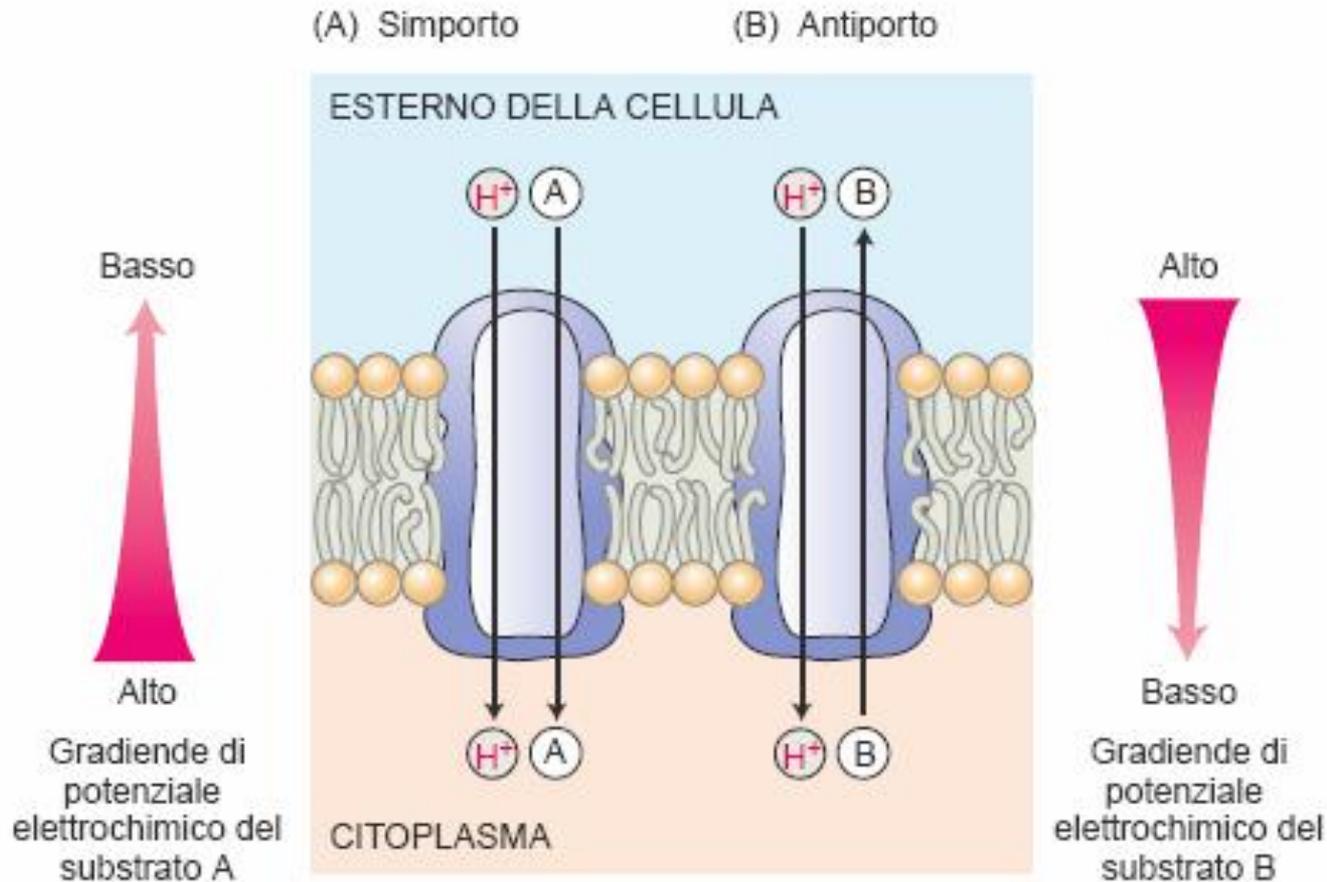
### SIMPORTO

protone e molecola X si muovono nella stessa direzione

### ANTIORTO

protone e molecola X si muovono in direzioni opposte

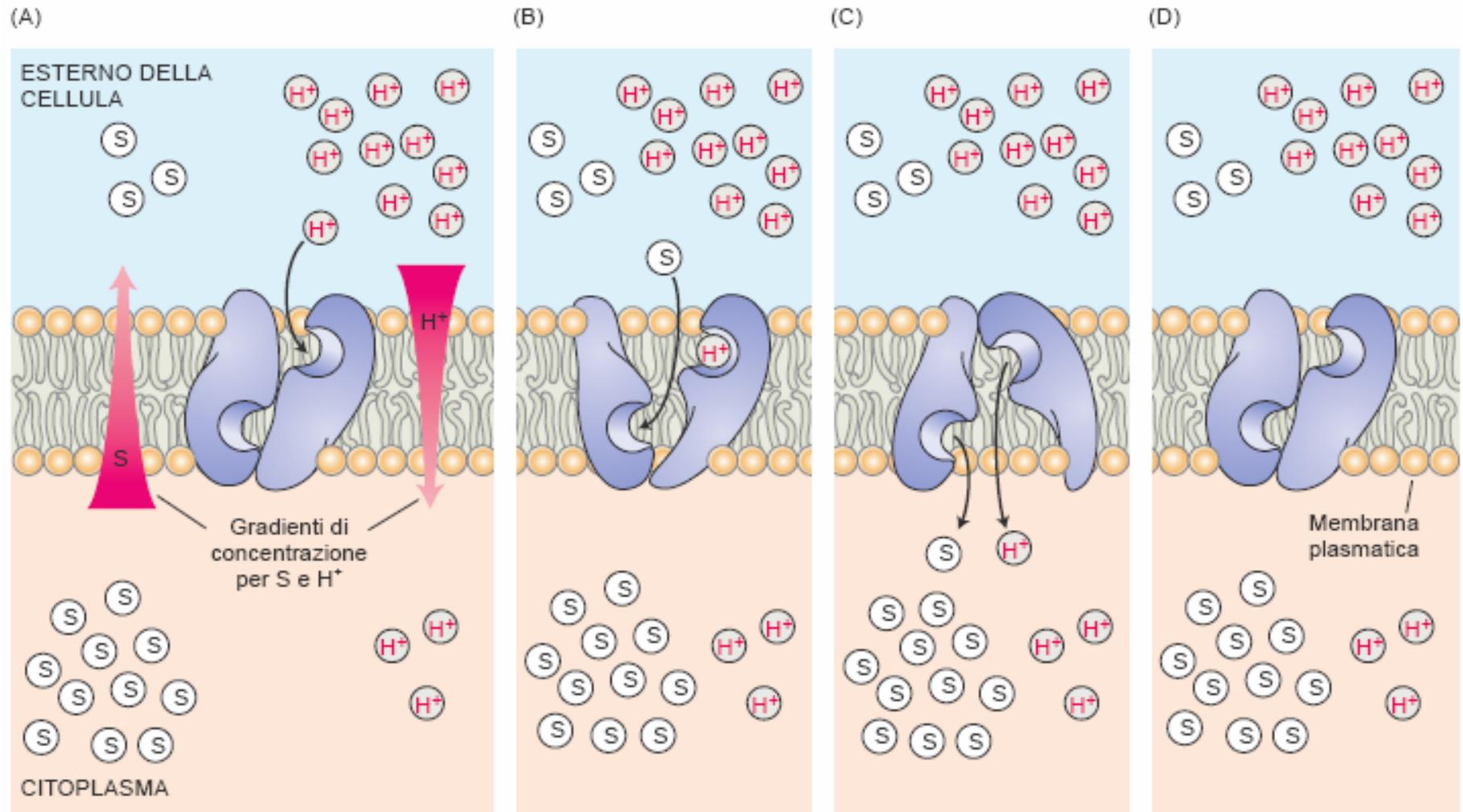
## TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO



Anche soluti privi di carica possono essere trasportati (sarà quindi un trasporto contro gradiente di concentrazione)

Trasporto di tipo elettrogenico (variazione del gradiente elettrochimico di protoni, e.g. simporto  $H^+$ /saccarosio) o elettro-neutro (a seconda della carica del soluto e stechiometria soluto:protoni)

## TRASPORTO ATTIVO SECONDARIO



L'energia immagazzinata come forza motrice protonica viene utilizzata per trasportare S contro il suo gradiente di concentrazione

## PRINCIPALI IONI E SOLUTI TRASPORTATI DA CARRIER

$\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , zuccheri, aminoacidi, basi azotate

Nella membrana plasmatica: assorbimento di nutrienti minerali (anioni nitrato, fosfato, solfato), aminoacidi

Elevata selettività per il soluto

Antiportatori  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sia nel tonoplasto che nella membrana plasmatica:

- Estrusione di  $\text{Na}^+$  attraverso la membrana plasmatica: SOS1 (Salt Overly Sensitive 1)
- Confinamento  $\text{Na}^+$  nel vacuolo: antiportatore NHX1 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 1)  
Sovraespressione del gene *AtNHX1* in *Arabidopsis* e in pomodoro: maggiore tolleranza alla salinità