

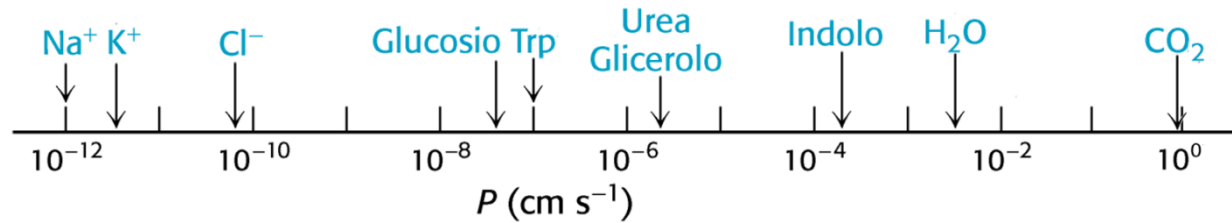
Modulo 6B

Trasporto Transmembrana

2024-25

TRASPORTO TRANSMEMBRANA

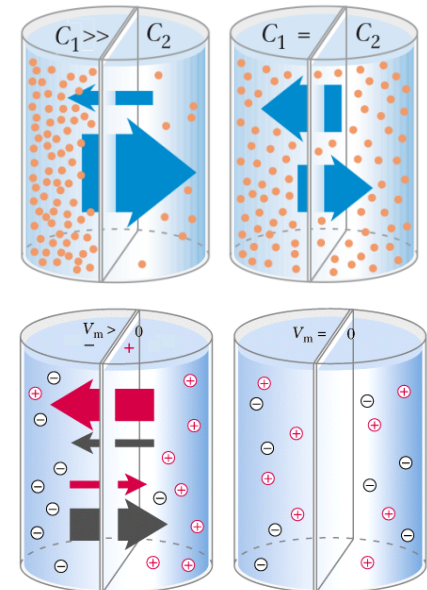
- La permeabilità di piccole molecole/ioni è correlata alla loro solubilità in ambiente apolare
- questo si riflette nei **coefficienti di permeabilità (P)** di soluti **attraverso le membrane**



- 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 10⁹ 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)



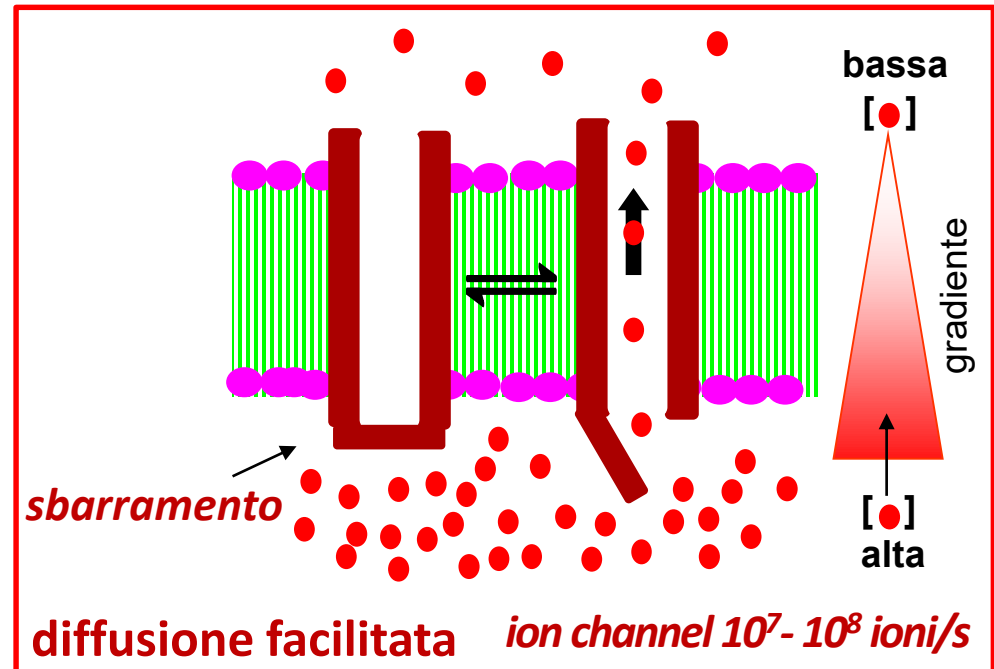
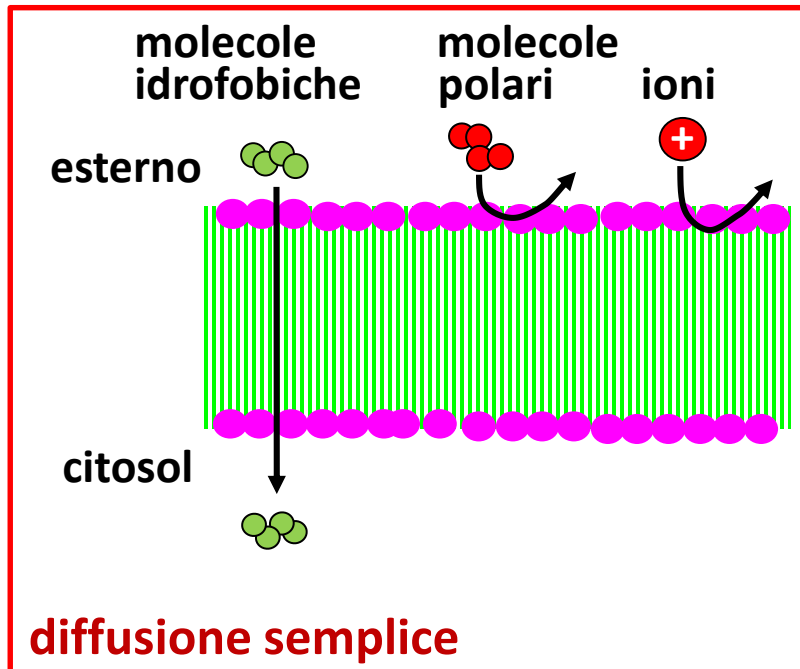
TRASPORTO TRANSMEMBRANA: DIFFUSIONE

- 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



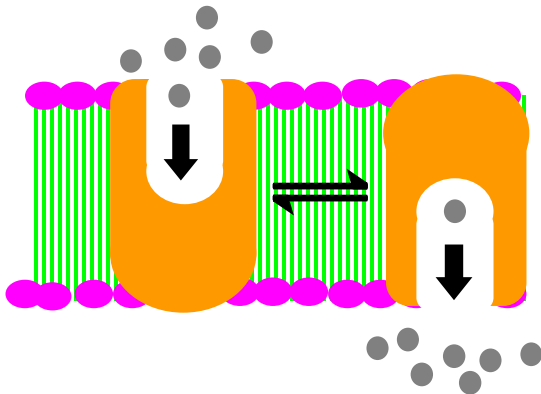
TRASPORTO TRANSMEMBRANA: TRASPORTATORI PROTEICI

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

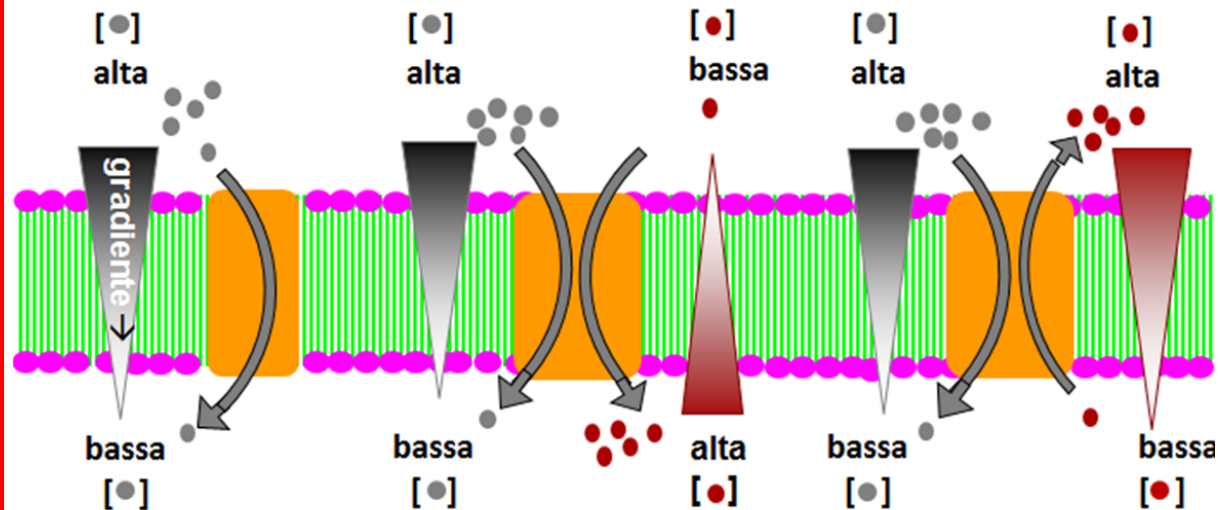
Trasportatori passivi: effettuano il trasporto di molecole in direzione del gradiente chimico

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

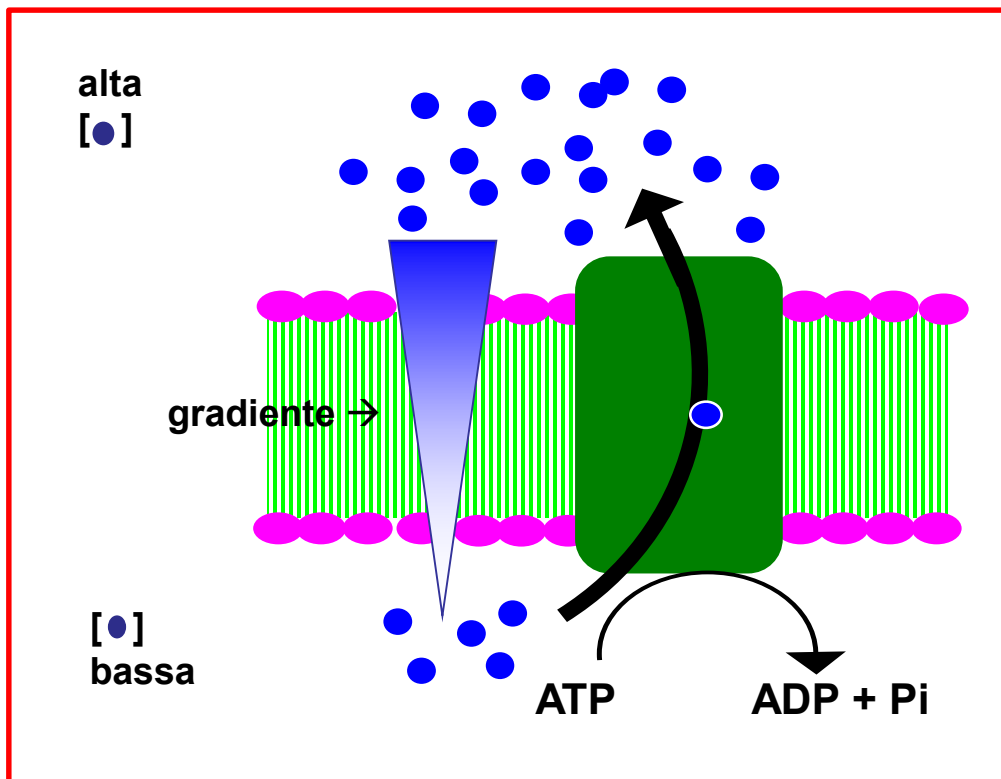


uniporto
trasporto passivo
(direzione del gradiente)

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)**
 $1 - 10^3$ 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, LGC*)

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

Canale attivato meccanicamente (*mechanosensitive channel, MSC*)

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

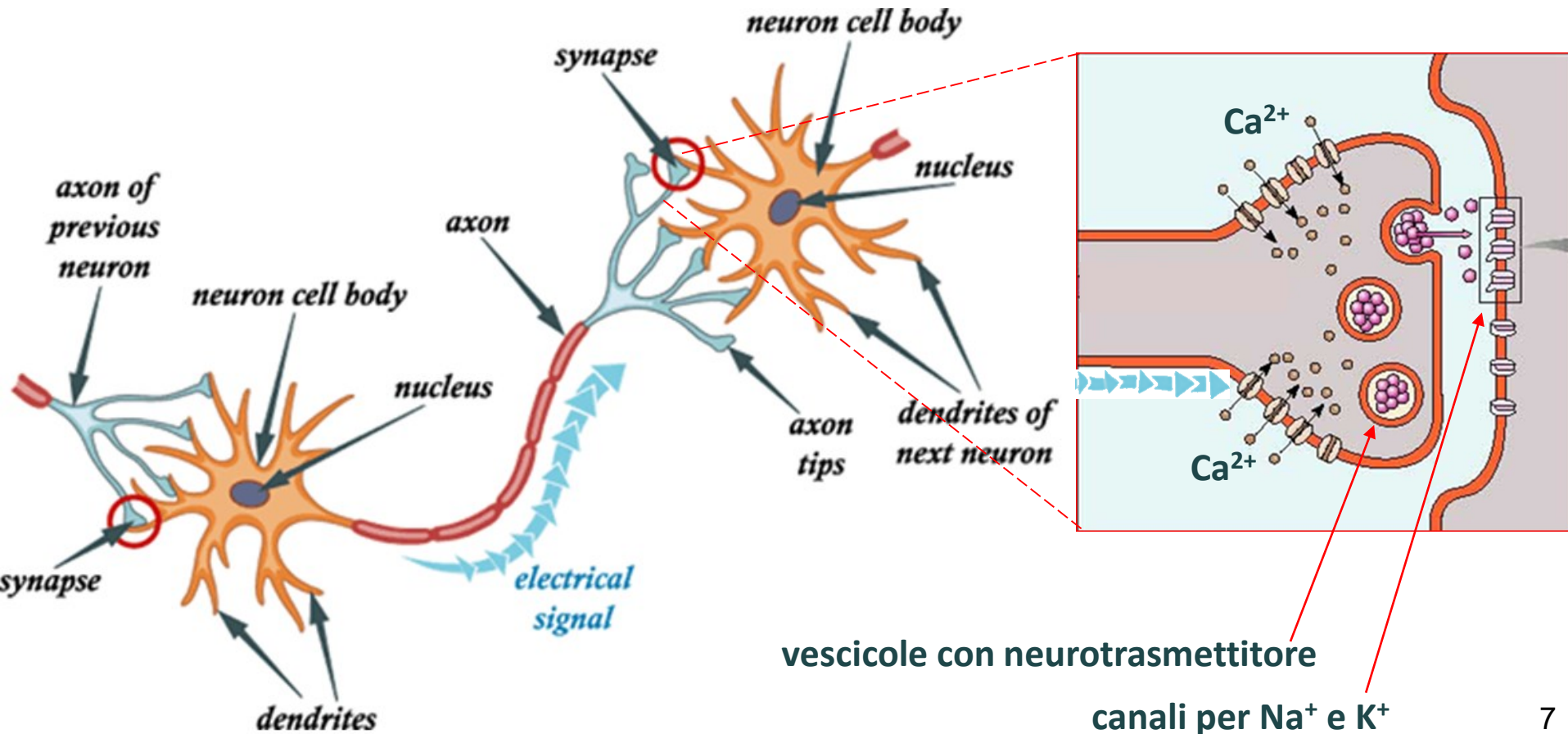
Canale attivato dal potenziale elettrico della membrana (*voltage-gated channel, VGC*)

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.)

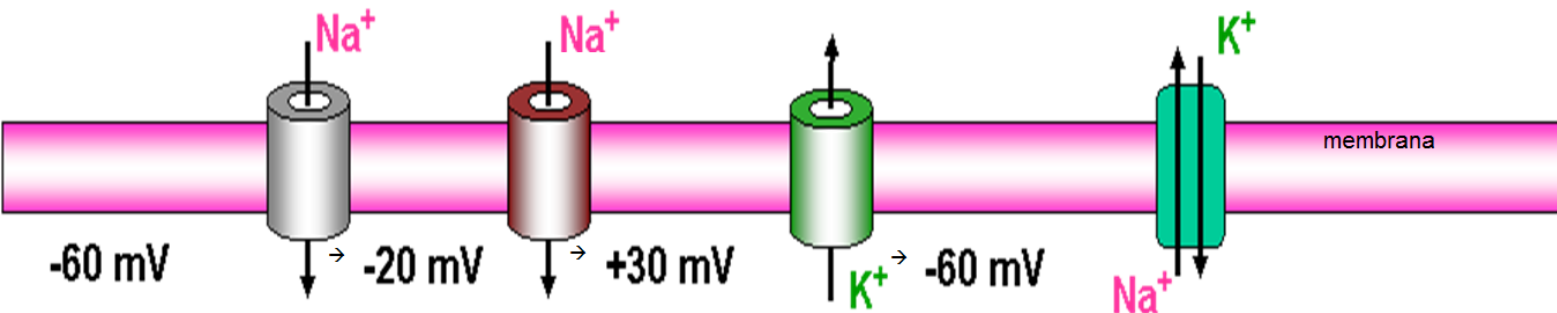
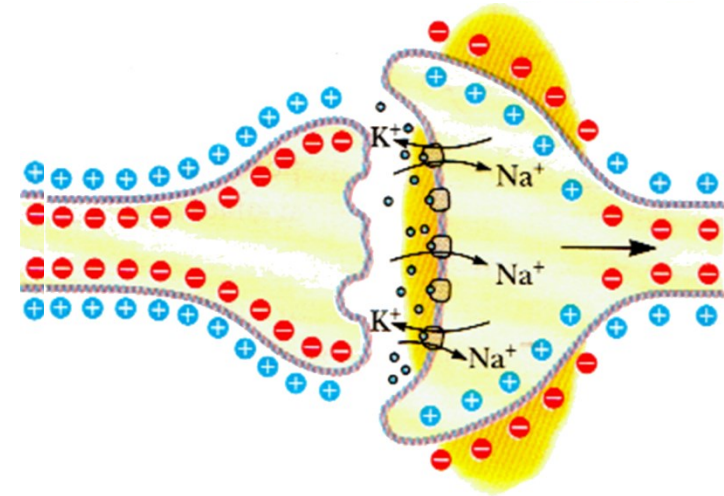
- L'impulso passa da un neurone ad un altro attraverso le sinapsi
 - dalla **sinapsi** di un neurone passa ai **dendriti** di un altro, e poi si **propaga lungo la membrana** assonale fino ad arrivare alla sinapsi del secondo neurone
 - qui causa il **rilascio di vescicole** che contengono il **neurotrasmettitore** 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

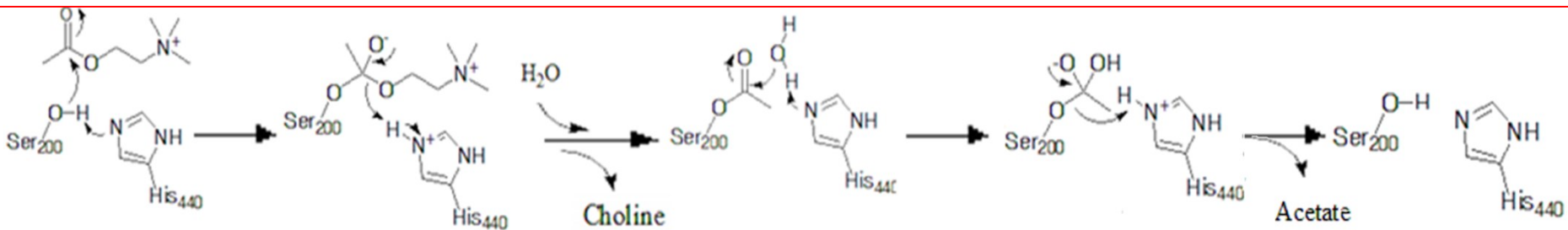
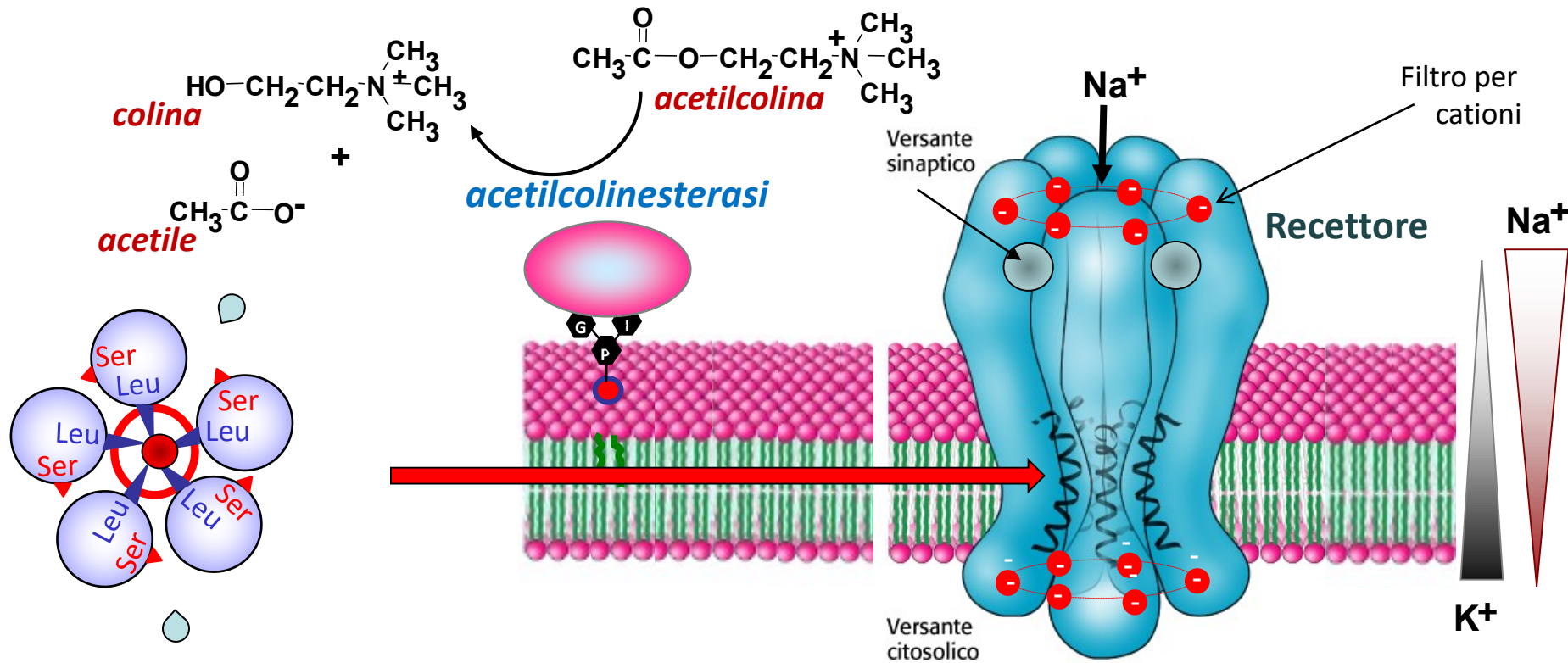
- quando il **potenziale d'azione** giunge alla membrana pre-sinaptica di un neurone, causa l'**apertura di canali per il Ca^{2+}** che fluisce nella sinapsi e causa la **fusione di vescicole** contenenti AC con la membrana plasmatica, e suo rilascio nella fessura sinaptica
- ca. 300/400 vescicole fondono e **[AC] passa rapidamente da 10 nM ad oltre 500 μM** .
- sulla membrana post-sinaptica dell'altro neurone, e **attiva canali LGC per Na^+** e la membrana si **depolarizza** ($-60 \rightarrow -20 \text{ mV}$)
- Questo causa l'**apertura di VGC per Na^+** con ulteriore depolarizzazione ($-20 \rightarrow +30 \text{ mV}$), che a sua volta causa l'**apertura di VGC per K^+** ripristinando il potenziale ($+30 \rightarrow -60 \text{ mV}$)
- 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 nicotinico per l'acetilcolina è un *LGC attivato dall'AC*

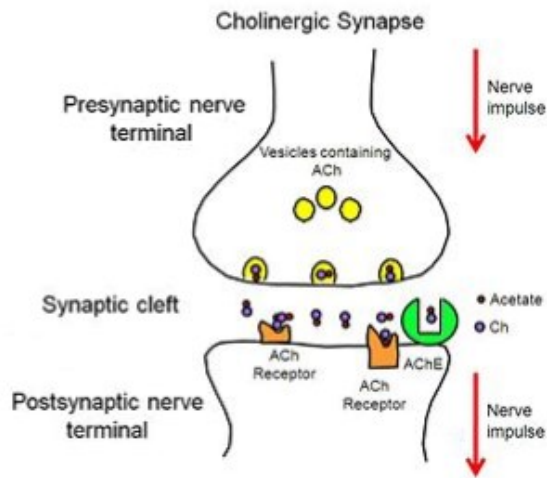
- Il legame di 2 molecole di acetilcolina attiva lo sbarramento, e la sua idrolisi da parte della *acetilcolinesterasi* lo disattiva



ACETYLCHOLINE-GATED CHANNEL: Meccanismi di disattivazione

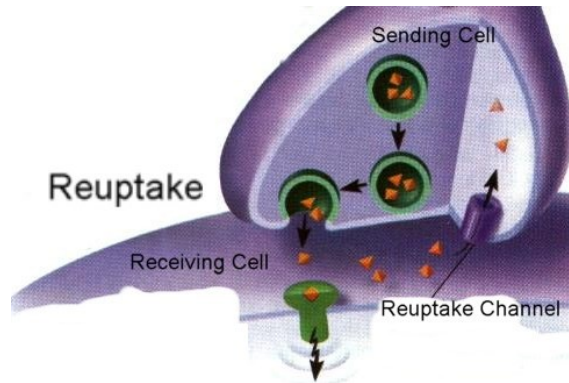
► È importante che lo stimolo iniziae nell'impulso neroso sia rimosso rapidamente

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



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

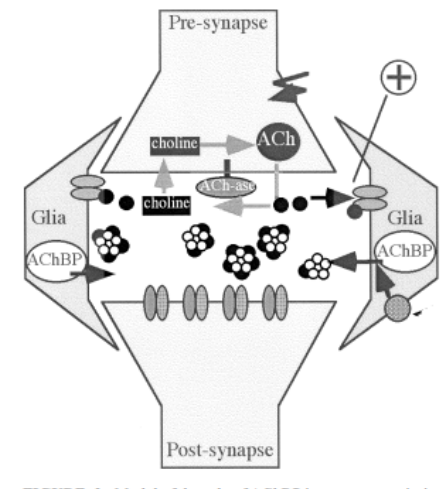
2) Ricaptazione (reuptake):
trasportatori di membrana
allontanano diversi neuro_
trasmettitori dalla spazio
extracellulare



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

3) Sequestro :

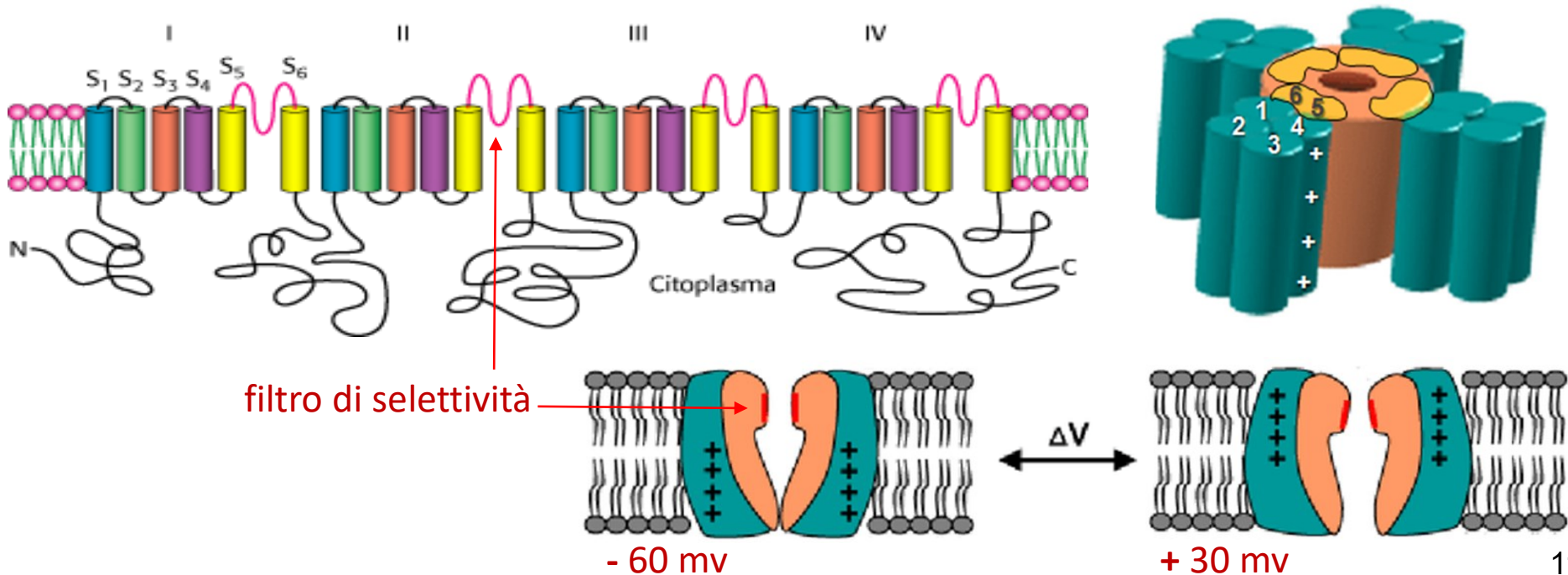
Da parte di una proteina solubile con sito di legame simile a quello del sito recettoriale



Le cellule gliali producono e rilasciano ACh-binding protein nello spazio intersinaptico

VOLTAGE-GATED CHANNELS

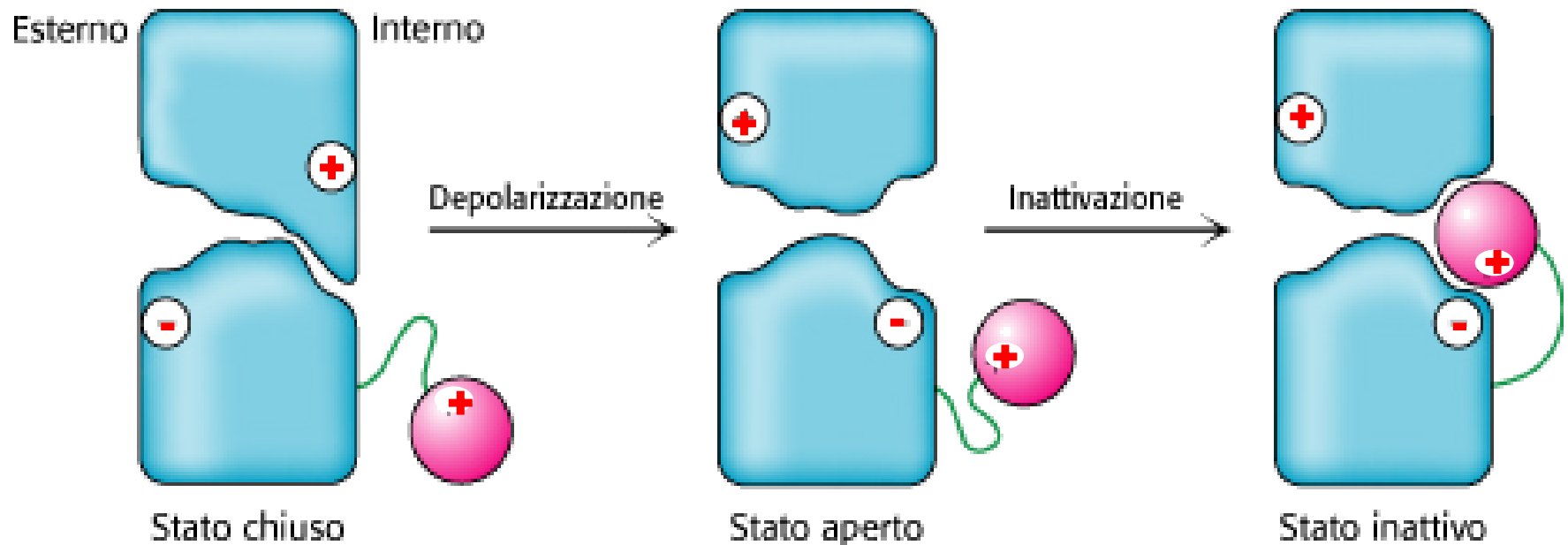
- ▶ I VGC sono composti da più subunità identiche o da diversi domini omologhi che si associano per formare il poro
- VGC per Na^+ o K^+ sono composti da 4 subunità (o da 4 domini) transmembrana, ciascuna/o formata/o da 6 α -eliche TM, delle quali 5 sono costituite principalmente da residui idrofobici (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



DISATTIVAZIONE DEI VOLTAGE-GATED CHANNELS

► Meccanismo di disattivazione secondo il modello 'palla-e-catena'

- il canale è dotato di un **piccolo dominio globulare cationico** connesso da una sequenza flessibile (palla e catena)
- quando il **VGC è chiuso**, la palla è tenuta a distanza dal poro di uscita del canale da repulsione da parte della **superficie cationica del canale chiuso**
- quando il **VGC si apre**, si forma una **superficie anionica che attira la 'palla'**, che dopo breve tempo **'tappa' il poro d'uscita del canale**, inattivandolo

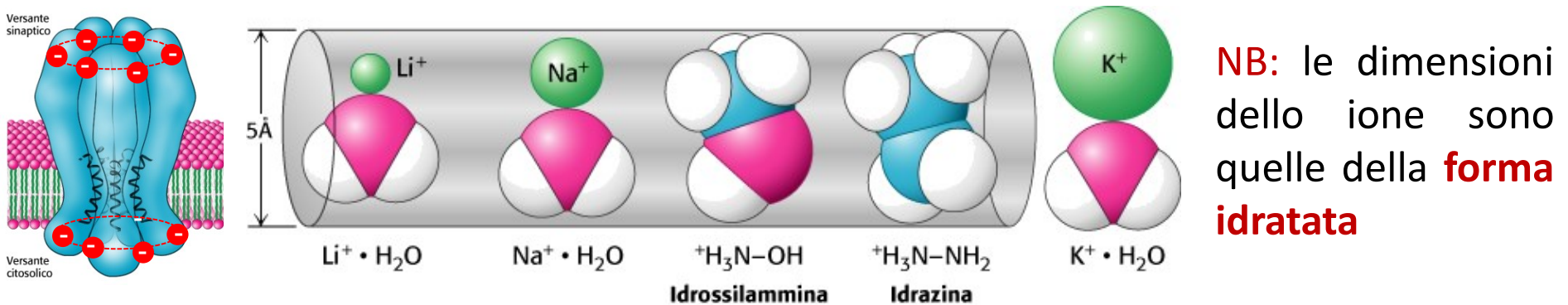


SELETTIVITÀ e DISATTIVAZIONE dei canali ionici

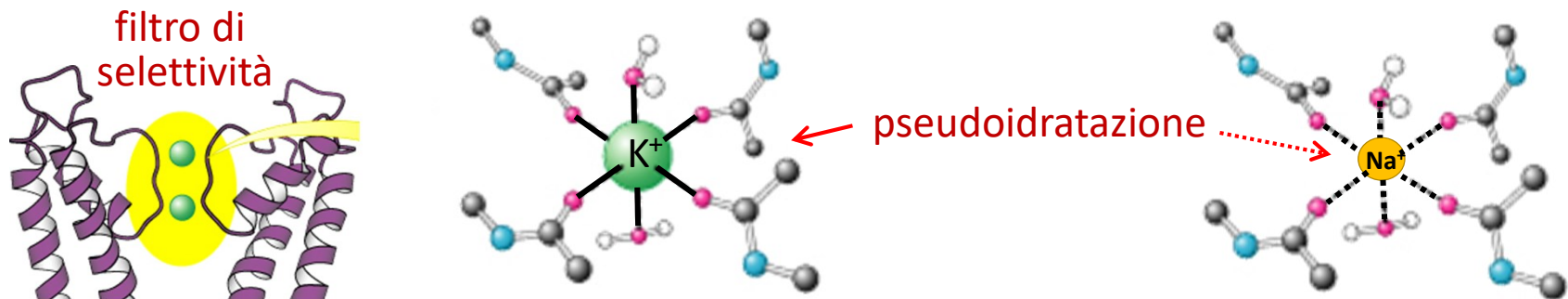
► Una volta attivato lo sbarramento i canali permettono il flusso di ioni in modo selettivo

- 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



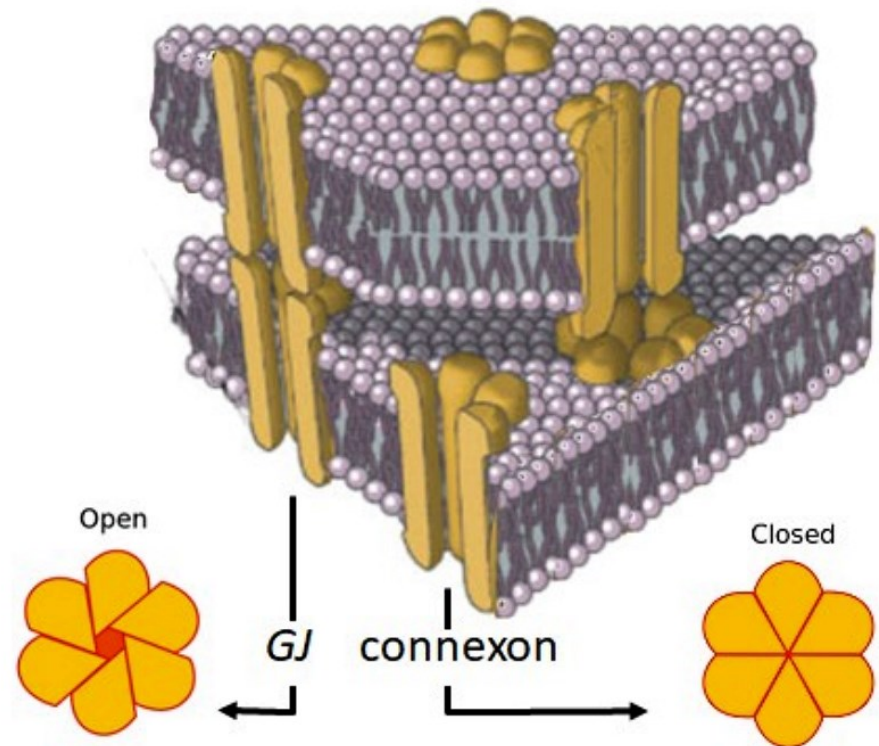
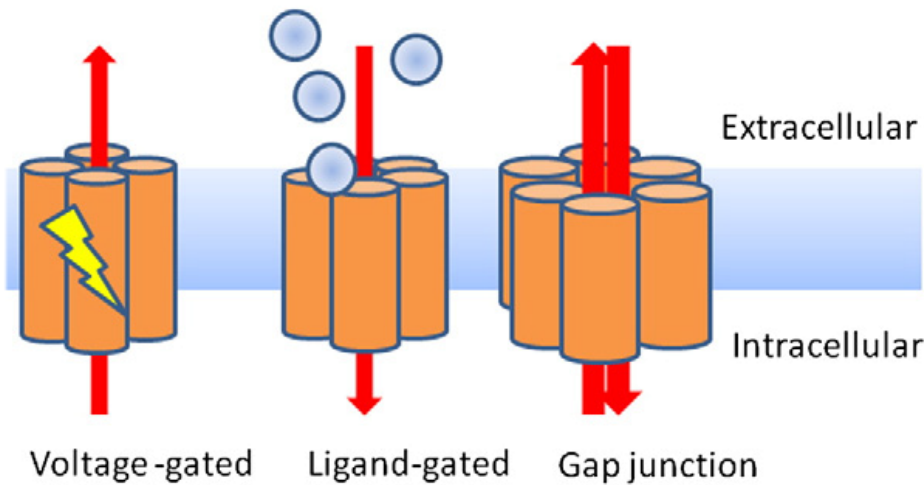
- il canale per Na^+ ha le corrette dimensione $\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ma non $\text{K} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (preferenza = 11).
- il canale per K^+ è **più stretto** e foderato con catene laterali polari che possono *transitoriamente* sostituire H_2O per K^+ ma non per Na^+ (le distanze non sono corrette)



I canali per ioni hanno strutture modulari

► Gli *ion-channels* mostrano motivi ricorrenti:

- sono costituiti da **subunità multiple** (K) o da **domini omologhi multipli** (Na e Ca)
- sono formati da **4** (*VGC*), **5** (*LGC*) o **6** (*Gap Junctions* - *giunzioni comunicanti*) subunità /domini
- il **lume del poro** si colloca lungo l'asse di simmetria del canale ed è foderato da amino acidi provenienti dalle diverse subunità/domini.
- più unità formano il canale, meno selettivo è (es. le *GJ* hanno 6 subunità)
- sono generalmente proteine allosteriche controllate da fattori esterni (*LGC*, *MSC*, *VGC*)



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 ATPasica* 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)

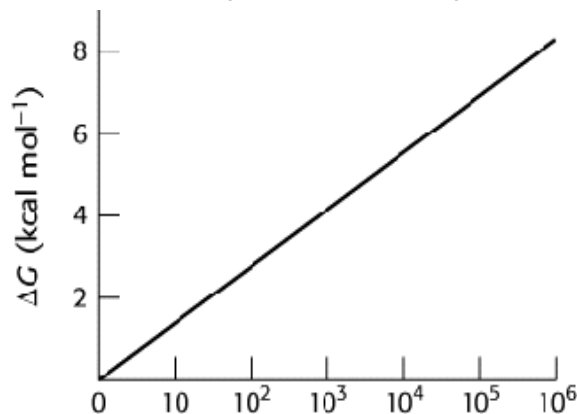
ΔV = potenziale transmembrana

z = carica

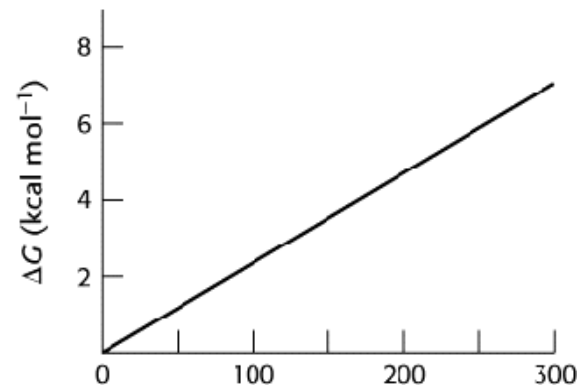
R = costante dei gas

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)



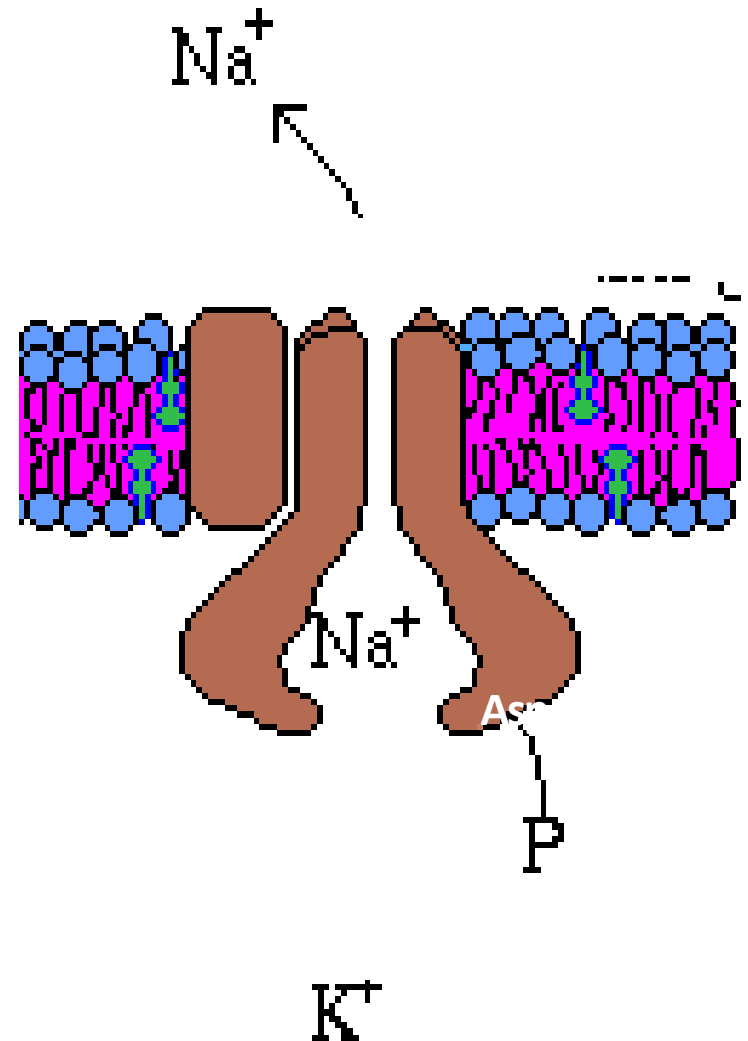
(B) Potenziale di membrana (mV)

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
- ATP si lega solo se $[Na]^{int}$ è elevato ed utilizza 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 perché 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 la defosforilazione** di Asp, portando all'**inversione dell'impalcatura** proteica
- 5) la conformazione iniziale **perde affinità per K^+** e lo rilasciando anche se $[K]$ qui è elevata
- 6) Questo causa l'inversione, iniziando un nuovo ciclo



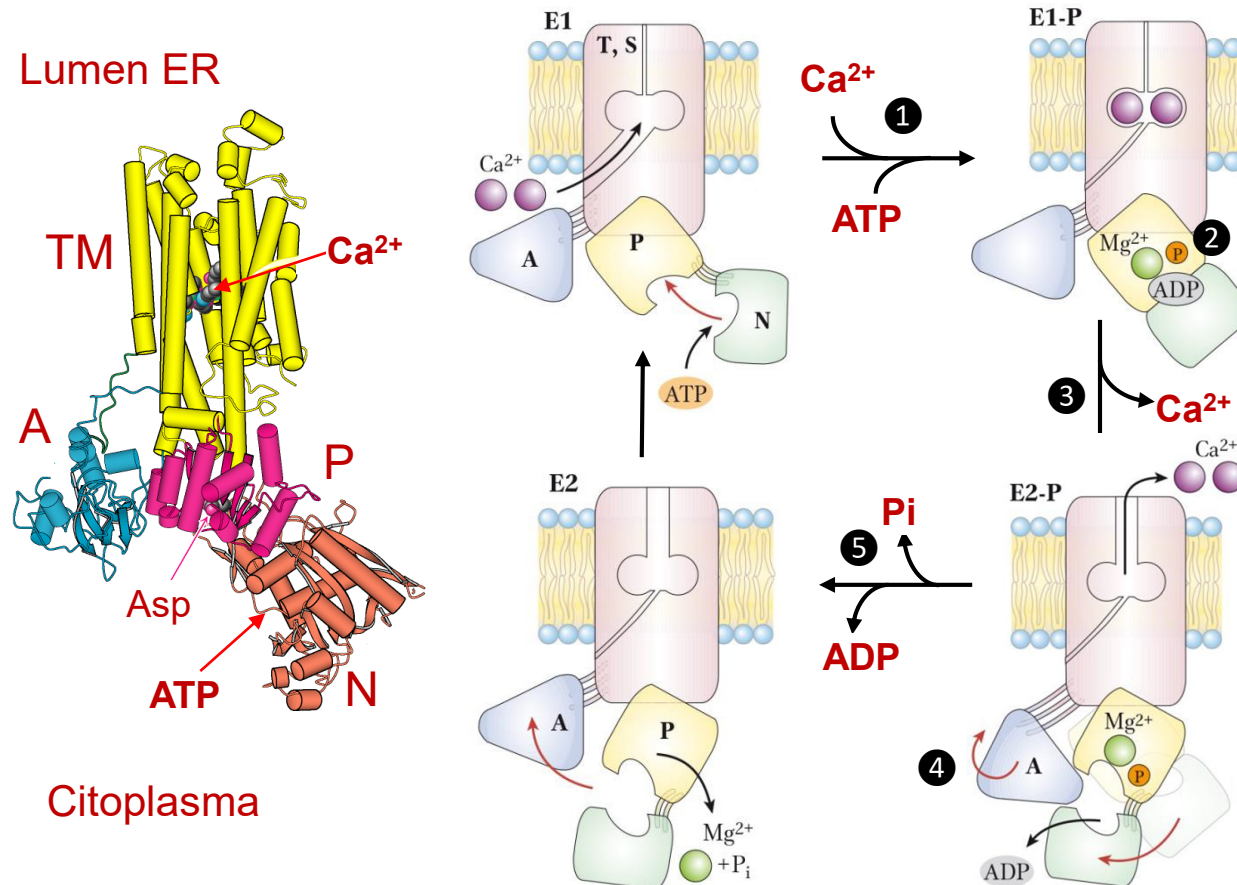
POMPA Ca^{2+} ATPasi

► 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 confoamzione **TM** → **E1**

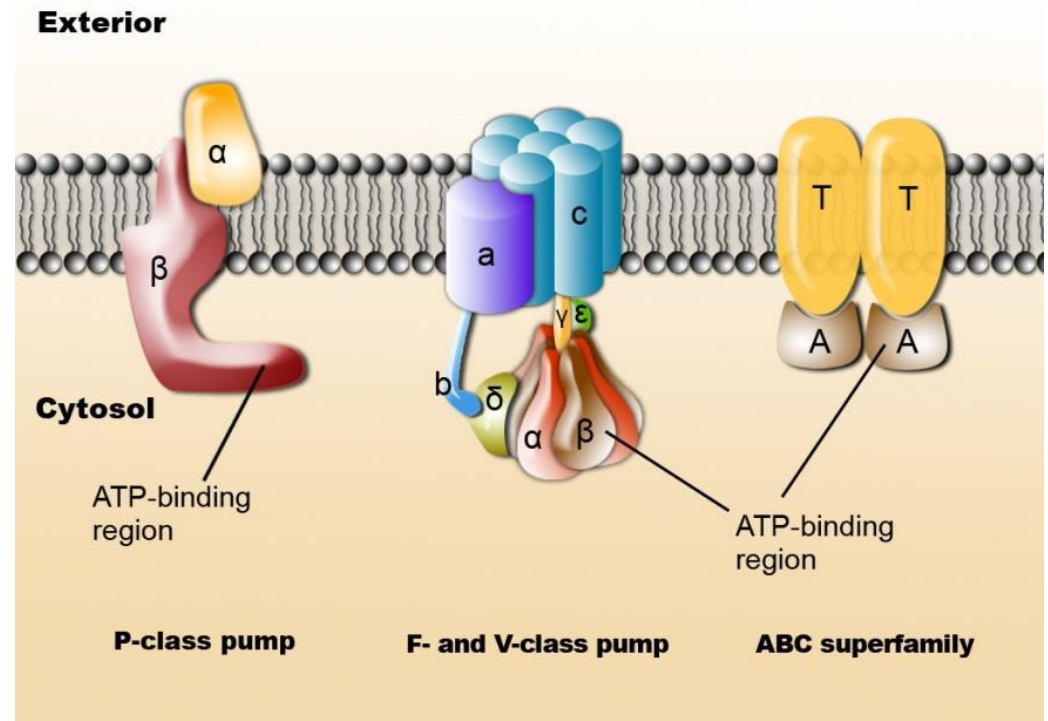
ALTRI TIPI DI TRASPORTATORI ATTIVI

► Altri trasportatori utilizzano l'idrolisi di ATP – servono per concentrare metaboliti

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**).

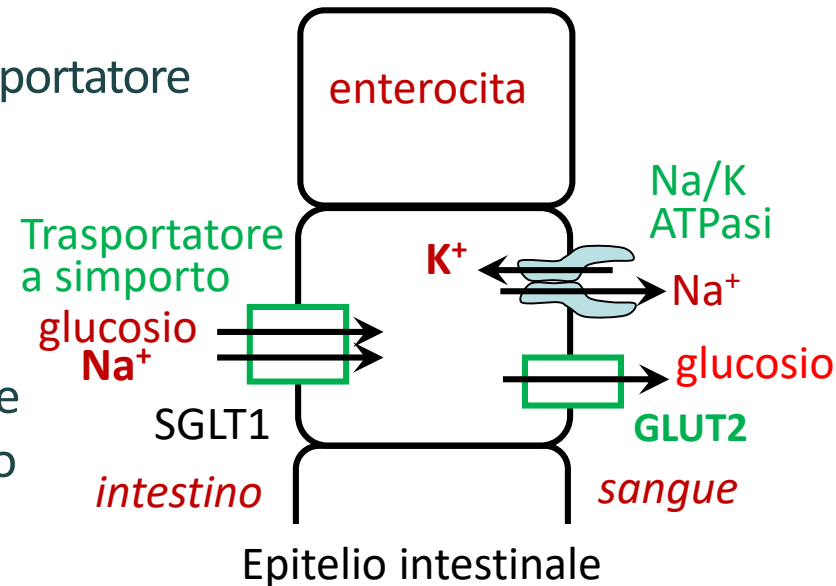


TRASPORTO DI METABOLITI: trasporto del glucosio

► 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

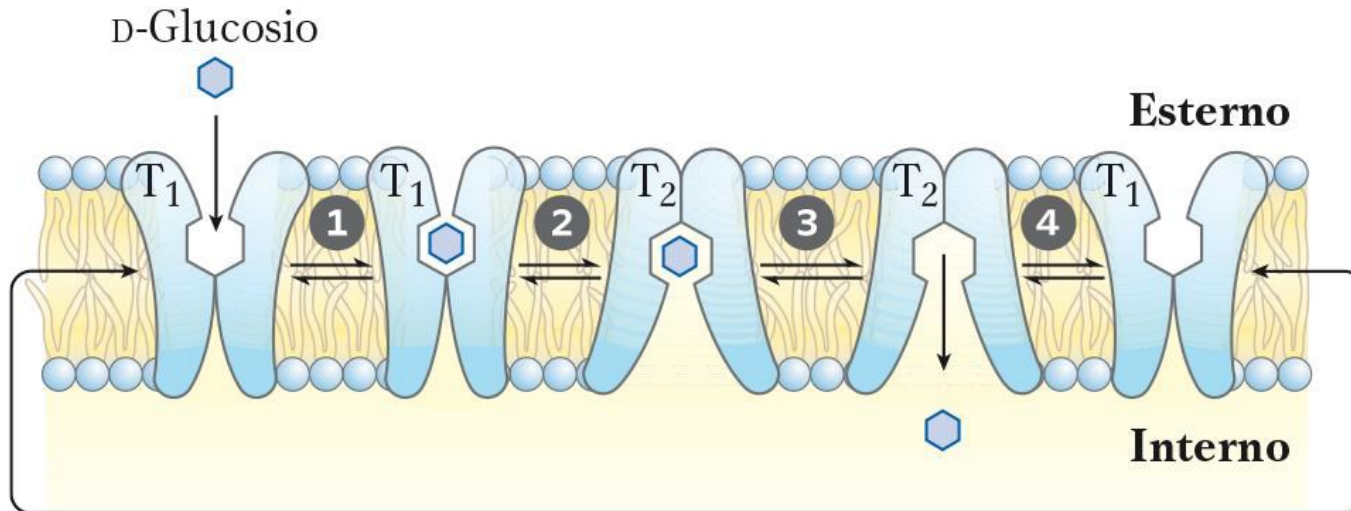


- i **GLUT** sono una famiglia di trasportatori a 12 eliche transmembrana che mediano la traslocazione dello zucchero in direzione del suo gradiente chimico
- **GLUT 1**: tutte le cellule ($K_t \sim 5 \text{ mM Gluc}$) captazione basale
- **GLUT 2**: fegato, pancreas e enterociti ($K_t 15\text{-}20 \text{ mM Gluc}$) 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

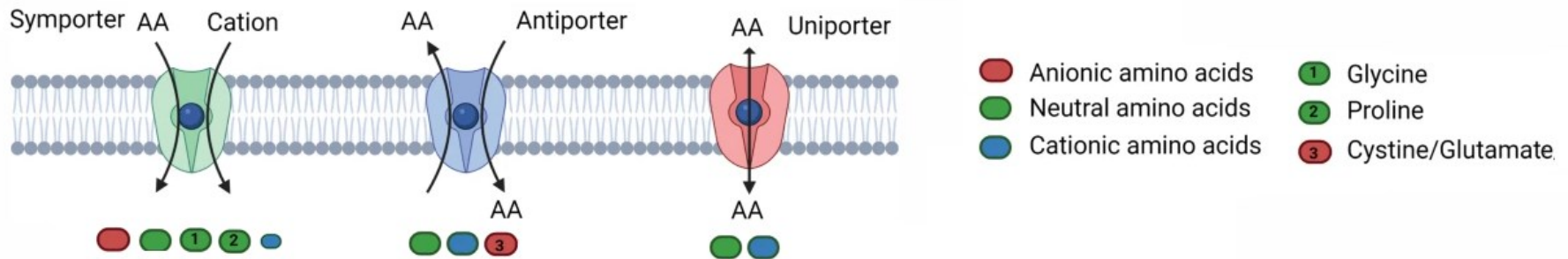
- ci sono **2 conformazioni alternative** T1 e T2; **T1 apre all'esterno, T2 apre all'interno** e si alternano mediante il meccanismo di inversione/eversione
- ognuna legare il glucosio con **siti di legame esposti sui diversi lati** della membrana
- il **trasporto avviene in entrambe le direzioni**;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



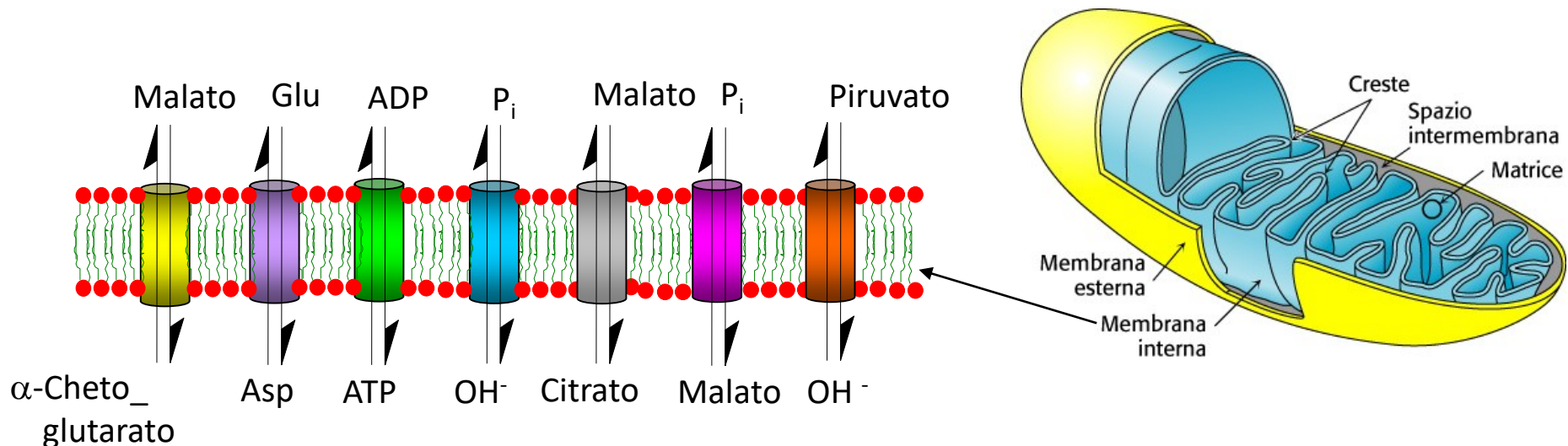
(glucosio non in scala rispetto a trasportatore e membrana)

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**



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)

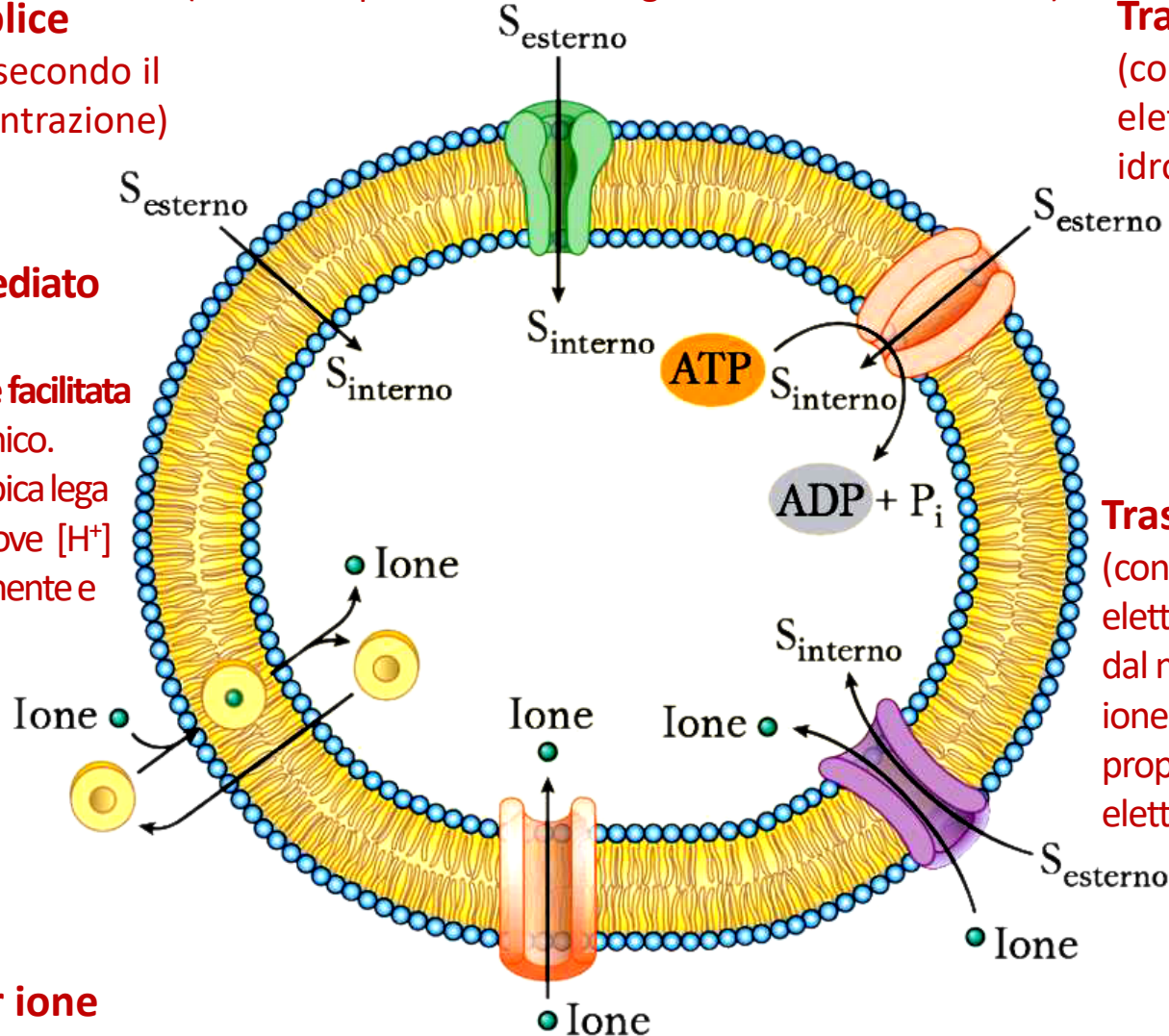
Trasporto ionico mediato da ionofori

(una forma di **diffusione facilitata** secondo gradiente chimico.

Es. una molecola idrofobica lega un protone da un lato dove $[H^+]$ è alta, diffonde passivamente e lo rilascia sull'altro lato)

Trasporto attivo 2°

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



Canale per ione

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