

Necessità di meccanismi per il controllo del pH intracellulare.

Sono necessari meccanismi di estrusione attiva di protoni o introduzione di alcali perché:

- I) V_m negativo favorisce l'entrata di protoni ($E_H \approx -5$ mV).
- II) HCO_3^- tende ad uscire dalla cellula per lo stesso motivo ($E_{HCO_3} \approx -7$ mV).
- III) Produzione continua di acidi a causa del metabolismo cellulare (CO_2 , ma non solo).

FUNZIONI SEGNALE: p.es. attivazione uova
" spermatozoi
" ciclo cellulare
cellule immunitarie

GRADIENTI PROTONICI NEI COMPARTIMENTI INTRACELLULARI

POTERE TAMPONE

$$\beta = - \frac{\Delta \text{AC. FORTE}}{\Delta \text{pH}} = \frac{\Delta \text{BASE FORTE}}{\Delta \text{pH}}$$

quantità di base forte da aggiungere perché $\Delta \text{pH} = +1$
(per $\Delta \text{AC FORTE}$ segno -)

" β_b " (o meglio ESTRINSECI) = dipendente da HCO_3^-
(è il principale controllo mediante
permeazione, ma non è l'unico)

" β_i " = dipendente da tamponi intrinseci (che non possono
la membrana)

Si può misurare β_i ?

P.es. bloccando il trasporto, HCO_3^- . Ma c'è anche
produzione interna durante il processo e l'effetto
degli ORGANULI.

INTRACELLULARE : IMIDAZOLO $pK_1 \approx 7$] tra 6.5 e 7
FOSFATI ≈ 7]

β_i tra 5 e 30 mM a pH fisiologici
ma fino a 40-50 mM nei neuroni neonati e p.es.

β_b rende conto del 50/65% di β cellulare,
nelle cellule di mammifero al pH di riposo

TRASPORTO DI H^+

- POMPE PROTONICHE
- ANTI PORTO Na^+/H^+
- CANALI PROTONICI
- TRASPORTATORI DIVERSI
DI HCO_3^-

POMPE PROTONICHE.

Tipo V
("vacuolo")

Lisosomi
Endosomi
Apparato del Golgi
Vescicole di secrezione
Vacuoli

pH acido nell'organulo.

ANCHE FUNZIONI
nelle MEMB. PUSA.

Tipo F
("fattore d'accoppiamento")

Mitocondri
Tilacoidi
Procarioti

Sintesi di ATP.

Tipo P
("intermedi fosforilati")

Piante-Funghi
H-K dello stomaco
Neuroni di Mammifero (?)
EPITELI RENALI

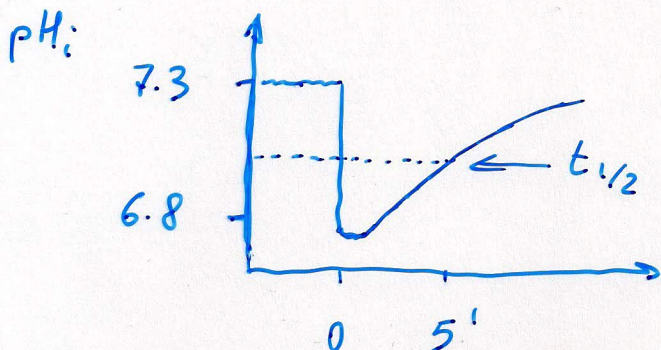
Estrusione di protoni

(V_{eq} molto negativo)

ESCREZIONE

AICKIN - THOMAS 1977

A) Soleus muscle : pH_i sensitive electrode



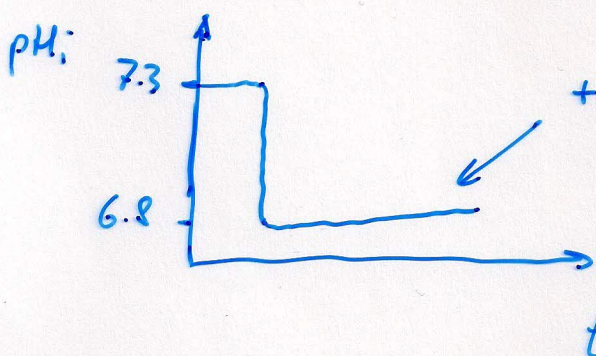
the same occurs in:

$$[\text{Ca}^{2+}]_o = 0$$

$$[\text{K}^+]_o = 0$$

100 μM OUBASTIN

B) INHIBITION OF pH RECOVERY

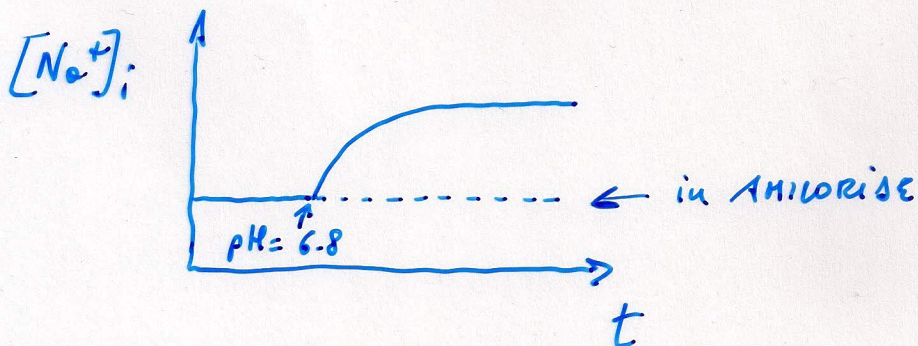


+ AMILORISE 100 μM

OR $[\text{Na}^+]_o = 0$

(but exchanger forms insensitive to amiloride are also known)

C) WITH AN ELECTRODE SENSITIVE TO $[\text{Na}^+]_i$:



D) No effect of ΔV_m

Funzioni dell' antiporto Na/H.

A) Mantiene la $[H^+]$ al di sotto dell'equilibrio, a spese del gradiente di Na^+ .

B) Estrude equivalenti acidi nell' urina per l'escrezione. *(e RiASS. nel tubulo prossimale)*

C) Controlla segnali intracellulari sensibili al pH:

- stato relativamente quiescente a pH 6.6-7.0, per certi tipi cellulari.
- uno stimolo attiva l'antiporto e l'attività cellulare riprende.
- p.es. attivazione dell' oocita alla fecondazione (Ca-PKC-antiporto).
- ciclo nelle cellule di mammifero.

D) Contribuisce al controllo del volume cellulare.

E) Contribuisce al controllo del pH degli organuli.

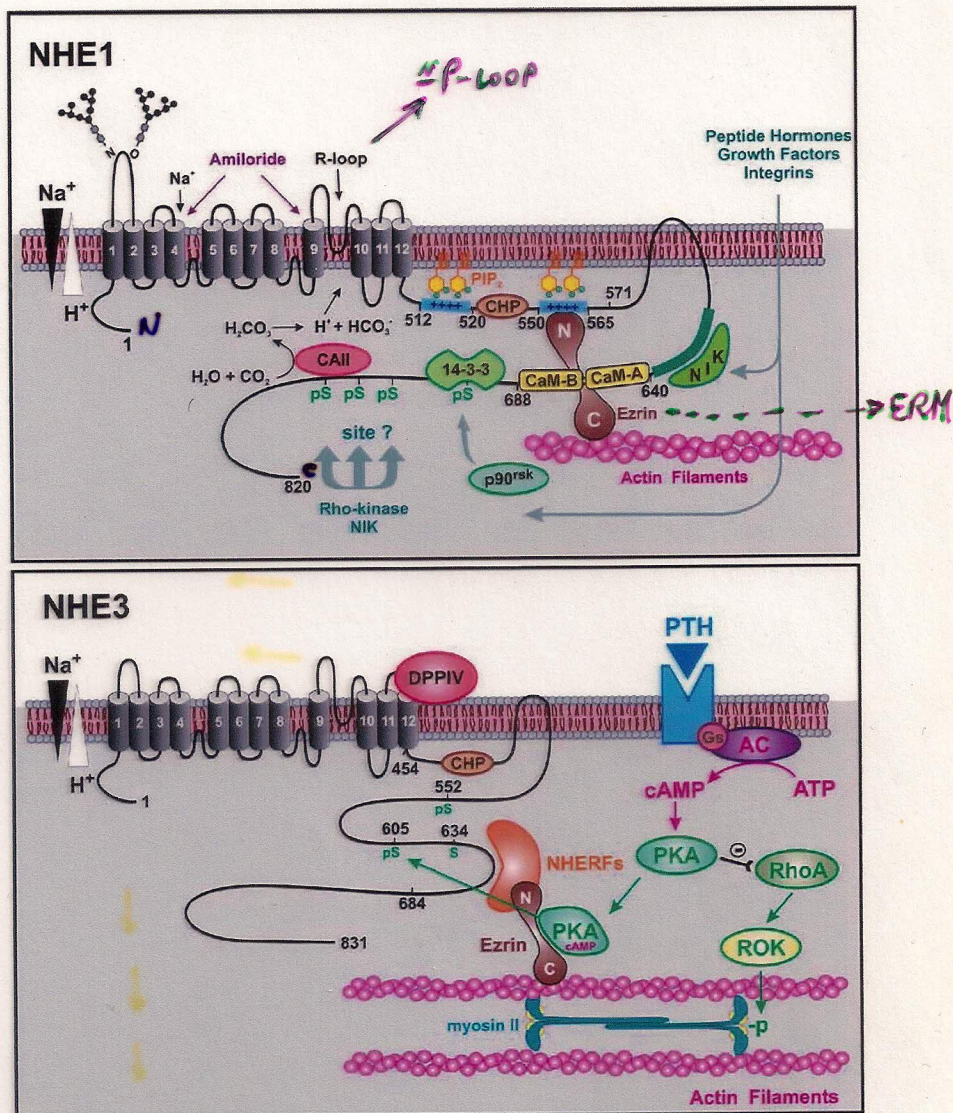
F) *RUOW PIU' COATU: per microambiente acido durante la migrazione nel fronte cell.*

Table 1 SLC9—the sodium/proton exchanger gene family

Human gene name	Protein name	Aliases	Substrate	Transport type/coupling ions*	Tissue distribution and cellular/subcellular expression	Link to disease [#]	Human gene locus	Sequence accession ID	Splice variants and their specific features
SLC9A1	NHE1	APNH	Na ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺	E: Na ⁺ /H ⁺ (1:1)	Ubiquitous; (plasma membrane; basolateral surface of epithelia)	Ischemia/reperfusion injuries ^A ; essential hypertension ^A ; diabetes-associated vascular hypertrophy ^A	1p36.1-p35	NM_003047 XM_046881	
SLC9A2	NHE2		Na ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺	E: Na ⁺ /H ⁺ (1:1)	Stomach, intestinal tract>skeletal muscle >>>kidney, brain, uterus, testis>>heart, lung; (plasma membrane; apical surface of epithelia)		2q11.2	NM_003048	
SLC9A2L							Xq13.3	XM_066494	Limited homology in C-terminus
SLC9A3	NHE3		Na ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺	E: Na ⁺ /H ⁺ (1:1)	Intestinal tract, stomach >kidney, gall bladder, epididymis, >>>>brain; (apical surface and recycling endosomes of epithelia)	Congenital secretory diarrhea; hypertension	5p15.3	NM_004174	
SLC9A3P1							10q21.1	XM_171384	Pseudogene
SLC9A3P2							22q11.21	XM_066360	Pseudogene
SLC9A4	NHE4		Na ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ ?; NH ₄ ⁺ ?	E: Na ⁺ /H ⁺ (1:1)	Stomach>>>>kidney, brain; (plasma membrane; basolateral membrane of epithelia)		2q11-q12	XM_087199	Partial mRNA
SLC9A5	NHE5		Na ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺ ?	E: Na ⁺ /H ⁺ (1:1)	Brain (neurons); (plasma membrane and recycling endosomes/synaptic vesicles)		16q22.1	NM_004594	
SLC9A6	NHE6	KIAA0267 ?		E: ?	Ubiquitous; (recycling endosomes)		Xq26.3	NM_006359	NHE6_v1 NHE6_v2
SLC9A7	NHE7		Na ⁺ , K ⁺ , H ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺ ?	E: Na ⁺ (K ⁺)/H ⁺	Ubiquitous; (<i>trans</i> -Golgi network and endosomes)		Xp11.3	NM_032591	
SLC9A7P1							12q23.1	XM_062645	Partially processed pre-mRNA pseudogene
SLC9A7P2							3q24	XM_067158	Very limited homology; pseudogene?
SLC9A8	NHE8	KIAA0939 ?		E: ?	Ubiquitous; (plasma membrane and possibly other endomembrane compartments)		20q13	XM_030524	

* E Exchanger, [#] A Acquired defect

Fig. 3 Transmembrane organization and regulation of mammalian Na^+/H^+ exchangers NHE1 and NHE3 (*R-loop* re-entrant loop, *PIP*₂ phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *CHP* calcineurin B homolog protein, *CaM* calcium-calmodulin, *NIK* Nck-interacting kinase, *CAII* carbonic anhydrase II, *PTH* parathyroid hormone, *DPPIV* dipeptidyl peptidase IV, *ROK* rho-associated kinase, *NHERF* NHE regulatory factor, *AC* adenylate cyclase)



NHE7, although the functional significance of this region, if any, has yet to be ascertained.

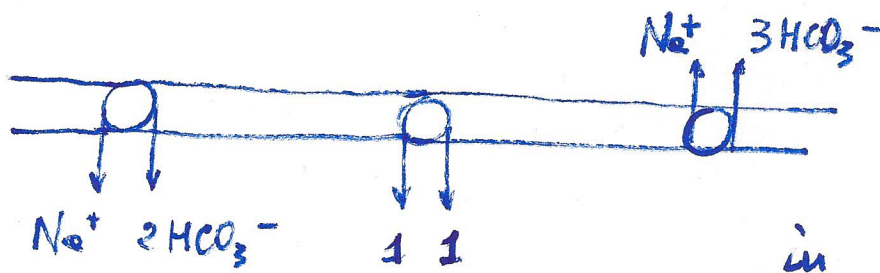
General structure-function correlates

Membrane topology

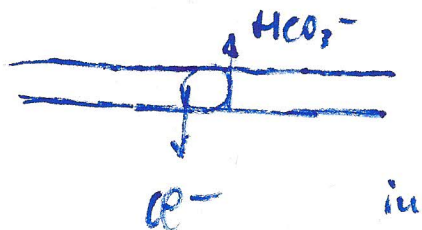
Computer modeling of the hydrophobic-hydrophilic nature and predicted secondary structures (i.e.; regions of α -helical and β -sheet structures) of the NHEs predicts a common membrane topology, with 12 relatively conserved membrane-spanning (M) segments at the N-terminus (~450–500 amino acids) and a more variable hydrophilic C-terminus that faces the cytoplasm (~130–450 amino acids depending on the isoform) and contains numerous canonical sites for phosphorylation by different protein kinases and for binding other ancillary factors, indicative of this region serving a regulatory function.

Empirical evidence generally supporting this model comes from a combination of approaches, including immunolocalization of epitopes [69, 162], delineation of glycosylation sites [32, 139], susceptibility to protease cleavage [125], functional measurements of C-terminal truncations [24, 75, 142] and accessibility of substituted cysteines [146]. The latter approach has provided the most detailed two-dimensional map of the organization of transmembrane helices and interconnecting hydrophilic loops of NHE1 (model illustrated in Fig. 3, upper panel). Of particular note is the presence of a large exofacial re-entrant loop (R-loop) between M9 and M10 that resembles the pore (P)-loop structure identified in ion channels and pumps as part of the ion conduction pathway [119], and may represent an analogous structure in the NHEs. Likewise, intracellular loops IL2 and IL4 are accessible to thiol-modification by reagents placed on either side of the membrane, suggesting that they insert into the lipid bilayer and face an aqueous milieu, perhaps also consti-

NBC TRASPORTO $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$



SCAMBIATORE DI ANIONI



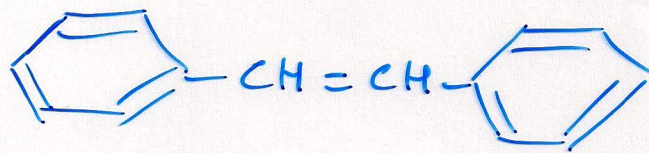
E MOLTI ALTRI

SITS

4-ACETAMIDE-4-ISOTHIOCYANOSTILBENE-2,2'-DISULFONIC ACID

SIS

4,4'-DIISOTHIOCYANOSTILBENE-2,2'-DISULFONIC ACID



STILBENE

POTENT IRREVERSIBLE INHIBITORS OF ANION
TRANSPORTERS and SEVERAL Cl^- CHANNEL TYPES

EXPERIMENTAL TREATMENTS TO DISTINGUISH THE
DIFFERENT H^+ TRANSPORTERS
(or HCO_3^-)

- MORE OR LESS SPECIFIC INHIBITORS
(amiloride, SITS, NDG, etc.)
- VOLTAGE DEPENDENCE/ELECTROGENICITY
(e.g. no for Na/H , yes for NBCs)
- DEPENDENCE ON $[Na^+]_o$
(e.g. the Cl^-/HCO_3^- transporter does not depend on $[Na^+]_o$)
- DEPENDENCE ON $[HCO_3^-]$ and $[Cl^-]$
(both intra- and extracellular, but changing the extracellular concentrations is much easier experimentally) -

PERCHÉ COSÌ TANTI TRASPORTATORI?

- REGOLAZIONE INDIPENDENTE DI FUNZIONI SOLO IN PARTE SOVRAPPOSTE.

P. es. H^+ non è lo stesso di HCO_3^- (legato al meta- b, esmo della CO_2 più direttamente) per la cellula.

Il flusso di H^+ può essere legato a quello di Ca^{2+} , o dei NTs, ecc.

- ALCUNI TRASPORTATORI NON FUNZIONANO IN CERTE CONDIZIONI.

P. es. Na/H della glia (e del rene) non funziona a $pH_0 < 6.9$, ma durante l'ischemia $pH_0 \approx 6.2-6.9$

In questo caso interviene NBC

- FUNZIONI DEI TRASPORTATORI NON LEGATE ALLA REGOLAZIONE DEL pH (p. es. controllo del volume)