

Membrana permeabile  
a  $K^+$  e  $Cl^-$

All'equilibrio:

$$V_m = E_K = E_{Cl}$$

$$\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o}$$

$$\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} = \frac{[Cl^-]_i}{[Cl^-]_o}$$



$$[K^+]_o [Cl^-]_o = [K^+]_i [Cl^-]_i$$

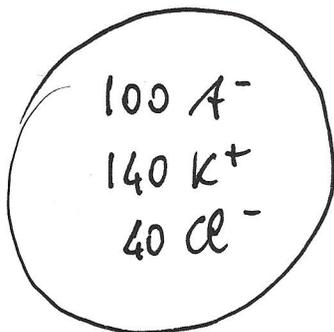
EQUILIBRIO DI DONNAN

Visto che:  $[K^+]_o = [Cl^-]_o$

e  $[K^+]_i > [Cl^-]_i$  (cioè  $[K^+]_i = [Cl^-]_i + [A^-]_i$ )

Si conclude che in presenza di anioni non permeanti nello spazio  $i$ , le concentrazioni di  $K^+$  e  $Cl^-$  extra- ed intracellulari non sono uguali.

SITUAZIONE INIZIALE



ESTERNO

140 K<sup>+</sup>  
140 Cl<sup>-</sup>

(cellula piccola rispetto al volume extracellulare)

ELETTRONEUTRALITÀ: SÌ

OSMOLARITÀ BILANCIATA: SÌ

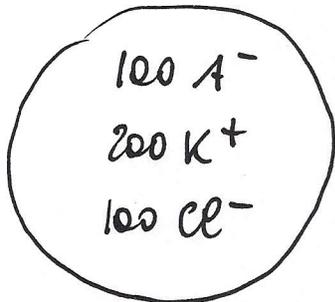
EQUILIBRIO DI HONNAN: NO

$[K^+]_o [Cl^-]_o = 140 \times 140 \approx 20000$

$[K^+]_i [Cl^-]_i = 140 \times 40 \neq 20000$

↓ La membrana è permeabile a K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>  
(ma non ad A<sup>-</sup>)

TEMPO SUCCESSIVO



140 K<sup>+</sup>  
140 Cl<sup>-</sup>

$V_m \approx E_{Cl} = E_K \approx -8/-9$   
mV

ELETTRONEUTRALITÀ: SÌ

EQ. DI HONNAN: SÌ

EQUILIBRIO OSMOTICO: NO

$[K^+]_o [Cl^-]_o \approx 20000$

$[K^+]_i [Cl^-]_i = 20000$

Si può dimostrare che in un sistema con flussi transmembranari puramente passivi, e che comprenda anche ioni incapaci di attraversare la membrana, non c'è modo di avere un equilibrio simultaneo delle tre quantità descritte in precedenza.

Cioè i compartimenti extra- ed intracellulare non possono essere nello stesso momento in tutte queste tre condizioni:

ELETTRONEUTRALITA'

EQUILIBRIO OSMOTICO

EQUILIBRIO DI DONNAN

La cellula può ovviare a questa difficoltà:

a) con una PARETE RIGIDA

b) mediante TRASPORTI ATTIVI

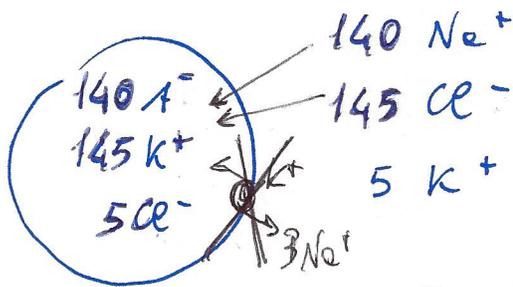
$i$	$\sigma$
140 $A^-$	140 $Na^+$
145 $K^+$	$\rightarrow Na$ 145 $Cl^-$
5 $Cl^-$	5 $K^+$

ELETTRO NEUTRALITÀ

(EQ DI DONNAN per  $K^+$  e  $Cl^-$  o NO) nelle celle  
OSMOTICITÀ BILANCIATA

In realtà c'è  $P_{Na}$  non trascurabile quindi c'è  $[Na]$ ;  
e c'è il punto comune di  $K^+$  e  $Na^+$  e la pompa  
bilancia entrambi.

Però se si blocca la pompa la cella si gonfia?



- Se  $Vol_{EXT} \gg Vol_{INT}$

non si applica l'eq. per  $NaCl$

- Se  $Vol_{EXT} \approx Vol_{INT}$

$$\frac{70}{70} = \frac{70}{70} = \frac{70}{70} \quad (\text{osmosi controllata})$$

# NECESSITÀ di MECCANISMI di REGOLAZIONE DEL VOL CELLULARE

- ORGANISMI SOGGETTI A STRESS OSMOTICO

(estuari, acque salmastre...)

SALINITÀ ACQUA MARIANA  $\sim 35\%$   
DOLCE  $\sim 0.5\%$  } shock  
25 atm

OSMOCONFORMI e OSMOREGOLATORI

ANCHE

- NEGLI OSMOREGOLATORI, possibile grandi variazioni osmotiche

P. es. - EPITELI GI dopo immersione di acqua

- globuli rossi in organi periferici, e.g. rene

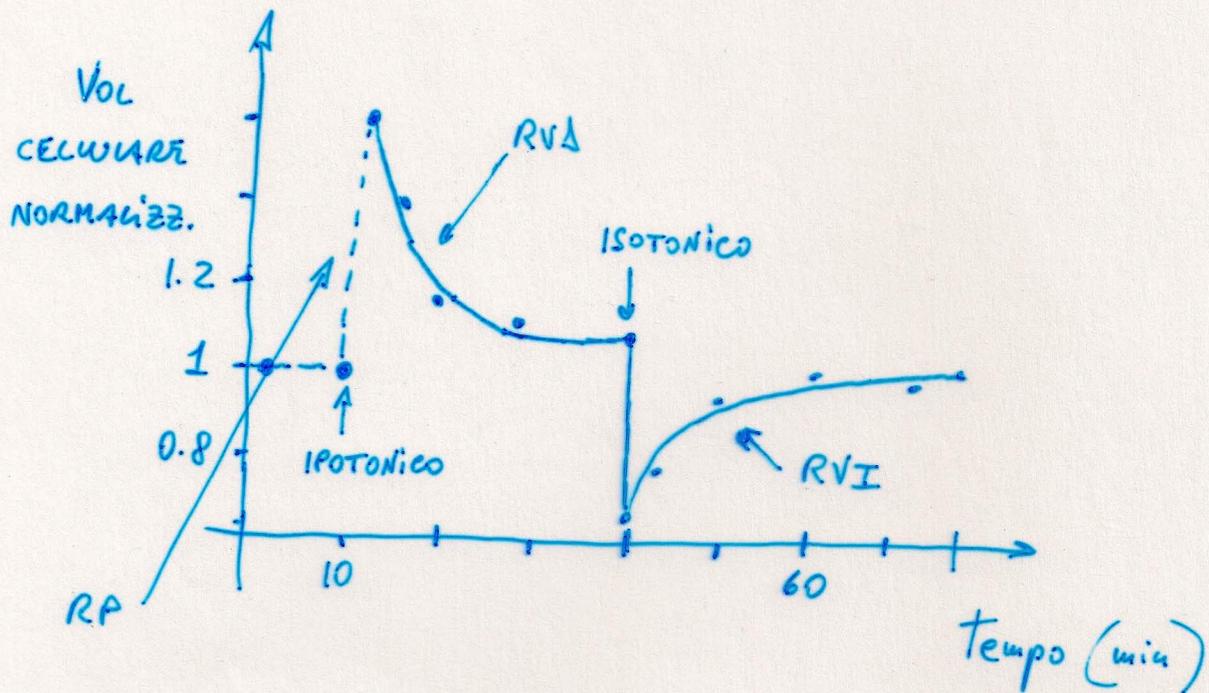
- patologie del sistema endoteliale e BEE

- rispostamento a ischemie / iperfusione

-  $\downarrow T + \uparrow K^+$  cardioplegia aortica

- Inoltre le cellule possono variare il volume durante  
normali processi fisiologici cellulari (p.e. migrazione  
o ciclo cellulare).

# RISPOSTA DEI LINFOCITI AL CAMBIAMENTO DELL'OSMOLARITÀ DEL MEZZO EXTRACELLULARE



DIMINUZIONE REGOLATIVA DEL VOLUME (RVD)

AUMENTO REGOLATIVO DEL VOLUME (RVI)

RP: RISPOSTA PRIMARIA RAPIDA DELLA CELLULA ALL'ALTERAZIONE OSMOTICA. (OSMOMETRO).

## CONTROLLO DEL VOLUME:

- 1) SENSORI
- 2) MEDIATORI ( $Ca^{2+}$ , fosforilazioni, Rho GTPas)
- 3) EFFETTORI (canali e trasportatori)

## CONTROLLO DEL VOLUME CELLULARE.

A) Le risposte regolative sono lente, ciò suggerisce che avvenga un cambiamento nella concentrazione dei soluti (processo che richiede tempo), accompagnata da un flusso osmotico d'acqua.

Possibili strategie:

- Sintesi o degradazione di soluti intracellulari.
- Alterazione dei processi di trasporto.

Ci sono evidenze sperimentali per entrambe, sebbene i meccanismi di trasporto abbiano diffusione maggiore nei diversi tipi cellulari studiati.

B) Sensore cellulare del volume:

Possibilità:

- Stiramento della membrana (canali o trasportatori attivati o regolabili da stiramento). †
  - Cambiamento della concentrazione di qualche soluto con funzione segnalatoria o della conc. macromolecolare.
  - Alterazione dell' interazione tra proteine di membrana (fra loro, col citoscheletro o con le proteine della matrice extracellulare). †
  - *Alterazione delle conc. di qualche ione o della loro ionice in generale.*
- ← POCO  
PROBABILE  
←

C) Ioni coinvolti nella regolazione del volume:

RVD: Uscita di  $K^+$  e  $Cl^-$  (i maggiori ioni intracellulari).

RVI: Entrata di  $Na^+$  e  $Cl^-$ , a volte accompagnata da soluti organici.

† TRP, EGFR, integrins

## RVD NEI MAMMIFERI.

### Efflusso iniziale di $K^+$ e $Cl^-$ .

- Attivazione di canali per il  $K^+$  (diversi, p.es.  $K_{Ca}$ )  
meccanismo poco chiaro, fosforilazione o  $Ca^{2+}$  (da TRP p.es.)
- VRAC ("volume regulated  $Cl^-$  channels", molte altre funzioni, producono depolarizzazione o iperpolarizzazione a seconda di  $E_{Cl}$  e  $V_{rest}$ ).
- KCC: cotrasporto  $K^+-Cl^-$ , attivato da defosforilazione (ser-thr, potenziale effetto reciproco rispetto agli NKCC) dopo rigonfiamento.

### Efflusso successivo di osmoliti (carriers).

- polioli: sorbitolo, mio-inositolo.
- aa e derivati: ala, pro, taurina (importante, canale?).

### Flusso di bicarbonato

### Concomitante flusso di acqua.

## RVI NEI MAMMIFERI

### Ingresso iniziale di $\text{Na}^+$ e $\text{Cl}^-$ .

- $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1, ubiquo, attivato da collasso della cellula, forse meccanosensibile o fosf. di subunità regolative)
- NKCC: cotrasporto  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  (fosforilazione diretta).
- Attivazione di canali permeabili ai cationi, sensibili all'ipertonicità (poco selettivi, prevale l'ingresso di  $\text{Na}^+$ ), anche TRP.
- Canali per il  $\text{Cl}^-$ .

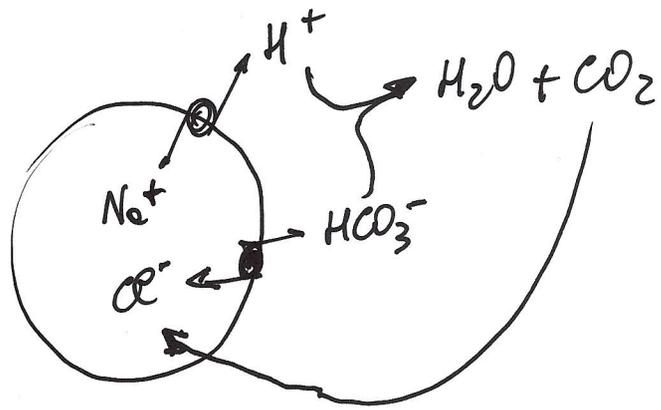
### Ingresso successivo di osmoliti organici.

Non si può mantenere un'alta forza ionica troppo a lungo (p.es. effetti sul ripiegamento delle proteine a sull'associazione delle macromolecole)  
Inoltre stabilizzano le proteine.

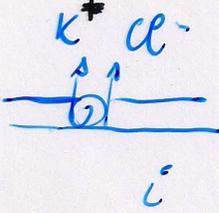
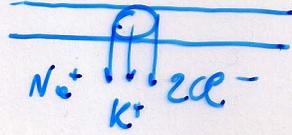
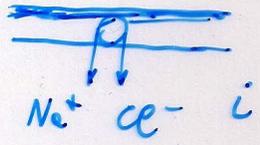
Taurina, betaina, inositolo: assorbimento (trasportatori)

Sorbitolo, GPC (glicerofosfolina): sintesi (!)

(DEGRAS. MACROMOL.)

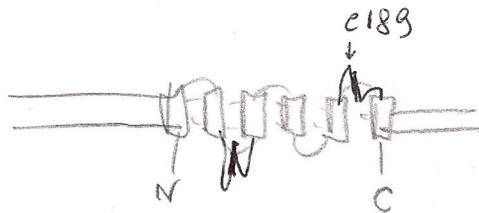


SOLUTE CARRIER 12 (SLC12) FAMILY OF  
ELECTRONEUTRAL CATION- $\text{Cl}^-$  COTRANSPORTERS  
(CCEs)

	gene	
KCC 1	SLC12A4	
KCC 2	" A5	
KCC 3	" A6	
KCC 4	" A7	
NKCC 1	SLC12A2	
NKCC 2	" A1	
NCC	" A3	

# ACQUAPORINE

## TETRAMERO



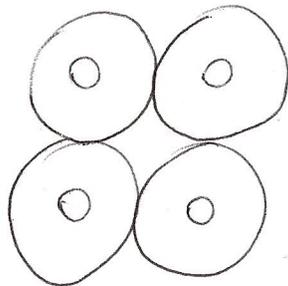
2 NPA  
nel poro

|| = NPA

N = ASPARAGINA

P = PROLINA

A = ALANINA



4 PORI

# ACQUAPORINE

TRE FAMIGLIE STRUTTURALI

ELENCO DI QUELLE DEI VERTEBRATI:

## 1) Acquaporine classiche.

AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8.

Canale tetramerico.

Poro centrale (per subunità) di circa 3Å di diametro (sequenza firma: 2 NPA nel poro).

Alta  $P_{\text{acqua}}$  e spesso impermeabilità a ioni e altri piccoli soluti, ma in certe isoforme passano  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  (p.es. AQP8 o anioni (p.es. nitrato in AQP6).

La funzione principale sembra in genere il trasporto d'acqua. Altri trasporti utili o meno a seconda delle proprietà della membrana plasmatica, probabilmente.

Passaggio di molecole d'acqua in fila singola, circa  $5 \times 10^8 \text{ sec}^{-1}$  (turnover molto veloce).

AQP0 e AQP4 possono esercitare funzioni di adesione tra cellule.

## 2) Acquagliceroporine.

AQP3, AQP7, AQP9, AQP10.

Struttura generale simile a quella delle precedenti, ma diversa sequenza firma: prima NPA e poi NPARD, D importante per la selettività al glicerolo.

$P_{\text{acqua}}$  minore che nelle AQP classiche. Però passa glicerolo. Probabile ruolo principale come trasportatori del glicerolo nel controllo del volume.

Altre funzioni da chiarire: trasporto di certi metalli in forma salina (As, Sb). AQP9 è permeabile a composti organici più grandi (lattato, basi azotate,...).

## 3) AQP non classiche.

AQP11, AQP12.

Piuttosto diverse dalle altre nella sequenza, spesso primo NP e secondo NPxxxxxxxxxC.

Esprese in moti organi, anche negli organuli (ma vale anche per le altre forme). Permeabili all'acqua, funzioni da chiarire nei dettagli.