

Transporte a través de membranas

Dra Sobeida Sánchez Nieto

sobeidasan@gmail.com

sobeida@unam.mx

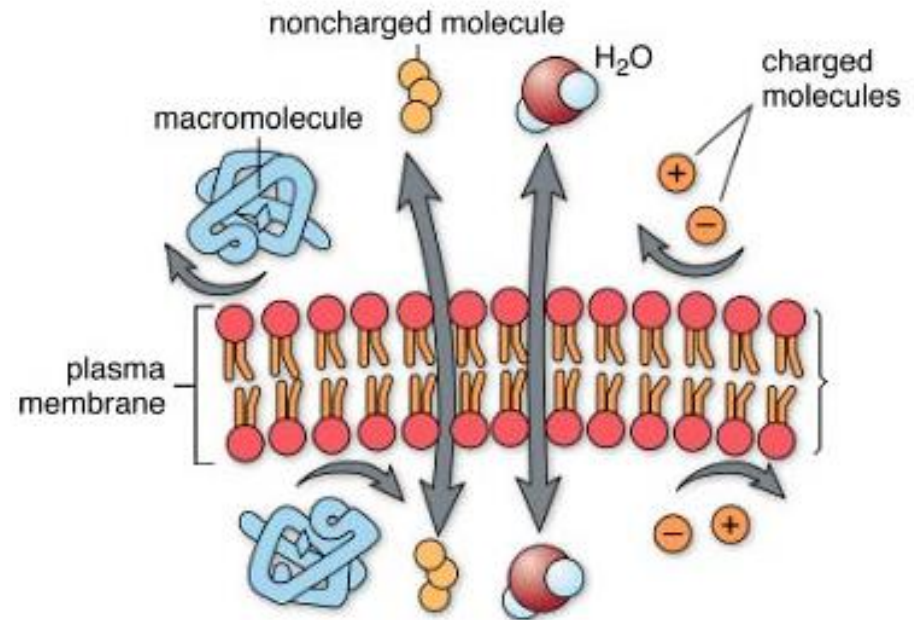
Lab 114, Departamento de Bioquímica,
Conjunto “E” Facultad de Química

MEMBRANAS Y TRANSPORTE

TRANSPORTE DIFUSIONAL

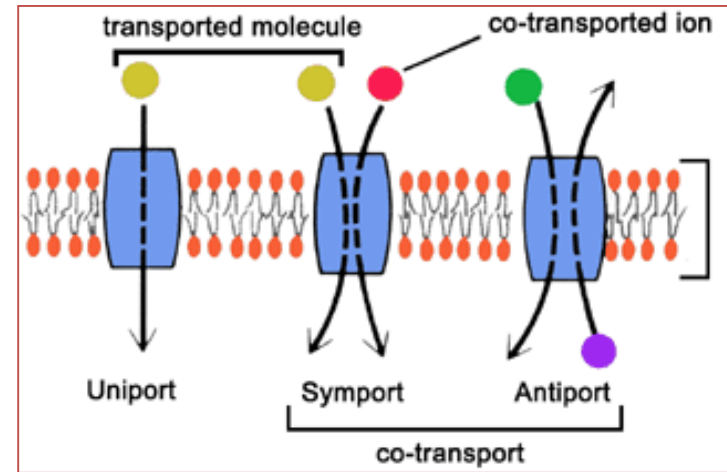
Movimiento de solutos a través de las membranas

1. Agua, pequeñas moléculas (CO_2 , O_2 , N_2), benceno, glicerol, etanol **NO TIENEN DIFICULTAD** en pasar a través de la membrana
2. Moléculas cargadas o sin carga pero grandes **no puede pasar la membrana**. Para atravesar necesitan a una proteína que les ayude o facilite su transporte.



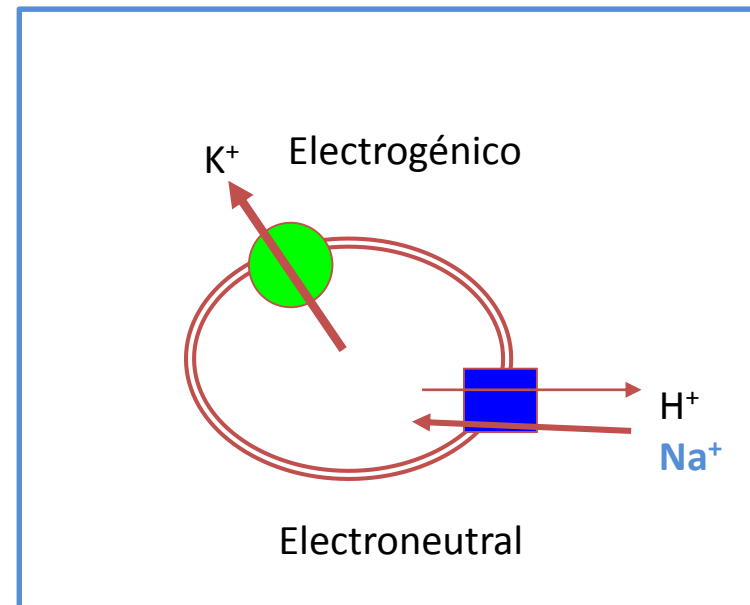
Clasificación de transporte

1. Estequiométrico



2. Eléctrico

3. Dependiente de energía para el transporte.



Mecanismos dependientes de energía

1. Los mecanismos por los cuales las sustancias pasan a través de las membranas sin gasto de energía son denominados **PASIVOS O DIFUSIVOS.**

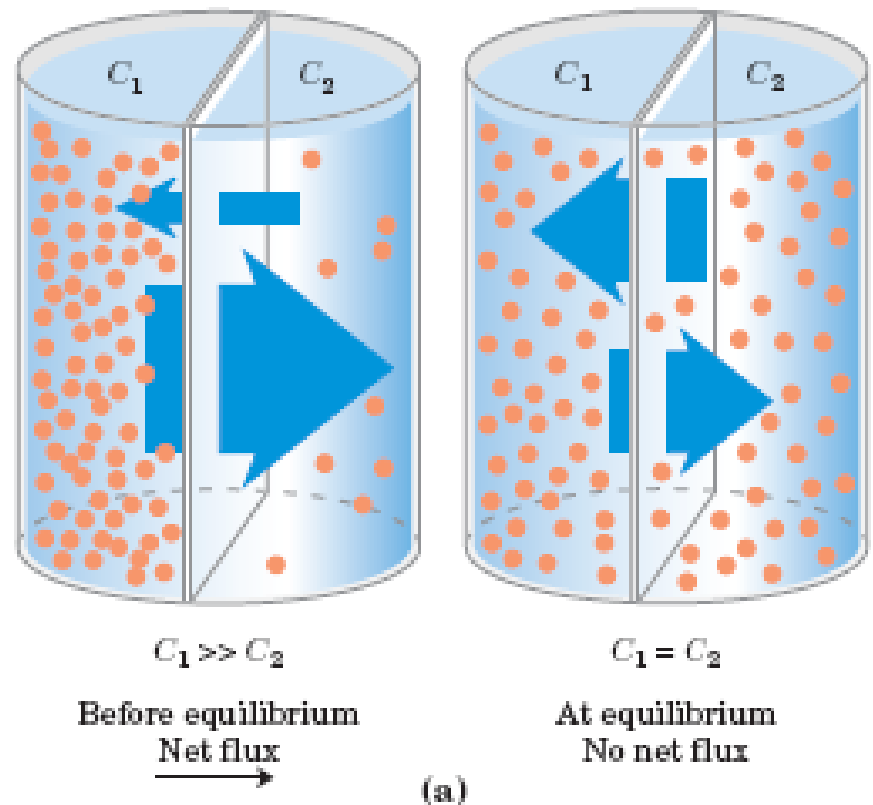
2. Mientras que los que necesitan del aporte de energía para el transporte de solutos son llamados **ACTIVOS**

Movement Through Cell Membranes

Passage of Molecules into and out of Cells				
	Name	Direction	Requirements	Examples
Passive Transport	Diffusion	Toward lower concentration	Concentration gradient	Lipid-soluble molecules, water, and gases
	Osmosis	Toward lower concentration	Concentration gradient	Water
	Facilitated diffusion	Toward lower concentration	Carrier and concentration gradient	Sugars and amino acids
Active Transport	Active transport	Toward greater concentration	Carrier plus energy	Sugars, amino acids, and ions
	Exocytosis	Toward outside	Vesicle fuses with plasma membrane	Macromolecules
	Endocytosis Phagocytosis	Toward inside	Vacuole formation	Cells and subcellular materials
	Pinocytosis (includes receptor-mediated endocytosis)	Toward inside	Vacuole formation	Macromolecules

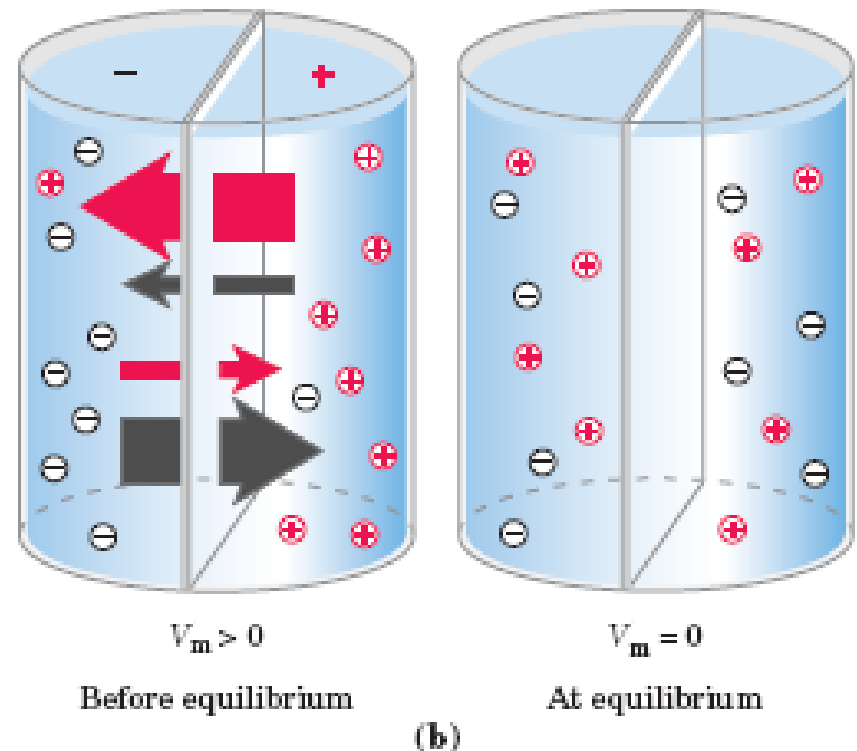
Proceso de difusión

- Movimiento del soluto a través de una membrana semipermeable, para lograr el equilibrio en las concentraciones entre ambos compartimentos

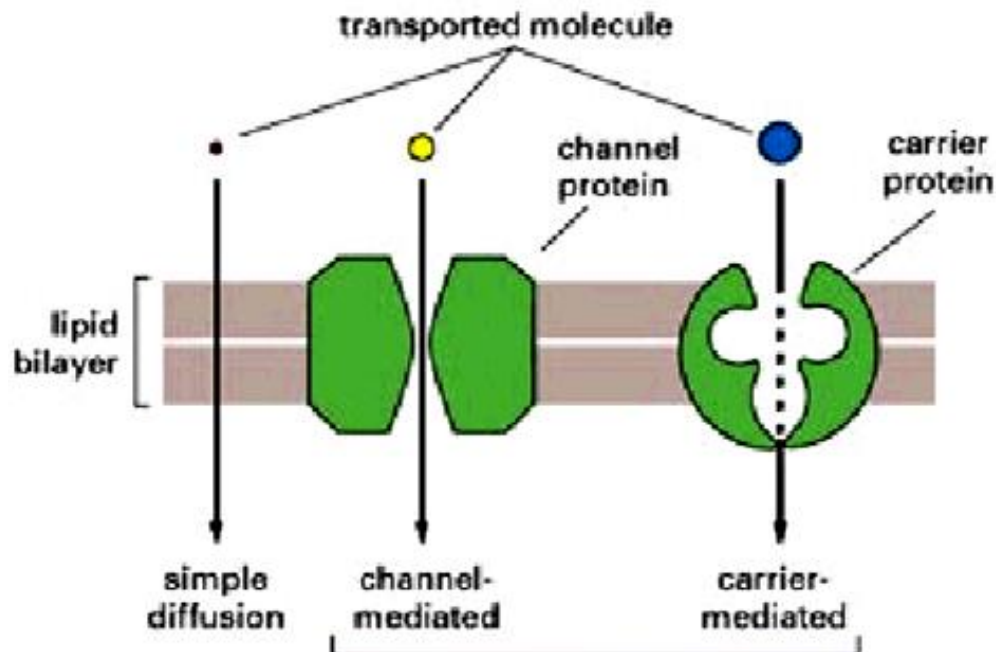


Proceso de difusión de solutos polares o cargados

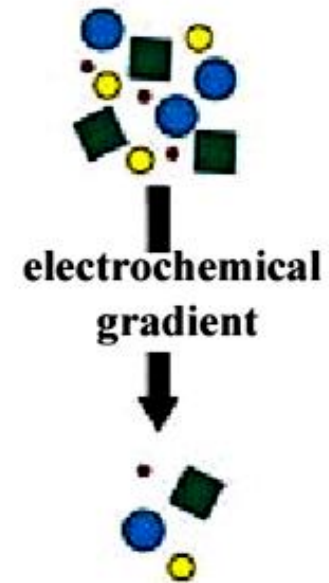
- Movimiento para igualar la concentración y la carga en los dos compartimentos
- **Se necesitan proteínas que faciliten el transporte**



Diferentes formas de transporte pasivo o difusional



Difusión facilitada

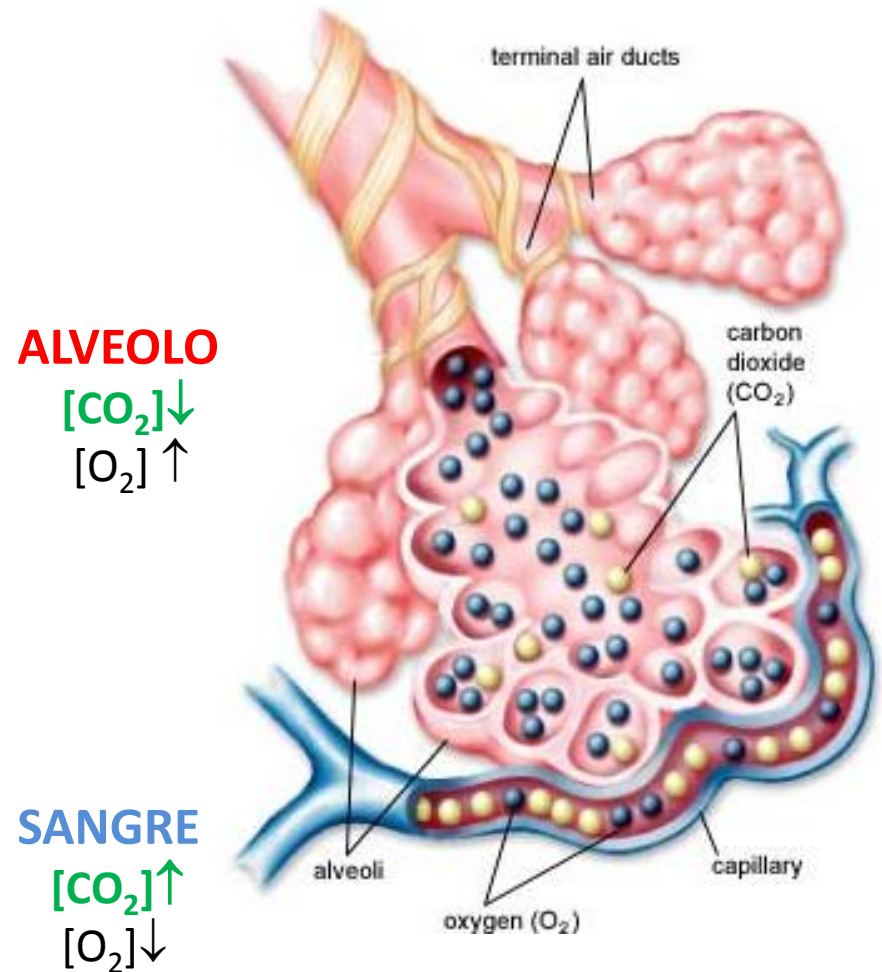


Difusión simple

- Espontáneo.
- Depende de la permeabilidad de la membrana para el soluto.
- Cinética lineal conforme se equilibran las concentraciones en ambas caras de la membrana.
- No es estereoespecífico, ni selectivo, es bidireccional y tiene relación directa con la temperatura.

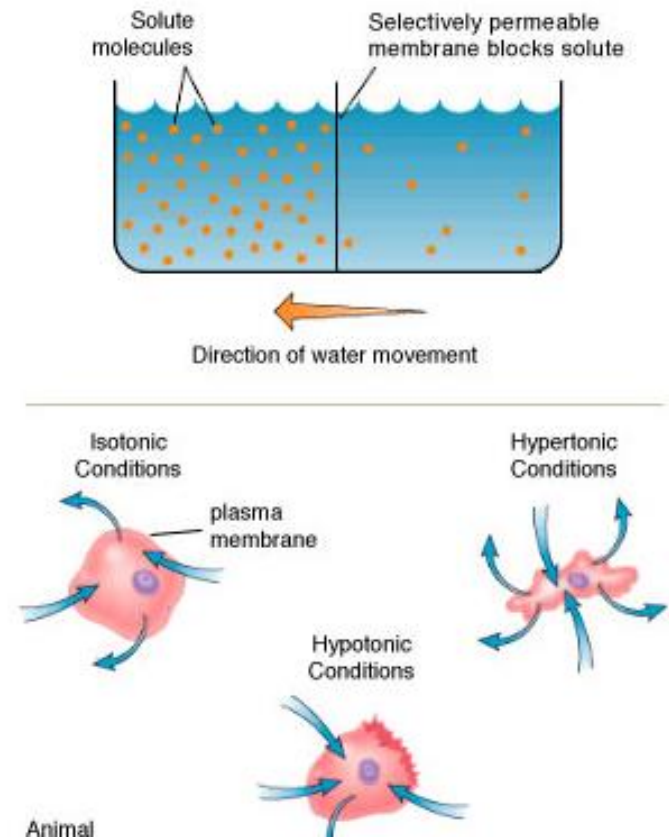
Ejemplo: difusión simple (moléculas pequeñas)

- Intercambio gaseoso en los pulmones se lleva a cabo por difusión.
- El CO_2 va de la sangre hacia el alveolo
- El O_2 va del alveolo a la sangre



Ejemplo: difusión simple (agua)

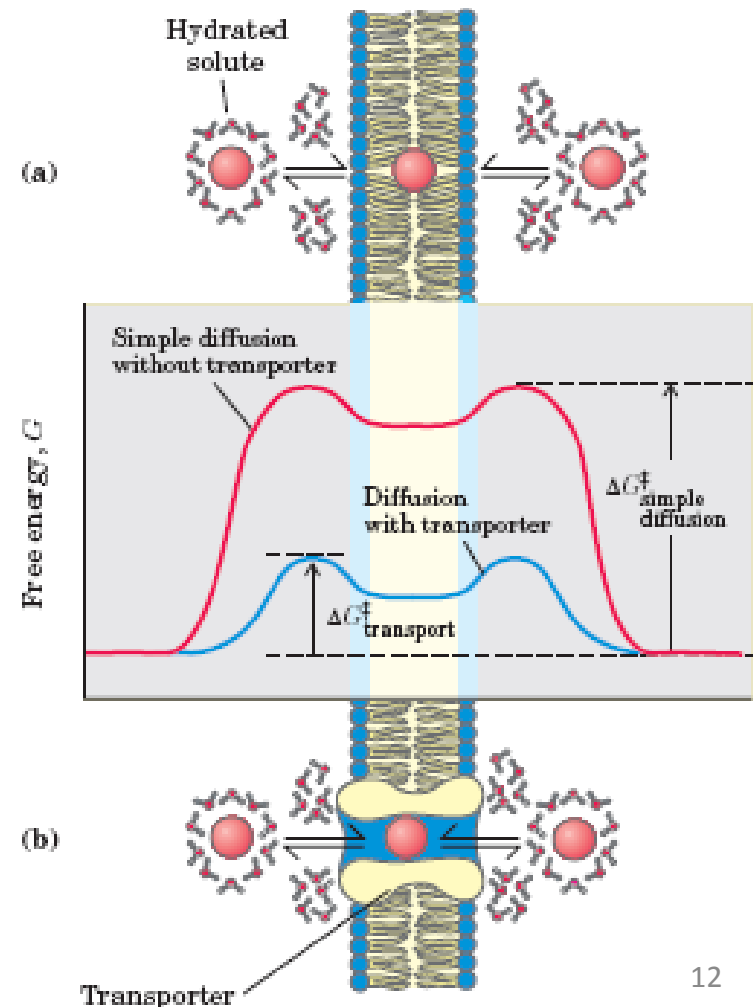
- **Osmosis.** Es la difusión de agua a través de la membrana. Movimiento de alta a baja [agua].
- Entre más solutos hay en solución más baja [agua] en esa solución.
- Una solución con una alta concentración de solutos es **hipertónica** siempre comparada con una solución de baja concentración de solutos.
- Una solución con una concentración baja de solutos es **hipotónica** relativa a la de alta concentración de solutos.



El agua se mueve de la solución hipotónica hacia la hipertónica

Difusión de solutos polares. Cambios en la energía libre del movimiento de un soluto hidrofílico sobre la bicapa lipídica

- Simple. El movimiento de un soluto polar a través de la membrana es un **PROCESO NO ESPONTÁNEO**
- Facilitada. El mismo soluto ayudado ahora por una proteína para entrar a la membrana (Disminuye la ΔG) lo hace un **PROCESO ESPONTÁNEO**



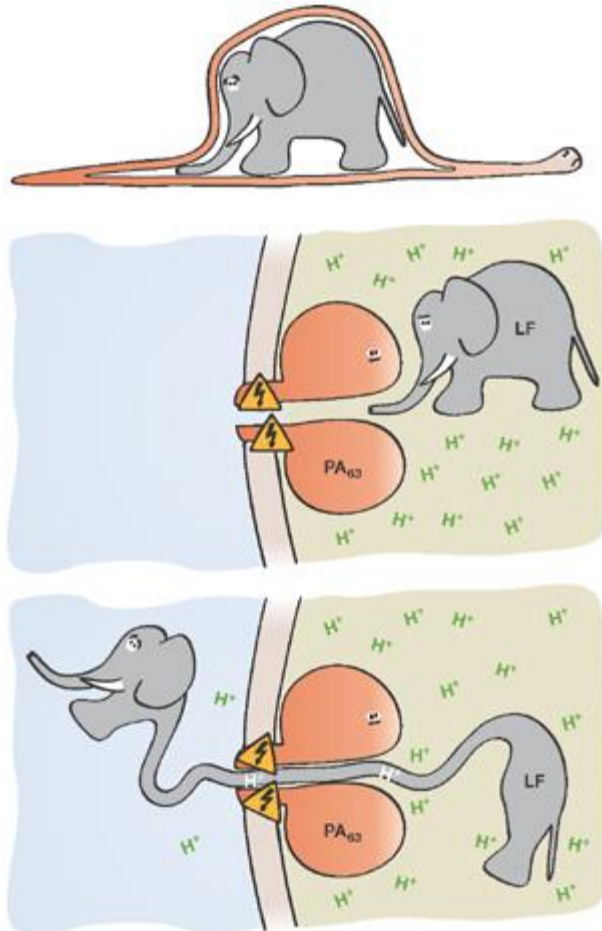
Coeficiente de permeabilidad

- Indica la tendencia de un soluto a transferirse desde un solvente acuoso hacia un núcleo apolar en la membrana

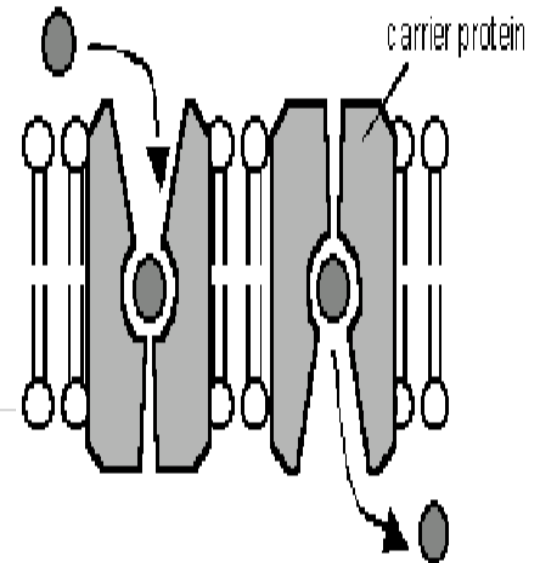
Coeficientes de permeabilidad de membranas naturales y sintéticas a la D-glucosa y al D-manitol, a 25 °C

Preparación de membranas	Coeficientes de permeabilidad (cm · s ⁻¹)	
	D-Glucosa	D-Manitol
Bicapa lipídica sintética	$2,4 \times 10^{-10}$	$4,4 \times 10^{-11}$
Difusión no mediada calculada	4×10^{-9}	3×10^{-9}
Eritrocitos humanos intactos	$2,0 \times 10^{-4}$	5×10^{-9}

Proteínas de transporte:



unen al soluto de un lado de la membrana y lo llevan al otro lado a través de un cambio en la conformación (estructura) de la proteína



The twain shall meet: channels, transporters and things between

László Csanády & Joseph A Mindell

EMBO reports (2008) 9, 960 - 965 | doi:10.1038/embor.2008.172
Published online: 5 September 2008

TABLE 11-3 The Transporter Classification (TC) System

1.A. α Helix type channels

- 1.A.1. Voltage-gated ion channel VIC superfamily
Voltage-gated K^+ channel
- 1.A.3. Ryanodine/ IP_3 receptor Ca^{2+} channel
- 1.A.8. Major intrinsic protein family
Aquaporins
- 1.A.9. Ligand-gated ion channel (LIC) of neurotransmitter receptors
Acetylcholine receptor/channel

1.B. β Barrel porins

- 1.B.1. General bacterial porin (GBP) family

1.C. Pore-forming toxins

- 1.C.7. Diphtheria toxin family
- 1.C.18. Mellitin family (bee venoms)

2.A. Porters: uniporters, symporters, and antiporters

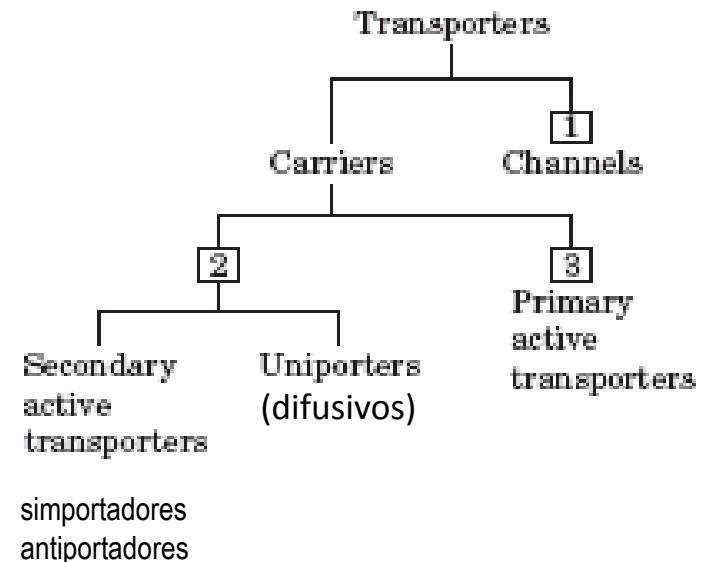
- 2.A.1. Major facilitator superfamily (MFS)
Lactose transporter/permease of *E. coli*
 - 2.A.1.1. Sugar porter family
GLUT1 glucose transporter of erythrocyte
 - 2.A.1.9. P_i - H^+ symporter
 - 2.A.12. ATP-ADP antiporter (AAA) family
 - 2.A.13. C_4 -dicarboxylate uptake (Dcu) family
 - 2.A.21. Solute- Na^+ symporter (SSS) family
 Na^+ -glucose symporter in epithelial cells
 - 2.A.73. HCO_3^- transporters
 HCO_3^- - Cl^- antiporter

2.B. Nonribosomally synthesized porters

- 2.B.1. Valinomycin carrier family
Valinomycin

3.A. Diphosphate bond hydrolysis-driven transporters (use PP_i , not ATP)

- 3.A.1. ATP-binding cassette (ABC) superfamily
CFTR Cl^- channel; multidrug transporter MDR1
- 3.A.2. H^+ - or Na^+ -translocating F-type, V-type, A-type ATPase superfamily
 F_0F_1 ATPase proton pump; V_0V_1 ATPase; A_0A_1 ATPase
- 3.A.3. P-type ATPase superfamily
 Na^+K^+ ATPase antiporter; SERCA Ca^{2+} pump



Diferencias entre acarreadores y canales

Característica	Acarreador	Canal
Especificidad	Alta	Moderada
Velocidad	1×10^2 a 1×10^4 soluto s^{-1}	1×10^8 iones s^{-1}
Número de moléculas transportadas por ciclo	1 (uniportador)	4-6
Saturable	Si	No
Arreglo estructural	Muchos en monómeros activos	Generalmente oligomérica

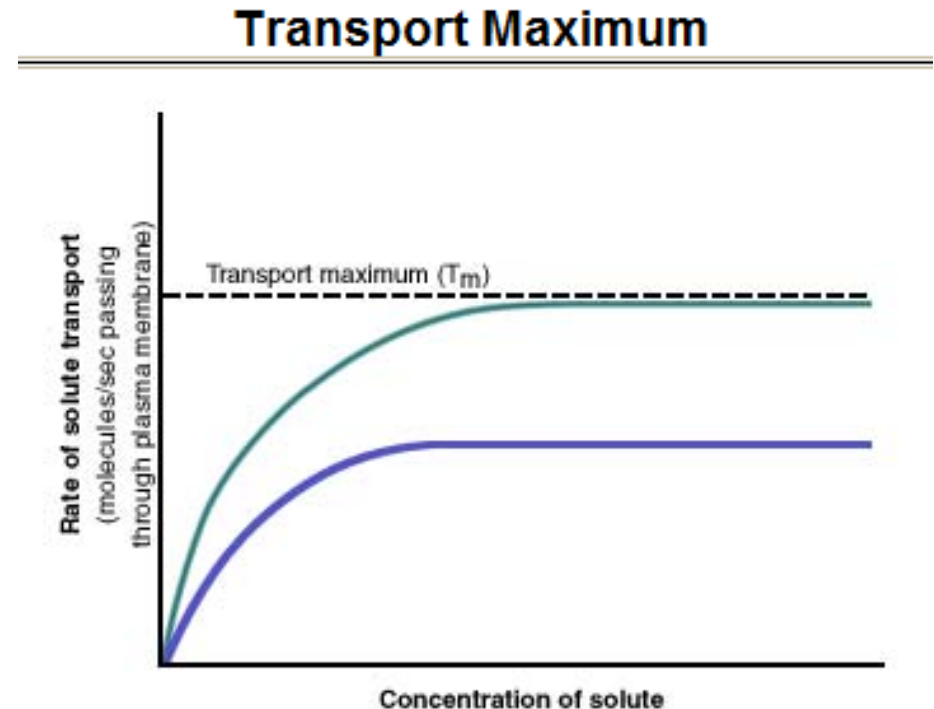
Difusión facilitada (acarreador)

- El transporte tiene un máximo, debido a que el transportador es:

- A) Específico
- B) Saturable

- Cinética descrita con la ecuación:

$$J_A = \frac{J_{\max}[A]}{K_M + [A]}$$



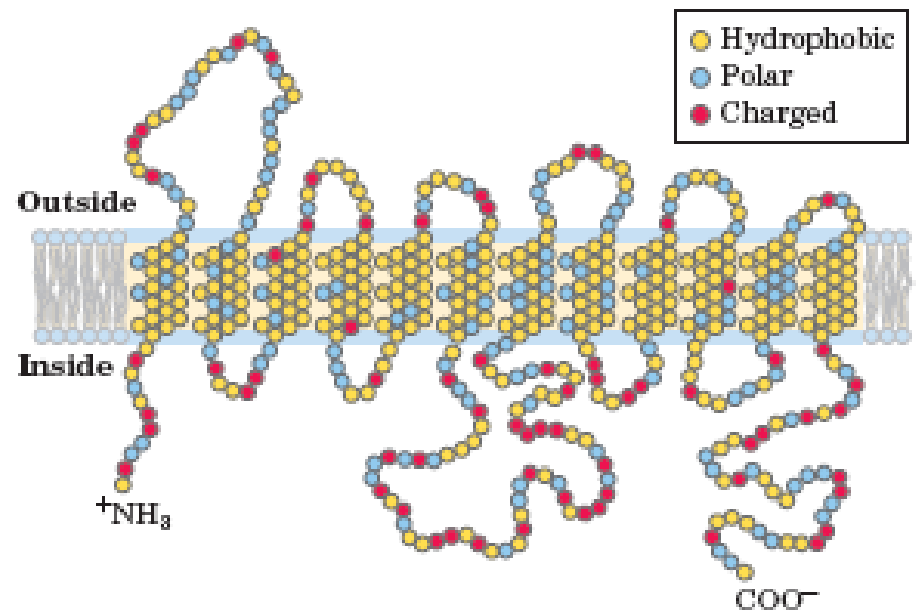
Acarreador: GLUT1

- Específico para Glucosa, saturable y estereoespecífico.

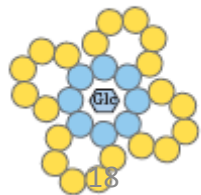
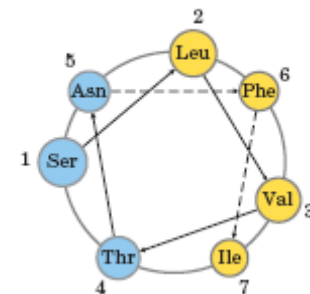
K_t $_{D-Glu}$ o K_m $_{D-Glu} = 1.5 \text{ mM}$

K_m $_{D-Gal} = 20-30 \text{ mM}$

K_m $_{L-Glu} = 3,000 \text{ mM}$



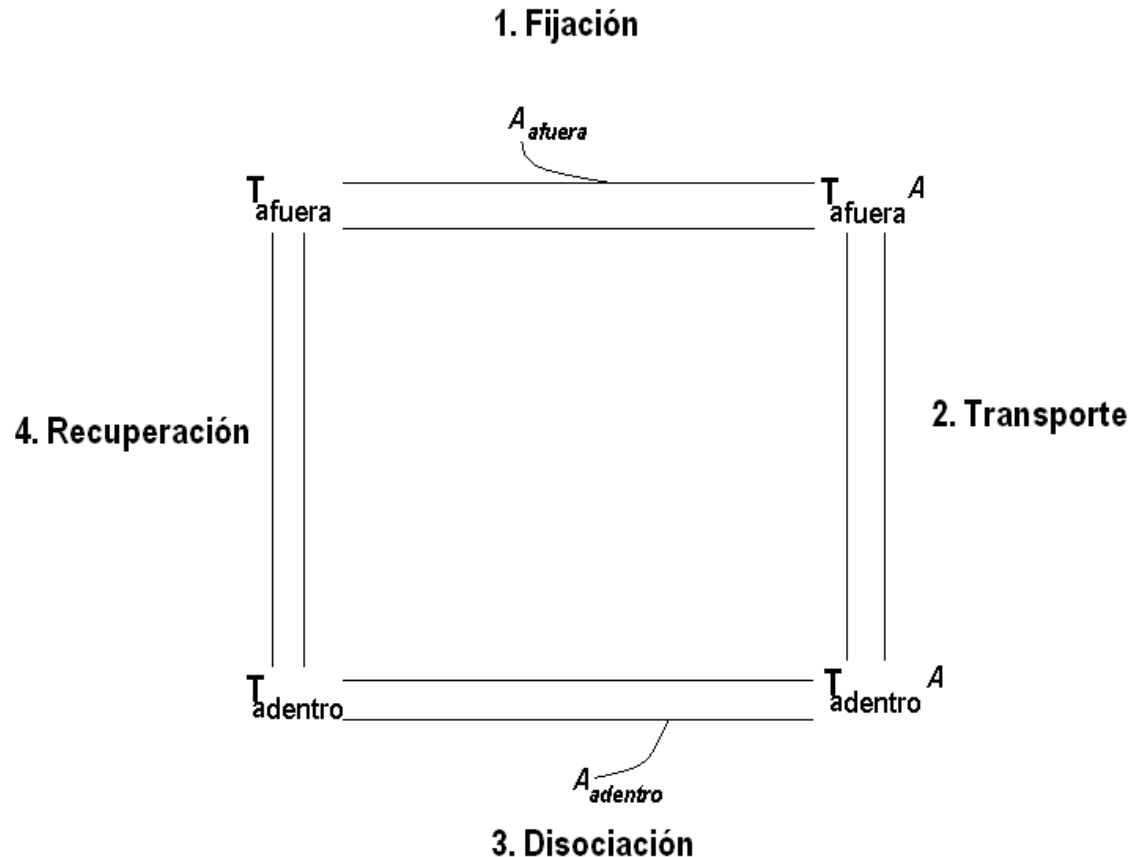
—Ser—Leu—Val—Thr—Asn—Phe—Ile—



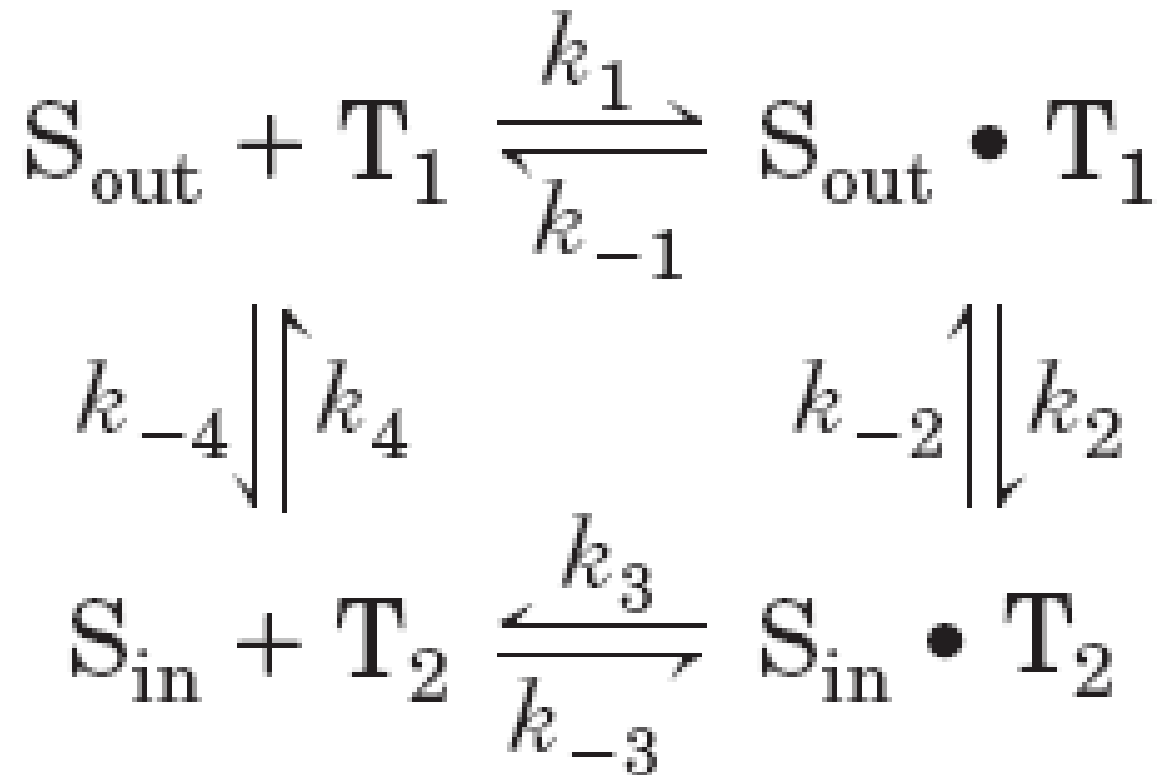
Proceso cinético de transporte

Cuatro pasos:

1. Fijación
2. Transporte
3. Disociación
4. Recuperación

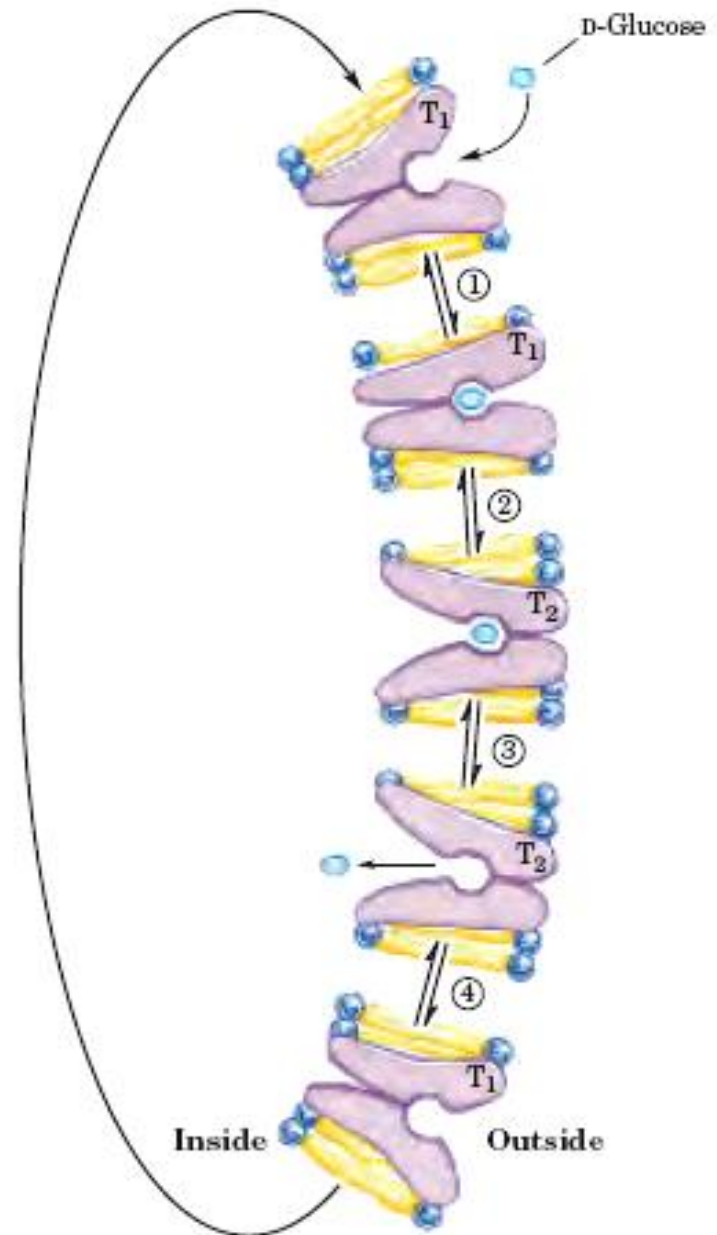


Proceso de transporte puede escribirse como el proceso cinético de una enzima:

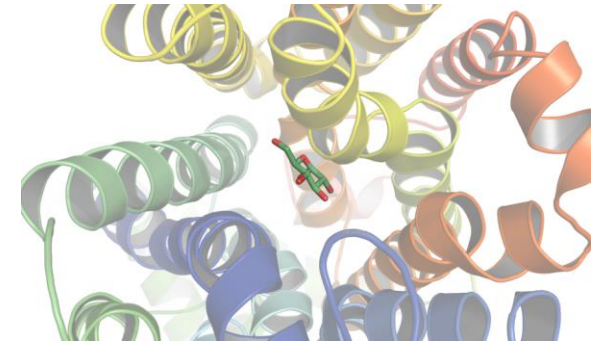
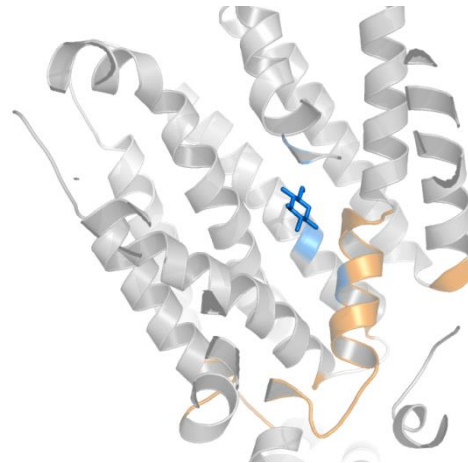
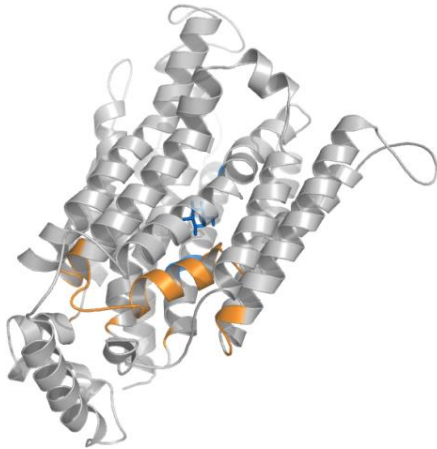
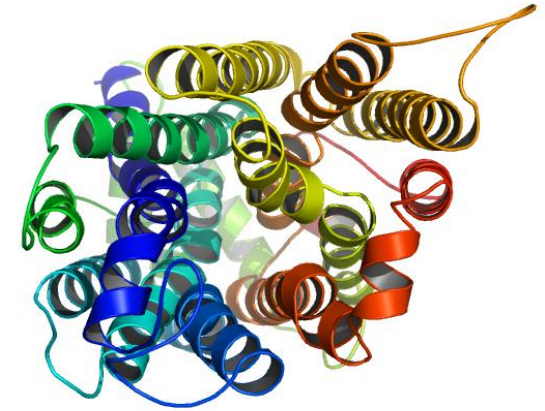
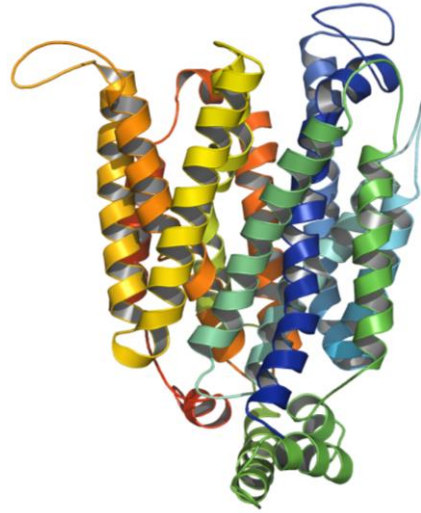
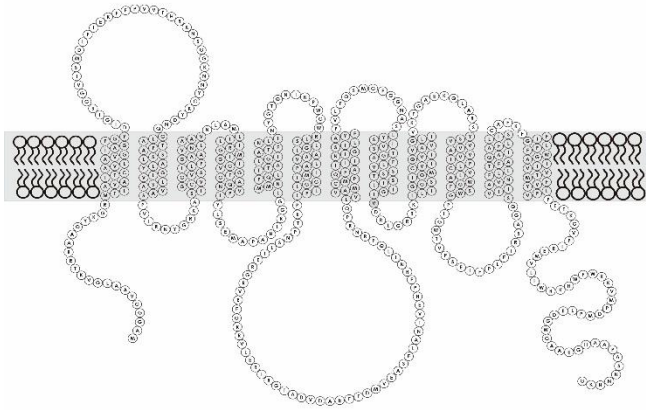


Transporte de glucosa

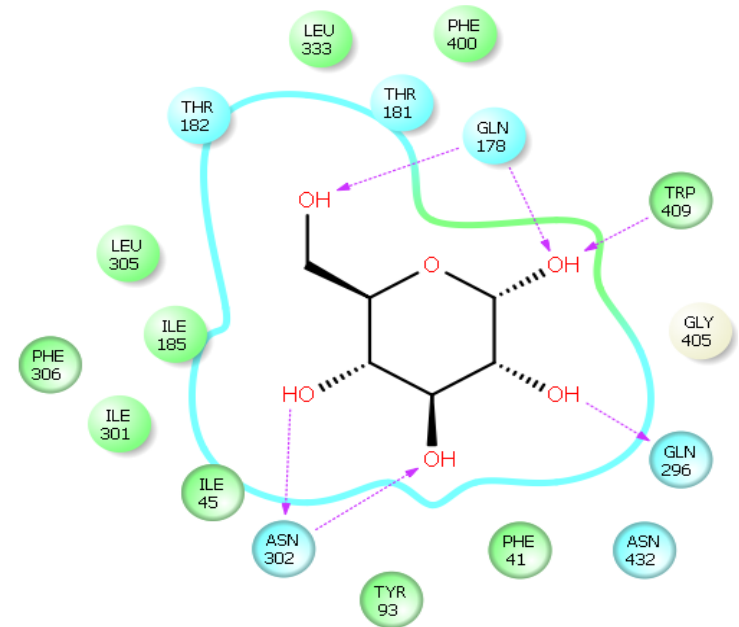
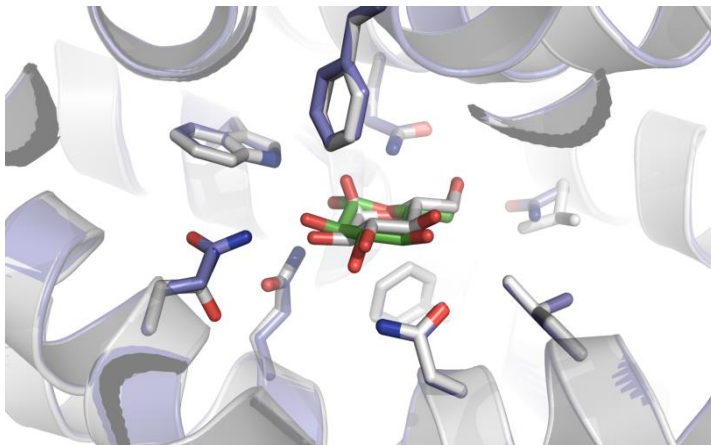
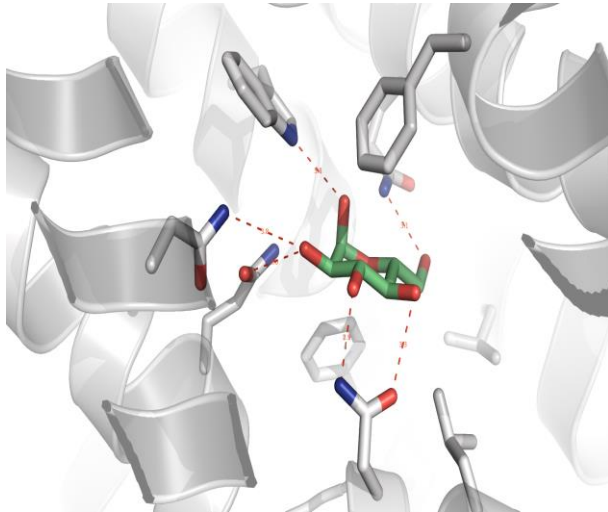
- Modelo del transporte de glucosa en el eritrocito, GLUT1.



Modelado por homología

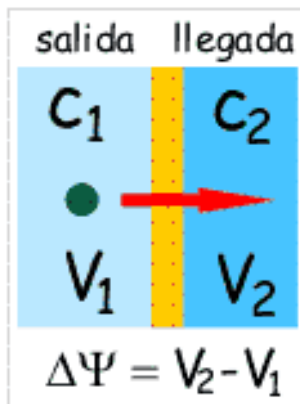


Acoplamiento molecular entre soluto y sitio de unión de la proteína transportadora.



Termodinámica del transporte

$$1 \quad \Delta G = R \cdot T \cdot \ln \frac{C_2}{C_1} + Z \cdot \mathcal{F} \cdot \Delta \Psi$$



Siendo:

R la constante de los gases (8,314 J/°.mol);

T , la temperatura absoluta

\mathcal{F} , la constante de Faraday (96.480 J/mol.V).

C_1 y C_2 son las concentraciones de soluto libre en los compartimentos de salida y llegada, respectivamente.

Z es la carga del soluto, con el signo adecuado.

$\Delta \Psi$: diferencia de potencial en voltios entre ambos compartimentos (Potencial del de llegada menos potencial de salida)

- La energía libre de cambio de un soluto difundiéndose a través de la membrana es directamente dependiente de la magnitud del gradiente de concentración. Si el electrolito no tiene carga entonces el movimiento se describe con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1$$

Donde $R=1.987$ cal/mol; T en $^{\circ}K$; C_1 concentración del soluto en el extremo 1 (SALIDA) y C_2 concentración del soluto en el extremo 2 (LLEGADA).

- Para C_1 alta el ΔG es **negativo** entonces es un proceso espontáneo y depende del movimiento al azar de los solutos

→ DIFUSIÓN

Para solutos cargados..

- Tomar en cuenta el gradiente químico determinado por las diferencias de concentración y por el gradiente de potencial eléctrico, siendo entonces descrita con la siguiente ecuación, **el potencial electroquímico**

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + zF \Delta \Psi$$

Donde z es la carga del soluto, F es la constante de Faraday (23062 Kcal/V mol o 96.5KJ/Vmol) y $\Delta \Psi$ es el la diferencia de potencial entre dos compartimentos.

Potencial de membrana

- Es el trabajo necesario para desplazar una carga positiva de un punto a otro en el interior de un campo eléctrico.
- Diferencia de potencial entre ambos puntos ($\Psi_{\text{Dentro}} - \Psi_{\text{Afuera}}$). La unidad de diferencia de potencial es el voltio (V).
- El potencial de membrana refleja tanto el gradiente de concentración de los iones individuales como la relativa permeabilidad de la membrana a los iones.

Ionóforos

- Moléculas orgánicas que aumentan la permeabilidad a iones.
- Mueven de manera pasiva los iones, de tal manera que equilibran la concentración de ciertos iones a través de la membrana.
- Hay mecanismos distintos por los que los ionóforos actúan.
- Ejemplos, valinomicina y gramicidina.

Valinomycin

- Compuesto producido por bacterias del género *Streptomyces*.
- Eficiente antibiótico
- Antibacteriano, antifúngico, antihelmíntico y efectos anticancerígenos

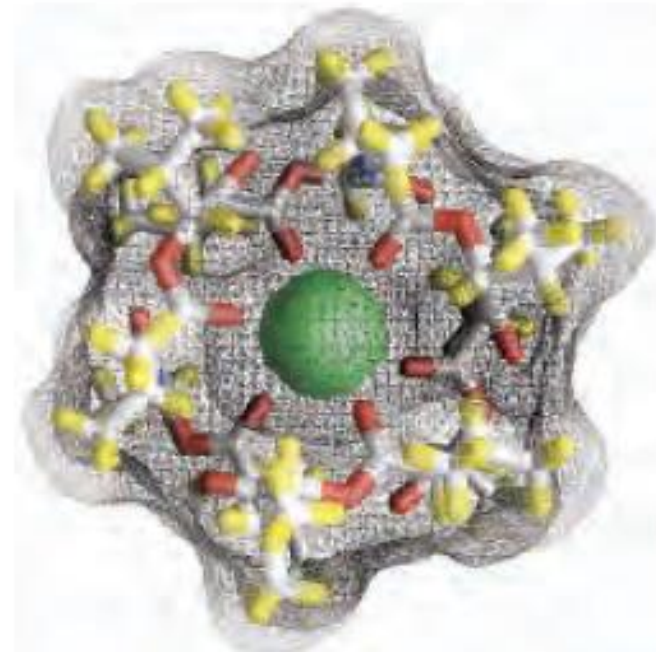
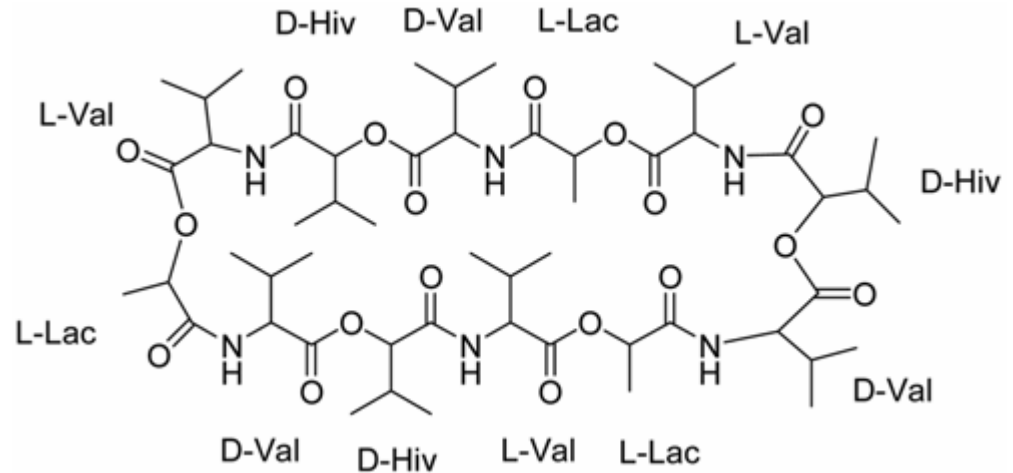
Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the antibiotic valinomycin (CNI) isolated from the *Streptomyces* strain M10 against various microorganisms.

Microorganism	MIC (µg/ml) ^a
<i>Alternaria mali</i>	>256
<i>Alternaria solani</i>	>256
<i>Botrytis cinerea</i>	4
<i>Cladisporium cucumerinum</i>	>256
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	256
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	>256
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	>256
<i>Didymella bryoniae</i>	>256
<i>Fusarium moniliforme</i>	>256
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	>256
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	>256
<i>Fusarium moniliforme</i>	>256
<i>Magnaporthe grisea</i>	4
<i>Phytophthora capsici</i>	>256
<i>Rhizoctonia solani</i>	256
<i>Candida albicans</i>	32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>256
<i>Bacillus megaterium</i>	>256
<i>Ralstonia solanacearum</i>	>256
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	>256

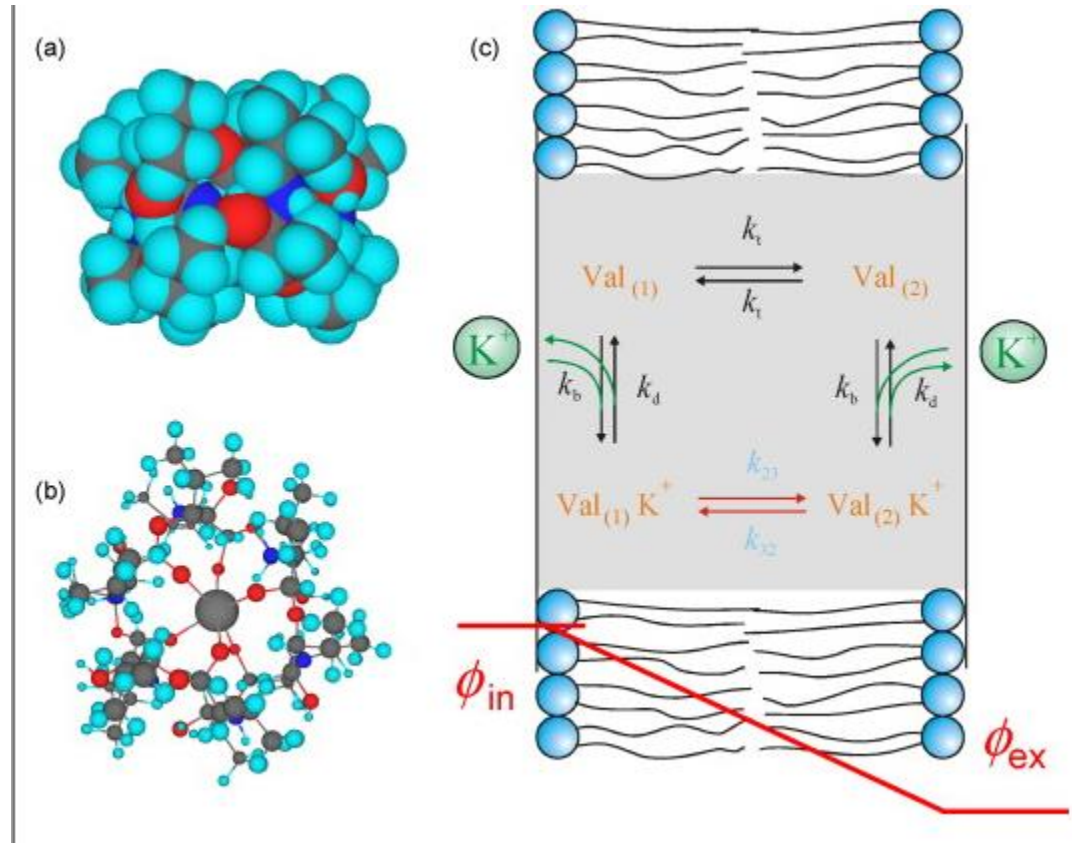
^aThe lowest concentration of the antibiotic valinomycin (CNI) required for complete inhibition of microbial growth.

Valinomycin

- Es una molécula lipídica (soluble en etanol, DMSO y otros solventes).
- Un macrociclo formado por 12 aminoácidos alternados con ésteres.
- Transporta eficientemente al K^+ , con una velocidad de 10^4 iones/s.
- Transporta Na^+ pero lo une con una afinidad 10,000 veces menor que el K^+



Valinomicina difunde en la membrana acarreando un K^+ en el centro de su estructura

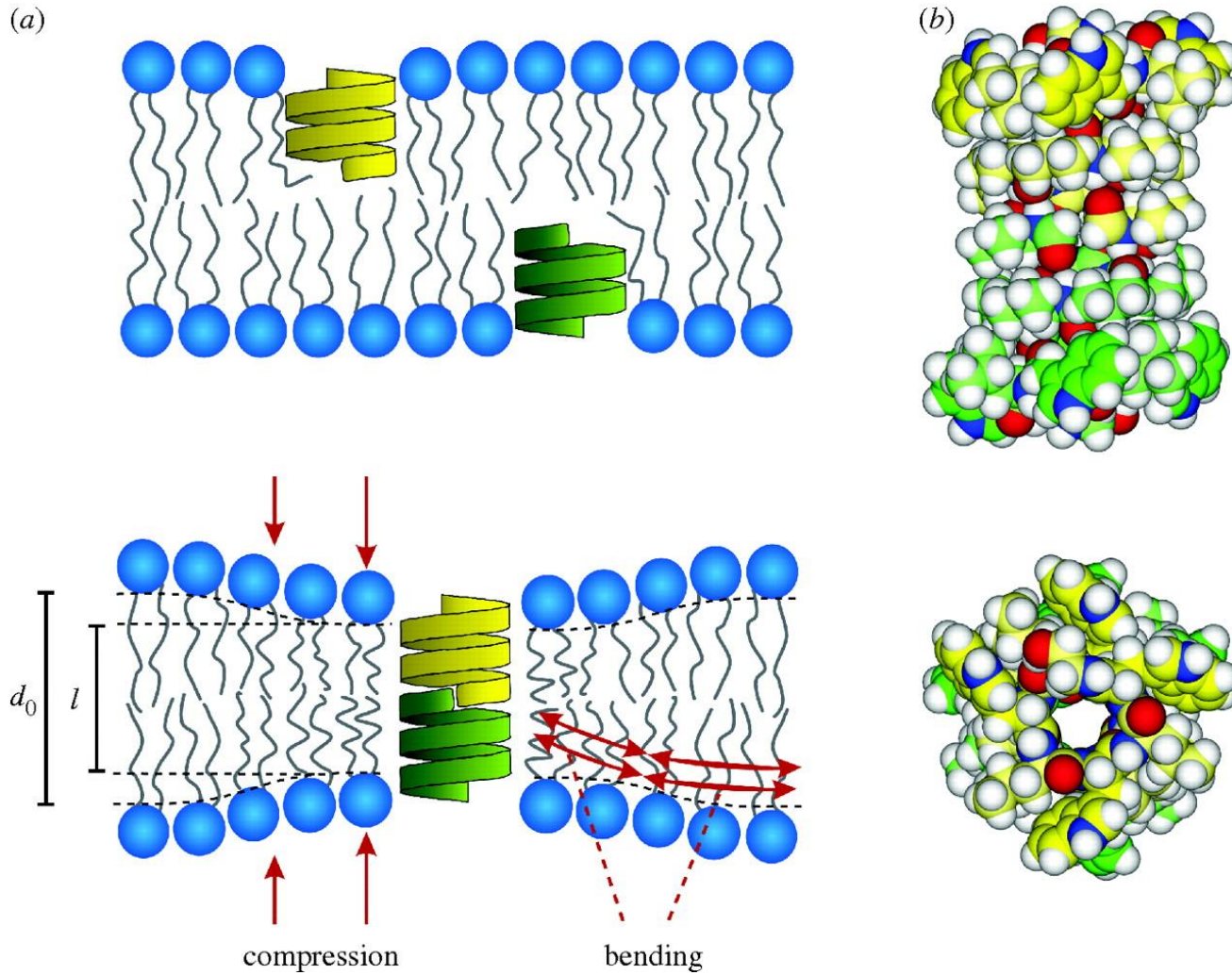


- (a) valinomicina, las esferas azules muestran las zonas hidrofóbicas.
- (b) Valinomicina acomplejada con iones básicos adentro de la cavidad del péptido (a través de 6 carbonilos).
- (c) Mecanismo de transporte de valinomicina acarreando iones K^+ .

Gramicidina

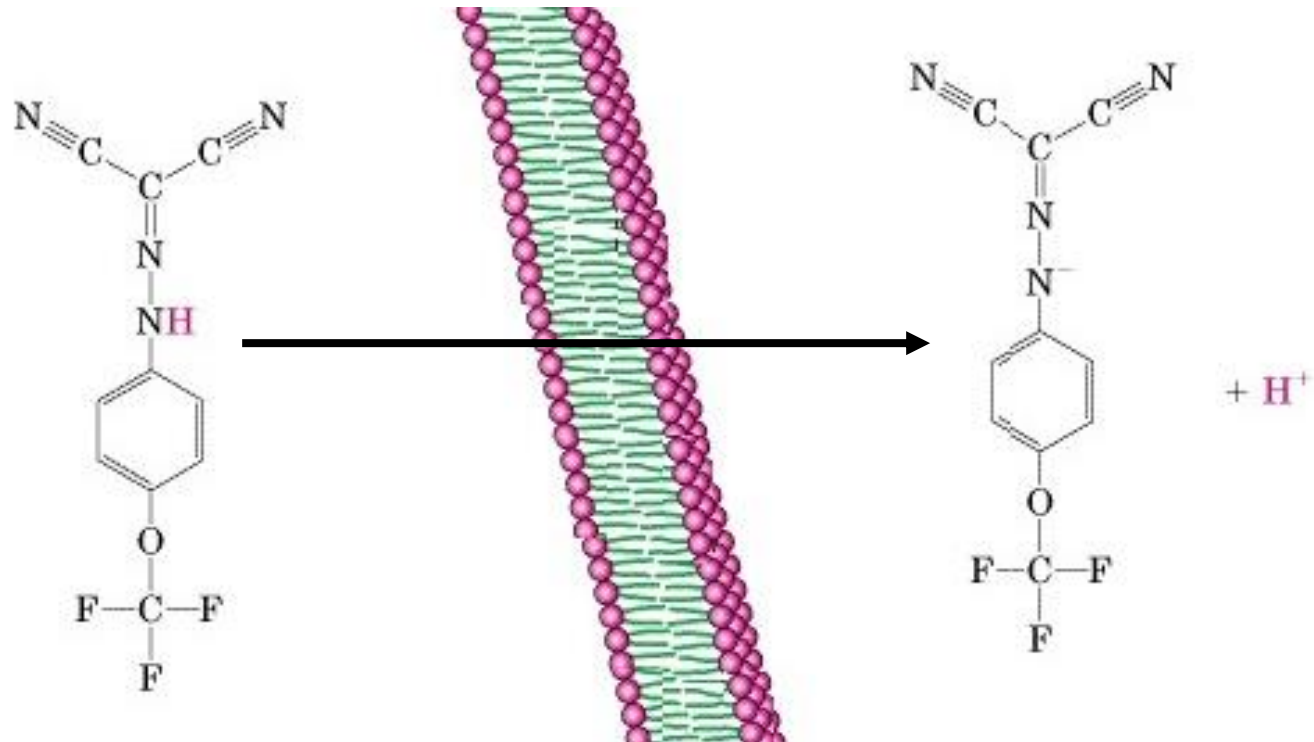
- ❖ Es una molécula polipeptídica que fue aislada de *Bacillus brevis*. El complejo fue llamado primero gramicidina D por Dubos para contrastar con la Gramicidina S que es un péptido cíclico.
- ❖ La forma comercial tiene una mezcla de diferentes gramicidinas gramicidin A, 6-7% B, 5-14% C and <1% gramicidin D.
- ❖ Soluble en metanol, etanol, isopropanol, etilenglicol, acetona
- ❖ **Transporta iones formando un canal, en donde pasan protones, así como iones alcalinos, se bloquea con Ca²⁺.**
- ❖ La gramicidina se encuentra involucrada en la regulación de la esporulación bacteriana y es un inhibidor específico de la RNA polimerasa afectando la unión de la RNA polimerasa al DNA *in vitro*.

Gramicidin channel formation.



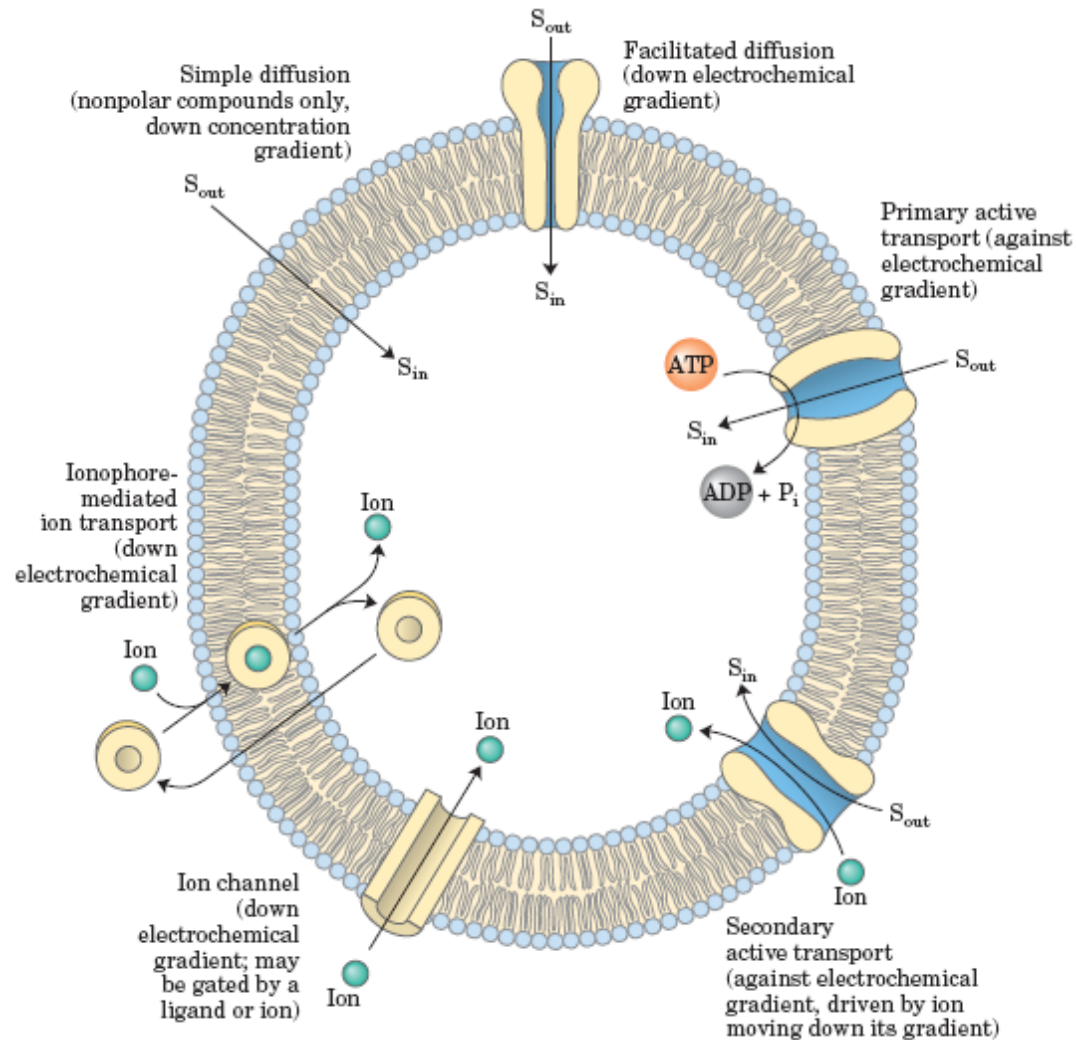
Lundbæk J A et al. *J. R. Soc. Interface* 2010;7:373-395

Herramientas para el estudio del transporte: **protónoforos**



Equilibra el pH en ambas caras de la membrana, DISIPADOR DE GRADIENTE EN LA MEMBRANA

Transporte a través de membranas



MEMBRANAS Y TRANSPORTE

TRANSPORTE ACTIVO DE SOLUTOS

Mecanismos dependientes de energía

1. Los mecanismos por los cuales las sustancias pasan a través de las membranas sin gasto de energía son denominados **PASIVOS O DIFUSIVOS**.
2. Mientras que los que necesitan del aporte de energía para el transporte de solutos son llamados **ACTIVOS**

Movement Through Cell Membranes

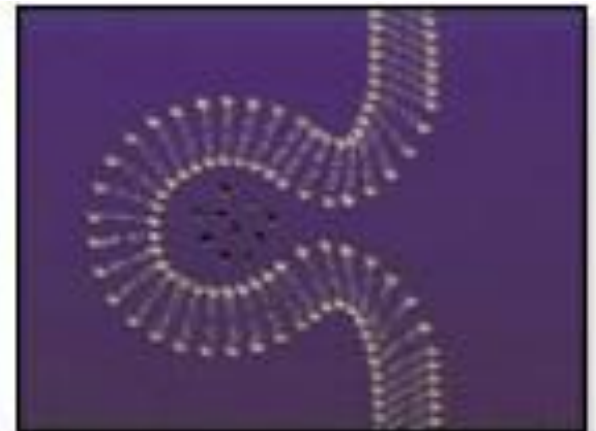
Passage of Molecules into and out of Cells				
	Name	Direction	Requirements	Examples
Passive Transport	Diffusion	Toward lower concentration	Concentration gradient	Lipid-soluble molecules, water, and gases
	Osmosis	Toward lower concentration	Concentration gradient	Water
	Facilitated diffusion	Toward lower concentration	Carrier and concentration gradient	Sugars and amino acids
Active Transport	Active transport	Toward greater concentration	Carrier plus energy	Sugars, amino acids, and ions
	Exocytosis	Toward outside	Vesicle fuses with plasma membrane	Macromolecules
	Endocytosis Phagocytosis	Toward inside	Vacuole formation	Cells and subcellular materials
	Pinocytosis (includes receptor-mediated endocytosis)	Toward inside	Vacuole formation	Macromolecules

Endocitosis y exocitosis

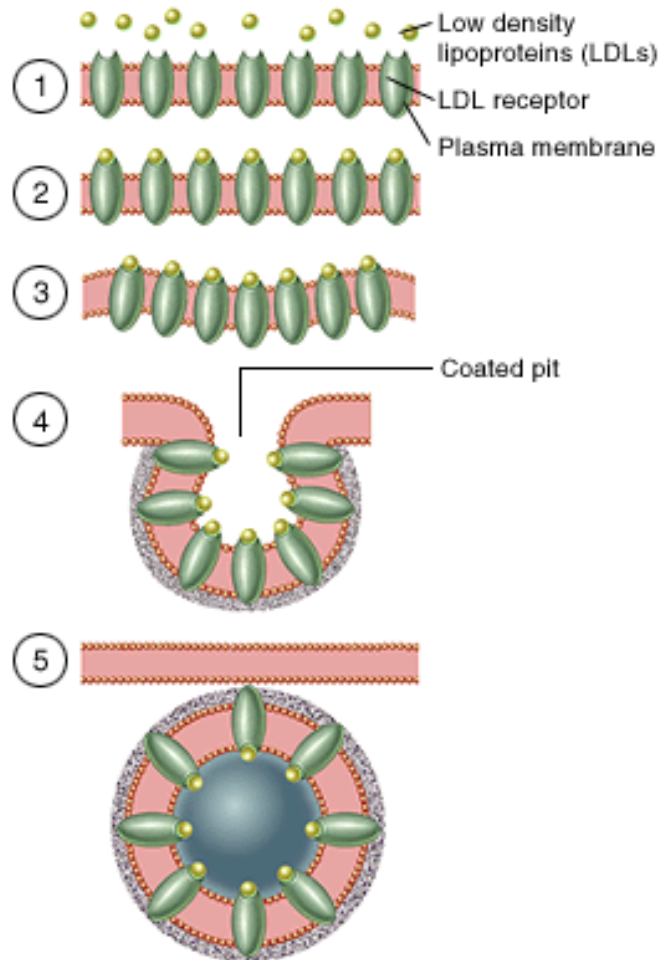
EXOCITOSIS. Proceso por el cual una célula puede secretar moléculas grandes que pueden pasar a través de la membrana.

Las vesículas de membrana que provienen del retículo endoplásmico o de otro compartimento pueden llevar consigo moléculas (proteínas, desechos celulares, solutos o toxinas). La vesícula se mueve hacia la membrana plasmática y se fusiona con ella dejando salir su contenido de la célula.

El proceso opuesto es llamado **ENDOCITOSIS**



Endocytosis



1. LDL suspended in the blood.

2. LDLs bind to their receptor.

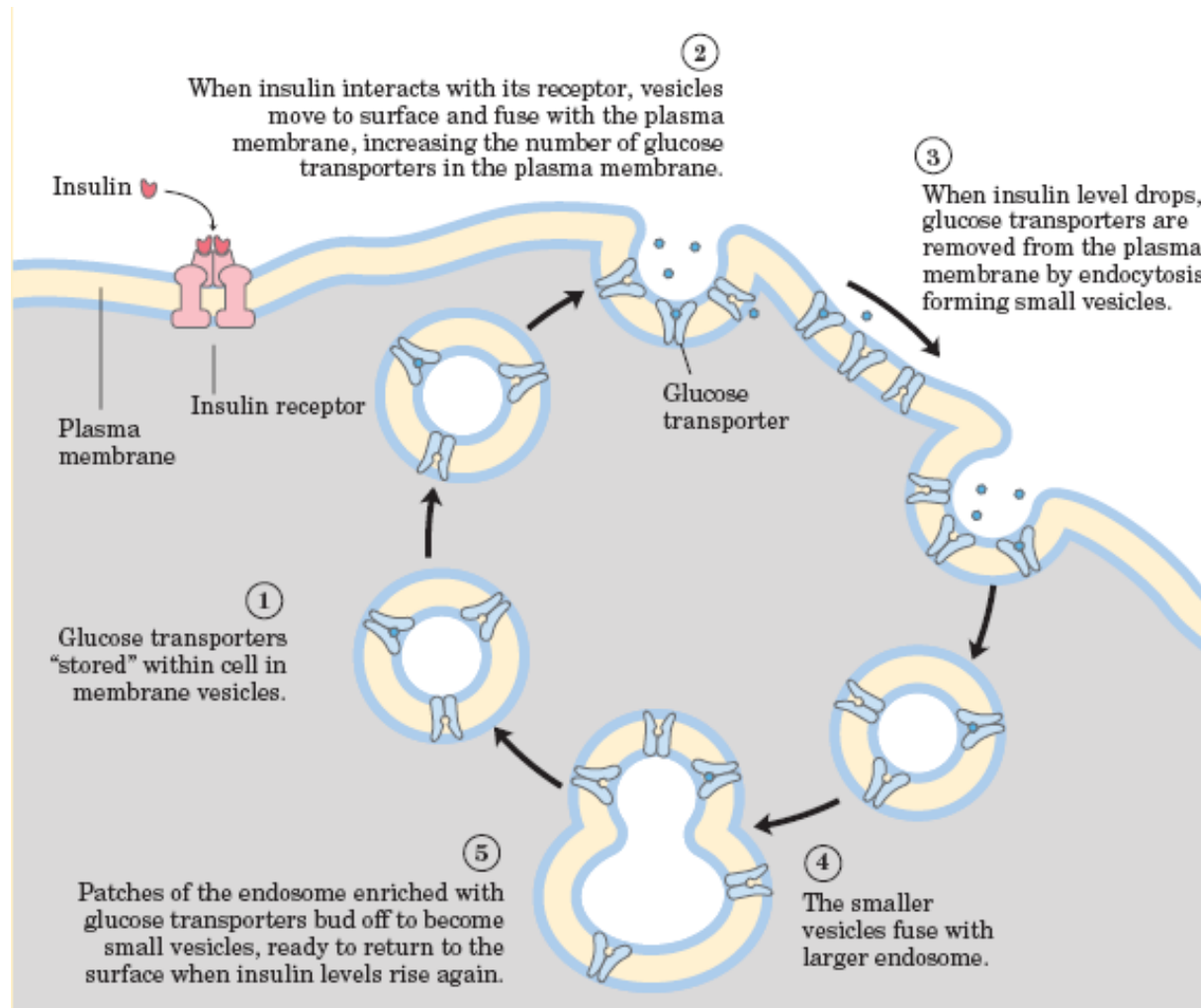
3. LDL-bearing receptors cluster together.

4. Plasma membrane sinks inward and forms a pit.

5. Pit separates from the membrane and becomes a vesicle containing LDL with its cholesterol.

Roll over names to see the item.

Regulación del transporte de glucosa por insulina



Tipos de transporte activo

Acoplamiento de un proceso endergónico con un proceso exergónico como puede ser la hidrólisis de ATP:

- **Transporte primario.** Denominadas bombas, realizan el transporte del soluto a expensas de la hidrólisis de ATP
- **Transporte secundario.** No se encuentran directamente involucrados en la hidrólisis de ATP, pero usan la energía de manera indirecta para transportar los solutos

Calcular:

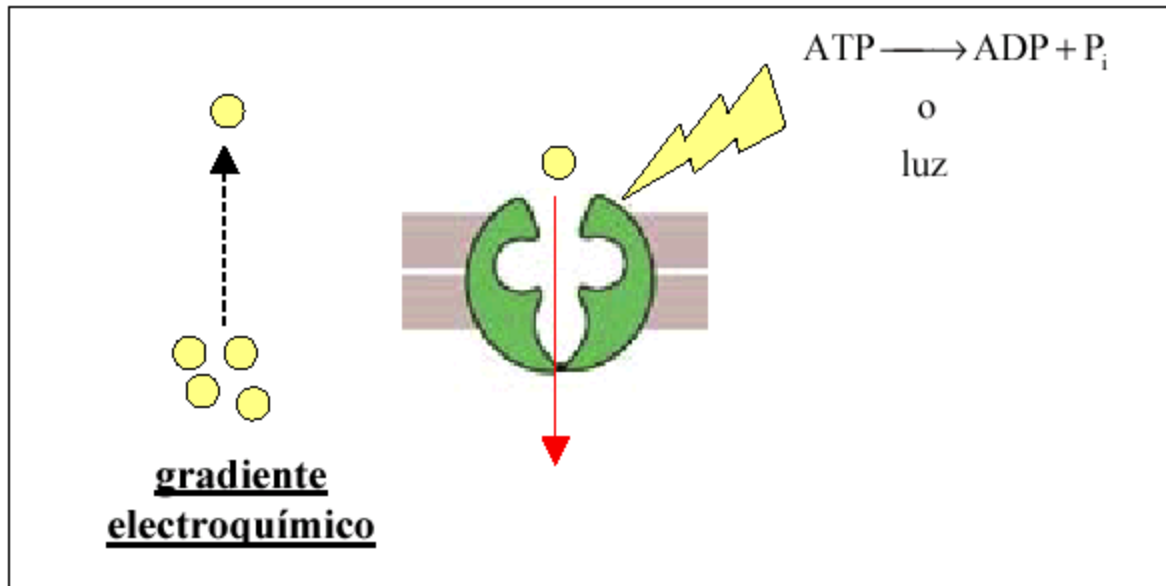
¿Cuál es el ΔG para el transporte de una molécula no cargada si va de una concentración $C_1=10^{-3}M$ a $C_2=10^{-1}M$?

$$\Delta G = 2.303RT \log_{10} C_2/C_1$$

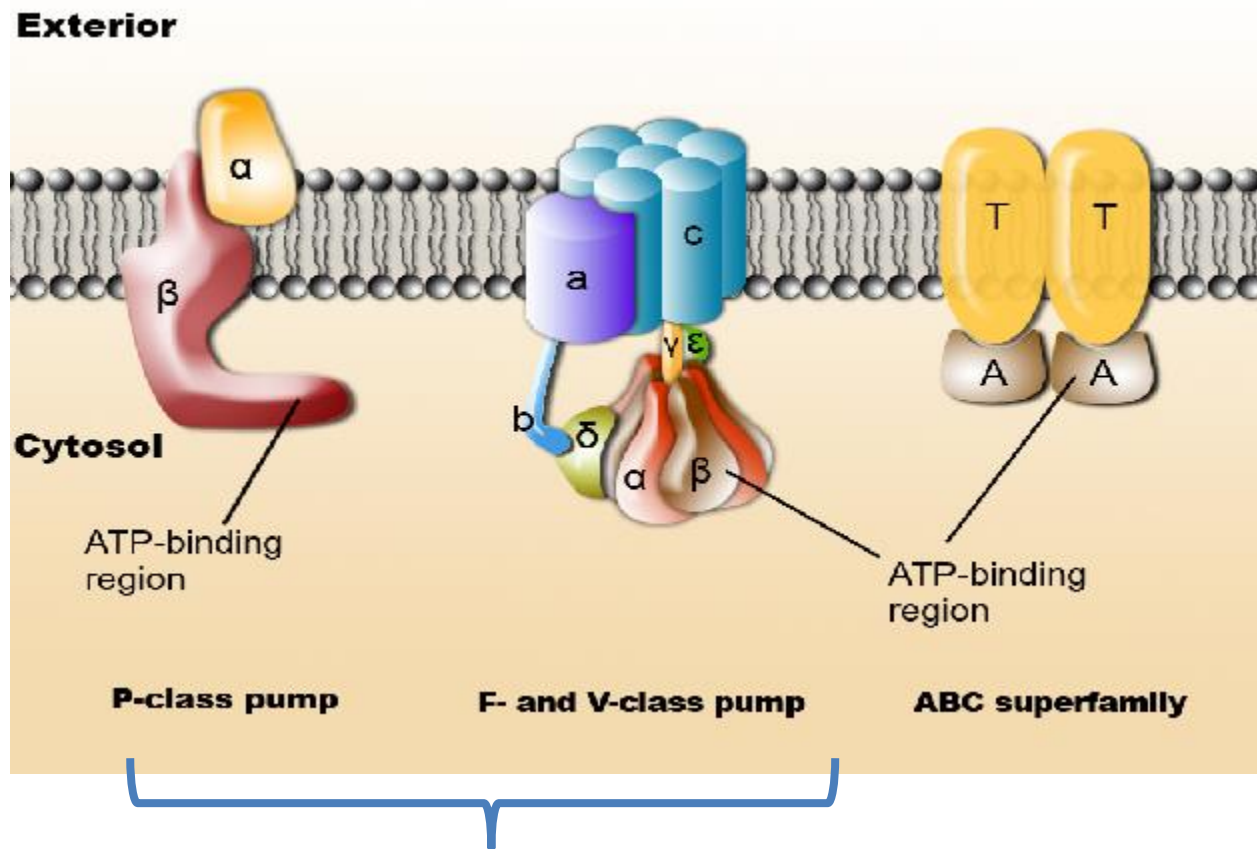
- $\Delta G = 2.303 \times 1.99 \times 298 \times 2$
- $\Delta G = +2.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ (+ 11.3 kJ mol⁻¹)
- **Transporte activo.**
- La hidrólisis del ATP tiene un $\Delta G = -12 \text{ kcal mol}^{-1}$ (-50.2 kJmol⁻¹)

Bombas primarias, movimiento de iones directamente acoplado a la utilización de energía.

- ATPasas Na^+/K^+
- Rodopsina

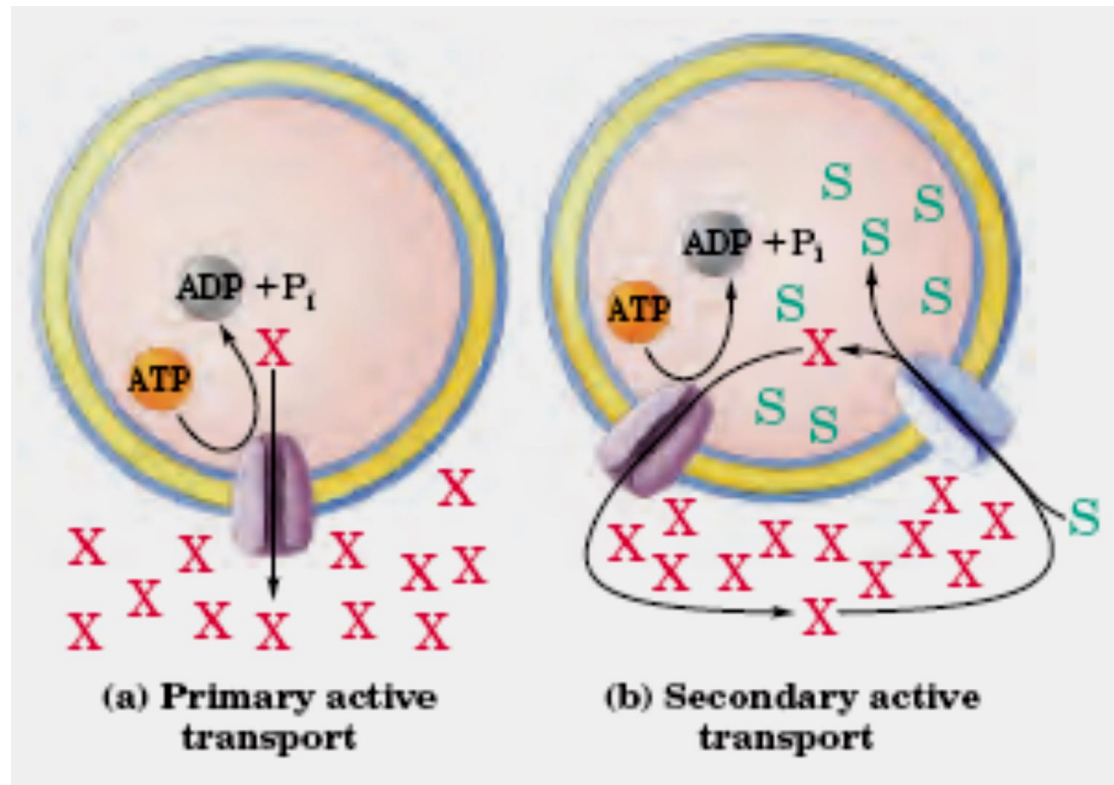


Proteínas que usan la energía en forma de ATP para el transporte



Mueven iones

Los dos tipos de transporte activo



Los transportadores de tipo activo primario

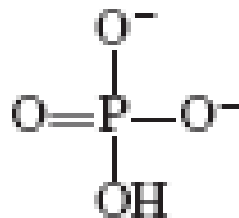
- ❖ Son proteínas que producen y mantienen un gradiente de concentración.
- ❖ Las bombas como la bomba sodio/potasio o ATPasa Na^+/K^+ , proteína que hidroliza ATP para regular la concentración intracelular de ambos iones.
- ❖ Otros transportadores producen gradientes de concentración de diferentes iones: los iones fisiológicamente importantes como Cl^- , Ca^{2+} y H^+ .

Bombas de iones.

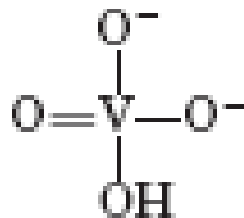
- **ATPasas tipo P.** Durante el ciclo catalítico son fosforiladas. Hidrólisis de ATP. Presente en la membrana plasmática y en algunos organelos
- **ATPasas tipo F.** ATPsintetasa o sintasa presente en la mitocondria y el cloroplasto
- **ATPasas tipo V.** Estructuralmente similar a la ATPasa tipo F, pero no sintetiza ATP lo hidroliza. Presente en la vacuola

ATPasas tipo **P**

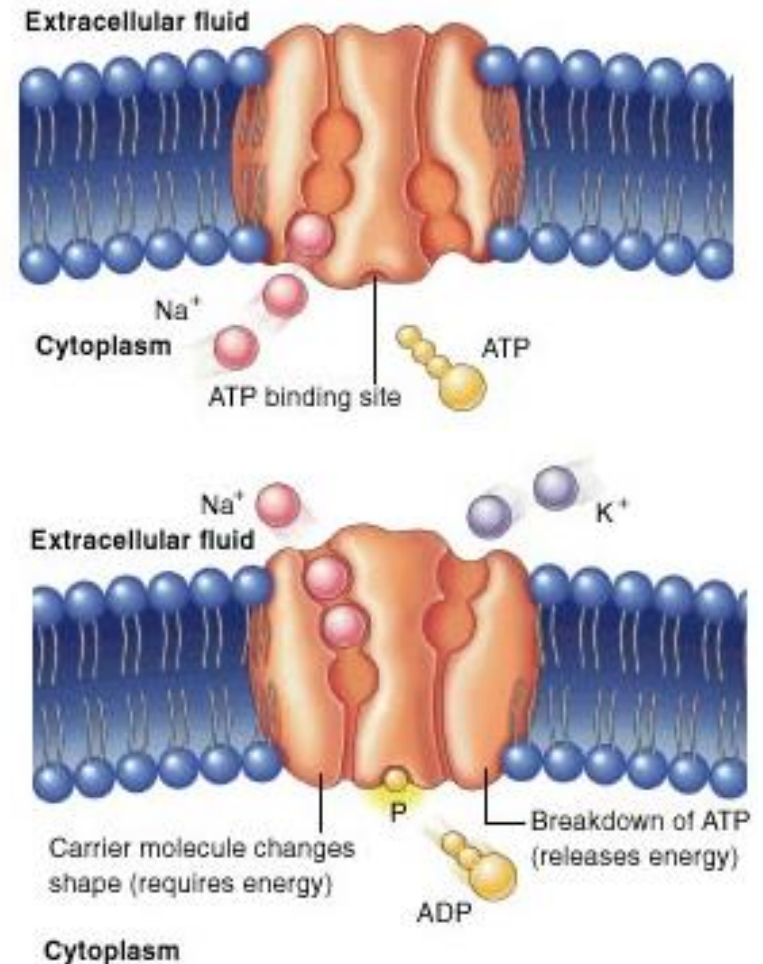
- Para transportar al ión o los iones la proteína se autofosforila de manera reversible.
- Residuo de Asp involucrado
- Inhibidor clásico de la enzima es el que tiene la estructura del fosfato, el vanadato.



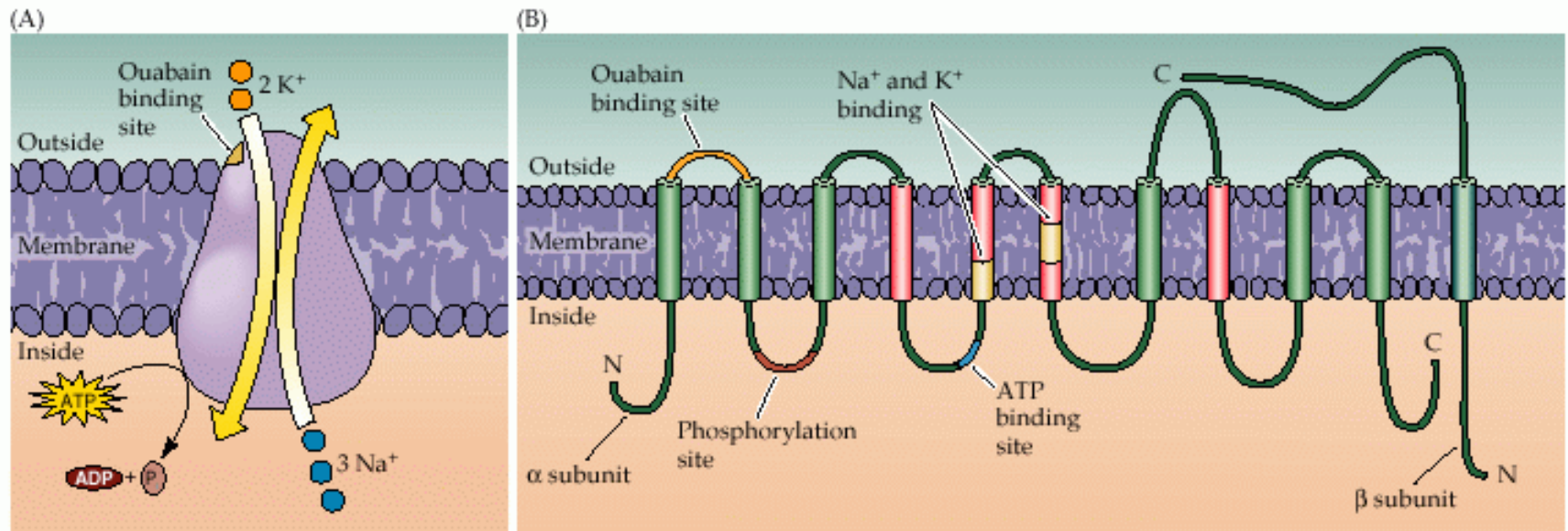
Phosphate



Vanadate

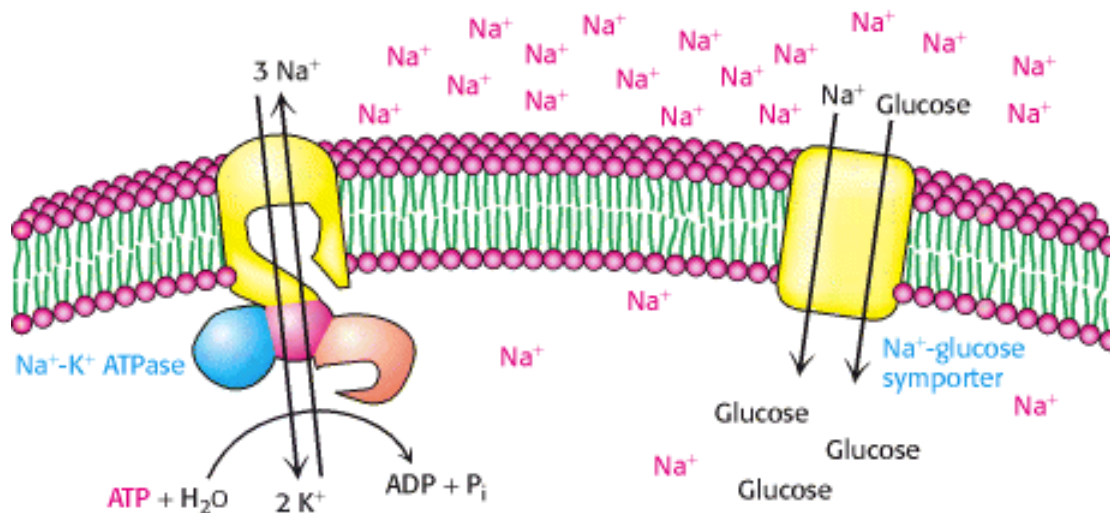


Propiedades de la bomba de Na^+/K^+



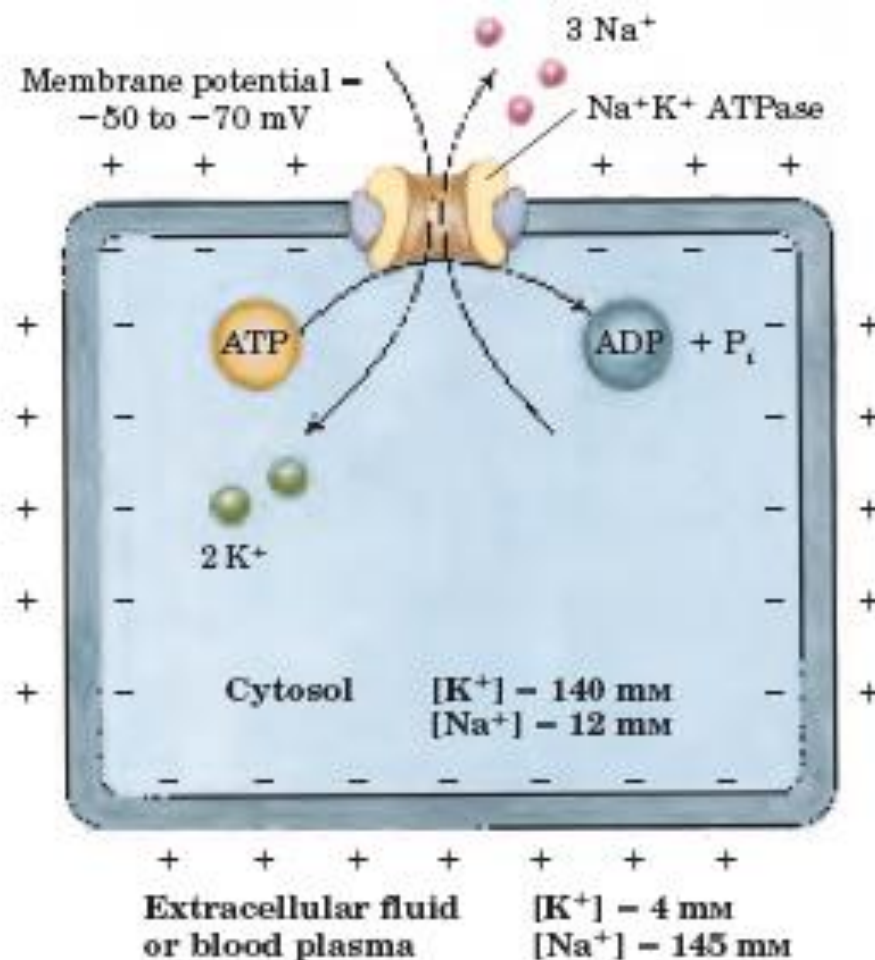
- 1) Capacidad de unión de ambos iones: Na^+ and K^+ ;
- 2) Posee sitios para la unión de ATP y un ASP en el que temporalmente unirá un grupo fosfato del ATP.
- 3) La ouabaina, es un inhibidor de su actividad, se une por el lado externo de la membrana

Transducción de energía por proteínas de membrana.



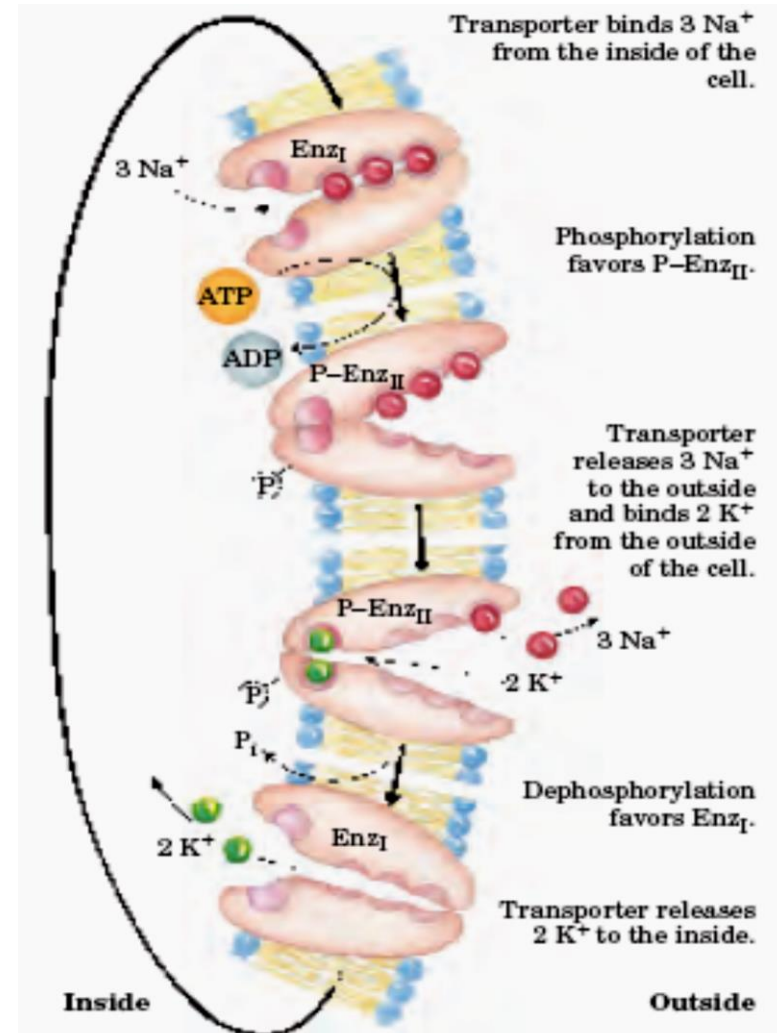
La ATPasa Na⁺-K⁺ convierte la energía libre de la transferencia del grupo fosforilo en la energía libre de un gradiente de sodio. Los gradientes de iones entonces pueden ser usados para bombear materiales hacia la célula, a través de la acción de transportadores secundarios como el simportador de Na⁺-glucosa.

Mantiene la concentración iónica alta de sodio afuera

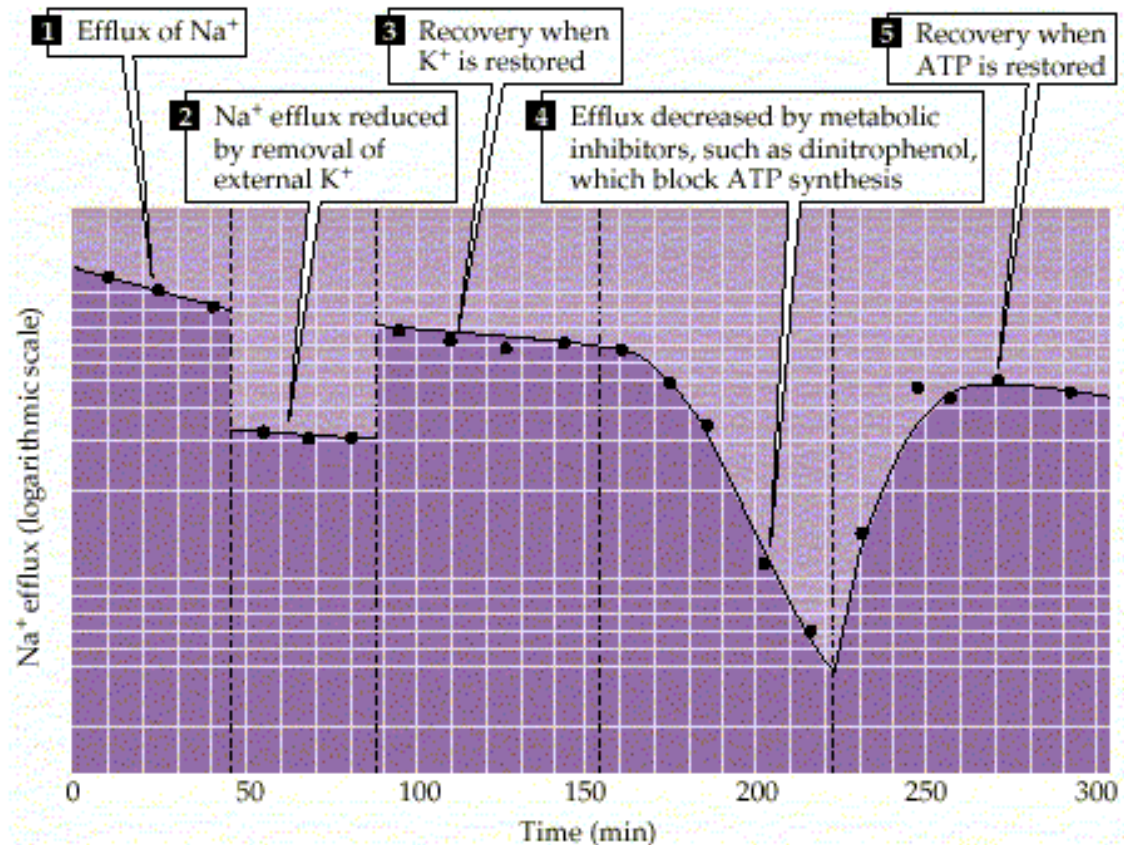


Modelo cinético de la actividad de transporte de la ATPasa Na^+/K^+

- 2 conformaciones.
- Intermediario fosforilado.
- Movimiento vectorial de K en contra del de sodio.
- Establecimiento de un gradiente de carga eléctrica.

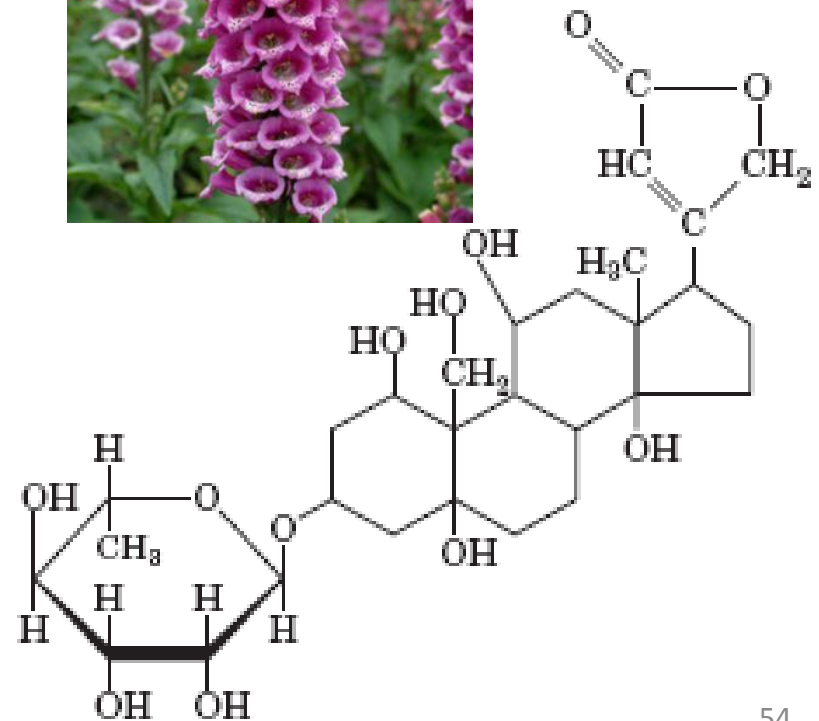


Medición de la salida de Na^+ radiactivo del axón del calamar gigante. La salida depende de la $[\text{K}^+]$ y de la $[\text{ATP}]$ intracelular.



Inhibición específica de las ATPasas

- Productos alcaloides de plantas como *Digitalis purpurea*
- Cardiotónicos.

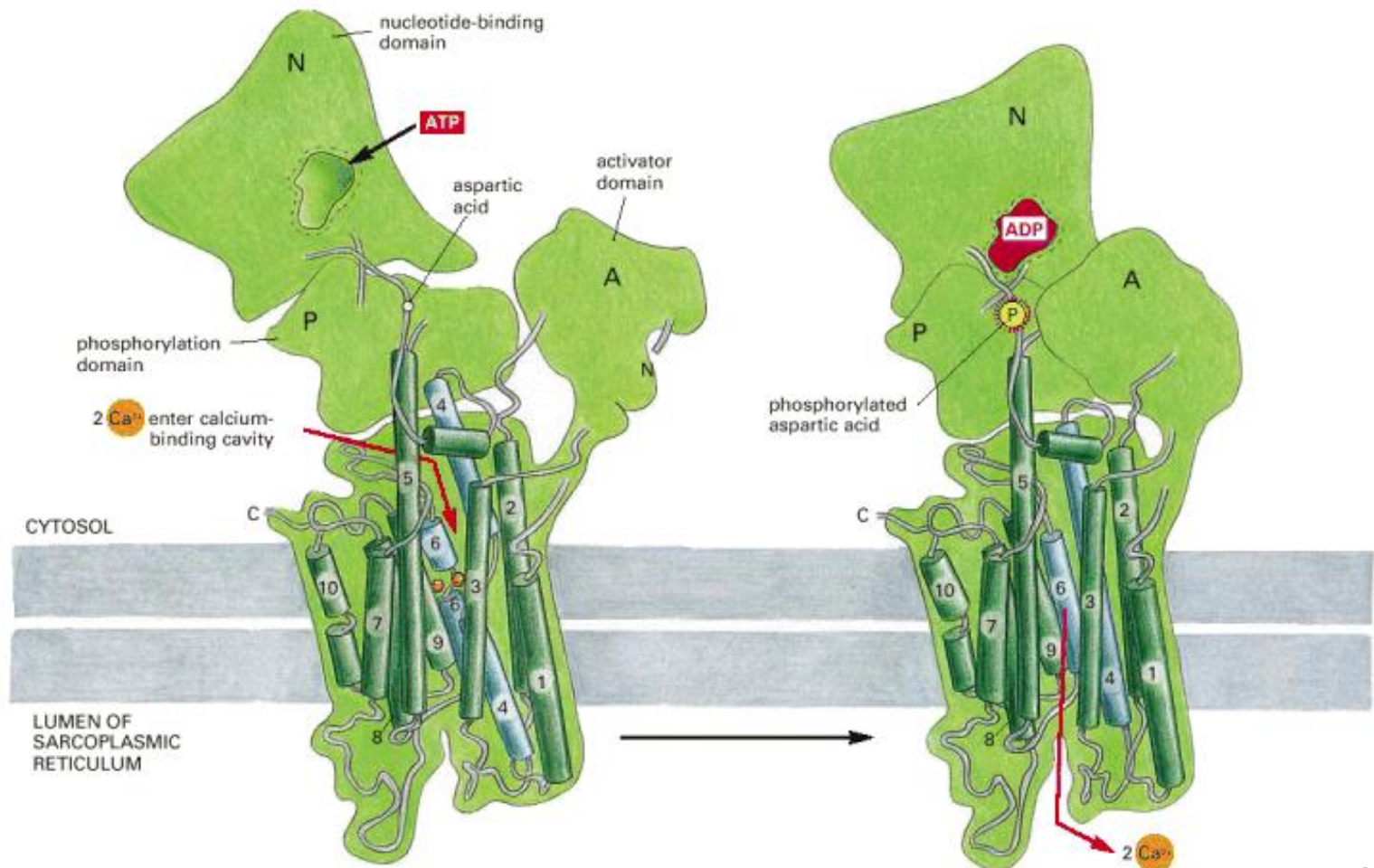


Ouabain

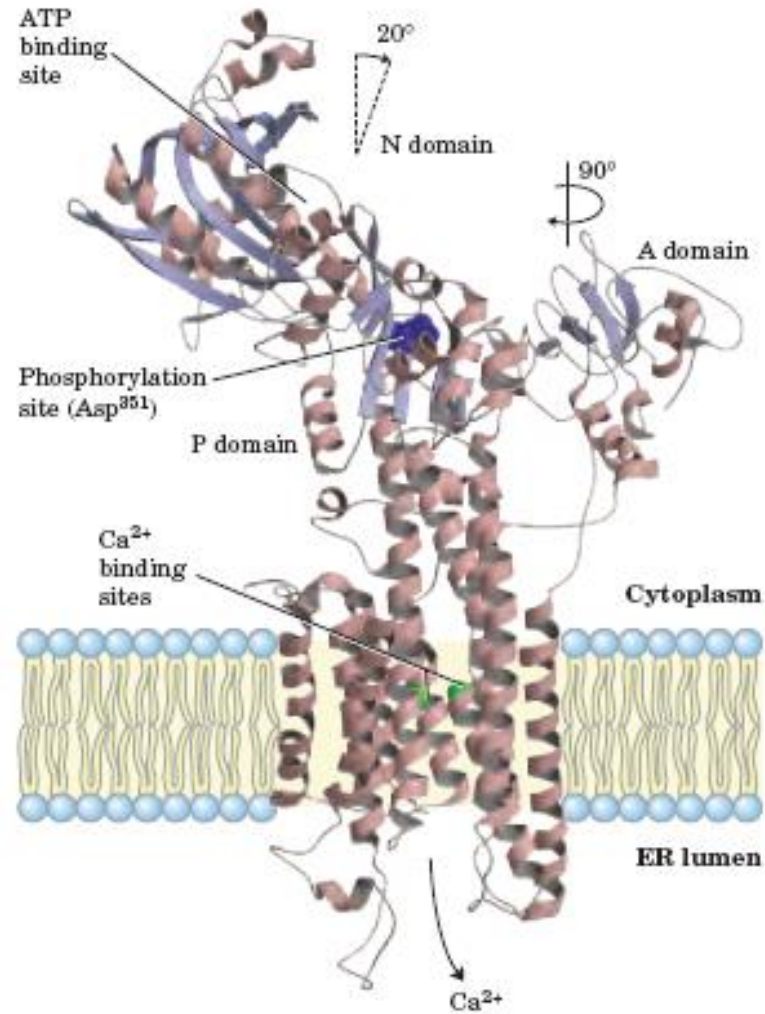
ATPasa de Ca^{2+}

- Enzima localizada en la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y el retículo sarcoplásmico.
- La ATPasa de Ca del retículo sarcoplásmico (SERCA) localizada en los miocitos, presenta una estructura similar a la del retículo endoplásmico. Ambas se inhiben con thapsigarnina.

A model of how the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump moves Ca^{2+} .

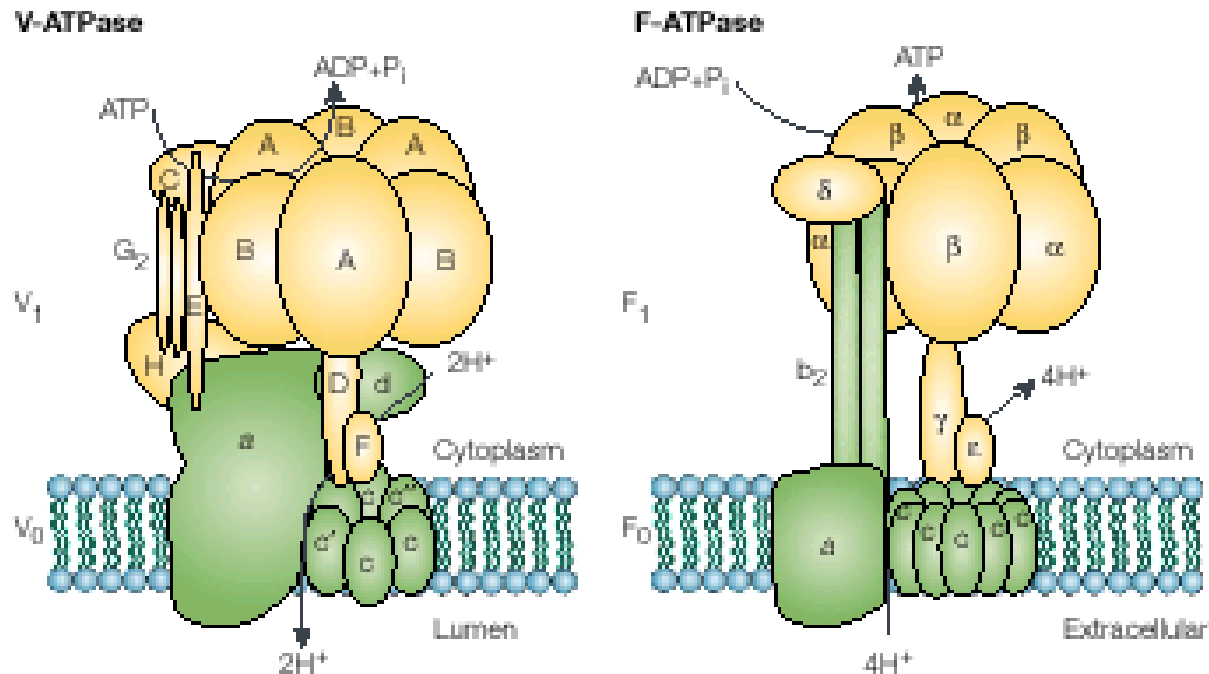


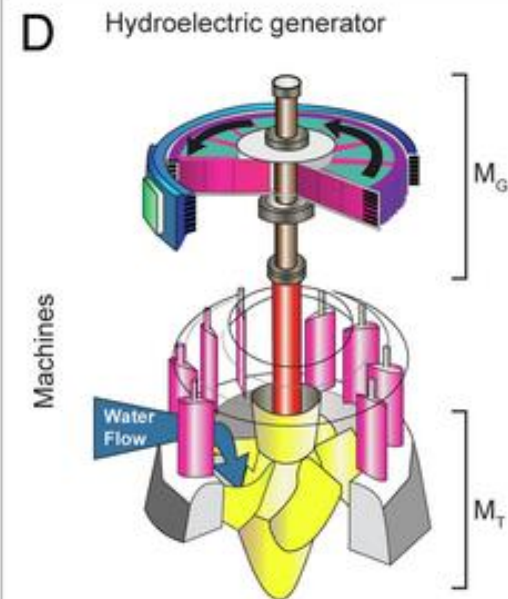
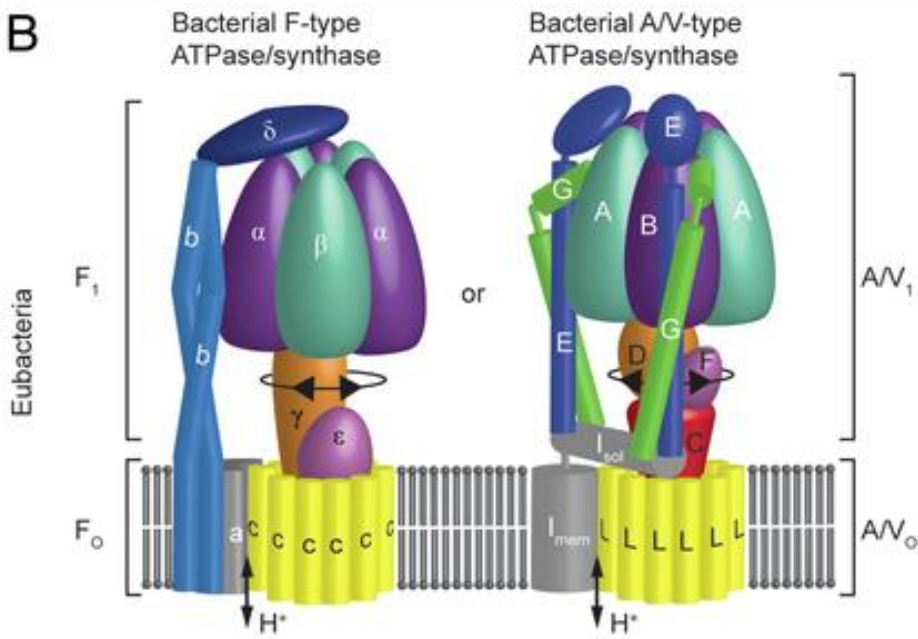
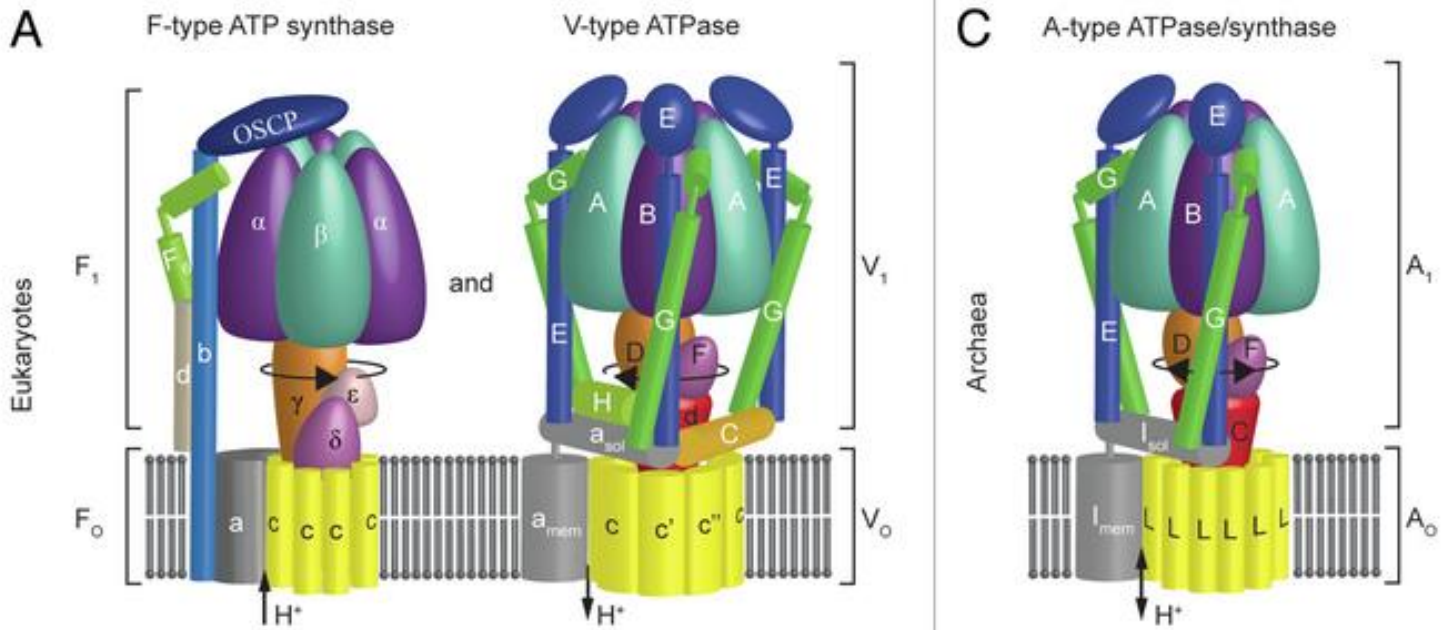
Otro modelo de la ATPasa de Ca^{2+}



Comparación estructural de las V-ATPasas con la F-ATPasas

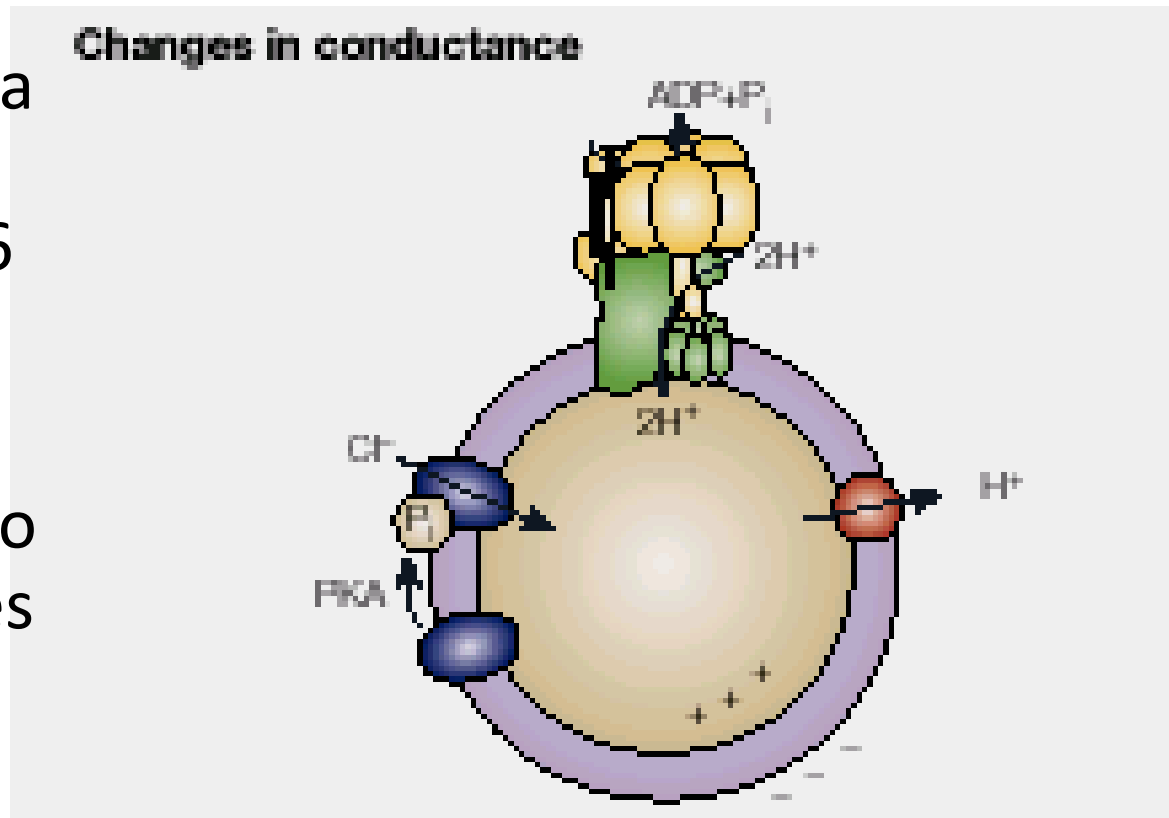
- Estructuralmente similares pero...
- Una hidroliza ATP y la otra lo sintetiza





La ATPasa vacuolar

- Impulsa protones a la vacuola, la mantiene a pH 3-6
- Acoplado a la hidrólisis de ATP
- Fuerza para el paso de solutos a través de acarreadores



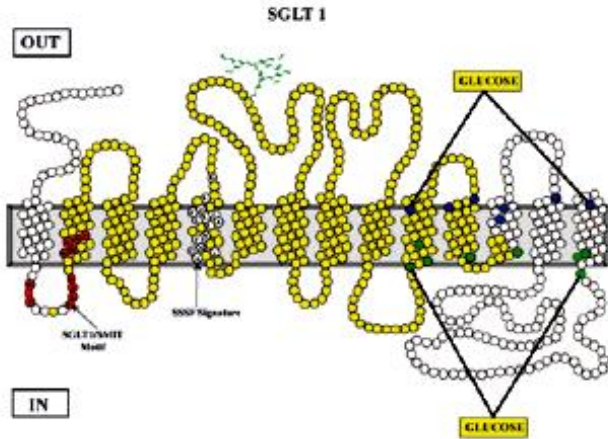
Lisosomas, endosomas, el complejo de Golgi y las vesículas secretoras.

Transporte activo secundario

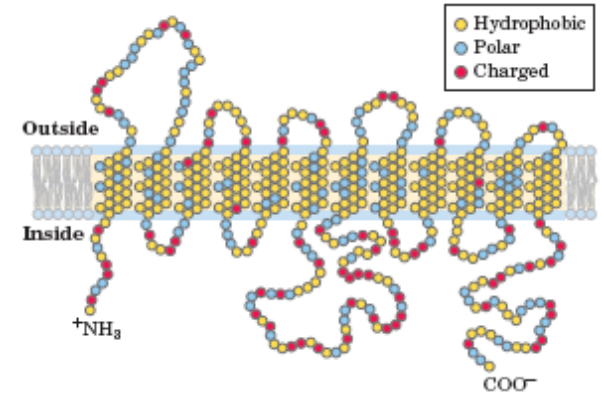
TABLE 11-5 Cotransport Systems Driven by Gradients of Na^+ or H^+

<i>Organism/tissue/cell type</i>	<i>Transported solute (moving against its gradient)</i>	<i>Cotransported solute (moving down its gradient)</i>	<i>Type of transport</i>
<i>E. coli</i>	Lactose	H^+	Symport
	Proline	H^+	Symport
	Dicarboxylic acids	H^+	Symport
Intestine, kidney (vertebrates)	Glucose	Na^+	Symport
	Amino acids	Na^+	Symport
Vertebrate cells (many types)	Ca^{2+}	Na^+	Antiport
Higher plants	K^+	H^+	Antiport
Fungj (<i>Neurospora</i>)	K^+	H^+	Antiport

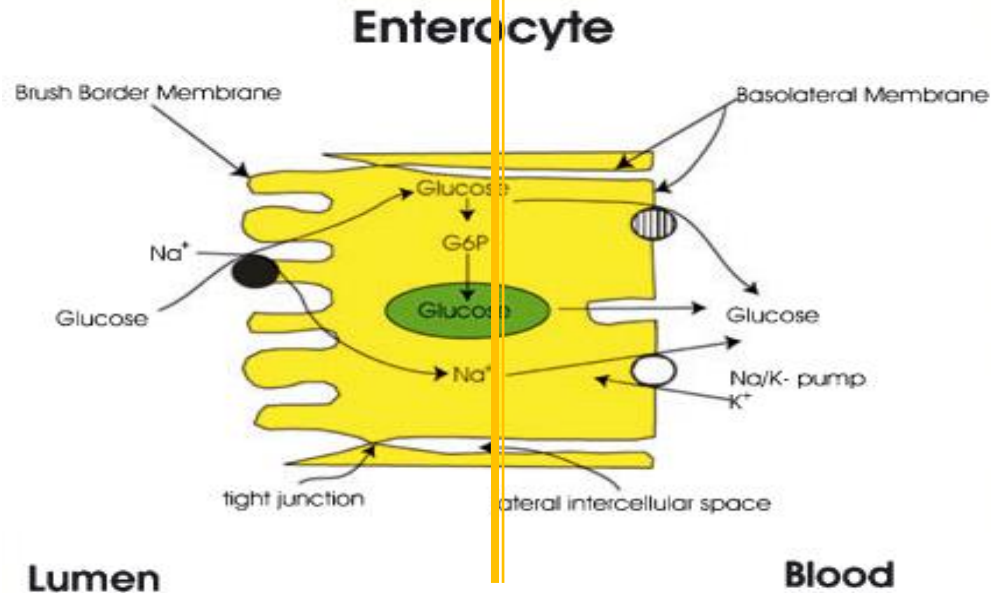
Transporte activo de glucosa



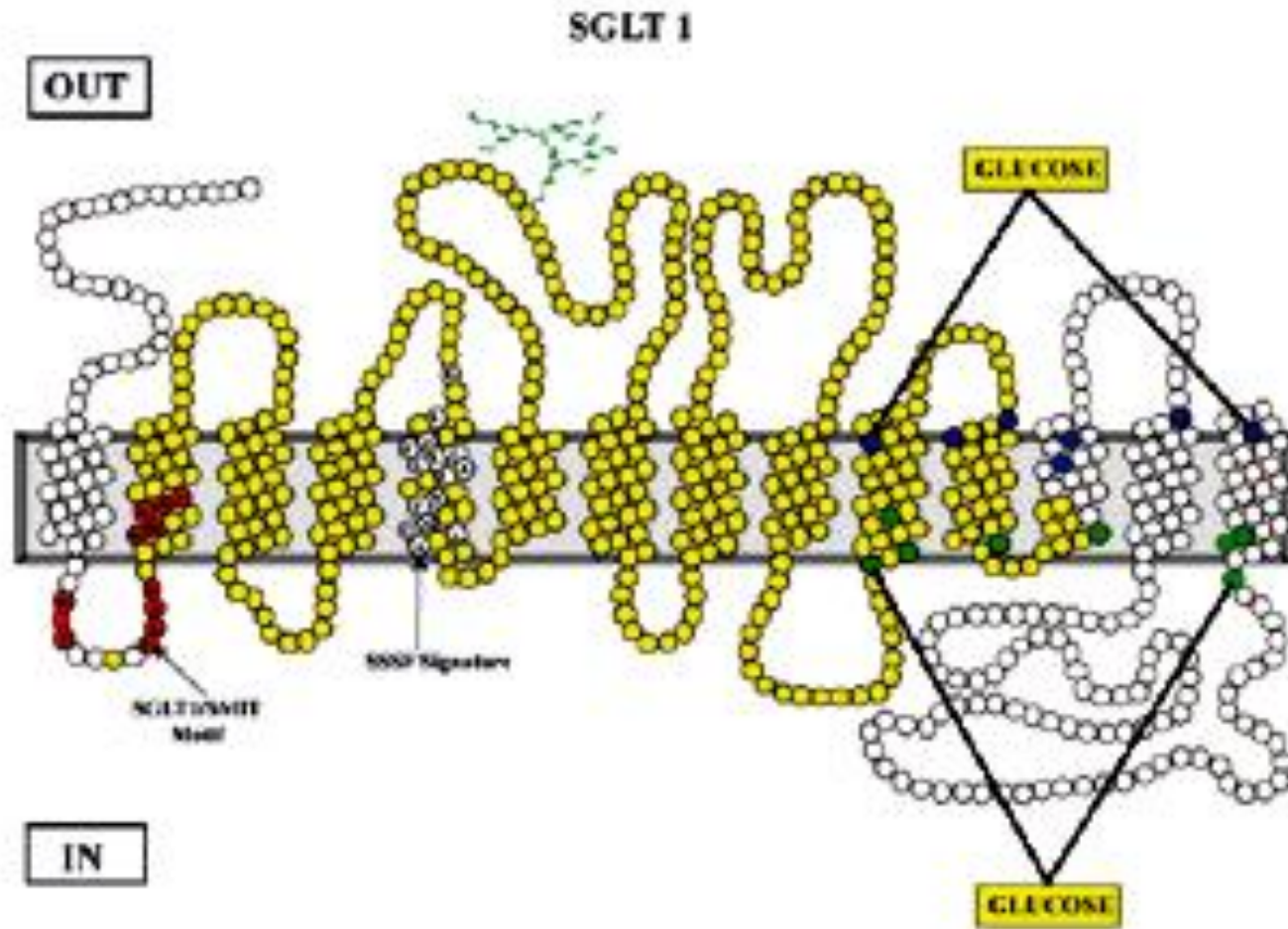
Transportador activo de glucosa



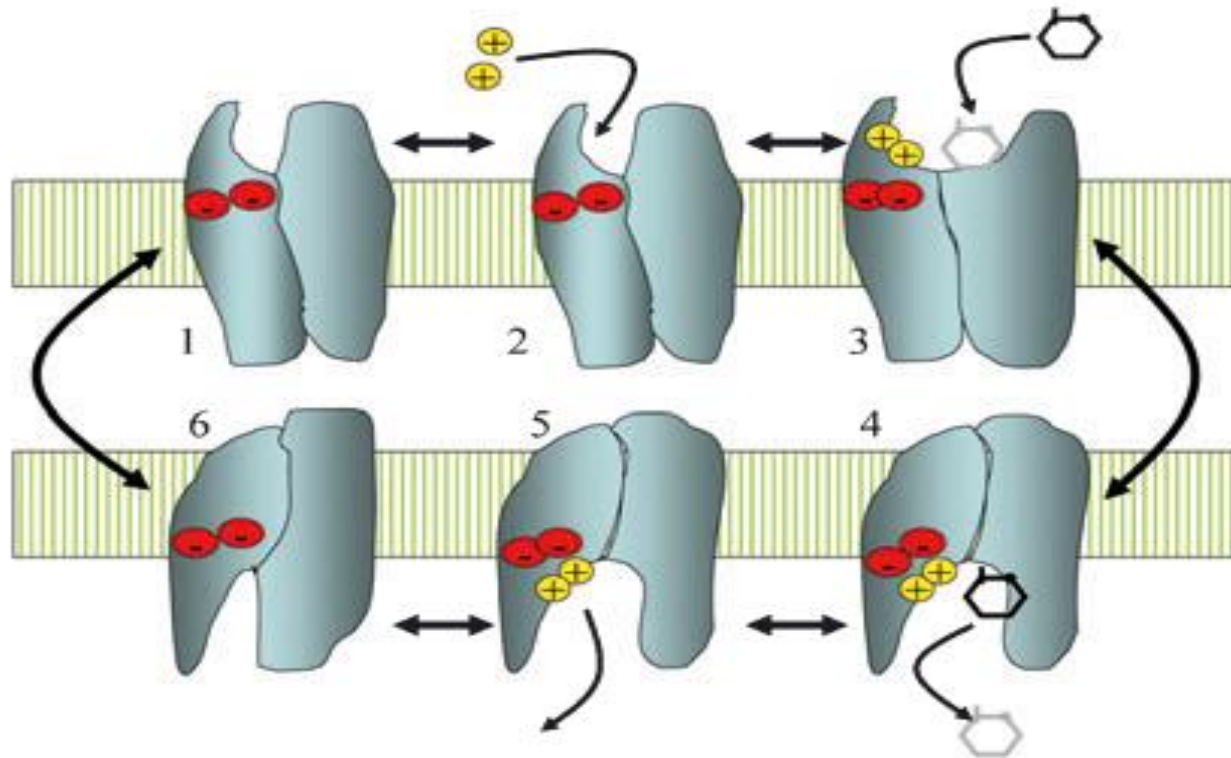
Transportador pasivo de glucosa



Modelo de la estructura secundaria de SGLT1



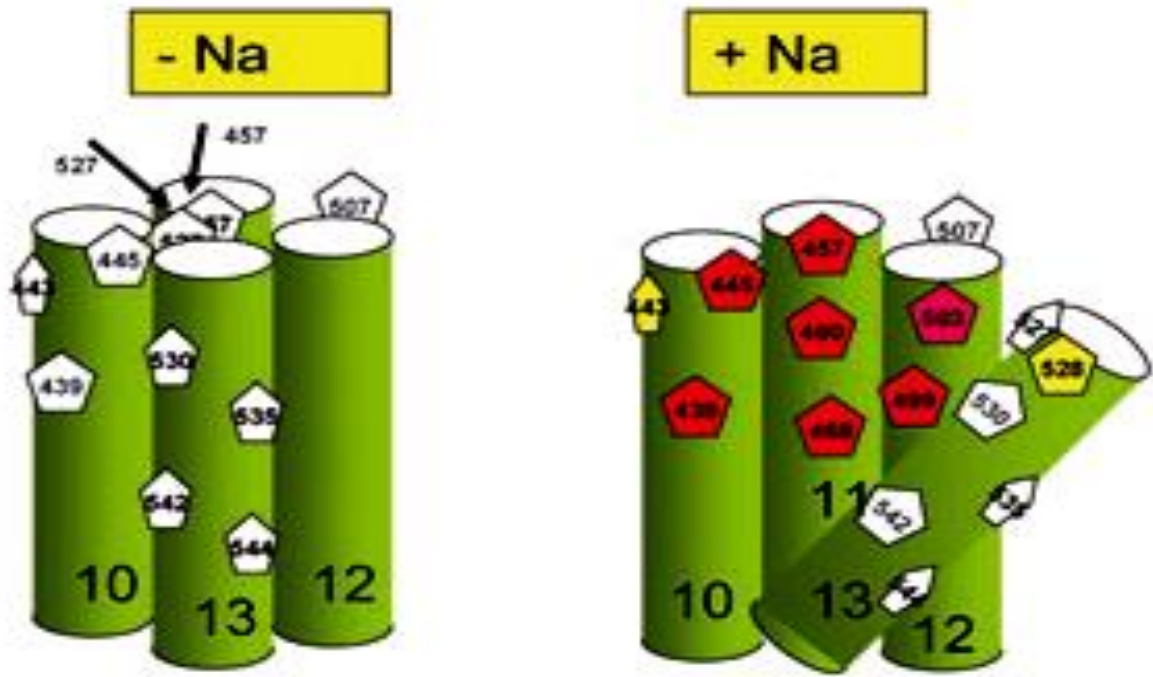
Mecanismo cinético del transportador SGLT



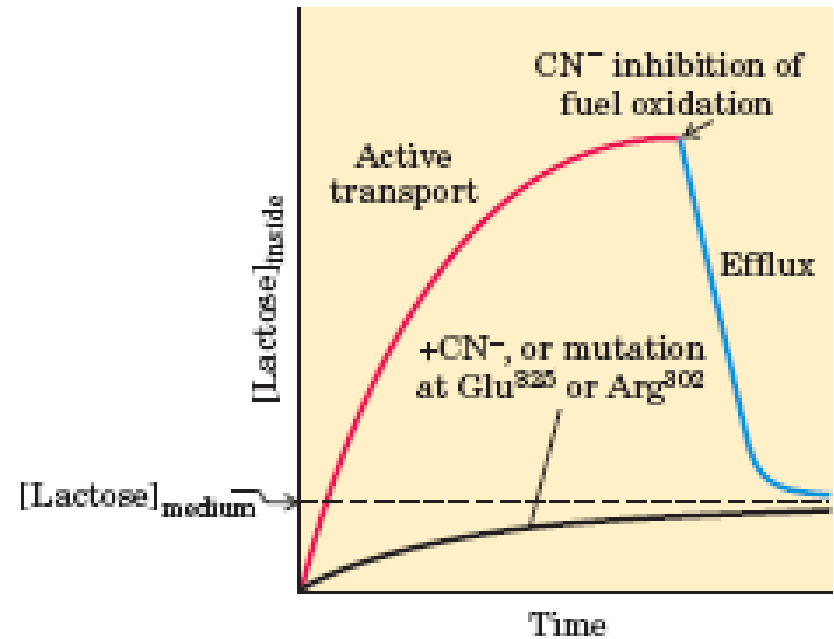
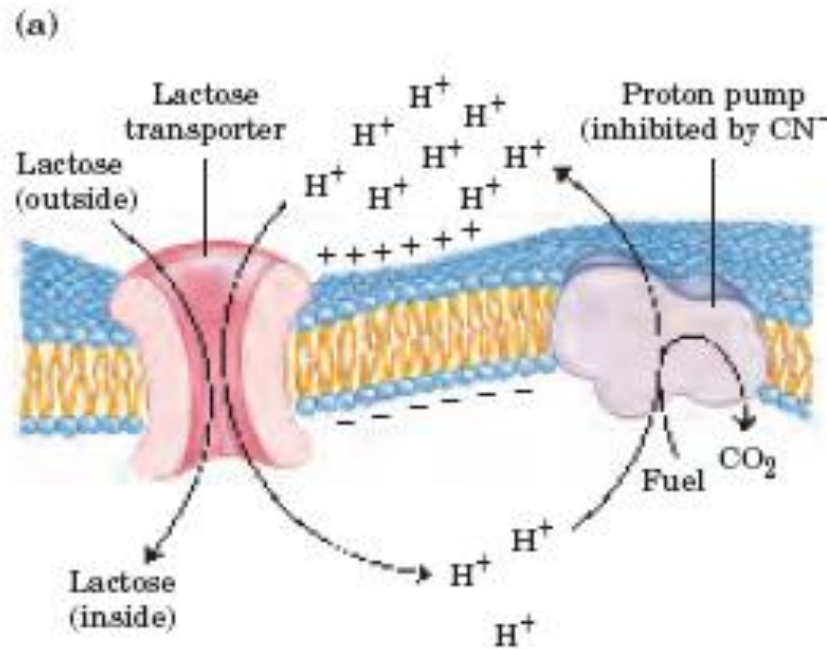
phlorizin

Inhibidor del transportador

Na-dependent conformational changes of SGLT1

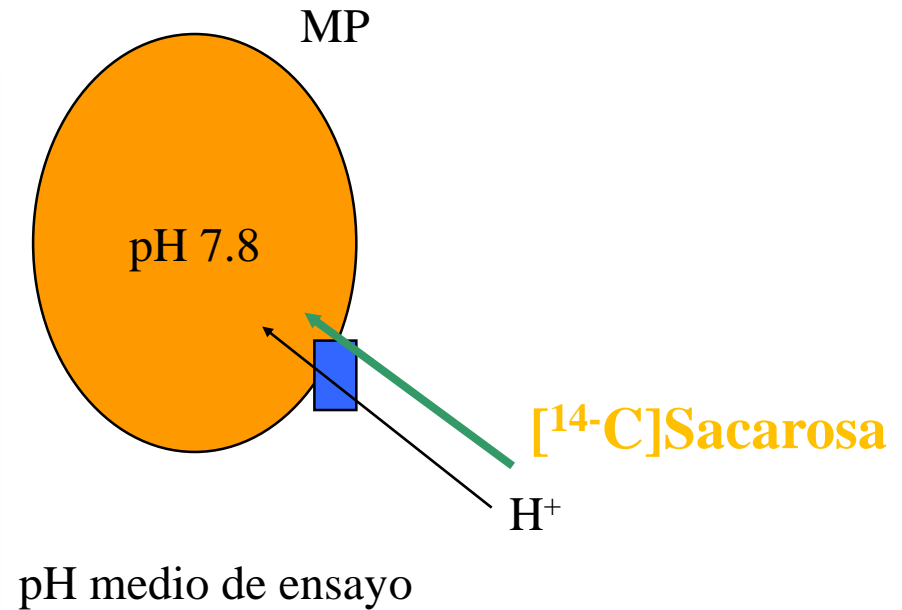
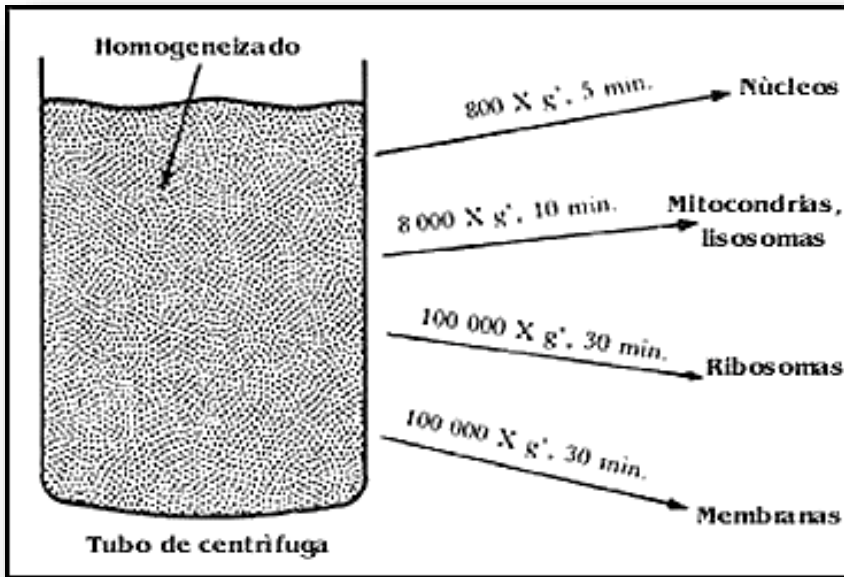


Lactosa permeasa



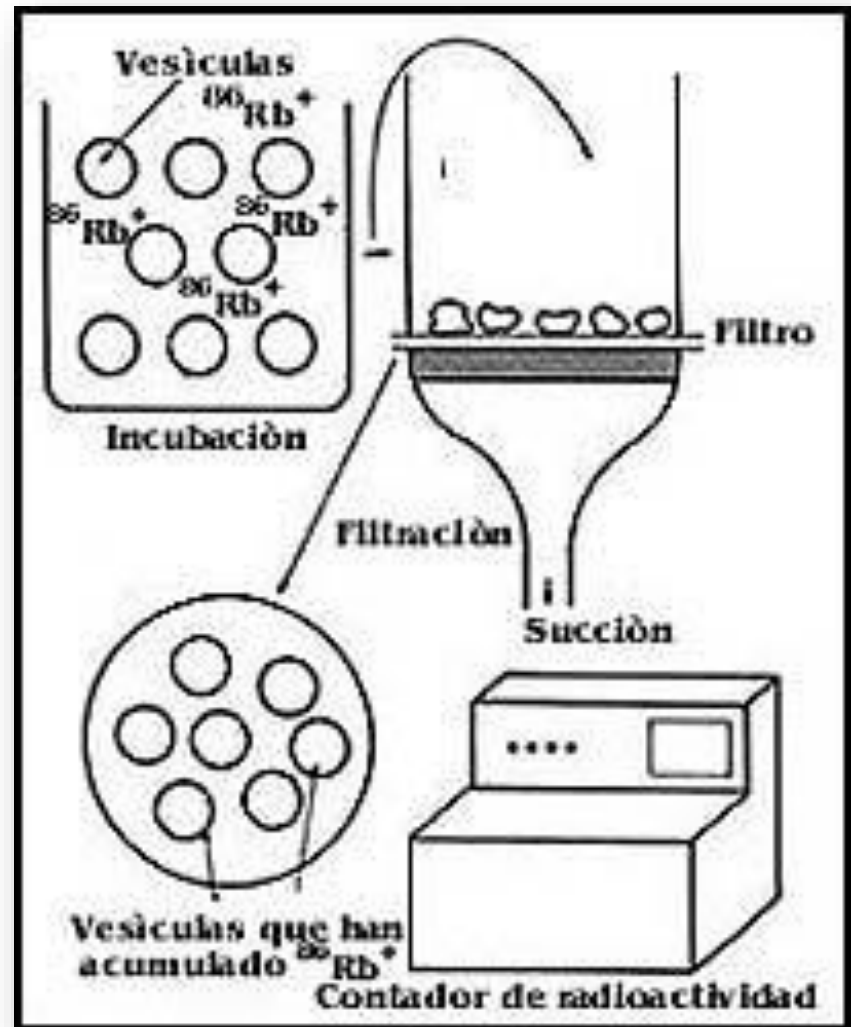
Formas de estudiar el transporte: Aislamiento de las membranas

- Aislar vesículas de membrana
- Ponerlas en contacto con el soluto a transportar marcado radiactivamente

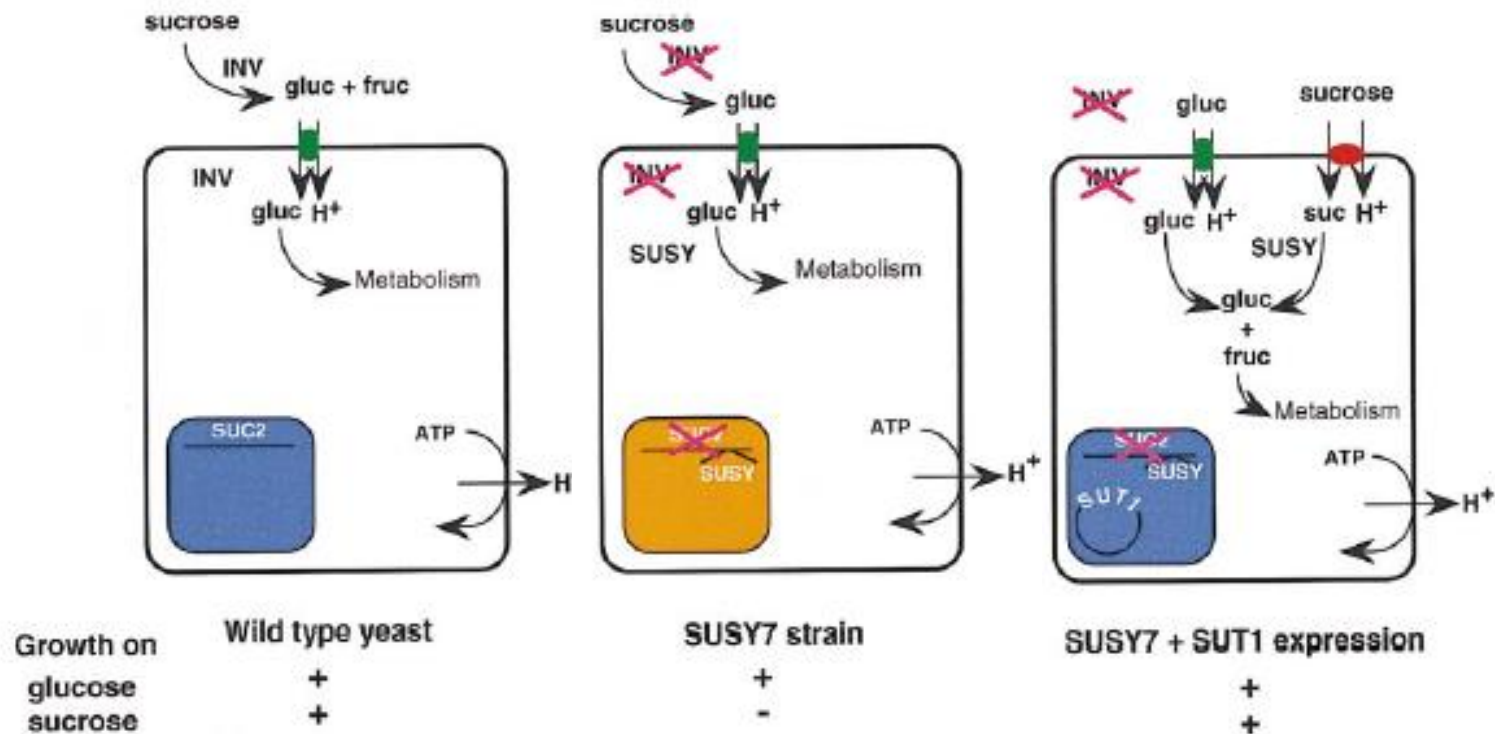


Caracterización de la actividad del transportador

- Leer la marca incorporada en las vesículas.



Análisis de la función del transportador de sacarosa en tomate (LeSUT1 y LeSUT2).



- SUT1 puede complementar la mutante de levadura, SUT1 es un transportador de sacarosa
- SUT2 no complementa a la mutante, SUT2 no es un transportador de sacarosa.