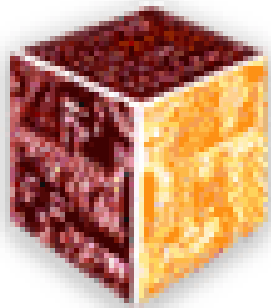


UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

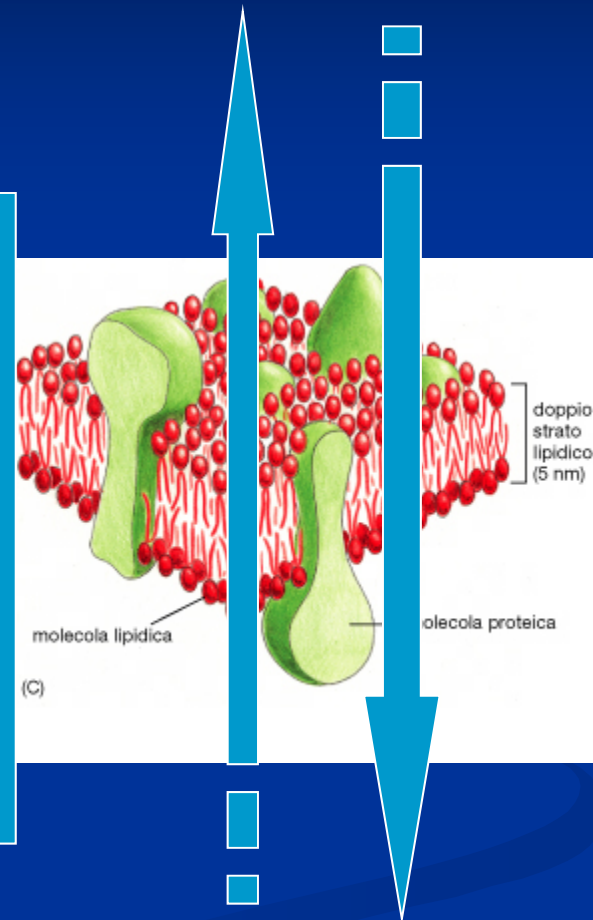
“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

TRASPORTO

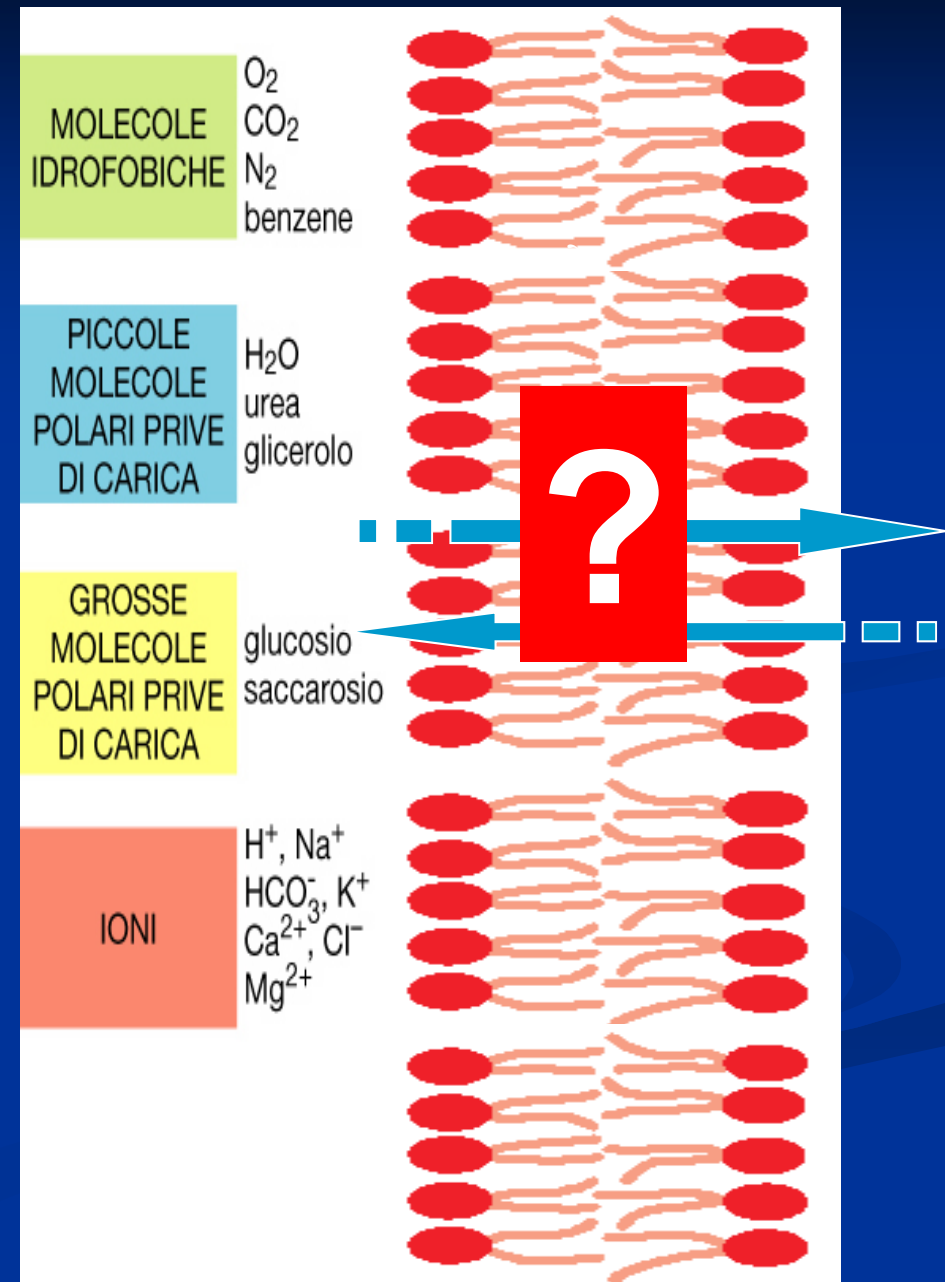
*spostamento di
sostanze
da un lato all'altro
della membrana*



DIFFUSIONE

attraverso una membrana sintetica

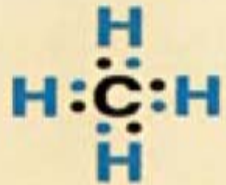
- Caratteristiche di **polarità/apolarità** **idrofilicità/lipofilicità**
- Dimensioni della molecola



MOLECOLE **APOLARI, POLARI, IONICHE**

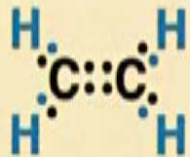
Quando due atomi interagiscono gli elettroni di legame possono essere condivisi tra i due atomi a formare un **legame covalente** oppure possono passare completamente da un atomo all'altro, formando **ioni**

MOLECOLE APOLARI, POLARI, IONICHE

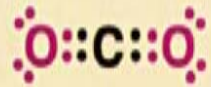


Metano
(CH₄)

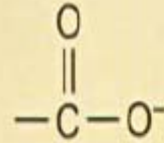
?



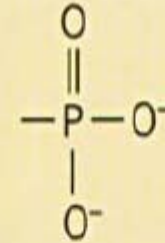
Etilene
(CH₂=CH₂)



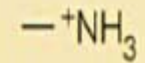
Anidride carbonica
(CO₂)



Carbossilico

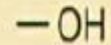


Fosforico

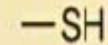


Amminico

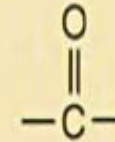
?



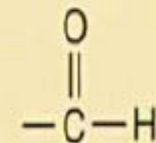
Ossidrilico



Sulfidrilico



Carbonilico

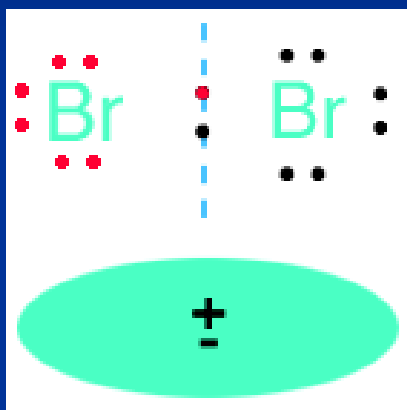


Aldeidico

?

MOLECOLE APOLARI

Prendiamo in considerazione **molecole biatomiche** delle quali possiamo con certezza prevedere la polarità. Quando la molecola è formata da due atomi uguali il legame che li unisce è covalente puro, **gli elettroni sono attirati con la stessa forza da entrambi gli atomi**, la carica elettrica è quindi distribuita uniformemente sulla molecola e questa risulta **apolare**.



Molecola Br_2 :

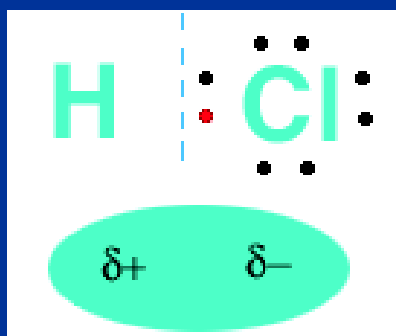
Gli elettroni dei due atomi sono rappresentati in colori diversi. La coppia di elettroni di legame è equidistante dai due nuclei. L'ellisse in verde rappresenta molto schematicamente la molecola.

Il baricentro delle cariche positive e negative coincide quindi la molecola è apolare.

MOLECOLE POLARI

Quando gli **atomi hanno invece** **differente elettronegatività** il legame che si instaura è covalente polare, **gli elettroni sono attirati maggiormente dall'elemento più elettronegativo**, la nuvola elettronica in questo caso non è distribuita uniformemente sulla molecola ma presenta un addensamento sull'atomo più elettronegativo (polo negativo) e un impoverimento sull'atomo meno elettronegativo (polo positivo). **Una molecola di questo genere è polare** e può anche essere definita un **dipolo** elettrico.

Bisogna però sottolineare che **la molecola nella sua totalità è elettricamente neutra**, presenta solo una "distorsione" della carica elettrica. Questa situazione può essere rappresentata utilizzando i simboli $\delta+$ e $\delta-$ nei quali il simbolo (delta) rappresenta una qualsiasi frazione di carica.



molecola polare HCl:

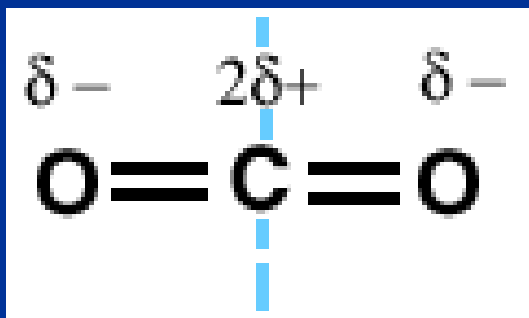
l'elettrone dell'idrogeno è rappresentato in rosso.

La coppia di elettroni di legame è più spostata verso il cloro.

Il baricentro delle cariche positive e negative non coincide e si ha la formazione di un dipolo elettrico.

MOLECOLE APOLARI

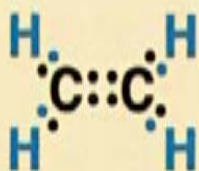
Quando **nella molecola sono presenti più di due atomi** non è così facile prevederne il carattere polare o apolare in quanto **acquista molta importanza la geometria delle molecole** cioè la disposizione nello spazio dei singoli atomi. In alcuni casi infatti legami polari disposti nello spazio in modo simmetrico danno globalmente origine a molecole apolari. :



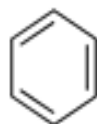
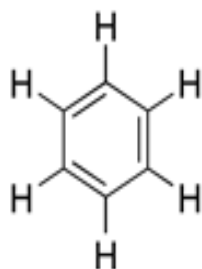
Molecola dell'anidride carbonica:

un atomo di carbonio centrale è unito a due atomi di ossigeno tramite legami doppi covalenti polari.

La disposizione dei legami è speculare rispetto al piano indicato con la linea azzurra tratteggiata, **le due polarizzazioni quindi si annullano l'una con l'altra e la molecola risulta apolare.**



Etilene
($CH_2=CH_2$)

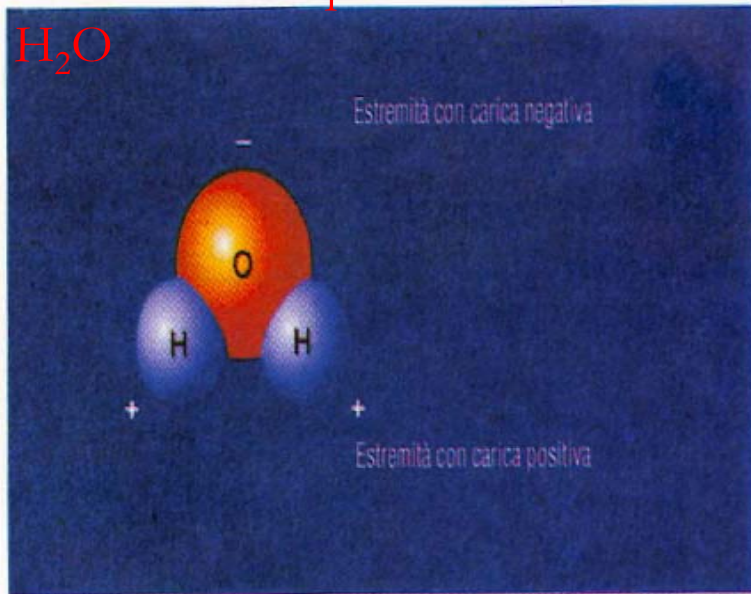


Benzene C_6H_6

MOLECOLE POLARI

molecola di acqua

H_2O



Le molecole dell'acqua si uniscono transitoriamente in un reticolo legato da **legami idrogeno**

La **molecola dell'acqua** è un *dipolo* con una zona ad addensamento di *carica positiva* dalla parte dei due atomi di *idrogeno*, ed una ad addensamento di *carica negativa* dalla parte dell'atomo di *ossigeno*

L' H_2O è una molecola fondamentale per il funzionamento di tutte le altre molecole organiche. Questa sua caratteristica deriva dal fatto che essa è un **dipolo** e un **solvente praticamente universale**

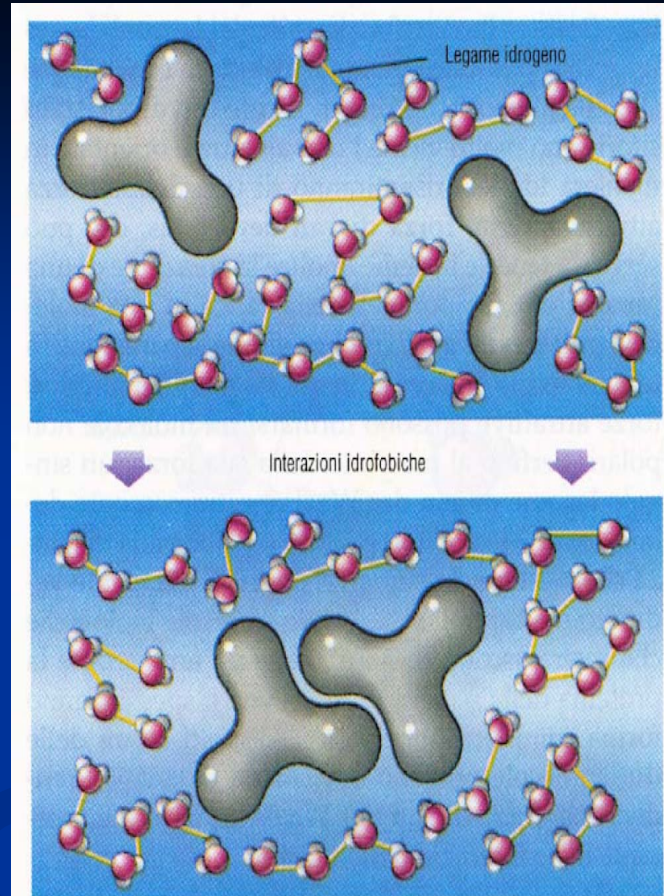
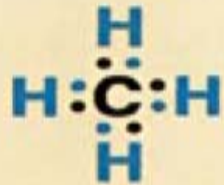


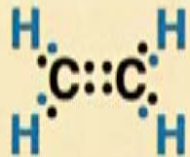
FIGURA 2.5 • In una **interazione idrofobica**, le molecole non polari (idrofobiche) sono "forzate" a formare aggregati, che minimizzano la loro esposizione alle molecole di acqua circostanti.

Cosa si intende per
"sostanza **idrofilica o idrofobica**"?

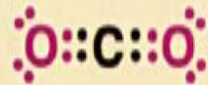
MOLECOLE APOLARI, POLARI, IONICHE



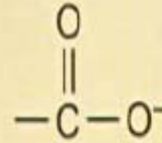
Metano
(CH₄)



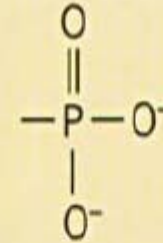
Etilene
(CH₂=CH₂)



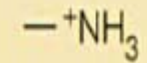
Anidride carbonica
(CO₂)



Carbossilico



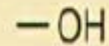
Fosforico



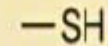
Amminico

(a) Gruppi carichi negativamente

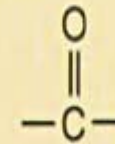
(b) Gruppo carico positivamente



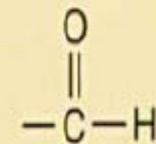
Ossidrilico



Sulfidrilico



Carbonilico



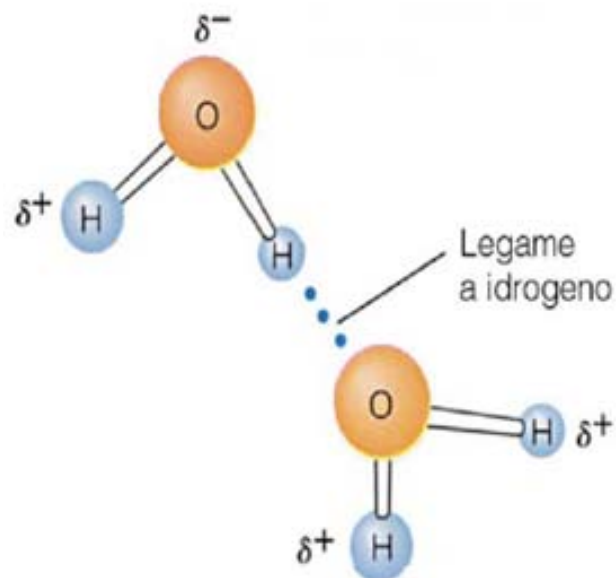
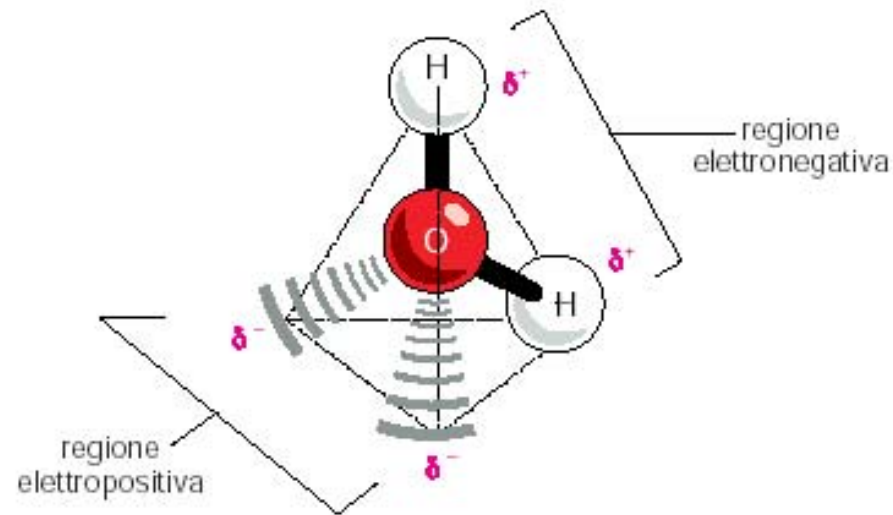
Aldeidico

(c) Gruppi neutri, ma polari

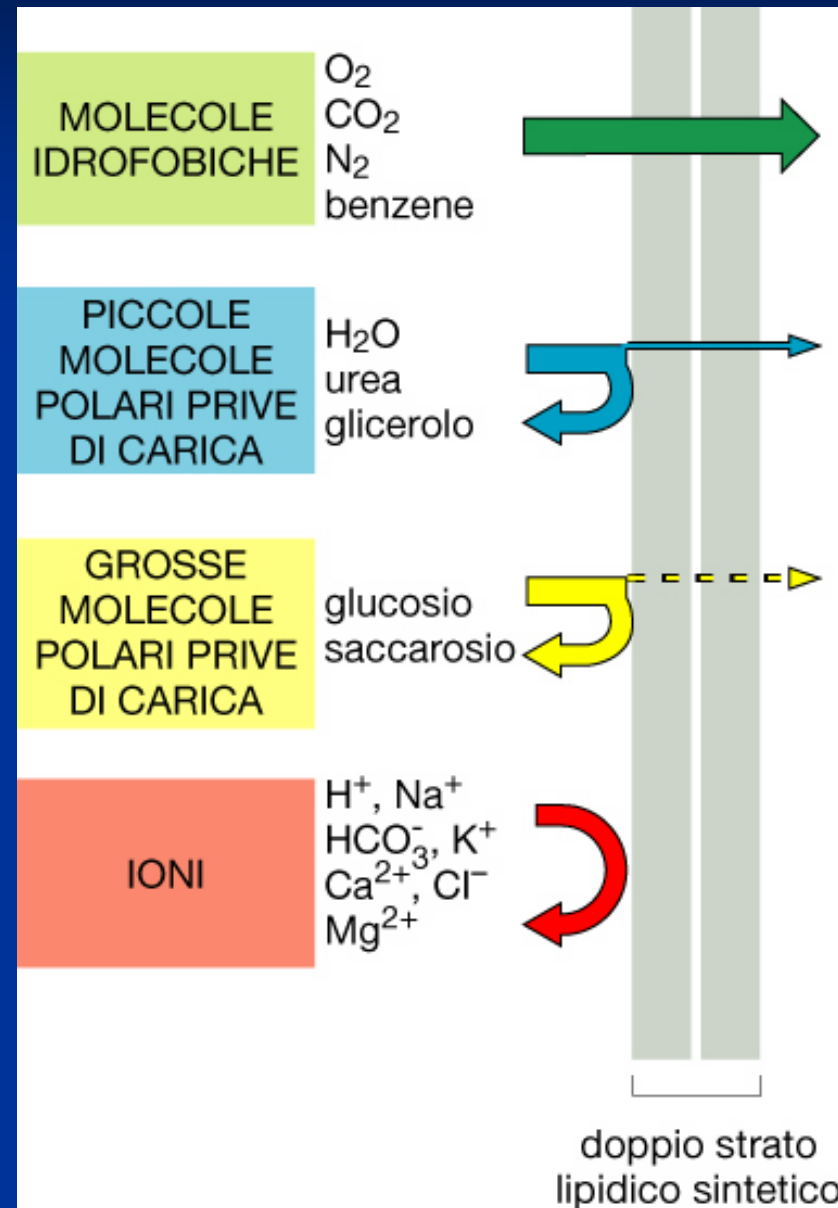
L'acqua è una molecola polare ed è in grado di formare numerosi legami a idrogeno

L'ACQUA

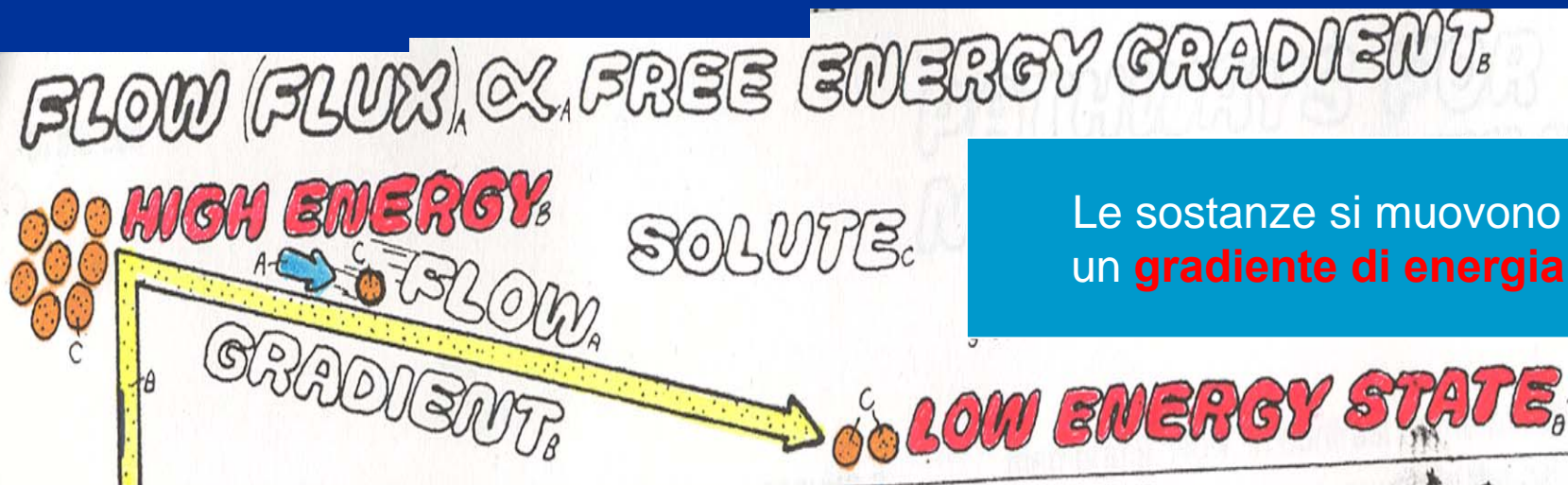
Due atomi, connessi da un legame covalente, possono esercitare attrazioni diverse per gli elettroni del legame. In questi casi il legame è polare, con un'estremità leggermente negativa (δ^-) e l'altra leggermente positiva (δ^+).



Diffusione di diverse sostanze attraverso una membrana sintetica



I movimenti di particelle attraverso la membrana richiedono sempre delle forze (GRADIENTI)



Le sostanze si muovono lungo un **gradiente di energia libera**

DIFFUSIONE



Quando una membrana che separa due comparti è **permeabile ai soluti**, ed esiste una **differenza di concentrazione** tra le due soluzioni presenti nei due comparti (gradiente chimico), si ha un **trasferimento netto di soluti dalla soluzione a maggiore concentrazione a quella a minore concentrazione**

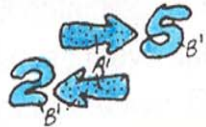
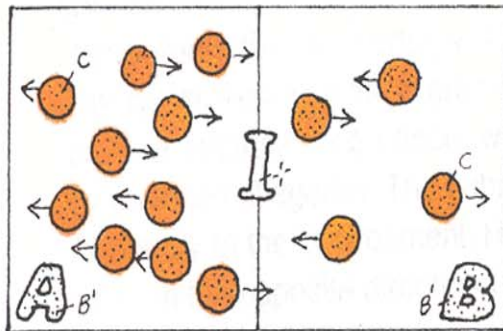
differenze di concentrazione
(gradienti chimici)



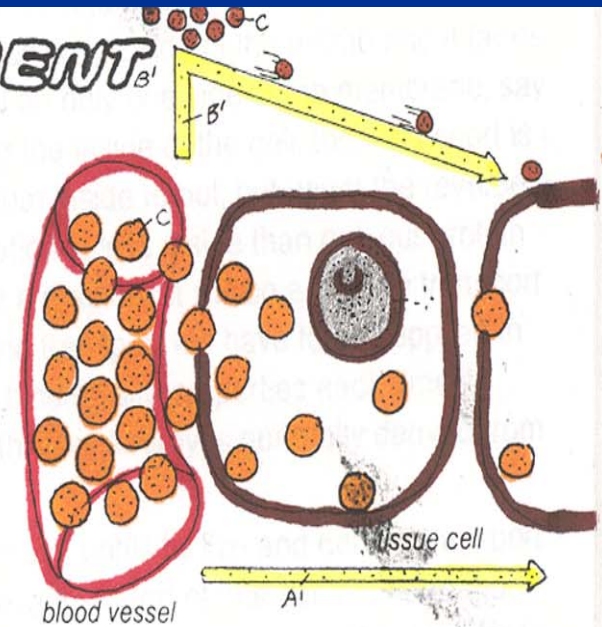
DIFFUSIONE
movimento di **soluti**

DIFFUSION: CONCENTRATION GRADIENT

FLUX_{A'}



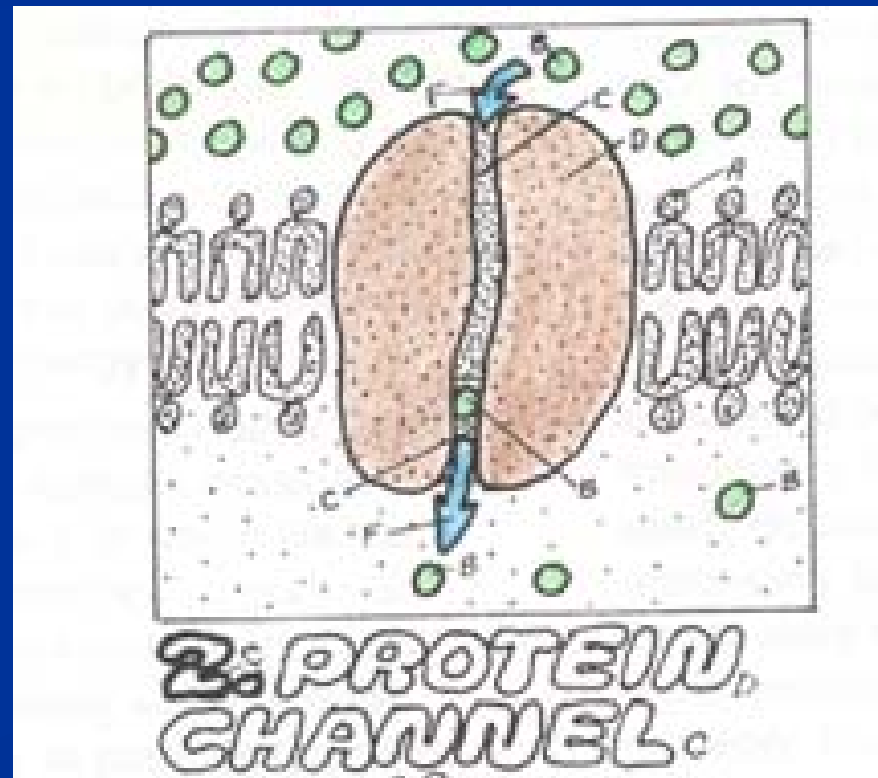
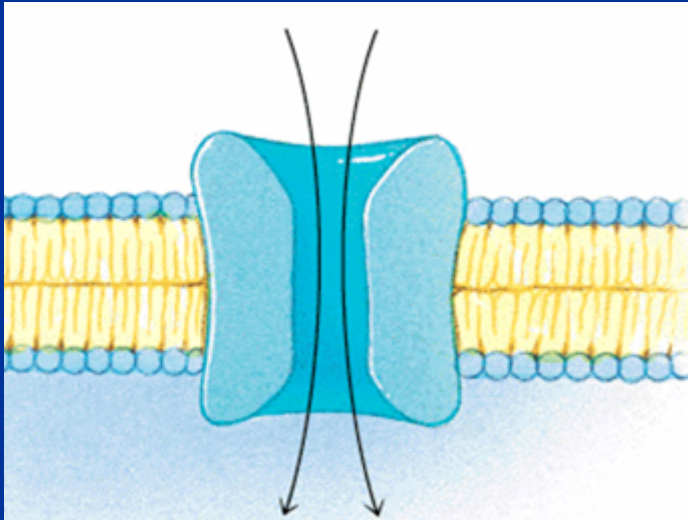
I soluti si spostano (diffondono) secondo il loro **gradiente di concentrazione**



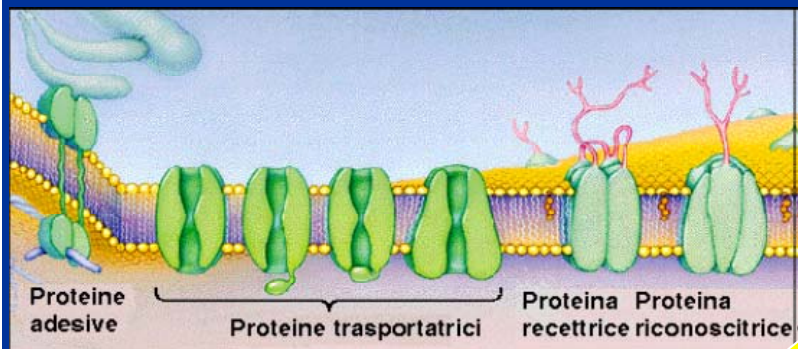
Nell'organismo: processi di diffusione attraverso l'endotelio capillare: trasporto di O₂ e nutrienti dal sangue ai tessuti

Il bilayer fosfolipidico è una barriera per le molecole polari (ancor più per gli ioni)

Come attraversano la membrana le sostanze (idrofiliche/polari, ioni) che non possono diffondere per diffusione semplice attraverso il bilayer fosfolipidico?

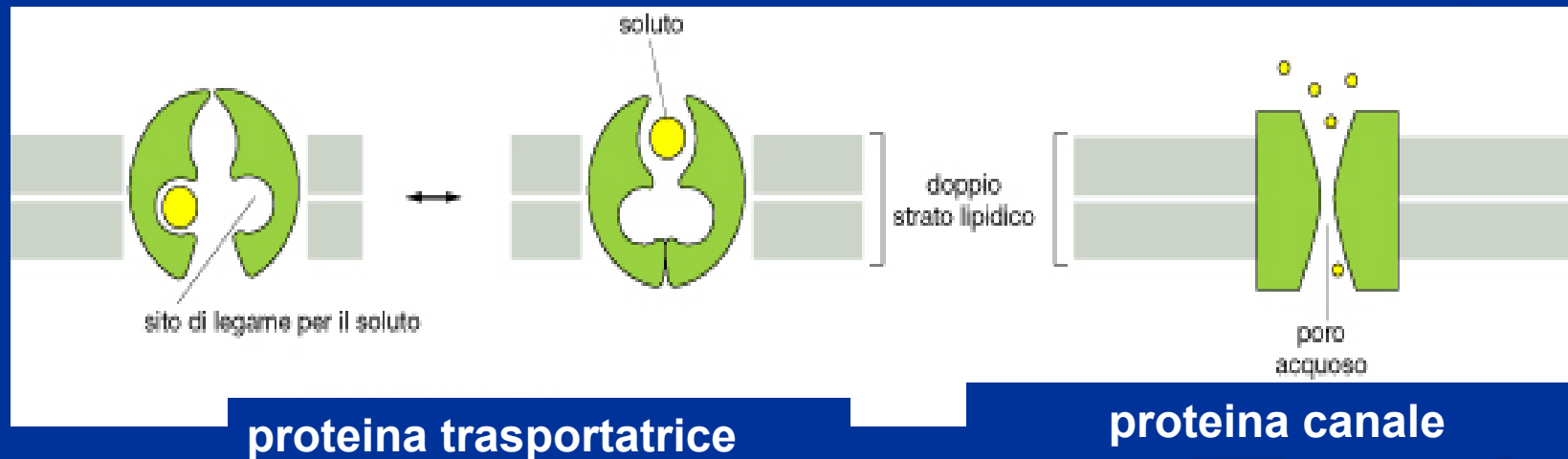


Le proteine di membrana e le loro funzioni



La membrana è una barriera per le molecole polari/ioni

- **Proteine trasportatrici** (*trasportatori o permeasi*)
- **Proteine canale**



velocità >>

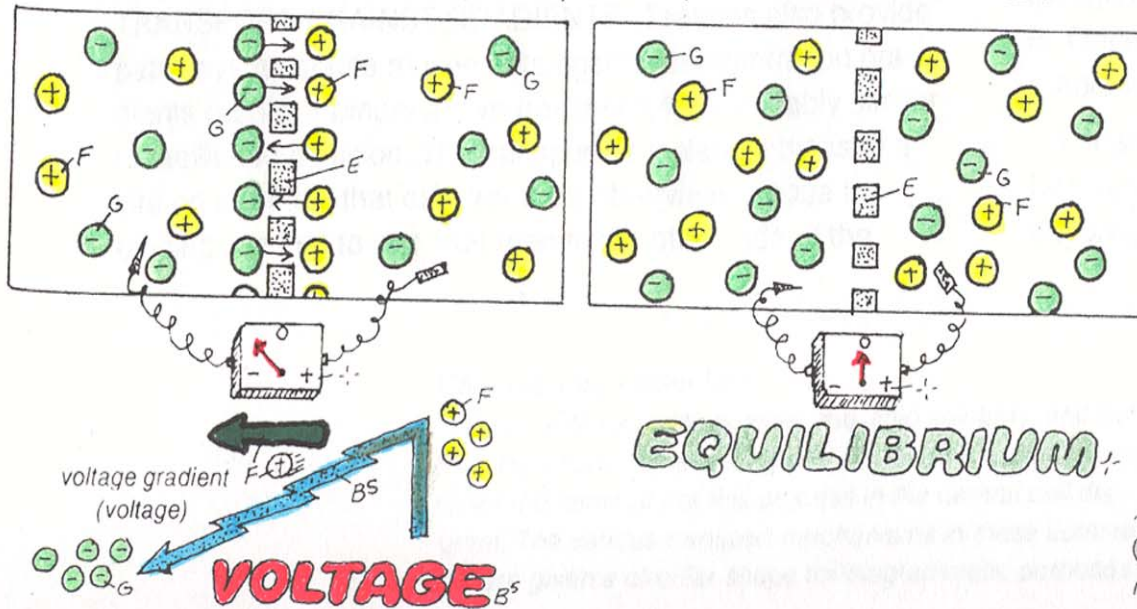
differenze di cariche
(**gradienti elettrici**)



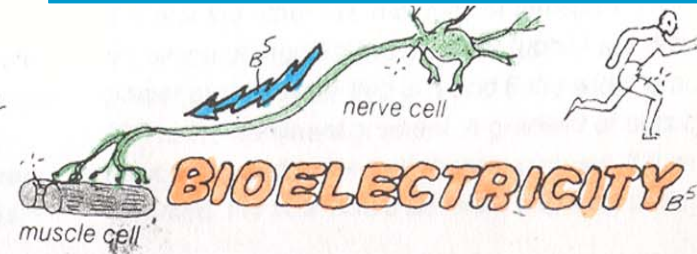
movimento di **ioni**

IONIC CURRENT: A VOLTAGE GRADIENT B^S

POSITIVE IONS F ← ELECTRIC FORCE B^S
NEGATIVE IONS G



Gli IONI si muovono sotto l'influenza di **forze elettriche** che sorgono perché ioni di segno opposto si attraggono, ioni di segno uguale si respingono

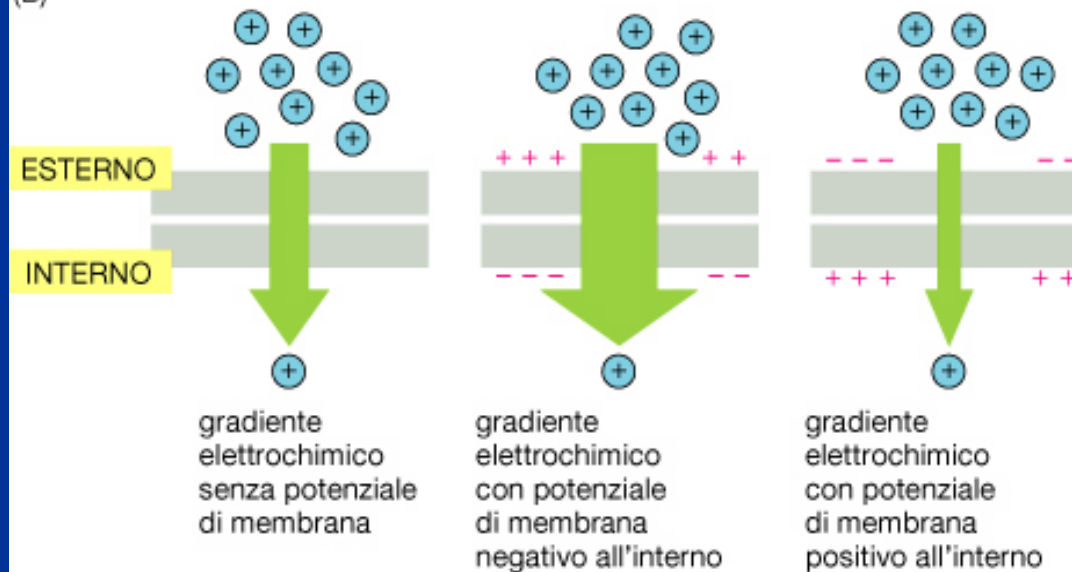


Gradiente chimico
Gradiente elettrico



Gradiente elettrochimico

(B)



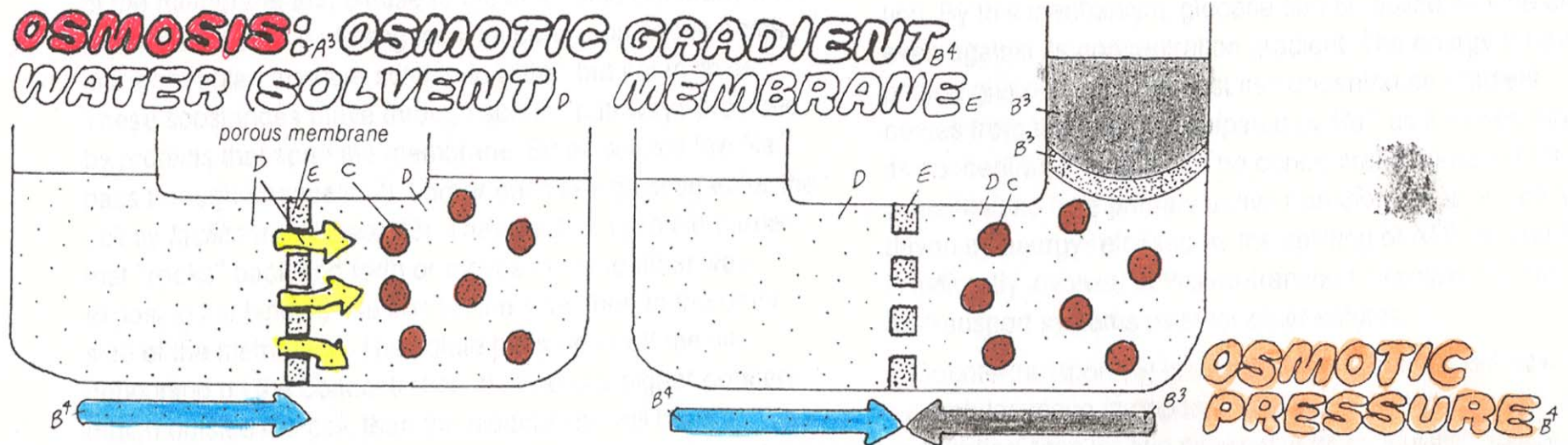
La membrana cellulare è dotata di un **voltaggio** che influenza il gradiente elettrochimico

Un particolare tipo di diffusione.... l'osmosi

OSMOSI



movimento di **acqua**

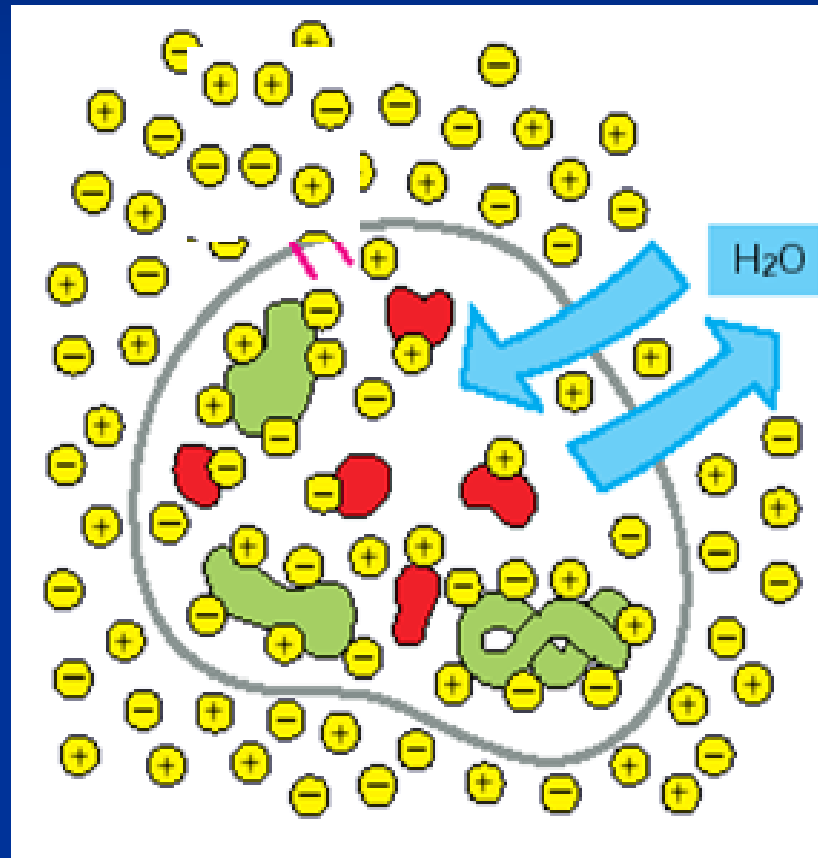


Attraverso una **membrana SEMIPERMEABILE*** l'acqua si sposta verso il comparto a maggior concentrazione di soluti: tale processo è detto **OSMOSI**

* **si lascia attraversare dall'acqua ma non dai soluti**

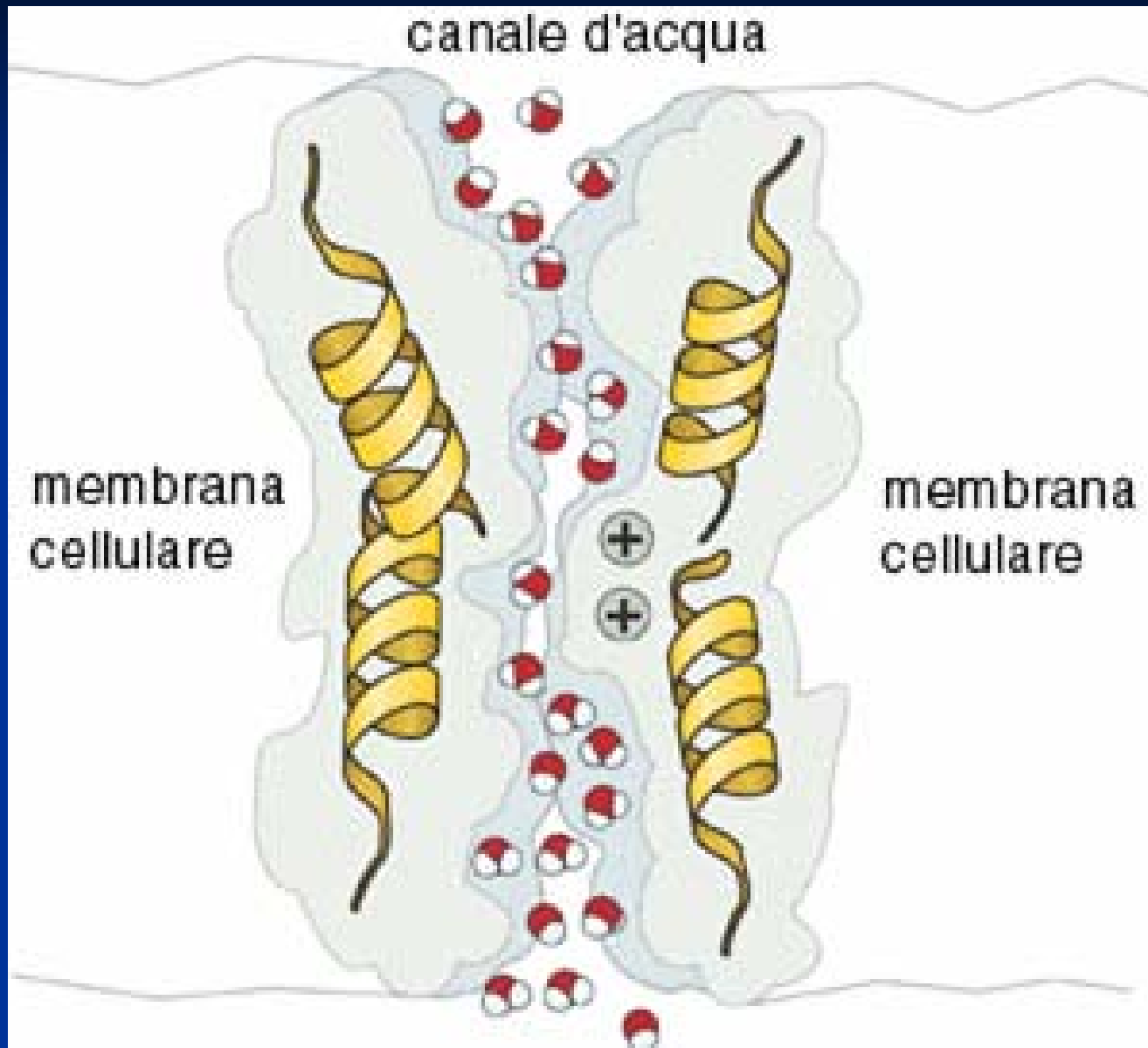
La membrana cellulare ha caratteristiche di **semipermeabilità*** e si lascia attraversare dall'**acqua** grazie ad un processo detto **OSMOSI**

** si lascia attraversare dall'acqua ma non dai soluti*



L'OSMOSI è un processo di DIFFUSIONE considerato dal punto di vista del solvente invece che del soluto

canale di acquaporina



L'OSMOSI È UNA PROPRIETÀ COLLIGATIVA

ambiente intracellulare

ambiente extracellulare

■ **MACROMOLECOLE**



contro-ioni

■ piccole molecole organiche



contro-ioni

■ **piccoli ioni inorganici**

eccesso di soluti

Ogni soluzione acquosa possiede una **OSMOLARITA'** che è proporzionale al numero di particelle osmoticamente attive in essa contenute

Quale è l'OSMOLARITA' fisiologica?

Il valore (*range*) della **osmolarità fisiologica** di una cellula è:

280-310 mOsm/L

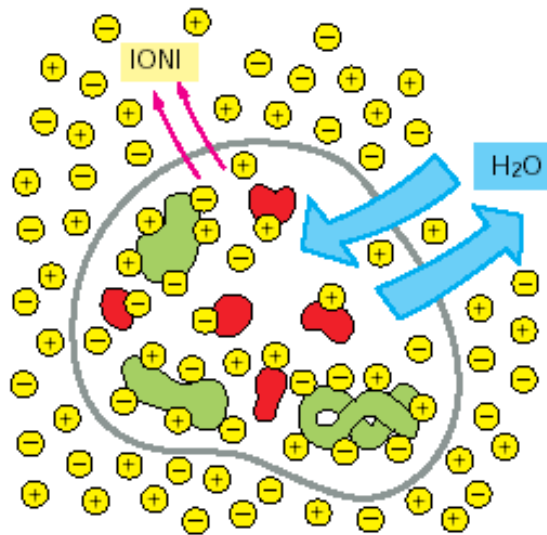
*la concentrazione totale di soluti è maggiore **dentro** la cellula*



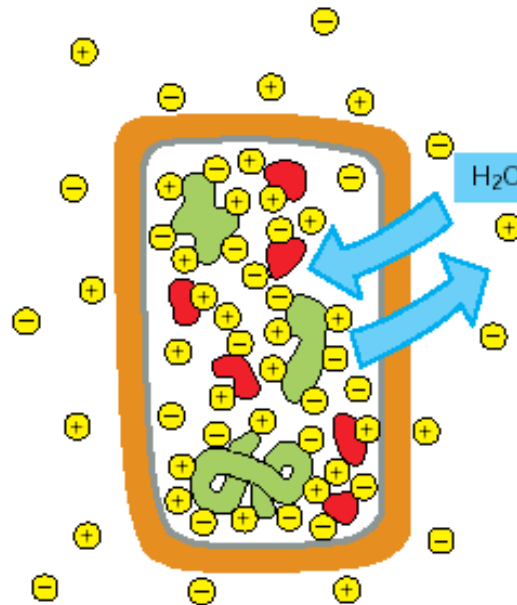
osmolarità

La soluzione

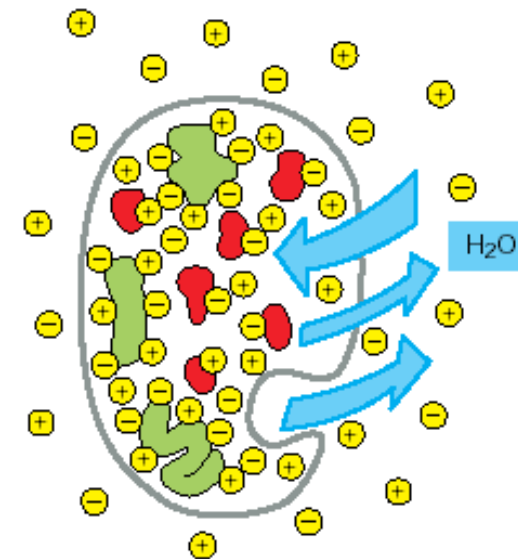
Le cellule animali e i batteri controllano la loro osmolarità intracellulare pompando attivamente fuori ioni inorganici, come Na^+ , in modo che il loro citoplasma contenga una concentrazione totale più bassa di ioni inorganici del fluido extracellulare, compensando così l'eccesso di soluti organici.



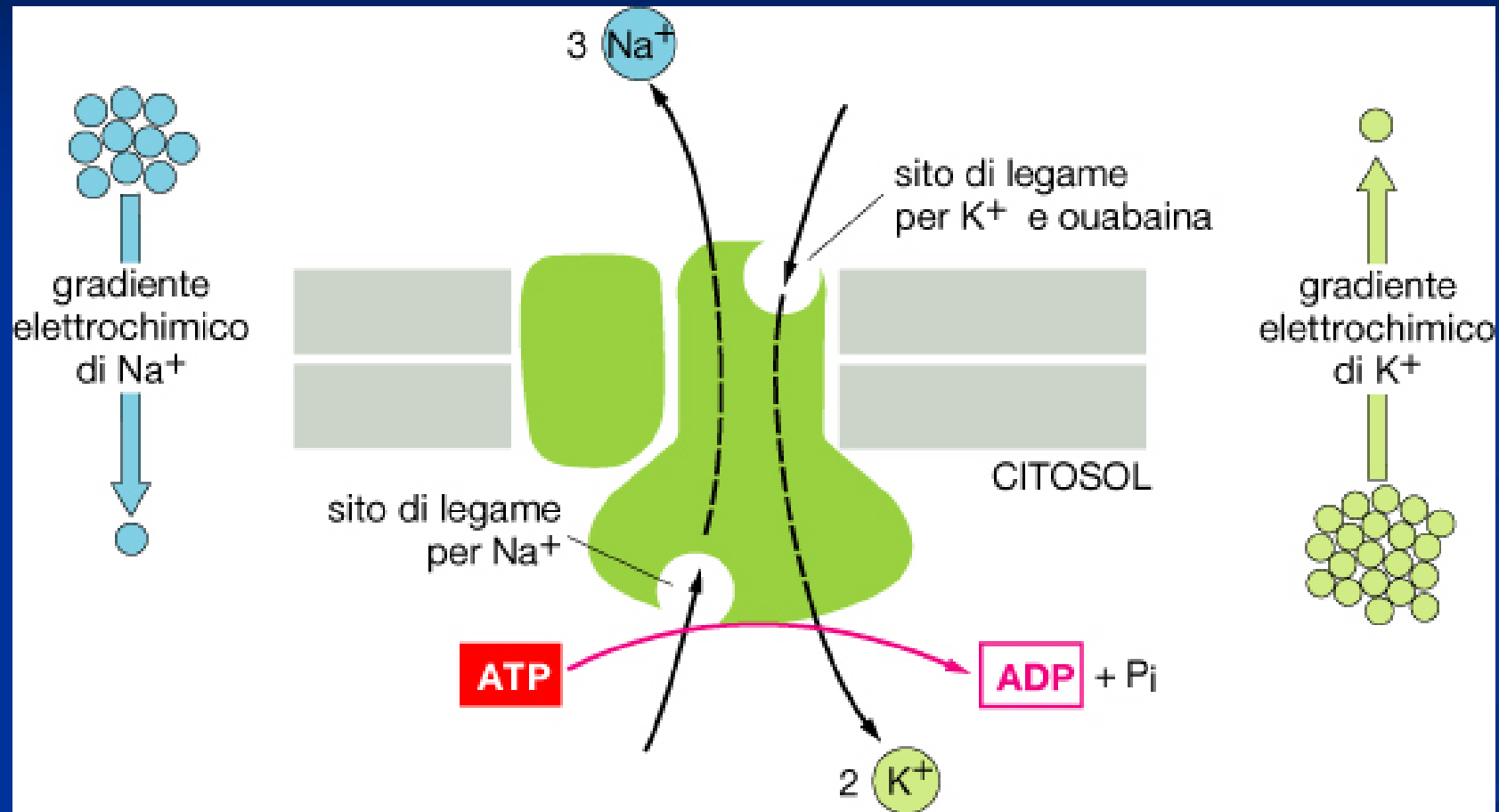
Le cellule vegetali non si rigonfiano per le loro pareti cellulari rigide e possono così tollerare una differenza osmotica attraverso le loro membrane plasmatiche: si crea una pressione di turgore interna, che all'equilibrio forza fuori tanta acqua quanta ne entra.



Molti protozoi evitano di rigonfiarsi di acqua, nonostante una differenza osmotica attraverso la membrana plasmatica, espellendo periodicamente acqua da vacuoli contrattili speciali.



Nelle cellule animali l'equilibrio osmotico è mantenuto principalmente dalla POMPA $\text{Na}^+ \text{-K}^+$

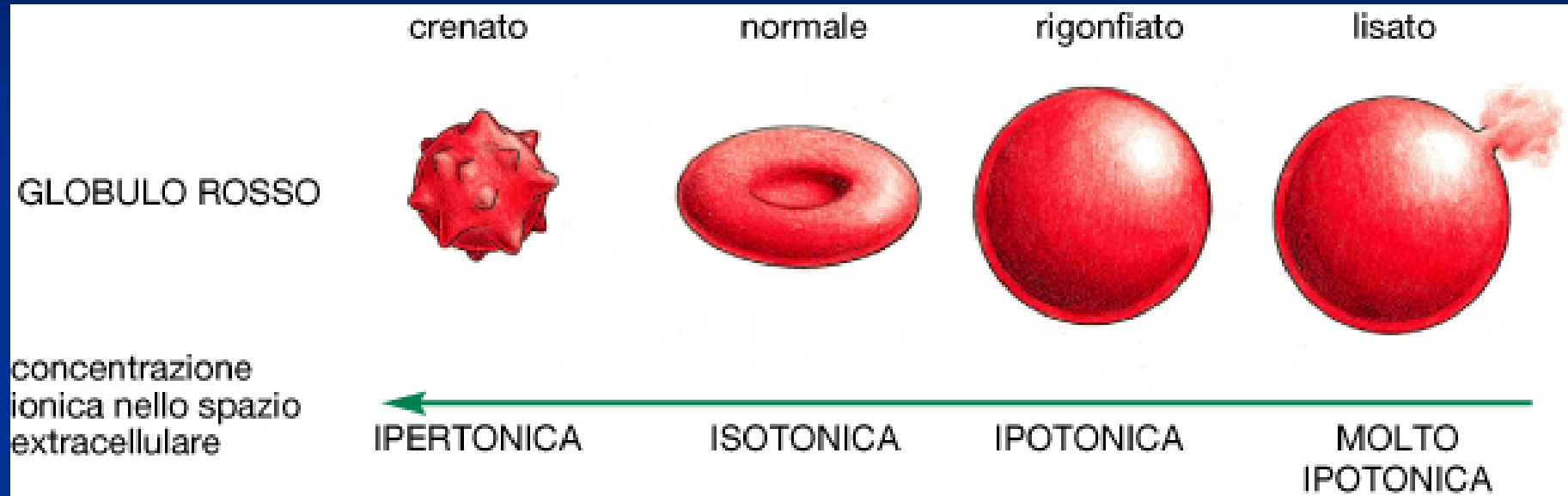


per la maggior parte delle cellule animali la pompa Na-K è cruciale

FUNZIONI DELLA POMPA $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

1. *Stabilità osmotica*
2. *Gradiente per il co-trasporto*
3. *Bioelettricità*

Per evitare problemi osmotici le cellule devono essere mantenute in soluzioni aventi osmolarità fisiologica
(ISO-OSMOTICHE o ISOTONICHE)



quesito:

Se ponendo alcune cellule in una soluzione salina vedo che esse si restringono e la membrana cellulare si corruga, rispetto alle cellule la soluzione salina è ?

SOLUZIONE FISIOLÓGICA (0,9% NaCl, w/v):

la piú semplice delle soluzioni saline utilizzate nel lab colture cellulari

E' composta da 0,9 g di NaCl in 100 ml di acqua

Sapendo che NaCl ha MW=58,44:

Quale **MOLARITA'** ha questa soluzione?
Quale **OSMOLARITA'** ha questa soluzione?

Mole/Molarità

Si chiama **MOLE** una quantità di sostanza che contiene la stessa quantità di particelle contenute in 12g di ^{12}C (isotopo 12 del carbonio, il consueto *isotopo di riferimento*).

Il numero di unità contenute in una mole si chiama *numero o costante di Avogadro* (N_A o N).

$$N_A = 6,022169 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

Quindi una mole di sostanza contiene 6.022×10^{23} molecole di quella sostanza

MOLARITÀ (M): indica il numero di moli di soluto presenti in 1 litro (1 L) di soluzione

$$M = \text{nmoli} / \text{VL}$$

$$\text{nmoli} = \text{g} / \text{PM}$$

Per $V=1$

$$M = \text{g}/\text{PM}$$

Soluzione fisiologica: **0,9% NaCl**

MOLARITA' ?

 **$M = g/PM$**

$M = 9g/58,44 = 0,154$

154 mM = ? mOsm

Relazione tra OSMOLARITA' e MOLARITA'

NaCl

Soluzione isotonica: 300 mOsm 150 mM

Glucosio

Soluzione isotonica: 300 mOsm 300 mM

MgCl₂

Soluzione isotonica: 300 mOsm 100 mM

Il **COEFFICIENTE OSMOTICO** corregge le deviazioni delle soluzioni reali da quelle ideali; esso dipende dalle proprietà chimiche del soluto, dalla sua concentrazione e dalla T.

ordine di grandezza	prefisso	simbolo
10^{12}	tera	T
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	chilo	k
10^2	etto	h
10^1	deca	da
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	milli	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f
10^{-18}	atto	a

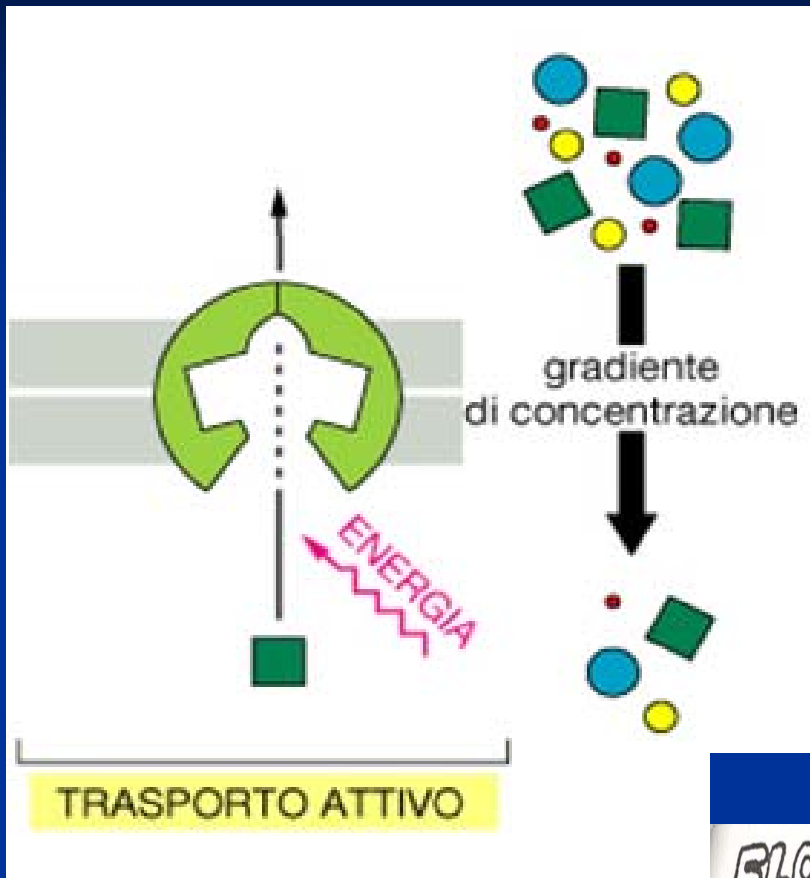
ESERCITAZIONE:

1. Quale quantità delle seguenti sostanze devo sciogliere in 1L di acqua, per ottenere la MOLARITA' indicata (conoscendo MW)? E in 100 ml?
2. Esprimere ciascuna molarità in valore milliMolare

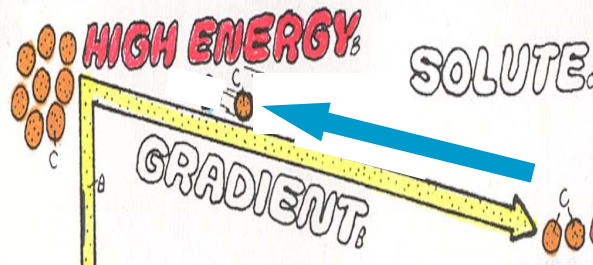
DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (10x)

Sali inorganici	g/L	g/100 ml	Peso molecolare (MW)	Molarità (M)	Molarità (mM)
CaCl ₂ x 2H ₂ O			147	0,0090	
MgCl ₂ x 6H ₂ O			203,30	0,0049	
KCl			74,55	0,027	
KH₂PO₄			136	0,0147	
NaCl			58,44	1,37	
Na₂HPO₄			141,96	0,081	

TRASPORTO ATTIVO

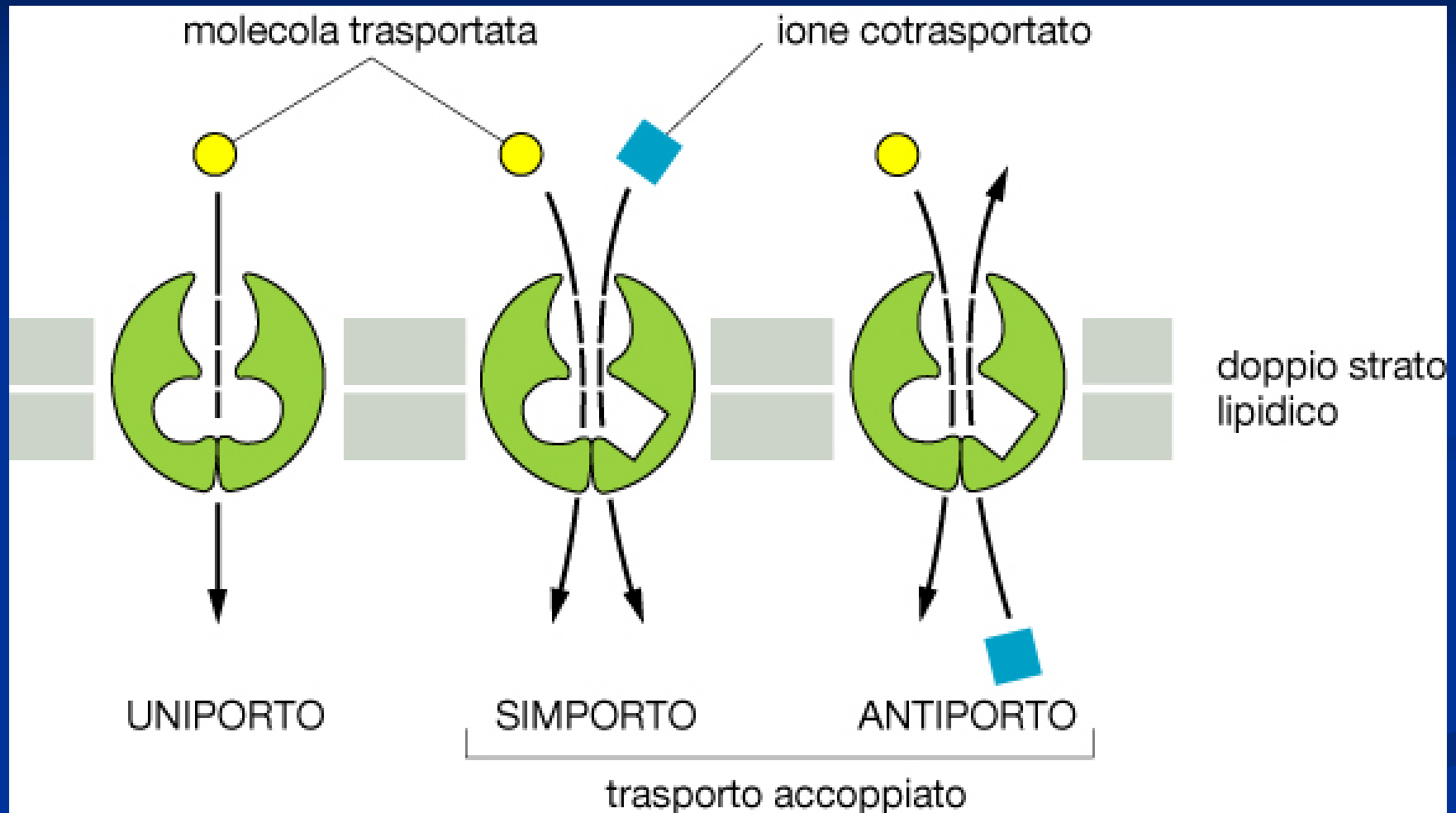


FLOW (FLUX) \propto FREE ENERGY GRADIENT

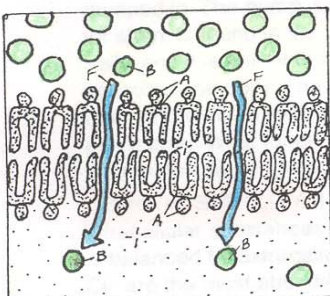


Le sostanze si muovono contro gradiente

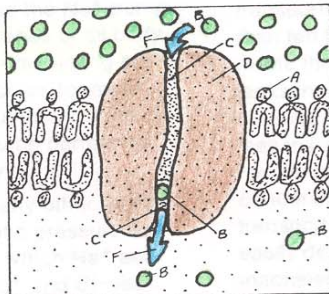
Tipologie di trasporto attivo



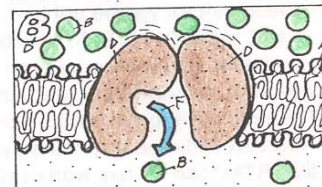
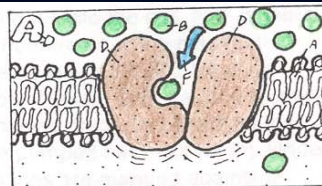
Trasporto passivo



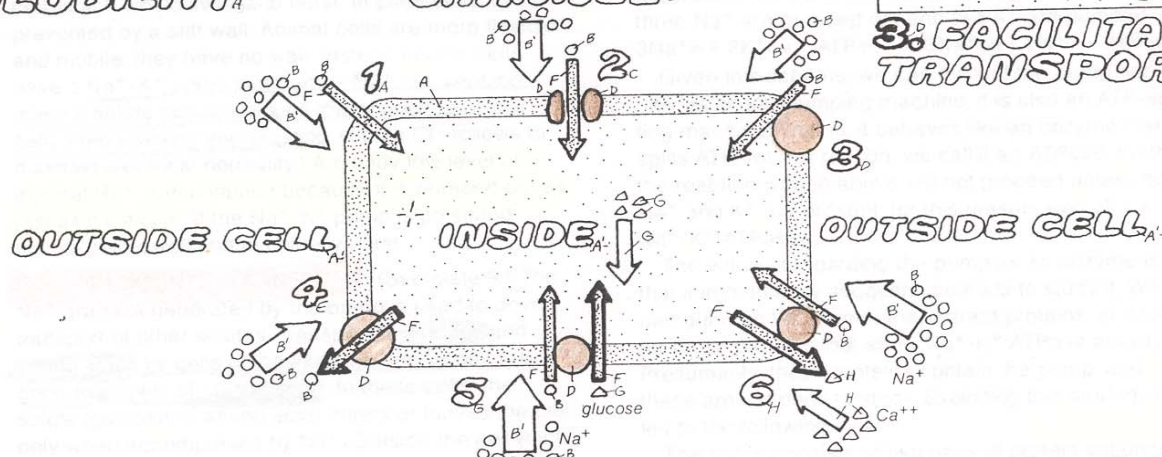
1. LIPID SOLUBILITY



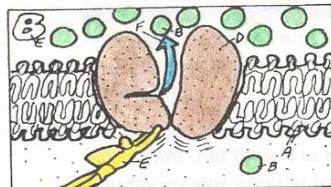
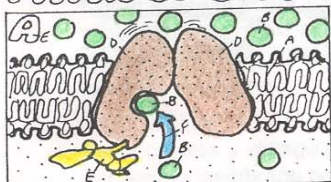
2. PROTEIN CHANNEL



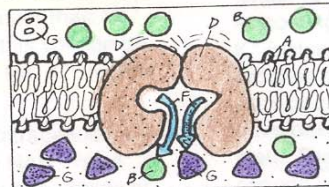
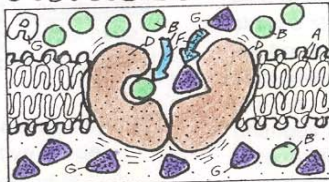
3. FACILITATED TRANSPORT



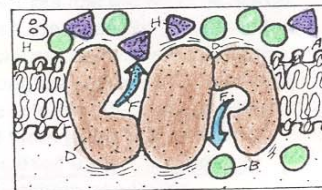
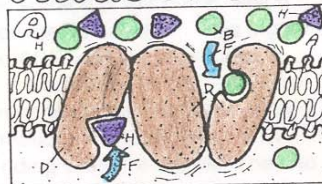
4. ACTIVE TRANSPORT



5. CO₂ TRANSPORT



6. COUNTER TRANSPORT



ATP

Trasporto attivo (contro-gradiente)

Una combinazione di permeabilità passiva e trasporto attivo mantengono **grosse differenze di composizione** tra il citosol e il fluido extracellulare o il fluido racchiuso negli organuli delimitati da membrana

<i>Componente</i>	<i>Concentrazione intracellulare (mM)</i>	<i>Concentrazione extracellulare (mM)</i>
cationi		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ⁺⁺	0,5 (20 mM)	1-2
*Ca ⁺⁺	10 ⁻⁴ (1-2 mM)	1-2
pH	7,2	7,2
anioni		
Cl ⁻	5-15	110

***0,1 μM → perchè è importante che le cellule mantengano la concentrazione di Ca⁺⁺ intracellulare molto bassa?**

Variazioni citoplasmatiche di $[Ca^{++}]_i$ determinano numerose risposte della cellula, ad esempio la contrazione muscolare

cellula del muscolo scheletrico

