

## CAPITOLO 11

### TRASPORTO TRANSMEMBRANA

Essendo l'interno del doppio strato lipidico di natura idrofobica ciò genera una barriera alle molecole polari, che sono quindi impossibilitate nel passaggio. Le cellule hanno dovuto quindi generare strategie per sopperire a ciò, e lo hanno fatto tramite l'uso di proteine di membrana specializzate nel trasporto o più semplicemente proteine di trasporto di membrana.

In generale, più è piccola e idrofobica, o non polare, la molecola, più rapidamente diffonde attraverso il doppio strato fosfolipidico (es: O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>); piccole molecole polari ma prive di carica (es: acqua o urea) diffondono anch'esse attraverso il doppio strato, ma più lentamente. I doppi strati lipidici sono, invece, altamente impermeabili a molecole cariche (ioni), non importa quanto piccole. Speciali proteine di trasporto di membrana (sono per lo più proteine transmembrana a passaggi multipli) sono responsabili del trasferimento di questi soluti attraverso le membrane cellulari. Ciascuna proteina trasporta spesso una specie particolare di molecole, hanno quindi una loro specificità, dimostrata da mutazioni per geni che codificano per queste proteine che non permetteranno il trasporto di una particolare sostanza. Le due classi principali di proteine di trasporto di membrana sono:

- trasportatori (detti anche carrier o permeasi): si legano al soluto specifico da trasportare e subiscono una serie di cambiamenti conformazionali per trasferire il soluto legato attraverso la membrana;
- canali: interagiscono con il soluto più debolmente e formano pori acquosi che si estendono attraverso il doppio strato lipidico.

Non è sorprendente che il trasporto attraverso i canali avvenga a una velocità molto maggiore del trasporto mediato dai trasportatori.

I canali e i trasportatori mediano un trasporto definito passivo cioè, nel caso di una molecola priva di carica, è la differenza di concentrazione sui due lati di membrana (gradiente di concentrazione) a spingere il trasporto e determinare la direzionalità. Se il soluto è carico sia il suo gradiente di concentrazione sia la differenza di potenziale elettrico attraverso la membrana (potenziale di membrana), ne influenzano il trasporto. Questi due fattori possono essere combinati e determinano, così, il gradiente elettrochimico di ogni soluto. Il trasporto può anche essere attivo: questo si ha quando si "pompa" un determinato soluto in una direzione contro il loro gradiente elettrochimico ed è mediato da trasportatori che per accompagnare questo processo consumano energia, ad esempio tramite idrolisi di ATP.

**RICORDA:** i trasportatori possono mediare sia trasporto attivo che passivo, i canali, invece, solo passivo.

### TRASPORTATORI E TRASPORTO ATTIVO DI MEMBRANA

Per molti aspetti i trasportatori ricordano gli enzimi con la differenza, però, che nei trasportatori il substrato non è modificato covalentemente ma viene consegnato immutato. Il trasportatore ha più siti di legame per il soluto e per permettere il trasferimento subisce dei cambiamenti conformazionali che lo rendono aperto su uno dei due lati della membrana o chiuso su entrambi i lati, ma mai aperto su entrambi i lati. Quando il trasportatore è saturo di substrato si raggiunge la velocità massima (V<sub>max</sub>) di trasporto che è tipica per i diversi trasportatori. Ogni trasportatore ha una sua costante di legame per il soluto (K<sub>m</sub>) che è la concentrazione del soluto quando la velocità di trasporto è ½ V<sub>max</sub>. Come per gli enzimi anche i trasportatori possono essere inibiti per inibizione competitiva e non competitiva.

Questo modello appena spiegato è valido anche per il trasporto attivo con alcune differenze. Il trasporto attivo è effettuato tramite tre modi principali:

- trasportatori accoppiati: imbrigliano l'energia immagazzinata nei gradienti di concentrazione per accoppiare il trasporto in salita di un soluto attraverso la membrana al trasporto in discesa di un altro;
- pompe alimentate da ATP: accoppiano il trasporto in salita all'idrolisi di ATP;
- pompe spinte dalla luce o da un potenziale redox.

Alcuni trasportatori mediano semplicemente il passaggio di un soluto da un lato della membrana all'altro e sono detti uniporti. Altri funzionano come trasportatori accoppiati, in cui il trasferimento di un soluto dipende strettamente dal trasporto di un secondo soluto. Il trasporto accoppiato comporta o il trasferimento simultaneo di un secondo soluto nella stessa direzione, eseguito da simporti oppure il trasferimento di un secondo soluto nella direzione opposta, eseguito da antiporti. In questi trasporti accoppiati l'energia libera rilasciata durante il movimento di, generalmente, uno ione inorganico lungo un gradiente elettrochimico viene usata come forza per pompare altri soluti in salita, contro il loro gradiente elettrochimico.  $\text{Na}^+$  è il tipico ione cotrasportato che entra nella cellula e poi pompato fuori da una pompa  $\text{Na}^+$  spinta da ATP. Questi trasportatori accoppiati spinti da ioni mediano un trasporto attivo secondario, mentre i trasportatori spinti da ATP mediano un trasporto attivo primario perché in questo caso l'energia libera dell'idrolisi dell'ATP è usata per spingere direttamente il trasporto di un soluto contro il suo gradiente di concentrazione. I trasportatori sono generalmente costituiti da fasci di 10 o più alfa-eliche che attraversano la membrana. I siti di legame per il soluto e gli ioni sono disposti a metà della membrana dove le eliche sono distorte e fungono da siti di legame. I trasportatori hanno quindi una conformazione aperta verso una delle due parti della membrana ed è concessa l'entrata del substrato e dello ione che lo "accompagna". Questi si legano all'interno del trasportatore ciò genera un cambiamento conformazionale che chiude il trasportatore da entrambe le parti cosicché lo ione e il substrato rimangano associati (altrimenti lo ione potrebbe arrivare dall'altra parte della membrana prima del substrato) e ciò garantisce al substrato di poter usare l'energia provvista dallo ione per arrivare dall'altra parte della membrana.

Analisi cristallografiche hanno rivelato che i trasportatori sono costituiti di ripetizioni invertite: l'impacchettamento delle alfa-eliche transmembrana in una delle metà del fascio di eliche è strutturalmente simile a quello dell'altra metà ma invertito. C'è quindi una pseudosimmetria che permette al trasportatore di lavorare e aprirsi da ambo i lati della membrana.

**RICORDA:** nei batteri il cotrasportatore principale è  $\text{H}^+$  e non  $\text{Na}^+$ .

Le pompe spinte da ATP sono anche chiamate ATPasi di trasporto e ne esistono tre classi principali:

- pompe di tipo P: sono proteine transmembrana a passaggi multipli e sono dette "P" perché si autoforforilano durante il ciclo di pompaggio;
- trasportatori ABC: pompano soprattutto piccole molecole attraverso le membrane cellulari;
- pompe di tipo V: sono proteine simili a turbine meccaniche, costituite da diverse subunità. Queste trasferiscono ioni  $\text{H}^+$  in organelli come i lisosomi per rendere l'ambiente acido.

Strutturalmente correlata alle pompe di tipo V è la famiglia distinta delle ATPasi di tipo F, comunemente chiamate ATP sintasi perché di norma agiscono al contrario: invece di usare

l'idrolisi di ATP per spingere il trasporto di  $H^+$ , usano il gradiente di  $H^+$  presente attraverso la membrana per spingere la formazione di ATP partendo da ADP e fosfato.

La concentrazione di  $K^+$  è in genere da 10 a 30 volte più alta dentro la cellula rispetto all'esterno, mentre per  $Na^+$  è vero l'opposto. Queste differenze di concentrazione sono mantenute da una pompa  $Na^+-K^+$ , o pompa ATPasi  $Na^+-K^+$ . Questa è una pompa appartenente alla famiglia delle ATPasi di tipo P e opera come antiporto spinto da ATP, pompando attivamente  $Na^+$  fuori dalla cellula contro il suo gradiente elettrochimico e pompando  $K^+$  all'interno. Il gradiente di  $Na^+$  generato da questa pompa è responsabile del trasporto della maggior parte dei nutrienti nelle cellule animali. Poiché la pompa  $Na^+-K^+$  spinge tre ioni carichi positivamente fuori dalla cellula per ogni due che ne pompa dentro, è elettrogenica; genera così una carica negativa all'interno della cellula.

Una prima interazione della proteina con gli ioni sodio rende possibile la fosforilazione mediante ATP di questa pompa, che cambia conformazione, libera sodio all'esterno e lega potassio. Il legame determina il distacco del fosforo, il che permette alla pompa di cambiare conformazione riaprendosi verso l'interno, dove libera ioni potassio.

**RICORDA:** la pompa sodio-potassio è cruciale per l'importo di glucosio nelle cellule epiteliali intestinali.

### I CANALI IONICI E LE PROPRIETA' ELETTRICHE DELLE MEMBRANE

La maggior parte delle proteine canale della membrana plasmatica delle cellule animali e vegetali che connettono il citosol all'esterno della cellula ha pori stretti e altamente selettivi che si possono aprire e chiudere rapidamente. Siccome queste proteine si occupano in particolare del trasporto di ioni inorganici, sono chiamate canali ionici (hanno il vantaggio, rispetto ai trasportatori, di mediare un trasporto molto più veloce).

**RICORDA:** i canali ionici mediano un trasporto che può essere unicamente passivo; permettono, infatti, il trasporto di ioni come  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  e  $Cl^-$  a seconda del loro gradiente elettrochimico.

Poiché le cellule sono costituite principalmente da acqua, il movimento di questa attraverso le membrane cellulari è fondamentale per la vita. La maggior parte delle membrane cellulari sono moderatamente permeabili all'acqua, questa quindi ha una diffusione diretta. Oltre alla diffusione diretta, però, l'acqua può attraversare il doppio strato lipidico tramite dei canali dell'acqua anche detti acquaporine (sono particolarmente abbondanti nelle cellule epiteliali del rene e le cellule esocrine). La struttura delle acquaporine rivela come avviene la risoluzione di un particolare problema: il trasporto deve essere selettivo per le molecole di acqua e non per gli ioni per evitare di distruggere i gradienti ionici attraverso le membrane. I canali hanno uno stretto poro che permette alle molecole di acqua di passare in fila indiana, seguendo il percorso degli ossigeni carbonilici che rivestono un lato del poro. l'altro lato è rivestito da amminoacidi idrofobici, quindi il poro risulta troppo stretto per il passaggio di ioni idratati e il processo di deidratazione sarebbe energeticamente sfavorevole data la presenza di amminoacidi idrofobici. Le acquaporine contengono due asparagine posizionate strategicamente, che si legano all'atomo di ossigeno della molecola centrale della fila di molecole d'acqua che attraversano il poro, imponendo una bipolarità all'intera colonna di molecole.

Due importanti proprietà distinguono i canali ionici dai semplici pori acquosi:

- in primis è presente una selettività ionica, cioè solo alcuni ioni possono passare attraverso il poro mentre altri no. Questo è dovuto alla grandezza del poro e gli ioni per passare devono liberarsi di tutte le molecole di acqua a loro legate, una volta fatto ciò gli ioni passano per la parte più stretta del canale detta filtro di selettività, che pone dei limiti alla velocità di passaggio (la velocità aumenta all'aumentare della concentrazione degli ioni finché non si stabilizza quando il canale è saturo).
- a differenza dei canali acquosi che sono sempre aperti, i canali ionici non sono sempre aperti. Sono muniti di un "cancello" che permette loro di aprirsi brevemente e quindi richiudersi (l'apertura è data da uno stimolo).

I principali tipi di stimolo sono: un cambiamento nel voltaggio attraverso la membrana, uno stress meccanico o l'attacco di un ligando che può essere o un mediatore extracellulare, come un neurotrasmettitore, o un mediatore intracellulare, come uno ione o un nucleotide. L'attività di molti canali ionici è anche regolata da un processo di fosforilazione e defosforilazione. I canali ionici sono responsabili dell'eccitabilità elettrica delle cellule muscolari e mediano la maggior parte delle forme di segnalazione elettrica nel sistema nervoso. I canali ionici che sono permeabili soprattutto a  $K^+$  si trovano sulla membrana plasmatica di quasi tutte le cellule. Un tipo importante di canali per il  $K^+$  si apre anche in una cellula non stimolata e viene talvolta chiamato canale che perde  $K^+$  ( $K^+$  leak channel). Questi servono a mantenere il potenziale di membrana attraverso tutte le membrane plasmatiche.

Un potenziale di membrana si forma quando c'è una differenza nella carica elettrica sui due lati di una membrana. Come spiegato in precedenza, la pompa  $Na^+-K^+$  aiuta a mantenere un equilibrio osmotico attraverso la membrana delle cellule animali mantenendo bassa la concentrazione intracellulare di  $Na^+$ . Poiché all'interno della cellula c'è poco  $Na^+$ , altri cationi devono essere abbondanti per bilanciare la carica portata dagli anioni fissi della cellula (le molecole organiche cariche negativamente confinate dentro la cellula). Questo ruolo di bilanciamento è svolto in gran parte da  $K^+$ , che pompato attivamente nella cellula dalla pompa  $Na^+-K^+$  e si può muovere liberamente dentro e fuori attraverso i canali che perdono  $K^+$  nella membrana plasmatica. A causa della presenza di questi canali,  $K^+$  raggiunge quasi l'equilibrio, in cui una forza elettrica esercitata da un eccesso di cariche negative che attraggono  $K^+$  dentro la cellula bilancia la tendenza di  $K^+$  di uscire fuori lungo il suo gradiente di concentrazione. Il potenziale di membrana è la manifestazione di questa forza elettrica e il suo valore all'equilibrio può essere calcolato in base alla ripidità del gradiente di concentrazione di  $K^+$ . La condizione di equilibrio, in cui non c'è flusso netto di ioni attraverso la membrana, definisce il potenziale di membrana a riposo per questa cellula idealizzata. Una formula semplice è l'equazione di Nernst che esprime quantitativamente la condizione di equilibrio (è un valore approssimativo perché la membrana non è attraversata solo da  $K^+$  e  $Cl^-$ ).

L'equazione di Nernst è

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

in cui

- $V$  = potenziale di equilibrio in volt  
(potenziale interno meno potenziale esterno)
- $C_o$  e  $C_i$  = concentrazione esterna e interna dello ione
- $R$  = costante dei gas ( $8,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
- $T$  = temperatura assoluta (K)
- $F$  = costante di Faraday ( $9,6 \times 10^4 \text{ J V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )
- $z$  = valenza (carica) dello ione
- $\ln$  = logaritmo in base e.

Il numero di ioni che si devono muovere attraverso la membrana plasmatica per stabilire il potenziale di membrana è molto basso. Se immaginiamo che venga spenta la pompa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  possiamo vedere come varia il potenziale di membrana. Immediatamente si ha una leggera diminuzione del potenziale di membrana (questo perché la pompa è elettrogenica). Lo spegnimento della pompa non annulla la componente principale del potenziale a riposo, che è generata dal meccanismo di equilibrio di  $\text{K}^+$ . Questa componente permane finché la concentrazione di  $\text{Na}^+$  dentro la cellula resta bassa e la concentrazione di  $\text{K}^+$  resta alta. Ma la membrana plasmatica è in parte permeabile a tutti i piccoli ioni, compreso  $\text{Na}^+$ . Perciò senza la pompa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  i gradienti ionici stabiliti dal pompaggio alla fine decadranno, e il potenziale di membrana stabilito dalla diffusione attraverso i canali che perdono  $\text{K}^+$  cadrà a sua volta. Non appena entra  $\text{Na}^+$  nella cellula si raggiunge un nuovo equilibrio con un potenziale di membrana inferiore rispetto a quello normale.

La membrana plasmatica di tutte le cellule eccitabili elettricamente contiene canali cationici regolati da voltaggio, che sono responsabili della generazione dei potenziali d'azione. Un potenziale d'azione è scatenato da una depolarizzazione della membrana plasmatica, cioè da uno spostamento del potenziale di membrana a un valore meno negativo. Nelle cellule nervose e del muscolo scheletrico uno stimolo che determina una depolarizzazione sufficiente causa prontamente l'apertura dei canali per il  $\text{Na}^+$  regolati da voltaggio, lasciando entrare una piccola quantità di  $\text{Na}^+$  nella cellula lungo il suo gradiente elettrochimico. Questo scatena un processo a feedback positivo che porta all'apertura di altri di questi canali per il  $\text{Na}^+$ , causando un aumento del potenziale di membrana. Questo processo viene bloccato, impedendo l'apertura di tutti i canali di questo tipo, tramite l'apertura di canali per il  $\text{K}^+$  regolati da voltaggio che ripristinano l'equilibrio e ristabiliscono il valore del potenziale di membrana. I canali per il  $\text{Na}^+$  dispongono di un meccanismo di inattivazione automatico, che fa richiudere rapidamente i canali anche se la membrana è ancora depolarizzata. I canali per il  $\text{Na}^+$  restano in questo stato inattivato, incapaci di riaprirsi, finché il potenziale di membrana non è ritornato al suo valore iniziale negativo. I canali per il  $\text{Na}^+$  possono perciò essere in tre stati distinti: chiusi, aperti e inattivati; questi cambiamenti contribuiscono all'innalzamento e alla diminuzione del potenziale d'azione.

**RICORDA:** il potenziale d'azione diffonde come un'onda dal sito iniziale di depolarizzazione coinvolgendo l'intera membrana plasmatica.