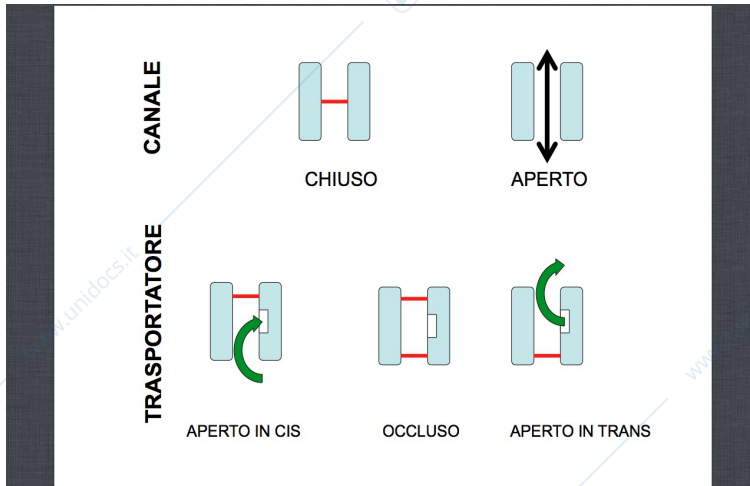


Trasporto molecolare o mediante trasportatori

Possiamo subito illustrare la differenza tra il passaggio di una molecola attraverso un canale e attraverso un trasportatore. Esaminando il canale, il suo stato dipende da quello dei suoi cancelli (in particolar modo nell'immagine sono rappresentati quelli di attivazione); esso risulta aperto se il cancello è aperto o chiuso se il cancello è chiuso. Se è aperto si viene a creare una comunicazione diretta tra i due lati considerati (ad esempio citoplasma e matrice extracellulare).



In un trasportatore abbiamo ugualmente dei cancelli, e tre differenti situazioni possibili, l'unica cosa che non avviene mai è l'apertura contemporanea dei due cancelli e una comunicazione diretta tra interno ed esterno. Nell'immagine chiamiamo i due cancelli cis e trans perché rispettivamente verso l'interno e verso l'esterno della membrana. Il primo caso riguarda un cancello aperto in cis e uno chiuso in trans, in una situazione del genere non c'è comunicazione diretta come nel canale. Il secondo caso riguarda i cancelli in cis ed in

trans che sono entrambi chiusi (stato occluso) così da non far avvenire alcuna comunicazione. Il terzo stato riguarda un cancello in cis chiuso e un cancello in trans aperto, e anche in questo caso non c'è comunicazione diretta.

Quindi riassumendo una prima importante differenza è che nei trasportatori non avviene comunicazione diretta tra un lato e l'altro. Una seconda importante differenza è che nel caso del trasportatore abbiamo una vera e propria interazione chimica, legame chimico, tra soluto e trasportatore, rappresentato da questa tasca che qui è inserita in una delle subunità del trasportatore, in grado di legare parte del soluto, questa interazione tra soluto e trasportatore è assimilabile all'interazione substrato-enzima. Queste sono le due principali differenze tra il meccanismo di funzionamento di un canale e quello di un trasportatore.

Altra importante differenza tra canale e trasportatore è che a parità di concentrazione, di gradiente di concentrazione, il trasporto di membrana è più efficiente rispetto a una semplice diffusione.

Quindi quando una cellula ha bisogno di trasportare velocemente un soluto incorpora nella sua membrana dei trasportatori, più efficienti.

Differenza fondamentale è che esistono trasportatori in grado di trasportare soluto contro gradiente, cosa che non è possibile con una diffusione, in questi casi si parla di trasporto attivo; il trasporto attivo necessita inoltre di energia chimica per poter avvenire.

I trasportatori hanno una specificità più o meno elevata, ad esempio i trasportatori del glucosio trasportano bene il D-glucosio ma non altrettanto bene l'L-glucosio anche se effettivamente le due molecole sono speculari e molto simili per ciò che riguarda la struttura (sono stereoisomeri).

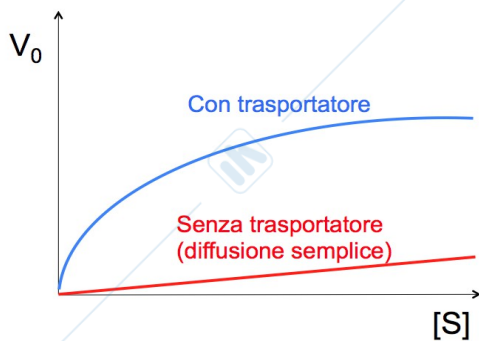
Questo indica l'elevata specificità di questi trasportatori.

Il fatto che il rapporto specifico soluto-trasportatore sia molto simile a quello tra substrato ed enzima fa sì che i meccanismi di trasporto mediante trasportatori seguono la stessa cinetica che seguono gli enzimi, che prende il nome di cinetica di Michaelis-Menten (o cinetica di saturazione).

Ovviamente quando parliamo di cinetica intendiamo una cinetica chimica, sempre determinata dal soluto che si attacca ad un sito del trasportatore detto "tasca". Nel trasportatore queste tasche o siti attivi possono essere inibite da sostanze chiamate inibitori mediante inibizione competitiva o non competitiva.

Ma consideriamo ora il caso della cinetica di Michaelis-Menten con questo grafico

Cinetica di trasporto



In cui V è la velocità con cui il trasportatore trasporta il soluto, espressa in moli/secondi, $[T]$ è la concentrazione del trasportatore nella membrana e $[S]$ è la concentrazione del soluto.

Ecco che se noi andiamo a considerare la semplice diffusione, quindi in assenza di un trasportatore, vale la

legge di Fick. In ogni caso V aumenta linearmente con la differenza di concentrazione. Dall'immagine infatti risulta evidente che nel caso di semplice diffusione se aumenta la concentrazione di S aumenta anche V linearmente, se invece il trasporto è mediato da un trasportatore, abbiamo una situazione differente. In quest'ultimo caso la curva descrive una regione in cui la velocità all'aumentare della concentrazione aumenta in maniera più evidente rispetto ad una semplice diffusione. Tuttavia a differenza della diffusione semplice la velocità con un trasportatore arriva ad un certo punto in cui tende asintoticamente ad un valore massimo, e non aumenta sempre allo stesso modo, per cui se aggiungo una grande quantità di soluto V non aumenta più, parliamo a questo proposito di saturazione.

K_m in questo caso è la costante di Michaelis-Menten e K che moltiplica T_0 può essere espresso con V_{max} , cioè la velocità massima

Altro appunto da fare è che la $[S]$ è espressa in moli/litro, proprio come la K_m (costante di Michaelis-Menten).

Equazione di Michaelis-Menten

$$V_0 = k \cdot [T_0] \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

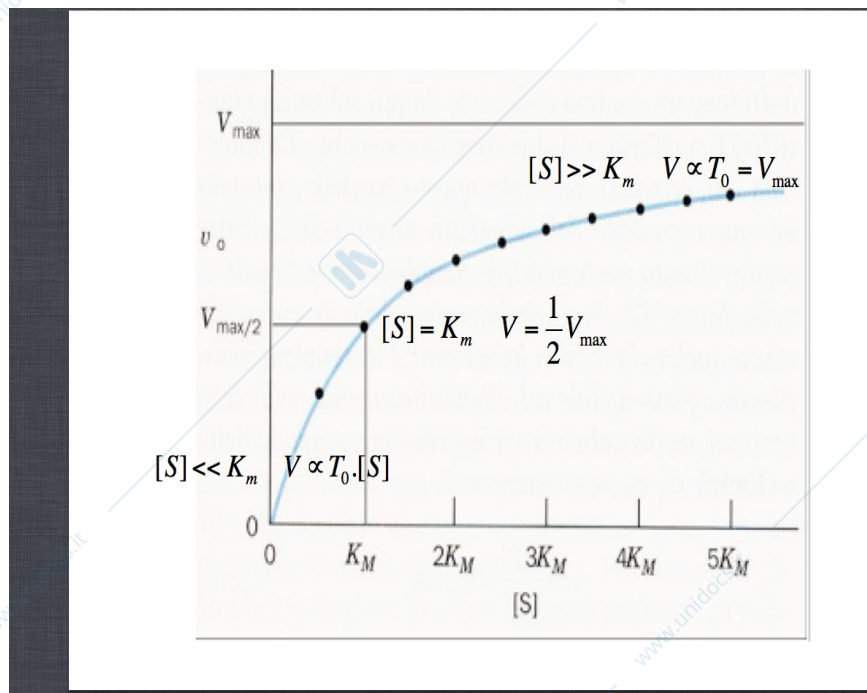
V = velocità di trasporto [moli.s⁻¹]

$[T_0]$ = concentrazione del trasportatore nella membrana

$[S]$ = concentrazione del soluto [moli.l⁻¹]

K_m = costante di Michaelis-Menten [moli.l⁻¹]

La seguente è invece un'analisi grafica dell'equazione di Michaelis-Menten:



Abbiamo indicato sull'ordinata il V_{max} e sull'ascissa la concentrazione del soluto, espressa non in mol/litro ma in termini di multiplo del K_m , è possibile fare questa operazione semplicemente perchè K_m e $[S]$ hanno la stessa unità di misura. Inoltre noi possiamo ricavare la K_m direttamente dall'equazione cinetica, infatti

quando $S = K_m$

il V_0 diventa $V_{max}/2$, e da ciò possiamo facilmente dedurre che la K_m è quella concentrazione di soluto tale che la velocità è la metà della velocità massima.

Questa proprietà è applicabile anche alla cinetica enzimatica e ricavabile sperimentalmente.

Considerando le concentrazioni di S molto inferiori al K_m , quindi $[S] \ll K_m$, la $[S]$ al denominatore dell'equazione può essere trascurata e otteniamo che la V è proporzionale alla $[T]$ (concentrazione del trasportatore) moltiplicata per $[S]$. Risulta evidente che se mi trovo in questa situazione posso modificare la velocità semplicemente alterando o la concentrazione del soluto o del trasportatore.

Viceversa se andiamo a concentrazioni di S molto maggiori alla K_m , $[S] \gg K_m$, la velocità tende asintoticamente al V_{max} , per questo in una situazione del genere variare la concentrazione del soluto fa variare di poco la velocità. L'unico modo per variare in maniera decisiva la velocità di trasporto è far variare la concentrazione del trasportatore $[T]$.

Voi mi chiederete di solito le cellule in che range della curva lavorano, questo dipende dal trasportatore, infatti ci sono dei trasportatori che lavorano fisiologicamente in un punto e altri in punti differenti.

Inibizione competitiva e non competitiva

L'argomento è molto interessante in quanto ha differenti applicazioni e può essere esteso anche all'utilizzo di farmaci che lavorano ad esempio per inibizione competitiva o non competitiva.

In generale un inibitore di un trasportatore fa sì che in sua presenza il trasportatore lavori in maniera meno efficiente, per cui a parità di concentrazione di soluto la velocità di trasporto è maggiore in assenza di un inibitore (l'inibitore riduce la velocità di trasporto).

Esistono due famiglie completamente diverse di inibitori: gli inibitori competitivi e non competitivi (o allosterici).

La differenza profonda che esiste tra le due famiglie è proprio a livello chimico. Nell'inibizione competitiva il trasportatore lega o l'inibitore o il soluto, non possono essere legati tutti e due contemporaneamente al trasportatore in quanto entrambi concorrono per la stessa tasca (come fosse un sedile, o ci sta seduta una persona o ci sta seduta un'altra). Nell'inibizione non competitiva o allosterica soluto ed inibitore possono essere legati contemporaneamente allo stesso trasportatore. La prima analogia semplice che può essere fatta è che in un treno dei passeggeri abusivi, senza

biglietto, (gli inibitori) occupano i posti dei passeggeri che hanno pagato, quindi il treno trasporta meno passeggeri regolari e la velocità di trasporto diminuisce, questo nel caso dell' inibizione competitiva. Nel caso di inibizione non competitiva invece i posti sono occupati da passeggeri regolari e dei passeggeri abusivi si attaccano dietro rallentando il treno, la velocità diminuisce. In entrambi i casi c'è una diminuzione della velocità di trasporto.

A livello di formule l' equazione di Michaelis-Menten subisce delle modifiche se è presente un inibitore.

Equazione di MM in presenza di inibitore competitivo

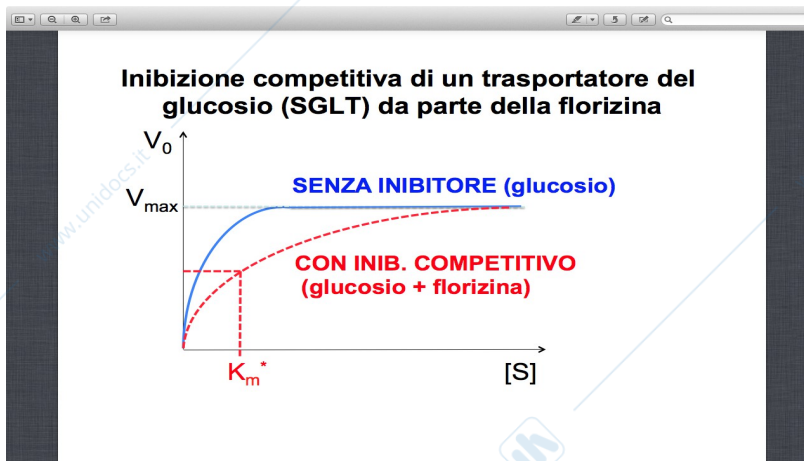
$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

K_m^*

$[I]$ = concentrazione dell'inibitore
 K_i = K_m costante dell'inibitore

Nell' inibizione competitiva viene modificato il K_m e lasciato inalterato il V_{\max} . Si parla di K_m^* o K_m apparente, cioè $K_m \cdot (1 + [I]/K_i)$, in cui $[I]$ è la concentrazione dell' inibitore e K_i è il K_m dell'inibitore.

Nel seguente grafico è evidente che senza inibitore avremmo la solita cinetica di Michaelis-Menten, mentre con l'inibitore competitivo il valore del K_m è aumentato, mentre il V_{\max} è rimasto invariato.



Esempio rilevante è il trasporto del glucosio, il cui inibitore è la florizina; risulta subito evidente che gli inibitori hanno conformazione chimica molto simile a quella dei soluti, la florizina infatti ha struttura molto simile a quella del glucosio.

La florizina è una sostanza utilizzata sperimentalmente per indurre diabete, ad esempio negli animali. Il diabete è poi

diagnosticabile tramite iperglicemia (elevata concentrazione di glucosio nel sangue) e glucosuria (presenza di glucosio nelle urine). Se ad esempio diamo florizina ad un topo quest'ultimo manifesterà iperglicemia e glucosuria, così saremo certi che il topo è malato di diabete e potremmo studiare eventuali cure alla malattia con esperimenti vari.

La florizina genera iperglicemia e glucosuria poiché inibisce competitivamente il trasporto del glucosio dal sangue ai tessuti e del glucosio dal lume del tubulo al sangue a livello renale.

Tutto questo discorso ci fa anche comprendere che se voglio vincere l'inibizione competitiva mi basta aumentare la concentrazione del soluto, tornando al grafico noto che aumentando $[S]$ aumento l'efficienza del trasportatore.

Esempi clinicamente importanti dell'inibizione competitiva sono l'inibizione competitiva del trasporto di Iodio radioattivo da parte di Iodio naturale (si da iodio naturale per ridurre l'assorbimento di iodio radioattivo a persone sottoposte a radiazioni), Inibizione dell'assorbimento della Levodopa da parte di aminoacidi (per il Parkinson la levodopa viene somministrata lontano dai pasti per evitare che competa con gli aminoacidi a livello di assorbimento perdendo di fatto il suo effetto), Inibizione competitiva del SGLT da parte della florizina o Aminoaciduria di origine genetica. Infine interessante è il caso di iperargininemia in cui un aminoacido presente ad alte concentrazioni inibisce il trasporto di altri, il risultato è un' aumentata escrezione urinaria di arginina per saturazione del trasportatore renale e inibizione competitiva del riassorbimento di altri aminoacidi dello stesso gruppo (lisina, ornitina), che porta quindi ad un' aumentata escrezione renale non solo di arginina ma anche di lisina e ornitina, con struttura molto simile all'arginina e per questo trasportati dallo stesso trasportatore. Per rilevare questo ci serviamo sempre della cinetica di Michaelis-Menten.

Nell'inibizione non competitiva l' equazione di Michaelis-Menten è modificata in senso opposto:

$$V = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

V_{\max}^*

Il K_m risulta essere inalterato, mentre il V_{\max} è diminuito; infatti il $V_{\max} = (V_{\max}/1 + [I]/K_i)$.

Dal grafico si può osservare come cambia l'equazione cinetica, dove V_{\max} è diminuito ma il K_m è inalterato. In questo caso aumentare la concentrazione di S non mi permette di vincere l'inibizione, l'unico modo per vincerla è eliminare l'inibitore. Ad esempio se una persona ha ingerito un veleno che agisce da inibitore competitivo ci

basta aumentare la concentrazione del soluto che quest'ultimo inibisce per risolvere la situazione, se invece ha ingerito un inibitore non competitivo l'unico modo per salvare la persona è fargli espellere il veleno o per via orale o con un diuretico o per dialisi.

L'esempio più rilevante di inibitore non competitivo è quello della ATPasi sodio e potassio dipendente da parte di varie sostanze tra cui la più conosciuta è la uabaina, o anche i glicosidi cardiaci.

Trasporto attivo

Adesso le considerazioni slittano dall'ambito della cinetica ad un ambito che potremmo definire più vicino alla termodinamica, in quanto le considerazioni sono fatte da un punto di vista prettamente energetico.

Nel trasporto attivo un soluto è trasportato contro gradiente chimico, cosa che in una diffusione semplice risulta impossibile; questo tipo di trasporto proprio perché non può avvenire spontaneamente ha bisogno di energia, sotto forma di ATP.

Un esempio è la pompa di H^+ in grado di trasportare idrogenioni nel lume dello stomaco acidificandolo e facendo abbassare il Ph, portando $[H^+]$ a $10^{-1.5}$.

Il trasporto attivo si suddivide a sua volta in trasporto attivo primario e trasporto attivo secondario.

Nel trasporto attivo primario i trasportatori utilizzano direttamente ATP, scindono ATP come fonte di energia

Nel trasporto attivo secondario non viene utilizzata direttamente ATP come fonte di energia, ma un

gradiente ionico, elettrochimico (generalmente un gradiente di ioni sodio)

I trasportatori primari, anche dette ATPasi, sono delle vere e proprie Pompe Ioniche.

Tra le pompe ioniche la più nota è la pompa sodio-potassio, ma anche la pompa del calcio o le pompe protoniche.

L'immagine fa vedere che le ATPasi sono sì un grande consumatore di ATP ma una di queste differisce e al contrario sintetizza ATP (è un' ATP sintetasi che sintetizza ATP).

Distinguiamo inoltre diverse famiglie di queste pompe. Una è chiamata E1/E2, un'altra F0/F1, la terza è detta V.

Esempi delle pompe E1/E2 sono quella sodio-potassio che trasporta fuori dalla cellula sodio e dentro la cellula potassio (anche se la concentrazione di K è più alta dentro la cellula), che agisce sinergicamente con la pompa E1/E2 di idrogenioni H⁺ e potassio, in grado di trasportare nella cellula potassio e fuori dalla cellula ioni H⁺. Infine altra pompa E1/E2 è quella calcio, che invece trasporta un solo ione, quello calcio dall' interno all'esterno (sempre contro gradiente).

Esiste anche una pompa calcio a livello del reticolo sarcoplasmatico (della famiglia E1/E2) che "sequestra" calcio al citoplasma per accumularlo all'interno del reticolo endoplasmatico.

Della famiglia delle pompe V abbiamo la pompa vescicolare, una pompa protonica che trasporta H⁺ all'interno delle vescicole o dei vacuoli acidificandoli (serve ad esempio per acidificare l'interno dei lisosomi). Tutte queste sono delle ATPasi, che quindi consumano ATP, ma ,dato che occorre anche produrre ATP, esiste una pompa che agisce da ATP sintetasi (sintetizza ATP). Quest'ultima sfrutta il gradiente di idrogenioni per produrre energia, ed appartiene alla famiglia delle pompe F0/F1.

