

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

LECTOR DOCTOR
RADU MEȘTER

BIOLOGIE CELULARĂ

PARTEA I

MEMBRANA PLASMATICĂ CELULARĂ

BUCUREȘTI
— 1979 —



BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
București

Cota III 461140.

Inventar 794931

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

Lector dr. RADU MESTER

BIOLOGIE CELULARA

PARTEA I

MEMBRANA PLASMATICA CELULARA

București
- 1979 -



Biblioteca Centrală Universitară
București
Cota _____
Inventar _____ 23

C. I. R.

Biblioteca Centrală Universitară
BUCUREȘTI
Cota " 461140
Inventar 794 931

CUPRINS

	<u>pag.</u>
INTRODUCERE	7
1. Compoziția chimică a membranelor	11
1.1. Compoziția în lipide a membranelor	12
1.1.1. Fosfogliceridele	13
1.1.2. Sfingolipidele	24
1.1.3. Colesterolul	31
1.2. Compoziția în acizi grași a lipidelor din membranele celulare	32
2. Organizarea lipidelor în structuri de membrană	35
2.1. Natura solventului	36
2.2. Structura amfipolară a lipidelor	37
2.3. Influența temperaturii	43
2.4. Mișcările lipidelor în struc- turile de membrană	46
2.5. Topografia fosfolipidelor din mem- branele plasmatice	47
2.6. Rolul colesterolului	50
3. Proteinele din membranele plasmatice celulare	52
3.1. Noțiuni introductive	52
3.2. Topografia proteinelor din membranele plasmatice	53
3.3. Dispoziția topografică a unei pro- teine majore, purificate din mem- brana plasmatică	58
3.4. Compoziția enzimatică a membranelor plasmatice	60
4. Relațiile dintre proteine și lipide	63
4.1. Caracterizare	63
4.2. Relațiile Na^+ , K^+ -ATP-azei cu fosfo- lipidele din membrane	65

4.3. Relațiile dintre lipide și ferocitro-	65
cromul c.	
4.4. Interrelațiile dintre polipeptide	67
sintetice și fosfolipide	
4.5. Rodopsina în membrana plasmatică	67
5. Glicoproteinele din membranele plasmaticice	69
5.1. Caracterizare	69
5.2. Glicoforina	71
5.3. Alte glicoproteine	73
5.4. Fibronectina	74
5.5. Glicoziltransferazele din membrana plas-	75
matică	
5.6. Glicoproteinele, glicolipidele și ciclul	80
celular	
5.7. Rolul glicoproteinelor în cooperarea in-	81
tercelulară	
5.8. Structuri secundare în corelație cu mem-	82
brana plasmatică	
6. Organizarea membranelor plasmaticice celulare	89
6.1. Conceptul actual al organizării membra-	89
nelor	
6.2. Acțiunea anestezicilor asupra organi-	91
zării membranelor	
6.3. Natura receptorilor din membranele plas-	93
maticice	
6.4. Specificitatea receptorilor din membrane	95
6.5. Distribuția și topografia receptorilor	96
în membrane	
6.6. Mobilitatea receptorilor în membranele	98
plasmaticice	
6.6.1. Mobilitatea receptorilor în	103
membrana eritrocitului	
6.6.2. Mobilitatea unor receptori în	105
membrana mastocitului	
6.6.3. Mobilitatea receptorilor anti-	106
genici	
7. Receptorii imunologici din membranele plas-	108
maticice celulare	
7.1. Receptorii antigenici de grup sanguin	113
7.2. Receptorii membranei plasmaticice în	114
cursul diferențierii	
8. Receptorii colinergici și adrenergici din	117
membranele plasmaticice	
8.1. Caracterizare	117
8.2. Receptorii colinergici	119
8.3. Natura receptorilor colinergici	122
8.4. Acetilcolinesteraza	125

	<u>PAG.</u>
8.5. Receptorii adrenergici	127
8.6. Receptori pentru serotonină	131
8.7. Receptori pentru acidul gama amino- butiric	132
9. Receptorii hormonali din membranele plas- matice	134
9.1. Caracterizare	134
9.2. Adenilatciclaza	134
9.3. Fosfodiesteraza	139
9.4. Guanilatciclaza	140
9.5. Particularitățile de acțiune ale nucleo- tidelor ciclice	141
9.6. Receptorii pentru hormonul adreno- corticotrop	143
9.7. Receptorii pentru insulină	144
9.8. Mecanismul de acțiune al hormonilor	145
10. Permeabilitatea membranelor plasmatiche	148
10.1. Considerații generale	148
10.2. Modalitățile de transport prin membra- nele plasmatiche	152
10.3. Difuzia prin membranele plasmatiche	152
10.4. Difuzia facilitată	156
10.5. Mecanismele difuziei facilitate	160
11. Difuzia facilitată în prezența peptidelor ionofore	165
11.1. Valinomicina	166
11.2. Gramicidina	168
11.3. Alte antibiotice cu proprietăți ionofore în membrane	170
11.4. Importanța lor biologică	171
12. Transportul activ prin membranele plasmatiche	176
12.1. Caracterizare	176
12.2. Na^+ , K^+ -ATP-aza (adenozintrifosfataza) din membranele plasmatiche	179
12.3. Particularitățile de transport prin membranele plasmatiche ale celulelor epiteliale	187
12.4. Mecanismele de control	192
13. Genetica transportului prin membranele plas- matice	195
14. Interrelațiile dintre ioni de calciu și mem- brana plasmatică	200
BIBLIOGRAFIE	205

INTRODUCERE

Orice tip de celulă, indiferent de gradul ei de ierarhizare în lumea vie (bacterii, plante sau organisme animale unicelulare până la om inclusiv) se caracterizează printr-o serie de particularități morfologice și funcționale. În lumea vie extrem de heterogenă, nu se poate descrie o celulă "tip", adică o celulă care prin particularitățile sale să fie comună tuturor celulelor. La aceasta se adaugă și faptul că chiar aceeași celulă suferă în cursul dezvoltării sale o serie de modificări, consecința unui proces de evoluție și cooperare intercelulară și a acțiunii factorilor de mediu.

Orice celulă se caracterizează printr-o anumită organizare, ce poate fi privită sub aspect morfologic (structural sau ultrastructural), funcțional, molecular, în timp și spațiu, sistematic, etc. Pentru a putea descifra însă organizarea morfo-funcțională a celulelor, trebuie să cunoaștem natura moleculelor care participă în formarea structurilor, interrelațiile ce se stabilesc între molecule în cadrul unei structuri celulare date, dinamica organizării componentelor de membrană, organizarea receptorilor din membranele celulare, și altele.

Dintre numeroșii factori ce cooperează în procesul foarte complex al organizării structurilor de membrană, un rol deosebit îl joacă natura chimică a membranelor. Orice celulă din lumea vie se caracterizează prin prezența unei membrane plasmactice celulare, care delimitează celula și îi conferă anumite particularități morfologice. Membrana plasmatică a fiecărei celule este expresia interrelațiilor dintre informație (DNA) și metabolismul celular. În același timp, membrana plasmatică poate fi apreciată ca fiind expresia fenotipică a codului genetic, prin care celulele realizează cooperarea cu mediul înconjurător. Cu toate că organizarea membranelor celulare apare specifică fiecărui tip de celulă, s-au descris numeroase caracteristici, comune tuturor celulelor din lumea vie.

În afara membranelor plasmatice și în strînsă interdependență cu ele, toate celulele prezintă membrane citoplasmatiche, a căror organizare depinde de tipul celular. Membranele citoplasmatiche formează în celule diverse organite (mitocondrii, aparatul Golgi, lizozomi, peroxizomi, etc.), care compartimentalizează celula din punct de vedere structural și funcțional. De asemenea, membranele citoplasmatiche separă în spațiu și timp numeroasele procese metabolice intracelulare și asigură reînnoirea permanentă a membranelor plasmatice. Compartimentalizarea în spațiu definește separarea preferențială a unor căi metabolice, în anumite structuri intracelulare. Separarea diverselor procese biochimice intracelulare (aproximativ 2000 de reacții enzimatiche care se pot desfășura simultan într-o celulă) este realizată prin distribuția deosebită a enzimelor în organitele celulare și prin topografia asimetrică a unor molecule funcționale, localizate pe structurile de membrană. Ultimul aspect favorizează desfășurarea vectorială a unor reacții enzimatiche, ceea ce permite separarea substratelor și produșilor de metabolism pe cele două fețe ale membranei.

Membranele celulare realizează de asemenea, și o separare în "timp" (temporală) a unor procese biochimice. Astfel, accesibilitatea unor produși metabolici comuni pentru mai multe căi metabolice, depinde de capacitatea membranelor de a permite trecerea lor dintr-un compartiment intracelular în altul. De aceea, viteza unei reacții biochimice intracelulare dintr-o cale metabolică, depinde de viteza de difuzie (sau transport) a metabolitului prin membrană. Posibilitatea de trecere a moleculelor prin membranele plasmatice și citoplasmatiche (de la o structură la alta) este condiționată de compoziția chimică și organizarea moleculară a fiecărei membrane, este controlată genetic și influențată de sistemul nervos, glandele cu secreție internă și numeroși factori de mediu.

Structurile de membrană coordonează prin mecanisme variate activitatea a numeroase enzime și a altor molecule funcționale. Proprietățile enzimelor fixate de membrane, depind de: natura chimică a dublului strat lipidic, densitatea de suprafață a sarcinilor electrice, interrelațiile enzimei cu alte componente din membrană, starea de fază a fosfolipidelor din membrană, etc. Lipidele din structurile de membrană participă în fixarea proteinelor în membrană, crează micromedii hidrofobe pentru proteine, participă la orientarea proteinelor în membrane, formează cu proteinele complexe moleculare dinamice, controlează funcția catalitică a unor enzime din membrane, ș.a. Trebuie să precizăm de asemenea, că recepționarea semnalelor din mediu de către celule, cooperarea intercelulară și desfășurarea unor procese imunitare, sînt expresii

funcționale celulare complexe în care membranele plasmatică joacă un rol important.

Toate aceste aspecte, și multe altele (care vor fi analizate parțial în paginile manualului), au creat premisele dezvoltării impetuoase a cercetării membranelor celulare. În ultimii ani, concepțiile noastre asupra organizării membranelor celulare au evoluat foarte mult și asistăm la o adevărată "explozie" de informație în acest domeniu. Aș aminti în acest sens că în ultimii 10 ani au apărut sute de cărți și monografii despre membrane, în afara sutelor de mii de articole care apar în publicațiile științifice de specialitate. De aceea, manualul nu a putut cuprinde toate aspectele legate de procesele morfo-funcționale ale membranelor celulare. Chiar și problemele luate în discuție, au fost tratate cât mai succint posibil. Pentru fiecare capitol există cărți și monografii și mii de articole de specialitate. S-a urmărit o prezentare analitică și selectivă a datelor din literatură, pe baza noilor concepții asupra membranei.

Îmi exprim speranța că elementele introductive cuprinse în acest manual, adresat în primul rând studenților, vor contribui la formarea unor absolvenți capabili să răspundă adecvat cerințelor dezvoltării științifice și sociale din țara noastră.

1. COMPOZITIA CHIMICA A MEMBRANELOR

Cunoștințele noastre asupra organizării moleculare și a compoziției chimice a membranelor celulare au evoluat în paralel cu posibilitățile de folosire a unor tehnici rafinate de cercetare și analiză a moleculelor componente. Deși compoziția chimică a membranelor nu este foarte bine cunoscută, și se referă numai la câteva categorii de membrane de la principalele tipuri de celule, totuși putem discuta și analiza particularitățile constituenților chimici și rolul lor funcțional.

Cu toate că lumea vie prezintă o mare varietate de organizare morfologică și funcțională, toate membranele celulare (plasmatică și citoplasmatică) sînt alcătuite din două clase majore de substanțe, și anume din proteine și lipide. Acestea reprezintă "cărămizile" de bază în formarea structurilor de membrană. În afara lor, în alcătuirea membranelor se descriu și alți compuși (glicoproteine, lipoproteine și glicolipide), a căror conținut în membrane este mult inferior lipidelor și proteinelor.

Pentru a avea o imagine generală asupra raporturilor procesuale a principalilor compuși ce iau parte la alcătuirea membranelor, prezentăm câteva date comparative (Tabelul 1). După cum se poate observa, membranele diferitelor tipuri de celule pot fi grupate în mai multe categorii: bogate în lipide (membrana mielinică), bogate în proteine (membrana plasmatică bacteriană, membrana internă a mitocondriilor) și numeroase membrane cu compoziții variabile. Cantitatea de glucide din membrane este relativ mică și nu depășește 1%. De fapt, glucidele intră în alcătuirea unor constituenți deosebit de importanți în funcțiile de recepție și imunitate (glicoproteine și glicolipide).

Tabelul 1 - Compoziția chimică a unor membrane

Tip de membrană	Proteine %	Lipide %	Glucide %	Raport P/L
Mielina	18	79	3	0,23
Membrana plasmatică				
- a eritrocitului uman	49	43	8	1,10
- a hepatocitului de șoarece	46	54	2-4	0,85
- a hepatocitului de șobolan	58	42	2-10	1,40
- a amoebei	54	42	4	1,30
- a celulei retiniene de bou	51	49	4	1,00
Membrana externă mitocondrie	52	48	2-4	1,10
Membrana internă mitocondrie	76	24	1-2	3,20
Reticul endoplasmic	67	33	-	2,00
Bacterii Gram-pozitive	75	25	10	3,00
Halobacterium	75	25	-	3,00

Compoziția chimică este heterogenă și reflectă particularitățile morfo-funcționale ale fiecărui tip de membrană. De exemplu, în membranele plasmatice ale celulelor epiteliale intestinale și renale, din cantitatea totală de lipide (46%), aproape jumătate este formată din sfingolipide (Sacktor, 1977). Chiar și în cadrul aceluiași tip de celulă, se descriu variații extrem de mari de compoziție chimică în funcție de specie, starea fiziologică, influența factorilor de mediu, ș.a. Astfel, conținutul în lipide din membrana celulelor neuronale variază în limite largi, între 24% și 76%, pentru creierul de șobolan, iepure, porc și om (Strichartz, 1977). Deosebiri mari de compoziție chimică apar între membranele plasmatice ale nervilor mielinizați și ale celor nemielinizați. Interrelațiile specifice și selective dintre lipide și proteine asigură cadrul morfo-funcțional de exprimare a particularităților fiecărui tip de celulă.

1.1. Compoziția în lipide a membranelor celulare.

Lipidele reprezintă o clasă însemnată de compuși, care intră în structura membranelor celulare (plasmatice și citoplasmatic). Ele stau la baza exprimării unor funcții biologice ale celulelor: asigură organizarea membranelor celulare, participă în mecanismele de recunoaștere dintre celule, exprimă o serie de specificități imunitare ale celulelor, formează compuși cu proteinele și glucidele cu funcții

receptoare și metabolice extrem de complexe și variate.

Pentru a putea face analiza lipidelor din membranele celulare, am adoptat clasificarea propusă de Lehninger (1975) bazată pe structura scheletului lor de carbon. Astfel, se deosebesc lipide complexe ce cuprind acilgliceroli (gliceride sau grăsimi neutre), fosfogliceride, sfingolipide și ceruri. Lipidele simple (nu conțin acizi grași) includ steroizii, prostaglandinele și terpenele.

In structura membranelor celulare s-au identificat numeroase tipuri de fosfogliceride și sfinbolipide, care sînt cunoscute și sub denumirea de lipide polare. Dintre lipidele simple, cel mai răspîdit compus al membranelor celulare este colesterolul, steroid important în compoziția membranelor plasmatiche animale.

1.1.1. Fosfogliceridele. Fosfogliceridele sau glicerofosfatidele sînt o clasă de lipide complexe, ce au ca precursor acidul glicerol-3-fosforic. Ele se mai numesc fosfolipide sau fosfatide, denumiri improprii d.p.d.v. științific, dar larg folosite de diverși autori. Fosfogliceridele prezintă o configurație sterică, deoarece unul din atomii de carbon (C_2) al glicerofosfatului este asimetric. De aceea s-a decis precizarea stereochemică a derivaților fosfoglicerolului, printr-o nu-

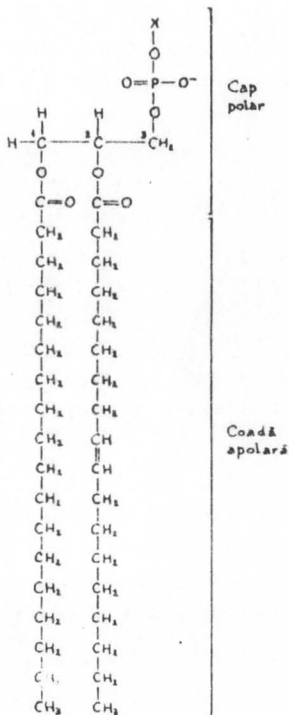


Fig.1. Structura chimică generală a fosfogliceridelor. Gruparea X poate fi ocupată de diverși alcooli secundari. Se evidențiază și amfipolaritatea fosfogliceridelor.

merotare stereospecifică a atomilor de carbon. La primul și al doilea atom de carbon (C_1 și C_2), cele două grupări hidroxilice ale glicero-fosfatului sînt esterificate cu doi acizi grași (R_1 și R_2), iar acidul fosforic poate fi esterificat de către un alcool secundar ($X-OH$). Într-o formă generală, structura chimică a fosfogliceridelor este redată în figura 1.

Variațiile de structură chimică ale fosfogliceridelor privesc compoziția în acizi grași (R_1 și R_2) și natura alcoolului secundar de la C_3 (X). Diferitele tipuri de fosfogliceride se deosebesc prin forma lor, polaritatea, încărcarea electrică și compoziția în acizi grași din regiunea hidrofobă. În membranele celulare (plasmatică și citoplasmatică), cele mai importante fosfogliceride sînt:

- acidul fosfatidic, care la C_3 are numai un rest de acid fosforic. Este considerat cel mai simplu fosfoglicerid. S-a identificat în cantități mici în unele membrane plasmatică și a fost apreciat ca intermediar metabolic necesar biosintezei altor tipuri de fosfogliceride.

- fosfatidilcolina, conține ca grupare X aminoalcoolul colina. Denumirea veche a acestui fosfoglicerid era de lecitină. Fosfatidilcolina prezintă regiunea hidrofila cu sarcini electrice pozitive și negative și la pH 7,0 este electroneutră (fig.2).

- fosfatidiletanolamina (etanolaminfosfoglicerid) are ca grupare X aminoalcoolul etanolamina. Denumirea veche a acestui fosfoglicerid era de cefalină. Este un fosfoglicerid major al membranelor celulare. Regiunea hidrofila prezintă sarcini electrice pozitive și negative și la pH 7,0 este electroneutră (fig.3).

- fosfatidilserina conține ca grupare X aminoacidul serina, ce conferă fosfogliceridului o încărcare electrică electronegativă netă a regiunii hidrofile (fig.4).

- fosfatidilinozitolul are ca grupare X hexa-alcoolul ciclic inozitolul și prezintă o încărcare electrică electronegativă determinată de restul fosforil (fig.5).

- cardiolipina (difosfatidilglicerolul) conține trei resturi de glicerol, unite între ele prin punți fosfodiester. Grupările periferice ale celor două resturi de glicerol (hidroxilice) sînt esterificate cu acizi grași. Cardiolipina este un fosfoglicerid cu regiunea hidrofila puternic electronegativă (resturile fosforil) și reprezintă un constituent al membranelor mitochondriale interne. Structura chimică a cardiolipinei este redată în figura 6, iar modelul molecular în figura 9 A.

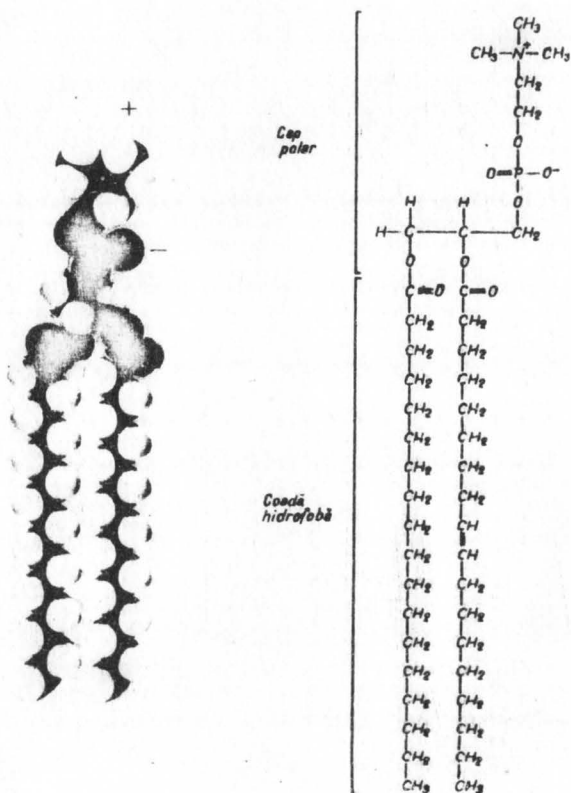


Fig.2. Structura chimică și modelul molecular al fosfatidilcolinei, glicerolipid major din numeroase membrane celulare.

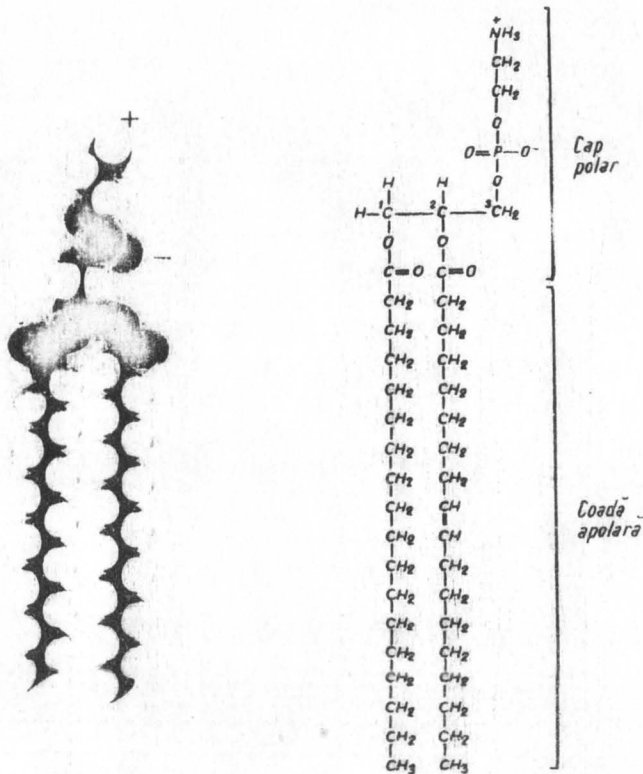


Fig.3. Structura chimică și modelul molecular al fosfatidiletanolaminei, glicerolipid ce intră în alcătuirea membranelor celulare (plasmactice și citoplasmactice).

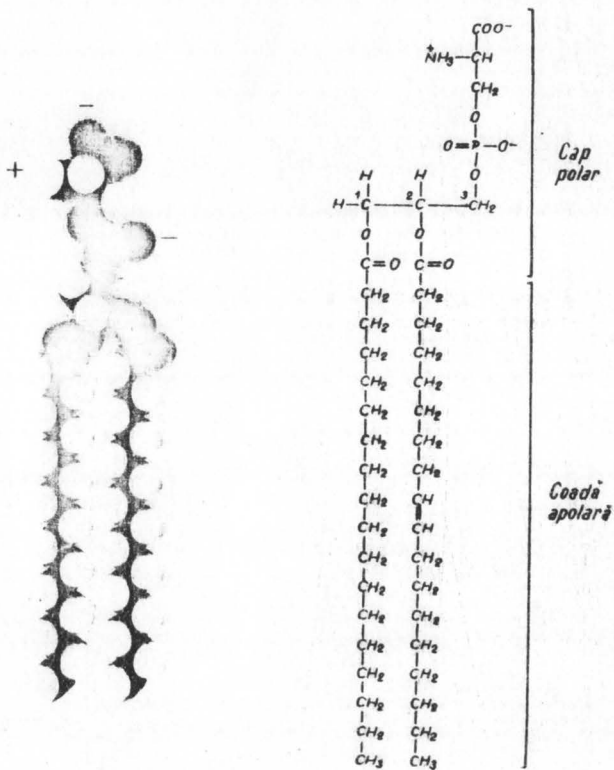


Fig.4. Structura chimică și modelul molecular al fosfatidilserinei.



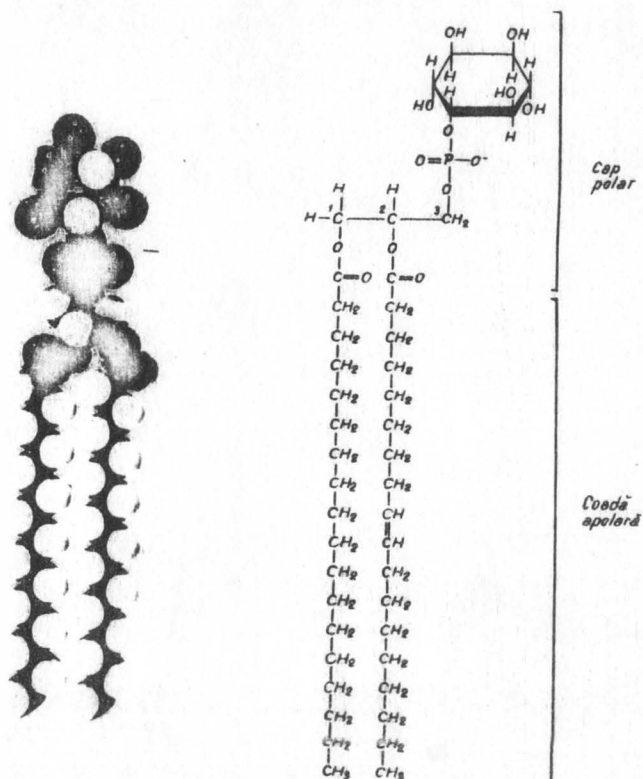


Fig.5. Structura chimică și modelul molecular al fosfatidilinozitolului (monofosfatidilinozitolul).

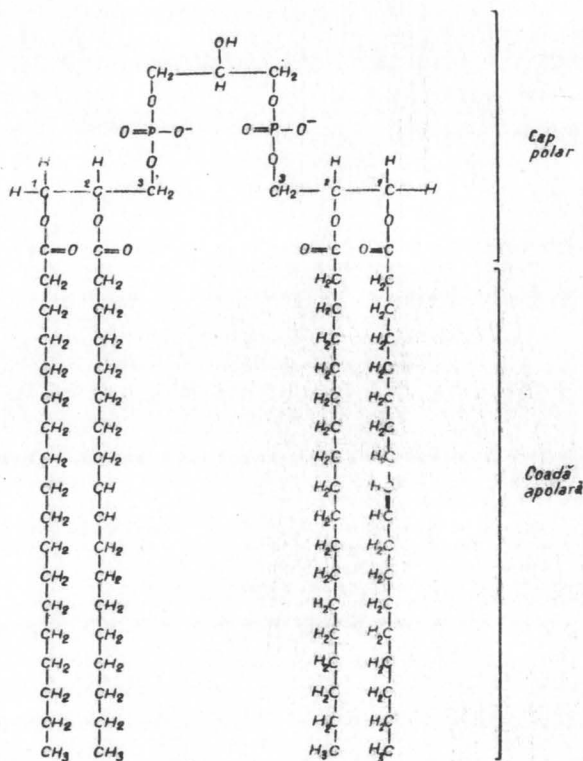


Fig.6. Structura chimică a difosfatidilglicerolului (cardiolipina), component chimic al unor membrane citoplasmatiche celulare.

În afara acestor fosfogliceride, în diverse tipuri de membrane celulare s-au descris și alte lipide: fosfatidilglicerolul, lizilfosfatidilglicerolul și glucosfosfogliceride. Acestea din urmă apar în membranele celulare ale plantelor și bacteriilor.

Plasmalogenele sînt compuși fosfoglicerici, care se deosebesc prin natura regiunii hidrofobe. La acestea, unul din acizii grași este înlocuit de un lanț alifatic, fixat de glicerol prin legătură esterică α, β -nesaturată. În regiunea polară s-au descris mai mulți alcooli deosebiți (cel mai frecvent etanolamina). Plasmalogenele se găsesc în cantități mari în membranele plasmatice ale celulelor nervoase și musculare.

Considerații generale asupra fosfogliceridelor din membranele celulare. În membranele plasmactice celulare s-au descris un număr restrâns de fosfogliceride. După cum se poate observa din tabelul 2, fosfogliceridele din membranele celulare se caracterizează printr-o mare diversitate de conținut și raporturi procentuale între componente. În general, se consideră că fiecare tip de membrană prezintă un conținut caracteristic în fosfogliceride. De obicei, membranele plasmactice sînt mai bogate în sfingomieline și colesterol, în comparație cu membranele citoplasmactice (Nes, 1974; Zambrano și col. 1975).

Pentru multe membrane plasmactice celulare, fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina sînt considerate fosfogliceride majore (pot reprezenta pînă la 70% din cantitatea totală de fosfogliceride). Aceasta nu poate constitui o regulă generală. În cazul membranei eritrocitare a ierbivorelor, fosfatidilcolina de obicei lipsește și este înlocuită cu sfingomielina. De asemenea, raporturile procentuale dintre fosfatidilcolină și sfingomielină sînt deosebite în membranele eritrocitare de la diverse specii de mamifere (Bretscher, 1973).

O serie de fosfogliceride apar în cantități mai mari în unele membrane citoplasmactice. Astfel, fosfatidilglicerolul, difosfatidilglicerolul și cardiolipina se găsesc în cantități mari în membranele ce efectuează conversia energiei și asigură transportul de electroni.

Fosfogliceridele sînt lipide polare ce prezintă o regiune ce poartă sarcini electrice, denumită cap polar sau regiune hidrofilă, și o porțiune ce nu are sarcini electrice, cunoscută popular sub numele de "coadă" apolară (regiune lipofilă sau hidrofobă). Amfipolaritatea fosfogliceridelor este rezultatul juxtapunerii în aceeași moleculă a capului polar hidrofil și a cozii apolare și hidrofobe. Acest caracter mixt conferă lipidelor proprietăți structurale particulare prin dispersia lor în apă. Variația structurală a regiunii hidrofile a moleculelor de fosfogliceride este relativ mică. De aceea, numărul variantelor structurale în membrane, prin combinarea diferitelor fosfogliceride este destul de restrîns. În schimb, regiunea hidrofobă a fosfogliceridelor prezintă variații structurale foarte mari, datorită existenței unor acizi grași deosebiți.

În membranele celulare, în afara acestor fosfogliceride, s-au identificat și lipide simple (mono-, di- și trigliceride), acizi grași liberi (pînă la 10%) și lisofosfogliceride. Cantitatea de lisoderivați este variabilă în diverse tipuri de membrane, iar rolul lor puțin elucidat. Probabil că aceștia reprezintă intermediari metabolici ai sintezei fosfogliceridelor din membrane. În concentrații mari, lisoderivații produc liza membranelor celulare.

Tabelul 2 - Conținutul în fosfolipide al unor membrane plasmatiche de la mamifere (în %)

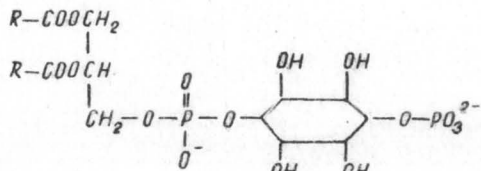
Tip de membrană	Fosfatidil colina	Fosfatidil etanolamina	Fosfatidil serina	Fosfatidil inozitol	Sfingo- mielina	Cardio- lipina	Liso FC	Acid fos- fati- dic
Membrane plasmatiche	12-63	6-35	3-14	1-16	5-35	0-6	0-7	-
Membrane eritrocitare	18-48	20-37	0-22	0,2-8	8-28	-	0-5	0-5
Membrane mielinice	17-43	24-40	9-33	1-6	7-32	-	-	1
Membrane nemielinice	35-55	21-38	4-16	1-7	3-23	-	-	-
Membrana plasmatică a celulelor epiteliale renale	21	40	14	-	7	-	2	-
Membrana plasmatică a celulelor fotoreceptoare	31-53	26-48	7-16	1-7	1-6	-	0,2-3	5
Membrana reticulului endoplasmic	34-71	16-27	7-15	1-5,6	1-17	-	3,6	-
Membrane nucleare	31-54	20-80	2-18	3-9	3-10	2-3	8	0,5-1

*) Liso FC = lisofosfatidilcolina

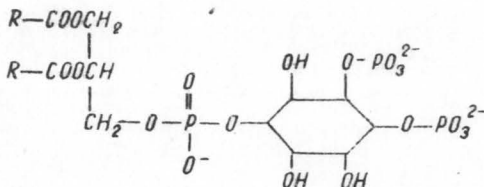
Datele din tabelul 2 (o sinteză a peste 50 lucrări) ne dau o imagine asupra heterogenității compoziției chimice în lipide polare a membranelor celulare. Modelul cel mai adecvat de studiu l-a constituit membrana plasmatică a eritrocitului (Emmelot, 1977). Diferențele de compoziție chimică în lipide polare au fost corelate cu deosebirile funcționale ale eritrocitelor. Eritrocitele de șobolan, a căror membrană plasmatică conține 47% fosfatidilcolină și 12% sfingomielină, sînt foarte permeabile pentru glucoză și prezintă un timp de hemoliză extrem de scurt. La polul opus se află eritrocitele de oaie, ale căror membrane plasmatică prezintă 0-2% fosfatidilcolină și 50% sfingomielină. Între aceste două extreme, se intercalează eritrocitele altor specii (porc, om, iepure), cu concentrații intermediare a celor două fosfolipide. De subliniat faptul că toate membranele plasmatică eritrocitare cercetate, conțin concentrații similare de colesterol (între 26-30%).

Membranele plasmatică cu bordură în perie a celulelor epiteliale de la mamifere (intestinale și renale), prezintă o compoziție particulară în lipide. Din cantitatea totală de lipide ale acestor membrane, 2% sînt lipide neutre, 30% fosfolipide și 50% sfingolipide (glicolipide). De asemenea, ele se caracterizează și printr-un raport foarte ridicat colesterol/fosfolipide (1,3) (Sacktor, 1977).

Importanța fosfatidilinozitolului. Deși cantitatea de fosfatidilinozitol în membranele plasmatică nu este prea mare în comparație cu alte fosfolipide, acestui glicerolipid i se atribuie un rol însemnat în controlul unor funcții de membrană. Fosfatidilinozitolul a fost identificat în membrane sub formă de mono-, di- și trifosfatidilinozitolii (vezi figura 7). În membranele celulelor neuronale din creier s-au des-



A



B

Fig.7. Structura chimică a difosfatidilinozitolului(A) și trifosfatidilinozitolului (B).

cris 27 forme moleculare de fosfatidilinozitolii, care se deosebesc prin natura acizilor grași din regiunea hidrofobă. De obicei, fosfatidilinozitolii prezintă la C_1 acid stearic și la C_2 acid arahidonic.

Datorită proprietăților anionice și hidrofile, fosfatidilinozitolii se deosebesc de celelalte fosfolipide din membrane. Toți derivații se caracterizează printr-o viteză mare de schimb a grupărilor ortofosfat, mai ales la nivelul celulelor neuronale (Michell, 1975). Prin caracterul electronegativ al moleculei, fosfatidilinozitolul influențează încărcarea electrică a membranei. De asemenea, ei interacționează cu substanțe încărcate electropozitiv. Trifosfatidilinozitolul fixează ionii de Ca^{+} în membrane. În plus, trifosfatidilinozitolii formează complecși insolubili în apă, cu sărurile cationilor bivalenți (Hendrickson, 1969).

Fosfatidilinozitolii se găsesc în cantități mari în membranele plasmatice ale celulelor neuronale, precum și în membranele celei hepatice și renale, putând reprezenta între 6-10% din totalul glicerolipidelor (Dittmer și Douglas, 1969). Hansen și Eichberg (1973) au stabilit că în cursul mielinizării celulelor nervoase, 50% din fosfatidilinozitol și 70% din trifosfatidilinozitol este legat de mielină. O cantitate mare de fosfatidilinozitol a fost constatată în membranele plasmatice ale celulelor neuronale mielinizate din creier, dar și în alte membrane (Bukley, 1974).

Majoritatea enzimelor implicate în metabolismul fosfatidilinozitolilor sînt legate de membrana plasmatică. Astfel, fosfatidilinozitolfosfotransferaza și difosfatidilinozitol-kinaza (catalizează sinteza trifosfatidilinozitolului), au fost descrise în membrana plasmatică a celei neuronale și pe fața citoplasmatică a membranei eritrocitului (Carrett și Redman, 1975).

Cercetările experimentale au evidențiat participarea fosfatidilinozitolilor în controlul permeabilității membranelor celulare, mai ales al membranelor postsinaptice. S-au sugerat mai multe modele speculative referitoare la activarea procesului de transport al cationilor prin membrană, în cursul trecerii potențialului de acțiune (Torda, 1973, 1974).

S-a presupus de asemenea, că fosfatidilinozitolii ar putea participa în mecanismele de transformare a energiei în unele tipuri de membrane, mai ales ale celulelor neuronale (Tou și col. 1972; Kiselev, 1977). Această idee derivă din faptul că trifosfatidilinozitolul prezintă o legătură macroergică, a cărei energie liberă de hidroliză este de aproximativ 7 Kcal/mol. Deși nu s-au adus dovezi experimentale suges-
tive asupra rolului lor în controlul unor procese funcționale legate de

membrană, participarea lor în funcțiile de transport ale membranelor nu este exclusă.

1.1.2. Sfingolipide. Sînt o clasă de lipide complexe, identificate în numeroase membrane plasmactice de la animale și vegetale. Toate sfingolipidele prezintă în structura lor o bază sfingozinică (sau alte molecule analoage), o moleculă de acid gras cu catenă lungă și un cap polar cu o alcătuire foarte variabilă. Cunoștințele noastre asupra distribuției sfingolipidelor în membrane sînt încă limitate, deși ele îndeplinesc funcții celulare importante.

În membrana plasmatică a unor tipuri de celule de la mamifere scheletul carboric este reprezentat de sfingozină (4-sfingenină) sau dihidrosfingozina (sfinganina); la sfingolipidele din membrana celulelor vegetale, baza sfingozinică principală o constituie fitosfingozina, iar la unele nevertebrate marine, 4,8-sfingadienul. Compusul format între sfingozină și un acid gras cu catenă lungă (18-26 atomi de carbon) poartă denumirea de ceramid, care reprezintă structura de bază a sfingolipidelor (vezi figura 8).

Sfingolipidele din membranele celulare se pot grupa în sfingomieline, glicosfingolipide neutre și glicosfingolipide acide. Ultimele două grupe de sfingolipide au fost clasificate deosebit de către diverși autori. Ele se pot împărți în patru clase principale de compuși sfingolipidici:

- 1) cerebrozide sau ceramidmonohexozide.
- 2) sulfatide sau sulfocerebrozide.
- 3) ceramidoligohexozide, de obicei cu 2-5 oligohexozide.
- 4) ganglioze sau ceramidhexozide cu acid sialic (glicosfingolipide acide).

Sfingomielinele. Acestea formează o clasă de sfingolipide, cu un conținut mare în unele membrane plasmactice. Sfingolipidul cel mai răspîndit este cunoscut sub denumirea de sfingomielină (N-acil-4-sfingozil-1-fosfocolina), identificat în cantități apreciabile în membrana plasmatică a celulelor neuronale.

Regiunea hidrofobă a sfingomielinei este formată dintr-o catenă alifatică saturată (ce aparține sfingozinei) și un acid gras, de obicei acidul oleic (vezi structura chimică în figura 8). În regiunea polară, sfingomielinele prezintă fosforilcolina sau fosforiletanolamina. La pH neutru, sfingomielinele poartă sarcini electrice negative și pozitive, adică se află sub formă de ioni electroneutri.

Cerebrozidele prezintă o structură chimică simplă, formată din trei componente: un acid gras cu catenă lungă legat de baza sfing-

gozinică (ceramid) și o hexoză (glucoză sau galactoză) fixată prin legătură β -ozidică, de hidroxilul liber al ceramidei. Acizii grași din

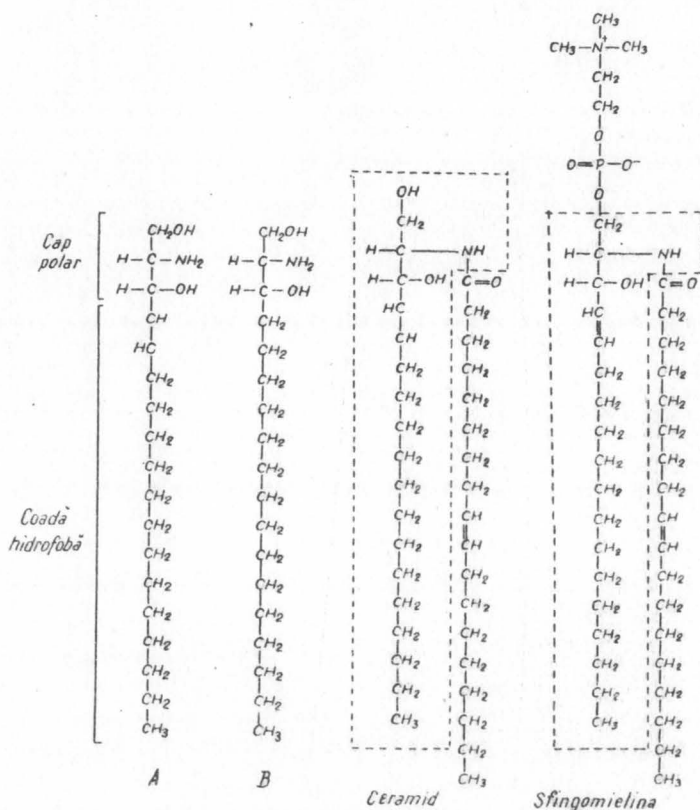


Fig.8. Structura chimică a sfingozinei (A), dihidrosfingozinei (B), a unui ceramid și a unui tip de sfingomielină.

constituția cerebrozidelor sînt deosebiți (între 18-27 atomi de carbon). Foarte adesea s-a identificat acidul lignoceric. Capul polar este alcătuit din hexoze simple, fără sarcini electrice iar segmentul lipofil din doi acizi grași deosebiți. În membranele plasmatiche ale celulelor neuronale (din creier și sistemul nervos periferic) s-au identificat galactocerebrozide și glucocerebrozide. În cantități mici se află și în alte membrane: ale leucocitelor, ale celulelor renale, pulmonare, ș.a.

Sulfatidele formează un grup de cerebroside sulfatate (acid sulfuric) sau ceramidoligohexozide sulfatate (vezi tabelul 3). Regiunea

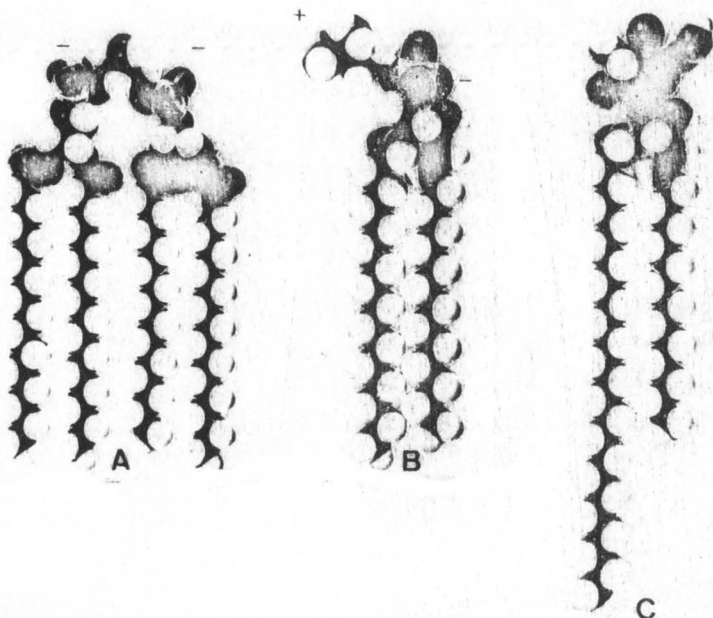


Fig.9. Modelele moleculare ale difosfatidil-glicerolului (A), sfingomielinei (B) și a unui glicosfingolipid neutru, galactocerebrozid (C). Galactocerebrozidul are un cap polar fără sarcini electrice, iar în regiunea hidrofobă prezintă un acid gras saturat cu catenă lungă (acidul lignoceric).

hidrofobă cuprinde acizi grași cu catene lungi (între 22-26 atomi de carbon), mai ales acidul lignoceric și cerebronic. În cantități mari apar în membrana plasmatică a celulelor neuronale. În cantități mici s-au identificat și în alte țesuturi (rinichi, inimă, ficat).

Ceramidoligohexozidele conțin 2-5 resturi de monozaharide: glucoză, galactoză, N-acetilgalactozamină și N-acetilglucozamină. Ele se găsesc pe fața externă a numeroase membrane plasmatice din rinichi, creier, eritrocite, etc. Leucocitele conțin o cantitate mare de ceramidoligozide (15% din cantitatea totală de lipide din membrană, mai ales ceramidgalactozide și ceramidlactozide).

Ganglioizidele sînt cele mai complexe glicosfingolipide.

Partea glucidică (capul polar) cuprinde de obicei D-glucoză, D-galactoză, hexozamine și acid sialic. Acidul sialic este un derivat al acidului neuraminic (produs de condensare al manozei și acidului piruvic) și foarte frecvent este reprezentat de acidul N-acetilneuraminic (prescurtat după terminologia internațională NANA). Natura acizilor grași din regiunea hidrofobă este heterogenă, fiind formați din lanțuri hidrocarbone de lungimi variabile.

Una din particularitățile ganglioizidelor o constituie capacitatea lor crescută de solubilizare în apă. Sfingolipidele ce conțin o grupare alifatică sînt slab solubile în apă. Solubilitatea lor mare este dată de prezența acidului sialic. Pentru o înțelegere mai bună a naturii ganglioizidelor, s-a adoptat clasificarea Svennerholm (1964). În tabelul 3 sînt cuprinse principalele ganglioizide descrise în membrane. După cum se poate observa din tabel, litera G definește ganglioizidul, iar litera M, D, și T, numărul acizilor sialici din moleculă (mono-, di-, și tri-). Indexul 1 arată că regiunea oligozaharidică este formată din patru monozaharide; indexul 2 descrie un ganglioizid ce a pierdut un monozaharid, etc. Inițialele "a" și "b", definesc locul de fixare a celei de a doua molecule de acid sialic. Prima moleculă se leagă întotdeauna de galactoză.

Compoziția chimică a ganglioizidelor din diverse membrane este puțin cunoscută. O cantitate mare de ganglioizide a fost descrisă în membranele plasmatice ale celulelor neuronale. În cantități variabile apar și în alte țesuturi: ficat, rinichi, mușchi, celule epiteliale, eritrocite, leucocite, fibroblaste.

Structura chimică a unui ganglioizid este prezentată în figura 10. Se remarcă natura complexă a capului polar, care în membrană este orientat spre fața externă.

Importanța glicolipidelor în exprimarea morfologică și funcțională a celulelor apare din ce în ce mai evidentă. Deși nu dispunem de date comparative prea multe, totuși este certificată importanța lor ca molecule informaționale (receptori) pe suprafața membranelor plasmatice (vezi capitolul receptori glicoproteici și glicolipidici).

S-a constatat că compoziția în glicolipide a celulelor în cultură prezintă o mare diversitate, în concordanță cu condițiile mediului de cultură și numărul de pasaje. De asemenea, natura glicolipidelor de membrană este controlată de numeroși hormoni, de metabolismul celular, genetic (enzimele implicate în sinteza lor), și se modifică la animale purtătoare de tumori (Cole și col. 1970, Adams și Gray, 1967).

Prezența ganglioizidelor în cantități mari în membranele plasmatice ale celulelor nervoase, a dus la presupunerea participării lor

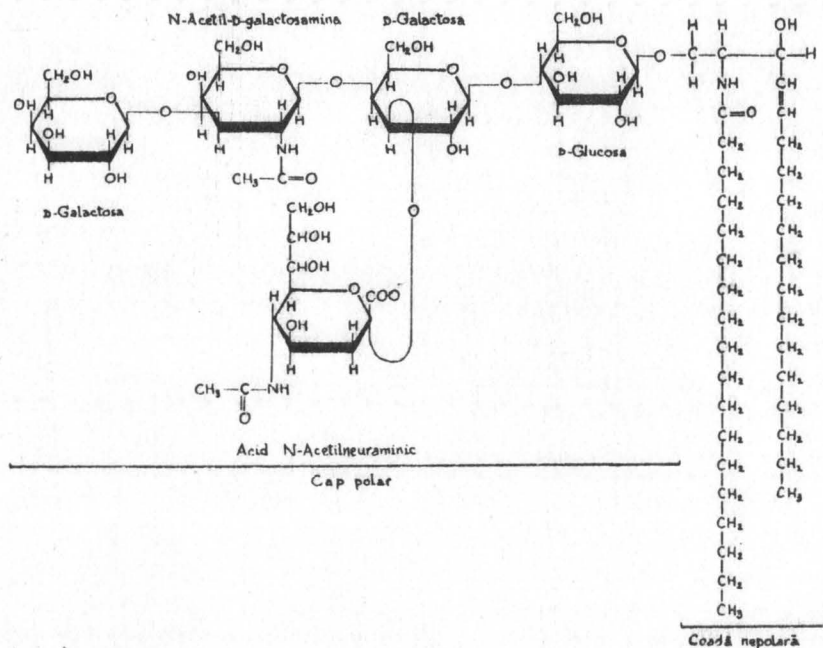


Fig.10. Structura chimică a unui ganglioizid din structura membranelor plasmatice celulare (glicosfingolipid acid GM₁).

în mecanismele de transport. Mecanismele moleculare de control și reglaj a ganglioizidelor sînt puțin cunoscute. Se apreciază că ele ar facilita formarea unor canale ionoforice în membrane. Ganglioizidele din membranele neuronale suferă o serie de transformări reversibile (în mono-, di-, tri-, și tetrasialoganglioizide), prin care se realizează un control al capacității de fixare al ionilor și implicit în reglarea transportului de electroliți prin membrane.

Ganglioizidele din unele tipuri de membrane pot forma complexe cu adrenalina și serotonina (Gielen, 1966). S-a demonstrat că receptorul pentru serotonină conține acid N-acetylneuraminic. Probabil, structura ganglioizidelor din membranele plasmatice este specializată pentru recepționarea unui mediator determinat, astfel că afinitatea mono-, di-, tri-

și tetraganglioizidelor să fie deosebită pentru mediatori diferiți. Un lucru apare evident, și anume că fără existența unei anumite compoziții specifice de ganglioziide a membranelor celulelor nervoase, activitatea funcțională a creierului este modificată, lucru constatat într-o serie de boli nervoase. Dacă în membrana celulei nervoase apare în cantitate mare un singur tip de monosialoganglioizid, membrana celulară este lipsită de funcțiile sale receptoare și se distrug contactele intercelulare din cadrul ansamblelor neuronale (Okada și col. 1971; Tumanova, 1976). Sugestiv în acest sens este descrierea unei boli genetice la om, determinată de incapacitatea de sinteză a unor sfingolipide. În urma îmbolnăvirii, în unele țesuturi se acumulează preponderent un tip de ganglioizid (ficat, creier). Astfel, acumularea ganglioizidului GM_3 se datorește lipsei N-acetilgalactoziltransferazei, care catalizează transformarea GM_3 în GM_2 . Boala determină modificări ale organizării sistemului nervos și moartea rapidă a noului născut (Fishman și col. 1975). S-au descris și alte tipuri de ganglioizidoze, ce duc la acumularea în membrana a altor sfingolipide. În boala Tay-Sachs (ganglioizidoza GM_2), crește cantitatea de GM_2 și GD_2 , și a unui globozid în organele extracraniene ($GalNac\beta 1 \rightarrow 3 Gal\alpha 1 \rightarrow 4 Gal\beta 1 \rightarrow 4 Glc\beta 1 \rightarrow 1' Cer$). Boala poate fi de natură ereditară sau datorită lipsei unor activatori intracelulari, pentru activitatea enzimei de degradare specifică (β -N-acetilglucozaminidaza; denumirea științifică 2-acetamid-2-deoxi- β -D-glucozid acetamid deoxiglucuhidrolaza) (Conzelman și col. 1978).

Foarte importantă apare și capacitatea ganglioizidelor de a fixa reversibil ionii de Ca^{2+} . Ionii de calciu fixați de ganglioizidele din membrane, pot fi schimbați cu cationii monovalenți (K^+ sau Na^+) proces însoțit de o modificare a conformației ganglioizidelor în membrană și facilitarea permeabilității membranei pentru cationii monovalenți.

Glicoproteinele. Acestea reprezintă o altă clasă de substanțe complexe, care intră în alcătuirea membranelor plasmatică și citoplasmatică, cu funcții multiple pentru celule. Ele vor fi descrise și discutate ulterior.

Tabelul 4 - Conținutul în lipide a unor tipuri de membrane de la mamifere (după Ribalcenco și Kurski, 1977).

Tip de mem- brană	Lipide totale %	Fosfo- lipide % din lipide totale	Lipide neutre în % din lipi- de totale		Glicolipide în % din li- pide totale
			Total Colest.		
Membrane plasmactice	15-65	39-81	18-39	4,2-36	1-42
Membrane eritrocit- tare	30-50	50-67	24-29	24-29	5,3-23,5
Membrane mielinice	60-80	54	24	24	22
Membrane celule epiteliale	46	30	20	14	50
Membrane mitocon- drii	15-50	61-91	5-10	1-5	-
Membrana internă a mitocondriilor	22-32	90	10	0,4-3	-
Membrana externă a mitocondriilor	40-50	45-80	-	1-5	-
Reticul endoplas- mic	22-71	70-80	8	8	-
Membrane fotore- ceptoare	39-60	31-53	-	2-3	4-10

1.1.3. Colesterolul. Este un lipid neutru, component obligatoriu al membranelor plasmactice din toate tipurile de celule animale. Colesterolul prezintă un nucleu steroidic ce conține o grupare hidroxică la C_3 și un lanț hidrocarbonic din 8 atomi de carbon la C_{17} (figura 11). Un conținut mare în colesterol se află în membrana mielinică (până la 24%) și în cantități mici în membranele citoplasmactice (între 0,4-8%) (vezi tabelul 4). În membrana plasmatică colesterolul

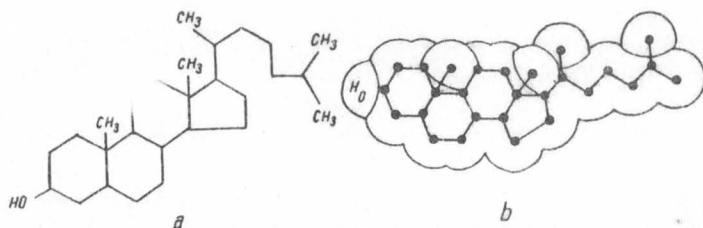


Fig.11. Structura chimică a colesterolului (a) și reprezentarea modelului molecular (b).

se află numai sub formă liberă; în unele membrane citoplasmatiche se găsesc și esterii ai colesterolului.

S-au descris numeroși factori ce influențează metabolismul și biosinteza colesterolului (hormoni, vitamine, hrană, factori emoționali, etc). Stratul lipidic extern este mai bogat în colesterol decât cel intern (Emmelot, 1977). În cazul membranei mielinice, s-a descris un raport echimolar colesterol/fosfolipide pentru stratul extern și un raport de 3:7 pentru stratul lipidic citoplasmatic (Caspar și Kirschner 1971). Rolul său în membrane se va trata ulterior.

1.2. Compoziția în acizi grași a lipidelor din membranele celulare.

După cum am arătat în capitolul anterior, lipidele polare prezintă în structura lor grupări hidrofobe reprezentate de acizi grași ca catene lungi. Acizii grași descriși în lipidele membranelor celulare sînt prezentați în tabelul 5. Deosebirea structurale și funcționale pe care le induc aceste grupări asupra lipidelor sînt extrem de variate. Este de ajuns să amintim că în lipidele naturale s-au identificat aproape 200 tipuri de acizi grași. Discuția noastră va fi canalizată asupra naturii acizilor grași din fosfolipide, a căror structură și rol în membranele celulare este relativ bine cunoscută.

S-a stabilit că un singur tip de grupare hidrofilă din fosfolipide poate conține cîteva zeci de radicali de acizi grași. De exemplu, lecitina (fosfatidilcolina) reprezintă un amestec de lecitine, care se deosebesc după caracterul acizilor grași ce intră în alcătuirea lor. S-a arătat anterior că în structura fosfatidilcolinei se deosebesc două catene hidrocarbonate de acizi grași (la C_1 și C_2), a căror poziție determină o serie de particularități ale moleculei fosfolipidului. Dacă lecitina conține doi acizi grași deosebiți (A și B), ea poate prezenta 4 variante structurale moleculare (AA, BB, AB și BA). Teoretic, o fosfatidilcolină ce conține 20 de acizi grași diferiți, poate prezenta 400 variante moleculare. Cu alte cuvinte, natura grupărilor hidrofobe din structura lipidelor polare asigură formarea unor structuri de membrană extrem de variabile. De asemenea, se pot realiza interrelații și cooperări multiple cu proteinele din membrane.

În general, la majoritatea fosfolipidelor cercetate (fosfatidilcolină, fosfatidiletanolamină și fosfatidilinozitol), la C_1 s-a identificat un acid gras saturat, de obicei acidul palmitic sau stearic (în proporție de 70-90%). Restul de 10-30%, poate fi ocupat de acizi grași nesaturați: acidul oleic sau linoleic.

Tabelul 5 - Cei mai comuni acizi grași din lipidele de membrană.

Nume comun	Nume sistematic	Structura chimică	Punct de topire
Acizi grași saturați			
Miristic	n-Tetradecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	53,9
Palmitic	n-Hexadecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63,1
Stearic	n-Octadecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69,6
Arahidic	n-Eicosanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76,5
Lignoceric	n-Tetracosanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	86,0
Cerotic	n-Hexacosanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	-
Acizi grași nesaturați			
Palmitoleic	1-Hexadecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-0,5
Oleic	9-Octadecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13,4
Linoleic	9,12-Octadecanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5,0
Linolenic	9,12,15-Octadecatrienoic	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-11
Arahidonic	5,8,11,14-Eicosatetraenoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-49,5
Nervonic	cis-15-Tetracosanoic	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	

Sigur că această generalizare este aparentă, mai ales datorită cunoașterii limitate a acizilor grași din lipidele membranelor celulare. În membranele mielinice s-au identificat acizi grași cu catene de 24 atomi de carbon (cu nesaturare limitată), în timp ce în membranele mitocondriale există o cantitate mare de acizi grași polinesaturați, dar cu catene mai scurte (18 atomi de carbon) (O'Brien, 1965). Din membrana plasmatică a celulei grase de la scrumbie, s-a izolat o fosfatidilcolină ce avea la C_1 acizi grași cu 20-22 atomi de carbon și 5-6 duble legături (Renkonen, 1968). Fosfolipidele din membranele unor celule excitabile (din retină sau creier), se caracterizează prin prezența în cantități relativ mari a unor acizi grași cu catenă lungă polinesaturată ($\text{C}_{22,6}$) (Gombos și Morgan, 1971).

S-a sugerat că există o anumită legitate care favorizează poziția preferențială a acizilor grași în moleculele glicerofosfatidelor. Astfel, în membranele celulare ale unor tipuri de celule (renale, cardiace), acizii grași monoenoici se combină adesea cu acidul palmitic (Collins și col. 1971). Cu o serie de acizi polienoici se asociază acidul stearic. Asocierea preferențială a acizilor grași în fosfolipide a fost verificată experimental (Moore și col. 1965). S-au hrănit iepuri cu cantități variabile de acid linoleic, cunoscându-se faptul că acesta nu se sintetizează în organism. Fosfatidilcolina izolată de la animale hrănite cu cantități mici de acid linoleic, prezenta la C_1 acid palmitic și la C_2 acid oleic. Prin creșterea acidului linoleic în hrană, s-a observat prezența lui la C_2 din lecitine. În paralel, s-a constatat că acest acid atrăgea după sine fixarea preferențială la C_1 a acidului stearic. Cu alte cuvinte, înlocuirea acidului monoenoic de la C_2 a fosfolipidului, cu un acid dienoic, induce schimbarea naturii acidului gras de la C_1 .

Trebuie însă subliniat că asocierea acizilor grași în structura lipidelor polare depinde de tipul de celulă, structura capului polar, condițiile de mediu, factorii metabolici, ș.a. De aceea se presupune că în celule există mecanisme regulatorii speciale, care asigură selecția acidului gras din rezervele intracelulare pentru sinteza unui anumit tip de fosfolipid. Acest lucru se realizează atât pe calea sintezei de novo a fosfolipidelor prin intermediul acidului fosfatidic, cât și pe calea reacilării lisofosfatidelor.

Datele experimentale au scos în evidență faptul că participarea sistemelor enzimactice în metabolismul fosfolipidelor și mai ales specificitatea lor de sinteză, apare în special în condițiile păstrării integrității structurilor biologice. Astfel, Hill și col. (1968) au cercetat mecanismul fixării selective a acizilor grași în glicerolipide, pe secțiuni de ficat de șobolan. În prezența linoleil-CoA și stearoil-CoA, se formează fosfatidilcoline cu o dispoziție obișnuită a acizilor grași. În condiții experimentale identice, microzomi hepatici sintetizează glicerolipide, la care poziția acizilor grași este extrem de variabilă.

Datele din literatură sugerează că specificitatea celulară (sau tisulară), joacă un rol deosebit în determinarea caracterului și poziției acizilor grași în glicerolipide. Van Deenen (1971) a arătat că membrana plasmatică a celulelor pulmonare fixează preferențial la C_2 acidul palmitic, în prezența l-acil lisofosfatidilcolinei. S-a conchis că în celulele pulmonare, procesul de reacilare al lisofosfatidilcolinelor duce la formarea unor glicerolipide specifice. De altfel, se știe

că membranele celulelor pulmonare prezintă în structura fosfatidilcolinei doi acizi grași saturați (dipalmitoilfosfatidilcolina).

Variațiile moleculare ale glicerolipidelor. Heterogenitatea moleculară a lipidelor din membranele celulare este relativ mică, față de posibilitățile teoretice. Probabil o serie de variante moleculare nu sînt permise din cauza restricțiilor stereoelectronice. În plus, metodele existente nu permit o cercetare fină a tuturor lipidelor din structura membranelor. Analizele actuale descriu capacitatea celulelor de a utiliza aproximativ 1% din posibilitățile teoretice de fixare a acizilor grași în structura lipidelor.

Dintre glicerolipidele membranelor plasmatice, cele mai cercetate au fost fosfatidilcolinele. Studiul comparativ din membranele diverselor tipuri de celule și de la mai multe organisme, a dus la constatarea existenței unei specificități în funcție de țesut și specie (Montfoort și col. 1971). Astfel, fosfatidilcolinele din membranele celulelor pulmonare de la toate speciile studiate (șobolan, iepure, vacă, porc), conțin în proporție mare dipalmitoilfosfatidilcolina (30%). Acest glicerolipid s-a identificat în proporție mai mică în membranele eritrocitelor (~10%) și lipsește din membranele celulelor renale, cardiace și hepatice. Celula nervoasă este bogată în fosfatidilcoline, ce au în structura lor acid oleic (40-60%), în două variante moleculare: 1-palmitoil-2-olenoilfosfatidilcolina și 1-olenoil-2-palmitoilfosfatidilcolina. Membranele celulelor hepatice și epiteliale (renale și intestinale) se caracterizează printr-o mare heterogenitate, determinată de influențele marcante ale factorilor de mediu asupra conținutului și structurii glicerolipidelor. Probabil că aceste celule au și posibilități adaptative mari, care se exteriorizează deosebit în funcție de specie.

Toate aceste modificări ale conținutului acizilor grași din lipidele membranelor plasmatice, sugerează variabilitatea structurală și de organizare moleculară a membranelor.

2. ORGANIZAREA LIPIDELOR ÎN STRUCTURI DE MEMBRANA.

Dacă ne punem întrebarea, cine favorizează asamblarea lipidelor în agregate moleculare, răspunsul va fi deosebit în funcție de unghiul sub care analizăm acest aspect. De fapt, în organizarea lipidelor în membrane cooperează numeroși factori, și anume: a) natura solvențului; b) structura amfipolară a lipidelor; c) interrelațiile lipidelor cu ioni metalici și alte componente; d) temperatură; e) presiune; f) pH mediului și alții.

2.1. Natura solventului. Apa, solventul universal al materiei vii, joacă un rol fundamental în organizarea lipidelor în membrane. Moleculele apei se leagă ușor între ele formînd o rețea. În afara acestei particularități, în apă se află și molecule libere cu o dispoziție haotică. În jurul regiunilor apolare ale lipidelor, moleculele de apă se dispun sub formă de "rețea". De aceea, pentru formarea agregatelor lipidice nu sînt necesare forțe particulare de asamblare a cozilor apolare între ele.

Majoritatea lipidelor se dizolvă slab în apă. Numai la diluții foarte mari, plutesc în apă sub formă de molecule independente. Dacă are loc o creștere a concentrației lipidelor în apă, ele se adună sub formă de vezicule închise, numite miceli. Concentrația critică de formare a miceliilor pentru majoritatea lipidelor membranare este de aproximativ 1%.

Miceliile lipidice se găsesc într-o stare dinamică. O parte din moleculele lipidice părăsesc miceliul în apă, iar altele intră în miceliu. Prin creșterea concentrației lipidelor în mediul apos și scăderea temperaturii, se formează miceli mai mari. S-au descris miceli sferice, cilindrice, etc.

Creșterea concentrației lipidelor peste un anumit prag este însoțită de modificări de organizare a lor sub formă de structuri cristaline-lichide. Astfel, s-au observat structuri lamelare formate din straturi bimoleculare lipidice alternative separate de apă și structuri cilindrice. O structură poate trece dintr-o formă în alta prin modificarea concentrației apei, temperaturii, ionilor, etc. Foarte adesea, lipidele formează concomitent mai multe tipuri de agregate, fenomen denumit mezomorfism. Dacă trecerea unui agregat în altul depinde de conținutul în apă, avem de-a face cu un mezomorfism lipotrop. Cînd structuralitatea lor depinde de temperatură, se descrie un mezomorfism termotrop (Luzzati, 1968).

Unele fosfolipide sînt capabile să formeze atît structuri lamelare cît și hexagonale. În schimb, fosfatidilcolina formează numai structuri lamelare, la concentrații variabile în apă. Alte fosfolipide, cum sînt fosfatidiletanolamina și unele lipide din membranele neuronale, prezintă organizări hexagonale sau lamelare în funcție de concentrația în apă.

Dispersia lipidelor în apă crește foarte mult deasupra temperaturii lor de tranziție de fază. Numai fosfolipidele ce au temperaturi de tranziție de fază la temperatura camerei sau sub această temperatură pot forma figuri mielinice spontan. Fosfolipidele saturate nu sînt capabile să formeze figuri mielinice la temperatura camerei. Tranziția de

temperatură endotermică pentru un fosfolipid scade prin creșterea cantității de apă. Acest lucru se explică prin efectul apei, care are la început o influență de labilizare a structurii cristalului fosfolipidic și duce (în anumite limite) la o dispersie a forțelor dintre lanțurile hidrocarbonate. Cantități mari de energie sînt necesare pentru a contracara dispersia forțelor dintre lanțurile de acizi grași, adică este nevoie de o temperatură mare pentru a determina "topirea" lor.

2.2. Structura amfipolară a lipidelor. După cum se știe, la interfața apă-aer lipidele formează o peliculă monomoleculară. Cantitatea de lipide necesară pentru formarea filmului este foarte mică: o,oolg lipide sînt suficiente pentru a acoperi o suprafață de 1 m^2 . Dacă această suprafață se "strînge" în condiții adecvate, suprafața ocupată de lipide scade treptat. În condițiile unei comprimări, lanțurile hidrocarbonate ale acizilor grași se apropie. În acest caz, moleculele lipidice sînt foarte strînse iar filmul molecular este definit ca fiind în stare "solidă" (cristalină, gel). Dacă comprimarea este intermediară, acizii grași din moleculele lipidice devin mai liberi, iar membrana formează o structură lichid-cristalină (lichidă fluidă). Pentru un strat bimolecular lipidic, cele două organizări structurale deosebite ale lipidelor sînt prezentate schematic în figura 12.

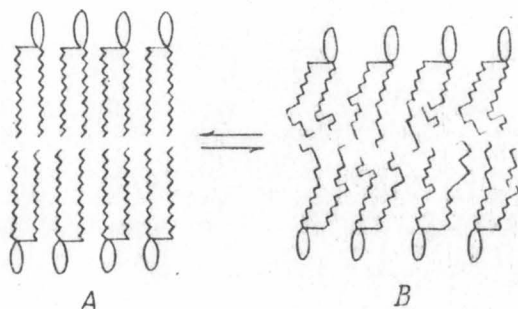


Fig.12. Starea cristalină (A) și lichid-cristalină (B) a unui dublu strat lipidic, cu o compoziție uni-formă în acizi grași.

Rolul regiunilor hidrofobe ale lipidelor. Membranele celulare prezintă lipide cu o mare varietate de compoziție în acizi grași (lungimea lanțului, gradul de nesaturare, variante moleculare). Modul în care acizii grași influențează organizarea lipidelor în structuri de membrană a fost ilustrat pe diverse căi.

- membrane artificiale
- lipozomi preparați din lipide cu structuri chimice variate, care se deosebeau prin natura lanțurilor de acizi grași.
- cercetarea permeabilității acestora pentru diferite molecule.

Demel și col. (1972) au arătat că filmele monomoleculare (sau bimoleculare) preparate din fosfolipide ce conțineau 2 acizi grași identici, ocupau o suprafață mai mică decât lipidele ce aveau 2 acizi grași deosebiți. Introducerea în molecula lor a unor acizi grași cu catene scurte sau acizi grași nesaturați, mărea semnificativ suprafața membranei. Cu cât crește numărul dublelor legături din catena hidrocarbonată a fosfolipidelor, cu atât se mărește suprafața membranei și structura devine mai "laxă". Nesaturarea determină o scădere a forțelor van der Waals dintre lanțurile hidrocarbonate și are ca rezultat o "desfacere" a organizării structurale. Dubla legătură din lanțurile hidrocarbonate crează regiuni cu flexibilitate scăzută și mărește suprafața regiunii hidrofobe (figura 13.)

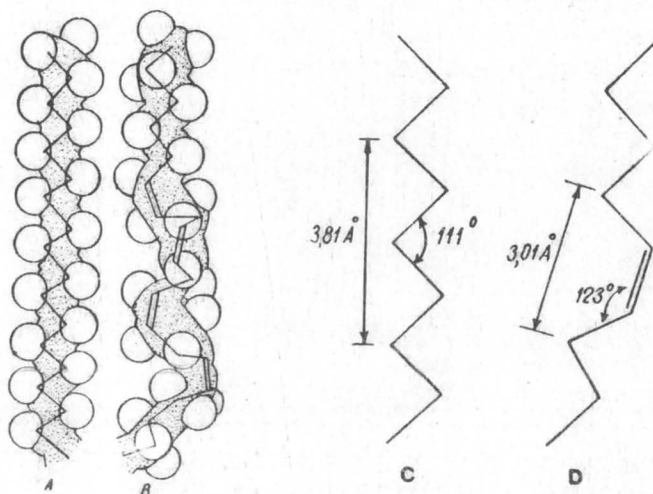


Fig.13. Structura moleculară a unui acid gras saturat (A) și a unui acid gras nesaturat (B). Reprezentarea schematică a poziției lanțului hidrocarbonat la un acid gras saturat (C) și un acid gras cu o dublă legătură (D). La majoritatea acizilor grași dublele legături au o poziție cis.

Posibilitatea modificării permeabilității membranelor artificiale pe calea schimbării conținutului în acizi grași din fosfolipide, sugerează modificări ale structurii membranelor biologice. Permeabilitatea lipozomilor formați din fosfatidilcoline ce conțin 2 acizi polienoici este atât de mare, încât la 37°C glicerina poate trece liberă prin aceste membrane. În schimb, lipozomii alcătuiți din fosfolipide ce conțin acid stearic, sînt impermeabili pentru glicerină (la 37°C).

De Gier și col. (1972) au studiat permeabilitatea față de eritrol a lipozomilor cu compoziții diferite în acizi grași. Observații experimentale ale autorilor dovedesc că lipozomii formați din dilinoileifosfatidicolină ($\text{C}_{18:2}$) sînt permeabili pentru eritrol chiar la temperaturi scăzute. Dimpotrivă, lipozomii formați din dipalmitoilfosfatidilcolină sînt permeabili pentru aceeași substanță la temperaturi de peste 40°C (vezi figura 14). Între aceste două situații extreme, se

Rata de umflare

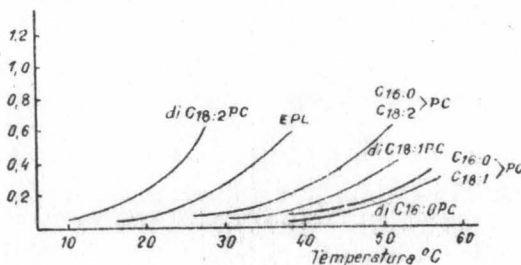


Fig. 14. Viteza inițială de umflare a lipozomilor alcătuiți din glicerolipide cu compoziții variabile în acizi grași, în funcție de temperatură. Cu cât crește gradul de nesaturare a acizilor grași, cu atât lipozomii devin mai permeabili la temperaturi joase. În toate cazurile, lipozomii au fost preparați în soluții izotonice de eritrol.
EPL = dilinoileifosfatidilcolina; PC = fosfatidilcolina.

plasează toate variantele de organizare moleculară a lecitinelor cu compoziții deosebite în acizi grași, reflectate prin permeabilități diferite. Autorii au interpretat relația dintre structură și permeabilitate pe baze termodinamice (energia de activare variază direct proporțional cu numărul grupărilor oxidril a moleculei permeante).

Observații similare au fost făcute la organisme unicelulare. Prin cultivarea celulelor de *Mycoplasma laidlawii* pe medii de cultură sărace în lipide și suplimentate cu diverși acizi grași, aceștia din urmă se regăsesc relativ rapid în lipidele structurale, ale membranei celulare. În acest fel se pot obține membrane plasmatiche cu structuri

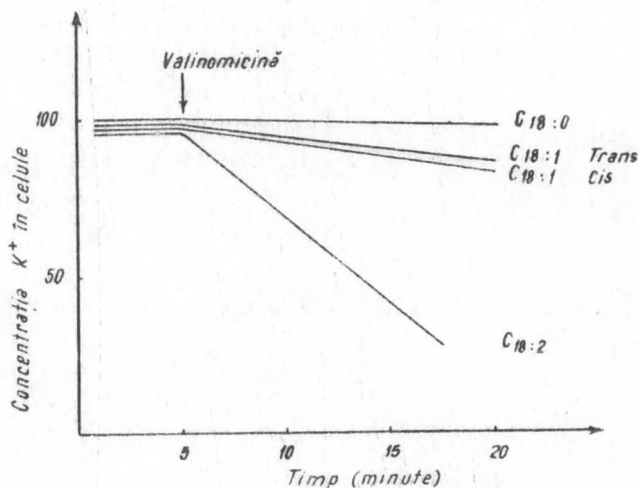


Fig. 15. Eliberarea ionilor de K^+ (în prezența unui ionofor) din celulele de *Mycoplasma laidlawii*, în funcție de natura acizilor grași din membrana plasmatică.

moleculare variabile. Celulele de *Mycoplasma* prezintă o permeabilitate mai mare pentru electrolitiți și neelectrolitiți, pe măsura creșterii gradului de nesaturare al acizilor grași din structura lipidelor de membrană.

De Gier și col. (1972) au crescut *Mycoplasme* pe medii de cultură cu acizi grași deosebiți și au urmărit viteza de ieșire a ionilor de K^+ în prezența valinomicinei. Datele experimentale arată că eliberarea ionilor de K^+ era direct proporțională cu gradul de nesaturare a lanțului hidrocarbonat din structura membranei (figura 15).

Exemplele sînt numeroase și pot fi extinse și la eucariote. Membranele plasmatiche ale eritrocitelor prezintă acizi grași cu grade deosebite de nesaturare în funcție de specie. După cum se observă din

figura 16, membranele eritrocitelor de la capră și oaie au cantități scăzute de acizi grași nesaturați, reflectate și printr-o permeabili-

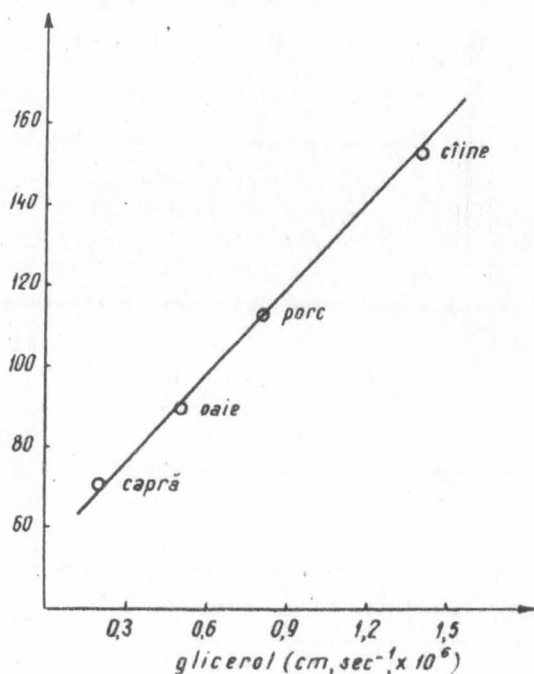


Fig.16. Raportul dintre compoziția în acizi grași nesaturați (în %) din fosfolipidele membranei eritrocitare și permeabilitatea membranelor plasmatice pentru glicerol.

litate scăzută pentru glicerol; în schimb, eritrocitele de la cîine conțin cantități mari de acizi grași nesaturați și prezintă o permeabilitate mare pentru glicerol.

Rolul capetelor polare ale lipidelor în organizarea membranelor. Regiunea polară a lipidelor prezintă sarcini electrice negative sau electroneutre (negative și pozitive). În membranele celulare predomină lipidele cu sarcini electroneutre, deoarece ele se organizează ușor în structuri.

Amestecul a două lipide deosebite, dar cu compoziții identice în acizi grași (dimiristoilfosfatidilcolina și dimiristoilfosfatidiletanolamina) prezintă proprietăți de topire deosebite. S-a constatat

că adausul de numai 5% de dimiristoilfosfatidiletanolamină într-un bistrat molecular de fosfatidilcolină, determină o mărire a tranziției de fază endotermice a lecitinelor. Acest lucru dovedește că prezența unei cantități mici de material "străin" în regiunea polară, afectează modul de organizare al lipidelor în membrane. Astfel de comportări pot avea semnificații biologice deosebite, și uneori constituie un mijloc de înțelegere a transmiterii unor semnale din mediu, de pe o față a membranei pe cealaltă (Ladbrook și Chapman, 1969; Chapman, 1977).

Apare evident că natura capului polar influențează organizarea membranelor fosfolipidice. Astfel, dimiristoilfosfatidiletanolamina suspendată în apă, prezintă o temperatură de tranziție de fază mai mare decât dimiristoilfosfatidilcolina. Explicația este dată de faptul că gruparea hidrofilă trimetilamoniu din structura lecitinei și cantitatea de apă fixată la nivelul ei, împiedică moleculele lipidice să se adune prea strâns; dimpotrivă, fosfatidiletanolamina are un cap polar mai simplu și favorizează o apropiere mai mare între moleculele de lipide.

Condensarea deosebită a unui film monomolecular format din lipide diferite dar cu conținut identic în acizi grași sub influența modificărilor de pH, constituie un alt exemplu referitor la rolul capului polar asupra organizării moleculelor lipidice în membrane (Chapman, 1976). De exemplu, compoziția în fosfolipide a membranei plasmatice de la *Staphylococcus aureus* depinde în bună măsură de pH-ul mediului. Celulele de *S. aureus* cultivate la un pH de 6,5, conțin cantități mari de fosfatidilglicerol. Prin incubarea celulelor la pH 5,0, scade compoziția membranei în fosfolipide încărcate negativ, proces însoțit de o creștere a nivelului lizilfosfatidilglicerolului (purător al unei sarcini pozitive).

Cei doi factori, mărime și sarcină, influențează apreciabil permeabilitatea membranei. Demonstrația s-a făcut pe lipozomi. Lipozomii alcătuiți din fosfolipide cu sarcini negative erau mai permeabili decât cei formați din fosfolipide încărcate pozitiv. Valinomicina stimulează ieșirea ionilor de K^+ și Rb^+ din lipozomi formați din fosfatidilglicerol, dar nu afectează viteza procesului la lipozomi ce conțin lizilfosfatidilglicerol (vezi figura 17).

Structurile polare ale fosfolipidelor de membrană, îndeplinesc multiple funcții în organizarea și stabilizarea membranelor. De exemplu, grupările polare ale fosfatidilcolinei și sfingomielinei prezintă efecte stabilizatoare în membrană. Grupările polare ale acestor fosfolipide sînt capabile să fixeze cîte 11 molecule de apă fiecare. Ca molecule amfipolare, a unei baze puternice (colina) și a unui acid (funcția fosfat a acidului fosforic), fosfolipidele rămîn stabile în stratul bi-

molecular lipidic, la o gamă largă a variațiilor de pH. Fosfatidiletanolamina și fosfatidilserina, de asemenea, fixează lo-11 molecule de

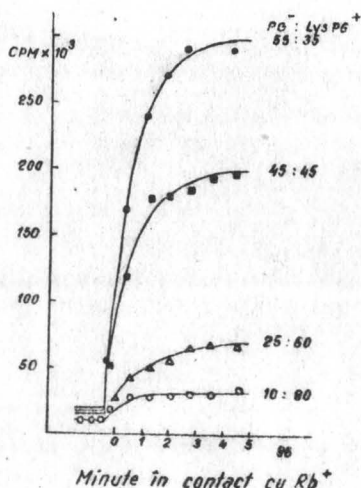


Fig.17. Capacitatea de inducere a captării rubidiului radioactiv din mediu (Rb^{86}) de către celulele de *S.aureus*, care conțineau raporturi variabile de lizil-fosfatidilglicerol și fosfatidilglicerol. Studiul permeabilității a fost urmărit în prezența valinomicinei.

apă fiecare și participă în stabilizarea stratului molecular lipidic. De aceea, aceste fosfolipide au fost definite ca stabilizatori hidrofilici în membrane (Brockerhoff, 1977). Rolul capetelor polare apare deosebit în stabilirea de legături electrostatice cu componentele funcționale ale membranei (proteine și glicoproteine).

2.3. Temperatura. Starea de vîscozitate a bistratului molecular lipidic este controlată de numeroși factori, dintre care compoziția în acizi grași ai fosfolipidelor și temperatura joacă un rol deosebit. Temperatura influențează în mod variat organizarea moleculară a lipidelor din membrane, în funcție de numeroși factori. Mișcările moleculare ale acizilor grași din fosfolipide cresc odată cu ridicarea temperaturii, pînă la temperatura de tranziție de fază a lor. Cu alte cuvinte, trecerea unei membrane lipidice din starea de gel (cristalină)

în starea lichid-cristalină este un proces controlat de temperatură și poartă denumirea de tranziție termotropă (tranziție endotermică sau exotermică). Dacă fosfolipidele din stratul bimolecular lipidic conțin lanțuri scurte de acizi grași sau cu un grad mare de nesaturare, tranziția termotropă de fază are loc la temperaturi mici. Acest lucru dovedește că tranziția termotropă de fază a lipidelor este în primul rând o caracteristică a acizilor grași din structura fosfolipidelor.

Tranziția de fază termotropă afectează distribuția componentelor lipidice în planul membranei. Dacă compoziția membranei constă dintr-un singur tip de fosfolipid cu lanțuri hidrocarbonate deosebite, trecerea membranei în stare cristalină nu afectează distribuția componentelor în planul membranei. Dimpotrivă, prezența în membrana lipidică a unor fosfolipide deosebite, determină comportări termotrope variate ale fosfolipidelor, însoțite de separări de fază. Cu alte cuvinte, într-o membrană lipidică heterogenă ca compoziție, tranziția termotropă crează în membrană regiuni distincte cu lipide ce posedă tranziții de temperatură variate (McConnell și col. 1972; Lee, 1975).

Tranziția de fază termotropă a lipidelor membranare din starea cristalină într-una lichid-cristalină este însoțită de o pierdere a ordinii structurii și o creștere a fluidității membranei. La microorganisme, compoziția în lipide a membranei este reglată pe cale biosintetică. Celulele își ajustează compoziția chimică a lipidelor în așa fel ca ele să aibe temperatura de tranziție de fază, sub temperatura la care organismul își desfășoară creșterea (Rottem și col. 1973). Membranele celulare de la *Tetrahymena pyriformis* au compoziții caracteristice în fosfolipide și acizi grași, în funcție de temperatura de creștere. De asemenea, capacitatea de agregare a particulelor intramembranare este deosebită în funcție de temperatură și natura membranei și se exteriorizează deosebit în acord cu posibilitățile adaptative ale celulelor. Pentru unele celule, tranziția termotropă și trecerea membranei în stare cristalină este însoțită de o inhibare a activității enzimelor din membrană.

Datele cele mai numeroase cu privire la rolul temperaturii asupra lipidelor din membrane, au fost obținute pe organisme unicelulare. Bevers și col. (1978) au studiat capacitatea de hidroliză a fosfolipazei A_2 asupra fosfatidilglicerolului din membrana de *Acholeplasma laidlawii*, în funcție de temperatura de creștere. Faptul că hidroliza este dependentă de temperatura de creștere și nu de cantitatea de fosfolipază, arată că procesul de eliberare al fosfatidilglicerolului din membrană depinde de starea de fază a lipidelor. În cazul membranelor îmbogățite cu acid oleic, lipidele din membrană sînt în stare lichid-

cristalină, în limitele de temperatură de $0-40^{\circ}\text{C}$ și hidroliza fosfolipidului nu mai depinde de temperatura de creștere. Cu alte cuvinte, hidroliza fosfatidilglicerolului are loc numai când o parte din lipide se află în stare fluidă.

Un amestec de două fosfatidilcoline, care se deosebesc puțin prin lanțurile hidrocarbonate, cocrystalizează împreună la temperatura de tranziție de fază. Dacă lanțurile acil din moleculele de fosfatidilcolină sînt deosebite (peste două grupări CH_2 sau ca grad de nesaturare), se constată două picuri termotrope în membrană. De exemplu, palmitoil-oleil fosfatidilcolina și dipalmitoil fosfatidilcolina prezintă temperaturi de tranziție de fază la 3°C și respectiv $41,5^{\circ}\text{C}$ în timp ce palmitoil-elaidoil fosfatidilcolina și dielaidoil fosfatidilcolina, au tranziții termotrope la 26°C și $9,5^{\circ}\text{C}$.

Christiansson și Wieslander (1978) au cercetat capacitatea de sinteză a lipidelor în funcție de temperatură pe celule de *Acholeplasma*. Scăderea bruscă a temperaturii provoacă o creștere rapidă a sintezei unor lipide (fosfatidilglicerol, monoglucozildiglicerol). Temperatura scăzută induce mai multe procese aproape simultane: modifică turnover-ul unor lipide în membrană sau a unor variante moleculare ale aceluiași lipid, determină modificări enzimatice selective a lipidelor existente (acilări sau deacilări), etc. Scăderea temperaturii de creștere la 17°C , determină o stimulare a încorporării acidului oleic în fosfolipidele de membrană, dovedind că membranele plasmatice de la *Acholeplasma* sînt echipate cu sisteme enzimatice ce permit reglarea gradului de nesaturare al lipidelor.

Trebuie subliniat și faptul că tratarea membranelor de *Acholeplasma* cu fosfolipază A_2 la temperatură scăzută ($0-15^{\circ}\text{C}$), nu hidrolizează toată cantitatea de fosfatidilglicerol (numai 70%). S-a sugerat că acea cantitate de fosfatidilglicerol rămasă în membrană este protejată de alte componente, în special proteine.

Membranele plasmatice ale unor mamifere hibernante prezintă capacități adaptative particulare. De exemplu funcțiile catalitice ale Na^+ , K^+ -ATP-azei rămîn nealterate chiar la temperaturi foarte scăzute (aproape de 0°C). Aloia (1977) a analizat compoziția în fosfolipide a unor membrane plasmatice din țesutul nervos, hepatic și renal de la veriga hibernantă. S-au observat modificări semnificative în compoziția fosfolipidelor din membrane în cursul hibernării. Astfel, în creier crește conținutul în fosfatidilcolină și scade nivelul fosfatidiletanolaminei; în rinichi crește concentrația fosfatidilcolinei și scade concentrația sfingomielinei. În membranele plasmatice ale hepatocitului

scade nivelul fosfatidilinozitolului, fosfatidilserinei și crește fosfatidiletanolamina. S-a apreciat că fosfatidiletanolamina activează glucoză-6-fosfataza, enzimă implicată în procesul de gluconeogenază. În cursul hibernării, activitatea acestei enzime crește 100%. De asemenea, la temperatură scăzută citidiltransferaza folosește preferențial acidul fosfatidic pentru biosinteza fosfatidiletanolaminei din membranele plasmactice ale celulei hepatice.

2.4. Mișcările lipidelor în membrane. Stratul bimolecular lipidic din membrane este o structură dinamică, apreciată pe baza interferenței a numeroși factori. Lanțurile acizilor grași din structura lipidelor prezintă mișcări de agitație continuă, care favorizează rotația lor în membrane. Flexibilitatea este mai mare la fosfolipidele ce conțin acizi grași saturați și a fost dedusă termodinamic.

Deoarece majoritatea lipidelor din stratul bimolecular nu se află într-o organizare foarte strinsă, ele sînt capabile să se miște sau să se reorienteze în membrană. În membranele plasmactice ale unor tipuri de celule s-au descris mișcări de interversiune a fosfolipidelor (molecula din stratul extern se rotește cu capul polar spre interior și invers), proces cunoscut sub denumirea de mișcări "flip-flop". Cu alte cuvinte, unele molecule fosfolipidice se pot deplasa dintr-un strat lipidic în celălalt, dar vitezele lor de mișcare sînt relativ mici. În afara acestor posibilități de mișcare, lipidele se pot deplasa în membrană fără să părăsească stratul din care fac parte. Aceste mișcări se numesc difuzie laterală. Măsurătorile fizice au arătat că moleculele lipidice din membrane efectuează numeroase deplasări de difuzie laterală în unitate de timp (la o temperatură normală). S-a calculat

că viteza de difuzie laterală a unei molecule fosfolipidice este de aproximativ 5-10 nm/sec. Acest lucru înseamnă că în structura unei membrane, fiecare moleculă rămîne într-o anumită poziție, în medie 10^{-7} sec (vezi figura 18).

Difuzia lipidelor din membrane poate fi apreciată prin fixarea în stratul lipidic a unui marker fluorescent, de exemplu derivați ai acidului 9-antroilcarboxilic. Analiza polarizării

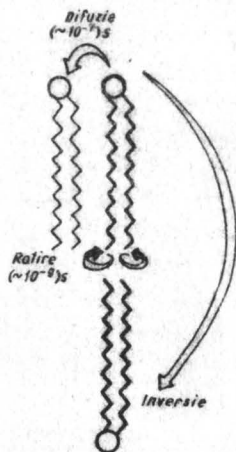


Fig.18. Principalele tipuri de mișcări ale lipidelor în structurile de membrană ale celulelor.

luminii emise de fluorocrom, dă informații asupra orientării, rotației și translației sale în stratul lipidic, ceea ce reflectă natura micro-mediului din membrane. De asemenea, tehnica de rezonanță electronică de spin și utilizarea unor markeri adecvați (6-nitroxil-palmitat), poate măsura energia absorbită de către electronul de spin liber, pe baza căreia se deduce orientarea fosfolipidelor în membrane și fluiditatea lor.

Observațiile asupra mișcărilor lipidelor au fost efectuate pe filme monomoleculare, bimoleculare, membrane sau lipozomi (Vanderkooi și Collis, 1974; Chapman, 1973). Trissie și col. (1978) au studiat difuzia antroilstearatului în filme mono- și bimoleculare de dipalmitoil-fosfatidilcolină și dipalmitoil-fosfatidilglicerină. Markerul segregă în arii, în care mișcările de rotație și translație ale fosfolipidelor rămân nemodificate. În prezența unor condiții ionice variabile împachetarea fosfatidilglicerolului în membrane este modificată (Sacré și Tocanné, 1977). Filmele mono- și bimoleculare cele mai condensate se obțin în apă la pH 6,0. Ioni din faza apoasă influențează difuzia fosfolipidelor în membrane, și pot juca un rol însemnat în modularea activității proteinelor funcționale.

Pentru unele membrane plasmaticе, fluiditatea este mai mare în stratul lipidic citoplasmatic, în comparație cu cel extern. De asemenea, fluiditatea membranei este mai mare în zona centrală a bistratului lipidic, decât la periferie, unde grupările polare mențin un oarecare grad de rigiditate al fosfolipidelor (van Dijk și col. 1975, Teissie și col. 1976).

Capacitatea de deplasare variabilă a fosfolipidelor din structurile de membrană are multiple semnificații pentru funcțiile celulare. Mișcările lipidelor pot fi modificate ca urmare a interrelațiilor cu proteinele și glicoproteinele din membrane. În acest fel se asigură o mobilitate și o adaptabilitate remarcabilă a proteinelor, lipoproteinelor și glicoproteinelor din membrane, în mecanismele complexe de recepție și transformare a semnalelor din mediu.

2.5. Topografia fosfolipidelor din membranele plasmaticе.

Stratul bimolecular lipidic al membranelor plasmaticе și citoplasmaticе este asimetric, adică prezintă o distribuție deosebită a fosfolipidelor pe cele două fețe (externă și citoplasmatică). Dispoziția fosfolipidelor din stratul bimolecular al membranelor a fost studiată cu ajutorul enzimelor lipolitice. Fosfolipazele hidrolizează specific anumite legături din molecula fosfolipidului (vezi figura 19).

Fosfolipaza A_2 are o acțiune litică asupra unor membrane eritrocitare, în funcție de compoziția lor în fosfolipide. Fosfolipazele care acționează numai asupra suprafeței externe a celulelor eritrocitare (stratul molecular extern), nu produc hemoliza. Eliberarea selec-

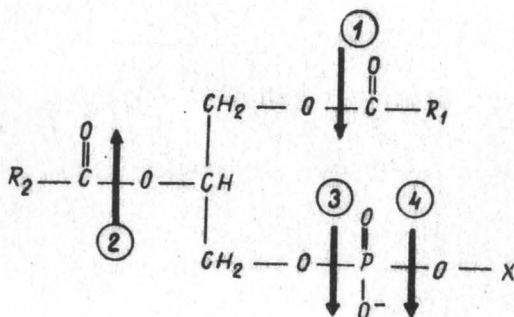


Fig.19. Mecanismul de acțiune al fosfolipazelor asupra fosfogliceridelor.

1. fosfatidilacilhidrolaza (fosfolipaza A_1 sau B).
2. fosfatidilacilhidrolaza (fosfolipaza A_2).
3. fosfatidilacilfosfohidrolaza (fosfolipaza C).
4. fosfatidilacilfosfatid hidrolaza (fosfolipaza D).

tivă a fosfatidilcolinei din membrana eritrocitului uman, demonstrează că cel puțin 2/3 din acest fosfolipid este localizat pe fața externă a membranei plasmatică; se eliberează de asemenea, și o mică fracție de fosfatidiletanolamină. Restul fosfolipidelor care rămân în membrană, nu mai sînt accesibile degradării în prezența fosfolipazei A_2 . Adăusul ulterior de sfingomielinază (sfingomielincolinfosfohidrolaza), determină o degradare suplimentară a unor fosfolipide. Sub acțiunea sinergică a ambelor enzime, se eliberează din membrană aproximativ 50% din fosfolipide. Un exemplu elocvent este oferit în tabelul 6 (Rencolij și col.1976). Cercetările enzimatice au arătat că bistratul molecular lipidic al membranei eritrocitare este asimetric. Stratul extern conține în cantitate mare fosfatidilcolină, sfingomielină și lisofosfatidilcolină, în timp ce fosfatidiletanolamina și fosfatidilserina se găsesc în cantitate mai mare în stratul intern (figura 2c).

Asimetria fosfolipidelor membranare este variabilă, adică în diverse membrane raporturile procentuale ale fosfolipidelor pe cele

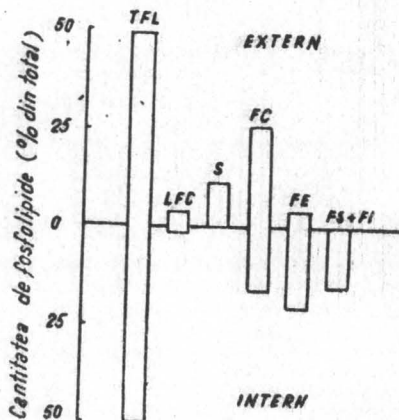


Fig.20. Distribuția principalelor tipuri de fosfolipide din cele două părți ale stratului bimolecular lipidic al membranei plasmatice eritrocitare. TFL = fosfolipide totale; LFC = lisofosfatidilcolină; S = sfingomielină; FC = fosfatidilcolină; FE = fosfatidiletanolamină; PS + PI = fosfatidilserină + fosfatidilinositol.

două fețe ale membranei plasmatice sînt deosebite. Astfel, membranele eritrocitare ale unor specii (oale, bou) prezintă în stratul lipidic extern cantități mai mari de sfingomielină și puține fosfatidilcoline. Se remarcă în acest sens că fosfolipaza A_2 și C nu produc hemoliza eritrocitelor de oale și bou, în timp ce eritrocitele de cobai sînt lizate.

În concordanță cu asimetria stratului bimolecular lipidic al membranei există și o distribuție preferențială a proteinelor. Originea asimetriei este rezultatul biogenezei membranelor, realizată în cursul dezvoltării embrionare și al proceselor metabolice specifice.

Tabelul 6 - Degradarea nehemolitică a fosfolipidelor membranei plasmactice eritrocitare de șobolan, sub acțiunea fosfolipazelor.

	Fosfo- lipide %	Degradate cu	
		Fosfolipaza A ₂	Sfingomielinază
Lisofosfatidilcolină	5	-	-
Sfingomielină	12	-	100
Fosfatidilcolină	42	48	-
Fosfatidilserină + fosfatidilinozitol	16	-	-
Fosfatidiletanolamină	25	8	-
TOTAL =	100	22	12

2.6. Rolul colesterolului. Cercetările experimentale au apreciat că colesterolul controlează fluiditatea acizilor grași din fosfolipide, prin inserția sa între lanțurile hidrocarbonate (Chapman, 1973, 1976). Nucleul steroidic al colesterolului cu gruparea hidroxică orientată în afară, fixează primii 9-10 atomi de carbon din lanțurile hidrocarbonate fosfolipidice, independent de starea fizică a membranei (lichid-cristalină sau cristalină). Ca urmare, lanțurile hidrocarbonice prezintă un grad de libertate intermediar, la orice temperatură. Cu alte cuvinte, colesterolul contracarează influența temperaturii asupra stării fizice a fosfolipidelor din membrană (tranziția de fază a lor). S-a demonstrat că la concentrații mari în colesterol (raport molar 1:1), are loc o inhibiție a tranziției de fază a fosfolipidelor din membrane.

Trebuie să subliniem faptul că colesterolul exercită asupra fosfolipidelor din membrane un efect dublu: scade fluiditatea lanțurilor hidrocarbonice deasupra temperaturii de tranziție de fază și crește fluiditatea lor, sub temperatura de tranziție de fază. Acest lucru a fost stabilit prin cercetarea permeabilității membranelor fosfolipidice (lipozomi), preparate din fosfatidilcoline cu compoziții variate în acizi grași. În aceste condiții, permeabilitatea membranelor este dependentă de gradul de împachetare a lanțurilor hidrocarbonice.

Membranele plasmactice celulare care au cantități mari de colesterol (eritrocitară, mielinică), nu prezintă tranziții de fază (Rudy și Gitler, 1972). Stratul intern lipidic al membranei conține cantități mici de colesterol, dar are fosfolipide cu acizi grași polinesaturați.

Explicația este dată de faptul că colesterolul nu poate stabili interacții van der Waals cu lanțuri hidrocarbonice polinesaturate, în limitele fiziologice de temperatură (Huang și col. 1974). Deci, distribuția preferențială a colesterolului în membranele plasmatică este consecința topografiei asimetrice a fosfolipidelor în dublul strat lipidic.

Deși colesterolul impune în membrana plasmatică o permeabilitate intermediară, s-au constatat o serie de deosebiri legate de existența unor interrelații diferite între colesterol-fosfatidilcolină și colesterol - sfingomielină. Modificarea conținutului în colesterol din membrana plasmatică este însoțită de schimbarea gradului de saturare al acizilor grași din fosfolipide, pentru a se păstra în limite normale fluiditatea membranei. Aceasta se reflectă deosebit în funcție de tipul celular și capacitățile sale adaptative (și probabil interferența altor factori). De exemplu, lipsa colesterolului din membrana eritrocitului uman este compensată prin creșterea conținutului în acizi grași saturați.

3. PROTEINELE DIN MEMBRANELE PLASMATICE CELULARE

3.1. Noțiuni introductive. Cunoștințele noastre asupra compoziției proteice și naturii lor din membranele celulare s-au dezvoltat enorm în ultimii 10 ani. În membrana plasmatică a celulei hepatice de la mamifere s-au descris peste 25 proteine enzimatice și numărul lor continuă să crească. Este cert că nu există nici o membrană plasmatică sau citoplasmatică, care să nu aibă una sau mai multe proteine enzimatice. Proteinele din membranele celulare, în funcție de rolul lor biologic, pot fi împărțite în trei grupe:

- a) proteine cu activități enzimatice.
- b) receptori proteici, care din punct de vedere chimic pot fi proteine, glicoproteine sau lipoproteine.
- c) proteine inactive (structurale).

În general, membranele plasmatiche ale celulelor animale prezintă o compoziție proteică complexă și variată. Nu putem vorbi de o compoziție "tip" în proteine pentru membrane. Fiecare tip celular se caracterizează prin prezența unor proteine proprii, ce individualizează celula și reflectă fenotipul ei. De asemenea, compoziția proteică a membranelor plasmatiche se modifică în cursul dezvoltării și sub influența factorilor mediului extern sau al metabolismului celular. Funcțiile membranelor plasmatiche (extrem de numeroase și variate) sînt dependente de existența proteinelor și de cooperarea lor cu lipidele și alte componente ale membranei, cu care pot forma organizări moleculare specifice.

Pentru captarea informației din mediu, celulele și-au dezvoltat în și pe membrane un arsenal de structuri receptoare (multe de natură proteică). Celulele diferențiate funcțional, se caracterizează printr-un spectru particular de receptori, care conferă fiecărui tip de celulă specializată, o capacitate deosebită de a recunoaște semnalele proprii.

Wallach și Winzler (1975) au examinat pe baze imunologice compoziția în proteine a unei celule ipotetice, cu un diametru de 5 nm. Dacă fiecare proteină ocupă o suprafață de aproximativ 2500 Å, s-a calculat că pentru 20.000 proteine deosebite, suprafața totală acoperită

de către proteine este de 5×10^7 Å. Această suprafață reprezintă doar 1% din suprafața totală a celulei ipotetice. Exemplul, ne oferă o imagine asupra numărului extrem de mare de proteine din membrana plasmatică a unei celule. Foarte sugestive sînt datele experimentale ale lui Sato și col. (1978). Folosind o tehnică de electroforeză bidimensională pe gel de acrilamidă și un procedeu de solubilizare original, autorii au identificat peste 120 proteine diferite în membrana internă și aproape 60 de proteine în membrana externă de la *E.coli*. De subliniat că tehnica nu permite vizualizarea proteinelor cu gr.mol. sub 20.000.

Experimental s-a dovedit că într-o serie de membrane plasmatică există doar o singură proteină dominantă. Astfel, membranele plasmatică ale celulelor fotoreceptoare din retină, conțin în proporție de 80-90% rodopsină (Dryer și col.1972). Marea majoritate a membranelor au compoziții proteice heterogene. Analizele chimice efectuate pe fantome eritrocitare de la diverse specii, au evidențiat existența unor componente proteice deosebite (cu gr.mol. cuprinse între 300.000 și 5000 daltoni). Studiul comparativ a dovedit însă prezența unor proteine analoge, în membranele plasmatică ale eritrocitelor de la diverse specii. Dimpotrivă, limfocitele se caracterizează printr-un spectru proteic foarte deosebit de cel al eritrocitelor.

Organizarea proteinelor în membrane, cît și distribuția lor, poate fi explicată pe mai multe căi. Într-o formulare generală, se poate aprecia că proteinele din membranele plasmatică sînt rezultatul cooperării dintre informația genetică și factorii mediului înconjurător.

3.2. Topografia proteinelor din membranele plasmatică.

Așezarea proteinelor în și pe membrane a constituit subiectul a numeroase discuții controversate, care au dus la elaborarea mai multor modele de membrană. Acest lucru s-a datorat insuficienței cunoașterii a diversității de organizare a membranelor și componentelor din diverse tipuri de celule, inaccesibilității de identificare a multor proteine, interpretării eronate a imaginilor de microscopie electronică (pe secțiuni fine), ș.a. Nici în prezent nu dispunem de date experimentale suficiente pentru a avea o imagine reală asupra topografiei proteinelor în membrane. Luînd în considerație conceptul după care majoritatea membranelor celulare prezintă un strat lipidic bimolecular asimetric, validitatea modelului în mozaic fluid a lui Singer și Nicolson (1972), cît și numeroase argumente experimentale actuale, putem aprecia aranjamentul unor proteine în membrana plasmatică a unor tipuri de celule.

Pentru membrana plasmatică s-au precizat mai multe posibilități de fixare a proteinelor biologice active, și anume:

- a) proteine asociate preferențial pe una din fețele membranei.
- b) proteine ce străbat întreaga grosime a membranei (transmembranare).
- c) proteine asociate de membrană prin intermediul unor componente constitutive (proteine periferice).

Trebuie să precizăm că nu se cunosc nici o proteină enzimatică ce poate fi prezentă pe ambele fețe ale aceiași membrane plasmactice. De asemenea, în cadrul unui tip de celulă, membrana plasmatică poate prezenta specializări regionale, reflectate prin distribuții variate și deosebite ale proteinelor. Sugestiv în acest sens sînt celulele epiteliale intestinale și renale, care prin poziția și funcțiile lor în cadrul structurilor, și-au dezvoltat în diverse arii, organizări morfo-funcționale particulare ale membranei plasmactice (membrana luminală, latero-bazală, seroasă), cu compoziții proteice deosebite.

Pentru a avea o imagine sugestivă asupra topografiei proteinelor în membranele plasmactice, prezentăm o schemă de ansamblu privind dispoziția unor proteine în membrana eritrocitului (figura 21).

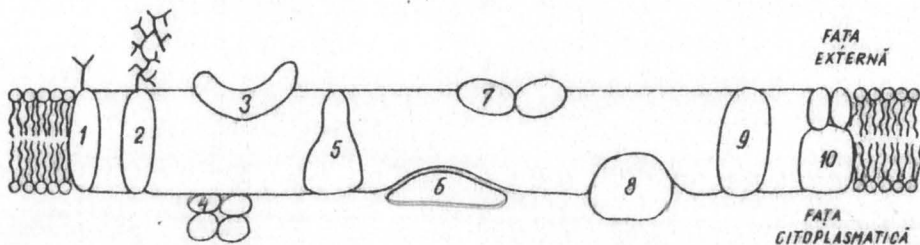


Fig.21. Reprezentarea schematică a topografiei unor proteine și glicoproteine, în membrana plasmatică a eritrocitului uman.

- 1 - glicoproteină; 2 - sialoglicoproteină; 3 - acetilcolinesteraza; 4 - Gliceraldehid-3 - fosfat dehidrogenaza; 5 - Na^+ , K^+ -ATP-aza; 6 - spectrina; 7 - fucosiltransferaza; 8 - proteinkinaza; 9 - proteină transportoare; 10 - adenilatciclaza.

Această reprezentare este foarte simplă și se referă numai la proteinele și glicoproteinele, care au fost relativ bine caracterizate. În membrana eritrocitară au fost identificate citochimic și blo-

chimic numeroase proteine. Din fantomele eritrocitare de la o serie de specii, solubilizate cu ajutorul detergenților (deoxicolat de Na, triton X-100), au fost separate electroforetic 15-25 benzi proteice și 4-6 benzi glicoproteice. Citochimic, în membrana eritrocitului uman s-au descris peste 30 enzime. Distribuția și topografia acestor proteine în membrană este greu de apreciat din multiple cauze. Astfel Na^+ , K^+ -ATP-aza se identifică citochimic în multe membrane plasmactice pe fața externă, deși datele biochimice și izotopice au dovedit că ortofosfatul se eliberează pe fața citoplasmatică a membranei.

În studiul distribuției proteinelor în membrane se folosesc mai multe metode: solubilizare selectivă, studiu citochimic (fotonic și electrono-microscopic), marcări cu izotopi sau lectine, cercetarea particulelor membranare cu tehnica de înghețare-fracturare, studii imunochimice, marcaje cu fluorocromi. Fiecare tehnică luată separat prezintă o serie de limite. De exemplu, prin solubilizare selectivă nu se pot distinge cele două fețe ale membranei, dar se poate aprecia dacă enzima este asociată de periferia membranei sau face parte din structura sa. Proteinele solubilizate cu soluții de forțe ionice mari sau prin digestie scurtă cu enzime proteolitice, sînt considerate ca fiind asociate de fața externă a membranei. Proteinele ce se eliberează numai după tratament cu solvenți organici sau detergenți, apar strîns asociate de membrană. Proteinele enzimactice care necesită lipide pentru funcționarea lor (Na^+ , K^+ -ATP-aza) sînt puternic legate de bistratul lipidic al membranei (Coleman, 1973; Hinton și Reid 1976).

Metodele imunochimice au permis descifrarea multor aspecte legate de distribuția și topografia proteinelor în membrane. Cu ajutorul lor se poate aprecia distribuția preferențială a proteinei pe una din cele două fețe ale membranei. De asemenea, se poate urmări distribuția unei proteine pe suprafața celulei intacte, mai ales dacă anticorpii sînt postcuplați cu alți markeri (fluorocromi, substanțe radioactive). Metodele imunochimice sînt limitate însă de puritatea antigenului utilizat pentru obținerea de antiseruri (Gurd și Evans, 1974; Coleman, 1973; Hubbard și Cohn, 1975).

Tratarea celulelor întregi cu enzime proteolitice sau substanțe ce nu pătrund în celule, a permis identificarea pe fața externă a membranei eritrocitare a trei polipeptide majore. Rezultate asemănătoare s-au obținut și prin incubarea celulelor în medii cu agenți chimici, care reacționează cu grupările libere funcționale ale proteinelor. Astfel, sarea de diazoniu radioactivă a acidului sulfanilic și formil-metionilsulfon metilfosfatul, se fixează de grupările amino libere din proteinele de membrană prin legături covalente. Solubilizarea lor din

membrană și electroforeza ulterioară pe gel de poliacrilamidă, a identificat numai 2 benzi proteice marcate. Rezultate deosebite s-au obținut când s-au folosit fragmente de membrană. Incubarea lor în condiții tehnice identice, a permis marcarea a numeroase proteine din membrana plasmatică. S-au emis mai multe păreri asupra acestor rezultate deosebite: a) multe proteine sînt accesibile numai pe fața internă a membranei; b) liza osmotică ar putea induce modificări în organizarea proteinelor din membrană; c) multe proteine din membrană se află puternic înglobate în structura lipidică și grupările lor funcționale sînt criptice.

Cele mai multe cercetări asupra identificării și distribuției enzimelor în membranele plasmatică s-au realizat cu ajutorul tehnicilor de citochimie, care combinate cu metodele biochimice au adus un real folos biologiei celulare. Revizuirea lor critică nu este posibilă în acest cadru restrîns.

Un aport deosebit la cunoașterea topografiei proteinelor în membrane, l-a adus în ultimii ani, tehnica de înghețare-fracturare. Celule întregi sau fragmente de membrane (plasmatică sau citoplasmatică) sînt rapid înghețate și apoi fracturate, într-o incintă vidată și la temperaturi foarte scăzute (între -100 și -150°C). Fracturarea se produce în planul membranei, în regiunea mijlocie a dublului strat lipidic. Suprafețele fracturate sînt umbrite prin metalizare, și apoi, sînt examinate la microscopul electronic. Tehnica permite vizualizarea în paralel și a uneia din suprafețele externe ale membranei (fața externă sau fața citoplasmatică), în funcție de poziția celulei față de planul fracturii.

Fracturarea membranei determină separarea celor două jumătăți ale bistratului lipidic și vizualizarea regiunii hidrofobe. În cazul a numeroase membrane plasmatică, suprafețele de fractură au identificat prezența unor mici proeminente, denumite particule intramembranare. Ele sînt structuri globulare cu un diametru aproximativ de $70-80 \text{ \AA}$, reprezentate de proteine ce străbat stratul lipidic al membranei. S-a apreciat că fiecare particulă intramembranară ar fi formată dintr-un agregat molecular, constituit din unirea mai multor proteine integrale (Marchesi, 1975; Nicolson și col. 1976). De exemplu, suprafața de fractură a membranei plasmatică eritrocitare evidențiază numeroase particule intramembranare, cu o dispoziție uniformă în membrană (în condiții normale) (vezi figura 22).

Dispoziția și topografia acestor particule intramembranare poate fi comparată cu repartiția unor componente de pe suprafața externă a membranei. În acest caz este necesar să se utilizeze o serie de markeri

specificali pentru situsuri receptoare de pe suprafața membranei. De exemplu, se folosesc lectine vegetale (fitohemaglutinina, aglutinina din



Fig.22. Imagine electrono-microscopică a membranei plasmatice a eritrocitului uman, prin regiunea internă hidrofobă a biatratului fosfolipidic. Tehnica de înghețare-fracturare evidențiază numeroase proeminențe globulare distribuite omogen pe întreaga suprafață de fractură, numite particule intramembranare; (după Branton, 1973).

germeni de grâu) pentru localizarea moleculelor de glicoforină pe suprafața celulei intacte, cunoscându-se că acești liganzi se fixează de receptori specifici oligozaharidici de pe molecula glicoproteică. Imaginile electrono-microscopice a dispoziției lectinelor vegetale conjugate cu feritină, au vizualizat pe suprafața externă a membranei componente globulare, a căror distribuție în membrana plasmatică este asemănătoare cu cea a particulelor intramembranare.

Deși tehnica de înghețare-fracturare permite vizualizarea unor macromolecule cu diametrul de 30-50 Å (puterea de rezoluție inferioară microscopiei electronice convenționale), ea are avantajul examinării regiunilor (suprafețelor) hidrofobe ale membranelor și corelarea situsurilor receptoare de pe suprafața membranei cu structurile proteice din interiorul membranei. Distribuția și mișcările particulelor intramembranare sub influența unor factori externi sau intrinseci, a permis elucidarea unor aspecte legate de topografia proteinelor în membrane și organizarea lor funcțională.

Dispoziția particulelor intramembranare și a receptorilor de pe suprafața membranei se modifică substanțial, sub acțiunea variațiilor de pH ale mediului, a concentrației saline, tratament cu EDTA, sub

acțiunea enzimelor proteolitice, a temperaturii, a modificării compoziției lipidelor din membrană, a naturii acizilor grași din fosfolipidele de membrană, în cursul ciclului celular, ș.a. Numeroase date experimentale au sugerat că starea de fluiditate a membranei și factorii care modifică tranziția de fază a lipidelor sau a relațiilor dintre lipide și proteine din membrane joacă un rol însemnat în distribuția componentelor din membranele plasmatice și citoplasmatiche.

Dovezi suplimentare asupra dispoziției unor proteine în membrane, s-au obținut prin studierea membranelor artificiale. Imaginile electrono-microscopice ale fețelor de fractură a unor membrane artificiale sau lipozomi alcătuite din lipide pure, vizualizează suprafețe netede. Același lucru se observă și în cazul în care lipidele sînt asociate cu proteine periferice din membrane (de exemplu acetilcolinesteraza din membrana eritrocitului). Prin asocierea lipidelor pure cu proteine constitutive se obțin imagini deosebite: suprafețele fracturate ale regiunii hidrofobe sînt acoperite de structuri globulare, asemănătoare particulelor intramembranare din membranele biologice. Aceste constatări obținute pe modele artificiale au permis să se aprecieze că proteinele constitutive din membranele plasmatice, sînt adînc înfipite în matricea hidrofobă a stratului bimolecular lipidic.

3.3. Dispoziția topografică a unei proteine extrase din membrana plasmatică eritrocitară. Una din proteinele intrinseci ale membranei eritrocitare (denumită banda 3), a constituit un model adecvat pentru a cerceta topografia ei în membrane lipidice artificiale (lipozomi) de către grupul de cercetători olandezi (van Deenen și col.1978). Pentru a permite înglobarea proteinei în membrane artificiale, lecitina de ou a fost dispersată într-un mediu cu triton X-100 și extract proteic. Suspensia a fost tratată ulterior cu Bio-Beds pentru îndepărtarea detergentului, iar Bio-Beds a fost eliminat prin filtrare pe vată de sticlă. Veziculele fosfolipidice au fost adunate în sediment prin centrifugare (150.000 g timp de 90 min). Prin acest procedeu, aproximativ 95% din proteină s-a regăsit încorporată în veziculele fosfolipidice (vezi figura 23).

Cu ajutorul tehnicii de înghețare-fracturare s-au vizualizat vezicule cu un diametru de 200 nm, în care se disting particule cu diametrul de 8 nm, pe ambele fețe ale fracturii. Omisia din mediul de recombinație a proteinei, vizualizează electrono-microscopic vezicule lipsite de particule. Prin îngheț și dezgheț repetat are loc o fuziune a veziculelor fosfolipidice permițînd observarea unei fețe de fracturi mai mari.

Combinând aceste tehnici cu metode de marcaj, s-a putut demonstra că proteina este o componentă a particulelor intramembranare

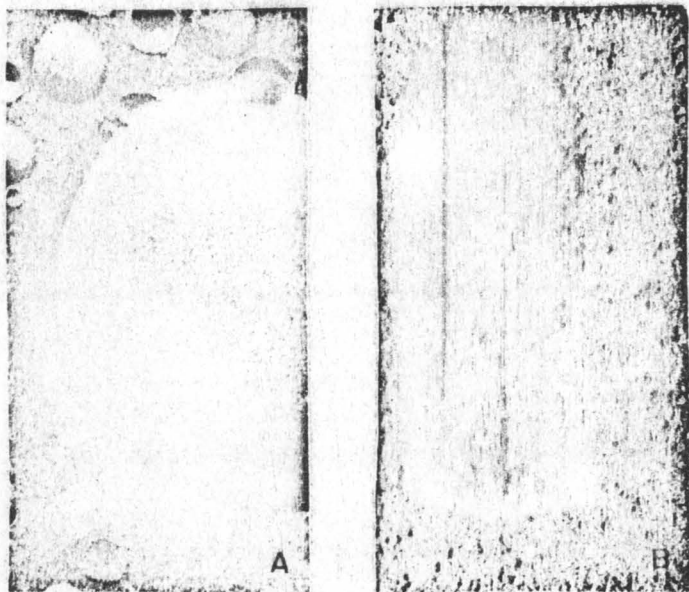


Fig.23. Imagine electrono-microscopică a fețelor de fractură obținute prin tehnica de înghețare fracturare.

A) față de fractură a unui lipozom format din fosfolipide pure.

B) față de fractură a unui lipozom în care s-au înglobat proteine purificate din membrana plasmatică a eritrocitului (proteina denumită banda 3) (după Gerritsen și col. 1978).

din membrana eritrocitară. Studiile de digestie enzimatică au arătat că proteina "banda 3" nu este orientată la întâmplare în membrană. Dacă distribuția inegală a particulelor intramembranare din membrana eritrocitului poate fi discutată pe baza asimetriei fosfolipidelor (Gunn și Kirk, 1976), absența asimetriei lipidelor din membranele artificiale determină o distribuție asemănătoare a particulelor pe cele două fețe ale membranei.

3.4. Compoziția chimică (enzimatică) a membranelor plasmatiche.

În membrana plasmatică a numeroase tipuri de celule s-au evidențiat citochimic și biochimic numeroase enzime (peste 200). Distribuția lor este foarte variată în funcție de tipul de celulă (țesut). Sub acest aspect trebuie să subliniem că nu există enzimă "marker" pentru membranele plasmatiche luate în general. Valabilitatea enzimelor marker poate fi corect apreciată numai pentru un anumit tip de celulă (sau țesut) și este variabilă de la o specie la alta. Multă vreme s-a considerat că adenilatciclaza este o enzimă marker pentru membrana plasmatică. Această afirmație este pusă la îndoială pentru multe membrane plasmatiche, inclusiv ale celulei hepatice (Cheng și Farquhar, 1976). Membrana plasmatică cu bordură în perie a celulelor epiteliale renale de la multe mamifere (iepure, șoarece, cîine, maimuță, om) conține trehalaza, care este absentă în celulele renale de la pisică și șobolan (Sacktor, 1977). O discuție exhaustivă asupra distribuției enzimelor din membranele plasmatiche depășește cadrul lucrării. Totuși, câteva precizări sînt utile.

Enzime ce participă în sinteza unor componente de membrană. Pe fața externă a membranei plasmatiche limfocitare s-au descris două fucoziltransferaze (GDP-fucoză: galactozilfucoziltransferaza și GDP-fucoză:N-acetilglucozamidfucoziltransferaza), care transferă fucoza pe acceptori membranari cu gr.mol. mici (glicolipide și glicoproteine). Experimental s-a calculat că o celulă este capabilă să accepte pînă la 100.000 resturi fucozil (Hoflack și col. 1978). Datele cantitative sînt analoage cu cele obținute pentru alte enzime, și anume: ectogalactoziltransferaza și ectosialiltransferaza (Verbert și col. 1976, Cacan și col. 1977). De subliniat că aceste enzime nu sînt capabile să transfere resturile fucozil pe acceptori externi macromoleculari (specific enzimelor intracelulare). Deosebiri funcționale sugerează existența unor enzime diferite, sau enzime analoage, ce lucrează deosebit pe membrana plasmatică.

Lisolecitinaciltransferaza a fost descrisă în multe membrane plasmatiche (Ferber și col. 1972). În membrana plasmatică a celulei hepatice mai există fosfolipază, fosfatidfosfohidrolaza, glicerolfosforilcolin fosfodiesteraza (Hinton și Reid, 1976).

Proteinkinaze de membrană. Cercetările din ultimii ani au reliefat importanța fosforilării unor proteine din structura membranei plasmatiche, în exercitarea unor funcții celulare specifice. Ca regulă

generală, proteinkinazele de membrană sînt stimulate de concentrații mici de AMP_0 . Din punct de vedere topografic, atît componenta catalitică cît și cea regulatoare (fixatoarea AMP_0) a proteinkinazei din membrana plasmatică a eritrocitului uman, sînt localizate pe fața intracelulară (Rubin și Rosen, 1973).

Prin incubarea membranelor celulelor hipofizare în prezența $32P$ -ATP, ortofosfatul radioactiv este regăsit în proteinele de membrană. Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a acestor proteine, solubilizate din membrane evidențiază 36 benzi proteice, din care 11 erau fosforilate. AMP_0 stimulează fosforilarea a 9 proteine din membrane (Lemay și col. 1974). Fosforilarea unor proteine din membrana plasmatică, joacă un rol însemnat în procesul de eliberare al proteinelor secretorii din celulele adenohipofizei.

În membrana plasmatică a eritrocitelor umane s-au identificat proteine, ce reprezintă substraturi pentru proteinkinazele din membrană. Fosforilarea a două dintre ele crește sub influența AMP_0 (Rubin și Rosen, 1973).

În membrana plasmatică a celulelor adipoase s-au descris două proteine ce pot fi fosforilate de proteinkinaze (Chang și Cuatrecasas, 1974). Fosforilarea lor facilitează funcția de transport a glucozei prin membrană (proces sensibil la insulină). Controlul permeabilității celulare poate fi asigurat și pe seama scăderii capacității de fosforilare a unor proteine de membrană. Astfel, incubarea vezicii urinare de broască în prezența AMP_0 sau a hormonului antidiuretic, determină o scădere a fosforilării unei proteine specifice din membrana plasmatică a celulelor epiteliale, proces care precede modificarea vitezei de transport a ionilor de Na^+ (De Lorenzo și Greengard, 1973).

Enzime cu funcții transportoare în membrane. Mecanismele de transport ale cationilor monovalenți (Na^+ , K^+) sînt facilitate de prezența unei ATP-aze specifice. Deosebiri mari există în privința numărului pompelor ionice, în diverse membrane: 100-200 pompe în membrana plasmatică eritrocitară și 300.000 pompe în membranele celulelor HeLa. În ultimul caz, enzima ocupă 3% din suprafața membranei (Ellory și Keynes, 1969; Baker și Willis, 1969). S-au descris și alte enzime cu funcții transportoare ce vor fi discutate ulterior.

Enzime cu funcții informaționale în membrane. Adenilatciclaza a fost descrisă în numeroase membrane plasmatice, dar și în unele membrane citoplasmatiche (vezi recepția hormonală de membrană).

Acetilcolinesteraza joacă un rol însemnat în transmiterea impulsului nervos și reglarea permeabilității unor membrane plasmatice. Enzima a fost localizată în membrana plasmatică eritrocitară, hepatică,

nervooasă, etc. În celula musculară enzima apare în reticulul endoplasmic, dar și în membrana plasmatică. După părerea lui Changeux (1966), acetilcolinesteraza din membrana postsinaptică se află în două stări conformaționale deosebite, cu afinități variate pentru substrat: Acetilcolina poate avea rol de substrat și modulator. Prin modificarea structurii membranei, are loc eliberarea enzimei de sub influența regulatorilor a substratului și acetilcolinesteraza se stabilizează sub forma unui conformer cu afinitate mare pentru acetilcolină (Kasai și Changeux, 1971). Autorii presupun că proprietățile regulatorii ale enzimei legate de membrană sînt condiționate de organizarea sa în structură. După alte păreri, deosebiriile cinetice ale enzimei fixate de membrană față de cea solubilizată, se explică prin modificarea structurii cuaternare a acetilcolinesterazei solubile (Robaire și Kato, 1973).

Alte enzime legate de membrana plasmatică. În multe țesuturi, au fost localizate ca enzime de membrană multe fosfohidrolaze, și anume: nucleozidtrifosfataze, nucleoziddifosfataze, nucleozidmonofosfataze (5'-nucleotidaza), fosfataze alcaline, nucleotidpirofosfataze și aminopeptidaze. Rolul acestor enzime în reglarea funcțiilor membranei plasmatică, din diversele tipuri de celule nu este clar definit (Sacktor, 1977).

5-nucleotidaza a fost identificată în membrana plasmatică a numeroase tipuri de celule, fiind considerată ca o enzimă marker. Enzima a fost purificată și caracterizată din diverse surse; este o glicoproteină cu gr.mol. de 130.000, cu proprietăți asemănătoare în numeroase membrane (Nakamura, 1976). Enzima din membranele unor celule (limfocit, ficat, glanda mamară) este puternic inhibată de concanavalina A (Dornand și col. 1978). Deoarece enzima a fost inhibată și după purificarea sa din membrane, s-a sugerat că 5-nucleotidaza ar putea fi un receptor (sau o parte din receptor) pentru con A. Studiul enzimei purificate din membrana limfocitului a permis descrierea unor parametri cinetici, asemănători enzimei fixate de membrană (specificitate pentru substrat, dependența de temperatură, influența ionilor). Totuși, enzima solubilizată prezintă proprietăți deosebite de fixare pentru o serie de lectine. Deosebiriile se referă la nivelul maxim al inhibiției cu lectine (scăzut pentru enzima purificată), capacitatea de cooperare pozitivă față de lectine (observat numai pentru enzima fixată de membrană) și tipul de inhibiție. Aceste date sugerează că enzima prezintă o serie de interacții cu receptorii lectinici din membrana plasmatică.

4. RELATIILE DINTRE PROTEINE SI LIPIDE

4.1. Caracterizare.

Lipidele din membranele celulare reprezintă factori de control și reglaj ai funcțiilor enzimelor fixate de membrană. Indepărtarea lipidelor, sau modificarea proprietăților lor, se răsfringe asupra a numeroase caracteristici funcționale ale proteinelor fixate în și de membrane, și anume: modificarea parametrilor cinetici, modificarea stabilității enzimelor ce poate fi însoțită de pierderea totală a activității, ș.a. Deoarece pierderea activității enzimatice se poate datora unor multiple cauze, apare necesar să se realizeze și experiențe de refacere a activității în prezența unor lipide specifice. Trebuie să subliniem de la început că nu toate enzimele prin solubilizare din membrane își modifică proprietățile.

În general, pentru refacerea activității unei enzime solubilizate, fosfolipidele sînt mai eficace decît lipidele neutre. Cantitatea de lipide necesară restabilirii activității este asemănătoare cu cea calculată din membrane, adică 50-150 moli de fosfolipide pentru 1 mol de proteină. Lipidele pot fi necesare proteinei fixate de membrane pentru crearea unui micromediu apolar în centrul activ catalitic, pentru menținerea unei conformații adecvate și pentru asigurarea accesibilității substratelor liposolubile. În unele cazuri, enzima prezintă o specificitate restrînsă pentru un anumit fosfolipid. În aceste condiții, fosfolipidul interferează cu proteina, atît prin regiunea hidrofobă, cît și prin capul polar.

Nucleozidmonofosfataza din membrana plasmatică a celulei hepatice de la șobolan, are o specificitate mare față de sfingomielină, în timp ce β hidroxiacid dehidrogenaza pentru fosfatidilcolină (Widnell și Unkelless, 1968). În ultimul caz, lipidul induce o activare a enzimei prin intermediul regiunii apolare, deoarece numai lecitina nesaturată activează complet enzima.

În membrana plasmatică de la *E.coli* s-a descris o fosfoenolpiruvatfosfotransferază, care este activată numai de prezența fosfatidilglicerinei (component lipidic minor al membranei bacteriene). Trata-

rea celulelor de *E.coli* cu fosfolipază D, duce la pierderea activității acestei enzime.

Pentru unele enzime din membrane, mediul lipidic asigură de asemenea atât sensibilitatea față de acțiunea activatorilor sau inhibitorilor, cât și posibilitatea proteinei de a realiza interrelații cooperative cu lanțuri omoloage (în cazul enzimelor polimerice). Solubilizarea lor din membranele lipidice nu duce la inactivarea enzimei. Astfel, capacitatea de răspuns a adenilatciclazei față de hormoni, se restabilește prin adăugarea în mediu a unor lipide determinate. Fosfatidilserina restabilește sensibilitatea enzimei pentru glucagon, în timp ce fosfatidilinozitolul reface sensibilitatea adenilatciclazei pentru noradrenalină. Se apreciază că lipidele favorizează asocierea subunității proteice reglatoare cu subunitatea catalitică din complexul adenilatciclazic.

Cercetările de difracție în raze X (Gulik, 1975) asupra interrelațiilor dintre proteine, lipide și apă, au sugerat următoarele particularități:

a) în cazul în care grosimea stratului lipidic apare identică în absența sau în prezența proteinei, se presupune existența unor interacții de natură electrostatică între proteine și lipide.

b) dacă grosimea stratului bimolecular lipidic apare mai mică după fixarea proteinelor, se apreciază că în procesul de asociere participă lanțurile acizilor grași. Un exemplu edificator este oferit de relațiile hidrofobe ale rodopsinei cu stratul bimolecular lipidic. Asocierea rodopsinei cu lipidele membranare, duce la formarea unor structuri cu o grosime de 18 Å, în timp ce grosimea stratului bimolecular lipidic simplu (fără proteină) este de 45 Å.

Poarte sugestive sînt observațiile efectuate asupra a două proteine care se găsesc în membrana mielinică, și anume: proteina A_1 , descrisă în membranele plasmatiche ale celulelor din sistemul nervos central și proteina P_1 , identificată în membranele celulelor neuronale din sistemul nervos periferic. S-a urmărit influența unor parametri asupra modului de organizare al acestor proteine cu lipidele: natura capului polar, gradul de saturare al fosfolipidelor, prezența colesterolului, forța ionică, pH-ul, etc. (Shipley 1973). Prin asocierea acestor proteine cu fosfolipide acide din mielină (sulfatide), se formează două tipuri de structuri lamelare bistratificate: unele ordonate la distanțe de 154 Å, cînd se folosește proteina A_1 , și alte structuri ordonate la distanțe de 175 Å, cînd se utilizează proteina P_1 . S-a apreciat că cele două proteine bazice A_1 și P_1 interacționează specific și în maniere

deosebite cu lipidele. Proteina bazică A_1 se află localizată topografic pe fața externă a membranei și este asociată în special cu cerebrozidsulfatii (mai puțin cu fosfolipidele acide). Acest lucru sugerează existența unei asimetrii a dublului strat lipidic a membranei mielinice (Demel și col.1974).

4.2. Relațiile Na^+ , K^+ -ATP-azei cu fosfolipidele membranei plasmactice. Prin incubarea Na^+ , K^+ -ATP-azei cu fosfolipază A, are loc o trecere a majorității fosfolipidelor în lisoderivați, iar activitatea enzimatică scade în proporție de 75-95%. Adăusul ulterior de fosfatidilserină și fosfatidilinozitol, restabilește aproape complet activitatea enzimei. Fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina și sfingomielinea nu produc nici o activare a enzimei.

Selectivitatea Na^+ , K^+ -ATP-azei pentru o serie de fosfolipide, sugerează că pentru asigurarea unei activități normale a enzimei, este necesară nu numai integritatea structurală a membranei, ci și prezența unor fosfolipide determinate, care conferă o conformație sterică adecvată acestei enzime (Tanaka și col.1971). Reactivarea enzimei este asigurată de o anumită cantitate de fosfolipide, iar activarea optimă se realizează cu un anumit raport lipide/proteină.

Activitatea Na^+ , K^+ -ATP-azei din membrana plasmatică este influențată și de natura acizilor grași, care intră în structura fosfolipidelor. Prin adăus de albumină în mediul de incubare, se obține o activare a preparatului enzimatic. În prezența acidului oleinic, activitatea ATP-azei scade semnificativ. Inhibiția Na^+ , K^+ -ATP-azei sub influența acizilor grași, are un caracter de tip concurent față de ATP și de tip neconcurent față de ionii monovalenți. Gradul de inhibiție depinde atât de lungimea lanțului acizilor grași cât și de numărul dublelor legături (Ahmed și Thomas, 1971).

Studiile de microscopie electronică au arătat că Na^+ , K^+ -ATP-aza are o dispoziție topografică asimetrică în membrană, deși este o proteină constitutivă ce străbate întreaga grosime a dublului strat lipidic. Centrul activ al enzimei a fost localizat pe fața citoplasmatică a membranei (Marchesi și Palade, 1967). Această asimetrie este susținută și de faptul că bistratul lipidic este de asemenea asimetric. Fosfatidilserina, fosfolipidul activator al enzimei, se găsește în cantitate mare în stratul intern lipidic.

4.3. Relațiile dintre lipide și ferocitocromul c. Ferocitocromul c este o proteină ce face parte din lanțul respirator. Prin complexarea sa cu fosfolipidele, are loc o scădere a activității enzimatice a ferocitocromului, se modifică potențialul său de oxidoreducere,

dar se mărește stabilitatea moleculei față de acțiunea denaturantă a unor agenți (Kimelberg și Lee, 1970; Ivanetich și col. 1973). De asemenea, se produce o creștere a permeabilității membranei pentru cationi și scade temperatura de tranziție de fază a fosfolipidelor (Kimelberg și Papahadjopoulos, 1971).

Modificările proprietăților, atât a moleculei proteice cât și a fosfolipidelor membranei, sînt rezultatul interacțiunilor cooperative dintre aceste molecule, care au ca rezultat modificarea conformației moleculei proteice și a organizării bistratului fosfolipidic și formarea unui complex proteină-lipide.

Formarea unui complex între ferocitocromul c și o serie de fosfolipide acide, a constituit obiectul a numeroase cercetări. Astfel, spectrele de RMN ale cardiopilinei se modifică, prin adăugarea ferocitocromului c. Chiar la concentrații mici ale moleculei proteice ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$), s-a observat o scădere a intensității tuturor semnalelor, sugerînd o oarecare imobilizare a cardiopilinei, în urma formării complexului proteină-lipide. La concentrații mari de proteină ($8 \times 10^{-4} \text{ M}$), semnalele protonice ale grupărilor polare se lărgesc. Datele experimentale dovedesc că au loc interacții electrostatice între grupările încărcate pozitiv ale proteinei și grupările încărcate negativ ale fosfolipidului.

Rezultate similare s-au obținut și prin cercetarea interacțiilor dintre ferocitocromul c și fosfatidilcolină. În acest caz, scăderea semnalelor protonice de la nivelul grupărilor polare, poate fi explicată în mai multe moduri, și anume:

a) un contact direct al fosfolipidului cu regiunile hidrofobe ale proteinei.

b) scăderea vitezei de difuzie laterală a fosfolipidelor, ca urmare a formării complexului proteină-lipid.

c) scăderea mișcărilor intramoleculare a fosfolipidelor din cauza apropierii moleculelor de fosfolipide, obținute în urma neutralizării sarcinilor polare ale lipidului cu grupările polare ale proteinei. Dintre aceste posibilități, cel mai adesea a fost considerată difuzia laterală a fosfolipidelor. De exemplu, ferocitocromul c, la un pH neutru, prezintă 8 sarcini pozitive, prin intermediul cărora este capabil să fixeze cel puțin 4 molecule de cardiopilină (Jori și col. 1974). Acest lucru presupune că în prezența proteinei difuzia laterală a fosfolipidului scade de cel puțin 4 ori.

Cu toate că datele experimentale sugerează o modificare a viscozității bistratului fosfolipidic în urma fixării moleculei proteice, ele nu ne dau informații concrete asupra modificărilor structurale ale fosfolipidelor. Datele biofizice descriu posibilitatea formării

unui complex proteină-fosfolipide, ceea ce are ca urmare o separare și reorganizare a membranei: o fază "lichidă" a moleculelor fosfolipidice libere și o fază mai "solidă" realizată de complex.

4.4. Interrelațiile dintre polipeptide și membrane lipidice artificiale. O altă modalitate de a urmări relațiile dintre lipide și proteine s-a realizat cu ajutorul unor polipeptide sintetice, înglobate în membrane artificiale (lipozomi). Polipeptidele bazice modifică proprietățile membranelor lipidice, iar amploarea lor depinde de caracterul hidrofobicității polipeptidelor. Un studiu amplu a fost realizat de către Bach și col.(1975), care au dovedit că polipeptidele bazice sintetice cu compoziții chimice deosebite, prin fixare de membrane pot lua conformații variabile.

Una din polipeptidele sintetice studiate a fost $(Liz-Phe)_n$, care la pH neutru are o conformație "random coil", iar prin creșterea pH își schimbă conformația (structură beta). La pH neutru, majoritatea grupărilor polare ale lizinei sînt încărcate pozitiv, în timp ce fosfatidilcolina apare electroneutră, iar fosfatidilserina este electronegativă. În prezența fosfatidilcolinei, acest polipeptid își intensifică conformația α helix. În schimb, polipeptidul $(Liz-Tir)_n$ suferă o tranziție către o conformație β , prin înglobare în fosfolipide. Această modificare de conformație, nu necesită prezența unor sarcini negative în membrană, deoarece modificarea are loc, atît cu fosfatidilserina cît și cu fosfatidilcolina.

Al treilea polimer cercetat, și anume $(Liz-Ser)_n$ este cel mai hidrofilic. În ciuda hidrofiliei sale, polipeptidul se absoarbe puternic pe filme de fosfatidilcolină și fosfatidilserină. S-a sugerat că acest polipeptid nu suferă nici o modificare de conformație prin interacție cu membranele fosfolipidice.

4.5. Rodopsina. În afara faptului că rodopsina intervine în mecanismul de fotorecepție, ea ne oferă un model interesant de interrelație dintre proteine și lipide. Pigmentul vizual se află în structura unor membrane fotoreceptoare speciale, a căror funcție este de a transforma semnalele luminoase din mediu în activitate electrică. Rodopsina prezintă interes și din punct de vedere bioenergetic, deoarece s-a demonstrat că la unele microorganisme ea îndeplinește funcția de transformare a energiei luminoase în energie chimică.

Membranele plasmatică ale celulelor retiniene (celulele cu bastonașe) sînt special adaptate procesului de fotorecepție. Rodopsina este un component proteic major și reprezintă 80-90% din cantitatea totală de proteine a acestor membrane (Daemen și col. 1972). Deși s-au întreprins studii ample asupra localizării sale în membrană distribuția

sa în membrana plasmatică nu este complet elucidată. S-au propus mai multe modele. După unii autori, rodopsina este distribuită pe ambele fețe ale membranei, în mod simetric (Vanderkooi, 1973). După alți autori, rodopsina are o localizare asimetrică în membrană (Blasie, 1972), sau sub formă elipsoidală în toată grosimea membranei (Raubach și col. 1974). Modelul cel mai sugestiv sugerează că molecula rodopsinei are forma unei haltere (Poo și Cane, 1974). Acest model apreciază și funcția sa ca moleculă ianoforică pentru ionii de Ca^{2+} , în actul de fotorecepție (Hogins și Yashikami, 1974).

Distribuția rodopsinei în membrană și asigurarea unei conformații adecvate este dată de cooperarea moleculei cu fosfolipide și o serie de oligoglucide, cu care formează un complex funcțional. Cu toate acestea, rodopsina se poate mișca în membrană, în mai multe direcții. Posibilitatea modificării poziției sale în membrană prin iluminare a fost dovedită de Blasie (1972). Datele experimentale sugerează caracterul fluid al mediului ce înconjoară rodopsina, ceea ce vine în acord cu observațiile asupra predominanței acizilor grași nesaturați în fosfolipidele membranelor fotoreceptoare (Daemen, 1973). S-a constatat și o difuzie a pigmentului vizual, în plan lateral (Poo și Cane, 1974).

Rolul oligoglucidelor din molecula rodopsinei nu este clar. Rodopsina conține 3 molecule de N-acetilglucozamină și 3 molecule de manoză, legate de opsină prin intermediul acidului aspartic. Glucidele ar menține o anumită conformație a moleculei în membrană. În ce privește rolul fosfolipidelor, s-a sugerat că ele sînt necesare pentru crearea unui micromediu hidrofob și asigurarea unei conformații funcționale adecvate (Daemen, 1973). Cercetările pe membrane artificiale susțin importanța fosfolipidelor, care au facilitat restaurarea proprietăților sale de fotoreactivare (Chen și Hubbel, 1973).

Fosfolipidele joacă un rol deosebit în transformarea foto-indusă a rodopsinei, determinînd parțial apariția cu o anumită viteză a produșilor ei de hidroliză. De asemenea, fosfolipidele participă în procesul de resinteză al pigmentului vizual în membrană. Fosfatidiletanolamina intervine în transformarea transretinolului în izomerul 11-cis.

5. GLICOPROTEINELE DIN MEMBRANELE PLASMATICE CELULARE

5.1. Caracterizare.

În structura membranelor plasmactice celulare s-au identificat numeroase glicoproteine. În afara acestora și în strinsă interdependență cu membrana, se află glicozaminoglicanii, care conferă membranei particularități funcționale specifice.

Regiunea oligozaharidică a glicoproteinelor de membrană conține în raporturi variabile și secvențe specifice, următoarele glucide: manoză, glucoză, fucoză, N-acetilglucozamină, N-acetilgalactozamină și acid sialic (mai ales sub formă de acid N-acetilneuraminic). Secvențele oligozaharidice din molecula glicoproteică, se leagă covalent de asparagină prin intermediul N-acetilglucozaminei, sau prin intermediul N-acetilgalactozaminei, manozei, galactozei de serină, treonină, hidroxilizină sau hidroxiprolină din lanțul polipeptidic. Spre deosebire de glicozaminoglicani, glicoproteinele nu conțin unități dizaharidice repetitive.

În general, acidul sialic din structura glicoproteinelor are o poziție terminală. Pentru exemplificare, prezentăm structura posibilă a regiunii oligozaharidice din cadrul unei glicoproteine caracteristice membranei plasmactice (figura 24).

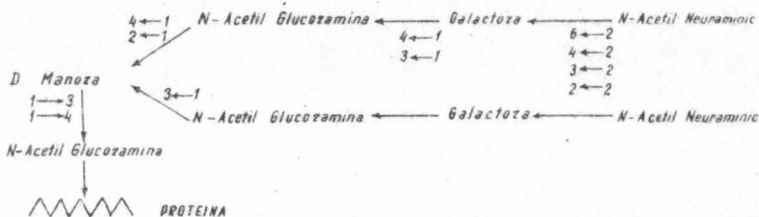


Fig.24. Structura oligozaharidică probabilă a unei glicoproteine din membrana plasmatică.

Glucidele din moleculele glicoproteinelor formează structuri stereospecifice, în funcție de natura glucidelor, poziția grupărilor reactive și interrelațiile cu alte molecule din membrană. În structura glicoproteinelor s-au descris 10 monozaharide, din cele peste 100 glucide întâlnite în natură. Numărul combinațiilor dintre monozaharide este însă foarte mare din cauza existenței mai multor tipuri de legături glicozidice ($1 \rightarrow 1$, $1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 6$), în conformație α și β . De aceea, pentru 2 monozaharide, în principiu pot exista 11 izomeri deosebiți. Numărul izomerilor posibili pentru un trizaharid poate ajunge la 1056. Așa se poate explica heterogenitatea și variabilitatea extrem de mare a glicoproteinelor în exprimarea unor funcții antigenice (sau de altă natură) din membranele celulare. Pentru exemplificare prezentăm tipurile de relații dintre acidul N-acetilneuraminic terminal și galactoză (figura 25).

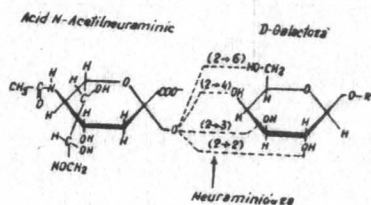


Fig.25. Tipurile de legături dintre acidul N-acetilneuraminic în poziție terminală din structura oligozaharidică a glicoproteinelor și galactoză.

În afara particularităților de structură chimică, caracterizarea glicoproteinelor poate fi făcută prin comportarea lor în câmpul electric. Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în prezența detergentului (dodecilsulfat de sodiu) a membranelor plasmatiche solubilizate din celulele papilelor gustative de la mamifere, s-au separat 21 fracții proteice, din care 14 erau de natură glicoproteică. Studiul electroforetic comparativ al proteinelor și glicoproteinelor din membrana eritrocitară de la diverse mamifere, evidențiază 9 benzi proteice majore. Dintre acestea, una sau mai multe sînt de natură glicoproteică și specifice fiecărui tip celular (prin mobilitate electroforetică sau alte criterii). În membranele eritrocitului uman, s-au identificat electroforetic trei benzi glicoproteice majore (gr.mol.230.000, 195.000 și 100.000) și alte 4 benzi glicoproteice minore (Marten și Govin, 1973).

Aproximativ 10% din greutatea uscată a membranei plasmatiche eritrocitare este formată din glucide, legate covalent de lipide sau proteine (Winzler, 1970). Raporturile procentuale sînt variabile în funcție de natura membranei (tipul celular) și numeroși alți factori. În majoritatea cazurilor, glicoproteinele (ca și glicolipidele) din membranele plasmatiche au o dispoziție asimetrică, cu regiunea oligozaharidică orientată spre mediul extracelular. Această apreciere a fost dată de faptul că majoritatea glucidelor pot fi eliberate din membrane de către

enzime specifice, care acționează numai pe fața externă a celulelor. Astfel, neuraminidaza adăugată la o suspensie de celule eritrocitare eliberează în mediu întreaga cantitate de acid sialic din membrane. Numeroase observații au fost efectuate cu ajutorul tehnicilor de marcarea (antigene, lectine, fluoroeromi, trasori radioactivi) a compușilor glicoproteici.

5.2. Glicoforina. O atenție deosebită a fost acordată unei glicoproteine majore din membrana eritrocitului uman, care a fost izolată, purificată și caracterizată (Marchesi, 1975). Este o sialoglicoproteină cunoscută sub denumirea de glicoforină. Molecula conține 60% glu-

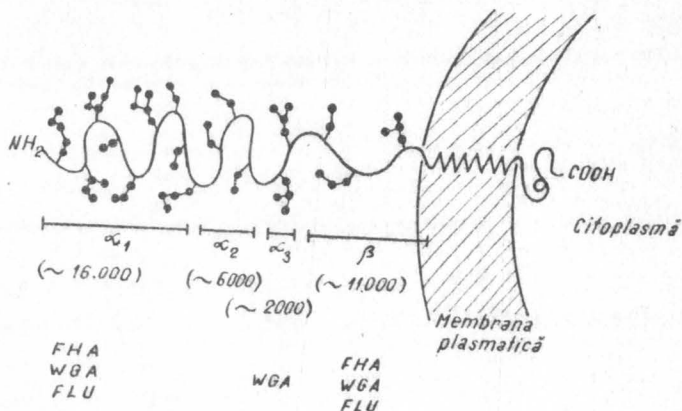


Fig.26. Reprezentarea schematică lineară a dispoziției glicoforinei în membrana plasmatică a eritrocitului (după Marchesi, 1977). Se precizează mărimea celor 4 segmente peptidice (α_1 , α_2 , α_3 și β), care se eliberează în urma tratamentului cu tripsină. De asemenea, se sugerează poziția unor situsuri receptoare ale moleculei: FHA = fitohemaglutinina; WGA = aglutinină din germene de grâu; FLU = situsul receptor al virusului gripei.

cide, din care 25% îl formează acidul sialic. Glicoforina este formată dintr-un lanț polipeptidic (aproximativ 200 aminoacizi), pe care se fixează numeroase unități oligozaharidice de lungimi variabile (20-30 unități oligozaharidice), spre capătul N-terminal al moleculei. Un model linear al glicoforinei din membrana eritrocitului uman este redat în figura 26.

Glicoforina este purtătoare a numeroși determinanți antigenici. De asemenea, este considerată ca moleculă receptoare pentru o serie de lectine vegetale și pentru virusul gripei. Studiile de hidroliză enzimatică a glicoforinei (mai ales cu ajutorul tripsinei), au permis

identificarea a patru glicopeptide solubile în apă și un fragment proteic insolubil în apă, cu un conținut mare în aminoacizi apolari. Analiza complexă a acestei glicoproteine a ușurat foarte mult înțelegerea poziției sale în membrană (Kornfeld și Kornfeld, 1971; Segrest și col. 1973; Marchesi, 1975).

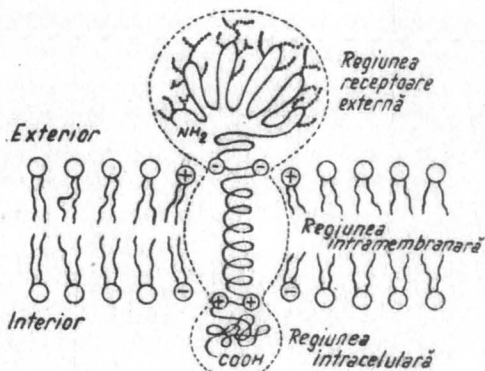


Fig. 27. Modelul dispoziției topografice a glicoforinei în membrana plasmatică a eritrocitului (după Bretcher, 1973).

moleculii) și analiza ulterioară a peptidelor prin autoradiografie, a identificat prezența izotopului numai în regiunea N-terminală a moleculei (vezi figura 28). Prin folosirea fragmentelor de membrane, s-a marcat și capătul C-terminal al moleculei glicoproteice (Hubbort și Cohn, 1972; Marchesi 1975). Orientarea asimetrică a moleculei a fost dovedită și cu ajutorul anticorpilor, față de regiuni specifice ale glicoforinei. Astfel, anticorpii preparați față de întreaga moleculă, determină o aglutinare a eritrocitelor. În schimb, anticorpii obținuți pentru capătul C-terminal al moleculei, nu produc aglutinarea celulelor. S-a tras concluzia că regiunea C-terminală a glicoforinei este expusă în interiorul celulei.

Orientarea asimetrică a glicoforinei din membrana plasmatică a fost dovedită și pe membrane artificiale (van Zoellen și col. 1978). Glicoproteina purificată

Un model al topografiei glicoforinei în membrana plasmatică a eritrocitului este redat în figura 27, care a fost susținut de numeroase cercetări. Incubarea celulelor întregi într-un mediu de reacție în prezența lactoperoxidazei și I^{125} -NaI (lactoperoxidaza catalizează iodinarea resturilor tirozinice ale

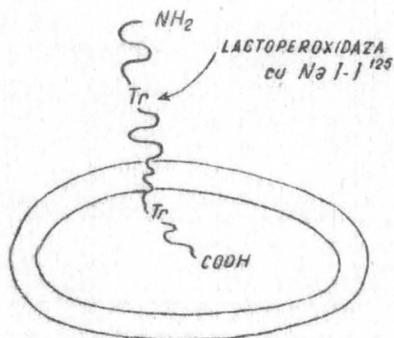


Fig. 28. Reprezentarea schematică a procedurii de iodinare a glicoforinei, din membrana plasmatică a eritrocitelor intacte, cu lactoperoxidază și NaI- I^{125} . În cazul celulelor întregi, are loc iodinarea resturilor tirozinice, expuse spre capătul N-terminal al moleculei (expus în mediul extracelular).

a fost înglobată în lipide. S-a calculat că fiecare moleculă de glicoforină este fixată de aproximativ 100 molecule lipidice. Pentru a aprecia procentajul de molecule de glicoforine orientate cu capătul N-terminal spre exterior, s-a aplicat un tratament cu tripsină. Cantitatea de acid sialic ce se eliberează în soluție, înainte și după digestie enzimatică, a constituit o bază de apreciere a orientării moleculelor. Aproximativ 80% din acidul sialic poate fi scos prin digestie triptică. Utilizarea unor fosfolipide deosebite pentru înglobarea glicoforinei în lipozomi a dat rezultate identice, sugerându-se că natura fosfolipidelor nu influențează orientarea proteinei.

5.3. Alte glicoproteine. Importanța glicoproteinelor din membrane apare deosebită, prin multiplele roluri pe care le îndeplinesc: antigene de suprafață, receptori hormonal și virali, receptori pentru lectine, receptori de recunoaștere intercelulară (Cuatrecasas, 1974). Unele aspecte vor fi tratate ulterior (vezi capitoul despre receptori). Cunoștințele noastre despre glicoproteinele din membranele plasmatice sînt foarte restrînse. Totuși, se apreciază că fiecare tip de celulă prezintă o compoziție specifică în glicoproteine de membrană (tabelul 7).

Gahmerg și col. (1976), prin utilizarea unei tehnici cu galactozoxidază cuplată cu borohidru de sodiu marcată, au identificat existența unor glicoproteine de membrană, caracteristice pentru fiecare populație limfocitară. Galactozoxidaza este o moleculă mare ce nu trece prin membrana plasmatică. Enzima atacă grupările galactozil și N-acetilgalactozaminil ale glicoproteinelor și prin oxidare duce la formarea unor derivați aldehidici.

Gibbons și col. (1976) au studiat o serie de glicoproteine din membrana plasmatică a hepatocitului, cu proprietăți antigenice de suprafață. Prin digestie enzimatică, s-a reușit izolarea și identificarea acestor glicoproteine și s-a propus următoarea secvență oligozaharidică (figura 29).

Studiul comparativ al glicoproteinelor din membranele plasmatice a unor tipuri de celule de la mamifere, a reliefat cîteva particularități. În membrana eritrocitului uman și a celulei adipoase bovine, s-au identificat glicoproteine ce conțineau cantități mari din dizaharidul β D-galactozil-(1-3)-N-acetil-D-galactozamină, componentă a grupării antigenice sanguine MN și al antigenului T_F (antigenul Thomsen-Friedenreich). Eritrocitele bovine prezintă în membrane cantități mari dintr-un alt oligozaharid ce conține N-acetilglucozamină. Membranele celulelor adipoase de la om, au glicoproteine cu nivel scăzut al antigenului T_F , dar expun receptori glicoproteici pentru diverse lectine: lectine din *Phaseolus vulgaris*, con A, soia și ricin. Datele comparative

asupra glicoproteinelor din membranele limfocitelor arătat că limfocitele bovine conțin mai multă galactoză și mai puțin acid sialic, în

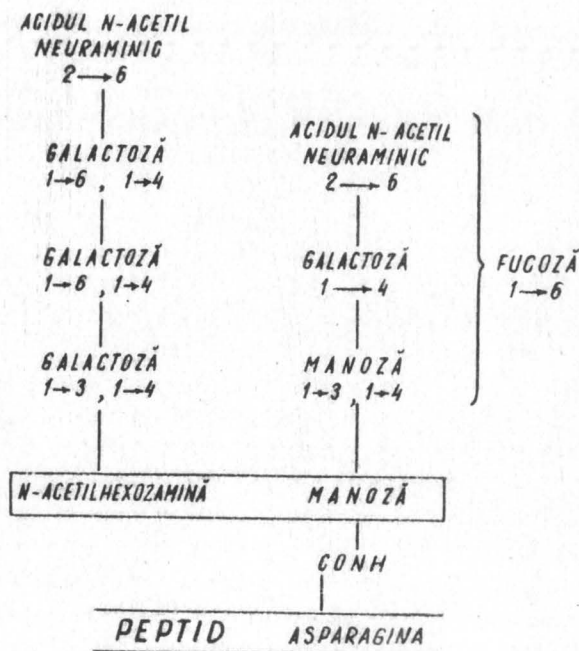


Fig.29. Structura probabilă a unei glicoproteine din membrana plasmatică a celulei hepatice (după Gibbons și col. 1976).

comparație cu limfocitele umane (Neuman și Uhlenbruck 1977).

Glicoproteinele din membrana plasmatică a eritrocitului uman cercetate de Winzler (1972), natura receptorilor pentru Phaeococcus caracterizați de Kornfeld (1972) și structura probabilă a glicoproteinei H_2 , prezintă o serie de analogii cu secvența oligozaharidică propusă de Montreuil (1977).

5.4. Fibronectina. În membrana plasmatică a fibroblastelor a fost identificată o glicoproteină, denumită fibronectină, proteină LETS sau CSP (proteină de pe suprafața celulară). Proteina a fost purificată și cu ajutorul ei s-au obținut antiserauri monospecifice (Yamada, 1978). Anti-fibronectina a fost utilizată pentru a localiza glicoproteina în membrană. Fibronectina îndeplinește mai multe roluri: apare în cantități scăzute după stabilirea contactelor între celule (Yamada și col. 1977),

scade sau lipsește la celulele transformate neoplazic (Chen și col. 1976). Fibronectina constituie un component major al membranei celulelor din țesutul conjunctiv și al membranei bazale (Vaheri și Mosher, 1978). S-a apreciat că fibronectina mediază interacțiile adezive ale celulelor cu substratul, atât *in vitro* cât și *in vivo* (Pearlstein, 1976).

Observațiile lui Yamada (1978) pe fibroblaste cultivate în cultură au demonstrat că fibronectina este dispusă pe fața externă a membranelor, cu rol adeziv și de menținere a morfologiei normale a celulelor. Tratarea fibroblastelor embrionare cu anti-fibronectină, determină rotunjirea celulelor în decurs de 20 min. În paralel, fixarea anti-fibronectinei de membrană induce o redistribuție a glicoproteinei, proces analog cu bonetarea antigenelor pentru carcinoembrionică A din membrana limfocitelor. Agregarea lor are loc cu viteză mică și a fost observată numai la celulele libere. Cu alte cuvinte, formarea unor legături între celule, nu mai permite fixarea anti-fibronectinei de membrane. Măsurătorile de mobilitate laterală a fibronectinei, au stabilit că această glicoproteină este relativ imobilă în membrană, în comparație cu alte proteine (Schlessinger și col. 1977). Nu s-a putut preciza însă dacă mișcarea fibronectinei în membrane (indusă de ligand), se datorește unei reorganizări a membranei sau a elementelor microtubulare și microfilamentare din citoplasmă.

5.5. Glicoziltransferazele. Biosinteza glicoproteinelor începe în reticulul endoplasmic, continuă în aparatul Golgi și foarte adesea se termină pe membrana plasmatică. Ultimul aspect este întreținut de o serie de glicoziltransferaze specifice de pe fața externă a membranelor plasmactice.

Glicoziltransferazele din membrana plasmatică îndeplinesc numeroase funcții celulare. Ele intervin în glicozilarea terminală a glicoproteinelor și glicolipidelor din cadrul aceleiași membrane, sau a unor molecule analoge de pe celule învecinate. Procesul glicozilării din membranele celulare este extrem de complex, puțin cunoscut și în realizarea lui cooperează numeroși factori. În calitate de donori de monozaharide participă nucleozidifosfatmonozaharidele (GDP-fucoză, UDP-galactoză, CMP-acid sialic, etc.) și compuși lipidici polizoprenolici (ficoprenol, dolichol, retinol). Retinolul are specificitate mare pentru glucoză, manoză și galactoză, în timp ce dolicholul pentru glucoză și N-acetilgalactozamină. Glicoziltransferazele apar specifice atât față de transportorii de monozaharide, cât mai ales față de acceptori cu secvențe oligozaharidice determinate (Roseman, 1970). Cu alte cuvinte, enzimele recunosc secvențe oligozaharidice și mai puțin un monozaharid din poziție terminală. De exemplu, fucoziltransferaza II ce fixează spe-

Tabelul 7 - Conținutul în monozaharide și dizaharide din glicoproteinele unor membrane plasmatic

Compusul	Membrane plasmaticice umane			Membrane plasmaticice bovine		
	eritrocit celulă grasă limfocit			eritrocit celulă grasă limfocit		
	moli/mg			moli/mg		
Fucoză	3,7	24,4	4,4	3,7	3,4	8,7
Manoză	3,3	15,6	7,9	1,1	20,8	9,9
Galactoză	28,9	55,6	9,6	105,6	48,0	38,1
Glucoză	2,2	45,6	10,1	13,9	26,0	10,5
N-acetil-galactozamină	20,8	8,6	0,59	34,8	20,4	0,84
N-acetil-glucozamină	12,7	34,4	4,7	76,0	14,1	5,8
Acid sialic	48,7	5,2	12,1	42,3	30,3	7,1
Gal (1 - 3)-N-acetil-galactoza-mină	20,3	4,3	0,31	1,0	12,0	urme

cific fucoza pe restul galactozil legat de N-acetilgalactozamină din molecula unei glicoproteine, nu poate cataliza fixarea fucozei pe restul galactozil legat de N-acetilglucozamină, din molecula fetuinei (moleculă lipsită de acidul sialic în poziție terminală). O reprezentare schematică a acestui proces este redată în figura 30.

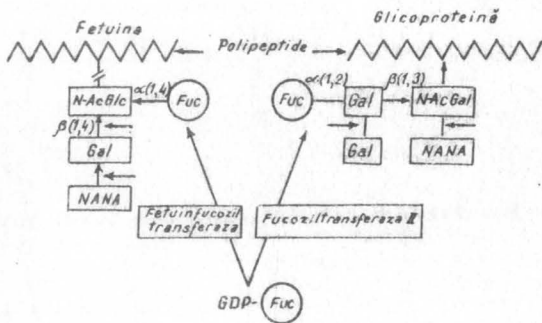


Fig.30. Specificitatea fucoziltransferazelor din celulele HeLa. N-AcGlc = N-acetilglucozamina; N-AcGal = N-acetilgalactozamina; Gal \pm galactoză; NANA = acidul N-acetilneuraminic; Fuc = fucoză.

Glicoziltransferazele de pe membranele plasmatice participă în glicozilarea homocelulară sau intercelulară și recunoașterea dintre celule. Au fost propuse mai multe modalități de stabilire a unor contacte între celule învecinate (vezi figura 31). După părerea lui Roseman (1970, 1975), în stabilirea unui contact între două celule are loc o cuplare între transferaza unei celule și lanțul oligozaharidic a celei de a doua celule, printr-un proces de transglicozilare. Glicozilarea modifică structura suprafeței celulare, urmată de o mărire sau micșorare a interrelațiilor dintre celule.

Pe măsura formării contactelor celulare, are loc o creștere a cantității de ceramidtrihexozid, accelerarea sintezei unor gangliozi-
de (GM₃) și disialoganglioziide (GD_{1a}, GD₃), precum și modificări în
structura unor glicoproteine și glicozaminoglicani (Gahmberg și col.
1974; Robbin și col. 1975). Prin stabilirea unor contacte între fibro-
blaste cultivate in vitro, crește glicozilarea glicoproteinelor din
membrană (de aproximativ 2,5 ori/celulă), însoțită de o mărime a lan-
țului oligozaharidic (Nicolson și Lacorbiere, 1973; Post și Nicolson,
1977). Acest proces reprezintă unul din factorii care oprește prolifa-
rarea celulelor și a fost denumit inhibiție de contact a creșterii ce-

lulelor. De asemenea, modificările structurale ale glicoproteinelor și glicolipidelor din membranele plasmatiche, reprezintă una din modalitățile cele mai clar exprimate de mascare a unor receptori sau dimpotrivă de activare a altora.

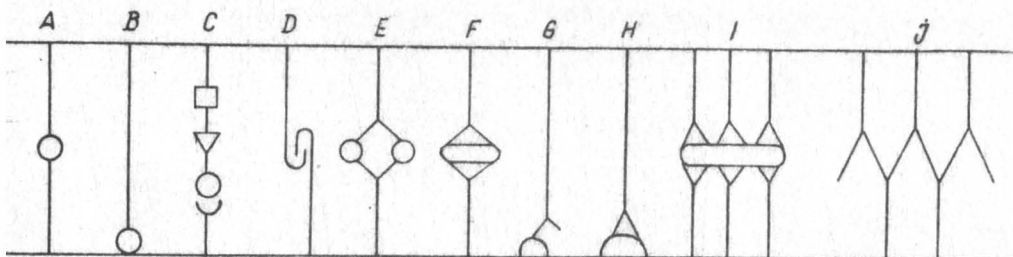


Fig.31. Cîteva tipuri de contacte (legături) între celule (după Bell, 1978).

- A) doi receptori legați de un ligand bivalent.
- B) receptorul de pe celula 1, fixat de un ligand de pe celula 2.
- C) legătură intercelulară prin intermediul unei enzime.
- D) un contact ipotetic între doi receptori identici.
- E) punți între doi anticorpi (sau glicoproteine) prin intermediul a doi antigeni bivalenți (sau lectine bivalente).
- F) punți între două glicoproteine prin intermediul unui ligand multivalent.
- G) glicoproteină fixată monovalent de antigen.
- H) glicoproteină fixată multivalent de antigen.
- I) legături multiple a glicoproteinelor similare din membrana a două celule învecinate cu un ligand multivalent.
- J) legături complementare între glicoproteine (glicolipide) din membranele a două celule învecinate.

În membrana plasmatică a celulelor transformate, apar glicoproteine cu gr.mol. mai mici, denumite antigene cancerospecifice (Glick și col.1973). Aceste glicoproteine prezintă o difuzie mai mare în membrană. Celulele transformate sînt incapabile să realizeze inhibiții de contact. Enzimele și substratele din membrana acestor celule sînt apropiate, ceea ce favorizează procese de cis-glicozilare. În membrana celulelor transformate activitatea unor glicoziltransferaze este inhibată. Astfel, atacul cu oncovirusuri a unor celule cultivate in vitro, determină scăderea activității sialiltransferazei (transformă GM_1 în GD_{1a}) și N-acetilgalactozaminiltransferazei (formează GM_2 din GM_3). În unele membrane transformate, crește cantitatea de lactozilceramid. Rezultatele apar deosebite în funcție de tipul celular și de natura virusului.

S-a apreciat că *trans*-glicozilarea glicoproteinelor și glicolipidelor de la nivelul membranei plasmatică nu poate constitui unica modalitate de control a biosintezei acestor molecule (Smith și Walborg, 1976). Un mecanism alternativ a fost sugerat de Critchley și Macpherson (1973), care au luat în considerație densitatea oligozaharidelor din membrana plasmatică. Urmărindu-se conținutul unor glicolipide pe celule cultivate *in vitro* (în monostraturi sau în suspensii), s-a constatat că conținutul în glicolipide crește când celulele sînt la confluență. Cantitatea acestor glicolipide de "contact", scade în cazul celulelor transformate (Hakomori, 1971). Enzima ce catalizează fixarea restului galactozil la trihexozidceramid (UDP-galactoza: lactozilceramid galactoziltransferaza), crește de 2-3 ori la celulele ce prezintă inhibiție de contact.

La celulele transformate de la șoarece cultivate *in vitro* scade conținutul disialo- și monosialoganglioizidelor și se acumulează o cantitate mare de hematozide. Aceste modificări sînt cauzate de scăderea activității enzimei UDP-N-acetilgalactozamină: hematozid N-acetilgalactozaminiltransferaza (Cumar și col. 1970). Secvențele de reacții catalizate de o serie de glicoziltransferaze din membranele celulare sînt redată în figura 32.

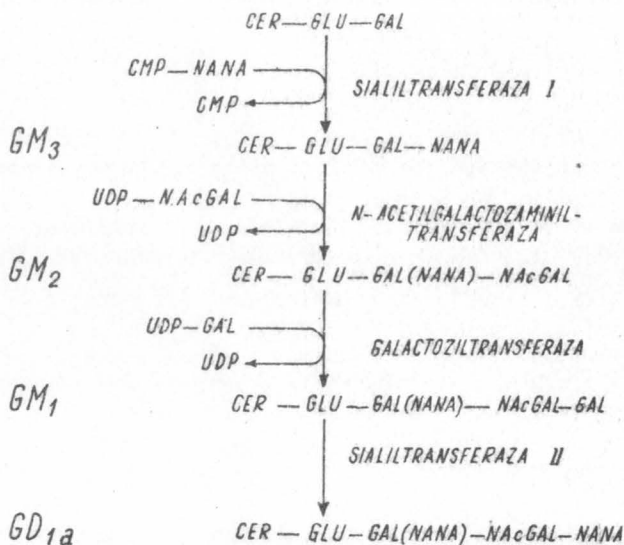


Fig.32. Reprezentarea schematică a elaborării principalelor tipuri de ganglioizide, cu funcții receptoare în membranele plasmatică celulare.

Glicoziltransferazele specifice diferitelor categorii de glicoproteine sînt mai puțin cunoscute, din cauza mării heterogenități a lor în membrane și a interferenței cu structurile secundare, mai ales glicocalixul.

5.6. Glicoproteinele, glicolipidele și ciclul celular. Observațiile experimentale au reliefat faptul că glicoproteinele și glicolipidele din membrana plasmatică a unor tipuri de celule, prezintă organizări succesive de distribuție și compoziție. În anumite faze ale ciclului celular, s-a descris existența unor molecule specifice. Astfel, s-a dovedit că accesibilitatea în membrana plasmatică a tri-, tetra- și pentahexozidceramidelor este maximă în faza G_1 și S (Wolf și Robbins 1976). În aceste faze, atît mobilitatea acestor componente este mai mare în membrană, cît și interrelațiile dintre ele.

Studiindu-se sinteza glicoproteinelor pe o linie sincronă de limfocite de șoarece, s-a constatat că formarea lor (măsurată prin încorporarea fucozei și glucozaminei radioactive), are loc în cursul întregului ciclu celular, cu un maximum în faza S. De asemenea, activitatea unor glicoziltransferaze de membrană, apare cu un nivel crescut în faza S (Bosmann, 1971).

O analiză destul de amplă a fost oferită de Brown (1972) și Glick și Buck (1973). Examinarea glicoproteinelor din membrana celulară în metafază, cu cele din restul ciclului celular, a reliefat prezența în primul caz a unor glicoproteine cu gr.mol.mari. Cu alte cuvinte, prezența unor glicoproteine în membrana plasmatică are o expresie temporară în funcție de diviziune.

A fost urmărită și capacitatea unor celule de a fixa lectine vegetale în cursul ciclului celular (Fox și col. 1971; Noonan și col. 1973). În cazul celulelor normale, situsurile receptoare pentru lectine vegetale sînt accesibile mai ales în cursul mitezei. Dimpotrivă, celulele transformate păstrează o capacitate crescută de aglutinare în prezența lectinelor, în tot cursul ciclului celular. Comparînd viteza de încorporare a unor substanțe în membrana plasmatică a timocitelor de șobolan stimulate cu con A, s-a observat că manoză și glucozamina se încorporează în compuși ai membranei cu viteză constantă, în timp ce înglobarea galactozei și fucozei prezintă două maxime (van Eijk și Muhlradt, 1978).

5.7. Rolul glicoproteinelor în cooperarea intercelulară.

Dacă de la o serie de glicoproteine circulante (fetuină, ceruloplasmică) se îndepărtează acidul sialic, supraviețuirea lor în sânge scade de la câteva zeci de ore la câteva minute (Morell și col. 1971). În aceste condiții, asialoglicoproteinele ies rapid din circulație fiind captate de către ficat. La început are loc fixarea lor de membrana plasmatică a celulelor hepatice, și apoi prin pinocitoză sunt introduse în celule unde sunt atacate de glicozidaze și proteaze lizozomale. Alte țesuturi (rinichi, plămâni, inimă), nu pot acumula asialoglicoproteinele circulante (Ashwell și Morel, 1974). Dacă din molecula de asialoglicoproteină se îndepărtează și galactoza, nu mai are loc fixarea lor de membrana celulei plasmatice.

Natura situsurilor receptoare capabile să fixeze asialoglicoproteinele circulante este puțin cunoscută. S-a sugerat prezența unor sialiltransferaze (sau galactoziltransferaze), care pot forma cu molecula circulantă un complex (Hudgin și col. 1974; Aronson și col. 1973).

S-a constatat că acidul sialic în poziție terminală din glicoproteinele de membrană, determină și timpul de viață a unor celule în special al eritrocitelor. Îndepărtarea acidului sialic din membrana eritrocitară duce la rapida lor eliminare din sânge (Gattengo și col. 1975). În acest proces, pot interfera și alte monozaharide. Injectând în sânge limfocite radioactive sunt regăsite după un timp în splină. Dacă înainte de injectare, din membrana limfocitelor se îndepărtează fucoza, "drumul" lor se modifică deoarece limfocitele sunt regăsite în ficat (Gesner și Ginsberg, 1964).

Regoezci și Hatton (1974) au arătat că asialotransferina umană marcată cu I^{125} și injectată la iepuri este prinsă de celula hepatică, iar supraviețuirea ei în circulație este direct proporțională cu conținutul în acid sialic al transferinei umane.

Aceste observații nu pot duce la generalizări, deoarece alte glicoproteine cu diferențe minore în structura oligozaharidică (în comparație cu fetuina) sunt incapabile de a fi prinse de celula hepatică, deși posedă un rest galactozil terminal. Acest lucru sugerează că în afara galactozei, modul de aranjare și legare a glucidelor din lanțul oligozaharidic influențează de asemenea activitatea biologică și implicit recunoașterea celulară.

Eritropoetina desializată este activă în vitro (stimulează încorporarea fierului în hemul porfirinic din celulele măduvei osoase). Totuși, eritropoetina desializată nu apare efectivă in vivo. Se pare că acidul sialic este necesar pentru protecția hormonului înainte de atingerea organului țintă. Goldwasser și col. (1974) au dovedit că aci-

dul sialic este necesar pentru stabilitatea biologică și chimică a eritropoetinei și nu pentru acțiunea sa asupra celulei țintă.

5.8. Structuri secundare în corelație cu membrana plasmatică.

Suprafața externă a membranelor plasmactice celulare prezintă relații strinse cu o serie de molecule, care nu fac parte componentă din organizarea propriu zisă a membranelor. Natura și importanța acestor asocieri este puțin cunoscută. Elementele constitutive cuprind glicoproteine, glicolipide, polizaharide, ce servesc la alcătuirea unor structuri celulare secundare. Aceste structuri formează glicocalixul (la numeroase tipuri de celule de la eucariote), pereții celulari de la bacterii și celulele vegetale, elementele de structură din spațiile intercelulare (a țesuturilor conjunctive) și membrana bazală a epitelilor. În figura 33 este redată schematic natura structurilor celulare

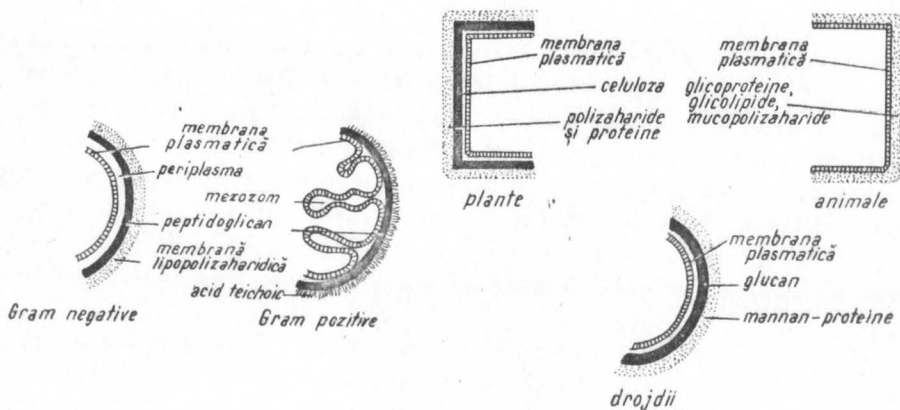


Fig.33. Reprezentarea schematică a structurilor secundare în raporturi de cooperare cu membrana plasmatică, la principalele tipuri de celule din lumea vie.

secundare, la principalele tipuri de celule din lumea vie. În afara acestora, moleculele polizaharidice s-au identificat de asemenea, în principalii compuși organici ai exoscheletului nevertebratelor. De exemplu, chitina este un polimer, format din N-acetilglucozamină fixat prin legături β (1 \rightarrow 4) de elemente organice majore ale exoscheletului insectelor și crustaceilor.

Structurile secundare ale membranelor plasmactice servesc la susținerea celulelor, conțin situsuri receptoare specifice de recunoaștere între celule, receptori cu funcții antigenice, etc. Să încercăm să facem o scurtă prezentare a organizării moleculare a acestor structuri la bacterii și celulele eucariote.

Pereții bacterieni sînt descriși ca structuri secundare ale membranei plasmatică, de formă capsulară, rigidă și poroasă. Prin natura lor, ei împiedică umflarea sau ruperea membranelor plasmatică, în condițiile unor variații mari a factorilor mediului exterior. Pereții celulari bacterieni conțin și antigeni specifici, a căror identificare permite diagnosticul unor maladii infecțioase. După cum se poate observa din figura 33, bacteriile Gram pozitive au pereții celulari săraci în compuși lipidici; dimpotrivă, bacteriile Gram negative au pereții celulari bogați în lipopolizaharide. La ambele tipuri de bacterii, pereții celulari posedă o organizare moleculară similară, adică sînt formați din structuri cunoscute sub denumirea de peptidoglicani sau mureine. Aceștia sînt alcătuiți din lanțuri paralele de oligozaharide legate covalent de lanțuri polipeptidice. Peptidoglicanii pot constitui pînă la 50% din compoziția peretelui celular. Pe această structură se fixează elemente chimice deosebite, în funcție de tipul de bacterie (Gram pozitive sau Gram negative) (vezi figura 32). În general, bacteriile Gram negative au pereți celulari mai complecși decît bacteriile Gram pozitive.

Natura și organizarea peretelui celular a fost bine analizată la *Staphylococcus aureus* (Ströminger, 1976). Unitățile polizaharidice repetitive (muropeptide) sînt alcătuite dintr-un dizaharid, și anume N-acetilglucozamina unită prin legătură β (1 \rightarrow 4) de acidul N-acetilneuraminic. Gruparea carboxil a acidului acetylneuraminic se unește de un tetrapeptid format din: L-alanină, D-izoglutamat, L-lizină și D-alanină. S-au observat variații în structura peptidului în funcție de specia bacteriană. Structura muropeptidului este redată în figura 34. Fiecare peptidoglican se unește de celălalt prin punți interpepti-

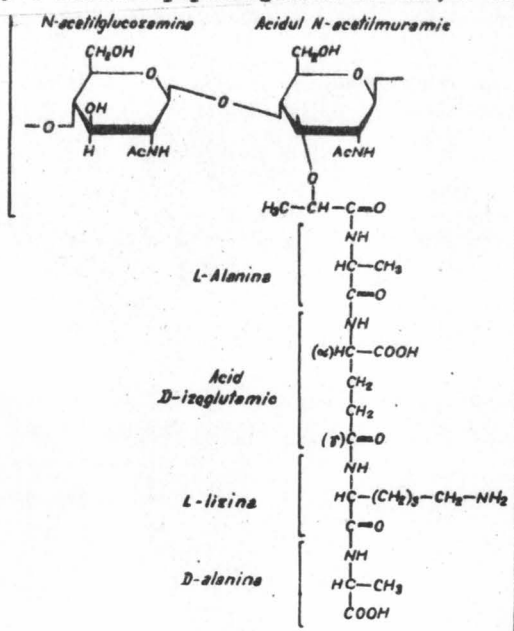


Fig.34. Structura chimică a unităților de muropeptid repetitive, care intră în compoziția pereților celulari bacterieni. Unitățile de muropeptid se leagă între ele prin legături 1 \rightarrow 4.

dice. La *S.aureus*, punțile sînt formate din lanțuri de pentaglicină, care se întind de la gruparea carboxil a alaninei terminale a unui tetrapeptid, la gruparea -NH_2 a celui de-al treilea aminoacid (L-lizina) din tetrapeptidul învecinat. Se formează o structură trispațială, prin punți orientate în diferite planuri (vezi figura 35).

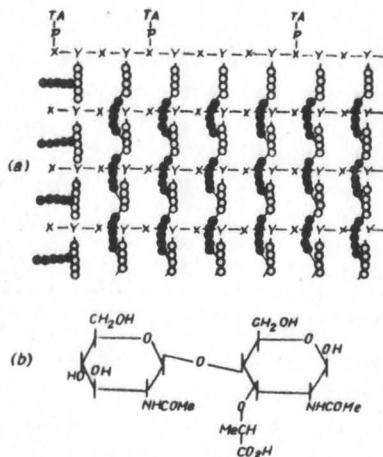


Fig.35. Structura peptidoglicanului din peretele celular de la *Staphylococcus aureus* (după Strominger, 1975).

a) modul de orientare și legare a elementelor în structură. Cele două unități glucidice din structura peptidoglicanului, au fost simbolizate cu X (acetilglucozamina) și Y (acidul acetilmuramic). Cercurile albe reprezintă aminoacizi din tetrapeptid: L-alanil-D-izoglutaminil-L-lizil-D-alanină. Cercurile negre formează punțile de pentaglicină, care fixează între ele lanțurile de peptidoglicani. TA-P reprezintă acidul telchoic, fixat de polizaharide prin legătură fosfodiester.

b) structura unității repetitive dizaharidice.

Lizozimul (enzimă purificată din albușul de ou) poate distruge pereții bacteriilor Gram pozitive, deoarece hidrolizează legăturile glicozidice β (1 \rightarrow 4) ale polizaharidului. În prezența unei concentrații mari în zaharoză (1,0 M), celula nu este supusă unui șoc osmotico și rămîne ca atare sub formă de protoplast. Pe acești pereți

celulari de natură peptidoglicanică, se găsesc și alte molecule în funcție de specie: acid teichoic, oligozaharide, polipeptide. La bacteriile Gram pozitive, acidul teichoic formează pînă la 40% din compoziția chimică a structurii secundare. Acidul teichoic este format din lanțuri lungi de glicerol sau ribitol legate între ele prin punți fosfodiesterice. În figura 36, este redată structura chimică a unui acid

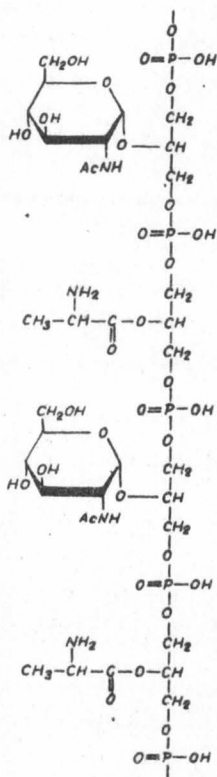


Fig.36. Structura chimică a unei secvențe din acidul teichoic. Scheletul principal este format din glicerină și ribitol unite prin punți diester. Structurile laterale sînt alcătuite din N-acetilglucozamină și alanină.

teichoic, la care de grupările libere hidroxilice ale lanțului sînt fixate alanina și N-acetilglucozamina. Lanțurile oligozaharidice au o alcătuire deosebită în funcție de specie și conțin glucoză, ramoză, galactoză, galactozamină, cu activități antigenice.

Structurile peptidoglicanice ale bacteriilor Gram negative conțin spre exterior molecule complexe și heterogene, în special lipopolizaharide. Acestea din urmă formează un înveliș extern și prin elementele constitutive contribuie la exprimarea specifică antigenică. Structura chimică a lipopolizaharidelor este puțin cunoscută. Se apre-

clază că este formată dintr-o unitate trizaharidică repetitivă (2 heptoze și un acid octulozinic), de care se unesc lanțuri oligozaharidice laterale și acidul β hidroximiristic.

Celulele animale. Multe tipuri de celule prezintă în strînsă corelație cu membrana plasmatică, structuri secundare mai lax cunoscute sub denumirea de glicocalix. Dacă structura chimică a glicocalixului este relativ bine cunoscută, aranjamentul molecular al moleculelor componente este foarte puțin stabilit. Principali compuși ce intră în alcătuirea glicocalixului sînt: glicoproteine, glicolipide și mucopolizaharide. Din păcate este greu de făcut o distincție între componentele intercelulare și moleculare care intră în organizarea membranei plasmatică.

Pe secțiuni fine la microscopul electronic, glicocalixul apare sub forma unei structuri fibroase de grosimi variabile, în funcție de tipul celular. Două tipuri de glicocalix sînt prezentate în figura 37.

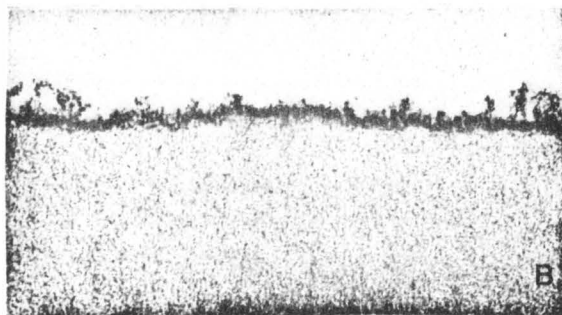
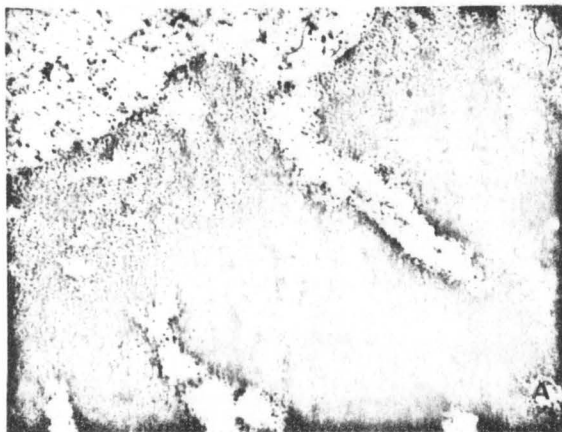


Fig.37. Glicocalixul văzut la microscopul electronic. A. Imagine electrono-microscopică a unei porțiuni din membrana radiată a unei ovocite de pește; pe suprafața membranei se observă prezența unui glicocalix dezvoltat. B. Glicocalixul de pe suprafața membranei plasmatică a celulei eritrocitare.

Dintre componentele chimice ale glicocalixului cel mai bine studiate sînt mucopolizaharidele. Ele reprezintă un grup de heteropolizaharide. Dacă formează complecși cu proteinele se numesc mucoproteine: substanțe viscoase, gelatinoase ce asigură contactele intercelulare; rol protector și rol de favorizare a alunecării celulelor între ele. Cele mai importante mucopolizaharide sînt redate în tabelul 8. Aceste substanțe sînt formate din dizaharide repetitive, alcătuite din molecule variate, în funcție de natura mucopolizaharidului.

Tabelul 8 - Structura principalelor mucopolizaharide

Denumirea	Dizaharidul repetitiv
Acidul hialuronic	Acid glucuronic β (1 \rightarrow 4)-N-acetilglucozamină β (1 \rightarrow 3)
Condroitina	Acid glucuronic, N-acetilgalactozamina
Condroitin-4-sulfat	Acid glucuronic, N-acetilgalactozamin-4-sulfat
Dermatan sulfat	Acid iduronic, N-acetilgalactozamin-4-sulfat
Heparina	Glucosamin-6-sulfat, acid glucuronic-2-sulfat
Keratan sulfat	Galactozo-6-sulfat, acid glucuronic-2-sulfat

Substanța fundamentală intercelulară este considerată ca o formă particulară de glicocalix. În țesuturile conjunctive ce formează substanța fundamentală intercelulară, s-au descris, izolat și caracterizat o serie de glicoproteine (denumite glicoproteine structurale). Studiul compoziției chimice în aminoacizi și în glucide a diverselor glicoproteine structurale de la nevertebrate și vertebrate, a arătat câteva particularități. Astfel, compoziția în aminoacizi apare destul de similară din punct de vedere filogenetic: prezintă un conținut mare în aminoacizi dicarboxilici și alifatici. Glicoproteinele structurale din cornee și de la spongieri, conțin cantități mari de triptofan. Dimpotrivă, compoziția în glucide este extrem de variabilă și constă din: glucosamină, galactozamină, glucosă, galactoză, manoză, fucosă și acid sialic (Robert și col.1976).

Glicoproteinele cercetate sînt slab solubile în apă, au tendință de agregare și punct izoelectric scăzut. De asemenea, au proprietăți imunogenice mari (Robert și col.1976). De exemplu, glicoproteinele structurale de la spongieri prezintă un grad mare de specificitate de

specie și nu dau reacții de precipitare cu preparate analoage de la alte specii de spongieri (Junqua și col.1975).

Macromoleculele din substanța fundamentală prezintă relații cu collagenul, elastina și proteoglicanii. Natura glicocalixului se modifică în cursul morfogenezei. Activarea sintezei glicozaminoglicanilor sulfatați în unele etape ale dezvoltării embrionare, a fost corelată cu mișcările morfogenetice (Karp și Solursh, 1974). De asemenea, cantități mari de acid hialuronic s-au constatat în condițiile unei proliferări mari a celulelor (Pratt și col.1975). Studiul maturării neuronilor în cultură în prezența glucozaminei- H^3 și sulfat- S^{35} , a arătat că maturarea celulei este însoțită de o creștere a capacității de înglobare în membrana plasmatică a heparan sulfatului (Augusti-Tocco și Chiarugi, 1976). În sorta de la animalele bătrâne și în cursul instalării arteriosclerozei, proporția dintre glicoproteine structurale și elastină crește (Robert și col.1976).

Substanța fundamentală din membranele bazale ale țesutului glomerular și al capsulei cristalinului, prezintă collagen glicozilat și glicoproteine asemănătoare cu cele descrise în alte țesuturi. Viteza de sinteză a collagenului și a glicoproteinelor structurale din membranele bazale se desfășoară independent, iar proporțiile lor relative apar deosebite în funcție de țesut și dezvoltare. S-a demonstrat că incorporarea prolinei- C^{14} în collagen și a glucozaminei- H^3 în glicoproteine structurale din țesuturile bogate în membrane bazale, este deosebită la animalele normale față de cele diabetice (Robert, 1976).

6. ORGANIZAREA MEMBRANELOR PLASMATICE CELULARE

6.1. Conceptul actual al organizării membranei.

După ce am descris natura componentelor din membranele plasmactice, să încercăm să facem o prezentare a organizării lor în ansamblu, ca sistem structural unitar. Membranele plasmactice celulare (la fel ca și membranele citoplasmactice) reprezintă sisteme dinamice, complexe și integrate, care prezintă tranziții structurale permanente, descrise pe baza a numeroși parametri (morfologici, chimici, fizici, fiziologici, etc.). Dinamica organizării membranei poate fi discutată pe multiple planuri (particularitățile lipidelor, proteinelor, glicoproteinelor, etc.) și se manifestă extrem de variat. La rândul ei variabilitatea organizării membranelor poate fi analizată în funcție de tipul celular, natura informației, relațiile cu alte celule, ș.a.).

Intr-o descriere generală, putem aprecia o organizare dinamică a membranei, temporară și reversibilă, în funcție de influențele factorilor de mediu și a celor metabolici. De asemenea, se poate descrie o organizare temporo-spațială, ontogenetică a membranei, care este rezultatul cooperărilor pe multiple planuri dintre informație, metabolismul celular și factorii mediului. Prin aceasta se asigură o stabilitate relativă a organizării structurale a membranei în timp, ce poate fi apreciată pe baza conceptelor termodinamice. Deși organizările temporare și reversibile ale structurilor de membrană nu sunt determinate genetic, ele se assemblează în limitele unor posibilități condiționate de structura proteinelor (și probabil a altor componente), care în ultimă instanță sunt elaborate pe baza informației genetice celulare.

Membranele celulare (plasmactice și citoplasmactice) reprezintă elemente majore ale structurii celulare. La unele tipuri de celule sistemele de membrană formează peste 80% din greutatea celulei, iar funcțiile lor sunt foarte variate.

Modificările de conformație și asamblare a proteinelor, glicoproteinelor, glicolipidelor și lipoproteinelor, interrelațiile cooperative dintre moleculele componente, precum și relațiile lor cu bistratul molecular lipidic, dau un nou sens concepției noastre asupra orga-

nizării membranelor celulare. Prima ipoteză asupra organizării membranei a fost emisă de Davson și Danielli (în anul 1935) și dezvoltată ulterior de Robertson (1950), care a sugerat conceptul "unității de membrană". Ipoteza unității de membrană s-a bazat pe faptul că pe secțiuni fine la microscopul electronic (în condiții tehnice standard), se observă două "straturi" întinse, care delimitează între ele un strat clar (vezi figura 38).

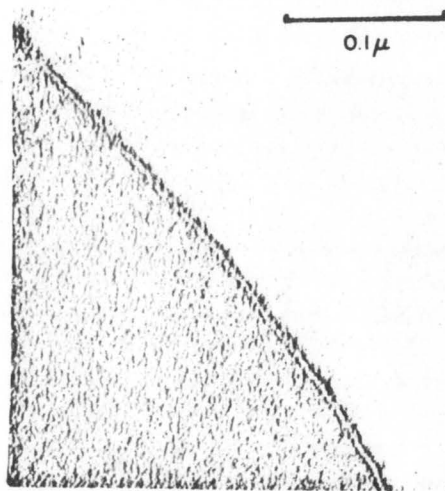


Fig.38. Membrana plasmatică a eritrocitului uman, văzută la microscopul electronic.

Dintre numeroasele modele de membrană propuse pentru a explica organizarea structurală a membranei, cel mai acceptat este cel elaborat de către Singer și Nicolson, care au sugerat organizarea membranei sub formă de mozaic fluid (1972). Această ipoteză a fost dezvoltată și perfecționată pe baza noilor date științifice. În mod analog cu ipotezele anterioare, noul model sugerează că componentele lipidice sînt organizate structural sub formă de bistrat molecular, care întreține proprietățile hidrofobe ale membranei. Lipidele dintr-o astfel de structură sînt însă relativ libere și pot executa multiple mișcări (rotație, translație, difuzie). Modelul în mozaic fluid descrie componentele proteice ale membranei sub formă de molecule globulare înfipte în grade deosebite în bistratul lipidic. Unele proteine străbat bistratul lipidic și apar expuse pe ambele fețe ale membranei. Cu alte cuvinte, proteinele din membrană formează o structură în mozaic, care apare mobilă în membrane. Diversele componente proteice au grade de li-

bertate variate și mișcarea lor în membrană favorizează formarea unor agregate proteice funcționale (figura 39).

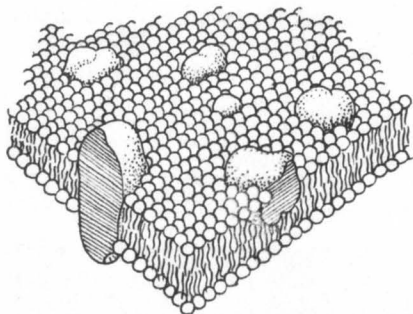


Fig.39. Modelul în "mozaic-fluid" al organizării membranelor celulare, sugerat de către Singer și Nicolson.

Fluiditatea membranei trebuie înțeleasă în sens larg, atât în cadrul organizării unei membrane date, cât și al diversității de manifestare la diverse tipuri de celule. De asemenea, comportarea termotropă a lipidelor din membrane este variabilă, în funcție de compoziția în acizi grași și influența a numeroși factori, ceea ce favorizează formarea unor regiuni cu organizări deosebite, în cadrul membranei. Într-o formă generală, se poate aprecia că

relațiile dintre organizarea structurală a membranei și compoziția în lipide, s-au formulat în termenii fluidității de membrană, exteriorizată prin interrelațiile variabile dintre lipide și proteine, proteine și proteine. Aceste interrelații sunt guvernate la rândul lor de distribuția diverselor tipuri de lipide pe cele două fețe ale membranei și de particularitățile metabolice și genetice ale celulei.

Modelul în mozaic fluid al membranei permite explicarea mai adecvată a numeroaselor caracteristici și proprietăți funcționale a membranelor de la diverse tipuri de celule, mobilitatea unor proteine în planul membranei, asimetria funcțională a membranelor, etc.

Trebuie să subliniem și faptul că în organizarea structurală a membranelor, moleculele componente se assemblează numai pe baza unor interacții polare și hidrofobe, ceea ce ne permite să înțelegem organizarea sa dinamică și reversibilă. Majoritatea celulelor din lumea vie mențin o compoziție adecvată a lipidelor în membrane, care asigură starea lor semifluidă. Starea semifluidă a membranelor celulare este necesară în asigurarea transportului transmembranar, exocitozei, endocitozei, în procesele de biogeneză a membranelor, fuziunii membranelor, captării unor informații din mediu, etc.

6.2. Acțiunea anestezicilor asupra organizării membranelor.

Anestezicii produc efecte foarte deosebite asupra membranelor exprimate prin expansiuni (Ryan și col.1974), alterări de permeabilitate (Roth și Seeman, 1971), modificări în topografia unor componente din membrană (Poste și Reeve, 1972), măresc capacitatea de adeziune și fuziune între celule (Post și Alison, 1973). Numeroase observații expe-

rimentale au arătat că anestezicii locali interferă cu lipidele din structura membranelor celulare (Chen, 1974; Paphadjopoulos, și col. 1975), în special cu fosfolipidele acide. Efectele lor se datoresc interacțiilor hidrofobe și electrostatice ale anestezicilor cu grupările anionice ale fosfolipidelor acide.

Anestezicii produc dezorganizări moleculare în stratul bimolecular lipidic, însoțite de o mărire a fluidității fosfolipidelor din membrane. Aceste efecte au fost observate însă la concentrații mari. În cazul utilizării unor concentrații mici, aminele terțiare produc modificări atât în aglutinabilitatea celulelor (Poste și col. 1975), cât și în mobilitatea unor receptori de suprafață. Se apreciază că receptorii se "decuplează" de controlul citoplasmatic, care corespunde elementelor citoscheletice asociate de membrana plasmatică.

Alterările ultrastructurale ale organizării microtubulilor în celulele intacte, au fost constatate atât în cazul acțiunii locale cât și generale a anestezicilor (Allison și Davies, 1974). Astfel, lidocaina blochează asamblarea microtubulilor, prin inhibarea polimerizării subunităților de tubulină (Haschke și col. 1974). Un alt anestezic, halothanul, provoacă o desfacere a microfilamentelor din celulele neuroblastice de șoarece în cultură, inhibă motilitatea celulară și kariokineza, ca urmare a distrugerii microfilamentelor localizate în aparatul mitotic al celulei în diviziune. De asemenea, produce modificări reversibile ale organizării proteinelor globulare din membrane (Hinkley și Telser, 1974).

Mecanismul prin care anestezicii afectează elementele citoscheletice celulare nu este cunoscut. Rețeaua de microfilamente din unele tipuri de celule conține elemente actomiozinice. Probabil că acțiunea lor este asemănătoare cu efectele pe care le produc asupra proteinelor contractile actomiozinice din celulele cardiace (Price și col. 1975). Un alt aspect al acțiunii anestezicilor se referă la afinitatea acestor substanțe pentru ioni de calciu și capacitatea lor de a scoate Ca^{2+} din membrane (Paphadjopoulos, 1972). Sub acest aspect se presupune că anestezicii produc modificări în capacitatea de legare a calciului de membrane și de structurile asociate membranei.

Nicolson și col. (1976, 1977) au arătat că sub influența anestezicilor se produc rearanjări a unor receptori în membrana plasmatică determinate de acțiunea drogului asupra rețelei citoscheletice. Cu alte cuvinte, acțiunea lor se poate explica prin capacitatea lor de a desface "legăturile" dintre receptori ancorați în membrană și rețeaua de filamente citoscheletice de pe fața internă a membranei. De altfel acțiunea anestezicilor locali, exteriorizată prin modificarea

răspunsurilor celulei față de lectine și anticorpi, poate fi reprodusă prin tratarea celulelor cu substanțe ce interferă cu asamblarea microtubulilor (colchicină, alcaloizi, citochalasină B). Ultimele două substanțe au efecte sinergice cu ale anestezicilor.

Una din proteinele ce exercită un control al mobilității receptorilor din membrana eritrocitului, și anume spectrina, este eliberată de pe fața citoplasmatică a membranei de agenți chelanți ai ionilor de calciu (Nicolson, 1974). În afara acestui aspect, integritatea microtubulilor este controlată de concentrațiile intracelulare ale ionilor de Ca^{2+} . După cum apreciază Nicolson (1977), anestezicii sînt inhibitori de tip competitiv față de ionii de Ca^{2+} . Multe argumente experimentale au dus la presupunerea că anestezicii eliberînd calciul din membrane, facilitează acumularea ionului în celulă (peste 10^{-5}M), suficientă pentru a declanșa depolimerizarea microtubulilor.

6.3. Receptorii din membranele plasmactice celulare.

Mesajele mediului extern sînt captate și apoi traduse la nivelul unor organe senzoriale, într-un limbaj comun sub formă de impuls nervos. Sistemul nervos și endocrin reprezintă două modalități de integrare și cooperare intercelulară. În ambele cazuri se eliberează o serie de substanțe chimice (hormoni și substanțe neurotransmițătoare), a căror acțiune selectivă asupra diverselor tipuri de celule, se bazează pe existența unor situsuri receptoare discriminatorii.

Recepția și traducerea semnalelor din mediu sînt procese specifice membranelor celulare, ce depind de prezența în membrane a unor molecule capabile să capteze informația, denumite cu un termen general receptori. Prin detectarea semnalelor din mediu, membrana plasmatică celulară induce, reglează sau dimpotrivă, alterează activitatea metabolică a celulei.

S-au descris numeroși receptori în membranele diverselor tipuri de celule (Nicolson și Post, 1978). În membrana plasmatică a aceluiași celule coexistă receptori pentru diferite semnale. Pentru exemplificare, prezentăm în figura 40 receptorii din membrana plasmatică a limfocitului uman.

Deși compoziția chimică a membranelor plasmactice apare calitativ similară pentru numeroase tipuri de celule, totuși sistemele receptoare sînt organizate deosebit. Fiecare tip de celulă specializată prezintă în membrana plasmatică un spectru caracteristic de recepție. În afara structurii chimice a receptorilor, specificitatea de recepție a unei celule este determinată și de distribuția receptorilor

în membrană. De aceea, foarte adesea transformarea semnalelor din mediu este apreciată ca un proces cooperativ dintre sistemul receptor (ce captează semnalul) și alte componente moleculare din membrană.

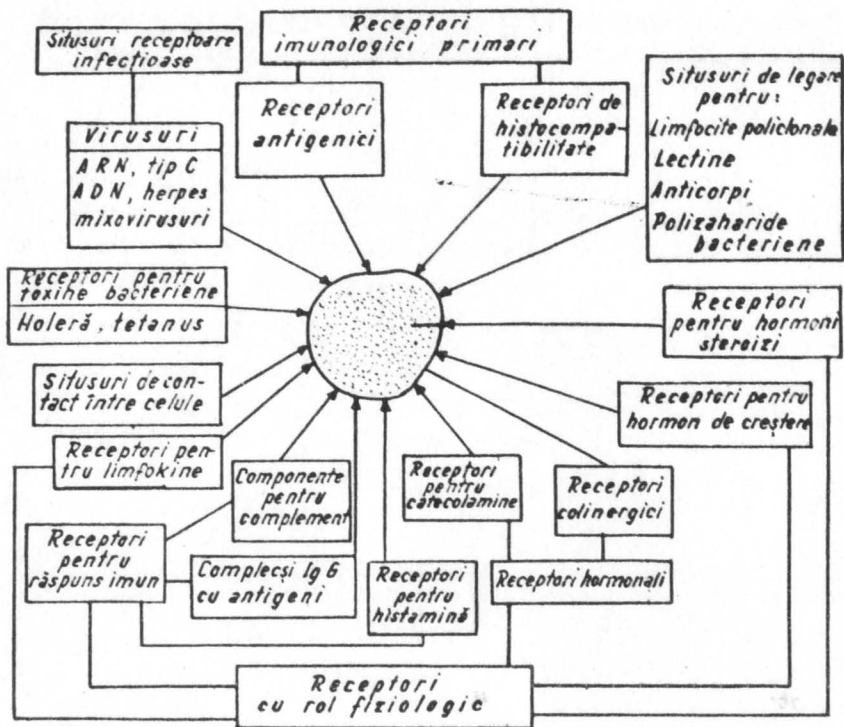


Fig.40. Heterogenitatea proteinelor cu funcții receptoare din membrana plasmatică a limfocitului uman (după Greaves, 1975).

Cunoștințele noastre actuale asupra mijloacelor de captare și transducere a semnalelor din mediul exterior sînt limitate. Ele se referă îndeosebi la impulsul nervos (pentru celulele senzoriale) și o serie de substanțe chimice (mai ales hormoni), pentru celelalte tipuri de celule. Pentru a înțelege mai bine funcționarea receptorilor din membranele celulare, s-a imaginat un model conceptual (figura 41). Modul său de organizare și funcționare, poate fi deosebit pentru diversele categorii de receptori. Modelul a fost elaborat pe baza a numeroase date experimentale referitoare la mecanismul de acțiune al hormonilor asupra celulelor.

Modelul de alcătuire a unui receptor descrie prezența unei componente de captare a informației, care funcționează ca discriminator.

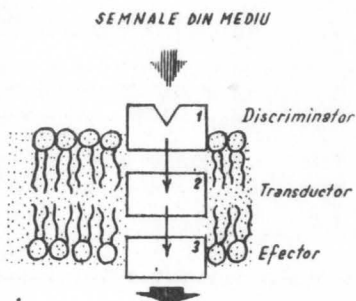


Fig.41. Reprezentarea schematică a unui model de sistem receptor din membrana plasmatică (după Greaves, 1975).

El are rolul de a capta semnalul specific din mediu, reprezentat de un ligand solubil, o componentă de pe suprafața unei celule învecinate sau a unei celule îndepărtate (hormon). Prin cuplarea dintre discriminator și molecula semnal se inițiază răspunsul (sau răspunsurile) celular. Discriminatorul se poate afla în strînsă cooperare cu un alt component din membrană, denumit transductor, care este responsabil de traducerea semnalului din mediul exterior într-un semnal secundar specific celulei. Transductorul poate fi reprezentat de o

parte din molecula receptoare sau de o moleculă deosebită. Al treilea element ce face parte din complexul receptor al membranei, asigură transferul informației prin membrană și a fost definit ca "efector" sau "transmițător". Acesta are rolul de a comunica în celulă mesajul. Pentru mulți receptori de membrană, mai ales hormoni de natură peptidică, efectorul este reprezentat de către o enzimă numită adenilataciclază sau guanilataciclază. În acest caz, mesajul secundar intracelular al acțiunii hormonale asupra celulelor țintă este reprezentat de către adenozinmonofosfatul ciclic (AMP_c) sau guanozinmonofosfatul ciclic (GMP_c).

6.4. Specificitatea receptorilor. Recepția semnalelor din mediu de către membranele celulare, se descrie ca un proces funcțional ce trebuie să prezinte sensibilitate și selectivitate. Aceasta se explică atât prin capacitatea receptorilor de a recunoaște în mod specific molecula sau semnalul, cât și prin abilitatea lor de a răspunde la concentrații foarte mici ale modulatorilor. Specificitatea unui receptor de membrană se apreciază și prin rapiditatea cu care poate capta molecula semnal și reversibilitatea procesului. Cu alte cuvinte, unirea dintre molecula "semnal" și receptorul de membrană trebuie să fie de natură necovalentă și cu afinitate mare. Dacă procesul de recunoaștere nu ar fi reversibil, cooperarea celulelor între ele și cu mediul ar fi imposibilă.

Afinitatea selectivă dintre ligand și receptorul de membrană a fost descrisă ca un proces de complementaritate sau stereospecificitate, care se apreciază pe baza următoarelor criterii: a) structura chimică a moleculei cu funcție semnal; b) poziția grupărilor reactive din moleculă și distanța dintre ele; c) capacitatea de modificare a conformației moleculelor reactante.

Formarea unor interacțiuni între molecula informațională și receptor poate favoriza modificarea conformației receptorului, modificarea conformației ligandului sau modificări ale ambelor molecule. Cuplarea liganzilor sau moleculelor semnal cu receptorii din membrane, nu poate fi apreciată ca o simplă interacție. Cinetica de reacție (de formare a complexului) deși prezintă unele analogii cu reacția enzimă-substrat, este deosebită și depinde de micromediul membranei, natura fizică a membranei, natura structurilor chimice de pe suprafața membranei. Toate aceste aspecte dau un nou sens biologic evenimentului primar de recunoaștere celulară, în care membrana ca structură specific organizată joacă un rol deosebit de important.

6.5. Distribuția și topografia receptorilor în membrane.

În capitolele anterioare, am descris câteva aspecte legate de orientarea proteinelor și glicoproteinelor în membrana plasmatică. O discuție largă asupra distribuției receptorilor în membranele plasmactice nu poate fi cuprinsă în acest cadru. Există câteva lucrări de sinteză remarcabile (Post și Nicolson, 1977; Nicolson și col. 1976). Câteva considerații generale sînt însă necesare.

Natura unui receptor din membrană a fost apreciată prin tehnici variate, și foarte adesea, exprimarea lor funcțională este rezultatul efectelor cooperative ale mai multor factori. Organizarea receptorilor în membrane se descrie mai ales pe baza observațiilor experimentale mai ample, obținute pe câteva modele celulare. Multe informații se referă la receptorii imunologici și hormonal, deși și în aceste cazuri, generalizările și concluziile sînt premature. Utilizarea lectinelor vegetale și a unor markeri de suprafață, a permis descifrarea unor aspecte legate de distribuția și topografia lor în membrane. Din punct de vedere topografic, receptorii de pe fața externă a membranei pot fi:

a) cu topografie criptică, adică regiunea receptoare a moleculei se află mascată în cripte sau adîncituri ale membranei. Mascarea receptorului poate fi directă (chimică), sau indirectă (figura 42).

b) cu topografie accesibilă.

c) cu topografie regională și/sau polarizată. Acest ultim aspect poate fi apreciat în mai multe moduri. Distribuția proteinelor

receptoare poate fi difuză, adică omogenă pe suprafața membranei. Putem deosebi și o distribuție discontinuă, descrisă prin organizarea preferențială a unor receptori în anumite arii ale membranei, sub forma unor mici aglomerări.

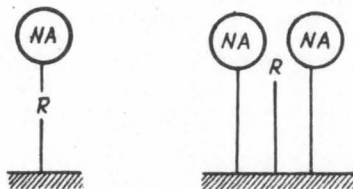


Fig.42. Mascarea directă sau indirectă a receptorului din membrana plasmatică, de către acidul neuraminic (NA).

În cadrul unui tip celular (de exemplu limfocitul), s-a constatat și o distribuție în funcție de densitatea receptorilor. De exemplu, receptorii Ig prezintă o distribuție continuă pe limfocitele B și T, dar au o densitate mai mare în membrana limfocitelor T. Densitatea receptorilor este variabilă în membrana aceleiași celule, în funcție de numeroși factori (metabolici, structurali, de mediu).

Receptorii se deosebesc și prin modul lor de așezare în dublul strat lipidic al membranei. Astfel, receptorii Ig fac parte din proteinele periferice, în timp ce antigenul H_2 este considerat o proteină constitutivă.

În recepționarea semnalului poate interfera, fie întreaga moleculă receptoare, fie structurile terminale oligozaharidice. Moleculele glucidice terminale maschează în unele situații structurile chimice receptoare, care se expun numai după îndepărtarea grupărilor terminale. Un exemplu sugestiv asupra complexității de organizare a receptorilor din membrane ne este oferit de glicoproteina majoră cu funcții receptoare multiple. Molecula are în regiunea terminală oligozaharidică acidul N-acetilneuraminic, care participă direct în specificitatea structurală a receptorului și indirect, în menținerea unei conformații adecvate a oligozaharidelor.

Acidul sialic din lanțurile oligozaharidice ale glicoproteinelor cu funcții receptoare, îndeplinește mai multe roluri (Lloyd, 1975). Îndepărtarea acidului sialic din moleculele glicoproteice de membrană determină modificarea activității unor enzime asociate membranei, lip-

seşte celula de o anumită încărcare negativă. Ultimul aspect are repercursiuni asupra conformaţiei regiunii oligozaharidice, privind interrelaţiile necovalente şi electrostatice cu moleculele învecinate. De asemenea, îndepărtarea acidului sialic din membrană determină modificări ale organizării şi arhitecturii membranei, măreşte capacitatea de agregare a receptorilor din membrană, etc.

Studiile efectuate cu ajutorul neuraminidazei au permis lămurirea unor aspecte funcţionale ale glicoproteinelor receptoare. Astfel, tratamentul cu neuraminidază al limfocitelor a dus la următoarele constatări:

a) se distrug receptorii pentru mixovirusuri, micoplasme şi pentru aglutininele de melc (*Cepaea nemoralis*) şi limulus (*Limulus polyphemus*).

b) pe celulele leucemice determină o creştere a receptorilor sanguini de grup A şi H.

c) inhibă capacitatea de agregare a celulelor şi le deformează.

d) scade mobilitatea lor electroforetică.

e) creşte viteza lor de distrugere la nivelul ficatului.

f) creşte numărul receptorilor pentru lectine vegetale şi aglutinine serice.

g) creşte capacitatea de formare a rozetelor.

h) se exteriorizează receptori HL-A.

6.6. Mobilitatea receptorilor în membranele plasmatice.

Prin utilizarea unor tehnici extrem de variate RMN, RMS, fluorocropmi, anticorpi marcaţi, îngheţare -fracturare, etc.), s-a dovedit că receptorii sînt capabili să se deplaseze în planul membranei (Bretscher, 1976; Nicolson şi col. 1976). Diversele proteine, glicoproteine şi glicolipide difuzează în planul membranei cu viteze deosebite, în funcţie de interferenţa a numeroşi factori. Totuşi, celulele posedă în acelaşi timp, o serie de mecanisme ce limitează mişcarea lor în membrană. Prin aceasta se asigură, în cazul celulelor normale, o anumită dispoziţie a moleculelor receptoare, sau după cum subliniază Nicolson (1976) o stabilitate topografică relativă.

Stabilitatea topografică a receptorilor are un sens biologic şi funcţional în recepţia semnalelor din mediu. Limitarea mişcărilor libere în membrană a moleculelor receptoare se realizează pe mai multe căi. Astfel, între lanţurile oligozaharidice ale glicoproteinelor alogenice sau heterogenice se pot forma complecşi polimerici (Gitler, 1974). Glicoproteinele pot interacţiona cu glicolipidele, limitîndu-se reciproc mobilitatea lor. În al treilea rînd, glicoprotei-

nele și glicolipidele pot interacționa prin legături ionice și de hidrogen cu glicozaminoglicanii periferici, care nu fac parte din structura membranei. De asemenea, glicolipidele și glicoproteinele formează complexe cu fosfolipidele din membrană.

Numeroase date experimentale au dovedit că constituenții din membranele plasmatiche sînt controlați și de sistemele microtubulare din citoplasmă (Berlin, 1975; Poste și col. 1977). Nicolson și col. (1976), utilizînd inhibitori ai organizării microtubulilor și microfilamentelor (colchicină, vinblastină, colcemidă), au constatat existența unor interdependențe între mișcarea unor componente în membrană și prezența citoscheletului intracelular. Trebuie însă să subliniem că elementele cito-scheletice reprezintă structuri dinamice, a căror organizare este dependentă de starea fiziologică a celulei. Factorii ce controlează asamblarea, sau dimpotrivă dezorganizarea lor în celule sînt departe de a fi cunoscuți. Majoritatea autorilor atribuie un rol deosebit nucleotidelor ciclice (AMP_c și GMP_c) și concentrației ionilor de calciu (Nicolson, 1976; Marx, 1976).

Noi nu putem să analizăm toți factorii care cooperează în controlul mobilității receptorilor din membrane. Dovezile sînt numeroase și au fost obținute cu metode deosebite. Vom limita discuția la cîteva aspecte generale. Un mijloc adecvat de urmărire a mobilității receptorilor, l-au format lectinele vegetale, care se fixează de regiuni specifice ale unor receptori glicoproteici sau glicolipidici de pe fața externă a membranei. Lectina din *Ricinus communis* (denumită fitohemaglutinină, FHA), este specifică pentru resturile galactoză și N-acetilgalactozamină a lanțurilor oligozaharidice; lectina din embrionii de grîu (WGA) este specifică pentru N-acetilglucozamină și acidul N-acetilneuraminic iar concanavalina A (con A), pentru manoză și glucoză (Hughes și Gardos, 1976; Nilsson și col. 1976).

Tehnica de înghețare-fracturare evidențiază la microscopul electronic distribuția conjugăților de feritină-lectine de pe suprafața membranei, care poate fi comparată cu distribuția particulelor intramembranare (de pe fața de ruptură a aceleiași membrane). Receptorii pentru FHA și WGA, apar cu o distribuție uniformă pe suprafața membranei eritrocitare și asemănătoare cu cea a particulelor intramembranare. Incubarea celulelor în prezența unor enzime proteolitice (tripsină), provoacă o rearanjare a dispoziției particulelor de membrană. Dacă la astfel de preparate tratate cu tripsină, se adaugă conjugăți de feritină-lectine, se constată că receptorii de pe suprafața celulei se reorganizează, corespunzător distribuției particulelor intramembranare (Marchesi, 1976). După părerea autorului, fiecare particulă ar fi re-

prezentată de un agregat macromolecular, format din mai multe proteine, sau monomeri analogi (vezi figurile 43 și 44).

Rearanjarea distribuției unor componente receptoare în structura membranei nu este un fenomen general. În primul rând trebuie să precizăm că dispoziția glicoproteinelor și glicolipidelor în membrane, apare deosebită și caracteristică fiecărui tip de celulă. Pentru unele tipuri de celule, mobilitatea receptorilor din membrană este foarte mică sau chiar inexistentă.

Moleculele de pe suprafața membranei, care nu interacționează cu liganzii, rămân în membrană într-o dispoziție omogenă. Două aspecte apar semnificative în experiențele de marcarea a receptorilor din membrane, și anume: 1) marcarea determină, de obicei, formarea unor mici aglomerări a moleculelor marcate în membrană; 2) markerii se fixează preferențial pe anumite molecule de pe suprafața membranei. Primul aspect, și anume adunarea receptorilor este rezultatul modificării interrelațiilor dintre situsurile receptoare, ca urmare a fixării moleculelor trăsore bivalente sau monovalente. S-a considerat că cuplarea markerului cu receptorul determină o modificare a conformației moleculei din membrană, sau a complexului receptor-ligand, care în cooperare cu membrana și alte componente funcționale legate de membrană, favorizează declanșarea unui răspuns specific. Formarea agregatelor în membrană (adunarea receptorilor sub formă de "insule" mai mici sau mai mari) și mișcarea lor ulterioară sub forme de calotă la un pol al celulei, este un aspect morfo-funcțional bine definit și specific fiecărui tip de membrană. De exemplu, membrana plasmatică a eritrocitului se deosebește de membrana plasmatică a altor tipuri de celule (limfocite). În ultimul caz, redistribuția proteinelor de pe suprafața membranei, poate avea loc fără să altereze deplasarea particulelor intramembranare (Wofsy, 1974).

Interesul cooperării dintre liganzi și situsurile receptoare din membrane rezidă în faptul că modificările de organizare a receptorilor, declanșează numeroase procese funcționale în diverse celule. Astfel, fixarea unui ligand de membrană și agregarea unor receptori poate stimula endocitoza, turnoverul membranei, captarea informației hormonale, transformarea blastică a unor celule, activarea unor enzime inhibarea altora, stimulează producerea de Ig pe limfocitele B, ș.a.

Mecanismul de acțiune. Deși în ultimii ani s-au acumulat numeroase date experimentale, nu se poate aprecia un mecanism unitar de acțiune al lectinelor asupra receptorilor din membranele plasmactice. Multe din lectinele vegetale sînt extrem de toxice pentru numeroase celule de la animale și om. Deoarece există o diversitate mare de expri-

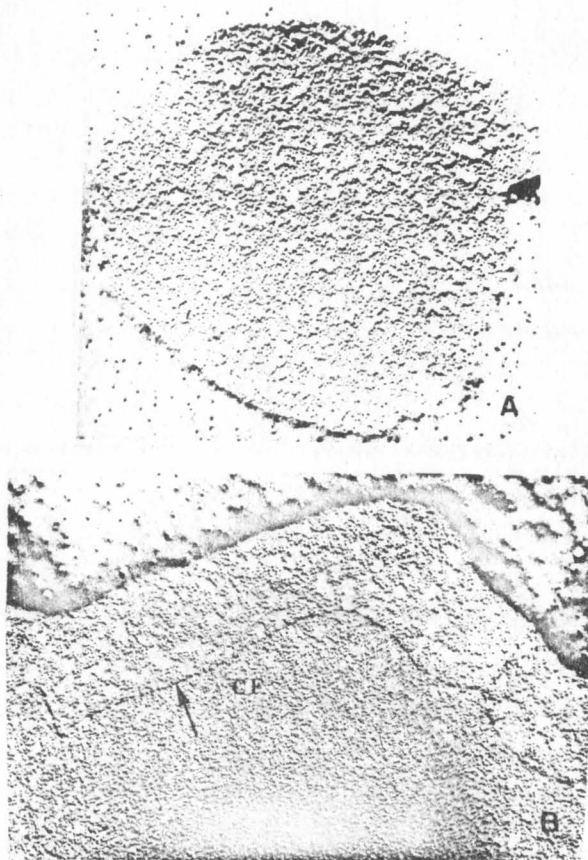


Fig.43. Distribuția receptorilor în membrana plasmatică a eritrocitului obținută prin tehnica de înghețare-fracturare.

A) preincubarea membranei cu fitohemaglutinină și feritină. Se evidențiază prezența unor "unități" globulare (cu diametrul de aproximativ 75 Å), cu o distribuție uniformă pe întreaga suprafață a membranei.

B) pretratarea membranei cu aglutinină din germe de grâu (WEG) și feritină conjugată. Imaginea evidențiază atât fața de fractură (CF) cât și suprafața externă a celulei. Săgeata indică delimitarea dintre cele două suprafețe. Dispoziția proteinelor cuplate cu WGA și feritină de pe suprafața externă este asemănătoare cu cea a particulelor intramembranare (după Marchesi, 1975).

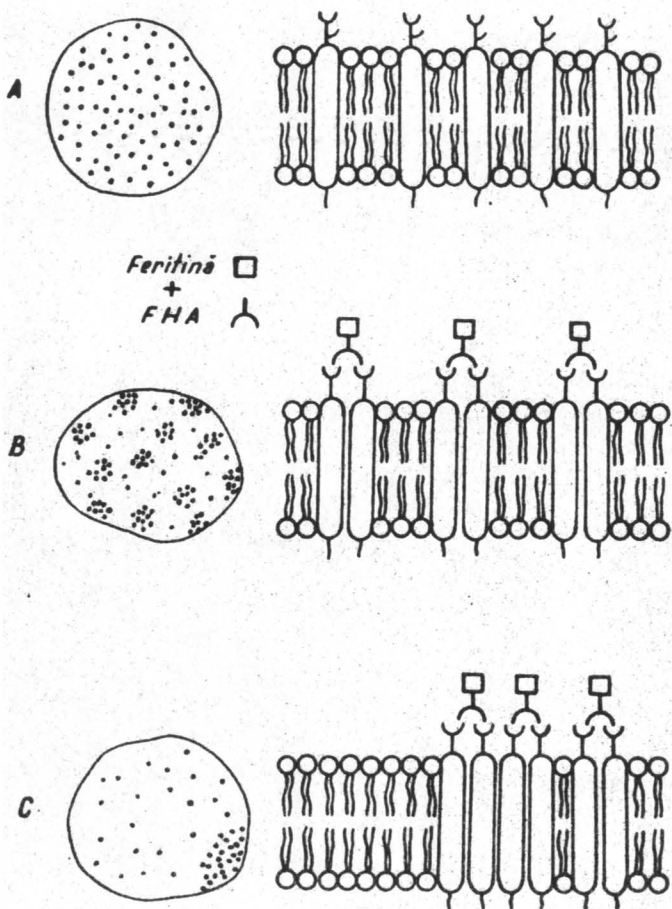


Fig.44. Reprezentarea schematică a distribuției și mobilității receptorilor din membrana plasmatică a limfocitului, obținute prin tehnica de înghețare-fractură.

A) Suprafața externă a celulei prezintă numeroase glicoproteine, cu o dispoziție uniformă în membrană. Organizarea lor în structura membranei nu este modificată.

B) Tratarea celulelor cu un ligand bivalent (FHA) și feritină, facilitează mișcarea glicoproteinelor în membrană.

C) adunarea unor receptori la un pol al celulei.

mare a situsurilor oligozaharidice în membrană, receptorii pot avea afinități deosebite pentru o lectină dată și induce în celule efecte variate. De exemplu, WGA și con A determină efecte asemănătoare insulinei, pe celula adipoasă și limfocitele unor mamifere (Cuatrecasas, 1974). Con A și WGA inhibă activitatea adenilatciclazei din membrana celulei adipoase, con A activează adenilatciclaza din membrana limfocitelor, a sialiltransferazei din membrana timocitelor și a acil-CoA-lisolecitinaciltransferazei din limfocit (Korolev, 1978). Capacitatea de agregare a situsurilor receptoare sub influența liganzilor, crează în membrane agregate temporar mai stabile și reversibile (Yahara și Edelman, 1975). Pentru unele membrane, adunarea receptorilor în membrană, favorizează creșterea permeabilității membranei pentru ioni de Ca^{2+} (Friedman și col. 1975). Acest lucru este susținut și de faptul că ionofori specifici pentru Ca^{2+} , sînt capabili să mimeze efectele unor lectine (Wang și col. 1975). Creșterea concentrației intracelulare a ionilor de calciu, influențează activitatea adenilatciclazei și guanilatciclazei de pe fața citoplasmatică a membranei, și induce o depolimerizare a microtubulilor, în funcție de natura substanțelor inductoare și de tipul celular.

Mobilitatea receptorilor în membranele plasmatice depinde și de compoziția chimică a bistratului lipidic. Agregarea receptorilor sub influența inductorilor are loc într-o membrană în care lipidele sînt în stare lichid-cristalină. Tratarea cu liganzi bivalenți la o temperatură scăzută, nu permite redistribuția receptorilor în unele membrane; prin creșterea temperaturii viteza de formare a agregatelor în membrană este mare. Dependența de temperatură a adunării receptorilor se exprimă deosebit, în funcție de tipul celular și natura ligandului (Ryan și col. 1974; Nicolson și col. 1976). După unele păreri, agregarea receptorilor este un proces pasiv, în timp ce formarea calotei (polarizarea lor) depinde de metabolismul celular și este inhibată de substanțe ce interferează cu metabolismul energetic și depolimerizarea microtubulilor (Nicolson, 1974, 1977).

6.6.1. Mobilitatea receptorilor în membrana eritrocitului. Particularitățile morfo-funcționale ale acestei membrane, au permis descrierea unor aspecte legate de mobilitatea receptorilor în membrană. Marcarea specifică a unor receptori de pe suprafața membranei, combinată cu tehnica de înghețare-fracturare, a facilitat studierea distribuției lor sub influența unor factori deosebiți.

Branton și col. (1976, 1978) au arătat că o pretratare a celulelor eritrocitare prin care spectrina se îndepărtează din membrană, duce la o agregare rapidă a particulelor, sub influența unor factori ai

mediului (variația pH-ului, modificarea forței ionice sau adăusul cationilor polivalenți). Gradul de agregare al particulelor intramembranare este direct proporțional cu gradul de precipitare al spectrinei. În al doilea rând, s-a examinat dacă eliberarea spectrinei induce agregarea tuturor proteinelor majore din membrana eritrocitară, sau dacă unele proteine rămân libere în membrană. Ultimul aspect derivă din observațiile anterioare, care au dovedit că în membrana limfocitului, unele proteine de suprafață (imunoglobuline) prezintă comportări deosebite. În membrana eritrocitului, receptorii specifici pentru FHA și con A, agregă împreună în urma unui tratament cu tripsină sau prin modificarea pH-ului (Pinto da Silva și Nicolson, 1974).

Datele experimentale ale lui Branton și col. (1978) arată că distribuția unor proteine integrale din membrana eritrocitului (glicoforina, proteina banda 3), antigenele de grup sanguin A, receptorii pentru virusul gripei, FHA, con A și alte situsuri receptoare încărcate negativ, se mișcă în membrană analog particulelor intramembranare. De asemenea, s-a arătat că numeroase proteine din membrană, coagregă cu particulele intramembranare. S-a sugerat existența unor interrelații între proteine în membrana nativă, o strinsă dependență a majorității proteinelor față de spectrină și față de unele proteine periferice. Aceste particularități presupun că proteinele de pe ambele fețe ale membranei interacționează între ele în așa fel încît, imobilizarea unora restrânge mobilitatea laterală a altora.

Totuși, s-a constatat prezența unor proteine care se pot deplasa în membrana eritrocitului. Astfel, proteina banda 3 este liberă să se rotească în planul membranei și este imobilizată numai cînd majoritatea particulelor intramembranare sînt agregate. De asemenea s-a observat că la temperatura camerei, o serie de proteine integrale din membrană prezintă mișcări laterale, a căror viteză de deplasare depinde de temperatură și de starea metabolică a celulei. De aceea s-a sugerat că în membrana nativă, spectrina formează o rețea labilă, care se leagă slab și reversibil de particulele intramembranare (Cherry și col. 1976; Fowler și Branton, 1977).

Din cauza naturii complexe a organizării structurale a membranelor plasmactice celulare, interacțiunile lectinelor, a antigenelor și a hormonilor peptidici cu receptorii celulari prezintă o serie de particularități, deosebite de interrelațiile bimoleculare simple. În membrană există multe clase de molecule relativ asemănătoare, capabile să servească ca receptori. Acestea au afinități variabile pentru un ligand dat. În plus, receptorii sînt mobili și pot interacționa în mănieri deosebite, afectînd în acest fel afinitatea lor.

În general, se consideră că situsurile de legare pot să se aglomereze, datorită mișcărilor induse de ligand, în membrana semiflu-idă, fenomen ce poate oferi proprietăți cooperative situsurilor. Se presupune că atât molecula receptoare cât și ligandul pot să-și modifice conformația, facilitând disocierea unor lectine marcate și înlocuirea lor cu lectine nemarcate. Acest lucru apare clar exprimat pentru unii hormoni. Astfel, De Meyts și col. (1976) au conchis că viteza crescută de disociere a insulinei radioactive fixate de membrană în prezența insulinei neradioactive, se datorește unei cooperări negative între situsurile de fixare pentru acest hormon. Există și cazuri în care această cooperare negativă este determinată de ligand. Astfel, disocierea unor liganzi de membrană, poate fi accelerată de prezența altui ligand. Faptul că o serie de liganzi (de exemplu hormonul somatotrop) nu măresc viteza de disociere a ligandului marcat și fixat de receptor, poate fi explicată prin aceea că atât receptorul cât și ligandul sînt inflexibili (Sandvig și col. 1978).

6.6.2 Mobilitatea unor receptori din membrana mastocitelor.

Am arătat că mobilitatea receptorilor în membrană are repercursiuni asupra funcțiilor celulare. Un exemplu sugestiv este oferit de mastocite, la care s-a observat o corelație lineară între mișcarea receptorilor pentru con A și efectul citotoxic al acestor lectine în prezența colchicinei. Fixarea con A pe situsurile receptoare ale membranei mastocitelor, induce agregarea receptorilor la un pol al membranei și reprezintă o modificare structurală necesară manifestării lizei (Lustig și col. 1977). Inhibitori ai procesului de agregare al acestor receptori (temperatura scăzută, NaN_3) împiedică liza celulelor. Populația de celule ce răspunde pozitiv la lectine, reprezintă 30% din celulele în interfază. Se presupune că sensibilitatea celulelor față de colchicină poate fi legată de o anumită fază a ciclului celular. Tratarea celulelor numai cu con A nu produce liza.

Prin metode în fluorescență și microscopie în relief (scanning), s-a arătat că la celulele normale microvilli sînt uniform repartizați pe suprafața membranei. Adăugarea de con A și colchicină determină o concentrare a microvillilor la un pol al celulei. Rezultate similare au fost obținute pe limfocite. Limfocitele purtătoare de calote (induse sub influența con A), manifestă proprietăți amiboideale (Unanue și Karnovsky, 1974). Bonetarea nu este un proces sincron și depinde de influența unor factori ai mediului. De exemplu, dextranul protejează celulele împotriva procesului de liză, la fel ca și albumina serică (în concentrație de 0,5%).

6.6.3 Mobilitatea receptorilor antigenici. În membranele plasmatice ale celulelor imunocompetente s-au descris numeroși receptori antigenici. În afara lor, în membrane există și alți receptori: receptori pentru mitogene (FHA, con A), receptori pentru imunoglobuline, receptori pentru complement, ș.a. Receptorii antigenici pot fi ușor testați și urmăriți în membrane cu ajutorul unor metode de marcarea specifică. Astfel, receptorii antigenici din membrana limfocitelor pot fi evidențiați cu anticorpi fluorescenți (izotiocianat de fluoresceină, rodamină), cu anticorpi anti-imunoglobulinici cuplați cu un fluorocrom sau feritină, cu anticorpi marcați cu I^{125} în prezența lactoperoxidazei, etc.

Mobilitatea receptorilor antigenici din membrană este dependentă de cooperarea a numeroși factori: valența ligandului, densitatea receptorilor, organizarea membranei, starea metabolică a celulei, tipul de celulă, ș.a. (Gheție, 1977). Redistribuirea receptorilor antigenici în membrană, atât cu ajutorul unor antigene specifice cât și sub influența unor liganzi (mitogene sau anticorpi), constituie un factor de inițiere al unor secvențe de procese funcționale celulare. În majoritatea cazurilor are loc activarea limfocitelor.

De obicei, receptorii Ig au o distribuție omogenă în membrană. Tratarea celulelor cu anticorpi monovalenți fluorescenți, evidențiază prezența fluorocromului pe toată suprafața membranei celulare. Dacă celulele sînt tratate cu anticorpi bivalenți sau polivalenți, receptorii antigenici din membrană se redistribuie sub formă de mici agregate (insule), și apoi, se concentrează la un pol ale celulei. Procesul poartă denumirea de adunare a receptorilor sub formă de bonetă sau calotă (vezi figura 45). Redistribuirea receptorilor antigenici nu afectează mobilitatea celorlalți receptori din membrana limfocitului. Dacă formarea insulelor ("peticelor") apare ca un proces independent de temperatură, redistribuirea receptorilor sub formă de calotă la un pol al celulei depinde de metabolismul celular. Primul aspect este un proces de interrelație dintre receptor și ligand (stereospecific), în timp ce bonetarea este un fenomen activ de cooperare al complexului format cu membrana plasmatică și se derulează în funcție de particularitățile specifice ale celulei.

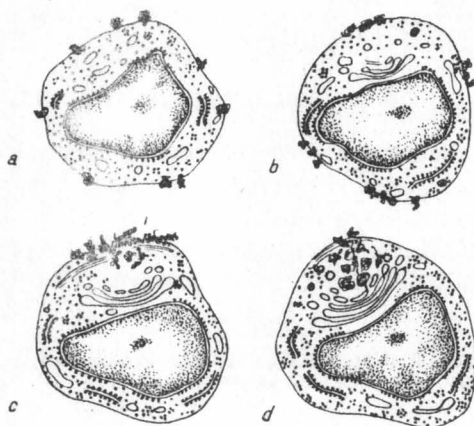


Fig.45. Principalele "faze" ale distribuției și mobilității receptorilor în membrana plasmatică celulară. a) distribuție omogenă a receptorilor; b) adunarea receptorilor sub formă de mici aglomerări; c) adunarea unor receptori la un pol al celulei (sub formă de bonetă sau calotă); d) endocitarea receptorilor care s-au deplasat la un pol al celulei.

7. RECEPTORII IMUNOLOGICI DIN MEMBRANELE CELULARE

Sistemul imunitar se caracterizează prin existența unor particularități determinate de heterogenitatea celulară, a unor receptori de recunoaștere, a capacității de colaborare a diferitelor tipuri de celule imunocompetente, prezența unor mecanisme variate de reglaj și a unui control genetic extrem de complex. Intenția noastră nu este de a analiza procesele imunitare, ci doar de a face o scurtă prezentare a receptorilor imunologici din membranele plasmatice ale celulelor imunocompetente, în care glicoproteinele și glicolipidele reprezintă elementele structurale de primă importanță.

Prezența receptorilor imunoglobulinici asociați de fața externă a membranei celulare, a fost dovedită prin diverse metode. Acest lucru este posibil, deoarece receptorii imunologici se pot cupla, atât cu antigeni cît și cu seruri anti-imunoglobulinice, cu specificități deosebite pentru situsuri variate ale moleculei. Dintre tehnicile utilizate pentru identificarea receptorilor imunologici în membranele plasmatice ale celulelor imunocompetente amintim: tehnica de rozetare (fixarea sau aglutinarea eritrocitelor de către celulele limfocitare); fixarea albuminei serice radioactive (I^{125}) pe celule splenice; anti-seruri anti-imunoglobulinice marcate cu I^{125} sau fluoresceină; colorare cu coloranți imunofluorescenți; tehnica cu feritină conjugată și antiser anti-imunoglobulinic și vizualizare la microscopul electronic pe secțiuni fine; iodinare cu lactoperoxidază și I^{125} -INa.

S-au descris mai multe structuri chimice implicate în recunoașterea imunologică. Moleculele ce recunosc antigenele sînt asemănătoare cu anticorpii secretați în sânge și lichidele biologice. Acești receptori sînt considerați molecule glicoproteice de membrană sintetizate intracelular (celulele limfocitare tip B), sau achiziționate secundar, ca rezultat al cooperării intercelulare și interacțiunii cu complexi antigen-anticorp.

Receptorii imunoglobulinici prezintă 2 lanțuri polipeptidice grele și 2 lanțuri polipeptidice ușoare, sau un multiplu al acestei

structuri de bază (figura 46). Deosebiri imunologice dintre diversele clase de imunoglobuline (IgG, IgA, IgM, IgD și IgE), se bazează pe de-

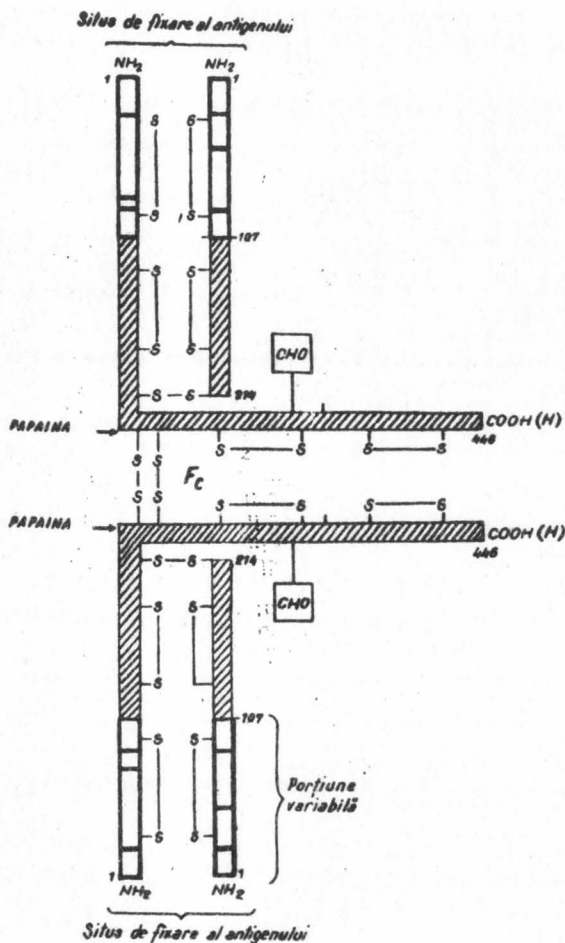


Fig.46. Structura imunoglobulinei IgG. Lanțurile grele (H) cît și cele ușoare (L) cuprind regiuni invariabile în aminoacizi (hașurate). Segmentele variabile din ambele lanțuri polipeptidice sînt reprezentate în alb. Zonele hipervariabile ale celor două lanțuri polipeptidice (în negru) determină specificitatea de fixare a antigenului. Hidroliza cu papaină desface imunoglobulina și eliberează segmentele Fab. CHO reprezintă grupările oligozaharidice din molecula imunoglobulinei.

terminanții antigenici ai lanțurilor ușoare. Unele limfocite poartă în membrană numai o singură clasă de imunoglobuline, în timp ce alte celule (celulele splenice de șoarece) au în membrană mai multe clase sau subclase de imunoglobuline (Lee și col.1971).

Vitetta și col. (1971), au arătat că receptorii imunoglobulinici din membrana limfocitelor splenice de la șoarece sînt formați deosebi din molecule monomerice, sau subunități ale IgM, în timp ce în sînge imunoglobulinele se află sub formă pentamerică. Numărul receptorilor imunoglobulinici din membranele celulelor limfocitare din diverse țesuturi limfoide este foarte variat. Proporția relativă a celulelor purtătoare de imunoglobuline în splină, măduva osoasă, sînge periferic, noduli limfatici, exudat peritoneal și timus, a fost de 49, 47, 14, 7, 10 și 0,1 la sută (Rabellino și col.1971). Cantitatea foarte mică de celule purtătoare de imunoglobuline din timus, sugerează că celulele timice poartă determinanți antigenici deosebiți (Raff, 1970).

Prezența sau absența receptorilor imunologici în membrana celulelor limfocitare tip T este controversată (Vitetta și col.1972).

Limfocitele B au în membrane receptori antigenici elaborați endogen (Greaves și col.1973). Totuși, și alte celule imunocompetente pot prezenta situsuri receptoare antigenice, căpătate secundar ca anticorpi proveniți de la celulele limfocitare B, sau în urma interacțiilor cu complecși antigen-anticorp. Acest lucru se realizează prin activitatea unor structuri din membrana celulară, care fixează segmentul Fc al IgG, sau a altor receptori ce fixează componente ale complementului din serul sanguin. În urma fixării antigenului sau a complecșilor antigen-anticorp, celula se activează. De remarcat faptul că celulele tip B care își elaborează receptorii antigenici, au de asemenea în membrană și receptori pentru complecși antigen-anticorp și situsuri pentru complement.

Anticorpii prezintă o mare diversitate structurală, descrisă prin situsuri antigenice variate. Celulele limfocitare B au un fond genetic descris de cel puțin 30 de gene structurale deosebite. Ele se exteriorizează deosebit în cadrul celulelor B, adică fiecare celulă sintetizează și secretă anticorpi omogeni ca structură și specificitate. S-a apreciat că în elaborarea produsului finit, participă 4 gene structurale, fiecare din ele controlînd secvențele de aminoacizi ale unei regiuni antigenice determinate. După părerea lui Greaves (1975), fundamentul răspunsurilor specifice ale limfocitelor B, constă în elaborarea unui singur tip de receptor și a unui tip de anticorp, în ciuda existenței unui repertoriu genetic așa de diversificat. Această părere vine în acord cu conceptul selecției clonale elaborat de către Burnet (1959).

Datele experimentale apreciază că imunoglobulinele reprezintă moleculele care fixează stereospecific și cu afinitate mare antigenul de către limfocitele B. Natura receptorilor antigenici din membrana limfocitelor T este disputată. În anumite condiții, celulele T acceptă anticorpii elaborați de limfocitele B, proces ce este considerat discriminator. Ideia după care celulele T ar poseda receptori imunologici nu a fost total abandonată. Totuși, cel mai adesea se consideră că celulele T prezintă în membranele lor structuri (situri) receptoare, prin care se poate realiza cooperarea cu celulele B și cu macrofagele. Aceste situri sunt reprezentate de glicoproteine de membrană, codificate de gene strâns asociate cu locușii de histocompatibilitate; cei mai cunoscuți sunt complexul major de histocompatibilitate (H_2) de la șoarece, care codifică majoritatea variantelor serologice găsite pe suprafața tuturor celulelor implicate în reacțiile de allogrefe și complexul de histocompatibilitate de la om (HL-A) (Bodmer, 1972).

Celulele limfocitare tip T cooperează cu numeroși antigeni în formarea anticorpilor și elaborarea unor răspunsuri specifice. Totuși răspunsurile cele mai caracteristice ale acestor celule au fost observate în urma interacțiilor lor cu componente de membrană ale altor tipuri de celule. Celulele T nu cooperează cu toate structurile din membrana celulelor, ci numai cu acelea care sunt codificate de gene ce sunt în strânsă legătură cu antigenele de histocompatibilitate ale speciei. De exemplu, celulele T răspund mai bine față de celulele allogene ale aceleiași specii dar de origine deosebită (sau de la indivizi deosebiți în cazul omului). Celulele T sunt capabile să recunoască toate aceste structuri ca antigene, dar numai unele sunt foarte potente în activarea lor. Acești determinanți antigenici prezintă două caracteristici: 1) se află în cantitate mare în membrana macrofagului și a celulelor B, dar sunt slab reprezentate pe celulele T și în membranele altor tipuri de celule din organism; 2) moleculele lor sunt codificate de gene dominante (așa numitele gene Ir sau gene pentru răspunsul imun), care determină răspunsul imun pozitiv sau negativ al celulelor T (Sachs și Dickler, 1975; Greaves 1975).

Toate aceste constatări ne permit să apreciem că sistemul imun prezintă două componente de recunoaștere, și anume:

a) anticorpii imunologici produși de celulele limfocitare B și folosiți ca receptori antigenici.

b) structuri polimorfe de pe suprafața membranelor celulare, care sunt implicate în inițierea unei imunități celulare mediate. În ultimul caz, probabil că regiunea I a complexului de histocompatibilitate H_2 (și regiuni analoge la alte specii), codifică structuri care îndeplinesc mai multe roluri:

1) aprovizionează cu componente structurale membranele plasmatice ale celulelor T, sub formă de unități receptoare sau ca receptori.

2) asigură interrelațiile dintre celulele limfocitare T si-nergice cu macrofagele și celulele limfocitare B.

3) asigură mijloacele de stimulare a celulelor T în prezența unor celule străine (allogene), sau a unor celule autoloage alterate morfo-funcțional (de exemplu macrofage invadate de virusi).

Acest concept sugerează că regiunea cromozomală a celulelor T se dezvoltă și se diversifică în așa fel încât să includă și să mențină structuri cognitive complementare. S-a sugerat ideea că genele ce codifică receptorii caracteristici interacțiilor imunitare sînt în raporturi strînse cu alte gene, care sînt implicate în primul rînd în dezvoltarea asocierii dintre celule homo- sau heterotipice. Acest lucru presupune că polimorfismul genetic are o funcție biologică mai generală, din care sistemul imunitar s-a dezvoltat ca un proces specializat (Bodmer, 1972; Greaves 1975).

Originea imunoglobulinelor. Datele experimentale au arătat existența unor legături între locusii de histocompatibilitate ce codifică structurile din membrana celulară și anticorpii imunoglobulinici (Moller, 1974). Studiile chimice și cele de reorganizare a receptorilor din membrane indică că moleculele H_2 și HL-A sînt formate din lanțuri polipeptidice mici (11.000 daltoni), analoage cu β microglobulinele. Acestea din urmă, la fel ca și H_2 și HL-A, s-au descris în membranele tuturor celulelor. Observațiile experimentale presupun că diversitatea imunoglobulinelor caracteristică vertebratelor, s-a dezvoltat din sistemele de recunoaștere intercelulare din membranele celulelor neimunitare.

Mecanismele de activare a sistemului imunitar. Aparatul de recunoaștere a sistemului imun, cuprinde cîteva tipuri de celule (limfocite B, macrofage, mastocite, bazofile) echipate pentru a recunoaște antigenele prin intermediul Ig (elaborat direct sau captat indirect). În plus, celulele T sînt echipate cu receptori ce pot recunoaște antigeni alterați de histocompatibilitate sau antigeni diferențiați. Nu se știe cum acești antigeni declanșează acțiuni în diverse tipuri de celule, deoarece mecanismul transducției de membrană este necunoscut. Totuși, s-au descris cîteva aspecte importante, obținute prin studii cu liganzi, care induc răspunsuri la limfocite, foarte asemănătoare cu cele obținute în cazul acțiunii antigenelor. Liganzii sînt apreciați, în general, ca activatori policlonali sau mitogeni policlonali, deoarece spre deosebire de antigene, ei activează populații mari de celule,

independent de specificitatea clonală (Greaves, 1975). Au fost descrise numeroase substanțe proteice, polizaharide bacteriene, polianioni și ioni ai unor metale grele, care posedă astfel de acțiuni. De asemenea, anticorpii anti-imunoglobulinici prezintă capacități stimulatorii pe celulele B și mastocite. Mecanismul similitudinii dintre acești activatori și antigeni este necunoscut. S-a sugerat că diverșii liganzi acționează asupra unor receptori deosebiți din membrane și inițiază producerea unui semnal intracelular comun (analog AMP_c pentru hormoni).

Deși există multe date controversate, câteva aspecte comune sînt de remarcat (Greaves 1975). Activitatea inițială este un fenomen al suprafeței celulare, ce poate fi indus cu liganzi insolubilizați sau cu antigene. În toate sistemele imunologice induse, valența liganzilor activatori apare deosebit de importantă. Mulți mitogeni policlonali și antigeni sînt polivalenți, în timp ce anticorpii mitogeni ai determinanților de membrană de la limfocite și mastocite trebuie să fie cel puțin bivalenți, în inițierea procesului activator. S-a sugerat că aceasta reflectă necesitatea de legare încrucișată a determinanților din membrană sau agregarea receptorilor. Ioni de calciu mimează efectul liganzilor fiziologici, pe celulele limfocitare și mastocite, probabil printr-un efect activator al GMP_c (Freedman, și col.1975).

7.1. Receptori antigenici de grup sanguin. În membrana plasmatică a eritrocitelor umane s-au identificat receptori antigenici de grup sanguin (sistemul ABO), ce cuprinde antigene specifice legate de membrană și anticorpii lor corespunzători în plasmă. Deoarece grupa O se caracterizează prin prezența antigenului H, sistemul a fost descris sub denumirea de ABO(H) sau ABH. Aceste antigene au fost identificate și în membranele plasmatice ale altor tipuri de celule (leucocite, spermatozoizi, celule epiteliale) și în lichidele biologice (salivă, lapte, urină) (Hakomori, 1970). De asemenea, s-a constatat că sușe deosebite de *E.coli*, posedă separat antigenul A, B sau H ori pe toate trei în aceeași membrană (Renwrandt și Uhlenbruch, 1974).

Prin metode chimice, imunochimice și enzimatiche, s-a dovedit că specificitatea antigenică a substanțelor de grup sanguin este dată de prezența unor monozaharide, dispuse spre capătul terminal al glicolipidelor. Moleculele cu funcții antigenice de grup sanguin, reprezintă o familie de glicosfingolipide (poliglicozilceramide), ce pot conține pînă la 59 resturi glucidice per mol (Zdebska și Koscielak, 1978). Prin studii de metilare, degradare cu trioxid cromic și hidroliză acidă s-a stabilit prezența unor tipuri de secvențe oligozaharidice în poliglicozilceramidele de membrană.

După cum se observă din figura 47, la baza acestor receptori din membrană stă un fragment oligozaharidic format din 4 monozaharide: galactoză, N-acetilglucozamină, fucoză și N-acetilgalactozamină. Specificitatea de grup sanguin este dată de prezența unor monozaharide specifice pe structura de bază. Pentru antigenul de grup H, aceasta este reprezentată de fucoză; pentru antigenul de grup B, de fucoză și galactoză, iar pentru antigenul de grup A, de fucoză și N-acetilgalactozamină.

Se apreciază că o moleculă glicoproteică din membrana eritrocitară poate avea numeroase oligozaharide. Pentru un glicolipid cu 22 oligozaharide, s-au descris 2-3 ramificații secundare cu secvențe monozaharidice specifice (Zdebska și Koscielak, 1978). Alți autori au apreciat că pentru un glicolipid cu 22 monozaharide, structura este simetrică și este formată dintr-un lanț oligozaharidic lung și neramificat (Watkins, 1972; Gardos 1976).

Variabilitatea antigenelor de grup sanguin din membrana plasmatică eritrocitară este controlată genetic iar biosinteza lor este reglată de prezența unor glicoziltransferaze specifice. Persoanele ce aparțin grupei H prezintă o fucoziltransferază specifică iar indivizii din grupa B o galactoziltransferază specifică. De subliniat faptul că în lipsa antigenului H, sinteza celorlalți receptori antigenici de grup nu are loc, deși enzimele specifice pot fi active (Goldstone și Koenig, 1973).

7.2. Receptorii membranei plasmatică în cursul diferențierii.

Numeroase cercetări au stabilit că în cursul diferențierii eritrocitului de mamifer, se produc modificări în densitatea și distribuția unor situsuri receptoare din membrana plasmatică. S-au descris diferențe în densitatea de suprafață a sarcinilor negative, a antigenității celulare și a receptorilor pentru concanavalină A. Cu ajutorul oxidului feric coloidal (fixează resturile terminale de acid sialic), s-a constatat că densitatea grupărilor anionice din membrana eritrocitului de iepure scade treptat în cursul dezvoltării și crește din nou, după expulzarea nucleului. Datele experimentale sugerează că viteza de sinteză și înglobare a diverselor proteine în membrana celulei eritrocitare, variază în paralel cu procesul de diferențiere.

Skutelsky și Farquhar (1976) au cercetat distribuția receptorilor pentru concanavalină A și densitatea grupărilor anionice din membranele plasmatică eritrocitare de șobolan. Frecvența receptorilor pentru con A și C_1 (charged ferric oxide), variază în cursul stadiilor de dezvoltare ale eritrocitului și la diverse tipuri de leucocite. Receptorii pentru con A aveau o densitate mare în membrana plasmatică a

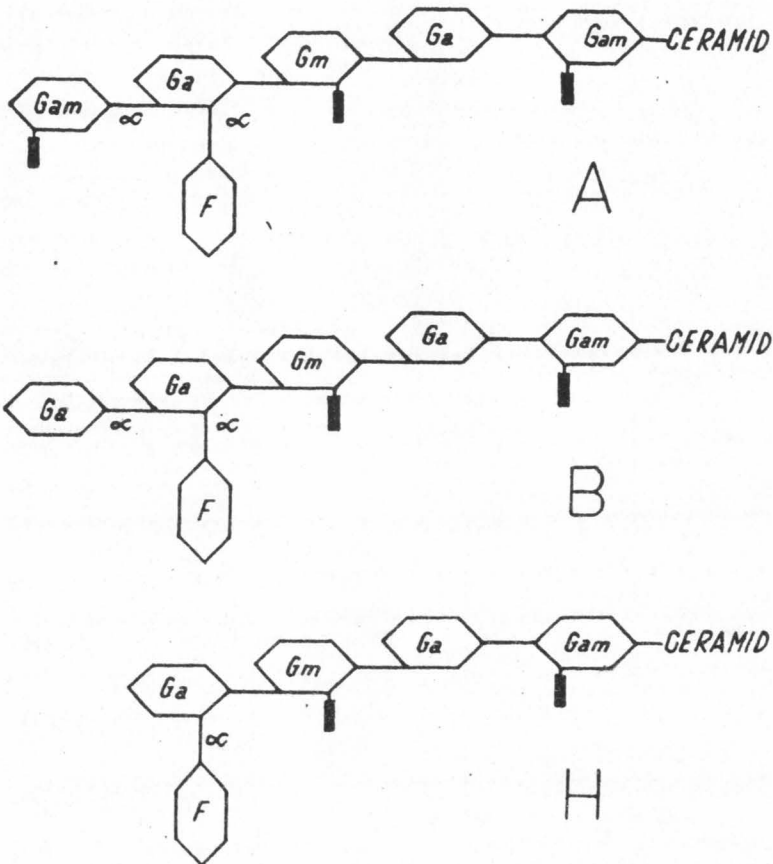


Fig.47. Structura oligozaharidică a receptorilor de grup sanguin din membrana plasmatică a eritrocitului. Gam = N-acetilgalactozamina; Ga = galactoză; Gm = N-acetilglucozamina; F = fucoză.

macrofagelor, densitate medie în membrana neutrofilelor și densitate slabă la eozinofile și bazofile. Distribuția receptorilor pentru grupări anionice apare inversă față de con A. Datele experimentale sugerează că concentrația asialoglicoproteinelor (ce fixează con A) este în raport invers proporțional cu distribuția sialoglicoproteinelor în cursul diferențierii. După extruzia nucleară, are loc o segregare selectivă a glicoproteinelor din membrană, caracteristică membranei eritrocitului matur.

Mecanismele posibile ce însoțesc aceste modificări ale proteinelor receptoare din membrană sînt puțin cunoscute. Segregarea diverselor componente ar putea fi un proces evolutiv de cooperare între factorii intracelulari și cei extracelulari. Cercetările lui Berlin și col. (1974, 1975) sugerează că anumite componente sînt ținute selectiv de membrana plasmatică, în timp ce altele (receptorii pentru con A) sînt eliminate și segregă în vacuole fagocitare.

Încărcarea deosebită a membranelor plasmatice are consecințe asupra funcțiilor celulare și cooperării dintre celule. De exemplu, fața luminală a membranei celulelor endoteliale a vaselor de sînge este încărcată negativ. Această particularitate facilitează repulsia dintre celulele sanguine și peretele endotelial, împiedicînd agregarea lor pe intimă. În urma modificării sarcinilor din membrane se favorizează formarea trombozelor (Skutelsky și col. 1975). Skutelsky și Danon (1976) au analizat abilitatea grupărilor anionice de pe suprafața luminală a vaselor de sînge de a migra sub influența unor liganzi. Interacțiunile cu feritina cationică determină o rapidă agregare a majorității situsurilor anionice din membrana celulelor endoteliale, urmată de o desprindere a lor, sau transferul lor în stratul subendotelial. Probabil că receptorii din membrana acestor celule suferă fluctuații de distribuție, paralel cu dezvoltarea organismului și sub influența numeroșilor factori de mediu.

8. RECEPTORII COLINERGICI SI ADRENERGICI

8.1. Caracterizare. Transmiterea informației între celulele senzoriale sau între celulele senzoriale și alte tipuri de celule se realizează prin intermediul unor mediatori chimici (neuromediatori, neurotransmițători). Aceștia se eliberează la nivelul terminațiilor nervoase și determină o creștere selectivă și tranzitorie a permeabilității membranei postsinaptice (regiunea din membrana plasmatică a celulei ce vine în contact cu terminațiile nervoase). Regiunile de contact dintre celule se disting printr-o serie de particularități morfologice, ultrastructurale, moleculare și mai ales funcționale și poartă denumirea generală de sinapse. Ele se caracterizează prin existența a două arii specializate, definite sub formă de membrană presinaptică și postsinaptică.

Mediatorii chimici implicați în transmiterea informației de la o celulă la alta, se sintetizează de obicei în celula neuronală. În regiunea presinaptică se disting numeroase mitocondrii și vezicule (uneori uniforme, alteori deosebite ca mărime și densitate). Prin fracționarea terminațiilor nervoase în gradient de densitate, se pot izola structuri de membrană, ce conțin în cantitate mare mediatorul chimic și echipamentul enzimatic de sinteză al acestuia. Ele poartă denumirea de sinaptozomi.

Excitarea prelungită a neuronului determină epuizarea sa în mediatorul chimic pe care îl conține. Astfel, în terminațiile presinaptice ale unei sinapse neuro-musculare de la broască s-au identificat aproximativ 600.000 vezicule. O excitare timp de 1 minut a unui astfel de preparat, duce la scăderea conținutului veziculelor presinaptice cu 50%. Eliberarea veziculelor încărcate cu mediator în spațiul presinaptic are loc printr-un proces de exocitoză. Se apreciază că o parte din veziculele descărcate, se pot întoarce în citoplasma terminației nervoase și formează noi vezicule sinaptice.

Membranele sinaptice sînt regiuni specializate morfo-funcțional, ale membranei plasmactice. Ele prezintă o compoziție în lipide relativ asemănătoare cu a membranelor plasmactice. Totuși, la nivelul sinapselor s-au identificat glicerofosfolipide cu compoziții deosebite

în acizi grași. Astfel, fosfatidiletanolamina conține în proporție de 33% un acid gras polienoic (22:6), la fel ca și fosfatidilserina (35%). Fosfatidilinozitolul conține 37% acid arahidonic. În schimb, sfingomielina prezintă un conținut ridicat de acid stearic (87%). În membranele sinaptice s-a identificat o cantitate mare de colesterol (19%) și ganglioze (5-10%) (Cotman și Levy, 1975).

Membranele sinaptice sînt foarte deosebite din punct de vedere al organizării ultrastructurale, probabil determinat de existența unor receptori variați. De aceea, și efectele lor sînt diferite, în funcție de specie și cooperarea cu alți factori puțin cunoscuți (Iversen, 1970). În lumea vie s-au identificat un număr restrîns de mediatori chimici (acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, dopamina) cu efecte deosebite asupra receptorilor sinaptici.

În regiunea membranei sinaptice se află un număr mare de receptori. Astfel, cu ajutorul bungarotoxinei iodinate (I^{125}) sau a anticorpilor fluorescenți obținuți față de toxină, care se fixează de receptorii sinaptici, s-a calculat că aproximativ 50% din proteinele membranei plasmatică sînt concentrate în această regiune. De asemenea prin tehnica de înghețare-fracturare, s-au identificat în membranele sinaptice un număr mare de particule intramembranare (Robertson, 1970).

Cunoștințele noastre asupra funcției sinapselor sînt destul de limitate și au fost obținute pe cîteva modele: preparatele colinergice neuro-musculare ale vertebratelor și organul electric al unor pești (Electrophorus, Torpedo). Se cunosc puține lucruri despre transmiterea sinaptică în sistemul nervos central.

Date suplimentare asupra organizării receptorilor s-au obținut cu ajutorul unor molecule cu structuri sterice apropiate mediatorilor, ce pot avea acțiuni antagoniste (inhibitorii) sau agoniste (mimetice), față de efectele mediatorilor chimici identificați la nivelul sinapselor. Se apreciază că fixarea cu afinitate mare de un receptor de membrană a mediatorului (sau analogilor), nu este suficientă în inițierea transducerii semnalului. Existența unor răspunsuri extrem de variabile pentru diverse substanțe farmacologice (agoniste și antagoniste), presupune că în transmiterea informației un rol însemnat îl are capacitatea sistemului receptor de a-și modifica conformația. De asemenea, diversitatea de manifestare din lumea vie, sugerează existența unor organizări specifice a receptorilor, în funcție de tipul celular și specie.

8.2. Receptorii colinergici.

Receptorul colinergic face parte dintr-un sistem colinergic în care principalul neurotransmițător îl formează acetilcolina. Disponibilitatea acetilcolinei în sistemul nervos central (SNC) și sistemul nervos periferic (SNP) este extrem de variabilă, și depinde de o serie de factori: capacitatea de sinteză a mediatorului într-un tip de celulă, capacitatea de depozitare a veziculelor sinaptice, viteza de eliberare a mediatorului în spațiul sinaptic, modul de interacție cu receptorul colinergic, maniera de eliberare a mediatorului din interacția cu receptorul, posibilitatea de recaptare de către membranele presinaptice sau viteza de degradare a sa de către enzimele din membrana postsinaptică. Toți acești factori cooperează în transmiterea influxului nervos între două celule.

Acetilcolina este sintetizată de către colinacetiltransferază, având ca precursori acetil CoA și colina. Enzima este inhibată de analogi ai acetilcolinei (cloroacetilcolina, bromoacetilcolina) și o serie de molecule stiril-piridinice. Inhibiția eliberării acetilcolinei în spațiul sinaptic este determinată de acțiunea toxinei botulinice, a unor substanțe anestezice cu acțiune locală (procaina) și de prezența ionilor de Mg^{2+} .

Receptorii colinergici au fost împărțiți în două categorii și anume: receptori nicotinici, care au ca principal agonist nicotina și sint blocați de d-tubocurarină; receptori muscarinici, care sint sensibili la muscarină și prezintă ca principal antagonist, atropina (vezi tabelul 9). Deosebiriile dintre cele două categorii de receptori colinergici constau în capacitățile deosebite de interacție cu acetilcolina și afinitățile discriminatorii diferite față de acțiunea agonistilor și antagoniștilor. Aceasta reflectă deosebiri atît în structura liganzilor, cît și a situsurilor de legare de la nivelul receptorului (vezi figura 48).

Acetilcolina este o moleculă cu o structură flexibilă, ce poate prezenta configurații sterice deosebite. După Pauling și col. (1968), acetilcolina are două conformații sterice active, și anume conformație muscarinică și nicotinică. Conformația muscarinică este determinată de poziția grupărilor metil în structura moleculei (profil metilic) în timp ce conformația nicotinică evidențiază gruparea carbonil (profil carbonilic). În figura 49 este prezentată structura chimică a acetilcolinei și cele două conformații sterice active. În general, agonistii cu funcție nicotinică au gruparea carbonil activă și gruparea

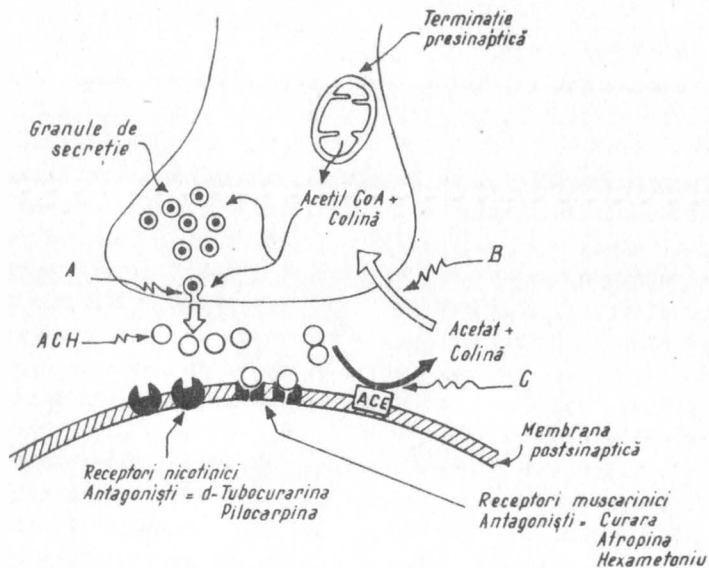


Fig.48. Reprezentarea schematică a unei sinapse colinergice.

A) Eliberarea granulelor de secreție în spațiul sinaptic este facilitată de către ioni de Ca^{2+} și tetraetilamoniu și este inhibată de procaină, ioni de Mg^{2+} și toxina botulinică.
 B) Recaptarea colinei de către terminația pre-sinaptică este inhibată de hemicolină.
 C) Inhibiția acetilcolinesterazei (ACE) de fizostigmină, ezerină.

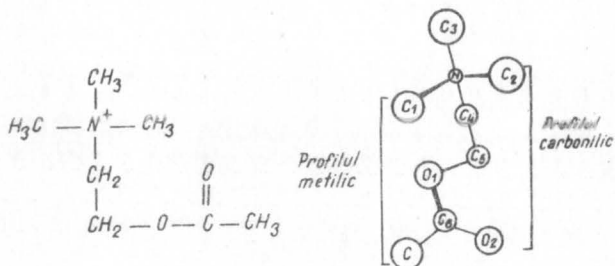


Fig.49. Structura chimică a acetilcolinei și cele două conformații ale moleculei, deosebite prin gradul de rotație; conformația muscarinică (profil metilic) și conformația nicotinică (profil carbonilic).

metil activă și cea carbonil inhibată sau inexistentă. Astfel, muscarina nu conține în structura sa gruparea carbonil (figura 50).

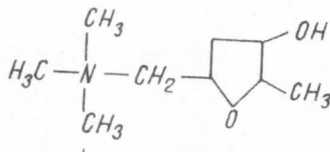


Fig.50. Structura chimică a muscarinei.

Fixarea acetilcolinei de receptorii colinergici determină activarea lor în decurs de câteva milisecunde. După unii autori, activarea receptorului se manifestă prin deschiderea unor canale ionice, probabil reprezentate de complexul acetilcolină-receptor, care funcționează ca ionofor. Changeux și col. (1977) susțin ideea existenței mai multor stări funcționale ale proteinei receptoare în membrana postsinaptică. Una din stări se caracterizează printr-o afinitate mică pentru agonist, în stare de repaus. În urma excitării, proteina receptoare prezintă o afinitate mare pentru agonisti.

De obicei, acțiunea acetilcolinei este însoțită de o creștere în grade variabile a permeabilității membranei postsinaptice pentru cationii monovalenți (Na^+ și K^+). Pentru unii neuroni de la moluște, acetilcolina determină și creșterea permeabilității pentru Cl^- . Creșterea permeabilității membranei postsinaptice provoacă o mărire rapidă și tranzitorie a potențialului de membrană. În acest proces funcțional, interacția dintre receptorul colinergic și mediator constituie factorul de inițiere al unor secvențe de procese celulare, la care cooperează și alte componente (cei mai importanți sînt ionii de Ca^{2+} și guanozin monofosfatul ciclic). Astfel, adăugarea la o serie de preparate ganglionare a unor derivați ai GMP_c , declanșează depolarizarea membranei; de asemenea, stimularea fibrelor nervoase presinaptice colinergice, induce o creștere a nivelului GMP_c la nivelul sinapselor.

Există mai multe ipoteze asupra mecanismului de acțiune al mediatorilor. De Robertis (1971), apreciază mecanismul de activare sub formă complexă (vezi figura 51). Grupul de cercetători francezi conduși

de Changeux susțin ideea după care receptorul colinergic are o funcție de ionofor. În ce privește relația dintre receptorul colinergic și

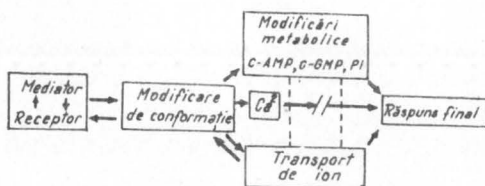


Fig.51. Reprezentarea schematică integrativă a mecanismului de acțiune al mediatorilor în membrana postsinaptică (după De Robertis).

canalele ionice din membrana postsinaptică, s-au emis mai multe păreri: a) receptorul face parte integrantă din molecula ionoforică; b) receptorul constituie un regulator alosteric pentru ionofor; c) receptorul afectează indirect funcția moleculei ionoforice.

8.3. Natura receptorului colinergic. Pentru caracterizarea receptorilor colinergici, s-au utilizat procedee de purificare a lor din membrane postsinaptice (bogate în receptori) și metode de cuplare cu o serie de liganzi cu specificități deosebite postcuplate cu substanțe radioactive. Unele substanțe au acțiuni inhibitorie reversibilă asupra receptorilor (d-tubocurarina, curara, atropina, decametoniul, ș.a.). Veninurile unor șerpi conțin o serie de neurotoxine, care se fixează ireversibil de receptorii colinergici: alfa neurotoxinele din veninurile de la cobre (*Naja naja*), bungarotoxina din veninurile de la Bungarus. Ultima neurotoxină este un polipeptid cu gr.mol. mică (8000), ce se leagă ireversibil de receptor, dar nu interferează cu acetilcolinesteraza. Pe baza proprietăților specifice și ireversibile ale unor toxine, s-au dezvoltat metode de identificare și purificare a receptorilor colinergici (Changeux și col. 1972, 1976; De Robertis și col. 1974). Prin tratarea membranei postsinaptice cu toxină marcată (I^{131}), în prezența unor detergenți (triton X-100), s-a reușit purificarea complexului receptor-toxină (vezi figura 52).

Purificarea receptorilor pentru acetilcolină a permis studierea capacității de înglobare a lor în membrane lipidice artificiale, care să ducă la refacerea funcțiilor specifice ale membranei. O astfel

de analiză poate fi privită pe multiple planuri, și anume: modul de interacțiune al proteinei receptoare purificate cu lipide de compoziții cunoscute, tranzițiile conformaționale ale proteinei receptoare, analiza proprietăților de fixare a agonistilor, etc.

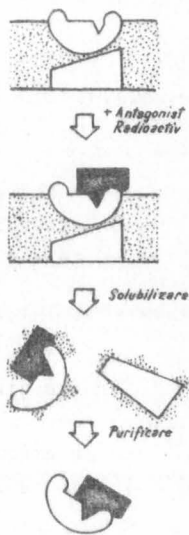


Fig.52. Reprezentarea schematică a unui procedeu de purificare a receptorului colinergic din membrană în prezența unei toxine marcate radioactiv (bungaro - toxina, reprezentată în negru), care se fixează ireversibil de receptor.

grași din fosfogliceride.

Receptorii colinergici purificați din organul electric de la *T. marmorata* și *Electrophorus electricus* interacționează preferențial cu filme de colesterol. Preparatele nu disting fosfolipidele cu capete polare deosebite, dar se înglobează mai ușor în lipozomi, care conțin glicerolipide cu acizi grași polinesaturați. Interacția receptorului nu se limitează numai la lipide. În afara existenței posibile a unei faze hidrofobe fluide în vecinătatea sistemului receptor pentru acetilcolină, molecula receptoare apare puternic imobilizată în membrana postsinaptică, ceea ce sugerează și existența unor interacții proteină-proteină (Bourgeois și col.1978). Nu se cunosc încă elementele structurale ale

Grupul de cercetători olandezi condus de prof. van Deenen, împreună cu prof. Changeux (Inst. Pasteur), au abordat această problemă folosind receptori purificați din organul electric de la *Torpedo marmorata* (Popot și col. 1978). Membranele plasmatică ale electroplicii conțin în cantitate mare receptori proteici pentru acetilcolină, într-un mediu lipidic puțin abundent. Ele apar sub forma unor arii specializate, ce conțin un singur tip de proteină. Una din particularitățile acestor membrane sinaptozomale o constituie compoziția particulară în lipide: colesterol, serin- și colinfosfogliceride. O altă particularitate este dată de abundența acizilor grași polinesaturați, cu lanțuri lungi, mai ales acidul docosahexanoic ($C_{22:6}$), care reprezintă peste 10% din cantitatea totală de acizi

moleculei receptoare, responsabile de interacția sa selectivă cu lipidele. Se presupune că ar exista un segment hidrofob cu o secvență particulară în aminoacizi.

Receptorul pentru acetilcolină a fost reconstituit *in vitro*, prin incorporarea sa în membrane lipidice cu compoziții apropiate celor din membranele sinaptice. Acești receptori își păstrează funcțiile biologice. Prima încercare aparține lui Changeux (1974), și a fost ulterior dezvoltată în alte laboratoare. Schieblier și Hucho (1978) au separat și purificat receptorul pentru acetilcolină din membranele organului electric de la *Torpedo californica*, prin centrifugare în gradient de densitate. Receptorul apare sub forma unui complex polipeptidic format din 4 lanțuri ($\alpha, \beta, \gamma, \epsilon$), care formează o moleculă tetramerică într-o stoichiometrie necunoscută. Prin integrarea receptorului purificat în membrane lipidice artificiale, complexul rămâne nemodificat, așa cum a fost observat prin colorație negativă la microscopul electronic, comportare pe gel de poliacrilamidă și prin măsurarea activității specifice. Se presupune că receptorul străbate membrana lipidică bistratificată, deoarece sistemul de translocare ionică este sensibil la carbamilcolină (agonist) și se blochează în prezența unui antagonist (α toxina din veninul de la *Naja naja*).

Utilizându-se tehnica de înghețare-fracturare, s-a permis vizualizarea unor particule ordonate, cu diametrul de 80-90 Å, și cu un mic canal central, la nivelul membranelor postsinaptice (Hazdai și col. 1978). Aceste particule au fost identificate ca fiind receptori pentru acetilcolină, deoarece densitatea lor corespunde cu cea calculată din legarea cu liganzi specifici a situsurilor active (α neurotoxină radioactivă). Receptorii pentru acetilcolină au fost observați electro-microscopic și cu o tehnică imunochimică. Proteina a fost cuplată cu anticorpi specifici și apoi cu conjugați de feritină (conțin ionul fier electrono-opac). Observațiile ultrastructurale sugerează că situsurile antigenice ale proteinei receptoare sînt accesibile pe ambele fețe ale membranei postsinaptice, în acord cu modelul propus de către Changeux (1975). Modelul lui Changeux descrie proteina receptoare ca o moleculă globulară, ce ocupă întreaga grosime a membranei (vezi figura 53).

Există un dezacord în ce privește relația dintre receptor și ionofor, element de structură legat de receptor, ce permite cationilor să străbată membrana și să inițieze influxul nervos. După părerea unor autori (Hazdai și col. 1978), există o singură moleculă cu funcție receptoare și ionoforică. Dacă receptorul și ionoforul sînt două enti-

tăți deosebite dar strâns asociate, configurația transmembranară a proteinei nu este obligatorie, deși rămâne posibilă. Changeux aduce argu-

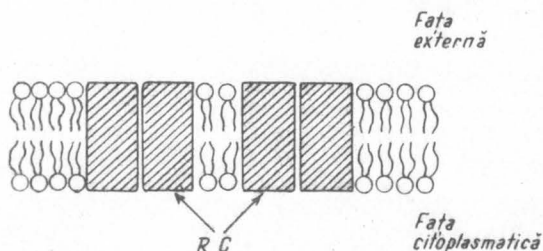


Fig.53. Reprezentarea schematică a topografiei receptorului colinergic (RC) în membrana plasmatică postsinaptică.

mente pentru ultima ipoteză. Electroforeza proteinei purificate din membrana postsinaptică a organului electric relevă prezența a 2 polipeptide distincte: una cu gr.mol. de 40.000 cu funcție receptoare și alta cu gr.mol. de 43.000.

8.4. Acetilcolinesteraza. Mediația colinergică este dependentă de prezența și activitatea acetilcolinesterazei, care hidrolizează substratul și prin aceasta controlează interrelația dintre acetilcolină și receptor. Prin metode histochimice și ultrastructurale, enzima a fost identificată în membrana plasmatică a numeroase tipuri de celule, și în mod special la nivelul sinapselor (Changeux și col.1968; Villegas și Villegas, 1974).

Studiul activității enzimei din membrana plasmatică de la nivelul plăcilor electogene, a sugerat că acetilcolinesteraza este o proteină strâns asociată de membrană. Enzima participă în organizarea structurală a membranei postsinaptice și în condiții fiziologice variabile este capabilă să sufere modificări cooperative (Changeux și col. 1972). Enzima se află în vecinătatea receptorului colinergic.

Organizarea structurală a acetilcolinesterazei apare deosebită în funcție de numeroși factori (specie, organ, etc). După Leuzinger (1971), enzima se disociază în prezența guanidinei și mercaptoetanolului în 4 subunități cu o structură hidrofobă dimerică. Studiul enzimei în gradient de zaharoză a permis identificarea mai multor forme moleculare, cu coeficienți de sedimentare deosebiți (Grafius și col. 1971). S-a sugerat că enzima se află organizată în structura membranei sub formă polimerică.

Tabelul 9 - Receptorii colinergici și adrenergici

	RECEPTORI COLINERGICI		RECEPTORI ADRENERGICI	
	NICOTINICI	MUSCARINICI	beta	alfa
Agonisti	Nicotina	Muscarina	Izoproterenol	Fenilefrina
Antagoniști	d-tubocurarina	Atropina	Propanolon	Fentolamina fenoxibenzamina
Distribuție	SNC, neuroni preganglionari, mușchi scheletici	SNC, neuroni postganglionari, mușchiul cardiac.	SNC, neuroni postganglionari simpatici, mușchi netezi, glande exocrine.	
Mediator principal	A C E T I L C O L I N A		EPINEFRINA	NOREPINEFRINA EPINEFRINA
Mecanism de acțiune în membrană	C A N A L E I O N O F O R I C E		Activarea adenilatciclazei	Activarea adenilatciclazei sau guanilatciclazei

Natura structurii terțiare a acetilcolinesterazei native din membrane, este controversată. După părerea lui Changeux (1966), enzima legată de membrană se află în două stări conformaționale, cu afinități deosebite pentru substrat. În urma distrugerii structurii membranei, enzima se eliberează de sub influența reglatoare și se stabilizează într-o conformație cu afinitate mare pentru substrat (Kasai și Changeux, 1971). De subliniat faptul că celulele musculare de la Ascidii nu prezintă acetilcolinesterază. Musculatura acestor organisme se contractă rapid și se relaxează extrem de încet. Totuși formele larvare ale acestor organisme prezintă o enzimă activă în musculatura cozii.

Se poate conchide că acetilcolinesteraza este o proteină reglatoare din membrana postsinaptică, care contribuie la hidroliza acetilcolinei. Inhibarea acetilcolinesterazei cu inhibitori specifici (ezerină, fizostigmină, diizopropilflorofosfat) determină o potențare a acțiunii fiziologice a acetilcolinei. Pe de altă parte, se poate bloca specific receptorul colinergic (\mathcal{L} bungarotoxină), fără să fie influențată activitatea acetilcolinesterazei.

8.5. Receptorii adrenergici.

A doua grupă de mediatori ai sistemului nervos o constituie monoaminele formate din:

- 1) catecolamine: dopamina, noradrenalina și adrenalina.
- 2) indolilalkilaminele: 5-oxitriptamina sau serotonina.

Receptorii adrenergici sînt extrem de heterogeni, atît în ce privește specificitatea cît și organizarea lor în membranele diverselor tipuri de celule. De aceea, apar mari variații funcționale sub influența catecolaminelor, de la un țesut la altul și în cadrul aceluiași țesut, de la o specie la alta. Adrenalina și noradrenalina pot avea acțiuni deosebite sau chiar opuse pe același organ. În general, noradrenalina produce vasoconstricția fibrelor musculare, în timp ce adrenalina poate avea efecte de vasoconstricție sau vasodilatație. În funcție de sensibilitatea la antagoniști și de structura catecolaminelor naturale, receptorii adrenergici au fost împărțiți în două categorii (vezi tabelul 9).

Receptorii alfa adrenergici prezintă ca principal agonist fenilefrina iar ca mediator primar noradrenalina (norepinefrina). Receptorii beta adrenergici au ca principal agonist izoproterenolul și ca mediator primar adrenalina. Identificarea unor antagoniști cu acțiuni selective asupra receptorilor alfa și beta, a constituit unul din criteriile principale ale clasificării lor. Dacă la gruparea aminică a mediatorului se introduce un substituent metil, efectele alfa

sînt inhibate parțial sau total. Dimpotrivă, catecolaminele cu un substituent mai mare la gruparea aminică, potențează efectele receptorilor beta (Ariens și col.1976; Pop și col.1977).

Biosinteza catecolaminelor pornește de la tirozină, într-o secvență de reacții prezentate în figura 54.

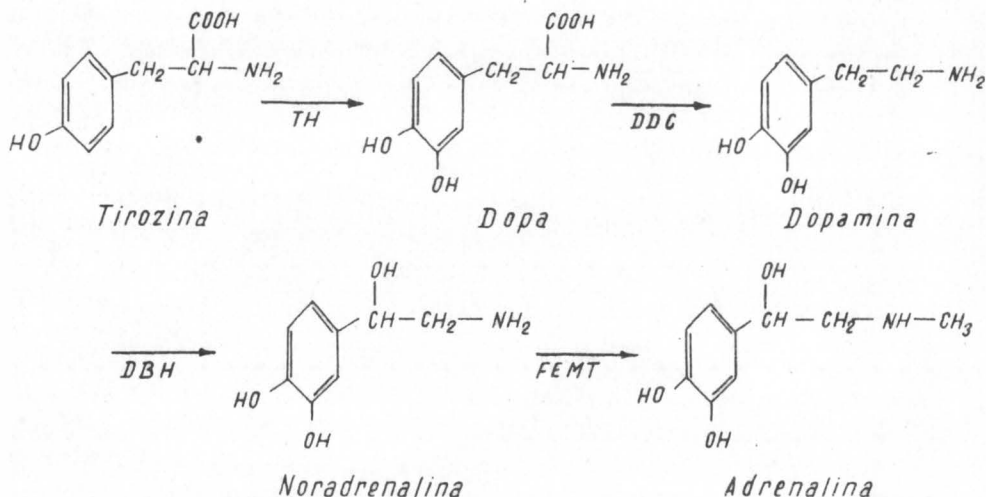


Fig.54. Etapele de biosinteză a catecolaminelor.

TH - tirozinhidroxilaza; DDC - DOPA decarboxilaza;
DBH - dopamin beta hidroxilaza; FEMT - feniletanolamin N-metiltransferaza.

Receptorii beta adrenergici. Acești receptori apar extrem de diferiți în lumea vie, prezentînd variații de sensibilitate la agonisti și antagonisti, în funcție de specie și organ. După părerea lui Levitsky și col.(1975), pentru unele tipuri de celule receptorii beta adrenergici apar stereospecifici față de catecolamine. Totuși, s-a sugerat existența a două subgrupe de receptori beta în membranele celulare (Lefkowitz, 1976): 1) receptori β_1 , cu constante de afinitate mari pentru catecolamine (10^{-8} - 10^{-9} M), prezenți mai ales în membranele celulelor adipose și cardiace. Practololul a fost identificat ca antagonist specific al acestor receptori. 2) receptori adrenergici β_2 ,

cu constante de afinitate mai mici pentru catecolamine ($10^{-7}M$), descriși în membranele celulelor musculare netede (uter, vasele sanguine). Acești receptori sînt inhibați selectiv de către butoxamină și au o afinitate de 100 de ori mai mare pentru izoproterenol, comparativ cu catecolaminele.

Receptorii alfa adrenergici. Acești receptori apar mai puțin specifici, în comparație cu receptorii β . De asemenea, prezintă o capacitate discriminatorie destul de slabă. Specificitatea receptorilor alfa este dată de gruparea aminică din structura mediatorului. Fixarea unei grupări N-alchil scade eficacitatea substanțelor ca molecule α adrenergice, dar ele devin β adrenergice. Substituția unui OH fenolic cu o grupare metilsulfonamică, potențează acțiunea lor ca agonisti α adrenergici și ca antagoniști ai receptorilor β .

Meccanismul de acțiune al catecolaminelor asupra membranelor celulare este controversat și variabil pentru diversele tipuri de celule (Lefkowitz, 1976). Ideea generală este aceea după care catecolaminele activează sistemele enzimatiche de membrană (adenilatciclaza și guanilatciclaza), care determină o creștere a nivelului nucleotidelor ciclice monofosforilate. Cu alte cuvinte, mediația adrenergică este controlată de nucleotidele ciclice, care pot declanșa o secvență de procese implicate în modificarea permeabilității membranei (fosforilarea unor proteine de membrană prin intermediul proteinkinazelor dependente de AMP_c ; deschiderea unor canale ionoforice selective pentru ioni de Ca^{2+} , ș.a.).

Deși s-au făcut numeroase încercări de izolare și purificare a receptorilor adrenergici din membranele celulare, natura lor este departe de a fi cunoscută (Cuatrecasas, 1975).

Neuromediatorii adrenergici se sintetizează în terminațiile presinaptice ale celulelor neuronale, de unde se pot elibera în sînge sau se acumulează în vezicule presinaptice. Metabolizarea lor are loc sub influența monoaminoxidazelor sau a catecol-O-metil transferazei din membrana postsinaptică. Rezerpina blochează sinteza unor molecule neurotransmițătoare. Substanțele analoage rezerpinei, epuizează depozitele de catecolamine din sinapsele centrale și determină la om maladii depresive. Dimpotrivă, inhibitorii monoaminoxidazei cresc nivelul catecolaminelor și sînt considerați substanțe antidepresive.

Cunoașterea naturii și specificității receptorilor adrenergici din membranele celulare are o deosebită importanță medicală și neurofarmacologică. În multe cazuri, acțiunea medicamentelor asupra unor receptori de membrană a fost descrisă pe baza analogiilor de structură chimică cu a catecolaminelor naturale. În plus, o serie de medica-

mente sînt folosite în tratamentul unor maladii nervoase: schizofrenie, psihoze depresive. Pentru a avea o imagine asupra interrelațiilor dintre substanțele medicamentoase active asupra celulelor neuronale din SNC și catecolamine, s-a ilustrat într-o formă simplificată o sinapsă adrenergică (figura 55).

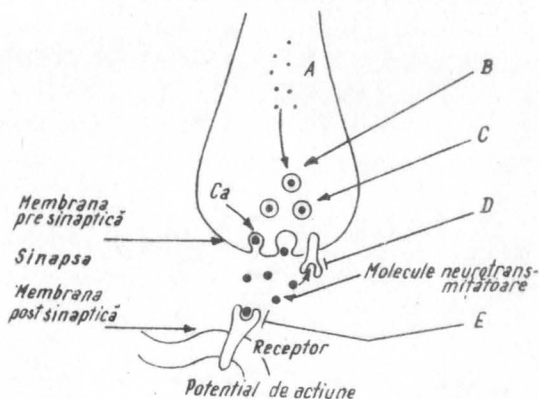


Fig.55. Reprezentarea schematică a unei sinapse adrenergice și interrelațiile catecolaminelor cu o serie de substanțe.

A) sinteza catecolaminelor; B) rezerpina și substanțele antidepressive inhibă sinteza serotoninei și noradrenalinei și acumularea lor în vezicule sinaptice; C) amfetaminele și ionii de Ca^{2+} stimulează eliberarea catecolaminelor din citoplasma terminației axonale; D) substanțele antidepressive blochează reabsorbția mediatorilor adrenergici; E) locul de acțiune al moleculelor analoage cu acțiune antagonistă (mescalina, amfetaminele).

Catecolaminele sintetizate sînt acumulate în vezicule delimitate de membrane, care se adună spre capătul terminal al axonului celulei neuronale. Prin stimularea celulei, veziculele sînt descărcate în spațiul sinaptic printr-un proces de exocitoză, facilitat de prezența ionilor de Ca^{2+} și amfetamine. Eliberarea mediatorilor adrenergici este controlată de prostaglandina E_2 (are efect inhibitor prin interferare cu ionii de Ca^{2+}) și prezența microtubulilor în axoplasma terminației nervoase (Axelrod, 1973, 1977). Pretratarea celulelor cu

citochalasină B, colchicină sau vinblastină, inhibă eliberarea catecolaminelor din terminațiile nervoase presinaptice.

Distribuția receptorilor adrenergici este foarte heterogenă. Neuronii postganglionari simpatici de la mamifere au receptori adrenergici. Delimitarea neuronilor la nevertebrate este imposibilă (în sinapsă parasimpatică colinergică și simpatică adrenergică). Noradrenalina poate avea acțiuni inhibitoare pe unele celule efectoare și acțiuni activatoare pe altele, probabil datorită coexistenței ambelor tipuri de receptori în aceeași membrană. De exemplu, membrana plasmatică a celulei hepatice prezintă atât receptori alfa, cât și beta adrenergici. De asemenea, noradrenalina determină contracția celulelor musculare a uterului de iepure și om, relaxarea uterului de șobolan, iar pe uterul de pisică are o acțiune mixtă în funcție de sarcină (Miller și col.1965). În SNC, distribuția receptorilor adrenergici este puțin cunoscută, iar catecolaminele pot avea efecte activatorii sau inhibitorii, în funcție de natura receptorilor din membrane. În plus, în multe membrane plasmactice neuronale de la mamifere și nevertebrate s-au descris și alți receptori (pentru dopamină, serotonină), care complică natura cooperării intercelulare prin intermediul substanțelor chimice neurotransmițătoare.

8.6. Receptori pentru serotonină. În membranele plasmactice ale unor tipuri de celule (musculare netede, membrane sinaptice, membrane ale celulelor ganglionare nervoase și celule neuronale), s-au identificat receptori specifici pentru serotonină. Incercările de izolare și purificare a acestor receptori din membrane au dus la rezultate contradictorii, probabil datorită heterogenității și labilității structurii lor în membranele diverselor tipuri de celule. Unii autori au apreciat că receptorul pentru serotonină este reprezentat de o glicoproteină (Wesemann și col.1971); alții l-au considerat de natură lipoproteică (De Robertis, 1975).

Funcția serotoninei ca mediator chimic de comunicare între celule, apare mai clar exprimată la unele specii de nevertebrate, mai ales moluște. Prin excitarea unor nervi extracardiaci ai moluștelor se eliberează serotonină. Serotonina a fost identificată de asemenea, ca mediator chimic în relaxarea mușchilor retractori ai bisusului de la moluște. O serie de observații experimentale efectuate pe celulele neuronale de la *Aplysia* (molușc) au arătat că, sub influența serotoninei are loc excitarea unor celule (concentrație de $10^{-8}M$) și inhibiția altora (concentrație de $10^{-10}M$).

Substanțe cu structuri chimice analoage serotoninei, prezintă acțiuni antagoniste față de acest mediator: mescalina, lohinbina, bufotenina (N,N-dimetilserotonina), LDS (dietilamina acidului lisergic). Serotonina este inhibată de către monoaminoxidază. Administrarea de rezepină duce la epuizarea rezervelor de serotonină din celule, ca urmare a blocării sintezei sale. Un conținut mare în serotonină a fost descris în celulele nervoase din talamus, hipotalamus, sistem limbic. Inhibiția sintezei de serotonină din creier determină insomnie. Adăusul ulterior de 5-oxitriptofan (precursor în sinteza mediatorului) și în prezența unei enzime specifice (triptofan decarboxilaza) are loc restabilirea somnului.

8.7. Receptori pentru acidul gama aminobutiric (GABA). Acidul gama aminobutiric ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) provine din decarboxilarea acidului glutamic, fiind apreciat ca mediator al SNC, cu acțiune inhibitorie în sinapsă. În celulă, GABA este degradat la nivelul mitocondriilor (4 aminobutirat: 2-oxoglutarat aminotransferaza). Importanța acestor receptori derivă din faptul că GABA și o serie de analogi ai săi, sint utilizați în vindecarea unor maladii nervoase și psihice.

Receptorii pentru GABA din membranele postsinaptice au constituit obiectul a numeroase cercetări. Fixarea C^{14} -GABA de membrana celulelor sarcoplasmice are un caracter de saturație (4-7 nmoli GABA/mg proteină). De Robertis (1975) a izolat receptorii pentru GABA din membranele celulelor sarcoplasmice și din membranele terminațiilor nervoase. Din omogenatele mușchilor de crevetă (*Artemisia longinoi*), s-a purificat o proteină hidrofobă, cu afinitate mare pentru GABA ($K_m = 8 \text{ M}$). De Robertis (1975) consideră că proteina hidrofobă purificată din membrane, reprezintă receptorul specific pentru GABA.

Warner și Steward (1975) au cercetat capacitatea de fixare a H^3 -GABA de membranele sinaptice, în prezența sau absența Na^+ . Fixarea GABA de fracția sinaptozomală depinde de ionii de Na^+ , în timp ce legarea de receptorii postsinaptici este independentă de prezența ionilor. Fixarea GABA de receptori scade prin pretratarea membranei cu protează, sau în prezența unor glicerolipide. Pe preparate de membrană de la șoareci, efectul inhibitor cel mai puternic l-a avut fosfatidiletanolamina (Gimbalvo și Rosemberg, 1976). Poziția sarcinilor pozitive din structura GABA, precum și a grupărilor polare ale glicerolipidului, condiționează concurența pentru fixarea de receptorii proteici din membrană, prin intermediul unor legături electrostatice și forțe van der Waals. Capacitatea de fixare apare deosebită și în funcție de tipul celular (mare în hipotalamus și mică în măduva spinării).

S-au descris o serie de inhibitori specifici ai GABA. Astfel, bicuculina (alcaloid ce produce convulsii epileptice de origine corticală) este un antagonist specific al GABA. În afara acestuia, s-au identificat și alți inhibitori ai fixării GABA de receptori, cu efecte variabile în funcție de tipul celular; β alanina, acidul 2-4 diaminobutiric, aminozina, ș.a. (De Robertis, 1975; Peck și col. 1976).

S-au sugerat câteva modele ale receptorului de membrană pentru GABA. Van Gelder (1971) a sugerat modificarea conformației receptorului în funcție de interacția sa cu grupările amino și carboxil a mediatorului. Prin interacția grupărilor aminate ale GABA cu situsurile anionice a 2 receptori grupați în agregate dimerice, se favorizează disocierea complexului fosfolipid-proteină din membrană (Olsen, 1976; Azanza și Walker, 1975). Faptul că molecula de GABA poate avea două conformații deosebite, permite interpretarea acțiunilor divergente ale mediatorului, în diverse membrane. Se presupune că molecula de GABA se fixează de receptor, în funcție de sarcinile N^+ și O^- și/sau distanța dintre ele. Fixarea de receptor a mediatorului, induce modificarea conformației moleculei receptoare și formarea unui ionofor (canal transmembranar). În cazul în care molecula mediatorului prezintă o conformație "întinsă", diametrul canalului ionoforic este mai mare (5,4 Å), fapt ce favorizează trecerea ionilor de Na^+ și implicit excitarea neuronului. Dacă molecula de GABA are o conformație "torsionată", complexul mediator-receptor formează în membrană un canal ionoforic mai mic (cu diametrul de 4,4 Å), care permite doar accesul ionilor de Cl^- , responsabili de procesul de inhibiție.

S-a sugerat că, în afara conformației mediatorului (GABA), determinată de o serie de factori ai mediului, este posibil să existe și deosebiri în structura receptorului, la diverse tipuri de celule, care condiționează efectele inhibitorii sau activatorii ale GABA în membranele postsinaptice (Azanza și Walker, 1975).

9. RECEPTORII HORMONALI DIN MEMBRANELE PLASMATICE

9.1. Caracterizare. În descifrarea mecanismelor de reglaj celular și intercelular, un rol deosebit l-a avut descoperirea importanței adenzinmonofosfatului ciclic (AMP_c) ca mediator intracelular al acțiunii hormonilor (Sutherland și col.1957). Lucrările școlii lui Sutherland au stabilit prezența în membrana plasmatică a majorității celulelor eucariote a unui sistem de recepție hormonal, răspunzător de captarea informației. Acesta este reprezentat de adenilatciclază ($ATP \rightarrow AMP$ fosfotransferaza, EC 2.7.4.3), care sub acțiunea unor factori ai mediului, mai ales hormonal, catalizează transformarea ATP în AMP_c (Sutherland și Rall, 1960). Sistemul adenilatciclazic a fost descris în toată lumea vie (plante, bacterii), și în afara captării informației participă și în controlul a numeroase procese metabolice intracelulare (Robinson și col.1971; Doman și Fedenko, 1976). De exemplu, la bacterii și unele celule de la eucariote, derepresia unor enzime inductibile are loc de asemenea prin participarea AMP_c (Macman și Sutherland, 1965; Robinson și col.1971).

Conform principiului elaborat de Sutherland și confirmat de numeroase cercetări experimentale ulterioare, hormonul acționează asupra celulei țintă, prin intermediul unui sistem receptor adenilatciclazic din membrana plasmatică. Sistemul adenilatciclazic activat, catalizează formarea AMP_c din adenzintrifosfat (ATP), după o reacție descrisă în figura 56. Nucleotidul ciclic este considerat un efector secundar intracelular al acțiunii diversilor hormoni. În funcție de tipul celular, AMP_c asigură un răspuns fiziologic specific de control și reglaj al proceselor metabolice celulare. Acțiunea nucleotidului ciclic la nivel celular prezintă numeroase aspecte comune pentru toate tipurile de celule din lumea vie, dar și unele particularități specifice.

9.2. Adenilatciclaza. Deși adenilatciclaza a fost identificată în membrana plasmatică a majorității tipurilor de celule, activitatea ei este foarte deosebită. O activitate enzimatică mare s-a descris în celulele neuronale din scoarța emisferelor cerebrale (Sutherland și

col.1962). Adenilatciclaza a fost considerată multă vreme, ca o enzimă specifică membranei plasmatice. La multe tipuri de celule, enzima

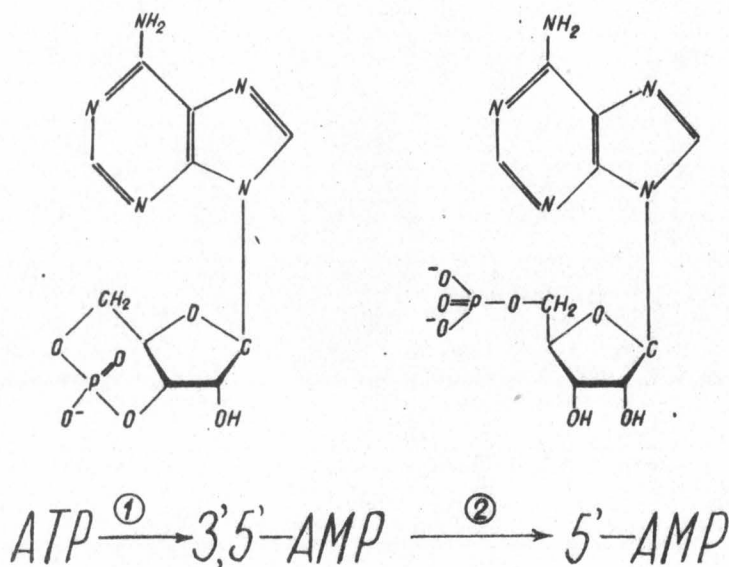


Fig.56. Structura chimică a AMP ciclic (3',5'-AMP) și a adenozinmonofosfatului (5'-AMP).

1. reacția catalizată de adenilatciclază (ATP:AMP-fosfotransferaza. 2. reacția catalizată de fosfodiesterază (3',5'-AMP 5'-nucleotidhidrolaza).

a fost descrisă și la nivelul unor membrane citoplasmatiche (membrana nucleară, mitocondrii, membranele aparatului Golgi) (Cheng și Farquhar, 1976; Solfer și Hechter, 1971). De exemplu, la nivelul celulelor foliculare din ovarul peștilor, adenilatciclaza a fost identificată ultrastructural în mitocondrii, membranele aparatului Golgi, nucleu și membrana plasmatică (vezi figura 57).

Studiindu-se interacția dintre hormon și receptorii din membrană, s-a constatat că aceștia din urmă sînt alcătuiți din subunități receptoare și catalitice deosebite (Robinson și col.1967). Centrul regulator (așezat pe fața externă a membranei) servește la captarea informației hormonale din mediu, și asigură în cooperare cu alte elemente din membrană, transmiterea informației pe fața citoplasmatică a celulei. După părerea lui Robinson și col. (1971), componenta regulatoră a sistemului adenilatciclazic ar fi similară cu receptorii α și β adrenergici din membrane. De aceea s-a sugerat că centrul regulator

al adenilatciclazei este format din două regiuni: regiunea α , care servește ca modulator negativ al activității centrului catalitic și

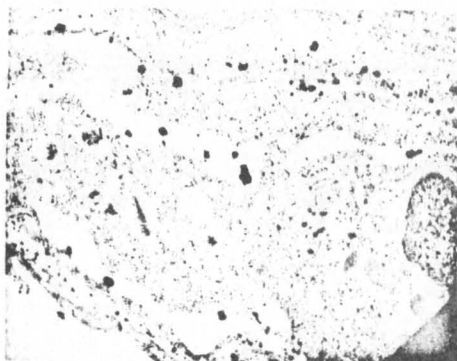


Fig.57. Repartiția intracelulară a adenilatciclazei (precipitate negre de pirofosfat de plumb) în celula foliculară din ovarul peștilor (crap). Adenilatciclaza apare citochimic la nivelul mitocondriilor, nucleului, cisternelor Golgi și în membrana plasmatică (vezi săgețile).

regiunea β , care participă la activarea funcției catalitice a enzimei (figura 58 a).

Deoarece hormoni deosebiți activează același sistem din diverse tipuri de celule, s-a presupus existența unor receptori specifici. Pentru o serie de hormoni a fost posibilă identificarea unor receptori deosebiți. Astfel, pentru adrenalină și glucagon s-au descris unități receptoare deosebite. De asemenea, în glanda suprarenală s-a constatat prezența a două adenilatciclaze deosebite, care sînt sensibile la hormonul paratiroidian și respectiv catecolamine (Kurokawa și Massry, 1973). În membrana plasmatică a celulelor din glanda tiroidă s-au constatat receptori deosebiți pentru tirotropină și prostaglandine (Wolf și Cook, 1973).

Receptorii adenilatciclazici au o structură de natură peptidică. Acest lucru a fost sugerat de faptul că tripsina inhibă capacitatea de fixare a glucagonului și ACTH. Observații directe asupra modului de legare al hormonilor de receptorul de membrană s-au obținut cu preparate hormonale marcate cu izotopi. În acest fel, s-a dovedit că hormonii se fixează direct de receptorul adenilatciclazic (Rodbell și col. 1971).

Capacitatea unor nucleotide de a modifica interacțiile complexului hormon-receptor cu adenilatciclaza a dus la presupunerea

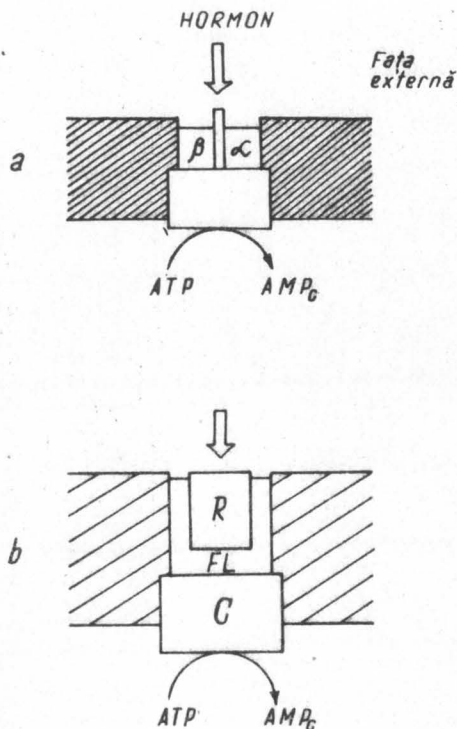


Fig.58. Reprezentarea schematică a sistemului adenilatciclazic din membrana plasmatică.
a) modelul lui Sutherland. C. regiunea catalitică; β și α - regiunea receptoare.
b) modelul lui Birnbaumer. R. regiunea receptoare; FL - fosfolipide; C - regiunea catalitică.

rolului unor fosfolipide în transducerea semnalelor. De aceea, Birnbaumer (1973) completează modelul receptorului adenilatciclazic (figura 58 b). Ulterior s-a dovedit că o serie de fosfolipide și analogi ai purinei joacă un rol critic în controlul funcției adenilatciclazei din membrane.

Adenilatciclaza a fost apreciată ca o moleculă lipoproteică. Tratarea enzimei cu detergenți ionici, digitonină și fosfolipază A,

duce la pierderea activității enzimatică. În schimb, în prezența unui detergent neionic (lubrol) este facilitată solubilizarea enzimei din structura membranei. Un astfel de preparat enzimatic prezintă activitate, dar nu interacționează cu hormonii. Adăusul ulterior la preparatele enzimatică solubilizate de fosfatidilserină, restabilește capacitatea adenilatciclazei de a răspunde la glucagon; adăusul de fosfatidilinozitol restabilește sensibilitatea receptorului față de acțiunea stimuloare a catecolaminelor (Levy 1971). În afara acestor observații, s-a constatat că activarea adenilatciclazei din membrana celulelor adipose de către noradrenalină, depinde de conținutul în acizi grași ai membranei (Counis, 1971). Toate aceste date experimentale au dus la concluzia că sistemul adenilatciclazic din membrană reprezintă un complex multimolecular, ce conține: receptorul hormonal, transductorul și regiunea catalitică (pe fața citoplasmatică a membranei). Fosfolipidele participă în recepția selectivă a informației hormonale și traducerea semnalului spre regiunea catalitică a adenilatciclazei.

Un deosebit interes este acordat fosfolipidelor ce posedă afinitate mare pentru ioni de calciu. Se apreciază că ioni de Ca^{2+} participă în reglarea funcției fosfolipidelor, ca factori de cuplare ai receptorului. Nu toți receptorii au nevoie de prezența ionilor de Ca^{2+} ca factori de activare. Calciul prezintă o acțiune inhibitoare asupra adenilatciclazei din unele tipuri de celule. Se presupune că acțiunea inhibitoare a ionilor de Ca^{2+} se datorește concurenței cu ioni de Mg^{2+} pentru ocuparea aceluiași situs pe molecula enzimatică, sau pentru stabilizarea unor fosfolipide din membrană (fosfatidilinozitolul). Astfel, acțiunea stimuloare a catecolaminelor asupra adenilatciclazei din membrana unor celule (adipoasă, neuronală) este mai mică în prezența Ca^{2+} , decât în lipsa lui. Adăugarea de EDTA în mediul de incubație, determină o activare a acțiunii hormonale (Birnbaumer, 1973; Sobel și Mayer, 1973).

Activarea adenilatciclazei de către ACTH necesită prezența ionilor de Ca^{2+} . Ioni de Ca^{2+} nu influențează fixarea hormonului de receptor. Astfel, s-a constatat că ACTH se poate fixa de receptorul din membrana plasmatică a celulelor glandei suprarenale, dar nu este capabil să activeze adenilatciclaza (Lefkowitz, 1970). Adenilatciclaza dintr-o serie de membrane este activată de Mg^{2+} (celule neuronale din scoarță) sau de ioni de flor (leucocite) (Bradham, 1972; Constantopoulos și Najjar, 1973).

În afara hormonilor peptidici, activitatea adenilatociclazei din membrane este controlată de numeroși alți factori. Influența lor se manifestă deosebit, în funcție de tipul celular. Astfel, în cazul celulelor adipoase noradrenalina stimulează formarea AMP_c , în timp ce pe trombocite determină o inhibiție. Cofeina, inhibitor puternic al fosfodiesterazei din numeroase țesuturi, nu influențează activitatea enzimei de la bacterii (*Escherichia coli*).

9.3. Fosfodiesteraza. Deși nu face parte din receptorul hormonal al membranei, enzima controlează nivelul AMP_c din celule și în acest fel, potențează, sau dimpotrivă, reduce efectele hormonale. Fosfodiesteraza hidrolizează nucleotidul ciclic la 5-AMP. Enzima a fost identificată atât pe fața citoplasmatică a membranei, cât și la nivelul unor membrane intracelulare (Russel și Pastan, 1973).

În numeroase tipuri de celule, s-au descris 2 forme moleculare fosfodiesterazice, cu afinități deosebite față de substrat și o serie de inhibitori. Fosfodiesteraza din țesutul pulmonar al cobailor este inhibată de aminofilină și teofilină, dar ioni de Ca^{2+} inhibă numai una din formele moleculare (Hitchcock, 1973). De asemenea, agenții adrenergici, inhibă forma moleculară enzimatică cu afinitate mare pentru substrat (izoproterenol, adrenalină); a doua formă moleculară a enzimei este inhibată numai de noradrenalină. Două forme moleculare fosfodiesterazice s-au identificat în limfocite, celulele glandei mamare, pancreas, etc.

Activitatea fosfodiesterazei este influențată de numeroase substanțe. Dintre activatori remarcăm imidazolul, histamina, fenobarbitalul, acidul gama aminobutiric, etc. Unele substanțe sînt folosite ca preparate farmacologice, în combaterea unor maladii însoțite de o acumulare excesivă de AMP_c .

Inhibitorii fosfodiesterazei (ca și activatorii) prezintă efecte deosebite, în funcție de natura enzimei și tipul celular. În unele tipuri de celule (neurală, hepatică, renală), hidroliza AMP_c este inhibată neconcurent de către GMP_c (Thompson și Appelman, 1971). S-au utilizat ca inhibitori analogi ai bazelor purinice și pirimidinice. În plus, ATP și PP_1 inhibă puternic enzima din celulele nervoase de șobolan. O inhibiție de 50% a fost observată cu concentrații de 1 mM și respectiv 4 mM (Cheung, 1967). În cercetările curente de histochimie, se folosesc ca inhibitori substanțe din grupul metilxantinelor: cofeina (1,3,7-trimetil-2,6-dioxipurina) și teofilina (1,3 dimetil-2,6-dioxipurina). Fosfodiesteraza prezintă grade deosebite de inhibiție față de metilxantine, în funcție de tipul celular. Teofilina determină o inhibiție a fosfodiesterazei cardiace de 50%, la o concentrație de $2 \times 10^{-4} M$.

9.4. Guanilatciclaza. Enzima catalizează formarea guanozin-monofosfatului ciclic (GMP_c) din GTP. Guanilatciclaza a fost descrisă în numeroase tipuri de celule animale și la bacterii. O activitate mare a fost observată în țesutul pulmonar, timus, limfocite.

Guanilatciclaza a fost considerată o enzimă ne legată de membrana plasmatică, deoarece 90% din activitate se regăsește în fracția solubilă, prin omogenizarea celulelor în lipsa detergenților. Se apreciază însă că enzima este legată de membrană prin forțe ionice (legături slabe), dar se eliberează de pe structură în cursul procesului de izolare. Guanilatciclaza este activată în mod deosebit de ioni de Mn^{2+} (de 10 ori mai mare decât în prezența Mg^{2+}). Ioni de Ca^{2+} , în combinație cu cei de Mn^{2+} , măresc activitatea enzimei de câteva ori. Acest lucru explică în parte de ce substanțele colinergice care activează guanilatciclaza necesită prezența ionilor de Ca^{2+} în exprimarea unor funcții metabolice.

Majoritatea substanțelor (FNa) și hormonilor ce activează adenilatciclaza, sînt inactive asupra sistemului guanilatciclazic. Cu alte cuvinte, concentrația intracelulară a GMP_c nu se modifică sub influența hormonilor activatori ai adenilatciclazei. Chiar și un activator puternic al adenilatciclazei (toxina holerică), nu influențează nivelul concentrației GMP_c ; Hardman și col.(1969) au demonstrat că conținutul GMP_c și AMP_c din diverse tipuri de celule este controlat de factori deosebiți.

Injectarea de glucagon, sau substanțe adrenergice, determină o creștere a concentrației AMP_c în unele celule. Substanțele cu acțiune antagonistă acestora, vor stimula sistemul guanilatciclazic. De exemplu, nivelul GMP_c din celula cardiacă crește în proporție de 250%, la 10 sec. după perfuzia inimii cu acetilcolină. O acumulare de GMP_c s-a observat în celulele epiteliale intestinale, prin injectarea intravenoasă de acetilcolină sau prin excitarea electrică a nervului vag (Eichorn și col.1974). Datele nu pot fi generalizate, deoarece pe unele tipuri de celule s-au obținut rezultate variate. În celulele glandei mamare de la șobolan, concentrația AMP_c crește în perioada de sarcină și scade în lactație; dimpotrivă, concentrația GMP_c crește numai în perioada de lactație. Sub influența histaminei, nivelul GMP_c din celulele neuronale ale scoarței cerebrale crește de 2-4 ori, dar s-a observat și un conținut ridicat de AMP_c . S-a sugerat că în membrana plasmatică a acestor celule există două tipuri de receptori histaminici.

Concentrația intracelulară a GMP_c este controlată și de prezența unor substanțe ne hormonale, Astfel, substanțele mitogenice

(concanavalina A, FHA) activează guanilatciclaza și crește nivelul GMP_c din limfocite (10-50 ori) (Hadden și col. 1972).

9.5. Particularitățile de acțiune ale AMP_c în celule. Adenosinmonofosfatul ciclic și guanozinmonofosfatul ciclic reprezintă molecule biologice active, care participă în reglarea și coordonarea a numeroase procese funcționale intracelulare (la bacterii, plante și animale).

La bacterii, AMP_c favorizează sinteza unor enzime inductibile specifice. Procesul se descrie prin prezența unor proteine capabile să fixeze nucleotidul ciclic. Complexul proteină-AMP_c se fixează de DNA în regiunea promotoare și favorizează sinteza unor RNA specifice. Proteine cu afinitate mare pentru AMP_c au fost purificate și caracterizate din numeroase tipuri de bacterii (Emmer și col. 1970; Pastan, 1972).

În celulele animalelor, AMP_c controlează procesele metabolice prin intermediul unor enzime specifice, denumite proteinkinaze. Acestea din urmă, prezintă afinități deosebite pentru AMP_c, prin care se exprimă funcția lor fosforilantă. Proteinkinazele, prin capacitatea lor deosebită de a fosforila diverse substanțe, controlează activitatea unor enzime din citoplasmă, a unor proteine nucleare sau a proteinelor de membrană (vezi figura 59). Glucagonul și adrenalina stimulează activitatea guanidinetat metil transferazei din celula hepatică, prin intermediul AMP_c. Enzima catalizează formarea creatinei, necesară funcțiilor energetice celulare (sinteza creatinfosfatului). De asemenea, sub influența proteinkinazei dependente de AMP_c are loc fosforilarea fosforilaskinazei, care se transformă într-o formă activă. La rândul ei, enzima favorizează conversia fosforilazei b în fosforilază a, implicată în hidroliza glicogenului.

Nucleotidul ciclic activează și o serie de proteinkinaze nucleare, care duc la activarea unor gene, probabil, legat de fosforilarea unor fracții histonice și a altor proteine cromatinice. Fosforilarea histonelor determină modificări ale proprietăților matriciale a DNA din cromatină.

Nucleotidele ciclice din spațiile extracelulare nu pot trece prin membrana celulară. De aceea, în afara controlului regulator intracelular, ele pot influența activitatea celulară și extracelular. În concentrații asemănătoare celor din plasmă, AMP_c extracelular stimulează proliferarea limfocitelor din timus (MacManus și Whitfield, 1969), și a celulelor neuronale din măduvă (Tisman și Herbert, 1973). În concentrații mici (10^{-7} - 10^{-8} M), influențează răspunsul imun al limfocite-

lor in vitro, iar în concentrații mari ($10^{-4}M$), inhibă producerea de anticorpi, ca răspuns la acțiunea antigenelor (Gericke și col.1970).

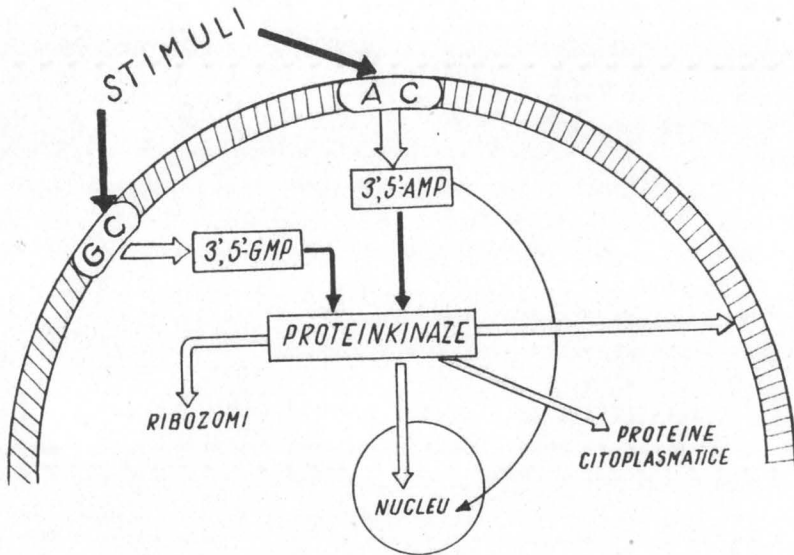


Fig.59. Rolul mesagerilor intracelulari (nucleotide ciclice) în controlul unor funcții celulare.

GC - sistemul receptor guanilatciclazic din membrana plasmatică; AC - sistemul receptor adenilatciclazic din membrana plasmatică.

Concentrații extracelulare de AMP_c de 10^{-3} - $10^{-4}M$, determină o inhibiție a fagocitozei și eliberarea enzimelor lizozomiale din leucocitele polimorfonucleare (Cox și col.1973; Ignarro și Colombo, 1973). În concentrații de 5 mM, nucleotidul ciclic exogen activează glicoliza și utilizarea glucozei de către eritrocitele umane și stimulează eritropoeza in vitro (Ford și Omachi, 1972). Aceste date dovedesc că cel puțin pentru unele tipuri de celule, nucleotidul ciclic mimează efectele hormonilor (Ignarro și George, 1974).

Datele experimentale cu privire la rolul regulator al GMP_c sînt mai reduse. S-au descris proteinkinaze ce pot fi activate de concentrații mici de GMP_c . În celulele musculare netede s-au descris două proteine, care sînt fosforilate în prezența GMP_c (Casnellie și Greengard, 1974). De asemenea, din mușchiul de homar s-a izolat o proteinkinază ce este mai sensibilă la GMP_c decît AMP_c . Stimularea fosforilării unor proteine din membrana plasmatică a celulelor pancreatice sub

influența pancreosimului este probabil legată de prezența proteinkinazelor dependente de GMP_o .

9.6. Receptorii hormonului adrenocorticotrop. Hormonul adrenocorticotrop (ACTH) este un hormon polipeptidic sintetizat de către adenohipofiză. Acțiunea sa principală constă în reglarea sintezei corticosteroidilor din celulele cortexului glandei suprarenale.

Adăugarea de ACTH la o cultură de celule din glanda suprarenală, stimulează steroidogeneza. Procesul este inițiat de fixarea ACTH de membrana plasmatică a celulelor, lucru dovedit prin marcarea hormonului cu iod radioactiv (I^{131}). ACTH interacționează cu receptorii din membrană, determină activarea adenilatciclazei și o creștere a nivelului AMP_o .

Nucleotidul ciclic activează mai multe proteinkinaze din celulele producătoare de steroizi. Una din ele, fosforilează colesterol-esteraza, enzimă ce activează conversia esterilor colesterolului din picăturile de lipide celulare în colesterol liber. Acesta din urmă poate proveni și din plasma sanguină sau în urma sintezei sale în celulele suprarenalei. Atât activarea proteinkinazelor, cât și acumularea de AMP_o este un proces ce precede steroidogeneza. Acest lucru s-a constatat pe celule izolate, preparate prin tripsinizare. S-a observat că creșterea nivelului AMP_o are loc la 1 min de la expunerea celulelor în prezența de 10.000 pg ACTH. Formarea de colesterol se detectează după 3 min de la incubare în prezența hormonului. Hormonul induce și activarea unor proteinkinaze, care catalizează fosforilarea unor proteine specifice ribozomale (Rees, 1973). Acestea sunt reprezentate de proteine cu viață scurtă, care participă în procesul de transformare al colesterolului în pregnenolon. Sinteza lor este stimulată de către ACTH sau AMP_o și este inhibată de către puremicină sau cicloheximină.

Modul în care hormonul se leagă și apoi traduce semnalul în celulă pentru activarea adenilatciclazei, nu este cunoscut. S-au propus mai multe modele ipotetice. Unul dintre ele a fost elaborat de către Cuatrecasas (1971) și a fost sugerat de modul de interacție al toxinei celerice cu receptorul din membrană. S-a presupus că legarea toxinei de receptorul din membrana plasmatică, modifică conformația acestuia, în așa fel încât regiunea apolară a receptorului (N-acilsfin-gozina) poate interacționa cu matricea hidrofobă a membranei. În această regiune are loc transducerea semnalului și probabil, activarea adenilatciclazei de pe fața intracelulară. Apare foarte posibil ca micromediul lipidic să servească ca mijloc de cuplare între regiunea receptoare și cea catalitică a enzimei, în procesul de transducere a semna-

lelor din mediu. Această presupunere este susținută de faptul că o serie de molecule simple (de exemplu GTP), prezintă efecte activatorii asupra unor enzime din membrane. Probabil că GTP stabilizează o parte din receptorii de membrană, lucru dovedit experimental prin modificările intrinseci ale fluorescenței unor fluorocromi fixați de situsurile receptoare din membrană. Modificările de fluorescență sugerează existența unor efecte cooperative dintre receptor și o serie de proteine ale membranei (Pastel-Vinay și col.1974).

9.7. Receptorii pentru insulină. Etapa primară a acțiunii insulinei asupra diverselor tipuri de celule o constituie fixarea sa de membrana plasmatică. Narahara (1972) a demonstrat că fixarea insulinei de celulele sarcoplasmice, precede acțiunea sa fiziologică asupra transportului glucozei prin membrana plasmatică.

Date experimentale interesante au fost obținute prin cercetarea capacității de fixare a monoid insulinei de receptori de membrană. De exemplu, în membrana celulei adipoase s-au apreciat aproximativ 50.000-160.000 receptori insulinici (Kene și Barham, 1971). Cuatrecasas (1971) a estimat existența a 11.000 receptori insulinici în membrana celulei adipoase. Prin incubarea celulelor în concentrații saline crescute sau în prezența unor fosfolipaze are loc demascarea unor receptori suplimentari (65.000).

Cercetările efectuate pe membranele plasmatice ale celulelor hepatice, au identificat 2 tipuri de receptori insulinici, ce prezintă constante de disociere deosebite. Datele experimentale sugerează existența unor receptori cu afinitate mare pentru hormon (în număr relativ restrâns), care sînt responsabili de efectele fiziologice ale insulinei. Tripsinizarea celulelor duce la pierderea capacității de fixare a hormonului de membrana plasmatică. Rezultate similare s-au obținut și prin tratarea celulelor cu fosfolipaze. Demascarea unor situsuri receptoare suplimentare în membrană este însoțită în paralel de pierderea capacității hormonului de a stimula metabolismul glucozei, probabil, din cauza unor modificări ale organizării structurale și moleculare a membranei celulare.

Cuatrecasas (1974) a solubilizat și purificat receptori insulinici din membrana plasmatică, cu ajutorul unor detergenți apolari (triton X-100).

În general, se apreciază că insulina fixată de receptorii de pe fața externă a membranei, determină transmiterea unui semnal în celulă, prin intermediul membranei celulare. Numeroase studii de fixare a insulinei de suporturi (dextran-2000, agaroză) au demonstrat capaci-

tatea hormonului de a stimula metabolismul glucozei celulei adipoase și a altor tipuri de celule (Hause și col.1972). De aceea s-a sugerat că intrarea insulinei în celulă nu este obligatorie pentru a realiza efectele sale metabolice.

Datele experimentale au arătat că hormonul cooperează cu fosfodiesteraza din membrana celulei hepatice, producând o creștere a activității enzimatică (Vaughan, 1972; Illiano și Cuatrecasas, 1972). De asemenea, insulina induce un efect inhibitor asupra acțiunii activatoare a adenilatciclazei, determinată de catecolamine și ACTH. Totuși, aceste interferențe nu pot explica multiplele și variatele acțiuni ale hormonului la nivel celular.

9.8. Mecanismul de acțiune al hormonilor. Deși au trecut 20 ani de la descoperirea acțiunii hormonilor nesteroidici, mecanismul de acțiune a rămas la nivelul ipotezelor și modelelor speculative. Acest lucru se datorește interferenței a numeroși factori asupra traducerii semnalelor hormonale de către celule. O discuție asupra lor depășește cadrul de față. Răspunsurile fiziologice ale celulelor la influențele hormonale sînt dependente de starea funcțională a celulelor și de particularitățile lor genetice.

Gindicelli și Pecquery (1978) au studiat natura receptorilor adrenergici și sensibilitatea adenilatciclazei pentru catecolamine din membrana plasmatică a celulei adipoase de șobolan, în cursul ontogenezei. Autorii au folosit un ligand specific, dihidroaloprenolonul - H^3 , pentru a identifica receptorii β adrenergici din diversele membrane celulare. S-a constatat că numărul receptorilor din membrane apare variabil în ontogeneză. Numărul receptorilor crește în cursul dezvoltării și atinge la maturitate o valoare de 40.800 per celulă. Pe măsura îmbătrînirii, numărul receptorilor din membrane scade treptat ajungînd la o valoare aproximativă de 7200 receptori per celulă (la șobolani de 30 luni). S-a sugerat că receptorii pentru catecolamine și subunitățile adenilatciclazei se dezvoltă independent. Evoluția ontogenetică nu este identică în toate țesuturile. Distribuția deosebită a receptorilor în membrane poate fi explicată prin: degradarea receptorilor, modificarea organizării structurale a membranei, desensibilizarea receptorilor, etc. Ipotezele asupra mecanismului de acțiune al hormonilor nesteroidici sînt:

1) Constantopoulos și Najjar (1973) au apreciat că activitatea adenilatciclazei depinde de capacitatea sa de fosforilare. Activarea enzimei este rezultatul unei reacții de defosforilare al sistemului receptor din membrană, în timp ce activitatea enzimatică "de bază" este dată de o formă fosforilată a enzimei. O serie de date experi-

mentale susțin această părere. Tratarea membranelor plasmatice plachetare cu prostaglandine în prezența ATP și proteinkinazei, determină o scădere a activității adenilato ciclazei.

2) Un alt mecanism de acțiune al hormonilor a fost propus de Cuatrecasas și col. (1975). Autorii iau în considerație natura fluidă a dublului strat lipidic, în care receptorii hormonali și adenilato ciclaza sunt considerați ca molecule proteice independente. Receptorii se deplasează liberi în membrană și independent de adenilato ciclază. Activarea sistemului de membrană sub influența hormonilor, este descris în două etape principale, și anume: a) formarea complexului hormon-receptor; b) cuplarea complexului hormon-receptor cu unitățile catalitice ale adenilato ciclazei de pe fața citoplasmatică (figura 6o).

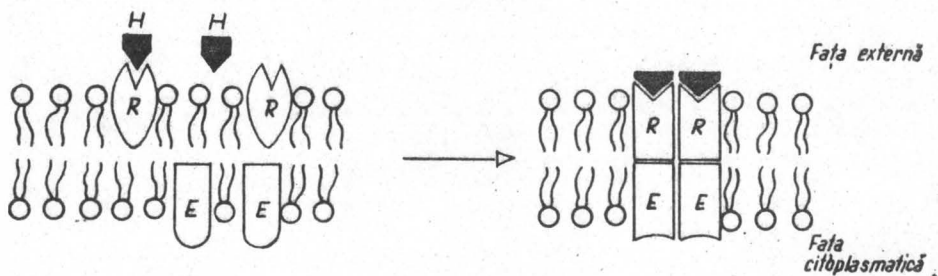


Fig.6o. Mecanismul de acțiune al hormonilor nesteroidici asupra sistemului adenilato ciclazic din membrana plasmatică, după ipoteza lui Cuatrecasas. H- hormon; R - receptor; E - enzima (adenilato ciclaza).

3) Altă ipoteză asupra mecanismului de acțiune al hormonilor, sugerează existența în sistemul adenilato ciclazic de membrană a unor elemente de "frinare". Acestea au fost descrise ca fiind subunități ale receptorului hormonal sau matricea fosfolipidică a membranei. Luând în considerare faptul că efectele F^- și Mg^{2+} asupra adenilato ciclazei din unele membrane sunt persistente, s-a sugerat că activarea indusă de ionul de F^- s-ar datora eliberării unei subunități cu rol inhibitor din sistemul adenilato ciclazic (Schramm și Nami, 1970). În sprijinul acestei păreri vin datele lui Levely și col.(1974). Studiindu-se adenilato ciclaza din membrana plasmatică a celulelor cardiace și acțiunea activatoare a glucagonului, s-a constatat că adenilato ciclaza și receptorul pentru glucagon, migrează împreună prin cromatografiere pe Sephadex G-100. Totuși, cele două componente migrează separat dacă ma-

terialul solubilizat este pretratată cu glucagon, înainte de cromatografiere. S-a emis părerea că interacția glucagonului cu complexul solubilizat duce la eliberarea unei componente din complexul adenilatciclazic.

4) În afara acestor modele, mai rămâne valabilă și părerea clasică emisă de Robison, Butcher și Sutherland (1967), care au apreciat că sistemul adenilatciclazic este format din subunitatea reglatoare și subunitatea catalitică. Prima componentă prezintă situsuri alosterice pentru nucleotide, hormoni și cationi.

Nici una din ipotezele imaginate, nu a căpătat o confirmare deplină. Sistemul adenilatciclazic a fost apreciat și pe baze genetice. De exemplu, s-au constatat modificări în ce privește specificitatea hormonală a adenilatciclazei din membranele celulare transformate. Astfel, adenilatciclaza din celula adrenală purtătoare de carcinom, nu prezintă specificitate față de hormoni și răspunde pozitiv la ACTH, catecolamine, LH, TSH și FSH. Deoarece răspunsurile nu au fost aditive, s-a conchis că la aceste celule s-a alterat natura receptorilor sau a factorilor de cuplare din sistemul adenilatciclazic de membrană (Schorr și col. 1971).

PERMEABILITATEA MEMBRANELOR CELULARE

Considerații generale.

Între diversele compartimente ale aceleiași celule, cît și între celule și mediul ambiant, există numeroase suprafețe de membrană prin intermediul cărora se asigură o circulație permanentă de apă, electroliți și neelectroliți. Procesul permeabilității de membrană este extrem de complex, iar părerile multor specialiști sînt divergente în ceea ce privește mecanismele intime (moleculare) ale diverselor aspecte funcționale.

Funcțiile membranei plasmactice sînt extrem de deosebite și variabile temporo-spațial, în raport cu tipul celular și cooperarea intercelulară. De aceea, analiza funcțiilor de permeabilitate a membranelor plasmactice poate fi privită din diverse unghiuri, sau în legătură cu importanța fiecărui factor care interferează în exprimarea particularităților de permeabilitate. Astfel, permeabilitatea membranelor plasmactice poate fi discutată prin:

a) modul de asamblare al lipidelor în membrane, compoziția lor chimică și raporturile dintre diversele tipuri de fosfolipide.

b) natura acizilor grași și raporturile dintre aceștia din structura moleculară a fosfolipidelor.

c) modul de interacțiune dintre lipide și proteine, proteine și proteine, precum și natura moleculelor proteice și glicoproteice caracteristice fiecărui tip de membrană.

d) natura legăturilor electrostatice dintre cationi și fosfolipide.

e) mobilitatea receptorilor în membranele plasmactice.

f) tipul de metabolism celular.

g) natura informației genetice ce duce la sinteza anumitor tipuri de proteine în fiecare membrană plasmatică, cu repercursiuni deosebite asupra organizării moleculare și a permeabilității.

Unele aspecte au fost discutate în capitolele anterioare unde s-a analizat organizarea moleculară a membranelor celulare.

Membrana plasmatică prezintă 3 nivele principale de rezistență în procesul general de transport al moleculelor. Primul nivel se referă la trecerea moleculei solvite din mediul apos în mediul hidrofob lipidic. Al doilea nivel este reprezentat de transferul moleculei prin mediul lipidic propriu zis (transmembranar). În etapa a 3-a are loc transferul moleculei din mediul lipidic al membranei în mediul apos. Cu alte cuvinte, viteza relativă de intrare și părăsire a membranei de către o moleculă permeantă depinde în bună măsură de coeficientul de partiție apă/lipid. Acest coeficient este o măsură a solubilității relative a unei molecule în apă și în lipid și depinde de capacitatea ei de a forma legături electrostatice. În plus, cele trei puncte de rezistență se caracterizează prin existența unor constante deosebite de străbătore a graniței soluție/membrană și membrană/soluție, apreciate prin constantele de afinitate pe situsuri receptoare (pe o față a membranei) și constantele de disociere (pe cealaltă față a membranei).

Semnificația fiziologică a membranei plasmactice constă în existența unor fluxuri de deplasare a moleculelor prin dublul strat lipidic. Nu arareori, fluxurile prin membrană sînt bidirecționale. În cazul sistemelor de transport activ, fluxurile sînt deosebite pe cele două fețe ale membranei, adică prezintă caracteristici vectoriale. Un sistem de transport de deplasează cu viteze egale amineacizii în celulă și în afara ei, nu este economic pentru viața celulară. În mod similar, un sistem de transport ce scoate material toxic din celulă nu este considerat eficient dacă substanțele sînt transportate cu viteze egale și în sens invers (la interior).

Trebuie să precizăm că nu cunoaștem prea bine natura permeabilității membranelor celulare, deoarece dificultățile de ordin experimental nu au permis studierea acestui proces decît la unele tipuri de celule. De asemenea, proprietățile de permeabilitate observate la aceste celule au fost puțin corelate cu organizarea moleculară a membranelor și cu natura proteinelor. Totuși, anumite particularități de permeabilitate par a fi caracteristice majorității membranelor celulare, și anume:

- a) marea permeabilitate pentru multe substanțe liposolubile.
- b) permeabilitatea deosebită pentru apă.
- c) existența în membranele plasmactice celulare a unor mecanisme speciale de transport.

Permeabilitatea membranelor celulare este selectivă, determinată de o serie de particularități metabolice și adaptări morfofuncționale proprii diverselor tipuri de celule (musculară, nervoasă

epitelială, glandulară, etc.). Permeabilitatea selectivă a membranelor constă în modalitățile de dezvoltare a unor mecanisme specifice, capabile să introducă în celulă substanțele necesare întreținerii metabolismului celular și să elimine produșii de catabolism. Permeabilitatea membranelor celulare este în același timp dinamică și reversibilă, apreciată în mod deosebit la fiecare tip de celulă în funcție de schimbările care au loc în mediul extracelular sau în metabolismul intracelular.

Permeabilitatea celulară și transportul prin membrane poate fi descris sub forma unor fluxuri unidirecționale sau bidirecționale. De asemenea, transportul prin membrane se realizează homocelular (hematia), sau heterocelular (celula epitelială intestinală). În ultimul caz, se descriu mecanisme speciale de transport în funcție de relațiile unor regiuni ale membranei cu micromediul înconjurător, bine delimitate pentru celula epitelială: transportul prin membrana luminală, transportul prin membrana seroasă și transportul prin regiunea laterală a membranei (vezi capitolul referitor la transportul prin celulele epiteliale).

Înțelegerea proceselor complexe de permeabilitate a membranelor celulare va permite descifrarea unor mecanisme biologice fundamentale privind organizarea materiei vii, precum și numeroase aspecte de interes practic (combaterrea unor maladii, acțiunea substanțelor farmacologice, comunicarea dintre celule, ș.a.). Permeabilitatea celulară este un fenomen universal al lumii vii, care se interferează pe numeroase planuri cu majoritatea proceselor biologice celulare. Acțiunea factorilor de mediu precum și dezvoltarea mecanismelor de cooperare și reglaj intercelular (nervos, endocrin, chemotaxic, imunologic, etc.), se descriu pe baza unor mecanisme de permeabilitate selectivă ale membranelor plasmatice celulare.

Permeabilitatea membranelor celulare se caracterizează prin lipsa de uniformitate (mare variabilitate). Mecanismele prin care diversele tipuri de celule mențin o anumită concentrație a ionilor pe cele două fețe ale membranei (adică în compartimentul extracelular și intracelular), sau transportă substanțele și produșii de metabolism sînt deosebite atît calitativ cît și cantitativ. În lumea vie există numeroase exemple care atestă faptul că unele tipuri de celule au în membrana plasmatică sisteme de transport limitate, dar cu specificitate largă (nespecifice); alte celule dispun însă de sisteme transportoare variate, a căror afinitate se limitează la una sau cîteva molecule analege.

Din punct de vedere al selectivității ionice, membranele plasmatice pot fi grupate în trei categorii distincte. Din prima grupă fac parte celulele a căror membrană are o permeabilitate predominantă pentru anionii hidrofili mici (de exemplu membranele eritrocitare). Din a doua categorie fac parte acele celule care prezintă o permeabilitate preferențială pentru cationi (celulele neuronale și membranele organismelor unicelulare). A treia grupă cuprinde celule, a căror membrană plasmatică are o permeabilitate relativ asemănătoare atât pentru cationi cât și pentru anioni (celula sarcoplasmatică).

Dacă ne referim la raporturile de concentrație ale ionilor de Na^+ și K^+ din mediul extracelular și intracelular, constatăm existența unor variații foarte mari în funcție de specie. Din tabelul 10 se observă că concentrațiile intracelulare ale cationilor monovalenți prezintă valori medii procentuale extrem de diferite în funcție de specie, deși valorile concentrațiilor aceluiași ioni în mediul extracelular sînt foarte constante. Astfel, raportul concentrației ionilor de K^+ din citoplasma eritrocitelor și mediul extracelular ($\text{K}_i^+/\text{K}_e^+$) este variabil, avînd valorile de 27 (pentru eritrocitele de om) și 1,7 (pentru eritrocitele de la pisică). În mod analog se constată variații pentru ionii de Na^+ ($\text{Na}_i^+/\text{Na}_e^+$): 9,5 (la cal), și 1,1 (la pisică). Datele comparative ale repartiției cationilor monovalenți din eritrocite sugerează existența unor mecanisme de transport deosebite în celulele eritrocitare de la diverse specii.

Tabelul 10 - Concentrația unor ioni în mediul intracelular și extracelular al eritrocitelor de la cîteva specii de mamifere (după Lev, 1975).

SPECIE	Concentrația intracelulară a ionilor (mM/l)			Concentrația extracelulară a ionilor (mM/l plasmă)			K_i/Na_i
	K^+	Na^+	Cl^-	K^+	Na^+	Cl^-	
Om	136	19	78	5,0	155	112	7,1
Babuin	145	24	78	4,7	157	115	6,0
Iepure	142	22	80	5,5	150	110	6,0
Cal	140	16	85	5,2	152	108	8,7
Oaie	46	98	78	4,8	160	116	0,47
Bou	35	104	85	5,1	150	109	0,33
Cîine	10	135	87	4,8	153	112	0,07
Pisică	8	142	84	4,6	158	112	0,05

10.2. Modalitățile de transport prin membranele plasmactice celulare.

Permeabilitatea celulară este un proces complex, definită pe baza cooperării a numeroși factori. În capitolul anterior s-a precizat importanța unor factori în exprimarea permeabilității membranei celulare. Caracterizarea generală a fost desigur foarte succintă și nu a luat în discuție toate aspectele.

Intr-o formulare generală, permeabilitatea membranei plasmactice celulare este controlată de forțe pasive și active. Forțele pasive sînt reprezentate în principal de organizarea ultrastructurală și compoziția chimică a membranei, gradientul osmotic și gradientul de concentrație. Forțele active ce guvernează permeabilitatea membranelor sînt reprezentate de mecanismele de difuzie facilitată, de prezența transportorilor de natură proteică din membrane și de existența unor sisteme de transport active, ce funcționează prin cuplarea lor cu reacții eliberatoare de energie (dependente de metabolismul celular).

Deplasarea transmembranară a electrolitilor și neelectrolitilor se realizează prin următoarele modalități:

- 1) Transport pasiv (difuzie simplă sau nemediată), descris pentru o serie de molecule mici (îndecsebi cationi și anioni) și molecule mari lipofile (medicamentele).
- 2) Difuzie facilitată (transport facilitat, sau transport mediat fără aport de energie).
- 3) Transport activ sau transport mediat cu necesar de energie (transport cuplat energetic).
- 4) Sisteme de cotransport al moleculelor organice împreună cu ioni de Na^+ .
- 5) Transportul prin endocitoză și alte procese discontinui particulare membranelor plasmactice celulare.

10.3 Difuzia prin membrana plasmatică.

Observațiile mai vechi referitoare la capacitatea de trecere a unor substanțe prin membranele celulare au dus la concluzia că moleculele cu grad mare de solubilitate în lipide traversează mai ușor regiunea hidrofobă a membranei. Totuși, această generalizare (în parte valabilă) s-a complicat, deoarece s-a dovedit că o serie de compuși organici hidrofilii (glicerol, uree) cu o solubilitate mică în solvenți lipidici, prezintă o viteză mare de pătrundere prin membrane. De asemenea, electrolitii anorganici care nu sînt solubili în lipide, traversează bariera de membrană destul de ușor. Dimpotrivă, unele substanțe

liposolubile (trietilcitratul) trec greu prin membrana plasmatică. Aceste observații împreună cu multe altele, au dus la dezvoltarea conceptului asupra existenței "porilor" în membranele plasmatice celulare.

În general, celulele sînt mai puțin permeabile pentru electroliți decît pentru neelectroliți, cu greutatea moleculare similare. De asemenea, membrana plasmatică este mai puțin permeabilă pentru cationii bivalenți, în comparație cu cei monovalenți. Viteza de difuzie a cationilor monovalenți prin membrane a fost corelată cu diametrul ionilor în stare hidratată. Pe această bază, cationii monovalenți au fost ordonați într-o scară de permeabilitate, și anume: $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ care este urmată de cationii bivalenți > anionii organici > $\text{F}^- > \text{SO}_4^{2-}$. Pentru diverse tipuri de celule această ordine de permeabilitate nu se păstrează. Astfel, eritrocitele sînt mai permeabile pentru anioni decît pentru cationi și prezintă grade deosebite de permeabilitate în funcție de specie.

Un aspect deosebit al permeabilității membranelor celulare l-a constituit observația referitoare la faptul că în condițiile limitelor de pH din organism, electroliții slabi trec mai ușor prin bariera lipidică în stare neionizată. Acest aspect are o importanță deosebită practică pentru sinteza unor medicamente cu un grad mare de solubilitate și viteză de trecere rapidă prin membranele celulare.

Substanțele solubile difuzează prin membranele celulare sub influența mai multor factori. Dintre aceștia, cel mai important apare gradientul de concentrație (sau potențialul chimic) și potențialul electric. În condițiile cele mai simple, viteza de deplasare a moleculelor (J) prin difuzie, în sensul gradientului de concentrație este apreciată prin legea difuziei simple (legea Fick), descrisă de relația:

$$J = D \frac{dc}{dx}$$

în care, D -reprezintă coeficientul difuziei simple iar dc/dx exprimă gradientul de concentrație (sau gradientul chimic). Deoarece deplasarea ionilor foarte adesea este influențată și de gradientul electric, viteza de mișcare a moleculelor este descrisă mai corect de relația introdusă de Ussing (1949):

$$J = -AD \left(\frac{dc}{dx} + \frac{zF}{RT} \cdot c \cdot \frac{dE}{dx} \right)$$

unde, A -simbolizează suprafața (cm^2); D -coeficientul de difuzie; z -numărul sarcinilor electrice ale moleculei; F -numărul Faraday (96.500 cal/mol); R -constanta gazelor; T -temperatura absolută; x -distanța (cm).

Relația dE/dx exprimă gradientul electric (v/cm).

Difuzia substanțelor prin membranele celulare și caracterizarea selectivității ionice a acestora s-a făcut de obicei pe baza măsurării conductibilității membranelor, aprecierea mărimii fluxurilor izotopice și a diferenței de potențial electric dintre citoplasmă și mediul extracelular. Există numeroase aprecieri asupra criteriilor de difuzie, pe baza cărora s-au elaborat mai multe teorii și interpretări matematice, ce pot fi grupate astfel:

1) teorii care apreciază procesele de membrană pe baza relației Nerst-Planck (Hodgkin, 1951; Keynes, 1951; Teorell, 1953; Katz, 1949).

2) teorii ce descriu fenomenele de membrană pe baza proceselor ireversibile din punct de vedere termodinamic (Hill, 1966; Katchalsky, 1961; Kedem, 1972).

3) teorii ce apreciază procesele de transport a ionilor prin membrane pe baza vitezei absolute a reacției (Sheuplein, 1968).

Toate aceste teorii au creat premisele elucidării unor aspecte fundamentale ale permeabilității membranelor. Totuși, ele nu sînt apreciate pozitiv, deoarece nu au ținut cont de organizarea moleculară, dinamică și reversibilă a membranei și mai ales de rolul diverselor componente proteice.

Difuzia simplă a membranelor plasmactice este un proces funcțional caracteristic fiecărui tip de celulă, care depinde de particularitățile de cooperare dintre lipide și proteine și de natura interacțiilor dintre componentele de membrană și factorii de mediu și cei intracelulari. În literatură există numeroase date experimentale care justifică rolul unui component sau altul, în exprimarea permeabilității pasive a membranelor: tipurile de lipide din membrană, natura acizilor grași, factorii metabolici, temperatură, etc.

Numeroase observații privind permeabilitatea membranelor plasmactice, au fost efectuate pe eritrocite. Naacache și Shaafi (1973) au studiat permeabilitatea membranei eritrocitare pentru 90 substanțe. S-au făcut aprecieri asupra permeabilității moleculare în funcție de gradul lor de solubilitate în lipide și de greutatea lor moleculară (mai evidentă pentru moleculele mari). Relații similare s-au obținut și pentru alte membrane plasmactice de la alte tipuri de celule. Permeabilitatea unor molecule mari cu structură ramificată este mică pentru membrana plasmatică eritrocitară și membranele celulelor epiteliale din vezica urinară. Dimpotrivă, membranele plasmactice ale celulelor epiteliale intestinale, nu fac discriminări pentru molecule cu structuri ramificate. Aceste observații au dus la concluzia că permeabili-

tatea diferitelor membrane plasmatică depinde în bună măsură de compoziția lor chimică și modul lor de organizare.

Un factor important în exprimarea permeabilității pasive a multor molecule, l-a constituit relația dintre energia de activare și starea de hidratare a moleculelor permeante. Energia de activare a transportului transmembranar a unei molecule, poate fi calculată pe baza relației dintre viteza de permeabilitate și temperatură. De exemplu, valorile energiei de activare pentru etilenglicol, glicerină și eritrol sînt următoarele: 60, 77 și 87 KJ/mol (1 KJ = 4,2 Kcal). Aceste valori sînt asemănătoare cu energia de deshidratare a moleculelor. Pe aceste considerente s-a sugerat că deshidratarea moleculelor permeante reprezintă o condiție preliminară pentru ca ele să poată intra în stratul lipidic hidrofob. În schimb, deplasarea moleculelor prin zona hidrofobă propriu zisă este controlată în primul rînd de natura acizilor grași ai fosfolipidelor. De aceea, transportul unor molecule prin membranele plasmatică poate fi descris și pe baza energiei potențiale. Această prezentare scoate în evidență importanța barierei energetice în deplasarea moleculelor permeante prin membrane, în sensul gradientului de concentrație. Molecula permeantă, pentru a intra în stratul lipidic hidrofob, trebuie să se elibereze de o parte din moleculele de hidratare.

Permeabilitatea crescută a membranelor pentru o serie de molecule mici, a constituit unul din argumentele care au stat la baza sugerării prezenței porilor în membrane. Noțiunea de "pori" apoi în membranele plasmatică nu a fost precis conturată, deși existența lor a fost presupusă și sugerată experimental pentru unele tipuri de membrane plasmatică: celula nervoasă, celulele epiteliale din vezica urinară de la broască, ș.a. Au apărut numeroase obiecții asupra criteriilor funcționale de identificare a porilor în membrane. Astfel, Macey și Marmer (1970), au arătat că permeabilitatea pentru uree, metiluree și glicerol a membranei eritrocitare este inhibată de floretină. Autorii au apreciat că aceste substanțe sînt transportate prin membrană prin mecanisme de difuzie facilitată, și ca urmare utilizarea lor experimentală pentru a sugera existența porilor nu apare corectă. Observații asemănătoare au fost obținute de Owen și Solomon, pentru o serie de compuși hidrofilii și hidrofobi.

Apare din ce în ce mai clar că, permeabilitatea membranelor poate fi mai bine apreciată prin existența unor canale ionoforice în membrane, în care proteinele îndeplinesc un rol reglator deosebit.

Dacă ne referim la difuzia simplă prin membrane, ea se exprimă deosebit în funcție de tipul celular. De exemplu, ionii de Na^+

și K^+ difuzează prin membrana eritrocitului uman, în sensul gradientului de concentrație, cu viteze de aproximativ 1,8 și respectiv 1,6 m moli/l celule/oră (Glynn, 1956). Aceste fluxuri sînt extrem de slabe, dar suficiente pentru a restabili echilibrul ionic în decurs de 1-2 zile. În cazul celulei neuronale a axonilor giganti de la calmar, difuzia pasivă a ionilor de sodiu are o valoare de 60 m moli/cm²/sec (Simpkins și Hokin, 1973). În schimb, în cursul trecerii potențialului de acțiune, fluxul ionilor de Na^+ crește foarte mult și are o valoare aproximativă de 10.000 m moli/cm²/sec.

Toate cercetările anterioare, au ignorat prezența și rolul proteinelor din membranele plasmatice celulare, ca mediatori ai permeabilității celulare. În etapa actuală, cunoaștem ceva mai bine organizarea moleculară a membranelor plasmatice iar proteinelor li se atribuie un rol principal în exprimarea permeabilității. De aceea, pare mai corect să apreciem membrana plasmatică ca o structură complexă, ce posedă sisteme de transport și transporteri (de natură proteică sau glicoproteică) pentru ioni și molecule organice. Caracterizarea membranei ca "barieră" de difuzie, nu corespunde realității și poate descrie doar particularitățile bistratului lipidic. Dacă luăm în considerație importanța proteinelor în controlul permeabilității celulare, lucru ce nu poate fi tăgăduit, atunci trebuie să descriem permeabilitatea ca fiind specifică fiecărui tip celular, determinată genetic și dependentă de influența reglatoare a numeroșilor factori ai mediului.

10.4. Difuzia facilitată.

Prin difuzie facilitată se înțelege transportul de substanțe prin membranele celulare, care se realizează în sensul gradientului de concentrație dar cu o viteză mult mai mare decît cel descris pentru procesele de difuzie simplă. Foarte adesea este denumit și transportul mediat, pentru că s-a presupus că moleculele nu traversează direct regiunea hidrocarbonată a lipidelor de membrană, ci prin intermediul unor transporteri speciali de natură proteică. Deoarece transportul mediat include și procesele de transport activ, s-a apreciat mai corect definirea sub formă de difuzie facilitată, pentru a caracteriza acele sisteme de transport ce nu necesită un aport de energie.

Numeroase observații experimentale au dovedit că transportul glucozei prin membrana plasmatică a celulelor eritrocitare umane are loc cu viteză mult mai mare decît în eritrocitele altor mamifere. S-a apreciat că acest transport se realizează prin mecanisme speciale, iar cinetica lui se deosebește foarte mult de transportul pasiv. Transportul glucozei prin aceste membrane se caracterizează printr-o energie

de activare scăzută, iar viteza de transport nu depinde semnificativ de temperatură. Molecula de glucoză are 5 grupări hidroxilice capabile să realizeze legături de hidrogen. Teoretic, energia de activare a transferului glucozei din faza apoasă în cea lipidică are o valoare de aproximativ 80 KJ/mol. Datele experimentale au calculat însă o energie de activare de numai 16 KJ/mol. De asemenea, s-a apreciat că viteza transportului glucozei prin membrana plasmatică a eritrocitului uman este de 10.000 ori mai mare, în comparație cu viteza presupusă în condițiile unui transport pasiv.

Transportul substanțelor prin membrane cu ajutorul transportorilor prezintă o serie de particularități, și anume:

a) Difuzia facilitată prezintă caracteristicile unei cinetici de saturație. La concentrații mari ale moleculelor permeante nu

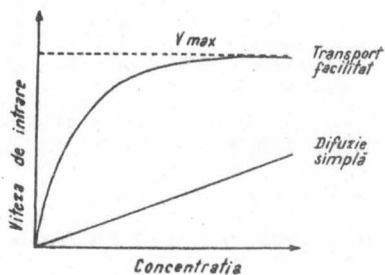


Fig. 61. Relația dintre concentrația în substrat și viteza de intrare în celulă, în cazul difuziei simple și a transportului facilitat.

se constată o creștere a vitezei relative de intrare, ceea ce a dus la presupunerea că sistemul se saturează. Reprezentarea grafică a vitezei inițiale de intrare în celulă a unei molecule în raport cu concentrația sa în mediu, descrie o curbă hiperbolică (figura 61). După cum se poate observa din figura 61, la concentrații mici ale moleculei permeante, viteza de intrare în celulă a moleculei este proporțională cu concentrația sa din mediu. În cazul unui proces de difuzie simplă

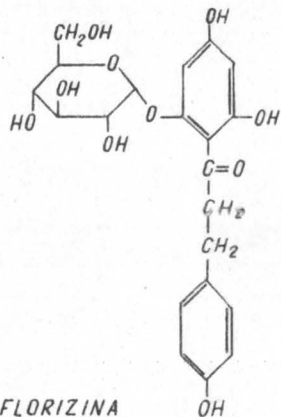
a moleculelor prin membrane, reprezentarea grafică a vitezei de transport în funcție de concentrație este lineară (direct proporțională), independent de concentrația moleculei în mediu și fără tendință de saturație.

Un exemplu sugestiv al unui transport facilitat ce se poate satura îl constituie transportul glucozei la nivelul membranelor plasmactice a celulelor epiteliale renale. Celulele vor reabsorbi toată cantitatea de glucoză din filtrat dacă concentrația sa nu depășește nivelul de saturație al sistemului de transport din membrana celulară. Pragul renal pentru glucoză corespunde unei concentrații de glucoză în sânge de 180 mg/ml. Dacă concentrația glucozei depășește această valoare, excesul de glucoză rămâne în filtrat și se elimină prin urină (glicozurie).

b) O altă particularitate a transportului facilitat este dată de specificitatea relativ mare a sistemului pentru o serie de molecule. De exemplu, eritrocitele unor vertebrate prezintă o specificitate relativ mare pentru glucoză și alte câteva monozaharide, dar au o specificitate redusă față de fructoză și dizaharide. Astfel, difuzia facilitată a unor glucide prin membrana plasmatică a eritrocitelor umane prezintă următoarele constante: D-glucoză, $K_m = 6,2 \text{ mM}$; D-manoză, $K_m = 18,5 \text{ mM}$; D-fructoză, $K_m > 2000 \text{ mM}$.

c) Transportul facilitat apare și stereospecific, adică transportorii au o mare selectivitate față de moleculele permeante. Sistemele de transport pentru aminoacizi din membranele celulare animale sînt mult mai active față de izomerii L și puțin active față de izomerii D. În cazul glucozei selectivitatea este mai mare pentru izomerii D. În unele situații, transportorii pot transporta molecule cu structuri chimice analoage, descriindu-se o concurență între ele pentru același sistem de transport.

d) Sistemele de transport facilitat se caracterizează și prin aceea că pot fi blocate cu ajutorul unor inhibitori specifici. Unele sisteme de difuzie facilitată din membrane sînt inhibitate specific și competitiv, cu ajutorul analogilor de substrat; altele sînt inhibitate necompetitiv, prin blocarea unor grupări funcționale ale moleculei proteice transportoare. De exemplu, N-etilmaleimida blochează grupările sulfhidrilice, iar dinitrofluorobenzenul blochează grupările amino libere.



FLORIZINA

Fig.62. Structura chimică a florizinei, inhibitor specific al transportului glucozei prin membrana plasmatică a celulei epiteliale intestinale.

Specificitatea majorității inhibitorilor este bine conturată prin faptul că sînt molecule impermeabile. Pe de altă parte, inhibitorii prezintă grade deosebite de acțiune în funcție de tipul celular. Un inhibitor larg utilizat pentru blocarea transportului facilitat al glucozei prin membranele plasmatică este florizina (figura 62).

e) Sistemele de transport facilitat din membranele plasmatică sînt puternic influențate de pH-ul mediului și de prezența ionilor metalelor grele (inhibitori de tip necompetent). Acești factori interferă prin mecanisme puțin elucidate cu molecula proteică transportoare. Astfel, transportul glicerolului

prin membrana eritrocitului are loc cu o viteză mare la un pH neutru (în jur de 7,0). Scăderea pH-ului mediului sub valoare 6,0, sau tratarea celulelor cu concentrații mici de CuSO_4 ($< 0,1 \text{ mM}$), determină o puternică inhibiție a transportului mediat.

Transportul moleculelor prin membranele celulare cu ajutorul transportorilor realizează două categorii principale de procese:

1) difuzie de schimb, care se realizează prin transportul transmembranar al moleculelor în ambele direcții. Când sistemul se află la echilibru, vitezele relative ale celor două direcții de transport tind către zero.

2) în unele tipuri de celule, sistemul de transport pentru o substanță depinde de prezența altei molecule în mediu. Acest proces este definit sub denumirea de transport cuplat sau cotransport (simport sau antiport). De exemplu, transportul facilitat al glucozei și aminocizilor în celulele epiteliale intestinale și renale are loc împreună cu ioni de Na^+ ; un transport cuplat este considerat și transportul adeninnucleotidelor (ATP și ADP) prin membranele mitocondriale interne.

Difuzia facilitată este controlată de o serie de factori, care se exteriorizează deosebit în funcție de tipul celular și de natura transportorului din membrană. Principalul factor al intrării (sau dimpotrivă ieșirii) unei molecule în celulă, prin intermediul transportorilor îl constituie gradientul chimic de concentrație. Funcționarea sistemului de transport trebuie să ducă la echilibrarea gradientului chimic și stabilirea unui echilibru în sistem.

Să facem o scurtă analiză a unui model de transport facilitat, în care sistemul de transport pentru glucoză este la saturație, iar transportorul de membrană nu apare specific. În condițiile unei saturații pentru glucoză nu se constată un transport net al acestei molecule prin membrana celulară. Adăugarea pe fața externă a membranei a unui alt monozaharid (manoză), va favoriza o activare a difuziei facilitate prin membrană, pe baza gradientului de concentrație foarte mare al manozei. Se va crea un flux spre interior al manozei, care va fi cuplat cu un eflux al glucozei. Dacă ambele glucide au un transportor comun, la suprafața externă a membranei va avea loc o competiție între cele două molecule. Ca urmare, manoză va inhiba influxul glucozei, fără a influența apreciazabil efluxul. În condițiile experimentale descrise, are loc o difuzie de schimb între două glucide. Totuși, un astfel de transport facilitat sugerează prezența cîterva particularități. În primul rînd, influxul și efluxul trebuiesc considerate ca două procese separate fizic. În caz contrar, saturația uneia din căi (pe o față a membranei) induce în paralel și blocarea celeilalte căi.

Interpretarea cinetică a datelor experimentale arată că cinetica de saturație nu reprezintă un criteriu selectiv de diferențiere între transportul prin difuzie simplă și transportul facilitat. Astfel, într-un sistem de difuzie ce implică o modificare a volumului osmotic, cinetica de translocare se aseamănă cu cinetica prin intermediul transportorului. De aceea Wilbrandt (1975) apreciază ca criteriu al transportului mediat, valoarea vitezei de scădere a transportului în sistemele de difuzie facilitată de schimb, la concentrații mari în substrat.

Sistemele de difuzie facilitată sînt destul de răspîndite în membranele plasmactice ale acestor tipuri de celule, la care substanțele transportate sînt rapid utilizate în procesele metabolice. În aceste celule, gradientul de concentrație al acestor molecule se păstrează permanent. Unele sisteme de transport din membrane se află sub control nervos și endocrin. De exemplu, difuzia facilitată a glucozei în celula cardiacă și sarcoplasmatică este stimulată de către insulină. Deosebiri de reglaj, presupun grade deosebite de control pentru întreținerea proceselor metabolice, care se desfășoară cu viteze variate în diverse țesuturi.

10.5. Mecanismele moleculare ale difuziei facilitate.

Difuzia facilitată (transportul facilitat) este considerată un mecanism de transport prin membrane în sensul gradientului de concentrație, mediat de proteine specifice, cu caracter hidrofob. Numeroase observații au fost efectuate la bacterii. La aceste organisme s-au descris mutații deficitare în transportul unor molecule. De asemenea, tot la bacterii, unele sisteme de transport din membrană pot fi induse, dacă în mediul de cultură se adaugă un substrat adecvat. După o anumită perioadă de timp (perioadă lag), transportorul apare în membrana plasmatică bacteriană.

În ultimii ani, cercetările de caracterizare a transportorilor din membrane s-au intensificat, mai ales după dezvoltarea unor procedee experimentale de purificare parțială a lor. Astfel, s-a reușit izolarea și purificarea transportorului pentru glucoză din membrana celulelor epiteliale intestinale, a transportorului pentru anioni din membrana eritrocitară, ș.a.

Mecanismele moleculare de difuzie facilitată a substanțelor prin membranele celulare, descriu trei etape principale: a) recunoașterea specifică a moleculei permeante și fixarea ei pe transportor; b) translocarea moleculei prin membrană; c) disocierea complexului moleculă-transportor pe una din fețele membranei.

Din cele trei etape, procesul de translocație este cel mai puțin cunoscut și reprezintă obiectul unor păreri controversate și al unor modele de transport variate. De fapt, argumentele experimentale au dus la crearea a două puncte de vedere majore. Unii cercetători presupun existența unui transportor care se deplasează în structura hidrofobă a membranei. Prin complexarea sa de o moleculă permeantă, transportorul capătă o mobilitate mai mare în membrană și deci, se poate deplasa spre una din cele două fețe ale membranei. Cea de a doua părere presupune că molecula proteică transportoare, prin complexare cu molecula permeantă își modifică în așa fel conformația încât facilitează formarea unor "canale" ianoforice în structura hidrofobă a membranei.

Pesibilitatea purificării unor transportori din membranele celulare a permis elucidarea unor aspecte funcționale și cinetice ale transportului facilitat. Astfel, constantele de asociere (afinitate) ale moleculelor permeante față de transportorul proteic, au valori apropiate de cele descrise pentru celulele întregi. Inglobarea transportorului purificat în membrana unei celule defective de acest proces, restabilește funcționalitatea celulei pentru sistemul de transport. Datele experimentale destul de numeroase au ajuns la concluzia că în afara celor trei etape principale a transportului facilitat, mai participă și alte elemente, a căror natură nu a fost definită.

În continuare vom prezenta particularitățile unor sisteme de transport facilitat purificate din membranele celulare.

Transportul glucozei. Sistemele de difuzie facilitată pentru D-glucoză au fost intens studiate pe celule eritrocitare întregi și pe fragmente de membrană (Jung, 1975). Kasahara și Hinkle (1976-1977) au reușit să purifice acest transportor proteic din membranele eritrocitare, după care au refăcut funcționalitatea transportorului prin inglobarea lui în lipozomi formați din fosfolipide de soia. În aceste condiții, captarea D-glucozei marcate de către lipozomi, apare

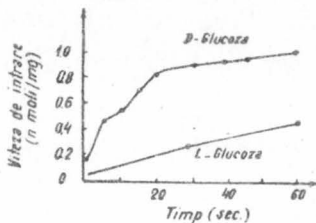


Fig. 63. Viteza inițială de captare a D-glucozei și L-glucozei, de către lipozomi, care conțin un transportor purificat din membrana plasmatică eritrocitară (după Kasahara și Hinkle, 1977).

specifică pentru această moleculă; s-a observat și o captare lentă a L-glucozei, similară și la lipozomi fără transportor. Ionul mercurie și citechalasina B, inhibă procesul de transport al D-glucozei (figura 63). Purificarea transportorului s-a făcut prin solubilizarea membranelor cu detergent (triton X-100, 0,5%), urmată de o trecere pe coloană de DEAE-celuloză echilibrată cu același detergent. S-a apreciat că o

celulă eritrocitară prezintă aproximativ $1,6 \times 10^5$ molecule transportoare, rezultat similar cu datele obținute pe alte căi (Kahlenberg, 1976).

Transportorul pentru anioni din membrana eritrocitară umană. Membrana plasmatică a eritrocitelor prezintă un sistem de transport pentru anioni, care mediază o difuzie facilitată de schimb între celulă și mediul extracelular a anionilor Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{--} . Identificarea acestor componente în membrană s-a făcut cu ajutorul unor inhibitori specifici, reversibili și ireversibili (Rothstein și col. 1976; Cabantchik și col., 1975, 1976).

Arhitectura situsurilor anionice din membrană a fost cercetată cu o serie de analogi ai acidului stilben disulfonic (agenți impermeabili). Studiile lui Rothstein și col. (1976) au sugerat că acești analogi se fixează electrostatic de grupări încărcate pozitiv de pe molecula proteică transportoare. Fixarea lor este inhibată competitiv de anionii SO_4^{--} . Astfel, 4,4'-diisothiociano 2,2'-stilben disulfonat (DIDS) și N-(4-azido-2-nitrofenil)-2-aminoetilsulfonat (NAP-taurina) se leagă de o polipeptidă cu gr.mol. de 95.000 din membrana celulelor întregi. Această proteină a fost identificată cu banda 3, în conformitate cu poziția sa în gel de poliacrilamidă. Digestia blîndă cu pronază a permis separarea proteinei în 2 segmente polipeptidice (65.000 și 35.000 daltoni). Polipeptida mai mare leagă direct DIDS și inhibă transportul de anioni prin membrane.

Cele două polipeptide au fost izolate din membrana eritrocitară prin solubilizare cu detergent neionic (triton X-100), urmată de reconstrucția funcției anionice prin înglobarea lor în vezicule fosfolipidice (lipozomi lecitinici). Tratarea acestor lipozomi cu DIDS inhibă parțial permeabilitatea pentru anioni. Cele două polipeptide au fost purificate, și apoi asociate cu lipide identice membranei eritrocitare. Lipozomii cu transportori prezentau un transport facilitat pentru anioni dependent de temperatură, asemănător observațiilor obținute pe celule întregi. Lipozomii erau capabili să transporte anioni bivalenți și monovalenți, sistemul fiind sensibil la acțiunea inhibitorilor. Acest ultim aspect presupune că poziția proteinei transportoare în lipozomi este asemănătoare cu cea din membrana intactă, deoarece situsurile de fixare pentru DIDS sînt dispuse asimetric și nu sînt accesibile pe fața citoplasmatică (Zaki și col. 1976).

Observațiile mai multor autori au dus la concluzia că proteina cunoscută sub denumirea banda 3 îndeplinește o funcție transportoare a anionilor în membranele plasmactice eritrocitare. Ea este o proteină transmembranară, ce permite crearea unui canal hidric, prin

care se realizează difuzia facilitată a anionilor prin bariera lipidică. Studiile cu inhibitori specifici sugerează existența unor situsuri anionice de fixare pe molecula proteică. Pentru ilustrare, prezentăm modelul ipotetic al dispoziției proteinei denumite "banda 3" din membrana plasmatică a eritrocitelor umane (după Rothstein și col. 1977), (figura 64).

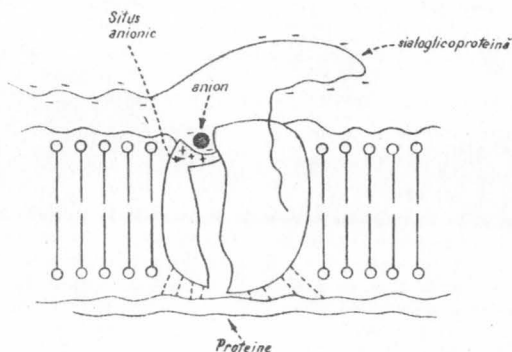


Fig. 64. Modelul presupus al sistemului de transport proteic pentru anioni, din membrana plasmatică a eritrocitului (după Rothstein și col., 1977).

Proprietățile transportorului proteic al alaninei din membrana plasmatică bacteriană. Din membrana unei bacterii termofile, a fost izolat și purificat un transportor pentru alanină. Procedul experimental a cuprins următoarele etape: solubilizarea membranelor izolate prin centrifugare diferențială cu un amestec de detergenți (colat și deoxicolat de Na), purificarea proteinei pe DEAE-celuloză și cromatografiere pe Sefaroză 6B, în prezența unui detergent neionic triton X-100 (Hirata și col., 1976, 1977).

Proteolipozomii refăcuți in vitro din fosfolipide și proteina purificată, se caracterizau printr-o viteză mare de transport a alaninei, la adăul în mediul de incubație a unui ionofor (valinomicina). Activitatea funcțională a acestor lipozomi a fost blocată de inhibitori specifici (carbonilcianid- p-triflorometoxifenil hidrazona, FCCP) (figura 65). Calcularea valorii cinetice (K_m) a transportorului pentru alanină pe proteolipozomi, a dat valori asemănătoare cu cele constatate pentru transportorul din membranele celulare intacte.

Urmărind importanța naturii fosfolipidelor din care sînt alcătuiți lipozomii în stabilizarea și optimizarea funcției proteinei transportoare pentru alanină, s-a constatat că transportorul prezintă

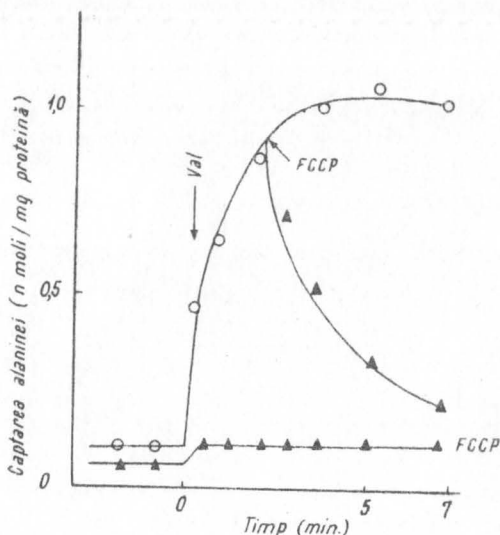


Fig.65. Captarea alaninei de către lipozomi reconstruiți in vitro, în prezența unui transportor specific purificat din membrana plasmatică a bacteriilor. Val. = valinomicină; FCCP = carbonilcianid p-trifluorometoxifenil hidrazona; o — o = proteolipozomi activi; A — A = proteolipozomii în prezența FCCP.

o specificitate mare pentru anumite fosfolipide. Fosfatidiletanolamina și fosfatidilglicerolul au constituit lipidele cu care proteina transportoare realizează o viteză mare de transport a alaninei, comparabilă cu cea descrisă pe celule întregi. De subliniat faptul că lipidele cele mai eficiente în refacerea funcțională a proteolipozomilor au fost obținute din membrana bacteriilor, sugerînd importanța naturii acizilor grași din fosfolipide. Cardiolipina nu a fost capabilă să formeze lipozomi funcționali cu proteina transportoare pentru alanină, iar în combinație cu alte fosfolipide (fosfatidilglicerolul) prezintă efecte inhibitorii asupra procesului de transport facilitat al alaninei.

11. DIFUZIA FACILITATA IN PREZENTA PEPTIDELOR IONOFORE

Deplasarea ionilor prin membranele lipidice artificiale (în special a cationilor) are loc cu viteze mult mai mici, în comparație cu vitezele lor de mișcare prin membranele naturale. Permeabilitatea membranelor artificiale și a membranelor celulare pentru ioni și unele substanțe organice crește foarte mult în prezența unor molecule, cunoscute sub denumirea generală de ionofori. Ionoforii (sau complexonii) au capacitatea de a fixa ionii metalici din soluție și de a-i transporta prin membrane artificiale sau naturale.

Ionoforii fac parte dintr-o clasă de substanțe organice, naturale sau sintetice, ciclice sau lineare, care se deosebesc prin structura chimică și prezența unor grupări funcționale. Ionoforii naturali sînt sintetizați de ciuperci (Actinomycetes) și o serie de microorganisme (Bacillus brevis). În laborator s-au sintetizat numeroși analogi, care au ușurat studiul mecanismelor lor moleculare (Ovchinov și col. 1974, 1977). În funcție de mecanismul lor de acțiune în membrane, ionoforii se grupează în două clase principale și anume:

- 1) Molecule transportoare mobile, care mediază transportul ionilor prin membrane pe baza mobilității lor în membrana hidrofobă. Din această grupă fac parte valinomicina, enlantina, nonactina, nigericina, alameticina, ș.a.

- 2) A doua grupă de substanțe ionofore formează în membrane canale ionoforice, oferind ionilor un "drum" hidrofilic prin bariera hidrofobă lipidică. Reprezentantul cel mai de seamă îl formează gramicidina A și numeroși analogi sintetici. Reprezentarea schematică a celor două modalități de transport a ionilor prin membrane este ilustrată în figura 66.

Unele molecule ionofore sînt polipeptide neutre (nu conțin grupări ionizabile). Din această categorie fac parte gramicidina, valinomicina, nonactina, enlantina și numeroși analogi sintetici. Alți ionofori prezintă în structura lor chimică grupări ionizabile (ionofori carboxilici). Astfel, nigericina prezintă o grupare carboxil terminală, care se ionizează la pH neutru. Din această grupă mai fac parte monen-

sina, alameticina, X-537 A și A-23187 (Pressman, 1973; Gomez-Puyou și

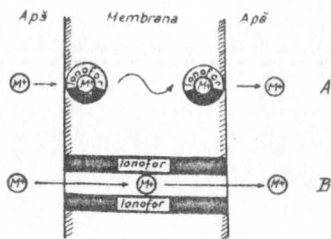


Fig. 66. Reprezentarea schematică a mecanismelor transportului ionilor în prezența ionoforilor. A) ionofor mobil; B) canal ionofor - ric.

Gomez-Lojero, 1977). Acești compuși sînt molecule neciclice, cu un număr variabil de grupări de oxigen (eter sau keto). Prin complexare cu ionii, se formează conformații ciclice cu selectivități variabile.

Ionoforii posedă o flexibilitate mare a structurii lor, ce permite intrarea ionului în interiorul moleculei. Procesul are loc prin modificarea conformației ionoforului și eliberarea unei părți din moleculele de apă ce înfășoară ionul metalic.

11.1. **Valinomicina.** Valinomicina este un polipeptid ciclic cu o structură relativ simplă (figura 67). Numeroase cercetări, mai ales ale lui Ovchinicov și col. (1974, 1975) au descris existența mai multor conformații ale valinomicinei. În medii apolare, valinomicina prezintă o

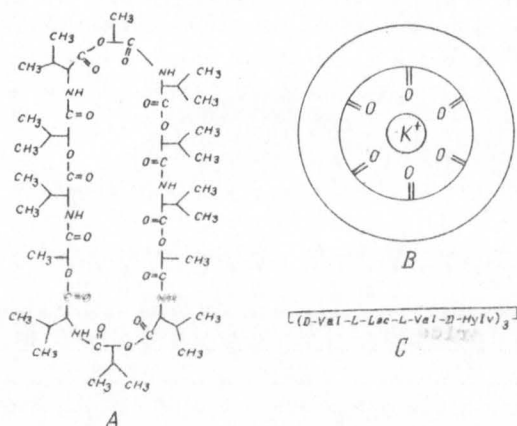


Fig. 67. Valinomicina. A) structura chimică; B) reprezentarea schematică a complexului valinomicină ion de K^+ ; C) unitatea structurală repetitivă.

structură compactă și simetrică, în care grupările NH și CO formează punți intramoleculare, iar grupările alkil sînt orientate la suprafața

moleculei (figura 68, A_1). În medii semipolare (suprafața membranei), valinomicina formează o structură mai plată (figura 68, B).

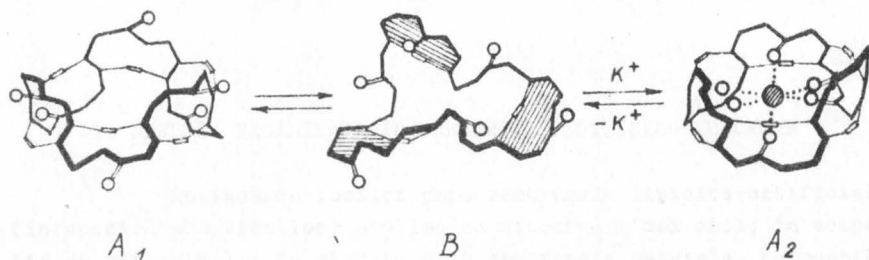


Fig. 68. Conformațiile valinomicinei (după Ovchinicov, 1975).
 A_1 - conformația valinomicinei în medii apo-lare.
 A_2 - conformația valinomicinei în prezența ionului de K^+ .
 B - conformația valinomicinei în lipsa ionului.

Prin formarea unui complex cu ionul de K^+ , valinomicina își modifică conformația în așa fel, încît grupările carbonil ale moleculei se ecranează spre interiorul structurii. Aceste grupări formează 6 legături dipol cu ionul, spre centrul structurii moleculare (figura 68 A_2 și o prezentare simplificată în figura 67, B). În acest fel, cationul este izolat de influența structurilor moleculare adiacente. Diametrul regiunii centrale a antibioticului sub formă de complex valinomicină- K^+ , este de 2,8 Å. Din cauza structurii sale mai rigide, valinomicina nu își modifică diametrul regiunii centrale, ceea ce explică în parte specificitatea acțiunii sale. Astfel, valinomicina fixează ioni de K^+ cu o afinitate de 10.000 ori mai mare, în comparație cu afinitatea sa pentru ioni de Na^+ .

Un factor important ce asigură creșterea vitezei de transport a cationilor prin membrane în prezența ionoforilor, îl constituie scăderea energiei de activare a ionului, în cursul procesului de trecere prin granița de separare de fază (apă-lipidă). Datele experimentale au dovedit că ionoforul captează ionul la granița de fază apă-lipid, proces ce este însoțit de înlocuirea unor molecule de apă asociate ionului cu atomii de oxigen din molecula peptidului. În paralel are loc și o scădere a energiei libere, care favorizează trecerea barierii lipidice cu viteză mare.

Complexul ion-valinomicină trece prin dublul strat lipidic al membranei sub forma unei unități independente. Viteza sa prin regiu-

nea hidrofobă a membranei depinde de natura fosfelipidelor și a acizilor grași. Deși comportarea valinomicinei în diverse membrane este bine cunoscută, există numeroase incertitudini asupra mecanismului de fixare al ionoforului în membrană. Observații interesante au fost realizate prin marcarea ionoforului cu substanțe fluorescente (dansilderivati). Folosind un derivat fluorescent al valinomicinei, și anume Vm(Lis.Dns), Ovchinicov și col. (1977) au studiat comportarea lui prin înglobare în lipozomi formați din fosfatidilcoline. Fluorescența compusului nu se modifică în urma complexării ionului de K^+ , sugerând neparticiparea regiunii polare în acest proces.

S-au descris două tipuri de complecși valinomicină- K^+ , stabiliți pe baza raporturilor stechiometrice dintre molecule. În afara complexului convențional de stechiometrie 1:1, s-au identificat și complecși în raporturi 2:1 (două molecule de valinomicină pentru un ion de K^+ , denumit sandwich). Ambele forme pot participa în procesele de transport facilitat al cationilor prin membrane celulare (Ivanov, 1975).

11.2. Gramicidina. Gramicidina este o pentadeca-peptidă lineară, care a fost izolată din *Bacillus brevis*. Se cunosc și mulți analogi sintetici. Molecula este formată din aminoacizi hidrofobi, cu excepția glicinei din poziția 2. Gramicidina este o moleculă neutră deoarece resturile terminale ale aminoacizilor sînt blocate de gruparea formil, respectiv etanolamin (vezi figura 69).

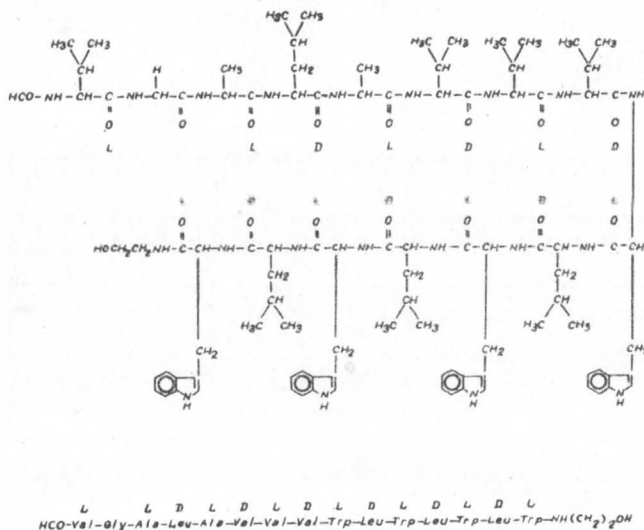


Fig.69. Structura chimică a gramicidinei A. În partea de jos este redată structura simplificată a antibioticului.

Dacă gramicidina A este fixată de o membrană celulară (Podelski și Changeux, 1969; Johnstone, 1975) sau într-un strat bimolecular lipidic (Lieberman și Topala, 1965; Kolb și col. 1975), membrana devine permeabilă pentru cationi. Mecanismul de acțiune al gramicidinei apare deosebit de cel al valinomicinei, sugerându-se formarea unui canal ionoforic în bistratul lipidic al membranei. Un model a fost propus de Urry (1971), care a apreciat că gramicidina formează în membrană un dimer paralel spiralat, stabilizat prin legături de hidrogen intramoleculare și intermoleculare. Lungimea dimerului este de 20-30 Å, ce corespunde cu limita inferioară a grosimii bistratului lipidic. Cavitatarea ce se formează în interiorul structurii favorizează intrarea ionului, care interacționează cu grupările amidice ale carbonilului, (vezi figura 70, A). Un alt model a fost sugerat de Veatch și Blont (1974), sub formă de dimer dublu helix antiparalel, în care toate legăturile de hidrogen sînt intermoleculare. La interiorul structurii se formează un canal hidrofил, de-a lungul axului de spiralare, cu un diametru de 3 Å (figura 70, B).

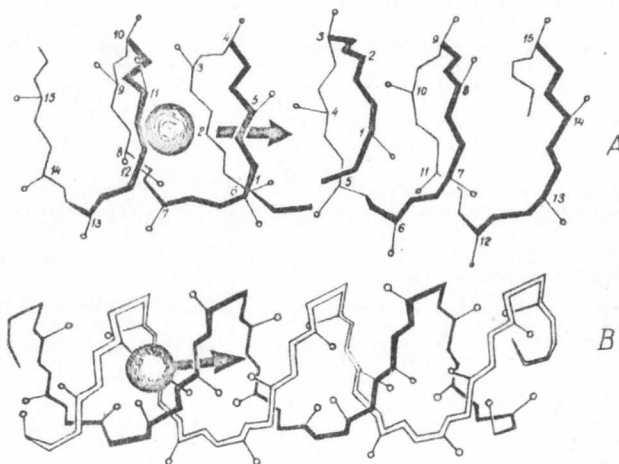


Fig.70. Conformațiile gramicidinei în membranele celulare. A) dimer paralel spiralat; B) dimer dublu helix antiparalel (după Ovchinicov, și Ivanov, 1977).

În ce privește modul de fixare în membrană, s-a sugerat că gramicidina sub formă monomerică se absoarbe pe suprafața membranei. Deoarece constanta dielectrică a monomerilor este mai mare decât a lanțului hidrocarbonat, ei intră în membrană și apoi se unesc în dimeri funcționali. Gramicidina mărește permeabilitatea membranelor pentru protoni și cationi monovalenți (a membranelor energizante). Antibioticul modifică gradientul electrochimic al protonilor și al cationilor, fiind considerat un "decuplant" eficient al fosforilării oxidative.

11.3. Alți ionofori. Permeabilitatea membranelor celulare a fost cercetată în prezența a numeroase peptide ionofore, dintre care unele pot produce efecte biologice semnificative.

Nonactina este un polipeptid neutru, care facilitează transportul selectiv al ionilor de K^+ prin membrane. În prezența ionului, antibioticul formează un complex, în care grupările carbonil sînt orientate spre interior și permit fixarea cationului în centrul unei structuri rigide (figura 71). Structurile apolare ale nonactinei sînt orientate spre exteriorul moleculei. Complexul nonactină- K^+ , traversează regiunea hidrofobă a membranei.

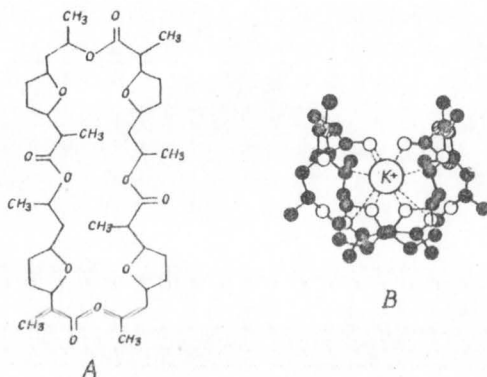


Fig.71. Structura chimică a nonactinei și a complexului dintre nonactină și ionul de K^+ .

Un grup mare de ionofori îl formează antibioticele polienice, care se fixează de membrane ce conțin colesterol și alți derivați ai acestuia. Amfotericina B și nistatina determină în grade deosebite eliberarea unor trasori din lipozomi (glucoză, ioni). Prezența

colesterolului în membrane artificiale, mărește selectivitatea de permeabilitate a antibioticelor pentru anioni monovalenți; de asemenea crește permeabilitatea membranei pentru apă și o serie de neelectroliti (uree, etilenglicol). Datele experimentale sugerează că amfoterina B și nistatina, în prezența colesterolului, formează în membrane canale ionoforice (Finkelstein și Holz, 1973; Kasumov și Liberman, 1973).

Levorina este un antibiotic ce conține două grupări amino în structura sa. Levorina crează în membrane cu colesterol o permeabilitate selectivă pentru cationi (Cass și col.1970).

Filipina este un antibiotic ionofor electroneutral, care permeabilizează membrana, dar cu o selectivitate mai redusă. Astfel, filipina permeabilizează membranele lipozomilor pentru ioni fosfat și glucoză, iar viteza lor crește în membrane cu colesterol. Datele de microscopie electronică au arătat că filipina determină formarea unor agregate macromoleculare de 150-250 Å în membrana plasmatică a eritrocitului de șobolan, în membrana de A.laidlawii ce conține colesterol și în lipozomi cu colesterol (Verkleij și col.1972).

Modificarea permeabilității membranelor naturale și artificiale pentru ioni în prezența ionoforilor, a dus la presupunerea că antibioticele polienice interacționând cu colesterolul, formează în structura hidrofobă a membranei canale ionoforice. Diametrul lor nu apare foarte constant fiind influențat de numeroși factori (Andreoli, 1973). Prezența canalelor în membrane, induse de antibioticele polienice, a fost confirmată de numeroase cercetări de microscopie electronică, spectroscopie în UV și metode în fluorescență (Tillack și Kinsky, 1973; Kasumov și col.1974; Strom și col.1973).

Cercetările din ultimii ani cu ajutorul antibioticelor ionofore au dus la presupunerea că permeabilitatea pentru ioni a membranelor celulare nu se bazează în mod deosebit pe proprietățile de difuzie, ci depinde în bună măsură de prezența unor componente funcționale în structura membranelor.

11.4. Importanța biologică. Faptul că membranele artificiale formate din lipide sînt foarte puțin permeabile pentru ioni, cît și modificarea destul de selectivă a permeabilității membranelor artificiale și naturale în prezența ionoforilor, a creat o bază serioasă de elucidare a permeabilității celulare. Majoritatea cercetărilor au fost concentrate asupra cloroplastelor, cromatoforilor și mitocondriilor, în legătură cu procesul de transformare al energiei în lumea vie. Analiza acestor procese se va face la mitocondrii.

Cîteva proprietăți ale moleculelor ionoforice sînt redată în tabelul 11. După cum se poate observa, ionoforii prezintă acțiuni diferite în membrane, în funcție de polaritatea lor și natura fluxurilor ionice. Astfel, în prezența nigericinei ionii de K^+ intră în celulă, iar ionii de hidrogen se eliberează în mediu (produc o scădere a gradientului chimic al protonilor și al cationilor monovalenți).

Gramicidina este considerată în primul rînd un decuplant al fosforilării oxidative. Molecula mărește permeabilitatea membranei pentru protoni și cationi monovalenți. De fapt gramicidina mimează acțiunea decuplanților clasici (DNF, FCCP), cu acțiuni similare în membrane (anularea forței protonomotrice), dar exprimate prin mecanisme deosebite.

S-au descris o serie de ionofori care transportă cu viteze mari prin membrane cationi bivalenți, în special ionii de Ca^{2+} . Natura lor chimică nu este bine cunoscută și de aceea au fost denumiți astfel: X-537 A și A-23187. Și în acest caz, majoritatea cercetărilor s-au efectuat pe membranele mitocondriale. Numeroase cercetări au arătat că acești ionofori pot declanșa în diverse țesuturi o serie de procese metabolice, prin controlul pe care îl realizează asupra permeabilității membranelor plasmactice pentru ionii de Ca^{2+} (tabelul 12). Datele din tabel subliniază capacitatea ionilor de calciu de a iniția răspunsuri variate, specifice tipului de celulă. Se observă de asemenea, că ionii de Ca^{2+} reprezintă un factor critic în modificarea metabolismului celular, care este controlat de permeabilitatea membranelor plasmactice ale celulelor.

S-au făcut numeroase încercări de izolare a unor molecule cu proprietăți ionoforice din membranele celulare de la eucariote. Succesele sînt limitate dar foarte promițătoare. Blondin (1974) a izolat un compus cu gr.mol.mică, care inducea umflarea mitocondriilor în soluții cu KCl și NaCl. Din membrana postsinaptică a organului electric s-a purificat un compus cu gr.mol.mică (1400-6000), care prin încorporare în membrane artificiale provoacă o creștere a conductanței (Shamoo și Myers, 1974). S-a sugerat că compusul formează pori în membrane, și/sau reprezintă o parte funcțională din Na^+ , K^+ -ATP-ază.

Cunoștințele noastre actuale asupra permeabilității membranelor celulare (facilitate de studii cu ionofori) justifică importanța unor proteine de membrană, care în anumite condiții și sub influența unor factori deosebiți formează canale hidrofile în dublul strat lipidic al membranei. Argumente serioase în sprijinul acestei păreri sînt aduse de Changeux pentru receptorul colinergic din membrana postsinaptică. De asemenea, Jilka și Martonosi (1977), studiind un preparat

enzimatic purificat (Ca^{2+} -ATP-ază) în membrane lipidice artificiale cu compoziții chimice variabile, apreciază proprietățile ionoforice (sau de difuzie facilitată) a proteinei în transportul transmembranar al ionilor de Ca^{2+} .

Tabelul 11 - Cîteva proprietăți ale ionoforilor (după Gomez-Puyou și Gomez-Lojero, 1977).

Tip de ionofor	Natura fluxului ionic	Acțiune în membrană	Mecanism de acțiune	Exemplu	Selectivitate
Ionofori neutri	Gradient electrochimic al cationilor monovalenți	Modificarea potențialului de membrană	Transportor mobil electroforetic	Valinomicina	$Rb^+ > K^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+$
Ionofori carboxilici pentru cationi monovalenți	Gradient chimic	Scăderea gradientului chimic al protonilor și cationilor monovalenți	Transportor mobil de schimb	Nigericina Monensina X-537 A ^{*)}	$K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ $Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$ $Cs^+ = Rb^+ = Na^+ = Li^+$
Ionofori ca agenți decuplanți	Gradient electrochimic al H^+	Anularea forței protonomotrice.	Transportor mobil electroforetic	Dinitrofenolul FCCP (X-537 A (în concentrație mare)	
Ionofori formatori de canale	Gradient electrochimic al H^+ și al cationilor	Anularea forței protonomotrice	Canale hidrofobice (apocae)	Alameticina Gramicidina	$H^+ > Cs^+ = Rb^+ = K^+ = Na^+$ $H^+ = Cs^+ > Rb^+ > K^+ = Na^+$
Ionofori carboxilici pentru cationi bivalenți	Gradient chimic	Scăderea gradientului chimic al H^+ și al cationilor bivalenți	Transportor mobil de schimb	X-537 A A-23187	$Ba^{2+} > Cs^{2+} > Mn^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$ $Mg^{2+} > Ca^{2+}$

174

*) la concentrații mici acționează ca ionofori de schimb, iar la concentrații mari ca decuplanți.

Tabelul 12 - Efectul ionoforilor A-23187 și X-537 A
asupra unor procese metabolice celulare.

=====		
Tesut	Ionofor	Efect
Neurohipofiză	X-537 A	Determină eliberarea vasopresinei
Retină	X-537 A	Induce curentul de întuneric
Diafragmă	X-537 A	Mărește contracția
Mușchi scheletic	X-537 A	Scade potențialul de repaus și amplitudinea sa.
Inimă	X-537 A	Crește frecvența și amplitudinea bătăilor inimii.
Aortă	X-537 A și A-23187	Induc contracția
Suprarenală	A-23187	Stimulează eliberarea catecolaminelor
Glanda salivară	A-23187	Stimulează secreția proteinelor, încorporarea P_1^{32} în proteine și catabolismul glicogenului.
Glanda parotidă	A-23187	Induce eliberarea K^+
Pancreasul endocrin	A-23187	Stimulează eliberarea insulinei și crește nivelul AMP_c în absența glucozei.
Tiroidă	A-23187	Inhibă acțiunea hormonului tireotrop asupra șuntului pentofosfat și fixarea iodului pe proteine
Pancreas exocrin	A-23187	Induce secreția amilazei.
Drojdii	A-23187	Induce diviziunea celulară
Ouă arici de mare	A-23187	Induce partenogeneza
Celulele mastice	A-23187 și X-537 A	Induc secreția de histamină.
=====		

12. TRANSPORTUL ACTIV PRIN MEMBRANELE CELULARE

Caracterizare.

În capitolul anterior s-a precizat că transportul facilitat prin membranele celulare este întreținut mai ales de existența unor componente specifice în membrană (transporteri proteici sau glicoproteici), care fixează relativ selectiv și specific moleculele ce vor fi transportate. Modelul general al unui astfel de mecanism consideră că pe una din fețele membranei are loc unirea transportorului (T) cu molecula permeantă (S), după care complexul TS este capabil să traverseze regiunea hidrofobă lipidică a membranei (prin mișcare liberă, rotație, modificare de conformație, formare de canal ionofor). În ultima etapă, transportorul eliberează molecula permeantă pe cealaltă față a membranei. În sistemul de transport facilitat, transportul este reversibil dar separat fizic iar deplasarea moleculelor se poate realiza în ambele sensuri în membrană, în funcție de concentrația relativă a moleculelor permeante în cele două compartimente (mediul extracelular și intracelular) (figura 72).

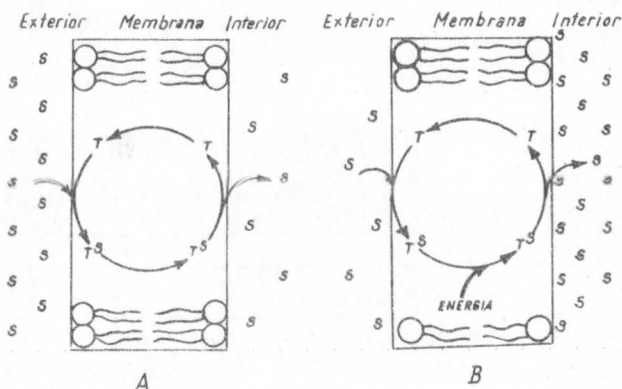


Fig. 72. Reprezentarea schematică a transportului mediat prin membranele plasmatiche.

A) transport mediat fără necesar de energie (difuzie facilitată).

B) transport mediat cu aport de energie (transport activ).

T = proteină transportoare specifică, component al membranei.

S = molecula transportată (substrat).

Transportul activ prezintă aceleași caracteristici ca și sistemele de transport facilitat, dar se deosebește de ele prin aceea că se realizează împotriva gradientului de concentrație și este însoțit de o cheltuială de energie. Aceste sisteme au fost elaborate de către celule pentru a-și procura din mediu substanțe, care se găsesc într-o concentrație mai mică decât în celulă. Modelul schematizat al transportului activ apreciază că transportul se energizează (E), ceea ce ușurează deplasarea complexului substrat-transportor (TS) prin regiunea hidrofobă a membranei (figura 72). Și în acest caz, etapa cea mai puțin cunoscută sub aspectele sale moleculare, o constituie translocția prin membrană. Deoarece părerile diverșilor autori asupra acestei etape nu sînt unanime, au fost propuse numeroase modele de transport activ.

În majoritatea cazurilor, transportul activ este dependent de accesibilitatea adenozintrifosfatului (ATP), deși nu este exclusă și participarea altor compuși. Din punct de vedere termodinamic în cursul transportului activ se realizează un câștig de energie potențială a moleculei transportoare, pe seama unei pierderi de energie într-o altă parte a sistemului. Dovezile cele mai elocvente ale dependenței transportului activ de sursele energetice celulare au fost obținute cu ajutorul inhibitorilor: florura și iodeacetatul (inhibitori ai glicolizei), arseniatul și cianura (inhibitori ai respirației celulare), oligomicina și dinitrofenolul (inhibitori ai fosforilării oxidative). Astfel, transportul activ spre exterior al ionilor de Na^+ de către celula neuronală, poate fi anulat prin adăugarea unui inhibitor, care blochează sinteza ATP. Dacă la o astfel de celulă se injectează intracelular ATP, transportul activ este reactivat. La unele tipuri de celule, transportul activ este întreținut mai ales de către glicoliză (celula sarcoplasmatică, eritrocitul), în timp ce pentru alte celule aportul energetic reclamă respirația celulară (neuron, celula renală).

Între celule și mediu există diferențe relativ mari ale gradientului de concentrație, mai ales pentru ioni. Întreținerea acestor gradiente de concentrație permite celulelor să-și regleze anumite procese metabolice. Astfel, transportul activ al cationilor monovalenți prin membranele plasmactice celulare menține celulele într-o stare de excitabilitate și crează fundamentul comunicării dintre celule (potențialul electric). Transportul activ menține în celule un raport ridicat al concentrației cationilor monovalenți (K^+/Na^+), deși în mediul extracelular acest raport este scăzut. Gradientele de concentrație ionică apar deosebite în funcție de tipul celular. De exemplu, celulele epiteliale din mucoasa intestinală au o concentrație intracelulară a protonilor de

10^{-7} M, în timp ce în mediul extracelular concentrația ionilor de H^+ este de 10^{-1} M. Se poate observa că gradientul de concentrație al ionilor de H^+ în cazul celulei epiteliale intestinale este de 10^6 . Păstrarea unui gradient mare de concentrație pe cele două fețe ale membranei plasmatică este susținută de procese deosebite. O celulă cheltuiește o mare cantitate de energie, care poate fi redusă după relația:

$$\Delta G = RT \log \frac{C_1}{C_2}$$

în care, ΔG , reprezintă energia liberă cheltuită pentru transportul unui mol de substrat împotriva gradientului de concentrație; C_1 și C_2 simbolizează concentrația moleculelor în cele două compartimente separate de către membrană.

Pentru a avea o imagine sugestivă asupra cantității de energie utilizată de către celule pentru întreținerea unui proces activ, să analizăm cazul țesutului renal. Rinichii filtrează pe zi 100-200 litri de urină primară, deși prin urină se elimină numai 1-2 litri. La nivelul celulelor epiteliale renale are loc reabsorbția unor săruri și a majorității glucidelor și aminoacizilor. Prin administrarea unui inhibitor specific al transportului activ al cationilor monovalenți (uabaina), scade consumul de oxigen al țesutului renal în proporție de 80%. Se poate deduce că la acest nivel, cea mai mare parte a energiei metabolice este folosită pentru întreținerea transportului activ prin membranele celulelor epiteliale renale.

Transportul activ a fost în mod deosebit cercetat la acele tipuri de celule, care întrețin funcții metabolice de schimb ionic. Transportul activ se referă în primul rând la transporturile de ioni prin membranele celulare (plasmatică și citoplasmatică), și foarte adesea a fost denumit pompă de sodiu. În linii generale, concepția de pompă activă descrie mecanismele prin care membrana asigurând transportul spre exterior al ionilor de Na^+ , crează suportul pentru transportul în sens invers al altor molecule.

Acest proces de transport activ este apreciat prin două tipuri de activități, și anume:

1) pompa de sodiu electroneutră, prin care eliminarea în mediul extracelular (extruzia) a ionilor de Na^+ este cuplată cu intrarea ionilor de K^+ (sau a altor cationi monovalenți).

2) pompa de sodiu electrogenică, prin care transportul la exterior al ionilor de Na^+ nu este însoțit de transportul la interior al ionilor de K^+ . Acest tip de transport activ prin membrana plasmatică

crează premisele apariției diferenței de potențial transmembranar, foarte bine individualizat în celula nervoasă și musculară (100 mV).

Rolul pompei de sodiu în diversele tipuri de celule din lumea vie apare foarte diversificat. Raportul concentrațiilor intracelulare și extracelulare ale cationilor monovalenți (K^+/Na^+) dependent în bună măsură de intensitatea activității pompei de sodiu, influențează o serie de procese metabolice celulare: respirația, glicoliza, sinteza proteică, ș.a. Transportul activ al ionilor prin membranele electrogene reprezintă fundamentul molecular al procesului de excitabilitate al celulelor nervoase și musculare, al comunicării între celule prin intermediul potențialului de acțiune, al medierii acțiunii unor hormoni, etc. De asemenea, transportul activ reglează activitatea contractilă a țesutului muscular, intervine în transportul neelectroliților prin membranele celulelor epiteliale, ș.a.

Dacă la organismele eucariote cationul expulzat din celulă prin membrana plasmatică este de obicei ionul de Na^+ , la microorganisme cationul cel mai frecvent eliberat este ionul de H^+ . Transportul activ al cationilor monovalenți este susținut de activitatea Na^+ , K^+ -ATP-azei. În afara ei, se descriu și alte sisteme enzimatică ce asigură un transport activ prin membrane, cum este Ca^{++} -ATP-aza din membrana celulei sarcoplasmatică.

12.2. Na^+ , K^+ -adenozintrifosfataza din membranele plasmatică.

În anul 1957, Skou identifică pentru prima dată la nivelul membranelor plasmatică ale neuronilor de la crustacei o activitate adenzintrifosfatazică magneziu dependentă, care era stimulată în mod deosebit de prezența ionilor de Na^+ și K^+ . Cercetările ulterioare au stabilit cu certitudine rolul fundamental al adenzintrifosfatazei dependente de ioni de Na^+ și K^+ în transportul activ al cationilor monovalenți prin membranele plasmatică celulare. Această enzimă, prin utilizarea energiei de hidroliză a ATP, realizează un transport activ vectorial al cationilor monovalenți prin membrane, împotriva gradientului de concentrație (Bonting, 1973; Skou, 1974; Dahl și Hokin, 1974).

Prezența Na^+ , K^+ -ATP-azei a fost demonstrată în membranele plasmatică de la majoritatea țesuturilor animale, vegetale și la organismele unicelulare (Bonting, 1973). O activitate enzimatică intensă s-a descris în membrana celulei nervoase, musculare, celulele organului electric al unor pești (Electrophorus), glanda rectală de la *Squalus acanthias* (rechin), celulele epiteliale ale tubulilor proximali renali, etc.

Activitatea ATP-azei purificate din diverse tipuri de celule, s-a dovedit a fi identică cu activitatea pompei de sodiu din

membrane. Posibilitatea stabilirii unor corelații între sistemul ATP-aze și transportul cationilor monovalenți prin membranele celulare a fost dovedită cu ajutorul inhibitorilor specifici ai transportului ionilor prin membrane (glicozide cardiace), prin studierea specificității de substrat, a afinității sistemului enzimatic din membrană față de concentrații deosebite ale ionilor de Na^+ și K^+ , sensibilitatea față de inhibitori, etc.

Izolare și purificare. Cercetarea activității Na^+ , K^+ -ATP-azei s-a făcut pe preparate de membrană separate prin centrifugare diferențială, sau pe preparate enzimatic purificate, după o prealabilă solubilizare a complexului lipo-proteic din structura membranei. În primul caz, fragmentele de membrană se veziculizează, iar centrul activ devine inaccesibil pentru substrat și activatori. Omogenizarea țesutului în medii hipotonice sau în prezența unor detergenți determină o creștere a activității enzimatic de câteva ori.

În cazul în care se izolează enzima din membrană, se folosesc pentru solubilizare o serie de detergenți (deoxicolat de Na, triton X-100, digitonină, lubrol, dodecilsulfat de Na). În concentrații mari unii detergenți inactivează enzima, dar detergenții neionici afectează puțin activitatea ATP-azei. Prin utilizarea detergenților, activitatea specifică a enzimei în extractele proteice totale crește foarte mult. Astfel, enzima din țesutul renal de la iepure prezintă o activitate specifică de 12 ori mai mare prin solubilizare cu detergent, în comparație cu ATP-aza extrasă fără ajutorul detergenților (Jorgensen și Skou, 1971; Philippot și Anthier, 1973).

Purificarea Na^+ , K^+ -ATP-azei din extractele proteice totale se face prin metode obișnuite: cromatografie sau gelfiltrare pe sefadex, agaroză, sefaroză, carboximetilceluloză (Uesugi și col. 1971). Un preparat foarte purificat de Na^+ , K^+ -ATP-ază a fost obținut din glanda rectală de la rechin de cățor Hokin și col. (1973). Observat la microscopul electronic, acest preparat a identificat veziculele membranare cu un diametru de 80 Å.

Specificitatea cationilor. În lipsa cationilor monovalenți Na^+ , K^+ -ATP-aza nu hidrolizează ATP. Adăugarea ionilor de K^+ în mediul de reacție ce conține Mg^{++} și Na^+ , provoacă o creștere deosebită a activității enzimatic. Ioni de K^+ pot fi substituiți cu alți cationi monovalenți, dar capacitatea lor de activare a enzimei este deosebită, în funcție de sursa enzimatică și natura ionului. În ultimul caz, s-a descris o scară de eficacitate a ionilor, și anume: $\text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$.

Dependența activității ATP-azei de concentrația ionilor a fost apreciată prin cantitatea de Na^+ din mediul de incubație. Cu cât este mai mare concentrația ionilor de Na^+ în mediul de incubație cu atât este necesară o concentrație mai mare de ioni de K^+ pentru a obține valori catalitice maxime (figura 73).

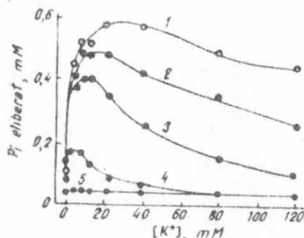


Fig. 73. Dependența activității Na^+ K^+ -ATP-azei din membrana plasmatică a celulei neuronale de crab în funcție de concentrația cationilor monovalenți. Concentrațiile ionilor de sodiu: 1 - 40 mM; 2 - 20 mM; 3 - 10 mM; 4 - 0,3 mM; 5 - fără sodiu.

rarea ionului de K^+ de pe situsul de legare al moleculei. S-a ajuns la concluzia că situsul de activare al enzimei pentru ionii de Na^+ se află pe fața internă a membranei, iar situsul pentru K^+ , pe fața externă a membranei celulare.

Studiindu-se dependența activității enzimatică în funcție de concentrația ionilor de K^+ , s-a constatat că în prezența unor concentrații scăzute a acestui ion, ATP-aza descrie o curbă cinetică sub formă de hiperbolă. Prin creșterea concentrației ionilor de K^+ , activitatea enzimei descrie o curbă de tip sigmoidal. Rezultate similare s-au obținut și prin studierea dependenței activității Na^+ , K^+ -ATP-azei de concentrația ionilor de Na^+ (Robinson 1974). Aceste observații au constituit unul din argumentele sugerării naturii alosterice a moleculei enzimatică. O serie de factori desensibilizanți (temperatura crescută) sau tratarea preparatelor enzimatică cu uree, duc la dispariția interacțiilor cooperative ale cationilor monovalenți cu Na^+ , K^+ -ATP-aza.

Deoarece situsurile de fixare pentru ionii de Na^+ și K^+ se află pe fețe deosebite ale membranei, și datorită faptului că ureea distruge structura cuaternară a enzimei, s-a apreciat că Na^+ , K^+ -ATP-aza este o moleculă globulară, ce ocupă întreaga grosime a membranei plasmatică (Skou, 1975).

Ionii de Na^+ activează Na^+ , K^+ -ATP-aza numai de pe fața citoplasmatică a membranei celulare și nu pot fi înlocuiți cu nici un cation anorganic sau organic (Skou, 1971; Rossi și col. 1978). Creșterea concentrației Na^+ în mediul extracelular nu activează enzima legată de membrană și nici nu favorizează eliberarea

Importanța structurii membranei. Activitatea Na^+ , K^+ -ATP-azei din multe tipuri de celule este puternic influențată de tranziția de fază a fosfolipidelor din membrane (Gaache și col., 1976). Când lipidele din membrană se află în stare fluidă, energia de activare a enzimei este cu 50% mai mică, în comparație cu ATP-aza dintr-o membrană în stare cristalină. Starea lipidelor din membrană controlează viteza maximală de hidroliză a substratului. Tranzițiile de fază ale membranei afectează proprietățile de recunoaștere pentru substraturi. În schimb, modificările de fază ale membranei nu afectează situsurile de legare pentru cationi. Starea lichidă a membranei facilitează mobilitatea ATP-azei în structură, ce asigură o activitate mai mare enzimei (Grisham și Barnett, 1973).

Prin compararea unor parametri cinetici ai ATP-azei (K_m) în funcție de concentrația cationilor, temperatură și influența glicozidelor, s-a constatat că enzima prezintă proprietăți similare, independent de natura enzimei, solubilă sau fixată de membrană (Hokin și col. 1973; Skou, 1974).

Pe de altă parte, natura lipidelor din membrană participă în funcționarea și organizarea Na^+ , K^+ -ATP-azei. Majoritatea autorilor apreciază că efectul activator asupra enzimei îl au fosfolipidele acide, din care cel mai important este fosfatidilserina. Mecanismul molecular al acestei dependențe a enzimei de fosfolipide nu este cunoscut. Se presupune că fosfolipidele crează în primul rând un micromediu hidrofob necesar funcției enzimatică. Studii pe preparate purificate au arătat că enzima formează cu lipidele un strat bimolecular, constituția stratului intern fiind mai fluidă (Simkins și Hokin, 1973).

Organizarea moleculară. Na^+ , K^+ -ATP-aza obținută din diverse membrane celulare, prezintă greutăți moleculare variabile. Probabil, preparatele enzimatică aveau omogenități variabile, deși nu este exclusă nici posibilitatea existenței unor enzime deosebite din punct de vedere structural în diferite țesuturi. Preparatele înalt purificate evidențiază pe gel de poliacrilamidă două fracții polipeptidice: o polipeptidă mare, cu gr.mol. de aproximativ 100.000 și o polipeptidă cu gr. mol. de aproximativ 35.000. Aceasta din urmă este de fapt o glicoproteină ce conține 13% oligoglucide. Cele două polipeptide au fost identificate în raporturi stoichiometrice variabile de 1:1, 2:1 și 1:2 (Kyte, 1972, 1975; Jorgensen, 1974; Peronne și col., 1975). Totuși, observațiile experimentale de legare încrucișată a celor două peptide, sugerează că ele se află în strînsă asociere și solubilizarea cu triton a membranei le eliberează împreună (Clarke, 1975).

Poliptidul mare este purtător al unui situs acceptor al grupării ortofosfat. Studii cu dicitlohexilcarbodiimid și ATP marcat, au stabilit în centrul acceptor un triptid (Tre-Asp-Liz); ortofosfatul radioactiv se fixează de gruparea carboxilică a acidului aspartic (Post și Kume, 1973). Pe același lanț se află și situsurile pentru uabaină și ATP. Poliptidul cu gr.mol.mică este o glicoproteină bogată în aminoacizi hidrofoi, iar ca oligoglucide cuprinde: glucozamină, galactozamină, glucoză, manoză, fructoză și acid sialic (Hokin și col. 1973; Jorgensen, 1977). Rolul acestui poliptid în organizarea Na^+ , K^+ -ATP-azei nu este elucidat. Se presupune că el asigură hidrofoicitatea centrului catalitic al enzimei și ar contribui la orientarea moleculei în membrana plasmatică. Datele experimentale sînt unanime privind topografia enzimei, care ocupă întreg stratul bimolecular lipidic al membranei. Deguchi și col. (1977) folosind mai multe tehnici de microscopie electronică, demonstrează existența enzimei purificate sub formă de vezicule membranare cu o distribuție dimerică a particulelor.

Etapele catalizate de Na^+ , K^+ -ATP-ază. Transportul cationilor monovalenți prin membranele plasmatice a constituit obiectul a numeroase discuții cu privire la organizarea moleculară a sistemului și a etapelor catalizate de către enzimă. Na^+ , K^+ -ATP-aza reprezintă un sistem enzimatic de transport în care enzima se fosforilează și se defosforilează ciclic. O schemă simplificată a acestui proces este redată în figura 74 (după Epstein, 1975). În această reprezentare, se presupune

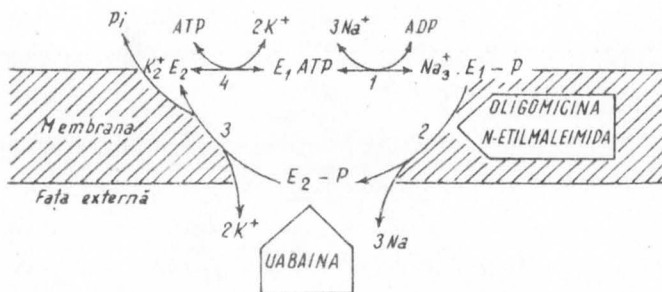


Fig.74. Principalele etape catalizate de către Na^+ , K^+ -ATP-aza din membrana plasmatică (explicația în text).

că enzima își modifică conformația în membrană. Poziția deosebită a intermediarilor sugerează existența unor schimbări în afinitatea pentru substrat a enzimei, precum și modificări în accesibilitatea situsurilor de fixare pentru cationi pe cele două fețe ale membranei.

În prima etapă are loc formarea fosfoenzimei (E_1-P), în prezența ionilor de Na^+ și pe seama ATP ca donor de grupare ortofosfat. Această etapă se desfășoară pe fața citoplasmatică a membranei, este reversibilă și necesită prezența complexului $ATP-Mg^{++}$. Reversibilitatea acestei etape a fost demonstrată cu ajutorul unor inhibitori specifici. În acest caz, are loc numai un schimb de $ATP-ADP$, dependent de ionii de Na^+ .

În etapa a doua, fosfoenzima suferă o modificare de conformație (de obicei ireversibilă), ce duce la formarea unui alt intermediar simbolizat prin E_2-P . Această etapă este inhibată selectiv de oligomicină și N-etilmaleimidă. În prezența ionilor de K^+ , fosfoenzima eliberează în mediu ionii de Na^+ .

În etapa a 3-a, ionii de K^+ (sau alți cationi monovalenți), se fixează de complexul ATP -azic și prin modificarea conformației enzimatice, situsurile cationice se expun pe fața internă a membranei. În paralel, are loc și eliberarea ortofosfatului, astfel că enzima apare sub forma complexului E_2-K_2 . ATP funcționează ca modulator pentru eliberarea ionilor de K^+ din complexul enzimatic, formându-se intermediarul E_1-ATP . Există o serie de dovezi ce sugerează că formarea complexului E_1-ATP are loc în lipsa ionilor de Na^+ (Post și col., 1972). Glicozidele cardiace inhibă activitatea Na^+, K^+-ATP -azei prin formarea cu enzima a unui complex stabil (Skou, 1973). Experimental s-a dovedit că uabaina (strofantina G) se fixează numai de complexul E_2-P . Adăugul de uabaină pe fața externă a membranei determină o inhibiție a transportului cationilor prin membrane, în timp ce prezența sa în mediul intracelular nu afectează procesul de transport activ al ionilor (figura 75).

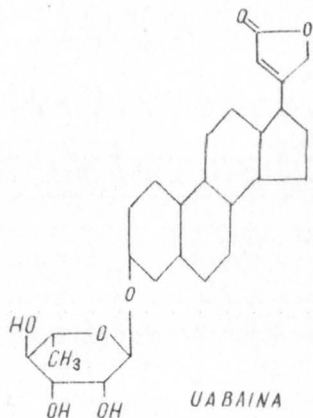


Fig.75. Structura chimică a uabainei (simplificată), inhibitor specific al Na^+, K^+-ATP -azei din membrana plasmatică.

După cum se poate constata din schemă, prima etapă (fosfo-kinazică) și ultima etapă (fosfatazică) a sistemului Na^+ , K^+ -ATP-azei se desfășoară pe fața citoplasmatică a membranei celulare, iar ortofosfatul se eliberează în interiorul celulei. Cele două forme principale ale enzimei ($\text{E}_1\text{-P}$ și $\text{E}_2\text{-P}$), corespund cu două conformații deosebite ale proteinei, ce fixează selectiv ionii de Na^+ și K^+ .

Schema ilustrează de asemenea, că toate etapele procesului de transport dintr-o celulă normală sînt reversibile. De aceea apare logic că se considere posibilitatea reversibilității funcției enzimatice în anumite condiții. Într-o serie de lucrări, s-a dovedit experimental capacitatea de funcționare în sens invers a pompei de Na^+ . Procesul se desfășoară în sensul gradientului de concentrație și este însoțit de sinteza ATP. Cercetările lui Post și col. (1974), Taniguchi și Post (1975) au arătat că în condițiile unei concentrații mari de Na^+ (pînă la 1 M), enzima poate transporta ortofosfatul pe ADF, cu formare de ATP. De asemenea, Ranker (1976) aduce o serie de argumente în favoarea reversibilității sistemelor ATP-azice, prin studii comparative pe preparate purificate (Na^+ , K^+ -ATP-aza și Ca^{2+} -ATP-aza). Autorul a sugerat și modelele moleculare a activității enzimelor în membrane. Există însă unele îndoieli asupra acestui proces, mai ales în ce privește sursa de energie și maniera de activare a ortofosfatului.

În afara acestor etape principale, sistemul ATP-azic din membranele plasmactice prezintă unele aspecte particulare, care nu pot constitui obiectul unei discuții, dar trebuie amintite. Astfel, la eritrocite și alte tipuri de celule, s-a descris un transport transmembranar între ionii de Na^+ ($\text{Na}^+\text{-Na}^+$), în medii în care lipsesc ionii de K^+ . Acest transport enzimatic este sensibil la oligomicină și necesită prezența ATP (deși nu are loc o pierdere netă de energie) (Glynn și Hoffman, 1971). De asemenea, în unele membrane s-a identificat și un transport transmembranar între ionii de K^+ ($\text{K}^+\text{-K}^+$) cînd nu există ioni de Na^+ în celulă (Simons, 1974). Și acest proces este sensibil la oligomicină.

Enzima din membrane cit și preparatele purificate sînt capabile să hidrolizeze și o serie de esteri fosforilați, proces ce este activat de către ionii de K^+ (acetilfosfat, p-nitrofenilfosfat, carbamilfosfat, umbeliferonfosfat). Hidroliza acestor substraturi duce la fosforilarea membranei. Cu alte cuvinte, există o activitate fosfatazică dependentă de ionii de K^+ , care probabil face parte din complexul Na^+ , K^+ -ATP-azei (Robinson, 1971). O serie de agenți lipofili (dimetilsulfoxid) exercită acțiuni diferențiate asupra activității fosfatazei K^+

dependente și Na^+ , K^+ -ATP-azei. Astfel, dimetilsulfoxidul inhibă ATP-aza și activează fosfataza. Pe baza unor date de cinetică enzimatică s-a sugerat că dimetilsulfoxidul inhibă etapa de translocare a sistemului ATP-azic din membrană.

Deși în literatura de specialitate se cunosc peste 3000 de lucrări referitoare la Na^+ , K^+ -ATP-ază, există încă multe neclarități în ce privește selectivitatea ionică a centrilor activi și mecanismul molecular al activității sistemului enzimatic. Într-o lucrare recentă Repke (1977), analizând datele din literatură, sugerează că sistemul ATP-azic din membrana plasmatică realizează o funcție de transport a cationilor monovalenți printr-un mecanism ionoforic.

Particularitatea transportului activ al cationilor prin membranele plasmatice constă în stoichiometria procesului, ce apare foarte similar la multe tipuri de celule. Acest raport este definit prin următoarea relație (vezi figura 76):

$$\text{ATP} : \text{Na}^+ : \text{K}^+ = 1 : 3 : 2$$

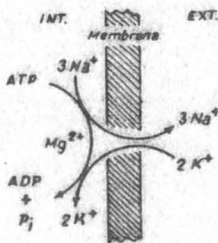


Fig.76. Stoichiometria pompei de Na din membranele plasmatice.

Refacerea funcției Na^+ , K^+ -ATP-azei prin înglobare în membrane artificiale. Un mijloc ingenios de studiere a Na^+ , K^+ -ATP-azei l-a constituit refacerea sistemelor de transport activ al cationilor prin înglobarea preparatelor enzimatice purificate în membrane artificiale. Deși participarea enzimei în transportul cationilor monovalenți este un fapt bine stabilit, au rămas nerezolvate o serie de aspecte: a) mecanismul molecular al procesului de translocare; b) dacă complexul ATP-azic din membrană este o entitate sau reprezintă o parte dintr-un

sistem mai complex; c) posibilitatea reversibilității procesului, adică în ce condiții sistemul enzimatic poate sintetiza ATP pe baza unui gradient ionic; d) dacă fosforilarea proteinei enzimatice este o etapă reală sau un artefact experimental.

Refacerea funcției enzimatice de transport activ a fost obținută cu numeroase preparate, purificate din diverse țesuturi: din glanda rectală a rechinului (Rhee și col.1974); din țesutul renal (Sood și col.1972); din creierul iepurilor (Chipperfield și Whittam, 1973), etc. Spațiul nu ne permite să discutăm particularitățile enzimelor din membranele artificiale. Într-o formulare generală se poate aprecia însă că Na^+ , K^+ -ATP-aza înglobată în membrane lipidice artificiale prezintă multe analogii cu enzima din membranele native. O discuție largă asupra acestui aspect este oferită de Racker (1976). S-a apreciat că translocația Na^+ , este electrogenică pe vezicule refăcute. Dintre lipidele folosite pentru alcătuirea lipozomilor, fosfatidiletanolamina a constituit fosfolipidul care a determinat cel mai eficient transport activ de Na^+ .

Reglaj. Na^+ , K^+ -ATP-aza din membrana plasmatică a unor tipuri de celule se supune unui reglaj complex. În mod deosebit a fost descrisă influența regulatoare a acetilcolinei. Independent de nivelul raporturilor cationice (Na^+ și K^+), acetilcolina inhibă enzima. S-a constatat că efectul inhibitor al acetilcolinei nu este total și este variabil în funcție de tipul celular. Faptul că Na^+ , K^+ -ATP-aza din membranele celulelor neexcitabile (ficat, eritrocite) nu este sensibilă la acetilcolină, susține părerea specificității sale de acțiune (Tkaciuk și col.1975).

Se apreciază că inhibiția ATP-azei sub influența acetilcolinei determină o modificare a pragului de excitabilitate a celulei musculare și stimulează fluxurile ionice, în urma excitației. Denervarea provoacă o creștere a sensibilității celulei musculare față de acetilcolină. Dimpotrivă, în sinapsele inhibitorii, acetilcolina mărește hiperpolarizarea, și probabil transportul activ electrogenic.

Particularitățile transportului prin celulele epiteliale.

Celulele epiteliale separă spații cu compoziții ionice deosebite și prin procese de transport transepiteliale, stabilesc și mențin o distribuție asimetrică a concentrației ionilor. De asemenea, celulele epiteliale (intestinale și a tubulilor renali proximali) sînt specializate în reabsorbția a numeroase substanțe, electroliți și ne-electroliți. În membranele plasmactice ale acestor celule s-au dezvoltat procese de transport deosebite și diversificate pentru arii dife-

rite ale membranei (membrana luminală sau mucoasă, membrana contraluminală sau seroasă și membranele laterale). În membrana plasmatică a celulelor epiteliale s-au descris mai multe sisteme de transport, și anume: sisteme de cotransport (simport) a moleculelor organice împreună cu ioni de Na^+ , difuzie facilitată de schimb între ioni de Na^+ și H^+ , Na^+ , K^+ -ATP-aza, transportori proteici specifici.

Observațiile asupra unei distribuții polarizate a sistemelor de transport au fost susținute de studiul proprietăților de transport pe vezicule de membrane plasmatică, izolate de pe fața luminală (cu bordură în perie), de pe fața contraluminală și fața laterală a celulelor epiteliale (Murer și col. 1974; Kinne și col. 1975). Murer și Kinne (1977) studiind transportul prin vezicule de membrană din intestinul de șobolan, au constatat că transportul D-glucosei și al L-valinei în vezicule preparate din membrana luminală este stimulat de un gradient de Na^+ . Dimpotrivă, transportul aceluiași substanțe în vezicule din membrana seroasă este insensibil față de prezența ionilor de Na^+ . Cele două tipuri de vezicule au specificități deosebite pentru substrat și inhibitori. Astfel, transportul D-glucosei prin vezicule din membrana contraluminală este inhibat de D-manoză și 2-deoxi -D-glucroză, și este mai sensibil la citochalasină B (Hopfer și col. 1975).

În schimb, transportul D-glucosei prin membrana luminală este inhibat de florizină. În mod similar, transportul fosfatului prin membranele luminală este stimulat mai puternic de către ioni de Na^+ , decât la nivelul membranelor contraluminală.

Cotransportul Na^+ împreună cu neoelectroliți este un proces electrogenic, afară de cazul în care este cuplat stechiometric cu deplasarea unui anion în aceeași direcție, sau a unui cation în sens opus. Cotransportul ionilor de Na^+ împreună cu anionii este electro-neutru, deoarece sarcina pozitivă a ionilor de sodiu compensează sarcina negativă a anionului fosfat (figura 77).

Conform ecuației:

$$\Delta^n \text{Na}^+ = RT \frac{\Delta^c \text{Na}^+}{C \text{Na}^+} + zF \Delta^p$$

forța de conducere prin membrană ($\Delta^n \text{Na}^+$) se compune din două componente; una se referă la diferența de concentrație chimică a Na^+ ($\Delta^c \text{Na}^+$) împărțită la concentrația medie a Na^+ ($C \text{Na}^+$); a doua componentă se referă la diferența de potențial electric (Δ^p).

Contribuția relativă a celor două componente ce descriu potențialul electrochimic, apare deosebită în funcție de încărcarea electrică a substanței cotransportate. Dacă are loc un transfer de

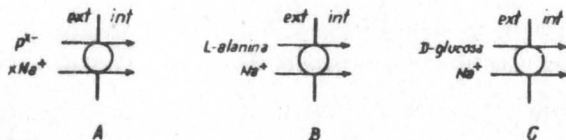


Fig.77. Influența potențialului de membrană electrochimic asupra transportului unor substanțe, dependent de ioni de Na^+ , prin membrana plasmatică a celulelor epiteliale intestinale. A) sinportul ionilor de Na^+ și al ortofosfatului (P^{--}) din mediul extracelular în interiorul celulei - proces electroneutral. B) sinportul ionilor de Na^+ și al aminoacizilor în celula epitelială intestinală - proces electrogenic. C) sinportul ionilor de Na^+ și al glucozei în celula epitelială intestinală - proces electrogenic.

sarcini (sinport glucoză + Na^+), atât gradientul chimic cât și potențialul electric influențează viteza de transport prin membrană. Dacă transportul este electroneutral, factorul principal al vitezei de transport îl reprezintă numai gradientul de concentrație. Ca urmare, interacția dintre procesul de cotransport electroneutral cu alte procese de transport dependente de Na^+ , localizate în aceeași membrană, va fi mediată pe calea modificării diferenței de concentrație a ionilor de Na^+ pe cele două fețe ale membranei, în timp ce interdependența dintre procesele de transport electrogenice va fi mediată de diferența de potențial electrochimic luat în ansamblu.

Aceste interdependențe sînt clar exprimate de membrana plasmatică a celulelor epiteliale (segmentul luminal). În condițiile în care gradientul de concentrație chimic al ionilor de Na^+ pe cele două fețe ale membranei este anulat, fluxurile transmembranare electrogenice pentru alanină și glucoză interferează. Acest lucru se explică prin faptul că alanina determină o intrare electrogenică a ionilor de Na^+ în celulă, induce un potențial de membrană, care inhibă intrarea glucozei prin sistemul propriu de transport. Dacă generarea acestui potențial de membrană este anulat (adaus de nonactină), are loc o rapidă reechilibrare a Na^+ pe cele două fețe ale membranei și influența inhibitoare

a alaninei asupra procesului de transport al glucozei dispăre. O dovadă suplimentară s-a obținut și prin experiențe cu valinomycină în prezența ionilor de K^+ . Deplasarea compensatorie de sarcini din vezicule în afară prin intermediul complexului valinomycină- K^+ , neutralizează generarea potențialului de membrană determinat de deplasarea ionului de Na^+ la interior.

La nivelul membranelor plasmactice a celulelor epiteliale s-au descris și interrelații între sistemele de cotransport dependente de Na^+ și permeabilitatea membranelor pentru ionii de Na^+ .

Deplasarea ionilor de Na^+ prin membrana celulară luminală este descrisă ca o difuzie de schimb prin intermediul protonului (schimb electroneutru). Acest sistem a fost identificat în membranele luminale ale celulelor epiteliale intestinale și renale (Murer și col. 1976), prin măsurarea acidifierii mediului de incubație în cursul influxului de Na^+ .

Toate aceste date experimentale au demonstrat că în membranele luminale ale celulelor epiteliale se găsesc sisteme de cotransport pentru glucoză, aminoacizi și ortofosfat, în timp ce sistemele de transport independente de Na^+ , sînt concentrate în membranele contraluminalale ale aceluiași celule. Sistemele de cotransport ce asigură acumularea intracelulară a unor substanțe sînt controlate de prezența unor mecanisme de schimb electroneutre între ionii de Na^+/H^+ din aceeași regiune de membrană. Nivelul concentrației ionilor de Na^+ în celulă este reglat de activitatea Na^+ , K^+ -ATP-azei localizate mai ales în membrana laterală a celulei epiteliale. Enzima asigură un nivel scăzut al concentrației ionilor de Na^+ în celulă, dependent de metabolismul energetic celular. O prezentare schematică a proceselor de transport prin membranele celulei epiteliale intestinale este redată în figura 78.

Mecanismele de transport prin membranele plasmactice ale celulelor epiteliale (mai ales intestinale și renale) nu sînt prea bine elucidate, din cauza particularităților structurale și funcționale ale lor. O analiză detaliată a fost făcută de către Sacktor (1977). Date suplimentare s-au obținut cu o serie de anioni lipofili (NO_3^- și SCN^-). În prezența acestor săruri, viteza de transport a D-glucozei este mai mare decît cu $NaCl$. Ambii anioni străbat membranele plasmactice sub formă încărcată la pH neutru și stimulează transportul Na^+ mai mult decît ionii de Cl^- . Dacă sistemul de transport al D-glucozei dependent de Na^+ este electrogenic, difuzia anionilor în celule va influența viteza procesului de transport. În cazul celulelor epiteliale ale tubulilor proximali de la iepure, ionii de Cl^- sînt de 3 ori mai permeabili decît cei de Na^+ , vor intra mai repede în celulă și permit

dezvoltarea unui potențial electrochimic (Schafer și col.1974). În mod analog, anionii de NO_3^- și SCN^- , care sînt mai permeabili decît Cl^- vor

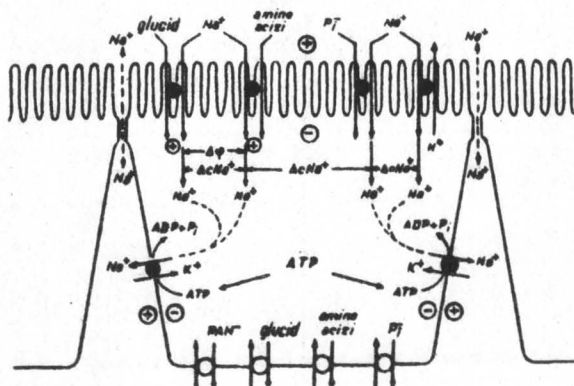


Fig.78. Reprezentarea schematică a transportului de electroliți și neelectroliți, prin diverse regiuni ale membranei plasmactice a celulei epiteliale intestinale (după Murer și Künne, 1977). Explicația în text.

facilita dezvoltarea unui potențial electrochimic. De altfel Murer și Hopfer (1974) au dovedit experimental că transportul D-glucosei prin membranele lumenale intestinale crește mai mult în prezența NaSCN în comparație cu NaCl .

Experimental s-a dovedit de asemenea, că sărurile de Na a căror translocare prin membrane este electroneutră (acetat, bicarbonat), sau cele care prin intrare disociază pentru a elibera protoni (fosfat), nu întrețin un transport de D-glucosă (Beck și Sacktor, 1975). Acest lucru sugerează că numai ionii care pătrund în celulă și generează un potențial electrochimic negativ la interior sînt capabili să susțină un transport facilitat al D-glucosei dependent de Na^+ . De altfel, cercetările cu ajutorul ionoforilor susțin această părere. Valinomicina, ce mediază un transport electrogenic al K^+ , susține transportul facilitat al D-glucosei dependent de Na^+ . Dimpotrivă, nigericina ce mediază un transport electroneutral de schimb ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) nu are nici o influență asupra procesului. De asemenea, captarea D-glucosei dependente de Na^+ este inhibată de către ionoforii ce permit sodiului să treacă prin alte canale, fie electrogenic (gramicidina), sau electroneutral (nigericina). De subliniat faptul că ionoforii nu afectează proprietățile nespecifice ale permeabilității membranelor și nici abilitatea lor de a discrimina D-glucosă de L-glucosă (Hopfer, 1975).

Hopfer (1975) a arătat că transportul D-glucosei dependent de gradientul de Na^+ este mai mare în membranele luminale intestinale de la șobolan cu diabet aloxanic, în comparație cu animalele normale. Autorul sugerează că deosebirea se datorează capacității mai mari a membranelor animalelor cu diabet de a întreține un gradient electrochimic, fără să afecteze natura transportorului glucosei.

Specificitatea. Sistemul de transport al D-glucosei dependent de Na^+ din membranele celulelor epiteliale prezintă o mare specificitate. Majoritatea glucidelor testate (L-glucoză, D-manoză, D-fucoză, ș.a.), nu afectează transportul D-glucosei. Dimpotrivă, sistemul de transport al D-glucosei independent de sodiu nu are specificitate și este inhibat de glucide (excepție L-glucoză). Pentru membranele epiteliale, s-a constatat o competiție între D-glucoză și D-galactoză, ceea ce presupune că transportorul prezintă situsuri receptoare similare pentru aceste glucide. Membranele luminale ale celulelor epiteliale intestinale prezintă un sistem de transport, distinct pentru D-fucoză. Acest sistem nu este afectat de Na^+ , florizină, D-glucoză, D-galactoză. Cu alte cuvinte, în membranele plasmatiche ale diverselor tipuri de celule și în funcție de specie se descriu sisteme de transport particulare.

Reglajul hormonal. Mecanismele de transport prin membranele plasmatiche ale celulelor epiteliale sînt reglate de către o serie de hormoni. Mecanismele hormonale sînt complexe, puțin elucidate și deosebite în funcție de numeroși factori. Sub aspect general se poate preciza că, o serie de hormoni (calcitonina, vasopresina, catecolaminele), a căror acțiune la nivelul celular interferează cu AMP_0 , afectează de asemenea transportul fosfatului, calciului, Na^+ , glucidelor și aminoacizilor. Membranele latero-bazale prezintă receptori specifici pentru hormoni și sisteme adenilatciclazice sensibile la acțiunea hormonilor; în cazul membranelor luminale, prezența receptorilor hormonalilor este mai puțin evidentă. Totuși, și la nivelul lor s-au descris situsuri de fixare a AMP_0 , precum și proteinkinaze capabile să fosforileze proteinele din membrane (Sacktor, și col. 1976). În plus, s-a dovedit că vasopresina induce modificări ale permeabilității celulelor epiteliale ale vezicii de broască, prin modificarea capacității de fosforilare a proteinelor din membrane (Walton și col. 1975). Probabil că astfel de mecanisme de control sînt operante și pentru reglajul permeabilității membranelor plasmatiche ale celulelor epiteliale (Sacktor, 1977).

Mecanismele de control. Apare neîndoielnic că mecanismele funcționale și energetice implicate în transportul neelectroliților prin membrane nu poate fi apreciat numai pe baza unui singur factor.

Probabil că în diversele tipuri de celule, modalitățile de susținere ale proceselor de transport ale substanțelor organice sînt operante în grade deosebite, în funcție de mijloacele energetice disponibile și mecanismele de control pe care celula le are la dispoziție. În membrana plasmatică a aceluiași celule pot coexista mai multe sisteme de transport, care cooperează între ele sau se exprimă separat și variabil. Totuși, nu arareori, s-au făcut generalizări ce au dus la enunțarea unor teorii, a căror succintă prezentare nu este lipsită de interes.

Una din teorii consideră că energia necesară întreținerii activității de transport a substanțelor organice împotriva gradientului de concentrație este obținută din energia gradientului ionic celular. În acest caz, gradientul ionic este schimbat cu un gradient de neelectroliti, fără cheltuială directă de energie chimică. Cel mai adesea acest transport a fost numit transport cuplat cu ioni de Na^+ . Luînd în considerare faptul că diferența de concentrație a Na^+ este de lo ori mai mare în mediul extracelular, cît și stoichiometria procesului se poate aprecia că substratul poate fi concentrat în celulă de lo ori.

Omiterea sau înlocuirea ionului de Na^+ cu alți ioni, duce la abolirea transportului glucozei prin membrană. De exemplu, Csaky (1966) a demonstrat că transportul transepitelial al 3-O-metilglucozei este complet inhibat în intestinul de broască, dacă Na^+ de pe fața mucoasă este înlocuit cu Li^+ , Mg^{++} , ș.a.

S-a pus întrebarea, de ce se utilizează preferențial pompa de Na^+ în locul celei de H^+ , în membranele plasmatice ale celulelor animale (Skulacev, 1972). Un aspect s-a referit la evoluția mecanismelor de transport prin membrane. Membranele plasmatice ale eucariotelor nu au componente respiratorii și de aceea, gradientul de H^+ nu apare necesar. În plus, sodiul este cel mai comun cation din mediu, capacitatea de tamponare a Na^+ este slabă, ceea ce a facilitat formarea gradientului. Totuși, aprecierea gradientului de Na^+ ca unica sursă energetică a transportului de neelectroliti prin membrana plasmatică nu este unanim acceptată din numeroase motive: 1) O serie de inhibitori reduc acumularea substratelor în celule, fără să afecțeze apreciabil gradientul de Na^+ (Eddy, 1968). 2) Inversarea gradientului de Na^+ celular, nu este însoțită de un eflux de substrat (Kimmich, 1970, 1973).

A doua ipoteză consideră că membrana plasmatică transduce energia chimică. Cu alte cuvinte, energia obținută prin hidroliza substratului macroergic este acumulată sub forma unui intermediar energizant (component al membranei), care în condiții adecvate fiziologice, constituie forța de conducere a transportului neelectrolitelor în celule (Schultz și Curran, 1970; Kimmich, 1973).

Kimmich (1973) consideră că limitarea energiei celulare poate reprezenta un factor important al transportului de neelectrolitiți prin membrana epitelială, puțin dependent de mărimea gradientului de Na^+ . Pentru a lua în considerare relațiile dintre transportul de Na^+ și transportul unor molecule organice dependente de Na^+ s-a sugerat că intermediarii energizanți ($\text{E}_1\text{-P}$ și $\text{E}_2\text{-P}$) descriși pentru sistemul ATP-azic, pot servi ca mijloc de cuplare a celor două sisteme de transport. Energia din cadrul intermediarului $\text{E}_2\text{-P}$ legat de membrană, este transferată unor componente de membrană (X, Y, Z), și apoi utilizată preferențial pentru o serie de transporturi active specifice. Procesul de transport este Na^+ dependent, deoarece intermediarul energizant pentru activarea transportului nu este generat în absența sodiului. Ionii de K^+ canalizează energia potențială accesibilă pentru transportul moleculelor organice ($\text{E}_2\text{-P}$), spre sistemul de transport al cationilor monovalenți.

A treia ipoteză susține că gradientul ionic transmembranar poate realiza un transport electrogenic, determinat de mărimea diferenței de potențial electric pe cele două fețe ale membranei plasmactice. Argumentele experimentale au fost prezentate anterior. Voi face numai o singură precizare experimentală suplimentară. Adăugarea substratelor transportabile la preparatele intestinale, provoacă o scădere transitorie a diferenței de potențial electric de pe fața mucoasă a celulei epiteliale. Acest lucru sugerează că transportul neelectrolitilor este în parte electrogenic și tinde să descarce potențialul de membrană.

13. GENETICA TRANSPORTULUI PRIN MEMBRANELE PLASMATICE

O discuție asupra interrelațiilor dintre informația celulară și sistemele de transport ale membranelor este extrem de utilă, dar limitată din cauza complexității fenomenului. Pentru celula eucariotă, datele experimentale sînt restrînse și pot fi analizate prin prisma mecanismelor de control neuro-hormonal. În schimb, bacteriile au oferit modele experimentale adecvate ce au permis descifrarea unor aspecte funcționale referitoare la controlul aparatului genetic asupra permeabilității celulare. Discuția noastră va fi concentrată asupra studiilor efectuate la bacterii.

Membranele plasmactice ale bacteriilor prezintă sisteme de transport specifice pentru glucide, aminoacizi, sulfați, fosfați, esterii fosforici, nucleotide, etc. Chiar și pentru un singur aminoacid, unele bacterii posedă în membrană cel puțin două sisteme de transport. Capacitatea de a sintetiza un sistem specific de transport membranar este redusă în condiții normale, dar poate fi activată prin expunerea celulelor în medii bogate în substratul respectiv. De exemplu, cultivarea unor bacterii pe medii cu glucoză, anulează capacitatea lor de a folosi citratul exogen, deși îl pot metaboliza în celulă. În cazul în care bacteriile au ca unică sursă energetică citratul, ele se adaptează noilor condiții și vor induce activitatea sistemului de transport membranar pentru citrat.

Experimental s-au putut selecționa o serie de sușe bacteriene, care au pierdut capacitatea de a sintetiza sistemul de transport al citratului. Aceste bacterii sînt cunoscute sub denumirea de mutanți defectivi de transport (transport negative), deși din punct de vedere metabolic sînt normale sub toate aspectele.

Biosinteza sistemelor membranare de transport este condiționată genetic de prezența (sau sinteza) enzimelor capabile să degradeze substratele ce vor fi transportate sau precursorii lor. Un exemplu clasic îl formează sistemul galactozidasic de la *E.coli*. Monod și colaboratorii au dovedit că acest sistem de transport este condiționat genetic de β galactoziltransferaza și β galactozidaza, două proteine ce sînt codificate de același operon.

Transportul substanțelor prin membranele bacteriene este dependent și de natura chimică și organizarea moleculară a membranei plasmactice. S-au descris mutații bacterieni, la care sinteza acizilor alfa fosfatidici este modificată, cu repercursiuni negative asupra unor procese de transport prin membrane (Kay și Kornberg, 1970; Mindich, 1970; Hechemy și Goldfine, 1971). Modificarea conținutului în fosfolipide din membranele bacteriene se reflectă variabil în transportul aminoacizilor; scade viteza de transport a unora și crește viteza de transport a altora. Beebe (1972), studiind transportul aminoacizilor la o mutantă de *B. subtilis* la care sinteza fosfatidiletanolaminei era blocată, a constatat că transportul fenilalaninei era de 5% iar al izoleucinei 88%, față de sușa sălbatică luată ca etalon. De asemenea, transportul alaninei nu era modificat la cele două sușe, în timp ce viteza de transport a acidului aspartic prin membrană a crescut de 2 ori la mutanta defectivă în sinteza fosfatidiletanolaminei. După cum am văzut în capitolele anterioare, fosfolipidele reprezintă adesea cofactori structurali pentru proteinele transportoare ale membranei și realizarea unor mișcări conformaționale adecvate.

Transportul aminoacizilor. Prima constatare asupra existenței unui sistem de transport pentru o serie de aminoacizi în membrană (alanină, glicină, serină), a fost făcută în anul 1959 (Schwartz și col.). Un studiu minuțios asupra acestui sistem de transport a fost efectuat de către Robbins și Oxender (1973). Autorii au descris în membrana plasmatică de la *E. coli*, prezența a două sisteme de transport pentru aminoacizi: un sistem ce transportă alanina (sistemul I) și un alt sistem de transport ce transportă concomitent trei aminoacizi (sistemul II).

Datele cinetice determinate din curbele Lineweaver-Burk, sugerează existența unui proces de transport bifazic pentru alanină, cu $K_m = 2 \times 10^{-6}M$ și $2,7 \times 10^{-5}N$, și linear pentru glicină ($K_m = 1 \times 10^{-6}M$). La mutantele bacteriene defective în transportul serinei, sistemul I este blocat și a fost localizat la 85 min, pe harta genetică Taylor (figura 79). De remarcă faptul că la aceste mutante transportul alaninei are loc prin intermediul sistemului II. Transportul alaninei prin membrana plasmatică se pierde la bacteriile ce au suferit un șoc osmotic, sau la cele crescute pe medii cu leucină (reprezie).

Transportul prolinei prin membrana plasmatică bacteriană a fost riguros analizat (Auraku, 1971). Datele experimentale au scos în evidență următoarele particularități: 1) La *E. coli* s-a individualizat un transport specific pentru prolină, dependent însă de o sursă

energetică. 2) Acest sistem intervine de asemenea și în transferul unor analogi ai prolinei, cu structura chimică modificată în poziția

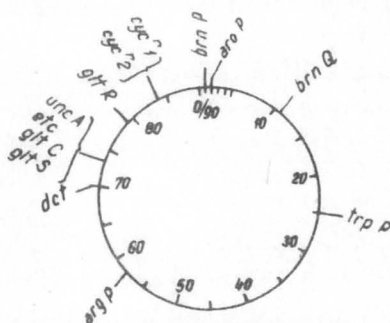


Fig. 79. Reprezentarea schematică a determinanților genetici de pe cromozomul de *E. coli*, care intervin în transportul aminoacizilor (după Gerșcovici, 1975). *brnP* și *brnQ* - locușii care participă în transportul aminoacizilor cu structuri ramificate; *aroP* - transportorul comun al aminoacizilor aromatici; *trpP* - transportorul triptofanului; *argP* - transportorul argininei; *dct* - transportorul aspartatului și acizilor dicarboxilici (C_4); *gltR*, *gltC* și *gltS* - genele implicate în transportul glutamatului (regulatorie, operatoare și structurale); *uncA* - Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATP-aza; *etc* - gena implicată în formarea unui component al lanțului respirator; *cyc^{r1}* și *cyc^{r2}* - locușii implicați în rezistența față de D-cicloserină, legat de transportul D-alaninei, glicinei și D-serinei.

4 a nucleului imidazolic. 3) S-au identificat mutanți defectivi în transportul transmembranar al prolinei, care au pierdut specificitatea de a fixa aminoacidul.

În membranele plasmatice ale unor bacterii s-au descris și transportori pentru aminoacizi aromatici (Thorne și Corwin, 1970; Brown, 1970). La *S. typhimurium* s-a identificat un transportor de membrană, care transportă triptofanul, fenilalanina și tirozina. Cei trei aminoacizi concurează între ei pentru fixarea de transportor. Astfel, transportorul triptofanului ($K_m = 5 \times 10^{-7} M$) este inhibat concurent de către fenilalanină și tirozină ($K_i = 7 \times 10^{-7} M$ și respectiv $2 \times 10^{-6} M$). Locusul genetic ce determină sinteza acestui transportor a fost identificat și localizat pe harta genetică Taylor sub denumirea de *aro P* (vezi figura 80).

Prin studierea aceleiași bacterii în cultură, s-a constatat în afara sistemului de transport membranar comun, și existența unor sisteme

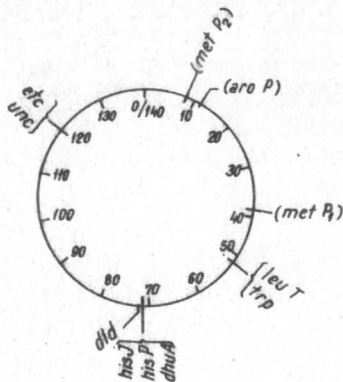


Fig. 80. Reprezentarea schematică a determinanților genetici de pe cromozomul de *S. typhimurium*, care intervin în transportul aminoacizilor (după Gerscovici, 1975). met P₁ - și met P₂ - transportorii metioninei; aro P - transportorul aminoacizilor aromatici; leu T și trp - locuși care intervin în transportul leucinei și triptofanului; his P - transportorul histidinei; his J - proteina ce fixează histidina; dld - locus cu funcție reglatoare a genei his J; dld - gena lagat-dehidrogenazei; unc - gena Ca²⁺, Mg²⁺ - ATP-azei.

specifice de transport. Derepresia lor se realizează în prezența unor concentrații mari în aminoacizi. De exemplu, sistemul specific de transport pentru fenilalanină se derepresează în prezența unor concentrații mari de tirozină (ce blochează transportorul comun). În aceste condiții, transportorul specific este capabil să introducă în celulă pînă la 75% din cantitatea extracelulară de fenilalanină. În mod analog, tirozina blocînd transportorul comun din membrană, derepresează un sistem de transport specific din membrana celulară bacteriană.

Existența mai multor sisteme de transport în membrana bacteriană are multiple semnificații fiziologice. Se apreciază că transportul comun funcționează în condițiile existenței în mediu a unor concentrații scăzute în aminoacizi, în timp ce transportorii specifici se derepresează în culturi de creștere intensive, legat de aportul selectiv ale unor aminoacizi pentru procesele de biosinteză a proteinelor.

La o serie de bacterii (*E.coli* și *S.typhimurium*), s-au descris sisteme membranare de transport constitutive, pentru lizină, ornitină și arginină (Rosen, 1973; Kusty și Ames, 1973). Studiul transportului aminoacizilor bazici prin membranele bacteriene a reliefat câteva particularități. Lizina și arginina, inhibă intrarea în celulă a ornitinei. Arginina și ornitina inhibă transportul lizinei, în grade deosebite dar niciodată 100%. Transportul argininei nu este inhibat de lizină. Aceste observații presupun existența în membranele plasmatice de la *E.coli* a unui transportor comun și a unui sistem specific pentru lizină și arginină.

Trebuie subliniat și faptul că la mutanți bacterieni cultivați în absența argininei, s-a observat o derepresie a enzimelor implicate în biosinteza acestui aminoacid (activitatea piruvatintranscarbamilazei crește de 25 ori față de sușa matrint). Cu alte cuvinte arginina exogenă reprezintă enzimele responsabile de propria sa biosinteză. În schimb, arginina sintetizată intracelular (în anumite limite de concentrație), nu afectează activitatea enzimatică.

Sușele sălbatice de *E.coli* nu au sisteme de transport pentru glutamat. Din aceste sușe s-au obținut însă mutanți, care utilizează ca sursă exterioară energetică glutamatul. Barash și Halpern (1971) au descris prezența unei proteine speciale în membrana celulară de la *E.coli*, care participă în transportul transmembranar al glutamatului. Proteina interacționează cu o serie de analogi. Astfel, alfa metilglutamatul a fost descris ca inhibitor de tip concurent iar alana ca inhibitor de tip neconcurent al transportului glutamatului în celulă.

La o mutantă de *E.coli* (K 12) s-au identificat 3 gene ce controlează sistemul de transport al glutamatului din membrană. S-a descris o genă structurală implicată în sinteza transportorului (*glt S*) și două gene reglatoare (*glt R* și *glt C*). Gena reglatoare *glt R* sintetizează un represor al sintezei transportorului, în timp ce gena *glt C* (operator) controlează gena structurală față de produsul genei *glt R*. Genele *glt C* și *glt R* sînt strîns asociate pe cromozomul de la *E.coli*. Posibilitatea derepresiei sistemului de transport al glutamatului în prezența genei operator, demonstrează că mutația ce lezează această regiune aparține segmentului operator (Marcus și Halpern, 1967).

Din succinta prezentare a unor sisteme de transport pentru aminoacizi la bacterii se constată marea diversitate a mecanismelor de transport, probabil datorită multiplelor funcții pe care le îndeplinesc în celulă (sinteza proteică, surse de energie, regulatori ai căilor metabolice). Mecanismele de transport a substranțelor organice prin mem-

branele bacteriene sînt puțin elucidate. Probabil în membrane coexistă sisteme variate (difuzie facilitată, transporturi active), condiționate genetic, care se exprimă deosebit în funcție de factorii de mediu și capacitatea de reglaj genetic.

Interrelațiile dintre ionii de Ca^{2+} și membrana plasmatică.

În general se apreciază că în organizarea structurală și moleculară a membranelor plasmactice și citoplasmactice iau parte și o serie de ioni anorganici. Dintre aceștia, ionii de calciu joacă un rol structural și funcțional deosebit în membrane. Membranele plasmactice de la unele tipuri de celule sînt capabile să fixeze cantități apreciabile de ioni de Ca^{2+} : celula miocardică, sarcoplasmatică, musculară netedă, nervoasă, renală (Chambaut și col.1974; Shami și col.1974). Ele prezintă afinități deosebite pentru ionii de Ca^{2+} , descrise prin situsuri receptoare specifice, cu constante de asociere sau disociere deosebite. Astfel, celula cardiacă prezintă două situsuri receptoare de fixare a ionilor de Ca^{2+} (ambele cu afinitate mare), în timp ce în membrana eritrocitară s-au descris 3 situsuri de fixare (două cu afinitate mare și unul cu afinitate mică). Numărul situsurilor de fixare al ionilor de Ca^{2+} este variabil, în funcție de starea funcțională a membranei și condițiile de mediu.

Cercetările efectuate pe membrana eritrocitară au arătat că 79% din cantitatea totală de calciu fixat de membrană este legat de proteine, 16% de lipide și 5% se află liber. Creșterea cantității de trifosfoinozitol în membrana eritrocitară este însoțită de o creștere a situsurilor de fixare pentru Ca^{2+} și o stimulare a activității Ca^{2+} -ATP-azei (Buckley și Hawthorne, 1972). Capacitatea de fixare a Ca^{2+} de către membrane depinde de prezența în mediu a altor ioni, pH, temperatură, etc.

În ce privește grupările funcționale ce pot participa în procesul de fixare al ionilor de Ca^{2+} , păreri sînt controversate.

Într-o formulare generală se poate preciza că în acest proces participă grupările fosfat din fosfolipide, grupările carboxilice, grupările anionice ale unor proteine, grupările ionizate ale acidului sialic, grupările hidroxilice ale serinei și glucidelor. Fixarea Ca^{2+} de componentele de membrană determină modificări de conformație ale moleculelor în membrane.

O parte din ionii de Ca^{2+} sînt fixați în membrane de către proteine (Ikemoto și col.1974). Fosforilarea proteinelor din membrana plasmatică a celulei cardiace (cu ajutorul proteinkinazelor intracelulare) este însoțită de o creștere a capacității de fixare a ionilor de

Ca^{2+} . De asemenea, capacitatea de fixare a ionilor de Ca^{2+} de membrane depinde de activitatea adenilatciclazei, concentrația AMP_c , activitatea proteinkinazelor, influența sistemului nervos, etc. În urma denervației, membrana plasmatică a celulei musculare striate este capabilă să fixeze o cantitate mai mare de ioni de Ca^{2+} , în comparație cu țesutul inervat (Thorpe și Seeman, 1971). Fixarea Ca^{2+} de proteine provoacă modificări de conformație ale lor. Din celulele neuronale de la porc s-au izolat 2 proteine acide, care sînt capabile să fixeze calciu (13.000 și 11.500). Prin gel filtrare în prezența ionilor de Ca^{2+} , proteinele agregă sub formă trimerică sau tetramerică (Ribalcenko, și Kurski, 1977). De asemenea, din membranele celulelor epiteliale renale și intestinale s-a separat o proteină capabilă să fixeze ioni de Ca^{2+} (Dorrington și col. 1974).

Permeabilitatea și mecanismele de transport. Concentrația ionilor de Ca^{2+} în sînge este mare (2mM), ionii fiind în mare parte fixați de proteine și fosfați. Concentrația calciului ionizat din plasmă este de aproximativ 0,5 mM. În schimb, concentrația acestui ion în celula musculară este redusă, și în raport cu starea funcțională a mușchiului, oscilează între 10^{-5} - 10^{-7} M. Aceste date demonstrează existența unui gradient mare de concentrație al ionilor de Ca^{2+} , între mediul extern și mediul intracelular. Ca urmare a gradientului de concentrație are loc o difuzie a ionilor de Ca^{2+} în celule, a cărei viteză este variabilă în funcție de tipul de membrană celulară (Tabelul 13) (Beldirev și Tkaciuk, 1976). În cursul trecerii potențialului de acțiune, fluxul Ca^{2+} în celula musculară crește semnificativ, mai ales în celula musculară netedă (preabil prin mecanisme de difuzie facilitată).

Tabelul 13 - Fluxurile pasive ale ionilor de Ca^{2+} prin diverse tipuri de țesuturi musculare.

Tesutul	Concentrația Ca^{2+} în mediu mM	Fluxul de Ca^{2+} în celule nmoli/g/sec
Mușchiul cardiac de broască	1,0	18,0
Mușchiul drept abdominal de broască	1,0	48,0
Aortă de la iepure	1,0	430,0

Se pune întrebarea, care sînt mecanismele de eliminare a ionilor de Ca^{2+} din celule. Cercetările experimentale efectuate pe cîteva tipuri de celule de la mamifere au dus la descrierea unor sisteme enzimactice active în membranele plasmactice. Ele au fost denumite

deosebit (pompă de Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATP-aza, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-aza). Astfel, ATP-aza calciu dependentă a fost izolată, purificată și caracterizată din membrana plasmatică eritrocitară, musculară, nerveasă și a unor celule glandulare acinoase. Există o serie de dificultăți de ordin experimental, ce au pus la îndoială prezența enzimei în membranele plasmatică, și anume: o mare parte din calciul intracelular este fixat sub formă neionizată (ATP, citrat, fosfolipide, proteine), sau acumulat într-o serie de structuri intracelulare (mitocondrii, reticul endoplasmatic). În plus, metodele de cercetare sînt foarte deosebite. Metoda cea mai adecvată de determinare a activității Ca^{2+} -ATP-azei se bazează pe măsurarea efluxului Ca^{45} , utilizarea unor agenți chelanți (EGTA, etilenglicol-bis (β -aminoetileter)-N, N'-tetraacetic acid) și a unei proteine izolate din meduze (aequerina), care devine luminescentă în prezența ionilor de Ca^{2+} (Baldirev și Tkaciuk, 1976; Ribalcenko și Kurski, 1977; Lambert și Christophe, 1978; Schatzman, 1977).

În pancreasul exocrin de la șobolan, șoarece și cobai, calciul este necesar inițial pentru a favoriza exocitoza hidrolazelor din celulele acinoase, ca răspuns la acțiunea unor agenți (pancreozimina, substanțe colinergice). În acest fel Ca^{2+} este eliberat din structurile de rezervă intracelulară și se fixează de membrana plasmatică, ceea ce determină o creștere a efluxului Ca^{2+} și a nivelului GMP_c (Schreurs și col. 1975; Paulsen și Williams, 1977). În membranele plasmatică ale celulelor acinoase s-a identificat și caracterizat o Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-ază destul de activă (Lambert și Christophe, 1978). Enzima nu funcționează ca o Ca^{2+} -ATP-ază stricto sensu, complexul Mg^{2+} -ATP fiind substratul cel mai eficient. Enzima nu este stimulată de K^{+} și Na^{+} și nu apare sensibilă la uşăind. Proprietățile cinetice ale Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-azei din celulele acinoase pancreatice sînt similare cu cele descrise pentru enzima din membrana limfocitelor (Pau și col. 1976) și membranele celulare din glanda medulo suprarenală (Apps și Reid, 1977).

Apare neîndoielnic că Ca^{2+} -ATP-aza din diversele membrane plasmatică prezintă proprietăți cinetice deosebite, ceea ce face mai dificilă caracterizarea sa într-o formă generală. O prezentare succintă a transportului activ al ionilor de Ca^{2+} prin unele membrane plasmatică celulare e considerăm foarte utilă.

Calula musculară. În membrana plasmatică a diferitelor tipuri de celule musculare (striată, cardiacă, netedă), s-au identificat sisteme de transport activ al ionilor de Ca^{2+} , și anume Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-aze. Identitatea acestei enzime a fost adesea pusă la îndoială din cauza contaminării preparatelor cu membranele reticulului endoplasmic. Enzima a fost izolată și caracterizată de numeroși cercetători: din membrana plasmatică a celulelor musculare striate (Weber, 1966);

Ribaşenco şi Kurski, 1977); din membrana plasmatică a celulei cardiace (Dietze şi Hepp, 1972); din membranele plasmactice ale celulelor musculare netede intestinale (Hurwitz şi col.1973); aortă (Preiss şi col. 1978).

Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-aza din membrana plasmatică a celulelor musculare este relativ instabilă şi activitatea sa este influenţată de numeroşi factori. Astfel, enzima din sarcolema celulei cardiace este inhibată de prezenţa unor concentraţii mici de AMP_0 ($3,3 \times 10^{-8} \text{M}$), fără să afecteze pompa de sodiu (Dietze şi Hepp, 1972).

Membrana eritrocitară. Intre celule şi sînge există un gradient de concentraţie al ionilor de Ca^{2+} . Raportul concentraţiilor $\text{Ca}_e^{2+}/\text{Ca}_i^{2+}$ este de aproximativ 50 (Schatzmann, 1970), ceea ce sugerează că membrana eritrocitului este puţin permeabilă pentru acest cation. În membrana eritrocitară s-a evidenţiat o Ca^{2+} -ATP-ază, care transportă ionii de Ca^{2+} în mediul extracelular împotriva gradientului de concentraţie. S-a apreciat că eliberarea a 2 ioni de Ca^{2+} în mediu consumă o moleculă de ATP (Quist şi Roufogalis, 1975).

Enzima are un optimum de activitate la o concentraţie în Ca^{2+} de 0,1 mM şi necesită prezenţa ionilor de Mg^{2+} . Activitatea enzimatică nu este influenţată de concentraţiile normale ale cationilor monovalenţi din mediu şi nu este sensibilă la uabaină. Din păcate nu s-a identificat un inhibitor specific al acestei enzime. S-a descris însă posibilitatea de inhibiţie a Ca^{2+} -ATP-azei de către o serie de substanţe. Clorpromasina inhibă activitatea Ca^{2+} -ATP-azei din membrana plasmatică eritrocitară, proces asemănător cu inhibiţie enzimei din reticulul endoplasmic. De asemenea, roşu de ruteniu inhibă enzima din membrana plasmatică eritrocitară şi din membrana mitocondriilor, dar nu influenţează transportul calciului prin reticulul endoplasmic.

Prezenţa unui transport activ al calciului în membrana eritrocitară asigură menţinerea unei concentraţii intracelulare scăzute a ionului (sub 0,1 mM), prin care se permite desfăşurarea unor procese metabolice specifice.

BIBLIOGRAFIE

1. MANUALE SI MONOGRAFII

1. Advances in cyclic nucleotide research, vol.4; ed. Greengard P. și Robison G.A., New York, Raven Press, 1973.
2. Advances in cyclic nucleotid research, vol.; ed. Drumond G.I., Greengard P., Robison G.A., New York, Raven Press, 1975.
3. Bacterial membranes and walls, M.Decker, New York, 1973.
4. Beta adrenergic blocking agents, ed.Saxena P.R., Forsyth R.P., North-Holland Pub.Comp., Amsterdam, 1976.
5. Bergelson L.D., Biologhiceskie membrani, Nauka, 1975.
6. Bioorganic chemistry, vol.III. Macro- and multimolecular systems ed. Tamelen E.E., Acad.Press Inc., 1977.
7. Biomembranes: structure and function, vol.35, ed.Gardos G., Ilma Szasz, Acad. Kiado Budapest, 1975 (FEBS symposium 1974).
8. Biomembranes, ed. Manson L.A., New York, Plenum Press, 1971.
9. Biochemistry of cell walls membranes, ed.Fox G.F. (MTT international review of sciences, Biochemistry series, vol.2), Medical technical pub., Aglesburg, England, 1975.
10. Biological membranes, vol.1, ed.Chapman D., Acad.Press, 1968.
11. Biological membranes, vol.2, ed.Chapman D., Wallach F.D.H., Acad. Press, 1973.
12. Biochemistry of membrane transport, FEBS symposium nr.42, ed. Semenza G., Carafoli E., Springer-Verlag, 1977.
13. Boldirev A.A., Tkaciuk V.A. Molecularnaia biologhia nr.13, Kiev, 1976.
14. Carriers and channels in biological systems. International conference, New York, Ann.New York Acad.Sci.USA, 1975.

15. Current topics in membranes and transport, ed. Bronner F., Klein-zeller A., New York, Acad.Press: vol.2 (1972), vol.5 (1975), vol.8 (1976).
16. Cellular recognition, ed.Smith T.R., Good R.A., New York, Appleton-Century Crofts, 1969.
17. Control of proliferation in animal cells, ed.Clarkson B., R.Baserga, New York, Cold Spring Harbor Lab.Pres., 1974.
18. Cell structure and function, ed.Holt R., Rinehard P., Winston P., New York, 1969.
19. Cell interactions, ed. Silvestri C.J., North-Holland Pub.Comp., Amsterdam, 1972.
20. Current topics in bioenergetics, ed.Sanadi P., vol.3, Acad.Press, New York, 1969.
21. Current topics in bioenergetics, vol.6, Acad Press., New York,1977.
22. Cook G.M.W., Stoddart R.W., Surface carbohydrates of the eucaryotic cell, New York, Acad.Press, 1973.
23. De Robertis E., Synaptic receptors. Isolation and molecular biology. Marcel Dekker, Inc., New York, 1975.
24. Diculescu Ion, Biologie celulară, ed. Medicală, 1975.
25. Dowben R.M., Cell biology, Harper Row Pub., New York, London, 1971.
26. Eighth meeting of FEBS, Amsterdam, vol.28: Mitochondria and biomem-branes, North-Holland, Elsevier, Amsterdam, 1972.
27. Evolving strategies and tactics in membrane research, ed.D.F.H. Wallach, Winsler, R.J., Springer-Verlag, Berlin, 1974.
28. Finean J.B., Coleman R., Michell R.H., Membranes and their cellular functions, Blackwell scientific pub., Oxford, London, 1974.
29. GABA in nervous system function, ed.De Robertis E., Chase T.N., Tower D.W., Raven Press, New York, 1976.
30. Greaves M.F., Cellular recognition, London Chapman and Hall, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
31. Glycoproteins, ed.Gottschalk A., Amsterdam, Elsevier, 1972.
32. Gheție Victor, Semnale și receptori în imunologie, ed. Stiințifică și enciclopedică, București, 1977.
33. Glycoproteins of red cells and plasma, ed.Jamieson G.A., Greenwalt P., Philadelphia, Lippincott, 1971.

34. Ionescu-Varo M., Biologie celulară, ed.Didactică și pedagogică, București, 1976.
35. Kerkut G.A., York B., The electrogenic sodium pump, Bristol, scientrohnica, 1971.
36. Konev C.B., Majuli B.M., Mejkletocinfe contacti, Nauka i tehnica, Minsk, 1977.
37. Lehninger A.L., Biochimie, les bases moleculaires de la structure et fonction cellulaire, Paris, 1975.
38. Lev A.A., Ionaia izbiratelinosti kletocinfi membran, Nauka, 1975.
39. Liško V.K., Natrievii nasos biologicheskikh membran, Akad.Nauk UССР, Kiev, 1977.
40. Mazliak P., Les membranes protoplasmiques, Dion, Paris, 1971.
41. Membranes and ion transport, vol.1, 2, 3, ed.Bittar E.E.Wiley-Interscience, London, 1970.
42. Mammalian cell membranes, vol.1-5, ed. Jamieson G.A., Robinson D.M., Butterworths, London, Boston, 1977.
43. Neurochemistry of cholinergic receptors, ed.De Robertis E., Schacht J., Raven Press, New York, 1974.
44. Nicolson L.G., Raftery M.A., Redbell M., Fox C.F., Cell surface receptors, North-Holland Amsterdam, Elsevier, 1976.
45. Nicolski N.N., Treșin A.C., Transport zaharov cerez kletocinfe membrani, Nauka, 1973.
46. O mecanism deistvia adenosinmonofosfatnoi kislot, Tbilisi, Medit'in, 1974.
47. Ovchinicov I.A., Scrob A.M., Ivanov T.V., Membrano-aktivnie complexoni, Nauka, Moscova, 1975.
48. Perspectives in membrane biology, ed.Estrada O. Gitler, Acad.Press, New York, 1974.
49. Pilet P., Les parois cellulaires, Dion, Paris, 1971.
50. Pre- and post-synaptic receptors, ed.Usdin E., Burney E.W., M.Dekker, Inc., New York, 1975.
51. Pop S., Cuparencu B., Bârzu T., Kory M., Safta L., Receptorii farmacologici, ed.Dacia, 1977.
52. Prescott D.M., Reproduction of eucaryotic cells, Acad.Press., New York, 1976.

53. Ribaliceenco B.K., Kurski D.M., Molecularnaia organizatia i fermentativnaia aktivnosti biologhiceskix membran, Kiev, Naukova dumka, 1977.
54. Racker Efraim, A new look at mechanisms in bioenergetics, Acad. Press, New York, 1976.
55. Richter G.W., Scarpelli D.G., Cell membranes, biological and pathological aspects, the Williams and Wilkins company, Baltimore, 1971.
56. Robison G.A., Butcher R.W., Sutherland E.W., Cyclic AMP, Acad. Press, New York, 1971.
57. Sair Milton H.Jr., Stiles C.D., Molecular dynamics in biological membranes, Heidelberg Science Library, vol.22, Springer-Verlag, 1975.
58. Schoffeniels E., Cellular aspects of membrane permeability, Oxford, Pergamon Press, 1967.
59. Synthesis and turnover of cell membranes. A report based on an NRP work session. Neurosciences research program, ed.Singer S.Rothfield L.I., 1973.
60. Stein O., The movement of molecules across cell membranes, Acad.press, New York, 1967.
61. Structure and function of biological membrane, ed.Rothfield, L.L., Acad.Press, New York, 1971.
62. Skulacev V.P., Transformatia bioenerghii biomembranax, Nauka, Moscova, 1973.
63. Symposion on neuraminidase, Marburg/Lohn, 1974.
64. Structura i functia biologhiceskix membran, Moscova, 1975.
65. Tamuramedov B.A., Gageligans A.I., Aktivini transport cerez biologhiceskix membran, Tashkent, 1973.
66. The dynamic structure of cell membranes, ed.Wallach, D.F.H., Fischer H., Springer-Verlag, Berlin, 1971.
67. Wallach D.F.H., The plasma membrane, New York, Springer-Verlag, 1972.

VERIFICAT
2017

Bun de tipar 26 iun.79 Apărut iul.1979

Tiraj 373 Coli tipar (Fasc.) 10

Tipar executat sub comanda nr. 96/979
Tipografia Universității București

VERIFICAT
2007

VERIFICAT
1987

Lei 13,80